

# 唐菖蒲质膜水孔蛋白基因 *GhPIP1;1* 的克隆及表达分析

林燕飞, 李红梅\*, 丁岳练, 黄新敏, 冼锡金, 何生根\*

(仲恺农业工程学院生命科学学院, 广州 510225)

**摘要:** 采用 RT-PCR 和 RACE 技术从唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus* 'Eerde') 花瓣中克隆得到 1 个质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic proteins, PIPs) 类的水孔蛋白基因, 命名为 *GhPIP1;1*。该基因 cDNA 全长 1 130 bp, 包含 867 bp 完整开放阅读框 (ORF), 编码 288 个氨基酸。克隆和分析相应的 gDNA 序列 (2 098 bp) 表明, 其包含由 4 个外显子和 3 个内含子组成的编码区序列。氨基酸序列分析表明 *GhPIP1;1* 具有水孔蛋白家族高度保守的 2 个 NPA (Asn-Pro-Ala) 基序。同源性分析显示 *GhPIP1;1* 氨基酸序列与同科的荷兰鸢尾 (*Iris hollandica*) PIP1 氨基酸序列的同源性达 94%。半定量 RT-PCR 分析表明, *GhPIP1;1* 在唐菖蒲花瓣、雄蕊、雌蕊、茎、苞片和叶片等均有表达, 但表达量以花瓣中最高, 叶片中最低; *GhPIP1;1* 在花蕾至花朵盛开期间的表达水平较高且变化不明显, 但在花朵盛开后的萎蔫过程中表达水平明显降低。

**关键词:** 唐菖蒲; 水孔蛋白; 分子特征; 基因表达

**中图分类号:** S 681

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2013) 01-0145-10

## Cloning and Expression Analysis of a Plasma Membrane Aquaporin Gene *GhPIP1;1* in Cut Gladiolus Flowers

LIN Yan-fei, LI Hong-mei\*, DING Yue-lian, HUANG Xin-min, XIAN Xi-jin, and HE Sheng-gen\*

(College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** A plasma membrane intrinsic proteins (PIPs) gene, designated *GhPIP1;1*, was cloned from petals on gladiolus (*Gladiolus hybridus* 'Eerde') flowers by RT-PCR and RACE. The full cDNA sequence of *GhPIP1;1* is 1 130 bp, containing an open reading frame (867 bp) and encoding a protein of 288 amino acids. The *GhPIP1;1* genomic DNA (2 098 bp) was also cloned, which contains 4 exons and 3 introns in its coding sequence. Two highly conserved NPA (Asn-Pro-Ala) motifs of aquaporins were found in *GhPIP1;1*. Homology of amino acids sequences between *GhPIP1;1* and PIP1 from *Iris hollandica* was up to 94%. The semi-quantitative RT-PCR analysis showed that *GhPIP1;1* gene was expressed in petals, stamina, pistils, stems, bracts, and leaves on gladiolus flowering stems, and the expression level was the highest in petals, and the lowest in leaves. Then after further expression analysis of *GhPIP1;1* gene in petals of gladiolus florets during opening process, it was found that it maintained high and relatively stable

收稿日期: 2012-09-20; 修回日期: 2012-12-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31071829, 31272193); 广东省自然科学基金项目 (10151022501000035, S2012010010418)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lihongmei0000@163.com; howtoroot@163.com)

levels from bud stage to flower full opening, however it was obviously down-regulated during the subsequent flower wilting.

**Key words:** gladiolus; *Gladiolus hybridus*; aquaporin; molecular characterization; gene expression

水孔蛋白是位于质膜和液泡膜上运输水分及一些小分子物质的主要内在蛋白 (Chrispeels et al., 1999; Krane & Kishore, 2003; Verkman, 2011)。已有研究表明, 水孔蛋白在植物中广泛分布, 并在植物体内的水分运输中具有重要作用 (Sakurai et al., 2008; 李红梅 等, 2010)。植物水孔蛋白根据氨基酸序列的同源性和结构特征, 又可分为质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic proteins, PIPs) 和液泡膜内在蛋白 (tonoplast intrinsic proteins, TIPs) 等 7 大类, 其中尤以 PIPs 最受关注 (Postaire et al., 2008; Wudick et al., 2009; 李红梅 等, 2010)。

目前, 对植物水孔蛋白的研究主要集中在拟南芥等模式植物和水稻、玉米等重要作物 (Sakurai et al., 2008; Zelazny et al., 2009; Rae et al., 2011), 而对观赏植物, 特别是切花水孔蛋白的研究还很少 (Ding et al., 2004; Ma et al., 2008; 李红梅 等, 2011)。Harada 等 (2010) 对香石竹花朵开放过程中基因差异表达研究认为, 水孔蛋白亚类 *PIPI* (AB517656) 在花瓣中的高量表达可能涉及花瓣伸展和花朵开放过程的水分跨膜运转。

唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus*) 花形别致, 花色丰富, 但采后易发生水分代谢失衡, 花序上小花失水萎蔫, 严重影响采后寿命和观赏品质 (Ezhilmathi et al., 2007; 白吉刚 等, 2008)。本研究中采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 从唐菖蒲花瓣中克隆得到 1 个 PIP 类水孔蛋白基因 *GhPIPI;1* 的 cDNA 全长序列和相应的基因组 (gDNA) 序列, 并就该基因的基本特征和表达特点进行分析和探讨, 以期为进一步研究该基因的功能以及深入探讨唐菖蒲切花采后水分代谢及其调控的分子机制提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

2011 年 11 月于广州市岭南花卉市场购唐菖蒲 ‘嫦娥粉’ (‘Eerde’) 切花, 1 h 内运至仲恺农业工程学院生物技术研究所切花采后试验室。室内温度 ( $20 \pm 2$ ) °C, 相对湿度  $60\% \pm 10\%$ , 光照强度约为  $15 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。选取健壮无病害的花枝, 将茎基部置于去离子水中平切至花茎约 50 cm 长, 瓶插于去离子水中备用。参照 Hossain 等 (2006) 的方法 (略作修改), 将唐菖蒲花序上小花开放进程分为花蕾期、半开、盛开、开始萎蔫、50%萎蔫和完全萎蔫共 6 个阶段 (图 1)。

待第 1 朵小花半开时, 取花瓣用去离子水清洗表面, 吸干水分, 然后用液氮速冻,  $-80$  °C 保存备用, 用于水孔蛋白基因克隆。分别取此阶段小花的花瓣、苞片、茎、叶、雌蕊和雄蕊用于水孔蛋白基因的组织特异性表达分析。取样时, 分别剪取 4 朵小花的上述组织混匀后作为试材。再者, 分别取唐菖蒲花序上处于 1~6 阶段小花的花瓣用于分析小花开放进程中水孔蛋白基因的表达情况。

### 1.2 试剂与工具酶

柱式 RNAout 试剂盒购于北京天恩泽基因科技有限公司, 载体 pMD19-T Vectors、*Taq* DNA 聚合酶、5'-Full Race kit、3'-Full Race kit、M-MLV Reverse Transcriptase 和 DNAiso Reagent 试剂盒购于 TaKaRa 生物工程 (大连) 有限公司, 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于生工生物 (上海) 有限公司, 质粒小样快速提取试剂盒购自博大泰克生化科技 (北京) 有限公司, 其他生化试剂均为国产

分析纯。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  由本实验室保存。引物委托上海英骏生物技术有限公司合成。



图 1 唐菖蒲花序上小花开放进程

1: 花蕾期; 2: 小花半开; 3: 小花盛开; 4: 小花开始萎蔫; 5: 小花花瓣约 50%萎蔫; 6: 小花花瓣完全萎蔫。

Fig. 1 The opening process of florets on cut gladiolus flowers

1: Flower bud; 2: Half bloom; 3: Full bloom; 4: Beginning of wilting; 5: 50% wilting; 6: Complete wilting.

