

doi:10.11707/j.1001-7488.20170705

盐胁迫下转复合多基因欧美杨 107 杨 幼苗生长及生理响应*

陈盼飞¹ 左力辉¹ 王桂英² 王进茂¹ 任亚超¹ 杨敏生¹

(1. 河北农业大学林学院 保定 071001; 2. 廊坊市农林科学院 廊坊 065000)

摘 要: 【目的】通过观测转复合多基因欧美杨 107 杨(转基因 107 杨)幼苗在不同浓度盐胁迫下生长性状,质膜透性、光合作用等各项指标,以及外源基因表达产物积累量的变化,综合评价转复合多基因杨树在盐胁迫下的适应能力。【方法】以转化成功且已经过验证的转基因 107 杨为试验材料,未转基因 107 杨为对照(CK),进行组培扩繁,在幼苗株高 10 cm 时定植在花盆中,置于人工气候室中培养。分别用 0、3、6 g·L⁻¹ 的 NaCl 溶液进行盐胁迫处理,胁迫 25 天后观测 2 个株系幼苗的生长指标、生理参数变化,以及甜菜碱与 Bt 毒蛋白的积累量。【结果】2 个株系的生长指标观测结果表明:在低盐浓度处理下,转基因 107 杨幼苗株高增长量显著高于非转基因对照,转基因株系幼苗地径增长量与对照差异不显著;高盐浓度处理下,2 个株系幼苗株高与地径均受到盐胁迫的显著影响。2 个株系的生理参数观测结果表明:在低盐浓度处理下,转基因 107 杨幼苗质膜透性显著低于对照 107 杨,叶绿素含量有一定程度的增加,净光合速率与蒸腾速率显著高于对照,光系统 II 实际光合效率 $Y(II)$ 小幅度降低但显著高于对照,光系统 II 能够保持较高的电子传递速率; F_v/F_m 增幅较高,具有较大光合作用潜力。在高盐浓度下,转基因株系幼苗叶绿素含量降幅较小,而质膜透性、净光合速率均显著降低, F_v/F_m 、 $Y(II)$ 均呈现较大幅度下降,光系统 II 电子传递速率受到较大影响,光合能力下降,变化趋势与对照相同,2 个株系幼苗均受到较大程度的盐害。转基因株系中外源基因表达产物积累量的 ELISA 研究结果表明,随盐浓度的增加,Cry1Ac 毒蛋白、Cry3A 毒蛋白及甜菜碱含量都呈现增加趋势;在高盐浓度胁迫下外源基因产物积累量均显著增加。【结论】转基因 107 杨在低浓度盐胁迫下表现出良好的适应性,耐盐性优于对照 107 杨。在高浓度盐胁迫下转基因株系与对照 107 杨均受到较大影响,转基因株系并未显示其优势。盐胁迫可以诱导外源 Bt 基因、BADH 基因表达加强,盐胁迫下转基因 107 杨表现出良好的耐盐和抗虫潜力。

关键词: 转复合多基因; 欧美杨 107 杨; 耐盐性; BADH 基因; Bt 基因

中图分类号: S718.43 文献标识码: A 文章编号: 1001-7488(2017)07-0045-09

Growth and Physiological Responses of Transgenic *Populus × euramericana* cv. '74/76' with Multiple Genes Under Salt Stress

Chen Panfei¹ Zuo Lihui¹ Wang Guiying² Wang Jinmao¹ Ren Yachao¹ Yang Minsheng¹

(1. College of Forestry, Agricultural University of Hebei Baoding 071000;

2. Langfang Academy of Agricultural and Forestry Sciences Langfang 065000)

Abstract: 【Objective】 This paper aimed to comprehensively evaluate the adaptability of transgenic *Populus × euramericana* cv. '74/76' with multiple genes (Abbreviation: Transgenic poplar 107) under salt stress through measurements of growth traits, membrane permeability and photosynthesis and other physiological parameters of the transgenic polar 107 under different salt stresses, as well as of the change in the accumulation amount of exogenous gene expression products. 【Method】 The transgenic polar 107 was used as test material, which had been verified successful transformation. The transgenic materials were propagated by tissue culture, and then the obtained seedlings were transplanted in pots when their heights were up to 10 cm. The seedlings were cultured in growth chamber and treated with NaCl solutions which concentrations were 0, 3, and 6 g·L⁻¹, with the nontransgenic poplar 107 served as the control

收稿日期: 2016-04-22; 修回日期: 2017-02-21。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370663); 国家高技术研究发展计划("863"计划)项目(2013AA102703)。

* 杨敏生为通讯作者。

(CK). The growth indexes and physiological parameters, as well as accumulation of betaine and Bt toxin proteins of two lines were measured in 25 days after treatment. **【Result】** The results showed that under low salt concentration treatment, the height of transgenic poplar 107 was significantly higher than that of poplar 107, and the diameter of the transgenic lines was greater than that of poplar 107. Under high salt concentration, the height and the ground diameter of the seedlings of the two lines all were significantly affected by salt stress. Under low salt concentration, membrane permeability of transgenic poplar 107 was significantly lower than that of polar 107, chlorophyll content increased more greatly, and both net photosynthetic rate and transpiration rate increased and were significantly higher than that of polar 107. The actual photosynthetic efficiency $Y(II)$ of photosystem II decreased slightly, but significantly higher than that of the control, indicating that photosystem II was able to maintain higher electron transfer rate. F_v/F_m had a relatively greater increase, suggesting increased photosynthetic capacity. Under high salt concentration, the chlorophyll content of transgenic lines decreased slightly. However, both the plasmalemma permeability and net photosynthetic rate decreased significantly, F_v/F_m and $Y(II)$ had a sharp decline, electron transfer rate of photosystem II was affected greatly and photosynthetic capacity decreased. The all change trends were the same as that of control, and the seedlings of two lines suffered to a great degree salt damage. The accumulation amount of exogenous genes expression in transgenic lines, detected by ELISA, showed that with the salt concentration increasing, the contents of CryIAc toxin protein, Cry3A toxin protein and betaine all had an increasing trend. The accumulation of exogenous genes products significantly increased under the stress of high salt concentration. **【Conclusion】** Transgenic polar 107 displayed strong adaptability under low concentration salt stress, and its salt tolerance was stronger than the polar 107. Both transgenic polar 107 with multiple genes and control polar 107 were to a great degree impacted under high concentration salt stress, and transgenic line did not show any advantage. Salt stress induced an expression enhancement of the exogenous *Bt* gene and *BADH* gene, suggesting that the transgenic poplar 107 would show a good salt tolerance and insect resistance potential under salt stress.

