

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2022.13068

不依赖基因型的高效玉米遗传转化体系的建立

许洁婷^{1,2,3,**} 刘相国^{4,**} 金敏亮^{1,2} 潘弘² 韩宝柱² 李梦娇² 岩说⁵
胡国庆⁵ 严建兵^{1,*}

¹ 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070; ² 未来生物科技(江苏)有限公司, 江苏常州 213000; ³ 未来生物科技(海南)有限公司, 海南三亚 572000; ⁴ 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 吉林长春 130033; ⁵ 西双版纳傣族自治州农业科学研究所, 云南景洪 666100

摘要: 玉米遗传转化严重依赖于受体基因型, 目前绝大部分商业化玉米骨干自交系的遗传转化仍然十分困难。*Baby boom (Bbm)*和*Wuschel2 (Wus2)*是植物干细胞发育中的2个关键基因, 调节这2个基因的时空表达可以有效提高植物遗传转化效率。本研究以多个我国玉米骨干自交系为受体材料开展转化效率测试, 发现虽然*Bbm*和*Wus2*的超表达可以显著提高转化效率, 但对玉米的生长发育具有不利影响。本研究开发了一种新型辅助转化技术, 在辅助载体中加入致死基因表达元件, 并调节2个基因的时空表达。结果表明该辅助载体和目标载体混合转化时, 不但可以在T₀代成功获得不含*Bbm*和*Wus2*辅助载体的正常生长发育的优质转化苗, 还显著提高转化效率(平均达19.5%)。本研究成功建立和完善了一套不依赖基因型的高效玉米遗传转化体系, 为提高生物育种效率和精准改良提供了有力支持。

关键词: 玉米; 遗传转化; *Baby boom*; *Wuschel2*; 辅助载体

Establishment of genotype-independent high-efficiency transformation system in maize

XU Jie-Ting^{1,2,3,**}, LIU Xiang-Guo^{4,**}, JIN Min-Liang^{1,2}, PAN Hong², HAN Bao-Zhu², LI Meng-Jiao², YAN Shuo⁵, HU Guo-Qing⁵, and YAN Jian-Bing^{1,*}

¹ National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China; ² WIMI Biotechnology Co., Ltd., Changzhou 213000, Jiangsu, China; ³ WIMI Biotechnology Co., Ltd., Sanya 572000, Hainan, China; ⁴ Institute of Agricultural Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, Jilin, China; ⁵ Institute of Agricultural Sciences of Xishuangbanna Prefecture of Yunnan Province, Jinghong 666100, Yunnan, China

Abstract: The reliance on receptor genotype of genetic transformation made it difficult for the transformation of commercial maize lines. Expression regulation of two important genes in plant stem cell development, *Baby boom (Bbm)* and *Wuschel2 (Wus2)*, was revealed to significantly improve transformation efficiency. Several Chinese core maize inbred lines were used as receptor materials to test the transformation efficiency. Although the overexpression of *Bbm* and *Wus2* could significantly improve the transformation efficiency, it had a negative impact on the growth and development of T₀ plants. Here, a new assisted transformation technology was developed, in which a lethal gene element was added to the assist vector and the spatial expression of the two genes were regulated. The results revealed that the hybrid transformation of the assist vector and the target vector could not only successfully obtain high-quality transformation seedlings without *Bbm* and *Wus2* assist vector in T₀ generation, but also significantly improve the transformation efficiency with an average 19.5%. The application of this improved genotype-independent genetic transformation system promises maize precise improvement with higher efficiency.

Keywords: maize; genetic transformation; *Baby boom*; *Wuschel2*; assist vector

本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项(2018ZX08010-04B, 2019ZX08010003-002-013)和吉林省科技发展计划项目(20190201290JC)资助。

This study was supported by the National Major Project for Developing New GM Crops (2018ZX08010-04B, 2019ZX08010003-002-013) and the Science and Technology Innovation Program of Jilin Province (20190201290JC).

