

甘蓝 *BoNHX* 基因家族生物信息学分析与鉴定

吴沁安¹, 张 萌², 丁一娟³

(1. 西藏自治区农牧科学院, 西藏 拉萨 850032; 2. 西藏自治区农牧科学院蔬菜研究所, 西藏 拉萨 850030; 3. 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715)

摘要: 为鉴定并分析甘蓝 *NHX* 基因家族成员的生物信息, 利用氨基酸特定序列比对和隐马尔可夫模型的蛋白结构域, 在甘蓝全基因组中筛选并鉴定出 *NHX* 基因家族成员 11 个, 命名为 *BoNHX1*~*BoNHX11*; 利用 TBtools、MEGA11、PlantCARE、MEME 等软件和网站进一步分析 11 个甘蓝 *NHX* 基因家族成员的理化性质。结果表明: 11 个家族成员编码氨基酸 127~1 166 个, 分子量为 14 174.59~128 874.77 Da, 等电点在 5.16~9.33。在拟南芥与甘蓝 *NHX* 家族成员构建的系统进化树中, 所有基因家族成员被分为 A/B/C 3 个亚家族, 每个亚家族成员在 3~12 个不等。对家族成员进行顺式作用元件预测, 主要集中在光反应、激素响应、低温应答等过程。在拟南芥与甘蓝物种间共线性分析中, 两者之间存在 12 对共线性关系; 在甘蓝物种内共线性分析中, 有 6 对共线性关系。在甘蓝基因组中共鉴定出 *NHX* 基因家族成员 11 个, 进一步分析表明, *NHX* 基因家族成员可能在胁迫应答、光反应以及激素响应等过程中发挥重要作用。

关键词: 甘蓝; *NHX*; 基因家族; 生物信息学

中图分类号: Q812; S635.1

文献标识码: A

Bioinformatics Analysis and Identification of *NHX* Gene Family in *Brassica oleracea*

WU Qinan¹, ZHANG Meng², DING Yijuan³

(1. Xizang Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lasha Xizang 850032, China; 2. Institute of Vegetable Research, Xizang Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Lasha Xizang 850030, China; 3. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), with its advantages of rich nutritional value and high yield, has become one of the most important vegetable crops in China. In this study, we systematically identified and conducted comprehensive bioinformatic analysis of *NHX* gene family members in cabbage, aiming to provide theoretical support for salt-tolerant breeding programs. Eleven *NHX* gene family members were identified in *B. oleracea* genome by amino acid sequence alignment and hidden Markov model (HMM)-based protein domain analysis, designated as *BoNHX1* to *BoNHX11*. Further analysis of these genes was conducted using TBtools, MEGA11, PlantCARE, MEME, and other bioinformatics tools. Physicochemical analysis revealed that the *NHX* family members encode proteins ranging from 127 to 1 166 amino acids, with molecular weights of 14 174.59 - 128 874.77 Da and isoelectric points (pI) of 5.16 - 9.33. Phylogenetic analysis divided the *NHX* family into three subfamilies (A, B, and C), and the number of members in each subfamily varies from 3 to 12. Cis-acting element prediction had highlighted roles in light response, hormone signaling, and low-temperature stress. Collinearity analysis identified 12 orthologous gene pairs between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*, and six pairs within the *B. oleracea* genome. Eleven *NHX* gene family members were identified in *B. oleracea*, with functional analysis suggesting their critical roles in stress response, light regulation, and hormone signaling.

Key words: *Brassica oleracea* var. *capitata* L.; *NHX*; gene family; bioinformatics

收稿日期: 2025-03-12

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0355); 西藏自治区 2024 年“西部之光”访问学者项目。

作者简介: 吴沁安(1991—), 男, 硕士, 主要从事油菜育种和抗病研究, E-mail: wuqinan2018@126.com。

通信作者: 丁一娟(1989—), 女, 博士, 主要从事油菜抗病研究, E-mail: dding1989@163.com。

甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata* Linnaeus), 又名卷心菜、包菜^[1], 是我国重要的且广泛种植的蔬菜作物, 也是甘蓝型油菜的亲本之一。我国是世界上最大的甘蓝生产国, 2022年全国种植面积达 20 万 hm^2 , 总产量超过 1 500 万 t。在甘蓝种植过程中, 可能遭遇盐碱胁迫等外界影响, 造成甘蓝产量和品质下降。Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白 (Na⁺/H⁺ antiporter, *NHX*) 以细胞内 Na⁺ 排出或区隔化等方式来维持细胞正常生理功能, 是植物抵御盐碱胁迫的关键因子^[2]。*NHX* 基因在植物中广泛存在, 已在拟南芥^[3]、水稻^[4]、大豆^[5]、葡萄^[6]、辣椒^[7]、柑橘^[8]、苹果^[9]、马铃薯^[10]、木薯^[11]、生姜^[12]、白菜^[13]、油菜^[14] 等多种植物基因组中被解析, 且部分 *NHX* 基因也已证明其具有耐盐功能。《中共中央办公厅 国务院办公厅关于加强耕地保护提升耕地质量完善占补平衡的意见》指出, 盐碱地是粮食增产的潜在粮仓。近年来, 甘蓝生产地土壤盐碱化日趋严重, 因此挖掘甘蓝耐盐碱基因是提升耕地质量、降低土壤盐碱化的重要手段。目前 *NHX* 基因家族在多种作物中被重点研究, 但在甘蓝上研究较少。本研究利用通过生物信息学方法, 从甘蓝全基因组筛选并鉴定 *NHX* 基因家族成员, 旨在为深入研究甘蓝耐盐碱机理及品种培育提供支撑。

