

液泡膜 H⁺-PPase 与植物耐盐性

包爱科 张金林 郭正刚 王锁民*

兰州大学草地农业科技学院农业部草地农业生态系统学重点开放实验室, 兰州 730000

Tonoplast H⁺-pyrophosphatase Involved in Plant Salt Tolerance

BAO Ai-Ke, ZHANG Jin-Lin, GUO Zheng-Gang, WANG Suo-Min*

Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystem, Ministry of Agriculture, College of Pastoral Agricultural Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

提要 文章介绍植物液泡膜 H⁺-PPase 的结构、功能及其分子生物学的研究进展, 并着重阐述液泡膜 H⁺-PPase 在植物耐盐性中的作用。

关键词 液泡膜 H⁺-PPase; 耐盐性; 进展

液泡是细胞内的一个由单层膜包裹的细胞器, 它起源于内质网或高尔基体的小泡。在一个成熟的植物细胞中, 液泡占据 40%~90% 的胞内空间 (Britten 等 1992), 它与细胞质一起维持细胞的膨压, 因而植物能够正常地生长和保持挺立的状态 (Gaxiola 等 2001)。在植物细胞中, 液泡不是一个静止的或被动的区域, 而是具有多种功能, 有明显代谢活性的细胞器。除了维持细胞的渗透压和贮存代谢的中间产物外, 液泡内还含有多种水解酶, 其 pH 值偏酸且具有类似溶酶体的功能。

液泡膜 H⁺ 转运无机焦磷酸酶 (H⁺-pyrophosphatase, H⁺-PPase, EC3. 6. 1. 1) 是一种区别于 H⁺-ATPase 的 H⁺ 转运酶, 广泛存在于植物和少数藻类、原生动物、细菌以及原始细菌中 (Maeshima 2000)。在液泡膜上, H⁺-PPase 能够把无机焦磷酸 (PPi) 水解产生的自由能和 H⁺ 跨膜转运相耦联, 在将 PPi 水解为 2 个 Pi 的同时, 还将细胞质中的 H⁺ 经液泡膜进入液泡内, 起质子泵的作用, 与液泡膜 H⁺-ATPase 一起形成 H⁺ 跨液泡膜电化学梯度, 为各种溶质 (如阳离子、阴离子、氨基酸和糖类等) 分子跨液泡膜的次级主动运输提供驱动力 (Blumwald 1987; 王延枝 1990)。自 1975 年 Karlsson 从甜菜 (*Beta vulgaris*) 根中分离到钾激活的 H⁺-PPase 以来, 近几十年, 此酶的研究已经取得了长足的进展, 并对其生理生化性质逐步达成共识 (赵利辉和刘友良 1999)。随着分子生物学研究的不断深入, 人们已经成功地从包括陆生植物在内的众多生物体中分离到 H⁺-PPase 的 cDNA, 但

大多研究仍然集中在此酶的生化特性及其在亚细胞结构中的定位和在组织中的分配上 (Lü 等 2005)。直到最近几年, 一些学者才开始对此酶在植物抵御盐胁迫中的作用进行了初步研究, 本文就这方面的研究进展介绍如下。

1 液泡膜 H⁺-PPase 的分子结构与功能

1.1 H⁺-PPase 的分子结构

1.1.1 H⁺-PPase 的分子克隆 1992 年, Sarafian 等用 λZAP 作为表达载体构建拟南芥的 cDNA 文库, 第 1 次筛选克隆出完整的 H⁺-PPase cDNA 序列, 命名为 *AVP1* (M81892)。此后, 人们相继从其它一些陆生植物中克隆出 H⁺-PPase 的 cDNA (表 1)。除陆生植物外, 其它生物体中也克隆到 H⁺-PPase 的基因, 如光合细菌 (*Rhodospirillum rubrum*, AF044912, Baltscheffsky 等 1998), 原始细菌 (*Pyrobaculum aerophilum*, AF182812, Drozdowicz 等 1999), 藻类如轮藻 (*Chara corallina*, AB018529, Nakanishi 等 1999) 和伞藻 (*Acetabularia acetabulum*, D88820, Ikeda 等 1999), 原生动物如锥虫 (*Trypanosomacruzi*, AF159881, Scott 等 1998)、疟原虫 (*Plasmodium*

收稿 2006-02-14 修定 2006-05-29

资助 国家自然科学基金 (30270947)、新世纪优秀人才支持计划 (NCET-05-0882)、甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目 (GNSW-2004-07)、农业部草地农业生态系统学重点开放实验室 2004 年开放课题基金。

