

# 苹果遗传转化的研究进展

孙爱君<sup>1</sup>, 章 镇<sup>1</sup>, 张新生<sup>2</sup>, 盛炳成<sup>1</sup>

(1 南京农业大学园艺学院, 南京 210095; 2 河北省农林科学院昌黎果树研究所, 昌黎 066600)

**摘要:** 苹果的遗传转化技术通过分子手段改良苹果, 有助于缩短其育种周期。最近十年, 在该领域的研究取得很大进展, 涉及到一些重要的苹果基因型及有用的外源基因。迄今, 苹果的遗传转化主要采用农杆菌介导法, 侵染与转化材料的再生是影响其转化效率的关键过程, 了解其影响因素, 寻找有利因素以提高转化效率是日前苹果遗传转化研究的重点。

**关键词:** 苹果; 农杆菌介导; 遗传转化

**中图分类号:** S661.1; Q78

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-9772(2001)06-0583-05

## Progress on Agrobacterium-mediated Genetic Transformation of Apple

SUN Ai-jun<sup>1</sup>, ZHANG Zhen<sup>1</sup>, ZHANG Xin-sheng<sup>2</sup>, SHENG Bing-cheng<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2. Changli Pomology Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Changli 066600, China)

**Abstract:** Techniques of apple genetic transformation can improve apple trees and shorten the breeding cycle by molecular methods. In the last ten years, great progress has been made in this field, which involves a number of important apple genotypes developed. So far, apple genetic transformation mainly adopts *Agrobacterium*-mediated technique, involving infection and transgenic tissue regeneration, which are important steps to affect the transformation efficiency. The initial work to the date is to know and to search for the factors which can increase the efficiency.

**Key words:** Apple; *Agrobacterium*-mediated; Genetic transformation

二十世纪70年代中后期,随着根癌农杆菌Ti质粒的应用,以及相应的植物遗传转化方法的建立,植物基因工程的发展日新月异<sup>[1]</sup>。在苹果上首先于1986年获得“绿袖”的转基因植株<sup>[2]</sup>,之后,苹果的遗传转化研究不断取得新进展。本文就近十多年在该领域取得的成就作一综合评述。

### 1 原理及策略简介

植物遗传转化是通过直接或间接的方法<sup>[3]</sup>,将外源基因转移进入植物细胞、组织或器官(以下通称转化材料),转化材料经诱导分化,形成完整的含有外源基因的植株,以期达到改良其遗传性状的目的。多年生木本植物苹果的遗传转化,旨在缩短其育种周期,以便在较短时间内获得改良的品种或砧木。迄今,苹果的遗传转化研究主要采用农杆菌介导

法,其策略可概括为图1。

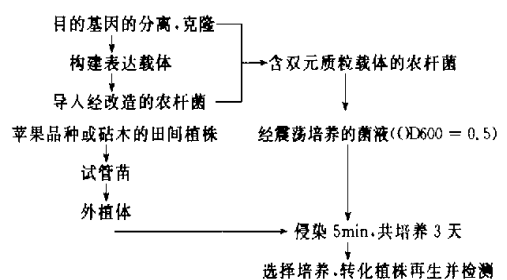


图1 农杆菌介导的苹果遗传转化策略  
Fig.1 Strategy of *Agrobacterium*-mediated transformation on apple

收稿日期:2000-12-26;修回日期:2001-07-23

基金项目:江苏省应用基础项目(BJ2000018)

