

农杆菌介导的体外萌发花粉玉米转基因方法研究

韩雅利^{1,2}, 焦宏业², 王磊², 史明山², 范子洋², 刘康¹

(1. 南京农业大学/作物遗传与种质创新利用全国重点实验室, 南京 210095; 2. 邯郸市农业科学院玉米研究室, 河北 邯郸 056001)

摘要: 目前, 玉米转基因方法主要采用农杆菌介导法和基因枪法, 但是这两种方法都需要经过组织培养, 实验条件要求较高、耗时长, 且受转基因受体的基因型限制。选取杂交种苏玉 19 为材料, 在优化玉米花粉离体萌发培养基的基础上, 探索通过农杆菌侵染萌发花粉将外源基因导入玉米花粉, 再将农杆菌侵染后的花粉给雌穗授粉从而获得转基因玉米。通过对培养基配方、培养温度、萌发时间、农杆菌侵染时间等技术因子的优化, 建立农杆菌介导的外源基因导入离体萌发花粉的玉米转基因新方法, 转化率最高可达 7.27%。Southern 杂交试验结果表明, 外源基因整合到了玉米基因组中, 该方法为外源基因导入, 具有操作简单、成本低、快速培育高产新品种等优点, 为玉米转基因提供技术支撑。

关键词: 玉米; 转基因; 农杆菌介导; 花粉离体培养

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Study on Agrobacterium-Mediated Transgenic Methods for in Vitro Germination of Pollen Maize

HAN Ya-li^{1,2}, JIAO Hong-ye², WANG Lei², SHI Ming-shan², FAN Zi-yang², LIU Kang¹

(1. National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Innovation and Utilization, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;

2. Maize Research Laboratory, Handan Academy of Agricultural Sciences, Handan 056001, China)

Abstract: The main methods for maize transgenesis are the Agrobacterium-mediated method and gene gun method. However, both methods require tissue culture, which is demanding and time-consuming, and they are limited by the genotypes of transgenic recipients. In this paper, the promotional hybrid Suyu19 was randomly selected as the material and the introduction of exogenous genes into maize pollen through Agrobacterium infestation of the germinating pollen was explored. Then, the female cob was pollinated with the Agrobacterium-infested pollen to obtain transgenic maize. By optimizing the medium formulation, incubation temperature, germination time, Agrobacterium infiltration time, and other technical factors, a new method of Agrobacterium-mediated introduction of exogenous genes into isolated germinating pollen for maize transgenesis has been established. The conversion rate can reach up to 7.27%, and the results of Southern hybridization test showed that the exogenous genes were integrated into the maize genome. The method is exogenous gene introduction has the advantages of simple operation, low cost, and rapid breeding of new high-yield varieties, providing technical support for maize transgenesis.

Key words: Maize; Transgene; Agrobacterium mediated; Pollen isolation culture

转基因和基因编辑技术应用于玉米新品种的培育, 已经成为提高玉米产量、改良品质、提高抗逆性

的重要途径。20 世纪 80 年代, 植物转基因技术出现, 玉米遗传转化体系也开始建立。转基因育种技术能通过外源 T-DNA 盒将所需性状的编码基因转移到作物中, 作为作物育种的重大突破, 可以加快优良玉米新品系、新品种的培育进程^[1-3]。目前, 育种家们已利用成熟稳定的玉米遗传转化体系, 获得了一批具有抗生物和非生物胁迫、营养品质高和雄性不育等优良性状的转基因玉米新品系, 并逐步将转基因植物应用到农业生产, 大幅度减少了农药的使

录用日期: 2023-11-12

基金项目: 国家玉米产业技术体系邯郸综合试验站项目(CARS-02-61)、河北省重点研发计划项目“高产抗逆玉米种质选育、方法研究及应用”(22326304D)、玉米现代种业科技创新团队项目(21326319D-10)

作者简介: 韩雅利(1989-), 女, 河北武安人, 助理研究员, 硕士, 主要从事玉米遗传育种工作。E-mail: hyl72710576@163.com
刘康为本文通信作者。E-mail: kangliu@njau.edu.cn

用量,减轻了环境和农产品污染,显著提高了作物产量,产生了可观的经济效益。利用转基因技术对玉米进行遗传改良成为提高玉米植株抗性和改善玉米品质的重要手段,转基因玉米的种植面积稳步逐年增加并且取得了巨大的效益,已成为世界上大规模的商业化转基因作物,并给人类带来了巨大的经济效益^[4,5]。截至2021年11月1日,据国际农业生物技术应用服务组织ISAAA统计,已经有244个转基因玉米事件进行商业化登记^[6,7]。

目前,玉米转化最主要的方法是农杆菌浸染法和基因枪法,农杆菌浸染法受载体类型、接种及共培养时间的影响,依赖组织培养过程,费时费力,后代遗传稳定性差^[8,9];基因枪法选择效率较低、周期长,对操作技术和硬件设施的要求都较高,转化条件要求苛刻,在应用过程中受到一定限制^[10]。鉴此,探讨新的玉米转基因方法应扬长避短,弥补传统转基因方法的不足之处,探索实用性强、简便易行的转化技术,推进玉米新品种的选育进程。本研究建立一种不依赖于组织培养、可以稳定高效适合于规模化操作的玉米转基因新方法,即以花粉为转基因受体,采用农杆菌浸染离体培养花粉法,建立一套完善的玉米花粉的采集、保存和体外培养与基因转化的技术体系,为玉米规模化转基因育种提供技术平台。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究供试材料为玉米品种苏玉19,种植于江苏省农业科学研究院试验田。实验所用菌株主要为以LBA4404为代表的章鱼碱型农杆菌、以GV3101为代表的胭脂碱型农杆菌、EHA105为代表的琥珀碱型农杆菌。

1.2 试验方法

选择晴朗天气进行试验,试验前一天将未授粉雌穗和即将开花的雄穗分别套袋,并配制不同的农杆菌菌液。次日上午采集新鲜花粉,用携带质粒

pCAMBIA3301的农杆菌对花粉进行处理,之后立即用携带质粒pCAMBIA3301的花粉进行玉米的转化,剪去距穗顶部1 cm以上的苞叶和花丝,打开纸袋,用毛刷迅速将花粉溶液涂抹在雌蕊上,重新套纸袋,防止其他花粉污染,套牌标记,并及时套黑色袋进行暗培养24 h。待种子收获后做进一步检测。

1.3 培养基、培养温度与时间

配制不同的花粉萌发培养基进行比较,在不同的培养温度(27、30℃)下对花粉进行离体培养,体外萌发条件下每30 min对花粉进行培养观察,确定花粉萌发率最高的时间段。

