

杨顺瑛, 丛郁, 郝东利, 等. 利用异源酵母功能互补法研究水稻铵转运体 *OsAMT1;1* 功能及调控机制[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 27–31.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.008

# 利用异源酵母功能互补法研究水稻铵转运体 *OsAMT1;1* 功能及调控机制

杨顺瑛<sup>1,2</sup>, 丛郁<sup>1</sup>, 郝东利<sup>1,2</sup>, 苏彦华<sup>1</sup>

(1. 中国科学院南京土壤研究所/土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:**水稻是一种以铵态氮为主要氮素营养的重要粮食作物, 存在至少 12 个铵转运体, 对水稻铵的吸收起着至关重要的作用, 其中, 水稻铵转运体 1;1 (*Oryza sativa* ammonium transporter1;1, *OsAMT1;1*) 是一个在根部和地上部相对组成型表达的基因。通过异源酵母功能互补法研究水稻铵转运体 *OsAMT1;1* 的功能及其调控机制, 结果表明, *OsAMT1;1* 是一个功能型的铵转运体, 和铵的同系物甲基铵 (Methylammonium, MeA<sup>+</sup>) 相比, *OsAMT1;1* 对铵具有相对较高的选择性; *OsAMT1;1* 介导铵的吸收不依赖于外界质子, 转运的底物可能是铵离子; *OsAMT1;1* 介导吸收铵的过程是一个依赖能量的主动运输过程, 对铵的吸收可能不受钙离子参与的磷酸化过程调控。

**关键词:**水稻; 铵转运体 1;1; 酵母功能互补; 调控

**中图分类号:** S511.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0027-04

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 生长在淹水条件下, 以铵为主要氮源<sup>[1]</sup>。铵转运体 (ammonium transporter, AMT) 家族基因编码的铵转运系统, 是水稻铵吸收和代谢的重要途径<sup>[1-2]</sup>。水稻中至少存在 12 个铵转运体基因, 分为两大家族, *OsAMT1;1-1;3* 归属于 AMT1 家族, 其余 9 个基因包括 *OsAMT2;1-2;3*、*OsAMT3;1-3;3*、*OsAMT4*、*OsAMT5;1-5*; 2 归属于 AMT2 家族<sup>[3]</sup>, 其中, 有关水稻铵转运体 1;1 (*Oryza sativa* ammonium transporter1;1, *OsAMT1;1*) 基因的表达规律及超表达转基因水稻的研究取得一定进展。*OsAMT1;1* 在根部和地上部更倾向于组成型表达, 可能负责根部从外界吸收铵<sup>[2]</sup>; 过表达研究表明, *OsAMT1;1* 能够增强铵的吸收和体内的铵含量<sup>[4]</sup>; 和野生型相比, 在铵次优和最优条件下, *OsAMT1;1* 表达水平高于野生型 20 多倍, 铵吸收速率明显高于野生型, 同时, 体内高铵含量也促进氮同化途径基因的表达, 使体内氮同化产物、叶绿素、淀粉、糖类及产量都有较大提高, 暗示 *OsAMT1;1* 有提高氮利用效率、植物生长及粮食产量的潜力<sup>[1]</sup>。然而, 对 *OsAMT1;1* 铵转运蛋白调控机制的研究进展不大。本试验采用酵母功能互补方法, 初步研究不同外界 pH 值、铵的同系物甲基铵 (methylammonium, MeA<sup>+</sup>)、羰基氰化间氯苯腈 (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, CCCP) 及离子钙 (Ca<sup>2+</sup>) 的整合剂乙二醇二乙醚二胺四乙酸 [ethyleneglycol-bis(beta-aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid, EGTA] 等处理条件对 *OsAMT1;1* 的调控机制, 以期为进一步解析 *OsAMT1;1* 在水稻铵代谢中的功能提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验用大肠杆菌菌株为 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , 中国科学院南京土壤研究所实验室保存; 所用表达宿主菌株为酿酒酵母铵转运体缺失突变体 31019b (*mep1* $\Delta$ , *mep2* $\Delta$ ; : *LEU2*, *mep3* $\Delta$ ; : *KanMX2 ura3*), 由德国 Hohenheim 大学 Nico Von Wirén 教授惠赠, 在外界铵作为唯一氮源且浓度低于 5 mmol/L 时, 此菌株不能正常生长<sup>[5]</sup>; 酵母表达载体 pYES2, 购于 Invitrogen 公司; YNB 培养基, 不含硫酸铵和氨基酸 (yeast nitrogen base w/o ammonium sulfate and amino acids), 购于 Difco 公司; D-半乳糖、精氨酸、氯化铵和甲基胺 (methylammonium, MeA<sup>+</sup>), 购于 Sigma 公司; PCR 扩增高保真酶 PrimeSTAR<sup>®</sup>, 购自 TaKaRa 公司; T<sub>4</sub> DNA 连接酶、限制性核酸内切酶 *Kpn* I 和 *Not* I, 购于 New England Biolabs 公司; 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.2 酵母表达载体 *OsAMT1;1*-pYES2 的构建