*通讯作者 (E-mail: smwang@lzu.edu.cn, Tel: 0931-8910983, Fax: 0931-8910979)。

表1 已克隆的一些陆生植物液泡膜H⁺-PPase cDNA序列

植物种类	氨基酸残基数	基因名称	基因库号码	参考文献
拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	770	<i>AVP1 (AVP3)</i>	M81892	Sarafian等1992
	800	<i>AVP2</i>	AF182813	Drozdowicz 等2000
大麦(<i>Hordeum vulgare</i>)	771	<i>HVP1</i>	AB032839	Tanaka 等1993
	762	<i>HVP2</i>	D13472	
甜菜(<i>Beta vulgaris</i>)	765	<i>BVP1</i>	L32791	Kim 等1994
	761	<i>BVP2</i>	L32792	
烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)	764	<i>NtVP5</i>	X77915	Lerchl 等1995b
	765	<i>NtVP9</i>	X83729	
	766	<i>NtVP31</i>	X83730	
水稻(<i>Oryza sativa</i>)	772	<i>OVPI</i>	D45383	Sakakibara等1996
	768	<i>OVPI2</i>	D45384	
绿豆(<i>Vigna radiata</i>)	766	<i>VVP2</i>	AB009077	Nakanishi 和 Maeshima 1998
南瓜(<i>Cucurbita moschata</i>)	768	<i>CmVPI</i>	D86306	Maruyama 等1998
小麦(<i>Triticum aestivum</i>)	763	<i>TVPI</i>	AY296911	Brini等2005
野大麦(<i>Hordeum brevisubulatum</i>)	773	<i>HbVPI</i>	AY255181	Lü 等2005
盐地碱蓬(<i>Suaeda salsa</i>)	764	<i>SsVP</i>	—	Guo 等2006

falciparum, AF115766, Mcintosh 等2001)和弓形虫(*Toxoplasma gondii*, Drozdowicz 等2003)。

大量研究表明, 大多数陆生植物H⁺-PPase cDNA 含有2 283~2 319个核苷酸的开放阅读框架(ORF), 编码大约761~773个氨基酸残基(Maeshima 2001; Lü 等2005), 计算出的分子量为80~81 kDa, 但SDS-PAGE凝胶电泳检测得到的分子量多为70~73 kDa (Rea和Poole 1993), 这可能因为H⁺-PPase蛋白是一个疏水性的膜蛋白, 在SDS凝胶上迁移距离过远所致(Branden和Tooze 1991; Sarafian 等1992)。在cDNA序列的同源性方面, 1998年, Nakanishi 和 Maeshima总结了11种不同陆生植物物种的H⁺-PPase氨基酸序列分析结果, 发现它们的同源性高达86%~91%。相比之下, 藻类和陆生植物H⁺-PPase氨基酸序列的同源性则较低, 例如绿藻为71%, 海藻更低, 仅为47%。因此, 从进化论的角度来看, 绿藻与陆生植物具有更近的亲缘关系(Maeshima 2001)。

在克隆H⁺-PPase cDNA的过程中, 许多研究者还发现, 有些陆生植物的H⁺-PPase拥有数个同工酶(isoform), 并且在很多植物中也克隆出了编码H⁺-PPase的同源基因(homologous gene), 例如, 编码水稻H⁺-PPase的同源基因至少有5个(*OVPI*~5, Brini 等2005), 大麦中也已发现有2个(*HVPI*~2, Tanaka 等1993), 甜菜中至少有2

个(*BVPI*~2, Kim 等1994)。研究发现, 这些同源基因的阅读区高度保守, 但其非转录区的保守性却很低(Maeshima 2000)。所以, H⁺-PPase可能是一个多基因家族。

1.1.2 液泡膜H⁺-PPase的拓扑结构及其特性 在前人大量研究的基础上, Maeshima (2000)以绿豆液泡膜H⁺-PPase为基础, 提出一个假定的植物液泡膜H⁺-PPase的拓扑结构模型(图1)。在这个模型中, 液泡膜H⁺-PPase可能有14个跨膜区域(1~14), 其中包括3个保守片段(CS1、CS2、CS3), 底物结合位点可能是突出于细胞质中的e环。保守区CS1中的一些酸性残基可能在PPi水解和H⁺转运过程中起关键作用。免疫分析发现, CS1内有一段暴露于细胞质中的氨基酸残基序列(DVGADLVGKVE), 可能是此酶的催化位点。初步研究绿豆H⁺-PPase C末端保守区CS3的结果表明, 其中3个谷氨酸残基在酵母中表达, 任何一个被替换都会导致酶活性的丧失, 这表明CS3可能暴露在细胞质中, 与CS1和CS2一起在酶的催化功能中起关键作用。*N*-乙基顺丁烯二酰亚胺(NEM)底物保护性结合位点是Cys-630(拟南芥中为Cys-634)半胱氨酸残基, 呈环形, 该位点在已知的所有植物(也包括一些海藻、绿藻和原核生物)H⁺-PPase序列中都是保守的(Maeshima 2000)。

