西北植物学报,2014,34(3):0438－0443
Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.

文章编号:1000-4025(2014)03-0438-06 **doi**:10.7606/j.issn.1000-4025.2014.03.0438

灰绿藜液泡膜焦磷酸酶基因的克隆及表达分析

杨　艺,徐　莉,张　霞,张富春*

(新疆大学 生命科学与技术学院,新疆生物资源基因工程重点实验室,乌鲁木齐 830046)

摘　要:采用同源克隆的方法,获得盐生植物灰绿藜的液泡膜焦磷酸酶基因(*VP*1)全长 cDNA,命名为 *CgVP*1。生物信息学预测分析表明,*CgVP*1 基因包含一个 2 292 bp 的开放阅读框,编码 763 个氨基酸。CgVP1 不仅具有与植物液泡膜焦磷酸酶共有的氨基酸序列 DVGADLVGKVE,而且 CgVP1 与其它植物的 VP1 相似性达 86%。跨膜结构域预测显示,CgVP1 氨基酸序列含有 12 个跨膜螺旋区,可能定位于细胞膜系统上。RT-PCR 检测表明,200 mmol/L NaCl 条件下萌发生长的灰绿藜,再进行 800 mmol/L NaCl 胁迫处理 24 h 后,*CgVP*1 基因表达显著增强。不同浓度 KCl、$CaCl_2$、$MgCl_2$ 分别处理 24 h,KCl 和 $MgCl_2$ 浓度增高,*CgVP*1 基因表达下降,$CaCl_2$ 则不影响 *CgVP*1 基因表达。研究结果表明,灰绿藜 *CgVP*1 基因表达对不同种类盐胁迫响应不同,NaCl 胁迫可以上调 *CgVP*1 基因表达。该研究结果有助于阐明盐胁迫对盐生植物灰绿藜 *CgVP*1 基因表达的调控作用。

关键词:灰绿藜;液泡膜焦磷酸酶(VP1);基因表达;盐处理

中图分类号:Q785;Q786　　**文献标志码**:A

Clone and Expression Analysis of the Vacuolar Pyrophosphatase Gene from *Chenopodium glaucum*

YANG Yi,XU Li,ZHANG Xia,ZHANG Fuchun*

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

Abstract:The full-length cDNA of the vacuolar pyrophosphatase(*VP*1) from halophyte *Chenopodium glaucum* was cloned by using RACE technique,and was named as *CgVP*1. It contained a 2 292 bp open reading frame (ORF) encoding 763 amino acid polypeptide. This sequence of CgVP1 contained DVGADLVGKVE, a consensuses sequence in plant *VP*1 proteins. CgVP1 shared more than 86% similarity with VP1s from other plants. Transmembrane domain prediction showed that CgVP1 contained 12 trans-membrane helix regions,and sub-cellularly localized in cellular membrane system. RT-PCR results showed that when *C. glaucum* was treated with 200 mmol/L NaCl during the germination and growth,and then treated with 800 mmol/L NaCl for 24 h,the expression of *CgVP*1 gene was significantly increased compared to the control which was not pre-treated with 200 mmol/L NaCl. When *C. glaucum* was treated with different concentrations of KCl,$CaCl_2$ and $MgCl_2$ for 24 h,respectively,the expression of *CgVP*1 was down regulated with the increase of the concentrations of KCl and $MgCl_2$,whereas $CaCl_2$ did not influence the expression of *CgVP*1. These results indicated that the expressions of *CgVP*1 response differentially to different types of salt treatments,and NaCl stress can induce its expression. This study can help to understand the regulatory function of *VP*1 in halophyte *C. glaucum* under salt stress.