* 通信作者(Corresponding author): 严建兵, E-mail: yjianbing@mail.hzau.edu.cn

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 许洁婷, E-mail: xjt@wimbio.com; 刘相国, E-mail: lxgyj@cjaas.com

Received (收稿日期): 2021-11-26; Accepted (接受日期): 2022-03-25; Published online (网络出版日期): 2022-04-20.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20220418.1450.020.html>

玉米(*Zea mays* L.)是我国种植面积最大、产量最高的粮食作物,同时也是全球重要的饲料作物和经济作物。20 世纪 80 年代以前,通过有性杂交实现基因重组的常规育种是玉米品种选育的主要手段^[1]。随着分子育种技术的快速发展,转基因技术逐渐广泛应用于玉米的遗传改良,并展现出了巨大的市场价值^[2]。自 1995 年世界上第一例抗虫抗除草剂玉米 Bt176 获得商业化许可后,截止到 2019 年全球转基因玉米累计种植面积已达到 7.5×10^8 hm² (ISAAA, 2019)^[3]。

遗传转化技术是转基因玉米产品研发的核心环节,自 1986 年以来国内外多个研究团队针对玉米遗传转化技术开展了多项研究。Fromm 等^[4]率先采用电击法将抗除草剂 *pat* 基因转入玉米原生质体,但并未得到玉米再生植株;Rhodes 等^[5]同样用电击法将 *NPT II* 基因转入玉米原生质体,并通过抗性筛选和分化再生得到带有卡那霉素抗性的转基因植株,但该植株没有结实;随后 Shillito 等^[6]成功地从玉米原生质体再生出可育的转基因植株。电击法虽然操作简便,但转化效率低,较难获得稳定遗传后代。随着技术的不断进步,基因枪法^[7]、农杆菌介导法^[8]、花粉管通道法^[9]和 PEG 介导法^[10]等多种技术均在玉米遗传转化中获得成功。1989 年, Klein 等^[7]首次采用基因枪法转化玉米,将 *gus* 和 *CAT* 基因转入到玉米悬浮细胞系中;Gordon-Kamm 等^[11]用基因枪法转入 *gus* 和 *pat* 基因,并获得可正常结实的转基因玉米植株。基因枪法虽有受体广泛、转化效率高的优点,但实际应用中仍存在外源基因多拷贝、DNA 断裂等问题。1991 年, Gould 等^[8]用根瘤农杆菌与玉米茎尖共培养得到了转基因玉米,但转化效率很低;1996 年, Ishida 等^[12]用含超二元载体的农杆菌侵染玉米自交系 A188 的幼胚,并优化菌株、菌液浓度等条件,转化效率可高达 30%,被认为是玉米农杆菌介导遗传转化技术发展的重要里程碑。相比基因型,农杆菌介导法插入的外源基因大多数是单拷贝,遗传稳定性好,且所需的仪器设备简单,操作易行,成本低。作为物美价廉的技术,农杆菌介导法已成为目前玉米转基因研究中应用最为广泛的遗传转化技术。

玉米是单子叶植物,并不是农杆菌的天然宿主,农杆菌介导的玉米遗传转化一直存在转化效率低的问题^[13]。影响玉米转化效率的因素有很多,如农杆菌菌株、受体材料、培养基成分和筛选方式等。受

体基因型不同,农杆菌介导的转化效率也不同,目前绝大部分玉米基因型的转化效率都不高。玉米中常用的受体材料有自交系 A188、杂交种 HiII (A188×B73)等,它们的转化效率要明显高于普通材料,原因在于大多数玉米自交系诱导产生的是难以转化的 Type I 型愈伤组织,而 A188 等受体材料可以产生 Type II 型愈伤组织^[14]。Type II 型愈伤组织是胚性愈伤组织,具有分化胚状体的能力并且可以长期继代^[15]。这种受体基因型依赖的问题在一定程度上限制了玉米转基因技术的应用进程。

Baby boom (*Bbm*)和 *Wuschel2* (*Wus2*)是植物干细胞发育中的关键调控因子^[16-17]。*Bbm* 编码一个 AP2/ERF 转录因子,在维持干细胞不分化状态中发挥重要作用;*Wus2* 编码同源异型结构域蛋白,能使周围的细胞具有干细胞特征。2016 年,杜邦先锋联合巴斯夫和陶氏益农公司研究发现超表达 *Bbm* 和 *Wus2* 这 2 个基因可以将转化效率从 2%提高到 25%~50%^[18]。2017 年,美国密苏里大学和罗德岛大学合作,在低转化效率的常规材料 B73 中同时超表达这 2 个基因,成功将 B73 的转化效率提高到 15%^[19]。2018 年,杜邦先锋公司分别用 *Zm-PLTPpro* 和 *Zm-Axig1pro* 启动子驱动 *Bbm* 和 *Wus2* 的表达,使玉米幼胚可不经愈伤诱导阶段直接被转化并长成植株,将愈伤转化后分化成苗的时间缩短至 1 个月^[20]。这种启动子和再生基因的有效组合为解决受体基因型依赖和再生困难的问题提供了一条新的途径。

