

利用外源钾通道基因改良水稻钾素营养

严蔚东¹ 王校常¹ 何锬洁² 汤利¹ 安志装¹ 田文忠² 施卫明^{1,*} 曹志洪¹

(¹ 中国科学院 南京土壤研究所, 江苏 南京 210008; ² 中国科学院 遗传研究所, 北京 100101; *通讯联系人, E-mail:wmshi@issas.ac.cn)

Improve the Character of Rice Plants Utilizing Potassium by Overexpressed Foreign Potassium Channel Genes

YAN Weidong¹, WANG Xiao-chang¹, HE Sirjie², TANG Li¹, AN Zhi-zhuang¹, TAN Wen-zhong², SHI Weiming^{1,*}, CAO Zhihong¹

(¹ Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; ² Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; *Corresponding author, E-mail:wmshi@issas.ac.cn)

Abstract: The potassium channel genes (*KATI* and *AKTI*) were introduced into the rice (Zhonghua 8, Zhonghua 9, Zhonghua 13 and 8706) by using particle bombardment method. The molecular analysis confirmed the integration and expression of these genes in the transgenic rice plants. The results showed that transgenic plants have the high capacity of accumulating potassium in a pot cultural experiment with two different K levels.

Key words: potassium channel gene; rice; potassium; plant nutrition; gene transfer

摘 要: 通过基因枪导入法, 将外源钾通道基因(*KATI* 和 *AKTI*) 导入水稻中花 8 号、中花 9 号、中花 13 以及 8706 中, 获得了转基因植株, 经分子检测, 证实了钾通道基因在水稻基因组中的整合与表达。盆栽试验表明, 转基因植株在低钾和高钾两种钾水平下其钾的累积能力都有明显提高。

关键词: 钾通道基因; 水稻; 钾素; 植物营养; 转基因

中图分类号: Q 943; Q 945; S188; S511.032

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2002)01-0077-03

据全国化肥试验网长期定位试验资料及中国科学院南京土壤研究所长期的研究工作表明, 目前我国化肥的利用率远低于世界发达国家的水平, 导致农业生产对化肥的需求量逐年增加, 如何提高肥料利用率是我国农业生产中一个急待解决的问题。同时, 土壤中缓效态及难溶性养分储量十分丰富, 以钾为例, 土壤中被植物直接利用的有效态钾仅占土壤全钾的 0.1%~2%, 所以, 如果能提高肥料及土壤非有效态养分的利用率, 其效益将相当可观¹。

水稻是我国重要的粮食作物, 种植面积约占我国整个粮食作物的 40%, 稻谷年产量约 2 亿 t, 占世界稻谷总产量的 40%, 占我国粮食总产量的 50% 左右。而钾是水稻重要的产量和质量因子, 缺钾不仅会影响正常细胞的渗透压平衡引起器官机能的破坏, 影响植物的正常生长, 而且会通过植物激素的调节破坏植物体内的代谢和转运过程, 导致水稻产量和质量的大幅下降。随着我国耕地土壤缺钾面积的不断扩大和缺钾程度的继续加重, 钾素营养已经成为影响我国许多地区水稻产量和质量的主要养分因子之一, 因此, 水稻钾素营养性状的改良具有十分重要的现实意义²。

近年来, 随着土壤学、植物营养学以及分子生物学等众多学科的不断发 展, 人们在寻求通过植物营养途径借助基因工程技术来改良植物品种, 以期在提高肥料利用率和农作物品质改良方面有所突破^{1,3}。我们早期的转基因烟草的研究也是将外源钾通道基因导入烟草中高效表达, 获得了钾高效利用型转基因烟草株系。研究证明外源钾通道基因的导入不

仅可以提高肥料钾和土壤缓效态钾的利用率, 而且可以显著提高烟叶的钾含量, 使烟草产量和品质得到较大幅度的改良⁴。这些研究结果表明, 利用外源基因改良植物的营养遗传特性是可行的。

