

马灵,袁轶,杨爽,等.‘京枣39’叶片遗传转化体系的建立[J].华中农业大学学报,2025,44(1):43-49.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.01.005

‘京枣39’叶片遗传转化体系的建立

马灵¹,袁轶¹,杨爽¹,高艺¹,陈学勋²,
焦立军²,刘巍巍²,薄文浩¹,庞晓明¹

1. 林木遗传育种国家重点实验室/林木育种与生态修复国家工程研究中心/北京林业大学生物科学与技术学院,北京 100083; 2. 内蒙古自治区赤峰市敖汉旗双井林场,赤峰 024300

摘要 为建立‘京枣39’高效遗传转化体系,以‘京枣39’叶片为外植体进行遗传转化,探究卡那霉素(kanamycin, Kan)质量浓度、头孢噻肟(cefotaxime, Cef)和特美汀(timentin, Tim)抑菌质量浓度、预培养时间、不同菌液浓度、侵染时间、乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)浓度及共培养时间对‘京枣39’叶片转化率的影响。结果显示,‘京枣39’叶片最佳遗传转化条件为,5 mg/L Kan选择压,50 mg/L Cef、250 mg/L Tim抑菌质量浓度,预培养4 d,农杆菌菌液OD_{600 nm}值为0.6,侵染时间20 min,共培养基添加200 μmol/L AS,共培养4 d。荧光检测和PCR试验证实外源目的基因已成功整合到‘京枣39’基因组中,实现了农杆菌介导的‘京枣39’叶片的遗传转化。

关键词 根癌农杆菌; 遗传转化; ‘京枣39’; 叶片; 抗性筛选

中图分类号 S665.1

文献标识码 A

文章编号 1000-2421(2025)01-0043-07

枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)是我国分布广泛的经济果树,具有较强的耐旱、耐贫瘠和耐盐碱特性,经济和生态效益显著^[1]。枣果实既可鲜食、制干和加工,又具有较高的药用价值,深受消费者喜爱。

培育更多符合市场需求的新品种是育种重要的发展方向。然而,传统杂交育种因枣花小、去雄困难、坐果率低和胚胎败育率高^[2]等问题受到了较大的限制。枣新品种的选育长期以来主要采用传统选优的方法^[3],缺乏定向选育因而进展缓慢。转基因技术因其高效和定向改良的优势,拓宽了传统育种渠道。其中,农杆菌介导的遗传转化方法因其方法简单、成本低、转化效率高、基因拷贝数低等优点成为枣遗传转化的主要方法^[4]。

近年来,枣的遗传转化取得了一定进展,李亚梅等^[5]建立了酸枣愈伤组织的遗传转化体系;罗在桀等^[6]利用壶瓶枣茎段和茎尖建立遗传转化体系;Gu等^[7]以冬枣茎尖为材料建立遗传转化体系,葛宏^[8]建立了灰枣茎段为外植体的遗传转化体系。但目前枣不同品种和不同外植体类型的遗传转化率较低,体系不稳定。高再生率对于促进农杆菌介导的

遗传转化过程至关重要^[9]。高艺等^[10]从数百份种质中筛选出具有高再生能力的‘京枣39’,成为理想的遗传转化材料,但目前尚缺乏其遗传转化体系的研究。

遗传转化效率受多种因素的影响,包括预培养时间、农杆菌的浓度、侵染时间、共培养时间以及乙酰丁香酮浓度等^[11]。不同枣品种的遗传转化最适条件也存在显著差异^[5,7,12-13]。本研究以‘京枣39’叶片为外植体,通过对比试验优化关键因素,建立一个稳定高效的农杆菌介导的叶片遗传转化体系,以期为枣的基因功能研究及分子育种提供重要的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料为4周苗龄的‘京枣39’无菌组培苗。组培苗生长条件为:温度(24±1)℃,光强2 000 lx,光照培养14 h,暗培养10 h。

1.2 菌株和载体

本研究使用的根癌农杆菌菌株为GV3101,表达载体为pYBA1132(图1)。eYGF_{Puv}(Genbank:

收稿日期:2024-04-12

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFD2200404);国家自然科学基金项目(32271925)

