

油莎豆块茎表达 *CeTIP4;1* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析

邹 智, 郑玉皎

热带作物生物育种全国重点实验室/中国热带农业科学院热带生物技术研究所/中国热带农业科学院三亚研究院, 海南海口 571101

摘 要: 液泡膜内在蛋白 (tonoplast intrinsic protein, TIP) 是调控植物细胞内水分平衡的主要水通道蛋白类型, 其根据进化关系可分为 TIP1 ~ TIP5 等 5 个亚类。本研究基于前期获得的油莎豆全长转录组对 1 个块茎高水平表达的 TIP 基因 (命名为 *CeTIP4;1*) 进行克隆和鉴定。序列分析显示, 该基因含有 2 个保守的内含子, 编码区全长 753 bp, 预测编码 250 个氨基酸, 理论分子量为 25.57 kDa、等电点 (pI) 为 6.02、总平均疏水指数 (GRAVY) 为 0.884, 属于典型的酸性疏水型蛋白; 该蛋白含有 1 个保守的 MIP (major intrinsic protein) 结构域, 且具有已结晶 AtTIP2;1 类似的结构特征。进化分析显示, *CeTIP4;1* 与 AtTIP4;1、OsTIP4;1、OsTIP4;2 和 OsTIP4;3 聚在一起, 序列相似性为 69.62%~82.94%, 支持其划归为 TIP4 亚类。本研究在基因克隆的基础上进一步构建了其亚细胞定位载体 pNC-Cam1304-*CeTIP4;1*。在烟草叶片中的瞬时过表达和共聚焦显微镜观察显示, *CeTIP4;1* 定位在细胞膜。进一步的表达分析显示, *CeTIP4;1* 具有明显的组织特异性, 主要在块茎、根、匍匐茎和芽尖中表达; 在起始期、膨大中期、膨大晚期和成熟期等 4 个典型的块茎发育时期中, *CeTIP4;1* 基因的表达呈现先升后降的趋势, 峰值出现在膨大中期, 最低的是成熟期, 与含水量趋势基本一致。本研究结果为深入解析油莎豆块茎的水分平衡机制奠定坚实的基础。

关键词: 油料作物; 虎坚果; 块茎; 液泡膜内在蛋白; 亚细胞定位; 表达模式

中图分类号: S565.9 文献标志码: A

Cloning, Subcellular Localization, and Expression Analysis of *CeTIP4;1*, an Aquaporin Gene Expressed in *Cyperus esculentus* Tubers

ZOU Zhi, ZHENG Yujiao

National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding / Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Tonoplast intrinsic proteins (TIPs), which comprise a subfamily of aquaporin (AQP) mediating the water balance within plant cells, could be divided into five phylogenetic groups on the basis of sequence similarity, i.e., TIP1–TIP5. Based on the full-length transcriptome previously described in tigernut (*Cyperus esculentus*), a tuber-abundant TIP gene named *CeTIP4;1* was cloned and characterized in this study. Sequence analyses revealed that *CeTIP4;1* contained two conservative introns with a complete coding sequence of 753 base pairs (bp), putatively encoding 250 amino acids with the theoretical molecular weight of 25.57 kDa, the isoelectric point (pI) value of 6.02, and the grand average of hydropathicity (GRAVY) value of 0.884, implying its acidic and hydrophobic features. The deduced peptide possessed one conservative major intrinsic protein (MIP) domain and exhibited similar structural features with the structure resolved AtTIP2;1. Classification of *CeTIP4;1* into the TIP4 group was supported by the phylogenetic analysis, which showed that *CeTIP4;1* clusters with AtTIP4;1, OsTIP4;1, OsTIP4;2 and OsTIP4;3 with sequence similarities of 69.62%–82.94%. After gene cloning, a plant expression vector for subcellular localization, i.e.,

收稿日期 2023-08-28; 修回日期 2023-09-30

基金项目 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2024XDNY171); 国家自然科学基金项目 (No. 32460342, No. 31971688)。

作者简介 邹 智 (1982—), 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 基因组进化与油脂调控; E-mail: zouzhi2008@126.com。

pNC-Cam1304-CeTIP4;1, was successfully constructed. When transiently overexpressed in tobacco (*Nicotiana benthamiana*) leaves, confocal laser scanning microscopy imaging showed that *CeTIP4;1* was unexpectedly localized to the cell membrane. Further expression analysis indicated that *CeTIP4;1* exhibited an apparent tissue-specific expression pattern, predominately expressed in tuber, root, rhizome, and shoot apex. Moreover, among the four typical stages of developmental tuber examined in this study, i.e., initiation, medium swelling, late swelling, and maturation, *CeTIP4;1* exhibited a bell-like expression pattern, peaking in medium swelling tubers and lowest in maturation tubers. These results lay a solid foundation for further uncovering the mechanism of water balance in tigernut tubers.