### 1.3 总 RNA 及总 DNA 的提取

提取花瓣的总 RNA, 加入 10 $\times$  DNase I Buffer 10  $\mu$ L, DNase I 3  $\mu$ L, RRI 0.5  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 保温 30 min, 用等体积酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提 1 次, 上清液再用氯仿抽提 1 次, 等体积异丙醇沉淀 30 min 后离心取沉淀并用 75%酒精洗涤, 用 DEPC 水溶解, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。采用 DNAiso Reagent 试剂盒提取唐菖蒲总 DNA。取总 RNA 和总 DNA 各 5  $\mu$ L 进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 *GhPIP1;1* 基因 cDNA 和 gDNA 的克隆

用 M-MLV 反转录酶进行 cDNA 第一链的扩增, 根据 GenBank 中 *PIP* 的保守区域设计 1 对兼并引物 F1 和 R1 (表 1) 进行 *PIP* 核心序列扩增。根据测序所得唐菖蒲 *PIP* 核心序列, 设计两对基因特异引物 F2 和 R2, F3 和 R3 (表 1), 用于 3'RACE 及 5'RACE 巢式 PCR 扩增。

PCR 反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 其中扩增核心序列的退火温度为 55  $^{\circ}$ C, 扩增 3'末端序列及 5'末端序列的退火温度均为 56  $^{\circ}$ C。PCR 产物经电泳检测后对目的片段进行切胶回收, 将纯化产物与 pMD19-T 连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 并将阳性克隆做菌落 PCR 鉴定后送上海英骏公司测序。

根据 5'RACE 和 3'RACE 及核心序列拼接 cDNA 全长序列, 设计一对基因特异引物 F4 和 R4 (表 1), 用于验证 cDNA 全长序列拼接的正确性。根据已经获得的 *PIP* cDNA ORF 序列, 设计 1 对基因特异引物 F5 和 R5 (表 1), 以总 DNA 为模板进行 *PIP* 的 gDNA 序列扩增。

### 1.5 *GhPIP1;1* 的生物信息学分析

用 NCBI Blast 对 *GhPIP1;1* 及其 gDNA 进行序列分析, 预测该基因编码的氨基酸序列, 并进行在线同源性比对。用 Clustal 和 Mega4 构建进化树。利用 Splign 软件在 NCBI 上查找基因的外显子序列。

### 1.6 *GhPIP1;1* 在不同组织中的表达分析

分别提取花瓣、叶片、茎、苞片、雌蕊和雄蕊的总 RNA, 按照上述方法反转录获得 cDNA 第一

链备用。用特异引物 F6 和 R6(表 1)扩增唐菖蒲  $\beta$ -actin 内参基因(GenBank 登录号为 AB180246.1), 并调整 cDNA 模板用量使其在各个组织的 PCR 产物(长度为 261 bp)条带亮度一致; 然后根据调整的模板用量, 用特异引物 F7 和 R7(表 1)检测  $GhPIP1;1$  在各个组织中的表达量。反应程序为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 其中,  $\beta$ -actin 的退火温度为 52 °C, 特异引物的退火温度为 54 °C。

表 1 PCR 扩增所用引物  
Table 1 Primers used in PCR amplification

引物 Primers	序列 Sequence (5' - 3')	引物 Primers	序列 Sequence (5' - 3')
F1	G (T/G) CTTT (T/C) GGTGG (C/T) ATGA	F5	ATGGAAGGGAAGAAGAGGATGTT
R1	ACT (C/T) CT (G/T) GC (A/G/T) GGGTTGA	R5	AGACCTGCTCTGAATGGGATGGC
F2	TGCAATCTGTGGTGTGGTGT	F6	TGCCAAAAGCGCTCGT
R2	GACAAGGACAAAGGTGCCAAT	R6	TCCTTGCTCATAACGATCAG
F3	GCACATTTGTCCTTGCTCTAC	F7	CTGATCGATCGATCGGTT
R3	CCTTCTGGAATCCTTTAACCAC	R7	CACAAATGACCTAGCCATG
F4	AATAATCCTTCCCCACAGCTGTTT		
R4	ATAGTGCAATTCACATCAC		

### 1.7 唐菖蒲花序上小花开放进程中花瓣 $GhPIP1;1$ 的表达分析

分别取处于 1 ~ 6 阶段小花各 4 朵的花瓣混匀后立即用液氮速冻后于 -80 °C 保存, 用于分析  $GhPIP1;1$  的表达情况, 方法同上。

### 1.8 唐菖蒲花序上小花开放进程中的花瓣含水量的测定

小花花瓣含水量的测定和计算参照 Jones 等(1993)的方法并略作修改。分别剪取唐菖蒲花序上 1 ~ 6 阶段小花各 12 朵, 分成 3 组(作为 3 个重复), 取每组(4 朵小花)的花瓣称其鲜样质量, 置于烘箱中烘干(温度设定为 50 °C, 烘干时间为 72 h 以上), 得其干样质量, 并计算花瓣含水量。

## 2 结果与分析

### 2.1 $GhPIP1;1$ 全长 cDNA 的克隆与序列分析

利用兼并引物 F1、R1 进行  $PIP1$  核心序列的扩增, 得到 1 条长为 441 bp 的 DNA 片段。测序所得的 cDNA 序列在 NCBI 上进行 BLAST 分析, 该片段与 GenBank 中的  $PIP1$  序列具有较高的同源性。

3'RACE 和 5'RACE 分别得到长为 470 bp 和 576 bp 的 DNA 片段。利用 Vector NTI Suite 8.0、BioEidt 及 Editseq 等软件进行拼接分析, 得到长为 1 130 bp 的 cDNA 全长序列(图 2)。

该序列包括 104 bp 5'-UTR、159 bp 3'-UTR 和 1 个 867 bp ORF, 编码 288 个氨基酸的多肽链。DNASTar 程序分析该氨基酸分子量约为 30.7 kD, 理论 pI 值 8.97。此推导的氨基酸序列具有两个高度保守的水孔蛋白“NPA”(Asn-Pro-Ala)基序和主要内在蛋白家族特有的 SGGHINPAVTFG 序列, 以及高等植物 PIPs 保守序列 GGGANVVAP 和 TGINPARSLGAIIYN。根据水孔蛋白类基因命名规则, 将该基因命名为  $GhPIP1;1$ , GenBank 登录号为 JN166013。

