

转 *AtNHX1* 基因烟草钾积累及根系生理特性

许 杰¹, 武恒燕¹, 薛 刚¹, 陈荣平², 彭玉富³,
韩助君¹, 徐世晓¹, 杨铁钊^{1*}

(1.河南农业大学烟草学院, 郑州 450002;
2.黑龙江省烟草科学研究所, 黑龙江 牡丹江 157011; 3.河南省烟草公司, 郑州 450003)

摘 要:为了探明转 *AtNHX1* 基因提高烟叶钾含量的生理原因,利用大田和水培试验,以 3 个转 *AtNHX1* 基因阳性纯合株系 N7、N9 和 N10,以及未转化烟草 K326(对照)为材料,研究了转 *AtNHX1* 基因烟草钾含量、根系形态和生理特性。结果表明,转 *AtNHX1* 基因烟草在大田中长势一致,烟叶含钾量在 10~70 d 叶龄始终显著高于对照;在水培实验中,转 *AtNHX1* 基因烟草吸收 K⁺能力强,具有较大的 K⁺吸收速率,其根系形态、根系活力、阳离子交换量和 ATPase 活性均显著高于对照。转 *AtNHX1* 基因烟草具有富钾基因型烟草钾高效吸收和积累的特征,因而钾含量大大提高。

关键词:转 *AtNHX1* 基因烟草;钾含量;根系形态;生理特性

doi:10.13304/j.nykjdb.2016.654

中图分类号:S572 文献标识码:A 文章编号:1008-0864(2017)04-0031-07

Potassium Accumulation and Root Physiological
Characteristics of *AtNHX1*-expressing Tobacco

XU Jie¹, WU Hengyan¹, XUE Gang¹, CHEN Rongping², PENG Yufu³,
HAN Zhujun¹, XU Shixiao¹, YANG Tiezhao^{1*}

(1.College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002; 2.Tobacco Scientific Research Institute,
Heilongjiang Mudanjiang 157011; 3.Henan Province Tobacco Company, Zhengzhou 450003, China)

Abstract: In order to investigate the physiological reason for potassium content increasing in leaves of *AtNHX1* tobacco, using positive *AtNHX1* gene homozygous strain N7, N9, N10 and non-transgenic control K326 as material under field and hydroponic condition, this paper studied the potassium content, root system morphology and physiological characteristics of *AtNHX1*-expressing tobacco lines. The results showed that *AtNHX1*-expressing tobacco lines grew with unanimous vigor in the fields. The potassium content on leaves at 10~70 d was remarkably higher than that of the control under filed condition. In hydroponic experiment, the *AtNHX1*-expressing tobacco lines exhibited strong potassium absorption capability and larger maximum potassium absorption rate. The root system morphology and vigor, cation exchange capacity and ATPase activity were significantly higher than that of the control. These results indicated that *AtNHX1*-expressing tobacco lines had effective potassium absorption and accumulation characteristics. Therefore, the potassium content in tobacco leaf was greatly increased.

Key words: *AtNHX1*-expressing tobacco lines; potassium content; root system morphology; physiological characteristics

钾对维持烟草的正常生长、提高抗逆性和改善烟叶品质等方面起着重要的作用,如何提高烟叶钾含量一直是北方烟区烟叶生产中的一个难

题^[1~2]。通过分子育种技术向烟草中导入与 K⁺吸收转运相关的基因取得了显著成效,郭兆奎等^[3]将酵母 *HAL1* 基因转入烟草,发现烟叶钾含

收稿日期:2016-10-25; 接受日期:2016-11-21

基金项目:河南省烟草公司科技项目(HNZY102015004)资助。

作者简介:许 杰,硕士研究生,主要从事烟草遗传育种与品质改良研究。E-mail:xujie2025@126.com。* 通信作者:杨铁钊,教授,博士生导师,主要从事烟草遗传育种与品质改良研究。E-mail:yangtiezhao@126.com

