

一种水稻雄性育性控制基因 STS1、其编码蛋白及应用

技术领域

本发明涉及植物基因技术领域，具体涉及一种水稻雄性育性控制基因 STS1、其编码的蛋白及应用。

背景技术

水稻是人类营养和热量摄入最重要的作物之一，提供了超过全人类所消耗卡路里的五分之一。杂种优势利用是培育水稻新品种的主要手段，也是提高水稻产量的重要途径。水稻属于自花授粉植物，雌蕊和雄蕊着生在同一朵很小的颖花里，人工去雄的方法难以满足生产所需的大量杂交种子，因此杂交稻育种依赖于雄性不育种质资源的发掘与利用。也就是说，利用这种天然的雄性不育水稻作为母本，通过人工辅助授粉，就能大量生产杂交种子。然而长久以来，由于雄性不育种质资源的发掘与利用整体有限，目前广为利用的仅限于核质互作雄性不育（三系）和温敏核不育（两系）两类，且前者受恢保关系制约，后者易受环境影响，更重要的是，这两个类型中实际的不育基因资源单一，限制了杂交水稻的优势进一步提升，同时也存在较大风险。随着当前生物技术的发展，近年来的研究表明充分利用一种称为“种子生产技术（Seed Production Technology, SPT）的技术手段，可实现水稻核雄性不育突变体在杂交稻中的直接应用。因此通过分离克隆新类型的核雄性育性控制基因，创制新的不育材料，对于扩展杂交水稻急需的不育系种质范围具有重要意义

发明内容

针对现有技术存在的问题和缺陷，本发明提供一种水稻雄性育性控制基因

STS1、其编码的蛋白及应用。利用该基因及其编码的蛋白调控水稻雄性育性，通过基因编辑等突变该编码基因获得新的水稻不育系，以及通过转基因技术恢复突变体育性，在农业生产上具有重要的应用价值。本发明的技术方案为：

第一方面，本发明提供一种水稻雄性育性控制基因 STS1，来源于水稻，其核苷酸序列具有如下群组之一：1) 具有如 SEQ ID NO .1 所示的核苷酸序列；2) 与 SEQ ID NO .1 所示的核苷酸序列具有不低于 90% 的相似性，且具有相同功能的 DNA 序列；3) 在一定条件下能够与 1) 所述序列的 DNA 杂交的 DNA 序列；4) 与 1) ~3) 任一所述序列互补的 DNA 序列。

本领域公知，本发明所述的水稻雄性育性控制基因包括与 STS1 基因高度同源，并且具有同样的育性控制功能的高度同源的功能等价体序列。所述高度同源的功能等价体序列包括在一定条件下能够与本发明所公开的 STS1 基因的核苷酸序列杂交的 DNA 序列。本发明中所使用的“一定条件”属于公知常识，包括采用变性（如 90~96℃ 条件下、一定 pH、以及有机溶剂存在下）、退火（于 40~65℃ 复性条件下）、延伸（于 68~75℃ 在聚合酶作用下）等手段进行核酸杂交。

功能等价体序列还包括与本发明所公开的 STS1 基因所示的序列有至少 90%、95%、96%、97%、98%、或 99% 序列相似性，且具有育性调控功能的 DNA 序列，可以从任何植物中分离获得。其中，序列相似性的百分比可以通过公知的生物信息学算法来获得，包括 Myers 和 Miller 算法(Bioinformatics, 4(1): 11-17, 1988)、Needleman-Wunsch 全局比对法(J.Mol.Biol., 48(3): 443-53, 1970)、Smith-Waterman 局部比对法(J.Mol.Biol., 147: 195-197, 1981)、Pearson 和 Lipman 相似性搜索法(PNAS, 85(8): 2444-2448, 1988)、Karlin 和 Altschul 的算法(Altschul 等, J.Mol.Biol., 215(3): 403-410, 1990; PNAS, 90: 5873-5877, 1993)。这对于本领域技术人员来说是熟悉的。

上文所指的“可以从任何植物中分离获得”，包括但不限于芸苔属、玉米、小麦、高粱、两节芥属、白芥、蓖麻子、芝麻、棉籽、亚麻子、大豆、拟南芥属、菜豆属、花生、苜蓿、燕麦、油菜籽、大麦、燕麦、黑麦(Rye)、粟、蜀黍、小

