

西番莲水通道蛋白 *PePIP2* 基因克隆及表达分析

敖茂宏¹, 马伏宁^{2,3}, 彭 杨¹, 黄东梅², 邢文婷², 吴 斌², 许 奕^{2,3*}

1. 贵州省亚热带作物研究所, 贵州兴义 562400; 2. 中国热带农业科学院海口实验站/海南省香蕉遗传改良重点实验室, 海南海口 571101; 3. 中国热带农业科学院三亚研究院/海南省南繁生物安全与分子育种重点实验室/海南省崖州湾种子实验室, 海南三亚 572000

摘要: 西番莲作为新兴的热带果树, 在热带农业中具有非常重要的作用, 然而干旱、高温等非生物胁迫严重影响其正常生长发育。相关研究表明水通道蛋白 (AQP) 能够提高植物的抗逆性, 本研究以西番莲‘台农’ (*Passiflora edulia* Sims) 为实验材料, 利用西番莲的基因组数据, 通过同源克隆法从西番莲中克隆得到了一个水通道蛋白基因 *PePIP2*, 其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 861 bp, 编码 286 个氨基酸。对其进行生物信息学分析, 其分子式为 $C_{1417}H_{2156}N_{360}O_{373}S_8$, 预测分子量为 30 459.37 Da, 等电点为 8.84, 亚细胞定位于细胞膜上。启动子区域分析显示其含有参与胁迫应答的顺式作用元件。对其进行干旱、高盐、低温、高温胁迫下的表达分析, 结果表明: *PePIP2* 能够受到干旱、高温和低温胁迫的诱导表达, 其中在土壤含水量为 50%, 在 45°C 高温处理 4 h 和 0°C 低温处理 48 h, 其表达量最高。在烟草中进行瞬时表达, 在不同时间的干旱胁迫处理下, *PePIP2* 的表达水平也受到不同程度的诱导。该研究结果将为西番莲抗逆机制解析和分子育种等方面打下基础。

关键词: 西番莲; 水通道蛋白; 克隆; 生物信息学; 非生物胁迫; 表达

中图分类号: S667.9 文献标识码: A

Cloning and Expression Analysis of *PePIP2* Gene from *Passiflora edulia* Sims

AO Maohong¹, MA Funing^{2,3}, PENG Yang¹, HUANG Dongmei², XING Wenting², WU Bin², XU Yi^{2,3*}

1. Guizhou Subtropical Crop Institute, Xingyi, Guizhou 562400, China; 2. Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Key Laboratory of Banana Genetic Improvement, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Key Laboratory for Biosafety Monitoring and Molecular Breeding in Off-season Reproduction Regions / Yazhou Bay Seed Laboratory, Sanya, Hainan 572000, China

Abstract: Passion fruit (*Passiflora edulia* Sims), as an emerging tropical fruit tree, plays a very important role in tropical agriculture. However, abiotic stresses such as drought and high temperature seriously affect its normal growth and development. Relevant studies have shown that aquaporin (AQP) can improve the stress resistance of plants. In this study, *Passiflora* ‘Tainong’ was used as the material, an aquaporin gene *PePIP2* was cloned using the genome data of passion fruit. The open reading frame (ORF) was 861 bp, encoding 286 amino acids. The molecular formula was $C_{1417}H_{2156}N_{360}O_{373}S_8$, the molecular weight was 30 459.37 Da, the isoelectric point was 8.84, and the subcellular localization was on the cell membrane. Analysis of the promoter region revealed that it contained cis-acting elements involved in stress response. The expression analysis showed that *PePIP2* could be induced by drought, high temperature and low temperature stress. Among them, the expression level was the highest when the soil water content was 50%, treated at 45°C for 4 h and at 0°C for 48 h. Transiently expressed in tobacco, the expression of *PePIP2* was also induced to varying degrees under drought stress at different times. The results of this study would lay the foundation for

收稿日期 2022-04-24; 修回日期 2022-05-23

基金项目 黔科合服企项目 (No. [2019]4005); 海南省自然科学基金项目 (No. 321MS091, No. 321RC1088)。

作者简介 敖茂宏 (1981—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 作物育种。*通信作者 (Corresponding author): 许奕 (XU Yi), E-mail: lukydog163@163.com。

the analysis of the stress resistance mechanism and molecular breeding of the passion fruit.

Keywords: passion fruit (*Passiflora edulia* Sims); aquaporin; cloning; bioinformatics; abiotic stress; express

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.01.003

西番莲 (*Passiflora edulia* Sims) 是原产于热带地区的藤本植物, 属被子植物门双子叶植物纲西番莲科 (*Passifloraceae*) 西番莲属 (*Passiflora*), 是珍稀的热带亚热带水果。果实酸甜可口, 风味浓郁, 芳香怡人, 故有“果汁之王”美誉, 其又被称为百香果。果实被誉为天然香料, 是重要的高档甜点调味剂、调香剂, 全株都具有药用价值, 是世界上已知最芳香的水果之一, 是一种极具开发前景的优质水果。因此, 西番莲在热带农业中具有非常重要的地位。西番莲在国内的种植面积是 7.33 万 hm^2 (农业农村部 2021 年数据), 已超过起源地巴西 (6.66 万 hm^2), 位列世界第一。然而, 其是典型的“易种难管”的热带高品质果树, “难管”的其中最重要的原因就是环境变换导致的逆境胁迫时常发生, 且给产业造成毁灭性伤害, 如高温导致座果率降至正常温度的 10%~15%, 低温致死, 干旱和高盐抑制生长发育, 究其根本原因就是抗性品种的缺乏, 且西番莲特有的抗逆机制不清楚。因此通过对西番莲的抗逆基因资源进行挖掘, 研究该基因的功能来进一步提高西番莲的抗逆性就成为一个重要的手段。

