

马蔺NHX基因的克隆与基因表达分析

郭强, 孟林*, 李杉杉, 张琳, 毛培春, 田小霞

北京市农林科学院, 北京草业与环境研究发展中心, 北京100097

摘要: 液泡膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白NHX所特有的液泡Na⁺区域化功能, 在植物耐盐中发挥着极其重要的作用。以马蔺根中总RNA为模板, 利用同源克隆方法克隆得到一个NHX基因, 命名为*IINHx*。序列分析表明该基因的开放阅读框为1 641 bp, 编码546个氨基酸, 与已知的植物NHX具有较高的同源性(>70%)。预测其蛋白质分子量为60 kDa, 等电点为6.67。实时定量PCR分析表明, 随着NaCl浓度的增加, 地上部和根中的*IINHx*基因表达水平呈增加趋势, 且地上部中的表达量显著高于根部, 表明*IINHx*基因的表达受到盐的诱导和调节。

关键词: 马蔺; 液泡膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白; 表达; 耐盐

Cloning of *Iris lactea* var. *chinensis* NHX and Analysis of Gene Expression

GUO Qiang, MENG Lin*, LI Shan-Shan, ZHANG Lin, MAO Pei-Chun, TIAN Xiao-Xia

Beijing Research and Development Center for Grasses and Environment, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097, China

Abstract: The tonoplast Na⁺/H⁺ antiporters (NHX) are involved in the compartmentalization of Na⁺ into vacuoles and also play critical roles in salt tolerance of plant. Total RNA was extracted from the roots of *Iris lactea* var. *chinensis* to obtain an *IINHx* by homology cloning. The open reading frame of *IINHx* was 1 641 bp encoding 546 amino acids. The deduced amino acid sequence of *IINHx* shared over 70% amino acid homology compared with other plants NHX. The protein was estimated to have a molecular weight of 60 kDa and isoelectric point of 6.67. Quantitative real-time PCR analysis showed that expression levels of *IINHx* exhibited an increase trends in both shoots and roots with the increase of external NaCl concentrations, and its levels in shoots was significant higher than that of roots, indicating that the expression of *IINHx* was induced and regulated by salt.

Key words: *Iris lactea* var. *chinensis*; tonoplast Na⁺/H⁺ antiporter; expression; salt tolerance

土壤盐渍化是限制农作物产量的主要非生物因素之一(Guo等2012), 这主要是由于土壤中过高的Na⁺会造成植物的生理干旱, 扰乱细胞的离子平衡, 导致膜功能失调和代谢活动的减弱, 从而抑制生长并最终导致细胞死亡(Zhu 2001)。植物细胞抵御Na⁺毒害的主要策略有Na⁺外排和Na⁺区域化(Guo等2013)。其中, 在Na⁺区域化过程中, 液泡膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白依靠液泡膜H⁺-ATPase形成的H⁺跨膜电化学梯度为其提供驱动力, 将细胞质中过多的Na⁺区域化到液泡中, 从而减轻了Na⁺对细胞质内的各类代谢酶的伤害, 同时还可作为一种廉价的渗透调节剂来维持细胞的膨压, 降低细胞渗透势, 进而提高植物耐盐性(Blumwald和Poole 1985)。

液泡膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白活性最初是在甜菜(*Beta vulgaris*)根中检测到(Blumward和Poole 1985)。Apse等(1999)从拟南芥(*Arabidopsis thali-*

ana)中鉴定出第一个高等植物液泡膜上的Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因*AtNHX1*。随后相继在水稻(*Oryza sativa*) (Fukuda等1999)、北滨藜(*Atriplex gmelinii*) (Hamada等2001)、盐地碱蓬(*Suaeda salsa*) (Ma等2004)、玉米(*Zea mays*) (Zörb等2005)、胡杨(*Populus euphratica*) (Ye等2009)和霸王(*Zygophyllum xanthoxylum*) (Wu等2011)等植物中克隆到液泡膜Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因NHX。异源表达互补实验表明, 在酵母*nhx1*突变体中过量表达*AtNHX1*, 显著降低了酵母对盐的敏感性, 增强了细胞内Na⁺的区域化能力(Gaxiola等1999)。Apse等

