

# 茶树 *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8* 基因的 克隆及其对干旱胁迫的响应

段梦莎, 刘祥宏, 万思卿, 张永恒, 贺镜元, 刘 焕, 余有本

(西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 为了探究茶树水分胁迫中水通道蛋白的作用, 以福鼎大白茶树 (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze 'Fuding Dabai') 为材料, 克隆获得了 2 个水通道蛋白基因 (*AQPs*, *aquaporins*), 并分析了其在模拟干旱、外源施加 ABA 以及干旱和复水下的表达模式。氨基酸序列分析表明, 2 个水通道蛋白均含有 MIP 蛋白家族保守的信号序列 SGGHINPAVT 和 2 个高度保守的 NPA (Asn-Pro-Ala) 单元, 均含有 6 个跨膜区。基于同源比对结果和细胞定位预测, 将其归为质膜水通道蛋白 (PIPs, plasma membrane intrinsic proteins) 亚家族。实时荧光定量 PCR 的结果表明, 2 个 *CsPIPs* 的基因表达具有一定组织特异性, *CsPIP2; 7* 在叶中表达量最高, *CsPIP2; 8* 在花和叶中表达量较高。20% PEG 模拟干旱胁迫处理后, *CsPIP2; 7* 转录水平显著下调, *CsPIP2; 8* 波动变化, 24 h 后轻微上调。外源施加 ABA 后, *CsPIP2; 7* 显著下调, 而 *CsPIP2; 8* 显著上调。此外, 盆栽自然干旱及复水试验表明, 2 个水通道蛋白基因均在根部受到干旱胁迫的诱导上调表达, 停灌 24 d 时转录水平达到最大值, *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8* 分别上调了 7.13 倍和 3.68 倍; 停灌 29 d 时 2 个基因转录水平又下调, 复水后下调或保持稳定。叶部表达模式与之不同, *CsPIP2; 7* 在缓慢干旱的过程中缓慢下调, 复水后又显著上调; *CsPIP2; 8* 波动变化, 与 PEG 处理时的表达模式相同, 复水后下调。

**关键词:** 茶树; 水分胁迫; 水通道蛋白; 基因克隆; 表达分析; 干旱复水

## Cloning of *CsPIP2; 7* and *CsPIP2; 8* Genes in Tea Plant and Its Response to Drought Stress

DUAN Meng-sha, LIU Xiang-hong, WAN Si-qing, ZHANG Yong-heng,

HE Jing-yuan, LIU Huan, YU You-ben

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Shaanxi Yangling 712100)

**Abstract:** In order to investigate the effect of aquaporin in tea plant under water stress, two aquaporin genes (*AQPs*, *aquaporins*) were cloned from *Camellia sinensis* (L.) Kuntze 'Fuding Dabai', and their expression patterns under simulated drought, exogenous application of ABA, natural drought and rehydration were analyzed. Amino acid sequence analysis showed that both aquaporins contained SGGHINPAVT, a conserved signal sequence of MIP protein family, and two highly conserved NPA (Asn-Pro-Ala) units, both of which contained six transmembrane regions. Based on the results of homologous alignment and the prediction of cell localization, they were assigned to the plasma membrane aquaporin (PIPs, plasma membrane intrinsic proteins) subfamily. The results of real-time fluorescence quantitative PCR showed that the gene expression of the two *CsPIPs* was tissue-specific, the expression level of *CsPIP2; 7* was the highest in leaves, and *CsPIP2; 8* was higher in flowers

收稿日期: 2019-12-02 修回日期: 2019-12-23 网络出版日期: 2020-01-17

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191202002>

第一作者研究方向为茶叶生物技术与遗传育种, E-mail: duaneve@qq.com

通信作者: 余有本, 研究方向为茶叶生物技术与遗传育种, E-mail: yyben@163.com

**基金项目:** 国家现代农业产业技术体系 (CARS-19); 陕西省农业专项资金项目 (SXNY2018-26); 西北农林科技大学农业科技推广专项基金 (TGZX2019-04)

**Foundation projects:** Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-19), Agricultural Special Fund Project of Shaanxi Province (SXNY2018-26), Special Fund for University-Supported Extension Model (TGZX2019-04)

and leaves. After 20% PEG simulated drought stress, *CsPIP2; 7* was significantly down-regulated, *CsPIP2; 8* fluctuated, and was slightly up-regulated 24 hours later. After exogenous application of ABA, *CsPIP2; 7* was significantly down-regulated, while *CsPIP2; 8* was significantly up-regulated. In addition, experiments of natural drought and rehydration showed that the expression of the two aquaporin genes was up-regulated by drought stress and reached the maximum 24 days after irrigation stopped, *CsPIP2; 7* and *CsPIP2; 8* were up-regulated by 7.13 times and 3.68 times respectively, and the two genes were down-regulated 29 days after irrigation stopped, and were down-regulated or remained stable after rehydration. Different from the expression pattern of leaves, *CsPIP2; 7* decreased slowly in the process of slow drought and was up-regulated significantly after rehydration, and *CsPIP2; 8* fluctuated as with PEG treatment, but was down-regulated after rehydration.

**Key words:** tea plant; water stress; aquaporin; gene cloning; expression analysis; drought and rehydration

水分胁迫是指土壤缺水而明显抑制植物生长的现象。淹水、冰、高温或盐渍等也能通过渗透胁迫和离子胁迫等引发水分胁迫。干旱缺水引起的水分胁迫是最直接和最常见的,也是对植物产量影响最大的。植物在长期的进化中,为了保持水分含量,已经形成了多种防御机制,包括提高根系的吸水能力和控制气孔孔径以减少水分流失等<sup>[1-4]</sup>。

水通道蛋白(AQPs, aquaporins)是一类跨膜通道嵌入蛋白,又称为主嵌入蛋白(MIPs, major intrinsic proteins),是广泛存在于植物体内各种生物膜上的一类特异的高效转运水及其他小分子底物的膜整合蛋白<sup>[5]</sup>。水通道蛋白介导水分子在膜上的传输,决定细胞膜、细胞和植物组织对水的渗透性<sup>[6-9]</sup>,促进了水的被动运输。

