

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017年1月5日 (05.01.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/000089 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/63 (2006.01) *A01H 1/02* (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/000519
- (22) 国际申请日: 2015年8月12日 (12.08.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510377125.0 2015年6月30日 (30.06.2015) CN
- (71) 申请人: 中国农业科学院郑州果树研究所
(ZHENGZHOU FRUIT RESEARCH INSTITUTE,
CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCI-
ENCES) [CN/CN]; 中国河南省郑州市港湾路 28 号
田莉莉, Henan 450009 (CN)。
- (72) 发明人: 田莉莉 (TIAN, Lili); 中国河南省郑州市港
湾路 28 号, Henan 450009 (CN)。 牛良 (NIU, Liang);
中国河南省郑州市港湾路 28 号, Henan 450009
(CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保
护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA,
RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保
护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,
RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于发明人身份(细则 4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: BIOTECHNOLOGICAL BREEDING METHOD FOR OBTAINING ANTIVIRAL SEEDLESS GRAPES

(54) 发明名称: 一种获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法

(57) Abstract: Disclosed is a biotechnological breeding method for obtaining antiviral seedless grapes. The method comprises the following steps: obtaining zygotic embryos containing seedless genes by carrying out hybridization between varieties of seedless grapes and embryo rescue, and inducing grape somatic embryogenesis by means of the zygotic embryos; and carrying out agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation by using RNAi antiviral vectors containing conservative gene segments of grape virus coat protein (CP), so that a grape material which is both antiviral and seedless can be obtained from transformed regeneration plants.

(57) 摘要: 本申请公开了一种获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法, 包括以下步骤: 通过无核葡萄品种间杂交和胚挽救获得带无核基因的合子胚, 通过合子胚诱导发生体细胞胚; 同时利用含有葡萄病毒外壳蛋白 (CP) 基因保守片段的 RNAi 抗病毒载体进行农杆菌介导的遗传转化, 可以从转化后的再生植株中获得既抗病毒又无核的葡萄材料。



WO 2017/000089 A1

说明书

一种获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法

技术领域

本发明属于农业生物技术育种技术领域，具体涉及一种获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法。

背景技术

葡萄是世界上最古老的果树树种之一，以其味美多汁、营养丰富及具有多种保健功能深受国内外消费者喜爱，近年来，国内外市场对鲜食葡萄品种的要求也越来越高，尤其是无核葡萄越来越受到人们的青睐，现有无核葡萄品种已不能满足生产上的需求。同时，葡萄也是感染病毒种类最多的果树树种[Martelli 等. Grapevine virology highlights: 2010–2012. Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, California, USA, 2012: 13-31]。近年来，我国各地竞相发展葡萄，地区间引种比较频繁，病毒本身可随苗木进行远距离传播，导致一些地方病害蔓延。据调查[刘晓等.部分葡萄品种的病毒病鉴定及健康状况评价.果树学报, 2006, 23(6):846-849]，我国多数主栽品种和砧木普遍带毒，有些品种的带毒株率几乎达到 100%。其中，葡萄扇叶病毒 (GFLV)、葡萄卷叶病毒 (GLRaV, 主要病原是 GLRaV-3) 葡萄病毒 A(GVA) 和葡萄病毒 B(GVB)是生产中最为广泛存在的 4 种危险性病毒，目前，葡萄病毒病已成为我国果树生产中亟待解决的问题，现有技术水平下全世界尚无有效的药剂防治办法，而培育抗病品种无疑是一条最为经济有效的途径。

现代葡萄育种的理论 [Ramming 等. Hybridization of seedless grapes. Vitis,1990 (Special issue):439-444] 认为，采用“无核×无核”葡萄品种间杂交，通过胚挽救的方法容易获得无核后代，杂种后代中无核类型比例可达 80%以上。目前，这种生物技术育种方法已成功应用于无核葡萄育种技术领域[田莉莉等. Seedless grape breeding for disease resistance by using embryo rescue. Vitis, 2008, 47(1):15-19; 田莉莉等. Breeding of disease-resistant seedless grapes using Chinese wild Vitis spp. I. In vitro embryo rescue and plant development. Scientia Horticulturae, 2008,117 (2):136-141]。同时，在植物抗病毒育种方面，利用植物外壳蛋白基因转化植物是目前培育抗病品种的主要手段。近年来，RNAi 技术的发展为植物转基因抗病毒提供了新策略。前人的研究表明，转化病毒外壳蛋白基因的全部或部分片段构建的 RNAi 载体，均能获得抗病的转基因植株 [朱常香等.多抗

PVY、TMV 和 CMV 转基因烟草的培育. 中国农业科学, 2008, 41(4): 1040-1047]。多数研究者在构建 RNAi 载体时, 通常选取的是病毒基因组中相对保守的片段作为干扰片段, 这样还可以减少因病毒变异造成的转基因植株抗病性的丧失[Xu 等.Conserved sequences of replicas gene-mediated resistance to Potyvirus through RNA silencing. Journal of Plant Biology, 2009, 52(6): 550-559]。

目前普遍采用的胚挽救技术培育无核葡萄方法尚存在不足之处: 由于生产上栽培的多数无核葡萄属于欧亚种, 虽然品质优良但抗病性普遍较差, 通过胚挽救这一技术虽然容易获得“无核×无核”的无核后代, 但获得的无核葡萄往往比亲本更不抗病, 更容易受到自然界中各种病毒的危害, 因此, 仅仅依靠胚挽救这一单一的生物技术手段获得的无核葡萄, 在抗病毒病方面存在很大缺陷。

采用传统的葡萄转基因技术培育抗病毒葡萄的缺点: (1) 必需利用完整基因翻译策略, 转基因产品无法排除安全隐患; (2) 转化植株的抗病毒反应多数表现为延迟发病, 属于耐病性; (3) 如果外源基因片段过大, 容易出现目的基因仅部分导入或导入基因仅能部分表达的现象; (4) 转化植株高抗病性的获得往往需要多拷贝。

目前, 虽然通过胚挽救的方法可以培育无核葡萄新品种, 但由于多数无核葡萄属于欧亚种, 普遍存在抗病性差的缺点, 而靠胚挽救这一单一的生物技术手段技术获得的无核葡萄后代往往比它们的亲本更不抗病, 更容易受到各种病毒的威胁。

发明内容

本发明的目的是提供一种获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法, 在无核葡萄育种技术领域, 将胚挽救技术和转基因两种生物技术手段进行有机融合, 在对无核葡萄杂种胚进行离体培养的过程中, 利用带有无核基因的合子胚诱导发生的胚状体作为转基因受体材料, 设法导入含有病毒外壳蛋白基因的 RNAi 抗病毒载体, 从而获得既抗病毒病又无核的葡萄再生植株新材料。

本发明所采用的技术方案是, 一种获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法, 包括以下步骤:

