北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

继代培养14年的转*AhDREB*1基因毛白杨环境释放的安全性评价

李烨 赵烨 韩昆瑾 张云翔 闫继峰 李向飞 冯玉帮 尤永鑫 孙宇涵 李云

Safety evaluation of environmental release of transgenic *Populus tomentosa* with *AhDREB*1 gene after 14 years of subculture

Li Ye, Zhao Ye, Han Kunjin, Zhang Yunxiang, Yan Jifeng, Li Xiangfei, Feng Yubang, You Yongxin, Sun Yuhan, Li Yun

引用本文:
李烨, 赵烨, 韩昆瑾, 张云翔, 闫继峰, 李向飞, 冯玉帮, 尤永鑫, 孙宇涵, 李云. 继代培养14年的转*AhDREB*1基因毛白杨环境释放的安全性评价[J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(9):90–98. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250081
Li Ye, Zhao Ye, Han Kunjin, Zhang Yunxiang, Yan Jifeng, Li Xiangfei, Feng Yubang, You Yongxin, Sun Yuhan, Li Yun. Safety evaluation of environmental release of transgenic *Populus tomentosa* with *AhDREB*1 gene after 14 years of subculture[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(9):90–98. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250081

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250081

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

转*BpCCR*1基因白桦生长适应性分析及优良株系选择
Growth adaptability analysis of *BpCCR*1 transgenic *Betula platyphylla* and selection of elite lines
北京林业大学学报, 2022, 44(7): 52–62. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200264

基于转基因741杨与新疆杨杂交创制抗虫非整倍体毛白杨新种质
Creating a new germplasm of aneuploid *Populus tomentosa* with insect–resistance based on hybridization of transgenic 741 poplar and *P. alba* var. *pyramidalis*
北京林业大学学报, 2024, 46(12): 92–102. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240021

毛白杨耐寒种质资源遗传鉴定及评价
Genetic identification and evaluation of cold–resistant germplasm resources in *Populus tomentosa*
北京林业大学学报, 2023, 45(12): 59–67. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220363

过表达毛白杨线粒体*APX*基因烟草提高抗逆能力的研究
Tobacco overexpression *Populus tomentosa* mitochondria ascorbate peroxidase improving stress resistance
北京林业大学学报, 2020, 42(7): 33–39. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20190390

过表达胡杨*PeAnn*1负调控拟南芥的抗旱性
Overexpression of *PeAnn*1 from *Populus euphratica* negatively regulates drought resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana*
北京林业大学学报, 2020, 42(6): 14–25. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200031

古建筑七架梁缺陷安全性影响数值模拟研究
Numerical simulation of the safety influence of defects on Qijia–beams of ancient timber building
北京林业大学学报, 2020, 42(4): 142–154. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20190328

DOI:10.12171/j.1000−1522.20250081

继代培养 14 年的转 *AhDREB*1 基因毛白杨环境释放的安全性评价

李 烨[1] 赵 烨[1] 韩昆瑾[1] 张云翔[1] 闫继峰[2] 李向飞[3]
冯玉帮[4] 尤永鑫[5] 孙宇涵[1] 李 云[1]

（1. 林木遗传育种全国重点实验室，林木育种与生态修复国家工程研究中心，北京林业大学生物科学与技术学院，北京 100083；2. 沧州市自然资源和规划局，河北 沧州 061001；3. 中国林业科学研究院高原林业研究所，云南 昆明 650000；4. 盐山县自然资源和规划局，河北 盐山 061300；5. 国家林业和草原局盐碱地研究中心，天津 300000）

摘要:【目的】本研究以继代培养 14 年，而后移栽到天津和河北大田生长 6 年的转 *AhDREB*1 基因毛白杨为研究对象，从生长适应性、基因表达稳定性、基因水平转移、对土壤环境影响以及根际土浸提液的化感作用等方面，系统评价转基因毛白杨经多年继代培养后又于田间释放后的稳定性与安全性，旨在提供转基因林木田间试验长期监测数据，为转基因林木的后续推广应用提供科学支持。**【方法】**通过测量转基因毛白杨在天津滨海和河北沧州盐碱地试验林的树高、胸径、材积等生长指标来分析其生长状况，提取叶片和土壤及微生物总 DNA 后运用 PCR 技术测定外源基因在转基因毛白杨中的表达稳定性以及探究外源基因对土壤环境的影响，采用稀释平板计数法解析不同月份土壤微生物数量，利用根际土浸提液来检测转基因杨树根系分泌物对白菜种子胚根、胚轴生长的化感效应。**【结果】**(1)转 *AhDREB*1 基因毛白杨在天津滨海和河北沧州盐碱地的生长情况皆优于非转基因株系。(2)外源基因 *AhDREB*1 在继代培养 14 年又田间生长 6 年的转基因毛白杨中仍稳定存在，未检测到外源基因向土壤及土壤微生物转移。(3)不同季节，转 *AhDREB*1 基因毛白杨与对照毛白杨的土壤微生物数量均无显著差异，其根际土浸提液对白菜种子胚根和胚轴的生长影响均无显著差异。**【结论】**在盐碱地条件下，转 *AhDREB*1 基因毛白杨生长适应性显著增强，且该基因在多年生转基因植株内稳定表达，未发现对环境产生生态安全隐患问题。本研究结果将为 *AhDREB*1 转基因株系在盐碱环境下的后续推广应用提供科学依据。

关键词：转基因林木；多年继代培养；田间试验；生长适应性；安全性评价；抗逆育种

中图分类号：S718.46；S792.11 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2025)09−0090−09

引文格式：李烨，赵烨，韩昆瑾，等. 继代培养 14 年的转 *AhDREB*1 基因毛白杨环境释放的安全性评价 [J]. 北京林业大学学报，2025，47(9)：90−98. Li Ye, Zhao Ye, Han Kunjin, et al. Safety evaluation of environmental release of transgenic *Populus tomentosa* with *AhDREB*1 gene after 14 years of subculture[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(9): 90−98.

