

长叶红砂液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 基因的克隆及表达特性

董禄禄¹, 秦晓春², 党振华^{1*}

(1 内蒙古大学 生命科学学院 内蒙古自治区牧草与特色作物生物技术重点实验室, 呼和浩特 010021; 2 包头市园林科技研究所, 内蒙古包头 014010)

摘要: 为研究长叶红砂 (*Reaumuria trigyna*) 离子转运分子机制, 利用 RT-PCR 和 RACE 技术, 克隆到其液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 (*NHX1*) 的全长 cDNA 片段, 命名为 *RtNHX1* (NCBI 序列号为 KR919802)。结果表明: *RtNHX1* 的 cDNA 片段全长 2 622 bp, 开放阅读框 1 662 bp, 5' 非编码区 509 bp, 3' 非编码区 451 bp, 编码 553 个氨基酸, 推测分子量为 60.91 kD。该蛋白含有 12 个跨膜结构域, 为疏水蛋白, 与其他植物液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 *NHX1* 的亲缘关系较近。实时荧光定量 PCR 对其在 NaCl 胁迫下的表达检测显示, 不同时间和不同浓度 NaCl 胁迫下, *RtNHX1* 表达量变化均呈先升高后降低趋势, 在 100 mmol/L NaCl 胁迫 6 h 和 200 mmol/L NaCl 胁迫后达到最高, 表达量分别超过或约是对照的 3 倍, 一定程度反应出 *RtNHX1* 参与长叶红砂的盐胁迫应答, 是该植物离子转运体系的重要元件。

关键词: 长叶红砂; 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因; cDNA; 实时荧光定量 PCR; NaCl 胁迫; 表达特性

中图分类号: Q785; Q789

文献标志码: A

Isolation and Expression of Vacuolar Membrane Na^+/H^+ Antiporter Gene in *Reaumuria trigyna*

DONG Lulu¹, QIN Xiaochun², DANG Zhenhua^{1*}

(1 College of Life Science, Inner Mongolia University, Key Laboratory of Herbage & Endemic Crop Biotechnology in Inner Mongolia, Hohhot 010021, China; 2 Baotou Landscape Research Institute of Inner Mongolia, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

Abstract: To investigate the molecular mechanism of the ion transport in *Reaumuria trigyna*, we cloned the full length cDNA of vacuolar membrane Na^+/H^+ antiporter gene (*RtNHX1*) with reverse transcription PCR and rapid amplification of cDNA ends technologies. The cDNA is 2 622 bp long, which contained a 1 662 bp open reading frame, a 509 bp 5'-UTR, and a 451 bp 3'-UTR. The cDNA encoded a protein with 553 amino acids and molecular weight of 60.91 kD. The protein was predicted to be composed of 12 transmembrane domains, was characterized as a hydrophobic protein, and showed high homology with the vacuolar membrane Na^+/H^+ antiporter (*NHX1*) in other plant species. Quantitative real-time analysis showed that the expression levels of *RtNHX1* under different salt concentrations and time gradients, were up-regulated initially and then down-regulated. The expression of *RtNHX1* under the stress of 100 mmol/L NaCl for 6 hours and 200 mmol/L NaCl were reached the highest, which were over or nearly 3-fold of the control, indicating that *RtNHX1* participated in the salt stress response of *R. trigyna* and may be an important element that plays a role in the ion transporting system in this plant.

Key words: *Reaumuria trigyna*; vacuolar membrane Na^+/H^+ antiporter; cDNA; quantitative real-time PCR; NaCl stress; expression pattern

收稿日期: 2015-07-20; 修改稿收到日期: 2015-09-29

基金项目: 国家自然科学基金(31360063); 内蒙古自治区高等学校创新研究团队发展计划(NMGIRT1401)

作者简介: 董禄禄(1992—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: 1250028826@qq.com

* 通信作者: 党振华, 博士, 讲师, 主要从事植物分子生态学研究。E-mail: zhdang_1982@aliyun.com

盐胁迫是严重威胁植物生长和发育的非生物胁迫之一^[1]。在盐胁迫下,植物细胞中积累过量的 Na^+ 会破坏细胞新陈代谢,导致渗透调节、离子转运及抗氧化系统的紊乱,最终导致植物生长受抑,甚至死亡^[2-4]。植物耐盐性为多种耐盐机制相互协作的复杂调控过程^[5],包括激活一系列基因的表达,使植物适应高盐环境^[6],如在高盐环境下维持离子稳态和细胞质酶活性等^[7]。因此,发现植物响应盐胁迫的关键基因是研究植物耐盐机理、利用它们改造植物耐盐性的前提和重点。

