

玉米耐盐分子机制研究进展

姜佩弦¹, 张 凯¹, 王艺桥¹, 张 鸣¹, 曹一博², 蒋才富¹
(¹ 中国农业大学生物学院, 北京 100193; ² 北京林业大学林学院, 北京 100083)

摘要: 玉米是我国总产量最大的农作物, 它对盐胁迫耐受性较差。玉米主产区日益加剧的土壤盐渍化已成为导致玉米产量和品质下降的主要环境胁迫之一。因此, 研究玉米的耐盐机制, 改良玉米的耐盐性对保障我国乃至世界玉米生产的可持续发展有重要意义。土壤中盐浓度过高会导致玉米根系外围土壤溶液的水势降低, 引起渗透胁迫, 而盐离子 (Na⁺、Cl⁻ 等) 的过量积累会导致离子毒害。近年来, 针对离子稳态维持、渗透压维持等关键生理过程, 国内外学者通过 GWAS、QTL 等方法克隆了多个重要耐盐 QTL 基因, 并对其作用机制进行了解析。本文综述了玉米耐盐领域的最新研究进展。

关键词: 玉米; 耐盐; 渗透胁迫; 离子稳态

Recent Advance of Molecular Understanding of Salt Tolerance in Maize

JIANG Pei-xian¹, ZHANG Kai¹, WANG Yi-qiao¹, ZHANG Ming¹, CAO Yi-bo², JIANG Cai-fu¹
(¹ China Agricultural University, College of Biological Sciences, Beijing 100193;
² Beijing Forestry University, The College of Forestry, Beijing 100083)

Abstract: Maize (*Zea mays* L.) is ranking first in total yield production of the crop species in China, whereas this important crop is sensitive to salt stress. As the salinization of farmlands has become one of the major environmental stresses that decrease maize yield and quality, it is important to study the mechanism of salt tolerance and thus facilitate the development of salt-tolerant maize. It's known that high-salt concentration can damage maize plant mainly by causing osmotic stress and ion toxicity. In recent years, several salt-tolerant QTL or genes which are involved in regulating either ion homeostasis or osmotic tolerance, have been identified by GWAS and/or QTL analysis, and their functional mechanisms have been investigated. Here, we review recent progress on deciphering the mechanisms of salt tolerance in maize.

Key words: maize; salt tolerance; osmotic stress; ion homeostasis

玉米是我国三大农作物之一, 是主要的饲用和粮食作物。近年来, 在极端自然条件 (降雨少) 和人为因素 (灌溉依赖的耕作模式) 的共同作用下, 我国北方地区和黄淮海平原等玉米主产区耕地盐碱化日益严重, 已成为导致玉米减产的主要环境因素之一。因此, 系统解析玉米耐盐的分子遗传基础、深入挖掘玉米耐盐的潜能、培育耐盐玉米品种, 有重要的理论

和生产实践意义^[1-2]。盐胁迫对作物的伤害主要体现在渗透胁迫和离子毒害两个方面, 作物在进化过程中也产生了一系列耐受渗透胁迫和离子毒害的机制。例如, 作物通过在胞质中积累大量的渗透调节物质, 降低膜内外的渗透势差, 从而应对盐胁迫导致的渗透胁迫; 作物通过离子外排、离子区域化等方式减少 Na⁺、Cl⁻ 等盐离子在胞质中的过量积累, 从而减

收稿日期: 2021-08-12 修回日期: 2021-09-22 网络出版日期: 2021-10-13

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210812004>

第一作者研究方向为玉米耐盐机制, E-mail: juliapeixian@163.com; 张凯为共同第一作者

通信作者: 曹一博, 研究方向为经济林耐盐机制, E-mail: caoyibo@bjfu.edu.cn

蒋才富, 研究方向为玉米耐盐机制, E-mail: cfjiang@cau.edu.cn

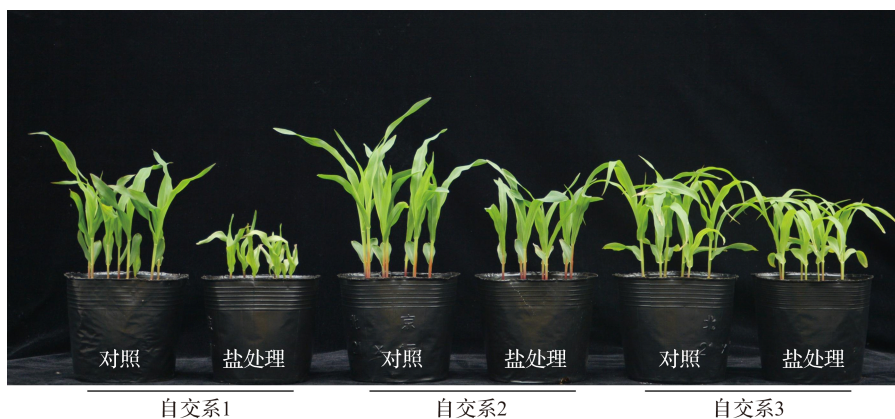
基金项目: 北京市自然科学基金项目 (6212010); 国家自然科学基金面上项目 (32071933, 31470350)

Foundation projects: Beijing Natural Science Foundation Project (6212010), The National Natural Science Foundation of China (32071933, 31470350)

少离子毒害^[3-4]。因此,培育耐盐作物(如:玉米)需要协同改良其渗透胁迫抗性和离子稳态维持能力。

玉米自然群体的遗传多样性十分丰富,不同玉米自交系对盐胁迫的耐受性存在显著差异(图1)^[5-9],越来越多的证据表明玉米耐盐性是受多基因控制的数量性状^[6]。例如,已有研究表明不同玉米自交系中渗透调节物质的含量存在显著差异(如:甘氨酸、甜菜碱等),且有多个与渗透调节相关的 QTLs 基因被克隆^[10];以 Na^+ 、 K^+ 含量为指标,克隆了多个调控玉米 Na^+ 、 K^+ 稳态和耐盐性的 QTLs 基因^[7-9, 11-12];以死亡率、生物量等为指标,通过全基因组关联分析

(GWAS, genome wide association study)、基于代谢组的全基因组关联分析(mGWAS, metabolite-based genome wide association study)、连锁分析(Linkage analysis)等方法鉴定了一系列与玉米耐盐性相关的候选基因。这些研究揭示了玉米耐盐性变异的多基因遗传基础,为培育耐盐玉米提供了重要的基因资源和遗传材料。本文综述了玉米耐盐应用基础研究最新进展,主要包括:(1)玉米耐盐应答中的渗透调节;(2)盐胁迫下玉米的 Na^+ 稳态调控机制;(3)盐胁迫下玉米中的 K^+ 稳态调控;(4)盐胁迫下玉米中的 Cl^- 稳态调控。



图片为在对照和盐胁迫(100 mmol/L NaCl)条件下生长 10 d 的幼苗
The photos show the 10-days old seedlings grown under control and salt (100 mmol/L NaCl) conditions

图 1 不同玉米自交系的耐盐性比较

Fig.1 The phenotype of three maize inbred lines grown under control and salt conditions

1 玉米耐盐应答中的渗透调节

1.1 盐胁迫下玉米对渗透胁迫的感知和信号转导

盐胁迫下土壤溶液的水势降低,导致渗透胁迫^[13]。已有研究表明植物体存在感受渗透胁迫的受体,它感受渗透胁迫后可将其转化为 Ca^{2+} 信号, Ca^{2+} 信号被 Ca^{2+} 结合蛋白解码后调控植物对渗透胁迫的适应性应答^[14-16]。拟南芥中的 OSCA1 (Reduced hyperosmolality-induced [Ca^{2+}]_i increase 1) 是一种高渗透压调控的 Ca^{2+} 通道,它可以特异响应外界渗透压胁迫,推测它可能是拟南芥感知渗透压变化的受体^[16]。虽然目前玉米中感知渗透压变化的受体尚未见报道,但玉米中存在 AtOSCA1 的直系同源蛋白 (GRMZM2G456000),它可能在玉米感受盐胁迫诱导的渗透胁迫 (SIOS, salt induced osmotic stress) 中起重要作用。Liu 等^[17]发现渗透胁迫可以诱导玉米根尖胞质中游离 Ca^{2+} 浓度快速升高,表明 Ca^{2+} 可能作为玉米感知渗透压变化的第二信使

发挥作用。也有研究表明,玉米中一些编码钙结合蛋白的基因(如: *ZmCBLs* 和 *ZmCDPKs*) 的转录水平受盐胁迫和渗透胁迫诱导上调,这些基因可能参与渗透胁迫下 Ca^{2+} 信号的解码并调控下游渗透胁迫应答过程^[14-15]。整体而言,玉米对 SIOS 的感知、第二信使的激活及下游基因表达调控的机制大多不清楚,仍有待研究。

