



基因编辑创制玉米温敏型不育系及其杂交制种应用评估

侯留迪^{1,2†}, 时点石^{1†}, 高照旭¹, 朱金洁¹, 刘昌林¹, 谢传晓^{1,2*}, 祁显涛^{1*}

1. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

2. 中国农业科学院国家南繁研究院, 三亚 572024

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: qixiantao@caas.cn; xiechuanxiao@caas.cn

2024-12-17 收稿, 2025-02-11 修回, 2025-05-16 接受, 2025-05-16 网络版发表

国家重点研发计划(2022YFF1003504-003)资助

摘要 如何提高作物杂交种的生产效率是现代农业科技的重要目标之一。目前, 玉米杂交制种主要采用母本物理去雄或胞质型不育系等方法, 制种质量控制难, 效率低且成本高昂。细胞核基因不育系因其易于建立恢保关系而具有显著优势, 光温敏感型核不育基因已在水稻杂交种产业中实现大规模应用, 但在玉米种业上仍是尚未攻克的难题, 限制了杂交种生产的效率。本研究采用CRISPR/Cas9基因编辑技术靶向编辑玉米 $ZmTms5$ 基因, 创制了11种该基因功能丧失型突变体。表型鉴定结果表明, 突变体在四分体至花粉成熟期日平均气温(day average temperatures, DAT)达28°C的高温条件下, 表现为雄性不育; 而在DAT不高于25°C的低温条件下, 花粉发育正常, 表现为雄性可育。在全国玉米主要生态区域的14个试验地点进行的表型鉴定试验进一步证实了这一发现, 并明确了适宜繁亲和繁杂的区域。本研究不仅提供了一种基于基因编辑的玉米温敏型核不育系创制技术策略, 而且为该种类种的杂交制种应用明确了产业化技术布局区域。为提高杂交种制种效率和降低成本提供了新的解决方案, 具有重要的理论研究和产业应用价值。此外, 本研究也为其他作物的温敏不育系创制提供了参考。

关键词 玉米, 杂交制种, 基因编辑, $ZmTms5$, 温敏雄性不育

玉米(*Zea mays* L.)是全球主要的粮食作物之一, 其产量对保障我国粮食安全至关重要。玉米是第一个成功利用杂种优势使产量得以提高的作物, 目前在生产应用上几乎100%使用的都是杂交种。杂交制种是杂种优势利用过程中的一个重要环节^[1]。然而, 目前杂交种生产主要采用母本物理去雄或化学杀雄等方法, 存在着耗费人力物力、种子纯度不稳定等问题, 阻碍了杂交种生产效率的提升和杂种优势的充分利用^[2]。雄性不育系的发现及应用, 使得杂种优势的利用更加简单快捷。首先在玉米上应用的细胞质雄性不育系, 虽然在20世纪50年代成功配套了玉米三系法杂交种制种技术, 并进行了大面积推广应用, 但随后暴发了严重的T型细胞质雄性不育系依赖的小斑病进而造成玉米大面积减

产甚至绝收^[3], 使人们意识到细胞质雄性不育系应用的缺陷, 因此当前玉米杂交种的生产很少应用三系法杂交制种技术。随后光温敏核雄性不育系的发展逐渐替代了细胞质雄性不育系, 与利用细胞质雄性不育系进行杂交种子生产相比, 利用光温敏核雄性不育系进行种子生产有以下优势: 一是不受恢复基因限制, 几乎所有的品种或自交系都能使其育性恢复, 增加了种质资源的利用范围; 二是可以实现一系两用, 育种程序简单, 制种效率高^[4]。而温敏核不育系相对于光敏核不育系而言, 环境适应性更强, 应用更加广泛。玉米种子生产技术(seed production technology, SPT)主要是利用现代生物技术将特定的基因进行组合和转化, 以解决细胞核雄性不育系的保持和繁殖问题。此方式种子纯度

引用格式: 侯留迪, 时点石, 高照旭, 等. 基因编辑创制玉米温敏型不育系及其杂交制种应用评估. 科学通报, 2025, 70: 3179–3190

Hou L, Shi D, Gao Z, et al. Genome editing for developing temperature-sensitive male-sterile maize and evaluating its application in hybrid seed production (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 3179–3190, doi: 10.1360/TB-2024-1335

高, 配组自由, 制种成本和风险低, 但是其技术复杂且投入大, 也没有进行广泛使用。

目前已被鉴定到的玉米温敏核不育系包括琼6Qms^[5]、琼68ms^[6]、琼42Qms^[7]、春杂^[8]、9417^[9]等, 然而, 玉米温敏不育材料种质资源匮乏, 研究相对落后, 极大限制了玉米温敏不育系的广泛应用^[4]。

水稻作为温敏不育系应用最为成功的作物, 其中71%的两系杂交组合都依赖于*Tms5*位点, 占据了83.8%的两系杂交稻种植面积^[10]。通过对*Tms5*基因功能解析发现, *Tms5*编码RNase Z^{S1}蛋白靶向切割受高温诱导并在花粉母细胞特异表达的UB_{L40} mRNA。在高温条件下, *tms5*突变体材料中UB_{L40} mRNA的合成速度加快, 而RNase Z^{S1}对UB_{L40} mRNA的切割效率降低, 导致UB_{L40} mRNA的含量富集, 最终导致雄性不育。相反, 在低温条件下, UB_{L40} mRNA的合成速度变慢, 即使不被RNase Z^{S1}切割, UB_{L40} mRNA的含量也不会大量富集, 因此在低温条件下恢复育性^[11]。该研究为玉米等作物温敏不育系研究及应用提供了重要理论基础。

近年来, 基因编辑技术通过定点删除、替换或插入等方式改变基因序列, 精准改良、调控目标性状, 并创造新性状, 已经成为颠覆性的新兴育种技术^[12,13]。特别是CRISPR/Cas9基因编辑技术^[14], 其低成本、简便设计和操作便捷的优势, 已在水稻^[15]、小麦^[16]、玉米^[17]、高粱^[18]、棉花^[19]等多种作物中得到广泛应用, 在加速和精确改良作物性状方面展现出巨大潜力, 并有望彻底革新作物遗传改良领域。

本研究旨在利用CRISPR/Cas9基因编辑技术, 针对玉米温敏细胞核雄性不育基因*ZmTms5*基因进行靶向编辑, 创建玉米温敏细胞核雄性不育系。先前Li等人^[20]的研究中证明了*Zmtms5*突变体具有低温可育、高温不育的温敏不育特性, 本研究创制的细胞核雄性不育系除了验证其温敏不育特性外, 进一步通过研究*ZmTms5*基因的突变对玉米育性的影响, 以及该温敏型不育系在不同生态区域的育性表现和稳定性, 探索其在杂交制种中的应用潜力。本研究将为玉米杂交种生产提供新的遗传材料及技术手段, 推动玉米种业的快速发展, 并对保障粮食安全和农业可持续发展具有重要的意义。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

微生物材料: 大肠杆菌DH5 α 菌株(CD501-03, 北京

全式金生物技术有限公司), 农杆菌EHA105菌株(ZC142, 北京庄盟国际生物基因科技有限公司)。植物材料: 玉米自交系KN5585(未来生物科技(江苏)科技有限公司)。载体质粒: CPB玉米基因编辑载体(本实验室构建并保存)。

1.2 *ZmTms5*基因编辑靶点设计

进化树分析: 利用phytozome数据库(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>)查找水稻*TMS5*(GenBank: Os02g0214300)在玉米和水稻中的同源基因, 并使用MEGA软件比对参数设定为ClustalW, 构建进化树方法选择Neighbor-Joining, 构建参数选择Bootstrap Method 500, 其他参数选择默认值。CRISPR-P靶点预测: 使用CRISPR-P在线工具(<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>), 将KN5585遗传背景下的*ZmTms5*基因序列输入到sequence栏目中, 选择Target Genome为*Zea mays*, 并提交分析。根据结果, 选择评分较高且脱靶率较低的靶位点作为基因编辑靶点。