液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(vacuolar membrane Na^+/H^+ antiporter, NHX),是植物盐胁迫应答的重要元件,是植物离子转运系统中的关键成员,具有将 Na^+ 区隔化入液泡内,调节 pH 值、渗透势、影响叶片发育等功能^[8]。目前,已从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[9]、水稻(*Oryza sativa*)^[10-11]、小麦(*Triticum aestivum*)^[12]、胡杨(*Populus euphratica*)^[13]、盐地碱蓬(*Suaeda salsa*)^[14]、盐角草(*Salicornia europaea*)^[15]、滨藜(*Atriplex patens*)^[16]等多种植物中克隆出 NHX 家族基因,并证实一些基因的编码产物能显著提高或赋予植物耐盐性^[17-20]。如过量表达拟南芥 NHX1 基因(*AtNHX1*)的转基因拟南芥、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、小麦等的耐盐性显著增强^[9,21];将滨藜 NHX1 基因转入水稻,赋予了转基因水稻耐盐性^[22];将水稻 NHX1 基因转入黑麦草(*Lolium perenne*)中,转基因植株能在 350 mmol/L NaCl 处理 10 周后正常存活^[23]。然而,该基因研究目前仍集中在少数模式植物上,针对在高盐环境下生存的野生植物鲜见报道。盐生植物是植物王国中的一大区系^[24],在这些植物中是否存在高效耐盐基因?与模式植物同源基因在功能上有什么异同?均有待研究,是当今植物耐盐机理方面的研究热点^[25]。可见,从野生耐盐植物中克隆 NHX 基因并鉴定其功能,将对回答上述问题提供重要信息。

长叶红砂(*Reaumuria trigyna*)是一种具有多细胞盐腺的泌盐盐生植物,隶属于怪柳科(Tamaricaceae)琵琶柴属(*Reaumuria* Linn.),是东阿拉善-西鄂尔多斯地区特有的孑遗植物,被列为内蒙古自治区珍稀濒危植物^[26]。该植物在长期适应恶劣生境的过程中,进化出多种逆境适应性机制,具有耐高盐、低温和干旱^[26-34]等特点。研究发现,长叶红砂幼茎和叶片表面分布有大量多细胞盐腺,该盐腺对 Na^+ 、 Cl^- 具有高度选择性,使其在高盐环境下有效

降低体内盐离子浓度,维持体内较高水平的 K^+/Na^+ 比^[29];低浓度盐份(100 mmol/L NaCl)对长叶红砂种子萌发具有促进作用,200 mmol/L NaCl 是该植物室内幼苗培养的最适生长浓度等^[26,31]。这些发现表明该植物可能存在高效的 Na^+ 调节机制,极具研究价值。本研究利用 RT-PCR 结合 RACE 技术,分离出长叶红砂液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因,并对其进行序列及表达特性分析,以期为进一步研究该植物离子转运机制,开发和利用其特有遗传资源积累理论依据和实践经验。

1 材料和方法

1.1 材料和胁迫处理

长叶红砂种子于 2012 年 9 月采自内蒙古自治区乌海市棋盘井镇,采集地地理坐标为 107°4'42"E、39°22'48"N,挑选饱满种子在 10% 次氯酸钠溶液中进行表面灭菌后,播种于装有 MS 固体培养基的 150 mL 培养瓶中。在 25 °C、湿度 70%、16 h/8 h 光照/黑暗的条件下培养 45 d 后,将长势良好的幼苗做为实验材料,分别将其移入对照和含有 NaCl 溶液的 1/2 Hoagland 营养液中,依次进行 100、200、300 和 400 mmol/L NaCl 胁迫处理,每 24 h 递增一个浓度梯度,到达终浓度后,继续处理 24 h,每个处理 3 个重复,处理结束后收取叶片,液氮速冻后置于 -80 °C 备用。同时,在 100 mmol/L NaCl 胁迫下,分别在 1、3、6、12 及 24 h 收取叶片,用于检测不同时间梯度下的基因表达特性。

1.2 长叶红砂 NHX1 基因全长 cDNA 的克隆

长叶红砂总 RNA 提取按照 RNA Plant Plus Regen(TaKaRa)说明书进行,反转录使用 M-MLV reverse transcriptase(Invitrogen)进行。依据已报道拟南芥、盐地碱蓬、盐角草等植物 NHX1 基因的氨基酸序列,利用 ClustalX 软件进行同源比对,根据氨基酸保守区设计简并引物 NHX1-F(5'-TTYATAT-ACCTWCTTCCRCVATW-3')和 NHX1-R(5'-GRT-CAADDTGBGTGAGGTCAAAG-3'),扩增长叶红砂 NHX1 基因片段。将 PCR 扩增所得片段连接到 pMD-19T(TaKaRa)载体上,进行阳性菌株鉴定及测序。测序结果用 Blast 程序进行比对。确认其为 NHX1 保守区片段后,设计 3'-RACE 引物 GSP3(5'-CCTTACAGGTGCTTAGTCAGGACGATAC-3')和 5'-RACE 引物 GSP5(5'-TCACATTTG-GAGCTATTGGTAC-3')。按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification 试剂盒(Clontech)操作步骤,

