

文章编号:1001-1498(2016)04-0521-08

毛竹 TIPs 基因家族成员组织表达模式研究

孙化雨, 娄永峰, 李利超, 赵韩生, 高志民*

(国际竹藤中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102)

摘要: [目的] 通过研究毛竹 TIPs 的分子特征和表达模式, 为揭示逆境胁迫条件下 TIPs 在竹子中的作用提供证据, 为培育抗逆的植物新品种提供新的基因资源。 [方法] 以毛竹为对象, 利用生物信息学方法对毛竹基因组中的 TIPs 基因进行了全面分析, 采用实时荧光定量 PCR 技术分析基因在不同组织及干旱、水淹和 NaCl 胁迫下的表达模式。 [结果] 毛竹基因组中含有 6 个 TIPs 同源基因, 分别隶属于 3 个亚类 (TIP1、TIP2 和 TIP4)。基因结构预测显示, *PeTIP1;1*、*PeTIP1;2*、*PeTIP2;2* 和 *PeTIP4;2* 由 2 个外显子和 1 个内含子组成, 而 *PeTIP2;1* 和 *PeTIP4;1* 由 3 个外显子和 2 个内含子组成。蛋白结构分析显示, 毛竹 6 个 TIPs 均具有 2 个典型的 NPA 结构域和 4 个 ar/R 模体。通过转录组数据分析基因的组织表达特异性, 结果表明 *PeTIP1;1* 在各组织中的表达丰度均较高; *PeTIP1;2* 主要在花中表达; *PeTIP2;1* 在根和鞭中表达量较高; *PeTIP2;2* 在根中特异表达; *PeTIP4;1* 在叶片中表达丰度最高; *PeTIP4;2* 在笋和鞭中表达水平较高, 在根中最低。实时定量 PCR 结果分析证明, 干旱处理后毛竹根中 *PeTIP4;1* 的表达量显著升高 ($p < 0.01$), *PeTIP2;1*、*PeTIP2;2* 和 *PeTIP4;2* 表达受到抑制 ($p < 0.01$); 水淹处理后根中 *PeTIP1;1* 和 *PeTIP4;1* 表达量显著增加 ($p < 0.01$), *PeTIP1;2*、*PeTIP2;2* 和 *PeTIP4;2* 则显著降低 ($p < 0.01$); NaCl 处理后根中 6 个 *PeTIPs* 的表达量均显著增加 ($p < 0.01$)。干旱处理后毛竹叶片中 *PeTIP1;1*、*PeTIP1;2* 和 *PeTIP4;1* 表达量均显著增加 ($p < 0.01$); 水淹处理后叶片中 *PeTIPs* 表达量均显著提高 ($p < 0.01$); NaCl 处理后叶片中 *PeTIP2;1* 表达受到明显抑制 ($p < 0.01$)。 [结论] *PeTIPs* 可能在毛竹抵抗干旱、水淹和 NaCl 等非生物胁迫中发挥着不同程度的作用。

关键词: 毛竹; 液泡膜内在水通道蛋白; 表达分析

中图分类号: S795.7

文献标识码: A

Tissue Expression Pattern Analysis of TIPs Genes in *Phyllostachys edulis*

SUN Hua-yu, LOU Yong-feng, LI Li-chao, ZHAO Han-sheng, GAO Zhi-min

(International Center for Bamboo and Rattan, State Forestry Administration Key Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

Abstract: [Objective] To reveal the role of tonoplast intrinsic proteins (TIPs) in bamboo under stress conditions and provide new genetic resource for the breeding of new varieties. [Method] The molecular characteristics and expression profiles of TIPs in moso bamboo (*Phyllostachys edulis* (Carr.) H. de Lehaie) were conducted. The gene expression in different tissues and those under drought, water and NaCl abiotic stresses were analyzed with real-time quantitative PCR. [Result] The result indicated that there were six TIPs homologous genes belonged to three subgroups (TIP1, TIP2 and TIP4) in moso bamboo genome, among which four genes (*PeTIP1;1*, *PeTIP1;2*, *PeTIP2;2* and *PeTIP4;2*) consisted of two exons and one intron, and the other two genes (*PeTIP2;1* and *PeTIP4;1*) consisted of three exons and two introns, respectively. Protein structure analysis indicated that all the six *PeTIPs*

收稿日期: 2015-08-04

基金项目: 国家科技支撑计划课题“竹藤优异种质创制创新与种苗培育标准化示范”(2015BAD04B01)、国际竹藤中心基本科研业务费专项资金项目(1632015008)。

作者简介: 孙化雨, 男, 在读博士。主要研究方向: 竹子分子育种研究。电话: 010-84789840 E-mail: huayusun@126.com

* 通讯作者: 高志民, 研究员, 博士生导师。主要研究方向: 竹藤生长发育的分子基础研究。电话: 010-84789803 E-mail: gaozhimin@icbr.ac.cn