1.3 基因编辑载体构建

利用基因编辑载体CPB, 进行以下操作: sgRNA表达盒构建, 利用引物U6-F(5'-CACGCTGCACTGCA-CAAGCTTGCCAAGCTTCTAATTGGCCC-3')和U6(Target)-R(5'-CTAAACTTGGCGGTCAAGAGACT-TGCGGAGCGGTGGTCGC-3')扩增玉米*ZmU6-2*启动子, 同时利用引物sgRNA(target)-F(5'-CGCAAGTCT-CTTGACCGCCAAGTTTTAGAGCTAGAAATAG-CAAG-3')和sgRNA-R(5'-CGTAGACTACACATCGA-GATCAAGCTGCACCGACTCGGTGCCAC-3')扩增sgRNA。采用Overlapping PCR方法构建*ZmTms5*靶向的sgRNA表达盒。载体连接, 利用Hind III限制性内切酶(R0104V, New England Biolabs)酶切CPB载体, 将其线性化。利用NEBuilder(E2621L, New England Biolabs)将*ZmU6-2*-sgRNA片段连接到CPB载体Hind III限制性内切酶位点处。转化与验证, 将连接产物转化到DH5 α 大肠杆菌感受态, 涂布于卡那抗性LB平板, 过夜培养后挑取单克隆菌斑, 并进行Sanger测序。测序验证正确的基因编辑载体菌株将被用于提取质粒并进行下一步试验。

1.4 玉米遗传转化

该部分试验委托未来生物科技(江苏)科技有限公

司采用农杆菌侵染玉米幼胚的方法进行, 具体步骤包括: 农杆菌转化, 将构建完成的基因编辑载体质粒转入农杆菌EHA105中, 并用N6液体培养基培养至 A_{600} 为0.8后进行菌液收集, 配制侵染缓冲液悬浮菌体得到悬浮液。幼胚侵染, 取授粉后18天的玉米果穗在无菌条件下分离幼胚, 并将悬浮液与幼胚23℃暗培养3天。恢复培养, 将侵染后的幼胚在恢复培养基上28℃暗培养6天。阳性筛选, 将侵染后的幼胚在含双丙氨膦的筛选培养基上培养两周进行阳性筛选, 获得阳性愈伤组织。分化与生根, 将阳性愈伤组织于诱导培养基上, 在28℃黑暗中诱导培养2周后进行分化培育, 获得愈伤组织的绿苗。将绿苗进行生根培养, 生根后将幼苗移进行炼苗并移栽于温室。

1.5 玉米基因编辑植株筛选与靶基因编辑类型鉴定方法

由于本试验所用基因编辑载体含有胚乳特异表达的红色荧光蛋白、*Cas9*基因片段以及组成型表达*Bar*基因, 因此, 鉴定基因编辑植株可通过三种途径: *Cas9*基因检测, 利用CTAB方法提取基因组DNA, 并使用*Cas9*检测引物*Cas9*-F(5'-CCAGTTCCTGGTCCACG-TAC-3')和*Cas9*-R(5'-ACCTGTTTCGACGACAAAGTG-3')对植株*Cas9*基因进行扩增及凝胶电泳检测。*Bar*基因检测, 将1 g玉米新鲜叶片捣碎并加入2 mL无菌水搅拌均匀, 制备待检测样品。利用*Bar*试纸条(AG-002-SLF, 北京珍源鼎创生物科技有限公司)插入待检测样品中10 min后读取结果。种子荧光标记筛选, 利用荧光灯(LUYOR-3415RG, 上海路阳仪器有限公司), 参数调节为510~540 nm激发光, 适用配套红色滤光片对收获的果穗进行观察拍照。靶基因编辑类型鉴定方法, 利用提取的基因组DNA为模版, 通过靶基因扩增引物*ZmTms5*-F(5'-ACCCCTCGGCACTGATAGAA-3')和*ZmTms5*-R(5'-CAGGGGTGGACACCGTATTT-3')对材料基因编辑靶点进行扩增。将PCR产物进行Sanger测序, 分析靶基因突变的位置及突变类型。

1.6 玉米雄性不育材料育性鉴定方法

本试验分别在雄穗、花药和花粉三个水平对材料育性进行鉴定和评价, 通过观察盛花期雄穗花药不外露情况判断是否为雄性不育, 不育系材料雄穗瘦弱, 花药不外露; 花药水平鉴定: 将新鲜的花药放置于KI/I₂溶液中染色2 h, 用体视显微镜(MSHOTMZX100, 广州市

明美光电技术有限公司)10×1倍镜观察, 不育花药表现为黄色, 而可育花药为黑色; 花粉水平鉴定: 取一成熟花药于载玻片上滴加1~2滴KI/I₂溶液, 并用镊子充分按压按夹花药使花粉脱离花药与溶液结合, 静置反应1~2 min。在体视显微镜(MSHOTMZX100, 广州市明美光电技术有限公司)10×3倍镜下镜检并拍照记录, 可育花粉可被碘液染成黑色, 而不育花粉为黄色。

1.7 气象数据统计

根据中国气象局(<https://www.cma.gov.cn/>)公布数据记录每个试点每天的最高气温、最低气温和日平均气温。记录周期为从玉米四分体时期一直记录到玉米花粉成熟。

1.8 种植测试地点及种植方式

种植测试地点遍布五大玉米主产区, 包括: 北方春玉米区(黑龙江黑河、黑龙江佳木斯和辽宁沈阳)、黄淮海平原春夏玉米区(北京、河北石家庄、河南新乡、河南洛阳、江苏南京、安徽合肥和湖北武汉)、西南山地丘陵玉米区(云南曲靖)、西北内陆玉米区(新疆乌鲁木齐、新疆吐鲁番)和南方丘陵玉米区(海南三亚)。在不同的生态区种植材料时采用网室进行隔离, 温度、湿度及光照条件等与当地气象温度保持一致。

2 结果与分析

2.1 两系法杂交制种原理及玉米温敏不育基因挖掘

温敏不育材料可在高温环境下作为母本材料与可育的父本材料进行杂交用于生产杂交种F₁。而在低温条件下, 温敏不育系雄穗育性恢复。因此, 在低温条件下温敏不育系自交, 用于温敏不育系的保持(图1(a))。本研究以水稻温敏不育基因*OsTms5*为参考, 通过蛋白质序列比对在玉米基因组中筛选出7个同源基因AQK59305、ONM55787、ONM40452、PWZ29729、PWZ17793、ACG47847、PWZ14349, 并对相应的蛋白序列进行进一步的同源性分析。结果表明, 玉米基因*ZmTms5*(Zm00001eb203810, AQK59305)与水稻*OsTms5*同源性最高(图1(b)), 因此选择*ZmTms5*为本研究的基因编辑靶标基因。