虽然国际上已经证实超表达 *Bbm* 和 *Wus2* 可以提高玉米转化效率,但实际应用时仍存在很多技术难点。为了进一步探索 *Bbm* 和 *Wus2* 在辅助玉米遗传转化中的应用价值,实现我国玉米骨干自交系的稳定遗传转化,本研究构建了多个 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达辅助载体,在我国玉米骨干自交系的背景下开展了辅助转化效率测试,建立了一套不依赖基因型的高效玉米遗传转化体系,助力未来玉米的精准育种。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 玉米常用转化受体材料为 KN5585^[21]和 B104,我国玉米骨干自交系郑单 958 母本(郑 58)、翔玉 998 父本(X923-1)、IL3、IL4、京科 968 母本(京 724)和糯玉米自交系 IN12 等共 6 个。

1.1.2 载体和菌株 所用载体主要是 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达辅助载体和目标载体(*Waxy* 基因敲除载

体)。农杆菌选用的是根癌农杆菌 EHA105, 农杆菌 OD₆₀₀ 值为 0.3。

1.2 方法

1.2.1 幼胚剥取和侵染 以授粉后 10 d 的幼穗为受体材料, 人工分离 1.5~1.8 mm 的幼胚。将剥取的幼胚放入含有 1.8 mL 悬浮液的 2 mL 塑料离心管中, 吸去悬浮液, 余下幼胚在管中继续加入 1.0 mL 农杆菌悬浮液, 放置 5 min。载体混合转化的比例 *Bbm* 和 *Wus2* 的超表达辅助载体: 目标载体为 1:10。

1.2.2 共培养和筛选培养 将离心管中的幼胚悬浮后倒入共培养基上, 并用移液器吸去表面多余的农杆菌菌液, 于 23℃ 黑暗共培养 1~2 d。将幼胚转移到休息培养基中, 于 28℃ 黑暗培养 7 d 后, 放至含 10 mg L⁻¹ 草丁膦的筛选培养基上, 开始筛选培养 2~3 周, 长出小芽。培养基成分组成参考已发表文献^[22], 并做适当的修改。

1.2.3 分化成苗 将小芽转移至无激素的 MS0 培养基中, 25℃, 80 μmol m⁻² s⁻¹, 光照培养 2 周。再将生出的小苗转移至生根培养基上, 25℃, 80 μmol m⁻² s⁻¹, 光照培养直到生根。将小苗转入小盆中生长, 一定生长阶段后移栽于温室。

1.2.4 转基因植株鉴定 取叶片提取 DNA, 使用载体特异性引物进行 PCR 检测, 包括 Bar 阳性检测 (BAR4-F: 5'-GCGGTCTGCACCATCGTCAA-3'; BAR4-R: 5'-AGATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3') 和 *Bbm*/*Wus2* 元件检测 (3369-F1: 5'-TGCTCAGATGGG GTACGAGA-3'; 3369-R1: 5'-CAGACACGAGAGG TTGCAGA-3'), 鉴定转基因植株。不含 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达辅助载体但含目标载体的阳性苗认为是优质转化苗, 统计优质转化苗数量, 分别计算分离率 (优质转化苗/阳性苗) 和优质转化率 (优质转化苗/起始胚数量)。

2 结果与分析

2.1 不同类型的 *Bbm* 和 *Wus2* 的超表达辅助载体和 *Waxy* 基因敲除载体构建

本研究设计并构建了 3 种 *Bbm* 和 *Wus2* 的超表达辅助载体和 1 种玉米 *Waxy* 基因 (Zm00001d045462) 双靶敲除载体 (图 1): (1) pWMDR001, *Bbm* 和 *Wus2* 的超表达元件与玉米 *Waxy* 基因敲除元件的整合载体。分别用 *Zm-PLTPpro* 和 *Zm-Axig1pro* 启动子驱动 *Bbm* 和 *Wus2* 的表达, 基因敲除关键元件 Cas9 由玉米 *ZmUbi* 启动子驱动表达, sgRNA (sgRNA1: 5'-CGGCATCTACAGGGACGCAAAGG-3'; sgRNA2: 5'-CCGTCTTCGTTCTCCATGCTCGT-3') 由玉米 *ZmU6* 启动子表达, 并连有 Bar 表达盒; (2) pWMDR002, 独立的 *Bbm* 和 *Wus2* 的超表达辅助载体, 仅含有 *Bbm* 和 *Wus2* 的超表达元件, 不含有筛选标记或其他元件; (3) pWMDR003, 在独立的 *Bbm* 和 *Wus2* 的超表达辅助载体中加入致死基因表达元件。用绿色组织特异性表达的 Photosystem II 10 kD 启动子驱动解淀粉芽孢杆菌 *Barnase* 基因的表达, *Barnase* 编码一种胞外核糖核酸酶, 具有强烈的毒性, 可以导致细胞的死亡^[23]; (4) p193412, 含有 Cas9 和 sgRNA 等编辑元件以及 Bar 表达盒, 用于与 pWMDR002 或 pWMDR003 混合转化。

