

## 油莎豆块茎高水平表达 *CePIP1;1* 基因的克隆与分析

郑玉皎<sup>1,2</sup>, 常丽丽<sup>2</sup>, 赵永国<sup>2</sup>, 曾长英<sup>1\*</sup>, 邹智<sup>2\*</sup>

1. 海南大学热带作物学院, 海南海口 570228; 2. 热带作物生物育种全国重点实验室/海南省南繁生物安全与分子育种重点实验室/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:** 油莎豆隶属于禾本科莎草科, 是一种在块茎中高水平积累油脂的新型草本油料作物。与其他块根块茎类作物类似, 未成熟油莎豆块茎的含水量高达 85%, 因此, 水分平衡对于块茎的发育至关重要。质膜内在蛋白 (PIP) 是一类定位在细胞膜上具有高效水分转运活性的水通道蛋白, 包含 PIP1 和 PIP2 两个亚类。本研究基于块茎蛋白组中鉴定到的一个 PIP 蛋白, 采用 RT-PCR 技术对其编码基因进行克隆, 并在此基础上分析其基因结构、序列特征、进化关系、表达特性及蛋白亚细胞定位。结果表明: *CePIP1;1* 含有 3 个内含子, 编码区全长 867 bp, 编码 288 个氨基酸, 理论分子量为 30.76 kDa, 等电点为 8.82, 不稳定系数为 32.95, 总平均疏水指数为 0.384, 脂肪族指数为 95.28, 属于稳定的碱性疏水型蛋白; 该蛋白含有保守的 MIP 结构域, 其中包括 6 个跨膜螺旋、2 个半螺旋以及位于半螺旋顶端的 NPA 基序。序列比对和进化分析显示, *CePIP1;1* 与水稻的 PIP1 亚类聚在一起, 相比于菠菜 PIP2;1 拥有延伸的 N 端和较短的 C 端, 符合 PIP1 亚类的基本特征。在烟草叶片中的亚细胞定位分析显示, *CePIP1;1* 定位在细胞膜, 这与生物信息学预测结果一致。表达分析显示, *CePIP1;1* 在分析的所有组织中均高水平表达, 属于组成型表达基因, 其在块茎的发育过程中呈现先升后降的钟形趋势, 与水分含量趋势基本一致。这些结果为下一步的功能分析及油莎豆遗传改良奠定坚实的基础。

**关键词:** 油料作物; 水通道蛋白; 质膜内在蛋白; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

## Molecular Cloning and Characterization of *CePIP1;1*, an Aquaporin Gene Highly Abundant in *Cyperus esculentus* Tubers

ZHENG Yujiao<sup>1,2</sup>, CHANG Lili<sup>2</sup>, ZHAO Yongguo<sup>2</sup>, ZENG Changying<sup>1\*</sup>, ZOU Zhi<sup>2\*</sup>

1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding / Hainan Key Laboratory for Biosafety Monitoring and Molecular Breeding in Off-Season Reproduction Regions / 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:** Tigernut (*Cyperus esculentus* L.), which belongs to the Cyperaceae family within Poales, is a novel herbaceous oil crop producing high amounts of oil in underground tubers. Like other tuber and tuberous root crops, water accounts for approximately 85% of immature tubers, implying a crucial role of water balance for tuber development in tigernut. Plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), which include two groups (i.e. PIP1 and PIP2) typically localized to the cell membrane, constitute a subfamily of aquaporin facilitating the passive transport of water. Based on one PIP identified in the proteomes of tigernut tubers, its coding gene *CePIP1;1* was cloned using the RT-PCR technique, followed by analyzing the exon-intron structure, sequence features, evolutionary relationships, expression profiles, and protein subcellular localization. *CePIP1;1* was shown to contain three introns with a coding sequence of 867 bp, putatively encoding 288 amino acids with the theoretical molecular weight of 30.76 kDa, the isoelectric point of 8.82, the

收稿日期 2023-05-15; 修回日期 2023-05-27

基金项目 “崖州湾” 菁英人才科技专项 (No. SCKJ-JYRC-2022-66); 海南省重点研发项目 (No. ZDYF2024XDNY171); 国家自然科学基金项目 (No. 31971688)。