作者简介:孙爱君(1972-),女,河北昌黎人,硕士学位,主要从事植物转基因研究。现为中国科学院遗传研究所博士研究生,北京 100101。

## 2 主要进展

1986年 James 等首次获得转基因“绿袖”(Greensleeves)苹果时<sup>[2]</sup>,采用的是农杆菌介导的叶盘共培养法<sup>[4]</sup>,导入的外源基因是其表达产物具有卡那霉素(Kanamycin)抗性的新霉素磷酸转移酶Ⅱ(Neomycin phosphotransferase Ⅱ, npt Ⅱ)基因和报道基因胭脂碱合成酶(Nopaline synthase, nos)基因。1992年我国的程家胜首次在国内报道获得转基因的苹果试管苗<sup>[5]</sup>,与 James 等一样,用绿袖作为转化对象,农杆菌介导,不同的是抗卡那霉素的标记基因为氨基酸磷酸转移酶基因,报道基因为葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucuronidase, GUS)基因。但他们均没有转化能改良植物性状的目的基因,所获得的转化植株也都没有经过分子水平的检测。随后几年,用于苹果遗传转化研究的基因型越来越多,主要有绿袖(Greensleeves)、M. 26、红元帅(Red Delicious)、乔纳金(Jonagold)、Elstar、嘎拉(Gala)、Braeburn、Merlijn、富士(Fuji)、金帅(Golden Delicious)、Jonagoldking、金矮生(Jonagored)、皇家嘎拉(Royal Gala)、辽伏(Liaofu)、元帅(Delectious)、粉红佳人(Pinklady)等<sup>[1-24]</sup>。外源基因涉及到改良植物性状的目的基因(表1),如抗虫基因—苏云金杆菌 $\delta$ -内毒素蛋白(Bacillus thuringiensis, B. t)基因,豇豆胰蛋白酶抑制剂(cowpea trypsin inhibitor, CprI)基因。Anna Holefors 等则用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)的 rolA (root loci A, rolA)基因转化苹果砧木 M. 26,旨在使其更加矮化<sup>[19]</sup>。同时,对转化材料的选择不再停留在最初的抗性材料筛选上,GUS 组织化学检测<sup>[26]</sup>及分子水平的检测(PCR 或 Southern 杂交<sup>[27]</sup>)技术被普遍采用(表2)。

表1 苹果遗传转化所用目的基因

外源目的基因 purpose gene	目的 purpose	苹果基因型 apple genotype	参考文献 references
CpTI	抗虫	绿袖	6
B. t	pest resistance	Greensleeves	8
	抗虫	绿袖,金矮生	
	pest resistance	Greensleeves, Jonagored 红富士,辽伏 Fuji, liaofu	
RolA	致矮 dwarf	M. 26	13

由于 GUS 基因可以在农杆菌中表达,而农杆菌在转化后的离体培养中至少能存活 12 个月而不表现生长<sup>[28]</sup>,所以 GUS 阳性结果不能准确反映初步转化频率。为此, Fridi A. Hammerschlag 等探索有效除菌又不影响转化材料再生的抗生素种类和浓度,结果发现头孢霉素(cefotaxime, cef)比羧苄青霉素(carbenicillin, crb)及头孢新霉素(mefoxin, mef)去除根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA101 的效果好,当酸性培养基(pH3.0)结合短时(1h)高浓度 cef 处理,然后长时间低浓度 crb 和 mef(100 $\mu$ g. ml<sup>-1</sup>)处理可以有效去

除 EHA101 且能使转化材料有效再生<sup>[25]</sup>。最近,另外一种报道基因—绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)被用于苹果的遗传转化<sup>[9]</sup>。GFP 在蓝光(395nm)下发出亮绿色荧光,此荧光稳定性好,且无种质特异性,检测操作方便。与 GUS 基因不同的是, GFP 基因在 CaMV35S 启动子控制下,在根癌农杆菌内不表达,因此可以避免因除菌不彻底造成的假 GUS 阳性结果。

表2 苹果遗传转化所采用的检测方法

Table 2 Detection methods used for apple genetic transformation

检测方法 detection method	参考文献 references
GUS 组织化学分析 GUS analysis	5,6,15,18,19,23
GUS 组织化学分析与冠醚碱分析 GUS analysis and opine analysis	7
PCR 检测 PCR amplification	8,20
GUS 组织化学分析与 Southern 杂交检测 GUS analysis and Southern hybridization	17,21,24,25
PCR 与 Southern 杂交检测 PCR and Southern hybridization	13
GUS 组织化学分析, Southern 杂交与绿色 荧光蛋白分析 GUS analysis, southern hybridization and greenfluorescence protein analysis	9

