

提高植物钾素利用效率的基因工程途径研究——以过表达 *ZmK2.1* 拟南芥为例^①

王家瑾^{1,2}, 杨顺瑛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: 本文通过对 13 种植物(拟南芥、水稻、玉米、大豆、甜瓜、胡萝卜、葡萄、马铃薯、沙冬青、苜蓿、小花碱茅、黄瓜及杨树)中的 Shaker 型 K^+ 通道进行生物信息学聚类分析和氨基酸序列比对, 选定 C 端区域反映 C4 植物特征的玉米气孔开放型 K^+ 吸收通道 *ZmK2.1*, 构建了过表达 *ZmK2.1* 的拟南芥株系(OE#3、OE#5、OE#11), 同时以野生型 Col-0 为对照试验材料, 研究过表达 *ZmK2.1* 拟南芥植株的钾素利用特征。试验采用固体培养基和水培培养相结合的方法, 设置低钾(0.1 mmol/L KCl)、中钾(1 mmol/L KCl)及高钾(10 mmol/L KCl)3 个不同供钾水平, 测定植株生物量、根长、钾含量、钾积累量、气孔导度、光合速率及蒸腾速率。研究结果表明, 在钾充足条件下, 与对照相比, 过表达 *ZmK2.1* 拟南芥的根长、生物量、钾含量、钾积累量均显著增加; 同时, 过表达 *ZmK2.1* 基因的拟南芥气孔导度、光合速率、蒸腾速率显著提高。由此说明, 在供钾充足的条件下, 通过基因工程手段过表达 *ZmK2.1* 基因可显著促进拟南芥植物的生长, 并显著提高其钾素利用效率, 这与 *ZmK2.1* 可显著增加植株的气孔导度, 进而提高其光合效率和蒸腾速率密切相关。

关键词: 玉米气孔开放型 K^+ 吸收通道 *ZmK2.1*; 拟南芥; 生物量; 钾素利用

中图分类号: S158.3; Q945.1 文献标志码: A

Genetic Engineering Approaches to Improve Plant Potassium Utilization Efficiency——Take Overexpressing *ZmK2.1* as an Example

WANG Jiajin^{1,2}, YANG Shunying¹, 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: Through bioinformatics clustering analysis of shaker-type potassium channels in 13 kinds of plants (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Soybean*, *Cucumis melo* L., *Daucus carota* Linn., *Vitis vinifera*, *Solanum tuberosum*, *Ammopiptanthus mongolicus*, *Medicago truncatula*, *Puccinellia tenuiflora*, *Cucumis sativus*, and *Populus tremula*), Selected the C-terminal region reflect the characteristics of the C4 plants stomata open of *Zea mays* potassium ion absorption channel *ZmK2.1*, build the *ZmK2.1* *Arabidopsis thaliana* overexpression of strains (OE#3, OE#5, OE#11), *ZmK2.1*-overexpressed *Arabidopsis thaliana* strain (OE#3, OE#5, OE#11) were constructed, and col-0 was used as control material to study potassium utilization efficiency of *Arabidopsis thaliana* *ZmK2.1* overexpressed plants. Biomass, root length, K^+ content and accumulation, stomatal conductance, photosynthetic rate and transpiration rate were determined at low K (0.1 mmol/L KCl), medium K (1 mmol/L KCl) and high K (10 mmol/L KCl) levels by solid medium and hydroponic culture. Compared with the control, the results show that root length, biomass, K^+ content and accumulation of *ZmK2.1*-overexpressed *Arabidopsis thaliana* are significantly increased compared with the control under sufficient K^+ content. Meanwhile, stomatal conductance, photosynthetic and transpiration rates of *ZmK2.1*-overexpressed *Arabidopsis thaliana* are significantly increased. The results of this study indicate that *ZmK2.1* overexpression can significantly promote the growth and potassium utilization efficiency of *Arabidopsis thaliana* plants under the condition of sufficient potassium supply, which is closely related to the fact that *ZmK2.1* can significantly increase stomatal

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: 王家瑾(1996—), 女, 宁夏中卫人, 硕士研究生, 主要从事植物营养生理学研究。E-mail: wangjiajin@issas.ac.cn

conductance, and thus improve photosynthetic efficiency and transpiration rate.

Key words: Stomatal opening controlling K^+ uptake channel *ZmK2.1*; *Arabidopsis thaliana*; Biomass; Potassium utilization

钾是植物体内含量最丰富的矿质营养元素, 约占植物干物质量的 2%~10%, 甚至更高, 在植物的整个生长发育过程中起着至关重要的作用^[1-2]。 K^+ 参与植物体内的多种生理活动, 如: 维持细胞电荷平衡及渗透调节、影响蛋白质的合成及同化产物分配与运输、保障碳氮代谢酶活性、促进植物进行光合作用、调节叶片气孔运动、参与花粉管伸长生长及果实成熟发育等, 另外在提高作物抵抗生物和非生物胁迫等方面也有重要贡献^[3]。

土壤是植物获取钾素的主要来源, 我国由于地形、土壤质量及长期耕作等诸多原因, 土壤根际的钾含量通常在 0.1~1 mmol/L 范围内波动^[4], 加之土壤耗竭和不可交换钾等因素以及可交换性钾的释放速率显著慢于植物吸收钾的速率, 导致土壤中可吸收的钾含量越来越低^[5], 耕地土壤缺钾成为长期困扰我国农业生产的严重问题之一^[6]。对农作物而言, 土壤溶液中钾浓度要达到 1 mmol/L 以上时才能基本满足植物的生长需要^[7], 为保证作物的高产和优质, 不得不外源施用足量的钾肥, 以保证土壤钾含量达到满足植物基本生长需求的钾水平^[8]。由此可见, 提高供钾后植物的钾素利用效率尤为重要。另一方面, 我国钾矿资源相对匮乏, 根据无机盐工业协会的预测, 未来十年我国钾肥的供需缺口仍将保持在 300 万~400 万 t 左右, 虽然我国钾肥需求对外依存度由 2000 年的 83.0% 下降到 2008 年的 62.9%, 但仍为世界第一大钾肥消费国和进口国^[9]。因而通过改良作物的钾营养性状提高其对钾素的利用效率, 成为近年来农学、植物营养学等研究领域应对农业生产钾肥供需矛盾的重要举措之一。

