

根癌农杆菌介导苹果遗传转化研究进展*

秦玲^{1,2}, 李明^{1*}, 王永熙², 韩礼星¹, 黄贞光¹, 赵改荣¹

(1 中国农业科学院 郑州果树研究所, 河南 郑州 450009; 2 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 论述和分析了影响苹果高效离体再生的主要因素, 包括试验材料苹果的基因型、外植体生理状态、培养基类型、植物激素、 $AgNO_3$ 、前期暗培养、抗生素等内外因子, 以及影响根癌农杆菌介导苹果遗传转化的主要因素, 包括苹果基因型、外植体生理状态、菌株类型、菌液浓度、活化物质的应用、共培养、预培养、选择培养、培养基成分等内外因子。并对其研究现状、存在的问题及应用前景作了简要概述。

[关键词] 苹果; 根癌农杆菌; 遗传转化; 影响因子

[中图分类号] S 661.103.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)04-0135-06

自从 James 等^[1]首次报道获得苹果转基因植株以来, 在苹果 (*Malus pumila* Mill.) 上利用根癌农杆菌介导法进行遗传转化研究的发展极为迅速。与其他植物遗传转化方法相比, 根癌农杆菌介导法具有转化频率高、操作简单、成本低、发生基因沉默率低、导入 DNA 片段较大等优点^[2]。而且, 苹果试管苗幼嫩叶片或茎段取材容易, 易于离体再生, 可将再生不定芽转化为单细胞起源纯合体等^[3]。因此, 利用根癌农杆菌介导法进行遗传转化, 已经成为苹果最为重要的一种遗传转化方法。目前有关苹果品种及其砧木的遗传转化研究报道已有很多, 但是他们面临一个共同问题——基因转化频率极低。这主要是由于缺乏对影响离体再生频率和基因转化频率内外因子的彻底认识^[3~5]。笔者主要从影响苹果高效离体再生和遗传转化的内外因子等方面, 论述当前根癌农杆菌介导苹果遗传转化的研究进展。

1 高效离体再生系统的影响因素

高效离体再生技术是苹果遗传转化研究中的重点内容, 遗传转化的成功首先依赖于良好的高效离体再生系统的建立^[2]。目前, 利用苹果茎段、叶片、叶柄、根段、子叶等外植体均离体培养获得了再生植株^[3,4]。在根癌农杆菌介导的遗传转化体系中, 主要是用试管苗幼嫩叶片作为基因转化的受体材料。另外, 也有用白化茎段作为受体材料获得转基因植株的报道^[5]。苹果试管苗幼嫩叶片有多种离体再生途

径, 但在根癌农杆菌介导的遗传转化研究中, 以研究利用离体叶片直接再生不定芽的途径为多^[3]。影响离体叶片再生不定芽的各类因素可大致归为内因和外因两个方面, 内因主要包括转化试验材料的基因型和外植体的生理状态; 外因主要包括再生培养基中各种化学物质成分及培养环境和条件等。

1.1 内因

1.1.1 基因型 苹果栽培品种及其砧木再生能力的大小首先取决于试材基因型, 不同基因型品种的离体叶片再生能力差异很大^[6~11]。倍性较高的三倍体和四倍体基因型品种要比二倍体品种更容易再生不定芽, 这可能与多倍体基因型品种新陈代谢旺盛、酶活性强有关^[10]。孙清荣等^[11]发现, 相同倍性的三倍体品种之间, 离体叶片再生能力差异不大; 而对二倍体品种来说, 不同基因型品种之间离体叶片再生能力差异很大, 基因型不同是影响不定芽再生的主要因素之一。

1.1.2 外植体生理状态

(1) 叶片熟性 试管苗的叶片熟性对其离体再生不定芽能力的影响很大^[12~16]。叶片熟性与试验材料继代培养时间、叶片位置及其大小等有关^[8,13~16]。试材基因型不同, 最佳成熟期则不同^[12]。一般认为, 28~35 d 日龄的试管苗幼嫩叶片再生频率最高, 单叶片平均出芽数也最多; 同时, 顶部平展并正在扩展的幼嫩叶片较下部老叶更易再生不定芽。另外, 叶片的大小对再生的影响也因基因型不同而存在差

* [收稿日期] 2002-01-29

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39970522)

[作者简介] 秦玲(1974-), 女, 山西高平人, 在读硕士, 主要从事苹果遗传转化方面的研究。

* 通讯作者(E-mail: kwifui@public2.zz.ha.cn)

