

· 技术方法 ·

一种高效花生遗传转化体系的建立与优化

李婷婷, 闫志文, 崔媛媛, 郭昊松, 陈方军, 张倩倩, 刘晓芹*

北京大学现代农业研究院, 潍坊现代农业山东省实验室, 潍坊 261325

摘要 为建立高效的农杆菌介导的花生(*Arachis hypogaea*)遗传转化体系, 选取11个花生品种, 从中筛选出胚小叶芽丛诱导率最高的品种为试材, 对农杆菌菌株、菌液OD值、乙酰丁香酮(AS)浓度、表面活性剂浓度、侵染方式和时间以及共培养时间等影响因素进行筛选优化, 获得花生胚小叶转基因植株。结果显示, 以花育9133胚小叶为受体, 利用含有绿色荧光蛋白(eGFP)和含 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)蛋白的重组农杆菌侵染转化, 发现侵染液为MS液体+LBA4404菌株+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS+150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 表面活性剂Silwet-77+菌液 $\text{OD}_{600}=0.7$ 时, 侵染方式为抽真空15分钟+浸泡20分钟+共培养4天时花生转化率最高, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*阳性率分别为52.67%和57.67%。经组织培养法诱导转化再生植株, 其中含eGFP蛋白的再生植株经eGFP绿色荧光和PCR检测鉴定为转基因阳性植株, 含GUS蛋白的再生植株经GUS染色和PCR检测鉴定为转基因阳性植株。该研究成功建立并优化了花生遗传转化体系, 旨在为花生基因功能研究、抗性品种培育、品质改良和生物技术研究提供参考。

关键词 花生, 胚小叶, 遗传转化体系, eGFP, GUS

李婷婷, 闫志文, 崔媛媛, 郭昊松, 陈方军, 张倩倩, 刘晓芹 (2026). 一种高效花生遗传转化体系的建立与优化. 植物学报 61, 123–135.

花生(*Arachis hypogaea*)亦称落花生, 起源于南美洲阿根廷北部至玻利维亚南部区域(Hammons, 1994; Grabile et al., 2012; 陈小平等, 2021), 是世界上最重要的油料作物之一(梁雪莲和郑奕雄, 2006; 许泽永等, 2007; 魏丽奇等, 2008; 杨艳雯, 2020), 也是中国重要的经济和油料作物(张秀青和刘珉, 2008; 申红芸等, 2012; 陈迪和王一茹, 2013; 王凤欢等, 2019; 殷冬梅, 2020; 邓洪涛等, 2024)。目前, 我国花生生物性状研究和遗传育种正面临全新的机遇和严峻的挑战。一方面, 科技的快速发展为花生研究带来机遇。现代先进技术手段层出不穷, 如基因测序技术、基因编辑技术和生物信息学分析等均为深入研究花生生物性状的遗传机制创造了有利条件(陈小平等, 2021)。利用这些先进技术, 科研人员可以更清晰地解读花生的基因功能, 挖掘出更多具有潜在价值的优良基因, 从而为花生遗传育种工作开辟新途径和方向。另一方面, 研究过程中也存在挑战。花生本身基因组复杂, 基因数量庞大, 这种内在特性使得基因

功能研究非常困难。此外, 花生生物性状受到大量基因互作的影响, 还受环境因素干扰, 二者相互作用, 进一步加大了解析性状和基因关联的复杂性(董建军, 2019)。首先在实际的遗传育种环节, 栽培种花生自身缺乏应对逆境的抗源, 在面对诸如病虫害、干旱、洪涝和盐碱等不利因素时显得极为脆弱; 再者, 野生花生中虽然具有如抗病虫害和抗逆等方面的优良性状, 但由于各种原因难以将其整合到栽培花生中; 此外, 杂交不亲和现象导致不同花生品种之间无法顺利杂交, 使得新的优良性状难以通过传统杂交方式在花生品种中聚合, 这些问题严重阻碍了花生传统育种工作的推进以及突破(张饶丹和何龙飞, 2015; 杨克相等, 2018; 王思雨, 2020)。

随着植物转基因技术的广泛应用和分子生物学的蓬勃发展, 人为地将有益目的基因定向转化至农作物中, 从而提高农作物的抗性并改良其品质已成为大势所趋, 这也为花生品种改良提供了行之有效的手段(苗利娟等, 2012)。因此, 开展花生转基因育种具有重

收稿日期: 2025-01-18; 接受日期: 2025-03-18

基金项目: 山东省重点研发计划(No.2024LZGC035)、泰山学者青年专家项目(No.tsqn202103161)和潍坊市科技发展计划(No.2024JZ0016)

* 通讯作者。E-mail: xiaoqin.liu@pku-iaas.edu.cn

要意义。然而,当前花生遗传转化体系尚不完善,严重制约了花生基因功能研究及育种应用。建立花生高效遗传转化体系有助于加速花生育种进程。

农杆菌介导法是花生遗传转化最常用的方法之一(单世华等, 2003; 徐勤青等, 2008; 朱军等, 2018; 王凤欢等, 2019; 边慧慧等, 2022; 邓洪涛等, 2024)。影响农杆菌介导的花生遗传转化率的因素很多,包括菌液OD值、侵染方式和侵染时间、共培养时间以及材料类型等(苗利娟等, 2012)。刘凤珍(2004)以花生胚小叶为外植体进行再生和转化,结果表明菌液浓度以 $OD_{600}=0.65$ 时转化效率最高。乔利仙等(2012)以花育22号和鲁花11号的成熟种子胚小叶为受体材料,采用针刺法辅助农杆菌介导转化,优化了花生遗传转化条件,提高了转化效率,最终成功获得转基因植株。邱金梅等(2010)以带子叶的胚轴为受体材料,通过真空侵染及二次侵染的方式显著提高了转化率。翟琼等(2022)以粤油13花生为试材,通过农杆菌注射花生第2茎节切面产生新芽,大幅提高了转基因种子的获得率。研究发现,共培养时间为3天时转化效率较高(Mayavan et al., 2013; Karthik et al., 2018; 王凤欢等, 2019)。

虽然农杆菌介导法在花生遗传转化中是常用方法之一,然而花生对农杆菌的敏感性处于相对较低的水平,导致其转化效率无法提高。在农杆菌侵染花生外植体后,T-DNA的转移与整合效率低下,这可能由多种因素共同作用导致,包括花生细胞特有的细胞壁结构、其内部的防御机制以及农杆菌与花生细胞之间复杂的相互作用等(邓洪涛等, 2024)。此外,不同农杆菌菌株对花生的侵染能力也存在差异,需要进一步筛选和优化适合花生遗传转化的农杆菌菌株及侵染条件。因此,本研究首先筛选出转化效率高的花生品种;

其次,通过农杆菌介导法筛选出适宜的侵染液(包括农杆菌菌株、菌液OD值、乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)浓度和表面活性剂浓度),探索侵染方式和时间以及共培养时间等对转化的影响,旨在建立高效稳定的遗传转化体系,为花生的基因功能研究、分子育种及优良品种培育提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以北京大学现代农业研究院刘晓芹实验室保存的11个花生(*Arachis hypogaea* L.)品种胚小叶为试材进行再生及遗传转化研究。*CaMV35S:eGFP*载体图谱如图1A所示,*AhUBQ4:GUS*载体图谱如图1B所示。

1.2 实验方法

1.2.1 花生品种

以狮头企、海花1号、鲁花14号、伏花生、山花9号、丰花1号、潍花8号、四粒红、花育31号、花育9133和花育9140花生种子的胚小叶为试材,培养28天后统计芽丛诱导率,筛选芽丛诱导率最高的花生品种作为本研究的转化材料。

