

水稻 OsAKT2 的钾吸收功能及其在地上部分 K⁺回流中的潜在作用

黄亚楠^{1,2}, 李俊林³, 苏彦华^{1*}

(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; 3 山东省蚕业研究所, 山东烟台 264002)

摘要: 【目的】研究水稻钾通道 OsAKT2 的基本功能和调控特征, 揭示其在地上部 K⁺回流中的潜在作用。

【方法】通过构建系统进化树和关键氨基酸区域序列比对, 对不同物种来源的 Shaker 类钾离子通道基因进行了同源性分析; 利用蛙卵电生理技术, 研究水稻 OsAKT2 的膜电位敏感性及其对钾离子的吸收特征、离子选择性和对钾通道抑制剂的响应变化; 并利用实时荧光定量 PCR 技术, 探究了水稻 OsAKT2 的表达与钾浓度、铵转运及胁迫处理间的相互关系。【结果】OsAKT2 与 AtAKT2 等典型通道高度同源 (56%), 属于 AKT2 类弱电压依赖—双向整流型钾离子通道。OsAKT2 所介导的 K⁺转运过程, 与典型该类通道表现出不同的性质, 主要体现在以介导 K⁺的吸收为主, 缺失了 AKT2 通道标志性的 K⁺外排活性, 且其 K⁺吸收过程转变为明显的电压依赖性。OsAKT2 对 K⁺吸收 Km 值为 43 mmol/L, 是一典型的低亲和钾离子通道 (>1 mmol/L); 与典型 Shaker 通道相比, 钾通道抑制剂 Ba²⁺对 OsAKT2 的 K⁺吸收活性的抑制效率 (<78%) 较低, 而且表现出一定程度的 NH₄⁺通透性 (约占 K⁺的 22%)。进一步模拟田间种植水稻可能遇到的胁迫环境, 发现水稻地上部 OsAKT2 基因的表达丰度在缺铵、缺钾及山梨醇处理下显著提高, 且表现出一定的避光性 (黑暗中基因表达水平较高)。【结论】水稻 OsAKT2 能够提高植物 K⁺吸收能力, 或将有助于增强其在地上部 K⁺回流和再利用中的功能, 且对水稻体内氮素营养吸收转运具有潜在的贡献。

关键词: 水稻; OsAKT2; 电生理; 功能特异性; 铵转运

The function of OsAKT2 in K⁺ uptake and the aboveground K⁺ reflux of rice

HUANG Ya-nan^{1,2}, LI Jun-lin³, SU Yan-hua^{1*}

(1 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences/State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3 Shandong Institute of Sericulture, Yantai, Shandong 264002, China)

Abstract: 【Objectives】The electrophysiological functions and regulatory characteristics of OsAKT2 were investigated to unravel its K⁺ uptake mechanisms and its potential influence on the aboveground K⁺ reflux.

【Methods】The Phylogenetic tree and sequence alignment were constructed to analyze the homology of Shaker potassium channel genes. The two-electrode voltage-clamp experiments were performed on OsAKT2-expressing *Xenopus* oocytes to study the electrophysiological characteristics of OsAKT2. The relationship between OsAKT2 gene expression and K⁺ concentration, NH₄⁺ concentration, and stress conditions in rice was studied. 【Results】The phylogenetic analysis showed that OsAKT2 was closest related to the weakly rectifying potassium channel with 56% to AtAKT2. The results showed that OsAKT2 function mainly as an inwardly rectifying K⁺ channel with strong voltage dependency. However, the outward activity of a typical leak-like AKT2 channel was notably

收稿日期: 2021-11-11 接受日期: 2022-03-15

基金项目: 国家重点研发专项 (2016YFD0100700); 国家自然科学基金项目 (31672230); 国家转基因植物研发专项 (2009ZX08009-129B)。

联系方式: 黄亚楠 E-mail: ynhuang@issas.ac.cn; * 通信作者 苏彦华 E-mail: yhsu@issas.ac.cn

suppressed. The electrophysiological results indicated that OsAKT2 was a typical low-affinity potassium channel ($K_m = 43 \text{ mmol/L}$, $>1 \text{ mmol/L}$) with high selectivity for K⁺. Compared with the Shaker-type channel, OsAKT2 was inhibited by Ba²⁺, but the inhibition rate was lower ($<78\%$). OsAKT2 had some permeability to NH₄⁺ (about 22% of K⁺ uptake). The gene expression abundance of OsAKT2 increased significantly under nitrogen deficiency, potassium deficiency, and sorbitol conditions, and had a circadian rhythm whereby the gene expression level was higher in the dark. **【 Conclusions 】** This study suggests that OsAKT2 mainly mediate the K⁺ uptake in rice, which is sensitive to the change of external K⁺ concentration. OsAKT2 may play an important role in plant adaptation to stress, which also provides a way to improve the reflux of K⁺. Further, OsAKT2 has a potential contribution to ammonium transport in rice.

Key words: rice; OsAKT2; electrophysiology; specific function; ammonium transport

K⁺是植物生长发育所必需的三大矿质营养元素之一,也是植物体中含量最丰富的无机阳离子,可占植物干重的 10%。K⁺在调节酶活性、蛋白质合成、细胞渗透势、细胞内电荷平衡以及提高植物对环境胁迫的适应能力等方面有重要作用^[1-2]。土壤溶液中的 K⁺浓度在 0.01~20 mmol/L 波动,而细胞质中的 K⁺浓度维持在 50~100 mmol/L 范围内且相对稳定^[3]。植物中有大量负责 K⁺吸收和转运的功能部件,包括高亲和的钾转运体(在钾浓度 $<0.2 \text{ mmol/L}$ 下起作用)和低亲和的钾离子通道(在钾浓度 $>1 \text{ mmol/L}$ 下起作用),它们决定了植物体内诸多功能和调控特性各异的钾吸收系统^[4]。一般钾离子通道吸收的 K⁺约占植物总吸钾量的 50%^[5],其中 Shaker 型 K⁺通道被认为是介导植物钾离子吸收、转运和细胞内动态平衡最为重要的一类钾通道^[6]。

