

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2021.01.006

赵鹏妹, 杨顺瑛, 郝东利, 等. 水稻钾素营养的基因型特征及分子机制初探. 土壤, 2021, 53(1): 37–46.

水稻钾素营养的基因型特征及分子机制初探^①

赵鹏妹^{1,2}, 杨顺瑛¹, 郝东利¹, 苏彦华^{1*}

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

摘要: 理解水稻(*Oryza sativa*)的钾素营养特征是提高水稻的钾素利用效率及其生产效应的重要环节。本文针对土壤钾素供应的时空非均匀性, 采用水培和分根模拟试验, 研究了日本晴(NB)、武育粳 18(WYJ18)、南光(NG)及桂单 4 号(GD4) 4 个水稻基因型品种的钾素营养特征。结果表明: 低钾(0.1 mmol/L K⁺)或高钾(5 mmol/L K⁺)条件均会显著抑制水稻的生长。与高钾条件相比, NB 和 GD4 在低钾及正常供钾(1 mmol/L K⁺)水平下即可保持较高的生物量, 推测 NB 和 GD4 有更强的钾吸收及转运能力。分根供钾试验表明, 4 种基因型水稻缺钾一侧的根长和根表面积均受到诱导, 而地上部生物量与全根供钾时没有明显差异, 说明局部根系供钾即可满足水稻生长需求。进而以 NB 为材料, 通过实时荧光定量 PCR, 发现水稻根内钾转运基因 *OsKATI;1* 主要定位于根部, 且受高钾和低钾抑制, 地上部钾分配基因 *OsAKT2/3* 主要定位于地上部且受高钾诱导, 根-茎钾传输系统 *OsSKOR* 基因主要定位于距根尖大于 1.5 cm 的成熟区, 且在根部的表达丰度受低钾诱导; 水稻伤流试验结果表明, 低钾条件下伤流液的强度和组分与根-茎传输基因 *OsSKOR* 的表达特征有较好的吻合度, 推测 *OsSKOR* 基因可能在根-茎钾转运过程中发挥重要作用。

关键词: 水稻; 钾; 生理响应; 钾转运; 分子机制

中图分类号: Q786; Q945.1 **文献标志码:** A

Genotypic Characteristics and Molecular Mechanism of Potassium Nutrition in Rice

ZHAO Pengshu^{1,2}, YANG Shunying¹, HAO Dongli¹, SU Yanhua^{1*}

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Understanding potassium nutrition characteristics of rice is an important step to improve the potassium utilization efficiency and production effect of rice. Aims at the temporal and spatial heterogeneity of soil potassium supply, in this study, Nipponbare (NB), Wuyujing 18 (WYJ18), Nanguang (NG) and Guidan 4 (GD4) four genotypes of rice were used to evaluate the potassium response characteristics by using hydroponic and root division simulation tests. The results showed that insufficient potassium (0.1 mmol/L K⁺) or excess (5 mmol/L K⁺) significantly inhibited rice growth. NB and GD4 maintained high biomass under low and normal potassium (1 mmol/L K⁺) supply levels compared with high potassium conditions, possibly attributed to the stronger potassium absorption and transport capacity of NB and GD4. Root division experiment simulated the uneven distribution of potassium showed root lengths and surface areas of the four genotypes were induced on potassium-deficient side, but no significant difference was found between the aboveground biomass compared with the total root potassium supply, indicating the partial potassium supply also can meet the growth requirements of rice. NB was used to study the expression position by using real-time quantitative PCR, and it was found that potassium transport gene *OsKATI;1* in rice roots is mainly located in the roots and inhibited by high and low potassium. The above-ground potassium distribution gene *OsAKT2/3* is mainly located in the shoots and induced by high potassium. The root-stem potassium transport system *OsSKOR* is mainly located in a mature region with a root tip greater than 1.5 cm, and the expression abundance at the root was induced by low potassium. The result of rice injury test showed that the strength and composition of the wound fluid had a good agreement with the expression of root-stem transfer gene *OsSKOR* under low potassium condition, suggesting *OsSKOR* may play an important role in root-stem potassium transport.

Key words: Rice; Potassium; Physiological response; Potassium transport; Molecular mechanism

^①基金项目: 国家自然科学基金项目(31672230)资助。

* 通讯作者(yhsu@issas.ac.cn)

作者简介: 赵鹏妹(1993—), 女, 甘肃白银人, 硕士研究生, 主要从事植物营养分子生理研究。E-mail: pszhao@issas.ac.cn

钾(K)是作物生长发育所必需的关键矿质营养元素。作为含量最丰富的阳离子,植物细胞内的钾离子浓度通常在 100 mmol/L 以上,占植物体干重的 2%~10%。在钾营养充足的条件下,植物体内的含钾量一般可高达其干重的 4% 以上^[1],而富钾植物如空心莲子草等,植株含钾量甚至可达 13%^[2]。与另外两种大量营养元素氮、磷不同,钾不直接参与植物体内蛋白质、核酸、多糖等生命物质的组成,其生理功能主要体现在基于该离子的运动和平衡所产生的调控作用上。细胞内钾浓度直接控制细胞的体积和膨压,对细胞、组织的伸长及韧性有重要调控作用,与植物体内水分的保持和抗旱性关系极为密切,并且对病虫害等侵害提供物理屏障和机械抗性^[3]。与钾素作为重要调控元素的生理作用相对应,植物钾素营养的关键环节除了根系从土壤中吸收、获取钾素之外,钾素在植株体内各部位的高效转运和分配过程也尤为重要。

土壤是植物根系获取钾营养的主要来源。我国土壤钾素及有效钾含量随地形、土壤质地、气候条件和土壤发育程度呈由北至南而递减的趋势^[4]。我国耕地土壤缺钾面积达 60% 左右,南方水稻主产区由于高温多雨、淋溶作用等土壤缺钾面积高达 70% 以上,其中近 90% 的水稻土处于钾亏缺状态^[5-6]。土壤供钾不足会导致作物产量和品质的降低^[7-8]、根系早衰和抗逆性下降,易感染病虫害和出现倒伏现象^[9-10]。因此,保证钾素供应是水稻等作物高产和优质的重要环节。诸多研究表明,稻田增施钾肥能够显著提高水稻产量及品质^[11-12]。在我国钾肥资源供应严重不能自给的背景下,通过生理学研究和分子生物学手段,掌握作物的钾素营养规律,针对钾素利用的关键环节挖掘关键基因资源,是目前钾素养分优化管理以及对作物进行钾高效分子调控的重要环节之一。