- 步骤 1、通过无核葡萄品种间杂交和胚挽救获得带无核基因的葡萄合子胚;
- 步骤 2、通过合子胚诱导发生葡萄体细胞胚;
- 步骤 3、构建 RNAi 抗病毒植物表达载体并转入根癌农杆菌;
- 步骤 4、农杆菌转化合子胚来源的体细胞胚获得再生植株。

本发明的特点还在于:

步骤 1 中通过无核葡萄品种间杂交和胚挽救获得带无核基因的葡萄合子胚具体为：

步骤 1.1、开花前 3 天对母本品种进行人工去雄，去雄后的花序立即用清水喷洗干净并套袋、挂牌标记；

步骤 1.2、去雄后第 2-3 天用毛笔蘸取父本花粉散落在母本柱头上进行人工授粉；

步骤 1.3、授粉后 6 周田间采集幼果，自来水冲洗 10min；在超净工作台上用 70% 的酒精浸泡 1 分钟后，再用 0.1% 的 HgCl_2 浸泡消毒 8 分钟，无菌水漂洗 4 次；

步骤 1.4、消毒后的果粒置于灭过菌的培养皿中，无菌条件下取出胚珠，接种在合子胚发育培养基上进行胚珠内胚培养，合子胚发育培养基为固液双相的 TL 培养基；

步骤 1.5、胚珠在合子胚发育培养基上培养 6 周后，无菌条件下取出发育的幼胚，接种在固体的胚性愈伤组织诱导培养基上；即获得带无核基因的葡萄合子胚。

TL 培养基的组分和含量如下：硝酸钙 250.0mg/L，硝酸钾 600.0mg/L，氯化钾 75.0mg/L，硝酸铵 300.0mg/L，硫酸镁 1200.0mg/L，磷酸二氢钾 300.0mg/L，硫酸锰 3.0 mg/L，碘化钾 0.8mg/L，硼酸 0.5mg/L，硫酸锌 0.5mg/L，亚硒酸钠 0.25mg/L，氯化钴 0.025mg/L，硫酸铜 0.025mg/L，钼酸钠 0.025mg/L，柠檬酸铁 10.0mg/L，盐酸硫胺素 0.25 mg/L，盐酸吡哆辛 0.25mg/L，D-泛酸钙 0.25mg/L，烟酸 0.25mg/L，天冬酰胺 300mg/L，甘氨酸 5.0mg/L，精氨酸 2.0mg/L，肌醇 50.0mg/L，水解酪蛋白 500.0mg/L，L-半胱氨酸 121.16mg/L，蔗糖 30000mg/L，琼脂 6000 mg/L，其余为蒸馏水，其中附加蔗糖 6.0g/L，活性炭 1.5g/L；步骤 1.5 中诱导培养基为：胚性愈伤组织诱导培养基的成分为 TL+0.5 mg/L 6-BA+1.0mg/L 2, 4-D，其中附加蔗糖 30g/L，琼脂 6.0g/L。

步骤 2 中通过合子胚诱导发生体细胞胚具体为：

步骤 2.1、将步骤 1 获得的杂交合子胚接种在固体的胚性愈伤组织诱导培养基上；

步骤 2.2、合子胚在胚性愈伤组织诱导培养基上培养 4 周后，将获得的黄色、颗粒状、发育紧实的胚性愈伤组织接种在固体的体细胞胚分化培养基上；

步骤 2.3、胚性愈伤组织在体细胞胚分化培养基上培养 4 周后，即可诱导获得大量的体细胞胚，此时多数体细胞胚发育时期处在子叶型期。

步骤 2.1 中胚性愈伤组织诱导培养基的成分为 TL+0.5 mg/L 6-BA+1.0mg/L 2, 4-D，其中附加蔗糖 30g/L，琼脂 6.0g/L；所述步骤 2.3 中体细胞胚分化培养基的成分为 TL+ 0.5 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA，其中，附加蔗糖 30g/L，琼脂 6.0g/L。

步骤 3 中构建 RNAi 抗病毒植物表达载体并转入根癌农杆菌具体为：

步骤 3.1、构建入门克隆载体：RNAi 干扰片段 GV 是 GFLV、GLRaV-3、GVA 和 GVB

4个葡萄病毒外壳蛋白基因的保守区段顺序串联后获得的825bp的大片段,序列见SEQ ID NO.1;用添加接头CACC的GV上游引物GV-F和下游引物GV-R进行PCR扩增,PCR产物经1.0%的琼脂糖凝胶电泳后目标条带切胶回收,获得含干扰片段GV的平末端PCR产物;构建6 μ L连接反应体系,25 $^{\circ}$ C条件下反应30 min,连接产物热激法转化大肠杆菌Top10感受态细胞,均匀涂布在含75 mg/L卡那霉素的LB固体培养基平板上,37 $^{\circ}$ C倒置培养16 h,挑单克隆到含有相同浓度Kan的LB液体培养基中37 $^{\circ}$ C震荡培养14 h,扩增片段的长度明显大于插入片段GV的长度,即构建好入门克隆载体;命名为pENTR-GV;

步骤3.2、构建RNAi载体:将入门载体pENTR-GV和目标载体pHELLSGATE12进行LR反应,构建20 μ L LR反应体系;25 $^{\circ}$ C条件下反应12 h后,加入蛋白酶K终止反应;反应产物热激法转化大肠杆菌Top10感受态细胞,均匀涂布在含有100 mg/L壮观霉素(Spec)的LB培养基平板上,37 $^{\circ}$ C倒置培养16 h,挑单克隆到含相同浓度Spec的LB液体培养基中37 $^{\circ}$ C震荡培养14 h,提取质粒后用Xho I和Xba I进行单酶切,以pHELLSGATE12空载作对照;LR反应之后的重组质粒经Xho I和Xba I进行单酶切后切下片段大小分别为917bp和915bp,且明显区别于未经反应的pHELLSGATE12空载切出的片段大小(空载用Xho I切出片段为1429 bp, Xba I切出片段为1419 bp),则重组质粒为构建好的RNAi载体,命名为PH12-GV;

步骤3.3、RNAi载体转化根癌农杆菌:将PH12-GV载体转化农杆菌菌株EHA105感受态细胞,均匀涂布在含有50 mg/L利福平和100 mg/L壮观霉素的YEB平板培养基上,28 $^{\circ}$ C条件下倒置培养48 h,挑单克隆到含有相同浓度的利福平和壮观霉素的YEB液体培养基中28 $^{\circ}$ C震荡培养48 h,用GV-F和GV-R作引物进行菌液PCR扩增,1.0%琼脂糖凝胶电泳,PCR产物为829bp的片段,则RNAi植物表达载体工程菌株已转化好,命名为EH-GV。

GV的上游引物GV-F的序列如SEQ ID NO.2所示,具体为:CACCATGGGTGATGAGCTTTGATGC;所述GV的下游引物的序列如SEQ ID NO.3所示,具体为:TAGACTCTCAAGCTTGCTAA;

