

# 芝麻人工构建雄性不育基因的转化研究初报

陈占宽 郅玉宝 易明林 王金兰 梁秀银 屠礼传

(河南省农业科学院, 郑州 450002)

傅荣昭 曹光诚 史艳红 孙勇如

(中国科学院遗传研究所, 北京)

**摘 要** 用基因枪将人工构建的植物雄性不育基因 TA<sub>29</sub>-Bamase及其标记基因 bar导入芝麻豫芝4号的离体子叶,在MS+ 5mg° L<sup>-1</sup>6-BA+ 4mg° L<sup>-1</sup>IAA+ 4mg° L<sup>-1</sup>ABA+ 5mg° L<sup>-1</sup>AgNO<sub>3</sub>的培养基上交培养 12天,转入光、暗光替培养,诱导出不定芽。经添加 2mg° L<sup>-1</sup>除草剂(BASTA)的上述培养基筛选,获得了 11个 BASTA 抗性株系,对其中 3个株系进行 Southern 杂交鉴定分析,证实其中 2个为转基因株系,转化率为 14.6%。

**关键词** 芝麻 基因枪 离体子叶 Bamase基因 bar基因 转基因芝麻植株

杂种优势利用是发展芝麻生产的关键措施<sup>[1 2 3]</sup>,但在实际应用中存在着诸多困难,如:缺乏核质互作细胞质雄性不育系材料;芝麻为无限花序,化学杀雄难于凑效;利用天然显、隐性核不育基因(材料)在其育性的恢复与保持上,又往往带有固有的不足或缺陷<sup>[3 4]</sup>。因此,建立新型杂优利用系统,已成为芝麻生产及其发展的迫切需要和技术关键。

人工构建的雄性不育基因系指利用植物基因工程技术将花药或花粉特异表达基因的启动子与核糖核酸酶基因(Bamase)<sup>[9 10]</sup>的编码序列融合而成的基因。当将其转入植物体后,该基因在花药或花粉中特异表达,专一性地阻止花粉发育或直接摧毁花粉,导致雄性不育<sup>[9- 11]</sup>。在此基础上可以建立起作物的新型杂优利用系统。

利用基因工程技术建立芝麻雄性不育杂优利用系统,需要解决三项关键技术:①适用于芝麻的人工构建的雄性不育基因;②将构建的雄性不育基因导入作物细胞,整合于芝麻的核基因,并再生植株;③使雄性不育基因在其雄性器官中专一表达。

本文报道以基因枪法转化芝麻子叶获得了以 bar基因标记的、人工构建的雄性不育基因转化株系, Southern 杂交(DNA 分子杂交)分析证实,目的基因已整合于该芝麻株系的核基因组中。

# 1 材料和方法

## 1.1 受体材料及其处理

1.1.1 芝麻 (*Sesamum indicum* L.) 品种为生产上大量推广应用的 国家审定品种豫芝 4 号。由河南省农科院芝麻研究中心杂优利用室提供

1.1.2 材料处理 豫芝 4 号种子经粒选、消毒, 在无菌水中  $25^{\circ}\text{C}$  振荡培养过夜 (种子已萌动)。切取种子远轴端  $1/3 \sim 1/2$  子叶, 并剥去种皮。将切取的子叶切口向上摆于  $\text{MS} + 5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IAA} + 1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ABA} + 5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{AgNO}_3$  固体培养基, 直径  $2 \sim 3\text{cm}$  左右的中心区。每皿 50 对 (100 片), 共处理 5 皿, 总计 250 对 (500 片) 对照 3 皿, 300 片。

## 1.2 质粒、基因及其制备

1.2.1 质粒为 pTABNBAR55 该质粒为携带有抗除草剂 (Basta) 基因 bar 标记的植物人工雄性不育基因 ( $\text{TA}_{29}$ -Bamase) 的 pUC19 质粒。

1.2.2 基因 以 bar 基因标记的植物人工雄性不育基因 该基因为烟草花药绒毡层特异基因启动子 ( $\text{TA}_{29}$ ) 解淀粉芽孢杆菌核糖核酸酶基因 (Bamase) 的编码序列及终止子  $\text{Nos}^{\circ} \text{ter}$  融合而成的基因 (见图 1) 该基因及其 pTABNBAR55 质粒的构建过程及结果将另文发表

