果 树 学 报 2019,36(7):825-836
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20180347

杜梨*NHX*基因家族的鉴定及其在非生物胁迫下的表达分析

王 影[1,2,3],李 慧[2,3],蔺 经[2,3],杨青松[2,3],张绍铃[1*],常有宏[2,3*]

([1]南京农业大学园艺学院,南京 210095;[2]江苏省农业科学院果树研究所,南京 210014;
[3]江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,南京 210014)

摘 要:【目的】*NHX*基因亚家族为钠氢逆转运体,具有Na^+/H^+ exchange(PF00999)蛋白结构域,广泛存在于多种物种中,主要参与植物响应盐胁迫过程离子平衡的重建。分析鉴定杜梨中*NHX*基因及其耐盐机制有助于实际生产中更为有效地利用这一砧木资源。**【方法】**结合已公布的梨基因组数据以及拟南芥相关数据,通过生物信息学手段,鉴定杜梨*NHX*基因家族成员;通过MEGA7.0软件进行序列比对以及进化分析;通过在线工具Pfam、SMART以及GSDS进行基因结构分析;通过定量PCR技术分析非生物胁迫下基因在不同组织中的表达特征;应用火焰石墨炉原子吸收光谱仪测定NaCl胁迫下杜梨不同组织中Na^+与K^+含量。**【结果】**成功鉴定出16个候选基因,其中有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。预测的候选基因均含有Na^+/H^+ exchange功能域;NaCl胁迫下,预测的16个基因在叶片中的表达差异大,但在8 h以后均为负调控;在茎中,PEG6000处理下,*PbNHX1*的表达量显著增高,且高于同一时期NaCl胁迫下的表达水平,仅在48 h时低于同一时期NaCl胁迫下的表达水平;在根中,基因*PbNHX12*、*PbNHX13*、*PbNHX14*和*PbNHX15*在NaCl胁迫和PEG6000处理下在任何时间段均为负调控。**【结论】**在盐胁迫过程中,与拟南芥*NHX*基因进化关系最近的*PbNHX1*和*PbNHX11*呈现出负调控模式,与拟南芥*KEA*基因进化关系相近的*PbNHX10*和*PbNHX7*可能参与K^+的运输。

关键词:杜梨;*NHX*基因家族;非生物胁迫;实时定量PCR

中图分类号:S661.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2019)07-0825-12

Identification of *NHX* gene family in *Pyrus betulaefolia* and its expression under abiotic stress

WANG Ying[1,2,3], LI Hui[2,3], LIN Jing[2,3], YANG Qingsong[2,3], ZHANG Shaoling[1*], CHANG Youhong[2,3*]

(*[1]College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China; [2]Institute of Pomology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China; [3]Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, Jiangsu, China*)

Abstract:【Objective】*NHXs* belong to sodium hydrogen reverse transporter, which is widely distributed in many species, with Na^+/H^+ exchange (PF00999) protein domain. *NHXs* is mainly involved in the process of keeping ion balance in response to salt stress in plants. Identification and expression analysis under stress of *NHXs* in *Pyrus betulaefolia* would be useful to understand the reveal salt tolerant. Resistant mechanism of *Pyrus betulaefolia* to the salinity and be helpful to the better use of this rootstock resources.【Methods】Identification of *NHX* gene family members of *Pyrus betulaefolia* were carried out with bioinformatics, combining published pear genome and *Arabidopsis* related data. MEGA7.0 software was employed to sequence alignment and phylogenetic analysis; Pfam, SMART and GSDS software were used to analyze gene structure. The plantlets of *Pyru betulaefolia* was cultured in Hoagland inoculum and were treated with 250 mmol · L^{-1} NaCl and 10% PEG6000 for 0, 1, 8, 16, 24, 48, 72 and 84 h, respectively. Plant materials in Hoagland inoculum without NaCl and PEG were used as control.

收稿日期:2018-09-14 接受日期:2019-04-15

基金项目:国家自然科学基金(31372051,31772287);江苏省自然科学基金(BK20151361)

作者简介:王影,女,在读硕士研究生,研究方向为果树遗传育种与生物分子学。Tel:15261873082,E-mail:1759068060@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail:nnzsl@sina.com.cn;E-mail:cyh@jaas.ac.cn

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

The total RNA was extracted from roots, stems and leaves of the plantlets with different treatments, and the expression level of the gene family under abiotic stress was analyzed systematically. qRT-PCR was further used to analyse the expression of *PbNHXs* under PEG and NaCl stress. Na^+ content and K^+ content in different tissues of NaCl stress were determined by flame graphite furnace atomic absorption spectrometry.【Results】Sixteen candidate genes were successfully identified, of which four genes belonged to *NHX* gene family, four genes belonged to *CHX* gene family and eight genes belonged to *KEA* gene family. The longest length NHX protein (*PbNHX13*) encoded 857 amino acids, the shortest protein (*PbNHX12*) encoded 401proteins, theoretical PI range from 5.14 (*PbNHX10*) to 9.92 (*PbNHX12*). All proteins except *PbNHX7* and *PbNHX10*, contained 8-13 transmembrane structures. In the *PbNHX1-PbNHX16* group of genes, the number of introns spaned a little bit, *PbNHX12* had only one intron, and *PbNHX3* had 25 introns. The predicted candidate genes contained Na^+/H^+ exchange domain, *PbNHX7* and *PbNHX10* contain TrKA_N domain, also. Under NaCl stress, the predicted expression trend of 16 genes in leaves was fluctuating, but all of them were negatively regulated after 8 hour. Eleven genes (*PbNHX1-4*, *PbNHX6*, *PbNHX7*, *PbNHX11-15*) appeared to peak at 8 h and 48 h in the stem, the expression of *PbNHX1*, *2*, *3*, *6*, *11* was the highest at 48 h and the lowest at 1 h; similar expression patterns of *PbNHX2*, *PbNHX3*, *PbNHX4*, *PbNHX7*, *PbNHX10*, *PbNHX11*, *PbNHX14*, *PbNHX15* in leaves, reached the highest expression level at 1 h, decrease to minimum expression at 1-8 h. The expression patterns of *PbNHX5* and *PbNHX12* are very similar, the expression level decreased gradually at 0-16 h, it tended to level off after 16 hours. *PbNHX1-PbNHX16* in the roots, it was more vulnerable to the positive regulation of PEG6000 stress compared with the NaCl stress. The trend expression of *PbNHX7* and *PbNHX10* in stem was very similar, taking "M" shape, and a low peak at 16 hours. The expression of *PbNHX5*, *PbNHX8* and *PbNHX9* genes in NaCl treatment was higher than that in PEG treatment at the same time, only in 8 hours. Under the treatment of PEG6000, the expression of *PbNHX1* in stem increased significantly, and was higher than that under NaCl stress in the same period, and was lower than that under NaCl stress in the same period only at 48 h. In leaves, the expression patterns of *PbNHX2-5*, *PbNHX7*, *PbNHX9-11* and *PbNHX13-15* genes were very similar. There were two peaks of *PbNHX2* and *PbNHX13* at 8 hour and 72 hour. Two peaks of high expression of the other eight genes occurred at 1 h and 72 h. In roots, *PbNHX12*、*PbNHX13*、*PbNHX14* and *PbNHX15* were negatively regulated at any time after NaCl stress and PEG6000 treatment. Determination of Na^+ content and K^+ content in three tissues of *Pyrus betulaefolia* under Salt stress (0-84 h) showed that K^+ content in leaves increased slowly. K^+ content in stem showed a trend of "W" change and slight downward trend in the root at 24 h. Na^+ content in leaves had a inflection point at 16 hour, Na^+ content rised linearly after 16 hours. Na^+ content in stem was also increasing, but the increase was more moderate after 48 hours. Na^+ content in the root increased slowly with a wave-like trend, but it showed a downward trend at the 72-84 h.【Conclusion】*PbNHX1* and *PbNHX11*, which was closely related to the evolution of *NHX* gene in *Arabidopsis thaliana*, showed a negative regulatory pattern during salt stress. *PbNHX10* and *PbNHX7*, which were closely related to the evolution of *Arabidopsis KEA* gene, might be involved in K^+ transport during salt stressin *Pyrus betulaefolia*.