根据基因的序列相似性和蛋白在细胞的分布,植物水通道蛋白主要分为5种亚型。质膜内在水通道蛋白(PIPs, plasma membrane intrinsic proteins)主要定位于细胞质膜上,是植物水通道蛋白家族中最大的一类,能够介导叶和根中水分的跨膜运输传导<sup>[6]</sup>。液泡膜水通道蛋白(TIPs, tonoplast intrinsic proteins)则主要定位于液泡膜上。目前AQPs已被证实在植物的多种生命活动中发挥着调节作用,如种子萌发<sup>[10]</sup>、幼苗下胚轴的伸长<sup>[11]</sup>、CO<sub>2</sub>膜运输、光合作用<sup>[12]</sup>和气孔运动<sup>[13]</sup>等。除此之外,植物AQPs在干旱、盐碱和低温等非生物胁迫响应中也起着重要作用<sup>[14-15]</sup>。植物通过调节水通道蛋白的丰度来影响细胞的透水性,进而影响水分转运<sup>[16]</sup>,使得植物能够在逆境条件下也能够较长时间维持自身水分稳态。过表达灰葫芦AQP基因*CfPIP2; 1*能提高拟南芥在极端干旱条件下的成活率<sup>[17]</sup>;在拟南芥中转入盐藻的水通道蛋白基因*TsPIP1; 2*能够增加拟南芥的耐旱性和耐盐性,并且过表达型拟南芥在胁迫后也能更好地

恢复正常生长<sup>[18]</sup>。敲除拟南芥中的*AtTIP2; 2*后,植株对模拟干旱胁迫和盐胁迫更为敏感,存活率降低<sup>[19]</sup>。

茶树是我国重要的叶用经济作物。茶树生长过程中,经常遭受高温、干旱、低温等非生物胁迫,其中干旱胁迫最为常见,严重影响茶叶产量和品质。水通道蛋白参与植物干旱胁迫响应,不同的水通道蛋白可能会有不同的表达模式。在植物细胞水平上,PIPs类水通道蛋白主要参与细胞水分的吸收和外排,水通道蛋白表达量越高,细胞就更容易吸水,同时水分也更容易因为外排作用而流失<sup>[20]</sup>。另外,在干旱胁迫下,茶树叶片IAA、ABA含量均增加,其含量累积是茶树在水分胁迫下一种有限度的适应性反应,ABA含量的增加有利于叶部气孔关闭并增强根系水分透性,从而起到保水的作用<sup>[21]</sup>。Yue等<sup>[22]</sup>分离鉴定出20个茶树水通道蛋白基因,并研究了其在10% PEG、ABA、低温等胁迫下的表达以及在花芽分化和种子萌发中的作用。然而,关于茶树中水通道蛋白在土壤干旱胁迫中的作用和复水的响应未见报道。本研究在前人研究的基础上,克隆了2个新的茶树水通道蛋白家族基因,重点探究这两个水通道蛋白基因对干旱的响应,以期茶树抗旱的分子机理研究奠定基础,为高水分利用效率的茶树分子育种提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为1年生无性系福鼎大白茶穴盘苗,2018年5月取自西北农林科技大学西乡茶叶试验站。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 模拟干旱处理和ABA处理 挑选生

长势一致、萌发新芽的茶苗 42 株, 并对其进行 20% PEG6000 模拟干旱处理, 另挑选 42 株进行 100  $\mu\text{mol/L}$  脱落酸处理。分别于处理后 0 h、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 时取芽下嫩叶于液氮中,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.2 干旱及复水试验处理** 选择长势均匀的茶树福鼎大白品种一年生穴盘苗, 移栽至花盆中, 放置于西北农林科技大学园艺学院玻璃温室大棚中缓苗一个月。温室光照强度为自然光照的 50% (黑色遮阳网遮荫), 10:00-18:00 开空调和湿帘控温。缓苗结束后, 选择 96 株长势均匀、萌发新芽的茶苗分为对照组和试验组, 每组各 48 株。

对照组采用称重法补水, 每天 18:00 补充当天的水分消耗, 保持土壤含水量。试验组停止灌水, 自然干旱。停灌第 29 天时, 土壤含水量降至 30%, 于当日 18:00 对试验组灌水, 第二天早上取样时间记为复水 1 d, 共复水 4 d, 于试验开始后 0 d、3 d、7 d、18 d、24 d、29 d、复水 1 d 和复水 4 d 的 10:00-10:40

时取样。每组分别取 6 株茶苗, 先取茶树幼嫩叶剪碎混匀分成 3 份于液氮中, 后缓慢刨起茶苗, 冲洗干净根部, 取新长出的白色嫩根剪碎混匀, 分成 3 份于液氮中,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.3 总 RNA 提取** 采用 CTAB 法提取茶树样品的总 RNA,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 用超微量分光光度计 NanoDrop 2000c 测定 RNA 的浓度和质量。cDNA 第一链合成按照 5  $\times$  All-In-One RT MasterMix 试剂说明书进行。

**1.2.4 *CsAQP*s 的 cDNA 全长克隆** 以拟南芥的水通道蛋白序列为查询对象, 对转录组数据库和茶树基因组进行了筛选, 将两者的结果结合对其进行了校正, 最终选择克隆了 2 个未曾报道的 *CsAQP*s 基因。利用 IDT (<http://sg.idtdna.com/calc/analyzer>) 在线软件设计基因特异性引物 (表 1)。以 cDNA 第一链为模板, 进行 PCR 扩增。引物合成和测序由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	引物方向 Primer direction	克隆引物序列 (5'-3') Clone primer sequence	定量引物序列 (5'-3') Quantitative primer sequence
<i>CsPIP2; 7</i>	F	GCATTCCTCATCTCCAATTC	AAGGTGACGTTGCTGAGAGC
	R	AGAGAGTGGGGTTTAAAGAGG	TCGGTGGCGGAAAAGATTGT
<i>CsPIP2; 8</i>	F	AGATGTCGAAAGAAGTGAGC	GTCGCTGATAAGAGCGGTGT
	R	TTAGTTGGTGGGGTTGCTG	TCCTCTGGGATCAGTGGCT
<i>Cs-<math>\beta</math>-actin</i>	F		CTGCGTGATGGTCAGGTCAT
	R		GCTGGGAGCAAGAGCAGTAA

