

文章编号: 1674-7054(2019)02-0106-05

水稻 *OsNHX5* 基因的亚细胞定位及表达分析

王丹阳, 范亚飞, 周 扬, 罗明华, 江行玉, 罗越华, 夏幽泉

(海南大学 热带农林学院 / 海南省耐盐作物生物技术重点实验室, 海口 570228)

摘 要: 采用 PCR 方法从水稻中克隆出 1 个 Na^+/H^+ 逆转运蛋白基因 *OsNHX5*, 构建了该基因的亚细胞定位表达载体, 利用注射烟草法对 *OsNHX5* 进行亚细胞定位, 利用荧光定量 PCR 技术研究 *OsNHX5* 基因在盐胁迫下的表达模式。结果表明, *OsNHX5* 与拟南芥 *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 的亲缘关系较近, 该蛋白定位于细胞内膜系统上; 荧光定量 PCR 结果表明, 叶中 *OsNHX5* 基因的表达受 KCl 胁迫诱导上调表达, 而根中 *OsNHX5* 基因的表达变化不明显。*OsNHX5* 是一个细胞内膜系统上的 K^+/H^+ 逆转运蛋白, 可为耐盐水稻的分子育种提供理论依据。

关键词: 水稻; K^+/H^+ 逆转运蛋白; *OsNHX5* 基因; 表达分析; 亚细胞定位

中图分类号: Q 948

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.02.002

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 然而由于大量耕地盐渍化, 严重影响了水稻的生产和产量的提高。在多种植物中研究发现, 盐胁迫环境中, 植物细胞内的离子平衡被打破, 细胞质中的 Na^+ 含量增加, 对植物细胞造成了离子毒害^[1], 而且外界环境中过多的 Na^+ 通过细胞膜上的 K^+ 通道进入细胞, 会抑制植物细胞对 K^+ , Ca^{2+} 等矿质营养元素的吸收^[2]。当细胞质中的 Na^+ 含量超过一定限度后, 植物一般会采取 2 种途径来降低 Na^+ 浓度: 一种方式是通过细胞膜上的 Na^+/H^+ 逆转运蛋白 SOS1 (salt overly sensitive) 外排 Na^+ , 即 SOS 途径。研究发现 SOS1 蛋白外排 Na^+ 需要质膜 H^+/ATPase 提供能量^[3]; 另一种方式是通过液泡膜上的 Na^+/H^+ 逆转运蛋白 NHX 将 Na^+ 区隔到液泡中^[4-5], 这一过程需要液泡膜上的 H^+/ATPase 和 H^+/PPase 提供能量^[6]。 Na^+ 的区隔化对于提高植物的耐盐性非常重要, 一方面可以降低细胞质中的 Na^+ 含量, 同时 Na^+ 进入液泡后可以作为渗透调节剂降低细胞水势, 促进植物细胞吸水^[7], 另一方面还可以调节液泡内的 pH 值, 促进植物细胞对营养元素钾的吸收, 维持细胞内的酸碱平衡和 K^+ 稳态^[8], 从而有利于植物在盐渍环境中生长。

植物中的 NHX 蛋白按照序列相似度可分为 2 个亚家族: Class I 和 Class II。Class I 亚家族成员之间有 56%~87% 的相似度, 主要定位于液泡膜上, 而 Class II 亚家族成员与 Class I 只有 21%~23% 的相似性, 它们主要定位于细胞的内膜系统如高尔基体膜、内质网膜等^[9-10]。拟南芥 *AtNHX1* 是植物中首次克隆到的 NHX 基因^[11], 该蛋白家族还包括 *AtNHX2*~*AtNHX6*, 其中 *AtNHX1*~*AtNHX4* 属于 Class I, 具有维持细胞内正常的 Na^+ 水平及 pH 平衡的功能^[12]。*AtNHX5* 和 *AtNHX6* 属于 Class II^[13], 可调控细胞内的 Na^+ , K^+ 平衡以及蛋白质的运输^[14]。研究还发现 *AtNHX1* 和 *AtNHX2*、*AtNHX5* 均能够补偿酵母盐敏感突变体 AXT3K 对 Na^+ 的敏感性^[15], 且 *AtNHX1* 基因的过表达不仅能提高拟南芥的耐盐性, 而且在番茄、油菜、棉花中异源表达后, 使转基因植株都能在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理下正常生长并结实。*AtNHX2* 主要在液泡膜上发挥 Na^+/H^+ 交换活性^[16]。过表达 *AtNHX5* 基因的拟南芥耐盐性也明显增强^[17], 转 *AtNHX5*