1.2 ABA 介导玉米响应盐诱导的渗透胁迫

植物激素脱落酸 (ABA, abscisic acid) 在植物响应逆境胁迫、维持胞内渗透压及调控气孔运动等方面都有重要的作用^[18-20]。拟南芥中的研究表明,渗透胁迫可诱导 ABA 合成,激活 ABA 信号途径,调控下游渗透胁迫响应基因的表达,从而增强植物对渗透胁迫的耐受性^[20-21]。渗透胁迫也可以促进玉米中 ABA 的合成,并且 ABA 信号途径与许多玉米渗透胁迫应答基因的表达调控相关^[22]。在玉米中过表达拟南芥的 ABA 合成基因 *AtLOS5* (*Low osmotic stress 5*),可以显著增加植株中的 ABA 含

量,提高其渗透胁迫耐受能力,促进植株抗盐^[15]。也有研究表明 ABA 可以显著诱导玉米中甜菜醛脱氢酶 (BADH, betaine aldehyde dehydrogenase) 的表达,进而促进渗透调节物质甜菜碱的合成。Hu 等^[23]对玉米 *vp5* 突变体 (ABA 合成缺陷突变体) 中的磷酸化蛋白进行蛋白组学分析,发现多个转录因子、酶和转运蛋白的磷酸化调控可能与 ABA 依赖的渗透胁迫应答相关。上述这些研究表明 ABA 信号通路在玉米响应盐诱导的渗透胁迫中起着重要的作用,但相关的精细调控机制还有待深入研究。

1.3 渗透调节物的积累增强玉米的耐盐性

盐胁迫条件下,植物通过调节胞质中的有机或无机渗透调节物质的积累来维持胞内外的渗透压平衡,从而抵御盐诱导的渗透胁迫^[3-4,24]。Cl⁻ 和 K⁺ 是植物中的主要无机渗透调节物质,它们无需通过代谢合成,所以也是植物体内较“廉价”的渗透调节物质^[25]。有机渗透调节物质包括丙氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、甘氨酸、甜菜碱和蔗糖等,盐胁迫下这些物质的合成显著增加^[26]。

甜菜碱是主要的有机渗透调节物质之一,参与响应多种非生物胁迫^[3,13],高盐、高温和干旱等胁迫都会诱导玉米中甜菜碱合成的增加^[27]。Yang 等^[10]利用甜菜碱含量较高及甜菜碱合成缺陷的自交系材料构建了含甜菜碱 (*Bet1/Bet1*) 和甜菜碱缺失 (*bet1/bet1*) 的近等基因系 (NILs) 材料,并对两种基因型材料在盐胁迫下的干重、叶面积扩展率、叶片含水量和碳同化率等生理指标进行测定,发现 *Bet1/Bet1* 植株的耐盐性显著高于 *bet1/bet1*,表明甜菜碱参与调控玉米的耐盐应答。水稻和小麦自交系中 *BADH* 的外显子存在插入和缺失等自然变异,导致蛋白翻译提前终止,进而使甜菜碱的合成受阻。玉米自交系群体中甜菜碱含量的差异是否与 *BADH* 的自然变异相关还未见报道。因此,鉴定导致不同玉米自交系中甜菜碱含量差异显著的自然变异位点,揭示其遗传基础,对培育抗盐玉米品种具有重要的意义。另外,游离氨基酸作为重要的有机渗透调节物质,其在胞质中积累可促进植物抗盐^[28]。Voetberg 等^[29]研究发现渗透胁迫可以诱导玉米根系分生区组织中脯氨酸的大量积累,与对照相比,脯氨酸含量增长近 10 倍。Zhang 等^[9]将 *ZmDi19-1* 在拟南芥植株中过表达,其转基因植株中的脯氨酸含量显著升高,耐盐性增强。这些研究结果表明脯氨酸积累有助于提高玉米耐盐性。

1.4 基于代谢组学分析的渗透胁迫耐受机制解析

盐胁迫下植物体内的大量次生代谢产物的含量会发生显著变化,从而适应盐胁迫环境。最近的一项研究利用基于液相色谱-质谱联用仪 (LC-MS, liquid chromatograph mass spectrometer) 的非靶向代谢组分析对 266 份玉米自交系在对照和盐胁迫下的代谢组进行了分析,检测出了 33619 个代谢物^[30]。同时,该研究利用盐胁迫处理后的叶片含水量来指示玉米对盐诱导的渗透胁迫 (SIOS) 的抗性,并对盐胁迫处理后的 404 份玉米自交系的叶片含水量进行了测定。在此基础上,该研究通过机器学习等方法鉴定到 37 个可以反映玉米 SIOS 抗性的标志代谢物 METO1~37 (Metabolite biomarker of SIOS tolerance)。以 METO 含量为表型,通过基于代谢组的全基因组关联分析 (mGWAS) 鉴定了 22 个可用于 SIOS 抗性预测的 SNP,建立了玉米的 SIOS 耐受性预测模型,并验证了柠檬酸循环的关键酶 *ZmCS3* (Citrate synthase 3)、类黄酮代谢酶 *ZmUGT* (Glucosyltransferase) 及 P450 蛋白 (Cytochrome P450 polypeptide) *ZmCYP709B2* 的功能变异与 SIOS 抗性及相关 METO 的含量变异相关。该研究还针对 *ZmCS3*、*ZmUGT* 及 *ZmCYP709B2* 的优良变异开发了分子标记,并证明了将这些优良等位基因导入骨干自交系材料 Zheng58 和 IL108 (分别为商用品种郑单 958 和先玉 335 的母本) 可显著提高其 SIOS 抗性^[30]。相关研究建立了通过代谢组学分析挖掘渗透胁迫耐受基因、改良玉米耐盐 (渗透胁迫) 的技术流程,也为改良玉米对高盐诱导的渗透胁迫的耐受性提供了理论基础和遗传材料。

2 盐胁迫下玉米的 Na⁺ 稳态调控机制

钠离子 (Na⁺) 是盐渍化土地中含量最丰富的可溶性阳离子,植物中的 Na⁺ 过量积累会引起 Na⁺ 毒害,导致植物生长发育迟缓甚至死亡^[3]。因此,维持细胞及植株水平的 Na⁺ 稳态是植物耐盐的重要途径^[24,31-32]。土壤中的 Na⁺ 主要通过非选择性的阳离子通道或高亲和 K⁺ 转运蛋白 (如: *AtHKT1*) 进入植物根细胞,由质外体或共质体途径通过内皮层进入根中柱中的木质部导管,而后随蒸腾流运输到植物地上部^[31]。植物中已有多个调控 Na⁺ 稳态的关键因子被鉴定,其中 Na⁺ 选择性转运蛋白在维持植物 Na⁺ 稳态的过程中发挥重要功能。例如,质膜 Na⁺/H⁺ 反向转运蛋白 SOS1 (Salt overly sensitive 1)

介导 Na^+ 由根向土壤中的外排^[24]; HKT1 家族 Na^+ 转运蛋白的主要功能是介导木质部导管中 Na^+ 的卸载,从而减少 Na^+ 由根向地上部的运输,降低地上部 Na^+ 含量,增强其耐盐性^[33]; 位于液泡膜上的 Na^+/H^+ 反向转运体 NHXs 通过离子区域化作用将过量的 Na^+ 储存于液泡中,从而降低胞质中的 Na^+ 浓度^[34]。这些机制协同调控组织和细胞水平的 Na^+ 稳态,增强植物的耐盐性^[3,24]。已有的研究表明, Na^+ 稳态维持也是玉米耐盐的核心生理过程,并且 Na^+ 稳态维持能力的差异是导致不同玉米自交系耐盐性差异的主要因素之一。近年来,多个与盐胁迫下玉米中 Na^+ 稳态维持相关的 QTL 基因已被克隆,它们在不同的 Na^+ 稳态维持过程中发挥作用^[7-9,12]。

