

## 技术与方法 Techniques and Methods

## 烟草幼苗期耐低钾突变体的筛选及验证

徐丽娟<sup>1</sup>, 王倩<sup>2</sup>, 郑春花<sup>1</sup>, 隋炯明<sup>1</sup>, 刘光亮<sup>1</sup>, 刘贯山<sup>2,\*</sup><sup>1</sup>青岛农业大学生命科学院, 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛266109; <sup>2</sup>中国农业科学院烟草研究所, 山东青岛266101

**摘要:** 为了探讨筛选烟草耐低钾突变体的最优条件, 以烟草野生型品种‘中烟100’为材料, 研究了不同钾离子浓度对其根生长的影响, 确定了在培养基中筛选耐低钾突变体的适宜钾离子浓度为 $0.075 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。然后以EMS诱变处理获得的‘中烟100’ $M_2$ 代种子为材料, 进行了大规模的耐低钾突变体的筛选, 初步筛选出了99个 $M_2$ 代候选材料。选取50个材料继续进行了验证, 其中22个 $M_3$ 代突变体经复选鉴定弯根率 $\geq 75\%$ , 这些突变体在低钾培养基上长势明显好于对照, 且绝大多数突变体的单位鲜重叶片的钾含量明显高于对照。研究结果可为烟草耐低钾突变体的筛选提供依据。

**关键词:** 烟草; EMS诱变; 耐低钾突变体; 弯根; 筛选

## Screening and Identification of Low $K^+$ Tolerant Mutants at the Seedling Stage of *Nicotiana tabacum*

XU Li-Juan<sup>1</sup>, WANG Qian<sup>2</sup>, ZHENG Chun-Hua<sup>1</sup>, SUI Jiong-Ming<sup>1</sup>, LIU Guang-Liang<sup>1</sup>, LIU Guan-Shan<sup>2,\*</sup><sup>1</sup>College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong, Qingdao, Shandong 266109, China; <sup>2</sup>Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao, Shandong 266101, China

**Abstract:** In order to determine the optimal condition for screening of  $K^+$  tolerant mutants, a wild type variety, *Nicotiana tabacum* cultivar ‘Zhongyan 100’ was selected to analyze the effect of different concentrations of  $K^+$  on the growth of roots in this experiment and the optimal  $K^+$  concentration for screening of  $K^+$  tolerant mutants was considered to be  $0.075 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Then,  $M_2$ -generation mutagenic seeds of ‘Zhongyan 100’ treated by EMS were selected for screening of  $K^+$  tolerant mutants. Finally, 99  $M_2$ -generation candidate individuals were obtained. We selected 50 individuals to further examine their tolerance to low  $K^+$ . The results showed that 22 of 50 individuals were obtained with a higher root-bending rate ( $\geq 75\%$ ) and their growth vigor and  $K^+$  content of fresh weight per gramme was obviously better than that of the mutagenic parent, ‘Zhongyan 100’ in low  $K^+$  medium. This study can provide basis for screening of low  $K^+$  tolerant mutants in *N. tabacum*.

**Key words:** *Nicotiana tabacum*; EMS mutagenesis; low  $K^+$  tolerant mutant; root-bending; screening

烟草叶片含钾量是评价烟叶品质的重要指标之一(刘华山等2006; Marchand等1997), 钾能影响烟叶中糖类、色素类、芳香类等物质合成和积累, 并与烤烟的香气质、香气量、燃烧性和阴燃持火力等因素有着密切的关系(李佛琳等1999)。我国烟叶钾含量普遍偏低, 特别是北方烟区, 与其他主要产烟国相比存在很大的差距(曹志洪1991)。土壤中的钾是植物钾素的主要来源, 目前我国土壤缺钾严重, 钾资源相对稀缺, 严重限制了烟草产量和品质的提高(鲁如坤1989)。因此, 选育耐低钾型烤烟将是解决这一问题的关键途径之一(杨帆等2012)。

本研究建立了一种高效、简便的耐低钾突变

体的筛选和验证体系, 并获得了一些耐低钾烟草突变体, 这对于解决土壤中钾元素缺乏, 提高烟叶品质以及 $K^+$ 通道基因的克隆和钾营养的生理、生化和分子生物学机理研究具有重要的意义。