土壤溶液的 K⁺经植物根表皮和皮层细胞中的钾离子通道吸收,再通过根中柱鞘和木质部薄壁细胞中的钾离子通道将 K⁺运输到植物地上部。叶片保卫细胞作为 K⁺发挥功能的终端,其中的钾离子通道通过调节 K⁺的吸收和外排来调控气孔开关^[4-7]。在植物的生长发育过程中, K⁺具有很强的移动性,叶片中多余的 K⁺可沿韧皮部向下回流到根系中,衰老叶片组织中的 K⁺也可重新分配到幼嫩及生长发育较旺盛的组织。植物体内的这种钾循环可表征地上部钾营养状况并调节根系对 K⁺的吸收^[8]。耐低钾型大麦能够高效地将 K⁺转运至功能叶,从而使新生叶保持正常的光合作用和代谢活动^[9]。烟草叶片的钾含量是表征烟叶品质的重要指标,由老叶向新叶的 K⁺回流会导致成熟期烟草叶片中 K⁺的流失,从而影响烟叶品质^[10]。叶片中 K⁺的分布及含量都会对植物的生理功能产生一定的影响。作为重要的渗透调节物质, K⁺参与调控气孔开关过程。保持叶片较高的 K⁺浓度使得保卫

细胞可以吸收更多的水分,促进气孔的开放^[11]。另外 K⁺会影响光合作用所需要酶类的活性、ATP 合成、叶绿素含量等。缺 K⁺通常会导致植物光合作用效率下降,并影响光合作用产物的转运^[12-13]。但迄今为止,植物地上部 K⁺回流的的基础和分子机制还有待进一步深入探索。

钾离子通道 AKT2 主要在韧皮部表达,兼具 K⁺吸收和外排活性,但吸收活性占主导地位。韧皮部 AKT2 介导自上而下的 K⁺运输,与植物地上部分 K⁺的回流途径相吻合;而其 K⁺外排活性主要体现在对韧皮部细胞极化状态(由 H⁺内流引起)的平衡方面,进而协助蔗糖/H⁺共转运体将地上部光合同化产物蔗糖经由韧皮部的向下运输过程^[14-16]。拟南芥韧皮部 AKT2 缺失会降低细胞内钾离子和蔗糖含量以及膜电位对 K⁺的依赖性,导致植株生长减缓、发育延迟^[14-16]。AKT2 的表达丰度受到光照和光合同化产物的诱导,这也暗示其可能参与韧皮部蔗糖的运输^[15]。脱落酸处理会增加 AKT2 的表达丰度,提示 AKT2 在植物应对干旱胁迫时有重要作用^[14]。在盐胁迫条件下,水稻 OsAKT2 的缺失会使得植株韧皮部的 K⁺降低,导致自上而下的 K⁺再分配过程受损。此外,OsAKT2 还调节 K⁺和蔗糖从老叶到新叶中的转运,并影响籽粒形成和产量^[17]。

通过归纳分析本领域最新研究进展及本课题组前期工作,发现水稻 OsAKT2 主要定位于地上部韧皮部细胞^[18],且主要介导 K⁺的吸收,推测其可能在地上部 K⁺回流和再分配过程中发挥潜在作用。为此,通过蛙卵电生理技术研究了 OsAKT2 介导 K⁺运输的功能特征,包括其电流本身特性、钾浓度依赖性、离子选择性及对钾通道抑制剂的响应情况。进一步模拟田间生长环境,利用实时荧光定量 PCR 试验测定 OsAKT2 基因表达的昼夜节律特征及对外界胁迫

条件的响应规律。

1 材料与方法

1.1 质粒构建

将水稻 *OsAKT2* (GenBank: JN989970.1) 基因经酶切位点 *SmaI/NotI* 构建到 pCI 载体上, 用质粒小提试剂盒 (Axygen, AP-MN-P-250) 提取质粒, 并浓缩至 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 待用。

1.2 蛙卵注射与电生理检测

非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 冰浴麻醉 1 h 后, 用手术刀在其腹部切开小口取出蛙卵, 置于 1 mg/mL 的胶原酶 A 中消解 1~2 h, 挑选出健康饱满的蛙卵放入 ND96 溶液 (96 mmol/L NaCl、1.8 mmol/L CaCl_2 、2 mmol/L KCl、1 mmol/L MgCl_2 、5 mmol/L HEPES, pH 7.4) 中培养。通过微量注射仪 (Nanol 2000, WPI, Sarasota, FL, USA), 将 59.8 nL 的 pCI-*OsAKT2* 质粒 cDNA 注射到蛙卵中, 等量的无菌水注射到蛙卵中作为阴性对照。在相应的处理条件下, 用“注射 *OsAKT2* 的蛙卵产生的电流”减去“注射 H_2O 的蛙卵产生的电流”得到“*OsAKT2* 产生的净电流”, 以扣除各离子处理对蛙卵本身的影响。注射后的蛙卵置于 19 $^{\circ}\text{C}$ 的 ND96 溶液中培养 (含 50 mg/L 庆大霉素), 每天更换一次培养液, 并及时去除坏死细胞。2~3 天后用双电极电压钳放大器 (Axoclamp 900A, Foster City, CA, USA) 检测蛙卵细胞电流。在检测电流时, 钳制电压为 -40 mV, 阶越电压为 10 mV, 施加的电压范围从 -160 mV 到 +50 mV, 刺激间隔为 2 s。基本检测溶液含有 1.8 mmol/L CaCl_2 、1 mmol/L MgCl_2 、5 mmol/L HEPES-NaOH, pH 调整为 7.4, KCl 和 NaCl 浓度根据实验设置进行调整 (用于调整溶液中的恒定离子强度)。用 pClampfit 10.3 (Molecular Devices) 初步分析电生理数据。

检测所用处理溶液如下:

OsAKT2 的钾吸收特征检测: 0、1、2、5、10、20、50、100 KCl (mmol/L)。

OsAKT2 的离子选择性检测: 100 LiCl、100 NaCl、100 RbCl、100 NH_4Cl 、100 KCl (mmol/L)。

通道抑制剂对 *OsAKT2* 的影响检测: 1 BaCl_2 、1 CsCl、25 TEACl、50 KCl (mmol/L)。

1.3 水稻生长试验

以粳稻日本晴 (*Oryza sativa. ssp. Japonica* Nipponbare) 为供试水稻材料。水稻幼苗在改良的 IRRI 溶液中生长, 光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 温度设定为 27 $^{\circ}\text{C}$ /25 $^{\circ}\text{C}$ (光照/黑暗), 光强度为 400 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 相对