Keywords: oil crop; tigernut; tuber; tonoplast intrinsic protein; subcellular localization; expression profile

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.09.006

液泡膜内在蛋白 (tonoplast intrinsic protein, TIP) 隶属于水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 家族, 因其定位在液泡膜而得名^[1]。TIP 最先在模式植物拟南芥中被鉴定, 拟南芥 γ -TIP1 (*AtTIP1;1*) 及其同源基因在蟾蜍卵母细胞和酵母中异源表达通常表现出高效的水分转运活性, 高于或与细胞膜定位的质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic protein, PIP) 相当^[2-3]。在体外, 有些 TIP 还被证实可以转运甘油、尿素、硼酸、 NH_3 、 H_2O_2 等中性小分子^[4-10]。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基因组含有 10 个 TIP 基因, 并根据进化关系分为 TIP1~TIP5 等 5 个亚类, 其中, 除 TIP4 和 TIP5 仅有 1 个成员外, 其他亚类含有 2~3 个成员不等^[11]。晶体结构显示, 与 PIP 类似, TIP 含有 6 个由 5 个亲水环 (LA-E) 连接的跨膜 α 螺旋 (TM1-6)、2 个由 LB 和 LE 折向膜内形成的半螺旋以及位于半螺旋顶端的 NPA 基序^[10, 12], 2 个 NPA 基序与位于 TM2、TM5 和 LE 上的 4 个保守残基 (即 ar/R 选择性滤器: H2、H5、LE1 和 LE2) 共同决定了孔道的大小和底物的特异性^[13-14]; 此外, 拟南芥 *AtTIP2;1* 位于 LC 的 H^{131} 为 NH_3 的高效转运所必须^[10]。与 PIP 相比, 拟南芥 TIP 的 ar/R 选择性滤器变异较大, TIP1 为 H-I-A-V, TIP2、TIP3 和 TIP4 为 H-I-G/A-R, TIP5 为 N-V-G-C, 孔径介于 0.67~1.56 Å^[15]。研究表明, 不同 TIP 亚类定位于不同类型的液泡, 如 TIP1 主要定位于裂解型液泡, TIP2 位于蛋白储藏型液泡, TIP3 定位于种子的蛋白储藏型液泡, 并在种子的萌发过程中逐步被 TIP1 所替代^[16]。TIP4 也在裂解型液泡被发现, 主要参与水分、尿素和甘油的转运^[5, 9]。

油莎豆 (*Cyperus esculentus* L.), 又名虎坚果, 是一种隶属于禾本科莎草属的新型草本油料作物^[17-20]。不同于传统油料作物在种子中积累油脂, 油莎豆不开花或开花不结实, 但它可在地

下块茎中积累高达 35% 的油脂, 这使其成为研究营养组织油脂合成与调控的理想模型^[21-23]。油莎豆块茎起源于地下匍匐茎, 其发育过程主要分为起始、膨大和成熟等 3 个阶段^[21, 24]。通过前期研究, 团队发现海南地区块茎的发育非常迅速, 自起始后 35 d 即可成熟, 成熟块茎的含水量约为 45%, 而在此之前一般维持在 85% 左右^[24], 表明水分平衡在块茎发育和代谢中的重要作用。前期研究显示, 在新鲜成熟块茎的蛋白组中鉴定到多个 AQP 基因, 如 *CePIP1;1*、*CePIP2;1*、*CeTIP1;1* 和 *CeTIP2;1*^[19, 25-28]。其中, *CeTIP1;1* 隶属于 TIP1 亚类, 在块茎、叶片、叶鞘、根、匍匐茎和芽尖等主要油莎豆组织中均高水平表达, 且其编码蛋白定位在烟草叶片的液泡^[27]。本研究报道另一个块茎表达的 TIP 基因 *CeTIP4;1*, 该基因源于团队先前构建的油莎豆全长转录组^[29], 其与 *AtTIP4;1* 同源。研究显示, *CeTIP4;1* 的表达模式及其编码蛋白的亚细胞定位与 *CeTIP1;1* 明显不同, 这些研究结果将有助于深入解析油莎豆块茎的水分平衡机制。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用油莎豆品系为热研 3 号, 植株种植于中国热带农业科学院文昌实验基地, 不同发育时期块茎的采集详见文献^[24]; 本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 种植于中国热带农业科学院热带生物技术研究所温室, 具体生长条件详见文献^[30]; 大肠杆菌 DH5 α 和根癌农杆菌 GV3101 (内含 *pSoup-P19*) 感受态、亚细胞定位载体 *pNC-Cam1304-SubN* 和 *pNC-HbPIP2;3-RFP*^[31] 均由本实验室保存; 各类酶、试剂盒及生化试剂详见文献^[17]。

油莎豆的基因组和转录组数据分别下载于

CNGBdb (<https://db.cngb.org/search/assembly/CNA-0051961/>) 和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/703731>) 数据库; 拟南芥和水稻 (*Oryza sativa*) 的 TIP 蛋白下载于 TAIR11 (<https://www.arabidopsis.org/>) 和 RGAP7 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 数据库; 菠菜 (*Spinacia oleracea*) 的 SoPIP2;1 下载于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1Z98>) 数据库。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和反转录 油莎豆块茎总 RNA 的提取及反转录方法参照文献[17], 即用天根植物多糖多酚 RNA 提取试剂盒抽提总 RNA, 并用宝生物反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。