本研究运用基因枪技术, 将外源钾通道基因导入水稻植株, 并高效表达, 以期获得能较好地利用土壤钾素营养的水稻品种; 同时也为水稻营养遗传改良提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 外源基因

从拟南芥 (*A. thaliana*) 中克隆出来的高亲和钾通道基因(*KATI* 和 *AKTI*), 其 DNA 序列参见施卫明等的文章⁵。所用菌株 *E. coli* 为 DH5 α 。

1.1.2 试剂

实验所用化学试剂和生化试剂购自 Sangon 公司, 所设计的特异性 PCR 检测引物由 Sangon 公司合成, 其序列为:

5'-TGTCGA TCTCTTGGA CTCGA -3';

5'-CAA TCTCA GCGTTGTCCGA -3'。

收稿日期: 2001-02-23; 修改稿收到日期: 2001-05-21。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770437); 中国科学院重点项目(KZ952-S1-221); 中国科学院生物学特别资助项目(STZ-3-09); 国家基础研究重点发展规划项目(G1999011808)。

第一作者简介: 严蔚东(1969-), 男, 助理研究员。

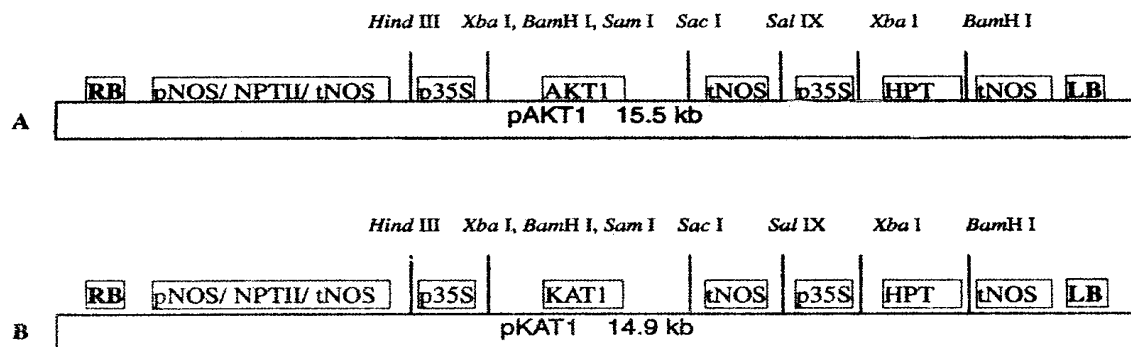


图1 所用基因质粒图

Fig. 1. Map of *AKT1* and *KAT1* gene plasmid.A- *AKT1*; B- *KAT1*.

1.1.3 受体材料

采用4个水稻品种,分别为中花8号、中花9号、中花13和8706。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

包含目的基因的质粒在日本东京大学农学院完成。其结构如图1所示。

1.2.2 质粒DNA的大量制备

对含有目的基因的质粒通过大肠杆菌(DH5 α)感受态细胞的转化,获得大肠杆菌菌株,再通过含有抗生素(50 mg/L Kanamycin)的液体培养基振荡培养,得到大量菌体,经过裂解、抽提等步骤得到较纯的质粒DNA。其他质粒构建、DNA纯化、PCR检测等参见分子克隆实验手册⁶。

1.2.3 基因转导方法

采用基因枪导入法⁷。

1.2.4 转基因株系的筛选

对所获得的转基因水稻株系经过PCR和Southern杂交鉴定后的阳性株系收获种子。用含潮霉素(Hygromycin, 50 mg/L)的NB培养基(N6大量元素+B5微量元素)多代筛选纯合系。