湿度设定为 70%。将 10 天苗龄 (从水稻发芽后算起) 的水稻幼苗移至不同的处理液中: 0 mmol/L K^+ 、1 mmol/L K^+ 、20 mmol/L K^+ 、0 mmol/L NH_4^+ 、1 mmol/L NH_4^+ 、10 mmol/L NH_4^+ 、180 mmol/L sorbitol、15% PEG-6000, 分别处理 0、4、8、12、20 和 24 h 后收获植株, 用于 RNA 提取。

其中改良的 IRRI 营养液配方为: 0.5 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.3 mmol/L KH_2PO_4 、0.35 mmol/L K_2SO_4 、1 mmol/L $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1 mmol/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 mmol/L Na_2SiO_3 、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ NaFeEDTA、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H_3BO_3 、0.32 $\mu\text{mol}/\text{L}$ $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、9 $\mu\text{mol}/\text{L}$ $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.77 $\mu\text{mol}/\text{L}$ $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.39 $\mu\text{mol}/\text{L}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、pH 调至 5.8。不同的铵处理浓度采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 调节, 其他离子成分保持不变; 不同的钾处理浓度使用 KCl 调节, 并分别用 NaH_2PO_4 和 Na_2SO_4 取代 KH_2PO_4 和 K_2SO_4 , 其他离子成分保持不变。

1.4 水稻地上部分 *OsAKT2* 基因表达丰度的测定

使用总 RNA 提取试剂 (R401-01, 南京诺唯赞生物科技有限公司) 对收获后的水稻地上部样品进行总 RNA 提取。用反转录试剂 HiScript III RT-SuperMix for qPCR (+gDNA-wipper, R323-01, 南京诺唯赞生物科技有限公司) 将 1 μg 总 RNA 反转录成 cDNA。实时荧光定量 PCR 酶为 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Q711-02, 南京诺唯赞生物科技有限公司)。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。使用荧光定量 PCR 仪 LightCycler 480 (Roche, Switzerland) 检测基因表达情况, 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ (30 s), 95 $^{\circ}\text{C}$ (10 s)、60 $^{\circ}\text{C}$ (15 s)、72 $^{\circ}\text{C}$ (15 s), 44 个循环。以水稻的看家基因 *OsActin* 作为内标, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法分析目的基因的相对表达量。

1.5 Shaker 钾通道的系统进化树分析与关键位点序列比对

钾通道序列由 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站下载获得, 利用 DNAMAN 对这些钾通道序列进行比对分析, 并构建 Shaker 钾通道系统发育树。

1.6 数据处理与分析

使用 SPSS 16.0 进行统计分析, 采用 SigmaPlot 12.5 绘图, 所示数据为平均值 \pm 标准误差 SE ($n>3$)。多重比较采用 Duncan 法, 差异显著水平为 5%。

2 结果与分析

2.1 *OsAKT2* 的氨基酸序列分析

由图 1a 可看出, *OsAKT2* 在通道孔区域具有特

征性的序列 TxxTxGYGD, 属于典型的 Shaker 型钾离子通道。根据电压依赖特征和钾离子跨膜流动方向, Shaker 型 K⁺通道又可划分为 3 类: 内向钾离子通道 (Kin), 主要包括 AKT1 和 KAT1 类钾通道; 外向钾离子通道 (Kout), 主要包括 SKOR 和 GORK 类钾通道; 以及弱整流型钾离子通道 (Kweak), 主要

是 AKT2 钾通道。与内向、外向钾离子通道不同, 弱整流型钾离子通道 AKT2 在 S4 跨膜区上的关键氨基酸均为带正电的赖氨酸 K (图 1b), 这可能对其整流性有重要作用。系统进化树的结果显示, 水稻 OsAKT2 在进化上与单子叶植物玉米的 ZMK2 的亲缘关系最近, 大麦 HvAKT2 次之, 与双子叶植物拟南芥的

