

拟南芥耐低钾突变体筛选标准的优化

沈晓艳¹, 姜翠茹², 王增兰^{*}

(山东师范大学 山东省逆境植物研究重点实验室 山东 济南 250014)

摘要: 为了探讨筛选耐低钾突变体的最优条件, 比较了 5 种琼脂粉(糖)及不同钾浓度的低钾培养基对拟南芥生长的影响。结果表明: 添加 Seakem LE agarose 培养基的钾离子浓度为 $43.07 \mu\text{mol/L}$; 钾离子浓度在 60、80、100、120、 $160 \mu\text{mol/L}$ 时, 拟南芥弯根长度显著或极显著高于在 $40 \mu\text{mol/L}$ 时, 因此, $40 \mu\text{mol/L}$ 左右可作为耐低钾突变体的筛选标准。

关键词: 拟南芥; 耐低钾突变体; 筛选条件; 钾离子

中图分类号: Q945.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)03-0056-03

Optimization of the Method for Screening *Arabidopsis* low- K^+ Tolerant Mutants

SHEN Xiao-yan¹, JIANG Cui-ru², WANG Zeng-lan^{*}

(Shandong Provincial Key Lab of Plant Stress Research, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: In order to find the optimal condition for screening *Arabidopsis* mutants with low K^+ tolerance, the effects of different kinds of agars and different concentrations of K^+ were compared on root growth of *Arabidopsis*. The results showed that Seakem LE agarose containing $43.07 \mu\text{mol/L}$ of K^+ . $40 \mu\text{mol/L}$ K^+ should be the best choice to solidify K^+ -free MS medium for screening low- K^+ tolerant mutant compared with other concentration, such as 60, 80, 100, 120, $160 \mu\text{mol/L}$.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; Low- K^+ tolerant mutant; Screening condition; K^+

钾是对植物生长和发育非常重要的大量元素^[1], 土壤中的钾是植物钾素的主要来源^[2], 目前我国土壤缺钾肥严重, 提高农作物自身的钾营养效率是解决作物生产中钾资源短缺的重要途径之一。拟南芥是十字花科拟南芥属植物, 近年来, 拟南芥以其个体小、生长周期短以及基因组小等特点而成为分子遗传学研究的模式植物^[3], 筛选拟南芥耐低钾突变体, 对于寻找对植物钾营养起重要调节作用的基因, 以及探讨高等植物钾营养的生理、生化和分子生物学调控机制具有重要的意义^[4]。但目前对于钾离子浓度的控制还没有很好的方案。因此, 以拟南芥为试验材料, 研究了几种琼脂粉(糖)钾离子浓度和外加钾离子浓度对其生长的影响, 旨在筛选拟南芥耐低钾突变体的条件。

1 材料和方法

1.1 试验材料

植物材料为 Wassileskija 生态型的拟南芥。基本培养基为 1/2MS 培养基, 筛选培养基为含有不同琼脂粉(糖)的 MS 低钾培养基^[5] 和含不同钾离子浓度的 MS 培养基。

5 种琼脂粉(糖): Agar D、Agar B 为 Bio Basic USA Inc 生产, 普通琼脂粉为北京奥博星生物技术有限责任公司生产, Seakem LE agarose 为瑞士 Lonza E 生产, Invitrogen agarose 为美国 invitrogen 生命技术公司生产。

1.2 种子消毒、播种与培养条件

拟南芥种子先用 75%乙醇消毒 1 min, 再用 1%

收稿日期: 2010-11-18

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2010CM0367)

作者简介: 沈晓艳(1985-), 女, 山东诸城人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物抗逆与分子生物学。E-mail: yuefenzhang@126.com

*通讯作者: 王增兰(1965-), 女, 山东五莲人, 教授, 主要从事植物耐盐分子生物学研究。E-mail: wangzenglan666@yahoo.cn

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

次氯酸钠表面消毒 15 min(期间多次颠倒混匀),再用无菌水冲洗 5~6 遍。播种前种子与 0.15%(m/v)琼脂糖混和,然后用吸管将种子吸出,成行地播种于 1/2 MS 培养基上;将培养皿置于 4℃冰箱春化 2 d,之后转入培养室中光照培养,培养皿垂直放置。待根长至 2 cm 时,将拟南芥幼苗转移至相应的低钾培养基上,倒置培养,观察拟南芥根的弯曲情况。培养室温度(22±2)℃,光照条件:16 h 光照,8 h 黑暗,光强 110 μmol/(m²·s)。

1.3 不同品牌琼脂粉(糖)钾离子含量的测定方法

5 种不同琼脂粉或琼脂糖各称取 0.25 g 放进坩埚中,在马弗炉中首先在 300℃中灰化 2 h,然后再 500℃灰化 10 h,灰分用硝酸溶解,加纯净水定容到 10 mL,用火焰光度计进行钾离子含量的测定。每个样品 3 个重复。