1 材料与方法

1.1 甘蓝 *NHX* 基因鉴定

从拟南芥基因组数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>)、油菜泛基因组和比较基因组生物信息平台 (<https://yanglab.hzau.edu.cn/>) 下载拟南芥和甘蓝的核酸与蛋白质组数据, 甘蓝核酸与蛋白质组数据版本为“*Brassica oleracea*_JZS_v2”。根据拟南芥 *AtNHX* 家族的保守结构域, 获得拟南芥 *NHX* 基因家族编号并提取蛋白序列信息。使用软件 TBtools v2.136 (<https://tbtools.updatestar.com/en>)^[15], 将得到的所有序列进行合并筛选, 去除重复序列, 得到甘蓝 *NHX* 基因家族候选序列。使用简单模块架构研究工具 (SMART) 域分析网站 ([MAL=1/\) 和 Pfam \(<http://pfam.xfam.org/>\) 进一步确认候选基因序列, 以及 NCBI 保守域搜索, 最终获得甘蓝 *BoNHX* 基因家族成员。](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NOR-</p></div><div data-bbox=)

1.2 甘蓝 *NHX* 染色体定位和基因结构分析

首先利用甘蓝 *NHX* 基因家族成员信息, 从甘蓝数据库中提取 *BoNHX* 基因家族成员的基因和蛋白序列, 然后使用 TBtools 对 *BoNHX* 基因家族成员进行染色体定位分析和基因结构分析, 获得基因家族成员染色体位置及内含子与外显子结构。

1.3 基因基序和保守结构域分析

使用在线网站 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 预测氨基酸保守基序, 基序数量设定为 10, 其他参数均设定为默认参数。利用 NCBI 保守结构域数据库的 Batch Web CD Search Tool 在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对甘蓝 *BoNHX* 保守结构域进行预测。上述结果均使用 TBtools 进行可视化分析。

1.4 *NHX* 基因系统进化分析

使用 MEGA11 软件 (<https://www.megasoftware.net/>), 将甘蓝、拟南芥 *NHX* 基因家族的氨基酸序列采用最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 构建系统进化树, Bootstrap 值设定为 1000。使用 TBtools 软件功能, 预测 *BoNHX* 基因家族成员蛋白质的长度 (amino acid, Aa)、分子量 (molecular weight, Mw)、等电点 (Theoretical pI)、不稳定系数 (Instability Index)、脂肪系数 (Aliphatic Index) 以及亲水指数 (Grand Average of Hydropathicity); 使用 NPS@ (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 进行 *NHX* 蛋白质二级结构预测。

1.5 启动子顺式元件和共线性分析

从甘蓝基因组数据库中下载每个 *NHX* 基因转录起始位点 (ATG) 上游的 2000 bp 序列, 使用在线网址 PlantCARE (<http://www.dna.afrc.go.jp/PLACE/>) 分析启动子区域的顺式作用元件。利用拟南芥与甘蓝基因组数据和基因组注释文件, 分析拟南芥与甘蓝物种间、甘蓝物种内共线性分析。

2 结果与分析

2.1 甘蓝 *BoNHX* 基因家族基本信息、蛋白理化性质分析

根据拟南芥 *NHX* 基因家族信息,结合该家族成员的保守结构域,使用 *NHX* 结构域(PF00999)模型,在甘蓝蛋白组数据中进行搜索手动去除冗余序列和假基因序列,最终获得11条基因和蛋白序列,并根据其基因在染色体上的位置依次命名为 *BoNHX1*~*BoNHX11*(表1)。

表1 甘蓝 *BoNHX* 基因家族成员基本信息

基因名称	基因编号	氨基酸数	分子量	等电点	稳定系数	脂肪系数	亲水性	α -螺旋/%	拓展链结构/%	β -转角/%	无规则卷曲/%
<i>BoNHX1</i>	BolC02g056920.2J	530	58 810.75	7.19	34.45	106.09	0.482	52.26	14.34	2.83	30.57
<i>BoNHX2</i>	BolC05g012230.2J	722	80 030.75	6.13	28.31	109.61	0.265	66.34	7.89	3.05	22.71
<i>BoNHX3</i>	BolC05g059290.2J	560	62 245.77	6.6	39.76	108.46	0.43	55.54	13.57	2.86	28.04
<i>BoNHX4</i>	BolC05g060560.2J	549	60 909.32	7.35	37.52	105.65	0.492	47.54	13.66	3.46	35.34
<i>BoNHX5</i>	BolC06g050470.2J	501	55 570.9	5.33	42.39	98.98	0.379	55.69	14.17	3.19	26.95
<i>BoNHX6</i>	BolC07g039160.2J	174	19 406.96	7.75	33.27	119.2	0.855	61.49	16.09	4.60	17.82
<i>BoNHX7</i>	BolC07g039170.2J	222	24 756.65	9.33	39.31	87.79	-0.017	36.94	9.91	1.80	51.35
<i>BoNHX8</i>	BolC07g057510.2J	127	14 174.59	5.16	32.26	114.25	0.739	56.69	14.17	2.36	26.77
<i>BoNHX9</i>	BolC09g005190.2J	535	59 343.36	7.19	34.8	107.31	0.484	52.90	13.83	3.18	30.09
<i>BoNHX10</i>	BolC09g027600.2J	1166	128 874.8	6.65	35.09	103.17	0.092	56.86	9.18	3.17	30.79
<i>BoNHX11</i>	BolC09g043080.2J	529	58 665.61	6.64	34.11	110.49	0.559	53.50	13.80	3.02	29.68

