

欧洲葡萄体胚诱导及农杆菌介导的遗传转化研究

谭 超, 张剑侠, 王跃进

(西北农林科技大学 园艺学院, 农业部西北园艺植物种质资源利用重点开放实验室,

陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:以欧洲葡萄(*Vitis vinifera* L.)品种“无核白”(‘Thompson Seedless’)、“佳利酿”(‘Carignane’)、“红地球”(‘Red Globe’)的雄蕊、雌蕊和花蕾为外植体,对花器官体细胞胚诱导及农杆菌介导的转芪合成酶基因进行研究。结果表明:所采用的5种胚性愈伤组织诱导培养基中,MC培养基较适于雄蕊胚性愈伤组织的诱导,“无核白”、“佳利酿”和“红地球”雄蕊的胚性愈伤组织诱导率分别为1.7%、0.3%和11.8%;PIV培养基可诱导“无核白”和“佳利酿”雌蕊胚性愈伤组织形成,诱导率分别为4.0%和3.2%,而“红地球”雌蕊在MC培养基上诱导率最高,达5.6%;仅“红地球”的花蕾在MS1培养基上可诱导产生胚性愈伤组织,诱导率为0.5%。改良X₆液体培养基较有利于次生胚的诱导;B培养基有利于体细胞胚萌发成苗。转基因材料经抗性筛选和植株再生,获得了2株“无核白”抗性苗,经PCR和PCR-Southern检测表明,目的基因被整合到转基因植株中。

关键词:葡萄;花器官;体细胞胚;植株再生;转基因

中图分类号:S 663.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)19-0113-05

葡萄(*Vitis* L.)是世界上栽培历史最长的果树种类之一^[1],也是世界性第二大水果。生产上广泛栽培的葡萄品种属于欧洲葡萄种(*Vitis vinifera* L.),风味好,坐果率高,耐储运;但抗病性、抗寒性差^[2]。通过转基因手段是解决欧洲葡萄抗性差问题的重要育种途径之一。由于葡萄本身基因型的复杂性,迄今为止葡萄的遗传转化率仍然较低。Jayasankar等^[3]认为,要通过遗传转化的方式提高葡萄品质,就必须建立高效的再生体系。Gresshoff等^[4]在1974年首先通过葡萄胚状体发生途径成功获得了再生植株,之后国内外研究者分别从雌蕊^[5-6]、雄蕊^[6-9]、花蕾^[10]上诱导出胚状体,并获得再生植株。但是目前体细胞诱导、培养的过程繁琐耗时,且诱导率一般较低^[11-12]。许多研究者^[6,11,13]认为,葡萄体胚发生是一个多因素共同作用的过程,影响因素包括基因型、外植体来源及培养基条件等。因此,葡萄体胚诱导与再生体系建立研究仍是目前葡萄转基因研究的重要

前提。试验以欧亚种葡萄品种“无核白”、“红地球”和“佳利酿”的雄蕊、雌蕊和花蕾为外植体进行体细胞胚诱导,比较5种不同培养基对胚性愈伤组织诱导的影响,3种不同培养基对次生胚诱导的影响,3种不同培养基对体胚萌发的影响;并进一步对获得的体胚通过农杆菌介导法进行了转芪合成酶基因研究。旨在获得欧洲葡萄体胚诱导及遗传转化的技术体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试葡萄品种“无核白”(*Vitis vinifera* L. cv. ‘Thompson Seedless’)、“佳利酿”(*Vitis vinifera* L. cv. ‘Carignane’)、“红地球”(*Vitis vinifera* L. cv. ‘Red Globe’)均取自西北农林科技大学葡萄种质资源圃。

植物表达载体:根癌农杆菌菌株GV3101。植物表达载体含有长约500 bp的目的基因VpSTSgDNA2(登录号:FJ830330)、中国野生葡萄白河35-1芪合成酶基因特异启动子P_{vSTS}(登录号:FJ605484)、筛选标记基因HPT II及增强元件CaMV35S Enhancer和TMV Ω。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 将获得的花穗在自来水下冲洗30 min,在超净工作台上用70%酒精漂洗30 s,无菌水冲洗2次;用有效氯1%的NaClO浸泡15 min后,无菌水冲洗3次;再用有效氯1%的NaClO浸泡10 min,无菌水冲洗3次。然后从花蕾中剥离雄蕊和雌蕊,分别接种培养。

