

· 农业生物技术 ·

大白菜 *NHX* 基因家族的鉴定与表达分析

王雪花, 韩佳, 马济中, 杨曦婷, 满华丽, 乔亚丽, 高雪琴, 胡琳莉*

甘肃农业大学园艺学院, 甘肃 兰州 730070

王雪花, 韩佳, 马济中, 杨曦婷, 满华丽, 乔亚丽, 高雪琴, 胡琳莉. 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.

WANG Xuehua, HAN Jia, MA Jizhong, YANG Xiting, MAN Huali, QIAO Yali, GAO Xueqin, HU Linli. Identification and expression analysis of *NHX* gene family in Chinese cabbage[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 552-565.

摘 要: Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(Na^+/H^+ antiporter, *NHX*)基因家族在植物响应盐胁迫中发挥重要作用。本研究鉴定了大白菜 *NHX* 基因家族成员, 并分析了大白菜 *NHX* 基因(*Brassica rapa* ssp. *Pekinensis* *NHX*, *BrNHXS*)响应高温、低温、干旱和盐胁迫等非生物逆境的表达模式。结果表明, 在大白菜中共鉴定到 9 个 *NHX* 基因家族成员, 分布在大白菜的 6 条染色体上, 其氨基酸数目在 513–1 154 aa 之间, 相对分子量集中在 56 804.22–127 856.66 kDa, 等电点位于 5.35–7.68 之间。该基因家族成员主要存在于液泡中, 基因结构完整, 外显子的数目介于 11–22 之间。大白菜 *NHX* 基因家族编码的蛋白质二级结构都具有 α -螺旋、 β -转角和不规则卷曲结构, 其中 α -螺旋发生频率较高。实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 分析显示, 该基因家族成员在高温、低温、干旱和盐胁迫下均有不同程度地响应, 且在不同时间表达差异显著。以 *BrNHX02* 和 *BrNHX09* 对这 4 种胁迫的响应最为显著, 表达量在处理 72 h 时均显著上调, 可作为候选基因进一步验证其功能。

关键词: *NHX* 基因家族; 亚细胞定位; 荧光定量; 胁迫; 大白菜

资助项目: 甘肃农业大学省级大学生创新创业训练计划项目(S202010733085); 甘肃农业大学学生大学生创新创业计划(202012007); 甘肃省高等学校创新基金项目(2021A-058)

This work was supported by the Gansu Agricultural University Provincial College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (S202010733085), the Gansu Agricultural University Student innovation and Entrepreneurship Program (202012007), and the Higher Education Innovation Fund Project of Gansu Province (2021A-058).

*Corresponding author. E-mail: hull@gsau.edu.cn

Received: 2022-08-05; Accepted: 2022-11-01

Identification and expression analysis of *NHX* gene family in Chinese cabbage

WANG Xuehua, HAN Jia, MA Jizhong, YANG Xiting, MAN Huali, QIAO Yali, GAO Xueqin, HU Linli*

College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: Na^+/H^+ antiporter (*NHX*) gene subfamily plays an important role in plant response to salt stress. In this study, we identified the *NHX* gene family members of Chinese cabbage and analyzed the expression patterns of *BrNHXs* gene in response to abiotic stresses such as high temperature, low temperature, drought and salt stress. The results showed that there were 9 members of the *NHX* gene family in Chinese cabbage, which were distributed on 6 chromosomes respectively. The number of amino acids was 513–1 154 aa, the relative molecular weight was 56 804.22–127 856.66 kDa, the isoelectric point was 5.35–7.68. Members of *BrNHX* gene family mainly existed in vacuoles, the gene structure is complete, and the number of exons is 11–22. The secondary structures of the proteins encoded by the *NHX* gene family in Chinese cabbage had alpha helix, beta turn and random coil, and the alpha helix occurred more frequently. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis showed that the gene family members had different responses to high temperature, low temperature, drought and salt stress, and their expression levels differed significantly in different time periods. *BrNHX02* and *BrNHX09* had the most significant responses to these four stresses, and their expression levels were significantly up-regulated at 72 h after treatments, which could be used as candidate genes to further verify their functions.

Keywords: *NHX* gene family; subcellular localization; fluorescence quantitative; stress; Chinese cabbage

目前约有超过 400 个编码 Na^+/H^+ 反向运输载体(Na^+/H^+ hydrogen exchangers, NHEs)已经在类似于 GenBank 数据库中注册, 该 Na^+/H^+ 反向运输载体广泛存在于自然界的各种生物, 如原核生物霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酵母和各类植物等。其主要可分为以下 2 种, 定位于质膜上的一类和定位于胞质内膜系统(如内质网, 线粒体及液泡)的一类。*NHX* 基因属于后者, 现已被证实其编码具有 10–12 个跨膜结构的蛋白, 定位于植物液泡膜上, 其作用机理为依靠液泡膜质子泵

(TP-H^+ -ATPase 和 TP-H^+ -PPase)建立的膜内外质子浓度差提供能量来进行 Na^+ 与 H^+ 跨膜反向运输, 将 Na^+ 区隔化^[1]。

NHX 基因亚家族属于 *CPA1* 基因家族, 具有 Na^+/H^+ 交换(PF00999)蛋白结构域^[2], 广泛存在于多种物种中, 现已在至少 60 种物种发现了该基因家族蛋白。在葡萄(*Vitis vinifera* L.)中有 8 个 *NHX* 基因家族成员^[3]; 藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd.)基因组中存在 10 个 *CqNHX* 基因家族成员^[4]; 杜梨(*Pyrus betulifolia* Bunge)有 4 个基因属于 *NHX* 亚家族, 4 个基因属于 *CHX*

亚家族, 8 个基因属于 *KEA* 亚家族^[5]; 胡杨 (*Populus euphratica* Oliv.) 中存在 6 个 *NHX* 基因家族成员^[6]; 香蕉 (*Musa nana* Lour.) 中鉴定到 11 个 *MaNHXs* 基因家族成员^[7]。在 20 世纪 90 年代以来, 人们将单一的 Na^+/H^+ 反向转运蛋白基因转入植物中, 发现超量表达外源液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白基因能够显著提高受体植物的耐盐性^[8]。随后, 人们先后在拟南芥发现并克隆了 *NHX01* 基因家族的其他成员, 已发现拟南芥 *NHX01* 基因家族 6 个基因被标注为编码 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的功能成员^[9]。*NHX* 基因具有维持 Na^+ (K^+) 浓度、调节细胞内的 pH 值、控制细胞扩增、维持细胞膨压的功能, 是与植物抗旱耐盐性相关的关键因子^[10]。

在我国盐碱地总面积约 $0.33 \times 10^8 \text{ hm}^2$, 其中可耕地面积占 $666.7 \times 10^4 \text{ hm}^2$ 以上, 广泛分布于东北和华北重要农产区、生态脆弱的西北内陆地区以及经济繁荣的沿海地带。由于盐碱地盐浓度过高, 不能种植各类农作物而成为荒地, 培育耐盐农作物是开发这些盐碱荒地的有效途径。相对于粮食作物, 蔬菜的经济价值较高, 是开发盐碱地更有前景的农作物^[11], 而大白菜 (*Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*) 是人们餐桌上不可缺少的蔬菜之一, 也是我国种植面积较大的蔬菜作物之一^[12], 所以如何提高白菜抗盐性是一个很重要的问题。

