

液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白与植物耐盐性伍国强¹, 王强龙^{1,2}, 包爱科¹, 王锁民¹

(1. 兰州大学草地农业科技学院, 兰州 730000; 2. 内江师范学院, 四川 内江 641112)

摘要:土壤盐碱化作为一种主要的非生物胁迫因子严重影响着世界范围内的农业生产。植物抵御盐胁迫的有效策略之一是将细胞质中过多的 Na^+ 区隔化在液泡, 这一过程是由液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白完成的。本文概述了植物液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的分子结构、功能、表达调控及其与植物耐盐性的关系等方面的研究进展, 并对未来几年该蛋白的主要研究方向作了分析和展望。

关键词:盐胁迫; 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白; 耐盐性

中图分类号: Q816 文献标识码: A 文章编号: 1008-0864(2008)02-0013-09

Vacuolar Na^+/H^+ Antiporter Involved in Plant Salt ToleranceWU Guo-qiang¹, WANG Qiang-long^{1,2}, BAO Ai-ke¹, WANG Suo-min¹

(1. School of Pastoral Agricultural Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730000;

2. Neijiang Normal University, Sichuan Neijiang 641112, China)

Abstract: Soil salinization is a major abiotic factor that adversely affects worldwide agricultural production. One of the effective strategies that enable plants to resist salt stress is to compartmentalize Na^+ into the vacuole, which is accomplished by the vacuolar Na^+/H^+ antiporter. In this paper, recent progresses on molecular structure and function, expression and regulation of the vacuolar Na^+/H^+ antiporters, and their roles in plants salt tolerance were summarized; the future goals of this research field were also discussed.

Key words: salt stress, vacuolar Na^+/H^+ antiporter, salt tolerance

盐胁迫是全世界范围内造成作物减产的主要非生物因素之一。土壤中过高的 Na^+ 造成植物新陈代谢异常、扰乱植物对 K^+ 和其他矿质营养元素的吸收、产生渗透胁迫并诱发诸如氧化胁迫等次生胁迫作用, 从而使植物的生长受到抑制, 甚至导致植物的死亡, 对农业生产构成严重的威胁^[1]。研究表明, 植物抵御盐胁迫的有效策略之一是通过液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 (vacuolar Na^+/H^+ exchanger or antiporter, 简称 NHX、NHE 或 NHA) 将细胞质中过多的 Na^+ 区域化在液泡, 一方面降低过多 Na^+ 对细胞质的毒害, 另一方面又可将 Na^+ 作为一种有益的渗透调节剂来降低细胞的渗透势^[2,3], 从而使植物能更好地适应盐渍生境。因此, 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白是一种重要的耐盐决定因子, 在植物耐盐性的遗传改

良中具有重要应用价值。近年来, 有关液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的研究受到学术界的广泛关注, 现将该领域的研究进展概述如下。

1 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的分子结构与功能1.1 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的分子结构

1.1.1 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的分子克隆 1999年, Apse等^[3]在拟南芥中鉴定了第一个高等植物的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *AtNHX1*。此后, 人们相继在其他高等植物中克隆出编码液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的基因(表1), 但绝大多数来自甜土植物或盐生植物。根据此类蛋白质的保守区设计简并性引物, 采用 RT-

收稿日期: 2007-11-26; 修回日期: 2008-02-29

基金项目: 973项目(2007CB108901), 863计划(2006AA10Z126), 国家自然科学基金(30770347, 30671488)和新世纪优秀人才支持计划(NCET-05-0882)资助。

作者简介: 伍国强, 硕士研究生, 主要从事牧草逆境生理及分子生物学研究。通讯作者: 王锁民, 教授, 博士生导师, 主要从事植物逆境生理与分子生物学研究工作。Tel: 0931-8910983, Fax: 0931-8910979; E-mail: smwang@lzu.edu.cn

PCR 和 RACE 方法,从荒漠多浆旱生植物霸王 (*Zygophyllum xanthoxylum*) 中已成功克隆得到液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的同源基因 *ZxNHX* (登录号为 EU103624,作者待发表)。

在克隆液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的过程中,许多研究者还发现有些高等植物的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白拥有数个同功酶 (isoform),并且在很多植物中也克隆出了编码该蛋白的同源基因 (homologous gene)。例如,编码水稻液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的同源基因至少有 5 个 (*OsNHX1-5*)^[23],拟南芥中至少有 6 个 (*AtNHX1-6*)^[24],玉米中也有 6 个 (*ZmNHX1-6*)^[12],大麦中至少有 2 个 (*HvNHX1-2*)^[25]。研究发

现,这些同源基因的编码区保守性较高,但其非编码区的保守性却很低。因此,液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白是一个多基因家族。

大量研究表明,大多数液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因含有 1 410 ~ 1 668 个核苷酸的开放阅读框 (ORF),编码 470 ~ 556 个氨基酸残基 (表 1),推测分子质量从 47kDa 到 179 kDa 不等。例如拟南芥 *AtNHX1* 分子质量为 47 kDa^[3],葡萄 *VvNHX1* 则为 60 kDa^[20],而菊芋 *HtNHX1* 高达 178.53 kDa^[17]。由此可见,不同植物液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的多肽大小变化较大,分子质量具有一定差异性。说明液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白在进化上可能具有多样性。

表 1 高等植物液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白

Table 1 The vacuolar Na^+/H^+ antiporters from various higher plants.