Key words: transgenic with multiple genes; *Populus* × *euramericana* cv. '74/76'; salt tolerance; *BADH* gene; *Bt* gene

杨树(*Populus*)是世界中纬度地区广泛栽培的主要树种之一。杨树在我国北方地区生态建设和林业生产中占有不可替代的地位,我国杨树种植面积远远超过世界所有其他国家杨树人工林面积之和(卢孟柱等, 2006)。然而随着杨树栽培面积的不断扩大,虫害现象日趋严重,给生态环境和林业生产带来前所未有的毁灭性灾难;另一方面,随着土壤盐渍化问题的日益加剧,可利用土地资源逐年减少,严重影响农林业生产和可持续发展。

目前,基因工程技术在杨树抗虫、耐盐和耐旱等抗性遗传改良方面取得了很多研究成果,在不同程度上提高了杨树的抗虫、耐盐以及耐旱能力(Klocko *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2012; Hanet *et al.*, 2013)。综合来看,依靠单基因转化对杨树进行遗传改良获得的效果有限,多基因导入或聚合育种可以作为培育杨树新品种的一条可选途径。前人在基因的修饰和改造、多基因表达载体的构建、转基因植物的筛选和培育等方面进行了大量研究。王建革等(2006)通过基因枪法将双价抗蛀干害虫基因(*BtCry3A* + *OC-1*)、透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)、枯草杆菌果聚糖蔗糖酶基因(*SacB*)、报告基因 *npt II* 以及调节基因 *JERF36* 等外源基因导入到库安托杨(*Populus* ×

euramericana 'Guariento') 基因组,共获得 25 株抗性植株,经过 southern 杂交和 PCR 检测,外源基因成功整合到库安托杨基因组中,其中 7 株含有上述全部 5 个外源基因。ELISA 试验表明,*BtCry3A* 基因在 7 株库安托杨中已得到表达,并且转基因植株在滨海盐碱地中生长良好。朱永兴等(2015)以'宁杨 1 号'(*P. tomentosa* cv. Niyang-1)为转化受体材料,建立杨树多基因遗传转化体系,并对三价质粒 MT (*SOS1* - *SOS2* - *SOS3*)进行了共转化并建立了最佳的'宁杨 1 号'多基因遗传转化体系,获得 14 株 PCR 阳性株系。

本研究利用转复合多基因(*BtCry1Ac* + *BtCry3A* + *BADH*)欧美杨 107 杨(*Populus* × *euramericana* cv. '74/76')为试验材料,以未转基因欧美杨 107 杨为对照,在人工气候室控制环境下,通过浇施不同浓度的 NaCl 水溶液进行盐胁迫处理,观测 2 个杨树株系幼苗的株高、节间距等生长指标,电导率、光合相关参数等生理变化,以及转基因株系外源 *Bt* 基因、*BADH* 基因表达产物积累量的变化。通过综合分析比较,探究转多基因 107 杨在盐胁迫下的生长和生理响应,为多元复合基因转化及转基因新品种培育提供借鉴和理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为欧美杨 107 杨与转复合多基因 (*BtCry1Ac + BtCry3A + BADH*) 欧美杨 107 杨 (转基因 107 杨) 高抗株系 1 号, 由河北农业大学遗传育种实验室提供。转基因 107 杨是将 3 个目的基因构建在同一转化载体上, 采用农杆菌介导法, 将外源基因整合到欧美杨 107 杨基因组中, 获得转基因组培苗, 经分子检测、Bt 毒蛋白检测及初步抗性试验, 证明外源基因已整合到 107 杨基因组中, 并进行了转录和表达, 初步证明转基因株系具有抗虫性和耐盐能力 (王奥璇, 2015)。

1.2 试验设计

对 2 个 107 杨株系进行组培扩繁, 组培苗生根后, 移入内径 5 cm、高 8 cm 的盆中, 每个株系栽植 50 株。栽培用土壤为园土: 基质土 = 1: 3。盆栽苗置于人工气候室中培养, 条件为日温 26 ~ 28 °C, 夜温 18 °C; 光周期: 14 h·d⁻¹ (光强 10 000 Lx)。培养 40 天后, 幼苗株高约 10 cm 时, 选取生长一致的幼苗, 定植在内径 18 cm、高 20 cm 的盆中, 每盆 2 株, 分别为对照 107 杨与转基因 107 杨, 共 27 盆。

定植 2 天后, 分别用 NaCl 浓度为 0、3、6 g·L⁻¹ 的盐溶液进行胁迫处理。每个处理设置 9 盆幼苗, 3 次重复。每隔 4 天浇 1 次盐溶液, 每次 150 mL。盐胁迫 25 天后, 每株选取顶端第 1 片完全展开的成熟叶片, 进行光合色素含量、光合作用指标和叶绿素荧光参数的测定。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 生长指标的测定 在盐处理前和第 25 天时, 分别用不锈钢刻度尺、千分尺测量盐胁迫前后的株高、地径。每个处理 9 次重复。

1.3.2 质膜透性的测定 在盐处理第 25 天时, 分别取 2 个杨树株系幼苗相同部位叶片, 用去离子水冲洗 2 遍, 用滤纸吸干叶面浮水后用打孔器打孔取样, 在电子天平称量后放入 50 mL 三角瓶中, 按 200 mL·g⁻¹ 加入去离子水, 抽真空 20 min, 静置 2 h, 用 DDS-11A 型电导仪测定电导值, 然后将样品在 97 °C 中水浴 30 min, 静置 2 h, 测定电导值, 以相对电导率表示细胞原生质膜透性的大小。每个处理 4 次重复。

1.3.3 光合色素的测定 叶绿素 a、叶绿素 b 含量的测定按照李合生 (2000) 方法, 用上海精工 722 s 分光光度计进行测定, 含量以 mg·g⁻¹ FW 表示。每个处理 6 次重复。

1.3.4 光合作用指标的测定 上午 9: 00—10: 00 在人工气候室条件下采用 Li-6400XT 便携式光合仪 (美国拉格公司生产) 进行光合速率有关指标的测定, 其中包括: 净光合速率 (P_n)、蒸腾速率 (Tr)、胞间 CO₂ 浓度 (C_i) 以及气孔限制值 (L_s)。每个处理 6 次重复。