2.2 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达元件和 *Waxy* 基因敲除元件整合辅助载体的直接转化

为了测试 *Bbm* 和 *Wus2* 的超表达对玉米骨干自交系转化效率的影响, 本研究首先测试了整合辅助载体 pWMDR001 的辅助效果。在郑 58 等 5 个骨干自交系中均可以观察到侵染后的愈伤组织上由于 *Bbm* 和 *Wus2* 的超表达引起的胚状凸起。一般转化后 3 d 左右就有明显的突起 (图 2-A), 7 d 后就可以观察

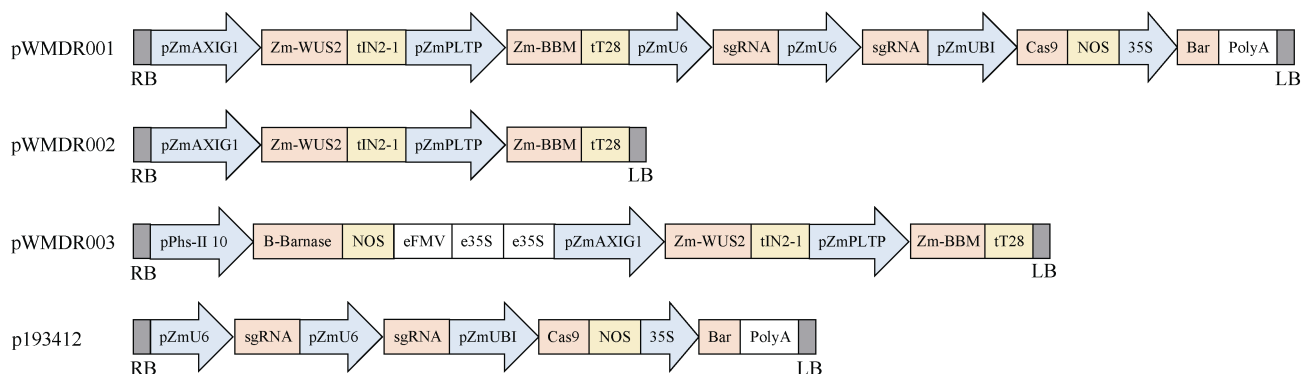


图 1 辅助载体和基因敲除载体示意图

Fig. 1 Schematic diagram for assist vectors and gene-targeting vectors

到明显成簇的胚状体(图 2-B)。侵染后的愈伤组织可见丰富的胚状凸起(图 2-C), 并成功在培养基上分化成苗(图 2-D)。转化效率在不同自交系之间存在差异, 从 6.0%~24.0%不等, 平均可达 14.0% (表 1)。*Bbm* 和 *Wus2* 的超表达同时也显著提高了玉米常规转化受体材料 KN5585 和 B104 的转化效率, 从均值 7.8% 提高到 18.0%。然而一些骨干自交系的 T_0 代转化植株表现异常, 如 IL3 的 T_0 植株的雄穗部分表现为雌穗性状(图 2-E), 比例达到 80.0%以上, 推测是 *Bbm* 或 *Wus2* 的泄露表达造成的不利农艺性状。与含有 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达元件的辅助载体 pWMDR001 相比, 采用不含 *Bbm* 和 *Wus2* 元件的载体 p193412 进行遗传转化测试时, 仅有 KN5585 和 B104 可以产生阳性苗, 转化效率分别为 10.5%和 5.0%, 其中异常

单株比较少(约 20.0%), 这是组织培养的正常现象, 而其他 5 个玉米骨干自交系均未获得阳性苗。

2.3 独立的 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达辅助载体和 *Waxy* 基因敲除载体的混合转化

虽然超表达 *Bbm* 和 *Wus2* 可以显著提高玉米遗传转化效率, 但是本研究发现其产生的后代玉米植株存在发育障碍等不利农艺性状, 限制了该技术的推广应用。为解决上述问题, 本研究首先尝试独立构建 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达辅助载体和 *Waxy* 基因敲除载体的混合转化, 期望可以获得不含 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达元件的转基因植株。在郑 58、KN5585 和 B104 背景下混合转化后发现, T_0 代确有分离现象, 可以得到不含 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达元件的转基因植株(部分示例如图 3-A; 样品 3、样品 9), 即优质转化苗。