说明书

黑麦、单粒小麦、斯佩尔特小麦(Spelt)、双粒小麦、亚麻、格兰马草(Gramma grass)、摩擦禾、假蜀黍、羊茅、多年生麦草、甘蔗、红莓苔子、番木瓜、香蕉、红花、油棕、香瓜、苹果、黄瓜、石斛、剑兰、菊花、百合科、棉花、桉、向日葵、芸苔、甜菜、咖啡、观赏植物和松类等。优选地，植物包括玉米、大豆、红花、芥菜、小麦、大麦、黑麦、稻、棉花和高粱。

第二方面，本发明还提供与该水稻雄性育性控制基因 STS1 相关的生物材料，为以下 1) ~5) 中的任一种：

- 1) 编码基因 STS1 的蛋白；
- 2) 含有基因 STS1 的表达盒；
- 3) 含有基因 STS1 的重组载体；
- 4) 含有基因 STS1 的重组微生物；
- 5) 含有 3) 所述重组载体的重组微生物。

进一步地，所述编码基因 STS1 的蛋白氨基酸序列具有如 SEQ ID NO .2 所示的序列，或者与 SEQ ID NO .2 所示的氨基酸序列相似且具有相同功能的氨基酸序列。

进一步地，所述含有基因 STS1 表达盒的制备过程中，可对多种 DNA 片段加以操作，以提供处于合适方向，或是处于正确读码框中的 DNA 序列。为达到此目的，可使用衔接子或接头，将 DNA 片段连起来，或者进一步包括其它操作，以提供方便的限制性酶切位点等。此外，本发明所提供的表达盒或者重组载体可被插入质粒、粘粒、酵母人工染色体、细菌人工染色体或其他适合转化进宿主细胞中的任何载体中。优选的宿主细胞是细菌细胞，尤其是用于克隆或储存多核苷酸、或用于转化植物细胞的细菌细胞，例如大肠杆菌、根瘤土壤杆菌和毛根土壤杆菌。当宿主细胞是植物细胞时，表达盒或重组载体可被插入被转化的植物细胞的基因组中。插入可以是定位的或随机的插入。优选地，插入通过诸如同源重组来实现。另外，表达盒或重组载体可保持在染色体外。本发明的表达盒或重组载体可存在于植物细胞的核、叶绿体、线粒体和/或质体中。优选地，本发明的表达盒或重组载体被插入植物细胞核的染色体 DNA 中。

进一步地，所述重组微生物可以通过常规方法或是基因编辑手段获得，诸如将启动子序列与报告基因可操作性连接，形成可转化的构建体，再将该构建体转入植株中；或者将上述构建体亚克隆用于瞬时表达实验的表达载体，通过瞬时表达实验来检测启动子或其调控区的功能用来测试启动子或调控区域功能的适当表达载体的选择将取决于宿主和将该表达载体引入宿主的方法，这类方法是本领域普通技术人员所熟知的。对于真核生物，在载体中的区域包括控制转录起始和控制加工的区域。这些区域被可操作地连接到报告基因，所述报告基因包括 YFP、UidA、GUS 基因或荧光素酶。包含位于基因组片段中的推定调控区的表达载体可以被引入完整的组织，例如阶段性花粉，或引入愈伤组织。

第三方面，本发明所述的应用是：本发明提供了通过影响 STS1 的核苷酸序列或者通过调控 STS1 基因的转录表达从而影响植株育性的方法，获得新的水稻雄性不育系，该水稻雄性不育系可以用来生产杂交种子。

所述影响植株育性的方法是指通过调控 STS1 基因的表达，从而使所述植株的育性发生改变，如导致植株雄性不育。具体地，取决于具体应用需求，可以通过多种方法来影响 STS1 基因在植物体内的表达，从而达到调控植株雄性育性的效果。更具体地，调控 STS1 基因的表达可以使用许多本领域普通技术人员可获得的工具进行，例如，通过突变、诱变、反义基因的转入、共抑制或发夹结构的引入以及基因编辑等，都可以用于破坏 STS1 基因的正常表达，从而获得雄性不育的植株。

另外，本发明还提供了一种 STS1 基因的不育突变体序列及其雄性不育突变体材料。更具体地，所述雄性不育突变体材料是通过突变水稻内源的 STS1 基因，或突变与其高度同源的基因的核苷酸序列，使该植物体丧失雄性育性的过程。所述“突变”包括但不限于以下方法，如用物理或化学的方法导致的基因突变，化学方法包括用 EMS 等诱变剂处理所导致的诱变，所述突变还可以是点突变，也可以是 DNA 缺失或插入突变，还可以是通过 RNAi、定点突变等基因沉默和基因编辑等手段产生。