2.2 基因编辑*ZmTms5*突变体材料的创制及分子鉴定

玉米*ZmTms5*基因由6个外显子和5个内含子构成,

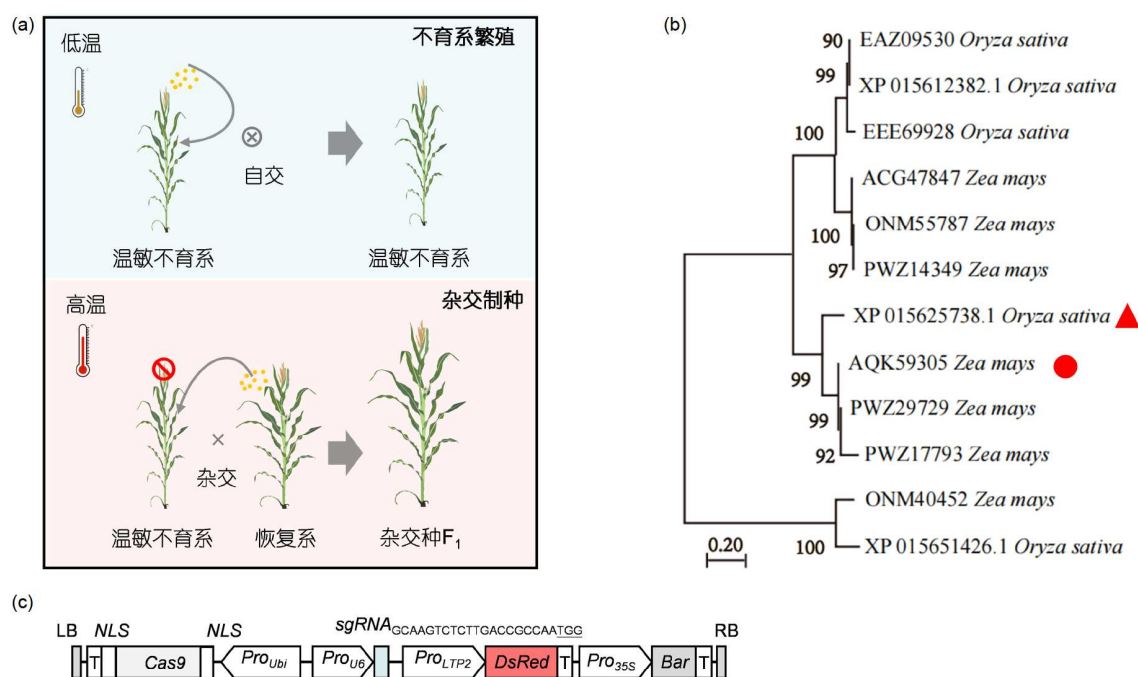


图 1 玉米温敏不育杂交制种应用与靶基因 $ZmTms5$ 编辑载体构建. (a) 玉米温敏不育系繁殖与杂交种制种一系两用原理示意图. 上图: 低温环境下, 温敏不育系雄花育性恢复, 用于不育系繁殖; 下图: 高温环境下, 温敏不育系雄性不育, 用于杂交制种. (b) 玉米与水稻温敏不育基因 $Tms5$ 蛋白质序列亲缘关系分析. 红色三角形, 水稻 $OsTms5$; 红色圆形, 玉米 $ZmTms5$. (c) 构建的含籽粒荧光报告系统CRISPR/Cas精准编辑 $ZmTms5$ 表达载体. Bar , 抗除草剂基因; $Cas9$, $SpCas9$; $DsRed$, 红色荧光蛋白; LB, T-DNA左边界; NLS(右), SV40 NLS; NLS(左), 核定位信号; Pro35S, 增强型CAMV35S启动子; ProLTP2, 大麦胚乳麦芽酮特异性启动子; ProU6, $ZmU6-2$ Pol III启动子; ProUbi, $ZmUbi$ 启动子; RB, T-DNA右边界; sgRNA, 向导RNA, 靶向 $ZmTms5$ 基因; T, T-NOS终止子

Figure 1 Application of thermo-sensitive male sterile hybrid seed production in maize and construction of the editing vector for the target gene $ZmTms5$. (a) Schematic diagram of the principle of dual-purpose use of one line for the propagation of thermo-sensitive male sterile lines and hybrid seed production in maize. Upper part: In a low-temperature environment, the male fertility of the thermo-sensitive male sterile line is restored, which is used for the propagation of the sterile line; Lower part: In a high-temperature environment, the thermo-sensitive male sterile line is male sterile, which is used for hybrid seed production. (b) Analysis of the genetic relationship of the protein sequences of the thermo-sensitive male sterile genes $Tms5$ in maize and rice. Red triangle, rice $OsTms5$; Red circle, maize $ZmTms5$. (c) The constructed CRISPR/Cas precise editing expression vector of $ZmTms5$ containing the grain fluorescence reporting system. Bar , Herbicide resistance gene; $Cas9$, $SpCas9$; $DsRed$, red fluorescent protein; LB, left border of T-DNA; NLS (Right), SV40 NLS; NLS (Left), nuclear localization signal; Pro35S, enhanced CAMV35S promoter; ProLTP2, specific promoter of hordein in barley endosperm; ProU6, $ZmU6-2$ Pol III promoter; ProUbi, $ZmUbi$ promoter; RB, right border of T-DNA; sgRNA, guide RNA, targeting the $ZmTms5$ gene; T, T-NOS terminator

编码一个全长为302aa的核糖核酸酶. 为了构建 $ZmTms5$ 基因编辑材料, 本研究利用CRISPR-P工具进行预测并最终选择第一外显子上靶点序列为5'-GCAAGTCTCTTGACCGCCAATGG-3'作为CRISPR/Cas9基因编辑靶点, 构建CRISPR-Cas9基因编辑载体(图1(c)). 通过农杆菌转化和除草剂筛选, 获得了22份基因编辑材料, 对T₀代基因编辑材料进行基因型检测及转基因成分分析, 结果表明, 22株T₀代基因编辑材料中所有材料均为转基因阳性(图2(a)). 基因型检测发现, CRISPR/Cas9介导 $ZmTms5$ 基因编辑的突变频率为91%, 其中包括纯合突变3株, 包含2种突变类型, 分别是+1 bp和-20 bp两种; 杂合突变3株, 仅包含1种突变类型, 即(wt, +1 bp); 双

等位突变10株, 包含6种突变类型, 分别为(-1 bp, +1 bp)、(+1 bp, -14 bp)、(-2 bp, +1 bp)、(+1 bp, C-T)、(+1 bp, -11 bp)和(+1 bp, -6 bp); 嵌合体4株, 包含2种突变类型, 分别为(WT, +1 bp, +23 bp)和(WT, -1 bp, +1 bp); 未发生突变2株(图2(b)).

2.3 转基因阴性 $Zmtms5$ 目标突变体的筛选

结合22株T₀代基因编辑材料靶标基因 $ZmTms5$ 突变类型及基因型数据, 我们选择T85(-C, +A杂合突变), T93(+G, +G纯合突变), T103(-20 bp, -20 bp纯合突变)作为重点材料, 并对材料的基因编辑载体成分进行分析. 实验结果表明, T85, T93及T103三个材料均含有

