

花粉管通道和农杆菌介导的花生 *AhFatB* 基因编辑

潘雷雷^{1,2}, 纪红昌², 黄建斌², 淮东欣¹, 雷永¹, 隋炯明², 唐艳艳²,
朱虹², 姜德锋², 王晶珊², 乔利仙²

(1. 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北 武汉 430062; 2. 青岛农业大学 农学院,
山东省花生产业协同创新中心, 山东 青岛 266109)

摘要:为探究 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在花生中的应用, 利用花粉管注射浸花法和农杆菌介导法转化花生, 通过在侵染液中添加合适浓度的 AS、MES 以及 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 促进了转化事件的发生, 并通过注射液每日现用现配最大程度地保持农杆菌的活力, 提高了转化效率。本试验首次将该转化法用于基于 CRISPR/Cas9 技术的花生基因编辑, 根据花生 *FatB* 基因序列设计编辑靶位点, 成功构建 CRISPR/Cas9 基因编辑载体 PX458-Cas9-*FatB* 并成功转化农杆菌菌株 GV3101; 利用 1 mL 无菌注射器将当日离心配置的新鲜农杆菌侵染液注射到花生龙骨瓣中至花瓣浸透, 每日 8:00 以前完成注射, 连续注射 15 日, 待注射花朵下针后用尼龙绳进行捆绑标记; 待荚果成熟后, 收获捆绑标记的花生荚果, 正常晾晒干燥后剥取花生籽粒, 提取籽粒基因组 DNA, 进行 PCR 扩增, 筛选转化阳性籽粒。结果显示, 在被检测的 274 粒籽粒中, 有 108 粒扩增出了相应目的条带, 转基因阳性率为 39.42%; 经测序验证, 108 粒阳性籽粒中有 1 粒在靶位点外发生了基因编辑, 在部分阳性籽粒的自交后代中, 发现了靶位点发生编辑的籽粒。因此, 本研究初步证实利用注射浸花以及农杆菌介导法对基于 CRISPR/Cas9 技术的花生基因编辑是有效的, 但编辑效率有待于进一步提高。

关键词:花生; CRISPR/Cas9; 注射浸花法; *FatB*; 基因编辑

中图分类号: Q78; S565.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2020)04-0064-07

doi: 10.7668/hbxb.20190658



AhFatB Gene Editing Using Pollen-tube Pathway and *Agrobacterium* Mediated Method in Peanut

PAN Leilei^{1,2}, JI Hongchang², HUANG Jianbin², HUAI Dongxin¹, LEI Yong¹, SUI Jiongming²,
TANG Yanyan², ZHU Hong², JIANG Defeng², WANG Jingshan², QIAO Lixian²

(1. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture,
Wuhan 430062, China; 2. College of Agronomy, Qingdao Agricultural University, Shandong Provincial
Peanut Industry Cooperative Innovation Center, Qingdao 266109, China)

Abstract: In order to explore the possible application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in peanut, the genetic transformation by pollen tube injection pathway and *Agrobacterium tumefaciens* mediated method was conducted firstly in peanut. The transformation efficiency was improved dramatically by adding appropriate concentration of AS, MES and $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ to the infection solution, and using the fresh infection solution produced daily which could maximize the activity of *A. tumefaciens*. In this experiment, the transformation method was applied to peanut gene editing based on CRISPR/Cas9 technology for the first time. The editing target site was designed according to the peanut *FatB* gene sequence, and the CRISPR/Cas9 gene editing vector PX458-Cas9-*FatB* was successfully constructed and transformed into the *A. tumefaciens* strain GV3101. The fresh *A. tumefaciens* infection solution was injected into the carina of peanut plants by 1 mL aseptic syringe until the petals were soaked. The injection was conducted before 8:00 everyday, with 15 d continuous injection. Those pod needles from injected flowers were then marked by tied with nylon cord. Those pods tied by nylon cord from injected flowers were harvested, and then

收稿日期: 2019-12-26

基金项目: 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室开放课题基金(KF2018008); 山东省重点研发计划项目(2018GNC111014)