had two typical NPA domains and four conserved ar/R selectivity filter. Tissue specific analysis based on transcriptome demonstrated that *PeTIP1;1* expressed with high levels in all tissues, *PeTIP1;2* had the highest expression level in flower, *PeTIP2;1* was mainly expressed in root and rhizome, *PeTIP2;2* was specifically expressed in roots, *PeTIP4;1* had the highest expression level in leaf, and *PeTIP4;2* expressed in shoot and rhizome with high level, but the lowest in the roots. The result of qRT-PCR confirmed that in roots *PeTIP4;1* was up-regulated, while *PeTIP2;1*, *PeTIP2;2* and *PeTIP4;2* were inhibited significantly ($p < 0.01$) by drought treatment, the expression of *PeTIP1;1* and *PeTIP4;1* increased and those of *PeTIP1;2*, *PeTIP2;2*, and *PeTIP4;2* decreased significantly ($p < 0.01$) under water stress, the expression of six *PeTIPs* all raised significantly ($p < 0.01$) under NaCl treatment. Meanwhile, in leaves the expression of *PeTIP1;1*, *PeTIP1;2* and *PeTIP4;1* were up-regulated under drought treatment, all the expression levels of six *PeTIPs* were significantly increased under water stress ($p < 0.01$), while *PeTIP2;1* was suppressed significantly ($p < 0.01$) by NaCl treatment. [**Conclusion**] This result indicated that *PeTIPs* may play roles with varying degrees in bamboo tolerance of drought, water, NaCl and other abiotic stresses.

Keywords: *Phyllostachys edulis*; tonoplast intrinsic proteins; expression analysis

干旱、水淹和盐胁迫是影响植物生长、限制作物产量的主要因素。快速调节细胞渗透压和维持水分平衡是植物应对非生物胁迫的重要方式。维护细胞内渗透势平衡对保持细胞内稳态至关重要,这个过程需要大量的水通道蛋白(Aquaporins, AQPs)调节完成^[1-2]。AQPs是微生物、植物和动物细胞中普遍存在的具有高度保守性的整合膜蛋白。AQPs具有调节细胞内水分快速流动的功能,细胞内约70%~90%的水分流动通过AQPs完成^[3]。非生物胁迫下,植物会通过控制细胞膨压来维持体内渗透平衡和离子平衡,降低外界因素带来的伤害^[4-5]。控制细胞内水分流动和维持渗透压平衡主要依靠嵌于细胞质膜和液泡膜的AQPs完成^[2]。液泡膜内在水通道蛋白(TIPs)是AQPs一个亚家族,具有高效透水性,透水效率是质膜水通道蛋白的100倍以上^[6]。TIPs不仅能转运水分,而且还具有传输H₂O₂、甘油、尿素和NH₃等底物的能力^[7]。研究表明,TIPs控制水分进出液泡膜使细胞迅速膨胀或紧缩,适应复杂多变的外界环境,维持细胞内稳态^[7],在植物正常生理活动和响应非生物胁迫方面均发挥着重要的作用^[8-10]。

竹子属于禾本科(Poaceae)竹亚科(Bambusoideae)植物,具有生长快、产量高、竹材强度大、纤维性能好等特性,在人类经济生活和生活环境中发挥着重要的作用^[11]。细胞分裂和细胞伸长共同促使竹子节间伸长^[12],细胞的分裂和伸长需要细胞膨压提供动力^[13]。一些竹子植株高大,需要强大的根压和蒸腾拉力把水和营养物质运输到各个组织器官。竹子茎秆缺乏次生生长,必须多年使用同一套导管

系统进行水分的运输,因此,依赖于根压的木质部栓塞再修复对竹子生长发育意义重大^[14]。无论是水分的运输还是渗透压的调节都离不开AQPs。而作为AQPs中转运水分效率最高的TIPs,势必在竹子生长发育过程中发挥着重要作用。因此,本研究以重要经济竹种毛竹(*Phyllostachys edulis* (Carr.) H. de Lehaie)为研究材料,通过与禾本科植物水稻(*Oryza sativa* L.)和玉米(*Zea mays* L.)的TIPs比对分析,在毛竹基因组中获得6条TIPs同源序列,在对其基因结构和保守结构域等进行预测分析的基础上,通过基因表达谱(RNA-seq)分析了TIPs基因在不同组织器官中的表达情况,并利用实时定量PCR方法检测了其在干旱、水淹和NaCl胁迫下的表达模式,以期揭示TIPs在竹类植物生长发育与胁迫响应过程中的功能及其作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 毛竹 TIPs 基因序列的获取与分析

以单子叶植物水稻(*Oryza sativa* Linn.)和玉米(*Zea mays* Linn.)的TIPs基因序列为诱饵^[15-16],在毛竹基因组数据库BambooGDB(<http://www.bamboogdb.org/>)^[17]中比对查找,获得TIPs直系同源序列。采用生物信息学方法对获得的基因序列及其编码氨基酸进行分析,用ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白的基本理化性质,用Gene Structure Display Server(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)预测基因结构,用ClustalW2比对并分析NPA结构域和ar/R模体等保守结构域,用Plant-mPLoc(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/>)预测亚细

胞位置,用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测跨膜结构域,并用 MEGA 5.0 软件邻接法 (Neighbor-Joining) 构建基于 TIPs 同源蛋白的系统发育进化树。

1.2 毛竹 TIPs 基因表达组织特异性分析

从 NCBI 的 Short Read Archive (SRA) 数据库中下载毛竹 7 个不同组织 (叶、鞭、根、20 cm 和 50 cm 高的笋、早花期和晚花期花序) 的转录组数据 (登录号: SRX082501、SRX082502、SRX082503、SRX082504、SRX082505、SRX082506、SRX082507、SRX082508、SRX082509、SRX082510、SRX082511 和 SRX082512), 利用 PeTIPs 基因的表达值 RPKM (Reads per kilobase of exon model per million mapped reads) 表示基因的表达丰度。为方便统计,对每个表达数值取以 2 为底数的对数 (Log_2), 使用 Matrix2png 绘制基因表达热图。

