

## 转基因杨树的抗盐性分析

孙仲序\* 杨红花 崔得才 赵春芝 赵淑萍

(山东农业大学,泰安 271018)

**摘 要** 以转 1-磷酸甘露糖醇脱氢酶基因的八里庄杨为试材,对获得的杨树转化体进行了不同 NaCl 梯度的组织培养、水培和盆栽试验。抗盐试验中,转基因八里庄杨比对照的始分化天、分化率、芽头密度、苗高、生长势、生根率明显得到提高,主根数、侧根数、根长的发生数量均较多。结果表明在 4‰含盐量的基质上,转基因苗木比对照有更好的抗性。

**关键词** 转基因,杨树,组织培养,水培,盆栽

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0481-05

杨树是林业最早开展基因工程研究的树种,我国林木育种科学家对杨树建立了离体繁殖再生体系<sup>[1~5]</sup>,一些功能基因被转入杨树细胞基因组中<sup>[2,4]</sup>,通过对愈伤组织进行盐分锻炼的方法也已经获得了小胡杨、河北杨、群众杨、加拿大杨以及一些其他杨树品种的耐盐突变体,并筛选出了抗性植株<sup>[6~8]</sup>。刘风华、孙仲序<sup>[9]</sup>等用 PCR 方法克隆了大肠杆菌 1-磷酸甘露糖醇脱氢酶基因(mtl-D),利用土壤农杆菌介导法导入八里庄杨(*Populus × Xiao Zhannica*, cv. "Balizhuangyang"),经卡那霉素筛选及盐胁迫获得一批较高抗盐性的转化植株。为了尽快将试验结果转化生产力,必须要对所获苗木进行抗盐性试验。

研究植物抗盐碱能力和鉴定,许多科学家进行了水培和盆栽方法,张立钦利用水培研究了杨树新无性系抗盐的指数<sup>[10]</sup>。苑增武将主要造林树种通过盆栽评价出抗盐的顺序级别<sup>[11]</sup>。本研究将获得的转 mtl-D 基因的八里庄杨进行了组织培养、水培和盆栽 3 个方面的耐抗盐性鉴定研究,为以后的推广及应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

以山东农业大学温室内栽植的转 mtl-D 基因八里庄杨<sup>[13]</sup>为试材。

### 1.2 组织培养培养基

采用 MS<sup>[1]</sup>为基本培养基,附加一定浓度的 6-BA(6-benzyladenine,6-苄基嘌呤), $\alpha$ -NAA( $\alpha$ -naphthalene acetic acid, $\alpha$ -萘乙酸),KT(Kinetin,激动素),IBA(Indolebutyric acid,吲哚丁酸),按常规调整生长激素和细胞分裂素的浓度和比例。在所配制的培养基中加入 1‰、2‰、3‰、4‰、5‰、6‰、7‰、8‰不同含量的 NaCl 进行幼苗的抗盐试验。所有试验重复 3 次,每次 5 瓶,培养于温度 24~25℃、光照 16h、光强 3000lx 的培养室中。待苗木在瓶中生长至 2~4cm 时进行抗盐试验,并定期观察其生长状况及生根状况。

### 1.3 盆栽试验

采用山东沿海地区盐渍土壤,分别配比含盐量 1‰、2‰、3‰、4‰、5‰、6‰、7‰、8‰不同梯度试验土,装入直径 30cm 的花盆内。每盆移入一株约 60cm 高的一年生转化体杨树苗木,每个试验栽 10 株。为了保持花盆的含盐量,每个花盆垫一塑料盆,以免浇水时盐碱流失。待缓苗后,开始观测成活率、盐害症状及生长情况。

### 1.4 水培条件

秋季剪取长约 10~15cm,直径 1cm 大小的转化体及对照的杨树落叶枝条,分别插入含有 1‰~8‰ 查苗木的生根数、发芽数、相对生长量以及生长势等指标,统计结果,并统计不同浓度下的苗木的存活率及盐害症状等指标。

