

AtJAR1 基因在拟南芥耐盐性中的功能分析

李丹丹¹, 林 蓉², 李新国³, 郑月萍¹

(1. 浙江农林大学 现代农学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300; 3. 山东省农业科学院 农作物种质资源研究所, 山东 济南 250100)

摘要: 【目的】茉莉酰氨基酸结合物合成酶 (jasmonoyl amino acid conjugate synthase, JAR1) 可以催化茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 形成茉莉酸的活性形式茉莉酸异亮氨酸复合体 (jasmonic acid-isoleucine, JA-Ile), 从而激活 JA 信号途径。JA 信号途径在介导植物盐胁迫的响应中发挥重要作用, 因此, 探究 *AtJAR1* 在植物耐盐性中的功能对于研究 JA 信号途径影响植物耐盐性的机制具有重要作用。【方法】运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 创建了 2 个不同的拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *AtJAR1* 基因突变体, 并对这 2 个突变体进行地上部生物量的统计分析和 JA 信号标记基因的表达分析, 以确定 *AtJAR1* 基因功能缺失。之后, 观察分析不同浓度氯化钠和脱落酸 (ABA) 处理对 *jar1* 突变体的种子萌发和幼苗建成的影响, 明确 *AtJAR1* 基因对拟南芥耐盐性的影响。最后, 通过比较分析盐处理前后野生型和突变体的钾离子 (K^+) 和钠离子 (Na^+) 质量摩尔浓度, 以及高亲和力 K^+ 转运蛋白基因 *AtHAK5* 的表达变化情况, 初步探究 *AtJAR1* 基因在拟南芥耐盐性中的功能。【结果】JA 信号标记基因 *AtVSP1* 和 *AtVSP2* 的表达量大幅下调, 表明 *AtJAR1* 基因功能丧失。与点突变产生的 *jar1-1* 突变体不同的是, 这 2 个突变体表现为前 3 周生长加快, 之后逐渐减缓并出现叶片萎蔫的表型。同时, *AtJAR1* 突变可以缓解盐胁迫和 ABA 对种子萌发和根系生长产生的抑制作用。此外, 盐胁迫下 *AtJAR1* 突变可以促进 *AtHAK5* 的表达和根系对 K^+ 的吸收转运。【结论】JA 信号途径可能通过与 ABA 交互作用影响 *AtHAK5* 的表达量, 以调节植物根系对 K^+ 的吸收转运, 进而改变细胞内 K^+/Na^+ 平衡, 最终影响植物耐盐性。图 8 表 2 参 52

关键词: 拟南芥; CRISPR/Cas9; 茉莉酰氨基酸结合物合成酶; 耐盐性; K^+/Na^+ 平衡

中图分类号: S722.3; Q781 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2022)05-0998-12

Functional analysis of *AtJAR1* gene in salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*

LI Dandan¹, LIN Rong², LI Xinguo³, ZHENG Yueping¹

(1. College of Advanced Agricultural Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China;

2. College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 3. Institute of

Crop Germplasm Resources, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, Shandong, China)

Abstract: [Objective] Jasmonal amino acid conjugate synthase (JAR1) can catalyze jasmonic acid (JA) to form jasmonic acid-isoleucine (JA-Ile), an active form of jasmonic acid, and activate the JA signal pathway. JA signaling pathway plays an important role in mediating the response of plants to salt stress. This study aims to explore the function of *AtJAR1* in plant salt tolerance, which plays an important role in studying the mechanism of JA signal pathway affecting plant salt tolerance. [Method] CRISPR/cas9 gene editing technology was used to create two different *Arabidopsis thaliana* *AtJAR1* gene mutants. The aboveground biomass of the two mutants and the expression of JA signal marker gene were analyzed to determine the loss of *AtJAR1* gene function. Then, the effects of different concentrations of NaCl and ABA treatment on seed germination and

收稿日期: 2021-11-11; 修回日期: 2022-04-24

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD1000906-3); 浙江省自然科学基金青年基金项目 (Q21C020003)

作者简介: 李丹丹 (ORCID: 0000-0003-3501-1220), 从事植物生物技术研究。E-mail: 2551448078@qq.com。通信作者: 郑月萍 (ORCID: 0000-0002-8702-9556), 讲师, 博士, 从事植物生化和代谢研究。E-mail: 630713861@qq.com

seedling establishment of *jar1* mutants were observed and analyzed to clarify the effect of *AtJAR1* gene on salt tolerance of *A. thaliana*. Finally, the role of *AtJAR1* gene in salt tolerance of *A. thaliana* was investigated by comparing the content of potassium and sodium ions in wild type and mutants before and after salt treatment, as well as the expression of *AtHAK5*, a high affinity potassium ion transporter gene. [Result] The expression of JA signal marker genes *AtVSP1* and *AtVSP2* decreased significantly, indicating the loss of *AtJAR1* gene function. Different from the *jar1-1* mutant produced by point mutation, the growth of the two mutants accelerated in the first three weeks, then gradually slowed down and the leaves wilted. At the same time, *AtJAR1* mutation can alleviate the inhibition of salt stress and ABA on seed germination and root growth. In addition, *AtJAR1* mutation can promote the expression of *AtHAK5* and the absorption and transport of potassium ions in roots under salt stress. [Conclusion] JA signaling pathway may affect the expression of *AtHAK5* through interaction with ABA, so as to regulate the absorption and transport of K^+ by plant roots, change the intracellular K^+/Na^+ balance, and finally affect plant salt tolerance. [Ch, 8 fig. 2 tab. 52 ref.]

Key words: *Arabidopsis thaliana*; CRISPR/Cas9; jasmonal amino acid conjugate synthase; salt tolerance; K^+/Na^+ balance

近年来, 全球气候变暖, 降雨量减少以及不适当的灌溉, 导致干旱以及半干旱地区土壤盐渍化愈加严重, 土壤盐渍化成为全球农业生产中面临的重大难题^[1-2]。目前, 中国可耕地面积中约 1/5 的盐渍化土地, 总面积高达 0.98 亿 hm^2 ^[2]。中国是世界人口大国, 人均耕地面积不足 0.1 hm^2 , 如何利用盐渍化的土地, 促进粮食产量的增加是艰巨的课题^[3], 因此, 研究植物的耐盐性和生理机制, 筛选及培育耐盐作物品种成为农业研究领域的热点之一。

在长期的进化过程中, 植物进化出多种应对盐胁迫的防御机制, 其中报道较多的主要有 4 种: ①渗透调节平衡机制。分为有机渗透调节和无机渗透调节。无机渗透调节是植物细胞通过吸收钠离子 (Na^+) 和钾离子 (K^+) 等无机离子作为渗透调节剂, 将 Na^+ 在细胞内区隔化, 从而使根和地上部积累较多的 Na^+ , 但不会出现明显的毒害症状^[4-6]。有机渗透调节则是指植物通过自身合成并积累一些可溶性无毒的有机小分子物质, 如糖类、氨基酸类和甜菜碱等来维持细胞渗透平衡^[7-8]。如盐胁迫下, 苹果 *Malus pumila* 通过积累可溶性有机溶质和无机盐离子来降低胞内渗透势^[9-10], 番茄 *Lycopersicon esculentum* 叶片中可溶性糖含量升高^[11]。②离子的区域化与 pH 调节机制。植物细胞利用跨膜运输将 Na^+ 和 K^+ 等无机离子转运至液泡中, 使之与细胞质隔绝, 降低渗透势, 避免细胞器遭受毒害^[12]。同时, 植物自身可以分泌有机酸从而调节根细胞中的 pH 稳态, 缓解盐胁迫对根系的毒害^[13]。③抗氧化防御系统机制。在高盐胁迫下, 植物细胞质膜因受到水分胁迫或者离子胁迫而受损, 从而导致脂质过氧化, 使细胞内积累大量的活性氧, 当积累的活性氧超过了细胞自身的清除能力就会对细胞造成损伤^[8, 14-15]。在长期的进化过程中, 植物自身会产生活性氧清除系统, 包括一些抗氧化酶类等抗氧化物质, 如超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 等, 它们是衡量植物抗逆性的重要指标^[6, 16-17]。④内源激素和信号转导途径。研究发现植物内源激素在盐胁迫反应中起着重要作用, 如脱落酸 (ABA)、乙烯 (ET)、茉莉酸 (JA) 等^[18-20]。同时, 蛋白激酶途径、ABA 途径 (ABA 依赖型、ABA 不依赖型)、盐超敏感 (SOS) 途径等^[21-24] 信号转导途径也参与了植物对盐胁迫的响应, 并在其中发挥重要作用。

