

## 油莎豆水通道蛋白基因 *CeTIP2;1* 的克隆与分析

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:** 油莎豆起源于非洲和地中海沿岸, 是一种在块茎中高水平积累油脂的新型草本油料作物。水分平衡对于块茎的发育与代谢至关重要。液泡膜内在蛋白(TIP)是一类液泡膜定位并具有高效水分转运活性的水通道蛋白, 包含 TIP1~5 等 5 个亚类。本研究基于油莎豆的基因组和转录组数据, 采用 RT-PCR 技术对 1 个块茎高水平表达的 TIP 基因 *CeTIP2;1* 进行克隆。序列分析表明: *CeTIP2;1* 的基因全长 3323 bp, 含有 2 个内含子, 编码区长 747 bp, 编码 248 个氨基酸, 理论分子量为 24.73 kDa, 等电点为 5.09, 总平均疏水指数为 0.948, 脂肪族指数为 114.60, 不稳定系数为 21.76, 属于稳定的酸性疏水型蛋白, 与其液泡膜定位一致; 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 2 个典型的 NPA 基序。*CeTIP2;1* 与 *AtTIP2;1* 的序列相似性高达 87.20%, 远高于与 *SoPIP2;1* 的 46.23%。进化分析进一步证实, *CeTIP2;1* 隶属于 TIP2 亚类, 是 *AtTIP2;1* 的直系同源基因。进化分析同时显示 TIP2 亚类早在单、双子叶植物分化之前就已经进化出 2 个小组。表达分析显示: *CeTIP2;1* 在叶片、叶鞘、根、芽尖、匍匐茎、块茎等主要组织中均有较高水平的表达, 丰度最高的是块茎和匍匐茎, 最低的为芽尖; 在块茎的发育过程中, 呈现先升后降的钟形趋势, 峰值出现在膨大中期, 最低的为成熟期。此外, *CeTIP2;1* 还在块茎的蛋白组中被检测到, 表明其功能的重要性。这些结果为进一步揭示油莎豆的块茎水分平衡机制奠定坚实的基础。

**关键词:** 油料作物; 块茎; 液泡膜内在蛋白; 进化分析; 表达模式

中图分类号: S565.9

文献标志码: A

## Molecular Cloning and Characterization of *CeTIP2;1*, an Aquaporin Gene from Tigernut (*Cyperus esculentus* L.)

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:** Tigernut (*Cyperus esculentus* L.), most likely originated from Africa and Mediterranean, represents a novel herbaceous oil crop accumulating high levels of oil in its underground tubers. Water balance is essential for tuber development and metabolism in tigernut. Tonoplast intrinsic proteins (TIPs), which include five phylogenetic groups (i.e. TIP1–5), constitute a subfamily of aquaporin facilitating the fast and passive transport of water across vacuolar membranes. Based on available genome and transcriptome data, one TIP gene named *CeTIP2;1* was isolated from tigernut tubers by using the RT-PCR technique. Sequence analysis showed that the full gene length of *CeTIP2;1* is 3323 bp, including two introns with a coding sequence of 747 bp; the gene was predicted to encode 248 amino acids with the theoretical molecular weight of 24.73 kDa, the isoelectric point of 5.09, the grand average of hydropathicity of 0.948, the aliphatic index of 114.60, and the instability index of 21.76, implying its stable, acidic, and hydrophobic features, which is consistent with its tonoplast-localization; presence of one conservative MIP domain was observed, which possesses six transmembrane helices, two half helices, and two typical NPA motifs. *CeTIP2;1* was shown to exhibit the sequence

收稿日期 2023-07-20; 修回日期 2023-08-28

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

similarity of 87.20% with *AtTIP2;1*, which was considerably higher than 46.23% with *SoPIP2;1*. Further phylogenetic analysis revealed that *CeTIP2;1* belongs to the TIP2 group and is a true ortholog of *AtTIP2;1*. Interestingly, the phylogenetic analysis also supported that TIP2 has diverged into two subgroups sometime before monocot-eudicot divergence. Tissue-specific expression analysis showed that *CeTIP2;1* was highly expressed in all tissues examined in this study, i.e., leaf, sheath, root, shoot apex, rhizome, and tuber, with most in tuber/rhizome and lowest in shoot apex. A bell-like expression pattern was observed during tuber development, peaking at the medium stage of swelling and lowest in maturation. Moreover, *CeTIP2;1* was also detected in the tuber proteomes, implying its high abundance and key roles. These findings would lay a solid foundation for further uncovering the mechanism of water balance in tigernut tubers.

