

# 葡萄抗病毒转基因研究进展

任芳, 董雅凤\*, 张尊平, 范旭东, 胡国君, 朱红娟

(中国农业科学院果树研究所, 国家落叶果树脱毒中心, 辽宁兴城 125100)

**摘要:** 迄今已发现 63 种病毒侵染葡萄。利用转基因技术培育抗病品种是防控葡萄病毒病的重要手段之一。对葡萄再生体系和遗传转化方法及影响因素、葡萄抗病毒转基因研究进展, 以及转基因植株检测、抗性评价和抗性机理等进行了综述, 并对今后研究方向进行了讨论和展望。

**关键词:** 葡萄; 抗病毒; 转基因; 再生; 遗传转化

**中图分类号:** S 663.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2013) 09-1633-12

## Review of Advances and Perspectives in Virus-resistant Transgenic Grapevine Studies

REN Fang, DONG Ya-feng\*, ZHANG Zun-ping, FAN Xu-dong, HU Guo-jun, and ZHU Hong-juan

(National Center for Producing Virus-free Deciduous Fruit Tree, Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Xingcheng, Liaoning 125100, China)

**Abstract:** To date, sixty-three viruses have been identified to infect grapevine. Cultivating virus-resistant varieties by transgenic technology is an important way to control grapevine viral diseases. Grapevine regeneration system, genetic transformation methods and impact factors, research progress of virus-resistant transgenic grapevine, as well as the detection, resistance evaluation and mechanism of transgenic plants were reviewed. Prospects for virus-resistant transgenic grapevine were discussed.

**Key words:** grapevine; virus-resistance; transgenic; regeneration; transformation

葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 是感染病毒种类最多的果树, 现已发现 63 种病毒侵染葡萄 (Martelli, 2012)。中国种植的葡萄品种普遍感染病毒, 部分地区带毒率达 60% 以上 (刘晓等, 2006; 王升吉等, 2011)。葡萄为多年生藤本植物, 受病毒侵染后终身带毒, 持久危害, 且无法通过化学药剂进行有效控制。因此培育抗病品种是防控葡萄病毒病的有效途径之一。由于葡萄生长周期长且基因型复杂, 传统育种方法受到很大限制。利用基因工程技术将抗病毒基因导入植物是使之获得或提高抗性的有效途径。葡萄转基因研究起步较晚, 直到 20 世纪 90 年代 Mullins 等 (1990) 以沙地葡萄花粉为材料, 通过农杆菌介导的遗传转化, 才首次获得了表达 *GUS* 和 *NPT II* 的转基因葡萄植株, 此后葡萄遗传转化研究取得了较大进展。目前葡萄上采用的抗病毒目的基因多为病毒源基因, 通过农杆菌介导的遗传转化及体细胞胚再生等方法, 多种病毒外壳蛋白 (Coat protein, CP) 或移动蛋白 (Movement protein, MP) 基因被成功导入葡萄, 获得了转基因植株, 且有部分植株表现对病毒的

收稿日期: 2013-04-15; 修回日期: 2013-08-09

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-30-bc-3)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yfdong@163.com)

抗性 (Le Gall et al., 1994; Gölles et al., 2000; Krastanova et al., 2000; Gambino et al., 2005, 2010; Valat et al., 2006)。高效的再生体系和遗传转化体系是成功获得抗病毒转基因葡萄的关键, 本文就葡萄再生体系、遗传转化方法以及抗病毒转基因等方面的研究进展进行综述。

## 1 葡萄再生体系

与其他植物相比, 葡萄再生困难, 再生率低、重复性差, 导致其遗传转化进展缓慢, 获得的抗病毒转基因植株也较少。近年来针对不同品种及不同外植体材料分别建立了再生体系。

### 1.1 器官发生途径

器官发生 (Organogenesis) 途径是在外植体上直接形成或通过愈伤组织间接形成不定芽。葡萄再生采用的外植体材料主要包括叶片、叶柄、茎段和花药等。90 年代初, Mullins 等 (1990)、Colby 等 (1991) 及 Berres 等 (1992) 就已通过葡萄叶片、叶柄和茎段等器官获得再生不定芽及植株。中国研究者通过器官发生途径建立了数十个葡萄品种的再生体系, 主要采用 MS、B5、NN69 等基本培养基, 配合使用 BA、TDZ、KT 等细胞分裂素和 IBA、IAA、NAA 等生长素 (表 1)。但目前通过该途径获得抗病毒转基因葡萄的报道并不多。韩继成等 (2006a) 以 ‘无核白’ 叶片为受体通过器官再生途径获得转 GFLV CP 基因的再生植株。金万梅等 (2009) 对葡萄器官离体再生不定芽的遗传稳定性进行了分析, 66 个再生株系中仅 2 个株系出现变异且均为愈伤组织诱导产生, 所有直接再生的不定芽没有检测到变异, 说明葡萄采用器官发生途径, 特别是直接再生不定芽的遗传稳定性与母株的遗传稳定性相一致。这为器官发生途径进一步应用于葡萄遗传转化研究提供了有力支持。

表 1 中国部分葡萄品种器官途径再生体系  
Table 1 Organogenesis regeneration system of some grapevine cultivars in China

葡萄品种 Grapevine cultivar	外植体 Explant	再生培养基/ (mg · L <sup>-1</sup> ) Regeneration medium	再生率/% Regeneration rate	参考文献 Reference
赤霞珠	叶片 Leaf	MS + TDZ4.0	18.06	王华 等, 2004
Cabernet Sauvignon	叶柄 Petiole	MS + TDZ4.0 + NAA0.01	28.57	王敬东 等, 2011
	茎尖 Stem-tip	B5 + KT1.0 + IAA0.5	83.30	
黑比诺 Pinot Noir	叶柄 Petiole	MS + BA5.0 + IBA0.1	20.00	袁维凤 等, 2007
	茎段 Stem	MS + BA5.0 + NAA0.1	62.50	
黑王 Heiwang	叶片 Leaf	NN69 + BA2.0	86.70	韩继成 等, 2006a
		NN69 + BA1.5 + CH250 + IBA0.02	100.00	
红地球 Red Globe	叶片 Leaf	NN69 + BA2.0 ~ 2.5 + IBA0.2	22.00	李云 等, 2002
	叶片、叶柄 Leaf, petiole	1/2MS + BA0.5 + NAA0.05 + CH500	35.40	周鹏 等, 2002
	茎尖 Stem-tip	B5 + KT1.0 + IAA0.5	100.00	王敬东 等, 2011
皇家夏天 Summer Royal	叶片 Leaf	1/2MS/WPM/B5/NN69 + BA3.0 + IAA0.05	37.74	贺柱 等, 2007
		B5 + TDZ2.5 + IAA0.05	41.64	师校欣 等, 2008
梅尔诺 Merlot Noir	叶柄 Petiole	MS + TDZ2.0	62.42	王华 等, 2005
玫瑰香 Muscat	茎段 Stem	GS + ZT2.0 + IBA0.1	100.00	陈力耕 等, 2001
		GS + ZT2.0	98.30	
美人指 Manicure Finger	叶片 Leaf	MS + BA3.0 + IBA0.1	63.16	陶建敏 等, 2005
		MS + TDZ1.0 + IBA0.1	60.71	余智莹 等, 2011
	叶柄 Petiole	MS + BA2.0 + IBA0.05	40.00	陶建敏 等, 2005
		MS + TDZ1.0 + IBA0.1	93.10	余智莹 等, 2011
	茎段 Stem	MS + BA1.0 + IBA0.01	75.00	陶建敏 等, 2005
		MS + TDZ1.0 + IBA0.2	47.37	余智莹 等, 2011