植物激素信号调控网络是植物应对各种非生物胁迫所必须的^[25]。茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 作为重要的植物逆境激素在调控植物耐盐性方面发挥着重要的作用。耐盐水稻 *Oryza sativa* 品种内源茉莉酸含量高于盐敏感品种, 外源茉莉酸甲酯处理能够提高水稻幼苗耐盐性和大豆 *Glycine max* 幼苗对盐胁迫的抗性^[26-27]。盐胁迫下, 水稻 JA 信号调控基因 *OsJAZ9* 与 *OsbHLH062* 互作介导离子稳态或通过增强抗氧化能力, 从而增加对盐胁迫的耐受性^[28-29]; 内源茉莉酸通过维持番茄体内活性氧稳态来提高番茄的耐盐性^[30]。但是, 目前关于 JA 信号如何调控植物的耐盐性仍鲜有报道。茉莉酰氨基酸结合物合成酶 (jasmonoyl amino acid conjugate synthase, JAR1) 催化 JA 形成 JA-Ile, *AtJAR1* 基因发生突变后可导致 JA 信号传递中

断。因此,本研究运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术创建拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *AtJAR1* 基因突变体,并考察突变体对盐和 ABA 胁迫下的种子萌发和根系生长影响,以及盐胁迫下突变体对 K^+ 的吸收转运和 *AtHAK5* 表达量的影响,从而解析 JA 信号通路在植物耐盐性中的可能生理机制。

1 材料与方法

1.1 *AtJAR1* 基因突变体的构建

1.1.1 CRISPR/Cas9 载体的构建及拟南芥的遗传转化 CRISPR/Cas9 靶序列的设计和载体的构建参照 WANG 等^[31] 和朱丽颖等^[32] 的方法。以拟南芥茉莉酰氨基酸结合物合成酶 *AtJAR1* 为靶基因,选取鸟嘌呤和胞嘧啶含量高、特异性较强的 2 个关键片段作为靶序列,获得双靶点 CRISPR/Cas9 基因编辑载体。以哥伦比亚野生型拟南芥为材料,使用农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 侵染法进行拟南芥遗传转化^[33-34]。

1.1.2 突变体的筛选 CRISPR/Cas9 编辑载体具有 *mCherry* 荧光蛋白报告基因,因此,本研究参考朱丽颖等^[32] 的方法,挑选 T_1 代转基因阳性种子,提取转基因阳性植株的基因组 DNA,在目标基因靶序列 2 端设计引物进行 PCR 扩增(约 200 bp),利用质量浓度 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE,丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺的质量比为 29:1)对 PCR 产物进行检测^[32]。

1.2 地上部生物量测定

取播种后 21 d 的植株整个地上部,称其鲜质量。每个株系设置 5 个生物学重复,用单因素方差分析对株系间的差异显著性进行分析。

1.3 种子萌发试验

1.3.1 种子消毒 1 mL 体积分数为 75% 乙醇溶液清洗 3 min,弃乙醇加入 1 mL 体积分数为 35% 的漂白水 and 体积分数为 0.05% 吐温 20 混合溶液,轻轻摇晃混匀 5 min,弃混合溶液;最后加入 1 mL 灭菌超纯水,清洗 5 次,置于 4 °C 避光春化 2 d。

1.3.2 氯化钠(NaCl)和脱落酸(ABA)培养基的配制 在 1/2 MS 植物培养基上添加不同浓度 NaCl,分别配成 0、75、100、125 mmol·L⁻¹ NaCl 的 1/2 MS 植物培养基。将 ABA 溶于体积分数为 70% 的乙醇中,配置成 25 mmol·L⁻¹ 的母液,参考 STASWICK 等^[35] 的浓度。用体积分数为 70% 的乙醇进行稀释,分别配成含 0、0.25、0.50、1.00、5.00、10.00、20.00 μmol·L⁻¹ ABA 的 1/2 MS 植物培养基。

1.3.3 种子萌发率统计 将消毒后的种子均匀点在添加有不同浓度 NaCl(0、75、100、125 mmol·L⁻¹) 和 ABA (0、1、5、10、20 μmol·L⁻¹) 的 1/2 MS 植物培养基上,置于 22 °C、14 h 光照/10 h 黑暗的温室中培养。隔 24 h 统计 1 次萌发率,连续 6 d,以拟南芥胚根穿透种皮时即认定萌发。每个浓度重复 3 次。萌发率=试验时间(d)的萌发种子总数/供试种子总数×100%。

1.4 幼苗耐盐性和 ABA 耐受性分析

将消毒春化后的种子单粒点于 1/2 MS 植物竖直培养基上,于 22 °C、16 h 光照/8 h 黑暗的条件下竖直培养 5 d 后,移栽在添加不同浓度 NaCl(0、50、100 mmol·L⁻¹) 和 ABA(0、0.25、0.50、1.00 μmol·L⁻¹) 的 1/2 MS 植物竖直培养基上,继续培养 7 d,以根长来评估它们的生长状况。

1.5 植物组织中 K^+ 和 Na^+ 质量摩尔浓度的测定

1.5.1 幼苗培养及处理 将 1/2 MS 植物培养基上生长 7 d 幼苗,移栽至装有 1/5 Hoagland 培养液的蓝色花盆中(配方见表 1),培养 14 d 后对每个株系分别进行盐处理和对照处理。盐处理更换外源添加 50 mmol·L⁻¹ NaCl 的培养液,在处理 0 和 24 h 时,分别取每个株系的根部样品用于基因实时表达量的检测。处理 2 d 后,将每个株系的地上部和根部用去离子水润洗后分别转入做好标记的信封中,放入恒温 60 °C 烘箱连续烘 6 h 以上进行杀青。

1.5.2 样品消解及稀酸溶液的制备 将待测样品研磨后,称取 50 mg 左右样品用称量纸送至洁净干燥的消解管底部,每个样本设置 3 次生物学重复,依次加入 7 mL 浓硝酸、1 mL 质量分数为 30% 的过氧化氢水溶液,室温放置 2 h,最后放入微波消解仪消解。利用石墨赶酸仪于 190 °C 下蒸发反应液至 2 mL 左右。冷却后将反应液倒入离心管内,用超纯水将反应液定容至 15 mL。

1.5.3 消解液中钾和钠质量摩尔浓度的测定 使用钾和钠的氯化物分别配制标准曲线。离子的质量浓度梯度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.2、1.6、2.0 mg·L⁻¹。利用原子吸收光谱法测定 K^+ 和 Na^+ 的质量摩尔

表 1 1/5 Hoagland 水培培养液配方

Table 1 1/5 Hoagland formula for hydroponic culture solution

组成	母液浓度/ (mol·L ⁻¹)	母液添加体 积/(mL·L ⁻¹)	水培液中浓 度/(mmol·L ⁻¹)	组成	母液浓度/ (mol·L ⁻¹)	母液添加体 积/(mL·L ⁻¹)	水培液中浓 度/(mmol·L ⁻¹)
KNO ₃	1.0	1.25	1.25	KH ₂ PO ₄	0.5	1.00	0.50
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1.0	1.00	1.00	Fe盐 ^①		1.00	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4	1.00	0.40	微量元素 ^②		0.10	

