

doi:10.7668/hbxb.2014.06.036

拟南芥高亲和性钾转运体 AtHAK5 参与植物根对盐胁迫及 ABA 的反应

张彦桃, 王 欣, 祁 智, 亢 燕

(内蒙古大学 生命科学院, 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要:为研究在不同逆境,如低钾、低钙、NaCl 及 ABA 胁迫下,对拟南芥高亲和性钾转运体基因 *AtHAK5* 表达的影响,在对含有 *promoter AtHAK5::GUS* 融合基因的拟南芥转基因植株进行组织化学染色基础上进行 Real time RT-PCR 检测。结果表明,这些逆境条件可以引起拟南芥 *AtHAK5* 基因表达量的上调。同时在对拟南芥 Col-0 和 *AtHAK5* 缺失突变体 *athak5* 表型对比分析,发现 *AtHAK5* 参与植物根对盐胁迫及 ABA 的反应。

关键词: *AtHAK5*; 拟南芥; 非生物胁迫

中图分类号: S143.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)06-0214-06

Arabidopsis thaliana High-affinity Potassium Transporter AtHAK5 Participated in the Response to Salt Stress and ABA in the Plant Root

ZHANG Yan-tao, WANG Xin, QI Zhi, KANG Yan

(College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China)

Abstract: In present study, the expression of *AtHAK5* gene were found to be induced by some abiotic stress, such as low potassium, low calcium, NaCl and ABA by GUS activity based histochemical staining of the *Arabidopsis thaliana* transgenic plants containing a *promoter AtHAK5::GUS* fusion gene. These stress could up-regulate the expression of *AtHAK5* gene of *Arabidopsis thaliana* confirmed by Real time RT-PCR. The differences of growth phenotype between wild-type *Arabidopsis thaliana* (Col-0) and the mutant (*athak5*) in the various abiotic stress treatments proved that *AtHAK5* participated in the response to salt and ABA in the plant root.

Key words: *AtHAK5*; *Arabidopsis thaliana*; Abiotic stress

钾是植物中大量存在的阳离子,在植物的代谢、生长及胁迫适应方面发挥重要作用。植物能够有效地感应 K^+ 并且适应不同浓度的钾环境,是由于植物的根系统存在不同的钾吸收机制。在大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 中存在两相的根吸收系统,即高亲和性钾吸收系统和低高亲和性钾吸收系统^[1],同样的模式在其他植物中也存在^[2]。由于在根土界面钾离子的浓度经常在微摩尔级别,所以对农业生产具有重要意义的高亲和性钾吸收系统成为研究的热点。在一些植物中, KUP/HAK/KT 家族是主要的高亲和性钾吸收系统, T-DNA 插入突变体研究证实

AtHAK5 是这一家族中主要的钾离子转运体之一,定位于细胞质膜^[3]。研究发现, *AtHAK5* 功能缺失突变体 *athak5* 的高亲和性钾离子吸收能力降低,在低钾培养基上根长变短^[3]。

钙是植物生长所需的大量元素之一,同时钙离子也是维持植物多种代谢活动正常运行的物质保障,是植物细胞内多种信号转导途径中重要的第二信使。钙离子不仅维持着细胞膜内外两侧的电位平衡,而且对植物细胞应对各种胁迫反应有重要作用。在农业生产中,一个影响钾吸收的重要因素就是盐胁迫。ABA (Abscisic acid, 脱落酸)除了在种子发育

收稿日期: 2014-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060163); 国家青年基金项目(31201066)

作者简介: 张彦桃(1975-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 助理研究员, 在读博士, 主要从事植物生化与分子生物学研究。

通讯作者: 亢 燕(1982-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 讲师, 博士, 主要从事植物生化与分子生物学研究。

方面发挥一定作用,在植物非生物胁迫中也起着重要作用,也可以作为一种内源的信号物质来调节离子进入木质部微管组织^[4-5]及调节气孔的开度^[6-7]。Roberts 等^[5]首次证实植物根中的 K⁺ 通道可以被 ABA 所调节。