续表 1

葡萄品种 Grapevine cultivar	外植体 Explant	再生培养基/ (mg · L <sup>-1</sup> ) Regeneration medium	再生率/% Regeneration rate	参考文献 Reference
莫利莎 Mellisa	叶片 Leaf	B5 + TDZ2.5 + IAA0.05	63.72	师校欣 等, 2008
森田尼无核 Centennial Seedless	叶片、叶柄、茎段 Leaf, petiole, stem	MS + TDZ2.0 ~ 4.0	33.50 ~ 40.20	金万梅 等, 2008
魏可 Wink	叶片 Leaf	MS + TDZ4.0 + IBA0.1	78.74	Zhang et al., 2011
	叶柄 Petiole	MS + TDZ2.0 + IBA0.1	39.33	
		MS + BA2.0 + IBA0.2	20.00	陶建敏 等, 2004
无核白 Tomson Seedless	叶片 Leaf	NN69 + BA2.0	93.30	韩继成 等, 2006a
	叶片、叶柄 Leaf, petiole	1/2MS + BA0.5 + NAA0.05 + CH500	35.40	周 鹏 等, 2002
	茎尖 Stem-tip	B5 + KT1.0 + IAA0.5	100.00	王敬东 等, 2011
砧木 1202 Rootstock 1202	叶片 Leaf	Ms + TDZ1.0 + IBA0.01	68.78	袁红燕 等, 2011
砧木 5BB Rootstock 5BB	叶柄 Petiole	MS + BA2.5 + IBA0.05	43.33	李金凤 等, 2007
砧木 99R Rootstock 99R	叶片 Leaf	MS + BA5.0 + IBA0.1	40.54	庄智敏 等, 2006
	叶柄 Petiole	MS + BA5.0 + BA0.1	50.00	
		MS + BA1.5 + IBA0.01	20.80	陶建敏 等, 2004
	茎段 Stem	MS + BA2.0 + IBA0.02	62.50	庄智敏 等, 2006
		MS + TDZ0.7 + IBA0.2	42.90	陶建敏 等, 2004
紫苑 Shien	茎段 Stem	MS + BA2.0 + IBA0.05	30.80	

## 1.2 体细胞胚发生途径

体细胞胚发生 (Somatic embryogenesis) 途径是从植物组织上直接分化或通过胚性愈伤组织间接再生出体细胞胚。胚状体一般源于单个细胞, 更易产生均一的转化克隆, 并且胚性细胞再生能力强于叶片、叶柄、茎段等器官发生途径, 因此在葡萄转基因中具有很大应用价值, 迄今所得抗病毒转基因葡萄也大多是通过该途径获得的 (表 2)。但体细胞胚的诱导比不定芽诱导困难, 一般需要转接于几种不同培养基, 诱导过程繁琐, 需要半年甚至更长时间, 诱导率普遍较低。因此简化诱导过程、提高诱导率是将该途径更好地用于葡萄遗传转化的关键。葡萄体细胞胚发生途径主要是从葡萄生殖器官, 如子房 (Kikkert et al., 2005; López-Pérez et al., 2005; Pradoa et al., 2010)、柱头 (Morgana et al., 2004)、花药 (Gribaudo et al., 2004; Kikkert et al., 2005; Amar et al., 2007; Pradoa et al., 2010; Dhekney et al., 2012) 及整花 (Gambino et al., 2007) 等获得体细胞胚, 其中又以未成熟的花药及合子胚等更易于诱导产生胚状体。此外也有少量研究从叶片 (Martinelli et al., 1993; Dhekney et al., 2012)、叶柄 (Das et al., 2002)、卷须 (Salunkhe et al., 1997) 和茎段 (Maillot et al., 2006) 等营养结构诱导体细胞胚进而获得再生葡萄植株。王华等 (2005) 及杨晓明等 (2006) 分别建立了酿酒葡萄 ‘梅尔诺’ 和 ‘神索’ 的体细胞胚再生途径, 诱导率达 37.5% ~ 47.5%。Yang 等 (2008) 采用基本培养基 NN69 以未成熟合子胚为材料, 建立了 ‘品丽珠’ 等 6 种基因型葡萄的体细胞再生体系, 并且再生植株未发生体细胞无性系变异, 具有很好的遗传稳定性。

## 1.3 影响葡萄再生的因素

葡萄不同基因型不定芽及体细胞胚的形成能力存在差异, 砧木品种比栽培品种更易产生不定芽, 在以叶片、叶柄为外植体时, 沙地葡萄和圆叶葡萄一般较易产生体胚, 而欧洲葡萄再生出体胚的品种较少 (李云 等, 2000)。器官发生途径中以叶片、叶柄、茎段等材料均可再生出不定芽。李云等 (2002) 以叶片为外植体时顶端第 1 片幼嫩叶片再生效果最好, 其次为第 2、3 片叶。以 MS 或 NN69 为基本培养基, BA、TDZ 分别与 IBA 组合均能诱导不定芽再生, 但 TDZ 诱导效果更好 (袁

维风等, 2007; 金万梅等, 2008; Zhang et al., 2011)。叶片外植体放置方式也可能造成再生能力的差异, 红地球、‘5BB’、‘Wink’等叶片近轴面接触培养基再生效果较好(李云等, 2002; 李金凤等, 2007; Zhang et al., 2011), 而‘无核白’、砧木‘1202’等叶片远轴面接触培养基更利于不定芽再生(韩继成等, 2006b; 袁红燕等, 2011)。

## 2 遗传转化方法

### 2.1 农杆菌介导法

建立较好受体系统后, 需要有效的转化手段将外源基因导入受体系统, 其中农杆菌介导的遗传转化应用最多。农杆菌通过伤口感染植物, 其 Ti 质粒的一段 DNA 可转移进植物细胞染色体, 稳定保留并遗传给子代, 通过包含外源基因质粒的农杆菌与原生质体或植物组织共培养可实现外源基因的遗传转化。农杆菌介导法不仅可用于报告基因转化(Das et al., 2002; Dhekney et al., 2008; Dutt et al., 2008), 也可用于目的基因转化, 目前获得的绝大多数抗病毒转基因葡萄都是通过该方法实现的。农杆菌介导的转化效率受农杆菌活化程度、侵染时间、共培养时间及抗生素浓度等因素的影响。一般认为农杆菌培养至菌液 OD 值为 0.6~0.8 左右时转化能力较强(陶建敏等, 2003)。李金凤等(2009b)的研究表明葡萄砧木 5BB 在农杆菌侵染 4 min、共培养 2 d 时, 不定芽再生率和 GUS 瞬时表达率较高。转化过程中抗生素浓度过低易造成假阳性转化植株, 过高不利于转化细胞生长和植株再生。葡萄组织对常用抗生素, 如卡那霉素非常敏感, 部分品种在卡那霉素浓度为 3~10 mg·L<sup>-1</sup> 时叶片再生就完全受到抑制(韩继成等, 2006b; 庄智敏等, 2006; 李金凤等, 2009b), 不过有的品种再生抑制浓度可达 20~50 mg·L<sup>-1</sup>(孙仲序等, 2003; 金万梅等, 2008)。采取一些辅助手段, 如共培养前对受体材料预培养以及添加乙酰丁香酮(AS)等可提高转化效率(孙仲序等, 2003; 邓杰等, 2008)。