收稿 2015-09-01 修定 2015-10-30

资助 北京市自然科学基金项目(6142007和6152008)、北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJ CX20140103)和北京市农林科学院草业中心人才培养基金项目。

* 通讯作者(E-mail: menglin9599@sina.com; Tel: 010-51503345)。

(1999)发现,在拟南芥中超表达*AtNHX1*,转基因植株液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性显著高于野生型,且在高盐胁迫下仍能正常生长发育。在油菜中过量表达*AtNHX1*,与野生型相比,发现 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 胁迫下转基因油菜 T_2 代植株叶和根中 Na^+ 含量提高了7~9倍,而且仍能正常生长、开花和结实(Zhang等2001)。将*AtNHX1*转入玉米(Yin等2004)和小麦(Xue等2004)等植物中,显著提高了它们的耐盐性。Bao等(2014)研究发现,将荒漠旱生植物霸王*ZxNHX*转入百脉根(*Lotus corniculatus*)后,发现转基因植株的叶和根中积累了更多 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} ,降低了其叶片渗透势和增强了保水性,使得其抗旱性和耐盐性得以显著提高。近年来,随着研究的深入,液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的其他一些功能也逐步被发现:敲除拟南芥*AtNHX1*,与野生型相比,*atnhx1*突变体植株表皮细胞数量与叶面积明显减小,并发生叶片卷曲现象(Apse等2003)。He等(2005)研究表明,在棉花(*Gossypium hirsutum*)中超表达*AtNHX1*,盐胁迫下转基因植株棉纤维产量显著增加,同时,转基因棉花的光合速率和氮同化速率均比野生型植株强,这可能是转基因植株提高棉纤维产量的一个重要原因。此外,植物液泡膜NHX类蛋白也可能参与 K^+/H^+ 逆向转运,这类蛋白的过量表达将有助于 K^+ 在液泡内的大量积累,并调控 K^+ 在细胞质和液泡中的分配,从而提高转基因植物对高 Na^+ 环境的适应能力(Leidi等2010)。随后Bassil等(2011)研究表明,利用T-DNA定点插入的方法,获得拟南芥双突变体*atnhx1atnhx2*,与野生型相比,双突变体液泡中的pH值显著降低,使之发生酸化,液泡中的 K^+ 浓度和花粉活性也随之降低;说明*AtNHX1*和*AtNHX2*通过控制液泡中pH和 K^+ 稳态来调节拟南芥开花和生长发育。综上所述,液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白NHX不仅在植物耐盐中扮演着至关重要的作用,而且在保持细胞中的 K^+ 和pH稳态中也起重要作用,从而影响植物的生长发育(Reguera等2014)。

马蔺(*Iris lactea* var. *chinensis*)又名马莲,是鸢尾科鸢尾属多年生宿根草本植物,广泛分布于我国西北、东北和华北等地区,其叶片色泽青绿,返青早,绿期长,花淡雅美丽,具有较强的抗病虫能力,其根系发达入土深,须根稠密呈伞状分布,具有很强的缚土保水能力,耐粗放管理,养护成本较

低,是优良的水保、护坡、观叶赏花园林地被植物,同时,马蔺的种子还具有重要的药用价值(孟林等2003);特别是其极强的耐盐能力已成为我国北方退化低地盐生草甸的主要植被(白文波和李品芳2005)。然而,有关液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白NHX在马蔺耐盐性中的作用机制研究尚不清楚。鉴于此,本研究以马蔺为材料,克隆其*IINHX*,并分析了盐胁迫下*IINHX*基因的表达特性,这为进一步研究*IINHX*基因的转化及功能解析奠定了基础。

材料与方法

1 实验材料

植物材料为马蔺[*Iris lactea* Pall. var. *chinensis* (Fisch.) Koidz.],其种子采自北京市农林科学院小汤山草资源试验基地。大肠杆菌菌株*Escherichia coli* DH5 α 由本实验室保存。

2 主要试剂

RNA提取、PCR扩增、DNA回收、TA克隆、Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser第一链合成、DNA marker等试剂盒均购自宝生物工程(中国)有限公司,其他生化试剂均为进口或国产分析纯。

