

## 葡萄器官离体再生和遗传转化体系的建立

金万梅<sup>1,2\*</sup>, 董 静<sup>2</sup>, 闫爱玲<sup>2</sup>, 王 忆<sup>1</sup>, 陈梅香<sup>2</sup>, 韩振海<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100094; <sup>2</sup>北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093)

**摘要:**以‘森田尼无核’葡萄为试材, 研究了生长调节物质、外植体类型、抑菌素等对离体不定芽再生和转化效率的影响。相对于 BA 和 KT, 细胞分裂素 TDZ 无论单独使用还是与生长素配合使用均可使葡萄不定芽再生频率达到最高; 在 MS + TDZ 2.0 mg · L<sup>-1</sup>, MS + TDZ 4.0 mg · L<sup>-1</sup> 或 MS + TDZ 4.0 mg · L<sup>-1</sup> + IAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 培养基上均可以较好地诱导再生不定芽; 叶盘、茎段和叶柄都可以诱导再生不定芽, 在同一种培养上再生频率差异不大; 采用根癌农杆菌介导的叶盘法转化时, 卡那霉素抗性筛选浓度为 20 mg · L<sup>-1</sup>; 抑菌抗生素使用头孢霉素适宜浓度为 400 mg · L<sup>-1</sup>, 而使用羧苄青霉素时以 300 mg · L<sup>-1</sup> 最佳; 获得转化芽 45 个, 部分株系用 PCR 和 Southern 杂交证实外源基因已整合在葡萄基因组 DNA 中。

**关键词:** 葡萄; 器官发生途径; 不定芽; 组织培养

**中图分类号:** S 663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 01-0027-06

## Studies on Adventitious Shoots Regeneration and Transformation System of Grape *in Vitro*

JIN Wan-mei<sup>1,2\*</sup>, DONG Jing<sup>2</sup>, YAN Ai-ling<sup>2</sup>, WANG Yi<sup>1</sup>, CHEN Mei-xiang<sup>2</sup>, and HAN Zhen-hai<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100094, China; <sup>2</sup>Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100093, China)

**Abstract:** Establishing an efficient regeneration and transformation system is a fundamental role to the transgenic study. Using Centennial Seedless as materials, the effects of growth regulators, explants and antibiotics to the generation of adventitious shoots were studied and the optimal condition for regeneration and transformation was determined. Results of experiments showed that, when being used alone or combined with auxins, the cytokinin TDZ is always better than BA and KT in inducing adventitious shoots. The adventitious shoots of Centennial Seedless could be efficiently induced in the media of MS + TDZ 2.0 mg · L<sup>-1</sup>, MS + TDZ 4.0 mg · L<sup>-1</sup> or MS + TDZ 4.0 mg · L<sup>-1</sup> + IAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>. For fixed medium, adventitious shoots can be generated with minor difference in efficiency from leaf disc, stem and petiole. When this regeneration system was used in genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, the optimal concentration of screening resistance medium was 20 mg · L<sup>-1</sup> for kanamycin, and for the control of agrobacterium growth, the best concentration was 400 mg · L<sup>-1</sup> for cephaloridine or 300 mg · L<sup>-1</sup> for carbencillin. Forty-five transformants were obtained. It was confirmed by PCR and Southern blotting that the foreign gene had been integrated into the genome of grape.

**Key words:** grape; organogenesis approach; adventitious shoot; tissue culture

国内外关于葡萄 (*Vitis* L.) 的遗传转化多采用体细胞胚胎发生途径, 但诱导时间长, 过程较为复杂, 而器官发生途径过程简单, 诱导时间相对较短, 但存在基因型的差异。Mullins 等 (1990) 以沙地葡萄为材料, 利用根癌农杆菌介导的遗传转化方法, 获得了表达 *gus* 和 *npt II* 基因的转基因植株。

收稿日期: 2007-05-14; 修回日期: 2007-08-20

基金项目: 北京市科技新星计划项目 (2006B39); 北京市优秀人才培养专项经费资助项目

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: rschan@cau.edu.cn)