1.2.2 农杆菌菌株

将*CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*质粒分别转化GV3101、EHA105和LBA4404菌株,然后使用不同农杆菌菌株分别转化花生胚小叶,筛选利于转化的最佳农杆菌菌株,其它转化条件保持一致,侵染液为MS液体+不同农杆菌菌株+ $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS+ $50 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Silwet-77+菌液 $OD=0.6-0.8$ +抽真空3分钟+浸泡10分钟+共培养3天,依据荧光显微镜观察到有荧光的材

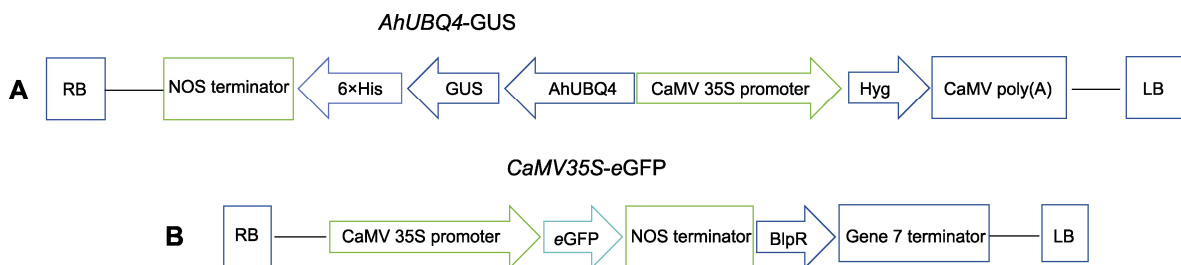


图1 *AhUBQ4:GUS* (A)和*CaMV35S:eGFP* (B)载体图谱

Figure 1 *AhUBQ4:GUS* (A) and *CaMV35S:eGFP* (B) vector map

料数量和GUS染色数量, 统计转化阳性数和阳性率。

1.2.3 菌液OD值筛选

将花生胚小叶分别置于含不同菌液OD值(0.4、0.5、0.6、0.7和0.8)的侵染液中, 其它转化条件保持一致。侵染液为MS液体+LBA4404菌株+不同菌液OD值+50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS+50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Silwet-77, 侵染方式为抽真空3分钟+浸泡10分钟+共培养3天, 统计转化阳性数和阳性率。

1.2.4 乙酰丁香酮浓度筛选

将花生胚小叶分别置于含不同浓度(50、100、150和200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) AS的侵染液中, 以未添加AS作为对照, 其它转化条件一致, 侵染液为MS液体+LBA4404菌株+50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Silwet-77+菌液 $\text{OD}_{600}=0.7$, 侵染方式为抽真空3分钟+浸泡10分钟+共培养3天, 统计转化阳性数和阳性率。

1.2.5 表面活性剂Silwet-77浓度筛选

将花生胚小叶分别置于含不同浓度(50、100、150和200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)表面活性剂Silwet-77的侵染液中, 以未添加表面活性剂Silwet-77作为对照, 其它转化条件一致, 侵染液为MS液体+LBA4404菌株+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS+不同浓度表面活性剂Silwet-77+菌液 $\text{OD}_{600}=0.7$, 侵染方式为抽真空3分钟+浸泡10分钟+共培养3天, 统计转化阳性数和阳性率。

1.2.6 侵染方式及时间筛选

将花生胚小叶采用不同的方式进行侵染(表1), 其它条件一致, 侵染液为MS液体+LBA4404菌株+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS+150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 表面活性剂Silwet-77+菌液 $\text{OD}_{600}=0.7$, 采用不同侵染时间+共培养3天, 统计转化阳性数和阳性率。

1.2.7 共培养时间筛选

胚小叶侵染结束后进行不同时间的共培养(2、3、4和5天), 筛选利于转化的最佳共培养时间, 侵染液为MS液体+LBA4404菌株+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS+150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 表面活性剂Silwet-77+菌液 $\text{OD}_{600}=0.7$, 采用抽真空15分钟+浸泡20分钟+不同共培养时间, 统计转化阳性数和阳性率。

表1 不同侵染方式及时间

Table 1 Different infection methods and durations

Treatment number	Infection method and time
A1	Vacuum for 5 min
A2	Vacuum for 10 min
A3	Vacuum for 15 min
A4	Soak for 10 min
A5	Soak for 20 min
A6	Soak for 30 min
A7	Vacuum for 5 min+soak for 10 min
A8	Vacuum for 5 min+soak for 20 min
A9	Vacuum for 5 min+soak for 30 min
A10	Vacuum for 10 min+soak for 10 min
A11	Vacuum for 10 min+soak for 20 min
A12	Vacuum for 10 min+soak for 30 min
A13	Vacuum for 15 min+soak for 10 min
A14	Vacuum for 15 min+soak for 20 min
A15	Vacuum for 15 min+soak for 30 min

1.2.8 转基因花生的鉴定

经过CaMV35S:eGFP侵染处理的实验材料, 采用蔡司荧光显微镜观察并拍照。经AhUBQ4:GUS侵染的植物材料, 使用索莱宝GUS染色试剂盒(北京, Cat No.G3060)进行染色, 并用徕卡体式显微镜拍照。使用TIANGEN植物基因组DNA提取试剂盒提取花生基因组DNA(北京, Cat No.DP305)。PCR检测酶使用2×KOD One PCR Master Mix (Toyobo, Cat No.KMM-201), 在30 μL PCR反应体系中分别加入15 μL 2×KOD One PCR Master Mix、1 μL DNA模板、1 μL 正向引物、1 μL 反向引物和12 μL ddH₂O。扩增反应程序: 95°C预变性2分钟; 98°C变性10秒, 58°C退火30秒, 68°C延伸10秒, 30个循环; 68°C终延伸5分钟; 10°C保存。eGFP扩增片段大小为187 bp, GUS扩增片段大小为211 bp。取6 μL PCR产物进行电泳检测, 以不加DNA模板的反应作为阴性对照, 以加质粒DNA作为阳性对照。特异性引物: eGFP-F: 5'-ACGTAAACGGCCACAA-GTTC-3', eGFP-R: 5'-AAGTCGTGCTGCTTCA-TGTG-3'; GUS-F: 5'-CTGATAGCGCGTGACAAAA-A-3', GUS-R: 5'-GGCACAGCACATCAAAGAGA-3'。

1.3 培养条件

若无特别说明, 培养基pH为5.8±0.5。每个处理接种200个外植体。实验重复3次。

1.4 数据分析

采用Excel 2010软件整理数据,用IBM SPSS STATISTIC 23.0软件分析数据。

阳性率=(eGFP荧光外植体数量(或GUS蓝色位点外植体数量)/侵染外植体总数量)×100%

2 结果与讨论

2.1 不同基因型花生品种对芽丛诱导率的影响

研究表明,不同花生品种的芽丛诱导率差异显著(表

表2 不同花生品种的芽丛诱导率

Table 2 Induction rates of buds from different peanut varieties

Variety	Bud cluster induction rate (%)			
	Replication I	Replication II	Replication III	Means±SD
Shitouqi	97.47	93.16	95.45	95.36±2.16 b
Haihua1	95.95	93.55	94.23	94.58±1.24 b
Luhua14	93.24	90.62	92.31	92.06±1.33 c
Fuhuasheng	87.42	86.89	87.42	87.24±0.31 d
Shanhua9	89.04	85.13	86.53	86.90±1.98 d
Fenghua1	82.28	81.15	82.88	82.10±0.88 e
Weihua8	72.93	74.08	73.55	73.52±0.58 f
Silihong	68.45	67.85	67.76	68.02±0.38 g
Huayu31	57.76	56.66	57.65	57.36±0.61 h
Huayu9133	97.50	97.00	99.00	97.83±1.04 a
Huayu9140	96.00	95.00	96.50	95.83±0.76 b

不同小写字母表示在0.05水平差异显著,下同。

Different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level, the same as below.

