

钾素对马铃薯钾转运体 *KUP6* 和 *KUP7* 基因表达量的调节

张子义¹, 赵 阳¹, 梁红胜¹, 樊明寿²

(1. 内蒙古农业大学 生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 为了研究不同钾素浓度对钾转运体 *KUP6* 和 *KUP7* 基因表达量的影响, 通过水培法培养马铃薯幼苗, 通过提取马铃薯总 RNA, 经检测合格后用反转录试剂盒合成其 cDNA 的第一链。运用实时荧光定量核酸扩增检测技术对幼苗叶片进行基因转录水平的检测。在马铃薯幼苗种植后的第 10, 20, 30 天分别测定马铃薯幼苗根、茎和叶中钾的含量, 并进行统计分析。结果表明: 钾素浓度为 1.00 mmol/L 时, *KUP6* 和 *KUP7* 基因表达量最高, 且与其他处理有显著差异; 钾素浓度低于 0.10 mmol/L 时, 表达量较低, 钾素浓度为 10.00 mmol/L 时该基因表达量也降低。表明较高和较低的钾离子浓度都不利于 *KUP6* 和 *KUP7* 基因的表达。通过对根、茎和叶内钾素含量测定表明: 对于根系来说, 钾素浓度在 1.0 mmol/L 时已到达其吸收饱和值; 在钾素浓度为 1.00, 10.00 mmol/L 的高钾水培中, 马铃薯根、茎和叶钾素含量大于水培钾素浓度为 0.01, 0.10 mmol/L 的低钾处理; 在低钾水培条件下, 茎叶随着培养时间的延长, 其钾素含量之间的差异逐渐减小, 而在高钾条件下, 其差异逐渐增大。

关键词: 马铃薯; 钾转运体; qPCR; *KUP6*; *KUP7*

中图分类号: S141.3; Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2018)02-0095-05

doi: 10.7668/hbxb.2018.02.014

Response of Potassium Concentration on Potassium Transporter *KUP6* and *KUP7* Gene Expression in Potato Seedlings

ZHANG Ziyi¹, ZHAO Yang¹, LIANG Hongsheng¹, FAN Mingshou²

(1. College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: In order to study response of the potassium concentration on the expression of *KUP6* and *KUP7* potassium transporter gene, hydroponic potato seedlings was conducted. The RNA of potato was isolated and checked, the first chain of the cDNA was synthesized by the Reverse Transcriptional Kit, and gene transcription on seedlings was detected by Real-time fluorescence quantitative PCR technique and the content of potassium in potato seedlings was detected. The content of potassium in potato seedlings was detected at 10, 20 and 30 days after potato seedling planting. The results showed that when potassium concentration was 1.00 mmol/L, the expression level of *KUP6* and *KUP7* was the highest. When potassium concentration was lower than 0.10 mmol/L, the expression was low, and the expression level of potassium decreased when potassium concentration was 10 mmol/L. It indicates that higher and lower potassium concentration is not conducive to the expression of *KUP6* and *KUP7* genes. Potassium content in roots, stems and leaves showed that potassium concentration reached its absorption saturation at 1.00 mmol/L for root. The higher potassium concentration in hydroponics, the higher potassium content in root, stem and leaf. The difference of potassium content in stem and leaf was decreased when lower potassium concentration in hydroponics and increased when higher concentration.

Key words: Potato; Potassium transporter; qPCR; *KUP6*; *KUP7*

收稿日期: 2017-12-26

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目(2017MS0351); 内蒙古硕士研究生科研创新资助项目(S20171012912); 国家自然科学基金项目(31760356)

作者简介: 张子义(1973-), 男, 内蒙古鄂尔多斯人, 副教授, 博士, 主要从事马铃薯抗逆生理及分子生物学研究。

通讯作者: 樊明寿(1965-), 男, 内蒙古乌兰察布人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事马铃薯养分管理研究。

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是茄科多年生的草本植物,它的块茎可供食用,是仅次于小麦、水稻和玉米的第四大重要粮食作物。内蒙古是我国马铃薯的主产区之一,马铃薯产业已经成为内蒙古地区农业经济发展的主导产业。马铃薯是喜钾作物,它对钾素的吸收量大于氮和磷,且钾素直接影响马铃薯的产量和质量^[1-3]。K⁺是植物体内最为丰富的无机一价阳离子,可以参与植物的多种生理生化过程^[4]。钾转运蛋白主要包括 KUP/HAK/KT 家族、HKT/Trk 家族、CHX 家族和 KEA 家族。而其中的 KUP/HAK/KT 家族是在生物界内最早被发现的,它不仅数目最多而且功能最丰富,它的主要作用是介导植物中钾离子等元素的吸收转运和根部生长素的运输^[5-7]。目前,已在拟南芥、水稻、大麦、桃树中分别预测得到 13,27,5,17 个 KUP/HAK/KT 钾转运体^[8-11]。