2.1 玉米根部 Na^+ 外排的机制

盐处理条件下,进入根细胞的 Na^+ 大部分会被根表皮细胞以主动运输的方式重新外排到土壤溶液中,该过程主要由定位于细胞膜的 Na^+/H^+ 反向转运蛋白完成^[24,35]。拟南芥中, AtSOS1 是介导 Na^+ 外排的主要 Na^+/H^+ 反向转运蛋白,其转运活性依赖于质膜 H^+ -ATPase 维持的质子跨膜梯度,过表达 AtSOS1 可显著提高拟南芥的耐盐性^[24]。当盐胁迫来临时,胞内游离 Ca^{2+} 的浓度瞬时升高, Ca^{2+} 信号被 Ca^{2+} 结合蛋白 SOS3 感知,促进 SOS3 与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 SOS2 互作并激活 SOS2,被激活后的 SOS2 可以磷酸化 SOS1 并增强其活性,从而促进 Na^+ 稳态维持和耐盐^[36]。SOS 通路的功能已在拟南芥以外的多个物种(如:水稻和大麦)中被报道,说明 SOS 途径介导的 Na^+ 稳态调控机制在不同物种中保守存在^[37]。玉米中也存在 SOS 途径主要组分的同源基因,包括 1 个 AtSOS1 同源序列、43 个 CIPKs (Ca^{2+} independent kinase protein) 和 11 个 CBLs (Calcineurin B-like protein)^[38]。Selvakumar 等^[39]的研究发现根际微生物的定殖可能通过提高 ZmAKT2 (*Arabidopsis K⁺ channel 2*)、ZmSOS1 和 ZmSKOR (*Shaker-like outward channel*) 的表达水平维持 K^+/Na^+ 离子稳态,促进玉米耐盐。Luo 等^[40]以玉米自交系 PH6WC 和 PH4CV 为亲本构建重组自交系(RIL)群体,以株高和耐盐指数为表型进行 QTL 分析,在 Chr.1 上定位了一个主效 QTL 位点,并发现 AtSOS3 和 AtSOS1 的同源基因 (*GRMZM2G007555* 和 *GRMZM2G098494*) 位于候选区间内,推测它们是该 QTL 位点的候选基因。这些研究表明 SOS 信号通路在玉米抗盐应答的过程

中有重要的作用,寻找该途径的优良自然变异可能为培育耐盐玉米提供重要的基因资源。

拟南芥中 AtSOS1 转运 Na^+ 的活性依赖于质膜 H^+ -ATPase 维持的跨膜质子梯度^[24,36]。盐碱胁迫条件下,根际 pH 过高会破坏跨膜质子梯度,使 Na^+/H^+ 反向转运体的活性降低,加剧 Na^+ 在胞质中积累^[24]。有研究表明盐碱胁迫(高浓度的 NaHCO_3)也会导致 Na^+ 在玉米中的过量积累^[12,41]。Cao 等^[12]通过 GWAS 分析克隆了一个调控盐碱胁迫下玉米叶片中 Na^+ 含量的 QTL 基因 ZmNSAI (*Na⁺ content under saline-alkaline condition 1*),它编码一个含有 EF-hand 的 Ca^{2+} 结合蛋白。在盐碱胁迫条件下,ZmNSAI 功能缺失突变体的地上部 Na^+ 含量显著低于野生型,突变体相较野生型耐盐碱性增强,相反,ZmNSAI 过表达植株则表现出对盐胁迫超敏感的表型。这些研究表明 ZmNSAI 是玉米盐碱胁迫应答的负调控因子。后续研究发现 ZmNSAI 3'-UTR 上的一个 4 bp 缺失导致了 ZmNSAI mRNA 翻译效率降低,ZmNSAI 蛋白丰度降低,从而促进玉米耐盐碱。含有该缺失的 ZmNSAI 等位基因为改良玉米的耐盐碱性提供了基因资源。进一步的研究初步解析了 ZmNSAI 参与调控盐碱胁迫应答的机制,即:(1)盐碱胁迫下,胞内 Ca^{2+} 浓度升高, Ca^{2+} 与 ZmNSAI 结合并促使其通过 26S 蛋白酶体途径降解;(2)ZmNSAI 的降解导致质膜 H^+ -ATPase 基因 (*MHA2* 和 *MHA4*) 的转录水平增加,从而增强质膜 H^+ -ATPase 的功能,促进根系 H^+ 外排和跨膜 H^+ 梯度维持;(3)跨膜 H^+ 梯度的维持促进质膜 Na^+/H^+ 反向转运体的功能,从而促进 Na^+ 稳态和玉米耐盐碱(图 2A)。

2.2 玉米木质部导管 Na^+ 卸载的机制

减少 Na^+ 在地上部的积累对增强植物的耐盐性至关重要,将木质部汁液中过量的 Na^+ 转运到周围薄壁细胞中是降低地上部 Na^+ 含量的重要生理过程^[7-8]。拟南芥、水稻、小麦等多种植物中的群体遗传研究表明,地上部 Na^+ 含量的差异主要是由 HKT1 (High-affinity K^+ transporter) 家族蛋白功能变异导致,这些 HKT1 家族成员具有 Na^+ 转运活性,它们通过介导木质部导管的 Na^+ 卸载来减少 Na^+ 在地上部的积累^[42-43]。Zhang 等^[7]的研究表明,ZmHKT1 的功能变异是导致玉米自交系 Zheng58 和 Chang7-2 地上部 Na^+ 含量差异显著的主要原因。该研究发现,盐胁迫条件下,Chang7-2 对盐胁迫更敏感,地上部的 Na^+ 含量显著高于 Zheng58。通过

QTL 分析鉴定了调控盐胁迫下地上部 Na^+ 含量的 QTL 位点 *ZmNC1* (*Na⁺ content 1*), 其候选基因为 *HKT1* 家族基因 *ZmHKT1*。该研究还发现 *Chang7-2* 的 *ZmHKT1* 外显子中存在一个 Gypsy 家族长末端重复序列 LTR 反转录转座子插入, 该插入导致了 *ZmHKT1* 翻译提前终止, 从而导致了 *Chang7-2* 的盐胁迫超敏感表型。*ZmHKT1* 主要在根的中柱及周围薄壁细胞中表达, 编码膜定位的 Na^+ 离子转运蛋白, 其突变体在盐胁迫下木质部汁液和地上部的 Na^+ 含量显著高于野生型。这些研究结果表明 *ZmHKT1* 通过将木质部导管中的 Na^+ 转运到周围薄壁细胞中来减少 Na^+ 由根向地上部的运输, 从而减少了 Na^+ 在地上部的积累, 促进玉米抗盐 (图 2B)。*ZmHKT1* 的优异等位基因也为创制耐盐玉米新种质提供了基因资源。

HAK (High-affinity K^+)/KUP/KT 家族离子转运蛋白是一类最早在真菌中发现的、具有高亲和钾转运活性的蛋白^[44]。在拟南芥和水稻中, HAK/KUP/KT 家族转运蛋白参与了根部 K^+ 吸收及由根往地上部的 K^+ 长距离运输^[45]。Zhang 等^[8] 在玉米中鉴定到一个 Na^+ 选择性的 HAK/KUP/KT 家族转运蛋白 *ZmHAK4*, 它参与调控玉米木质部 Na^+ 卸载。该研究以盐处理下地上部的 Na^+ 含量为表型指标, 通过 GWAS 分析鉴定到一个调控地上部 Na^+ 含量的主效位点, 并将其命名为 *ZmNC2* (*Na⁺ content 2*), 其候选基因编码 HAK 家族的离子转运蛋白 *ZmHAK4*。玉米自然群体中, *ZmHAK4* 内含子中的一个 12586 bp

插入导致其转录水平降低, 地上部 Na^+ 含量增加。盐胁迫条件下, *ZmHAK4* 功能缺失的突变体相较野生型地上部 Na^+ 含量显著增加, 表现出对盐胁迫超敏感表型。*ZmHAK4* 主要在根中柱中表达, 编码一个膜定位的 Na^+ 选择性离子转运蛋白, 推测 *ZmHAK4* 通过将木质部导管中的 Na^+ 转运到周围薄壁细胞中来减少 Na^+ 由根向地上部的运输, 降低地上部的 Na^+ 含量, 促进玉米抗盐, 这与 *ZmHKT1* 的作用机制类似 (图 2B)。该研究还发现小麦、水稻等作物中都存在 *ZmHAK4* 的直系同源基因, 表明 *ZmHAK4* 及其直系同源基因可能介导了一种进化上保守的 Na^+ 稳态维持机制。

综上所述, 玉米木质部导管 Na^+ 卸载是盐胁迫下 Na^+ 稳态维持的关键生理过程之一, 分属不同家族的 Na^+ 选择性离子转运蛋白 (*ZmNC1/ZmHKT1* 和 *ZmNC2/ZmHAK4*) 在玉米木质部导管 Na^+ 卸载中协同发挥作用。在育种过程中, 可将 *ZmNC1/ZmHKT1* 和 *ZmNC2/ZmHAK4* 的优异等位基因导入高产玉米中, 培育耐盐玉米新种质。