作者简介 郑玉皎 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子育种。\*通信作者 (Corresponding author): 曾长英 (ZENG Changying), E-mail: zengchangying@hainanu.edu.cn; 邹智 (ZOU Zhi), E-mail: zouzhi2008@126.com。

instability index of 32.95, the grand average of hydropathicity of 0.384, and the aliphatic index of 95.28, implying that it is stable, basic, and hydrophobic. The protein was predicted to harbor one conserved MIP (major intrinsic protein) domain, including six transmembrane helices, two half helices, and dual NPA motifs located at the N-termini of two half helices. Sequence alignment and phylogenetic analysis revealed that *CePIP1;1* clustered with *Oryza sativa* PIP1s and possesses an extended N-terminus but a short C-terminus relative to *Spinacia oleracea* PIP2;1, supporting its classification. Transient over-expression in *Nicotiana benthamiana* leaves supported the plasma membrane localization of *CePIP1;1*, which is consistent with the bioinformatics prediction. Further expression analysis showed that *CePIP1;1* was constitutively expressed in all tissues examined in this study. During tuber development, *CePIP1;1* exhibited a typical bell-shaped expression pattern, which is consistent with that of the moisture content. These results lay a solid foundation for further functional analysis and genetic improvement in tigernut.

**Keywords:** oil crop; aquaporin; plasma membrane intrinsic protein; subcellular localization; expression analysis

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.05.003

水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 隶属于古老的主要内在蛋白 (major intrinsic protein, MIP) 超家族, 是一类高效转运水分子的膜内在蛋白<sup>[1]</sup>。在高等植物中, AQP 家族可分为质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic protein, PIP)、液泡膜内在蛋白 (tonoplast intrinsic protein, TIP)、类根瘤 26 膜内在蛋白 (NOD26-like intrinsic protein, NIP)、未鉴定膜内在蛋白 (X intrinsic protein, XIP) 和碱性小分子膜内在蛋白 (small basic intrinsic protein, SIP) 等五大类<sup>[2-6]</sup>。其中, PIP 包含 PIP1 和 PIP2 两个亚类, 是介导细胞间水分跨膜运输的主要通道<sup>[1, 7]</sup>。

油莎豆 (*Cyperus esculentus* L.) 俗称虎坚果, 是一种起源于非洲和地中海沿岸的新型草本油料作物<sup>[8]</sup>。与油菜、大豆、花生等传统油料作物不同, 油莎豆以收获营养组织——地下块茎为主要经济目标, 是迄今唯一已知在块茎中高水平积累油脂 (24%~35%) 的作物<sup>[9-12]</sup>。油莎豆块茎营养丰富, 除富含油脂外, 还含有 25%~45% 的淀粉、15%~30% 的糖、5%~10% 的蛋白质、8%~10% 的膳食纤维以及丰富的维生素 C/E 和矿物质<sup>[13]</sup>。更重要的是, 油莎豆具有适应性广、抗逆性强、发展潜力大、每亩产油量高、适合机械化等特点, 便于在不挤占现有耕地的情况下利用沙化边际土地增加我国的食用油和饲料原料供给, 满足国家的战略需求<sup>[14-15]</sup>。虽然如此, 至今仍对油莎豆的遗传背景、产油和适应机制知之甚少。基于核基因和叶绿体 DNA 序列的进化分析显示, 油莎豆隶属禾本科莎草科莎草属, 其与同属香附子的分化时间约在 560 万年前, 在此之后油莎豆进化出产油的块茎<sup>[8, 16-18]</sup>。已报道的油莎豆染色体数目差异很大, 介于 54~156 条之间<sup>[19-20]</sup>, 暗示其可能

存在多种倍型。与其他油料作物相比, 油莎豆的分子生物学研究比较薄弱。除 *CeWRI1*、*CeWRI4*、*CeEPS*、*CeALS*、*CeSMP1~5*、*CeOLE1~6*、*CeTIP1;1*、*CeTIP2;1* 等少数基因得到克隆和鉴定外<sup>[9-12, 17-18, 21-23]</sup>, 至今未见有关 PIP 基因的报道。通过分析公共数据库中的蛋白组数据<sup>[16]</sup>, 本团队鉴定到 1 个在块茎中高水平表达的 PIP 基因, 根据序列特征和进化关系将其命名为 *CePIP1;1*。本研究主要报道该基因的基因结构、序列特征、进化关系、表达特性及蛋白亚细胞定位, 以期为进一步的功能分析及油莎豆遗传改良奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 基因克隆和表达分析所用油莎豆品系为热研 3 号<sup>[9]</sup>; 亚细胞定位分析所用材料为本氏烟草<sup>[24]</sup>。