植物从生长环境中获取 K^+ 以及 K^+ 在植物细胞间的转运和分配主要是通过定位于质膜上的钾吸收系统包括 K^+ 通道和 K^+ 转运体介导的^[10]。通常, 在 K^+ 浓度较低(<1 mmol/L)的条件下, 主要由高亲和的钾吸收系统即钾转运体起重要作用, 而在高钾浓度(>1 mmol/L)条件下, 低亲和的钾吸收系统即 K^+ 通道则发挥重要作用^[3, 11]。不过, 近年来已有不少研究表明, 只要质膜处于足够超级化状态(如胞内有足量的负电荷时), 即使处于低钾条件, 被定义为低亲和的 K^+ 通道也可参与高亲和的钾吸收^[12-13], 表明 K^+ 通道在植物生长发育过程中起主导性作用。20 世纪 80 年代, Schroeder 等^[14]利用膜片钳技术在蚕豆(*Vicia*

faba)的保卫细胞中首次发现 K^+ 通道的存在。1992 年, Sentenac 等^[15]和 Anderson 等^[16]分别通过酵母钾吸收突变体钾吸收功能互补的方法, 从拟南芥中率先克隆到 KAT1 和 AKT1 两个 K^+ 通道基因。迄今已有大量 K^+ 通道从不同植物中得以克隆和鉴定^[3, 10, 17-18]。根据蛋白序列和结构特征将 K^+ 通道划分为 3 个类型: Shaker 型、TPK 型和 Kir-like 型, 其中 Shaker 型通道被认为是介导植物 K^+ 吸收、转运和细胞内动态平衡最为重要的一类通道^[18]。

一个完整的 Shaker 型 K^+ 通道是由 4 个蛋白亚基围绕而成的四聚体, 每个亚基都含有一个 N 端、6 个跨膜区(S1~S6)及一个 C 端, N 端和 C 端均位于胞质内。其 C 端至少含有两个区域, 包括一个环核苷酸结合区(cyclic nucleotide-binding domain, cNBD)和一个富含疏水酸性残基的 K_{HA} 域^[19], 大多数 Shaker 型 K^+ 通道的 C 端 cNBD 和 K_{HA} 之间还包含一个锚蛋白区(ankyrin-related domain, ANK)^[18]。根据植物 Shaker K^+ 通道的序列、基因结构和功能特征, 又将其分为 5 个亚组: Group I (AKT1 亚家族)、Group II (KAT 亚家族)、Group III (AKT2 亚家族)、Group IV (AtKC1 亚家族)、Group V (SKOR/GORK 亚家族)^[18]。Group I 中, 以 AKT1 为代表, 多在植物从土壤中获取钾的过程中发挥作用^[20]; Group IV 以 AtKC1 为代表, 主要调控 K^+ 吸收通道从而辅助根系对钾的吸收^[21]; Group II 中主要是气孔开放型 K^+ 吸收通道, KAT1 和 KAT2 主要在气孔保卫细胞中表达, 缺失这两个通道则导致气孔无法开放^[22], 并与外向整流型通道 GORK 共同参与气孔运动的调控^[23]; Group III 中, 以弱整流性通道 AKT2 为代表, 主要在韧皮部表达, 其通过介导 K^+ 在韧皮部的装载或卸载实现 K^+ 在植株体内的长距离运输; Group V 中的外向 K^+ 通道 SKOR 将钾朝向中柱疏导组织分泌, 再以质流的方式向地上部运输。缺失 AtSKOR 基因的拟南芥地上部组织的含钾量降低约 50%^[24], 这些研究都凸显了 K^+ 通道对植物生长发育的关键作用。

近年来, 通过在植物中过表达 K^+ 通道研究其生理意义的报道逐渐增多^[25-31], 不过这些研究的尝试主要聚焦于根系吸收或根茎长距离传输的 K^+ 通道(内向整流型 AKT 亚家族和外向整流型 SKOR 亚家族)。而关于叶片气孔类 K^+ 通道, 尤其是对源于光合效率强大的 C4 植物, 如玉米等的气孔调控型 K^+ 通道钾素利

用效率的研究相对较少。本研究从玉米(*Zea mays*)郑丹 958 中克隆了 KAT1 型 K^+ 通道 *ZmK2.1*, 并在拟南芥中过表达 *ZmK2.1*, 通过筛选获得了转 *ZmK2.1* 的过表达拟南芥纯系材料; 通过比较不同供钾水平下, 过表达 *ZmK2.1* 拟南芥的根长、生物量、钾含量、钾积累量以及光合效率等指标, 明确玉米气孔开放型 K^+ 通道 *ZmK2.1* 的钾素利用特征, 从基因工程角度为提高植物的钾素利用效率提供有益的证据。

1 材料与方法

1.1 过表达 *ZmK2.1* 拟南芥材料的创制

1.1.1 K^+ 通道 *ZmK2.1* 的聚类分析 为进一步明确 *ZmK2.1* 所属的 K^+ 通道类型, 本研究从 plant membrane protein database 检索了 13 种植物包括拟南芥、水稻、玉米、大豆、甜瓜、胡萝卜、葡萄、马铃薯、沙冬青、苜蓿、小花碱茅、黄瓜及杨树中已经有明确功能机制报道的 Shake 型 K^+ 通道的氨基酸序列, 其中 *ZmK2.1* 的序列参照 Su 等^[32]的报道。利用 MEGA11.0 软件构建系统发育进化树, 利用 DNAMAN 软件对氨基酸序列进行比对分析。

1.1.2 过表达 *ZmK2.1* 拟南芥材料载体的构建 以实验室保存的 pCambia1301-35s-nos 为过表达载体骨架, 以玉米郑丹 958 的 cDNA 为模板, 参照 Su 等^[32]报道的 *ZmK2.1* 的 CDS 序列, 并通过 CE Design 在线引物设计软件设计特异引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ l: 高保真酶混合物 2 \times Phanta Max Master Mix(Vazyme, 货号 P515-01)为 25 μ l, 上、下游引物(10 μ mol/L)各为 1 μ l, 模板为 1 μ l, 加水补齐至 50 μ l。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。琼脂糖凝胶回收 *ZmK2.1* 片段, 并通过 *Bam* HI 和 *Xba* I 酶切位点将 *ZmK2.1* 基因构建到过表达载体 pCambia1301-35s-nos 上, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 后, 挑选阳性克隆委托南京擎科生物科技有限公司进行测序, 确定获得正确的含玉米 *ZmK2.1* cDNA 的过表达转基因载体 pCambia1301-35s-nos-*ZmK2.1*。