收稿日期: 2019-02-25

修回日期: 2019-03-13

基金项目: 国家自然科学基金(31660253), 海南大学科研团队项目(hdkytg201706), 海南省重大科技计划项目(HNGDhs201502), 海南省教育厅高等学校科学研究项目(Hnky2018-19)

作者简介: 王丹阳(1991-), 女, 海南大学热带农林学院 2016 级硕士研究生。E-mail: 2804048569@qq.com

通信作者: 夏幽泉(1980-), 女, 硕士, 讲师。研究方向: 植物抗逆分子生物学。E-mail: xiayq54@163.com

基因的烟草在 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的培养基中生长明显优于未转基因烟草^[14]。在水稻中共发现 5 个 *NHX* 基因,其中 *OsNHX1*–*OsNHX4* 均属于 Class I 家族成员,*OsNHX5* 属于 Class II 成员^[17–18],*OsNHX1* 基因能够抑制酵母 *nhx1* 突变体对 Na^+ 和 Li^+ 的敏感性,增强转基因酵母的耐盐性^[9],耐盐水稻品种中的 *OsNHX2* 基因在盐胁迫下的表达量显著增强^[20],共表达 *OsNHX1* 和液泡膜 H^+ -PPase 基因 *OsVP1* 的转基因水稻耐盐性强于转单个基因的水稻,说明 *OsVP1* 可为 *OsNHX1* 区隔化 Na^+ 提供能量^[21]。笔者从水稻中克隆到 1 个逆转运蛋白基因 *OsNHX5*,采用烟草瞬时表达分析其在细胞中的定位,利用荧光定量 PCR 技术分析 *OsNHX5* 基因在胁迫下的表达模式,以期深入研究 *OsNHX5* 基因的功能,为水稻耐盐育种提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料处理 供试材料为水稻品种‘日本晴’(*Oryza sativa* L., cv. Nipponbare)。将水稻种子用水培装置培养,待长到两叶一心时分别用 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 进行处理^[18],在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 取水稻幼苗的根和叶,用 ddH_2O 冲洗干净后放入液氮中速冻,再放入 -80°C 冰箱保存,以备提取 RNA。

1.2 基因克隆及载体构建 采用天根生化科技(北京)有限公司的 RNA 提取试剂盒(目录号: DP441)提取水稻 RNA,采用宝生物工程(大连)有限公司的反转录试剂盒(目录号: DRR047A)进行反转录,具体操作步骤参照说明书。根据 *OsNHX5* 基因序列(GenBank: AB531434.1),用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,构建到亚细胞定位表达载体 pCambia1300-GFP 上,基因引物如下: *OsNHX5*-GFP-F: ataGTCGACATG-GCGCTGGAGCTGAGCCT; *OsNHX5*-GFP-R: eggGGTACCTTGCTCATAGAATCCGCGTC。以 cDNA 为模板扩增目的基因,PCR 产物纯化后用 *Sal* I 和 *Kpn* I 双酶切,同时用这 2 个内切酶双酶切 1 300 载体,再用 T4 连接酶进行连接得到重组质粒 1 300-*OsNHX5*。构建成功的重组质粒送往上海生工生物工程有限公司测序。