参照文献[3]中 *OsAMT1;1* ID 号, 从水稻基因组数据库 TIGR (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 检索 *OsAMT1;1* 的 cDNA 序列, 大小为 1 497 bp。设计引物 *OsAMT1;1*-*Kpn* I - P1: 5'-GTCGGTACCATGGCGACGTGCGCGCGGACCTG-3' 和 *OsAMT1;1*-*Not* I - P2: 5'-GTCGCGGCCGCTTACACTTG-GTTGTTGCTGTTGG-3', 以梗稻日本晴 (*Oryza sativa* ssp. Japonica Nipponbare) cDNA 为模板, 扩增 *OsAMT1;1* 基因。扩增条件为: 95℃ 预处理 5 min; 95℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物用 MN (MACH-EREY-NAGEL) 胶回收试剂回收, 利用常规 *rTaq* 酶在无引物 PCR 反应体系中 72℃ 反应 20 min, 将产物的 3' 端加上碱基 A, 然后连接到 pMD18-T vector, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 阳性克隆送北京六合华大基因科技有限公司上海分公司测序。用限制性核酸内切酶 *Kpn* I 和 *Not* I, 分别酶切测序正确的阳性

收稿日期: 2014-04-01

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划 (编号: 91125028)。

作者简介: 杨顺瑛 (1982—), 女, 湖北恩施人, 博士, 主要从事分子植物营养学研究。Tel: (025) 86881553; E-mail: ysy@issas.ac.cn。

通信作者: 苏彦华, 山东济宁人, 博士, 教授、研究员, 从事植物营养与分子生物学研究。E-mail: yhsu@issas.ac.cn。

克隆和酵母表达载体 pYES2, 回收并用  $T_4$  DNA 连接酶连接目的片段和载体大片段, 转化 DH5 $\alpha$ , 筛选鉴定并获得 *OsAMT1*;1-pYES2 阳性克隆。

