

文章编号: 1001-1498(2008)03-0379-07

转基因三倍体毛白杨抗盐试验研究

刘 静¹, 王长宪¹, 王 斌², 刘 杰³, 赵进红¹, 黄艳艳¹, 张 虹¹

(1. 泰安市泰山林业科学研究院, 山东 泰安 271000; 2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101;
3. 青岛科技大学生物系, 山东 青岛 266042)

摘要: 试验设计 4 ~ 11 g · kg⁻¹ 8 个 NaCl 浓度梯度, 对转 PLD/A NHX I 基因抗盐碱三倍体毛白杨进行组培苗抗盐分化试验, 设计 2 ~ 10 g · kg⁻¹ 9 个 NaCl 浓度梯度进行组培苗抗盐生根试验, 设计 3 ~ 12 g · kg⁻¹ 10 个 NaCl 浓度梯度对 1 年生盆栽苗进行抗盐试验, 结果表明: 在 NaCl 浓度达 8 g · kg⁻¹ 时, 转基因三倍体毛白杨分化培养 37 d 后, 组培苗的叶色、分化芽数及新梢长度开始受到影响, 随着 NaCl 浓度的增大将抑制组培苗分化生长, 甚至枯萎死亡; 在含 NaCl 7 g · kg⁻¹ 的生根培养基中, 培养 20 d 后, 虽然叶色没有受到盐太大的影响, 但生根和新梢的生长都开始受到抑制, 根系明显的减少; 在含 NaCl 7 g · kg⁻¹ 的土壤条件下, 盆栽苗培养 32 d 后, 开始表现出盐害症状。

关键词: PLD/A NHX I 基因; 三倍体毛白杨; 组培分化; 组培生根; 盆栽苗; 抗盐性

中图分类号: S792.11

文献标识码: A

Study on the Salt Tolerance of Genetically Modified Triploid Chinese White Poplar

LIU Jing¹, WANG Chang-xian¹, WANG Bin², LIU Jie³, ZHAO Jin-hong¹, HUANG Yan-yan¹, ZHANG Hong¹

(1. Taishan Institute of Forestry Science, Tai'an 271000, Shandong, China;

2. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

3. Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, Shandong, China)

Abstract: The salt tolerance of tissue cultured plantlet differentiation of modified triploid Chinese white poplar which PLD/A NHX I gene of saline resistance were transformed into were tested within 4 - 11 g · kg⁻¹ salt concentration of 8 levels. Tissue cultured plantlets rooting were tested within 2 - 10 g · kg⁻¹ salt concentration of 9 levels. One year pot seedlings were tested salt tolerance within 3 - 12 g · kg⁻¹ salt concentration of 10 levels. The results showed that when salt concentration reached 8 g · kg⁻¹, the genetically modified triploid Chinese white poplar began to have effects on differential growth, leaves color of tissue cultured plantlets, number of differentiation buds and length of new growth, and differentiation of bottle seedlings was restrained, got withered or dead with increasing of salt concentration, and that leaves color had little effect, but rooting and new growth began to be restrained and rootage obviously reduced when tissue cultured plantlets grew in rooting culture medium of 7 g · kg⁻¹ salt concentration for 20 days, and that when pot seedlings grew for 32 days in the soil of 7 g · kg⁻¹ salt concentration, they began to appear salt injury.

Key words: PLD/A NHX I gene; triploid Chinese white poplar; tissue cultured plantlets of differentiation; tissue cultured plantlets rooting; pot seedlings; salt tolerance

三倍体毛白杨 (*Populus tomentosa* Carr. ZU.) 是目前我国推广栽培的重要速生杨树品种, 也是中国

特有的优良种质资源。土壤盐渍化是影响农业生产和农业生态环境的一个重要因素, 是限制林业生产

收稿日期: 2007-10-10

基金项目: 山东省科技攻关项目“抗盐碱双价基因转化三倍体毛白杨新品种培育研究(2007GG10009002)”