以长叶红砂 cDNA 为模板,结合试剂盒内提供的锚定引物扩增 *NHX1* 基因 3' 和 5' 末端。将扩增到的 3' 和 5' 末端片段拼接后设计上游引物 RtNHX1-F (5'-TAGCTGTTTACGGGAACGAGGAC-3') 和下游引物 RtNHX1-R (5'-CTTGCGACAAAGCATA-AACTCTACAT-3'), 扩增长叶红砂 *NHX1* 基因的全长 cDNA 序列, 并提交至 NCBI。

1.3 长叶红砂 *NHX1* 基因的生物信息学分析

长叶红砂 *NHX1* 基因编码蛋白的序列比对和开放阅读框分析通过 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 Blast P 和 ORF finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 进行在线操作; 理论分子量和等电点、信号肽、二级结构、跨膜结构等分析依次利用 ProtParam 软件 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)、SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>)、Sopma 程序 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopm.html)、Tmhmm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 程序进行在线分析; Na^+/H^+ 转运蛋白多序列比对和系统进化树构建分别由 ClustalX 和 Mega5.05 软件的邻近法 (Neighbor-joining, NJ) 执行。

1.4 长叶红砂 *NHX1* 基因响应盐胁迫的实时荧光定量 PCR 分析

根据长叶红砂 *NHX1* 序列, 设计用于 qRT-PCR 的特异引物 RtNHX1-F (5'-TGCCTTTGCGACACT-GTCATTT-3') 和 RtNHX1-R (5'-TGTTTCCTGGACT-GTCACTCACG-3'), 利用 Rotor-gene Q Real-time PCR 系统进行实验, 以长叶红砂 β -Actin 为内参基因, 上游引物 Rt β -Actin-F (5'-GGAATCCACGAGAC-CACCTACA-3'), 下游引物 Rt β -Actin-R (5'-GGAATC-CACGAGACCACCTACA-3'), 反应条件参照 SYBR-Green Real-time PCR Master Mix 说明书设置。反应体系为: 12.5 μL PCR Master Mix, 9.5 μL ddH₂O, 1 μL cDNA 模板, 各 1 μL 上下游引物。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 40 个循环, 溶解曲线从 65~95 $^{\circ}\text{C}$, 进行 3 次重复实验。实验结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析, 利用 SPSS 19.0 软件进行数据统计及绘图。

2 结果与分析

2.1 长叶红砂 *NHX1* 基因全长 cDNA 的克隆

经 RT-PCR 扩增到长度为 367 bp 的 cDNA 片

段, 同源比对分析显示, 所得片段与其他植物 *NHX1* 基因序列高度一致, 说明该片段是长叶红砂 *NHX1* 基因的保守区部分。通过 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增, 获得长叶红砂 *NHX1* 基因的 3' 端和 5' 端序列, 长度分别为 1 665 bp 和 903 bp。将上述 3 个核苷酸序列拼接后, 得到长度为 2 622 bp 的 cDNA 序列, 即为长叶红砂 *NHX1* 全长基因 (图 1), 命名为 RtNHX1, NCBI 序列号为 KR919802。

2.2 RtNHX1 基因氨基酸序列的生物信息学分析

RtNHX1 基因 cDNA 序列包括 1 662 bp 的开放阅读框, 5' 端和 3' 端分别存在 509 bp 和 451 bp 的非翻译区, 编码 553 个氨基酸 (图 2), 理论分子量为 60.91 kD, 等电点为 7.73。RtNHX1 与冰叶日中花 (*Mesembryanthemum crystallinum*, CAN99589.1) Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 NHX1 的一致性最高, 达 83%, 与盐角草 (AAN08157.1)、大叶补血草 (*Limonium gmelinii*, ACF05807.1)、盐地碱蓬 (AAP15178.1) 和拟南芥 (AED93655.1) 等植物的 NHX1 序列一致性分别为 81%、81%、81% 和 76%。疏水性分析显示, 该蛋白整个多肽链表现为疏水性, 为疏水性蛋白, 具有膜蛋白特征。SignalP4.1 预测结果显示, RtNHX1 的 N 端原始剪切位点分值 (raw cleavage site score, C-score)、信号肽分值 (signal peptide score, S-score) 和综合剪切位点分值 (combined cleavage site score, Y-score) 均较低, 分别为 0.131、0.354 和 0.166, 该蛋白缺乏信号肽, 为非分泌蛋白, 二级结构以 α -螺旋和随机卷曲为主。Tmhmm 软件预测该蛋白含有 12 个跨膜结构域。其中, 跨膜结构 5 和 6 为部分跨膜, 跨膜结构域 3 含真核生物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白高度保守的氨氯吡啶结合位点 (amiloride binding site) "LFFIYLLPPI", C 端存在与 AtNHX1 相同的保守性 CaM 结合位点。