## 材料与方法

### 1 材料

试验所用材料烟草(*Nicotiana tabacum* L.) ‘中

收稿 2015-04-13 修定 2015-04-30

资助 中国烟草总公司项目(110201201004JY-04和11020130-1005JY-05)。

\* 通讯作者(E-mail: liuguanshan2002@163.com; Tel: 0532-88703168)。

烟100'及其EMS诱变后的M<sub>2</sub>代种子来自中国农业科学院烟草研究所。

## 2 方法

### 2.1 琼脂粉本底钾的测定

将实验所用琼脂粉称取0.5 g放进坩埚中,在马弗炉中250 °C炭化2 h,然后再525 °C灰化10 h,冷却后灰分用1:1的硝酸溶解,加水定容,用火焰光度计进行钾离子含量的测定,重复测定3次。

### 2.2 K<sup>+</sup>梯度培养基的配制

以正常MS培养基为基础,去除KNO<sub>3</sub>以NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>替换,去除KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,以等浓度NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>替换。实验设置12个处理,外加钾离子浓度分别为0、0.025、0.050、0.075、0.100、0.250、0.500、1.000、2.500、5.000、10.000、20.000 mmol·L<sup>-1</sup>,以硝酸钾调节K<sup>+</sup>浓度(外加K<sup>+</sup>浓度20 mmol·L<sup>-1</sup>相当于MS培养基),灭菌后分装到培养皿中待用。

### 2.3 烟草种子消毒和播种

将烟草种子用70%乙醇浸泡30 s,再用10%双氧水溶液处理10 min,期间不停颠倒摇匀,然后用无菌水冲洗3~5次,点播在1/2MS培养基上垂直培养,每皿接种30粒种子。培养条件为温度25 °C,光照强度40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照时间12 h·d<sup>-1</sup>。

### 2.4 烟草耐低钾突变体筛选指标的确定

烟草幼苗在钾浓度较高的培养基中,主根生长速度较快,伸长较明显,叶片呈现正常的绿色;随着培养基中钾浓度的降低,烟草幼苗主根生长速度减慢,底叶叶缘变黄。相对于主根伸长这一现象,底叶叶缘变黄出现较晚。因此,选择幼苗的主根伸长作为筛选指标。

### 2.5 烟草耐低钾突变体筛选压(临界钾浓度)的确定

将在1/2MS培养基上垂直培养的'中烟100'野生型幼苗,待根长长到1 cm左右时(约10 d)转接到钾离子浓度梯度培养基上,动作应轻柔,避免伤根断根。每处理3皿,每皿15~20株,3次重复,置于培养架上倒置培养。利用根的向地生长性,根生长时会向下弯曲。10 d后观察测量弯根长度,根据烟草幼苗主根生长被抑制时(平均弯根长度小于0.5 mm,见实验结果图1)的最高钾含量确定钾离子的临界浓度。

### 2.6 烟草M<sub>2</sub>代耐低钾突变体的初步筛选

在1/2MS培养基上垂直培养的EMS诱变后的烟草M<sub>2</sub>代幼苗,待根长1 cm左右时(约10 d)转接到

外源添加0.075 mmol·L<sup>-1</sup>钾离子的低钾MS培养基上,置于培养架上倒置培养,10 d后测量弯根长度,选择弯根长度大于5 mm的植株为可能的耐低钾突变体。

### 2.7 烟草M<sub>3</sub>代耐低钾突变体的验证

将在培养基上筛选出的M<sub>2</sub>代耐低钾突变体的后代(M<sub>3</sub>代)在外源添加0.075 mmol·L<sup>-1</sup>钾离子的MS培养基上进行重复筛选,选择在该浓度下弯根长度大于5 mm,弯根率≥75%的材料为中选耐低钾突变体。

### 2.8 叶片钾离子含量的测定

将重复筛选出的耐低钾突变体在外源添加0.075 mmol·L<sup>-1</sup>钾离子的低钾培养基、以及MS培养基上培养1个月后,观察其生长情况,取3株叶片进行称重,用湿法消解,用电感耦合等离子体发射光谱仪测定钾离子含量(杨远等2013)。

将上述筛选出的耐低钾突变体移栽到田间。田间管理:基底肥施硫酸钾22.5~30.0 g·m<sup>-2</sup>,后期追肥硝酸钾7.5 g·m<sup>-2</sup>。在成熟期,取3株突变体,每株取1叶,去除主叶脉,自然风干,混合后用火焰光度计测定钾离子含量。