作者简介: 刘静(1958—), 女, 研究员, 主要从事林果茶生物育种技术研究。

的一个重要因子。我国科学家对治理盐碱地的探索从未停止,灌水洗盐让土壤中的盐分溶解排走或通过换土改善盐碱地的物理性质^[1],此措施虽然对治理土壤盐渍化很有效,但所需条件苛刻,耗资巨大,绝大多数盐碱地区在经济上难以承受,因而不能轻易实现。通过培育抗盐碱树种提高植物耐盐性是开发盐碱地生产潜力、降低改造盐碱地成本的重要途径之一。现代分子遗传学的发展为杨树品种的进一步改良提供了机会,不但可以大大缩短育种周期,而且具有高效性、专一性等特点。迄今为止,杨树基因工程取得了重要进展^[2-5],有近 20 个杨属种或杂种获得了转基因植株。2000 年以来,在杨树抗盐基因转化研究方面,刘风华等^[6]用 PCR 方法克隆了大肠杆菌 1 磷酸甘露醇脱氢酶基因 (mtD),并利用土壤农杆菌介导法导入八里庄杨 (*P. xiaozhuanica*, cv. "Balizhuangyang"),经卡那霉素筛选及盐胁迫获得了一批较高抗盐性的转化植株;杨传平等^[7]将与甜菜碱合成的 betA 基因转入小黑杨 (*P. simonii* × *P. nigra*) 中,获得阳性植株;樊军锋等^[8]利用叶盘转化法开展了 84K 杨 (*P. alba* × *P. glandulosa*) 双价耐盐基因 mtD/guD 的转化研究,经诱导不定芽及诱导生根阶段卡那霉素连续筛选,获得了 16 株卡那霉素抗性植株,经 PCR 检测,有 4 株呈阳性等;崔德才等^[9]利用根癌农杆菌介导法,将反义磷脂酶 D_r 基因 (*PLD_r*) 转入三倍体毛白杨等。以上转基因植株的抗盐性研究大部分限于试验室内,对转化体抗盐动态分析及抗盐基因在生产中表达程度研究较少,均未培育出速生、高抗等多性状聚合的杨树优良品种。本研究利用中科院提供的转 *PLD/A NHX* 双元抗盐基因三倍体毛白杨转化体,进行组培苗抗盐性分化、抗盐性生根及盆栽苗抗盐等试验,为培育适合生产应用的转基因耐盐碱杨树新品种提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

转 *PLD/A NHX* 基因抗盐碱三倍体毛白杨组培苗,由中科院遗传与发育研究所王斌老师提供。

1.2 耐盐性试验方法

1.2.1 转基因组培苗抗盐分化试验 将已导入抗盐基因的三倍体毛白杨转化体组培苗分别转入含 4 ~ 11 g · kg⁻¹ NaCl 的分化培养基 (配方为 MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.06 mg · L⁻¹) 中,每 1 g · kg⁻¹

为 1 个浓度梯度,进行抗盐分化试验。每组接种 4 瓶,每瓶接种 4 株。接种后 30 d 开始调查叶色、分化数、新梢长度;此后,每隔 7 d 调查 1 次,共调查 3 次,同时设未转基因三倍体毛白杨为对照。

1.2.2 转基因组培苗抗盐生根试验 将三倍体毛白杨转化体组培苗分别转入含 2 ~ 10 g · kg⁻¹ NaCl 生根培养基 (配方为 1/2MS + NAA 0.5 mg · L⁻¹) 中,每 1 g · kg⁻¹ 为 1 个浓度梯度,进行抗盐生根试验。每组接种 4 瓶,每瓶接种 4 株。接种后 20 d 开始调查叶色、生根数、苗高;此后,每隔 7 d 调查 1 次,共调查 5 次,同时设未转基因三倍体毛白杨为对照。

1.2.3 转基因植株 1 年生盆栽苗抗盐试验 将三倍体毛白杨转化体 1 年生苗定干 15 cm,移入盛有普通土壤的盆中 (盆口直径 30 cm,盆高 35 cm),缓苗 1 周,待生长稳定后,分别浇入 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 g · kg⁻¹ 浓度的盐水 1 000 mL,盆底部用含有 10 cm 高水位的塑料盆保持盆栽苗湿度,保证不使盐流失,定期观察生长情况,浇盐水后第 7 天开始调查枯叶率、苗高、盐害面积;此后,每隔 8 d 调查 1 次,共调查 5 次,同时设未转基因三倍体毛白杨为对照。