不同浓度 NaCl 水溶液的玻璃瓶, 培养于 28℃ 恒温室内, 每隔 7d 换 1 次 NaCl 盐水。30d 后调查分析。

### 1.5 盐害分级标准

0 级——无盐害症状;

1 级——轻度盐害, 有少部分叶尖、叶缘或叶脉变黄;

2 级——中度盐害, 有大约 1/2 的叶尖、叶缘焦枯;

3 级——重度盐害, 大部分叶尖、叶缘焦枯或脱落;

4 级——极重度盐害, 枝枯、叶落、最终死亡;  
盐害指数(D) =  $\sum(\text{盐害极值} \times \text{相应盐害级值株数}) / (\text{总株数} \times \text{盐害最高极值}) \times 100\%$

## 2 结果与讨论

### 2.1 杨树转化体组织培养抗盐性的鉴定

表 1 组织培养抗盐性调查

Table 1 Investigation of salt-tolerance on tissue culture

NaCl concentration/%	Transgenic poplar					Control				
	Days of first differentiation	Differentiation rate/%	Death rate/%	Rooting rate/%	Growth potential	Days of first differentiation	Differentiation rate/%	Death rate/%	Rooting rate/%	Growth potential
1	7	98	11.11	91.11	Strength	6	99	12.50	97.5	Strength
2	8	97.5	11.11	88.89	Strength	14	57	21.43	90.5	Medium
3	10	76.3	12.50	87.50	Strength	30	24.8	33.33	55.5	Weak
4	12	46.7	16.67	86.11	Medium	0	0	80.56	41.6	Heavenly weak
5	16	25.8	29.63	77.78	Medium	0	0	93.75	28.1	Heavenly weak
6	24	13.1	42.86	75.56	Medium	0	0	100.00	0	-
7	28	5.2	44.44	64.28	Weak	0	0	100.00	0	-
8	Upwards of 30 days	0	82.05	1.0	Weaker	0	0	100.00	0	-

从表 1 看出杨树转化体, 无论始分化天数、芽分化率、死亡率、生根率与对照相比均有着相当大的差异; 当培养基 NaCl 浓度为 1‰ ~ 7‰ 时, 杨树转化体能存活并都能进行一定的分化, 而对照 6‰ 时, 却都已枯死。

含盐量 4‰ 时, 转化体 12d 开始分化, 分化率达到 46.7%, 死亡率为 16.67%。生根率高达 86.11%, 而对照已不能分化, 死亡率为 80.56%; 从生长势来看, 转化体生长中等, 芽头比较密集, 叶片青绿, 愈伤组织没有发现明显受到抑制和衰老褐化的现象。而对照则相反, 在盐胁迫下本身的发育受阻, 芽叶黄褐, 生长延缓, 愈伤组织老化, 呈现出盐害症状。所以从组织培养的角度来看, 杨树转化体抗盐能力明显增强, 优于对照。

### 2.2 杨树转化体水培抗盐性鉴定

2.2.1 抗盐试验的苗木生长表现: 利用水培进行抗盐性试验, 30d 后统计的试验结果在一定程度上与组培的结果相似(见表 2)。从表可以看出, 杨树转化体生根数量比对照要高, 1‰ 可以达到每根树条生长出 2 条主根, 根长平均 8cm, 并有多量侧根和密集根毛。对照却无论在何种盐处理浓度中都没有长出根来, 仅在 1‰ NaCl 处理浓度的情况下, 树条的基部皮孔处略有突出现象。对照靠树条本身营养长出的绿叶和新梢枝条, 随着时间的延长逐渐枯黄变褐, 在 2‰ 浓度以上的全无存活。杨树转化体在 3‰ 时的死亡率仅为 1.7%, 7‰ 以上时杨树转化体才逐渐开始死亡, 盐害胁迫周期要比对照持续 15d 左右, 说明杨树转化体在水培中的抗盐作用较对照有明显的提高。