Key words: *Pyrus betulaefolia*；*NHX* gene family；Abiotic stress；Quantitative real-time PCR

盐渍化是抑制植物生长和降低植物产量的主要环境因子之一[1]，而气候原因、不当的生活耕作方式以及水质问题又导致盐渍化日益严重。至20世纪80年代全球盐碱地面积高达9.5×10^8 hm^2[2]，仅我国盐渍化土地总面积就已达1亿hm^2，且面积还在持续扩大，因此盐渍化已成为耕地流失的主要原因之一[3]。据报道，预计在未来的25年内因干旱、盐渍化等问题，全国将丢失30%的耕地，到2050年将失去50%的耕地[4]。梨树是世界上重要的果树之一，嫁接为梨树的主要生产方式，因此砧木的抗性与嫁接苗

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的适应能力紧密相连[5]。杜梨作为中国北方梨树栽培中普遍应用的一种砧木，具备耐寒、耐旱、耐涝、耐盐碱、耐贫瘠等综合抗性，是梨属植物重要的抗性种质资源。分析杜梨的耐盐机制有助于实际生产中更为有效地利用这一砧木资源。盐胁迫使得植物体内离子平衡和水分平衡遭到破坏，并由此产生一系列次生胁迫，从而破坏正常代谢，抑制植物生长[6]。盐胁迫条件下由于土壤环境中盐类离子等浓度过高，土壤溶液水势降低，这样便给植物体造成一种水逆境，从而造成细胞失水导致生理干旱[7]。此外，高浓度盐分对植物体最直接的影响就是改变了细胞膜透性。植物体大量转运蛋白都属于膜蛋白，膜透性的改变实际上就是破坏了转运蛋白体的正常运作，造成植物大量吸收环境中较多的盐类离子，从而影响其他离子（主要是Ca^{2+}、K^{+}）的吸收，造成营养失衡[8]。同时植物体内离子平衡被破坏，易产生单盐离子毒害[9]，也有研究认为过高浓度的Na^{+}影响植物体内部分植物激素的合成，从而抑制了植物的正常生长[10]。不仅如此，大量盐分离子的涌入破坏了体内很多酶的活性，从而影响正常的生理进程[11]。其中离子毒害是盐胁迫对植物体造成的最直接的伤害，也是盐胁迫所特有的。维持或重建离子平衡是植物耐盐的重要机制之一，在盐胁迫过程中，植物体内离子平衡被破坏，重建离子平衡，维持体内较高浓度的K^{+}和较低水平的Na^{+}浓度的能力与植物耐盐性水平呈正相关[12]，其关键在于降低细胞质内Na^{+}的浓度和促进K^{+}的吸收。在盐胁迫环境下降低细胞质内Na^{+}的浓度，一般通过离子转运体将Na^{+}转移或者区隔化于液泡中。*NHX*基因亚家族为钠氢逆转运体，属于*CPA1*基因家族，具有Na^{+}/H^{+} exchange（PF00999）蛋白结构域。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[13]。其主要参与植物响应盐胁迫过程中离子平衡的重建，负责Na^{+}的外排和区隔化，阻止Na^{+}的过量积累[14-18]。*NHX*基因亚家族成员虽然已在很多植物中被深入研究，但在梨中没有深入的研究，尤其是杜梨这一优良砧木中，并没有涉及到。随着梨基因组数据的公布，以及转录组技术的广泛应用，使通过杜梨转录组数据与梨基因组数据之间的比对来阐明杜梨*NHX*家族基因所介导的盐胁迫调控机制成为可能。本研究从课题组杜梨转录组数据中鉴定出16个与白梨*NHX*基因亚家族成员高度同源的基因，应用NaCl以及与其等渗的PEG6000对杜梨进行处理，利用定量PCR技术分析杜梨*NHX*基因亚家族成员在非生物胁迫条件下不同时空的表达模式以及相应的离子浓度，初步分析该家族成员的生物学功能，为改良作物的抗逆性以及对杜梨的充分开发利用提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　植物材料准备

杜梨组培苗，接种于培养瓶中无菌繁殖，基础培养基为1/2MS，添加0.25 $mg \cdot L^{-1}$吲哚乙酸（IBA，Sigma USA）和2%(*w*，后同)的蔗糖。培养环境条件为：光周期16/8 h昼夜，温度23~25 ℃，光照强度125 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$，50 d之后，挑选长势一致的植株作为试材。将长势一致的组培苗移至霍格兰培养液培养7 d，进行缓苗。

1.2　胁迫处理

由于盐胁迫对植物的影响有两个方面（渗透胁迫和离子毒害），因此，本研究中设置两种不同的处理，试图将渗透胁迫和离子毒害的效应加以分开。分别配置等渗的250 $mmol \cdot L^{-1}$ NaCl溶液和10% PEG6000溶液，溶剂为霍格兰培养液，分别对植物材料进行处理。用FM-8P自动冰点渗透剂对两种处理也进行检测以确保两种溶液渗透压相等，同时以不含NaCl和PEG6000的霍格兰培养液作为对照处理。分别在0、1、8、16、24、48、72、84 h后收获根部，茎段以及叶片，随机分为3份，每份为1个生物学重复，将其置于液氮中冷冻保存备用。

1.3　杜梨中*NHX*基因的鉴定及结构分析

以白梨中已鉴定的NHXs序列[19]为目的片段，去杜梨盐胁迫转录组数据库[20]（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA327474）中筛选候选的*NHX*基因，BLAST检索的阈值E-value=e^{-6}，经检测含有Na^{+}/H^{+} exchange保守结构域的候选基因确定为杜梨NHX基因家族。对含有Na^{+}/H^{+} exchange结构域的成员进行命名。通过Pfam和SMART在线工具http://web.expasy.org/protparam/对杜梨NHX蛋白结构序列进行分析，利用GSDS工具http://gsds.cbi.pku.edu.cn/对其基因结构进行分析。

1.4　系统发育树的构建

根据杜梨NHX蛋白所含的保守结构域，从TAIR（http://www.arabidopsis.org/）中调取拟南芥相

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

对应的序列。利用Clustal W将候选蛋白与拟南芥NHX基因家族蛋白进行多序列比对。在最大节约法(maximum parsimony，MP)、最大似然法(maximum likelihood，ML)和邻接法(Neighbor-joining，NJ)3种建树方法中，依据杜梨和拟南芥蛋白序列的特征，最终使用MEGA7.0(http://megasoftware.net)[21]软件，采用邻接法(Neighbor-Joining，NJ)生成系统进化树，校验参数Bootstrap重复1 000次。

1.5 杜梨总RNA的提取与引物设计

利用甲基溴化铵(CTAB)和氯化锂沉淀法[22-23]从冷冻样品中提取总RNA。采用cDNA合成试剂盒(TaKaRa)合成cDNA第一条链。用软件Beacon Designer7.0设计杜梨中*NHX*基因成员的实时荧光定量PCR特异性引物，由金唯智生物科技有限公司合成，引物序列及扩增产物信息见表1。