目前, 关于大白菜基因家族功能的研究报道已经相对成熟, 有研究指出大白菜中 *GIDI* 基因家族^[13]和 *YUCCA* 基因家族^[14]与大白菜的生长发育有关; *BrROP* 基因家族^[15]对花粉管的萌发较敏感; *ENT* 基因家族^[16]具有控制核苷转运的功能; *BrLAC* 基因家族^[17]可以代替多酚氧化酶参与酶促褐变。但是对于大白菜 *NHX* 基因家族的研究报道相对较少。因此, 本研究利用生物信息学方法鉴定大白菜 *NHX* 基因家族成

员, 分析其理化性质、染色体定位、基因结构、蛋白结构及系统发育等信息, 并且用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 方法初步探究了 *BrNHXs* 基因响应非生物胁迫的表达模式, 筛选出候选基因进一步研究其功能, 为下一步利用该基因进行遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

本研究以娃娃菜为供试材料, 品种为“秋玉黄”。选择籽粒饱满、大小一致的娃娃菜种子, 温汤浸种后排列有序地播到滤纸上, 然后用 $30 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ 瓷盘子铺上 2 层湿润的滤纸, 滤纸下面垫一层湿润的毛巾, 再给其盖上一层喷过水的滤纸, 随后再覆盖一层湿润的毛巾, 这样保证种子在湿润的环境下发芽, 且发芽速度较快。放入培养箱黑暗催芽 48 h [培养温度: $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$]。待其长出 4–5 cm 的芽之后, 将其播到种植棉上进行水培 [培养温度: 白天 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ /夜晚 $18 ^\circ\text{C}$, 光周期 14 h/10 h 昼/夜, 光照强度: $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]。播种 23 d (三叶一心时) 将娃娃菜置于高温气候箱 ($32 ^\circ\text{C}/20 ^\circ\text{C}$)、低温气候箱 ($10 ^\circ\text{C}/5 ^\circ\text{C}$) 内进行高温低温处理, 不浇水进行干旱处理、用 2% NaCl 溶液浇灌进行盐胁迫处理, 在处理 0、6、12、24、48 和 72 h 时分别取幼苗的叶片, 立即用液氮冷冻并放在 $-80 ^\circ\text{C}$ 下保存。

利用植物 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa) 从叶片组织中提取总 RNA。利用 Prime ScriptRT 试剂盒 (TaKaRa) 从总 RNA 合成第一链 cDNA 片段。利用实时荧光定量 PCR 测定 *BrNHXs* 基因的相对表达水平。

1.2 大白菜 *NHX* 基因家族成员鉴定

从拟南芥数据库 (<https://www.arabidopsis>).

org/)中得到拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 *NHX* 基因登录号, 获取其氨基酸序列并保存下来。然后用拟南芥的氨基酸序列比对大白菜数据库(<http://brassicadb.cn/#/>), 获得相应的大白菜基因或蛋白, 从而获取大白菜(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)中 *NHX* 基因登录号, 并保存大白菜 *NHX* 基因的氨基酸序列。从已知文献中找到 *NHX* 基因的蛋白结构域为 Na^+/H^+ 交换 (PF00999)^[18], 将大白菜基因的氨基酸序列输入到筛选结构域网站 HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>)进行筛选, 筛选出含有此结构域的基因成员, 将大白菜 *NHX* 基因的登录号输入到 Ensembl Plant (<http://plants.ensembl.org/index.html>)在线网站中, 下载并保存基因的全长、编码序列(coding sequence, CDS)以及 cDNA 序列, 以供后续使用。

1.3 大白菜 *NHX* 基因家族理化性质

在大白菜数据库(<http://brassicadb.cn/>)中找到特有的 Search 工具选项, 检索到大白菜 *NHX* 基因家族的染色体位置、正反链和染色体具体起始位置, 再利用 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>)在线软件分析大白菜基因家族的理论等电点(isoelectric point)、相对分子量、亲水性(grand average of hydropathicity, GRAVY)和氨基酸数目。

1.4 大白菜 *NHX* 基因家族染色体定位和基因结构

在软件 TBtools^[19]中输入基因全长和染色体全长, 得到染色体定位图, 由基因在染色体上的位置顺序对大白菜 *NHX* 基因家族的基因成员进行命名。利用在线软件 GSDS2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>)进行基因结构分析。

1.5 大白菜 *NHX* 基因家族成员启动子顺式作用元件分析

采用 TBtools 分析软件, 从 CDS 中抽取

2 000 bp 的序列, 通过联机工具 PlantCARE 对其进行预测启动子顺式作用元件。在 TBtools 软件上将结果描绘出来, 得到基因家族成员启动子顺式作用元件分布图。

1.6 大白菜 *NHX* 基因家族二级结构和亚细胞定位预测

运用蛋白质结构预测软件 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)在线预测蛋白质二级结构功能; 利用 Plant-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)在线进行大白菜 *NHX* 基因家族亚细胞定位。

1.7 大白菜 *NHX* 基因进化分析和 motif

利用 MEGA-X 软件将拟南芥中 *NHX* 基因与大白菜 *NHX* 基因的氨基酸序列进行多序列比对^[20], 构建拟南芥和大白菜 *NHX* 基因家族系统发育树, 用 NJ 检索法进行自检(bootstrap), 以 1 000 作为重复设定默认值。利用 MEME (<http://meme-suite.org/>)在线程序检索大白菜 *NHX* 基因家族保守基序, 预测基序的数量设置为 10 个。

1.8 实时荧光定量 PCR

将 *BrNHXs* 基因的 CDS 序列输入生工生物工程(上海)股份有限公司(<https://www.sangon.com/>)主页, 进行在线引物设计(表 1), 合成引物序列。以 *BrActin* 基因作为内参。扩增体系含 2 μL cDNA, 上游引物 0.6 μL , 下游引物 0.6 μL , Rox 0.4 μL , SYBR GREEN 10 μL , 反应混合液 6.4 μL , ddH₂O 20 μL 。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 共 40 个循环, 每个处理进行 3 次生物学重复。*BrNHXs* 基因的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算^[21]。

1.9 数据分析与处理

实时荧光定量测得的 *BrNHXs* 基因的相对表达量数据采用 SPSS 软件(spss17.0, IBM)进行

方差分析,并运用 Duncan's 检验法进行显著性检验($P<0.05$),采用 Microsoft Excel 2010 软件进行处理和用 Origin9.0 绘图。

2 结果与分析

2.1 大白菜 *NHX* 基因家族理化性质分析

用拟南芥 *NHX* 基因的蛋白序列在大白菜数据库中进行 BLASTp 搜索,一共得到 9 个大白菜基因成员,将鉴定出的 *NHX* 家族基因分别命名为 *NHX01*–*NHX09*。由表 2 分析可知,在大白菜 *NHX* 基因家族中,*BrNHX05* 和 *BrNHX08* 编码的氨基酸数目较多,分别为 1 154 aa 和 1 139 aa;

相对分子量主要集中在 56 804.22–127 856.66 kDa,*BrNHX01* 相对分子量最小为 56 804.22 kDa;*NHX* 基因的亲水性均为正值,为疏水性蛋白,其中 *BrNHX09* 基因最不溶于水分子。等电点位于 5.35–7.68 之间,其中 *BrNHX03* 和 *BrNHX07* 为碱性蛋白,其余为酸性蛋白。

2.2 大白菜 *NHX* 基因家族染色体定位图

根据每条基因在对应染色体上的位置,得出染色体定位图,将大白菜 *NHX* 基因成员命名。从图 1 上看,9 个基因成员分别位于大白菜 10 条染色体中的第 2、5、6、7、9、10 号染色体上,*BrNHX02* 和 *BrNHX03* 在 5 号染色体