表 2 杨树转化体与对照水培抗盐试验的生长表现

Table 2 Status of transgenic poplar and control through water planting

NaCl concentration/%	con-	Transgenic poplar				Control			
		Rooting number	Rooting rate/%	Death rate/%	Length of shoot	Rooting number	Rooting rate/%	Death rate/%	Length of shoot/cm
1	2	70	0.8	5.38a	0	0	0	0.5b	
2	1	33.3	0.8	4.84	0	0	100	0	
3	0.9	25	1.7	4.21	0	0	100	0	
4	0.1	16.7	33.3	3.95	0	0	100	0	
5	0	0	58.3	3.43	0	0	100	0	
6	0	0	75	0	0	0	100	0	
7	0	0	100	0	0	0	100	0	
8	0	0	100	0	0	0	100	0	
9	0	0	100	0	0	0	100	0	
10	0	0	100	0	0	0	100	0	

\* Statistical average result through after 30 days

2.2.2 不同盐处理下杨树枝条受害状况 :从表可以看出,在不同盐处理浓度下,杨树转化体开始出现盐害的情况不同。在 1‰ 处理下 20d 左右,其盐害指数为 0,盐害 1 级;在含盐量 2‰、3‰、4‰ 下,18d 左右分别开始出现盐害症状,叶片有个别发黄现象,盐害指数为 30,盐害 0 级。5‰、6‰ 含盐量下,15d 左

右开始出现盐害症状,叶片发黄变褐,一直维持到 30d 为止,盐害指数为 50,盐害 1 级。随着盐处理浓度从 7‰ 提高到 10‰,受害的时间差距越来越小,叶片也变褐死亡,测定结果盐害为指数 90,盐害 2 级以上。由此得出叶片及茎生长在含盐量 0.5% 以下受害较轻,树条发育较为正常。

表 3 不同盐处理下杨树转化体叶和茎出现的危害状况

Table 3 The case of transgenic poplar salt injury symptom on different salt stress

Salt concentration/%	Index of salt injury	Value of grade	Days of amering salt depression /d	Amount of relative acrement/%	Salt resistance
1	0	0	20	209	Strength
2	5	0	18	179	Strength
3	15	0	18	143	Strength
4	25	0	18	138	Strength
5	30	1	15	117	Strengthen
6	53.3	1	15	77	Medium
7	99.9	2	10	50	Weaker
8	100	3	7	0	Weak
9	100	3	6	0	Heavily weak
10	100	3	5	0	Heavily weak

## 2.3 转基因八里庄杨盆栽抗盐性鉴定

2.3.1 不同梯度的盐碱土对转基因八里庄杨一年生苗的影响 :山东沿海黄河冲击平原主要受海水浸渍的影响,是以 NaCl 为主的土壤类型,土壤浸取液

中,阳离子中的有害阳离子  $\text{Na}^+$  和阴离子中  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{SO}_4^{2-}$  的含量较高,它们对植物毒害作用较大。因此从该地域有代表性的土壤所取的样土做试验能表现出更加接近实际的情况。结果见表 4。

由表 4 可以看出,转基因八里庄杨在盐碱土含盐量 1‰、2‰和 3‰中苗木都能很好的生长,在 3‰、4‰中除个别死亡外,所有存活植株表现出叶片浓绿,生长势旺盛。在 5‰~7‰时苗木可以存活,但是生长势较弱,叶色黄绿,表现出了较为明显的盐害

症状。在含盐量 8‰以上时,苗木在移栽后不久就表现出严重的盐害症状,其枝条枯干、叶片变黑,最终死亡。对照苗木在 1‰还表现正常,2‰以上时个别植株苗木能生存外,大部分逐渐变黄枯干死亡。

表 4 杨树转化体在含盐量不同盐碱土上的生长表现  
Table 4 Status of transgenic poplar in different saline-alkali soil