马灵, E-mail: lingmaml@163.com

通信作者:庞晓明, E-mail: xmpang@163.com

LC217533.1)可在紫外光激发下显示出明亮的荧光。BA1132载体中的EGFP序列替换为eYGF_{Puv}序列^[14]。利用合成的eYGF_{Puv}序列,通过双酶切技术将pY-

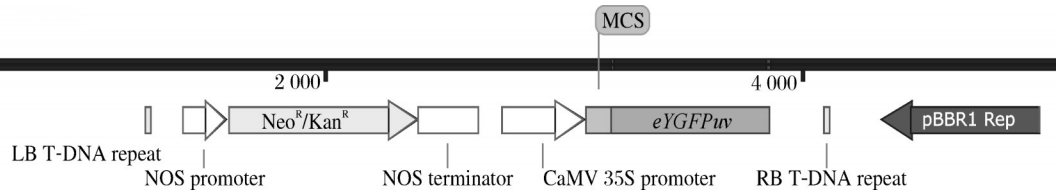


图1 pYBA1132质粒图谱

Fig. 1 Map of pYBA1132 plasmid

1.3 培养基配方

本研究中LB培养基的配制方法参照Elbing等^[15],‘京枣39’叶片再生体系培养基的配制方法参照高艺等^[10]。分化筛选培养基具体配方如下:1/2 MS培养基+1.00 mg/L TDZ+0.50 mg/L 6-BA+0.20 mg/L NAA+30 g/L 麦芽糖+6 g/L 琼脂+50 mg/L Cef+250 mg/L Tim+10 mg/L Kan。

1.4 Kan质量浓度确定

从生长状况良好的‘京枣39’组培苗中,选取自上而下第1~4枚叶片,沿着叶脉的方向垂直切割成小块,随后将其以近轴端接触培养基的方式接种于含有不同质量浓度Kan(0、5、10、15、20 mg/L)的分化培养基中。每个处理接种10个‘京枣39’叶片外植体,6次生物学重复。

1.5 抗生素Cef和Tim抑菌质量浓度确定

分别设置4个质量浓度梯度Cef(0、50、100、200 mg/L)和Tim(0、100、200、250 mg/L),采用完全随机区组设计,双因素四水平,共16个试验组合,以确定最优的抑菌效果和较高的叶片再生率组合。

1.6 根癌农杆菌菌液的制备

取10 μL保存于-80℃的含pYBA1132表达载体的GV3101农杆菌菌液,接种于含50 mg/L Kan和50 mg/L利福平(rifampin, Rif)的LB固体培养基上,于28℃恒温培养箱中倒置培养2 d。待其长出单菌落后,挑取PCR检验为阳性的单菌落,接种于500 μL的LB液体培养基(含上述抗生素),置于28℃、200 r/min的摇床上活化12~16 h。将活化后的全部菌液加入10 mL LB液体培养基(含上述抗生素),置于28℃、200 r/min的摇床上进行二次活化。培养至对数期后,取1 mL菌液加入50 mL不含抗生素的LB液体培养基,继续以相同条件振荡培养至OD_{600nm}值为0.6。

1.7 遗传转化培养条件的确定

将‘京枣39’叶片切成小块,置于预培养基上暗培养不同时间(0、4、6 d),随后使用携带pYBA1132质粒的根癌农杆菌GV3101菌液(OD_{600nm}值为0.4、0.6、0.8)进行侵染,分别设置不同的侵染时间(5、10、15、20 min)、AS浓度(0、100、200 μmol/L)、共培养不同时间(2、4、6 d)。经过共培养后,将叶片转移到筛选分化培养基上培养30 d,统计存活的‘京枣39’抗性芽数和平均转化率。所有试验均接种10个叶片,并进行6次生物学重复。

1.8 ZjGIF1遗传转化及转基因植株鉴定

参照植物RNA提取试剂盒(RC411,南京诺唯赞生物科技有限公司)操作指南,从‘京枣39’叶片中提取总RNA,按照反转录试剂盒说明书进行反转录。利用引物ZjGIF1-F: ATGCAGCAGCACCTGATGCA和ZjGIF1-R: TCAATTCCCATCATCCG-CAG进行PCR扩增。回收目的基因片段,连接至Xba I酶切后的pYBA1132表达载体,获得35S::ZjGIF-eYGF_{Puv}重组载体。