1.3.5 叶绿素荧光参数的测定 测定前用暗处理夹片对杨树幼苗的叶片进行 20 min 的暗处理。然后采用 Porek PEA 高速连续击发式荧光仪 (英国 Bioscientific 有限公司生产) 测定幼苗光化学活性、光能吸收和转化效率。叶绿素荧光参数的测定和光合作用指标的测定同时进行。每个处理 4 次重复。

1.3.6 转基因株系叶片外源 Bt 毒蛋白含量的测定

采用美国 Agdia 公司 Bt-Cry1Ab/1Ac 及 Bt-Cry3A ELISA 试剂盒进行 Bt 毒蛋白含量的测定。称取 0.1 g 左右 (记录实际质量) 新鲜叶片, 在液氮中研磨至粉末状, 加入 1 mL 1 × PBST 提取缓冲液, 研磨呈匀浆状, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 取上清液用于 Bt 毒蛋白含量的检测。具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。每个处理 6 次重复。

1.3.7 叶片甜菜碱含量的测定 采用北京冬歌生物科技有限公司植物甜菜碱 (Betaine) 酶联免疫分析 (ELISA) 试剂盒进行甜菜碱的测定。称取 0.1 g 左右 (记录实际质量) 新鲜叶片, 液氮中研磨至粉末, 加入 0.9 mL PBS (浓度为 0.01 mol·L⁻¹, pH 为 7.4) 提取缓冲液, 匀浆充分, 2 000 ~ 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 取上清液用于甜菜碱含量的检测, 具体操作步骤参照试剂盒说明书。每个处理 3 次重复。

1.4 数据分析

采用 DPS v 7.05 数据处理系统对各项参数进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫下生长指标变化

由表 1 可知, 转基因 107 杨在 3 g·L⁻¹ 低浓度盐处理下株高增长量小幅升高, 但未达到显著水平, 且显著高于相同浓度盐处理下的对照 107 杨。在 6 g·L⁻¹ 高浓度盐处理下, 转基因 107 杨株高增长量显著降低, 且与相同浓度盐处理下的对照无显著差异。对照 107 杨株系在不同 NaCl 浓度处理下, 株高增长量均受到明显抑制。在不同浓度盐处理下, 2 个株系幼苗地径均呈现逐渐降低的趋势, 在 3 g·L⁻¹ 低盐浓度处理下, 转基因 107 杨地径增长量比对照 107 杨高, 但 2 个株系间差异不显著。在 6 g·L⁻¹ 高盐浓度处理下, 2 个株系地径增长量均显著降低且

株系之间无显著差异。可见在低浓度盐胁迫下转基因 107 杨具有良好的适应能力,而在高浓度盐胁迫下,2 个株系幼苗均受到较大的盐害影响。

表 1 盐胁迫下 2 个株系幼苗生长指标变化^①

Tab.1 Changes of growth indexes of two lines under salt stress

NaCl 浓度 Concentration of NaCl/(g·L ⁻¹)	株高增长量的相对值 Relative value of plant height growth (%)		地径增长量的相对值 Relative value of ground diameter growth (%)	
	107 杨 Poplar 107	转基因 107 杨 Transgenic poplar 107	107 杨 Poplar 107	转基因 107 杨 Transgenic poplar 107
	0	100.00aA	100.00aA	100.00aA
3	81.43 ± 9.00bB	106.50 ± 9.93aA	93.12 ± 32aA	97.54 ± 20aA
6	58.00 ± 11.60cA	64.25 ± 9.94bA	77.10 ± 15bA	75.41 ± 13bA

①小写字母表示同一株系不同浓度 NaCl 处理条件下差异,大写字母表示相同浓度 NaCl 处理条件下不同株系间差异,显著性水平为 0.05,下同。Lower case letters represent significant differences of same poplar lines at different treatment; capital letters represent significant difference of different poplar lines at same treatment. significant difference test level is at 0.05, the same below.

2.2 盐胁迫处理对叶片质膜的伤害

大量研究报道,在盐分胁迫下植物细胞质膜首先受到伤害,导致质膜透性增大,细胞内无机离子大量外渗,外界盐离子大量进入,破坏细胞内离子平衡,致使细胞代谢失调,影响植物正常的生长发育。而植物则可以通过吸收并积累从外界环境进入的 K⁺、Cl⁻ 等无机离子,或自身合成小分子有机类调节剂,如氨基酸类、糖类、多元醇和生物碱等调节渗透势,抵御盐胁迫对质膜的伤害,从而提高胁迫环境下的适应能力。图 1 结果显示,在 3 g·L⁻¹ 盐浓度处理下,107 杨相对电导率显著增加 41.23%,转基因株系呈现小幅度降低,降低 5.11%,显著低于相同浓度处理 107 杨。在 6 g·L⁻¹ 盐浓度处理下,2 个株系相对电导率均显著增大,且转基因株系增幅高于 107 杨。在低盐浓度处理下,转基因株系相对电导率略微降低表明细胞可能通过外源 *BADH* 基因的表达,促使细胞内甜菜碱含量增加,避免了盐胁迫对细胞质膜的伤害。而 107 杨电导率显著增加,其质膜受到伤害。高盐浓度下,转基因株系质膜透性变化较大,2 个株系质膜透性均受到显著伤害。

2.3 盐胁迫处理对光合色素的影响

叶绿素是植物进行光合作用的主要色素。盐胁迫会对植物细胞产生一定的破坏性,破坏叶绿体结构,造成叶绿素含量降低从而影响植物的光合能力。研究植物盐胁迫下的响应机制,叶片光合色素的含量可作为植物耐盐生理研究的重要指标。盐胁迫下 2 个株系叶片叶绿素含量测定结果见表 2。在 3 g·L⁻¹ 盐浓度处理下,2 个株系叶绿素 a、b 和叶绿素总量均表现为不同程度增加,相同盐浓度处理下转基因株系增幅更大。在 6 g·L⁻¹ 盐浓度处理下,叶绿素 a、叶绿素 b 和叶绿素总量均呈现较大幅度降低,转基因株系降幅较对照小。表明在盐胁迫处理

