

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.07.008

# *BcA9-Barnase* 转基因雄性不育甘蓝的获得<sup>①</sup>

李春雨, 何绍敏, 兰彩耘, 任雪松,  
司军, 李成琼, 宋洪元

西南大学 园艺园林学院/南方山地园艺学 教育部重点实验室/重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715

**摘要:** 将白菜绒毡层特异启动子 *BcA9* 驱动下的核糖核酸酶 *Barnase* 基因, 通过农杆菌介导的下胚轴转化导入甘蓝材料‘TF’, 获得具有除草剂 Basta 抗性的甘蓝转基因植株. 经 PCR 鉴定, *BcA9-Barnase* 融合基因已经整合到甘蓝基因组中. 细胞学观察显示, 转基因甘蓝植株的花药因绒毡层细胞提前降解, 花粉母细胞退化, 成熟花药中无正常花粉粒产生. 相对非转基因对照, 转基因甘蓝植株花器官变小, 花瓣褶皱多, 柱头弯曲, 雄蕊瘦小等现象. 另外, 转基因植株在温度低于 22 °C 时出现明显的死蕾现象, 当温度高于 25 °C 时, 死蕾现象得到缓解. 田间结实情况调查显示, 转基因甘蓝植株自交不能结实, 与野生型杂交可结实但种荚变短.

**关键词:** 甘蓝; 雄性不育; *BcA9* 启动子; *Barnase* 基因

**中图分类号:** S503.53; Q786

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2015)07-0052-07

对大多数农作物来说, 利用雄性不育系是杂种优势利用最为经济、有效的办法. 育种实践中发现, 一方面, 不少农作物天然雄性不育资源有限; 另外, 即使发现了天然雄性不育资源, 但在配套优良保持系以及恢复系选育上遇到困难, 导致育种周期变长, 或者组合选育受限等一系列问题, 增加了杂交育种难度, 杂种优势的潜力难以得到充分的发挥<sup>[1]</sup>. 鉴于基因工程技术在农作物定向改良中的高效率, 基因工程技术被研究者用于创造植物雄性不育. 1990 年, MARIANI 等人在烟草和油菜中获得了世界上首例基因工程雄性不育<sup>[2]</sup>, 随后, 基因工程技术雄性不育在多种植物中获得成功. 根据 2010 年的资料显示, 利用基因工程雄性不育系选育出的油菜、菊苣和玉米杂交品种已经成功进行商业化应用<sup>[3]</sup>. 将花药绒毡层特异启动子与细胞毒蛋白基因 *Barnase* 融合, 在花药绒毡层发育阶段特异表达破坏绒毡层细胞, 从而导致小孢子败育, 不能产生正常的花粉是目前使用最为普遍的方法. 利用类似的方法分别在烟草<sup>[4-5]</sup>、油菜<sup>[6-8]</sup>、芥菜<sup>[9]</sup>、小麦<sup>[10]</sup>中获得雄性不育植株.

甘蓝(*Brassica oleracea* L.)是我国重要的叶菜类蔬菜, 属异花授粉植物, 雄性不育是其杂种一代新品种选育的重要途径之一. 目前, 基于雄性不育系的甘蓝杂种选育, 除中国农科院蔬菜花卉研究所利用显性核不育系育成部分甘蓝品种外<sup>[11]</sup>, 绝大多数品种利用源自萝卜的 *Ogu* CMS 细胞质雄性不育进行<sup>[12]</sup>. 单一不育源的广泛使用容易出现遗传脆弱性风险. 如玉米曾发生商业品种大量使用单一 CMS-T 不育源后导致 1970—1971 年美国玉米小斑病大范围流行<sup>[13]</sup>. 然而, *Barnase* 基因在 *TA29* 驱动下得到的转基因甘蓝植株

① 收稿日期: 2014-07-84

基金项目: 国家自然科学基金(30771462); 重庆市自然科学基金(CSTC2011jjA80014); 中央高校基本科研业务费项目(XDJK2009B024); 国家科技支撑计划项目(2012BAD02B01-4); 重庆市科技攻关项目[CSTC2012GG(8005)].

