

拟南芥 AtSOS1 基因调控耐盐性的分子机制

聂佳磊

江苏海洋大学 江苏 镇江 212300

摘要:为明确 AtSOS1 基因调控拟南芥耐盐性的分子机制,为作物耐盐分子育种提供核心靶点。本文以拟南芥野生型、AtSOS1 过表达及敲除株系为材料,经 150mmol/L NaCl 胁迫 7d 后,采用生理指标测定、转录组测序、qRT-PCR 及亚细胞定位技术,分析各株系表型、离子稳态、抗氧化能力及下游基因表达特征。结果显示:过表达株系根长、鲜重较野生型提升 28.6%、32.1%,Na⁺ 含量降 41.3%,K⁺/Na⁺ 比值升 58.7%,MDA 含量降 35.7%,SOD、POD 活性显著升高;敲除株系耐盐性骤降,Na⁺ 大量积累、膜损伤加剧。转录组鉴定 127 个差异基因,富集于离子转运、氧化应激通路,AtNHX1、AtCAT1 表达与 AtSOS1 正相关;亚细胞定位证实 AtSOS1 定位于细胞质膜。结论:AtSOS1 通过介导 Na⁺ 外排维持离子稳态、调控抗氧化基因缓解氧化损伤,正向调控拟南芥耐盐性,为作物耐盐育种提供理论支撑。

关键词:拟南芥; AtSOS1 基因; 盐胁迫; 离子稳态; 分子机制

Molecular Mechanism of AtSOS1 Regulating Salt Tolerance in Arabidopsis

Jialei Nie

Jiangsu Ocean University, Zhenjiang, Jiangsu, 212300

Abstract:To clarify the molecular mechanism by which the AtSOS1 gene regulates salt tolerance in Arabidopsis thaliana and provide core targets for salt-tolerant molecular breeding of crops, this study used wild-type Arabidopsis, AtSOS1-overexpressing and AtSOS1-knockout lines as materials. After 7 days of stress treatment with 150 mmol/L NaCl, physiological index determination, transcriptome sequencing, qRT-PCR and subcellular localization techniques were adopted to analyze the phenotype, ion homeostasis, antioxidant capacity and downstream gene expression characteristics of each line. The results showed that compared with the wild-type, the root length and fresh weight of the overexpressing lines increased by 28.6% and 32.1%, respectively, the Na⁺ content decreased by 41.3%, the K⁺/Na⁺ ratio increased by 58.7%, the MDA content decreased by 35.7%, and the activities of SOD and POD increased significantly. By contrast, the salt tolerance of the knockout lines decreased sharply, accompanied by massive Na⁺ accumulation and aggravated membrane damage. Transcriptome analysis identified 127 differentially expressed genes, which were enriched in ion transport and oxidative stress pathways; the expression of AtNHX1 and AtCAT1 was positively correlated with AtSOS1. Subcellular localization confirmed that AtSOS1 was localized on the plasma membrane. It is concluded that AtSOS1 positively regulates salt tolerance in Arabidopsis by mediating Na⁺ efflux to maintain ion homeostasis and regulating antioxidant genes to alleviate oxidative damage, providing theoretical support for salt-tolerant crop breeding.

Keywords: Arabidopsis Thaliana; Atsosl Gene; Salt Stress; Ion Homeostasis; Molecular Mechanism

引言

土壤盐渍化已成为制约全球农业生产的核心非生物胁迫因素,全球约 20% 耕地受盐胁迫影响,且面积呈逐年扩张趋势^[1],该问题不仅在干旱半干旱地区频发,还随设施农业连作不断加剧,直接威胁耕地生产力与粮食安全。植物在盐胁迫下会面临离子毒害、渗透胁迫及氧化损伤三重逆境,其中 Na 过量积累导致的细胞离子失衡是抑制植物生长的关键因素^[2],会破坏酶活性、扰乱代谢途径,最终造成植株生长停滞。拟南芥作为模式植物,基因组小、遗传背景清晰,其耐盐调控通路解析对作物耐盐改良具有

重要借鉴意义,盐超敏感(Salt Overly Sensitive, SOS)通路是植物响应盐胁迫的核心通路,而 AtSOS1 作为该通路下游关键基因,编码质膜钠氢反向转运蛋白,是调控 Na⁺ 外排的核心元件^[3]。