Berres 等 (1992) 取圆叶葡萄的叶片和叶柄作为外植体, 将 *npt II* 基因导入基因组中, 获得了转化组织。Scorza 等 (1996) 和 Franks 等 (1998) 分别以 ‘无核白’ (Thompson Seedless) 和 ‘萨娜’ (Sultana) 为材料, 利用根癌农杆菌介导法, 分别获得了表达番茄环斑病毒 (TomRSV) 的外壳蛋白 (CP) 基因和 *uidA* 及 *npt II* 基因的转基因植株。我国关于葡萄的遗传转化报道不多。周鹏等 (2002) 将人胰岛素样生长因子 *IGF-I* 基因导入了葡萄中。孙仲序等 (2003) 以鲁贝葡萄的花丝为外植体, 诱导体细胞胚胎, 获得了转甜菜碱醛脱氢酶基因的葡萄。本试验通过器官发生途径对葡萄进行系统研究, 旨在建立葡萄再生遗传转化体系, 为葡萄转基因研究以及为通过分子育种手段进行葡萄种质创新提供技术平台。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

取 ‘森田尼无核’ 葡萄当年生幼嫩新梢, 经小茎尖培养, 建立试管苗无性繁殖系。取继代培养 (培养基为  $1/2 MS + IBA 0.2 mg \cdot L^{-1}$ ) 35 d 的无菌苗, 剪成  $3 \sim 5 mm^2$  的叶盘及 3 mm 左右的叶柄和无腋芽茎段作为外植体。

### 1.2 不定芽再生影响因素的研究

细胞分裂素: 将葡萄叶盘、茎段和叶柄接种在 MS 分别附加  $1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg \cdot L^{-1}$  的 TDZ、BA 或 KT 的培养基上。

细胞分裂素与生长素组合: 将葡萄叶盘、茎段和叶柄分别接种在 MS 附加  $4.0 mg \cdot L^{-1}$  TDZ、BA 或 KT 和  $0.1 mg \cdot L^{-1}$  2,4-D、NAA、IBA 或 IAA 的培养基中。除 IAA 以外, 其它生长调节物质均在灭菌前加入。IAA 经  $0.45 \mu m$  微孔滤膜过滤灭菌, 在培养基灭菌后待其温度降至  $55^\circ C$  时加入。

卡那霉素: 将外植体叶盘接种在分别含  $0, 10, 20, 30, 40, 50 mg \cdot L^{-1}$  卡那霉素的 MS + TDZ  $4.0 mg \cdot L^{-1} + IAA 0.1 mg \cdot L^{-1}$  培养基上, 统计黄化率和再生频率。卡那霉素在培养基灭菌后待其温度降至  $55^\circ C$  时加入。

### 1.3 抑菌素对根癌农杆菌生长的影响

根癌农杆菌菌株为 LBA 4404, T-DNA 携带有 35S 启动子、*DREB* 基因和 *NPT II* 标记基因。农杆菌过夜培养后在附加终浓度为  $100 \mu mol \cdot L^{-1}$  乙酰丁香酮的 MS 液体培养基中继续振荡培养 3 h, 至  $OD_{600}$  为  $0.2 \sim 0.5$ 。将葡萄叶盘浸入菌液中 5 min 后取出, 用无菌滤纸吸去多余的菌液, 在 MS + TDZ  $4.0 mg \cdot L^{-1} + IAA 0.1 mg \cdot L^{-1}$  培养基上共培养 3 d 后转至含有不同浓度头孢霉素 (Cef) 或羧苄青霉素 (Carb) 的 MS + TDZ  $4.0 mg \cdot L^{-1} + IAA 0.1 mg \cdot L^{-1}$  培养基中继续培养。抑菌素在培养基灭菌后待其温度降至  $55^\circ C$  时加入。以上培养基用  $1 mol \cdot L^{-1} NaOH$  或  $HCl$  调至 pH 5.8,  $121 \sim 126^\circ C$  高压灭菌 20 min。所有处理每瓶接种外植体 15 个左右, 每处理 3 瓶, 重复 3 次。暗培养 1 d 后置于 16/8 h 光周期下, 温度  $(25 \pm 2)^\circ C$ 。45 d 后统计外植体总数和不定芽数, 计算再生频率 (再生不定芽数/外植体总数  $\times 100\%$ )。数据用 SAS 软件进行分析。