大量的研究表明, 植物细胞中的膜蛋白在植物抗逆过程中具有重要作用, 水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 就是其中研究较为深入和系统的一类膜蛋白。水通道蛋白是一类位于各种细胞膜上 24~34 kDa 的小分子跨膜蛋白, 能够调节水分以及其他小分子物质的运输。植物中存在较多的水通道蛋白成员, 其中拟南芥中有 35 个^[1], 水稻中有 33 个^[2], 玉米中有 36 个^[3], 香蕉中有 47 个^[4]。根据序列同源性, AQP 被分为 8 大亚家族, 分别为质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)、液泡膜内在蛋白 (tonoplast intrinsic proteins, TIPs)、类 Nod26 膜内在蛋白 (nodulin 26-like intrinsic proteins, NIPs)、碱性小分子膜内在蛋白 (small basic intrinsic proteins, SIPs)、GlpF 样内在蛋白 (GlpF-like intrinsic proteins, GIPs)、未鉴定膜内在蛋白 (uncategorized members designated X intrinsic proteins, XIPs)、杂种内在蛋白 (hybrid intrinsic proteins, HIPs)、大的内在蛋白

(large intrinsic proteins, LIPs)^[5]。这 8 类 AQP 具有高度保守结构, 都有 6 个倾斜的右旋性跨膜结构 (TM1 to TM6), 并被 5 个环 (loop) 所连接。

AQP 不仅在植物生长发育过程如生殖生长、种子萌发、气孔运动等方面起着重要作用^[6-8], 而且能够控制植物体内的水分平衡而响应干旱、高盐 and 低温等各种非生物胁迫^[9-11]。相关报道显示, 在植物中过量表达一些 AQP 家族基因能够提高转基因植物对低温胁迫的耐受性。在拟南芥中过表达 *MaPIP1;1* 能够提高其抗寒能力^[12], *MaSIP2-1* 提高了转基因香蕉的耐寒性^[9], 在烟草中转化 *TaAQP7* 提高了其耐低温的能力^[13]。

综上所述, 当前的研究揭示了 AQP 基因在提高植物抵抗非生物胁迫上起着重要的作用。目前西番莲中关于 AQP 基因的功能研究尚未见报道。本研究以西番莲全基因组数据为基础, 在前期的转录组数据中, 选取了 1 个受到非生物胁迫诱导表达的 AQP 基因 *PePIP2*, 对其进行克隆并运用生物信息学分析其核酸序列的特征、蛋白质理化性质、蛋白结构、系统进化关系、启动子元件等信息, 并对其在干旱、高盐、低温、高温胁迫诱导的表达模式进行验证和研究, 通过烟草瞬时表达进一步验证了其能够响应干旱胁迫诱导表达。研究结果对于深入了解 AQP 基因家族功能, 同时为西番莲抗逆功能基因的挖掘及抗逆育种提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

选取西番莲‘台农’嫩叶, 用无菌水清洗后立即用液氮速冻放 -80°C 冰箱备用, 西番莲取自中国热带农业科学院海口实验站种苗组培中心。pCAMBIA1304 表达载体取自中国热带农业科学院海口实验站。克隆载体 pMD19-T、RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、高保真酶 PrimeS-TAR[®] Max DNA Polymerase、实时荧光定量 PCR 试剂盒、T4 连接酶均购自 TaKaRa 公司, 大肠杆菌感受态 (*E. coli* DH5 α)、农杆菌感受态 (EHA105)、

质粒提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购自 AXY-GEN 公司, DNA Marker (DL 2000) 购自北京中科瑞泰公司。无缝克隆试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。其他化学药品为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 的获得 将西番莲‘台农’嫩叶用液氮研磨,按照柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒说明书进行。1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,将其反转录获得 cDNA 并置于-80℃冰箱中保存备用。

1.2.2 目的基因的获得 从西番莲基因组数据库中获取西番莲 AQP 家族基因 *PePIP2* 的序列,利用 NCBI Primer-BLAST 在线工具设计全长引物,引物序列为 *PePIP2F* (5'-ATGGCAAAGGATGTG GAGACAGCAG-3')和 *PePIP2R* (5'-CTAAACAGT TGGGTTGCTCCTGAAG-3'),以 cDNA 为模板扩增 *PePIP2* 全长序列。PCR 扩增程序为:95℃ 预变性 3 min;95℃ 40 s,55℃ 40 s,72℃ 50 s,共 35 个循环,72℃ 失活 10 min。对 PCR 产物进行 PCR 产物纯化回收,连接克隆载体 pMD19-T,转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞,对长出的单克隆菌落 PCR 鉴定,选取几个 PCR 鉴定阳性的克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。

1.2.3 生物信息学分析 使用 ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 在软件线计算蛋白的等电点 (pI)、分子量 (Mw) 和分子式。利用 Clustal X 和 MEGA3 软件,将 *PePIP2* 所编码的氨基酸序列与其他植物中的 PIP 的氨基酸序列进行了系统进化树的比对分析。利用 WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 在线软件预测它们的亚细胞定位点。从 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 数据库获得 *PePIP2* 基因转录起始位点上游的 2000 bp 基因组 DNA 序列,用于鉴定 *PePIP2* 基因启动子区域的作用元件^[14]。利用 DNAMAN 对各物种中的 PIP2 的氨基酸序列进行比对。

1.2.4 不同非生物胁迫处理及不同组织中的表达 选择西番莲‘台农’品种的健康无病毒组育苗,在培养室 [温度为 30℃;光照强度为 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;12 h 光照/12 h 黑暗循环;70%