异^[15]。Yepes等^[9]认为,自由叶片长度在1.6~2.01 cm、旭和M26在1.1~1.5 cm更易再生不定芽,对维管束尚未形成的幼小叶片,通过增加BA含量,再生频率也能够提高,但小叶易形成过多的愈伤组织对再生不利。

(2) 叶片极性 叶片极性对再生不定芽的影响是一个复杂的问题,可能与激素的运输和组织的熟性有关^[17]。叶片的极性反映在从叶尖到叶基(靠近叶柄一端)叶片再生能力逐渐增加,即靠近叶基部位的叶块要比靠近叶尖部位的叶块更易再生不定芽,并且每个叶块再生不定芽数也更多^[8,18]。这种极性的影响可能和叶片基部聚集过多的维管束有关。叶片在培养基上放置的方向对再生也有一定的影响,一般认为,近轴面接触培养基(叶背面向上)再生频率高^[8,9,19~21]。这可能是由于叶片正面的栅栏组织对培养基中的营养物质更敏感,而且它们也是叶片最后停止生长和分化的组织^[9]。另外,也有人认为可能是由于叶背面向上,增加了氧气的交流,使叶片更容易从培养基中吸收营养,从而提高了叶片的再生效率^[8]。

(3) 继代培养基中激素配比与黄化处理 继代培养基中低质量浓度的细胞分裂素及低的细胞分裂素/生长素,对叶片再生不定芽有一定的促进作用。试验表明^[22],继代培养基中BA质量浓度降低到0~0.2 mg/L,可以提高叶片的再生效率。另外,暗培养黄化处理试管苗也能提高叶片的再生频率^[22]。研究发现^[22],继代培养基中使用高质量浓度生长素或用低质量浓度生长素在黑暗条件下培养一段时间均可促进叶片再生,这可能是因为黑暗培养增加了生长素质量浓度。

1.2 外 因

1.2.1 培养基类型 在苹果离体叶片再生不定芽的研究中,再生培养基大部分采用的是MS培养基,低盐(1/4MS, 1/2MS)培养基不利于叶片再生^[13,15,23]。Fasolo等^[13]认为,矿物质特别是 K^+ , NO_3^- , NH_4^+ 的浓度对叶片再生影响很大; N_6 培养基低氮、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ,高 K^+ ,并具有较高的 NO_3^-/NH_4^+ ,被认为是适宜的诱导培养基。也有人认为^[15],用 N_6 的大量元素代替MS的大量元素也能促进叶片离体再生^[15]。

1.2.2 植物激素种类及浓度 再生培养基中,植物激素的种类和浓度是影响苹果离体叶片再生最主要的因素之一,细胞分裂素和生长素对苹果离体叶片的再生是必需的^[6,7,9,13,18,24~27]。细胞分裂素常用BA

和TDZ(thidiazuron),生长素常用NAA和BA。使用人工合成的生长素BOA(1,2-benzisoxazole-3-acetic acid)也能够促进叶片再生,其活性取决于试材基因型,当试材对NAA不敏感时,可考虑用BOA来促进叶片分化不定芽^[17]。BA常用质量浓度为2.0~10.0 mg/L,不同基因型品种所用最适浓度不同。与BA相比,TDZ是一种具有更高生理活性的细胞分裂素,促进再生的效果比BA要高出许多,尤其对较难再生的基因型品种,效果更为明显^[7,16,21,27]。

1.2.3 $AgNO_3$ $AgNO_3$ 作为一种乙烯抑制剂,加入再生培养基中能够显著促进离体叶片再生不定芽。这可能与密闭容器内产生过多乙烯,不利于器官分化有关。陈喜文等^[27]发现,1 μ mol/L的 $AgNO_3$ 可显著降低嘎拉苹果离体叶片再生培养容器中的乙烯浓度,降低乙烯对不定芽分化的抑制作用,而促进不定芽的形成。

1.2.4 前期暗处理 苹果离体叶片再生培养过程中,前期暗处理可以显著提高叶片再生频率,以暗培养2~3周为佳^[7,8,13,14,28~30]。而前期光照处理则明显抑制叶片再生。前期暗处理的叶片再生率是光照处理的2倍^[13]。这可能是因为红光抑制不定芽形成,远红光促进不定芽形成,而白炽灯发出的红光要比远红光多,直接在光照下培养,不定芽的形成受到红光抑制,导致再生频率大大降低^[14]。