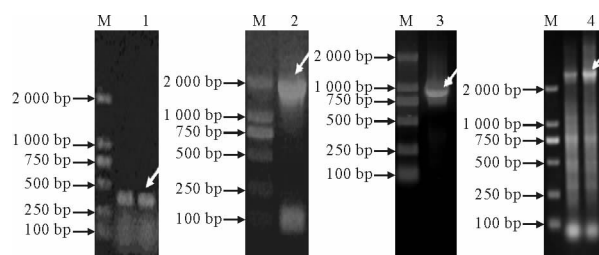


图 1 长叶红砂 *NHX1* 基因全长 cDNA 扩增

1. 保守区扩增结果; 2. 3'-RACE; 3. 5'-RACE;

4. 全长 cDNA; M. DL2000

Fig. 1 The full-length cDNA cloning of RtNHX1

1. Conserved region amplification of RtNHX1; 2. 3'-RACE;

3. 5'-RACE; 4. The full length cDNA; M. DL2000

以拟南芥 NHX 家族成员 1~8、其他植物 NHX1 及质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白 SOS1 为背景构建系统进化树,进一步分析了 RtNHX1 与其他 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白间的亲缘关系。结果如图 3 所示,RtNHX1 与拟南芥一类 NHX(Class 1)聚为一类,与二类 NHX(Class 2)为不同分支。RtNHX1

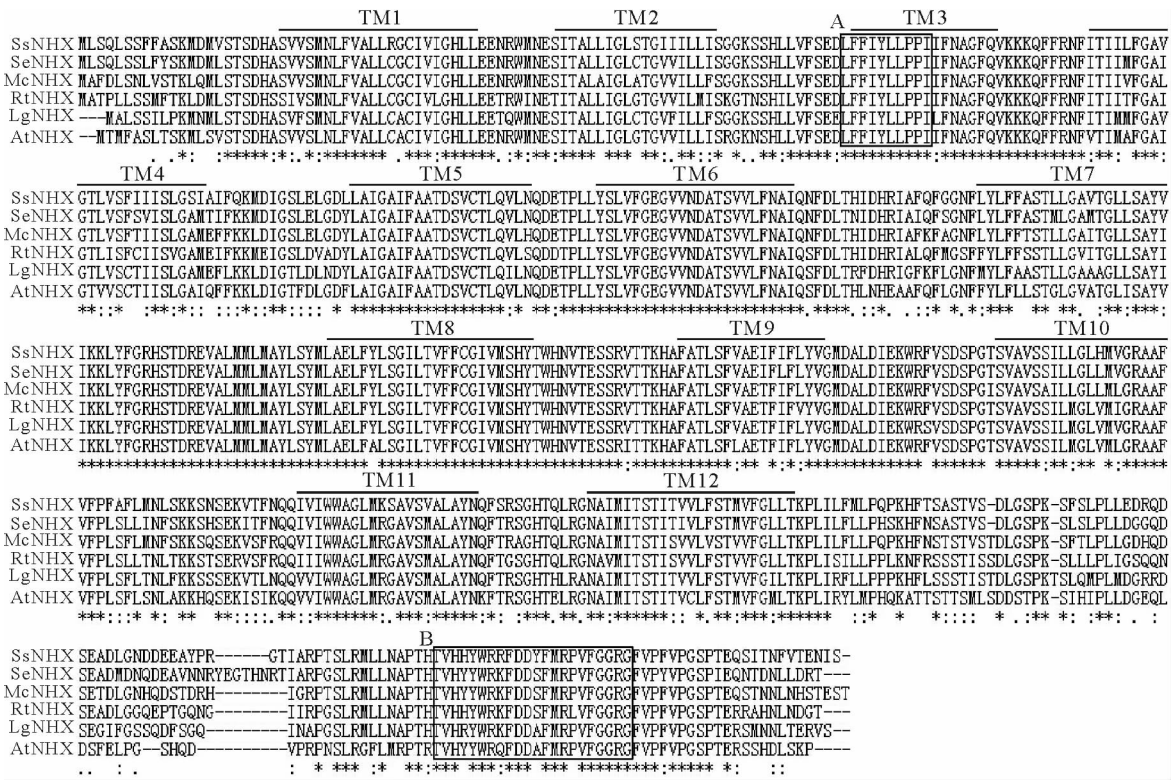


图 2 长叶红砂 RtNHX1 与其他植物 NHX1 氨基酸序列比对结果
TM 是 transmembrane 的缩写;TM1~TM12 表示 Tmhmm 预测的跨膜结构;方框 A 代表转运蛋白氨基吡嗪咪唑结合位点;方框 B 代表保守性 CaM 结合位点

