

水稻 OsNramp4 介导锰离子吸收和转运的功能分析

李少庄¹, 莫伊凡¹, 郝小花^{2*}, 赵丹¹, 胡爽¹, 雷晗¹

(1. 湖南师范大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410081; 2. 湖南文理学院 生命与环境科学学院, 中国湖南 常德 415000)

摘要: 锰(Mn)是植物生长发育必需的矿质营养元素。水稻天然抗性相关巨噬细胞蛋白(natural resistance-associated macrophage protein, OsNramp)家族有 7 个成员, 其中 4 个具有 Mn²⁺ 转运活性。OsNramp4 已被鉴定为一个铝离子转运蛋白, 但尚未报道其是否具有 Mn²⁺ 转运活性。本文利用 Mn²⁺ 吸收突变株 $\Delta smf1$ 进行 OsNramp4 功能互补实验, 分析 OsNramp4 对 Mn²⁺ 的响应, 研究环境 Mn²⁺ 胁迫对敲除突变体 *nramp4* 的生长势以及 Mn²⁺ 吸收和转运的影响。结果显示: OsNramp4 能互补 $\Delta smf1$ 的 Mn²⁺ 吸收缺陷表型; 水稻根部 OsNramp4 的表达受 Mn²⁺ 的诱导; 高 Mn²⁺ 胁迫下, *nramp4* 的长势明显优于野生型对照, 突变体地上部 Mn²⁺ 含量显著低于野生型, 且根-茎 Mn²⁺ 转运率明显低于野生型, 暗示 OsNramp4 可能作为一个低亲和性 Mn²⁺ 转运蛋白, 具有在高 Mn²⁺ 环境下吸收 Mn²⁺, 并由根部向地上组织运输 Mn²⁺ 的功能。本研究结果对深入探讨植物 Mn²⁺ 吸收、转运和分配分子机制具有重要意义。

关键词: 锰离子转运蛋白; 水稻天然抗性相关巨噬细胞蛋白 4 (OsNramp4); 水稻

中图分类号: Q947, S511

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)01-0042-07

Functional Analysis of OsNramp4 on Manganese Ion Uptake and Translocation in Rice

LI Shaozhuang¹, MO Yifan¹, HAO Xiaohua^{2*}, ZHAO Dan¹, HU Shuang¹, LEI Han¹

(1. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China; 2. College of Life and Environmental Sciences, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, Hunan, China)

Abstract: Manganese (Mn) is an essential mineral nutrient element for plant growth and development. Several members of natural resistance-associated macrophage protein (OsNramp) family in rice have shown Mn²⁺ transport activity, among which OsNramp4 has been identified as an aluminum transporter, but it is still unknown whether OsNramp4 has Mn²⁺ transport activity. This paper utilized Mn²⁺ absorption mutant strain $\Delta smf1$ to perform OsNramp4 functional complementation analysis, analyzed response of *OsNramp4* to Mn²⁺, and studied the effects of environmental Mn²⁺ stress on the growth and Mn²⁺ uptake and transport of *nramp4* knockout mutant. The results showed that OsNramp4 can complement Mn²⁺ uptake defect phenotype in $\Delta smf1$ yeasts. The expression of *OsNramp4* in root of rice was induced by Mn²⁺. The growth of *nramp4* under high Mn²⁺ stress was significantly better than that of the wild-type control. Meanwhile, both the content of Mn²⁺ in the shoot of *nramp4* mutant and the root-to-shoot translocation ration of Mn²⁺ were significantly lower than those of the wild type. These data suggested that OsNramp4 might function as a low-affinity Mn²⁺ transporter with activity of Mn²⁺ uptake under high Mn²⁺ stress and capacity of Mn²⁺ transport from root to aboveground tissue. These results are of great significance for further exploring the molecular mechanisms of Mn²⁺ uptake, transport and distribution in plants.

收稿日期: 2022-08-22; 修回日期: 2022-09-28; 网络首发日期: 2022-11-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32071930); 湖南省自然科学基金项目(2020JJ4426, 2021JJ30445, 2022JJ30421); 长沙市自然科学基金项目(kq2014076)

作者简介: 李少庄(1996—), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生; * 通信作者: 郝小花(1979—), 女, 河南郑州人, 湖南文理学院副教授, 主要从事植物矿质营养生理与分子生物学研究, E-mail: 14771417@qq.com.

Key words: Mn²⁺ transporter; natural resistance-associated macrophage protein 4 (OsNramp4); *Oryza sativa* L. (*Life Science Research*, 2023, 27(1): 042–048)

锰(Mn)是植物生长发育必需的微量元素之一,参与植物的光合作用、蛋白质和脂质合成、酶活性调节、氧化胁迫调控等过程^[1]。植物体内的 Mn²⁺含量须稳定在一定范围内,缺 Mn²⁺会导致植物生长受阻,新叶出现典型的叶片变黄、叶脉间失绿症状;而 Mn²⁺积累太高也会对细胞产生毒性,抑制植物生长发育,即缺 Mn²⁺或 Mn²⁺毒害都会限制作物的产量和品质^[2–3]。因此,深入探讨植物 Mn²⁺吸收、转运和分配的分子机制有重要意义。