Key words:*Chenopodium glaucum*;vacuolar pyrophosphatase(VP1);gene expression;salt treatment

收稿日期:2013-12-06;**修改稿收到日期**:2014-03-07

基金项目:国家"973"计划前期研究专项(2012CB722204)

作者简介:杨　艺(1989－),女,在读硕士研究生,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:563226049@qq.com

*通信作者:张富春,博士,教授,主要从事分子生物学与基因工程研究。E-mail:zfcxju@gmail.com

中国盐渍土总面积占全国可利用土地面积的4.88%，盐渍化土壤能够严重影响农作物的产量[1]。盐生植物受到盐胁迫，液泡膜上 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白能够将细胞质中过多的 Na^+ 区域化至液泡中，降低细胞质中盐浓度，从而减轻对细胞器的毒害，提高植物的耐盐性，因此，Na^+ 的区域化分配是盐生植物对盐渍环境适应的结果。而液泡膜上逆向转运蛋白能够通过跨液泡膜的 H^+ 梯度来驱动转运[2-3]，并且 H^+ 梯度的形成依赖于液泡膜上的 2 种质子泵：H^+-ATP 酶和 H^+-焦磷酸酶，它们分别以 ATP 和焦磷酸为动力，将 H^+ 泵到胞外和液泡中，从而形成 H^+ 梯度[4]。研究表明植物细胞液泡膜焦磷酸酶（Vacuolar pyrophosphatase，VP1）可利用焦磷酸为动力将 H^+ 从细胞质转运至液泡内，从而产生电势梯度[5]。

随着分子生物学研究的不断深入，人们相继从多种植物拟南芥、绿豆、陆地棉、盐地碱蓬、玉米、番茄、盐穗木等克隆获得了 *VP*1 基因[6-12]。Dupont 指出盐胁迫能够通过调节 *VP*1 基因表达和蛋白合成促进 H^+ 梯度形成[13]。Wang 等过量表达番茄 *VP*1 基因增加了番茄植株中离子向液泡膜的转运，从而缓解盐胁迫对植株的伤害，增强番茄幼苗对盐胁迫的耐性[14]。由于不同环境条件或植物发育的不同阶段中 *VP*1 基因表达水平主要是在转录水平上进行调节的，从基因转录水平对 *VP*1 基因表达特性进行探讨，有助于进一步阐明植物 *VP*1 基因的功能。

藜科植物对盐碱、干旱和贫瘠等逆境的适应特征，对改良盐渍化土壤有重要意义[15]。灰绿藜（*Chenopodium glaucum*）为藜科一年生草本植物，广泛分布于世界各地，能在干旱贫瘠的土地上生长，属典型的干旱区盐生植物，在较高浓度的盐胁迫下能正常完成其生活史。本实验通过灰绿藜细胞液泡膜焦磷酸酶（*CgVP*1）基因克隆以及盐胁迫下 *CgVP*1 基因表达变化的研究，探讨灰绿藜 *CgVP*1 在抗逆生理中发挥的作用。

1　材料和方法

1.1　植物材料

野生灰绿藜（*Chenopodium glaucum*）的种子采自新疆乌鲁木齐市地区，收集后保存待用。

1.2　灰绿藜的 NaCl 胁迫处理

选择籽粒饱满的灰绿藜种子均匀撒在用1/8 MS、1/8MS＋200 mmol/L NaCl 的营养液浸润的滤纸上，使营养液刚刚没过种子，即种子在不同浓度（0、200 mmol/L）NaCl 处理下萌发生长，待种子萌发后 5 d，将其转移至蛭石中，并用 1/8MS 和1/8 MS＋200 mmol/L NaCl 营养液隔 2 d 浇灌 1 次直至成苗，再进行 800 mmol/L NaCl 胁迫处理 24 h，分别检测灰绿藜对照组、经 800 mmol/L NaCl 胁迫处理 24 h 和 200 mmol/L 预处理再经 800 mmol/L NaCl 盐胁迫处理 24 h 这 3 种处理组 *CgVP*1 基因的表达差异。