植物全钾的计算公式如下:  $\omega(K) = \rho(K) \times V \times D \times 10^{-4} / m$ ; 式中,  $\omega(K)$ : 植物钾的质量分数, %;  $\rho(K)$ : 从校准曲线或回归方程求得的测读液中K的浓度, mg·L<sup>-1</sup>; V: 显色液体积, mL; D: 消煮液定容体积/吸取测定的消煮液体积; m: 称样量, g。

## 实验结果

### 1 临界钾离子浓度的确定

烟草幼苗冠部的生长受环境钾浓度变化的影响较小,而根部生长对环境钾浓度的变化比较敏感。野生型烟草幼苗在1/2MS培养基上垂直培养约10 d后,分别转移到钾离子梯度培养基上(在无外源施加钾的培养基中,钾的本底含量为0.05 mmol·L<sup>-1</sup>)。通过测量幼苗弯根长度发现:在培养基外加钾离子浓度小于或等于0.075 mmol·L<sup>-1</sup>时,野生型幼苗根的生长受到严重抑制,弯根长度几乎都小于5 mm。随着培养基中钾离子浓度的提高,野生型烟草幼苗根的生长速度加快,根的弯曲程度更加明显。因此选取外源施加0.075 mmol·L<sup>-1</sup>的钾离子作为钾的临界浓度,在该钾离子浓度下以幼苗弯根长度5 mm作为耐低钾突变体的筛选临界值(图1)。

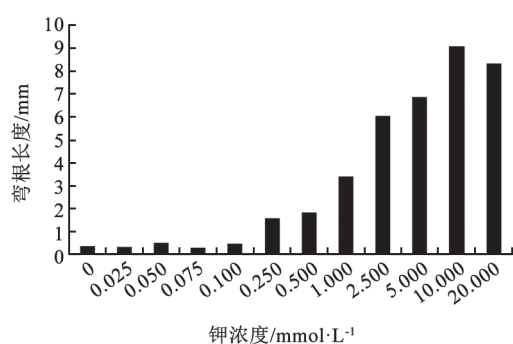


图1 烟草幼苗在K<sup>+</sup>梯度培养基上的弯根根长情况  
Fig.1 Root-bending analysis of wild type seedlings of tobacco in various K<sup>+</sup> media

## 2 烟草耐低钾突变体的筛选及验证

将‘中烟100’ M<sub>2</sub>代突变体种子和野生型种子(对照)灭菌,单粒点播到1/2MS培养基上,垂直培养至根长1 cm左右时,将其分别转接到外加钾离子浓度为0.075 mmol·L<sup>-1</sup>的低钾培养基上,倒置培养10 d后测量弯根长度。选择弯根长度大于5 mm的植株为可能的耐低钾突变体。本实验已对2 000份烟草M<sub>2</sub>代突变体进行筛选,每份材料选择弯根长度最长的3株幼苗进行测量,共筛选出99个材料,平均弯根长度在5 mm以上,明显长于对照(平均弯根长度为0.3 mm)(图2)。之后将这99个烟草突变体

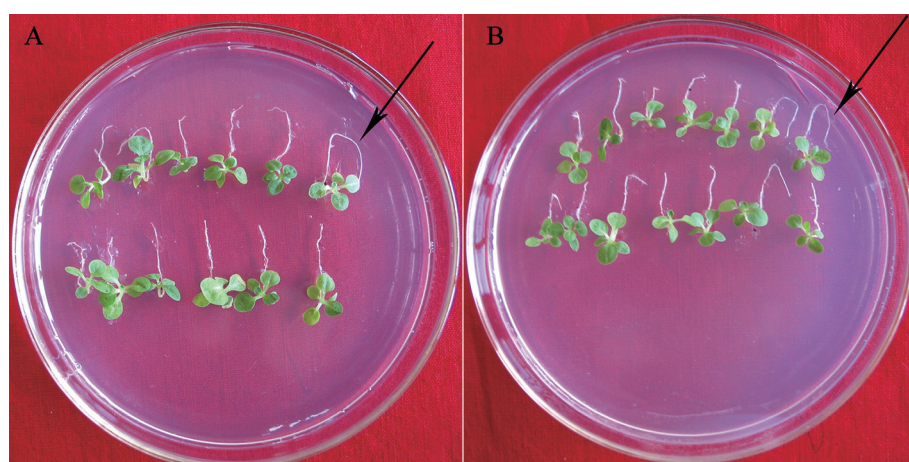


图2 M<sub>2</sub>代耐低钾突变体的筛选  
Fig.2 Screening of M<sub>2</sub>-generation low K<sup>+</sup> tolerant mutants  
A: 16号突变体; B: 568号突变体; 箭头示弯根明显的突变体。

