



门龙楠, 刘立超, 魏中华, 等. 水稻 KEA 基因家族全基因组鉴定和表达分析[J]. 黑龙江农业科学, 2025(12):1-13.

水稻 KEA 基因家族全基因组鉴定和表达分析

门龙楠, 刘立超, 魏中华, 宗天鹏, 孙中华, 沙汉景, 李 帅, 谢树鹏

(黑龙江省农业科学院 绥化分院, 黑龙江 绥化 152000)

摘要: KEA(K^+ Efflux Antiporter)基因家族隶属于 CPA 超家族,是植物中的 K^+ 转运体。KEA 主要在植物的离子平衡和信号转导中起重要作用,但是其具体机制尚不清楚。为进行水稻 KEA 基因家族的全基因组分析,对 8 种不同科属的 KEA 基因进行了全基因组鉴定和系统发育分析。通过同源性搜索,在 8 个物种中鉴定出 KEA 基因家族的 54 个非冗余成员。系统发育聚类分析将 KEA 基因分为 4 个亚类,其中亚类 IV 为禾本科特有。保守基序、结构域和基因结构分析显示,*OsKEA1*、*OsKEA2* 和 *OsKEA3* 的蛋白及基因结构更加相似,而 *OsKEA4*、*OsKEA5* 和 *OsKEA6* 的蛋白和基因结构更加相似。全基因组复制和串联复制是植物基因家族扩张的主要驱动力。通过 KEA 基因家族在物种间和物种内的共线性分析揭示了进化动力学,其中水稻与拟南芥之间未发现共线性基因对,而水稻与玉米之间存在 7 对共线性基因对。Ka/Ks 值分析显示,水稻和玉米的 KEA 基因对经历了强烈的纯化选择,而 *OsKEA5* 和 *OsKEA6* 之间呈中性进化趋势。同时,检测了水稻 KEA 基因在干旱和盐胁迫中的表达,发现 *OsKEA5* 和 *OsKEA6* 在盐胁迫中表达上调,*OsKEA2* 在干旱胁迫中表达上调,而 *OsKEA1*、*OsKEA3* 和 *OsKEA4* 在两种胁迫条件下表达下调。

关键词: KEA 基因家族;水稻;系统发育分析;共线性分析;胁迫响应

水稻(*Oryza sativa* L.)是全球一半以上人口的重要粮食作物,同时也是用于单子叶植物研究的模式植物^[1]。在全球气候变化背景下,盐渍化、干旱、低钾等非生物胁迫日益加剧,严重限制水稻的生长发育、产量形成与品质稳定,成为威胁全球粮食安全的关键瓶颈。钾离子(K^+)作为水稻等植物生长发育的关键常量营养元素,在细胞内发挥着多方面的生理作用,包括渗透调节、酶活性调控、离子平衡以及膜电位的维持^[2]。 K^+ 作为关键的渗透调节剂,可以调节细胞膨压,进而影响气孔开闭和花粉管伸长^[3-4]。此外, K^+ 参与光合作用及其后续的碳水化合物运输与代谢过程,对作物的产量与品质具有决定性影响^[5],更重要的是,充足的 K^+ 供应还能增强植物对多种生物和非生物胁迫(如盐害和干旱)的耐受性^[6]。阳离子质子逆向转运蛋白(Cation Proton Antiporter, CPA)超家族是植物中一类重要的蛋白质,其可以促进 Na^+ 、 K^+ 和 Li^+ 等阳离子的运输^[7-9]。CPA 超家族分为 CPA1 和 CPA2 两大类,前者包含 NHX 家族,后者涵盖 KEA 和 CHX 家族,其成员通过阳离子运输参与植物离子稳态维持和耐逆性调节^[7,10-12]。CPA 已在多种植物中报道,如拟南芥^[13-14]、

水稻(*Oryza sativa* L.)^[15]、葡萄(*Vitis vinifera* L.)^[16]、小麦(*Triticum aestivum* L.)^[17]、萝卜(*Raphanus sativus* L.)^[18]和番茄(*Solanum lycopersicum* L.)^[19]。*AtCPAs* 存在于质膜、液泡和叶绿体中,能够进行离子交换和运输,特别是植物中的单价阳离子,包括 Na^+ 和 K^+ ^[20-21]。CPA 超家族通过 Na^+ 外流和区域化维持细胞质离子稳态并增强耐盐性。NHX 蛋白已被报道存在于 60 多种植物中^[22],但是对于 KEA 亚家族的研究非常少,其主要研究来自拟南芥。2001 年, Mäser 等^[23]首次描述了拟南芥中的 6 个 *AtKEA* 转运体基因,但它们的功能特性尚未明确。之前的研究表明, *AtKEA1*、*AtKEA2*、*AtKEA3* 在叶绿体渗透调节和 pH 稳态中起着至关重要的作用^[20],而 *AtKEA2* 也能够调节质体中的 K^+ 和 pH^[24]。近期, Zhang 等^[25]通过分子和生化分析表明,拟南芥突变体 *keal kea2* 中的人工种子蛋白 GFP-CT24 被错误分选,种子储藏蛋白前体在 *keal kea2* 中大量积累,并且蛋白储存液泡在 *keal kea2* 中变小。进一步分析表明, *keal kea2* 内膜系统的运输过程受到损害。总之, *KEA1* 和 *KEA2* 通过调节细胞 pH 和 K^+ 稳态平衡调节质体小管的功能,从而调节液泡

收稿日期:2025-10-17

基金项目:农业生物育种重大专项(2022ZD0400204-4);黑龙江省农业科学院 2020 年度院级课题(2020FJZX031);黑龙江省农业科学院 绥化分院科技创新项目(SHFY2022-06)。

第一作者:门龙楠(1988-),男,硕士,助理研究员,从事水稻遗传育种与智慧农业研究。E-mail:1925367890@qq.com。

通信作者:谢树鹏(1980-),男,硕士,研究员,从事水稻遗传育种与智慧农业研究。E-mail:15046615666@163.com。

运输过程。除此之外,在其他植物中对 KEA 机制的研究比较浅显,主要是集中在基因家族的鉴定方面。比如在棉花中,KEA 家族可以分为 3 个亚群,在 KEA 家族成员的启动子中发现了激素响应元件和应激响应元件;进一步的 qRT-PCR 实验发现大多数 *GhKEAs* 对低钾、低盐和干旱胁迫有响应;而病毒诱导基因沉默(Virus Induced Gene Silencing, VIGS)试验也表明,*GhKEA4* 和 *GhKEA12* 正向调控盐耐受性,*GhKEA4* 能在高钾胁迫下保持更稳定的 Na^+/K^+ 平衡,并且 *GhKEA12* 沉默后 K^+ 从地下向地上转运的活性降低^[26]。在葡萄基因组中鉴定到了 4 个 KEA 家族基因,主要在葡萄果实、叶片和种子中表达,其成员与拟南芥 KEA 成员在遗传距离上较近;*VvKEA3* 在成年葡萄树中的整体表达水平最为丰富(幼果中最高),而幼苗中 *VvKEA3* 受缺钾、ABA 和 sorbitol 渗透胁迫的调控;*VvKEA3* 在地上部和根部及 *VvKEA4* 在根部对 sorbitol 渗透处理较为敏感,其表达水平显著被诱导^[27]。然而,现有研究存在明显局限:第一,拟南芥作为双子叶模式植物,其 KEA 功能结论能否直接外推至单子叶作物尚未可知;第二,棉花、葡萄等作物中的 KEA 研究多停留在基因鉴定与表达分析,功能验证及机制解析仍较薄弱;第三,也是最关键的一点,即在水稻这一全球性粮食作物中,KEA 基因家族的系统分析仍属空白,其成员是否以及如何参与 K^+ 稳态与耐逆调控,至今未见报道。鉴于此,本研究通过基因家族分析对水稻 KEA 家族进行研究,鉴定水稻 KEA 家族基因及其编码蛋白的特征,旨在加深对水稻 K^+ 外排逆向转运蛋白的认知,为进一步研究 K^+/H^+ 平衡机制提供了基因资源和理论基础。

1 材料与方法

1.1 水稻中 KEA 基因家族的鉴定及特征分析

本研究以 6 个拟南芥 KEA 基因序列作为参考,从 TAIR 网站(www.arabidopsis.org)下载,水稻的基因组从 Phytozome 数据库(https://phytozome-next.jgi.doe.gov/pz/portal.html)中进行下载。本地 BLAST 比对分析的 E-value $\leq 1 \times 10^{-10}$ 。去除重复序列后,提交到 Pfam (http://pfam.sanger.ac.uk) 在线进行蛋白保守结构域的筛查,确定水稻 KEA 基因家族成员。高粱、短柄草、玉米、大豆、苜蓿和番茄相关的 KEA 家族成员鉴定方法均与水稻保持一致。使用在线工具