量提高了 30%。谭颖等^[4]将 K^+ 转运体蛋白基因 *HAK1* 通过共转化法导入烟草后发现多个株系烟叶钾含量显著高于未转化的烟草。

NHX(Na^+/H^+ antiporter) 是编码液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运体的基因家族,过表达盐角草 *SeNHX1* 基因^[5]、杂花苜蓿 *MvNHX1* 基因^[6]、荷花 *NnNHX1* 基因^[7] 和獐茅 *AlNHX5* 基因^[8] 均能显著提高烟草的耐盐性。缺失 *NHX1* 基因的酵母细胞内 K^+ 浓度降低为正常酵母细胞的三分之一^[9],而将番茄 *LeNHX2* 导入 *NHX1* 缺失的酵母菌株,则可显著提高酵母细胞的 K^+ 浓度^[10]。郭兆奎等^[11-12] 研究发现将拟南芥和酵母中的 *NHX1* 基因转入烟草,与未转化材料相比,转 *AtNHX1* 基因烟草烟叶中 K^+ 含量显著增加。张桦等^[6] 将杂花苜蓿 *MvNHX1* 基因导入烟草,转基因烟草的 K^+ 含量是野生型对照的 2~3 倍;这表明 *NHX1* 基因与植物对钾素的吸收密切相关,但是前人对该基因的研究更多的放在了耐盐性上,而对该基因提升转基因材料钾含量的生理原因还未见报道。因此,本研究拟通过一系列试验从大田烟叶钾含量,烟株根系形态特征和生理特性以及钾吸收动力学参数等方面探究转 *AtNHX1* 基因烟草提高烟叶钾含量的原因,以为富钾基因型烟草品种的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的 3 个转基因株系 N7、N9 和 N10 由黑龙江省烟草科学研究所提供,未转化材料 K326 由河南农业大学育种实验室提供。郭兆奎等^[11] 用叶盘法将反转录合成 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *AtNHX1*(832773) 通过高效表达载体导入烟草品种 K326,从转入 *AtNHX1* 基因的株系中筛选出钾含量高的株系进行多代自交,形成了稳定的品系,本实验中所用的 N7、N9 和 N10 就是其中的 3 个品系。

1.2 试验设计

1.2.1 大田试验 大田试验在河南农业大学科教园区实施,试验地土壤为轻壤质潮土,基本理化性状为有机质 11.50 g/kg,全氮 0.85 g/kg,全磷 0.11 g/kg,速效钾 120 mg/kg,缓效钾 675 g/kg,

pH 7.67。

烟苗 5 月初移栽,大田常规管理,每个材料各栽 30 株。于移栽后 30 d、40 d 和 50 d 追施硫酸钾肥,每株 5 g,配置成溶液穴施于距离主茎 20 cm 处(为常规施钾量的 2 倍)。定位第 12 片叶,分别于叶龄 10 d、20 d、30 d、40 d、50 d、60 d、70 d 取样(5 点取样法,3 株为一个混合样),杀青测定烟叶钾含量。圆顶期测定农艺性状。

1.2.2 水培试验 烟株成苗后(5~6 片真叶)各基因型选择生长一致的烟苗转入人工气候室中进行水培,人工气候室昼/夜温度 28℃/25℃,白天光照时间为 14 h,光照强度为 350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 。烟苗用泡沫板固定于 500 mL 黑色玻璃广口瓶中,Hoagland 营养液培养,通气泵 24 h 不间断通气,营养液定期更换(生长前期 2 d 换一次,旺长期 1 d 换一次),调节营养液 pH 5.5~6.0。

培养 30 d 后,各基因型选取生长一致的 6 株烟苗,在人工气候室中进行钾吸收动力学测定;另选取整齐一致的烟苗测定根系活力,根系活跃吸收面积,阳离子交换量和 ATPase 活性,各指标重复测定 3 次。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 烟叶含钾量测定 将所取不同叶龄的烟叶在 105~108℃ 杀青 15 min,60~75℃ 烘干至烟叶恒重,磨碎后过 60 目筛,火焰光度法测定钾含量^[13]。

1.3.2 根系鲜重和干重 将待测烟株根系用蒸馏水反复冲洗干净,用吸水纸吸干水后在天平上称其鲜重;再在 105~108℃ 杀青 15 min,60~75℃ 烘干至恒重后在天平上称其干重^[14]。

1.3.3 根系活力 用 TTC 法测定根系活力,排水法测定根系体积,甲烯蓝法测定根系的吸收面积^[15]。

1.3.4 根系可溶性蛋白 用 Coomassie brilliant blue G-250 染色法测定^[15]。

1.3.5 根系 ATPase 活性 利用 K^+ -ATPase 试剂盒(南京建成生物公司)测定,其原理是每小时每毫克根系组织蛋白的组织中 ATP 酶产生 1 μmol 无机磷的量即为一个 ATP 酶的活力单位。称取 0.2 g 鲜根与生理盐水按 1:9 研磨、配制成 10% 的匀浆,4℃、6 000 g 离心 15 min,取上清液与生理盐水按 1:4 稀释到 2% 浓度,之后根据试剂盒使用步骤进行测定。

