

利用 Bulk-Way 转化法获得甘蓝型油菜 BBM-GR 转化植株



吴晗^{1,*}, 王佳旭¹, 张旷野¹, 赵莹², 段有厚¹, 李佳¹, 刘志强¹, 张志鹏¹

¹ 辽宁省农业科学院高粱研究所, 辽宁沈阳 110161

² 沈阳药科大学功能食品与葡萄酒学院, 辽宁沈阳 110016

摘要: BBM (Baby-boom) 是重要的植物胚胎发生相关转录因子, 近年来在转基因顽抗种受体再生和植物体细胞胚胎发生 (somatic embryogenesis) 研究中起到关键作用。但目前芸薹属作物中, BBM 转录因子的剂量效应和时间窗口仍然未知。糖皮质激素受体系统 (glucocorticoid receptor system, GR) 和地塞米松 (dexamethasone) 是定时定量分析转录因子的重要研究工具。本研究首先利用 BP、LR 反应, 构建了 *czn3999 35S::omega-BBM-GR* 载体; 通过电击转化法将 *czn3999 35S::omega-BBM-GR* 质粒转入大肠杆菌 DH5 α 及农杆菌 C58 的感受态细胞中, 将 PCR 酶切验证的菌株制成甘油菌, -80 °C 备用。再利用农杆菌 C58 菌株介导的 bulk-way 转化技术, 以甘蓝型油菜代表性品种 12075 子叶柄为转化受体, 共培养后诱导地上部生长, 生根处理后获得可育转基因阳性植株 22 株。本研究详尽梳理了 Bulk-Way 转化法的实验流程, 为分析 BBM 的剂量效应及时间窗口提供了宝贵的研究材料。

关键词: 转录因子; BBM; 糖皮质激素受体系统; 芸薹属; 遗传转化

DOI: [10.57237/j.life.2023.02.003](https://doi.org/10.57237/j.life.2023.02.003)

Brassica napus BBM-GR Transformants from Bulk-Way Transformation

Han Wu^{1,*}, Jiaxu Wang¹, Kuangye Zhang¹, Ying Zhao², Youhou Duan¹, Jia Li¹, Zhiqiang Liu¹, Zhipeng Zhang¹

¹ Sorghum Research Institute, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China

² Faculty of Functional Food and Wine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: BBM (baby boom) is an important embryogenesis transcription factor in plants, which is valuable in molecular research and could improve the transformation efficiency in recalcitrant species. However, in time and dose aspect, which stage and how much BBM transcription factor is necessary for stimulating embryogenesis is still largely unknown in Brassicas. GR system and dexamethasone are important to timing and quantitative analysis of transcription factors. In this study, BP and LR reaction were applied to build *czn3999-35s: Omega-BBM-GR* construct, which was transformed into *E. coli* DH5 α and *Agrobacterium* C58 competent cells by electric shock transformation respectively. The correct strain verified by PCR digestion reaction was kept in glycerol and stored at -80 °C. *Brassica napus* 12075

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目 (2021M693846).

*通信作者: 吴晗, wuhan8453@sina.com

收稿日期: 2023-03-28; 接受日期: 2023-05-23; 在线出版日期: 2023-06-15

<http://www.lifescitech.org>

cotyledon petioles were used as recipient, and eventually 22 transgenic plantlets were obtained from agrobacterium mediated bulk-way transformation. We describe Bulk-Way transformation protocol in detail, and provides valuable materials for analyzing dose and time effect of BBM in Brassicas.

Keywords: Transcription Factor; BBM; Glucocorticoid Receptor System; Brassicas; Genetic Transformation

1 引言

转录因子 Baby-boom (BBM) 属于 AP2/ERF 家族中 AINTEGUMENTA-LIKE (AIL)分支的一员, 是在诱导甘蓝型油菜的小孢子胚的过程中被发现的[2]。在不施加外源激素的情况下, 异位表达 BBM 足以诱导拟南芥幼苗的体细胞胚胎发生[2, 6, 8]。BBM 的过表达也会强化受体再生, 这一属性已应用于多个顽抗种转染平台的构建[1, 3-6, 8-11, 14]。但目前的时间维度上, 多大剂量的 BBM 是起始芸薹属胚胎发生所必须, 仍是未知的。