### 1.4 转化葡萄的分子检测

以 CTAB 法提取转化葡萄的总 DNA。PCR 扩增的引物分别为: P1, 5'-GTACTCTAGTCAAT-GAACTC-3'; P2, 5'-GAAACGACTATCGAATATTAG-3'。扩增体系为:  $1 \mu L$  模板,  $2 \mu L 10 \times PCR$  缓冲液,  $2 \mu L 25 mmol \cdot L^{-1} Mg^{2+}$ , *TaqDNA* 酶 1U,  $10 pmol \cdot L^{-1}$  的 P1 和 P2 分别为  $1 \mu L$ , 去离子水补足  $20 \mu L$ 。扩增程序为:  $94^\circ C$  预变性 5 min;  $94^\circ C 30 s, 55^\circ C 40 s, 72^\circ C 40 s$ , 35 个循环;  $72^\circ C 10 min$ 。Southern 杂交: 用 *Hind III* 酶切基因组 DNA, 上样、转膜, 入紫外交联仪 (UV-tralinker) 在能量为 1 500 J 下对其正反面交联固定。杂交按 DIG Detection Kit (Roche) 说明进行。探针采用 PCR 方法标记, 在  $20 \mu L$  的反应体系中用 DIG-MIX 代替 dNTP, 模板为含目的基因的大肠杆菌质粒 DNA。

### 1.5 葡萄再生植株的生根与移栽

再生的不定芽长到 0.2 ~ 0.5 cm 时从基部单个切下接种在 1/2 MS + IBA 0.2 mg · L<sup>-1</sup> + 活性炭 0.5 g · L<sup>-1</sup> 培养基上, 待不定根长至 5 cm 左右时在温室中炼苗 3 ~ 5 d, 移栽至营养土 (土: 蛭石: 草木炭 = 1: 1: 1) 中。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄愈伤组织和不定芽诱导的过程

叶盘在接种 8 d 后开始有愈伤组织产生, 而叶柄和茎段则在 10 d 后才有。愈伤组织有两种类型, 一种呈紧凑的绿色或黄绿色, 可以诱导产生不定芽; 另一种为黄绿色或红白色、白色, 均呈疏松状, 继续培养时逐渐褐化, 无不定芽发生 (图版, 1)。叶盘、茎段和叶柄均可通过器官发生途径诱导产生不定芽 (图版, 2)。产生不定芽有两种类型: 直接再生 (外植体接种两周后, 切口处稍有膨大且有绿色芽点出现, 随后有不定芽再生) 和通过诱导愈伤组织再生 (首先诱导产生黄绿色紧凑型愈伤组织, 继续培养后在愈伤组织上出现绿色芽点, 长成不定芽)。

### 2.2 细胞分裂素对葡萄不定芽再生的影响

本试验所使用的 3 种细胞分裂素中, TDZ 诱导不定芽的再生频率明显高于 BA 和 KT, 其中附加 KT 的培养基难以诱导再生不定芽 (表 1)。低浓度的细胞分裂素不利于再生不定芽。MS 培养基中附加 TDZ 2.0 或 4.0 mg · L<sup>-1</sup> 时, 不定芽再生频率均较高, 达到 33.5% ~ 40.2%, 且不同外植体类型的处理间无显著性差异。附加 6-BA 4.0 或 8.0 mg · L<sup>-1</sup> 时, 叶盘、茎段和叶柄也都可以诱导产生不定芽, 但再生频率较低, 仅为 4.5% ~ 21.5%。即使附加高浓度的 KT, 也不能诱导不定芽。本试验结果表明 TDZ 对于再生不定芽的诱导活性大于 BA, 远大于 KT。

表 1 细胞分裂素对森田尼无核葡萄不定芽再生率的影响  
Table 1 Effects of different cytokinins on adventitious shoot regeneration rate of Centennial Seedless