2.2 甘蓝 *BoNHX* 基因家族系统进化树分析及染色体分布

为探究基因家族成员系统发育关系,将拟南芥8个与甘蓝11个 *NHX* 基因家族成员使用MEGA11进行系统进化树分析(图1a)。结果表明,将拟南芥与甘蓝 *NHX* 基因家族成员分为3个亚家族,其中A亚家族包含12个成员,分别是 *BoNHX1*、*BoNHX9*、*BoNHX6*、*BoNHX7*、*BoNHX4*、*AtNHX7*、*AtNHX5*、*AtNHX6*、*BoNHX3*、*AtNHX8*、*BoNHX8*、*BoNHX11*;B亚家族包含3个成员 *AtNHX2*、*AtNHX3*、*BoNHX5*;C亚家族包含4个成员,分别是 *AtNHX4*、*BoNHX10*、*AtNHX1*、*BoNHX2*。11个 *BoNHX* 基因家族成员不均匀地分布在甘蓝5条染色体上,其中C05、C07、C09染色体均分布3个基因,C02和C06染色体各分布1个基因(图2)。

BoNHX 家族11个成员编码127~1166个氨基酸,分子量介于14174.59~128874.77 Da。等电点在5.16~9.33之间变化,酸性蛋白与碱性蛋白数量基本相同。不稳定系数在28.31~42.39区间内,其中有10个蛋白不稳定系数小于40,可能这些蛋白较稳定,只有 *BoNHX5* 不稳定系数大于40,可能其蛋白性质不稳定。脂肪系数在87.79~119.20,亲水性在-0.017~0.559,所有11个家族蛋白中除了 *BoNHX5*,其余亲水性小于0,可能它为亲水性蛋白。

2.3 甘蓝 *BoNHX* 基因家族的基序与保守结构域预测分析

利用MEME在线网站对甘蓝和拟南芥 *NHX* 基因家族进行基序分析(图1b),结果表明甘蓝 *BoNHX* 基因家族成员基序结构存在区别,各成员包含1~10个基序不等。在A亚家族中,除 *BoNHX6*、*BoNHX7*、*BoNHX8*、*AtNHX8*、*BoNHX11*外,其余均包含相同顺序的Motif6、Motif3、Motif5、Motif8、Motif1、Motif9、Motif7、Motif2、Motif10、Motif4等10个基序,*BoNHX6*只包含Motif6、Motif1两个基序,*BoNHX7*包含Motif7、Motif2、Motif10、Motif4等4个基序,*BoNHX8*只包含Motif5基序和Motif8,*AtNHX8*和*BoNHX11*只缺少Motif4。在B亚家族中,*AtNHX2*、*AtNHX3*、*BoNHX5*均包含Motif3、Motif5、Motif1、Motif9等4个基序。在

C亚家族中,4个基因家族成员均包含 Motif3、Motif5、Motif9等3个基序,且 *AtNHX4*、*BoNHX10* 各包含两个 Motif3、Motif5。

利用 NCBI 保守结构域数据库的 Batch Web CD Search Tool 在线工具对保守结构域进行预

测(图 1c),A、B、C 亚家族均含有 Na-H-Exchanger 保守结构域,保守结构域在各蛋白的相对位置不一。基序预测结果与保守结构域及系统进化关系保持一致。