GR 体系 (glucocorticoid receptor system) 是定时定量分析转录因子功能的重要工具[7, 12]。常态下, GR 蛋白可与细胞内的热激蛋白 HSP 相结合, 使得与之融合蛋白无法进入细胞核内, 阻碍其行使生物性功能[12]。但当外源添加激活剂地塞米松 (dexamethasone) 时, GR 便可与 HSP 分离, 使得与 GR 融合的蛋白可以进入细胞核内, 行使相应的生物学功能[7]。这使得在时间维度上研究哪一个阶段的、多大剂量的 BBM 转录因子是起始胚胎发生所必须成为可能; 也为利用 BBM 等胚胎发生相关转录因子, 优化顽抗种转染体系提供理论依据。

本研究构建了 czn3999 35s:omega-BnBBM-GR 载体; 详尽梳理了农杆菌介导的 Bulk-Way 转化技术, 获得了甘蓝型油菜转基因阳性植株; 为下游分析

BBM 的剂量效应、时间效应提供了研究材料。

2 材料与amp;方法

2.1 BBM-GR 载体构建

载体 czn3999 35s:omega-BnBBM-GR 构建方法如下:

2.1.1 酶切

按照表 1 配制酶切反应体系, 在相应温度下反应至少 3h。

表 1 酶切反应体系

Table 1 Restriction endonuclease digestion system

反应体系	剂量
限制性内切酶	1 ul
10X Buffer	1 ul
DNA	500 ng
加 MQ H ₂ O 至	10 ul

2.1.2 PCR 反应

按照表 2 配制 PCR 反应体系, 并按照表 3 的程序进行扩增反应。本文所用引物信息参见表 4。

表 2 PCR 反应体系

Table 2 PCR system

PCR 反应体系	剂量
DNA 模板	1 ul
FW primer 10 μM	2 ul
RV primer 10 μM	2 ul
5x Q5 buffer	10 μl
Q5 DNA polymerase	0.5 μl
10 mM dNTPs	2 μl
MQ H ₂ O 至	50 ul

表 3 PCR 反应程序
Table 3 PCR procedure

PCR 温度设置	时间设置
98 ℃	30 sec
98 ℃	10 sec
60 ℃	20 sec 35 cycles
72 ℃	2 min
72 ℃	8 min
10 ℃	∞

表 4 本研究所用引物序列
Table 4 primers used in this study

引物	序列	PCR 产物大小
PZN158 BBM F	GGAAGGTGGTGGAGAAGTT	840 bp
PZN160 BBM R	TCAGCTAACATCTCTGGGAAC	
PZN478 F	GGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGG	540 bp
PZN479 R	GATATTCGGCAAGCAGGCATCG	
PZN482 F	GAACAAGATGGATTGCACGCAGG	300 bp
PZN483 R	AATAGCAGCCAGTCCCTTCCCG	
Pbi221 3F	GATGGTTAGAGAGGCTTACGCAG	523 bp
Pbi221 3R	CACAATAAAGTGACAGATAGCTGGG	
Pbi221 4F	AGTTCACCTTGATGCCGTTC	300 bp
Pbi221 4R	GTGCTTCAGCCGCTACCC	
PDS4149 BBM1F	GGAAGATGGCAAGCTAGGATAG	600 bp
PDS4150 BBM1R	TCACTAGCAGCGTAGGCATC	

2.1.3 BP 反应

本文利用 BP、LR 法构建载体，体系见表 5、6。配好反应体系后，室温反应 1 小时，再加 1 μl proteinase K，37 ℃ 孵育 10 min。通过电转化法转化 2 μl BP 反应液加至 DH5α 感受态细胞中（见 1.3）。涂板在含有 gentamycin 的 LB 固体培养基上，37 ℃ 过夜培养。次日挑取单克隆，加至 5 ml 含有 gentamycin 的 LB 液体培养基中，37 ℃ 过夜。

表 5 BP 反应体系
Table 5 BP reaction system

BP 反应	剂量
Mix pDONR207	1 ul
PCR 产物 BnBBM-GR	1 ul
5x BP clonase mix	1 ul
TE buffer pH 8	2 ul
final volume	5 ul

