

抗松针褐斑病湿地松体胚繁殖条件优化及遗传转化体系初建

费琪^{1, 2}, 叶建仁^{1, 2}, 朱丽华^{1, 2*}

(1 南方现代林业协同创新中心 南京 210037; 2 南京林业大学林草学院 南京 210037)

摘要:【目的】建立高效稳定的湿地松 (*Pinus elliottii Englem*) 体细胞胚植株再生体系, 以及农杆菌介导的遗传转化体系, 为湿地松优良种质资源的大规模繁育和关键基因功能的研究提供技术支撑, 同时为高产、高抗湿地松转基因新品种培育奠定基础。【方法】以来自 4 个家系的湿地松未成熟球果为试验材料, 探究基因型及合子胚发育阶段对胚性愈伤组织诱导的影响; 选取增殖效果好的胚性细胞系开展体细胞胚成熟及萌发条件优化试验; 对体胚再生植株接种不同菌根真菌, 探讨菌根化对体胚再生植株生长及移栽存活率的影响。以胚性愈伤组织为受体, 探讨不同农杆菌菌株 (LBA4404、AGL1、EHA105 及 GV3101)、菌液浓度、共培养时间等对遗传转化效率的影响。【结果】基因型对胚性愈伤组织的诱导存在显著影响 ($p < 0.05$), 20#家系的诱导率高达 $32.22 \pm 1.92\%$; 处于 2-3 阶段的合子胚更适于诱导胚性愈伤组织。正交试验表明, 影响体胚成熟及萌发因素的主次顺序为 ABA、PEG8000 和麦芽糖, 添加 3 mg/L ABA、120 g/L PEG8000 和 25 g/L 麦芽糖的处理显著提高了体胚产量 (111.25 ± 8.54 个/皿) 及其萌发率 (100%); 合适的干化处理时间 (7 d) 和麦芽糖浓度 (20 g/L) 可提高体胚萌发率。共培养 4 个月后, 接种菌根真菌紫金蜡蘑 (*Laccaria aemthystea*) 的再生植株根系最长 (7.92 ± 4.06 cm); 移栽至温室 3 个月后, 接种东方豆马勃 (*Pisolithus orientalis*) 和红绒盖牛肝菌 (*Xerocomus chrysentron*) 的再生植株成活率最高, 达 100%。使用农杆菌 LBA4404, 菌液浓度 $OD_{600} = 0.2 \sim 0.4$, 共培养 6 d, 经 GUS 染色和 PCR 鉴定, 确认成功将 GUS 基因导入胚性愈伤组织并成功表达, 转基因愈伤组织进一步分化出转基因体细胞胚。

【结论】本研究成功优化了抗性湿地松体胚繁殖条件, 并初步建立了遗传转化体系。基因型和合子胚发育度是影响胚性愈伤组织诱导的关键因素, 20#家系表现最佳, 最适合的合子胚发育阶段为 2-3 阶段; 体胚最优成熟条件为 3 mg/L ABA、120 g/L PEG8000 和 25 g/L 麦芽糖; 菌根真菌接种显著提高湿地松再生植株成活率。成功建立了农杆菌 LBA4404 介导的转化体系, 实现胚性愈伤组织的遗传转化, 并成功诱导转基因愈伤组织分化出体细胞胚, 为后续转基因研究和应用奠定了基础。

关键词: 湿地松; 体细胞胚胎发生体系; 菌根真菌; 遗传转化