

新疆3种藜科盐生植物 *NHX* 基因的克隆与序列分析比较

蔡伦 张富春* 马纪 李金耀 陈邦党 恩特马克·布拉提拜

新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点实验室, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046

Cloning and Sequence Analysis of *NHX* Genes from Three Species of Halophytes from Xinjiang

CAI Lun, ZHANG Fu-Chun*, MA Ji, LI Jin-Yao, CHEN Bang-Dang, Entemark·Bulatibai

Key Laboratory of Molecular Biology, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, Urumqi 830046, China

摘要 从新疆野生植物盐角草(*Salicornia europaea*)、盐爪爪(*Kalidium foliatum*)和盐穗木(*Halostachys caspica*)中分别克隆了约1.7 kb的*NHX*基因cDNA片段, 此片段均包含了*NHX*完整基因, 三者之间有较高的同源性, 盐角草*NHX*基因与盐爪爪*NHX*基因同源性达92.81%, 盐角草与盐穗木同源性达92.19%, 盐爪爪与盐穗木同源性达97.66%。它们与其它几种藜科盐生植物如滨藜、碱蓬、灰绿藜的*NHX*基因同源性也很高, 达到80%以上, 与拟南芥同源性也达到86%。此基因在植物尤其是藜科盐生植物中高度保守, 其编码的功能性蛋白可能在影响植物耐盐中起作用。

关键词 盐生植物; *NHX*基因; RT-PCR; 植物耐盐

采用植物基因工程技术培育耐盐、耐旱植物新品种是十分热门的研究课题, 主要是从细胞膜和分子水平上探讨植物耐盐的细胞生物学机制以及提高作物抗盐性的途径。其内容包括盐生物质膜和液泡膜质子泵及 Na^+ 、 K^+ 转运蛋白与细胞离子稳态重建的机制, 各种渗透调节剂相关的基因、盐生物质膜和液泡膜 $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ 逆向转运蛋白、 K^+ 转运蛋白及 H^+ -ATPase、 H^+ -PPase等基因克隆和功能分析, 目的在于查明植物耐逆性的应答过程和耐逆应答功能蛋白以提高植物耐逆性的分子机制^[1], 为培育作物耐盐新品种, 开发利用盐碱地提供新的植物资源材料。目前, 已经证实盐过敏感(salt overly sensitive, SOS)信号途径在植物耐盐方面起着关键的调控作用, 并同时控制着离子的自身稳衡(homeostasis)^[2]。这一信号通路中 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因(*NHX*)备受人们关注, 它所编码的蛋白存在于植物细胞液泡膜上, 可以将 Na^+ 区隔化至液泡中, 避免细胞质中的高 Na^+ 盐毒害, 维持高的 K^+/Na^+ 比, 达到离子平衡和渗透平衡, 以提高植物的盐耐特性, 从而减轻或防止植物生长受抑制等^[3~5]。

盐角草、盐爪爪和盐穗木均为藜科(*Chenopodiaceae*)植物。盐角草为一年生草本, 高10~40 cm, 在新疆分布较广, 常生于水沟边缘、盐湖

周围和积水洼地的盐沼地段, 呈小面积分布, 根际土土壤盐分8.59%条件下盐角草能良好生长, 属稀盐盐生植物; 盐爪爪为小半灌木, 高20~50 cm, 在新疆全疆有分布, 生于洪积扇缘地带及盐湖边的潮湿盐土、盐化沙地、砾石荒漠的低湿处, 在根际土土壤盐分3.22%环境下生长良好, 在重度盐渍土上常形成优势群落或与盐穗木、柽柳属植物共同组成群落, 属稀盐盐生植物; 盐穗木为灌木, 高50~200 cm, 在新疆全疆分布, 其生境土壤中强度盐渍化, 土表常可见到盐霜, 属旱生、旱中生稀盐盐生植物。这些植物对于利用野生耐盐碱基因来改良作物性状, 培育耐盐碱的作物品种有重要意义。 Na^+/H^+ 反向运输载体(*NHX*)是植物细胞液泡膜上的跨膜蛋白, 可以将 Na^+ 在液泡中区隔化, 可以避免高浓度的 Na^+ 在细胞质中产生毒害。采用RT-PCR技术从盐角草、盐爪爪和盐穗木中扩增出*NHX*基因片段, 有助于探讨盐生植物的耐盐机制和培育出耐盐碱的优良作物品种。