**Keywords:** oil crop; tuber; tonoplast intrinsic protein; phylogenetic analysis; expression profile

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.08.004

水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 是一类广泛存在于生物体内的膜内在蛋白, 因其高效的水分转运活性而得名<sup>[1-2]</sup>。与动物和微生物相比, 植物 AQP 家族出现了明显的扩张, 主要包含液泡膜内在蛋白 (tonoplast intrinsic protein, TIP)、质膜内在蛋白 (plasma membrane intrinsic protein, PIP)、类根瘤 26 膜内在蛋白 (NOD26-like intrinsic protein, NIP)、小分子碱性膜内在蛋白 (small basic intrinsic protein, SIP) 和未鉴定膜内在蛋白 (X intrinsic protein, XIP) 等 5 大类<sup>[2-7]</sup>。其中, TIP 定位在液泡膜, 是介导细胞内水分平衡的关键 AQP 类型<sup>[8-12]</sup>。根据进化关系, TIP 可进一步分为 TIP1~5 等 5 个亚类<sup>[3-7]</sup>。

油莎豆 (*Cyperus esculentus* L.), 又名油莎草或虎坚果, 是一种起源于非洲和地中海沿岸的新型草本油料作物<sup>[13]</sup>。系统分析显示, 油莎豆隶属于禾本目莎草科, 其单套染色体的基因组大小约为 225.6 Mb<sup>[14-18]</sup>。相比于传统油料作物在种子中积累油脂, 油莎豆是迄今唯一已知在块茎中高水平积累油脂 (24%~35%) 的作物, 这使其成为研究营养组织油脂代谢与调控的理想模型<sup>[14, 19-21]</sup>。油莎豆具有适应性广、抗逆性强、产量高、适合机械化等特点, 这有助于在不挤占现有耕地的情况下充分利用沙化边际土地额外增加我国食用油供给, 减少对国外大豆的刚性需求, 进而服务国家的战略需求<sup>[22]</sup>。作为主要的经济器官, 积极开展块茎的发育生物学研究具有重要的理论意义和现实价值。本研究报道 1 个在块茎中高水平表达的 TIP 基因 *CeTIP2;1*, 其中包括基因结构、序列特征、进化关系及表达特性, 以期为下一步的功能分析及块茎水分平衡机制的阐释奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究所用油莎豆品系为热研

3 号<sup>[14]</sup>, 其中, 起始期 (起始后 1 d)、膨大中期 (起始后 20 d)、膨大晚期 (起始后 25 d) 和成熟期 (起始后 35 d) 等不同发育时期的块茎采集于中国热带农业科学院热带生物技术研究所周昌试验基地<sup>[23]</sup>。

1.1.2 菌株、载体及试剂耗材 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态和植物过表达载体 pCambia1301 由本实验室制备和保存; 酶、试剂盒及生化试剂购自相应的试剂公司。

### 1.2 方法

1.2.1 块茎总 RNA 的提取和反转录 参照文献 [14], 采用天根植物多糖多酚 RNA 提取试剂盒分别提取不同发育时期块茎的总 RNA, 并采用赛默飞反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。

