

· 农业生物技术 ·

## 香蕉 MaNHX5 关键耐盐氨基酸位点的鉴定及验证

徐亚<sup>1</sup>, 滕梦鑫<sup>1</sup>, 乔飞<sup>2</sup>, 江行玉<sup>3</sup>, 周扬<sup>1</sup>, 李新国<sup>1</sup>

1 海南大学 园艺学院, 海南 海口 570228

2 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 海口 570100

3 海南大学 热带作物学院, 海南 海口 570228

徐亚, 滕梦鑫, 乔飞, 江行玉, 周扬, 李新国. 香蕉 MaNHX5 关键耐盐氨基酸位点的鉴定及验证. 生物工程学报, 2022, 38(5): 1946-1952.

XU Y, TENG MX, QIAO F, JIANG XY, ZHOU Y, LI XG. Identification and verification of key salt-tolerant amino acid sites of banana MaNHX5. Chin J Biotech, 2022, 38(5): 1946-1952.

**摘要:** 为提高香蕉 *NHX* 基因的耐盐性, 从巴西蕉 (*Musa acuminata* L. AAA group) 中克隆到一个 *MaNHXs* 基因家族的 *MaNHX5* 基因, 利用生物信息学方法预测了 *MaNHX5* 关键耐盐氨基酸位点和突变前后蛋白质结构的变化, 通过定点突变技术将 *MaNHX5* 蛋白的 276 位丝氨酸 (S) 成功突变为天冬氨酸 (D), 利用 AXT3 盐敏感突变酵母进行功能回补试验。结果表明, 将突变后的 *MaNHX5* 基因转入 AXT3 盐敏感突变酵母, 200 mmol/L NaCl 处理下, 突变酵母耐盐性显著提高。由此推测 *MaNHX5* 蛋白的 Ser276 对香蕉 Na<sup>+</sup> 跨液泡膜运输起重要作用。

**关键词:** 香蕉; *NHX* 基因; 耐盐性; 定点突变

## Identification and verification of key salt-tolerant amino acid sites of banana MaNHX5

XU Ya<sup>1</sup>, TENG Mengxin<sup>1</sup>, QIAO Fei<sup>2</sup>, JIANG Xingyu<sup>3</sup>, ZHOU Yang<sup>1</sup>, LI Xinguo<sup>1</sup>

1 School of Horticulture, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

2 Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 570100, Hainan, China

3 College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

**Abstract:** In order to improve the salt tolerance of banana *NHX* genes, we cloned a *MaNHX5* gene from

**Received:** November 21, 2021; **Accepted:** January 15, 2022

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (31760549, 32160679)

**Corresponding author:** LI Xinguo. E-mail: lixinguo13@163.com

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31760549, 32160679)

*Musa acuminata* L. AAA group and predicted the key salt-tolerant amino acid sites and mutant protein structure changes of MaNHX5 by using bioinformatics tools. The 276-position serine (S) of MaNHX5 protein was successfully mutated to aspartic acid (D) by site-directed mutagenesis, and the AXT3 salt-sensitive mutant yeast was used for a functional complementation test. The results showed that after the mutated *MaNHX5* gene was transferred to AXT3 salt-sensitive mutant yeast, the salt tolerance of the mutant yeast was significantly improved under 200 mmol/L NaCl treatment. It is hypothesized that Ser276 of MaNHX5 protein plays an important role in the transport of  $\text{Na}^+$  across the tonoplast.

**Keywords:** banana; *NHX* gene; salt tolerance; site-directed mutagenesis

香蕉是盐敏感型植物,盐胁迫是制约香蕉产业发展的关键问题之一<sup>[1-2]</sup>。为提高香蕉的耐盐性,可使用基因定点突变技术对香蕉的耐盐基因进行改造,以此提高香蕉耐盐基因的耐盐性。