目前关于 AtSOS1 的研究多集中于基因克隆及初步功能验证,但对其调控耐盐性的下游分子网络及与其他耐盐基因的协同作用机制尚未明确。部分研究表明 AtSOS1 可能与液泡膜 Na 转运基因 AtNHX1 存在协同作用,但具体调控关系缺乏直接实验证据^[4],现有研究仍未清晰阐明其在耐盐调控中的完整作用链条。基于此,本研究通过基因编辑、多组学联合分析及生理功能验证,系统解

析 AtSOS1 调控拟南芥耐盐性的分子机制, 拟南芥耐盐基因的相关研究基础也为本次实验提供了重要参考^[5], 研究结果既能丰富植物耐盐调控理论^[6], 也能为作物耐盐基因工程提供理论支撑与核心基因资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

野生型拟南芥 (Col-0)、AtSOS1 过表达株系 (35S::AtSOS1)、AtSOS1 敲除株系 (sos1-1, CRISPR/Cas9 介导), 均由本实验室保存。培养基采用 1/2 MS 固体培养基 (含 1.5% 琼脂、1% 蔗糖, pH 5.8), 所有培养基均经 121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min 后备用。

1.2 盐胁迫处理

拟南芥种子经 75% 乙醇表面消毒 30s, 用无菌水冲洗 5~6 次, 播种于 1/2 MS 培养基, 4℃ 春化 3 d 打破休眠, 置于光照培养箱 (22℃, 光周期 16 h 光照/8 h 黑暗, 光照强度 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 相对湿度 60%) 培养 7 d, 选取长势一致、无病虫害的幼苗转移至含 0 mmol/L (对照)、150 mmol/L NaCl 的 1/2 MS 培养基, 继续培养 7 d, 用于后续表型观察及生理指标测定。

1.3 生理指标测定

采用火焰光度计测定植株地上部及根系 Na^+ 、 K^+ 含量并计算 K^+/Na^+ 比值; 采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛 (MDA) 含量, 反映膜脂过氧化损伤程度; 采用氮蓝四唑法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 采用愈创木酚法测定过氧化物酶 (POD) 活性; 所有生理指标均设置 3 次生物学重复和 3 次技术重复, 数据分析采用 SPSS 26.0 软件, 数据以 “平均值 \pm 标准差” 表示, 差异显著性采用独立样本 t 检验, 以 $P<0.05$ 为显著差异标准, $P<0.01$ 为极显著差异标准。

1.4 分子生物学实验

采用 Trizol 法提取植株幼苗总 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性、核酸蛋白检测仪测定纯度后, 经反转录试剂盒 (TaKaRa) 反转录为 cDNA, 用于 qRT-PCR 及转录组测序; qRT-PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 以 AtActin2 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因相对表达量, 引物序列见附录。转录组测序委托诺禾致源生物信息科技有限公司完成, 差异表达基因筛选标准为 $|\log_2\text{FC}|>2$, $\text{FDR}<0.05$, 采用 GO、KEGG 数据库进行功能富集分析及通路注释。

亚细胞定位实验中, 将 AtSOS1 编码区克隆至 pCambia1300-GFP 载体, 通过农杆菌介导转化拟南芥叶肉原生质体, 暗培养 16 h 后, 采用 Zeiss LSM 880 激光共聚焦显微镜观察 GFP 荧光信号, 明确基因编码蛋白的亚细胞定位位置, 这也是探究钠氢反向转运蛋白功能的关键方法^[7]。

1.5 数据统计与分析

所有实验均设置 3 次生物学重复, 避免单次实验误差, 采用

Excel 2021 进行原始数据整理与录入, SPSS 26.0 进行差异显著性分析, GraphPad Prism 9 进行数据可视化处理, 所有统计符号均以斜体呈现, 确保数据结果的准确性与可重复性。

2 结果与分析

2.1 AtSOS1 基因调控拟南芥盐胁迫下的表型差异

盐胁迫处理后, 不同拟南芥株系表型呈现显著差异: 野生型拟南芥幼苗生长受显著抑制, 表现为根长缩短、叶片发黄萎蔫; AtSOS1 过表达株系生长状态良好, 无明显黄化萎蔫现象, 根长、鲜重较野生型分别提升 28.6%、32.1%, 且差异达到极显著水平 ($P<0.01$); sos1-1 敲除株系生长受抑程度最严重, 表现为根系短小、叶片大面积黄化坏死, 其根长、鲜重较野生型分别降低 39.2%、45.7%, 差异达到极显著水平 ($P<0.01$)。上述表型差异表明, AtSOS1 基因可正向调控拟南芥的耐盐性, 这与 SOS 通路调控植物耐盐性的核心规律相契合。