每份选择弯根较长的幼苗转移至MS培养基中缓苗培养,进行驯化移栽,获得M<sub>3</sub>代种子。

随机选取50个M<sub>3</sub>代种子,在外加0.075 mmol·L<sup>-1</sup>钾离子的低钾培养基上进行复选,倒置培养10 d后,弯根长度大于5 mm,弯根率在75%及以上的材料有22个(图3、表1)。

### 3 M<sub>3</sub>代突变体的生长情况和钾含量测定

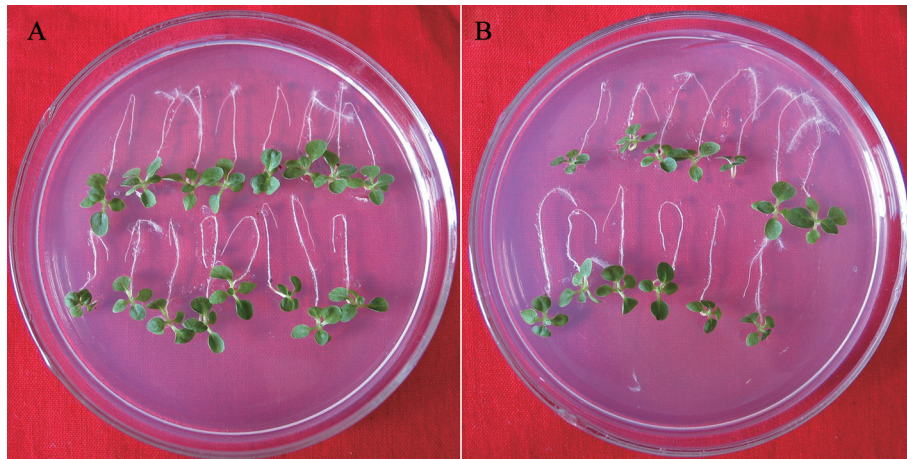
将复选后弯根率在75%及以上的22个材料的M<sub>3</sub>代种子,分别在外加0.075 mmol·L<sup>-1</sup>钾离子的低钾培养基上和MS培养基上培养1个月,以野生型材料为对照,观察植株生长情况,并进行叶片含钾量测定,确定钾积累和利用的情况。

试验中发现在外加0.075 mmol·L<sup>-1</sup> K<sup>+</sup>的低钾培养基上,对照植株出现叶片黄化的症状,尤其是

下部叶片更为严重,而筛选出的绝大多数突变体在低钾处理下叶片没有出现黄化现象,这表明突变体更能适应低钾胁迫的环境,能充分利用培养基中有限的钾素维持正常的生长发育。在0.075 mmol·L<sup>-1</sup>的低钾培养基上,耐低钾突变体的生物量明显高于对照;除630-2外,每克鲜重叶片的含钾量明显高于对照(图4-A~C、表2)。

在MS培养基上,对照和耐低钾突变体的生物量明显增加,耐低钾突变体的生物量明显高于对照,但只有16-5和1043-1的每克鲜重叶片的含钾量显著高于对照(图4-D~F、表2)。

为进一步明确在正常栽培条件下耐低钾突变体的叶片钾含量,将上述筛选出的耐低钾突变体移栽到田间后,在成熟期,选取15份材料用火焰光

图3 M<sub>3</sub>代耐低钾突变体在低钾培养基上的弯根情况Fig.3 Root-bending analysis of M<sub>3</sub>-generation low K<sup>+</sup> tolerant mutants in low K<sup>+</sup> medium

A: 16-5突变体; B: 568-2突变体。

表1 M<sub>3</sub>代突变体弯根率分析Table 1 Analysis on root-bending rate of M<sub>3</sub>-generation mutants