传统农杆菌介导法遗传稳定性好, 但有时转化效率不高。超声波辅助农杆菌介导法(Sonication-assisted agrobacterium-mediated transformation, SAAT), 通过超声波处理植物受体材料, 利用超声波空化效应造成目标细胞微损伤, 扩大农杆菌的感染部位, 可提高转化效率(Trick & Finer, 1997)。在葡萄转基因中, 通过超声波处理提高了砧木‘5BB’、‘美人指’、‘霞多丽’等葡萄品种的外源基因转化效率(邓杰等, 2008; 李金凤等, 2009a; 周蓓蓓等, 2010); Gago 等(2011)利用超声波辅助农杆菌介导法成功将外源基因转入葡萄品种‘Albariño’, 用于培育抗维管束病害的转基因植株。需要注意的是, 在不同葡萄品种转化中, 超声波处理条件需根据仪器设备和转化材料的不同进行相应调整和优化才能达到最佳的转化效果。

### 2.2 基因枪法

基因枪法通过一种仿枪结构装置用表面附有外源基因的金属颗粒轰击受体, 在瞬间力量作用下使外源基因进入植物细胞。该法已成功应用于葡萄遗传转化, 但多为报告基因的转化, 用裹有 GUS 和 NPT II 基因的微粒轰击葡萄胚性培养物, 获得了转基因植株(Hebert et al., 1993; Kikkert et al., 1996)。Vidal 等(2003)通过改良条件参数提高了基因枪法转化效率, 建立了稳定高效的‘霞多丽’遗传转化体系, 分别获得了 GUS、NPT II 和抗真菌基因共转化植株, 共转化频率达 48%~56%, 并证实外源基因在植株中获得稳定遗传。此外, 将基因枪法与根癌农杆菌结合转化葡萄效果较好。Scorza 等(1995, 1996)先用基因枪轰击葡萄体细胞胚两次后再与含外源基因的农杆菌共培养, 获得导入报告基因、溶菌酶 *Shirva-1* 基因或番茄环斑病毒(Tomato ringspot virus, ToRSV) CP 基因的

‘无核白’葡萄。

不论是农杆菌介导还法是基因枪法, 均是将外源基因与环状质粒载体连接构建重组质粒, 将整个质粒转入寄主, 其中包含一些不必要的载体框架序列 (Vector backbone sequence), 这些序列可能影响转化效率和转化后基因表达, 造成未知的生物安全问题。Vidal 等 (2006) 首次利用最小基因表达盒 (Minimal gene cassettes, MCs) 技术对葡萄进行基因枪法转化, 将不含载体框架序列的线性 DNA 片段 (仅包含启动子 + ORF + 终止子) 转化 ‘霞多丽’, 转化效率及目的基因转录水平与传统环状质粒转化方法相当, 报告基因和目的基因的整合和转录不影响转基因葡萄植株的表型特征, 表明这一新的转化技术具有良好的应用潜力。

### 3 葡萄抗病毒转基因研究

#### 3.1 已获得的抗病毒基因及转基因葡萄品种

利用病原物基因导入植物获得抗性植株的抗病毒策略 (Pathogen-derived resistance, PDR) 是植物抗病毒育种的热点之一, 也是葡萄抗病毒基因工程采用的主要策略, 可利用的病毒基因, 包括外壳蛋白基因、复制酶基因、反义 RNA、移动蛋白基因等。葡萄抗病毒基因工程中已成功导入的目的基因多为病毒外壳蛋白基因, 如南芥菜花叶病毒 (*Arabis mosaic nepovirus*, ArMV)、葡萄铬黄花叶病毒 (*Grapevine chrome mosaic nepovirus*, GCMV)、葡萄扇叶病毒 (*Grapevine fan leaf virus*, GFLV)、葡萄卷叶伴随病毒 2 和 3 (*Grapevine leaf roll associate virus 2 and 3*, GLRaV-2, GLRaV-3)、葡萄 A 病毒 (*Grapevine virus A*, GVA) 和葡萄 B 病毒 (*Grapevine virus B*, GVB) 等的 CP 基因, 其次还包括 GFLV 和 GVA 等病毒的 MP 基因, 已有 10 余个葡萄品种获得转病毒基因植株, 其中大多为砧木品种 (表 2)。在已导入葡萄的目的基因中, 研究最多的是 GFLV CP 基因。1995 年 Mauro 等 (1995) 和 Krastanova 等 (1995) 就已通过农杆菌介导将其分别转入砧木 41B、SO4 和欧洲葡萄以及沙地葡萄和砧木 110R。此后多项研究将 GFLV CP 基因转入欧洲葡萄、沙地葡萄及其他多个砧木品种 (表 2), Gambino 等 (2005, 2010) 还将该基因转入 ‘Nebbiolo’ 等酿酒葡萄品种。上述转基因葡萄均是通过体细胞胚再生途径获得。韩继成等 (2006a) 首次以试管苗叶片为受体将 GFLV CP 基因转入栽培品种 ‘无核白’ 获得转基因植株。Le Gall 等 (1994) 将 GCMV CP 基因转入砧木 110R, ELISA 及 Western blot 检测表明 CP 获得高水平表达。Gölles 等 (2000) 将 ArMV、GVA 和 GVB CP 基因导入自花授粉品种 ‘拉莎伽’ 及砧木 110R 的胚性细胞培养物中, 并获得再生植株。Krastanova 等 (2000) 以 5 种砧木的胚性愈伤组织为受体, 获得转 GFLV、GLRaV-2 和 GLRaV-3 CP 基因的葡萄植株。目前对病毒 CP 基因以外的其他基因转化的葡萄研究相对较少。Martinelli 等 (2002) 成功将 GVA MP 基因正义链和反义链导入沙地葡萄体细胞胚中, 获得再生植株, 通过 4 年快繁, 检测证实外源 MP 基因获得稳定插入和表达。Valat 等 (2006) 将 GFLV MP 基因导入砧木 41B, 并从细胞水平进行了抗性评价。

除完整基因外, 一些反义 RNA、小分子 RNA 等也可用于抗病毒转基因研究。Jardak-Jamoussi 等 (2009) 将 GFLV MP 基因部分片段的反向重复序列 (Inverted repeat, IR) 成功导入本氏烟和 ‘Arich Dressé’ 葡萄。天然 miRNAs 可通过降解 mRNA 及抑制翻译等方式调节转录后基因沉默, 人造 miRNAs (amiRNA) 也具有类似作用, 因此近年来逐渐被用于抗病毒转基因研究。例如, 源于 GVA ORF1 和 ORF5 靶标序列的 amiRNA 在本氏烟中瞬时表达可诱导对病毒的抗性 (Roumi et al., 2012); 源于 GFLV CP 的 amiRNA 被转入葡萄体细胞胚并获得瞬时表达, 为基于 amiRNA 策略的葡萄抗病毒研究奠定了基础 (Jelly et al., 2012)。

表 2 已导入葡萄的抗病毒目的基因及葡萄品种  
Table 2 Antiviral genes transformed into grapevine and transgenic grapevine cultivars