2.1.4 LR 反应

按照表 6 配制 LR 反应体系，25 ℃ 室温孵育 1h。加 1 μl 蛋白酶 K 37 ℃ 消化 10min。取 2ul LR 反应液，电转化至 DH5α 感受态中。涂在含有相应抗生素的 LB 固体培养基上，37 ℃ 培养过夜。次日挑取单克隆，

加至 5 ml 含有抗生素的 LB 培养基中，37 ℃ 过夜。酶切检测后，正确的菌株制备成甘油菌，并将质粒转化入农杆菌中。

表 6 LR 反应体系
Table 6 LR reaction system

LR 反应	加入药品的体积
Mix	1 ul
czn1637 plasmid DNA	0.7 ul
czn3255 plasmid DNA	0.5 ul
5x LR clonase mix	1 ul
TE buffer pH 8	2.8 ul
final volume	5 ul

2.2 质粒提取

按照 NucleoSpin Plasmid EasyPure kit（Machery-nagel）操作流程：将 5 ml 过夜培养菌液 3500rpm 离心 5 min 弃上清。加 150 μl Buffer A1 振荡混匀。（若提取农杆菌质粒，在加入 A1 后，须添加 50ul 溶菌酶，再次震荡混匀，室温孵育 10min。）再加 250 μl Buffer A2 轻柔颠倒混匀 5 次，室温孵育 2 min。再加 350 μl Buffer A3 颠倒混匀，反应液由蓝色变成无色后全速离心 5min。

向收集管中加入 NucleoSpin Plasmid EasyPure 纯

化柱。将反应液加至纯化柱中, 1000 g 离心 30 sec 弃滤液。再加 450 μ l AQ 液到纯化柱上。全速离心 1min, 若纯化柱表面湿润, 再次离心, 直至表面干燥。再将纯化柱加入 1.5ml 离心管中。向纯化柱滴加 50 μ l Buffer AE 后室温孵育 2min, 全速离心 2min, 即得质粒 DNA 溶液。

2.3 大肠杆菌 DH5 α 的电击转化

2.3.1 大肠杆菌转化

从-80℃冰箱中取出 DH5 α 感受态细胞 (50ul/支), 冰上融化。电转化管一并放置于冰上。向感受态细胞中加入 1.5ul 质粒 DNA, 抽吸混匀。将混合物转移至电转化管底部的金属片之间。用纸巾擦拭电转化管外壁水滴, 保障导电性。打开电转化器, 电压设定为 1.8V, 按住"pulse"按钮 2-3 sec, 听到提示音后松开按钮。加 950ul LB 培养基悬浮大肠杆菌细胞, 并转移至 1.5ml 离心管中, 37℃ 孵育 1h。取 50ul 孵育后菌液, 涂布于含有 25mg/L 卡那霉素的 LB 平板上, 37℃ 培养过夜。次日挑单克隆, 放置于含有 25mg/L 卡那霉素的 10 ml LB 培养基中, 过夜培养。再次日取一部分菌液制备成 20% 甘油菌, -80℃ 保存备用。另一部分菌液用于提取质粒, 转化入农杆菌感受态细胞中。

2.3.2 甘油菌制备

将单克隆置于 5ml LB 培养基中, 37℃ 培养过夜。离心弃上清, 留 1ml 菌液, 加 250ul 100% 甘油, 混匀后按 10ul 分装并标记, 放置于-80℃ 冰箱保存。使用时取一支 10ul 菌液, 加入到 10ml 含有相应抗生素的 LB 培养基中过夜活化。

2.3.3 清洗电转化管

向转化管中加入 1ml 0.1M HCl 浸泡 30min; 吸弃 HCl 后加入 1ml 0.1M NaOH 浸泡 15min; 吸弃后重复用 NaOH 浸泡 15min。再用 MQ H₂O 清洗三次, 沥干水分, 扣盖备用。

2.4 农杆菌 C58 的电击转化

从-80℃冰箱中取出 C58 感受态细胞 (50ul/支) 冰上融化, 将电转化管一并放置于冰上。向感受态细胞加入 2.0ul 质粒 DNA 后抽吸混匀, 加至电转化管底部。擦拭电转化管外壁, 保障导电性。打开电转化器,