### 2.2 $GhPIP1;1$ cDNA 氨基酸序列同源性和系统进化分析

氨基酸序列同源分析(图 3)表明,  $GhPIP1;1$  与同为鸢尾科的荷兰鸢尾(*Iris hollandica*)  $IhPIP1$

(BAF44223.1) 的氨基酸序列同源性达 94%; 与粳稻 (*Oryza sativa*) OsPIP1; 2 (Q7XSQ9.3) 的氨基酸序列同源性为 93%; 与甘蔗 (*Saccharum officinarum*) SoPIP1 (ACC59097.1) 的氨基酸序列同源性为 92%; 与高粱 (*Sorghum bicolor*) SbPIP1 (XP002446929.1) 的氨基酸序列同源性为 91%。

```

1          gaaaagctcacaacaataatccttccccacagctgttcattttgg
46  ttttcttgagagcatcttgagagagagagagagagagagagagagagagagag
105  atg gaa ggg aaa gaa gag gat gtt aag ctt gga gcc aac aaa ttc
      M  E  G  K  E  E  D  U  K  L  G  A  N  K  F
150  tca gag ggg caa ccc ata ggg aca gca gcc cag gta tct gac agc
      S  E  G  Q  P  I  G  T  A  A  Q  U  S  D  S
195  aag gac tac aag gaa cca cca cca gcc cct ctt ttt gaa cct ggt
      K  D  Y  K  E  P  P  P  A  P  L  F  E  P  G
240  gag ctc aag tca tgg tcc ttc tat agg gct ggt att gct gag ttc
      E  L  K  S  W  S  F  Y  R  A  G  I  A  E  F
285  att gcc acc ttc ctc ttc ctc tac atc acc atc atc atc gtc atg
      I  A  T  F  L  F  L  Y  I  T  I  L  T  U  M
330  ggg gtc tcc aaa tcc cct tcc aag tgc cag act gtt ggc atc cag
      G  U  S  K  S  P  S  K  C  Q  T  U  G  I  Q
375  gga att gct tgg gcc ttt ggg gga atg att ttt gct ctt gtc tac
      G  I  A  W  A  F  G  G  M  I  F  A  L  U  Y
420  tgc act gct ggc atc tct ggt ggt cac ata aat cct gca gtg act
      C  T  A  G  I  S  G  G  H  I  N  P  A  U  T
465  ttt ggg ctg ttc ttg gca aga aag ctg tcc ctg acc agg gcc atc
      F  G  L  F  L  A  R  K  L  S  L  T  R  A  I
510  ttc tac atg gtg atg cag tgc ctg ggt gca atc tgt ggt gct ggt
      F  Y  M  U  M  Q  C  L  G  A  I  C  G  A  G
555  gtg gtg aag gga tac cag aag ggt ctc tat gag acc aaa ggt ggt
      U  U  K  G  Y  Q  K  G  L  Y  E  T  K  G  G
600  ggt gct aat gtt gtg gca cct gga tat acc aag ggt gat ggt ctt
      G  A  N  U  U  A  P  G  Y  T  K  G  D  G  L
645  ggt gct gag att att ggc acc ttt gtc ctt gtc tac aca gtc ttc
      G  A  E  I  I  G  T  F  U  L  U  Y  T  U  F
690  tct gct act gat gct aag agg aat gct aga gac tcc cat gtc cct
      S  A  T  D  A  K  R  N  A  R  D  S  H  U  P
735  atc ctt gct ccc tta cca att ggg ttt gct gtt ttc ctt gtc cac
      I  L  A  P  L  P  I  G  F  A  U  F  L  U  H
780  ctg gcc acc atc ccc att act ggc act ggc atc aac cct gca aqa
      L  A  T  I  P  I  T  G  T  G  I  N  P  A  R
825  agt ctt gga gct gca atc atc tac aac aag gaa cat gcc tgg agt
      S  L  G  A  A  I  I  Y  N  K  E  H  A  W  S
870  gat cat tgg att ttc tgg gtt gga ccc ttc att gga gct gcc ctt
      D  H  W  I  F  W  U  G  P  F  I  G  A  A  L
915  gct gcc atc tac cac cag ata gtg atc agg gcc atc cca ttc aag
      A  A  I  Y  H  Q  I  U  I  R  A  I  P  F  K
960  agc agg tct tga agt att atc act tgt gcc ttt cct caa tat cta
      S  R  S  *
1 005  atc ttt gta tgg ttg tgg acc ttc cct cgg gtg tat taa tta ttg
1 050  tat tcc aga agt agt gtt gtt gtt tat taa gtg tgt aaa tta agt
1 095  taa gtg atg tga att gca cta ttg gga aaa aaa aaa

```

图2 *GhPIP1;1* 的 cDNA 核苷酸序列和推导的氨基酸序列

起始密码子 (atg) 和终止密码子 (tga) 用下划线表示; 方框内 SGGHINPAVTFG 为主要内在蛋白家族信号序列; 方框内 GGGANVVAP 和 TGINPARSLGAIIYN 是高等植物 PIPs 保守序列。

Fig. 2 Sequence of *GhPIP1;1* cDNA and its deduced amino acid sequence

Initiation codon (atg) and termination codon (tga) were underlined; SGGHINPAVTFG in frame is the conserved major intrinsic proteins family signal sequence; GGGANVVAP and TGINPARSLGAIIYN in frames are conserved regions of higher plants PIPs.