作者简介: 李春雨(1987-), 女, 河南南阳人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜遗传育种及生物技术研究.

通信作者: 宋洪元, 教授.

中存在全不育植株和半不育植株,半不育植株在开花中后期出现育性恢复现象,转基因甘蓝植株表现明显的育性不稳定<sup>[14-15]</sup>,出现该现象的原因之一可能与启动子有关<sup>[7]</sup>.为获得不育性状稳定、彻底的甘蓝基因工程雄性不育植株,本研究利用大白菜花药绒毡层特异表达的 *BcA9* 启动子驱动 *Barnase* 基因表达,并通过遗传转化获得转基因甘蓝植株,从分子水平、细胞学水平和田间开花结籽情况等方面调查分析转基因植株的育性性状,结果显示 *BcA9* 启动子驱动 *Barnase* 基因表达后能导致彻底的雄性不育,但同时伴随着花器官变小,花瓣褶皱,雌蕊弯曲,种荚变短,在温度低于 22 °C 时出现死蕾的现象.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

含 *pCABarABn* 雄性不育基因表达载体的农杆菌 EHA105 和甘蓝材料“TF”均由本实验室保存提供.植物组织培养、植物 DNA 提取以及显微镜制片的各种化学药品为国产分析纯;Taq DNA 聚合酶和 DNA Marker 购自全式金生物工程有限公司;除草剂 Basta 购自日产化学工业株式会社;链霉素(Streptomycin)、羧苄青霉素(Carbenicilin)、卡那霉素(Kanamycine)、萘乙酸(NAA)、6-苄基腺嘌呤(6-BA)以及细菌培养基均购自北京鼎国生物技术公司.

### 1.2 甘蓝的遗传转化和转基因植株的获得

利用农杆菌介导的下胚轴转化法<sup>[16-18]</sup>转化甘蓝.切取 6 d 苗龄的甘蓝下胚轴在预培养基(MS+3 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA)上预培养 2 d 后,在含 *pCABarABn* 表达载体的农杆菌菌液中浸泡 15 min,吸干菌液置于预培养基暗培养 2 d 后转至筛选培养基(MS+3.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+4 mg/L PPT+400 mg/L Carb)上进行抗 PPT 筛选.生长健壮的绿芽,待其长至 3 cm 左右时,转至生根培养基(MS+0.3 mg/L NAA+4 mg/L PPT+400 mg/L Carb)生根.

### 1.3 转基因甘蓝植株的分子鉴定

#### 1.3.1 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取转基因甘蓝叶片的基因组 DNA.

#### 1.3.2 转基因甘蓝植株的 PCR 检测

用引物 A9-F: 5-CTAGTCCAATAATGTGAGTCATGT-3 和 BN-2: 5-GGATCCGATATCCTACCT-GATCTTAGTG-3 进行 PCR 检测. 25  $\mu$ L 反应体系中,含模板 DNA 1  $\mu$ L(30 ng/L),上下游引物各 1  $\mu$ L(10 ng/L),dNTP Mixture 0.2  $\mu$ L(2.5 mmol/L),MgCl<sub>2</sub> 2.0  $\mu$ L(25 mmol/L),Taq DNA 聚合酶 0.3  $\mu$ L(5 U/L),10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 17  $\mu$ L.PCR 扩增反应程序:94 °C 预变性 5min,94 °C 变性 40 s,56 °C 预变性 40 s,72 °C 延伸 2 min,30 个循环,72 °C 延伸 10 min.PCR 扩增完毕后,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳及成像系统检测.

### 1.4 转基因甘蓝植株的花器官观察

比较转基因甘蓝植株以及野生型甘蓝植株花器官各个发育时期的表型差异,并取转基因甘蓝植株以及野生型植株当天开放的花,比较雄蕊、雌蕊和花瓣的形态结构.