ProtParam (http://expasy.org/tools/protparam.html)评估水稻 KEA 蛋白成员的理论等电点、分子量、稳定性等理化性质。

1.2 系统发育分析

使用拟南芥和水稻 KEA 基因的蛋白质序列进行系统发育分析。通过 ClustalW 对所选 KEA 蛋白质序列进行多序列比对,参数保持默认。使用 MEGA 11 软件,通过 NJ 的方法构建 KEA 蛋白质序列的无根系统发育树^[28]。使用 Evolview (https://www.evolgenius.info/evolview/) 在线对系统发育树进行可视化。仅包含水稻 KEA 的系统发育分析,所有步骤和参数均与上述方法保持一致。

1.3 保守基序、基因结构和结构域鉴定

将水稻所有 KEA 基因的蛋白质序列导入 MEME Suite (http://meme-suite.org/tools/meme)^[29],以分析保守基序,每个蛋白序列最多包含 10 个保守基序。使用 TBtools-II 可视化保守基序结构^[30]。通过 GSDS(https://gsds.gao-lab.org/index.php)在线鉴定水稻所有 KEA 的基因结构^[31]。对于蛋白质结构域分析,将水稻 KEA 蛋白质序列上传至 NCBI Batch CD-Search (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi)^[32],并使用默认参数进行处理,将获得的结果通过 TBtools-II 可视化。

1.4 启动子分析

将水稻所有 KEA 基因的起始密码子位点上游的 2 000 bp 区域的 DNA 序列提交至 PlantCARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/) 数据库中^[33],使用默认参数鉴定顺式作用元件。使用 TBtools-II 进行可视化。

1.5 染色体定位分析、共线性分析和 KaKs 分析

KEA 基因在水稻中的染色体位置信息是从 Phytozome 数据库中获得的,并由 TBtools-II 进行可视化。使用 MCScanX^[34] 鉴定拟南芥-水稻-玉米中的共线性基因对,以及水稻内部的共线性基因对,在 BlastP 鉴定同源基因时,筛选 E-value $\leq 1 \times 10^{-5}$ 作为最终结果^[35]。使用 TBtools-II 可视化拟南芥-水稻-玉米物种间的共线性关系和水稻物种内部的共线性关系。使用 TBtools-II 计算具有共线性基因对的非同义替换率(Ka)、同义替换率(Ks),以及它们之间的比例(Ka/Ks)。

1.6 基因表达分析

水稻根部 KEA 基因家族在非生物胁迫下的表

达数据从 Rice eFP Browser(<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi> dataSource = rices-tress_mas)数据库中下载。使用 TBtools-II 可视化水稻 KEA 基因在非生物胁迫下的表达水平。

1.7 实时定量 PCR(qPCR)

首先对抗旱耐盐样本绥粳 133 进行 12 h $100 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐胁迫, 20% PEG6000 模拟干旱胁迫 6 h, 同时设置无胁迫对照。总 RNA 采用 Trizol 试剂(Invitrogen, USA)从根中提取, 按照试剂盒说明书进行操作。RNA 浓度和纯度通过紫外分光光度计(NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific)测定, 并以 A_{260}/A_{280} 比值评估其纯度。随后, 等量 RNA 在无 RNA 酶污染的条件下使用反转录试剂盒(HiScript II Q RT SuperMix, Vazyme)逆转录合成 cDNA。qPCR 引物根据目标基因序列设计, 长度为 20~25 bp, T_m 值约为 60°C , 扩增片段长度控制在 150~250 bp 之间, 以确保扩增效率和特异性。qPCR 反应体系总量为 $20 \mu\text{L}$, 包含 $10 \mu\text{L}$ SYBR Green Master Mix (例如 ChamQ SYBR qPCR Master Mix, Vazyme)、 $0.4 \mu\text{L}$ 正/反向引物($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $1 \mu\text{L}$ cDNA 模板及无 RNA 酶水补足至终体积。

扩增程序设定为 95°C 预变性 30 s, 随后进行

40 个循环的 95°C 变性(10 s)和 60°C 退火/延伸(30 s)。实时荧光信号的检测通过荧光定量 PCR 仪(QuantStudio 5, Applied Biosystems)完成。扩增结束后进行溶解曲线分析, 以评估产物的特异性并排除引物二聚体等非特异性扩增。

相对基因表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行分析, 使用 GAPDH 作为内参基因进行归一化。所有样本均设有 3 个技术重复, 并在 3 个独立生物学重复下完成, 以保证试验结果的可靠性和统计学意义。

2 结果与分析

2.1 KEA 基因家族在 8 种不同科属植物中的鉴定与系统发育分析

为了鉴定 8 种不同科属植物中的 KEA 基因家族成员, 将拟南芥 KEA 基因的蛋白质序列作为参考^[23], 采用 BlastP 方法在 8 种植物基因组中进行搜索, 共筛选出 54 个 KEA 候选基因及其对应的基因 ID, 其中拟南芥 6 个, 短柄草 5 个, 大豆 12 个, 蒺藜苜蓿 5 个, 水稻 6 个, 高粱 7 个, 番茄 5 个, 玉米 8 个(表 1)。这些候选基因涵盖了 4 个禾本科(单子叶)、2 个豆科(双子叶)、1 个十字花科(双子叶)和 1 个茄科(双子叶)。

表 1 8 种植物 KEA 基因家族蛋白信息

物种(数量)	基因号	基因名称	物种(数量)	基因号	基因名称	
拟南芥(6)	AT1G01790.1	<i>AtKEA1</i>	拟南芥(6)	Glyma.08G029300.1	<i>GmKEA12</i>	
	AT4G00630.1	<i>AtKEA2</i>		蒺藜苜蓿(5)	Medtr8g031550.4	<i>MtKEA1</i>
	AT4G04850.1	<i>AtKEA3</i>			Medtr4g092790.1	<i>MtKEA2</i>
	AT5G51710.1	<i>AtKEA4</i>			Medtr0050s0160.1	<i>MtKEA3</i>
	AT5G11800.1	<i>AtKEA5</i>			Medtr1g016450.1	<i>MtKEA4</i>
	AT2G19600.1	<i>AtKEA6</i>			Medtr8g101640.1	<i>MtKEA5</i>
短柄草(5)	Bradi5g26820.1	<i>BdKEA1</i>	水稻(6)	LOC_Os04g58620.1	<i>OsKEA1</i>	
	Bradi4g01430.1	<i>BdKEA2</i>		LOC_Os12g42300.1	<i>OsKEA2</i>	
	Bradi1g37860.5	<i>BdKEA3</i>		LOC_Os06g36590.1	<i>OsKEA3</i>	
	Bradi2g26740.1	<i>BdKEA4</i>		LOC_Os05g31730.1	<i>OsKEA4</i>	
	Bradi3g42260.1	<i>BdKEA5</i>		LOC_Os09g37300.1	<i>OsKEA5</i>	
大豆(12)	Glyma.03G014000.1	<i>GmKEA1</i>		LOC_Os08g43690.1	<i>OsKEA6</i>	
	Glyma.07G073700.3	<i>GmKEA2</i>	高粱(7)	Sobic.006G271800.1	<i>SbKEA1</i>	
	Glyma.09G262000.1	<i>GmKEA3</i>		Sobic.008G173800.1	<i>SbKEA2</i>	
	Glyma.18G230100.3	<i>GmKEA4</i>		Sobic.001G522100.2	<i>SbKEA3</i>	
	Glyma.07G184800.1	<i>GmKEA5</i>		Sobic.010G168900.1	<i>SbKEA4</i>	
	Glyma.08G064600.1	<i>GmKEA6</i>		Sobic.009G121300.1	<i>SbKEA5</i>	
	Glyma.09G152300.1	<i>GmKEA7</i>		Sobic.002G284500.1	<i>SbKEA6</i>	
	Glyma.16G203200.1	<i>GmKEA8</i>		Sobic.007G175800.1	<i>SbKEA7</i>	
	Glyma.14G093900.1	<i>GmKEA9</i>	番茄(5)	Solye01T002812.2	<i>SlKEA1</i>	
	Glyma.17G229700.4	<i>GmKEA10</i>		Solye11T001553.5	<i>SlKEA2</i>	
	Glyma.05G222500.1	<i>GmKEA11</i>		Solye03T000204.1	<i>SlKEA3</i>	

表 1 (续)

