

花粉特异性核糖核酸酶基因诱导籼稻雄性不育及其遗传研究*

陶利珍 凌定厚 梁承邨 马镇荣

(中国科学院华南植物研究所, 广东广州 510650)

提 要 以水稻愈伤组织和悬浮细胞系作为基因枪转化的外植体, 把水稻花粉特异性基因 *PS1* 启动子与 *barnase* 构成的嵌合基因导入籼稻, 获得籼稻五个品种 Basmati-1、青油占、胜优 2 号, 明恢 63, 新山占 29 的转基因植株。试验以两个质粒 *PS1-barnase* 和 pILTAB227 共转化的方法, 以潮霉素 B 作为筛选因子, 选择抗性愈伤及再生植株。获得的 *barnase* 转基因植株的育性比未转化的对照明显降低, 表现为部分不育和完全不育。除 *barnase* 阳性转化株平均株高比对照有所降低外, 营养器官发育正常, 雌性可育。完全不育的植株花粉粒畸形, 不能被 I-KI 溶液染色, 但它们与正常植株杂交能够获得杂交种子。转基因植株的 Southern 杂交分析表明, *barnase* 基因普遍为多拷贝整合。对转基因植株自交及与非转化株测交后代以点杂交分析 *barnase* 转基因的遗传行为, 发现转基因的遗传符合 1~3 个插入位点的孟德尔遗传模式。

关键词 核糖核酸酶; 工程雄性不育; 籼稻; 花粉特异性基因 *PSI*

Studies on Male Sterile *Indica* Rice Induced by a Pollen Specific Ribonuclease Gene and Its Inheritance

Tao Lizhen Ling Dinghou Liang Chengye Ma Zhenrong

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract A fusion of the rice pollen-specific *PS1* gene promoter to ribonuclease (*barnase*) and plasmid pILTAB 227 were introduced to *indica* rice cultivars in a particle co-bombardment transformation system with embryogenic callus and cell suspension cultures. The transgenic plants of varieties Basmati-1, Qingyouzhan, Shengyou2, Minghui63 and Xinshanzhan29 were obtained. Comparing with untransformed control, *PSI-barnase*-containing plants reduced significantly fertility from partially to completely male sterile, but were phenotypically normal and female fertile. Some *barnase* transgenic plants decreased in plant height. The pollen grains of complete male sterile plants were of abnormal morphology and failed to be stained by I-KI solution. Southern blot analysis of transgenic plants demonstrated multiple copies of the *barnase* gene integration were common. Microspores with *barnase* gene were inability for fertilization, based on Dot blot analysis of seed progenies of back crossings. Dot blot analysis of T₁ plants showed that *barnase*-containing plants inherited the *barnase* gene at 1~3 loci in a Mendelian fashion. The rice *PS1* promoter was found to be active in the stage before meiosis of pollen mother cell to microspore development.

Key words Ribonuclease; Engineered male sterile; *Indica* rice; Pollen specific gene *PSI*

* 本研究获国家自然科学基金(3047445), 广东省自然科学基金(940496)及美国 Rockfeller Foundation(1994-0001-02420)资助。

收稿日期: 1998-12-30

杂种优势在农业生产上已获得广泛应用,水稻的杂种优势利用更在我国获得了举世瞩目的成就,但目前生产上应用的三系和二系杂交水稻各有应用的局限性。近年,应用基因工程改良作物品种已显示出巨大的潜力,发展水稻工程不育系及工程杂交水稻将为水稻育种提供新的策略。运用遗传转化技术诱导工程雄性不育主要有二种途径,即花器官组织遗传败育(genetic ablation)和基因抑制^[1]。前者利用的细胞毒素基因有核糖核酸酶基因 *barnase* (来自 *Bacillus amyloliquefaciens*) 或米曲霉菌的 RNaseT1^[2]、ADP 核糖基转移酶(ADP-ribosyl-transferase)^[3]、发根农杆菌的 RoLC 基因^[4]、葡聚糖酶基因^[5]等 4 种。其中应用较多的是 *barnase* 基因拼接雄性特异性(male-specific)基因启动子组成嵌合基因,诱导烟草、油菜、甘蓝、莴苣等作物雄性不育,已有成功的报道^[6]。经典的试验是 Mariani 等(1990)^[7]将花药绒毡层特异性启动子 *TA29* 与 *barnase* 嵌合基因转入烟草、油菜,获得雄性不育株。Zou 等(1994)^[8]克隆了水稻花粉特异性基因 *PS1* 启动子, Zhan 等(1996)^[9]将 *PS1-barnase* 转入烟草,获得工程不育株。国内近年有获得 *TA29-barnase* 油菜不育株的报道^[10]。本研究中以 *PS1-barnase* 基因转化籼稻,试验结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 品种

