

红肉苹果组织培养及转基因体系的建立与优化

李厚华, 阙 怡, 费昭雪, 王亚杰

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:于早春取红肉苹果植株上当年生茎段, 建立其组织培养体系, 并对其组织培养体系进行优化。结果表明: 在添加 0.2 mg/L IBA+1.0 mg/L TDZ 的 MS 培养基上红肉苹果叶盘不定芽诱导率最高, 再生率为 100%, 平均每个叶盘再生 9.57 个不定芽; 1 mg/L IBA+1 mg/L BAP 组合有利于植株扩繁, 其扩繁率为 8.27; 添加 0.6 mg/L IBA 的培养基上的生根率最高, 为 93.3%。转基因测试结果表明, 农杆菌菌株 EHA105 适于红肉苹果的基因转化; 农杆菌浸染后进行 3 d 的共培养有利于转化效率的提高。

关键词:红肉苹果; 不定芽; 组织培养; 转基因; 农杆菌

中图分类号:S 661.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)15-0175-05

红肉苹果 (*Malus Sieversii* var. *niedzwetzkyana* (Dieck) Langenf.) 原产中国新疆, 果皮和果肉全部为红色, 是优良的栽培果树和观赏树^[1-2]。红肉苹果果肉中富含多种具有保健功能的类黄酮, 其中对抗癌起重要作用的槲皮素含量要比苹果 (*Malus domestica*) 主栽品种‘红富士’和‘嘎拉’高 80~270 倍^[3-5]。通过对普通人群与摄入了大量含槲皮素和其它类黄酮食物的人群比较发现, 后者的乳腺癌、肺癌、胰腺癌和胃癌发病率远远低于前者^[6-7]。红肉苹果果肉中槲皮素的含量比‘红富士’和‘嘎拉’高, 理论上其果品的抗癌保健功能要更强, 对其进行深入研究对于中国野生基因资源保护及开发利用具有重要理论和战略意义。

虽然红肉苹果富含保健功能的类黄酮, 但其果实相对较小、口感一般, 且栽培过程中多种病虫害会影响其产量。红肉苹果从种子播种到开花结果需要 3~4 a 的时间, 通过传统的杂交育种改良其性状育种周期很长, 而通过转基因技术将优良性状基因有目的的转化到红肉苹果中可以缩短其育种周期。该研究建立了一个高效的红肉苹果叶盘不定芽再生组织培养体系和农杆菌介导的基因转化体系, 为通过基因工程提高其果实品质、果实大小以及植株抗病虫害能力等提供良好的理论和技术基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

该试验选择生长健壮的红肉苹果枝条为外植体,

农杆菌菌株 EHA105 和 LBA4404 作为工程农杆菌(其基因组 DNA 均含有 1 个利福霉素抗性基因)。

1.2 外植体处理与消毒

在芽萌动前 1 周左右(3 月上旬)采集侧芽饱满的茎段, 先用自来水进行表面冲洗 1 h, 再用 70% 酒精预消毒 1 min, 然后用 10% 次氯酸钠溶液消毒 15 min, 处理过程中用磁力搅拌器搅动以帮助清洗样品, 在次氯酸钠溶液中加入几滴吐温(Tween)溶液进行表面消毒, 用灭菌去离子水在超净工作台上清洗消毒后的茎段 3 次, 然后将其切成包含 1 个饱满芽(芽距离上下端各约 1~2 cm)的茎段, 将该茎段接种在扩繁培养基(MS+0.1 g/L 肌醇+0.1 mg/L IBA+1 mg/L BAP+0.8% 琼脂+30 g/L 蔗糖, pH 5.8)上, 芽朝上以“y”形斜插入培养基进行培养, 每个试管内放置 1 个茎段。培养环境条件为 4 000~6 000 lx 的光照、16 h/d 的光周期和 25℃ 的室温, 培养 4 周后进行鉴定。

