

液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白研究进展

马红萍, 包爱科* (兰州大学草地农业科技学院, 甘肃兰州 730000)

摘要 土壤盐渍化是造成全世界农作物减产的主要非生物胁迫因素之一, 盐渍化土壤中过多的 Na⁺ 是使植物生长受到抑制的主要阳离子。植物细胞中的液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白(NHX)是应对盐胁迫的一种重要离子转运蛋白, 盐胁迫下 NHX 可以调控植物体内的离子稳态平衡及细胞内的 pH, 对提高植物耐盐性具有非常重要的作用。简要概述了近年来液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的亚细胞定位与结构特点、主要生理功能及其与植物耐盐性关系等方面的研究进展, 以期对相关研究提供参考。

关键词 液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白; 离子稳态; 亚细胞定位; 结构特点; 生理功能; 耐盐性

中图分类号 Q 943 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)14-0004-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.14.002

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Research Progress of Na⁺/H⁺ Antiporter in Vacuolar Membranes

MA Hong-ping, BAO Ai-ke (College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract Soil salinization is one of the main abiotic stress factors that cause crop yield reduction in the world. Excessive Na⁺ in salinized soil is the main cation that inhibits plant growth. The vacuolar membrane Na⁺/H⁺ antiporter (NHX) in plant cells is an important ion transporter in response to salt stress. Under salt stress, NHX can regulate the homeostasis balance of ions in plants and the pH in cells, which plays a very important role in improving plant salt tolerance. This paper briefly summarized the research about the subcellular localization and structural characteristics, main physiological functions and relationship with plant salt tolerance of the vacuolar membrane Na⁺/H⁺ antiporter in recent years, which may provide a reference for related research.

Key words Vacuolar membrane Na⁺/H⁺ antiporter; Ionic homeostasis; Subcellular localization; Structural characteristics; Physiological functions; Salt resistance

目前, 全球盐碱化土地面积约 3.97 亿 hm², 约占土地总面积的 3.1%^[1], 土壤盐碱化逐步增加可能会导致未来 25 年内约 30% 的耕地流失^[2]。大多数作物不能在盐渍化土壤中正常生长, 其主要原因是高浓度的 Na⁺ 进入植物细胞会对植物产生毒害作用, 使植物的生长发育受到严重抑制^[3]。此外, 土壤盐碱化导致全球各种农作物大面积减产, 给农业生产造成巨大损失^[4]。植物细胞适应高盐环境的重要手段是维持胞质内较低的 Na⁺ 水平, 在漫长的适应过程中, 很多植物进化出了一系列策略来实现上述目标, 主要有 Na⁺ 的分泌、Na⁺ 的外排以及 Na⁺ 的区域化^[5]。研究发现, 某些盐生植物可以通过自身特有的结构(如盐腺、盐囊泡等)将过多的 Na⁺ 分泌出体外, 避免过量 Na⁺ 对植物重要代谢器官造成毒害, 从而保证植物正常的生长发育^[6]。Na⁺ 的外排和 Na⁺ 的区域化主要依赖于植物细胞中与离子转运相关的蛋白(如质膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白、液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白等)发挥功能, 进而通过降低胞质中过多的 Na⁺, 使植物能够更好地适应盐渍生境^[7-8]。目前, 液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白家族成员的离子区域化功能尚存有争议, 因此还需进一步深入研究。笔者将从该类蛋白的亚细胞定位、蛋白结构特点、主要生理功能及其与植物耐盐性的关系等方面对液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白(NHX)近年来的主要研究结果进行简要概述和展望。

基金项目 国家重点研发计划项目(2017YFC0504804); 国家自然科学基金项目(31670405, 31971761)。

作者简介 马红萍(1993—), 女, 陕西渭南人, 硕士研究生, 研究方向: 植物逆境生理与分子生物学。* 通信作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事草类植物逆境生理与分子生物学、牧草遗传改良研究。