1.6 实时荧光定量PCR分析

表1 *PbNHXs*基因所用定量引物

Table 1 Quantitative primers of *PbNHXs*

基因 Gene	正向引物序列(5'—3') Forward primer sequences(5'—3')	反向引物序列(5'—3') Reverse primer sequences(5'—3')
PbNHX1	CACCACCGAATCAACATC	GTGCTGAAGAGAACAACAA
PbNHX2	TCACCAGTACCATCACAGTT	GGAAGCAAGATTCTCACAAGT
PbNHX3	GGCTCCTGTCAATACCAT	GTGTGTTTACCCGTCTTAC
PbNHX4	GCTTCTTCTCGGAACAAC	TTCATTATGGCAGGAGTCA
PbNHX5	GGTGAAGAATGAGAGGAAT	CTGATTGAATGGCTGAGA
PbNHX6	ATAGAGAGGATTGAGGACTTTG	TTCGCTACATCGGTCTTC
PbNHX7	AGTCAGAGCATACAGAAG	GTTTCGGAAGAGGTAGAT
PbNHX8	AGCATTCACTTCCATCTC	TTAACCCTCTTCTCCATTG
PbNHX9	GGAGTGATGTCTATGGCTAAG	TAAGTAACCAAGGAACACAAGTA
PbNHX10	GGTCAGAGAATACAGGAGAA	GTTGTTACGCAAGAGGTT
PbNHX11	TGATGATTCTTATGGCTTAT	GCAATGAATGACAATGTT
PbNHX12	CTGCTGCTGCTGGTTATATTC	CTTACACGCCATCGACAA
PbNHX13	GCAGAGTACATAGAGAAG	CTACGATTAACAGGTCAT
PbNHX14	TGGCACAGATAGGCGAAT	GTTCCAAGAAGCAGCAGAT
PbNHX15	GCCGTGCTTCTAATCTTC	GTAGTGACCAGACTGAGAG
PbNHX16	ACCAGCACCATCACAGTT	CAGGAAGCAAGATTCTCACAA

实时荧光定量试验进行前，进行PCR扩增产物的克隆测序以避免出现假阳性与保证扩增产物的特异性(表1)。qRT-PCR检测杜梨*NHX*基因在干旱、盐胁迫条件下的表达，仪器选用ABI7500，以ACTIN2/ACTIN7作为内参基因，反应体系(20 μL)为10 μL SYBR荧光染料、1.5 μL cDNA、0.2 μmol·L^{-1}引物。反应条件为95 ℃10 min；95 ℃15 s，58 ℃ 30 s，40个循环。实时荧光定量PCR数据分析采用$2^{-\Delta Ct}$法计算分析。每个组织样本进行3个平行样，内参和目的基因均做3次生物学重复。

1.7 离子浓度测定

配置250 mmol·L^{-1} NaCl溶液，溶剂为霍格兰培养液，对杜梨材料进行水培处理。分别在0、1、8、16、24、48、72、84 h后收获根部、茎段以及叶片。通过火焰石墨炉原子吸收光谱仪(ZEEnit 700P，Jena，Munich，Germany)分别测定叶片，茎段以及根部的K^+含量和Na^+含量。

1.8 数据统计与分析

采用SAS Version 9.0软件进行统计分析，采用Duncan检测进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 杜梨*NHX*基因成员的鉴定以及系统进化分析

利用生物信息学方法从杜梨盐胁迫转录组数据库[20]中鉴定得到16个*NHX*基因家族成员(表2)。利用在线工具ExPASy分析了这16个基因的蛋白质长度，等电点和分子质量等生化属性。其中蛋白长度最长的NHX蛋白(*PbNHX13*)编码857个氨基酸，最短的蛋白(*PbNHX12*)编码401个蛋白(表2)。其等电点范围从5.14(*PbNHX10*)到9.92(*PbNHX12*)(表2)。

2.2 杜梨*NHX*家族基因序列特征

通过GSDS软件http://gsds.cbi.pku.edu.cn/分析杜梨和白梨*NHXs*基因的内含子外显子结构(图1)，发现*PbNHX1-PbNHX16*这一组基因中，内含子个数跨度较大(如*PbNHX12*仅有1个内含子，而*PbNHX3*有25个内含子)；在白梨中*PbrNHXs*的内含子跨度也较大，但与杜梨中对应的*PbNHXs*所含有的内含

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　杜梨 *NHXs* 基因的相关信息

Table 2　Characteristics of *NHXs* from *PbNHXs*

基因 Gene	白梨同源基因 ID Homologous gene ID	CDS/bp	等电点 Theoretical PI	分子质量 Molecular mass/kDa	氨基酸 Amino acid/aa
PbNHX1	Pbr006552.1	1 659	5.67	61 841.83	564
PbNHX2	Pbr014804.1	1 656	7.28	60 457.50	551
PbNHX3	Pbr041608.1	2 514	6.60	90 541.14	837
PbNHX4	Pbr036088.1	2 400	6.63	86 677.85	799
PbNHX5	Pbr013103.1	2 538	7.58	93 401.19	845
PbNHX6	Pbr029536.1	1 215	9.26	42 917.26	404
PbNHX7	Pbr007039.1	2 298	5.15	82 825.66	765
PbNHX8	Pbr010960.1	2 460	6.79	90 036.47	819
PbNHX9	Pbr036420.2	1 743	5.49	62 202.91	580
PbNHX10	Pbr009904.1	2 301	5.14	82 910.06	766
PbNHX11	Pbr017120.1	1 659	5.65	60 595.39	552
PbNHX12	Pbr018594.1	1 206	9.92	42 450.17	401
PbNHX13	Pbr034908.1	2 574	8.40	92 972.44	857
PbNHX14	Pbr019828.1	1 767	5.48	62 992.05	588
PbNHX15	Pbr015588.2	1 674	5.53	60 260.68	557
PbNHX16	Pbr011197.1	1 494	8.39	54 948.75	497