1.3　灰绿藜液泡膜焦磷酸酶基因的克隆

1.3.1　灰绿藜 *CgVP*1 基因核心片段的获得　根据植物总 RNA 提取试剂盒（北京天根公司）操作说明进行灰绿藜根的总 RNA 提取。依照 TaKaRa RNA PCR Kit（TaKaRa）操作指南进行，以 Oligo（dT）作为引物进行反转录合成 cDNA。根据已经报道的拟南芥液泡膜焦磷酸酶基因的核苷酸序列（GenBank 登录号 M81892.1），设计液泡膜焦磷酸酶基因的简并上游引物（5′-ATGGTGGCGCCTGCTTTGTT-3′）和下游引物（5′-GCCATAAGCTT GATCAG GATGTT-3′），以 RNA 反转录产物 cDNA 为模板，进行 RT-PCR 反应。PCR 反应扩增参数为 94 ℃预变性 2 min；94 ℃变性 45 s，57.5 ℃退火 45 s；72 ℃延伸 2 min，35 个循环；72 ℃延伸 10 min，反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.2　3′末端快速克隆　根照 3′-Full RACE Core Set（TaKaRa）操作指南，以灰绿藜根的总 RNA 为模板，用 3′-RACE 接头引物进行反转录合成 cDNA。根据已获得的核心片段设计 3′上游特异性外侧引物（GSP1）（5′-GGATACATCTGGACCAT-CAC-3′）和 3′上游特异性内侧引物（GSP2）（5′-GACCATCACTCAACATCCTG-3′）。PCR 反应首先以 RNA 反转录产物 cDNA 为模板，使用 GSP1 和 3′-RACE 下游外侧引物进行 PCR 扩增，扩增参数为 94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s；72 ℃延伸 1 min，20 个循环；72 ℃延伸 10 min。而后以该产物为模板，使用 GSP2 和 3′-RACE 下游内侧引物进行 PCR 扩增，扩增参数为 94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环；72 ℃延伸 10 min，PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3　灰绿藜 *CgVP*1 基因 cDNA 片段的克隆与测序　按 PCR Fragment Recovery Kit（TaKaRa）说明书进行 PCR 产物的回收。回收的片段与 pMD18-T 载体在 T4DNA 连接酶的作用下 16 ℃过夜连接，连

接产物转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞(北京全式金公司),酶切鉴定出阳性克隆后,送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.4 灰绿藜 CgVP1 生物信息学分析

对灰绿藜 CgVP1 的氨基酸序列利用在线工具 Blast(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)和 DNAMAN 以及 MEGA 4.0[16]软件,进行氨基酸序列的序列比对和同源性分析。将 CgVP1 的氨基酸序列输入 TMHMM Server v.2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)分析预测其蛋白跨膜区域。将 CgVP1 的氨基酸序列输入 Psort[17]软件(http://psort.hgc.jp/form.html)进行亚细胞定位的分析预测。

1.5 灰绿藜的 KCl、$CaCl_2$ 和 $MgCl_2$ 的胁迫处理

分别配制 1 mol/L 的 KCl、$CaCl_2$、$MgCl_2$ 母液,加入 1/8MS 营养液,使营养液终浓度分别是 KCl 为 200、400 和 600 mmol/L,$CaCl_2$ 为 100 和 200 mmol/L,$MgCl_2$ 为 100 和 200 mmol/L。待灰绿藜长至 4 周龄时,用上述浓度盐溶液分别处理 24 h,对照为不加盐的 1/8MS 营养液处理 24 h 的灰绿藜。

1.6 灰绿藜 *CgVP1* 基因表达检测

以不同浓度 NaCl 和不同盐处理下的灰绿藜 *CgVP1* cDNA 为模板,根据 cDNA 下游片段的特异性,分别在 *CgVP1* 基因 ORF 下游区和 3′-UTR 区设计上游引物(5′-GACCATCACTCAACATCCT-3′)和下游引物(5′-TCAGCCTTGCCTTCTAACG-ACG-3′),以28S(上游引物5′-GCCGACCCTGAT-CTTCTGTGA-3′和下游引物 5′-TACCCAAGT-CAGACGAACGATT-3′)为参照基因。PCR 反应条件为 94 ℃预变性 2 min;94 ℃变性 20 s,54 ℃退火 20 s;72 ℃延伸 20 s,35 个循环;72 ℃延伸 10 min,反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 灰绿藜 *CgVP1* 基因克隆及氨基酸同源性分析

利用 RACE 技术克隆获得了灰绿藜液泡膜焦磷酸酶基因(*CgVP1*,DQ443731.1),包含一个2 292 bp 的开放阅读框,编码 763 个氨基酸残基。用 DNAMAN 软件对灰绿藜 CgVP1 的氨基酸序列和其它植物VP1部分氨基酸序列进行比对(图1),发