表 1 大白菜 *NHX* 基因家族表达分析的实时荧光定量引物

Table 1 qRT-PCR primers for expression analysis of Chinese cabbage *NHX* gene family

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>BrNHX01</i>	GCTTTGACCTCACCCACCTTAACC	ATCAGACCAGTCGCAACACCAAG
<i>BrNHX02</i>	CTGATGCGTGCGTCCGTGTC	ACAACAGTGATGGTGCTGGTGATC
<i>BrNHX03</i>	CTTGTATTCGAGAGGGCGTTGTG	GGTTAAGGTGGGTGAGGTCAAAGC
<i>BrNHX04</i>	AGAGCGGTTTCGAGACCTGTAGATG	GATCCGAGAACGATGCCGATGAC
<i>BrNHX05</i>	CGGCGACGGCGTTTCCTTAC	GCTTGCCACCGCTCCATCTTC
<i>BrNHX06</i>	TCGGGTTGATCGTTGGTGGTTTAG	ATGATGGGCGGAAGCAGAAACAG
<i>BrNHX07</i>	AGTGGAGATCCGTGAGTGACAGTC	ACAAGGGAAAGACGAATGCTGCTC
<i>BrNHX08</i>	TGGAGGAGGCGACAGGTTCTTC	ACGAGGAGAGCGACGGTGTAC
<i>BrNHX09</i>	CCAGGAATCGCTGACCGTAT	GTAGCGGTGGATGGTGTAACAGG
<i>Actin</i>	CTTTGCCGCTTGCTCTGATG	CTGTTGGAAAGTGCTGAGGGA

表 2 大白菜 *NHX* 基因家族理化性质

Table 2 The physical and chemical properties of *NHX* gene family in Chinese cabbage

Gene	Gene Accession number	Strand (+; -)	Chromosome location	Number of amino acid	Isoelectric point	Formula	Molecular weight	GRAVY
<i>BrNHX01</i>	Bra020599	+	23 747 985–23 751 127	513	6.60	C2614H4054N646O721S23	56 804.22	0.469
<i>BrNHX02</i>	Bra020755	+	23 983 891–23 986 949	540	6.15	C2754H4292N682O764S21	59 853.74	0.438
<i>BrNHX03</i>	Bra039469	+	24 456 485–24 459 528	546	7.07	C2784H4324N700O757S28	60 610.87	0.471
<i>BrNHX04</i>	Bra026197	–	5 341 891–5 346 226	743	6.42	C3777H5893N961O1054S25	82 430.64	0.294
<i>BrNHX05</i>	Bra003601	+	17 279 543–17 286 364	1 154	6.31	C5821H9142N1526O1650S30	127 865.66	0.132
<i>BrNHX06</i>	Bra035130	–	25 587 270–25 591 010	511	5.35	C2601H3964N654O738S22	56 909.35	0.297
<i>BrNHX07</i>	Bra036110	+	2 424 337–2 427 401	543	7.68	C2776H4317N689O755S24	60 193.42	0.498
<i>BrNHX08</i>	Bra017430	+	13 876 104–13 881 875	1 139	6.58	C5696H9013N1485O1650S33	125 756.16	0.112
<i>BrNHX09</i>	Bra002905	–	6 915 362–6 918 243	533	6.87	C2735H4265N663O749S16	58 931.90	0.537

上，距离相近；*BrNHX04* 和 *BrNHX07* 基因位于染色体末端；*BrNHX01*、*BrNHX04*、*BrNHX09* 分别独立位于第 2、6、10 号染色体上。

2.3 大白菜 *NHX* 基因家族基因结构分析

对 *NHX* 基因家族的 9 个成员进行基因结构分析，结果如图 2 所示，该基因家族中 *BrNHX01*、*BrNHX02*、*BrNHX03*、*BrNHX07*、*BrNHX09* 这几个基因长度差别不太大，主要集

中在 4 000–6 000 bp 左右；*BrNHX05* 基因最长，超过 7 000 bp，且内含子分布不均匀，由此可预测 *BrNHX05* 基因与其他基因在结构和功能方面差异较大；*BrNHX08* 基因相对较长，外显子数目最多，为 22 个；*BrNHX03*、*BrNHX07*、*BrNHX09* 基因都具有 13 个外显子，且结构相似，由此推测 *BrNHX03*、*BrNHX07*、*BrNHX09* 基因在功能上可能具有相似性。

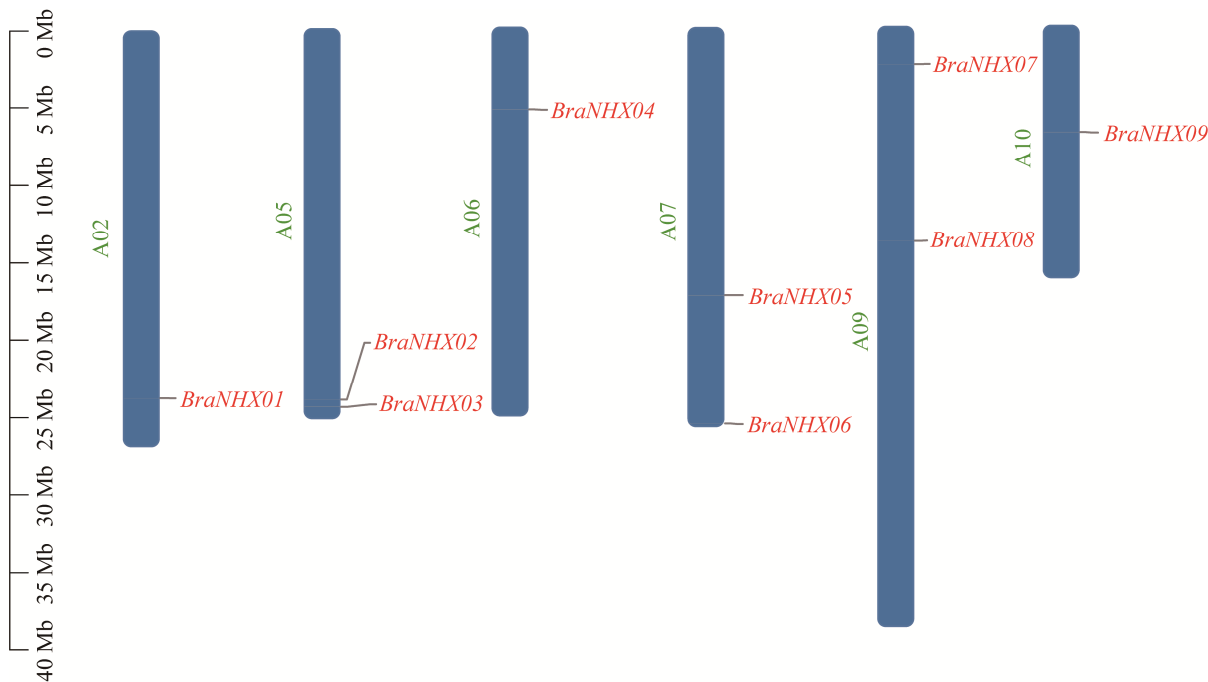


图 1 大白菜 *NHX* 基因家族染色体定位图
Figure 1 Chromosome mapping of *NHX* gene family in Chinese cabbage.