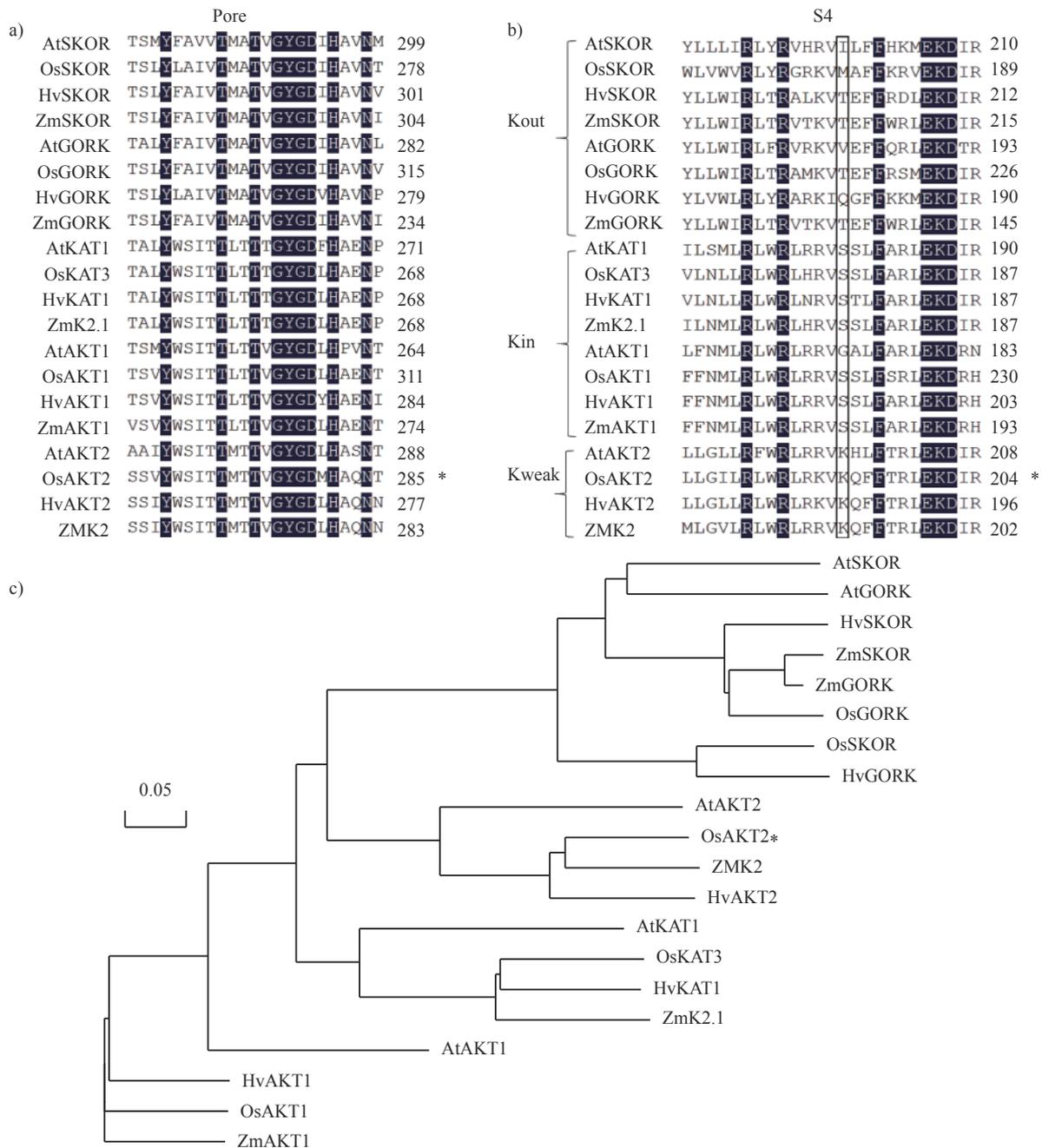


图 1 不同 Shaker 型 K⁺通道的关键序列比对及系统进化树分析

Fig. 1 Sequence alignment and phylogenetic tree analysis of Shaker K⁺ channels

GenBank 登录号 (The registration code in GenBank): AtSKOR (NP_186934), OsSKOR (Q7XUW4.2), HvSKOR (KAE8812996.1), ZmSKOR (AFW85147.1), AtGORK (NP_198566), OsGORK (Q653P0.1), HvGORK (XP_044966653.1), ZmGORK (AAW82753.1), AtKAT1 (NP_199436), OsKAT3 (XP_464796.1), HvKAT1 (XP_044953988.1), ZmK2.1 (AAR21352.1), AtAKT1 (NP_180233), OsAKT1 (AK120308), HvAKT1 (XP_044976493.1), ZmAKT1 (XP_008675279.1), AtAKT2 (AAA97865), OsAKT2 (JN989970), HvAKT2 (DQ465923), ZMK2 (AJ132686).

AtAKT2 (56%) 等 AKT2 家族成员也有较高的相似度 (图 1c)。综上, 水稻钾通道 OsAKT2 与 AKT2 的其它家族成员具有较高的同源性, 且氨基酸序列在进化上具有保守性。

2.2 OsAKT2 的钾浓度响应

弱整流型拟南芥 AtAKT2 通道可以同时介导 K^+ 的吸收和外排, 且电压依赖性较弱^[14,19]。借助双电极电压钳电生理技术, 发现水稻 OsAKT2 主要介导 K^+ 的吸收, 但是缺少明显的外排活性 (图 2a)。从电流-电压的关系可看出, 当外界钾离子浓度高于 5 mmol/L 时, OsAKT2 的电流开始显著增加, 而 K^+ 浓度达到 100 mmol/L 时电流基本接近饱和值 (图 2b 和 c), 反映了其对外界 K^+ 的吸收具有反馈调节机制。在 50 mmol/L K^+ 且膜电位大于 -50 mV 时, 记录到明显的内向电流, 且随着膜电位的降低, 电流变得更大 (图 2c)。OsAKT2 的电流具有浓度依赖性和电压依赖性。尽管 OsAKT2 在生物信息学和结构分析上属于 AKT2 通道, 但是 OsAKT2 的电流性质与已报道的拟南芥弱整流型 AtAKT2 明显不同。

用米氏方程拟合 OsAKT2 的 K^+ 吸收动力学曲线, 发现在各个膜电位下, K_m 值 (达到 1/2 最大吸收速率时的钾浓度) 均大于 43 mmol/L (图 2c), 是一个典型的低亲和力钾离子通道 (在大于 1 mmol/L K^+ 浓度下介导 K^+ 吸收) (图 2d)。在叶片衰老过程中, 老叶中的 K^+ 要运输至生长旺盛的叶子、果实及种子中, 可能会造成细胞内 K^+ 释放, 导致老叶中 K^+ 瞬时增加达到 10 mmol/L^[20], 而 OsAKT2 正是在此浓度范围内发挥最适作用, 揭示 OsAKT2 可能在地上部分 K^+ 回流和分配中有重要作用。

2.3 OsAKT2 的离子选择性

对比与 K^+ 半径相近的碱金属阳离子通透性发现, 在不同膜电位下, OsAKT2 对 K^+ 的吸收具有较高的选择性, 基本不能通透 Li^+ 和 Na^+ , 对 Rb^+ 有轻微的通透能力 (图 3)。OsAKT2 对 NH_4^+ 有很大的通透性, 约占 K^+ 吸收量的 22% 左右 (以 OsAKT2 对 K^+ 的吸收量为标准, 100%), 推测 OsAKT2 可能参与体内 NH_4^+ 的再分配, 在缓解体内 NH_4^+ 毒害方面有一定作用。