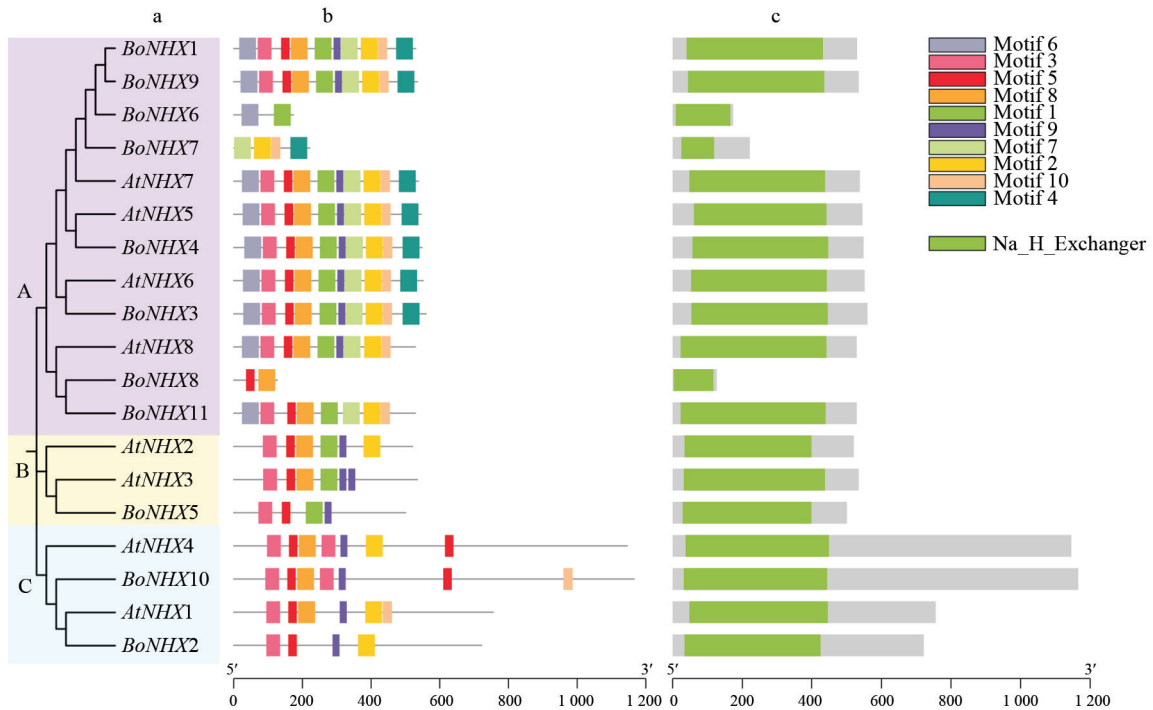


图 1 甘蓝 *BoNHX* 基因家族成员进化关系、保守基序、结构域分析

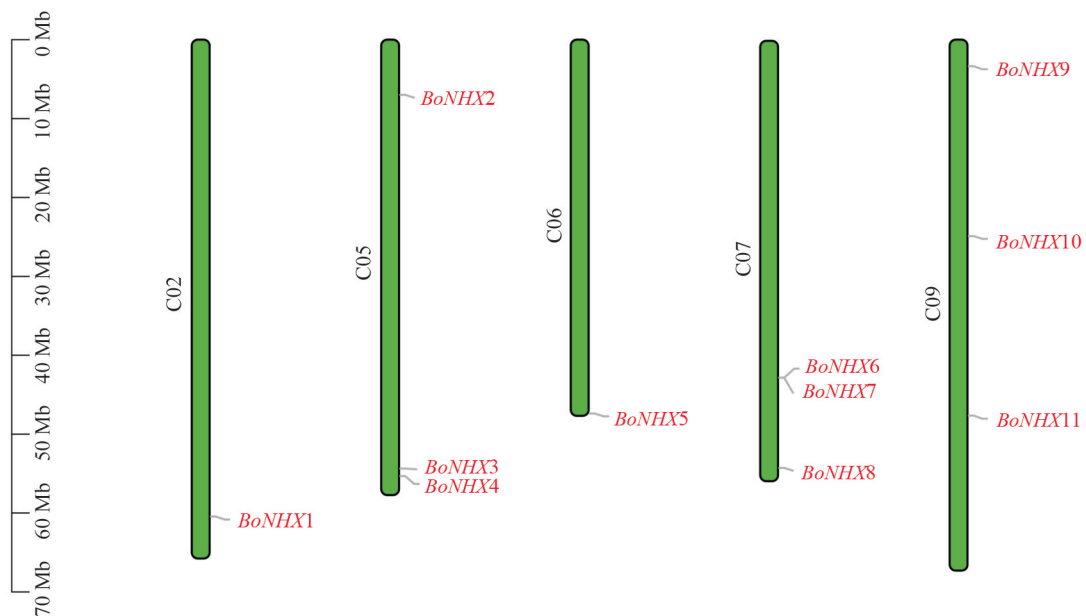


图 2 甘蓝 *BoNHX* 基因家族染色体定位图

从甘蓝 *NHX* 家族成员的基因结构分析得到(图 3),甘蓝 11 个 *NHX* 基因之间的基因结构存在较大差异,且所有基因在序列两端或中间均没有非编码区域,成员基因内含子数目范围在与外显子数量变化较大,内含子与外显子分别为 0~

21 个,1~22 个。

2.4 甘蓝 *BoNHX* 基因家族启动子顺式作用元件预测分析

甘蓝 *NHX* 基因家族的启动子区域含有多种顺式作用元件(图 4),从图中可知,光反应、激

素、低温、厌氧诱导、玉米醇代谢等元件,尤其脱落酸、光反应、茉莉酸甲酯相对比例较大。其中,光反应元件除 *BoNHX5* 之外,其余均含有;脱落酸元件除 *BoNHX3*,其余都包含;低温元件只存在于 *BoNHX1*、*BoNHX2*、*BoNHX3*、*BoNHX4*、*BoNHX8*; 锌代谢元件只在 *BoNHX1*、*BoNHX2*、*BoNHX3*、*BoNHX10*; 水杨酸元件

存在于 *BoNHX1*、*BoNHX4*、*BoNHX7*、*BoNHX8*;除 *BoNHX3*、*BoNHX4*、*BoNHX10*,其余均含有茉莉酸甲酯元件;除 *BoNHX9* 外,均含有厌氧诱导元件;*BoNHX2* 单独包含一个同时响应脱水、低温、盐胁迫的元件,可能作为响应外界胁迫的重点研究对象。