1.3 毛竹材料处理

以本实验室培养的一年生毛竹盆栽实生苗为材料,培养条件:温度 28°C ,光照 $150 \text{ mol} \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光周期光明/黑暗 = 16 h/8 h,相对湿度 50%。从基质中取出竹苗,冲洗干净,进行处理。干旱处理:直接将竹苗于实验室条件下放置;水淹处理:将竹苗根系置于去离子水中;NaCl 处理:将竹苗置于浓度为 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液中。2 h 后分别剪取根和叶片,同时以未处理的竹苗作为对照采样。每个样本 3 个随机重复,迅速置于液氮中冻存, -80°C 存放,用于 RNA 的提取。

1.4 实时定量 PCR 分析

利用 TRIzol 方法 (Invitrogen, USA) 分别提取处理后毛竹根和叶的 RNA^[18], 使用反转录试剂盒 (Promage, USA) 合成 cDNA 第一链。使用 Primer 5.0 在毛竹 TIPs 基因核苷酸序列的非保守区设计定量引物 (表 1), 并由上海生工技术有限公司合成。

qPCR 反应体系为 $10 \mu\text{L}$: LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master Mix (Roche, USA) $5.0 \mu\text{L}$, 正、反向引物各 $0.2 \mu\text{L}$, cDNA $0.8 \mu\text{L}$, ddH₂O 3.8

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'→3')
<i>PeTIP1;1</i>	F: TAGCTAGCTACCCGGCAGAGTCT R: TGGCCTGCGAAGACGAAGAT
<i>PeTIP1;2</i>	F: TCGATCCATCCATTACTCTCTCT R: CATCGCAACAAACACAGATGACA
<i>PeTIP2;1</i>	F: ATGGCGATTGGCTTCATCGT R: TCACTGGCCCGACCCAGTAC
<i>PeTIP2;2</i>	F: GGTCCATGAACCCAGCAAGGT R: CATGAAGACGTCCCCGTAGACT
<i>PeTIP4;1</i>	F: GTCTTCTAGTAATGAGCACCACACAT R: GAAACAGCTCTGCAGGCCT
<i>PeTIP4;2</i>	F: TGACGACAGATCAGCGACACTG R: AAGAGGAAGGTGACGACGAGCT
<i>PeNTB</i>	F: TCTTGTTTGACACCGAAGAGGAG R: AATAGCTGTCCCTGGAGGAGTTT

μL 。选取毛竹 NTB 作为内参基因^[19]。PCR 反应在 qTOWER2.2 (Analytik Jena, Germany) 荧光定量 PCR 仪上进行,反应程序: 95°C 5 min; 95°C 10 s, 62°C 10 s, 50 个循环。每个反应重复 3 次,反应结束后,分析 Ct 值和溶解曲线,使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法^[20] 分析 3 次生物学实验的基因表达情况。

