



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103981211 B

(45) 授权公告日 2016. 07. 06

(21) 申请号 201410209551. 9

(22) 申请日 2014. 05. 16

(73) 专利权人 安徽省农业科学院水稻研究所  
地址 230031 安徽省合肥市农科南路 40 号

(72) 发明人 倪大虎 杨剑波 魏鹏程 马卉  
李浩 李莉 倪金龙 陆徐忠  
宋丰顺 杨亚春

(74) 专利代理机构 北京律谱知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11457

代理人 黄云铎

(51) Int. Cl.

C12N 15/82(2006. 01)

A01H 4/00(2006. 01)

A01H 5/00(2006. 01)

审查员 耿锬锬

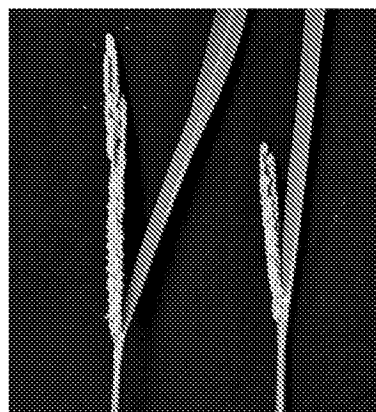
权利要求书1页 说明书7页  
序列表5页 附图1页

(54) 发明名称

一种创制闭颖授粉水稻材料的育种方法

(57) 摘要

本发明涉及一种创制闭颖授粉水稻材料的育种方法,包含以下步骤:在水稻闭颖授粉决定基因 DEP2 外显子区选取靶标片段并构建植物 CRISPR/Cas9 打靶重组载体,导入水稻细胞并再生成苗,通过剪切造成水稻细胞 DEP2 基因出现功能缺失突变,在通过对再生株系基因组目标片段的测序,获取携带两个等位 DEP2 基因同时发生功能缺失突变的株系,经过表型鉴定,确认再生植株开花授粉由开颖转为闭颖。实验表明,本方法可快速获得闭颖授粉水稻材料。



1. 一种创制闭颖授粉水稻材料的育种方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

步骤1,在水稻闭颖授粉决定基因DEP2外显子区选取靶标片段;

其中,所述靶标片段的双链结构中一条链具有NGG结构,其中N代表碱基A、T、G、C中的任意一种;

步骤2,按照靶标序列的核苷酸排列顺序,构建用于水稻DEP2基因打靶的CRISPR/Cas9重组载体,所述重组载体包含向导RNA表达框和Cas9核酸酶表达框,所述向导RNA表达框包含所述靶标片段;

步骤3,将所述重组载体导入水稻细胞,使所述向导RNA表达框和所述Cas9核酸酶表达框在水稻细胞中共同表达,剪切DEP2基因的双链的所述靶标片段,诱发所述水稻细胞自身的DNA修复功能,在靶标位点随机插入或缺失碱基,实现细胞内DEP2基因的功能缺失突变;

步骤4,用导入所述重组载体的水稻细胞再生植株;

步骤5,对所述再生植株中DEP2基因包含靶标片段的DNA区段进行测序;

步骤6,选择两个等位DEP2基因都出现功能缺失突变的再生植株,进行表型鉴定,观察所述再生植株的开花习性,挑取完全闭颖授粉的植株,作为所创制的闭颖授粉水稻材料,

其中,所述向导RNA表达框能够在水稻细胞内表达并且核苷酸序列如Seq ID No.1所示;所述Cas9核酸酶表达框能够在水稻细胞内表达并且核苷酸序列如Seq ID No.2所示。

2. 根据权利要求1所述的创制闭颖授粉水稻材料的育种方法,其特征在于,所述靶标片段的双链结构中一条链具有5'-(N)<sub>x</sub>-NGG-3'结构,其中,(N)<sub>x</sub>表示数目为X的一条碱基序列{N<sub>1</sub>,N<sub>2</sub>……N<sub>x</sub>},N<sub>1</sub>,N<sub>2</sub>……N<sub>x</sub>中的每一个表示A、G、C、T中的任意一个。

3. 根据权利要求2所述的创制闭颖授粉水稻材料的育种方法,其特征在于,所述向导RNA表达框包括:水稻U6启动子,其核苷酸序列如Seq ID No.1第1至246位所示;结构特征为(N)<sub>x</sub>的靶标序列和人工合成的sgRNA骨架序列,其核苷酸序列如Seq ID No.1第266至349位所示;和Poly-T终止子,其核苷酸序列如Seq ID No.1第350至357位所示,

所述Cas9核酸酶表达框包括:玉米ZmUBI启动子,其核苷酸序列如Seq ID No.2第1至2031位所示;植物偏好密码子改造后的Cas9编码序列,其核苷酸序列如Seq ID No.2第2034至6305位所示;以及tNOS终止子,其核苷酸序列如Seq ID No.2第6347至6599位所示。

4. 根据权利要求1所述的创制闭颖授粉水稻材料的育种方法,其特征在于,

所述向导RNA表达框包括CRISPR RNA序列,其具有所述靶标片段的5'-(N)<sub>x</sub>-NGG-3'中的(N)<sub>x</sub>或与之互补的序列。