1.2.2 胚性愈伤组织的诱导 将雄蕊、雌蕊和花蕾按品

第一作者简介:谭超(1985-),男,在读硕士,研究方向为葡萄遗传育种。E-mail:tanchaos@163.com

责任作者:王跃进(1958-),男,教授,博士生导师,现主要从事葡萄种质资源与生物技术育种研究工作。E-mail:wangyj@nwsuaf.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30971972);现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-30-yz-7);公益性行业(农业)科研专项经费资助项目(200903044)。

收稿日期:2012-06-14

种分别接种于 MS1、MSA^[9]、PIV^[6]、MC^[14]、MSI 5 种不同培养基(表 1)上。其中 MS1、PIV、MC 使用 B₅ 培养基的有机成分;MS1 和 MC 培养基附加 500 mg/L 谷氨酰胺;MSA 培养基添加 800 mg/L 酪蛋白和 2.5 g/L 活性炭,并以 5 g/L Agar(Sigma)作固化剂,pH 6.2;MS1 和 MSI 培养基使用 7 g/L Agar(Sigma)作固化剂,pH 分别为 5.8 和 6.0;PIV 和 MC 培养基则使用 3 g/L Phytogel(Sigma)作固化剂;MC 培养基 pH 为 5.8 而 PIV 培养基的 pH 5.7。所有培养基经过 25 min 高温高压灭菌后在无菌操作台内分装待用。外植体接种后在 25℃ 暗条件下培养,每 3 周继代 1 次,直到诱导出胚性愈伤组织;其中雄蕊剥离时应保持花丝与花药的完整连接。观察胚性愈伤组织发育情况并统计胚性愈伤组织诱导率。胚性愈伤组织诱导率(%)=胚性愈伤组织数量/接种外植体数量×100。

表 1 葡萄花器官胚性愈伤组织诱导培养基

Table 1 Medium for embryogenic callus induction from floral organ of grapevine

培养基	无机元素	2,4-D	BA	NOA	4-CPPU	蔗糖
Medium	Inorganic element	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	Source/%
MS1	MS	0.55	—	0.505	1.24	3
MSA	MS	2.0	0.2	—	—	6
PIV	Nitsch	1.0	2.0	—	—	6
MC	Nitsch	0.55	—	0.505	1.24	3
MSI	MS	1.1	1.0	—	—	2

1.2.3 体胚的诱导 将诱导获得的胚性愈伤组织转接于不含植物激素的 X₆ 固体培养基^[15]上,25℃ 暗条件下培养,每 2 周继代 1 次,直到诱导出体细胞胚。

1.2.4 次生胚的诱导 将诱导出的体胚团先用不含激素的 MS 液体培养基 120 r/min,25℃ 下避光摇散,再分别接种于 3 种培养基中诱导次生胚(表 2)。培养基 I:不含植物激素的 X₆ 固体培养基,添加 0.5 g/L 活性炭,pH 6.0;培养基 II:含 1.0 mg/L IAA 和 1.0 mg/L BA 的 X₆ 液体培养基,附加 400 mg/L 谷氨酰胺,pH 5.8,摇床转速 120 r/min。培养基 III:1/2MS 培养基附加 1 mg/L IAA,pH 5.8。所有培养基均用 100 mL 三角瓶分装,每个三角瓶接种 10 个胚,重复 3 次。25℃ 避光培养。培养基 I、II 中的体胚每 2 周继代 1 次,培养基 II 中的体胚每周与等量或更多的新鲜液体培养基混匀后均分。2 个月后统计次生胚的诱导率。次生胚的诱导率(%)=形成次生胚的总数/接种体胚总数×100。

表 2 次生胚诱导培养基

Table 2 Medium for secondary embryogenesis induction

培养基	大量元素	微量元素	有机成分	IAA	BA	蔗糖
Medium	Macroelement	Microelement	Organic component	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	Source/%
培养基 I	X ₆	MS	X ₆	—	—	2
培养基 II	X ₆	MS	MS	1.0	1.0	6
培养基 III	1/2MS	MS	MS	1.0	—	6