通常,植物对土壤钾素的吸收、利用过程可分为 3 个阶段:①根系表皮吸收土壤中的钾离子;②钾在根内及根-地上部的传输;③钾在地上各组织部位的分配及行使调控功能(如气孔运动)^[13]。这些过程分别由定位于细胞质膜上的相应钾转运体和钾离子通道来承担。在模式植物拟南芥中,根系从土壤中吸收钾离子及钾由根表向内部组织的转运主要是通过钾转运系统如高亲和钾转运体(KUP)及钾离子通道基因 *AKT1* 来完成^[14-15];其中,KUP 主要负责根系从土壤吸收钾离子^[14],而 *AKT1* 基因主要介导钾离子在植物根内的转运^[15-16]。外排型钾通道拟南芥 *AtSKOR* 基因主要定位于根的韧皮部,其作用是将根中的钾由韧皮

部分泌至木质部,进而实现钾离子经由木质部的根-茎长距离运输^[17]。缺失该通道活性导致拟南芥植株地上部含钾量降低约 50%^[17]。此外,*AtSKOR* 基因的表达丰度受脱落酸(ABA)抑制,随着 ABA 处理时间的延长,几乎检测不到 *AtSKOR* 基因的存在,暗示 ABA 有可能参与钾离子所介导的渗透调节且在调控植物生长方面起着重要作用^[17]。在地上部,钾的再运输或分配主要由双向整流型钾通道基因 *AKT2/3* 负责。*AKT2/3* 主要在拟南芥包括根、茎、叶柄、花及叶片的韧皮部表达,通过介导钾离子在其中的装载和卸载从而实现钾离子在植株各部位的分配^[18]。作为钾离子调控功能的典型例证,拟南芥保卫细胞中的 *KATI* 和 *KAT2* 基因共同介导钾离子的吸收,其运作的结果使得保卫细胞钾离子积累,细胞膨压增大而促使气孔开放^[19]。与此相反,外排型钾通道 *GORK* 的运作则降低保卫细胞的钾浓度从而关闭气孔^[20]。

上述过程在拟南芥中已经比较明晰,而在水稻中目前仅限于类似的推测,还缺乏相应的实验证据。同时,与拟南芥相比,水稻中的 KUP 和钾通道蛋白则更为众多,预示其作用机制可能更为复杂。本文通过水培试验研究了不同供钾强度对 4 种基因型水稻日本晴(NB)、武育梗 18(WYJ18)、南光(NG)及桂单 4 号(GD4)生长特性及养分吸收的影响,同时通过分根试验探究了根系局部供钾条件下水稻的生长状况,进而以日本晴为材料通过实时荧光定量 PCR 研究了水稻钾传输/转运通道基因 *OsKATI1*、*OsSKOR* 和 *OsAKT2/3* 的表达定位及其对外界供钾水平的响应特征,通过伤流试验探索了低钾条件下水稻根茎钾传输能力与 *OsSKOR* 基因之间存在的可能关联,为理解水稻钾的体内转运过程提供有益的依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及培养条件

试验所用的 4 种基因型水稻品种分别为模式品种日本晴(NB)和生产品种武育梗 18(WYJ18)、南光(NG)及桂单 4 号(GD4)。水稻种子经 NaClO (2.5%, *V/V*)溶液消毒 30 min,再用蒸馏水清洗 6~8 次去除种子表面的消毒液,于 37℃ 培养箱浸种 24 h 使种子充分吸水后,均匀放置于尼龙网上暗处萌发 6 d;挑选长势一致的幼苗,3 颗 1 束移栽于盛有 8 L 国际水稻完全营养液(IRRI 营养液)的周转箱中培养 1 周。周转箱四周及底部喷黑漆,以防藻类生长。IRRI 营养液配方: 1.25 mmol/L NH_4NO_3 , 0.3 mmol/L KH_2PO_4 , 0.5 mmol/L K_2SO_4 , 1 mmol/L CaCl_2 , 1 mmol/L

MgSO₄·7H₂O, 0.5 mmol/L Na₂SiO₃·9H₂O, 20 μmol/L EDTA-Fe, 20 μmol/L H₃BO₃, 0.32 μmol/L CuSO₄·5H₂O, 9 μmol/L MnCl₂·4H₂O, 0.77 μmol/L ZnSO₄·7H₂O 和 0.39 μmol/L Na₂MoO₄·2H₂O, 用 HCl 调 pH 至 5.5^[21]。

温室培养条件: 27℃/25℃(昼/夜), 16 h/8 h(光照/黑暗), 相对湿度 70%, 光强为 400 μmol/(m²·s)。并于移苗后的第 3 天、第 5 天及第 7 天更换营养液, 第 7 天选则长势一致的水稻苗分别于 1 mmol/L CaSO₄ 溶液(1 min)及蒸馏水中冲洗, 以除去附着于根表面的离子, 然后置于装有不同钾处理的 IRR1 营养液的 1.2 L PVC 桶中进行培养, 每桶 4 穴。

1.2 试验设计

水培试验: 设置 3 个钾水平处理: 低钾(LK, 0.1 mmol/L K⁺), 即在缺钾的 IRR1 营养液中加入所需浓度的 KCl, 并用 NaH₂PO₄ 代替 KH₂PO₄, 其他成分保持不变, 其余处理钾处理方式相同; 高钾(HK, 5 mmol/L K⁺); 正常钾(MK, 1 mmol/L K⁺), 即中钾, 为对照。每 2 d 更换 1 次营养液, 处理 10 d 后收样。样品根系用 1 mmol/L CaSO₄ 及蒸馏水依次清洗干净, 每处理收 3 个重复, 将地上部和根部剪开, 在烘箱中 105℃ 杀青 30 min, 接着 75℃ 左右烘 72 h, 称干重后再粉碎样品, 用于钾含量测定。

分根试验: 取上述正常钾浓度培养条件下生长 1 周且长势一致的水稻苗用于分根试验。水稻苗生长于 IRR1 营养液(不含钾), 两侧根系处理分别为: ①+K(5 mmol/L KCl); ②-K(5 mmol/L NaCl), 其他养分均同完全营养液。每个分根培养箱种 6 穴, 每穴 8 棵苗。分根处理两侧营养液均为 6 L, 每 2 d 换 1 次, 处理 10 d 后取样测定总根长和根表面积。