供试的籼稻品种有 Basmati-1、青油占、胜优 2 号、明恢 63、新山占 29 号、新七占 1 号、闽 129、26 窄早等。

1.2 愈伤诱导和悬浮细胞系的建立

以成熟去壳的水稻种子为外植体,灭菌后培养于 MS 培养基,添加 2, 4-D 2.0 mg/L, 诱导愈伤组织,愈伤组织继代增殖后可直接作为靶材料供基因枪轰击用。在初级愈伤组织中挑选结构良好的胚性愈伤在 R₂ 培养基(Ohira 等 1973)^[11]中悬浮培养。

1.3 质粒结构

采用 *PS1-barnase* 嵌合基因(图 1)。水稻 1.7 kb 的 *PS1* 基因上游区域和 12 bp 的 *PSI* 转录起始位点(Zou 等, 1994)^[8]的拼接 *Bacillus amyloliquefaciens* 的 *Barnase* 基因(Hartley 1988)^[2]和 *nos-km* 植物选择标记基因。报道基因使用质粒 pILTAB227, 此质粒包含 *uidA* (*Gus*)和 *hph* 基因, *CaMV35s* 双启动子结构^[12]。

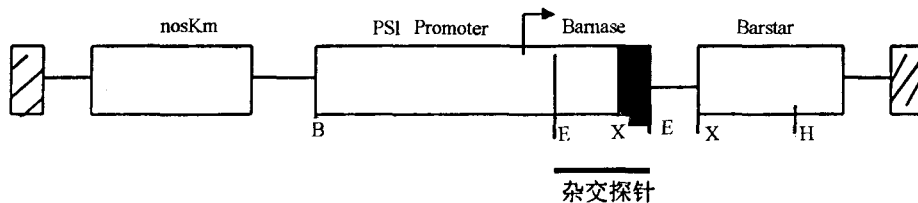


图 1 *PSI-barnase* 质粒结构图

Fig. 1 Construction of Plasmid *PSI-barnase*

nosKm: 植物选择标记; B, E, X, H: 分别为: *Bam*HI, *Eco*RI, *Xba*I, *Hind* III 限制性内切酶

1.4 共转化

PSI-barnase 和 pILTAB227 质粒 DNA 按一定分子摩尔比充分混合后,按基因枪产商推荐的将 5 μ g DNA 包裹到 3 mg1.0 μ m 金粉微粒表面上,用基因枪 PDS-1000/He 法轰击

靶材料, 轰击前对靶材料进行高渗透压预处理。悬浮细胞系在继代后 3 天转入具高渗透压的 R₂ 固体培养基上(含 30 g/L 甘露醇, 30 g/L 山梨糖醇, 30 g/L 蔗糖), 预处理 4 h 后, 将盛靶材料的平皿置于静止屏下 8 cm, 氦气压为 1100 psi, 轰击靶材料 2 次, 轰击后的靶材料在黑暗条件下继续在高渗透压培养基上培养 16~20 h。

1.5 抗性细胞的选择和生长及植株再生

基本按 Zhang^[12]的方法。以 NB 或 CC 培养基(Potrykus 等 1979)^[13]为基本培养基, 抗性愈伤筛选附加 2, 4-D 2 mg/L, 3% 蔗糖及潮霉素(hygB, Calbiochem)。初步筛选的选择压为 30 mg/L hygB, 随后的选择均为 50 mg/L hygB。分化培养基以麦芽糖代替蔗糖, 添加 2.5 mg/L KKT, 0.1 mg/L NAA, 50 mg/L hygB, 0.45% 琼脂糖固化。获得的转基因植株称为 PS1-*bn* 植株, T₀ 代, PS1-*bn* 转基因植株自交后代称为 T₁ 代。