Safety evaluation of environmental release of transgenic *Populus tomentosa* with *AhDREB*1 gene after 14 years of subculture

Li Ye[1] Zhao Ye[1] Han Kunjin[1] Zhang Yunxiang[1] Yan Jifeng[2] Li Xiangfei[3]
Feng Yubang[4] You Yongxin[5] Sun Yuhan[1] Li Yun[1]

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, National Engineering Research Center of Tree Breeding and Ecological Restoration, School of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
2. Seedling Station of Cangzhou Natural Resources and Planning Bureau, Cangzhou 061001, Hebei, China;
3. Institute of Highland Forest Science, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650000, Yunnan, China;
4. Yanshan Natural Resources and Planning Bureau, Cangzhou 061300, Hebei, China;
5. Research Center for Saline-Alkali Land of the National Forestry and Grassland Administration, Tianjin 300000, China)

收稿日期: 2025−03−10 **修回日期:** 2025−04−03

基金项目: 农业生物育种重大项目(2023ZD04056)，中国博士后科学基金面上项目(2023M740277)，国家资助博士后研究人员计划(GZC20240114)，国家青年科学基金项目(32401611)。

第一作者: 李烨。主要研究方向：杨树转基因育种。Email: 18500832800@163.com 地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者: 李云，教授，博士生导师。主要研究方向：林木育种与生物技术。Email: yunli@bjfu.edu.cn 地址：同上。

本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn；http://journal.bjfu.edu.cn

Abstract: ［**Objective**］This study used transgenic plants that had been subcultured for 14 years and subsequently grown in field conditions in Tianjin and Hebei of northern China for 6 years as research materials. The assessment covered multiple aspects including growth adaptability, gene expression stability, horizontal gene transfer potential, impact on soil environment, and allelopathic effects of rhizosphere soil extracts. The study systematically evaluated the stability and safety of transgenic *P. tomentosa* for *AhDREB*1 gene after long-term subculture and field release. The aim of this research was to provide long-term monitoring data from field trials of transgenic trees, thereby offering scientific support for the subsequent application and promotion of transgenic woody plants. ［**Method**］The growth status of transgenic *P. tomentosa* was analyzed by measuring its growth indicators such as tree height, DBH, and volume in the experimental forests on saline-alkali research sites in Tianjin Binhai and Hebei Cangzhou. After extracting total DNA from leaves, soil, and microorganisms, PCR technology was used to determine expression stability of exogenous genes in transgenic *P. tomentosa* and to explore the impact of exogenous genes on soil environment. The dilution plate counting method was adopted to analyze the quantity of soil microorganisms in different months. The allelopathic effect of root exudates from transgenic poplars on the growth of radicle and hypocotyl of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*) seeds was detected using rhizosphere soil extracts. ［**Result**］(1) The growth of transgenic *P. tomentosa* for *AhDREB*1 gene in the Tianjin Binhai and Hebei Cangzhou saline-alkali research sites was better than that of the non-transgenic lines. (2) The exogenous gene *AhDREB*1 still stably existed in the transgenic poplar through 14 years of subculturing and 6 years of field cultivation. No transfer of exogenous gene to soil and soil microorganisms was detected. (3) In different seasons, there was no significant difference in the quantity of soil microorganisms between the transgenic *P. tomentosa* for *AhDREB*1 gene and control. Additionally, the extracts of their rhizosphere soils showed no significant differences in their effects on the growth of radicles and hypocotyls of Chinese cabbage seeds. ［**Conclusion**］Under saline-alkali soil conditions, transgenic *P. tomentosa* for *AhDREB*1 gene exhibites significantly enhanced growth adaptability compared with non-transgenic *P. tomentosa*. Moreover, the *AhDREB*1 gene was stably expressed in perennial plants, and no potential ecological security risks to the environment caused by *P. tomentosa* transgenic for the *AhDREB*1 gene were observed. The results of this study will lay a scientific foundation for promotion and application of this transgenic line in saline-alkali environments.

Key words: transgenic trees; multi-year subculture; field experiment; growth adaptability; safety evaluation; stress-resistant breeding

土地盐渍化是制约全球农业发展的重大环境问题，全世界约有四分之一的土地受盐碱化威胁，我国盐碱地面积约为 14.8 亿亩，占国土面积的 10.3%，严重限制农林业生产[1]。毛白杨（*Populus tomentosa*）作为华北地区主要造林树种之一，具有速生、材质优良等特点，具有极高的经济价值，但其耐盐阈值仅为 0.3% NaCl，严重限制了杨树栽种面积和产业发展[2−3]。而转基因技术的出现为林木抗逆性改良提供了重要手段，自 20 世纪 80 年代末全球借助转基因手段已成功培育出提升木质素含量[4]、抗逆[5]、抗除草剂[6]等性状改良的林木新品种。我国耐盐杨树研究自 1996 年开始，通过转 *mtl-D* 基因八里庄杨的培育，首次实现杨树耐盐能力的提升[7]。此后，陆续培育得到的转 *GmNHX*1[8]、转 *OsNHX*1[9]、转 *BADH*[10]等转基因杨树均展现出较强的耐盐碱能力。

随着转基因林木技术的发展，转基因植物进入推广新阶段，其环境安全性问题也备受关注[11]。因林木栽培环境复杂、遗传背景不明、生产经营周期长等特点，林木转基因技术的安全性难以通过实验室短期试验充分评估[12]。因此，对转基因林木进行长期田间监测，已成为转基因林木从实验室走向规模化种植的必要前提[13]。当前转基因林木安全评价研究存在时间尺度局限性，多数研究[14−15]聚焦于 1 ~ 3 年生幼龄阶段的转基因植株，重点评估其基因表达稳定性及短期生态效应。然而，林木作为多年生木本植物，其生命周期通常跨越数十年，短期试验可能在转基因林木长期风险的评估过程中造成偏差，因此，开展长期且持续的监测已成为转基因林木产业化进程中必须重点关注的科学问题。

本研究聚焦转基因林木环境释放安全性的两大

核心问题：一是目的基因在长期继代培养及复杂田间环境中的整合与表达稳定性，二是转基因林木对土壤微生物群落及非靶标生物的生态效应。因此，本研究以实验室继代培养 14 年，田间种植 6 年的转 *AhDREB*1 基因毛白杨作为研究对象，拟通过检测转基因毛白杨在不同浓度盐碱地的生长适应能力，探究其外源基因表达稳定性以及水平转移情况，评估转基因杨树对根际土壤微生物数量及非目标植物化感作用的影响，进而揭示外源基因在盐碱环境中的长期遗传稳定性，系统评价转基因杨树对土壤生态环境的影响。研究结果将为转基因林木田间安全评价提供参考依据，为后续转基因杨树的种植推广和商业化发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验林概况