1.3.6 根系阳离子交换量 (cation exchange capacity, 简称 CEC) 依据崔国贤等^[16]的方法, 将用蒸馏水冲洗过的根系在 80℃ 烘至恒重, 粉碎过 40 目筛。用 200 mL 浓度为 0.01 mol/L HCl 处理 0.20 g 上述样品 5 min 后过滤, 用约 200 mL 去离子水冲洗滤渣, 用 200 mL 浓度为 1 mol/L、pH 7.0 的 KCl 溶液冲洗滤渣到 250 mL 的烧杯中, 以 7~8 d 酸碱混合指示剂 (1 体积 1 g/L 中性红的乙醇溶液与 1 体积 1 g/L 亚甲基蓝的乙醇溶液混合, pH 7.0 时为紫蓝色) 指示滴定终点, 用 0.01 mol/L KOH 滴定。

1.3.7 根系钾吸收动力学参数 取样依据聂红资等^[17]的方法, 将待测烟苗用饥饿液 (由 0.2 mmol/L CaSO₄ 和 5 mmol/L Mes 组成) 处理 1 d, 之后将烟苗转入装有 250 mL 耗竭液 (由 0.15 mmol/L KCl、0.20 mmol/L CaSO₄ 以及 5 mmol/L Mes 组成), 用多层黑色塑料袋覆盖的三角瓶中进行耗

竭试验, 各基因型选取 4 株烟苗。每小时取样一次, 每次取 1 mL (再补加 1 mL 去离子水), 取样至溶液中 K⁺ 浓度接近 0 时结束。用火焰光度计测定所取样品的 K⁺ 浓度, 根据崔国贤等^[16]的方法计算吸收动力学参数。

1.4 数据处理分析

采用 DPS7.05 进行统计分析, 多重比较用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 转 *AtNHX1* 基因烟草大田农艺性状分析

4 个烟草基因型种植于田间, 烟株圆顶期的相关农艺形状调查结果如表 1 所示。统计分析表明: 3 个 *AtNHX1* 基因的品系生长整齐一致; 与未转化 K326 相比, 转基因品系的株高、茎围、节距、最大叶长、最大叶宽以及叶片数等各项农艺性状

表 1 转 *AtNHX1* 基因烟草与对照农艺性状差异

Table 1 Difference of agronomic traits between *AtNHX1*-expressing tobacco lines and control.

品系 Strain	株高 (cm) Plant height (cm)	茎围 (cm) Stem circumference (cm)	节距 (cm) Pitch (cm)	最大叶长 (cm) Lenth of the largest leaf (cm)	最大叶宽 (cm) Width of the largest leaf (cm)	叶片数 Leaf number
N7	130.33 aA	9.40 aA	5.67 aA	67.33 aA	36.33 aA	28.33 aA
N9	125.67 abA	9.28 aA	5.28 aA	66.67 aA	36.17 aA	26.67 abA
N10	128.33 aA	9.20 abA	5.50 aA	66.67 aA	35.00 aA	27.67 aA
K326	126.33 abA	9.25 aA	5.30 aA	65.33 abA	35.00 aA	28.00 aA

注: 同列中数值后面不同小写或大写字母表示用 LSD 检验差异达到 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 显著水平。
Notes: The small or capital letters in the same column indicate significantly difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ levels by LSD test, respectively.

指标与未转化材料 K326 差异均不显著。说明 3 个转 *AtNHX1* 基因的烟草品系与品种 K326 长势一致。

2.2 转 *AtNHX1* 基因烟草不同叶龄烟叶钾含量分析

在烟株生长过程中对中部叶进行烟叶钾含量测定, 烟叶钾含量随叶龄变化而变化的曲线绘于图 1 中。结果显示, 烟叶钾含量随着叶龄的增加而降低, 到叶龄 50 d 后又逐渐增加, 各烟草基因型表现一致。3 个转 *AtNHX1* 基因烟草品系中部叶各叶龄的烟叶钾含量均高于未转化 K326, 具体表现为 N7>N9>N10>K326; 其中烟叶成熟期 (叶龄 70 d 时), 各基因型烟叶钾含量分别为: N7 是 2.70%, N9 是 2.39%, N10 是 1.82%, K326 是 1.29%,

