

# 津田芜菁 *BrPIP1* 的克隆及其在非生物胁迫下的表达分析

宋 珊, 马 璇, 闫海芳\*

(东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

**摘 要:** 克隆得到津田芜菁 (*Brassica rapa* ssp. *rapifera* ‘Tsuda’) 质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic proteins, PIPs) 基因全长 cDNA 序列, 命名为 *BrPIP1* (GenBank 登录号为 KJ173685), 全长为 1 056 bp, 开放阅读框为 861 bp, 编码 286 个氨基酸。荧光定量 PCR 分析 *BrPIP1* 在不同组织以及其在温度、脱水、渗透、ABA 和盐等非生物胁迫条件下幼苗中的表达表明, 该基因表达具有组织特异性, 在花瓣中表达量最高, 花蕾中次之; 在上述非生物胁迫下表达量都有不同程度增加, 暗示 *BrPIP1* 在非生物胁迫应答中发挥作用。

**关键词:** 芜菁 (蔓菁); *PIP1*; 基因克隆; 非生物胁迫; 表达分析

**中图分类号:** S 631.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2017) 07-1335-09

## Cloning and Expression of the *BrPIP1* Gene in *Brassica rapa* subsp. *rapa* ‘Tsuda’ Under Abiotic Stress

SONG Shan, MA Xuan, and YAN Haifang\*

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** In this study, we cloned the plasma membrane intrinsic proteins1 (PIP1) gene from *Brassica rapa* ‘Tsuda’, which was designated as *BrPIP1* with the accession number of KJ173685 in the NCBI GenBank. The full cDNA sequence of the *BrPIP1* gene has 1 056 base pairs, containing an open reading frame of 861 bp encoding a protein of 286 amino acids. We determined the expression of the *BrPIP1* gene in different tissues and under different abiotic stress conditions, such as extreme temperature, dehydration, adverse osmosis, abscisic acid (ABA) and salt stress by quantitative-PCR analysis. The results demonstrated that the highest expression levels of the *BrPIP1* gene could be reached in the petal, followed by the bud, with tissue specificity. The expression of the *BrPIP1* gene was upregulated under the aforementioned stress conditions, suggesting that the *BrPIP1* gene may play a role in response of abiotic stresses.

**Keywords:** *Brassica rapa*; *PIP1*; gene cloning; abiotic stress; gene expression

收稿日期: 2017-05-04; 修回日期: 2017-07-03

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (DL12CA10); 黑龙江省哈尔滨市青年后备人才项目 (2015RQXXJ062); 国家自然科学基金项目 (31272200, 30730078)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yanhaifang224@126.com)

水孔蛋白 (aquaporin, AQP) 属于主要内在蛋白 (major intrinsic proteins, MIPs) 中的一个重要分支, 在生物的物质代谢中发挥重要功能 (Scalera et al., 2014)。MIPs 家族蛋白能够促进水和甘油等极性分子的跨膜运输, 其中 AQPs 主要负责水分的运输 (Park et al., 2010)。质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic proteins, PIPs) 是一类定位于质膜上的水孔蛋白。近年来许多编码 PIPs 的水孔水稻蛋白基因陆续被发现, 比如拟南芥 (Johanson et al., 2001)、番茄 (Zhang et al., 2013)、水稻 (Scalera et al., 2014; Vinnakota et al., 2015)、烟草 (Zhuo et al., 2016) 等多个物种中发现多个 PIPs 基因。PIPs 不仅与植物的水分、多种小分子物质的运输有关 (Berny et al., 2016), 还与植物在非生物胁迫条件下的物质代谢有关 (Li et al., 2015)。在很多高等植物中, PIPs 又进一步分为 PIP1 和 PIP2 两类 (Kaldenhoff & Fischer, 2006; Lawrence et al., 2013), 其中, 拟南芥作为模式生物, 已有 13 种 PIPs 基因被发现和研究, 其中 PIP1 类有 5 种, PIP2 类有 8 种 (Johanson et al., 2001)。另外有研究发现 PIP1 和 PIP2 的成员在执行特定的功能时存在一定的协同 (Wang et al., 2016), 两者都具有 6 个跨膜的  $\alpha$ -螺旋, 6 个跨膜结构域通过膜两侧的 5 个亲水环 (1~5 Loop) 相互连接, 其中 1、3、5 环位于膜外, 2 和 4 环及氨基和羧基末端位于膜内, 2 和 5 环上都具有 MIPs 家族保守的基序 NPA (Asn-Pro-Ala) 结构域, 该结构是运输水和甘油的基础 (Jiang & Tong, 2007)。PIP1 和 PIP2 两类氨基酸序列不同, PIP1s 相对于 PIP2s 更易磷酸化, N-端更长, C-端更短, 这可能也是导致两个成员具有不完全相同功能的原因, 比如 PIP2 比 PIP1 具有较强的水通道活性 (Li et al., 2013)。