基因表达试验: 取上述正常钾浓度培养条件下生长 1 周且长势一致的日本晴水稻苗进行低钾(LK, 0.1 mmol/L K⁺)、正常钾(MK, 1 mmol/L K⁺)、高钾(HK, 5 mmol/L K⁺)处理 4 d 和 7 d 后, 将水稻地下部样品分整体根、根段(0~1.5、1.5~3.0、>3.0 cm)及根茎连接处收样; 并于处理当天早上 9:00 对样品进行 ABA 处理(完全营养液中加入 ABA 至浓度为 10 μmol/L), 分别于处理 0、2、4、8、12、24、72 h 不同时间点收取水稻根样, 迅速置于液氮中速冻, -80℃ 保存备用, 用于进行不同钾离子通道基因在各个部位的表达试验。

伤流试验: 收集水培试验中低钾处理 4 d 和 7 d 的水稻伤流液。具体为: 于当日 17:00 距离根茎结合处约 2 cm 处用刀割去上部水稻茎秆, 并用脱脂棉擦干切口液后, 再用装有脱脂棉的自封袋套于剩余茎

秆上, 并保持脱脂棉和切口充分接触, 放于黑暗环境中收集, 于次日早上 9:00 取回称重。脱脂棉吸收伤流液前后重量差即为伤流量^[22]。于装有脱脂棉的自封袋中加入适量蒸馏水, 揉捏混匀后, 用带有滤芯的注射器挤出伤流液保存, 用于进一步分析伤流液中 ABA 含量和钾含量。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 ABA 含量及钾含量的测定 伤流液中的 ABA 含量使用 MALLBIO 公司提供的植物激素脱落酸(ABA)试剂盒 MBE21031 进行测定。不同基因型水稻在不同钾浓度处理下地上部、根部及伤流液中钾含量通过 HG-5 型火焰光度计(北京检测仪器有限公司)测定^[23]。

1.3.2 水稻根系活力的测定 用伤流强度评估根系活力, 计算公式为: 伤流强度=伤流液中钾含量/(烘干根重×时间)。伤流液的收集时间为 16 h, 伤流液收集完成后将根系放于烘箱烘至恒重并称量。

1.3.3 根表面积及根长的测定 通过 Epson 根系扫描仪获取分根试验中+K 和-K 处理 10 d 的水稻根系图像, 通过 WinRHIZO 软件分析获得其根长及根表面积指标。

1.3.4 水稻钾通道基因检索与引物设计 从水稻基因组网站(<http://rice.plantbiology.msu.edu>)检索得到 *OsAKT2/3*, *OsKATI;1* 及 *OsSKOR* 的 cDNA 序列, 采用 Primer 5 软件及 NCBI 网站 Primer-BLAST 工具设计引物(表 1)。采用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)^[24] 对水稻 SKOR 启动子顺式作用元件进行预测分析。

1.3.5 水稻样品 RNA 提取及钾通道基因表达量的检测 用 Trizol 法提取不同钾浓度及 ABA 处理基因表达试验水稻各个部位样品 RNA, 使用超微量核酸蛋白测定仪 Nanodrop 2000(北京芯起点基因科技)测定 RNA 浓度, 并用甲醛变性胶电泳检测 RNA 质量。甲醛变性胶的制备: 称取 0.72 g Agarose 于三角瓶中, 加入 Running buffer(10×)及 DEPC 水, 于微波炉溶解, 待降温至 60℃, 于通风橱中加入甲醛溶液, 此时溶液体积约 60 ml, 充分摇匀后倒板。RNA 电泳样品制备: 于 1.5 ml 离心管中加 0.5 μg RNA 样品及 5 μl 的 Mix 混合液, 并用 DEPC 水补充至 13 μl, 混匀后 65℃ 金属浴加热 10 min, 冰上冷却后用于电泳检测。电泳条件: 80 V, 1 h。

反转录及基因扩增: 采用 Prime Script RT reagent Kit (Takara)将 RNA 反转录为 cDNA, 用于基因转录表达的半定量及定量检测。用 2×Phanta Master

Mix(Vazyme)进行半定量的 PCR 扩增检测,用 LightCycler480 II 荧光定量 PCR 仪(罗氏公司)对基因

表达进行定量检测,内参基因选用 *Actin* (Os03g50885),基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算。

表 1 *OsKAT1;1*、*OsAKT2/3* 和 *OsSKOR* 基因表达丰度检测引物

Table 1 Primers used to amplify *OsKAT1;1*, *OsAKT2/3*, *OsSKOR* genes of rice for testing expressive abundance

基因名称	引物序列(5'-3')
<i>Actin</i>	qF: TTATGGTTGGGATGGGACA qR: AGCACGGCTTGAATAGCG
<i>OsKAT1;1</i>	qF: CCACAGCACCAGCCGCACCCGAGACTT qR: CCCAACAGCTTGGTCTACTGATCCTCAGA
<i>OsAKT2/3</i>	qF: GATCAACCTGCCCGGCACCATGG qR: CTATGATCCAGACACCGAGTCCATC
<i>SKOR</i> (第一对引物)	qF1: TGGCAGGACTGCATTGCATA qR1: TGATCCTGTCATGGCCTGAT
<i>SKOR</i> (第二对引物)	qF2: ACGCTGATAGAATCTGGAGCAGA qR2: AATTAGTCGCAACAGTTCTAGCCTG

1.4 数据处理

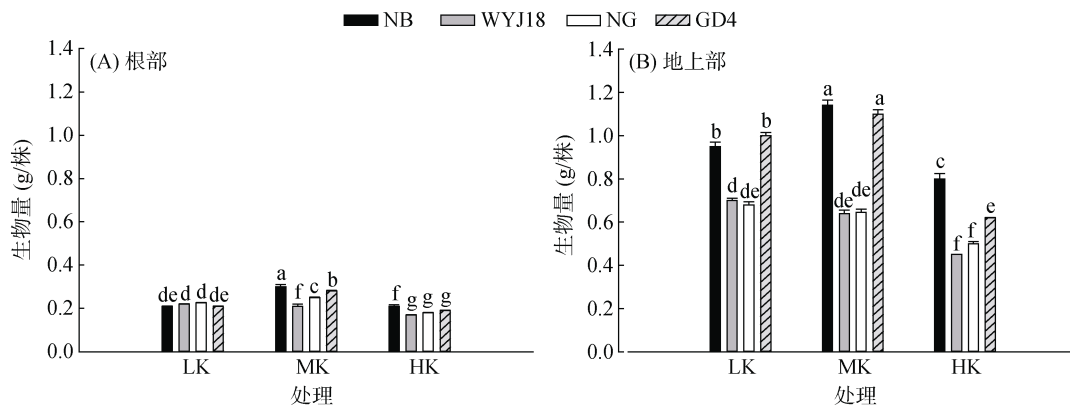
数据统计分析使用 SPSS 16.0,用 T-test 进行显著性检验,采用 Sigma Plot 13.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同供钾水平对 4 种基因型水稻生长的影响