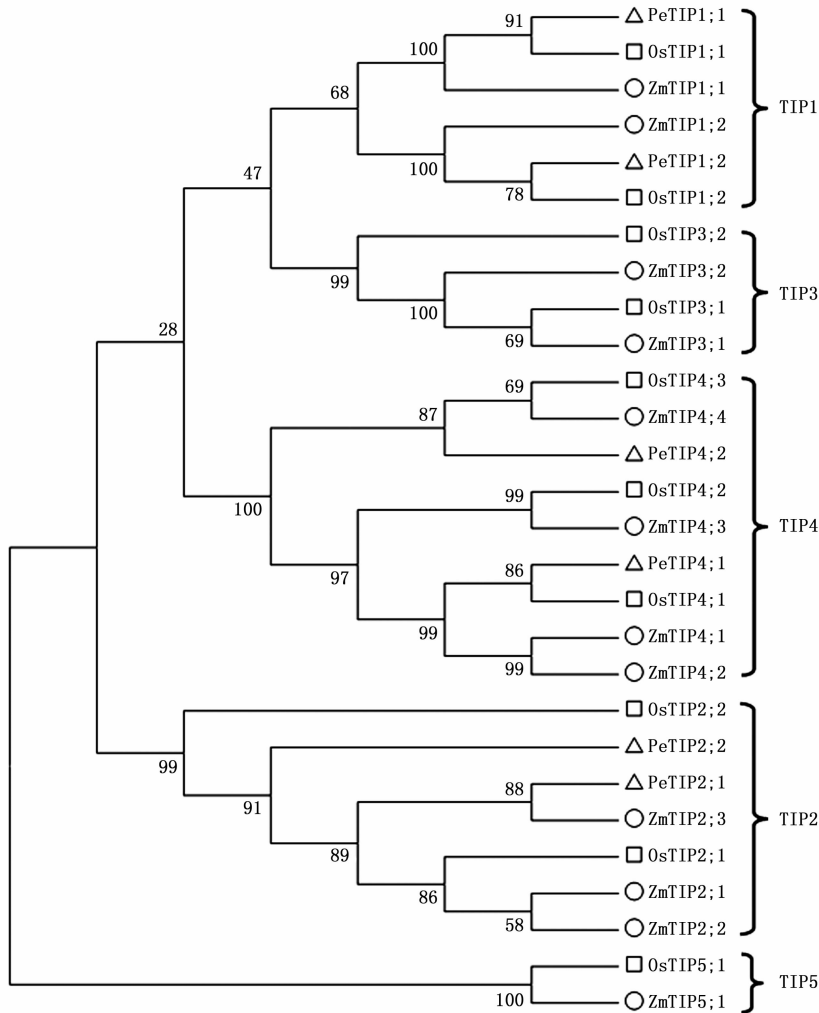
2 结果与分析

2.1 基因序列分析

通过序列比对分析,从毛竹基因组数据中找到 6 个 TIPs 亚家族成员基因 (表 2), 分别是 PH01000157G0460、PH01001117G0550、PH01000023G0610、PH01001207G0140、PH01000003G3730 和 PH01001821G0300, 所编码的蛋白长度在 248 ~ 272 aa 之间,分子量在 25.107 2 ~ 27.312 5 kDa 之间,理论等电点为 5.61 ~ 6.74,均为酸性蛋白。构建基于毛竹、水稻、玉米 TIPs 序列的系统发育树,结果显示 TIPs 分别聚到五个亚类 (TIP1、TIP2、TIP3、TIP4 和 TIP5), 而毛竹的 6 个 TIPs 仅聚类在 TIP1、TIP2 和 TIP4 三个亚类上,每个亚类有 2 个基因,在毛竹中未找到 TIP3 和 TIP5 的直系同源基因 (图 1)。根据聚类结果,将毛竹 6 个 TIPs 亚家族成员基因分别命名为 *PeTIP1;1*、*PeTIP1;2*、*PeTIP2;1*、*PeTIP2;2*、*PeTIP4;1* 和 *PeTIP4;2*。

表 2 *PeTIPs* 编码蛋白的基本信息

基因名称	基因登录号	亚细胞位置	多肽长度/aa	分子量/Da	理论等电点	跨膜结构数量/个
<i>PeTIP1;1</i>	PH01000157G0460	液泡	250	25 807.8	6.01	6
<i>PeTIP1;2</i>	PH01001117G0550	液泡	252	25 413.5	5.61	6
<i>PeTIP2;1</i>	PH01000023G0610	液泡	248	25 107.2	5.87	6
<i>PeTIP2;2</i>	PH01001207G0140	液泡	272	27 312.5	6.39	7
<i>PeTIP4;1</i>	PH01000003G3730	液泡	252	25 386.8	6.42	6
<i>PeTIP4;2</i>	PH01001821G0300	液泡	250	25 315.7	6.74	6



通过 ClustalW2 软件对毛竹,水竹,水稻和玉米的 TIPs 蛋白序列进行比对,用 MEGA 5.0 软件邻接法(Neighbor-Joining)构建基于 TIPs 蛋白序列的系统发育进化树,并进行亚类划分。图的最右侧是对应水稻和玉米 TIPs 的亚类。

图1 水稻、玉米和毛竹的 TIPs 系统树分析

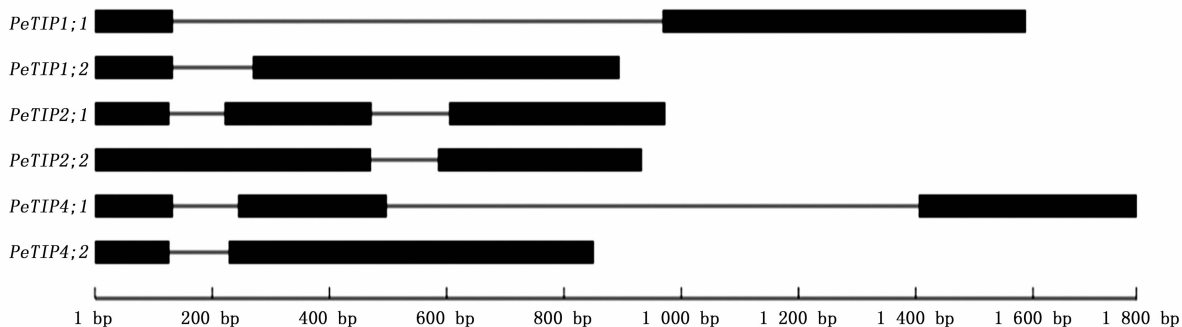
利用毛竹转录组数据和全长 cDNA 数据^[21]与对应的基因组序列进行比对,预测到 *PeTIPs* 的基因结构,进一步分析发现,毛竹 *PeTIPs* 亚家族各成员的外显子-内含子结构相对保守,区别主要是在内含子的大小和插入位置上(图2),其中 *PeTIP1;1*, *PeTIP1;2*, *PeTIP2;2* 和 *PeTIP4;2* 由2个外显子1个内含子组成, *PeTIP2;1* 和 *PeTIP4;1* 由3个外显子2个内含子组成,内含子完全符合 GT-AG 剪接原则^[22]。

2.2 蛋白结构分析

根据氨基酸序列具有的信号肽对 *PeTIPs* 亚细胞位置进行预测^[23],结果显示毛竹 *PeTIPs* 均位于液泡膜,表明 *PeTIPs* 可能在液泡膜上控制水分或小分子物质的透过膜系统,间接证明了6个 *PeTIPs* 基因

的可靠性。跨膜结构域预测结果显示,除 *PeTIP2;2* 有7个跨膜结构域外,其它成员均有6个跨膜结构域(TM1-TM6),由三个位于膜外两个位于膜内的环连接而成,依次为(Loop A~Loop E)(表2)。

AQPs 的孔道由位于 Loop B 和 Loop E 处的2个高度保守的 NPA(Asn-Pro-Ala)结构域反向折叠而成,NPA 结构域控制水分子通过^[24]。序列分析结果显示,*PeTIPs* 均具有2个典型的 NPA 结构域(表3),分别位于 Loop B 和 Loop E 处,表明 *PeTIPs* 具有转运水通过膜系统的能力。此外,AQPs 还具有4个保守的芳香族化合物/精氨酸(ar/R)模体,前2个位于 TM2 和 TM5 处,后2个位于 Loop E 处,ar/R 模体对底物的选择透过性通过生物膜起着至关重要的作用,模体的组合形式决定着底物的类型^[25]。通过与



