

烟草重要基因篇：2. 烟草钾吸收与转运相关基因

王 倩, 刘好宝

(中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101)

烟草是典型的喜钾作物。除了作为重要的营养元素发挥作用外, 钾能明显增强烟株的抗病虫、抗逆能力, 提高烟叶的燃烧性。同时, 钾还通过调节细胞中的生化反应影响细胞中的有机酸、氨基酸和糖等化学成分, 改善烟叶的品质^[1]。因此, 钾含量是衡量烟叶品质的重要指标之一。长期以来, 烟草钾素营养研究主要集中于钾肥种类与品质关系、钾肥施用方法及施用量、土壤 pH 对钾素吸收的影响及土壤供钾特性等方面, 其分子机制研究起步较晚。随着分子生物学的发展, 烟草钾营养的遗传、吸收转运机制等研究取得了较大进展。开展烟草钾营养基础研究, 充分挖掘钾营养高效基因, 培育钾营养高效烟草品种, 不仅符合烟草行业降焦减害的主旨, 也为研究其他喜钾作物的钾营养机制、改善作物品质、提高钾肥利用率、缓解我国钾肥贫瘠的现状提供科学借鉴, 具有重大的生产应用和理论研究意义。

植物对钾的跨膜吸收机制主要有两种, 即高亲和性钾吸收系统(机制 I)和低亲和性钾吸收系统(机制 II)。高亲和性钾吸收是植物在低钾浓度(0.001~0.2 mM)下的主要吸收途径, K^+ 多通过钾转运体介导的主动运输逆电化学势梯度进入细胞, 需要消耗能量; 低亲和性钾吸收主要在高钾浓度(1~10 mM)下发挥作用, K^+ 多通过钾通道调节的被动运输进入细胞, 该过程依赖细胞膜电势^[2]。更深入的研究表明植物中的钾吸收情况要复杂于上述简单的划分。 K^+ 进入根部细胞后, 由钾通道或钾转运体将其运往植物的各个组织^[3]。植物对钾的吸收转运受到一系列钾转运蛋白及调控因子的共同调节。目前烟草钾吸收与转运相关基因的研究主要集中于钾通道、钾转运体和钾营养相关调控基因三个方面。

1 钾通道

植物中的钾通道分为 Shaker 家族钾通道、TPK 家族钾通道和 Kir-like 家族钾通道三类^[4]。Shaker 家族是介导植物钾营养吸收、转运和细胞钾离子动态平衡过程的最为重要的钾通道蛋白, 也是烟草钾营养中研究最早的转运蛋白。到目前, 烟草中报道的钾通道共有 10 个, 分别是圆锥烟草的 NpKT1、黄花烟草的 NKCl、普通烟草的 NtKCl、NTORK1、NKT1、NKT2、NKT3、NKT4、NKT5 和林烟草的 NKT6。Hashimoto 等(1999)从圆锥烟草(*Nicotiana paniculata*)中克隆得到第一个 Shaker 钾通道基因 *NpKT1*, 但相关功能研究未见报道。随后, Sano 等(2007)在对植物细胞周期的研究中, 以烟草 BY-2 细胞系为材料, 克隆得到四个 Shaker 钾通道基因 *NKT1*、*NKT2*、*NtKCl* 和 *NTORK1*^[5]。其中, 前三个分别与拟南芥 Shaker 钾通道 *AKT1*、*AKT2/3* 和 *AtKCl* 存在同源性, 经鉴定均具内向整流 Shaker 钾通道活性; *NTORK1* 与拟南芥 *SKOR/GORK* 钾通道亚族同源, 均属于外向整流 Shaker 钾通道。研究发现, *NKT1* 在 G1 期中表达, 调节细胞的钾吸收, 而 *NTORK1* 主要在 S 期中表达, 调节细胞的钾外流, 表明钾通道参与烟草的细胞周期调控^[5]。郭兆奎等^[6](2008)国内首个报道的钾通道基因为黄花烟草(*Nicotiana rustica*)的 *NKCl*, 该基因与马铃薯 Shaker 钾通道 *SKT1* 同源, 在烟草幼根、叶片和花等器官均有表达, 在幼根中转录量最多, 缺钾处理可显著诱导根系中该基因的转录, 而高浓度 NH_4^+ 处理对该基因的转录具有抑制作用。刘好宝等利用 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 技术相继获得了 4 个钾通道基因, 分别命名为 *NKT3*^[7]、*NKT4*^[8]、*NKT5*^[9] 和 *NKT6*^[10]。其中前三个基因均从烟草钾高效基因型 Special Warne 中获得, *NKT6* 从林烟草中获得。 *NKT3*