5. 根据权利要求1所述的创制闭颖授粉水稻材料的育种方法,其特征在于,所述靶标片段位于水稻闭颖授粉决定基因DEP2的第一、第二和/或第三外显子上。

## 一种创制闭颖授粉水稻材料的育种方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于水稻生物技术育种领域,具体涉及一种快速创制闭颖授粉水稻材料的选育方法。

### 背景技术

[0002] 基因漂移(或基因逃逸, Gene flow),是指一种生物的目标基因向附近野生近缘种自发转移,导致附近野生近缘种发生内在变化,具有目标基因的一些优势特征,形成新物种,以致整个生态环境发生结构性的变化。根据转基因漂移对象的不同,可以分为转基因作物的外源基因向其非转基因作物、野生近缘种和同一物种的杂草类型逃逸。基因漂移的途径主要包括花粉漂移、种子传播(或扩散)和无性繁殖器官的移动等。基因漂移一般需要一定的媒介,如风、昆虫、动物和水等,其中风媒和虫媒传粉是最为有效的方式,而花粉也可以产生生长距离的漂移

[0003] 闭花受精(cleistogamy)是在花朵未开放时成熟花粉粒在花粉囊内萌发,花粉管穿出花粉囊,伸向柱头,进入子房,把精子送入胚囊,完成受精。被子植物(60个科约300种植物)中广泛存在着闭花受精现象。栽培作物中,大豆、豌豆属于严格的闭花受精作物,水稻、大麦、棉花、高粱中也存在闭花受精类型。闭花受精能使植物避免外来花粉干扰而保持纯种,也可以防止自身花粉向外漂移。因此,闭花受精可作为控制基因漂流的途径之一。

[0004] 水稻是典型的开花授精(开颖授粉)的作物。但目前有一些研究分离了部分表现为闭颖性状的水稻突变体,如:单个隐性基因d7决定CL突变体的表型(不正常的护颖,使外颖和内颖结合在一起);单个隐性基因ld(t)[lodiculeless spikelet(t)]突变产生浆片缺失突变体,颖壳不张开;水稻直立穗基因DEP2突变能产生严格的闭颖授粉性状。

[0005] 虽然闭颖材料品种在水稻转基因育种方面具有广阔的应用前景,但是天然的遗传突变资源有限,应用存在一定的技术难度。通过传统的回交导入技术,育种周期漫长,成本较大,且可能导入与突变位点连锁的其他供体基因组片段,对品种选育带来不可预知的风险。因此,人们希望获得一种能够快速定向创制闭颖授粉水稻材料的方法。

### 发明内容

[0006] 针对上述问题,本发明提供了一种创制闭颖授粉水稻材料的育种方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

[0007] 步骤1,在水稻闭颖授粉决定基因DEP2的第一、第二或第三外显子区选取靶标片段;

[0008] 其中,所述靶标片段的双链结构中的一条链具有NGG结构,其中N代表碱基A、T、G、C中的任意一种;

[0009] 步骤2,按照靶标序列的核苷酸排列顺序,构建用于水稻DEP2基因打靶的CRISPR/Cas9重组载体,所述重组载体包含向导RNA表达框和Cas9核酸酶表达框,所述向导RNA表达框包含所述靶标片段;

[0010] 步骤3,将所述重组载体导入水稻细胞,使所述向导RNA表达框和所述Cas9核酸酶表达框在水稻细胞中共同表达,剪切DEP2基因的双链的所述靶标片段,诱发所述水稻细胞自身的DNA修复功能,在靶标位点随机插入或缺失碱基,实现细胞内DEP2基因的功能缺失突变;

[0011] 步骤4,用导入所述重组载体的水稻细胞再生植株;

[0012] 步骤5,对所述再生植株中DEP2基因包含靶标片段的DNA区段进行测序;

[0013] 步骤6,选择两个等位DEP2基因都出现功能缺失突变的再生植株,进行表型鉴定,观察所述再生植株的开花习性,挑取完全闭颖授粉的植株,作为所创制的闭颖授粉水稻材料。

[0014] 优选地,所述靶标片段的双链结构中的一条链具有5'-(N)<sub>x</sub>-NGG-3'结构,其中,(N)<sub>x</sub>表示数目为X的一条碱基序列{N<sub>1</sub>,N<sub>2</sub>……N<sub>x</sub>},N<sub>1</sub>,N<sub>2</sub>……N<sub>x</sub>中的每一个表示A、G、C、T中的任意一个,NGG中的N也代表A、G、C、T中的任意一个。X一般为19或20。

[0015] 优选地,所述重组载体包含向导RNA表达框,其能够在水稻细胞内表达并且核苷酸序列如Seq ID No.1所示,并且所述重组载体包含Cas9核酸酶表达框,其能够在水稻细胞内表达并且核苷酸序列如Seq ID No.2所示。也可以说,另一方面本发明还提供了这种重组载体。

[0016] 优选地,所述向导RNA表达框包括:水稻U6启动子,其核苷酸序列如Seq ID No.1第1至246位所示;结构特征为(N)<sub>x</sub>的靶标序列和人工合成的sgRNA骨架序列,其核苷酸序列如Seq ID No.1第266至349位所示;和Poly-T终止子,其核苷酸序列如Seq ID No.1第350至357位所示,

[0017] 所述Cas9核酸酶表达框包括:玉米ZmUBI启动子,其核苷酸序列如Seq ID No.2第1至2031位所示;植物偏好密码子改造后的Cas9编码序列,其核苷酸序列如Seq ID No.2第2034至6305位所示;以及tNOS终止子,其核苷酸序列如Seq ID No.2第6347至6599位所示。

[0018] 优选地,所述向导RNA表达框包括CRISPR RNA(crRNA)序列,其具有所述靶标片段的5'-(N)<sub>x</sub>-NGG-3'中的(N)<sub>x</sub>或与之互补的序列。