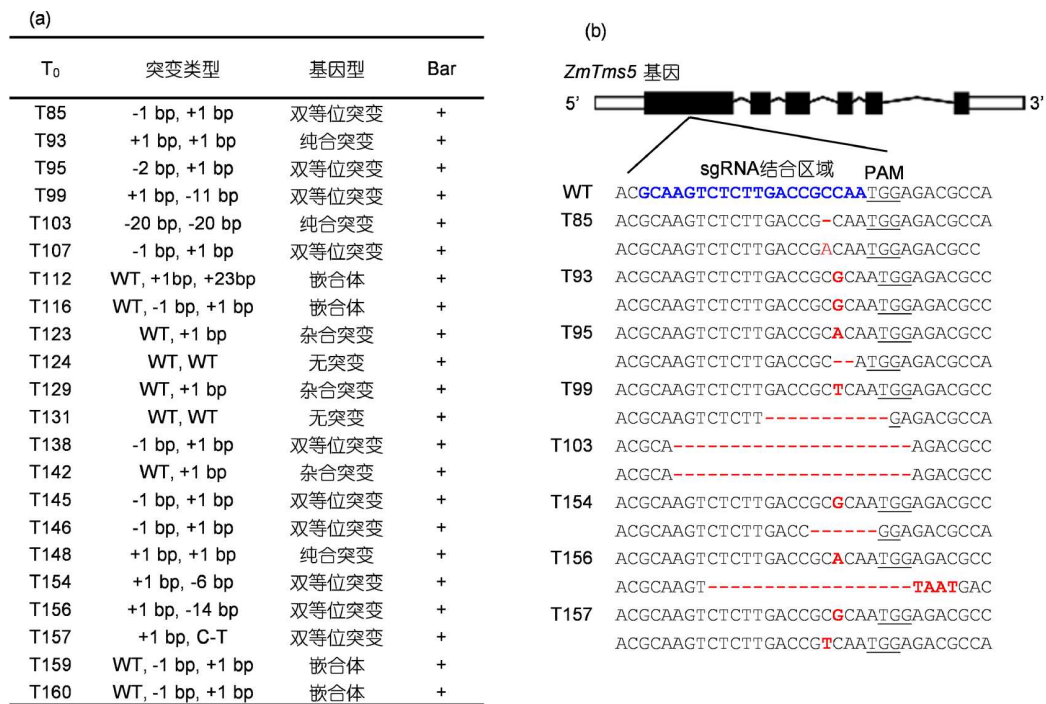


图 2 CRISPR/Cas精准编辑Zmtms5突变体基因型鉴定。(a) 22个T₀代基因编辑Zmtms5突变体的突变类型及转基因阳性鉴定。突变类型中“+”或“-”表示在基因编辑靶点处有碱基的插入或缺失，WT表示靶点未发生变化，Bar检测中加号“+”表示为Bar试纸条检测呈阳性。(b) 代表性基因编辑T₀株系Zmtms5突变体靶标区间DNA序列鉴定。WT为野生型ZmTms5基因序列，蓝色粗体字母为野生型ZmTms5编辑靶点sgRNA与DNA结合区域，下划线的字母为PAM (Protospacer-adjacent-motif)序列，红色粗体字母为该位置发生碱基插入或替换，红色“-”表示该位置产生了碱基缺失

Figure 2 Genotyping identification of CRISPR/Cas precisely edited Zmtms5 mutants. (a) Identification of the mutation types and transgenic positivity of 22 T₀ generation gene-edited Zmtms5 mutants. In the mutation types, “+” or “-” indicates the insertion or deletion of bases at the gene editing target site, WT indicates that there is no change at the target site. In the Bar detection, the plus sign “+” indicates a positive result detected by the Bar test strip. (b) Identification of the DNA sequences of the target region of the representative gene-edited T₀ line Zmtms5 mutant. WT represents the wild-type ZmTms5 gene sequence. The bold blue letters are the binding region between the sgRNA of the wild-type ZmTms5 editing target and the DNA. The underlined letters are the PAM (Protospacer-adjacent-motif) sequence. The bold red letters indicate the insertion or substitution of bases at this position, and the red “-” indicates the deletion of bases at this position

CRISPR/Cas9基因编辑载体(图3(a))，且载体中的除草剂筛选标记Bar蛋白能够高效的表达(图3(b))，对T85、T93及T103自交获得T₁代籽粒的果穗。为了高效分选携带基因编辑载体阳性及阴性籽粒，我们在基因编辑载体中增加了与基因编辑表达框紧密连锁的籽粒荧光筛选标记表达框(图1(c))。因此，基因编辑载体阳性籽粒在波长510~540 nm光源照射下产生红色荧光，而阴性的籽粒在相同条件下无荧光。根据该技术原理我们分离了一系列的荧光信号阴性的基因编辑T₁代籽粒(图3(c))。通过对系列的荧光信号阴性的T₁代植株进行Bar试纸条检测，结果表明，T85-2、T93-4和T103-7三个材料均未发现Bar蛋白表达(图3(d))。进一步通过Sanger测序对T85-2、T93-4、T103-7基因编辑材料的靶标基因ZmTms5突变情况进行分析，结果表明，T85-2突变类型为PAM上游3 bp处一个碱基C缺失，基因型为纯合突变；

T93-4突变类型为PAM上游3 bp处一个碱基G插入，基因型为纯合突变；T103-7突变类型为在sgRNA结合区域处有20 bp的碱基缺失，基因型为纯合突变(图3(e))。

2.4 基因编辑Zmtms5突变体材料温敏雄性不育表型鉴定

为了评估基因编辑Zmtms5突变体材料在不同温度条件下的雄性不育表型，本研究将获得的T85-2、T93-4及T103-7三个基因编辑载体阴性且ZmTms5发生纯合突变的突变体材料，分别种植在低温及高温条件下进行种植，并观察材料雄穗育性表型。结果表明，在低温条件下，对照组KN5585、T85-2、T93-4及T103-7突变体材料雄穗花药外露，花药大小及形态正常，且花药内部含有正常的花粉。花粉颗粒大小均匀，并可被碘染成蓝黑色，表明花粉发育正常(图4(a))。对碘染后的可育花

