北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

‘京枣39’愈伤组织遗传转化体系构建

冯雪晶 马灵 杨爽 薄文浩 陈学勋 庞晓明

Construction of genetic transformation system of ‘Jingzao 39’ callus

Feng Xuejing, Ma Ling, Yang Shuang, Bo Wenhao, Chen Xuexun, Pang Xiaoming

引用本文:
冯雪晶, 马灵, 杨爽, 薄文浩, 陈学勋, 庞晓明. ‘京枣39’愈伤组织遗传转化体系构建[J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(10):74–80. doi: 10.12171/j.1000–1522.20240055
Feng Xuejing, Ma Ling, Yang Shuang, Bo Wenhao, Chen Xuexun, Pang Xiaoming. Construction of genetic transformation system of ‘Jingzao 39’ callus[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(10):74–80. doi: 10.12171/j.1000–1522.20240055

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240055

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

杂交枫香胚性愈伤组织遗传转化体系研究
Agrobacterium tumefaciens–mediated transformation of hybrid sweetgum embryogenic callus
北京林业大学学报, 2021, 43(8): 9–17. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210032

‘京枣39’离体叶片高效再生体系的建立
Establishment of high–efficiency regeneration system from in vitro leaves of ‘Jingzao 39’
北京林业大学学报, 2023, 45(2): 68–77. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210370

‘京枣39’离体多倍体诱导及其增殖、生根培养体系优化
In vitro polyploid induction and optimization of its proliferation and rooting culture system for ‘Jingzao 39’
北京林业大学学报, 2024, 46(6): 118–126. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230039

杉木体细胞胚胎发生胚性愈伤组织诱导条件的优化
Optimization of induction conditions for embryogenic callus of somatic embryogenesis in *Cunninghamia lanceolata*
北京林业大学学报, 2020, 42(2): 79–86. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20190196

气动生物反应器油松胚性愈伤增殖体系的建立研究
Enhancement of embryogenic callus proliferation in Chinese pine (*Pinus tabuliformis*) by airlift bioreactor
北京林业大学学报, 2019, 41(11): 37–43. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20190221

茶壶枣离体多倍体诱导关键技术研究
Study on key techniques of polyploid induction in *Ziziphus jujuba* Mill. cv. ‘Teapot’
北京林业大学学报, 2019, 41(7): 49–56. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20190230

DOI:10.12171/j.1000−1522.20240055

‘京枣 39’愈伤组织遗传转化体系构建

冯雪晶[1] 马 灵[1] 杨 爽[1] 薄文浩[1] 陈学勋[2] 庞晓明[1]
（1. 林木遗传育种全国重点实验室，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. 内蒙古敖汉旗双井林场，内蒙古 赤峰 024308）

摘要:【目的】以‘京枣 39’愈伤组织为外植体进行遗传转化，建立枣树愈伤组织遗传转化体系，优化阳性植株鉴定方法。**【方法】**本研究以‘京枣 39’愈伤组织为转化材料，利用含有报告基因 *eYGFPuv* 的改造载体，并通过根癌农杆菌介导方法转化，探究预培养时间、农杆菌菌液浓度、侵染时间、乙酰丁香酮浓度、共培养时间对转化率的影响，建立愈伤组织遗传转化体系并优化阳性植株鉴定方法。**【结果】**(1)卡那霉素对愈伤组织的最小致死质量浓度为 30 mg/L。(2)遗传转化最佳处理条件为预培养时间为 4 d，菌液 OD_{600} 为 0.6，侵染时间 20 min，乙酰丁香酮浓度 100 μmol/L，共培养时间为 4 d；(3)阳性愈伤组织在 365 nm 紫外光下呈现明亮的荧光绿色，平均转化率达 21.2%。**【结论】**经对比试验，成功建立了‘京枣 39’愈伤组织遗传转化体系，为加速枣遗传转化提供了新的方法。

关键词：‘京枣 39’；愈伤组织；遗传转化；eYGFPuv
中图分类号：S665.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2024)10−0074−07
引文格式：冯雪晶，马灵，杨爽，等. ‘京枣 39’愈伤组织遗传转化体系构建［J］. 北京林业大学学报，2024，46(10)：74−80.
Feng Xuejing, Ma Ling, Yang Shuang, et al. Construction of genetic transformation system of ‘Jingzao 39’ callus［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(10): 74−80.