2003 年，本实验室成功将 *AhDREB*1 基因转入三倍体毛白杨 401 中，获得转基因株系 T 转和 T46[16−17]，相关试验证实转基因苗的抗盐能力得到显著提升[18]。此后，将转基因株系在组培条件下连续继代培养 14 年。2017 年选取继代培养 14 年的转 *AhDREB*1 基因毛白杨 T 转、T46 株系，以及非转基因毛白杨株系（CK）移栽于天津滨海和河北沧州试验林地，开展转 *AhDREB*1 基因毛白杨的限制性田间试验。

天津试验林位于天津滨海国家林业和草原局盐碱地研究中心（117°49′E，39°25′N），属于暖温带大陆性季风气候，年平均气温 12 ℃，年平均降水量 636 mm，试验林种植面积 2 500 m^2，株行距 3.0 m × 1.5 m，土壤盐碱度 0.2%。河北试验林位于河北沧州盐山县国家抗盐碱树种良种基地（117°14′E，38°04′N），属于暖温带半湿润大陆性季风气候，年平均气温 12.8 ℃，年平均降水量 509 mm，种植面积 10 000 m^2，株行距 3 m × 3 m，土壤盐碱度 0.4% ~ 0.6%，高于天津试验林。

1.2 研究方法

1.2.1 转基因林木的生长指标测定

为明确转 *AhDREB*1 基因毛白杨在盐碱胁迫下是否具有生长优势，2023 年 4 月份对天津滨海和河北沧州两试验林的 6 年生转基因杨树（T 转、T46 株系）及非转基因对照（CK）进行全林调查，使用米尺测量胸径（diameter at breast height，*D*），测高仪测量树高（height，*H*），记录相关数据，使用 SPSS 软件进行数据分析。

依据杨树二元材积表[19]，基于实测的树高（*H*）与胸径（*D*），计算单株材积（*V*）。

$$V = 0.513\,40 H^{0.826\,956} D^{1.995\,375}$$

1.2.2 外源基因在杨树中的稳定性检测

为验证 *AhDREB*1 基因在多年生转基因植株中的遗传稳定性，于 2023 年春天从两块试验林随机选取样本（T 转、T46、CK）各 9 株，每 3 株组成 1 个生物学重复，共计 27 株植株，作为本次试验对象。采集样本叶片于−80 ℃ 超低温保存。参照王颖[20]研究中 CTAB 法提取叶片 DNA，测定核酸浓度合格后保存于−20 ℃ 待用。

以叶片 DNA 为模板，以蒸馏水为阴性对照，以含目的基因的质粒为阳性对照，使用 *AhDREB*1 引物（表 1）进行 PCR 扩增。反应体系为模板 DNA 1 μL，2 × Taq Mix 10 μL，上下游引物各 1 μL，ddH_2O 补齐至 20 μL。反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min；94 ℃ 变性 30 s，63 ℃ 退火 40 s，72 ℃ 延伸 90 s，35 个循环；72 ℃ 延伸 10 min；4 ℃ 保存。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 外源基因对土壤环境影响

从微生物群落数量、土壤总 DNA 外源基因、主要微生物中外源基因转移 3 个维度全面探究转 *AhDREB*1 基因毛白杨对土壤环境的潜在影响，且考虑到季节变化可能对土壤生态造成一定的影响，因此本研究土壤样本设置 2023 年 10 月和 2024 年 5 月两个采集时间点。

1.2.3.1 土壤中可培养微生物数量

为探究转基因毛白杨对根际土壤微生物群落的影响，采用等边三角形取样法，距树干 30 cm 处，采集不同试验林不同株系 20 cm 深度处的根际土壤，每个株系设置 3 次重复。土样过 2 mm 孔径筛后装入无菌密封袋，编号标记后置于干冰盒，带回实验室后于 4 ℃ 冰箱保存备用。取 10 g 鲜土于 80 ℃ 恒温烘干至质量恒定，随后记录土壤干物质质量。

采用稀释平板培养法对土壤可培养微生物进行分离培养与计数。细菌、真菌和放线菌分别采用牛肉膏蛋白胨培养基、马丁氏培养基和改良高氏一号

表 1 试验涉及引物及其序列

Tab. 1 Primers involved in the experiment and their sequences

引物名称	引物序列（5′—3′）
AhDREB1-F	5′-GAAGAAAGATGTTGCTAATAATAAC-3′
AhDREB1-R	5′-AATAATAATACTTCACTAAAAATGATC-3′
16S rDNA-F	5′-ACGGGCGGTGTGTAC-3′
16S rDNA-R	5′-CCTACGGGAGGCAGCAG-3′
18S rDNA-F	5′-GGGGGAGTATGGTCGCAAGGC-3′
18S rDNA-R	5′-TCAGTGTAGCGCGCGTGCGGC-3′

培养基进行培养，培养基配方和培养过程参照魏冰等[21]研究。土壤可培养微生物菌落数量为微生物数量和稀释倍数乘积与土壤干物质质量的比值。

1.2.3.2　土壤中外源基因水平转移

为判断外源基因是否进入土壤环境，采用天根土壤基因组 DNA 提取试剂盒提取已经采集的土壤 DNA，使用原核生物 16S rDNA 引物检测土壤总 DNA 提取质量，使用 *AhDREB*1 基因特异性引物检测外源基因是否转移于土壤 DNA。

为检测外源基因是否向 3 类主要微生物中发生水平转移，使用添加 50 g/L 卡那霉素的细菌、真菌和放线菌培养基，对根际土壤中的微生物进行抗性菌株的筛选培养，并随机挑取部分单菌落培养[22]。使用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌和放线菌 DNA，用 16S rDNA 引物检测质量；使用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒（DP305）提取真菌 DNA，选择真核生物 18S rDNA 通用引物检测质量。

以 3 种微生物 DNA 为模板，使用 *AhDREB*1 基因特异性引物进行 PCR 扩增，反应体系及扩增程序见 1.2.1，使用引物序列如表 1 所示。

1.2.3.3　不同季节根际土浸提液化感作用的检测

为探究转基因毛白杨根际分泌物对周边植物的潜在化感效应，以白菜（*Brassica pekinensis*）为指示植物，探究不同季节根际土浸提液对其种子萌发及幼苗生长的影响。取 50 g 不同季节采集的根际土，加入 100 mL 无菌水，室温振荡 4 h，静置 24 h 后取上层清液，先经 3 层滤纸过滤，再通过 0.45 μm 滤膜过滤，制得不同季节 0.5 g/mL 的土壤浸提液[23]。