[0019] 在所选的DEP2基因外显子上,具有所述(N)<sub>x</sub>-NGG-3'结构的片段可选为靶标的共有35个。

[0020] 步骤6中所提到功能缺失突变指的是正常DEP2编码序列在靶标位点出现终止子或阅读框移位。

[0021] 所述Cas9核酸酶表达框位于包含所述向导RNA表达框的同一载体中。

[0022] 在步骤3中将所获重组载体导入水稻细胞,从而使细胞同时含有步骤所述靶标片段的向导RNA,Cas9核酸酶。在向导RNA和Cas9核酸酶的共同作用下,DEP2基因的双链靶标片段被剪切,再通过水稻细胞自身的DNA修复功能,最终实现细胞内DEP2基因靶标片段的随机插入和/或随机缺失。

[0023] 所述方法中,将重组载体导入水稻细胞的方法为农杆菌介导的水稻愈伤组织稳定转化。由于在将所获重组载体导入水稻细胞的过程中,是采用农杆菌介导的方法,重组载体被导入到水稻的遗传DNA中,所以在进行剪切时使得水稻的遗传DNA的片段受到剪切。

[0024] 在本发明中,所述再生植物的方法为细胞或组织经过组织培养,获得植株。

[0025] 在步骤5中,可以通过基因组PCR方法克隆再生植株中DEP2基因包含靶标片段的

DNA区段,并对扩增产物测序。所述基因组PCR方法为,针对包含靶标片段的基因组区域,设计位点特异性引物,以再生植株的基因组DNA为模板,扩增所述包含靶标片段的基因组区域。所述扩增产物测序是指,对PCR产物中的目的条带测序。

[0026] 所述两个等位DEP2基因都出现功能缺失突变是指测序结果在DEP2基因靶标位点出现两种功能缺失突变序列,且没有出现野生型序列;

[0027] 其中所述功能缺失突变序列指的是正常DEP2编码序列在靶标位点出现终止子或阅读框移位。

[0028] 向导RNA表达框的核苷酸序列(Seq ID No.1)如下所示:

[0029]

ggatcatgaaccaacggcctggctgtatttgggtggtgtgtagggagatggggagaagaaaagccccgattctctcttcg  
ctgtgatgggctggatgcatgcgggggagcgggagcccaagtacgtgcacggtgagcggccacagggcgagtgtg  
agcgcgagagggcgggaggaacagtttagtaccacattgcccagetaactcgaacgcgaccaacttataaacccgcgc  
gctgtegetttgtgtgGCTCTCCCGCGCCGCTCGgttttagagctatgctgaaaagcatagcaagttaaaataagge  
tagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctttttttt

[0030] Cas9核酸酶表达框的核苷酸序列(Seq ID No.2)如下所示:

[0031]

ctgcagtgacgctgacccggctcgtgccccctctctagagataatgagcattgcatgtctaaagtataaaaaattacc  
acatatttttttgtcacacttgtttgaagtgcagttatctatctttatacatatatttaaactttactctacgaa  
taatataatctatagctactacaataatcagtggttttagagaatcatataaatgaacagttagacatggctctaaag  
gacaattgagtattttgacaacaggactctacagttttatcttttagtgtgcatgtgttctctcttttttttgcaa  
atagcttcaactatataataacttcatccattttat tagtacatccatttagggtttagggttaatggttttttaga  
ctaatttttttagtacatctattttattctattttagcctctaaattaagaaaactaaactctatttttagtttttt  
tatttaataatttagatataaaaatagaataaaaataaagtac taaaaat taaacaaataccctttaagaaattaaaa  
aaactaaggaaacatttttcttgtttcgagtagataatgccagcctgttaaacgccgctgcagagcttaacggacac  
caaccagegaaccagcagcgtcgcgtcgggccaagcgaagcagacggcagcgcacgcctctctgctcgtcctctggacce  
ctctcgagagttccgctccaccgttggacttgcctccgctgctggcattccagaaatgcgtggcggagcggcagacgtg  
agccggcagcggcagcggcctcctcctcctcctcacggcagcgcagctacgggggattcctttcccaccgctccttcg  
ctttcccttctctgccccgcgtaataaatagacacccccccacacctctttcccaacctcgtgtgttctggagc  
gcacacacacacaaccagatctccccaaatccaccgctcggcaccctccgcttcaaggtacgcgctcgtcctcccc  
ccccccccctctctaccttctctagatcggcgttccggctccatgggttagggcccggtagttctacttctgttcatgt  
ttgtgttagatccgtgtttgtgttagatccgtgctgctagcgttcgtacacggatgacgacctgtacgtcagacacgt  
tctgattgctaacttgcagtggttctctttggggaaatcctgggatggctctagccgttccgcagacgggatcgatt  
tcatgatttttttgtttcgttgcatagggtttggttgcccctttctttatttcaatataatgccgtgcacttgtt  
tgtcgggtcatcttttcatgctttttttgtcttgggtgtgatgatgtggtctggttgggcggtcgttctagatcgg  
agtagaattctgtttcaactacctgggtgatttattaattttggatctgtatgtgtgtgccatacatattcatagt  
tacgaattgaagatgatggatggaaatatcgatctagga taggtatacatgttgatgcgggttttactgatgcatat  
acagagatgcctttttgttccgttgggtgtgatgatgtggtgtggttgggcggtcgttccattcgttctagatcggagt  
agaactactgtttcaactacctgggtgatttattaattttggaactgtatgtgtgtgtcatacatcttcatagttac  
gagtttaagatggatggaaatatcgatctagga taggtatacatgttgatgtgggttttactgatgcatatacatga