1.2.2 *CeTIP2;1* 基因的克隆与载体构建 为鉴定油莎豆中 *AtTIP2;1* 的直系同源基因, 首先从 CNGbDb (<https://db.cngb.org/search/assembly/CNA-0051961/>) 和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/703731>) 数据库分别下载油莎豆的基因组和转录组数据; 以 *AtTIP2;1* 作为种子, 采用本地 TBLASTN 程序 (E 值设为 1e-10) 搜索油莎豆的基因组, 并利用 StringTie (v2.2.0) 将转录组数据比对到基因组以界定转录区域; 根据基因序列设计引物对 *CeTIP2;1*F/R (AAACGGAGACCCA-ACAAGCAAAAC/CAACCAAACAACATCAGGA-AACCA) 和 *CeTIP2;1*Hf/R (AGTGGTCTCTGT-CCAGTCCTATGGCAGGCATTGCTTTTGG/GGT-CTCAGCAGACCACAAGTTTAGTACTCGCTGCTGGACACTGG), 分别用于全长 cDNA 的分离和植物过表达载体的构建, 具体的 PCR 反应和载体构建流程详见文献 [15]。

1.2.3 序列分析 采用在线软件 GSDS (v2.0) (<http://gsds.gao-lab.org/>) 分析基因结构, 并分别用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>),

CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)、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](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 等在线软件分析蛋白的理化特性、保守结构域、亚细胞定位、二级结构和三级结构。

**1.2.4 多序列比对与进化分析** 采用 MEGA (v6.06) 软件中的 MUSCLE 进行蛋白多序列比对, 其中, 跨膜螺旋区和保守残基根据与已结晶 AtTIP2;1<sup>[12]</sup> 和菠菜 (*Spinacia oleracea*) SoPIP2;1<sup>[24]</sup> 的序列比对进行鉴定; 进化树的构建采用 MEGA 软件中的邻接法以及 1000 次自举重复。

**1.2.5 转录谱分析** 转录组读段的比对采用 StringTie 软件, 并用 FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) 法均一化基因在不同样本中的相对表达水平。

**1.2.6 蛋白谱分析** 油莎豆的蛋白组数据下载于 ProteomeXchange/PRIDE (<https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD021894>), 质谱数据的检索与分析采用 Proteome Discoverer (v2.4.1.15) 软件。

**1.2.7 荧光定量分析** 参照文献[17], 以 *CeUCE2* 作为内参, 应用引物对 *CeTIP2;1*Fq/Rq (TCG-TCATATTCAGCCCGGTGC/GGGTGCTTACCGGTAAGGTACTTG) 进行荧光定量分析, 每样本 3 次生物学重复。

### 1.3 数据处理

采用 SPSS 20 软件进行统计分析, 采用邓肯单因素多样本差异显著性进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *CeTIP2;1* 基因的克隆与序列分析

通过同源搜索, 从油莎豆基因组的 Scaffold27 鉴定 1 个 *AtTIP2;1* 同源基因, 二者在蛋白水平的序列相似性高达 87.20%, 将其命名为 *CeTIP2;1*。*CeTIP2;1* 基因的全长为 3323 bp, 包含 2 个内含子, 5'和 3' UTR 分别为 307 bp 和 1956 bp (图 1A)。随后, 采用 RT-PCR 技术对其 747 bp 的编码区序列进行分离, 并成功构建了植物过表达载体 pCambia1301-*CeTIP2;1*, 桑格测序未发现碱基差异。进一步的序列分析显示, *CeTIP2;1* 编码区的 GC 含量为 56.76%, 编码 248 个氨基酸, 理论分子量为 24.73 kDa, 等电点为 5.09, 总平均疏水