1.1.2 菌株及载体 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和农杆菌 GV3101 (内含辅助质粒 *pSoup-P19*) 感受态、亚细胞定位载体 *pNC-Cam1304-SubN* 均由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂 生化试剂、酶及试剂盒详见文献<sup>[17]</sup>。

1.1.4 数据库资源 油莎豆的基因组数据下载于 CNGbDb (<https://db.cngb.org/search/assembly/CN-A0051961/>) 数据库; 转录组数据下载于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/703731>) 数据库; 蛋白组数据下载于 ProteomeXchange/PRIDE (<https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD021894>) 数据库。

### 1.2 方法

1.2.1 *CePIP1;1* 的鉴定 采用上述蛋白组数据

鉴定块茎表达 *PIP* 基因, 其中, 二级质谱数据的检索采用 Proteome Discoverer (v2.4.1.15) 软件; 采用 HISAT 2 软件将上述转录组读段比对到基因组, 基因相对定量采用 FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) 法。

1.2.2 总 RNA 的提取和反转录 参照文献[18], 分别提取油莎豆不同发育时期块茎的总 RNA, 经质量检测合格后合成 cDNA 第一链用于基因克隆与表达分析。

1.2.3 基因克隆与载体构建 根据油莎豆的基因组和转录组序列设计引物对 *CePIP1;1F/R* (5'-AATCCACTCATCATCTCCAC-3'/5'-AAGTAACAACACAGCAAGGC-3') 和 *CePIP1;1HF/R* (5'-AGTGGTCTCTGTCCAGTCCTATGGAGGCGAAGGAGCAGG-3'/5'-GGTCTCAGCAGACCACAA GTTTATCTGCTCTTGAATGGG-3'), 分别用于 *CePIP1;1* 全长 cDNA 的分离和亚细胞定位载体的构建: 首轮 PCR 扩增以 *CePIP1;1F/R* 为引物, 块茎来源的 cDNA 作为模板; 第二轮 PCR 以 *CePIP1;1HF/R* 为引物, 稀释 100 倍的首轮 PCR 产物作为模板, 具体 PCR 反应和载体构建流程详见文献[17]。

1.2.4 生物信息学分析 基因结构分析采用 GSDS (v2.0) (<http://gsds.gao-lab.org/>) 在线软件; 蛋白的理化特性和保守结构域分析分别采用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 和 NCBI CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 在线软件; 亚细胞定位、二级结构和三级结构的预测分别采用 WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>)、SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](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; 多序列比对和进化树的构建分别采用 ClustalX (v1.83) 和 MEGA (v6.06) 软件; 跨膜螺旋区根据与已结晶菠菜 PIP2;1<sup>[7]</sup> 的序列比对进行界定。

1.2.5 亚细胞定位分析 将 pNC-Cam1304-*CePIP1;1* 和阳性质粒 pNC-HbPIP2;3-RFP<sup>[25]</sup> 转入农杆菌后, 参照乔雪莹等<sup>[24]</sup> 的方法制备浸染液及进行烟草叶片的瞬时转化, 转化 48 h 后用激光共聚焦显微镜 Zeiss LMS880 进行荧光观察。

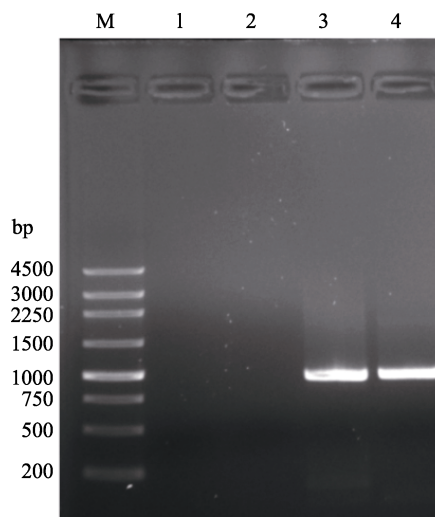
1.2.6 荧光定量分析 参照文献[9], 以 *CeUBL5* 作为内参, 利用引物对 *CePIP1;1Fq/Rq* (5'-CCCC-CTCCAAGTGTGCCT-3'/5'-GGTTGATGTGTCC-

ACCTGAGATT-3') 进行荧光定量分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 块茎表达 *CePIP1;1* 蛋白的鉴定及编码区序列的分离