GhPIP1;1	1	MEGKEEDU <sup>*</sup> KL <sup>*</sup> GANKF <sup>*</sup> SE <sup>*</sup> GQ <sup>*</sup> PI <sup>*</sup> G <sup>*</sup> TAA <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> U <sup>*</sup> S <sup>*</sup> D-S <sup>*</sup> K <sup>*</sup> D <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> K <sup>*</sup> E <sup>*</sup> P <sup>*</sup> P <sup>*</sup> A <sup>*</sup> P <sup>*</sup> L <sup>*</sup> F <sup>*</sup> E <sup>*</sup> P <sup>*</sup> G <sup>*</sup> E <sup>*</sup> L <sup>*</sup> K <sup>*</sup> S <sup>*</sup> W <sup>*</sup> S <sup>*</sup> F <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> R <sup>*</sup> A <sup>*</sup> G <sup>*</sup> I <sup>*</sup> A <sup>*</sup> E <sup>*</sup> F <sup>*</sup> I <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T	63
IhPIP1	1	MEGKEEDU <sup>*</sup> KL <sup>*</sup> GANKF <sup>*</sup> SER <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> PI <sup>*</sup> G <sup>*</sup> TAA <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> U <sup>*</sup> A <sup>*</sup> E <sup>*</sup> S <sup>*</sup> K <sup>*</sup> D <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> K <sup>*</sup> E <sup>*</sup> P <sup>*</sup> P <sup>*</sup> A <sup>*</sup> P <sup>*</sup> L <sup>*</sup> F <sup>*</sup> E <sup>*</sup> P <sup>*</sup> G <sup>*</sup> E <sup>*</sup> L <sup>*</sup> K <sup>*</sup> S <sup>*</sup> W <sup>*</sup> S <sup>*</sup> F <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> R <sup>*</sup> A <sup>*</sup> G <sup>*</sup> I <sup>*</sup> A <sup>*</sup> E <sup>*</sup> F <sup>*</sup> I <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T	64
OsPIP1;2	1	MEGKEEDU <sup>*</sup> RL <sup>*</sup> GANKF <sup>*</sup> SER <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> PI <sup>*</sup> G <sup>*</sup> TAA <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> G <sup>*</sup> S <sup>*</sup> D-D <sup>*</sup> K <sup>*</sup> D <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> K <sup>*</sup> E <sup>*</sup> P <sup>*</sup> P <sup>*</sup> A <sup>*</sup> P <sup>*</sup> L <sup>*</sup> F <sup>*</sup> E <sup>*</sup> P <sup>*</sup> G <sup>*</sup> E <sup>*</sup> L <sup>*</sup> K <sup>*</sup> S <sup>*</sup> W <sup>*</sup> S <sup>*</sup> F <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> R <sup>*</sup> A <sup>*</sup> G <sup>*</sup> I <sup>*</sup> A <sup>*</sup> E <sup>*</sup> F <sup>*</sup> M <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T	63
SoPIP1	1	MEGKEEDU <sup>*</sup> RL <sup>*</sup> GANKF <sup>*</sup> SER <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> PI <sup>*</sup> G <sup>*</sup> TAA <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> G <sup>*</sup> A <sup>*</sup> G <sup>*</sup> D <sup>*</sup> D <sup>*</sup> K <sup>*</sup> D <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> K <sup>*</sup> E <sup>*</sup> P <sup>*</sup> P <sup>*</sup> A <sup>*</sup> P <sup>*</sup> L <sup>*</sup> F <sup>*</sup> E <sup>*</sup> P <sup>*</sup> G <sup>*</sup> E <sup>*</sup> L <sup>*</sup> K <sup>*</sup> S <sup>*</sup> W <sup>*</sup> S <sup>*</sup> F <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> R <sup>*</sup> A <sup>*</sup> G <sup>*</sup> I <sup>*</sup> A <sup>*</sup> E <sup>*</sup> F <sup>*</sup> U <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T	64
SbPIP1	1	MEGKEEDU <sup>*</sup> RL <sup>*</sup> GANK <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> SER <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> PI <sup>*</sup> G <sup>*</sup> TAA <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> G <sup>*</sup> T-D <sup>*</sup> D <sup>*</sup> K <sup>*</sup> D <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> K <sup>*</sup> E <sup>*</sup> P <sup>*</sup> P <sup>*</sup> A <sup>*</sup> P <sup>*</sup> L <sup>*</sup> F <sup>*</sup> E <sup>*</sup> P <sup>*</sup> G <sup>*</sup> E <sup>*</sup> L <sup>*</sup> K <sup>*</sup> S <sup>*</sup> W <sup>*</sup> S <sup>*</sup> F <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> R <sup>*</sup> A <sup>*</sup> G <sup>*</sup> I <sup>*</sup> A <sup>*</sup> E <sup>*</sup> F <sup>*</sup> U <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T	63
***** ** *****			
GhPIP1;1	64	FLFLYITIL <sup>*</sup> TUMGUSK <sup>*</sup> SPSK <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> TUGI <sup>*</sup> QGI <sup>*</sup> A <sup>*</sup> WAF <sup>*</sup> GGMIF <sup>*</sup> ALUYCTAGI <sup>*</sup> SGGHINPAVTFGLFLAR	127
IhPIP1	65	FLFLYITIL <sup>*</sup> TUMGUSK <sup>*</sup> SKSCATUGI <sup>*</sup> QGI <sup>*</sup> A <sup>*</sup> W <sup>*</sup> SF <sup>*</sup> GGMIF <sup>*</sup> ALUYCTAGI <sup>*</sup> SGGHINPAVTFGLFLAR	128
OsPIP1;2	64	FLFLYITUL <sup>*</sup> TUMGUNNST <sup>*</sup> SKCATUGI <sup>*</sup> QGI <sup>*</sup> A <sup>*</sup> W <sup>*</sup> SF <sup>*</sup> GGMIF <sup>*</sup> ALUYCTAGI <sup>*</sup> SGGHINPAVTFGLFLAR	127
SoPIP1	65	FLFLYITIL <sup>*</sup> TUMGUSK <sup>*</sup> STSKCATUGI <sup>*</sup> QGI <sup>*</sup> A <sup>*</sup> W <sup>*</sup> SF <sup>*</sup> GGMIF <sup>*</sup> ALUYCTAGI <sup>*</sup> SGGHINPAVTFGLFLAR	128
SbPIP1	64	FLFLYISIL <sup>*</sup> TUMGUSK <sup>*</sup> STSKCATUGI <sup>*</sup> QGI <sup>*</sup> A <sup>*</sup> W <sup>*</sup> SF <sup>*</sup> GGMIF <sup>*</sup> ALUYCTAGI <sup>*</sup> SGGHINPAVTFGLFLAR	127
***** ** *****			
GhPIP1;1	128	KL <sup>*</sup> SL <sup>*</sup> TRAI <sup>*</sup> F <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> M <sup>*</sup> U <sup>*</sup> M <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> CL <sup>*</sup> GAIC <sup>*</sup> GAGU <sup>*</sup> K <sup>*</sup> G <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> K <sup>*</sup> GL <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> ET <sup>*</sup> KG <sup>*</sup> GGANV <sup>*</sup> VAP <sup>*</sup> GY <sup>*</sup> TK <sup>*</sup> GD <sup>*</sup> LG <sup>*</sup> AEI <sup>*</sup> IG <sup>*</sup> TF <sup>*</sup> F <sup>*</sup> U <sup>*</sup> L <sup>*</sup>	191
IhPIP1	129	KL <sup>*</sup> SL <sup>*</sup> TRAF <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> M <sup>*</sup> U <sup>*</sup> M <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> CL <sup>*</sup> GAIC <sup>*</sup> GAGU <sup>*</sup> K <sup>*</sup> G <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> G <sup>*</sup> K <sup>*</sup> M <sup>*</sup> L <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> TQ <sup>*</sup> GGANV <sup>*</sup> VAP <sup>*</sup> GY <sup>*</sup> TK <sup>*</sup> GD <sup>*</sup> LG <sup>*</sup> AEI <sup>*</sup> U <sup>*</sup> G <sup>*</sup> TF <sup>*</sup> F <sup>*</sup> U <sup>*</sup> L <sup>*</sup>	192
OsPIP1;2	128	KL <sup>*</sup> SL <sup>*</sup> TRAL <sup>*</sup> F <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> M <sup>*</sup> U <sup>*</sup> M <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> CL <sup>*</sup> GAIC <sup>*</sup> GAGU <sup>*</sup> K <sup>*</sup> G <sup>*</sup> F <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> K <sup>*</sup> GL <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> ET <sup>*</sup> TGGANV <sup>*</sup> VAP <sup>*</sup> GY <sup>*</sup> TK <sup>*</sup> GD <sup>*</sup> LG <sup>*</sup> AEI <sup>*</sup> U <sup>*</sup> G <sup>*</sup> TF <sup>*</sup> F <sup>*</sup> U <sup>*</sup> L <sup>*</sup>	191
SoPIP1	129	KL <sup>*</sup> SL <sup>*</sup> TRAI <sup>*</sup> F <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> I <sup>*</sup> IM <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> CL <sup>*</sup> GAIC <sup>*</sup> GAGU <sup>*</sup> K <sup>*</sup> G <sup>*</sup> F <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> GL <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> M <sup>*</sup> GN <sup>*</sup> GGANV <sup>*</sup> VAP <sup>*</sup> GY <sup>*</sup> TK <sup>*</sup> GD <sup>*</sup> LG <sup>*</sup> AEI <sup>*</sup> U <sup>*</sup> G <sup>*</sup> TF <sup>*</sup> F <sup>*</sup> U <sup>*</sup> L <sup>*</sup>	192
SbPIP1	128	KL <sup>*</sup> SL <sup>*</sup> TRAF <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> I <sup>*</sup> IM <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> CL <sup>*</sup> GAIC <sup>*</sup> GAGU <sup>*</sup> K <sup>*</sup> G <sup>*</sup> F <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> GL <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> M <sup>*</sup> GN <sup>*</sup> GGANV <sup>*</sup> VAP <sup>*</sup> GY <sup>*</sup> TK <sup>*</sup> GD <sup>*</sup> LG <sup>*</sup> AEI <sup>*</sup> U <sup>*</sup> G <sup>*</sup> TF <sup>*</sup> F <sup>*</sup> U <sup>*</sup> L <sup>*</sup>	191