1.3 组织培养体系优化

1.3.1 再生体系 以 MS+0.1 g/L 肌醇为基础培养基, 分别以 0.1、0.2、0.5、1.0 mg/L IBA 与 0.3、0.6、1.0、2.0 mg/L TDZ 进行正交组合, 组合为 16 种培养基, 对植物激素浓度配比进行优化。从通过茎段再生获得的植株上选取完全展开的 4 片最幼嫩的叶子, 切成 0.5~1 cm² 大小的叶盘, 生理正面朝下放在培养基上, 每个培养皿放置 10 个叶盘, 先暗培养 2 周, 然后放在光下培养, 每 2 周更换 1 次培养基, 6 周后统计不定芽发生数量, 计算其诱导率。

1.3.2 扩繁体系 以 MS+0.1 g/L 肌醇为基础培养基, 分别以 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mg/L 的 IBA 与 1.0 mg/L BAP 进行植物激素组合, 组合为 5 种培养基, 对红肉苹果植株扩繁培养基激素浓度配比进行优化。取高度在 2 cm 以上的芽, 接种到装有上述培养基的培养瓶中。4 周以后统计高度在 2 cm 以上的芽的数量, 计算扩繁系数。

第一作者简介:李厚华(1973-),男,博士,副教授,现主要从事植物基因工程和类黄酮次生代谢研究工作。E-mail:lihuhua73@163。基金项目:陕西省自然科学基金资助项目(2010JQ3009);西北农林科技大学引进人才经费资助项目(Z111020901);西北农林科技大学基本科研业务费资助项目(Z109021001)。

收稿日期:2011-04-26

1.3.3 生根体系 以 MS+0.1 g/L 肌醇为基础培养基,分别加入 0、0.3、0.6、1.0 和 2.0 mg/L IBA。选择生长健壮、高度在 3 cm 以上的无根组织培养苗接种到上述培养基上。分别在普通组织培养光照条件下(4 000~6 000 lx)和弱光照条件下(1 000~1 500 lx)进行培养,4 周以后统计生根植株的数量,计算生根率。

1.4 抗生素敏感试验

1.4.1 抑菌抗生素敏感性测试 将红肉苹果叶盘接种在添加 0、25、50、100、200 和 400 mg/L 替卡西林(Tica rcillin)的经过优化的 R7(表 1)再生培养基上诱导不定芽分化。暗培养 2 周后转移到光下培养,每 2 周更换 1 次培养基,6 周后统计愈伤组织鲜重及植株的再生率,确定合适的抗生素筛选浓度。

1.4.2 筛选抗生素的敏感性测试 将红肉苹果叶盘分别接种在添加 0、12.5、25、50、100 和 200 mg/L 卡那霉素(Kanamycin)的 R7(表 1)再生培养基中上诱导不定芽分化。暗培养 2 周后转移到光下培养,每 2 周更换 1 次培养基,6 周后统计愈伤组织鲜重及植株的再生率,以植物叶盘不能再生植株的最低卡那霉素浓度为抗生素筛选的最佳浓度。

1.5 农杆菌介导的 GUS 基因转化体系

用牙签从农杆菌(菌株 EHA105 和 LBA4404)培养皿里面取出一个菌群,接种到 15 mL 含有相应抗生素的 YEB 培养液中,在 28℃ 和 160 r/min 条件下过夜培养。将农杆菌培养液在 4 000 r/min 的转速下离心 10 min 后,用 MS 培养液将菌株沉淀稀释到 OD₆₀₀ 为 0.8。取完全展开的 4 片最幼嫩的红肉苹果叶子,切成 0.5~1 cm² 大小的叶盘,用稀释过的农杆菌浸染叶盘 15 min 后用滤纸吸去液体残留;把浸染过的叶盘生理正面朝下放在新 R7 培养基中暗培养。分别共培养 0、1、2、3 和 4 d,先用无菌水清洗叶盘 2 次,每次 15 min,然后用 300 mg/L 的替卡西林溶液震荡清洗 15 min。将叶盘用滤纸吸干后放在筛选培养基(R7+50 mg/L 卡那霉素+100 mg/L 替卡西林)上继续暗培养,2 周后更换培养基,放在光照条件下继续培养。6 周后取再