1.4 农杆菌转化

将配好的花粉培养基、新鲜花粉和农杆菌倒入离心管进行培养和处理,在荧光显微镜下镜检,用蓝色激发光激发,激发波长为495 nm。花粉玻片图像的采集均在同一曝光时间下进行。

1.5 抗性检测

为了检测T₀代玉米幼苗转基因是否成功,对T₀代植株进行检测。检测步骤为草丁膦PCR检测,用0.1%草丁膦涂抹筛选,以引物为BarF和BarR的PCR检测;Southern杂交检测,以转pCAMBIA3301的玉米基因组用*Bar*基因的质粒扩增产物作探针,经HindIII单酶切消化的玉米DNA作Southern杂交检测。

2 结果与分析

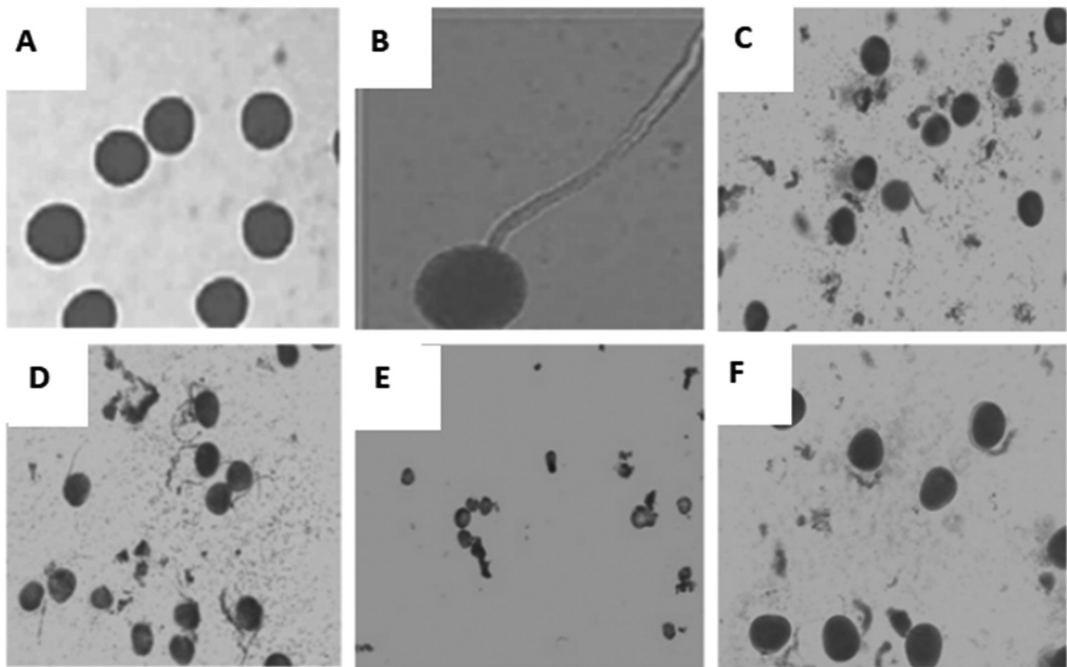
2.1 培养基的优化

配制不同培养基配方^[11],并观察离体花粉在不同培养基中的萌发情况(表1)。

成熟花粉粒萌发后所示,在上述4种培养基中,玉米离体花粉均可以萌发,但萌发率有所不同。花粉在第2种花粉培养基中的萌发率最佳,其他3种花粉培养基中花粉萌发率明显低于第2种花粉培养基。本实验采取第2种花粉培养基进行花粉培养(图1)。

表1 不同花粉培养基配方
Table 1 Formulation of different pollen culture mediums

培养基 Culture medium	蔗糖 (%) Fructose	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O (mg/L)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (mg/L)	H ₃ BO ₃ (mg/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (mg/L)	KNO ₃ (mg/L)	赖氨酸 (mg/L) Lysine	谷氨酸 (mg/L) Glutamate	Tris (mg/L)	DMSO (%)
1	5	300		100	200	100				
2	10	300		100	200	100				
3	20		200	100			37.5	0.05		
4	15	300		100	200	100			100	2



注:A为未培养的成熟花粉;B为萌发花粉;C为花粉在培养基1中的萌发;D为花粉在培养基2中的萌发;E为花粉在培养基3中的萌发;F为花粉在培养基4中的萌发。

Note: A, Uncultured mature pollen; B, Germination pollen; C, Germination of pollen in medium 1; D, Germination of pollen in medium 2; E, Germination of pollen in medium 3; F, Germination of pollen in medium 4.

图1 花粉在不同培养基中的萌发

Fig.1 Pollen germination in different culture media

培养温度与培养时间^[12]对花粉的体外培养也有一定的影响。在温度为27、30℃下分别对花粉进行培养,取培养后0.5、1.0、1.5、2.0 h共4个时段的花粉进行观察。花粉在不同温度、不同培养时间的平均萌发率见表2。

从不同温度的萌发率来看,花粉在27℃下平均

萌发率高达37.06%,比30℃下的萌发率31.75%高5.31个百分点;从不同培养时间来看,在培养0.5 h时花粉萌发率均达到高峰,27℃的萌发率为54.59%,30℃萌发率为40.63%。由此本实验选择在27℃下对花粉进行0.5 h离体培养。

表2 温度对玉米花粉萌发率的影响

Table 2 Effects of temperature on maize pollen germination rate %

培养时间(h) Incubation time	不同温度萌发率 Germination rate at different temperatures		均 值 Average
	27℃	30℃	
0.5	54.59	40.63	47.61
1.0	30.55	27.92	29.24
1.5	41.87	40.56	41.22
2.0	21.22	17.87	19.55
均 值	37.06	31.75	34.40

2.2 农杆菌转化体系的建立与优化

为了建立优化的玉米花粉体外转化体系,保证花粉在体外的转化可以正常进行,对3种不同的农杆菌(EHA105、GV3101、LBA4404)在不同的浸染时

间进行探索。在花粉体外培养萌发的最佳时间0~30 min内,以绿色荧光蛋白(GFP)为报告基因对花粉进行OD₆₀₀为0.6的农杆菌浸染,浸染的时间分别为30、25、20、15、10、5 min(图2)。