收稿 2004-12-13 修定 2005-03-20

资助 国家“863”项目(2004AA227110-2)、国家科技攻关西部科技行动项目(2001BA901A32)和教育部春晖计划项目。

*通讯作者(E-mail: zfc@xju.edu.cn, Tel: 0991-8583517)。

材料与amp;方法

盐角草(*Salicornia europaea*)和盐爪爪(*Kalidium foliatum*)为我们实验室培养的,盐穗木(*Halostachys caspica*)采自新疆五家渠干旱盐碱地区。大肠杆菌DH5 α 菌株为我们实验室保藏菌种。pMD18-T测序载体、RNA提取试剂盒、PCR产物回收试剂盒、DNA marker、*Bam*HI和*Hind*III限制性内切酶、exTaq酶以及RT-PCR和PCR引物均购自Takara公司。测序试剂盒购自美国PE公司,其它试剂均为分析纯。

总RNA的提取依据操作试剂盒进行。

根据已发表的相关*NHX*基因序列,设计7对PCR引物,其中的5条引物序列为:2P1: 5' TTTCAAGTAAAAAGAAGCAGTTTTTCCG 3'; 3P1: 5' TCTTGCTATTGGTGCCATATTTGCTGC-AACAGATTC 3'; 1P2: 5' CCACGACCTCCAAA-GACGGGTGCGCAT 3'; 2P2: 5' GGTTTGGTCAGCA-TACCAAACACCA 3'; 3P2: 5' ATCGTACTCGTG-ATCATGATTGCATT 3'。依照TaKaRa RNA PCR Kit操作指南进行,反转录用Oligo(dT)作下游引物,反应条件:42 $^{\circ}$ C 30 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min。PCR反应用*NHX*基因序列设计特异性引物(盐角草:3P1和2P2,盐爪爪:2P1和3P2,盐穗木:3P1和1P2)。扩增参数:94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52.5 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

根据已获得的核心片段设计3' RACE引物,盐角草引物序列为:3' P1: 5' GATCACGAGCAC-TATAACTATTGTCC 3', 3' P2: 5' GAGCTCC-ATATTGCTTGGTTTACTCATG 3'; 盐爪爪引物序列为:3' P1: 5' TGACTGAGAGTTCAAGA-GTAACCACCAAG 3', 3' P2: 5' GCTGTGAG-CTCCATATTGCTCGGTTTA 3'; 盐穗木引物序列为:3' P1: 5' ACCCGTCTTTGGAGGTCGTG-GAATC 3', 3' P2: 5' TGATGTGGACAACCAGG-ATGAAGGA 3'; P4: oligo(dT)。依照TaKaRa 3'-Full RACE Core Set操作指南进行。反转录用Oligo dT-3 sites Adaptor Primer作下游引物,反应条件:42 $^{\circ}$ C 30 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min。PCR

反应用*NHX*基因序列特异性引物3' P2和3 sites Adaptor Primer进行。扩增参数:94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min; 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。由于条带太多,用3' P1和3 sites Adaptor Primer进行半巢式PCR,模板为第1次PCR反应产物。

根据GenBank已发表的相关*NHX*基因序列,在5'端起始密码子处设计引物P1: 5' TCAGG-ATCCATGTGGTCACAGTTAAGC 3',下游引物分别为3种植物扩增核心序列的下游引物(盐角草:2P2,盐爪爪:3P2,盐穗木:1P2),对*NHX*基因读码框5'端未知序列进行扩增。扩增参数:94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

根据已获得的核心片段、5'端序列和3' RACE产物设计引物full P1:和full P2(盐角草:5' CTCGGA-TTCCCTGTCCCTATGTTCTGTGTC 3',盐爪爪:5' GTCTCCGAATTCTCTCTCTCTATGTTCTG 3',盐穗木:5' TGTCGCTTAGCTTTCTTTTCTCA-GTTCC 3'),进行PCR反应。扩增参数:94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