之前大量研究证实,拟南芥高亲和性钾转运体基因 *AtHAK5* 在低钾的环境条件下表达量成倍上升^[8]。而盐胁迫、低钙及 ABA 等这些影响植物生长发育的非生物胁迫因素对植物高亲和性钾转运体基因 *AtHAK5* 的表达有何影响, *AtHAK5* 是否参与了植物对以上非生物逆境胁迫的响应,目前尚无报道。因此,本研究对这些问题进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

拟南芥哥伦比亚野生型种子 Col-0 由内蒙古大学生命科学学院植物逆境信号转导实验室保存,拟南芥突变体 *athak5* Salk_101014 种子购自拟南芥资源中心 (Arabidopsis biological resource center, ABRC); 稳定表达 *promoter AtHAK5::GUS* 融合基因的拟南芥转基因植物 1172 *promoter::GUS* T₃ 种子由本实验室建立和保存。

1.2 主要酶及试剂

TransZol UP 购自北京全式金生物技术有限公司; ExTaq 聚合酶、DNase I、感受态细胞提取试剂盒、限制性内切酶及反转录试剂盒购自大连宝生物工程技术有限公司; T₄ DNA 连接酶为 Promega 公司产品; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化有限公司; 其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 对照 (CK) 培养基

大量元素: 0.5 mmol/L H₃PO₄, 2 mmol/L Ca(NO₃)₂, 1 mmol/L KCl, 0.75 mmol/L MgSO₄; 微量元素: 5 μmol/L H₃BO₃, 1 μmol/L MnCl₂, 2 μmol/L ZnSO₄, 0.1 μmol/L CuSO₄, 0.5 μmol/L Na₂MoO₄; 铁盐: 74 μmol/L FeSO₄·7H₂O, 74 μmol/L Na₂·EDTA·2H₂O, 5 mmol/L MES (MES hydrate), 1% 蔗糖, BTP (BIS-TRIS propane) 调 pH 值至 5.8, 1.0% 琼脂糖。低钾培养基含有 50 μmol/L KCl (LKC: Low K CK)。

1.4 方法

1.4.1 拟南芥组织化学染色检测 将稳定表达 *promoter AtHAK5::GUS* 融合基因的拟南芥转基因植株 1172 *promoter::GUS* 的 T₃ 种子播种于 CK 培养基上, 4 °C 春化 3 d, 22 °C 光照 (16 h 光照/8 h 黑暗) 竖直培养 8 d (根长 2~3 cm), 挑选长势较好的植株给予不同胁迫处理, 48 h 后进行组织化学法染色,

在显微镜下观察根的染色情况。

1.4.2 Real time RT-PCR 经过不同胁迫处理的拟南芥植株, TransZol UP 提取其总 RNA, Prime Script II 1st Strand cDNA Synthesis kit 反转录为 cDNA, 以 *Actin2*-LF (5'-GCCAATCCGGTGCTGCTAACA-3') 和 *Actin2*-RF (5'-CATACCAGATCCAGTTCCTCCTCCC-3') 作为内参基因引物, *AtHAK5*-LF (5'-GAAAGGGA TGTTTATCTAATG-3') 和 *AtHAK5*-RF (5'-ATCGCA AGTGCTTTGTCTCC-3') 为目的基因引物进行 Real time RT-PCR。

1.4.3 *athak5* T-DNA 插入突变体的鉴定 提取生长于 1/2 MS 培养基上 13 d 的拟南芥突变体 *athak5* (Salk_101014) 总 DNA, 以引物 SALK_101014-L (5'-CAAGTGTACAAATTGCACATGC-3'), SALK_101014-R (5'-CTCGTACTTAGCCGAGGTGTG-3') 和 LBb1.3 (5'-ATTTTGCCGATTTTCGGAAC-3') 分别进行 PCR 检测。

1.4.4 拟南芥野生型 Col-0 与 *athak5* 表型分析 逆境胁迫浓度 Ca²⁺ 浓度梯度: 0, 100, 500, 1 000 μmol/L。K⁺ 浓度梯度: 0, 1, 10, 50, 1 000 mmol/L。Na⁺ 浓度梯度: 0, 10, 20, 50, 100 mmol/L。ABA 浓度梯度: 0, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0 μmol/L。