研究不同钾素浓度下马铃薯钾转运体 *KUP6* 和 *KUP7* 基因表达量的不同,并分析它们之间的关系,以及不同钾浓度对马铃薯幼苗钾素含量的影响,从而探索马铃薯生长的适宜钾浓度,对提高马铃薯产量和提高钾素的利用效率具有十分重要的意义。

1 材料和方法

1.1 供试材料

试验材料为脱毒马铃薯费乌瑞它组培苗,由内蒙古正丰马铃薯种业股份有限公司提供。试剂为柱式植物总 RNA 抽提纯化试剂盒,购自上海生工生物有限公司,反转录试剂盒和 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。水培试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 试验设计

马铃薯组培苗置于 20 °C,18 h 光照(光照强度 9 000 lx)/6 h 黑暗条件下培养。水培营养液参照 Hongland 营养液,其中,4 个钾素浓度(K₂SO₄)处理见表 1,随机排列,4 次重复。

表 1 不同浓度的钾处理

处理组标号 Treatment	K ⁺ 浓度 /(mmol/L) Concentrations of potassium
LA	0.01
L	0.10
M	1.00
H	10.00

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 反转录

在培养组培苗 30 d 时,随机选取不同处理的马铃薯幼苗,剪取叶片之前将剪刀浸入液氮处理,剪

取的叶片放入事先做好标记的塑料袋中并放入液氮中保存。将取好的叶片放入研钵中进行充分研磨,使叶片磨成粉末,整个研磨过程中要及时加入液氮,防止叶片融化。采用柱式植物总 RNA 抽提纯化试剂盒提取马铃薯叶片总 RNA。用超微量紫外可见分光光度计 Q500 对 RNA 进行浓度测定,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。选用 TaKaRa 公司生产的反转录试剂盒合成 cDNA 的第一链。

1.4 基因表达分析

使用 SYBR Green I 荧光染料法,在 LightCycler480(Roche Diagnostics) 实时荧光定量 PCR 仪上对马铃薯幼苗转录表达水平进行分析。根据 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒说明书配制反应体系,每个反应 3 次重复。反应体系中含有 10 μL SYBR Premix Ex TaqTM,引物各 1 μL(5 μmol/L),稀释的 cDNA 模板 5 μL,灭菌水 3 μL,总体积 20 μL。反应程序为 95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环。反应结束后做溶解曲线分析,用 2^{-ΔΔCt} 法分析数据。

1.5 测定项目及方法

分别在马铃薯幼苗种植后的 10,20,30 d 进行取样,选取具有代表性的 3 株,运用钼锑抗比色法^[12]测定马铃薯幼苗根、茎、叶中钾的含量。

1.6 数据分析

采用 SPSS 软件进行相关统计分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 的提取

用试剂盒成功提取 RNA 后,由于实时荧光定量 PCR 需要高品质的 RNA,所以需要对提取物先进行分析。由图 1 可知,较亮的带为 28S RNA,下面较暗的带是 18S RNA,28S 带的亮度大概是 18S 带的 2 倍,而 5S RNA 带则不明显。所以,RNA 未降解,可以用作后续试验。

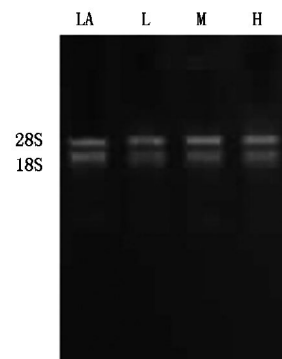


图 1 马铃薯 RNA 电泳结果

Fig. 1 The result of agar gel electrophoresis of potato

2.2 实时荧光定量 PCR 结果分析

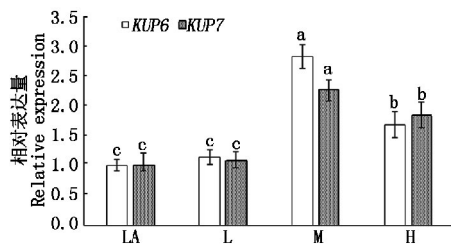
首先查询拟南芥中 *KUP6* 和 *KUP7* 基因表达的蛋白的一级结构,再从马铃薯中查找到与其一级结构最相似的蛋白,然后查看其基因序列,最后利用 Premier 5.0 软件设计最适引物。荧光定量 PCR 所用引物见表 2。