**1.2.5 生物信息学分析** 利用 NCBI 中的 Blast 工具对获得的基因及其编码蛋白进行同源比对和保守结构域分析; 用 ProtParam 工具预测蛋白质分子量与理论等电点; 用 DNAMAN 6.0 进行多序列氨基酸同源性比较并用 MEGA 7.0 构建系统发育树; 运用 ProtScale (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>) 进行氨基酸亲 / 疏水性分析; 在 TMPRED ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) 预测跨膜结构; 用 SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 在线网址预测信号肽; 用 WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 进行亚细胞定位预测; 用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) 预测编码蛋白的三

维结构; 用 Prosite 在线分析 (<https://prosite.expasy.org/prosite.html>) 预测序列的特征结构; 用 SPSS 21 进行数据显著性差异分析。

**1.2.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析** 温室中选取 10 株已经开花的福鼎大白茶苗, 取嫩叶、嫩茎、嫩根和花朵等部位样品, 于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  储存, 供组织特异性表达分析使用。

根据克隆得到的基因序列设计定量引物 (表 1), 以茶树  *$\beta$ -actin* 基因 (HQ420251.1) 作为内参基因。使用 EvaGreen 2  $\times$  qPCR MasterMix-ROX 试剂盒说明书进行体系选择及荧光 PCR 分析。使用 Bio-Rad IQ5 Real Time PCR System 进行荧光定量 PCR 反应:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  3 min;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  70 s,

循环 40 次; 60 °C 30 s, 71 个循环, 每次循环上升 0.5 °C。每个样品均设置 3 次技术重复, 采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析结果, 用 Duncan 检验进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 AQP 全长克隆

PCR 扩增获得 2 个水通道蛋白基因全长 cDNA, 测序结果表明, 2 个基因长度均为 840 bp, 与预期结果一致。测序后根据注释的信息及 NCBI 中 BLASTP 的检索结果, 参考其他植物水通道蛋白命名方法, 分别将 2 条序列命名为 *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8*。

### 2.2 蛋白特征分析

氨基酸序列分析表明 (表 2), 2 个水通道蛋白

基因均编码 280 个氨基酸, 且 2 个蛋白的分子量均在 30 kD 左右。不稳定指数均小于 40, 表明其属于稳定蛋白。脂溶指数均高于 95, 表明其均为脂溶性蛋白。2 个水通道蛋白的理论等电点分别为 9.25 和 9.43, 属于碱性氨基酸。

WoLF PSORT 中亚细胞定位预测结果 (表 2) 显示, 茶树 *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8* 蛋白均定位在质膜上。亲/疏水性分析预测结果显示, 从整体来看, 水通道蛋白的疏水性氨基酸分布多于亲水性氨基酸, GRAVY 值也均是正值, 表明其均属于疏水性蛋白 (图 1)。SignalIP 预测结果显示 2 个 *CsAQPs* 均不含信号肽, 属于非分泌性蛋白质。

表 2 水通道蛋白基因序列蛋白特征

Table 2 Protein characteristics of aquaporin gene sequence

基因名称 Gene name	CDS 序列 (bp) CDS sequence	开放 阅读框 ORF	蛋白质特征 Protein characteristics						
			氨基酸 Animo acids	分子量 (kD) MW	等电点 pI	亲水性 平均系数 GRAVY	不稳定系数 Instability index	脂溶指数 Aliphatic index	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>CsPIP2; 7</i>	964	840	280	30.017	9.25	0.411	31.68	98.68	细胞质膜
<i>CsPIP2; 8</i>	845	840	280	29.855	9.43	0.476	32.78	99.68	细胞质膜

ORF: Open reading frame, MW: Molecular weight, GRAVY: Grand average of hydrophilicity