本领域技术人员应该知晓，创制的雄性不育材料受体，可以包括，但不限

于目前已知的所有的常规籼粳水稻品种。

具体地，本发明采用上述方法构建了四种水稻雄性不育突变体，这四种水稻雄性不育突变体均含有突变后的雄性不育基因，所述突变后的雄性不育基因的核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.6 (sts1-1)、SEQ ID NO.7 (sts1-2)、SEQ ID NO.8 (sts1-3)、SEQ ID NO.9 (sts1-4) 所示。与野生型相比，在四个雄性不育突变体中，sts1-1 突变体在该基因编码区内含子上一个剪接识别位点的核苷酸发生替换，产生 3 个错误的转录本；sts1-2 突变体在该基因的第 7 外显子的一个核苷酸发生替换进而导致终止子提前形成；sts1-3 突变体在该基因的第 2 外显子上发生一个碱基的插入，进而导致终止子提前形成；sts1-4 突变体在该基因的第 9 外显子上发生两个碱基的缺失，进而导致终止子提前形成。四个突变体中该基因的突变最终都导致了蛋白翻译提前终止。

第四方面，本发明还涉及一种恢复水稻雄性不育株系的雄性不育性状的方法，包括如下步骤：采用常规遗传转化手段将所述 STS1 基因，转入如前述所述应用获得的水稻雄性不育株系，进而使得突变体恢复野生型表型。

第五方面，本发明还涉及一种水稻不育株系在水稻制种中的用途，以如前述所述构建获得的水稻雄性不育突变体株系作为母本，进行杂交育种。具体地，在某些应用的实施方式中，可以应用本发明所提供的 STS1 基因来实现 STS1 或其他类似育性相关基因突变所获得的雄性不育系的繁殖和保持。

更具体地，上述雄性不育系的繁殖和保持，是指以纯合隐性核雄性不育突变体为转化受体材料，将紧密连锁的 3 个目标基因转化至该不育突变体受体植株中。所述 3 个目标基因分别是育性恢复基因、花粉失活基因和筛选基因。其中，育性恢复基因可使不育的转化受体育性恢复，花粉失活基因可使含有转化的外源基因的花粉失活，即失去授精能力，筛选基因可以用于转基因种子和非转基因种子的分拣，分拣出的非转基因种子用作不育系生产杂交种，转基因种子用作保持系来源源不断地、稳定地生产不育系。本发明的所提供的花粉特异表达启动子可用于外源基因在花粉中的特异性表达，从而避免该外源基因在植物其他组织中持续表达所带来的不利影响，还可以用于植物花粉生长发育相关

说明书

基因的功能分析和鉴定；可用于雄性不育系和恢复系的创建；并可应用于花粉败育实验中，从而避免由植物转基因漂移或花粉逃逸所带来的生物安全问题，对植物雄性不育系和恢复系的创造具有重要意义。

本领域技术人员应该知晓，合适的筛选基因包括但不限于：氯霉素抗性基因，潮霉素抗性基因，链霉素抗性基因，奇霉素抗性基因，磺胺类抗性基因，草甘磷抗性基因，草丁膦抗性基因。所述选择标记基因还可以是红色荧光基因、青色荧光蛋白基因、黄色荧光蛋白基因、荧光素酶基因、绿色荧光蛋白基因、花青甙 p1 等基因。

此外，本发明的转基因植物使用植物生物技术领域技术人员已知的转化方法制备。任何方法可被用于将重组表达载体转化进植物细胞中，以产生本发明的转基因植物。转化方法可包括直接和间接的转化方法。合适的直接方法包括聚乙二醇诱导的 DNA 摄入、脂质体介导的转化、使用基因枪导入、电穿孔、以及显微注射等。在本发明的具体实施方式中，本发明使用了基于土壤农杆菌的转化技术。

与现有技术相比，本发明可以获得包括以下技术效果：

1) 本发明通过控制水稻雄性育性 STS1 基因及其编码蛋白获得水稻雄性生殖发育的变异株，实现人为控制水稻生殖过程。

2) 本发明获得的水稻突变体在营养期与来源亲本无明显差异，进入生殖生长阶段后雄性生殖发育异常，花粉败育，得到完全雄性不育的不育系，该不育系的育性稳定、不受环境条件影响、能够被野生型转基因恢复。