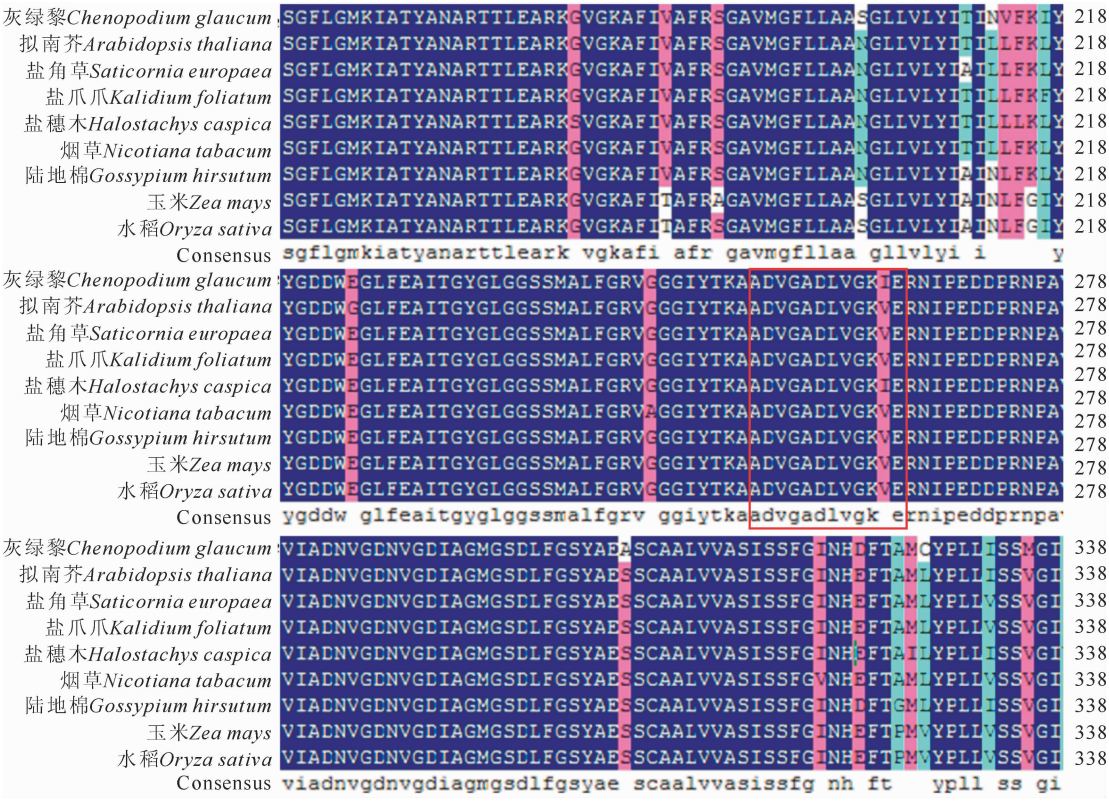

图 1 植物 VP1 氨基酸序列比对

红色方框部分为 VP1 与催化相关的保守序列

Fig. 1 A partial alignment of the amino acid sequences of the predicted VP1

The red block diagram is the conserved segment and putative catalytic site of VP1

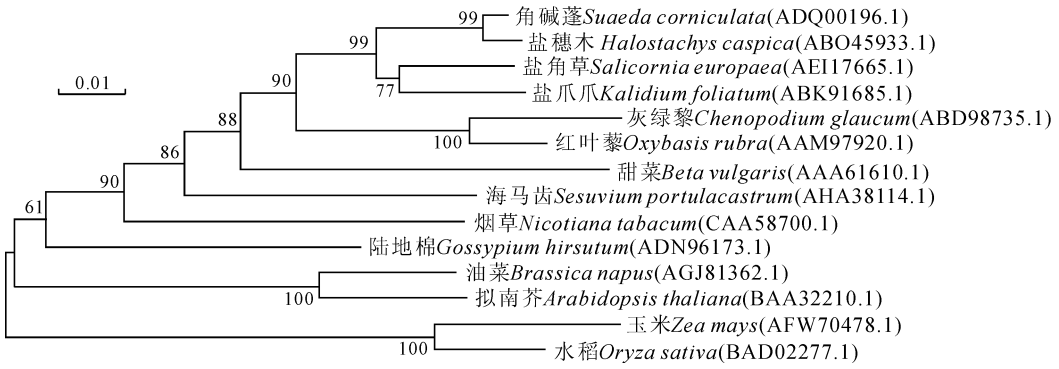

图 2　不同植物基于 VP1 氨基酸序列的系统进化树

分支上的数字表示 Bootstrap 验证中基于 1 000 次重复该节点的可信度；标尺表示演化距离

Fig. 2　Phylogenetic tree of different plants based on amino acid sequences of VP1