收稿日期 2020-02-09

1 液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白的亚细胞定位

液泡膜 NHX 属于阳离子逆向转运蛋白 CAP1 家族中的 NHE/NHX 亚家族成员^[9]。通过亚细胞定位发现植物 NHX 蛋白都定位于细胞内部(intra-cellular, IC), 进一步通过系统进化树分析, 可以将植物 NHX 划分为 Class-I NHX 和 Class-II NHX。Class-I NHX 定位于液泡膜上, Class-II NHX 则定位于内囊体膜上, 在动物、真菌内膜上也存在相应的同源蛋白^[10]。在大多数植物中, Class-I NHX 的成员数目要多于 Class-II NHX, 如大豆(*Glycine max*)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、玉米(*Zea mays*)等(表 1)。另有研究发现, NHX 蛋白家族成员的同源性不仅在不同植物种类间具有差异, 而且在同一植物中也有一定差异。例如在拟南芥 NHX 家族中, 定位于液泡膜上(Class-I NHX)的 4 个成员 AtNHX1 ~

表 1 几种代表性植物的 NHX 基因的数目和类型^[11]

Table 1 Number and type of NHX genes of several representative species

物种 Species	Class-I NHX(Vac)	Class-II NHX(Endo)
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	4	2
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	3	1
蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	7	2
大豆 <i>Glycine max</i>	7	3
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	5	1
高粱 <i>Sorghum bicolor</i>	6	2
玉米 <i>Zea mays</i>	6	2
水稻 <i>Oryza sativa</i>	4	2
二穗短柄草 <i>Brachypodium distachyon</i>	4	2
卷柏 <i>Selaginella moellendorffii</i>	3	2
小立碗藓 <i>Physcomitrella patens</i>	5	2
衣藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1	3

3.2 参与 K^+ 的稳态平衡 钾不仅是植物必需的营养元素,还在平衡细胞内电荷的过程中发挥了重要作用^[29]。大部分细胞内的 K^+ 存在于液泡中,间接驱动细胞的膨胀^[30]。此外,胞质 K^+ 还是植物细胞内许多生化和酶促反应必不可少的催化剂。最新研究发现 NHX 可能参与介导液泡中 K^+ 的积累,并且是细胞主动吸收 K^+ 所必需的离子转运蛋白^[31]。Bassil 等^[32] 研究发现,相比于野生型拟南芥 *nhx1nhx2* 双突变株系的生物量显著降低;通过测定离子转运活性,发现 *nhx1nhx2* 双突变株系液泡膜 K^+/H^+ 转运活性降低,其液泡中 K^+ 含量仅为野生型植株的 1/3,并且与野生型相比,双突变株系气孔关闭延迟。进一步对拟南芥 *nhx1nhx2* 双突变株系的气孔特征进行研究,发现气孔的闭合依赖于保卫细胞通过液泡膜上 NHX1 和 NHX2 积累 K^+ 来实现^[33]。随后同时对拟南芥 *NHX1*、*NHX2*、*NHX3*、*NHX4* 进行敲除^[34],发现相比于野生型,*nhx1nhx2nhx3nhx4* 幼苗液泡中 K^+ 含量显著降低;并且在高浓度 K^+ 处理下,*nhx1nhx2nhx3nhx4* 幼苗的根发生了明显的偏斜和卷曲反应,而在同等浓度的 Na^+ 处理下并未观察到此类表型,表明 *NHX* 对 K^+ 高度敏感。另外在苜蓿中过表达小麦 *TaNHX2*,发现盐胁迫下转基因株系 K^+/H^+ 转运活性显著提高,其叶中 K^+ 含量也显著高于野生型^[35]。将葡萄 *VvNHX1* 在马铃薯中进行超表达,转基因株系叶中 K^+ 含量也显著增加, Na^+ 含量减少^[36]。另外,在烟草中超表达花生 (*Arachis hypogaea*) *AhNHX1* 基因,发现盐处理后转基因烟草具有更高的 K^+/H^+ 转运活性,其根、茎、叶中也积累了较多的 K^+ ;从生长表型上来看,盐处理下转基因植株的根长、干鲜重、生长速率都优于野生型,表明超表达 *AhNHX1* 可以促使转基因烟草增强 K^+/H^+ 转运活性,积累更多的 K^+ ,增强烟草对盐胁迫的耐受性^[37]。以上结果均表明 NHX 可以通过调控植物细胞中 K^+ 的稳态平衡,提高植物抵御盐胁迫的能力。