1.3 相关的标准^[10-11]

瓶苗分化率 = 分化数 / 总接种数 × 100%

盆栽苗枯叶率 = 枯叶数 / 叶片总数 × 100%

瓶苗死亡率 = 死亡数 / 总接种数 × 100%

移植成活率 = 移植成活数 / 种植数 × 100%

盆栽苗盐害分级标准为:

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。

2 结果与分析

2.1 转基因组培苗抗盐分化试验

从表 1 看出:当培养基的 NaCl 浓度达 4 g · kg⁻¹ 时,随培养时间的延长,转基因苗的叶色变化不是很大,芽苗分化数及芽苗高度都有明显增加,与对照苗相比差异不显著;当培养基的 NaCl 浓度达 5 ~ 7 g · kg⁻¹ 时,随培养时间的延长,转基因苗的叶色有变黄的趋势,但变化幅度很小,芽苗分化数和芽苗高

度都有不同程度的增加和增长,与对照苗相比差异极显著,对照苗在 NaCl 浓度达 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时不再分化,芽苗仅有少量生长;当培养基的 NaCl 浓度达 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,随培养时间的延长,转基因苗的叶色变黄的趋势明显,特别是 44 d 时,分化芽有枯死现象,分化芽数有一定的减少,芽苗基本停止生长,表明 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 NaCl 浓度已经对转基因瓶苗分化产生了一定的影响,对照苗已停止生长;当培养基的 NaCl 浓度达 $9 \sim 11 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,随培养时间的延长,分化苗的叶色变黄更加明显,芽苗仍有一定的分化,芽苗高仍有一定的生长,但生长量非常小,对照苗近

于死亡。

从表 1 还看出:培养 30~37 d 时,当 NaCl 浓度达 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,转基因苗能正常分化生长;当 NaCl 浓度达 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时,随着 NaCl 浓度的升高,苗叶色由黄绿逐渐变黄,分化芽数都有所下降,但芽苗有一定生长量;培养 44 d 时,转基因苗仍能在 NaCl 浓度 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 条件以下正常生长;当 NaCl 浓度达 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时,随着 NaCl 浓度的升高,苗的叶色开始变黄,芽苗高生长均处于较低水平,生长趋于停止。对照苗在 NaCl 浓度达 $4 \sim 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时有少量生长,在 NaCl 浓度达 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时停止生长或死亡。

表 1 转基因组培苗在不同盐浓度培养基上的抗盐分化结果

NaCl 浓度 /($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	培养时间 /d	叶色		生根数/条				苗高/cm			
		转基因苗	对照	转基因苗	变异系数	对照	变异系数	转基因苗	变异系数	对照	变异系数
4	30	绿	黄绿	3.25	0.41	3.12	0.38	0.39	0.50	0.39	0.56
	37	黄绿	黄绿	3.38	0.48	3.23	0.52	1.03	0.46	0.87	0.49
	44	黄绿	黄绿	4.44	0.47	3.86	0.45	1.51	0.39	1.22	0.42
5	30	绿	黄绿	2.88	0.35	0.78	0.27	0.47	0.36	0.21	0.39
	37	绿	黄绿	3.13	0.36	0.92	0.32	1.04	0.21	0.42	0.57
	44	黄绿	黄	3.25	0.27	1.06	0.24	1.22	0.21	0.83	0.61
6	30	黄绿	黄	3.00	0.32	0.0		0.48	0.42	0.22	0.46
	37	黄绿	黄	3.50	0.43	0.0		1.05	0.36	0.45	0.38
	44	黄绿	黄	4.50	0.45	0.0		1.29	0.26	0.50	0.87
7	30	黄绿	黄	2.44	0.43	0.0		0.37	0.29	0.20	1.06
	37	黄绿	黄	3.06	0.35	0.0		0.86	0.30	0.28	0.92
	44	黄绿	枯黄	3.56	0.31	0.0		1.15	0.16	0.28	1.21
8	30	黄绿	黄	2.38	0.44			0.62	0.49		
	37	黄绿	枯黄	2.38	0.36			0.62	0.23		
	44	黄	枯	2.13	0.43			0.62	0.28		
9	30	黄	枯黄	1.94	0.23			0.44	0.48		
	37	黄绿	枯黄	2.13	0.33			0.60	0.38		
	44	黄	枯	2.34	0.45			0.80	0.21		
10	30	黄绿	枯黄	1.75	0.29			0.45	0.45		
	37	黄绿	枯黄	2.13	0.36			0.59	0.43		
	44	黄	枯	2.81	0.35			0.76	0.26		
11	30	黄	枯黄	2.13	0.51			0.46	0.67		
	37	黄	枯	2.18	0.40			0.61	0.36		
	44	黄	枯	2.25	0.37			0.77	0.22		