1.1.3 过表达 *ZmK2.1* 拟南芥纯系材料的筛选 将 pCambia1301-35s-nos-*ZmK2.1* 转入农杆菌 Gv3101 中, 挑选阳性克隆侵染开花盛期的野生型拟南芥 Col-0 花序, 侵染的植株收获种子后, 播种于含 50 mg/L Hygromycin 的 MS 固体培养基进行筛选,

经过连续两代筛选和鉴定, 最终获得转基因过表达 *ZmK2.1* 拟南芥纯系材料, 进行后续试验。

1.2 植物材料的培养

1.2.1 固体培养基培养 选取过表达 *ZmK2.1* 拟南芥纯系材料 OE#3、OE#5、OE#11, 以及野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* Columbia, Col-0)为对照, 用 75% 乙醇 +0.1% SDS (十二烷基硫酸钠)消毒 10 min, 无水乙醇清洗两次, 每次 2 min。吹干后置 4 $^{\circ}$ C 低温避光保存 48 h, 然后播种于培养基(10 cm \times 10 cm)上密封好。将培养皿直立地置于光照培养箱中, 让根沿琼脂表面向下生长。

固体培养基组成: 2 mmol/L NH_4Cl 、2 mmol/L $NaNO_3$ 、1 mmol/L KH_2PO_4 、1 mmol/L $MgSO_4$ 、250 μ mol/L K_2SO_4 、250 μ mol/L $CaCl_2$ 、100 μ mol/L 2Na-Fe-EDTA、50 μ mol/L KCl 、50 μ mol/L H_3BO_3 、5 μ mol/L $MnSO_4$ 、1 μ mol/L $ZnSO_4$ 、1 μ mol/L $CuSO_4$ 、1 μ mol/L Na_2MoO_4 、0.5 g/L MES-KOH(2-码琳已磷酸)、1%(*m/V*)蔗糖、0.8%(*m/V*)琼脂, NaOH 调 pH 至 5.8。

光照培养箱的温度为 (23±1) $^{\circ}$ C, 光周期为 16 h 光照、8 h 黑暗, 光照强度为 400 μ mol/($m^2\cdot s$), 相对湿度为 70%。在固体培养基生长 7 d 后挑选长势一致的拟南芥植株, 分为 3 组进行处理。

1.2.2 水培培养 经过消毒春化的拟南芥种子, 用牙签点至内置湿润海绵的去底离心管中蒸馏水萌发。待长出两片针叶后上水培营养液, 水培培养液中不含有蔗糖和琼脂, 其他成分及培养条件与固体培养基相同。营养液每 3 d 更换一次。水培培养 21 d 后, 挑选长势一致的拟南芥植株, 分为 3 组进行处理。

1.2.3 不同供钾条件下的表型观测 选取饱满适量的拟南芥种子经消毒, 低温处理 2 d 后均匀布于固体培养基上, 放入 23 $^{\circ}$ C 光照培养箱中培养 6 d。随后选取生长较为一致的拟南芥幼苗, 分别移至不同钾浓度的培养基上, 继续培养 7 d 后观察表型并照相记录表型变化。

固体培养基处理条件如下: ①LK(低钾)0.1 mmol/L KCl ; ② MK(中钾)1 mmol/L KCl ; ③ HK(高钾)10 mmol/L KCl , 以 KCl 为唯一钾源。其他成分相同: 2 mmol/L NH_4Cl 、2 mmol/L $NaNO_3$ 、1 mmol/L NaH_2PO_4 、1 mmol/L $MgSO_4$ 、250 μ mol/L $CaCl_2$ 、100 μ mol/L 2Na-Fe-EDTA、50 μ mol/L H_3BO_3 、5 μ mol/L $MnSO_4$ 、1 μ mol/L $ZnSO_4$ 、1 μ mol/L $CuSO_4$ 、1 μ mol/L Na_2MoO_4 、0.5 g/L MES-KOH(2-码琳已磷酸)、1% (*m/V*) 蔗糖、0.8%(*m/V*)琼脂, NaOH 调 pH 至 5.8。每个处

理设置 60 个重复, 处理 7 d 后收样, 测定统计相关生理指标。

水培试验处理条件: 不含有蔗糖和琼脂, 其他成分与固体培养基相同。营养液每 3 d 更换一次。每个处理 8 个重复, 处理 14 d 后收样, 测定相关生理指标。

1.3 生理指标的测定

1.3.1 拟南芥对不同供钾条件的响应 固体培养基试验不同供钾条件处理的植株, 收样前拍照记录表型。然后测定植株根长, 称量鲜物质量。每个处理重复 60 次, 计算平均值和标准误差。

水培试验不同供钾条件处理的植株, 收样时拍照记录表型, 收获各植株并称量鲜物质量, 然后用双蒸水润洗两次后擦干; 经消煮 (H_2SO_4 - H_2O_2 消煮法) 后采用火焰光度计测全钾含量。

1.3.2 光合指标的测定 采用 LI-cor 公司(美国)生产的 Licor-6400 型便携式光合作用测定系统, 测定气孔导度、净光合速率、蒸腾速率。测定时将样本室 CO_2 浓度设定为 CO_2 (400 ± 1) $\mu\text{mol/mol}$, CO_2 由系统内置的 CO_2 注入系统提供。叶片温度设定为 (23 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $70\% \pm 1\%$ 。设置红蓝光源

LED, 测定前对待测叶片诱导 30 min, 诱导条件为叶室温度 23 $^{\circ}\text{C}$, 光强 $750 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 待仪器读数稳定后, 进入自动测定程序。

1.4 数据处理与分析

数据使用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 采用独立样 t-检验分析不同供钾浓度处理条件下不同株系各项指标的差异显著性。多重比较采用 Duncan 法, 差异显著水平为 5%。使用 Sigma Plot 12.5 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 *ZmK2.1* 基因的生物信息学聚类分析结果

Shaker 家族 K^+ 通道数量众多, 分为 5 个亚家族, 在植物中的分布呈现出多样性, 有的存在于特定的植物器官中, 有的则广泛分布在植物的各个组织中。通过对来源于几个不同物种的多种 K^+ 通道的氨基酸序列比对分析, 发现 *ZmK2.1* 属于 Group II (KAT1 亚家族), 是内向整流型 K^+ 通道, 与已报道的气孔类 K^+ 通道 OsKAT3、OsKAT2、OsKAT1、AtKAT1、AtKAT2 等聚为一类(图 1)。