3.3 调节细胞内 pH 适宜的 pH 环境是植物细胞中参与各种代谢途径的酶功能正常行使的必要条件。细胞内酸碱平衡主要通过质子泵和产生 H^+ 或 OH^- 的代谢过程来调节^[38]。NHX 参与调控细胞内 pH 的典型例子就是三色牵牛花 (*Ipomoea tricolor*) 的花色变化^[39]。当三色牵牛花发育处于花蕾期时,花瓣细胞液泡内 pH 为 6.6,此时花色为紫色,而当三色牵牛花发育至盛花期时,相应的液泡中 pH 升高至 7.7,此时花色呈现为蓝色,而该时期液泡膜 $H^+-ATPase$ 、 $H^+-PPase$ 以及 NHX 的活性显著提高。另有研究发现,拟南芥 *nhx1nhx2* 双突变株系根的成熟细胞和子叶下胚轴细胞中液泡 pH 相比野生型分别降低了 0.50 和 0.35^[31],同样拟南芥 *nhx5nhx6* 双突变株系液泡 pH 相比于野生型也显著降低^[40-41],这可能是因为 NHX 的缺失导致双突变株系中跨液泡膜 Na^+/H^+ 交换比率减少,从而使其液泡中的 H^+ 含量较野生型高,使液泡酸化。可见 NHX 活性的改变对植物细胞内 pH 的变化有着非常重要的影响。

3.4 调节细胞中的囊泡运输 植物细胞内的囊泡运输是维持生命活动的关键枢纽^[11]。研究发现 *AtNHX1* 参与细胞中的囊泡运输^[42],位于液泡膜上的 *AtNHX1* 介导 Na^+ 进入囊

泡,后者会移动并融合到液泡中。驻留在液泡腔中的 *AtNHX1* 的亲水性 C-末端尾巴与钙调素蛋白 *AtCaM15* 相互作用,调节阳离子的选择性,而盐胁迫通常会引起液泡碱化,此时 *AtCaM15* 与 *AtNHX1* 的结合能力降低, Na^+/H^+ 转运活性增强,*AtNHX1* 可以将更多的 Na^+ 区域化进液泡中,提高植物的耐盐性^[19]。对拟南芥 *nhx1* 转录组数据进行分析,发现编码与囊泡运输有关蛋白(如动力蛋白、网格蛋白包被蛋白、网格蛋白结合蛋白等)的编码基因出现差异表达^[43]。另外,对拟南芥 *nhx5nhx6* 双突变株系分析发现,突变体中高尔基体到液泡前体或液泡膜的囊泡运输无法顺利完成^[44]。上述结果均表明 NHX 在囊泡运输过程中发挥了重要作用。