Salt content of soil/‰	Transgenic poplar			Control
	Number of transplant seedlings	Rate of surviving/ %	Growth status under salt stress	Rate of surviving/ %
1	10	100	Leaf colour very green , growth strengthen ,no salt damage symptom	100
2	10	100	Leaf colour green , growth strength ,no salt damage symptom	60
3	10	90	Leaf green above part ,below part paucity leaf yellow - green ,no salt damage symptom	10
4	10	80	Leafyellow-green ,growth medium ,lighter salt damage ,paucity leaf tip yellow	0
5	10	50	Leaf yellow-green ,growth medium ,lighter salt damage ,to appear small black spot	0
6	10	30	Leaf yellow-green ,growth weaker ,salt damage obvious ,1/2 leaf tip and rim death	0
7	10	20	Yellow-green ,growth weaker ,many part leaf trun up death	0
8	10	0	Branch hand leaf death , after transplant	0
9	10	0	Branch hand leaf death ,after transplant	0
10	10	0	Branch hand leaf death ,after transplant	0

2.3.2 杨树转化体生长性状的调查 :调查了含盐量 3‰土壤上的所有对照与转基因杨树植株,统计叶宽和株高,结果如图 1。从图 1 可以看出,杨树转化体与对照存在着一定差异,转化体的叶片及株高均大于对照,对照在盐胁迫下,生长受到抑制,年生长量在盆中仅为转化体的 1/2,苗木叶片的宽度也比较窄。其抗盐程度明显不如转化体优良。

2.3.3 杨树转化体与对照气孔的比较 :在盐胁迫下,植物气孔密度会受到一定的影响<sup>[12]</sup>,因此对气孔进行观测并统计分析,结果见表 5。

表 5 气孔密度及差异显著性检验比较

Table 5 Comparison of transgenic poplar and control stoma

	Average value	5%	1%
Control	16.535	A	A
Test	13.927	B	B

Note : Multiple of microscopic is 10 × 40, observation 30 visual field , fetch average value

由表中可以看出,对照与处理的气孔密度通过方差分析得出在 5%时差异显著,在 1%时差异极显著,说明转基因植株在气孔密度方面与对照之间存在着明显的不同。气孔密度的降低在一定程度上减少了蒸腾作用,有助于在盐胁迫的存活及生长,成为转基因杨树抗盐能力提高的又一证据。

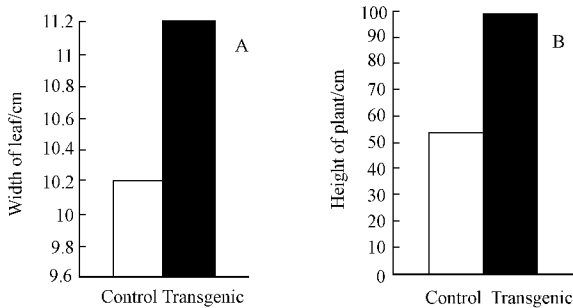


图 1 杨树生长性状的调查

Fig.1 Investigation of growth character on poplar plant

A. Comparison of leaf width ;B. Comparison of plant height

Data is average value of investigating plant

### 3 结 论

八里庄杨经用磷酸甘露糖醇脱氢酶基因转化后,其转化体在通过组织培养、水培和盆栽试验的不同 NaCl 盐梯度的试验,均比对照表现出明显的抗盐能力。在组织培养鉴定中,其在 4‰ NaCl 浓度培养基里,盐害指数为 25,抗盐性表现较强。水培试验表明,4‰ 的水溶液能使生根率维持到 16.7%,成活植株叶茎色绿,无明显受害现象。盆栽的转化体在含 4‰ 的 NaCl 的土壤中能使其成活率达 80%,死亡率较低。因此本文认为抗盐碱基因 mtl-D 在八里庄杨的染色体中,能正确表达,植株表现出叶绿苗壮、根系发达、成活率高、气孔密度增加,发挥了其抗盐的作用,杨树转化体苗木抗盐能力超过对照植株三倍以上,成为一种基因工程的新型产品。我国沿海地带是以 NaCl 为主的盐碱土壤类型,本次一系列转抗盐碱基因八里庄杨的抗盐试验结果表明,转化体植株在含盐量的 4‰ 土壤中能正常生长,在 5‰ ~ 6‰ 的土地上可以试行推广应用。