电压设定为 1.8V, 按住"pulse"按钮 2-3 sec, 听到提示音后松开按钮。加 950ul LB 培养基悬浮农杆菌, 转移至 1.5ml 离心管中, 28℃ 孵育 1h。取 50ul 菌液, 涂布于含有相应抗生素的 LB 平板上, 28℃ 孵育 48h 后挑单克隆, 接种于含有相应抗生素的 10 ml LB 培养基中, 再培养 48h。测定 OD 值, 制甘油菌备用 (见 1.3.2)。

2.5 Bulk-Way 转化流程

将 1:1 稀释的 84 消毒液 45ml、tween-20 10ul、甘蓝型油菜 12075 种子 350 粒加入 50ml 蓝盖离心管中, 震荡消毒 15min。弃去消毒液后用 75% 乙醇洗 3 次、MQ H₂O 洗 3 次。在 1/2MS 固体培养基上播种, 每盒七行八列共 56 粒种子。选择子叶未平展 (unfold) 的 7 日龄幼苗, 切下子叶保存在水中 (注意不要切下茎尖生长点)。待切好全部子叶后吸弃水分, 加入 4.5ml 侵染培养基 (inoculation medium) 浸润子叶。

在含有相应抗生素的 5ml LB 液体培养基中, 28℃ 培养农杆菌 48h。2000g 离心菌液 10min 后弃上清, 加入 5ml 侵染培养基 (inoculation medium) 悬浮菌液。按 1: 9 的体积比, 在浸润子叶外植体的培养皿中加入重悬菌液 (以上述的 4.5ml 侵染培养基为例, 应加入 0.5ml 重悬菌液), 总稀释倍数为 10 倍。充分摇匀培养皿 5min, 确保农杆菌在培养皿内充分混匀, 每个子叶都浸润在菌液中。吸弃所有菌液。封口膜封口, 锡箔纸包好后, 置于 25℃ 暗室保存 2d。再转入 4℃ 冰箱, 在黑暗环境下再孵育 3d。

将外植体插入抗性筛选培养基中 (须使用 25mm 的深培养皿), 注意不要将叶片插入培养基, 而只插入子叶柄部分。用封口膜封好后放置在 25℃, 光周期 16 h/8h, ca125uE 的人工气候室中。每 2-3 周更换一次新的选择培养基 (selection medium), 直至获得再生外植体地上部 (shoot)。切下再生的地上部, 插入到制备好的茎伸长培养基 (shoot elongation medium), 培养 4 周后转入生根培养基中 (rooting medium)。外植体生根成苗后转入培养钵中。经 PCR 测序后确定为阳性的留种备用。

所用培养基配方如下:

侵染培养基 (Inoculation Medium)

MS 或 B5 基础培养基中加 3% 蔗糖, 0.5 mg/L BA, 调节 pH 至 5.8。

筛选培养基 (Selection Medium)

MMO 基本培养基中加入 3% 蔗糖、4.5 mg/L BA、

500 mg/L MES，调节 pH 至 5.8，再加入 0.7%琼脂粉。灭菌冷却至 65 ℃ 后，加入 300 mg/L 特美汀、25 mg/L 卡那霉素。倒平板时须使用深度为 25mm 的深培养皿。

茎伸长培养基（Shoot Elongation Medium）（SEM）

MS/B5 基本培养基中加入 2%蔗糖、0.5 mg/L BA、0.03 mg/L GA3、500 mg/L MES、150 mg/L Phloroglucinol、调节 pH 值至 5.8，再加入 0.9%琼脂粉。灭菌后加入 300 mg/L 特美汀、25 mg/L 卡那霉素。倒入深度为 25mm 的深培养皿中。

生根培养基（Root Induction Medium）（RIM）
1/2 MS/B5 基本培养基中加入 1%蔗糖、0.5 mg/L IBA（indolebutyric acid）、500 mg/L MES，调节 pH 值至 5.8 后加入 0.8%琼脂粉。灭菌冷却至 65 ℃，加入 300 mg/L 特美汀、25 mg/L 卡那霉素。倒平板仍使用 25mm 的深培养皿。

2.6 DNA 提取

DNA 提取方法源于日本筑波植物生物技术研究所。将下列药剂配制成 2X 缓冲液备用：0.6 M NaCl、100 mM Tris-HCl（pH 7.5）、40 mM EDTA、4% sarkosyl（肉桂酰）、1% SDS。而 5M 尿素、5%苯酚按照表 7 现用现配。