Construction of genetic transformation system of ‘Jingzao 39’ callus

Feng Xuejing[1] Ma Ling[1] Yang Shuang[1] Bo Wenhao[1] Chen Xuexun[2] Pang Xiaoming[1]
(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, National Engineering Laboratory of Tree Breeding, School of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
2. Shuangjing Forest Farm of Aohan Banner, Chifeng 024308, Inner Mongolia, China)

Abstract:［**Objective**］This paper aims to establish a genetic transformation system of jujube callus and optimize the identification method for selecting positive plants using the callus of ‘Jingzao 39’ as explants.［**Method**］Using ‘Jingzao 39’ callus as plant material, the modified vector containing the reporter gene *eYGFPuv* was transformed by agrobacterium tumefaciens mediated method, genetic transformation was performed by agrobacterium tumefaciens mediated method, the effects of pre-culture time, agrobacterium concentration, infection time, acetosyringone (AS) mass concentration and co-culture time on genetic transformation of ‘Jingzao 39’ were investigated to establish a genetic transformation system of jujube callus and optimize the identification method for selecting positive plants.［**Result**］(1) The minimum lethal concentration of kanamycin on callus was 30 mg/L. (2)The optimal treatment conditions of genetic transformation included that pre-culture time was 4 d, bacterial solution concentration OD_{600} was 0.6, infection time was 20 min, AS mass concentration was 100 μmol/L, co-culture time was 4 d. (3) The positive

收稿日期: 2024−03−07 **修回日期:** 2024−05−05
基金项目: 国家重点研发计划(2022YFD2200404)，中央引导地方科技发展专项“特色果树种质创新与育种能力提升”。
第一作者: 冯雪晶。主要研究方向：经济林育种。Email: 17339193560@163.com 地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。
责任作者: 庞晓明，教授。主要研究方向：经济林育种。Email: xmpang@bjfu.edu.cn 地址：同上。
本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn; http://journal.bjfu.edu.cn

callus group showed bright fluorescent green under 365 nm ultraviolet light and the transformation rate was averaged 21.2%. [**Conclusion**] Through comparative experiments, the ‘Jingzao 39’ callus genetic transformation system is successfully established, which provides a new method for accelerating the genetic transformation of jujube.

Key words: *Ziziphus jujuba* ‘Jingzao 39’; callus; genetic transformation; eYGFPuv

枣(*Ziziphus jujuba*)为鼠李科(Rhamnaceae)枣属(*Ziziphus*)植物，是我国重要的经济树种[1]。枣树具有悠久的栽培历史，而目前生产上存在品种较单一的问题，迫切需要选育多样性的品种满足消费者的需求。枣树具有胚败育率高[2]、花小且去雄困难[3]、落花落果严重等问题，影响了枣的育种进程。随着生物技术的不断发展，植物基因工程技术正在成为现代植物品种改良的有效手段。然而，枣基因组杂合度较高、遗传转化率很低等问题阻碍了枣分子育种研究进展[4]。

以茎尖、叶片、嫩梢和下胚轴等器官为材料，通过根癌农杆菌介导法，成功获得了转基因植株[4−6]，但试验耗时长、转化率低，尚不能满足解析枣树基因功能和分子育种的需要。愈伤组织具有外植体来源容易、易扩繁等优点[7]，李亚梅等[8]建立了酸枣(*Z. jujuba* var. *spinosa*)愈伤组织诱导和转化体系，但酸枣作为材料在果实等重要性状研究上存在不足，因此，建立以栽培枣品种为试材的转化体系具有重要意义。‘京枣 39’(*Z. jujuba* ‘Jingzao 39’)是优良鲜食大枣品种，具有较高的育种价值[9]，通过对沧县枣树国家良种基地 216 份枣种质的叶片再生率的对比筛选，发现‘京枣 39’不定芽再分化率最高[10]，具有果实较大、果形整齐、早熟高产优质等特性，并且其适应性及抗虫、抗病能力强[9]，是理想的转化体系材料。Tong 等[11]通过‘京枣 39’愈伤组织遗传转化，得到了过表达 *ZjHXK5* 和 *ZjHXK6* ‘京枣 39’愈伤组织。

植物遗传转化中，假阳性是经常需要克服的问题[12]。eYGFPuv 蛋白在 365 nm 紫外光下，可在活体植物中观察到绿色荧光[13]，因此可以用于转基因研究中筛选转化系；且 eYGFPuv 可作为选择标记，通过实时成像进行体内转化子的选择，而不需要破坏性采样，节省了时间和成本[14]。本研究以‘京枣 39’愈伤组织为材料，对可能影响枣树愈伤组织遗传转化率的几个因素进行探究，建立了根癌农杆菌介导的‘京枣 39’愈伤遗传转化体系，并证实了报告基因 *eYGFPuv* 可应用于枣树遗传转化，使阳性转基因植株的鉴定更方便快捷，将为枣树基因工程育种提供重要技术支撑。