2.2 AtSOS1 基因调控拟南芥盐胁迫下的离子稳态

离子含量测定结果显示, 盐胁迫下野生型拟南芥地上部 Na^+ 含量显著升高, K^+ 含量呈下降趋势, 最终 K^+/Na^+ 比值降低至 0.32; AtSOS1 过表达株系 Na^+ 含量较野生型降低 41.3%, 差异达极显著水平 ($P<0.01$), K^+ 含量较野生型提升 18.5%, 差异达显著水平 ($P<0.05$), K^+/Na^+ 比值提升至 0.51, 极显著高于野生型 ($P<0.01$); sos1-1 敲除株系离子稳态失衡程度最严重, 其 Na^+ 含量较野生型升高 62.7%, 差异达极显著水平 ($P<0.01$), K^+ 含量较野生型降低 27.3%, 差异达显著水平 ($P<0.05$), K^+/Na^+ 比值仅为 0.14, 极显著低于野生型 ($P<0.01$)。上述结果表明, AtSOS1 可通过促进 Na^+ 外排、维持 K^+ 含量稳定, 进而维持细胞离子稳态, 缓解盐胁迫导致的离子毒害, 这也是植物应对盐胁迫的核心生理响应机制。

2.3 AtSOS1 基因调控拟南芥盐胁迫下的氧化应激响应

盐胁迫下植物会积累大量活性氧, 引发膜脂过氧化损伤, 而抗氧化酶活性直接反映植物的氧化应激响应能力。本研究测定结果显示, 盐胁迫下野生型拟南芥 MDA 含量显著升高至 12.6 $\mu\text{mol/g}$ FW, SOD、POD 活性分别为 215.3 U/g FW、186.7 U/g FW; AtSOS1 过表达株系 MDA 含量较野生型降低 35.7%, 差异达极显著水平 ($P<0.01$), SOD、POD 活性分别提升 26.4%、31.2%, 差异均达极显著水平 ($P<0.01$); sos1-1 敲除株系 MDA 含量较野生型升高 58.7%, 差异达极显著水平 ($P<0.01$), SOD、POD 活性分别降低 29.8%、35.1%, 差异均达极显著水平 ($P<0.01$)。表明 AtSOS1 可通过提升抗氧化酶活性、降低膜脂过氧化程度, 增强拟南芥对盐胁迫下氧化损伤的抵御能力。

2.4 AtSOS1 调控的下游差异表达基因筛选及功能富集

转录组测序结果显示, 以 $|\log_2\text{FC}|>2$, $\text{FDR}<0.05$ 为筛选标准, 共鉴定出 127 个受 AtSOS1 调控的差异表达基因, 其中 79 个基因

随 AtSOS1 表达量升高而上调表达, 48 个基因随 AtSOS1 表达量降低而下调表达。GO 功能富集分析显示, 差异表达基因主要富集于离子转运、氧化应激响应、跨膜转运等生物学过程; KEGG 通路富集分析显示, 差异表达基因集中分布于离子转运通路、抗氧化通路及植物激素信号转导通路。

qRT-PCR 验证结果显示, 离子转运相关基因 AtNHX1、AtAKT1, 氧化应激响应相关基因 AtCAT1、AtSOD1 的表达量与 AtSOS1 呈显著正相关, 其中 AtSOS1 过表达株系中上述基因表达量较野生型提升 1.8~3.2 倍, sos1-1 敲除株系中上述基因表达量较野生型下降 52%~71%, 证实 AtSOS1 可通过调控下游功能基因表达参与耐盐调控。

2.5 AtSOS1 基因的亚细胞定位分析

亚细胞定位结果显示, AtSOS1 编码蛋白的 GFP 荧光信号仅在细胞质膜上特异性分布, 对照组(空载体转化原生质体)的 GFP 荧光信号在细胞内广泛分布, 表明 AtSOS1 基因编码的钠氢反向转运蛋白定位于细胞质膜, 可通过介导细胞质内 Na⁺ 向胞外转运, 减少胞内 Na⁺ 积累, 维持细胞内离子稳态, 从而提升拟南芥耐盐性, 这也印证了非生物胁迫响应基因的功能与亚细胞定位高度关联的特性。

3 讨论

本研究证实 AtSOS1 通过维持离子稳态、增强氧化应激响应能力正向调控拟南芥耐盐性, 其核心功能依赖于细胞质膜上的 Na⁺ 外排作用, 这与前期研究中 AtSOS1 作为质膜钠氢反向转运蛋白的功能定位一致⁺。本研究发现 AtSOS1 过表达株系 K⁺ 含量显著提升, 推测 AtSOS1 可能通过调控钾离子通道基因 AtAKT1 表达维持 K⁺ 稳定, 这一结果补充了 AtSOS1 在离子稳态调控中的作用维度, 突破了以往仅关注 Na⁺ 外排的研究局限。

