



2023年第54期总87期

种质资源保护与创制专题

本期导读

▶ 前沿资讯

1. 中国农大田长富课题组揭示根瘤菌广谱定殖豆科与禾本科植物根表的新机制
2. 中国农大韩振海、李威团队在苹果基因编辑技术方面取得重要进展
3. 变“废”为“宝”！常玉晓课题组开发出低成本全基因组基因分型技术FBI-seq

▶ 学术文献

1. 黄瓜(黄瓜*Cucumis sativus* L.)果实发育的形态和遗传多样性
2. 基于CRISPR / Cas9的mlo介导的黄瓜(黄瓜*Cucumis sativus* L.)对白粉病菌的抗性研究

▶ 相关专利

1. 一种转基因水稻杂草化基因漂移风险的评估方法及应用
2. 转基因水稻mfb-MH3301的外源插入片段全序列及其旁侧序

更多资讯 尽在农业专业知识服务系统:<http://agri.ckcest.cn/>

列

中国农业科学院农业信息研究所

联系人：王丽娟，张玉玮，信丽媛

联系电话：022-23678616

邮箱：agri@ckcest.cn

2023年1月13日

▶ 前沿资讯

1. 中国农大田长富课题组揭示根瘤菌广谱定殖豆科与禾本科植物根表的新机制

简介：1月10日，《国际微生物生态学会会刊》(The ISME Journal)在线发表了中国农业大学生物学院根瘤菌研究团队田长富教授课题组的研究论文：《FadL-ExoFQP通过调控胞外长链酰基高丝氨酸内酯水平介导根瘤菌向根迁移》(Rhizobial migration toward roots mediated by FadL-ExoFQP modulation of extracellular long-chain AHLs)。根瘤菌是陆生植物根际微生物群落的优势细菌类群之一，能够与豆科植物共生并建立自然界效率最高的生物固氮体系，也能对禾本科等非豆科植物产生促生作用。近年来，越来越多的研究致力于提高根瘤菌-豆科植物共生固氮效率及其抗逆性，并探索建立根瘤菌与非豆科植物的共生固氮体系，以促进农业绿色发展。在前期工作中，田长富课题组系统研究了广宿主费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)结瘤固氮功能与底盘整合效率的遗传演化与分子调控机制(Nucleic Acids Research 2022; ISME J 2022a, 2022b, 2018; mBio 2022a, 2022b, 2021, 2020; mSystems 2021; PLoS Genetics 2018; Environ Microbiol 2017)。为了进一步解析根瘤菌在共生关系建立过程中适应植物根表的遗传基础和分子机理，从而指导广适性根瘤菌的合成生物学改造，在1月10日发表的最新研究中，该课题组利用 Tn-seq 高通量挖掘了广宿主费氏中华根瘤菌 *S. fredii* 定殖栽培大豆、野生大豆、玉米和水稻根表的功能基因，并围绕根际与根表存活能力、从根际到根表的迁移能力，利用反向遗传学和微生物生理学方法研究了正向和反向调控根瘤菌广谱定殖能力的基因元件与模块。该研究针对广宿主费氏中华根瘤菌 *S. fredii*，构建了三个独立的高覆盖度转座子随机插入突变体库，将其接种到栽培大豆、野生大豆、玉米和水稻根际，7天后收集根表细菌样品并利用 Tn-seq 高通量鉴定根表定殖能力显著增强和减弱的突变体(图1)。少数基因参与广谱性根表定殖。*fadL* 编码一个位于外膜的脂肪酸转运蛋白，该基因突变后根瘤菌的广谱根表定殖能力显著增强；*exoFQP* 编码参与胞外多糖寡聚化与分泌的三个膜蛋白，这三个基因突变后广谱根表定殖能力显著减弱，但是其他参与胞外多糖合成的必需基因突变后并没有呈现定殖能力缺陷(如*exoA* 和 *exoY*；图1)。这些表型差异与根际或根表存活能力、游动能力、胞外多糖和生物被膜产生能力无关。对称接种实验表明(图1)：根瘤菌向根表的迁移效率呈现距离衰减模式，*fadL* 缺失突变株的迁移能力显著高于野生型菌株，*exoF* 缺失突变株的迁移能力显著降低，两个突变株的基因回补菌株与野生型菌株均无显著差异。遗传学和生理学证据表明(图2)：*fadL* 缺失突变株的细胞外 AHLs 总量增加，*exoF/exoQ/exoP* 缺失突变株的胞外AHLs总量降低，基因回补使得这些突变株的表型恢复(AHLs 感应菌株显色与定量分析)；*exoF* 缺失导致细胞内短链AHL积累(3-OXO-C8-HSL)而细胞内外长链AHLs含量均降低(C12-HSL、3-OXO-C12-HSL、C14-HSL和3-OXO-C14-HSL)，*fadL* 缺失使得细胞外长链AHLs 水平升高(C12-HSL、3-OXO-C12-HSL、C14-HSL和3-OXO-C14-HSL)(HPLC-MS定量分析)。进一步在缺失内源 AHLs 的遗传背景下(*traI sinI*、*traI sinI exoF* 和 *traI sinI fadL*)添加外源 AHLs 研究，发现 FadL 介导长链 AHLs 的吸收，ExoF 介导短链 AHLs 的分泌(图2)。在此基础上，该研究提出了 FadL-ExoFQP 调控根瘤菌细胞外长链 AHLs 的工作模型。参照 *fadL* 缺失突变株的胞外长链AHLs组分(HPLC-MS)，该研究构建了人工合成的长链 AHLs “鸡尾酒”混合物，该长链 AHLs 混合物能够以扩散的方式促进根瘤菌(野生型菌株和相关突变株)从根际向根表的迁移，也能促进根瘤菌的表面运动(图3)。