遗传转化的最终目的是获得能稳定表达且遗传外源基因的转化植株,这就需要不断观察和检测转基因植株在田间的表现。首次获得的转基因苹果“绿袖”已被栽入田间, James 等<sup>[29]</sup>研究了其外源基因的表达情况及其在后代中的遗传规律,在含卡那霉素(50 $\mu$ g.  $\mu$ l<sup>-1</sup>)的培养基上,经 6 周诱导产生了转基因植株所产果实的果肉愈伤组织,而对照只形成了极少量的愈伤组织。他们运用生理、生化及分子检测方法证明 nos 基因和 npt Ⅱ 基因在转基因植株的果实中得到稳定表达,用 Southern 杂交和 PCR 方法证明了 F<sub>2</sub> 子代中 nos 基因呈 1:1 分离, npt Ⅱ 基因呈 3:1 分离。根据孟德尔遗传规律认为在原始的转基因植株的基因组中, npt Ⅱ 基因插入了两个位点, nos 基因插入了一个位点。

前述的研究均是采用根癌农杆菌或发根农杆菌介导的间接转化方法,在转化结束后,培养基中需加入至少两种抗生素:一种用于杀死农杆菌,另一种用作相应于标记基因的选择标记。如前所述,当除菌不彻底时,会造成假阳性结果,加上有些抗生素会抑制转化材料的再生<sup>[7,3]</sup>,这些都会影响转化效果。而直接转化方法则不必用农杆菌为载体,可以免去除菌这一步骤,选择培养基中不必加杀菌的抗生素。但在苹果的遗传转化上,很少有人用直接转化法。直到 20 世纪 90 年代中期, Gercheva 等研究了粒子轰击对苹果叶片再生不定芽的影响,认为氦流压为 6.2MPa, 暗培养 10 天的条件最适于皇家嘎拉叶片的再生,其再生频率可以有效地用于

遗传转化研究<sup>[6]</sup>,为建立苹果的直接转化方法打下了基础。迄今,用直接转化方法对苹果进行转化的仍然很少,Hyung 等用电激法(electroporation)对富士叶肉的原生质体进行转化,并检测到了 GUS 的瞬时表达<sup>[19]</sup>。而在其他作物上,直接转化法用得很多,如基因枪法、子房注射法等,最近又有人采用了超声波介导法,并获得了转基因玉米<sup>[21]</sup>。当然,大多数直接转化法需要原生质体的分离<sup>[3]</sup>,并且还需原生质体能有效再生,而苹果的这方面研究还不多见。但是有些直接转化法如显微注射法、基因枪法、超声波法可以直接作用于植物组织或器官,而不需原生质体的制备与再生。简言之,苹果的遗传转化研究中直接转化法还需进一步探索。

### 3 影响转化效率的因素

苹果遗传转化研究的初期,农杆菌介导的转化效率很低<sup>[2,32]</sup>,后人虽然做了大量工作,但转化效率仍然仍没有作物的转化效率高,如张宏等用超声波法转化玉米愈伤组织时,转化效率达到 13.3%<sup>[31]</sup>,Puite 等用农杆菌介导的嘎拉、金帅、Elstar 的转化效率分别为 0.7%~8.0%,0.2%~6.0%,0.4%~0.8%<sup>[31]</sup>;张志宏转化新乔纳金时,抗性芽诱导率为 0.62%(9/1443),而其中只有 4 个转化植株明显表达 GUS 活性,抗性愈伤组织的诱导率虽然较高(36.0%±5.4%),但未能从抗性愈伤组织分化出芽<sup>[25]</sup>。探索影响苹果遗传转化效率的因素,以达到良好的转化效果,就成了该研究领域的主要内容。

Dandekar 等在对胡桃的研究中和 Martin 等在对葡萄的研究中认为影响转化效率的两个重要因素为:①用于转染的农杆菌菌株;②目标植物受侵染的部位<sup>[33,34]</sup>。实际上,农杆菌介导的遗传转化有两个关键过程:农杆菌侵染转化材料及转化材料的再生(外源基因在转化材料中的稳定表达暂不考虑在转化效率之内),各种因素对于转化效率的影响都可以归于对这两个过程的影响,而且这两个过程需要相辅相成,不能只考虑优化一个而抑制另一个。前文提到的 Dandekar 及 Martin 所总结的两点因素皆可归于影响侵染过程的因素,而第二个因素还可以影响到转化材料的再生。下面就影响上述两个过程的多种因素的有关研究作一回顾与总结。