按Takara公司PCR Fragment Recovery Kit说明书进行PCR产物的回收。回收的*NHX*基因cDNA片段与pMD 18-T载体在T₄ DNA连接酶的作用下16 $^{\circ}$ C过夜,使*NHX*基因cDNA连接到pMD 18-T的载体上。连接产物转化感受态细胞,感受态的制备及转化按参考文献6。

为鉴定克隆的cDNA序列,对pMD 18-T/*NHX*重组质粒进行纯化,并用BcaBEST primer RV-M和BcaBEST primer M13-47对盐角草、盐爪爪和盐穗木*NHX*基因cDNA在PE377全自动测序仪进行双向DNA序列测定,所得序列用PE公司SeqEd v1.0.3软件进行分析。

实验结果

1 *NHX* 基因全长序列的获得

利用提取的总RNA,以Oligo(dT)为引物进行

反转录得到单链 cDNA 为模板, 再以设计的 PCR 引物进行扩增, 得到 *NHX* 基因片段, 长度为 1 700 bp 左右。盐角草 *NHX* 基因 cDNA 命名为 *SeNHX*, 盐爪爪 *NHX* 基因 cDNA 命名为 *KfNHX*, 盐穗木 *NHX* 基因 cDNA 命名为 *HcNHX*。RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 与我们预计的大小一致 (图 1)。

2 盐角草、盐爪爪和盐穗木 *NHX* cDNA 序列分析

对重组质粒用 BcaBEST primer RV-M 和 BcaBEST primer M13-47 进行双向测序, *SeNHX* 核苷酸长度为 1 683 bp, *KfNHX* 核苷酸长度为 1 683 bp, *HcNHX* 核苷酸长度为 1 737 bp (图 2)。

3 序列同源性分析

用 DNAMAN 对盐角草、盐爪爪和盐穗木 *NHX* 基因与碱蓬、滨藜和灰绿藜等 *NHX* 基因进行同源性分析显示, 所克隆的 cDNA 为 *NHX* cDNA。其中, 盐角草与盐爪爪同源性达 93.17%, 盐角草与盐穗木达 87.64%, 盐爪爪与盐穗木达 93.05%。与其它藜科植物如碱蓬同源性达 86%, 与滨藜达 89% (图 3)。

讨 论

一般认为, 非生物胁迫是多基因控制的性状, 但通过转单基因的方法也能获得转基因耐盐植株^[7,8]。通过 RT-PCR 技术扩增盐角草、盐爪爪和盐穗木 *NHX* 基因, 对比前人已发表的 *NHX* 基因序列设计引物, 从盐角草、盐爪爪和盐穗木总 RNA 中扩增出目的片段。序列分析表明, *NHX*

基因在植物中尤其是藜科植物中是高度保守的, 它可能编码一种功能性蛋白。藜科植物属于三类盐生植物(真盐生植物、假盐生植物和泌盐盐生植物)中最耐盐的真盐生植物, 具有特殊的适应性结构, 如叶肉质化, 能大量吸收盐分并通过离子区隔化将盐分局限于液胞以及老叶中, 它们能大量吸水以保持细胞膨压, 稀释体内盐分, 并通过老叶或茎的脱落减轻盐分危害^[9]。

液泡膜中的 Na^+/H^+ 反向运输体可促进离子在液泡中的分室效应, 跨液泡膜的 pH 为其提供能量。从拟南芥中分离出的 *AtNHX* 基因, 与哺乳动物 NHE 反向运输体具有序列相似性^[10,11]。在转基因拟南芥和转基因西红柿中过量表达 *AtNHX*, 可在液泡膜中积累大量的运输体和极大地提高它们的耐盐性^[10,12]。拟南芥 *NHX* 基因在 *NHX* 基因突变的酵母中表达, 可以使酵母由盐敏感型转变为盐耐受型^[11]。水稻自身 *NHX* 基因的过量表达也能提高其耐盐性^[13]。这些结果显示, *AtNHX* 基因家族经离子液泡区隔化效应能较大幅度上增强植物的耐盐性, 通过转化并过量表达 *NHX* 基因, 对于增强离子的转运能力、解除离子对细胞毒害、提高植物盐耐受等方面有重要意义^[8,13,14]。钠离子和氯离子区隔化在液泡中, 不仅可作为有效的渗透调节剂, 同时还可减小细胞毒性。植物细胞的生长主要是由液泡体积的膨胀调控的, 所以, 钠离子和氯离子的区隔化不仅有利于减轻离子毒害并进行渗透调节, 而且对细胞的发育也是必需的。