物种(数量)	基因号	基因名称	物种(数量)	基因号	基因名称
玉米(8)	Solyc05T001666.1	<i>SlKEA4</i>		Zm00001d046231_T002	<i>ZmKEA4</i>
	Solyc07T001072.1	<i>SlKEA5</i>		Zm00001d036981_T006	<i>ZmKEA5</i>
	Zm00001d001788_T004	<i>ZmKEA1</i>		Zm00001d021461_T002	<i>ZmKEA6</i>
	Zm00001d026645_T008	<i>ZmKEA2</i>		Zm00001d050509_T001	<i>ZmKEA7</i>
	Zm00001d041308_T001	<i>ZmKEA3</i>		Zm00001d053237_T001	<i>ZmKEA8</i>

用 MEGA 11 对 8 种植物的全长氨基酸序列进行比对和分析,并用邻接法(NJ)构建系统发育树,8种植物中的 KEA 家族可以分为 4 个亚类,即亚类 I~IV(Class I~IV,图 1)。在亚类 I 中,水稻 *OsKEA1* 与短柄草 *BdKEA1* 紧密聚集在一起,其次是与玉米 *ZmKEA1*、*ZmKEA2* 和高粱 *SbKEA1* 关系相近,与其他双子叶植物距离较远;亚类 II 中的亲缘关系情况与亚类 I 中类似,水稻 *OsKEA2* 与短柄草 *BdKEA2* 紧密聚集在一起,其次是与玉米 *ZmKEA3* 和高粱 *SbKEA2* 关系相近,与其他双子叶植物距离较远;亚类 III 中含有最多的 KEA 基因家族成员,其中主要是双子叶植物中 KEA 基因家族成员居多,拥有 15 个成员,而单子叶 KEA 基因家族成员只有 5 个,说明双子叶 KEA 基因家族在该亚类中进行了扩张,可能在双子叶植物中,该类 KEA 基因家族出现功能分化,而在单子叶 KEA 基因家族中,该亚类并未出现扩张现象;亚类 IV 是单子叶植物 KEA 基因家族特有的分支,说明该类 KEA 蛋白可能与其他双子叶 KEA 蛋白的功能不同(图 1)。

2.2 水稻 KEA 的蛋白特征和染色体定位

由于水稻的 KEA 属于不同亚类,推测这些蛋白质可能具有不同的性质。事实上,水稻的 6 个 KEA 基因的 CDS 长度范围为 1 362~3 465 个核

苷酸;KEA 蛋白的长度范围为 453~1 154 个氨基酸(aa),分子量(MW)范围为 46.152~123.825 kDa;这些 KEA 也具有不同的蛋白质等电点(PI 值),其中 *OsKEA4* 的 PI 值大于 8,而其他 KEA 蛋白质的 PI 值范围为 5.03~6.93;水稻 KEA 的不稳定指数范围为 32.08~46.67,脂肪族指数范围为 102.85~124.70,亲疏水性为 0.087~0.833(表 2)。

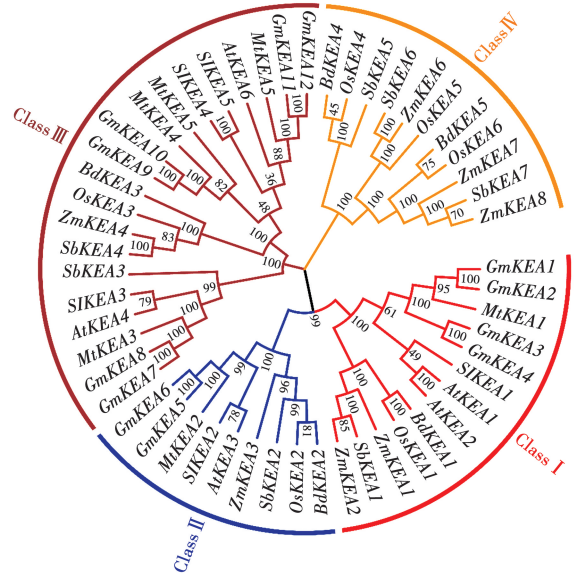


图 1 8 种植物 KEA 基因家族的系统发育分析

表 2 水稻 KEA 基因家族成员的理化性质分析

基因名称	编码区长度	氨基酸数	分子量/kDa	等电点	不稳定指数	脂肪族指数	亲疏水性
<i>OsKEA1</i>	3465	1154	123.825	5.03	41.23	104.19	0.087
<i>OsKEA2</i>	2376	791	85.343	5.49	46.67	114.54	0.327
<i>OsKEA3</i>	1884	627	66.212	5.69	32.08	124.70	0.681
<i>OsKEA4</i>	1362	453	46.152	8.64	40.73	119.45	0.833
<i>OsKEA5</i>	2484	827	88.975	6.21	40.53	102.85	0.236
<i>OsKEA6</i>	2454	817	87.826	6.93	37.57	102.94	0.295

进一步使用 TBtools-II 可视化了所有 KEA 基因在水稻染色体中的分布。如图 2 所示,水稻 KEA 家族基因的成员分布在 6 条染色体(Chromosome)上,包括 Chr4、Chr5、Chr6、Chr8、Chr9 和 Chr12(图 2)。这些 KEA 基因在染色体上分

布比较平均,这 6 条染色体上都分别只有其中一个家族成员,这种分散分布可能有助于减少功能冗余。值得注意的是,6 个 KEA 基因中的 4 个(*OsKEA1*、*OsKEA2*、*OsKEA5* 和 *OsKEA6*)最接近染色体末端。

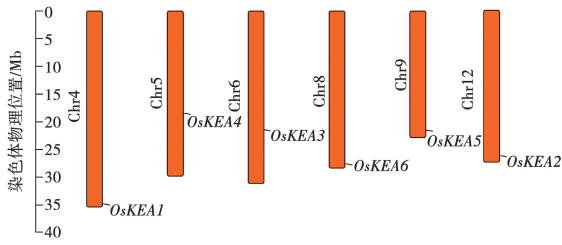


图2 KEA 基因的染色体分布分析

2.3 水稻 KEA 的保守蛋白基序和结构域分析

为了解水稻 KEA 基因的功能,进一步分析了水稻中所有 KEA 蛋白的保守基序和结构域(图3)。如图3所示,在这些 KEA 蛋白中共获得了10个保守基序。其中,基序3、基序4和基序6是最保守的区域,存在于所有成员中,表明这些基序可能是 KEA 蛋白的特征基序。保守基序分析还表明,关系更密切的成员之间具有更相似的保守基序排列。例如,OsKEA1、OsKEA2 和 OsKEA3 均包含基序3、基序4和基序6,并且排列顺序一致,但是与其他亚类成员的基序数量相比,保守基序的数量过少,说明这3个蛋白可能产生了功能分化,拥有新的功能,尤其是在蛋白的N端,并未发现任何保守基序;而 OsKEA4、OsKEA5 和 OsKEA6 均包含基序3、基序4、基序6、基序7、基序8和基序10,除基序3外,基序4、基序6、基序7、基序8和基序10排列顺序一致。进一步分析发现 OsKEA5 和 OsKEA6 的基序组成更加相近,但是在C末端,OsKEA5 相比 OsKEA6 多出来一个基序4。OsKEA4 的基序组成与 OsKEA5 和 OsKEA6 大致相同,但是 OsKEA4 缺少了基序1、基序2、基序5和基序9,结构差异提示潜在的功能分化。

随后,进行了蛋白结构域分析,以区分水稻 KEA 蛋白。由图4可知,水稻的6种 KEA 蛋白结构域不尽相同,表明它们在外部分信号重组中的功能可能不同。根据这些激酶结构域的特征,KEA 蛋白可分为4种类型。其中 OsKEA1 同时包含了 PRK02224 (DNA double-strand break repair Rad50 ATPase) 和 PRK03562 (Glutathione-regulated potassium-efflux system protein KefC) 结构域,其他 KEA 蛋白没有发现 PRK02224 结构域,说明 OsKEA1 的功能可能不同于其他 KEA 蛋白;OsKEA2 只包含了 PRK03562

结构域,该结构域也在 OsKEA1 被发现;OsKEA3 只包含了 RosB (Predicted Kef-type K^+ transport protein, K^+/H^+ antiporter domain) 结构域,该结构域在其他 KEA 蛋白中并未发现,说明 OsKEA3 可能有新的功能;在 OsKEA4、OsKEA5 和 OsKEA6 蛋白中都仅发现 PLN03159 (Cation/ H^+ antiporter 15) 结构域。

以上结果也进一步证明 OsKEA1、OsKEA2 和 OsKEA3 蛋白可能产生了功能分化,可能产生了新的功能,OsKEA4、OsKEA5 和 OsKEA6 的功能更相似。