横轴数字代表核苷酸位置;黑色方框表示外显子;灰色线条表示内含子

图2 毛竹 TIPs 基因组 DNA 结构示意图

标准序列 AQP1 (F56-H180-C189-R195) 比对, 预测得到毛竹 TIPs 的 ar/R 模体结构^[26], 结果显示, PeTIPs 的 ar/R 模体存在多样性, 包括 H/L/A/V (PeTIP1)、H/L/G/R (PeTIP2)、Q/T/A/R (PeTIP4;1) 和 H/L/A/R (PeTIP4;2) 四种不同的组合(表3)。在 TM2 和 TM5 处的氨基酸除 PeTIP4;1 为 Q 和 T 以外, 均为 H 和 I, 其中 PeTIP1 和 PeTIP2 的 ar/R 模体组合保持组内一致, PeTIP4 在 Loop E 处的模体结构也具有组内一致性。

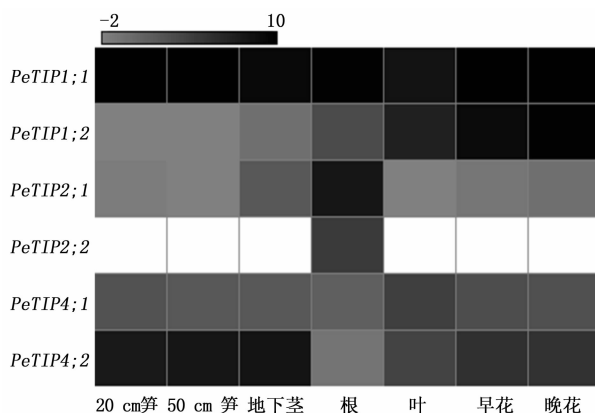
表3 PeTIPs 蛋白的 NPA 结构域和 ar/R 模体

基因名称	NPA 结构域		ar/R 模体			
	Loop B	Loop E	TM2	TM5	Loop E1	Loop E2
<i>PeTIP1;1</i>	NPA	NPA	H	I	A	V
<i>PeTIP1;2</i>	NPA	NPA	H	I	A	V
<i>PeTIP2;1</i>	NPA	NPA	H	I	G	R
<i>PeTIP2;2</i>	NPA	NPA	H	I	G	R
<i>PeTIP4;1</i>	NPA	NPA	Q	T	A	R
<i>PeTIP4;2</i>	NPA	NPA	H	I	A	R

2.3 基因组织特异性分析

利用毛竹不同组织的 RNA-Seq 表达谱数据, 对 *PeTIPs* 基因的组织表达模式进行分析。结果表明, 除 *PeTIP2;2* 仅在根中表达以外, 其它 *PeTIPs* 在叶、鞭、根、20 cm 和 50 cm 高的笋、早花期和晚花期花序 7 个组织中均有表达, 但表达丰度存在明显差异。其中, *PeTIP1;1* 在 7 个组织中的表达丰度均较高; *PeTIP1;2* 主要在叶和花中的表达, 在花中表达值最高, 且晚花期高于早花期, 表明其随花的发育 *PeTIP1;2* 表达水平提高; *PeTIP2;1* 在根中表达量最高, 在鞭中的表达次之; *PeTIP4;1* 在叶中表达量最高, 在根中最低; *PeTIP4;2* 主要在鞭和笋中表达, 在根中的表达量最低, 50 cm 高的笋中表达量高于 20 cm 高的笋(图3)。*PeTIPs* 在不同组织中的表达差异意味着其在不同组织及发育不同阶段可能具有不

同的功能, 其具体的表达模式尚需进一步用实验来证实。



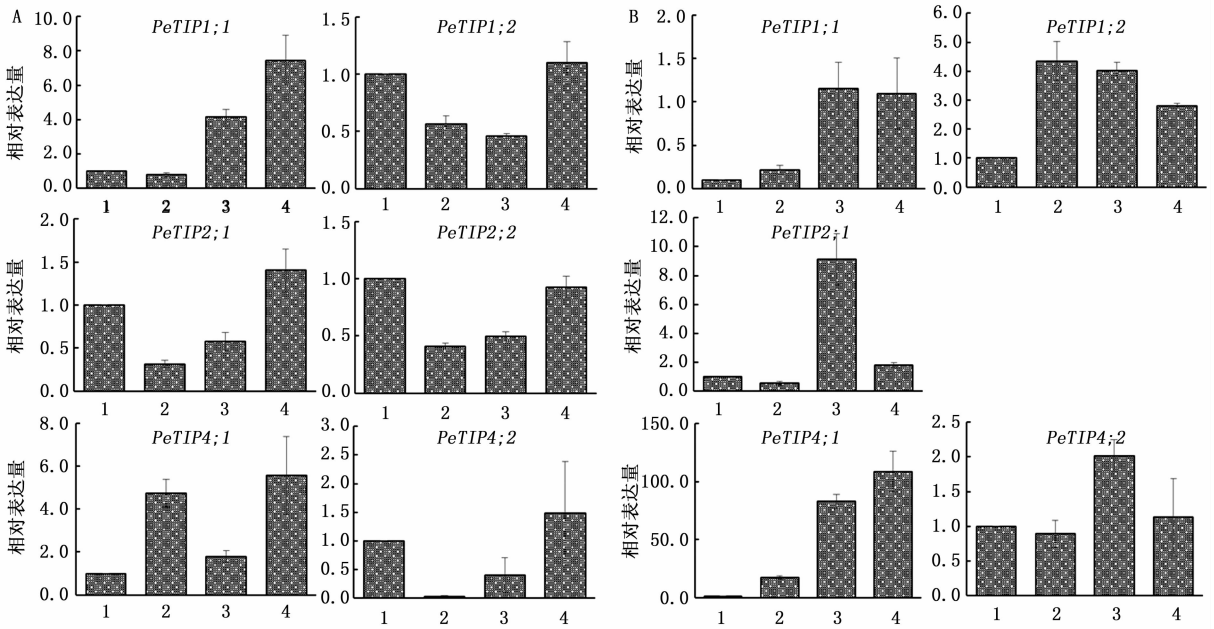
基因表达丰都用 RPKM 值取以 2 为底数的对数(Log2)表示, 从左到右分别是 20 cm 笋, 50 cm 笋, 地下茎, 根, 叶, 早花和晚花。丰度值由不同的灰度表示: 最小值 -2, 最大值 10。