相对湿度]中生长至约 1 m 并具有 8~10 个功能叶片时进行各种非生物胁迫处理。干旱胁迫处理时,停止浇水至土壤水分为 50%和 10%时进行叶片取样。高盐胁迫处理时,用 300 mmol/L NaCl 溶液进行浇灌幼苗分别在第 3 天和第 10 天时进行叶片取样。低温处理时,将植株在 0℃下分别处理 20、48 h 进行叶片取样。对于高温处理时,植物在 45℃分别处理 2、4、24 h 进行叶片取样。进行西番莲不同组织中的表达,根、茎、叶分别取生长至 1 m 并具有 8~10 个功能叶的西番莲各幼嫩组织,花、果分别采自儋州实验基地的健康材料。对上述各样品用液氮速冻,提取 RNA 并反转录成 cDNA。根据 *PePIP2* 全长基因序列设计荧光定量引物,*qPePIP2F* (5'-AGGACTATCATGACCCACCACCA GCA-3')和 *qPePIP2R* (5'-GCGATCCCAAGAATT CCAACACCAGC-3'),选用西番莲 *EF1 α* 为内参基因,进行 qRT-PCR 检测,使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算相对表达水平。

1.2.5 表达载体的构建 用添加 *Nco* I 和 *Spe* I 酶切位点的 *PePIP2* 全长引物扩增 *PePIP2*-19T 载体获得 PCR 产物,进行纯化回收。用 *Nco* I 和 *Spe* I 将获得的 PCR 产物和 pCAMBIA1304 表达载体分别进行双酶切,回收片段后进行 T4 连接酶连接,转化大肠杆菌感受态,37℃过夜培养,将平板上的克隆进行摇菌 PCR 检测,提取质粒酶切验证。

1.2.6 干旱胁迫下的烟草瞬时表达 将构建成功的 *PePIP2*-pCAMBIA1304 载体质粒转化农杆菌感受态 EHA105,进行阳性克隆验证,将验证成功的克隆摇菌保存。取 1 mL 农杆菌接种至 50 mL YEP 液体培养基中,在 28℃摇床中摇至 $OD_{600}=1.0$ 。在 8000 r/min 转速下,5 min 离心收菌,配置含有 0.2 mmol/L AS(乙酰丁香酮),10 mmol/L MgCl_2 ,pH 5.6 (KOH 调 pH) 的 10 mmol/L MES 溶液,洗菌体,重悬至 $OD_{600}=1.0$ 。将重悬后的菌液室温放置 3~5 h,用 1 mL 注射器,去掉针头,注射本氏烟草的叶片下表皮,黑暗培养 48 h,切下直径为 0.5 cm 的叶盘,在 25℃下漂浮在含有 18% (m/V) 的 PEG 6000 (模拟干旱胁迫) 1/2 MS 液体培养基中进行 0、2、4、8、12、24、36、48 h 处理,将各叶盘进行液氮冻样提取 RNA 并反转录,对 *PePIP2* 基因在各处理下进行荧光定量 PCR 分析检测。

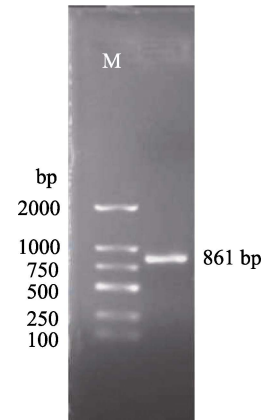
2 结果与分析

2.1 *PePIP2* 基因的克隆与鉴定

以西番莲‘台农’嫩叶的 cDNA 为模板, 用基因全长引物 *PePIP2F* 和 *PePIP2R* 进行 PCR 扩增, 获得 *PePIP2* 的基因全长为 861 bp (图 1), 编码 286 个氨基酸 (图 2)。

2.2 生物信息学分析

2.2.1 *PePIP2* 编码蛋白质的理化性质分析 利用 ProtParam 在线软件分析 *PePIP2* 的理化性质, 其分子式为 $C_{1417}H_{2156}N_{360}O_{373}S_8$, 分子量为 30 459.37 Da, 理论等电点 (pI) 为 8.84。预测其定位于细胞质中。



M: DL2000 DNA marker.