取 30 粒白菜种子均匀置于铺有滤纸的培养皿，分为处理组（每日添加 1 mL 浸提液）和空白对照组（每日添加 1 mL 蒸馏水），在 25℃、60% 湿度，16 h 光照/黑暗 8 h 条件下培养 3 d，以胚根突破种皮 1 ~ 2 mm 为种子发芽的标准，3 d 后利用 image J 软件测量种子胚根和胚轴长度。

2　结果与分析

2.1　6 年生转基因毛白杨的生长测定

天津滨海（低浓度盐碱地）与河北沧州（高浓度盐碱地）两地转基因株系（T 转、T 46）的胸径、树高、材积均值均高于非转基因对照（CK），但株系优势程度存在差异（表 2，表 3）。其中 T 转株系的生长优势在两地均更为显著，其胸径、树高、材积均高于 CK，且大多达到显著水平；而 T46 株系与 CK 的差异相对较小。综上，在天津滨海与河北沧州的盐碱环境中，与对照组相比，转 *AhDREB*1 基因株系的生长适应性仍保留明显优势，其中 T 转株系表现更好。

表 2　天津滨海各株系生长性状单因素方差分析

Tab. 2　One-way ANOVA of growth traits of different lines in Tianjin Binhai

株系	胸径/m	树高/m	材积/m^3
CK	0.35 ± 0.05 b	9.61 ± 0.91 c	0.43 ± 0.13 b
T转	0.41 ± 0.04 a	12.30 ± 1.17 a	0.70 ± 0.17 a
T46	0.37 ± 0.05 b	10.61 ± 1.15 b	0.51 ± 0.14 b

注：不同小写字母表示同一指标在不同株系中差异显著（$P < 0.05$）。下同。

表 3　河北沧州各株系生长性状单因素方差分析

Tab. 3　One-way ANOVA of growth traits of different lines in Hebei Cangzhou

株系	胸径/m	树高/m	材积/m^3
CK	0.46 ± 0.06 b	10.94 ± 1.34 a	0.80 ± 0.24 b
T转	0.50 ± 0.06 a	11.88 ± 1.51 a	1.00 ± 0.29 a
T46	0.45 ± 0.07 b	11.35 ± 1.99 a	0.81 ± 0.27 b

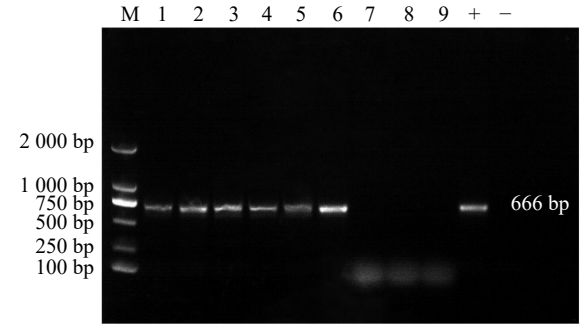
2.2　外源基因在转基因杨树中的稳定性检测

本研究以实验室继代培养 14 年，田间种植 6 年生的转 *AhDREB*1 基因杨树（T 转、T46）为试验材料，以野生型杨树为对照（CK），检测两地试验林中外源基因在转基因杨树中的遗传稳定性。结果显示，两地试验林中的转基因杨树均成功扩增出了与阳性对照的质粒片段等大小的条带（666 bp 左右），而阴性对照（蒸馏水）及 CK 中则未扩增到目的基因片段（图 1）。这表明转基因植株即使经过 20 年生长（14 年继代培养、6 年田间生长），外源基因依然稳定存在并表达，未出现丢失现象。

2.3　外源基因对土壤环境影响综合分析

2.3.1　外源基因对不同季节土壤中微生物数量的影响

土壤微生物数量是转基因植物安全性评价重要内容之一。对天津滨海、河北沧州试验林的土壤根



M 为 2 000 DNA marker；1 ~ 3 为转基因 T46 株系；4 ~ 6 为转基因 T 转株系；7 ~ 9: 为野生型对照；+ 为阳性对照；−为阴性对照。下同。

图 1　两地试验林转基因毛白杨稳定性检测

Fig. 1　Stability test of transgenic *P. tomentosa* in two experimental forests

际微生物(细菌、放线菌和真菌)数量进行动态监测，测定两个季节(2023 年 10 月、2024 年 4 月)的杨树根系周围土壤微生物的数量。

结果(表 4，表 5)显示，天津滨海和河北沧州两块试验林微生物数量均呈轻微季节波动。在天津滨海，4 月细菌、真菌数量显著高于 10 月($P < 0.05$)，而放线菌季节差异不显著(表 4)；在河北沧州，4 月真菌数量显著高于 10 月($P < 0.05$)，而细菌、放线菌季节差异不显著(表 5)。株系间微生物数量差异结果显示：T46、T 转株系与 CK 株系的根际细菌、放线菌、真菌数量均无显著差异(表 4，表 5)。这表明转 *AhDREB*1 基因毛白杨未对根际土壤细菌、放线菌、真菌数量产生显著影响，仅微生物数量因季节不同存在轻微波动，从微生物群落数量角度印证了该转基因毛白杨的生态安全性。

2.3.2 外源基因对根际土壤环境的影响研究

对天津和滨海两地试验林土壤 DNA 进行质量检测，结果(图 2)显示：在转基因株系和对照株系根系周围土壤中，两地均扩增出了单一条带，条带大小均在 1 050 bp 左右，表明提取的土壤微生物总 DNA 质量良好，可用于后续试验。

对土壤进行外源基因 *AhDREB*1 的检测，结果(图 3)显示：两地点土壤和阴性对照均未扩增出条带，而阳性对照中扩增出与外源基因大小相似的片段，这表明两地点转基因杨树在栽植的 6 年里，没有向土壤发生外源基因水平转移。

采用外源基因特异性引物及通用引物对两地点土壤中筛选出的抗性菌株进行检测，结果(图 4 ~ 6)显示：在微生物 DNA 提取质量合格的前提下，细菌、放线菌和真菌 DNA 中均未检测到与目的基因片段长度一致的条带。这表明外源基因并未向根际土壤微生物发生转移。

2.3.3 根际土浸提液化感作用的检测

通过化感试验，检测天津滨海、河北沧州试验林不同季节根际土浸提液对白菜种子胚根、胚轴生长的影响。结果(图 7，图 8)显示：与清水空白对照相比，两地各株系(T 转、T 46、CK)土壤浸提液均对白菜胚根生长有一定抑制作用，但各株系间无显著差异；此外，所有土壤浸提液对白菜胚轴生长无显著影响；不同季节采集的根际土浸提液也无显著差异效应。综上表明，转 *AhDREB*1 基因毛白杨暂未通过根际分泌物对周边植物生长产生显著影响，且季节对化感效应无明显影响。