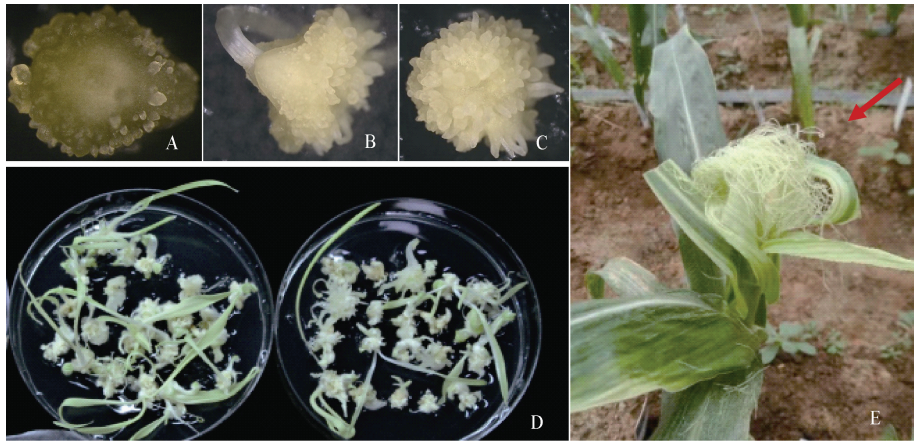


图 2 郑 58 的愈伤诱导(A-C)、愈伤分化(D)和 IL3 T_0 植株异常表型(E)
Fig. 2 Generation (A-C) and differentiation (D) of callus in Zheng 58 and abnormal phenotype of T_0 plant in IL3 (E)
红色箭头所示为异常的雄穗。The red arrow refers to an abnormal maize tassel.

表 1 玉米骨干自交系和常规受体材料中 pWMDR001 和 p193412 载体的转化效率
Table 1 Transformation efficiency of pWMDR001 and p193412 in maize elite inbred and receptor lines

试验编号	玉米自交系	载体	起始胚数量	转化阳性苗数量	转化效率
Test ID	Maize inbred line	Vector name	No. of embryos	No. of positive transgenic seedlings	Transformation frequency (%)
1	郑 58 Zheng 58	pWMDR001	100	24	24.0
2	X923-1	pWMDR001	50	3	6.0
3	IL3	pWMDR001	50	5	10.0
4	IL4	pWMDR001	50	9	18.0
5	京 724 Jing 724	pWMDR001	50	6	12.0
6	KN5585	pWMDR001	50	9	18.0
7	B104	pWMDR001	100	18	18.0
8	郑 58 Zheng 58	p193412	200	0	0
9	X923-1	p193412	100	0	0
10	IL3	p193412	100	0	0
11	IL4	p193412	100	0	0
12	京 724 Jing 724	p193412	100	0	0
13	KN5585	p193412	200	21	10.5
14	B104	p193412	100	5	5.0

通过测序发现优质转化苗中的 *Waxy* 基因得到了编辑(图 3-C), 且编辑类型丰富, 有 2 个靶标之间的大片段缺失, 也有单个靶标上的单碱基插入等。然而这种方法的优质转化苗分离率和优质转化效率都较低, 均值分别为 22.2%和 4.7% (表 2), 不适于高通量的玉米转化苗生产。

2.4 致死基因表达元件的辅助载体能显著提高优质转化效率

虽然独立构建辅助载体并混合转化的方法可以

有效解决 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达产生不利性状的问题, 但是目标载体稳定转化的有效获得率仍然很低。为了进一步提高优质转化苗的分离率和优质转化效率, 本研究在 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达载体上加入致死基因表达元件, 使得含有 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达载体的愈伤不能分化成苗。与 *Waxy* 基因敲除载体混合转化后, 优质转化苗分离率显著升高(图 3-B), 样品 1、4、5、6、8、9、10, 平均可达 89.2%。优质转化效率平均达到 19.5%, 是第 2 组载体转化效率的 4.1 倍(表 3)。