盐角草、盐爪爪和盐穗木是常见于新疆高度

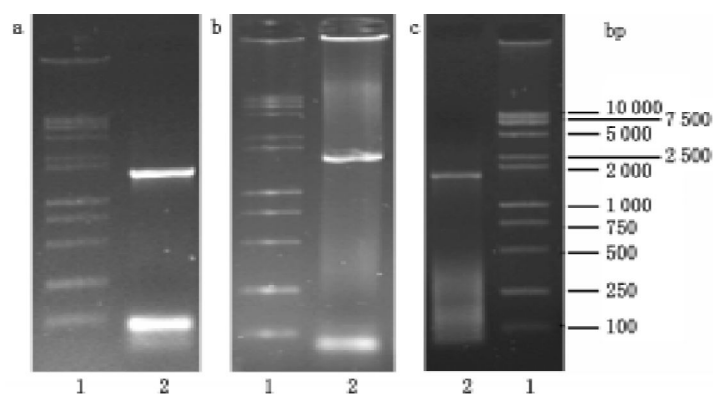


图1 RT-PCR 扩增产物的凝胶电泳

1: DL2000+15000 marker; 2: *SeNHX*(a), *KfNHX*(b), *HcNHX*(c)。

a. 盐角草

ATGTGGTCACAGTTAAGCTCTCTATTTTATAGCAAGATGGACATGCTATCCAGTCTGATCATGCTTCCGTGGTGTGATGAATTT
 GTTCGTAGCACTGCTATGTGGCTGCATTGTAATTGGTCATCTTCTCGAGGAGAATCGTTGGATGAACGAGTCCATCACCGCTTTA
 CTAATTGGTTTTGTACTGGGGTTGTGATTCTGCTGATTAGTGGAGGAAAAGAGCTCACATCTATTAGTCTTCAGTGAAGATCTTT
 TCTTTATATACCTCCTTCCGCCAATTATATTTAATGCAGGGTTTCAGGTAAAAAAGAAGCAATTTCTCCGCAACTTCATTACTAT
 TATAATGTTGGAGCCATTGGTACACTGGTATCATTCTCCGTCATATCTCTAGGAGCAATGACTATTTTAAAGAAGATGGATATTGGTTC
 TCTGGAGTTAGGAGACTATCTTGAATTGGTGAATATTCGCTGCAACCGATTCTGTGTGCACATTGCAGGTGCTTAATCAAGATGA
 GACTCCTCTTCTACAGTCTGGTGTGGTGAAGGTGTTGTTAATGATGCTACGTCGGTGGTGGCTTTTCAATGCGATTCCAGAAC
 TTCGACCTCAGCAATATTGATCACAGAATTGCTATACAGTTTTCTGGCAACTTCTTGATTTGTTTTTCGCAAGCACTCTGCTTGGGA
 GCGATGACCGGCTTGCTAAGTGTATTGTTATCAAAAAGCTGTACTTTGGAAGGCATTCAACTGATCGTGAGGTTGCCTTAATGA
 TGCTTATGGCTTATCTATCATACATGCTTGGCTGAACCTTCTATTTTGGAGGGGATTCTCACAGTATTCTTCTGTGGGATTGTCTAG
 TCCCATTATACATGGCACAATGTGACTGAGAGTTCAAGAGTAACCACCAAGCATGCTTTTGCACACTGTCTTTGTTGCTGAGA
 TTTTCTCTTTCTATATGTTGGTATGGATGCATTGGACATTGAGAAGTGGAGATTTGTGAGTGATAGTCCGGGAACCTTCTGTTGCT
 GTGAGCTCCATATTGCTTGGTTTACTCATGGTTGGACGAGCAGCTTTTGTTCCTTTATCCTTGTGATAAACTTTTCCAAA
 AAATCACATAGTGAGAAGATCACCTTCAATCAGCAGATAGTTATATGGTGGGCTGGTCTCATGAGAGGTGCTGTTTCCATGGCACT
 TGCTTATAATCAGTTTACGAGGTCAGGGCACACGAGCTGAGGGGGAATGCAATCATGATCACGAGCACTATAACTATTGTCTTT
 TTAGTACGACGGTGTGGGTTGCTGACAAAAGCCACTTATATTTTGGCTGCCACATTCAAAAACCTTCACTAGTGCCAGCAGCTG
 TGTCAGATTTAGGGAGTCCAAAATCATTATCCTTGCCTCTCCTTGATGGCGGACAAGATTCCGAAAACCTGATATGGACAACCAAGAC
 GAAGCAGTCAACAACCGCTATGAAGGAACCCACAACCGGGCTATAGCCCGGCCGTCGAGCCTTCCAATGCTTCTAAATGCACCTA
 CTCACACCGTCCACTATTATTGGCGCAAATTCGATGATTCTGTTTCATGCGGCCTGTATTTGGTGGCAGGGGTTTTGTACCGTACGT
 GCCTGGCTCGCTATTGAAACAGAACCCGACAATTTGCTAGACAGAACATAG