已有研究表明 PIP1 基因在拟南芥 (Di et al., 2013)、香蕉 (Xu et al., 2014)、唐菖蒲 (林燕飞等, 2013)、杜梨 (冉昆等, 2016) 等物种中的大部分组织中都有表达, 在根、花中的表达较高。在低温 (Zhuo et al., 2016)、干旱 (Li et al., 2013)、盐 (Xu et al., 2014) 等非生物胁迫下 PIP1 基因表达量也有不同程度的增加。芜菁具有很高的食用价值和药用价值。有研究表明新疆芜菁水提取物 (BAE) 对肿瘤具有一定的抑制作用 (马国财等, 2016)。为研究 *BrPIP1* 基因在芜菁中的表达特性, 参考拟南芥 *AtPIP1* 序列, 通过 RT-PCR 结合 RACE 技术克隆了芜菁 *BrPIP1* 基因, 研究 *BrPIP1* 应答逆境胁迫的分子机制, 为津田芜菁的生物信息学研究提供依据, 也为未来在基因水平上调控其生长或生产提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料处理

取东北林业大学生命科学学院温室中生长 2 个月左右的津田芜菁 (*Brassica rapa* L. ssp. *rapifera* 'Tsuda') 茎、根、叶 (第 5 叶)、花后 1 d 的花瓣和长 8 mm 的花蕾、种子萌发 4 d 的幼苗, 共计 6 个样品, 液氮冷冻, 置于  $-80^{\circ}\text{C}$  (2016 年 5 月), 用于组织表达研究。取种子萌发 4 d 的幼苗进行  $4^{\circ}\text{C}$  和  $37^{\circ}\text{C}$  处理 2、4、8 和 24 h, 以及脱水处理 0、1、2 和 4 h。将萌发 4 d 的幼苗根部置于 PEG (10%)、甘露醇 ( $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、ABA ( $150\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、NaCl ( $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、KCl ( $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、LiCl ( $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 CsCl ( $60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 液体中处理 2、4、8 和 24 h, 将材料液氮冷冻, 置于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。同时取相应时间点未处理幼苗作为对照。每次处理 8 株苗, 重复 3 次。

### 1.2 *BrPIP1* 的 cDNA 克隆与序列测定

利用 Trizol RNA 提取试剂盒 (TaKaRa 公司) 提取津田芜菁总 RNA, 利用 Nanodrop 系统和琼脂糖凝胶电泳检验浓度和纯度后, 以总 RNA 为模板, 以 oligo (dT)<sub>17</sub> + P19E 为引物, 以  $1\text{ }\mu\text{g}$  总 RNA 为模板, 根据反转录试剂盒 (BioLabs 公司) 操作说明合成 cDNA。

利用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 法克隆基因序列, 以根皮 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 为模板, 以 oligo (dT)<sub>17</sub> 接头引物: 5'-GACTCGAGTGCACATCG (T)<sub>17</sub>-3' 为引物, 用反转录酶 III (Invitrogen) 合成 cDNA。3'-RACE 参考拟南芥 *PIP1* 基因序列设计引物 BrPIP1-F: 5'-ATTGCTGAGTTTATAGCT ACGTT-3' 和接头引物: 5'-GACTCGAGTGCACATCG-3' 进行 PCR 扩增: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 随后 30 个循环, 每循环 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火扩增 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 90 s, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测、回收目的条带, 与 pEASY-T5 载体 (北京全式金公司) 连接, 转化大肠杆菌, 挑选克隆并测序 (引物分别为 M13 正反向引物)。

利用 5'/3'-RACE 试剂盒 (Roche) 克隆 5' 末端。基因特异性引物 *BrPIP1*-3F: 5'-TTCCTTTGG TGTAGCCATGAGCT-3'; oligo (dT) 锚定引物: 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC (T)<sub>16</sub>(A/C)-3'; PCR 锚定引物: 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3', 进行 PCR 扩增, 克隆 *BrPIP1* 基因的 5' 端序列, 体系及后续方法同 3'-RACE。

根据 RACE 获得的序列设计引物 *BrPIP1*-F: 5'-ATGGAAGGCAAAGAAGAAGA-3' 和 *BrPIP1*-R: 5'-TCAGCTTCTGGACGTTTGAA-3', 验证 cDNA 序列拼接的正确性。

### 1.3 *BrPIP1* 基因生物信息学分析

1) 利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 的 nucleotide BLAST 对 *BrPIP1* 序列的同源性进行对比分析。2) 利用 NCBI 的 protein BLAST 程序分析 *BrPIP1* 保守性功能域。3) 利用 TMHMM server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线工具对 *BrPIP1* 蛋白的跨膜情况进行分析。4) ProtParam 工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *BrPIP1* 的理化性质。5) 利用 [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/) 分析分子量和等电点。6) 利用 MEGA6.0 构建进化树。