步骤3.1和步骤3.3中的PCR反应体系为:10 \times Buffer 5 μ L, dNTP mixtuer 5 μ L, 10 μ mol/L的GV-F 2 μ L, 10 μ mol/L的GV-R 2 μ L, Pfu DNA Polymerase 1 μ L, 模板1 μ L, 灭菌双蒸水 34 μ L, 总体积50 μ L; PCR反应参数为:94 $^{\circ}$ C预变性5min; 94 $^{\circ}$ C变性30s, 56 $^{\circ}$ C退火30s, 72 $^{\circ}$ C延伸40s, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10min;

M13-F的序列如SEQ ID NO.4所示,具体为:GTAAAACGACGGCCAGT。

步骤 3.1 中所用连接反应体系为：回收目的基因片段 GV 1 μ L, salt solution 1 μ L, pENTR™/SD/D-TOPO® vector 1 μ L, 灭菌超纯水 3 μ L。

步骤 3.2 中的 Xba I 酶切体系为：Xba I 1 μ L, 10 x M Buffer 2 μ L, 0.1% BSA 2 μ L, LR 反应产物 6 μ L, 灭菌超纯水 9 μ L; Xho I 酶切体系为：Xho I 1 μ L, 10 x H Buffer 2 μ L, LR 反应产物 6 μ L, 灭菌超纯水 11 μ L。

步骤 3.2 中的 LR 反应体系为：pENTR-GV 2 μ L, pHELLSGATE12, 2 μ L, LR clonase enzyme mix 4 μ L; Sterile water 12 μ L。

步骤 4 中农杆菌转化合子胚来源的体细胞胚获得再生植株具体为：

步骤 4.1、28°C、200rpm 条件下，将转化农杆菌后的 RNAi 植物表达载体工程菌株 EH-GV 在含有 50 mg/L 利福平的 YEB 液体培养基中震荡培养 48 小时，至 OD 值约为 0.5，5000rpm 离心 10 分钟后收集沉淀的菌体，用等体积的 WPM 液体培养基重悬，将步骤 2.3 获得的体细胞胚用农杆菌菌液浸泡侵染 10-15 分钟；

步骤 4.2、侵染后的体细胞胚置于灭过菌的培养皿中，用灭过菌的滤纸吸干多余菌液，接种在 WPM 固体培养基上，黑暗条件下培养 3 天；

步骤 4.3、之后将侵染后的体细胞胚接种在 WPM+0.2mg/L 6-BA+50 mg/L 卡那霉素 (Kan)+200 mg/L 头孢霉素(Cef)+200 mg/L 羧苄青霉素(Carb)培养基上，在 16 h/8 h 光周期条件下培养 3 个月，每 2 周继代一次；

步骤 4.4、将萌发获得的抗性芽培养在 1/2MS+0.2mg/L 吲哚丁酸(IBA)+25 mg/L Kan+200 mg/L Cef+200 mg/L Carb 培养基上，在 16 h/8 h 光周期条件下培养 2 个月，每 4 周继代一次，生根后的试管苗在 1/2MS+0.2mg/L IBA+25 mg/L Kan+200 mg/L Cef+200 mg/L Carb 培养基上扩大培养后，选择生长健壮、生根良好的再生植株在温室内进行炼苗和移栽，制备得到抗病毒无核葡萄。

本发明的有益效果是：本发明转化葡萄时农杆菌侵染所采用的受体材料“体细胞胚”为“无核×无核”葡萄杂交后的合子胚诱导所得，由于受体材料中含有无核基因的比率很高 ($\geq 80\%$)，所以在转化后的再生植株中比较容易获得抗病毒的无核材料。

与传统的转基因方法相比，本发明转化葡萄所采用 RNAi 抗病毒载体的主要优点在于：(1)不需要病毒的完整基因，只需基因部分片段也可起到抗病作用；(2)转入的基因片段较小，有利于载体构建和遗传转化；(3)在转基因植株中侵入病毒的 RNA 迅速被降解，不需要病毒基因表达蛋白质，转基因产品更加安全可靠；(4)单拷贝的转化子也能产生高度抗病甚至免疫的植株。

本发明通过将无核葡萄胚挽救技术与转基因技术相结合，采用胚挽救获得的无核葡萄杂交幼胚起源的胚状体作为受体材料，同时利用含有葡萄病毒外壳蛋白（CP）基因保守片段的 RNAi 抗病毒载体进行农杆菌介导的遗传转化，可以从转化后的再生植株中获得既抗病毒病又无核的葡萄新材料，进而选育新品种。

附图说明

图 1 是入门克隆载体 pENTR-GV 的 PCR 鉴定，其中，M: DL2000 marker; 1: pENTR-GV 以 M13-F&GV-R 作引物 PCR 扩增结果; 2: pENTR-GV 以 GV-F&GV-R 作引物 PCR 扩增结果;

图 2 是 RNAi 载体 PH12-GV 的 Xho I 酶切鉴定；其中，M: DL2000 marker; 1: PH12-GV 酶切结果; 2: pHELLSGATE12 空载酶切结果;

图 3 是本发明 RNAi 载体 PH12-GV 的 Xba I 酶切鉴定，其中，M: DL2000 marker; 1: PH12-GV 酶切结果； 2: pHELLSGATE12 空载酶切结果;

图 4 是本发明 EH-GV 的 PCR 鉴定；其中，M: DL2000 marker; 1: EHA105 空载 PCR 结果； 2-3: EH-GV 工程菌株的 PCR 结果;

图 5 是本发明农杆菌 EH-GV 转化合子胚来源的体细胞胚获得再生植株，其中，D-1: 农杆菌侵染后的体细胞胚，D-2: 农杆菌转化体细胞胚后萌发的抗性芽，D-3: 农杆菌转化体细胞胚后生根的再生植株， D-4: 温室移栽成活的转基因植株。

具体实施方式

下面结合具体实施方式对本发明进行详细说明。

实施例 1 通过无核葡萄品种间杂交和胚挽救获得带无核基因的葡萄合子胚:

步骤 A-1、开花前 3 天对母本品种进行人工去雄（本实施例中母本品种为“红脸无核”），去雄后的花序立即用清水喷洗干净并套袋、挂牌标记；

步骤 A-2、去雄后第 2-3 天用毛笔蘸取父本花粉（本实施例中父本品种为“火焰无核”）散落在母本柱头上进行人工授粉；

步骤 A-3、授粉后 6 周田间采集幼果，自来水冲洗 10min；在超净工作台上用 70% 的酒精浸泡 1 分钟后，再用 0.1% 的 HgCl₂ 浸泡消毒 8 分钟，无菌水漂洗 4 次；