抗病毒的基因 Antiviral target gene	葡萄品种 Grapevine cultivar	外植体 Explant	参考文献 Reference
ArMV CP	拉莎伽、砧木 110R Russalka, 110 Richter	胚性培养物 Embryogenic cultures	Gölles et al., 2000
	沙地葡萄 <i>V. rupestris</i>	体细胞胚 Somatic embryos	Spielmann et al., 2000
GCMV CP	砧木 110R 110 Richter	体细胞胚 Somatic embryos	Le Gall et al., 1994
GFLV CP	砧木 41B、SO4、欧洲葡萄 41B, SO4, <i>V. vinifera</i> L.	悬浮细胞 Suspension cells	Mauro et al., 1995
	沙地葡萄、砧木 110R <i>V. rupestris</i> Scheele, 110 Richter	胚性愈伤组织、下胚轴 Embryogenic callus, hypocotyls	Krastanova et al., 1995
	砧木 110R、3309C 110 Richter, 3309C	体细胞胚 Somatic embryos	Xue et al., 1999
	拉莎伽、砧木 110R Russalka, 110 Richter	胚性培养物 Embryogenic cultures	Gölles et al., 2000
	砧木 3309C、河岸葡萄、MGT 101-14、110R、 沙地葡萄圣乔治、5C Rootstock 3309C, Riparia Gloire, MGT 101-14, 110 Richter, Rupestris St. George, 5C Teleki	胚性愈伤组织 Embryogenic callus	Krastanova et al., 2000
	沙地葡萄、砧木 110R <i>V. rupestris</i> Scheele, 110 Richter	胚性培养物 Embryogenic cultures	Tsvetkov et al., 2000
	内比奥罗、卢玛斯纳、蓝佛朗克 Nebbiolo, Lumassina, Blaufrankisch	胚性愈伤组织 Embryogenic callus	Gambino et al., 2005, 2010
	拉莎伽 Russalka	体细胞胚 Somatic embryos	Maghuly et al., 2006
	砧木 41B Rootstock 41B	胚性培养物 Embryogenic cultures	Valat et al., 2006
	无核白 Tomson Seedless	叶片 Leaf	韩继成 等, 2006a
GFLV MP	砧木 41B Rootstock 41B	胚性培养物 Embryogenic cultures	Valat et al., 2006
GFLV MP IR	Arich Dressé	胚性细胞 Embryonic cell	Jardak-Jamoussi et al., 2009
GFLV-derived amiRNA	霞多丽 Chardonnay	体细胞胚 Somatic embryos	Jelly et al., 2012
GLRaV 2 CP, GLRaV 3 CP	砧木 3309C、河岸葡萄、MGT 101-14、110R、 沙地葡萄圣乔治、5C 3309 C, Riparia Gloire, MGT 101-14, 110 Richter, Rupestris St. George, 5C Teleki	胚性愈伤组织 Embryogenic callus	Krastanova et al., 2000
GVA CP	拉莎伽、砧木 110R Russalka, 110 Richter	胚性培养物 Embryogenic cultures	Gölles et al., 2000
	砧木 41B Rootstock 41B	胚性细胞 Embryonic cell	Radian-Sade et al., 2000
GVA MP	沙地葡萄 <i>V. rupestris</i> Scheele	体细胞胚 Somatic embryos	Martinelli et al., 2002
GVB CP	拉莎伽、砧木 110R Russalka, 110 Richter	胚性培养物 Embryogenic cultures	Gölles et al., 2000

### 3.2 转基因植株检测分析及抗性评价

目前已获得多种转病毒基因的葡萄植株, 其中部分转基因品种的抗病性得到初步评价。从细胞水平来讲, 目的基因的导入会降低转基因葡萄植株内相关病毒基因或蛋白的积累水平。Valat 等 (2006) 采用原生质体电穿孔法 (Protoplast electroporation) 从细胞水平对导入 GFLV CP、MP 基因的葡萄砧木 41B 进行了抗性评价, 证实部分转基因葡萄可抑制病毒 MP 或 CP 积累, 并且 MP 的抑制效果受作用对象、接种剂量等因素影响。从植株表现来看, GFLV CP 转基因植株的抗性效果在不同条件下存在差异, 在田间以线虫自然传播 GFLV 时, 3/18 的转基因葡萄株系对 GFLV 表现抗性, 而在温室通过嫁接法接种 GFLV 时, 所有转基因葡萄虽未表现扇叶病症状, 但 ELISA 均检测到病毒存在, 造成这种抗性差异的原因与接种剂量及砧木、苗木生长状况有关 (Vigne et al., 2004; Gambino

et al., 2010)。

由于在葡萄上检测转基因植株抗性周期长、难度大，因此多项研究选择烟草等模式植物进行抗性评价。导入葡萄病毒 CP 基因的本氏烟对同源病毒普遍具有抗性，表现为抗病（植株在整个试验期间均无症状）或耐病（植株发病延迟或症状减弱）两种类型（Radian-Sade et al., 2000; Ling et al., 2008）。Gölles 等（2000）获得的转 GFLV CP 基因本氏烟（*Nicotiana benthamiana*）接种病毒表现出抗性效果。转化 GLRaV-2 CP 基因的本氏烟后代也具有抗性，14/20 的 T1 代未被病毒侵染，T2 代抗性植株比例低于 T1 代。导入 GFLV MP IR 的 T1 代本氏烟也可产生类似的抗病、植株恢复或延迟感染等抗性表现（Jardak-Jamoussi et al., 2009）。导入 GVA 微型复制子（Minireplicon）的转基因烟草对 GVA 具有很强抗性，60% 的 T1 代和 90% ~ 95% 的 T2 代植株表现抗性，但转基因植株对同属另一种病毒 GVB 却没有抗性（Brumin et al., 2009），这也是采用病原物基因诱导抗性策略培育转基因植株的共同缺陷。

### 3.3 转基因植株的抗病毒机理研究

转录后基因沉默（Post-transcriptional gene silencing, PTGS）是大多病原物基因诱导抗性策略转基因植物的抗病毒机制，对导入葡萄病毒源基因的转基因烟草抗性机理研究也证实这一观点（Valat et al., 2006; Ling et al., 2008; Jardak-Jamoussi et al., 2009）。转 GLRaV-2 CP 基因的本氏烟感病植株中导入基因 RNA 转录本高水平积累，抗病植株中未检测到 RNA 转录本，而在初期 RNA 的核失控转录试验中不论感病植株还是抗病植株均检测到转基因 RNA 转录本，表明抗性植株中稳定态的导入基因 RNA 转录本被沉默，也正是通过这种机制使得这些植株表现对病毒的抗性，从而不被 GLRaV-2 侵染，且转基因植株的病毒抗性始终与导入基因 RNA 转录本的低水平积累相一致。同样，导入 GVA 微型复制子的转基因烟草通过持续激发强烈的转录后基因沉默，引起导入基因低水平积累、GFP 低水平表达以及对 GVA 的抗性（Brumin et al., 2009）。值得注意的是，同一转基因株系并非所有植株都具有抗性，抗性在世代间也有所不同，影响病原物基因诱导抗性的因素包括 RNA 沉默抑制子、植株发育阶段、基因表达量及环境条件等（Ling et al., 2008; Winterhagen et al., 2009）。Winterhagen 等（2009）培育的转基因烟草中抗性植株比例与基因沉默植株比例相近，因此推测病毒抗性是转入基因诱导的转录后基因沉默所致。目前尚没有证据表明转录后基因沉默诱导与 siRNA 无关，但 Winterhagen 等（2009）的研究表明产生转录后基因沉默的接种转基因植株并不必然产生可达检测水平的 siRNA，可能低于检测水平的少量 siRNA 即可诱导沉默产生。