3 实验材料培养

挑选色泽光亮饱满的马蔺种子经5%次氯酸钠溶液消毒5 min后,再用蒸馏水冲洗然后置于40 °C的水浴锅中浸泡56 h,将其均匀播撒在装有营养土和细沙(2:1)的花盆中,置入人工气候箱培养至6周龄时,挑选长势一致的幼苗移入培养盒(长19 cm、宽13.5 cm、高7.5 cm)中浇灌Hoagland营养液[$2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KNO}_3$, $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $0.25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Fe-citrate}$, $92\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_3\text{BO}_3$, $18\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $1.6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0.7\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$]培养2周,营养液每2 d更换一次。培养室光照培养16 h(昼)/8 h(夜),昼/夜温度为25 °C/18 °C,光强约为 $600\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,空气相对湿度为50%~80%。

4 马蔺*IINHX*基因的克隆

将培养至8周龄的马蔺幼苗在 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 溶液中处理24 h,采集其根经无菌水冲洗后,置于消毒滤纸上吸干水分,取其鲜根100 mg,于液

氮中充分研磨,参照宝生物RNA提取试剂盒和说明书提取总RNA,利用Prime Script RTase cDNA第一链合成试剂盒进行反转录,合成cDNA。根据NCBI GenBank数据库中注册的白花马蔺*IINH2*的序列(登录号: AY730277),设计正、反向引物P1 (5'-ATGGGGTCTGGTATGGAGGA-3')和P2 (5'-TCATTCCCATCCATGAACAC-3'),引物由上海生工合成。PCR扩增反应体系:在200 μ L PCR管中依次加入: Prime STAR HS (Premix) 25 μ L, 20 pmol· μ L⁻¹ P1和P2各0.5 μ L, cDNA 4 μ L,加水补至50 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 1 min;98 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,30个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR扩增产物用1.2%琼脂糖凝胶检测,目的片段的回收和纯化按照宝生物DNA胶回收试剂盒说明书操作说明进行。回收得到的PCR纯化产物连接到pMD19-T载体,转化到感受态大肠杆菌DH5 α 中,用含有50 mg·L⁻¹氨苄青霉素的LB固体培养基进行蓝白斑筛选,转化白斑菌株经质粒PCR鉴定确认阳性克隆后,送至上海生工测序。

5 实时荧光定量PCR

采用实时荧光定量PCR方法分析不同盐浓度(0、25、50、100和200 mmol·L⁻¹ NaCl)处理48 h后马蔺地上部和根中*IINH2*基因的表达模式。盐处理下马蔺地上部和根中的总RNA的提取参照宝生物RNA提取试剂盒说明书进行。cDNA第一链的合成按照Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒说明书进行(宝生物工程有限公司)。马蔺*IINH2*基因实时荧光定量PCR正向引物P3 (5'-TCTTCCCGCTGTCTTTCCTATC-3')和反向引物P4 (5'-CATCAAACCTGCCACCA-3'),PCR产物长度为98 bp;马蔺内参基因*Actin*实时荧光定量PCR正向引物P5 (5'-TATTGTGCTGGATTCTGGTGATG-3')和反向引物P6 (5'-GGAGGATAGCATGGGAAGAG-3'),PCR产物长度为80 bp。参考宝生物SYBR® Premix Ex Taq II试剂盒说明书的方法在Step One Plus仪器上进行实时荧光定量PCR实验。反应体系: cDNA 1 μ L, SYBR® Premix Ex Taq II 10 μ L, ROX Reference Dye 0.4 μ L, 正、反向引物分别为1 μ L,加水补至20 μ L。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 1 min;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,40个循环。采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}方法计算马蔺*IINH2*基因在不同盐浓度胁迫下的相对表达量,设置3次重复。

6 生物信息学分析

序列的比较、翻译和系统进化树分析分别在DNAMAN 8.0、Primer 5.0和MEGA 6.0软件上进行,Blast搜索和蛋白质二级结构预测分别在NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)和SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)网站上进行。