取 100-150 mg 叶片置于 1.5 ml safe-lock 离心管中。加入 5 粒玻璃珠后，液氮速冻，研磨仪破碎样本。在室温下加入 1X DNA 提取缓冲液，再加 600 μl 苯酚/氯仿（1:1），涡旋振荡混匀，14,000 rpm 离心 10 min。吸取上清 450 μl，加入 315 μl 异丙醇在 -20 ℃ 沉淀 DNA 20 min，14,000 rpm 离心 5min。乙醇清洗沉淀，全速离心 5min，吸弃乙醇。通风橱中干燥样本，滴加 100 μl 10 mM Tris（pH 8.0）溶解 DNA 沉淀。

表 7 1x DNA 提取缓冲液配方

Table 7 recipe of 1x DNA isolation buffer

1x DNA isolation buffer	10ml
2x stock solution	5
12M 尿素	4.17
苯酚	0.5
MQ 水	0.33

2.7 转化子的 PCR 检测

PCR 反应见 1.1.2。琼脂糖凝胶电泳检测：称取 1g 琼脂糖，加入 100ml TBE 缓冲液，配制 1%凝胶。

PCR 产物加入 loading buffer，混匀后 5ul 上样。100V 电泳 25min 后拍照并保存图片。

3 结果与分析

3.1 BBM-GR 等载体构建

载体 parc259 与 czn3255 进行 LR 反应，转化大肠杆菌后，提取质粒。经 bsa1 酶切，发现预期片段 8168bp+3797bp（图 1A）。用另一种限制性内切酶 stu1 辅助验证，同样发现预期片段：10580bp+1385bp（图 1B）。继而将含有正确质粒的菌液制备甘油菌。

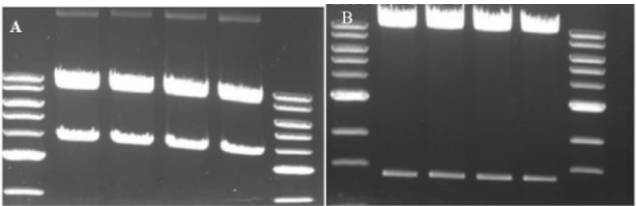


图 1 大肠杆菌中 czn3999 酶切后电泳结果

A: BsaI 消化结果，B: StuI 消化结果

Figure 1 construct czn3999 isolated from DH5α Restriction endonuclease digestion

A: BsaI digestion, B: StuI digestion

将正确的质粒转化入农杆菌 C58 感受态细胞中。28 ℃ 培养两天后，提取质粒酶切、电泳检测。经 bsa1 酶切后发现目标片段：8168bp+3797bp（图 2A）；再用 stu1 辅助验证，同样发现预期片段：10574bp+1391bp（图 2B）。将含有正确质粒的农杆菌制备成甘油菌。至此，已成功构建 czn3999 35S::omega-BBM-GR 载体，并转化入农杆菌 C58 感受态细胞，可进行下游遗传转化实验。

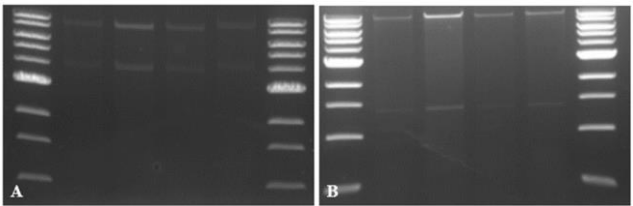


图 2 农杆菌中 czn3999 酶切后电泳结果

A: BsaI 消化结果；B: StuI 消化结果

Figure 2 construct czn3999 isolated from agrobacterium C58

Restriction endonuclease digestion A: BsaI digestion, B: StuI digestion

3.2 Bulk-Way 遗传转化

将农杆菌侵染后的子叶柄插入筛选培养基（图 3A）。培养基中子叶柄切口处愈伤组织逐渐形成（图 3B）。转入茎伸长培养基后，愈伤组织开始分化出地上部（图 3C）。生根后的再生植株移栽到培养钵中，在气候室内继续培养（图 3D）。本研究利用 Bulk-Way 转化法，成功获得甘蓝型油菜 12075 转基因植株 22 株。