为鉴定油莎豆块茎中的主要 *PIP* 基因, 本研究首先分析了已有的蛋白组数据, 发现 *CePIP1;1* 在新鲜收获的成熟块茎、吸水 48 h 的块茎以及萌发的块茎中均有较高的丰度, 暗示其可能在块茎发育过程中起重要作用。为此, 采用 RT-PCR 技术对该基因 867 bp 的编码区 (CDS) 序列进行分离 (图 1), 并将其克隆到亚细胞定位载体构建重组质粒 pNC-Cam1304-*CePIP1;1*。通过将克隆到的序列比对到基因组, 发现其与基因的对应区域完全一致。*CePIP1;1* 位于 Scaffold9, 基因全长 3321 bp, 含有 3 个内含子 (图 2A)。



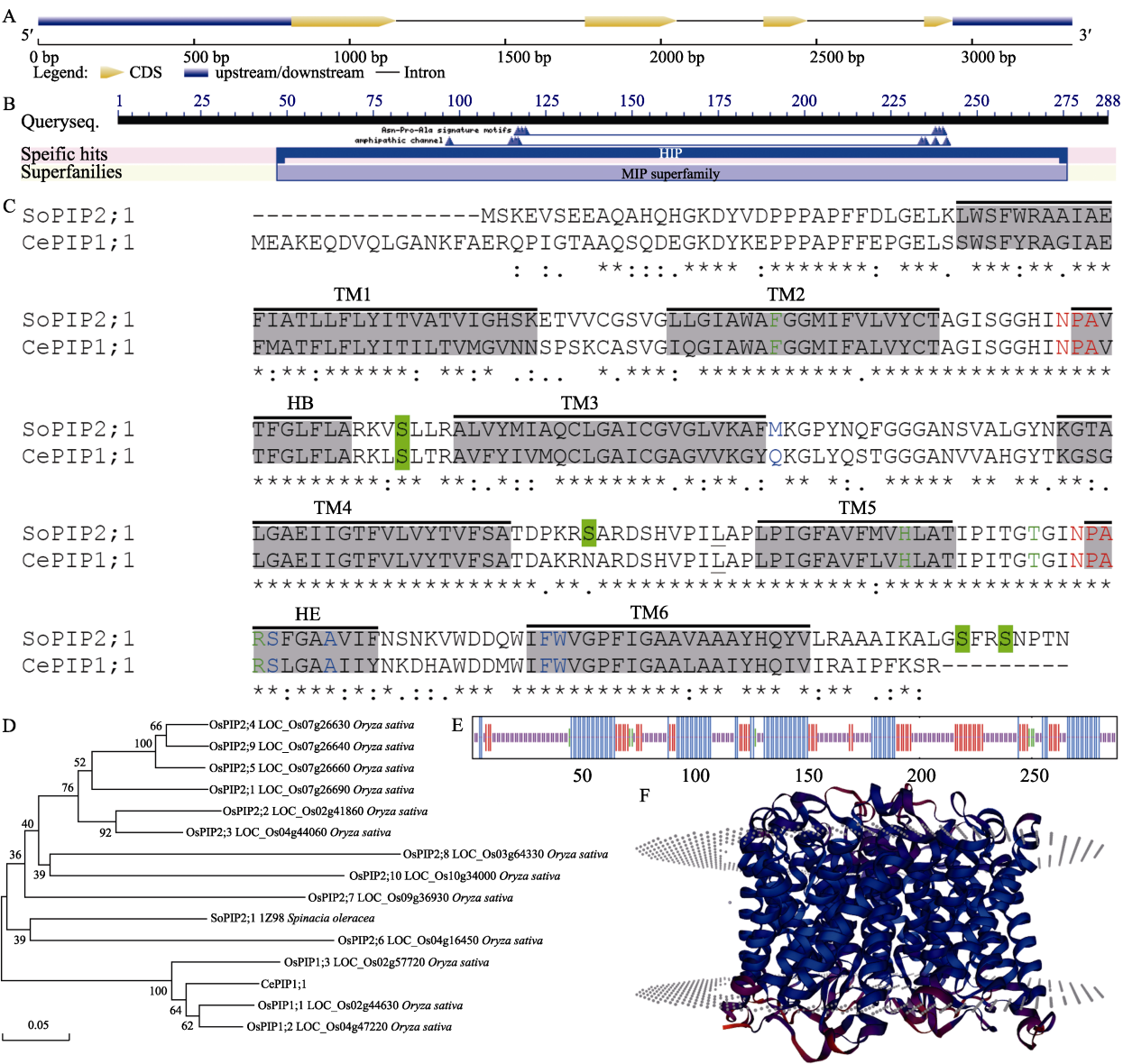
M: 4500 bp DNA ladder; 1-2: ddH<sub>2</sub>O; 3-4: *CePIP1;1*.