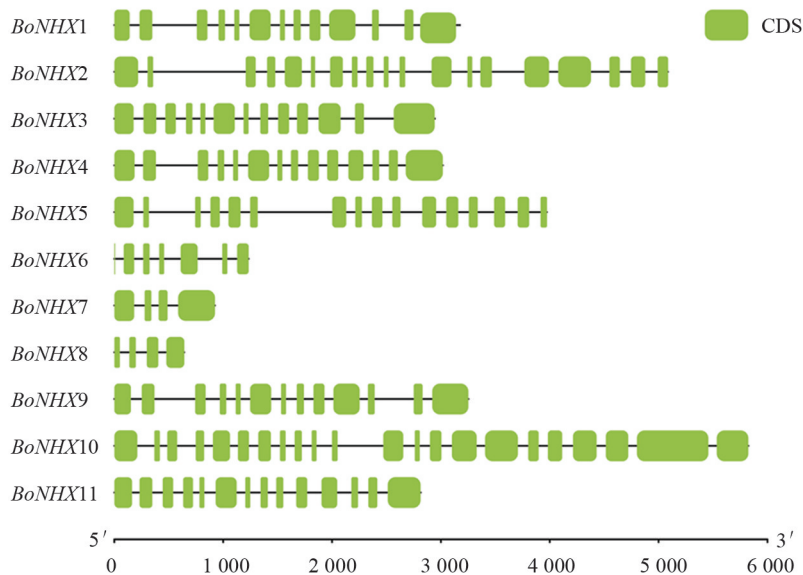


图3 甘蓝 *BoNHX* 基因家族基因结构分析

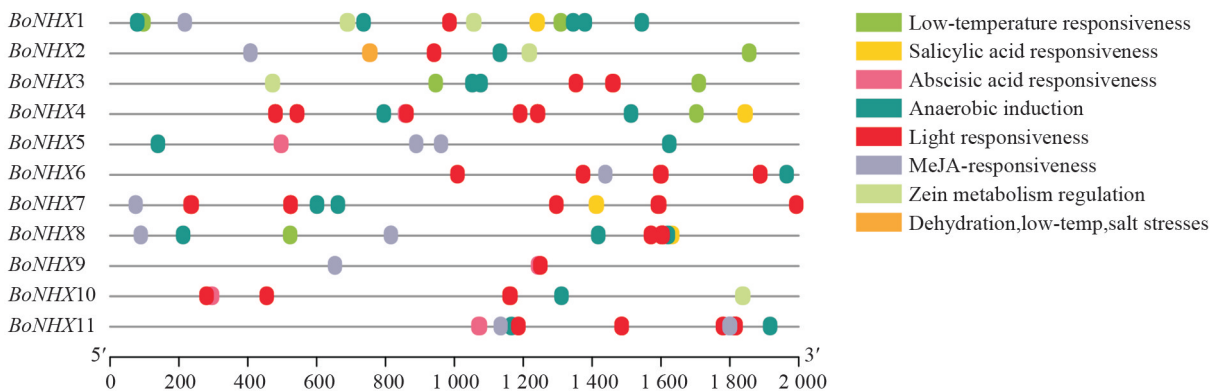
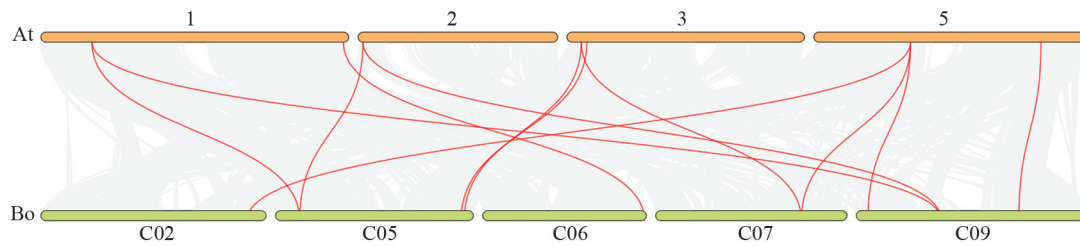