### 1.4 津田芜菁 *BrPIP1* 基因表达分析

利用 Trizol 试剂盒提取所有材料的 RNA, 借助 Nanodrop 测定 RNA 浓度, 并将浓度调到一致, 以 RNA 为模板反转录成 cDNA。定量表达检测 *BrPIP1* 的引物为 BrPIP1-F: 5'-TACACCAAAGGAA GTGGTCT-3', BrPIP1-R: 5'-TTCTTGGTCCACTTGGCAAC-3', 内标 *BrACTIN* 的引物为 BrACTIN-F: 5'-GCTCAGTCCAAGAGAGGTATTC-3', BrACTIN-R: 5'-GCTCGTTGTAGAAAGTGGATC-3'。反应体系: 5  $\mu\text{L}$  SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (TaKaRa, 日本), 0.2  $\mu\text{L}$  ROX Reference Dye (50 $\times$ ) (TaKaRa, Japan), 4.5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O (TIANGEN, 中国), 0.17  $\mu\text{L}$  cDNA, 0.33  $\mu\text{L}$  引物混合物 (正、反向引物各 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。Real-Time PCR 程序: 预变性 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个扩增循环 (95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  31 s), 最后 60  $^{\circ}\text{C}$  加热到 90  $^{\circ}\text{C}$  的溶解过程。定量 PCR 仪器: 7 500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)。表达水平计算:  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ ,  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{目的基因}) - \text{Ct}(\text{Actin})$ 。每个样品设 3 次试验重复, 3 次生物学重复。运用 Duncan's 多重比较, 相同字母为差异不显著 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 *BrPIP1* cDNA 序列分析

克隆了 *BrPIP1* 基因序列, 将该序列进行 BLAST 检索, 显示其与拟南芥 *AtPIP1b* 具有极高的同源性, 高达 90% 以上, 命名为 *BrPIP1* (*BrPIP1b1*), GenBank 登录号为 KJ173685。*BrPIP1* 序列全长 1 056 bp, 5' 非翻译区长 25 bp, 3' 非翻译区长 171 bp, 开放阅读框区长 861 bp, 编码 286 个氨基酸多肽 (图 1)。

BrPIP1 蛋白的分子量为 30.5 kD, 等电点为 9.16。分子式为  $C_{1416}H_{2176}N_{362}O_{374}S_9$ , 原子总数为 4 337, 带负电荷的残基 (Asp + Glu) 有 17 个, 带正电荷的残基 (Arg + Lys) 有 23 个, 属于稳定蛋白; PIP1 蛋白 GRAVY 约为 0.410, 为疏水性蛋白。BrPIP1 蛋白含有 MIPs 超家族中一段高度保守的氨基酸序列 (HINPAVTFG), 并含有 AQP 家族成员所共有 2 个保守序列 NPA (图 1)。具有水通道蛋白典型的 6 个跨膜区 (TM1 ~ TM6), 由膜两侧的 5 个环状结构 (环 1 ~ 5) 连接, 其中第 1、3 和 5 环在细胞膜外, 第 2 和 4 环以及 C、N 末端都位于细胞膜内。2 个保守序列 NPA 分别位于 2 环和 5 环上 (图 1)。再次说明 *BrPIP1* 基因编码的蛋白质属于水通道蛋白家族。

```

1   GCCCTTAAAGAAGCTCAAAGTGAATGGAAGGCAAAGAAGAAGATGTTAGAGTCGGAGCCAACAAGTT
1   M E G K E E D V R V G A N K F
69  TCCTGAGAGACAGCCGATCGGAACATCGGCTCAGAGCGACAAGGACTACAAGGAGCCACCTCCCGTCC
16  P E R Q P I G T S A Q S D K D Y K E P P P A P
      N-terminal (1-52 aa)
138 CTTGTTGAGCCCGCGGAGCTTGTCTGTGGTCTTCTGGAGAGCAGGGATCGCCGAGTTCATCGCCAGC
39  L F E P G E L A S W S F W R A G I A E F I A T
208 TTTCTGTTCTTTACATCACTGTTTTGACCGTCATGGGTGTGAAGAGGTGCGCGAACATGTGTCTTCTGT
62  F L F L Y I T V L T V M G V K R S P N M C A S V
      TM1 (53-75 aa) loop 1 (76-89 aa)
279 CGGAATCCAAGGCATCGCTTGGGCTTCGGTGGTATGATCTTCGCTCTCGTCTACTGCACCGTGGTATC
86  G I O G I A W A F G G M I F A L V Y C T A G I
      TM2 (90-112 aa)
349 TCCGGTGGACACATCAACCCAGCAGTCACGTTTCGGTCTGTCTTGGCGGGAAGCTTTCGCTTACACGA
109 S G G H I N P A V T F G L F L A R K L S L T R
      loop 2 (113-132 aa)
418 GCTGTGTACTACATAGTGATGCAGTGCTTAGGAGCTATCTGTGGAGCTGGTGTGGTCAAGGGTCCAA
132 A V Y Y I V M Q C L G A I C G A G V V K G F Q
      TM3 (133-155 aa)
487 CCAAAGCAGTACCAAGCTCTTGGAGTGGAGCCAACACTGTAGCTCCTGGTTACACCAAGGAAGTGG
155 P K O Y O A L G G G A N T V A P G Y T K G S G
      loop 3 (156-174 aa)
555 TCTCGGAGCTGAGATTATTGGAACCTTTGTCCTTGTTCACCCGTCTTCTCCGCTACTGATGCTAAGAGA
178 L G A E I I G T F V L V Y T V F S A T D A K R
      TM4 (175-194 aa)
625 AACGTCGTGACTCTCATGTTCCCACTTCTGCACCTCTCCTATTGGATTCGCTGTGTTCTGGTCCACTT
201 N A R D S H V P I L A P L P I G F A V F L V H L
      loop 4 (195-206 aa) TM5 (207-229 aa)
696 GGCAACCATCCCCATCACTGGAAGTGAATCAACCCAGCAAGAAGTCTTGGAGCTGCAATCATCTTCA
225 A T I P I T G T G I N P A R S L G A A L I F
      loop 5 (230-254 aa)
764 ACAAGGACAACGCTTGGGACGACCATTGGGCTTCTGGGTTGGACCATTCATCGGTGCTGCACTCGCT
247 N K D N A W D D H W V F W V G P F I G A A L A
832 GCTCTATACCAGTGTGATCGTATCAGAGCCATCCCATCAAGTCCAGAAGCTGATTGAGTTACTCTTA
270 A L Y H V I V I R A I P F K S R S
      TM6 (255-277 aa) C-terminal (278-286 aa)
900 TAAGCCTGGCTTTTGTCTCTTAGTTTGGTTTCTTTTGTGAATGTACTACTACTACTACTTGTGTGAA
971 ACATCGTGTGATGTGTTGGTTGCTTCTTTTGCCTAATGCAGACTCTAATTATAAACAGAGTCAGAG
1041 ACATCCCTGAAAAA