### 1.5 转基因甘蓝植株花药、花粉的细胞学观察

取转基因甘蓝植株和野生型甘蓝植株的花序,投入 FAA 固定液中固定 24 h 后,用 50% 乙醇清洗干净并按大小将花蕾分为 6 个等级,分级完成后依次用 70%,80%,85%,90%,95% 乙醇逐级脱水各 1 h,无水乙醇脱水两次,各 30 min,再用等体积的二甲苯和无水乙醇混合溶液以及纯二甲苯透明各 2 h,浸蜡 12 h 以上,常规方法包埋.用 YD-202C 旋转式切片器切片,切片厚度 8  $\mu$ m,明胶粘片剂粘片,37 °C 烘片 24 h,0.1% 海氏苏木精染色,在 LEICACTR5000 显微镜下镜检并照相.

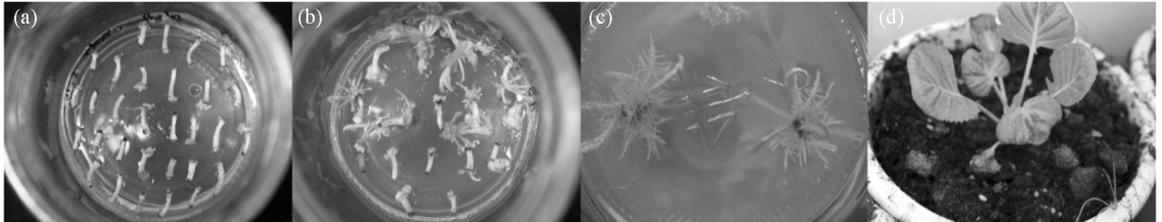
### 1.6 转基因甘蓝植株田间结籽情况调查

转基因甘蓝植株自交以及用野生型甘蓝植株的花粉进行人工授粉后,调查植株的结荚及结籽情况.

## 2 结果与分析

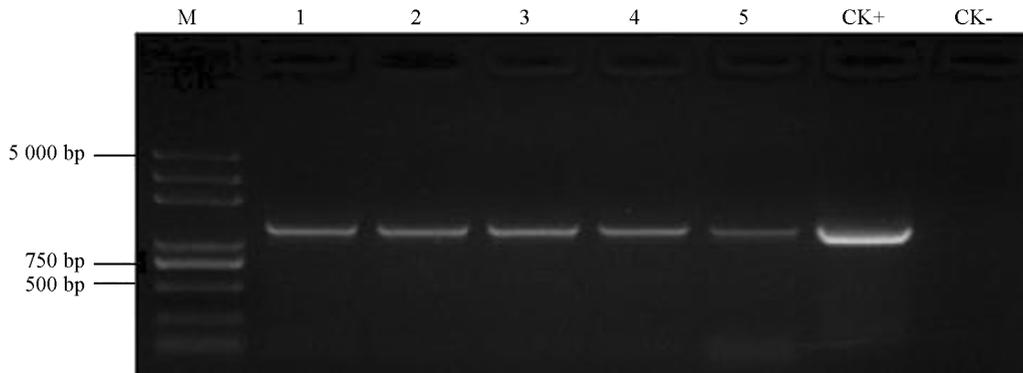
### 2.1 转基因甘蓝植株的获得

pCABarABn 表达载体经农杆菌介导的下胚轴转化法侵染甘蓝下胚轴, 经除草剂 Basta (有效成分 PPT) 多轮筛选, 获得 5 株具有除草剂抗性并能正常生根的转基因甘蓝植株 (图 1)。提取其 DNA, 利用引物 A9-F 和 BN-2 扩增 *BcA9* 启动子及其下游的 *Barnase* 基因, 结果在 5 株转基因植株中均获得了预期大小约 1.2 kb 左右的 DNA 片段 (图 2)。表明 *BcA9-Barnase* 基因已整合到甘蓝基因组中。