2 结果与分析

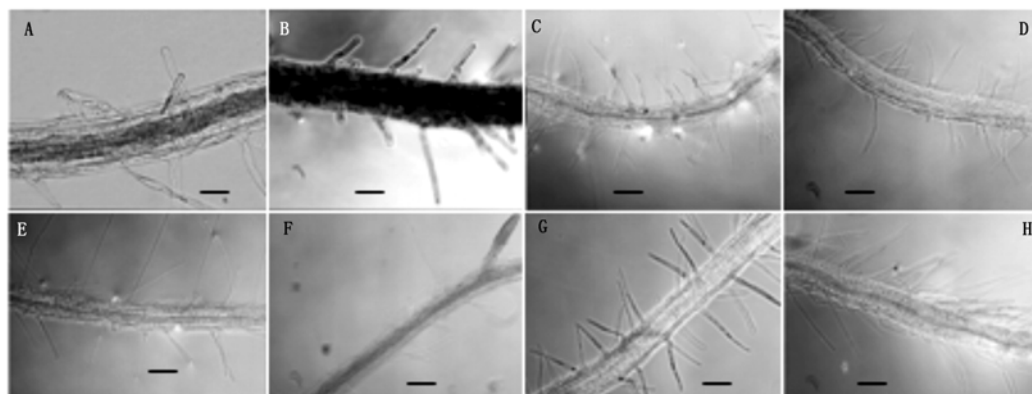
2.1 不同矿质离子、ABA 和盐胁迫条件对 *AtHAK5* 基因表达的影响

为了验证除低钾环境条件外, 是否有其他因素可以调控 *AtHAK5* 基因的表达, 本试验分别选取了钾、钙、镁、氮、磷等植物生长所需的矿质离子、植物激素 ABA 和 NaCl 胁迫等作为逆境诱导条件, 对可以稳定表达全长 *AtHAK5* 启动子和 *GUS* 基因的 T₃ 转基因植株 (1172 *promoter::GUS*) 进行诱导。在合适的诱导条件下, *AtHAK5* 启动子可以启动下游 *GUS* 基因的表达, 在底物存在的情况下, 经酶催化后肉眼可见拟南芥根部变蓝。显微镜下观察结果见图 1。

在没有任何处理的条件下, 转基因植株 (1172 *promoter::GUS*) 的根部没有观察到蓝色 (图 1-A), 说明 *AtHAK5* 基因的表达需要一定的诱导条件; 在缺失钾的培养基上, 1172 *promoter::GUS* 的根部观察到明显的蓝色 (图 1-B), 说明 K⁺ 缺乏的条件可诱导拟南芥根中 *AtHAK5* 基因大量表达, 这与已报道的研究结果一致^[8]; 另外本研究发现, 经过低钙 (图 1-C)、NaCl (图 1-G) 和 ABA (图 1-H) 胁迫处理后, 转基因植株 (1172 *promoter::GUS*) 的根部可以观察到

蓝色,说明低钾、低钙、NaCl 和 ABA 胁迫处理均可

诱导 *AtHAK5* 基因的表达。



A. 1172 promoter::GUS 生长在 CK 培养基;B、C、D、E、F. 1172 promoter::GUS 生长于缺 K、缺 Ca、缺 Mg、缺 N、缺 P 的培养基;G、H. 1172 promoter::GUS 生长于添加 100 mmol/L NaCl、10 μmol/L ABA 的培养基(A、B、G Bar = 25 μm);(C、D、E、H Bar = 18 μm);(F Bar = 10 μm)。
A. 1172 promoter::GUS were grown on CK culture medium;B、C、D、E、F. 1172 promoter::GUS were grown on low potassium, low calcium, low magnesium, low nitrogen or low phosphorus culture medium;G、H. 1172 promoter::GUS were grown on culture medium containing 100 mmol/L NaCl and 10 μmol/L ABA(A、B、G Bar = 25 μm);(C、D、E、H Bar = 18 μm);(F Bar = 10 μm)。

图 1 不同胁迫条件下拟南芥 1172 promoter::GUS 转基因植株根部 GUS 组织化学染色

Fig. 1 Results of GUS staining in roots of 1172 promoter::GUS under the condition of different stresses