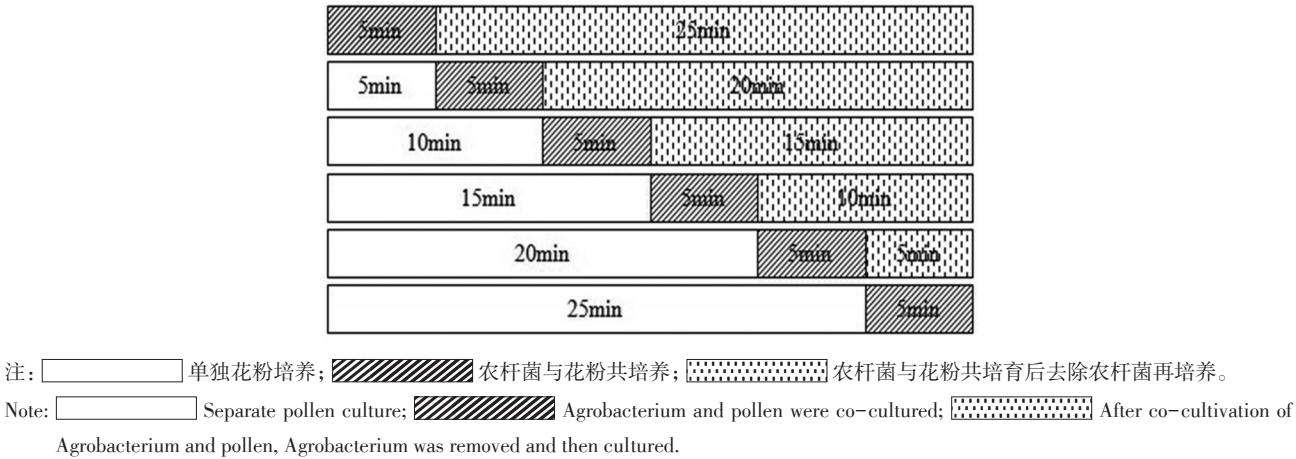


图2 农杆菌感染体外培养玉米花粉试验设计

Fig.2 Schematic diagram of the experimental design for Agrobacterium infection of in vitro cultured maize pollen

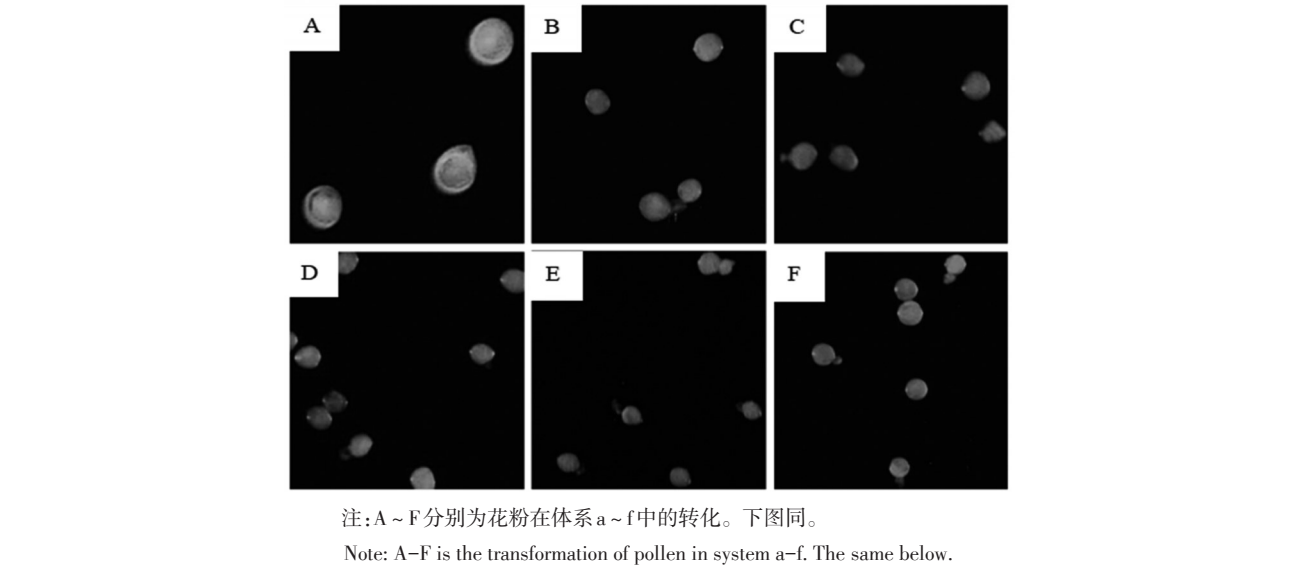
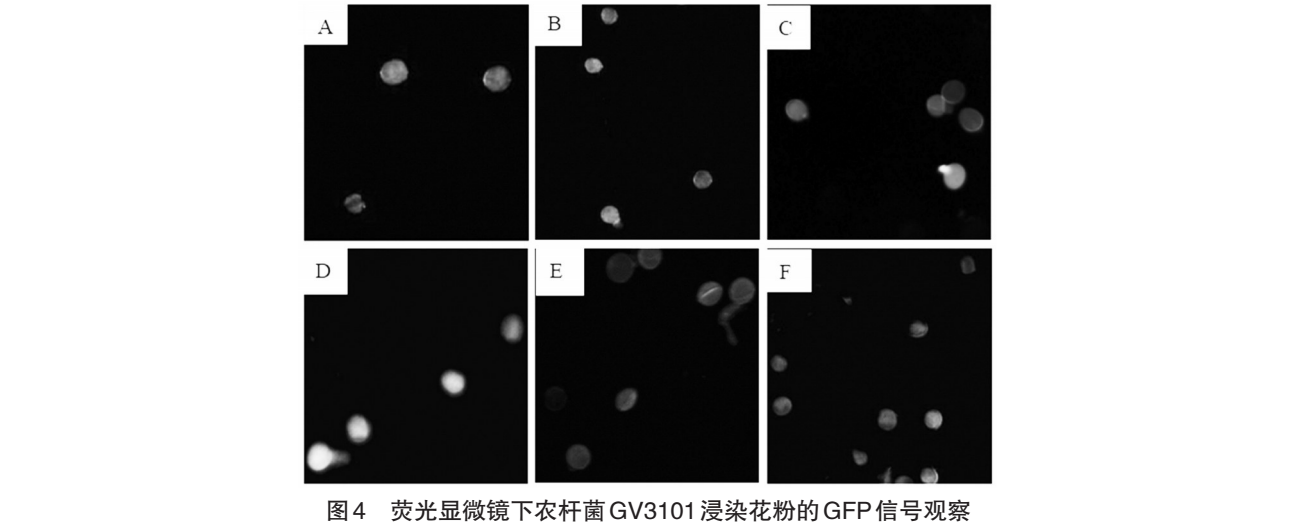