图 1 *PePIP2* 基因克隆 PCR 鉴定
Fig. 1 PCR amplification of *PePIP2* gene

| | | | | | | | | | |
|-----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
| 1 | ATGGCAAAGGATGTGGAGACAGCAGGATCACTTCGGCTAAGGACTATCATGACCCACCAGCACCAATTGTTTATGATGCAGAGGAGCTGGGAAGGTGG | | | | | | | | |
| | M | A | K | D | V | E | T | A | G |
| | S | F | S | A | K | D | Y | H | D |
| | P | P | P | A | P | L | F | D | A |
| | E | E | L | G | R | W | | | |
| 100 | 109 | 119 | 129 | 139 | 149 | 159 | 169 | 179 | 189 |
| 34 | TCATTCTACAGAGCTTTGATTGCTGAGTTTATAGCAACTCTGCTCTTCTTTACGTTACTGTTCTCACTGTTATTGGGTACAAGGCCAGTCTGATGTT | | | | | | | | |
| | S | F | Y | R | A | L | I | A | E |
| | F | I | A | T | L | L | F | L | Y |
| | V | T | V | L | T | V | I | G | Y |
| | K | S | Q | S | D | V | | | |
| 199 | 208 | 218 | 228 | 238 | 248 | 258 | 268 | 278 | 288 |
| 67 | CACAAGGTGAATGCTGACGCTTGTGCTGGTGTGGAATTCCTGGGATCGCTTGGCCCTTTGGTGGCATGATCTTTATCCTTGTTTACTGCAGTCTGCTGGT | | | | | | | | |
| | H | K | V | N | A | D | A | C | A |
| | G | V | G | I | L | G | I | A | W |
| | A | F | G | G | M | I | F | I | L |
| | V | Y | C | T | A | G | | | |
| 298 | 307 | 317 | 327 | 337 | 347 | 357 | 367 | 377 | 387 |
| 100 | ATTTCGGGGGACATCAACCCAGCAGTGCATTTGGGCTTTTCTAGCCCGTAAGGTCTCATTGGTGGAGGGCGTTGCTGTACATGGTGGCTCAGTGT | | | | | | | | |
| | I | S | G | H | I | N | P | A | V |
| | T | F | G | L | F | L | A | R | K |
| | V | S | L | V | R | A | L | L | Y |
| | M | V | A | Q | C | | | | |
| 397 | 406 | 416 | 426 | 436 | 446 | 456 | 466 | 476 | 486 |
| 133 | TTAGGACCCATATGTGGAGTTGGGCTAGTCAAGTCCCTCCAAAAGCCTACTACAACCACTATGGTGGTGGTGTCAACGGTGTCAAGATGGGTTCCAGC | | | | | | | | |
| | L | G | A | I | C | G | V | G | L |
| | V | K | S | F | Q | K | H | Y | Y |
| | N | H | Y | G | G | A | N | G | V |
| | Q | D | G | F | S | | | | |
| 496 | 505 | 515 | 525 | 535 | 545 | 555 | 565 | 575 | 585 |
| 166 | AAAGGCAGTCCGCTTAGGTGCTGAGATCATCGGCACCTTTTCTGCTGCTACTGTTCTCCGCCACCGATCCCAAAGAGTGCAGGACTCTCAT | | | | | | | | |
| | K | G | T | A | L | G | A | E | I |
| | I | G | T | F | V | L | V | Y | T |
| | V | F | S | A | T | D | P | K | R |
| | S | A | R | D | S | H | | | |
| 595 | 604 | 614 | 624 | 634 | 644 | 654 | 664 | 674 | 684 |
| 199 | GTGCTGTTTGGCTCCACTTCTACTTGGATTGCTGTTTTCATGGTTCACCTTGGCCACCAATCCAACTGGAACAGGCATCAACCCAGCAAGGAGT | | | | | | | | |
| | V | P | V | L | A | P | L | P | I |
| | G | F | A | V | F | M | V | H | L |
| | A | T | I | P | I | T | G | T | G |
| | I | N | P | A | R | S | | | |
| 694 | 703 | 713 | 723 | 733 | 743 | 753 | 763 | 773 | 783 |
| 232 | TTGGGAGCTGCTGTAATCTTCAACCGAGGCAGTGCCTGGGATGATCAATGGATCTTCTGGGTTGGACCCCTTCAATGGAGCCATTGCAGCCTTCTAT | | | | | | | | |
| | L | G | A | A | V | I | F | N | R |
| | G | S | A | W | D | D | Q | W | I |
| | F | W | V | G | P | F | I | G | A |
| | A | A | I | A | A | F | Y | | |
| 793 | 802 | 812 | 822 | 832 | 842 | 852 | | | |
| 265 | CACCAGTTCATCTTGAGAGCAGGAGCTGTCAAGGCTCTTGGGTCCTTCAGGAGCAACCCAACTGTTTATG | | | | | | | | |
| | H | Q | F | I | L | R | A | G | A |
| | V | K | A | L | G | S | F | R | S |
| | N | P | T | V | * | | | | |

图 2 *PePIP2* 基因 CDS 区核苷酸序列及其推导氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *PePIP2* CDS region

2.2.2 氨基酸序列比对 由 *PePIP2* 推导的氨基酸序列与 NCBI 中已登录的其他高等植物的 PIP2 氨基酸序列进行同源关系的比较, 结果显示, 各种植物 PIP2 编码的氨基酸序列存在较高的同源性, 多数都达到 64% 以上 (图 3)。BLASTX 分析表明, *PePIP2* 编码的氨基酸序列与银白杨 *PaPIP2* (*Populus alba*), 含羞草 *MpPIP2* (*Mimosa pudica*), 麻风树 *JcPIP2* (*Jatropha curcas*), 菜豆 *PvPIP2* (*Phaseolus vulgaris*), 雷公藤 *TwPIP2* (*Tripterygium wilfordii*), 雨树 *SsPIP2* (*Samanea saman*) 编码的氨基酸序列具有较高的一致性, 分别为 84.72%、

84.38%、69.58%、69.23%、68.53%、64.11%。

2.2.3 *PePIP2* 编码蛋白质的 Motif 分析 利用 Motif Search (<http://www.genome.jp/tools/motif/>) 在线软件对推导的 *PePIP2* 氨基酸序列进行生物学意义的位点分析 (图 4), 只在 30~265 位点之间预测到 1 个 MIP 结构域, 位点 230 的氨基酸 (A, 丙氨酸) 为主要内在蛋白。

2.2.4 *PePIP2* 启动子元件分析 利用 PlantCARE 软件对 *PePIP2* 基因的启动子元件进行分析, 结果表明该片段包含多个 TATA-box 和 CAAT-box 核心 cis-acting element, 其余的功能元件主要包括 3 个