The numbers on the branches represent the reliability percent of bootstraps values based on 1 000 replications; Scaleplate represents the evolution distance of these plants

现灰绿藜 CgVP1 的氨基酸序列也具有植物作为 VP1 的催化位点并且共有保守的氨基酸片段 DVGADLVGKVE。灰绿藜 CgVP1 氨基酸序列同源性分析表明，其与拟南芥、盐角草、盐爪爪、盐穗木、烟草、陆地棉、玉米、水稻的 VP1 氨基酸序列相似性分别为 87%、93%、93%、90%、90%、89%、86%和 86%。运用 MEGA4.0 软件对 12 种植物的 VP1 氨基酸序列构建系统进化树(图 2)，结果表明 CgVP1 与红叶藜 VP1 关系最近并在同一分支上。

2.2　灰绿藜 CgVP1 蛋白的跨膜结构域预测和分析

跨膜结构域是膜内在蛋白与膜脂相结合的主要部位，它固着于细胞膜上起锚定作用。通过 TMHMM Server v. 2.0 工具(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)预测 CgVP1 的跨膜螺旋区。预测结果显示，CgVP1 氨基酸序列中存在 12 个跨膜螺旋区，可推测 CgVP1 蛋白定位于细胞膜系统，属于跨膜转运蛋白。

2.3　灰绿藜 CgVP1 蛋白的亚细胞定位

应用 Psort 工具(http://psort.hgc.jp/form.html)预测 CgVP1 的亚细胞定位(表 1)，结果表明其可能定位于细胞膜系统、内质网(膜)、高尔基体和内质网(腔)。表 1 显示 CgVP1 定位于内质网(膜)的概率最高，为 0.820，定位于细胞质膜其次，为 0.685，定位于高尔基体和内质网(腔)的概率较小。表明 CgVP1 可能定位于细胞膜系统上，作为跨膜转运蛋白在离子的调控运输中发挥重要作用。

2.4　不同浓度盐处理下 *CgVP1* 基因的表达

对在不同 NaCl 浓度(0、200 mmol/L)下萌发生长的灰绿藜，再进行 800 mmol/L NaCl 不同方式的胁迫处理 24 h，检测 *CgVP1* 基因表达情况。结果表明，与对照组相比较，未经200 mmol/L NaCl预处理，直接受到 800 mmol/L NaCl 胁迫的灰绿藜，*CgVP1* 基因表达受到明显抑制，而 200 mmol/L NaCl 预处理后，再进行 800 mmol/L NaCl 胁迫的灰绿藜，*CgVP1* 基因的表达明显增强(图 3)。

表 1　CgVP1 蛋白亚细胞定位

Table 1　Subcellular location of prochymosin of CgVP1

亚细胞定位 Subcellular location	概率 Probability
膜系统 Membrane system	0.820
内质网(膜)Endoplasmic reticulum (membrane)	0.685
高尔基体 Golgi body	0.460
内质网(腔)Endoplasmic reticulum (lumen)	0.100

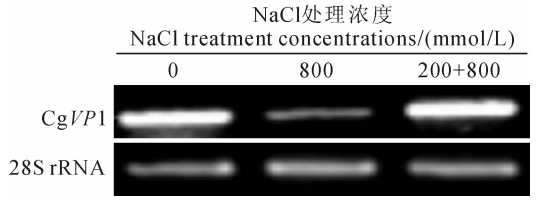

图 3　不同 NaCl 胁迫处理下灰绿藜 *CgVP1* 基因的表达

Fig. 3　The expression of *CgVP1* under different NaCl salt concentrations

用不同浓度 KCl 处理灰绿藜 24 h 后，检测灰绿藜 *CgVP1* 基因的表达，结果表明，较低浓度(200 mmol/L)KCl 不影响灰绿藜 *CgVP1* 基因的表达，而较高浓度(400 和 600 mmol/L) KCl 则抑制 *CgVP1* 基因的表达(图 4，A)。