tggcatatgcagcatctattcatatgctctaacctgagtacctatctattataataaacaagtatgttttataatt  
 attttgatcttgatatacttggatgatggcatatgcagcagctataatgtggatTTTTtagccctgccttcatacgc  
 tatttatttgccttggtactgtttcttttgcgatgctcaccctgttgtttgggtgttacttctgcagcccgggggatc  
 cccaatacttgtatggcgcggccgctctagatggattacaaggaccacgacggggattacaaggaccacgacattg  
 attacaaggatgatgatgacaagatggctccgaagaagaagaggagggtggcatccacggggtgccagctgctgac  
 aagaagtactcgatcgccctcgatattgggactaacctctgttggctgggcccgtgatcaccgacgagtacaagggtcc  
 ctcaaagaagttcaaggctctgggcaacaccgatcggcattccatcaagaagaatctcattggcgctctcctgttgc  
 acagcggcgagacggctgaggctacgcggctcaagcgcaccgcccgcaggcggtacacgcgcaggaagaatcgcatc  
 tgctacctgcaggagatTTTctccaacgagatggcgaagggtgacgattctttctccacaggctggaggagtcatt  
 cctcgtggaggaggataagaagcacgagcggcatccaatctctggcaacattgtcgcagagggtgacctaccacgaga  
 agtacctacgatctaccatctgcggaagaagctcgtggactccacagataaggcggacctccgctgatctacctc  
 gctctggcccacatgattaagttcaggggcatTTTctgatcaggggggactcacaaccggacaatagcgaTgttga  
 caagctgttcatccagctcgtgcagacgtacaaccagctcttcgaggagaacccattaatgcgtcaggcgctcagc  
 cgaaggctatcctgtccgctaggctctcgaagctcggcgctcgagaacctgatcgcaccagctgcccggcgagaag  
 aagaacggcctgttccgggaatctcattgcgctcagcctggggctcagcccaactcaagtcgaatttcgatctcgc  
 tgaggacgccaagctgcagctctccaaggacacatacagcagtgacctggataacctcctggcccagatcggcgatc  
 agtacgggacctgttctcctcgtcgaagaatctgtcggacgccatctctctgtctgatattctcaggggtgaacacc  
 gagattacgaaggctccgctctcagcctccatgatcaagcgtacgacgagcaccatcaggatctgacctctctgaa  
 ggcgctggctcagcgcagctccccgagaagtacaaggagatcttcttcgatcagtcgaagaacggctacgctgggt  
 acattgacggcggggcctctcaggaggagttctacaagttcatcaagccgattctggagaagatggacggcacggag  
 gacgtctggtgaagctcaatcgcgaggacctcctgaggaaagcagcggacattcgataacggcagcatcccacacca  
 gattcatctcggggagctgcacgctatcctgaggaggcaggaggactctaccctttctcaaggataaccgcgaga  
 agatcgagaagattctgactttcaggatcccgtactacgtcggcccactcgttaggggcaactcccgtctcgttgg  
 atgacctgcaagctcagaggagacgatcacgccgtggaacttcgaggagggtggtcgacaagggcgctagcgtcagtc  
 gttcatcagaggatgacgaatttcgacaagaacctgccaaatgagaaggtgctccctaagcactcgtctctgtacg  
 agtacttcacagctctacaacgagctgactaagggtgaagtagtgaccgagggcatgaggaagccggctttcctgtct  
 ggggagcagaagaaggccatcgtggacctcctgttcaagaccaaccggaagggtcacggttaagcagctcaaggagga  
 ctacttcaagaagattgagtgtctcgattcggctcgagatctctggcgttgaggaccgcttcaacgcctccctgggga  
 cctaccacgatctcctgaagatcattaaggataaggacttctggacaacgaggagaatgaggatatacctcgaggac  
 attgtgtgacactcactctgttcgaggaccgggagatgatcaggagcgcctgaagacttacgcccattctctcga  
 tgacaaggctcatgaagcagctcaagaggaggaggtacaccggctgggggaggctgagcaggaagctcatcaacggca  
 ttccgggacaagcagctccgggaagacgatcctcgacttctgaagagcgaTggcttcgcgaaccgcaatttcatgcag  
 ctgattcacgatgacagcctcacattcaaggaggataccagaaggctcaggtgagcggccagggggactcgtctga  
 cgagcatatcgcgaacctcgttggctcgcagctatcaagaaggggattctgcagaccgtgaaggttggtggacgagc  
 tgggtgaaggtcatgggcaggcacaagcctgagaacatcgTcattgagatggcccgggagaatcagaccacgcagaag  
 ggcagaagaactcacgcgagaggatgaagaggatcgaggagggeattaaaggagctgggggtcccagatcctcaagga  
 gcaccgggtggagaacacgcagctgcagaatgagaagctctacctgtactacctccagaatggcccgatataTgatg  
 tggaccaggagctggatattaacaggctcagcgattacgacgtcgatcataatcgttccacagtcattctgaaggat  
 gactccattgacaacaaggtcctcaccaggctcgacaagaaccggggcaagctctgataatgttctctcagaggaggt