4 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白编码基因在提高植物耐盐性中的应用

植物的耐盐性是一个复杂的性状,涉及对细胞渗透压和离子胁迫及其随之产生的次级胁迫(如氧化胁迫)在整株水平上协调的响应^[45]。目前已经从 60 多种植物中鉴定并克隆出 *NHX* 基因^[46],其中大多数已被证明与植物的耐盐性相关^[47]。大量研究表明,超表达 *AtNHX* 可以提高植物的耐盐性。例如,*AtNHX5* 的过表达能够提高盐处理下转基因拟南芥的干鲜重及地上部 Na^+ 、 K^+ 含量,转基因植株的耐盐能力明显提高^[48]。同样将 *AtNHX5* 在水稻中进行超表达,转基因水稻的干鲜重、叶绿素含量、叶片相对含水量及脯氨酸含量均高于野生型植株,进一步研究发现转基因水稻种子可以在含有 250 mmol/L 甘露醇的 1/2MS 培养基上发芽,并且转基因水稻幼苗的生长明显优于野生型^[49],这与在大豆中超表达 *AtNHX5* 的研究结果相类似^[50]。表明 *AtNHX5* 的过表达增强了转基因植株的耐受性。另外 Leidi 等^[51] 在番茄中超表达 *AtNHX1*,发现转基因番茄的根长、地上部干重及含水量都显著高于野生型。Sahoo 等^[52] 在绿豆中超表达 *AtNHX1*,转基因绿豆在高盐胁迫下(200 mmol/L NaCl 处理)生长良好,其株高、干鲜重、光合速率等指标都高于野生型植株,表明转基因株系耐盐性提高。另有研究发现,超表达其他植物的 *NHX* 基因同样会改善多数植物的耐盐性^[53],刘琳等^[54] 在拟南芥中超表达水稻 *OsNHX1*,结果发现转基因拟南芥的根长、叶片相对含水量均高于野生型植株,表明转基因植株的胁迫耐受性得到改善。之后将小麦 *TaNHX2* 在茄子中进行超表达,发现 T_2 代转基因植株在 200 mmol/L NaCl 处理下可以维持正常生长,而野生型植株表现出叶片萎黄,生长受到抑制甚至死亡;并且相较于野生型,转基因植株的光合速率、总叶绿素含量及叶片相对含水量都有所提高,表明超表达 *TaNHX2* 可以明显改善茄子的耐盐能力^[55]。同样在马铃薯中超表达葡萄 *VvNHX1*^[35],转基因马铃薯在盐处理后其体内可溶性糖含量及抗氧化酶活性都显著提高,表明转基因植株可以克服盐胁迫导致的氧化应激反应,从而使其耐盐性增强。综上所述,*NHX* 的超表达可以显著提高转基因植株的耐盐性。另外对 *nhx* 突变体研究发现,渗透胁迫下拟南芥 *nhx1nhx2* 双突变株系长势明显弱于野生型植株^[31],拟南芥 *nhx5nhx6* 双突变株系对盐分也极度敏感^[56],表明 *NHX* 的缺失降低了植物的