基因定点突变是研究蛋白质结构与功能的常用方法<sup>[3-8]</sup>。使用同源重组技术进行定点突变时几乎没有特殊条件限制,该方法进行定点突变时需设计两对引物进行两次 PCR 反应,第一次 PCR 反应由正向外侧引物与突变引物合成片段一,第二次 PCR 反应由另一突变引物与反向外侧引物合成片段二。利用上述两种 DNA 片段在同源重组酶的作用下使含突变位点的目标基因与载体连接形成环状。有研究表明,通过定点突变来自桑树的 MnNHX6,发现突变体 S292D、E287Q 对盐更敏感<sup>[9]</sup>。在木榄 SOS1 逆转运蛋白中,通过缺失 C 末端的自抑制区,获得 *BgSOS1-3000* 基因突变基因,发现转 *BgSOS1-3000* 的盐敏感酵母 AXT3K 可以表现出更高的耐盐性<sup>[10]</sup>。

NHX 是  $\text{Na}^+$  ( $\text{K}^+$ )/ $\text{H}^+$  的逆向转运蛋白,具有  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$  交换 (PF00999) 蛋白结构域 (<http://pfam.xfam.org/>)<sup>[11]</sup>。NHX 蛋白在植物生长发育的许多方面发挥着重要作用,包括耐盐、钾稳态、细胞 pH 调节和花发育等<sup>[12-17]</sup>。目前已经证明 NHX 等  $\text{Na}^+$  逆转运蛋白在盐胁迫下维持植物体内  $\text{Na}^+$  平衡中的核心功能<sup>[18]</sup>。在盐胁迫下,

植物 NHX 和 SOS1 逆转运蛋白协同工作以减少胞质中  $\text{Na}^+$  含量,最终形成细胞内外的离子平衡<sup>[19]</sup>。笔者前期从香蕉 A 基因组中鉴定到了 11 个 *NHX* 基因,并且确定 MaNHX5 蛋白定位在液泡膜上<sup>[20]</sup>。

以提高香蕉 *NHX* 基因耐盐性为目的,本实验拟寻找 MaNHX5 关键的耐盐氨基酸位点,进而提高 MaNHX5 蛋白耐盐的生物学特性,为促进 MaNHX5 蛋白在植物耐盐的应用中提供技术手段,为深入研究 MaNHX5 蛋白的结构和功能提供一定参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

植物材料采用生长期一致、株高 10–12 cm 的巴西蕉 (*M. acuminata* L. AAA group) 幼苗。

菌株材料采用酵母突变体 AXT3 菌株,它丧失了转运  $\text{Na}^+$  的能力,因此对  $\text{Na}^+$  特别敏感。AXT3 菌株不能编码腺嘌呤 (A) 和尿嘧啶 (U),如果酵母培养基不含腺嘌呤或尿嘧啶,AXT3 则无法生长。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 *MaNHX5* 的克隆

用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (北京天根) 从香蕉幼苗根、假茎和叶中提取总 RNA。反转录步骤参照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书,

将总 RNA 反转录为 cDNA, 反转录产物在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存备用。基于实验室前期香蕉 *MaNHXs* 基因家族鉴定等研究, 参考香蕉 A 基因组数据库 (<https://banana-genome-hub.southgreen.fr/blast>), 利用 Primer Premier 5.0 设计引物, 以 cDNA 为模板, 扩增 *MaNHX5* 目的基因, 将扩增产物从凝胶上回收后连接 TA 载体, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 筛选阳性克隆送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

### 1.2.2 生物信息学分析

使用序列处理在线工具包 (<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>) 将测序获得的 DNA 序列转换为氨基酸序列, 使用 TBtools 软件分析序列基本信息。使用 TMHMM 和 HMMTOP 分析 *MaNHX5* 蛋白的跨膜结构, 使用 SWISS-MODEL 软件预测 *MaNHX5* 蛋白的三级结构, 使用 ProtParam 在线网站对 *MaNHX5* 蛋白的理化性质进行分析。将香蕉 *MaNHX5*、拟南芥 *AtNHX1* 和水稻 *OsNHX1* 氨基酸序列使用 MEGA5.1 进行比对, 使用 SOPMA 和 PredictProtein 进行蛋白二级结构预测和点突变的影响预测, 选择合适的突变位点。

### 1.2.3 *MaNHX5* 定点突变

将香蕉 *MaNHX5* 与水稻 *OsNHXs* 和拟南芥 *AtNHXs* 进行氨基酸序列比对, 使用定点突变技术对 *MaNHX5* 的 276 位氨基酸位点进行点突变, 将丝氨酸突变为天冬氨酸。引物设计如表 1 所示。使用第一对突变引物和第二对突变引物分别进行 2 个体系的 PCR 扩增反应, 反应总