(a), (b) 为诱导分化愈伤组织; (c) 为转基因抗性植株根的生长情况; (d) 为正常生长的转基因抗性植株。

图 1 甘蓝转基因植株的获得



M 为 Marker DL5000; CK+ 为 pCABarA-Bn 质粒; CK- 为阴性对照; 1-5 为转基因甘蓝植株。

图 2 转基因甘蓝植株的 PCR 检测结果

### 2.2 转基因甘蓝植株的花器官形态比较

转基因植株与野生型植株在营养生长各个阶段 (幼苗期、莲座期、结球期) 的性状表现无明显差异。获得 5 株转基因甘蓝植株在开花后均表现为雄性不育, 即不育株率为 100%。与野生型植株相比, 转基因植株在花发育的各个时期, 明显地瘦小、不饱满 (图 3(a))。在日平均温度低于 22 °C 时, 转基因植株花序出现明显的死蕾现象 (图 3(c)), 当日平均温度高于 25 °C 时, 死蕾现象消失 (图 3(b))。在开花期, 转基因植株的花萼发育正常与野生型相比无明显差异, 但转基因植株的花瓣、雌蕊、雄蕊和花药的发育变化明显。转基因植株花瓣褶皱多, 花朵开放度小; 柱头顶端弯曲; 花药瘦小, 不饱满, 不产生花粉。而野生型植株的花瓣伸展, 花朵开放度大, 无褶皱; 柱头直立; 花药饱满, 内含大量花粉 (图 3(d)-(l))。