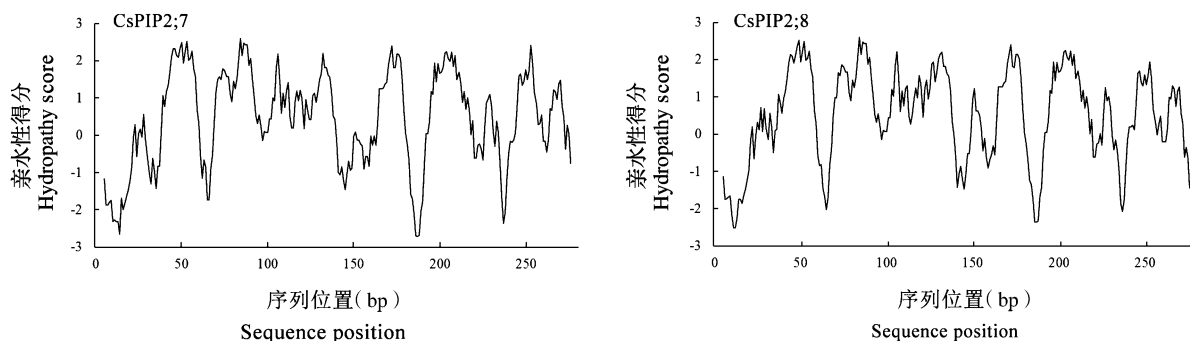


图 1 水通道蛋白的亲/疏水性分析

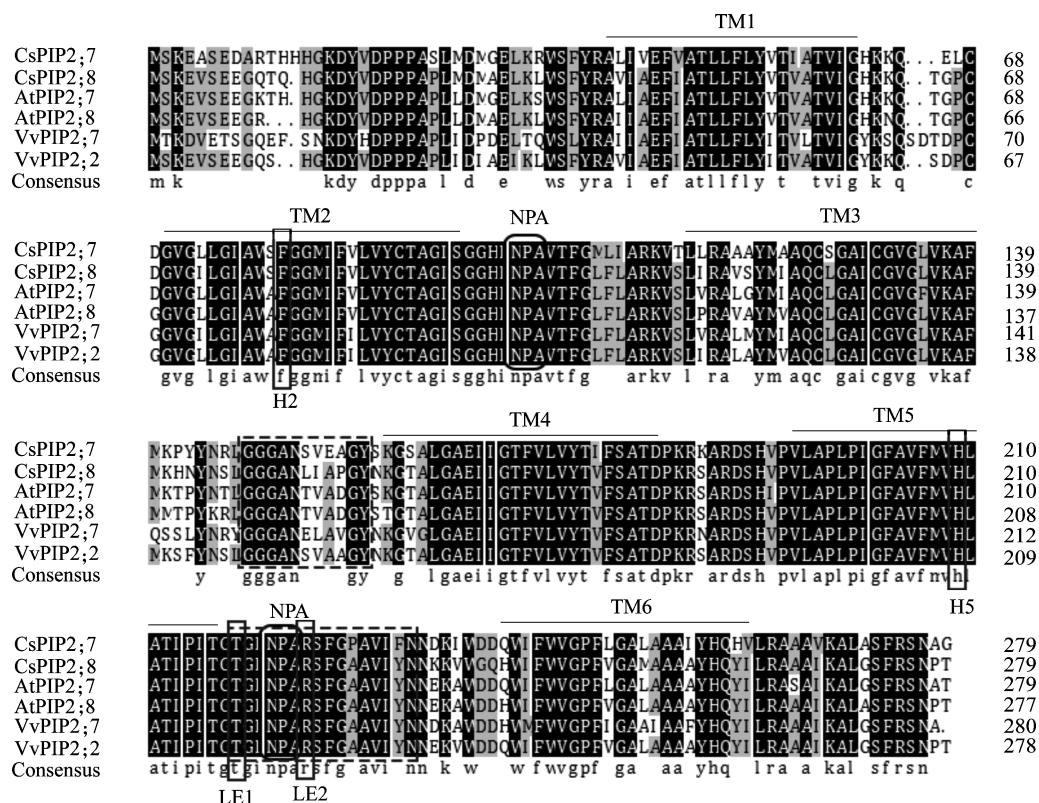
Fig.1 Hydrophilicity/hydrophobicity analysis of the *CsAQPs* proteins

多序列比对结果显示 (图 2), *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8* 均具有 GGGANXXXXGY 和 TGI/TNPARSL/FGAAI/VI/VF/YN 的特征结构域, 表明其属于质膜水通道蛋白家族。这些特征序列是鉴别质膜水通道蛋白基因及其类别划分的重要标准之一, 也是执行和调控质膜水通道蛋白功能的重要序列单元<sup>[23]</sup>。

Prosites 在线分析显示, 在 *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8* 编码的氨基酸序列的 N 端均含有 MIP 家族蛋白的

特征序列 HI/VNPAVTF。跨膜结构域预测分析显示其均含有 6 个跨膜结构域。三维结构预测和多序列比对结果显示, 2 个蛋白的 LoopB 和 LoopE 均含有形成水通道蛋白亲水通道的 2 个反向的 NPA (Asn-Pro-Ala) 保守结构域 (图 2、图 3)。而离 NPA 不远处的周质一侧有由 H2 和 H5 的 2 个残基和 E 环上的残基组成的芳香族/精氨酸 (Ar/R, aromatic/arginine) 区域, 该区域作为选择性过滤器而对底物进行筛选<sup>[24]</sup>。





虚线框: PIP 亚家族的特征序列; 黑色实线椭圆框: 2 个 NPA (Asn-Pro-Ala) 单元; 黑色实线框:

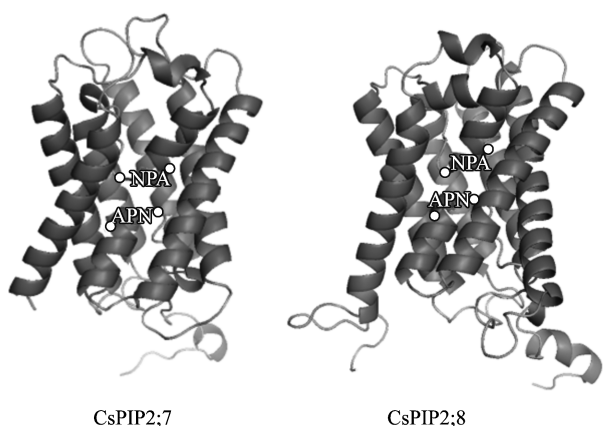
芳香族 / 精氨酸 (Ar/R) 选择性过滤器位点 H2、H5、LE1、LE2

Dotted square: characteristic sequences of the PIPs subfamily, Black solid-lined elliptic frame: two NPA (Asn-Pro-Ala) units,

Black solid-lined square: Ar/R selectivity filters H2, H5, LE1 and LE2

图 2 水通道蛋白多序列比对

Fig.2 Multiple sequence alignment of the CsAQP proteins



2 个小黑点中间的部分为 NPA 保守单元; 带状螺旋部分为  $\alpha$  螺旋结构; 细线条代表无规则卷曲

Region between two little black dots: conserved NPA units,

Banded helix:  $\alpha$  helices, Thin lines: irregular coils

图 3 水通道蛋白的三维结构预测

Fig.3 3D structure prediction of the CsAQP proteins

## 2.3 进化树构建

将 *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8* 的氨基酸序列与拟南芥、葡萄和茶树的同源序列进行比对分析并用邻

接法构建了系统进化树 (图 4A)。图 A 中的拟南芥序列来自 Phytozome 植物基因组网站, 葡萄和茶树序列来自 NCBI 网站。相同结果显示 *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8* 均属于质膜水通道蛋白中的 PIP2 亚家族; *CsPIP2; 7* 与拟南芥的 *AtPIP2; 7* 和 *AtPIP2; 8* 聚为一簇, 表明 *CsPIP2; 7* 的亲缘关系与拟南芥更近。 *CsPIP2; 8* 与茶树水通道蛋白 *CsPIP2; 4* 及葡萄的 *VvPIP2; 2* 聚为一簇, 表明其相对于 *CsPIP2; 7* 蛋白来说, 与木本植物的亲缘关系更近。

为了探究这 2 个茶树水通道蛋白的进化关系, 通过 NCBI 的 BLASTP 功能, 选择了与 *CsPIP2; 8* 和 *CsPIP2; 7* 编码蛋白同源性较高的序列 28 条构建了系统进化树, 如图 4B 所示。茶树的水通道蛋白 *CsPIP2; 7* 与拟南芥、山茶花、甘蓝型油菜、萝卜、甘蓝的同源蛋白聚在一簇, 表明其与草本植物中的十字花科植物有较近的亲缘关系; *CsPIP2; 8* 与野大豆、含羞草等草本及榴莲、柑橘等木本植物同源蛋白聚为一簇, 表明其进化介于草本植物与木本植物之间。