实验结果

1 马蔺*IINH2*基因的克隆

以马蔺根cDNA为模板,用克隆引物P1和P2进行PCR扩增,1.2%的琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行检测,发现约在2 000 bp处有一条亮带,且上下无杂带,与目的片段的大小一致,将此片段回收纯化连接到pMD19-T克隆载体上,转化到DH5 α 中。从转化的平板上随机挑取多个阳性克隆,随后从这些克隆中任选6个提取质粒,进行PCR扩增,得到的扩增片段大小约在2 000 bp处(图1),表明这些克隆为阳性克隆,测序结果发现该基因的开放阅读框为1 641 bp,编码546个氨基酸,预测其蛋白质分子量为60 kDa,等电点为6.67;与白花马蔺*IINH2*基因的碱基序列相似性为99.39%,氨基酸序列相似性为99.27%,命名为*IINH2*。

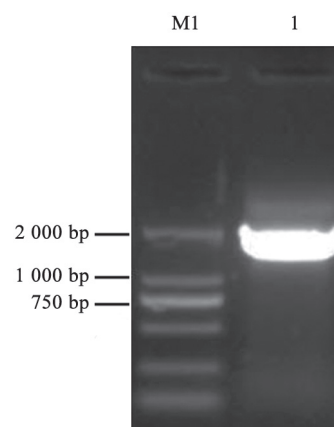


图1 *IINH2* PCR扩增产物

Fig.1 The PCR products of *IINH2*

M1: DL2000 DNA Marker; 1: *IINH2*扩增产物。

2 马蔺*IINH2*的生物信息学分析

将*IINH2*的氨基酸序列与GenBank中的氨基酸序列进行比对,结果显示*IINH2*与油棕(*Elaeis guineensis*)、谷子(*Setaria italica*)和拟南芥植物的

液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白*NHX*同源性分别为87%、83%和72%; *IINHx*具有11个跨膜保守区, 在第3个跨膜的保守区上有氨氯吡嗪的结合位点($^{85}\text{LFFIYLLPPI}^{94}$), 可能与 Na^+ 的竞争性抑制有关(图2)。

利用在线的SOPMA软件对*IINHx*蛋白质二级结构进行了预测(图3), 发现其含有34.25% α 螺旋、28.75%延伸链、10.99% β 转角和26.01%无规则卷曲。 α 螺旋和无规则卷曲结构交错构成了其蛋白质二级结构的主要部分。

为了进一步分析*IINHx*与其他植物液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因*NHX*的亲缘关系, 利用MEGA 6.0软件对植物的*NHX*进行系统进化树分析(图4)。结果表明: *IINHx*与油棕*EgNHx2*、海枣(*Phoenix dactylifera*) *PdNHx2*、小果野蕉(*Musa acuminata*) *MaNHx2*、谷子*SiNHx2*、拟南芥*AtNHx1*

*Hx1*等的亲缘关系较近, 而与拟南芥质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白*AtSOS1*亲缘关系较远。序列比较结果以及进化树分析都表明*IINHx*应为液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白上的一类基因。

3 马蔺*IINHx*基因表达模式分析

为了分析盐处理对马蔺地上部和根中*IINHx*的表达影响, 8周龄的马蔺幼苗分别用0、25、50、100及200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理48 h。结果显示, 随 NaCl 浓度的增加, 地上部和根中的*IINHx*表达水平呈递增趋势, 且地上部*IINHx*表达水平显著高于根中的(图5)。由此表明, *IINHx*的表达受盐胁迫的诱导和调节。