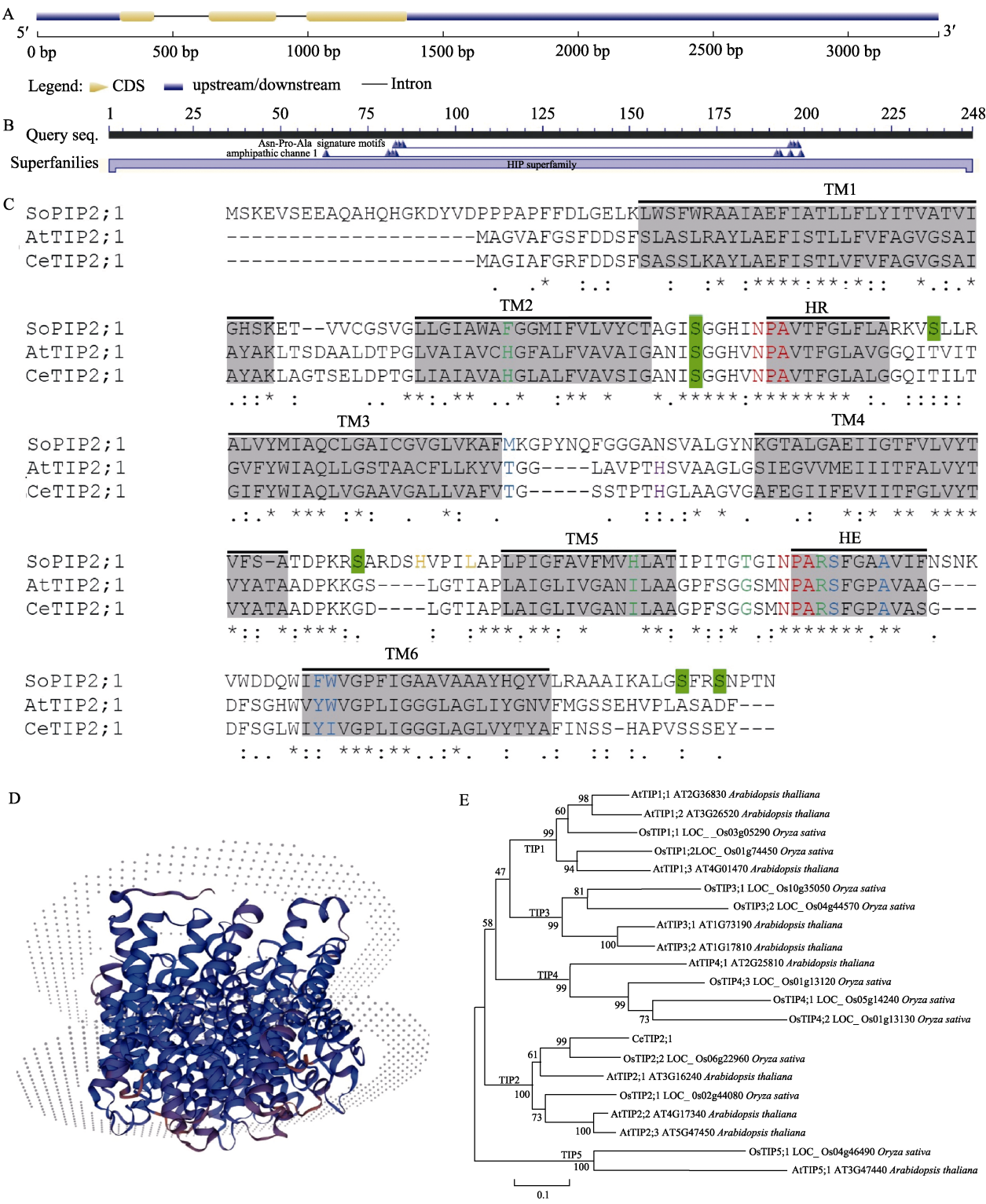
指数为 0.948, 脂肪族指数为 114.60, 不稳定系数为 21.76, 属于稳定的酸性疏水型蛋白, 这与 *AtTIP2;1* 类似, 但不同于 *SoPIP2;1* 的碱性特性 (表 1)。CDD 分析显示, *CeTIP2;1* 的 14~231 位为保守的 MIP 结构域 (图 1B)。虽然 *CeTIP2;1* 与 *SoPIP2;1* 的序列相似性仅为 46.23%, 但都拥有如图 1C 所示的 6 个跨膜螺旋 (TM1~6)、2 个半螺旋 (HB 和 HE) 以及 2 个典型的 NPA 基序。*CeTIP2;1* 的 ar/R 选择性过滤器为 H-I-G-R, 与 *AtTIP2;1* 一致, 但不同于 *SoPIP2;1* 的 F-H-T-R; *CeTIP2;1* 的 Froger 位点为 T-S-A-Y-I, 不同于 *AtTIP2;1* 的 T-S-A-Y-W 和 *SoPIP2;1* 的 M-S-A-F-W。与 *SoPIP2;1* 相比, *CeTIP2;1* 和 *AtTIP2;1* 具有较短的 N 端, 且仅含有对应于 *SoPIP2;1* S<sup>96</sup> 的磷酸化位点; *CeTIP2;1* 的连环 C 含有 1 个对应于 *AtTIP2;1* H<sup>131</sup> 的组氨酸, 而 *SoPIP2;1* 的相应位点为 N (图 1C)。亚细胞定位预测显示, *CeTIP2;1* 定位在液泡膜。*CeTIP2;1* 的二级结构以无规则卷曲和  $\alpha$ -螺旋为主, 分别占 37.90% 和 36.29%, 这与 *AtTIP2;1* 和 *SoPIP2;1* 类似 (表 1)。基于 *AtTIP2;1* 的同源建模显示, *CeTIP2;1* 可形成同源四聚体, 每个单体含有 6 个跨膜螺旋 (图 1D)。