图3 荧光显微镜下农杆菌 EHA105 浸染花粉的 GFP 信号观察

Fig.3 Observation of GFP signals in pollen infiltrated by Agrobacterium EHA105 under fluorescence microscope



以 GFP 为报告基因对玉米花粉在 3 种农杆菌 EHA105、GV3101 和 LBA4404 的中的浸染时间段进行观察,在蓝光激发下,加有 GFP 质粒的处理组有部分花粉粒呈强烈的绿色荧光(图 3、图 4、图 5)。

对 3 种不同农杆菌 EHA105、GV3101 和 LBA4404 在不同浸染时间的转化率进行统计,每个浸染率均是由 17 个镜检重复所得(表 3)。

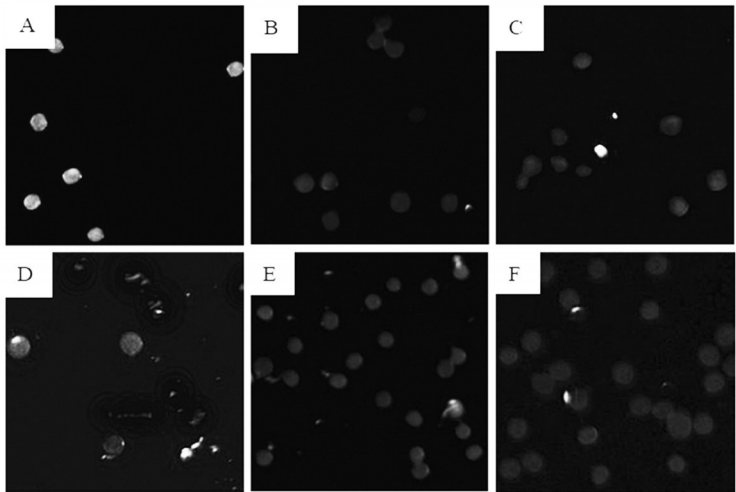


图5 荧光显微镜下农杆菌LBA4404浸染花粉的GFP信号观察

Fig.5 Observation of GFP signals in pollen infiltrated by Agrobacterium LBA4404 under fluorescence microscope

表3 不同农杆菌浸染处理玉米体外培养花粉的GFP转化率

Table 3 GFP transformation rate of maize in vitro cultured pollen with different Agrobacterium infiltration treatments %

农杆菌侵染处理 Treatment of Agrobacterium infection	农杆菌株株转化率 Transformation rate of strain			均 值 Average
	EHA105	GV3101	LBA4404	
花粉浸染 30 min(a)	7.75	10.24	8.14	8.71
花粉浸染 25 min(b)	9.95	10.72	9.22	9.96
花粉浸染 20 min(c)	15.25	11.16	10.12	12.18
花粉浸染 15 min(d)	17.22	14.83	11.97	14.67
花粉浸染 10 min(e)	20.07	14.75	14.12	16.31
花粉浸染 5 min(f)	7.07	5.54	10.74	7.78
均 值	12.89	11.21	10.72	11.60

研究结果表明,0.5 h 内,花粉在携带 *GFP* 基因的不同农杆菌中均能被浸染,转化率随着农杆菌浸染时间点的变化而有所不同。从不同农杆菌菌系来看,浸染效果最好的是农杆菌 EHA105,平均转化率为 12.89%,转化率的最高值与最低值之间幅度变化很大,即农杆菌 EHA105 受浸染时间变化的影响最大,因此,在用农杆菌 EHA105 浸染玉米离体花粉时一定要选择合适的浸染时间。农杆菌 LBA4404 浸染总趋势较平缓,平均转化率为 10.72%,最高值与最低值相差不是很大。农杆菌 GV3101 介于两者之间。从不同培养时间来看,新鲜花粉在最适体外萌发体系下,用花粉培养基先培养 20 min,待花粉管长至最易被农杆菌浸染的长度时浸染 5 min,之后将残

留的农杆菌液体尽可能的洗去,培养基再培养 5 min 时进行体外转化,平均转化率可达到最高值。

转基因玉米种子以 *Bar* 基因为报告基因,在 *GFP* 报告基因瞬时表达优化的农杆菌浸染离体花粉转化的基础上,对玉米进行花粉的体外转化。在花粉大量萌发的时间 0.5 h 内,用花粉培养基培养 20 min,农杆菌浸染 5 min,培养基再培养 5 min 时进行体外转化,可以保证玉米离体花粉在体外转化的正常进行。

2.3 草丁膦检测

以 *Bar* 基因为报告基因的农杆菌浸染玉米离体花粉培养法根据农杆菌菌系、OD 值和去污剂的不同进行了 18 种处理组合(表 4)。

表4 农杆菌转化的不同处理组合

Table 4 Different treatment combinations for Agrobacterium transformation

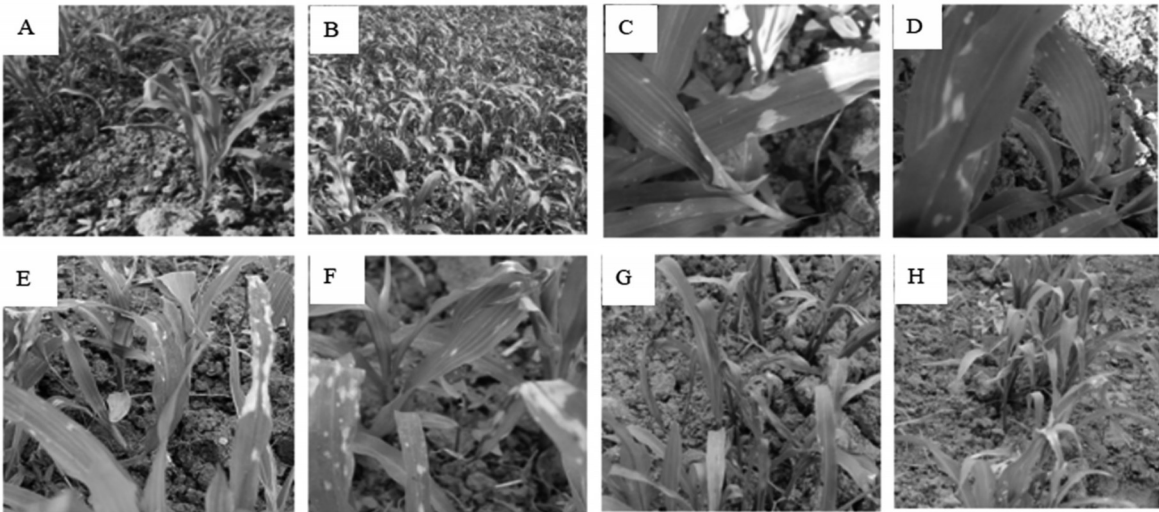
处理组合 Treatment combination	菌 系 Strain	去污剂 Stain remover	OD值 OD value
T ₁	EHA105	Tween20	0.4
T ₂			0.6
T ₃			0.8
T ₄		Silwet-L77	0.4
T ₅			0.6
T ₆			0.8
T ₇	GV3101	Tween20	0.4
T ₈			0.6
T ₉			0.8
T ₁₀		Silwet-L77	0.4
T ₁₁			0.6
T ₁₂			0.8
T ₁₃	LBA4404	Tween20	0.4
T ₁₄			0.6
T ₁₅			0.8
T ₁₆		Silwet-L77	0.4
T ₁₇			0.6
T ₁₈			0.8