1.2.5 抗生素 在植物遗传转化研究中,常使用Cef(cefotaxime, 头孢霉素)或Carb(carbenicillin, 羧苄青霉素)来除菌。在苹果再生研究中发现^[9,20],在一定浓度范围内,Cef促进不定芽分化,而Carb刺激愈伤组织增殖。

1.2.6 其 他 (1)碳源:再生培养基中糖的种类和质量浓度对再生有很大影响^[20,21]。30 mg/L的蔗糖再生效率最好,使用白砂糖、葡萄糖、苏梨糖效果都不好,再生频率均降低。(2)固化物:在苹果离体叶片再生试验中,再生培养基常用5~7 g/L琼脂(Agar)来固化。Welandar等^[18]证明,用脱乙酰吉兰糖胶(Gelrite)固化能显著促进离体叶片再生不定芽,但是用Gelrite很容易出现玻璃化现象。(3)叶片切割:在苹果离体叶片再生研究中,叶片切割对再生也有很大影响,因为不定芽多从切割部位再生^[6,8,13]。常采用将叶片切割成叶块状或在叶中脉横切数刀进行研究。

2 高效遗传转化系统的影响因素

目前,影响苹果品种及其砧木遗传转化因素的

报道已有很多。下面主要从内外因两个方面介绍近年来这方面的研究情况。

2.1 内因

2.1.1 基因型 苹果遗传转化成功与否,在很大程度上取决于试验材料的基因型。据国内外报道,农杆菌介导获得苹果转基因植株的基因型品种主要有绿袖^[1, 31~33]、元帅^[34~36]、皇家嘎拉^[36~38]、嘎拉^[38~40]、金冠^[39~41]、澳洲青苹^[42]以及砧木M26^[43~46]、M7^[47]等。苹果基因转化频率与再生效率之间有极大的联系,通常是再生效率越高,转化频率也越高,这是转化效率依赖于试材基因型的主要原因。

2.1.2 外植体生理状态 在苹果遗传转化研究中,一般取30 d日龄试管苗的顶部2~3片平展、幼嫩、正在扩展的叶片进行接种转化。Dandekar等^[31]取靠近顶端部位的2~3片平展、幼嫩、正在扩展的叶片为试材,转化效率最高。Bondt等^[48]研究认为,必须用继代培养20~40 d日龄的试管苗幼嫩叶片进行转化,才能获得最高的再生和转化效率。

2.1.3 菌株类型 农杆菌的浸染能力与转化效率有直接联系,也是影响遗传转化成功与否的主要因素之一。不同植物体对农杆菌浸染的敏感性不同,而不同农杆菌对植物体的浸染能力也不同,农杆菌与植物体之间是否有高浸染力的配合,直接影响到转化效率的高低^[2]。目前,在苹果上应用的农杆菌菌株类型主要有章鱼碱型的LBA 4404^[1, 37, 49~52],琥珀碱型A281^[31, 43], EHA 101^[33, 40]和EHA 105^[5, 37, 38, 53~56],胭脂碱型C58^[31, 37, 42, 46, 49]和pGV类^[34, 35, 42, 57, 58]。早期检测*gus*基因瞬时表达,以GU^{S+}抗性愈伤组织诱导率为评价指标,发现EHA 101菌株的转化效率约是LBA 4404或C58的10倍多^[37],EHA 105约是LBA 4404的8倍^[4]。所以,选用浸染能力强的农杆菌菌株类型有利于进行苹果遗传转化研究。

2.2 外因

2.2.1 菌液浓度及外植体在菌液中的浸泡时间 掌握合适的菌液接种浓度及外植体在菌液中浸泡的时间,有助于提高转化效率并兼顾到以后的除菌。菌液浓度太低或浸泡时间太短,接种到伤口面的农杆菌数量太少,在共培养时转化效率低;菌液浓度过高或浸泡时间过长,常导致农杆菌繁殖过度,对植物材料造成毒害作用,降低转化效率。苹果对农杆菌较为敏感,在转化过程中常用菌液浓度OD₆₀₀为0.04~0.60^[31~55],浸泡时间多在4~6 min^[1, 32~39, 51~54]。

2.2.2 Vir区活化物质的使用 Vir区基因的活化直接调控着T-DNA的转移,是农杆菌基因转化的

开关。苹果遗传转化研究中常用的Vir区基因活化诱导物质是酚类化合物乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)。James等^[32]发现,在农杆菌介导转化绿袖苹果时,与AS同时加入诱导稳定剂甜菜碱或脯氨酸,对Vir区基因活化有协同作用。