1.6 点杂交和 Southern blot 分析

根据 Dellaporta 等(1983)^[14]的方法提取叶片组织的基因组 DNA。点杂交采用 Sambrook 等(1989)^[15]的方法。Southern 印迹杂交中, 每株叶片 DNA 用 *EcoRI* 内切酶消化, 随机引物³²P 标记的 *Barnase EcoRI* 片段用作探针, 酶解和未酶解的同一植株 DNA 各取 10 μg 在 0.8% 琼脂糖胶上电泳, 2V/cm 电泳过夜, 然后将 DNA 转移到 positively charged 尼龙膜(Boehringer Mannheim), 琼脂糖酶(Boehringer Mannheim)用作 *barnase* (*bn*) 探针的分离纯化。洗膜及 X 光片放射自显影根据 Sambrook(1989)^[15]的方法进行。

1.7 转基因植株的育性分析

对 PS1-*bn* 转基因植株首先考察花粉的育性, 用 KI-I 溶液染色鉴定, 然后套袋自交以及用非转基因植株作父本与之测交, 部分高不育的转基因植株(父本)和非转基因植株(母本)反交。收获种子的植株为杂交(正, 反交)F₁ 代, 用点杂交方法考察 *bn* 在后代中的分离比例。

2 试验结果

2.1 共转化

采用胚性愈伤组织或悬浮细胞系作为靶组织, 提供一个大群体的靶材料供基因枪轰击之用。在本试验中, Basmati-1 用初级愈伤或继代不超过 2 次的次级愈伤组织, 青油占采用液体培养 6 周的悬浮细胞系作为基因枪转化的靶材料(图 1A)。同时设置未转化的同期培养对照材料。试验采用两个质粒共转化, 以潮霉素(hygromycin)筛选抗性愈伤组织(图 1B)和再生植株(图 1C)。共获得 Basmati-1, 青油占, 胜优 2 号, 明恢 63, 新山占 29 号 5 个品种 84 个转化体。新七占 1 号、闽 129、26 窄早 3 个品种没有获得抗性植株。胜优 2 号, 明恢 63, 新山占 29 号 3 品种的转化株与父本非转化株由于花期不遇, 未获得杂交种子。表 1 显示 2 个品种 Basmati-1 及青油占的部分试验结果。点杂交的结果表明 2 个品种 24 个转化体(T₀)为 *bn* 及 *hph* 阳性(表 1), 换言之, *barnase* 与 *hph* 两基因共同整合在水稻 T₀ 代基因组中。在 T₁ 代我们发现有些株系的单株 *barnase* 基因和 *hph* 基因发生分离, 但大部分植株 *barnase* 和 *hph* 两基因在同一位点整合, 紧密连锁遗传。在 Basmati-1 转化试验中, 点杂交结果显示 2 个质粒共转化频率达到 88%(数据未显示)。

2.2 PS1-*barnase* 转基因植株的育性

详细观察了 Basmati-1、青油占转化体的 PS1-*barnase* 表达, 包括花粉育性, 自交结实和测交结实情况。在套袋自交情况下, 转基因植株表现的育性, 从完全不育(图 1E), 到部分不

表1 *PS1-barnase* 转基因植株(T_0)的花粉和种子育性
Table 1 Pollen and seed Fertility of *PS1-barnase* transgenic plants in T_0 generation

品种 Variety	株系编号 Code of plant line	花粉染色 Pollen stained(%)	种子育性 Seed fertility		点杂交 Dot blot		<i>bn</i> 拷贝数 No. of copies for <i>bn</i> based on Southern blot
			自交结实率 Seed setting by selfing(%)	杂交结实率 Seed setting by crossing(%)			
					<i>bn</i>	<i>hph</i>	
Basmati-1	BN1	31.3	10	25.5	+	+	7
	BN2	0	0	0	+	+	10
	BN3	0	0	18.8	+	+	5
	BN6	79.8	7.1	3.6	+	+	4
	BN7	32.9	8.2		+	+	
	BN8	69.1	30.5		+	+	3
	BN9	60.0	60.2	30.5	+	+	
	BN10	12.5	0	5.4	+	+	4
	BN11	0	0	5.8	+	+	7
	BN12	65.0	12.6	28.5	+	+	11
	BN13	7.0	2.7	4.5	+	+	3
	BN14	82.2	58.8	60.0	+	+	4
	BN15	70.0	16.2	60.5	+	+	2
	BN16	75.0	8.5	50.8	+	+	4
	BN17	80.5	3.97	70.1	+	+	4
	BN18	81.5	17.5	69.4	+	+	2
	BN19	30.5	18.3	35.6	+	+	7
	BN20	28.9	21.4	21.4	+	+	
	BN21	0	0	45.2	+	+	6
	BN22	23.2	9.1	65.2	+	+	3
	BN23	67.0	8.0	60.5	+	+	5
	Control		98.0	87.4	-	-	
	Qingyouzhan	Qing-1	85.6	41.98		+	+
Qing-2		73.2	21.8		+	+	6
Qing-3		52.5	8.99	15.3	+	+	3
Control		95.0	81.4		-	-	