不同供钾水平的水培试验结果表明,高钾条件(HK)对 4 种基因型水稻的生长都有不同程度的抑制

作用,地上部和根部生物量与正常供钾条件(MK)相比均显著降低(图 1)。高钾条件下根部生物量降低的幅度在不同基因型水稻中差异不大,均为 30.0% 左右(图 1A)。地上部生物量降低幅度最大的是 GD4,达 43.6%,降低幅度最小的是 NB,为 22.4%(图 1B)。与高钾条件相比,WYJ18 及 NG 在低钾及正常供钾条件下的生物量较低,而 NB 和 GD4 在 3 个钾水平下生物量均较高(图 1)。



(图中 LK 为低钾处理, MK 为中钾处理, HK 为高钾处理; 柱图上方不同小写字母表示不同钾水平及基因型水稻下处理间差异在 $P < 0.05$ 水平显著; 下同)

图 1 不同基因型水稻在不同供钾水平下根部及地上部生物量

Fig. 1 Biomass of roots and shoots of rice genotypes under different K supplying levels

2.2 不同供钾水平对 4 种基因型水稻植株含钾量的影响

图 2A 结果表明, 4 种基因型水稻根部的含钾量在正常供钾条件下最高,而在高钾和低钾条件下其含钾量都明显下降。与正常供钾相比,低钾处理时 4 种水稻的根部含钾量均降低了约 4.5 倍;而高钾处理的根系含钾量降低约 40%(图 2A)。然而 4 种基因型

水稻的地上部含钾量则随外界供钾浓度的增加呈现出较一致的显著增加趋势(图 2B)。其中正常供钾时, 4 种水稻的含钾量是低钾条件时的 2.5 倍;继续增加供钾浓度(HK),地上部含钾量仅呈略有增加趋势(增幅均 15%)(图 2B)。这一结果表明,水稻根系对供钾浓度较为敏感,缺钾或过量供钾不利于水稻生长。在同一供钾水平下,无论是在根部还是地上部,4 种水

稻的含钾量均无显著差异(图 2A 和 2B)。而在钾素利用效率方面, 4 种水稻在正常供钾条件下的钾积累量达到最高, 其中 NB 和 GD4 的钾积累量较 WYJ18 和

NG 增加了近 1 倍(图 2C), 结合图 1B 结果, NB 及 GD4 在低钾条件下即可保持较好的生长, 推测 NB 和 GD4 较 WYJ18 和 NG 有更强的钾吸收及转运能力。

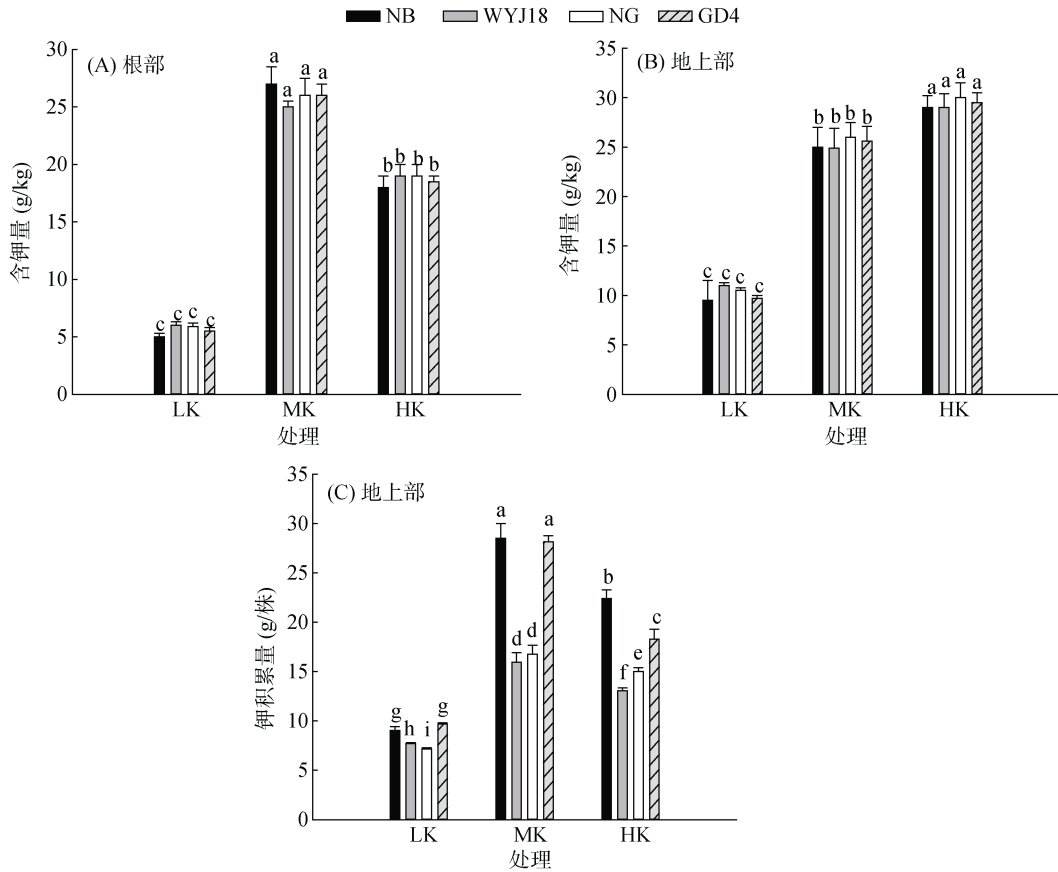


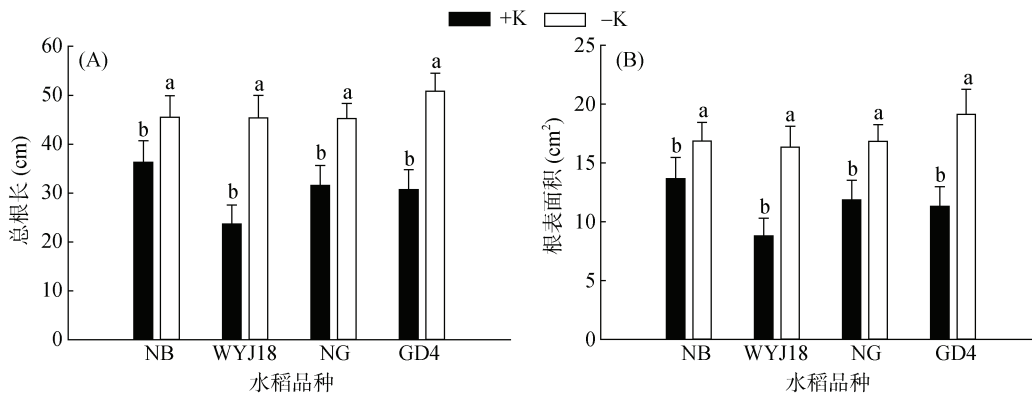
图 2 不同基因型水稻在不同处理条件下的含钾量

Fig. 2 Potassium content of different rice genotypes in response to different growth conditions