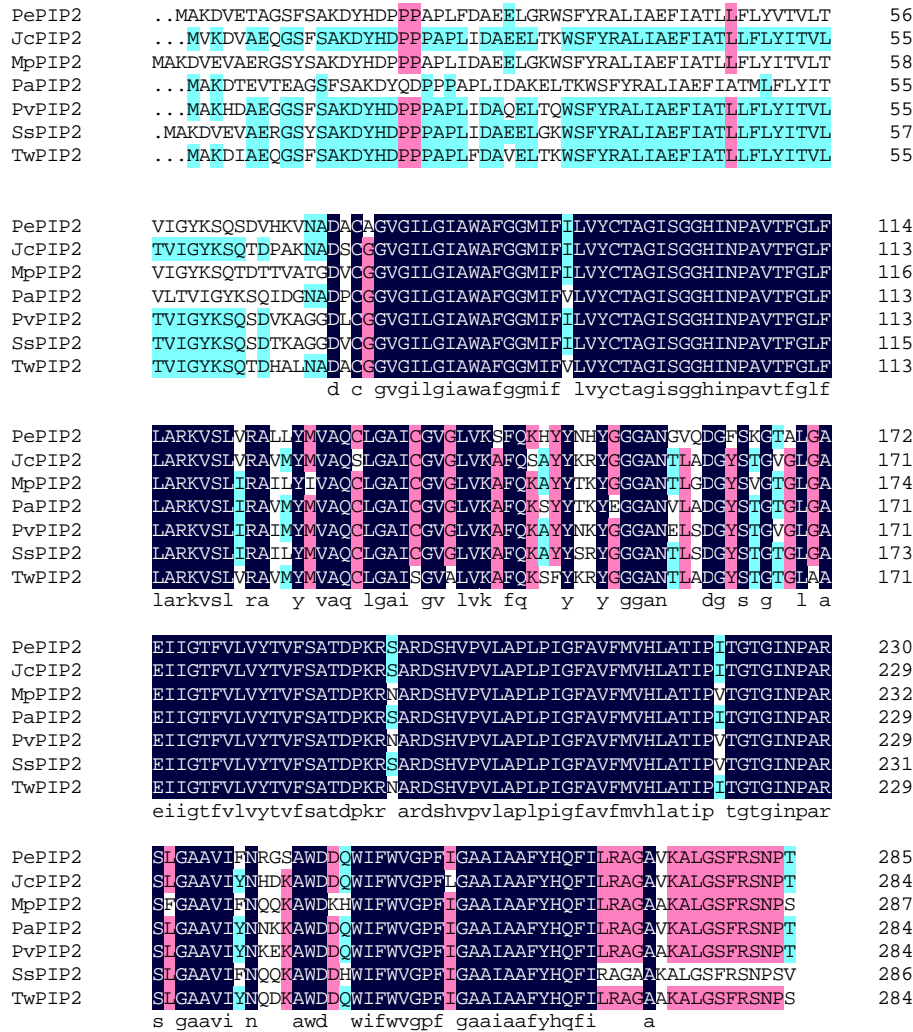


图 3 *PePIP2* 氨基酸序列差异比对

Fig. 3 Sequence difference alignment of *PePIP2* amino acid



图 4 *PePIP2* 蛋白序列 Motif 预测分析

Fig. 4 Motif prediction from deduced amino acid sequence of *PePIP2*

脱落酸响应元件 (ABRE), 1 个低温响应元件 (LTR), 1 个生长素响应元件 (AuxRR-core), 2 个与厌氧反应相关的元件 (ARE), 2 个与防御相关的元件 (TC-rich repeats), 7 种类型的光响应元件 (TCCC-motif, TCT-motif, ATCT-motif, Box 4, G-Box, AE-box, MRE) 等 (图 5)。该分析表明基因的功能可能和非生物胁迫和植物发育相关。

2.2.5 *PePIP2* 进化树分析 利用 Clustal X 和 MEGA3 软件, 将 *PePIP2* 所编码的氨基酸序列与其他植物中的 PIP2 的氨基酸序列进行系统进化

树的比对分析。结果表明西番莲 *PePIP2* 与含羞草 *MpPIP2* (*Mimosa pudica*), 木豆 *CcPIP2* (*Cajanus cajan*), 大豆 *GsPIP2* (*Glycine soja*) 这 3 个物种的同源基因具有较近的亲缘关系 (图 6)。

2.3 不同非生物胁迫下及在各组织中的表达分析

前期对西番莲在干旱、高盐、高温、低温胁迫进行转录组分析, 其中 *PePIP2* 受到干旱、高温和低温胁迫, 其转录组 FPKM 值如表 1。本研究对其进行了 qRT-PCR 验证, 结果表明该基因未受到高盐胁迫的诱导表达在干旱、高温和低温胁迫