### 1.3 酵母培养和转化

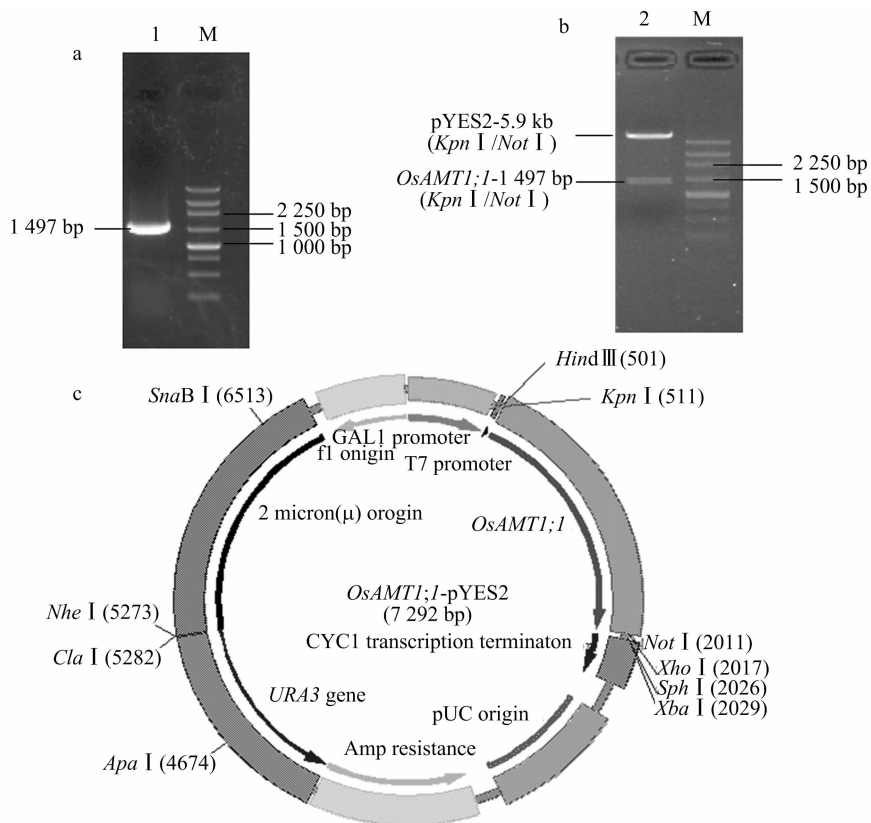
采用电转化仪 Micro Pulser (Bio-Rad 公司), 将 *OsAMT1*;1-pYES2 和空载体 pYES2 分别转入酵母铵转运体缺失突变菌株 31019b 感受态细胞, 电击后加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇, 30 ℃ 度温育 2 h, 于酵母选择性培养基 (0.17% YNB + 2 mmol/L 精氨酸 + 2% D-半乳糖 + 2% 琼脂) 平板上 30 ℃ 黑暗培养 3 d; 挑取单菌落在酵母液体选择培养基中 30 ℃ 振荡培养 36 h, 经 PCR 鉴定为阳性的单菌落即为重组酵母 *OsAMT1*;1-pYES2/31019b。重组酵母菌株在 YNB 液体选择性培养基上培养至  $D_{600\text{ nm}}$  为 1.0, 经 10 倍梯度稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  3 个浓度, 分别取 4 个浓度梯度的菌液 5  $\mu\text{L}$ , 点样于以 2 mmol/L 精氨酸, 或 pH 值为 5.8、不同浓度  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为唯一氮源, 或 2 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为唯一氮源, pH 值分别为 4.8、5.8、6.8 和不同处理试剂 (EGTA,  $\text{MeA}^+$  或 CCCP) 的

固体培养基 (0.17% YNB + 2% D-半乳糖 + 2% 琼脂) 上, 于 30 ℃ 黑暗培养, 观察菌落生长状况并适时拍照。所有处理均以转空载体 pYES2 的 31019b 酵母 pYES2/31019b 为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 *OsAMT1*;1-pYES2 载体构建

以水稻 Nipponbare cDNA 为模板, 以 *OsAMT1*;1-Kpn I-P<sub>1</sub> 和 *OsAMT1*;1-Not I-P<sub>2</sub> 为引物, 进行 PCR 扩增, 获得长度为 1 497 bp 的产物 (图 1-a); 纯化并连接 pMD18-T 载体, 经转化、筛选和测序获得阳性克隆 *OsAMT1*;1-pMD18-T; 用 Kpn I 和 Not I 分别酶切质粒 *OsAMT1*;1-pMD18-T 和 pYES2, 胶回收获得线性目的片段 *OsAMT1*;1 和 pYES2 载体大片段, 用  $T_4$  DNA 连接酶连接目的片段和载体大片段, 16 h 后经转化筛选鉴定, 获得阳性质粒 *OsAMT1*;1-pYES2, 其酶切验证图谱见图 1-b, *OsAMT1*;1-pYES2 质粒构成见图 1-c。将获得的阳性质粒电转化至 31019b 酵母感受态细胞, 获得阳性重组菌株用于本研究。



a. *OsAMT1*;1 PCR 产物扩增图谱; b. *OsAMT1*;1-pYES2 质粒酶切图谱; c. *OsAMT1*;1-pYES2 质粒构成图。1—*OsAMT1*;1 PCR 产物; 2—*OsAMT1*;1-pYES2 质粒酶切 (Kpn I/Not I); M—250 bp DNA ladder marker