```

图 1 津田芜菁 *BrPIP1* 基因核苷酸序列和其编码的氨基酸序列

下划线是 N 端和 C 端, 阴影是 6 个跨膜区, 波浪线是 5 个环, 框内是 NPA 域。

Fig. 1 cDNA and deduced protein sequence of *BrPIP1* from Tsuda gene

N-terminal and C-terminal are underlined. Six transmembrane regions are highlighted. Five loop regions are wavy lined. NPA regions are boxed.

利用 MEGA6.0 软件, 将津田芜菁 BrPIP1 氨基酸序列与大豆 PIP1、小麦 PIP1、丝颖针茅 PIP、龙眼 PIP1、菠菜 PIP1<sub>2</sub>、甘蓝 PIP1b<sub>2</sub>、麻风树 PIP1、苹果 PIP1、唐菖蒲 PIP1、橡胶树 PIP1、大白菜 PIP1b<sub>1</sub>、拟南芥 PIP1A、拟南芥 PIP1B 和欧洲油菜 PIP1-2 共 14 个物种, 15 条氨基酸序列构建系统进化树 (图 2)。结果表明, 津田芜菁的 BrPIP1 与油菜 PIP1 亲缘关系最近, 并与同为十字花科的拟南芥、甘蓝、大白菜聚为一支, 其他科属的 PIP1 则聚为一支。

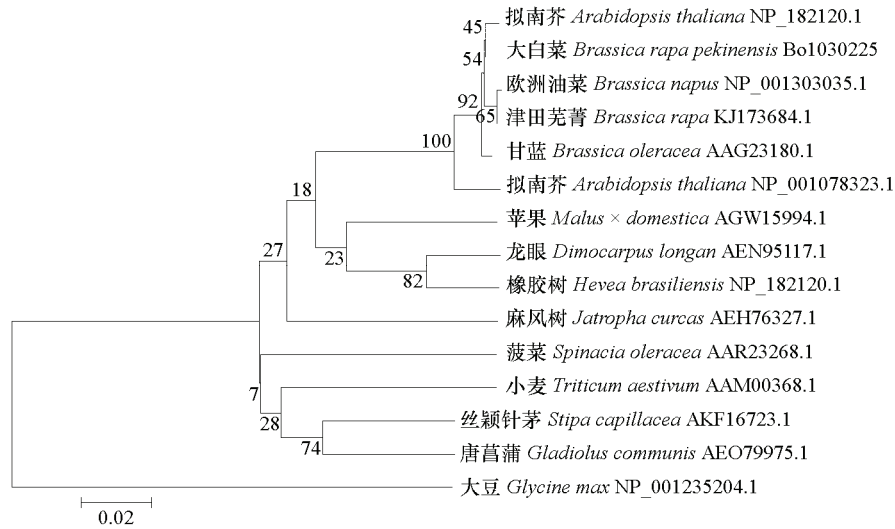


图 2 *BrPIP1* 进化树分析

用 1000 个重复进行 Bootstrap 检验, 可信度超过 25% 的在接点部位标出。

Fig. 2 *BrPIP1* phylogenetic analysis

The numbers next to the nodes indicate bootstrap values of more than 25% support from 1000 replicates.

## 2.2 *BrPIP1* 组织特异性表达

*PIP1* 基因在植物的大多数组织根茎叶花中都有表达, 且表达具有一定的组织特异性, 因此对 *BrPIP1* 在芜菁茎、根、花瓣、花蕾、叶和幼苗不同组织中的表达进行分析 (图 3), 结果表明津田芜菁 *BrPIP1* 基因在检测组织中都有表达, 在花瓣中的表达最高, 在根、花蕾、幼苗中次之。在茎最少, 具有一定的组织表达特异性。