为了进一步验证上述试验结果,本试验又以野生型拟南芥(Col-0)作为试验材料,在按照可使 1172 promoter::GUS 根变蓝的低钾(-K⁺)、低钙(-Ca²⁺)、添加植物激素 ABA(+ABA)及 NaCl(+NaCl)为诱导条件的基础上,进一步采用 Real time RT-PCR 法,在转录水平上对 *AtHAK5* 基因的表达量进行检测,结果见图 2。

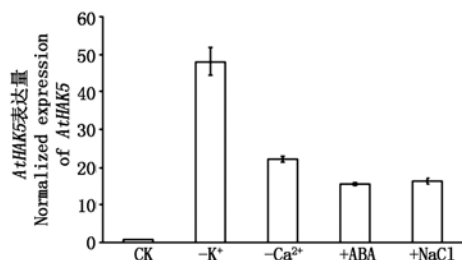


图 2 不同矿质离子、ABA 和盐胁迫条件下 *AtHAK5* 基因 Real time RT-PCR 检测结果

Fig. 2 Results of RT-PCR in different mineral ions, ABA and salt stress conditions

Real time RT-PCR 试验结果显示:低钙、低钾、添加 10 μmol/L ABA 及添加 100 mmol/L NaCl 处理 Col-0 后, *AtHAK5* 基因表达量均有不同程度的升高。试验结果在转录水平上证实了除低钾诱导 *AtHAK5* 基因表达外,低钙、植物激素 ABA 和 NaCl 胁迫处理同样可以诱导 *AtHAK5* 基因表达。

2.2 矿质离子、ABA、盐胁迫等条件下拟南芥野生型与突变体表型分析

为了进一步研究 *AtHAK5* 是否参与了植物对矿质离子缺乏、ABA、盐胁迫等逆境条件的响应,本试验选取了野生型 Col-0 和插入型功能缺失突变体 *athak5* 这 2 种植物,分别进行不同胁迫条件(低钾、

低钙、ABA 和 NaCl)的表型分析。

2.2.1 *athak5* T-DNA 纯合突变体的鉴定 *athak5* T-DNA 插入突变体是在野生型拟南芥(Col-0)的第 4 号染色体的 7 798 565 位置上插入了一段 T-DNA 而形成的功能缺失型突变体。利用插入的 T-DNA 序列上游引物 LP、T-DNA 序列下游引物 RP 和插入的 T-DNA 上特异性序列作为引物,根据不同大小的 PCR 产物条带,判断植物的基因型。对试验所需的拟南芥纯合突变体种子进行分子鉴定,以保证试验材料的可靠性。结果见图 3。

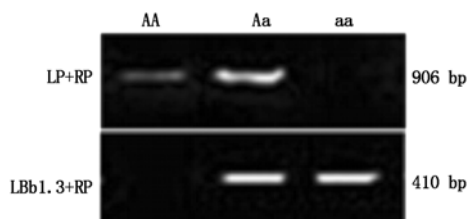


图 3 拟南芥 T-DNA 插入突变体 PCR 鉴定结果

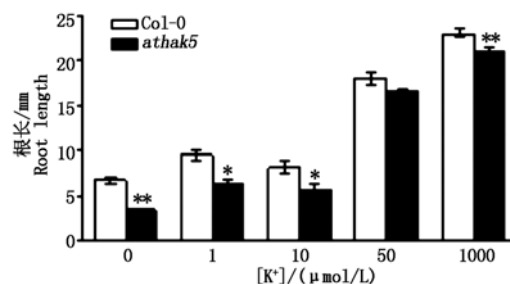
Fig. 3 PCR products of *athak5*

2.2.2 拟南芥野生型 Col-0 与 *athak5* 在钾浓度梯度条件下生长情况 *AtHAK5* 是由低钾诱导的高亲和性钾离子通道蛋白,而 *athak5* 是功能缺失型突变体。因此,它们在不同的钾浓度培养基上的表型不同。将拟南芥野生型 Col-0 与 *athak5* 分别播种于不同钾浓度梯度的培养基上,其表型见图 4。

由图 4 可知,Col-0 与 *athak5* 突变体的根长随着培养基中钾浓度的降低,总体呈下降趋势;在相同钾浓度处理条件下, *athak5* 突变体的根比 Col-0 短,说明 *AtHAK5* 基因在维持植物根系正常生长方面有重要作用;随着培养基中钾浓度的降低,Col-0 与

athak5 突变体的根长差距逐渐增加, 在无钾培养基上 *athak5* 突变体的根长只有 Col-0 根长的 1/2, 说明 *athak5* 突变体对低钾环境更为敏感。