生植株按照 Jefferson 的方法^[8]进行组织化学的 GUS 测试:把再生植株放在 GUS 测试溶液中,用真空使溶液渗透到植物材料中,在 37℃ 条件下过夜孵育,然后放在 70% 的乙醇中去除叶绿素、保持叶片的兰色;观察植物材料颜色变化,有 GUS 基因表达的材料被染成蓝色;统计 GUS 基因转化率[GUS 基因转化率=(显蓝色的植株数/被检测的外植体数)×100%];选择转化率最高的处理为该试验体系的最佳处理。

2 结果与分析

2.1 外植体处理与消毒

将红肉苹果枝条消毒后切取 50 个茎段,在苹果扩繁培养基上培养 6 周后,其中 21 个样本没有被感染,14 个样本侧芽萌发出新梢。将萌发的新梢切下后接种到新的苹果扩繁培养基上进行培养,让其形成大的植株,以后每 4 周继代培养 1 次,扩繁的材料用于下一步的组织培养体系优化试验。

2.2 组织培养体系的优化

2.2.1 再生体系优化 以 16 种组合对不定芽再生诱导的激素浓度配比进行了优化,测试了不同组合对不定芽再生率及每叶盘不定芽数量的影响。结果显示,0.2 mg/L IBA+0.6 mg/L TDZ 和 0.2 mg/L IBA+1.0 mg/L TDZ 的激素组合都具有很高的不定芽诱导率(表 1)在添加 0.2 mg/L IBA+1.0 mg/L TDZ 的培养基上再生不定芽数量更多,而在添加 0.2 mg/L IBA+0.6 mg/L TDZ 的培养基上再生不定芽总体上更大一些。因此,在转基因体系研究中选择再生不定芽较多的 0.2 mg/L IBA+1.0 mg/L TDZ 的植物激素组合。

2.2.2 扩繁体系优化 为了能够快速获得大量植株,对其扩繁体系进行了优化。以 MS+0.1 g/L 肌醇为基础培养基,以 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mg/L IBA 与 1.0 mg/L BAP 组合为 5 种培养基,对红肉苹果植株扩繁培养基植物激素浓度配比进行优化。结果表明,添加了 1.0 mg/L IBA+1.0 mg/L BAP 的培养基上扩繁系数最高,达到 8.27(表 2、图 1)。

表 1 不同植物激素组合对红肉苹果叶盘不定芽再生的影响

Table 1 Adventitious shoots regeneration of *Malus sieversii* var. *niedzwetzkyana* from leaf explants on MS medium supplemented with different phytohormone concentrations and combinations

编号 Code	植物激素 Phytohormone/mg · L ⁻¹	叶盘数量 Number of explants	植株再生叶盘数量 Number of shoots Regenerated explants	再生率 Regeneration rate/%	再生植株数量 Number of regenerated shoots	每个叶盘植株数量 Shoots per explants
R1	0.1 IBA+0.3 TDZ	30	23	76.7	127	4.23
R2	0.1 IBA+0.6 TDZ	30	25	83.3	154	5.13
R3	0.1 IBA+1.0 TDZ	30	21	70.0	153	5.10
R4	0.1 IBA+2.0 TDZ	30	21	70.0	97	3.23
R5	0.2 IBA+0.3 TDZ	30	23	76.7	151	5.03
R6	0.2 IBA+0.6 TDZ	30	30	100	272	9.07
R7	0.2 IBA+1.0 TDZ	30	30	100	287	9.57
R8	0.2 IBA+2.0 TDZ	30	26	86.7	207	6.90
R9	0.5 IBA+0.3 TDZ	30	24	80.0	111	3.70
R10	0.5 IBA+0.6 TDZ	30	30	100	174	5.80
R11	0.5 IBA+1.0 TDZ	30	28	93.3	205	6.83
R12	0.5 IBA+2.0 TDZ	30	28	83.3	172	5.73
R13	1.0 IBA+0.3 TDZ	30	5	16.7	11	0.37
R14	1.0 IBA+0.6 TDZ	30	16	53.3	54	1.80
R15	1.0 IBA+1.0 TDZ	30	22	73.3	108	3.60
R16	1.0 IBA+2.0 TDZ	30	25	83.3	134	4.47