2),芽丛诱导率高于80%的品种有8个,分别为狮头企、海花1号、鲁花14号、伏花生、山花9号、丰花1号、花育9133和花育9140,其中花育9133芽丛诱导率最高,为97.83%。因此选择花育9133进行后续转化培养(图2)。

2.2 不同农杆菌菌株对转化率的影响

研究表明,不同农杆菌菌株对转化的影响差异显著(表3),在LBA4404菌株的侵染液中, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*均呈现出最高的阳性数和阳

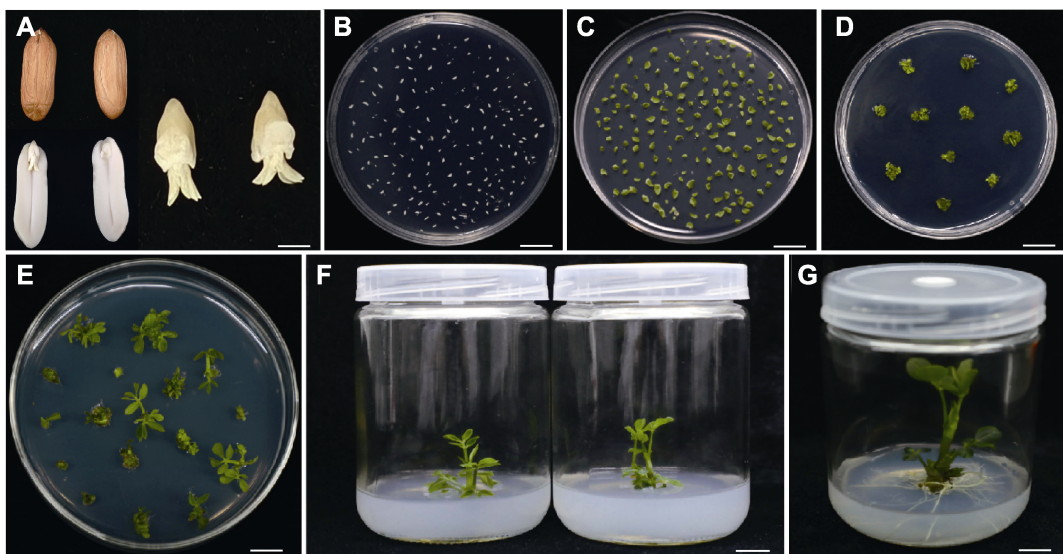


图2 花育9133胚小叶再生完整流程图

(A) 从花生种子中分离出胚小叶; (B) 将胚小叶接种至平板培养基中进行初代培养; (C) 培养14天后, 胚小叶在培养基上形成小芽点; (D) 进一步培养后, 诱导形成密集的芽丛结构; (E) 芽丛分化出明显的幼芽, 形态逐渐舒展; (F) 幼芽转移至新培养基后, 芽体持续伸长, 生长健壮; (G) 伸长的芽体诱导形成根系, 最终获得完整的再生植株。Bars=1 cm

Figure 2 Complete flow chart of the regeneration of embryonic leaflets of Huayu9133

(A) Embryonic lobules were isolated from peanut seeds; (B) Embryonic lobules were inoculated into plate medium for primary culture; (C) After 14 days of culture, the embryo lobules formed small buds on the medium; (D) After further culture, a dense bud cluster structure was induced; (E) Buds differentiate into obvious buds, and the morphology gradually stretches; (F) After the buds were transferred to the new medium, the buds continued to elongate and grow robustly; (G) Elongated buds were induced to form roots, and finally complete regenerated plants were obtained. Bars=1 cm

表3 不同农杆菌菌株筛选

Table 3 Screening of different *Agrobacterium* strains

<i>Agrobacterium</i> strain	<i>CaMV35S:eGFP</i>		<i>AhUBQ4:GUS</i>	
	Number of positive samples (units)	Positive rate (%)	Number of positive samples (units)	Positive rate (%)
GV3101	14.33±0.58 b	7.17±0.29 b	15.00±1.00 b	7.50±0.50 b
EHA105	10.67±1.15 c	5.33±0.58 c	11.00±1.00 c	5.50±0.50 c
LBA4404	20.67±1.53 a	10.33±0.76 a	17.67±1.53 a	8.83±0.76 a

表4 菌液OD值的筛选

Table 4 Screening of the OD values of bacterial liquid

OD value of bacterial suspension	<i>CaMV35S:eGFP</i>		<i>AhUBQ4:GUS</i>	
	Number of positive samples (units)	Positive rate (%)	Number of positive samples (units)	Positive rate (%)
0.4	14.33±1.15 e	7.17±0.58 e	16.33±1.15 e	8.17±0.58 e
0.5	17.67±0.58 d	8.83±0.29 d	23.33±0.58 d	11.67±0.29 d
0.6	25.33±1.53 c	12.67±0.76 c	36.00±1.00 b	18.00±0.50 b
0.7	44.00±1.73 a	22.00±0.87 a	53.67±1.53 a	26.83±0.76 a
0.8	32.00±1.00 b	16.00±0.50 b	27.67±1.53 c	13.83±0.76 c

性率, 分别为20.67个和10.33%, 17.67个和8.83%, 均与其它菌株处理差异显著。因此, 综合考虑阳性数和阳性率, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*转化最适宜的菌株均为LBA4404。

2.3 菌液OD值对转化的影响

研究表明, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*侵染材料的阳性数和阳性率均随菌液OD值的升高呈先上升后下降趋势(表4), 可能是浓度过高不利于转化。菌液OD=0.4时, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*侵染的材料阳性率均最低(分别为7.17%和8.17%), 菌液OD=0.7时, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*侵染的材料阳性数和阳性率均最高(分别为44个和22%; 53.67个和26.83%), 与其它处理差异显著。综上所述,

*CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*侵染材料最适宜的菌液OD值为0.7。

2.4 AS浓度对芽丛转化的影响

研究表明, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*侵染材料的阳性数与阳性率均呈现出随菌液OD值升高先增加后降低的趋势(表5)。在未添加AS的情况下, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*侵染材料的阳性率处于最低水平, 分别为7.67%和6.17%, 与添加AS处理后的材料相比差异显著。当AS浓度为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*侵染材料的阳性数和阳性率均达到最大值, 阳性数分别为58.33个和66.33个, 阳性率分别为29.17%和33.17%, 与其它处理差异显著。综上所述, AS最适浓度为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.5 表面活性剂Silwet-77浓度对芽丛转化的影响

研究表明, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*侵染材料的阳性数与阳性率均呈现出随着表面活性剂Silwet-77浓度的增加呈先升高后降低的趋势(表6)。在未添加表面活性剂Silwet-77的情况下, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*侵染材料的阳性率处于最低水平, 分别为12.50%和11.33%, 与添加Silwet-77处理的材料相比存在显著差异。当Silwet-77浓度为150 mg·L⁻¹时, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*侵染材料的阳性数和阳性率均达到最大值, 阳性数分别为77.67个和80.33个, 而阳性率分别为38.83%和40.17%, 与其它处理呈显著差异。综上所述, 表面活性剂Silwet-77最适浓度为150 mg·L⁻¹。