采用农杆菌介导法将35S::ZjGIF-eYGF_{Puv}重组载体和35S::eYGF_{Puv}空载分别转化至‘京枣39’叶片。使用CTAB法^[16]提取抗性芽基因组DNA,利用引物35S-F: 5'-GACGCACAATCCAC-TATCC-3'和GFP-R: 5'-GTGGTCAGCAG-GAAGGGAGAGAAT-3'进行转基因阳性系鉴定。同时利用手持365 nm紫外灯(V30-20W, SHENYU)照射筛选具有荧光的抗性芽。

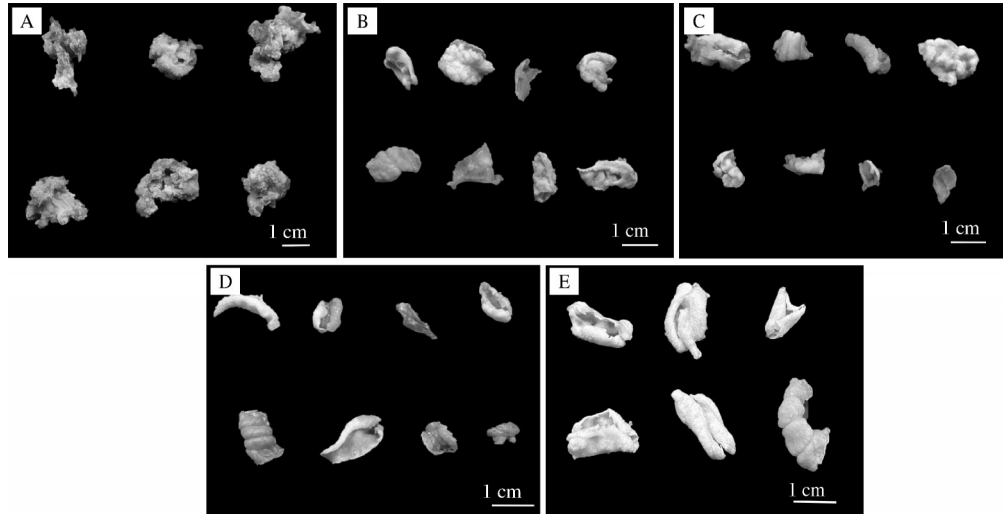
PCR反应体系(20 μL):模板(DNA)1 μL,2×PCR Mix 10 μL,上下游引物各1 μL,ddH₂O 7 μL。PCR扩增程序(35个循环):94℃预变性15 min,94℃变性40 s,55℃退火40 s,72℃延伸40 s,72℃延伸10 min,4℃保存,1%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 Kan质量浓度的确定

不同质量浓度 Kan 培养基对‘京枣39’叶片生长和分化的影响结果如图2所示,随着Kan质量浓度的增加,叶片黄化程度逐渐加重。当Kan质量浓度达到

5 mg/L时,‘京枣39’叶片出现膨大和黄化现象;当Kan质量浓度达到20 mg/L时,叶片已全部黄化并死亡。结果表明,‘京枣39’叶片对Kan高度敏感,Kan质量浓度达到5 mg/L时,野生型叶片出现黄化和死亡,并且无不定芽分化。因此,确定筛选压为5 mg/L Kan质量浓度。



A: 0 mg/L Kan; B: 5 mg/L Kan; C: 10 mg/L Kan; D: 15 mg/L Kan; E: 20 mg/L Kan.