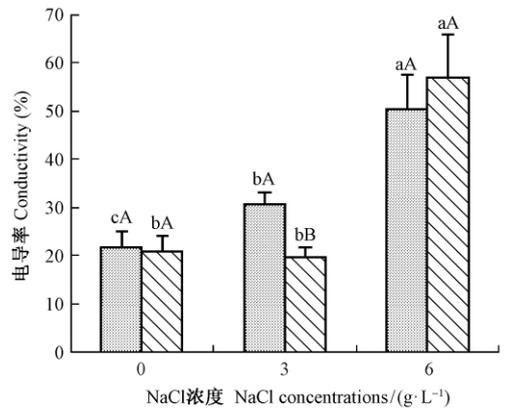


图 1 盐胁迫下质膜透性的变化
Fig.1 Changes of plasma membrane permeability under salt stress

图 1 盐胁迫下质膜透性的变化
Fig.1 Changes of plasma membrane permeability under salt stress
图中误差棒为平均值的标准差;小写字母表示同一株系不同浓度 NaCl 处理条件下差异,大写字母表示相同浓度 NaCl 处理条件下不同株系间差异,显著性水平为 0.05,下同。
Error in the figure for the standard deviation. Lower case letters represent significant differences of same poplar lines at different treatment; capital letters represent significant difference of different poplar lines at same treatment, significant difference test level is at 0.05, the same below.

下转基因株系耐受性较强。高浓度盐处理对 2 个杨树株系幼苗均产生了较大伤害。

2.4 盐胁迫处理对光合参数的影响

不同浓度盐处理下 2 个株系光合参数的测定结果见图 2。随着 NaCl 浓度增加,107 杨叶片净光合速率 P_n 呈降低趋势(图 2A),3 g·L⁻¹ 浓度盐处理下光合速率下降 22.6%,但未达到显著水平,6 g·L⁻¹ 浓度盐处理下该数值显著降低;转基因株系叶片净光合速率呈先升高后降低,在 3 g·L⁻¹ 盐浓度处理下净光合速率升高 18%,显著高于相同盐浓度处理

107 杨。在 $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐浓度处理下降低显著, 与相同盐浓度处理 107 杨无显著差异。说明低盐浓度下转

基因植株可以通过提高光合速率来适应盐胁迫条件。

表 2 盐胁迫下叶片光合色素含量的变化

Tab. 2 Changes of photosynthetic pigment contents in leaves under salt stress

NaCl 浓度 Concentration of NaCl/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	叶绿素 a Chlorophyll a/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$		叶绿素 b Chlorophyll b/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$		叶绿素总量 Total chlorophyll content/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	
	107 杨 Poplar 107	转基因 107 杨 Transgenic poplar 107	107 杨 Poplar 107	转基因 107 杨 Transgenic poplar 107	107 杨 Poplar 107	转基因 107 杨 Transgenic poplar 107
	0	$1.01 \pm 0.18\text{aA}$	$1.03 \pm 0.25\text{aA}$	$0.16 \pm 0.04\text{aA}$	$0.17 \pm 0.04\text{aA}$	$1.17 \pm 0.22\text{aA}$
3	$1.06 \pm 0.23\text{aA}$	$1.20 \pm 0.20\text{aA}$	$0.18 \pm 0.05\text{aA}$	$0.21 \pm 0.03\text{aA}$	$1.24 \pm 0.28\text{aA}$	$1.41 \pm 0.42\text{aA}$
6	$0.83 \pm 0.18\text{aA}$	$0.98 \pm 0.23\text{aA}$	$0.15 \pm 0.06\text{aA}$	$0.20 \pm 0.03\text{aA}$	$0.99 \pm 0.23\text{aA}$	$1.18 \pm 0.35\text{aA}$

不同浓度盐处理下 2 个株系气孔限制值 (L_s) 与胞间 CO_2 浓度 (C_i) 变化见图 2B、2C。低盐浓度下, 107 杨叶片 C_i 降低, 但未达到显著水平, 而气孔限制值 L_s 大幅度增加, 净光合速率下降, 表现为气孔限制。转基因株系气孔限制值小幅度降低, 胞间 CO_2 浓度降低, 但未达到显著水平, 净光合速率增加, 表明低盐浓度下转基因株系可以通过降低气孔限制以适当提高光合速率, 表现出较好的适应性。在高盐浓度下, 2 个株系幼苗气孔限制值显著增加, P_n 下降且 C_i 升高, 这可能是由于高浓度盐胁迫导致大量盐离子在细胞中累积, 破坏了叶绿体结构, 造

成叶绿素含量降低、叶片光合器官损伤, 从而导致叶肉细胞光合活性下降, 说明此时非气孔限制已成为促使光合速率降低的主要因子。

盐胁迫处理下 2 个株系幼苗蒸腾速率 Tr (图 2D) 变化趋势与 P_n 相同。随盐浓度增加, 对照 107 杨 Tr 逐渐降低, 转基因株系呈先升高后降低。在低盐浓度下转基因株系 Tr 显著高于 107 杨, 高盐浓度处理下差异不显著。植物在盐胁迫下叶片气孔限制值增大, 导致水分蒸发和 CO_2 传输受阻, 从而抑制叶片的蒸腾作用和光合作用, 而转基因株系在低盐浓度下气孔限制值小幅度降低, 气孔导度增加, C_i