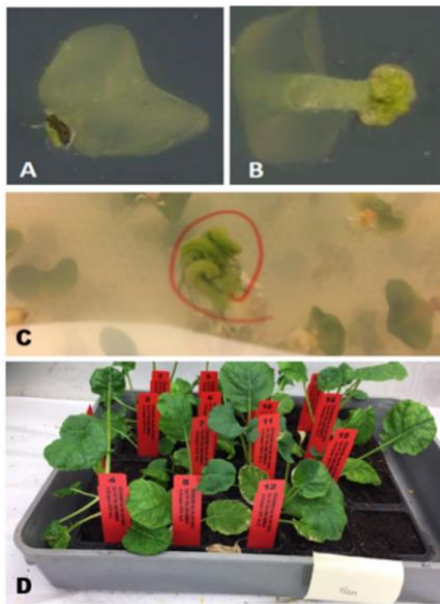


图 3 Bulk-Way 转化子的获得

A 农杆菌侵染后的子叶柄；B 培养基中愈伤组织初步形成
C 愈伤组织发育出地上部；D 抗性筛选后的阳性植株

Figure 3 obtaining Bulkway transformants

A: petiole after agrobacterium infection; B: forming callus in medium.
C: Shoot development from callus; D: some positive transformants after resistance selection.

3.3 转化子的 PCR 鉴定

为更准确地鉴定转化子，再生植株经抗性标签筛选后，又对 BBM-GR、NPT2 片段进行了 PCR 检测。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，结果见图 4。BBM-GR 的 PCR 产物为 840bp（图 4A），PCR 阳性率为 75%；NPT2 的 PCR 产物为 540bp（图 4B），PCR 阳性率为 93.3%。通过与质粒 DNA 的阳性对照比较，除了第 1、3、4 号植株可能有不同的整合模式外（integration pattern），czn3999 T-DNA 已经成功转入其他准转化子中。

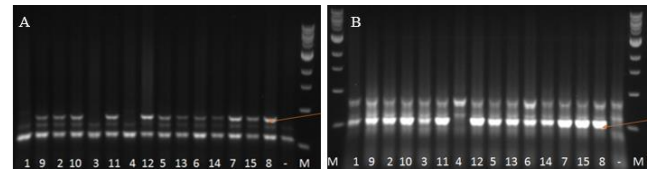


图 4 PCR 检测 czn3999 转化子

A BBM-GR 转入转化子；B NPT2 转入转化子

Figure 4 czn3999 transformants PCR results

A: BBM-GR had transformed into transformants; B: NPT2 gene had integrated into transformants.

4 结论与讨论

SE 相关转录因子是植物细胞全能性的重要影响因素。转录因子 BBM (Baby-boom) 可作为植物胚胎发生的标记基因，是 AP2 家族的重要一员[2]。BBM 在体细胞胚胎发生的组织中通常会靶向 *TAA1* 或 *YUC3/8* 等生长素合成基因，或者活化下游转录因子 *LAFL/AGL15* 的表达[6]，通过生长素通路诱导体细胞胚胎发生。BBM 与 *WUSCHEL* 一起常用来提高转基因顽抗种的再生率[1, 3-5, 7, 9-11, 14]。前人报道，AP2 家族转录因子 BBM 会通过一个较长窗口时期，直接诱导体细胞胚胎发生。超出时间窗口，体细胞胚胎发生率显著下降[13]；利用地塞米松处理 *PLT2-GR* 突变体 (*PLETHORA2-GR*) 也表现出类似的结果[7]。但在芸薹属作物中转录因子的剂量及时效规律仍是未知的。

载体构建是遗传转化的重要前提。本文利用 BP、LR 法构建了 *czn3999 35S::omega-BnBBM-GR* 载体。糖皮质激素受体系统 (GR system) 常用于转录因子的剂量和时效研究。*Omega* 增强子序列源于烟草花叶病毒 TMV；在 35S 启动子后加入 *omega* 序列，会增强转化后表达 ([15]，及本团队未发表数据)。本研究利用农杆菌介导的 Bulk-Way 转化技术，成功获得甘蓝型油菜 12075 转基因阳性植株 22 株，为进一步研究胚胎发生转录因子 BBM 的剂量及时效规律提供了宝贵的研究材料。