1　材料与方法

1.1　植物材料

转化受体材料来自北京林业大学林木遗传育种全国重点实验室保存的‘京枣 39’愈伤组织。

1.2　农杆菌菌株与载体

采用的农杆菌菌株为实验室保存的 GV3101，表达载体为 pYBA1132(图 1)，并对其进行改造。eYGFPuv (Genbank:LC217533.1)是一种 CpYGFP 衍生物，在不可见的紫外光激发下显示出明亮的荧光[14]。我们合成了 *eYGFPuv* 基因序列，利用双酶切，将表达载体 pYBA1132 中的 *eYGFP* 序列替换。

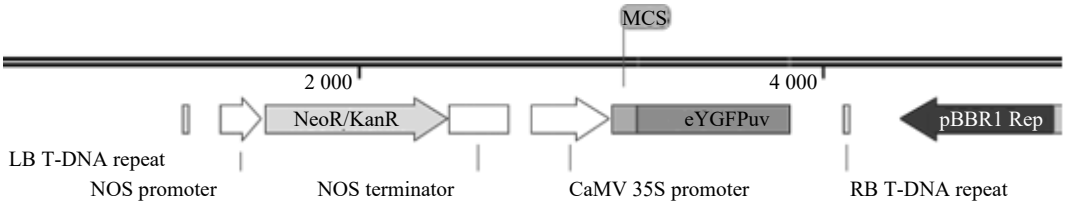
1.3　试验方法

1.3.1　愈伤组织的扩繁

将愈伤切成 0.5 cm^3 的块状，接入诱导培养基中，每个培养瓶接种 5 个愈伤。将培养瓶置于组织培养间进行培养，培养条件为光照强度 1 500 lx，温度 24～26 ℃，光照周期为 16 h/8 h(光照/黑暗)。

1.3.2　卡那霉素（Kana）选择压

为了筛选利于愈伤组织存活和分化的最适 Kana 浓度，将预培养 4 d 后的野生愈伤组织接种到含有 0、10、20 和 30 mg/L Kana 的愈伤分化培养基中进行培养，每处理各水平外植体 30 个，每次处理重复 3 次。培养温度 26 ℃，光强 1 500 lx，20 d 后统



NOS promoter. NOS 启动子；NOS terminator. NOS 终止子；CaMV 35S promoter. 花椰菜花叶病毒 35S 启动子；T-DNA repeat. T-DNA 重复序列；NeoR/KanR. 新霉素/卡那霉素抗性基因；pBBR1 rep. 编码 rep 蛋白；MCS. 多克隆位点。

图 1　pYBA-1132-eYGFPuv 质粒图谱

Fig. 1　pYBA-1132-eYGFPuv plastic profile

计愈伤组织存活率。

1.3.3 不同浓度农杆菌菌液的制备

取 5 uL 50% 甘油保存的农杆菌菌液，在含有 25 mg/L Kana 和 20 mg/L 利福平(RIF)的 LB 固体培养基上进行平板划线，28 ℃ 暗培养 2 d。

在 2 mL 离心管中加入 500 uL 液体 LB，加入 0.5 uL Kana(50 mg/L)，0.5 uL RIF (50 mg/L)，加入挑出的单菌落，置于 28 ℃、200 r/min 的摇床上进行活化，暗培养至生长对数期(12 ~ 16 h)。

将以上培养好的 500 uL 的农杆菌菌液，加入 10 mL 液体 LB、10 uL Kana(50 mg/L)，10 uL RIF(50 mg/L)，置于 50 mL 离心管中，置于 28 ℃、200 r/min 的摇床上进行二次活化，过夜(12 ~ 16 h)。

准备已灭菌的锥形瓶或组培瓶，加入 40 ~ 50 mL 液体 LB，吸取 2 mL 培养好的农杆菌菌液，调整初始菌液 OD_{600} = 0.1，置于 28 ℃，200 r/min 的摇床上，振荡培养至 OD_{600} = 0.4、0.6、0.8，用于后续侵染实验。

1.3.4 愈伤组织的预培养

取生长周期为 3 ~ 4 周的、生长状态良好的‘京枣 39’愈伤组织，将愈伤切成 0.5 cm^3 的小块，置于预培养培养基(MS + 1 mg/L TDZ + 0.3 mg/L NAA)中黑暗培养，温度 24 ~ 26 ℃，预培养时间设置为 4 d、6 d、8 d。每个处理接种 30 个外植体，3 组重复。统计愈伤组织存活率。

1.3.5 外植体的侵染和共培养

将预培养 4 d 后的愈伤组织分别置于 OD_{600} = 0.4、0.6、0.8 的农杆菌菌液中进行侵染，菌液中加入 100 μmol/L 乙酰丁香酮(AS)，侵染时间为 20 min，转入共培养培养基(MS + 1 mg/L TDZ + 0.3 mg/L NAA)4 d 后，将叶片转移至筛选分化培养基上进行筛选培养。每个浓度接种 30 块愈伤外植体，3 组重复，统计愈伤组织转化率。