1.2.5 体胚萌发及成苗 将获得的体胚转入 3 种不同的萌发培养基中:培养基 A:1/2MS 培养基附加 3% 蔗糖、0.25 g/L 活性炭以及 1.75 mg/L IAA 和 0.35 mg/L GA;培养基 B:其它条件相同的 X₆ 培养基;培养基 C:不含植物激素的 X₆ 培养基,附加 3% 蔗糖和 0.25 g/L 活性炭。所有培养基 pH 5.8,在 25℃,60 μmol · m⁻² · s⁻¹,16 h/8h 冷白光下培养,观察体胚萌发情况并统计萌发率。萌发率(%)=萌发胚的总数/接种体胚总数×100。将萌发的体胚转入 WPM 成苗培养基,附加 0.15 mg/L IBA、2% 蔗糖和 1.0 g/L 活性炭。在 25℃,45 μmol · m⁻² · s⁻¹,16 h/8h 冷白光下培养。成苗率(%)=成苗数/萌发体胚数×100。

1.2.6 遗传转化 将获得的体胚用活化好的农杆菌菌液侵染 10 min,共培养 48 h 后,用浓度为 500 mg/L 的 Cef 溶液、Carb 溶液和无菌水各冲洗 2 遍,再置于含有 200 mg/L 的 Cef、200 mg/L 的 Carb 和 1 mg/L Hyg 的 X₆ 筛选培养基中,每 2 周继代 1 次,并逐步增加潮霉素浓度至 10 mg/L,并逐渐降低 Cef 和 Carb 浓度至 100 mg/L。经过抗性筛选的转化体胚被转移至的萌发培养基,萌发的体胚再转入成苗培养基中。

1.2.7 抗性植株检测 剪取少量抗性植株叶片,采用少量 DNA 提取法^[16]提取叶片中 DNA。进行 PCR 和 PCR-Southern 检测。

2 结果与分析

2.1 胚性愈伤组织的诱导

部分外植体经过诱导会产生浅黄或亮黄色、致密且表面呈颗粒状(图 1A~F)的胚性愈伤组织(表 3)。MC 培养基的胚性愈伤组织诱导效果最好,有利于雄蕊,尤其是“红地球”雄蕊的诱导;PIV 培养基相对其它培养基较有利于雌蕊的胚性愈伤组织诱导;MS1 培养基的效果较前 2 种略差,但对于不同品种和外植体的诱导率较稳定;MSA 和 MSI 的效果最差,基本没有胚性愈伤组织的出现。从基因型对诱导率影响的角度考虑,“红地球”品种较易于诱导出胚性愈伤组织,“佳利酿”品种的诱导率最低。3 种外植体中,胚性愈伤组织的诱导以雄蕊最易,雌蕊次之,花蕾很低。

2.2 体胚的诱导和观察

“无核白”、“佳利酿”、“红地球”3 个品种的胚性愈伤组织均易于在不含植物激素的 X₆ 固体培养基上诱导出体胚(图 1G~M)。但可以很明显地观察到“无核白”和“佳利酿”的单个胚性愈伤组织上体胚诱导数大于“红地球”。

2.3 次生胚的诱导

诱导出的体胚团在 3 种设计培养基中诱导次生胚的诱导培养结果见表 4。诱导培养 2 个月后 3 个品种都

表 3 不同品种不同外植体在不同培养基上的胚性愈伤组织诱导率

Table 3 Embryogenic callus induction rate of different explants from different cultivar in five kinds of media

品种 Genotype	培养基 Medium	雄蕊 Stamens		雌蕊 Pistils		花蕾 Flowers	
		接种总数 No. of explants cultured	胚性愈伤诱导率 Percent of embryogenic callus induced/ %	接种总数 No. of explants cultured	胚性愈伤诱导率 Percent of embryogenic callus induced/ %	接种总数 No. of explants cultured	胚性愈伤诱导率 Percent of embryogenic callus induced/ %
		/个		/个		/个	
“无核白” ‘Thompson Seedless’	MSI	300	0.3	250	0.0	200	0.0
	MSA	300	0.0	250	0.0	183	0.0
	PIV	298	0.3	250	4.0	195	0.0
	MC	300	1.7	250	0.4	198	0.0
“佳利酿” ‘Carignane’	MSI	292	0.0	252	0.0	198	0.0
	MSI	300	0.0	250	0.4	191	0.0
	MSA	300	0.0	250	0.0	198	0.0
	PIV	300	0.0	250	3.2	195	0.0
“红地球” ‘Red Globe’	MC	301	0.3	249	0.0	179	0.0
	MSI	300	0.0	250	0.0	183	0.0
	MSI	300	0.3	250	0.8	190	0.5
	MSA	301	0.3	254	0.0	190	0.0
	PIV	300	0.0	250	2.4	190	0.0
	MC	305	11.8	251	5.6	193	0.0
	MSI	300	0.0	250	0.0	192	0.0