作者简介: 潘雷雷(1992-), 男, 山东潍坊人, 在读硕士, 主要从事花生基因编辑研究。

通讯作者: 乔利仙(1973-), 女, 山西晋中人, 教授, 博士, 主要从事作物遗传育种研究。

dried by normal sunlight. The genomic DNAs from those seeds from marked pods were extracted, and the positive transformed seeds were screened by PCR amplification. The results showed that among the 274 seeds tested, the corresponding target bands were obtained from 108 seeds, and the positive rate of transformation was 39.42%. The sequencing results showed that one of the 108 positive kernels had gene editing outside the target site, the kernels with edited target sites were found in the inbred progenies of some positive kernels. Therefore, this study preliminarily showed that the injection dipping flower method was effective for peanut gene editing based on CRISPR/Cas9 technology, but the editing efficiency needs to be further improved.

Key words: Peanut; CRISPR/Cas9; Infection and soaking flower; *FatB*; Gene editing

随着分子生物学及基因工程技术的飞速发展,转基因技术成为研究基因功能和植物改良的重要途径,高效遗传转化体系的建立便成为影响物种间功能基因发掘及研究利用的限制条件。目前,在植物遗传转化中普遍应用的转化方法主要有农杆菌介导法和 DNA 直接导入法。农杆菌介导法具有操作简单、成本低、转化频率高等优点,但需依赖于物种高效的再生体系,存在再生周期长等缺点^[1-2]。DNA 直接导入法主要包括基因枪轰击法以及花粉管通道法。其中基因枪轰击法受体类型广泛,无物种限制,但存在转化频率低、价格昂贵以及后代遗传不稳定等缺点^[1-2]。花粉管通道法是由我国科学家周光宇^[3]于 1979 年首先提出和设计的,与其他方法相比,该法操作简便,无需昂贵的仪器和化学药品,注射后直接收获种子,无须经过组织培养再生,且转化周期短,其首先在棉花上获得成功应用^[4]。

花生属于比较难于转化的作物,目前花生遗传转化的方法主要有农杆菌介导法和花粉管通道法,使用的外植体有胚小叶、子叶节、胚轴、幼叶等^[5-8]。王凤欢等^[9]对农杆菌介导的花生胚小叶遗传转化体系进行优化,使抗性丛生芽诱导率可达到 15% ~ 93%。贾宇臣等^[10]以子叶节为外植体进行研究,获得最佳转化条件。邱金梅等^[11]利用农杆菌 EHA105 菌株侵染花生胚轴外植体,认为外植体在真空中侵染利于转化。钟育海等^[12]研究认为在农杆菌菌液中添加烟草提取物,以及超声波处理,可使子叶外植体的分化率达到 86%。花粉管通道法最初用于外源 DNA 的转移,如申馥玉等^[13]和梁炫强等^[14]提取高抗锈病的花生野生种 *Arachis glabrata* 基因组 DNA,通过花粉管通道法导入栽培品种白沙 1016 中,结果获得抗锈病性及其他性状明显转移的株系。王亚等^[15]、范乾程等^[16]通过花粉管通道法将携带外源基因的重组农杆菌导入花生,PCR 检测阳性率分别为 34.7% 和 18.0%。

CRISPR-Cas9 技术是最新发展的基因编辑技术,可以对特定 DNA 进行定点切割,并进一步引起

靶基因的定点突变。运用 CRISPR/Cas9 技术已经在水稻、小麦、玉米三大作物上实现了高效精确的单碱基定点突变^[17],并显著提高了水稻白叶枯病抗性^[18]。但基因编辑同样要依赖于成熟高效的遗传转化体系,由于基因编辑是在外源质粒成功转化的基础上发生,所依赖的遗传转化体系需要具有更高的转化效率,方可提高编辑的效率。因此,简单高效遗传转化体系的建立也成为基因编辑有效利用的途径。

花生是重要的油料作物,花生油富含多种脂肪酸,主要包括饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸,分别占到总脂肪酸含量的 20% 和 80%。由于饱和脂肪酸被认为对人体有害,故降低饱和脂肪酸含量成为花生育种的目标之一。高等植物中的 *FatB* (acyl-ACP thioesterase, 酰基-ACP 硫脂酶) 主要编码生成饱和脂酰碳链的硫酯酶,催化饱和脂肪酸的合成释放。采用 RNA 干扰技术沉默 *FatB* 基因的表达使棉籽油中的 C16:0 含量从最初的 20% 下降到 8%;过表达 C12:0-ACP 硫酯酶的转基因拟南芥和油菜中月桂酸含量显著增加^[19]。在亚麻荠中将 *FAD2* 基因突变则获得油酸含量由 16% 增加到 50% 的籽粒^[20]。因此,通过调控 *FatB* 的催化活性,可以对花生籽粒饱和脂肪酸的合成进行调控。