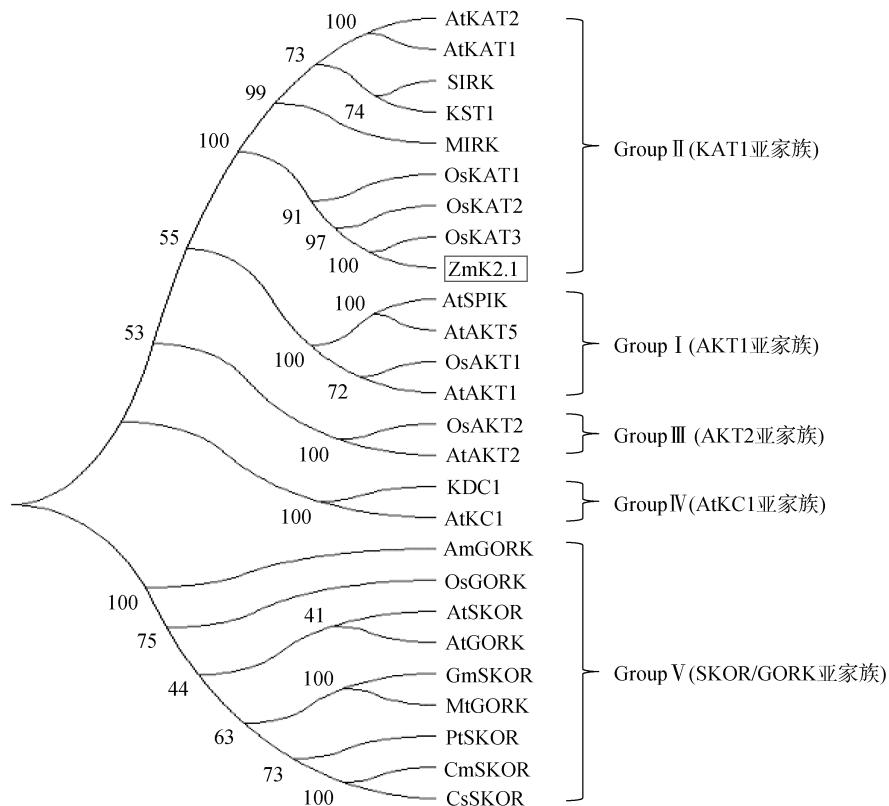


图 1 *ZmK2.1* 的聚类分析
Fig. 1 Clustering analysis of *ZmK2.1*

进一步分析结果表明, *ZmK2.1* 与 AtKAT1、AtKAT2、OsKAT3、KST1、MIRK 等气孔开放类 K^+

通道的关键结构域氨基酸序列高度相似, 都有 6 个跨膜结构域和 1 个通道孔区域、1 个环核苷酸结合区

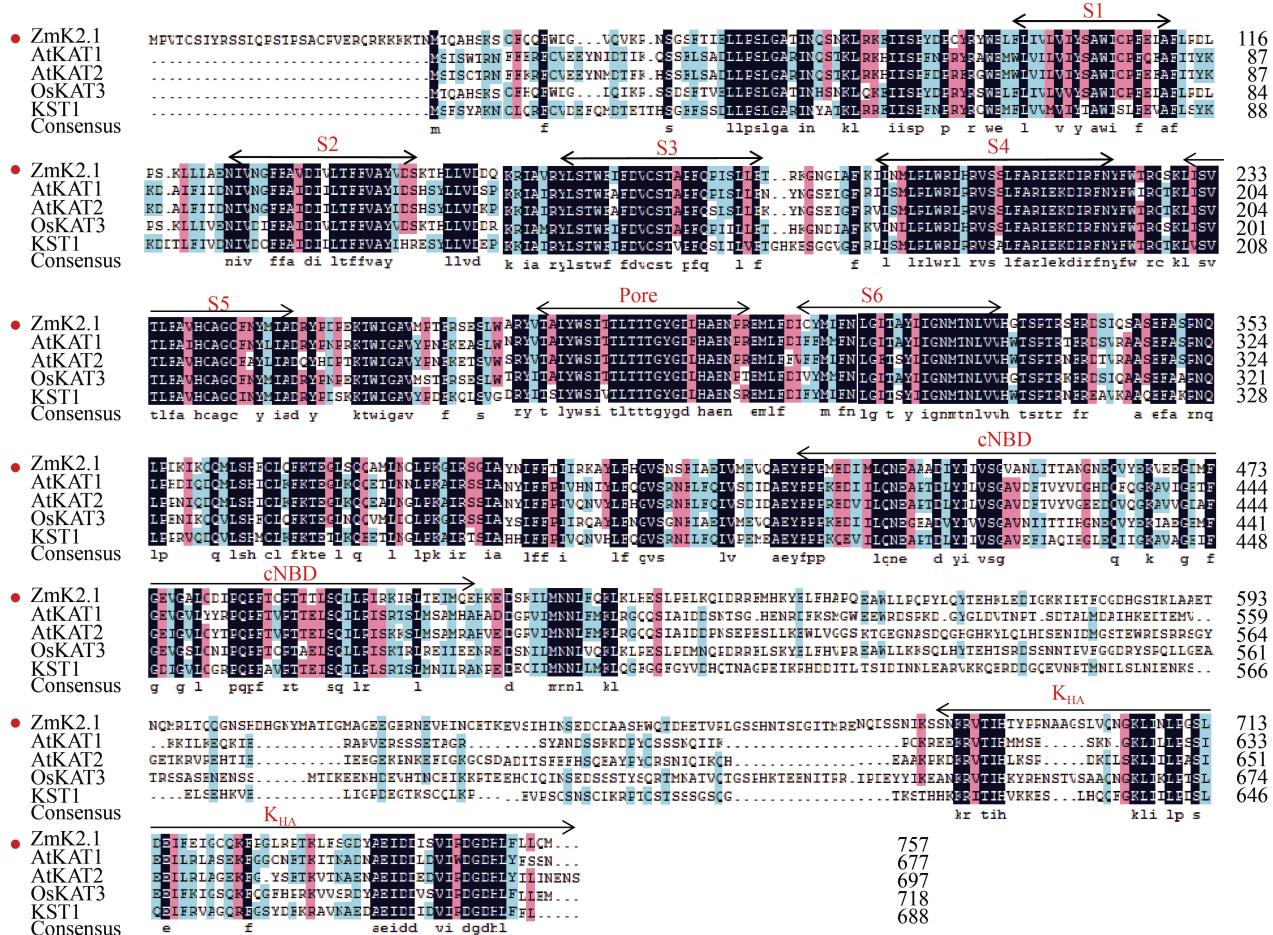
(cNBD) 和 1 个富含疏水酸性残基的 K_{HA} 域, 同源性 62.8%, 表明 ZmK2.1 属于气孔类 K^+ 吸收通道(图 2)。为研究 ZmK2.1 的钾素利用特征, 通过构建过表达转基因载体 pCambia1301-35s-nos-ZmK2.1(图 3), 利用农杆菌侵染法转入拟南芥 Col-0 中, 连续筛选两代后获得了纯系转基因材料(overexpression: OE)OE#3、OE#5、OE#11, 进行后续试验。