图 1 *CePIP1;1* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *CePIP1;1*

### 2.2 *CePIP1;1* 生物信息学分析

序列分析显示, *CePIP1;1* 编码 288 个氨基酸, 理论分子量为 30.76 kDa, 等电点为 8.82, 不稳定系数为 32.95, 总平均疏水指数为 0.384, 脂肪族指数为 95.28, 推测其为稳定的碱性疏水型蛋白。CDD 分析显示蛋白的第 47~276 位为 MIP 结构域 (pfam00230) (图 2B)。 *CePIP1;1* 与 *SoPIP2;1* 的序列一致性为 65.70%, 均拥有 6 个跨膜螺旋 (即 TM1-6)、2 个半螺旋 (即 HB 和 HE) 以及 2 个位于半螺旋顶端的 NPA 基序; ar/R 选择性滤器 (F-H-T-R) 和对应于 *SoPIP2;1* S<sup>115</sup> 的磷酸化位点



A: *CePIP1;1* 的基因结构; B: *CePIP1;1* 的保守结构域预测; C: *CePIP1;1* 与 *SoPIP2;1* 的序列比对; D: *CePIP1;1*、*SoPIP2;1* 和水稻 PIP 蛋白的进化分析; E: *CePIP1;1* 的二级结构预测; F: *CePIP1;1* 的三级结构预测。  
A: Gene structure of *CePIP1;1*; B: Predicted conservative domain of *CePIP1;1*; C: Sequence alignment of *CePIP1;1* and *SoPIP2;1*; D: Phylogenetic analysis of *CePIP1;1*, *SoPIP2;1* and PIPs in *O. sativa*; E: Predicted secondary structure of *CePIP1;1*; F: Predicted 3D structure of *CePIP1;1*.

图 2 *CePIP1;1* 的生物信息学分析  
Fig. 2 Bioinformatics analysis of *CePIP1;1*

和 L<sup>197</sup> 门控位点完全一致;在 5 个 Froger 位点中, 仅 P1 存在差异, *SoPIP2;1* 为 M-S-A-F-W, 而 *CePIP1;1* 为 Q-S-A-F-W。相比于 *SoPIP2;1*, *CePIP1;1* 具有延伸的 N 端和较短的 C 端, 同时缺乏对应于 *SoPIP2;1* S<sup>188</sup>、S<sup>274</sup> 和 S<sup>277</sup> 的磷酸化位点, 符合 PIP1 亚类的基本特征 (图 2C)。进化分析显示, *CePIP1;1* 与水稻的 PIP1 亚类聚在一起, 与 *OsPIP1;2*、*OsPIP1;1*、*OsPIP1;3* 的一致性分别为 90.30%、87.90%和 85.50% (图 2D)。SOPMA

分析显示, *CePIP1;1* 的  $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角和无规则卷曲分别占 32.64%、19.10%、2.78%和 45.49% (图 2E)。以 *SoPIP2;1* 作为模板的同源建模进一步表明 *CePIP1;1* 含有 6 个跨膜螺旋, 同时也显示其可以形成同源四聚体 (图 2F)。

### 2.3 *CePIP1;1* 亚细胞定位分析

WoLF PSORT 预测显示 *CePIP1;1* 定位在细胞膜。为验证该结果, 本研究以先前报道的 *HbPIP2;3*<sup>[25]</sup> 作为阳性对照, 将含 *pNC-HbPIP2;*

3-RFP 和 pNC-Cam1304-CePIP1;1 的农杆菌工程菌等量混合后微量注射烟草叶片。共聚焦观察结果显示, EGFP-CePIP1;1 的绿色荧光信号与 HbPIP2;3-RFP 的红色荧光信号高度重合, 这表明 CePIP1;1 确实是定位在细胞膜 (图 3)。

## 2.4 CePIP1;1 基因表达分析

为揭示 CePIP1;1 的时空表达特性, 首先利用转录组数据分析其在幼嫩叶片、成熟叶片、叶鞘、根、芽尖、匍匐茎、播后 40 d 块茎、播后 85 d 块茎和播后 120 d 块茎等主要组织和发育时期中