步骤 A-4、消毒后的果粒置于灭过菌的培养皿中，无菌条件下取出胚珠，接种在合子胚发育培养基上进行胚珠内胚培养，合子胚发育培养基为固液双相的 TL 培养基，其组分和含量如下：硝酸钙 250.0mg/L，硝酸钾 600.0mg/L，氯化钾 75.0mg/L，硝酸铵 300.0mg/L，硫酸镁 1200.0mg/L，磷酸二氢钾 300.0mg/L，硫酸锰 3.0 mg/L，碘化钾 0.8mg/L，

硼酸 0.5mg/L, 硫酸锌 0.5mg/L, 亚硒酸钠 0.25mg/L, 氯化钴 0.025mg/L, 硫酸铜 0.025mg/L, 钼酸钠 0.025mg/L, 柠檬酸铁 10.0mg/L, 盐酸硫胺素 0.25 mg/L, 盐酸吡哆辛 0.25mg/L, D-泛酸钙 0.25mg/L, 烟酸 0.25mg/L, 天冬酰胺 300mg/L, 甘氨酸 5.0mg/L, 精氨酸 2.0mg/L, 肌醇 50.0mg/L, 水解酪蛋白 500.0mg/L, L-半胱氨酸 121.16mg/L, 蔗糖 30000mg/L, 琼脂 6000 mg/L, 其余为蒸馏水, 其中附加蔗糖 6.0g/L, 活性炭 1.5g/L;

步骤 A-5、胚珠在合子胚发育培养基上培养 6 周后, 无菌条件下取出发育的幼胚, 接种在固体的胚性愈伤组织诱导培养基上, 胚性愈伤组织诱导培养基的成分为 TL+0.5 mg/L 6-BA+1.0mg/L 2, 4-D, 其中附加蔗糖 30g/L, 琼脂 6.0g/L; 即可获得带无核基因(比率在 80%以上)的葡萄合子胚。

实施例 2 通过合子胚诱导发生体细胞胚

步骤 B-1、将步骤 A 获得的杂交合子胚接种在固体的胚性愈伤组织诱导培养基上, 胚性愈伤组织诱导培养基的成分为 TL+0.5 mg/L 6-BA+1.0mg/L 2, 4-D, 其中附加蔗糖 30g/L, 琼脂 6.0g/L;

步骤 B-2、合子胚在胚性愈伤组织诱导培养基上培养 4 周后, 将获得的黄色、颗粒状、发育紧实的胚性愈伤组织接种在固体的体细胞胚分化培养基上, 体细胞胚分化培养基的成分为 TL+ 0.5 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA, 其中, 附加蔗糖 30g/L, 琼脂 6.0g/L;

步骤 B-3、胚性愈伤组织在体细胞胚分化培养基上培养 4 周后, 即可诱导获得大量的体细胞胚, 本实施例中此时多数体细胞胚发育时期处在子叶型期。

实施例 3 构建 RNAi 抗病毒植物表达载体并转入根癌农杆菌

步骤 C-1(入门克隆载体的构建过程)、在本实施例中, RNAi 干扰片段 GV 是 GFLV、GLRaV-3、GVA 和 GVB 4 个葡萄病毒外壳蛋白基因的保守区段顺序串联后获得的 825bp 的大片段(序列见 SEQ ID NO.1)。用添加接头 CACC 的 GV 上游引物 GV-F(引物序列为 CACCATGGGTGATGAGCTTTGATGC, 序列见 SEQ ID NO.2)和下游引物 GV-R(引物序列为 TAGACTCTCAAGCTTGCTAA, 序列见 SEQ ID NO.3)进行 PCR 扩增, 本实施例中 PCR 反应体系为: 10×Buffer 5 μ L, dNTP mixtuer (2.5mM of each dNTP) 5 μ L, GV-F (10μ mol/L) 2 μ L, GV-R (10μ mol/L) 2 μ L, Pfu DNA Polymerase 1 μ L, 模板 1 μ L, 灭菌双蒸水 34 μ L, 总体积 50 μ L。PCR 反应参数为: 94℃预变性 5min; (94℃变性 30s, 56℃退火 30s, 72℃延伸 40s) 35 个循环; 72℃延伸 10min。PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后目标条带切胶回收, 获得含干扰片段(GV)的平末端 PCR 产物。按照 pENTR™/SD/D-TOPO®试剂盒说明书, 构建 6 μ L 反应体系, 本实施例所用反应体系为:

回收目的基因片段 GV 1 μL , salt solution 1 μL , pENTR™/SD/D-TOPO® vector 1 μL , 灭菌超纯水 3 μL , 25°C 条件下反应 30 min, 连接产物热激法转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 均匀涂布在含 75 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基平板上, 37°C 倒置培养 16 h, 挑单克隆到含有相同浓度 Kan 的 LB 液体培养基中 37°C 震荡培养 14 h, 分别以 GV-F&GV-R 和 M13-F (GTAAAACGACGGCCAGT, 序列见 SEQ ID NO.4) &GV-R 两对引物, 进行菌液 PCR 扩增, PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳。本实施例中 PCR 反应体系为: 10 \times Buffer 2 μL , dNTP mixtuer (2.5mM of each dNTP) 1.6 μL , 引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 各 1 μL , rTaq DNA Polymerase 0.2 μL , 模板 1 μL , 灭菌双蒸水 13.2 μL , 总体积 20 μL 。PCR 反应参数同步骤 C-1。在以 GV-F 和 GV-R 作引物时, 扩增产物如果出现 829bp(825+4 个碱基 CACC=829bp)大小的目标条带 (GV 的长度为 825bp), 而以引物 M13-F 和 GV-R 为引物时, 扩增片段的长度明显大于插入片段 GV 的长度, 说明串联基因片段 GV 已连接进入 pENTR/SD/D-TOPO 载体, 则被认定为构建好的入门克隆载体, 在本实施例中命名为 pENTR-GV(图 1)。

步骤 C-2RNAi 载体的构建过程: 将入门载体 pENTR-GV 和目标载体 pHELLSGATE12 进行 LR 反应, 按照 Gateway LR Clonase II Enzyme Mix 剂盒说明书构建 20 μL 反应体系, 本实施例反应体系为: pENTR-GV 2 μL , pHELLSGATE12, 2 μL , LR clonase enzyme mix 4 μL , Sterile water 12 μL 。25°C 条件下反应 12 h 后, 加入蛋白酶 K 终止反应。反应产物热激法转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 均匀涂布在含有 100 mg/L 壮观霉素的 LB 培养基平板上, 37°C 倒置培养 16 h, 挑单克隆到含相同浓度 Spec 的 LB 液体培养基中 37°C 震荡培养 14 h, 提取质粒后用 Xho I (图 2)和 Xba I (图 3)进行单酶切(以 pHELLSGATE12 空载作对照), 本实施例中 Xba I 酶切体系为: Xba I 1 μL , 10 \times M Buffer 2 μL , 0.1% BSA 2 μL , LR 反应产物 6 μL , 灭菌超纯水 9 μL ; Xho I 酶切体系为: Xho I 1 μL , 10 \times H Buffer 2 μL , LR 反应产物 6 μL , 灭菌超纯水 11 μL 。如果 LR 反应之后的重组质粒经 Xho I 和 Xba I 进行单酶切后切下片段大小约为 900bp, 且明显区别于未经反应的 PHELLSGATE12 空载切出的片段大小(Xho I 切出片段为 1429 bp, Xba I 切出片段为 1419 bp), 则认定为重组质粒为构建好的 RNAi 载体, 在本实施例中命名为 PH12-GV。