3) 该基因以及该基因突变产生的不育系为构建第三代杂交育种体系提供了必要的元件，该基因突变产生的雄性不育系，用来生产杂交种子，对于突破并改良现有的“三系”和“两系”杂交技术有重要意义，并在杂交水稻构建和农业生产上具有十分重要的应用价值。

当然，实施本发明的任一产品并不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

附图说明

图 1 为本发明实施例 1 中 STS1 基因突变后的表型图；其中 A 为野生型 9311 和突变体株型；B 为野生型和突变体穗部；C 为野生型和突变体小花；D 为野生型和突变体的花药形态；E 为突变体和野生型花粉碘染情况。

图 2 为本发明实施例 2 中 STS1 基因的克隆；其中 A、B 分别为突变体 sts1-1、sts1-2 的 SNP 指数图谱；C 为 STS1 基因的基因结构和变异位点及方式；D 为 sts1-1 中变异产生的 3 个错误的转录本；E 为突变体 sts1-1、sts1-2 变异位点与表型的共分离验证。

图 3 为本发明实施例 3 中 STS1 基因经过基因编辑获得的突变体表型图；其中 A 为 STS1 基因的基因结构和突变体 sts1-3、sts1-4 的基因编辑位点及成功编辑之后的碱基变化；B 为野生型日本晴和突变体 sts1-3、sts1-4 株型；C 为野生型日本晴和突变体 sts1-3、sts1-4 的花药形态；D 为野生型日本晴和突变体 sts1-3、sts1-4 的花粉碘染情况。

图 4 为本发明实施例 4 中 sts1-1 突变体育性恢复株系的表型图；其中 A 为恢复育性的 STS1 基因结构；B 为野生型 9311、突变体和互补株系的株型；C 为野生型 9311、突变体和互补株系的小花；D 为野生型 9311、突变体和互补株系的花药形态；E 为野生型 9311、突变体和互补株系的花粉碘染情况。

具体实施方式

在本发明的描述中，需要说明的是，实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

发明人采用本领域技术人员所熟知的生物信息学技术，从水稻基因组中确定一个含完整水稻雄性育性控制基因 STS1，核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，

其编码的蛋白氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示；STS1 基因的全长 ORF 长度为 1986bp，编码 661 个氨基酸。

下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明，所述是对本发明的解释而不是限定。

实施例 1

STS1 基因突变的表型

利用本领域常规基因突变技术，对常规水稻品种 9311 进行诱变，在获得的突变体库中发现两个雄性不育突变体 sts1-1 和 sts1-2，核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7 所示，将两个突变体和野生型（WT）多代杂交之后稳定遗传，表型分析发现突变体与野生型表现相似的营养生长，但不能产生成熟花粉粒，表现为无粉型雄性不育（图 1）。进一步通过基因组重测序技术从两个突变体中克隆到同一基因 STS1，具体步骤见实施例 2。

实施例 2

STS1 基因的克隆

1、STS1 基因突变的重测序克隆

利用两个突变体 sts1-1 和 sts1-2 做母本与野生型体杂交，分别构建分离群体，将分离群体中的雄性不育单株和正常育性的单株分别混池测序，同时将测序数据与野生型基因组进行比较，获得 SNP 指数为 1 的图谱（如图 2 中 A、B 图所示）。进一步分析上述图谱中的变异位点，并以 PCR 测序的方法对群体中分离的单株和变异位点进行共分离验证，分别得到唯一可以与表型共分离的 SNP 变异位点，验证该位点的引物分别是 sts1-1F（SEQ ID NO.10）、sts1-1R（SEQ ID NO.11）和 sts1-2F（SEQ ID NO.12）、sts1-2R（SEQ ID NO.13）该位点所在的基因为 STS1。如图 2 中 C、D、E 图所示，sts1-1 和 sts1-2 的变异方式、sts1-1 中突变产生的三个错误转录本和 sts1-1、sts1-2 的共分离分析。从而确认 sts1-1 和 sts1-2 是发生在同一基因 STS1 上的不同变异。其中，STS1 基因的编码区内