材料名称	重复I		重复II		平均弯根率/%
	总苗数	弯根苗数	总苗数	弯根苗数	
CK	13	1	20	2	9.0
16-5	14	14	18	16	93.8
16-6	20	18	18	16	89.5
31-3	20	16	17	17	89.2
51-3	10	8	14	13	87.5
113-2	18	17	11	10	93.1
132-1	16	13	20	19	88.9
132-2	18	17	12	10	90.0
204-1	20	20	20	14	85.0
568-1	20	11	16	16	75.0
568-2	20	16	16	13	80.6
619-1	19	16	18	15	83.8
619-2	19	17	17	16	91.7
619-4	19	16	18	16	86.5
619-5	18	15	9	9	88.8
630-1	12	8	18	18	86.6
630-2	20	13	16	14	75.0
721-1	20	15	15	12	77.1
736-2	20	18	12	12	93.8
756-1	18	16	16	16	94.1
1043-1	16	13	12	12	89.3
1045-1	13	9	15	15	85.7
1045-2	18	16	14	13	90.6

度计测定干重叶片的钾离子含量。由表3可以看出,除16-5、16-6和568-2外,其余耐低钾突变体的烟叶钾含量都低于对照,这说明我们筛选到的绝

大多数突变体只是钾利用高效型突变体,而不是钾高效积累型突变体。

## 讨 论

我国土壤缺钾严重,选育耐低钾的烟草品种可缓解这一问题。目前,可以通过两个途径获得耐低钾材料;一是通过基因工程技术将K<sup>+</sup>通道和高亲和K<sup>+</sup>转运体蛋白基因转入野生型品种中,使之高效表达(唐劲驰和曹敏建2001)。植物根细胞K<sup>+</sup>通道基因*AKT1*是植物细胞从土壤中吸收钾离子的主要执行者(Hirsch等1998)。Xu等(2006)在拟南芥植物中过量表达*LKSI*、*CBL1/9*基因后,转基因植株中*AKT1*基因的表达量也得到提高,最终使转基因植株对低钾胁迫的耐受性增强。Shi等(1997)将K<sup>+</sup>通道基因*KATI*和*AKT1*导入烟草,获得了钾高效利用型转基因烟草株系,使烟草的吸钾能力提高了18%~22%,证明外源K<sup>+</sup>通道基因的导入不仅可提高土壤中缓效态钾的利用率,而且可显著提高烟叶的含钾量,从而改良烟草产量和品质。郭兆奎等将拟南芥的*AtKup1*基因和*AtNHX1*基因转入烟草,获得了钾的吸收利用率明显提高的转基因植株(郭兆奎等2005, 2007)。二是筛选耐低钾突变体。本研究以烟草野生型品种‘中烟100’为材料,研究了不同钾离子浓度对其根生长的影响,确定了在培养基中外源施加0.075 mmol·L<sup>-1</sup>钾离子为筛选耐低钾突变体的适宜浓度。然后以EMS诱