1.2.5 转基因水稻对钾的吸收

选用4个导入*AKT1*基因的转基因水稻株系(其中T-

22和T-30两株系的受体品种为中花8号,T-21和T-23为中花13)。供试土壤为潜育型水稻土,采自中国科学院常熟生态试验站(土壤钾本底值:速效钾138.5 mg/kg,全钾1.901%)。试验设2个钾水平,不施钾与施钾(以单位质量土壤施入的K₂O计,0.15 g/kg)。氮(N)与磷(P₂O₅)分别按0.15 g/kg和0.10 g/kg施入。供试肥料为硫酸钾、尿素和磷酸二铵。供试土壤过1 mm筛,每盆装土1 kg,3次重复,随机排列,常规管理,分蘖期收获分析。

2 结果与讨论

2.1 转基因植株的获得

通过基因枪转化技术,共获得4个品种(中花8号、中花9号、中花13和8706)、两种基因(*KAT1*和*AKT1*)并经过PCR和Southern杂交鉴定的具有潮霉素抗性的转基因水稻植株42个株系(表1)。

部分转基因水稻株系的Southern杂交鉴定结果见图2。

2.2 转基因水稻植株对钾的累积量

由图3可以看出,与未转化对照相比,转基因株系在两种钾水平下对钾的累积量都有不同程度的提高。在未施钾条件下,T-22和T-30植株吸钾量分别比对照中花8号高22.3%和24.3%,T-21和T-23比中花13高16.4%和

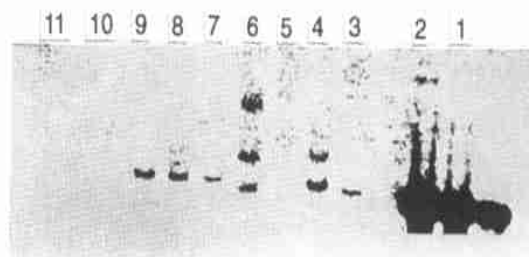


图2 部分转基因水稻Southern杂交结果

Fig. 2. Results of Southern analysis of transgenic rice plants. From right to left, 1- *KAT1*, 1 copy; 2- *KAT1*, 5 copies; 3- *KAT1*, 10 copies; Lane 4- 10, Part of transgenic rice plants; Lane 11, CK.

表1 已获得的鉴定后转基因水稻株系

Table 1. Transgenic rice plants obtained

基因 Gene	水稻品种 Rice variety	转化植株数 Number of transgenic plants
<i>AKT1</i>	中花9号 Zhonghua 9	24
	中花8号 Zhonghua 8	5
	中花13 Zhonghua 13	5
	8706	0
<i>KAT1</i>	中花9号 Zhonghua 9	4
	中花8号 Zhonghua 8	1
	中花13 Zhonghua 13	1
	8706	2

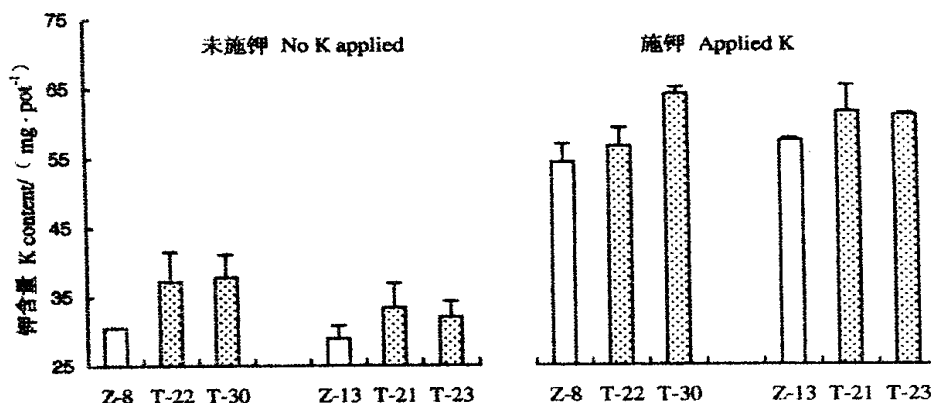


图3 转基因水稻植株钾的累积量(分蘖期)

Fig. 3 K content in transgenic rice plants at tillering stage under low K level and high K level

Z-8- 中花8号; Z-13- 中花13.