说明: ①1 000倍铁盐母液的配置: 称取5.56 g七水合硫酸亚铁(FeSO₄·7H₂O)放入100 mL烧杯中, 边加水边搅拌; 将7.50 g 二水合乙二胺四乙酸二钠(EDTA·2Na·2H₂O)放入1 L烧杯中加水煮沸, 缓慢加入FeSO₄溶液, 于微波炉中煮沸2 min; 避光放入60 ℃烘箱烘2 h以上; 室温静置, 冷却后定容至1 L, 即为浓度为20 mmol·L⁻¹的母液。使用时稀释1000倍。②10 000倍微量元素母液的配置: 称取H₃BO₃ 6.18 g; MnCl₂·4H₂O 0.99 g; CuSO₄·5H₂O 1.25 g; ZnSO₄·7H₂O 1.44 g; H₂MoO₄ 0.08 g; NaCl 0.20 g溶解于水中, 冷却后定容至1 L。使用时稀释10 000倍

浓度。

1.5.4 植物组织中 K⁺和 Na⁺质量摩尔浓度的计算 具体的计算公式如下: $C = [(C_n - C') \times 0.015 / (M \times 10^{-3})] / m$ 。其中: C 为 1 g 干物质样本中该离子的物质的量 ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$); C_n 为各样品消解液中该离子的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); C' 为空白对照消解液中该离子的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); M 为待测元素的相对分子量 ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$); m 为样品的干物质质量 (g)。

1.6 相关基因的表达分析

采用 Trizol 法提取拟南芥根中总 RNA, 之后进行基因组 DNA 的去除、反转录, 以反转录后的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测基因的相对表达量。从拟南芥信息资源库中查找以编码拟南芥肌动蛋白基因 *Actin2* 为内参基因, 根据已知的 *AtVSP1*、*AtVSP2* 和 *AtHAK5* 基因 (Gene ID: AT5G24780、AT5G24770 和 AT4G13420) 序列, 设计 qRT-PCR 引物 (表 2)。采取 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算待测基因的相对表达量。

表 2 相关引物序列

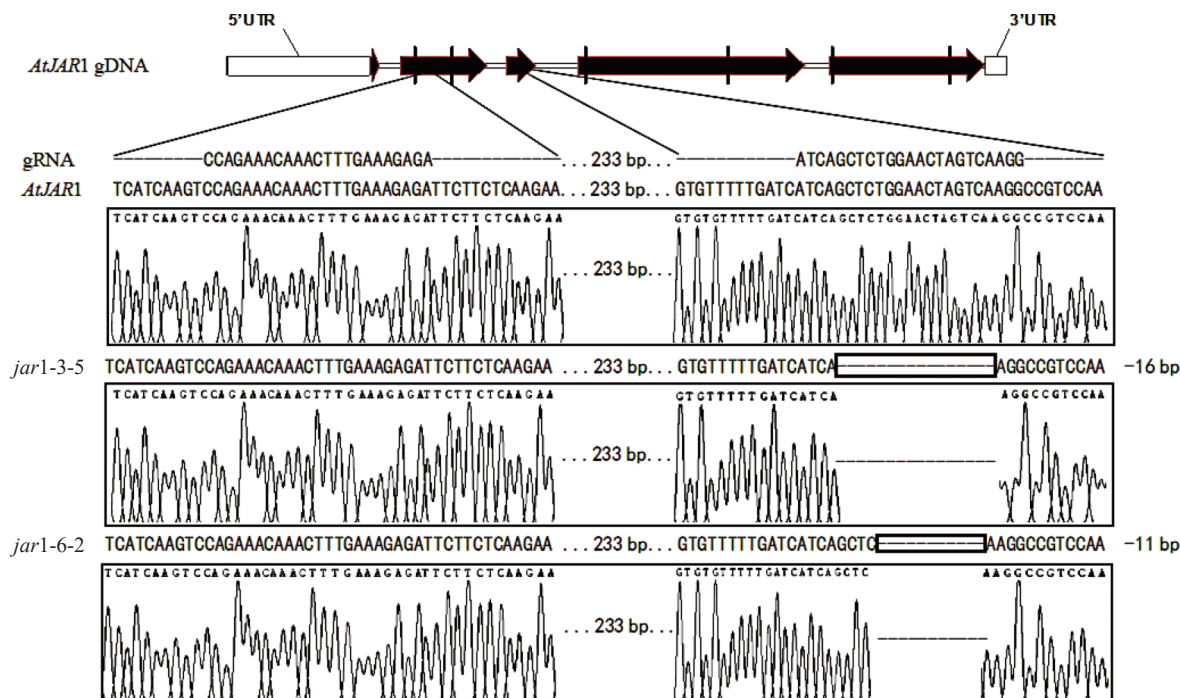
Table 2 Sequence of related primers

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
<i>AtActin2</i>	GTCGTACAACCGGTATTGTGCT	TGTCTCTTACAATTTCCCGCTCT
<i>AtVSP1</i>	TGGATCTTTGACCTAGACGACA	GAGTTCCAAGAGGTTTTCGTA
<i>AtVSP2</i>	TGACCTAGATGATACCCTCCTCTC	CAATCCCAGACTCTATGATGTT
<i>AtHAK5</i>	TCTGCATCACTGGGACGGAG	CAGTATAACGGATCAGGGATTGA

2 结果与分析

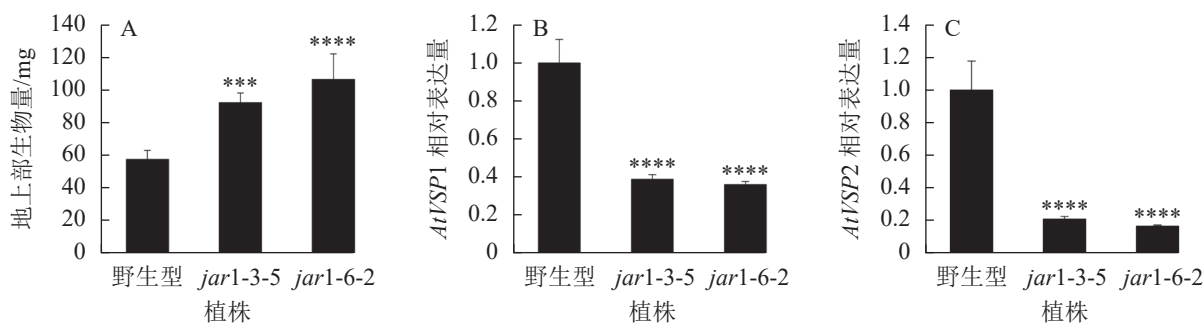
2.1 *AtJAR1* 基因突变体的获得及表型分析

2.1.1 *AtJAR1* 基因突变体基因型的分子鉴定 在早期的基因功能研究中, 常采用反向遗传学手段, 构建基因突变体。因技术水平的限制, 前人构建突变体的方法多为化学诱变法。然而, 这种方式构建的突变体多只在目标基因发生点突变, 使氨基酸残基发生变化, 基因功能未必完全丧失。例如, 有研究发现: 使用甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变创建的 *ATS1* 基因突变体存在严重的基因渗透现象^[36]。因此, 本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 *AtJAR1* 功能完全丧失型突变体。经多代筛选鉴定, 从转基因后代中获得了 2 个纯合突变体, 分别将其命名为 *jar1-3-5* 和 *jar1-6-2*。对其靶位点附近序列进行测序分析, 结果表明: *jar1-3-5* 和 *jar1-6-2* 突变体在第 2 个靶位点, 即第 3 个外显子处, 分别发生了 16 和 11 bp 缺失的突变 (图 1), 导致编码序列 (CDS) 发生了相应变化, 氨基酸序列发生移码突变。在转录后翻译过程中, *jar1-3-5* 的第 111 位氨基酸残基由丝氨酸突变为异亮氨酸 (I), 并在继续错误翻译 12 个氨基酸 (SGTSQGRPKFIP-KAVQSLFLSLMN) 后, 引入终止密码子 UAA, 提前终止翻译; *jar1-6-2* 的第 113 位氨基酸残基由甘氨酸突变为精氨酸, 并在继续错误翻译 8 个氨基酸 (TSQGRPKF-PSKVYSFH) 后, 引入终止密码子 UGA, 提前终止翻译。因此, 构建的突变体可判断为功能完全丧失型突变体。