的表达模式。结果表明, 该基因在所分析的样本中均有较高水平的表达, 其中, 丰度最高的是叶鞘, 最低的是芽尖; 与幼嫩叶片相比, 基因在成熟叶片中的表达下调; 在块茎发育过程中, 呈现典型的钟形趋势 (图 4A), 峰值出现在发育中期。为进一步揭示基因表达与块茎含水量之间的关系, 采用 qRT-PCR 技术分析其在块茎起始形成 1 d ( $S_1$ )、20 d ( $S_2$ )、25 d ( $S_3$ ) 和 35 d ( $S_4$ ) 的表达模式。结果显示, 该基因呈先升后降的趋势 (图 4B), 这与块茎水分动力学趋势基本一致。

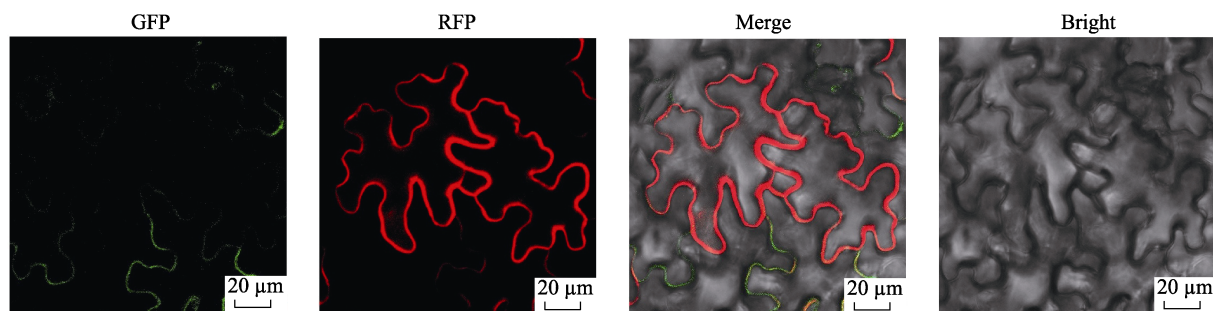
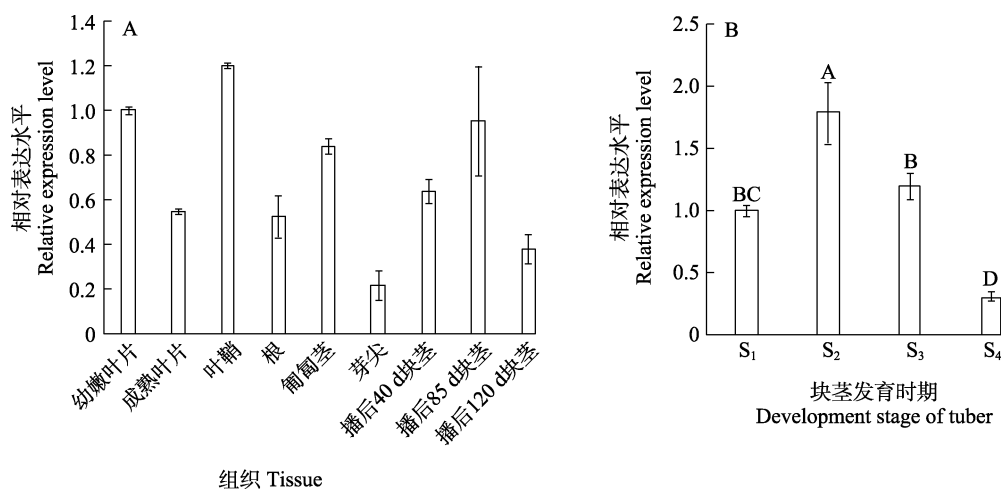


图 3 CePIP1;1 的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization analysis of CePIP1;1



不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

Different uppercase letters indicate extremely significant difference ( $P < 0.01$ ).

