

项目编号：2018B020202009

广东省科技计划项目  
“优质、多抗柑橘新品种选育”  
课题二任务书

课题名称：多抗、优质柑橘分子育种

课题负责人：彭爱红

课题承担单位：西南大学

执行期限：2019 年01 月至2022 年12 月

2018年12月20日



子课题基本信息表

名 称		多抗、优质柑橘分子育种					
经费		37.5 万元					
承担单位		名称	西南大学		单位性质		大专院校
		所在地	重庆市		组织机构代码		1210000045040 1733W
		通信地址	重庆市、北碚区、 天生街道 2 号		邮政编码		400700
		银行账号	3100028109024968 877		法定代表人		张卫国
		单位开户名称			西南大学		
		开户银行			工行重庆朝阳支行		
课题负责人		姓名	彭爱红	性别	女	出生日期	1974. 11 . 02
		证件类型	身份证	证件号码	36031119741102252X		
		所在单位	西南大学				
		最高学位	硕士				
		职 称	助理研究员				
		电子邮箱	pengaihong@cric.cn		移动电话		13883578451
参 与 人 员	姓名	单位	职称/学位		任务	签名	
	陈善春	西南大学柑橘研究所	研究员		参与主持及 指导	陈善春	
	何永睿	西南大学柑橘研究所	副研究员		杂交群体和 抗性材料创 制	何永睿	
	邹修平	西南大学柑橘研究所	副研究员		抗性相关基 因发掘	邹修平	
	雷天刚	西南大学柑橘研究所	助理研究员		抗性评价	雷天刚	

## 一、任务考核指标

利用基因编辑、基因沉默等创制抗（耐）柑橘黄龙病新种质材料 5 份以上，获新品登记种证书或新品种保护权 1 个，发表论文 2 篇以上（其中 SCI 1 篇以上），培养研究生 1 名或以上，示范推广新品种 1-2 个，提供 2 份抗（耐）柑橘黄龙病材料到项目负责单位接毒评价。

发表相关论文基金资助注明：广东省科技创新战略专项资金（项目编号：**2018B020202009**），（英文：**the Science and Technology Innovation Strategy Special Fund of Guangdong Province (Grant No. 2018B020202009)**）。

## 二、研究内容

1、高效安全遗传转化技术：利用已筛选的抗病基因（柑橘源 PR 基因、抗菌肽、溶菌酶等）、组织特异表达启动子等，结合我们成熟的 Marker-free 等高效安全遗传转化技术，创制抗（耐）黄龙病的柑橘新材料。

2、基因沉默：针对柑橘黄龙病病原致病关键基因，构建 RNAi 表达载体遗传转化主栽优良柑橘品种，创制基于黄龙病致病基因沉默的抗（耐）黄龙病柑橘新材料。

3、基因编辑：针对目前筛选的可能与柑橘黄龙病病原菌侵染相关的柑橘感病基因，利用已建立的基于 CRISPR/Cas9 系统的柑橘基因组编辑技术对柑橘感病基因进行定点编辑，创制抗（耐）黄龙病的柑橘新材料。