图1 *OsAMT1*;1 ORF 全长扩增及 *OsAMT1*;1-pYES2 质粒构建

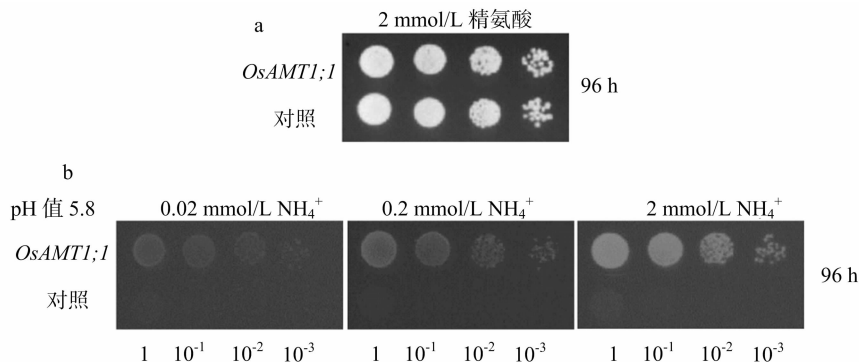
### 2.2 *OsAMT1*;1 的酵母功能互补结果

试验结果表明, 在以 2 mmol/L 精氨酸为唯一氮源的固体培养基 (0.17% YNB + 2% D-半乳糖 + 2 mmol/L 精氨酸 + 2% 琼脂) 上, 转化了 *OsAMT1*;1-pYES2 和空载体 pYES2 的菌株都能正常生长 (图 2-a); 在以 0.02、0.2、2 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为唯一氮源的培养基 (0.17% YNB + 2% D-半乳糖 + 不同浓度的铵 + 2% 琼脂) 上, 转化空载体的酵母 pYES2/

31019b 不能正常生长, 而转化了 *OsAMT1*;1-pYES2 的重组酵母能够正常生长 (图 2-b), 并随铵浓度不断升高, 重组酵母 *OsAMT1*;1-pYES2/31019b 生长得越好。这说明 *OsAMT1*;1 具有吸收铵的功能, 能够介导铵的吸收。

### 2.3 甲基铵对 *OsAMT1*;1 吸收铵功能的影响

甲基铵是铵的有机同系物, 通常作为铵的竞争吸收底物而用于研究铵转运体的功能<sup>[6-7]</sup>。由图3可见, 在 0.17%



a. 重组菌株 *OsAMT1;1*-pYES2/31019b 在 2 mmol/L 精氨酸为唯一氮源的固体培养基上的生长情况;  
b. 重组菌株 *OsAMT1;1*-pYES2/31019b 在不同浓度铵为唯一氮源的固体培养基上的生长情况

图2 *OsAMT1;1* 的酵母功能互补结果

YNB、2% *D*-半乳糖和 25 mmol/L  $\text{MeA}^+$  固体培养基上培养 48 h 或 96 h, 转化了 *OsAMT1;1* 的酵母菌株能够生长, 而对照菌株生长极其微弱, 甚至观察不到生长迹象, 这表明 *OsAMT1;1* 能够吸收甲基铵, 并以其为氮源促进 31019b 的生长; 在 0.17% YNB、2% *D*-半乳糖和 100 mmol/L  $\text{MeA}^+$  固体培养基条件下, 转化了 *OsAMT1;1* 的酵母菌株可能吸收过多的甲

基铵而致死; 在铵和甲基铵共存时 (0.17% YNB、2% *D*-半乳糖和 2 mmol/L  $\text{NH}_4^+$  添加 25 mmol/L 或 100 mmol/L  $\text{MeA}^+$ ), 转化了 *OsAMT1;1* 的酵母菌株生长恢复正常, 这些均表明 *OsAMT1;1* 也能够介导吸收甲基铵, 在铵和甲基铵共存时, *OsAMT1;1* 会优先吸收铵, 对铵具有较高选择性。