物种 Species	基因名称 Gene names	基因库登录号 GenBank accession no.	氨基酸残基数 Amino acid residue numbers	参考文献 References
北滨藜 <i>Atriplex gmelini</i>	<i>AgNHX1</i>	AB038492	555	[4]
甜菜 <i>Beta vulgaris</i>	<i>BvNHX1</i>	AY189676	552	[5]
柑橘 <i>Citrus × paradisi</i>	<i>cNHX1</i>	AY028416	542	[6]
番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>LeNHX1</i>	AJ306630	534	[7]
油菜 <i>Brassica napus</i>	<i>BnNHX1</i>	AY189676	515	[8]
棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	<i>GhNHX1</i>	AF515632	543	[9]
盐地碱蓬 <i>Suaeda salsa</i>	<i>SsNHX1</i>	AF370358	556	[10]
番杏 <i>Tetragonia tetragonioides</i>	<i>TtNHX1</i>	AF527625	554	[11]
玉米 <i>Zea mays</i>	<i>ZmNHX1</i>	AY270036	540	[12]
	<i>ZmNHX2</i>	AY270037	540	
	<i>ZmNHX3</i>	AY270038	539	
	<i>ZmNHX4</i>	AY270039	538	
	<i>ZmNHX5</i>	AY270040	545	
	<i>ZmNHX6</i>	AY270041	541	
月季 <i>Rosa hybrida</i>	<i>RhNHX1</i>	AB199912	543	[13]
大豆 <i>Glycine max</i>	<i>GmNHX1</i>	AY392759	546	[14]
杨树 <i>Populus tomentosa</i>	<i>PtNHX1</i>	AY660749	544	[15]
	<i>PtNHX6</i>	AY832912	526	
长穗偃麦草 <i>Agropyron elongatum</i>	<i>AeNHX1</i>	AF507044	546	[16]
菊芋 <i>Helianthus tuberosus</i>	<i>HtNHX1</i>	ABM17091	549	[17]
珍珠粟 <i>Pennisetum glaucum</i>	<i>PgNHX1</i>	DQ071264	470	[18]
小麦 <i>Triticum aestivum</i>	<i>TaNHX2</i>	AY040246	538	[19]
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	<i>VvNHX1</i>	AY634283	541	[20]
中间偃麦草 <i>Elytrigia intermedia</i>	<i>TiNHX</i>	EF409418	546	[21]
獐毛 <i>Aeluropus litoralis</i>	<i>AlNHX</i>	AY825361	540	[22]

序列分析表明,液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白在不同种类植物间的同源性有所不同^[4, 11, 12, 17]。如盐生植物番杏 *TiNHX1* 和盐角草 *SsNHX1* 与北滨藜 *AgNHX1* 的同源性很高,而与甜土植物水稻 *OsNHX1* 的同源性很低^[11]。此外,同一种植物的液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白家族成员间的同源性也有所差异。如在拟南芥 *NHX*

家族中,根据同源性将其成员分为 I 型和 II 型, I 型 (*AtNHX1-4*) 成员间的同源性为 54% ~ 87%, II 型 (*AtNHX5-6*) 之间为 79%, 而 I 型与 II 型之间的同源性仅为 21% ~ 23%^[24]。由此说明液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白是一个高度异源的蛋白质群体,它们可能是由不同祖先蛋白经趋同进化而来。

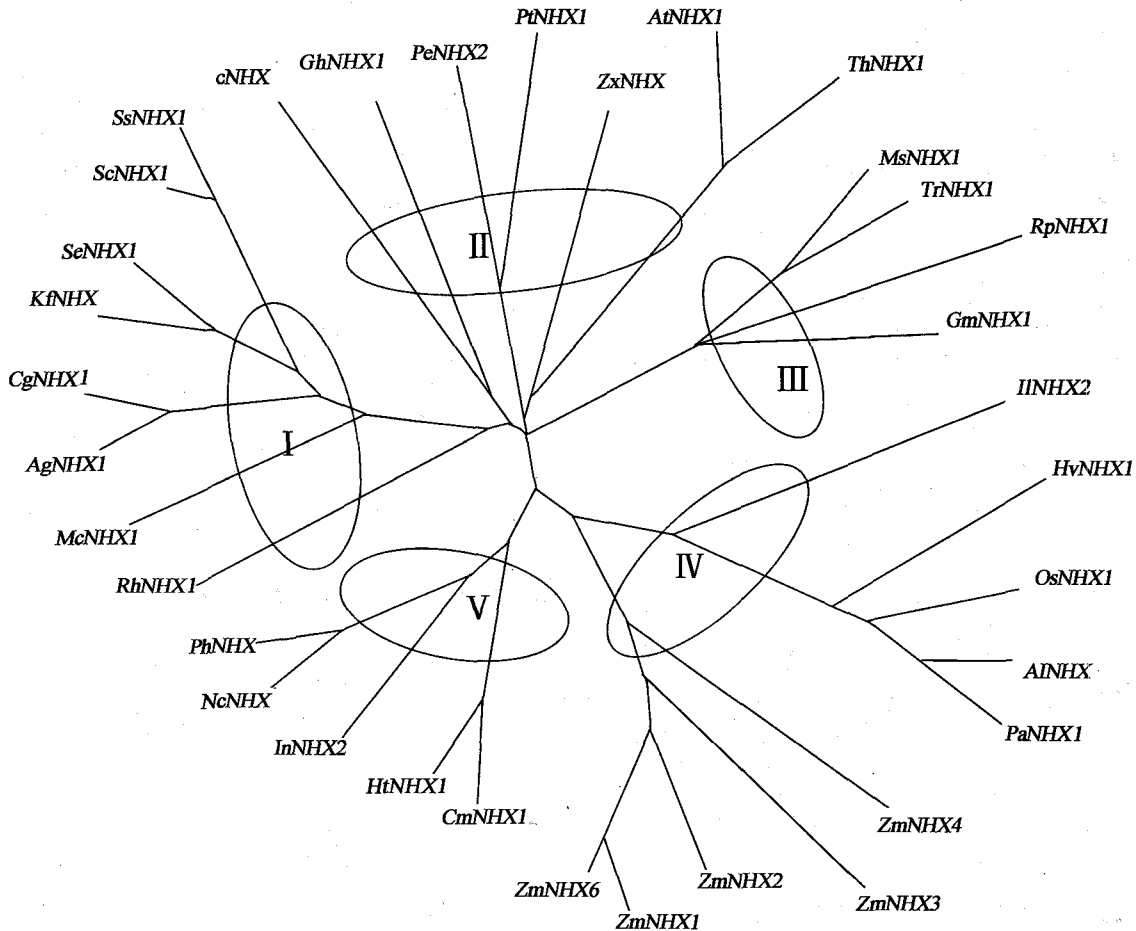


图 1 植物液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白氨基酸序列的系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of Na⁺/H⁺ antiporter proteins from various plants species.