Control; non-transformed plant of Basmati-1 and Qingyouzhan; +=positive, -=negative
bn copies of transgene were based on Southern blot pattern.

育。和对照相比,两个品种阳性转化体自交结实率均比对照植株低。就 Basmati-1 而言, 21 个独立转化体中, 有 5 个完全不育株(占 23.8%), 自交结实率在 3%~10% 的高不育 8 株(占 38.1%), 自交结实率在 12%~35% 的部分不育株 6 株(占 28.6%), 自交结实率高于 50% 育性降低的转化体 2 个(表 1)。但给这些转基因植株授予对照植株花粉, 杂交可以结实, 杂交结实率在 3.5%~70.1% 之间, 仅 BN2 例外。有些转化体的杂交结实率达到了正常水稻的水平, 说明 *bn* 转化体的雌性器官是正常可育的。

BN2、3、10、11、21 完全不育的转基因植株, 花药干瘪, 花粉粒较小, 畸形, 几乎没有内含物的空壳花粉, 基本不被 KI-I 溶液染色(图 1D), 反交完全不结实。另外有些转基因植株如 BN6, 12, 15, 16, 17, 18 花粉染色百分比在 70% 以上, 但自交结实率低下, 这些植株花药不能正常开裂, 散粉, 花粉粒虽然能着色, 但大部分仍然是无功能的染败花粉(表 1)。

2.3 *PS1-barnase* 转基因植株其它农艺性状

我们还观察了转基因植株的其它农艺性状如株高, 分蘖数, 穗长等(表 2)。结果表明转基因植株平均株高比对照有所降低, 而分蘖数, 穗长和对照植株没有明显差异。

2.4 转基因植株的遗传分析

为了解外源转基因 *bn* 在水稻基因组的整合样式及遗传行为, 对转基因植株当代(T_0)及后代(T_1 或 F_1)进行了 DNA 的分析。

表 2 转基因植株(T₀)的部分农艺性状

品种 Variety	试验编号 Code of experiment	样本数 Sample size	株高(cm)	Plant height(cm)	分蘖数/株	Tillers/plant	穗长	Panicle length(cm)
			范围 Range	平均数 Mean (标准差)(sd)	范围 Range	平均数 Mean (标准差)(sd)	范围 Range	平均数 Mean (标准差)(sd)
Baimati-1	a	8	41~67	50.31(9.15)	3~9	6.6(1.9)	12~20	16.75(2.43)
	b	10	45~61	54.4(5.18)	3~8	6.8(1.69)	15~21	17.98(1.78)
	c	11	48~72	57.9(9.69)	3~10	6.7(2.69)	11.5~20	16.2(2.21)
对照		9	55~68.5	60(4.87)	4~9	7.0(1.8)	14~19.5	17.2(1.14)
青油占	a	5	43.5~53	45.1(5.1)	2~8	6(2.3)	14~17	15.4(1.14)
	b	8	34~45.2	38.7(4.59)	3~9	6.88(1.96)	13~18	15.5(1.19)
对照		10	41~56	48.9(4.7)	3~9	6.3(2.0)	13~18	15.4(1.89)