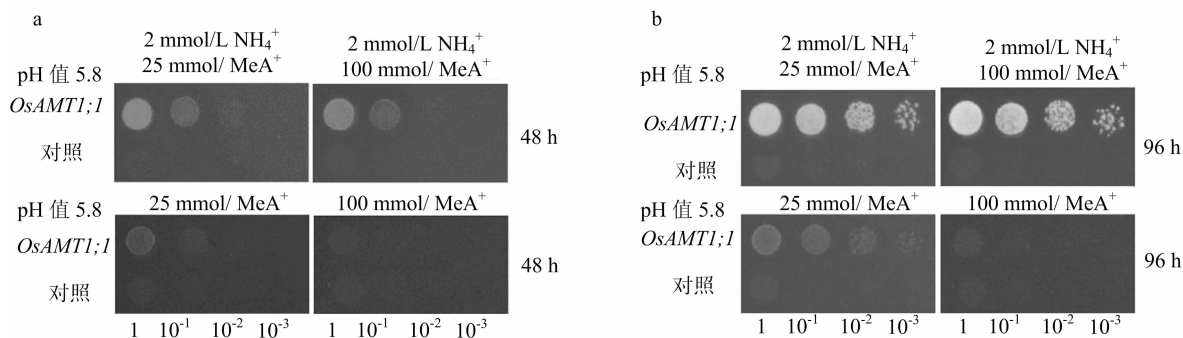


图3 甲基铵对重组酵母 *OsAMT1;1*-pYES2/31019b 生长的影响

## 2.4 外界 pH 值对 *OsAMT1;1* 功能的影响

在 2 mmol/L  $\text{NH}_4^+$  作为唯一氮源、pH 值分别为 4.8、5.8、6.8 的固体培养基 (0.17% YNB + 2% *D*-半乳糖 + 2 mmol/L 铵 + 2% 琼脂) 上, 转化空载体的酵母 pYES2/31019b 不能正

常生长, 重组酵母 *OsAMT1;1*-pYES2/31019b 生长良好 (图 4)。这说明 *OsAMT1;1* 转运铵的能力可能与外界质子无关, 对铵的吸收可能不受外界质子的调控, 并且 *OsAMT1;1* 转运体蛋白转运铵的底物是离子态铵。

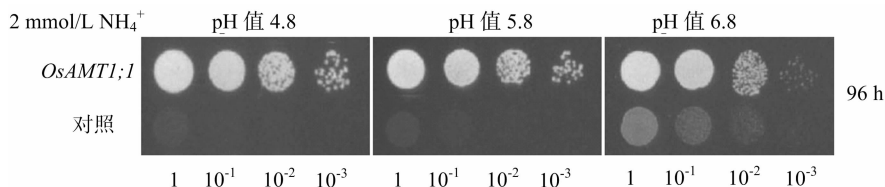


图4 重组酵母 *OsAMT1;1*-pYES2/31019b 对外界 pH 值的依赖特征

## 2.5 CCCP 对 *OsAMT1;1* 功能的影响

羧基氧化间氯苯胺 (CCCP) 是一种解偶联剂<sup>[8]</sup>, 最早用于研究线粒体和叶绿体的氧化磷酸化解偶联过程<sup>[9]</sup>。在含 0.17% YNB、2% *D*-半乳糖和 2 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  固体培养基中添加 100  $\mu\text{mol/L}$  CCCP 时, 转化了 *OsAMT1;1* 的酵母和对照菌株几乎都观察不到生长迹象 (图 5), CCCP 强烈抑制 *OsAMT1;1* 对铵的吸收, *OsAMT1;1* 的吸铵过程可能是一个依赖能量的主动运输过程。

## 2.6 EGTA 对 *OsAMT1;1* 功能的影响

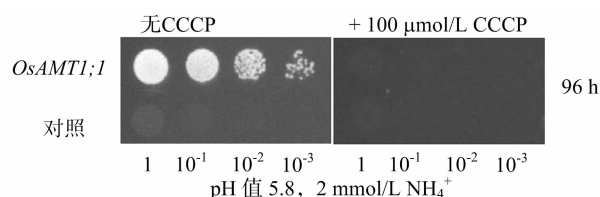


图5 CCCP 对重组酵母 *OsAMT1;1*-pYES2/31019b 生长的影响

乙二醇二乙醚二胺四乙酸 (EGTA) 是一种钙离子螯合剂, 在含 0.17% YNB、2% *D*-半乳糖和 2 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  固

体培养基中添加 1 mmol/L EGTA 时培养 48、96 h, 重组酵母 *OsAMT1;1* - pYES2/31019b 能够正常生长, 和未添加 EGTA 的 YNB 培养基上几乎没有差别(图 6), *OsAMT1;1* 对铵的吸收可能不受  $\text{Ca}^{2+}$  参与的磷酸化过程调控。