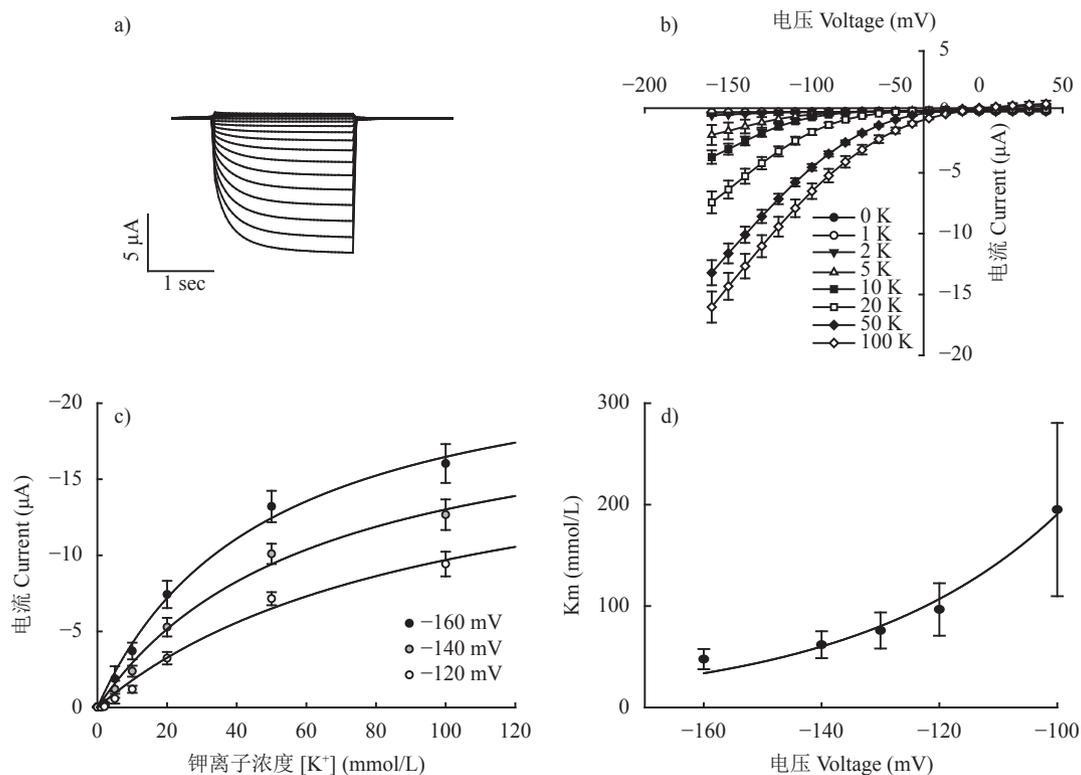


图 2 OsAKT2 的钾吸收特征

Fig. 2 K^+ transport kinetics in OsAKT2 expressing *Xenopus* oocytes

注: a 图, 在 50 mmol/L K^+ 条件下 OsAKT2 的原始电流形状; b 图, OsAKT2 对钾吸收的电流-电压曲线; c 图, OsAKT2 的钾吸收动力学; d 图, OsAKT2 对钾吸收的电流-电压曲线 K_m 值对膜电位的依赖性。

Note: Fig. a, Representative current trace of OsAKT2 at 50 mmol/L K^+ ; Fig. b, I-V curves of OsAKT2; Fig. c, K^+ transport kinetics for OsAKT2 at -120 mV, -140 mV or -160 mV; Fig. d, Voltage dependence of the K_m values for K^+ .

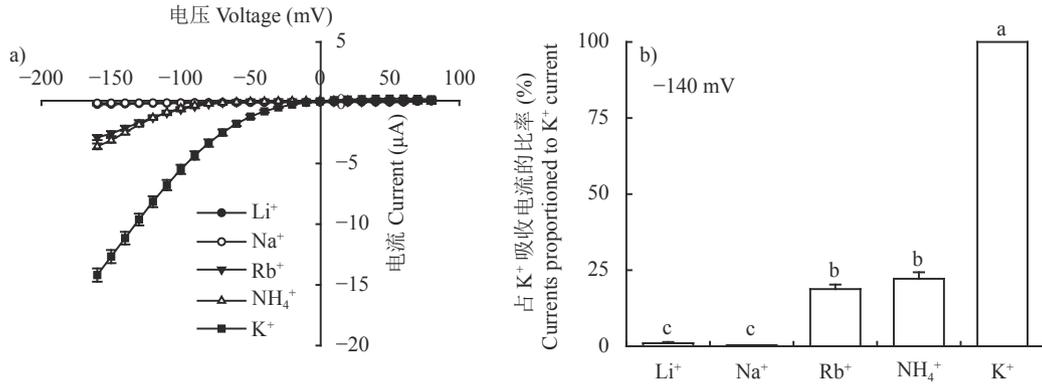


图 3 OsAKT2 对一价阳离子的吸收电流-电压曲线 (a) 和一价阳离子吸收电流相对于 K⁺吸收电流的比例 (b)
 Fig. 3 I-V curves of monovalent ion uptake by OsAKT2 (a) and the current proportion of monovalent ions relative to that of K⁺ (b)

注: 柱上不同小写字母表示离子间差异显著 (P < 0.05)。

Note: Different letters above the bars mean significant difference among ions (P < 0.05).

2.4 钾离子通道抑制剂对 OsAKT2 的影响

我们检测了 K⁺通道专性抑制剂 Ba²⁺、Cs⁺和 TEA 对 OsAKT2 通道活性的影响, 以验证在蛙卵表达系统中产生的电流是否为专一性的钾吸收电流。

结果显示, Ba²⁺、Cs⁺对 OsAKT2 电流的抑制作用具有电压依赖性 (图 4a), 膜电位越负, 抑制效果越显著, 在膜电位从-80 mV 到-160 mV 的范围内, Cs⁺对 OsAKT2 电流的抑制率从 42% 增加到了 94%; Ba²⁺