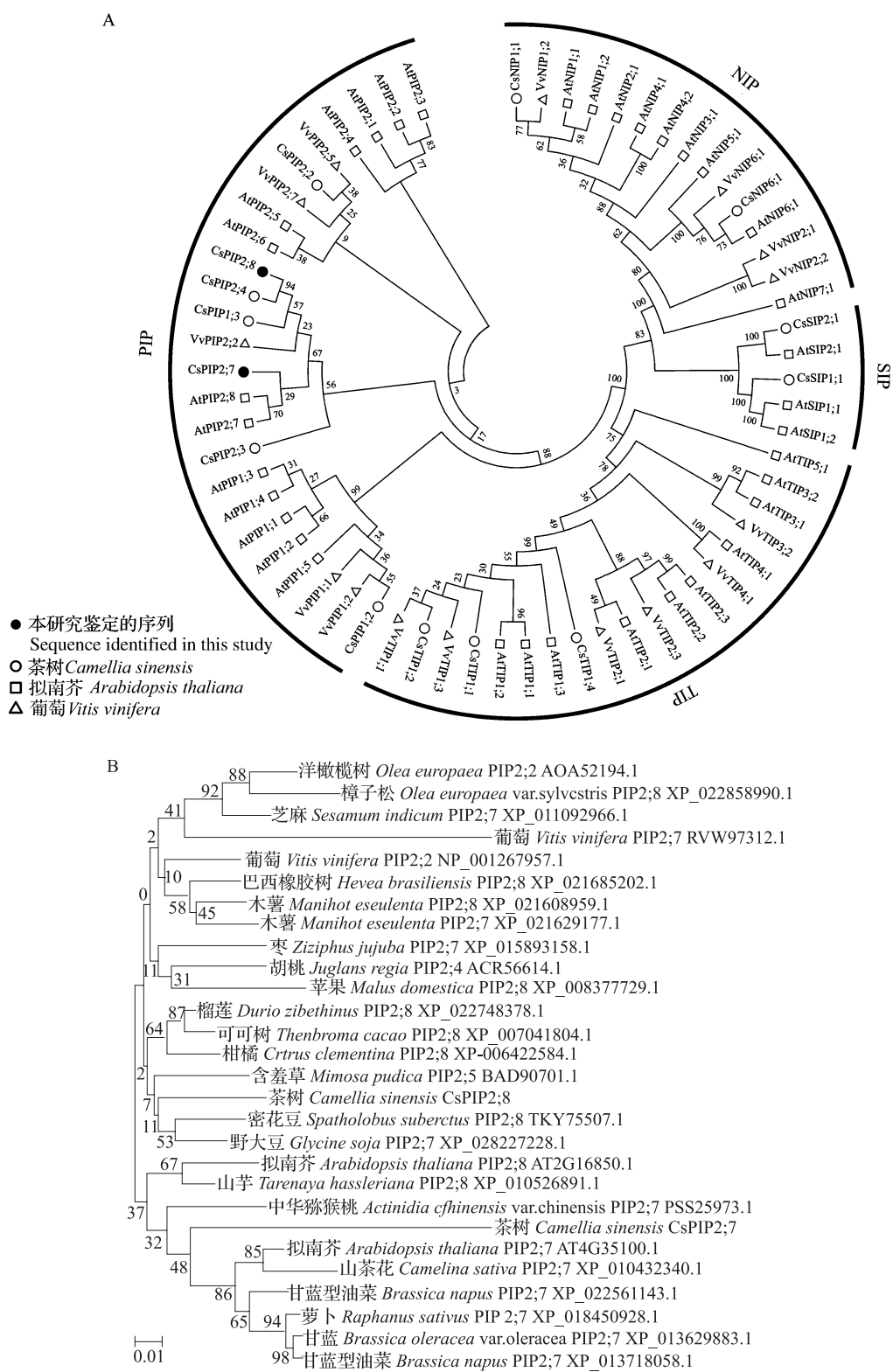
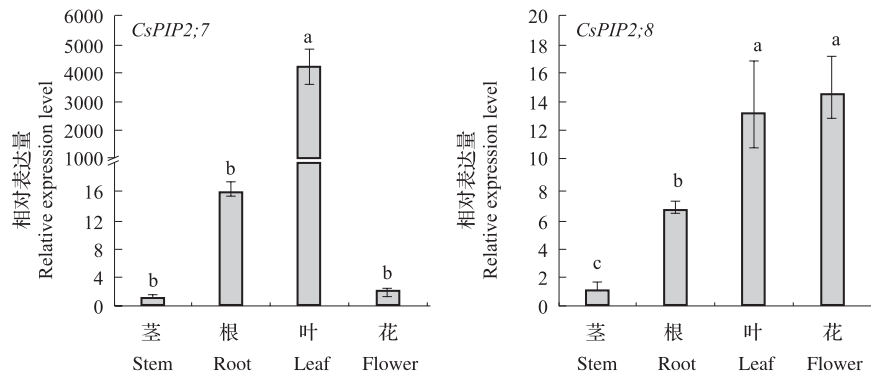


图 4 水通道蛋白进化树构建

Fig.4 Phylogenetic analysis of the CsAQPs proteins

## 2.4 水通道蛋白在茶树中的组织表达

茶树不同部位水通道蛋白基因表达水平如图 5 所示。从图中可以看出, *CsPIP2; 7* 在根、茎、花等组织中的表达量均显著低于叶部, 说明其主要在叶部表达; *CsPIP2; 8* 在叶部和花部的表达量都很高, 其次是根部, 茎部表达量最低。

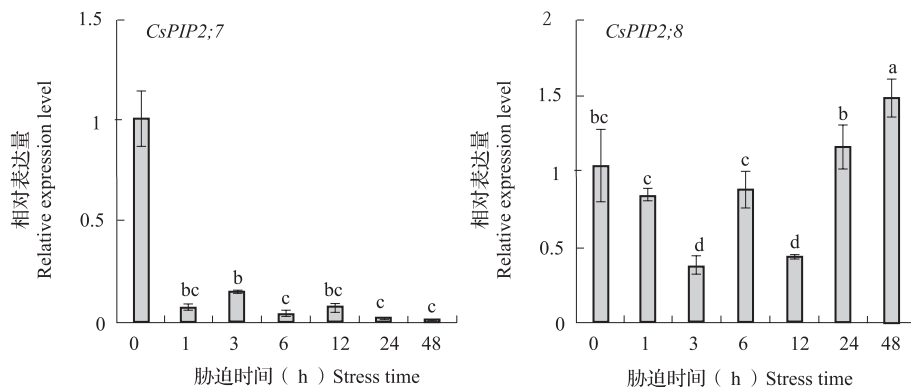


不同小写字母表示基因在不同组织中的差异显著 ( $P < 0.05$ )