1.3 农杆菌介导的烟草瞬时表达 将测序正确的重组质粒采用热激法转化到农杆菌感受态细胞 GV3101 中,在含有利福平和卡那霉素的 YEP 培养基上筛选,挑取阳性克隆,扩大培养至 30 mL 液体 YEP 培养基中,至 $OD_{600} = 1.5$; 室温, $5\,000 \text{ g}$ 离心 10 min,弃掉上清液,用重悬液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES, pH 5.6; 高温高压灭菌后,加 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮)重悬菌体,至 $OD_{600} = 1.0$,室温放置 2~3 h; 用注射器将悬浮液注射到生长 1 个月左右的烟草叶片下表面,将注射后的烟草置于黑暗中 24 h; 3 d 后,剪下注射的烟草叶片,提取烟草叶片的原生质体^[22],在共聚焦显微镜下观察原生质体的荧光。同时转化重组质粒 pCambia1300-*AtNHX5* 和 pCambia1300 空载体作为对照, pCambia1300-*AtNHX5* 质粒由笔者实验室保存。

1.4 基因表达分析 *OsNHX5* 基因和内标基因 β -actin^[22] 的荧光定量引物序列如下: *OsNHX5*-qRT-F: TCAAATACAGAGACCAACACTAGGAT, *OsNHX5*-qRT-R: CCCAAGGATGGCAAAAGTTAC; Actin-F: GGAAG-TACAGTGTCTGGATTGGAG, Actin-R: TCTTGGCTTAGCATTCCTTGGGT。引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计,由上海生工生物工程有限公司合成。荧光定量 PCR 采用 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒(目录号: DRR820A),在 ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System 仪器上运行,Real-Time PCR 反应体系参照说明书进行。实时荧光定量 PCR 反应条件: 95°C 预变性 30 s, 94°C 变性 5 s, 60°C 退火延伸 30 s, 45 个循环,结束后读取荧光信号: 95°C 15 s, 60°C 15 s, 95°C 15 s, 进行熔解曲线分析。采用比较 CT 法来计算目的基因的相对表达量,实验结果设 3 个重复,实验数据用 Sigma Plot 12.0 软件分析。

2 结果与分析

2.1 *OsNHX5* 基因克隆及定位载体的构建 用 *OsNHX5*-GFP-F 和 *OsNHX5*-GFP-R 引物从水稻 cDNA 中扩增 *OsNHX5* 基因(图 1A),得到的目的片段纯化后,用 *Sal* I 和 *Kpn* I 内切酶进行双酶切,再用连接酶连接到定位载体 pCambia1300 上,重组质粒的酶切鉴定产物如图 1B 中所示,片段大小符合预期,重组质粒经测序验证正确,说明质粒构建成功。

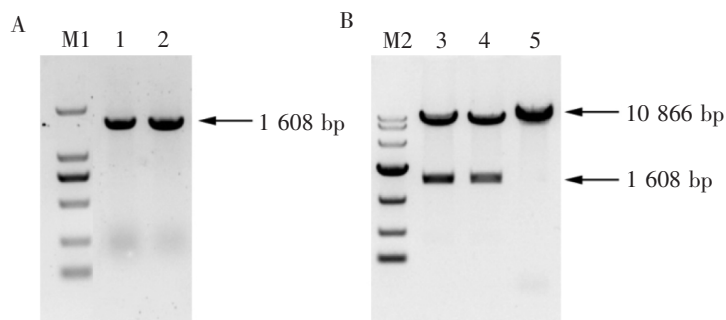


图1 pCambia1300-*OsNHX5* 重组质粒构建

A: *OsNHX5* 基因扩增; B: 重组质粒构建。M1: DL2000 marker; M2: DL10000 marker; 1,2: *OsNHX5* 基因 PCR 产物; 3,4: pCambia1300-*OsNHX5* 酶切检测; 5: pCambia1300 空载体酶切

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pCambia1300-*OsNHX5*

A: PCR amplification of *OsNHX5*; B: Construction of recombinant plasmid. M1: DL2000 marker; M2: DL10000 marker; 1,2: PCR product of *OsNHX5*; 3,4: Identification of pCambia1300-*OsNHX5* by restriction enzymes digestion; 5: Identification of the vector pCambia1300

2.2 *OsNHX5* 蛋白的进化分析 测序发现 *OsNHX5* 基因全长 1 608 bp, 编码 535 个氨基酸, 先将 *OsNHX5* 蛋白进行进化分析, 采用 MEGA7.0 软件分析 *OsNHX5* 蛋白与模式植物拟南芥 NHX 蛋白的进化关系。从图 2 中可以发现, 在 NHX 蛋白的 2 个亚家族中, 水稻 *OsNHX1* 和 *OsNHX2* 属于 Class I 亚家族, 而 *OsNHX5* 与拟南芥 *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 相似, 均属于 Class II 亚家族。