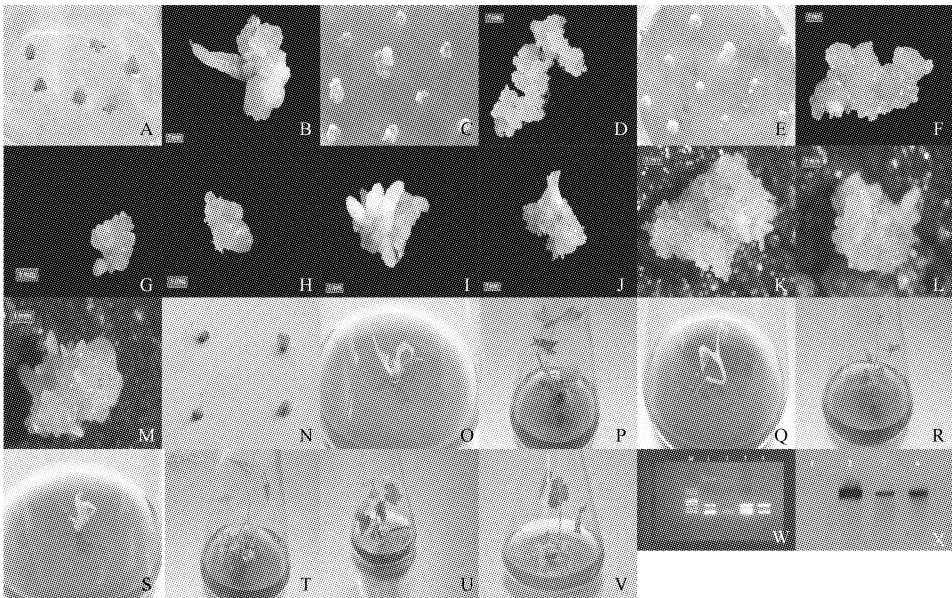


图 1 欧洲葡萄体胚诱导及农杆菌介导的遗传转化

注：A~F：不同葡萄品种诱导出的胚性愈伤组织；A~B：由“红地球”雄蕊诱导的胚性愈伤组织；C~D：由“无核白”雌蕊诱导的胚性愈伤组织；E~F：由“佳利酿”雌蕊诱导的胚性愈伤组织；G~J：不同时期的体细胞胚；G：球形期；H：心形期；I：鱼雷期；J：子叶期；图 K~M：3 个葡萄品种诱导出的体胚团；K：“无核白”；L：“佳利酿”；M：“红地球”；N：萌发后的体胚；O~T：体胚成苗；O~P：“无核白”；Q~R：“佳利酿”；S~T：“红地球”；U、V：用于检测的“无核白”抗性植株；W：PCR 检测结果；M：DNA Mark，泳道 1. 阳性对照（质粒 DNA），泳道 2. 阴性对照（未转化植株），泳道 3、4. 抗性植株；X：PCR-Southern 检测结果；1. 阴性对照（未转化植株），2. 阳性对照（质粒 DNA），3、4. 转化植株。

Fig. 1 Agrobacterium-mediated of *Vitis vinifera* (L.) transformation and regeneration

Note: Fig. A~F: Embryogenic callus from different kinds of grape; A~B: Embryogenic callus induced from stamens of Red Globe; C~D: Embryogenic callus induced from pistils of ‘Thompson Seedless’; E~F: Embryogenic callus induced from pistils of ‘Carignane’; Fig. G~J: Somatic embryos in different stage; G: Globular stage; H: Heart stage; I: Torpedo stage; J: Cotyledon stage; Fig. K~M: The somatic embryo masses from three kinds of grape; K: ‘Thompson Seedless’; L: ‘Carignane’; M: ‘Red Globe’; Fig. N: Germinated somatic embryos; Fig. O~T: Plant recovery from somatic embryos; O~P: ‘Thompson Seedless’; Q~R: ‘Carignane’; S~T: ‘Red Globe’; Fig. U, V: The tested Thompson seedless resistant plants; Fig. W: The result of PCR test; M: DNA Mark, Lane1. Control plasmid, Lane2. Non-transformed plant, Lane3, 4. Transformed plants; Fig. X: PCR-Southern analysis of transformed plants; 1. Non-transformed plant, 2. Control plasmid, 3, 4. Transformed plants.