而 Gambino 等（2010）对 8 个转 GFLV CP 基因葡萄株系的研究却发现，部分株系中转入基因被沉默，但不论沉默与否，未接种植株均检测不到小 RNA，在 GFLV 接种后的所有转基因和非转基因葡萄中均检测到 21nt 的 siRNA，表明是病毒侵染而非转入基因诱导产生转录后基因沉默。虽然这些转基因葡萄能产生转录后基因沉默，嫁接接种也不表现症状，但却能检测到病毒存在，转入相同基因的葡萄与烟草抗性表现不一致，其原因还不明确。Vigne 等（2004）认为转基因葡萄对 GFLV 的抗性与 CP 表达水平不相关，但已知转基因烟草中 mRNA 和 CP 可获得高水平表达（Spielmann et al., 2000），而大多转基因葡萄中的 mRNA 和 CP 积累水平很低或达不到检测水平（Vigne et al., 2004; Gambino et al., 2005; Maghuly et al., 2006），因此不同寄主中这种基因表达调控的差异是否导致抗性表现不同，还有待于进一步研究。

## 4 讨论与展望

由于葡萄为多年生藤本植物，其生长周期长且再生困难，故与大田作物相比葡萄抗病毒基因工

程进展相对缓慢,虽然获得了一定数量的转基因植株,但植株后期生长发育及抗病性评价研究较少。今后可主要从以下几个方面开展研究:(1)葡萄再生频率低是限制葡萄转基因发展的关键因子,需建立高效稳定的再生体系。体细胞胚是较好的转化受体,已获得的葡萄抗病毒转基因植株多通过该途径,但目前很多品种还没有成熟的体细胞胚再生体系,在这方面应加强研究。器官途径再生相对快速简单,但通过该方法获得的转基因葡萄植株较少,今后可通过改进转化方法等提高其应用潜力并对该途径再生植株遗传稳定性进行评价。(2)建立更高效的遗传转化体系。目前所得抗病毒转基因葡萄多是通过农杆菌介导法转化的,基因枪法快速、高效,在大田作物上应用较多,而在葡萄上的成功应用较少(Hebert et al., 1993; Kikkert et al., 1996);此外在农作物转基因育种上应用较多的花粉管通道法在木本果树核桃上已有成功应用(师校欣等, 2012)。如果能将这些方法成功应用于葡萄将大大提高转化效率,缩短育种周期。(3)扩展目的基因选择范围,寻找抗性更好或可抗多种病毒的广谱抗性基因。如病毒复制酶基因介导的抗性可能优于CP基因(徐章逸, 2006)。已获得的转基因植株多为针对某种病毒的单一抗性,葡萄由于多年生和无性繁殖等因素常造成多种病毒的复合侵染,因此亟需寻找广谱抗病基因。粟酒裂殖酵母 *Pac-1* 基因表达产物可降解多种病毒及类病毒 dsRNA,其转基因小麦对大麦黄矮病毒(*Barley yellow dwarf virus*, BYDV)表现抗性(燕飞等, 2006; 李黎等, 2008),因此可考虑将其转化葡萄观察是否能获得相对广谱病毒抗性。(4)加强对转基因植株的后期评价,如基因表达调控、抗性评价、农艺性状、遗传稳定性及生物安全性评价等。由于葡萄生长周期长、病毒潜伏时间长或难以表现症状等原因,转基因葡萄对病毒的抗病性评价一直是一个薄弱环节,抗性鉴定也多针对于烟草等模式植物,因此需要对转基因葡萄的病毒抗性进行监测。(5)进行转基因植株的抗病毒机制研究。已有研究发现,转葡萄病毒CP基因的植株抗性与转录后基因沉默有关(Valat et al., 2006; Ling et al., 2008),但其抗性影响因子及在葡萄植株中的作用机制等尚不明确,对这一领域的深入研究将有助于进一步明确转基因植株抗病毒机理,从而提高植株抗性提供理论基础。

## References

- Amar A B, Cobanov P, Boonrod K, Krczal G, Bouzid S, Ghorbel A, Reustle G M. 2007. Efficient procedure for grapevine embryogenic suspension establishment and plant regeneration: role of conditioned medium for cell proliferation. *Plant Cell Reports*, 26 (9): 1439 - 1447.
- Berres R, Otien L, Tinland B, Malgarini-Clog E, Walter B. 1992. Transformation of *Vitis* tissue by different strains of *Agrobacterium tumefaciens* containing the T-6b gene. *Plant Cell Reports*, 11 (4): 192 - 195.
- Brumin M, Stukalov S, Haviv S, Muruganantham M, Moskovitz Y, Batuman O, Fenigstein A, Mawassi M. 2009. Post-transcriptional gene silencing and virus resistance in *Nicotiana benthamiana* expressing a *Grapevine virus A* minireplicon. *Transgenic Research*, 18: 331 - 345.
- Chen Li-geng, Liu Shu-fang, Hu Xi-qin. 2001. Development and studies on *LEAFY* genetic transformation system with high efficiency in commercial grape (*Vitis vinifera* L. var. *muscat*). *Journal of Zhejiang University: Agric & Life Sci*, 27 (5): 523 - 526. (in Chinese)
- 陈力耕, 刘淑芳, 胡西琴. 2001. 葡萄高效再生体系的建立及转 *LEAFY* 基因的研究. *浙江文学学报: 农业与生命科学版*, 27 (5): 523 - 526.
- Colby S M, Juncosa A M, Meredith C P, Cellul A R. 1991. Cellular differences in *Agrobacterium* susceptibility and regenerative capacity restrict the development of transgenic grapevines. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116 (2): 356 - 361.
- Das D K, Reddy M K, Upadhyaya K C, Sopory S K. 2002. An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 20 (11): 999 - 1005.
- Deng Jie, Cao Yin-sheng, Liu Cai-yu, Liu Xin, Xue Ren-gao. 2008. Optimizing conditions for *Agrobacterium*-mediated transformation of Chardonnay grape cultivar's embryogenic cell. *Journal of Fruit Science*, 25 (2): 236 - 239. (in Chinese)
- 邓杰, 曹银生, 刘彩玉, 刘新, 薛仁高. 2008. 农杆菌介导霞多丽葡萄胚性细胞系遗传转化条件的优化. *果树学报*, 25 (2): 236 - 239.
- Dhekney S A, Li Z T, Dutt M, Gray D J. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cultures and plant regeneration in *Vitis rotundifolia* Michx. (*Muscadine grape*). *Plant Cell Reports*, 27 (5): 865 - 872.