2.6 侵染方式及时间对芽丛转化的影响

研究表明, 单独使用抽真空处理或浸泡处理所呈现出的阳性数和阳性率均处于较低水平。然而, 当将抽真空处理与浸泡处理相结合进行侵染时, 阳性数和阳性率均显著增高, 表明二者联合处理对阳性结果有重要影响, 或许在两者协同作用下, 某种机制被激活或强化, 从而使得阳性表现更为突出, 其具体机制值得后续深入研究。随着处理时间的延长, 阳性率逐渐升

高, 但超过一定范围后, 阳性率又显著下降。当采用抽真空15分钟+浸泡20分钟处理时, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*侵染材料的阳性数与阳性率均达到最大值, 阳性数分别为86个和90.33个, 阳性率分别为43%和45.17% (表7)。综合来看, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*侵染材料的最佳侵染方式及时间为抽真空15分钟+浸泡20分钟。

2.7 共培养时间对芽丛转化的影响

研究表明, 随着共培养时间的延长, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*侵染材料的阳性数与阳性率呈现出先逐渐升高而后下降的趋势(表8)。这可能是由于共培养时间过长, 导致相关生理过程受到影响, 从而使得阳性数和阳性率出现动态变化。当共培养时间为4天时, *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*阳性数与阳性率均达到最大值, 与其它处理差异显著, 阳性数分别为105.33个和115.33个, 而阳性率分别为52.67%和57.67%。

2.8 转基因花生鉴定

将*CaMV35S:eGFP*侵染后的材料用荧光显微镜观察并拍照, 结果发现茎秆及叶片均有绿色荧光(图3A)。

表5 乙酰丁香酮(AS)适宜浓度筛选

Table 5 Screening for the appropriate concentration of acetosyringone (AS)

AS concentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>CaMV35S:eGFP</i>		<i>AhUBQ4:GUS</i>	
	Number of positive samples (units)	Positive rate (%)	Number of positive samples (units)	Positive rate (%)
0	15.33±1.53 e	7.67±0.76 e	12.33±1.53 e	6.17±0.76 e
50	35.67±1.53 c	17.83±0.76 c	46.00±1.00 b	23.00±0.50 b
100	58.33±1.15 a	29.17±0.58 a	66.33±1.53 a	33.17±0.76 a
150	40.00±1.00 b	20.00±0.50 b	37.67±1.53 c	18.83±0.76 c
200	29.33±1.53 d	14.67±0.76 d	22.33±1.53 d	11.17±0.76 d

表6 表面活性剂Silwet-77浓度筛选

Table 6 Screening of the concentration of surfactant Silwet-77

Silwet-77 concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>CaMV35S:eGFP</i>		<i>AhUBQ4:GUS</i>	
	Number of positive samples (units)	Positive rate (%)	Number of positive samples (units)	Positive rate (%)
0	25.00±1.00 d	12.50±0.50 d	22.67±1.53 d	11.33±0.76 d
50	46.00±1.00 c	23.00±0.50 c	52.00±1.00 c	26.00±0.50 c
100	60.00±1.00 b	30.00±0.50 b	66.33±1.15 b	33.17±0.58 b
150	77.67±1.53 a	38.83±0.76 a	80.33±1.53 a	40.17±0.76 a
200	48.00±1.00 c	24.00±0.50 c	51.33±1.53 c	25.67±0.76 c

表7 侵染方式及时间筛选

Table 7 Screening of infection methods and durations

Infection method and duration	<i>CaMV35S:eGFP</i>		<i>AhUBQ4:GUS</i>	
	Number of positive samples (units)	Positive rate (%)	Number of positive samples (units)	Positive rate (%)
Vacuum for 5 min	11.33±1.53 m	5.67±0.76 m	16.00±1.00 n	8.00±0.50 n
Vacuum for 10 min	19.00±1.00 k	9.50±0.50 k	24.00±1.00 l	12.00±0.50 l
Vacuum for 15 min	26.33±1.53 j	13.17±0.76 j	35.00±1.00 j	17.50±0.50 j
Soak for 10 min	9.00±1.00 n	4.50±0.50 n	20.33±1.53 m	10.17±0.76 m
Soak for 20 min	16.67±1.53 l	8.33±0.76 l	29.67±1.53 k	14.83±0.76 k
Soak for 30 min	25.33±1.15 j	12.67±0.58 j	39.00±1.00 i	19.50±0.50 i
Vacuum for 5 min+soak for 10 min	31.00±1.00 i	15.50±0.50 i	44.67±1.53 h	22.33±0.76 h
Vacuum for 5 min+soak for 20 min	39.00±1.00 h	19.50±0.50 h	48.33±0.58 g	24.17±0.29 g
Vacuum for 5 min+soak for 30 min	43.33±1.53 g	21.67±0.76 g	52.67±1.53 f	26.33±0.76 f
Vacuum for 10 min+soak for 10 min	48.33±0.58 f	24.17±0.29 f	66.67±1.53 e	33.33±0.76 e
Vacuum for 10 min+soak for 20 min	51.33±0.58 e	25.67±0.29 e	71.00±1.00 d	35.50±0.50 d
Vacuum for 10 min+soak for 30 min	54.33±1.53 d	27.17±0.76 d	74.00±1.00 c	37.00±0.50 c
Vacuum for 15 min+soak for 10 min	73.67±1.53 b	36.83±0.76 b	80.33±1.53 b	40.17±0.76 b
Vacuum for 15 min+soak for 20 min	86.00±1.00 a	43.00±0.50 a	90.33±1.53 a	45.17±0.76 a
Vacuum for 15 min+soak for 30 min	66.67±1.53 c	33.33±0.76 c	74.33±1.15 c	37.17±0.58 c

表8 共培养时间筛选

Table 8 Screening of co-culture durations

Co-culture time (d)	<i>CaMV35S:eGFP</i>		<i>AhUBQ4:GUS</i>	
	Number of positive samples (units)	Positive rate (%)	Number of positive samples (units)	Positive rate (%)
2	38.33±1.53 c	19.17±0.76 c	44.33±1.53 c	22.17±0.76 c
3	80.67±1.53 b	40.33±0.76 b	89.00±1.00 b	44.50±0.50 b
4	105.33±1.53 a	52.67±0.76 a	115.33±1.15 a	57.67±0.58 a
5	82.33±2.08 b	41.17±1.04 b	90.33±1.53 b	45.17±0.76 b

将侵染后的材料提取基因组DNA, 通过PCR扩增出预期大小的目的基因片段(图3B)。经eGFP绿色荧光检测和PCR检测, 结果均呈阳性, 因此判定该材料为含有eGFP蛋白的转基因阳性植株。将*AhUBQ4:GUS*侵染后的材料进行GUS染色并观察拍照, 结果发现材料均有蓝色位点(图4A)。通过PCR扩增出预期大小的目的基因片段(图4B)。经GUS染色和PCR检测, 结果均呈阳性, 因此判定该材料为含有GUS蛋白的转基因阳性植株。阳性对照以及转基因植株均能够扩增出显著的目的基因条带, 而阴性对照则未扩增出条带(图3B, 图4B)。

2.9 讨论与结论

不同品种花生的基因型不同。基因控制着花生体内的

各种生理过程和代谢途径, 某些基因可能影响花生细胞的全能性表达(何红卫, 2002; 苗利娟等, 2012; 王允, 2012; 徐娟等, 2014)。部分品种可能具有更活跃的与细胞分裂和分化相关的基因。这些基因在诱导过程中能够更有效地启动细胞的分裂和分化程序, 使得诱导率更高(蒋菁, 2012; 李换丽等, 2020)。

高等植物遗传转化有不同方法, 在双子叶植物中最重要且最有效的方法是农杆菌介导的外源基因遗传转化(方小平等, 1999)。自Eapen和George (1994)报道获得花生转基因植株以来, 农杆菌介导转化花生的研究已有较多成功案例(刘峰等, 2007; 万小荣等, 2007; 贾宇臣等, 2011, 2012; Iqbal et al., 2012; Chen et al., 2015; Hsieh et al., 2017; Karthik et al., 2018)。