3 个转基因品系的烟叶钾含量分别是 K326 的 2.09 倍、1.85 倍和 1.41 倍。这表明 3 个转基因品系具有较高的钾积累能力。

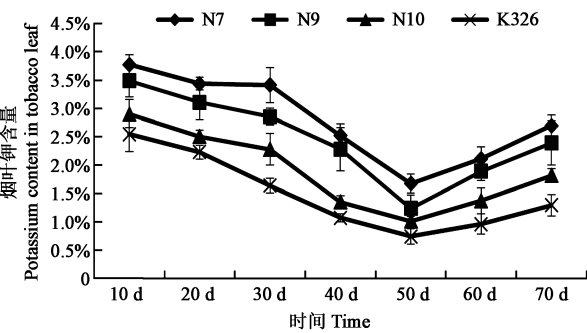


图 1 转 *AtNHX1* 基因烟草与对照不同叶龄烟叶钾含量
Fig.1 The potassium content of *AtNHX1*-expressing tobacco lines and control at different leaf age.

2.3 转 *AtNHX1* 基因烟草根系钾吸收动力学参数分析

对烟株旺长期(水培 30 d 后)各基因型烟草 K^+ 吸收动力学参数进行测定(表 2)。由表 2 可知,转基因材料的 K^+ 最大吸收速率极显著的高于未转化材料,N7、N9 和 N10 的 V_{max} 值分别是 K326 的 1.71 倍、1.62 倍和 1.40 倍;与未转化材料相比,转 *AtNHX1* 基因烟草的 K_m 和 C_{min} 值也显著高于 K326;3 个转基因品系 K_m 值分别比 K326 提高 37.22%、31.38%和 22.23%,而 C_{min} 则分别比 K326 提高 40.49%、38.37%和 24.61%。上述结果表明,转基因品系具有较大的 K^+ 最大吸收速率,因而能够吸收较多的 K^+ ;但是 K^+ 亲和性低于未转化材料,所以烟株能够吸收的最低 K^+ 浓度也显著提高;转 *AtNHX1* 基因烟草吸收钾素能力强,但是耐低钾能力却不强,因此想要通过转入 *AtNHX1* 基因提高烟草钾含量,必须保证充足的钾素供应。

表 2 转 *AtNHX1* 基因烟草与对照钾吸收动力学参数比较

Table 2 The potassium absorption kinetic parameters of *AtNHX1*-expressing tobacco lines and control.

品系 Strain	V_{max} ($\mu\text{mol/g} \cdot \text{FW/h}$)	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	C_{min} ($\mu\text{mol/L}$)
N7	118.91 aA	110.89 aA	33.17 aA
N9	112.69 aA	106.17 aA	32.67 aA
N10	97.35 bA	98.77 aA	29.42 aA
K326	69.42 cB	80.81 bA	23.61 bA

注:同列中数值后面不同小写或大写字母表示用 LSD 检验差异达到 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 显著水平。
Notes: The small or capital letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ levels by LSD test, respectively.

2.4 转 *AtNHX1* 基因烟草根系形态学特征分析

对各基因型烟草在旺长期的根系养分吸收形态学特征测定结果如表 3 所示。从表 3 可以看出,3 个转基因品系的根体积、鲜干重以及活跃吸收面积和总吸收面积都显著的高于对照 K326。N7、N9 和 N10 的根鲜重分别比对照增加了 2.80 g、2.53 g 和 1.36 g,而根体积分别是 K326 的 1.70 倍、1.60 倍和 1.34 倍,根干重则分别比 K326 增大了 84.21%、73.68%和 36.84%。根系吸收面积与根体积和鲜干重表现一致,N7、N9 和 N10 的活跃吸收面积分别是 K326 的 1.48 倍、1.42 倍和 1.16 倍,而总吸收面积则分别比 K326 提高 36.97%、33.50%和 17.12%。由此可见,转 *AtNHX1* 基因烟草具备良好的根系形态学特征,这是其提高根系对 K^+ 吸收和转运能力,并最终提高烟叶含钾量的基础。

2.5 转 *AtNHX1* 基因烟草根系活力和阳离子交换量分析

测定 4 个基因型烟草的根系活力和阳离子交换量,结果列于表 4 中。由表 4 可知,3 个转基因品系的根系活力和 CEC 均显著或极显著的高于对照 K326。其中,N7、N9 和 N10 的根系活力分别是 K326 的 1.77 倍、1.66 倍和 1.32 倍,而 CEC 分别比 K326 提高了 50.46%、40.88%和 21.76%。这两个指标的大大提高表明,转 *AtNHX1* 基因 K^+ 吸收量大并且吸收和运输 K^+ 能力较强。

2.6 转 *AtNHX1* 基因烟草可溶性蛋白含量和 ATPase 活性分析

各基因型的根系可溶性蛋白含量和 ATPase 活性测定结果如表 5 所示。由表 5 可知,3 个转基因品系 N7、N9 和 N10 的根系可溶性蛋白含量

表 3 转 *AtNHX1* 基因烟草与对照根系形态特征差异

Table 3 The root morphological of *AtNHX1*-expressing tobacco lines and control.