试验序号 Experiment number	细胞分裂素 / (mg · L <sup>-1</sup> ) Cytokinin	叶盘 / % Leaf discs	茎段 / % Stem	叶柄 / % Petiole
1	TDZ 1.0	0 d	0 c	0 d
2	TDZ 2.0	36.7 ± 1.5 a	37.4 ± 2.4 a	35.5 ± 2.2 a
3	TDZ 4.0	33.5 ± 3.6 a	40.2 ± 1.4 a	38.0 ± 1.7 a
4	TDZ 8.0	25.3 ± 2.9 b	26.1 ± 1.0 b	28.7 ± 2.5 b
5	6-BA 1.0	0 d	0 c	0 d
6	6-BA 2.0	0 d	0 c	0 d
7	6-BA 4.0	6.8 ± 1.3 c	21.5 ± 2.8 b	16.2 ± 5.1 c
8	6-BA 8.0	4.5 ± 1.2 c	19.3 ± 1.0 b	12.6 ± 2.3 c
9	KT 1.0	0 d	0 c	0 d
10	KT 2.0	0 d	0 c	0 d
11	KT 4.0	0 d	0 c	0 d
12	KT 8.0	0 d	0 c	0 d

注: 基本培养基 MS。同列不同字母表示  $P \leq 0.05$  显著性差异。

Note: MS medium. Different letters in the same column indicate statistically significant difference at  $P \leq 0.05$ .

### 2.3 细胞分裂素与生长素组合对葡萄不定芽再生的影响

从表 2 可以看出, 3 种细胞分裂素与 2,4-D 组合均不能诱导产生不定芽。TDZ 与 NAA、IBA 和 IAA 组合可以有效诱导不定芽的产生, 其中 TDZ 与 IAA 组合效果最好; 6-BA 与 IBA 和 IAA 组合可以诱导产生不定芽, 但再生频率无显著性差异。KT 与 4 种生长素组合诱导葡萄不定芽效果最差, 对叶盘、茎段和叶柄均没有诱导出不定芽。

### 2.4 卡那霉素对葡萄不定芽再生的影响

当培养基中不含卡那霉素时, 外植体再生频率为 47.8%, 随着卡那霉素浓度的增加, 外植体黄化率逐渐升高, 再生频率逐渐下降, 20 mg · L<sup>-1</sup> 时难以产生不定芽, 黄化率为 88%, 而 30, 40, 50

mg · L<sup>-1</sup>时黄化率达 100%，均不能诱导产生不定芽（表 3）。因此将 20 mg · L<sup>-1</sup>作为葡萄遗传转化的筛选浓度

表 2 细胞分裂素与生长素组合对不定芽再生率的影响

Table 2 Effects of combination of different plant growth hormones and cytokinin on adventitious shoot regeneration rate

序号 Number	PCR/ (mg · L <sup>-1</sup> )	叶盘/% Leaf discs	茎段/% Stem	叶柄/% Petiole
1	TDZ 4.0 + 2,4-D 0.1	0 d	0 d	0 d
2	TDZ 4.0 + NAA 0.1	12.9 ± 3.0 c	11.4 ± 2.1 c	16.1 ± 1.0 c
3	TDZ 4.0 + IBA 0.1	42.3 ± 2.6 a	44.5 ± 3.1 a	38.9 ± 3.3 a
4	TDZ 4.0 + IAA 0.1	47.8 ± 2.4 a	50.0 ± 1.2 a	43.6 ± 1.9 a
5	6-BA 4.0 + 2,4-D 0.1	0 d	0 d	0 d
6	6-BA 4.0 + NAA 0.1	0 d	0 d	0 d
7	6-BA 4.0 + IBA 0.1	28.3 ± 2.4 b	25.0 ± 2.0 b	23.3 ± 1.5 b
8	6-BA 4.0 + IAA 0.1	27.5 ± 2.1 b	20.0 ± 2.7 b	26.7 ± 4.1 b
9	KT 4.0 + 2,4-D 0.1	0 d	0 d	0 d
10	KT 4.0 + NAA 0.1	0 d	0 d	0 d
11	KT 4.0 + IBA 0.1	0 d	0 d	0 d
12	KT 4.0 + IAA 0.1	0 d	0 d	0 d

注：同列不同字母表示  $P \leq 0.05$  显著性差异。

Note: Different letters in the same column indicate statistically significant difference at  $P \leq 0.05$ .