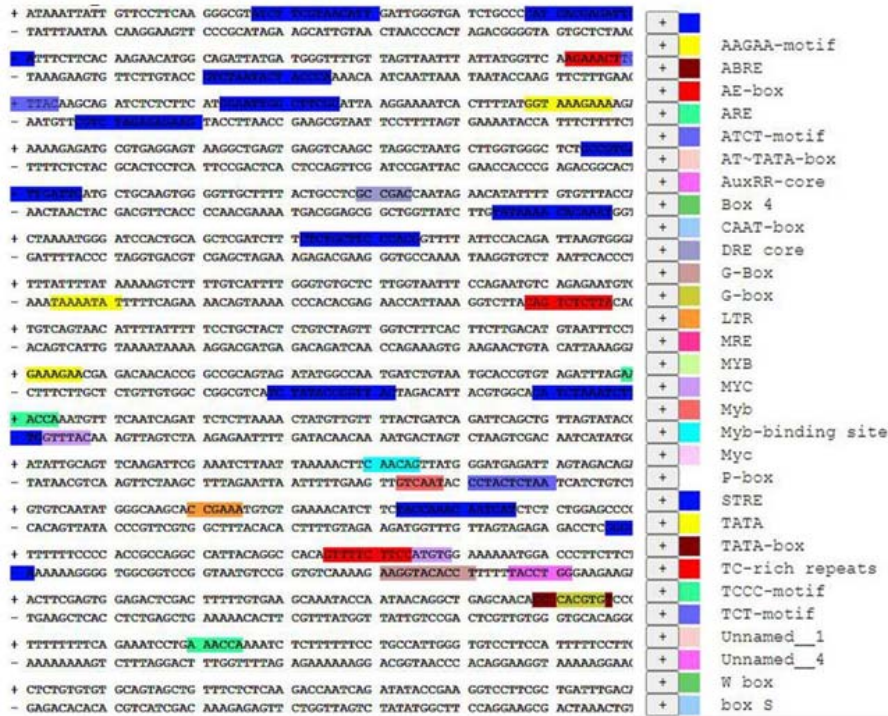


图 5 *PePIP2* 启动子顺式作用元件

Fig. 5 cis-acting element of *PePIP2*

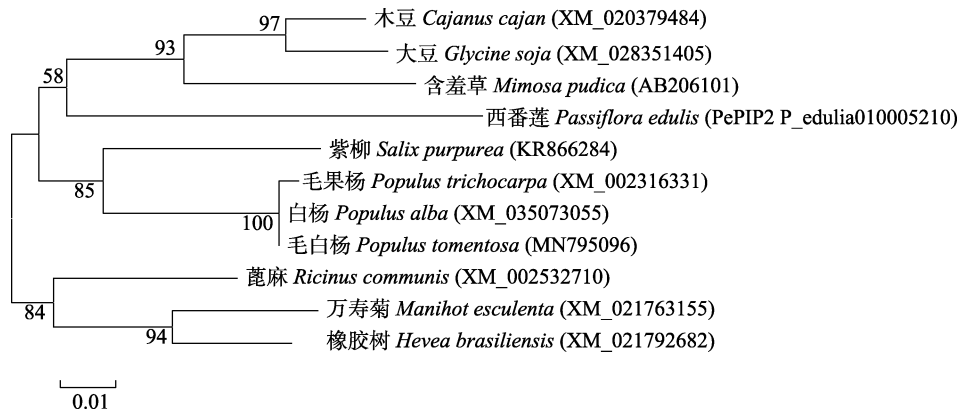


图 6 不同植物 PIP2 的进化树分析

Fig. 6 Phylogenetic relationships of known PIP2 in plants

表 1 *PePIP2* 在非生物胁迫转录组测序中的 FPKM 值

Tab. 1 FPKM values of *PePIP2* in abiotic stress transcriptome sequencing

| 对照 CK | 干旱 50% Drought 50% | 干旱 10% Drought 10% | 盐 3 d Salt 3 d | 盐 10 d Salt 10 d | 低温 20 h Low temperature 20 h | 低温 48 h Low temperature 48 h | 高温 2 h High temperature 2 h | 高温 4 h High temperature 4 h | 高温 24 h High temperature 24 h |
|----------|--------------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| 72.1108 | 231.6430 | 207.1410 | 88.2703 | 66.0960 | 164.7219 | 329.1531 | 215.2940 | 278.5230 | 72.1108 |

下均被诱导表达 (图 7), 其中在土壤含水量为 50%, 在 45℃ 高温处理 4 h 和 0℃ 低温处理 48 h, 其表达量最高。在对其进行组织特异性的表达结果表明, *PePIP2* 在西番莲的各个组织中均有表达, 其中在根部表达量最高 (图 8)。

2.4 *PePIP2* 表达载体构建

将 *PePIP2* 基因连接表达载体 pCAMBIA-1304 质粒进行酶切验证, 结果如图 9 所示, 在 861 bp 处有酶切的条带, 与该基因大小一致。表明 *PePIP2* 已经成功连接到 pCAMBIA-1304 载体上。

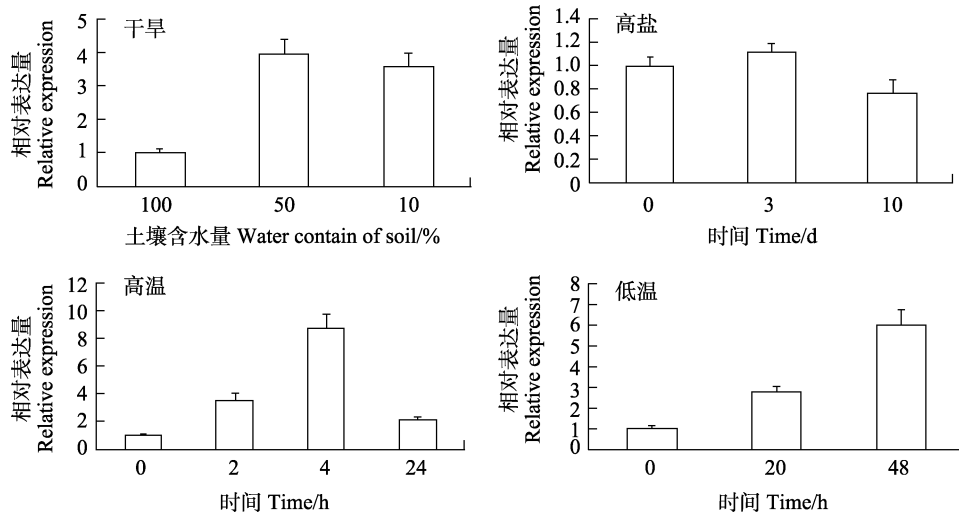


图 7 不同非生物胁迫中 *PePIP2* 的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *PePIP2* under different abiotic stresses

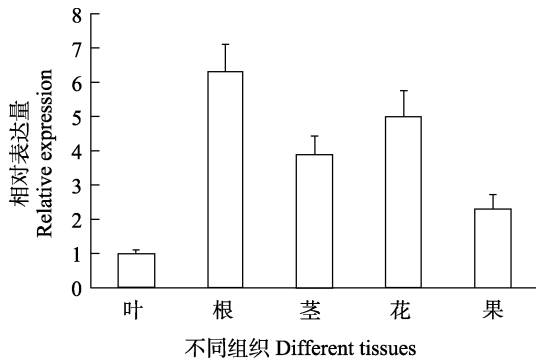
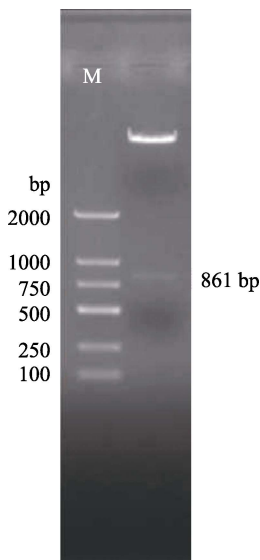


图 8 *PePIP2* 在西番莲不同组织中的表达模式

Fig. 8 Expression patterns of *PePIP2* in different tissues of passion fruit



M: DL2000 DNA marker.