步骤 C-3 (RNAi 载体转化根癌农杆菌过程)、将 PH12-GV 载体转化农杆菌菌株 EHA105 感受态细胞, 均匀涂布在含有 50 mg/L 利福平和 100 mg/L 壮观霉素的 YEB 平板培养基上, 28°C 条件下倒置培养 48 h, 挑单克隆到含有相同浓度的利福平和壮观霉素的 YEB 液体培养基中 28°C 震荡培养 48 h, 用 GV-F&GV-R 作引物进行菌液 PCR 扩增,

1.0% 琼脂糖凝胶电泳,PCR 反应体系和反应参数同步骤 C-1,如果出现 829bp 大小(825+4 个碱基 CACC=829bp)的片段(图 4),则认定为 RNAi 植物表达载体工程菌株已经转化好,在本实施例中命名为 EH-GV。

实施例 4 农杆菌转化合子胚来源的体细胞胚获得再生植株

步骤 D-1、28℃、200rpm 条件下,将转化农杆菌后的 RNAi 植物表达载体工程菌株 EH-GV 在含有 50 mg/L 利福平的 YEB 液体培养基中震荡培养 48 小时,至 OD 值约为 0.5,5000rpm 离心 10 分钟后收集沉淀的菌体,用等体积的 WPM 液体培养基重悬,将步骤 B-3 获得的体细胞胚用农杆菌菌液浸泡侵染 10-15 分钟。

步骤 D-2、侵染后的体细胞胚置于灭过菌的培养皿中,用灭过菌的滤纸吸干多余菌液,接种在 WPM 固体培养基上,黑暗条件下培养 3 天。

步骤 D-3、之后将侵染后的体细胞胚接种在 WPM+0.2mg/L6-BA+50 mg/L 卡那霉素 (Kan) +200 mg/L 头孢霉素 (Cef) +200 mg/L 羧苄青霉素 (Carb) 培养基上,在 16 h/8 h 光周期条件下培养 3 个月,每 2 周继代一次。

步骤 D-4、将萌发获得的抗性芽培养在 1/2MS+0.2mg/L 吲哚丁酸 (IBA) +25 mg/L 卡那霉素(Kan)+200 mg/L Cef+200 mg/L Carb 培养基上,在 16 h/8 h 光周期条件下培养 2 个月,每 4 周继代一次,生根后的试管苗在 1/2MS+0.2mg/L IBA+25 mg/L Kan+200 mg/L Cef+200 mg/L Carb 培养基上扩大培养后,选择生长健壮、生根良好的再生植株在温室内进行炼苗和移栽,具体为:将离体条件下根系发育良好的植株经温室炼苗后用清水洗净其上附着的琼脂,移栽入装有营养土的营养钵内,成活后的幼苗进行常规管理,发育成健壮的葡萄植株。

实施例 5 转基因葡萄的抗病毒特性的鉴定

步骤 E-1、从田间上发病植株的葡萄病叶,用 10 倍体积 0.05 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH=7.2) 充分研磨,4000rpm 离心 10 分钟,取上清液作为病毒提取物。

步骤 E-2、用 70%酒精对叶片进行表面消毒后充分晾干,用石英砂摩擦叶片上表面制造轻微伤口后,用手指蘸取病毒提取物,摩擦接种至葡萄幼嫩叶片,每个单株接种 5 个叶片,同时接种未转化的植株作对照,20 天后进行植株带毒的 DAS-ELISA 检测。

步骤 E-3、取供试植株顶部叶片 100 mg,于 1 mL PBS 缓冲液中研磨,离心后取上清,用 0.1mol/L (pH 9.6) 的碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释成 1 g/mL 包被 ELISA 板,每孔 100 uL,37℃ 孵育 4 h;用 PBST 缓冲液洗板 3 次 拍干 加入病毒汁液 每孔 100 uL,4℃ 过夜;用 PBST 洗板 3 次 拍干加入 1/4 000 稀释的共轭酶标抗体每孔 100 uL,37℃

孵育 3 h; 用 PBST 洗板 4 次, 拍干, 每孔加底物 100 μ L, 1 h 后在 405nm 波长下读取吸光值 (OD₄₀₅)。以脱毒试管苗“红宝石无核”为阴性对照, 如果某植株读取的吸光值与阴性对照吸光值之比大于 2.5 则为阳性反应 (植株带毒), 即被认定为感病反应, 否则为阴性反应 (植株不带毒), 即被认定为抗病反应, 鉴定结果见表 1。

表 1 转基因植株病毒接种后的抗病性反应鉴定

转基因植株代号	GFLV	GLRaV-3	GVA	GVB
TrGV-1	抗	抗	抗	抗
TrGV-2	抗	抗	抗	感
TrGV-3	抗	抗	抗	抗
TrGV-4	抗	抗	抗	抗
对照植株	感	感	感	感

表 1 结果可见, 病毒接种后对照植株对 4 种病毒均表现为感病反应, 而转化后获得的转基因植株多数情况下表现为抗病反应。在获得的 4 个转基因株系中, 株系 TrGV-1、TrGV-3、TrGV-4 对葡萄生产中危害最为严重的 4 种病毒 (GFLV、GLRaV-3、GVA、GVB) 均表现为抗病反应; 株系 TrGV-2 仅对病毒 GVB 表现为感病, 而对其它 3 种病毒均表现为抗病反应。说明这些转基因植株在接种病毒后病毒积累量明显降低了, 从而获得了抗病性的明显提高。

权利要求书

1. 一种获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法，其特征在于，包括以下步骤：

步骤 1、通过无核葡萄品种间杂交和胚挽救获得带无核基因的葡萄合子胚；

步骤 2、通过合子胚诱导发生葡萄体细胞胚；

步骤 3、构建 RNAi 抗病毒植物表达载体并转入根癌农杆菌；

步骤 4、农杆菌转化合子胚来源的体细胞胚获得再生植株。

2. 根据权利要求 1 所述的获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法，其特征在于，所述步骤 1 中通过无核葡萄品种间杂交和胚挽救获得带无核基因的葡萄合子胚具体为：