图1 *jar1-3-5* 和 *jar1-6-2* 突变序列信息Figure 1 Sequence information of *jar1-3-5* and *jar1-6-2* mutants

2.1.2 *AtJAR1* 基因突变体表型分析 将筛选的突变体 (*jar1-3-5* 和 *jar1-6-2*) 和野生型种子进行播种, 在生长前期观察并比较两者的表型差异。结果显示: 前 21 d 时, 突变体植株可以正常生长, 甚至其地上部明显大于野生型。进一步对生长 21 d 的植株地上部生物量进行统计分析发现: 突变体极显著 ($P < 0.001$) 高于野生型 (图 2A)。之后, 野生型和突变体之间的生长差异逐渐减小, 并且在生长 32 d 时突变体植株叶片开始出现萎蔫的现象。

此外, *AtJAR1* 可以催化 JA 形成 JA-Ile, 激活 JA 信号途径, *AtJAR1* 基因突变会影响植物体内茉莉酸信号强度。因此, 对茉莉酸信号标记基因 *AtVSP1* 和 *AtVSP2* 进行表达量分析显示: *AtJAR1* 突变后, *AtVSP1* 和 *AtVSP2* 基因在根中的表达量极显著 ($P < 0.0001$) 减少, 其中 *AtVSP1* 表达量下降了 60% 左右 (图 2B), *AtVSP2* 表达量下降了 80% 左右 (图 2C)。表明获得的这 2 个突变体中茉莉酸信号强度明显减弱。

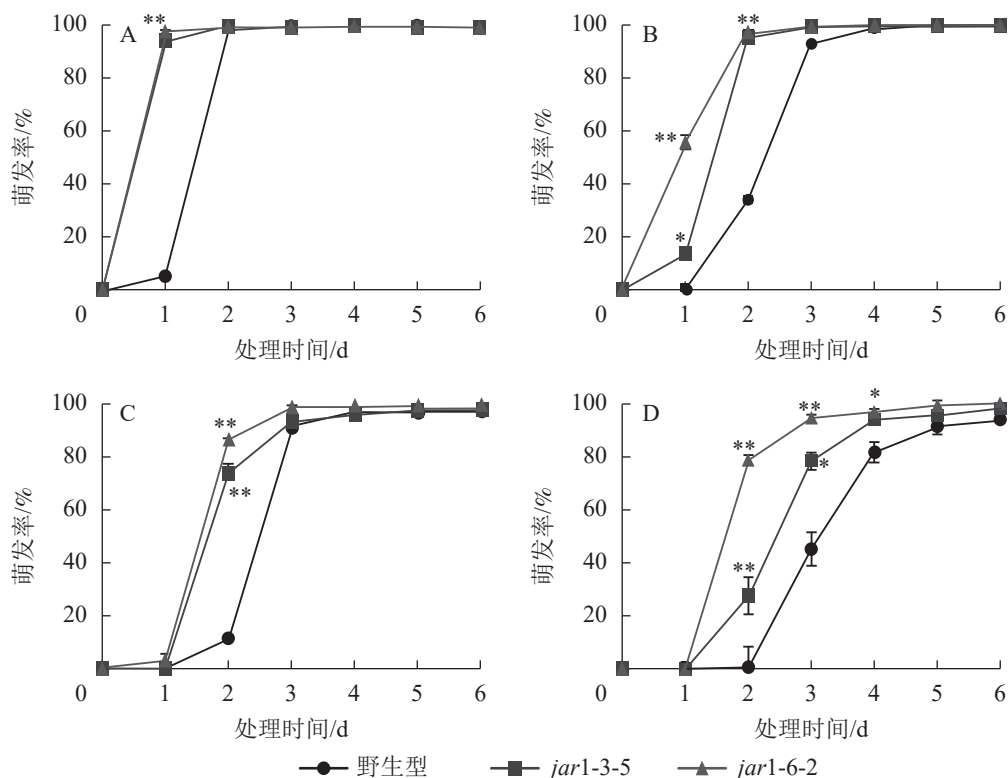


A. 播种后第 21 天地上部鲜质量 ($n=5$); B. 水培第 21 天 *AtVSP1* 基因相对表达量; C. 水培第 21 天 *AtVSP2* 基因相对表达量。***、**** 分别表示与野生型相比在 $P < 0.001$ 、 $P < 0.0001$ 水平上差异显著

图2 *AtJAR1* 基因突变体与野生型的表型差异Figure 2 Phenotypic differences between *AtJAR1* gene mutants and wild type

2.2 盐胁迫对 *AtJAR1* 基因突变体的种子萌发率和幼苗建成的影响

2.2.1 盐胁迫对 *AtJAR1* 基因突变体萌发率的影响 种子萌发是植株个体发育的重要阶段。已有研究表明: 盐胁迫能够抑制植物种子萌发, 同时, JA 作为重要的植物逆境激素在调控植物耐盐性方面发挥着重要的作用^[37-38]。然而 JA 信号通路在盐胁迫下的种子萌发过程中发挥着何种作用尚不明确, 因此, 对盐胁迫下野生型和突变体的种子萌发率 (图 3) 进行统计分析可知: 在不含 NaCl 的条件下, 第 1 天突变



*, ** 分别表示与野生型相比在 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 水平上差异显著。A、B、C、D 分别表示 0、75、100、125 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理

图 3 不同盐浓度下拟南芥种子的发芽率

Figure 3 Germination rate of *A. thaliana* seeds under different salt concentrations

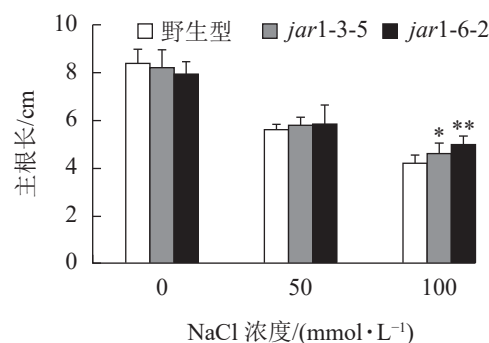
体种子的萌发率极显著 ($P < 0.01$) 高于野生型, 第 2 天时各株系基本全部萌发, 没有显著差别。在不同浓度 NaCl 处理时, 虽然突变体和野生型最终都能达到或者接近于正常生长条件下的最大萌发率, 但是达到最大萌发率的时间都随着 NaCl 处理浓度的增加而有所推迟, 且突变体均早于野生型; 在处理的前 3 d 中突变体的萌发率虽随着 NaCl 处理浓度的增加有所下降, 但均高于野生型, 并且随着 NaCl 处理浓度的增加, 这种差别逐渐显著。表明 *AtJAR1* 突变加速了种子的萌发, 降低了拟南芥在幼苗建成时对盐的敏感性。

2.2.2 盐胁迫对 *AtJAR1* 基因突变体根系生长的影响 幼苗建成是植株个体发育的另一个重要阶段。一直以来盐胁迫对幼苗的影响也是进行抗逆研究的重要方向之一, 因此, 本研究比较了在盐胁迫条件下野生型和突变体幼苗根的生长情况 (图 4)。将在正常培养基上生长 5 日龄的幼苗转移至含有不同浓度 NaCl 的竖直培养基上继续培养 7 d 后, 发现在未用 NaCl 条件下, 突变体的主根长与野生型相比无显著差异。随着 NaCl 浓度的增加, 两者的主根长度都随之下降, 但是, 突变体的主根长度逐渐大于野生型, 在 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理时, 突变体的主根长显著 ($P < 0.05$) 大于野生型, 表明 *AtJAR1* 突变降低了拟南芥根对盐的敏感性。