2.3 *OsNHX5* 蛋白的亚细胞定位 将构建成功的质粒转化到农杆菌 GV3101 中, 筛选阳性克隆, 在 YEP 培养基中扩大培养, 农杆菌菌液经过悬浮后, 注射到烟草叶片中, 待生长 3 d 后, 提取注射叶片的原生质体, 在共聚焦显微镜下观察荧光, 发现与 *AtNHX5* 在细胞中的位置相似, 水稻 *OsNHX5* 蛋白定位于细胞中的内膜系统上(图 3)。

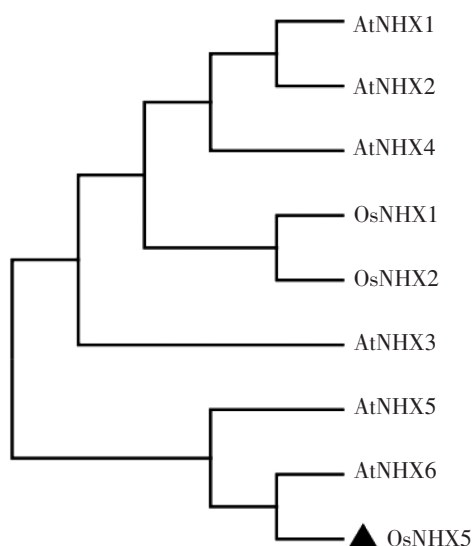


图2 *OsNHX5* 蛋白与拟南芥 NHX 蛋白的进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis between *OsNHX5* and *Arabidopsis* NHX proteins

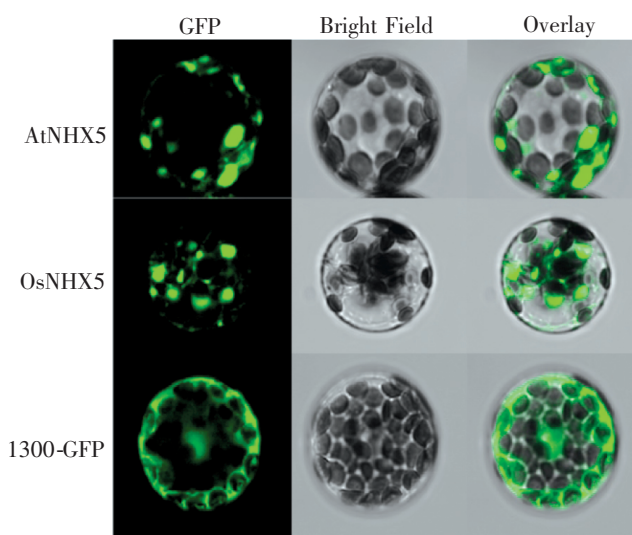


图3 *OsNHX5* 蛋白的亚细胞定位

Fig.3 Subcellular localization of *OsNHX5* protein

2.4 *OsNHX5* 基因的表达分析 将水稻幼苗进行胁迫处理, 采用荧光定量 PCR 技术研究 *OsNHX5* 基因应对胁迫的表达量变化。从图 4 中可以看出, 在 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 胁迫下, 叶片中 *OsNHX5* 基因在 3 h 的表达量有稍微上升, 约为起始表达量的 1.6 倍, 此后表达量回到起始水平。而根中 *OsNHX5* 基因表达没有明显

变化,在起始表达量的上下浮动(图4A)。叶中 *OsNHX5* 基因在 KCl 胁迫下呈现出上调表达,在处理 3 h 后的表达量是处理前表达量的 3.6 倍,而在 KCl 胁迫下根中 *OsNHX5* 基因的表达量变化不明显(图4B)。