Mg²⁺是液泡膜H⁺-PPase的一个必需的辅助因

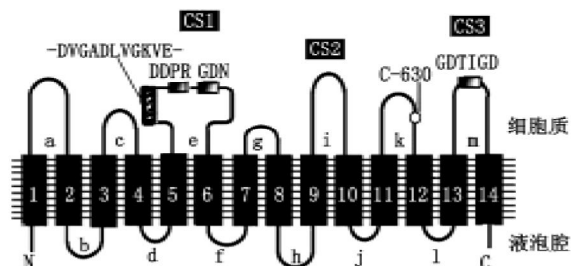


图1 H⁺-PPase的多肽结构模式(Maeshima 2000)

子, Mg²⁺ 对该酶不仅有激活作用, 还有保护作用, 使其在较高温度下不易失活(Maeshima 2000)。除受Mg²⁺ 激活外, H⁺-PPase还可能受K⁺ 和NH₄⁺ 等激活(Siswanto等1994), 在有些植物中, H⁺-PPase活性尤其是H⁺转运活性表现出对K⁺ 的绝对需要(Pugliarella等1991)。有趣的是, 2000年, Drozdowicz等发现了拟南芥的另外一种液泡膜H⁺-PPase——AVP2, AVP2和AVP1一样, 也可以为Mg²⁺ 激活, 但与AVP1不同的是, 它对K⁺ 等一价阳离子并不敏感, 却对Ca²⁺ 敏感; 比较AVP2与AVP1的氨基酸序列, 发现它们的同源性只有36%。因此, Drozdowicz等(2000)、Belogurov和Lahti(2002)认为, 同一个有机体中的H⁺-PPase可以分为2个类型, 即I型(AVP1类)和II型(AVP2类)。他们分析拟南芥和其它有机体中的H⁺-PPase系统发生的结果进一步表明, II型H⁺-PPase并不是I型H⁺-PPase的同功酶, 而是存在于植物(甚至一些真核生物和原核生物)体内的另外一类H⁺-PPase; 在同一个有机体内, I型和II型H⁺-PPase共存于液泡膜上, 但可能定位于液泡膜的不同区域, 调节细胞的不同生理过程。

1.2 H⁺-PPase的主要功能

1.2.1 质子泵功能

H⁺-PPase作为质子泵, 和H⁺-ATPase一起将细胞质中的H⁺泵入液泡中, 一方面, 建立跨液泡膜电化学梯度, 为无机离子及其他溶质进出液泡提供驱动力(Blumwald 1987), 既能维持细胞离子平衡和渗透平衡, 又能减轻一些无机离子(比如Na⁺和Cl⁻)对细胞质的毒害; 另一方面, 可以使液泡酸化和细胞质碱化, 有利于细胞质中生理生化反应的顺利进行。

1.2.2 参与K⁺向液泡内的主动运输

H⁺-PPase是否参与K⁺向液泡内的主动运输, 目前还存在很多争议。Davies等(1992)和Obermeyer等(1996)用膜片

钳技术分别检测甜菜和东亚市藜(*Chenopodium rubrum*)液泡H⁺-PPase的结果显示, 液泡膜H⁺-PPase可能是作为H⁺/K⁺共向转运蛋白, 介导K⁺向液泡内的运输, 其耦联比为1.3 H⁺/1.7 K⁺/1 PPI。但另外一些学者却并不认同这个看法, 他们认为, H⁺-PPase蛋白重组和⁴²K⁺示踪实验没有证实K⁺的这一运输过程(Sato等1994), Ros等(1995)用荧光探针法也没有检测到H⁺-PPase对K⁺的主动运输过程。

1.2.3 参与蔗糖的生物合成

植物体内的蔗糖合成酶和尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDPG)焦磷酸化酶将蔗糖转化为葡萄糖和己糖磷酸盐。这一过程中形成的PPi主要由液泡膜H⁺-PPase清除(Lerchl等1995a)。