将预培养 4 d 后的愈伤组织置于 OD_{600} 值为 0.6 的农杆菌菌液中进行侵染，分别在菌液中加入 0 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L AS，侵染时间为 20 min，共培养 4 d 后将叶片转移至筛选分化培养基上进行筛选培养，每个处理接种 30 块愈伤外植体，3 组重复，统计愈伤组织转化率。

将预培养 4 d 后的外植体材料置于 OD_{600} 值为 0.6 的农杆菌菌液中进行侵染，菌液中加入 100 μmol/L AS，侵染时间为 10、20、30 min。侵染完成后用灭菌水对愈伤进行清洗，共培养 4 d 后将叶片转移至筛选分化培养基上进行筛选培养，每个处理接种 30 块愈伤外植体，3 组重复，统计愈伤组织转化率。将预培养 4 d 后的外植体材料置于 OD_{600} 值为 0.6 的农杆菌菌液中进行侵染，菌液中加入 100 μmol/L AS，侵染时间为 20 min，分别共培养 2、4、6 d 后，将叶片转移到筛选分化培养基上进行筛选培养。每个处理接种 30 个外植体，3 组重复，统计愈伤组织转化率。

1.3.6 转化愈伤组织的鉴定

用 365 nm 的紫外灯照射愈伤组织，呈现绿色荧光表示转化成功，呈现红光或者蓝光表示未转化成功。

将生长状态良好的转化成功的‘京枣 39’愈伤组织 45 ℃ 下烘干 2 h，研磨成粉末状后，使用天根生化科技公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP305)提取‘京枣 39’愈伤组织的总 DNA，进行 PCR 扩增，扩增片段大小为 230 bp 左右，正向引物为载体 35S 启动子序列末端区域 20 bp(5′-GACGCACAATCCCACTATCC-3′)，反向引物为 eYGFPuv 序列前段区域 19 bp(5′-TGCCGTGGATCCGGGACTC-3′)。扩增体系为：PCR Mix 20 μL、DNA 1 μL、上游和下游引物各 1 μL、dd H_2O 7 μL、Mix 酶 10 μL。PCR 扩增条件如下：预变性 95 ℃ 5 min；变性 94 ℃ 30 s，退火 59 ℃ 30 s，延伸 72 ℃ 40 s，循环数为 35；72 ℃ 10 min，4 ℃ 保存。反应结束后，用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测，用紫外凝胶成像仪进行拍照。

1.4 数据统计与分析

数据均采用 Excel 2016 进行记录处理。通过 SPSS 22.0 软件利用单因素 ANOVA 检验($P < 0.05$，Duncan's test)进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 卡那霉素质量浓度临界值的确定

图 2 显示：培养基中不含 Kana 时，野生型愈伤组织存活率可达到 100%；含 Kana 10 mg/L 时，野生型愈伤组织存活率较高；含 Kana 20 mg/L 时，野生

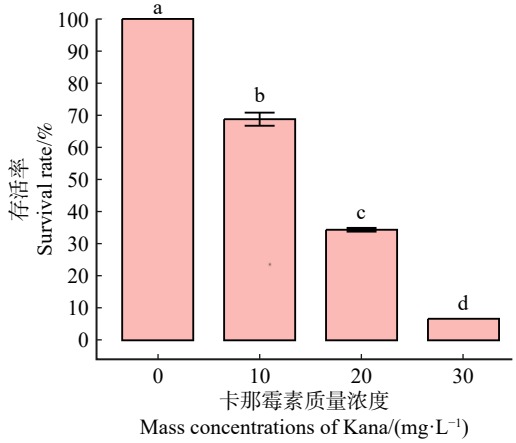


图 2 不同质量浓度 Kana 对‘京枣 39’愈伤组织存活率的影响

Fig. 2 Effects of different mass concentrations of Kana on survival rate of ‘Jingzao 39’ callus

型愈伤组织开始死亡;在质量浓度为 30 mg/L 时,野生型愈伤组织大部分死亡。故在 Kana 10 mg/L 时,基本可抑制愈伤组织的生长和增殖,同时外植体存活率较高,因此以 10 mg/L Kana 作为转基因‘京枣 39’愈伤组织的筛选质量浓度。

2.2　最佳预培养时间的确定

方差分析结果(图 3a)显示:预培养 4、6、8 d 对应的转化率没有显著差异。综合试验时间长短考虑,选择最短时间(4 d)为最佳预培养时间。

2.3　农杆菌液浓度及侵染时间的确定

农杆菌菌液浓度和侵染时间是转化体系中影响转化率的重要因素。对平均转化率进行方差分析,发现农杆菌 OD_{600} 的不同取值、不同侵染时间对转化率影响存在差异。其中,OD_{600} 为 0.6 时,转化率显著高于 0.4 和 0.8(图 3b)。在侵染时间对转化率的影响研究中发现,侵染 20 min 效果转化率最高,显著高于侵染 10 min 和 30 min,而侵染 10 min 和 30 min 之间差异不显著(图 3c)。选择农杆菌菌液浓度 OD_{600} 为 0.6 和侵染时间为 20 min 为优化条件。