在花生遗传转化中, 常用的农杆菌菌株有GV3101、

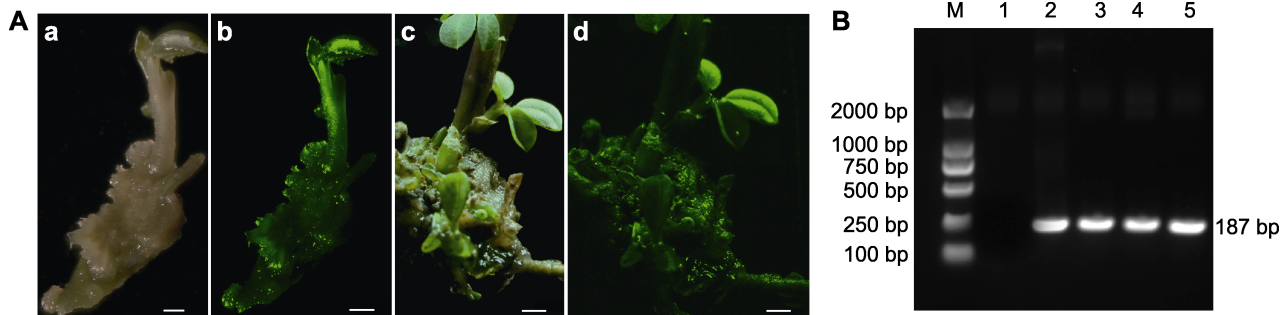


图3 *CaMV35S:eGFP* 侵染材料验证

(A) *CaMV35S:eGFP* 侵染材料荧光示意图(a: 再生芽丛明场(bar=500 μm); b: 再生芽丛荧光(bar=500 μm); c: 再生苗明场(bar=2 mm); d: 再生苗荧光(bar=2 mm)); (B) *CaMV35S:eGFP* 侵染材料PCR检测(M: DNA marker; 1: 阴性对照未侵染材料DNA; 2: 阳性对照质粒DNA; 3-5: 花育9133材料提取的DNA, 3次重复)。

Figure 3 Verification of *CaMV35S:eGFP*-infected materials

(A) Schematic diagram of fluorescence in *CaMV35S:eGFP*-infected materials (a: Bright-field image of regenerated bud clusters (bar=500 μm); b: Fluorescence image of regenerated bud clusters (bar=500 μm); c: Bright-field image of regenerated plants (bar=2 mm); d: Fluorescence image of regenerated plants (bar=2 mm)); (B) PCR detection of *CaMV35S:eGFP*-infected materials (M: DNA marker; 1: DNA from non-infected materials as negative control; 2: Plasmid DNA as positive control; 3-5: DNA extracted from Huayu9133 materials, with three replicates).



图4 *AhUBQ4:GUS* 侵染材料验证

(A) *AhUBQ4:GUS* 侵染材料荧光示意图(a: 胚小叶GUS染色; b: 再生芽丛GUS染色; c: 再生芽丛伸长GUS染色; d: 再生苗GUS染色; bars=1 cm); (B) *AhUBQ4:GUS* 侵染材料PCR检测(M: DNA marker; 1: 阴性对照未侵染材料DNA; 2: 阳性对照质粒DNA; 3-5: 花育9133材料提取的DNA, 3次重复)。

Figure 4 Verification of materials infected with *AhUBQ4:GUS*

(A) Schematic diagram of fluorescence in *AhUBQ4:GUS*-infected materials (a: GUS staining of cotyledonary leaflets; b: GUS staining of regenerated bud clusters; c: GUS staining of elongated regenerated bud clusters; d: GUS staining of regenerated plantlets; bars=1 cm); (B) PCR detection of *AhUBQ4:GUS*-infected materials (M: DNA marker; 1: Negative control DNA from uninfected materials; 2: Positive control plasmid DNA; 3-5: DNA extracted from Huayu9133 materials, with three replicates).

EHA105、LBA4404和EHA101等(单世华等, 2003; 徐勤青等, 2008; 王凤欢等, 2019; 殷冬梅, 2020; 邓洪涛等, 2024)。不同花生品种以及不同外植体的适宜菌株有所不同, 有的菌株在面对某些植物品种时, 其趋化性相关基因表达活跃, 能准确识别并靠近目标植物细胞, 从而提高转化效率; 而另一些菌株可能在识别并靠近目标植物细胞方面能力较弱, 进而导致遗传转化效果欠佳。植物的基因型以及自身的防御机制等对农杆菌转化的敏感性均有很大影响。因此需要根据

材料来选择其适宜转化的农杆菌菌株。本研究发现, LBA4404菌株的转化效果最佳, 显著优于其它2种菌株, 这与前人的研究结果一致(单世华等, 2003; 王允, 2012)。共培养4天时, 花生转化效率进一步提高, 然而共培养超过4天, 过量的农杆菌限制外植体生长, 最终导致转化效率降低。但不同品种及外植体间的共培养时间略有差异, 部分材料的最佳共培养时间为3天(Mayavan et al., 2013; Karthik et al., 2018; 王凤欢等, 2019)。

本研究中, 农杆菌菌液浓度 $OD_{600}=0.7$ 时转化效率最高, 这与前人的研究结果一致(邱金梅, 2010; 朱军等, 2018)。AS浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时转化效率最高(贾宇臣等, 2011; 朱军等, 2018), 与本研究结果较为一致; 当AS浓度过高时(如 150 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)会显著降低转化率, 与徐勤青等(2008)的研究结果一致。然而研究发现 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS更利于转化(Karthik et al., 2018)。Silwet-77是一种有机硅表面活性剂, 能够显著降低液体的表面张力。这使得含有农杆菌的转化液能够更好地在植物表面铺展和湿润, 增加农杆菌与植物细胞的接触面积。本研究中最适宜的Silwet-77浓度为 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 不同品种及外植体侵染适宜的表面活性剂种类也有所不同, 邱金梅等(2010)以带子叶的胚轴为外植体进行侵染, 使用的表面活性剂则是脂肪酯磺酸盐(fatty acid methyl ester sulfonate, MES)。

本研究发现, 单一的侵染方式, 如浸泡侵染或者抽真空的方式均可进行转化, 但转化率并不高, 当侵染方式为浸泡和抽真空相结合时, 转化率显著高于单一侵染方式。不同品种及不同外植体的侵染方式各有不同, 邱金梅等(2010)发现抽真空二次侵染可显著提高转化效率。超声波处理更有利于转化(徐勤青等, 2008; Chen et al., 2015)。乔利仙等(2012)使用针刺法加浸泡15分钟辅助转化, 转化率显著高于对照。单一侵染方式相对温和, 能够减少对外植体的生理损伤, 多种侵染方式相结合可以从不同角度突破材料自身的防御。单一侵染方式和多种侵染方式对转化率的影响取决于植物品种、外植体类型、目的基因的性质以及实验条件等诸多因素。在实际应用中, 需要根据所选材料选择最适合的侵染方式来提高转化率。

不同研究中花生的遗传转化效率差异较大, 这可能受到多种因素影响。早期的研究由于技术手段相对落后、对花生遗传背景了解不够深入、受体材料不合适以及转化方法不佳等原因, 转化效率较低(徐勤青等, 2008; 邱金梅等, 2010; 贾宇臣等, 2011; 乔利仙等, 2012; 朱军等, 2018)。随着技术的进步, 采用了更优化的转化方法以及更合适的受体材料, 转化效率有所提升。有研究通过改进农杆菌介导法、使用CRISPR/Cas9基因编辑技术以及选择合适的受体材料等, 阳性转基因植株数量较高(Huai et al., 2024)。与前人的研究相比, 本研究中转化率较高的原因可能与以下几个因素相关。首先是转化方法的优化, 选择