4、对创新材料进行抗病评价，对优良新品种进行示范推广。

### 三、年度计划（建议以1年或6个月为一阶段）

	起始时间	主要工作内容	预期目标	成果形式
1	2019 年 1 月 -2019 年 12 月	完善基于柑橘基因组编辑、病原基因沉默等技术的柑橘抗病分子育种技术体系；利用已明确的抗病基因和建立的高效安全遗传转化技术创制抗（耐）黄龙病的柑橘新材料	建立高效的柑橘基因组编辑和病原基因沉默技术体系；创制抗（耐）黄龙病的柑橘新材料	论文；新材料（品种）
2	2020 年 1 月 -2020 年 12 月	克隆并功能验证柑橘响应黄龙病病原菌侵染相关基因；利用柑橘基因组编辑、病原致病基因沉默等技术开展抗（耐）黄龙病柑橘新材料创制；已获得新材料的抗病性评价	克隆柑橘响应黄龙病病原菌侵染相关基因 5 个；创制抗（耐）黄龙病柑橘新材料	论文；新材料
3	2021 年 1 月 -2021 年 12 月	继续利用基因编辑、病原菌致病基因沉默结合高效安全的基因工程育种技术，创制抗（耐）黄龙病柑橘新材料 2-3 份	创制抗（耐）黄龙病柑橘新材料	论文；新材料
4	2022 年 1 月 -2022 年 12 月	创制新材料的抗病性和重要园艺性状评价，筛选抗（耐）黄龙病新种质 5-8 份	获得抗（耐）黄龙病新种质 5-8 份	论文；专利；新种质

### 四、验收指标

\*（一）成果指标请（对照项目申报书和协议的内容进行填写，不得降低或删减相关目标要求；结题验收时可用项目内同类型同水平指标替换。）



## 1、核心考核指标

	成果名称	成果类型	验收指标	评测方式/方法（应提出符合相关研究成果与指标的具体考核技术方法、测算方法等）
1	抗（耐）柑橘黄龙病新种质材料	<input type="checkbox"/> 新理论 <input type="checkbox"/> 新产品 <input type="checkbox"/> 新技术 <input type="checkbox"/> 新方法 <input type="checkbox"/> 新品种 <input type="checkbox"/> 数据库 <input type="checkbox"/> 应用解决方案 <input type="checkbox"/> 规范/标准 <input type="checkbox"/> 工艺 <input checked="" type="checkbox"/> 其他	5 份以上	抗（耐）黄龙病能力显著提高的研究报告
2	新品种鉴定、保护或登记	<input type="checkbox"/> 新理论 <input type="checkbox"/> 新产品 <input type="checkbox"/> 新技术 <input type="checkbox"/> 新方法 <input checked="" type="checkbox"/> 新品种 <input type="checkbox"/> 数据库 <input type="checkbox"/> 应用解决方案 <input type="checkbox"/> 规范/标准 <input type="checkbox"/> 工艺 <input type="checkbox"/> 其他	1 个	通过新品种审（鉴）定或获得保护权等证书
3	论文	<input type="checkbox"/> 新理论 <input type="checkbox"/> 新产品 <input type="checkbox"/> 新技术 <input type="checkbox"/> 新方法 <input type="checkbox"/> 新品种 <input type="checkbox"/> 数据库 <input type="checkbox"/> 应用解决方案 <input type="checkbox"/> 规范/标准 <input type="checkbox"/> 工艺 <input checked="" type="checkbox"/> 其他	2 篇以上 (SCI 1 篇以上)	国内 A 类或 SCI
4	研究生	<input type="checkbox"/> 新理论 <input type="checkbox"/> 新产品 <input type="checkbox"/> 新技术 <input type="checkbox"/> 新方法 <input type="checkbox"/> 新品种 <input type="checkbox"/> 数据库 <input type="checkbox"/> 应用解决方案 <input type="checkbox"/> 规范/标准 <input type="checkbox"/> 工艺 <input checked="" type="checkbox"/> 其他	1 名	毕业
5	基因组编辑技术等	<input checked="" type="checkbox"/> 新技术	1-2 个	发明专利受理书或授权书

## 2、高水平知识产权指标

	内容 (拟申请发明专利的核心内容)	类型 (国内发明或 PCT 专利)	结题时状态 (受理或授权)	拟解决关键问题 (填补国内空白、达国际最高水平、突破行业制约、形成技术首创、其他)
1	柑橘高效基因组编辑技术	国内发明	受理	填补国内空白
2				
3				
4				
...				