2.3 玉米中 Na^+ 的区隔化

Na^+ 的区隔化是使植物免于 Na^+ 毒害的重要途径。组织水平上, 植物会通过组织间转运将 Na^+ 储存在 Na^+ 耐受性强的组织中; 细胞水平上, Na^+ 会被区隔化到液泡中, 从而降低胞质的 Na^+ 浓度^[24]。James 等^[46] 发现小麦耐盐 QTL *Nax1* 能够促进 Na^+ 转运到叶鞘的木质部组织中, 从而降低叶片中的 Na^+ 含量。水稻 *OsHKT1; 1* 主要在叶鞘组

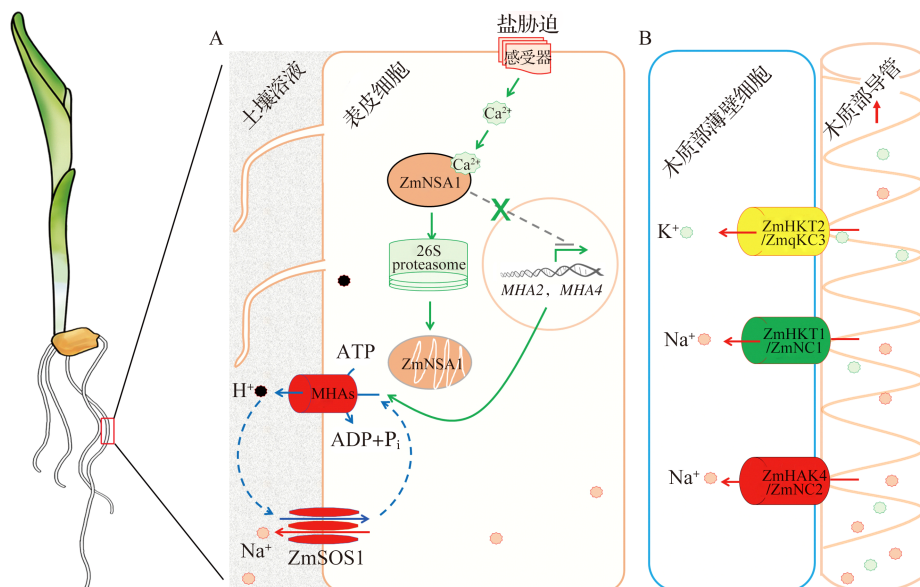


图 2 *ZmNC1*、*ZmNC2*、*ZmNSA1* 及 *ZmqKC3* 调控离子稳态的模式图

Fig.2 The model of Na^+ and K^+ homeostasis mediated by *ZmNC1*, *ZmNC2*, *ZmNSA1* and *ZmqKC3*

织的木质部和韧皮部中表达,盐处理条件下,突变体材料木质部和韧皮部汁液中 Na^+ 含量均显著增加,暗示 *OsHKT1*;1 在木质部 Na^+ 卸载及 Na^+ 进入韧皮部的过程中均发挥作用^[47]。玉米叶片对盐胁迫敏感,在盐胁迫下,玉米倾向于将过量的 Na^+ 转运到茎和叶鞘组织中,以减少 Na^+ 在叶片中的积累^[48]。拟南芥位于液泡膜上的 Na^+/H^+ 反向转运蛋白 *NHX1* (Na^+/H^+ exchanger 1) 可以将胞质中过量的 Na^+ 通过离子区域化作用储存到液泡中,且其转运活性依赖于液泡跨膜质子梯度^[34]。玉米 *NHX* 家族共有 6 个成员 (*ZmNHX1~6*),部分基因的表达水平受盐胁迫诱导上调^[49],这些 *NHXs* 家族的 Na^+/H^+ 反向转运蛋白可能具有与拟南芥同源蛋白相似的功能,参与 Na^+ 区隔化到液泡的过程。

3 盐胁迫下玉米中的 K^+ 稳态调控

钾 (K) 是植物必需的大量元素,它与许多重要生命活动过程密切相关。盐处理条件下,拟南芥根部细胞质中的 K^+ 含量迅速下降,增加胞内 K^+ 含量可以显著增强植物的耐盐性^[50]。植物中 K^+ 含量主要由 K^+ 转运蛋白(如: *AKT1*, *Arabidopsis K⁺ channel 1*) 或 *KORC* (*Shaker-like outward channel*) 通道介导的 K^+ 吸收和外排调控,它们参与胞内 K^+ 的稳态维持,并受跨膜电位梯度调控,盐胁迫会破坏跨膜电位、诱导膜去极化,进而抑制 K^+ 转运蛋白的活性,使胞内 K^+ 含量降低^[50]。目前,拟南芥和水稻等植物中已有报道,离子转运蛋白(如: *AtKUP* (K^+ uptake permease)、*OsHAK1*、*OsHAK5* 和 *OsAKT1* 等)通过参与 K^+ 在木质部的装载调控 K^+ 的长距离运输,进而影响地上部的 K^+ 含量和植株的耐盐性^[51]。玉米杂交材料先锋 32B33 和先锋 30Y87 具有较高 K^+ 含量和 K^+/Na^+ 比,并且表现出更强的盐耐受性^[52],表明 K^+ 稳态调控在玉米耐盐应答中具有重要作用。

部分植物 *HKT2* 家族成员具有 K^+ 转运活性^[3,53]。玉米中的 *ZmHKT2* 编码一个 *HKT* 家族离子转运蛋白(图 2B)。Cao 等^[11]以盐胁迫下地上部 K^+ 含量为表型,测定亲本为 W22 和大乌草的 RIL 群体地上部 K^+ 含量,通过 QTL 分析发现 *ZmHKT2* 的功能变异与盐胁迫下地上部 K^+ 含量显著相关。玉米自交系 W22 中 *ZmHKT2* 的 K^+ 转运活性显著低于大乌草,该活性差异是由一个单碱基差异 (SNP389) 导致的。进一步研究发现 *ZmHKT2* 负调控盐胁迫下地上部 K^+ 含量和玉米的耐盐性,其突变体表现

出耐盐性增强的表型。*ZmHKT2* 为通过基因编辑培育耐盐玉米材料提供了一个基因操作靶点。

4 盐胁迫下玉米中的 Cl^- 稳态调控

4.1 玉米对高浓度的 Cl^- 敏感

氯离子作为植物必需的营养物质,在正常生长条件下参与玉米的气孔运动、细胞膨压维持和光合作用等多种生理过程^[54-56]。 Cl^- 也是盐渍化土地中含量较高的阴离子,盐胁迫条件下,植物过量吸收 Cl^- 后会导致离子毒害。因此, Cl^- 稳态维持是许多植物响应盐胁迫的重要生理过程^[57]。Sun 等^[58]在研究胡杨抗盐机制时发现,耐盐株系根部表皮细胞中的 Cl^- 外排活性显著高于敏感株系,说明植物根部 Cl^- 外排对降低 Cl^- 毒害具有重要作用。同时,定位于液泡膜的 Cl^- 转运蛋白通过将 Cl^- 转运到液泡中降低胞质中 Cl^- 的浓度,维持胞内离子稳态。大麦中的研究发现 Cl^- 的分布具有一定的组织特异性,主要集中在表皮细胞而不是叶肉细胞^[59]。玉米对高浓度的 Cl^- 也比较敏感,探究玉米中 Cl^- 稳态维持的分子机制具有重要的理论实践意义。

Cl^- 转运蛋白是 Cl^- 稳态维持机制的重要组成部分,目前发现多个离子转运蛋白家族的成员具有 Cl^- 转运活性,包括:硝酸盐转运体/肽转运蛋白 (*NPF*, nitrate transporter/peptide transporter protein)、慢型阴离子通道相关同系物 (*SLAH*, slow-type anion channel associated homolog)、氯离子通道 (*CLCs*, chloride channels)、铝激活的苹果酸转运蛋白 (*ALMTs*, aluminium-activated malate transporters)、阳离子/氯离子共转运蛋白 (*CCCs*, cation/chloride cotransporters) 和多药及毒素化合物外排蛋白 (*MATEs/DTXs*, multidrug and toxic compound extrusion transporters)^[60-61]。这些转运蛋白协同调控 Cl^- 的吸收、转运、区隔化等生理过程^[62-65]。玉米中存在这些 Cl^- 转运蛋白的同源蛋白,其中部分成员已被证明具有 Cl^- 转运活性,它们可能与盐胁迫条件下的 Cl^- 稳态维持密切相关。