图3 毛竹 TIPs 基因在 7 个组织中的表达分析

2.4 干旱、水淹和 NaCl 胁迫下基因表达模式分析

TIPs 不仅具有运输和储存水分的能力, 而且可以运输与细胞水势有关的物质来控制细胞渗透压, 在响应干旱、水淹和盐等非生物胁迫方面发挥重要作用^[27]。为揭示 *PeTIPs* 在非生物胁迫下的响应机制, 利用 qRT-PCR 方法检测其在干旱、水淹和 NaCl 胁迫下的表达模式。

结果显示, 干旱处理后毛竹根中 *PeTIP1;1* 和 *PeTIP1;2* 表达量有所下降, 但变化差异不显著, 其它 4 个基因均有明显变化 (>2 或 $<1/2$), 且存在显著差异, 其中 *PeTIP4;1* 的表达量显著升高 ($p < 0.01$), 是处理前的 4.7 倍, *PeTIP2;1*、*PeTIP2;2* 和 *PeTIP4;2* 表达受到抑制 ($p < 0.01$), *PeTIP4;2* 受抑制程度最为严重, 仅为处理前的 1/30; 水淹处理后, 根中 *PeTIP1;1* 和 *PeTIP4;1* 表达量显著增加 ($p <$



柱形图表示从荧光定量 RT-PCR 中得到的转录丰度(相对表达量);A 和 B 分别表示 *PeTIPs* 基因在根和叶片中的表达丰度。1~4 分别为对照、干旱、水淹和 NaCl 处理。

图4 胁迫条件下 *PeTIPs* 基因在毛竹根和叶片中的表达分析

0.01), 其中 *PeTIP1;1* 增加最多, 是处理前的 4 倍以上, *PeTIP1;2*、*PeTIP2;2* 和 *PeTIP4;2* 在水淹处理后显著降低 ($p < 0.01$), *PeTIP2;1* 也有所降低但差异不显著; NaCl 处理后, 根中 6 个 *PeTIPs* 的表达量均显著增加 ($p < 0.01$) (图 4 - A)。

干旱处理后, 毛竹叶片中 *PeTIP1;1*、*PeTIP1;2* 和 *PeTIP4;1* 表达量显著增加 ($p < 0.01$), 其中 *PeTIP4;1* 上升幅度最大, 约为对照的 17 倍; 水淹处理后, 叶片中 *PeTIPs* 表达量均显著提高 ($p < 0.01$), 其中 *PeTIP4;1* 变化最为明显, 约为对照的 82 倍, *PeTIP1;1* 和 *PeTIP2;1* 分别约是对照的 11 倍和 9 倍; NaCl 处理后, 叶片中 *PeTIP2;1* 表达受到明显抑制 ($p < 0.01$), 仅为对照的 1/5, 其他 *PeTIPs* 表达量也受到影响, 但变化不显著 (图 4 - B), *PeTIP2;2* 在叶片中未检测到表达。

3 讨论

随着测序技术的发展, 越来越多植物的基因组和转录组数据被公布, 为研究 *TIPs* 基因家族成员在植物中的作用奠定了基础。目前在多个单子叶禾本科植物中已有相关报道, 如玉米、水稻、小麦和大麦等^[15-16, 28-29], 而竹亚科植物中还未见报道, 因此利用毛竹基因组和转录组数据进行 *TIPs* 基因识别以及表达模式分析对揭示其在竹子生长发育中的作用

具有重要意义。研究表明, *TIPs* 亚家族分为 5 个亚类, 依次为 *TIP1*、*TIP2*、*TIP3*、*TIP4* 和 *TIP5*^[7], 毛竹中找的 6 个 *TIPs* 基因成员属于其中的 3 个亚类, 无论在亚类数量还是在整体数量上都少于其他禾本科植物^[15-16, 28-29], 究其原因, 一方面由于现有毛竹基因组数据是覆盖 95% 基因组的草图^[30], 尚不完整; 另一方面可能是由于毛竹繁殖主要是依靠无性生殖, 长期处于营养生长阶段, 导致减数分裂的缺少, 降低了基因拷贝数改变的概率。根据聚类结果可以看出毛竹各 *TIPs* 成员和水稻的聚在一起 (图 1), 进一步验证了毛竹与水稻亲缘关系较近, 与玉米相对较远^[30]。