对照: 分别为 Basmati-1, 青油占未转化植株

Control: non-transformed plant of Basmati-1 and Qingyouzhan

2.4.1 转基因植株(T₀)Southern blot 分析 用 *bn* 基因编码序列作探针 Southern 杂交的结果证实了 *barnase* 基因已经整合进水稻的基因组中。试验比较了用 *EcoRI* 酶消化的 DNA 图谱, 不同的 Basmati-1 和青油占转化体之 DNA 图谱各不相同(图 2A~2D)。试验发现外源 DNA 插入引起大量 DNA 的重排, *bn* 基因一般是多拷贝地整合进水稻的基因组中, *bn* 基因的拷贝数在 2~11 之间(表 1)。在 Basmati-1 16 个转化体中, 9 个转化体(占 58.8%)有 2~4 *bn* 基因拷贝, 5 个(29.4%)有 5~7 *bn* 基因拷贝, 2 个(占 11.8%)有 10~11 *bn* 基因拷贝。但没有发现 *bn* 的拷贝数与转基因植株的不育程度有任何明确的相关性(表 1)。这种不同拷贝在该基因性状表达及其遗传上有何不同尚需进一步研究。

2.4.2 转基因植株后代的点杂交 观察了自交完全不育和自交结实率低下转基因植株(作父本)与非转基因植株(母本)反交的结果, 前者完全不结实, 后者结实率降低。在成株期作叶片 DNA 点杂交分析, 由表 3 可知, 在这些反交组合中 100% 的后代不含 *barnase* 基因, 这

表 3 Basmati-1 PS1-*barnase* 转基因植株后代(T₁ 及 F₁)的遗传分析Table 3 Analysis of the inheritance of the *barnase* transgene in the T₁ or F₁ progeny of PS1-*barnase* transgenic plants of Basmati-1

母本 Female	父本 Male	点杂交 Dot blot		χ^2	母本 Female	父本 Male	点杂交 Dot blot		χ^2
		+	-				+	-	
BN1	BN1	50	16	0 (3 : 1)	control	BN18	0	24	
BN1	control	34	11	0.01 (3 : 1)	BN21	control	13	9	0.41 (1 : 1)
control	BN1	0	30		BN22	BN22	14	12	0.5 (1 : 1)
BN11	control	15	2	0.076 (7 : 1)	BN22	control	15	14	0 (1 : 1)
BN15	control	81	44		control	BN22	0	22	0.46
control	BN15	0	30		BN23	BN23	15	20	(1 : 1)
BN17	BN17	4	7	0.36 (1 : 1)	BN23	control	10	8	0.06 (1 : 1)
control	BN17	0	1.5	0.429	control	BN23	0	26	
BN18	BN18	23	5	(3 : 1)					

+: 表示点杂交阳性, -: 表示点杂交阴性, control: 非转化植株

+: positive, -: negative, control: non-transformant

表明能使非转基因植株卵细胞受精的花粉粒不含 *barnase* 基因, 而含有 *barnase* 基因的花粉是致死或是有缺陷的, 不能使卵细胞受精。由此可知 *bn* 基因只能通过母本传递。

以转基因植株作母本授予非转基因植株花粉, 杂交能够结实(图 1F)。BN21, 22, 23 与对照杂交的组合, 经 χ^2 测验, 后代 *bn* 阳性与阴性个体分离比约为 1:1(2E, 表 3), 表明有 1 个 *barnase* 插入位点; BN1 与对照杂交组合中, *bn* 基因阳性与阴性个体分离比约为 3:1, 说明水稻基因组中有 2 个 *barnase* 插入位点; BN11 与对照杂交组合中, *barnase* 阳性与阴性分离比约为 7:1(图 2F), 表明有 3 个 *barnase* 插入位点。在转基因植株自交后代(T_1)中, 点杂交阳性与阴性的分离比与转基因植株作母本和对照杂交的结果相一致(表 3, 图 2G)。更进一步地证明 *barnase* 基因仅由一个亲本传递。从转基因植株反交组合之点杂交结果可知, BN 植株花粉粒是明显致死的。

在 BN15 与对照的杂种 F_1 的一个组合中 *bn* 基因阳性与阴性个体分离比是 81:44, *barnase* 基因遗传似乎比较复杂, 这种分离很显然不符合 1:1 分离比。

在四个完全不育的转基因株系 BN2, 3, 11, 21 中, BN2 植株矮化, 仿佛是单倍体, 穗部严重包颈, 导致抽穗困难, 其基因组 DNA 中 *barnase* 拷贝数高达 10 拷贝(见表 1, 图 2C)。该转基因植株与对照杂交, 未结实, 原因有待进一步研究。