2.2 过表达 ZmK2.1 拟南芥对不同供钾条件的响应

2.2.1 不同供钾条件下过表达 ZmK2.1 拟南芥的生长特征 低钾条件下, 过表达 ZmK2.1 拟南芥株系与对照(后文所有 Col-0 均称为对照)的生物量并没有显著差异。中钾条件下, 与对照相比, OE#3、OE#5、OE#11 的生物量分别增加了 6.0%、4.5% 和 3.8%, 根长分别增加了 5.93%、3.4% 和 5.5%; 高钾条件下, OE#3、OE#5、OE#11 的生物量也显著

增加, 与对照相比分别增加了 7.6%、5.2% 和 5.1%, 根长分别增加了 4.5%、8.9% 和 9.0%(图 4)。表明在钾充足条件下, 过表达 ZmK2.1 基因可促进植株生长。

为深入了解不同供钾条件下过表达 ZmK2.1 拟南芥的生长特征及钾素利用特征, 进一步设置水培试验进行观测, 每隔 3 d 对培养罐中的营养液进行更换。研究结果(图 5)表明, 与固体培养基试验结果类似, 在低钾条件下过表达 ZmK2.1 株系与对照的地上部生物量没有显著差异; 中钾条件下, OE#3、OE#5、OE#11 的地上部生物量与对照相比显著增加, 分别增加了 11.3%、11.3% 和 12.9%; 高钾条件下, 与对照相比分别增加了 14.9%、18.6% 和 20.0%(图 5B)。表明在钾充足条件下过表达 ZmK2.1 基因可促进植株生长。



(蛋白的登录号如下: OsKAT3, Q6K3T2; ZmK2.1, NP_001105240; OsKAT2, NP_001042370; OsKAT1, NP_001044290; KST1, NP_001275475; MIRK, NP_001284388; SIRK, NP_001268073; KAT2, NP_193563; KAT1, NP_199436; KDC1, CAB62555; AtK1, NP_194991; SPIK, NP_180131; AKT5, NP_194976; OsAKT1, NP_001043713; AKT1, NP_180233; OsAKT2, JN989970; AKT2, NP_567651; AmGORK, ALX27201; GORK, NP_198566; SKOR, NP_186934; OsGORK, XP_015644419; GmGORK, KAG4383022; MtGORK, XP_003616247; PtSKOR, XP_006372521; CmSKOR, AXL94152; CsSKOR, XP_004140369)

图 2 ZmK2.1 的结构域比对分析
Fig. 2 Structural domain comparison analysis of ZmK2.1

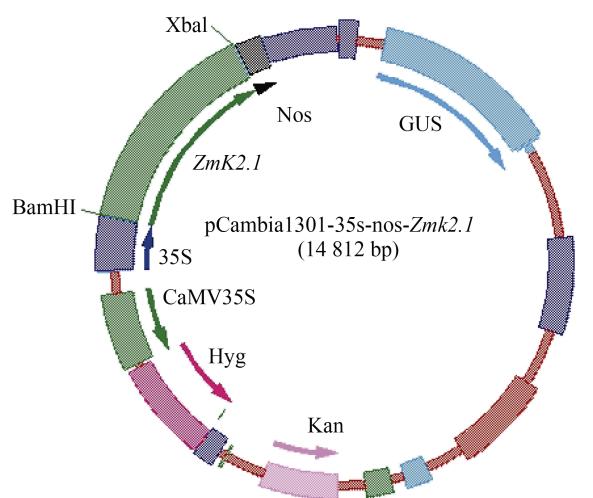


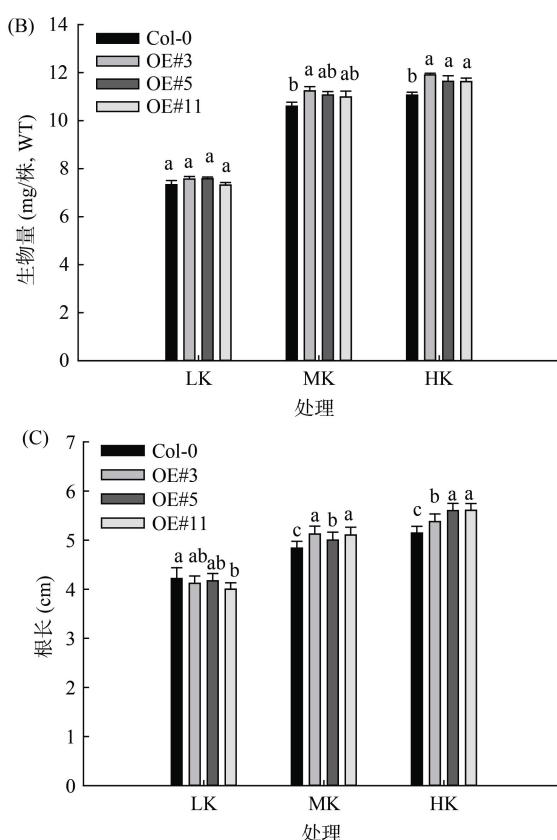
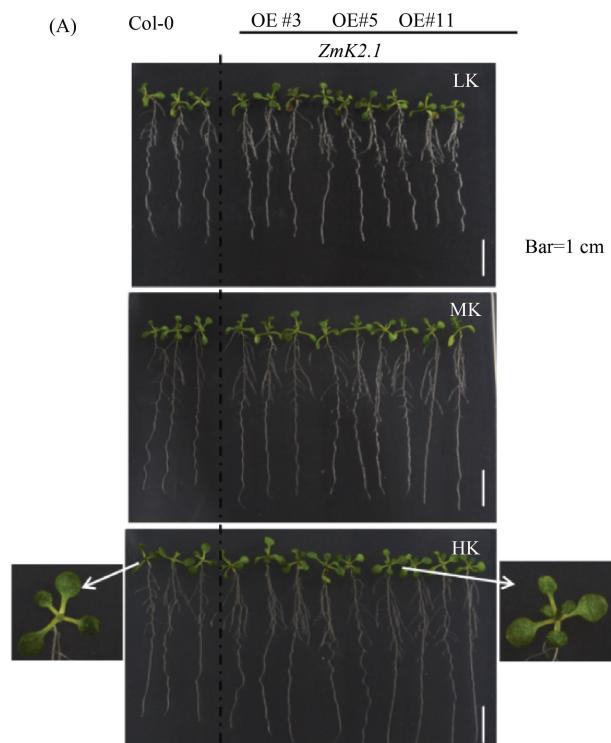
图3 过表达载体 pCambia1301-35s-nos-ZmK2.1 的构建图谱