Fig. 2 Comparison of the amino acid sequences between RtNHX1 with other representative plants' NHX1
TM represents the transmembrane; TM1-TM12 are the predicted transmembrane domains; Amino acids in the box A represent the conserved amiloride binding site; Amino acids in the box B represent the CaM binding site

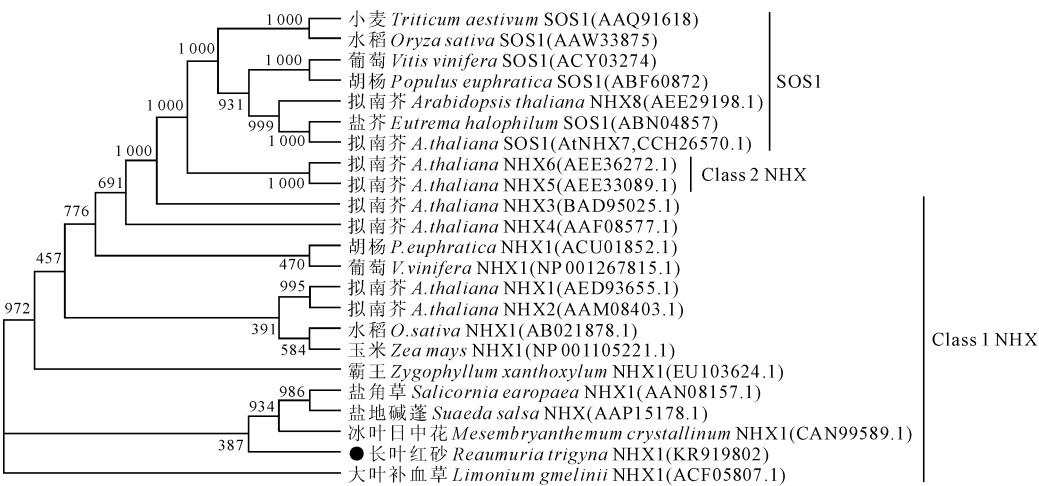


图 3 RtNHX1 与其他植物 Na⁺/H⁺ 转运蛋白的系统进化分析
分支上的数字表示 1 000 次重复计算得到的 Bootstrap 值

Fig. 3 Phylogenetic analysis of RtNHX1 with other Na⁺/H⁺ antiporters from different plant species
Numbers upon branches represent the Bootstrap values calculated from 1 000 repetitions

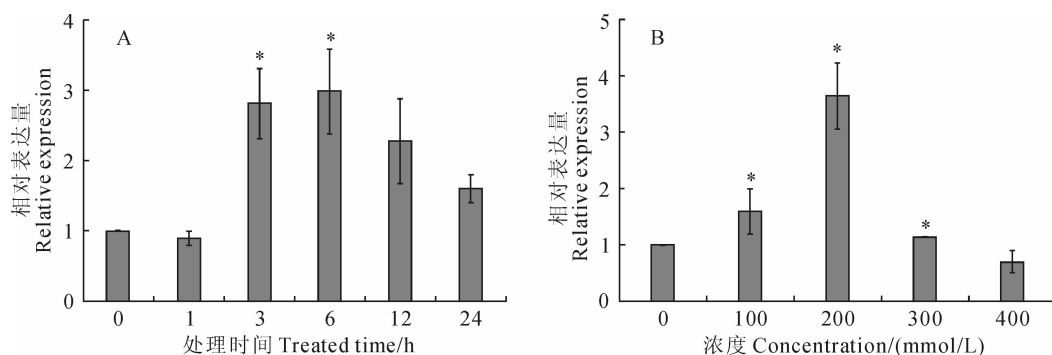


图4 不同时间(A)和浓度(B)NaCl胁迫下 *RtNHX1* 的表达模式

* 表示处理与对照间存在显著性差异($P < 0.05$)

Fig. 4 Expression patterns of the *RtNHX1* under different times and NaCl concentrations

* represents significant difference between control and treatment($P < 0.05$)

与大叶补血草、冰叶日中花、盐地碱蓬、盐角草等盐生植物 *NHX1* 亲缘关系较近,与拟南芥、葡萄等植物 *NHX1* 的亲缘关系较远,与 *SOS1* 属不同分支。上述结果均一定程度表明 *RtNHX1* 为长叶红砂液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的编码基因。

2.3 *RtNHX1* 盐胁迫表达特性

不同时间和浓度梯度 NaCl 胁迫长叶红砂幼苗后, *RtNHX1* 均表现出先上调后下调的趋势(图4)。在 0~200 mmol/L NaCl 胁迫后, *RtNHX1* 表达量随 NaCl 浓度增加而增加,在 200 mmol/L NaCl 时表达量达到最高,超过对照 3 倍;随着 NaCl 浓度的进一步增加, *RtNHX1* 表达量开始下降,在 400 mmol/L NaCl 时降至最低;在时间梯度胁迫下,0~6 h *RtNHX1* 表达丰度逐步提高,在 6 h 时达到最高,约是对照的 3 倍。随着胁迫时间的延长, *RtNHX1* 表达量开始下降,至 24 h 时降至最低。