当前,植物 Mn²⁺吸收、转运的分子机制研究在模式植物拟南芥中取得了较大进展,多个 Mn²⁺转运蛋白家族已被鉴定出来,包括天然抗性相关巨噬细胞蛋白(natural resistance-associated macrophage protein, AtNramp)、金属耐性蛋白/阳离子扩散促进蛋白(metal tolerance protein/cation diffusion facilitator, AtMTP/AtCDF)、铁/锌转运蛋白(iron-regulated transporter-like protein/zinc-regulated transporter, AtIRT/AtZIP)、类黄色条纹蛋白(yellow stripe-like, AtYSL)、二价金属离子转运蛋白(divalent metal transporter, AtDMT)、阳离子交换体(cation exchanger, AtCAX)、内质网型钙泵(ER-type calcium ATPase, AtECA)、液泡铁转运蛋白(vacuolar iron transporter, AtVIT)和未知蛋白家族 UPF0016 (unknown protein family 0016)等^[1, 4–8]。尽管这些 Mn²⁺转运体在拟南芥中被陆续鉴定,但人们对水稻等作物中有关 Mn²⁺转运蛋白的了解还不多,从水稻等作物中挖掘和鉴定更多的 Mn²⁺转运蛋白很有必要。

近年来,水稻中 OsNramp、OsMTP 和 OsYSL 家族的部分成员已被鉴定出可介导 Mn²⁺的吸收和转运^[1]。研究报道,OsNramp5 和 OsMTP9 两个转运蛋白介导根部 Mn²⁺的吸收和向维管束的转移,其中 OsNramp5 介导 Mn²⁺吸收和从细胞远轴端跨膜转入细胞内,OsMTP9 负责从细胞远轴端跨膜运 Mn²⁺出细胞,通过这两个转运蛋白的接力传递, Mn²⁺从表皮细胞,经过外皮层细胞、内皮层细胞、中柱鞘细胞,最终被载入到木质部^[6, 9–10]。此外,OsMTP8.1^[11]、OsMTP8.2^[12]可以将多余的 Mn²⁺转入根部细胞的液泡内,OsMTP11 将 Mn²⁺转入根部细胞的高尔基体^[13–14]。有关 OsYSL 家族的研究显示,OsYSL2 在韧皮部介导烟酰胺螯合的 Mn²⁺/铁(Fe)的转运,能够把 Mn²⁺/Fe 转运至籽粒^[15]; OsYSL6 在叶

片中介导烟酰胺螯合的 Mn²⁺/Fe 的转运,是缓解过量 Mn²⁺中毒必需的^[16]。

水稻 OsNramp 家族有 7 个成员,其中 4 个已被鉴定具有 Mn²⁺转运活性。除了 OsNramp5 被鉴定为吸收 Mn²⁺和镉离子(Cd²⁺)的主效转运蛋白外,定位于质膜的 OsNramp1 也具有吸收 Mn²⁺的功能^[17]。定位于液泡膜的 OsNramp3 在韧皮部细胞中特异表达,是一种响应环境中 Mn²⁺变化的 Mn²⁺转运调节器^[18]。OsNramp6 在幼叶中高表达,参与调控 Mn²⁺和 Fe²⁺的运输^[19]。其余的 3 个成员中,OsNramp2 定位在液泡膜,介导 Fe²⁺的迁移和籽粒 Cd²⁺的分配^[20]; OsNramp4 是一个铝离子(Al³⁺)转运蛋白,在根部介导解 Al³⁺毒害^[21]; OsNramp7 已被数量性状基因座(quantitative trait loci, QTL)定位到籽粒锌(Zn)积累关联位点^[22],它们是否也参与 Mn²⁺的转运和分配仍不清楚。研究发现,OsNramp4 不仅受 Al³⁺诱导表达^[21],也受 Mn²⁺诱导表达,暗示 OsNramp4 不仅介导 Al³⁺转运^[21],还可能有转运 Mn²⁺的功能。本研究拟利用酵母突变体和 *OsNramp4* 基因敲除突变体水稻,鉴定 OsNramp4 的 Mn²⁺转运活性及转运特性。研究结果将丰富水稻 OsNramp 蛋白家族的功能,加深人们对植物 Mn²⁺吸收、转运和分配分子机制的了解。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻材料为粳稻日本晴品种(*Oryza sativa* L. japonica, Nipponbare),由作物不育资源创新与利用湖南省重点实验室提供。水稻 CRISPR/Cas9 基因编辑系统由北京大学瞿礼嘉教授惠赠。基因敲除突变体 *nramp4* 以日本晴为背景,以未进行基因敲除的日本晴作为野生型对照(wild type, WT)。Mn²⁺吸收酵母突变体菌株 $\Delta smf1$ (MATa、*his3* $\Delta 1$ 、*leu2* $\Delta 0$ 、*met15* $\Delta 0$ 、*ura3* $\Delta 0$ 、YOL122c::kan-MX4),以及野生型酵母菌株 BY4741 (MATa、*his3* $\Delta 1$ 、*leu2* $\Delta 0$ 、*met15* $\Delta 0$ 、*ura3* $\Delta 0$),由湖南省杂交水稻研究中心提供。常用化学试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 酵母功能互补分析