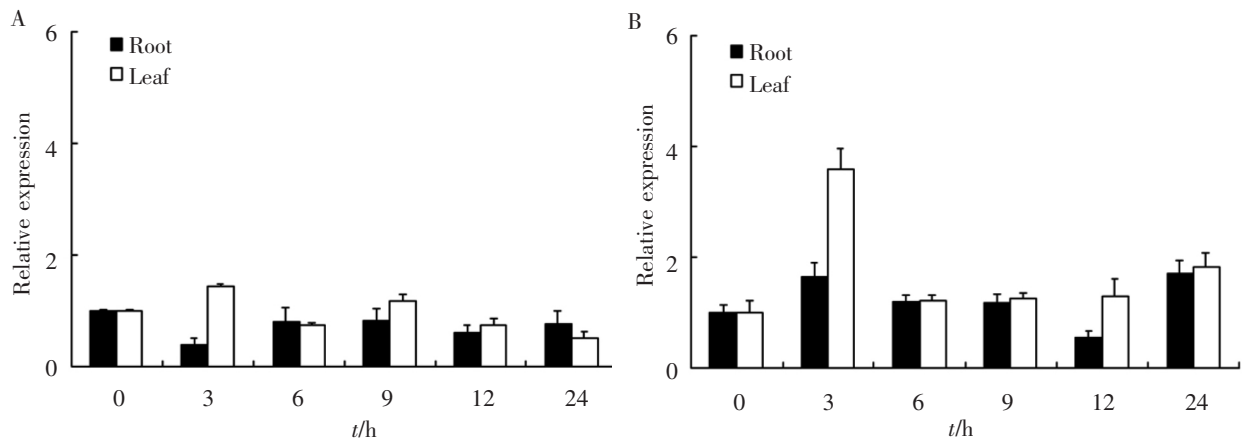


图4 *OsNHX5* 基因在 NaCl 和 KCl 胁迫下的相对表达量变化

A: 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理; B: 200 mmol·L⁻¹ KCl 处理

Fig. 4 Relative expression of *OsNHX5* under NaCl or KCl stress

A: 200 mmol·L⁻¹ NaCl treatment; B: 200 mmol·L⁻¹ KCl treatment

3 讨论

植物生长发育过程需要必需的营养元素,但如果土壤中含有过量的可溶性盐就会对植物造成危害。土壤盐渍化已经成为一个全球性的问题,且盐渍化土壤的面积在不断增加,因此,研究植物耐盐机理,培育可在盐渍化土壤中生长的耐盐植物已成为一项重要的课题。盐胁迫对于植物造成的危害主要是环境中的 Na^+ ,而当过多的 Na^+ 进入细胞后,通过区隔化来降低细胞质中的 Na^+ 浓度已经被证实是一种有效的耐盐调节途径。这一途径主要是由液泡膜或者细胞内膜系统上的 NHX 蛋白来完成,自从植物中的第 1 个 NHX 基因在拟南芥中被克隆出来^[1],至今已在超过 60 种植物发现和分离到 NHX 基因^[10],而且也证实了这些基因可以提高耐盐性。玉米 *ZmNHX1* 基因可以恢复酵母盐敏感突变体 AXT3 对 Na^+ 和 Li^+ 的耐受能力^[23],小麦 *TaNHX2* 通过调控细胞内 K^+ 的平衡来提高酵母突变体的耐盐性^[24]。