2.4　乙酰丁香酮浓度的确定

乙酰丁香酮(AS)对农杆菌 Vir 区基因的活化具有重要作用,Vir 区基因的活化直接通过调控 T−DNA 的转移来提高农杆菌对植物的转化率,而 T−DNA 的转移发生在共培养时期。在共培养时,在培养基中添加 AS,愈伤组织转化率提高,当 AS 的浓度为 100 μmol/L 时,其转化率最高为 32%,显著高于 200 μmol/L 的转化率,因而选择 AS 100 μmol/L 为优化的浓度(图 3d)。

2.5　共培养时间的确定

合适的共培养时间对转化率有很大的影响。共培养 4 d 时愈伤组织的平均转化率最高,显著高于 2 d 和 6 d 共培养时间下的转化率,故共培养时间 4 d 确认为最优的共培养条件(图 3e)。

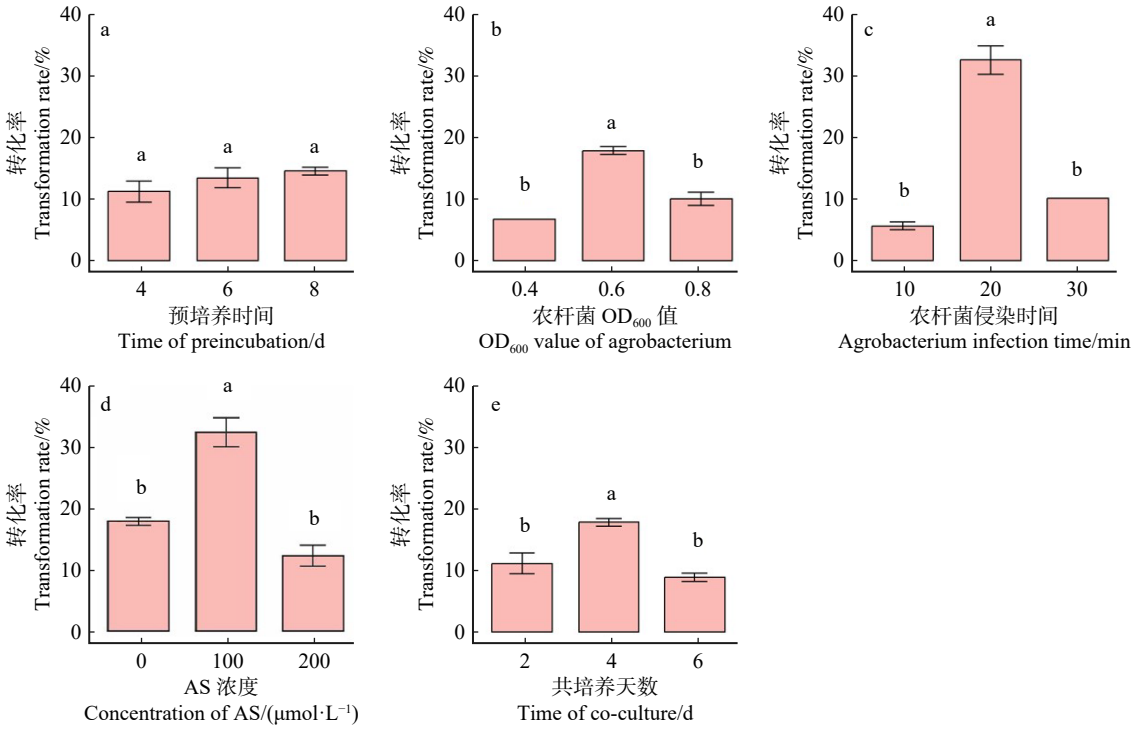
2.6　转化植株的鉴定

2.6.1　转化植株紫外灯照射荧光检测

在正常光下,肉眼无法识别野生型愈伤组织(图 4a)和转基因愈伤组织(图 4d);在 365 nm 紫外光下,未转化成功的野生型愈伤叶绿素含量高的区域呈现红色,叶绿素含量低的区域呈现蓝色(图 4b、c),转化成功的愈伤组织呈现荧光绿色(图 4e、f)。