***** ** *****			
GhPIP1;1	192	YT <sup>*</sup> U <sup>*</sup> F <sup>*</sup> S <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T <sup>*</sup> D <sup>*</sup> A <sup>*</sup> K <sup>*</sup> R <sup>*</sup> N <sup>*</sup> A <sup>*</sup> R <sup>*</sup> D <sup>*</sup> S <sup>*</sup> H <sup>*</sup> U <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> P <sup>*</sup> L <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> G <sup>*</sup> F <sup>*</sup> A <sup>*</sup> U <sup>*</sup> F <sup>*</sup> L <sup>*</sup> V <sup>*</sup> H <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T <sup>*</sup> I <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> T <sup>*</sup> G <sup>*</sup> T <sup>*</sup> G <sup>*</sup> I <sup>*</sup> N <sup>*</sup> P <sup>*</sup> A <sup>*</sup> R <sup>*</sup> S <sup>*</sup> L <sup>*</sup> G <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> I <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> N <sup>*</sup> K <sup>*</sup> E <sup>*</sup> H <sup>*</sup> A <sup>*</sup> W <sup>*</sup> S	255
IhPIP1	193	YT <sup>*</sup> U <sup>*</sup> F <sup>*</sup> S <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T <sup>*</sup> D <sup>*</sup> A <sup>*</sup> K <sup>*</sup> R <sup>*</sup> N <sup>*</sup> A <sup>*</sup> R <sup>*</sup> D <sup>*</sup> S <sup>*</sup> H <sup>*</sup> U <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> P <sup>*</sup> L <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> G <sup>*</sup> F <sup>*</sup> A <sup>*</sup> U <sup>*</sup> F <sup>*</sup> L <sup>*</sup> V <sup>*</sup> H <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T <sup>*</sup> I <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> T <sup>*</sup> G <sup>*</sup> T <sup>*</sup> G <sup>*</sup> I <sup>*</sup> N <sup>*</sup> P <sup>*</sup> A <sup>*</sup> R <sup>*</sup> S <sup>*</sup> L <sup>*</sup> G <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> I <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> N <sup>*</sup> D <sup>*</sup> H <sup>*</sup> A <sup>*</sup> W <sup>*</sup> D	256
OsPIP1;2	192	YT <sup>*</sup> U <sup>*</sup> F <sup>*</sup> S <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T <sup>*</sup> D <sup>*</sup> A <sup>*</sup> K <sup>*</sup> R <sup>*</sup> N <sup>*</sup> A <sup>*</sup> R <sup>*</sup> D <sup>*</sup> S <sup>*</sup> H <sup>*</sup> U <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> P <sup>*</sup> L <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> G <sup>*</sup> F <sup>*</sup> A <sup>*</sup> U <sup>*</sup> F <sup>*</sup> L <sup>*</sup> V <sup>*</sup> H <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T <sup>*</sup> I <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> T <sup>*</sup> G <sup>*</sup> T <sup>*</sup> G <sup>*</sup> I <sup>*</sup> N <sup>*</sup> P <sup>*</sup> A <sup>*</sup> R <sup>*</sup> S <sup>*</sup> L <sup>*</sup> G <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> I <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> N <sup>*</sup> R <sup>*</sup> G <sup>*</sup> H <sup>*</sup> A <sup>*</sup> W <sup>*</sup> D	255
SoPIP1	193	YT <sup>*</sup> U <sup>*</sup> F <sup>*</sup> S <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T <sup>*</sup> D <sup>*</sup> A <sup>*</sup> K <sup>*</sup> R <sup>*</sup> N <sup>*</sup> A <sup>*</sup> R <sup>*</sup> D <sup>*</sup> S <sup>*</sup> H <sup>*</sup> U <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> P <sup>*</sup> L <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> G <sup>*</sup> F <sup>*</sup> A <sup>*</sup> U <sup>*</sup> F <sup>*</sup> L <sup>*</sup> V <sup>*</sup> H <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T <sup>*</sup> I <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> T <sup>*</sup> G <sup>*</sup> T <sup>*</sup> G <sup>*</sup> I <sup>*</sup> N <sup>*</sup> P <sup>*</sup> A <sup>*</sup> R <sup>*</sup> S <sup>*</sup> L <sup>*</sup> G <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> I <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> N <sup>*</sup> R <sup>*</sup> D <sup>*</sup> H <sup>*</sup> A <sup>*</sup> W <sup>*</sup> S	256
SbPIP1	192	YT <sup>*</sup> U <sup>*</sup> F <sup>*</sup> S <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T <sup>*</sup> D <sup>*</sup> A <sup>*</sup> K <sup>*</sup> R <sup>*</sup> N <sup>*</sup> A <sup>*</sup> R <sup>*</sup> D <sup>*</sup> S <sup>*</sup> H <sup>*</sup> U <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> P <sup>*</sup> L <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> G <sup>*</sup> F <sup>*</sup> A <sup>*</sup> U <sup>*</sup> F <sup>*</sup> L <sup>*</sup> V <sup>*</sup> H <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> T <sup>*</sup> I <sup>*</sup> P <sup>*</sup> I <sup>*</sup> T <sup>*</sup> G <sup>*</sup> T <sup>*</sup> G <sup>*</sup> I <sup>*</sup> N <sup>*</sup> P <sup>*</sup> A <sup>*</sup> R <sup>*</sup> S <sup>*</sup> L <sup>*</sup> G <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> I <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> N <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> N <sup>*</sup> H <sup>*</sup> A <sup>*</sup> W <sup>*</sup> S	255
***** ** *****			
GhPIP1;1	256	DH <sup>*</sup> W <sup>*</sup> I <sup>*</sup> F <sup>*</sup> W <sup>*</sup> U <sup>*</sup> G <sup>*</sup> P <sup>*</sup> F <sup>*</sup> I <sup>*</sup> G <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> H <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> I <sup>*</sup> V <sup>*</sup> I <sup>*</sup> R <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> P <sup>*</sup> F <sup>*</sup> K <sup>*</sup> S <sup>*</sup> R <sup>*</sup> S	288
IhPIP1	257	DH <sup>*</sup> W <sup>*</sup> I <sup>*</sup> F <sup>*</sup> W <sup>*</sup> U <sup>*</sup> G <sup>*</sup> P <sup>*</sup> F <sup>*</sup> I <sup>*</sup> G <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> M <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> H <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> I <sup>*</sup> V <sup>*</sup> I <sup>*</sup> R <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> P <sup>*</sup> F <sup>*</sup> K <sup>*</sup> S <sup>*</sup> R <sup>*</sup> S <sup>*</sup> L <sup>*</sup> K <sup>*</sup> L <sup>*</sup> F <sup>*</sup> U <sup>*</sup> F <sup>*</sup> D <sup>*</sup> H <sup>*</sup> H <sup>*</sup> F <sup>*</sup> C <sup>*</sup> C <sup>*</sup> N <sup>*</sup> U <sup>*</sup> P <sup>*</sup> U <sup>*</sup> F <sup>*</sup> S <sup>*</sup> L <sup>*</sup> N <sup>*</sup> I <sup>*</sup> C <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> A <sup>*</sup> N <sup>*</sup> V <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> U <sup>*</sup> L <sup>*</sup> F <sup>*</sup> Q	320
OsPIP1;2	256	DH <sup>*</sup> W <sup>*</sup> I <sup>*</sup> F <sup>*</sup> W <sup>*</sup> U <sup>*</sup> G <sup>*</sup> P <sup>*</sup> F <sup>*</sup> I <sup>*</sup> G <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> H <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> U <sup>*</sup> V <sup>*</sup> I <sup>*</sup> R <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> P <sup>*</sup> F <sup>*</sup> K <sup>*</sup> S <sup>*</sup> R <sup>*</sup> S	288
SoPIP1	257	DH <sup>*</sup> W <sup>*</sup> I <sup>*</sup> F <sup>*</sup> W <sup>*</sup> U <sup>*</sup> G <sup>*</sup> P <sup>*</sup> F <sup>*</sup> I <sup>*</sup> G <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> H <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> I <sup>*</sup> I <sup>*</sup> R <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> P <sup>*</sup> F <sup>*</sup> K <sup>*</sup> S <sup>*</sup> R <sup>*</sup> S	289
SbPIP1	256	DH <sup>*</sup> W <sup>*</sup> I <sup>*</sup> F <sup>*</sup> W <sup>*</sup> U <sup>*</sup> G <sup>*</sup> P <sup>*</sup> F <sup>*</sup> I <sup>*</sup> G <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> L <sup>*</sup> A <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> Y <sup>*</sup> H <sup>*</sup> Q <sup>*</sup> I <sup>*</sup> I <sup>*</sup> R <sup>*</sup> A <sup>*</sup> I <sup>*</sup> P <sup>*</sup> F <sup>*</sup> K <sup>*</sup> S <sup>*</sup> R <sup>*</sup> S	288
***** ** *****			
GhPIP1;1	289	LCCLLSL	288
IhPIP1	321	LCCLLSL	327
OsPIP1;2	289		288
SoPIP1	290		289
SbPIP1	289		288