2.2.3 共培养时间、叶片放置方向及切割方式 外植体与农杆菌接种后的共培养,在整个转化过程中是一个非常重要的环节,农杆菌的附着及T-DNA的切割、转移和整合都在共培养期间内完成。所以,共培养技术条件的掌握是成功转化的关键因素之一^[2]。

共培养时间对转化效率有很大影响,不同转化材料或不同菌株类型所需的最佳共培养时间不同。共培养时间过短,农杆菌尚未附着,T-DNA还没有充分切割、转移和整合;时间过长,植物细胞易受毒害,后继培养时难以除菌,农杆菌容易过度生长。利用早期检测*gus*基因瞬时表达,在苹果上确定最佳共培养时间在2~4 d,具体长短依品种基因型和菌液浓度等而定^[2]。

关于共培养时叶片放置方向,文献报道不一。一般认为,叶背面(远轴面)接触培养基有利于基因转化,但也有人得出相反的结论。张志宏等^[55]认为,共培养时叶背面接触培养基效果较好,目测GU^{S+}叶片频率两者相差1.5倍,GU^{S+}抗性愈伤组织诱导率相差2.5倍。

关于叶片切割方式,James等^[1]首次用叶盘转化获得转基因植株,后来也有用叶块^[37, 47]、整叶划痕^[48]及压点痕^[38]获得较高转化效率的报道。

2.2.4 预培养、脱菌培养和选择培养 (1)预培养:指外植体在接种转化前离体培养一段时间。预培养有利于提高外源基因的瞬时表达和转化频率,但也有相反的结果。苹果叶片转化前预培养6 d, GU^{S+}瞬时表达率最高,但却没有获得GU^{S+}抗性愈伤组织,瞬时表达频率与稳定遗传转化频率之间并不呈平行关系^[48]。(2)脱菌培养:结束共培养的外植体表面及浅层组织中,存在大量农杆菌,为了后继培养研究必须进行脱菌培养,通常在培养基中加入某些抗生素来除菌。苹果上常用的抗生素有Cef和Carb,这两种抗生素对农杆菌都有杀伤和抑菌作用,同时对植物细胞也有一定的生物效应。苹果再生试验已证明^[9, 20, 40],在一定浓度范围内Cef促进不定芽的分化,Carb促进愈伤组织的形成,抑制不定芽的分化。所以,转化时可用Cef来抑制农杆菌的生长,浓度一般在500 mg/L左右。也有和Carb混用达到较好抑

菌效果的报道^[5]。(3)选择培养:转化植物细胞和非转化细胞之间存在着生长竞争,转化细胞由于数目少,在竞争中常处于劣势,必须进行选择。在苹果遗传转化中,常用的选择标记基因是 *np t II*,它编码合成的新霉素磷酸转移酶,对卡那霉素、新霉素、G418 等氨基糖苷类抗生素均具有抗性^[32~54]。由于苹果对卡那霉素极为敏感,故选择压一般在 5~25 mg/L。试验表明^[46,48],使用新霉素或潮霉素要比卡那霉素或 G418 更有利于选择转化植物细胞。关于苹果的选择培养方式,常采用立即选择或延迟选择两种。前者是指共培养结束后就转入加有选择压的培养基上进行选择培养;后者是指共培养结束后,先转到只含有脱菌抗生素的培养基上培养一段时间,再转入加有选择压的培养基上进行选择培养。由于苹果对卡那霉素极为敏感,研究中多采用后者进行选择培养。Yao 等^[51,52]在皇家嘎拉苹果上研究发现,延迟选择 2 d,转化频率达到 4.6%,获得极好的转化效果。

2.2.5 培养基成分 获得高再生率的培养基不一定适用于获得高的基因转化频率。在转化时,应对培养基的某些组分作出一些相应的调整。

(1)碳源:碳源不仅影响组织再生,而且影响基因转化,在转化时常采用 30 g/L 的蔗糖作为碳源。Bondt 等^[37]用 20 g/L 的果糖、半乳糖、蔗糖、葡萄糖、山梨醇作为碳源研究,发现果糖和半乳糖对转化效率具有明显的抑制作用,蔗糖和葡萄糖能获得较高的转化频率,而山梨醇的效果则不及后两者好。