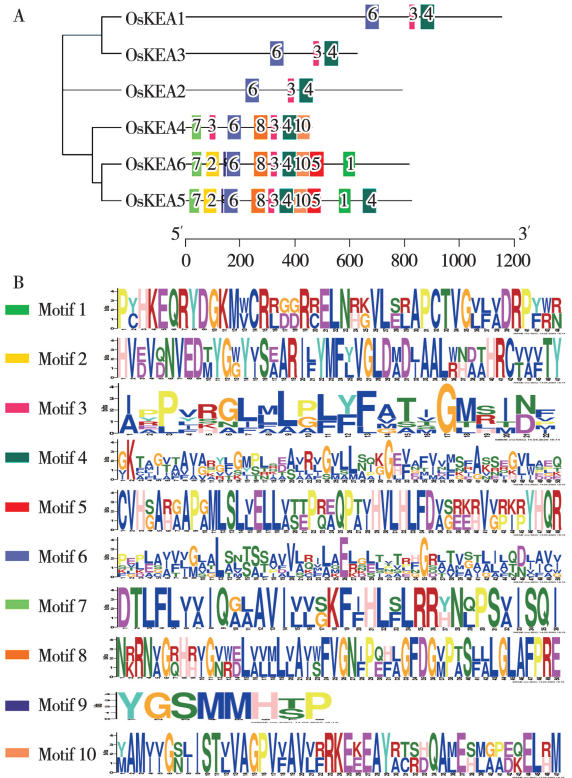


图3 水稻 KEA 保守蛋白基序(A)及每种基序的保守氨基酸序列(B)

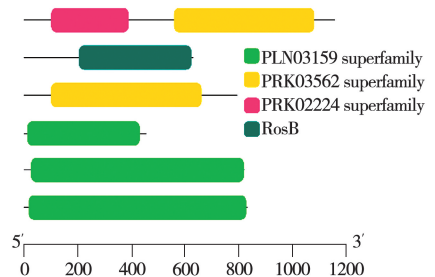


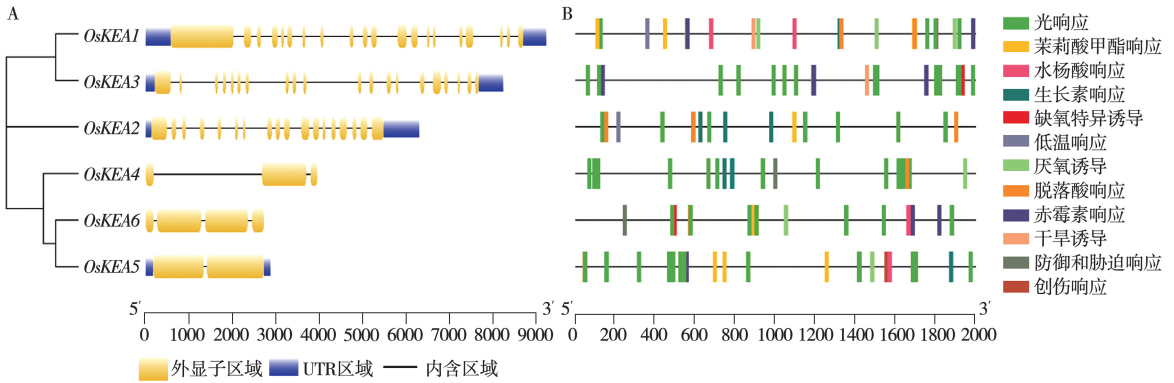
图4 水稻 KEA 保守蛋白结构域

2.4 KEA 基因家族结构分析

为深入了解水稻 KEA 家族的结构进化,分析了其基因结构。结果表明,水稻不同 KEA 家族成员的外显子-内含子结构差异很大,但亲缘关系相近的基因具有相似的基因结构(图 5A)。

由图 5 可知,*OsKEA1*、*OsKEA2* 和 *OsKEA3* 的外显子数量很多,其中 *OsKEA1* 和 *OsKEA3* 包含 20 个外显子,*OsKEA2* 包含 18 个外显子。相比之下,*OsKEA4*、*OsKEA5* 和 *OsKEA6* 均只

包含 4 个外显子。还注意到,2 个水稻特有的 KEA 基因(*OsKEA4* 和 *OsKEA6*)没有 UTR。此外,亲缘关系相近的 KEA 基因在外显子分布方面具有相似的基因结构。从上述描述中,可以发现 *OsKEA1*、*OsKEA2* 和 *OsKEA3* 的外显子数量要远远多于另外 3 个 KEA 家族成员,而水稻 KEA 基因家族成员外显子数目的变异,表明基因受环境调控影响比重不同,从而经历着不同的进化历程。



A. KEA 基因的基因结构;B. 水稻中 6 个 KEA 启动子的顺式作用元件。

图 5 水稻 KEA 基因结构和启动子元件分析

2.5 KEA 基因启动子区顺式元件分析

基因的表达由启动子控制,启动子具有由转录因子调节的各种顺式元件。为了研究水稻 KEA 基因的表达谱和潜在功能,通过 PlantCARE 数据库分析了 KEA 基因启动子(ATG 上游 2 kb)中的顺式作用元件^[32]。除了转录起始所必需的元件外,还鉴定出 12 个具有功能预测的顺式元件(图 5B,表 3)。这些顺式元件可分为植物激素相关(茉莉酸甲酯、水杨酸、生长素、脱落酸及

赤霉素)和环境相关(光响应、低温响应、缺氧特异诱导、厌氧诱导、干旱诱导、防御和胁迫响应以及伤口响应)。这些发现表明,各个 KEA 基因在不同的发育阶段和对不同生物/非生物胁迫的反应中可能表现出不同的表达谱。值得注意的是,*OsKEA1* 和 *OsKEA5* 的启动子区域含有最丰富的顺式元件类型及数量,表明其转录调控网络可能受更多因子的协同影响,响应机制更为复杂。

表 3 水稻 KEA 基因启动子顺式作用元件分析

顺式作用元件	<i>OsKEA1</i>	<i>OsKEA2</i>	<i>OsKEA3</i>	<i>OsKEA4</i>	<i>OsKEA5</i>	<i>OsKEA6</i>	顺式作用元件	<i>OsKEA1</i>	<i>OsKEA2</i>	<i>OsKEA3</i>	<i>OsKEA4</i>	<i>OsKEA5</i>	<i>OsKEA6</i>
光响应	7	9	15	15	25	7	脱落酸响应	3	3	3	1	9	4
茉莉酸甲酯响应	8	2	0	0	6	4	赤霉素响应	2	0	3	0	1	2
水杨酸响应	2	0	0	0	1	1	干旱诱导	1	0	2	0	0	0
生长素响应	1	3	0	2	1	0	防御和胁迫响应	0	0	0	1	0	1
缺氧特异诱导	1	0	1	0	0	1	创伤响应	0	0	0	0	1	0
低温响应	1	1	0	0	0	0	元件总数	30	18	24	20	45	21
厌氧诱导	4	0	0	1	1	1							

2.6 KEA 基因家族的共线性分析

为了进一步研究 KEA 基因的同源关系,在全基因组水平上构建了水稻-拟南芥和水稻-玉米的物种间共线性分析,以探索水稻 KEA 基因家

族的进化起源(图 6A)。在拟南芥和水稻中,没有发现任何具有共线性的基因对。这一现象可能归因于水稻和拟南芥分别隶属于单子叶植物和双子叶植物两大类,它们之间的亲缘关系相对较远。