更适合花生转化的农杆菌菌株, 其具有更强的侵染能力和更高的T-DNA转移效率, 在侵染花生细胞的过程中, 能够更有效地将携带目的基因的T-DNA片段导入花生细胞, 并且促进这些T-DNA片段更顺利地整合到花生基因组的特定位置, 极大提高了目的基因整合到花生基因组的成功率。其次, 对农杆菌侵染方式及时间、表面活性剂、AS浓度和共培养时间等因素进行精细优化, 筛选出适宜的条件; 最后是受体材料的选择, 本研究选用再生能力强、易被农杆菌侵染的基因型。选择胚小叶作为外植体, 其具有较强的分裂能力和分化潜力, 能够更好地接受外源基因并进行整合和表达, 从而提高转化率。

本研究以11个花生品种为材料进行胚小叶芽丛诱导试验, 发现花育9133芽丛诱导率最高(为97.83%); *CaMV35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*转化最适宜的菌株均为LBA4404; 最适宜的菌液OD值为0.7; AS最适浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 表面活性剂Silwet-77最适浓度为 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 最佳侵染方式及时间为抽真空15分钟+浸泡20分钟; 最适宜的共培养时间为4天, *CaMV-35S:eGFP*和*AhUBQ4:GUS*阳性率分别为52.67%和57.67%。经eGFP绿色荧光检测和PCR检测, 结果均呈阳性, 因此判定该材料为含有*CaMV35S:eGFP*的转基因阳性植株。经GUS染色检测和PCR检测, 结果均呈阳性, 判定该材料为含有*AhUBQ4:GUS*的转基因阳性植株。

作者贡献声明

李婷婷: 实验设计、操作及数据采集与分析, 撰写论文初稿; 闫志文: 协助实验操作; 崔媛媛: 协助实验操作; 郭昊松、陈方军和张倩倩: 协助分析数据; 刘晓芹: 实验方案制定设计, 文章撰写及修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests: The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献

Bian HH, Zhao WC, Wei JW, Yu YM, Xue XR, Liu ZA, Lü

- WX, Wang SH, Zhao FK** (2022). Effects of *Agrobacterium rhizogenes* strains on induction rate and positive rate of hairy roots. *Mol Plant Breed* **20**, 8237–8244. (in Chinese)
- 边慧慧, 赵文超, 魏婧薇, 余雨玫, 薛晓汝, 刘紫傲, 吕伟兴, 王绍辉, 赵福宽 (2022). 不同发根农杆菌菌株对番茄毛状根诱导率及阳性率的影响. *分子植物育种* **20**, 8237–8244.
- Chen D, Wang YR** (2013). Analysis on the influencing factors of international competitiveness of China's peanut industry—empirical analysis based on production link indicators. *J Agric Econom* (11), 112–119. (in Chinese)
- 陈迪, 王一茹 (2013). 中国花生产业国际竞争力影响因素分析——基于生产环节指标的实证分析. *农业技术经济* (11), 112–119.
- Chen MN, Yang QL, Wang T, Chen N, Pan LJ, Chi XY, Yang Z, Wang M, Yu SL** (2015). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of peanut and the efficient recovery of transgenic plants. *Can J Plant Sci* **95**, 735–744.
- Chen XP, Lu Q, Hong YB, Li SX, Liang XQ** (2021). Research progress in genomics and breeding of peanut. *Guangdong Agric Sci* **48**(12), 33–43. (in Chinese)
- 陈小平, 鲁清, 洪彦彬, 李少雄, 梁炫强 (2021). 花生基因组学在遗传育种中的研究进展. *广东农业科学* **48**(12), 33–43.
- Deng HT, Yang YW, Feng HY, Li XK, Cui SL, Hou MY, Liu YR, Liu LF** (2024). Optimization of *Agrobacterium*-mediated peanut genetic transformation system. *Mol Plant Breed*, 1–21. (in Chinese)
- 邓洪涛, 杨艳雯, 冯鹤言, 李秀坤, 崔顺立, 侯名语, 刘盈茹, 刘立峰 (2024). 农杆菌介导花生遗传转化体系的优化. *分子植物育种*, 1–21. 2024.9.25.
- Dong JJ** (2019). Establishment of Regeneration Systems and Bioinformatics Analysis of *AhRR* Gene Family in Peanut. Master's thesis. Zhengzhou: Henan Agricultural University. pp. 1–55. (in Chinese)
- 董建军 (2019). 花生再生体系的建立及*AhRR*基因家族分析. 硕士学位论文. 郑州: 河南农业大学. pp. 1–55.
- Eapen S, George L** (1994). *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep* **13**, 582–586.
- Fang XP, Xu ZY, Zhang ZY, Yan LY, Chen KR, Luo LX, Chen JX, Birch RG, Dietzgen RG** (1999). Genetic study of GUS gene and NPTII gene in transgenic peanut progeny. *Peanut Sci Technol* **29**(S1), 241–245. (in Chinese)
- 方小平, 许泽永, 张宗义, 晏立英, 陈坤荣, 罗莉霞, 陈金香, Birch RG, Dietzgen RG (1999). GUS基因和NPTII基因在转基因花生后代的遗传研究. *花生科技* **29**(S1), 241–245.
- Grabiele M, Chalup L, Robledo G, Seijo G** (2012). Genetic and geographic origin of domesticated peanut as evidenced by 5S rDNA and chloroplast DNA sequences. *Plant Syst Evol* **298**, 1151–1165.
- Hammons RO** (1994). The origin and history of the groundnut. In: Smartt J, ed. *The Groundnut Crop: A Scientific Basis for Improvement*. London: Chapman & Hall. pp. 24–42.
- He HW** (2002). Establishment of Peanut Regeneration System. Master's thesis. Guangzhou: South China Normal University. pp. 1–68. (in Chinese)
- 何红卫 (2002). 花生再生系统的建立. 硕士学位论文. 广州: 华南师范大学. pp. 1–68.
- Hsieh YF, Jain M, Wang J, Gallo M** (2017). Direct organogenesis from cotyledonary node explants suitable for *Agrobacterium*-mediated transformation in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* **128**, 161–175.
- Huai DX, Xue XM, Wu J, Pandey MK, Liu N, Huang L, Yan LY, Chen YN, Wang X, Wang QQ, Kang YP, Wang ZH, Jiang HF, Varshney RK, Liao BS, Lei Y** (2024). Enhancing peanut nutritional quality by editing *AhKCS* genes lacking natural variation. *Plant Biotechnol J* **22**, 3015–3017.
- Iqbal MM, Nazir F, Ali S, Asif MA, Zafar Y, Iqbal J, Ali GM** (2012). Over expression of rice *chitinase* gene in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) improves resistance against leaf spot. *Mol Biotechnol* **50**, 129–136.
- Jia YC, Wang L, Chen Q, Li LG, Li QL, Liu DH** (2011). Establishment of genetic transformation system of peanut cotyledon node explants. *Sci Technol Eng* **11**, 3142–3146. (in Chinese)
- 贾宇臣, 王利, 陈琦, 李连国, 李巧玲, 刘德虎 (2011). 花生子叶节外植体遗传转化体系的建立. *科学技术与工程* **11**, 3142–3146.
- Jia YC, Zhao K, Xue X, Li W, Li SW, Liu DH** (2012). Study on genetic transformation of antigen G3VP7 gene of human rotavirus in peanut. *J Biomed Eng* **29**, 328–331. (in Chinese)
- 贾宇臣, 赵凯, 薛昕, 李薇, 李少伟, 刘德虎 (2012). 轮状病毒抗原蛋白G3VP7基因在花生中遗传转化的研究. *生物医学工程学杂志* **29**, 328–331.
- Jiang J** (2012). Developing of Regeneration System of Peanut Varieties. Master's thesis. Nanning: Guangxi University. pp. 1–57. (in Chinese)