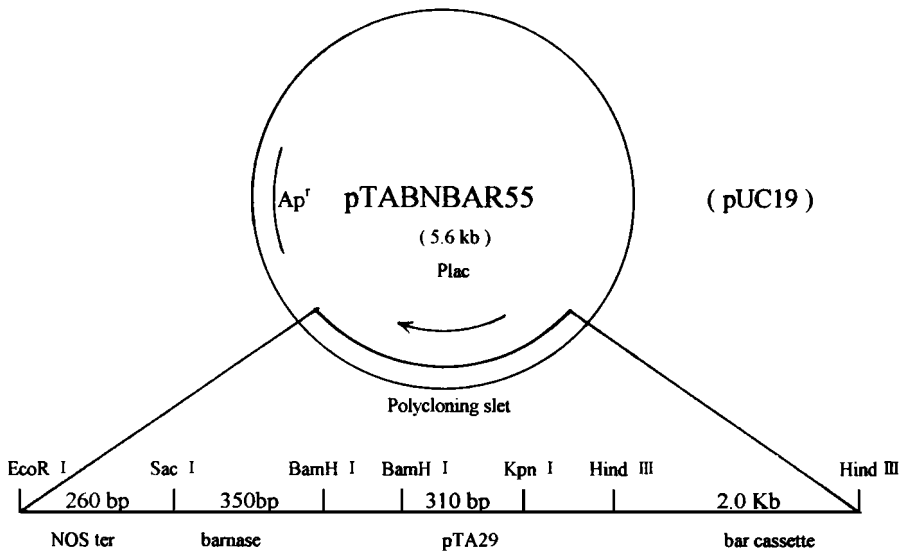


图 1 人工雄性不育基因植物表达载体 pTABNBAR55 图谱

1.2.3 质粒的制备 采用 Promega 公司生产的  $\text{M} \alpha \text{rgic}^{\text{TM}} \text{Megaprep} \text{S} \text{DNA}$  试剂盒及其提供的方法进行。提取的纯化质粒溶于无菌重蒸水平, 其浓度为  $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}$ 。

## 1.3 转化方法及其技术参数

利用美国杜邦公司中生产的 PDS 1000 HE 型基因枪; 以金粉为微粒子弹, 制备方法参照《植物遗传转化技术手册》<sup>[5]</sup> 进行。每枪质粒用量为  $0.2 \mu\text{g}$  金粉量约  $1\text{mg}$  压力膜 (rupture disk) 为 1100 ps, 工作距离为  $6\text{mm}$ ; 每皿材料枪击次数为 2 次。

## 1.4 转化材料的培养及选择

1.4.1 培养基 A: 不定芽诱导培养基  $MS + 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IAA} + 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ABA} + 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{AgNO}_3$  B 转化体选择培养基 在 A 培养基的基础上添加  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  除草剂 Basta

1.4.2 材料的培养及选择过程 材料被枪击转化后, 与未转化材料一起被转到不定芽诱导培养基 (A) 上,  $25^\circ\text{C}$  暗培养 12 天左右, 转入  $16\text{h}/8\text{h}$  光暗交替培养。以后每 20~25 天在不定芽诱导培养基 (A) 上继代 1 次。培养 45 天将转化材料转入选择培养基 (B) 选择 30 天。然后将筛选出的阳性材料重新转入不定芽诱导培养基 (A) 培养。

## 1.5 转化材料的鉴定分析

采用 Southern 杂交 (Southern blotting) 技术对获得的 Basta 抗性材料进行鉴定分析。

1.5.1 杂交探针制备 pTANBAR55 质粒经 *E. coli* HindIII 双酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 收集 Bamase 编码序列 DNA 片段作探针。探针的  $^{32}\text{P}$  标记采用 Promega 公司的随机引物试剂盒及其提供的方法进行。

1.5.2 转化材料总 DNA Southern 杂交分析 分别剪取转化及未转化材料的叶片, 按照尿素法<sup>[4]</sup>提取其总 DNA, 并分别经 *E. coli* HindIII 双酶切。将正对照 (pTANBAR55 质粒经 *E. coli* HindIII 双酶切) 及制备好的转化材料及负对照 (未转化材料) 三种总 DNA 点样, 电泳并转移到尼龙膜上, 然后进行 Southern 杂交分析。具体操作方法参照《植物遗传转化技术手册》<sup>[5]</sup>进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 转化材料的培养、选择及其再生