Lower-case letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) for genes in different tissues

图 5 水通道蛋白序列在茶树不同组织中的表达模式

Fig.5 Expression pattern of AQPs in different tissues of tea plant



不同小写字母表示不同胁迫时间在相同处理中差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同

Lower-case letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) for different durations of stress in the same treatment, the same as below

图 6 PEG 处理下茶树水通道蛋白序列表达模式

Fig.6 Expression pattern of AQPs in tea plant treated with PEG

ABA 处理后水通道蛋白基因表达如图 7 所示。从图中可以看出 ABA 处理后, 茶树叶片 *CsPIP2; 7* 的转录水平显著下调, *CsPIP2; 8* 则在 ABA 胁迫下显著上调, 推测其可能与茶树气孔的运动有关。

## 2.6 *CsAQPs* 在干旱及复水下的表达分析

为进一步验证水通道蛋白在自然干旱和复水后的表达规律, 本研究设置了盆栽茶苗的干旱复水试验。18 d、24 d 和 29 d 的土壤含水量分别为 42%、35% 和 31%。由于试验过程较长, 外部环境 (每天早上的光照、水分、温度) 和内部环境 (采样部位的

## 2.5 水通道蛋白对模拟干旱和 ABA 的响应

模拟干旱胁迫下, 茶树叶片中水通道蛋白的表达如图 6 所示。从图中可以看出, 20% PEG 模拟干旱胁迫下, 茶树叶片中的水通道蛋白 *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8* 呈现不同的表达模式。*CsPIP2; 7* 在胁迫之后的整个过程中均显著下调, *CsPIP2; 8* 在胁迫前期 (3 h 内) 逐渐下调, 然后又波动上调。

老嫩程度) 变化剧烈, 因此本试验在每个采样的时间点均设置对照, 数据处理时以每个时间点的对照为准。试验结果显示, 2 个水通道蛋白基因的表达在茶树根部和叶部有着不同的表现。

**2.6.1 *CsAQPs* 在根中的表达分析** 如图 8 所示, 茶树受干旱胁迫前期 (停灌 24 d), 随胁迫程度加深, 根系中 *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8* 基因均被显著诱导上调表达, 表达量逐渐上升, 停灌 24 d 时, 分别比对照上调 7.13 倍和 3.68 倍; 而停灌 29 d 时, *CsPIP2; 7* 仅上调 2 倍, *CsPIP2; 8* 下调至原来水

平,可能是由于土壤中严重缺水,超出了茶树防御系统的防御范围,水分平衡被打破。复水后 1 d 和 4 d 时, *CsPIP2; 7* 转录水平上调(相比对照),而 *CsPIP2; 8* 显著下调。

**2.6.2 *CsAQPs* 在叶中的表达分析** 如图 9 所示,两种水通道蛋白在缓慢干旱胁迫和复水条件下的表

现不同,随着胁迫程度加深,茶树叶片中 *CsPIP2; 7* 的转录水平逐渐降低,而复水后 1 d,转录水平显著升高,结合其在叶部中高表达的特性,可推测其在复水过程中发挥着重要的作用。叶片中 *CsPIP2; 8* 的转录水平在整个干旱胁迫中变化不大,复水后转录水平显著下降。

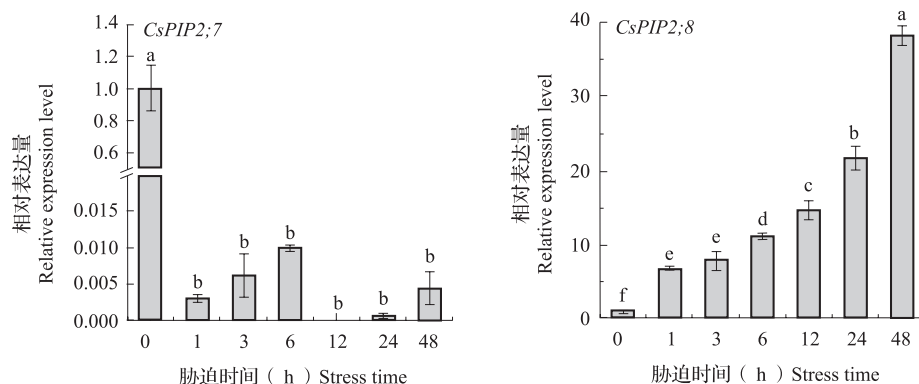
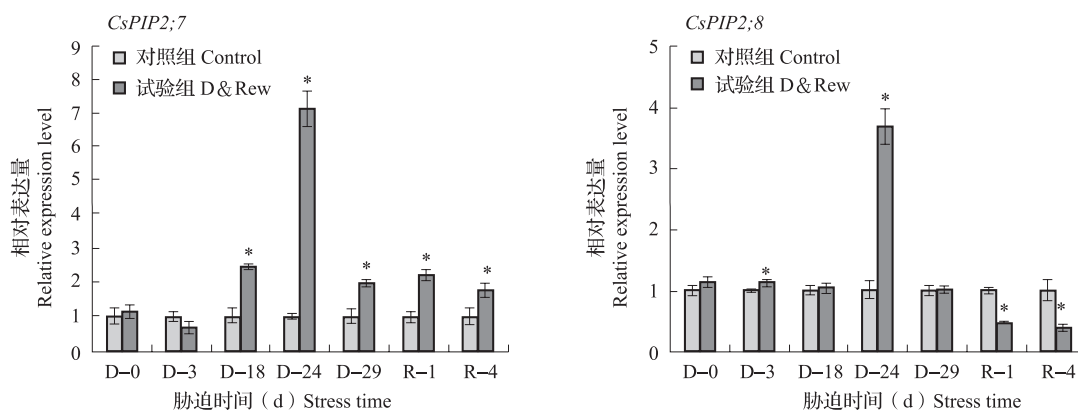