表 2 引物序列

Tab. 2 Primer sequence

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence
<i>KUP6</i> -F	AAAATAAGCTCTCTGTCGAGTGCC
<i>KUP6</i> -R	GTGGAATGCTGGAAGATTGGTAAC
<i>KUP7</i> -F	TAGGGACACAGGAAAGGCAGTTAT
<i>KUP7</i> -R	TGACCAAGAAGATAGACCACACCA
EF1 α -F	CCATTGGGTCGTTTTGCTGTG
EF1 α -R	TTTGGCACCAAGTTGGCTCCT

通过实时荧光定量 PCR 检测了 *KUP6* 和 *KUP7* 基因表达水平,结果见图 2,与钾离子浓度 0.01 mmol/L 相比,当钾离子浓度为 0.10 mmol/L 其基因表达量增加不明显;当钾离子浓度为 1.00 mmol/L 时,*KUP6* 和 *KUP7* 基因表达量最高,且与其他处理之间都具有显著差异,分别为 LA 处理的 2.82,2.28 倍;而钾离子浓度为 10.00 mmol/L 时,与处理 LA 和 L 具有显著差异,*KUP6* 和 *KUP7* 基因表达量分别为 LA 的 1.68,1.86 倍,说明过高或较低的钾离子浓度都不利于 *KUP6* 和 *KUP7* 基因的表达。



a, b, c. 表示在 0.05 水平上显著。图 3-5 同。

a, b, c. Correlation is significant at the 0.05 level. The same as Fig. 3-5.

图 2 实时荧光定量 PCR 基因表达量

Fig. 2 The expression of *KUP6* and *KUP7* detected by qRT-PCR

2.3 钾素在根、茎、叶中的含量

从图 3 可以看出,在各个阶段 H 和 M 处理之间根系的钾素含量变化为 30.2 ~ 32.5 g/kg,且在不同阶段两处理之间均无显著差异,说明 M 处理根系中钾素已经达到了饱和。在水培后 20 d 内,培养液钾素含量在 0.01 ~ 1.00 mmol/L 时,随着培养液钾素浓度的增加,根系钾素含量增加。在水培第 10 天,LA、L 和 M 处理根系钾素浓度分别为 1.5,24.9,32.5 g/kg;在水培第 20 天,LA、L 和 M 处理根系钾素浓度分别为 2.0,9.6,31.0 g/kg,且处理 LA、L 和

M 之间均具有显著差异。在水培 30 d 时,M 处理和 H 处理与 LA 和 L 处理有显著差异,但 L 和 LA 处理之间没有显著变化。L 处理钾素含量随着培养天数的增加呈下降的趋势。

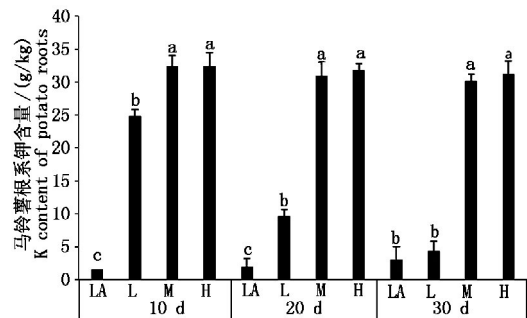


图 3 不同处理下根系钾素的含量

Fig. 3 The potassium content in potato roots

马铃薯茎中钾素含量随着培养液钾素浓度的增加而增加(图 4),在水培后第 20 天内,处理 H 和 M 之间没有差异,但其与 LA 和 L 之间有显著差异,且 L 与 LA 之间也有显著差异。在水培第 10 天,LA、L 和 M 处理中茎钾素浓度分别为 2.0,26.3,37.1 g/kg;在水培第 20 天,LA、L 和 M 处理中茎钾素浓度分别为 13.2,24.0,58.3 g/kg;在水培第 30 天时,处理 LA 和 L 与 M 和 H 之间有显著差异,但在数值上差距倍数缩小,说明处理 LA 和 L 在生长过程中累积了钾素,并维持了一定的钾素浓度;H 处理的钾素含量达 65.1 g/kg,与其他处理之间均具有显著差异,且随着培养天数的增加 LA 和 H 处理钾素茎内含量呈上升趋势。