耐受性。

众所周知, NHX 区域化 Na^+ 的动力主要是由液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 产生的跨膜质子驱动力提供的, 据此推测可以通过超表达为区域化 Na^+ 提供动力的液泡膜质子泵基因, 这样可以供给 NHX 更强的驱动力来将细胞质中更多的 Na^+ 区域化到液泡内腔中, 进一步增强植物的耐盐性^[57]。随后这一理论推测已经得到充分验证, 例如在拟南芥^[58-59]、紫花苜蓿^[60] 中超表达 H^+ -PPase 基因 (VP), 均能够提高转基因植株的耐盐能力, 表明 H^+ -PPase 基因的超表达能够增强植物的耐盐性。据此进一步推测, NHX 和 VP 的共表达可以使 Na^+ 区域化进液泡的能力成倍增加, 从更大程度上减轻 Na^+ 对细胞质的毒害, 进而赋予植物更强的耐盐碱能力^[61]。目前, 这一假说已在水稻^[62]、番茄^[63]、烟草^[64] 等植物中通过共表达 NHX 和 VP 得到了验证。Bhaskaran 等^[63] 研究发现在 200 mmol/L NaCl 处理下, 共表达狼尾草 (*Pennisetum glaucum*) $Pg\text{NHX1}$ 和拟南芥 $AVP1$ 的转基因番茄生长良好, 而野生型植株的生长受到严重抑制, 叶片萎蔫甚至在 21 d 内死亡。同样 Liu 等^[65] 在苜蓿中超表达盐地碱蓬 $Sc\text{NHX1}$ 和 $ScVP$, 发现转基因植株在盐处理下仍然可以维持自身的正常生长, 而野生型植株则表现出叶片发黄褪绿, 植株整体萎蔫甚至死亡。随后 Bao 等^[61] 将旱生植物霸王 $Zx\text{NHX}$ 和 $ZxVP1-1$ 在紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 中进行共表达, 200 mmol/L NaCl 处理下 T_0 代转基因苜蓿生长良好, 野生型植株萎蔫甚至死亡; 并且相较于野生型植株, T_0 代转基因紫花苜蓿植株的生物量、光合效率、叶片相对含水量更高, 叶和根中也积累了更多的阳离子 (如 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+})。2017 年, 珠拉太^[66] 分别用 50 mmol/L NaCl 和不同浓度的山梨醇进行渗透胁迫处理, 发现共表达 $Zx\text{NHX}$ 和 $ZxVP1-1$ 的 T_1 代转基因紫花苜蓿可以有效积累 Na^+ 和 K^+ 以增加自身的渗透调节能力, 从而维持植株的正常生长。张婧^[67] 用 200 mmol/L NaCl 对 T_2 代转基因紫花苜蓿进行胁迫处理, 发现 T_2 代转基因苜蓿的株高、生物量及根系活力均高于野生型。表明 $Zx\text{NHX}$ 和 $ZxVP1-1$ 的聚合转化可以获得稳定遗传, 同时也充分表明 $Zx\text{NHX}$ 和 $ZxVP1-1$ 的共表达可以通过增加质子驱动力促使更多的 Na^+ 区域化进液泡中, 改善转基因株系的渗透调节能力, 进而提高转基因紫花苜蓿的耐盐性。综上所述, 共表达 NHX 和 VP 基因可以显著增强植物对高盐环境的耐受能力。

5 结论与展望

土壤盐渍化严重制约着全球农业发展。液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 (NHX) 在植物抵御盐胁迫过程中发挥着重要作用, 因此该蛋白在植物抗逆性改良中将具有重要的应用前景。然而目前仅对 NHX1 和 NHX2 功能的研究较为广泛, 而其他 NHX 成员在植物中的抗逆调控机理仍不清楚, 深入揭示它们的功能, 不仅可以挖掘更多优异的抗逆基因资源, 而且可以为培育抗逆性较强的作物品种奠定更加充分的理论依据。此外, 基于目前的研究现状, NHX 的离子区域化功能在不同植物和不同家族成员间存在差异: 早期的研究发现该

类蛋白主要介导 Na^+ 的区域化, 但最近的大量研究又表明 NHX 可能通过介导液泡 K^+ 的区域化来维持胞内 K^+ 的稳态平衡。因此, 深入解析造成这些差异的分子机制将是未来的重要研究方向, 这将有助于全面理解 NHX 蛋白家族在不同类型植物生长发育和环境适应中的作用。