4.2 玉米中的 Cl^- 转运蛋白

4.2.1 多肽转运蛋白 (*NPFs*) 拟南芥中的 Cl^- 转运蛋白 *AtNPF2.4* 参与调控 Cl^- 在木质部中的卸载过程,*AtNPF2.4* 主要在主根和侧根维管束中表达,其转录水平在盐处理后显著下调,盐胁迫下 *Atnfp2.4* 突变体地上部的 Cl^- 含量显著低于野生型^[66]。*AtNPF2.4* 的同源蛋白 *AtNPF2.5* 也参与调控 Cl^- 稳态,外界 Cl^- 浓度较高时,*AtNPF2.5* 可以促进根部

的 Cl^- 外排, 且其转录水平受盐胁迫诱导显著上调, 过表达 *AtNPF2.5* 会导致植株中积累过量的 Cl^- , 表现出盐敏感的表型^[57]。在玉米中, *ZmNPF6.4* 和 *ZmNPF6.6* 参与调控根中 NO_3^- 和 Cl^- 的转运, *ZmNPF6.6* 是一个高亲和性的 NO_3^- 转运体, 同时具有低亲和的 Cl^- 转运活性。当 NO_3^- 浓度较低时, *ZmNPF6.6* 主要转运 Cl^- , 且其转运 Cl^- 的能力会受到 NO_3^- 的强烈抑制, 这可能与 NO_3^- 占据了底物结合位点有关^[66-67]。*ZmNPF6.4* 是一种高亲和性的 Cl^- 转运蛋白, 且其转运 Cl^- 的活性不受 NO_3^- 抑制。*ZmNPF6.4* 和 *ZmNPF6.6* 对 Cl^- 或 NO_3^- 的转运亲和性与一个氨基酸的改变相关。*ZmNPF6.4* 第 370 位氨基酸为一个酪氨酸残基, 使其具有高亲和的 Cl^- 转运活性, 将酪氨酸突变成组氨酸 (Y370H) 时, *ZmNPF6.4* 的 NO_3^- 的转运活性显著增强。上述结果说明, 玉米中的 NPF 家族蛋白参与调控 Cl^- 的转运, 进一步研究 *ZmNPF6.4*、*ZmNPF6.6* 及其他 NPF 家族成员的生理功能对阐明玉米响应高浓度 Cl^- 胁迫的机制具有重要意义^[67]。

4.2.2 慢型阴离子通道相关同源物 (SLAH) 拟南芥中, SLAH 家族成员 *AtSLAH1* 和 *AtSLAH3* 被报道参与调控 Cl^- 由根向地上部的长距离运输。盐胁迫条件下, *slah1* 和 *slah3* 突变体地上部的 Cl^- 含量显著低于野生型。*AtSLAH1* 是一个 Cl^- 转运蛋白, 调控 Cl^- 在木质部中的卸载过程。*AtSLAH3* 是一个 NO_3^- 转运蛋白, 它可与 *AtSLAH1* 互作形成异源三聚体, 增强 *AtSLAH1* 的 Cl^- 转运活性, 共同调控 Cl^- 由根往地上部的运输^[68-69]。拟南芥中的 *SLAC1* 对 NO_3^- 的渗透性较高, 对 Cl^- 的渗透性较低, 其在调节气孔运动的过程中具有重要的作用^[70]。玉米中 *AtSLAC1* 的同源蛋白已被鉴定, 它具有 NO_3^- 转运活性, 但不具有 Cl^- 转运活性。*ZmSLAC1* 突变体的气孔运动对 ABA 和盐处理不敏感, 说明 *ZmSLAC1* 通过调控 NO_3^- 的转运影响气孔运动^[71]。目前, 玉米中其他 SLAH 家族成员是否具有 Cl^- 转运活性还不清楚, 它们是否参与玉米盐胁迫应答也有待研究。

4.2.3 氯离子通道蛋白 (CLCs) CLC 家族成员数量较多, 不同的 CLC 转运蛋白亚细胞定位存在差异。例如, *AtCLCa*、*AtCLCb*、*AtCLCc* 和 *AtCLCg* 定位于液泡膜, *AtCLCd* 和 *AtCLCf* 定位于高尔基体, 而 *AtCLCe* 则定位于叶绿体。已有的研究表明 CLC 家族成员具有调节细胞膨压、调控气孔运动、参与营养物质运输和调控金属离子耐受性等方面的作

用, 其中 *AtCLCa*、*AtCLCc* 和 *AtCLCg* 通过介导 Cl^- 往液泡中的转运调控拟南芥的气孔运动^[62, 65, 72]。Luo 等^[73] 通过全基因组关联分析发现 *ZmCLCg* (*GRMZM2G071119*) 与盐胁迫下玉米的生长相关, 盐胁迫下该基因的功能缺失突变体地上部 Cl^- 含量显著高于野生型, 表明 *ZmCLCg* 可能在 Cl^- 长距离运输调控中发挥作用。

4.2.4 铝激活的苹果酸转运蛋白 (ALMTs) 拟南芥 ALMT 家族转运蛋白主要定位于质膜或液泡膜, 参与多种生理过程^[74-77]。如: 在高浓度 Al^{3+} 胁迫条件下, Al^{3+} 结合 *AtALMT1* 和 *TaALMT2* 后可激活其苹果酸外排活性, 从而增强对 Al^{3+} 毒害的耐受性^[75, 78]。*AtALMT9* 主要在维管组织中表达, 其转录水平受盐诱导上调, 盐处理条件下, *almt9* 突变体地上部 Cl^- 含量显著低于野生型^[74]。ALMT 家族转运蛋白也参与气孔运动调控、阴离子稳态维持和种子发育等生理过程。玉米 *ZmALMT1* 具有转运苹果酸、柠檬酸、 Cl^- 、 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 的活性^[65]。*ZmALMT2* 也具有阴离子 (如: Cl^- 、 NO_3^- 等) 转运活性, 且在外界 Al^{3+} 浓度较高的条件下参与苹果酸盐和 NO_3^- 的转运^[63]。鉴于多个玉米 ALMT 蛋白均具有转运 Cl^- 的能力, 它们也可能参与盐胁迫下的 Cl^- 稳态维持, 但相关假设还有待实验结果的支持。

4.2.5 多药和有毒化合物排出家族转运蛋白 (MATE) MATE 家族转运蛋白和 ALMT 家族蛋白功能类似, 主要通过转运苹果酸盐和柠檬酸盐响应铝离子毒害^[60, 79-80]。同时, 有多个 MATE 家族转运蛋白被报道具有 Cl^- 转运活性。例如, 拟南芥 MATE 家族成员 *AtDTX33* 和 *AtDTX35* 定位于根毛和保卫细胞的液泡膜上, 在干旱胁迫下主要通过调控 Cl^- 的外排维持细胞膨压, 增强植物的抗旱性^[60]。玉米中有 49 个编码 MATE 家族转运蛋白的基因^[81], 其中 *ZmMATE1* 和 *ZmMATE2* 是参与调控 Al^{3+} 毒害耐受性的 QTL 候选基因^[82-83], 它们具有柠檬酸盐和苹果酸盐的转运活性, 但没有 Cl^- 转运活性^[83]。玉米中 MATE 家族蛋白参与调控 Cl^- 稳态的机制及其与盐胁迫应答的关系还有待研究。

4.2.6 阳离子 / 氯离子共转运蛋白 (CCCs) CCCs 家族蛋白是阳离子 / 氯离子共转运蛋白, 根据偶联的阳离子种类可分为 3 类: Na^+ - Cl^- 共转运蛋白 (NCC)、 K^+ - Cl^- 共转运蛋白 (KCC) 和 Na^+ - K^+ - Cl^- 共转运蛋白 (NKCC)^[84]。拟南芥中的 *AtCCC* 编码一个 Na^+ - K^+ - Cl^- 共转运蛋白 (NKCC), 与野生型相比, *Atccc* 突变体植株地上部 Cl^- 含量较高, 而根部

Cl⁻含量较低,说明 AtCCC 可能参与调控 Cl⁻由根向地上部的运输^[85]。玉米中 CCCs 家族蛋白是否参与调控 Cl⁻稳态和盐胁迫应答还有待研究。

5 其他玉米耐盐基因的鉴定

除了上述的耐盐基因,玉米中的多个 GWAS

分析还鉴定了一系列可能与玉米耐盐相关的候选基因(表1)。例如,Luo等^[86]通过 GWAS 分析鉴定出了 57 个与耐盐性显著相关的 QTLs,共有 47 个候选基因,在拟南芥中过表达某些候选基因(如: *SAG4* (*GRMZM2G077295*) 和 *SAG6* (*GRMZM2G106056*)) 可以显著增强拟南芥的抗盐性。