2.6.2　转化植株 PCR 检测

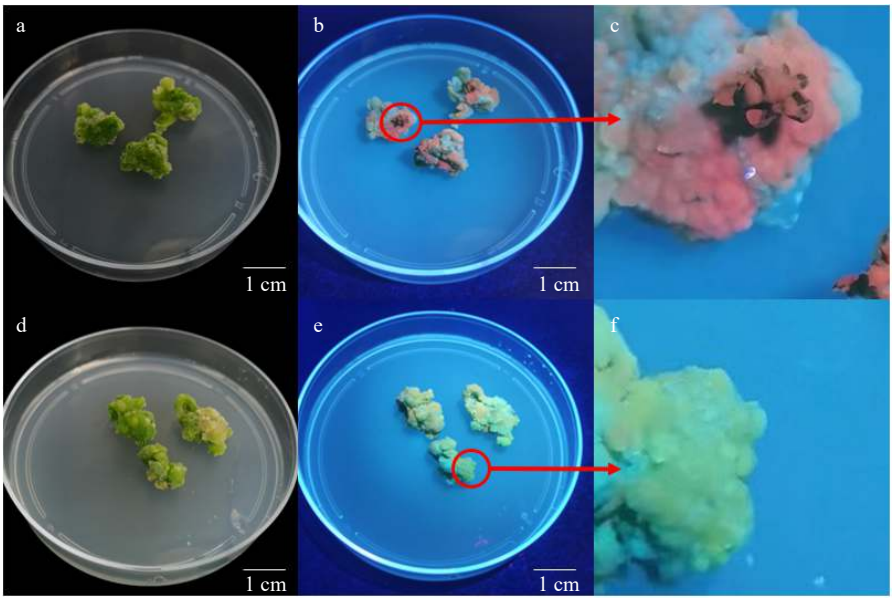
本研究共试验处理 1 080 块愈伤组织,得到 230 块呈绿色荧光的愈伤组织。抽取 7 个绿色荧光的愈伤组织,提取其 DNA 作为模板,以农杆菌质粒作为阳性对照,水为空白对照,以未进行遗传转化的‘京枣 39’愈伤的 DNA 为阴性对照,进行 PCR 扩增。图 5 显示:转化植株(4 ~ 10)DNA 扩增出与目的基因(230 bp)大小一致的条带,证明 *eYGFPuv* 已经整合到‘京枣 39’愈伤组织基因组中。



不同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

图 3　不同因素对转化率的影响

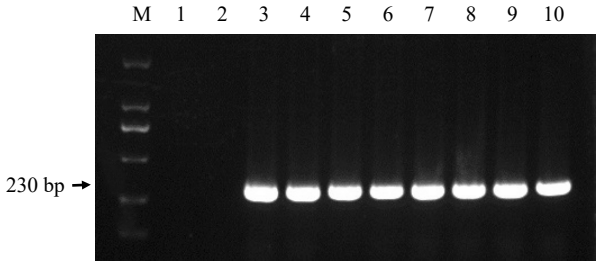
Fig. 3　Effects of different factors on transformation rate



a ~ c.野生型‘京枣 39’愈伤；d ~ f.转化成功的‘京枣 39’愈伤。a−c, wild type ‘Jingzao 39’ callus; d−f, successfully transformed ‘Jingzao 39’ callus.

图 4 部分转 *eYGFPuv* 基因愈伤组织紫外灯检测结果

Fig. 4 Results of UV lamp detection of partial callus transfected with *eYGFPuv* gene



M 为 Marker dl 2000；1 为野生型的‘京枣 39’愈伤组织 DNA，为阴性对照；2 为水，为空白对照；3 为质粒菌液，为阳性对照；4 ~ 10 为呈现荧光的‘京枣 39’愈伤组织。M is Marker dl 2000; 1 is wild type ‘Jingzao 39’ callus DNA, which is negative control; 2 is water, which is blank control; 3 is plasmid bacterial liquid, which is positive control; 4−10 are the DNA of ‘Jingzao 39’ callus confirmed with green fluorescent.

图 5 呈现绿色荧光的愈伤组织 PCR 检测结果

Fig. 5 PCR detection results of callus showing green fluorescent

3 讨 论

本研究用‘京枣 39’愈伤组织作外植体，与农杆菌共培养，研究了转化过程中影响转化的各种因素，得到了适合‘京枣 39’愈伤组织遗传转化的条件，初步实现了农杆菌介导的‘京枣 39’愈伤组织遗传转化，平均转化率达 21.2%，约是以前报道的木枣（*Z. jujuba* ‘Muzao’）[15]和骏枣（*Z. jujube* ‘JunZao’）[16]愈伤转化率的 2.1 倍和 3.4 倍。转基因植株通常采用 PCR 扩增检测鉴定，尚秉众等[17]侵染木枣叶块 600 片，放入暗箱进行暗培养 3 d，再移到光下进行培养；4 周后分化出愈伤组织及逐渐分化成苗后进行 PCR 鉴定，共耗时 6 周方可进行阳性鉴定，本研究引入了含有报告基因 *eYGFPuv* 的改良载体，可在愈伤阶段进行 PCR 鉴定，实现了阳性植株的早期筛选，缩短了试验时间。