图4 甘蓝 *BoNHX* 基因家族成员顺式作用元件分析

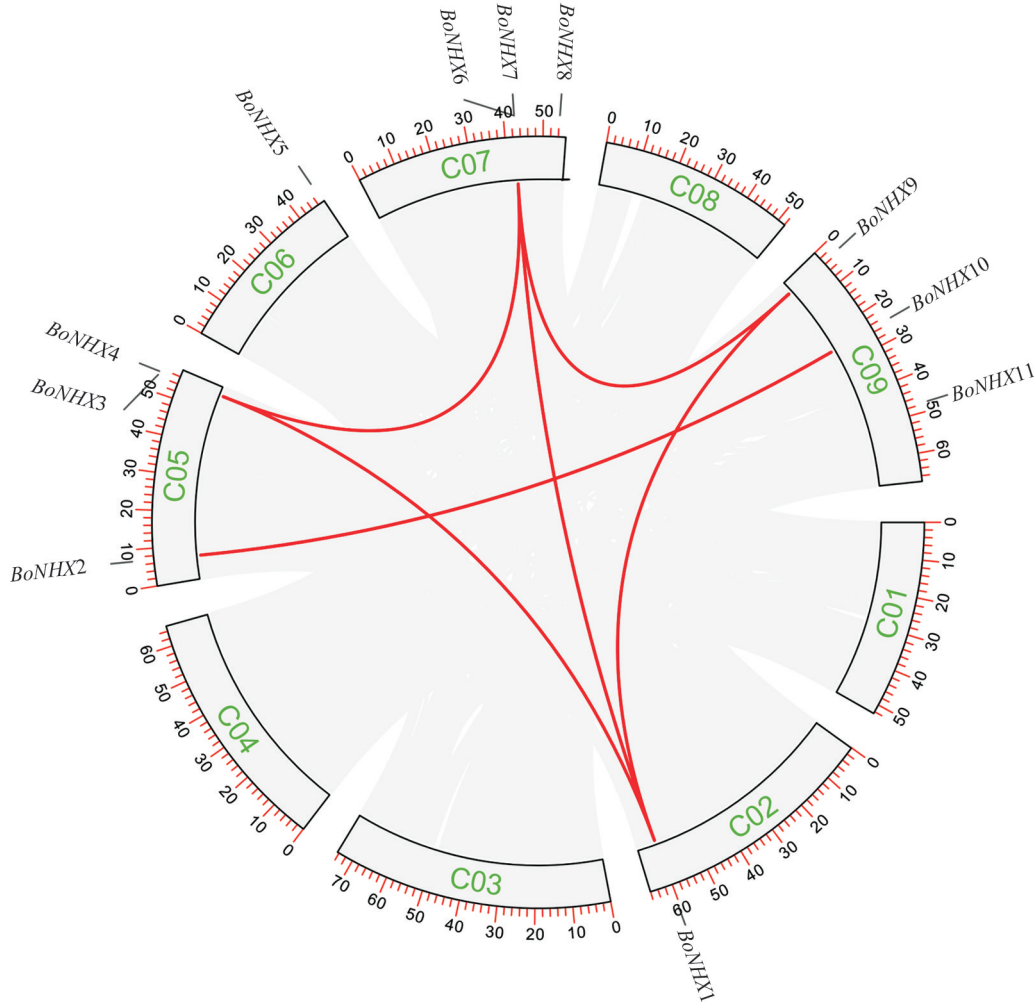
2.5 *NHX* 基因家族成员共线性分析

在拟南芥与甘蓝物种间共线性关系中(图5a),拟南芥与甘蓝 *NHX* 基因家族成员之间共产生 12 对共线性关系,主要集中在拟南芥第 1、2、3、5 染色体和甘蓝 C02、C05、C06、C07、C09 染色体。拟南芥 *AtNHX1* 与 *BoNHX2*、*BoNHX10* 产生共线性关系,*AtNHX3* 与 *BoNHX5* 产生共线性关系,*AtNHX4* 与 *BoNHX2*、*BoNHX10* 产生共线性关系,*AtNHX5* 与 *BoNHX4*、*BoNHX6* 存在共线性关系,*AtNHX6* 与

BoNHX3 存在共线性关系,*AtNHX7* 与 *BoNHX1*、*BoNHX6*、*BoNHX9* 存在共线性关系,*AtNHX8* 与 *BoNHX11* 存在共线性关系。在甘蓝物种内共线性关系中(图5b),共有 6 对共线性关系,其中 *BoNHX1* 与 *BoNHX4*、*BoNHX6*、*BoNHX9* 产生 3 对共线性关系,*BoNHX2* 与 *BoNHX10* 产生 1 对共线性关系,*BoNHX4* 与 *BoNHX6* 产生共线性关系,*BoNHX6* 与 *BoNHX9* 产生共线性关系。



a. 甘蓝与拟南芥间NHX基因共线性分析



b. 甘蓝物种内共线性关系

图 5 NHX 基因家族成员共线性分析

3 讨论与结论

3.1 讨论

甘蓝在生长发育过程中,面对外界胁迫,尤其是盐胁迫条件下,NHX 蛋白通过 Na-H^+ Exchanger 将 Na^+ 排出体外或区隔在液泡中,以此来保障细胞内 Na^+ 浓度和维持正常生理状态^[2]。本研究针对甘蓝 *BoNHX* 基因研究较少的现状,利用生物信息学方法对甘蓝 *NHX* 基因家族进行分析,结果表明与同为十字花科芸薹属作物油菜^[14]与白菜^[13]的相关结果一致,所有 *NHX* 基因家族被系统进化为 3 类。*NHX* 基因被研究

证明是植物、微生物(拟南芥、水稻、玉米、浮萍、绿豆、红薯、烟草、酵母等)耐盐的重要基因^[16-44]。*AtNHX1* 与 *BoNHX2* 被系统进化树聚类到 C 亚家族,且在物种间共线性关系中,*AtNHX1* 与 *BoNHX2*、*BoNHX10* 存在共线性关系,说明其同源性较高。因而,*BoNHX2*、*BoNHX10* 可以作为耐盐功能基因,通过分子标记辅助选择等手段,在现有甘蓝种质资源中设计分子标记引物,筛选出 *BoNHX2*、*BoNHX10* 表达量显著并能作为育种桥梁的中间材料,为西藏的甘蓝耐盐育种提供一种思路。