(2)固化物:许多试验使用 5~7 g/L 的琼脂固化培养基即可获得极好的再生效率。但在遗传转化中,用琼脂固化培养基,叶片有时容易腐烂褐化。用 2.5 g/L Gelrite 代替 7 g/L Agar 获得了较好的效果^[51]。Bolar 等^[54]用 5.2 g/L Agar+0.1 g/L Gelrite 或 3.5 g/L Agar+1.2 g/L Gelrite 做固化物,获得了较高的转化频率。Maheswaran 等^[43]在转化 M26 砧木时用 Gelrite 做固化物,转化频率高达

1%~4%。但 Sriskandarajah 等^[35]转化金冠时用琼脂做固化物,也获得 1%~2% 的转化频率。

(3)激素配比:共培养时,再生培养基用高浓度细胞分裂素要比用高浓度生长素转化效果好,测定 $GU S^+$ 转化位点数增加 3 倍多,这可能是由于高浓度细胞分裂素刺激细胞分裂,而有丝分裂的细胞对农杆菌更敏感^[55]。人工合成的细胞分裂素 TDZ 在诱导愈伤组织和不定芽分化时,要比用其他细胞分裂素如 ZT, BA, Zip 等更有效,但并不能提高苹果的转化频率^[48]。

(4)pH 的影响:用 EHA 101 转化嘎拉苹果时,接种的叶片在 pH 3.0 和高浓度的 Cef 培养基上放置短暂时间,有利于抑制农杆菌的过度生长,从而提高转化频率^[40]。

3 存在问题、应用前景及展望

在过去的十几年中,农杆菌介导的苹果遗传转化技术已取得了相当大的进展,转化过程中的各个环节已形成了相当成熟的技术流程,但也存在不少亟待解决的问题。

离体再生是一个与遗传转化效率密切相关,但至今还没有彻底解决的问题,许多苹果的基因型品种再生效率还很低,再生能力严重依赖于试材基因型。尽管国内外已有很多有关外源基因导入苹果主栽品种及砧木的报道,但遗传转化频率极低,而且缺乏系统的跟踪研究报告。另外,外源基因在转基因植株体内的沉默和丢失仍是一个普遍存在的现象,高效表达和稳定遗传尚不尽如人意。这些都将是今后需要重点研究解决的问题。

相信随着植物分子生物学和植物基因工程技术的迅速发展,这些问题的解决将指日可待。利用植物基因工程技术进行苹果品种的遗传改良,将具有广阔的发展前景。

[参考文献]

- [1] James D J, Passey A J, Derek D J, et al. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector[J]. Plant Cell Rep, 1989, 7: 658-661.
- [2] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 194-317.
- [3] 潘增光, 邓秀新. 苹果组织培养再生技术研究进展[J]. 果树科学, 1998, 15(3): 261-266.
- [4] James D J, Dandekar A M. Regeneration and transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991: 1-18.
- [5] Liu Q, Salih S, Hammerschlag F. Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus domestica* Borkh) shoots promotes high frequency shoot organogenesis and enhanced β -glucuronidase expression from stem internodes[J]. Plant Cell Rep, 1998, 18: 32-36.