品系 Strain	根鲜重(g) Fresh weight of root(g)	根体积(mL) Root volume (mL)	根干重(g) Dry weight of root(g)	活跃吸收面积(m ²) Active uptake area(m ²)	总吸收面积(m ²) Total uptake area(m ²)
N7	5.13 aA	5.67 aA	0.35 aA	3.97 aA	5.52 aA
N9	4.86 aA	5.33 aA	0.33 aA	3.83 aA	5.38 aA
N10	3.69 bB	4.45 bB	0.26 bB	3.11 bB	4.72 bB
K326	2.33 cB	3.33 cB	0.19 cB	2.69 cB	4.03 cB

注:同列中数值后面不同小写或大写字母表示用 LSD 检验差异达到 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 显著水平。
Notes: The small or capital letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ levels by LSD test, respectively.

表 4 转 *AtNHX1* 基因烟草与对照根系活力和
阳离子交换量差异

Table 4 The root activity and CEC of *AtNHX1*-expressing tobacco lines and control.

品系 Strain	根系活力 (ug/gFW · h) Root vigor (ug/gFW · h)	阳离子交换量 (me · 100/g) CEC (me · 100/g)
N7	191.85 aA	57.67 aA
N9	179.42 aA	54.00 aA
N10	142.43 bB	46.67 bB
K326	108.25 cB	38.33 cB

注:同列中数值后面不同小写或大写字母表示用 LSD 检验差异达到 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 显著水平。
Notes: The small or capital letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ levels by LSD test, respectively.

表 5 转 *AtNHX1* 基因烟草与对照根系可溶性
蛋白含量和 ATPase 活性差异

Table 5 The root soluble protein content and ATPase activity of *AtNHX1*-expressing tobacco lines and control.

品系 Strain	可溶性蛋白含量 (mg/kg) Soluble protein content (mg/kg)	ATPase 活性 (ug Pi/gFW · h) ATPase activity (ug Pi/gFW · h)
N7	0.18 aA	288.37 aA
N9	0.18 aA	271.71 aA
N10	0.15 bB	244.08 bB
K326	0.11 cC	193.99 cC

注:同列中数值后面不同小写或大写字母表示用 LSD 检验差异达到 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 显著水平。
Notes: The small or capital letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ levels by LSD test, respectively.

分别是 K326 的 1.64 倍、1.64 倍和 1.36 倍,而 ATPase 活性则分别是 K326 的 1.49 倍、1.40 倍和 1.26 倍。表明烟草转入 *AtNHX1* 基因后,根系酶含量显著增加,根系代谢情况显著增强。

3 讨论

烟叶钾含量关系着烟叶成熟度、烟叶香味和卷烟制品的安全性,是国内外衡量烤烟品质的一个重要参考指标^[1]。彭玉富^[18]研究了富钾基因型农大 202 在大田整个生育期的钾吸收积累和分配后发现,在充足供钾的情况下,富钾基因型烟草

在整个生育期内烟叶钾含量均高于一般基因型品种。张喜琦^[19]的研究发现,吸钾效率高的烟草品种在大田生长各生育期内烟叶钾含量始终高于吸钾效率低的烟草品种。本研究测定了转 *AtNHX1* 基因烟草大田农艺性状和中部叶 10~70 d 叶龄的烟叶钾含量,结果表明各基因型烟草在田间长势一致,向烟草中导入 *AtNHX1* 提高了烟株的钾素积累能力,烟叶钾含量在烟株整个生长过程中均显著高于未转化品种 K326。

根系 K^+ 吸收动力学参数可以定量的描述根系养分吸收特征^[20]。 K^+ 的最大吸收速率 V_{max} 值越大,根系对 K^+ 的吸收强度也越大; K_m 值表征根系对 K^+ 的亲性和, K_m 值越小,根系对 K^+ 的亲性越强^[20];根系可吸收的最低 K^+ 浓度 C_{min} 值越小,植物所能耐受的最低 K^+ 浓度也越低,植物也就越耐低钾^[21]。李廷轩^[22]的研究表明,富钾基因型籽粒苋 V_{max} 高于一般基因型,而 K_m 和 C_{min} 低于一般基因型。赵学强等^[23]研究认为,钾高效基因型小麦具有 V_{max} 较大、而 K_m 较小的特点。杨志晓等^[24]发现富钾基因型烟草在苗期 V_{max} 较高,而 K_m 、 C_{min} 较低,但是在旺长期 V_{max} 、 K_m 和 C_{min} 均较高。本研究中,转 *AtNHX1* 基因烟草具有较大的 V_{max} ,但是 K_m 和 C_{min} 也高,与李廷轩^[22]和赵学强等^[23]在 V_{max} 上的研究结果一致,即钾含量高的基因型具有较大的 K^+ 吸收速率,而 K_m 和 C_{min} 不一致,这可能是由于本研究测定的烟株处于旺长期,此时烟株需钾量大,不耐低钾,这与杨铁钊等^[24]的研究结论一致。