3.2 结论

本研究对 *BoNHX* 基因家族成员进行研究, 鉴定并分析出 11 个 *BoNHX* 基因家族成员编码氨基酸 127~1 166 个, 在拟南芥与甘蓝 *NHX* 家族成员构建的系统进化树中, 所有基因家族成员被分为 A/B/C3 个亚家族, 每个亚家族成员在 3~12 个不等。对家族成员进行顺式作用元件进行预测, 主要集中在光反应、激素响应、低温应答等过程, *NHX* 基因家族成员在上述生理过程中可能发挥重要作用。在拟南芥与甘蓝物种间共线性分析中, 两者之间存在 12 对共线性关系; 在甘蓝物种内共线性分析中, 有 6 对共线性关系, 同时 *BoNHX2*、*BoNHX10* 可作为耐盐育种潜在基因进行深入研究。

参考文献:

- [1] 旷碧峰, 季家磊, 蒋可, 等. 甘蓝病虫害综合防治技术[J]. 上海蔬菜, 2024(4): 42-43.
- [2] BASSIL E, BLUMWALD E. The ins and outs of intracellular ion homeostasis: *NHX*-type cation/H(+) transporters[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 22: 1-6.
- [3] GAXIOLA R A, RAO R, SHERMAN A, et al. The arabidopsis thaliana proton transporters, *AtNhx1* and *Avp1*, can function in cation detoxification in yeast[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(4): 1480-1485.
- [4] 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 Cell Physiol*, 2004, 45(2): 146-159.
- [5] 方义生, 曹东, 杨红丽, 等. 大豆耐盐相关基因研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2020, 42(4): 512-526.
- [6] 卢世雄, 许春苗, 何红红, 等. 葡萄 *NHX* 基因家族的鉴定和表达分析[J]. 果树学报, 2019, 36(3): 266-276.
- [7] 罗建, 许春苗, 张国斌, 等. 辣椒 *NHX* 基因家族的鉴定和表达分析[J]. 华北农学报, 2021, 36(3): 15-24.
- [8] 岳杨, 张德健, 王鹏, 等. 柑橘 *NHX* 基因的鉴定及盐胁迫下表达分析[J]. 江苏农业科学, 2025, 53(4): 161-168.
- [9] 朱红梅, 王新亮. 苹果 *NHX* 基因家族生物信息学及功能分析[J]. 西南农业学报, 2024, 37(12): 2582-2591.
- [10] 黄强, 姜伟业, 舒婷. 马铃薯 *NHX* 基因家族的鉴定与表达模式分析[J]. 江苏农业科学, 2024, 52(15): 44-52.
- [11] 杨仕梅, 谢恩俊, 罗春芳, 等. 木薯 *NHX* 基因家族鉴定及特征分析[J]. 贵州农业科学, 2024, 52(8): 19-26.
- [12] 尹军良, 李婧怡, 韩硕, 等. 生姜 *NHX* 基因家族成员鉴定及其在硅缓解盐胁迫中的表达特征[J]. 中国农业科学, 2024, 57(19): 3848-3869.
- [13] 王雪花, 韩佳, 马济中, 等. 大白菜 *NHX* 基因家族的鉴定与表达分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 552-565.
- [14] 安蓉, 李永红, 张振兰, 等. 甘蓝型油菜 *NHX* 基因家族鉴定及其在盐胁迫下的表达分析[J]. 福建农业学报, 2024, 39(6): 643-651.
- [15] CHEN C, WU Y, LI J, et al. TBtools-II: A "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining[J]. *Mol Plant*, 2023, 16(11): 1733-1742.
- [16] SHEN C, YUAN J, LI X, et al. Genome-wide identification of *NHX* (Na(+)/H(+)) antiporter gene family in *Cucurbita* L. and functional analysis of *CmoNHX1* under salt stress [J]. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1136810.
- [17] TEAKLE N L, AMTMANN A, REAL D, et al. Lotus tenuis tolerates combined salinity and waterlogging: maintaining O₂ transport to roots and expression of an *NHX1*-like gene contribute to regulation of Na⁺ transport[J]. *Physiol Plant*, 2010, 139(4): 358-374.
- [18] BAOXIONG W, BO X, YAN L, et al. A novel mechanisms of the signaling cascade associated with the *SAPK10*-*bZIP20*-*NHX1* synergistic interaction to enhance tolerance of plant to abiotic stress in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Sci*, 2022, 323: 111393.
- [19] KUMAR S, KALITA A, SRIVASTAVA R, et al. Co-expression of arabidopsis *NHX1* and *bar* improves the tolerance to salinity, oxidative stress, and herbicide in transgenic mungbean[J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1896.
- [20] KARIM M A, BRETT C L. The Na(+)(K(+))/H(+) exchanger *Nhx1* controls multivesicular body-vacuolar lysosome fusion [J]. *Mol Biol Cell*, 2018, 29(3): 317-325.
- [21] MOOSAVI S N V, SAADATMAND S, JAMEI R, et al. Chitosan nanoparticles (CSNPs) conferred salinity tolerance in maize by upregulating E3 ubiquitin-protein ligase, *P5CS1*, *HKT1*, *NHX1*, and *PMP3* genes[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2024, 31(51): 61210-61219.
- [22] SWLLAMUTHU G, JEGADEESON V, SAJEEVAN R S, et al. Distinct evolutionary origins of intron retention splicing events in *NHX1* antiporter transcripts relate to sequence specific distinctions in *oryza* species [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 267.
- [23] MUKHERJEE S, KALLAY L, BRETT C L, et al. Mutational analysis of the intramembranous H10 loop of yeast *Nhx1* reveals a critical role in ion homeostasis and vesicle trafficking [J]. *Biochem J*, 2006, 398(1): 97-105.
- [24] BRETT C L, TUKAYE D N, MUKHERJEE S, et al. The yeast endosomal Na⁺ K⁺/H⁺ exchanger *Nhx1* regulates cellular pH to control vesicle trafficking[J].