更多资讯 尽在农业专业知识服务系统：<http://agri.ckcest.cn/>

该表面运动过程和向根表的迁移不依赖鞭毛 —— *flaA* 基因突变后，依赖鞭毛的游动能力降低，但是在实验条件下的表面运动能力和向根表的迁移能力与野生型菌株无显著差异(图3)。而*fadL* 和 *exoF* 突变株呈现了显著的表面运动能力差异(图3)。此外，该研究发现 *S. fredii* 的 *fadL*缺失突变株在野生大豆和栽培大豆的竞争结瘤能力显著提高，*Sinorhizobium meliloti* 的两株商业菌株缺失 *fadL* 之后在紫花苜蓿的竞争结瘤能力也获得了显著提升。系统发育分布分析表明 *FadL-ExoFQP*在 Alphaproteobacteria 较为保守，暗示了该系统对 AHLs 的调控以及在根际细菌定殖根表过程中的重要作用。中国农业大学生物学院根瘤菌研究团队田长富教授为该研究论文的通讯作者，纪园园博士为第一作者，已毕业博士研究生张碧亮和张盼，在读博士生司有为和田雨，本科生陈柳池、万茜瑶、李璨和王人禾，及张子丁教授为共同作者。该研究得到了国家重点研发计划、国家自然科学基金、中国农业大学“2115人才培养发展支持计划”（青年科学家创新团队）等项目的支持。论文链接：
<https://www.nature.com/articles/s41396-023-01357-5>

来源：中国农业大学生物学院

发布日期:2023-01-11

全文链接:

http://news.cau.edu.cn/art/2023/1/11/art_8769_896188.html

2. 中国农大韩振海、李威团队在苹果基因编辑技术方面取得重要进展

简介：近日，中国农业大学园艺学院韩振海、李威团队在国际知名杂志《植物生理》（*Plant Physiology*）发表了题为《基因编辑苹果 *SQUAMOSA* PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 6提高不定芽再生效率》（Genome editing of apple *SQUAMOSA* PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 6 enhances adventitious shoot regeneration）的研究论文。该研究成功利用基因编辑技术突变苹果*MdSPL6*基因，显著提高不定芽的再生效率，为在苹果和其他蔷薇科果树中利用基因编辑技术创制高再生种质探索出一条有效途径。在苹果中建立高效的转基因及基因编辑技术体系是实现分子设计育种的关键。然而，多数苹果品种和砧木材料遗传转化效率普遍偏低，严重限制了分子遗传改良进程。不定芽再生能力低是苹果遗传转化的主要瓶颈。挖掘适用于苹果的再生基因，提高不定芽再生能力，是建立苹果高效遗传转化体系的重要基础。该研究首先通过多组学联合分析和遗传转化实验揭示苹果‘GL-3’材料高再生的分子机制，发现*miR156aa*的高表达是其再生能力强的主要原因；进而通过WGCNA分析和双荧光素酶实验验证*miR156aa*对不定芽再生的调控是通过靶向调控*MdSPL6*实现的，并结合遗传转化实验证实*MdSPL6*对不定芽再生的抑制作用。进一步在苹果*MdSPL6*基因编码区设计2个基因编辑位点，利用农杆菌介导法进行遗传转化实验，成功获得苹果*Mdsp16*突变株系。通过对突变体材料进行不定芽再生能力检验，证实叶片再生能力显著增强。韩振海教授和李威副教授为论文共同通讯作者，博士研究生李会霞为论文第一作者。研究工作得到了国家自然科学基金、国家现代农业产业技术（苹果）体系、中国农业大学2115人才培养工程以及111引智计划等项目的支持。论文链接：<https://doi.org/10.1093/plphys/kiac570>