和 *NKT5* 与拟南芥 *AtKCI* 同源^[7,9]; *NKT4* 与拟南芥 *AKT1*、番茄 *LKT1* 和马铃薯 *SKT1* 的氨基酸序列相似性分别为 71%、90%和 90%，主要在烟草根部尤其是幼嫩侧根中表达，在低钾和干旱处理早期，该基因的转录水平迅速上调，推测该基因在低钾和干旱等胁迫条件下发挥重要作用^[8]，可能与黄花烟草 *NKCI* 是同工蛋白。*NKT6* 属于 Shaker 家族 Group II，在林烟草的茎和腋芽中最高，在萼片、叶、花中次之，在根中最低，蛋白主要定位于细胞膜和核膜附近的内质网。干旱与外源 ABA 胁迫处理下该基因的表达量均呈下降趋势，推测可能参与林烟草的气孔运动调节过程^[10]。

烟草 *TPK* 家族基因研究尚处于起步阶段，目前只报道了两个 *TPK* 家族钾通道基因——*NtTPK1* 和 *NtTPK2*。对 *NtTPK1* 的研究多集中于体外电生理功能上：该基因在普通烟草栽培种 *Nicotiana tabacum* cv. SR1 中存在 4 个异构体；同 *TPK* 家族其他蛋白一样，该蛋白定位与液泡膜，对 K^+ 有极强的选择性，部分异构体在盐胁迫和高渗透压的胁迫诱导后表达量提高^[11]。*NtTPK2* 来源于普通烟草红花大金元，在花、叶、茎和根中均有表达。两类基因在烟草钾生理代谢过程中的作用尚待解析^[12]。

2 钾转运体

钾转运体分为 *KUP/HAK/KT* 转运体、*HKT/TrK* 转运体、*CHX* 转运体和 *KEA* 转运体四类^[13]。*KUP/HAK/KT* 家族是生物界内发现最早、数目最多、功能最丰富的钾转运体家族，在烟草中也开展了一定的研究。

目前发现的首个烟草钾转运体基因是 *NrHAK1*，由郭兆奎等^[14]（2009）从黄花烟草中克隆得到。该基因可恢复酵母钾吸收缺陷型菌株的吸钾能力，且在烟苗幼根转录水平最高，表明其与烟草根部的钾吸收有关。随后，鲁黎明等^[15]（2011）在普通烟草中得到 *NrHAK1* 的同源基因 *NtHAK1*，该基因在烟草栽培种 K326 中过表达后，转化株的钾含量显著高于野生型，表明其可提高烟株富集钾的能力^[16]。随着测序技术的发展和部分烟草基因组数据库信息的公开，利用生物信息学方法预测和获得基因成为一种新手段。烟草 *NtPOT10* 是利用该策略获得的 *KUP/HAK/KT* 家族的成员之一（该基因原来被称为 *TPK1*，序列分析表明该基因与拟南芥的 *AtPOT10* 和水稻的 *HAK12* 同源，为避免与文中上述的 *TPK* 钾通道家族混淆，称之为 *NtPOT10*）。该基因主要在叶、茎和花中表达，在根中几乎无表达，其具体功能还有待确定^[17]。宋毓峰等（2014，待发表）通过生物信息学预测，对林烟草和绒毛状烟草的基因组进行分析，获得了两物种 *KUP/HAK/KT* 家族所有的钾转运体成员，并对林烟草中一个新基因 *HAK11* 进行了表达、定位等研究。分析表明，林烟草和绒毛状烟草均含有 19 个可能的 *KUP/HAK/KT* 钾转运体，*HAK11* 基因在盛花期林烟草的各组织中均有表达，在主根中表达量最高，侧根次之，叶片中的表达量最低，蛋白定位于质膜，胁迫处理后的转录水平变化表明其可能参与叶片响应低温、高温和低钾胁迫的应对机制。