讨论

植物为了抵御盐害将 Na^+ 区域化到液泡中, 以避免 Na^+ 在细胞质中的含量达到毒害水平, 并保持

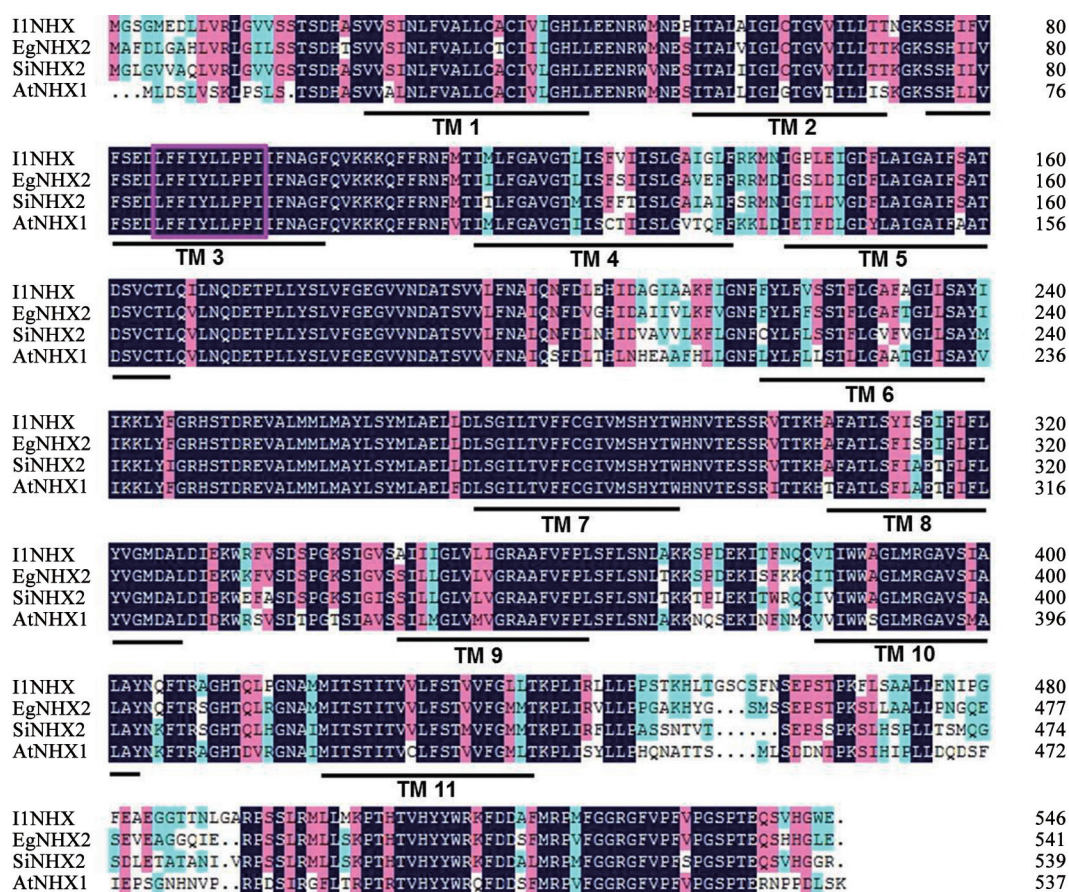


图2 *IINHx*与其他植物*NHX*氨基酸序列比对

Fig.2 Amino acid sequence alignment of *IINHx* with other plants *NHX*

紫红色方框表示高度保守的氨氯吡嗪的结合位点; 黑色下划线表示跨膜区; Il: 马蔺; Eg: 油棕; Si: 谷子; At: 拟南芥。

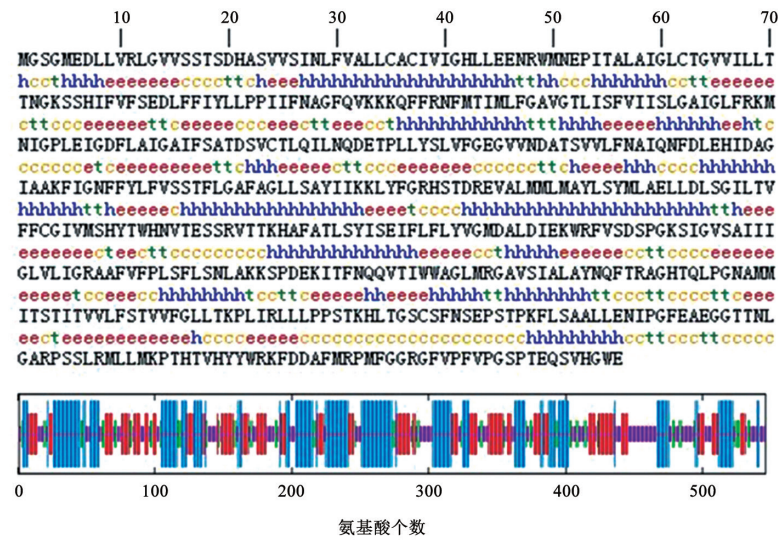


图3 IINHx蛋白质二级结构预测

Fig.3 Prediction of the secondary structure of IINHx

螺旋(h)、折叠(s)、转角(t)和卷曲(c)分别由蓝、红、绿和黄色线条表示。