液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的来源和基因库登录号分别为:冰叶日中花 *McNHX1* (AM746985);灰绿藜 *CgNHX1* (AY371319);盐爪爪 *KfNHX* (AY825250);盐角草 *SeNHX1* (AY131235);角果碱蓬 *ScNHX1* (DQ512716);胡杨 *PeNHX2* (DQ414512);霸王 *ZnNHX* (EU103624);拟南芥 *AtNHX1* (AY685183);盐芥 *ThNHX1* (DQ490966);苜蓿 *MsNHX1* (AY513732);白三叶 *TrNHX1* (EU109427);刺槐 *RpNHX1* (EF675631);白花马蔺 *IINHX2* (AY730277);大麦 *HvNHX1* (AB089197);水稻 *OsNHX1* (AY324877);芦苇 *PaNHX1* (AB211145);菊花 *CmNHX1* (EF396235);日本牵牛 *InNHX2* (AB194065);高杯花 *NcNHX* (AB051818);矮牵牛 *PhNHX* (AB051817);其他 *NHXs* 参照表 1。

The sources and GenBank accession numbers of vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter genes are as follows: *McNHX1* (AM746985), *Mesembryanthemum crystallinum*; *CgNHX1* (AY371319), *Chenopodium glaucum*; *KfNHX* (AY825250), *Kalidium foliatum*; *SeNHX1* (AY131235), *Salicornia europaea*; *ScNHX1* (DQ512716), *Suaeda corniculata*; *PeNHX2* (DQ414512), *Populus euphratica*; *ZnNHX* (EU103624), *Zygophyllum xanthoxylum*; *AtNHX1* (AY685183), *Arabidopsis thaliana*; *ThNHX1* (DQ490966), *Thellungiella halophila*; *MsNHX1* (AY513732), *Medicago sativa*; *TrNHX1* (EU109427), *Trifolium repens*; *RpNHX1* (EF675631), *Robinia pseudoacacia*; *IINHX2* (AY730277), *Iris lactea*; *HvNHX1* (AB089197), *Hordeum vulgare*; *OsNHX1* (AY324877), *Oryza sativa*; *PaNHX1* (AB211145), *Phragmites australis*; *CmNHX1* (EF396235), *Chrysanthemum morifolium*; *InNHX2* (AB194065), *Ipomoea nil*; *NcNHX* (AB051818), *Nierembergia caerulea*; *PhNHX* (AB051817), *Petunia hybrida*; The other *NHXs* refer to Table 1.

通过比较氨基酸序列同源性,可以研究各种植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的进化关系(图 1)。液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白在进化上可分为 5 个群。群 I 主要以盐生植物的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白为主,包括盐地碱蓬 *SsNHX1*、北滨藜 *AgNHX1*、盐爪爪 *KfNHX1* 和冰叶日中花 *McNHX1* 等。群 II 主要以木本植物的为主,包括胡杨 *GhNHX2*、杨树 *PtNHX1* 和柑橘 *cNHX* 等;其次还有较耐盐草本植物的如棉花 *GhNHX1*、盐芥 *ThNHX1*, 新鉴定的多浆旱生植物霸王 *ZxNHX* 也属于此群,且与胡杨的进化关系最近。群 III 的成员均来源于豆科植物,如紫花苜蓿 *MsNHX1*、白三叶 *TrNHX1*、刺槐 *RpNHX1* 和大豆 *GmNHX1* 等。群 IV 的成员来自于单子叶植物,如水稻 *OsNHX1*、芦苇 *PaNHX* 和大麦 *HvNHX1* 等。群 V 主要以草本花卉植物为主,如日本牵牛 *InNHX2*、矮牵牛 *PhNHX*、菊花 *CmNHX1* 和高杯花 *NcNHX1* 等。在进化上这 5 个群来自共同的祖先,表明植物液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白拥有共同的进化起源。

1.1.2 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的拓扑结构及其特性 Yamaguchi 等^[26] 对拟南芥 *AtNHX1* 的拓扑学结构进行了分析(图 2)。结果表明, *AtNHX1* 由 12 个跨膜区和 1 个较长的亲水性 C 末端“尾巴”组成,其中 3 个推测的疏水跨膜区 TM3、TM5 和 TM6 虽然与膜相连,但似乎并没有跨过液泡膜。在棉花的 *GhNHX1*^[9] 和大豆的 *GmNHX1*^[14] 中也有类似的结构。另外, *AtNHX1* N 末端朝向胞质,但几乎整个 C 末端都位于液泡腔中。与其他 NHX 相比较, *AtNHX1* N 末端很保守,对于 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的活性非常重要,因为 N 末端缺失会使 Na^+/H^+ 转运轻微地降低和 Na^+/K^+ 转运少量地增加; *AtNHX1* C 末端变化则较大,可能对蛋白质的活性起调节作用, C 末端的缺失使 Na^+/H^+ 转运活性大量增加,而 Na^+/K^+ 转运的比率则是未修饰的两倍^[26]。此外,钙调素蛋白 *At-CaM15* 作用于 *AtNHX1* 的 C 末端会提高转运蛋白 Na^+/K^+ 的选择性而降低其 Na^+/H^+ 交换活性^[27]。