根系形态和生理特性在很大程度上决定着植物对养分的吸收能力^[25]。钾高效性的小麦、玉米和水稻其根系量、活跃吸收面积和总吸收面积与吸钾量成正比^[26]。籽粒苋比烟草和番茄钾含量高的原因在于根系 ATP 酶活性高^[27]。杨志晓等^[28]发现,在充足供钾情况下,富钾基因型烟草的根系活力、 H^+ 分泌量、CEC 及可溶性蛋白含量和 ATPase 活性显著高于一般型品种,他认为这些指标可能是造成品种间钾素吸收能力差异的主要因素。谭颖等^[4]将 *HAK1* 导入烟草后发现其中 3 个株系烟叶含钾量显著提高,并且根系活力、CEC 以及 ATPase 活性也显著高于未转化材料。研究对转 *AtNHX1* 基因烟草的在水培条件下根系形态和生理特性进行研究后发现,转基因烟草根

系活力强,吸收面积大,CEC 和 ATPase 活性显著高于未转化的 K326。由此看见,向烟草中导入 *AtNHX1*,增加了烟草的根系量,提高了烟草的根系活力、吸收能力和根系代谢强度,使烟草具有与富钾基因型烟草品种相似的钾高效吸收和积累能力,这可能是转 *AtNHX1* 基因烟草含钾量提高的重要原因。此结果也进一步说明,表征根系形态和生理特性的参数可以作为筛选富钾品种或材料的重要参考指标,培育富钾烟草品种应特别重视根系形态和生理特性。

此外,周树峰等^[29]用拟南芥 *AtNHX1* 转化烟草后发现,转 *AtNHX1* 基因烟草耐盐性显著增强。多项研究表明, K^+/Na^+ 是评价植物耐盐性的一个重要指标^[30],NHX 基因家族在高盐胁迫条件下,通过增加细胞中 K^+ 浓度,减轻 Na^+ 对细胞器的伤害^[31]。研究发现,转 *AtNHX1* 基因烟草钾素吸收和积累能力强,烟株体内 K^+ 含量大大提高,而这可能是转 *AtNHX1* 基因烟草耐盐性强的原因之一。本课题组也将对钾与转 *AtNHX1* 基因烟草耐盐性的关系做进一步的研究。

转 *AtNHX1* 基因烟草在大田烟叶钾含量显著高于未转化 K326,水培条件下根系量大,总吸收面积和活跃吸收面积大,具有良好的养分吸收形态学特征,并且根系活力、CEC、可溶性蛋白和 ATPase 活性等也显著高于未转化的 K326,根系 K^+ 吸收速率较高。