- [6] James D J, Passey A J, Rugini E. Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissue cultured *in vitro* [J]. J Plant Physiol, 1988, 132: 148- 154
- [7] Korban S S, Oconnor P A, Elobeidy A. Effects of thidiazuron naphthaleneacetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves [J]. Hort Science, 1992, 67(3): 341- 349
- [8] Welander M. Plant regeneration from leaf and stem segment of shoots raised *in vitro* from mature apple trees [J]. J Plant Physiol, 1988, 132: 738- 744
- [9] Yepes L M, Aldwinckle H S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple and effect of antibiotics in morphogenesis [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1994, 37: 257- 269
- [10] 石荫坪, 李雅志, 王强生. 果树突变育种 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1986
- [11] 孙清荣, 孙洪雁, 刘庆忠, 等. 不同倍性苹果叶片植株再生研究 [J]. 落叶果树, 2000, (2): 9- 11
- [12] 赵政阳, 曹晓玲, 黄 英, 等. 叶片成熟度对苹果试管苗叶片再生植株的影响 [J]. 陕西农业科学, 1997, (1): 20- 21
- [13] Fasolo F, Zimmernan R H, Fordham I A. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1989, 16: 75- 87
- [14] Predieri S, Fasol F. High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M 26 (*Malus Pumila* Mill.) [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1989, 17: 133- 142
- [15] Sriskandarajah S, Skirvin R M, Abu-qaoud H, et al. Factors involved in shoot elongation and growth of adventitious and axillary shoots of three apple scion cultivars *in vitro* [J]. Hort Science, 1990, 65(2): 113- 121
- [16] Swartz H J, Bors R, Mohamed F, et al. The effect of *in vitro* pretreatment on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaf [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1990. 179- 184
- [17] Caboni E, Tonelli M G. Effect of 1, 2-benzisoxazole-3-acetic acid on adventitious shoot regeneration and *in vitro* rooting in apple [J]. Plant Cell Rep, 1999, 18: 985- 988
- [18] Welander M, Maheswaran G. Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple rootstocks [J]. Plant Physiol, 1992, 140: 223- 228
- [19] 赵政阳, 付润民, 税守歧, 等. 苹果试管苗叶片再生植株研究 [J]. 陕西农业科学, 1992, (6): 18- 19
- [20] 张志宏, 景士西, 王关林, 等. 苹果品种新乔纳金离体再生体系的建立 [J]. 农业生物技术学报, 1997, 5(3): 305- 306
- [21] 师校欣, 杜国强, 高 仪, 等. 苹果离体叶片高效再生不定芽技术研究 [J]. 果树科学, 1999, 16(4): 255- 258
- [22] Ferradini N, Farniani F, Proietti, et al. Influence of growth regulators and light on *in vitro* shoot regeneration in M 26 apple rootstock [J]. Hort Science, 1996, 71(6): 859- 865
- [23] 张军科, 沈 向, 曹庆芹, 等. 平邑甜茶叶盘组培再生研究初报 [J]. 西北农业大学学报, 2000, 28(4): 94- 97
- [24] Fasolo F, Predieri S. Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple [J]. Acta Hort, 1990, 280: 61- 68
- [25] Dufour M. Improving yield of adventitious shoots in apple [J]. Acta Hort, 1990, 280: 51- 60
- [26] 张志宏, 景士西, 王关林. TDZ 对苹果叶片离体再生不定芽的效应 [J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(6): 420- 423
- [27] 陈喜文, 范 晖, 袁立群, 等. AgNO₃ 对苹果叶片培养的影响及其与乙烯产生的关系 [J]. 核农学报, 1997, 11(1): 39- 44
- [28] Liu J R, Sink K C, Dennis F G. Plant regeneration from apple seedling explants and callus cultures [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1983, 2: 293- 304
- [29] Christel T H, Robert T H. Influence of TDZ and BA on adventitious shoots regeneration from apple leaves [J]. Acta Hort, 1990, 280: 195- 199
- [30] 吴禄平, 张志宏, 林丽华, 等. 苹果品种试管苗叶片再生不定芽 [J]. 沈阳农业大学学报, 1995, 26(2): 131- 135
- [31] Dandekar A M, Uratsu S L, Matsuta N. Factors influencing virulence in *Agrobacterium* mediated transformation of apple [J]. Acta Hort, 1990, 280: 483- 493
- [32] James D J, Uratsu S, Cheng J S, et al. A ceto-syringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium* mediated transformation of apple [J]. Plant Cell Rep, 1993, 12: 559- 563
- [33] 程家胜, Dandekar A M, Uratsu S L. 苹果基因转移技术研究初报 [J]. 园艺学报, 1992, 19(2): 101- 104
- [34] Sriskandarajah S, Goodwin P B, Speirs J. Genetic transformation of apple scion cultivar 'Delicious' via *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1994, 36: 317- 329
- [35] Sriskandarajah S, Goodwin P. Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1998, 53(1): 1- 11
- [36] Maximova S N, Dandekar A M, Guiltinan M J. Investigation of *Agrobacterium* mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting [J]. Plant Mol Biol, 1998, 37(3): 549- 559
- [37] Bondt A D, Eggemont K, Duart P, et al. *Agrobacterium* mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps [J]. Plant Cell Rep, 1994, 13: 587- 593
- [38] Norelli J, Mills J, Aldwinckle H. Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium* mediated transformation of apple [J]. Hort Science, 1996, 31(6): 1026- 1027
- [39] Schaart J G, Puite K J, Kolova L. Some methodological aspects of apple transformation by *Agrobacterium* [J]. Euphytica, 1995, 85: 131- 134