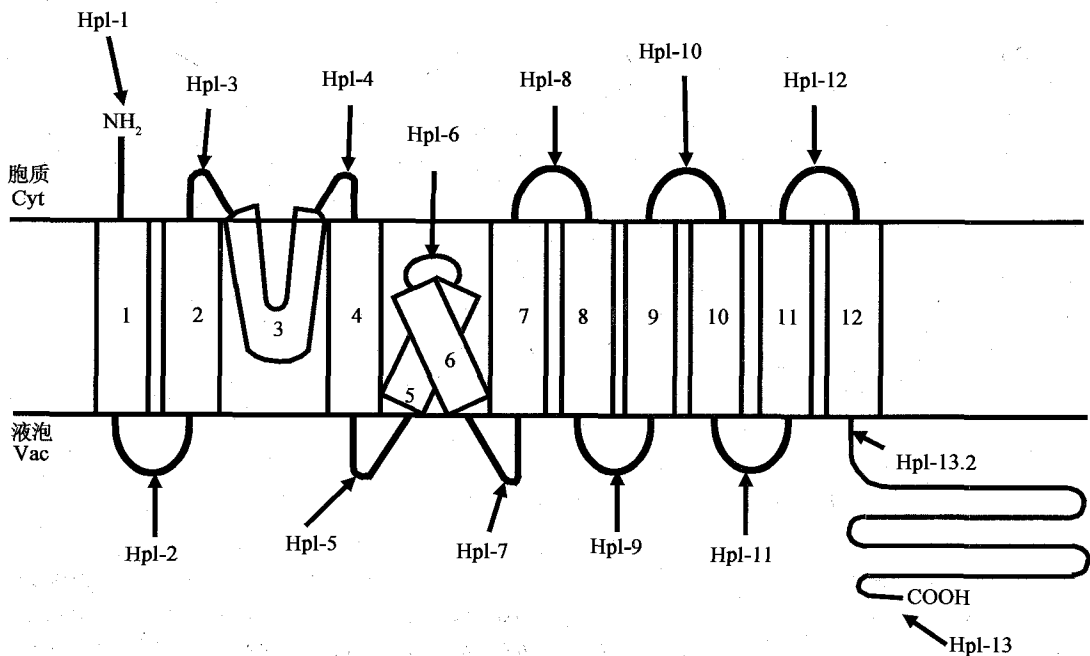


图 2 *AtNHX1* 的假定拓扑模型^[26]

Fig. 2 Proposed topological model of *AtNHX1*^[26]

AtNHX1 TM3 的 ⁸¹LFFIYLLPPI⁹⁰ 序列在 *AgNHX1*、*SsNHX1*、*HtNHX1*、*AeNHX1* 以及哺乳动物的 NHX 都是高度保守的,该段序列在哺乳动物中被鉴定是真核生物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白抑制

剂氨氯吡嗪脒 (amiloride) 的结合位点^[4]。另外, *GhNHX1*^[9]、*SsNHX1*^[10]、*GmNHX1*^[14] 和 *AtNHX1*^[28] 等均具有 Asn 的糖基化位点,表明这类蛋白是糖基化蛋白。此外,蓝藻质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋

白 SynNhap 疏水区的 Asp¹³⁸ 残基是该类蛋白行使功能必不可少的^[4], 如果 Asp¹³⁸ 残基被 Glu 替代, SynNhap 的活性就会丧失。AtNHX1、BnNHX1 和 SsNHX1 等也有 Asp 残基, 但是该残基在植物液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白功能中的作用目前仍不清楚。

1.2 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的主要功能

1.2.1 离子区域化功能

大量研究表明, 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白作为转运载体将细胞质中过多的 Na^+ 区域化到液泡中, 与此同时将液泡内的 H^+ 转入细胞质^[2, 3], 这个过程依靠液泡膜上的 2 个质子泵 $\text{H}^+ \text{-ATPase}$ 和 $\text{H}^+ \text{-PPase}$ 产生的 H^+ 电化学势梯度来驱动。 Na^+ 在液泡中的区域化一方面减轻过多的 Na^+ 对细胞质代谢酶和膜系统的伤害; 另一方面, 积累在液泡的 Na^+ 可作为有益的渗透调节剂, 降低细胞的渗透势, 从而抵御盐分造成的渗透胁迫^[2, 3]。因此, 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白以及为其提供驱动力的 2 个质子泵在离子区域化和离子稳态平衡中发挥着至关重要的作用。

1.2.2 调节液泡 pH

Yamaguchi 等^[29] 在日本牵牛 (*Ipomoea nil*) 中鉴定了一个与 *AtNHX1* 同源的基因 *InNHX1*, 该基因的表达与液泡 pH 增大密切相关。*InNHX1* 在开花前 12 h 时的表达量最大, 花瓣的颜色从花蕾时的紫色变为完全开放时的蓝色, 相应地花瓣液泡 pH 也由 6.6 上升到 7.2。当转座子 *Tpn4* 插入 *InNHX1* 时, 突变体的花瓣颜色没有发生变化, 相应地液泡 pH 也没有发生变化。Yoshida 等^[30] 研究发现, 三色牵牛 (*Ipomoea tricolor*) 花瓣的 pH 在紫色花蕾中为 6.6, 在开放的蓝色花中为 7.7, 相应地花瓣液泡膜 $\text{H}^+ \text{-ATPase}$ 、 $\text{H}^+ \text{-PPase}$ 和 NHX 的活性明显增强。这说明液泡 pH 发生变化是由液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白利用液泡膜 $\text{H}^+ \text{-ATPase}$ 、 $\text{H}^+ \text{-PPase}$ 产生的质子梯度将细胞质中 Na^+ 转入液泡中而导致的^[30]。此外, Ohnishi 等^[31] 同样在研究日本牵牛时发现, *InNHX2* 的功能除了赋予牵牛植株耐盐性外, 还参与花瓣 pH 的调节。这些结果表明, 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白具有调控液泡 pH 的功能。