表 2 红肉苹果在附加不同浓度植物激素培养基上的扩繁

Table 2 Shoots propagation of *Malus sieversii* var. *niedzwetzkyana* on MS medium supplemented with different phytohormon concentrations

植物激素 Phytohormone /mg · L ⁻¹	接种植株数量 No. of tested shoots	扩繁植株数量 No. of propagated shoots	扩繁系数 Propagation efficient
0.1 IBA+1.0 BAP	30	23	0.77
0.2 IBA+1.0 BAP	30	55	1.83
0.5 IBA+1.0 BAP	30	126	4.20
1.0 IBA+1.0 BAP	30	247	8.27
2.0 IBA+1.0 BAP	30	124	4.13

2.2.3 生根体系优化 为了确定诱导红肉苹果根萌生的最佳条件,以 MS+0.1 g/L 肌醇为基础培养基,用 0、0.3、0.6、1.0、2.0 mg/L IBA 和正常光照、弱光条件相

组合进行了测试。培养 4 周后结果表明,在弱光条件下培养下植株生根率比在正常光照条件下培养的要高 1 倍。在 IBA 浓度为 0.6 mg/L 的培养基上诱导生根率最高,达到 93.3%(表 3)。

2.3 红肉苹果的抗生素敏感性测试

2.3.1 抑菌抗生素敏感性测试 替卡西林(Ticarcillin)是苹果农杆菌介导的叶盘转化法中常用的一种抑制农杆菌生长的抗生素,但过高浓度的替卡西林会抑制不定芽再生。为了在不影响植物细胞再生的基础上有效抑制农杆菌的过度生长,对其使用浓度进行了优化。结果表明,当替卡西林浓度从 0 增至 100 mg/L 时,不定芽再生率从 100%降到 78.3%;当替卡西林浓度增加至 200 mg/L 时,不定芽诱导率下降至 13.3%,同时抑制不定芽的伸长和生长;而当浓度增加到 400 mg/L 时,不定芽诱导率降到 0(表 4)。综合上述结果,100 mg/L 替卡西林浓度为合适的抑菌浓度。

表 3 不同光照条件和不同 IBA 浓度培养基上红肉苹果的生根情况

Table 3 Root formation of *Malus sieversii* var. *niedzwetzkyana* on medium supplemented with different IBA concentrations under different light condition

浓度 Concentration /mg · L ⁻¹	接种植株数量 No. of tested shoots	正常光照 Normal light		弱光 Weak light	
		生根植株数量 No. of root forming shoots	生根率 Rooting rate/%	生根植株数量 No. of root forming shoots	生根率 Rooting rate/%
0	30	0	0	0	0
0.3 IBA	30	5	16.7	22	73.3
0.6 IBA	30	13	43.3	28	93.3
1.0 IBA	30	9	30	14	46.7
1.5 IBA	30	2	6.7	5	16.7
2.0 IBA	30	0	0	2	6.7

2.3.2 筛选抗生素敏感性测试 农杆菌菌株 EHA105 和 LBA4404 被用于转基因体系优化,pBI121 双元载体被转化到这 2 种菌株里,pBI121 拥有 1 个编码抗卡那霉素蛋白的选择性标记基因 *NPTII*(新霉素磷酸转移酶二)。卡那霉素具有能够杀死非转基因细胞的毒性,同时死亡的细胞会对周围的转化细胞产生不利的影响。因此,选择使用抗生素的最佳浓度非常重要。一方面,选择压力不应该太低,以防止非转基因细胞的再生。另一方面,它不应该太高,以防止转基因细胞被杀死。红肉苹果叶盘鲜重及不定芽再生率情况见表 5。随着卡那霉素浓度从 0 增到 50 mg/L,植株再生率从 100%下降至 0。在卡那霉素浓度为 25 mg/L 的培养基上,60 个叶盘中只有 2 个再生出不定芽;在卡那霉素浓度为 50 mg/L 的培养基上叶盘有愈伤组织形成,但随着培养时间的延长,没有观察到不定芽分化;当培养基中卡那霉素浓度大于 100 mg/L 时已完全抑制愈伤组织形成,叶片发黄并褐化死亡。上述结果表明,50 mg/L 卡那霉素浓度为转基因试验最佳筛选浓度。