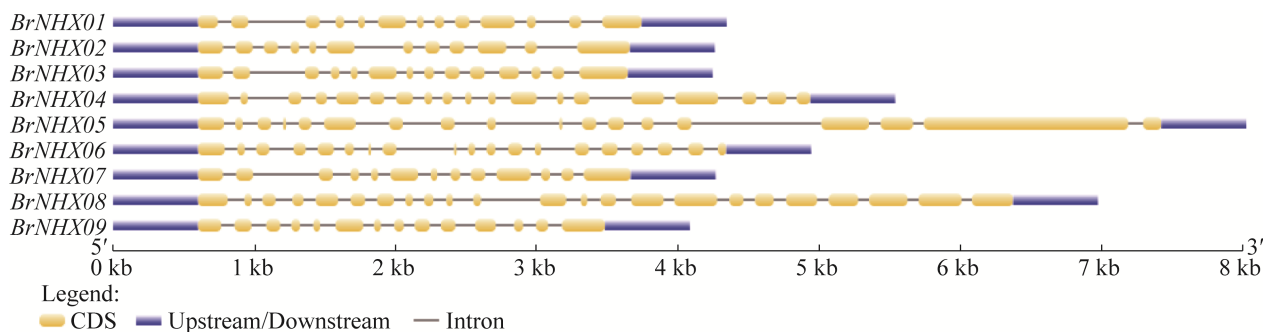


图 2 大白菜 *NHX* 基因家族基因结构分析
Figure 2 Gene structure analysis of *NHX* gene family in Chinese cabbage.

2.4 大白菜 *NHX* 基因家族成员启动子顺式作用元件分析

使用 TBtools 软件展示大白菜 *ECA* 基因启动子序列的相关顺式调控元件发现(图 3), 大白菜 *NHX* 启动子序列含有 18 个可能的顺式作用

元件(表 3)。大致分为植物激素应答元件, 如脱落酸应答元件(ABRE)、茉莉酸甲酯应答元件(TGACG)、乙烯应答元件(GARE)等。生物和非生物胁迫响应顺式作用元件, 如光响应元件(Box 4、GATA、G-Box、MRE、AE-box 等)、

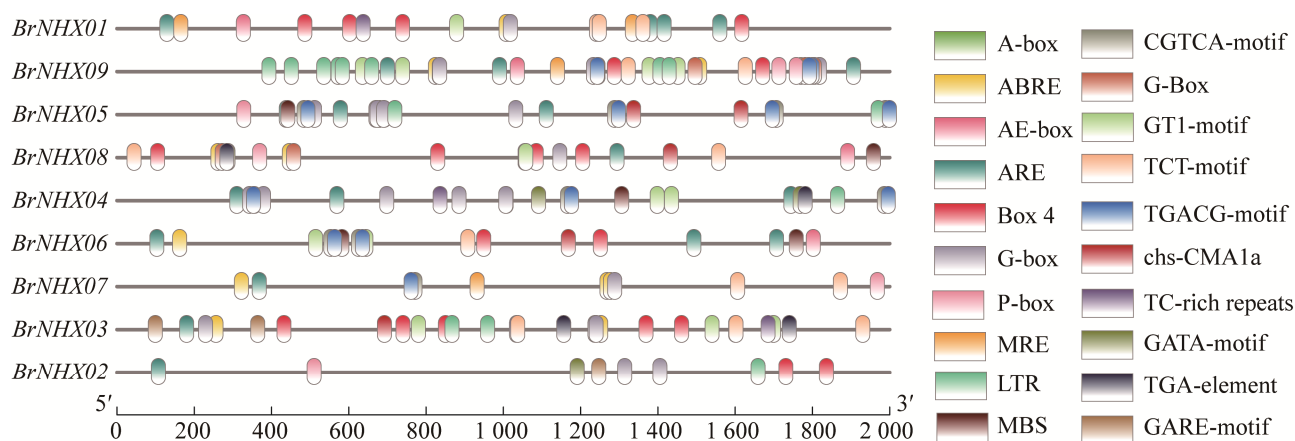


图 3 大白菜 *NHX* 基因家族启动子元件分析

Figure 3 Analysis of *NHX* gene family promoter elements in Chinese cabbage.

表 3 大白菜 *NHX* 基因家族成员启动子序列顺式作用元件功能

Table 3 Functions of *cis*-acting elements in the promoter sequences of *NHX* gene family members in Chinese cabbage

<i>cis</i> -element	Number of genes	Sequence of <i>cis</i> -element	Functions of <i>cis</i> -elements
G-box	35	CACGTG	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness
ABRE	31	ACGTG	<i>cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness
ARE	23	AAACCA	<i>cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction
Box 4	20	ATTAAT	Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
GT1-motif	15	GGTTAA	Light responsive element
LTR	14	CCGAAA	<i>cis</i> -acting element involved in low-temperature responsiveness
CGTCA-motif	13	CGTCA	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TCT-motif	13	TCTTAC	Part of a light responsive element
TGACG-motif	13	TGACG	<i>cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
P-box	7	CCTTTTG	Gibberellin-responsive element
AE-box	5	AGAAACTT	Part of a module for light response
MBS	5	CAACTG	MYB binding site involved in drought-inducibility
chs-CMA1a	5	TTACTTAA	Part of a light responsive element
TGA-element	4	AACGAC	Auxin-responsive element
GATA-motif	4	AAGGATAAGG	Part of a light responsive element
MRE	4	AACCTAA	MYB binding site involved in light responsiveness
TC-rich repeats	4	GTTTTCTTAC	<i>cis</i> -acting element involved in defense and stress responsiveness
GARE-motif	3	TCTGTTG	Gibberellin-responsive element

冷胁迫应答元件(LTR)、干旱应答元件(MBS)、参与防御和应激反应元件(TC-rich repeats)等。在这些因素中,与光反应相关的顺式作用元件占据了全部预计的一半以上,这表明 *NHX* 和发育中的光敏反应有关。

2.5 大白菜 *NHX* 基因家族蛋白质二级结构预测和亚细胞定位

NHX 基因家族蛋白质二级结构预测和亚细胞定位分析结果表明(表 4),大白菜 *NHX* 基因家族编码的蛋白质二级结构都具有 α -螺旋、 β -转角和不规则卷曲结构, α -螺旋含量相对比例较高,范围在 41.94%–59.89%之间; β -转角含量比例相对较低为 3.38%–6.33%;不规则卷曲含量比例为 25.04%–36.40%。亚细胞定位预测发现,大白菜 *NHX* 基因家族基因主要位于液泡膜

上, *BrNHX04* 基因位于液泡膜和细胞膜上, *BrNHX08* 基因位于细胞膜上,除以上 2 个基因,剩余基因都位于细胞的液泡膜上,参与基因的表达。

2.6 大白菜 *NHX* 基因家族保守域结构特征分析

大白菜 *NHX* 基因家族保守域结构特征分析结果(图 4)表明, *BrNHX01*、*BrNHX02*、*BrNHX03* 和 *BrNHX07* 除了不含有 motif 10,其余结构域相似;*BrNHX05* 和 *BrNHX08* 结构域相似,都含有 motif 1、motif 9 和 motif 10, *BrNHX06* 和 *BrNHX09* 结构域相似,都含有 motif 1、motif 2 和 motif 9,说明这些结构域相似的基因成员在功能上与其他基因一样或协同控制基因表达。

表 4 大白菜 *NHX* 基因家族二级结构预测和亚细胞定位

Table 4 Secondary structure prediction and subcellular localization of *NHX* gene family in Chinese cabbage