1.2.4 控制植物生长素的运输

Li等(2005)报道, 拟南芥AVP1除了酸化液泡外, 还控制植物生长素的运输, 从而影响着依赖生长素的各种发育过程。他们发现, AVP1的过量表达导致植物器官形成时的细胞分裂、增生加快以及生长素运输加快; 相反, *avp1-1*突变体的根和地上部分发育都受到削弱, 生长素运输也变得缓慢。其原因是AVP1表达的变化会影响与生长素分布有关的2种蛋白(三磷酸腺苷酶和生长素外流介体PIN1)的分布和数量。因此, AVP1作用的结果是生长素外流变得更为容易, 从而促进根系发育和植株地上部分的生长。

2 液泡膜H⁺-PPase与植物耐盐性的关系

2.1 盐胁迫下的植物液泡膜H⁺-PPase活性

各种逆境条件(如低温、缺氧和盐分胁迫等)都能影响植物中H⁺-PPase的活性(赵利辉和刘友良1999; Maeshima 2000)。从目前的资料看, 有关盐胁迫对H⁺-PPase影响的看法主要有二: (1) Na⁺对H⁺-PPase有抑制作用, NaCl胁迫下, 植物H⁺-PPase活性降低。Matsumoto和Chung(1988)用200 mmol·L⁻¹ NaCl处理大麦根3 d后发现, 其H⁺-PPase活性只有未做NaCl处理的一半; Nakamura等(1992)将绿豆根置于100 mmol·L⁻¹ NaCl中, 绿豆H⁺-PPase活性强烈受抑; Bremberger和Lüttge(1992)用400 mmol·L⁻¹ NaCl处理的冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum*)后, 盐处理植株中的H⁺-PPase活性在各个生长阶段都低于未做

NaCl 处理的植株。(2) NaCl 诱导 H⁺-PPase 活性或转录水平增加。用 50 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 10 d 的胡萝卜 (*Daucus carota*) 中, H⁺-PPase 活性是未做 NaCl 处理的 2 倍 (Colombo 和 Cerana 1993); Zingarelli 等 (1994) 用 80 mmol·L⁻¹ NaCl 处理欧亚槭 (*Acer pseudoplatanus*) 后, 其 H⁺-PPase 活性也成倍增加; Fukuda 等 (2004) 用 100 mmol·L⁻¹ NaCl 处理大麦后, 其根中 H⁺-PPase 转录水平显著升高, Lü 等 (2005) 用 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理野大麦后也得到了相同的结果; Vera-Estrella 等 (2005) 用 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理盐芥 (*Theilungiella halophila*) 后, 盐芥叶片中 H⁺-PPase 水解活性是未做 NaCl 处理的 1.3 倍 Guo 等 (2006) 将盐地碱蓬 (*Suaeda salsa*) H⁺-PPase 基因 *SsVP* 转入拟南芥, 400 mmol·L⁻¹ NaCl 处理能够诱导转化植株叶中 *SsVP* 的表达。但是, Brini 等 (2005) 观察到, 生长在 200 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫下的小麦根和叶中, H⁺-PPase 转录水平与未做 NaCl 处理的均无明显差异。以上结果表明, 盐胁迫下, 植物液泡膜 H⁺-PPase 活性或转录水平的变化可能与植物种类、器官类型、发育状态以及盐溶液中的 Na⁺ 浓度有关。

有趣的是, 赵利辉和刘友良 (1999) 发现, 在 100 和 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理下, 耐盐的大麦品种 ‘鉴 4’ 根系和叶中 H⁺-PPase 水解活性均上升, 而不耐盐的 ‘科品 7 号’ 根系和叶中 H⁺-PPase 水解活性均下降。Yu 等 (2005) 的研究也发现了类似的现象, 他们将大豆 (*Glycine max*) 栽培品种 ‘Wenfeng7’ 和 ‘Union’ 在 0.3% (w/v) NaCl 下处理 3 d, 发现耐盐品种 ‘Wenfeng7’ 根中 H⁺-PPase 活性升高, 而在盐敏感品种 ‘Union’ 的根中却没有观察到类似的结果。所以, H⁺-PPase 似乎也可以作为衡量植物耐盐性的一个指标。