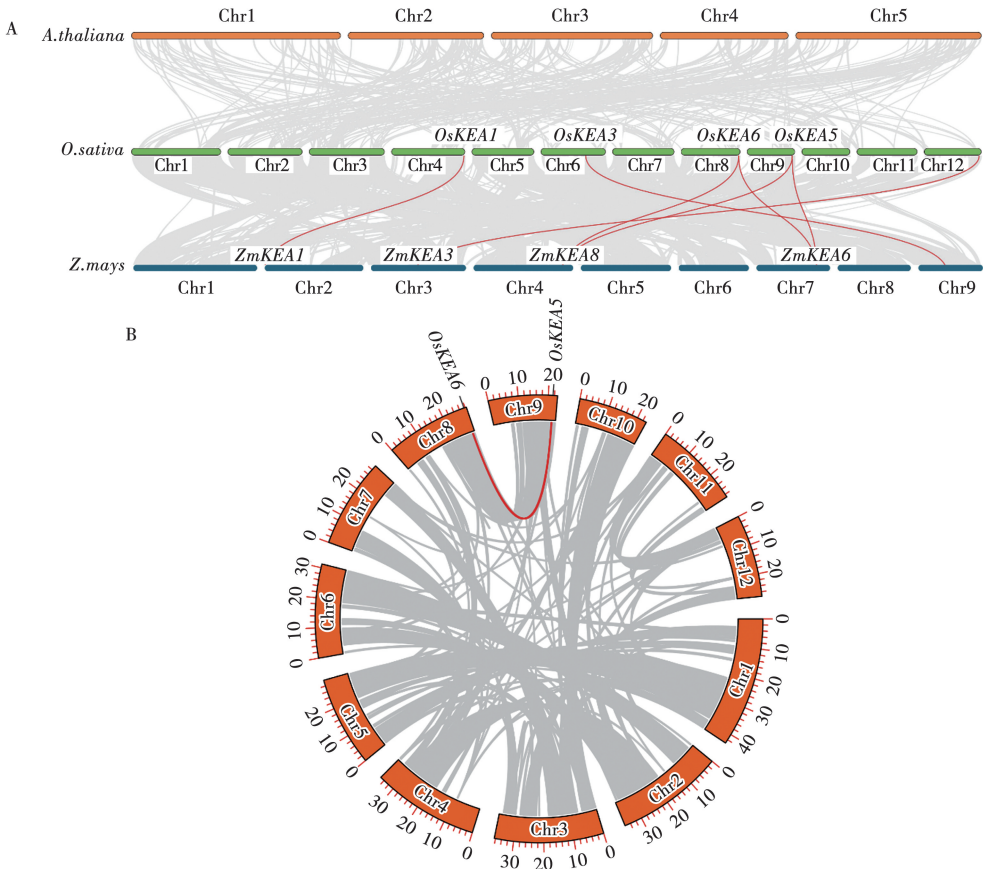
相比之下,在水稻和玉米中发现了 7 对具有共线性的基因对(图 6A,表 4),这可能是由于水稻和玉米都属于单子叶植物,亲缘关系更近。同时也表明这些共线性基因对在祖先分化之前就存在。此外,进一步检测了水稻基因组内部的共线性基因对,以确定水稻 KEA 基因的复制事件。如图 6B 和表 5 所示,在水稻基因组内部中,只发现了 *OsKEA5* 和 *OsKEA6* 之间发生过染色体片段复制事件。此外,并未发现水稻 KEA 基因的串联复制事件。水稻基因组内部 KEA 的复制事件较少,说明水稻 KEA 基因家族并未出现过多的家族扩张。

对上述存在共线性关系的基因对进行了 K_a 、 K_s 和 K_a/K_s 值的分析。 K_a/K_s 值=1 意味着基因处于中性选择状态; K_a/K_s 值<1 表示受到纯化选择, K_a/K_s 值>1 表示受到正选择。通过 K_a/K_s 值计算,发现水稻和玉米中 KEA 基因对的 K_a/K_s 值均小于 1,并且绝大多数的 KEA 基

因对的 K_a/K_s 比值要小于 0.5(表 4),证明水稻 KEA 基因和玉米 KEA 基因之间经历了强烈的纯化选择压力,说明水稻和玉米的 KEA 基因保守进化。在水稻基因组内部中,*OsKEA5* 和 *OsKEA6* 之间的 K_a/K_s 值为 0.944 999,比值接近于 1(表 5)。该结果说明 *OsKEA5* 和 *OsKEA6* 之间呈中性进化趋势,说明 *OsKEA5* 和 *OsKEA6* 之间的突变对水稻来说无明显影响。

表 4 水稻和玉米 KEA 基因成员之间的一对一直系同源关系分析

<i>OsKEA</i> 基因	<i>ZmKEA</i> 基因	K_a	K_s	K_a/K_s
<i>OsKEA1</i>	<i>ZmKEA1</i>	0.098869	0.685373	0.144256
<i>OsKEA3</i>	<i>ZmKEA4</i>	0.051057	0.467987	0.109100
<i>OsKEA6</i>	<i>ZmKEA8</i>	0.158178	0.408888	0.386850
<i>OsKEA6</i>	<i>ZmKEA6</i>	0.357080	0.452499	0.789129
<i>OsKEA5</i>	<i>ZmKEA8</i>	0.377148	0.504113	0.748142
<i>OsKEA5</i>	<i>ZmKEA6</i>	0.143937	0.356133	0.404167
<i>OsKEA2</i>	<i>ZmKEA3</i>	0.050347	0.482038	0.104445



A. KEA 基因进行共线性分析;B. *OsKEA* 基因的染色体位置和共线性。

图 6 水稻基因组中 *OsKEA* 基因的染色体间关系和共线性分析

表 5 水稻 KEA 基因成员之间的一对一直系同源关系

<i>O_sKEA</i> 基因	<i>O_sKEA</i> 基因	Ka	Ks	Ka/Ks
<i>O_sKEA5</i>	<i>O_sKEA6</i>	0.366261	0.387578	0.944999

2.7 水稻 KEA 基因在干旱和盐胁迫中的表达

KEA 基因家族的主要功能是依靠 K⁺ 外排来帮助植物抵御非生物胁迫的,因此根据 eFP (electronic Fluorescent Pictograph) 浏览器植物基因图谱的 RNA-seq 数据,专门研究了在干旱和盐胁迫条件下水稻 KEA 基因在根组织中的表达模式。由图 7 可知,*O_sKEA5* 和 *O_sKEA6* 主要在盐胁迫中被诱导,而 *O_sKEA5* 在干旱胁迫中也会被诱导,但是基因上调倍数要低于盐胁迫条件下;*O_sKEA2* 在干旱胁迫下被显著诱导,在盐胁迫条件下无明显差别;而 *O_sKEA1*、*O_sKEA3* 和 *O_sKEA4* 在两种胁迫条件下,基因表达均受到抑制,推测这 3 个基因的功能可能不同于 *O_sKEA2*、*O_sKEA5* 和 *O_sKEA6*。

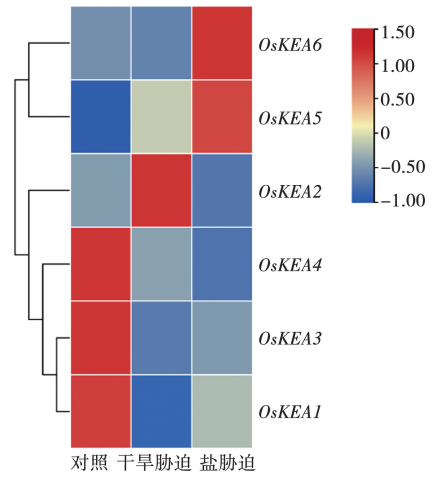


图 7 水稻 KEA 基因对干旱胁迫和盐胁迫的响应

注:数据均来自 eFP RNA-seq 数据库。

为此又进行了水稻在两种胁迫下的荧光定量 PCR 验证,由图 8 可知,KEA 基因在干旱和盐胁迫下的表达量与 eFP 植物图谱 RNA-seq 数据结果基本吻合。

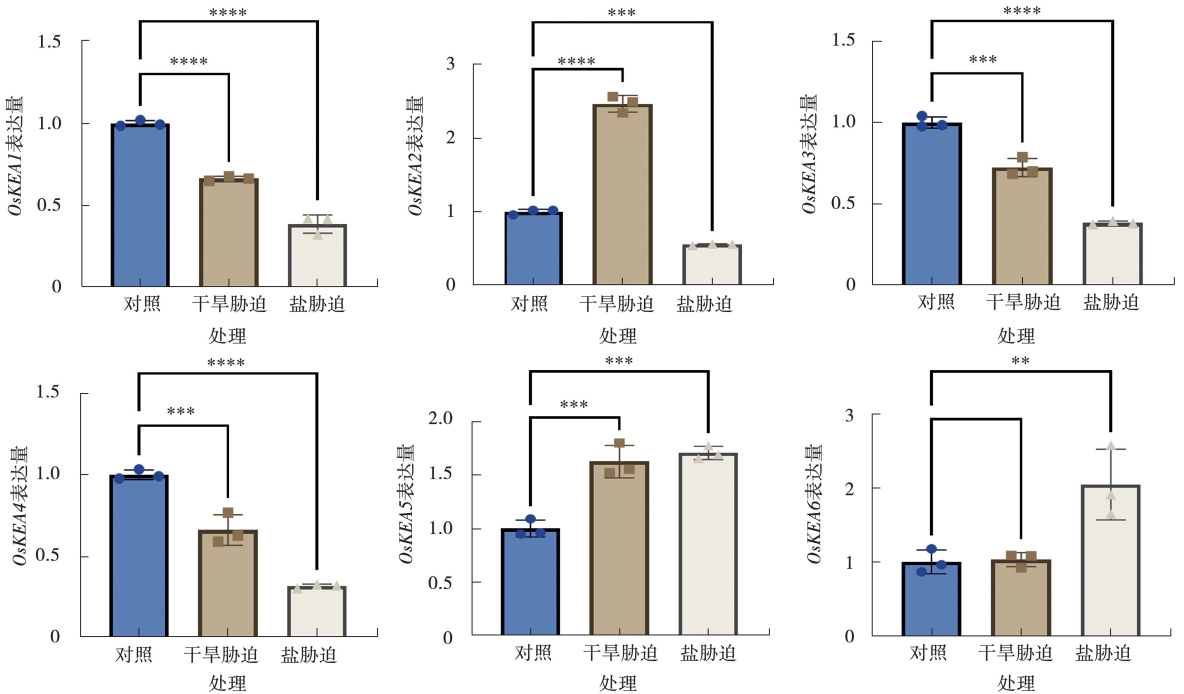


图 8 水稻 KEA 基因在干旱和盐胁迫下的相对表达量

注:同上*表示处理间存在显著性差异。

发现水稻 KEA 基因在干旱和盐胁迫条件下的根组织表达模式存在差异。*O_sKEA5* 和 *O_sKEA6* 在盐胁迫中显著上调,*O_sKEA5* 在干旱中也显著上调。*O_sKEA2* 在干旱中显著上调,而