2.2.3 拟南芥野生型与 *athak5* 突变体在钙浓度梯度条件下生长情况 本试验根据不同钾浓度下 Col-0 和 *athak5* 的植物表型, 分别选取了 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 1 mmol/L 这 2 个不同钾浓度作为诱导的背景条件, 分析 *AtHAK5* 基因是否参与了植物对低钙环境的响应。

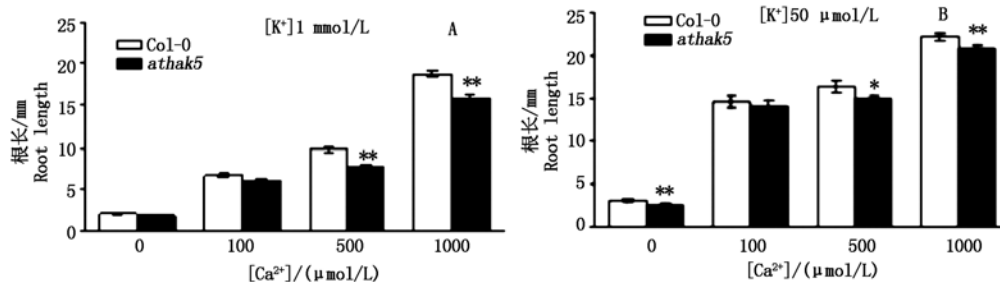


** . $P < 0.01$; * . $0.01 < P < 0.05$. 图 5 ~ 7 同。

** . $P < 0.01$; * . $0.01 < P < 0.05$. The same as Fig. 5 - 7.

图 4 Col-0 与 *athak5* 在不同钾浓度培养基上根长分析

Fig. 4 The root length of Col-0 and *athak5* under various K^+ levels

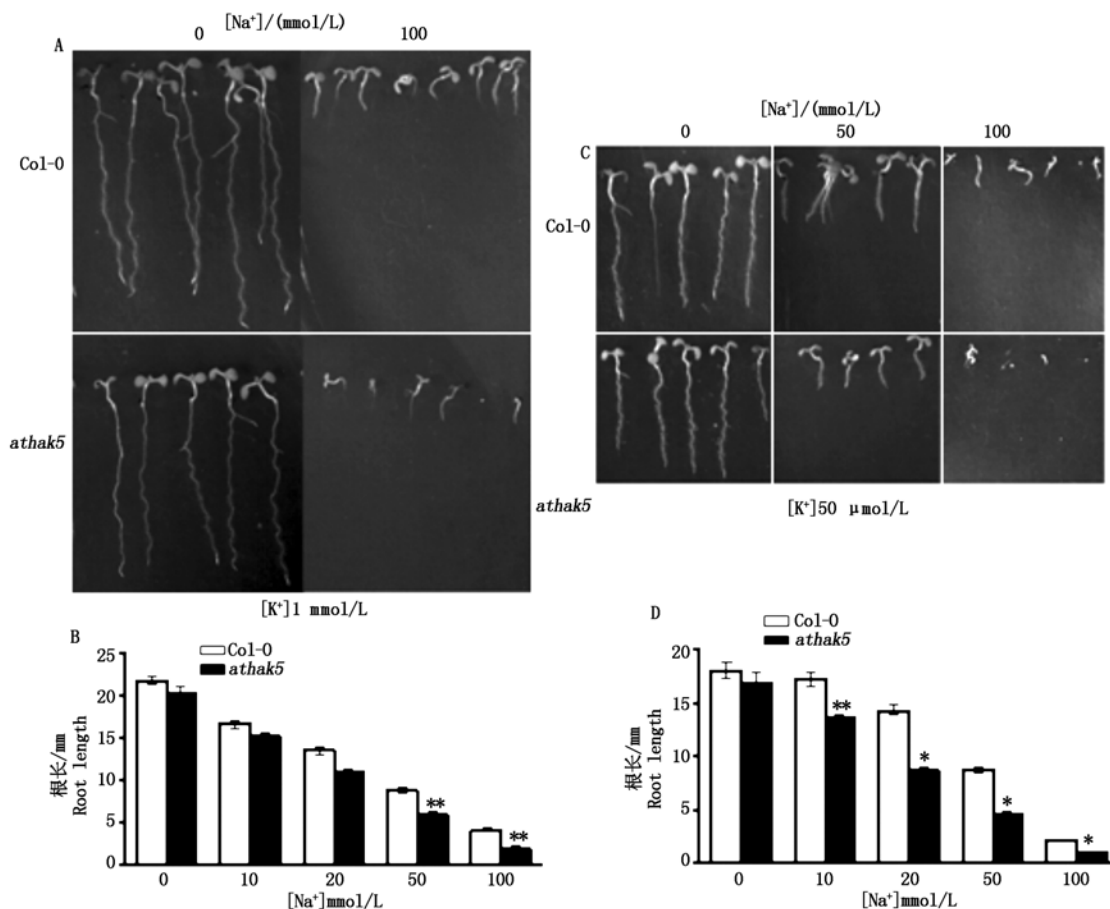


A. 正常钾 (1 mmol/L K^+); B. 低钾 (50 $\mu\text{mol/L}$ K^+).

A. Normal K^+ (1 mmol/L K^+); B. Low K^+ (50 $\mu\text{mol/L}$ K^+).

图 5 不同钙浓度处理拟南芥 Col-0 及 *athak5* 的根长

Fig. 5 The root length of Col-0 and *athak5* under various Ca^{2+} levels



A, B. 正常钾 (1 mmol/L K^+); C, D. 低钾 (50 $\mu\text{mol/L}$ K^+). 图 7 同。

A, B. Normal K^+ (1 mmol/L K^+); C, D. Low K^+ (50 $\mu\text{mol/L}$ K^+). The same as Fig. 7.

图 6 正常钾及低钾环境不同钠浓度处理拟南芥 Col-0 与 *athak5* 的生长情况及根长