- 蒋菁 (2012). 四个花生优良品种再生体系的构建. 硕士论文. 南宁: 广西大学. pp. 1–57.
- Karthik S, Pavan G, Sathish S, Siva R, Kumar PS, Manickavasagam M (2018). Genotype-independent and enhanced in planta *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of peanut [*Arachis hypogaea* (L.)]. *3 Biotech* **8**, 202.
- Li HL, Wang D, Zhang SW, Lei J, Wu X, Wang XS, Ma YB (2020). Selection of soybean regeneration system with different varieties in Shanxi. *J Shanxi Agric Sci* **48**(2), 161–166. (in Chinese)
- 李换丽, 王丹, 张树伟, 雷佳, 吴霞, 王新胜, 马燕斌 (2020). 山西不同大豆品种再生体系的筛选. *山西农业科学* **48**(2), 161–166.
- Liang XL, Zheng YX (2006). Research progress of peanut transgenic. *Seed* **25**, 46–50. (in Chinese)
- 梁雪莲, 郑奕雄 (2006). 花生转基因研究进展. *种子* **25**, 46–50.
- Liu F, Shan SH, Yan CX, Bi YP, Li GM, Lun WZ (2007). Research of influence factors on peanut cotyledon regeneration in genetic transformation. *J Peanut Sci* **36**, 13–19. (in Chinese)
- 刘峰, 单世华, 闫彩霞, 毕玉平, 李光敏, 伦伟志 (2007). 花生子叶遗传转化再生体系影响因素的研究. *花生学报* **36**, 13–19.
- Liu FZ (2004). Study on Transferring *Rs-afp₁* Gene and γ -*tmt* Gene Into Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Respectively and High Efficient System of Genetic Transformation. PhD dissertation. Tai'an: Shandong Agricultural University. pp. 1–102. (in Chinese)
- 刘凤珍 (2004). *Rs-afp₁*基因和 γ -*tmt*基因转化花生及高效遗传转化体系的研究. 博士论文. 泰安: 山东农业大学. pp. 1–102.
- Mayavan S, Subramanyam K, Arun M, Rajesh M, Dev GK, Sivanandhan G, Jaganath B, Manickavasagam M, Selvaraj N, Ganapathi A (2013). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in planta seed transformation strategy in sugarcane. *Plant Cell Rep* **32**, 1557–1574.
- Miao LJ, Zhang XY, Huang BY, Dong WZ, Tang FS, Qin L, Gao W, Han SY (2012). Efficient induction of adventitious buds from peanut leaflets of various varieties. *J Henan Agric Sci* **41**(11), 45–48. (in Chinese)
- 苗利娟, 张新友, 黄冰艳, 董文召, 汤丰收, 秦利, 高伟, 韩锁义 (2012). 不同花生品种幼叶丛生芽诱导研究. *河南农业科学* **41**(11), 45–48.
- Qiao LX, Yu XL, Sui JM, Fan QC, Sun SM, Wang JS (2012). Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system of peanut. *J Nucl Agric Sci* **26**, 1244–1248. (in Chinese)
- 乔利仙, 于新玲, 隋炯明, 范乾程, 孙世孟, 王晶珊 (2012). 农杆菌介导的花生遗传转化体系的优化. *核农学报* **26**, 1244–1248.
- Qiu JM, Wen SJ, Liu HY, Liang XQ (2010). An effective *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Chin J Oil Crop Sci* **32**, 208–211. (in Chinese)
- 邱金梅, 温世杰, 刘海燕, 梁炫强 (2010). 根癌农杆菌介导花生高效遗传转化体系的优化. *中国油料作物学报* **32**, 208–211.
- Shan SH, Zhuang WJ, Guan DY, Li CJ, Liu SH (2003). Genetic transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* I. Molecular identification of plasmid vector and substitute of *A. tumefaciens* strains. *J Peanut Sci* **32**(2), 1–6. (in Chinese)
- 单世华, 庄伟建, 官德义, 李春娟, 刘思衡 (2003). 以农杆菌为介导花生的遗传转化研究I. 质粒载体的分子鉴定及农杆菌菌株的转换. *花生学报* **32**(2), 1–6.
- Shen HY, Xiong HC, Guo XT, Zuo YM (2012). A new method of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in peanut plants. *Plant Nutr Fert Sci* **18**, 518–522. (in Chinese)
- 申红芸, 熊宏春, 郭笑彤, 左元梅 (2012). 一种发根农杆菌介导的花生遗传转化新方法. *植物营养与肥料学报* **18**, 518–522.
- Wan XR, Yang LX, Li L (2007). Plantlet regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of peanut with epicotyl as explants. *J Huazhong Agric Univ* **26**, 15–19. (in Chinese)
- 万小荣, 杨丽霞, 李玲 (2007). 花生上胚轴为外植体的植株再生及转化研究. *华中农业大学学报* **26**, 15–19.
- Wang FH, Feng Y, Ma XC, Yang XX, Zhang L (2019). Optimization of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system of peanut embryo leaflets. *Agric Henan* (17), 23–25. (in Chinese)
- 王凤欢, 冯滢, 马旭策, 杨晓欣, 张乐 (2019). 农杆菌介导花生胚小叶遗传转化体系的优化研究. *河南农业* (17), 23–25.
- Wang SY (2020). Creation, Identification and Genetic Analysis of Alien Chromosome Lines between Cultivated Peanut and Diploid Wild Species *Arachis Duranensis*. Master's thesis. Zhengzhou: Zhengzhou University. pp. 1–80. (in Chinese)