综上，转基因杨树中的外源基因 *AhDREB*1 并未向土壤环境中发生水平转移。

3 讨 论

土地盐渍化已成为威胁全球粮食安全与生态平衡的紧迫性问题，严重制约农林可持续发展，尽管转基因技术为林木耐盐性改良提供了解决方法，但其环境释放安全性始终饱受争议。公众担忧多源于理论推测，认为转基因植物会对人体或生态环境造成

表 4 天津滨海试验林微生物数量统计分析

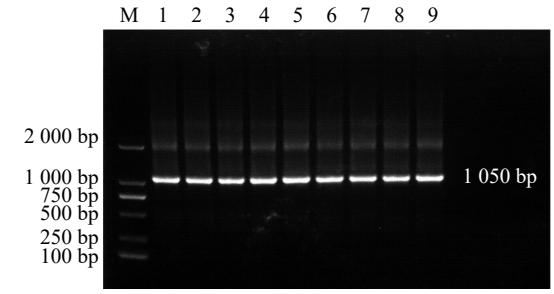
Tab. 4 Statistical analysis of microbial quantity in Tianjin Binhai experimental forest

时间	株系	细菌×10^{-5}/(CFU·g^{-1})	放线菌×10^{-5}/(CFU·g^{-1})	真菌×10^{-4}/(CFU·g^{-1})
4月	CK	4.82 ± 0.63 ab	3.16 ± 0.47 a	1.28 ± 0.16 a
	T转	4.92 ± 0.62 a	3.12 ± 0.67 a	1.26 ± 0.15 a
	T46	4.92 ± 0.63 a	3.17 ± 0.88 a	1.27 ± 0.15 a
10月	CK	4.63 ± 0.46 ab	2.87 ± 0.33 a	1.08 ± 0.11 b
	T转	4.67 ± 0.35 ab	2.98 ± 0.58 a	1.10 ± 0.11 b
	T46	4.55 ± 0.46 b	2.92 ± 0.57 a	1.10 ± 0.12 b

表 5 河北沧州试验林微生物数量统计分析

Tab. 5 Statistical analysis of microbial quantity in Hebei Cangzhou experimental forest

时间	株系	细菌×10^{-5}/(CFU·g^{-1})	放线菌×10^{-5}/(CFU·g^{-1})	真菌×10^{-4}/(CFU·g^{-1})
4月	CK	4.88 ± 0.99 a	3.27 ± 0.62 a	1.20 ± 0.19 a
	T转	4.92 ± 0.62 a	3.20 ± 0.55 a	1.26 ± 0.15 a
	T46	4.94 ± 0.76 a	3.17 ± 0.42 a	1.28 ± 0.16 a
10月	CK	4.65 ± 0.53 a	2.97 ± 0.52 a	1.10 ± 0.12 b
	T转	4.61 ± 0.46 a	3.06 ± 0.38 a	1.07 ± 0.12 b
	T46	4.57 ± 0.48 a	3.05 ± 0.49 a	1.10 ± 0.14 b



因两地检测图的条带特征、结果趋势及质量判定标准高度统一，仅呈现共有代表性图，下同。

图 2　两地试验林土壤 DNA 质量检测

Fig. 2　Soil DNA quality detection in two experimental forests

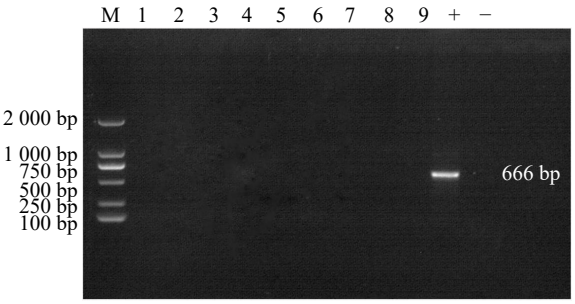
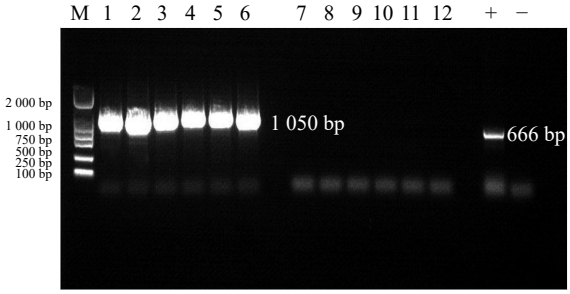


图 3　两地试验林土壤 DNA 外源基因检测

Fig. 3　Detection of soil DNA exogenous gene in two experimental forests



1 ~ 6 为 16S rDNA 通用引物 PCR 检测；7 ~ 12 为 *AhDREB*1 基因特异性引物 PCR 检测。下同。

图 4　两地试验林土壤抗性细菌检测

Fig. 4　Detection of soil resistant bacteria in two experimental forests

威胁，而目前相关研究数据仍比较少。且当前研究多集中在 1 ~ 3 龄的幼年树木，而林木生长周期长达

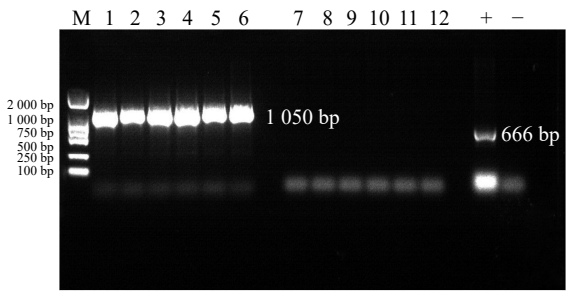


图 5　两地试验林土壤抗性放线菌检测

Fig. 5　Detection of soil resistant actinomycetes in two experimental forests

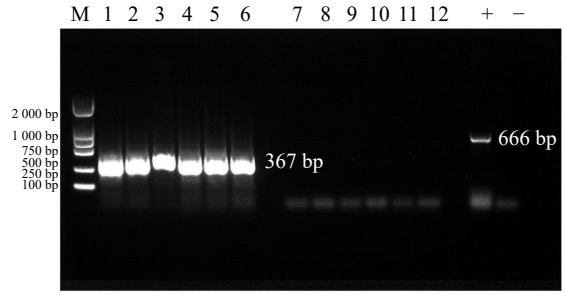


图 6　两地试验林土壤抗性真菌检测

Fig. 6　Detection of soil resistant fungi in two experimental forests

数十年，短期试验可能无法反映长期风险。针对该问题，本研究以实验室继代培养 14 年，又经过田间生长 6 年的转基因毛白杨为研究对象，栽植于天津滨海和河北沧州两盐碱地试验林，系统评估转 *AhDREB*1 基因毛白杨生长情况及环境释放安全性，旨在提供转基因林木田间试验长期监测数据，为转基因林木的推广提供科学支持。