参考文献

- [1] TAVAKKOLI E, RENGASAMY P, MCDONALD G K. High concentrations of Na^+ and Cl^- ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress [J]. Journal of experimental botany, 2010, 61 (15): 4449-4459.
- [2] WANG W X, VINOCUR B, ALTMAN A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance [J]. planta, 2003, 218: 1-14.
- [3] SHABALA S, CUIN T A. Potassium transport and plant salt tolerance [J]. Physiologia plantarum, 2008, 133 (4): 651-669.
- [4] TESTER M, DAVENPORT R. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants [J]. Annals of botany, 2003, 91 (5): 503-527.
- [5] ZHANG J L, SHI H Z. Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance [J]. Photosynthesis research, 2013, 115: 1-22.
- [6] 张乐, 郭欢, 包爱科. 盐生植物的独特泌盐结构——盐囊泡 [J]. 植物生理学报, 2019, 55 (3): 232-240.
- [7] SHI H Z, ISHITANI M, KIM C, et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2000, 97: 6896-6901.
- [8] BLUMWALD E. Sodium transport and salt tolerance in plants [J]. Current opinion in cell biology, 2000, 12 (4): 431-434.
- [9] BRETT C L, DONOWITZ M, RAO R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers [J]. American journal of physiology, 2005, 288 (2): 223-239.
- [10] PARDO J M, CUBERO B, LEIDI E O, et al. Alkali cation exchangers: Roles in cellular homeostasis and stress tolerance [J]. Journal of experimental botany, 2006, 57 (5): 1181-1199.
- [11] BASSIL E, COKU A, BLUMWALD E. Cellular ion homeostasis: Emerging roles of intracellular NHX Na^+/H^+ antiporters in plant growth and development [J]. Journal of experimental botany, 2012, 63 (16): 5727-5740.
- [12] 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]. The plant journal, 2002, 30 (5): 529-539.
- [13] 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 (5431): 1256-1258.
- [14] YAMAGUCHI T, APSE M P, SHI H Z, et al. Topological analysis of a plant vacuolar Na^+/H^+ antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity [J]. Proceedings of the national academy of science USA, 2003, 100: 12510-12515.
- [15] FUKUDA A, NAKAMURA A, TANAKA Y. Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+ exchanger gene in *Oryza sativa* [J]. Biochimica et biophysica acta, 1999, 1446: 149-155.
- [16] BRINI F, GAXIOLA R A, BERKOWITZ G A, et al. Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump [J]. Plant physiology and biochemistry, 2005, 43: 347-354.
- [17] CHRISTIAN Z, NOLL A, KARL S, et al. Molecular characterization of Na^+/H^+ antiporters ($Zm\text{NHX}$) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress [J]. Journal of plant physiology, 2005, 162: 55-66.
- [18] WU G Q, XI J J, WANG Q L, et al. The $Zx\text{NHX}$ 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: 758-767.
- [19] YAMAGUCHI T, GILAD S, AHARON 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]. Proceedings of the national academy of science USA, 2005, 102: 16107-16112.
- [20] DONG W, LI D L, QIU N W, et al. The functions of plant cation/proton antiporters [J]. Biologia plantarum, 2018, 62 (3): 421-427.
- [21] FRANS J M, MAATHUIS I A, PATISTHAN J. Regulation of Na^+ fluxes in plants [J]. Plant science, 2014, 5: 467.
- [22] 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* vacuolar Na^+/H^+ antiporter [J]. The plant journal, 2003, 36: 229-239.