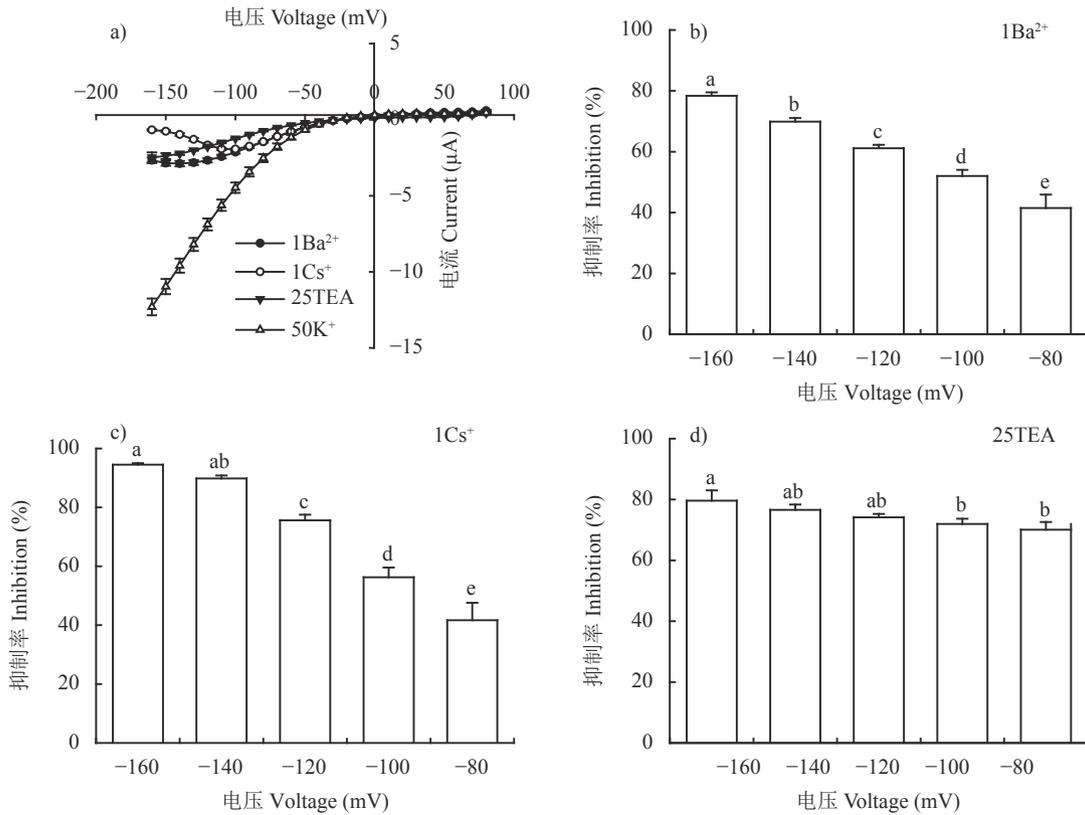


图 4 OsAKT2 在钾通道抑制剂 Ba²⁺、Cs⁺和 TEA 处理下的电流-电压曲线 (a) 和稳态电流 (b、c、d)
 Fig. 4 I-V curves (a) and steady currents (b, c, d) of the OsAKT2 by the external application of K⁺ channel blockers Ba²⁺, Cs⁺ and TEA

注: 柱子上不同小写字母表示处理间差异显著 (P < 0.05)。

Note: Different letters above the bars mean significant difference among treatments (P < 0.05).

对 *OsAKT2* 电流的抑制率虽然从 42% 增加到了 78% (图 4b), 但较其他高度专一的 K^+ 通道来说抑制率较低, 这与图 3 中 *OsAKT2* 对离子的通透性特征相吻合 (主要通透 K^+ , 但是也可以通透一定量的 NH_4^+) (图 4c)。而 TEA 对 *OsAKT2* 电流的抑制作用没有电压依赖性, 在膜电位从 -80 mV 到 -160 mV 的范围内, TEA 的抑制率基本维持在 70%~79% (图 4d)。总之, *OsAKT2* 通道活性受 K^+ 通道抑制剂较程度的抑制, 表明 *OsAKT2* 产生的电流为专一性的钾吸收电流 (图 4)。

2.5 不同供铵、供钾及胁迫处理对 *OsAKT2* 基因表达丰度的影响

为了进一步揭示 *OsAKT2* 的作用条件及分子机制, 测定了不同供铵、供钾及干旱胁迫 (模拟叶片衰老的过程) 条件下 *OsAKT2* 的表达特征。模拟昼夜光照变化, 发现 *OsAKT2* 的基因表达受光照条件影响, 在光照条件下其表达丰度较低, 而在黑暗中 *OsAKT2* 表达水平较高 (图 5), 具有一定的昼夜节律。在处理 20 h 时 *OsAKT2* 基因的表达丰度达到最高, 因此在该处理时间进行各处理的基因丰度比较。缺钾 (图 5a) 和缺铵 (图 5b) 处理均会显著增加 *OsAKT2* 的表达量, 而 *OsAKT2* 主要介导地上部 K^+ 的吸收 (图 2), 推测 *OsAKT2* 在水稻氮、钾营养亏缺时可促进地上部分离子的回流以保障植物完整的生长发育进程。此外, 相比于正常条件, 利用 sorbitol

(山梨醇) 处理模拟渗透胁迫增加了 *OsAKT2* 基因的表达丰度, PEG 处理无显著效果 (图 5c)。在不同胁迫处理条件下均未改变 *OsAKT2* 的昼夜节律变化, 这可能是植株应对胁迫条件的一种策略。

3 讨论与结论

植物 Shaker 型钾通道是一类电压门控的 K^+ 离子通道, 在 K^+ 的吸收、转运以及维持细胞内离子动态平衡等方面发挥重要作用^[21]。尽管 *OsAKT2* 在结构和基本性质上都与典型的 AKT2 钾通道相似, 如二者在氨基酸序列上高度同源, 且表现出较高的钾离子选择性, 同属于弱整流型 Shaker 类钾通道 (图 1), 但是其也表现出一些特殊电流性质。利用非洲爪蟾卵母细胞作为外源表达系统, 发现 *OsAKT2* 主要介导 K^+ 的吸收, 缺少明显的外向活性, 且表现出明显的电压依赖性 (图 2), 这与已知的拟南芥 *AtAKT2* 的“双向”电流明显不同^[14]。*AtAKT2* 的外向活性 (不受电压影响) 有其特殊的生理意义: K^+ 的外流能够阻止韧皮部细胞内由于 H^+ 内流引起的过度去极化, 进而通过蔗糖/ H^+ 共转运体驱动蔗糖的运输^[22]。而水稻 *OsAKT2* 缺少明显的外排活性, 意味着其可能缺少蔗糖运输的功能。另外, 研究表明 *OsAKT2* 主要定位在韧皮部^[18], 且负责 K^+ 的吸收, 那么 *OsAKT2* 很可能参与了将植株地上部分多余的 K^+ 经由韧皮部运往根系, 一方面给韧皮部负载提供所需的营养物