体积均为  $50\text{ }\mu\text{L}$ , 包括  $31\text{ }\mu\text{L}$  双蒸水,  $5\text{ }\mu\text{L}$  PCR 缓冲液,  $1\text{ mmol/L}$  dNTPs  $10\text{ }\mu\text{L}$ , KOD 酶  $1\text{ }\mu\text{L}$ ,  $1\text{ }\mu\text{L}$   $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  上游引物,  $1\text{ }\mu\text{L}$   $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  下游引物,  $1\text{ }\mu\text{L}$   $150\text{ ng}/\mu\text{L}$  模板。反应程序:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$   $5\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$   $30\text{ s}$ ,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$   $45\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$   $94\text{ s}$ , 共 30 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$   $10\text{ min}$ ;  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$   $30\text{ min}$ 。

将电泳条带进行混合切胶回收与使用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切的 p416 线性化载体进行连接反应。将连接产物转化大肠杆菌感受态, 将菌液涂至含  $100\text{ mg/mL}$  卡那霉素的 LB 固体培养基上, 过夜培养后进行菌落 PCR 验证并测序。

### 1.2.4 酵母功能回补试验

酵母功能回补试验采用不同浓度的 YNB 培养基, 在 YNB 培养基的基础上添加 Ade 和 Ura。分别取转基因酵母菌液和取对照菌液  $100\text{ }\mu\text{L}$  加入到  $1\text{ mL}$  YNB+A+U 培养基中, 在  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  振荡培养至饱和状态。将菌液稀释 1、10、100 和 1 000 倍, 分别标记为: 1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  和  $10^{-3}$ 。分别从 1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  和  $10^{-3}$  中吸取  $6\text{ }\mu\text{L}$  酵母菌液, 并在 YNB+A+U 的筛选培养基上点板。 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 3 d 左右, 待菌斑长出后进行拍照观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MaNHX5* 生物信息学分析

香蕉 *MaNHX5* 基因 GenBank 登录号为 103983891, CDS 全长为  $1\text{ }560\text{ bp}$ , 编码  $519\text{ aa}$ 。使用 ProtParam 在线网站对 *MaNHX5* 蛋白的理

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

| Primer names | Primer sequences (5'→3')                            | Size (bp) |
|--------------|---|-----------|
| MaNHX5-1F    | GGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGGCGCTCGATCTTTTC          | 42        |
| MaNHX5-1R    | CAAAAGAAAACAGTCAGAATCCCGTCCAAGTACAGCTCAGCC          | 45        |
| MaNHX5-2F    | TGGACGGGATTCTGACTGTTTTCTTTTGTG                      | 30        |
| MaNHX5-2R    | CATAACTAATTACATGACTCGAGGTCGACCTAGGTTGGACCACCAAACACT | 51        |

化性质进行分析, 预测结果表明, *MaNHX5* 编码的蛋白分子量为 57.91 kDa, 等电点 (pI) 为 7.30, 元素组成为  $C_{2692}H_{4157}N_{663}O_{710}S_{23}$ 。使用 TMHMM 和 HMMTOP 分析 *MaNHX5* 基因编码蛋白的跨膜结构, 预测出 11 个跨膜螺旋结构 (图 1)。使用 SWISS-MODEL 软件预测 *MaNHX5* 蛋白的三级结构 (图 2)。

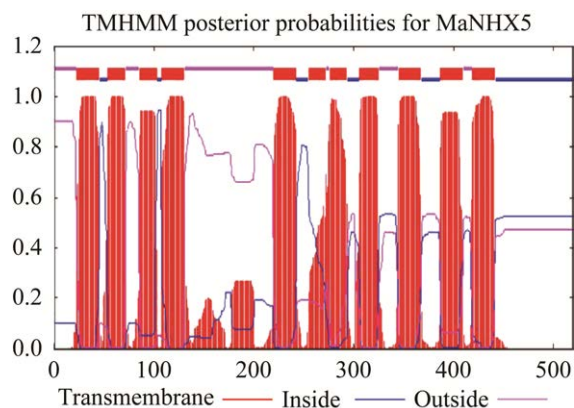


图 1 *MaNHX5* 蛋白的跨膜结构

Figure 1 Transmembrane structure of *MaNHX5* protein.