图2 ‘京枣39’叶片在不同质量浓度 Kan 培养基上的生长情况

Fig. 2 Growth of leaf explants of ‘Jingzao 39’ on Kan medium with different concentrations

2.2 抑菌剂质量浓度的确定

不同抑菌剂质量浓度下‘京枣39’叶片再生率和方差分析结果如表1所示,不同质量浓度 Cef 对叶片再生率有显著影响($F=36.351, P<0.001$);而不同质量浓度 Tim 对叶片再生率影响不显著($F=2.405, P>0.01$)。Cef 与 Tim 之间的交互作用对叶片再生率有显著影响($F=49.919, P<0.001$)。Tim 质量浓度为250 mg/L, Cef 质量浓度为50 mg/L时,叶片再

生率最高。因此,抑菌剂最佳使用质量浓度确定为250 mg/L Tim 和50 mg/L Cef。

2.3 ‘京枣39’叶片遗传转化体系条件筛选

对不同预培养时间具有绿色荧光的‘京枣39’抗性芽进行统计分析(图3A),随着预培养时间的增加,转化率呈现先上升后下降的趋势。预培养4 d时,转化率达到最高,为25%,是‘京枣39’叶片外植体最适的预培养时间。

不同浓度农杆菌菌液对‘京枣39’叶片转化率的影响如图3B所示,转化率呈现先上升后下降的趋势。当 $OD_{600\text{nm}}$ 值为0.6时转化率最高,为40.47%,而当菌液浓度提高至0.8时,转化率下降至13.33%。因此,农杆菌菌液侵染的适合浓度选择 $OD_{600\text{nm}}$ 值为0.6。

不同侵染时间对‘京枣39’叶片转化率的影响如图3C所示,当侵染时间为20 min时,与侵染5、10 min的叶片转化率存在显著差异,转化率最高,达到44.46%,因此,将20 min作为最佳侵染时间。

不同浓度 AS 对‘京枣39’叶片转化率的影响如图3D所示,添加200 $\mu\text{mol/L}$ AS 的叶片转化率与添加100 $\mu\text{mol/L}$ AS 的叶片转化率存在显著差异,而不添加 AS 的叶片转化率存在极显著差异。因此,

表1 不同质量浓度 Cef、Tim 处理下‘京枣39’叶片再生率
Table 1 Leaf regeneration rate of ‘Jingzao 39’ under different concentrations of Cef and Tim mg/L

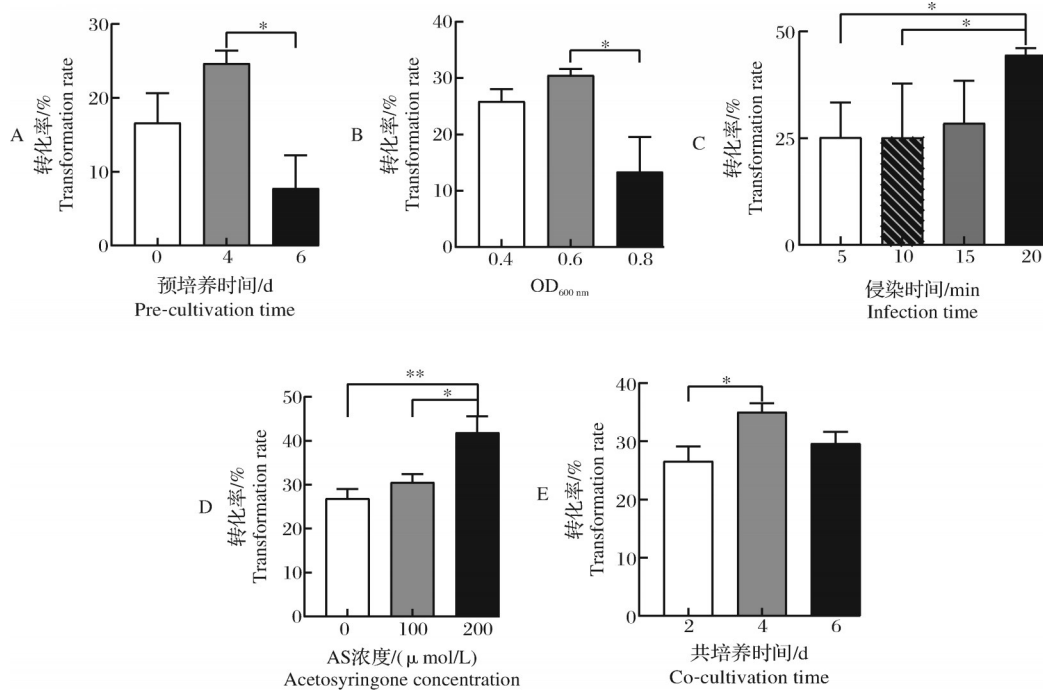
Tim	Cef			
	0	50	100	200
0	0.000±	0.325±	0.675±	0.700±
	0.000f	0.096cd	0.050b	0.115b
100	0.400±	0.650±	0.775±	0.175±
	0.082c	0.058b	0.126ab	0.050e
200	0.700±	0.675±	0.325±	0.175±
	0.082b	0.096b	0.126cd	0.050e
250	0.700±	0.850±	0.250±	0.175±
	0.082b	0.058a	0.129de	0.096e