图 7 ABA 处理下茶树水通道蛋白序列表达模式

Fig.7 Expression pattern of *AQPs* in tea plant treated with ABA



D&Rew: 干旱和复水; D-3: 停灌 3 d; R-1: 复水 1 d; \* 表示对照组与试验组在 0.05 水平上差异显著, 下同  
D&Rew: drought and rehydration, D-3: stop irrigation for three days, R-1: rehydration for one day. \* indicates significant difference ( $P=0.05$ ) between Control and Experimental group, the same as below

图 8 茶树根部 *CsAQPs* 在干旱和复水条件下的表达分析

Fig.8 Expression analysis of *CsAQPs* in tea plant roots under drought and rehydration conditions

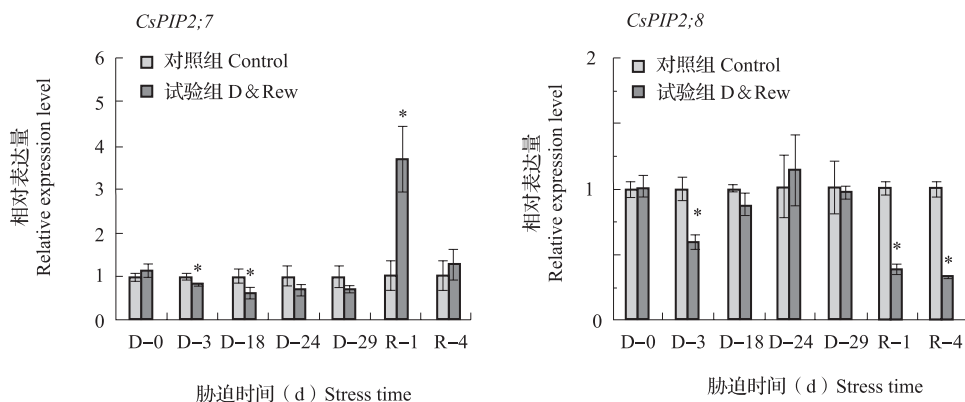


图 9 茶树叶部 *CsAQPs* 在干旱和复水条件下的表达分析

Fig.9 Expression analysis of *CsAQPs* in tea plant leaves under drought and rehydration conditions



### 3 讨论

水分胁迫对茶树的生长发育产生严重影响,水通道蛋白在植物响应水分胁迫中起重要作用<sup>[25-26]</sup>。本研究在前人研究的基础上,结合茶树基因组数据和本试验室的茶树转录组数据,鉴定克隆出 2 个新的水通道蛋白基因 *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8*,氨基酸多序列比对结果表明 2 个蛋白具有 PIP 亚家族的特征序列 GGGANXXXXGY 和 TGI/TNPARSL/FGAAl/VI/VF/YN,且其核苷酸序列和氨基酸序列具有很高的相似性。根据其他植物的研究结果,水通道蛋白 *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8* 含有水分运输型 Ar/R 滤器 (FHTR),预测它们还可以运输 CO<sub>2</sub>、硼酸、尿素和过氧化氢等底物<sup>[27]</sup>。水通道蛋白不仅是调节水分在植物细胞间以及体内水分平衡的分子基础,且具有参与渗透胁迫应答、调节气孔运动等功能<sup>[20, 28-29]</sup>。Yue 等<sup>[22]</sup>对水培茶苗进行了 10% PEG 胁迫处理,在根中绝大多数茶树水通道蛋白基因是下调的。有研究表明,在根中高表达的 3 个水通道蛋白,在模拟干旱胁迫 24 h 内根中的水通道蛋白均逐渐下调<sup>[30]</sup>。本研究中,叶部的 *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8* 在模拟干旱胁迫前期均为下调表达,与前人研究<sup>[22, 30]</sup>高度一致。组织定量试验结果表明, *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8* 在叶中的表达量都较高,这可能意味着它们在叶片中发挥着重要的功能。

ABA 是重要的逆境信号转导物质,上承干旱胁迫信号和初级应答基因的表达调控,下启对植物细胞、组织和表型的改变调节,对作物响应干旱等非生物胁迫具有重要的调节作用<sup>[31]</sup>。杨菲等<sup>[21]</sup>研究表明,茶树在干旱胁迫下 ABA 含量会有所增加。而 ABA 是通过诱导气孔关闭减少植物蒸腾作用的水分散失<sup>[32]</sup>。本研究发现,受 ABA 处理的诱导,叶片中 *CsPIP2; 7* 的转录水平显著下调且反应迅速,推测其能够感知 ABA 信号;而 *CsPIP2; 8* 则显著上调且转录水平随时间不断上升,推测其可能与茶树气孔的运动有关,可能是通过 ABA- 依赖型途径调节保卫细胞水分的快速运输,但两者与 ABA 信号途径和干旱胁迫的关系还需要研究者的进一步验证。

植物体内水通道蛋白基因在响应干旱胁迫中发挥着重要作用。在植物细胞水平上,PIPs 类水通道蛋白主要参与细胞水分的吸收和外排,水通道蛋白表达量越高,细胞就更容易吸水,同时水分也更容易因为外排作用而流失<sup>[20]</sup>。因此在干旱胁迫下,不同植物在不同阶段可能采取的吸水保水策

略是不同的。Joan 等<sup>[33]</sup>发现离体杨树叶片脱水后,12 个高表达的水通道蛋白均下调;用木质部汁液再水合 2 h 后,其中只有 4 个水通道蛋白上调。Alexandersson 等<sup>[34]</sup>对拟南芥进行了停灌和复水处理表明,莲座叶中多数水通道蛋白基因随停灌时间的延长下调,复水后又上调至正常水平。有关菜豆的研究发现,停灌后,4 种高表达水通道蛋白的基因表达均受到抑制,复水后恢复到对照组的水平,甚至表达量更高。*PvPIP2; 7* 和 *PvTIP4; 1* 在抗旱过程中的基因表达是品种特异性的,在耐旱型菜豆中的下调较大<sup>[35]</sup>。本研究发现,茶树干旱复水过程中根部和叶部 2 个水通道蛋白基因的表达呈现不同趋势。干旱胁迫下,根部 *CsPIP2; 7* 和 *CsPIP2; 8* 均不同程度地上调表达,叶部均下调表达,由此说明,干旱胁迫下,茶树通过提高根部水通道蛋白的表达量,增强从土壤中吸收水分的能力,通过降低叶部水通道蛋白表达水平来减少叶片中水分的移动和散失。复水后,不论在根部还是叶部, *CsPIP2; 7* 转录水平依然显著上调,而 *CsPIP2; 8* 显著下调,这可能意味着两个基因在复水过程中发挥着不同的功能。虽然不同植物的 AQP 在不同状态的干旱胁迫下表达模式各不相同,但总体而言,大多数 AQP 在遭受干旱胁迫后,叶部的表达都出现不同程度的下调,减少水分散失,保持体内水分平衡。