- [40] Hammerschlag F A, Zimmernan R H, Yadava U L, et al Effect of antibiotics and exposure to an acidified medium on the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from apple leaf explants and on shoot regeneration[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1997, 122(6): 758- 763
- [41] Puite K J, Schaart J G. Genetic modification of the commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elstar via a *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation method[J]. Plant Science, 1996, 119: 125- 133
- [42] Trifonova A, Savova D, Ivanova K, et al *Agrobacterium* mediated transformation of the apple cultivars Granny Smith [A]. Schmidt H, Kellerhals M. Progress in Temperate Fruit Breeding[C]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994 343- 347.
- [43] Maheswaran G, Welander M, Hutchinson J H, et al Transformation of apple rootstock M 26 with *Agrobacterium tumefaciens*[J]. J Plant Physiol, 1992, 139, 560- 568
- [44] Lambert C, Tepper D. Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones[J]. Theor Appl Gener, 1992, 85: 105- 109
- [45] Norelli J L, Herb S, Destefano B L. Transgenic 'Malling26' apple expressing the *attacinE* gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*[J]. Euphytica, 1994, 77: 123- 128
- [46] Norelli J L, Aldwin H S. The role of aminoglycoside antibiotics in the regeneration and selection of neomycin phosphotransferase⁺ transgenic apple tissue[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1995, 118(2): 311- 316
- [47] Welander M, Pawlicki N, Holefors A, et al Genetic transformation of the apple rootstock M 26 with the *rolB* gene and its influence on rooting[J]. J Plant Physiol, 1998, 153: 371- 380
- [48] Bondt A D, Eggenmont K, Penninckx I *Agrobacterium* mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plant [J]. Plant Cell Rep, 1996, 15: 549- 554
- [49] 程家胜, 田颖川, 孟秀美, 等 苏云金杆菌 δ 内毒素基因(*Bt*)导入苹果[J]. 西北农业学报, 1999, 8(1): 78- 81
- [50] 师校欣, 王 斌, 杜国强, 等 根癌农杆菌介导豇豆胰蛋白酶抑制剂基因转入苹果主栽品种[J]. 园艺学报, 2000, 27(4): 282- 284
- [51] Yao J L, Cohen D, Atkinson R, et al Transgenic apple (*Malus domestica*) [A]. Bajaj Y P S. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 44, Transgenic tree[C]. Germany, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999 153- 170
- [52] Yao J L, Cohen D, Atkinson R, et al Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivars Royal Gala[J]. Plant Cell Rep, 1995, 14: 407- 412
- [53] 刘庆忠, 赵红军, Hammerschlag F A. 培育苹果转基因植株的研究[J]. 落叶果树, 2000, (1): 5- 9
- [54] Bolar J P, Brown S K, Norelli J L, et al Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1999, 55(1): 31- 38
- [55] 张志宏, 方宏筠, 景士西, 等 苹果主栽品种高效遗传转化系统的建立及其影响因子的研究[J]. 遗传学报, 1998, 25(2): 160- 165
- [56] 达克东, 任德才, 张 松, 等 超强表达介导豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*CpTI*)转化苹果的研究[J]. 园艺学报, 2001, 28(1): 57- 58
- [57] Holefors A, Xue Z T, Welander M. Transformation of the apple rootstock M 26 with *rolA* gene and its influence on growth[J]. Plant Science, 1998, 136(42): 69- 78
- [58] Holefors A. Genetic transformation of the apple rootstock M 26 with genes influencing growth properties[J]. Acta University Agriculture Sueciae Agraria, 1999, 158: 53, 10

Advance of research on genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in apple

QIN Ling^{1,2}, LIMing¹, WANG Yong-xi², HAN Li-xing¹, HUANG Zhen-guang¹, ZHAO Gai-rong¹

(1 Zhengzhou Fruit Research Institute, CAAS, Zhengzhou, Henan 450009; 2 College of Horticulture,

Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract The paper summarizes and analyses main influencing factors of highly efficient regenerations *in vitro* including apple genotype, explants properties, plant hormone ratio and level, $AgNO_3$, dark incubation, antibiotics, et al, and influencing factors of transformations mediated by *Agrobacterium tumefaciens* including apple genotypes, explants properties *Agrobacterium* strain, *Agrobacterium* concentration, function of activated matters co-cultivation, pretreatment, selection culture, medium types, et al The present situation of its studies, existing problems and its prospects are briefly mentioned

Key words: apple; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation; influencing factors