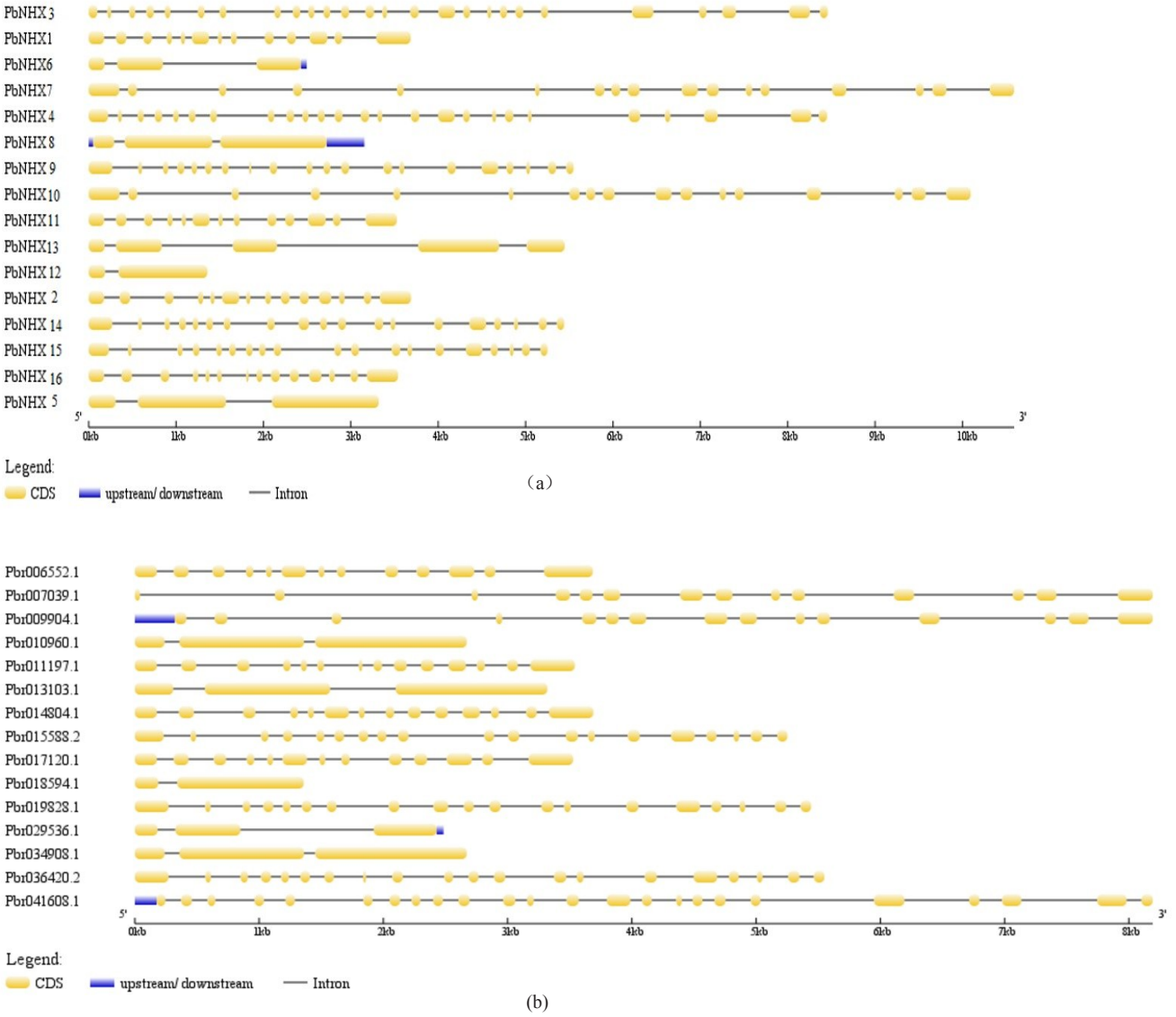

图 1　杜梨（a）和白梨（b）*NHXs* 的基因结构

Fig. 1　The gene structures of *PbNHXs*(a) and *PbrNHXs*(b)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

子个数不同。通过Pfam和SMART在线软件分析发现，杜梨 *PbNHX1*-*PbNHX16* 基因中都含有 Na^+/H^+ exchange 保守结构域，其中 *PbNHX7* 和 *PbNHX10* 还包含结构域 TrKA_N（图2）；除了 *PbNHX7* 和 *PbNHX10*，其他蛋白都含有8~13个跨膜结构（图3）。共搜集拟南芥中含有 Na^+/H^+ exchange 保守结构域的基

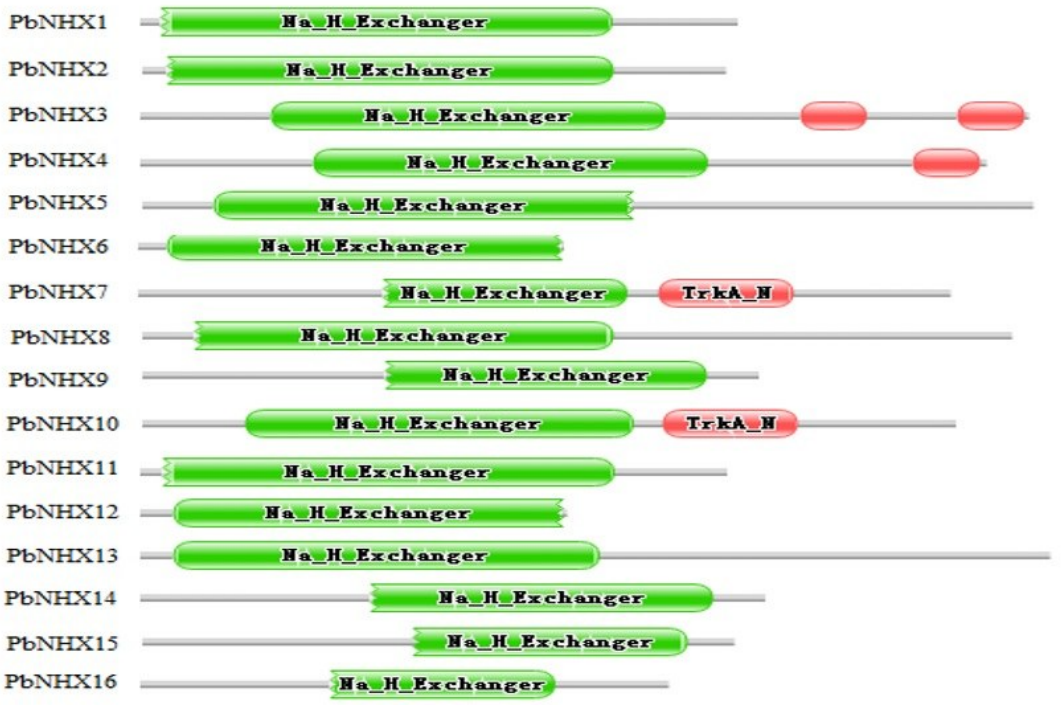

图 2 杜梨 *NHXs* 基因的结构域分析

Fig.2 Structure of the domain of *PbNHXs*

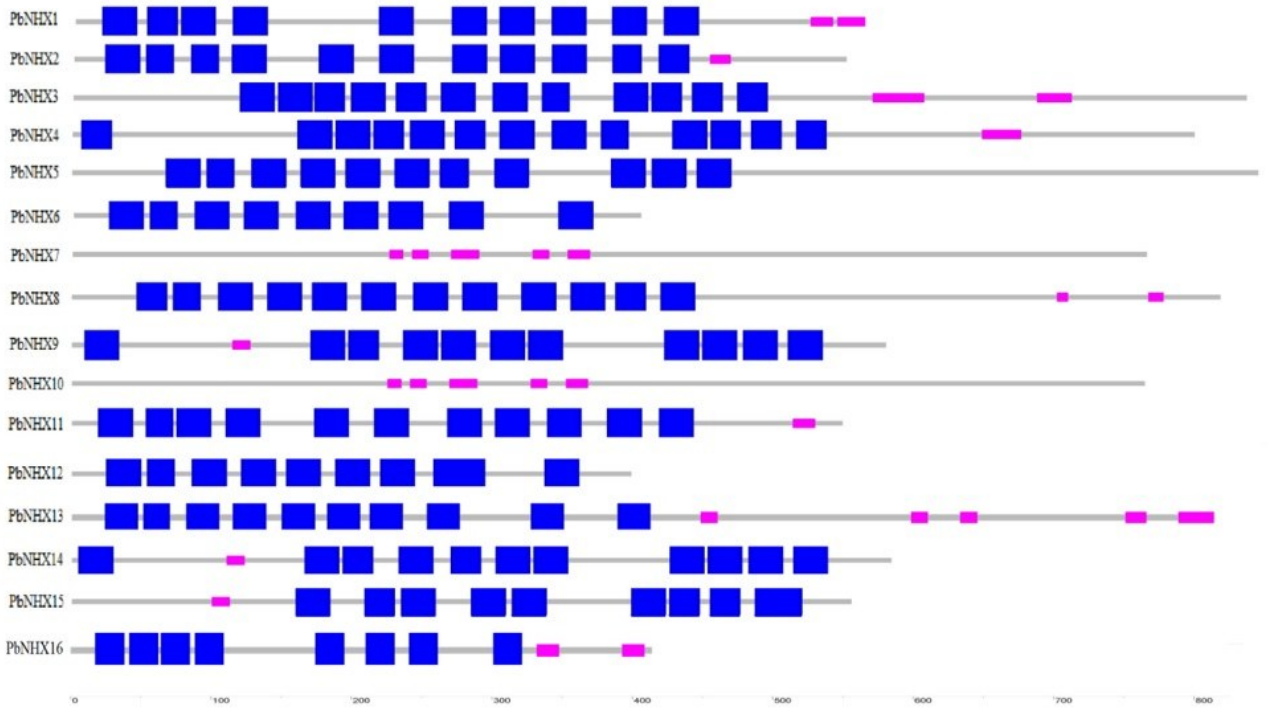

图 3 杜梨 *NHXs* 蛋白的跨膜结构分析

Fig. 3 Analysis of trans membrane structure of *PbNHXs* proteins

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

因31个，将拟南芥与杜梨共57个基因进行系统进化分析，结果显示（图4），这57个基因可以分为3类，将3类亚家族分别命名为class Ⅰ、class Ⅱ和class Ⅲ。其中class Ⅰ中含有28个*AtCHX*基因，4个杜梨*NHX*基因；class Ⅱ中含有8个*AtNHX*基因，4个杜梨*NHX*基因；class Ⅲ含有6个*AtKEA*基因，8个杜梨