来源：中国农业大学园艺学院

发布日期:2022-12-12

全文链接:

http://news.cau.edu.cn/art/2022/12/12/art_8769_894205.html

更多资讯 尽在农业专业知识服务系统:<http://agri.ckcest.cn/>

3. 变“废”为“宝”！常玉晓课题组开发出低成本全基因组基因分型技术FBI-seq

简介：近日，基因组所联合南京农业大学等单位成功开发出低成本全基因组基因分型技术FBI-seq (Foreground and Background Integrated genotyping by sequencing)，该技术可同时检测育种材料的前景基因和遗传背景，大大节省了育种成本，提高了育种效率，是一种全新的全基因组基因分型技术。该技术有望在作物品种鉴别、种质资源鉴定、遗传图谱构建、亲缘关系推测等方面中发挥重要作用。相关研究成果在线发表在《植物学报 (Journal of Integrative Plant Biology)》(原文链接：<https://www.jipb.net/EN/10.1111/jipb.13395>)。“搜索”的“困境”在日常工作学习中，你有没有过这样的烦恼：比如你想起一句歌词或是一段旋律，却忘记了歌名，只依稀记得歌词里有“朝阳”两字，于是你在歌库中输入关键词“朝阳”，却搜索出了上千条含有“朝阳”的歌，一首一首听是不太可能的，你只得增加关键词的长度，例如：“一杯敬朝阳”“”或者换一个关键词比如“毛不易”，于是你找到了这首歌，是毛不易的《消愁》。我们无时无刻不在搜索，但如何又快又准地找到我们想要的东西？这是我们生活中的困扰，也是摆在科研人员面前的一道难题。把基因组当成一个数据库或者一个word文档，里面充斥着“A”“G”“C”“T”的字符，当你想要找出或复制某一特定基因片段的序列时，往往将基因片段的15-20位序列作为关键词进行搜索。然而，由15-20位字符组成的序列有时候并不“特异”，总是会得到多个相似的搜索结果，以至于我们不得不往后或往前再延长几位，以确保我们搜索到的结果就是我们想要的。在生物学里，我们把由20位字符组成的序列叫做“引物”，把特定的基因片段叫做“目的基因”。生物育种的第一步就是筛选出目的基因，又叫做前景基因选择，目前，最常用的方法是基于PCR的分子标记方法。简单来说，基于PCR的分子标记方法是通过特异性引物进行PCR扩增及建库测序，然而在这一步中受实验条件或引物影响，大多数人都会受到弥散条带(smear)或多个条带的影响，又称PCR的非特异性扩增现象，这一现象让不少人头疼不已，极力避之，然而，常玉晓却决定反其道而行之。变“废”为“宝”这一发现来源于实验室的一次“不完美”，常玉晓的研一学生在设计PCR引物时，错误理解了导师的实验思路，操作失误导致实验结果很不“理想”，学生虽然感到很沮丧，却又不得不硬着头皮将这一结果报告给常玉晓。而常玉晓却在其中发现了秘密。他让学生将实验数据深入分析后意外地发现，学生“不完美”的实验却带来了远远高于期望值的“超完美”结果，而产生“超完美”结果的根本原因，正是一直被大家视为“噪音”和“垃圾”的PCR引物与DNA模板之间不完美匹配(primer-template mismatched annealing, PTMA)引发的非特异性扩增。当一条长度为20个碱基的引物与基因组配对时，若只有7-8个碱基的完美匹配、剩余的碱基全部是不完美匹配，这时，通过优化PCR的反应体系(如试剂组成、退火温度、循环数)可以增强非特异性扩增的产生！常玉晓恰恰是利用这一意外发现，将“不完美”的匹配转换为“完美”的结果！他们基于这一发现开发的FBI-seq (Foreground and Background Integrated genotyping by sequencing, 图1)，利用引物与模板间的PTPA扩增检测前景基因，利用引物与模板间的PTMA扩增检测遗传背景，因此，FBI-seq可实现同时检测前景基因和遗传背景！为了验证FBI-seq技术对不同前景基因的检测效果，研究团队随机选择了水稻中稻瘟病抗性基因Pi2和粒长基因qGL3等共6个前景基因，分别设计引物进行文库构建及测序，数据分析发现通过引物的PTPA扩增可准确覆盖这些前景基因位点，同时基于全基因组范围内的PTMA扩增也获得了数以万计的