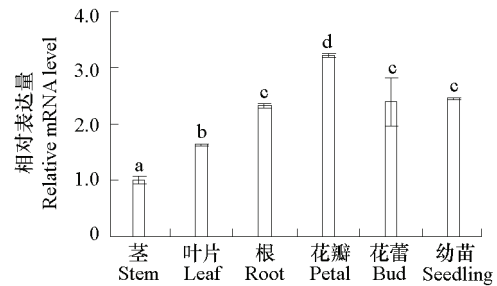


图 3 芜菁不同组织中 *BrPIP1* 的表达

Fig. 3 Expression of *BrPIP1* in various *Tsuda* tissues

## 2.3 温度、脱水胁迫下 *BrPIP1* 的表达

将 4 d 龄幼苗进行 4 °C 和 37 °C 处理, 在处理的 24 h 内 *BrPIP1* 在低温和高温中表达量都增加, 且都在 8 h 分别增加了 10 倍和 68 倍之后开始下降 (图 4)。在脱水处理中, 将 4 d 龄幼苗置于室温

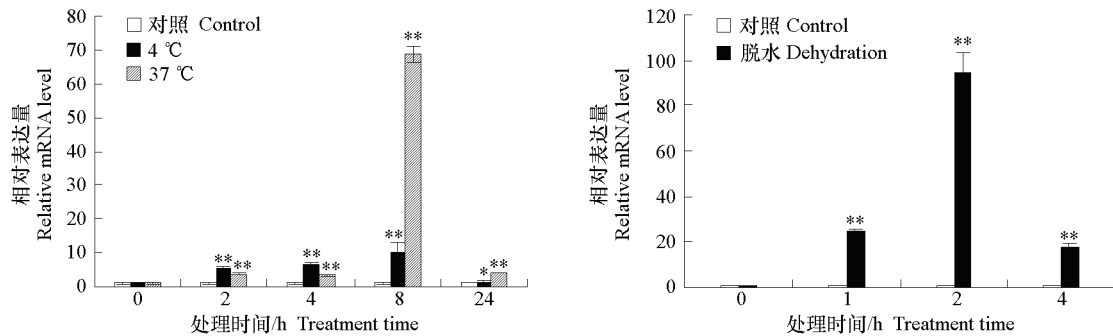


图 4 4 °C、37 °C 和脱水处理下芜菁 4 d 幼苗中 *BrPIP1* 的表达

Fig. 4 Expression of *BrPIP1* treated by 4 °C、37 °C and dehydration in 4-day-old seedling

脱水环境中脱水处理, *BrPIP1* 的表达量在脱水处理 2 h 时是增加至未处理时的 94 倍, 随后降低 (图 4)。结果说明, 对于水孔蛋白基因 *BrPIP1* 来说无论是高温、低温还是脱水处理在短时间内都能诱导其上调表达。

## 2.4 渗透胁迫下 *BrPIP1* 的表达

检测 *BrPIP1* 在 PEG 和甘露醇处理后的表达, 结果发现在 PEG 和甘露醇处理 24 h 内, *BrPIP1* 表达量在处理 2 h 后均迅速增加, 分别为未处理时的 37.9 倍和 15.6 倍, 之后表达量都下降 (图 5)。说明渗透胁迫都促进了 *BrPIP1* 的表达。

## 2.5 脱落酸 (ABA) 处理下 *BrPIP1* 的表达

在 ABA 处理 2 h 时, *BrPIP1* 表达量比未处理时增加了 4.9 倍, 4 h 时增加了 27.8 倍, 之后表达量降低。说明 *BrPIP1* 基因可能也参与了 ABA 信号的转导 (图 6)。

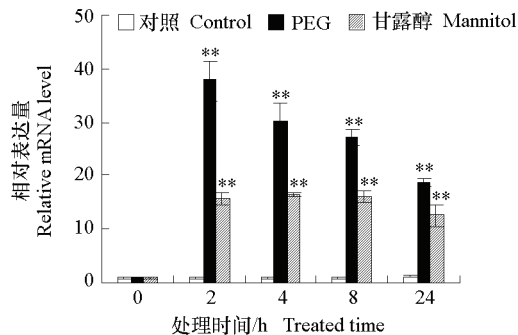


图 5 渗透胁迫 (PEG、甘露醇) 下芜菁幼苗中 *BrPIP1* 的表达  
Fig. 5 Expression of *BrPIP1* treated by osmotic stress (PEG, mannitol) in seedling

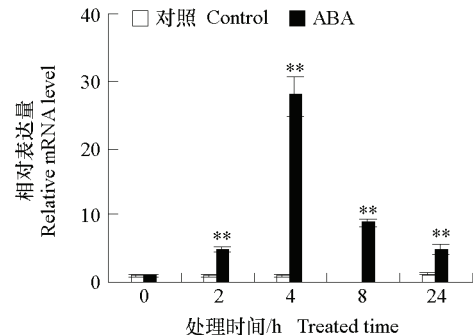


图 6 ABA 处理下芜菁幼苗中 *BrPIP1* 的表达  
Fig. 6 Expression of *BrPIP1* treated by ABA in seedling

## 2.6 无机盐胁迫下 *BrPIP1* 的表达

在植物生存环境中, 盐胁迫是大多数植物所面临的环境因素之一, 在高盐环境中, 植物为了生存细胞保持着细胞质  $K^+/Na^+$  比, 提高细胞之间水分的运输。检测了 NaCl、KCl、LiCl 和 CsCl 处理津田芜菁幼苗后 *BrPIP1* 基因的表达, NaCl 和 LiCl 处理 4 d 龄幼苗后 *BrPIP1* 基因表达量在处理的 2 h 时分别增加了 67.2 和 44.1 倍, 之后降低 (图 7)。