研究表明，在天津滨海和河北沧州两地盐碱试验林中，转基因株系（尤其是 T 转）在树高、胸径和材积方面大多显著优于非转基因对照（CK）。以河北沧州高盐碱地（0.4% ~ 0.6% NaCl）为例，T 转株系材积达（1.00 ± 0.29）m^3，较 CK（0.80 ± 0.24）m^3 显著提高 25%（表 3）。这一生长优势可能源于 *AhDREB*1 基因通过激活渗透调节和离子转运相关基因，增强植株对盐胁迫的适应能力，该结论在早期的组培苗耐

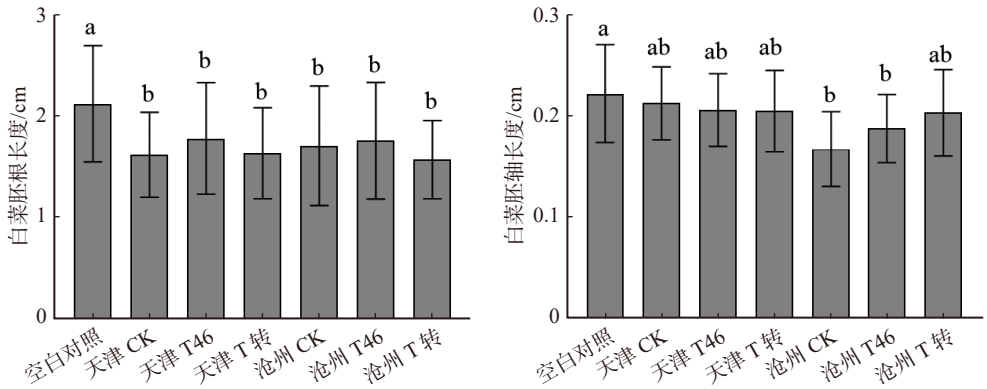


图 7　4 月份不同来源根际土壤浸提液对白菜种子胚根及胚轴长度的影响

Fig. 7　Effects of rhizosphere soil extract on lettuce radicle and hypocotyl length of lettuce seeds in April

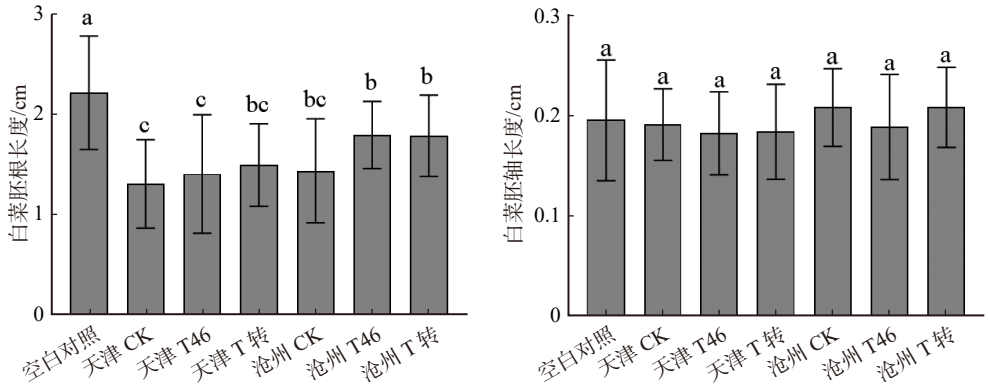


图 8 10 月份不同来源根际土壤浸提液对白菜种子胚根及胚轴长度的影响

Fig. 8 Effects of rhizosphere soil extract on radicle radicle and hypocotyl length of lettuce seeds in October

盐性试验中已得到刘欣等[18]的验证。此外，在天津滨海低盐条件下，T 转株系材积为(0.70 ± 0.17) m^3，而在河北沧州高盐条件下，材积提升到(1.00 ± 0.29)m^3，两地生长数据的差异进一步表明，*AhDREB*1 基因在高盐环境下对植株生长的调控优势更为突出。

在转基因受体植物(尤其是多年生林木)中，检测转基因植物安全性的首要问题是判断外源基因能否稳定存在，影响外源基因稳定性的因素较多，主要包括外源基因片段大小、表观调控、基因沉默以及环境互作等方面[24]。Fladung[25]以 19 年生的白杨(*Populus tremula* × *P. tremuloides*)组织培养苗为材料，证明外源基因在长期继代培养条件下仍保持遗传稳定性；但长期生长也可能引发体细胞变异或表观漂变，导致外源基因表达量下降，比如在转 *COMT* 基因杨树中检测到基因沉默现象[26]。因此，有必要对转基因林木进行外源基因水平检测。本研究通过 PCR 检测，发现转基因植株中 *AhDREB*1 基因特异性片段(666 bp)稳定存在，未出现基因丢失(图 1)。初步证明，即便历经长时间的继代培养以及后续在田间的生长过程，外源基因依然稳定地存在于转基因林木中，但对于外源基因的具体表达量仍有待后续进一步试验。

转基因树木种植大田后，外源基因可能通过根际分泌物、生物残体、土壤微生物生命活动过程等[27]方式进入土壤，因此外源基因是否渗入土壤以及对土壤微生物数量产生影响，是转基因林木安全性评价的重要内容之一。澳大利亚 Tran 等[28]研究发现，转基因桉树(*Eucalyptus camaldulensis*)对土壤微生物数量及群落并未产生显著的影响。金冬雪[29]发现转基因白桦(*Betula platyphylla*)对土壤微生物的影响与自然条件下分布比例一致。春季 4 月，土壤中一些冬眠的细菌开始活跃，而秋季 10 月部分细菌会为过冬做准备，数量和种类都会有所变化，在这两个月份检测土壤微生物的数量，能够一定情况下全面反映微生物的活动情况。本研究结果显示，转基因株系与 CK 的根际土壤微生物数量无显著差异(表 4 ~ 5)。对天津滨海试验林转基因株系 T46 的根际微生物分析表明，细菌数量在不同月份间呈现波动，这一差异可能与季节性温度变化导致嗜中温细菌减少有关。相比之下，放线菌的数量变化在两个月份间并未呈现出显著差异，可能是不同微生物的活动季节存在差异。