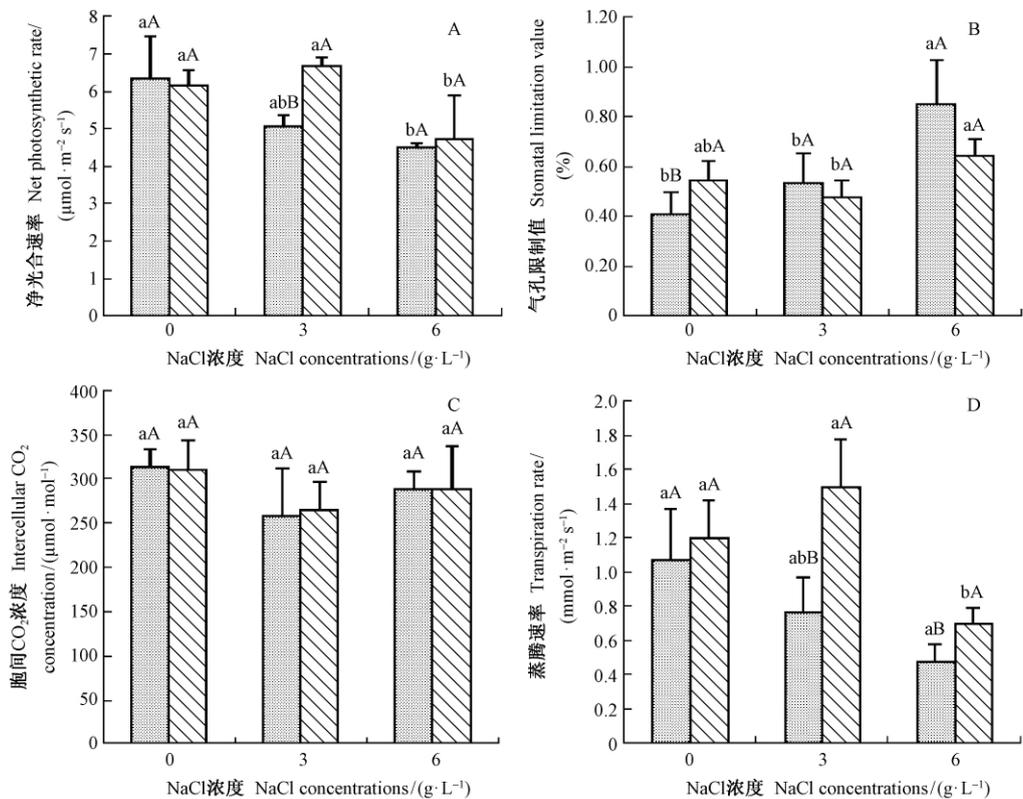


图 2 盐胁迫下 2 个株系光合有关参数的变化

Fig. 2 Changes of photosynthetic parameters under salt stress

升高,其 P_n 与 T_r 表现出一定程度的增大且显著高于 107 杨。说明在低盐浓度下转基因株系可以通过降低气孔限制以增强光合速率和蒸腾速率,提高转基因株系的耐盐性。

2.5 盐胁迫处理对叶绿素荧光诱导动力学的影响

最大光量子产量 F_v/F_m 反映 PS II 初始最大光能利用效率。 F_v/F_m 下降越多,代表 PS II 受到的损伤程度越大。由图 3A 可知,2 个株系幼苗 F_v/F_m 均呈现先升高后降低的趋势。在 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐浓度胁迫下,转基因 107 杨 F_v/F_m 增幅较大,说明转基因杨树具有较大光合作用潜力。 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐浓度处理下 2 个株系 F_v/F_m 均下降明显,说明该盐浓度下 2 个株系均受到较大影响。

初始荧光 F_o (图 3B) 和最大荧光 F_m (图 3C) 分别表示 PSII 反应中心处于完全开放和关闭时的荧光产量。2 个株系均表现出在低盐浓度下 F_o 小幅

度降低、高盐浓度下升高的趋势,对照 107 杨升幅较大。对照 107 杨最大荧光 F_m 随盐浓度增加逐渐降低,转基因株系在低盐浓度下无变化,在高盐浓度下急剧下降。

$Y(II)$ 反映光系统 II 实际光合效率。PS II 反应中心在部分关闭状态下,实际光能转换效率可作为光合电子传递速率快慢的评测指标。从图 3D 可知,无盐胁迫和低盐浓度下转基因株系均保持较高的电子传递速率。低盐浓度下 107 杨和转基因株系 $Y(II)$ 分别降低 7.41%、4.62%,转基因株系显著高于 107 杨,高盐浓度下两者均降低且无显著差异。证明在低盐浓度下转基因杨树光系统 II 能够保持较高的电子传递速率,且受盐害影响较小。高盐浓度下 2 个株系电子传递速率均降到较低水平,受伤程度较大。

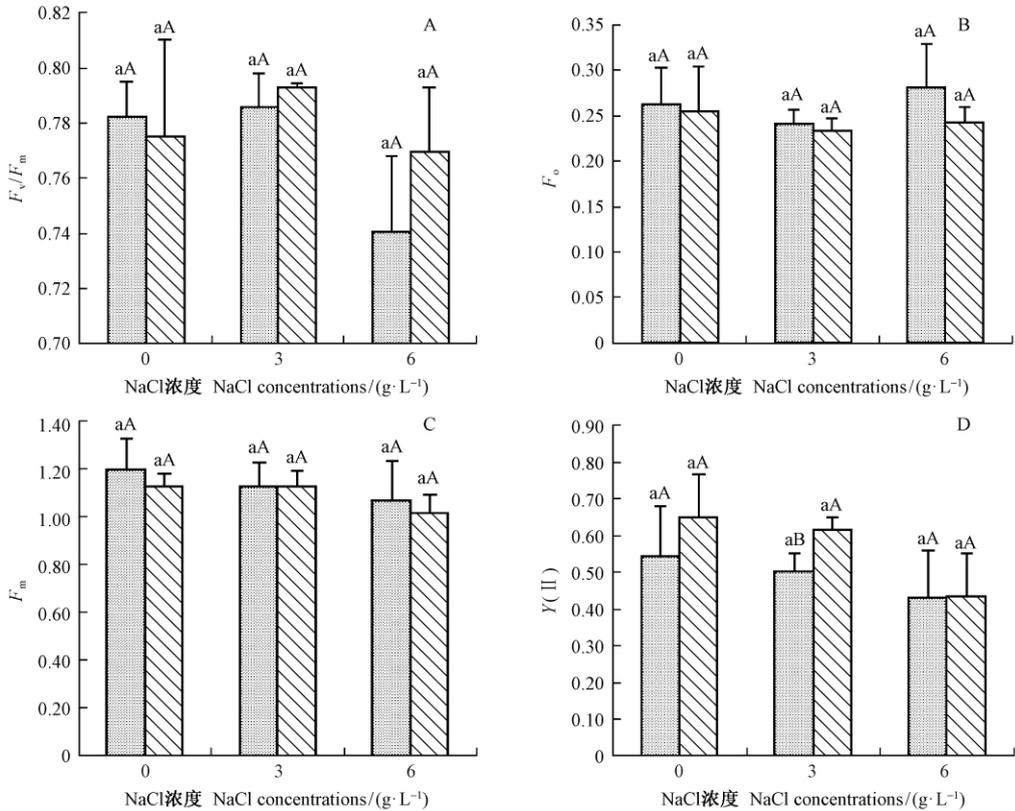


图 3 盐胁迫下 2 个株系叶绿素荧光参数的变化

Fig. 3 Changes of chlorophyll fluorescence parameters under salt stress

2.6 盐胁迫下转基因株系外源 Bt 毒蛋白含量的变化

外源 *Bt* 基因的导入可以使目标植物表达抗性蛋白从而获得对靶标害虫的抗性,但环境因素会对外源基因表达产生影响。盐胁迫下转基因株系外源 Bt 毒蛋白含量如表 3 所示。随着 NaCl 浓度增大,Bt