3 讨论

籼稻是栽培稻的重要亚种, 它的种植面积占栽培稻面积的 80% 左右^[16, 17], 由于籼稻的再生频率低, 它的转化还相当困难, 所以籼稻目的基因的转化是水稻遗传工程的重点和难点所在。本研究首次探索了 *PS1-barnase* 基因对籼稻不同品种(有些是生产上广泛栽培的品种的转化), 考虑到禾本科作物对卡那霉素有着天然抗性^[18], 所以在转化方法上采用两个质粒共转化, 以潮霉素 B 作为筛选因子。

从以上结果, 我们看到, *barnase* 基因不仅在 T_0 代转化体核基因组中被检测出来(图 2A~2D), 而且在 T_1 代各株系不同单株之分离亦获分子水平的证实, 这清楚地表明 *PS1-barnase* 基因被整合到水稻染色体组中。*PS1-barnase* 基因在水稻上的表达导致转基因植株育性降低, 即发生完全不育和部分不育, 这正是 *PS1* 启动子的特点所决定的。*PS1-barnase* 在花粉母细胞减数分裂之前表达, 产生完全不育株, 如 BN3, 11, 21 不育株, *PS1-barnase* 的表达抑制了花粉母细胞的分化、分裂, 进一步影响到花粉的发育。这时 *PS1* 启动子的功能类似烟草上的 *TA29*。而当 *PS1-barnase* 表达发生在花粉粒发育期, 则导致部分不育。Zou 等(1994)^[8] 和 Zhan 等(1996)^[9] 在烟草转基因植株上也报道了相似结果。转基因的遗传在大部分植株中基本符合 1~3 个插入位点的孟德尔式遗传。上述结果表明运用 *PS1* 启动子和细胞败育基因的策略, 诱导水稻雄性不育是可行的, 值得在农作物杂种优势的应用中进一步研究。

致谢: 作者衷心感谢 Alice Cheung 博士(Yale University, U. S. A)和 Claude M Fauquet 博士(The Scripps Research Institute, U. S. A)分别提供的 *PS1-barnase* 质粒和 pILTAB227 质粒, 同时我们也非常感谢张世平博士(The Scripps Research Institute, U. S. A)提供的 Basmati-1 水稻种子。

参 考 文 献

- 1 Strauss S H, W H Rottmann, A M Brunner, et al. Molecular Breeding 1995, 1: 5~26

- 2 Hartley R W. J Mol Biol, 1988, 202: 913~915
- 3 Pappenheimer A M Jr. Diphtheria Toxin Annu Rev Biochem, 1977, 46: 69~94
- 4 Paul W, R Hodge, S Smartt, *et al.* Plant Mol Biol, 1992, 19: 611~622
- 5 Schultz E A, F B Pickett, G W Haughn. Plant Cell, 1991, 2: 1221~1237
- 6 Mariani C, R B Goldberg, J Leemans. Society for Experimental Biology, 1991, 217~227
- 7 Mariai C, M De Beuckeleer, J Truettner, *et al.* Nature, 1990, 347: 737~741
- 8 Zou J T, X Y Zhan, H Wang *et al.* Am Jour Bot, 1994, 81: 552~561
- 9 Zhan X Y, Henming Wu, Alice Y Cheung. Sex Plant Reprod, 1996, 8: 299~307
- 10 彭仁旺, 周雪荣, 方荣强等. 遗传学报, 1996, 23: 84
- 11 Ohira K, K Ojima, A Fujiwara. Plant Cell Physiol 1973, 14: 1113~1121
- 12 Zhang S, Lily Chen, Rongda *et al.* Plant Cell Reports, 1996, 15: 465~469
- 13 Potrykus L, C T Harms, H Lorz. Theo Appl Genet, 1979, 54: 209~214
- 14 Dellaporta SL, J Wood, J B Hicks. Plant Mol Biol Rep, 1983, 1: 19~21
- 15 J Sambrook, E F Fritsch, T Maniatis. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 486~487
- 16 Swaminathan M S. Science, 1982, 218: 967~972
- 17 Wu R, E Kemmerer, D Mcelroy. Gene Manipulation in Plant Improvement, 1990, 251~263
- 18 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣等. 植物遗传转化技术手册, 北京: 科学出版社, 1994. 124