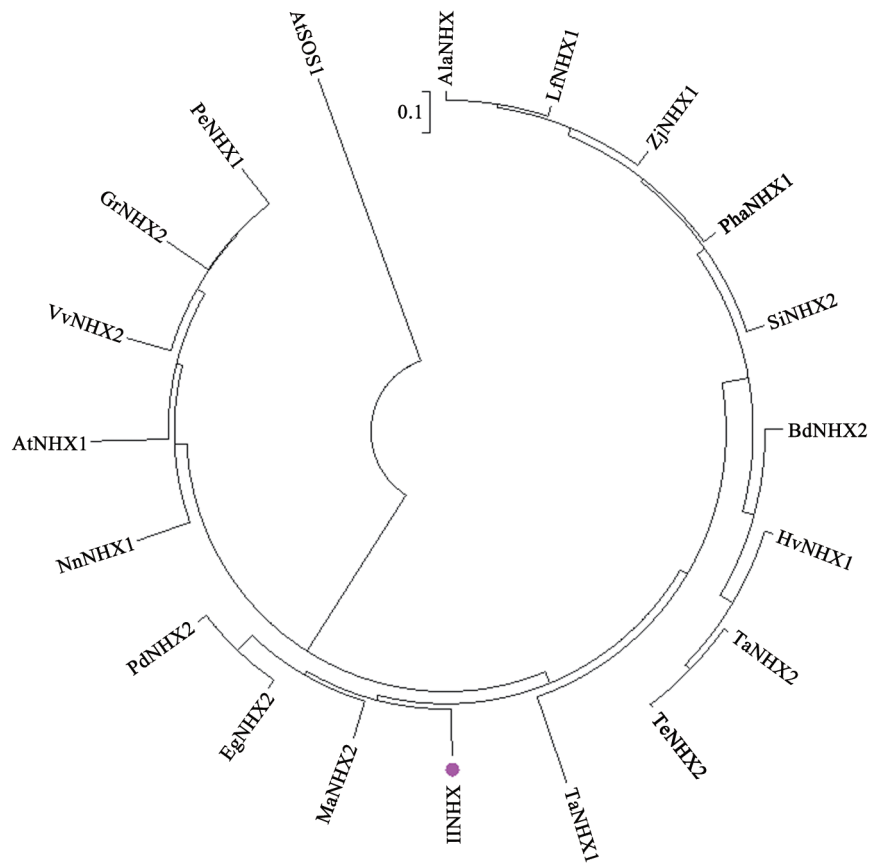


图4 INHX与其他植物NHX的系统进化树分析

Fig.4 Phylogenetic tree of IINHx and NHX from other plants

Al: 平滑獐毛; At: 拟南芥; Bd: 二穗短柄草; Eg: 油棕; Gr: 雷蒙德氏棉; Hv: 大麦; Il: 马蔺; Lf: 细穗千金子; Ma: 小野果蕉; Nn: 荷花; Pd: 海枣; Pe: 胡杨; Pha: 芦苇; Si: 谷子; Ta: 小麦; Te: 长穗偃麦草; Vv: 葡萄; Zj: 结缕草。

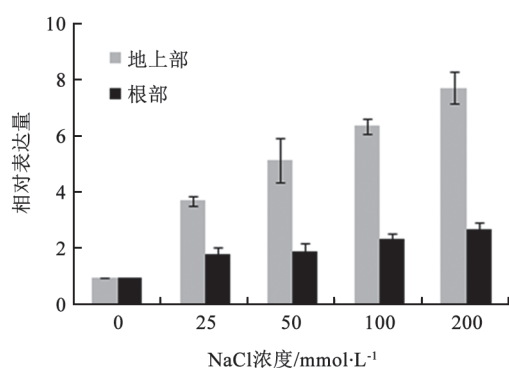


图5 不同浓度NaCl处理下马蔺地上部和根中*IINHx*基因的表达分析

Fig.5 Expression analysis of *IINHx* in shoots and roots under different NaCl concentrations