蛋白结构决定其功能。AQP 两个 NPA 结构域经过反向折叠形成孔道控制水分子通过, 单一位点的变异会影响到通道的透水效率甚至细胞内稳态, *PeTIPs* 具有典型的 NPA 结构域, 反映了毛竹 *PeTIPs* 具有转运水分、维持水分平衡的能力^[24]。ar/R 模体的组合形式决定着底物的类型, 在 *PeTIPs* 中 ar/R 模体以 4 种形式存在, 表明毛竹 *PeTIPs* 具有转运多种底物的潜力^[25], 4 种组合形式与拟南芥以及一些禾本科植物相一致^[7, 16, 28-29], ar/R 模体的组合形式在组内具有保守性 (表 2), 进一步证明了聚类结果及其命名的可靠性。嵌于生物膜上的 AQP 通常是一个由 4 个亚基组成的四聚体, 每个亚基是一个单肽

链,大小一般在 23 ~ 31 kD 左右,通常含有 6 个跨膜区(TM1 ~ TM6),由 3 个位于膜外 2 个位于膜内的环连接而成,依次为(Loop A - Loop E)^[31]。跨膜结构域预测结果显示 PH01001207G0140 编码的氨基酸序列有 7 个跨膜结构域(表 2),但是其具有典型的 NPA 结构域和保守的 ar/R 模体(表 3),此外,在番茄和大豆中也发现部分 TIPs 存在 7 个跨膜结构域的情况^[26,32],因此,认为 PH01001207G0140 是毛竹 TIPs 中的一员。尽管如此,依靠生物信息学的预测往往会出现一些错误,需要后续的实验进行验证^[33]。

基因的表达是其发挥生物学功能的具体表现形式之一。本研究中 *PeTIP1;1* 在各组织中均高度表达,与拟南芥和大麦中的研究结果相一致^[29,34],水分胁迫和高盐胁迫下 *PeTIP1;1* 在根部的表达量升高(图 4 - A),叶片中的表达量在干旱和水分胁迫下也有所提高(图 4 - B),表明 *PeTIP1;1* 在胁迫环境下发挥着重要的作用^[7,35]。*PeTIP1;2* 在花中表达丰度最高,晚花期高于早花期,表明该基因随着花的发育表达水平提高,这与拟南芥中 *TIP1;3* 在花中表达类似^[35],推测 *PeTIP1;2* 可能参与花的形态建成。*PeTIP2;2* 在根中特异表达,*PeTIP2;1* 在根表达丰度最高,高盐胁迫下 *PeTIP2;1* 和 *PeTIP2;2* 在根中的表达量均增高,表明 *PeTIP2;1* 和 *PeTIP2;2* 可能通过参与透过 Na⁺ 进入液泡膜,增强液泡的渗透势抵抗高盐胁迫^[9]。已有研究表明,过量表达 *TsTIP2;1* 和 *SITIP2;1* 基因能增强植株的抗旱水平^[8-9],然而干旱胁迫下,*PeTIP2;1* 和 *PeTIP2;2* 的表达量均明显降低,可能是干旱处理的方法导致,干旱情况下过量表达 *TsTIP2;1* 和 *SITIP2;1* 的转基因植株需要从土壤中吸收水分供生长发育所需,而毛竹干旱处理采取风干方法,无法从外界吸收水分,因此干旱胁迫下 *PeTIP2;1* 可能在防止自身水分的散失方面起作用。干旱胁迫下 *PeTIP4;1* 在根和叶片中的表达量显著增加,而且是 *PeTIPs* 中唯一在根中表达量增加的基因(图 4 - A),说明其表达水平受干旱的调控,可能参与干旱响应调控。*PeTIP4;2* 主要在鞭和笋中表达,鞭和笋在形态学上都属于茎,其表达量随笋的发育而增加,说明其随着笋的发育表达水平也相应提高,可能参与维管组织的形成。本研究根据 *PeTIPs* 基因表达做出的推测,虽然得到一些其他物种中同源基因功能研究证据的支持,但 *PeTIPs* 在毛竹中的具体功能尚需要进一步通过实验来证实。

4 结论

本研究通过对毛竹 *TIPs* 基因家族的结构特点和组织表达特异性的分析,在毛竹基因组中找到 6 个 *TIPs* 同源基因,隶属于 3 个亚类,且均含有水通道蛋白典型的结构域;对 *TIPs* 基因家族成员在根、茎、叶片和鞘四个组织中的表达量进行分析,发现除 *PeTIP2;2* 在根中特异表达外,其它均呈组成型表达。干旱胁迫下,根中 *PeTIP4;1* 和叶片中 *PeTIP1;1*、*PeTIP1;2* 和 *PeTIP4;1* 表达量显著增加,水淹胁迫下,根中 *PeTIP1;1* 和 *PeTIP4;1* 和叶片中所有的 *PeTIPs* 表达量均增加,NaCl 胁迫下,根中 6 个 *PeTIPs* 的表达量均显著增加,表明 *PeTIPs* 在干旱、水淹和 NaCl 等非生物胁迫中发挥着重要作用。本研究为揭示 *PeTIPs* 在竹子生长发育过程中的作用提供了重要参考。

参考文献:

