[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[6]
C12N 15/82
C12N 9/14

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 97198244.9

[43]公开日 1999年10月13日

[11]公开号 CN 1231699A

[22]申请日 97.9.15 [21]申请号 97198244.9
[30]优先权
[32]96.9.26 [33]DE [31]19639463.5
[86]国际申请 PCT/EP97/05037 97.9.15
[87]国际公布 WO98/13504 德 98.4.2
[85]进入国家阶段日期 99.3.25
[71]申请人 赫彻斯特－舍林农业发展有限公司
地址 联邦德国柏林
[72]发明人 K·巴特施
[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 周中琦

权利要求书1页 说明书7页 附图页数0页

[54]发明名称 产生雌性不育植株的方法

[57]摘要

本发明公开了利用组织特异性启动子产生转基因植物的方法。这些植物特定部 分的发育可以有目的地被阻止。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 制备包含可选择性破坏的植株部分的转基因植物的方法，其特征在于将脱乙酰基酶基因置于组织特异性启动子的控制下，并且通过用N－乙酰基－PTC或N－乙酰基－PTT适当适时处理引起有关组织的部分死亡。

2. 制备包含可选择性破坏的植株部分的转基因植物的方法，其特征在于该植物具有对PTC的抗性，此外含有受组织特异性启动子控制的脱乙酰基酶基因，并且通过用PTC或PTT适当适时处理引起有关的组织部分死亡。

3. 根据权利要求1或2所述的方法，其特征在于脱乙酰基酶基因来源于土壤微生物，并用N－乙酰基－PTC或PTC处理植物。

4. 根据权利要求1和/或2所述的方法，其特征在于脱乙酰基酶基因的表达受特异地在雌性器官中有活性的启动子控制。

5. 根据权利要求1，2，3或4中的至少一项所述的方法，其特征在于得到雌性不育植株。

6. 雌性不育植株或其部分，可以通过根据权利要求1所述的方法制备。

说　　明　　书

产生雌性不育植株的方法

本发明涉及在采用组织特异性启动子的同时使用脱乙酰基酶基因(dea 基因)制备转基因植物。在这些转基因植物中，可以有意地阻止特定植株部分的发育。

膦丝菌素(PCT, 2-氨基-4-甲基膦基丁酸)是谷氨酰胺合成酶(GS)的抑制剂。PTC 是抗菌的膦丝菌素丙氨酰丙氨酸(phosphinothricylalanylalanine) (PTT)的“构件”，该三肽(PTT)具有抵抗格兰氏阳性菌、格兰氏阴性菌和真菌灰葡萄孢(Botrytis cinerea)的活性。PTT 由绿色产色链霉菌(streptomyces viridochro-mogenes)菌株 TÜ494 合成，该菌株已保藏于德意志微生物保藏中心，保藏号为 DSM 40736 和 DSM 4112，可从此处获得该菌株。从德国专利说明书 2717440 中可知 PTC 作用为完全除草剂。已公开的申请(EP-A-0257542)中描述了如何用膦丝菌素 N-乙酰基转移酶(pat)基因来制备除草剂抗性植物。由 pat 基因编码的膦丝菌素 N-乙酰基转移酶修饰细胞内出现的 PTC 并消除此除草剂的毒性。

在此，本发明描述使用脱乙酰基酶基因(dea)制备雌性不育植株，脱乙酰基酶表达产物能在细胞内使 N-乙酰膦丝菌素(N-Ac-PTC)和/或 N-Ac-PTT 脱去乙酰基，从而恢复它们的抗菌活性。

N-乙酰膦丝菌素三肽脱乙酰基酶基因可从绿色产色链霉菌 TÜ494 中分离。dea 基因位于 pat 基因下游区已知的 4.0kb BamHI 片段上(EP-A-0257542)。此基因位于 BglII/BamHI 片段上，并由序列（图 1 和表 1）精确定位。由 DNA 序列得出蛋白质序列。

可以使用在细菌和植物中识别的 ATG 密码作为翻译起始密码子；形成 Shine-Dalgarno (SD) 序列。脱乙酰基酶基因编码 PTT 生物合成中的最后步骤，即使无活性的 N-乙酰膦丝菌丝三肽脱去乙酰基以形成有活性的 PTT。

已知许多酶的特异性并不限于一种底物。例如， pat 基因编码的膦丝菌素 N-乙酰基转移酶实际上在 PTT 的生物合成中用于使脱甲基-PTC 乙酰化，并且由于缺少特异性，它可用于消除 PTC 的毒性。通过过量表达 dea 基因(使用合适的启动子或通过克隆入高拷贝的载体)，缺乏特异性的 N-乙酰基-PTT 脱乙酰基酶现已用于活化 N-乙酰基膦丝菌素。