图 3 部分植物 PIP1 氨基酸序列的比较

完全相同的氨基酸序列用星号表示；方框内 SGGHINPAVTFG 为主要内在蛋白家族信号序列；

方框内 GGGANVAP 和 TGINPARSLGAAIYN 是高等植物 PIPs 保守序列；

灰色部分为 NPA 保守基序。

Fig. 3 Comparison of amino acid sequences of PIP1 from some plants

Identical amino acids were indicated with asterisks; SGGHINPAVTFG in frame is the conserved major intrinsic

proteins family signal sequence; GGGANVAP and TGINPARSLGAAIYN in frames are

conserved regions of higher plants PIPs; NPA conserved motifs were

shown in gray background.

另外，将唐菖蒲 GhPIP1;1 与部分植物的 PIP1 和 PIP2 氨基酸序列进行系统进化树分析可知，本研究获得的 GhPIP1;1 属于 PIPs 类的 PIP1 亚类，与 PIP1 亚类氨基酸序列的同源性明显高于 PIP2 亚类，且与同科植物荷兰鸢尾 IhPIP1 的亲缘关系最近（图 4）。

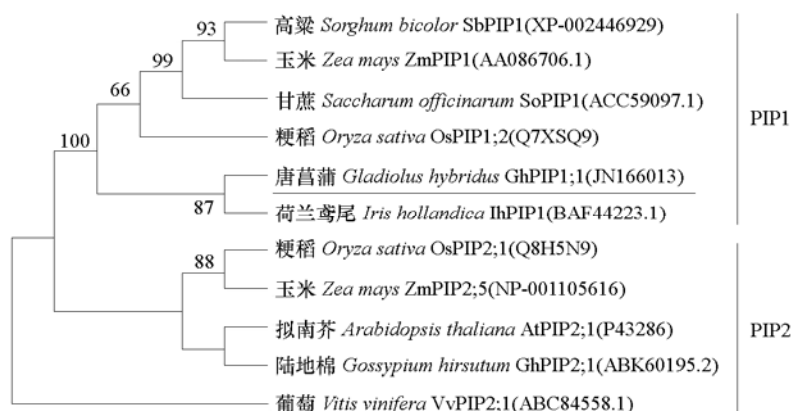


图 4 *GhPIP1;1* 与其他植物 PIP1 和 PIP2 的进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of *GhPIP1;1* and other plants PIP1 and PIP2

### 2.3 *GhPIP1;1* gDNA 序列和结构特征分析

本研究获得的 *GhPIP1;1* gDNA 序列 (GenBank 登录号为 JX105429) 长为 2 098 bp, 包含 4 个外显子和 3 个内含子组成的编码区序列 (图 5)。4 个外显子 (E1 ~ E4) 的长度依次为 336、294、141 和 93 bp, 3 个内含子 (I1 ~ I3) 的长度依次为 527、596 和 111 bp。其中, 第 1 个外显子主要编码 *GhPIP1;1* 蛋白第 1、2 个跨膜螺旋, 第 2 个外显子主要编码第 3、4 个跨膜螺旋, 第 3 个外显子主要编码第 5 个跨膜螺旋, 最后 1 个外显子主要编码第 6 个跨膜螺旋。

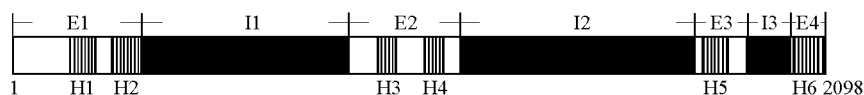


图 5 *GhPIP1;1* 结构示意图

E1、E2、E3 和 E4: 4 个外显子; I1、I2 和 I3: 3 个内含子; H1、H2、H3、H4、H5 和 H6: 6 个跨膜螺旋。

Fig. 5 The diagram of *GhPIP1;1* gene structure

E1, E2, E3 and E4: 4 exons; I1, I2 and I3: 3 introns; H1, H2, H3, H4, H5 and H6: 6 transmembrane-helices.