1.2.2 基因克隆与载体构建 本课题组前期通过对油莎豆的全长转录组^[29]进行功能注释, 发现 1 条与 *AtTIP4;1* 同源的转录本, 序列全长 1098 bp, 包含 1 个 753 bp 的开放读码框。为克隆该基因, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计巢式 PCR 引物对 *CeTIP4;1F/R* (AAACAAAGCAACCAAGACAG/CTTGCATCTCATGATCCAAA) 和 *CeTIP4;1HF/R* (AGTGGTCTCTGTCCAGTCCTATGGCAAAGATTGCATTAGG/GGTCTCAGCAGACCACAAGTTCAAAATTCTTCACCATCTC)。PCR 扩增和载体构建参照文献[17]: 首先利用外侧引物 *CeTIP4;1F/R* 分离基因的全长转录本, 随后采用内侧引物 *CeTIP4;1HF/R* 扩增基因的编码区序列, 最后运用 NC 克隆试剂盒将目的片段克隆到亚细胞定位载体 *pNC-Cam1304-SubN*。

1.2.3 序列的生物信息学分析 利用本地 BLASTN 程序将上述 *CeTIP4;1* 的转录本比对到油莎豆的基因组, 提取相应的基因序列后用 GSDS 2.0 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 在线软件分析其基因结构; 蛋白的理化特性和保守结构域分析分别使用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 和 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 在线软件; 亚细胞定位、二级和 3D 结构的预测分别使用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)、SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线软件; 跨膜螺旋区及保守残基的鉴定基于与已结晶 *AtTIP2;1*^[10] 和 *SoPIP2;1*^[12] 的序列比对。

1.2.4 多序列比对与进化树的构建 蛋白的多序

列比对采用 MUSCLE 软件, 进化树的构建采用 MEGA (v6.06) 软件, 所用参数为最大似然法、1000 次自举重复。

1.2.5 亚细胞定位分析 以前期报道的 *pNC-HbPIP2;3-RFP*^[31] 作为细胞膜定位的阳性标记, 参照文献[30]将重组质粒 *pNC-Cam1304-CeTIP4;1* 导入农杆菌, 挑选单克隆, 用含 Kan 和 Rif 的 LB 培养基摇菌, 随后与含阳性标记的农杆菌工程菌等量混合, 制备浸染液, 转化受体, 选取 4 周龄的烟草叶片, 荧光观察采用共聚焦显微镜 Zeiss LMS880。

1.2.6 基因表达分析 转录谱分析采用 StringTie (v2.2.0) 软件, 即将转录组数据比对到基因组, 然后用 FKPM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) 法均一化基因的相对表达水平。qRT-PCR 分析参照文献[20], 以 *CeUCE2* (Fq: ATCATCAAGGAGACCCAGCG, Rq: CTTA-GGGGCAGCCATAGGA) 作为内参基因, 所用基因特异性引物为 *CeTIP4;1Fq/Rq* (GTCCTCACT-TTCTCCCTCCTCT/CACTAACCCGACAAGCAACG)。

2 结果与分析

2.1 *CeTIP4;1* 的克隆与序列分析

通过将 *CeTIP4;1* 的转录本比对到基因组, 发现该基因位于 Scaffold40 反向链的 5 229 867~5 231 478 位, 基因全长 1612 bp, 包含 2 个内含子, 5'和 3' UTR 分别为 154、191 bp (图 1A)。重组质粒 *pNC-Cam1304-CeTIP4;1* 的桑格测序显示, 克隆到的序列与基因的对应区域(外显子)完全一致。进一步的序列分析显示, *CeTIP4;1* 编码区的 GC 含量为 58.03%, 编码 250 个氨基酸(aa), 理论分子量(MW)为 25.57 kDa, 等电点(pI)为 6.02, 总平均疏水指数(GRAVY)为 0.884, 脂肪族指数(AI)为 119.40, 不稳定系数(II)为 33.70, 属于稳定的酸性疏水型蛋白, 这与 *CeTIP1;1*、*CeTIP2;1* 和 *AtTIP2;1* 类似, 但不同于 *SoPIP2;1* 的碱性特性(表 1)。CDD 分析显示, *CeTIP4;1* 的第 3~235 位残基为保守的 MIP 结构域(图 1B)。*CeTIP4;1* 与 *CeTIP1;1*、*CeTIP2;1*、*AtTIP2;1* 和 *SoPIP2;1* 的序列相似性分别为 67.19%、70.92%、73.81%和 44.08%, 拥有 6 个相对保守的跨膜螺旋

Fig. 1 Bioinformatics analysis of CeTIP4;1

表 1 *CeTIP4;1* 与 *CeTIP1;1*、*CeTIP2;1*、*AtTIP2;1* 和 *SoPIP2;1* 理化特性和二级结构比较

Tab. 1 Comparison of physicochemical properties and secondary structure of *CeTIP4;1*, *CeTIP1;1*, *CeTIP2;1*, *AtTIP2;1*, and *SoPIP2;1*