2.3 ABA 胁迫对 *AtJAR1* 基因突变体的种子萌发率和幼苗建成的影响

2.3.1 ABA 对 *AtJAR1* 基因突变体萌发率的影响

ABA 作为重要的植物激素, 常与其他激素一起协同调控植物对逆境胁迫的应答响应, 但是, 目前并不明确 JA 信号途径与 ABA 交互作用共同调控植物抗逆性的机制。本研究对 *jar1* 突变体在 ABA 胁迫下的种子萌发率进行了统计 (图 5)。结果表明: 随着 ABA 浓度的增加, 野生型和突变体种子的萌发时间都相应推



*, ** 分别表示与野生型相比在 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 水平上差异显著

图 4 盐胁迫对 *jar1* 突变体主根长的影响

Figure 4 Effect of salt stress on the main root length of *jar1* mutant

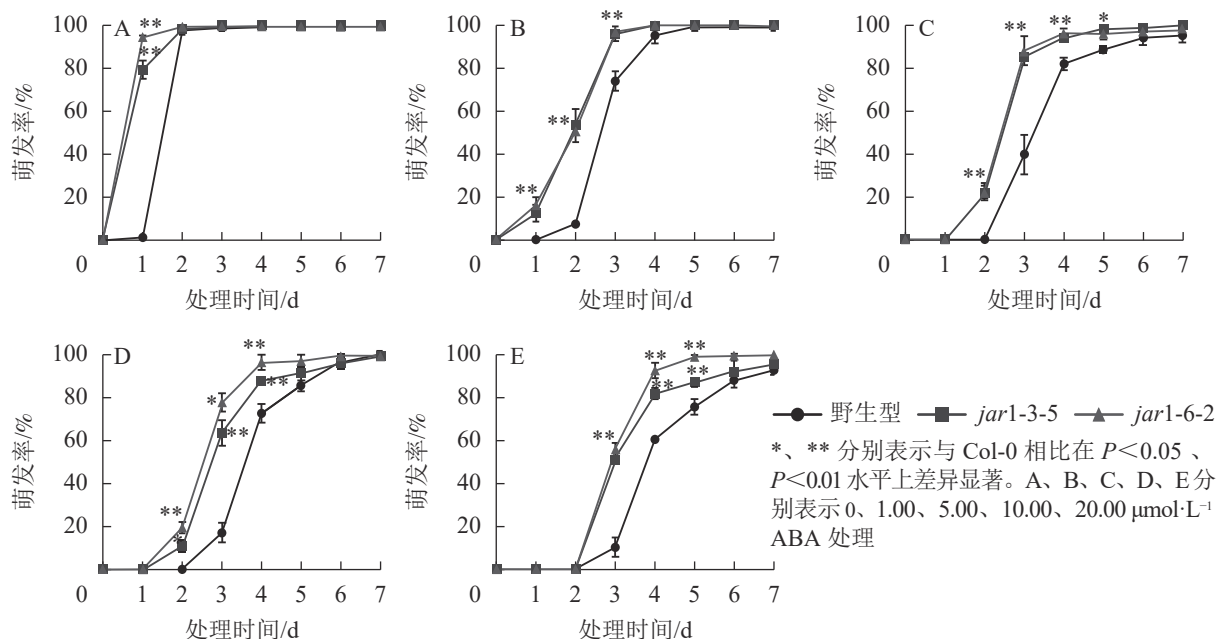


图5 不同ABA浓度下拟南芥种子的萌发率

Figure 5 Germination rate of *A. thaliana* seeds under different ABA concentrations

迟, 萌发率随之下落, 但是突变体的萌发时间均要早于野生型, 萌发率也均显著 ($P < 0.05$) 高于野生型, 表明 *AtJAR1* 突变缓解了ABA对种子萌发的抑制作用。

2.3.2 ABA对*AtJAR1*基因突变体根系生长的影响

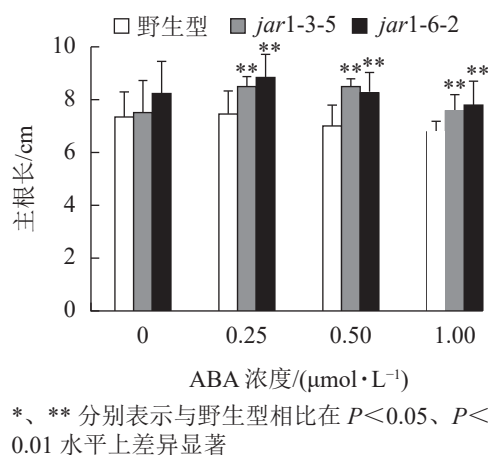
ABA胁迫下野生型和突变体幼苗根的生长情况见图6。将正常培养基上的5日龄幼苗转移到含有不同浓度ABA的竖直培养基上继续培养7d后发现: 在未用ABA处理时突变体的主根长与野生型相比无显著差异, 但是, 当用各浓度ABA处理时, 突变体的主根长均极显著 ($P < 0.01$) 大于野生型, 表明 *AtJAR1* 突变降低了拟南芥根对ABA的敏感性。

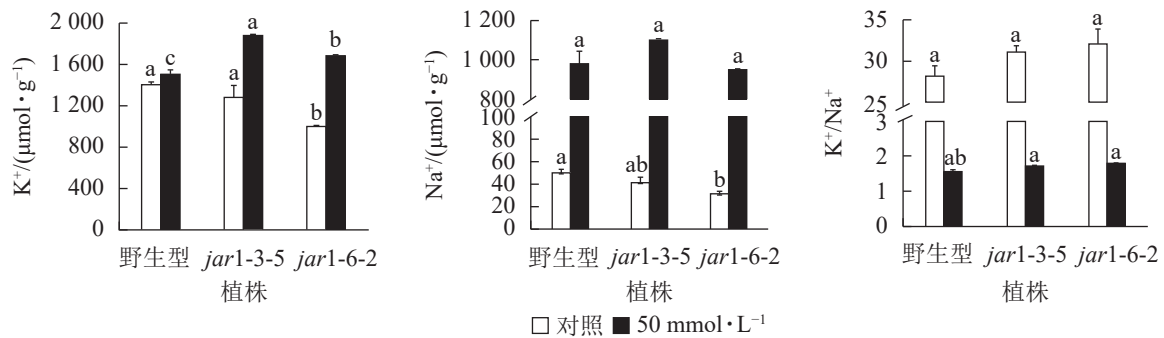
2.4 *AtJAR1* 基因突变体离子质量摩尔浓度分析

盐胁迫下 Na^+ 不断的积累, 导致细胞 K^+ 质量摩尔浓度降低。为避免高盐条件下植物细胞中离子紊乱, 维持 K^+ 稳定吸收, 植物细胞胞浆中的代谢酶必须保持低 Na^+ 、高 K^+ 的浓度水平^[39], 因此, 细胞中 K^+/Na^+ 是盐胁迫下保证植物正常生长的关键。本研究利用原子吸收光谱法测定了正常和盐胁迫条件下突变体和野生型根中的 Na^+ 、 K^+ 质量摩尔浓度 (图7), 发现在正常生长条件下, 突变体根中的 Na^+ 、 K^+ 质量摩尔浓度较野生型都有所下降, 特别是 *jar1-6-2* 下降显著, 但是 K^+/Na^+ 并没有发生显著变化。当用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ 处理后, 突变体根中的 K^+ 质量摩尔浓度较未处理时提高约40%, 且显著 ($P < 0.05$) 高于相同浓度 NaCl 处理下的野生型。 NaCl 处理后野生型和突变体根中的 Na^+ 质量摩尔浓度都急剧上升, 但两者并没有显著差别。相应地, 盐处理后野生型和突变体的 K^+/Na^+ 都急剧下降, 并且突变体比野生型高11%以上。表明 *AtJAR1* 突变, 可能增加了盐胁迫下植物对 K^+ 的吸收和转运, 影响了植物体内的钾钠平衡, 从而增强了拟南芥的耐盐性。