转化及未转化材料在不定芽诱导培养基上培养 6~8 天后开始膨大, 变黄, 培养 12 天转入光培养后材料很快变绿, 20 天左右不定芽在其切口, 叶缘形成。继续培养, 不定芽生长、发育旺盛。其不定芽的分化率稳定在 80% 左右, 表明选用的不定芽诱导分化培养基是合适的, 良好的。

材料培养 45 天, 转入转化体选择培养基后, 对照材料与大部分转

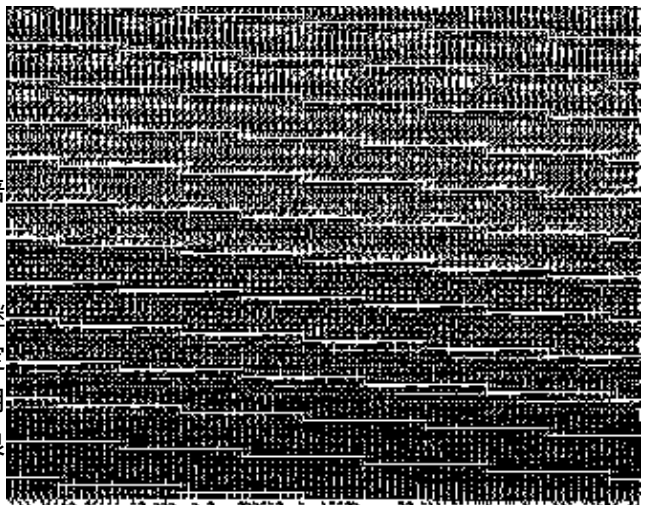


图 2 芝麻转基因植株

化材料及其各自分化出的不定芽相继在 1 周后颜色变浅变白, 至 30 天后这些材料 (300 片) 相继白化, 失去活力。从转化材料上得到 11 个 Basta 抗性株系。这 11 个株系转到不定芽诱导培养基后, 分生能力很强, 生长旺盛 (见图 2)。

### 2.2 对转化体的 Southern 杂交鉴定分析结果

用  $^{32}\text{P}$  标记的 Bamase 探针对 11 个株系中的 3 株 (11 12 13) 进行了 Southern 杂交分析。

13 11两个材料,在放射自显影的 X-光底片上大约 1 0kb 处显示较强的杂交带,其中 13 较 11 更强。而负对照材料(未转化材料)10在底片上 1 0kb 处未发现可见杂交带(见图 3)。

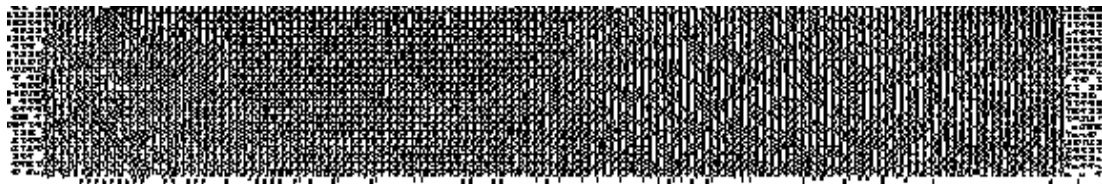


图 3 转化芝麻的 Southern 杂交分析

1 杂交带大小(Kb); 2 450pg 的质粒 pTABNBARs 经 EcoRI/HindIII 酶切后上样所获得的杂交带; 3~9 其它作物转化植株的杂交带; 10 10<sub>g</sub> 未转化植株总 DNA 经 EcoRI/HindIII 酶切后的上样所获得的杂交带; 11~13 分别为 9<sup>g</sup> 转化植株 11 12 13 总 DNA 经 EcoRI/HindIII 酶切后上样所获得的杂交带(11 呈弱阳性, 13 呈强阳性, 12 呈阴性)。

这一结果表明,在 13 11 的核基因组中存在着与 Bamase 基因编码序列相同的基因,即人工构建的雄性不育基因(TA<sub>29</sub>-Bamase)已成功转入,并稳定地整合于该 2 个株系的核基因组中。其平均转化效率为 1 46%。

上述结果表明,以芝麻子叶为受体材料的基因枪转化法及其相应转化系统,包括材料的处理及培养技术、转化体的选择方法及选择程序是可行的,可以将外源基因有效地转入芝麻的核基因组中。

## 3 讨论

### 3.1 关于芝麻基因转化系统的建立问题

芝麻的基因转化系统迄今尚少见报道。我们所建立的芝麻基因转化系统已初步有效地将外源基因转入芝麻的核基因组中,这一工作为植物基因工程在芝麻上的应用奠定了基础。当然,这个转化系统转化效率还不够高,它包括多方面的因素,需要不断的完善、提高。