2.2 液泡膜 H⁺-PPase 在植物抵御盐及干旱胁迫中的作用 在盐胁迫下, 植物细胞要维持离子平衡, 就要吸收大量的无机离子, 但高浓度的无机离子 (特别是 Na⁺ 和 Cl⁻) 会不可避免地对细胞中的代谢系统造成伤害 (Rodriguez 等 1997)。所以, 在高盐环境中, 盐生植物细胞常常将过多的 Na⁺ 和 Cl⁻ 区隔在液泡中, 这既可以克服由于盐分过高造成的生理干旱, 又可以减轻这 2 种离子对细胞质产生的毒害作用 (Blumwald 和 Poole 1985; Niu 等

1995)。有研究证明, 盐生植物和甜土植物在对盐胁迫的适应过程中都有离子区隔化, 但盐生植物的离子区隔化更为明显和有效 (Blumwald 2000)。当 Na⁺ 和 Cl⁻ 被区隔在液泡内时, 盐生植物为了维持细胞内的渗透平衡, 在它们的细胞质和其它细胞器中就会积累大量的 K⁺ 和有机渗透调节物质 (Rhodes 和 Hanson 1993)。

众所周知, 离子的吸收和运输主要靠主动运输完成。各种膜转运蛋白, 特别是质膜和液泡膜转运蛋白在离子主动运输过程中起作用。高盐条件下, 盐生植物主要依靠液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白将细胞质中过多的 Na⁺ 区隔到液泡中 (Blumwald 和 Poole 1985; Staal 等 1991)。迄今为止, 已经有很多植物的液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因得到克隆 (任仲海等 2002; 吕慧颖等 2003)。众多的研究表明, 过量表达液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因可增强植物的抗盐性 (Xue 等 2004; Yin 等 2004; Lü 等 2005)。

在离子区隔化过程中, 液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白必须依靠液泡膜质子泵 (H⁺-ATPase 和 H⁺-PPase) 形成的 H⁺ 跨膜电化学梯度, 为其提供驱动力 (Blumwald 1987; Blumwald 和 Gelli 1997)。这意味着通过增大液泡膜质子泵基因表达来增大 H⁺ 跨膜梯度, 可以为液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白介导 Na⁺/H⁺ 交换提供更强大的驱动力, 这样就有可能将细胞质中过多的 Na⁺ 区隔化到液泡内腔中, 增强细胞的耐盐性。

Wang 等 (2001) 的研究表明, 在对盐地碱蓬耐盐性的贡献上, 液泡膜 H⁺-ATPase 的作用要大于 H⁺-PPase 的作用。但另外一些研究者却认为, 液泡膜 H⁺-PPase 建立 H⁺ 跨膜电化学梯度是与液泡膜 H⁺-ATPase 的作用相当的, 甚至有更大的效应 (Britten 等 1992)。因此, 从理论上说, 液泡膜上 2 个 H⁺ 泵中的任何一个过量表达, 都有可能提高 H⁺ 的利用率, 增大 H⁺ 跨膜梯度 (Gaxiola 等 2001)。但是, 液泡膜 H⁺-ATPase 过量表达并不是一件容易的事, 因为此酶是由许多亚基组成, 只有当编码这些亚基的基因同时达到超表达的水平时, 液泡膜 H⁺-ATPase 才能实现超表达 (Gaxiola 等 2001), 这样的基因在拟南芥中至少有 26 个 (Sze 等 2002), 就目前的技术水平而言, 要做到这一点,

显然是相当困难的。相比之下,液泡膜 H^+ -PPase结构非常简单,它只由一条受单基因编码的多肽组成(Maeshima 2000),因此, H^+ -PPase超表达就相对简单些(Gaxiola等2001)。