Dandekar 最先研究农杆菌菌株对苹果的致毒力,发现根癌农杆菌菌株 A281 和 C58 的毒力最强,使转化材料的冠瘿瘤形成率超过 65%<sup>[33]</sup>。当 A281 构建与其 Ti 质粒 pTi-Bo542 相配的含毒区的质粒 pVK291 时,其毒性更强,使材料的整个伤口边缘产生了大量的冠瘿瘤,可能是增加的毒区拷贝位点提高了其毒性,从而侵染植物的能力更强<sup>[7]</sup>。如果双元质粒载体不稳定,则会导致转化效率下降。仍以 Dandekar 等的研究为例,A281 中构建的质粒与其原来 Ti 质粒的复制区不相配时,可能会导致一个或另一个质粒丢失,从而引起 A281 的转化效率从 66%下降到 22%,在发根农杆菌 A4 上也观察到同样影响,转化率下降了 50%<sup>[17]</sup>。因此,双

元载体的两个质粒要有相容性<sup>[1]</sup>。植物酚化合物乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)、渗透保护剂磷酸甜菜碱(betaine phosphate, BP)能提高农杆菌的毒力。当再生培养基中附加 AS(0.1mol/L)时,绿袖的转化效率大大提高<sup>[6]</sup>。在一系列农杆菌介导的遗传转化中,AS 已被普遍采用。然而有时 AS 并不表现明显效果,张志宏等在研究中发现用 AS(100 $\mu$ m)处理菌株 EHA105 的细胞,未能提高转化效率<sup>[21]</sup>。AS 可能是激活农杆菌的毒区,从而提高其侵染能力,而碳源的种类则对侵染与再生均有影响。果糖和半乳糖抑制这两个过程,半乳糖引起转化后培养 6 周的受体材料出现坏死斑,蔗糖和葡萄糖则使转化材料获得最高的转化效率<sup>[15]</sup>。同时,植物材料本身的生理特性也会影响农杆菌的侵染效果。苗龄为 20~40 天的试管苗叶片适于转化,25 天苗龄的叶片转化效率最高<sup>[15]</sup>。离分生组织最近的叶片,比苗基部的叶片易受农杆菌侵染<sup>[7]</sup>,An De Bondt 等推测正在分裂的细胞易受农杆菌侵染<sup>[15]</sup>,大概苗龄 20~40 天的叶片或离分生组织近的叶片细胞分裂旺盛,农杆菌进入叶片细胞较易。Sridevy Sriskandarajin 和 Peter Goodwin 则认为细胞壁孔隙度的增加能有助于农杆菌的转移 DNA 片段(T-DNA)进入细胞壁,从而提高转化效率<sup>[24]</sup>。另外,农杆菌菌液的浓度及材料在菌液中的浸泡时间也影响菌对材料的侵染效果,过度的侵染不仅需要高浓度的抗生素来杀菌,材料所受的伤害也会太重,皆不利于转化材料的恢复。如叶片在菌液中浸泡 20 分钟,选择培养过程中菌的生长难以被头孢霉素(cefataxime, cef)(200mg, L<sup>-1</sup>)抑制<sup>[21]</sup>。在多数植物转化工作中,采用农杆菌浓度达到 OD<sub>600</sub> 为 0.5,植物材料在菌液中浸泡 5 分钟。