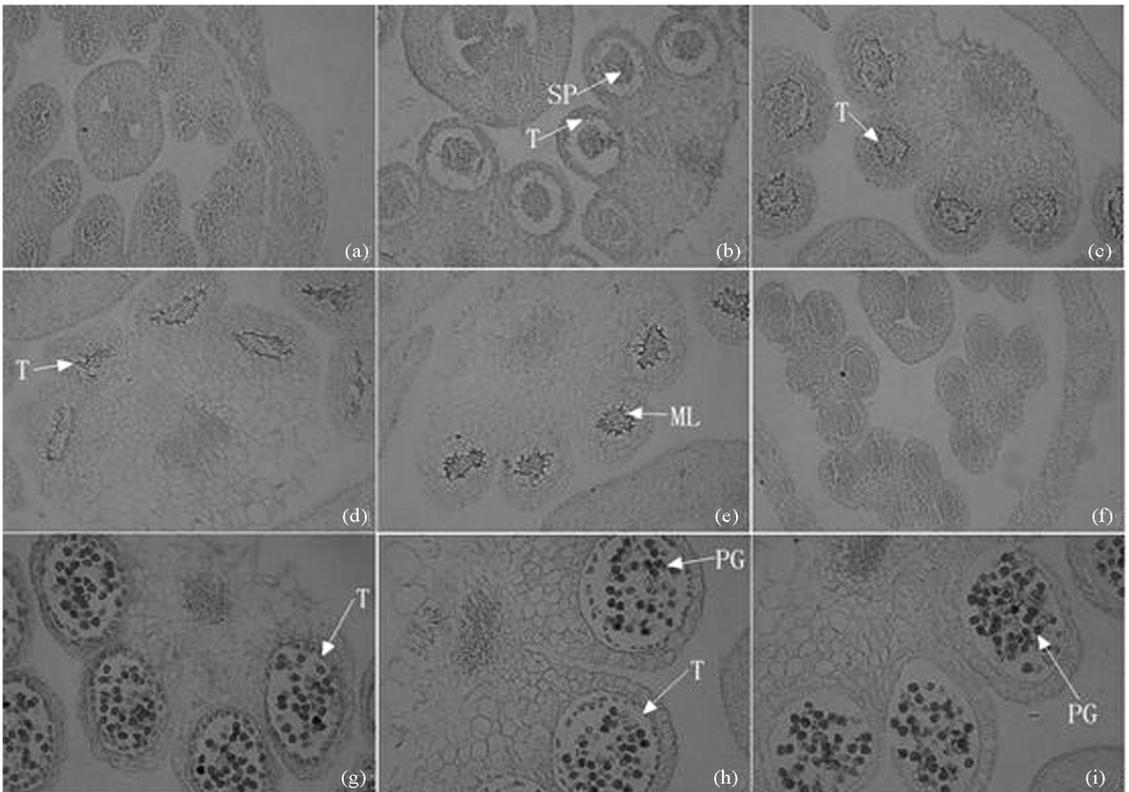
### 2.3 转基因甘蓝植株与野生型甘蓝植株花药、花粉发育过程的比较

从造孢细胞期到花粉母细胞初期, 转基因雄性不育植株与野生型植株的花药发育过程没有明显差异, 花药横切面呈蝴蝶状, 花药的 4 个角隅处形成正常的表皮、药室内壁、中层、绒毡层和造孢细胞 (图 4(a)、(f))。花粉母细胞初期至四分体时期, 转基因雄性不育植株的绒毡层细胞提前解体, 花药壁收缩, 中层细胞体积不规则膨大, 挤压小孢子, 致使小孢子和解体的绒毡层细胞粘连在一起, 在药室内形成着色较深的团块状物质 (图 4(b)、(c))。花粉粒成熟期药室内壁细胞排列紧密, 药室不开裂, 无明显花粉粒形成 (图 4(d)、(e))。而野生型植株在四分体时期, 其绒毡层细胞体积达到最大, 减数分裂形成的小孢子细胞形状不规则, 细胞壁薄; 花粉粒成熟期, 绒毡层细胞消失, 小孢子变圆, 药室内壁开裂散放花粉 (图 4(g)、(h)、(i))。



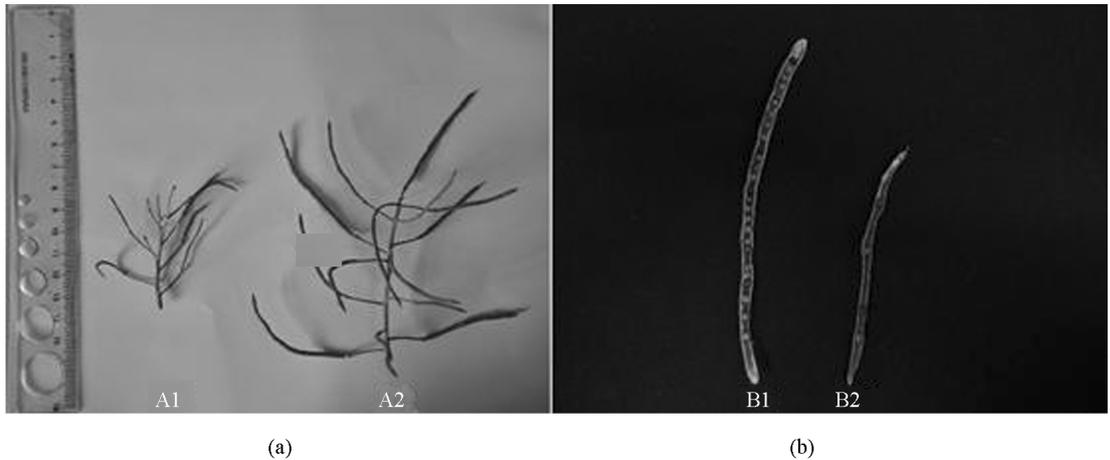
(a). 转基因植株(上)与野生型植株(下)的花朵比较; (b). 低于 22 °C 时, 野生型植株的花器官表型; (c). 低于 22 °C 时, 转基因植株的花器官表型; (d). 野生型植株的花朵; (e). 转基因植株的花朵; (f). 野生型植株的雄蕊和雌蕊; (g). 转基因植株的雄蕊及雌蕊; (h). 转基因植株(左)与野生型植株(右)的花瓣形态比较; (i)、(j). 转基因植株(右)与野生型植株(左)的雌蕊形态比较; (k). 转基因植株(右)与野生型植株(左)的雄蕊形态比较; (l). 野生型植株花药; (m). 转基因植株花药。