cgTTaagaagatgaagaactactggcgccagctcctgaaTgccaagctgatcacgcagcggaagttcgataacctca  
 caaaggctgagagggggcgggctctctgagctggacaaggcgggcttcatcaagaggcagctggctgagacacggcag  
 atcactaagcacgTtgcgcagattctcgactcacggatgaacactaagtacgatgagaatgacaagctgatccgcga  
 ggtgaaggTcatcaccctgaagTcaaagctcgTctccgacttcaggaaggatttccagTtctacaaggTtcgggaga  
 tcaacaattaccaccatgcccattgacgcgtacctgaacgcggTggTcggcacagctctgatcaagaagTaccCAAag  
 ctcgagagcgagTtctgtgtacggggactacaaggTttacgatgtgaggaagatgatcgccaagTcggagcaggagat  
 TggcaaggctaccgccaagTacttcttctactctaacattatgaatttcttcaagacagagatcactctggccaatg  
 gcgagatccggaagcgcCCCCctatcgagacgaacggcgagacgggggagatcgTgtgggacaagggcagggaTtct  
 gcgaccgtcaggaaggTtctctccatgccacaagTgaatatcgTcaagaagacagagTccagactggcgggTtctc  
 taaggagTcaattctgcctaagcggaaacagcgcacaagctcatcgcccgaagaaggactgggatccgaagaagTacg  
 gcgggTtcgacagccccactgtggcctactcggtcctggTtTgtggcgaaggTtgagaaggcgaagTccaagaagctc  
 aagagcgtgaaggagctgctggggatcacgatTatggagcgtccagcttcgagaagaaccgatcgatttctctgga  
 ggcaagggttacaaggaggtgaagaaggacctgatcattaaagTccccaaagTactactcttctgagctgggaaagc  
 gcaggaagcggatgctggcttccgctggcgagctgcagaaggggaaacgagctggctctgccgtccaagTatgtgaac  
 ttctctacctggcctcccactacgagaagctcaaggcagccccgaggacaacgagcagaagcagctgttctgctega  
 gcagcacaagcattacctcgacgagatcattgagcagatttccgagTtctccaagcgcgtgatcctggccgacgcga  
 atctggataaggTctctcccgctacaacaagcaccgcgacaagccaaTcaggagcaggctgagaatatcattcat  
 ctcttaccctgacgaacctcggcgccccTgctgcttcaagTacttcgacacaactatcgatcgcaagaggtacac  
 aagcactaaggaggtctggacgcgacctcatccaccagTcgattaccggcctctacgagacgcgcacTcgacctgt  
 ctgagctcgggggcgacaagcggccagcggcgacgaagaaggcggggcaggcgaagaagaagaagTgagctcaggcc  
 tccatacaagTattggggatccgaatttccccgatcgTtcaaacattTggcaataaagTtctttaaagattgaatcct  
 gTtgcggTctTgcgatgattatcatataattctgTtgaattacgttaagcatgtaataattaacatgtaatgcat  
 gacgttatttatgagatgggtttttatgattagatcccgaattatacatttaacgcatagaaaacaaaat  
 agcgcgcaaacTaggataaattatcgcgcgcggtgtcatctatgttactagatc

[0032] 采用本发明的育种方法,能够快速创制出闭颖授粉的水稻品种,时间短,效果明显。

[0033] 具体而言,相对于传统育种方法,本方法有以下优点

[0034] ①,育种周期短,整个材料定向创制过程可在7个月内完成,而传统杂交-回交方法至少需要3~5年时间。

[0035] ②,只改变了受体品种的一个基因,所获材料除变为闭颖授粉之外其他农艺性状不变,而传统回交方法会导入与DEP2连锁的其他基因,可能影响受体品种的农艺性状。

**附图说明**

[0036] 图1为农杆菌介导的水稻DEP2基因CRISPR/Cas9载体转基因株系中对水稻DEP2基因定点突变测序检测的部分结果图,其中WT表示为野生型基因,“-”表示发生了删除突变的序列,“+”表示发生了插入突变的序列,“-/+”后边的数字表示删除或插入的核苷酸数量,第一行阴影部分表示目标靶位;

[0037] 图2为所创制闭颖授粉水稻品种H02材料开花时的表型,左侧为供体材料H02,即用于闭颖授粉性状改良的品种,右侧为供体品种H02经定向改良后具有闭颖授粉性状的材料。

## 具体实施方式

[0038] 下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0039] 下述实施例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0040] 下面描述本发明的一个实施例中所采用的育种方法

[0041] 一、用于水稻DEP2基因打靶的重组载体的制备。

[0042] 1.1,选择水稻DEP2基因(LOC\_0s07g42410)中第一外显子中自翻译起始密码子ATG后第39-60位的核苷酸序列GCTCTCCCCGCGCCGCTCGCGG,(下划线部分为5'-(N)<sub>x</sub>-NGG-3'结构中NGG部分),作为打靶位点。

[0043] 1.2,按所选择靶位点合成(华大基因公司)正向寡核苷酸链(DEP2K01P1)和可与之互补的反向寡核苷酸链(DEP2K01P2),

[0044] 具体序列为:

[0045] DEP2K01E P1:TGTGGCTCTCCCCGCGCCGCTCG

[0046] DEP2K01E P2:AAACCGAGCGGCGCGGGAGAGC

[0047] 其中未被下划线标注的部分为上述靶位点中去除NGG的序列或互补序列,下划线部分为用于连接载体的粘性末端。

[0048] 1.3,经过退火程序,将DEP2K01P1和DEP2K01P2两链退火形成具有粘性末端的双链DNA,作为构建重组载体的插入片段。

[0049] 1.4,用BsaI内切酶(NEB公司)在37°C酶切包含能够在水稻细胞内表达的向导RNA表达框(核苷酸序列如Seq ID No.1所示)和能够在水稻细胞内表达的Cas9核酸酶表达框的水稻CRISPR/Cas9基因工程载体(核苷酸序列如Seq ID No.2所示),载体结构和构建方法按现有文献(Xuet al, Gene targeting using the Agrobacterium tumefaciens-mediated CRISPR-Cas system in rice, RICE, 2014)所示,使用BsaI内切酶酶切水稻CRISPR/Cas9基因工程载体2小时,65°C失活酶切体系10分钟,作为构建重组载体的骨架片段。

[0050] 1.5,用T4连接酶(NEB公司)将重组载体骨架片段和插入片段相连,转入大肠杆菌中。经测序验证后,提取阳性转化子,构成用于水稻DEP2基因CRISPR/Cas9打靶的重组载体质粒。