Z-8- Zhonghua 8; Z-13- Zhonghua 13.

11.5%。而在施用钾肥条件下, T-22 和 T-30 则分别比对照中花8号高4%和18%, T-21 和 T-23 也比中花13高7%和6.5%。

本试验条件下, 表达 *AKT1* 的转基因水稻在生物量差异不显著的条件, 具有较高的钾累积量, 表明 *AKT1* 基因高效表达后, 转基因水稻吸收利用土壤钾的能力得到明显提高。这与我们先前的转基因烟草研究结果相吻合⁴。

与施肥处理相比, 在未施钾肥条件下转基因水稻的植株对钾的累积量提高幅度更大(与对照相比), 这是由于表达了钾通道基因的植株在低钾胁迫下提高了其对钾的吸收和转运能力以及对一部分土壤缓效钾的利用率提高⁴, 而在施用钾肥的条件下, 介质钾浓度较高, 即使是对照在这样的环境下所吸收的钾也基本可以满足水稻生长的需求, 由于根系对养分的吸收受植物对养分需求量的主动控制⁸, 因此在高钾水平下, 外源钾通道基因对水稻钾素累积的贡献率有所下降。

由于外源基因插入的位点不一导致了不同株系间对钾的累积提高幅度有明显差异, 本研究发现转基因株系 T-30 在低钾和高钾两种条件下对钾的累积量都有较大幅度的提高, 因此它有可能是我们的目标株系, 但其具体的插入位置及其表达和作用机理尚需进一步研究。

总之, 本研究初步证明通过外源钾通道的导入来提高水稻对土壤钾的利用效率是可行的, 但在田间试验中, 不同土壤类型、不同生态环境下是否能取得较好的结果, 转基因水稻在提高养分资源利用率上的贡献率和作用方式等尚需进一步的研究。

参考文献

1 Yan W D (严蔚东), Wang X C (王校常), Tang L (汤利), et

al Application of biotechnology in improvement on fertilizer use efficiency. In: Colloquium of the Fourth National Conference on Agrochemical Service and Development and Use of New Fertilizer (第四届全国农化服务暨新型肥料开发应用交流会论文集).

Chengdu: Shanghai Research Institute of Chemical Industry, Sichuan Academy of Agricultural Sciences (化工部上海化工研究院, 四川省农业科学院), 1999. 55- 58 (in Chinese)

2 Lin X Y (林咸永), He N Z (何念祖), Zhang Y S (章永松), et al Genetic difference of rice varieties on K uptake and utilization and the effect on product and quality. *Soil Science Bulletin* (土壤通报), 1995, 26(Suppl): 49- 52 (in Chinese with English abstract)

3 Cao Z H (曹志洪), Shi W M (施卫明), Zhu Y G (朱永官). Soil biotechnology. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 1994, 31(3): 229- 235. (in Chinese with English abstract)

4 Shi Wein ing, Su Yanhua, Fujiwara T, et al Transfer of potassium channel genes into tobacco. In: Ando T. Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. 195- 196

5 Shi W M (施卫明), Wang X C (王校常), Cao Z H (曹志洪). The research progress in plant potassium channel. *Plant Physiol Can* (植物生理学通讯), 1998, 34(3): 219- 224 (in Chinese)

6 Zheng H H (郑宏红), He S J (何锬洁), Dai S H (戴顺洪), et al Improving transformation efficiency of gene gun in rice. *Chinese J Biotech* (生物工程学报), 1996, 12(Suppl): 111- 115. (in Chinese with English abstract)

7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

8 Yan Weidong, Shi Wein ing, Liao Haiqiu, et al Genotypic difference of plants in K⁺-enrichment capability and the distribution of K in plant rhizosphere. *Pedosphere*, 1997, 7(2): 165- 170