Fig. 6 Growing condition and root length of Col-0 and *athak5* under normal potassium and low potassium supplementing with different Na^+

在低钾 ($50 \mu\text{mol/L K}^+$) 及正常钾 (1 mmol/L K^+) 的培养基上, Col-0 与 *athak5* 的根长随着培养基中钙浓度的降低总体均呈下降趋势, 说明 Col-0 与 *athak5* 对低钾与低钙环境敏感; 2 种钾浓度培养基中添加不同浓度的钙, 当植物生长于低钙 ($100 \mu\text{mol/L}$) 的条件下时, Col-0 和 *athak5* 的根长都明显变短, *athak5* 比 Col-0 根长只是略有差异, 表明 *AtHAK5* 基因在植物根对低钙环境的响应过程中不起主要作用 (图 5)。

2.2.4 拟南芥野生型与 *athak5* 突变体在钠浓度梯度条件下生长情况 为了研究 *athak5* 基因在植物盐胁迫响应中的作用, 对拟南芥 Col-0 及 *athak5* 突变体在低钾及正常钾情况下, 添加不同浓度的盐 ($0, 10, 20, 50, 100 \text{ mmol/L NaCl}$), 观察植物的根及整个植株的生长情况, 结果见图 6。

由图 6 可知, 正常钾条件下, 高盐 ($50, 100 \text{ mmol/L}$) 情况下拟南芥 *athak5* 突变体根长显著小于野生型 Col-0 (图 6-B), 在 100 mmol/L NaCl 条件下

突变体的生长情况明显比 Col-0 弱 (图 6-A); 在低钾情况下, 添加 10 mmol/L NaCl 即可引起突变体根长与野生型显著差别 (图 6-D), 而在 $50, 100 \text{ mmol/L NaCl}$ 的培养基上突变体的生长情况与野生型也有明显差别, 甚至 100 mmol/L NaCl 会抑制突变体的发芽 (图 6-C)。低钾环境中 *athak5* 突变体对高盐环境更为敏感, 说明 *AtHAK5* 参与了拟南芥对盐的胁迫响应。