蛋白名称 Protein name	aa	MW /kDa	pI	GRAVY	AI	II	MIP	α-螺旋 Alpha helix/%	延伸链 Extended strand/%	β-转角 Beta turn/%	无规则卷曲 Random coil/%
<i>CeTIP4;1</i>	250	25.57	6.02	0.884	119.40	33.70	3~235	36.00	22.80	4.40	36.80
<i>CeTIP1;1</i>	251	25.75	6.01	0.831	107.77	27.81	1~249	33.86	21.51	6.77	37.85
<i>CeTIP2;1</i>	248	24.73	5.09	0.948	114.60	21.76	14~231	36.29	20.97	4.84	37.90
<i>AtTIP2;1</i>	250	25.03	5.30	0.974	112.48	26.73	1~244	33.20	20.80	5.60	40.40
<i>SoPIP2;1</i>	281	29.90	9.03	0.579	102.81	27.81	31~260	36.65	18.15	2.14	43.06

(TM1-6)、2 个半螺旋 (HB 和 HE) 以及 2 个典型的 NPA 基序 (图 1C)。*CeTIP4;1* 的 ar/R 选择性滤器为 H-I-A-R, 不同于 *CeTIP1;1* 的 H-I-A-V、*CeTIP2;1* 和 *AtTIP2;1* 的 H-I-G-R 以及 *SoPIP2;1* 的 F-H-T-R; *CeTIP4;1* 的 Froger 位点为 T-S-A-Y-W, 与 *CeTIP1;1* 和 *AtTIP2;1* 一致, 但不同于 *CeTIP2;1* 的 T-S-A-Y-I 和 *SoPIP2;1* 的 M-S-A-F-W。与 *SoPIP2;1* 相比, *CeTIP4;1*、*CeTIP1;1* 和 *AtTIP2;1* 具有较短的 N 端, 且仅含有对应于 *SoPIP2;1* 的 S⁹⁶ 磷酸化位点; *CeTIP4;1* 的 LC 区含有一个对应于 *AtTIP2;1* 的 H¹³¹ 组氨酸, 而 *CeTIP1;1* 和 *SoPIP2;1* 的相应位点分别为 F 和 N (图 1C)。与 *CeTIP1;1*、*CeTIP2;1*、*AtTIP2;1* 和 *SoPIP2;1* 类似, *CeTIP4;1* 的二级结构以无规则卷曲和 α-螺旋为主, 分别占 36.80% 和 36.00% (表 1)。基于 *AtTIP2;1* 的同源建模显示, *CeTIP4;1* 含有 6 个跨膜螺旋, 且可形成同源四聚体 (图 1D)。

2.2 *CeTIP4;1* 进化分析

为确认 *CeTIP4;1* 的进化关系, 本研究将其与已报道的 *AtTIP*^[11] 和 *OsTIP*^[32] 构建如图 1E 所示的无根进化树。结果显示, 这些蛋白被聚为 5 组, 分别对应于前期报道的 *TIP1~TIP5*^[11], 其中, *CeTIP4;1* 与拟南芥和水稻中的 *TIP4* 亚类聚在一起, 其与 *AtTIP4;1*、*OsTIP4;1*、*OsTIP4;2* 和 *OsTIP4;3* 的序列相似性分别为 78.57%、71.71%、69.62% 和

82.94%。以上结果证实 *CeTIP4;1* 属于 *AtTIP4;1* 的直系同源基因, 而水稻中的 3 个成员可能在其与油莎豆分化之后产生。

2.3 *CeTIP4;1* 亚细胞定位分析

为揭示 *CeTIP4;1* 所起的功能部位, 利用含 *pNC-Cam1304-CeTIP4;1* 的农杆菌工程菌对烟草叶片进行瞬时转化, 共聚焦显微镜观察结果如图 2 所示。虽然 Plant-mPLOC 预测 *CeTIP4;1* 定位在液泡膜, 但本研究结果显示其定位在细胞膜, 并与细胞膜标记 *HbPIP2;3-RFP* 的红色荧光信号高度重合。

2.4 *CeTIP4;1* 基因表达分析

如图 3A 所示, 转录谱分析显示 *CeTIP4;1* 主要在块茎、根、匍匐茎和芽尖中表达, 而在幼嫩叶片、叶鞘和成熟叶片中的表达量极低, 表现出明显的组织特异性。为进一步揭示基因在块茎发育过程中的表达模式, 本研究选取起始期、膨大中期、膨大晚期和成熟期等 4 个典型的时期进行 qRT-PCR 分析, 结果显示, *CeTIP4;1* 在 4 个典型时期的表达量呈先升后降的趋势, 峰值出现在膨大中期, 最低的是成熟期 (图 3B)。