表 3 卡那霉素对葡萄不定芽再生的影响

Table 3 Effects of kanamycin concentration on adventitious shoots regeneration in grape

卡那霉素/ (mg · L <sup>-1</sup> ) Kanamycin	外植体黄化率/% Yellowish and bleaching rate	再生频率/% Regeneration rate
0	0 d	47.8 ± 2.4 a
10	36.5 ± 2.3 c	18.5 ± 2.6 b
20	88.0 ± 3.8 b	0 c
30	100 a	0 c
40	100 a	0 c
50	100 a	0 c

注：同列不同字母表示  $P \leq 0.05$  显著性差异

Note: Different letters in the same column indicate statistically significant difference at  $P \leq 0.05$ .

2.5 抑菌素对根癌农杆菌生长的影响

试验中发现，根癌农杆菌侵染后的叶盘外植体在对照培养基上 3 d 后就有大量农杆菌繁殖，约 3 周后外植体褐化逐渐死亡；头孢霉素或羧苄青霉素浓度为 100 和 200 mg · L<sup>-1</sup>时仅 1~2 周对农杆菌表现出抑制作用，而分别为 400 和 300 mg · L<sup>-1</sup>以上时才能完全抑制，因此确定 400 和 300 mg · L<sup>-1</sup>分别为头孢酶素和羧苄青霉素适宜浓度。

利用根癌农杆菌介导的叶盘法转化葡萄，重复进行 40 次，每次对 200 个外植体进行侵染，获得转化株系（图版，3）45 个，部分株系采用 PCR 鉴定，得到阳性株系（图 1），对 PCR 阳性株系进行 Southern 杂交，结果显示均有杂交信号（图 2），表明外源目的基因已经整合在葡萄基因组上。