表 1 已报道的玉米耐盐基因列表

Table 1 The list of the salt-tolerance-associated genes in maize

名称 Gene	基因编号 Gene ID	基因注释 Annotation	克隆方式 Cloning method	遗传验证 Genetic evidence	参考文献 Reference
<i>ZmCS3</i>	<i>GRMZM2G063909</i>	柠檬酸合酶 3	mGWAS	玉米	[30]
<i>ZmUGT</i>	<i>GRMZM2G383404</i>	葡萄糖基转移酶	mGWAS	玉米	[30]
<i>ZmCYP709B2</i>	<i>GRMZM2G148969</i>	P450 家族 709 亚家族 B 多肽 2	mGWAS	玉米	[30]
<i>ZmSOS1</i>	<i>GRMZM2G098494</i>	Na ⁺ /H ⁺ 反向转运体,	连锁分析	—	[40]
<i>ZmSOS3</i>	<i>GRMZM2G007555</i>	CBL 蛋白家族成员	连锁分析	—	[40]
<i>ZmNSA1</i>	<i>GRMZM2G000397</i>	EF-hand 蛋白家族成员	GWAS	玉米	[12]
<i>ZmHKT1</i>	<i>GRMZM2G047616</i>	HKT1 家族转运体	连锁分析	玉米	[7]
<i>ZmHKT2</i>	<i>GRMZM2G135674</i>	HKT2 家族转运体	连锁分析	玉米	[11]
<i>ZmHAK4</i>	<i>GRMZM2G425999</i>	HAK 家族转运体	GWAS	玉米	[8]
<i>ZmSAG4</i>	<i>GRMZM2G077295</i>	COP II 复合体 SEC23 蛋白	GWAS	拟南芥	[86]
<i>ZmSAG6</i>	<i>GRMZM2G106056</i>	双链断裂修复蛋白 MRE11	GWAS	拟南芥	[86]
<i>ZmDi19-1</i>	<i>GRMZM2G014066</i>	干旱诱导蛋白家族	—	拟南芥	[9]
<i>ZmNPF6.4</i>	<i>GRMZM2G086496</i>	NPF 家族转运体	—	玉米	[67]
<i>ZmALMT1</i>	<i>DQ358745</i>	ALMT 家族转运体	—	玉米	[65]
<i>ZmALMT2</i>	<i>GRMZM5G858653</i>	ALMT 家族转运体	—	玉米	[63]
<i>ZmCLCg</i>	<i>GRMZM2G071119</i>	CLC 家族转运体	GWAS	玉米	[73]
<i>ZmPMP3</i>	<i>GRMZM2G477325</i>	PMP 蛋白家族成员	GWAS	玉米	[73]

Xie等^[87]通过 GWAS 分析,鉴定到了 8 个与盐胁迫下植株高度和生物量变化相关的 QTLs,耐盐自交系和盐敏感自交系中候选基因(*GRMZM2G158568*、*LOC103631163*、*LOC100280148* 和 *LOC103651154*) 的转录水平存在显著差异。Sandhu等^[88]以 6 个与地上部和根系生长相关的性状为表型,通过 GWAS 分析鉴定到一些可能与玉米耐盐性相关的候选基因。Luo等^[73]利用玉米自交系群体,对 27 个盐相关性状进行 GWAS 分析,鉴定到 83 个耐盐相关的 QTLs,并对其中的 *GRMZM2G071119* 和 *GRMZM2G477325* 的突变体材料进行盐胁迫下表型分析,结果显示突变体对盐胁迫更加敏感。上述这些候选基因的功能大多还有待验证,相关作用机制也有待研究。

6 耐盐玉米培育过程中亟待解决的问题

近年来,玉米耐盐分子机制的研究取得了多方面进展,通过 GWAS、QTL 等方法克隆了多个与玉米耐盐相关的 QTL 基因,例如,调控盐和盐碱胁迫条件下玉米 Na⁺ 稳态的 *ZmHKT1*、*ZmHAK4* 和 *ZmNSA1*,维持 K⁺/Na⁺ 平衡的 *ZmHKT2*,以及参与调控盐诱导的渗透胁迫的 *ZmCS3*、*ZmUGT* 和 *ZmCYP709B2* 等。这些基因的鉴定和作用机制解析增进了我们对玉米耐盐分子机制的认识,也为耐盐玉米品种的培育提供了基因资源和筛选靶点。与此同时,利用反向遗传学手段也鉴定到一些可能参与玉米耐盐应答的基因,例如,调控盐胁迫下 Cl⁻ 转运的 *ZmNPF6.4*、*ZmNPF6.6* 和 *ZmSLAH1* 等。但由

于玉米耐盐性是一个由多基因控制的复杂性状,因此,培育商业化的高产耐盐玉米品种仍任重道远,现阶段的任务包括但不限于以下几个方面。

(1) 不同玉米自交系对高浓度 Na^+ 、 Cl^- 及盐诱导的渗透胁迫的耐受性存在显著差异,但目前仅有少数 QTL 基因被鉴定,系统挖掘耐盐 QTL 基因、解析其作用机制仍是当前玉米耐盐研究的重要任务。

(2) 玉米盐胁迫应答是一个复杂的生理过程,将来的研究需要借助多组学分析等策略系统挖掘耐盐关键因子、构建玉米耐盐调控网络,从而为耐盐玉米的全基因组选择育种奠定基础。

(3) 对拟南芥几十年的研究已鉴定出了一系列重要的耐盐基因,利用反向遗传学方法研究这些基因在玉米中的同源基因的耐盐功能,将加速玉米耐盐应用基础研究的进程。

(4) 商业化的玉米品种大多数是杂交种,但目前的玉米耐盐分子机制研究大多以自交系为材料,将来的研究需要考虑玉米耐盐性的杂种优势,这对培育商业化耐盐玉米品种尤为重要。

参考文献

- [1] 赵久然,王帅,李明,吕慧颖,王道文,葛毅强,魏珣,杨维才. 玉米育种行业创新现状与发展趋势. 植物遗传资源学报, 2018, 19(3): 435-446
Zhao J R, Wang S, Li M, Lv H Y, Wang D W, Ge Y Q, Wei X, Yang W C. Current status and perspective of maize breeding. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(3): 435-446
- [2] Schnable J C. Genome evolution in maize: from genomes back to genes. Annual Review of Plant Biology, 2015, 66: 329-343
- [3] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 651-681
- [4] Nadeem M, Li J, Yahya M, Wang M, Ali A, Cheng A, Wang X, Ma C. Grain legumes and fear of salt stress: focus on mechanisms and management strategies. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(4): 799
- [5] Zhao C, Zhang H, Song C, Zhu J K, Shabala S. Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity. The Innovation, 2020, 1(1): 1-41
- [6] Gao Y, Lu Y, Wu M Q, Liang E X, Li Y, Zhang D P, Yin Z T, Ren X Y, Dai Y, Deng D X, Chen J M. Ability to remove Na^+ and retain K^+ correlates with salt tolerance in two maize inbred lines seedlings. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1716
- [7] Zhang M, Cao Y, Wang Z, Wang Z Q, Shi J, Liang X Y, Song W, Chen Q, Lai J S, Jiang C F. A retrotransposon in an HKT1 family sodium transporter causes variation of leaf Na^+ exclusion and salt tolerance in maize. New Phytologist, 2018, 217(3): 1161-1176
- [8] Zhang M, Liang X Y, Wang L, Cao Y B, Song W, Shi J, Lai J S, Jiang C F. A HAK family Na^+ transporter confers natural variation of salt tolerance in maize. Nature Plants, 2019, 5(12): 1297-1308
- [9] Zhang X, Cai H, Lu M, Wei Q, Xu L, Bo C, Ma Q, Zhao Y, Cheng B. A maize stress-responsive Di19 transcription factor, *ZmDi19-1*, confers enhanced tolerance to salt in transgenic *Arabidopsis*. Plant Cell Reports, 2019, 38(12): 1563-1578
- [10] Yang W J, Nadolska-Orczyk A, Wood K V, Hahn D T, Rich P J, Wood A J, Saneoka H, Premachandra G S, Bonham C C, Rhodes J C, Joly R J, Samaras Y, Goldsbrough P B, Rhodes D. Near-isogenic lines of maize differing for glycinebetaine. Plant Physiology, 1995, 107(2): 621-630
- [11] Cao Y B, Liang X Y, Yin P, Zhang M, Jiang C F. A domestication-associated reduction in K^+ -preferring HKT transporter activity underlies maize shoot K^+ accumulation and salt tolerance. New Phytologist, 2019, 222(1): 301-317
- [12] Cao Y B, Zhang M, Liang X Y, Li F, Shi Y, Yang X, Jiang C F. Natural variation of an EF-hand Ca^{2+} -binding-protein coding gene confers saline-alkaline tolerance in maize. Nature Communications, 2020, 11(1): 186
- [13] Muhammad F, Mubshar H, Abdul W, Kadambot H M. Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms, and management. Agronomy for Sustainable Development, 2015, 35: 461-481
- [14] Mittal S, Mallikarjuna M G, Rao A R, Jain P A, Dash P K, Thirunavukkarasu N. Comparative analysis of CDPK family in maize, *Arabidopsis*, rice, and sorghum revealed potential targets for drought tolerance improvement. Frontiers in Chemistry, 2017, 5: 115
- [15] Zhang F, Li L, Jiao Z, Chen Y, Liu H, Chen X, Fu J, Wang G, Zheng J. Characterization of the calcineurin B-Like (CBL) gene family in maize and functional analysis of *ZmCBL9* under abscisic acid and abiotic stress treatments. Plant Science, 2016, 253: 118-129
- [16] Yuan F, Yang H, Xue Y, Kong D, Ye R, Li C, Zhang J, Theprungsirikul L, Shrift T, Krichilsky B, Johnson D M, Swift G B, He Y, Siedow J N, Pei Z M. OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca^{2+} increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. Nature, 2014, 514(7522): 367-371
- [17] Liu Z, Ma Z, Guo X, Shao H, Cui Q, Song W. Changes of cytosolic Ca^{2+} fluorescence intensity and plasma membrane calcium channels of maize root tip cells under osmotic stress. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(10-11): 860-865
- [18] Munemasa S, Hauser F, Park J, Waadt R, Brandt B, Schroeder J I. Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. Current Opinion in Plant Biology, 2015, 28: 154-162
- [19] Sah S K, Reddy K R, Li J. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 571
- [20] Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. Current Opinion in Plant Biology, 2014, 21: 133-139
- [21] Yu Z, Duan X, Luo L, Dai S, Ding Z, Xia G. How plant hormones mediate salt stress responses. Trends in Plant Science, 2020, 25(11): 1117-1130
- [22] Bahrn A, Jensen C R, Asch F, Mogensen V O. Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition, and ABA concentration act as early signals in field-grown maize (*Zea mays* L.). Journal of Experimental Botany, 2002, 367(53):