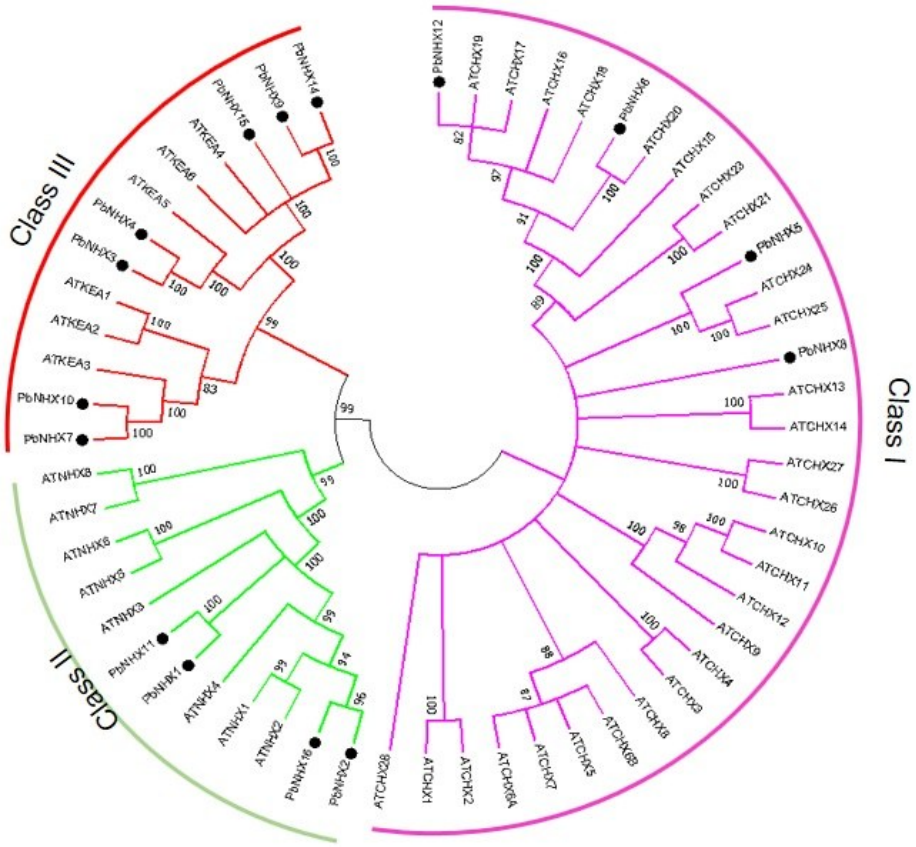

图4　拟南芥和杜梨的*NHXs*基因的系统进化分析

Fig. 4　Phylogenic analysis of *NHXs* genes from *Arabidopsis* and *pyrus*

*NHX*基因。

2.3　渗透胁迫下杜梨*NHXs*基因表达特性

通过分析NaCl和等渗的PEG6000处理后杜梨在不同组织、不同时间点的表达量，发现PEG6000条件下*PbNHX2*、*PbNHX12*、*PbNHX16*这3个基因在根部的表达模式极为相似，都是在24 h的时候达到一个最高点，而基因*PbNHX2-5*、*PbNHX7*、*PbNHX9-11*和*PbNHX13-15*这10个基因在叶片中的表达模式极为相似，均有2个峰值出现，其中基因*PbNHX2*和*PbNHX13*在8 h和72 h出现2次峰值。其他8个基因的2次高表达量峰值均出现在1 h和72 h。且基因*PbNHX3*、*PbNHX9*、*PbNHX13*和*PbNHX14*四个基因的最高表达峰值出现在1 h，而其他4个基因的最高表达峰值出现在72 h（图5）。

2.4　盐胁迫下杜梨*NHXs*基因表达特性

图6表明，NaCl处理后，*PbNHX1-PbNHX16*在根部中，相较于NaCl胁迫，更容易受到PEG6000胁迫的正向调控，只有在8 h的时候，*PbNHX5*、*PbNHX8*和*PbNHX9*三个基因在NaCl处理后的表达量高于同时期PEG处理后。在茎中，有11个基因（*PbNHX1-4*、*PbNHX6*、*PbNHX7*、*PbNHX11-15*）在8 h和48 h的时候出现峰值，其中*PbNHX1*、*2*、*3*、*6*、*11*在48 h的时候表达量最高，在1 h的时候均出现最低表达量。基因*PbNHX5*和基因*PbNHX12*的表达模式非常相似，在0 ~16 h阶段内表达量逐渐下降，16 h以后趋于平缓。基因*PbNHX7*和*PbNHX10*在茎中的表达量的趋势非常相似，呈“M”状，在16 h的时候均出现一个低峰值。*PbNHX2*、*PbNHX3*、*PbNHX4*、*PbNHX7*、*PbNHX10*、*PbNHX11*、*PbNHX14*、*PbNHX15*在叶片中的表达模式相似，均在1 h时达到最高表达量，随后在1~8 h阶段下降至最低表达量。而基因*PbNHX8*、*PbNHX9*在0 ~1 h的阶段叶片中的表达量