O_sKEA1、*O_sKEA3* 和 *O_sKEA4* 在两种胁迫下均受显著抑制,表明其功能与 *O_sKEA2*、*O_sKEA5* 和 *O_sKEA6* 不同。

3 讨论

在农业生产上,钾是植物生长发育的重要元素,适量施用钾肥对促进植物的生长、开花以及果实品质的提升具有积极作用^[36-39]。然而,关于这一领域的报道主要集中在生理和生化角度,而对于钾素营养的分子机制研究则相对匮乏。在植物界,KEA 转运蛋白是一类关键的 K^+/H^+ 逆向转运体,负责维持细胞内 K^+ 的动态平衡,并参与叶绿体功能、光合作用以及渗透调节。尽管这些转运蛋白在模式植物拟南芥中的研究较为充分^[11,20,40-41],但在水稻中关于 K^+/H^+ 动态平衡的研究相对较少。

近二十年来,植物基因组测序技术飞速发展,为植物科学研究领域带来了大量的基因信息资源。在众多物种中,同一基因家族的成员数量存在显著差异。本研究在水稻中鉴定到了 6 个 *OsKEA* 转运体基因,与拟南芥(6)、短柄草(5)、蒺藜苜蓿(5)、高粱(7)、番茄(5)和玉米(8)中 KEA 家族成员数量接近,而远远低于大豆(12)。由于大豆是一种古四倍体作物,其经历过两次全基因组复制事件,大豆的基因组更加复杂和庞大,这可能是大豆的 KEA 家族成员众多的原因^[42]。另外,不同物种中的 KEA 家族成员在遗传进化上展现出显著的差异。具体来看,2 种豆科植物(大豆和蒺藜苜蓿)的 KEA 基因成员在遗传关系上较为接近,而 4 种禾本科植物(水稻、玉米、高粱和短柄草)的 KEA 基因成员则更倾向于聚集在一起(图 1),这也体现了不同物种的 KEA 基因家族之间在进化过程中趋向于保守。在 6 个水稻 KEA 基因中,*OsKEA1* 属于亚类 I,*OsKEA2* 属于亚类 II,*OsKEA3* 属于亚类 III,而 *OsKEA4*、*OsKEA5* 和 *OsKEA6* 属于亚类 IV,其中亚类 IV 是禾本科植物特有的分支,这一发现强烈暗示,该亚类的 KEA 基因可能在禾本科植物从双子叶植物分化出来后,经历了特定的基因复制和功能特异性进化过程。这与拟南芥等双子叶植物中的 KEA 基因家族构成形成了鲜明对比,例如在拟南芥中,KEA 家族成员主要被划分为 3 个亚组(*AtKEA1-2*、*AtKEA3* 和 *AtKEA4-6*),而本研究鉴定的禾本科特有亚类 IV 并未包含在其中。因此,深入探讨亚类 IV 的功能,对于理解 KEA 基因家族在禾本科植物中的适应性进化具有重要意义。值得注意的是,尽管目前对玉米、高粱等禾本

科作物 KEA 基因的直接功能研究相对有限,但已有的一些研究提供了重要的线索。例如,在玉米中,已有研究通过蛋白组学等方法鉴定出 KEA 基因的存在,并预测其可能定位在质体膜上^[1]。这提示禾本科 KEA 基因可能类似拟南芥中的 *KEA1-3*,在质体发育和光合作用调节中发挥作用^[2]。更为直接的支持来自对拟南芥 KEA 基因功能的研究。多项研究表明,KEA 基因在维持 K^+ 稳态和渗透调节中扮演关键角色。例如,*AtKEA2* 和 *AtKEA5* 的表达受渗透胁迫和 ABA 诱导^[3],而 *KEA4*、*KEA5*、*KEA6* 在应对盐胁迫中发挥作用,通过调节内膜系统的 pH 和 K^+ 稳态来增强植物的耐盐性^[4]。综合以上信息,可以推测,禾本科特有的亚类 IV KEA 基因,很可能在适应禾本科特有的生长发育需求或环境胁迫中发挥了重要作用。例如,禾本科作物经常面临土壤钾亏缺或盐胁迫等逆境,亚类 IV 基因可能通过调控 K^+ 运输、参与渗透调节或影响质体相关功能,从而贡献于禾本科作物的抗逆性。因此,本研究将水稻 KEA 基因家族的系统发育分析结果与这些潜在功能进行了关联分析。

本研究通过分析水稻 KEA 蛋白的保守基序和结构域,揭示了其功能多样性。保守基序分析显示,KEA 基因家族成员间存在显著的基序差异,暗示功能分化。结构域分析进一步支持了这一观点,不同 KEA 基因具有不同的结构域组合,表明其在信号传导中的功能可能各异。特别是 *OsKEA1*、*OsKEA2* 和 *OsKEA3* 可能具有新的功能,而 *OsKEA4*、*OsKEA5* 和 *OsKEA6* 的功能更为相似。此外,基因结构分析显示,水稻 KEA 的基因结构也与保守基序的结果类似,具体来说,*OsKEA1*、*OsKEA2* 和 *OsKEA3* 的基因结构更加相似且数量较多,而 *OsKEA4*、*OsKEA5* 和 *OsKEA6* 的结构更加相似且数量较少(图 5A)。KEA 基因家族在水稻中的功能多样性可能与其在植物生长发育和响应环境胁迫中的重要作用有关。下一阶段将通过遗传实验进一步证明不同 KEA 基因的功能和调控机制,将有助于深入理解水稻 KEA 家族的适应性进化,对于提高水稻耐逆性具有重要意义。

基因复制导致基因家族的分化,这是进化过程中的关键事件^[43-45]。通过全基因组水平的物种间共线性分析,探讨了水稻 KEA 基因家族的

进化起源。水稻与拟南芥之间未发现共线性基因对,而水稻与玉米之间存在7对共线性基因对,表明它们在较近的进化分支上(图6A)。水稻基因组内部仅发现 *OsKEA5* 和 *OsKEA6* 之间存在染色体片段复制事件,且未发现串联复制,暗示 *KEA* 基因家族的扩张有限(图6B)。Ka/Ks 值分析显示,水稻和玉米的 *KEA* 基因对经历了强烈的纯化选择,而 *OsKEA5* 和 *OsKEA6* 之间呈中性进化趋势,表明这些基因对在水稻中具有保守性(表4和5)。水稻 *KEA* 基因家族的进化模式揭示了基因复制和选择压力的作用。水稻与拟南芥之间未检测到 *KEA* 基因的共线性关系,这首先反映了两者分属单、双子叶植物,进化距离较远的基本事实。在这一背景下,长期的基因组重排、谱系特异的基因丢失或独立复制事件,都可能进一步模糊或消除了它们之间可追溯的共线性信号。这一结果提示,*KEA* 基因家族在单、双子叶植物分化后,可能经历了复杂的、独立的进化轨迹。水稻 *KEA* 基因家族的有限扩张和保守性可能与其在水稻生长发育和响应环境胁迫中的关键作用有关。这些发现为进一步研究 *KEA* 基因的功能和调控提供了重要的进化背景信息。