b. 盐爪爪

ATGTGGTCACAGTTAAGCTCTTTATTTTATAGCAAGATGGACATGCTTTCCACATCCGATCATGCTTCCGTGGTGTCCATGAAT
 TGTTTGTAGCACTGCTATGTGGCTGCATTGTAATTGGTCATCTTCTGAGGAGAATCGCTGGATGAATGAGTCCATCACCGCTTT
 GCTAATAGGTTTTGCTACTGGGGTTGTGATTCTGCTGATTAGTGGAGGAAAAGAGTTCGCATCTGTTAGTCTTCAGTGAAGATCTT
 TTCTTCATATACCTTCTTCCACCAATTATATTTAATGCAGGGTTTCAGGTGAAAAAGAAGCAATTTCTCCGCAACTTCATTACTA
 TCATAATGTTCCGAGCCCTTGGTACACTGGTATCATTCTCCATCATATCTCTAGGAGCAATGACTACTTTTAAAGAGGATGGATAT
 TGGTTCTCTGGAGTTAGGAGACTATCTTGCATTGGTGAATATTCGCTGCAACCGATTCTGTTTGCACATTGCAGGTGCTTAAT
 CAAGATGAGACTCCTTCTCTACAGTCTGGTGTGGTGAAGGTTGTTGTTAATGACGCTACATCGGTGGTGGCTTTTCAATGCAA
 TTCAGAACTTCGATCTGACGCATATTGATCACAGAATTGCTTTACAGTTTTCTGGCAACTTCTTATATTTGTTTTTCGCAAGCA
 CTCTGCTTGGAGCGATGACCGGCTTGTAAAGTCTTATGTTATCAAAAAGTTGACTTTGGCAGGCATTCAACTGACCGTGAGG
 TTGCCTTAATGATGCTTATGGCTTATCTATCGTACATGCTTGTGAACTCTTCTATTTGAGTGGAACTTCTACTGTATTCTTCTG
 CGGGATTGTCATGTCCCATTATACATGGCACAATGTGACTGAGAGTTCAAGAGTAACCACCAAGCATGCTTTTGGCACCCTGTCTT
 TTGAGTCTGAGATTTTCTCTTTCTATATGTTGGTATGGATGCATTGGACATTGAGAAGTGGAGATTTGTGAGTGATAGTCCCG
 GAACCTCTGTTGCTGTGAGCTCCATATTGCTCGGTTTACTCATGGTTGGAGCAGCAGCTTTTGTTCCTTTTCTTATCCTTTTAA
 TGAACCTTCTCCAAAAAACGCACAGTGAGAAGGTCACCTTCAATCAGCAGATAGTCAATGTTGGGCGCGTCTCATGAGAGGTGC
 CGTCTCCATGGCACTTGCTTATAATCAGTTTACAAGGTCAGGGCATAACACAGCTGAGGGGAAATGCAATCATGATCACAAGCACTA
 TATCTGTTGCTCCTTTTAGTACGATGGTATTTGGATTGCTGACAAAAGCCGCTTATATGTTTTGTTGCTCATCCAAAACACTT
 CACTAGTGGAGCACTGTGTGAGATTTGGGGAGTCCAAAATCATTCTCCATGCCTCTCCTTGGAGGGCTACAAGATTCTGAGGTT
 GATGTGGACAACCAAGGATGAAGGAACCAACAACCAAGGTCGAAGGAACCAATAACCGGACTATAGCTCGACCTGGTAGCCTTCGCATG
 CTTCTAAATGCACCTACTACACCGTCCACTATTATTGGCGTAAATTCGATGATTCTATTCATTCGCGCCTGTACTTGGTGGCCGGG
 GTTTTGTACCTTATGTCCCGGGCTCACCTATTGAAACAGACCACCAACAATTTGCTAGACAGAACATAG