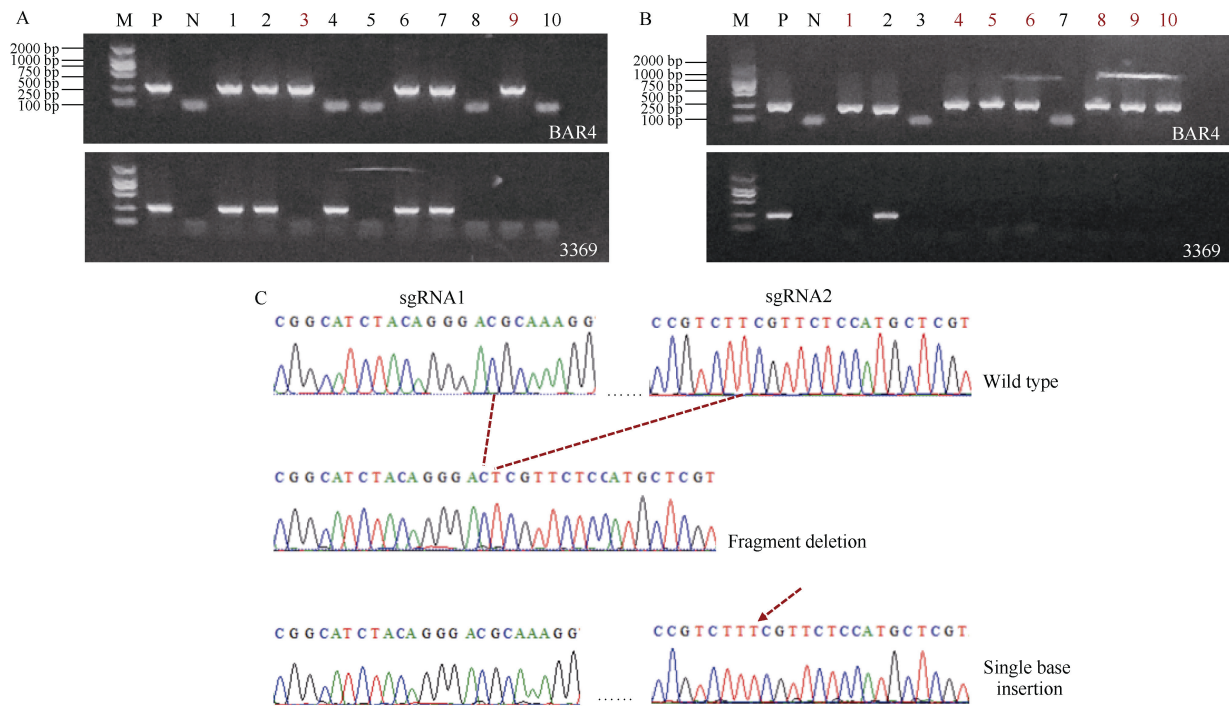


图 3 混合转化后的基因型分离检测(A, B)和 *Waxy* 基因编辑情况(C)
Fig. 3 Genotype identification after mixture transformation (A, B) and sequencing results for *Waxy* mutants (C)
M: DL2000 marker; P: 阳性对照; N: 阴性对照。
M: DL2000 marker; P: the positive control; N: the negative control.

表 2 3 种玉米材料中 pWMDR002 和基因编辑载体混转的转化效率

Table 2 Transformation efficiency by mixing pWMDR002 and gene editing vector in three maize lines						
试验编号 Test ID	玉米自交系 Maize inbred line	起始胚数量 No. of embryos	转化阳性苗数量 No. of positive transgenic seedlings	优质转化苗数量 No. of high-quality transformed seedlings	优质转化苗分离率 Separation rate of high-quality transformed seedling (%)	优质转化效率 High-quality transformation frequency (%)
1	郑 58 Zheng 58	313	24	8	33.3	2.6
2	郑 58 Zheng 58	535	107	2	1.9	0.4
3	郑 58 Zheng 58	828	129	56	43.4	6.8
4	郑 58 Zheng 58	446	103	14	13.6	3.1
5	KN5585	210	40	5	12.5	2.4
6	KN5585	256	65	18	27.7	7.0
7	KN5585	260	51	16	31.4	6.2
8	B104	189	59	13	22.0	6.9
9	B104	242	70	11	15.7	4.5
10	B104	150	48	10	20.8	6.7

3 讨论

尽管近些年玉米的遗传转化技术取得了较大的进步,但仍存在着基因型依赖、转化效率不高等问题,是玉米生物育种应用的限制因素之一。*Bbm* 和 *Wus2* 的发现和应用为解决玉米受体基因型依赖的问题提供了契机。*Bbm* 属于 AP2/ERF 家族转录因子, AP2/ERF 蛋白在生长发育相关的转录调控和对环境的应激反应中起着重要作用^[24]。有研究表明 *BBM* 可通过 *LEC1-ABI3-FUS3-LEC2* 调控途径来诱导拟南芥胚状体的发生^[25], *BBM*、*LEC1* 和 *LEC2* 这类转录因子是植物细胞多能性的主要调节因子,在没有外源激素刺激下超表达其中任何一个基因都可以诱导胚状体的发生。*Wus2* 是一种植物中特有的 *WOX*