本研究拟构建花生 *AhFatB* 基因的 CRISPR/Cas9 编辑载体,并通过农杆菌介导的花粉管注射法转化花生,在成功转化的基础上获得 *AhFatB* 位点被成功编辑的花生籽粒,进一步筛选出饱和脂肪酸含量降低的突变材料,旨在为花生基因编辑的有效展开提供依据和参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 花生品种为花育 23 号,由青岛农业大学花生研究中心保存。

1.1.2 菌株、质粒、载体和试剂药品 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium*

200 r/min, 摇菌约 10~12 h 后, 取适量菌液于紫外分光光度计中测量 OD_{600} 值, 待 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$ 时, 先取 1 mL 菌液保存在 4 °C 冰箱待次日摇菌备用, 剩余菌液经离心后收集沉淀, 加入提前制备好的等体积侵染液, 充分混匀后得到菌体注射液。注射于当日 8:00 之前进行, 使用 1 mL 的医用注射器吸取注射液注入开放花朵的龙骨瓣内(或者花萼管), 连续注射 10 d, 之后再连续摘花 7~10 d, 对新生果针进行绑绳标记。待荚果发育成熟后收获绑绳标记的花生荚果。

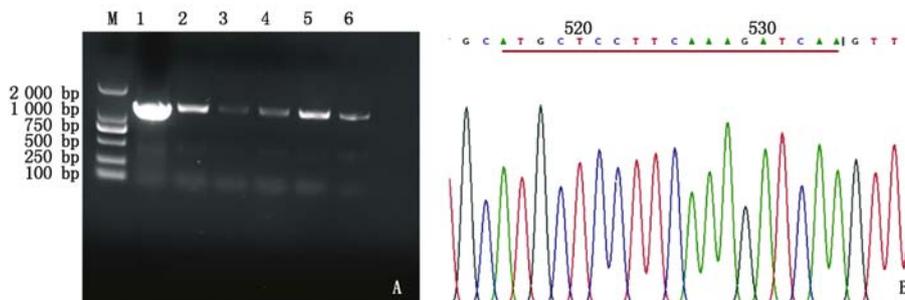
1.2.4 收获籽粒的分子鉴定 取注射后收获的花生荚果籽粒, 使用 SDS 法提取基因组 DNA 为模板^[21], 以 *CS4-F* 和 *CS4-R* 为引物进行 PCR 扩增检测。扩增体系为: 总体积 25 μ L, 包括正反向引物各 10 μ mol/L, 2 \times Taq Plus Master Mix II 12.5 μ L,

DNA 模板 50 ng。扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min; 然后进行 35 次循环: 95 °C 变性 40 s, 64 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min; 最后 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果, 对检测的阳性籽粒 DNA, 再用 *AI-F/AI-R* 及 *BI-F/BI-R* 引物进行扩增后测序, 验证靶位点编辑情况。

2 结果与分析

2.1 CRISPR/Cas9 编辑载体的构建

以转化后的单克隆大肠杆菌为模板, *CS4-F*、*CS4-R* 为引物进行 PCR 扩增, 扩增出产物为 1 249 bp 的条带(图 2-A), 说明重组质粒已成功转入。再取部分阳性克隆送公司测序, 测序结果含有靶位点 DNA 序列的为阳性克隆(图 2-B)。对测序成功的重组载体命名为 PX458-Cas9-*FatB*。



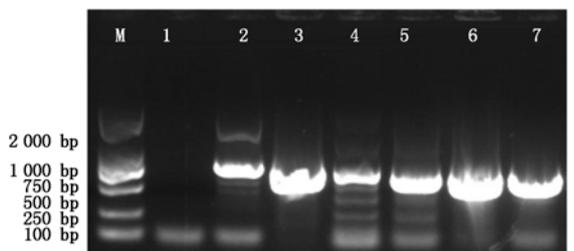
A. 重组质粒的 PCR 扩增验证; M. DL2000; 1. 阳性对照(1 249 bp); 2-6. 单克隆。B. 重组质粒的测序峰图, 横线部分为靶位点序列。
A. PCR amplification verification of recombinant plasmid; M. The molecular weight Marker of DL2000; 1. Positive control (1 249 bp); 2-6. Every monoclonal. B. The sequencing peak map of the recombinant plasmid, with the horizontal line as the target sequence.