3 讨论

长叶红砂为东阿拉善-西鄂尔多斯地区典型的泌盐盐生植物,可能具有独特的离子平衡调节机制,研究其离子转运分子机理,有望得到高效的离子平衡调节基因。本研究克隆得到该植物离子转运体系成员液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *RtNHX1*,为进一步鉴定该基因功能奠定了基础。该基因全长 2 622 bp,开放阅读框 1 662 bp,其推测编码蛋白质与其他植物 *NHX1* 具有高度同源性。*RtNHX1* 的 N 端含有 12 个高度疏水性跨膜结构域,与盐地碱蓬^[35]、霸王^[36]、盐芥(*Thellungiella halophila*)^[37]、棉花(*Gossypium hirsutum*)^[38] 等植物相同,与该植物质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 *SOS1* 的 11 个跨膜结构域不同^[30]。液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白家

族特有的氨基吡嗪咪结合位点“LFFIYLLPPI”,该位点在氨基吡嗪咪存在的情况下抑制液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的活性^[39]。*RtNHX1* 的氨基吡嗪咪结合位点位于第三跨膜结构域,与盐地碱蓬^[35]、拟南芥^[40]、胡杨^[41]、霸王^[36] 等植物相同,与人类 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 hNHE1 不同,后者的“LFFIYLLPPI”序列位于第四跨膜结构域^[40];此外, *RtNHX1* 有 2 个部分跨膜结构域,可能是该液泡 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白结合 Na^+ 的重要部位^[42]。

Na^+/H^+ 逆向转运蛋白分为质膜转运蛋白(*SOS*)和细胞内转运蛋白(*NHX*),在序列组成、结构和功能方面均有所不同^[43];拟南芥 *NHX* 家族中, *NHX1*~4 被归为一类 *NHX* 蛋白, *NHX5* 和 *NHX6* 为二类 *NHX* 蛋白,两类 *NHX* 的相似性仅为 20%~25%^[44], *NHX7* 和 *NHX8* 为质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白。以此分类依据为基础,本研究对拟南芥 *NHX* 家族成员 1~8、已报道其他植物 *NHX1* 及 *RtNHX1* 进行了系统进化树的构建,旨在进一步明确所克隆基因归属,为后续该基因的功能鉴定提供佐证。结果发现, *RtNHX1* 与其他植物 *NHX1* 亲缘关系较近,与 *SOS1* 属不同分支; *RtNHX1* 与拟南芥一类 *NHX* 和其他植物 *NHX1* 亲缘关系较近,与拟南芥 *NHX5* 和 *NHX6* 亲缘关系较远,属于一类 *NHX* 蛋白。据报道,一类 *NHX* 的共同特点是定位于液泡膜,二类 *NHX* 蛋白分布于细胞内多个部位^[43]。因此,可以推测 *RtNHX1* 是定位于长叶红砂液泡膜的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白。

盐胁迫可上调 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因家族多个成员的表达量,如拟南芥 *NHX1*、2 和 5,胡杨 *NHX1*、2、3、5 和 6,霸王 *NHX1* 等;而葡萄

NHX1 和牵牛花(*Ipomoea nil*) *NHX1* 则表现出对盐不敏感^[36]。本研究利用实时荧光定量 PCR 技术检测了 *RtNHX1* 对不同时间和浓度 NaCl 胁迫的响应,结果显示,在一定时间(6 h)和浓度(200 mmol/L)NaCl 胁迫下,*RtNHX1* 的表达量均被显著诱导($P < 0.05$),与拟南芥 *NHX1*^[45]、盐地碱蓬 *NHX1*^[35]、滨藜 *NHX1*^[15] 及霸王 *NHX1*^[36] 等受 NaCl 胁迫诱导上调的结果相似,表明 *RtNHX1* 可能具有和其他植物 *NHX1* 相似的功能,在 Na^+ 区隔化过程中发挥作用;然而,随 NaCl 浓度的增加和胁迫时间的延长,*RtNHX1* 的表达量又逐渐降低,

一定程度反映出在盐胁迫条件下长叶红砂离子转运的复杂性。在盐胁迫初期,长叶红砂体内迅速积累 Na^+ ,*RtNHX1* 的显著上调有助于将 Na^+ 区隔化入液泡内,快速调节胞质内的 Na^+/K^+ 比,保持离子稳态;随着进一步盐胁迫,长叶红砂其他耐盐信号通路被激活,如盐腺外排 Na^+ 等,共同完成盐胁迫应答,因此无需大量转录 *RtNHX1*,其表达量呈现下降趋势。因此,*RtNHX1* 可能是长叶红砂盐胁迫应答的先锋基因,在整个耐盐过程中发挥重要作用,但其是否比其他植物 *NHX1* 更高效,还需要进一步鉴定。