利用反转录聚合酶链反应(reverse transcrip-

tion PCR, RT-PCR)技术扩增 *OsNramp4* 编码框的 cDNA 片段(正向引物: 5'-CAAGCTATTGGAAGC-TGGTG-3'; 反向引物: 5'-GCTCTAGAACTACAT-GAAGCAT-3'), 将其连接到 pYES2 载体(实验室保存), 构建 pYES2-*OsNramp4*、pYES2-*OsNramp5* 重组载体并转化酵母。以转 pYES2 空载的酵母菌为阴性对照, 以转 pYES2-*OsNramp5* 的酵母菌为阳性对照。所用 SD 培养基包含 0.67% 去氨基酸的酵母氮基、0.20% 适当氨基酸、2.00% 葡萄糖、2.00% 琼脂。SG 培养基的主要成分同 SD, 只是将葡萄糖替换为半乳糖。做 Mn^{2+} 实验时, 在培养基中添加不同浓度的乙二醇双 2-氨基乙醚四乙酸[ethylene glycol bis (2-aminoethyl ether) tetraacetic acid, EGTA]。

将在 $\Delta smf1$ 突变体中表达了 pYES2 空载体、pYES2-*OsNramp4*、pYES2-*OsNramp5* 的转化子分别在尿嘧啶缺陷型葡萄糖基础培养基(SD-Ura)平板上 30 °C 活化, 并用液体 SD-Ura 培养基培养过夜, 使其生长至 OD_{600} 到达 1.6~1.8。收集菌体, 用无菌水将其 OD_{600} 调整为 1.0, 并按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 的梯度进行稀释; 每个样品取 4 μ L 在包含不同 EGTA 浓度的 SD-Ura 和尿嘧啶缺陷型半乳糖基础培养基(SG-Ura)平板上进行点样, 30 °C 倒置培养 3~5 d, 每天观察并拍照。具体操作参考文献[18]。

1.2.2 *OsNramp4* 表达量分析

使用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)提取日本晴野生型水稻不同组织的总 RNA, 利用逆转录酶(赛默飞世尔科技公司)反转录合成 cDNA, 进行半定量 RT-PCR 与实时荧光定量 RT-PCR (qRT-PCR)分析(RT-PCR 正向引物: 5'-GCTCTCATCC-CTCTACTCAAGTT-3', 反向引物: 5'-GAACACC-ACCACGGAGATGA-3')。qRT-PCR 分析使用美国 Promega 公司的 SYBR Green I 试剂盒, 按说明书上的程序操作。qRT-PCR 反应在 QuantStudio 5 定量 PCR 仪(赛默飞世尔科技公司)中进行, 每个样品 3 个重复, 实验重复 3 次。

1.2.3 敲除突变体 *nramp4* 的制备

利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统获得敲除突变体 *nramp4*。选择编辑的靶序列(5'-CGGTTCTA-CCTCCTTTAAGAA-3')位于 *OsNramp4* 基因的第 2 个外显子上, 具体的基因编辑方法参考文献[22]。将构建好的编辑载体转入农杆菌 AH105 (本实验室提供), 通过农杆菌转愈伤组织法, 获得转化水稻苗; 再通过 PCR, 对编辑位点进行扩增和测序, 确定基因编辑阳性植株。

1.2.4 水稻材料的培养和 Mn^{2+} 含量的测定

将 *nramp4* 突变体与野生型种子去壳后, 置于超净工作台中, 用 75% 乙醇消毒 30 s, 无菌水清洗 3 次, 再用 2.5% 次氯酸钠消毒 15 min, 无菌水清洗 5 次。将种子转移至无菌滤纸上吹干, 再接种于含有不同浓度 $MnSO_4$ 的 1/2 MS 平板中培养, 按实验需求测量植株地上部和根部的长度。另外, 将 *nramp4* 突变体与野生型种子清洗, 再置于皿底加有滤纸的培养皿中, 于 37 °C 恒温培养箱中浸水 48 h, 水控干后催芽, 每天用水清洗 1 次。待种子萌发后, 选取长势一致的幼苗于完全培养液 [0.18 mmol/L $CaCl_2$, 0.23 mmol/L $MgSO_4$, 0.09 mmol/L Na_2HPO_4 , 0.18 mmol/L NH_4NO_3 , 0.14 mmol/L K_2SO_4 , 0.09 mmol/L SiO_2 , 22.50 μ mol/L $Fe(III)$ -EDTA, 9.20 μ mol/L H_3BO_3 , 2.30 μ mol/L $MnSO_4$, 0.78 μ mol/L $CuSO_4$, 0.77 μ mol/L $ZnSO_4$, 0.50 μ mol/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$] 中培养(参考文献[23])。至 3 叶期时, 分别将幼苗移到含不同 $MnSO_4$ 浓度的完全培养液中处理 12 d, 每隔 5 d 更换 1 次培养液。处理结束后, 用单蒸水清洗材料 2~3 次, 分离不同部位, 用 80 °C 烘箱烘干至恒重, 用 HNO_3 - $HClO_4$ (体积比 4 : 1) 混合溶液消解材料, 并采用火焰原子吸收分光光度计检测 Mn^{2+} 含量。

1.2.5 Mn^{2+} 转运率的计算及数据处理

Mn^{2+} 处理结束后, 分别称量不同处理的材料的重, 测定每个样品中的 Mn^{2+} 含量, Mn^{2+} 从根部到地上部的转运率为地上部 Mn^{2+} 含量占整个植株中 Mn^{2+} 含量的百分比。