参考文献

- [1] Aregawi, K., Shen, J., Pierroz, G., Sharma, M. K., Dahlberg, J., Owiti, J., & Lemaux, P. G. Morphogene-assisted transformation of *Sorghum bicolor* allows more efficient genome editing. *Plant Biotechnology Journal*, (2022). 20 (4), 748–760. <https://doi.org/10.1111/pbi.13754>

- [2] 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 (8), 1737–1749. <https://doi.org/10.1105/tpc.001941>
- [3] Deng, W., Luo, K., Li, Z., & Yang, Y. *Plant Science A novel method for induction of plant regeneration via somatic embryogenesis*. *Plant Science* (2009). 177, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.03.009>
- [4] Florez, S. L., Erwin, R. L., Maximova, S. N., Guiltinan, M. J., & Curtis, W. R. Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABY BOOM transcription factor. *BMC Plant Biology*, (2015) 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0479-4>
- [5] Heidmann, I., de Lange, B., Lambalk, J., Angenent, G. C., & Boutilier, K. Efficient sweet pepper transformation mediated by the BABY BOOM transcription factor. *Plant Cell Reports*, (2011). 30 (6), 1107–1115. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1018-x>
- [6] Horstman, A., Bemer, M., & Boutilier, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*, (2017) 4 (4), 201–216. <https://doi.org/10.1002/reg2.91>
- [7] Horstman, A., Fukuoka, H., Muino, J. M., Nitsch, L., Guo, C., & Passarinho, P. *AIL and HDG proteins act antagonistically to control cell proliferation STEM CELLS AND REGENERATION AIL and HDG proteins act antagonistically to control cell proliferation*. *January*. (2015). <https://doi.org/10.1242/dev.117168>
- [8] Li, H., Soriano, M., Cordewener, J., Muiño, J. M., Riksen, T., Fukuoka, H., Angenent, G. C., & Boutilier, K. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes totipotency in the male gametophyte. *Plant Cell*, (2014). 26 (1), 195–209. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116491>
- [9] Lowe, K., Wu, E., Wang, N., Hoerster, G., Hastings, C., Cho, M., 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., ... Marredpally, W. *Morphogenic Regulators Baby boom and Wuschel Improve Monocot Transformation*. (2016). <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00124>
- [10] Lutz, K. A., Azhagiri, A., & Maliga, P. Transplastomics in arabidopsis: Progress toward developing an efficient method. *Methods in Molecular Biology*, (2011). 774 (7), 133–147. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-234-2_9
- [11] Maher, M. F., Nasti, R. A., Vollbrecht, M., Starker, C. G., Clark, M. D., & Voytas, D. F. Plant gene editing through de novo induction of meristems. *Nature Biotechnology*, (2020). 38 (1), 84–89. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0337-2>
- [12] Moore, I., Samalova, M., & Kurup, S. Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *Plant Journal*, (2006). 45 (4), 651–683. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02660.x>
- [13] Passarinho, P., Ketelaar, T., Xing, M., Van Arkel, J., Maliepaard, C., Hendriks, M. W., Joosen, R., Lammers, M., Herdies, L., Den Boer, B., Van Der Geest, L., & Boutilier, K. BABY BOOM target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. *Plant Molecular Biology*, (2008). 68 (3), 225–237. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9364-y>
- [14] Zhang, X., Xu, G., Cheng, C., Lei, L., Sun, J., Xu, Y., Deng, C., Dai, Z., Yang, Z., Chen, X., Liu, C., Tang, Q., & Su, J. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Hemp (*Cannabis Sativa* L.). *Plant Biotechnology Journal*, (2021). 19 (10), 1979–1987. <https://doi.org/10.1111/pbi.13611>
- [15] 罗文新, 张军, 杨海杰, 李少伟, 谢小燕, 逢淑强, 李少菁, 夏宁邵. 一种带增强子的原核高效表达载体的构建及初步应用. *生物工程学报*, (2000). 16 (5), 3–6.

作者简介

吴晗

1984 年生, 博士, 助理研究员. 研究方向为植物 DNA-free 基因编辑研究.

E-mail: wuhan8453@sina.com