步骤 1.1、开花前 3 天对母本品种进行人工去雄，去雄后的花序立即用清水喷洗干净并套袋、挂牌标记；

步骤 1.2、去雄后第 2-3 天用毛笔蘸取父本花粉散落在母本柱头上进行人工授粉；

步骤 1.3、授粉后 6 周田间采集幼果，自来水冲洗 10min；在超净工作台上用 70% 的酒精浸泡 1 分钟后，再用 0.1% 的 HgCl_2 浸泡消毒 8 分钟，无菌水漂洗 4 次；

步骤 1.4、消毒后的果粒置于灭过菌的培养皿中，无菌条件下取出胚珠，接种在合子胚发育培养基上进行胚珠内胚培养，合子胚发育培养基为固液双相的 TL 培养基；

步骤 1.5、胚珠在合子胚发育培养基上培养 6 周后，无菌条件下取出发育的幼胚，接种在固体的胚性愈伤组织诱导培养基上；即获得带无核基因的葡萄合子胚。

3. 根据权利要求 2 所述的获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法，其特征在于，所述 TL 培养基的组分和含量如下：硝酸钙 250.0mg/L，硝酸钾 600.0mg/L，氯化钾 75.0mg/L，硝酸铵 300.0mg/L，硫酸镁 1200.0mg/L，磷酸二氢钾 300.0mg/L，硫酸锰 3.0 mg/L，碘化钾 0.8mg/L，硼酸 0.5mg/L，硫酸锌 0.5mg/L，亚硒酸钠 0.25mg/L，氯化钴 0.025mg/L，硫酸铜 0.025mg/L，钼酸钠 0.025mg/L，柠檬酸铁 10.0mg/L，盐酸硫胺素 0.25 mg/L，盐酸吡哆辛 0.25mg/L，D-泛酸钙 0.25mg/L，烟酸 0.25mg/L，天冬酰胺 300mg/L，甘氨酸 5.0mg/L，精氨酸 2.0mg/L，肌醇 50.0mg/L，水解酪蛋白 500.0mg/L，L-半胱氨酸 121.16mg/L，蔗糖 30000mg/L，琼脂 6000 mg/L，其余为蒸馏水，其中附加蔗糖 6.0g/L，活性炭 1.5g/L；步骤 1.5 中诱导培养基为：胚性愈伤组织诱导培养基的成分为 TL+0.5 mg/L 6-BA+1.0mg/L 2, 4-D，其中附加蔗糖 30g/L，琼脂 6.0g/L。

4. 根据权利要求 2 所述的获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法，其特征在于，所述步骤 2 中通过合子胚诱导发生体细胞胚具体为：

步骤 2.1、将步骤 1 获得的杂交合子胚接种在固体的胚性愈伤组织诱导培养基上；

步骤 2.2、合子胚在胚性愈伤组织诱导培养基上培养 4 周后，将获得的黄色、颗粒状、发育紧实的胚性愈伤组织接种在固体的体细胞胚分化培养基上；

步骤 2.3、胚性愈伤组织在体细胞胚分化培养基上培养 4 周后，即可诱导获得大量的体细胞胚，此时多数体细胞胚发育时期处在子叶型期。

5. 根据权利要求 4 所述的获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法，其特征在于，所述步骤 2.1 中胚性愈伤组织诱导培养基的成分为 TL+0.5 mg/L 6-BA+1.0mg/L 2, 4-D，其中附加蔗糖 30g/L，琼脂 6.0g/L；所述步骤 2.3 中体细胞胚分化培养基的成分为 TL+ 0.5 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA，其中，附加蔗糖 30g/L，琼脂 6.0g/L。

6. 根据权利要求 4 所述的获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法，其特征在于，所述步骤 3 中构建 RNAi 抗病毒植物表达载体并转入根癌农杆菌具体为：

步骤 3.1、构建入门克隆载体：RNAi 干扰片段 GV 是 GFLV、GLRaV-3、GVA 和 GVB 4 个葡萄病毒外壳蛋白基因的保守区段顺序串联后获得的 825bp 的大片段，序列见 SEQ ID NO.1；用添加接头 CACC 的 GV 上游引物 GV-F 和下游引物 GV-R 进行 PCR 扩增，PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后目标条带切胶回收，获得含干扰片段 GV 的平末端 PCR 产物；构建 6 μ L 连接反应体系，25 $^{\circ}$ C 条件下反应 30 min，连接产物热激法转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞，均匀涂布在含 75 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基平板上，37 $^{\circ}$ C 倒置培养 16 h，挑单克隆到含有相同浓度 Kan 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 震荡培养 14 h，扩增片段的长度明显大于插入片段 GV 的长度，即构建好入门克隆载体；命名为 pENTR-GV；

步骤 3.2、构建 RNAi 载体：将入门载体 pENTR-GV 和目标载体 pHELLSGATE12 进行 LR 反应，构建 20 μ L LR 反应体系；25 $^{\circ}$ C 条件下反应 12 h 后，加入蛋白酶 K 终止反应；反应产物热激法转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞，均匀涂布在含有 100 mg/L 壮观霉素 (Spec) 的 LB 培养基平板上，37 $^{\circ}$ C 倒置培养 16 h，挑单克隆到含相同浓度 Spec 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 震荡培养 14 h，提取质粒后用 Xho I 和 Xba I 进行单酶切，以 pHELLSGATE12 空载作对照；LR 反应之后的重组质粒经 Xho I 和 Xba I 进行单酶切后切下片段大小分别为 917bp 和 915bp，且明显区别于未经反应的 pHELLSGATE12 空载切出的片段大小，其中，空载用 Xho I 切出片段为 1429 bp，空载用 Xba I 切出片段为 1419 bp，则重组质粒为构建好的 RNAi 载体，在命名为 PH12-GV；

步骤 3.3、RNAi 载体转化根癌农杆菌：将 PH12-GV 载体转化农杆菌菌株 EHA105 感受态细胞，均匀涂布在含有 50 mg/L 利福平和 100 mg/L 壮观霉素的 YEB 平板培养基上，28 $^{\circ}$ C 条件下倒置培养 48 h，挑单克隆到含有相同浓度的利福平和壮观霉素的 YEB 液

体培养基中 28℃ 震荡培养 48 h, 用 GV-F 和 GV-R 作引物进行菌液 PCR 扩增, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物为 829bp 的片段, 则 RNAi 植物表达载体工程菌株已转化好, 命名为 EH-GV。

7. 根据权利要求 6 所述的获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法, 其特征在于, 所述 GV 的上游引物 GV-F 的序列如 SEQ ID NO.2 所示, 具体为: CACCATGGGTGATGAGCTTTGATGC; 所述 GV 的下游引物的序列如 SEQ ID NO.3 所示, 具体为: TAGACTCTCAAGCTTGCTAA;

所述步骤 3.1 和步骤 3.3 中的 PCR 反应体系为: 10×Buffer 5 μL, dNTP mixtuer 5 μL, 10 μmol/L 的 GV-F 2 μL, 10 μmol/L 的 GV-R 2 μL, Pfu DNA Polymerase 1 μL, 模板 1 μL, 灭菌双蒸水 34 μL, 总体积 50 μL; PCR 反应参数为: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s, 56℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 40s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10min;