2.3 根系非均匀供钾对不同基因型水稻生长的影响

将在正常供钾条件下生长一周的水稻苗根系均分为两部分置于分根根系生长箱中, 一侧供钾(5 mmol/L K^+), 一侧缺钾处理 10 d, 结果表明, 缺钾一

侧 4 种基因型水稻的根系生长均比供钾侧更快。与供钾侧相比, 不同基因型水稻在缺钾侧的总根长均显著增加(图 3A)。同时根表面积的变化趋势与总根长的变化趋势一致, 缺钾侧的根表面积显著大于供钾一侧(图 3B), 而分侧供钾时地上部的生物量与全根



(柱图上方不同小写字母表示同一水稻品种下处理间差异显著($P < 0.05$))

图 3 分根试验中不同基因型水稻的总根长及根表面积

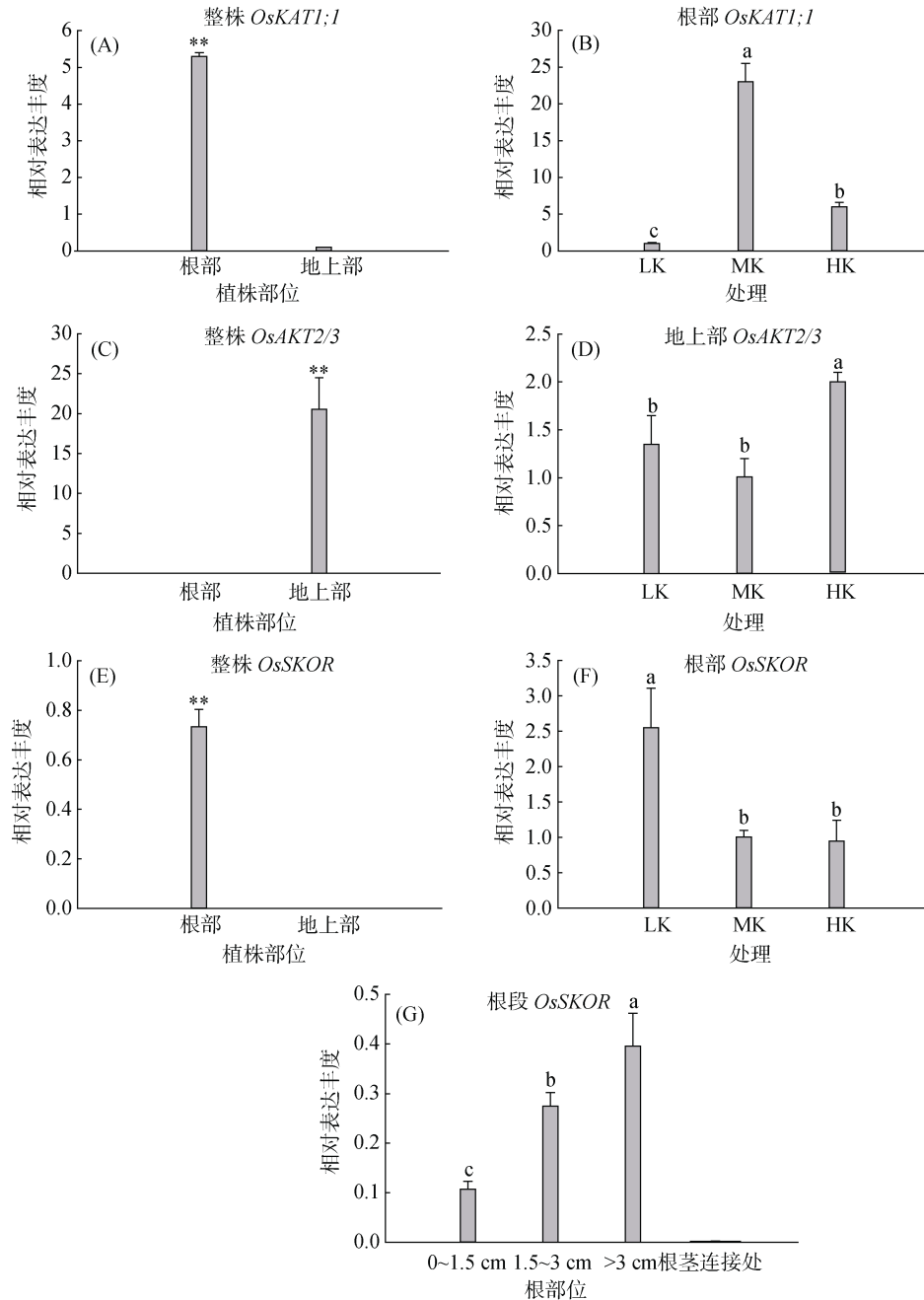
Fig. 3 Total root lengths and root surface areas of different rice genotypes in split-root experiments

供钾时没有显著差异(同图 1B), 说明根部分侧供钾对地上部生长的影响非常小, 根系局部供钾即可满足水稻生长需求。

2.4 水稻钾离子通道 *OsKATI;1*、*OsAKT2/3* 及 *OsSKOR* 基因对外界不同供钾水平的响应特征

以 NB 为研究材料, 通过实时定量 PCR 研究表明, 内向型钾离子通道基因 *OsKATI;1* 主要定位于根部(图 4A), *OsAKT2/3* 基因主要定位于地上部(图 4C), 其中 *OsAKT2/3* 基因在地上部的表达丰度受高