### 2.2 进化分析

为进一步鉴定 *CeTIP2;1* 的进化关系, 本研究将其与已报道的 10 个 *OsTIP* 和 10 个 *AtTIP* 构建了无根进化树。如图 1E 所示, 21 个 TIP 被聚为 5 组, 即 TIP1~5。TIP1 明显聚成 2 个分支, 其中一支包括 *OsTIP1;1*、*AtTIP1;1* 和 *AtTIP1;2*, 另一支包括 *OsTIP1;2* 和 *AtTIP1;3*; TIP2 也聚成 2 个分支, 其中一支包括 *CeTIP2;1*、*OsTIP2;2* 和 *AtTIP2;1*, 另一支包括 *OsTIP2;1*、*AtTIP2;2* 和 *AtTIP2;3*, 表明 TIP1 和 TIP2 早在单、双子叶植物分化之前就已经进化成 2 个小组。与此相反, TIP3 按物种聚在一起, 这与 *AtTIP1;1/1;2*、*AtTIP2;2/2;3* 和 *OsTIP4-1/4-2/4-3* 类似, 表明这些基因在单双子叶植物分化之后产生。综上, 这些结果表明 *CeTIP2;1* 属于 *AtTIP2;1* 和 *OsTIP2;2* 的直系同源基因。

### 2.3 *CeTIP2;1* 的组织特异性分析

为揭示 *CeTIP2;1* 在不同组织中的表达特性, 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、块茎等主要组织中的表达模式。如图 2A 所示, *CeTIP2;1* 在所有组织中均有较高水平的表达, 其中, 表达丰度最高的



A: *CeTIP2;1* 的基因结构; B: *CeTIP2;1* 的保守结构域; C: *CeTIP2;1* 与 *AtTIP2;1* 和 *SoPIP2;1* 的序列比对, 6 个跨膜螺旋和 2 个半螺旋用灰色背景显示, 保守残基用不同颜色显示; D: *CeTIP2;1* 的 3D 结构预测; E: *CeTIP2;1* 与水稻和拟南芥 TIP 蛋白的进化分析。  
A: Gene structure of *CeTIP2;1*; B: Identified conservative domain of *CeTIP2;1*; C: Sequence alignment of *CeTIP2;1*, *AtTIP2;1*, and *SoPIP2;1*, where six transmembrane helices and two half helices are shaded and conserved residues are marked in different colors; D: Predicted 3D structure for *CeTIP2;1*; E: Phylogenetic analysis of *CeTIP2;1* and TIPs in *O. sativa* and *A. thaliana*.