根据实验所用的农杆菌菌系、OD值和去污剂的不同,进行从T₁至T₁₈的18种不同的处理,并配制18种不同的农杆菌菌液,用以转化玉米植株,为了提高实验的可靠性,增加群体数量,每个处理均做10个重复。

对转基因T₀代种子在3~4叶龄用致死浓度0.1%的草丁膦进行为期一周筛选,未转成功的玉米

植株,经草丁膦筛选一周后会枯萎致死;已转成功的玉米植株,叶片有斑点但不会致死(图6)。

经草丁膦喷施后第1天,一部分T₀代玉米植株开始出现浅黄色的斑点,喷施3~5 d后叶片显著枯黄、萎蔫并脱落变色或枯死。一周后,对大田中的T₀代玉米植株进行统计,判断其抗草丁膦的玉米植株数(表5)。



注:A,B为未筛选前的植株;C,D为筛选第1天的植株;E,F为筛选第3天的植株;G,H为筛选第5天的植株。
Note: A and B, plants before screening; C and D, screened the plants on day 1; E and F, screened the plants on day 3; G and H, Screened plants on day 5.

图6 转基因玉米草丁膦抗性的大田筛选

Fig.6 Field screening for glufosinate resistance in transgenic maize

表5 不同农杆菌侵染处理获得的T₀代幼苗的草丁膦抗性筛选结果

Table 5 Results of screening for glufosinate resistance in T₀ generation seedlings obtained from different Agrobacterium infestation treatments

处理组合 Treatment combination	抗性植株(株) Resistant plant	敏感植株(株) Sensitive plant	总株数(株) Total number of plants	成活率(%) Survival rate
T ₁	127	1 463	1 590	8.00
T ₂	58	1 541	1 599	3.60
T ₃	58	15	73	79.50
T ₄	164	1 396	1 560	10.50
T ₅	61	3	64	95.30
T ₆	117	570	687	17.00
T ₇	175	2 260	2 435	7.20
T ₈	94	608	702	13.40
T ₉	59	605	664	8.90
T ₁₀	188	2 975	3 163	5.90
T ₁₁	63	885	948	6.70
T ₁₂	133	1 783	1 916	6.90
T ₁₃	50	872	922	5.40
T ₁₄	125	613	738	16.90
T ₁₅	153	2 490	2 643	5.80
T ₁₆	51	702	753	6.80
T ₁₇	140	1 942	2 082	6.70
T ₁₈	127	1 463	1 590	8.00
总 计	1 943	22 186	24 129	8.05

由农杆菌浸染离体花粉培养法转化获得的转基因植株经草丁膦检测,在24 129株待检测植株中,得到1 943株绿色未死亡植株,22 186株枯萎或死亡植株,初步转化率为8.05%。由于植株的假阳性高,样品数可能比较少,导致最终筛选到的成活率可能偏

高。由OD₆₀₀为0.6的农杆菌EHA105加去污剂Silwet-L77转化的玉米植株草丁膦抗性最强,成活率达峰值,为95.3%;其次是由OD₆₀₀为0.8的农杆菌EHA105加去污剂Tween20转化的玉米植株,成活率为79.5%,因此要进行DNA的检测。

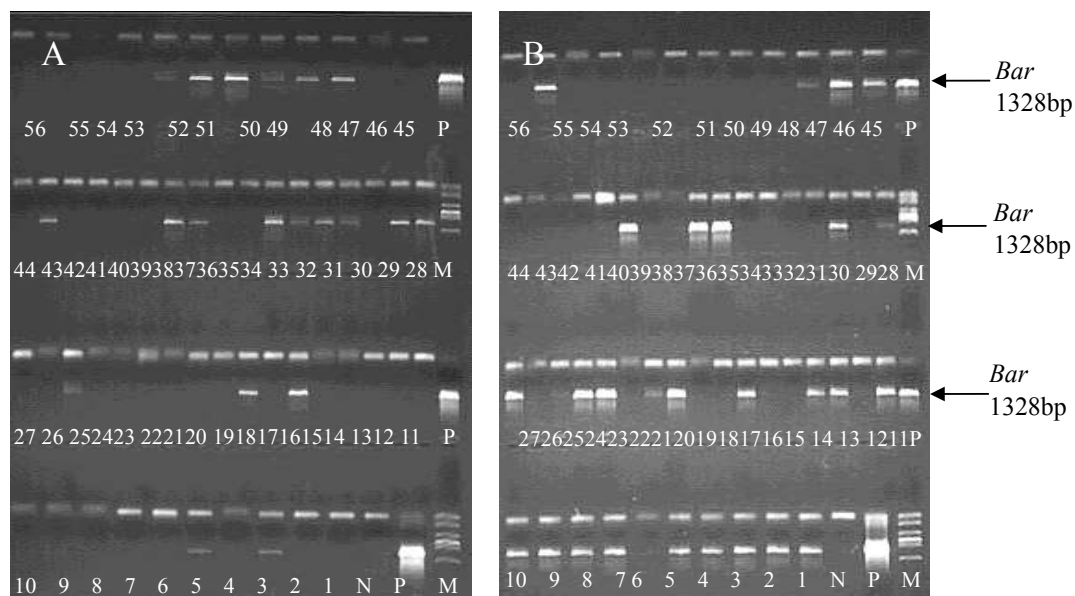


图7 草丁膦抗性植株 *Bar* 基因的PCR扩增产物的电泳图谱

Fig.7 Map of agarose gel electrophoresis of PCR products of *Bar* gene in glufosinate resistant maize plants

对农杆菌浸染离体花粉培养法得到的抗草丁膦的T₀代玉米植株,进行DNA的PCR检测,引物为BarF和BarR,预期扩增产物为1 328 bp。阴性对照为非转基因玉米苏玉19,不会有条带出现,阳性对照为质粒pCAMBIA3301,扩增应出现条带。已转成功的玉米植株能扩增到与质粒对照相同的预期条带(图7)。