3 讨论

在植物中, 细胞的水分平衡主要由细胞膜定

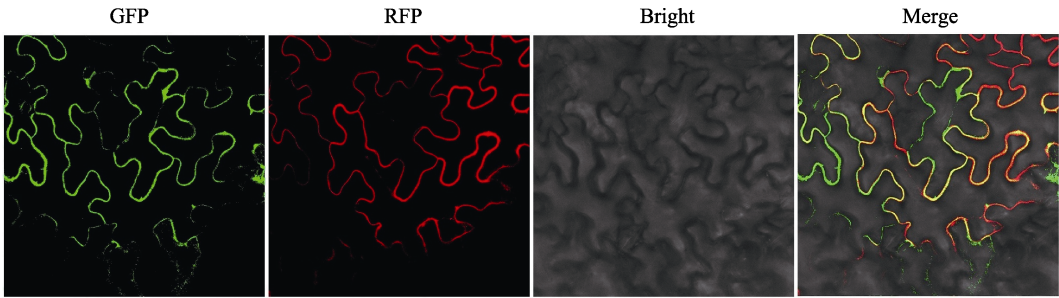
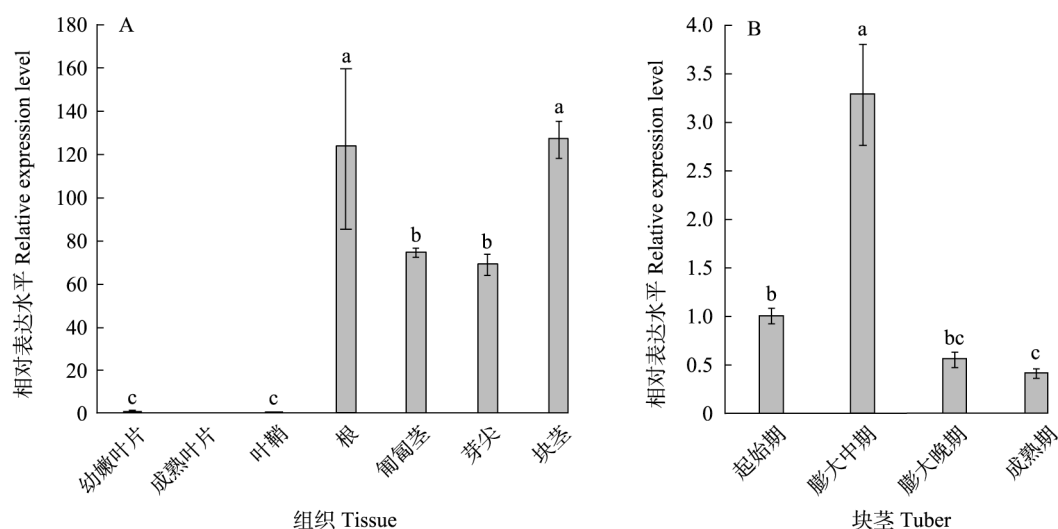


图 2 *CeTIP4;1* 的亚细胞定位

Fig. 2 Subcellular localization analysis of *CeTIP4;1*



A: *CeTIP4;1* 的组织特异性分析; B: *CeTIP4;1* 在不同发育时期块茎中的表达模式; 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

A: Tissue-specific expression profiles of *CeTIP4;1*; B: Expression profiles of *CeTIP4;1* in different stages of developmental tubers; Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 3 *CeTIP4;1* 的表达模式

Fig. 3 Expression profiles of *CeTIP4;1*

位的 PIP 和液泡膜定位的 TIP 介导^[1, 33]。PIP 高度保守, 仅存在 2 个进化小组, 相比而言, TIP 高度分化, 其在高等植物中至少存在 5 个进化小组^[3, 11, 32, 34-37]。本研究报道的 *CeTIP4;1* 隶属于 TIP4 亚组, 其与 *AtTIP4;1*、*OsTIP4;1*、*OsTIP4;2* 和 *OsTIP4;3* 在蛋白水平的相似性介于 69.62%~82.94%, 且在进化分析中被聚在一起, 推测它们可能具有类似的生物学功能。*CeTIP4;1* 含有 2 个内含子, 这与 *AtTIP4;1* 和 *OsTIP4;1* 一样, 但不同于仅含有 1 个内含子的 *OsTIP4;2* 和 *OsTIP4;3*^[11, 32]。蓖麻 (*Ricinus communis*)、麻疯树 (*Jatropha curcas*)、木薯 (*Manihot esculenta*)、橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 和杨树 (*Populus trichocarpa*) 等植物中的 TIP4 成员均含有 2 个内含子, 且内含子位置高度保守^[11, 34-37], 这极可能是 *OsTIP4;2* 和 *OsTIP4;3* 的第 2 内含子发生了丢失, 而非 *CeTIP4;1* 和 *OsTIP4;1* 获得了新的内含子。