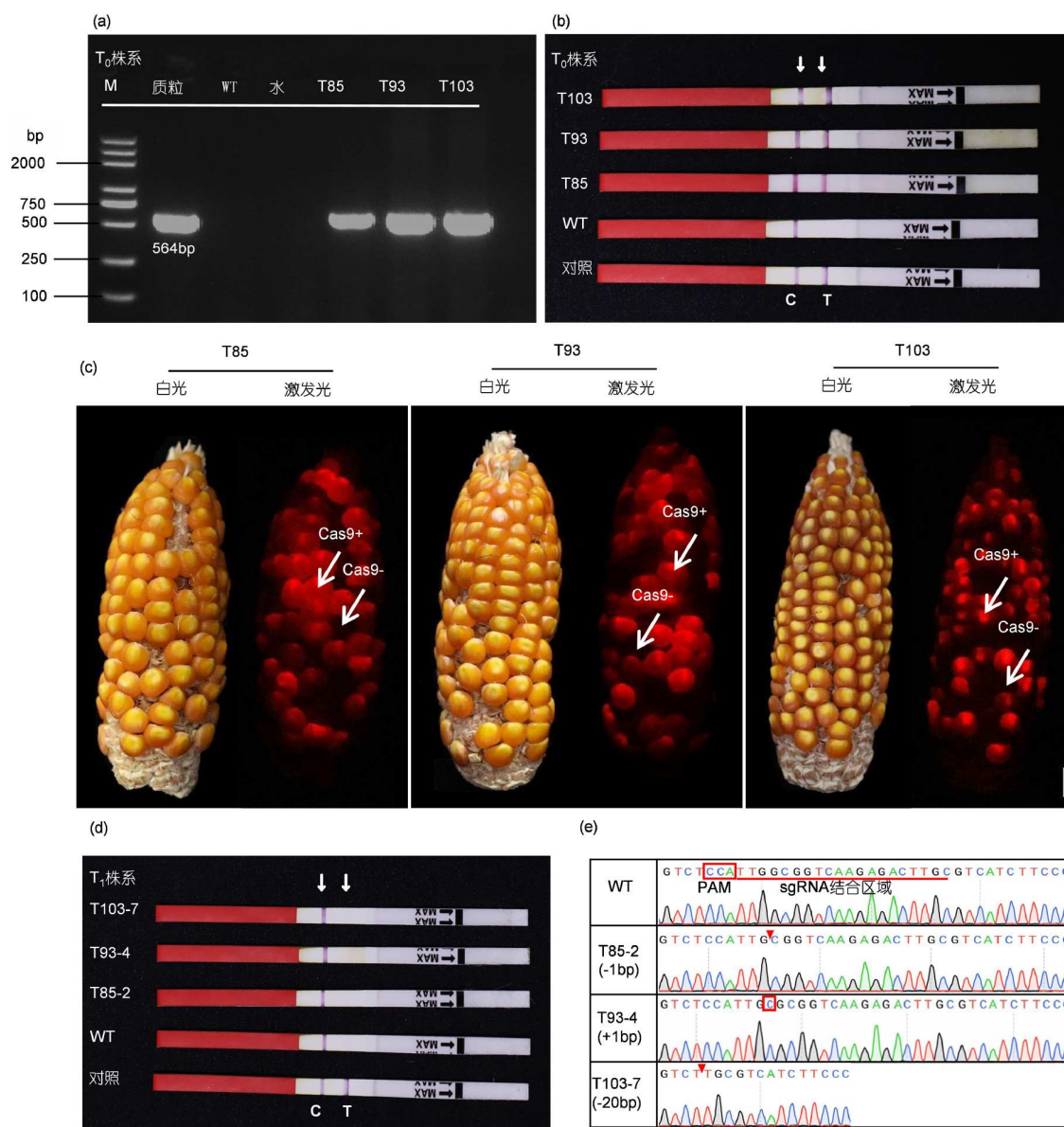


图 3 基因编辑载体阳性转化体鉴定与转基因阴性 *Zmtms5* 目标突变体的筛选. (a) T_0 材料转基因成分PCR检测. M: 2K DNA Marker; 质粒: 本实验中基因编辑载体质粒; WT: 野生型基因组. (b) T_0 株系转基因成分 *Bar* 试纸条检测. 对照: *Bar* 转基因阳性植株; WT: 野生型材料; C: 质控线; T: 检测线. (c) 基于种子红色荧光报告系统分选 T_1 代籽粒. 红色荧光的籽粒为转基因阳性籽粒标记为 Cas9+, 无荧光的籽粒为转基因阴性籽粒标记为 Cas9-. 荧光波长参数调节为 510~540 nm 激发光, 检测设备为手持式荧光灯 (LUYOR-3415RG, 上海路阳仪器有限公司, 中国). (d) 转基因阴性 T_1 株系 *Bar* 试纸条检测验证. 对照组为 *Bar* 转基因阳性植株; C 为质控线; T 为检测线. (e) 转基因阴性 T_1 株系 *ZmTms5* 编辑靶点 Sanger 测序鉴定. 红色框标记的 CCA 为 PAM 序列; 红色下划线为基因编辑 sgRNA 靶点结合区域; 红色三角形为在该位置发生碱基缺失; 红色框标记的 C 为在该位置发生 1 个 C 的插入

Figure 3 Identification of positive transformants of the gene editing vector and screening of transgenic negative *Zmtms5* target mutants. (a) PCR detection of transgenic components in T_0 materials. M: 2K DNA Marker; Plasmid: the gene editing vector plasmid used in this experiment; WT: wild-type genome. (b) Detection of transgenic components in T_0 lines using Bar test strips. Control: Bar transgenic positive plants; WT: wild-type materials; C: quality control line; T: detection line. (c) Sorting of T_1 generation seeds based on the seed red fluorescence reporting system. Seeds with red fluorescence are transgenic positive seeds, marked as Cas9+; Seeds without fluorescence are transgenic negative seeds, marked as Cas9-. The fluorescence wavelength parameters are adjusted to an excitation light of 510~540 nm, and the detection device is a handheld fluorescent lamp (LUYOR-3415RG, Shanghai Luyor Instrument Co., Ltd., China). (d) Verification of Bar test strip detection of transgenic negative T_1 lines. The control group is Bar transgenic positive plants; C is the quality control line; T is the detection line. (e) Identification of the *ZmTms5* editing target site of transgenic negative T_1 lines by Sanger sequencing. CCA marked in the red box is the PAM sequence; red underline is the binding region of the gene editing sgRNA target site; red triangle indicates the deletion of bases at this position; C marked in the red box indicates the insertion of one C at this position

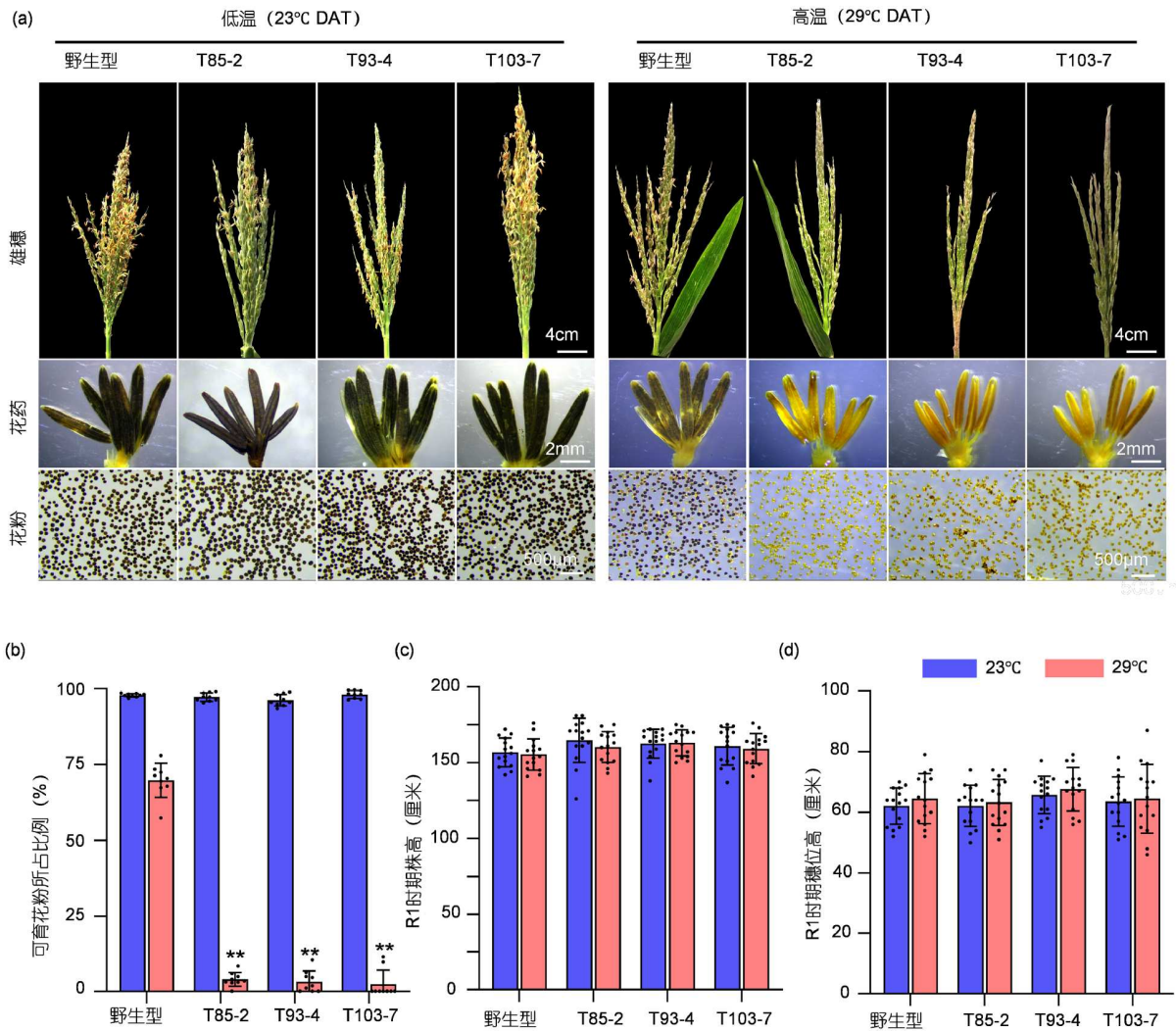


图 4 基因编辑*Zmtms5*突变体材料温敏雄性不育表型鉴定。(a) 低温及高温条件下雄花及花粉育性鉴定。左图：低温条件下雄穗形态和花药、花粉碘染的显微观察；右图：高温条件下雄穗形态和花药、花粉碘染的显微观察；体式显微镜(MSHOTMZX100, 广州市明美光电技术有限公司, 中国), 花药观察参数为10×1倍数, 花粉观察参数为10×3倍数。DAT: Day average temperature, 记录从四分体时期到花粉发育成熟时期的日平均温度。(b) 低温及高温条件下花粉活性统计。蓝色直方图数据表示低温23°C材料可育花粉占总花粉百分比；浅红色直方图数据表示高温29°C材料可育花粉占总花粉百分比。**P*<0.05, ***P*<0.01。(c) 低温及高温条件下R₁时期的株高数据统计。R₁时期, 玉米散粉吐丝期。(d) 低温及高温条件下R₁时期的穗位高数据统计