### 2.4 *GhPIP1;1* 基因组织表达分析

由图 6 可知, *GhPIP1;1* 在唐菖蒲茎、叶片及花朵的花瓣、苞片、雌蕊和雄蕊均有表达, 但在花瓣的表达量最高, 然后依次是雄蕊、茎、雌蕊和苞片, 而在叶片的表达量最低。

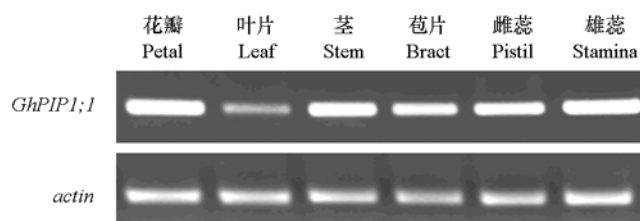


图 6 *GhPIP1;1* 在唐菖蒲不同组织中的表达

Fig. 6 *GhPIP1;1* gene expression in various tissues of gladiolus flowering stem

## 2.5 唐菖蒲花序上小花开放进程中花瓣含水量及 *GhPIP1;1* 表达的变化

唐菖蒲花序上小花的花瓣含水量在由花蕾至花朵半开期间（即第1~2阶段）快速增加，此后直至花瓣开始萎蔫之前（即第2~4阶段）维持稳定，但在花瓣由开始萎蔫至完全萎蔫（即第4~6阶段）则呈快速下降（图7）。

进一步分析小花开放进程中花瓣 *GhPIP1;1* 的表达发现，该基因在花蕾至花朵盛开期间（即第1~3阶段）的表达水平较高且变化不明显，但自花朵盛开后花瓣开始萎蔫至完全萎蔫（即第4~6阶段）表达水平则呈明显的下降趋势（图8）。

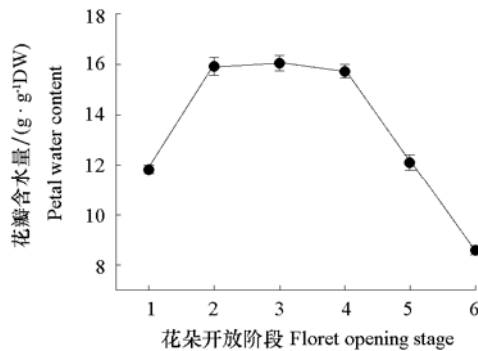


图7 唐菖蒲花序上小花开放进程中花瓣含水量的变化  
Fig. 7 Changes in water content in petals of gladiolus florets during opening process

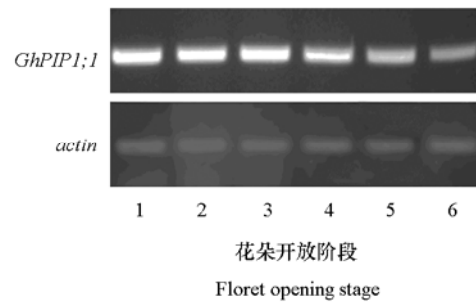


图8 唐菖蒲花序上小花开放进程中花瓣 *GhPIP1;1* 表达量的变化

Fig. 8 Changes in expression of *GhPIP1;1* gene in petals of gladiolus florets during opening process

## 3 讨论

### 3.1 唐菖蒲 *GhPIP1;1* cDNA 及 gDNA 的主要特征

水孔蛋白属于多基因家族，并具有高度保守的结构特征（Sakurai et al., 2008; 李红梅 等, 2010; Verkman, 2011）。本研究从唐菖蒲切花花瓣克隆得到1个 PIPs 类水孔蛋白基因 *GhPIP1;1*，其氨基酸序列的 N 端和 C 端各分布着1个 NPA 基序，这是水孔蛋白家族的特征基序，其与水孔蛋白的功能密切相关（Krane & Kishore, 2003）。另外，*GhPIP1;1* 氨基酸序列中还含有已知水孔蛋白均具有的6个跨膜螺旋区，并具有主要内在蛋白家族典型的保守序列 SGGHVNPVTFG 及植物 PIPs 的特征信号序列 GGGANXXXXGY 和 TGI/TNPARSL/FGAAI/VI/VF/YN（图2）。这些特征序列成为鉴别植物水孔蛋白基因及其类别划分的重要标准之一，也是执行和调控植物水孔蛋白功能的重要基序（Postaire et al., 2008; 李红梅 等, 2010）。氨基酸同源性和聚类分析进一步表明，唐菖蒲 *GhPIP1;1* 为 PIP1 亚类水孔蛋白，并与同科的荷兰鸢尾 *IhPIP1* 亲缘关系最近（图3和图4）。

Johanson 等（2001）分析拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）5个 *PIP1* 和8个 *PIP2* 的结构发现，它们均含有4个外显子和3个内含子。本研究得到的 *GhPIP1;1* gDNA 序列也含有4个外显子和3个内含子（图5）。不过，李登弟等（2006）克隆得到的棉花 *GhAQP1*（属于 *PIP1* 基因）及李红梅等（2011）克隆得到的香石竹 *DcPIP2* 的 gDNA 序列则均含有3个外显子和2个内含子。可见，*PIP*s 基因的结构较保守，其内含子和外显子数较为稳定，但也会发生一些变异（Johanson et al., 2001; Krane & Kishore, 2003; 李红梅 等, 2011）。



### 3.2 唐菖蒲 *GhPIP1;1* 表达的组织特异性及其在小花开放进程中的表达特点

水孔蛋白作为水分快速跨膜运输的通道蛋白, 几乎存在于植物各个器官和组织中。不过, 各类水孔蛋白基因在植物不同器官和组织的表达存在一定的差异 (Sakurai et al., 2008; Wudick et al., 2009; 李红梅等, 2010)。Ding 等 (2004) 研究发现百合 *AqpL1* (属于 *PIP1* 基因) 在其叶片、根及花朵的花瓣、柱头和花药等均有表达, 但表达量以花瓣最高、叶片最低。Bots 等 (2005) 研究表明, 烟草 (*Nicotiana tabacum*) *NtPIP1;1* 基因主要在根及花的雌蕊、花药和柱头等表达, 而 *NtPIP2;1* 则主要在茎、叶片及花的雌蕊和花药等表达。另外, 李红梅等 (2011) 新近报告香石竹 *DcPIP2* 基因在叶片、茎及花朵的花瓣、雌蕊、雄蕊和萼片均有表达, 但在花朵 (花瓣、雌蕊、雄蕊) 的表达明显高于茎和叶片等营养器官。本研究中显示 *GhPIP1;1* 基因在唐菖蒲花序的茎、叶片及小花的花瓣、苞片、雌蕊和雄蕊等组织均有表达, 并以小花的花瓣表达水平最高、叶片最低 (图 6)。结合前人及本研究结果可知, 尽管同为 *PIPs* 类的不同亚类基因 (如 *PIP1* 和 *PIP2* 基因) 甚至同为 *PIP1* 亚类基因, 其表达可因植物种类及其不同的器官和组织而存在差异, 但 *PIPs* 类基因 (*PIP1* 和 *PIP2* 基因) 通常在花朵 (尤其是花瓣和雌蕊等部位) 高量表达, 意味着该类基因在花的发育和开放中可能起着重要的作用。