Pardo 等将植物细胞内的 NHX 蛋白按照它们在细胞中所处的位置分为 I 类(Class I)和 II 类(Class II),而至今发现的 NHX 蛋白中 Class I 类都位于液泡膜上,并在细胞内形成 1 个独立的转运子分支,Class II 类定位于核内体中。NHX 家族中 Class I 类液泡膜逆转运蛋白对 Na^+/H^+ 或 K^+/H^+ 转运有相同的亲和性^[25,26],而 Class II 类核内体逆转运蛋白对 K^+ 的亲和性要高于 Na^+ ^[27]。这表明液泡膜逆转运蛋白和核内体逆转运蛋白对离子的亲和性不同,执行着不同的功能。Class II 类中 NHX 逆转运蛋白活性研究的最为详细的是西红柿 Na^+/H^+ 逆转运蛋白 *LeNHX2*,*LeNHX2* 定位于前液泡或者高尔基体中,在序列上与 *AtNHX5* 最为相似,是植物中发现的第 1 个 K^+/H^+ 逆向转运蛋白,盐胁迫下,转 *LeNHX2* 基因的酵母细胞内 K^+ 浓度要比对照高很多,而 Na^+ 的浓度与对照相差不大^[27]。本研究中克隆到的 *OsNHX5* 基因编码的蛋白在序列上与拟南芥 *AtNHX5* 和 *AtNHX6* 最为接近,属于 NHX 蛋白家族中的 Class II 类,烟草原生质体中的定位结果也表明 *OsNHX5* 位于细胞内膜系统上。荧光定量 PCR 结果表明 *OsNHX5* 基因受到 KCl 胁迫的诱导上调表达,受 NaCl 胁迫的影响较小,表明 *OsNHX5* 基因的功能可能与 K^+ 相关,推测 *OsNHX5* 可能是 1 个 K^+/H^+ 逆转运蛋白。

参考文献:

- [1] APSE M P, BLUMWALD E. Na^+ transport in plants [J]. FEBS Letters, 2007, 581(12): 2247–2254.
- [2] MAATHUIS J M. The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity [J]. Journal of Experimental Bota-

- ny, 2006, 57: 1137 – 1147.
- [5] ZHOU Y, YIN X, DUAN R, et al. SpAHA1 and SpSOS1 coordinate in transgenic yeast to improve salt tolerance [J]. PLoS One, 2015, 10: e0137447.
- [6] 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(5341): 1256 – 1258.
- [7] ZHOU Y, YANG C, HU Y, et al. The novel Na^+/H^+ antiporter gene *SpNHX1* from *Sesuvium portulacastrum* confers enhanced salt tolerance to transgenic yeast [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2018, 40: 61.
- [8] RODRIGUEZ-ROSALES M P, GALVEZ F J, HUERTAS R, et al. Plant NHX cation/proton antiporters [J]. Plant Signaling Behavior, 2009, 4: 265 – 276.
- [9] BLUMWLAD E, AHARON G S, APSE M P. Sodium transport in plant cells [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1465 (12): 140 – 151.
- [10] LEIDI E O, BARRAGAN V, RUBIO L, et al. The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato [J]. The Plant Journal, 2010, 61(3): 495 – 506.
- [11] BRETT C L, DONOWITZ M, Rao R. Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers [J]. American Journal of Physiology-cell Physiology, 2005, 288: 223 – 239.
- [12] PARDO J M, CUBERO B, LEIDI E O, et al. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance [J]. Journal of Experiment Botany, 2006, 57: 1181 – 1199.
- [13] 徐璐, 郭善利, 尹海波. Na^+/H^+ 逆向转运蛋白与植物耐盐性研究 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(11): 2727 – 2730.
- [14] YOKOI S, QUINTERO F J, CUBERO B. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporter in the salt stress response [J]. The Plant Journal, 2002, 30(5): 529 – 539.
- [15] 邱全胜. 拟南芥 NHX5 和 NHX6: 离子平衡与蛋白持运输 [J]. 中国科学: 生命科学, 2017, 47(8): 839 – 846.
- [16] BARRAGAN V, LEIDI E O, ANDRES Z, et al. Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2012, 24: 1127 – 1142.
- [17] 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.
- [18] 林小洁, 李洪清. 转拟南芥 *AtNHX5* 基因烟草的耐盐性研究 [J]. 北方园艺, 2011, 9: 123 – 126.
- [19] 李静, 刘明, 孙晶, 等. $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ 转运蛋白 NHX 基因的研究进展 [J]. 大豆科学, 2011, 30(6): 1035 – 1039.
- [20] FUKUDA A, NAKAMURA A, HARA N, et al. Molecular and functional analyses of rice NHX-type Na^+/H^+ antiporter genes [J]. Planta, 2010, 233(1): 175 – 188.
- [21] FUKUDA A, NAKAMURA A, Tagin A, et al. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice [J]. Plant Cell Physiology, 2004, 45: 146 – 159.
- [22] 邱生平, 周国安, 陆驹飞, 等. 一个新的水稻液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因的克隆及表达特征 [J]. 中国水稻科学, 2006, 20(2): 119 – 124.
- [23] LIU S P, ZHENG L Q, Xue Y H, et al. Overexpression of *OsVPI* and *OsNHX1* increases tolerance to drought and salinity in rice [J]. Journal of Plant Biology, 2010, 53: 444 – 452.
- [24] 彭廷, 文慧丽, 赵亚帆, 等. 盐、干旱胁迫下水稻相关 miRNA 的鉴定及表达分析 [J]. 华北农学报, 2018, 33(2): 20 – 27.
- [25] 卜华虎. 玉米 Na^+/H^+ 质子泵 ZmNHX1 功能的初步研究 [D]. 北京: 中央民族大学, 2011, .
- [26] XU Y Y, ZHOU Y, HONG S, et al. Functional characterization of a wheat NHX antiporter gene *TaNHX2* that encodes a K^+/H^+ exchanger [J]. PLoS One, 2013, 8: e78098.
- [27] VENEMA K, QUINTERO F J, PARDO J M, et al. The *Arabidopsis* Na^+/H^+ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na^+ and K^+ transport in reconstituted liposomes [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277: 2413 – 2418.
- [28] 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 thaliana* vacuolar Na^+/H^+ antiporter [J]. The Plant Journal, 2003, 36: 229 – 239.
- [29] VENEMA K, BELVER A, MARÍN-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]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278: 22453 – 22459.