可从大肠杆菌中分离到其它 dea 基因。已发现与其它细菌（如根瘤菌和链霉菌）相反，大肠杆菌中，在 pat 基因克隆入合适表达载体后，在所谓 pat 分析[Inge Broer 的学位论文， Bielefeld 大学生物学系，绿色产色链霉菌(S. viridochromogenes)膦丝菌素 N-乙酰基转移酶基因在烟草中的表达，第 42 - 43 页， 1989]中检测不到活性(Strauch 等，基因，63， 65 - 74， 1988； Wohlleben 等,基因， 70， 25 - 37， 1988)。此外，当 pat 基因在大肠杆菌中以低拷贝数存在时，由于内源脱乙酰基酶消除了膦丝菌素 N-乙酰基转移酶的作用，所以 pat 不能赋予对 PTT 的抗性。最后，脱乙酰基酶的活性可以直接由加入 N - 乙酰膦丝菌素后出现对 GS 活性的有效抑制来证明。脱乙酰基酶将 N-Ac-PTC 转化为 PTC，然后 PTC 以已知方式抑制 GS，这种抑制可在γ-谷氨酰转移酶分析中得到测定(Bender 等，细菌学杂志， 129， 1001 - 1009， 1977)。这是由于大肠杆菌具有内源脱乙酰基酶活性。

从文献中可知大肠杆菌的 argE 突变体中明显不存在脱乙酰基酶的活性(Baumberg, Molec. Gen. Genetics, 106, 162-173, 1970)。其它大肠杆菌脱乙酰基酶突变体也容易在经典的诱变(Delic 等, Mut. Res., 9, 167-182, 1970; Drake 和 Baltz,生物化学年鉴, 45， 11-38, 1976)或 Tn5 诱变(Kleckner, 遗传学年鉴, 15, 341-404, 1981)后进行筛选。这样的突变体可在加有 PTT 的基本培养基上得到鉴定，这是因为只有它们能在用克隆入低拷贝数载体的 pat 基因转化以后生长。

因此大肠杆菌脱乙酰基酶基因可以通过使用常规方法(Maniatis 等，分子克隆：实验手册, Gold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harber, New York, 1982)例如在大肠杆菌 argE 突变体中或在新分离的突变体中构建基因文库来分离。

分离其它脱乙酰基酶基因的方法可从上述方法推出，即：分离新的

尽管存在低拷贝数载体上的 pat 基因但仍对 PTT 敏感的生物体，随后分离脱乙酰基酶基因。

本发明另一方面是使用 pat 和 dea 基因并与组织特异性启动子一起用于有意地阻止植物特定组织的发育。一个特殊的应用例子是形成雌性不育植株的例子。

在植物育种中，杂交种子的生产依赖于以高度可靠性防止亲本植物自体受精。在育种中所采用的雄性不育突变体在许多植物种中天然存在。细胞质雄性不育性(cms)的分子抗理至今尚未完全弄清楚。此外许多作物品种，如甜菜，没有任何 cms 变体。因此应用遗传工程途径产生所有重要作物品种的特定不育突变体，对农业有很大益处。比利时 PGS 公司已在专利申请 PCT/EP 89/ 00495 中提供了这样的方法。该方法是基于破坏花粉亲本细胞周围的组织（绒毡层）。为此目的，将核糖核酸酶基因与绒毡层特异的启动子(Mariani 等，自然, 347, 737-741, 1990)融合。该基因在绒毡层细胞中专一表达，确保选择性地破坏该组织并由此防止了成熟花粉的形成。根据此专利，携带此基因的植物只能通过异花传粉形成种子。

此系统的重要缺点是此植物的子代也是雄性不育，因此在形成种子不得不靠自体受精的情况下在田间不能形成种子。成功地形成种子的唯一可能性是杂交的雄性配偶体在后代中携带能抵销核糖核酸酶效应的基因。根据上述公开的专利应用，预计可以由芽胞杆菌 RNA 酶抑制剂(barstar)基因来实现这一点。事实上，只有遗传修饰的转基因的配偶体可以在此文献的杂交中使用。

产生雌性不育植株(fs 植物)的方法在下面说明，该方法允许转基因亲本植物与同种的任何配偶体杂交。为了实现这一点，将受选择性地在雌性器官中有活性的启动子控制的 dea 基因与组成型表达的 pat 基因适当结合。通过施用 PTC 和/或 PTT，特异地抑制细胞中的谷氨酰胺合成酶，并造成这些细胞死亡。更简单的系统包括制备仅含一种受组织特异性启动子（在此例中为雌性特异的启动子）控制的外来基因即 dea 基因的转基因植物，然后给植物施用 N-Ac-PTC 和/或 N-Ac-PTT 。