注:表中数据为每次调查累计数的平均值;叶色分:绿、黄绿、黄、枯黄 4 个等级,下同。

2.2 转基因组培苗抗盐生根试验

从表 2 看出:当生根培养基的 NaCl 浓度在 $2 \sim 4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,随培养时间的延长,转基因组培苗的叶色变化不是很大,生根数和苗高都有一定程度的增加,与对照相比差异不显著;当 NaCl 浓度在 $5 \sim 6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,随培养时间的延长,转基因苗的叶色有变黄的趋势,但整体变化不是很大,平均生根数和苗高

都有所增加,而对照苗生根缓慢,数量较少;当 NaCl 浓度在 $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,随培养时间的延长,转基因苗的叶色变黄的趋势非常明显,苗高生长趋于停止,生根数维持在一个很低的水平上;当 NaCl 浓度在 $8 \sim 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,苗叶很快变黄,苗高生长和生根很快停止,后期有枯梢现象,对照苗已停止生长或死亡。

表 2 转基因组培苗在不同盐浓度培养基上的抗盐生根结果

NaCl浓度 /(g · kg ⁻¹)	培养时间 /d	叶色		生根数 条				苗高 /cm			
		转基因植株	对照	转基因植株	变异系数	对照	变异系数	转基因植株	变异系数	对照	变异系数
2	20	绿	绿	1.63	0.86	1.66	0.92	4.42	0.21	4.40	0.22
	27	绿	绿	2.94	0.71	2.89	0.63	4.61	0.16	4.63	0.19
	34	绿	绿	2.94	0.66	2.89	0.58	5.19	0.17	5.24	0.16
	41	绿	绿	3.19	0.69	3.20	0.66	5.27	0.20	5.29	0.20
	48	绿	绿	3.38	0.74	3.36	0.71	5.81	0.24	5.82	0.22
3	20	绿	绿	1.38	1.00	1.40	0.96	2.48	0.26	2.49	0.24
	27	绿	绿	1.75	0.90	1.78	0.93	2.61	0.23	2.60	0.27
	34	绿	绿	1.94	0.79	1.99	0.87	2.94	0.27	3.00	0.26
	41	绿	绿	2.19	0.67	2.20	0.89	2.96	0.29	3.00	0.30
	48	绿	绿	2.19	0.68	2.20	0.72	3.00	0.38	3.00	0.29
4	20	绿	绿	2.13	0.69	2.06	0.68	1.68	0.15	1.66	0.40
	27	绿	绿	2.13	0.69	2.06	0.68	1.91	0.18	1.89	0.35
	34	绿	绿	2.18	0.62	2.20	0.89	2.13	0.21	2.20	0.42
	41	绿	绿	2.28	0.72	2.20	0.97	2.69	0.24	2.20	0.38
	48	黄绿	黄绿	2.31	0.69	2.20	1.02	2.69	0.35	2.20	0.37
5	20	绿	绿	1.00	1.35	0.30	1.25	1.63	0.40	1.12	0.44
	27	绿	绿	1.83	0.96	0.30	1.25	1.66	0.31	1.23	0.35
	34	绿	黄绿	1.83	0.49	0.62	1.32	1.92	0.37	1.23	0.38
	41	绿	绿	2.00	0.78	0.62	1.32	2.13	0.37	1.46	0.29
	48	黄绿	黄绿	2.58	0.74	0.62	1.32	2.58	0.32	1.46	0.32
6	20	绿	黄	1.42	1.23	0.30	1.80	1.94	0.42	0.98	0.58
	27	绿	黄	1.33	1.20	0.30	1.80	2.00	0.42	1.02	0.29
	34	黄绿	黄	1.33	1.20	0.30	1.80	2.04	0.31	1.10	0.31
	41	绿	黄	1.33	1.28	0.30	1.80	2.15	0.35	1.10	0.26
	48	黄绿	枯黄	1.33	1.10	0.30	1.80	2.75	0.27	1.10	0.26
7	20	绿	黄	0.19	1.75	0.0		1.79	0.58	1.16	0.22
	27	绿	黄	0.19	1.75	0.0		1.83	0.25	1.16	0.22
	34	黄绿	枯黄	0.19	1.75	0.0		1.91	0.29	1.20	0.28
	41	黄绿	枯黄	0.19	1.75	0.0		2.19	0.25	1.20	0.28
	48	黄	枯死	0.19	1.75	0.0		2.21	0.28	1.20	0.28
8	20	绿	黄	0.00				1.38	0.30		
	27	黄绿	枯黄	0.08	1.80			1.54	0.25		
	34	黄绿	枯黄	0.08	1.80			1.17	0.18		
	41	黄绿	枯黄	0.08	1.80			1.17	0.39		
	48	枯黄	枯死	0.08	1.80			1.13	0.21		
9	20	绿	黄					1.34	0.31		
	27	绿	枯黄					1.43	0.23		
	34	黄绿	枯黄					1.07	0.12		
	41	黄	枯黄					1.07	0.27		
	48	枯黄	枯死					1.00	0.00		
10	20	绿	黄					1.26	0.30		
	27	绿	枯黄					1.34	0.23		
	34	黄绿	枯黄					1.08	0.27		
	41	黄	枯死					1.08	0.43		
	48	枯黄	枯死					1.00	0.15		