所述 M13-F 的序列如 SEQ ID NO.4 所示, 具体为: GTAAAACGACGGCCAGT。

步骤 3.1 中所用连接反应体系为: 回收目的基因片段 GV 1 μL, salt solution 1 μL, pENTR™/SD/D-TOPO® vector 1 μL, 灭菌超纯水 3 μL。

8. 根据权利要求 6 所述的获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法, 其特征在于, 所述步骤 3.2 中的 Xba I 酶切体系为: Xba I 1 μL, 10 × M Buffer 2 μL, 0.1% BSA 2 μL, LR 反应产物 6 μL, 灭菌超纯水 9 μL; Xho I 酶切体系为: Xho I 1 μL, 10 × H Buffer 2 μL, LR 反应产物 6 μL, 灭菌超纯水 11 μL。

9. 根据权利要求 6 所述的获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法, 其特征在于, 所述步骤 3.2 中的 LR 反应体系为: pENTR-GV 2 μL, pHELLSGATE12, 2 μL, LR clonase enzyme mix 4 μL; Sterile water 12 μL。

10. 根据权利要求 6 所述的获得抗病毒无核葡萄的生物技术育种方法, 其特征在于, 所述步骤 4 中农杆菌转化合子胚来源的体细胞胚获得再生植株具体为:

步骤 4.1、28℃、200rpm 条件下, 将转化农杆菌后的 RNAi 植物表达载体工程菌株 EH-GV 在含有 50 mg/L 利福平的 YEB 液体培养基中震荡培养 48 小时, 至 OD 值约为 0.5, 5000rpm 离心 10 分钟后收集沉淀的菌体, 用等体积的 WPM 液体培养基重悬, 将步骤 2.3 获得的体细胞胚用农杆菌菌液浸泡侵染 10-15 分钟;

步骤 4.2、侵染后的体细胞胚置于灭过菌的培养皿中, 用灭过菌的滤纸吸干多余菌液, 接种在 WPM 固体培养基上, 黑暗条件下培养 3 天;

步骤 4.3、之后将侵染后的体细胞胚接种在 WPM+0.2mg/L6-BA+50 mg/L 卡那霉素

(Kan)+200 mg/L 头孢霉素(Cef)+200 mg/L 羧苄青霉素(Carb)培养基上, 在 16 h/8 h 光周期条件下培养 3 个月, 每 2 周继代一次;

步骤 4.4、将萌发获得的抗性芽培养在 1/2MS+0.2mg/L 吲哚丁酸(IBA)+25 mg/L Kan+200 mg/L Cef+200 mg/L Carb 培养基上, 在 16 h/8 h 光周期条件下培养 2 个月, 每 4 周继代一次, 生根后的试管苗在 1/2MS+0.2mg/L IBA+25 mg/L Kan+200 mg/L Cef+200 mg/L Carb 培养基上扩大培养后, 选择生长健壮、生根良好的再生植株在温室内进行炼苗和移栽, 制备得到抗病毒无核葡萄。