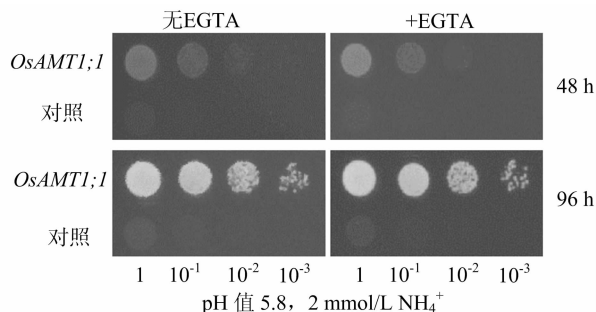


图6 EGTA对重组酵母 *OsAMT1;1*-pYES2/31019b 生长的影响

### 3 结论与讨论

植物从土壤环境中吸收铵主要由高亲和与低亲和的转运系统介导,在铵浓度大于 1 mmol/L 时,一般认为,主要通过离子通道调控铵的内流<sup>[10-12]</sup>;当外界铵浓度小于 1 mmol/L 时,主要是通过高亲和铵转运系统介导铵的吸收<sup>[13-14]</sup>。在通气良好的农业土壤中,硝酸盐是主要的无机氮形式,植物吸收的硝酸大于铵,相反,在通气不良的农业土壤尤其是水田,铵是主要的无机氮形式。水稻是一种喜铵和耐铵的作物<sup>[15-16]</sup>,在整个生育期几乎全部以铵态氮为营养<sup>[2]</sup>。*OsAMT1;1* 能够介导铵的吸收,是一个功能型的铵转运体,在外界铵为唯一氮源的情况下,能够互补铵转运体缺失突变体酵母菌株 31019b 的生长<sup>[2]</sup>,并随外界铵浓度的升高,重组菌株 *OsAMT1;1* - pYES2/31019b 的生长越好。在外界铵浓度变化的情况下,*OsAMT1;1* 对铵的吸收起着非常重要的作用。

长期以来,植物 AMT 吸收转运铵是以分子态  $\text{NH}_3$  还是离子态铵一直是研究者们关注的焦点。在外界不同 pH 值条件下,重组菌株 *OsAMT1;1* - pYES2/31019b 的生长状况几乎没有差别,*OsAMT1;1* 转运体蛋白对铵的吸收不受外界质子的调控,转运的底物是铵离子而非分子态  $\text{NH}_3$ ,和 *PcAMT1* - 1 类似<sup>[17]</sup>,可能都是不受外界质子调控的铵转运体。电生理手段证明,当外界 pH 从酸性值变化为碱性时,铵转运体介导的电流大小和方向几乎没有改变,这与拟南芥 *AtAMT1;1*、番茄 *LeAMT1;1* 转运铵不依赖于外界质子的转运机制结论<sup>[13,18]</sup>吻合。对于 *OsAMT1;1* 的详尽转运机制,需要进一步用电生理手段完善。

高亲和的转运系统介导铵的内流通常依赖于代谢能量,解偶联剂 CCCP 能够使高亲和转运系统介导铵的内流下降 81% ~ 87%<sup>[19]</sup>。在铵作为唯一氮源的 YNB 选择性培养基中添加 100  $\mu\text{mol/L}$  CCCP,几乎观察不到重组菌 *OsAMT1;1* - pYES2/31019b 的生长,*OsAMT1;1* 对铵的吸收转运是一个依赖能量的主动运输过程。

钙是植物生长发育的一种重要信号转导分子,植物体内 CBL( Calcineurin B - like Protein) 被钙离子活化后,能激活 CIPK(CBL - Interacting Protein Kinase) 基因蛋白来影响植物的生长发育及响应逆境胁迫信号<sup>[20-21]</sup>。拟南芥钾转运体 AKT1 的转运活性受 CIPK23 磷酸化调控,CIPK23 受上游

CBL1 和 CBL9 激活,从而增强植物在外界低钾条件下对钾素的吸收<sup>[20]</sup>。本研究初步探索钙对 *OsAMT1;1* 的调控特征,*OsAMT1;1* - pYES2/31019b 在施加钙的螯合剂 EGTA 1 mmol/L 的固体培养基上生长 48、96 h,与未加 EGTA 的生长几乎没有差别,*OsAMT1;1* 对铵的吸收转运可能不受钙信号参与的磷酸化过程调控,其调控机制尚需进一步深入研究。