Fig. 3 Construction diagram of overexpressed transgenic vector pCambia1301-35s-nos-ZmK2.1

2.2.2 不同供钾条件下过表达 *ZmK2.1* 拟南芥的钾含量特征 不同供钾水平培养 14 d 后, 测定植物地上部钾元素的含量。过表达 *ZmK2.1* 株系与对照相比,

地上部含钾量在低钾条件下没有显著差异; 中钾条件下, 与对照比较, 过表达 *ZmK2.1* 株系地上部含钾量分别增加 10.8%、17.5%、15.8%; 高钾条件下, OE#3、OE#5、OE#11 的地上部含钾量与对照相比分别增加了 20.0%、10.6%、23.5% (图 6A)。在低钾条件下, 过表达 *ZmK2.1* 株系与对照相比地上部钾积累量没有显著差异; 中钾条件下, 与对照相比较, OE#3、OE#5、OE#11 的地上部钾积累量分别增加了 28.5%、15.3%、32.5%; 高钾条件下过表达 *ZmK2.1* 株系地上部钾积累量显著增加, 与对照相比分别增加了 40.1%、42.1% 和 52.4% (图 6B)。表明过表达 *ZmK2.1* 基因可以在钾充足条件下促进拟南芥植株吸收并积累钾元素。

2.2.3 过表达 *ZmK2.1* 拟南芥的光合特征 进一步的测定结果表明, 与对照相比, 过表达 *ZmK2.1* 拟南芥植株的光合特征, OE#5、OE#11 的气孔导度分别增加了 40.2% 和 26.5% (图 7A), 净光合速率分别增加了 24.3% 和 17.5% (图 7B), 蒸腾速率分别增加了 49.9% 和 27.1% (图 7C)。表明过表达 *ZmK2.1* 的拟南芥气度导度增强, 进而提高了植株的光合速率和蒸腾速率。



(图柱上方不同小写字母表示相同处理下不同株系植株间差异达 $P < 0.05$ 显著水平, 下同)

图4 固体培养中不同供钾条件对过表达 *ZmK2.1*(OE#3、OE#5 和 OE#11)拟南芥植株生长的影响

Fig. 4 Effects of different potassium supply levels on plant growth of *ZmK2.1*-overexpressed *Arabidopsis thaliana* in solid medium(OE#3、OE#5 and OE#11 lines)

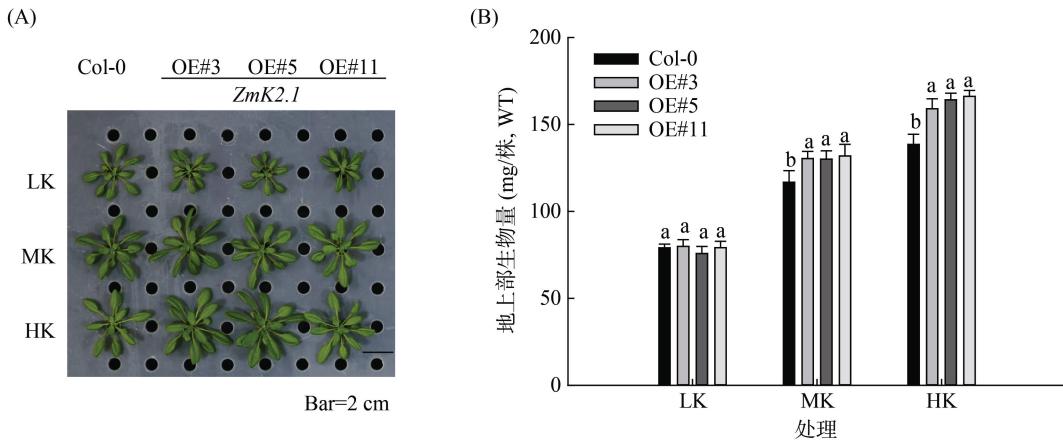


图 5 水培条件下不同供钾水平对过表达 *ZmK2.1*(OE#3、OE#5 和 OE#11)拟南芥植株生长的影响

Fig. 5 Effects of different potassium supply levels on plant growth of *ZmK2.1*-overexpressed *Arabidopsis thaliana* in hydroponic culture(OE#3、OE#5 and OE# 11 lines)