图 3 转基因植株花器官形态结构



(a)-(e). 转基因甘蓝植株花药切片(8 mm 横切面); (f)-9g). 野生型甘蓝植株花药切片(8 mm 横切面); (a)、(f). 造孢细胞时期(20×); (b)、(g). 花粉母细胞时期(20×); (c)、(l). 四分体时期(20×); (d)、(e)、(i). 花粉粒成熟期(20×); T. 绒毡层; SP. 造孢细胞; PG. 花粉粒; ML. 中层细胞。

图 4 转基因甘蓝植株的花药发育过程



A1. 转基因甘蓝植株自交所得种荚; A2. 转基因甘蓝植株与野生型杂交所得种荚; B1. 野生型甘蓝植株自交所得种荚; B2. 用野生型甘蓝花粉对转基因植株进行授粉所得种荚。

图 5 转基因甘蓝植株的结籽情况

#### 2.4 转基因甘蓝植株田间结籽情况的调查

转基因甘蓝植株开花后自交种荚基本不膨大, 不能正常结实(图 5(a)中 A1). 利用野生型甘蓝的花粉授粉后, 种荚膨大, 成熟后能形成正常形态的种子(图 5(a)中 A2). 但与野生型植株相比, 种荚较短, 结种量下降(图 5(b)). 表明大白菜启动子 *BcA9* 驱动的 *Barnase* 基因在甘蓝植株的花药绒毡层表达后, 除了导致花粉败育外, 也降低了柱头的授粉受精能力。

### 3 讨论

目前, 在植物基因工程雄性不育中使用最为普遍的启动子是来自烟草的 TA29 融毡层特异启动子<sup>[2, 6-9, 14]</sup>. 然而, TA29 作为不育基因启动子驱动 *Barnase* 的表达却存在较为普遍的温度敏感性问题. 钟蓉等人<sup>[7]</sup>将 TA29-*Barnase* 转入“浙优油 1 号”后发现大多数植株在 30~25 °C 下为全可育植株, 当温度低于 25 °C 时育性表现较为稳定. 认为 TA29 启动子驱动的 *Barnase* 基因表达受温度控制, 属于温度敏感性雄性不育材料, 而 TA29-*Barnase* 转基因烟草中, 27 °C/23 °C 条件下即可导致转基因植株育性恢复<sup>[19]</sup>. 该特点在转基因甘蓝中也有类似的现象, TA29-*Barnase* 转基因甘蓝在开花后期随温度升高, 有约 35% 的植株会出现育性恢复现象<sup>[19]</sup>.

白菜 *BcA9* 启动子为融毡层特异启动子, 从性母细胞发育(stage6)到融毡层细胞降解、二核花粉形成期(stage11)表达, 表达特点与拟南芥 A9 启动子类似<sup>[20]</sup>. 在本研究中, 该启动子驱动下的 *Barnase* 基因在绒毡层表达后, 导致绒毡层细胞在四分体时期提前解体, 导致小孢子不能得到充足的营养物质和能量维持正常的生长发育, 最后小孢子败育, 无正常花粉产生(图 3). 由于 2014 年 3-4 月重庆气温较低, 转基因植株开花期间未遇 30 °C 以上温度, *BcA9-Barnase* 转基因甘蓝植株是否具有在高温下的育性恢复现象有待进一步的研究. 但本课题组曾将 *BcA9* 启动子启动 *Barnase* 基因在烟草绒毡层中表达, 产生完全的雄性不育, 不育性十分彻底, 开花期间田间温度变化从 19~44 °C, 均未发现转基因植株在育性上有明显变化<sup>[5]</sup>.