注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。Note: Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

AS的最适浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 。

不同共培养时间对叶片转化率的影响结果如图3E所示,共培养2、4 d的叶片转化率存在显著差异,

共培养4、6 d的叶片转化率没有显著差异。在共培养4 d时,转化率达到最高值35.02%,因此,确定4 d为最佳共培养时间。



A: 预培养时间 Pre-cultivation time; B: 菌液浓度 *Agrobacterium* concentration; C: 侵染时间 Infection time; D: AS 浓度 AS concentration; E: 共培养时间 Co-cultivation time. *和**分别表示在0.05和0.01水平上差异显著。* and ** indicate significant difference at 0.05 or 0.01 levels, respectively.

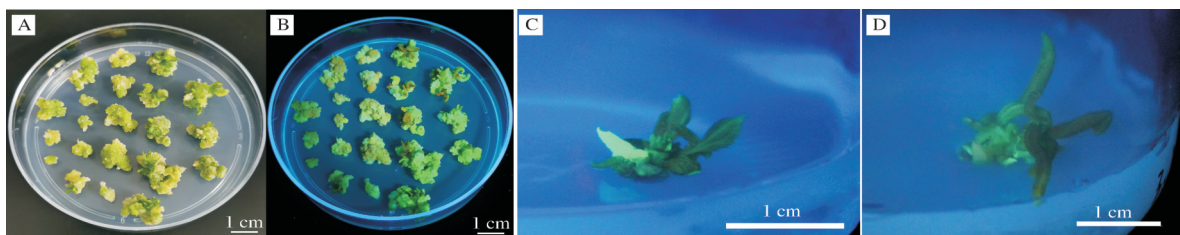
图3 不同因素对‘京枣39’叶片转化率的影响

Fig. 3 Effect of different factors on leaf transformation rate of ‘Jingzao 39’

2.4 转基因材料鉴定

利用365 nm的紫外灯照射抗性芽(图4),结果显示,阳性材料在紫外光下发出明亮的绿色荧光,可见光下未见此现象。PCR扩增结果如图5所示,抗性芽PCR扩增产物条带与阳性对照条带大小一致。‘京枣39’叶片转化体系各阶段生长状态如图6所示。不同

处理共侵染了960个外植体,获得641个抗性芽和180个在365 nm紫外光照射下能发出明亮绿色荧光的抗性芽,空载转化率为28.08%。对于35S::Zj-GIF-eYGFPuv重组载体,共获得了20个抗性芽株系,其中6个经PCR鉴定为转基因株系,转化率为30%。



A: 可见光下的阳性愈伤和芽 Positive callus and buds under visible light; B-D: 365 nm 紫外光照射下的阳性愈伤和芽 Positive callus and buds under 365 nm UV light.

图4 阳性芽的GFP荧光信号鉴定

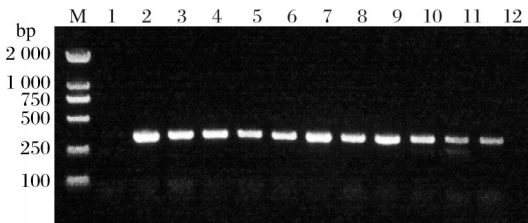
Fig. 4 GFP fluorescence signal identification of positive buds

3 讨论

本研究探索了筛选剂、抑菌剂等抗生素质量浓度、预培养时间、农杆菌浓度、AS浓度、侵染时

间和共培养时间等因素对‘京枣39’叶片遗传转化的影响,并建立了一个较为稳定的遗传转化体系。

试验中使用Kan作为筛选剂,以区分转基因植



M: DL2000 DNA maker; 1: 阴性对照 Negative control; 2: 阳性对照 Positive control; 3~12: ‘京枣39’阳性系 PCR 扩增结果 PCR amplification results of positive ‘Jingzao 39’ transgenic lines.