图 4 CePIP1;1 的表达模式

Fig. 4 Expression profiles of CePIP1;1

## 3 讨论

AQP 最先因其高效的水分转运活性而得名, 是介导细胞间水分跨膜运输的主要通道, 因此, AQP 介导的水分平衡理所当然成为植物生物学研究的热点<sup>[1, 7]</sup>。至今, AQP 基因已在拟南芥、水稻、菠菜、番木瓜、蓖麻、麻疯树、木薯、橡胶树等不同植物中得到了克隆和鉴定<sup>[1-7, 22-25]</sup>。

油莎豆隶属莎草科, 与禾本科植物具有较近的亲缘关系<sup>[9-11, 17-18]</sup>。众所周知, 禾本科包含水稻、小麦、玉米等重要粮食作物, 其种子是人类的主要淀粉来源。油莎豆不开花或开花不结实, 主要通过地下块茎进行营养繁殖<sup>[15]</sup>。不同于其他块根块茎类植物, 油莎豆除积累淀粉外, 还可以积累高达 35% 的油脂<sup>[10, 12]</sup>, 这使其成为研究营

养组织高水平积累油脂的理想模型<sup>[15, 26]</sup>。据研究, 油莎豆的块茎生长迅速, 起始后约 35 d 即可成熟<sup>[9-10]</sup>。在成熟前, 块茎外观为白色, 含水量约为 85%; 25 d 后开始逐渐变黄, 含水量约 75%; 35 d 时外观呈现褐色, 含水量降低到 45%<sup>[9]</sup>, 这表明水分平衡对于块茎的发育乃至干物质(包括油脂)的积累至关重要。事实也是如此, 有的研究仅在成熟块茎的蛋白组中就鉴定出多个 *AQP* 基因<sup>[16]</sup>, 本研究报道的 *CePIP1;1* 就是其中之一。

与其他 *PIP* 基因类似, *CePIP1;1* 含有 3 个内含子, 其编码蛋白包含保守的 *MIP* 结构域, 分子量为 30.76 kDa。*CePIP1;1* 具有较高的脂肪族指数(95.28), 且总平均疏水指数>0、等电点>7.0、不稳定系数为<40, 属于稳定的碱性疏水型蛋白。在水稻的 13 个 *PIP* 蛋白中, *CePIP1;1* 与 *OsPIP1;2* 的序列一致性最高(90.30%), 远高于与 *SoPIP2;1* 的 65.70%; 在进化分析中也确实与 *PIP1* 亚类聚在一起; 此外, 相比于 *SoPIP2;1* 和水稻 *PIP2* 蛋白, *CePIP1;1* 具有较长的 N 端和较短的 C 端, 这些结果都支持其归为 *PIP1* 亚类。在烟草叶片中, *CePIP1;1* 定位在细胞膜, 因其具有 *SoPIP2;1* 类似的 ar/R 选择性滤器(F-H-T-R)以及 2 个典型的 NPA 基序, 推测 *CePIP1;1* 在体内具有高效的水分转运活性。虽然如此, 不少 *PIP1* 在蟾蜍卵母细胞和酵母体外体系中无或仅有微弱的水分转运活性, 其中包括 *OsPIP1;1*、*OsPIP1;2* 和 *OsPIP1;3*<sup>[27-28]</sup>。深入研究发现, *PIP1* 在体外无水分转运活性主要与其不能有效定位到细胞膜有关。譬如当 *OsPIP1;3* 在蟾蜍卵母细胞和水稻原生质体过表达时, 其编码蛋白被发现定位在内质网, 但当其与 *OsPIP2;2* 共表达时却定位在细胞膜, 并具有高效的水分转运活性<sup>[29]</sup>。因此, 推测 *CePIP1;1* 可通过与烟草和油莎豆中的 *PIP2* 蛋白互作有效定位到细胞膜, 继而介导水分的跨膜转运。根据时空表达分析, *CePIP1;1* 属于组成型表达基因, 广泛参与包括块茎在内的不同组织的水分平衡: 在幼嫩叶片和块茎成熟前高水平表达, 与其快速的细胞分裂与扩张以及活跃的生理代谢是相适应的<sup>[24]</sup>; 在块茎成熟过程中下调, 与其含水量降低和脱水抗性的获得是一致的<sup>[9-10]</sup>; 在叶鞘和匍匐茎中的高水平表达则与其重要的疏导特性是相适应的。