参 考 文 献

- [1] 刘国顺.烟草栽培学[M].北京:中国农业出版社,2003,143-145.
Liu G S. Tobacco Cultivation [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003,143-145.
- [2] 胡国松.烤烟营养原理[M].北京:中国科技出版社,2000,141-144.
Hu G S. Nutrient Principle of Flue-cured Tobacco [M]. Beijing: Science Press, 2000, 141-144.
- [3] 郭兆奎,杨 谦,姚泉洪,等. *HAL1* 基因转化烟草提高烟叶含钾量研究[J]. 中国烟草学报,2006,12(5):46-51.
Guo Z K, Yang Q, Yao Q H, et al.. Study on *HAL1* modified tobacco with high leaf potassium content [J]. Acta Tab. Sin., 2006, 12(5):46-51.
- [4] 谭 颖,秦利军,赵 丹,等. 共转化法获得 *HAK1* 基因高表达烟草提高植株钾吸收能力[J]. 植物生理学报,2013(7):689-699.
Tan Y, Qin L J, Zhao D, et al.. The overexpression of *HAK1* gene improved the absorbing ability for potassium in transgenic tobacco by co-transformation method [J]. Acta Phytophysiol. Sin., 2013(7):689-699.
- [5] 陈亚东.耐盐基因 *SeNHX1* 在烟草中的表达研究[D].河南新乡:河南科技学院,硕士学位论文,2016.
Chen Y D. The expression of salt tolerance gene *SeNHX1* in tobacco [D]. Henan Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, Master Dissertation, 2016.
- [6] 张 桦,张富春,张雨良,等. 新牧一号杂花苜蓿 *MvNHX1* 基因的表达分析和提高烟草耐盐性的研究[J]. 植物研究,2011(5):550-557.
Zhang H, Zhang F C, Zhang Y L, et al.. Expressional analysis of *Mv NHX1* in medicago varia Xinmu-1 and enhancing the salt tolerance of tobacco [J]. Bull. Bot. Res., 2011(5):550-557.
- [7] 郭会敏,顾春笋,陈发棣,等. 荷花 *NnNHX1* 基因耐盐性在转化烟草中的验证[J]. 园艺学报,2012,39(2):323-332.
Guo H M, Gu C S, Chen F L, et al.. Salt tolerance verification of lotus *Nn NHX1* in transformed tobacco [J]. Acta Hort. Sin., 2012,39(2):323-332.
- [8] 王景艳. 獐茅液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆及其转基因烟草的耐盐性研究[D]. 南京:南京农业大学,博士学位论文,2006.
Wang J Y. Study on cloning of C-DNA encoding Na^+/H^+ antiporter from tonoplast membrane of *Aeluropus litoralis* and salt tolerance of its transgenic tobacco [D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, Doctor Dissertation, 2006.
- [9] Brett C L, Tukaye D N, Mukherjee S, et al.. The yeast endosomal $Na^+(K^+)/H^+$ exchanger *NHX1* regulates cellular pH to control vesicle trafficking [J]. Mol. Biol. Cell, 2005, 16(3):1396-1405.
- [10] Venema K, Quintero F J, Pardo J M, et al.. The *Arabidopsis* Na^+/H^+ exchanger *AtNHX1* catalyzes low affinity Na^+ and K^+ transport in reconstituted liposomes [J]. Biol. Chem., 2002, 277(4):2413-2418.
- [11] 郭兆奎,杨 谦,姚泉洪,等.转拟南芥 *AtNHX1* 基因促进烟草对钾吸收的研究[J]. 高技术通讯,2007,17(11):1174-1179.
Guo Z K, Yang Q, Yao Q H, et al.. Study on the improvement of the absorbing ability for potassium of *AtNHX1*-expressing tobacco [J]. Chin. High Technol. Lett., 2007,17(11):1174-1179.
- [12] 郭兆奎,杨 谦,万秀清,等. 酿酒酵母 *NHX1* 基因克隆与烟草表达分析[J]. 分子植物育种,2006,4(6):779-785.
Guo Z K, Yang Q, Wan X Q, et al.. Cloning of *NHX1* gene from *saccharomyces cerevisia* and its heterologous expression in tobacco [J]. Mol. Plant Breed, 2006,4(6):779-785.
- [13] 王瑞新,韩富根,杨素勤,等.烟草化学品质分析法[M].郑州:河南科技出版社,1998,102-105.
Wang R X, Han F G, Yang S Q, et al.. Analysis Method for Tobacco Chemical Quality [M]. Zhengzhou: Henan Science & Technology Press,1998,102-105.
- [14] 张志良.植物生理学实验指导[M].(第3版).北京:高等教育出版社,2003,267-269.
Zhang Z L. Experimental of Plant Physiology [M]. (3rd Edn). Beijing: Higher Education Press, 2003,267-269.
- [15] 邹 琦.植物生理学实验指导[M].北京:中国农业科技出版社,2000,120-124.