图 2 重组载体 PX458-Cas9-*FatB* 的构建

Fig. 2 Construction of recombinant vector PX458-Cas9-*FatB*

2.2 重组质粒转化农杆菌

挑选在含有 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 利福平的 YEB 平板上的单克隆菌落, 利用 *CS4-F*、*CS4-R* 引物进行菌落 PCR 扩增验证, 能扩增出 1 249 bp 目的片段的均为阳性菌落, 说明重组质粒已成功转入农杆菌(图 3)。



M. DL2000; 1. 空白对照; 2. 阳性质粒对照; 3-7. 农杆菌单克隆。
M. The molecular weight Marker of DL2000; 1. Blank control; 2. Positive plasmid control; 3-7. *Agrobacterium tumefaciens* monoclonal.

图 3 琼脂糖凝胶电泳检测农杆菌阳性克隆

Fig. 3 Detection of *Agrobacterium tumefaciens* positive clones by agarose gel electrophoresis

2.3 注射浸花法转化花生

使用 1 mL 的无菌注射器吸取农杆菌注射液, 每

次吸取之前先将离心管中的注射液摇匀。选择当日盛开的花朵(图 4-A), 从花生花瓣的龙骨瓣处进行注射, 一只手拖住花瓣, 另一只手持注射器扎破龙骨瓣进行注射(图 4-B), 直到花萼管中充满水柱, 并且打开翼瓣后看到注射液浸满整个花朵(图 4-C)。每朵花大约注射 0.1 mL 注射液, 每天 6:00-8:00 进行注射, 持续 7~10 d。随后对新生果针进行绑绳标记(图 4-D)。待荚果发育成熟后收获绑绳标记的花生荚果(图 4-E、F)。

2.4 注射后收获籽粒的分子鉴定

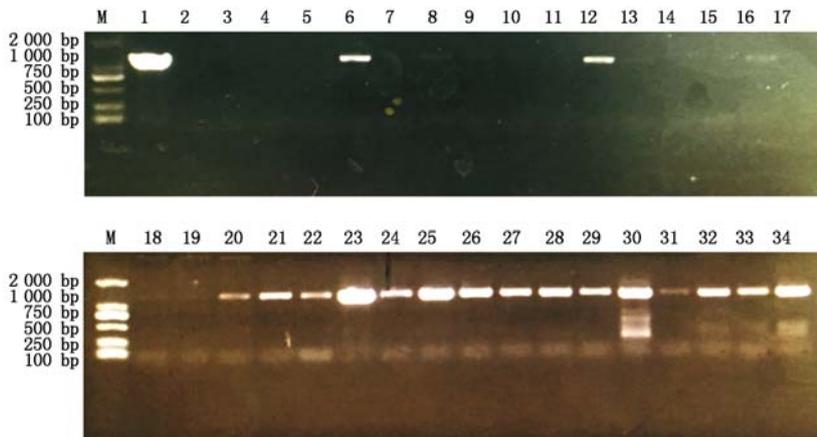
图 5 结果显示, 注射后收获的籽粒中, 能成功扩增出了相应目的条带的籽粒含有外源重组质粒, 未能扩增出相应条带的为转基因阴性籽粒。在被检测的 274 粒籽粒中, 共检测获得 108 粒阳性籽粒, 转基因阳性率为 39.42%。对扩增阳性的 108 粒籽粒进行测序验证, 发现有 1 粒在靶位点外发生了编辑, 在部分阳性籽粒的自交后代中, 发现了靶位点发生编辑的籽粒。



A. 待注射的花朵; B. 注射龙骨瓣; C. 侵染液包满雄蕊且在花萼管有一段水柱; D. 尼龙绳捆绑果针; E. 收获植株; F. 收获的荚果和籽粒。
A. Flowers to be injected; B. Carina injected; C. Infection medium covered with stamens and a column of water in the calyx tube;
D. Pod needles tied with nylon cord; E. Harvested plants; F. Harvested pods and seeds.