钾的诱导, 增幅约 1 倍, 而在低钾下的表达丰度与对照相比无显著差异(图 4D)。在根部, *OsKATI;1* 基因在正常供钾条件下的表达丰度最高(图 4B)。而外向型钾离子通道 *OsSKOR* 则主要在水稻的根系表达(图 4E), 进一步的根系分段定量 PCR 结果表明, *OsSKOR* 基因主要在距根尖大于 1.5 cm 的成熟区表达(图 4G), 且在根部的表达丰度受低钾诱导(图 4F), 而对高钾的响应不敏感, 推测 *OsSKOR* 很可能是一个在低钾环境中起重要作用的钾离子通道基因。



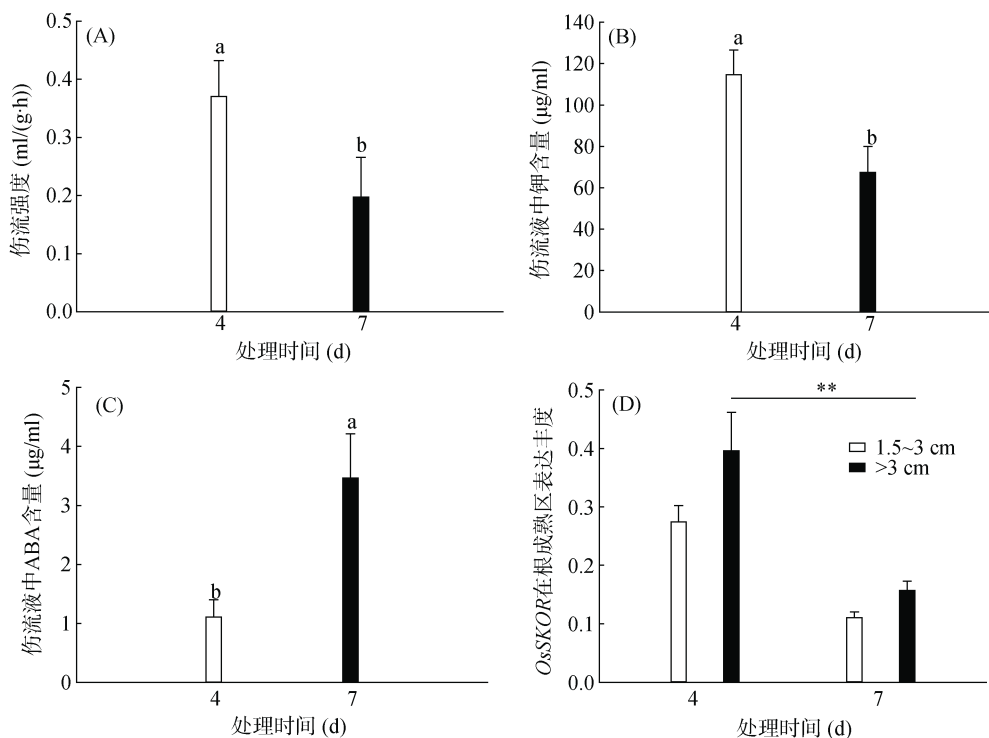
(柱图上方**或不同小写字母表示植株不同部位或不同处理间差异在 $P < 0.05$ 水平显著)

图 4 不同供钾水平下水稻钾离子通道 *OsKATI;1*、*OsAKT2/3* 及 *OsSKOR* 基因响应
Fig. 4 Responses of *OsKATI;1*, *OsAKT2/3* and *OsSKOR* genes of rice to different K supplying levels

2.5 低钾条件下水稻根系活力及伤流液中钾含量、ABA 含量及与 *OsSKOR* 的关联

在拟南芥中, *SKOR* 基因在根茎钾传输过程中发挥着极其关键的作用^[17]。为进一步了解 *OsSKOR* 基因在低钾条件下可能发挥的作用, 本研究通过伤流试验评估了 NB 水稻在低钾处理后的根系活力, 同时测定了伤流液组分中的 ABA 含量及钾含量。结果表明, 随着低钾处理时间的延长, 根系活力逐渐降低, 与处理 4 d 相比, 处理 7 d 后的水稻根系

活力降低了约 50%(图 5A); 低钾处理 7 d 后, 伤流液中 ABA 含量是低钾处理 4 d 的 3 倍(图 5C), 而钾含量比低钾处理 4 d 降低约 1 倍(图 5B), 随低钾处理时间的延长, 伤流液中 ABA 含量与钾含量呈相反的变化趋势。与此同时, *OsSKOR* 基因的表达丰度却随着低钾处理时间的推移而下降(图 5D), 暗示缺钾条件下, 水稻体内积累的 ABA 可能与参与钾离子从根向茎传输过程中的钾离子通道基因 *OsSKOR* 存在紧密联系。



(柱图上方**或不同小写字母表示不同处理时间间差异在 $P < 0.05$ 水平显著; 下同)

图 5 低钾处理下不同时间水稻伤流强度(A)、伤流液组分中钾(B)、ABA(C)含量及 *OsSKOR* 在根成熟区的表达丰度(D)
Fig.5 Bleeding sap intension (A), K (B) and ABA (C) contents in bleeding saps in different time under low K condition and relative expression (D) of *OsSKOR* in maturation zone of root

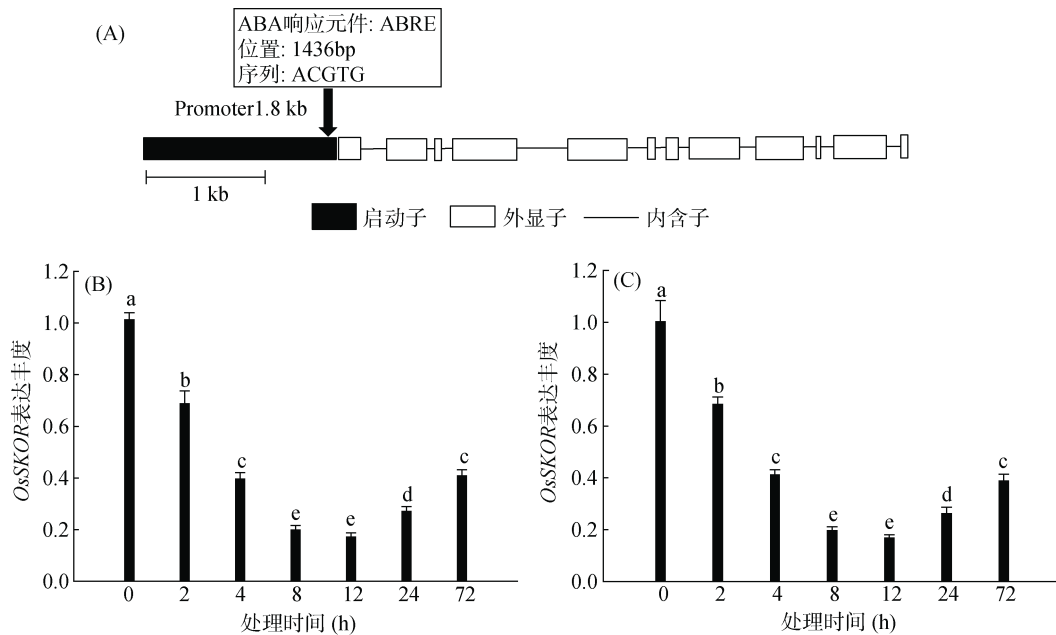
2.6 *OsSKOR* 基因的启动子结构及外源添加 ABA 对 *OsSKOR* 表达丰度的影响