在遗传转化过程中，合适的选择压可以抑制未转化成功的植物生长，同时利于转化成功的植物生长与发育；过高浓度的筛选抗生素导致植物细胞的损伤，浓度过低则无法有效的筛选转化细胞[18]，故遗传转化体系构建中选择压的确定需根据具体情况而定。刘闵豪等[19]在杜仲（*Eucommia ulmoides*）叶片愈伤组织的遗传转化体系构建中发现，卡那霉素质量浓度为 70 mg/L 时，能够导致不含 Kana 抗性的野生型愈伤组织死亡，从而筛选出有 Kana 抗性的抗性愈伤组织。武小娟等[20]以紫色马铃薯（*Solanum tuberosum*）‘华颂 66 号’无菌组培苗茎段为外植体，得到植株再生及生根的抗生素最适筛选 Kana 质量浓度为 75 mg/L。

植物愈伤组织诱导材料来源广、增殖快，是离体培养和生物技术研究的良好材料，但受农杆菌浓度、侵染时间和共培养时间等因素影响，愈伤组织转化率较低[18]。本研究表明，当农杆菌菌液浓度高且愈伤组织侵染时间较长时，接触农杆菌面积大，导致愈伤褐化甚至死亡，未感染农杆菌的愈伤生长停滞。感染活性高的菌株处于对数生长期时，菌液 OD_{600} 在 0.3 ~ 0.8 之间；如以甜橙（*Citrus sinensis*）愈伤组织为受体进行遗传转化，侵染时间为 15 ~ 20 min，农杆菌菌液 OD_{600} 为 0.8 时，其遗传转化率最高；当农杆菌 OD_{600} 为 1.2 时，约 50% 的外植体感染了农杆菌后褐化死亡，这可能与高浓度的农杆菌对愈伤的毒害作用有关[21]，与本实验结果一致。

GFP 在紫外线下呈现绿色荧光，因此可以作为筛选转基因植物的体内标记物，目前被广泛应用于细胞生物学[22]。本研究表明，用紫外光照射转基因愈伤组织，愈伤组织激发绿色荧光，照射野生型愈伤则呈现红光或者蓝光，这与前人研究一致。eYGFPuv 在紫外线下表现出自发的绿色荧光，且 eYGFPuv 的绿色荧光在 365 nm 的不可见区域明显盖过叶绿体的天然红色荧光，并且没有表现出叠加的黄色[13]，这也在转化成功的矮牵牛（*Petunia*）中观察到[22]。Fan 等[23]研究发现，eYGFPuv 蛋白在两种草本植物和两种木本植物中也表现出明亮的绿色荧光。此外，他们还发现 eYGFPuv 蛋白在 365 nm 紫外光下呈现的绿色荧光在很长一段时间内保持稳定、不降解，并且对植物的生长发育没有不利影响。eYGFPuv 蛋白的荧光可以在活体植物中直接观察到，因此可以作为转基因研究中筛选转化系的标记。

本研究使用表达载体 pYBA-1132-eYGFPuv 空载进行遗传转化体系的探索，最高转化率达 32%，但空载转化率与携带不同目的基因的载体转化率可能会存在差异，因此，后续可以根据携带不同基因的材料进行遗传转化体系的优化。本研究通过对预培养时间、农杆菌浓度、AS 浓度、侵染时间和共培养时间等影响枣愈伤组织遗传转化的因素进行探索，建立了一个较为完善的‘京枣 39’愈伤组织遗传转化体系，同时也为阳性植株的早期筛选提供了新的方法。

参　考　文　献

［1］ 郭烨, 崔艳红, 孔德仓, 等. 茶壶枣离体多倍体诱导关键技术研究 [J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(7): 49−56.
Guo Y, Cui Y H, Kong D C, et al. Study on the key techniques of polyploid induction in vitro of Chinese jujube[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2019, 41(7): 49−56.

［2］ 祁业凤, 刘孟军. 两个胚败育率不同的枣品种果实生育期内源激素的变化 [J]. 园艺学报, 2004, 33(6): 800−802.
Qi Y F, Liu M J. Changes of endogenous hormones in fruit growth period of two jujube varieties with different embryo abortion rates[J]. Acta Horticulture Sinica, 2004, 33(6): 800−802.

［3］ 潘依玲, 鲍荆凯, 吴翠云, 等. 雄性不育枣‘JMS2’ × ‘交城 5 号’杂交 F1 代花性状遗传变异分析 [J]. 西北农业学报, 2023, 32(12): 1913−1921.
Pan Y L, Bao J K, Wu C Y, et al. Analysis on genetic variation of flower characters of F1 generation of male sterile jujube ‘JMS2’ × ‘Jiaocheng 5’[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2023, 32(12): 1913−1921.