说明书附图

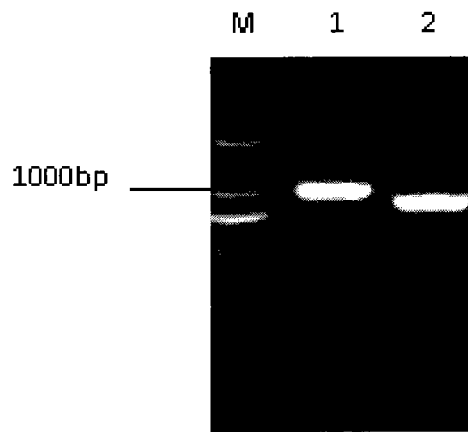


图 1

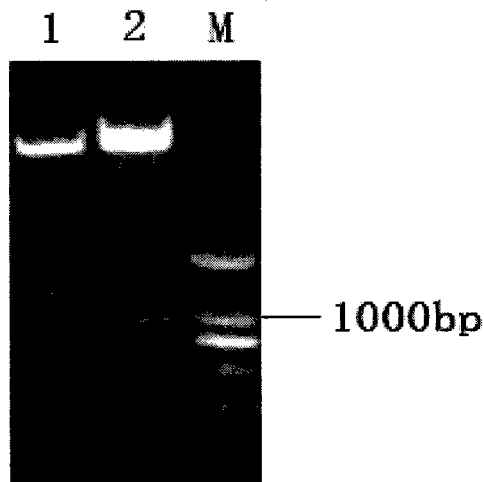


图 2

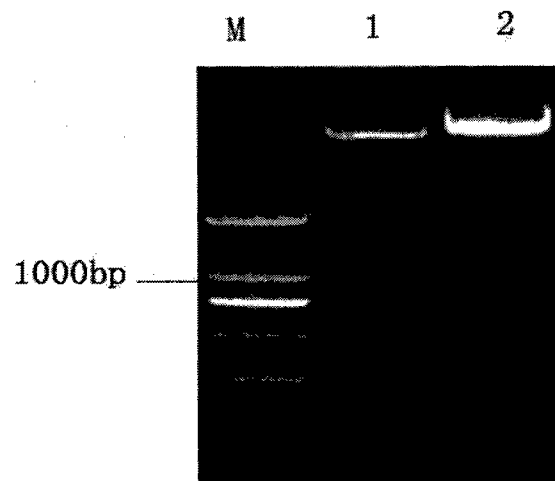


图 3

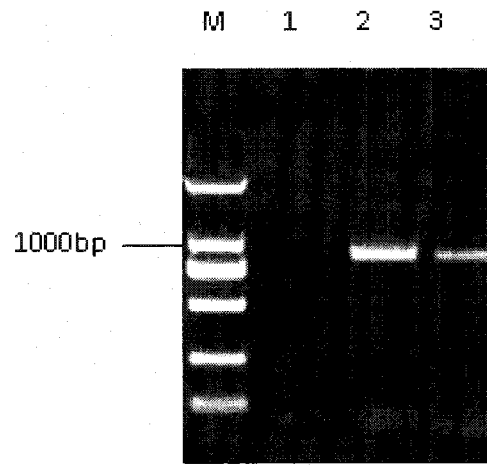


图 4

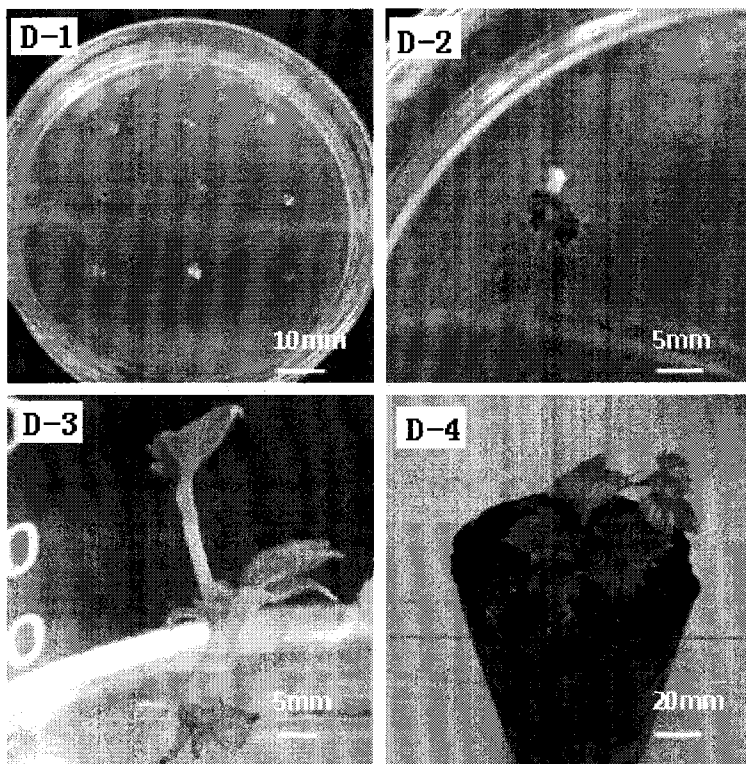


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/000519

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/63 (2006.01) i; A01H 4/00 (2006.01) i; A01H 1/02 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A01H; A01G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED and Keywords: RNAi, grape, Vitis L., seedless, hybridize, crossbreed, cross, mate, intercross, embryo rescue, disease resistance, disease tolerance, etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1415189 A (NORTHWEST A & F UNIVERSITY), 07 May 2003 (07.05.2003), claims 1-2	1-10
Y	TIAN, Lili et al. "Construction of Binary RNAi Expression Vector with Virus Resistance and Genetic Transformation in Tobacco", JOURNAL OF FRUIT SCIENCE, vol. 29, no. 6, 31 December 2012 (31.12.2012), the whole document, particularly abstract	1-10
Y	CN 1896227 A (NORTHWEST A & F UNIVERSITY), 17 January 2007 (17.01.2007), claims 1-4	2-10
A	CN 101564011 A (HANGZHOU BLUESKY LANDSCAPE CONSTRUCTION GROUP CO., LTD., YUHANG BRANCH), 28 October 2009 (28.10.2009), the whole document	1-10
A	CN 101982065 A (HEBEI NORMAL UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY), 02 March 2011 (02.03.2011), the whole document	1-10
A	CN 103181321 A (NORTHWEST A & F UNIVERSITY), 03 July 2013 (03.07.2013), the whole document	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
30 March 2016 (30.03.2016)

Date of mailing of the international search report
07 April 2016 (07.04.2016)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
WANG, Ying
Telephone No.: (86-10) **62089434**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/000519

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1415189 A	07 May 2003	CN 1176575 C	24 November 2004
CN 1896227 A	17 January 2007	CN 1896227 B	27 July 2011
CN 101564011 A	28 October 2009	CN 101564011 B	14 December 2011
CN 101982065 A	02 March 2011	CN 101982065 B	04 July 2012
CN 103181321 A	03 July 2013	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/000519

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 15/63(2006.01)i; A01H 4/00(2006.01)i; A01H 1/02(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N; A01H; A01G</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED 和关键词: 葡萄, 无核, 杂交, 胚拯救, 胚挽救, RNAi, 抗病, grape, Vitis L., seedless, hybridize, crossbreed, cross, mate, intercross, embryo rescue, disease resistance, disease tolerance等。</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 1415189 A (西北农林科技大学) 2003年 5月 7日 (2003 - 05 - 07) 权利要求1-2</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>田莉莉等. “葡萄抗病毒双价RNAi植物表达载体构建及其对烟草的遗传转化” 果树学报, 第29卷, 第6期, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 全文, 尤其摘要</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 1896227 A (西北农林科技大学) 2007年 1月 17日 (2007 - 01 - 17) 权利要求1-4</td> <td>2-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101564011 A (杭州蓝天园林建设集团有限公司余杭分公司) 2009年 10月 28日 (2009 - 10 - 28) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101982065 A (河北科技师范学院) 2011年 3月 2日 (2011 - 03 - 02) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103181321 A (西北农林科技大学) 2013年 7月 3日 (2013 - 07 - 03) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 1415189 A (西北农林科技大学) 2003年 5月 7日 (2003 - 05 - 07) 权利要求1-2	1-10	Y	田莉莉等. “葡萄抗病毒双价RNAi植物表达载体构建及其对烟草的遗传转化” 果树学报, 第29卷, 第6期, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 全文, 尤其摘要	1-10	Y	CN 1896227 A (西北农林科技大学) 2007年 1月 17日 (2007 - 01 - 17) 权利要求1-4	2-10	A	CN 101564011 A (杭州蓝天园林建设集团有限公司余杭分公司) 2009年 10月 28日 (2009 - 10 - 28) 全文	1-10	A	CN 101982065 A (河北科技师范学院) 2011年 3月 2日 (2011 - 03 - 02) 全文	1-10	A	CN 103181321 A (西北农林科技大学) 2013年 7月 3日 (2013 - 07 - 03) 全文	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
Y	CN 1415189 A (西北农林科技大学) 2003年 5月 7日 (2003 - 05 - 07) 权利要求1-2	1-10																					
Y	田莉莉等. “葡萄抗病毒双价RNAi植物表达载体构建及其对烟草的遗传转化” 果树学报, 第29卷, 第6期, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 全文, 尤其摘要	1-10																					
Y	CN 1896227 A (西北农林科技大学) 2007年 1月 17日 (2007 - 01 - 17) 权利要求1-4	2-10																					
A	CN 101564011 A (杭州蓝天园林建设集团有限公司余杭分公司) 2009年 10月 28日 (2009 - 10 - 28) 全文	1-10																					
A	CN 101982065 A (河北科技师范学院) 2011年 3月 2日 (2011 - 03 - 02) 全文	1-10																					
A	CN 103181321 A (西北农林科技大学) 2013年 7月 3日 (2013 - 07 - 03) 全文	1-10																					
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2016年 3月 30日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2016年 4月 7日</p>																						
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>授权官员</p> <p>王颖</p> <p>电话号码 (86-10)62089434</p>																						

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/000519

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	1415189	A	2003年 5月 7日	CN	1176575	C	2004年 11月 24日
CN	1896227	A	2007年 1月 17日	CN	1896227	B	2011年 7月 27日
CN	101564011	A	2009年 10月 28日	CN	101564011	B	2011年 12月 14日
CN	101982065	A	2011年 3月 2日	CN	101982065	B	2012年 7月 4日
CN	103181321	A	2013年 7月 3日	无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)