1.4 拟南芥根生长测定方法

将根长 2 cm 的拟南芥幼苗分别转移到含有 5 种琼脂粉(糖)的低钾培养基上,培养基中的钾由琼

脂粉(糖)提供。倒置培养,培养条件同上。10 d 之后观察测定幼苗的弯根长度,比较拟南芥在不同琼脂粉(糖)低钾培养基上的生长情况。每处理 3 个重复,每个重复 16 株拟南芥幼苗。根据上述结果选择合适的琼脂粉(糖)用于配制低钾培养基,外加 KNO₃ 调节钾浓度,分别配成总钾离子浓度为 40、60、80、100、120、140、160、180 μmol/L 的低钾培养基。将根长 2 cm 的拟南芥幼苗从 1/2 MS 培养基转移到含不同钾离子浓度的低钾培养基上,倒置培养,6 d 之后统计幼苗弯根长度。每个浓度处理 3 次重复,每个重复 16 株幼苗。

2 结果与分析

2.1 5 种琼脂粉(糖)的钾离子浓度

由表 1 可以看出,各种琼脂糖(粉)的钾离子浓度差别很大,其中 Agar B 中钾离子浓度最高,Invitrogen agarose 中钾离子浓度最低。

表 1 5 种琼脂粉(糖)的钾离子浓度 μmol/L

项目	Agar B	Agar D	普通琼脂粉	Seakem LE agarose	Invitrogen agarose
K ⁺ 浓度	230.77	105.98	66.77	43.07	4.27

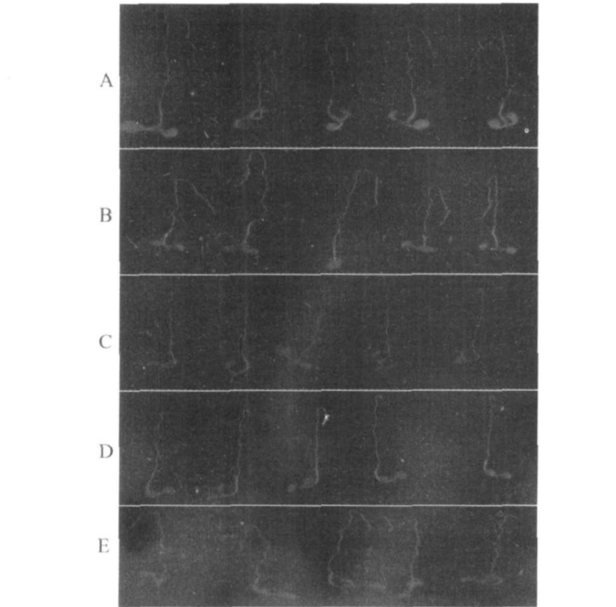
2.2 拟南芥在含有 5 种不同琼脂粉(糖)的低钾培养基上的弯根程度

对拟南芥在 5 种琼脂粉(糖)中生长进行弯根试验。由图 1 可知,在 Seakem LE agarose 和 Invitrogen

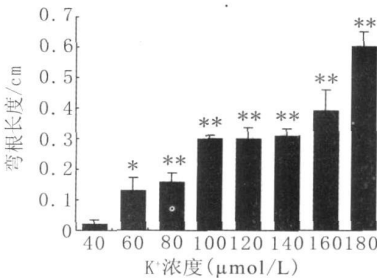
agarose 中,根弯曲度基本不变,而在其他 3 种琼脂粉中,拟南芥根部发生了明显的弯曲。选择 Seakem LE agarose 进行后续试验。

2.3 拟南芥在不同浓度钾离子的低钾培养基上的弯根长度

随着低钾培养基中钾离子浓度的提高,拟南芥根的生长速度加快,根的弯曲程度更加明显。图 2、图 3 显示,拟南芥在低钾培养基上生长 6 d 后,在总钾离子浓度为 40 μmol/L 时根基本不发生弯曲,钾离子含量 60 μmol/L 以上时弯根长度显著或极显著增加。