实验结果表明,经草丁膦抗性筛选的玉米一部分确为转基因玉米,他们的基因组总DNA中能够扩增出载体pCAMBIA3301上的*Bar*基因片段。随机抽取40%农杆菌浸染离体花粉培养法得到的抗草丁膦的玉米植株,分两组进行阳性苗的转化率数据统计(表6)。

表6 草丁膦抗性植株*Bar*基因的PCR检测
Table 6 PCR Inspection of the *Bar* gene in glufosinate-resistant maize plants

处理组合 Treatment combination	检测数(株) Number of detections	阳性苗数(株) Number of positive seedlings	转化率(%) Conversion rate
T ₁	636	11	1.73
T ₂	640	11	1.72
T ₃	29	1	3.45
T ₄	624	11	1.76
T ₅	26	0	0.00
T ₆	275	20	7.27
T ₇	974	23	2.36
T ₈	281	7	2.49
T ₉	266	4	1.50
T ₁₀	1 265	15	1.19
T ₁₁	379	11	2.90
T ₁₂	766	13	1.70
T ₁₃	369	1	0.27
T ₁₄	295	18	6.10
T ₁₅	1 027	17	1.66
T ₁₆	301	0	0.00
T ₁₇	833	20	2.40
T ₁₈	636	31	4.87
总 计	9 622	214	2.22

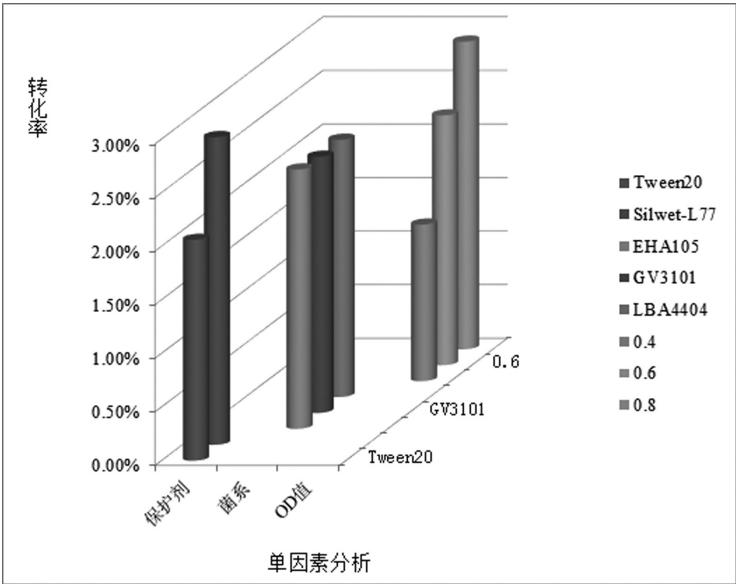


图8 去污剂、农杆菌菌系及农杆菌浓度对*Bar*基因转化率的影响
Fig.8 The effects of different decontaminants, Agrobacterium strains and Agrobacterium concentrations on *Bar* gene transformation rate

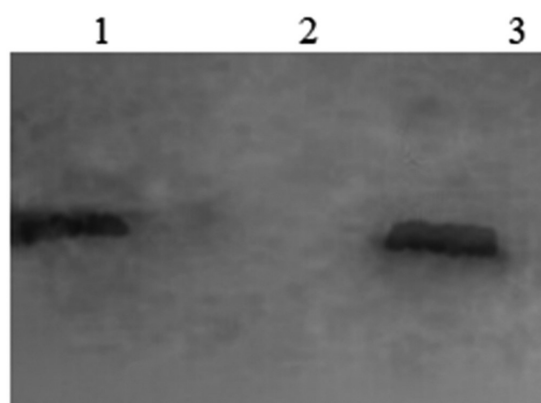
对于随机抽取40%的农杆菌浸染离体花粉培养法得到的草丁膦抗植株,在待检测的9 622株待检测植株中,经PCR验证,得到214株阳性植株,转化率为2.22%。其中,转化效率最高的是由OD₆₀₀为0.8的农杆菌EHA105,其加去污剂Silwet-L77转化所得,转化率高达7.27%;其次是OD₆₀₀为0.8的农杆菌LBA4404加去污剂Silwet-L77转化所得,转化率为4.87%。实验过程中,由于转化效率低,OD₆₀₀为0.4的农杆菌LBA4404去污剂Silwet-L77处理收获的种子很少,T₀代转基因植株出苗率和抗草丁膦的能力低下,没有收到转基因种子。将影响花粉转化的因素分别对比研究(图8)。只考虑菌系的影响时,3种农杆菌菌系EHA105、GV3101和LBA4404的转化效果大体趋于一致,这表明3种菌系对花粉转化率的影响不是很大。加去污剂Silwet-L77处理的植株平均转化比去污剂Tween20处理的植株平均转化率高,这表明只考虑去污剂的影响时,去污剂Silwet-

L77的转化效果优于Tween20。只考虑菌系浓度的影响时,农杆菌菌系的OD₆₀₀为0.8时,花粉平均转化率明显高于OD₆₀₀为0.6和0.4时,这表明农杆菌OD₆₀₀为0.8时的转化效果最好。本实验建立了适合花粉体外培养和转化的生长体系,用农杆菌浸染离体花粉培养法得到214株阳性苗,转化率为2.22%。

2.4 Southern杂交

对PCR检测到的阳性玉米植株进行Southern杂交。选取一植PCR阳性苗进行Southern杂交,以质粒pCAMBIA3301为阳性对照,苏玉19未进行转基因的玉米苗作为阴性对照(图9)。

转pCAMBIA3301基因玉米基因组用*Bar*基因的质粒扩增产物作探针,经HindIII单酶切消化的玉米DNA作印迹杂交。结果显示,阳性苗的消化产物有单一杂交带出现,即转化植株有1个拷贝的*Bar*基因插入。



注:1为阳性对照,质粒pcambia3301;2为阴性对照,未进行转基因的苏玉19玉米苗;3为PCR检测含有*Bar*基因的植株。

Note: 1 was the positive control, plasmid pcambia3301; 2 was the negative control, Suyu19 maize seedling without transgenic; 3 is PCR detection of plants containing *Bar* gene.