图5 阳性植株鉴定

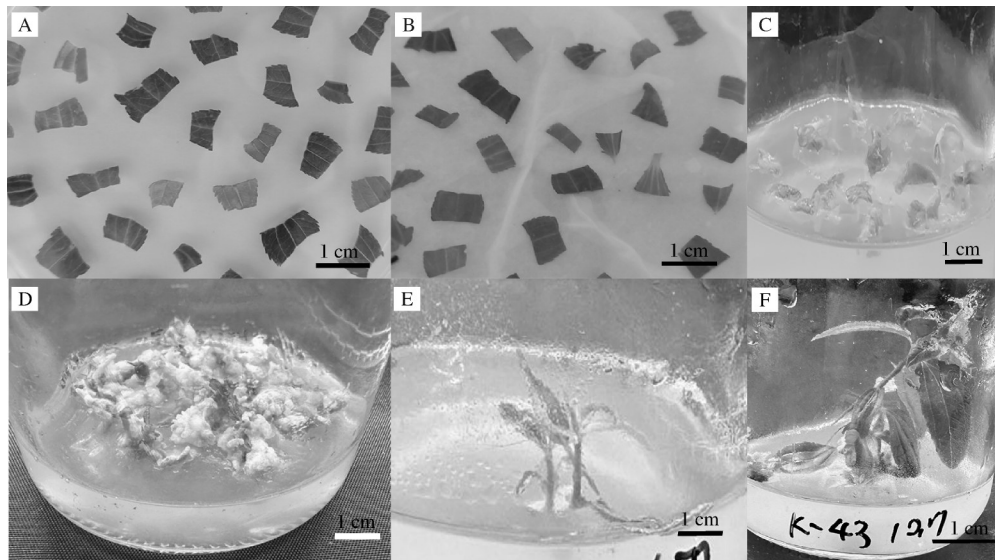
Fig. 5 Detection of positive buds

株与非转基因植株。结果表明,‘京枣39’叶片对Kan高度敏感,非转化植株在含有5 mg/L Kan的筛选分化培养基中生长2周后叶片发黄、白化。这一浓度远低于其他枣品种如木枣(20 mg/L)^[12]、‘蜂蜜罐’(50 mg/L)^[17]、骏枣愈伤组织(125 mg/L)^[13]的筛选浓度。

本研究中发现,不同质量浓度的抑菌抗生素Cef和Tim的组合使用,对‘京枣39’叶片再生率有显著影响。当Cef质量浓度达到200 mg/L时,抑制了‘京

枣39’叶片不定芽的再生,表明抗生素在抑制农杆菌过度生长的同时,可能会影响植物细胞的生长发育,从而降低转化效率。前期研究发现,以酸枣叶片^[18]和愈伤组织^[5]为外植体的遗传转化体系中分别使用100 mg/L和250 mg/L Cef抑制农杆菌的过度生长;哈密大枣中Cef的使用量高达400 mg/L,表明不同基因型、不同类型的外植体对抑菌剂敏感性不同^[19]。因此,在后续针对特定品种建立遗传转化体系研究中,应综合考虑抑菌剂对外植体材料的毒害作用。

本研究各因素下空载的总体转化率达28.08%,含目的基因的转化率为30%。前期研究中壶瓶枣茎段的转化率为1.52%^[6],骏枣愈伤组织的转化率为0.75%^[13],冬枣茎尖的转化效率为5.20%^[7]。虽然酸枣愈伤组织的转化率最高达31.80%^[5],但未获得完整的转化植株。本研究总体的高转化率表明了具有高再生率的‘京枣39’在建立遗传转化体系上的优势,未来通过多因素优化有望进一步提高转化效率。



A: 叶片预培养阶段 Leaf pre-cultivation stage; B: 叶片共培养阶段 Leaf co-cultivation stage; C—D: 筛选阶段 Screening stage; E—F: 抗性芽生长阶段 Resistant bud growth stage.