c. 盐穗木

ATGTGGTCACAGTTAAGCTCTTTATTTTATAGCAAGATGGACATGCTTTCCACATCCGATCATGCTTCCGTGGTGTCCATGAAT
 TTGTTTGTAGCACTGCTATGTGGCTGCATTGTAATTGGTCATCTTCTGAGGAGAATCGCTGGATGAATGAGTCCATCACCGCTTT
 GCTAATAGGTTTTGCTACTGGGGTTGTGATTCTGCTGATTAGTGGAGGAAAAGAGTTCGCATCTGTTAGTCTTCAGTGAAGATCTT
 TTCTTCATATACCTTCTTCCACCAATTATATTTAATGCAGGGTTTCAGGTAAAAAAGAAGCAATTTCTCCGCAACTTCATTACTA
 TCATAATGTTCCGAGCCCTTGGTACACTGGTATCATTCTCCATCATATCTCTAGGAGCAATGACTATTTTAAAGAAGATGGATAT
 TGGTTCTCTGGAGTTAGGAGACTATCTTGAATTGGTGAATATTTGCTGCAACCGATTCTGTTTGCACGTTGCAGGTGCTTAAT
 CAAGATGAGACTCCTTCTCTACAGTCTGGTGTGGTGAAGGTGTTGTTAATGACGCTACATCGGTGGTGGCTTTTCAATGCAA
 TTCAGAACTTCGATCTGACGCATATTGATCACAGAATTGCTTTACAGTTTTCTGGCAACTTCTTATATTTATTTTTCGCAAGCA
 CTCTGCTTGGAGCGATGACCGGCTTGTAAAGTCTTATGTTATCAAAAAGTTGACTTTGGCAGGCATTCAACTGACCGTGAGGT
 TGCTTAAATGATGCTTATGGCTTATCTATCGTACATGCTTGTGAACTTCTCTATTTGAGTGGAACTTCTACAGTATTTTCTGC
 GGGATTGTCATGTCCCATTATACATGGCACAATGTGACTGAGTTCAAGAGTAACCACCAAGCATGCTTTTGGCACCCTGTCTTTTG
 TAGCGAGATTTTCTCTTTCTATATGTTGGTATGGATGCATTGGACATTGAGAAGTGGAGATTTGTGAGTGATAGTCCCGGAACCT
 CTGTTGCTGTGAGCTCCATATTGCTCGGTTTACTCATGGTTGGACGAGCAGCTTTTGTTCCTTTTATCCTTTTAAATGAACCT
 CTCCAAAAAACGCACAGTGAGAAGGTCACCTTCAATCAGCAGATAGTCAATGGTGGGCGGCTCATGAGAGGTGCCGTCTCCA
 TGGCACTTGCTTATAATCAGTTTACAAGGTCAGGGCATAACACAGCTGAGGGGAAATGCAATCATGATCACAAGCACTATATCTGT
 TGCCTTTTTAGTACGATGGTATTTGGATTGCTGACAAAAGCCGCTTATATTGTTTTGTTGCTCCTCAAAAACACTTCACTAGT
 GCGAGCACTGTGTGAGATTTGGGGAGTCCAAAATCATTCTCCATGCCTCTCCTTGGAGGGCTACAAGATTCTGAGGTTGATGTGGA
 CAACCAGGATGAAGGAACCAACAACCAAGGTCGAAGGAACCAATAACCGGACTATAGCTCGACCTGGTAGCCTTCGCATGCTTCTAA
 ATGCACCTACTCACACCGTCCACTATTATTGGCGTAAATTCGATGATTCTTTCATGCGACCCGCTTTGGAGGTCGTGGAATCTC
 TAGAGGATCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTCAATTTTGTTCCTTCTGTTCCGGGCTCACCAACAGAACCGGAGC
 GTCCATCAATGGAACGAGAAAAGAAGCTAA