- [23] MA Q, YUE L J, ZHANG J L, et al. Sodium chloride improves photosynthesis and water status in the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* [J]. Tree physiology, 2012, 32: 4–13.
- [24] YUAN H J, MA Q, WU G Q, et al. *ZxNHX* controls Na^+ and K^+ homeostasis at the whole-plant level in *Zygophyllum xanthoxylum* through feedback regulation of the expression of genes involved in their transport [J]. Annals of botany, 2015, 115: 495–507.
- [25] ZHANG H X, BLUMWALD E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit [J]. Nature biotechnology, 2001, 19: 765–768.
- [26] 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 science, 2004, 167(4): 849–859.
- [27] 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 and cell physiology, 2005, 46(11): 1848–1854.
- [28] ZHAO J S, ZHI D Y, XUE Z Y, et al. Enhanced salt tolerance of transgenic progeny of tall fescue (*Festuca arundinacea*) expressing a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene from *Arabidopsis* [J]. Journal of plant physiology, 2007, 164(10): 1377–1383.
- [29] KHAN I U, ALI A, YUN D J. *Arabidopsis* NHX transporters: Sodium and potassium antiport mythology and sequestration during ionic stress [J]. Journal of plant biology, 2018, 61: 292–300.
- [30] ADEM G D, ROY S J, ZHOU M, et al. Evaluating contribution of ionic, osmotic and oxidative stress components towards salinity tolerance in barley [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 113–125.
- [31] BARRAGÁN V, LEIDI E O, ANDRÉS Z, et al. Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis* [J]. Plant cell, 2012, 24: 1127–1142.
- [32] BASSIL E, TAJIMA H, LIANG Y C, et al. The *Arabidopsis* Na^+/H^+ antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K^+ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction [J]. Plant cell, 2011, 23: 3482–3497.
- [33] ANDRÉS Z, PÉREZ-HORMAECHÉ J, LEIDI E O, et al. Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2014, 111: 1806–1814.
- [34] MCCUBBIN T, BASSIL E, ZHANG S Q, et al. Vacuolar Na^+/H^+ NHX-type antiporters are required for cellular K^+ homeostasis, microtubule organization and directional root growth [J]. Plants, 2014, 3: 409–426.
- [35] ZHANG Y M, ZHANG H M, LIU Z H, et al. The wheat NHX antiporter gene *TaNHX2* confers salt tolerance in transgenic alfalfa by increasing the retention capacity of intracellular potassium [J]. Plant molecular biology, 2015, 87: 317–327.
- [36] CHARFEDDINE S, CHARFEDDINE M, HANANA M, et al. Ectopic expression of a grape vine vacuolar NHX antiporter enhances transgenic potato plant tolerance to salinity [J]. Journal of plant biochemistry and biotechnology, 2019, 28(1): 50–62.
- [37] ZHANG W W, MWNG J J, XING J Y, et al. The K^+/H^+ antiporter *AhNHX1* improved tobacco tolerance to NaCl stress by enhancing K^+ retention [J]. Journal of plant biology, 2017, 60: 259–267.
- [38] PAROUTIS P, TOURET N, GRINSTEIN S. The pH of the secretory pathway: Measurement, determinants, and regulation [J]. Physiology, 2004, 19: 207–215.
- [39] 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 physiology, 2005, 46(3): 407–415.
- [40] REGUERA M, BASSIL E, TAJIMA H, et al. pH regulation by NHX-type antiporters is required for receptor-mediated protein trafficking to the vacuole in *Arabidopsis* [J]. Plant cell, 2015, 27: 1200–1217.
- [41] WANG L G, WU X X, LIU Y F, et al. *AtNHX5* and *AtNHX6* control cellular K^+ and pH homeostasis in *Arabidopsis*: Three conserved acidic residues are essential for K^+ transport [J]. PLoS One, 2015, 10(12): 1–19.
- [42] HAMAJI K, NAGIRA M, YOSHIDA K, et al. Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis* [J]. Plant and cell physiology, 2009, 50(12): 2023–2033.
- [43] SOTTOSANTO J B, GELLI A, BLUMWALD E. DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking a vacuolar Na^+/H^+ antiporter: Impact of *AtNHX1* on gene expression [J]. Plant journal, 2010, 40(5): 752–771.
- [44] WU X X, EBINE K, UEDA T, et al. *AtNHX5* and *AtNHX6* are required for the subcellular localization of the SNARE complex that mediates the trafficking of seed storage proteins in *Arabidopsis* [J]. PLoS One, 2016, 11(3): 1–25.