甲基铵是铵的有机同系物,通常作为铵的吸收底物或竞争吸收底物研究铵转运体的功能特征<sup>[6-7,13]</sup>,人红血细胞中的铵转运体同族体 RHCG 能够介导甲基铵的电中性转运,对甲基铵的吸收速率随外界 pH 值增加而增加<sup>[7]</sup>。本研究中,当以 25 mmol/L 甲基铵为唯一氮源时,重组菌 *OsAMT1;1* - pYES2/31019b 能够生长,而对照菌株 pYES2/31019b 不能生长,这表明 *OsAMT1;1* 能够介导甲基铵的吸收;当外界甲基铵浓度为 100 mmol/L 时,重组菌 *OsAMT1;1* - pYES2/31019b 几乎没有生长,可能是吸收甲基铵过量而致死。当在 25 mmol/L 或 100 mmol/L 甲基铵条件下补充 2 mmol/L  $\text{NH}_4^+$  时,重组菌 *OsAMT1;1* - pYES2/31019b 的生长恢复正常,表明在铵和甲基铵共存的条件下,*OsAMT1;1* 会优先、更多地吸收转运铵,对铵具有较高的选择性,这也表明 *OsAMT1;1* 在对水稻铵营养吸收方面具有至关重要的作用。

### 参考文献:

- [1] Ranathunge K, El - kereamy A, Gidda S, et al. *AMT1;1* transgenic rice plants with enhanced  $\text{NH}_4^+$  permeability show superior growth and higher yield under optimal and suboptimal  $\text{NH}_4^+$  conditions[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(4): 965 - 979.
- [2] Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, et al. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1* - 1;3) in rice[J]. Plant & Cell Physiology, 2003, 44(7): 726 - 734.
- [3] Li B Z, Merrick M, Li S M, et al. Molecular basis and regulation of ammonium transporter in rice[J]. Rice Science, 2009, 16(4): 314 - 322.
- [4] Hoque M S, Masle J, Udvardi M K, et al. Over - expression of the rice *OsAMT1 - 1* gene increases ammonium uptake and content, but impairs growth and development of plants under high ammonium nutrition[J]. Functional Plant Biology, 2006, 33(2): 153 - 163.
- [5] Marini A M, Said S B, Vissers S, et al. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular and Cellular Biology, 1997, 17(8): 4282 - 4293.
- [6] Ninnemann O, Jauniaux J C, Frommer W B. Identification of a high affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter from plants[J]. The EMBO Journal, 1994, 13(15): 3464 - 3471.
- [7] Mayer M, Schaaf G, Mouro I, et al. Different transport mechanisms in plant and human AMTRh - type ammonium transporters[J]. Journal of General Physiology, 2006, 127(2): 133 - 144.
- [8] Kasianowicz J, Benz R, McLaughlin S. The kinetic mechanism by which CCCP(carbonyl cyanide m - chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes[J]. Journal of Membrane Biology, 1984, 82(2): 179 - 190.
- [9] Heytler P G. Uncoupling of oxidative phosphorylation by carbonyl cyanide phenylhydrazones: some characteristics of ns - Cl - CCP action on mitochondria and chloroplasts[J]. Biochemistry, 1962, 803: 357 - 361.

石开明,方响亮. 贡水白柚组织培养快速繁殖技术[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):31-33.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.009

# 贡水白柚组织培养快速繁殖技术

石开明<sup>1</sup>,方响亮<sup>2</sup>

(1. 湖北民族学院林学院园艺学院,湖北恩施 445000; 2. 湖北民族学院生物科学与技术学院,湖北恩施 445000)

**摘要:**为了探明贡水白柚组织培养快速繁殖高效系统的培养基类型和培养基配方,以沙田柚、蜜柚、红心柚、玉环柚 4 个品种为材料,研究柚组织培养过程中的关键技术。以 4 种柚成年嫁接树梢尖、带芽茎段为外植体,研究柚组织培养各环节的主要影响调控因子,建立有效贡水白柚组织培养快速繁殖体系。结果表明,柚种子发苗的最佳方案是成熟种子在半固体 1/2MS 培养基萌发后,再转至固体 MS 培养基上培养为宜;在激素配比中,最适合贡水白柚幼嫩茎段的 6-BA 浓度为 0.5mg/L, NAA 浓度以 0.2mg/L 为佳;不同外植体的培养诱导率表明,用春梢嫩茎段进行组织培养时出芽率高,生长迅速。

**关键词:**柚;组织培养;快速繁殖

**中图分类号:** S666.304+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0031-03

柚子是芸香科植物柚的成熟果实,柚果实清香、酸甜、凉润,营养丰富,药用价值很高,是人们喜食的名贵水果之一。柚果实是柑橘类果实中生长周期最长的品种,采摘期避开了柑果上市“洪峰”,加上柚果大而皮厚,非常适合贮藏,生产上辅以适当保鲜条件和贮藏调控库的特殊处理,便可周年供应,风味不减,成为柑果类中的“天然罐头”。