图版说明

图版 1 1A 青油占液体培养 6 周的细胞悬浮系形态 1B Basmati-1 抗性愈伤在包含 30 mg/L hygB NB 培养基上选择
1C 青油占抗性愈伤在 50 mg/LCC 再生培养基上苗的形成 1D 不育转化株花粉粒 I-KI 溶液染色 1E Basmati-1
不育转化株(左)和阴性对照(右) 1F 人工授粉后, 不育株形成种子

Explanation of plates

Plate 1 1A: Morphology of cell suspension culture of Qingyouzhan 6 weeks after initiation; 1B: Resistant calli of Basmati-1 growing on NB medium containing 30 mg/L hygromycin for selection; 1C: Shoots formation from resistant calli of Qingyouzhan on 50 mg/L hygromycin CC regeneration medium; 1D: Pollen grains from a *PS1-barnase* positive plant; 1E: BN male sterile transformant (left) and negative control of Basmati-1(right); 1F: seeds produced from male sterile transgenic plant of Basmati-1 by crossing to a non-transformant

图版 2 2A~2C 是 Basmati-1、2D 是青油占 T_0 转基因植株叶片总 DNA Southern 杂交图谱

2A)1: 质粒 *PS1-barnase* 2: 阴性对照: 未转化植株 3~4: BN21 未消化和消化 DNA 5~6: BN22 7~8: BN11 9~10: BN10

2B)1: 质粒 *PS1-barnase* 2: 阴性对照: 未转化植株 3: 阴性植株 4: BN17 5: BN18 6: BN15 7: BN16 8: BN19 9: BN23 10: BN5

2C)1: 质粒 *PS1-barnase* 2: 阴性对照: 未转化植株 3~4: BN2 5~6: BN6 7~8: BN8 9~10: BN3

2D)1: 质粒 *PS1-barnase* 2: 阴性对照: 未转化植株 3: 阴性植株 4: Qing-2 5: Qing-1 6: Qing-3 7: Qing-3 8: 阴性植株 9: Qing-1 10: Qing-2

2E~2G: Basmati-1 转基因植株后代(F_1 或 T_1)点杂交图谱

2E)1: 质粒 *PS1-barnase* 2: 阴性对照: 未转化植株 2~24: BN22×control 组合种子后代

2F)1: 质粒 *PS1-barnase* 2: 阴性对照: 未转化植株 3~19: BN11×control 组合种子后代

2G)1: 质粒 *PS1-barnase* 2: 阴性对照: 未转化植株 3~70: BN1 自交种子后代(T_1)

Plate 2 Leaf genomic DNA of Southern blot analysis: 2A~2C for Basmati-1, 2D for Qingyouzhan 2A: Lane 1: Plasmid *PS1-barnase*; lane 2: Negative control; non-transformant; lane 3~4: undigested and digested DNA for BN21; lane 5~6: BN22; lane 7~8: BN11; lane 9~10: BN10; 2B: Lane 1: Plasmid *PS1-barnase*; lane 2: Negative control; non-transformant 3: neative plant; lane 4: BN17; lane 5: BN18; lane 6: BN15; lane 7: BN16; lane 8: BN1; lane 9: BN23; lane 10: BN5; 2C: Lane 1: Plasmid *PS1-barnase*; lane 2: Negative control; Non-transformant; lane 3~4: BN2; lane 5~6: BN6; lane 7~8: BN8; lane 9~10: BN3; 2D: Lane 1: Plasmid *PS1-barnase*; lane 2: Negative control; non-transformant; lane 3: negative plant; lane 4: Qing2; lane 5: Qing-1; lane 6: Qing-3; lane 7: Qing-3; lane 8: negative plant; lane 9: Qing-1; lane 10: Qing-2