农杆菌侵染后的转化材料是否能有效再生是转化成功与否的另一个关键,这需要首先建立外植体的高效再生系统。实际上,苹果的外植体再生研究早于其遗传转化研究<sup>[35~39]</sup>,随着遗传转化研究的展开,外植体离体再生的研究也越来越多。许多研究人员从多方面入手,进行了大量的研究,努力探索易于再生的基因型、外植体及培养条件。研究叶片再生系统所涉及到的苹果基因型有:新红星、赤阳、秋绵、辽伏、千秋、嘎拉、里斯金、金嫫生、贝拉、乔纳金、1,2 龙金蜜、调查号、M26、帝国、自由、富士、金帅、Jonasty、红乔纳金、解放、皇家嘎拉、M7、红元帅<sup>[40~44]</sup>、八棱海棠<sup>[45]</sup>等。MS 培养基<sup>[46]</sup>被普遍认为是适宜的基本培养基,附加一定浓度的细胞分裂素和生长素类物质,叶片的放置方式采用倒置较好,接种后需要暗培养 10~30 天,以 14 天为宜,而叶片往往选用苗龄 1 个月左右的。苗龄一个月左右的叶片也正是易受农杆菌侵染的受体材料,但是不难发现,转化材料的再生能力比非转化材料的再生能力低。经过转染后的外植体,在进行选择培养时,需要在原来的再生培养基中加入杀菌抗生素和选择标记抗生素,这不可避免地会影响转化材料的再生。以常用的选择 nptII 的抗生素卡那霉素为例,即使在低剂量(5mg, L<sup>-1</sup>)时,也会使叶片切口变褐,无愈伤组织形成,

到中等剂量(40mg, L<sup>-1</sup>)时,叶片坏死率达 30%<sup>[20]</sup>。同时,在农杆菌的 T-DNA 中有控制植物激素合成的功能基因,可以导致转化细胞内生长素和细胞分裂素含量过高<sup>[47]</sup>,这必然会影响转化材料的分化特性,在原来适合非转化材料再生的激素浓度条件下,就有可能得不到高效的再生频率,因此需要寻找不同的激素种类和浓度,以适合转化材料的再生。噻重氮苯基脲(Thidiazuron, TDZ)是一种细胞分裂素类似物<sup>[16]</sup>,比细胞分裂素苄氨基嘌呤(benzylaminopurine, BA)能更有效地刺激离体苹果茎尖的增殖<sup>[48]</sup>,结合生长素萘乙酸(naphthylacetic acid, NAA)使皇家嘎拉叶片的再生频率达到 100%<sup>[44]</sup>。在其余条件相同的情况下,改变细胞分裂素的种类,含 TDZ 的选择培养基上受转化的乔纳金叶片获得最高的转化效率<sup>[16]</sup>。另外,在选择培养基中加入苹果酸大大提高了苹果的转化效率<sup>[16]</sup>。上述的外植体再生,多是经过愈伤组织阶段,如果能直接再生,则可能会减少或避免因组织培养引起的遗传突变。Schaart 等<sup>[18]</sup>将外植体在感染农杆菌前进行培养,发现 6 周的选择培养结果,预培养没有对转化效率起作用,并且认为从叶片上直接再生转基因芽非常困难, Sridevy Srisankarajah 等<sup>[24]</sup>将外植体在进行感染前液体震荡处理几天,结果发现再生及转化效率均有提高,并且促进了不经愈伤组织阶段的直接再生,他们认为液体培养的处理使外植体内的抑制物得以去除,而有利于细胞吸收一些生长调节物质。

上文所述多种因素皆是通过影响农杆菌的侵染及转化材料的再生这两个过程而影响转化效率。但是 Maximova 等<sup>[9]</sup>则认为农杆菌的侵染和 T-DNA 的转移不是农杆菌介导的苹果遗传转化的限制步骤,因为再生的转化芽中报道基因绿色荧光蛋白的表达量比转染后 48 小时的表达量下降了 10000 倍,其实这涉及到外源基因在植物细胞中稳定表达和传代的问题,因此就涉及到表达载体中启动子、增强子的设计与构建、植物本身基因组的复杂背景以及接受外源基因的能力。获得的能稳定表达并且遗传外源基因的转基因植株最能有力地评价整个遗传转化过程的转化效率,目前苹果的遗传转化研究达到此阶段的还不多见。

#### 4 问题与展望

除了前文提到的直接转化方法很少被采用而且转化效率不高外,苹果的遗传转化中所应用的外源基因皆不是来自苹果基因组本身。苹果本身是杂合体,遗传背景相当复杂,分离克隆有明确优良性状的单个基因将是一个漫长的过程。另外,抗虫基因的转入还会涉及到产生虫的抗性突变的可能,转基因苹果植株生产的果实能否被普遍接受,还需要法定的安全检测程序加以证明。