2.2.5 拟南芥野生型与 *athak5* 突变体在 ABA 浓度梯度条件下生长情况 ABA 是影响植物生长的一个重要的逆境胁迫。研究证实, ABA 在植物种子发育及非生物胁迫中起着重要作用, 同时也可以作为一种内源的信号物质调节离子进入木质部微管组织及调节气孔的开度。本试验利用组织化学染色和 Real time RT-PCR 实验证实 ABA 可以引起表达量升高。同时进一步利用 Col-0 和 *athak5* 在低钾和正常钾条件下表型的差异, 明确 *AtHAK5* 基因在植物响应 ABA 过程中的作用, 结果见图 7。

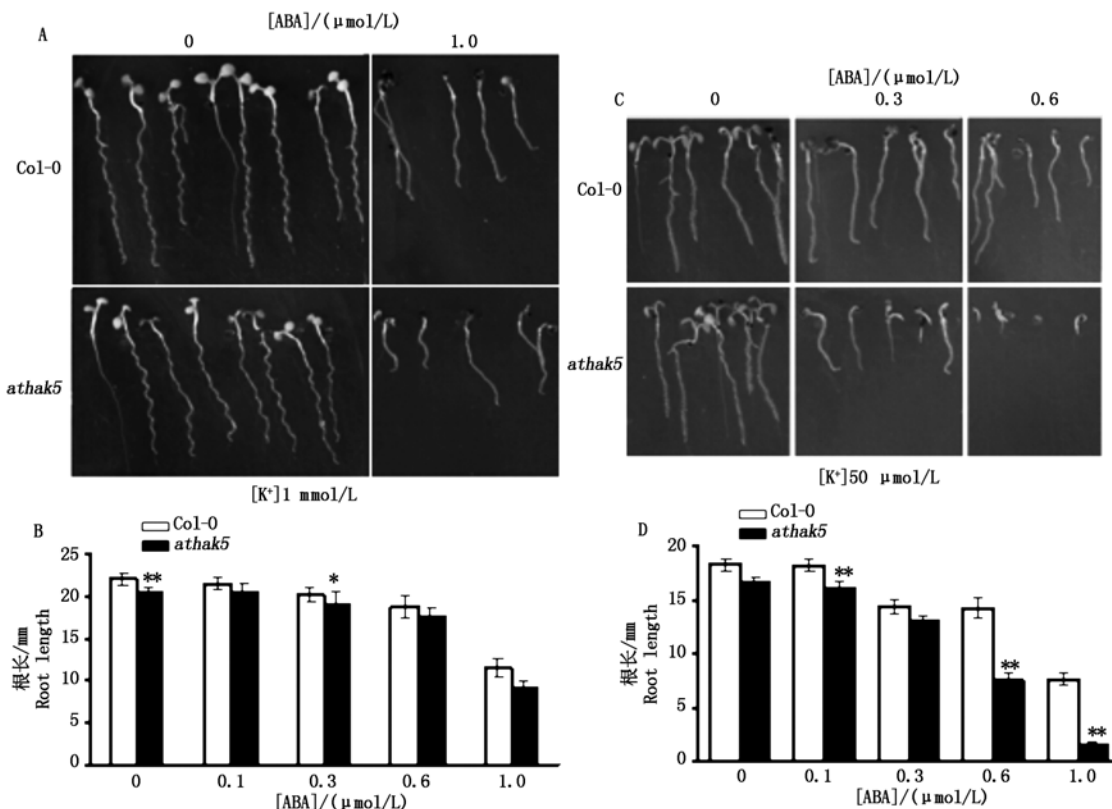


图 7 正常钾及低钾环境不同 ABA 浓度处理拟南芥 Col-0 与 *athak5* 的生长情况及根长

Fig.7 Growing condition and root length of Col-0 and *athak5* under normal potassium and low potassium supplementing with different ABA

在外界环境钾浓度正常的条件下, 分别添加 $0, 0.1, 0.3, 0.6 \mu\text{mol/L}$ 的 ABA 后, 野生型 Col-0 与 *athak5* 突变体的根长逐渐变短, 但根长差距不明显 (图 7-A)。当添加 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的 ABA 后, 突变体的根长为野生型植物根长的 79% (图 7-B), 统计学