### 3.2 关于转化体选择的时候、浓度及历程

从基因的转化效率来讲,转化率只有 1 46%,明显偏低。初步认为主要与转化体的选择偏晚有关。一般认为,基因枪转化体筛选应在 7~15 天进行较为合适<sup>[5]</sup>,我们是在基因枪转化 45 天进行的,较常规偏晚。在非选择条件下,基因枪转化形成的转化细胞在早期显然不占优势,偏晚选择会被未转化细胞所淹没,同时形成的转化植株又往往是嵌合体,在选择培养基上对 Basta 的抗性不强而被淘汰<sup>[5]</sup>。另外,还由于缺乏芝麻对 Basta 敏感性的文献,Basta 对转化体的选择浓度难于确定。有效地解决这两个问题,有可能会较大幅度地提高对转化体选择的效率。从选择结果来看,芝麻对 Basta 这种除草剂非常敏感,2mg/L 浓度即可使其非转化体被淘汰。

### 3.3 关于抗除草剂 bar 基因与人工雄性不育基因在芝麻中的表达问题

在该质粒中,bar 基因与人工雄性不育基因紧密连锁,其目的是将 bar 作为工人雄性不育基因的选择标记,以便用于室内及田间。选择 bar 基因的启动子为 CaMV 35S,为植物系统表达

启动子,可以在植物的各种器官中表达。筛选出的转化体对 Basta的抗性即表明了该基因在芝麻中的表达。Southern杂交证实 Bamase编码序列在芝麻核基因组中已稳定整合,而 bar基因与 Bamase编码序列紧密连锁,故可推测 bar基因亦可能整合于芝麻核基因组中。对此,我们正在对 bar基因在芝麻核基因的表达及遗传特性等进行研究。TA<sub>29</sub>-Bamase在芝麻花药中能否特异表达,尚待进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 屠礼传,柳家荣,梁秀银. 芝麻杂种优势研究. 中国油料, 1988(2): 8~ 11
- 2 王文泉,郑永战,柳家荣. 芝麻雄性核不育两系制种效果的研究. 中国油料, 1995 17(1): 12~ 15
- 3 李树林,钱玉秀,周熙荣. 甘蓝型油菜细胞核雄性不育性的遗传规律及其应用. 上海农业学报, 1987 3 (2): 1~ 8
- 4 张书芳,宋兆华,赵雪云. 大白菜核基因互作雄性不育系选育及应用模式. 园艺学报, 1990 17(2): 117~ 125
- 5 傅荣昭,孙勇如,贾士荣. 植物遗传转化技术手册. 北京:中国科学技术出版社, 1994
- 6 李胜国,刘玉乐,朱峰等. 基因工程雄性不育烟草的获得. 植物学报, 1995 37(8): 659~ 660
- 7 并木满夫,小林贞作. Sesame Science(Japanese). 东京:朝仓书店出版, 1989
- 8 Celestina Mariani Marc De Beuckeleer, Jessie Truettner et al. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. Nature, 1990 347: 737~ 741
- 9 Celestina Mariani Veronique Gossele Marc De Bruckeleer et al. A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. Nature, 1992 357: 784~ 787
- 10 Koltunow AM. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. Plant Cell, 1990 2: 1201~1223

# Transformation of Engineered Male Sterile Gene and Establishment of Transgenic Plants in Sesame (*Sesamum indicum* L.)

Chen Zhankuan      Zhi Yubao      Yi Minglin      Wang Jinlan  
Liang Xuyin      Tu Lichuan

(Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002)

Fu Rongzhao      Cao Guangcheng      Shi Yanhong      Sun Yongru  
(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing)

**Abstract** The engineered male sterile gene barnase together with the mark gene bar were transformed to the isolated cotyledon of a sesame variety Yuzhi 4 by microprojectile bombardment. The transformed cotyledon was cultured under darkness for 12 days then converted into dark-light alternative conditions on the culture media  $M S + 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IAA} + 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ABA} + 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{AgNO}_3$ . Resistant calli were selected on herbicide Basta  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . 11 anti-Basta plants were obtained. Southern blot of 3 well-developed green plants confirmed stable integration of both barnase and bar genes into nuclear DNA. The transformation efficiency reached 1.46%.

**Key words** Sesame; Microprojectile bombardment; Cotyledon; Barnase gene; Bar gene; Transgenic sesame plant