图 1 *CeTIP2;1* 的生物信息学分析  
Fig. 1 Bioinformatics analysis of *CeTIP2;1*

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

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

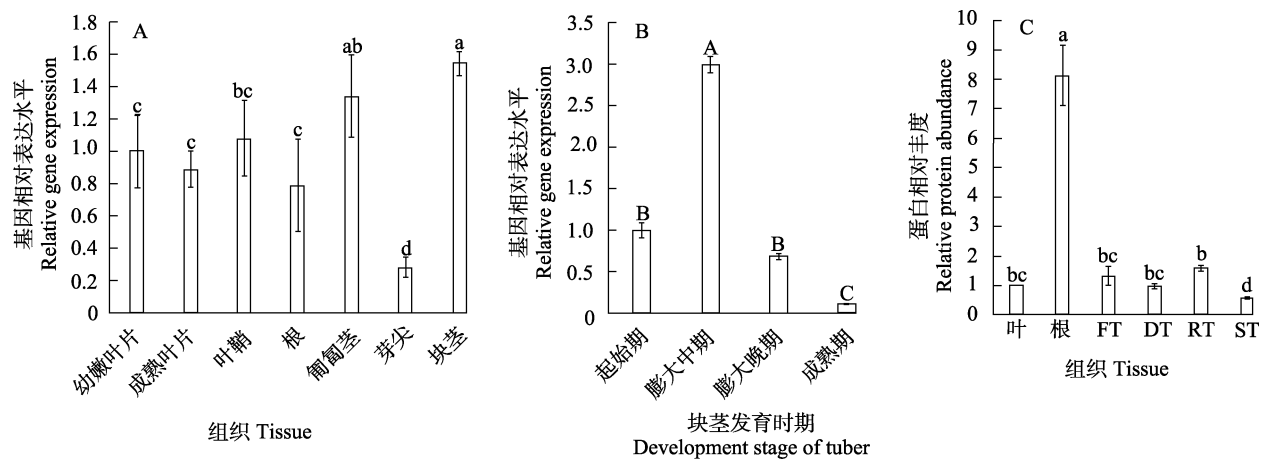
| 蛋白名称<br>Protein name | 氨基酸数量<br>Numbers of amino acid | 分子量<br>MW/kDa | pI   | GRAVY | AI     | II    | MIP     | α-螺旋<br>Alpha helix/% | 延伸链<br>Extended strand/% | β-转角<br>Beta turn/% | 无规则卷曲<br>Random coil/% |
|----------------------|--------------------------------|---------------|------|-------|--------|-------|---------|-----------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|
| CeTIP2;1             | 248                            | 24.73         | 5.09 | 0.948 | 114.60 | 21.76 | 14..231 | 36.29                 | 20.97                    | 4.84                | 37.90                  |
| AtTIP2;1             | 250                            | 25.03         | 5.30 | 0.974 | 112.48 | 26.73 | 14..232 | 33.20                 | 20.80                    | 5.60                | 40.40                  |
| SoPIP2;1             | 281                            | 29.90         | 9.03 | 0.579 | 102.81 | 27.81 | 31..260 | 36.65                 | 18.15                    | 2.14                | 43.06                  |

是块茎和匍匐茎，其次是叶鞘、幼嫩叶片、成熟叶片和根，最低的是芽尖。

2.4 CeTIP2;1 在不同发育时期块茎中的表达模式

为揭示基因表达与块茎发育的关系，采用

qRT-PCR 技术进一步分析 *CeTIP2;1* 在起始期、膨大中期、膨大晚期和成熟期等 4 个典型发育时期块茎中的表达模式。如图 2B 所示，结果表明基因在膨大中期的表达丰度最高，极显著高于起始期和膨大晚期，而在成熟期的丰度最低。



A: *CeTIP2;1* 的组织特异性分析; B: *CeTIP2;1* 在不同发育时期块茎中的表达模式; C: *CeTIP2;1* 在不同组织中的蛋白丰度。

小写字母和大写字母分别表示差异显著 ( $P<0.05$ ) 和差异极显著 ( $P<0.01$ )。

A: Tissue-specific expression profiles of *CeTIP2;1*; B: Expression profiles of *CeTIP2;1* in different stages of developmental tubers; C: *CeTIP2;1* protein abundance in different tissues. Lowercase and uppercase letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ) and extremely significant difference ( $P<0.01$ ), respectively.