Functional Analysis of the *mon1* Gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4

LI Heng^{1,2}, CHANG Wenjun², CHEN Hanqing², QIAO Fan^{1,2}, ZENG Huicai²

(1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Tropical Crop Biology and Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Sciences, Hainan Key Laboratory of Tropical Microbial Resources, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: Based on the clues obtained from our previous proteomics studies, the *mon1* gene from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (Foc4) was found to play a role in pathogenic infection. To further characterize the functions of the *mon1* in the infection of Foc4, the *mon1* gene was knocked out through homologous recombination method and the phenotype and pathogenicity of the mutant strains analyzed. The results showed that the mutant strains of Foc4 grew slowly, produced less spores and thinner mycelia with fewer branches, and was lower in their resistance to exogenous oxygen stress, their capacity of cell wall penetration and their cellulose utilization, as compared with the wild strains. Pathogenicity test showed the mutant strains exhibited a significantly low infection against the banana seedlings. All the results suggested that the *mon1* gene played a certain role in the growth, development, sporulation and pathogenicity of the Foc4.

Keywords: *mon1*; *Fusarium oxysporum*; gene knockout; pathogenicity

(责任编辑: 叶 静)

(上接第 110 页)

Subcellular Localization and Expression of *OsNHX5* in Rice

WANG Danyang, FAN Yafei, ZHOU Yang, LUO Minghua, JIANG Xingyu, LUO Yuehua, XIA Youquan

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / Hainan Key Laboratory for Biotechnology of Salt Tolerant Crops, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Salt stress suppresses growth and development of rice. Cloning salt tolerant related genes in rice for analysis of their functions might lay a foundation for research in rice salt tolerance mechanism and for salinity resistance breeding. A Na^+/H^+ antiporter gene *OsNHX5* was cloned from *Oryza sativa* by polymerase chain reaction (PCR) method, and its localization expressing vector was constructed and observed through tobacco injection mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The expression patterns of *OsNHX5* under salinity were analyzed by using real-time PCR. Phylogenetic analysis revealed that *OsNHX5* was homologous to *Arabidopsis AtNHX5* and *AtNHX6*. The results showed that *OsNHX5* protein was localized in the intracellular membranes. The *OsNHX5* gene was induced by KCl stress and its expression was upregulated in leaves but was not significantly different in roots under NaCl or KCl stress. Our results illustrated that *OsNHX5* was an endosomal K^+/H^+ antiporter, and this finding would give a theoretical basis for molecular breeding of salt tolerant rice in the future.

Keywords: *Oryza sativa*; K^+/H^+ antiporter; *OsNHX5* gene; expression analysis; subcellular localization

(责任编辑: 钟云芳)