3 钾营养相关调控蛋白

植物的钾吸收转运是一个复杂的基因表达网络调控过程，除钾通道和钾转运体的参与外，还涉及众多的调控基因^[3]。就目前的研究而言，烟草中还未直接鉴定得到新的调控蛋白，大量工作多以烟草为材料，研究其他物种来源的基因在钾营养过程中的作用。因此，发现和鉴定烟草自身的钾营养相关调控基因，解析其调控机制，逐步建立相关调控手段，是了解烟草钾吸收积累过程、改善烟草钾含量的重要内容。

研究表明，植物利用不同的钙调神经素 B 亚基蛋白 CBL (calcineurin B-like protein)，与其下游的靶激酶 CIPK (CBL-interacting protein kinase) 组成的 CBL-CIPK 信号转导途径，将感应到的信号层层传递，激活或抑制某些基因的表达水平或蛋白活性，使植物在分子水平上做出相应的反应，从而响应高盐、低钾、

低温、干旱等非生物逆境胁迫^[18-19]。拟南芥通过 CBL1/CBL9-CIPK23-AKT1 路径响应其低钾胁迫,该路径也存在于杨树等植物中^[20]。研究发现,拟南芥 *AtCIPK23* 转入烟草后,转基因材料的干物质积累以及各器官钾含量明显高于对照,且具有较强的根系活力^[21],预示着烟草中极可能也存在类似的机制。

普通烟草 *Nt-SYR1* 基因编码一个质膜融合 Qa-SNARE 蛋白。*Nt-SYR1* 通过其 C 端的跨膜结构域锚定于质膜上。该蛋白被突变或抑制后, K^+ 和 Cl^- 通道对 ABA 的响应也受到抑制,气孔关闭受阻,表明 *Nt-SYR1* 可影响包括钾通道在内的一些离子通道的功能^[22]。拟南芥无机焦磷酸酶基因(H^+ -PPase) *AVP2* 在烟草中过表达后,*NtHAK1* 的转录水平显著上调,同时 *NKT1* 的转录水平也略有增加,烟叶 K^+ 的含量显著增加。该研究表明,钾转运体和钾通道基因的转录和表达与液泡膜上 H^+ -PPase 的能力供应有关^[23]。披碱草 (*Elymus dahuricus*) 中的氢离子焦磷酸化酶基因 *EdHPI* 转入烟草后,烟草的根系活力、总根体积、总表面积及发育程度等各项指标均明显优于野生型对照,而钾外排速率却显著低于对照,表明 *EdHPI* 能够增加植物对钾的吸收^[24]。

4 问题与展望

长期以来,通过传统的栽培手段和措施来提高烟叶含钾量及品质的研究均未达到理想效果。烟草钾营养分子机制研究起步晚而导致理论基础相对缺乏这一现状更加剧了国内烟叶与国际优质烟叶品质的差异。烟草钾营养研究成为农业科技的重要关注点之一。随着其他作物钾营养研究的深入,开展基础理论研究、选育钾营养高效品种以提高烟草自身的钾营养效率这一策略逐渐受到烟草工作者的广泛认可。随着基因组计划的顺利实施,立足于已有的材料资源和数据资源,充分借鉴其他作物的研究思路,大力挖掘钾营养高效的基因,解析其功能及调控路径,培育钾营养高效的烟草品种,将成为改善我国烟叶质量的重要手段。