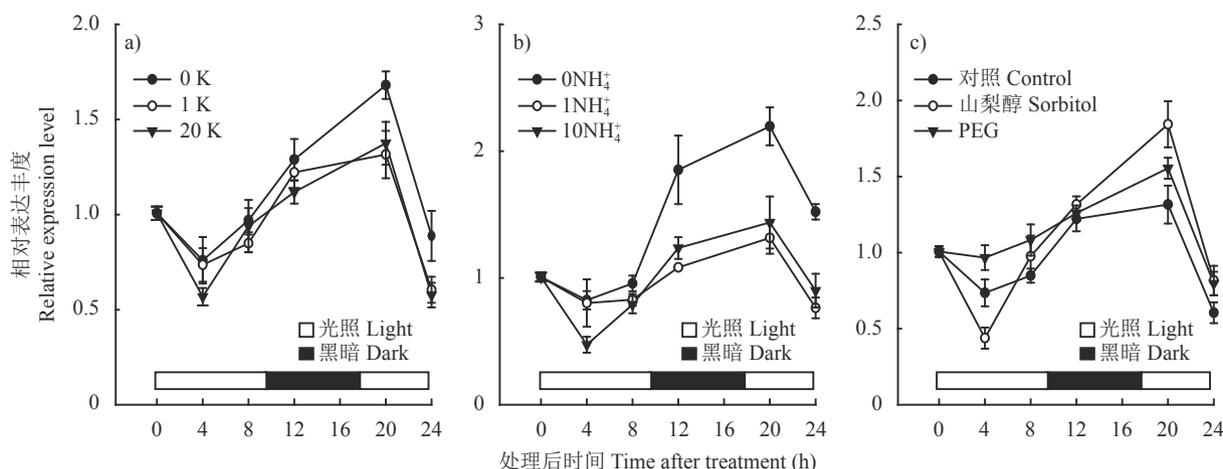


图 5 不同处理条件下 *OsAKT2* 基因的表达丰度

Fig. 5 *OsAKT2* gene expression level in response to different treatments

注: a 图, 钾处理, 其中 0K、1K、20K 代表钾处理浓度为 0、1、20 mmol/L KCl。b 图, 铵处理, 其中 $0NH_4^+$ 、 $1NH_4^+$ 、 $10NH_4^+$ 代表处理浓度为 0、1、10 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$ 。c 图中, 对照为 (1 mmol/L KCl) / [1 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$]; 山梨醇为 180 mmol/L sorbitol; PEG 为 15% PEG-6000。

Note: In fig. a, 0K, 1K and 20K indicate treatments of 0, 1 and 20 mmol/L KCl, respectively; In fig. b, $0NH_4^+$, $1NH_4^+$ and $10NH_4^+$ indicate treatments of 0, 1 and 10 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$; In fig. c, Control is (1 mmol/L KCl) / [1 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$], Sorbitol is 180 mmol/L sorbitol, and PEG is 15% PEG-6000.

质, 另一方面也作为地上部钾营养状况的重要信号对根系吸收 K⁺进行反馈调节。植株地上部分的 K⁺回流有利于水稻等粮食作物维持其生长部位的功能, 但是对于农业生产中需要保持叶片高钾水平的作物如烟草等较为不利。

OsAKT2 对于维持细胞内 K⁺浓度稳定发挥着关键作用。本研究发现 OsAKT2 对外界 K⁺浓度的变化很敏感, 且显示出典型的低亲和力特性 (K_m 为 43 mmol/L, 远大于高亲和系统介导的 0.2~1 mmol/L K⁺的吸收^[23]), 与已知的其它 Shaker 型钾通道一致^[24]。植物细胞质中的 K⁺浓度一般维持在 50~100 mmol/L 范围内^[25], 这种最佳的 K⁺浓度有利于细胞质中酶的活化^[9]。水稻 OsAKT2 对 K⁺具有较高的选择性 (图 3), 且会抑制根系对 Na⁺的吸收^[17], 表明 OsAKT2 可能有助于提高植物的抗盐能力。此外, 水稻 OsAKT2 对 NH₄⁺表现出一定的通透性 (图 3), 且缺铵处理会显著上调 OsAKT2 的表达水平, 说明 OsAKT2 可能对水稻氮素营养吸收转运具有潜在的贡献。植株内多余的 NH₄⁺或可通过 OsAKT2 再回流到根系并进行氨同化, 降低植株体内游离 NH₄⁺含量, 从而缓解 NH₄⁺毒害。这一结果对于将来研究水稻体内 NH₄⁺回流及再分配有一定的参考价值。

OsAKT2 基因的表达呈现出明显的避光性, 与 AtAKT2 基因受光照诱导的特性相反, 说明水稻和拟南芥两种植物具有不同的昼夜节律和光合产物分配机制。拟南芥 AtAKT2 钾通道参与的蔗糖分配过程具有光依赖性^[15], AKT2 的一个重要作用就是激活韧皮部质膜协助光合产物的向下运输, 从而有效的装载糖类物质^[26]。而水稻 OsAKT2 基因在光照下表达较弱 (图 5), 且 OsAKT2 功能缺失并不影响水稻地上部植株的蔗糖含量^[17], 表明 OsAKT2 可能不参与协助蔗糖的运输, 这也与 OsAKT2 缺少明显的外向活性及其可能对应的蔗糖运输功能这一特征相一致 (图 2)。黑暗条件下, 气孔关闭不再提供蒸腾拉力, 植物为了满足正常的生长需求, 其体内存在一定的离子循环, 此时 OsAKT2 的表达丰度升高 (图 5), 显示 OsAKT2 具有潜在的 K⁺回流作用。这些不同植物之间的特异性节律变化可能是植物表现出的适应性进化, 具体生理机制有待进一步探索。本研究中基因表达试验采用的是 10 天苗龄 (2~3 叶期) 的水稻幼苗, 该结果可以在一定程度上反映 OsAKT2 介导地上部分的 K⁺回流, 而老叶到新叶的 K⁺回流可能需在 4~5 叶期的幼苗中进行验证, 在此时期, 第一片叶已开始进入衰老阶段, 便于新的完全展开叶和老叶之

间进行比较。

缺氮、缺钾以及干旱等胁迫环境因素会加速叶片老化, 缩短植物生育期。本研究发现在这类胁迫条件下 OsAKT2 基因的表达水平会显著上调, 这可能有助于 K⁺从衰老器官运输到生长旺盛的新器官, 反映了植物对外界环境的适应性生存策略。相关研究也发现, 过表达大麦 HvAKT2 和 HvHAK1 能够通过调节叶片 H⁺内稳态和细胞信号传导来提高大麦的耐旱性^[27]。而对于喜钾作物烟草来说, 保持叶片充足的 K⁺是其品质保证, 沈方科等^[28]发现环割或断根处理可以阻断物质在韧皮部的运输, 从而减少 K⁺向地下部分回流, 提高烟叶钾含量。综上, 水稻 OsAKT2 可能在地上部 K⁺的再分配过程中发挥重要作用, 这为通过超表达 OsAKT2 来提高植物抗逆性提供了可能。

参 考 文 献:

- [1] Lebaudy A, Véry A A, Sentenac H. K⁺ channel activity in plants: Genes, regulations and functions[J]. *FEBS Letters*, 2007, 581: 2357–2366.
- [2] 陈光, 高振宇, 徐国华. 植物响应缺钾胁迫的机制及提高钾利用效率的策略[J]. *植物学报*, 2017, 52(1): 89–101.
Chen G, Gao Z Y, Xu G H. Adaption of plants to potassium deficiency and strategies to improve potassium use efficiency[J]. *Bulletin of Botany*, 2017, 52(1): 89–101.
- [3] Zörb C, Senbayram M, Peiter E. Potassium in agriculture—status and perspectives[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(9): 656–669.
- [4] Dreyer I, Uozumi N. Potassium channels in plant cells[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(22): 4293–4303.
- [5] Amtmann A, Blatt M R. Regulation of macronutrient transport[J]. *The New Phytologist*, 2009, 181(1): 35–52.
- [6] Pilot G, Pratelli R, Gaymard F, et al. Five-group distribution of the Shaker-like K⁺ channel family in higher plants[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2003, 56(4): 418–434.
- [7] Ragel P, Raddatz N, Leidi E O, et al. Regulation of K⁺ nutrition in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 281.
- [8] 王意琼, 刘会玲, 王艳群, 等. 钾对不同基因型玉米生长、体内钾循环和分配的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2013, 19(4): 773–780.
Wang Y Q, Liu H L, Wang Y Q, et al. Effects of potassium on plant growth, potassium cycle and distribution in different maize genotypes[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2013, 19(4): 773–780.
- [9] 叶芝兰. 大麦响应低钾胁迫的基因型差异及其耐性机制研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2020.
Ye Z L. Genotype differences in response to low potassium stress and the mechanism of low potassium tolerance in barley[D]. Hangzhou: PhD Dissertation of Zhejiang University, 2020.
- [10] 刘彦中, 李永忠, 程辉斗, 等. 钾在烟株中的积累和分配[J]. *烟草科技*, 2000, (2): 39–41.
Liu Y Z, Li Y Z, Cheng H D, et al. The accumulation and distribution

- of potassium in flue-cured tobacco plant[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2000, (2): 39–41.
- [11] 陆志峰, 鲁剑巍, 潘勇辉, 等. 钾素调控植物光合作用的生理机制[J]. *植物生理学报*, 2016, 52(12): 1773–1784.
Lu Z F, Lu J W, Pan Y H, *et al.* Physiological mechanisms in potassium regulation of plant photosynthesis[J]. *Plant Physiology Journal*, 2016, 52(12): 1773–1784.
- [12] 胡文诗, 孟凡金, 李静, 等. 不同钾肥用量对冬油菜主要光合器官演替的影响[J]. *中国油料作物学报*, 2021, 43(5): 843–850.
Hu W S, Meng F J, Li J, *et al.* Effects of potassium application rates on succession of main photosynthetic organs in oilseed rape[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2021, 43(5): 843–850.
- [13] 周敏, 毛曦, 陈环, 等. 葡萄钾营养及其在果实中积累的研究进展[J]. *果树学报*, 2017, 34(6): 752–761.
Zhou M, Mao X, Chen H, *et al.* Research advances on potassium nutrition and berry accumulation in grape vines[J]. *Journal of Fruit Science*, 2017, 34(6): 752–761.
- [14] Lacombe B, Pilot G, Michard E, *et al.* A Shaker-like K^+ channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2000, 12(6): 837–851.
- [15] Deeken R, Geiger D, Fromm J, *et al.* Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2002, 216: 334–344.
- [16] Dennison K L, Robertson W R, Lewis B D, *et al.* Functions of AKT1 and AKT2 potassium channels determined by studies of single and double mutants of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127: 1012–1019.
- [17] Tian Q, Shen L, Luan J, *et al.* Rice shaker potassium channel OsAKT2 positively regulates salt tolerance and grain yield by mediating K^+ redistribution[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2021, 44(9): 14101.
- [18] Shen L, Tian Q, Yang L, *et al.* Phosphatidic acid directly binds with rice potassium channel OsAKT2 to inhibit its activity[J]. *The Plant Journal*, 2020, 102: 649–665.
- [19] Marten I, Hoth S, Deeken R, *et al.* AKT3, a phloem-localized K^+ channel, is blocked by protons[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96: 7581–7586.
- [20] 李飒, 彭云峰, 于鹏, 等. 不同年代玉米品种干物质积累与钾素吸收及其分配[J]. *植物营养与肥料学报*, 2011, 17(2): 325–332.
Li S, Peng Y F, Yu P, *et al.* Accumulation and distribution of dry matter and potassium in maize varieties released in different years[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2011, 17(2): 325–332.
- [21] 王毅, 武维华. 植物钾营养高效分子遗传机制[J]. *植物学报*, 2009, 44(1): 27–36.
Wang Y, Wu W H. Molecular genetic mechanism of high efficient potassium uptake in plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2009, 44(1): 27–36.
- [22] Gajdanowicz P, Michard E, Sandmann M, *et al.* Potassium (K^+) gradients serve as a mobile energy source in plant vascular tissues[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108: 864–869.
- [23] 汤利, 施卫明, 王校常. 植物钾吸收转运基因的克隆与作物遗传改良[J]. *植物营养与肥料学报*, 2001, 7(4): 467–473.
Tang L, Shi W M, Wang X C. Cloning of potassium transport genes in higher plants and crop molecular breeding[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2001, 7(4): 467–473.
- [24] Su Y H, North H, Grignon C, *et al.* Regulation by external K^+ in a maize inward Shaker channel targets transport activity in the high concentration range[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17: 1532–1548.
- [25] Nieves-Cordones M, Alemán F, Martínez V, *et al.* K^+ uptake in plant roots. The systems involved, their regulation and parallels in other organisms[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171: 688–695.
- [26] Dreyer I, Gomez-Porras J L, Riedelsberger J. The potassium battery: A mobile energy source for transport processes in plant vascular tissues[J]. *The New Phytologist*, 2017, 216: 1049–1053.
- [27] Feng X, Liu W, Qiu C, *et al.* HvAKT2 and HvHAK1 confer drought tolerance in barley through enhanced leaf mesophyll H^+ homeostasis [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(8): 1683–1696.
- [28] 沈方科, 何明雄, 黄芬芬, 等. 断根、环割处理对烤烟内源激素水平及钾积累的影响[J]. *中国烟草学报*, 2011, 17(6): 37–42.
Shen F K, He M X, Huang Q F, *et al.* Effects of root-cutting and girdling on endogenous hormone level and potassium accumulation in flue-cured tobacco[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2011, 17(6): 37–42.