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

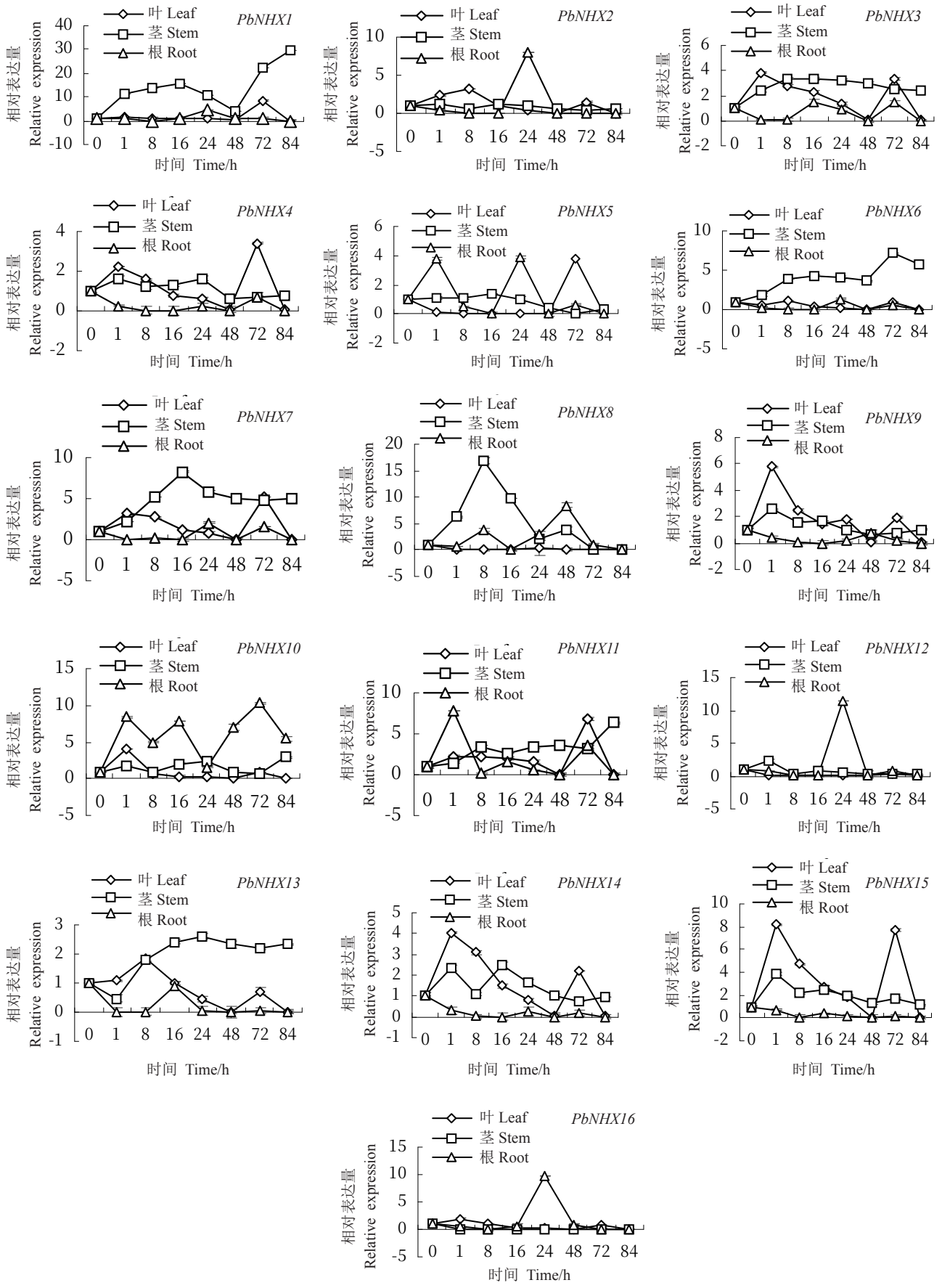

图 5 渗透胁迫下杜梨 *NHXs* 基因表达特性

Fig. 5 Expression characteristics of *PbNHXs* under osmotic stress

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

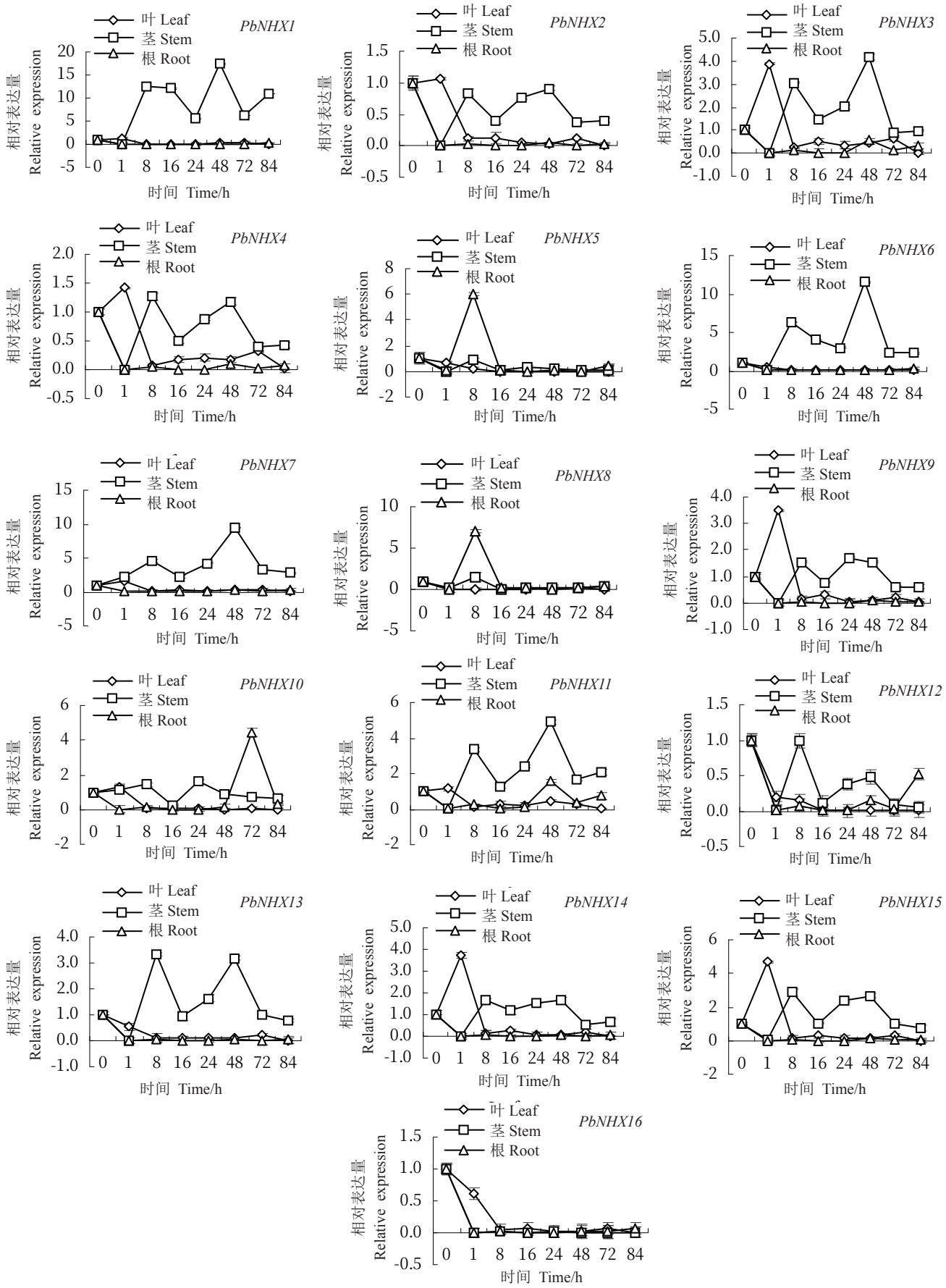

图 6　盐胁迫下杜梨 *NHXs* 基因表达特性

Fig. 6　Expression characteristics of *PbNHXs* under salt stress

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

逐渐下降，至1 h时达到最低点，并在随后的实验时间内并没有显著的增加；基因 *PbNHX13* 和 *PbNHX16* 在叶片中的表达模式也是极为相似的，在0～8 h内，表达量逐渐下降，在8 h的时候达到最低值，而在8～16 h和48～72 h之间逐渐上升，并在16 h和72 h的时候达到峰值（图6）。

2.5 盐胁迫下杜梨Na^+和K^+含量测定

分别测定盐胁迫下（0~84 h）杜梨3种组织中的Na^+含量以及K^+含量，结果表明，K^+在叶片中的含量是缓慢上升的，在茎中的含量呈“W”变化趋势，且0、16、84 h时，K^+含量在同一水平。在根中24 h时的K^+含量略有下降趋势（图7-A）。Na^+在叶片中的含量以16 h为拐点，1~16 h期间变化并不显著，16 h以后Na^+含量直线上升，在茎中Na^+含量也是呈增长趋势，但在48 h以后增加幅度较为平缓，在根中Na^+含量呈波浪式趋势平缓增加，但在72～84 h阶段呈下降趋势（图7-B）。

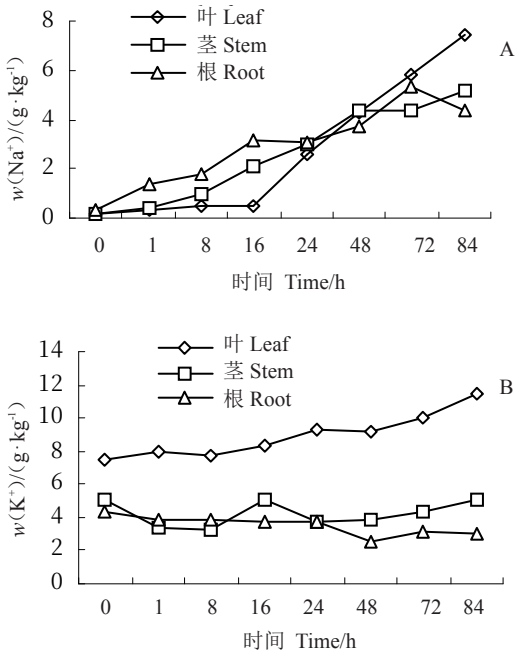

图7 盐胁迫下（0~84 h）杜梨3种组织中的K^+含量以及Na^+含量

Fig. 7 K^+ content and Na^+ content in three tissues under salt stress (0-84 h)