目前,国内柚苗木繁殖技术还相对落后,各种保护技术措

施不能得到落实,田间繁殖的柚苗木携带有很多病毒和病原体,在推广过程中容易造成病原传播,往往使得柚株生长不良,树势衰弱,产量减少,品质退化,给柚类生产带来严重影响。植物组织培养技术可以克服传统苗木繁殖方法易带毒的不足,同时能获得基因型统一、表型优良的一致性群体,应用植物组织培养技术对良种柚的苗木进行快速繁殖具有重要的意义。柑橘类组织培养快速繁殖研究,目前以甜橙和宽皮柑橘较多,关于柚的报道较少,一般也都是使用由种子萌发而产生的试管实生苗,并不能解决脱毒问题。在已有的试管苗的组培微繁殖研究中,涉及到有关不同外植体、上下胚轴、子叶和根尖等不同部位对芽苗分化的影响。目前,我国在研究柚类组培方面的试验材料已有沙田柚、砧板柚、文旦柚、下河蜜柚、酸柚<sup>[1-5]</sup>等。通过实生繁殖要克服种子发芽的困难,嫁接无性繁殖用工成本高,不能适应良种柚苗木的快速大量推广和

收稿日期:2014-04-03

基金项目:湖北省教育厅项目(编号:Q20122902)。

作者简介:石开明(1980—),男,湖北大冶人,博士,讲师,主要从事林学院园艺植物遗传育种研究。E-mail:skm331@163.com。

通信作者:方响亮,硕士,实验师,主要从事野生动植物保护与利用研究。E-mail:94486529@qq.com。

- [10] Schachtman D P, Schroeder J I, Lucas W J, et al. Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis KATI* cDNA [J]. Science, 1992, 258 (5088): 1654-1658.
- [11] Loqué D, Ludewig U, Yuan L, et al. Tonoplast intrinsic proteins *AtTIP2;1* and *AtTIP2;3* facilitate  $\text{NH}_3$  transport into the vacuole [J]. Plant Physiology, 2005, 137 (2): 671-680.
- [12] Szczerba M W, Britto D T, Ali S A, et al.  $\text{NH}_4^+$ -stimulated and -inhibited components of  $\text{K}^+$  transport in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59 (12): 3415-3423.
- [13] Ludewig U, von Wirén N, Frommer W B. Unipolar transport of  $\text{NH}_4^+$  by the root hair plasma membrane ammonium transporter *LeAMT1;1* [J]. Journal of Biochemistry, 2002, 277 (16): 13548-13555.
- [14] D'apuzzo E, Rogato A, Simon-Rosin U, et al. Characterization of three functional high-affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation spatial expression [J]. Plant Physiology, 2004, 134 (4): 1763-1774.
- [15] Sasakawa H, Yamamoto Y. Comparison of the uptake of nitrate and ammonium by rice seedlings [J]. Plant Physiology, 1978, 62 (4): 665-669.

- [16] Kronzucker H J, Britto D T, Davenport R J, et al. Ammonium toxicity and the real cost of transport [J]. Trends in Plant Science, 2001, 6 (8): 335-337.
- [17] 丛郁, 杨顺瑛, 金曼, 等. 豆梨铵转运蛋白基因 *PcAMT1-1* 和 *PcAMT1-2* 的克隆与功能鉴定 [J]. 园艺学报, 2013, 40 (11): 2115-2126.
- [18] Loqué D, Mora S I, Andrade S L, et al. Pore mutations in ammonium transporter AMT1 with increased electrogenic ammonium transport activity [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284 (37): 24988-24995.
- [19] Wang M Y, Siddiqi M Y, Ruth T J, et al. Ammonium uptake by rice roots II. kinetics of  $\text{NH}_4^+$  influx across the plasmalemma [J]. Plant Physiology, 1993, 103 (4): 1259-1267.
- [20] Xu J, Li H D, Chen L Q, et al. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates  $\text{K}^+$  transporter AKT1 in *Arabidopsis* [J]. Cell, 2006, 125 (7): 1347-1360.
- [21] 张和臣, 叶楚玉, 夏新莉, 等. 逆境条件下植物 CBL-CIPK 信号途径转导的分子机制 [J]. 分子植物育种, 2009, 7 (1): 143-148.