CeTIP4;1 含有 1 个保守的 MIP 结构域, 其中包含 6 个跨膜螺旋、2 个半螺旋以及 2 个典型的 NPA 基序, 且具有与 *AtTIP4;1* 和 *OsTIP4;3* 完全一样的 ar/R 选择性滤器 (即 H-I-A-R), 其孔径大小与 *AtTIP1;1* 相当 (0.72 Å vs 0.67 Å)^[15], 推测 *CeTIP4;1* 可能具有 *AtTIP1;1* 类似的水分转运活性。事实上, *AtTIP4;1* 和 *OsTIP4;1* 均已被证实具有高效的水分转运活性^[5, 9]。相比于 *SoPIP2;1*^[12], *CeTIP4;1* 与 *AtTIP2;1*^[10] 的结构比较接近, 且其 LC 区含有 1 个与 NH_3 转运所必须的 H 残基^[10],

推测 *CeTIP4;1* 可能具有高效的 NH_3 转运活性。此外, 研究还显示 *AtTIP4;1* 可以转运尿素^[5], *OsTIP4;1* 可以转运甘油^[9]。

在拟南芥原生质中的亚细胞定位分析显示 *AtTIP4;1* 主要定位在液泡^[5], 而本研究结果显示 *CeTIP4;1* 定位在烟草叶片的细胞膜, 其中的原由还有待进一步研究。可能的原因是: (1) TIP4 的亚细胞定位与组织类型有关, 其中包括液泡的类型与数量, 前人用的是原生质^[5], 而本研究用的是幼嫩的烟草叶片; (2) TIP4 原本定位在液泡, 但可以与 PIP 互作从而定位到细胞膜, 因为有研究显示 *AtTIP1;2*、*AtTIP2;1* 和 *AtTIP3;1* 均可与 *AtPIP2;1* 互作^[38]; (3) *CeTIP4;1* 本身就定位在细胞膜, 但这与其 $\text{pI} < 7$ 的酸性特性不太相符。

作为主要块茎表达的 *TIP1* 基因, *CeTIP4;1* 同时被发现在根、匍匐茎、芽尖中也有较高水平的表达, 却很少在光合组织叶片和叶鞘中表达, 这与 *CeTIP1;1* 和 *CeTIP2;1* 的组成型高水平表达不同^[27-28]。在块茎发育过程中, *CeTIP4;1* 与 *CeTIP1;1* 和 *CeTIP2;1* 均表现出钟型趋势, 但峰值出现不同, *CeTIP4;1* 和 *CeTIP2;1* 较早, 出现在膨大中期, 而 *CeTIP1;1* 出现在膨大晚期; 此外, *CeTIP4;1* 和 *CeTIP2;1* 在成熟期的表达量显著低于起始期, 而 *CeTIP1;1* 在起始期和成熟期的表达量差异不显著^[27-28]。这表明 *CeTIP4;1* 与 *CeTIP2;1* 类似, 主要在块茎发育前期起作用, 同时也解释了 *CeTIP4;1* 未能在成熟块茎的蛋白组中被鉴定

到的原因^[19]。与 *CeTIP1;1* 相比, *CeTIP4;1* 在块茎发育过程中的表达模式与含水量趋势更为吻合, 因为在本研究分析的 4 个时期中, 起始期和膨大中期的含水量约为 85%, 膨大晚期为 75%, 成熟期为 45%^[24]。

综上, 本研究首次报道了 1 个油莎豆 *TIP4* 基因 *CeTIP4;1*, 该基因含有 2 个保守的内含子, 为 *AtTIP4;1* 的直系同源基因; *CeTIP4;1* 定位在细胞膜, 具有 *AtTIP2;1* 类似的理化特性和结构特征; *CeTIP4;1* 的表达具有明显的组织特异性, 且其在块茎发育过程中的表达模式与含水量趋势基本吻合。本研究结果为深入解析油莎豆块茎的水分平衡机制及遗传改良奠定坚实的基础。