数据平均值的统计及显著性差异分析在 Excel 软件中完成。

2 结果与分析

2.1 *OsNramp4* 在酵母中具有 Mn^{2+} 转运活性

利用 Mn^{2+} 吸收缺陷型酵母突变菌株 $\Delta smf1$ 进行 *OsNramp4* 的体外功能分析。把已知的 Mn^{2+} 转运蛋白 *OsNramp5* 作为阳性对照, 空载 pYES2 作为阴性对照, 将 pYES2、pYES2-*OsNramp4*、pYES2-*OsNramp5* 载体分别转入 $\Delta smf1$ 中, 得到表达 *OsNramp4*、*OsNramp5* 及空载体的 $\Delta smf1$ 菌株。通过点板实验, 我们发现: 在添加不同浓度 EGTA 的 SD-Ura 培养基上, 表达 *OsNramp4*、*OsNramp5* 及空载体的菌株生长状态没有差异; 在未添加 EGTA 的 SG-Ura 培养基中, 3 种菌株在各种稀释浓度梯度下都能生长, 且 3 种菌株间的生长势没

有明显差异;但在添加 2 mmol/L、5 mmol/L EGTA 的 SG-Ura 培养基中,表达 *OsNramp4* 和 *OsNramp5* 的酵母菌株的生长状态明显好于空载体菌株,说明与阳性对照 *OsNramp5* 一样,表达 *OsNramp4* 能弥补 $\Delta smf1$ 突变体对 Mn^{2+} 吸收的缺陷(图 1),即 *OsNramp4* 在酵母中具有吸收 Mn^{2+} 的活性。

2.2 *OsNramp4* 的表达受环境 Mn^{2+} 的影响

为了探究 *OsNramp4* 的表达量是否受到外界 Mn^{2+} 浓度的影响,将生长两周的日本晴幼苗用 50 $\mu\text{mol/L}$ $MnSO_4$ 处理 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h,再分别取地上、地下部分提取 RNA,反转录成 cDNA 后,进行半定量 RT-PCR 与 qRT-PCR 检测。幼苗地上部分 *OsNramp4* 的半定量 RT-PCR 检测结果显示,在各处理条件下,即使 32 个循环也扩增不出目的条带,表明 *OsNramp4* 在幼苗地上部分没有表达或表达量极低,这与 Xia 等^[21]报道的 *OsNramp4* 只在根中表达,地上部分无表达的研究结果一致。但在 $MnSO_4$ 处理后的根中, *OsNramp4* 的表达量有变化(图 2)。与未处理对照相比,处理 3 h 和 12 h 时,根中 *OsNramp4* 的表达量显著升高(图 2B)。半定量 RT-PCR 的检测结果(图 2A)与 qRT-PCR 所得的结果(图 2B)趋势一致,说明外界 Mn^{2+} 能诱导水稻根部 *OsNramp4* 的表达。

2.3 Mn^{2+} 对 *nramp4* 敲除突变体生长的影响

将 *nramp4* 敲除突变体及野生型的种子消毒、清洗后,接种于 1/2 MS (含 50 $\mu\text{mol/L}$ Mn^{2+}) 平板

中培养 2 d,选取长势一致的材料分别转移至含有 0 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、5 000 $\mu\text{mol/L}$ $MnSO_4$ 的 1/2 MS 平板上继续培养,5 d 后对地上和地下部分的长度进行测量并对数据进行统计分析。结果显示:在缺 Mn^{2+} 或低浓度 Mn^{2+} (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 生长条件下,野生型与突变株之间的长势没有明显差异,而在 5 000 $\mu\text{mol/L}$ 高 Mn^{2+} 条件下,突变株 *nramp4* 与野生型相比,无论是地上部长度,还是根长,都具有显著差异;与正常 Mn^{2+} 浓度(50 $\mu\text{mol/L}$) 培养的植株相比,在高 Mn^{2+} 条件下,野生型与突变株 *nramp4* 的地上、地下部分的生长都受到抑制,但野生型受到的抑制程度更强,突变株 *nramp4* 的地上部与根部都显著长于野生型,暗示 *OsNramp4* 在高 Mn^{2+} 环境中具有转运活性(图 3)。

2.4 *OsNramp4* 调控 Mn^{2+} 在地上和地下部的分布

将野生型与 *nramp4* 突变体种子催芽,挑选长势一致的幼苗种入完全培养液中培养至 3 叶期(约两周),再将幼苗转移至含 0 $\mu\text{mol/L}$ 、0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、2.3 $\mu\text{mol/L}$ 、8 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、800 $\mu\text{mol/L}$ 、4 000 $\mu\text{mol/L}$ 、8 000 $\mu\text{mol/L}$ $MnSO_4$ 的完全培养液中处理 12 d,然后收集地上、地下部分进行 Mn^{2+} 含量检测。结果显示:当 Mn^{2+} 浓度低于 800 $\mu\text{mol/L}$ 时,突变体与野生型的地上、地下部分的 Mn^{2+} 含量无显著差异;当 Mn^{2+} 浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 、4 000 $\mu\text{mol/L}$ 、8 000 $\mu\text{mol/L}$ 时,突变体地上部分的 Mn^{2+} 含量低于野生型,特别是在