2.6 盐胁迫下杜梨*NHXs*基因表达和Na^+、K^+含量的联合分析

将盐胁迫下（0～84 h）杜梨 *NHXs* 基因表达特性和杜梨3种组织中的Na^+含量以及K^+含量联合分析，得到了 *NHXs* 基因表达和Na^+含量以及K^+含量之间的关系。结果表明，在16 h时，基因 *NHX10* 在茎中的表达量达到最低值，而K^+在茎中的含量达到峰值；在48 h时，基因 *PbNHX3*、*PbNHX11* 和 *PbNHX12* 在根中的表达量达到一个高峰值，而K^+在根中的含量达到一个低峰值；在72 h时，基因 *PbNHX10* 在根中的表达量达到最高值，Na^+在根中的含量也达到最高值。基因 *PbNHX7* 和 *PbNHX10* 在茎中的表达量的趋势非常相似，呈“M”状，而K^+在茎中的含量呈“W”变化趋势，两者在茎中的变化趋势是相反的。

3 讨 论

3.1 杜梨*NHX*基因序列结构与进化特征

基因 *PbNHX5*、*PbNHX6*、*PbNHX8*、*PbNHX12* 和 *PbNHX13* 内含子数目很少，而基因 *PbNHX3*、*PbNHX4* 有24~25个内含子，因此 *PbNHXs* 内含子数目并不保守。基因组大小1.3~10 kb不等，氨基酸数量在401~857个氨基酸之间，即由于其内含子外显子的数目和位置大小差别较大，导致其在基因组以及编码氨基酸数目上存在较大的差异。*PbNHXs* 蛋白均含有Na^+/H^+ exchange保守结构域说明其蛋白结构相对保守。其中 *PbNHX3* 和 *PbNHX4* 蛋白不仅含有保守功能结构域，还具有low complexity区域，这种结构在拟南芥、葡萄、盐芥和水稻中的 *NHX* 基因家族成员中也有出现过，且将这类基因成员归类于Nhap亚家族[24]。蛋白 *PbNHX7* 和 *PbNHX10* 不仅具有保守结构域Na^+/H^+ exchange，在C端还具有TrkA N结构域，该结构域经常出现在与K^+相关的转运蛋白中[25]和磷酸酯酶转运蛋白中[26]，这表明，*PbNHX7* 和 *PbNHX10* 这两个基因不仅和Na^+的转运有关，还和K^+的转运相关。为了分析杜梨NHX蛋白系统进化关系，笔者用拟南芥中含有保守结构域Na^+/H^+ exchange的CPA家族蛋白以及PbNHXs蛋白构建了系统进化树。根据进化树聚类，将所有基因划分为3组（class Ⅰ，class Ⅱ，class Ⅲ）。其中，*PbNHX12*、*PbNHX8*、*PbNHX5* 和 *PbNHX6* 与拟南芥 *CHX* 基因亚家族在一个分支上（class Ⅰ），*PbNHX11*、*PbNHX1*、*PbNHX16* 和 *PbNHX2* 与拟南芥 *NHX* 基因亚家族在一个分支上（class Ⅱ），*PbNHX14*、*PbNHX9*、*PbNHX15*、*PbNHX4*、*PbNHX3*、*PbNHX10*、*PbNHX13* 和 *PbNHX7* 与拟南芥 *KEA* 基因亚家族在一个分支上（class Ⅲ）。根据这个拓扑结构，可以将鉴定出的 *PbNHXs*（16个）基因归类为 *CHX* 基因亚家族，*NHX*

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基因亚家族以及*KEA*基因亚家族。

3.2　杜梨*NHX*基因在不同组织中的响应特征

NaCl胁迫条件下基因*PbNHX1*、*PbNHX6*、*PbNHX7*、*PbNHX11*和*PbNHX13*在茎中特异性表达；除了基因*PbNHX5*、*PbNHX8*、*PbNHX9*、*PbNHX10*之外，其余的基因在根中均为表现出负调控效应。基因*PbNHX10*和*PbNHX7*在NaCl胁迫处理条件下，在茎中的表达模式与同一条件下茎中K^+含量的变化趋势恰好相反，基因表达量均在0、16、84 h时，达到一个低峰值，而这3个时间点时，茎中K^+含量恰好达到一个高峰值（基因*PbNHX7*和*PbNHX10*在茎中的表达量的趋势呈“M”状，而K^+在茎中的含量呈“W”变化趋势）；基因*PbNHX10*和*PbNHX7*又恰好为同一进化分支上的一对平行同源基因，且这一分支均为拟南芥*KEA*亚家族基因，蛋白结构也极为相似，不仅具有Na^+/K^+ exchange保守结构域，在C端还具有特异的TrkA_N蛋白结构域，而且有关研究表明，拟南芥*KEA*基因亚家族具有K^+运输功能[27]。综上两点推测基因*PbNHX10*和*PbNHX7*与K^+的运输有关，且在进化关系上与拟南芥的*KEA*基因亚家族在同一分支上，基因*PbNHX10*和*PbNHX7*可能属于杜梨*KEA*基因亚家族。而*PbNHX10*和*PbNHX7*在PEG6000处理条件下表达模式并无相似之处，这就说明*PbNHX10*和*PbNHX7*在盐胁迫响应过程中，是通过调节K^+的运输而参与胁迫响应途径的，但对PEG6000渗透胁迫的响应具有不同的分子调节机制。有研究表明拟南芥中*KEA*基因家族成员具有不同的基因表达模式[27]，这也就解释了在同一分支上的基因所表现出的不同表达模式。前人研究表明，*NHX*基因亚家族成员，都含有阿米利落蛋白结合位点（amiloride-binding）(FFI/LY/FLLPPI)[28-29]。笔者的分析结果显示，在class Ⅱ分支上的4个杜梨基因*PbNHX1*、*PbNHX11*、*PbNHX16*、*PbNHX2*不仅与拟南芥*NHX*基因亚家族进化关系紧密，且都含有该结构，因此推测杜梨*PbNHX1*、*PbNHX2*、*PbNHX11*、*PbNHX16*这4个基因为*NHX*基因亚家族。然而他们的表达模式并不相同，NaCl胁迫下，*PbNHX2*和*PbNHX16*这2个基因在根、茎、叶3个组织中均表现为负调控，而基因*PbNHX1*和*PbNHX11*在根和叶片中表达水平表现为负调控，在茎中的表达却有很大的波动，这说明很有可能与盐离子的运输有关。杜梨基因*PbNHX12*、*PbNHX6*、*PbNHX5*、*PbNHX8*与拟南芥的*CHX*基因亚家族在同一分支上，有关*CHX*基因亚家族成员的研究与*KEA*基因亚家族的研究相似，已被确定为是Na^+/H^+反向转运蛋白，少数是K^+/H^+反向转运蛋白[30-33]。

4　结　论

杜梨盐胁迫转录组数据库中与白梨*NHX*基因亚家族成员同源性较高的16个*NHX*基因，仅有*PbNHX1*、*PbNHX11*与拟南芥*NHX*基因进化关系最近，且在盐胁迫过程中呈现出负调控模式，而与拟南芥*KEA*基因进化关系相近的*PbNHX10*和*PbNHX7*在盐胁迫过程中可能直接参与K^+的运输。

参考文献 References：

[1] ALLAKHVERDIEV S I，SAKAMOTO A，NISHIYAMA Y，INABA M，MURATA N. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems Ⅰ and Ⅱ in synechococcus sp [J]. Plant Physiology，2000，123(3): 1047-1056.

[2] KOVD A，VICTOR A. Loss of productive land due to salinization[J]. Ambio，1982，12(2): 91-93.

[3] FLOWERS T，TROKE P，YEO A. The mechanism of salt tolerance in halophytes[J]. Annual Review of Plant Physiology，1977，28(1): 89-121.

[4] WANG W，VINOCUR B，ALTMAN A. Plant responses to drought，salinity and extreme temperatures：towards genetic engineering for stress tolerance[J]. Planta，2003，218(1): 3-6.