2.5 盐胁迫下*AtJAR1*基因突变体中相关基因的表达量分析

在植物获得 K^+ 与维持 K^+/Na^+ 稳定的过程中钾转运蛋白发挥着重要作用, 而KT/HAK/KUP转运体是植物中最重要的 K^+ 转运体家族之一, 其中的HAK转运体可能在维持盐胁迫下的钾钠稳态过程中发挥重

图6 ABA对*jar1*突变体主根长对的影响Figure 6 Effect of ABA on the main root length of *jar1* mutant



不同小写字母表示同一处理在不同基因型之间差异显著 ($P < 0.05$)

图 7 野生型和 *AtJAR1* 基因突变体根 K^+ 和 Na^+ 变化

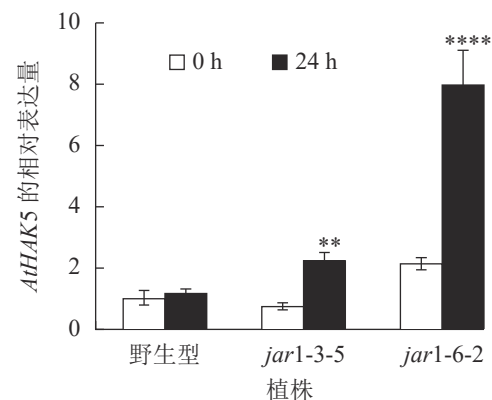
Figure 7 Determination of element contents in wild-type and mutants of *AtJAR1* gene

要的作用^[39-42]。目前, 拟南芥中, *AtHAK5* 是研究最为广泛和深入的高亲和性 K^+ 吸收系统成员^[43], 因此, 本研究通过对盐胁迫下 *jar1* 突变体中 *AtHAK5* 的表达量进行分析, 探究 JA 信号通路在植物耐盐性中的调节机制。图 8 显示: 在正常条件下野生型和突变体根中的 *AtHAK5* 表达量无显著差异; 而 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 24 h 后, 野生型 *AtHAK5* 表达量无显著变化, 而突变体中 *AtHAK5* 表达量上升 3 倍左右, 极显著 ($P < 0.01$) 高于野生型。表明盐胁迫下, *AtJAR1* 突变影响了植物体内 K^+ 的吸收和转运。

3 讨论

JA 是植物生长发育和防御过程中的关键信号分子, JA 合成后经 *AtJAR1* 催化形成 JA-Ile, JA-Ile 介导 F-box 蛋白与 COI1-JAZ 蛋白相互作用, 释放 MYC2 和其他转录因子 (TFs) 从而诱导早期 JA 应答基因的表达。本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统创制的 2 个 *jar1* 突变体, 其 JA 信号标记基因 *AtVSP1* 和 *AtVSP2* 的表达量极显著下降, 说明 *AtJAR1* 基因功能丧失, 从而影响了 JA 信号传导通路。同时, 创制的这 2 个 *jar1* 突变体植株还表现出前 21 d 地上部生物量极显著大于野生型, 之后这种差异逐渐减小并出现叶片萎蔫的表型, 这在早期的研究中并未提及^[34]。此外, 研究发现: 通过基因编辑手段使 *AtJAR1* 基因突变可以缓解 ABA 对种子萌发的抑制作用, 而这与早期的研究结果正好相反^[34]。出现这些表型的差异极有可能是由于早期研究中的突变体 *jar1-1* 是通过 EMS 诱变的方法获得, 其目的蛋白仅第 101 位的丝氨酸 (Ser) 残基突变为苯丙氨酸 (Phe)^[44]。在这种突变体中, *AtJAR1* 基因功能可能未完全丧失, 而本研究通过基因编辑手段构建的突变体发生了大片段基因序列的缺失, 从而引起氨基酸序列发生移码突变以及翻译提前终止等情况, 是基因功能完全丧失型突变体。因此, 获得的这 2 个 *jar1* 突变体将有助于彻底研究 *AtJAR1* 基因的功能。同时, 本研究也为利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术创制基因功能完全丧失型突变体, 从而为进一步研究基因功能提供借鉴和参考。

植物对盐胁迫的耐受性与植物激素有着密切关联。JA 作为一种植物内源激素, 一方面能够参与根系的生长与再生、下胚轴的生长、种子萌发、气孔的开闭等多种生长发育过程, 另一方面可以激活植物的防御机制, 以应对盐害、低温、干旱和病虫害等逆境胁迫造成的伤害^[45]。其中, 在茉莉酸调控植物应对逆境胁迫的过程中, 首先被位于细胞表面的受体所识别, 合成 JA-Ile, 而 JA-Ile 又能与 E3 泛素连接酶 SCF^{COI1} 和 26S 蛋白酶体相互作用, 加快 JAZ 蛋白降解, 从而缓解了与 JAZ 相互作用的转录因子的抑制作用。而这些转录因子又参与调控各种胁迫耐受性的生理输出响应^[46-47]。所以, 本研究运用基因编辑



、** 分别表示与野生型相比在 $P < 0.01$ 、 $P < 0.0001$ 水平上差异显著

图 8 盐胁迫下野生型和突变体中 *AtHAK5* 基因的相对表达量

Figure 8 Relative expression of *AtHAK5* gene in wild-type and mutants under salt stress

手段使 *AtJAR1* 基因功能丧失, JA-Ile 的合成受阻, 对盐胁迫耐受性的生理输出响应受到影响, 表现为盐胁迫对种子萌发和根系生长的抑制作用有所缓解。此外, 许多研究表明: 在植物响应盐胁迫的过程中, JA 和 ABA 存在交互作用, 而与 JAZ 蛋白相互作用的转录因子 MYC2 是 JA 和 ABA 交互作用的关键点^[38]。ABE 等^[48] 和 LORENZO 等^[49] 研究指出: MYC2 过表达和突变体植株分别表现出对 ABA 敏感性的增加和降低。ABE 等^[48] 和 IWASAKI 等^[50] 则指出: MYC2 可以促进盐胁迫和 ABA 胁迫响应基因 *RD22* 的表达。因此, 本研究中 *jar1* 突变体表现出对 ABA 敏感性的下降可能是由于 MYC2 激活受阻所导致的。

在盐胁迫下, Na^+ 会争夺植物钾通道上 K^+ 结合位点, 促进 K^+ 的外排, 降低 K^+ 的吸收利用, 植物表现出对高盐胁迫的敏感现象^[51]。本研究中, *jar1* 突变体根系在盐胁迫下 K^+ 质量摩尔浓度显著增加, K^+/Na^+ 较野生型有所提高, 这可能就是突变体对盐胁迫的敏感性下降的原因之一。在植物获得 K^+ 与维持 K^+/Na^+ 稳定的过程中钾转运蛋白发挥着重要作用, T-DNA 插入突变体研究发现: 拟南芥中 *AtHAK5* 是 HAK 家族中主要的 K^+ 转运体之一^[52]。在盐胁迫下 *jar1* 突变体中的 *AtHAK5* 表达量极显著增加, 表明 *AtJAR1* 突变可以促进 *AtHAK5* 的表达, 从而增加植株根系对 K^+ 的吸收, 提高 K^+/Na^+ 。此外, *AtHAK5* 还被证实参与植物对盐胁迫及 ABA 的响应^[51], 说明突变体中 *AtHAK5* 表达的变化可能是通过 JA 信号转导途径与 ABA 的交互作用实现的。