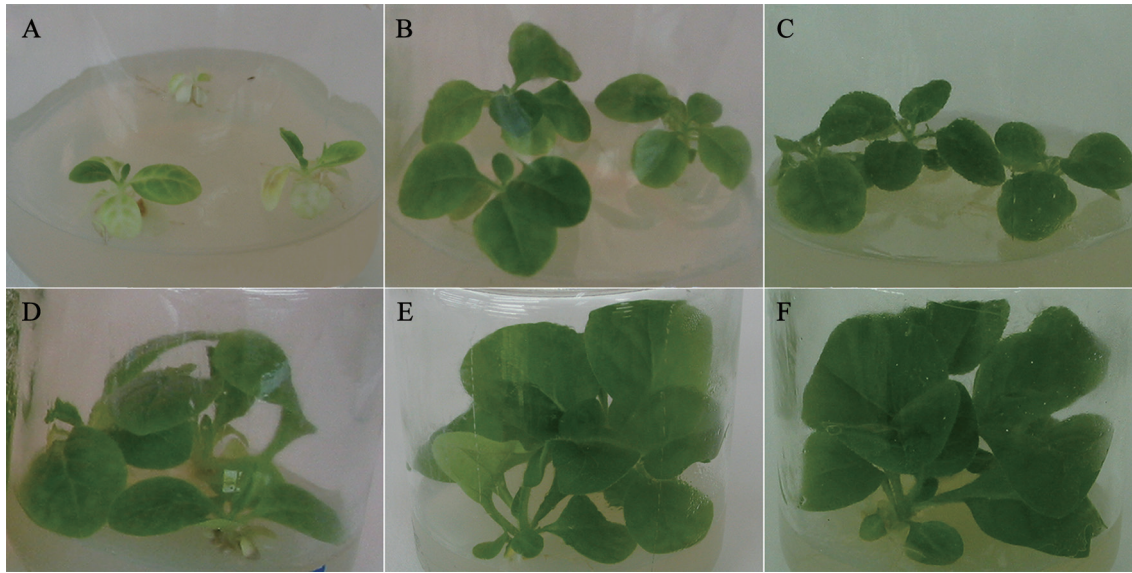


图4 野生型植株(对照)与突变体在 $0.075 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{K}^+$ 的低钾培养基和MS培养基中处理1个月后的表型比较  
 Fig.4 Phenotype comparison of wild type plant (CK) and mutants grown in  $0.075 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{K}^+$  medium or MS medium for one month  
 A~C: 野生型植株(A)和突变体植株16-5 (B)、132-2 (C)在 $0.075 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{K}^+$ 的低钾培养基上的生长情况; D~F: 野生型植株(D)和突变体植株16-5 (E)、132-2 (F)在MS培养基上的生长情况。

表2 野生型植株和耐低钾突变体在低钾培养基和MS培养基上生长1月后的叶片 $\text{K}^+$ 含量

Table 2  $\text{K}^+$  content of wild type plant (CK) and low  $\text{K}^+$  tolerant mutants grown in low  $\text{K}^+$  medium or MS medium for one month

材料名称	外加 $0.075 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{K}^+$ 的低钾培养基		MS培养基	
	3株样品叶片鲜重/g	$\text{K}^+$ 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)	3株样品叶片鲜重/g	$\text{K}^+$ 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)
CK	0.2021	222.63±7.42	0.8270	4 933.60±39.43
16-5	0.3812	273.73±6.45**	1.5323	5 267.43±67.98**
16-6	0.2690	410.47±10.78**	1.7999	4 436.81±55.35**
31-3	0.3258	399.21±1.95**	2.1271	4 260.16±40.53**
51-3	0.4010	321.32±9.36**	2.1300	4 146.41±32.44**
113-2	0.3468	348.37±0.48**	1.9070	3 850.39±25.31*
132-1	0.4076	275.18±10.85**	3.7575	3 817.83±34.42**
132-2	0.3752	338.28±11.14**	1.9242	4 897.06±64.60
204-1	0.3486	317.92±2.33**	1.9858	4 784.87±72.21
568-1	0.3960	266.55±2.08**	1.6800	4 853.57±62.28
568-2	0.4911	275.58±8.43**	1.6553	4 896.81±55.59
619-1	0.3924	325.43±6.58**	2.0969	4 340.01±14.04**
619-2	0.3086	368.43±5.67**	1.5505	4 717.40±34.17*
619-4	0.3500	280.59±10.65**	4.0128	3 593.14±57.50**
619-5	0.3102	294.67±6.56**	1.6116	4 436.81±49.88**
630-1	0.3214	319.77±7.72**	1.7443	3 047.53±62.62**
630-2	0.5113	214.19±3.92	2.4960	4 493.21±27.37**
721-1	0.3232	272.32±9.62**	1.2864	1 435.90±78.36**
736-2	0.3470	323.88±3.32**	0.9024	4 139.18±53.81**
756-1	0.3629	270.01±8.80**	1.1212	4 579.39±27.29**
1043-1	0.3809	320.01±4.48**	1.7512	5 232.37±53.15*
1045-1	0.4628	285.05±6.43**	1.4763	3 899.48±62.83**
1045-2	0.5339	423.80±1.57**	1.0824	4 528.23±26.70**

\*表示与对照相比差异显著,\*\*表示与对照相比差异极显著;下表同。

表3 野生型植株和耐低钾突变体成熟后叶片钾含量

Table 3 K<sup>+</sup> content of wild type plant (CK) and low K<sup>+</sup> tolerant mutants after harvest

材料名称	样品干重/g	K <sup>+</sup> 含量/%
CK	0.5045	1.97±0.03
16-5	0.5010	1.97±0.08
16-6	0.5060	1.98±0.06
31-3	0.5051	1.50±0.04**
51-3	0.5009	1.15±0.10**
132-1	0.5003	1.68±0.03*
132-2	0.5045	1.30±0.10**
204-1	0.5032	1.94±0.06
568-1	0.5045	1.64±0.07*
568-2	0.5049	1.97±0.10
619-2	0.5056	0.89±0.08**
630-1	0.5073	1.01±0.07**
721-1	0.5052	1.76±0.10
736-2	0.5057	1.22±0.03**
756-1	0.5025	1.54±0.04
1043-1	0.5073	1.25±0.06**