2E~2G: Dot blot analysis of the progeny of Basmati-1 transgenic plants

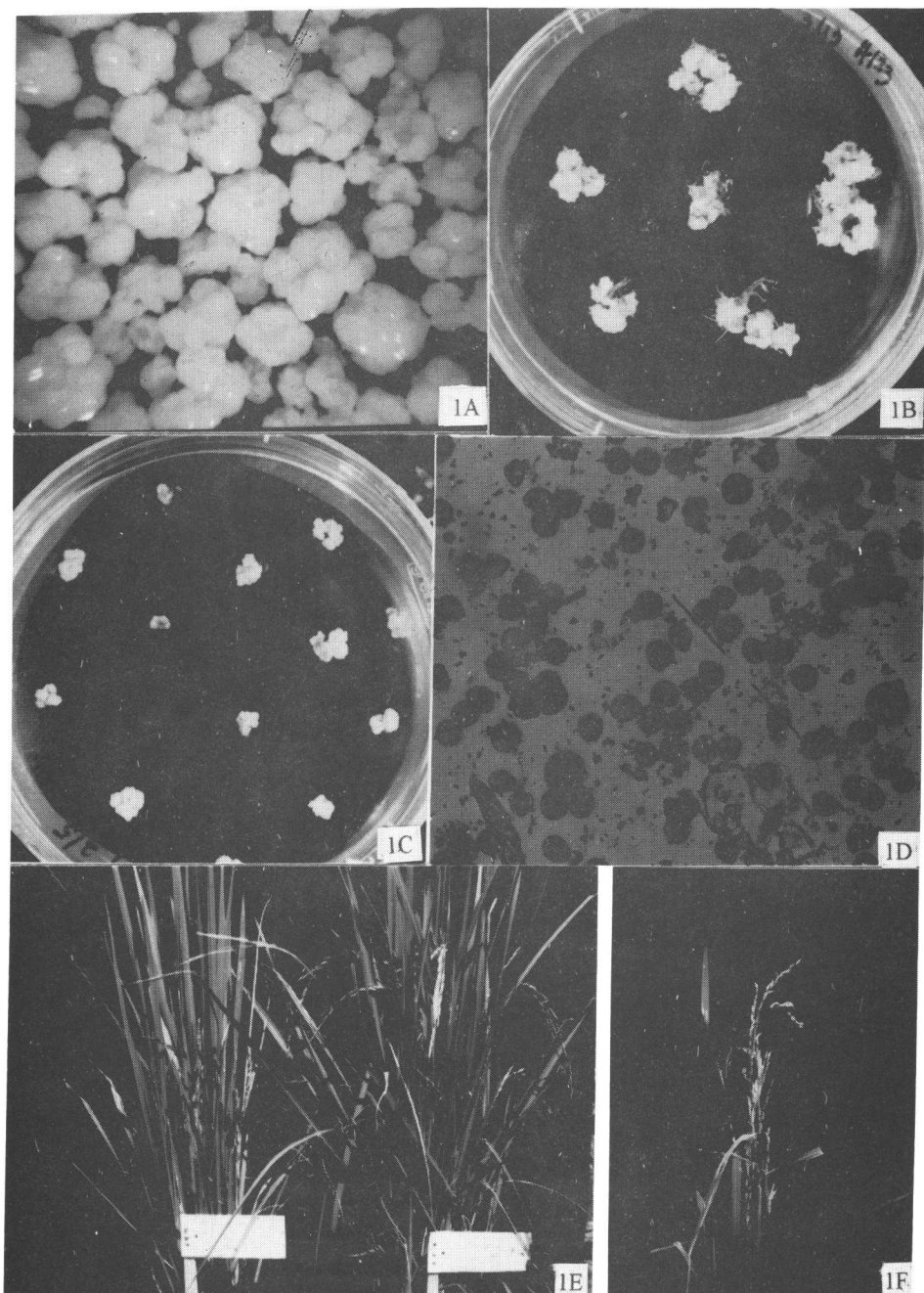
2E: 1: Plasmid *PS1-barnase*; 2: Negative control; 3~24: the progeny of BN22×control; 2F: 1: Plasmid *PS1-barnase*; 2: Negative control; 3~19: the progeny of BN11×control; 2G: 1: Plasmid *PS1-barnase*; 2: Negative control; 3~70: the progeny of BN1 selfing

陶利珍等：花粉特异性核糖核酸酶基因诱导籼稻雄性不育及其遗传研究

图版 I

Tao Lizhen et al. : Studies on Male Sterile *Indica* Rice Induced by a Pollen Specific
Ribonuclease Gene and Its Inheritance

Plate I



陶利珍等：花粉特异性核糖核酸酶基因诱导籼稻雄性不育及其遗传研究

图版 II

Tao Lizhen et al. : Studies on Male Sterile *Indica* Rice Induced by a Pollen Specific
Ribonuclease Gene and Its Inheritance

Plate II