图6 ‘京枣39’叶片转化体系流程

Fig. 6 Leaf transformation system for ‘Jingzao 39’

参考文献 References

- [1] LIU M J, WANG J R, WANG L L, et al. The historical and current research progress on jujube: a superfruit for the future [J/OL]. Horticulture research, 2020, 7: 119 [2024-04-12]. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00346-5>.
- [2] 刘孟军,王玖瑞,刘平,等.枣树免去雄杂交育种的设计与实践[J].园艺学报,2014,41(7):1495-1502.LIU M J, WANG J R, LIU P, et al. Design and practice of emasculation-free cross breeding in Chinese jujube [J]. Acta horticulturae sinica, 2014, 41(7): 1495-1502 (in Chinese with English abstract).
- [3] 邱可,潘依玲,鲍荆凯,等.枣规模化控制杂交育种技术体系[J].河北果树,2022(1):1-3.QIU K, PAN Y L, BAO J K, et al. Technical system of jujube crossbreeding by scale control-

- ling[J].Hebei fruits,2022(1):1-3 (in Chinese).
- [4] TZFIRA T,CITOVSKY V.Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology [J]. Current opinion in biotechnology,2006,17(2):147-154.
- [5] 李亚梅,马福利,张山奇,等.酸枣愈伤组织转化体系构建及在 *ZjBRC1* 调控 *ZjYUCCA* 表达中的应用[J].园艺学报,2022,49(4):749-757.LI Y M,MA F L,ZHANG S Q,et al. Optimization of jujube callus transformation system and application of *ZjBRC1* in regulating *ZjYUCCA* expression[J].Acta horticulturae sinica,2022,49(4):749-757 (in Chinese with English abstract).
- [6] 罗在荣,郭辉力,杨亚东,等.农杆菌介导虎杖芪合酶基因遗传转化壶瓶枣的研究[J].林业科学,2015,51(10):101-109. LUO Z Q, GUO H L, YANG Y D, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of resveratrol synthase gene (*PcPKS5*) into Huping jujube (*Zizyphus jujuba*) [J]. Scientia silvae sinicae, 2015, 51 (10) : 101-109 (in Chinese with English abstract).
- [7] GU X F, MENG H, QI G, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of the winter jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2008, 94(1):23-32.
- [8] 葛宏. 枣种质资源收集保存与 *ZjTCP6*、*ZjTCP16* 基因的遗传转化[D]. 郑州:河南农业大学,2019. GE H. Jujube germplasm resource collection, preservation and genetic transformation of *ZjTCP6* and *ZjTCP16* genes [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [9] HAMZA S, CHUPEAU Y. Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. Journal of experimental botany, 1993, 44(12):1837-1845.
- [10] 高艺,薄文浩,李颖岳,等.‘京枣39’离体叶片高效再生体系的建立[J].北京林业大学学报,2023,45(2):68-77.GAO Y, BO W H, LI Y Y, et al. Establishment of high-efficiency regeneration system from in vitro leaves of ‘Jingzao 39’ [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2023, 45 (2) : 68-77 (in Chinese with English abstract).
- [11] ZIEMIENOWICZ A. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: factors, applications and recent advances [J]. Biocatalysis and agricultural biotechnology, 2014, 3(4):95-102.
- [12] 尚秉众,田瑞康,雒淑婷,等.狗头枣 *ACO I* 基因RNAi表达载体的构建及遗传转化[J].延安大学学报(自然科学版),2023,42(4):55-60.SHANG B Z, TIAN R K, LUO S T, et al. Construction and transformation of RNAi expression vector regulate with *ACO I* gene from Goutou jujube [J]. Journal of Yanan University (natural science edition), 2023, 42 (4) : 55-60 (in Chinese with English abstract).
- [13] 冯晓东,陈国梁,乔璟,等.根瘤农杆菌介导的骏枣愈伤组织遗传转化体系的研究[J].延安大学学报(自然科学版),2014,33(1):54-57.FENG X D, CHEN G L, QIAO J, et al. Study on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation system for callus of *Zizyphus jujube* cv. Junzao [J]. Journal of Yanan University (natural science edition), 2014, 33 (1) : 54-57 (in Chinese with English abstract).
- [14] YUAN G L, LU H W, TANG D, et al. Expanding the application of a UV-visible reporter for transient gene expression and stable transformation in plants [J/OL]. Horticulture research, 2021, 8 (1) : 234 [2024-04-12]. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00663-3>.
- [15] ELBING K, BRENT R. Media preparation and bacteriological tools [J/OL]. Current protocols in molecular biology, 2002, 59: 1 [2024-04-12]. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0101s59>.
- [16] POREBSKI S, BAILEY L G, BAUM B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. Plant molecular biology reporter, 1997, 15(1):8-15.
- [17] 张燕征,张梦洋,李继东,等.‘蜂蜜罐’枣遗传转化条件的优化及 *Bt* 基因的导入[J].河南农业大学学报,2018,52(1):43-49. ZHANG Y Z, ZHANG M Y, LI J D, et al. Optimization of genetic transformation system and transformation of *Bt* gene for epicotyl and cotyledon from seedlings of jujube ‘Fengmiguang’ (*Zizyphus jujuba* Mill) [J]. Journal of Henan Agricultural University, 2018, 52(1):43-49 (in Chinese with English abstract).
- [18] 崔艳红,王欢,豆苏含,等.农杆菌介导酸枣叶片遗传转化 *SPDS* 基因体系的建立[J].分子植物育种,2018,16(20):6710-6717. CUI Y H, WANG H, DOU S H, et al. Establishment of *SPDS* system for leaf genetic transformation in *Zizyphus jujuba* Mill. var. *spinose* mediated by *Agrobacterium* [J]. Molecular plant breeding, 2018, 16 (20) : 6710-6717 (in Chinese with English abstract).
- [19] 高启明,王斌,赛买提·吐尔逊,等.农杆菌介导的 *CBF* 基因转化哈密大枣[J].北方园艺,2016(18):94-98. GAO Q M, WANG B, TUERXUN S, et al. *Agrobacterium*-mediated *CBF* genetic transformation of Hami *Zizyphus jujuba* [J]. Northern horticulture, 2016(18):94-98 (in Chinese with English abstract).