毒蛋白含量呈现增加趋势。在 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐浓度处理下,Cry1Ac、Cry3A 毒蛋白含量分别增加 40.15%、50.49%;在 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理浓度下,Cry1Ac、Cry3A 毒蛋白含量分别增加 158.84%、144.04%。结果表明,盐胁迫对外源 *Bt* 基因的表达起到促进作用,随盐浓度增加,毒蛋白含量增幅变大。

表3 盐胁迫下转基因株系 Bt 毒蛋白含量

Tab.3 The content of Bt toxin protein of transgenic plants under saltstress

NaCl 浓度 Concentration of NaCl/(g·L ⁻¹)	Bt 毒蛋白含量 Content of Bt toxin protein/(ng·g ⁻¹)	
	CryI Ac	Cry3A
0	3.96 ± 3.04b	8 052.5 ± 3 725.6b
3	5.55 ± 2.79ab	12 118.34 ± 2 341.77b
6	10.25 ± 3.78a	19 651.26 ± 3 623.96a

2.7 盐胁迫下叶片甜菜碱含量的积累

甜菜碱是一种天然无毒的小分子有机化合物。在植物受到环境胁迫时作为渗透调节物质在植物叶片中大量积累以降低渗透势,维持细胞水分平衡,保护一些关键酶类,维持生物大分子的结构和完整性,维持植物正常的生理功能。不同浓度盐处理下转基因 107 杨幼苗叶片甜菜碱含量如图 4 所示,随盐浓度增加,叶片甜菜碱含量逐渐增大,转基因株系叶片甜菜碱含量显著高于 107 杨。在无盐处理条件下,转基因株系叶片甜菜碱含量为 107 杨的 2.97 倍,6 g·L⁻¹ 盐浓度处理下上升到 6.22 倍,表明 *BADH* 基因的导入导致转基因株系叶片甜菜碱含量大幅增加。随盐浓度增加,2 个株系叶片的甜菜碱含量在 3 g·L⁻¹ 盐浓度处理下增幅较大。在 6 g·L⁻¹ 盐浓度处理下含量最高,2 个株系甜菜碱含量分别为无盐处理条件下的 1.3 倍与 2.8 倍。结果证明,低盐浓度胁迫下,甜菜碱的积累量迅速上升,随着盐浓度增加,甜菜碱积累量增幅减缓,盐胁迫在一定程度上可以诱导外源 *BADH* 基因表达加强。

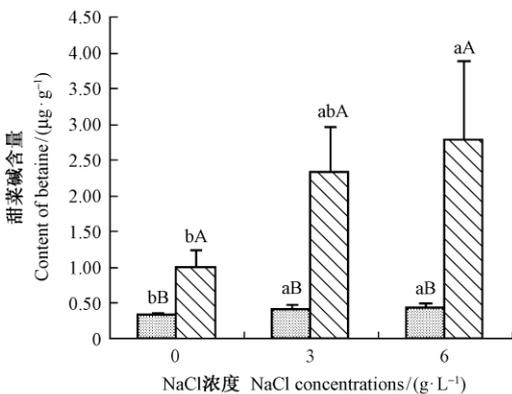


图4 盐胁迫下2个株系叶片中甜菜碱的含量

The content of betaine in leaves of two lines under salt stress

3 讨论

本研究中,转复合多基因(*BtCry1Ac* + *BtCry3A* + *BADH*) 107 杨中的耐盐基因为 *BADH* 基因。*BADH*

基因是合成甜菜碱醛脱氢酶的基因,而甜菜碱醛脱氢酶则是合成甜菜碱的关键酶。大量研究表明,甜菜碱的积累可以提高植物对环境胁迫的耐受性。李敏等(2013)研究指出耐盐柳树(*Salix*) L0911 *BADH* 基因的表达受盐胁迫条件的诱导,说明盐胁迫与 *BADH* 基因存在着紧密关联。王亮(2006)在利用 *BADH* 基因转化 107 杨的研究中,*BADH* 基因的导入使得相同盐胁迫条件下转基因植株的相对电导率降低,转基因植株受到伤害较小。此外,在盐胁迫条件下部分转基因株系叶绿素含量显著高于对照株系,表明转基因株系能够更好地抵御盐害影响。本研究中,在低盐胁迫下转基因株系相对电导率小幅度降低且显著低于对照,而叶绿素含量均高于对照,表明导入 *BADH* 基因的株系受盐害影响程度较小,这与前人研究结果相同。张士功等(1999)研究表明盐胁迫下一定浓度的甜菜碱可以增加叶绿素含量,提高叶绿体对光能的吸收利用,从而降低盐胁迫对光合作用的影响。另外,甜菜碱的积累还可以保护多种抗氧化酶的活性,降低活性氧的积累,维持膜的有序性和完整性,保护类囊体膜上蛋白复合体的功能,减轻胁迫对类囊体膜的破坏,维持较高水平的 PSII 活性及 CO₂ 同化速率,提高光合活性(梁超等, 2007),最终提高转基因植物的耐盐性。本研究中,转复合多基因 107 杨株系在无盐胁迫条件下,甜菜碱积累量较低,此时 *BADH* 表达量较低,转基因株系与对照生长及生理指标无显著差异,而盐胁迫处理可以诱导外源 *BADH* 基因加强表达,使转基因株系叶片中甜菜碱获得大量积累。在 3 g·L⁻¹ 低盐浓度下甜菜碱含量迅速积累,并通过渗透调节维持细胞膜良好的稳定性,可以增加叶绿素含量,且能够维持较高的 PSII 活性,增大气孔导度、蒸腾速率,提高转基因株系盐胁迫下的净光合速率,因此盐胁迫下转基因株系保持了相对较高的生长量。*BADH* 基因的导入提高了转基因株系对盐胁迫适应能力。