转录因子,这一类转录因子在植物的胚胎形成、干细胞维持和器官形成等关键发育过程中发挥着重要功能^[26]。*WUS* 和 *CLV* (*CLAVATA*) 构成的负反馈调节环调控着植物干细胞的增殖与分化^[27]。*WUS* 促进干细胞的维持, *CLV* 则促进干细胞的分化。本研究利用 *Bbm* 和 *Wus2* 的超表达在多个我国玉米骨干自交系中实现遗传转化,并通过加入致死基因表达元件和载体混合转化解决 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达对玉米生长发育的不利影响,平均转化效率可达 19.5%,是目前玉米常用转化受体 KN5585 和 B104 的转化效率 (7.8%) 的 2.5 倍。然而,不同材料背景和不同实验组之间的转化效率还不稳定,如郑 58 背景的 2 组实验,转化效率分别是 8.0% 和 24.0%,差距较大,因此还需继续优化以建立更加高效且稳定的转化体系。

表 3 4 个玉米自交系中 pWMDR003 和基因编辑载体混合转化的转化效率

Table 3 Transformation efficiency by mixing pWMDR003 and gene editing vector in four maize inbred lines

试验编号 Test ID	玉米自交系 Maize inbred line	起始胚数量 No. of embryos	转化阳性苗数量 No. of positive transgenic seedlings	优质转化苗数量 No. of high-quality transformed seedlings	优质转化苗分离率 Separation rate of high-quality transformed seedling (%)	优质转化效率 High-quality transformation frequency (%)	平均优质转化效率 Average high-quality transformation frequency (%)
1	B104	430	133	123	92.5	28.6	31.0
2	B104	100	39	39	100.0	39.0	
3	B104	150	45	38	84.4	25.3	
4	郑 58 Zheng 58	160	18	14	77.8	8.8	16.4
5	郑 58 Zheng 58	200	56	48	85.7	24.0	
6	京 724 Jing 724	50	6	5	83.3	10.0	11.5
7	京 724 Jing 724	100	15	13	86.7	13.0	
8	糯 IN12 Nuo IN12	50	7	7	100.0	14.0	13.3
9	糯 IN12 Nuo IN12	200	27	25	92.6	12.5	

4 结论

在 *Bbm* 和 *Wus2* 的超表达辅助载体中加入致死基因表达元件,与基因敲除载体混合转化后,可以分离得到不含 *Bbm* 和 *Wus2* 超表达元件并正常生长的优质转化苗。该玉米遗传转化体系可以解决玉米受体基因型依赖的问题,依托未来米生物科技(江苏)有限公司已经建立了高通量的玉米转化平台,可以实现每年 5 万个玉米事件的转化,能服务未来玉米生物育种的需要。

致谢:感谢未来米生物科技有限公司的大力支持;感谢吉林省鸿翔种业有限公司提供翔玉 998 父本 (X923-1),北京市农林科学院赵久然老师提供郑单 958 母本(郑 58)和京科 968 母本(京 724),湖北康农种业股份有限公司提供糯玉米自交系 IN12。

References

- [1] 石清琢, 姜敏. 玉米转基因育种技术概述. 杂粮作物, 2005, 25: 230–231.
Shi Q Z, Jiang M. Review on selection techniques for maize transgenic. *Rain Fed Crops*, 2005, 25: 230–231 (in Chinese).