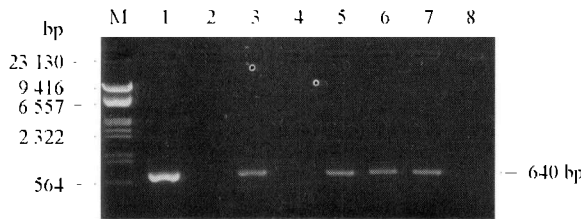


图 1 葡萄转化植株的 PCR 鉴定结果

M. Marker; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照;  
3, 5~7. PCR 葡萄阳性株系;  
4, 8. PCR 葡萄阴性株系

Fig. 1 PCR analysis of transgenic plants

M. Marker; 1. Plasmid DNA as PCR control;  
2. Negative control; 3, 5-7. PCR position;  
4, 8. Non-transgenic plants.

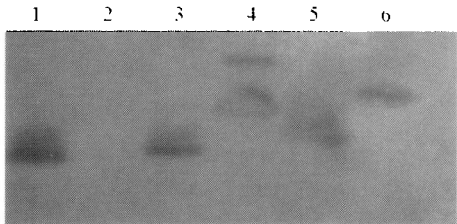


图 2 Southern blot 鉴定转基因葡萄

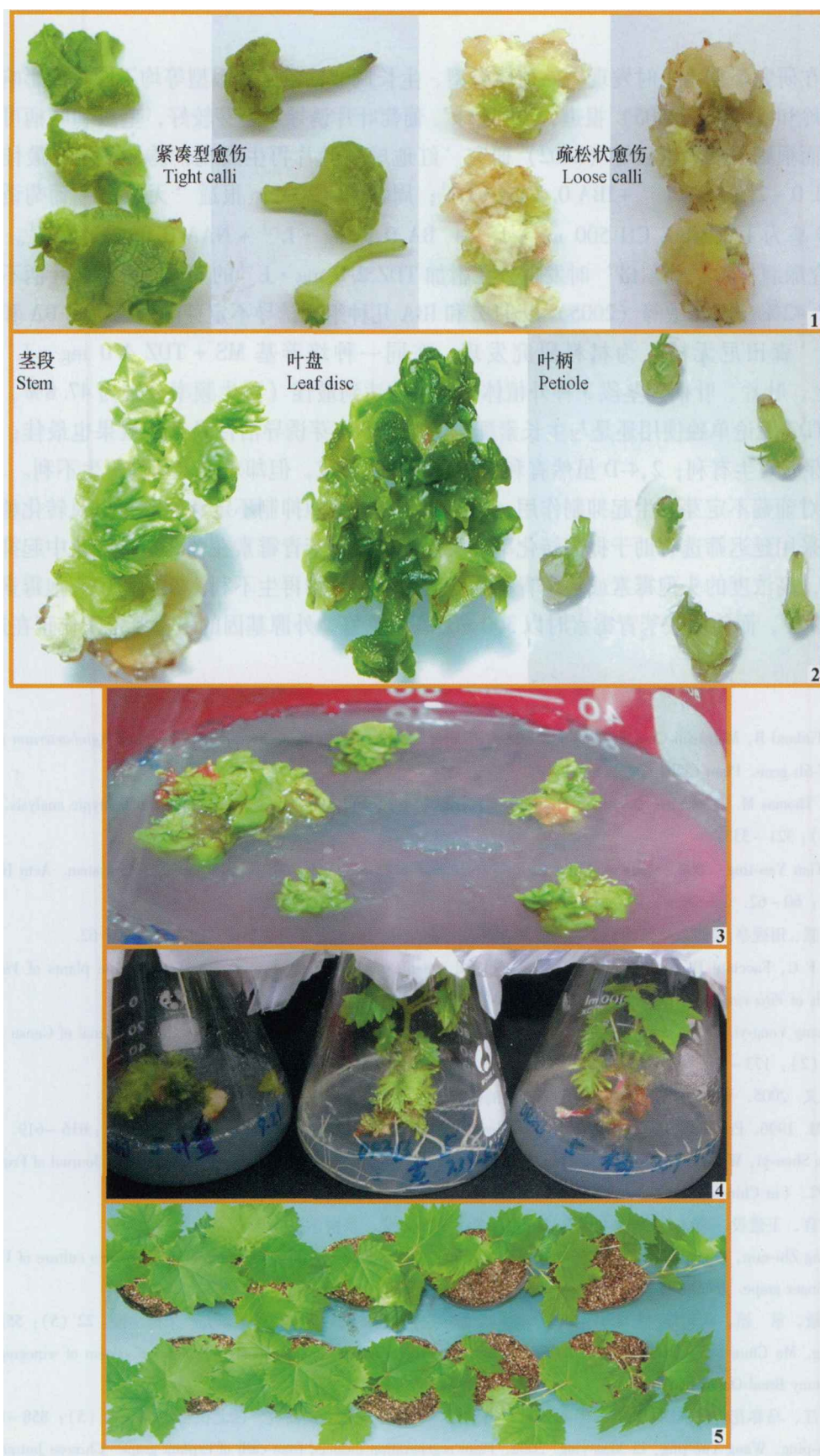
1. 阳性对照; 2. 阴性对照;  
3~6. 葡萄阳性株系

Fig. 2 Southern blot analysis of transgenic plants

1. Plasmid DNA as control;  
2. Negative control;  
3-6. Southern position.

2.6 葡萄再生植株生根与移栽

葡萄再生不定芽长到 0.2~0.5 cm 时，将单个不定芽从基部切下，接种在生根培养基上，3 周左右可以看到有不定根发出，生根苗（图版，4）在温室中炼苗 3~5 d，100 棵移栽到营养钵中（图版，5），1 个月后成活率达 98%。



图版说明：1. 愈伤组织的诱导；2. 不定芽再生；3. 叶盘转化芽抗性生长；4. 转化芽生根；5. 再生植株移栽。

**Explanation of plates:** 1. Inducing calli; 2. Adventitious shoots; 3. The growth of transformed shoots in grape leaf disc; 4. The roots growth of transformation shoots; 5. Regeneration plants were transplanted.