许多研究表明:在高盐、干旱、低温等胁迫诱导下,*BADH* 基因表达量的增加在不同植物之间存在显著差异(Nakamura *et al.*, 2001; 刘佳琪等, 2012)。在非胁迫条件下,基因工程使得转基因植株在体内积累甜菜碱的含量为 0.05 ~ 5 µmol·g⁻¹ FW(段晓光等, 2004),耐盐性强的胡杨(*Populus euphratica*)受到盐胁迫后甜菜碱含量显著提高,特别是叶中甜菜碱含量达到 1.90 µmol·g⁻¹,提高约 243 倍(陈少良等, 2001)。本研究中转基因株系在 6 g·L⁻¹ 盐浓度胁迫下甜菜碱积累量最大,但仅相当于 0.02 µmol·g⁻¹,约为对照处理 2.8 倍,表明该基

因的表达效果不强。在盐胁迫下对各项生长指标与生理参数综合性分析表明,转基因株系 $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 较低浓度盐胁迫下,表现出良好的适应性,耐盐能力强于非转基因对照,然而在 $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 较高盐浓度胁迫下,虽然甜菜碱与 Bt 毒蛋白积累量继续增加,但转基因株系与 107 杨的各项生理指标对比并没有表现出明显差异,受盐害程度较大。从而进一步证明, *BADH* 基因表达能力较弱,在 $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 较高盐浓度胁迫下,同时超出转基因株系幼苗对盐害的耐受能力。当然,本研究仅为人工气候室条件下盆栽幼苗试验结果,转基因株系在田间条件下的耐盐性表现还需作进一步研究。

Ren 等 (2015) 将多基因表达载体 *BtCry1Ac + BtCry3A + BADH* 转化烟草 (*Nicotiana tabacum*), 每个外源基因均为 CaMV35S 启动子,结果显示 *BADH* 基因表达水平较低。本研究中转基因株系所用植物表达载体与之相同,而外源 *BADH* 基因表达效果同样较差,分析其原因可能是多基因排列顺序或者多基因间由于启动子相同而相互作用,导致多个外源基因不能同时高效表达。多基因表达载体的构建和转化仍面临一系列技术难题(袁飞荣等, 2011; Untergasser *et al.*, 2012)。在今后研究中,应考虑从以下几方面进行改善,以期达到多个外源基因在转基因植株中同时高效地表达: 首先,在构建转化载体时,根据不同外源基因使用不同特异性启动子,降低序列的重复性; 其次,构建载体时在外源基因两侧添加增强序列或者核基质结合区 MAR, 促使外源基因稳定高效地表达; 第三,可以通过优化起始密码周边序列,对基因编码区进行修饰改造等方式增强翻译效率,例如对基因进行修饰,使其更接近植物中 GC 含量,以提高其表达量。

有研究提出,盐胁迫条件可以抑制或诱导多种 cDNA 克隆子、mRNA 和特异蛋白质的合成,通过代谢产物的诱导或阻遏作用,影响相关基因表达,以适应胁迫条件下细胞内的特殊代谢反应(孙静等, 2006; 赵凤云等, 2007)。韩会景等(2007)将发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) Ri 质粒 T-DNA 转入双抗虫基因 ‘741 杨’ [*Populus alba* × (*P. davidiana* + *P. simonii*) × *P. tomentosa*] 株系 Pb29 后,生长素 (IAA) 和赤霉素 (GA) 含量升高, Bt 毒蛋白表达受抑制,提出可能是发根基因促使激素含量提高,导致代谢发生变化,促进植物发根,但抑制了某些结构蛋白质的表达,从而使 Bt 毒蛋白的表达也受到抑制。经过盐胁迫处理后,激素含量呈降低趋势, Bt 毒蛋白的表达上升。这可能是由于盐胁迫使

转基因杨树生长素和细胞分裂素类物质表达受到抑制,而诱导产生一些特异抗盐蛋白,从而缓解对 Bt 毒蛋白的表达抑制。本研究中 Bt 毒蛋白的含量随盐处理浓度增加呈现升高趋势,其原因可能是正常条件下外源基因表达受到植物的某种抑制,但随着盐处理浓度的增大,细胞内代谢发生变化,某类代谢产物的积累或者减少缓解了 Bt 基因的表达抑制。

4 结 论

在人工气候室控制条件下,通过盆栽浇施不同浓度 NaCl 溶液进行盐胁迫处理,25 天对转多基因 107 杨及未转基因对照 107 杨生长性状、生理指标的测定结果表明,盐胁迫下转基因 107 杨幼苗生长受盐害影响较小; 在 $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 低盐浓度处理下,转基因株系质膜透性显著低于 107 杨,叶绿素含量升高幅度较大,蒸腾速率与净光合速率增加且显著高于 107 杨; Y (II) 小幅度降低但显著高于对照,光系统 II 能够保持较高的电子传递速率; F_v/F_m 上升幅度较大,表明转基因株系具有较大光合作用潜力。在 $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 高盐浓度处理下,转基因株系叶绿素含量降低,而质膜透性、净光合速率均显著降低, F_v/F_m 、Y (II) 均呈现较大幅度下降,光系统 II 电子传递受到较大影响,光合能力下降,变化趋势与对照无显著差异,2 个株系幼苗均受到较大程度的伤害。转多基因 107 杨在 $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 低盐浓度处理下表现出良好的适应性,耐盐性优于 107 杨; 在 $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 高盐浓度处理下转基因株系与对照 107 杨均受到较大影响,转基因株系并未显示其优势。对转基因株系中外源基因表达产物积累量的研究结果表明,随盐浓度的增加, *Cry1Ac* 毒蛋白、*Cry3A* 毒蛋白及甜菜碱的含量逐渐增加,在高盐浓度胁迫下积累量显著增加,盐胁迫在一定程度上可以诱导外源 Bt 基因、*BADH* 基因表达加强。

参 考 文 献

- 陈少良, 李金克, 毕望富. 2001. 盐胁迫条件下杨树盐分与甜菜碱及糖类物质变化. 植物学通报, 18 (5): 587 - 596.
- (Chen S L, Li J K, Bi W F. 2001. Genotypic variation in accumulation of salt ions, betaine and sugars in poplar under conditions of salt stress. Chinese Bulletin of Botany, 18 (5): 587 - 596. [in Chinese])
- 段晓光. 2004. 转基因聚合提高烟草耐盐性的研究. 济南: 山东大学博士学位论文.
- (Duan X G. 2004. The study of the enhanced salt tolerance in tobacco by transgene pyramiding. Jinan: PhD thesis of Shandong Agricultural University. [in Chinese])
- 韩会景, 张法勇, 杨敏生, 等. 2007. NaCl 胁迫对转基因杨树外源基因表达的影响. 植物生理与分子生物学学报, 33 (5): 435 -