参考文献:

- [1] KRONZUCKE H J, BRITTO D T. Sodium transport in plants: a critical review[J]. *New Phytologist*, 2011, **189**(1): 54—81.
- [2] ZHU J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, **53**(1): 247.
- [3] ZHU J K. Regulation of ion homeostasis under salt stress[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, **6**(5): 441—445.
- [4] ABOGADALLAH G M. Antioxidative defense under salt stress[J]. *Plant Signal and Behavior*, 2010, **5**(4): 369—374.
- [5] HASEGAWA M, BRESSAN R, PARDO J M. The dawn of plant salt tolerance genetics[J]. *Trends Plant Science*, 2000, **5**(8): 317—319.
- [6] MITTLER R, BLUMWALD E. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, **61**(1): 443—462.
- [7] BARTELS D, SUNKAR R. Drought and salt tolerance in plants[J]. *Critical Review in Plant Science*, 2005, **24**(1): 23—58.
- [8] LI J(李 静), LIU M(刘 明), SUN J(孙 晶), *et al.* Progress of research on $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ antiporter *NHX* gene[J]. *Soybean Science* (大豆科学), 2011, **3**(6): 1 035—1 039(in Chinese).
- [9] APSE M P, AHARON G S, SNEDDEN W A. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 1999, **285**(6): 1 256—1 258.
- [10] FUKUDA A, NAKAMURA A, TANAKA Y. Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+ exchanger gene in *Oryza sativa* [J]. *BBA-Gene Structure and Expression*, 1999, **1 446**(1/2): 149—155.
- [11] 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[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, **45**(2): 146—159.
- [12] XUE Z Y, ZHI D Y, XUE G P. 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^+ [J]. *Plant Science*, 2004, **167**(4): 859—899.
- [13] ZHU X L(朱馨蕾), MA Y(马 艳), ZHANG F CH(张富春). Construction of a cDNA library and cloning of *nhx* cDNA from *Populus euphratica* under salt stress[J]. *Bulletin of Botanical Research* (植物研究), 2007, **27**(1): 82—88(in Chinese).
- [14] LI J, JIAND G, HUANG P, *et al.* Overexpression of the Na^+/H^+ antiporter gene from *Suaeda salsa* confers cold and salt tolerance to transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2007, **90**(1): 41—48.
- [15] JHA A, JOSHI M, YADAV N S, *et al.* Cloning and characterization of the *Salicornia brachiata* Na^+/H^+ antiporter gene *SbNHX1* and its expression by abiotic stress[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, **38**(3): 1 965—1 973.
- [16] HAMADA A, SHONO M, XIA T, *et al.* Isolation and characterization of a Na^+/H^+ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, **46**(1): 35—42.
- [17] YIN X Y, YANG A F, ZHANG K W, *et al.* Production and analysis of transgenic maize with improved salt tolerance by the introduction of *AtNHX1* gene[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, **46**(7): 854—861.
- [18] ZHANG H X, BLUMWALD E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, **19**(8): 765—768.
- [19] WU L Q, FAN Z M, QU L J, *et al.* Overexpression of the bacterial *NHX* gene in rice enhances salt and drought tolerance[J]. *Plant Science*, 2005, **168**(2): 297—302.
- [20] RAJAGOPAL D, AGARWAL P, TYAGI W, *et al.* *Pennisetum glaucum* Na^+/H^+ antiporter confers high level of salinity tolerance in transgenic *Brassica juncea* [J]. *Molecular Breeding*, 2007, **19**(2): 137—151.
- [21] QUINTERO F J, BLATT M R, PARDO J M. Functional conservation between yeast and plant endosomal Na^+/H^+ antiporters[J]. *Fed-*