注:表中数据为每次调查累计计数平均值,苗高为保持成活部分的平均值。

从表 2 还看出:生根培养 27 d 时,在盐浓度 2~7 g · kg⁻¹ 范围内,随着 NaCl 浓度的升高,苗的叶色没有发生太大的变化,但生根数和苗高都有所减

少,当 NaCl 浓度达 3 g · kg⁻¹ 时,与 2 g · kg⁻¹ 相比,生根数和苗高生长量有明显下降,但仍保持一定的生长量,转基因植株与对照植株基本相同;当 NaCl

浓度达 $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,各项指标已处于很低的状态;当 NaCl 浓度达 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时,苗停止生根;生根培养 34 d 后,在盐浓度 $2 \sim 6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 范围内,随着 NaCl 浓度的升高,苗叶色没有发生太大的变化,但生根数和苗高生长逐渐减少;当 NaCl 浓度达 $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时,生根及苗高生长基本停止;而对照在 NaCl 浓度 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,生根数及苗高较转基因苗明显减少,在盐浓度 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,对照苗的生根数及苗高都保持在一个很低的水平上,随着 NaCl 浓度的升高,生根及苗高停止生长或死亡。

2.3 转基因盆栽苗抗盐试验

从表 3 看出:当盐浓度在 $3 \sim 7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,盐水对盆栽转基因苗没有造成影响,苗高生长一直保持在较高水平,但在盐浓度 $6 \sim 7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、培养 40 d 时开始有轻度盐害,不过对盆栽苗没有造成影响,而对照苗在 24 ~ 32 d 时就有了轻度盐害,此时期高生长远不如转基因苗;当盐浓度在 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,转基因苗 32 d 时有轻度盐害,但高生长没有受到大的影响,40 d 时有重度(3 级)盐害表现,转基因苗叶片枯黄,高生长缓慢,而对照苗在 24 d 时就有轻度盐害,高生长量减少;当盐浓度在 $9 \sim 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,转基因苗在 24 d 时有轻度盐害症状,在 40 d 时表现出重

度盐害,而对照苗在 16 ~ 24 d 时就有轻度盐害,高生长基本停止;当盐浓度在 $11 \sim 12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,转基因苗 24 d 时有中度盐害,叶片枯黄,苗高停止生长,而对照苗在第 16 天时就有轻度盐害,高生长基本停止。