图 2 *CeTIP2;1* 的表达模式

Fig. 2 Expression profiles of *CeTIP2;1*

2.5 CeTIP2;1 在不同组织中的蛋白定量

为揭示 *CeTIP2;1* 在不同组织中的蛋白丰度，研究进一步分析了油莎豆的蛋白组数据，即叶片、根、新鲜收获的成熟块茎 (RT)、脱水块茎 (DT)、吸水 48 h 块茎 (RT) 和萌发块茎 (ST)。如图 2C 所示，结果表明 *CeTIP2;1* 在根中的丰度最高，显著高于吸水 48 h 块茎，而在萌发块茎中的丰度最低；蛋白在块茎的脱水、吸水过程中差异不显著，丰度与叶片相当。

3 讨论

细胞膜定位的 PIP 和液泡膜定位的 TIP 是调控植物细胞水分平衡的主要 AQP 类型<sup>[2, 8]</sup>。相比

于 PIP, TIP 高度分化，其在高等植物中至少存在 5 个亚类，且其决定底物特异性的 ar/R 选择性滤器明显呈现多样化<sup>[3-7]</sup>。根据 ar/R 选择性滤器的类型及残基特性，BANSAL 等<sup>[25]</sup>将拟南芥、水稻和玉米中的 TIP 归为三大主要类型，第一类包含 TIP1 (H-I-A-V)，第二类包含 TIP2、TIP3 和 TIP4 (H-I/M/V-G/A/S-R)，第三类包含 TIP5 (N-V-G-C)。

本研究报道了在油莎豆块茎中高水平表达的 TIP 基因 *CeTIP2;1*，其编码蛋白包含 AQP 家族特有的 MIP 结构域，理化特性与 AtTIP2;1 高度相似，属于稳定的酸性疏水型蛋白。*CeTIP2;1* 可归为 TIP2 亚类，主要依据如下：首先，*CeTIP2;1* 与

*AtTIP2;1* 和 *OsTIP2;2* 的序列相似性在 87% 以上；其次，3 个蛋白在进化分析中聚在一起，并独立于 *OsTIP2;1*、*AtTIP2;2* 和 *AtTIP2;3*。这些证据表明 *CeTIP2;1* 是 *AtTIP2;1* 的直系同源基因，而非 *AtTIP2;2* 和 *AtTIP2;3*。根据先前的比较基因组学分析，与 *AtTIP3;1* 和 *AtTIP3;2* 一样，*AtTIP2;2* 和 *AtTIP2;3* 起源于芸薹属特有的  $\alpha$  全基因组重复<sup>[5, 26]</sup>。因为 *AtTIP2;1* 和 *AtTIP2;2/-2;3* 在水稻中 都存在直系同源基因，暗示基因分化发生在单、双子叶植物分化之前，这与 TIP1 类似<sup>[27]</sup>。也就是说，在目前鉴定的 5 个 TIP 亚类中，TIP1 和 TIP2 早在单、双子叶植物分化之前就发生了进一步的分化，因此，从进化角度讲，单、双子叶植物中的 TIP 分为 7 个亚类更为适合。基因结构分析显示，*CeTIP2;1* 含有 2 个内含子，其内含子数量和位置与 *AtTIP2;1* 和 *OsTIP2;2* 完全一致<sup>[3-4]</sup>，表明进化的保守性。*CeTIP2;1* 含有 2 个典型的 NPA 基序，ar/R 选择性过滤器为 H-I-G-R，且其连环 C 含有 1 个保守的 H 残基，这与 *AtTIP2;1* 和 *OsTIP2;2* 完全一致，表明其具有类似的生物学功能。在蟾蜍卵母细胞和酵母体系中功能分析显示，*AtTIP2;1* 和 *OsTIP2;2* 可转运水分、尿素和氨<sup>[10, 12, 28-29]</sup>。*CeTIP2;1* 的重要性还体现在其泛组织、高水平表达。由于现有蛋白组技术的灵敏性，一般只有较高丰度的蛋白才能检测到。先前研究表明，NIEMEYER 等<sup>[30]</sup>采用 nanoLC-MS/MS 技术对 45 个样本进行了蛋白组分析，合计仅检测到 2257 个蛋白。本研究的定量分析显示，*CeTIP2;1* 在叶片、根和 4 个时期的块茎中均被检测到，表明其在这些组织中的高水平表达。事实上，组织特异性分析显示 *CeTIP2;1* 是 1 个泛组织表达基因，其在块茎中的高水平表达与块茎的高含水量及活跃的生理代谢是相适应的。据前期研究结果表明，油莎豆块茎发育早期的含水量一致维持在 85% 左右，在膨大晚期和成熟期逐渐降低到 75% 和 45%<sup>[23]</sup>。*CeTIP2;1* 在块茎发育过程中的表达模式与水分含量趋势基本一致，峰值出现在膨大中期，而在膨大晚期和成熟期逐渐降低。*CeTIP2;1* 在成熟期的显著下调可能与其蛋白组中丰度低于根组织有关。