用不同浓度 $CaCl_2$ 处理灰绿藜 24 h，检测灰绿藜 *CgVP1* 基因表达情况，结果表明，灰绿藜 *CgVP1* 基因的表达基本不受 $CaCl_2$ 影响，不同浓度 $CaCl_2$ 处理后 *CgVP1* 基因的表达没有变化(图 4，B)。

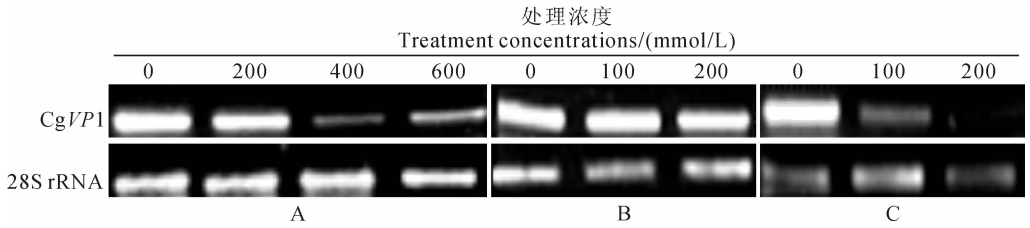

图 4 不同浓度 KCl(A),$CaCl_2$(B)和 $MgCl_2$(C)处理 24 h 后灰绿藜 *CgVP1* 基因的表达

Fig. 4 The expression changes of *CgVP1* under different KCl(A), $CaCl_2$(B) and $MgCl_2$(C) concentrations

用不同浓度 $MgCl_2$ 处理灰绿藜 24 h,检测灰绿藜 *CgVP1* 基因表达情况,结果表明,灰绿藜 *CgVP1* 基因表达受 $MgCl_2$ 的影响很大,随着 $MgCl_2$ 浓度增大,*CgVP1* 基因的表达逐渐减弱(图 4,C)。

3 讨 论

灰绿藜是广布的盐生植物,对环境的适应能力强,能够耐受盐的胁迫。对克隆的 *CgVP1* 基因通过生物信息学分析,明确了所获得的 CgVP1 蛋白不仅具有植物液泡膜焦磷酸酶共有氨基酸序列 DV-GADLVGKVE,而且 CgVP1 与其它植物的 VP1 相似性达 86%,是跨膜蛋白。已有的研究表明 VP1 在植物生长发育过程通过调节激素运输对植物的生理功能起调控作用,并且与植物的耐盐性密切相关[17-19]。Gaxiola 等[20]在盐敏感的 *ena*1 酵母突变体中过量表达拟南芥液泡 *AVP12D* 基因 的 *ena*1 菌株可以恢复耐盐性。Colombo 等[21]研究表明 50 mmol/L NaCl 处理的胡萝卜细胞,*VP1* 基因在 10 d 内较对照增加 1 倍。Liu 等[22]在拟南芥中过表达角碱蓬 *VP* 基因,盐胁迫下与野生型拟南芥相比在叶和根中积累了更多的 Na^+,并呈现耐盐性的增加。本研究将灰绿藜种子在对照培养液(1/8MS)和添加 200 mmol/L NaCl 的培养液(1/8MS+200 mmol/L NaCl)中分别萌发生长,再对正常成长的幼苗和经过盐胁迫处理的幼苗,继续用高浓度的 NaCl(800 mmol/L)处理,结果显示后者的 *CgVP1* 基因的表达明显增强,而不经盐胁迫预处理的灰绿藜幼苗在高盐胁迫 24 h 后 *CgVP1* 基因的表达则明显受到抑制,可以表明不经盐预处理的灰绿藜幼苗,在直接受到 800 mmol/L NaCl 胁迫时,所引起的伤害致使 *CgVP1* 基因表达下降,幼苗的生长也受到了抑制,从后续的植物生长状况弱小可直观看出来。而经过盐预处理的灰绿藜幼苗即盐驯化后的幼苗在受到同样的处理时,表现出 *CgVP1* 基因表达明显增加,说明灰绿藜幼苗能够耐受盐胁迫而不影响其生长,同时增加 *CgVP1* 基因的表达减缓盐胁迫造成的伤害,从而体现了 *CgVP1* 基因的双重作用,不仅与灰绿藜的生长相关,也与灰绿藜耐盐性提高有关,这表明盐的驯化能够提高植物的耐盐性。