参考文献

- [1] 闫慧峰,石屹,李乃会,等. 烟草钾素营养研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(1): 123-129.
- [2] Epstein E, Rains D, Elzam O. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1963, 49(5): 684-692.
- [3] Véry A A, Sentenac H. Molecular mechanisms and regulation of K^+ transport in higher plants[J]. Annu Rev Plant Biol, 2003, 54(1): 575-603.
- [4] Lebaudy A, Véry A A, Sentenac H. K^+ channel activity in plants: Genes, regulations and functions[J]. FEBS Lett, 2007, 581(12): 2357-2366.
- [5] Sano T, Becker D, Ivashikina N, et al. Plant cells must pass a K^+ threshold to re-enter the cell cycle[J]. Plant J., 2007, 50(3): 401-413.
- [6] 郭兆奎,杨谦,颜培强,等. 黄花烟草 K^+ 通道基因 *NKCI* 克隆与序列分析[J]. 中国烟草学报, 2008, 14(5): 63-68.
- [7] Liu H, Qu P, Liu G, et al. Cloning and expression analysis of potassium channel gene *NKT3* from *Nicotiana tabacum*[J]. Afr J Biotechnol, 2012, 11(48): 10824-10830.
- [8] 曲平治,刘贯山,刘好宝,等. 普通烟草 K^+ 通道基因 *NKT4* 的克隆、序列和表达分析[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(3): 354-359.
- [9] 司丛丛,刘贯山,刘好宝,等. 烟草钾离子通道基因 *NKT5* 的克隆和序列分析[J]. 中国烟草科学, 2010, 31(4): 8-13.
- [10] 靳义荣,宋毓峰,白岩,等. 林烟草钾离子通道 *NKT6* 的克隆与表达定位分析[J]. 作物学报, 2013, 39(9): 1602-1611.
- [11] Hamamoto S, Marui J, Matsuoka K, et al. Characterization of a tobacco TPK-type K^+ channel as a novel tonoplast K^+ channel using yeast tonoplasts[J]. J Biol Chem, 2008, 283(4): 1911-1920.
- [12] 闫亚飞,王根洪,程廷才,等. 烟草钾离子通道基因 *NtTPK2* 的克隆及序列分析[J/OL]. 北京: 中国科技论文在线, 2012. <http://www.paper.edu.cn>.
- [13] Mäser P, Thomine S, Schroeder J I, et al. Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 2001, 126(4): 1646-1667.
- [14] Guo Z, Yang Q, Wan X, et al. Functional characterization of a potassium transporter gene *NrHAK1* in *Nicotiana rustica*[J]. J Zhejiang Univ-SC B, 2009, 9(12): 944-952.

- [15] 鲁黎明, 杨铁钊. 烟草钾转运体基因 *NtHAK1* 的克隆及表达模式分析[J]. 核农学报, 2011, 25(3): 469-476.
- [16] 谭颖, 秦利君, 赵丹, 等. 共转化法获得 *HAK1* 基因高表达烟草提高植株钾吸收能力[J]. 植物生理学报, 2013, 49(7): 689-699.
- [17] 鲁黎明. 烟草钾转运体基因 *TPK1* 的电子克隆及生物信息学分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(1): 28-35.
- [18] Luan S. The CBL-CIPK network in plant calcium signaling[J]. Trends Plant Sci, 2009, 14(1): 37-42.
- [19] Luan S, Lan W, Chul Lee S. Potassium nutrition, sodium toxicity, and calcium signaling: connections through the CBL-CIPK network[J]. Curr Opin Plant Biol, 2009, 12(3): 339-346.
- [20] Xu J, Li H, Chen L, 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] 聂红资, 杨铁钊, 杨志晓, 等. 不同供钾水平下转 *AtCIPK23* 基因烟草钾吸收特征的研究[J]. 河南农业科学, 2009(6): 53-56.
- [22] Leyman B, Geelen D, Quintero F J, et al. A tobacco syntaxin with a role in hormonal control of guard cell ion channels[J]. Science, 1999, 283(5401): 537-540.
- [23] 郭兆奎, 杨谦, 颜培强, 等. 拟南芥 *AVP2* 基因转化烟草中吸钾相关基因的转录分析[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(9): 58-64.
- [24] 金维环, 董建辉, 陈明, 等. 转 *EdHPI* (氢离子焦磷酸化酶) 基因烟草促进钾离子吸收的生理机制[J]. 作物学报, 2010, 36(10): 1752-1759.