综上, 本研究报道了 1 个油莎豆 *PIP* 基因, 并明确了其基因结构、序列特征、进化关系、亚细

胞定位及表达特性, 这为深入揭示块茎的水分平衡机制及油莎豆遗传改良奠定坚实的基础。

## 参考文献

- [1] ABASCAL F, IRISARRI I, ZARDOYA R. Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1840(5): 1468-1481.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] ZOU Z, ZHENG Y J, XIE Z N. Analysis of *Carica papaya* informs lineage-specific evolution of the aquaporin (AQP) family in Brassicales[J]. *Plants*, 2023, 12(22): 3847.
- [7] TORNROTH-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.
- [8] DE CASTRO O, GARGIULO R, DEL GUACCHIO E, CAPUTO P, DE LUCA P. A molecular survey concerning the origin of *Cyperus esculentus* (Cyperaceae, Poales): two sides of the same coin (weed vs. crop)[J]. *Annals of Botany*, 2015, 115(5): 733-745.
- [9] 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.
- [10] ZOU Z, ZHENG Y J, ZHANG Z T, XIAO Y H, XIE Z N, CHANG L L, ZHANG L, ZHAO Y G. Molecular characterization of oleosin genes in *Cyperus esculentus*, a Cyperaceae plant producing oil in underground tubers[J]. *Plant*

- Cell Reports, 2023, 42(11): 1791-1808.
- [11] 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.
- [12] 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 *CeWRI1* 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 *CeWRI1*, 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)
- [13] DEFELICE M S. Yellow nutsedge *Cyperus esculentus* L.—snack food of the gods[J]. Weed Technology, 2002, 16: 901-907.
- [14] 张学昆. 我国油莎豆产业研发进展报告[J]. 中国农村科技, 2019(287): 67-69.
- ZHANG X K. Research progress of the tigernut industry in China[J]. China Rural Science Technology, 2019(287): 67-69. (in Chinese)
- [15] 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, 43(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)
- [16] 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]. Plant Journal, 2022, 112(2): 518-534.
- [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-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from tigernut (*Cyperus esculentus* L.)[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2023, 44(1): 26-34. (in Chinese)
- [19] ROALSON E H. A synopsis of chromosome number variation in the Cyperaceae[J]. Botanical Review, 2008, 74: 209-393.
- [20] ZHAO X, YI L, REN Y, LI J, REN W, HOU Z, SU S, WANG J, ZHANG Y, DONG Q, YANG X, CHENG Y, LU Z. Chromosome-scale genome assembly of the yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*) [J]. Genome Biology Evolution, 2023, 15(3): evad027.
- [21] CHENG C, HU S, HAN Y, XIA D, HUANG BL, WU W, HUSSAIN J, ZHANG X, HUANG B. Yellow nutsedge WRI4-like gene improves drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* by promoting cuticular wax biosynthesis[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 498.
- [22] 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, 1-7 [2024-05-10]. <https://link.cnki.net/urlid/42.1429.S.20240307.1022.001>.
- ZHANG 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, 1-7 [2024-05-10]. <https://link.cnki.net/urlid/42.1429.S.20240307.1022.001>. (in Chinese)
- [23] ZOU Z, ZHENG Y J, CHANG L L, ZOU L P, ZHANG L, MIN Y I, ZHAO Y G. TIP aquaporins in *Cyperus esculentus*: Genome-wide identification, expression profiles, subcellular localizations, and interaction patterns[J]. BMC Plant Biology 2024, 24(1): 298.
- [24] 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)
- [25] 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)
- [26] TURESSON H, MARTTILA S, GUSTAVSSON K E, HOFVANDER P, OLSSON M E, BÜLOW L, STYMNE S, CARLSSON A S. Characterization of oil and starch accu-

- mulation in tubers of *Cyperus esculentus* var. *sativus* (Cyperaceae): a novel model system to study oil reserves in non-seed tissues[J]. *American Journal of Botany*, 2010, 97(11): 1884-1893.
- [27] MATSUMOTO T, LIAN HL, SU WA, TANAKA D, LIU CW, IWASAKI I, KITAGAWA Y. Role of the aquaporin PIP1 subfamily in the chilling tolerance of rice[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2009, 50(2): 216-229.
- [28] DING L, GAO L, LIU W, WANG M, GU M, REN B, XU G, SHEN Q, GUO S. Aquaporin plays an important role in mediating chloroplastic CO<sub>2</sub> concentration under high-N supply in rice (*Oryza sativa*) plants[J]. *Physiologia Plantarum*, 2016, 156(2): 215-226.
- [29] LIU S, FUKUMOTO T, GENA P, FENG P, SUN Q, LI Q, MATSUMOTO T, KANEKO T, ZHANG H, ZHANG Y, ZHONG S, ZENG W, KATSUHARA M, KITAGAWA Y, WANG A, CALAMITA G, DING X. Ectopic expression of a rice plasma membrane intrinsic protein (OsPIP1;3) promotes plant growth and water uptake[J]. *Plant Journal*, 2020, 102(4): 779-796.