### REFERENCES (参考文献)

[1] ZHENG J H (郑均宝), LIANG H Y (梁海永), WANG J M (王进茂) et al. Relationship between the formation of shoot apices and calli differentiation of poplar and apple *in vitro* and endogenous IAA and ABA. *Acta Phytophysiological Sinica* (植物生理学报), 1999, 2(1): 80 ~ 86

[2] CHEN Y (陈颖), HAN Y F (韩一凡), LI L (李玲) et al. Study on the plant regeneration from *Populus deltoides* explant transformed with BT. Toxin gene. *Scientia silvae sinicae* (林业科学), 1995, 31(2): 97 ~ 103

[3] ZHANG Q W (张绮文), YANG C F (杨传平), SHI J S (施季森)

et al. Current advances of biotechnology on forest genetic breeding. *World Forestry Research* (世界林业研究), 1998, 1: 7 ~ 14

[4] TIAN Y C (田颖川), LI T Y (李太元), MANG K Q (莽克强) et al. Insect tolerance of transgenic *Populus Nigra* plants transformed with bacillus thuringiensis Toxin gene. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1993, 9(4): 291 ~ 297

[5] PENG X H (彭信海), BIN Q S (宾秋实). Plant tissue culture as used in forest tree breeding. *Economic Forest Researches* (经济林研究), 1998, 16(2): 54 ~ 55

[6] LI J H (季金花), SU X H (苏晓华), ZHANG Q W (张绮文) et al. Progress in the breeding of saline-tolerant somatic mutant trees. *World Forestry Research* (世界林业研究), 1997, 6: 15 ~ 21

[7] TAO J (陶晶), QIN C Y (秦彩云), YAO L X (姚露贤) et al. Review on breeding of Sact-tolerant mutants of poplar. *Jilin Forestry Science and Technology* (吉林林业科技), 2000, 29(2): 5 ~ 8, 50

[8] LI L (李玲), HAN Y F (韩一凡). The saline tolereant inducement of poplar callus lines. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), 1990, 26(4): 359 ~ 362

[9] LIU F H (刘凤华), SUN Z X (孙仲序), CUI D C (崔德才) et al. Cloning of *E. coli* mtl-D and its expression in transgenic balizhuangyang (*Populus*). *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 2000, 27(5): 428 ~ 433

[10] ZHANG L Q (张立钦), ZHENG Y F (郑勇平), WU J L (吴纪良) et al. NaCl stress of new aigeiros clones seedlings from water cultures. *Journal of Zhejiang Forestry College* (浙江林学院学报), 2000, 17(2): 121 ~ 125

[11] ZHANG Q H (张庆宏), GAO Y Q (高亚芹), ZHANG Y X (张延新) et al. Preliminary study on afforestation on the saline-alkali soil in Daqing area. *Protecion Forest Science and Technology* (防护林科技), 2000, 3(1): 60 ~ 66

[12] CAO F L (曹福亮), LI S H (吕士行), HUANG J H (黄家洪) et al. The effect of NaCl on young seedlings growth of poplar. *Journal of Nanjing Forestry University* (南京林业大学学报), 1993, 17(supplement): 24 ~ 30

### Analysis of Salt Resistance on the Poplar Transferred with Salt Tolerance Gene

SUN Zhong-Xu YANG Hong-Hua CUI De-Cai ZHAO Chun-Zhi ZHAO Shu-Ping

(Agricultural University of Shandong, Tai'an 271018, China)

**Abstract** Poplar (*Populus × Xiao zhannica*, cv. "balizhuang-yang") transferred with mtl-D gene was used as an experimental material. Through tissue culture, aquaculture and pot culture transgenic poplars are tested with variant NaCl salt gradient. In it transgenic poplar raises its initial days for differentiation, differentiation rate, bud intensity, bud height and growth potential than control plant. At the same time, the transgenic poplar has higher rooting rate and more top roots, side roots and higher root length than control under the same salt stress. The result shows that the transgenic poplar has better tolerance ability than control plant in the salt 4‰ contensity mediums.

**Key words** transgenic, poplar, tissue culture, aquaculture, pot culture