图2 盐角草、盐爪爪和盐穗木 *NHX* 基因 cDNA 序列

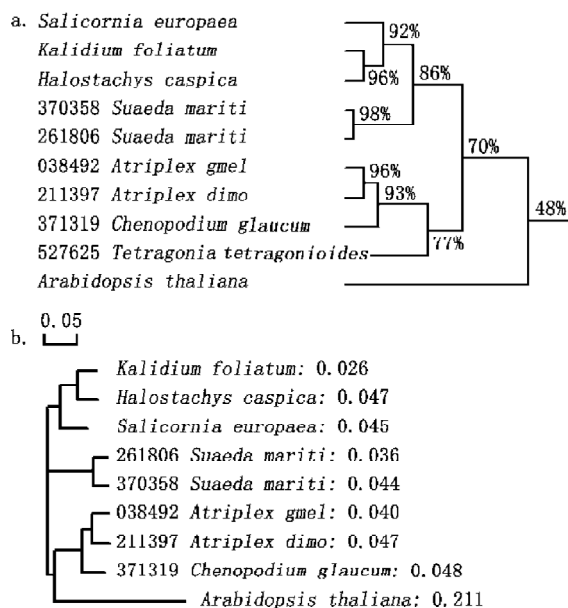


图3 盐角草、盐爪爪和盐穗木与其它几种藜科植物的 *NHX* 基因同源性比较和系统分析

a: 藜科植物 *NHX* 基因的同源性分析; b: 藜科植物 *NHX* 基因的系统关系。

盐渍化地区的藜科植物, 分别属于草本、小半灌木和灌木, 它们的耐盐性依序逐步减弱, 表明草本植物比灌木适应外界盐碱环境的能力更强。本文克隆这3种藜科植物 *NHX* 基因, 它们的序列有较高的同源性。此外, 这3种植物是新疆分布较广的盐生植物, 其中, 盐角草已经被公认为世界上最耐盐的植物。从序列比对分析可以看出, 它们的 *NHX* 基因相对于其他植物来说同源性更高和系统进化关系更近, 推测 *NHX* 基因在这3种植物耐盐性中可能具有相同的作用, 也为进一步深入研究新疆盐生植物 *NHX* 的分子进化关系提供了基础资料。

参考文献

- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51: 463~499
- Qiu QS, Guo Y, Francisco J et al. Regulation of vacuolar Na^+/H^+ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-

- sensitive (SOS) pathway. *J Biol Chem*, 2004, 279 (1): 207~215
- Barkla BJ, Apse MP, Manolson MF et al. The plant vacuolar Na^+/H^+ antiport. *Symp Soc Exp Biol*, 1994, 48: 141~153
- Barkla J, Pantoja O. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 159~84
- Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A et al. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(2): 146~159
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 19~56
- Kasuga M, Liu Q, Miura S et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotech*, 1999, 17: 287~291
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J et al. Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J*, 2000, 23:319~327
- 赵可夫, 李军. 盐浓度对3种单子叶盐生植物渗透调节剂及其在渗透调节中贡献的影响. *植物学报*, 1999, 41(12): 1287~1292
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 285: 1256~1258
- Gaxiola RA, Rao R, Sherman A et al. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1480~1485
- Apse MP, Sottosanto JB, 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. *Plant J*, 2003, 36: 229~239
- Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A et al. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 146~159
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 285: 1256~1258
- Wu CA, Yang GD, Meng QW et al. The Cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast Na^+/H^+ antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(5): 600~607