- Mol Biol Cell, 2005, 16(3):1396-1405.
- [25] REN Q, LI N, LIU R, et al. Nitric oxide (NO) involved in Cd tolerance in NHX1 transgenic duckweed during Cd stress[J]. Plant Signal Behav, 2022, 17(1): 2065114.
- [26] MORGAN S H, KADER M A, LINDBERG S. Cytosolic sodium influx in mesophyll protoplasts of arabidopsis thaliana, wt, sos1:1 and nhx1 differs and induces different calcium changes[J]. Plants (Basel), 2022, 11(24).
- [27] SOLIS C A, YONG M, ZHOU M, et al. Evolutionary significance of NHX family and NHX1 in salinity stress adaptation in the genus oryza[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(4):2092.
- [28] YANG L, WEI Y, LI N, et al. Declined cadmium accumulation in Na(+)/H(+) antiporter (NHX1) transgenic duckweed under cadmium stress[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 182:109397.
- [29] GOUIAA S, KHOUDI H. Expression of V-PPase proton pump, singly or in combination with a NHX1 transporter, in transgenic tobacco improves copper tolerance and accumulation[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2019, 26(36):37037-37045.
- [30] DARLEY C P, VAN WUYTSWINKEL O C, VAN DER WOUDE K, et al. Arabidopsis thaliana and saccharomyces cerevisiae NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na⁺/H⁺ exchangers[J]. Biochem J, 2000, 351(1):241-249.
- [31] ZHANG Y, DENG G, FAN W, et al. NHX1 and eIF4A1-stacked transgenic sweetpotato shows enhanced tolerance to drought stress[J]. Plant Cell Rep, 2019, 38(11):1427-1438.
- [32] 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]. Plant Cell, 2012, 24(3):1127-1142.
- [33] BASSIL E, TAJIMA H, LIANG Y, 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(9):3482-3497.
- [34] WELLS K M, RAO R. The yeast Na⁺/H⁺ exchanger Nhx1 is an N-linked glycoprotein. Topological implications[J]. J Biol Chem, 2001, 276(5):3401-3407.
- [35] ROMBOLA-CALDENTEY B, MENDOZA I, QUINTERO F J, et al. Structure-guided identification of critical residues in the vacuolar cation/proton antiporter NHX1 from arabidopsis thaliana[J]. Plants (Basel), 2023, 12(15):2778.
- [36] RAO Y R, ANSARI M W, SAHOO R K, et al. Salicylic acid modulates ACS, NHX1, sos1 and HKT1;2 expression to regulate ethylene overproduction and Na(+) ions toxicity that leads to improved physiological status and enhanced salinity stress tolerance in tomato plants cv [J]. Pusa Ruby. Plant Signal Behav, 2021, 16(11):1950888.
- [37] NASS R, RAO R. The yeast endosomal Na⁺/H⁺ exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock[J]. Microbiology (Reading), 1999, 145(11):3221-3228.
- [38] ADABNEJAD H, KAVOUSI H R, HAMIDI H, et al. Assessment of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter (NHX1) transcriptional changes in *Leptochloa fusca* L. in response to salt and cadmium stresses[J]. Mol Biol Res Commun, 2015, 4(3):133-142.
- [39] KALLEY L M, BRETT C L, TUKAYE D N, et al. Endosomal Na⁺(K⁺)/H⁺ exchanger Nhx1/Vps44 functions independently and downstream of multivesicular body formation [J]. J Biol Chem, 2011, 286(51):44067-44077.
- [40] KINCLOVA-ZIMMERMANN O, FLEGELOVA H, SYCHROVA H. Rice Na⁺/H⁺-antiporter Nhx1 partially complements the alkali-metal-cation sensitivity of yeast strains lacking three sodium transporters[J]. Folia Microbiol (Praha), 2004, 49(5):519-525.
- [41] 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(4):425-431.
- [42] ZHU J, YING S, FENG M. The Na(+)/H(+) antiporter Nhx1 controls vacuolar fusion indispensable for life cycles in vitro and in vivo in a fungal insect pathogen[J]. Environ Microbiol, 2016, 18(11):3884-3895.
- [43] TIWARI V, PATEL M K, CHATURVEDI A K, et al. Cloning and functional characterization of the Na(+)/H(+) antiporter (NHX1) gene promoter from an extreme halophyte *Salicornia brachiata*[J]. Gene, 2019, 683:233-242.
- [44] ZHANG W, WANG P, BAO Z, et al. SOS1, HKT1;5, and NHX1 synergistically modulate Na(+) homeostasis in the halophytic grass *puccinellia tenuiflora*[J]. Front Plant Sci, 2017, 8:576.