tag位点，因此FBI-seq中的PTPA和PTMA扩增特性可成功应用于其他不同前景基因引物。随后，研究团队又分析了多个水稻品种的不同技术重复间可重复鉴定到的tag的数量和分布位置，以及不同抽样数据量下tag数目的变化特征，进一步验证了PTMA扩增的稳定性。为了探究FBI-seq在育种中的实际应用效果，研究团队选择了一个水稻BC(2)F(4)群体进行验证。利用结合在稻瘟病抗性基因Pi2位点的SP引物，对随机选择的5个单株进行FBI-seq文库构建及测序，根据覆盖深度及稳定性获得了三类SNP，基于三类SNP分别获得的binmap图谱以及PTPA扩增结果，发现5个测试单株均含Pi2抗性基因，遗传背景回复率在83.8~93.0%之间（图2）。最后，研究团队测试了源于水稻的多个SP引物在西红柿和豇豆中的基因分型效果，发现PTMA扩增产生的稳定tag位点在这两个物种的全基因组上均可均匀分布，说明FBI-seq在其他物种中也有很好的基因分型能力。FBI-seq技术是常玉晓课题组继AIO-seq测序技术开发之后的又一重要研究成果。FBI-seq的成功开发，不仅实现了作物育种中前景基因和遗传背景的同时检测，节省了育种成本，提高了育种效率；同时，作为一种新的全基因组基因分型技术，FBI-seq也有望在各种作物的真假品种鉴别、种质资源鉴定、遗传图谱构建、亲缘关系推测等领域中发挥重要作用。基因组所常玉晓研究员、钱前院士和南京农业大学智海剑教授为本论文通讯作者。本项目得到国家自然科学基金、江苏省现代作物生产协同创新中心等项目的资助。

来源：中国农业科学院深圳农业基因组研究所

发布日期:2022-10-27

全文链接:

<https://agis.caas.cn/xwzx/kyjz/f1a67a156d90420e980d7cbd74179af0.htm>

➤ 学术文献

1. Morphological and Genetic Diversity of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Fruit Development (黄瓜(黄瓜*Cucumis sativus* L.)果实发育的形态和遗传多样性)

简介: Cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruits, which are eaten at an immature stage of development, can vary extensively in morphological features such as size, shape, waxiness, spines, warts, and flesh thickness. Different types of cucumbers that vary in these morphological traits are preferred throughout the world. Numerous studies in recent years have added greatly to our understanding of cucumber fruit development and have identified a variety of genetic factors leading to extensive diversity. Candidate genes influencing floral organ establishment, cell division and cell cycle regulation, hormone biosynthesis and response, sugar transport, trichome development, and cutin, wax, and pigment biosynthesis have all been identified as factors influencing cucumber fruit morphology. The identified genes demonstrate complex interplay between structural genes, transcription factors, and hormone signaling. Identification of genetic factors controlling these traits will facilitate breeding for desired characteristics to increase productivity, improve shipping, handling, and storage traits, and enhance consumer-desired qualities. The following review examines our current understanding of developmental and genetic factors driving diversity of cucumber fruit morphology.