苹果植株可以进行无性繁殖,避免其杂合基因发生分离,因此一旦有价值的外源基因被成功导入苹果,即有希望使其稳定遗传,在短时间内迅速得到推广。

#### 参考文献(References):

- [1] 李宝健,曾庆平. 植物生物技术原理与方法[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1990.
- [2] James D J, Passey A J, Barbara D J, et al. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector[J]. Plant Cell Reports, 1989, 7: 658~661.
- [3] 邵宏波, 初立业, 姜恩来. 转基因技术在果树抗性育种中的应用[J]. 北方园艺, 1994, 3: 12~13.
- [4] Horsh R B, Fry J E, Hoffman N I, et al. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. Science, 1985, 227: 1229~1231.
- [5] 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.
- [6] James D J, Passey A J, Webster A D, et al. Transgenic apples and strawberries: Advances in transformation, introduction of genes for insect resistance and studies of tissue cultured plants[J]. Acta Horticulturae, 1993, 336: 179~184.
- [7] Dandekar A M, Uratsu S L, Matsuta N. Factors influencing virulence in *Agrobacterium*-mediated transformation of apple[J]. Acta Horticulturae, 1990, 280: 483~494.
- [8] 程家胜, 郭超苏, 田渊川, 等. 转 Bt 抗虫基因苹果植株的再生[J]. 中国果树, 1994(4): 14~15.
- [9] 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 Molecular Biology, 1998, 37: 549~559.
- [10] Claude Lambert, David Tepfer. Use of *Agrobacterium rhizog* genes to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones[J]. Thepr Appl Genet, 1992, 85: 105~109.
- [11] Sutter E G, Juvenal Luza. Developmental anatomy of roots induced by *agrobacterium rhizogenes* in *Malus Pumila* 'M. 26' shoots grown *in vitro*[J]. Int J Plant Sci, 1993, 154(1): 59~67.
- [12] Norelli J L, Aldwinckle H S. The role of Aminoglycoside Antibiotics in the regeneration and selection of neomycin phosphotransferase-transgenic apple tissue[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1993, 118(2): 311~316.
- [13] Anna Holfors, Zhong-Tian Xue, Margareta Welander. Transformation of the apple rootstock M26 with the rolA gene and its influence on growth[J]. Plant Science, 1998, 136: 69~78.
- [14] Goodwin P B, Srisankarajah S, Speirs J, et al. Genetic transformation of apple[A]. In: T. Hayashi et al. (Eds). Techniques on Gene Diagnosis and Breeding in Fruit Trees[C]. FIRS, Japan, 1993, pp. 178~183.
- [15] An De Bondt, Kristel Eggermont, Philippe Druart, 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 Reports, 1994, 13: 587~593.
- [16] An De Bondt, Kristel Eggermont, Iris Penninckx, et al. Agrobacterium - mediated transformation of apple (*Malus Domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15: 549~554.
- [17] Puite K. J., Schaart JG. Genetic modification of the commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elstar vir an *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation method [J]. Plant Science, 1996, 119: 125~133.
- [18] Schaart J G, Puite KJ, Kolova L, et al. Some methodological aspects of apple transformation by *agrobacterium*[J]. Euphytica, 1995, 85: 131~134.
- [19] Hyung N I, Lee C H, kin S B. Foreign gene transfer using electroporation and transient expression in apple (*Malus Domestica* Borkh.) [J]. Acta Horticultrae, 1995, 392: 179~185.
- [20] 裴东, 田颖川, 刘群禄, 等. 苹果叶片再生的改进及转抗虫基因植株的获得[J]. 河北农业大学学报, 1996, 19(4): 23~26.
- [21] 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.
- [22] Yao J, Cohen D, Atkinson R, et al. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala[J]. Plant Cell Reports, 1995, 14: 407~412.
- [23] Hammerschlag F A, Zimmerman 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.