- [1] Mueller N D, Gerber J S, Johnston M, et al. Closing yield gaps through nutrient and water management [J]. *Nature*, 2012, 490 (7419): 254 - 257.
- [2] Kaldenhoff R, Fischer M. Functional aquaporin diversity in plants [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1758 (8): 1134 - 1141.
- [3] Henzler T, Steudle E. Reversible closing of water channels in Chara internodes provides evidence for a composite transport model of the plasma membrane [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1995, 46 (2): 199 - 209.
- [4] Chen S, Polle A. Salinity tolerance of Populus [J]. *Plant Biology*, 2010, 12(2): 317 - 333.
- [5] Ruiz-Lozano J M, Porcel R, Azcón C, et al. Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(11): 4033 - 4044.
- [6] Maurel C, Tacnet F, Guclu J, et al. Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(13): 7103 - 7108.
- [7] Regon P, Panda P, Kshetrimayum E, et al. Genome-wide comparative analysis of tonoplast intrinsic protein (TIP) genes in plants [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2014, 14(4): 617 - 629.
- [8] Sade N, Vinocur B J, Diber A, et al. Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? [J]. *New Phytologist*, 2009, 181(3): 651 - 661.
- [9] Wang L L, Chen A P, Zhong N Q, et al. The *Thellungiella salsuginea* tonoplast aquaporin TsTIP1;2 functions in protection against

- multiple abiotic stresses[J]. *Plant Cell Physiology*, 2014, 55(1): 148–161.
- [10] Peng Y, Lin W, Cai W, *et al.* Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. *Planta*, 2007, 226(3):729–740.
- [11] 江泽慧. 世界竹藤[M]. 辽宁科学技术出版社, 2002, 3–10.
- [12] Cui K, He C, Zhang J. Temporal and spatial profiling of internode elongation-associated protein expression in rapidly growing culms of bamboo[J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(4):2492–2507.
- [13] Hepler P K. Calcium: A central regulator of plant growth and development[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(8):2142–2155.
- [14] Cao K F, Yang S J, Zhang Y J, *et al.* The maximum height of grasses is determined by roots[J]. *Ecology Letters*, 2012, 15(7): 666–672.
- [15] Nguyen M X, Moon S, Jung K H. Genome-wide expression analysis of rice aquaporin genes and development of a functional gene network mediated by aquaporin expression in roots[J]. *Planta*, 2013, 238(4):669–681.
- [16] Yue X, Zhao X, Fei Y, *et al.* Correlation of aquaporins and transmembrane solute transporters revealed by genome-wide analysis in developing maize leaf[J]. *Comparative and Functional Genomics*, 2012, 2012:546930.
- [17] Zhao H, Peng Z, Fei B, *et al.* BambooGDB: a bamboo genome database with functional annotation and an analysis platform[J]. *Database*, 2014, 2014:bau006.
- [18] Gao Z M, Li X P, Li L B, *et al.* An effective method for total RNA isolation from bamboo[J]. *Chinese Forestry Science and Technology*, 2006, 5(3):52–54.
- [19] Fan C, Ma J, Guo Q, *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e56573.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402–408.
- [21] Peng Z, Lu T, Li L, *et al.* Genome-wide characterization of the biggest grass, bamboo, based on 10,608 putative full-length cDNA sequences[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10:116.
- [22] Moore M J, Query C C, Sharp P A. Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome[M]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor laboratory Press, 1993, 303–357.
- [23] Chou K C, Shen H B. Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization [J]. *PLoS One*, 2010, 5:e11335.
- [24] Wree D, Wu B, Zeuthen T, *et al.* Requirement for asparagine in the aquaporin NPA sequence signature motifs for cation exclusion [J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(5):740–748.
- [25] Mitani-Ueno N, Yamaji N, Zhao F J, *et al.* The aromatic/arginine selectivity filter of NIP aquaporins plays a critical role in substrate selectivity for silicon, boron, and arsenic[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(12):4391–4398.
- [26] Reuscher S, Akiyama M, Mori C, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of aquaporins in tomato [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e79052.
- [27] Utsugi S, Shibasaki M, Maekawa M, *et al.* Control of the water transport activity of barley HvTIP3;1 specifically expressed in seeds [J]. *Plant Cell Physiology*, 2015, pii:pcv104.
- [28] Forrest K L, Bhavé M. The PIP and TIP aquaporins in wheat form a large and diverse family with unique gene structures and functionally important features [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2008, 8(2):115–133.
- [29] Hove R M, Ziemann M, Bhavé M. Identification and expression analysis of the barley (*Hordeum vulgare* L.) aquaporin gene family [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):e0128025.
- [30] Peng Z H, Lu Y, Li L B, *et al.* The draft genome of the fast growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(4):456–461.
- [31] Verma R K, Prabh N D, Sankaramakrishnan R. Intra-helical salt-bridge and helix destabilizing residues within the same helical turn: Role of functionally important loop E half-helix in channel regulation of major intrinsic proteins [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1848(6):1436–1449.
- [32] Zhang D Y, Ali Z, Wang C B, *et al.* Genome-wide sequence characterization and expression analysis of major intrinsic proteins in soybean (*Glycine max* L.) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e56312.
- [33] Katsuhara M, Hanba Y T, Shiratake K, *et al.* Expanding roles of plant aquaporins in plasma membranes and cell organelles [J]. *Functional Plant Biology*, 2008, 35(1):1–14.
- [34] Schmid M, Davison T S, Henz S R, *et al.* A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development [J]. *Nature Genetics*, 2005, 37(5):501–506.
- [35] Beebo A, Thomas D, Der C, *et al.* Life with and without AtTIP1; 1, an *Arabidopsis* aquaporin preferentially localized in the apposing tonoplasts of adjacent vacuoles [J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 70(1–2):193–209.

(责任编辑:张 研)