[0051] 农杆菌稳定转基因介导的水稻DEP2基因打靶和闭颖水稻材料的获得。

[0052] 2.1,利用冻融法将上面获得的所述用于水稻DEP2基因CRISPR/Cas9打靶的重组载体质粒转入根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)EHA105(安徽省农业科学院农业部转基因生物产品成分监督检验测试中心水稻组保存),获得阳性克隆。

[0053] 2.2、取粳稻品种H02成熟种子去掉颖壳后,用70%酒精浸泡种子1min,倒掉酒精。用含有1滴Tween 20的50%次氯酸钠(原液有效氯浓度大于4%)溶液浸泡种子40min(150r/min)。倒掉次氯酸钠,无菌水洗5遍至溶液澄清,无次氯酸钠味道。无菌水浸泡种子过夜。用解剖刀沿种子的糊粉层将胚剥下,将胚接种于愈伤诱导培养基上。30°C下暗培养11天后将愈伤与胚乳及胚芽分离,将去芽的状态良好、分裂旺盛的初级愈伤组织进行预培养3~5天后用于农杆菌转化。

[0054] 2.3、采用上述转入了重组表达载体的根癌农杆菌进行农杆菌介导的遗传转化,该遗传转化、转化子筛选及转基因植株再生等参照Yongbo Duan(Yongbo Duan, Chenguang



Zhai, et al. An efficient and high-throughput protocol for *Agrobacterium* mediated transformation based on phosphomannose isomerase positive selection in Japonica rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Cell Report*, 2012. DOI 10.1007/s00299-012-1275-3. 等提出的方法。共获得54株转基因植株。

[0055] 2.4, 利用植物基因组小量提取试剂盒(天根生化公司), 提取所获54株含有所述水稻DEP2基因CRISPR/Cas9打靶的重组载体的转基因水稻植株的基因组DNA。以该DNA为模板, 用Phusion高保真DNA聚合酶(NEB公司)PCR扩增包含靶标区域的序列, 其中PCR扩增所用的引物为:

[0056] DEP2K01genome check FP: TTGGGGTTCTTGGTGAGGGGAT

[0057] DEP2K01genome check RP: GCGATTCGACTCAATTCAAGTG

[0058] 2.5, 以DEP2K01genome check FP为引物对所获PCR扩增片段直接测序, 分析靶位点的突变。测序结果表明, 在所测54株植株中, 46带有DEP2基因靶标序列上的突变, 突变效率为85.2%; 突变的形式包括碱基的插入和/或缺失。部分结果如图1所示(图中阴影部分, 即第7位开始的GCTCTCCCCGCGCCG--CTCG为打靶的目标位); 其中两个等位DEP2基因都出现功能缺失突变的再生株系为11株, 同时出现等位基因效率为20.4%。

[0059] 2.6, 观察具有两个等位DEP2基因都出现功能缺失突变的再生株系的开花习性, 其中9株水稻的花明显表现为闭颖授粉, 表明所述9株具有两个等位DEP2基因都出现功能缺失突变的转基因株系为所定向创制闭颖授粉水稻材料。

[0060] 相对于传统育种方法, 本方法有以下优点

[0061] ①, 育种周期短, 整个材料定向创制过程可在7个月内完成, 而传统杂交-回交方法至少需要3~5年时间。

[0062] ②, 只改变了受体品种的一个基因, 所获材料除变为闭颖授粉外其他农艺性状不变, 而传统回交方法会导入与DEP2连锁的其他基因, 可能影响受体品种的农艺性状。

<110> 安徽省农业科学院水稻研究所  
 <120> 一种创制闭颖授粉水稻材料的育种方法  
 <130> HCl20140060

<160> 2  
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 向导 RNA 表达框

[0001]

<400> 1:  
 ggatcatgaa ccaacggcct ggcgtattt ggtggttgtagggagatg gggagaagaa 60  
 aageccgatt ctcttcgctg tgatgggctg gatgcatgcg ggggagcggg aggcccaagt 120  
 acgtgcacgg tgageggccc acagggegag tgtgagcgcg agaggcggga ggaacagttt 180  
 agtaccacat tgeccagcta actegaacgc gaccaactta taaaccgcg cgtgtcgcgt 240  
 tgttggtc tccccgcgcg gctcggttt agagctatgc tgaaaagcat agcaagttaa 300  
 aataaggcta gtccgttate aacttgaaaa agtggcaccg agtcggtgct tttttt 357

<210> 2  
 <211> 6599  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> Cas9 核酸酶表达框