Figure 4 Identification of the thermo-sensitive male sterile phenotype of gene-edited *Zmtms5* mutant materials. (a) Identification of the fertility of male flowers and pollen under low-temperature and high-temperature conditions. Left figure: Microscopic observation of the morphology of tassels, anthers, and pollen stained with iodine under low-temperature conditions; right figure: microscopic observation of the morphology of tassels, anthers, and pollen stained with iodine under high-temperature conditions; stereo microscope (MSHOT MZX100, Guangzhou Mshot Optoelectronic Technology Co., Ltd., China). The observation parameter for anthers is 10×1 magnification, and the observation parameter for pollen is 10×3 magnification. DAT: Day average temperature, recording the daily average temperature from the tetrad stage to the mature pollen development stage. (b) Statistics of pollen viability under low-temperature and high-temperature conditions. The data in the blue histogram represents the percentage of fertile pollen in the materials at a low temperature of 23°C to the total pollen; the data in the light red histogram represents the percentage of fertile pollen in the materials at a high temperature of 29°C to the total pollen. **P*<0.05, ***P*<0.01. (c) Statistics of plant height data at the R₁ stage under low-temperature and high-temperature conditions. At the R₁ stage, it is the tasselling and silking stage of maize. (d) Statistics of ear height data at the R₁ stage under low-temperature and high-temperature conditions

粉占总花粉的比例进行统计, 结果表明, KN5585碘染后的可育花粉占比为97.82%, T85-2为97.21%, T93-4为

96.18%, T103-7为98.04%(图4(b)). 这些结果表明, *Zmtms5*突变体在低温条件下其雄穗育性与对照组一

致, 表现为雄性育性恢复表型. 在高温条件下, 对照组KN5585材料雄穗、花药、花粉等大小形态观察表明, KN5585表现为雄性可育. 然而, T85-2, T93-4及T103-7突变体材料雄穗瘦弱且无花药外露, 花药较小且无法被碘染色, 表现为花药发育不良, 花粉干瘪畸形且无内含物, 表现为败育(图4(a)). 对碘染后的可育花粉占总花粉的比例进行统计, 结果表明, KN5585碘染后的可育花粉占比为69.73%, T85-2为3.92%, T93-4为3.19%, T103-7为2.63%(图4(b)). 实验数据表明, *Zmtms5*突变体在高温条件下表现为雄性不育. 此外, 通过对高温、低温条件下的对照组KN5585, T85-2、T93-4及T103-7突变体材料株高、穗位高等农艺性状调查发现, *Zmtms5*突变体在株高穗位高等基础农艺性状方面与野生型无明显差别(图4(c, d)), 表明该研究创制的基因编辑*Zmtms5*突变体是较为理想的玉米温敏不育材料.

2.5 全国玉米主产区不同纬度和海拔生态区域 *Zmtms5*突变体温敏育性表型鉴定

为了评估基因编辑*Zmtms5*突变体材料在我国玉米主产区温敏育性表型, 本研究依据中国气象局公布数据历年温度数据, 结合经度、纬度、海拔等综合因素共选择了包含五个玉米主产区的14个生态区域进行基因编辑*Zmtms5*突变体材料的温敏育性表型鉴定(图5(a)). 根据玉米雄花发育特点, 我们选择记录玉米雄穗发育V10时期开始直至散粉结束VT时期的日平均温度、日平均最高温度、以及日平均最低温度(图5(a)). 通过对不同测试点雄穗、花药形态及花粉育性观察, 实验结果表明, 在高纬度、低温地区的黑河, 日平均温度为23°C, 基因编辑*Zmtms5*突变体材料与野生型的雄穗、花药形态及花粉育性保持一致, 表现为稳定的可育表型. 在高海拔、低温地区的曲靖, 日平均温度为22°C, 基因编辑*Zmtms5*突变体材料与野生型的雄穗、花药形态及花粉育性保持一致, 表现为稳定的可育表型. 在纬度较高的地区如洛阳, 日平均气温为28°C, 基因编辑*Zmtms5*突变体材料表现为雄穗花药不外露, 花药较小, 花粉皱缩且无内含物, 表现为稳定的雄性不育表型, 而同一地点的对照组材料则表现为雄性可育表型(图5(b)).

2.6 基因编辑*Zmtms5*突变体杂交制种应用上适宜繁亲和繁杂区域探索

为了探索基因编辑*Zmtms5*突变体在杂交制种应用

上适宜繁亲和繁杂区域, 我们对本研究涉及的不同种植地点基因编辑*Zmtms5*突变体材料的雄性育性表型进行统计. 结果表明, 纬度较低、日平均气温较低的区域, 如北方春玉米区、黄淮平原春夏玉米区北部、西北内陆玉米区部分地区, 以及部分海拔较高的西南山地丘陵玉米区, 温敏不育系材料花粉活性高于80%(图6), 且通过田间开放授粉实验表明, 在该部分区域基因编辑*Zmtms5*突变体材料可正常结实(图5(b)), 因此以上地区更适宜基因编辑*Zmtms5*突变体材料的繁亲区域(图6). 纬度较高、日平均气温高于28°C, 如黄淮平原春夏玉米区南部、南方丘陵玉米区以及西南山地丘陵玉米区以东等部分地区, 基因编辑*Zmtms5*突变体材料花粉表现为不育表型(图6), 且通过田间开放授粉实验表明, 在该部分区域的基因编辑*Zmtms5*突变体材料不能正常结实(图5(b)), 因此以上地区更适宜温敏不育系材料的繁杂区域, 本试验用的玉米材料在合肥, 武汉等城市由于高温影响导致WT和野生型花粉彻底败育, 育性为0.

3 结论与讨论

本研究成功利用CRISPR/Cas9基因编辑技术创制了玉米*Zmtms5*温敏型不育系材料, 并对其育性进行了全面评估. 研究结果表明, *Zmtms5*基因编辑材料在低温条件下表现为雄性可育, 而在高温条件下则表现为雄性不育, 符合温敏不育系的特征. 该材料的创制为玉米杂交种生产提供了新的育种材料, 具有重要的应用价值. 未来, 将进一步研究*Zmtms5*基因编辑材料在不同玉米品种中的应用效果, 并探索其在玉米杂交种生产中的应用潜力.

CRISPR/Cas9基因编辑技术在玉米温敏不育系创制中的优势: 与传统的诱变育种方法相比, CRISPR/Cas9基因编辑技术具有高效、精准和可控性强的特点, 能够更快速、更准确地获得目标基因的突变体. 本研究成功利用CRISPR/Cas9技术对*ZmTms5*基因进行精准编辑, 并获得了稳定的温敏不育系材料. 先前Li等人^[20]报道, 在生长室控温条件下*tms5*突变体表现为低温(24°C)可育, 高温(32°C)不育的特性, 育性转换温度为28°C, 对本研究*Zmtms5*基因编辑材料的表型鉴定具有指导意义. 本研究针对*Zmtms5*突变体的田间育性进行评估, 在全国14个不同纬度不同海拔的地区进行种植, 深入探索其在杂交制种应用方面的潜力与价值, 结果表明, 该材料在不同生态区域表现出不同的育性特征.