参考文献

- [1] WUDICK M M, LUU D T, MAUREL C. A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins[J]. *New Phytologist*, 2009, 184(2): 289-302.
- [2] MAUREL C, REIZER J, SCHROEDER J I, CHRISPEELS M J. The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes[J]. *EMBO Journal*, 1993, 12(6): 2241-2247.
- [3] SUDHAKARAN S, THAKRAL V, PADALKAR G, RAJORA N, DHIMAN P, RATURI G, SHARMA Y, TRIPATHI D K, DESHMUKH R, SHARMA T R, SONAH H. Significance of solute specificity, expression, and gating mechanism of tonoplast intrinsic protein during development and stress response in plants[J]. *Physiologia Plantarum*, 2021, 172(1): 258-274.
- [4] GERBEAU P, GÜÇLÜ J, RIPOCHE P, MAUREL C. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes[J]. *The Plant Journal*, 1999, 18(6): 57-87.
- [5] LIU L H, LUDEWIG U, GASSERT B, FROMMER W B, VON WIRÉN N. Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(3): 1220-1228.
- [6] LOQUÉ D, LUDEWIG U, YUAN L, VON WIRÉN N. Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH_3 transport into the vacuole[J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(2): 671-680.
- [7] BIENERT G P, MØLLER A L, KRISTIANSEN K A, SCHULZ A, MØLLER I M, SCHJOERRING J K, JAHN T P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(2): 1183-1192.
- [8] SOTO G, ALLEVA K, MAZZELLA M A, AMODEO G, MUSCHIETTI J P. AtTIP1;3 and AtTIP5;1, the only highly expressed *Arabidopsis* pollen-specific aquaporins, transport water and urea[J]. *FEBS Letters*, 2008, 582(29): 4077-4082.
- [9] LI G W, PENG Y H, YU X, ZHANG M H, CAI W M, SUN W N, SU W A. Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165(18): 1879-1888.
- [10] KIRSCHT A, KAPTAN S S, BIENERT G P, CHAUMONT F, NISSEN P, DE GROOT B L, KJELLBOM P, GOURDON P, JOHANSON U. Crystal structure of an ammonia-permeable aquaporin[J]. *PLoS Biology*, 2016, 14(3): e1002411.
- [11] JOHANSON U, KARLSSON M, JOHANSSON I, GUSTAVSSON S, SJÖVALL 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(4): 1358-1369.
- [12] TÖRNROTH-HORSEFIELD S, WANG Y, HEDFALK K, JOHANSON U, KARLSSON M, TAJKHORSHID E, NEUTZE R, KJELLBOM P. Structural mechanism of plant aquaporin gating[J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 688-694.
- [13] FU D, LIBSON A, MIERCKE L J, WEITZMAN C, NOLLERT P, KRUCINSKI J, STROUD R M. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity[J]. *Science*, 2000, 290(5491): 481-486.
- [14] SUI H, HAN B G, LEE J K, WALIAN P, JAP B K. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel[J]. *Nature*, 2001, 414(6866): 872-878.
- [15] WALLACE I S, ROBERTS D M. Homology modeling of representative subfamilies of *Arabidopsis* major intrinsic proteins. classification based on the aromatic/arginine selectivity filter[J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(2): 1059-1068.
- [16] JAUH G Y, PHILLIPS T E, ROGERS J C. Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions[J]. *The Plant Cell*, 1999, 11(10): 1867-1882.
- [17] 肖艳华, 邹智, 赵永国, 郭安平, 张丽. 油莎豆乙酰乳酸合酶基因 *CeALS* 的克隆与分析[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(4): 184-192.
XIAO Y H, ZOU Z, ZHAO Y G, GUO A P, ZHANG L. Molecular cloning and characterization of an acetolactate synthase gene (*CeALS*) from tigernut (*Cyperus esculentus* L.)[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(4): 184-192. (in Chinese)
- [18] 邹智, 肖艳华, 张丽, 赵永国. 油莎豆 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶基因 *CeEPSPS* 的克隆与分析[J]. *热带作物学报*, 2023, 44(1): 26-34.
ZOU Z, XIAO Y H, ZHANG L, ZHAO Y G. Cloning and