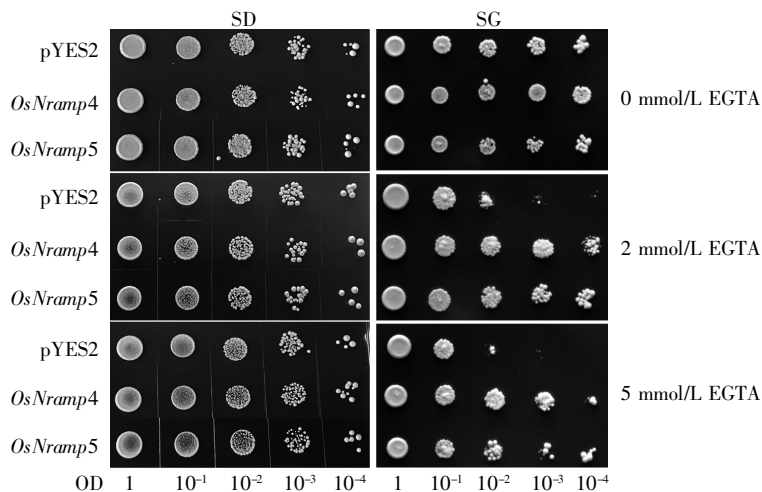


图 1 *OsNramp4* 在 $\Delta smf1$ 突变体酵母中的功能互补分析

分别培养转 pYES2、*OsNramp4*、*OsNramp5* (阳性对照)的酵母后调 OD_{600} 至 1.0,连续稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} ,取 4 μL 各级稀释液点到含不同 EGTA 浓度的 SD-Ura 和 SG-Ura 平板上,30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 3 d。

Fig.1 Functional complementation analysis of *OsNramp4* in $\Delta smf1$ mutant yeasts

The pYES2-, *OsNramp4*-, *OsNramp5*-transformed $\Delta smf1$ yeasts were grown on SD-Ura plates separately and were collected. Then the yeasts were adjusted to 1.0 of OD_{600} with distilled water, and serially diluted to 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} separately for dotting on SD-Ura and SG-Ura plates containing different concentrations of EGTA. The dotted plates were cultured at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 3 d.

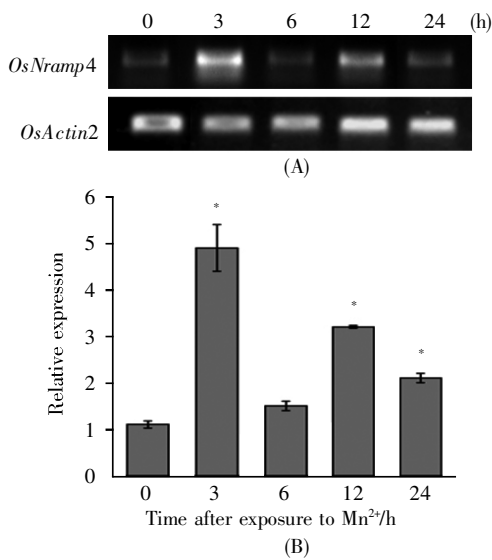


图2 根部 *OsNramp4* 的表达对外界 Mn^{2+} 的响应

(A) 半定量 RT-PCR; (B) qRT-PCR。不同时间点幼苗根中 *OsNramp4* 的表达量; 实验独立重复 3 次, 取平均值。 Mn^{2+} 处理后不同时间点的表达量都与“0 h”时间点的表达量进行差异显著性分析, * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig.2 Response of *OsNramp4* expression to external Mn^{2+} in root

(A) Mn^{2+} -inducible *OsNramp4* expression pattern by semi-quantitative RT-PCR; (B) Mn^{2+} -inducible *OsNramp4* expression pattern by qRT-PCR. Data are an average of three independent experiments. *: Significant difference compared with 0 h group ($P < 0.05$).

800 $\mu\text{mol/L}$ $MnSO_4$ 处理时, 突变体地上部分的 Mn^{2+} 含量显著低于野生型(图 4A)。进一步对突变体和野生型从根到地上部分的 Mn^{2+} 转运率进行分

析, 结果显示: 当 Mn^{2+} 浓度低于 800 $\mu\text{mol/L}$ 时, 突变体与野生型的转运率无显著差异; 当 Mn^{2+} 浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 、4 000 $\mu\text{mol/L}$ 、8 000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 突变体的转运率依次为 66%、80%、79%, 而野生型的转运率依次为 85%、87%、88%, 突变体的转运率明显低于野生型(图 4B), 表明 *OsNramp4* 具有介导水稻在高 Mn^{2+} 环境下把 Mn^{2+} 从根部转运到地上部分的功能。