[5] 刘永富 . 梨砧木杜梨和BA_{29}组培苗生根移栽体系的研究[D]. 保定：河北农业大学，2010.
LIU Yongfu. Study on rooting and transplanting system of tissue culture seedlings of pear rootstock[D]. Baoding: Hebei Agricultural University，2010.

[6] 胡涛，张鸽香，郑福超，曹钰 . 植物盐胁迫响应的研究进展[J]. 分子植物育种，2018，16(9)：3006-3015.
HU Tao，ZHANG Gexiang，ZHENG Fuchao，CAO Yu. Advances in plant salt stress response[J]. Molecular Plant Breeding，2018，16(9): 3006-3015.

[7] 谷俊，耿贵，李冬雪，於丽华 . 盐胁迫对植物各营养器官形态结构影响的研究进展[J]. 中国农学通报，2017，33(24)：62-67.
GU Jun，GENG Gui，LI Dongxue，YU Lihua. Research progress on the effect of salt stress on the morphological structure of various vegetative organs[J]. China agriculture Bulletin，2017，33 (24): 62-67.

[8] TATTINI M，GUCCI R，CORADESCHI M A，PONZIIO C，EVERARD J D. Growth，gas exchange and ioncontent in olea europaea plants during salinity stress and subsequent relief[J]. Physiologia Plantarum，1995，95(2): 203-210.

[9] 常红军，秦毓茜 . 植物的盐胁迫生理[J]. 安阳师范学院学报，2006，40(5)：149-152.
CHANG Hongjun，QIN Yuqian. The salt stress physiology of plants[J]. Journal of Anyang Normal University ，2006，40 (5): 149-152.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[10] 李彦，张英鹏，孙明 . 盐分胁迫对植物的影响及植物耐盐机理研究进展[J]. 中国农学通报，2008，24(1)：258-265.
LI Yan，ZHANG Yingpeng，SUN Ming. Research progress on the effect of salt stress on plants and the mechanism of salt tolerance in plants [J]. Chinese Agronomy Bulletin ，2008，24 (1): 258-265.

[11] 曾红学，王俊 . 盐害生理及植物抗盐性[J]. 生物学通报，2006，40(1)：1-3.
ZENG Hongxue，WANG Jun. Salt stress physiology and salt resistance of plant physiology[J]. Bulletin of Biology，2006，40 (1): 1-3.

[12] HAUSER F，HORIE T. A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters:a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K^+/Na^+ radio in leaves during salinity stress[J]. Plant，Cell & Environment，2010，33 (4): 552-565.

[13] PARDO J M，CUBERO B，LEIDI E O，QUINTERO F J. Alkali cation exchangers：roles in cellular homeostasis and stress tolerance[J]. Journal of Experimental Botany，2006，57(5): 1181-1199.

[14] GORHAM J，JONES R G W，MCDONNELL E. Some mechanisms of salt tolerances in crop plants[J]. Plant Soil，1985，89(1/3): 15-40.

[15] BLUMWALD E，POOLE R J. Na^+/H^+antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of beta vulgaris[J]. Plant Physiology，1985，78(1): 163-167.

[16] APSE M P，AHARON G S，SNEDDEN W A，BLUMWALD E. Slat tolerance coferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in arabidopsis[J]. Science，1999，285(5431): 1256-1258.

[17] SZE H，LI X，PALMGREN M G. Energization of plant cell membrances by H^+-pumping ATPases regulation and biosynthesis[J]. The Plant Cell，1999，11(4): 677-690.

[18] SHI H，LEE B H，WU S J，ZHU J K. Overexpression of plant a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Nature Biotechnology，2003，21 (1): 81-85.

[19] ZHOU H S，QI K J，LIU X. Genome-wide identification and comparative analysis of the cation proton antiporters family in pear and four other rosaceae species[J]. Molecular Genetics and Genomics，2016，291(4): 1727-1742.

[20] LI H，LIN J，YANG Q S，LI X G，CHANG Y H. Comprehensive analysis of differentially expressed genes under salt stress in pear (*Pyrus betulaefolia*) using RNA-Seq[J]. Plant Growth Regulation，2017，82(3): 409-420.

[21] 邵红雨，孔广超，齐军仓，任丽彤，王瑞清，曹连莆 . 植物耐盐生理生化特性的研究发展[J]. 安徽农学通报，2006，12(9)：51-53.
SHAO Hongyu，KONG Guangchao，QI Juncang，REN Litong，WANG Ruiqing，CAO Lianpu. Research and development of physiological and biochemical characteristics under salt tolerant of plants[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin，2006，12(9): 51-53.

[22] CHANG S，PURYEAR J，CAIRNEY J. A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees[J]. Plant Molecular，2002，17(8): 844-851.

[23] GONZALEZ-MENDOZA D，QUIROZ M A，ZAPATA-PEREZ O. An improved method for the isolationof total RNA from avicennia germinans leaves[J]. Zeitschrift fur Naturforschung C，A Journal of Biosciences，2008，63(1/2): 124-126.

[24] 马媛春 . 葡萄 *CPA1* 基因家族注释和功能分化及植物 *CPA1* 基因家族过表达的 META 分析[D]. 南京：南京农业大学，2014.
MA Yuanchun. *CPA1* gene family annotation and functional differentiation and META analysis of *CPA1* gene family overexpression [D]. Nanjing：Nanjing Agricultural University，2014.

[25] BASSIL E，TAJIMA H，LIANG Y C，OHTO M A，USHIJIMA K，NAKANO R，ESUMI T，COKU A，BELMONTE M，BLUMWALD E. The arabidopsis Na^+/H^+ antiporters *NHX1* and *NHX2* control vacuolar pH and K^+ homeostasis to regulate growth，flower development and reproduction[J]. The Plant Cell，2011，23: 3482-3497.

[26] CHOE S. Potassium channel structures[J]. Nature Reviews Neuroscience，2002，3(1): 115-121.

[27] 郑晟 . 拟南芥 K^+/H^+反向转运体 *AtKEA* 基因家族的生物学功能研究[D]. 兰州：甘肃农业大学，2014.
ZHENG Sheng. Study on the biological function of the *AtKEA* gene family of K^+/H^+ reverse transporter in *Arabidopsis* [D]. Lanzhou：Gansu Agricultural University，2014.

[28] HARRIS C，FLIEGE L. Amiloride and the Na^+/H^+ exchanger protein：mechanism and significance of innhibition of the Na^+/H^+ exchanger(review)[J]. International Journal of Molecular Medicine，1999，3(3): 315-336.

[29] YUN C H，LITTLE P J，NATH S K，LEVINE S A，POUYSSEGUR J，TSE C M，DONOWITZ M. Leu143 in the putative fourth membrane spanning domain is critical for amiloride inhibition of an epithelial Na^+/H^+ exchanger isoform(NHE-2)[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications，1993，193 (2): 532-539.

[30] BARRAGAN V，LEIDI E O，ANDRES Z，RUBIO L ，DE LUCA A，FERNANDEZ J A，CUBERO B ，PARDO J M. 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.

[31] BASSIL E，HIROMI T，LIANG Y C，OHTO M A，USHIJIMA K，NAHANO R，ESUMI T，COKU A，BELMOMTE M，BLUMWALD E. The arabidopsis Na^+/H^+antiporters *NHX1* and *NHX2* control vacuolar pH and K^+ homeostasis to regulate growth，flower development，and reproduction[J]. The Plant Cell，2011，23(2): 3482-3497.

[32] ZHAO J，CHENG N H，MOTES C M，BLANCAFLOR E B，MOORE M，GONZALES N，PADMANABAN S，SZE H，WARD J M，HIRSCHI K D. *AtCHX13* is a plasma membrane K^sup +^ transporter [J]. Plant Physiology，2008，148(2): 796-807.

[33] LU Y X，CHANROJ S，ZULKIFLI L，JOHNSON M A，UOZUMI J N，CHEUNG A，SZE H. Pollen tubes lacking a pair of K^+ transporters fail to target ovules in *arabidopsis* [J]. The Plant Cell，2011，23(1): 81-93.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net