图 9 *PePIP2*-pCambia-1304 载体酶切验证图

Fig. 9 Picture of *PePIP2*-pCambia-1304 vector digestion verification

2.5 干旱胁迫下烟草瞬时表达分析

将各时期干旱胁迫处理的烟草提取 RNA 并反转录为 cDNA, 对 *PePIP2* 基因进行表达分析, 结果表明在经过不同时期的干旱胁迫处理后, *PePIP2* 均被诱导表达, 呈现先升后降的趋势, 其中当干旱胁迫 12 h 其表达量最大 (图 10)。

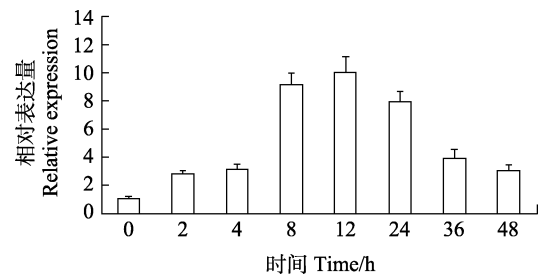


图 10 瞬时表达烟草叶片不同时间干旱胁迫下 *PePIP2* 的表达

Fig. 10 Transient expression of *PePIP2* in tobacco leaves under drought stress at different times

3 讨论

近年来, AQP 在植物抵御非生物逆境胁迫方面的研究成为热点, 相关报道显示, 在植物中过量表达一些 AQP 家族基因能够提高转基因植物对干旱、高盐和低温胁迫的耐受性。目前的研究表明植物 AQP 中的 PIPs 亚家族与非生物胁迫关系最为紧密。在植物中过表达 *OsPIP1*、*OsPIP2*、*OsPIP1*、*VfPIP1*、*BnPIP1* 能够增加植物对渗透胁迫或干旱胁迫的耐受性^[15]。另外, 香蕉 *MaPIP1;1* 的表达受到高盐胁迫诱导, 能够显著提高转基因拟南芥的耐盐性^[12]。拟南芥、水稻、玉米根和叶

的转录组分析显示大多数水通道蛋白基因表达受低温胁迫抑制^[16-17]。水稻 *OsPIP2;5* 的相对表达在长期低温处理后被显著诱导^[18]。一些水通道蛋白基因的表达被证实可显著提高不同植物对非致死低温的耐受能力,如小麦 *TaAQ7*、水稻 *OsPIP2;7*、香蕉 *MusaPIP1;2*、*MaPIP2;7*、*MaPIP1;4* 和 *MaPIP2;5*^[19-20]。香蕉 *MaPIP2-7* 的表达受低温胁迫诱导,在香蕉中过量表达水通道蛋白基因可显著提高香蕉对低温胁迫的耐受能力^[4]。本研究中对克隆到的西番莲水通道蛋白基因 *PePIP2* 在不同非生物胁迫下的表达分析表明,该基因在干旱、高温和低温胁迫下均能被不同程度上诱导表达,同时在烟草中进行瞬时表达,其在不同时间的干旱胁迫下也被诱导表达,说明该基因能响应不同的非生物胁迫。

本研究对其序列推导蛋白的氨基酸组成进行分析发现其富含丙氨酸(A);亲疏水性分析表明其亲水氨基酸少于疏水氨基酸,推测其蛋白为疏水蛋白;对序列进行生物学意义位点分析发现,*PePIP2* 的氨基酸序列上具有典型 MIP 结构域,符合 PIP 蛋白的结构特点。结果表明,*PePIP2* 蛋白与木豆、大豆和含羞草的蛋白遗传距离最近,与万寿菊和橡胶树的遗传距离相对较远,表现为亲缘关系近的同源性较高,亲缘关系相对较远的同源性低的特点^[21]。目前在香蕉等^[6]植物的 PIP 基因功能研究比较深入,可为西番莲 PIP 基因的功能提供研究方向。对该启动子元件进行分析,结果表明 *PePIP2* 基因启动子中包括响应低温、脱落酸、生长素以及光响应元件。说明该基因可能和非生物胁迫与植物生长发育过程相关。启动子对于启动基因转录和调节基因在时间和空间上的表达起了重要的作用^[22]。因此,选择具有诱导型的启动子能够有效驱动基因的表达。

本研究通过同源克隆了西番莲水通道蛋白基因 *PePIP2* 的全长序列,运用生物信息学分析该基因及其编码的氨基酸序列,并根据氨基酸多重序列比对及系统进化树,启动子元件分析等推测其生物学功能,并在干旱、高盐、高温和低温等非生物胁迫下对该基因表达进行分析,结果表明 *PePIP2* 能够响应干旱、高温和低温胁迫。在烟草中进行瞬时表达进一步验证了 *PePIP2* 能够响应干旱胁迫。本研究为进一步对水通道蛋白的功能分析和表达调控奠定了基础。后续研究可将其过