综上，本研究报道了 1 个油莎豆 TIP2 基因 *CeTIP2;1*，该基因含有 2 个内含子，属于 *AtTIP2;1* 的直系同源基因。该基因在不同组织中均高水平表达，与这些组织特别是块茎的水分平衡密切相关，这为下一步的功能分析及油莎豆水分平衡机

制的阐释奠定基础。

## 参考文献

- [1] PRESTON G M, CARROLL T P, GUGGINO W B, AGRE P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein[J]. Science, 1992, 256(5055): 385-387.
- [2] MAUREL C, VERDOUCQ L, LUU D T, SANTONI V. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 595-624.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] MAUREL C, REIZER J, SCHROEDER J I, CHRISPEELS M J. The vacuolar membrane protein  $\gamma$ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes[J]. EMBO Journal, 1993, 12(6): 2241-2247.
- [10] LOQUÉ D, LUDEWIG U, YUAN L, VON WIRÉN N. Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate  $\text{NH}_3$  transport into the vacuole[J]. Plant Physiology, 2005, 137(2): 671-680.
- [11] CHU T T H, HOANG T G, TRINH D C, BUREAU C, MEYNARD D, VERNET A, INGOUFF M, DO N V, PÉRIN C, GUIDERDONI E, GANTET P, MAUREL C, LUU D T.

- Sub-cellular markers highlight intracellular dynamics of membrane proteins in response to abiotic treatments in rice[J]. *Rice* (N Y), 2018, 11(1): 23.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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)
- [15] 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)
- [16] 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)
- [17] 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.
- [18] 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 nut-sedge (*Cyperus esculentus*) [J]. *Genome Biology Evolution*, 2023, 15(3): evad027.
- [19] TURESSON H, MARTTILA S, GUSTAVSSON K E, HOFVANDER P, OLSSON M E, 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.
- [20] 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)
- [21] 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.
- [22] 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)
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] BANSAL A, SANKARARAMAKRISHNAN R. Homology modeling of major intrinsic proteins in rice, maize and *Arabidopsis*: comparative analysis of transmembrane helix association and aromatic/arginine selectivity filters[J]. *BMC Structural Biology*, 2007, 7: 27.
- [26] 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* (Basel), 2023, 12(22): 3847.
- [27] 郑玉蛟, 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, 39(4): 184-192.
- 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, 39(4): 184-192. (in Chinese)
- [28] LIU L H, LUDEWIG U, GASSERT B, FROMMER W B, VON WIRÉN N. Urea transport by nitrogen-regulated tonop-

- plast intrinsic proteins in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2003, 133(3): 1220-1228.
- [29] 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.
- [30] 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.