图9 Southern杂交图谱

Fig.9 The map of Southern blot analysis

基于以上转化和鉴定结果,可以发现,农杆菌浸染离体花粉培养法是一种改良的农杆菌辅助花粉介导植物转基因方法,以携带外源基因片段的农杆菌Ti质粒为基因供体,以玉米花粉为载体,在合适的蔗糖溶液培养基中将携带外源基因的农杆菌浸染花粉,进而完成质粒的转化。将外源DNA导入到花粉中,进行授粉,借助植物胚胎的自然发育获得转基因种子,从而简化转基因过程。

3 结论与讨论

玉米花粉离体后死亡率很高,要对玉米花粉进行非组织培养的转基因过程,需创造适合花粉体外

生长的适宜条件,即在300 mg/L Ca(NO₃)₂·4H₂O、100 mg/L H₃BO₃、200 mg/L MgSO₄·7H₂O、100 mg/L KNO₃的培养基中、27℃下培养0.5 h,可以保证玉米离体花粉在体外的正常萌发和生长。转化时间对转基因的影响很大,合适的转化时间是高效转化的前提。本实验建立的花粉体外转化体系,在花粉大量萌发的0.5 h内,用花粉培养基培养20 min,农杆菌浸染5 min,培养基再培养5 min时进行体外转化,可以保证玉米离体花粉在体外转化的正常进行。农杆菌浸染离体花粉培养法经草丁膦和PCR筛选验证得到214株转基因玉米阳性植株,转化率高达2.22%。经Southern检测,转化植株的基因组DNA

中有 *Bar* 基因插入。

在分析现有玉米转化方法的基础上,探索建立玉米实用新型转化方法特别是非依赖于组织培养的方法,对于玉米基因工程和功能基因组学的研究具有重要意义^[14~17]。本实验通过农杆菌浸染离体花粉培养法进行玉米转基因,避免了组织培养过程,节省了大量的时间;以玉米花粉为材料,受体没有基因型的限制,来源广,易取得;通过授粉直接获得转基因玉米种子,后代稳定性好,结实率高;转化技术容易操作,简便易行^[18~24]。本方法是适合玉米有效快速获得转基因植株的一种新的转基因方法,为玉米转基因提供了技术支持。

参考文献:

- [1] 黎 裕,王天宇.玉米转基因技术研发与应用现状及展望[J].玉米科学,2018,26(2):1-15,22.
LI Y, WANG T Y. Current situation and prospect of corn transgenic technology development and application[J]. Journal of Maize Sciences, 2018, 26(2): 1-15, 22. (in Chinese)
- [2] 梁晋刚,张旭冬,毕研哲,等.转基因抗虫玉米发展现状与展望[J].中国生物工程杂志,2021,41(6):98-104.
LIANG J J, ZHANG X D, BI Y Z, et al. Development status and prospect of transgenic insect-resistant maize[J]. Chinese Journal of Bioengineering, 2021, 41(6): 98-104. (in Chinese)
- [3] 岳润清,李文兰,孟昭东.转基因抗虫耐除草剂玉米自交系LG11的获得及抗性分析[J].作物学报,2024,50(1):89-99.
YUE R Q, LI W L, MENG Z D. Acquisition and resistance analysis of transgenic insect-resistant and herbicide-tolerant maize inbred line LG11[J]. Acta Agronomica Sinica, 2024, 50(1): 89-99. (in Chinese)
- [4] 赵兴坤,孙 昊,杨丽云,等.发根农杆菌介导的细茎柱花草毛状根转化体系的建立[J].草地学报,2023,31(2):581-586.
ZHAO X K, SUN H, YANG L Y, et al. Establishment of hairy root transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in *Stylosanthes leptostylosa*[J]. Acta Agrariae Sinica, 2023, 31(2): 581-586. (in Chinese)
- [5] 姚兴兰,杨文竹,罗彦忠,等.转phyA2、ZmTMT和Bar玉米的获得及其特性分析[J].中国农业科学,2020,53(24):4982-4991.
YAO X L, YANG W Z, LUO Y Z, et al. Synthesis and characterization of transphyA2, ZmTMT and Bar maize[J]. Chinese Journal of Agricultural Sciences, 2020, 53(24): 4982-4991. (in Chinese)
- [6] HÜSKEN A, PRESCHER S, SCHIEMANN J. Evaluating biological containment strategies for pollen-mediated gene flow[J]. Environmental Biosafety Research, 2010, 9: 67-73.
- [7] 李香菊.我国耐除草剂转基因作物研发与产业化应用前景[J].植物保护,2023,49(5):316-324.
LI X J. Research and development and industrialization application prospect of herbicide-tolerant transgenic crops in China[J]. Plant Protection, 2023, 49(5): 316-324. (in Chinese)
- [8] 郭向萌,周晓君.花粉管通道法介导辣椒总DNA获得转基因小麦[J].江苏农业科学,2018,46(8):36-38.
GUO X M, ZHOU X J. Pollen tube method mediated total DNA of pepper to obtain transgenic wheat[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(8): 36-38. (in Chinese)
- [9] 林 淦,周建平,刘华俊,等.玉米植物组织培养研究进展[J].安徽农业学,2007(28):8797-8798.
LIN G, ZHOU J P, LIU H J, et al. Research progress of maize plant tissue culture[J]. Anhui Agricultural Sciences, 2007(28): 8797-8798. (in Chinese)
- [10] 鲜 彬,徐翔铭,吴清华,等.农杆菌和基因枪介导的瞬时表达方法研究综述[J].中药与临床,2022,13(5):110-117.
XIAN B, XU X M, WU Q H, et al. A review of transient expression methods mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and gene gun[J]. Chinese Medicine and Clinic, 2022, 13(5): 110-117. (in Chinese)
- [11] 蔡昭艳,董 龙,王小媚,等.培养基pH值及蔗糖、硼酸、PEG-4000对百香果花粉体外萌发的影响[J].分子植物育种,2021,19(21):7274-7281.
CAI Z Y, DONG L, WANG X M, et al. Effects of culture medium pH value, sucrose, Boric acid and PEG-4000 on pollen germination of passion fruit in vitro[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(21): 7274-7281. (in Chinese)
- [12] 罗远华,钟淮钦,方能炎,等.兰科植物花粉离体萌发与贮藏研究进展[J].农业与技术,2023,43(17):14-16.
LUO Y H, ZHONG H Q, FANG N Y, et al. Research progress on pollen germination and storage in vitro of Orchidaceae[J]. Agriculture and Technology, 2023, 43(17): 14-16. (in Chinese)
- [13] 刘来盘,刘 标.抗虫耐除草剂转基因玉米花粉生活力研究[J].玉米科学,2019,27(6):58-61.
LIU L P, LIU B. Study on pollen viability of transgenic maize with insect resistance and herbicide tolerance[J]. Journal of Maize Sciences, 2019, 27(6): 58-61. (in Chinese)
- [14] 王才林,龚蓁蓁.用花粉管通道法将*Bar*基因导入水稻获得可遗传的转基因植株[J].江苏农业学报,2002(18):129-133.
WANG C L, GONG Z Z. Transgene *Bar* was introduced into rice by pollen tube channel method to obtain heritable transgenic plants[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2002(18): 129-133. (in Chinese)
- [15] 赵鑫闻.利用花粉管通道技术将外源银白杨DNA导入黑杨[J].植物学报,2016,51(4):533-541.
ZHAO X W. Exogenous silver poplar DNA into black poplar using pollen tube channel technique[J]. Acta Botanica Sinica, 2016, 51(4): 533-541. (in Chinese)
- [16] 张 茜,李 新,关雅静.转基因技术在玉米遗传育种中的应用研究[J].种子科技,2023,41(3):133-135.
ZHANG Q, LI X, GUAN Y J. Application of transgenic technology in maize genetic breeding[J]. Seed Science and Technology, 2023, 41(3): 133-135. (in Chinese)
- [17] 宋鉴达,林春晶,韦正乙,等.利用超声波处理花粉转化法获得玉米转基因新材料[J].玉米科学,2012,20(2):48-51.
SONG J D, LIN C J, WEI Z Y, et al. New maize transgenic materials obtained by ultrasonic pollen conversion method[J]. Journal of Maize Sciences, 2012, 20(2): 48-51. (in Chinese)
- [18] 严亚琴,胡天华,王五宏,等.基于农杆菌介导的茄子枯萎病菌遗传转化体系建立及GFP标记菌株的构建[J].农业生物技术学