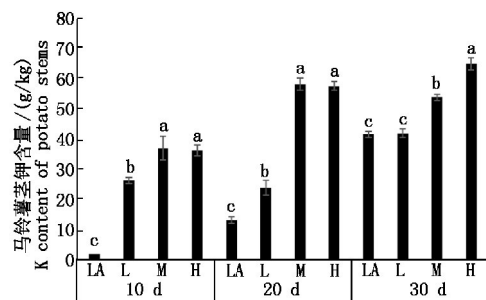


图 4 不同浓度处理下茎中钾素的含量

Fig. 4 The potassium content in potato stems

马铃薯叶中钾素含量也随着培养液钾素浓度的增加而增加(图 5),在试验第 10 天,4 个处理之间均具有显著差异,LA、L、M 和 H 处理的钾素浓度分别为 4.2,18.6,26.2,32.4 g/kg,说明水培 10 d 所测试的叶片钾素浓度与水培的钾素浓度呈一定的正相关性。在水培试验 20 d 时,L 处理与 LA 处理之间无显著差异,H 处理与 M 处理也没有显著差异,但 M 和 H 处理与 LA 和 L 之间具有显著差异。水培试验第 30 天,H 处理钾素浓度达到 46.0 g/kg,

与其他处理之间有显著差异; M 处理钾素浓度为 32.9 g/kg, 与 LA 和 L 均具有显著差异, LA 和 L 之间无显著差异。

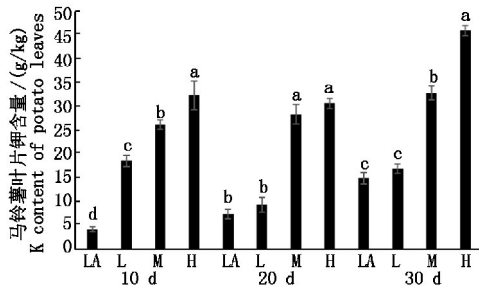


图5 不同浓度处理下叶中钾素的含量

Fig. 5 The potassium content in potato leaves

3 结论与讨论

植物细胞有 2 种机制来介导钾离子的跨膜吸收, 它们分别是钾离子通道蛋白介导的低亲和性钾吸收系统和钾转运体介导的高亲和性钾吸收系统。当细胞外钾离子浓度高时, 低亲和性钾转运系统发挥作用, 这种吸收主要是由离子通道蛋白调节的被动运输的过程; 当细胞外的钾离子浓度低时, 高亲和性钾转运系统起主要作用。虽然对于多数植物来说, 它们吸收钾离子主要依赖于低亲和性的钾转运系统, 但是高亲和性钾转运系统也在植物生长发育中发挥了不可替代的作用, 尤其是在外界存在低钾胁迫时, 它能够让植物更好地生存。而且钾离子通道蛋白和钾转运体并不是只能在一种机制中起作用, 钾离子通道蛋白可以在高亲和性钾吸收系统中起作用, 钾转运体也可以在低亲和性钾吸收系统中起作用^[13-15]。

已有的研究表明, KUP/HAK/KT 家族是植物中一类非常重要的钾离子转运体蛋白, 它们在钾离子高亲和性吸收系统中起作用, 也就是在外界钾离子浓度过低时介导植物钾离子的吸收。而植物中的钾离子通道蛋白和钾转运体往往是通过转录水平的变化或翻译后蛋白的修饰来参与植物对低钾胁迫的响应^[16-18]。

本试验利用实时荧光定量 PCR 法检测了不同钾素浓度下 KUP6 和 KUP7 转录水平基因表达量的变化, 结果显示, 低钾处理后 KUP6 和 KUP7 的表达水平都没有发生很显著的变化; 在钾素浓度为 1.00 mmol/L 时, KUP6 和 KUP7 的表达水平都上升明显; 高钾处理后 KUP6 和 KUP7 的表达水平都上升但其上升的幅度减小了。而叶片中的钾素含量随着培养液钾素浓度的增大呈递增的趋势。以上试验结果说明, 钾转运体 KUP6 和 KUP7 不仅是通过转录

水平的调控来参与马铃薯对钾素的响应, 很可能是由翻译后蛋白的修饰来响应钾素胁迫的, 由于目前人们对于此类钾转运体蛋白生理功能的研究还非常有限^[19-20], 所以, 还有很大的研究空间, 希望本研究对马铃薯生长发育中合理分配钾素资源以及对钾转运体 KUP6 和 KUP7 的分子机制的后续研究有所帮助。

参考文献:

- [1] 张鑫, 陈杨, 秦永林, 等. 马铃薯钾素营养研究进展及营养诊断 [J]. 北方农业学报, 2016, 44(1): 109-112.
- [2] 高媛, 韦艳萍, 樊明寿. 马铃薯的养分需求 [J]. 中国马铃薯, 2011, 25(3): 182-187.
- [3] Ngomat M S, Mworio M. Evaluation of the effects of potassium fertilizer on potato growth and yield in Saboti Sub County, Trans Nzoia County, Kenya [J]. International Journal of Academic Research in Environment & Geography, 2017, 4(1): 33-40.
- [4] Ma T L, Wu W H, Wang Y. Transcriptome analysis of rice root responses to potassium deficiency [J]. BMC Plant Biology, 2012, 12(1): 161.
- [5] Ahn S J, Shin R, Schachtman D P. Expression of Kt/KUP genes in Arabidopsis and the role of root hairs in K⁺ uptake [J]. Plant Physiology, 2004, 134(3): 1135-1145.
- [6] 晁毛妮, 温青玉, 张晋玉, 等. 大豆 KUP/HAK/KT 钾转运体基因家族的鉴定与表达分析 [J]. 西北植物学报, 2017, 37(2): 239-249.
- [7] Anne-Aliénor V, Manuel N C, Meriem D, 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.
- [8] 韩敏. 钾转运体 KUP7 参与拟南芥响应低钾胁迫的功能研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [9] Song Z Z, Ma R J, Yu M L. Genome-wide analysis and identification of KT/HAK/KUP potassium transporter gene family in peach (*Prunus persica*) [J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(1): 774-787.
- [10] Wang Y, Wu W H. Potassium transport and signaling in higher plants [J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64(1): 451-476.
- [11] Song Z Z, Yang Y, Ma R J, et al. Transcription of potassium transporter genes of Kt/HAK/KUP family in peach seedlings and responses to abiotic stresses [J]. Biologia Plantarum, 2015, 59(1): 65-73.
- [12] 张永成, 田丰. 马铃薯试验研究方法 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2007: 187.
- [13] Mäser P, Thomine S, Schroeder J I, et al. Phylogenetic re-

- relationships within cation transporter families of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(4): 1646 - 1667.
- [14] 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(3): 1012 - 1019.
- [15] Hirsch R E, Lewis B D, Spalding E P, et al. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition [J]. *Science*, 1998, 280(5365): 918 - 921.
- [16] Han M, Wu W, Wu W H, et al. Potassium transporter *KUP7* is involved in K^+ acquisition and translocation in *Arabidopsis* root under K^+ -limited conditions [J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(3): 437 - 446.
- [17] 宋毓峰, 张 良, 董连红, 等. 植物 KUP/HAK/KT 家族钾转运体研究进展 [J]. *中国农业科技导报*, 2013(6): 92 - 98.
- [18] Zhang Z, Zhang J, Chen Y, et al. Genome-wide analysis and identification of HAK potassium transporter gene family in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(8): 8465 - 8473.
- [19] He C, Cui K, Duan A, et al. Genome-wide and molecular evolution analysis of the poplar Kt/HAK/KUP potassium transporter gene family [J]. *Ecology and Evolution*, 2012, 2(8): 1996 - 2004.
- [20] 杨中敏, 王 艳. 钾离子转运载体 KUP/HAK/KT 家族功能的研究进展 [J]. *生物技术*, 2014(3): 100 - 103.

《天津农业科学》征订启事

《天津农业科学》是天津市农业科学院信息研究所主办的综合性学术期刊,创刊于 1974 年。国际刊号: ISSN 1006 - 6500, 国内刊号: CN: 12 - 1256/S。本刊为月刊,大 16 开,150 页,每期定价 5 元,全年 60 元。

本刊为美国化学文摘 CA 收录期刊、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊,中国学术期刊综合评价数据统计源期刊,全国优秀农业期刊。

开设栏目有:植物生理与生物技术、作物栽培与设施园艺、植物保护、土壤肥料与节水灌溉、畜牧兽医与水产养殖、园林绿化、贮藏加工、农产品安全、农业经济与信息技术、农业科研管理、三农问题研究、农业区划等。

适合各级农业科研人员、农技推广人员、农业行政管理干部、农业大中专院校师生参阅。
欢迎订阅,欢迎投稿!

地 址:天津市南开区白堤路 268 号农科大厦 1905 室

邮 编:300192

电话/传真:022 - 23678601 E-mail: tjnykx@163.com

在线投稿网址: tjnykx.paperopen.com