从表 3 还看出:转基因盆栽苗和对照苗在不同的盐浓度下生长,8、16 d 时,转基因盆栽苗没有出现盐害症状,苗高均有不同程度的增长,出现了随着盐浓度的提高苗高生长加速的现象,这说明短时间内高盐有促进苗木生长的特性;培养 24 d 时,在盐浓度 $3 \sim 7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,转基因盆栽苗高生长没有受到太大影响,待盐浓度达 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时,转基因盆栽苗已受到盐害的影响,并随着时间的延长盐害加重;生长 32 ~ 40 d 后,在盐浓度 $3 \sim 7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,转基因盆栽苗仍没有受到大的盐害,在盐浓度 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时,转基因盆栽苗已受到严重的影响,已达中等程度以上的盐害症状。由此表明,转基因盆栽苗在盐浓度达 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时,苗高生长将受到抑制;对照苗在盐浓度 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,生长 40 d 出现盐害,在盐浓度 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时,生长 32 d 出现盐害,并随着盐浓度的增加苗生长缓慢,盐害加重。

表 3 不同盐浓度下转基因植株 1 年生盆栽苗的抗盐结果

盐浓度 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	培养时间 /d	转化植株			对照		
		苗高生长量 /cm	变异系数	盐害级数	苗高生长量 /cm	变异系数	盐害级数
3	8	12.25	0.05	0	12.28	0.06	0
	16	10.00	0.08	0	11.00	0.08	0
	24	14.03	0.07	0	13.82	0.09	0
	32	13.50	0.09	0	14.53	0.07	0
	40	16.75	0.11	0	17.02	0.12	0
4	8	11.00	0.09	0	11.22	0.05	0
	16	11.00	0.07	0	9.82	0.08	0
	24	17.75	0.05	0	14.68	0.06	0
	32	11.25	0.17	0	15.42	0.12	0
	40	10.75	0.13	0	13.28	0.11	1
5	8	11.25	0.12	0	11.32	0.14	0
	16	10.50	0.10	0	10.28	0.10	0
	24	11.25	0.14	0	9.82	0.12	0
	32	12.25	0.06	0	8.28	0.08	1
	40	18.50	0.07	0	8.16	0.12	2
6	8	13.25	0.13	0	12.98	0.13	0
	16	10.25	0.14	0	10.23	0.16	0
	24	11.00	0.20	0	7.22	0.19	1
	32	15.00	0.17	0	6.23	0.23	2
	40	15.00	0.17	1	3.18	0.21	3

续表 3

盐浓度 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	培养时间 /d	转化植株			对照		
		苗高生长量 /cm	变异系数	盐害级数	苗高生长量 /cm	变异系数	盐害级数
7	8	12.75	0.14	0	13.03	0.17	0
	16	8.25	0.07	0	7.12	0.18	0
	24	12.25	0.12	0	7.23	0.09	1
	32	11.75	0.12	0	5.26	0.13	2
	40	10.75	0.11	1	0.92	0.11	4
8	8	12.25	0.23	0	12.89	0.12	0
	16	6.75	0.11	0	6.26	0.09	0
	24	11.00	0.23	0	7.24	0.08	1
	32	11.00	0.07	1	2.22	0.12	3
	40	6.75	0.27	3	0.00	0.09	4
9	8	13.50	0.13	0	12.48	0.14	0
	16	7.50	0.12	0	5.69	0.12	0
	24	9.25	0.16	1	1.28	0.07	2
	32	4.25	0.29	2	0.00	0.00	4
	40	3.50	0.16	4	0.00	0.00	4
10	8	14.75	0.09	0	12.56	0.09	0
	16	5.25	0.10	0	3.38	0.11	1
	24	8.50	0.13	1	0.00	0.00	2
	32	1.00	0.19	3	0.00	0.00	4
	40	0.00	0.00	4	0.00	0.00	4
11	8	25.50	0.12	0	25.03	0.09	0
	16	3.00	0.14	0	0.00	0.00	1
	24	3.00	0.18	2	0.00	0.00	2
	32	0.00	0.03	4	0.00	0.00	4
	40	0.00	0.00	4	0.00	0.00	4
12	8	25.50	0.23	0	26.03	0.16	0
	16	5.00	0.26	1	0.00	0.00	1
	24	2.50	0.24	2	0.00	0.00	2
	32	0.00	0.00	4	0.00	0.00	4
	40	0.00	0.00	4	0.00	0.00	4
清水对照 CK	8	32.00	0.12	0	31.10	0.12	0
	16	11.50	0.09	0	12.50	0.07	0
	24	17.50	0.07	0	15.50	0.05	0
	32	9.00	0.12	0	10.00	0.08	0
	40	8.00	0.08	0	9.16	0.11	0