### 3、技术就绪度提升指标

当前技术就绪度等级	中期评估时技术就绪度等级	项目完成时技术就绪度等级
<input type="checkbox"/> 3 级 <input checked="" type="checkbox"/> 4 级 <input type="checkbox"/> 5 级 <input type="checkbox"/> 6 级	<input type="checkbox"/> 5 级 <input checked="" type="checkbox"/> 6 级 <input type="checkbox"/> 7 级 <input type="checkbox"/> 8 级 <input type="checkbox"/> 9 级	<input checked="" type="checkbox"/> 7 级 <input type="checkbox"/> 8 级 <input type="checkbox"/> 9 级

对项目实施后技术就绪度提升情况的相关说明（限 1000 字）：

高的遗传转化效率和突变效率是筛选到丰富以及可靠的突变材料的基础。柑橘是一种木本植物，其中一些属于甜橙类，枳类的柑橘品种的转基因技术相对比较成熟，然而相对于草本植物而言，其遗传转化率仍然较低。目前 CRISPR/Cas9 基因编辑系统中，通常 Cas9 蛋白原件大于 5kb，所以遗传转化效率在一定程度会受到影响；同时，Cas9 蛋白对植物细胞具有一定的毒性，转化细胞的生长受到一定程度的限制，导致利用常规的柑橘遗传转化程序对 CRISPR/Cas9 系统进行转化时转化效率低下，经常要通过多次的转基因实验才能获得一定数量的转基因植株，浪费大量的物力和财力。因而，在本项目的实施过程中，通过优化柑橘遗传转化中细胞分裂素的种类、暗培养时间、筛选剂的浓度等技术参数，建立基于 CRISPR/Cas9 系统的柑橘遗传转化技术体系，使其适合于 CRISPR/Cas9 系统的柑橘基因组编辑。同时，在 CRISPR/Cas9 系统中，Cas9 蛋白的表达水平和 sgRNA 的转录调控是决定基因编辑效率的两个主要因素。sgRNA 一般由 AtU6 或 AtU3 启动子控制，Cas9 基因由 CaMV35S 启动子控制。研究表明，与 CaMV35S 相比，YAO 启动子控制的 Cas9 基因可以提高其表达水平，在柑橘中获得更高的突变效率。因而，用 YAO 启动子代替本实验室中常用的 CaMV35S 启动子，控制 Cas9 基因的表达，有望进一步提高柑橘基因组的编辑效率。通过优化基于 CRISPR/Cas9 系统的遗传转化技术体系和提高 Cas9 基因的表达水平，最终建立基于 CRISPR/Cas9 系统的柑橘基因组编辑技术体系，使其能成功地应用于创制耐（抗）黄龙病的柑橘新材料。

#### 4、科技报告考核指标

注意事项： 1.报告类型。包括验收前撰写的最终科技报告；研究期限超过 2 年（含 2 年）的项目，每年撰写的年度技术进展报告；根据研究内容、期限和经费强度，撰写的数量不等的专题科技报告。科技报告应按国家标准规定的格式撰写。

2. 公开类别及时限。公开项目科技报告分为公开或延期公开，内容需要发表论文、申请专利、出版专著或涉及技术诀窍的，可标注为“延期公开”。需要发表论文的，延期公开时限原则上在 2 年（含 2 年）以内；需要申请专利、出版专著的，延期公开时限原则上在 3 年（含 3 年）以内；涉及技术诀窍的，延期公开时限原则上在 5 年（含 5 年）以内。涉密项目科技报告按照有关规定管理。

	报告类型	提交时间	公开类别及时限 (限 50 字)
1	年度技术进展报告	2019-12-01	延期 5 年公开
2	年度技术进展报告	2020-12-01	延期 4 年公开
3	年度技术进展报告	2021-12-02	延期 3 年公开
4	项目总结科技报告	2022-12-01	延期 2 年公开

#### 5、参考指标

（请认真对照项目申报书的内容，以上各指标尚未详尽的，可在此补充填写，包括发表的论文/专著数量、发布标准数量、引进人才情况、获得国家/省部级奖项情况）（限 1000 字）