1.2.3 影响叶的发育

Apse 等^[32] 研究发现, 与野生型植株相比, *AtNHX1* 的缺失突变体 *nhx1* 表现出 Na^+/H^+ 和 K^+/H^+ 交换活性降低、表皮细胞数量减少、总叶面积缩小等现象, 然而在 *nhx1* 突

变体中过量表达 *AtNHX1* 可使其基本恢复正常。由此说明 *AtNHX1* 不但可以影响 Na^+/H^+ 和 K^+/H^+ 交换活性, 而且还可以影响植物的发育^[32]。

2 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的表达及其调控机制

2.1 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的表达特性

根据液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白对盐胁迫的不同响应, 可将其表达方式分为组成型和诱导型表达^[33] 两种。组成型表达是指无论是否进行盐胁迫, 植物体内都可以检测到该蛋白的活性。如北滨藜经 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 胁迫后, 对照和盐处理植株中均可检测到液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 只不过盐处理植株中的蛋白活性高、是对照的 2.2 倍^[4]。此外, 拟南芥 *AtNHX1*^[3]、甜菜 *BvNHX1*^[5]、番杏 *TtNHX1*^[11]、菊芋 *HtNHX1*^[17] 等也属于此类。诱导型表达是指无盐胁迫时检测不到这种蛋白的活性, 盐胁迫后蛋白才进行表达, 如向日葵^[34]。另外, 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白在不同植物基因组中的拷贝数也是不完全一致的, 如小麦 *TNHX1*^[35] 和月季 *RhNHX1*^[13] 只有 1 个拷贝, 柑橘 *cNHX* 是 1 ~ 2 个拷贝^[6], 番杏 *TtNHX1*^[11] 和獐毛 *AlNHX*^[22] 则有 2 ~ 3 个拷贝, 杨树 *PtNHX1* 和 *PtNHX6* 均有 1 ~ 4 个拷贝^[15]。

液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的表达还具有组织特异性。在不同植物中, 其表达的组织部位有所不同, 主要有以下 4 种情况: ①几乎在所有组织中表达。大多数较耐盐的植物属于这种情况, 如 NaCl 胁迫后, 拟南芥 *AtNHX1* 在叶、茎、根和花中均有所表达, 但在叶中的表达量明显高于其他部位^[3]; 棉花 *GhNHX1* 和碱蓬 *SsNHX1* 也呈现出类似情况^[9, 10]。②仅在花中表达。如日本牵牛 *InNHX1*^[29]。③仅在根中表达。如长穗偃麦草 *AeNHX1*^[16]。④仅在果实中表达。如葡萄 *VvNHX1*^[20]。这种表达上的差异可能与液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白在不同组织中的不同功能密切相关。

2.2 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白表达的调控机制

目前, 有关液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白表达调控机制的研究主要集中在拟南芥的 *AtNHX1*。Shi 和 Zhu^[36] 研究表明, NaCl 、 KCl 和 ABA 上位调

节 *AtNHX1* 的转录水平。*AtNHX1* 的启动子区含有推测的 ABA 应答元件 ABRE (ABA Responsive Element), 位于起始密码子后 736 ~ 728 位, 该元件参与多种 ABA 诱导基因的表达调节。由于 *AtNHX1* 的启动子活性受 NaCl、KCl 和 ABA 上位调节, 说明 *AtNHX1* 的表达是在转录水平上的调控。NaCl 对 *AtNHX1* 的上调程度在 ABA 缺失突变体 *aba2-1*、*aba3-1* 和 ABA 非敏感突变体 *abi1-1* 中下降, 但在 *abi2-1*、*SOS1* (质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *SOS1* 突变体)、*SOS2* (蛋白激酶基因 *SOS2* 突变体) 和 *SOS3* (钙结合蛋白基因 *SOS3* 突变体) 中没有发生变化。ABA 诱导的 *AtNHX1* 转录水平同样在 *abi1-1* 中下调, 但 *abi2-1* 中没有变化^[36]。这些结果说明, 盐胁迫下 *AtNHX1* 转录水平的上调, 部分依赖于 ABA 生物合成和 ABA 通过 ABI1 发出的信号。ABI1 可以调控 *AtNHX1* 等基因的表达, ABI2 则可以通过抑制 *SOS2* 的激酶活性或 *SOS2* 的底物活性来负调控离子稳态平衡。此外, *SOS* 信号途径在调控离子稳态平衡和拟南芥耐盐性中也发挥着重要作用, *SOS3-SOS2* 激酶复合物通过磷酸化激活 *SOS1* 和 *AtNHX1*, 分别调节 Na^+ 的外排和 Na^+ 的区隔化。Qiu 等^[37] 通过比较野生型和 *SOS1*、*SOS2*、*SOS3* 突变体的 Na^+/H^+ 交换活性发现, *SOS2* 不但调控质膜 Na^+/H^+ 交换, 而且也调控液泡膜 Na^+/H^+ 交换活性。值得注意的是, 体外添加活化的 *SOS2* 蛋白使 *SOS2* 突变体的液泡膜 Na^+/H^+ 交换活性恢复到野生型水平。相反, *SOS3* 突变体不影响液泡膜 Na^+/H^+ 交换活性, 说明液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性不受 *SOS3* 的调控^[37]。Qiu 等^[37] 的研究还发现, *AtNHX1* 和 *SOS1* 之间可能存在协同调节机制, 当其中一种 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性丧失或降低时, 另一种逆向转运蛋白的活性也许会增强以弥补损失, 但这种潜在的协同调控机理还有待更进一步的研究。

3 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白与植物耐盐性

3.1 盐胁迫下液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的活性

高等植物液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白对盐胁迫的响应有 3 种表现形式。①有无盐处理都不显示 Na^+/H^+ 逆向转运活性, 这可能是由于其体