- Dhekney S A, Li Z T, Dutt M, Gray D J. 2012. Initiation and transformation of grapevine embryogenic cultures. *Methods Mol Biol*, 847: 215 - 225.
- Dutt M, Li Z T, Dhekney S A, Gray D J. 2008. A co-transformation system to produce transgenic grapevines free of marker genes. *Plant Science*, 175 (3): 423 - 430.
- Gago J, Grima-Pettenati J, Gallego P P. 2011. Vascular-specific expression of *GUS* and *GFP* reporter genes in transgenic grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Albariño) conferred by the EgCCR promoter of *Eucalyptus gunnii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 (4): 413 - 419.
- Gambino G, Gribaudo I, Leopold S, Scharl A, Laimer M. 2005. Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: I. *Plant Cell Reports*, 24 (11): 655 - 662.
- Gambino G, Perrone I, Carra A, Chitarra W, Boccacci P, Marinoni D T, Barberis M, Maghuly F, Laimer M, Gribaudo I. 2010. Transgene silencing in grapevines transformed with GFLV resistance genes: analysis of variable expression of transgene, siRNAs production and cytosine methylation. *Transgenic Research*, 19 (1): 17 - 27.
- Gambino G, Ruffa P, Vallania R, Gribaudo I. 2007. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 90 (1): 79 - 83.
- Gölles R, Moser R, Pühringer H, Katinger H, Laimer da Câmara Machado M, Minafra A, Savino V, Saldarelli P, da Câmara Machado G P M. 2000. Transgenic grapevine expressing coat protein gene sequences of *Grapevine fanleaf virus*, *Arabis mosaic virus*, *Grapevine virus A* and *Grapevine virus B*. *Acta Horticulturae*, 528: 305 - 311.
- Gribaudo I, Gambino G, Vallania R. 2004. Somatic embryogenesis from grapevine anthers: The optimal developmental stage for collecting explants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55 (4): 427 - 430.
- Han Ji-cheng, Chen Ning, Chen Shuang-ying, Zhang De-ming, Cai Wen-qi. 2006a. Plant regeneration of grape leaves and genetic transformation of GFLV-CP gene. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 10 (3): 6 - 9. (in Chinese)  
韩继成, 陈 宁, 陈霜莹, 章德明, 蔡文启. 2006a. 葡萄叶片植株再生及 GFLV-CP 基因的转化. *河北农业科学*, 10 (3): 6 - 9.
- Han Ji-cheng, Chen Ning, Chen Shuang-ying, Zhang De-ming, Cai Wen-qi. 2006b. The effects of different treatments on genetic transformation of grapevine. *Molecular Plant Breeding*, 4 (5): 670 - 674. (in Chinese)  
韩继成, 陈 宁, 陈霜莹, 章德明, 蔡文启. 2006b. 不同处理对无病毒葡萄离体叶片遗传转化的影响. *分子植物育种*, 4 (5): 670 - 674.
- He Zhu, Shi Xiao-xin, Du Guo-qiang, Ge Jing-ru. 2007. Study on the regeneration system from leaves of summer royal grape *in vitro*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 23 (2): 74 - 76. (in Chinese)  
贺 柱, 师校欣, 杜国强, 葛静茹. 2007. 皇家夏天葡萄离体叶片再生体系的建立. *中国农学通报*, 23 (2): 74 - 76.
- Hebert D, Kikkert J R., Smith F D, Reisch B I. 1993. Optimization of biolistic transformation of embryogenic grape cell suspensions. *Plant Cell Reports*, 12 (10): 585 - 589.
- Jardak-Jamoussi R, Winterhagen P, Bouamama B, Dubois C, Mliki A, Wetzell T, Ghorbel A, Reustle G. 2009. Development and evaluation of a GFLV inverted repeat construct for genetic transformation of grapevine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 97 (2): 187 - 196.
- Jelly N S, Schellenbaum P, Walter B, Maillot P. 2012. Transient expression of artificial microRNAs targeting *Grapevine fanleaf virus* and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos. *Transgenic Research*, 21: 1319 - 1327.
- Jin Wan-mei, Dong Jing, Wang Yuan-hua, Mao Hai-liang, Xiao Zheng, Chen Mei-xiang. 2009. Genetic fidelity of regeneration adventitious shoots in grape through organogenesis. *Molecular Plant Breeding*, 7 (2): 375 - 379. (in Chinese)  
金万梅, 董 静, 王媛花, 毛海亮, 肖 政, 陈梅香. 2009. 葡萄器官发生途径再生不定芽的遗传稳定性. *分子植物育种*, 7 (2): 375 - 379.
- Jin Wan-mei, Dong Jing, Yan Ai-ling, Wang Yi, Chen Mei-xiang, Han Zhen-hai. 2008. Studies on adventitious shoots regeneration and transformation system of grape *in vitro*. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (1): 27 - 32. (in Chinese)  
金万梅, 董 静, 闫爱玲, 王 忆, 陈梅香, 韩振海. 2008. 葡萄器官离体再生和遗传转化体系的建立. *园艺学报*, 35 (1): 27 - 32.
- Kikkert J R, Hebert-Soule D, Wallace P G, Streim M J, Reisch B I. 1996. Transgenic plantlets of 'Chancellor' grapevine (*Vitis* sp.) from biolistic transformation of embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Reports*, 15 (5): 311-316.
- Kikkert J R, Streim M J, Vidal J R, Wallace P G, Barnard J, Reisch B I. 2005. Long term study of somatic embryogenesis from anthers and ovaries of 12 grapevine (*Vitis* sp.) genotypes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41 (3): 232 - 239.
- Krastanova S, Ling K S, Zhou H Y, Xue B, Burr T J, Gonsalves D. 2000. Development of transgenic grapevine rootstocks with genes from *Grape vine fanleaf virus* and *Grapevine leafroll associated viruses 2 and 3*. *Acta Horticulturae*, 528: 367 - 371.

- Krastanova S, Perrin M, Barbier P, Demangeat G, Cornuet P, Bardonnet N, Otten L, Pinck L, Walter B. 1995. Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of *Grapevine fanleaf nepovirus*. *Plant Cell Reports*, 14 (9): 550 - 554.
- Le Gall O, Torregrosa L, Danglot T, Candresse T, Bouquet A. 1994. Agrobacterium mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of *Grapevine chrome mosaic nepovirus* (GCMV). *Plant Science*, 102 (2): 161 - 170.
- Li Jin-feng, Tao Jian-min, Mi Lin, Li Guo-ping, Zhang Zhen. 2009a. Transformation condition for grape rootstock 5BB by SAAT. *Jiangsu Agr Sci*, 25 (5): 1190 - 1192. (in Chinese)
- 李金凤, 陶建敏, 糜林, 李国平, 章镇. 2009a. 葡萄砧木 5BB 超声波辅助农杆菌介导法遗传转化的条件. *江苏农业学报*, 25 (5): 1190 - 1192.
- Li Jin-feng, Yang Li-na, Zhou Bei-bei, Zhang Zhen, Tao Jian-min. 2009b. Genetic transformation system grape rootstock 5BB (*Vitis berlandieri* × *V. riparia*) mediated by agrobacterium. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 25 (3): 715 - 717. (in Chinese)
- 李金凤, 杨丽娜, 周蓓蓓, 章镇, 陶建敏. 2009b. 葡萄砧木 5BB 农杆菌介导法的遗传转化体系. *江苏农业学报*, 25 (3): 715 - 717.
- Li Jin-feng, Zhang Zhen, Zhuang Zhi-min, Tong Zhao-guo, Tao Jian-min. 2007. Plant regeneration of grape rootstock '5BB'. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 27 (7): 1323 - 1328. (in Chinese)
- 李金凤, 章镇, 庄智敏, 佟兆国, 陶建敏. 2007. 离体条件下葡萄砧木 '5BB' 植株再生体系研究. *西北植物学报*, 27 (7): 1323 - 1328.
- Li Li, Li Shi-fang, Guo Li-hua, Wu Zu-jian, Wang Hong-qing. 2008. *In vitro* activity assay of dsRNA nuclease PAC 1 to digest dsRNAs of 4 plant viruses and 3 viroids, and *pac 1* transgenic tobacco mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 38 (5): 489 - 495. (in Chinese)
- 李黎, 李世访, 郭立华, 吴祖建, 王红清. 2008. dsRNA 分解酶 PAC 1 对 4 种植物病毒、3 种类病毒 dsRNA 的降解活性检测及转 *pac 1* 基因烟草的获得. *植物病理学报*, 38 (5): 489 - 495.
- Li Yun, Feng Hui, Tian Yan-ting. 2000. Progress in the studies of grape regeneration system. *Blotechnology Information*, (2): 28 - 31. (in Chinese)
- 李云, 冯慧, 田砚亭. 2000. 葡萄再生系统研究进展. *生物技术通报*, (2): 28 - 31.
- Li Yun, Feng Hui, Tian Yan-ting. 2002. Study on 'Red Globe' grape leaf and petiole adventitious bud regenerating system. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (1): 60 - 62. (in Chinese)
- 李云, 冯慧, 田砚亭. 2002. '红地球' 葡萄叶片、叶柄不定芽再生体系的建立. *园艺学报*, 29 (1): 60 - 62.
- Ling K S, Zhu H Y, Gonsalves D. 2008. Resistance to *Grapevine leafroll associated virus-2* is conferred by post-transcriptional gene silencing in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Transgenic Research*, 17 (4): 733 - 740.
- Liu Xiao, Chen Jian, Wang Jian-hui, Liu Jian-jun. 2006. Identification of virus diseases in some grapevine cultivars and evaluation of their sanitary state. *Journal of Fruit Science*, 23 (6): 846 - 849. (in Chinese)
- 刘晓, 陈建, 王建辉, 刘建军. 2006. 部分葡萄品种的疾病病鉴定及健康状况评价. *果树学报*, 23 (6): 846 - 849.
- López-Pérez A J, Carreno J, Martí nez-Cutillas A, Dabauza M. 2005. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis*, 44 (2): 79 - 85.
- Maghuly F, Leopold S, Machado A D, Fernandez E B, Khan M A, Gambino G, Gribaudo I, Scharl A, Laimer M. 2006. Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: II. *Plant Cell Reports*, 25 (6): 546 - 553.
- Maillot P, Kieffer F, Walter B. 2006. Somatic embryogenesis from stem nodal sections of grapevine. *Vitis*, 45 (4): 185 - 189.
- Martelli G P. 2012. Grapevine virology highlights: 2010 - 2012. Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, California, USA: 13 - 31.
- Martinelli L, Bragagna P, Poletti V, Scienza A. 1993. Somatic embryogenesis from leaf and petiole derived callus of *Vitis rupestris*. *Plant Cell Reports*, 12 (4): 207 - 210.
- Martinelli L, Candioli E, Costa D, Minafra A. 2002. Stable insertion and expression of the movement protein gene of *Grapevine virus A* (GVA) in grape (*Vitis rupestris* S). *Vitis*, 41 (4): 189 - 193.
- Mauro M C, Toutaina S, Walter B, Pinck L, Otten L, Coutos-Thevenot P, Deloire A, Barbier P. 1995. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Science*, 112 (1): 97 - 106.
- Morgana C, Di Lorenzo R, Carimi F. 2004. Somatic embryogenesis of *Vitis vinifera* L. (cv. Sagraone) from stigma and style culture. *Vitis*, 43 (4): 169 - 173.
- Mullins M G, Archie Tang F C, Facciotti D. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformmion of grapevines: Transgenic plants of *Vitis rupestris* Schelle