- [45] ZHU J K. Plant salt tolerance [J]. Trends in plant science, 2001, 6: 66–71.
- [46] BASSIL E, BLUMWALD E. The ins and outs of intracellular ion homeostasis: NHX-type cation/ H^+ transporters [J]. Current opinion in plant biology, 2014, 22: 1–6.
- [47] JIA Q, ZHENG C, SUN S, et al. The role of plant cation/proton antiporter gene family in salt tolerance [J]. Biologia plantarum, 2018, 62(4): 617–629.
- [48] 安静, 侯蕾, 孔祥强, 等. *AtNHX5* 基因过量表达对拟南芥耐盐性的影响 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(6): 1106–1111.
- [49] LI M R, LIN X J, LI H Q, et al. Overexpression of *AtNHX5* improves tolerance to both salt and water stress in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant cell tissue and organ culture, 2011, 107: 283–293.
- [50] WU X X, LI J, WU X D, et al. Ectopic expression of *Arabidopsis thaliana* $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ antiporter gene, *AtNHX5*, enhances soybean salt tolerance [J]. Genetics and molecular research, 2016, 15(2): 1–12.
- [51] LEIDI E O, BARRAGÁN V, RUBIO L, et al. The *AtNHX1* exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato [J]. The plant journal, 2010, 61: 495–506.
- [52] SAHOO D P, KUMAR S, MISHRA S, et al. Enhanced salinity tolerance in transgenic mungbean overexpressing *Arabidopsis* antiporter (NHX1) gene [J]. Molecular breeding, 2016, 36: 144.
- [53] ROY S J, NEGRÃO S, TESTER M. Salt resistant crop plants [J]. Current opinion in plant biology, 2014, 26: 115–124.
- [54] 刘琳, 曾幼玲, 张富春. 水稻 NHX1 基因启动子和 C 末端的调控功能研究 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(7): 1295–1303.
- [55] YARRA R, KIRTI P B. Expressing class I wheat NHX (*TaNHX2*) gene in eggplant (*Solanum melongena* L.) improves plant performance under salinerecondition [J]. Functional and integrative genomics, 2019, 19: 541–554.
- [56] BASSIL E, BLUMWALD E. The ins and outs of intracellular ion homeostasis: NHX-type cation/ H^+ transporters [J]. Current opinion in plant biology, 2014, 22: 1–6.
- [57] 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.
- [58] 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 of the United States of America, 2001, 98: 11444–11449.
- [59] GUO S L, YIN H B, ZHANG X, et al. Molecular cloning and characterization of a vacuolar H^+ -pyrophosphatase gene, *SsVP*, from the halo-phyte *Suaeda salsa* and its overexpression increases salt and drought tolerance of *Arabidopsis* [J]. Plant molecular biology, 2006, 60: 41–50.
- [60] 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: 232–240.
- [61] BAO A K, WANG Y W, XI J J, et al. Co-expression of xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* *ZxNHX* and *ZxVP1-1* enhances salt and drought tolerance in transgenic *Lotus corniculatus* by increasing cations accumulation [J]. Functional plant biology, 2015, 41: 203–214.
- [62] LIU S P, ZHENG L Q, XUE Y H, et al. Overexpression of *OsVP1* and *OsNHX1* increases tolerance to drought and salinity in rice [J]. Journal of plant biology, 2010, 53: 444–452.
- [63] BHASKARAN S, SAVITHRAMMA D L. Co-expression of *Pennisetum glaucum* vacuolar Na^+/H^+ antiporter and *Arabidopsis* H^+ -pyrophosphatase enhances salt tolerance in transgenic tomato [J]. Journal of experimental botany, 2011, 62: 5561–5570.
- [64] GOUIAA S, KHOUDI H, LEIDI E O, et al. Expression of wheat Na^+/H^+ antiporter *TNHS1* and H^+ -pyrophosphatase *TVPI* genes in tobacco from a bicistronic transcriptional unit improves salt tolerance [J]. Plant molecular biology, 2012, 79: 137–155.
- [65] LIU L, FANX D, WANG F W, et al. Co-expression of *ScNHX1* and *ScVP* in transgenic hybrids improves salt and saline-alkali tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Journal of plant growth regulation, 2013, 32: 1–8.
- [66] 珠拉太. NaCl 在共表达 *ZxNHX* 和 *ZxVP1-1* 转基因紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 响应渗透胁迫中的生理功能分析 [D]. 兰州: 兰州大学, 2017.
- [67] 张婧. 共表达 *ZxNHX-ZxVP1-1* 转基因紫花苜蓿抗旱耐盐性评价及 *ZxNHX* 和 *PcCLCg* 对紫花苜蓿的聚合转化 [D]. 兰州: 兰州大学, 2019.