Protein	Gene Accession No.	Alpha helix	Beta turn	Random coil	Subcellular localization
BrNHX01	Bra020599	44.25	3.7	32.94	Vacuole
BrNHX02	Bra020755	43.15	4.44	34.07	Vacuole
BrNHX03	Bra039469	41.94	4.03	35.16	Vacuole
BrNHX04	Bra026197	59.89	4.04	25.71	Vacuole cell membrane
BrNHX05	Bra003601	53.03	6.33	25.04	Vacuole
BrNHX06	Bra035130	44.23	3.91	36.40	Vacuole
BrNHX07	Bra036110	44.01	4.79	32.97	Vacuole
BrNHX08	Bra017430	48.29	4.13	32.57	Cell membrane
BrNHX09	Bra002905	48.78	3.38	30.96	Vacuole

表 5 大白菜 *NHX* 蛋白的保守基序序列分析预测

Table 5 Prediction of conserved motifs of Chinese cabbage *NHX* protein

Alt. name	E-value	Motifs	Site count	Width
Motif 1	1.90E-205	YMLAELFSLSGILTVFFCGIVMSHYTWHN	9	29
Motif 2	1.40E-201	VFSEDLFFIYLLPPIIFNAGFQVKKKQFFRNFTIMLFGAIGTLISTTVI	7	50
Motif 3	2.30E-189	DYLAIGAIFAATDSVCTLQVLNQDETPLLYSLVFGEGVVNDATSVVLFNA	5	50
Motif 4	8.80E-168	IDFKMQVVIWWAGLMRGAVSMALAYNKFTRSGHTDLRGNAIMITSTITVC	5	50
Motif 5	1.40E-149	NLFVALLCACIVJGHLLEENRWMNESITALLIGLATGVVILLISNGKSSH	5	50
Motif 6	8.70E-083	TTKHTFATLSFLAETFIFLYVGMDALDIDKWRVSVDSPGTS	5	41
Motif 7	5.90E-084	NHNVPRPDSJRGFLTRPTRTVHHYWRQFDDAFMRPVFGGRGFVPFVPGSP	4	50
Motif 8	1.50E-032	STLLGVATGLISAYVIKKLYFGRHSTDREVALMMLMAYLS	5	40
Motif 9	3.60E-026	GLLLLGRAAFVFPLSFLSNLSKTNPSEK	9	28
Motif 10	9.40E-017	QISPAIHDPQGQEQQAAGVGILLQIMMLVLSFVLGHVLRHRHKFYYPE	2	50

2.7 大白菜和拟南芥 *NHX* 基因家族系统进化树

为进一步了解大白菜 *NHX* 基因与其他物种的进化关系,本研究利用 MEGA-X 软件对拟南芥 *NHX* 基因和大白菜 *NHX* 基因构建系统发育树,如图 4 所示,基因家族可以被分为 3 个大亚族 Class I、Class II 和 Class III,亚族 Class I 中有 *BrNHX04* 和 *BrNHX08* 两个大白菜 *NHX* 基因,其中 *BrNHX04* 和 *AtNHX04* 亲缘关系较近, *BrNHX08* 与 *AtNHX07* 亲缘关系较近。

亚族 Class II 中有 *BrNHX01*、*BrNHX02*、*BrNHX03*、*BrNHX07* 和 *BrNHX09* 五个大白菜 *NHX* 基因,且 *BrNHX01* 和 *BrNHX07* 基因相似度较高,大白菜 *BrNHX02* 与 *AtNHX04* 亲缘关系较近, *BrNHX09* 与 *AtNHX03* 亲缘关系较近, *BrNHX03* 与 *AtNHX02* 亲缘关系较近。Class III 亚族中有 *BrNHX05* 和 *BrNHX06* 两个大白菜 *NHX* 基因,其中 *BrNHX05* 和 *BrNHX06* 的基因进化长度与其他基因存在一定差异。

总的来说,各亚族内的基因间同源性较高,各亚族内基因进化方向大致相似,进化过程大致稳定。

2.8 大白菜 *NHX* 基因家族表达模式分析

大白菜 *NHX* 基因家族成员不同胁迫处理下的时间表达模式如图 6 所示,从图中可以看出,在高温、低温、干旱以及盐 4 种胁迫下, *BrNHX01*、*BrNHX02*、*BrNHX03*、*BrNHX05*、*BrNHX06*、*BrNHX09* 基因的表达量均显著上调。 *BrNHX08* 基因除在高温 72 h 时显著上调,在其他各逆境胁迫下表达量均下调。其中在盐胁迫处理 12 h 时, *BrNHX02* 基因表达量显著上调;干旱处理 6 h 时, *BrNHX09* 基因表达量显著上调;在低温胁迫处理 72 h 时 *BrNHX02* 和 *BrNHX09* 基因表达量显著上调。在高温胁迫 72 h 时, *BrNHX01*、*BrNHX02* 和 *BrNHX09* 表达量均显著上调。说明 *BrNHXs* 基因家族成员对高温、低温、干旱、盐等非生物逆境有不同程度地响应,且响应时间有差异。

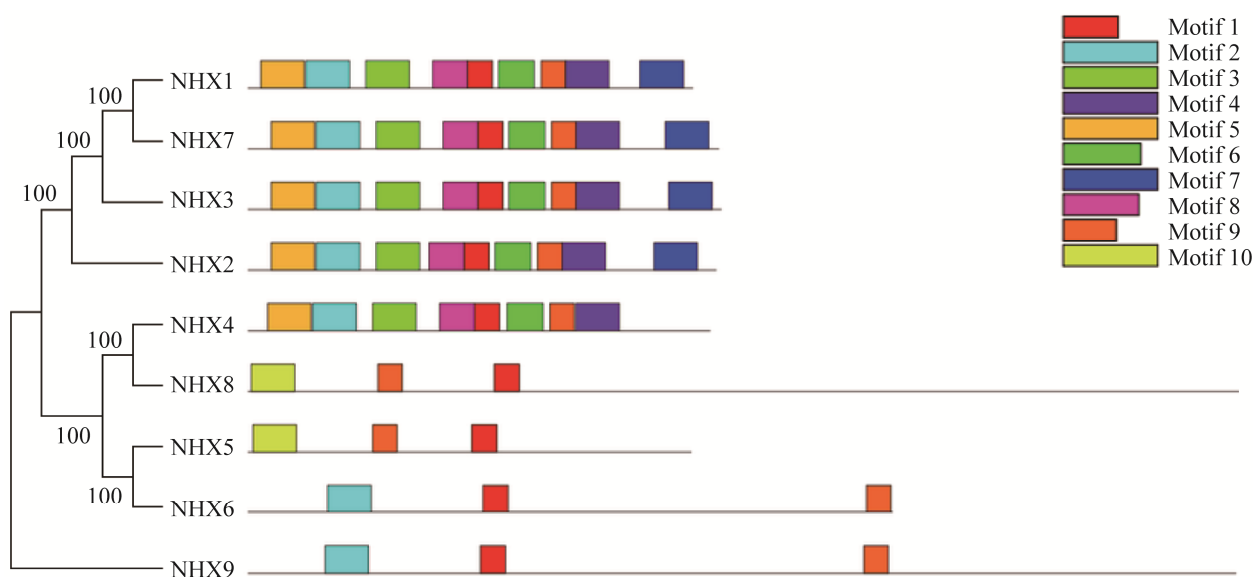


图 4 大白菜 *NHX* 基因家族氨基酸保守结构域分析

Figure 4 Analysis of conserved domain of *NHX* gene family in Chinese cabbage.