表 4 不同培养基上的次生胚诱导率

Table 4 The secondary embryos induction rate in different medias

品种 Genotype	培养基 Medium	获得体胚数	次生胚诱导率
		Secondary embryos obtained /个	Secondary embryo-induced rate /%
“无核白”	培养基I	32	106.67
‘Thompson	培养基II	55	183.33
Seedless’	培养基III	2	6.67
“佳利酿”	培养基I	33	110.00
‘Carignane’	培养基II	39	110.00
	培养基III	11	36.67
“红地球”	培养基I	7	23.33
‘Red Globe’	培养基II	29	96.67
	培养基III	13	43.33

获得了次生胚,其中“无核白”品种的次生胚诱导率最高。3种培养基中,培养基III的次生胚诱导率最高。

2.4 体胚萌发及成苗

体胚萌发培养1个月后,体胚开始变绿,上胚轴和子叶明显生长(图1N)。在培养基B中的体胚得到了89%~92%的萌发率。而培养基A和C中体胚的萌发率则略低。萌发后的体胚在成苗培养基上的成苗率较低(图1O~T),分别为“无核白”47.3%，“佳利酿”53.9%和“红地球”22.3%。

2.5 遗传转化及初步检测

体胚的转化抗性筛选培养3~4个月后,从潮霉素浓度为8 mg/L的培养基上获得了“无核白”抗性植株,如图1U~V。对从筛选培养基上获得的转基因植株叶片DNA进行PCR检测,结果见图1W,有2株抗性植株检测到了500 bp左右的目标条带。并进一步进行PCR-Southern检测,结果见图1X,转基因植株有较明显的杂交信号。

3 结论与讨论

3.1 影响胚性愈伤组织诱导的因素

该试验结果表明,完整雄蕊的胚性愈伤组织诱导率高于雌蕊和花蕾。并且胚性愈伤组织均出现于与花药连接的花丝顶端,Dhekney等^[6]认为雄蕊的胚性愈伤组织很可能是从花丝顶端的体细胞诱导出来的,而非小孢子;因此小孢子生长期的确定对于雄蕊诱导胚性愈伤组织的意义不大。所以雄蕊的这一特点可能使得其最佳接种时间较长,从而保证了更多有成胚能力的外植体被利用。同时指出,小孢子单核靠后期时雌蕊胚性愈伤诱导率明显高于其它时期。

从培养基条件来看,MC、PIV和MS1的诱导效率较高。其中PIV培养基较高的激素浓度可能是其促进胚性愈伤组织诱导的因素;MC和MS1有着相同的激素组成,并都含有500 mg/L谷氨酰胺。4-CPPU的细胞分裂素活性比BA高10~100倍;Kikkert等^[14]认为少量的有机氮源物质如谷氨酰胺等能有效提高外植体的胚性诱导率,这与该试验的结果相一致。MS1培养基与MC培养基的区别在于基本元素和固化剂的选择,MS1培养基的大量元素浓度高于MC培养基。Dhekney等^[6]曾报道过在体胚保存时,固化剂的选择对胚性保持的影响很大,因此固化剂种类对胚性愈伤组织的诱导率也可能存

在一定的影响。至于胚性愈伤组织诱导率是否受到了基本元素和固化剂的共同影响,以及这2个影响因素之间的关系尚待进一步研究。

葡萄花器官胚性愈伤组织的诱导是一个多因素共同作用的过程,但基因型强烈影响着不同外植体在不同培养条件下的胚性诱导率^[18]。该试验采用的3个品种中,“红地球”的诱导率最高,“无核白”次之,“佳利酿”最低。证明“红地球”是一个较利于建立花器官再生体系的品种。从体胚诱导的结果上看,单个胚性愈伤组织上诱导出的体胚个数“红地球”要少于其它2个品种,表现为胚性愈伤组织诱导率高的品种体胚诱导率反而较低。Dhekney等^[17]的研究得到了与此相同的结果,认为胚性愈伤组织诱导环境会影响到体胚的诱导率,并且高胚性愈伤组织诱导率有可能导致体胚诱导率下降。但是,由于胚性愈伤组织的诱导是葡萄体胚诱导的前提,因此提高胚性愈伤组织的诱导率仍是研究的关键。