来源: Plants

更多资讯 尽在农业专业知识服务系统:<http://agri.ckcest.cn/>

发布日期:2022-12-21

全文链接:

<http://agri.ckcest.cn/file1/M00/03/49/Csgk0YgdBl6AQ2u2AJHiVQB1jIo230.pdf>

2. CRISPR/Cas9 based mlo-mediated resistance against *Podosphaera xanthii* in cucumber (*Cucumis sativus* L.) (基于CRISPR / Cas9的mlo介导的黄瓜(黄瓜*Cucumis sativus* L.) 对白粉病菌的抗性研究?)

简介: Powdery mildews (PM) are common and severe pathogen groups that threaten plants, and PM resistance is complex and polygenic in cucumbers. Previously mlo-based resistance was reported in various plants, including cucumber, with generated loss-of CsaMLO function mutants. However, mlo-based resistance in cucumber is also complex and involves additional mechanisms such as hypersensitive response (HR) and papillae formation. For this reason, we focused on determining the mlo-based powdery mildew resistance mechanism in cucumber. CRISPR/Cas9 was used in the present study to generate loss-of-function mutants for CsaMLO1, CsaMLO8, and CsaMLO11 of PM susceptible ADR27 cucumber inbred lines and CsaMLO mutants were obtained and validated. Trypan Blue and DAB staining were performed to detect *Podosphaera xanthii* germination/penetration rates and accumulation of Reactive Oxygen Species (ROS). Our results indicate that PM-susceptibility associated CsaMLOs in cucumber are negative regulators in different defense mechanisms against powdery mildew at early and late stages of infection. Further, the experiment results indicated that CsaMLO8 mutation-based resistance was associated with the pre-invasive response, while CsaMLO1 and CsaMLO11 could be negative regulators in the post-invasive defense response in cucumber against *P. xanthii*. Although the loss-of CsaMLO8 function confers the highest penetration resistance, CsaMLO1 and CsaMLO11 double mutations could be potential candidates for HR-based resistance against PM pathogen in cucumber. These results highlighted the crucial role of CRISPR/Cas9 to develop PM resistant cucumber cultivars, possessing strong pre-invasive defense with CsaMLO8 or post-invasive with CsaMLO1/CsaMLO11 mutations.

来源: Frontiers in Plant Science

发布日期:2022-12-19

全文链接:

<http://agri.ckcest.cn/file1/M00/10/1B/Csgk0GPGU3aAOKqRAQikEDdnvco951.pdf>

➤ 相关专利

1. 一种转基因水稻杂草化基因漂移风险的评估方法及应用

简介: 本发明公开了一种转基因水稻杂草化基因漂移风险的评估方法及应用,该方法包括以下步骤:通过隔行种植或包围种植的方式混种,分别收获转基因水稻与杂草稻的后代种子,正向漂移检测和筛选幼苗抗性,存活植株再检测抗性基因;反向漂移检测子实

更多资讯 尽在农业专业知识服务系统:<http://agri.ckcest.cn/>

中红皮Rc基因。根据抗性基因和Rc基因的检出率，合并计算转基因水稻基因漂移率，评价基因漂移风险。该方法克服了以往仅考虑正向漂移风险忽视反向漂移风险而低估实际漂移风险的弊端，从而可以更准确评估转基因水稻通过花粉介导的基因漂移风险大小，为转基因水稻商业化过程中的环境安全评价和管理提供技术支撑。

来源：佰腾网

发布日期：2022-08-12

全文链接：

<http://agri.ckcest.cn/file1/M00/10/1B/Csgk0GPGVYaAVnR2ABmF8RITfbA068.pdf>

2. 转基因水稻mf_b-MH3301的外源插入片段全序列及其旁侧序列

简介：本发明在专利CN103667476A的基础上公开了转基因水稻mf_b-MH3301的外源插入片段全序列及其旁侧序列。本发明通过hiTAIL-PCR和LA-PCR扩增的方法获得外源插入片段和水稻序列连接区的3'端旁侧序列，其核苷酸序列为SEQ ID No. 1所示；本发明进一步公开了外源插入片段全序列，其核苷酸为SEQ ID No. 2所示；本发明提供的分子特征为转基因水稻mf_b?MH3301及其衍生品种检测方法的建立提供了基础。

来源：佰腾网

发布日期：2022-05-06

全文链接：

<https://www.baiten.cn/patent/detail/11ad23369ea889acaf22d6dc32f7b8c51042eefd66c07739?sc=&fq=&type=&sort=&sortField=&q=CN112592920A&rows=10#1/CN202011484799.8/sqdetail/abst>