无。



## \* (二) 主要技术经济指标及社会效益

主要技术经济指标及社会效益说明, 包括攻克核心关键技术、“卡脖子”技术等内容(包括支撑和服务其他重大科研、经济、社会发展、生态环境、科学普及需求等方面的直接和间接效益。)(限 1500 字以内)

### 主要技术经济指标

- 1、优化建立基于 CRISPR/Cas9 系统的柑橘高效基因编辑技术体系。
- 2、利用建立的高效遗传转化技术、基因编辑技术、和基因沉默等分子育种技术创制柑橘新材料 50-100 份, 评价筛选对黄龙病抗(耐)性显著提高的新材料 5 份以上。
- 3、从上述黄龙病抗(耐)性显著提高的新材料中筛选中选择 2 份综合性状优良的材料提供给项目负责单位进行接毒评价。
- 4、培育优良柑橘新品种 1 个, 通过重庆市新品种鉴定或获得新品种权。
- 5、建立优新品种示范基地 2 个, 带动企业创收 200 万元以上, 示范推广新品种 5000-10000 亩。
- 6、发表相关论文 2-3 篇(SCI 论文 1-2 篇), 申请相关专利 1 项。
- 7、培养研究生 1-2 名。

### 主要社会效益

柑橘黄龙病是目前世界柑橘产区危害最严重的毁灭性病害, 也给我国柑橘产业造成巨大的损失, 培育抗病品种是解决黄龙病危害的根本途径。通过本项目的实施将获得抗(耐)柑橘黄龙病材料, 进一步选育抗(耐)黄龙病柑橘品种将在黄龙病防控中发挥重要作用, 可有效提高果农种植效益, 显著减少农药施用, 其社会效益、生态效益显著。

## (三) 阶段性成果评价

	指标名称	立项时已有指标值/状态	中期指标值/状态	完成时指标值/状态	评估方式(方法)及评价手段
1	抗(耐)柑橘黄龙病新种质材料	无	2	6	活体材料
2	新品种鉴定、保护或登记	无	0	1	证书



3	论文	无	1	3	国内 A 类或 SCI 期刊录用
4	研究生	无	1	2	毕业
5	发明专利	0	1	2	受理或授权书

## 五、经费预算表

支出科目	经费额	用途说明
<b>一. 直接费用</b>	<b>32.625</b>	
1 设备费		
2 材料费	8.775	用于柑橘新种质检测分析所需常规分子学试剂、生物化学试剂、常规化学试剂耗材及种质资源圃所需肥料、农药、地布、防虫网等农资购买
3 测试化验加工费	7.65	用于柑橘新株系、抗耐病材料等的基因组重测序、转录组测序、蛋白质组测序、代析、果实品质分析、叶片和土壤元素分析等。
4 燃料动力费	1.2	设备设施水电、燃油
5 差旅费/会议/国际合作交流	3.75	资源收集、田间调查、参加国内外学术会议等差旅，项目总结、验收等会议费等
6 出版/文献/知识产权	1.725	论文发表、查新、专利及品种权申请等
7 劳务费	7.77	本项目组各参与单位聘请科研助理、资源圃管理、示范基地管理等的临时聘用人员所需劳务费。
8 专家咨询	0.375	项目咨询指导专家费用
9 其它支出	1.38	不可预见费等
<b>二. 间接费用</b>	<b>4.875</b>	
1 间接成本	3	项目各单位为课题研究提供公共资源有偿使用，包括设备及房屋，水电暖消耗等
2 绩效支出	1.875	项目成员科研绩效支出
<b>合计</b>	<b>37.5</b>	

## 六、任务书签署页

双方根据广东省科技计划项目管理办法及各级有关文件规定,依据项目立项通知及项目合作协议,签署本任务书。

课题负责人签字: 彭爱红

课题单位法人签章:



课题负责单位 (盖章):



2019年4月19日

项目承担单位: 广东省农业科学院果树研究所

项目负责人签字: 钟远

单位法人签字 (签章):

黄继寿

项目单位公章:



2019年3月 / 日