注:表中数据为各时间阶段的平均生长量;0,1,2,3,4代表盐害级数。

3 结论与讨论

转基因三倍体毛白杨组培苗在 NaCl 浓度达 $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,转基因组培苗可以分化生长,耐盐浓度比对照高 $2 \sim 3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,在 NaCl 浓度达 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、分化生长 37 d 时,苗叶色、芽苗分化数及芽苗高度开始受到盐害,随着 NaCl 浓度的增大,分化受抑制,甚至使组培苗枯萎死亡。在生根培养基中,当 NaCl 浓度达 $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,转基因组培苗培养 20 d 后,虽然叶色没有受到太大的影响,但生根和苗高生长开

始受到抑制,根系明显减少,在 NaCl 浓度达 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,转基因组培苗可以生根,耐盐浓度比对照高 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。在盐浓度 $6 \sim 7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤条件下,盆栽苗生长 40 d 时开始表现出盐害症状,耐盐浓度比对照高 $2 \sim 3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;在盐浓度 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时,随着盐浓度的增加,生长受抑制。由此得出,转基因三倍体毛白杨在盐浓度 $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时能生长。

转基因三倍体毛白杨组培苗在高盐浓度 $10 \sim 11 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,不同时期分化苗的叶色表现为先黄然后

又黄绿的不规律现象,这表明转基因植物在抗性表达过程中有不稳定性;生根培养 41 d 以后,苗高生长不仅停止,而且有枯梢萎缩现象,随着时间的延长,苗平均高度有所下降。在盆栽苗抗盐试验中,出现了短时间内高盐浓度处理比低浓度处理生长快的现象,这可能是高盐浓度的胁迫有促进植物细胞变异的特性^[12],为此,对转基因三倍体毛白杨抗盐机理还需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 平斯科依. 盐渍土的土壤改良措施 [M]. 北京:科学出版社, 1959: 28 - 36
- [2] 林善枝,肖基沂,张志毅. 杨树抗性基因工程研究进展 [J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(6): 85 - 88
- [3] 陶晶. 植物盐胁迫研究进展 [J]. 吉林林业科技, 2003, 5(32): 1 - 5
- [4] Holmberg N, Bulow L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer[J]. Trends in Plant Science, 1998(3): 61 - 66
- [5] Bondt A D, Druart P. Agrobacterium mediated transfections of apple (*Malus domestica* Borth): an assessment of factors affecting gene transfer-efficiency during early transformation steps[J]. Plant cell Rep, 1994, 13: 587 - 593
- [6] 刘风华,孙仲序,崔德才,等. 细菌 mtD 基因的克隆及在转基因八里庄杨中的表达 [J]. 遗传学报, 2000, 27(5): 428 - 433
- [7] 杨传平,刘桂丰,梁宏伟,等. 耐盐基因 Bet-A 转化小黑杨的研究 [J]. 林业科学, 2001, 37(6): 34 - 38
- [8] 樊军锋,韩一凡,李玲,等. 84K 杨树耐盐基因转化研究 [J]. 西北林学院学报, 2002, 17(4): 34 - 37
- [9] 崔德才,刘斌,李红双,等. 反义磷脂酶 D 基因转化毛白杨的研究 [J]. 遗传, 2002, 24(1): 40 - 44
- [10] 孙仲序,扬红花,崔德才,等. 转基因杨树的抗盐性分析 [J]. 生物工程学报, 2002, 18(4): 481 - 485
- [11] 尹建道,孙仲序,王玉祥,等. 转抗盐碱基因八里庄杨大田释放试验 [J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(3): 23 - 25
- [12] 应天玉,刘国生,姜中珠. 植物耐盐的分子机理 [J]. 东北林业大学学报, 2003, 31(1): 31 - 33