图 4 注射浸花法转化花生

Fig. 4 Peanut transformation by injection soaking flower method



M. DL2000; 1. 阳性质粒对照; 2. 空白对照; 3. 非转基因对照; 4 - 34. 转化后收获的籽粒。
M. The molecular weight Marker of DL2000; 1. Positive plasmid control; 2. Blank control; 3. Non-transgenic control; 4 - 34. Seeds harvested after transformation.

图 5 转化后收获籽粒的 PCR 扩增结果(目的条带为 1 249 bp)

Fig. 5 Results of PCR amplification of harvested kernels after transformation (target band is 1 249 bp)

3 结论与讨论

利用浸花法进行遗传转化在拟南芥以及油菜等植物上获得了巨大成功^[22-23]。花生属于较难转化的作物,青岛农业大学花生研究中心十多年来坚持对该法进行摸索优化,建立了简单高效的注射浸花法遗传转化技术。根据以往经验,影响转化效率最关键的因素是农杆菌的活力,因此,注射液必须要现用现配,具体为注射前 1 d 晚上摇菌,第 2 天早上离心后用侵染液重悬菌体,用于当日注射效果最好,第 2 日注射需要第 2 日早上再重新配置注射液,如使用第 1 日的注射液,转化成功率会降低 50% ~ 80%。另外在注射过程中,直接注射花萼管虽然可行,但因花萼管较细长,直接用注射器扎破后容易造成花萼

管受损折弯,影响受精过程进而降低转化效率。因此,应该尽量选择注射龙骨瓣,注射龙骨瓣直到雄蕊被浸透,农杆菌可随着花粉管通道直接进入胚囊而提高转化效率。有研究者直接利用花粉管注射法转化外源 DNA 也能达到很好的转移效果,但由于同时导入大片段的序列而引起受体很多基因及性状的改变,而直接注射农杆菌可以保证外源基因的单一进入而增加了转化后代的定向选择效果。因此,使用注射浸花法,将携带外源基因的重组农杆菌通过花粉管通道完成整个转化过程,与其他的遗传转化方法相比较,该法不需要依赖其他设备,操作简单,可以大大降低成本和节约时间。利用此法将花生 *nsLTPs*、*Lea-D*、*WRKY75* 等基因导入花生,分别获得 35% ~ 56% 的阳性转化率^[24-25]。如果能够更好地

控制摘花时间,而且即时标记果针,预计可提高转化率达到 70% 以上。本研究首次使用该转化方法进行 CRISPR/Cas9 基因编辑,虽然产生较高的阳性籽粒(39.42%),但是经测序结果验证,只有 1 粒在靶位点外发生编辑,说明应用此法未能实现高效率的基因编辑。有报道说非同源性的启动子会抑制编辑效率^[26],本研究使用了大豆的 U6 启动子对花生进行了编辑,这种非同源性的差异可能是造成编辑效率低的原因之一,目前正在尝试用花生的启动子来替代大豆 U6 启动子来提高编辑效率。此外,*FatB* 基因在植物的发育过程中起到非常重要的作用^[19-20],基因被编辑失活可能会影响到种子的正常发育而被选择淘汰,因而显示出极低的编辑效率。高效的注射浸花法转化技术是否能更有效地用于花生基因编辑,仍需进一步的研究证实。

参考文献:

- [1] 苗利娟,黄冰艳,张新友,董文召,刘娟,秦利,张俊,齐飞艳,石磊. 花生组培再生及农杆菌介导遗传转化研究进展[J]. 中国农学通报, 2017, 33(32): 15-20. doi:10.11924/j.issn.1000-6850.casb16090137.
- Miao L J, Huang B Y, Zhang X Y, Dong W Z, Liu J, Qin L, Zhang J, Qi F Y, Shi L. Tissue culture regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation of peanut; research progress [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2017, 33(32): 15-20.
- [2] 简纯平,李开绵,欧文军. 花粉管通道法转基因育种研究进展[J]. 热带作物学报, 2012, 33(5): 956-961. doi:10.3969/j.issn.1000-2561.2012.05.033.
- Jian C P, Li K M, Ou W J. Research progress in pollen-tube pathway method in transgenic plants [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2012, 33(5): 956-961.
- [3] 周光宇. 从生物化学的角度探讨远缘杂交的理论[J]. 中国农业科学, 1978, 11(2): 16-20.
- Zhou G Y. Discussion on the theory of interspecific hybridization from the biochemical perspective [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1978, 11(2): 16-20.
- [4] 周光宇,陈善葆,黄骏麒. 农业分子育种研究进展[M]. 北京:中国农业科技出版社, 1993:154-156.
- Zhou G Y, Chen S B, Huang J L. Advances in molecular breeding research of agriculture [M]. Beijing: China Agriculture Science and Technology Press, 1993:154-156.
- [5] 王旭达,于树涛,张高华,王鹤,丰明,都兴范,范琦,于国庆. 农杆菌介导花生转化体系的优化及转化 *AIDREB2A* 基因花生的耐旱性研究[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(7): 26-35. doi:10.11841/j.issn.1007-4333.2018.07.04.
- Wang X D, Yu S T, Zhang G H, Wang H, Feng M, Du X F, Fan Q, Yu G Q. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens* mediated peanut transformation system and studies on the drought tolerance of transgenic *AIDREB2A* peanut [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2018, 23(7): 26-35.
- [6] 朱军,韩锁义,袁美,贺梁琼,何国浩,黄家权. 农杆菌介导的花生遗传转化条件优化[J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(2): 191-198. doi:10.7505/j.issn.1007-9084.2018.02.004.
- Zhu J, Han S Y, Yuan M, He L Q, He G H, Huang J Q. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in peanut [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2018, 40(2): 191-198.
- [7] Swathi A T, Divya K, Jami S K, Kirti P B. Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens [J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(11): 1777-1786. doi:10.1007/s00299-008-0596-8.
- [8] Tiwari S, Tuli R. Factors promoting efficient *in vitro* regeneration from de-embryonated cotyledon explants of *Arachis hypogaea* L. [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2008, 92(1): 15-24. doi:10.1007/s11240-007-9297-1.
- [9] 王凤欢,冯滢,马旭策,杨晓欣,张乐. 农杆菌介导花生胚小叶遗传转化体系的优化研究[J]. 河南农业, 2019(17): 23-25. doi:10.15904/j.cnki.hnny.2019.17.012.
- Wang F H, Feng Y, Ma X C, Yang X X, Zhang L. Optimization of genetic transformation system of peanut embryo leaflets mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Agriculture of Henan*, 2019(17): 23-25.
- [10] 贾宇臣,王利,陈琦,李连国,李巧玲,刘德虎. 花生子叶节外植体遗传转化体系的建立[J]. 科学技术与工程, 2011, 11(14): 3142-3146. doi:10.3969/j.issn.1671-1815.2011.14.006.
- Jia Y C, Wang L, Chen Q, Li L G, Li Q L, Liu D H. Establishment of genetic transformation system of peanut cotyledon node explants [J]. *Science Technology and Engineering*, 2011, 11(14): 3142-3146.
- [11] 邱金梅,温世杰,刘海燕,梁炫强. 根癌农杆菌介导花生高效遗传转化体系的优化[J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(2): 208-211.
- Qiu J M, Wen S J, Liu H Y, Liang X Q. An effective *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system of peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2010, 32(2): 208-211.
- [12] 钟育海,申良宝. 植物基因的遗传转化方法[J]. 安徽农学通报, 2010, 16(11): 65-66, 206. doi:10.3969/j.issn.1007-7731.2010.11.032.
- Zhong Y H, Shen G B. Genetic transformation technique of plant gene [J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2010, 16(11): 65-66, 206.
- [13] 申馥玉,朱忠学,吕祝章,王传堂. 外源 DNA 导入技术在花生育种中的应用研究初报[J]. 花生科技, 1990(4): 5-6. doi:10.14001/j.issn.1002-4093.1990.04.002.
- Shen F Y, Zhu Z X, Lü Z Z, Wang C T. A preliminary study on the application of exogenous DNA transfer technique in peanut breeding [J]. *Peanut Science and Technology*, 1990(4): 5-6.
- [14] 梁炫强,罗虹. 外源 DNA 导入技术在花生选育种中的应用研究[J]. 广东农业科学, 1995(6): 15-17.
- Luo X Q, Luo H. Study on the application of exogenous DNA transfer technology in peanut selection and breeding [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 1995(6): 15-17.
- [15] 王亚,郭宝太,乔利仙,武秀玲,王晶珊,韩立坤,