总之，本发明因而包括在脱乙酰基酶基因的帮助下的组织特异性抑

制作用。

用受在植物中表现组织特异活性的启动子控制的脱乙酰基酶基因，转化由于pat活性而对PTT和/或PTC有抗性的植物(例如按EP 0257542或EP0242236中所述的制备）。在施用PTT或PTC之后，脱乙酰基酶基因的表达在相应的组织中导致膦丝菌素N-乙酰基转移酶活性的中和。然后这些组织被选择性地杀死，而植物的其它部分具有抗性。

可以通过使用N-乙酰膦丝菌素或N-乙酰膦丝菌素－三肽使系统简化。而这两种物质都不具除草剂活性，它们被植物吸收转运并且不立即降解。至今尚未在植物中检测到对N－乙酰膦丝菌素和N－乙酰膦丝菌－三肽的脱乙酰活性。这样，上述两基因系统可以减为单基因系统，并由此决定性地简化为下面详细描述的：可以用受组织特异性启动子控制的链霉菌起源的脱乙酰基酶基因转化任何植物。在施用N－乙酰膦丝菌素或N－乙酰膦丝菌素－三肽之后，组织特异性表达导致相应组织的立即死亡。

所有已描述的已证明在特定组织，优选地雌性器官中选择性表达的启动子都可用作组织特异性启动子，在这方面，术语雌性器官包含配子体和在其周围或与其的毗连组织，例如雌蕊群（心皮）、胚珠、胎座、雌蕊（子房、花柱和柱头）。

例如，Robert等描述了源自油菜的柱头特异启动子（Robert等，1994）。也已有对雌蕊特异启动子的描述（Sato等，1991，Dzelzkalns等，1993，WO 94/25613）。

而且虽不是特异地在雌性器官中有选择活性，但是在对有功能的花、胚和种子发育必须的组织中表达的启动子也适用于根据本发明所述的方法。

当然所有新分离的具有相似特性的启动子也都是合适的。除了组织特异性启动子外，也可使用受到另一类型调控（例如时序的、逆境决定的或环境依赖的）和以组织特异方式起作用的那些启动子。

而且这些方法提供分析细胞调控差异的可能性并产生已有意阻止其特定部分发育的植物。本方法可优选地用于制备雌性不育植株。

实施例1：将脱乙酰基酶编码区与真核生物转录信号融合。

从大肠杆菌菌株中分离 pPRI 质粒(见 EP - 0 257 542)并用 BamHI 和 BglII 切割。将经酶切的 DNA 在琼脂糖凝胶中分离，从胶中分离 0.9kb 片段。同样用 BamHI 对 pROKI 载体(Baulcombe 等，自然， 321， 446 - 449， 1986)进行限制性酶切。混合这两种混合物并连接。按照大肠杆菌 S17.1 的方法(Simon 等，生物/技术， 1， 784 - 791， 1983) 转化连接混合物。于 37 ℃培养 12 小时后将在含卡那霉素的培养基上生长的菌落转移到硝酸纤维素滤膜上并进行裂解。将细菌 DNA 固定在膜上。将从琼脂糖凝胶中分离的 0.9kb 片段在 100 ℃温育形成单链，然后用 Klenow 聚合酶和洋地黄毒苷标记的核苷酸合成缺失的链。使用标记链作为探针与结合于膜上的细菌 DNA 杂交。杂交的克隆用抗体反应检测。阳性克隆的 DNA 用 Qiagen 裂解法分离并用 BamHI/EcoRI 和 BamHI/HindIII 酶切。该限制性酶切可决定插入的 0.9kb 片段的方向。具有方向 I 和方向 II 的质粒分别称为 pIB 17.1 和 pIB17.2 表示(见图 2)。

实施例 2： 检测脱乙酰基酶基因对 N - 乙酰基 - PTC 和 N - 乙酰基 - PTT 的脱乙酰基作用。

证明在 pROK1 载体中克隆的真核生物转录信号也可以在萨赫勒中华根瘤菌(Rhizobium meliloti)、根瘤土壤杆菌和大肠杆菌中表达。

通过二因子杂交将 pIB17.1 和 pIB17.2 质粒转移到萨赫勒中华根瘤菌菌株 2011 中。将萨赫勒中华根瘤菌野生型菌株与放射性标记的 N - 乙酰基 - PTC 一起温育，可以证明此菌株不能使 N-乙酰基-PTC 脱去乙酰基(将携带 pIB 17.1 的菌株与 N - 乙酰基 - PTC 和 N - 乙酰基 - PTT 一起温育后，用薄层层析测定脱乙酰基作用)。也可以证实赫勒中华根瘤菌非常敏感地对 PTC 和 PTT 反应。因此脱乙酰基作用可以通过认为由释放的 PTC 引起的对萨赫勒中华根瘤菌谷氨酰胺合成酶的抑制作用得到证实。