1999年,Gaxiola等将拟南芥液泡膜 H^+ -PPase基因 *AVP1* 在酵母盐敏感突变体 *ena1* 上超表达后,得到了2个很有说服力的实验结果:(1)该突变体恢复了耐盐性(2)在前液泡(prevacuolar)膜上必须要有能够介导耐盐性的功能性离子载体(Nhx1和Gef1)。2005年,Brini等克隆了小麦液泡膜 H^+ -PPase基因 *TVP1*,并将其在 *ena1* 突变体上异源表达,得到了与Gaxiola等(1999)相一致的结果。这2个实验直接证明了 H^+ -PPase活性与细胞耐盐性有关。后来,Gaxiola等(2001)又将带有35S启动子的 *AVP1* 基因转入拟南芥,与同基因型的野生型相比, *AVP1* 超表达的转基因植株耐盐性和耐旱性显著提高,能在 $250 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 中正常生长;他们进一步研究的结果表明,在转基因植株液泡中,包括 Na^+ 在内的阳离子的积累明显增加。Park等(2005)将 *AVP1* 基因转入番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 的一个商业栽培品种 (money maker) 中,转基因植株表现出下列特点:根系生长较为强壮,生物量显著增加;根系液泡中积累大量依赖于 H^+ -PPase驱动而运输的阳离子,因而转基因植株耐旱性明显增强。另外,Guo(2006)等将盐地碱蓬 H^+ -PPase基因 *SsVP* 转入拟南芥,发现超表达 *SsVP* 的转基因拟南芥的耐盐性和耐旱性显著提高。这些结果表明:在盐分或水分胁迫下, H^+ -PPase超表达能够增强 H^+ 跨液泡膜电化学梯度,提高液泡膜上有 H^+ 参与的各种次级运输载体(包括液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白)的运输效率,促进包括 Na^+ 在内的各种离子向液泡内的运输和积累,从而维持了细胞中离子的平衡和细胞的膨压,同时也可减轻过多 Na^+ 对细胞造成的伤害,进而增强细胞的耐旱性和耐盐性。可见, H^+ -PPase作为一种有效的质子泵,在植物对水分胁迫和盐分胁迫的响应中,可能扮演着重要的角色。

3 结语

液泡膜 H^+ -PPase是一种广泛存在于很多生物体内的 H^+ 转运酶。它只包含一条分子量约为80

kDa的多肽,结构简单;其底物为简单的低价焦磷酸(PPi),含有一个高能磷酸酐键。在植物细胞中, H^+ -PPase除了作为一种有效的质子泵调节细胞的酸度,驱动各种离子在液泡内的区隔化外,还可作为一种调节因子控制植物生长素的运输,在植物响应逆境胁迫和调节植物生长发育的过程中可能起作用。

至于今后这一领域的研究,有两个方面可以考虑:(1)利用分子生物学手段,对植物液泡膜 H^+ -PPase的功能和作用机制深入研究,特别是揭示其水解PPi和转运 H^+ 的耦联机制,将成为重要的研究方向;(2)将 H^+ -PPase基因与其它耐盐抗旱基因一起转入甜土植物中并超表达,从而获得一批耐盐性和抗旱性较强的转基因植物新品种,这对改良和利用大面积盐荒地,发展干旱、半干旱地区的农业是重要的。

参考文献

- 吕慧颖,李银心,孔凡江,杨庆凯(2003).植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白研究进展.植物学通报,20(3):363~369
- 任仲海,马秀灵,赵彦修,张慧(2002). Na^+/H^+ 逆向转运蛋白和植物耐盐性.生物工程学报,18(1):16~19
- 王延枝(1990).植物液泡膜上的焦磷酸酶.植物生理学通讯,(4):73~76
- 赵利辉,刘友良(1999).液泡膜 H^+ -PPase及其对逆境胁迫的反应.植物生理学通讯,35(6):441~445
- Baltscheffsky M, Nadanaciva S, Schultz A (1998). A pyrophosphate synthase gene: molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*. Biochim Biophys Acta, 1364: 301~306
- Belogurov GA, Lahti R (2002). A lysine substitute for K^+ : A460K mutation eliminates K^+ -dependence in H^+ -pyrophosphatase of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. J Biol Chem, 277: 49651~49654
- Blumwald E (1987). Tonoplast vesicles for the study of ion transport in plant vacuoles. Physiol Plant, 69: 731~734
- Blumwald E (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. Curr Opin Cell Biol, 12(4): 431~434
- Blumwald E, Gelli A (1997). Secondary inorganic ion transport in plant vacuoles. Adv Bot Res, 25: 401~407
- Blumwald E, Poole RJ (1985). Na^+/H^+ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 78: 163~167
- Branden C, Tooze J (1991). Introduction to Protein Structure. New York: Garland Publishing
- Bremberger C, Lüttge U (1992). Dynamics of tonoplast proton pumps and other tonoplast proteins of *Mesembryanthemum crystallinum* L. during the induction of crassulacean acid