变处理获得的‘中烟100’ M<sub>2</sub>代种子为材料,进行了大规模的耐低钾突变体的筛选和验证,并初步筛选出了一部分M<sub>2</sub>代候选材料。对M<sub>3</sub>代突变体继续进行验证后,50个材料中有22个M<sub>3</sub>代突变体弯根长度大于5 mm,弯根率在75%以上;这些突变体在外源添加0.075 mmol·L<sup>-1</sup>钾离子的低钾培养基上长势明显好于对照,且绝大多数突变体的单位鲜重叶片的钾含量也明显高于对照,进一步证实烟草幼苗期耐低钾突变体筛选体系的有效性。由于烟草的生命周期很长,烟草成熟期的基因表达种类、数量及表达模式与幼苗期相比会发生显著变化,即苗期耐低钾的突变体在成熟期不一定继续保持耐低钾特性。因此对于在幼苗期筛选出的耐低钾突变体,还需设计一定的低钾栽培条件,在整个生育期观察其生长状况。

据牛佩兰等(1996)的研究:烟草基因型的钾效率可以分为钾积累高效利用高效、钾积累低效利用高效和钾积累低效利用低效3种类型,其中钾积累高效基因型具有单位干重含钾量高的特点,可用于提高烟叶含钾量,继而提高烟叶的品质。我

们选择了部分耐低钾突变体移栽到田间,在正常栽培条件下叶片成熟时测定了其干重的钾含量,结果发现个别突变体的叶片钾含量在苗期明显高于对照,但在成熟期和对照差不多。我们设想,如果继续扩大筛选群体,有可能会筛选到既耐低钾,叶片中钾含量又明显高于对照的突变体。这种突变体可以同时解决生产中的两大问题,具有广阔的应用前景。

### 参考文献

- 曹志洪(1991). 优质烤烟生产的土壤与施肥. 南京: 江苏科学技术出版社, 17~28
- 郭兆奎, 杨谦, 姚泉洪, 万秀清, 颜培强(2007). 转拟南芥*AtNHX1*基因促进烟草对钾吸收的研究. 高技术通讯, 17 (11): 1174~1179
- 郭兆奎, 杨谦, 姚泉洪, 万秀清, 颜培强(2005). 转拟南芥*AtKup1*基因高含钾量烟草获得. 中国生物工程杂志, 25 (12): 24~28
- 李佛琳, 彭桂芬, 萧凤回, 杨焕文(1999). 我国烟草钾素研究的现状与展望. 中国烟草科学, (1): 22~25
- 刘华山, 王方, 韩锦峰, 黄元炯, 孟凡庭(2006). 烟草钾素营养的研究进展. 安徽农业科学, 34 (19): 4961~4962
- 鲁如坤(1989). 我国土壤氮、磷、钾的基本状况. 土壤学报, 26 (3): 280~286
- Marchand M, Etourneau F, Bourrie B (1997). 不同钾肥品种对烟草产量与化学成分的影响研究. 中国烟草科学, 18 (2): 6~11
- 牛佩兰, 石屹, 刘好宝, 梁洪波, 申国明, 孙玉和(1996). 烟草基因型间钾效率差异研究初报. 烟草科技, (1): 33~35
- 唐劲驰, 曹敏建(2001). 作物耐低钾营养研究进展. 沈阳农业大学学报, 32 (5): 382~385
- 杨帆, 戴林建, 潘著, 吴成林(2012). 钾高效基因型烟草的选育及研究进展. 作物研究, 26 (2): 183~188
- 杨远, 邓飞跃, 肖立青, 闵晓芳(2013). 湿法消解-电感耦合等离子体发射光谱法测定烟叶中22种元素. 中国烟草学报, 19 (3): 11~17
- Hirsch RE, Lewis BD, Spalding EP, Sussman MR (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science*, 280: 918~921
- Shi WM, Su YH, Fujiwara T, Hayashi H, Goto K, Komeda Y, Shaff JE, Kochian LV, Chino M (1997). Transfer of potassium channel genes into tobacco. In: Ando T, Fujita K, Mae T, Matsumoto H, Mori S, Sekiya J (eds). *Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 195~196
- Xu J, Li HD, Chen LQ, Wang Y, Liu LL, He L, Wu WH (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K<sup>+</sup> transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*, 125 (7): 1347~1360