综上所述, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术创建 *AtJAR1* 基因功能完全丧失型突变体不仅有助于完善对 *AtJAR1* 基因功能的认识, 同时为进一步研究植物激素与植物盐胁迫提供研究材料和研究基础。此外, JA 信号通路可能通过 MYC2 与 ABA 交互作用, 影响下游 HAK5 的表达, 从而改变植物根系对钾的吸收, 使 K^+/Na^+ 发生变化, 最终影响植物对盐胁迫的耐受性。

4 参考文献

- [1] 王俭珍, 刘倩, 高娅妮, 等. 植物对盐碱胁迫的响应机制研究进展[J]. 生态学报, 2017, 37(16): 5565 – 5577.
WANG Quanzhen, LIU Qian, GAO Yani, *et al.* Review on the mechanisms of the response to salinity-alkalinity stress in plants [J]. *Acta Ecol Sin*, 2017, 37(16): 5565 – 5577.
- [2] 王雷, 郭岩, 杨淑华. 非生物胁迫与环境适应性育种的现状及对策[J/OL]. 中国科学: 生命科学, 2021, 51(10)[2021-10-10]. doi:10.1360/SSV-2021-0162.
WANG Lei, GUO Yan, YANG Shuhua. Designed breeding for adaptation of crops to environmental abiotic stresses[J/OL]. *Sci Sin Vitae*, 2021, 51(10)[2021-10-10]. doi:10.1360/SSV-2021-0162.
- [3] 温赛群, 丁红, 徐扬, 等. 不同耐盐性花生品种对 NaCl 胁迫的光合和抗逆生理响应特征[J]. 西北植物学报, 2021, 41(9): 1535 – 1544.
WEN Saiqun, DING Hong, XU Yang, *et al.* Physiological response characteristics of peanut varieties with different salt resistance under NaCl stress [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2021, 41(9): 1535 – 1544.
- [4] JAMES R A, BLAKE C, BYRT C S, *et al.* Major genes for Na^+ exclusion, *Nax1* and *Nax2* (wheat *HKT1;4* and *HKT1;5*), decrease Na^+ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(8): 2939 – 2947.
- [5] MAATHUIS F J M, ANNA A. K^+ nutrition and Na^+ toxicity: the basis of cellular K^+/Na^+ ratios [J]. *Ann Bot*, 1999, 84(2): 123 – 133.
- [6] 付丽, 刘加珍, 陶宝先, 等. 盐生植物对盐渍土壤环境的适应机制研究综述[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(15): 32 – 39.
FU Li, LIU Jiazhen, TAO Baoxian, *et al.* Adaptive mechanism of halophytes to saline soil environment: a review [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2021, 49(15): 32 – 39.
- [7] 孙聪聪, 赵海燕, 郑彩霞. NaCl 胁迫对银杏幼树渗透调节物质及脯氨酸代谢的影响[J]. 植物生理学报, 2017, 53(3): 470 – 476.
SUN Congcong, ZHAO Haiyan, ZHENG Caixia. Effects of NaCl stress on osmolyte and proline metabolism in *Ginkgo biloba* seedling [J]. *Plant Physiol J*, 2017, 53(3): 470 – 476.
- [8] 刘政, 胡孙田, 沈晓飞, 等. 外源褪黑素处理对月季幼苗盐胁迫的缓解效应[J]. 浙江农林大学学报, 2020, 37(5): 957 – 962.
LIU Zheng, HU Suntian, SHEN Xiaofei, *et al.* Alleviation of exogenous melatonin on rose seedlings under salt stress [J]. *J*

- Zhejiang A&F Univ, 2020, **37**(5): 957 – 962.
- [9] 王锴, 张立新, 高梅, 等. 盐胁迫对 2 种苹果属植物愈伤组织及组培苗生长和有机渗透调节物质累积的影响[J]. *西北农业学报*, 2013, **22**(2): 112 – 118.
- WANG Kai, ZHANG Lixin, GAO Mei, *et al.* Effects of salinity stress on growth and organic osmolytes accumulation of callus and tissue culture seedlings of two *Malus* [J]. *Acta Agric Boreali-Occident Sin*, 2013, **22**(2): 112 – 118.
- [10] 杜中军, 翟衡, 罗新书, 等. 苹果砧木耐盐性鉴定及其指标判定[J]. *果树学报*, 2002, **19**(1): 4 – 7.
- DU Zhongjun, ZHAI Heng, LUO Xinshu, *et al.* Salt-tolerance identification on apple rootstocks [J]. *J Fruit Sci*, 2002, **19**(1): 4 – 7.
- [11] 尚娜, 李景富, 吴明臣. 盐胁迫下番茄幼苗对赤霉素处理的响应[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, **36**(7): 2965 – 2972.
- SHANG Na, LI Jingfu, WU Mingchen. Response of tomato seedlings to gibberellin treatment under salt stress [J]. *Genomics Appl Biol*, 2017, **36**(7): 2965 – 2972.
- [12] SHEN Yue, SHEN Like, SHEN Zhenxing, *et al.* The potassium transporter *OsHAK21* functions in the maintenance of ion homeostasis and tolerance to salt stress in rice [J]. *Plant Cell Environ*, 2015, **38**(12): 2766 – 2779.
- [13] YANG Chunwu, GUO Weiqing, SHI Decheng. Physiological roles of organic acids in alkali-tolerance of the alkali-tolerant halophyte *Chloris virgata* [J]. *Agron J*, 2010, **102**(4): 1081 – 1089.
- [14] 刘云芬, 彭华, 王薇薇, 等. 植物耐盐性生理与分子机制研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2019, **47**(12): 30 – 36.
- LIU Yunfen, PENG Hua, WANG Weiwei, *et al.* Research progress on physiological and molecular mechanisms of salt tolerance for plants [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2019, **47**(12): 30 – 36.
- [15] 江超. 紫花苜蓿耐盐生理特性及转录组分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- JIANG Chao. *Analysis of the Alfalfa (Medicago sativa L.) Transcriptome and Physiological Property in Response to Salinity Stress* [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2014.
- [16] 顾帆, 季梦成, 顾翠花, 等. 高温干旱胁迫对黄薇抗氧化防御系统的影响[J]. *浙江农林大学学报*, 2019, **36**(5): 894 – 901.
- GU Fan, JI Mengcheng, GU Cuihua, *et al.* Heat and drought stress with an antioxidant defense system in *Heimia myrtifolia* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2019, **36**(5): 894 – 901.
- [17] 王树凤, 陈益泰, 潘红伟, 等. 土壤盐胁迫下桤木 8 个无性系生理特性的变化[J]. *浙江林学院学报*, 2006, **23**(1): 19 – 23.
- WANG Shufeng, CHEN Yitai, PAN Hongwei, *et al.* Changes of physiological characteristics of eight *Alnus cremastogyne* clones under salt stress [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2006, **23**(1): 19 – 23.
- [18] ISMAIL A, TAKEDA S, NICK P. Life and death under salt stress: same players, different timing? [J]. *J Exp Bot*, 2014, **65**(12): 2963 – 2979.
- [19] SHEN Xiaoyan, WANG Zenglan, SONG Xiaofeng, *et al.* Transcriptomic profiling revealed an important role of cell wall remodeling and ethylene signaling pathway during salt acclimation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2014, **86**(3): 303 – 317.
- [20] CAO Wanhao, LIU Jun, HE Xianjian, *et al.* Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses [J]. *Plant Physiol*, 2007, **143**(2): 707 – 719.
- [21] KNIGHT H, TREWAVAS A J, KNIGHT M R. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity [J]. *Plant J*, 1997, **12**(5): 1067 – 1078.
- [22] ZHU Jiankang. Regulation of ion homeostasis under salt stress [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, **6**(5): 441 – 445.
- [23] 陈莎莎, 兰海燕. 植物对盐胁迫响应的信号转导途径[J]. *植物生理学报*, 2011, **47**(2): 119 – 128.
- CHEN Shasha, LAN Haiyan. Signal transduction pathways in response to salt stress in plants [J]. *Plant Physiol J*, 2011, **47**(2): 119 – 128.
- [24] LEUNG J, GIRAUDAT J. Abscissic acid signal transduction [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, **49**: 199 – 222.
- [25] PELEG Z, BLUMWALD E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, **14**(3): 290 – 295.
- [26] KANG D J, SEO Y J, LEE J D, *et al.* Jasmonic acid differentially affects growth, ion uptake and abscissic acid concentration