- 王思雨 (2020). 花生栽培种与二倍体野生种 *Arachis duranensis* 异染色体系创制、鉴定及遗传分析. 硕士学位论文. 郑州: 郑州大学. pp. 1–80.
- Wang Y (2012). Establishment and Optimization of the Peanut Cotyledon Regeneration System and Transformation System. Master's thesis. Zhengzhou: Henan Agricultural University. pp. 1–49. (in Chinese)
- 王允 (2012). 花生子叶再生体系及转化体系的建立与优化. 硕士学位论文. 郑州: 河南农业大学. pp. 1–49.
- Wei LQ, Shao FX, Shan L, Bi YP (2008). Recent progress of transgenic research in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *China Biotechnol* **28**(10), 124–129. (in Chinese)
- 魏丽奇, 邵凤霞, 单雷, 毕玉平 (2008). 花生转基因研究进展. 中国生物工程杂志 **28**(10), 124–129.
- Xu J, Zhang TT, Zhang JJ, Wang ZJ, Li L, Shan SH (2014). Establishment of regeneration systems of different peanut varieties. *Shandong Agric Sci* **46**(6), 23–26. (in Chinese)
- 徐娟, 张廷婷, 张甲佳, 王昭静, 李林, 单世华 (2014). 不同花生品种再生体系的建立. 山东农业科学 **46**(6), 23–26.
- Xu QQ, Liu FZ, Wan YS (2008). Studies on influencing factors of peanut (*Arachis hypogaea* L.) genetic transformation rate with *Agrobacterium*. *J Shandong Agric Univ (Nat Sci)* **39**(2), 161–165. (in Chinese)
- 徐勤青, 刘凤珍, 万勇善 (2008). 影响农杆菌介导花生遗传转化率主要因素的研究. 山东农业大学学报(自然科学版) **39**(2), 161–165.
- Xu ZY, Liao BS, Yan LY, Chen KR (2007). Progresses of transgenic peanut research. *Chin J Oil Crop Sci* **29**, 489–496. (in Chinese)
- 许泽永, 廖伯寿, 晏立英, 陈坤荣 (2007). 转基因花生研究进展. 中国油料作物学报 **29**, 489–496.
- Yang KX, Tang R, Lü JW, Cheng LQ, Hu TH, Wang J (2018). Research progress on tissue culture of peanut. *Agric Technol Ser* **35**, 69–70, 72. (in Chinese)
- 杨克相, 唐容, 吕建伟, 成良强, 胡廷会, 王军 (2018). 花生组织培养研究进展. 农技服务 **35**, 69–70, 72.
- Yang YW (2020). Optimization of *Agrobacterium*-mediated Peanut Genetic Transformation System. Master's thesis. Baoding: Hebei Agricultural University. pp. 1–40. (in Chinese)
- 杨艳雯 (2020). 农杆菌介导花生遗传转化体系的优化. 硕士学位论文. 保定: 河北农业大学. pp. 1–40.
- Yin DM (2020). Nongdahua 108, a new peanut variety with high yield and high resistance to bacterial wilt. *China Seed Ind* (11), 117–118. (in Chinese)
- 殷冬梅 (2020). 高产高抗青枯病花生新品种农大花108. 中国种业 (11), 117–118.
- Zhai Q, Chen RQ, Liang XH, Zeng CC, Hu B, Li L, Li XY (2022). Establishment and application of a rapid genetic transformation method for peanut. *Chin Bull Bot* **57**, 327–339. (in Chinese with English abstract)
- 翟琼, 陈容钦, 梁晓华, 曾楚淳, 胡博, 李玲, 李晓云 (2022). 一种花生快速遗传转化方法的建立与应用. 植物学报 **57**, 327–339.
- Zhang RD, He LF (2015). Research advances on tissue culture and genetic transformation of peanut. *J Anhui Agric Sci* **43**(11), 27–29. (in Chinese)
- 张饶丹, 何龙飞 (2015). 花生组织培养及遗传转化研究进展. 安徽农业科学 **43**(11), 27–29.
- Zhang XQ, Liu M (2008). Experimental study on the international competition power of China's peanut industry. *J Henan Agric Sci* **37**(11), 42–46. (in Chinese)
- 张秀青, 刘珉 (2008). 中国花生产业国际竞争力实证研究. 河南农业科学 **37**(11), 42–46.
- Zhu J, Han SY, Yuan M, He LQ, He GH, Huang JQ (2018). Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in peanut. *Chin J Oil Crop Sci* **40**, 191–198. (in Chinese)
- 朱军, 韩锁义, 袁美, 贺梁琼, 何国浩, 黄家权 (2018). 农杆菌介导的花生遗传转化条件优化. 中国油料作物学报 **40**, 191–198.

Establishment and Optimization of an Efficient Peanut Genetic Transformation System

Tingting Li, Zhiwen Yan, Yuanyuan Cui, Haosong Guo, Fangjun Chen, Qianqian Zhang, Xiaoqin Liu*

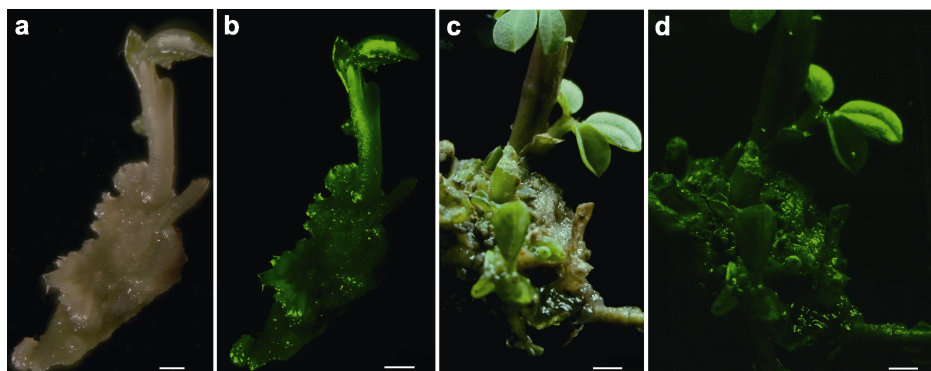
Shandong Laboratory of Advanced Agriculture Sciences in Weifang, Institute of Advanced Agricultural Sciences, Peking University, Weifang 261325, China

INTRODUCTION: To establish an efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system for peanuts and lay a foundation for the study of peanut gene functions and variety breeding.

RATIONALE: In this study, 11 peanut varieties were selected, and the cotyledonary leaflets from the variety with the highest bud cluster induction rate were screened out as experimental materials. By screening and optimizing influencing factors such as *Agrobacterium* strains, the optical density (OD) value of the bacterial suspension, the concentration of acetosyringone (AS), the concentration of surfactants, the infection method and duration, and the co-culture time, transgenic plants of peanut cotyledonary leaflets were obtained.

RESULTS: The results showed that using the embryo leaflet of Huayu9133 as the receptor, the recombinant *Agrobacterium* strains containing eGFP (green fluorescent protein) and GUS (β -glucosidase) were used to infect and transform, respectively. The results showed that when the infection solution was MS liquid+LBA4404 strain+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS+150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ surfactant Silwet-77, bacterial solution OD_{600} was 0.7, and the infection method was vacuuming for 15 min+soaking for 20 min+co-culture for 4 d, the peanut conversion rate was the highest. The positive rates of *CaMV35S:eGFP* and *AhUBQ4:GUS* were 52.67% and 57.67%, respectively. The transgenic plants were induced by tissue culture method. The transgenic plants containing eGFP protein were identified as transgenic positive plants by eGFP green fluorescence and PCR detection, and the transgenic plants containing GUS protein were identified as transgenic positive plants by GUS staining and PCR detection.

CONCLUSION: This experiment successfully established and optimized the peanut genetic transformation system, which provided a solid foundation for the study of peanut gene function, the cultivation of resistant varieties, quality improvement and biotechnology research.



Fluorescence schematic diagram of *CaMV35S:eGFP* infection material (a: Regeneration bud cluster under the bright field (bar=500 μm); b: Regeneration bud cluster fluorescence (bar=500 μm); c: Regeneration plantlet under the bright field (bar=2 mm); d: Regeneration plantlet fluorescence (bar=2 mm))

Key words peanut, embryo lobule leaflet, genetic transformation system, eGFP, GUS

Li TT, Yan ZW, Cui YY, Guo HS, Chen FJ, Zhang QQ, Liu XQ (2026). Establishment and optimization of an efficient peanut genetic transformation system. *Chin Bull Bot* 61, 123–135.

* Author for correspondence. E-mail: xiaoqin.liu@pku-iaas.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)

通讯作者/团队简介

刘晓芹, 研究员, 现任北京大学现代农业研究院花生功能基因组学与种质资源创新实验室PI, 同时担任实验室主任以及潍坊市油料作物分子设计育种重点实验室主任。当前, 研究工作主要聚焦于花生功能基因组学与种质资源创新。其研究团队综合运用多组学、遗传学、分子生物学以及基因编辑等先进技术手段, 全方位开展全基因组水平的基因型精准鉴定工作。借助花生自然群体、遗传群体和突变体群体等丰富的研究材料, 深入挖掘目标性状的优异等位基因, 系统解析花生重要性状形成的分子遗传机制。