3.2 影响次生胚诱导的因素

在该研究中,在诱导2个月后,培养基I、II、III中陆续有次生胚的出现。培养基II在第2周时有液体变黄的现象。Jayasankar等^[3]认为体胚发育过程中产生和积累的大量酚类物质使悬浮液变黄,并且抑制了体胚的分化和增殖;采用每周更新培养基较为有效地缓解了这种现象。Raemakers等^[18]指出雄蕊诱导出的球形胚在生长素与细胞分裂素的共同作用下易于诱导出次生胚。胚胎发生所需还原态氮和氧化态氮的最佳配比是10 mmol/L NH_4^+ 和40 mmol/L NO_3^- ,即1:4。1/2MS培养基和 X_0 培养基分别为1:2和1:5,因此 X_0 培养基更能促进体胚的发生和发育^[19]。同时,Bao等^[20]在研究玫瑰次生胚诱导时认为,高渗透压下体内多胺的聚集有利于次生胚发生,而较高的糖类和无机元素浓度可以提供这种渗透压。因此,该试验的培养基II在2个月的次生胚诱导过程中效果较好。Martinelli等^[21]曾报道培养基III与另一种培养基可形成高效的体胚再生循环,但其效果仍受外植体基因型的影响,因此该试验与其结果相左应该与此有关。总之,试验证明,葡萄次生胚诱导受多因素共同影响,合理的培养条件和及时更新培养基是诱导成功的关键,而基因型仍是决定性因素。

3.3 葡萄体胚的萌发及成苗

体胚的萌发率和成苗率是葡萄植株再生的关键,培养基条件和体胚的形态学、生理学状况则是影响萌发率、成苗率的因素^[22]。Gray等^[23]认为葡萄体胚也有不萌发、生长停止等类似“休眠”状态,必须经过预处理“打破休眠”,赤霉素便是一种预处理方式。Faure等^[24]研究证明,葡萄体胚不能够积累足够的IAA来保证正常萌发,认为含有生长素的培养基可以促进体胚发育。López-Pérez等^[22]在之后的研究中证明了含有GA、IAA和活性炭的培养基能有效提高葡萄体胚的萌发率。

Dhekney等^[17]认为葡萄体胚成苗率低是因为子叶融合会抑制体胚顶端分生组织的发育。其之前的研究^[25]发现,切除萌发体胚的子叶可以促进成苗,但某些品种在切除子叶后成苗率无变化,因此这种处理在不同