外源基因的水平转移是指在不同生物个体之间进行的遗传物质交流现象[30]，可能会影响物种之间的相互作用，影响生态系统稳定，因此有必要针对试验林转基因植株的外源基因开展水平转移方面的评价工作。已有的研究结果显示，未在外界环境中检测到转基因林木的外源基因，比如，朱文旭等[31]对 8 年生转基因库安托杨(*Populus* × *euramericana* 'Guariento')根际土壤微生物的 DNA 进行检测，未发现外源基因片段。在本试验中，通过对土壤 DNA 和筛选到的微生物 DNA 进行鉴定，也未检测到外源基因的存在，证明外源基因向外界环境中转移的可能性比较小。

根系是化感物质进入土壤的重要通道，伴随着化感物质释放、迁移与转化，林木根际微域成为化感作用研究的重要场所。1937 年，德国科学家 Goodyear[32]首次提出“化感作用”概念，其涵盖植物间及植物与微生物间的生化相互作用，随后 Rice[33] 在专著中对该理论进行了补充。目前大多数化感试验主要通过“三明治”法，陈莉莎[23]发现杨树根际土壤水浸提液对作物种子萌发起抑制作用。在田间林木转基因安全性相关研究方面，未发现转基因植株通过根际土壤浸提液对外界环境发生化感作用的结果，在本试验中，根际土浸提液对白菜种子胚根和胚轴长度的抑制作用在转基因株系与对照间无显著差异，并且不同季节不同地点间也未见显著区别(图 7 ~ 8)。推测 *AhDREB*1 基因未对土壤环境造成显著影响，未改

变根系分泌物的化感物质组成，从而避免了其对伴生植物的负面影响。

本研究通过多角度系统评价，初步证明转 *AhDREB*1 基因毛白杨在长达 20 年（14 年继代培养 + 6 年田间生长）生长周期内仍兼具耐盐性，在田间生长 6 年周期内未对环境造成显著影响。这为转基因林木环境释放评价提供了关键数据，对转基因林木从理论研究迈向产业化应用提供了重要的试验支撑。然而，本研究仍存在一定的不足：比如，时间长度仍有待延长，6 年田间试验虽已覆盖林木早期生长阶段，但未能观测成熟期（15 ~ 20 年生）的基因稳定性与生态效应；未评估转基因株系对伴生杂草的影响，可能低估其对生物多样性的影响。针对这些不足，后续研究将从以下方面深化：其一，继续开展长期监测工作，密切关注是否会引发基因沉默以及生态效应累积等长期风险；其二，将对该生境内其他可能受影响的生物（比如周围伴生杂草）的研究纳入未来研究范畴；其三，针对外源基因表达量展开更为精细深入的探究，以期得到更完善的数据。

4　结　　论

本试验在前期研究基础上，以经 14 年继代培养，后移栽至大田 6 年的转 *AhDREB*1 基因毛白杨为研究对象，从转基因植株的生长适应性、基因稳定性、基因水平转移、根际土壤微生物影响以及根际土浸提液的化感作用等方面开展了一系列系统性的研究，初步证明了转 *AhDREB*1 基因毛白杨在经过多年继代培养以及田间种植后，*AhDREB*1 基因仍稳定存在并表达，且在河北沧州高盐碱地下生长态势良好，未发现产生环境风险问题，这表明 *AhDREB*1 转基因植株具有田间种植的安全性，后续可对其进行进一步的推广应用。本研究可为其他耐逆转基因林木的环境释放及长期田间安全性评价提供参考，并为后续的转基因林木生态风险评估体系构建奠定基础。

参　考　文　献

[1] 赵可夫, 张万钧, 范海, 等. 改良和开发利用盐渍化土壤的生物学措施 [J]. 土壤通报, 2001(增刊 1): 115−119.
Zhao K F, Zhang W J, Fan H, et al. Biological measures for the improvement and development of saline-alkali soils[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2001(Suppl.1): 115−119.

[2] 朱之悌, 林惠斌, 康向阳. 毛白杨异源三倍体 B301 等无性系选育的研究 [J]. 林业科学, 1995, 31(6): 499−505, 579.
Zhu Z T, Lin H B, Kang X Y. Breeding of clones such as allopolyploid triploid B301 of *Populus tomentosa* Carr.[J]. Scientia Silvae Sinicae, 1995, 31(6): 499−505, 579.

[3] 张绮纹, 苏晓华, 李金花. 中国杨树遗传改良 [J]. 中国农业科技导报, 1999, 1(2): 54−58.
Zhang Q W, Su X H, Li J H. Genetic improvement of poplars in China[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 1999, 1(2): 54−58.

[4] Franke R, McMichael C M, Meyer K, et al. Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the arabidopsis gene encoding ferulate 5-hydroxylase[J]. Plant Journal, 2000, 22(3): 223−234.

[5] Li J H, Su X H, Zhang Q W, et al. Progress in the breeding of saline-tolerant somatic mutant trees[J]. World Forestry Research, 1997, 6: 15−21.

[6] Fillatti J A J, Sellmer J, Mccown B, et al. Agrobacterium mediated transformation and regeneration of *Populus*[J]. Molecular & General Genetics, 1987, 206: 192−199.

[7] 刘凤华, 孙仲序, 崔德才, 等. 细菌 *mtl-D* 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.
Liu F H, Sun Z X, Cui D C, et al. Cloning of bacterial *mtl-D* gene and its expression in transgenic *Populus* × *beijingensis* W. Y. Hsia & Liang[J]. Acta Genetica Sinica, 2000, 27(5): 428−433.

[8] 孙伟博, 邓大霞, 杨立恒, 等. 南林 895 杨树 *GmNHX*1 基因的转入及其耐盐性分析 [J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2014, 43(1): 34−38.
Sun W B, Deng D X, Yang L H, et al. Transfer of *GmNHX*1 gene into *Populus* × *euramericana* 'Nanlin895' and analysis of its salt tolerance[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2014, 43(1): 34−38.

[9] 王树耀, 陈其军, 王文龙, 等. 转 *OsNHX*1 基因耐盐 84K 杨的培育 [J]. 科学通报, 2005, 50(2): 140−144.
Wang S Y, Chen Q J, Wang W L, et al. Breeding of salt-tolerant transgenic 84K poplar with *OsNHX*1 gene[J]. Chinese Science Bulletin, 2005, 50(2): 140−144.