- and shoots of *Vitis vinifera* L. *Nature Biotechnology*, 18 (8): 1041 - 1045.
- Pradoa M J, Grueiroa M P, González M V, Testillano P S, Domínguez C, López M, Rey M. 2010. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from anthers and ovaries of six autochthonous grapevine cultivars from Galicia (Spain). *Scientia Horticulturae*, 125 (3): 342 - 252.
- Roumi V, Afsharifar A, Saldarelli P, Niazi A, Martelli G P, Izadpanah K. 2012. Transient expression of artificial microRNAs confers resistance to *Grapevine virus A* in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Plant Pathology*, 94 (3): 643 - 649.
- Radian-Sade S, Perl A, Edelbaum O, Kuznetsova L, Gafny R, Sela I, Tanne E. 2000. Transgenic *Nicotiana benthamiana* and grapevine plants transformed with *Grapevine virus A* (GVA) sequences. *Phytoparasitica*, 28 (1): 79 - 96.
- Salunkhe C K, Rao P S, Mhatre M. 1997. Induction of somatic embryogenesis and plantlets in tendrils of *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Reports*, 17 (1): 65 - 67.
- Scorza R, Cordts J M, Ramming D W, Emershad R L. 1995. Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plant. *Plant Cell Reports*, 14 (9): 589 - 592.
- Scorza R, Cordts J M. 1996. Producing transgenic 'Thompson Seedless' grape (*Vitis vinifera* L.) plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 12 (4): 616 - 619.
- Shi Xiao-xin, Du Guo-qiang, He Zhu, Xu Hong-hai. 2008. Effects of explants and culture status on adventitious bud regeneration in grapes. *Journal of Fruit Science*, 25 (4): 585 - 588. (in Chinese)
- 师校欣, 杜国强, 贺 柱, 徐洪海. 2008. 外植体及培养条件对葡萄不定芽再生的影响. *果树学报*, 25 (4): 585 - 588.
- Shi Xiao-xin, Du Guo-qiang, Wang Xiao-man, Pei Dong. 2012. Studies on gene transformation via pollen tube pathway in walnut. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (7): 1243 - 1252. (in Chinese)
- 师校欣, 杜国强, 王晓蔓, 裴 东. 2012. 花粉管通道法遗传转化核桃的研究. *园艺学报*, 39 (7): 1243 - 1252.
- Spielmann A, Krastanova S, Douet-Orhant V, Gugerli P. 2000. Analysis of transgenic grapevine (*Vitis rupestris*) and *Nicotiana benthamiana* plants expressing an *Arabidopsis mosaic virus* coat protein gene. *Plant Science*, 156 (2): 235 - 244.
- Sun Zhong-xu, Chen Shou-yi, Wang Jian-she, Li Gui-fen, Guan Xue-qiang. 2003. Research of transform to grape with BADH gene by *Agrobacterium*. *Journal of Fruit Science*, 20 (2): 89 - 92. (in Chinese)
- 孙仲序, 陈受宜, 王建设, 李桂芬, 管雪强. 2003. 农杆菌介导 BADH 基因转化葡萄的研究. *果树学报*, 20 (2): 89 - 92.
- 陶建敏, 耿其芳, 庄智敏, 蔡斌华, 章 镇. 2004. 葡萄不定芽离体诱导再生植株的研究. *河北林业科技*, (5): 53 - 56.
- Tao Jian-min, Zhuang Zhi-min, Zhang Zhen, Cai Bin-hua. 2003. Advances in research on genetic transformation in grapevine. *Journal of Fruit Science*, 20 (5): 384 - 387. (in Chinese)
- 陶建敏, 庄智敏, 章 镇, 蔡斌华. 2003. 葡萄基因转导研究进展. *果树学报*, 20 (5): 384 - 387.
- Tao Jian-min, Zhuang Zhi-min, Zhang Zhen, Geng Qi-fang, Cai Bin-hua. 2005. Study on plant regeneration from *in vitro* culture of *Vitis vinifera* cv. Manicure finger. *Journal of Fruit Science*, 22 (5): 551 - 553. (in Chinese)
- 陶建敏, 庄智敏, 章 镇, 耿其芳, 蔡斌华. 2005. 美人指葡萄不定芽离体诱导再生植株的研究. *果树学报*, 22 (5): 551 - 553.
- Trick H N, Finer J J. 1997. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Research*, 6 (5): 329 - 336.
- Tsvetkov I J, Atanassov A V, Tsoleva V M. 2000. Gene transfer for stress resistance in grapes. *Proceedings of the seventh international symposium on grapevine genetics and breeding. Acta Horticulturae*, 528: 389 - 394.
- Valat L, Fuchs M, Burrus M. 2006. Transgenic grapevine rootstock clones expressing the coat protein or movement protein genes of *Grapevine fanleaf virus*: Characterization and reaction to virus infection upon protoplast electroporation. *Plant Science*, 170 (4): 739 - 747.
- Vidal J R, Kikkert J R, Donzelli B D, Wallace P G, Reisch B I. 2006. Biolistic transformation of grapevine using minimal gene cassette technology. *Plant Cell Reports*, 25 (8): 807 - 814.
- Vidal J R, Kikkert J R, Wallace P G, Reisch B I. 2003. High-efficiency biolistic co-transformation and regeneration of 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) containing npt-II and antimicrobial peptide genes. *Plant Cell Reports*, 22 (4): 252 - 260.
- Vigne E, Komar V, Fuchs M. 2004. Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of *Grapevine fanleaf virus*. *Transgenic Research*, 13 (2): 165 - 179.
- Wang Hua, Cui Fu-jun, Zhang Ji-shu. 2004. Adventitious bud regeneration from leaf and petiole of 'Cabernet Sauvignon'. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 32 (8): 49 - 52. (in Chinese)
- 王 华, 崔福君, 张继澍. 2004. 酿酒葡萄 '赤霞珠' 叶片和叶柄离体再生系统建立的研究. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 32 (8):