3 讨论

Mn 对植物的生长发育极为重要, 缺 Mn^{2+} 和高 Mn^{2+} 都会严重影响植物生长发育, 影响作物的产量和质量。筛选和鉴定各种具有 Mn^{2+} 吸收、转运和分配活性的 Mn^{2+} 转运蛋白, 对改良作物适应不同 Mn 环境有重要意义。本研究报道了一个 Al^{3+} 转运蛋白 *OsNramp4* 的新功能, 即转运 Mn^{2+} 的活性。首先, 用 Mn^{2+} 吸收突变体酵母鉴定出 *OsNramp4* 在酵母中具有转运 Mn^{2+} 的活性。然后, 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 *OsNramp4* 的基因敲除突变体 *nramp4*, 发现在高 Mn^{2+} 条件下, *nramp4* 植株的耐性比野生型强。最后, 通过比较不同 Mn^{2+} 环境下各组织中 Mn^{2+} 的含量及根茎转运率, 发现只有在高 Mn^{2+} 环境下(亚毫摩尔级及以上), *nramp4* 植株地上部分的 Mn^{2+} 含量才会明显低于野生型, 同时根茎转运率也显著下降, 使得地上部分积累的 Mn^{2+} 较少, 可能导致地上部分的 Mn 毒害比野生型轻, 这与 *nramp4* 植株对高 Mn^{2+} 的耐性强于

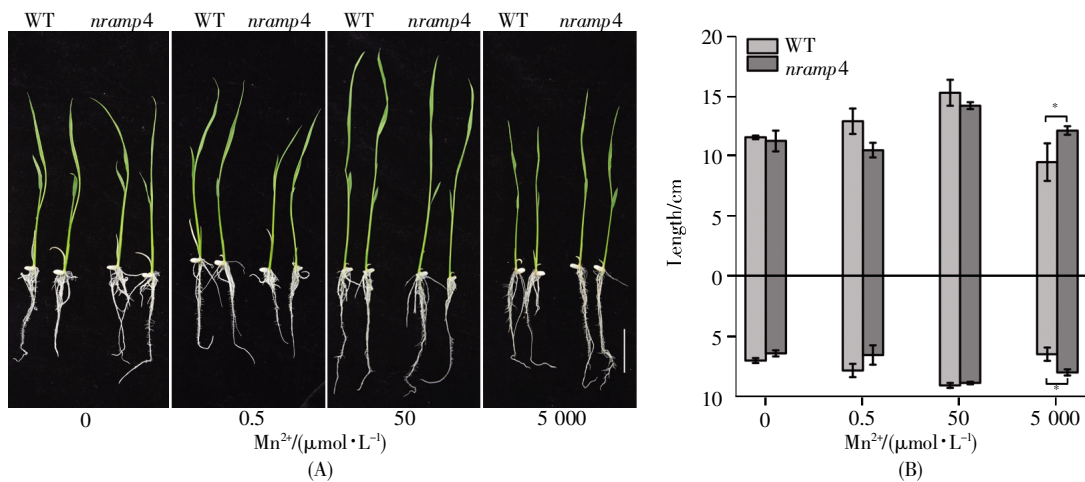


图3 不同 Mn^{2+} 浓度下野生型和突变体幼苗的生长状态比较

(A) 不同 Mn^{2+} 浓度下幼苗的生长状态, 比例尺=2 cm; (B) 野生型和 *nramp4* 幼苗的地上部长度(纵坐标 0 刻度以上)与根长(纵坐标 0 刻度以下)的统计分析, * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig.3 Comparison of the growth status between WT and *nramp4* mutant seedlings under different concentrations of Mn^{2+}

(A) The growth status of seedlings under different concentrations of Mn^{2+} . Scale bar: 2 cm; (B) Comparison of shoot and root length between WT and *nramp4* mutant seedlings. *: Significant difference ($P < 0.05$).

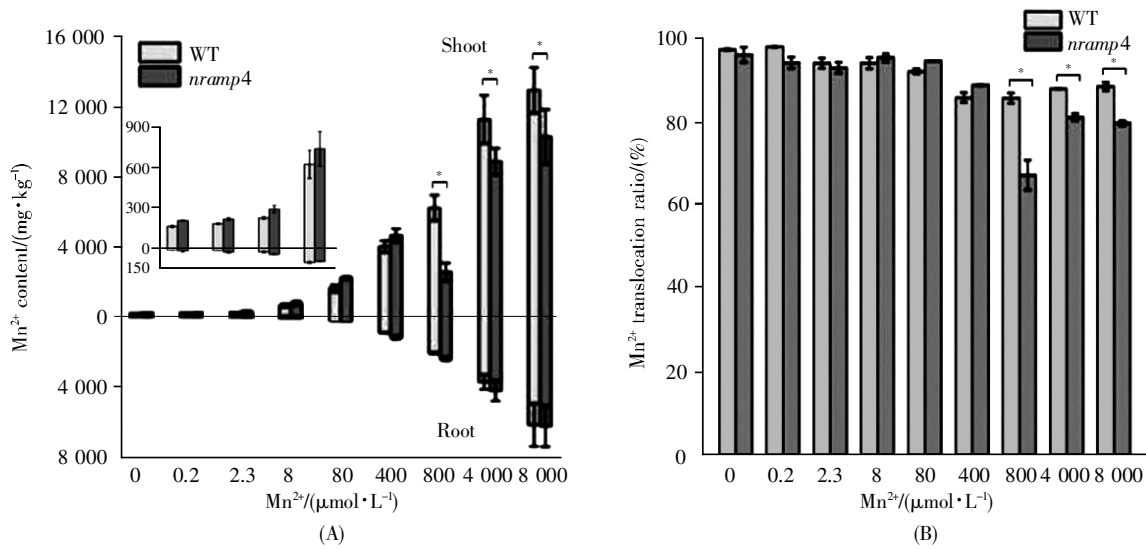


图 4 不同 Mn^{2+} 浓度下野生型和 *nramp4* 突变体水稻 Mn^{2+} 分布的比较

(A) 不同 Mn^{2+} 浓度下野生型和 *nramp4* 突变体水稻地上与地下部分的 Mn^{2+} 含量; (B) 不同 Mn^{2+} 浓度下野生型和 *nramp4* 突变体水稻中 Mn^{2+} 从根转移至地上部的转运率。* 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig.4 Comparison of Mn^{2+} distribution between WT and *nramp4* mutant seedlings at different concentrations of Mn^{2+}

(A) Mn^{2+} accumulation in rice root and shoot; (B) Mn^{2+} root-to-shoot translocation ratios. *: Significant difference ($P < 0.05$).