启动子作为调控基因表达的重要顺式作用元件, 在基因表达过程中具有重要作用。本研究使用启动子分析软件对 *OsSKOR* 基因起始密码子 ATG 上游 1.8 kb 的序列进行了预测, 结果显示, *OsSKOR* 基因启动子内除含有必需的核心元件 CAAT-box 和 TATA-box 外, 还存在对 ABA 响应的 ABRE 元件(图 6A), 预测 ABA 可能调控 *SKOR* 基因的转录水平。ABA 作为一种胁迫激素, 在低温、高温、干旱和盐害等多种胁迫下, 植物体 ABA 含量大幅度升高。进而, 为进一步证实 ABA 含量与 *OsSKOR* 基因转录丰度的直接关系, 本研究在正常供钾水平(对照)中添加

10 $\mu\text{mol/L}$ ABA, 研究 ABA 处理不同时间后水稻根系样品 *OsSKOR* 基因表达量的变化。提取 RNA 并通过定量 PCR 研究发现, 与对照相比, 使用两对引物的平行定量试验结果均表明, ABA 显著抑制 *OsSKOR* 基因的表达, 随着处理时间的延长, 其表达丰度显著降低(图 6B 和 6C)。这些结果表明, 低钾条件下, ABA 很可能在钾从水稻根部向地上部的传输过程中扮演着重要角色, 相关研究需要进一步证实。

3 讨论

钾是植物生长最关键的矿质营养元素之一, 在植物生长发育的各个时期都发挥着关键作用。在我国耕地土壤普遍缺钾的背景下, 由于长期耕作过程中施肥



(A: *OsSKOR* 的基因结构; B: 外源 ABA 处理不同时间水稻根系 *SKOR* 相对表达丰度(第一对引物); C: 外源 ABA 处理不同时间水稻根系 *SKOR* 相对表达丰度(第二对引物))

图 6 *OsSKOR* 基因结构及其对 ABA 的响应特征

Fig. 6 Structure (A) of *OsSKOR* gene and expression (B and C exogenous sources) of root-specific *SKOR* gene in response to ABA

量、肥料种类及施肥方式的差异,促使土壤钾的供应强度及空间分布存在非均匀性^[4]。

本研究以日本晴(NB)、武育梗 18(WYJ18)、南光(NG)及桂单 4 号(GD4)四种基因型水稻为材料模拟根系钾不均匀分布状况,发现 4 种不同基因型水稻缺钾一侧的根系总根长和根表面积均显著高于供钾侧,这与王为木等^[8]研究发现水稻根系在缺钾时变长且侧根增多结果一致。不均匀供钾时水稻地上部生物量与全根供钾没有显著差异,根系局部供钾即可满足水稻正常的生长需求,由此可以说明,田间施肥方式侧施等不影响水稻的生长。通过水培试验对 4 种基因型水稻供应不同钾水平的研究发现,4 种水稻在正常供钾(1 mmol/L K⁺)条件下生物量达到最高,这与薛欣欣和李小坤^[25]报道的水稻品种丰两优香 1 号和两优 6326 在中等钾肥供应水平下其地上部干物质量即可达到较高水平的结果一致;钾积累量在正常供钾条件下达到最高,而高钾(5 mmol/L K⁺)条件反而抑制水稻生长及钾的积累,由于 NB 和 GD4 在低钾及正常供钾条件下均能保持较高的生物量,推测 NB 和 GD4 具有高效利用养分产生生物量的能力。

植物通过根系从土壤中吸获取钾营养,再将钾分配到各个部位,主要是由定位于细胞膜上的钾转运体及钾通道完成^[26]。本研究以 NB 为研究材料,初步分析了水稻钾离子通道 *OsKATI;1*、*OsSKOR* 及

OsAKT2/3 基因的定位及其对外界不同供钾状态的响应特征,结果表明, *OsAKT1;1* 基因主要定位于根部,其表达受高钾和低钾抑制,在正常供钾条件下表达丰度最高。*OsAKT2/3* 基因在地上部的表达丰度受高钾供应的诱导,其作用机理有待进一步深入研究。而 *OsSKOR* 基因与已经报道的 *AtSKOR* 基因高度同源^[17],在根部特异性表达,与 Kim 等^[27]对其定位研究结果一致,且其表达丰度受外界低钾的诱导,推测是一个在外界低钾环境中起关键作用的基因。根系伤流不仅可以作为根系活力的重要指标,也是植物体内溶质从根向茎传输能力的体现^[28],本研究通过伤流试验初步探讨了低钾条件下水稻的根系活力及伤流钾含量与 *OsSKOR* 基因之间的关系,发现随低钾处理时间的延长伤流液中 ABA 含量增加;同时伤流强度及钾离子含量随处理时间的延长而降低, *OsSKOR* 基因的表达量也同步降低。一方面,长时间缺钾会影响根系活力, *OsSKOR* 基因的表达丰度降低,导致从根部转运到地上部的钾减少,暗示 *OsSKOR* 基因在水稻根茎钾传输过程中起关键作用,很可能与已经报道的 *AtSKOR* 基因的功能一致^[17];另一方面,长时间缺钾导致 ABA 含量大幅度增加,而外源添加 ABA 显著降低了 *OsSKOR* 基因的表达丰度。推测在水稻中,ABA 很可能参与调控了 *OsSKOR* 基因介导的根茎钾传输过程。水稻伤流液中含钾量与 ABA 含量之

间的变化关系与本研究发现 *OsSKOR* 基因在低钾下起着更关键的作用及前人研究发现 *SKOR* 基因钾外排能力受 ABA 抑制的结果相吻合^[17], 推测水稻伤流液中观察到的现象可能与 *OsSKOR* 基因的功能有关。鉴于 *OsSKOR* 基因在根茎钾传输环节及其在低钾胁迫中可能发挥的重要作用, 进一步深入研究其功能并充分发挥其用钾能力很可能是一项行之有效的提高作物钾素利用效率的措施。