### 3 讨论

许多学者在研究葡萄再生时发现,外植体类型、生长调节物质、基因型等均不同程度影响不定芽的诱导。权冬玲和常永义(2005)报道,‘红地球’葡萄叶片诱导不定芽较好,茎段和叶柄可以诱导产生不定芽,而根则不能。李云等(2002)研究‘红地球’叶片再生发现,诱导不定芽最佳培养基为  $\text{NN}_{69} + \text{BA } 2.0 \sim 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;周鹏等(2002)报道‘无核白’葡萄诱导不定芽的最佳培养基为  $1/2 \text{ MS} + \text{CH } 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。王华等(2005)在研究酿酒材料‘梅尔诺’时发现,在附加  $\text{TDZ } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MS 培养上,叶柄不定芽诱导频率达到 62.42%。陶建敏等(2005)以 TDZ 和 IBA 几种组合诱导不定芽的效果不如 BA 和 IBA 组合。本试验以‘森田尼无核’为材料研究发现,在同一种培养基  $\text{MS} + \text{TDZ } 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  上,叶片、叶柄和茎段 3 种外植体的再生均达到最佳(再生频率分别为 47.8%, 50.0% 和 43.6%);TDZ 无论单独使用还是与生长素配合使用对不定芽诱导活性最高,效果也最佳;高浓度的 BA 对不定芽的发生有利;2,4-D 虽然有利于愈伤组织的形成,但却对不定芽的再生不利。

卡那霉素对葡萄不定芽再生起抑制作用,即使低浓度也强烈抑制不定芽的分化以及转化植株的生根,在试验中采用延迟筛选有助于提高转化率。头孢霉素或羧苄青霉素在葡萄遗传转化中起抑制根癌农杆菌的作用,高浓度的头孢霉素或羧苄青霉素对葡萄不定芽的再生不利。本试验中头孢霉素适宜浓度为  $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,而使用羧苄青霉素时以  $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  为好。外源基因的表达鉴定工作正在进行中。

### References

- Berris R, Otten 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 Rep*, 11 (4): 192 - 195.
- Franks T, He D G, Thomas M. 1998. Regeneration of transgenic *Vitis vinifera* L. Sultana plants: genotypic and phenotypic analysis. *Molecular Breeding*, 4 (4): 321 - 333.
- Li Yun, Fen 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’叶盘、叶柄不定芽再生系统的建立. *园艺学报*, 29 (1): 60 - 62.
- Mullins M G, Tang F C, Facciotti D. 1990. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grape vines: transgenic plants of *Vitis rupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L. *Bio/Technology*, 8: 1041 - 1045.
- Quan Dong-ling, Chang Yong-yi. 2005. Study on direct regenerating adventitious buds from different organ of grape. *Journal of Gansu Agriculture University*, 20 (2): 173 - 177. (in Chinese)
- 权冬玲, 常永义. 2005. 葡萄不同器官直接再生不定芽的研究. *甘肃农业大学学报*, 20 (2): 173 - 177.
- Scorza R, Cordts J M. 1996. Producing transgenic ‘Thompson Seedless’ grape plants. *J Amer Soc Hort Sci*, 121 (4): 616 - 619.
- Sun Zhong-xu, Chen Shou-yi, Wang Jian-she. 2003. Transformation of grape by *Agrobacterium* containing *BADH* gene. *Journal of Fruit Science*, 20 (2): 89 - 92. (in Chinese)
- 孙仲序, 陈受宜, 王建设. 2003. 农杆菌介导 *BADH* 基因转化葡萄研究. *果树学报*, 20 (2): 89 - 92.
- 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 grape. *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.
- Wang Hua, Lu Jiang, Ma Chun-hua, Zhang Ji-shu. 2005. Somatic embryogenesis and organogenesis regeneration system of winegrape ‘Merlot Noir’. *Acta Botany Breal-Occident 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.
- Zhou Peng, Guo An-ping, Wang Yue-jing, Li Xiao-ying. 2002. Plant regeneration induced from calli of explant grape. *Chinese Journal of Tropic Crops*, 23 (3): 52 - 56. (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的诱导和植株再生. *热带作物学报*, 23 (3): 52 - 56.