- 251-263
- [23] Hu X, Li N, Wu L, Li C, Li C, Zhang L, Liu T, Wang W. Quantitative iTRAQ-based proteomic analysis of phosphoproteins and ABA-regulated phosphoproteins in maize leaves under osmotic stress. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15626
- [24] Yang Y Q, Guo Y. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytologist*, 2018, 217(2): 523-539
- [25] Sanders D. Physiological control of chloride transport in chara corallina; II. The role of chloride as a vacuolar osmoticum. *Plant Physiology*, 1981, 68(2): 401-406
- [26] Rodriguez H G, Roberts J, Jordan W R, Drew M C. Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiology*, 1997, 113(3): 881-893
- [27] Brunk D G, Rich P J, Rhodes D. Genotypic variation for glycine betaine among public inbreds of maize. *Plant Physiology*, 1989, 91(3): 1122-1125
- [28] Chyzykova O A, Palladina T O. The role of amino acids and sugars in supporting of osmotic homeostasis in maize seedlings under salinization conditions and treatment with synthetic growth regulators. *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal*, 2006, 78(1): 124-129
- [29] Voetberg G S, Sharp R E. Growth of the maize primary root at low water potentials: III. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiology*, 1991, 96(4): 1125-1130
- [30] Liang X, Liu S, Wang T, Li F, Cheng J, Lai J, Qin F, Li Z, Wang X, Jiang C. Metabolomics-driven gene mining and genetic improvement of tolerance to salt-induced osmotic stress in maize. *New Phytologist*, 2021, 230(6): 2355-2370
- [31] Fang S, Hou X, Liang X. Response mechanisms of plants under saline-alkali stress. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 667458
- [32] 刘凯, 朱静雯, 宛柏杰, 代金英, 唐红生, 孙明法. 水稻耐盐性分子遗传研究进展. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(4): 881-889
- Liu K, Zhu J W, Wan B J, Dai J Y, Tang H S, Sun M F. Research progress on molecular genetics of rice salt tolerance. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(4): 881-889
- [33] Moller I S, Gilliam M, Jha D, Mayo G M, Roy S J, Coates J C, Haseloff J, Tester M. Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2009, 21(7): 2163-2178
- [34] Apse M P, Sottosanto J B, Blumwald E. Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of *AtNHX1*, the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *The Plant Journal*, 2003, 36(2): 229-239
- [35] Roberts S K, Tester M. A patch clamp study of Na⁺ transport in maize roots. *Journal of Experimental Botany*, 1997, 48: 431-440
- [36] Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu J K. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(12): 6896-6901
- [37] Nadeem M, Li J, Yahya M, Wang M, Ali A, Cheng A, Wang X, Ma C. Grain legumes and fear of salt stress: focus on mechanisms and management strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(4): 799
- [38] Chen X, Gu Z, Xin D, Hao L, Liu C, Huang J, Ma B, Zhang H. Identification and characterization of putative *CIPK* genes in maize. *Journal of Genetics and Genomics*, 2011, 38(2): 77-87
- [39] Selvakumar G, Shagol C C, Kim K, Han S, Sa T. Spore associated bacteria regulates maize root K⁺/Na⁺ ion homeostasis to promote salinity tolerance during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 109
- [40] Luo M, Zhao Y, Zhang R, Xing J, Duan M, Li J, Wang N, Wang W, Zhang S, Chen Z, Zhang H, Song W, Zhao J. Mapping of a major QTL for salt tolerance of mature field-grown maize plants based on SNP markers. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 140
- [41] Guo R, Shi L, Yan C, Zhong X, Gu F, Liu Q, Xia X, Li H. Ionic and metabolic responses to neutral salt or alkaline salt stresses in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 41
- [42] Munns R, James R A, Xu B, Athman A, Conn S J, Jordans C, Byrt C S, Hare R A, Tyerman S D, Tester M, Plett D, Gilliam M. Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(4): 360-364
- [43] Ren Z H, Gao J P, Li L G, Cai X L, Huang W, Chao D Y, Zhu M Z, Wang Z Y, Luan S, Lin H X. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics*, 2005, 37(10): 1141-1146
- [44] Li W, Xu G, Alli A, Yu L. Plant HAK/KUP/KT K⁺ transporters: Function and regulation. *Seminars in Cell and Development Biology*, 2018, 74: 133-141
- [45] Rubio F, Nieves-Cordones M, Aleman F, Martinez V. Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. *Plant Physiology*, 2008, 134(4): 598-608
- [46] James R A, Davenport R J, Munns R. Physiological characterization of two genes for Na⁺ exclusion in durum wheat, *Nax1* and *Nax2*. *Plant Physiology*, 2006, 142(4): 1537-1547
- [47] Ismail A M, Horie T. Genomics, physiology, and molecular breeding approaches for improving salt tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 2017, 68: 405-434
- [48] Wang R, Jing W, Xiao L, Jin Y, Shen L, Zhang W. The rice high-affinity potassium transporter1; 1 is involved in salt tolerance and regulated by an MYB-type transcription factor. *Plant Physiology*, 2015, 168(3): 1076-1090
- [49] Zorb C, Noll A, Karl S, Leib K, Yan F, Schubert S. Molecular characterization of Na⁺/H⁺ antiporters (*ZmNHX*) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162(1): 55-66
- [50] Shabala S, Pottosin I. Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Plant Physiology*, 2014, 151(3): 257-279
- [51] Very A A, Sentenac H. Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54: 575-603