不同的盐类具有不同的金属离子,对不同盐离子胁迫表现的 *VP1* 基因表达活性的研究,表明各种金属离子在 *VP1* 基因发挥作用的信号通路中分别起到不同的调控作用[23-24]。Ca^{2+} 在植物各种信号通路中都起到了重要的作用,Huang 等[25]研究表明 0.1 mmol/L 的 Ca^{2+} 能显著抑制 *VP1* 的活性。但 *CgVP1* 基因表达对 $CaCl_2$ 并不敏感,说明其表达调控可能是非 Ca^{2+} 依赖性的。有研究表明 *VP1* 活性尤其是 H^+ 转运活性的形成表现出对 K^+ 的绝对需要[26],Lee 等[27]研究表明 50 mmol/L 的 K^+ 可以使 *VP1* 的活性提高 6 倍。但较高浓度的 KCl 会抑制 *VP1* 的表达活性,推测这种抑制可能是由较高浓度 Cl^- 胁迫造成的;White 等[28]的研究表明 Mg^{2+} 可以增强 *VP1* 的活性,这与本研究结果 *CgVP1* 的表达下降不一致,外加 Mg^{2+} 浓度 *CgVP1* 表达活性均受到抑制,表现出 *CgVP1* 表达对 Mg^{2+} 的敏感性比 Ca^{2+} 和 K^+ 高,表明 *VP1* 表达受盐离子调控因植物种类不同尤其是盐生植物种类而表现出明显差异,*VP1* 基因表达对不同盐离子的敏感性不同,也许会影响不同的信号传导通路。研究灰绿藜 *CgVP1* 在不同盐胁迫下的表达调控,有助于今后从离子转运基因功能角度阐明灰绿藜耐盐的分子机理。

参考文献:

[1] YANG J S(杨劲松). The development and prospect of China saline soil research[J]. *Acta Pedologica Sinica*(土壤学报),2008,**45**(5):837-845(in Chinese).

[2] BAYKOV A A, DUBNOVA E B, BAKULEVAB N P, *et al*. Differential sensitivity of membrane-associated pyrophosphatases to inhibition by diphosphonates and fluoride delineates two classes of enzyme[J]. *Federation of European Biochemical Societies*, 1993, **327**(2): 199－202.

[3] MAESHIMA M. Vacuolar H^+-pyrophosphatase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1 465**(1－2): 37－51.

[4] APSE M P, AHARON G S, SNEDDEN W A, *et al*. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 1999, **285**(5 431): 1 256－1 258.

[5] REA P A, POOLE R J. Vacuolar H^+-translocating pyrophosphatase[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1993, **44**(1): 157－180.

[6] GAXIOLA R A, LI J, UNDURRAGA S, *et al*. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H^+-pump[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, **98**(20): 11 444－11 449.

[7] HSIAO Y Y, PAN Y J, HSU S H, *et al*. Functional roles of arginine residues in mung bean vacuolar H^+-pyrophosphatase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, **1 767**(7): 965－973.

[8] SONG L Y(宋丽艳), YE W W(叶武威), ZHAO Y L(赵云雷), *et al*. Isolation and analysis of salt tolerance related gene(*GhVP*) from *Gossypium hirsutum* L.[J]. *Cotton Science*(棉花学报), 2010, **22**(3): 285－288(in Chinese).

[9] LI Y Y(李艳艳), LI P H(李平华), WANG B SH(王宝山). Cloning and expression of subunit H of V-H^+-ATPase in vacuole membrane in the leaves of the halophyte *Suaeda salsa* under salt stress[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2006, **26**(1): 63－67(in Chinese).

