

柿及其近缘种高效遗传转化体系的建立

袁稼营^{1,2} 白璐^{1,2} 张腾岳^{1,2} 张路^{1,2} 胡银凤^{1,2} 卫娟^{1,2} 李华威^{1,2} 索玉^{1,2}
孙^{1,2} 傅建敏^{1,2}

(1 中国林业科学研究院经济林研究所,河南 郑州 450003; 2 经济林种质创新与利用国家林业和草原局重点实验室, 河南 郑州 450003)

摘要: 柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 是我国重要的木本粮食树种, 综合利用价值高。柿优良雄性资源缺乏严重限制了杂交育种和多倍体育种效率。柿属植物 (*Diospyros*) 转录因子 *MeGI* 具有促雌抑雄的作用。沉默柿雌性良种的 *MeGI*, 理论上可诱导其开雄花, 用作优良授粉父本。目前已在油柿中建立了高效遗传转化体系, 获得了油柿 *MeGI* 基因的 RNAi 沉默突变体植株, 转化效率达到了 5%, 但该高效转化体系尚未在柿及其它近缘种中建立。因此, 本研究主要通过优化转化过程中各步骤的培养条件, 以期建立起由根瘤农杆菌介导, 并以柿、美洲柿、君迁子的幼嫩胚根为侵染对象的高效稳定遗传转化体系。首先将‘次郎’柿、‘磨盘’柿、美洲柿和君迁子各约 60 个幼嫩胚根 (8 月中旬采样) 在含有玉米素的 MS(1/2N) 培养基上预培养 1 天, 然后用添加了 L-脯氨酸和乙酰丁香酮的农杆菌重悬液 ($OD_{600}=0.5$) 侵染 10 分钟; 侵染后进入胚根和农杆菌共培养阶段, 培养条件是: 将无菌滤纸铺于固体培养基上, 然后用 MS 液体培养基 (添加了 L-脯氨酸和乙酰丁香酮) 浸润滤纸, 再将胚根置于滤纸上, 暗培养 3 天; 然后转接到含有 50 mg/L 美罗培南的农杆菌抑制培养基中 (暗培养 7 天), 农杆菌受到完全抑制后, 对侵染材料进行阳性筛选并诱导不定芽产生, 其中筛选培养基为含有 50 mg/L 卡纳霉素+50 mg/L 美罗培南及适宜浓度的细胞分裂素和生长素的 MS(1/2N) 培养基, 筛选过程需暗培养约 30 天; 不定芽诱导培养基与筛选培养基类似, 不同之处在于降低了生长素浓度, 诱导过程需光照培养约 50~80 天。当不定芽长到 1cm 后转接到不定芽增殖培养基, 最大增殖系数达到了 15。侵染后的组培苗经载体序列克隆和 GUS 染色阳性验证, 目前已获得‘次郎’柿胚根培养的 *MeGI* 基因 RNAi 沉默阳性苗 10 株, 转化率达到 16.7%; 而‘磨盘’柿胚根侵染的转化效率为 1.8%, 美洲柿转化效率为 2.3%, 君迁子转化效率为 1.9%。现已将阳性苗进行了扩繁, 用于后续研究。本研究建立的柿及其近缘种的高效遗传转化体系为基因功能验证和基因编辑育种奠定了基础。