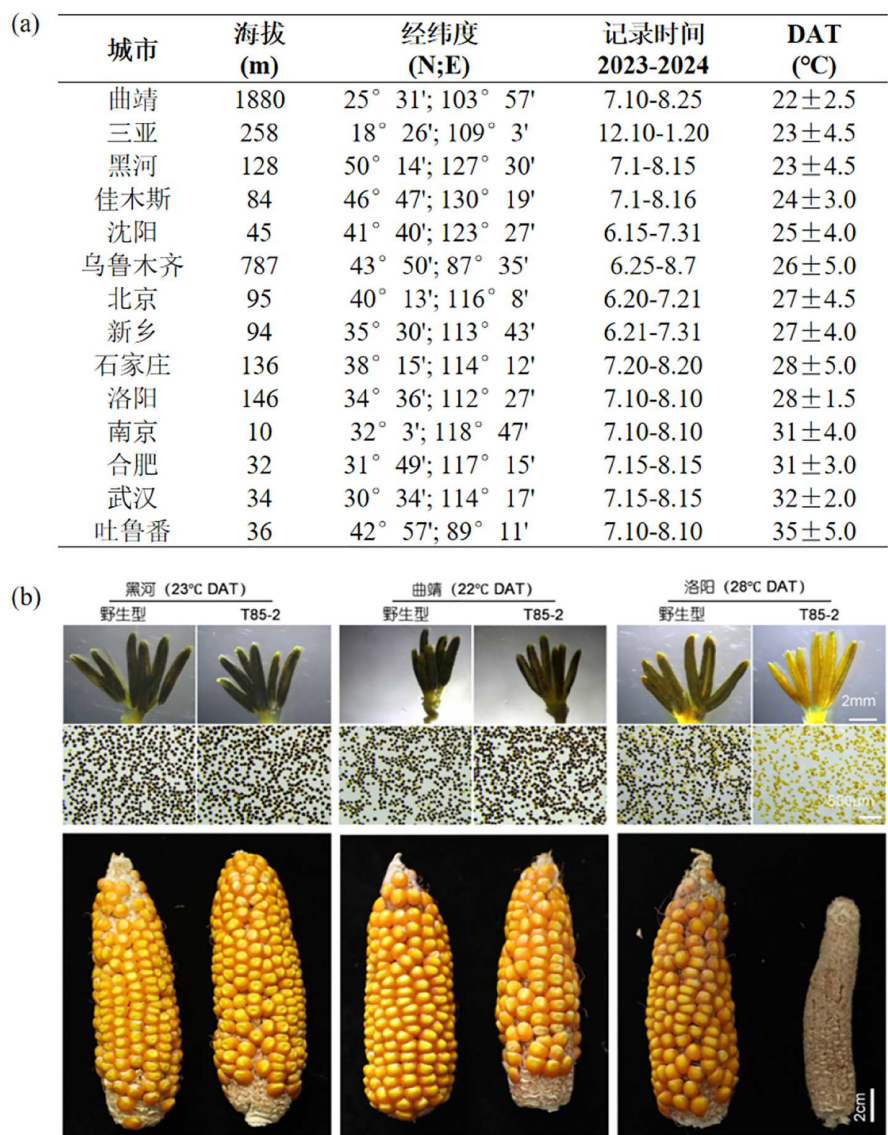


图 5 全国玉米主产区不同纬度和海拔生态区域*Zmtms5*突变体温敏育性表型鉴定。(a) 测试点、海拔、经纬度、气温记录时间及日平均气温数据。海拔单位为米；气温记录时间：从四分体时期到花粉发育成熟时期的日平均温度；DAT: day average temperature表示日均气温。(b) 高纬度(黑河)、高海拔(曲靖)及中纬度(洛阳)等代表性生态区温敏育性表型

Figure 5 Identification of the thermo-sensitive fertility phenotypes of *Zmtms5* mutants in ecological regions with different latitudes and altitudes in the main maize-producing areas across China. (a) Data of the test sites, altitudes, longitudes and latitudes, temperature recording time, and daily average temperature. The unit of altitude is meter; temperature recording time: the daily average temperature from the tetrad stage to the mature pollen development stage; DAT: day average temperature represents the daily average temperature. (b) Thermo-sensitive fertility phenotypes in representative ecological regions such as high latitude (Heihe), high altitude (Qujing), and mid-latitude (Luoyang)

在北方春玉米区、黄淮平原春夏玉米区北部以及西南山地丘陵玉米区的高海拔地区，日平均气温均在25℃以下，*Zmtms5*突变体材料表现为稳定的可育表型，表明该材料在这些区域适宜作为繁亲材料使用。在黄淮平原春夏玉米区南部、南方丘陵玉米区以及西南山地丘陵玉米区东部，日平均气温达到28℃及以上，黄淮平

原春夏玉米区南部的洛阳日平均气温为28℃，*Zmtms5*突变体材料则表现为雄性不育，说明该材料在该区域适宜作为繁杂材料使用。注意到与Gao等人^[19]报道的不育温度略有差异，推测原因是Li等人^[20]的研究是在生长室控温条件下统计的育性转换温度，而本研究统计的是田间实时温度，因此存在差异。同时研究中发现

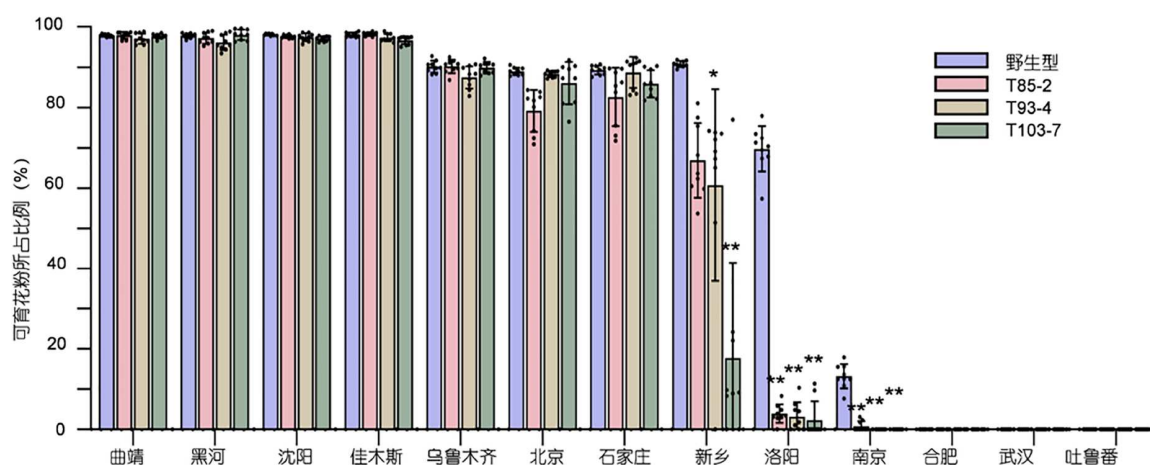


图 6 基因编辑 *Zmtms5* 突变体杂交制种应用上适宜繁亲和繁杂区域. 全国不同经纬度和海拔地区 *Zmtms5* 突变体材料的花粉育性统计.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Figure 6 Suitable regions for parental line propagation and hybrid seed production in the application of gene-edited *Zmtms5* mutants for hybrid seed production. Statistics of the pollen fertility of *Zmtms5* mutant materials in regions with different longitudes, latitudes, and altitudes across China.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

地处南方丘陵玉米区的南京及合肥等地以及西北内陆玉米区的山间盆地吐鲁番, 野生型及突变体均表现出

不同程度的不育特性(图6), 推测是由材料的遗传背景所致, 应更换为当地常用遗传背景的材料进一步验证.