- characterization of *CeEPSPS*, a gene encoding 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase from tigernut (*Cyperus esculentus* L.)[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2023, 44(1): 26-34. (in Chinese)
- [19] NIEMEYER P W, IRISARRI I, SCHOLZ P, SCHMITT K, VALERIUS O, BRAUS G H, HERRFURTH C, FEUSSNER I, SHARMA S, CARLSSON A S, DE VRIES J, HOFVANDER P, ISCHEBECK T. A seed-like proteome in oil-rich tubers[J]. The Plant Journal, 2022, 112(2): 518-534.
- [20] ZOU Z, XIAO Y H, ZHANG L, ZHAO Y G. Analysis of *Lhc* family genes reveals development regulation and diurnal fluctuation expression patterns in *Cyperus esculentus*, a Cyperaceae plant[J]. Planta, 2023, 257(3): 59.
- [21] TURESSON H, MARTTILA S, GUSTAVSSON K E, HOFVANDER P, OLSSON ME, BÜLOW L, STYMNE S, CARLSSON A S. Characterization of oil and starch accumulation in tubers of *Cyperus esculentus* var. *sativus* (Cyperaceae): a novel model system to study oil reserves in nonseed tissues[J]. American Journal of Botany, 2010, 97(11): 1884-1893.
- [22] 徐硕, 邹智, 肖艳华, 张丽, 孔华, 郭静远, 郭安平. 油莎豆块茎油脂积累相关基因 *CeWRII* 的克隆与功能分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(5): 923-929.
- XU S, ZOU Z, XIAO Y H, ZHANG L, KONG H, GUO J Y, GUO A P. Cloning and functional characterization of *CeWRII*, a gene involved in oil accumulation from tigernut (*Cyperus esculentus* L.) tubers[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(5): 923-929. (in Chinese)
- [23] ZOU Z, ZHENG Y J, ZHANG Z T, XIAO Y H, XIE Z N, CHANG L L, ZHANG L, ZHAO Y G. Molecular characterization *oleosin* genes in *Cyperus esculentus*, a Cyperaceae plant producing oil in underground tubers[J]. Plant Cell Reports, 2023, 42: 1791-1808.
- [24] ZOU Z, ZHAO Y G, ZHANG L, XIAO Y H, GUO A P. Analysis of *Cyperus esculentus* SMP family genes reveals lineage-specific evolution and seed desiccation-like transcript accumulation during tuber maturation[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 187: 115382.
- [25] 郑玉皎, 常丽丽, 赵永国, 曾长英, 邹智. 油莎豆块茎高水平表达 *CePIP1;1* 基因的克隆与分析[J]. 热带作物学报, 2024, 45(5): 894-901.
- ZHENG Y J, CHANG L L, ZHAO Y G, ZENG C Y, ZOU Z. Molecular cloning and characterization of *CePIP1;1*, an aquaporin gene highly abundant in *Cyperus esculentus* tubers[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(5): 894-901. (in Chinese)
- [26] 邹智, 郑玉皎, 常丽丽, 赵永国. 油莎豆 *CePIP2;1* 的克隆、亚细胞定位与表达分析[J]. 热带作物学报, 2024, 45(7): 1340-1347.
- ZOU Z, ZHENG Y J, CHANG L L, ZHAO Y G. Cloning, subcellular localization, and expression analysis of *CePIP2;1*, an aquaporin gene from tigernut (*Cyperus esculentus* L.)[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(7): 1340-1347. (in Chinese)
- [27] 郑玉皎, 赵永国, 常丽丽, 邹智. 油莎豆液泡膜内在蛋白基因 *CeTIP1;1* 的克隆与分析[J]. 中国油料作物学报, [2024-03-10]. <https://doi.org/10.19802/j.issn.1007-9084.2023127>.
- ZHENG Y J, ZHAO Y G, CHANG L L, ZOU Z. Molecular cloning and characterization of *CeTIP1;1*, a gene encoding tonoplast intrinsic protein from *Cyperus esculentus* tubers[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, [2024-03-10]. <https://doi.org/10.19802/j.issn.1007-9084.2023127>. (in Chinese)
- [28] 邹智, 郑玉皎. 油莎豆水通道蛋白基因 *CeTIP2;1* 的克隆与分析[J]. 热带作物学报, 2024, 45(7): 1340-1347.
- ZOU Z, ZHENG Y J. Molecular cloning and characterization of *CeTIP2;1*, an aquaporin gene from tigernut (*Cyperus esculentus* L.)[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(7): 1340-1347. (in Chinese)
- [29] 邹智, 赵永国, 张丽, 孔华, 郭运玲, 郭安平. 基于单分子实时测序的油莎豆全长转录组分析[J]. 中国油料作物学报, 2021, 42(2): 229-235.
- ZOU Z, ZHAO Y G, ZHANG L, KONG H, GUO Y L, GUO A P. Single-molecule real-time (SMRT)-based full-length transcriptome analysis of tigernut (*Cyperus esculentus* L.)[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2021, 43(2): 229-235. (in Chinese)
- [30] 乔雪莹, 郑玉皎, 阳江华, 曾长英, 邹智. 橡胶树 *HbPIP1;1* 基因的克隆及蛋白的亚细胞定位与多聚化分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(12): 2405-2412.
- QIAO X Y, ZHENG Y J, YANG J H, ZENG C Y, ZOU Z. Gene cloning, subcellular localization and multimerization analysis of *HbPIP1;1* from *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(12): 2405-2412. (in Chinese)
- [31] 邹智, 乔雪莹, 郑玉皎, 阳江华. 橡胶树 *HbPIP2;3* 的亚细胞定位与多聚化分析[J]. 热带作物学报, 2024, 45(3): 443-449
- ZOU Z, QIAO X Y, ZHENG Y J, YANG J H. Subcellular localization and multimerization analyses of *HbPIP2;3*, an efficient water transporter from *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(3): 443-449. (in Chinese)
- [32] 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 and Cell Physiology, 2005, 46(9): 1568-1577.

- [33] MAUREL C, VERDOUCQ L, LUU DT, SANTONI V. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 595-624.
- [34] ZOU Z, GONG J, HUANG Q, MO Y Y, YANG L F, XIE G S. Gene structures, evolution, classification and expression profiles of the aquaporin gene family in castor bean (*Ricinus communis* L.)[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0141022.
- [35] ZOU Z, GONG J, AN F, XIE G, WANG J, MO Y, YANG L. Genome-wide identification of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) aquaporin genes and their response to ethephon stimulation in the laticifer, a rubber-producing tissue[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 1001.
- [36] ZOU Z, YANG L F, GONG J, MO Y Y, WANG J K, CAO J H, AN F, XIE G S. Genome-wide identification of *Jatropha curcas* aquaporin genes and the comparative analysis provides insights into the gene family expansion and evolution in *Hevea brasiliensis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 395.
- [37] ZOU Z, YANG J H. Genome-wide comparison reveals divergence of cassava and rubber aquaporin family genes after the recent whole-genome duplication[J]. BMC Genomics, 2019, 20: 380.
- [38] MUROZUKA E, HANISCH S, POMORSKI T G, JAHN T P, SCHJOERRING J K. Bimolecular fluorescence complementation and interaction of various *Arabidopsis* major intrinsic proteins expressed in yeast[J]. Physiologia Plantarum, 2013, 148(3): 422-431.