表 4 替卡西林对红肉苹果愈伤组织鲜重及不定芽再生的影响

Table 4 Effects of ticarcillin used to control *Agrobacterium* growth on the fresh weight of callus and the regeneration rate of adventitious shoots of the *Malus sieversii* var. *niedzwetzkyana*

浓度 Concentration/mg · L ⁻¹	鲜重 Fresh weight/mg	再生率 Regeneration rate/%
0	141±3.4	100
25	128±4.8	93.3±1.5
50	97±3.7	86.7±1.5
100	61±3.1	78.3±2.1
200	35±1.3	13.3±0.6
400	15±0.7	0

注:每个试验变化重复 3 次,每个重复培养 20 个叶盘。再生率=(产生不定芽叶盘数/接种叶盘数)×100%。下同。

Note: Each numerical value is an average of three replicates in a set of experiments. Twenty leaf explants were cultured in each replicates; Regeneration rate=(number of adventitious shoots / number of explants)×100%. The same as below.

2.4 农杆菌介导的转基因体系优化

为了得到优化的红肉苹果转基因体系,选择了农杆菌菌株 LBA4404、EHA105 和 0~4 d 的共培养时间进行了组合测试。GUS 测试结果表明,农杆菌菌株

EHA105 比 LBA4404 更适于农杆菌介导的红肉苹果遗传转化,在 50 个共培养 3 d 的叶盘中有 6 个再生出 GUS 阳性植株,所以,其最优的共培养时间为 3 d(表 6、图 2)。

表 5 卡纳霉素对红肉苹果愈伤组织鲜重及不定芽再生的影响

Table 5 Effects of kanamycin used to select *NPT II*-transformed cells on the fresh weight of callus and the regeneration rate of adventitious shoots of the *Malus sieversii* var. *niedzwetzkyana*

浓度 Concentration/mg · L ⁻¹	鲜重 Fresh weight/mg	再生率 Regeneration rate/%
0	141±3.4	100
12.5	102±2.9	88.3±1.2
25	55±2.2	3.3±0.6
50	21±1.3	0
100	12±0.5	0
200	9±0.1	0

表 6 农杆菌介导的红肉苹果基因转化条件优化

Table 6 Optimization of the *Agrobacterium* mediated transformation situation for *Malus sieversii* var. *niedzwetzkyana*

农杆菌菌株 Agrobacterium strain	共培养时间 Co-culture time/d	GUS 测试阳性再生植株比例 Percentage of GUS-positive shoots/%
EHA 105	0	0 (0/50)
	1	0 (0/50)
	2	6 (3/50)
	3	12 (6/50)
	4	2 (1/50)
LBA 4404	0	0 (0/50)
	1	0 (0/50)
	2	2 (1/50)
	3	4 (2/50)
	4	0 (0/50)

3 结论与讨论

试验选择了早春为材料采集时间,因为这个季节冬天刚结束,温度比较低,病菌少;且此时期芽即将萌动,储存了大量营养物质,有利于芽的萌发。把消毒后的茎段放在试管里面培养,每个试管放 1 个茎段,每个茎段包含 1 个芽,可以有效的避免交叉感染。