本研究获得的转基因甘蓝植株除了表现雄蕊败育外, 还表现花蕾变小, 花朵开放度小、花瓣褶皱加剧, 伸展度小; 柱头顶端弯曲; 种荚较短; 结种量下降; 在温度低于 22 °C 时出现明显死蕾的现象(图 2). 这些结果显示大白菜的绒毡层特异表达启动子 *BcA9* 在甘蓝中的表达存在一定的泄漏, 导致 *Barnase* 蛋白在绒毡层之外的组织和细胞表达. 实际上, KONAGAYA 等人<sup>[20]</sup>的研究中也发现, 白菜的 *BcA9* 启动

子和花椰菜的 *BoA9* 启动子除了在绒毡层优势表达之外,在包括花梗、花丝和花瓣中均有少量的表达,但未发现雌蕊、胚珠有表达。另外,钟蓉等的研究表明,在 *TA29-Barnase* 转基因油菜植株中,发现有转化植株柱头在花蕾期先露,柱头上部扭曲现象,他们认为 *TA29-Barnase* 基因在柱头上有零星表达,从而造成柱头形态上的异常,但给这些变形的柱头授粉仍可结实,说明其雌性可育<sup>[7]</sup>。将 *TA29-Barnase* 基因转化芥菜后发现,转基因植株除了表现雄蕊败育外,也出现了花朵变小,雌蕊变短,种荚变短的现象<sup>[9]</sup>。而在棉花中也发现 *TA29-Barnase* 转基因棉花除花药干瘪、花粉无活力外,也表现出花朵变小、花丝变短等现象<sup>[21]</sup>。因此,针对不同农作物研究和发掘表达严谨、稳定的特异启动子是基因工程雄性不育系走向实践应用的前提条件。

#### 参考文献:

- [1] PEREZ-PRAT E, Van LOOKEREN CAMPAGNE M M. Hybrid Seed Production and the Challenge of Propagating Male Sterile Plants [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(5): 199—203.
- [2] MARIANI C, De BEUCKELEER M, TRUETTNER J, et al. Induction of Male Sterility in Plants by a Chimaeric Ribonuclease Gene [J]. Nature, 1990, 347(6295): 737—741.
- [3] KEMPKEN F, JUNG C. Engineered Male Sterility. Genetic Modification of Plants: Biotechnology in Agriculture and Forestry [J]. 2010, 64(2): 253—265.
- [4] PAUL W, HODGE R, SMARRT S, et al. The Isolation and Characterization of the Tapetum-Specific Arabidopsis Thaliana A9 Gene [J]. Plant Mol Biol, 1992(19): 611—622.
- [5] 韩凤英, 韩学智, 邹敏, 等. *BcA9-Barnase* 转基因雄性不育烟草的获得 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2012, 34(4): 58—64.
- [6] 周雪荣, 彭仁旺, 方荣祥, 等. 表达核糖核酸酶基因的雄性不育油菜的获得 [J]. 遗传学报, 1997, 24(6): 531—536.
- [7] 钟蓉, 刘玉乐, 朱锋, 等. *TA29-Barnase* 基因导致油菜雄性不育的研究 [J]. 植物学报, 1996, 38(7): 582—585.
- [8] 何业华, 熊兴华, 官春云, 等. 根癌农杆菌介导 *TA29-Barnase* 基因转化甘蓝型油菜的研究 [J]. 作物学报, 2003, 29(4): 615—620.
- [9] 王倩, 杨海鹏, 邹敏, 等. *TA29-Barnase* 转基因雄性不育芥菜的获得 [J]. 中国蔬菜, 2013(4): 26—31.
- [10] 王勇, 林忠平, 徐惠君, 等. 转核酸酶 *barnase* 基因对小麦育性的影响 [J]. 作物杂志, 2011(5): 27—30.
- [11] 方智远, 孙培田, 刘玉梅, 等. 几种类型甘蓝雄性不育的研究与显性不育系的利用 [J]. 中国蔬菜, 2001, 1(1): 6—10.
- [12] 张艳, 王小佳, 李成琼, 等. 甘蓝细胞质雄性不育材料分子鉴定及花器官形态对核背景的背景响应 [J]. 园艺学报, 2010, 37(6): 915—922.
- [13] ULLSTRUP A J. The Impacts of the Southern Corn Leaf Blight Epidemics of 1970—1971 [J]. Annual Review of Phytopathology, 1972, 10(1): 37—50.
- [14] 沈革志, 王新其, 朱玉英, 等. *TA29-barnase* 基因转化甘蓝产生雄性不育植株 [J]. 植物生理学报, 2001, 27(1): 43—48.
- [15] 朱玉英, 龚静, 吴晓光, 等. 甘蓝转 *TA29-Barnase* 基因植株的花器特征及育性分离的初步研究 [J]. 上海农业学报, 2001, 17(1): 79—82.
- [16] 张文玲, 李凌, 刘凡. 农杆菌介导羽衣甘蓝转化体系的建立 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2010, 32(4): 61—65.
- [17] 孙洁, 黄团, 李加纳, 等. 农杆菌培养方式和预培养基激素配比对甘蓝型油菜下胚轴转化效应分析 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(12): 49—53.
- [18] 曹必好, 孟成民, 雷建军, 等. *TA29-barnase* 基因转化菜心 [J]. 生物工程学报, 2008, 24(5): 881—886.
- [19] 李胜国, 刘玉乐, 朱峰, 等. 基因工程雄性不育烟草及其温度敏感性 [J]. 植物学报, 1997, 39(3): 231—235.