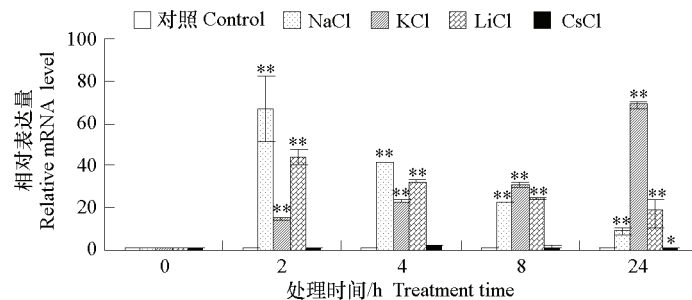


图 7 NaCl、KCl、LiCl 和 CsCl 处理下芜菁幼苗中 *BrPIP1* 的表达  
Fig. 7 Expression of *BrPIP1* treated by NaCl, KCl, LiCl and CsCl in seedling

KCl 处理后 *BrPIP1* 基因在 24 h 内表达量增加至未处理时的 68.7 倍, 而 CsCl 处理则抑制了 *BrPIP1* 基因的表达 (图 7), 说明 *BrPIP1* 基因在盐胁迫应答中发挥作用。

### 3 讨论

本研究克隆了津田芜菁水孔蛋白 *BrPIP1* 基因, *BrPIP1* 蛋白含有水孔蛋白家族蛋白特有的保守氨基酸序列和 NPA 基序, 并且具有植物 PIPs 的特征信号序列 GGGANXXXXGY 和 TGI/TNPARSL/FGAAI/VI/VF/YN。*BrPIP1* 蛋白还含有 6 个跨膜区和 5 个环状结构, 所有这些都是鉴别植物水孔蛋白基因及其类别划分的重要标准 (Postaire et al., 2007)。进化树分析进一步表明 *BrPIP1* 蛋白为 PIP1 类水孔蛋白, 并与同科的油菜、拟南芥等亲缘关系最近。

水孔蛋白 PIP1 类蛋白属于多基因家族, 不同成员表达模式不同, 有的组成型表达, 有的特异性表达 (刘迪秋 等, 2009)。在津田芜菁中 *BrPIP1* 基因在茎、根、花瓣、花蕾、叶和幼苗中都有表达, 在花瓣中表达量最高, 根、花蕾和幼苗中次之。同样在百合中, *PIP1* 基因在花瓣、花药等组织中都有表达, 在花瓣中表达量最高 (Ding & Iwasaki, 2003)。在唐菖蒲中 *GhPIP1* 基因也在花瓣、雌蕊、雄蕊等花发育组织中高量表达 (林燕飞 等, 2013)。这些研究结果表明该类基因可能在花的发育和开放中发挥重要作用。另外 *BrPIP1* 基因在芜菁的根和幼苗中也高量表达, 而拟南芥的根中 *PIP1* 基因也高量表达, 这可能与植物生长都由根系吸收水分, 供给植物生长需要有关 (颜培玲 等, 2015; 冉昆 等, 2016)。

在植物抗逆分子机制研究中, 分离出很多 *PIP1* 家族基因参与抗逆应答反应 (Ayadi et al., 2011; Hu et al., 2012)。检测低温、高温、脱水、渗透、脱落酸和 4 种无机盐对津田芜菁 *BrPIP1* 基因表达的影响。将津田芜菁 4 d 龄幼苗进行 4 °C 处理 4 h 内 *BrPIP1* 基因表达量增加, 可能与抗低温应答反应有关, 而之后表达量降低, 说明较长时间低温处理植株可能会适应低温条件; 在香蕉、杜梨、水稻等植物中 12 h 以上的处理 *PIP1* 基因表达都下降 (Matsumoto et al., 2009; Xu et al., 2014; 冉昆 等, 2016), 暗示低温可能抑制了 *BrPIP1* 基因表达。短时间 37 °C 处理也促进了 *BrPIP1* 基因在幼苗中的表达, 可能该基因在高温胁迫应答中也发挥作用。

水孔蛋白可以使体内水分快速流动, 以维持植物体内水分平衡、保证植物在干旱等缺水环境中的生长发育。大多数水孔蛋白 PIP1 都参与植株干旱、脱水胁迫应答, 在山羊豆、香蕉、马尾松等物种干旱胁迫中 *PIP1* 基因表达量增加 (Xu et al., 2014; Li et al., 2015; 蔡琼 等, 2016), 津田芜菁中 *BrPIP1* 基因受脱水处理诱导, 呈现出先增后减的趋势, 很有可能是当植物水分大量的丧失时, *BrPIP1* 大量表达来调节植物体内水分的运输和代谢, 说明 *BrPIP1* 基因参与调节了这一胁迫反应。

植物体内渗透压改变, 直接影响植物细胞内水分膜内外的流动 (Li et al., 2015), 用 PEG 和甘露醇进行渗透胁迫处理, *BrPIP1* 基因转录水平迅速增加, 同 PEG 处理的山羊豆、水稻、杜梨和甘露醇处理的香蕉中 *PIP1* 基因转录水平平均增加的趋势相似 (Guo et al., 2006; Xu et al., 2014; Li et al., 2015), *BrPIP1* 基因可能对提高植物吸收和转运水分的能力、应对胁迫环境的能力有一定的调节作用。