图 2 *MaNHX5* 蛋白的三级结构

Figure 2 Tertiary structure of *MaNHX5* protein.

## 2.2 *MaNHX5* 突变位点选择

将香蕉 *MaNHX5*、拟南芥 *AtNHX1* 和水稻 *OsNHX1* 氨基酸序列进行比对分析发现, 位于 TM7 的跨膜区域中含有一个氨基酸序列为 LSGILTV 的保守区 (图 3)。将这一保守区域使用 SOPMA 进行蛋白二级结构预测, 结果发现将 276 位的 S 突变为 D 后,  $\alpha$ -螺旋的占比由 47.01% 变为 46.44%,  $\beta$ -转角由 3.85% 变为 4.62%, 无规则卷曲由 30.44% 变为 31.60%, 延伸链由 18.69% 变为 17.34% (表 2)。使用 Predictprotein 对这一保守区域预测蛋白点突变的影响 (图 4), 结果表明将香蕉 *MaNHX5* 蛋白第 276 位丝氨酸替换为天冬氨酸时, 可能对 *MaNHX5* 蛋白影响较大。

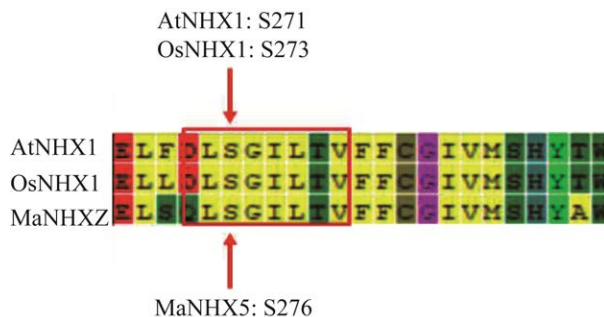


图 3 香蕉 *MaNHX5*、拟南芥 *AtNHX1* 和水稻 *OsNHX1* 氨基酸序列比对

Figure 3 Comparison of amino acid sequences of *MaNHX5*, *AtNHX1*, and *OsNHX1*.

表 2 *MaNHX5* 突变前后蛋白二级结构的变化

Table 2 Secondary structure of *MaNHX5* protein before and after mutation

| Names           | Percentage before mutation (%) | Percentage after mutation (%) |
|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|
| $\alpha$ -helix | 47.01                          | 46.44                         |
| $\beta$ -sheet  | 18.69                          | 17.34                         |
| $\beta$ -turn   | 3.85                           | 4.62                          |
| Random coil     | 30.44                          | 31.60                         |

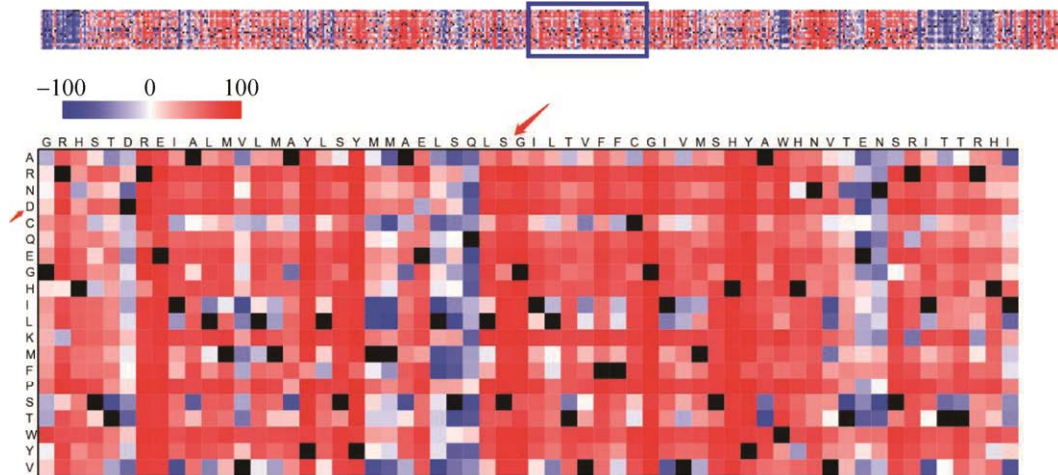


图4 香蕉 *MaNHX5* 定点突变预测图 从-100至+100颜色变化代表突变该位点对蛋白质功能的影响可能性依次增加；横坐标为 *MaNHX5* 氨基酸序列，纵坐标为突变后的氨基酸序列