液泡较低的水势, 维持膨压和细胞膨胀, 是植物耐盐的重要策略之一(Guo等2013)。液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白NHX是植物耐盐的关键因子, 主要负责参与液泡 Na^+ 区域化, 其次还在保持液泡中的 K^+ 和pH值稳态以及影响叶片发育扮演着重要的角色(Reguera等2014)。本研究从马蔺中克隆得到液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因*IINHx*, 其编码了546个氨基酸, 与其他植物NHX的同源性高达72%以上, 且N末端具有11个疏水跨膜结构域, C末端含有一个长的亲水性尾巴(图2)。一般而言, 植物NHX蛋白含有10~12个跨膜结构域, 主要以二聚体的形式行使功能(Padan等2009), 该蛋白C末端是调节活性的区域, 其结构域中含有多个蛋白激酶作用位点, 主要参与钙调素的结合以及多种信号的启动反应(石乐义等2006)。据此, 推测马蔺*IINHx*的C末端结构域可能也参与多种信号的启动及钙调素的结合。由图2所示, 与拟南芥*AtNHX1*一样, 在*IINHx* TM3跨膜区同样含有高度保守的氨基吡嗪咪结合位点(LFFIYLLPPI)。拟南芥*AtNHX1*对于氨基吡嗪咪具有高度的敏感性, 可被氨基吡嗪咪完全抑制, 这归于拟南芥*AtNHX1*的氨基吡嗪咪结合位点(LFFIYLLPPI)的第4个氨基酸残基是异亮氨酸、第5个是酪氨酸残基, 而这2个氨基酸残基对于氨基吡嗪咪具有很高的亲和性(Counillon等1993)。这暗示着, 马蔺*IINHx* TM3跨膜区上的LFFIYLLPPI结构域对液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的底物 Na^+ 的竞争性抑制剂氨基吡嗪咪具有敏感性, 是负责 Na^+ 转运的区域。

系统进化树分析表明, 植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白家族可分为两类, 即质膜型和液泡型。*IINHx*与其他植物液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的同源关系较近, 而与质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(SOS1)的同源关系较远(图4)。这与之前报道的该家族分类的结果一致(Brett等2005)。特别是, 随着NaCl浓度的增加, 马蔺地上部和根中的*IINHx*表达水平呈增加趋势, 且地上部中的*IINHx*表达水平显著高于根部(图5); 这或许是由于随着盐处理浓度的增加对*IINHx*的诱导和刺激作用越大, 这也有利于将地上部细胞质中的 Na^+ 及时有效的区域化在液泡中, 从而减轻盐对植物的伤害(Apse等2003; Wu等2011)。由此可知, 马蔺液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因*IINHx*定位在液泡膜上, 且与其他植物如拟南芥*AtNHX1*一样具有类似的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的功能。

马蔺具有极强的耐盐能力, 是我国北方退化低地盐生草甸的主要植被, 在长期的自然选择过程中具有极强的抗逆性, 可能蕴藏着丰富的耐盐基因资源, 挖掘和鉴定与其耐盐相关的功能基因, 将能克服栽培作物抗性育种中抗逆基因匮乏的问题。鉴于此, 本研究从马蔺中克隆了*IINHx*基因, 同时定量分析了不同浓度NaCl处理下各组织中的*IINHx*基因表达变化规律, 这将为下一步*IINHx*基因的转化及功能分析奠定了坚实的基础。

参考文献

- 白文波, 李品芳(2005). 盐胁迫对马蔺生长及 K^+ 、 Na^+ 吸收与运输的影响. 土壤, 37 (4): 415~420
- 孟林, 张国芳, 赵茂林(2003). 水保护披观赏优良地被植物-马蔺. 农业新技术, (3): 38~39
- 石乐义, 李美茹, 李洪清, 陈贻竹(2006). 植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白功能及调控的研究进展. 广西植物, 26 (6): 602~607
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis*. Science, 285: 1256~1258
- Apse MP, Sottosanto JB, Blumwald E (2003). 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, 36: 229~239
- Brett CL, Donowitz M, Rao R (2005). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. Am J Physiol Cell Physiol, 288: C223~C239
- Bassil E, Tajima H, Liang YC, Ohto MA, Ushijima K, Nakano R, Esumi T, Coku A, Belmonte M, Blumwald E (2011). The *Arabidopsis* Na^+/H^+ antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH

- and K^+ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *Plant Cell*, 23 (9): 3482~3497
- Bao AK, Wang YW, Xi JJ, Liu C, Zhang JL, Wang SM (2014). Co-expression of xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* *ZxNHX* and *ZxVPI-1* enhances salt and drought tolerance in transgenic *Lotus corniculatus* by increasing cations accumulation. *Funct Plant Biol*, 41: 203~214
- Blumwald E, Poole RJ (1985). Na^+/H^+ antiporter in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 78: 163~167
- Coumillon L, Franchi A, Pouysségur J (1993). A point mutation of the Na^+/H^+ exchanger gene (*NHE1*) and amplification of the mutated allele confer amiloride resistance upon chronic acidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 4508~4512
- Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y (1999). Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+ exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochim Biophys Acta*, 1446: 149~155
- Gaxiola RA, Rao RI, 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 Q, Wang P, Ma Q, Zhang JL, Bao AK, Wang SM (2012). Selective transport capacity for K^+ over Na^+ is linked to the expression levels of *PtSOS1* in halophyte *Puccinellia tenuiflora*. *Funct Plant Biol*, 39 (12): 1047~1057
- Guo Q, Meng L, Mao PC, Tian XX (2013). Role of silicon in alleviating salt-induced toxicity in white clover. *Bull Environ Contam Toxicol*, 91: 213~216
- Hamada A, Shono M, Xia T, Ohta M, Hayashi Y, Tanaka A, Hayakawa T (2001). Isolation and characterization of a Na^+/H^+ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Mol Biol*, 46: 35~42
- He C, Yan J, Shen G, Fu L, Holaday AS, Auld D, Blumwald E, Zhang H (2005). Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fibre yield in the field. *Plant Cell Physiol*, 46: 1848~1854
- Leidi EO, Barragán V, Rubio L, El-Hamdaoui A, Ruiz MT, Cubero B, Fernández JA, Bressan RA, Hasegawa PM, Quintero FJ, Pardo JM (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *Plant J*, 61: 495~506
- Ma XL, Zhang Q, Shi HZ, Zhu JK, Zhao YX, Ma CL, Zhang H (2004). Molecular cloning and different expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene in *Suaeda salsa* under salt stress. *Biol Plant*, 48: 219~225
- Padan E, Kozachkov L, Herz K, Rimon A (2009). NhaA crystal structure: functional-structural insights. *J Exp Biol*, 212: 1593~1603
- Reguera M, Bassil E, Blumwald E (2014). Intracellular NHX-type cation/ H^+ antiporters in plants. *Mol Plant*, 7 (2): 261~263
- Wu GQ, Xi JJ, Wang Q, Bao AK, Ma Q, Zhang JL, Wang SM (2011). The *ZxNHX* gene encoding tonoplast Na^+/H^+ antiporter in the xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* plays important roles in response to salt and drought. *J Plant Physiol*, 168: 758~767
- 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
- Ye CY, Zhang HC, Chen JH, Xia XL, Yin WL (2009). Molecular characterization of putative vacuolar NHX-type Na^+/H^+ exchanger genes from the salt-resistant tree *Populus euphratica*. *Physiol Plant*, 137: 166~174
- 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: 854~861
- Zhang HX, Joanna NH, John PM, Blumwald E (2001). Engineering salt tolerant *Brassica* plant: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increase vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 12832~12836
- Zhu JK (2001). Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci*, 6: 66~71
- Zörb C, Noll A, Karl S, Leib K, Yan F, Schubert S (2005). Molecular characterization of Na^+/H^+ antiporters (*ZmNHX*) of maize (*Zea mays* L.) and its expression under salt stress. *J Plant Physiol*, 162: 55~66