	<400> 2:	
	ctgcagtgca gcgfgaccgc gtcgtgeccc tctctagaga taatgagcat tgcattgtcta	60
	agttataaaa aattaccaca tatttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta	120
	tctttataca tatattttaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa	180
	tatcagtgtt tttagagaatc atataaatga acagttagac atggctctaaa ggacaattga	240
	gtattttgac aacaggactc tacagittta tctttttagt gtgcattgtt tctcttttt	300
	ttttgcaaat agcttcacct atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg	360
	gttttaggggt aatgggtttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt	420
	agcctctaaa ttaagaaaac taaaacteta ttttagtttt tttattfaat aatttagata	480
	taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa taaacaaat accctttaag aaattaaaaa	540
	aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgac agcctgttaa acgctgtcga	600
	cgagctctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtctgggcca gcaagcaga	660
	cggcacggca tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gatttccgct ccaccgttgg	720
	acttgcctcg ctgtggcat ccagaaatgc gtggcggagc ggcagacgtg agccggcacg	780
	gcagggcgcc tctctctct ctcacggcac ggcagctacg ggggattcct tcccaccgc	840
	tcttctgctt tcccttctc gcccgcgta ataaatagac acccctcca caccctctt	900
	ccccaccctc gtgtttgtcg gagegcacac acacacaacc agatctccc caaatccacc	960
[0002]	cgctggcacc tccgcttcaa ggtacgcgc tegtctccc cccccccc tctctacct	1020
	ctctagatcg gcgttccgtt ccatggtag ggcccggtag ttctacttet gttcatgtt	1080
	gtgttagatc cgtgtttgt tttagatcct gctctctcgc ttctctacag gatgcacct	1140
	gtactctaga cactttctga ttgctaacct gccagttttt ctctttgggg aatcttggga	1200
	tggtctctagc cgttccgcag acgggatcga ttctatgatt tttttgttt cgttgcctag	1260
	ggtttgggtt gccctttcc ttatttcaa tatatgccgt gcaattgttt gtcgggtcat	1320
	ctttctatgc tttttttgt cttgggtgt atgatgtgt ctggttgggc ggtcgttcta	1380
	gatcggagta gaattctgtt tcaaacctacc tgggtgattt attaatittg gatctgtatg	1440
	tgtgtccat acatattcat agttacgaat tgaagatgat ggatggaaat atcgatctag	1500
	gataggtata catgttgat cgggttttac tgatgcatat acagagatgc tttttgttcg	1560
	cttggttgtg atgatgtgtt gtggttgggc ggtcgttcat tcttctaga tccgagtaga	1620
	atactgttcc aaactacctg ggtatttat taattttgga actgtatgtg tgtgtcatac	1680
	atcttcatag ttacagattt aagatggatg gaaatctcga tctaggatag gtatacatgt	1740
	tgatgtgggt ttactgatg catatacatg atggcatatg cagcatctat tcatatctc	1800
	taacctlgag tacctacta ttataataa caagtaigt ttataattat ttgatcttg	1860
	atatacttgg atgatggcat atgcagcagc tatatgtgga ttttttagc cctgcctca	1920
	taectattt atttcttgg tactgttct tttgtcagc ctcacctgt tgtttgtgt	1980

tacttctgca gcccggggga tcccgaatac ttgtatggcc gcggccgctc tagatggatt	2040
acaaggacca cgacggggat tacaaggacc acgacattga ttacaaggat gatgatgaca	2100
agatggctcc gaagaagaag aggaagggtg gcatccacgg ggtgccagct getgacaaga	2160
agtactcgat cggcctcgat attgggacta actctgttgg ctgggccgtg atcaccgacg	2220
agtacaaggt gccctcaag aagttcaagg tcttgggcaa caccgategg cattecatca	2280
agaagaatct caitggcget ctctgttcc acagcggcga gacggctgag getacgcggc	2340
teaagcgca cggccgcagg cggtaacgc gcaggaagaa tgcattctgc tacttgcagg	2400
agattttctc caacgagatg gcgaagggtg acgattcitt ctccacagg ctggaggagt	2460
cattctctgt ggaggaggat aagaagcacg agcggcatcc aatcttcggc aacattgtcg	2520
acgagggtgc ctaccacgag aagtaacctc cgatctacca tctggggaag aagctctggg	2580
actccacaga taaggcggac ctccgctga tetacctcgc tetggcccac atgattaagt	2640
tcaggggcca ttctctgac gagggggac tcaacctgga caatagcgtat gttgacaage	2700
tgttcatcca gctctgacg acgtacaacc agctcttcca ggagaacccc ataatgcgt	2760
caggcgtcga cgcgaaggct atctgtccg ctaggctctc gaagtctcgg cgcctcgaga	2820
acctgatcgc ccagctgccg ggcgagaaga agaacggcct gttcgggaat ctattgcgc	2880
tcagcctggg getcaagccc aacttcaagt cgaatttcca tctcctgag gacgccaagc	2940
tgcagctctc caaggacaca taagcagatg acctggalaa cctcttggcc cagatcggcg	3000
atcagtacgc ggacctgttc ctctctgcca agaattctgc ggacgcccac ctctctctg	3060
atattctcag ggtgaacacc gagattacga aggtctcctc ctacgctcc atgatcaagc	3120
gctacgacga gcaccatcag gatctgacc tctgaagge gctggtcagg cagcagctcc	3180
ccgagaagta caaggagatc ttctctgac agtcgaagaa cggctacgct ggglacattg	3240
acggcggggc ctctcaggag gagttctaca agttcatcaa gccgattctg gagaagatgg	3300
acggcacgga ggagctgctg gtgaagctca atcgcgagga cctctgagg aagcagcgga	3360
cattcgataa cggcagcacc ccacaccaga ttcatctcgg ggagctgcac gctatctga	3420
ggaggcagga ggacttctac ccttctctca aggataaccg cgagaagatc gagaagatc	3480
tgactttcag gatcccgtac taactcggcc caactcctag gggcaactcc cgttctgctt	3540
ggatgaccgg caagtcagag gagacgata cggcgtggaa ctctgaggag gtggtcgaca	3600
agggcgtctg cgtctcagtc ttcatcgaga ggatgacgaa ttctgacaag aacctgcaa	3660
atgagaaggt getccctaa cactcctcc tgtacgagta ctccacagtc tacaacgagc	3720
tgactaaggt gaagtatgt accgagggca tgaggaagcc ggctttctg tctggggagc	3780
agaagaagge caicgtggac ctctgttca agaccaaccg gaaggtcacg gttaacgagc	3840
tcaaggagga ctacttcaag aagattgagt gcttctgatt ggtcagatc tctggcgttg	3900
aggaccgtt caacgcctcc ctggggacct accacgatct cctgaagatc atlaaggata	3960
aggacttct ggacaacgag gagaatgagg atatctctga ggacattgtg ctgacactca	4020