- 440.
- (Han H J, Zhang F Y, Yang M S, *et al.* 2007. Effects of NaCl stress on the expression of exogenous gene in transgenic poplar. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 33 (5): 435 – 440. [in Chinese])
- 李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 134 – 137.
- (Li H S. 2000. Principles and techniques of plant physiology and biochemistry experiment. Beijing: Higher Education Press, 134 – 137. [in Chinese])
- 李敏, 张健, 王奎山, 等. 2013. 耐盐柳树 *BADH* 基因克隆及表达分析. *江苏农业学报*, 29 (3): 485 – 489.
- (Li M, Zhang J, Wang K S, *et al.* 2013. Molecular and expression analysis of *BADH* gene from salt-tolerant *Salix*. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 29 (3): 485 – 489. [in Chinese])
- 梁超. 2007. 过量积累甜菜碱改善小麦耐盐性的生理机制研究. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文.
- (Liang C. 2007. Studies on physiological mechanisms of over-accumulating glycine betaine in improving the salt tolerance in wheat. Tai'an: MS thesis of Shandong Agricultural University. [in Chinese])
- 刘佳琪, 杨雪, 李迪, 等. 2012. 胡杨甜菜碱醛脱氢酶基因的功能分化. *生物工程学报*, 28 (3): 329 – 339.
- (Liu J Q, Yang X, Li D, *et al.* 2012. Functional divergence of betaine aldehyde dehydrogenase genes in *Populus euphratica*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 28 (3): 329 – 339. [in Chinese])
- 卢孟柱, 胡建军. 2006. 我国转基因杨树的研究及应用现状. *林业科技开发*, 6 (20): 1 – 4.
- (Lu M Z, Hu J J. 2006. Research and application status of transgenic poplar in China. *China Forestry Science and Technology*, 6 (20): 1 – 4. [in Chinese])
- 孙静, 王宪泽. 2006. 盐胁迫对小麦过氧化物酶同工酶基因表达的影响. *麦类作物学报*, 26 (1): 42 – 44.
- (Sun J, Wang X Z. 2006. Effects of salt stress on gene expression of peroxidase isozyme in wheat. *Journal of Triticeae Corps*. 26 (1): 42 – 44. [in Chinese])
- 王奥璇. 2015. 转多基因 107 杨遗传检测及抗性表达研究. 保定: 河北农业大学硕士学位论文.
- (Wang A X. 2015. Study on genetic detection and resistance expression of the transgenic *Populus × euramericana* 'Neva' with multi-gene. Baoding: MS thesis of Hebei Agricultural University. [in Chinese])
- 王建革, 苏晓华, 纪丽丽, 等. 2006. 基因枪转多基因库安托杨的获得. *科学通报*, S1 (23): 2755 – 2760.
- (Wang J G, Su X H, Ji L L, *et al.* 2006. Multiple transgenes *Populus × euramericana* 'Guariento' obtained by biolistic bombardment. *Science Bulletin*, S1 (23): 2755 – 2760. [in Chinese])
- 王亮. 2006. *BADH* 基因转化 107 杨及构建甜菜碱合成酶相关酶多基因表达载体. 大连: 大连理工大学硕士学位论文.
- (Wang L. 2006. Transformation of *BADH* gene into *Populus × euramericana* 'Neva' and construction of a multi-gene vector expressing enzymes synthesizing glyberaine. Dalian: MS thesis of Dalian University of Technology. [in Chinese])
- 袁飞荣, 李芳, 蒋巧巧, 等. 2011. 转基因枳橙中 *GA20ox1* 与 *rol* 基因互作关系的研究. *中国农学通报*, 27 (19): 214 – 221.
- (Yuan F R, Li F, Jiang Q Q, *et al.* 2011. Study on Gene-gene Interactions between *GA20ox1* and *rol* gene in transgenic citranges. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27 (19): 214 – 221. [in Chinese])
- 张士功, 高吉寅, 宋景芝. 1999. 甜菜碱对 NaCl 胁迫下小麦细胞保护酶活性的影响. *植物学通报*, 16 (4): 429 – 432.
- (Zhang S G, Gao J Y, Song J Z. 1999. Effects of betaine on activities of membrane protective enzymes in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under NaCl Stress. *Chinese Bulletin of Botany*, 16 (4): 429 – 432. [in Chinese])
- 赵凤云, 张慧. 2007. 耐非生物胁迫转基因水稻的培育——现在和未来. *生物工程学报*, 23 (1): 1 – 6.
- (Zhao F Y, Zhang H. 2007. Transgenic rice breeding of abiotic tress tolerance: present and future. *Chinese Journal of Biotechnology*, 23 (1): 1 – 6. [in Chinese])
- 朱永兴, 张岩, 吴昊, 等. 2015. 杨树多基因遗传转化体系的建立及优化. *中国农学通报*, 31 (1): 43 – 46.
- (Zhu Y X, Zhang Y, Wu H, *et al.* 2015. Establishment and optimization of multi-gene transformation system of *Populus*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 31 (1): 43 – 46. [in Chinese])
- Du N, Liu X, Li Y, *et al.* 2012. Genetic transformation of *Populus tomentosato* improve salt tolerance. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 108 (2): 181 – 189.
- Halpin C. 2005. Gene stacking in transgenic plants – the challenge for 21st century plant biotechnology. *Plant Biotech J*, 3 (2): 141 – 155.
- Han M S, Noh E W, Han S H. 2013. Enhanced drought and salt tolerance by expression of *AtGSK1* gene in poplar. *Plant Biotechnol Rep*, 7 (1): 39 – 47.
- Klocko A L, Meilan R, James R R, *et al.* 2014. *Bt-Cry3Aa* transgene expression reduces insect damage and improves growth in field-grown hybrid poplar. *Can J For Res*, 44 (1): 28 – 35.
- Nakamura T, Nomura M, Mori H, *et al.* 2001. An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiology*, 42 (10): 1088 – 1092.
- Ren Y C, Dong Y, Zhang J, *et al.* 2015. Genetic transformation and expression detection of tobacco by using a multi-gene plant transformation vector. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 25 (3): 13 – 21.
- Untergasser A, Bijl G J M, Liu W, *et al.* 2012. One-step agrobacterium mediated transformation of eight genes essential for rhizobium symbiotic signaling using the novel binary vector system pHUGE. *PLoS One*, 7 (10): e47885.

(责任编辑 王艳娜 郭广荣)