山羊豆 *GoPIP1* 基因与 ABA 合成和信号转导有关, *GoPIP1* 基因促进脱落酸 ABA 合成相关基因的表达 (Li et al., 2015)。本研究中 ABA 处理促进了 *BrPIP1* 基因的表达, *BrPIP1* 基因除了参与非生物胁迫应答, 也可能参与了 ABA 合成和信号的转导。

盐离子胁迫是大多数植物生存所面临的环境因素之一, 在拟南芥中过量表达香蕉 *MaPIP1* 基因, 提高了转基因植株耐盐和渗透胁迫的能力 (Xu et al., 2014)。本研究中 NaCl、LiCl 和 KCl 处理的

芜菁都促进了 *BrPIP1* 基因的表达, 而 CsCl 则抑制了该基因的表达, NaCl 处理促进了拟南芥、香蕉、山羊豆等物种 *PIP1* 基因的表达, 以提高植物抵抗盐胁迫的能力 (Jang et al., 2004; Xu et al., 2014; Li et al., 2015)。

水孔蛋白主要参与水分的吸收和外排, 尤其在根部水分吸收和外排中发挥作用 (Aroca et al., 2012)。在植物生长发育和相应环境胁迫中, 提高 *PIP1* 基因表达, 增加植物体内水分吸收。随着胁迫时间得延长, *PIP1* 基因表达下降, 减少水分的排出, 维持植物体内水分平衡, 减少环境胁迫对植物的伤害, 使植物度过难关。*PIP1* 基因和 *PIP2* 基因可共同协调植物体的水分代谢, *BrPIP1* 基因的研究也为进一步研究两亚家族成员间的互作机制提供参考。

## References

- Aroca R, Porcel R, Ruizlozano J M. 2012. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 63 (1): 43.
- Ayadi M, Cavez D, Miled N, Chaumont F, Masmoudi K. 2011. Identification and characterization of two plasma membrane aquaporins in durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) and their role in abiotic stress tolerance. *Plant Physiol Bioch*, 49: 1029 - 1039.
- Berny M C, Gilis D, Rooman M, Chaumont F. 2016. Single mutations in the transmembrane domains of maize plasma membrane aquaporins affect the activity of monomers within a heterotetramer. *Molecular Plant*, 9 (7): 986 - 1003.
- Cai Qiong, Ding Guijie, Xiao Peng. 2016. Cloning of the *PmPIP1* gene from *Pinus massoniana* and its expression with drought stress. *Journal of Zhejiang A & F University*, 33 (2): 191 - 200. (in Chinese)
- 蔡琼, 丁贵杰, 晓鹏. 2016. 马尾松水通道蛋白 *PmPIP1* 基因克隆及在干旱胁迫下的表达分析. *浙江农林大学学报*, 33 (2): 191 - 200.
- Di P M, Vialaret J, Li G W, Hem S, Prado K, Rossignol M, Maurel C, Santoni V. 2013. Coordinated post-translational responses of aquaporins to abiotic and nutritional stimuli in *Arabidopsis* roots. *Molecular & Cellular Proteomics* Mcp, 12 (12): 3886.
- Ding X, Iwasaki I Y. 2003. Overexpression of a lily *PIP1* gene in tobacco increased the osmotic water permeability of leaf cells. *Plant Cell & Environment*, 27 (2): 177 - 186.
- Guo L, Wang Z Y, Lin H, Cui W E, Chen J, Liu M, Chen Z L, Qu L J, Gu H Y. 2006. Expression and functional analysis of the rice plasma-membrane intrinsic protein gene family. *Cell Research*, 16 (3): 277 - 286.
- Hu W, Yuan Q, Wang Y, Cai R, Deng X, Wang J, Zhou S, Chen M, Chen L, Huang C. 2012. Overexpression of a wheat aquaporin gene, *TaAQP8*, enhances salt stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol*, 53: 2127 - 2141.
- Jang J Y, Kim D G, Kim Y O, Kim J S, Kang H. 2004. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 54 (5): 713 - 725.
- Jiang Y, Tong H. 2007. Importance of NPA motifs in the expression and function of water channel aquaporin-1. *Science Bulletin*, 52 (6): 771 - 776.
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Fraysse L, Weig A R, 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 (4): 1358 - 1369.
- Kaldenhoff R, Fischer M. 2006. Functional aquaporin diversity in plants. *BBA Bio-membranes*, 1758: 1134 - 1141.
- Lawrence S D, Novak N G, Xu H, Cooke J E. 2013. Herbivory of maize by southern corn rootworm induces expression of the major intrinsic protein *ZmNIP1;1* and leads to the discovery of a novel aquaporin *ZmPIP2;8*. *Plant Signal Behav*, 8 (8): e249371-8.
- Li D D, Ruan X M, Zhang J, Wu Y J, Wang X L, Li X B. 2013. Cotton plasma membrane intrinsic protein 2s (PIP2s) selectively interact to regulate their water channel activities and are required for fibre development. *New Phytol*, 199 (3): 695 - 707.
- Li J, Ban L, Wen H, Wang Z, Dzyubenko N, Chapurin V, Gao H, Wang X. 2015. An aquaporin protein is associated with drought stress tolerance. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 459 (2): 208 - 213.