内不存在 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白, 或者有这种蛋白, 但不能被激活。盐敏感的甜土植物多为此类, 如玉米盐敏感品种 (Pioneer 3906) 经不同浓度的 NaCl ($1 \sim 100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理后, 在叶和根中均未检测到液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的活性^[12]。②未作盐处理的植株中没有 Na^+/H^+ 逆向转运活性, 只有在 NaCl 胁迫下才能诱导出 Na^+/H^+ 逆向转运活性。耐盐的甜土植物多为这种类型, 如大麦、向日葵^[34] 等。③无盐条件下植株中 Na^+/H^+ 逆向转运活性较低, 盐处理后由于 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的合成增加, 其活性也增加。大多数盐生植物表现出这种形式, 如北滨藜^[41]、盐地碱蓬^[38]、香雪球 (*Lobularia maritime*)^[39] 等。这些结果表明, 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的有无及其活性高低与植物的耐盐性密切相关。

有趣的是, 在一些耐盐植物上的研究表明, 盐胁迫下液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性与质子泵活性是相耦联的。如在向日葵中, 随着 NaCl 浓度的升高, 不仅液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性增加, 而且液泡膜 H^+-ATPase 和 H^+-PPase 的活性也同时增强^[34]; 盐地碱蓬经 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理后, 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性、 H^+-ATPase 水解活性和质子泵活性均较对照显著增强^[38]; 香雪球经盐处理后, 也表现出伴随着 *LmNHX1* 转录水平的增加, H^+-ATPase E 亚基基因 *LmVHA-E* 转录水平也增高的现象^[39]。但是, 盐胁迫强度对液泡膜的质子泵特别是 H^+-PPase 的影响有很大差异, 高浓度的 Na^+ 通常会抑制 H^+-PPase 的活性, 而低浓度的 Na^+ 可以促进 H^+-PPase 的活性或提高其转录水平^[40]。

值得一提的是, 其他非生物胁迫 (如干旱、低温、KCl、LiCl、ABA、水杨酸等) 也会诱导液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性或转录水平的增加。如大豆经 5% PEG 处理 48 h 后, *GmNHX1* 的转录水平明显高于对照^[41]; 棉花分别经 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA、 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理后, *GhNHX1* 的转录水平均有所增加, 尤其是在 KCl 和 ABA 处理下其增幅最高; 另外, 小麦幼苗经 -4°C 低温处理后, *TaNHX2* 也表现出类似的趋势^[18]。这说明液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白可能在植物适应其他逆境中也起着重要作用。

3.2 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的过量表达增强植物的耐盐性

大量研究表明,过量表达拟南芥 *AtNHX1* 可以明显增强转基因植物的耐盐性。Apse 等^[3]将 *AtNHX1* 转入拟南芥,获得了可在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 中正常生长发育的转基因植株;进一步分析转基因植株,发现其 Na^+/H^+ 交换率及叶片 Na^+ 浓度均比野生型植株高,且转基因植株更高的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性和 *AtNHX1* 蛋白量的升高相一致^[3]。Zhang 等^[42]又将 *AtNHX1* 转入油菜,同样发现过量表达该蛋白的转基因油菜在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的环境中也能够正常生长、开花和结实,而转基因油菜产量和油的品质未受到高盐的影响。He 等^[43]在棉花中过量表达 *AtNHX1*,发现在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理条件下,转基因棉花植株产量增加并产生更多的棉纤维;转基因棉花的光合速率和氮同化速率均比非转基因植株强,这可能是产生更多棉纤维的原因;另外,转基因棉花在大田条件下,也能够生产更多、质量更好的棉纤维,说明 *AtNHX1* 能够真正的被用来改进棉花的耐盐性。此外,在小麦中过量表达 *AtNHX1* 的转基因植株不但有更强的耐盐性,而且还有更高的产量^[44]。

除了 *AtNHX1* 之外,过量表达其他植物的液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因,同样能够增强转基因植物的耐盐性。Qiao 等^[45]在拟南芥和油菜(*Festuca*)中过量表达长穗偃麦草 *AeNHX1*,发现在 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理下,转基因植株的种子能够正常发芽,而野生型则不能。Werma 等^[46]将珍珠粟 *PgNHX1* 转入水稻,发现该基因的过量表达除了增强转基因植株的耐盐性外,还能促进其根系的生长发育。这一实验结果与 Li 等^[47]在过量表达 *AVPI* (拟南芥液泡膜 H^+ -PPase 基因)的转基因拟南芥上的研究结果相类似。Li 等^[47]认为 *AVPI* 的过量表达影响了质膜 H^+ -ATPase 的分布和活性,从而提高了生长素的运输效率。然而,遗憾的是过量表达 *PgNHX1* 能够促进转基因植株根系发育的具体作用机理仍不清楚,但可能和液泡膜上的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性与膜上的质子泵活性之间的耦联关系有关。

由于植物的耐盐性是由多基因控制的复杂性状,因此同时过量表达多个基因可能比单个基因更能赋予转基因植物更强的耐盐性。Zhao 等^[48]

将盐地碱蓬 *SsNHX1* 及拟南芥 *AVPI* 在水稻中同时过量表达,获得的转基因植株比单独过量表达两者之一的转基因植株具有更强的耐盐性;Brini 等^[49]将小麦 *TNHX1* 和 *TVPI* 在拟南芥中同时过量表达,得到了与 Zhao 等^[48]相一致的结果。这两个实验再次证明了液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白和 H^+ -PPase 在植物耐盐性中的重要作用。另外,Zhou 等^[50]将盐角草 *SeNHX1* 和菠菜(*Atriplex hortensis*)的甜菜碱合成酶基因 *BADH* 构建成双价基因表达载体转入烟草,获得的转基因植株与转单一基因的转基因植株相比较,双价转基因植株在盐胁迫下具有更高的生物量、 Na^+ 以及甜菜碱积累量。