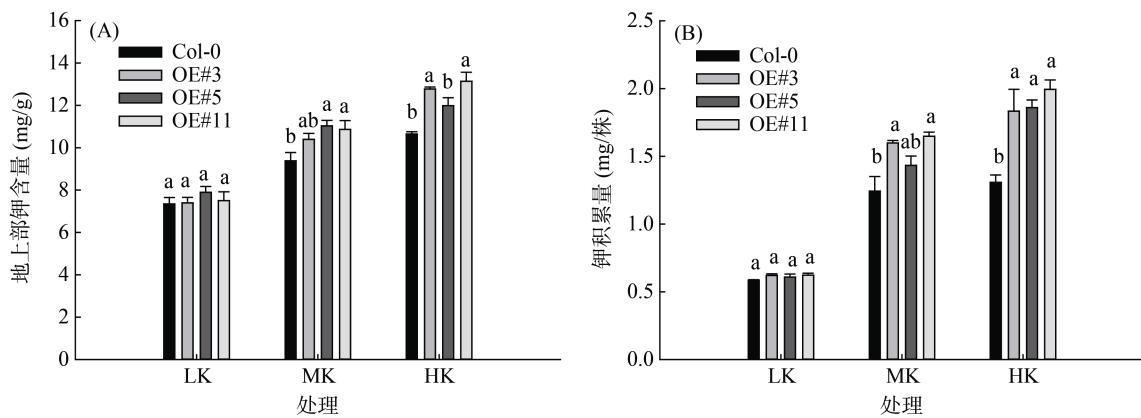


图 6 不同供钾条件下过表达 *ZmK2.1*(OE#3、OE#5 和 OE#11)拟南芥植株钾含量特征

Fig. 6 Characteristics of potassium content in *ZmK2.1*-overexpressed *Arabidopsis thaliana* under different potassium supply levels(OE#3、OE#5 and OE#11 lines)

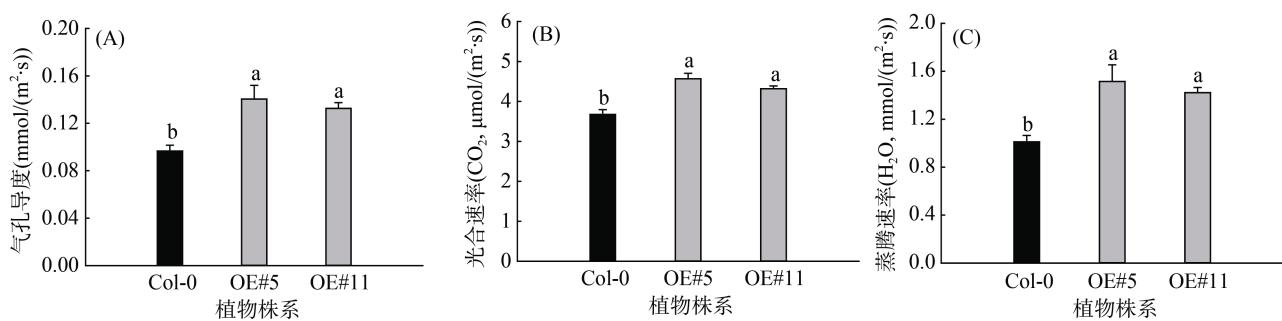


图 7 过表达 *ZmK2.1*(OE#5 和 OE#11)拟南芥的植株光合特征

Fig. 7 Photosynthetic characteristics of *ZmK2.1*-overexpressed *Arabidopsis thaliana*(OE#5 and OE#11 lines)

3 讨论

K^+ 是植物体内含量最丰富的阳离子，在植物生长发育过程的许多生理生化反应中起关键作用。在土壤中，植物根系表面的可利用钾浓度较低，是导致植物缺钾及叶片发黄、生长缓慢等症状发生的主要原因^[33]。植株缺钾会导致茎秆的节间长度和茎

秆直径减小，从而使得茎秆的稳定性下降，植株易倒伏，抗病抗逆性都降低，果实的产量和品质变差^[34]。通过基因操作过表达调控 K^+ 通道以提高植物钾素利用效率成为近年来的一个重要研究方向。

众多结果表明，通过过表达 K^+ 通道基因可增加植物对钾的吸收和转运效率。在水稻中过表达 OsAKT1 可提高组织钾含量并增强对植株低钾及干旱胁迫下

的耐受性^[25]; 施卫明等^[35]将拟南芥 K^+ 通道基因 *AKT1* 和 *KAT1* 转入水稻后, 转基因植株的钾吸收速率和对钾的累积能力都有明显的增强, 钾积累量增加 4% ~ 24.3%。过表达棉花 *GhAKT1* 基因的拟南芥可促进低钾胁迫下转基因苗的生长并提高植株对 K^+ 的吸收能力^[27]; 甜瓜 *CmMIRK* 及 *CmSKOR* 的过表达拟南芥植株可促进植株的钾积累并提高其耐盐性^[28, 29]。这些研究的尝试主要关注根系吸收或根茎长距离传输的 K^+ 通道, 而关于气孔类 K^+ 通道钾素利用效率方面的研究相对较少。本研究利用转 C4 植物玉米的气孔开放型 K^+ 通道基因 *ZmK2.1* 拟南芥研究植株的钾素利用特征, 试验结果表明在低钾条件下, 过表达 *ZmK2.1* 拟南芥的生长和钾素特征与对照相比没有显著差异, 而在充足供钾(1 mmol/L K^+ 和 10 mmol/L K^+)条件下, 过表达 *ZmK2.1* 拟南芥植株的生物量、钾含量及植株钾积累量较对照相比均显著增加。中钾条件下地上部生物量增加 11.3% ~ 12.9%(图 5B), 钾含量增加 10.8% ~ 17.5%(图 6A), 钾积累量增加 15.3% ~ 28.5%(图 6B); 高钾条件下增幅更大, 地上部生物量增加 14.9% ~ 20.0%(图 5B), 钾含量增加 10.6% ~ 23.5%(图 6A), 钾积累量增加 40.1% ~ 52.4%(图 6B)。过表达 *ZmK2.1* 拟南芥只在供钾充足条件下可显著促进植株生长和钾素利用的特征, 可能与 Su 等^[32]报道的 *ZmK2.1* 本身是一个低亲和($[K^+]\geq 1$ mmol/L 时介导钾吸收)的 K^+ 通道密切相关。

进一步的研究表明, 在钾充足条件下, 过表达 *ZmK2.1* 拟南芥的气孔导度、光合速率及蒸腾速率较对照相比均显著增加(图 7), 气孔导度增加 26.5% ~ 40.2%(图 7A), 光合速率增加 17.5% ~ 24.3%(图 7B), 蒸腾速率增加 27.1% ~ 49.9%(图 7C)。这与已经报道的拟南芥气孔开放型 K^+ 通道 *KAT1* 和 *KAT2* 的特征类似^[36]。这一现象表明过表达 *ZmK2.1* 基因可增加叶片保卫细胞的钾浓度, 进而增加细胞膨压, 细胞吸水导致气孔更高效地开放, 因而其气孔导度增加, 促进植株对 CO_2 的摄取, 促进光合效率, 从而促进植株生长。另一方面, 气孔导度增加也增强了植株的蒸腾速率, 促进矿质元素随质流从根系向地上部转运, 因而植株地上部的钾含量及钾积累量得到同步增加。