Figure 4 Prediction map of *MaNHX5* site-directed mutation. The color change from -100 to +100 represents the possibility of the effect of this site on protein function increases in turn; The abscissa is the original amino acid sequence of *MaNHX5*, and the ordinate is the amino acid sequence after mutation

### 2.3 *MaNHX5'*的测序结果

将定点突变后的 *MaNHX5'*-p416 质粒用 *EcoR* I 和 *Sal* I 内切酶对其进行双酶切，凝胶电泳结果如图5所示，得到一条长度为1566 bp且符合预期的条带。将定点突变后的载体质粒进行测序，结果显示成功将 *MaNHX5* 基因826和827位的AG碱基突变为GA碱基(图6)，表明 *MaNHX5* 蛋白276位丝氨酸已成功替换为天冬氨酸，因此获得一个突变体：*MaNHX5*<sup>S276D</sup>，以下简称 *MaNHX5'*。

### 2.4 香蕉 *MaNHX5'*基因耐盐性

为了验证突变前的 *MaNHX5* 基因与突变后的 *MaNHX5'*基因耐盐性及其差异，使用 AXT3 盐敏感突变酵母进行功能回补试验。结果显示，将276位的丝氨酸突变为天冬氨酸后，*MaNHX5'*-AXT3耐盐性强于 *MaNHX5*-AXT3(图7)。

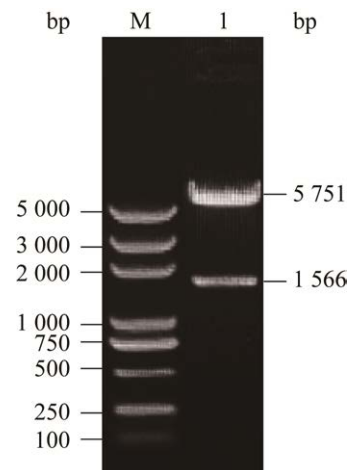


图5 *MaNHX5'*-p416 酶切验证 泳道M为5000 bp marker，泳道1为 *MaNHX5'*-p416 酶切条带

Figure 5 Verification of *MaNHX5'*-p416 by enzyme digestion. Lane M is a bp marker, and lane 1 is enzyme digestion product of *MaNHX5'*-p416.



图6 *MaNHX5* 突变前后测序对比图

Figure 6 Comparison of *MaNHX5* sequence before and after mutation.



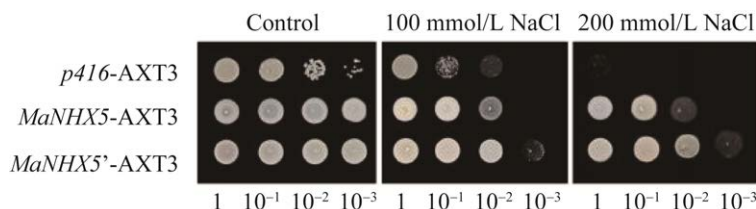


图7 香蕉 *MaNHX5* 突变前后的耐盐性比较 1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  分别代表稀释 1、10、100、1 000 倍的酵母菌液

Figure 7 Comparison of yeast salt tolerance before and after *MaNHX5* mutation. 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$  represent dilutions of 1, 10, 100 and 1 000 times respectively.

在 100 mmol/L NaCl 和 200 mmol/L NaCl 处理下, 转入 *MaNHX5'* 基因的 AXT3 突变酵母耐盐性明显强于转入 *MaNHX5* 基因的 AXT3 突变酵母。