与其它苹果属植物相比,红肉苹果最优的扩繁和生根培养基中 IBA 浓度都相对较高,这可能是由于红肉苹果植株体内积聚了大量的类黄酮的原因。许多文章报导了特定种类的类黄酮能够抑制生长素在植物体内的运输。当把西葫芦栽培在含有奎宁酸的基质上后,导致其体内类黄酮的积聚,抑制了其顶端产生的生长素向下胚轴的运输;其原因被证明是类黄酮具有与一种生长素运输抑制剂 Naphthylphthalamic acid (NPA)相结合,进而阻碍生长素在植物体内运输的功能^[9-10]。通过 RNA 干扰抑制了豆科模式植物蒺藜苜蓿中类黄酮合成后,降低了其对生长素运输的抑制作用^[11]。许多活体试验数据表明内源类黄酮浓度的变化会导致生长素的运输情况变化,验证了类黄酮是植物体内生长素运输的内源调控因子的假说^[12]。在试验

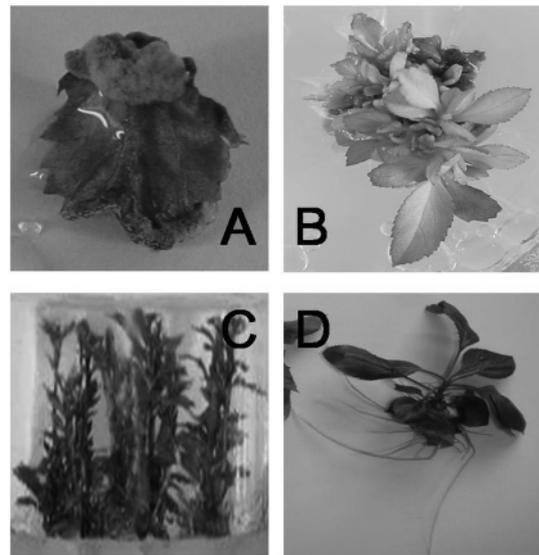


图 1 红肉苹果组织培养不同时期形态
Fig. 1 Form of *Malus sieversii* var. *niedzwetzkyana* in different tissue culture phase

注:A:愈伤组织形成;B:不定芽再生;C:植株扩繁;D:诱导生根。
Note: A: callus formation; B: adventitious shoots regeneration; C: shoots propagation; D: roots induction.

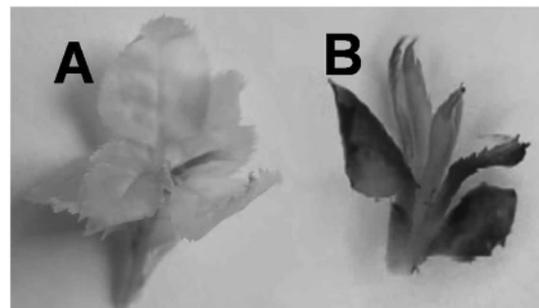


图 2 GUS 基因在转基因红肉苹果中的表达
Fig. 2 GUS expression in shoots of transgenic *Malus sieversii* var. *niedzwetzkyana*

注:A:对照植株;B:转基因植株。
Note: A: wild type shoots; B: transgenic shoots.

中可能是因为类黄酮大量积聚,导致植株顶端产生的生长素向下运输被抑制,需要从培养基中吸收更多的生长素以促进其扩繁或生根。这在生根体系优化试验中也可以得到验证,在弱光培养下的植株生根效率要比正常光照条件下的生根率高 1 倍以上(表 3);通过观察发现,在弱光培养条件培养的植株颜色开始变绿,红色色素(花青素,类黄酮的一种)积聚明显少于直接放置于正常光照下的处理植株(图 1)。该试验结果可以为红叶碧桃、红叶樱、红叶李、红叶小檗、红枫等红色叶植物的组织培养体系构建提供一定的理论参考,在这类植物组织培养体系构建与优化过程中可以考虑适当提高生长素的浓度。