4 结论

通过分子生物学操作, 在模式植物拟南芥中过表达玉米气孔保卫细胞开放型 K^+ 吸收通道 *ZmK2.1*, 在钾充足(1 mmol/L K^+ 和 10 mmol/L K^+)条件下可显著提高植株的气孔导度, 增加植株的光合速率及蒸腾速率, 进而促进植株生长, 提高植株的钾素利用能力。

这一研究从基因工程角度, 为进一步提高植物的钾素利用效率提供了有力的技术支撑。

参考文献:

- [1] 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[J]. 土壤, 2021, 53(1): 37–46.
- [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] Ragel P, Raddatz N, Leidi E O, et al. Regulation of K^+ nutrition in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 281.
- [4] Schroeder J I, Ward J M, Gassmann W. Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K^+ channels in higher plants: Biophysical implications for K^+ uptake[J]. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1994, 23: 441–471.
- [5] Pretty K M, Stangel P J. Current and future use of world potassium[J]. Potassium in Agriculture, 1985: 99–128.
- [6] 谢建昌, 周健民. 我国土壤钾素研究和钾肥使用的进展[J]. 土壤, 1999, 31(5): 244–254.
- [7] Munson R D, Barber S A. Potassium availability at the soil-root interface and factors influencing potassium uptake[J]. Potassium in Agriculture, 1985: 309–324.
- [8] 占丽平, 李小坤, 鲁剑巍, 等. 水旱轮作条件下不同类型土壤供钾能力及钾素动态变化研究[J]. 土壤学报, 2013, 50(3): 591–599.
- [9] 刘佳. 我国钾盐资源供需态势与国内外供矿前景分析[J]. 中国矿业, 2011, 20(S1): 24–27, 57.
- [10] Véry A A, Nieves-Cordones M, Daly M, et al. Molecular biology of K^+ transport across the plant cell membrane: What do we learn from comparison between plant species? [J]. Journal of Plant Physiology, 2014, 171(9): 748–769.
- [11] Köckenberger W. Nuclear magnetic resonance micro-imaging in the investigation of plant cell metabolism[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(356): 641–652.
- [12] Gierth M, Mäser P. Potassium transporters in plants - Involvement in K^+ acquisition, redistribution and homeostasis[J]. FEBS Letters, 2007, 581(12): 2348–2356.
- [13] Rubio F, Alemán F, Nieves-Cordones M, et al. Studies on *Arabidopsis* *athak5*, *atakt1* double mutants disclose the range of concentrations at which AtHAK5, AtAKT1 and unknown systems mediate K uptake[J]. Physiologia Plantarum, 2010, 139(2): 220–228.
- [14] Schroeder J I, Hedrich R, Fernandez J M. Potassium-selective single channels in guard cell protoplasts of *Vicia faba*[J]. Nature, 1984, 312(5992): 361–362.
- [15] Sentenac H, Bonneau N, Minet M, et al. Cloning and

- expression in yeast of a plant potassium ion transport system[J]. *Science*, 1992, 256(5057): 663–665.
- [16] Anderson J A, Huprikar S S, Kochian L V, et al. Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(9): 3736–3740.
- [17] Lebaudy A, Véry A A, Sentenac H. K⁺ channel activity in plants: Genes, regulations and functions[J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(12): 2357–2366.
- [18] Véry A A, Sentenac H. Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54: 575–603.
- [19] 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(9): 688–695.
- [20] 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.
- [21] Duby G, Hosy E, Fizames C, et al. AtKC1, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K⁺ channels[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2008, 53(1): 115–123.
- [22] Lebaudy A, Vavasseur A, Hosy E, et al. Plant adaptation to fluctuating environment and biomass production are strongly dependent on guard cell potassium channels[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(13): 5271–5276.
- [23] Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, et al. The *Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(9): 5549–5554.
- [24] 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.
- [25] Ahmad I, Mian A, Maathuis F J M. Overexpression of the rice AKT1 potassium channel affects potassium nutrition and rice drought tolerance[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(9): 2689–2698.
- [26] Ardie S W, Liu S K, Takano T. Expression of the *AKT1*-type K⁺ channel gene from *Puccinellia tenuiflora*, PutAKT1, enhances salt tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(8): 865–874.
- [27] Xu J, Tian X L, Eneji A E, et al. Functional characterization of GhAKT1, a novel Shaker-like K⁺ channel gene involved in K⁺ uptake from cotton (*Gossypium hirsutum*)[J]. *Gene*, 2014, 545(1): 61–71.
- [28] 谢亚丽, 张屹东, 季凯莉, 等. 转甜瓜钾离子通道基因 MIRK 拟南芥植株的耐盐性分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2009, 27(5): 441, 443–447.
- [29] Huang L T, Zhao L N, Gao L W, et al. Constitutive expression of CmSKOR, an outward K⁺ channel gene from melon, in *Arabidopsis thaliana* involved in saline tolerance[J]. *Plant Science*, 2018, 274: 492–502.
- [30] Tian Q X, Shen L K, Luan J X, et al. Rice shaker potassium channel OsAKT2 positively regulates salt tolerance and grain yield by mediating K⁺ redistribution[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2021, 44(9): 2951–2965.
- [31] Huang Y N, Yang S Y, Li J L, et al. The rectification control and physiological relevance of potassium channel OsAKT2[J]. *Plant Physiology*, 2021, 187(4): 2296–2310.
- [32] 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(5): 1532–1548.
- [33] 张斌, 刘记, 张朝军, 等. 过表达拟南芥 AtCIPK 23、AtAKT 1 和 AtCBL 1 基因棉花苗期耐低钾的差异及机制研究[J]. 棉花学报, 2018, 30(3): 205–214.
- [34] 薛欣欣, 吴小平, 王文斌, 等. 植物-土壤系统中钾镁营养及其交互作用研究进展[J]. 土壤, 2019, 51(1): 1–10.
- [35] 施卫明, 王校常, 严蔚东, 等. 外源钾通道基因在水稻中的表达及其钾吸收特征研究[J]. 作物学报, 2002, 28(3): 374–378.
- [36] 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.