[10] ZHU CH L(朱春利), ZHANG D F(张登峰), LIU Y H(刘颖慧), *et al*. Cloning and expression analysis of *ZmVPP*1 under stresses in maize(*Zea mays* L.)[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*(植物遗传资源学报), 2011, **12**(1): 107－112(in Chinese).

[11] MOHAMMED S A, NISHIO S, TAKAHASHI H , *et al*. Role of vacuolar H^+-inorganic pyrophosphatase in tomato fruit development [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, **63**(15): 5 613－5 621.

[12] HU Y ZH, ZENG Y L, GUAN B, *et al*. Overexpression of a vacuolar H^+-pyrophosphatase and a B subunit of H^+-ATPase cloned from the halophyte *Halostachys caspica* improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2012, **108**(1): 63－71.

[13] DUPONT F M. Salt-induced changes ion transport: Regulation of primary pumps and secondary transporters[M]//Transport and Receptor Proteins of Plant Membranes, New York: Plenum Press, Springer US, 1992: 91－100.

[14] WANG B(王　斌), YAO ZH Q(姚兆群), ZHAO S F(赵思峰), *et al*. Effect of AM fungi on processing tomato seedlings physiological characteristics and *AVP*1 gene expression under salt stress[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2013, **33**(10): 2 016－2 023(in Chinese).

[15] HUANG ZH W(黄志伟), PENG M(彭　敏), CHEN G CH(陈桂琛), *et al*. An anatomical study on the leaf structure of salinized wetland *Chenopodium glaucum* of Qinghai Lake[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2001, **21**(6): 1 199－1 203(in Chinese).

[16] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, *et al*. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis(MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(8): 1 596－1 599.

[17] NAIR R, ROST B. Better prediction of sub-cellular localization by combing evolutionary and structural information[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2003, **53**(4): 917－930.

[18] LI X Y(李小园), ZENG R ZH(曾日中), XIAO X ZH(校现周). Advances on the research of pyrophosphatase in plants[J]. *Life Science Research*(生命科学研究), 2004, **8**(4): 83－87(in Chinese).

[19] LI J, YANG H, PEER W. A, *et al*. Arabidopsis H^+-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development[J]. *Science*, 2005, **310**(5 745): 121－125.

[20] GAXIOLA R. A, RAO R, SHERMAN A, *et al*. The *Arabidopsis thaliana* transporters, AtNHX1 and Avp1, can function in cation in yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, **96**(4): 1 480－1 485.

[21] COLOMBO R, CERANA R. Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatase in NaCl-grown cells of *Daucus carota*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1993, **142**(2): 226－229.

[22] LIU L, WANG Y, WANG N, *et al*. Cloning of a vacuolar H^+-pyrophosphatase gene from the halophyte *Suaeda corniculata* whose heterologous overexpression improves salt, saline-alkali and drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, **53**(9): 731－742.

[23] BAO A K, WANG S M, WU G Q, *et al*. Overexpression of the *Arabidopsis* H^+-PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa(*Medicago sativa* L.)[J]. *Plant Science*, 2009, **176**(2): 232－240.

[24] KABAŁA K, JANICKA-RUSSAK M. Differential regulation of vacuolar H^+-ATPase and H^+-PPase in *Cucumis sativus* roots by zinc and nickel[J]. *Plant Science*, 2011, **180**(3): 531－539.

[25] HUANG Y T, LIU T H, CHEN Y W, *et al*. Distance variations between active sites of H-pyrophosphatase determined by fluorescence resonance energy transfer[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**(31): 23 655－23 664.

[26] PUGLIARELLA M C, RASI-CALDOGNO F, MICHELIS M I D , *et al*. The tonoplast H^+-pyrophosphatase of radish seedings: biochemical characteristics[J]. *Physiologia Plantarum*, 1991, **83**(3): 339－345.

[27] LEE C H, PAN Y J, HUANG Y T, *et al*. Identification of essential lysines involved in substrate binding of vcuolar H-pyrophosphatase [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, **286**(14): 11 970－11 976.

[28] WHITE P J, MARSHALL J, SMITH J A C. Substrate kinetics of the tonoplast H^+-translocating inorganic pyrophosphatase and its activation by free Mg^{2+}[J]. *Plant Physiology*, 1990, **93**(3): 1 063－1 070.