- in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars [J]. *J Agron Crop Sci*, 2005, **191**: 273 – 282.
- [27] YOON J Y, HAMAYUN M, LEE S K, *et al*. Methyl jasmonate alleviated salinity stress in soybean [J]. *J Crop Sci Biotechnol*, 2009, **12**: 63 – 68.
- [28] WU Hua, YE Haiyan, YAO Ruifeng, *et al*. OsJAZ9 acts as a transcriptional regulator in jasmonate signaling and modulates salt stress tolerance in rice [J]. *Plant Sci*, 2015, **232**: 1 – 12.
- [29] HAZMAN M, HAUSE B, EICHE E, *et al*. Increased tolerance to salt stress in OPDA-deficient rice ALLENE OXIDE CYCLASE mutants is linked to an increased ROS-scavenging activity [J]. *J Exp Bot*, 2015, **66**(11): 3339 – 3352.
- [30] ABOUELSAAD I, RENAULT S. Enhanced oxidative stress in the jasmonic acid-deficient tomato mutant *def-1* exposed to NaCl stress [J]. *J Plant Physiol*, 2018, **226**: 136 – 144.
- [31] WANG Zhiping, XING Huili, DONG Li, *et al*. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation[J/OL]. *Genome Biol*, 2016, **16**(1): 144[2021-10-10]. doi: 10.1186/s13059-015-p0715-0.
- [32] 朱丽颖, 郑月萍, 徐雪珍, 等. 1 种准确、简便测定 CRISPR/Cas9 基因编辑效率的方法[J]. *江苏农业学报*, 2020, **36**(2): 299 – 305.
- ZHU Liying, ZHENG Yueping, XU Xuezheng, *et al*. A convenient and accurate method for determining the efficiency of CRISPR/Cas9-based gene editing [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2020, **36**(2): 299 – 305.
- [33] 郭勇, 王玉成, 王智博. 1 种基于农杆菌介导的拟南芥瞬时转化技术优化[J]. *东北林业大学学报*, 2016, **44**(6): 41 – 44, 83.
- GUO Yong, WANG Yucheng, WANG Zhibo. Optimizing transient genetic transformation method on *Arabidopsis* plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *J Northeast For Univ*, 2016, **44**(6): 41 – 44, 83.
- [34] 胡欢, 李媛, 丁筠, 等. 农杆菌介导遗传转化获得转 CP4 基因水稻的研究[J]. *浙江农林大学学报*, 2021, **38**(2): 420 – 425.
- HU Huan, LI Yuan, DING Yun, *et al*. *Agrobacterium*-mediated transformation of CP4 gene into indica rice [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2021, **38**(2): 420 – 425.
- [35] STASWICK P E, SU Wenpei, HOWELL S H. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, **89**(15): 6837 – 6840.
- [36] XU Changcheng, YU Bin, CORNISH A J, *et al*. Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of *Arabidopsis* mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3-phosphate acyltransferase [J]. *Plant J*, 2006, **47**(2): 296 – 309.
- [37] DASZKOWSKA-GOLEC A. *Arabidopsis* seed germination under abiotic stress as a concert of action of phytohormone [J]. *Omics J Integrative Biol*, 2011, **15**(11): 763 – 774.
- [38] DELGADO C, MORA-POBLETE F, AHMAR S, *et al*. Jasmonates and plant salt stress: molecular players, physiological effects, and improving tolerance by using genome-associated tools[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(6): 3082[2021-10-10]. doi: 10.3390/ijms22063082.
- [39] 李明, 冷冰莹, 张晗菡, 等. 盐胁迫下调控玉米胞内 Na⁺/K⁺比稳定的主要机制与措施[J]. *山东农业科学*, 2021, **53**(6): 133 – 138.
- LI Ming, LENG Bingying, ZHANG Hanhan, *et al*. Main mechanism and measures of regulating stability of intracellular Na⁺/K⁺ ratio in maize under salt stress [J]. *Shandong Agric Sci*, 2021, **53**(6): 133 – 138.
- [40] ZHANG Ming, LIANG Xiaoyan, WANG Limin, *et al*. A HAK family Na⁺ transporter confers natural variation of salt tolerance in maize [J]. *Nat Plants*, 2019, **5**(12): 1297 – 1308.
- [41] KRAEV A, QUEDNAU B D, LEACH S, *et al*. Molecular cloning of a third member of the potassium-dependent sodium-calcium exchanger gene family, *NCKX3* [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(25): 23161 – 23172.
- [42] GIERTH M, MÄSER P. Potassium transporters in plants: involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis [J]. *FEBS Lett*, 2007, **581**(12): 2348 – 2356.
- [43] 柴薇薇, 王文颖, 崔彦农, 等. 植物钾转运蛋白 KUP/HAK/KT 家族研究进展[J]. *植物生理学报*, 2019, **55**(12): 1747 – 1761.
- CHAI Weiwei, WANG Wenying, CUI Yannong, *et al*. Research progress of function on KUP/HAK/KT family in plants [J]. *Plant Physiol J*, 2019, **55**(12): 1747 – 1761.

- [44] 卫昭君, 牛冰洁, 王永新, 等. 茉莉酸甲酯对盐胁迫下偏关苜蓿种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 草地学报, 2020, **28**(4): 998 – 1005.
- WEI Zhaojun, NIU Bingjie, WANG Yongxin, *et al.* Effect of methyl jasmonate on seed germination and seedling growth of *Medicago sativa* ‘Pianguan’ under salt stress [J]. *Acta Agrestia Sin*, 2020, **28**(4): 998 – 1005.
- [45] STASWICK P E, TIRYAKI I, ROWE M L. Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation [J]. *Plant Cell*, 2002, **14**(6): 1405 – 1415.
- [46] 毛佳昊, 熊晓辉, 卢一辰. 茉莉酸调控植物应对逆境胁迫作用的研究进展[J]. 生物加工过程, 2021, **19**(4): 413 – 419, 462.
- MAO Jiahao, XIONG Xiaohui, LU Yichen. Advances in the regulation of plant stress response by jasmonic acid [J]. *Chin J Bioprocess Eng*, 2021, **19**(4): 413 – 419, 462.
- [47] HOWE G A, MAJOR I T, KOO A J. Modularity in jasmonate signaling for multistress resilience [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2018, **69**: 387 – 415.
- [48] ABE H, URAO T, ITO T, *et al.* *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling [J]. *Plant Cell*, 2003, **15**(1): 63 – 78.
- [49] LORENZO O, CHICO J M, SNCHEZ-SERRANO J J, *et al.* JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2004, **16**(7): 1938 – 1950.
- [50] IWASAKI T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis [J]. *Mol Gen Genet*, 1995, **247**(4): 391 – 398.
- [51] 张彦桃, 王欣, 祁智. 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[J]. 华北农学报, 2014, **29**(6): 214 – 219.
- ZHANG Yangtao, WANG Xin, QI Zhi. *Arabidopsis thaliana* high-affinity potassium transporter AtHAK5 participated in the response to salt stress and ABA in the plant root [J]. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2014, **29**(6): 214 – 219.
- [52] QI Zhi, 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]. *J Exp Bot*, 2008, **59**(3): 595 – 607.