野生型是一致的,同时也表明 OsNramp4 在介导 Mn^{2+} 的根茎转运中发挥作用。

到目前为止,研究人员已在水稻中鉴定出了多个介导 Mn^{2+} 吸收和胞间转运的基因,但有关木质部、韧皮部的 Mn^{2+} 装载和卸载的转运蛋白的鉴定很少。OsNramp4 在水稻根部皮层和维管柱细胞的细胞膜表达^[21],有可能介导 Mn^{2+} 在皮层细胞间的轴向转运,以及木质部 Mn^{2+} 的装载。水稻响应根际环境中 Mn^{2+} 浓度的变化,需要不同亲和性的转运蛋白协同发挥作用,比如 OsNramp5–OsMTP9 与 OsNramp4 的协作。在正常(微摩尔级)或低 Mn^{2+} 环境下,OsNramp5–OsMTP9 发挥作用,而在高 Mn^{2+} 环境下,OsNramp4 发挥作用。前人的研究表明,OsNramp5 是高亲和性 Mn^{2+} 转运蛋白,当 Mn^{2+} 浓度不超过 $800 \mu\text{mol/L}$ 时,*nramp5* 突变体的地上部分极显著低于对照;当 Mn^{2+} 浓度为 $800 \mu\text{mol/L}$ 时,*nramp5* 突变体的地上部分得到了一定的恢复^[24]。而我们对 OsNramp4 的研究发现,当环境 Mn^{2+} 浓度低于 $800 \mu\text{mol/L}$ 时,野生型与 *nramp4* 突变株地上部分的生长势及 Mn^{2+} 含量无明显差异,但当 Mn^{2+} 超过 $800 \mu\text{mol/L}$ 时,突变体地上部分 Mn^{2+} 积累量开始显著低于野生型,生长势也优于野生型,推测 OsNramp4 具有低亲和性吸收 Mn^{2+} 的活性,在高 Mn 环境中调控水稻对 Mn^{2+} 的吸收、转运和分配。但是,在高 Mn^{2+} 环境下,从根部 Mn^{2+} 的吸收,到皮层细胞间的转移,再到木质部 Mn^{2+}

的装载,OsNramp4 到底行使什么功能,与哪些转运蛋白或调控蛋白合作,还有待进一步研究。

OsNramp4 最早是被鉴定为一个 Al^{3+} 转运蛋白,在水稻根部发挥解 Al^{3+} 毒害作用^[21]。一般认为 Al^{3+} 在动植物包括人的体内积累是有害的。虽然有报道认为, Al^{3+} 对茶树是有益的,甚至是必需的^[25–26],但该结论尚未在其他物种中得到支持。通常,植物对非必需或非益生的元素的吸收是非专性的,例如: OsNramp5 在正常情况下负责根部 Mn^{2+} 的吸收,调控植物生长发育,但在有 Cd^{2+} 的环境下,根部 OsNramp5 能同时吸收 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} ^[18,24]。同样,根部吸收 Fe^{2+}/Mn^{2+} 的 OsNramp1 还可以吸收砷 (As^{3+})^[17,27–28]。因此,OsNramp4 在水稻中的正常功能可能是,在高 Mn 环境下介导根部 Mn^{2+} 的转运,但在酸性稻田中也能介导 Al^{3+} 的吸收。有趣的是,有研究报道,OsNramp4 在酵母中还被鉴定具有吸收一价铯 (Cs^+) 的活性^[29]。OsNramp4 转运活性的多样性暗示着其功能结构的可变性。进一步研究 OsNramp4 的功能,并从结构上解析 OsNramp4 如何能转运电荷数及原子结构有显著差异的阳离子,对阐释 OsNramp4 的运输机制是非常关键的。

参考文献(References):

- [1] ALEJANDRO S, HÖLLER S, MEIER B, *et al.* Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 300.