- 隋炯明. *PyTPS* 转化花生对其后代耐盐性和品质性状的影响[J]. 华北农学报, 2014, 29(5): 175 - 179. doi: 10.7668/hbxb.2014.05.030.
- Wang Y, Guo B T, Qiao L X, Wu X L, Wang J S, Han L K, Sui J M. Effect of *PyTPS* on salt tolerance and quality of transgenic offspring of peanut [J]. *Acta Agricultrae Boreali-Sinica*, 2014, 29(5): 175 - 179.
- [16] 范乾程, 谭玲玲, 王亚, 乔利仙, 王晶珊, 隋炯明. 花粉管通道法验证花生 *Oleosin* 基因启动子的特异性表达[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(12): 52 - 56. doi: 10.3969/j.issn.1003-0174.2013.12.011.
- Fan Q C, Tan L L, Wang Y, Qiao L X, Wang J S, Sui J M. Identification of specific expression of promoter of *Oleosin* gene via pollen-tube pathway method [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2013, 28(12): 52 - 56.
- [17] Zong Y, Wang Y P, Li C, Zhang R, Chen K L, Ran Y D, Qiu J L, Wang D W, Gao C X. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion [J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(5): 438 - 440. doi:10.1038/nbt.3811.
- [18] Scheben A, Edwards D. Genome editors take on crops [J]. *Science*, 2017, 355(6330): 1122 - 1123. doi: 10.1126/science.aal4680.
- [19] Dong S B, Huang J C, Li Y N, Zhang J, Lin S Z, Zhang Z X. Cloning, characterization, and expression analysis of acyl-acyl carrier protein (ACP)-thioesterase B from seeds of Chinese Spicehush (*Lindera communis*) [J]. *Gene*, 2014, 542(1): 16 - 22. doi:10.1016/j.gene.2014.03.028.
- [20] Jiang W Z, Henry I M, Lynagh P G, Comai L, Cahoon E B, Weeks D P. Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using *CRISPR-Cas9* gene editing [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(5): 648 - 657. doi:10.1111/pbi.12663.
- [21] 于明洋, 孙明明, 郭悦, 姜平平, 雷永, 黄冰艳, 冯素萍, 郭宝珠, 隋炯明, 王晶珊, 乔利仙. 利用回交法快速选育高油酸花生新品系 [J]. 作物学报, 2017, 43(6): 855 - 861. doi: 10.3724/SP.J.1006.2017.00855.
- Yu M Y, Sun M M, Guo Y, Jiang P P, Lei Y, Huang B Y, Feng S P, Guo B Z, Sui J M, Wang J S, Qiao L X. Breeding new peanut line with high oleic acid content using backcross method [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2017, 43(6): 855 - 861.
- [22] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735 - 743. doi:10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x.
- [23] Hu D, Bent A F, Hou X L, Li Y. *Agrobacterium*-mediated vacuum infiltration and floral dip transformation of rapid-cycling *Brassica rapa* [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 246. doi:10.1186/s12870-019-1843-6.
- [24] 郭悦. 花生 *AhWRKY75* 基因的克隆、遗传转化及功能分析 [D]. 青岛: 青岛农业大学, 2018.
- Guo Y. Cloning, genetic transformation and functional analysis of *AhWRKY75* gene in peanut [D]. Qingdao: Qingdao Agricultural University, 2018.
- [25] 姜平平. 花生 *AhLea-D*、*AhLea-3* 基因的克隆及其耐盐功能验证 [D]. 青岛: 青岛农业大学, 2019.
- Jiang P P. Cloning and functional analysis of *AhLea-D* and *AhLea-3* genes in peanut [D]. Qingdao: Qingdao Agricultural University, 2019.
- [26] Howells R M, Craze M, Bowden S, Wallington E J. Efficient generation of stable, heritable gene edits in wheat using *CRISPR/Cas9* [J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 215. doi:10.1186/s12870-018-1433-z.