- Lin Yanfei, Li Hongmei, Ding Yuelian, Huang Xinmin, Xian Xijin, He Shenggen. 2013. Cloning and expression analysis of a plasma membrane aquaporin gene *GhPIP1; 1* in cut *Gladiolus* flowers. *Acta Horti Sin.*, 40 (1): 145 - 154. (in Chinese)
- 林燕飞, 李红梅, 丁岳练, 黄新敏, 洗锡金, 何生根. 2013. 唐菖蒲质膜水孔蛋白基因 *GhPIP1;1* 的克隆及表达分析. *园艺学报*, 40 (1): 145 - 154.
- Liu Diqu, Wang Jilei, Ge Feng, Li Wenxian. 2009. Advances in the physiological functions of plant aquaporins. *Journal of Biology*, 26 (5): 63 - 66. (in Chinese)
- 刘迪秋, 王继磊, 葛 锋, 李文娴. 2009. 植物水通道蛋白生理功能的研究进展. *生物学杂志*, 26 (5): 63 - 66.
- Ma Guocai, Wang Yuru, Xuan Zhengying. 2016. Analysis and comparison of nutritional compositions in Xinjiang turnip (*Brassica rapa* L.). *Science and Technology of Food Industry*, 37 (4): 360 - 364. (in Chinese)
- 马国财, 王玉茹, 轩正英. 2016. 新疆芜菁不同品种营养成分分析与比较. *食品工业科技*, 37 (4): 360 - 364.
- Matsumoto T, Lian H L, Su W A, Tanaka D, Liu C W, Iwasaki I, Kitagawa Y. 2009. Role of the aquaporin PIP1 subfamily in the chilling tolerance of rice. *Plant & Cell Physiology*, 50 (2): 216 - 229.
- Park W, Scheffler B E, Bauer P J, Campbell B T. 2010. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biology*, 10 (1): 142
- Postaire O, Verdoucq L, Maurel C. 2007. Aquaporins in plants: From molecular structure to integrated functions. *Advances in Botanical Research*, 46 (7): 75 - 136.
- Ran Kun, Sun Xiaoli, Wang Hongwei, Wei Shuwei, Wang Shaomin, Zhang Yong. 2016. Cloning and expression analysis of a plasma membrane aquaporin gene *PbPIP1* in *Pyrus betulifolia*. *Plant Physiol.*, (6): 868 - 876. (in Chinese)
- 冉 昆, 孙晓莉, 王宏伟, 魏树伟, 王少敏, 张 勇. 2016. 杜梨质膜水孔蛋白基因 *PbPIP1* 的克隆与表达分析. *植物生理学报*, (6): 868 - 876.
- Scalera V, Gena P, Mastrodonato M, Kitagawa Y, Carulli S, Svelto M, Calamita G. 2014. Functional reconstitution of a rice aquaporin water channel, *PIP1; 1*, by a micro-batchwise methodology. *Plant Physiology & Biochemistry*, 85: 78 - 84.
- Vinnakota R, Ramakrishnan A M, Samdani A, Venugopal M A, Ram B S, Krishnan S N, Sankaranarayanan K, Murugesan D. 2015. A comparison of aquaporin function in mediating stomatal aperture gating among drought-tolerant and sensitive varieties of rice (*Oryza sativa* L.). *Protoplasma*, 1 - 5.
- Wang W F, Zong Y Z, Zhang S Q. 2016. Effects of short-term osmotic stress on leaf hydraulic conductivity and *ZmPIPs* mRNA accumulation in maize seedlings. *Journal of Integrative Agriculture*, 15 (11): 2497 - 2506.
- Xu Y, Hu W, Liu J, Zhang J B, Jia C H, Miao H X, Xu B Y, Jin Z Q. 2014. A banana aquaporin gene, *MaPIP1; 1*, is involved in tolerance to drought and salt stresses. *BMC Plant Biology*, 14 (1): 59.
- Yan Peiling, Pan Xuejun, Zhang Wene. 2015. Cloning of aquaporin gene *VhPIP1* in *Vitis heyneana* and its expression under drought stress. *Acta Horti Sin.*, 42 (2): 221 - 232. (in Chinese)
- 颜培玲, 潘学军, 张文娥. 2015. 野生毛葡萄水通道蛋白基因 *VhPIP1* 的克隆及其在干旱胁迫下的表达分析. *园艺学报*, 42 (2): 221 - 232.
- Zhang D Y, Ali Z, Wang C B, Xu L, Yi J X, Xu Z L, Liu X Q, He X L, Huang Y H, Khan I A, Trethowan R M, Ma H X. 2013. Genome-wide sequence characterization and expression analysis of major intrinsic proteins in soybean (*Glycine max* L.). *PLoS ONE*, 8 (2): e56312
- Zhuo C, Wang T, Guo Z, Lu S Y. 2016. Overexpression of *MfPIP2-7*, from *Medicago falcata*, promotes cold tolerance and growth under  $\text{NO}_3^-$  deficiency in transgenic tobacco plants. *BMC Plant Biology*, 16 (1): 1 - 10.