Ding 等 (2004) 曾研究发现百合 *AqpL1* 在花瓣中的表达量随着花的衰老而显著降低。另外, Ma 等 (2008) 研究表明月季水孔蛋白基因 *Rh-PIP2;1* 在花瓣表皮细胞中的表达量在花朵盛开前期随着开放进程逐渐升高, 达到盛开后迅速下降。本研究中, 唐菖蒲 *GhPIP1;1* 在小花花瓣的表达特点与上述结果颇为一致, 该基因在花蕾至花朵完全开放期间高量表达, 但花朵盛开后随着花瓣的逐渐萎蔫表达水平明显下降 (图 8)。本研究还发现, 唐菖蒲小花花瓣的含水量在小花开放期间 (第 1~3 阶段) 先快速增加然后维持在最高水平, 但随着花瓣的逐渐萎蔫 (第 4~6 阶段) 呈快速下降趋势 (图 7)。换言之, 小花开放期间花瓣的伸长和扩大有赖于水分的快速进入花瓣细胞, 而小花萎蔫期间花瓣的凋萎则因进入花瓣细胞的水分越来越跟不上其散失的水分。Harada 等 (2010) 曾研究认为, 香石竹花瓣 *PIP1* 可能涉及花朵开放过程的水分代谢。从本研究的结果来看, *GhPIP1;1* 很可能参与唐菖蒲小花开放进程中花瓣细胞的水分代谢过程。不过, 这方面还有待于进一步研究验证。

本研究中着重就唐菖蒲 *GhPIP1;1* 的主要特征及其表达特点进行了分析和探讨, 为接下来开展该基因在唐菖蒲切花采后水分代谢中的作用及其调控研究奠定了基础。鉴于该基因很可能参与唐菖蒲切花小花开放及凋谢过程的水分代谢, 将来在明确其功能及其调控机制的情况下可望为延缓唐菖蒲及其他切花采后的失水凋萎及其贮运保鲜提供新的思路和策略。

## References

- Bai Ji-gang, Xu Pei-lei, Zong Cheng-shun, Wang Cai-yun. 2008. Effects of exogenous calcium on vase life and some physiological characteristics of cut *Gladiolus*. *Scientia Agricultura Sinica*, 41 (10): 3229 - 3239. (in Chinese)
- 白吉刚, 许培磊, 宗成顺, 王彩云. 2008. 外源钙对唐菖蒲切花的保鲜效果和生理效应. *中国农业科学*, 41 (10): 3229 - 3239.
- Bots M, Feron R, Uehlein N, Weterings K, Kaldenhoff R, Mariani T. 2005. PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development. *Journal of Experimental Botany*, 56 (409): 113 - 121.
- Chrispeels M J, Crawford N M, Schroeder J I. 1999. Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *Plant Cell*, 11: 661 - 667.
- Ding X, Iwasaki I, Kitagawa Y. 2004. Overexpression of a lily *PIP1* gene in tobacco increased the osmotic water permeability of leaf cells. *Plant, Cell and Environment*, 27 (2): 177 - 186.
- Ezhilmathi K, Singh V P, Arora A, Sairam R K. 2007. Effect of 5-sulfosalicylic acid on antioxidant activity in relation to vase life of *Gladiolus* cut flowers. *Plant Growth Regulation*, 51 (2): 99 - 108.

- Harada T, Torii Y, Morita S, Masummura T, Satoh S. 2010. Differential expression of genes identified by suppression subtractive hybridization in petals of opening carnation flowers. *Journal of Experimental Botany*, 61 (9): 2345 - 2354.
- Hossain Z, Mandal A K A, Datta S K, Biswas A K. 2006. Decline in ascorbate peroxidase activity - A prerequisite factor for tepal senescence in gladiolus. *Journal of Plant Physiology*, 163: 186 - 194.
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Fraysse L, Alfons R W, Kjellbom P. 2001. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology*, 126: 1358 - 1369.
- Jones, R B, Faragher J D, van Doorn W G. 1993. Water relations of cut flowering branches of *Thryptomene calycina* (Lindl.) Stapf. (Myrtaceae). *Postharvest Biology and Technology*, 3: 57 - 67.
- Krane C M, Kishore B K. 2003. Aquaporins: The membrane water channels of the biological world. *Biologist*, 50 (2): 81 - 86.
- Li Hong-mei, Ding Yue-lian, Huang Xin-min, Lin Yan-fei, Zou Jie-yun, He Sheng-gen. 2011. Cloning and characterization of aquaporin gene *DcPIP2* in cut carnations. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (11): 2199 - 2208. (in Chinese)
- 李红梅, 丁岳炼, 黄新敏, 林燕飞, 邹洁云, 何生根. 2011. 香石竹切花水孔蛋白基因 *DcPIP2* 的克隆及特征分析. *园艺学报*, 38 (11): 2199 - 2208.
- Li Hong-mei, Wan Xiao-rong, He Sheng-gen. 2010. Advances in plant aquaporins. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 37 (1): 29 - 35. (in Chinese)
- 李红梅, 万小荣, 何生根. 2010. 植物水孔蛋白最新研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 37 (1): 29 - 35.
- Li Deng-di, Huang Geng-qing, Tan Xin, Wang Jie, Wang Xiu-lan, Xu Wen-liang, Wu Ya-jie, Wang Hong, Li Xue-bao. 2006. Cloning of *GhAQPI* gene and its specific expression during ovule development in cotton. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 32 (5): 543 - 550. (in Chinese)
- 李登弟, 黄耿青, 谭新, 王杰, 王秀兰, 许文亮, 吴雅洁, 汪虹, 李学宝. 2006. 棉花 *GhAQPI* 基因克隆及其在胚珠发育中的特异表达. *植物生理与分子生物学报*, 32 (5): 543 - 550.
- Ma Nan, Xue Jing-qi, Li Yun-hui, Liu Xiao-jing, Dai Fan-wei, Jia Wen-suo, Luo Yun-bo, Gao Jun-ping. 2008. *Rh-PIP2;1*, a rose aquaporin gene, is involved in ethylene-regulated petal expansion. *Plant Physiology*, 148 (2): 894 - 907.
- Postaire O, Verdoucq L, Maurel C. 2008. Aquaporins in plants: From molecular structures to integrated functions. *Advances in Botanical Research*, 46: 75 - 136.
- Rae L, Lao N T, Kavanagh T A. 2011. Regulation of multiple aquaporin genes in *Arabidopsis* by a pair of recently duplicated DREB transcription factors. *Planta*, 234 (3): 429 - 444.
- Sakurai J, Ahamed A, Murai M, Maeshima M, Uemura M. 2008. Tissue and cell-specific localization of rice aquaporins and their water transport activities. *Plant Cell Physiology*, 49 (1): 30 - 39.
- Verkman A S. 2011. Aquaporins at a glance. *Journal of Cell Science*, 124 (13): 2107 - 2112.
- Wudick M M, Luu D T, Maurel C. 2009. A look inside: Localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytologist*, 184 (2): 289 - 302.
- Zelazny E, Micielica U, Borst J W, Hemminga M A, Chaumont F. 2009. An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins ZmPIP2;4 and ZmPIP2;5 to the plasma membrane. *The Plant Journal*, 57 (2): 346 - 355.