表达模式植物拟南芥等进行进一步研究,验证 *PePIP2* 在抗非生物胁迫中的功能。

参考文献

- [1] JOHANSON U, KARLSSON M, JOHANSSON I, GUSTAVSSON S, SJVALL S, FRAYSSE L, WEIG A R, KJELLBOM P. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126: 1358-1369.
- [2] SAKURAI J, ISHIKAWA F, YAMAGUCHI T, UEMURA M, MAESHIMA M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function[J]. *Plant Cell Physiology*, 2005, 46: 1568-1577.
- [3] CHAUMONT F, BARRIEU F, WOJCIK E, CHRISPEELS MJ, JUNG R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize[J]. *Plant Physiology*, 2001, 12: 1206-1215.
- [4] XU Y, HU W, LIU J H, SONG S, HOU X W, JIA C H, LI J Y, MIAO H X, WANG Z, TIE W W, XU B Y, JIN Z Q. An aquaporin gene *MaPIP2-7* is involved in tolerance to drought, cold and salt stresses in transgenic banana (*Musa acuminata* L.)[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 147: 66-76.
- [5] HUSSAIN A, TANVEER R, MUSTAFA G, FAROOQ M, AMIN I, MANSOOR S. Comparative phylogenetic analysis of aquaporins provides insight into the gene family expansion and evolution in plants and their role in drought tolerant and susceptible chickpea cultivars[J]. *Genomics*, 2020, 112(1): 263-275.
- [6] ZWIAZEK J J, XU H, TAN X, NAVARRO-RÓDENAS A, MORTE A. Significance of oxygen transport through aquaporins[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40411.
- [7] WANG R, WANG M, CHEN K, WANG S, MUR L A J, GUO S. Exploring the roles of aquaporins in plant-microbe Interactions[J]. *Cells*, 2018, 7(12): 267.
- [8] PAWŁOWICZ I, MASAJADA K. Aquaporins as a link between water relations and photosynthetic pathway in abiotic stress tolerance in plants[J]. *Gene*, 2019, 687: 166-172.
- [9] XU Y, LI J, SONG S, LIU J, HOU X, LI Y, WANG A, HUANG D, WANG J, XU Z, ZHAO D, HU W, XU B, JIN Z. A novel aquaporin gene *MaSIP2-1* confers tolerance to drought and cold stresses in transgenic banana[J]. *Molecular Breeding*, 2020b, 40: 62.
- [10] SONG S, MA F, HUANG D, WU B, MA C, LI J, LI Y, WEI Q, SUN Q, WANG W, XU Y. Identification of a 1,274 bp promoter of a *Musa acuminata* L. aquaporin gene (*MaPIP1;1*) which confers salinity stress inducibility in transgenic

- Arabidopsis*[J]. Agronomy Journal, 2021, 113: 886-893.
- [11] SONG S, XU Y, HUANG D, MIAO H, LIU J, JIA C, HU W, VALAREZO AV, XU B, JIN Z. Identification of a novel promoter from banana aquaporin family gene (*MaTIP1;2*) which responses to drought and salt-stress in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 128: 163-169.
- [12] XU Y, HU W, LIU J, ZHANG J, JIA C, MIAO H, XU B, JIN Z. A banana aquaporin gene, *MaPIP1;1*, is involved in tolerance to drought and salt stresses[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 59.
- [13] HU W, YUAN Q, WANG Y, CAI R, DENG X, WANG J, ZHOU S, CHEN M, CHEN L, HUANG C, MA Z, YANG G, HE G. Overexpression of a wheat aquaporin gene, *TaAQP8*, enhances salt stress tolerance in transgenic tobacco[J]. Plant Cell Physiology, 2012, 53: 2127-2141.
- [14] JOUNG YH, KAMO K. Expression of a polyubiquitin promoter isolated from *Gladiolus*[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25: 1081-8.
- [15] KAPILAN R, VAZIRI M, ZWIAZEK J J. Regulation of aquaporins in plants under stress[J]. Biological Research, 2018, 51(1): 4.
- [16] ARIANI A, GEPTS P. Genome-wide identification and characterization of aquaporin gene family in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2015, 290(5): 1771-1785.
- [17] WANG G, LOVATO A, POLVERARI A, WANG M, LIANG Y H, MA Y C, CHENG Z M. Genome-wide identification and analysis of mitogen activated protein kinase kinase gene family in grapevine (*Vitis vinifera*)[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 219.
- [18] VENKATESH J, YU J W, PARK S W. Genome-wide analysis and expression profiling of the *Solanum tuberosum* aquaporins[J]. Plant Physiol Biochem, 2013, 73: 392-404.
- [19] HECKWOLF M, PATER D, HANSON D T, KALDENHOFF R. The *Arabidopsis thaliana* aquaporin At-PIP1;2 is a physiologically relevant CO₂ transport facilitator[J]. Plant Journal, 2011, 67: 734-737.
- [20] MORI I C, RHEE J, SHIBASAKA M, SASANO S, KANEKO T, HORIEM T, KATSUHARAM M. CO₂ transport by PIP2 aquaporins of barley[J]. Plant and Cell physiology, 2014, 55: 251-257.
- [21] 王云霄, 张颖, 江璐玓, 牛蓓, 陈放. 麻疯树水通道蛋白新基因 *JcPIP* 干旱胁迫下的功能分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 16(4): 289-295.
- WANG Y X, ZHANG Y, JIANG L D, NIU B, CHEN F. Functional analysis of a novel aquaporin gene *JcPIP* from *Jatropha curcas* under drought stress[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2008, 16(4): 289-295. (in Chinese)
- [22] POTENZA L, CUCCHIARINI L, PIATTI E, ANGELINI U, DACHA M. Effects of high static magnetic field exposure on different DNAs[J]. Bioelectromagnetics, 2004, 25: 352-355.