4 结论

1) 高钾条件可抑制 4 种基因型水稻地上部和根部生物量, 根部生物量降低幅度均为 30% 左右, 地上部生物量降低幅度最大的是 GD4, 达 43.6%, 降低幅度最小的是 NB, 为 22.4%。与高钾条件相比, WYJ18 及 NG 在低钾及正常供钾条件下的生物量较低, 而 NB 和 GD4 在 3 个钾水平下生物量均较高; 与正常供钾相比, 4 种基因型水稻低钾处理时根部含钾量均降低了约 4.5 倍, 高钾处理的根系含钾量降低约 40%, 地上部含钾量随外界供钾浓度的增加呈现出较一致的显著增加趋势; 4 种不同基因型水稻不均匀供钾时缺钾一侧的根系总根长和根表面积均显著高于供钾侧。

2) NB 水稻钾离子通道 *OsKATI;1* 基因主要定位于根部, 其表达受高钾和低钾抑制, 在正常供钾条件下表达丰度最高; *OsAKT2/3* 基因在地上部的表达丰度受高钾供应的诱导; *OsSKOR* 基因在根部特异性表达, 且其表达丰度受外界低钾的诱导。

3) 低钾处理时间延长, 根系活力逐渐降低, 处理 7 d 比处理 4 d 的水稻根系活力降低了约 50%, 低钾处理 7 d 后, 伤流液中 ABA 含量是低钾处理 4 d 的 3 倍, 钾含量比低钾处理 4 d 降低约 1 倍, *OsSKOR* 基因的表达丰度却随着低钾处理时间的推移而下降。

4) *OsSKOR* 基因启动子内存在对 ABA 响应的 ABRE 元件, 随着 ABA 处理时间的延长, *OsSKOR* 基因的表达丰度显著降低。

参考文献:

[1] Leigh R A, WYN JONES R G. A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell[J]. *New Phytologist*, 1984, 97(1): 1-13.

[2] Song Z Z, Su Y H. Distinctive potassium-accumulation capability of alligatorweed (*alternanthera philoxeroides*) links to high-affinity potassium transport facilitated by K^+ -uptake systems[J]. *Weed Science*, 2013, 61(1): 77-84.

[3] Maathuis F J M, Amtmann A. K^+ Nutrition and Na^+ toxicity: The basis of cellular K^+/Na^+ ratios[J]. *Annals of Botany*, 1999, 84(2): 123-133.

[4] 朱向东, 王宏庭. 土壤钾素管理研究进展[J]. *山西农业科学*, 2013, 41(11): 1274-1281.

[5] 黄绍文, 金继运. 土壤钾形态及其植物有效性研究进展[J]. *土壤肥料*, 1995(5): 23-28.

[6] 陈防, 郑圣先. 我国南方作物高效施钾技术的研究进展[J]. *土壤肥料*, 2004(6): 28-32.

[7] 胡泓, 王光火, 张奇春. 田间低钾胁迫条件下水稻对钾的吸收和利用效率[J]. *中国水稻科学*, 2004, 18(6): 527-532.

[8] 王为木, 杨肖娥, 李华, 等. 低钾胁迫对两个耐钾能力不同水稻品种养分吸收和分配的影响[J]. *中国水稻科学*, 2003, 17(1): 52-56.

[9] Mengel K, Kirkby E A. *Principles of plant nutrition* [M]. 4th Edition. Bern Switzerland: International Potash Institute, 1987: 687.

[10] Mengel K, Kirkby E A, Kosegarten H, et al. *Potassium[M]/Principles of Plant Nutrition*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2001: 481-511.

[11] 林咸永, 孙羲. 不同水稻品种对钾的吸收及其对钾肥的反应[J]. *土壤学报*, 1995, 32(1): 77-83.

[12] 李华, 杨肖娥, 罗安程. 不同氮钾条件下水稻基因型氮、钾积累利用差异[J]. *中国水稻科学*, 2002, 16(1): 86-88.

[13] Besford R T. Effect of replacing nutrient potassium by sodium on uptake and distribution of sodium in tomato plants[J]. *Plant and Soil*, 1978, 50(1/2/3): 399-409.

[14] Kim E J, Kwak J M, Uozumi N, et al. AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity[J]. *The Plant Cell*, 1998, 10(1): 51-62.

[15] 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(7): 1347-1360.

[16] 徐赫韩, 侯国媛, 李洋, 等. 植物钾离子通道 AKT1 的研究进展[J]. *生物技术*, 2018, 28(2): 200-205.

[17] Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, et al. Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K^+ release into the xylem Sap[J]. *Cell*, 1998, 94(5): 647-655.

[18] 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 Cell*, 2000, 12(6): 837-851.

[19] Pilot G, Lacombe B, Gaymard F, et al. Guard cell inward K^+ Channel activity in Arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(5): 3215-3221.

[20] Schroeder J I. Knockout of the guard cell K^+ out channel and stomatal movements[J]. *PNAS*, 2003, 100(9): 4976-4977.

[21] Yang S Y, Hao D L, Song Z Z, et al. RNA-Seq analysis of differentially expressed genes in rice under varied nitrogen supplies[J]. *Gene*, 2015, 555(2): 305-317.

- [22] 郭士伟, 夏士健, 朱虹霞, 等. 水稻根系活力测定方法及超级稻两优培九生育后期根系活力研究[J]. 土壤, 2012, 44(2): 308–311.
- [23] 王敬, 王火焰, 周健民, 等. 盐酸提取-火焰光度计法测定黑麦草中钾含量的可行性研究[J]. 土壤通报, 2013, 44(3): 624–627.
- [24] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 325–327.
- [25] 薛欣欣, 李小坤. 施钾量对水稻干物质积累及吸钾规律的影响[J]. 江西农业大学学报, 2018, 40(5): 905–913.
- [26] Véry A A, Sentenac H. Molecular mechanisms and regulation of K^+ transport in higher plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54(1): 575–603.
- [27] Kim H Y, Choi E H, Min M K, et al. Differential gene expression of two outward-rectifying shaker-like potassium channels OsSKOR and OsGORK in rice[J]. *Journal of Plant Biology*, 2015, 58(4): 230–235.
- [28] 黄沅, 陈光辉. 水稻根系育种的研究现状及展望[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2009, 35(z1): 35–39.