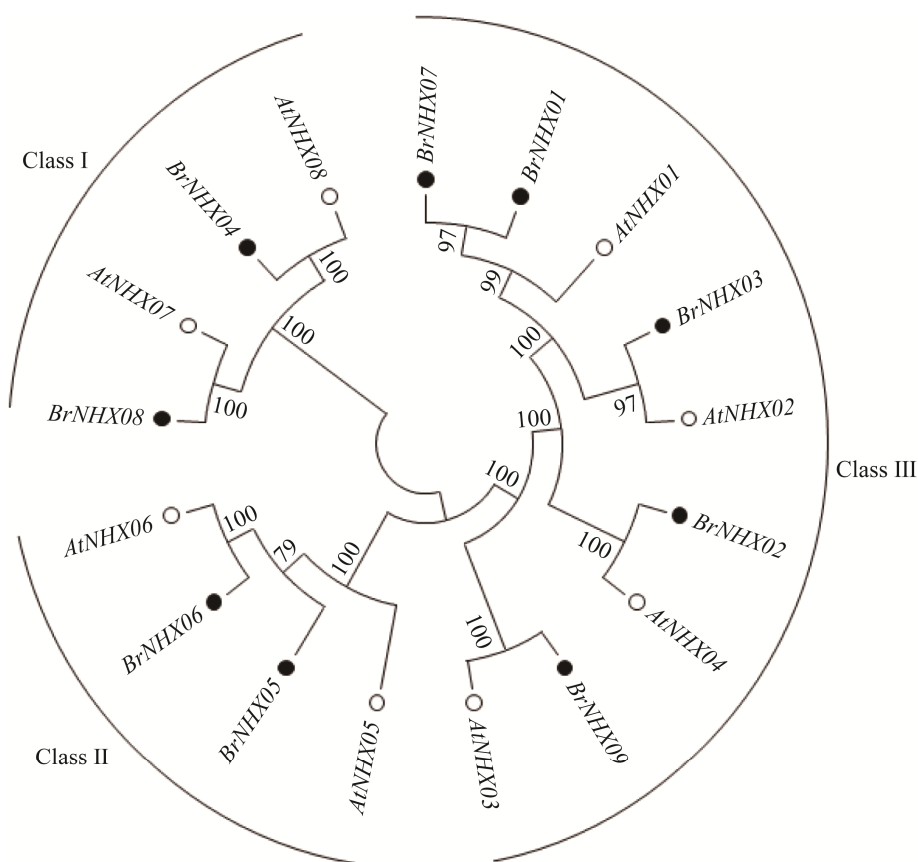


图 5 大白菜(●)与拟南芥(○) *NHX* 基因的系统进化树

Figure 5 Phylogenetic tree of *NHX* gene in Chinese cabbage (●) and *Arabidopsis* (○).

3 讨论与结论

为了寻找大白菜 *NHX* 基因家族的成员并探究其对不同非生物胁迫(高温、低温、干旱和盐)的响应模式,本研究采用生物信息学方法对大白菜 *NHX* 基因家族进行分析鉴定。在对比筛选其特有结构域后得到 9 个 *NHX* 基因家族成员,它们在染色体上所处的位置不同,可以将 9 个 *NHX* 基因成员分别命名为 *NHX01*–*NHX09*,在理化性质、基因结构等方面存在有一定的差异。植物的 *NHX* 基因家族亚细胞定位主要分为 2 类,一类位于液泡膜,另一类位于内膜系统上。在拟南芥 *AtNHX01*–*AtNHX04* 定位在液泡膜上,而 *AtNHX05* 和 *AtNHX06* 具有功能冗余,它们都定

位在高尔基体(Golgi apparatus, GA)、高尔基反面网状结构(trans Golgi network, TGN)、内质网(endoplasmic reticulum, ER)和液泡前体(prevacuolar compartments, PVCs), 参与调控耐盐胁迫、pH平衡和 K^+ 平衡等^[22]。本研究对拟南芥、大白菜 *NHX* 的系统发育树进化分析表明, 大白菜 *BrNHX02* 与 *AtNHX04* 亲缘关系较近, *BrNHX09* 与 *AtNHX03* 亲缘关系较近。拟南芥转基因株系中 *AtNHX04* 的过度表达比野生型植物具有更高的耐盐性^[23]。并且在之前研究中证明了甜菜(*Beta vulgaris* L.)中 *AtNHX03* 的过度表达能使转基因植物增强对高盐度的抵抗力^[24]。故可以推测大白菜 *BrNHX02* 和 *BrNHX09* 基因通过调解 K^+/H^+ 交换来负责耐盐性。

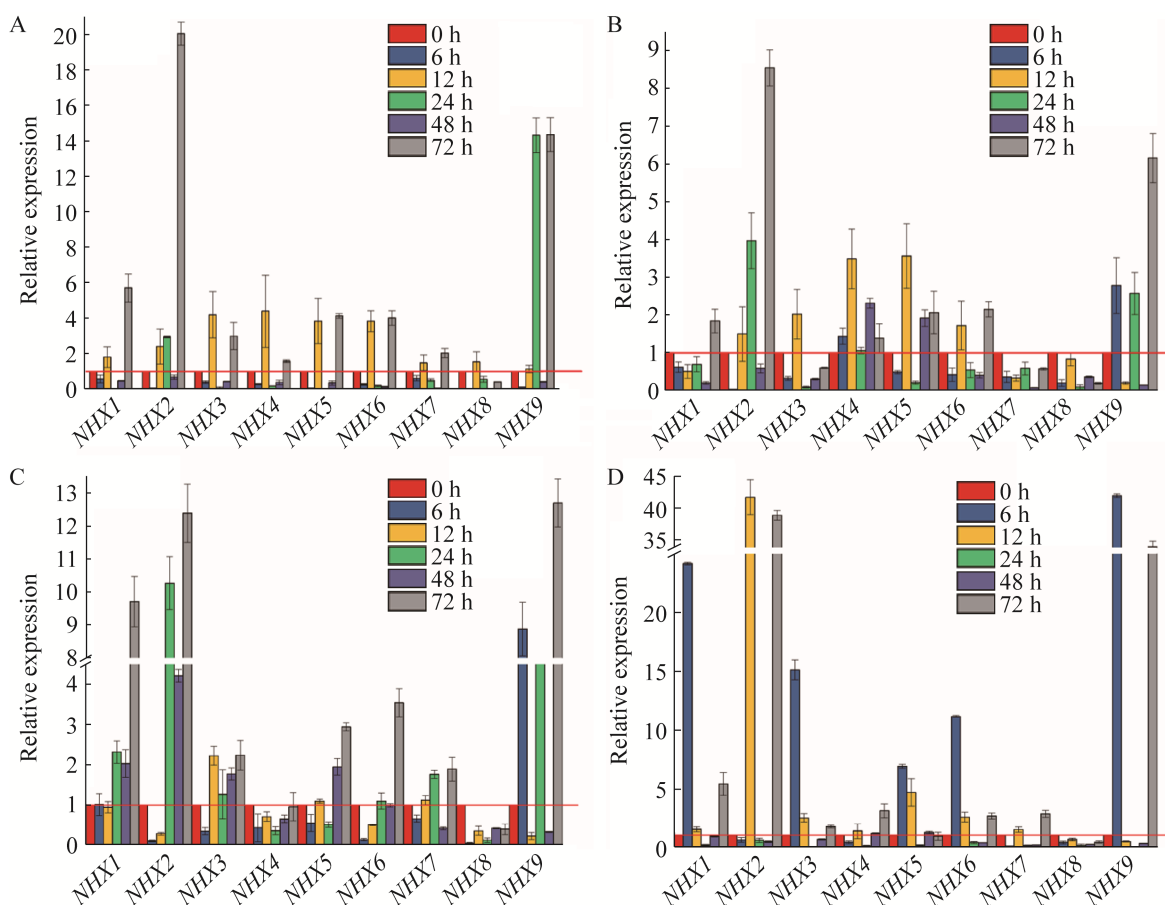


图6 大白菜 *NHX* 基因成员在不同胁迫下的时间表达模式

Figure 6 Time expression mode of *NHX* genes in Chinese cabbage under different abiotic stresses. A: Heat. B: Cold. C: Drought. D: NaCl.