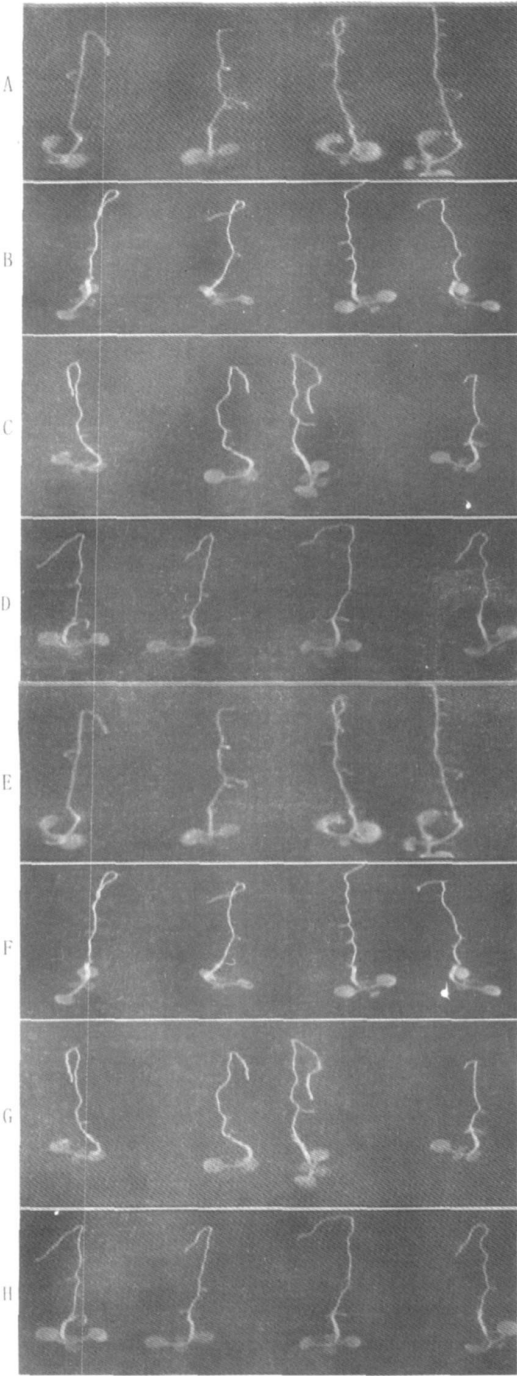
A—E 分别为培养基中加 Agar B、Agar D、Invitrogen agarose、Seakem LE agarose、普通琼脂粉时拟南芥的弯根情况



*和 ** 分别表示各处理与含 40 μmol/L 钾离子的处理相比差异显著(P<0.05)和差异极显著(P<0.01)

图 1 拟南芥在不同琼脂粉(糖)低钾培养基上弯根程度(处理 10 d 后拍照)

图 2 拟南芥在不同浓度钾离子低钾培养基上的弯根长度



A—H. 拟南芥分别在 40、60、80、100、120、140、160、180 $\mu\text{mol/L}$ 的钾离子浓度的低钾培养基上的弯根程度

图 3 拟南芥在不同浓度钾离子的低钾培养基上弯根程度

3 结论与讨论

本研究中发现, Invitrogen agarose 和 Seakem LE agarose 的钾离子含量都比较低, 可显著抑制拟南芥根的生长。但前者价格较贵, 不适合大量筛选应用; 后者价格合适, 适于大量低钾培养基的配制。

钾离子浓度太低会限制拟南芥幼苗正常生长, 在选定 Seakem LE agarose 的条件下, 低钾培养基中不同钾离子浓度可用外加硝酸钾调节。Seakem LE agarose 的本底钾离子浓度为 43.07 $\mu\text{mol/L}$, 在不另外加钾的条件下, 根的生长即受到抑制, 40 $\mu\text{mol/L}$ 可作为耐低钾突变体的筛选浓度。本研究阐述了拟南芥在低钾培养基上的生长条件即适合筛选的钾离子浓度和生长情况, 为耐低钾突变体的筛选提供了有价值的参考。

参考文献:

[1] Xu J, Li H D, Chen L Q, *et al*. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*[J]. Cell, 2006, 125: 1347-1360.

[2] 李皓东. 拟南芥钾营养突变体的筛选和低钾敏感基因 *LKSI* 的功能与分子调控机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.

[3] 李志邈, 张海扩, 曹家树, 等. 拟南芥激活标记突变体库的构建及突变体基因的克隆[J]. 植物生理与分子生物学报, 2005, 31(5): 499-506.

[4] 刘国栋, 刘更令. 论缓解我国钾源短缺问题的新对策[J]. 中国农业科学, 1995, 28(1): 25-32.

[5] Liu J P, Zhu J K. An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance[J]. Plant Biology, 1997, 94: 14960-14964.

[6] 赵佳, 姜春云, 沈晓艳. 拟南芥抗盐突变体筛选中盐浓度的确定[J]. 现代农业科技, 2010(23): 25.

[7] 黄亚丽, 蒋细良, 田云龙, 等. 哈茨木霉厚垣孢子产生突变体的筛选及 T-DNA 标签序列的克隆[J]. 华北农学报, 2009, 24(5): 35-39.