- [52] Akram M, Malik M A, Ashraf M Y, Saleem M F, Hussain M. Competitive seedling growth and K^+/Na^+ ratio in different maize (*Zea mays* L.) hybrids under salinity stress. *Pakistan Journal of Botany*, 2007, 48 (39): 2553-2563
- [53] Yao X, Horie T, Xue S, Leung H Y, Katsuhara M, Brodsky D E, Wu Y, Schroeder J I. Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice OsHKT2; 1 and OsHKT2; 2 transporters in plant cells. *Plant Physiology*, 2010, 152 (1): 341-355
- [54] Wege S, De Angeli A, Droillard M J, Kroniewicz L, Merlot S, Cornu D, Gambale F, Martinoia E, Barbier-Brygoo H, Thomine S, Leonhardt N, Filleur S. Phosphorylation of the vacuolar anion exchanger AtCLCa is required for the stomatal response to abscisic acid. *Science Signaling*, 2014, 7 (333): ra65
- [55] Franco-Navarro J D, Brumos J, Rosales M A, Cubero-Font P, Talon M, Colmenero-Flores J M. Chloride regulates leaf cell size and water relations in tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67 (3): 873-891
- [56] Rivalta I, Amin M, Luber S, Vassiliev S, Pokhrel R, Umena Y, Kawakami K, Shen J R, Kamiya N, Bruce D, Brudvig G W, Gunner M R, Batista V S. Structural-functional role of chloride in photosystem II. *Biochemistry*, 2011, 50 (29): 6312-6315
- [57] Li B, Qiu J, Jayakannan M, Xu B, Li Y, Mayo G M, Tester M, Gilliam M, Roy S J. *AtNPF2.5* modulates chloride (Cl^-) efflux from roots of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 2013
- [58] Sun J, Chen S, Dai S, Wang R, Li N, Shen X, Zhou X, Lu C, Zheng X, Hu Z, Zhang Z, Song J, Xu Y. NaCl-induced alternations of cellular and tissue ion fluxes in roots of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. *Plant Physiology*, 2009, 149 (2): 1141-1153
- [59] Fricke W, Leigh R A, Tomos A D. The intercellular distribution of vacuolar solutes in the epidermis and mesophyll of barley leaves changes in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany*, 1996, 47 (9): 1413-1426
- [60] Zhang H, Zhao F G, Tang R J, Yu Y, Song J, Wang Y, Li L, Luan S. Two tonoplast MATE proteins function as turgor-regulating chloride channels in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114 (10): E2036-E2045
- [61] Li B, Tester M, Gilliam M. Chloride on the Move. *Trends in Plant Science*, 2017, 22 (3): 236-248
- [62] Jossier M, Kroniewicz L, Dalmas F, Le Thiec D, Ephritikhine G, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Vavasseur A, Filleur S, Leonhardt N. The *Arabidopsis* vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *The Plant Journal*, 2010, 64 (4): 563-576
- [63] Ligaba A, Maron L, Shaff J, Kochian L, Pineros M. Maize ZmALMT2 is a root anion transporter that mediates constitutive root malate efflux. *Plant, Cell and Environment*, 2012, 35 (7): 1185-1200
- [64] Nguyen C T, Agorio A, Jossier M, Depre S, Thomine S, Filleur S. Characterization of the chloride channel-like, AtCLCg, involved in chloride tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 2016, 57 (4): 764-775
- [65] Pineros M A, Cancado G M, Maron L G, Lyi S M, Menossi M, Kochian L V. Not all ALMT1-type transporters mediate aluminum-activated organic acid responses: the case of *ZmALMT1*-an anion-selective transporter. *The Plant Journal*, 2008, 53 (2): 352-367
- [66] Li B, Byrt C, Qiu J, Baumann U, Hrmova M, Evrard A, Johnson A A, Birnbaum K D, Mayo G M, Jha D, Henderson S W, Tester M, Gilliam M, Roy S J. Identification of a stellar-localized transport protein that facilitates root-to-shoot transfer of chloride in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2016, 170 (2): 1014-1029
- [67] Wen Z, Tyerman S D, Dechorgnat J, Ovchinnikova E, Dhugga K S, Kaiser B N. Maize NPF6 proteins are homologs of *Arabidopsis* CHL1 that are selective for both nitrate and chloride. *The Plant Cell*, 2017, 29 (10): 2581-2596
- [68] Cubero-Font P, Maierhofer T, Jaslan J, Rosales M A, Espartero J, Diaz-Rueda P, Muller H M, Hurter A L, Al-Rasheid K A, Marten I, Hedrich R, Colmenero-Flores J M, Geiger D. Silent S-type anion channel subunit SLAH1 gates SLAH3 open for chloride root-to-shoot translocation. *Current Biology*, 2016, 26 (16): 2213-2220
- [69] Qiu J, Henderson S W, Tester M, Roy S J, Gilliam M. SLAH1, a homologue of the slow type anion channel SLAC1, modulates shoot Cl^- accumulation and salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67 (15): 4495-4505
- [70] Brandt B, Brodsky D E, Xue S, Negi J, Iba K, Kangasjarvi J, Ghassemian M, Stephan A B, Hu H, Schroeder J I. Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (26): 10593-10598
- [71] Qi G N, Yao F Y, Ren H M, Sun S J, Tan Y Q, Zhang Z C, Qiu B S, Wang Y F. The S-type anion channel ZmSLAC1 plays essential roles in stomatal closure by mediating nitrate efflux in maize. *Plant and Cell Physiology*, 2018, 59 (3): 614-623
- [72] Hechenberger M, Schwappach B, Fischer W N, Frommer W B, Jentsch T J, Steinmeyer K. A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a *CLC* gene disruption. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (52): 33632-33638
- [73] Luo M, Zhang Y, Li J, Zhang P, Chen K, Song W, Wang X, Yang J, Lu X, Lu B, Zhao Y, Zhao J. Molecular dissection of maize seedling salt tolerance using a genome-wide association analysis method. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19 (10): 1937-1951
- [74] De Angeli A, Zhang J, Meyer S, Martinoia E. AtALMT9 is a malate-activated vacuolar chloride channel required for stomatal opening in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 2013, 4: 1804
- [75] Hoekenga O A, Maron L G, Pineros M A, Cancado G M, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan P R, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, Matsumoto H, Yamamoto Y, Koyama H, Kochian L V. *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America, 2006, 103 (25): 9738-9743
- [76] Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid K A, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R. AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *The Plant Journal*, 2010, 63 (6): 1054-1062
- [77] Meyer S, Scholz-Starke J, De Angeli A, Kovermann P, Burla B, Gambale F, Martinoia E. Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation. *The Plant Journal*, 2011, 67 (2): 247-257
- [78] Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn S J, Ryan P R, Delhaize E, Matsumoto H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal*, 2004, 37 (5): 645-653
- [79] Maron L G, Pineros M A, Guimaraes C T, Magalhaes J V, Pleiman J K, Mao C, Shaff J, Belicuas S N, Kochian L V. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *The Plant Journal*, 2010, 61 (5): 728-740
- [80] Omote H, Hiasa M, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacological Sciences*, 2006, 27 (11): 587-593
- [81] Zhu H, Wu J, Jiang Y, Jin J, Zhou W, Wang Y, Han G, Zhao Y, Cheng B. Genomewide analysis of MATE-type gene family in maize reveals microsynteny and their expression patterns under aluminum treatment. *Journal of Genetics and Genomics*, 2016, 95 (3): 691-704
- [82] Guimaraes C T, Simoes C C, Pastina M M, Maron L G, Magalhaes J V, Vasconcellos R C, Guimaraes L J, Lana U G, Tinoco C F, Noda R W, Jardim-Belicuas S N, Kochian L V, Alves V M, Parentoni S N. Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. *BMC Genomics*, 2014, 15 (1): 153
- [83] Martiniere A, Fiche J B, Smokvarska M, Mari S, Alcon C, Dumont X, Hematy K, Jaillais Y, Nollmann M, Maurel C. Osmotic stress activates two reactive oxygen species pathways with distinct effects on protein nanodomains and diffusion. *Plant Physiology*, 2019, 179 (4): 1581-1593
- [84] Russell J M. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiological Reviews*, 2000, 80 (1): 211-276
- [85] Colmenero-Flores J M, Martinez G, Gamba G, Vazquez N, Iglesias D J, Brumos J, Talon M. Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *The Plant Journal*, 2007, 50 (2): 278-292
- [86] Luo X, Wang B, Gao S, Zhang F, Terzaghi W, Dai M. Genome-wide association study dissects the genetic bases of salt tolerance in maize seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2019, 61 (6): 658-674
- [87] Xie Y, Feng Y, Chen Q, Zhao F, Zhou S, Ding Y, Song X, Li P, Wang B. Genome-wide association analysis of salt tolerance QTLs with SNP markers in maize (*Zea mays* L.). *Genes Genomics*, 2019, 41, 1135-1145
- [88] Sandhu D, Pudussery M V, Kumar R, Pallete A, Markley P, Bridges W C, Sekhon R S. Characterization of natural genetic variation identifies multiple genes involved in salt tolerance in maize. *Functional and Integrative Genomics*, 2019, 20 (2): 261-275