在鉴定 *NHX* 基因家族成员的过程中, 结合蛋白序列多序列比对, 发现大白菜 *NHX* 基因成员与拟南芥 *NHX* 基因成员有很大的同源性, 在进化过程中其亲缘关系也保持稳定。前人也对 *NHX* 基因家族做了大量研究, 在葡萄、杜梨、茄子(*Solanum melongena* L.)^[25]、小麦(*Triticum aestivum* L.)^[26]中都有相关的报道。结合前人研究成果来看, 葡萄中 *NHX* 家族成员差异较大, 不仅在盐胁迫中有所表达, 还在调控种子成熟, 花卉颜色等方面起到一定作用。另外发现, 利用小麦中的 *NHX* 基因成员通过农杆菌介导法导入到茄子中, 显著提高了茄子的耐盐性, 与

未经过转化的茄子相比, 转基因茄子的相对含水量、叶绿素含量、脯氨酸、光合速率和蒸腾效率等生理指标也比较稳定。以上结果表明植物钠氢反向转运蛋白不仅能响应盐胁迫, 还参与了植物不同的生理途径。王彦芹^[27]发现 *KcNHX01* 基因具有广谱抗逆性功能。从荒漠植物花花柴[*Karelinia caspia* (Pall.) Less.]中克隆了液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因(*KcNHX01*), 并对其蛋白质结构进行了分析, 结果显示转基因植株对干旱、高盐及高温的耐受性都强于野生型。在高温条件下 *KcNHX01* 的超量表达增强了转基因植株过氧化物酶(peroxidase, POD)的

酶活、增加了可溶性糖的积累、降低了丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量,能增加花器官中 IAA 的含量。同时在高温条件下,转基因植株叶片的气孔开度明显增加,而且与 K^+ 和 Ca^{2+} 相关的转运体及离子通道蛋白基因的表达也明显上调,说明 *KcNHX01* 基因具有耐高温、耐旱、耐盐的功能。为了研究液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白基因 *TaNHX02* 在棉花(*Gossypium* spp.)耐盐耐旱中的作用,以晋棉 7 号为受体,利用农杆菌介导法将克隆自小麦的 *TaNHX02* 基因转入棉花愈伤组织,通过组织培养胚状体发生途径获得转基因再生植株,提高转基因棉花的耐盐抗旱能力^[28]。周梦岩等^[29]以耐盐植物互花米草(*Spartina alterniflora* Loisel)为材料,采用 PCR 技术克隆 *NHX2* 基因,并将其转入拟南芥鉴定出 *SaNHX02* 基因可能在盐胁迫调节机制中发挥调控作用,可作为改良农作物耐盐的重要候选基因。

本研究表明大白菜 9 个 *NHX* 基因的表达在叶片中均受到高温、低温、干旱、盐等非生物胁迫的诱导。高温(32 °C/20 °C)胁迫下 *BrNHX01*–*BrNHX09* 基因在 12 h 时均显著上调,说明高温可以促进基因的表达并且表达较快。在高温(32 °C/20 °C)和低温(10 °C/5 °C)处理下, *BrNHX02* 和 *BrNHX09* 基因在 0–24 h 下表达量逐渐升高,在 48 h 处理下骤然下降后在 72 h 表达量达到最高值,而干旱胁迫下则无明显变化。出现此类情况可能是因为 48 h 无光高温(20 °C)样品的相对表达量比 48 h 无光低温(5 °C)样品相对表达量低,所以低温无光照可能抑制基因的表达。在盐胁迫(2% NaCl)处理下, *BrNHX02* 在 12 h 表达量达到峰值, *BrNHX09* 在 6 h 时表达量达到峰值,由此推测 *BrNHX02* 和 *BrNHX09* 对盐胁迫表达最显著,响应较快。

由此可以看出,大白菜 *NHX* 基因家族成员

可以不同程度地响应植物的高温、低温、干旱和盐等非生物胁迫,且以 *BrNHX02* 和 *BrNHX09* 对这 4 种胁迫的响应最为显著,表达量在处理 72 h 时均显著上调,今后可以通过遗传转化的方法进一步验证大白菜 *NHX02* 和 *NHX09* 基因的具体功能。

REFERENCES

- [1] 张霞. 盐生植物 *NHX* 基因的克隆及花花柴 RNAi 载体构建与转化的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学硕士学位论文, 2007.
ZHANG X. Cloning of *NHXs* from halophytes and construction of RNAi vectors for *KcNHXs* and their transformation of *Karelinia caspica*[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang University, 2007 (in Chinese).
- [2] 马红萍, 包爱科. 液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白研究进展[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(14): 4-8.
MA HP, BAO AK. Research progress of Na^+/H^+ antiporter in vacuolar membranes[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(14): 4-8 (in Chinese).
- [3] 卢世雄, 许春苗, 何红红, 梁国平, 王萍, 陈佰鸿, 毛娟. 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.
LU SX, XU CM, HE HH, LIANG GP, WANG P, CHEN BH, MAO J. Identification and expression analysis of *NHX* genes family in grape[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(3): 266-276 (in Chinese).
- [4] 王宇, 贾冰晨, 吴筱林, 张东亮, 褚晶, 田晓芹, 陈世华, 郭善利. 藜麦 *CqNHX* 基因家族鉴定及表达模式分析[J]. 烟台大学学报: 自然科学与工程版, 2020, 33(3): 270-275.
WANG Y, JIA BC, WU XL, ZHANG DL, CHU J, TIAN XQ, CHEN SH, GUO SL. Genome-wide identification and expression pattern analysis of *NHX* gene family in *Chenopodium quinoa*[J]. Journal of Yantai University: Natural Science and Engineering Edition, 2020, 33(3): 270-275 (in Chinese).
- [5] 王影, 李慧, 蔺经, 杨青松, 张绍铃, 常有宏. 杜梨 *NHX* 基因家族的鉴定及其在非生物胁迫下的表达分析[J]. 果树学报, 2019, 36(7): 825-836.
WANG Y, LI H, LIN J, YANG QS, ZHANG SL, CHANG YH. Identification of *NHX* gene family in *Pyrus betulaefolia* and its expression under abiotic stress[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(7):