- 49 - 52.
- Wang Hua, Lu Jiang, Ma Chun-hua, Zhang Ji-shu. 2005. Somatic embryogenesis and organogenesis regeneration system of winegrape 'Merlot Noir'. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 25 (5): 858 - 863. (in Chinese)
- 王 华, 卢 江, 马春花, 张继澍. 2005. 酿酒葡萄 '梅尔诺' 再生系统建立的研究. *西北植物学报*, 25 (5): 858 - 863.
- Wang Jing-dong, Zhang Li, Ma Hong-ai, Chen Xiao-jun, Guan Ya-jing, Song Yu-xia. 2011. High efficient regeneration system establishment of three grape cultivars in Ningxia. *Bei Fang Yuan Yi*, (22): 118 - 121. (in Chinese)
- 王敬东, 张 丽, 马洪爱, 陈晓军, 关雅静, 宋玉霞. 2011. 宁夏三个葡萄品种高效再生体系的建立. *北方园艺*, (22): 118 - 121.
- Wang Sheng-ji, Zhao Jiu-hua, Shang You-fen, Lv Zhi-hua, Zhang Jia-kui, Zhao Ya, Dai Zheng. 2011. Research on the survey and detection of several kinds of main grapevine viruses in Shandong province. *Bei Fang Yuan Yi*, (7): 20 - 23. (in Chinese)
- 王升吉, 赵玖华, 尚佑芬, 吕志华, 张加魁, 赵 亚, 戴 争. 2011. 山东省葡萄几种主要病毒病调查及检测研究. *北方园艺*, (7): 20 - 23.
- Winterhagen P, Dubois C, Sinn M, Wetzel T, Reustle G M. 2009. Gene silencing and virus resistance based on defective interfering constructs in transgenic *Nicotiana benthamiana* is not linked to accumulation of siRNA. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 739 - 742.
- Xu Zhang-yi. 2006. Gene cloning, expressing in *E. coli* of two grapevine leaf-roll associated viruses and preliminary establishment of grapevine transformation system [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agriculture University. (in Chinese)
- 徐章逸. 2006. 两种葡萄卷叶伴随病毒的基因克隆、原核表达及葡萄遗传转化体系的初步建立 [博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Xue B D, Ling K S, Reid C L, Krastanova S V, Sekiya M E, Momol E A, Sule S, Mozsar J, Gonsalves D, Burr T J. 1999. Transformation of five grape rootstocks with plant virus genes and a *virE2* gene from *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35 (3): 226 - 231.
- 燕 飞, 郑银英, 张文蔚, 肖 红, 李世访, 成卓敏. 2006. 农杆菌介导法获得转 *pac1* 基因小麦并表现对大麦黄矮病毒的抗性. *科学通报*, 51 (16): 1906 - 1912.
- Yang X M, An L Z, Xiong Y C, Zhang J P, Li Y, Xu S J. 2008. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos and monitoring the genetic fidelity of regenerated plants in grapevine. *Biologia Plantarum*, 52 (2): 209 - 214.
- Yang Xiao-ming, An Li-zhe, Wang Ya-mei, Li Sheng. 2006. Somatic embryogenesis and analysis of the genetic stability of regeneration system in grapevine 'Sinsaut'. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (6): 1317 - 1320. (in Chinese)
- 杨晓明, 安黎哲, 王雅梅, 李 胜. 2006. 酿酒葡萄 '神索' 体胚发生及再生体系遗传稳定性分析. *园艺学报*, 33 (6): 1317 - 1320.
- Yu Zhi-ying, Zhang Ping, Ren Jun-peng, Zhang Zhen, Yuan Hong-yan, Tao Jian-min. 2011. Regeneration of grape 'Manicure Finger' (*Vitis vinifera*) from its isolated explants. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 23 (5): 44 - 49. (in Chinese)
- 余智莹, 张 平, 任俊鹏, 章 镇, 袁红燕, 陶建敏. 2011. 美人指葡萄再生体系的建立. *江西农业学报*, 23 (5): 44 - 49.
- Yuan Hong-yan, Yu Zhi-ying, Zhang Zhen, Tao Jian-min. 2011. Establishment of regeneration system of grape rootstock '1202' *in vitro*. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 23 (8): 27 - 30. (in Chinese)
- 袁红燕, 余智莹, 章 镇, 陶建敏. 2011. 葡萄砧木 '1202' 离体再生体系的建立. *江西农业学报*, 23 (8): 27 - 30.
- Yuan Wei-feng, Xu Kai, Liao Hong-yan, Qian Yu-mei, Xu De-cong. 2007. Adventitious bud regeneration from 'Pinot noir' grape. *Journal of Anhui Agricultural University*, 34 (1): 120 - 123. (in Chinese)
- 袁维风, 徐 凯, 廖红艳, 钱玉梅, 徐德聪. 2007. '黑比诺' 葡萄不定芽离体再生的研究. *安徽农业大学学报*, 34 (1): 120 - 123.
- Zhang P, Yu Z Y, Cheng Z M, Zhang Z, Tao J M. 2011. *In vitro* explants regeneration of the grape 'Wink' (*Vitis vinifera* L. 'Wink'). *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 3 (11): 276 - 282.
- Zhou Bei-bei, Chen Yue-hong, Zhang Zhen, Tao Jian-min. 2010. Effect of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated genetic transformation on instantaneous expression of *GUS* in grape variety 'Meirenzhi'. *Acta Agriehume Jiangxi*, 22 (4): 6 - 8. (in Chinese)
- 周蓓蓓, 陈月红, 章 镇, 陶建敏. 2010. 超声波辅助对农杆菌介导 '美人指' 葡萄遗传转化中 *GUS* 瞬时表达的影响. *江西农业学报*, 22 (4): 6 - 8.
- Zhou Peng, Guo An-ping, Wang Yue-jin, Li Xiao-ying. 2002. Plant regeneration induced from calli of explants of grapes. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 23 (3): 52 - 57. (in Chinese)
- 周 鹏, 郭安平, 王跃进, 黎小瑛. 2002. 2 个葡萄品系外植体愈伤组织诱导和植株再生. *热带作物学报*, 23 (3): 52 - 57.
- 庄智敏, 陶建敏, 李金凤, 蔡斌华, 杨丽娜, 章 镇. 2006. 葡萄砧木 99R 再生体系的建立. *江苏农业科学*, (6): 211 - 216.