- [2] 张英, 穆楠, 朴红梅. 转基因技术在玉米遗传育种中的应用. 生物技术通报, 2009, 25(1): 64–68.
Zhang Y, Mu N, Piao H M. Applications of transgenic technology in maize genetic breeding. *Biotechnol Bull*, 2009, 25(1): 64–68 (in Chinese with English abstract).
- [3] 焦悦, 韩宇, 杨桥, 黄耀辉, 安吉翠, 杨亚洲, 叶纪明. 全球转基因玉米商业化发展态势概述及启示. 生物技术通报, 2021, 37(4): 164–176.
Jiao Y, Han Y, Yang Q, Huang Y H, An J C, Yang Y Z, Ye J M. Commercialization development trend of genetically modified maize and the enlightenment. *Biotechnol Bull*, 2021, 37(4): 164–176 (in Chinese with English abstract).
- [4] Fromm M E, Taylor L P, Walbot V. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature*, 1986, 319: 791–793.
- [5] Rhodes C A, Pierce D A, Mettler I J, Mascarenhas D, Detmer J J. Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science*, 1988, 240: 204–247.
- [6] Shillito R D, Carswell G K, Johnson C M, DiMaio J J, Harms C T. Regeneration of fertile plants from protoplasts of elite inbred maize. *Nat Biotechnol*, 1989, 7: 581–587.
- [7] Klein T M, Kornstein L, Sanford J C, Fromm M E. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. *Plant Physiol*, 1989, 91: 440–444.
- [8] Gould J, Devey M, Hasegawa O, Ulian E C, Peterson G, Smith R H. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex. *Plant Physiol*, 1991, 95: 426–434.
- [9] Ohta Y. High-efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 715–719.
- [10] Golovkin M V, Abraham M, Morocz S, Bottka S, Feher A, Dudits D. Production of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embryogenic protoplasts. *Plant Sci*, 1993, 90: 41–52.
- [11] Gordon-Kamm W J, Spencer T M, Mangano M L, Adams T R, Daines R J, Start W G, O'Brien J V, Chambers S A, Adams Jr W R, Willetts N G, Rice T B, Mackey C J, Krueger R W, Kausch A P, Lemaux P G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell*, 1990, 2: 603–618.
- [12] Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 745–750.
- [13] 黄敏, 杜何为, 张祖新. 玉米转基因技术研究进展. 安徽农业科学, 2004, 32: 1017–1020.
Huang M, Du H W, Zhang Z X. Transformation research progress in maize. *J Anhui Agric Sci*, 2004, 32: 1017–1020 (in Chinese with English abstract).
- [14] 黎裕, 王天宇. 玉米转基因技术研发与应用现状及展望. 玉米科学, 2018, 26(2): 1–15.
Li Y, Wang T Y. Germplasm enhancement in maize: advances and prospects. *J Maize Sci*, 2018, 26(2): 1–15 (in Chinese with English abstract).
- [15] Armstrong C L, Green C E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta*, 1985, 164: 207–214.
- [16] Boutilier K, Offringa R, Sharma V K, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu C M, van Lammeren A A M, Miki B L A, Custers J B M, van Lookeren Campagne M M. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*, 2002, 14: 1737–1749.
- [17] Zuo J, Niu Q W, Frugis G, Chua N H. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, 30: 349–359.
- [18] Lowe K, Wu E, Wang N, Hoerster G, Hastings C, Cho M J, Scelonge C, Lenderts B, Chamberlin M, Cushatt J, Wang L, Ryan L, Khan T, Chow-Yiu J, Hua W, Yu M, Banh J, Bao Z, Brink K, Igo E, Rudrappa B, Shamseer P, Bruce W, Newman L, Shen B, Zheng P, Bidney D, Falco C, Register J, Zhao Z Y, Xu D, Jones T, Gordon-Kamm W. Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation. *Plant Cell*, 2016, 28: 1998–2015.
- [19] Mookkan M, Nelson-Vasilchik K, Hague J, Zhang Z J, Kausch A P. Selectable marker independent transformation of recalcitrant maize inbred B73 and sorghum P898012 mediated by morphogenic regulators *BABY BOOM* and *WUSCHEL2*. *Plant Cell Rep*, 2017, 36: 1477–1491.
- [20] Lowe K, La Rota M L, Hoerster G, Hastings C, Wang N, Chamberlin M, Wu E, Jones T, Gordon-Kamm W. Rapid genotype “independent” *Zea mays* L. (maize) transformation via direct somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2018, 54: 240–252.
- [21] Liu H, Jian L, Xu J, Zhang Q, Zhang M, Jin M, Peng Y, Yan J, Han B, Liu J, Gao F, Liu X, Huang L, Wei W, Ding Y, Yang X, Li Z, Zhang M, Sun J, Bai M, Song W, Chen H, Sun X, Li W, Lu Y, Liu Y, Zhao J, Qian Y, Jackson D, Fernie A R, Yan J. High-throughput CRISPR/Cas9 mutagenesis streamlines trait gene identification in maize. *Plant Cell*, 2020, 32: 1397–1413.
- [22] Sidorov V, Duncan D. *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods Mol Biol*, 2009, 526: 47–58.
- [23] Hartley R W. Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends Biochem Sci*, 1989, 14: 450–454.
- [24] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 2006, 140: 411–432.
- [25] Horstman A, Li M, Heidmann I, Weemen M, Chen B, Muino J M, Angenent G C, Boutilier K. The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiol*, 2017, 175: 848–857.
- [26] Graaff E, Laux L, Rensing S A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biol*, 2009, 10: 248.
- [27] Weigel D, Jürgens G. Stem cells that make stems. *Nature*, 2002, 415: 751–754.