[10] 胡艳梅. 转盐角草甜菜碱合成相关基因提高欧美杨 107 和烟草的耐盐性 [D]. 大连: 大连理工大学, 2009.
Hu Y M. Improvement of salt tolerance in *Populus* × *euramericana* 'Neva' and tobacco by transferring genes related to betaine synthesis from *Salicornia europaea*[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2009.

[11] Häggman H, Raybould A, Borem A. et al. Genetically engineered trees for plantation forests: key considerations for environmental risk assessment[J]. Plant Biotechnology Journal, 2013, 11(7): 785−798.

[12] 康向阳, 刘志民, 李胜功. 论转基因林木的潜在生态风险性 [J]. 应用生态学报, 2004, 15(7): 1281−1284.
Kang X Y, Liu Z M, Li S G. On the potential ecological risks of transgenic forest trees[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(7): 1281−1284.

[13] Walter C, Fladung M, Boerjan W. The 20-year environmental safety record of GM trees[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(7): 656−658.

[14] 李霞, 薛泉宏, 樊军锋, 等. 一年生转 *Bt* 基因欧洲黑杨对土壤微生物的影响 [J]. 西北林学院学报, 2011, 26(4): 123−127.
Li X, Xue Q H, Fan J F, et al. Effects of one-year-old *Bt*-

transgenic *Populus nigra* on soil microorganisms[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(4): 123−127.

[15] 马晓星, 孙伟博, 魏辉, 等. 转 *AtSnRK2C* 基因杨树田间试验及生物安全性分析 [J]. 分子植物育种, 2019, 17(11): 3570−3578.
Ma X X, Sun W B, Wei H, et al. Field experiment and biosafety analysis of poplar with *AtSnRK2C* gene[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(11): 3570−3578.

[16] Shen Y G, Zhang W K, Yan D Q, et al. Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte *Atriplex hortensis*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(1): 155−161.

[17] 杜宁霞. 转 *AhDREB1* 基因三倍体毛白杨的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2003.
Du N X. Study on triploid *Populus tomentosa* Carr. transformed with *AhDREB1* gene[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2003.

[18] 刘欣. 转 *AhDREB1* 基因毛白杨的分子鉴定及耐盐性分析 [D]. 北京: 北京林业大学, 2007.
Liu X. Molecular identification and salt-tolerance analysis of *Populus tomentosa* Carr. transformed with *AhDREB1* gene[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2007.

[19] 陈章水. 杨树二元立木材积表的编制 [J]. 林业科学研究, 1989, 2(1): 78−83.
Chen Z S. Compilation of binary volume table for standing poplar trees[J]. Forest Research, 1989, 2(1): 78−83.

[20] 王颖. 转基因三倍体毛白杨外源基因及其表达的检测 [D]. 保定: 河北农业大学, 2004.
Wang Y. Detection of exogenous genes and their expression in transgenic triploid *Populus tomentosa* [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2004.

[21] 魏冰, 李云, 杜宁霞, 等. 毛白杨杂种外源基因稳定性及其对土壤微生物的影响 [J]. 核农学报, 2009, 23(6): 1054−1059.
Wei B, Li Y, Du N X, et al. Stability of exogenous genes in *Populus tomentosa* hybrids and their effects on soil microorganisms[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2009, 23(6): 1054−1059.

[22] 吕威, 卢楠, 侯荣轩, 等. 12 年生转基因毛白杨外源基因转移及其对土壤微生物的影响 [J]. 东北林业大学学报, 2018, 46(9): 1−6.
Lü W, Lu N, Hou R X, et al. Transfer of exogenous genes in 12-year-old transgenic *Populus tomentosa* and its effects on soil microorganisms[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2018, 46(9): 1−6.

[23] 陈莉莎. 杨树根系分泌物的化感作用及其生态效应 [D]. 南京: 南京林业大学, 2013.
Chen L S. Allelopathy and ecological effects of root exudates from poplar[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2013.

[24] 丁莉萍, 王宏芝, 魏建华. 杨树转基因研究进展及展望 [J]. 林业科学研究, 2016, 29(1): 124−132.
Ding L P, Wang H Z, Wei J H. Progress and prospect of research in transgenic poplar[J]. Forest Research, 2016, 29(1): 124−132.

[25] Fladung M, Hoenicka H, Ahuja M R. Genomic stability and long-term transgene expression in poplar[J]. Transgenic Research, 2013, 22(6): 1167−1178.

[26] Jouanin L, Goujon T, de Nadaï V, et al. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity[J]. Plant Physiology, 2000, 123(4): 1363−1374.

[27] 侯荣轩, 赵 烨, 田彦挺, 等. 实验田 4 年生转基因毛白杨嫁接苗和自根苗安全性研究 [J]. 林业科学研究, 2022, 35(2): 56−66.
Hou R X, Zhao Y, Tian Y T, et al. Safety evaluation of 4-year-old transgenic *Populus tomentosa* grafted seedlings and self-rooted seedlings in an experimental field[J]. Forest Research, 2022, 35(2): 56−66.

[28] Tran N T, Oguchi T, Matsunaga E, et al. Environmental risk assessment of impacts of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* events highly expressing bacterial *Choline Oxidase A* gene[J]. Plant Biotechnology (Tokyo), 2018, 35(4): 393−397.

[29] 金冬雪. 转 *BpGLK1* 白桦生长、叶色变异分析及环境安全性初步评价 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.
Jin D X. Analysis of growth and leaf color variation and preliminary evaluation of environmental safety of transgenic *Betula platyphylla* with *BpGLK1* gene[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2021.

[30] Tukey H B. Implications of allelopathy in agricultural plant science[J]. Botanical Review, 1969, 35(1): 1−16.

[31] 朱文旭, 丁昌俊, 张伟溪, 等. 8 年生转基因库安托杨外源基因转移及对土壤微生物数量影响的检测 [J]. 林业科学研究, 2017, 30(2): 349−353.
Zhu W X, Ding C J, Zhang W X, et al. Exogenous gene transformation of 8-year-old multi-gene transgenic *Populus* × *euramericana* ‘Guariento’ and its influence on soil microbial quantity[J]. Forest Research, 2017, 30(2): 349−353.

[32] Goodyear K L. Comment on: an assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in genetically modified plants: report of the Working Party of the British Society for antimicrobial chemotherapy[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004, 53(3): 418−431.

[33] Rice E L. Allelopathy [M]. 2nd ed. New York: Academic Press, 1984: 207−225.

（责任编辑 赵田芸
责任编委 卢孟柱）