影响农杆菌介导的苹果属植物基因转化效率因素主要为农杆菌菌系选择和共培养时间^[13-14]。为了获得

实验室中可操作的红肉苹果转基因技术体系,对 LBA4404 和 EHA105 农杆菌菌株与 5 个时间梯度进行了正交实验。再生植株的 GUS 测试试验结果表明,农杆菌菌株 EHA105 比 LBA4404 更适于农杆菌介导的红肉苹果遗传转化。3 d 的共培养时间显示了最高的转基因效率,而无共培养和 1 d 共培养时间的叶盘完全没有再生出 GUS 阳性新植株,这除了共培养时间短,浸染效率低的原因以外,可能还有 2 个原因:过早的筛选,非转基因细胞被杀死后营养运输受阻;抗生素抗性基因表达需要足够时间来进行孵育。而在 4 d 的共培养后农杆菌大量繁殖,叶盘褐化严重,直接影响叶盘愈伤组织再生,降低了转基因效率。

参考文献

- [1] 陆秋农,贾定贤. 中国果树志(苹果卷) [M]. 北京:中国农业科技出版社,1999:25-50.
- [2] 曾建飞,贾春燕. 中国植物志 [M]. 第 36 卷. 北京:科学出版社,2004:383.
- [3] 茅力,金念祖,陈景衡. 反相高效液相色谱法测定苹果中槲皮素的含量[J]. 色谱,2005,23:282-284.
- [4] Khanizadeh S, Tsao R, Rekika D, et al. Phenolic composition and antioxidant activity of selected apple genotypes [J]. Journal of Food, Agriculture & Environment, 2007, 5(1):61-66.
- [5] Li H H. Metabolic engineering of flavonoids biosynthesis in apple by genetic transformation [D]. Dissertation for Ph. D. Leibniz University Hannover, 2008.
- [6] Knekt P, Järvinen R, Seppänen R, et al. Dietary Flavonoids and the Risk of Lung Cancer and Other Malignant Neoplasms [J]. American Journal of Epidemiology, 2002, 146:223-230.
- [7] Liu R H, Liu J, Chen B. Apples prevent mammary tumors in rats [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53:2341-2343.
- [8] Jefferson R A. The GUS reporter gene system [J]. Nature, 1989, 342:837-838.
- [9] Jacobs M, Rubery P H. Naturally occurring auxin transport regulators [J]. Science, 1988, 241:346-349.
- [10] Eckardt N A. The role of flavonoids in root nodule development and auxin transport in *Medicago truncatula* [J]. Plant Cell, 2006, 18:1539-1540.
- [11] Wasson A P, Pellerone F I, Mathesius U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia [J]. Plant Cell, 2006, 18:1617-1629.
- [12] van Noorden G E, Wasson A P, Pellerone F I, et al. Regulation of Nodule Organogenesis by Auxin Transport and Flavonoids [J]. Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture, 2008, 42:183-184.
- [13] Bondt A, Eggermont K, Druart P, et al. Agrobacterium-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps [J]. Plant cell reports, 1994, 13:587-593.
- [14] Li H H, Flachowsky H, Fischer T C, et al. Maize *Lc* transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.) [J]. Planta, 2007, 226:1243-1254.

Establishment and Optimization of Tissue Culture and Genetic Transformation System of *Malus sieversii* var. *niedzwetzkyana*

LI Hou-hua, QUE Yi, FEI Zhao-xue, WANG Ya-jie

(College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Shoots of *Malus sieversii* var. *niedzwetzkyana* were adopted in early spring, the tissue culture system was established and optimized using of these plant materials. The influence of different phytohormone combination on shoots regeneration, propagation and root formation was studied. The results indicated that a combination of 0.2 mg/L IBA+1 mg/L TDZ was most suitable for adventitious shoot regeneration from leaf explants (100% regeneration rate and 9.57 adventitious shoots per explants); the combination of 1 mg/L IBA+1 mg/L BAP was optimum for shoot propagation with the propagation rate of 8.27 root formation rate (93.3%) on medium supplemented with 0.6 mg/L IBA was the highest. The results of transformation experiments showed that *Agrobacterium* strains EHA105 was suitable for the genetic transformation and 3 days of pre-culture support strongly the transformation efficiency.

Key words: *Malus sieversii*; adventitious shoots; tissue culture; genetic transformation; agrobacterium