- [20] KONAGAYA K, ANDO S, KAMACHI S, et al. Efficient Production of Genetically Engineered, Male-Sterile *Arabidopsis thaliana* Using Anther-Specific Promoters and Genes Derived from *Brassica oleracea* and *B. rapa* [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(11): 1741–1754.
- [21] ZHANG H J, WANG H Y, SHI Y J, et al. Cotton Genetic Transformation of *Barnase* Male Sterility Gene [J]. *Cotton Sci*, 2007, 19(4): 261–266.

## Transgenic Male Sterile Cabbage Plants Induced by *BcA9-Barnase* Transformation

LI Chun-yu, HE Shao-min, LAN Cai-yun, REN Xue-song,  
SI Jun, LI Cheng-qiong, SONG Hong-yuan

*School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, /*

*Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, /*

*Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Olericulture, Chongqing 400715, China*

**Abstract:** Ribonuclease *Barnase* gene driven by an anther tapetum-specific promoter *BcA9* from *Brassica rapa* was transformed into *B. oleracea* variety ‘TF’ by *Agrobacterium*-mediated transformation of the hypocotyls, and transgenic cabbage plants with herbicide Basta resistance were generated. Based on PCR identification, the *BcA9-Barnase* fusion gene was proved to have been integrated into the genome of *B. oleracea*. Cytological microscopy showed that no normal pollen was developed in mature anthers of the transgenic *B. oleracea* plants as a result of premature tapetum cell degradation and pollen mother cell degeneration. Compared with wild-type plants, the transgenic plants had smaller flower organs, more severely wrinkled petals, bent pistil and thinner stamens. In addition, a large number of buds died when the temperature was below 22 °C, but phenomenon of bud death was relieved when the temperature was higher than 25 °C. Field survey results showed that transgenic *B. oleracea* plants produced no seed by self-pollination, and they formed some seed when pollinated with the pollen of wild-type plants, though the pods were short.

**Key words:** cabbage; male sterility; *BcA9* promoter; *Barnase* gene

责任编辑 潘春燕