分析没有显著差异。在外界环境钾浓度低时, 分别添加 $0, 0.1, 0.3 \mu\text{mol/L}$ 的 ABA 后, 观察到野生型 Col-0 与 *athak5* 突变体在植物根长方面差距不大; 当添加 $0.6 \mu\text{mol/L}$ 的 ABA 后, 突变体的根长为野生型植物根长的一半, 当添加 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的 ABA

后,突变体的根长仅为野生型植物根长的 19% (图 7-C,D)。说明在外界环境钾浓度低时,*athak5* 突变体对 ABA 较敏感。

3 讨论

Roberts 等^[5]以玉米根部的皮层细胞和中柱细胞的原生质体作为研究对象,采用膜片钳技术分析了经水分胁迫处理及 ABA 处理的 K⁺ 流,结果发现水分胁迫或 ABA 处理对根皮层的 K⁺ 通道活性没有明显影响,而 2 种处理均明显降低了中柱细胞 K⁺ 流出通道的活性。同时相对于水分胁迫处理,ABA 处理明显提高了中柱细胞 K⁺ 流入通道的活性。我们从分子水平进一步研究了其中一个高亲和性 K⁺ 通道 AtHAK5 对于几种非生物胁迫的响应,并得出以下结论。

3.1 AtHAK5 基因的表达

拟南芥 AtHAK5 基因属于 KUP/HAK/KT 家族,在低钾条件下诱导表达高亲和性钾转运体 AtHAK5。本研究在对含有 *promoter AtHAK5::GUS* 融合基因的拟南芥转基因植株 1172 *promoter::GUS* 进行组织化学染色的基础上,进一步采用 Real time RT-PCR 从 RNA 水平上证实了除低钾条件外,其他一些逆境条件如低钙、盐胁迫、ABA 胁迫等均可以不同程度地诱导 AtHAK5 基因的表达。

3.2 AtHAK5 参与植物根对盐胁迫及 ABA 的响应

通过对拟南芥 Col-0 和 AtHAK5 缺失突变体 *athak5* 表型对比分析发现,AtHAK5 参与植物对盐胁迫及 ABA 的反应。由于高浓度 Na⁺ 可以竞争性结合植物细胞上的钾结合位点,并且通过增加钾的外排影响植物对环境中钾的吸收利用,从而引起植物对高浓度盐胁迫的敏感现象。在低钾环境中,由于 AtHAK5 参与了植物对盐的胁迫反应,所以 *athak5* 突变体的根对盐更为敏感,表现为 10 mmol/L NaCl 时根长明显受到抑制,而在 100 mmol/L NaCl 时不能发芽。在高浓度钾的条件下,Col-0 不能表达 AtHAK5 基因,因此,外源 ABA 不能使 Col-0 和 *athak5* 在表型上产生区别;但在低浓度钾的条件下,

Col-0 可以表达 AtHAK5 基因,而 *athak5* 缺失,所以它们在表型上会有明显差异。因此,可以认为 ABA 能够通过调节拟南芥高亲和性钾离子通道 AtHAK5 的活性来调节钾离子的运输,从而影响植物的生长发育。因此,拟南芥高亲和性钾离子通道 AtHAK5 参与了植物对盐胁迫及 ABA 的响应。

参考文献:

- [1] Epstein E, Rains D W, Elzam O E. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1963, 49(2): 684 - 692.
- [2] Kochian L V, Lucas W J. Potassium transport in roots [J]. Advances in Botanical Research, 1989 (15): 93 - 178.
- [3] Qi Z, Hampton C R, Shin R, et al. The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in *Arabidopsis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(3): 595 - 607.
- [4] 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.
- [5] Roberts S K. Regulation of K⁺ channels in maize roots by water stress and abscisic acid [J]. Plant Physiology, 1998, 116(1): 145 - 153.
- [6] Li J, Wang X Q, Watson M B, et al. Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase [J]. Science, 2000, 287(5451): 300 - 303.
- [7] Schroeder J I, Kwak J M, Allen G J. Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants [J]. Nature, 2001, 410(6826): 327 - 330.
- [8] Gierth M, Maser P, Schroeder J I. The potassium transporter AtHAK5 functions in K⁺ deprivation-induced high-affinity K⁺ uptake and AKT1 K⁺ channel contribution to K⁺ uptake kinetics in *Arabidopsis* roots [J]. Plant Physiology, 2005, 137(3): 1105 - 1114.