- metabolism. *Planta*, 188: 575~580
- Brini F, Gaxiola RA, Berkowitz GA, Masmoudi K (2005). Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump. *Plant Physiol Biochem*, 43: 347~354
- Britten CJ, Zhen RC, Kim EJ, Rea PA (1992). Reconstitution of transport function of vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase. *J Biol Chem*, 267 (30): 21850~21855
- Colombo R, Cerana R (1993). Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatase in NaCl-grown cells of *Daucus carota*. *J Plant Physiol*, 142: 226~229
- Davies JM, Poole RJ, Rca PA, Sanders D (1992). Potassium transport into plant vacuoles energized directly by a proton-pumping inorganic pyrophosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 11701~11705
- Drozdowicz YM, Kissinger JC, Rea PA (2000). AVP2, a sequence-divergent, K⁺-insensitive H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 123: 353~362
- Drozdowicz YM, Lu YP, Patel V, Fitz-Gibbon S, Miller JH, Rea PA (1999). A thermostable vacuolar-type membrane pyrophosphatase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum*: implications for the origins of pyrophosphate-energized pumps. *FEBS Lett*, 460: 505~512
- Drozdowicz YM, Shaw M, Nishi M, Striepen B, Liwinski HA, Roos DS, Rea PA (2003). Isolation and characterization of TgVP1, a type I vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase from *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*, 278 (2): 1075~1085
- Fukuda A, Chiba K, Maeda M, Nakamura A, Maeshima M, Tanaka Y (2004). Effect of salt and osmotic stresses on the vacuolar H⁺-pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiport from barley. *J Exp Bot*, 55 (397): 585~594
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 11444~11449
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL, Fink GR (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1 can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 1480~1485
- Guo SL, Yin HB, Zhang X, Zhao FY, Li PH, Chen SH, Zhao YX, Zhang H (2006). Molecular cloning and characterization of a vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene, *SsVP*, from the halophyte *Suaeda salsa* and its overexpression increases salt and drought tolerance of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 60: 41~50
- Ikeda M, Rahman M, Moritani C, Umami K, Tanimura Y, Akagi R, Tanaka Y, Maeshima M, Watanabe Y (1999). A vacuolar inorganic H⁺-pyrophosphatase in *Acetabularia acetabulum*: molecular cloning and comparison with higher plants and a bacterium. *J Exp Bot*, 50: 139~140
- Karlsson J (1975). Membrane-bound potassium and magnesium ion-stimulated inorganic pyrophosphatase from roots and cotyledons of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biochim Biophys Acta*, 399: 356~363
- Kim Y, Kim EJ, Rea PA (1994). Isolation and characterization of cDNAs encoding the vacuolar H⁺-pyrophosphatase of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 106: 375~382
- Lerchl J, Geigenberger P, Stitt M, Sonnewald U (1995a). Impaired photoassimilate partitioning by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. *Plant Cell*, 7: 259~270
- Lerchl J, König S, Zrenner R, Sonnewald U (1995b). Molecular cloning, characterization and expression analysis of isoforms encoding tonoplast-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase in tobacco. *Plant Mol Biol*, 29: 833~840
- Li J, Yang H, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Titapiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards EL et al (2005). *Arabidopsis* H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*, 310: 121~125
- Lü SY, Jing YX, Pang XB, Zhao HY, Ma LQ, Li YF (2005). cDNA cloning of a vacuolar H⁺-pyrophosphatase and its expression in *Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link. in response to salt stress. *Agr Sci China*, 4 (4): 247~251
- Maeshima M (2000). Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta*, 1465 (1~2): 37~51
- Maeshima M (2001). Tonoplast transporters: organization and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52: 469~497
- Maruyama C, Tanaka Y, Takeyasu K, Yoshida M, Sato MH (1998). Structural studies of the vacuolar H⁺-pyrophosphatase: sequence analysis and identification of the residues modified by fluorescent cyclohexylcarbodiimide and maleimide. *Plant Cell Physiol*, 39: 1045~1053
- Matsumoto H, Chung GC (1988). Increase in proton-transport activity of tonoplast vesicles as an adaptive response of barley roots to NaCl stress. *Plant Cell Physiol*, 29 (7): 1133~1140
- Mcintosh MT, Drozdowicz YM, Laroiya K, Rea PA, Vaidya AB (2001). Two classes of plant-like vacuolar-type H⁺-pyrophosphatases in malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 114 (2): 183~195
- Nakamura Y, Kasamo K, Shimosato N, Sakata M, Ohta E (1992). Stimulation of the extrusion of protons and H⁺-ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact mung bean roots under high-NaCl stress and its relation to external levels of Ca²⁺ ions. *Plant Cell Physiol*, 33 (2): 139~149
- Nakanishi Y, Maeshima M (1998). Molecular cloning of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean. *Plant Physiol*, 116: 589~597
- Nakanishi Y, Matsuda N, Aizawa K, Kashiyama T, Yamamoto K, Mimura T, Ikeda M, Maeshima M (1999). Molecular cloning of the cDNA for vacuolar H⁺-pyrophosphatase from *Chara corallina*. *Biochim Biophys Acta*, 1418: 245~250
- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environment. *Plant Physiol*, 109: 735~742
- Obermeyer G, Sommer A, Bentrup FW (1996). Potassium and