含子上一个剪接识别位点的核苷酸发生替换，产生如 SEQ ID NO.6 所示的 DNA 序列，导致产生 3 个错位的转录本，从而获得 sts1-1 突变体；STS1 基因的编码区第 7 外显子一个核苷酸发生替换，产生如 SEQ ID NO.7 所示的 DNA 序列，导致终止子提前形成，蛋白翻译提前终止，从而获得雄性不育株系，即 sts1-2 突变体。

野生型 STS1 基因的序列如 SEQ ID NO.1 所示，编码蛋白序列如 SEQ ID NO.2 所示。STS1 基因的全长 ORF 长度为 1986bp，编码 662 个氨基酸。

2、STS1 基因全长 cDNA 克隆

以正常野生型水稻日本晴品种的 RNA 为模板，合成第一链 cDNA，用该 STS1 基因 ORF 序列的 5'和 3'端的寡核苷酸作为 PCR 引物（SEQ ID NO.14 和 SEQ ID NO.15），用高保真 Taq 酶 Primerstar 进行扩增，获得约 1.9K 的 MFS1 基因的全长 cDNA 扩增产物。将该扩增产物通过 EcoR I 限制性酶切重组进载体 pEntry 的相应限制性内切酶多克隆位点，并对重组子进行测序验证。该重组的过渡质粒载体称为 pEntry-STS1。

5'端的寡核苷酸序列为(SEQ ID NO.14):

5'-aaaaaagcaggctccgaattcatggccacgacgctgacg-3'

3'端的寡核苷酸序列为(SEQ ID NO.15):

5'- caagaaagctgggtcgaattcttactgtgcaactgttccatctgtt-3'

实施例 3

利用基因编辑创制新的 STS1 突变体株系

采用商用 CRSPR/Cas9 基因编辑载体 BGK030（可商购）作为水稻转基因的载体。该载体编码一个细菌复制起点（ori）、卡那霉素抗性基因（Kan^r）、潮霉素抗性基因（Hyg^r）、基因编辑作用基因（Cas9）、35S 启动子、NOS 基因终止信号序列以及用于连接目的片段的多克隆位点（MCS）。在限制性内切酶位点分别插入 STS1 基因两个引导序列 SG RNAs，序列如 SEQ ID NO.16 和 SEQ

ID NO.17 所示，建成转基因质粒 BGK030-STSt1-3 和 BGK030-STSt1-4。

4、STSt1 基因转化水稻试验

将上述 BGK030-STSt1-3 和 BGK030-STSt1-4 通过冻融法导入农杆菌 EHA105，并侵染野生型粳稻品种日本晴的愈伤组织，培养，分化得到转基因植株。利用潮霉素筛选转化植株；阳性植株提取叶片总 DNA，经 PCR 进一步鉴定转化植株。用转基因 T1 代调查育性表型，验证 STSt1 基因功能。如图 3 所示，在 STSt1 靶位点插入一个碱基和缺失两个碱基的植株表现为雄性不育，获得的突变体分别为 stst1-3 和 stst1-4，核苷酸序列分别如 SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9 所示。即，stst1-3 突变体是在 STSt1 基因的编码区第 2 外显子插入一个核苷酸；stst1-4 突变体是在 STSt1 基因的编码区第 9 外显子发生两个核苷酸的缺失。

实施例 4

STSt1 基因突变体的育性恢复

STSt1 基因互补表达载体构建，在本实施例中，首先用 Pst I 和 Sac I 限制性酶切 pCMBIYA1300，将使用 SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.4 扩增的包含启动子的野生型 STSt1 互补片段约 6.3K，序列如 SEQ ID NO.5 所示。连入 pCMBIYA1300 的 Pst I 和 Sac I 位点中，对重组子进行酶切和测序鉴定。然后如实施例 3 所述的转基因方法获得水稻 STSt1 互补表达的突变体转基因植株，用转基因 T1 代植株观察，如图 4 所示，在突变体 stst1-1 中，成功转入互补表达载体之后获得的转基因阳性植株恢复了育性。

综上所述，本发明通过克隆技术和基因编辑方法使 STSt1 的个别核苷酸序列改变、增加或缺失，导致编码的蛋白功能丧失，从而获得雄性不育株系。产生的雄性不育株系育性彻底，不受环境条件影响，且转入野生型基因能恢复育性。本发明提供的雄性育性控制基因以及基于该基因产生的不育系将为新型杂交育种体系提供了必要的不育系种质资源，对杂交水稻育种具有重要意义。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，

但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。