Establishment of genetic transformation system for leaves of ‘Jingzao 39’ (*Ziziphus jujuba* Mill.)

MA Ling¹, YUAN Yi¹, YANG Shuang¹, GAO Yi¹, CHEN Xuexun²,
JIAO Lijun², LIU Weiwei², BO Wenhao¹, PANG Xiaoming¹

1.State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding/National Engineering Research Center of Tree Breeding and Ecological Restoration/College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
2.Shuangjing Forestry Farm, Aohan Banner, Inner Mongolia Autonomous Region, Chifeng 024300, China

Abstract Leaves of ‘Jingzao 39’ were used as explants to establish an efficient genetic transformation system for ‘Jingzao 39’. The effects of the selection pressure of kanamycin (Kan), the inhibitory concentration of cefotaxime (Cef) and timentin (Tim), pre-culture time, the density of bacterial suspension, infection duration, the concentration and co-culture time of acetylyringone (AS) on the transformation rate of leaves of ‘Jingzao 39’ were studied. The results showed that the optimal genetic transformation conditions for the leaves of ‘Jingzao 39’ were as follows: 5 mg/L Kan, 50 mg/L Cef, 250 mg/L Tim, pre-culture for 4 days, *Agrobacterium tumefaciens* concentration $OD_{600\text{ nm}}=0.6$, infection duration of 20 minutes, 200 $\mu\text{mol/L}$ AS, co-culture for 4 days. The results of fluorescence detection and PCR analyses confirmed that the exogenous target gene was successfully integrated into the genome of ‘Jingzao 39’, achieving the *Agrobacterium* mediated genetic transformation of leaves of ‘Jingzao 39’. It will provide an important support for analyzing the function of genes and molecular breeding in jujube.

Keywords *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation; ‘Jingzao 39’; leaves; resistance selection

(责任编辑:葛晓霞)