转录组分析发现 127 个受 AtSOS1 调控的差异表达基因, 富集于离子转运与氧化应激响应通路, 其中 AtNHX1 与 AtSOS1 的协同作用值得关注: AtSOS1 介导胞内 Na⁺ 外排, AtNHX1 介导 Na⁺ 区隔化至液泡, 二者形成“外排+区隔化”的双重防御体系, 共同维持胞内低 Na⁺ 环境, 这为解析 SOS 通路及液泡膜 Na⁺ 转运通路的协同机制提供了直接实验证据^[4]。此外, AtSOS1 对 AtCAT1、AtSOD1 等抗氧化基因的调控, 表明其可通过“离子调控+抗氧化调控”双路径提升耐盐性, 这一调控模式为作物耐盐分子育种提供了新的思路, 也丰富了拟南芥耐盐基因的调控网络研究。

本研究仍存在不足: 未深入解析 AtSOS1 与上游调控基因 AtSOS2、AtSOS3 的互作关系, 且未在作物中验证 AtSOS1 的耐盐功能, 后续可结合植物耐盐机制的最新研究进展, 通过酵母双杂交、双分子荧光互补等技术明确 SOS 通路蛋白互作机制, 同时深入探究钠氢反向转运蛋白的调控逻辑, 在水稻、小麦等作物中开

展 AtSOS1 同源基因的功能验证, 完善 SOS 通路调控植物耐盐性的完整路径, 并结合盐胁迫信号转导网络特征, 优化耐盐基因育种应用方案, 加速成果转化, 也为非生物胁迫响应基因的研究提供参考。

4 结论

本研究通过对拟南芥野生型、AtSOS1 过表达株系及敲除株系进行盐胁迫处理, 结合生理指标测定、分子生物学实验及组学分析, 明确了 AtSOS1 基因在拟南芥耐盐调控中的核心作用, 该基因正向调控拟南芥耐盐性, 过表达该基因可显著提升拟南芥在盐胁迫下的根长与鲜重, 缓解盐胁迫对植株生长的抑制作用, 而敲除该基因则会导致植株耐盐性骤降, 生长受抑程度显著加剧。研究证实 AtSOS1 基因编码的钠氢反向转运蛋白定位于细胞质膜, 能够通过介导胞内 Na⁺ 外排、维持 K⁺ 含量稳定, 有效提升植株体内 K⁺/Na⁺ 比值, 维持细胞离子稳态, 从而缓解盐胁迫引发的离子毒害, 同时该基因还能通过提升盐胁迫下拟南芥体内 SOD、POD 等抗氧化酶活性, 降低 MDA 含量, 减轻膜脂过氧化损伤, 增强植株氧化应激响应能力, 提升植株对盐胁迫下氧化损伤的抵御能力, 此外 AtSOS1 还能调控下游离子转运相关基因 AtNHX1、AtAKT1 及抗氧化相关基因 AtCAT1、AtSOD1 的表达, 通过多基因协同调控形成多维度耐盐调控网络, 最终实现对拟南芥耐盐性的正向调控, 本研究结果不仅丰富了植物耐盐调控的理论体系, 也明确了 AtSOS1 作为核心靶点在作物耐盐分子育种中的应用价值, 为后续水稻、小麦等大宗作物耐盐改良提供了重要理论支撑与基因资源。

参考文献:

- [1] 朱健康, 王涛. 植物耐盐性的分子机制与遗传改良 [J]. 中国科学: 生命科学, 2020, 50(3): 289-301.
- [2] 张劲松, 陈受宜. 植物非生物胁迫响应的分子机制研究进展 [J]. 遗传学报, 2019, 46(5): 387-400.
- [3] Shi H, Ishitani M, Kim C, et al. The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance[J]. Genes & Development, 2000, 14(6): 681-691.
- [4] 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]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(6): 3438-3443.
- [5] 李艳, 王晨, 赵世杰. 拟南芥耐盐基因研究进展 [J]. 植物生理学报, 2021, 57(2): 257-268.
- [6] Ji X, Li X, Zhu J K. Salt tolerance mechanisms of plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2022, 73: 701-726.
- [7] 王颖, 李磊, 张蜀秋. 植物钠氢反向转运蛋白的功能与调控 [J]. 植物学通报, 2020, 37(4): 456-465.