4 展望

土壤盐碱化是人类面临的一个重要的环境问题,对农业的可持续发展构成了严重威胁。液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白在植物抵御盐胁迫中发挥着重要的作用,这类蛋白不仅可以降低过多 Na^+ 对细胞质代谢酶的毒害,而且是保持细胞离子稳态平衡和调节细胞渗透势的关键因子。

基于目前的研究现状,今后对液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的研究有 3 个方面可以考虑:①在细胞和分子水平上深入研究此类蛋白的调控网络及与之有关的一些重要调控蛋白的功能,这对于全面阐明其在植物抗逆性和调控植物生长发育中的作用机制有重要意义;②通过比较中生植物和极端生境下生长的野生植物中的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,来研究此类蛋白在植物适应逆境中的特殊功能,为发掘功能更为强大的抗逆基因资源奠定基础;③将 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因与其他优良抗逆基因经聚合后转入重要的农作物和牧草中,从而获得一批抗逆性很强的优良转基因作物新品种,这对改良和利用大面积盐荒地,发展干旱、半干旱地区的农业尤为重要。

参 考 文 献

- [1] Zhu J K. Plant salt tolerance[J]. Trends Plant Sci., 2001, 6: 66-71.
- [2] Blumwald E. Tonoplast vesicles as a tool in the study of ion transport at the plant vacuole [J]. Physiologia Plantarum, 1987, 69: 731-734.
- [3] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, et al. Salt tolerance

- conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis*[J]. Science, 1999, 285: 1256-1258.
- [4] Hamada A, Shono M, Xia T, *et al.*. Isolation and characterization of a Na^+/H^+ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*[J]. Plant Mol. Biol., 2001, 46: 35-42.
- [5] Xia T, Apse M P, Aharon G S, *et al.*. Identification and characterization of a NaCl-inducible vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Beta vulgaris*[J]. Physiol. Plant, 2002, 116: 206-212.
- [6] Porat R, Pavoncello D, Ben-Hayyim G, *et al.*. A heat treatment induced the expression of a Na^+/H^+ antiport gene (*cNHX1*) in citrus fruit [J]. Plant Sci., 2002, 162: 957-963.
- [7] Venema V, Belver A, Marin-Manzano M C, *et al.*. A novel intracellular K^+/H^+ antiporter related to Na^+/H^+ antiporters is important for K^+ ion homeostasis in plants [J]. J. Biol. Chem., 2003, 278: 22453-22459.
- [8] Wang J, Zuo K, Wu W, *et al.*. Molecular cloning and characterization of a new Na^+/H^+ antiporter gene from *Brassica napus*[J]. DNA Seq., 2003, 14: 351-358.
- [9] 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 Cell Physiol., 2004, 45: 600-607.
- [10] Ma X L, Zhang Q, Shi H Z, *et al.*. Molecular cloning and differential expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene in *Suaeda salsa* under salt stress [J]. Biologia Plantarum, 2004, 48: 219-225.
- [11] 吕慧颖, 李银心, 陈华, 等. 番杏 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆及特性分析 [J]. 高技术通讯, 2004, 11: 26-31.
- [12] Zórb C, Noll A, Karl S, *et al.*. Molecular characterization of Na^+/H^+ antiporters (*ZmNHX*) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress [J]. J. Plant Physiol., 2005, 162: 55-66.
- [13] Kagami T, Suzuki M. Molecular and functional analysis of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene of *Rosa hybrida* [J]. Genes Genet. Syst., 2005, 80: 121-128.
- [14] Sun Y X, Wang D, Bai Y L, *et al.*. Studies on the overexpression of the soybean *GmNHX1* in *Lotus corniculatus*: The reduced Na^+ level is the basis of the increased salt tolerance [J]. Chinese Science Bulletin, 2006, 51: 1306-1315.
- [15] 张德强, 赵淑堂, 卢孟柱, 等. 杨树 Na^+/H^+ 反向运输蛋白基因 (*PtNHX1*、*PtNHX6*) 的克隆和检测 [J]. 林业科学, 2006, 42(11): 29-36.
- [16] Qiao W H, Zhao X Y, Li W, *et al.*. Overexpression of *AeNHX1*, a root-specific vacuolar Na^+/H^+ antiporter from *Agropyron elongatum*, confers salt tolerance to *Arabidopsis* and *Festuca* plants [J]. Plant Cell Rep., 2007, 26(9): 1663-1672.
- [17] 严一诺, 孙淑斌, 徐国华, 等. 菊芋 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆与表达分析 [J]. 西北植物学报, 2007, 27(7): 1291-1298.
- [18] Rajagopal D, Agarwal P, Tyagi W, *et al.*. *Pennisetum glaucum* Na^+/H^+ antiporter confers high level of salinity tolerance in transgenic *Brassica juncea* [J]. Mol. Breeding, 2007, 19: 137-151.
- [19] Yu J N, Huang J, Wang Z N, *et al.*. A vacuolar Na^+/H^+ antiporter from wheat plays an important role in stress tolerance [J]. J. Biosci., 2007, 32: 1153-1161.
- [20] Hanana M, Cagnac O, Yamaguchi T, *et al.*. A grape berry (*Vitis vinifera* L.) cation/proton antiporter is associated with berry ripening [J]. Plant Cell Physiol., 2007, 48(6): 804-811.
- [21] 张耿, 王赞, 关宁, 等. 中间偃麦草 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的分子克隆及生物信息学分析 [J]. 遗传, 2007, 29(10): 1263-1270.
- [22] Zhang G H, Su Q, An L J, *et al.*. Characterization and expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from the monocot halophyte *Aeluropus litoralis* [J]. Plant Physiol. Biochem., 2008, 46: 117-126.
- [23] Pardo J M, Cubero B, Leidi E O, *et al.*. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance [J]. J. Exp. Bot., 2006, 57: 1181-1199.
- [24] Yokoi S, Quintero F J, Cubero B, *et al.*. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response [J]. Plant. J., 2002, 30: 529-539.
- [25] Fukuda A, Chiba K, Maeda M, *et al.*. Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H^+ -pyrophosphatase, H^+ -ATPase subunit A, and Na^+/H^+ antiporter from barley [J]. J. Exp. Bot., 2004, 55: 585-594.
- [26] Yamaguchi T, Apse M P, Shi H, *et al.*. Topological analysis of a plant vacuolar Na^+/H^+ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100: 12510-12515.
- [27] Yamaguchi T, Aharon G S, Sottosanto J B, *et al.*. Vacuolar Na^+/H^+ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca^{2+} - and pH-dependent manner [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2005, 102: 16107-16112.
- [28] 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]. J Biochem., 2005, 138: 425-431.
- [29] Yamaguchi T, Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, *et al.*. Genes encoding the vacuolar Na^+/H^+ exchanger and flower coloration [J]. Plant Cell Physiol., 2001, 42: 451-461.
- [30] Yoshida K, Kawachi M, Mori M, *et al.*. The involvement of tonoplast proton pumps and $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ exchangers in the change of petal color during flower opening of morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. heavenly blue [J]. Plant Cell Physiol., 2005, 46: 407-415.
- [31] Ohnishi M, Fukada-Tanaka S, Hoshino A, *et al.*. Characterization of a novel Na^+/H^+ antiporter gene *InNHX2* and comparison of *InNHX2* with *InNHX1*, which is responsible for blue flower coloration by increasing the vacuolar pH in the Japanese morning glory [J]. Plant. Cell. Physiol., 2005, 46: 259-267.
- [32] Apse M P, Sottosanto J B, Blumwald E. Vacuolar cation/ H^+ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of *AtNHX1*, the *Arabidopsis vacuo-*