实施例 3： 将修饰的脱乙酰基酶基因转入烟草中

用二因子杂交将实施例 1 中修饰的脱乙酰基酶基因转入根瘤土壤杆菌 LBA4404 中。将烟草叶块与生成的菌株 LBA 4404/17.1 和 LBA4404/17.2 一起温育，三天后转移到含有卡那霉素的诱导长苗的培养基中。可用 Southern 杂交测验再生卡那霉素抗性苗中脱乙酰基酶基因的

存在。用 N－乙酰基－ PTC 或 N－乙酰基－ PTT 处理后，植物分别被所释放的 PTC 或 PTT 杀死。

实施例 4：构建用于在大肠杆菌和烟草原生质体中暂时表达修饰的脱乙酰基酶基因的载体。

来自 pIB17.1 和 pIB17.2 的修饰的脱乙酰基酶基因通过用 EcoRI/HindIII 消化从质粒中切出。将限制性 DNA 在琼脂糖凝胶上分离，并分别分离 0.9kb 片段。载体 pSVB28(Arnold 和 Pühler, 基因, 70, 171-179, 1988)也用 EcoRI/HindIII 酶切。合并这两种混合物并连接。在转化入β－半乳糖苷酶阴性的大肠杆菌菌株 JM83 之后，所有带有空载体的菌落表现蓝色生色作用，而带有其中已插入脱乙酰基酶基因的载体的菌落仍显白色。从已用此方法鉴定的克隆中分离 DNA 并用 EcoRI/HindIII 消化。根据限制性图谱，有可能对含有修饰的脱乙酰基酶基因的克隆进行鉴定。所构建的载体命名为 pIB27.1 和 pIB27.2（见图 2）。它们以高拷贝数存在于大肠杆菌中。

实施例 5：修饰的脱乙酰基酶基因在烟草原生质体中瞬间表达。

从实施例 4 中构建的大肠杆菌菌株中分离质粒 DNA，将烟草幼叶与消化酶类一起温育 20 小时。纯化从叶骨架中沉降出来的原生质体并在含有聚乙二醇（ PEG ）和分离的 DNA 的转移缓冲液中温育。随后洗涤原生质体并将其重新悬浮于培养液（ K3 培养基）中，在无光照条件下培养 3 天之后，破碎新生的原生质体，并将粗提取物与放射性标记的 N－乙酰基－ PTC 和 N－乙酰基－ PTT 一起温育，可用薄层层析分别检测脱乙酰基的 PTC 或 PTT 。

实施例 6：使用受绒毡层特异启动子控制的绿色产色链霉菌脱乙酰基酶基因制备雄性不育作物植株的方法。

将绿色产色链霉菌脱乙酰基酶基因与雌蕊特异启动子融合，并通过土壤杆菌介导的叶盘转化法导入烟草细胞。在从这些细胞再生的植株开花之前的任何时候用 N－乙酰基－ PTC 或 N－乙酰基－ PTT 注射。可以证明 N－乙酰基－ PTC 在植物细胞中稳定并已转运到所有的细胞中。对于野生型植物，这两种物质都具有可识别的阴性结果。一旦第一个雌蕊细胞形成，它们就开始表达脱乙酰基酶基因。脱乙酰基酶使贮存在细

胞中的 N－乙酰基－ PTC 或 N－乙酰基－ PTT 脱去乙酰基并由此转变为活性形式。此活性形式抑制细胞中谷氨酰胺合成酶并由此导致细胞迅速死亡。功能性的胚或种子不能再形成。尽管如此，雄性生殖器官的发育也受到损伤。此外，也中断了脱乙酰基酶的合成。周围的细胞未被破坏。如果植物不用 N－乙酰基－ PTC 或 N－乙酰基－ PTT 处理，它是完全可育的。因此没有必要用杂交的雄配偶体的基因中和 fs 。同时，该植物含有精确限定的突变，它对植物的活力和可利用性没有影响。

参考文献:

Dzelzkatns 等，植物细胞，第 5 卷， 855-863， 1993 年 8 月。

Robert 等，植物分子生物学， 26， 1217 － 1222， 1994 。

Sato 等，植物细胞，第 3 卷， 867 － 876， 1991 年 9 月。