### 3 讨论

香蕉是一种盐敏感植物, 由于 NHX 蛋白在植物抵抗盐胁迫过程中发挥着重要的作用, 因此寻找香蕉 NHX 蛋白关键耐盐氨基酸位点尤为重要。本研究采用 SWISS-MODEL 软件预测 *MaNHX5* 蛋白的三级结构, 利用 TMHMM 和 HMMTOP 分析了 *MaNHX5* 蛋白的跨膜结构, 结果表明 *MaNHX5* 蛋白有 11 个跨膜结构, 这和前期报道的 *AtNHX1*、*NHE1* 和 *PeNHX3* 蛋白包含 12 个跨膜结构的结果不同<sup>[21-23]</sup>。本研究表明, 位于 TM7 的跨膜区域的第 276 位的丝氨酸(S) 可能是一个耐盐相关的氨基酸保守位点。结果显示, 将 *MaNHX5* 蛋白 276 位的 S 突变为 D 后, *MaNHX5* 蛋白的  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲均发生了变化, 这表明 *MaNHX5* 蛋白中 276 位的 S 对蛋白质的稳定性非常重要, 这可能是 *MaNHX5* 蛋白突变后通过影响蛋白折叠情况来影响  $\text{Na}^+$  的转运功能。

本研究利用 AXT3 盐敏感酵母功能回补试验证明了香蕉 *MaNHX5* 和 *MaNHX5*<sup>S276D</sup> 的功能差异。AXT3 酵母功能回补试验结果表明, *MaNHX5*<sup>S276D</sup> 突变菌株比 *MaNHX5* 菌株更耐 NaCl 胁迫, 表明 *MaNHX5* 蛋白中 276 位的氨

基酸位点可能是参与  $\text{Na}^+$  转运的关键位点。酵母功能回补试验结果证明, 转入 *MaNHX5* 基因可以提高 AXT3 酵母的耐盐性, 与转入 *MaNHX5* 基因相比, 转 *MaNHX5'* 基因的 AXT3 酵母在 NaCl 胁迫下耐盐性显著提高, 进一步的耐盐性实验还需要在香蕉中进行验证。Cao 等发现将 *MnNHX2* 转入 AXT3 菌株后可提高其耐盐性<sup>[9]</sup>, 刘威等发现将 *MnNHX2* 转入 AXT3 菌株后可恢复 NaCl 对 AXT3 的生长抑制<sup>[24]</sup>。

前期研究表明, *NHE1* 模型中的 Arg180、Arg327、Glu330 和 Arg440 具有调节 pH 的作用<sup>[16]</sup>, *MaNHX5* 蛋白是否具有类似的作用有待进一步研究。苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 液泡型  $\text{Na}^+$  逆转运蛋白 Ser275 的磷酸化增强了 *MdNHX1* 蛋白的离子转运活性<sup>[25]</sup>。在 *MaNHX5* 跨膜结构中, 将 TM7 的跨膜区域的第 276 位的丝氨酸突变为天冬氨酸, 酵母的耐盐性显著增强, 这可能是由于 276 位的 S 突变为 D 后, 模拟了该氨基酸的磷酸化, 该保守位置的负电荷增强了 *MaNHX5* 蛋白的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  转运活性。

本研究表明, 香蕉 NHX 蛋白关键氨基酸残基对于该蛋白在离子转运方面有重要作用, 并为进一步研究植物 NHX 蛋白离子转运、阳离子特异性选择和 pH 调节等功能提供了线索。

### REFERENCES

- [1] Miri SM, Mousavi A, Naghavi MR, et al. Analysis of induced mutants of salinity resistant banana (*Musa*