［4］ 周义杰, 姜梦嫣, 闫希焕, 等. 枣树遗传转化研究进展 [J]. 北京农学院学报, 2019, 34(1): 107−112.
Zhou Y J, Jiang M Y, Yan X H, et al. Research progress of genetic transformation of Jujube[J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2019, 34(1): 107−112.

［5］ 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 gene system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in jujube leaves[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(20): 6710−6717.

［6］ 何业华, 林良斌, 熊兴华, 等. 根癌农杆菌介导的枣树遗传转化系统的建立 [J]. 分子植物育种, 2003, 1(5/6): 683−686.
He Y H, Lin L B, Xiong X H, et al. Establishment of genetic transformation system of jujube tree mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1(5/6): 683−686.

［7］ Gu X F, Meng H, Qi G, et al. Agrobacterium-mediated transformation of the winter jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.)[J]. Plant Cell, Tissue & Organ Culture, 2008, 94(1): 23−32.

［8］ 李亚梅, 马福利, 张山奇, 等. 酸枣愈伤组织转化体系构建及在 *ZjBRC*1 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. Construction of callus transformation system of jujube acid and its application in regulation of ZjYUCCA expression by *ZjBRC*1[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 49(4): 749−757.

［9］ 潘青华, 白金, 王保强. 枣鲜食优质新品种‘京枣 39’[J]. 中国果树, 2003(4): 3−4.
Pan Q H, Bai J, Wang B Q. New high quality jujube variety ‘Jingzao 39’[J]. China Fruits, 2003(4): 3−4.

［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 efficient regeneration system of ‘Jingzao 39’ leaves in vitro[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2023, 45(2): 68−77.

［11］ Tong P, Liao G, Lu D, et al. *ZjHXK*5 and *ZjHXK*6 negatively regulate the sugar metabolism of *Ziziphus jujuba* Mill.[J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1335120.

［12］ 杨静, 曹海峰. 转基因农作物检测相关问题解析 [J]. 科学技术创新, 2019(2): 141−142.
Yang J, Cao H F. Analysis of problems related to GMO crop detection[J]. Science and Technology Innovation, 2019(2): 141−142.

［13］ Shimizu A, Shiratori I, horii K, et al. Molecular evolution of versatile derivatives from a GFP-like protein in the marine copepod *Chiridius poppei*[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181186.

［14］ Yuan G, Lu H, Tang D, et al. Expanding the application of a UV-visible reporter for transient gene expression and stable transformation in plants[J]. Horticulture Research, 2021, 8(1): 234.

［15］ 魏薇. 枣外源小麦磷转运蛋白基因 (*TaPT*2) 遗传转化研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2013.
Wei W. Study on genetic transformation of exogenous phosphorus transporter gene (*TaPT*2) in jujube [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2013.

［16］ 冯晓东, 陈国梁, 乔璟, 等. 根癌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 genetic transformation system of jujube callus mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Yan'an University (Natural Science Edition), 2014, 33(1): 54−57.

[17] 尚秉众, 田瑞康, 雒淑婷, 等. 狗头枣 *ACOI* 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 genetic transformation of RNAi expression vector of *ACOI* gene in gosehead jujube[J]. Journal of Yan'an University (Natural Science Edition), 2023, 42(4): 55−60.

[18] 陈兰, 朱晨, 李小桢, 等. 茶树遗传转化体系研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2019, 47(12): 14−18.
Chen L, Zhu C, Li X Z, et al. Research progress of genetic transformation system of tea plant[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(12): 14−18.

[19] 刘闵豪, 徐郡儡, 叶靖, 等. 农杆菌介导的杜仲叶片愈伤组织遗传转化体系 [J]. 林业科学, 2019, 56(2): 79−88.
Liu M H, Xu J L, Ye J, et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation system of *Eucommia ulmoides* leaf callus[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2019, 56(2): 79−88.

[20] 武小娟, 吴娟, 王沛捷, 等. 马铃薯'华颂 66 号'遗传转化体系的建立 [J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(1): 21−30.
Wu X J, Wu J, Wang P J, et al. Establishment of genetic transformation system of potato 'Huasong 66'[J]. Journal of China Agricultural University, 2024, 29(1): 21−30.

[21] 陈传武. 根癌农杆菌介导 *MdSPDS*1 和 *HAL*2 基因转化柑橘的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
Chen C W. Study on transformation of *MdSPDS*1 and *HAL*2 genes in citrus mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006.

[22] Dong P C, Ikuo S, Akihisa S, et al. Generation of brilliant green fluorescent petunia plants by using a new and potent fluorescent protein transgene[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 16556.

[23] Fan S, Deng L, Yang H, et al. Synthesis and characteristic of a novel green fluorescent protein eYGFPuv[J]. Oil Crop Science, 2019, 4(2): 10.

（责任编辑 赵田芸
责任编委 康向阳）