参考文献

- 1 Duvick D. The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea Mays* L.). *Adv Agron*, 2005, 86: 83–145
- 2 Perez-Prat E, van Lookeren Campagne M M. Hybrid seed production and the challenge of propagating male-sterile plants. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 199–203
- 3 Scheifele G L, Nelson R R, Koons C. Male sterility cytoplasm conditioning susceptibility of resistant inbred lines of Maize to yellow leaf blight caused by *Phyllosticta zeae*. *Plant Dis Rep*, 1969, 53: 656–659
- 4 Fu Z Y, Qin Y T, Tang J H. Progress and application of light and temperature sensitive nuclear male sterility genes in major crops (in Chinese). *Chin J Bioeng*, 2018, 38: 115–125 [付志远, 秦永田, 汤继华. 主要作物光温敏感核雄性不育基因的研究进展与应用. 中国生物工程杂志, 2018, 38: 115–125]
- 5 Fu Z Y, Zhao G Y, Tang J H, et al. Comparison of fertility related traits and preliminary localization of sterile genes in two maize thermosensitive sterile lines (in Chinese). *Mol Plant Breed*, 2004, 5: 633–636 [付志远, 赵广远, 汤继华, 等. 两种玉米温敏不育系的育性相关性状的比较及不育基因的初步定位. 分子植物育种, 2004, 05: 633–636]
- 6 Tang J H, Fu Z Y, Hu Y M, et al. Genetic analyses and mapping of a new thermo-sensitive genic male sterile gene in maize. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 11–15
- 7 Zhang Y D, Liu Y M, Feng R J, et al. Differential expression analysis of temperature sensitive nuclear male sterile genes in maize (in Chinese). *J Trop Crops*, 2004, 25: 66–70 [张银东, 刘艳鸣, 冯仁军, 等. 玉米温敏型核雄性不育基因差异表达分析. 热带作物学报, 2004, 25: 66–70]
- 8 Mang Z H. Fine localization of light temperature sensitive male sterility genes in corn and proteomic analysis of hybrid vigor in silk filament (in Chinese). Doctor Dissertation. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2016 [马指挥. 玉米光温敏感雄性不育基因的精细定位与花丝活力杂种优势的蛋白组学分析. 博士学位论文. 郑州: 河南农业大学, 2016]
- 9 Li W P, Zhang W L, Tian Z M. The selection strategy of photo-thermo-sensitive male sterile lines in maize (in Chinese). *Acta Bot Boreal Occid Sin*, 2004, 24: 488–494 [李维平, 张文莉, 田中民, 等. 玉米温光敏雄性不育系的选育策略. 西北植物学报, 2004, 24: 488–494]
- 10 Wang Y C, Zhu B S, Zhou L, et al. Sterility mechanism of light/temperature-sensitive nuclear sterile lines and development and prospects of two-line hybrid rice (in Chinese). *Chin J Rice Sci*, 2024, 38: 463–474 [汪邑晨, 朱本顺, 周磊, 等. 光/温敏核不育系的不育机理及两系杂交稻的发展与展望. 中国水稻科学, 2024, 38: 463–474]
- 11 Zhou H, Zhou M, Yang Y, et al. RNase Z^{S1} processes Ub_{L40} mRNAs and controls thermosensitive genic male sterility in rice. *Nat Commun*, 2014,

- 5: 4884
- 12 Pacesa M, Pelea O, Jinek M. Past, present, and future of CRISPR genome editing technologies. [Cell](#), 2024, 187: 1076–1100
- 13 Zou J, Huang Y, Gao C, et al. Unlocking crop diversity: enhancing variations through genome editing. [Sci Bull](#), 2023, 69: 281–284
- 14 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. [Science](#), 2012, 337: 816–821
- 15 Miao J, Guo D, Zhang J, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. [Cell Res](#), 2013, 23: 1233–1236
- 16 Wang Y, Cheng X, Shan Q, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. [Nat Biotechnol](#), 2014, 32: 947–951
- 17 Liang Z, Zhang K, Chen K, et al. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. [J Genet Genomics](#), 2014, 41: 63–68
- 18 Che P, Wu E, Simon M K, et al. Wuschel2 enables highly efficient CRISPR/Cas-targeted genome editing during rapid de novo shoot regeneration in sorghum. [Commun Biol](#), 2022, 5: 344
- 19 Gao W, Long L, Tian X, et al. Genome editing in cotton with the CRISPR/Cas9 system. [Front Plant Sci](#), 2017, 8: 1364
- 20 Li J, Zhang H, Si X, et al. Generation of thermosensitive male-sterile maize by targeted knockout of the *ZmTMS5* gene. [J Genet Genomics](#), 2017, 44: 465–468

Summary for “基因编辑创制玉米温敏型不育系及其杂交制种应用评估”

Genome editing for developing temperature-sensitive male-sterile maize and evaluating its application in hybrid seed production

Liudi Hou^{1,2†}, Dianshi Shi^{1†}, Zhaoxu Gao¹, Jinjie Zhu¹, Changlin Liu¹, Chuanxiao Xie^{1,2*} & Xiantao Qi^{1*}

¹ Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

² National Nanfan Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Sanya 572024, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding authors, E-mail: qixiantao@caas.cn; xiechuanxiao@caas.cn

Hybrid maize production currently faces challenges from labor-intensive emasculation methods and genetic limitations of cytoplasmic male sterility (CMS). Thermosensitive genic male sterile (TGMS) systems offer a promising alternative but remain underexplored in maize. Building on rice *Tms5* mechanisms where RNase Z^{S1} regulates temperature-dependent fertility via UB_{L40} mRNA processing, we employed CRISPR/Cas9 to engineer a maize TGMS line by targeting *ZmTms5* (GRMZM2G126050), its functional homolog.

A CRISPR/Cas9 vector targeting exon 1 of *ZmTms5* was constructed in inbred line KN5585. T₀ transformants were screened via PCR, Bar protein detection, and seed fluorescence markers. Transgene-free T₁ mutants were isolated through fluorescence sorting and validated by sequencing. Phenotypic evaluations included anther morphology, pollen viability (I₂-KI staining), and field trials across 14 Chinese maize zones.

The main research results are as follows: (1) Efficient gene editing. Among 22 T₀ lines, 91% carried indels at *ZmTms5*. Three transgene-free mutants (T85-2: -1G, T93-4: +1G, T103-7: -20 bp) with frameshift mutations were obtained. (2) Temperature-dependent fertility. At 23°C, mutants (T85-2, T93-4, and T103-7) exhibited normal anther extrusion. At 29°C, complete male sterility with shriveled anthers and aborted pollen, while maintaining WT plant architecture. (3) Ecological adaptability. Northern regions (Heihe: 23°C) and high-altitude areas (Qijing: 22°C) supported fertility. Central-southern zones (Luoyang: 28°C) induced sterility, ideal for hybrid seed production. Extreme heat regions (Turpan Basin: 34°C) caused partial sterility even in WT, suggesting genotype-environment interactions.

This study establishes the first CRISPR-derived maize TGMS system, overcoming CMS limitations while demonstrating superior ecological adaptability. Our *Zmtms5* mutants mirror rice *Tms5* molecular mechanisms but exhibit field-based fertility transitions at 25–28°C, contrasting with Li et al.'s controlled-environment thresholds (24°C/32°C). Regional suitability maps provide actionable insights: cooler northern/western areas (e.g., Heihe) enable sterile-line propagation, while warmer southern regions (e.g., Luoyang) facilitate efficient hybrid production. Notably, genetic background influenced sterility patterns in Nanjing and Turpan, underscoring the need for local germplasm optimization. The transgene-free strategy aligns with biosafety regulations, offering a scalable solution for two-line hybrid systems.

By bridging rice TGMS knowledge with CRISPR precision, this work delivers an environmentally resilient male sterility system for maize. The technology reduces hybrid seed production costs compared to manual emasculation while eliminating CMS-associated disease risks. Future efforts will refine temperature thresholds across diverse genetic backgrounds and integrate this system into commercial breeding pipelines.

maize, hybrid seed production, gene editing, *ZmTms5*, temperature-sensitive male sterility

doi: [10.1360/TB-2024-1335](https://doi.org/10.1360/TB-2024-1335)