- acuminata* cv. Dwarf Cavendish) using morphological and molecular markers. Iran J Biotechnol, 2009, 7(2): 86-92.
- [2] Turner DW, Fortescue JA, Thomas DS. Environmental physiology of the bananas (*Musa* spp.). Braz J Plant Physiol, 2007, 19(4): 463-484.
- [3] Ho SN, Hunt HD, Horton RM, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene, 1989, 77(1): 51-59.
- [4] Kato S, Han SY, Liu W, et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. PNAS, 2003, 100(14): 8424-8429.
- [5] Li J, Li CH, Xiao W, et al. Site-directed mutagenesis by combination of homologous recombination and Dpn I digestion of the plasmid template in *Escherichia coli*. Anal Biochem, 2008, 373(2): 389-391.
- [6] Motohashi K. A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from *Escherichia coli* laboratory strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis. BMC Biotechnol, 2015, 15: 47.
- [7] James K, Van Sinderen D. Site-directed mutagenesis of *Bifidobacterium* strains. Methods Mol Biol, 2021, 2278: 45-60.
- [8] Zhang KW, Yin XM, Shi KT, et al. A high-efficiency method for site-directed mutagenesis of large plasmids based on large DNA fragment amplification and recombinational ligation. Sci Rep, 2021, 11(1): 10454.
- [9] Cao BN, Xia ZQ, Liu CY, et al. New insights into the structure-function relationship of the endosomal-type Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter NHX6 from mulberry (*Morus notabilis*). Int J Mol Sci, 2020, 21(2): 428.
- [10] 郭晓颖, 范亚飞, 周扬, 等. 木榄超活性突变基因 *BgSOS1-3000* 的分离及功能分析. 分子植物育种, 2016, 14(4): 851-857.
- Guo XY, Fan YF, Zhou Y, et al. Isolation and function analysis of a super-active mutant gene of *BgSOS1-3000* from *Bruguiera gymnorhiza*. Mol Plant Breed, 2016, 14(4): 851-857 (in Chinese).
- [11] Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. Nucleic Acids Res, 2016, 44(D1): D279-D285.
- [12] Huertas R, Rubio L, Cagnac O, et al. The K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter LeNHX2 increases salt tolerance by improving K<sup>+</sup> homeostasis in transgenic tomato. Plant Cell Environ, 2013, 36(12): 2135-2149.
- [13] Ohnishi M, Fukada-Tanaka S, Hoshino A, et al. Characterization of a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 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. Plant Cell Physiol, 2005, 46(2): 259-267.
- [14] Pardo JM, Cubero B, Leidi EO, et al. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. J Exp Bot, 2006, 57(5): 1181-1199.
- [15] Rodríguez-Rosales MP, Jiang XY, Gálvez FJ, et al. Overexpression of the tomato K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. New Phytol, 2008, 179(2): 366-377.
- [16] Zhang HX, Hodson JN, Williams JP, et al. Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. PNAS, 2001, 98(22): 12832-12836.
- [17] Yamaguchi T, Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, et al. Genes encoding the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger and flower coloration. Plant Cell Physiol, 2001, 42(5): 451-461.
- [18] Jiang XY, Leidi EO, Pardo JM. How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? Plant Signal Behav, 2010, 5(7): 792-795.
- [19] 沈义国, 陈受宜. 植物盐胁迫应答的分子机制. 遗传, 2001, 23(4): 365-369.
- Shen YG, Chen SY. Molecular mechanism of plant responses to salt stress. Hereditas(Beijing), 2001, 23(4): 365-369 (in Chinese).
- [20] 徐亚, 滕梦鑫, 何岳东, 等. 香蕉 *NHX* 基因家族的鉴定及表达分析. 植物生理学报, 2021, 57(3): 681-691.
- Xu Y, Teng MX, He YD, et al. Identification and expression analysis of *NHX* genes family in banana. Plant Physiol J, 2021, 57(3): 681-691 (in Chinese).
- [21] Landau M, Herz K, Padan E, et al. Model structure of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 (NHE1): functional and clinical implications. J Biol Chem, 2007, 282(52): 37854-37863.
- [22] Wang LG, Feng XY, Zhao H, et al. Functional analysis of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter PeNHX3 from the tree halophyte *Populus euphratica* in yeast by model-guided mutagenesis. PLoS One, 2014, 9(8): e104147.
- [23] Yamaguchi T, Apse MP, Shi HZ, et al. Topological analysis of a plant vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter reveals a luminal C terminus that regulates antiporter cation selectivity. PNAS, 2003, 100(21): 12510-12515.
- [24] 刘威, 李慧, 蔺经, 等. 杜梨 *PbNHX1* 基因的克隆、表达分析及功能验证. 果树学报, 2018, 35(2): 137-146.
- Liu W, Li H, Lin J, et al. Cloning, expression and functional analysis of *PbNHX1* gene in *Pyrus betulaefolia*. J Fruit Sci, 2018, 35(2): 137-146 (in Chinese).
- [25] Sun MH, Ma QJ, Hu DG, et al. The glucose sensor MdHXK1 phosphorylates a tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger to improve salt tolerance. Plant Physiol, 2018, 176(4): 2977-2990.

(本文责编 陈宏宇)