- 报, 2023, 31(9): 1980–1988.
- YAN Y Q, HU T H, WANG W H, et al. Establishment of genetic transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and construction of GFP labeled strains of *Fusarium* of eggplant [J]. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 31(9): 1980–1988. (in Chinese)
- [19] 罗 萍, 张昊楠, 徐建民, 等. 发根农杆菌介导的尾巨桉遗传转化体系的建立[J]. 植物研究, 2022, 42(3): 512–520.
- LUO P, ZHANG H N, XU J M, et al. Establishment of genetic transformation system mediated by *Agrobacterium rhizogenes* in *Eucalyptus urophylla* [J]. Plant Research, 2022, 42(3): 512–520. (in Chinese)
- [20] 李思琪, 王怡婷, 于 聿, 等. 抗草铵膦基因 *bar* 遗传转化蓖麻 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(6): 1899–1905.
- LI S Q, WANG Y T, YU S, et al. Genetic transformation of *Castor Ricinus* with *bar* resistance [J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(6): 1899–1905. (in Chinese)
- [21] 李美玉, 李 锐, 于 敏, 等. 根癌农杆菌介导的金发草遗传转化条件的优化[J]. 中国生物工程杂志, 2013(33): 41–46.
- LI M Y, LI R, YU M, et al. Optimization of genetic transformation conditions mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Chinese Journal of Bioengineering, 2013(33): 41–46. (in Chinese)
- [22] 何少海, 郑叶平, 严景城, 等. 农作物抗除草剂草丁膦基因的发展进程[J]. 现代农业, 2015(1): 33–34.
- HE S H, ZHENG Y P, YAN J C, et al. Development of herbicide resistant phosphine butadiene gene in crops [J]. Modern Agriculture, 2015(1): 33–34. (in Chinese)
- [23] 周启政, 钟宣伯, 崔 楠, 等. 抗草丁膦 G1 和 G2 转基因大豆对除草剂耐性评价及田间节肢动物影响研究[J]. 大豆科学, 2020, 39(6): 875–881.
- ZHOU Q Z, ZHONG X B, CUI N, et al. Evaluation of herbicide tolerance of G1–G2-resistant transgenic soybean and its effects on field arthropods [J]. Soybean Science, 2020, 39(6): 875–881. (in Chinese)
- [24] 李 敏, 王 磊, 邹俊杰. 我国转基因抗虫耐除草剂玉米产业化应用面临的机遇与挑战[J]. 生物技术进展, 2023, 13(2): 157–165.
- LI M, WANG L, ZOU J J. Opportunity and challenge of industrialization application of transgenic insect-resistant and herbicide-tolerant maize in China [J]. Advances in Biotechnology, 2023, 13(2): 157–165. (in Chinese)

(责任编辑: 朴红梅)

《玉米科学》月刊在5月15日首刊出版发行

近年来,《玉米科学》在全体玉米科研工作者的支持和关爱下,在编辑部全体人员的共同努力下,《玉米科学》期刊影响因子从1.322升至2.436,每年一个台阶,跨越式增长了83.7%,稳居农学农作物类期刊前列。期刊连续入选中国科学引文数据库(CSCD)核心库、中国科技核心期刊,入选“中国农林核心期刊”,被认定为农林领域高质量科技期刊T3等级,世界有影响力农业期刊方阵。这一系列的成就,体现了《玉米科学》在学术领域的重要地位和影响力。自2010年获得第二届吉林省新闻出版奖“期刊精品奖”到2020年的第五届吉林省新闻出版奖“优秀集体奖”,再到2024年荣获第六届吉林省新闻出版奖“优秀人物奖”,3次获得吉林省出版行业的最高奖项,不仅是对我们期刊的肯定,更是对我们玉米学科专业卓越素养的认可。这些荣誉不仅代表了玉米业界对我们团队辛勤工作的赞赏,也是推动我们持续前进、继续提升学术质量的动力源泉。为了更好地服务于广大科研工作者和广大读者,《玉米科学》在2024年5月进行一项重大变革——由双月刊转型为月刊。这一重要的调整,不仅意味着我们将以更快的出版频次和更丰富的内容与大家见面,还将带给读者和作者们更快速的信息更新、更及时的研究成果分享。此举无疑会极大地提高期刊论文发表的时效性和影响力,加快科研成果的传播速度,满足快速发展的玉米科学研究对高质量学术交流平台的需求。这对于推动国内外玉米科学领域内的信息交流,加强研究成果的国际合作与交互,无疑具有重要意义。我们期望通过这个举措能够进一步激发全行业的创新活力,共同促进玉米产业的科学发展和技术进步。展望未来,《玉米科学》将持续秉承创新、协作和开放核心理念,不断推动玉米科技领域的研究和发展,为我国玉米产业的繁荣与持续的进步贡献智慧与力量。让我们携手共进,共创《玉米科学》更加美好的明天。