- [24] Sridevy Sriskandarajah, Peter Goodwin. Conditioning promoters regeneration and transformation in apple leaf explants[J]. Plant cell Tissue and Organ Culture, 1998, 53: 1~11.
- [25] 张志宏, 景士西, 王关林, 等. 新乔纳金苹果遗传转化及基因植株再生[J]. 园艺学报, 1997, 24(4): 378~380.
- [26] Jefferson R A. Assaying chemric genes in plants: The GUS gene fusion system[J]. Mol. Biol. Rpt., 1987, 5: 387~405.
- [27] 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [28] Matzk A, Mantell S, Schiemann J. Localization of persisting agrobacteria in transgenic tobacco plants[J]. Mol Plant - Microbe Interactions, 1996, 9: 373~381.
- [29] James D J, Passey A J, Baker S A, et al. Ransgenes Display Stable Patterns of Expression in Apple Fruit and Mendelian Segregation in the Progeny[J]. BIO/TECHNOLOGY, 1996, 14, 6: 56~60.
- [30] Gercheva P, Zimmerman R H, Owens I. D, et al. Particle bombardment of apple leaf explants influences adventitious shoot formation[J]. HORTSCIENCE, 1994, 29(12): 1536~1538.
- [31] 张宏, 王闰英, 谢友菊, 戴景瑞, 等. 超声波介导法转化玉米愈伤组织及可育转基因植株的获得[J]. 中国科学, 1997, 27(2): 162~167.
- [32] James D J, Dandekar A M. Reneneration and transformation of apple (*Malus Pumila* Mill.) [A]. In: Lindsey K. (ed) Plant Tissue Culture Manual, Vol B8[C]. Kluwer Academic Publishers, 1991, pp. 1~18.
- [33] Dandekar A M, Martin L A, Mc Granahan G H. Genetic transformation and foreign gene expression in walnut tissue[J]. J Am Soc Hort Sci, 1998, 113: 949~949.
- [34] Martin I. A, Stamp J A, Meredith C P, et al. Genetic transformation and foreign gene expression in grapevine[A]. Proceedings of the AgBiotech'89 International Conference and Exposition[C]. Arilington, virginia; 1989, 172~185.
- [35] Liu J R, Sink C K, Dennis F G. Adventive embryogenesis from leaf explants of apple seedlings[J]. Hort Science, 1983, 18(6): 871~873.
- [36] Kouider M, Skirvin R M, Korban S S, et al. Adventitious shoot formation from Red Delicious apple cotyledons *in vitro* [J]. Journal of Horticultrae Science, 1984, 59(3): 295~302.
- [37] James D J, Passey A J, Deeming D C. Adventitious embryogenesis and the *in vitro* culture of apple seed parts[J]. J Plant Physiol, 1984, 115: 217~227.
- [38] Evaldsson I. Induction, growth and differentiation of callus from stem segments of *in vitro* cultured apple shoots (*Malus domestica* Borkh.) [J]. Swedish Journal of Agricultural Research, 1985, 15(3): 119~122.
- [39] James D J, Passey A J, Rugini E. Factors affecting high frequency plant regeneration from apple tissues cultured *in vitro* [J]. J Plant Physiol, 1988, 132: 148~154.
- [40] 达克东, 李雅志, 束怀瑞. 苹果叶片愈伤组织植株再生研究[J]. 核农学报, 1995, 9(3): 139~143.
- [41] 时保华, 付桐明, 赵政阳, 等. 苹果叶片离体培养研究[J]. 西北植物学报, 1995, 15(1): 67~72.
- [42] 孙清荣. 影响苹果叶片不定芽再生的几个因素[J]. 落叶果树, 1995, 27(4): 3~4.
- [43] 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, 06, 26(2): 131~135.
- [44] Korban S S, O - Connor P A, Elobeidy A. Effects of thidiazuron, naphtha leneacetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves[J]. Journal of Horticultural Science, 1992, 67(3): 341~349.
- [45] 孙爱君, 章 镇, 姚泉洪, 等. 苹果与八棱海棠的试管苗外植体植株再生[J]. 上海农业学报, 2000, 16(2): 23~30.
- [46] Murashige T and Skoog R. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Physiol Plant, 1962, 15: 473~497.
- [47] 许 耀, 贾敬芬. 农杆菌转化的植物细胞的若干特性[J]. 植物生理学通讯, 1988, (1): 16~21.
- [48] Nieuwkerk J P. - Van, Zimmerman R H. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro* [J]. HortScience, 1986, 21, 3(1): 516~518.