- voltage dependence of the inorganic pyrophosphatase of intact vacuoles from *Chenopodium rubrum*. *Biochim Biophys Acta*, 1284: 203~212
- Park S, Li JS, Pittman JK, Berkowitz GA, Yang HB, Undurraga S, Morris J, Hirschi KD, Gaxiola RA (2005). Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (52): 18830~18835
- Pugliarella MC, Rasi-Caldogno F, Michelis MID (1991). The tonoplast H⁺-pyrophosphatase of radish seedlings: biochemical characteristics. *Physiol Plant*, 83: 339~345
- Rea PA, Poole RJ (1993). Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 44: 157~180
- Rhodes D, Hanson AD (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 44: 357~384
- Rodriguez HG, Boberts JKM, Jordan WR, Drew MC (1997). Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiol*, 113: 881~893
- Ros R, Romieu C, Gibrat R, Grignon C (1995). The plant inorganic pyrophosphatase does not transport K⁺ in vacuole membrane vesicles multilabeled with fluorescent probes for H⁺, K⁺, and membrane potential. *J Biol Chem*, 270: 4368~4374
- Sakakibara Y, Kobayashi H, Kasamo K (1996). Isolation and characterization of cDNAs encoding vacuolar H⁺-pyrophosphatase isoforms from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 31: 1029~1038
- Sarafian V, Kim Y, Poole RJ, Rea PA (1992). Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 1775~1779
- Sato MH, Kasahara M, Ishii N, Homareda H, Matsui H, Yoshida M (1994). Purified vacuolar inorganic pyrophosphatase consisting of a 75-kDa polypeptide can pump H⁺ into reconstituted proteoliposomes. *J Biol Chem*, 269: 6725~6728
- Scott DA, de Souza W, Benchimol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SNJ, Docampo R (1998). Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, 273: 22151~22158
- Siswanto, Prevot JC, Clement A (1994). Characterization of tonoplast pyrophosphatase from *Hevea brasiliensis* latex. *Indian J Natl Rubber Res*, 7 (1): 1~8
- Staal M, Maathuis FJM, Elzenga TM, Overbeek JHM, Prins HBA (1991). Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt-tolerant *Plantago maritima* and the salt sensitive *Plantago media*. *Physiol Plant*, 82: 179~184
- Sze H, Schumacher K, Müller ML, Padmanaban S, Taiz L (2002). A simple nomenclature for a complex proton pump: *VHA* genes encode the vacuolar H⁺-ATPase. *Trends Plant Sci*, 7: 157~161
- Tanaka Y, Chiba K, Maeda M, Maeshima M (1993). Molecular cloning of cDNA for vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase in *Hordeum vulgare*. *Biochem Biophys Res Commun*, 190: 1110~1114
- Vera-Estrella R, Barkla BJ, García-Ramírez L, Pantoja O (2005). Salt stress in *Thellungiella halophila* activates Na⁺ transport mechanisms required for salinity tolerance. *Plant Physiol*, 139: 1507~1517
- Wang BS, Luttge U, Ratajczak R (2001). Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *J Exp Bot*, 52 (365): 2355~2365
- Xue ZY, Zhi DY, Xue GP, Zhang H, Zhao YX, Xia GM (2004). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. *Plant Sci*, 167: 849~859
- Yin XY, Yang AF, Zhang KW, Zhang JR (2004). Production and analysis of transgenic maize with improved salt tolerance by the introduction of *AtNHX1* gene. *Acta Bot Sin*, 46 (7): 854~861
- Yu BJ, Lam HM, Shao GH, Liu YL (2005). Effects of salinity on activities of H⁺-ATPase, H⁺-PPase and membrane lipid composition in plasma membrane and tonoplast vesicles isolated from soybean (*Glycine max* L.) seedlings. *J Env Sci*, 17 (2): 259~262
- Zingarelli L, Anzani P, Lado P (1994). Enhanced K⁺-stimulated pyrophosphatase activity in NaCl-adapted cells of *Acer pseudoplatanus*. *Physiol Plant*, 91: 510~516