- 825-836 (in Chinese).
- [6] 叶楚玉. 植物钠氢逆转运体与 *CIPK* 基因家族的进化分析及胡杨 *NHX* 基因的功能研究[D]. 北京: 北京林业大学博士学位论文, 2013.
- YE CY. Evolutionary analyses of Na^+/H^+ antiporters and *CIPK* genes in plants and molecular characterization of *NHX* genes in poplars *euphratica*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing Forestry University, 2013 (in Chinese).
- [7] 徐亚, 滕梦鑫, 何岳东, 乔飞, 李新国. 香蕉 *NHX* 基因家族的鉴定及表达分析[J]. 植物生理学报, 2021, 57(3): 681-691.
- XU Y, TENG MX, HE YD, QIAO F, LI XG. Identification and expression analysis of *NHX* genes family in banana[J]. Plant Physiology Journal, 2021, 57(3): 681-691 (in Chinese).
- [8] 付宇, 戴绍军, 陈刚, 周卫东, 孙国荣. 植物 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的研究进展[J]. 生物技术通报, 2009(8): 1-5, 10.
- FU Y, DAI SJ, CHEN G, ZHOU WD, SUN GR. Research of Na^+/H^+ antiporter in plants[J]. Biotechnology Bulletin, 2009(8): 1-5, 10 (in Chinese).
- [9] 原江峰, 杨建雄, 俞嘉宁, 王丽娟, 张志琪. 利用 RNAi 技术抑制拟南芥 *NHX1* 基因家族的表达[J]. 西北植物学报, 2007, 27(9): 1735-1741.
- YUAN JF, YANG JX, YU JN, WANG LJ, ZHANG ZQ. Inhibition of *NHX1* gene family expression of *Arabidopsis thaliana* by RNA interference[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2007, 27(9): 1735-1741 (in Chinese).
- [10] 沙伟, 吴艳, 张梅娟, 马天意. 大白菜受环境胁迫影响的研究进展[J]. 分子植物育种, 2021, 19(6): 2037-2040.
- SHA W, WU Y, ZHANG MJ, MA TY. Research progress of Chinese cabbage affected by environmental stresses[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(6): 2037-2040 (in Chinese).
- [11] 杨发斌, 杨晓刚, 薛梦迪, 黄晓晨, 李博, 崔晓晓, 李帅, 邱念伟, 高建伟. 18 个大白菜品种耐盐性筛选[J]. 山东农业科学, 2017, 49(3): 31-36.
- YANG FB, YANG XG, XUE MD, HUANG XC, LI B, CUI XX, LI S, QIU NW, GAO JW. Screening of salt tolerance of eighteen Chinese cabbage varieties[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2017, 49(3): 31-36 (in Chinese).
- [12] 李然红, 金志民, 宗宪春, 刘铸, 刘丹. NaCl 单盐胁迫对大白菜种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 甘肃农业科技, 2015(12): 31-34.
- LI RH, JIN ZM, ZONG XC, LIU Z, LIU D. Impact of NaCl single salt stress on seed germination and seedling growth of Chinese cabbage[J]. Gansu Agricultural Science and Technology, 2015(12): 31-34 (in Chinese).
- [13] 宋晴晴, 张慧敏, 张烨, 张一卉, 李景娟, 李化银, 贺立龙, 王凤德, 高建伟. 大白菜 *GID1* 家族基因鉴定及表达模式分析[J]. 山东农业科学, 2020, 52(3): 1-7.
- SONG QQ, ZHANG HM, ZHANG Y, ZHANG YH, LI JJ, LI HY, HE LL, WANG FD, GAO JW. Identification and expression profile analysis of *GID1* family genes in Chinese cabbage[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2020, 52(3): 1-7 (in Chinese).
- [14] 綦洋, 王秉钧, 桑园园, 沈玲玲, 申颖, 曹雪, 刘振宁. 大白菜 *YUCCA* 基因家族的鉴定与生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(3): 49-54.
- QI Y, WANG JJ, SANG YY, SHEN LL, SHEN Y, CAO X, LIU ZN. Bioinformatics analysis of *YUCCA* gene family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(3): 49-54 (in Chinese).
- [15] 闫敏, 王晗, 刘少华, 顾小敏, 许晔. 大白菜 *BrROP* 基因家族的生物信息学分析[J]. 河南农业科学, 2020, 49(4): 93-100.
- YAN M, WANG H, LIU SH, GU XM, XU Y. Bioinformatics analysis of *BrROP* gene family in Chinese cabbage[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2020, 49(4): 93-100 (in Chinese).
- [16] 庞文玉, 王安, 杨宝谊, 刘振宁. 大白菜 *ENT* 基因家族的鉴定与生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(12): 52-57.
- PANG WY, WANG A, YANG BY, LIU ZN. Identification and bioinformatics analysis of *ENT* gene family in Chinese cabbage[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(12): 52-57 (in Chinese).
- [17] 王虹云, 李涛, 张丽莉, 姚建刚, 夏秀波, 曹守军, 周杨. 大白菜漆酶基因家族(*BrLAC*)全基因组鉴定与生物信息学[J]. 分子植物育种, 2018, 16(24): 7956-7964.
- WANG HY, LI T, ZHANG LL, YAO JG, XIA XB, CAO SJ, ZHOU Y. Genome-wide identification and bioinformatics of laccase gene (*BrLAC*) family in Chinese cabbage[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(24): 7956-7964 (in Chinese).
- [18] FINN RD, COGGILL P, EBERHARDT RY, EDDY SR, MISTRY J, MITCHELL AL, POTTER SC, PUNTA M, QURESHI M, SANGRADOR-VEGAS A, SALAZAR

- GA, TATE J, BATEMAN A. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D279-D285.
- [19] CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS HR, FRANK MH, HE YH, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [20] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [21] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] 王立光. 拟南芥内膜 Na^+ , K^+/H^+ 反向转运体研究进展[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(8): 1424-1432.
WANG LG. Progress in endosomal Na^+ , K^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(8): 1424-1432 (in Chinese).
- [23] WANG WQ, LI Y, ZHANG YY, YANG CP, ZHENG NY, XIE Q. Comparative expression analysis of three genes from the *Arabidopsis* vacuolar Na^+/H^+ antiporter (*AtNHX*) family in relation to abiotic stresses[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(13): 1754-1763.
- [24] LIU H, WANG QQ, YU MM, ZHANG YY, WU YB, ZHANG HX. Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene, *AtNHX3*, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2008, 31(9): 1325-1334.
- [25] YARRA R, KIRTI PB. Expressing class I wheat *NHX* (*TaNHX2*) gene in eggplant (*Solanum melongena* L.) improves plant performance under saline condition[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2019, 19(4): 541-554.
- [26] BRINI F, GAXIOLA RA, BERKOWITZ GA, MASMOUDI K. Cloning and characterization of a wheat vacuolar cation/proton antiporter and pyrophosphatase proton pump[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(4): 347-354.
- [27] 王彦芹. 荒漠植物 H^+ -PPase 基因的系统发育分析及 *SaVPI* 和 *KcNHX1* 基因的功能鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2013.
WANG YQ. Phylogenetic analysis of H^+ -PPase family from eremophytes and characterization of *SaVPI* and *KcNHX1*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [28] 张慧军, 张万科, 俞嘉宁, 孔祥强, 陈受宜, 王丹, 张国强, 董合忠. 过量表达 *TaNHX2* 基因提高转基因棉花的抗旱耐盐性[J]. *东北农业科学*, 2021, 46(1): 31-35, 71.
ZHANG HJ, ZHANG WK, YU JN, KONG XQ, CHEN SY, WANG D, ZHANG GQ, DONG HZ. The overexpression of *TaNHX2* gene can improve salt and drought tolerance of transgenic cotton[J]. *Journal of Northeast Agricultural Sciences*, 2021, 46(1): 31-35, 71 (in Chinese).
- [29] 周梦岩, 王涛涛, 陈冉红, 金松松, 李明, 马留银. 互花米草 *NHX2* 基因的克隆与功能鉴定[J]. *西北植物学报*, 2019, 39(12): 2093-2099.
ZHOU MY, WANG TT, CHEN RH, JIN SS, LI M, MA LY. Cloning and function identification of *NHX2* gene from *Spartina alterniflora*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, 39(12): 2093-2099 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)