- eration of European Biochemical Societies Letters, 2000, **471**(2-3): 224-228.
- [22] OHTA M, HAYASHI Y, HAYAKAWA T. Introduction of a Na^+/H^+ antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice[J]. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2002, **532**(3): 279-283.
- [23] WU Y Y, CHEN Q J, WANG X C. Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass(*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene[J]. *Plant Science*, 2005, **169**(13): 65-73.
- [24] BRECKLE S W. Salinity, halophytes and salt affected natural ecosystems. In Salinity: environment-plants- molecules[J]. *Springer*, 2002: 53-77.
- [25] FLOWERS T J, COLMER T D. Salinity tolerance in halophytes[J]. *New Phytologist*, 2008, **179**(4): 945-963.
- [26] YUE Y (薛 焱), WANG Y CH (王迎春), WANG T ZH (王同智). Physiological and biochemical mechanisms of an endemic halophyte *Reaumuria trigyna* Maxim. under salt stress[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2012, **32**(1): 136-142(in Chinese).
- [27] DANG Z H, ZHENG L L, WANG J, et al. Transcriptomic profiling of the salt-stress response in the wild recretohalophyte *Reaumuria trigyna* [J]. *BMC Genomics*, 2013, **14**: 29.
- [28] YANG R L (杨瑞丽), WANG Y CH (王迎春), et al. Morphogenesis and changes in endogenous phytohormones in *Reaumuria trigyna* Maxim during fissurate growth[J]. *Acta Phytoecologica Sinica* (植物生态学报), 2008, **32**(2): 385-391(in Chinese).
- [29] XUE Y (薛 焱), WANG Y CH (王迎春). Study on characters of ions secretion from *Reaumuria trigyna* [J]. *Journal of Desert Research* (中国沙漠), 2008, **28**(3): 437-442(in Chinese).
- [30] DANG ZH H (党振华), ZHENG L L (郑琳琳), et al. Cloning and sequence analysis of the plasma membrane Na^+/H^+ antiporter cDNA in recretohalophyte *Reaumuria trigyna* Maxim. [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), 2013, **28**(3): 1-6(in Chinese).
- [31] XUE Y (薛 焱), WANG Y CH (王迎春). Influence of light, temperature and salinity on seed germination of *Reaumuria trigyna* Maxim. [J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 2007, **43**(4): 708-710(in Chinese).
- [32] DANG Z H, QI Q, ZHANG H R, et al. Identification of salt-stress-induced genes from the RNA-Seq data of *Reaumuria trigyna* using differential-display reverse transcription PCR[J]. *International Journal of Genomics*, 2014, **2014**: 1-16.
- [33] WANG J (王 佳), ZHENG L L (郑琳琳), GU T P (顾天培), et al. Cloning and expression analysis of two WRKY transcription factors from the rare recretohalophyte *Reaumuria trigyna* [J]. *Acta Prataculturae Sinica* (草业学报), 2014, **23**(4): 122-129(in Chinese).
- [34] ZHANG H R, ZHAO L X, WANG J, et al. Cloning and functional analysis of two flavanone-3-hydroxy-lase genes from *Reaumuria trigyna* [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, **36**(5): 1 221-1 229.
- [35] MA X L, ZHANG Q, SHI H Z, et al. Molecular cloning and different expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene in *Suaeda salsa* under salt stress[J]. *Biologia Plantarum*, 2004, **48**(2): 219-225.
- [36] WU G Q, XI J J, WANG Q et al. The *ZxNHX* gene encoding tonoplast Na^+/H^+ antiporter from the xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* plays important roles in response to salt and drought[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, **168**(8): 758-767.
- [37] WU C X, KONG X Q, ZHAO Y X, et al. Molecular cloning and functional analysis of a Na^+/H^+ antiporter gene *ThNHX1* from a halophytic plant *Thellungiella halophila* [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2009, **27**(1): 1-12.
- [38] WU C A, YANG G D, MENG Q W, et al. The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast Na^+/H^+ antiporter plays an important role in salt stress[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, **45**(5): 600-607.
- [39] DARLEY C P, VAN WUYTSWINKEL O C M, VAN DER WOUDE K, et al. *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* *NHX1* genes encode amiloride sensitive electroneutral Na^+/H^+ exchangers[J]. *Biochemical Journal*, 2000, **351**(1): 241-249.
- [40] SATO Y, SAKAGUCHI M. Topogenic properties of transmembrane segments of *Arabidopsis thaliana* *NHX1* reveal a common topology model of the Na^+/H^+ exchanger family[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2005, **138**(4): 425-431.
- [41] YE C Y, ZHANG H C, CHEN J H, et al. Molecular characterization of putative vacuolar *NHX*-type Na^+/H^+ exchanger genes from the salt-resistant tree *Populus euphratica* [J]. *Physiol. Plantarum*, 2009, **137**(2): 166-174.
- [42] ZHANG Y L (张雨良), ZHANG ZH J (张智俊), YANG F SH (杨峰山), et al. Cloning and bioinformatics analysis of *PmNHX1* gene from Xinjiang halophyte *Plantago maritima* [J]. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2009, **29**(1): 27-33(in Chinese).
- [43] BRETT C L, DONOWITZ M, RAO R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2005, **288**(2): C223-239.
- [44] RODRÍGUEZ-ROSALES M P, GÁLVEZ F J, HUERTAS R, et al. Plant *NHX* cation/proton antiporters[J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2009, **4**(4): 265-276.
- [45] SHI H Z, LEE B H, WU S J, et al. Over expression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, **21**(2): 81-85.

(编辑: 宋亚珍)