- [2] 安振锋, 方正. 植物锰营养研究进展[J]. 河北农业科学(AN Zhenfeng, FANG Zheng. The advance of manganese nutrition in plant[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences), 2002, 6(4): 35–41.
- [3] 陈远其, 陈章, 李志贤, 等. 锰污染土壤修复研究现状与展望[J]. 生态环境学报(CHEN Yuanqi, CHEN Zhang, LI Zhixian, *et al.* A review and perspective on remediation of manganese contaminated soil research[J]. Ecology and Environmental Sciences), 2017, 26(8): 1451–1456.
- [4] 赵秋芳, 马海洋, 贾利强, 等. 植物锰转运蛋白研究进展[J]. 热带作物学报(ZHAO Qiufang, MA Haiyang, JIA Liqiang, *et al.* Research progress on manganese transporters in plants[J]. Chinese Journal of Tropical Crops), 2019, 40(6): 1245–1252.
- [5] LI J F, JIA Y D, DONG R S, *et al.* Advances in the mechanisms of plant tolerance to manganese toxicity[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(20): 5096.
- [6] SHAO J F, YAMAJI N, SHEN R F, *et al.* The key to Mn homeostasis in plants: regulation of Mn transporters[J]. Trends in Plant Science, 2017, 22(3): 215–224.
- [7] SOCHA A L, GUERINOT M L. Mn-euvering manganese: the role of transporter gene family members in manganese uptake and mobilization in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5: 106.
- [8] YANG C H, WANG C, SINGH S, *et al.* Golgi-localised manganese transporter PML3 regulates Arabidopsis growth through modulating Golgi glycosylation and cell wall biosynthesis[J]. New Phytologist, 2021, 231(6): 2200–2214.
- [9] SASAKI A, YAMAJI N, YOKOSHO K, *et al.* Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice[J]. The Plant Cell, 2012, 24(5): 2155–2167.
- [10] UENO D, SASAKI A, YAMAJI N, *et al.* A polarly localized transporter for efficient manganese uptake in rice[J]. Nature Plants, 2015, 1: 15170.
- [11] CHEN Z H, FUJII Y, YAMAJI N, *et al.* Mn tolerance in rice is mediated by MTP8.1, a member of the cation diffusion facilitator family[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(14): 4375–4387.
- [12] TAKEMOTO Y, TSUNEMITSU Y, FUJII-KASHINO M, *et al.* The tonoplast-localized transporter MTP8.2 contributes to manganese detoxification in the shoots and roots of *Oryza sativa* L.[J]. Plant & Cell Physiology, 2017, 58(9): 1573–1582.
- [13] FARTHING E C, MENGUER P K, FETT J P, *et al.* OsMTP11 is localised at the Golgi and contributes to Mn tolerance[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 15258.
- [14] MA G, LI J Y, LI J J, *et al.* OsMTP11, a trans-Golgi network localized transporter, is involved in manganese tolerance in rice[J]. Plant Science, 2018, 274: 59–69.
- [15] KOIKE S, INOUE H, MIZUNO D, *et al.* OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem[J]. The Plant Journal, 2004, 39(3): 415–424.
- [16] SASAKI A, YAMAJI N, XIA J X, *et al.* OsYSL6 is involved in the detoxification of excess manganese in rice[J]. Plant Physiology, 2011, 157(4): 1832–1840.
- [17] CHANG J D, HUANG S, YAMAJI N, *et al.* OsNRAMP1 transporter contributes to cadmium and manganese uptake in rice[J]. Plant, Cell & Environment, 2020, 43(10): 2476–2491.
- [18] YAMAJI N, SASAKI A, XIA J X, *et al.* A node-based switch for preferential distribution of manganese in rice[J]. Nature Communications, 2013, 4: 2442.
- [19] PERIS-PERIS C, SERRA-CARDONA A, SÁNCHEZ-SANUY F, *et al.* Two NRAMP6 isoforms function as iron and manganese transporters and contribute to disease resistance in rice[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2017, 30(5): 385–398.
- [20] CHANG J D, XIE Y, ZHANG H H, *et al.* The vacuolar transporter OsNRAMP2 mediates Fe remobilization during germination and affects Cd distribution to rice grain[J]. Plant and Soil, 2022, 476(1): 79–95.
- [21] XIA J X, YAMAJI N, KASAI T, *et al.* Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2010, 107(43): 18381–18385.
- [22] MIAO J, GUO D S, ZHANG J Z, *et al.* Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system[J]. Cell Research, 2013, 23(10): 1233–1236.
- [23] TEZUKA K, MIYADATE H, KATOU K, *et al.* A single recessive gene controls cadmium translocation in the cadmium hyperaccumulating rice cultivar Cho-Ko-Koku[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 120(6): 1175–1182.
- [24] YANG M, ZHANG Y Y, ZHANG L J, *et al.* OsNRAMP5 contributes to manganese translocation and distribution in rice shoots[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(17): 4849–4861.
- [25] PILON-SMITS E A H, QUINN C F, TAPKEN W, *et al.* Physiological functions of beneficial elements[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(3): 267–274.
- [26] SUN L L, ZHANG M S, LIU X M, *et al.* Aluminium is essential for root growth and development of tea plants (*Camellia sinensis*)[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2020, 62(7): 984–997.
- [27] CURIE C, ALONSO J M, JEAN M L, *et al.* Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport[J]. Biochemical Journal, 2000, 347(Pt 3): 749–755.
- [28] TIWARI M, SHARMA D, DWIVEDI S, *et al.* Expression in *Arabidopsis* and cellular localization reveal involvement of rice NRAMP, OsNRAMP1, in arsenic transport and tolerance[J]. Plant Cell & Environment, 2014, 37(1): 140–152.
- [29] YAMAKI T, OTANI M, ONO K, *et al.* Isolation and characterization of rice cesium transporter genes from a rice-transporter-enriched yeast expression library[J]. Physiologia Plantarum, 2017, 160(4): 425–436.