[0003]

	ctctgttcca ggaccgggag atgatcgagg agcgcctgaa gaettacgcc catctcttcg	4080
	atgacaaggt catgaagcag ctcaagagga ggaggtacac cggctggggg aggctgagca	4140
	ggaagctcat caacggcatt cgggacaage agtccgggaa gacgatcctc gacttctctga	4200
	agagcgatgg cttcgcgaac cgcaatttca tgcagctgat tcacgatgac agcctcacat	4260
	tcaaggagga tatccagaag gctcaggtga gcgccaggg ggactcgtg cagcagcata	4320
	tcgcgaacct cgttggctcg ccagctatca agaaggggat tctgcagacc gtgaagggtg	4380
	tggacgagct ggtgaaggtc atgggcaggc acaagcctga gaacatcgtc attgagatgg	4440
	ccccggagaa tcagaccacg cagaagggcc agaagaacte acgcgagagg atgaagagga	4500
	tcgaggaggg cattaaggag ctggggctcc agatcctcaa ggagcaccg gtggagaaca	4560
	cgcagctgca gaatgagaag ctctacctgt actacctca gaatggccgc gatatgtatg	4620
	tggaccagga gctggatatt aacaggctca gcgattaca cgtcgatcat atcgttccac	4680
	agtcattctt gaaggatgac tccattgaca acaaggctct caccaggteg gacaagaacc	4740
	ggggcaagtc tgataatgtt ccttcagagg aggtcgttaa gaagatgaag aactactggc	4800
	gccagctctt gaatgccaag ctgateacgc agcggaggtt cgataacctc acaaaggctg	4860
	agagggcgcg gctctctgag ctggacaagg cgggcttcat caagaggcag ctggctgaga	4920
	caaggcagat cactaagcac gttgcgcaga ttctcactc acggatgaac actaagtacg	4980
[0004]	atgagaatga caagctgac cgcgaggatga aggtcactac cctgaagtca aagctcgtct	5040
	ccgacttcag gaaggattc cagttctaca aggttcggga gatcaacaat taccaccatg	5100
	cccatgacgc gtacctgaac ggggtggtcg gcacagctct gatcaagaag tacccaaage	5160
	tcgagagega gttctgttac ggggactaca aggtttaca tctgaggaag atgategcca	5220
	agtcggagca ggagattgac aaggtaccg ccaagtactt cttctactct aacattatga	5280
	atttctcaa gacagagatc actctggcca atggcgagat ccggaagcgc cccctcatcg	5340
	agacgaacgg cgagacgggg gagatcgtgt gggacaaggg cagggattc gcgacctca	5400
	ggaaggttct ctccatgcca caagtgaata tctcaagaa gacagaggtc cagactggcg	5460
	ggttctctaa ggagtcatt ctgcctaagc ggaacagcga caagctcact gcccgcaaga	5520
	aggactggga tccgaagaag tacggcgggt tcgacagccc cactgtggcc tactcggtec	5580
	tggttgtggc gaagggtgag aagggaagt ccaagaagct caagagcgtg aaggagctgc	5640
	tggggatcac gattatggag cgtctcagct tcgagaagaa cccgatgat ttcttggagg	5700
	cgaagggcta caaggagggt aagaaggacc tgatcattaa getccccaaag tactcaactt	5760
	tcgagctgga gaacggcagg aagcggatgc tggcttccgc tggcgagctg cagaagggga	5820
	acgagctggc tctgccgtcc aagtatgtga acttctctca cctggctccc cactacgaga	5880
	agctcaaggg cagccccgag gacaacgagc agaagcagct gttctctgag cagcacaagc	5940
	attacctega cgagatcatt gacgagattt ccgagttctc caagcggctg atcttggccg	6000
	acgcgaatct ggataaggtc ctctccgtgt acaacaagca ccgagacaag ccaatcaggg	6060

[0005]

agcaggctga gaatatacatt catctcttca cctgacgaa cctcggcgcc cctgctgctt	6120
teaagtactt cgacacaact atcgatcgca agaggtacac aagcaactaag gaggtcctgg	6180
acgcgacct catccaccag tcgattaccg gcctctacga gacgcgcate gacctgtctc	6240
agctcggggg cgacaagcgg ccagcggcga cgaagaaggc ggggcaggcg aagaagaaga	6300
agtgagctca ggctccata caagtattgg ggatccgaat tcecccgatc gttcaaacat	6360
ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt ctgfcgatga ttatcatata	6420
attctgttg aattacgta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat	6480
gagatggggt tttatgatta gactcccgca attatacatt taatagcga tagaaaacaa	6540
aatafagcgc gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcactatgt tactagatc	6599

5' ...CTTCCAGCTCTCCCCGCGCCG -- CTCGCGGTGAGGA ...3' WT  
 5' ...CTTCCAGCTCTCCCCGCGCCG -- -TCGCGGTGAGGA ...3' -1  
 5' ...CTTCCAGCTCTCCCCGCGCC -- --CTCGCGGTGAGGA ...3' -1  
 5' ...CTTCCAGCTCTCCCC -- -GCCG -- CTCGCGGTGAGGA ...3' -2  
 5' ...CTTCCAGCTCTCCCCGCGCCG -- C --- GCGGTGAGGA ...3' -2  
 5' ...CTTCCAGCTC-----GCGCCG -- CTCGCGGTGAGGA ...3' -5  
 5' ...CTTCCAGCTCTCCC-----GA ...3' -18  
 5' ...CTTCCAGCTCTCCCCGCACCG -- -----CGGTGAGGA ...3' -4/m1  
 5' ...CTTCCAGCTCTC --- CGCGCCG -ACTCGCGGTGAGGA ...3' -2/+1  
 5' ...CTTCCAGCTCTCCCCGCGCCGGTCTCGCGGTGAGGA ...3' +2

图1



图2