葡萄品种上的效果必须通过试验证明。

参考文献

- [1] 曲泽洲,孙云蔚.果树种类论[M].北京:中国农业出版社,1990:113-114.
- [2] 华南农业大学.果树栽培学各论[M].北京:中国农业出版社,1981:404-406.
- [3] Jayasankar S,Gray D J,Litz R E. High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of grapevine[J]. Plant Cell Reports,1999(18):533-537.
- [4] Gresshoff P M,Doy C H. Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera[J]. Z Pflanzenphysiol,1974,73:123-141.
- [5] Srinivasan C,Mullins M G. High-frequency somatic embryo production from unfertilized ovules of grapes[J]. Scientia Horticulturae,1980(13):245-252.
- [6] Dhekney S A,Li Z T. Optimizing Initiation and Maintenance of *Vitis* Embryogenic Cultures[J]. Hort Science,2009,44(5):1400-1406.
- [7] Das D K,Reddy M K,Upadhyaya K C, et al. An efficient leaf disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape(*Vitis vinifera* L.)[J]. Plant Cell Rep,2002(20):999-1005.
- [8] Popesc C F. Somatic embryogenesis and plant development from anther culture of *Vitis vinifera* L.[J]. Plant Growth Reg,1996,20:75-78.
- [9] Perl A,Saad S,Sahar N, et al. Establishment of long-term embryogenic cultures of seedless *Vitis vinifera* cultivars-a synergistic effect of auxins and the role of abscisic acid[J]. Plant Science,1995,104:193-200.
- [10] Gambino G,Ruffa P,Vallania R, et al. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine(*Vitis* spp.)[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult,2007,90:79-83.
- [11] Mauro M C,Toutain S,Walter B, et al. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene[J]. Plant-Science,1995,112:97-106.
- [12] Gray D J,Meredith C,Grape P. Biotechnology of perennial fruit crops [D]. Wallingford:Hammerslag FA,Litz RE,eds, CAB International,1992:229-262.
- [13] Salunkhe C K,Raopsmha T. Induction of somatic embryogenesis and plantlets intendrils of *Vitis vinifera* L[J]. Plant Cell Rep,1997,17:65-70.
- [14] Kikkert J R,Striem M J,Vidal J R, et al. Long-term study of somatic embryogenesis from anthers and ovaries of 12 grapevine (*Vitis* sp.) genotypes [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant,2005,41:232-239.
- [15] Li Z T,Dhekney S A,Dutt M, et al. Optimizing Agrobacterium-mediated transformation of grapevine[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant,2006,42(3):220-227.
- [16] Kasajima I,Ide Y,Ohkama-Ohtsu N, et al. A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis[J]. Plant Mol Biol Rep,2004(22):49-52.
- [17] Dhekney S A,Li Z T,Gray D J. Factors inducencing induction and maintenance of *Vitis rotundifolia* Michx. Embryogenic cultures[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult,2011,105:175-180.
- [18] Raemakers C J J M,Jacobsen E,Visser R G F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding[J]. Euphytica,1995,81:93-107.
- [19] 肖宇,张朝红,支玉玺,等. 葡萄花器官体细胞胚的诱导和植株再生[J]. 果树学报,2011,28(5):888-892.
- [20] Bao Y,Liu G F,Shi X P, et al. Primary and repetitive secondary somatic embryogenesis in *Rosa hybrida* "Samantha" [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,2012(1):1-8.
- [21] Martinelli L,Candioli E,Costa D, et al. Morphogenic competence of *Vitis rupestris* S. secondary somatic embryos with a long culture history[J]. Plant Cell Rep,2001(20):279-284.
- [22] López-Pérez A J,Carreño J,Martínez-Cutillas A. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal[J]. Vitis,2005,44(2):79-85.
- [23] Gray D J,Mortensen J A. Initiation and maintenance of long term somatic embryogenesis from anthers and ovaries of *Vitis longii* "Microsperma"[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,1987(9):73-80.
- [24] Faure O,Dewitte W,Nougarède A. Precociously germinating somatic embryos of *Vitis vinifera* have lower ABA and IAA levels than their germinating zygotic counterparts[J]. Physiol Plant,1998,102:591-595.
- [25] Dhekney S A,Li Z T,Zimmerman T W. Factors Influencing Genetic Transformation and Plant Regeneration of *Vitis*[J]. Am J Enol Vitic,2009,60(3):285-292.

Study on Agrobacterium-mediated Transformation of *Vitis vinifera* (L.) and Plant Regeneration

TAN Chao,ZHANG Jian-xia,WANG Yue-jin

(Key Laboratory of Molecular Biology of Shaanxi Province,Key Opening Laboratory of Plant Germplasm Resources,Northwest Gardening Plants of Ministry of Agricultural,College of Horticulture,Northwest Agricultural and Forestry University,Yangling,Shaanxi 712100)

Abstract: Stamen, pistils and flower buds from *Vitis vinifera* cvs. 'Thompson Seedless', 'Carignane' and 'Red Globe' were used as explants to investigate their efficiency of embryonic callus induction and *Agrobacterium*-mediated stilbene synthase gene transformation. The results indicated that MC medium was optimum for embryonic callus induction from stamens among 5 medium for embryonic callus induction. The induction rate in 'Thompson Seedless', 'Carignane' and 'Red Globe' were 1.7% 0.3% and 11.8%, respectively. Embryonic callus from 'Thompson Seedless' and 'Carignane' could be induced in PIV medium with 4.0% and 3.2% induction rates. However, the highest induction rate occurred in embryonic callus from flower buds of 'Red Globe' in MC medium with 5.6% induction rate. Only flower buds from Redglobe could be induced in MS1 medium with 0.5% induction rate. A modified X₆ liquid medium was suitable for secondary embryogenesis, and medium B favored germination and seedling of somatic embryos. Transformed plants were selected through resistance screening and 2 resistant plants of 'Thompson Seedless' were obtained. Results from PCR and PCR-Southern indicated that stilbene synthase gene were integrated into the genome of 'Thompson Seedless'.

Key words: *Vitis vinifera*; floral organ; somatic embryo; plant regeneration; genetic transformation