- lar Na^+/H^+ antiporter[J]. Plant J., 2003, 36: 229 - 239.
- [33] 张俊莲,张金文,陈正华,等. 植物 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白与植物耐盐性的研究进展[J]. 草原与草坪, 2005, 4: 3 - 8.
- [34] Ballesterous E, Blumwald E, Donaire J P, et al.. Na^+/H^+ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sun flowers roots induced by NaCl stress [J]. Physiologia Plantarum, 1997, 99: 328 - 334.
- [35] Brini F, Caxiola R, Berkowitz G, et al.. Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump [J]. Plant Physiol. Biochem., 2005, 43: 347 - 354.
- [36] Shi H, Zhu J K. Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid [J]. Plant Mol. Biol., 2002, 50: 543 - 550.
- [37] Qiu Q S, Guo Y, Quintero F J, et al.. Regulation of vacuolar Na^+/H^+ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway [J]. J. Biol. Chem., 2004, 279: 207 - 215.
- [38] Qiu N, Chen M, Guo J, et al.. Coordinate up-regulation of V-H^+ -ATPase and vacuolar Na^+/H^+ antiporter as a response to NaCl treatment in a C3 halophyte *Suaeda salsa* [J]. Plant Sci., 2007, 173(5): 487 - 494.
- [39] Popova O V, Golladack D. In the halotolerant *Lobularia maritime* (Brassicaceae) salt adaptation correlates with activation of the vacuolar H^+ -ATPase and the vacuolar Na^+/H^+ antiporter [J]. J. Plant Physiol., 2007, 164: 1278 - 1288.
- [40] 包爱科, 张金林, 郭正刚, 等. 液泡膜 H^+ -PPase 与植物耐盐性[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(4): 777 - 783.
- [41] Li Y W, Wong F L, Tsai S N, et al.. Tonoplast-located *Gm-CLC1* and *GmNHX1* from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY) -2 cells [J]. Plant Cell Environ., 2006, 9(29): 1122 - 1137.
- [42] Zhang H X, Joanna N H, John P M, et al.. Engineering salt tolerant *Brassica* plant; characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increase vacuolar sodium accumulation [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98: 12832 - 12836.
- [43] He C X, Yan J Q, Shen G X, et al.. Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field [J]. Plant Cell Physiol., 2005, 46: 1848 - 1854.
- [44] Xue Z Y, Zhi D Y, Xue G P, et al.. 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 Sci., 2004, 167(4): 849 - 859.
- [45] Qiao W H, Zhao X Y, Li W, et al.. Overexpression of *AeNHX1*, a root-specific vacuolar Na^+/H^+ antiporter from *Agropyron elongatum*, confers salt tolerance to *Arabidopsis* and *Festuca* plants [J]. Plant Cell Rep., 2007, 26(9): 1663 - 1672.
- [46] Verma D, Singla-Pareek S L, Rajagopal D, et al.. Functional validation of a novel isoform of Na^+/H^+ antiporter from *Pennisetum glaucum* for enhancing salinity tolerance in rice [J]. J. Biosci., 2007, 32(3): 1 - 7.
- [47] Li J, Yang H, Peer W A, et al.. *Arabidopsis* H^+ -PPase *AVP1* regulates auxin-mediated organ development [J]. Science, 2005, 310: 121 - 125.
- [48] Zhao F Y, Zhang X J, Li P H, et al.. Co-expression of the *Suaeda salsa* *SsNHX1* and *Arabidopsis* *AVP1* confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single *SsNHX1* [J]. Mol. Breeding, 2006, 17(4): 341 - 353.
- [49] Brini F, Hanin M, Mezghani I, et al.. Overexpression of wheat Na^+/H^+ antiporter *TNHX1* and H^+ -pyrophosphatase *TPVI* improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants [J]. J. Exp. Bot., 2007, 58: 301 - 308.
- [50] Zhou S, Chen X, Zhang X, et al.. Improved salt tolerance in tobacco plants by co-transformation of a betaine synthesis gene *BADH* and a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *SeNHX1* [J]. Biotechnol. Lett., 2008, 30: 369 - 376.