KEA 转运体在植物中扮演着核心角色,对于维持 K^+ 的动态平衡、调节渗透压、促进光合作用以及控制 pH 等方面具有重要作用^[20,24,34]。通过分析 eFP 植物基因图谱的 RNA-seq 数据与荧光定量 PCR 结果,结合水稻 *KEA* 基因家族成员在干旱和盐胁迫中的不同表达模式表明,它们可能参与不同的抗逆途径。*OsKEA5* 和 *OsKEA6* 在盐胁迫中的上调可能与其正向调控耐盐有关,而 *OsKEA2* 在干旱中的显著上调可能与其在水分平衡中的角色相关。*OsKEA1*、*OsKEA3* 和 *OsKEA4* 的表达抑制可能提示它们在胁迫条件下的功能涉及其他机制,如信号转导或基因调控,需进一步进行遗传试验研究这些基因的功能和调控网络,进而促进植物抗逆性的提高。

此外,顺式作用元件通过与启动子区域的关键元件相互作用,影响启动子的活性,从而调节靶基因的表达^[46-48]。本研究在水稻 *KEA* 基因家族的启动子区域识别出多种顺式作用元件(表3)。特别是,*OsKEA5* 的启动子区域包含了9个对脱落酸(ABA)响应的元件(其余成员的启动子中最多只包含4个ABA元件),该基因在水稻根组织

中表达水平受盐处理的诱导(表3),而 ABA 含量的增加对提高植物耐盐性具有不可或缺的作用^[49];而其他水稻 *KEA* 家族成员的启动子区域则包含了光响应、茉莉酸甲酯响应、水杨酸响应、生长素响应、缺氧特异诱导、低温响应、厌氧诱导、脱落酸响应、赤霉素响应、干旱诱导、防御和胁迫响应及伤口响应相关的元件。一个值得深入探讨的发现是,在盐胁迫下显著上调表达的 *OsKEA5* 和 *OsKEA6*,其进化分析却显示出趋向于中性进化的特征。这一看似矛盾的现象,实则可能揭示了基因复制后功能分化的一个特定阶段——亚功能化或松弛选择。首先,共线性分析表明 *OsKEA5* 和 *OsKE6* 是由一次近期的片段复制事件产生的。复制基因在初期常常会积累较多的突变,其 Ka/Ks 值会趋近于1(中性进化),这与本研究结果一致。其次,表达谱和顺式元件分析为这种中性进化提供了功能层面的解释:尽管两者均受盐胁迫诱导,但 *OsKEA5* 的启动子区包含了异常丰富的 ABA 响应元件(9个),而 *OsKEA6* 的启动子中则较少。这表明,在复制之后,*OsKEA5* 可能更多地承接或强化了由 ABA 信号通路介导的盐胁迫响应功能,而 *OsKEA6* 的功能可能发生了细微的转移或有所冗余。这种在调控序列而非编码序列上的分化,使得基因在蛋白序列水平上承受的选择压力得以放松,从而表现为中性进化。因此,可以认为,*OsKEA5/OsKEA6* 基因对正处在一个功能特异化的早期阶段,其功能创新主要体现在转录调控层面,而非蛋白编码序列本身。它们在盐胁迫下的协同上调,保证了水稻在面对逆境时具有足够的基因剂量,而调控元件的差异则可能为其功能进一步精细化奠定了基础。这些发现与钾离子转运体 *KT/HAK/KU* 家族的转运体研究相似^[39-40],这为深入探究水稻 *KEA* 转运体的功能和调控机制提供了理论基础。

本研究通过对水稻 *KEA* 基因家族进行系统的生物信息学分析,揭示了其成员在基因结构、进化历程及胁迫响应中的多样性,为理解 *OsKEAs* 的功能奠定了重要的理论基础。然而,本研究仍存在一些局限性。首先,本研究的功能推测主要基于序列分析和公共表达数据,缺乏直接的试验验证,例如通过基因敲除或过移栽技术来明确各个 *OsKEA* 基因在钾离子稳态、渗透调节及胁迫耐受中的具体生物学功能。其次,表达分析仅限

于根组织,未能揭示 KEA 基因在其他关键组织(如叶、茎)及不同发育阶段的表达模式,这限制了对其功能全貌的理解。本研究在共线性分析中主要聚焦于模式植物拟南芥及关键禾本科作物玉米,未来可进一步纳入更多近缘物种以绘制更精细的进化图谱。此外,虽然本研究发现了“*O_sKEA5/O_sKEA6* 趋向中性进化”与“其在盐胁迫下表达上调”这一有趣现象,并提出其可能处于亚功能化的早期阶段,但这一假说同样需要进一步的试验证据支持。

本研究构建的系统发育与分子特征框架,为后续深入探索 KEA 基因的功能奠定了坚实基础。基于此,未来的研究可遵循以下路径进一步深化。首先,利用 CRISPR/Cas9 等技术创制水稻 KEA 基因的突变体,是直接验证其生理功能的最有效途径。其次,应开展多组织、多时间点的胁迫表达谱分析,并结合亚细胞定位研究,以精确描绘每个基因的时空表达模式及其作用位点。特别地,对于 *O_sKEA5* 和 *O_sKEA6* 这一对近期复制的基因,需要深入探究其启动子活性的差异、蛋白质互作网络的不同,以揭示其调控分化与功能专化的具体分子机制。最后,将本研究在模式植物水稻中获得的成果,延伸至玉米、小麦等其他重要禾本科作物中进行比较分析,将有助于发掘具有育种应用价值的骨干基因,为通过遗传工程手段协同改良作物的养分利用效率和抗逆性提供新的基因资源。

4 结论

本研究通过对水稻 KEA 基因家族的全基因组鉴定与多维分析,首次系统揭示了该家族在禾本科作物中的进化轨迹与功能分化潜能。研究不仅鉴定了 6 个 *O_sKEA* 成员并将其划分为 4 个进化亚类,更重要的是发现了禾本科特有的亚类 IV,提示了该家族在单子叶植物中可能经历的功能特异性进化。整合基因结构、保守基序与结构域分析,明确了 *O_sKEA1*、*O_sKEA2*、*O_sKEA3* 与 *O_sKEA4*、*O_sKEA5*、*O_sKEA6* 两组基因可能具有不同的功能倾向。共线性与选择压力分析揭示了该家族整体上经历纯化选择,扩张有限,但近期复制的基因对 *O_sKEA5/O_sKEA6* 呈现出中性进化趋势,其启动子元件的差异与胁迫下的协同表达上调,为理解基因复制后的亚功能化提供了典型范例。表达谱分析进一步表明,不同成员在干旱和盐胁迫

中扮演着分化角色。这些结果为深入解析 KEA 转运体在水稻钾稳态与抗逆性中的分子机制奠定了坚实的进化与表达基础,并为后续利用基因工程手段改良水稻养分效率与逆境适应能力提供了关键候选基因与理论依据。

参考文献:

- [1] 曾贤军,王磊,卫海滨,等. 水稻 PIN 家族基因的自然变异与产量和抗旱性的关系[J/OL]. 分子植物育种, 2025: 1-15 [2025-09-19]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=FZZW20250618004&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- [2] CLARKSON D T, HANSON J B. The mineral nutrition of higher plants[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1980, 31: 239-298.
- [3] HOLDAWAY-CLARKE T L, HEPLER P K. Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes[J]. The New Phytologist, 2003, 159(3): 539-563.
- [4] KIM T H, BÖHMER M, HU H H, et al. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 561-591.
- [5] PETTIGREW W T. Potassium influences on yield and quality production for maize, wheat, soybean and cotton[J]. Physiologia Plantarum, 2008, 133(4): 670-681.
- [6] ZÖRB C, SENBAYRAM M, PEITER E. Potassium in agriculture-status and perspectives[J]. Journal of Plant Physiology, 2014, 171(9): 656-669.
- [7] YE C Y, YANG X H, XIA X L, et al. Comparative analysis of cation/proton antiporter superfamily in plants[J]. Gene, 2013, 521(2): 245-251.
- [8] BRETT C L, DONOWITZ M, RAO R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers [J]. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 2005, 288(2): C223-C239.
- [9] EVANS A R, HALL D, PRITCHARD J, et al. RETRACTION: The roles of the cation transporters CHX21 and CHX23 in the development of *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(2): 775.
- [10] PIRES I S, NEGRÃO S, PENTONY M M, et al. Different evolutionary histories of two cation/proton exchanger gene families in plants[J]. BMC Plant Biology, 2013, 13: 97.
- [11] CHANROJ S, WANG G Y, VENEMA K, et al. Conserved and diversified gene families of monovalent cation/H⁺ antiporters from algae to flowering plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2012, 3: 25.
- [12] JIA Q, ZHENG C, SUN S, et al. The role of plant cation/proton antiporter gene family in salt tolerance[J]. Biologia Plantarum, 2018, 62(4): 617-629.
- [13] QIU Q S, GUO Y, DIETRICH M A, et al. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in

- Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3 [J]. PNAS, 2002, 99(12): 8436-8441.
- [14] CELLIER F, CONÉJÉRO G, RICAUD L, et al. Characterization of AtCHX17, a member of the cation/H⁺ exchangers, CHX family, from *Arabidopsis thaliana* suggests a role in K⁺ homeostasis[J]. The Plant Journal, 2004, 39(6): 834-846.
- [15] ZENG Y, LI Q, WANG HY, et al. Two NHX-type transporters from *Helianthus tuberosus* improve the tolerance of rice to salinity and nutrient deficiency stress [J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(1): 310-321.
- [16] MA Y, WANG J, ZHONG Y, et al. Genome-wide analysis of the cation/proton antiporter (‘CPA’) superfamily genes in grapevine (‘*Vitis vinifera* L.’) [J]. Plant Omics, 2015, 8(4): 300-311.
- [17] SHARMA H, TANEJA M, UPADHYAY SK. Identification, characterization and expression profiling of cation-proton antiporter superfamily in *Triticum aestivum* L. and functional analysis of *TaNHX4-B* [J]. Genomics, 2020, 112(1): 356-370.
- [18] WANG Y, YING J L, ZHANG Y, et al. Genome-wide identification and functional characterization of the cation proton antiporter (CPA) family related to salt stress response in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(21): 8262.
- [19] HUSSAIN Z, KHAN H, IMRAN M, et al. Cation/proton antiporter genes in tomato: genomic characterization, expression profiling, and co-localization with salt stress-related QTLs [J]. Agronomy, 2022, 12(2): 245.
- [20] KUNZ H H, GIERTH M, HERDEAN A, et al. Plastidial transporters KEA1, -2, and -3 are essential for chloroplast osmoregulation, integrity, and pH regulation in *Arabidopsis* [J]. PNAS, 2014, 111(20): 7480-7485.
- [21] HAN L, LI J L, WANG L, et al. Identification and localized expression of putative K⁺/H⁺ antiporter genes in *Arabidopsis* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(5): 101.
- [22] PARDO J M, CUBERO B, LEIDI E O, et al. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(5): 1181-1199.
- [23] MÄSER P, THOMINE S, SCHROEDER J I, et al. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2001, 126(4): 1646-1667.
- [24] ARANDA-SICILIA M N, CAGNAC O, CHANROJ S, et al. *Arabidopsis* KEA2, a homolog of bacterial KefC, encodes a K⁺/H⁺ antiporter with a chloroplast transit peptide [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2012, 1818(9): 2362-2371.
- [25] ZHANG X, WANG L, PAN T, et al. Plastid KEA-type cation/H⁺ antiporters are required for vacuolar protein trafficking in *Arabidopsis* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2023, 65(9): 2157-2174.
- [26] LI Y, FENG Z, WEI H L, et al. Silencing of GhKEA4 and GhKEA12 revealed their potential functions under salt and potassium stresses in upland cotton [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 789775.
- [27] 王壮伟, 王庆莲, 夏瑾, 等. 葡萄 KEA 家族基因的克隆、鉴定及表达分析 [J]. 中国农业科学, 2018, 51(23): 4522-4534.
- [28] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [29] BAILEY T L, JOHNSON J, GRANT C E, et al. The MEME suite [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(W1): W39-W49.
- [30] CHEN C J, WU Y, LI J W, et al. TBtools-II: a “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. Molecular Plant, 2023, 16(11): 1733-1742.
- [31] HU B, JIN J P, GUO A Y, et al. GSDB 2.0: an upgraded gene feature visualization server [J]. Bioinformatics, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [32] LU S N, WANG J Y, CHITSAZ F, et al. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020 [J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(D1): D265-D268.
- [33] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a database of plant *Cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 325-327.
- [34] WANG YP, TANG H B, DEBARRY J D, et al. MCSanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity [J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(7): e49.
- [35] CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, et al. BLAST+: architecture and applications [J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10: 421.
- [36] ALI DEMIRAL M, KÖSEGLU A T. Effect of potassium on yield, fruit quality, and chemical composition of greenhouse-grown galia melon [J]. Journal of Plant Nutrition, 2018, 28(1): 93-100.
- [37] YURTSEVEN E, KESMEZ G D, ÜNLÜKARA A. The effects of water salinity and potassium levels on yield, fruit quality and water consumption of a native central Anatolian tomato species (*Lycopersicon esculantum*) [J]. Agricultural Water Management, 2005, 78(1/2): 128-135.
- [38] HARTZ T K, JOHNSTONE P R, FRANCIS D M, et al. Processing tomato yield and fruit quality improved with potassium fertigation [J]. HortScience, 2005, 40(6): 1862-1867.
- [39] 宋志忠, 郭绍雷, 马瑞娟, 等. KT/HAK/KUP 家族基因在桃开花期的表达及对钾肥施用的响应 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(6): 1177-1185.

- [40] ZHENG S, PAN T, FAN LG, et al. A novel AtKEA gene family, homolog of bacterial K^+/H^+ antiporters, plays potential roles in K^+ homeostasis and osmotic adjustment in *Arabidopsis* [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e81463.
- [41] ARMBRUSTER U, CARRILLO L R, VENEMA K, et al. Ion antiport accelerates photosynthetic acclimation in fluctuating light environments[J]. Nature Communications, 2014, 5: 5439.
- [42] ZHUANG Y B, WANG X T, LI X C, et al. Phylogenomics of the genus *Glycine* sheds light on polyploid evolution and life-strategy transition[J]. Nature Plants, 2022, 8(3): 233-244.
- [43] WANG XW, WANG H Z, WANG J, et al. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa* [J]. Nature Genetics, 2011, 43(10): 1035-1039.
- [44] CHENG F, MANDÁKOVÁ T, WU J, et al. Deciphering the diploid ancestral genome of the Mesohexaploid *Brassica rapa*[J]. The Plant Cell, 2013, 25(5): 1541-1554.
- [45] LI K, MA B, SHEN JJ, et al. The evolution of the expansin gene family in *Brassica* species [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 167: 630-638.
- [46] GUPTA M, QIU XH, WANG L, et al. KT/HAK/KUP potassium transporters gene family and their whole-life cycle expression profile in rice (*Oryza sativa*) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2008, 280(5): 437-452.
- [47] 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.
- [48] ZHANG Z B, ZHANG J W, CHEN Y J, 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.
- [49] LI S, WANG N, JI D D, et al. A GmSIN1/GmNCD3s/GmRbohBs feed-forward loop acts as a signal amplifier that regulates root growth in soybean exposed to salt stress[J]. The Plant Cell, 2019, 31(9): 2107-2130.

Genome-Wide Identification and Expression Analysis of KEA Gene Family in Rice

MEN Longnan, LIU Lichao, WEI Zhonghua, ZONG Tianpeng, SUN Zhonghua, SHA Hanjing, LI Shuai, XIE Shupeng

(Suihua Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Suihua 152000, China)

Abstract: The KEA (K^+ Efflux Antiporter) gene family, which belongs to the CPA superfamily, functions as potassium transporters in plants. KEA genes play important roles in ion homeostasis and signal transduction in plants, though their specific mechanisms remain unclear. To conduct a genome-wide analysis of the KEA gene family in rice, a comprehensive genome-wide identification and phylogenetic analysis of KEA genes were performed across eight species from different families. Using a homology search approach, 54 non-redundant members of the KEA gene family were identified in the eight species. Phylogenetic clustering analysis classified the KEA genes into four subclasses, with subclass IV being specific to Poaceae. Analyses of conserved motifs, domains, and gene structures revealed that *OsKEA1*, *OsKEA2*, and *OsKEA3* exhibit greater similarity in protein and gene structures, whereas *OsKEA4*, *OsKEA5*, and *OsKEA6* share more similar protein and gene structures. Whole-genome duplication and tandem duplication were identified as the main drivers of the expansion of the plant KEA gene family. Synteny analysis of the KEA gene family both within and across species revealed evolutionary dynamics, no syntenic gene pairs were detected between rice and *Arabidopsis*, while 7 syntenic gene pairs were identified between rice and maize. Ka/Ks value analysis indicated that the KEA gene pairs in rice and maize have undergone strong purifying selection, whereas the relationship between *OsKEA5* and *OsKEA6* showed a trend of neutral evolution. Additionally, the expression of rice KEA genes under drought and salt stress conditions was examined. The results showed that *OsKEA5* and *OsKEA6* were up-regulated under salt stress, *OsKEA2* was up-regulated under drought stress, while *OsKEA1*, *OsKEA3*, and *OsKEA4* were down-regulated under both stress conditions.

Keywords: KEA gene family; rice; phylogenetic analysis; synteny analysis; stress response