- Zou Q. Experimental of Plant Physiology [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000, 120-124.
- [16] 崔国贤, 李宗道. 苧麻不同基因型的吸钾能力及其与根系参数的关系[J]. 农业现代化研究, 2000, 21(6): 371-375.
- Cui G X, Li Z D. Relationship between potassium absorption and root parameters of different genotypes of ramie [J]. Res. Agric. Modern, 2000, 21(6): 371-375.
- [17] 聂红资, 杨铁钊, 杨志晓, 等. 不同供钾水平下转 *AtCIPK23* 基因烟草钾吸收特征的研究[J]. 河南农业科学, 2009, (6): 53-56.
- Nie H Z, Yang T Z, Yang Z X, *et al.* Potassium absorption characteristics of *AtCIPK23* transgenic tobacco under different levels of potassium treatments [J]. J. Henan Agric. Sci., 2009, (6): 53-56.
- [18] 彭玉富. 烤烟钾高效积累基因型钾积累与分配研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 硕士学位论文, 2003.
- Peng Y F. Study on the accumulation and distribution of potassium accumulation of different potassium efficient flue-cured tobacco genotypes [D]. Zhengzhou: Henan Agriculture University, Master Dissertation, 2003.
- [19] 张喜琦. 不同基因型烟草钾效率的差异及机理研究[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 硕士学位论文, 2003.
- Zhang X Q. Differences of potassium efficiency and mechanism of different tobacco genotypes [D]. Shandong Taian: Shandong Agriculture University, Master Dissertation, 2003.
- [20] 蒋廷惠, 郑绍建, 石锦芹, 等. 植物吸收养分动力学研究中的几个问题[J]. 植物营养与肥料学报, 1995, 1(2): 11-17.
- Jiang T H, Zheng S J, Shi J Q, *et al.* Several considerations in kinetic research on nutrients uptake by plants [J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 1995, 1(2): 38-43.
- [21] 黄建国, 杨邦俊, 袁玲. 小麦不同品种吸收钾离子的动力学研究[J]. 植物营养与肥料学报, 1995, (1): 38-43.
- Huang J G, Yang B J, Yuan L. Kinetics of K^+ absorption by various wheat varieties [J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 1995, (1): 38-43.
- [22] 李廷轩. 籽粒苋富钾营养机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 博士学位论文, 2003.
- Li T X. The nutrition mechanism of grain *Amaranth* enrichment in potassium [D]. Hangzhou: Zhejiang University, Doctor Dissertation, 2003.
- [23] 赵学强, 介晓磊, 李有田, 等. 不同基因型小麦钾离子吸收动力学分析[J]. 植物营养与肥料学报, 2006, 12(3): 307-312.
- Zhao X Q, Jie X L, Li Y T, *et al.* Study on potassium uptake kinetics by different genotype wheat [J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 2006, 12(3): 307-312.
- [24] 杨铁钊, 杨志晓, 聂红资, 等. 富钾基因型烤烟的钾积累及根系生理特性[J]. 作物学报, 2009, 35(3): 535-540.
- Yang T Z, Yang Z X, Nie H Z, *et al.* Potassium accumulation and root physiological characteristics of potassium-enriched flue-cured tobacco genotypes [J]. Acta Agron. Sin., 2009, 35(3): 535-540.
- [25] Lynch J P. Root architecture and plant productivity [J]. Plant Physiol., 1995, 109(1): 7-13.
- [26] 邹春琴, 李振声, 李继云, 等. 钾营养效率不同的小麦品种间根际钾营养动态的比较[J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(3): 87-91.
- Zou C Q, Li Z S, Li J Y, *et al.* Study on difference in morphological and physiological characters of wheat varieties to potassium [J]. J. China Agric. Univ., 2000, 5(3): 87-91.
- [27] 李廷轩, 马国瑞. 籽粒苋富钾基因型的根系形态和生理特性[J]. 作物学报, 2004, 30(11): 1145-1151.
- Li T X, Ma G R. Physiological and morphological characteristics of root in grain *Amaranth* genotypes enrichment in potassium [J]. Acta Agron. Sin., 2004, 30(11): 1145-1151.
- [28] 杨志晓, 张小全, 尚晓颖, 等. 富钾基因型烤烟根系形态和生理特性研究[J]. 西北植物学报, 2009, 29(3): 555-560.
- Yang Z X, Zhang X Q, Shang X Y, *et al.* Morphological and physiological characteristics root in potassium-enriched flue-cured tobacco genotype [J]. Acta Bot. Bor-Occid. Sin., 2009, 29(3): 555-560.
- [29] 周树峰, 兰海, 郑名敏, 等. *AtNHX1* 提高烟草耐盐性的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(19): 10059-10060, 10064.
- Zhou S F, Lan H, Zheng M M, *et al.* Study on improving salt tolerance by transformation of tobacco with *AtNHX1* gene [J]. J. Anhui Agric. Sci., 2010, 38(19): 10059-10060, 10064.
- [30] Cakmak I. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants [J]. Plant Nutr. Soil Sci., 2005, 168(4): 521-530.
- [31] Venema K, Belver A, *et al.* A novel intracellular K^+/H^+ antiporter related to Na^+/H^+ antiporters is important for K^+ ion homeostasis in plants [J]. J. Biol. Chem., 2003, 278(25): 22453-22459.

(责任编辑: 温小杰, 李艳华)