许多高等植物拥有 30 多个 AQP 基因,已知拟南芥中含 35 个水通道蛋白基因<sup>[36]</sup>,水稻中含 34 个<sup>[37]</sup>,杨树和陆地棉中分别多达 55 和 71 个<sup>[38-39]</sup>。茶树基因组庞大,而前期已被鉴定的基因仅有 26 个<sup>[22, 27]</sup>,因此茶树中仍还有多个未被鉴定的 AQP 基因,其功能有待进一步研究。

茶树作为我国的一种重要的经济作物,在生产中经常遭遇低温、干旱等逆境胁迫,影响产量和品质,严重制约了产业发展。本试验初步解析了茶树中的水通道蛋白在干旱胁迫中的表达模式,为阐明茶树 AQP 响应干旱胁迫的机制奠定了一定的基础,也为茶树抗逆育种提供了一定的理论依据。在接下来的研究中,我们将会通过筛选过表达 *CsAQP* 基因的拟南芥纯合子植株,进一步验证 2 个基因在干旱胁迫中的功能。

#### 参考文献

- [1] Wong S C, Cowan I R, Farquhar G D. Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. *Nature*, 1979, 282 (5737): 424-426
- [2] Javot H, Maurel C. The role of aquaporins in root water uptake.

- Annals of Botany, 2002, 90 ( 3 ): 301-313
- [ 3 ] Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano J M. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. Journal of Experimental Botany, 2012, 63 ( 1 ): 43-57
- [ 4 ] Kelly G, Sade N, Doron-Faigenboim A, Lerner S, Shatil-Cohen A, Yeselson Y, Egbaria A, Kottapalli J, Schaffer A A, Moshelion M, Granot D. Sugar and hexokinase suppress expression of PIP aquaporins and reduce leaf hydraulics that preserves leaf water potential. The Plant Journal, 2017, 91 ( 2 ): 325-339
- [ 5 ] 徐娜, 辛士超, 强晓晶, 于国红, 马雪峰, 程宪国. 番茄 *SIMIP* 基因参与转基因拟南芥的渗透调节. 植物营养与肥料学报, 2014, 20 ( 1 ): 195-204
- Xu N, Xin S C, Qiang X J, Yu G H, Ma X F, Cheng X G. Tomato *SIMIP* gene is involved in osmotic adjustment in the transgenic *Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2014, 20 ( 1 ): 195-204
- [ 6 ] Heinen R B, Ye Q, Chaumont F. Role of aquaporins in leaf physiology. Journal of Experimental Botany, 2009, 60 ( 11 ): 2971-2985
- [ 7 ] Postaire O, Tournaire-Roux C, Grondin A, Boursiac Y, Morillon R, Schäffner A R, Maurel C. A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of *Arabidopsis*. Plant Physiology, 2010, 152 ( 3 ): 1418-1430
- [ 8 ] Prado K, Maurel C. Regulation of leaf hydraulics: from molecular to whole plant levels. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 255
- [ 9 ] Chaumont F, Tyerman S D. Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. Plant Physiology, 2014, 164 ( 4 ): 1600-1618
- [ 10 ] Footitt S, Clewes R, Feeney M, Finch-Savage W E, Frigerio L. Aquaporins influence seed dormancy and germination in response to stress. Plant, Cell and Environment, 2019, 42 ( 8 ): 2325-2339
- [ 11 ] Eisenbarth D, Weig A. Dynamics of aquaporins and water relations during hypocotyl elongation in *Ricinus communis* L. seedlings. Journal of Experimental Botany, 2005, 56 ( 417 ): 1831-1842
- [ 12 ] Flexas J, Ribas-Carbó M, Hanson D T, Bota J, Kaldenhoff R. Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> *in vivo*. The Plant Journal, 2006, 48 ( 3 ): 427-439
- [ 13 ] Grondin A, Rodrigues O, Verdoucq L, Merlot S, Leonhardt N, Maurel C. Aquaporins contribute to ABA-triggered stomatal closure through OST1-mediated phosphorylation. The Plant Cell, 2015, 27: 1945-1954
- [ 14 ] Moshelion M, Halperin O, Wallach R, Oren R, Way D A. Role of aquaporins in determining transpiration and photosynthesis in water-stressed plants: crop water-use efficiency, growth and yield. Plant, Cell & Environment, 2015, 38 ( 9 ): 1785-1793
- [ 15 ] Kapilan R, Vaziri M, Zwiazek J J. Regulation of aquaporins in plants under stress. Biological Research, 2018, 51 ( 1 ): 4
- [ 16 ] Martre P, Morillon R, Barrieu F, North G B, Nobel P S, Chrispeels M J. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. Plant Physiology, 2002, 130 ( 4 ): 2101-2110
- [ 17 ] Jang J Y, Rhee J Y, Kim D G, Chung G C, Lee J H, Kang H. Ectopic expression of a foreign aquaporin disrupts the natural expression patterns of endogenous aquaporin genes and alters plant responses to different stress conditions. Plant and Cell Physiology, 2007, 48 ( 9 ): 1331-1339
- [ 18 ] Wang L L, Chen A P, Zhong N Q, Liu N, Wu X M, Wang F, Yang C L, Romero M F, Xia G X. The *Thellungiella salsuginea* tonoplast aquaporin TsPIP1; 2 functions in protection against multiple abiotic stresses. Plant and Cell Physiology, 2014, 55 ( 1 ): 148-161
- [ 19 ] Feng Z J, Xu S C, Liu N, Zhang G W, Hu Q Z, Xu Z S, Gong Y M. Identification of the AQP members involved in abiotic stress responses from Arabidopsis. Gene, 2018, 646: 64-73
- [ 20 ] 颜培玲, 潘学军, 张文娥. 野生毛葡萄水通道蛋白基因 *VhPIP1* 的克隆及其在干旱胁迫下的表达分析. 园艺学报, 2015, 42 ( 2 ): 221-232
- Yan P L, Pan X J, Zhang W E. Cloning of aquaporin gene *VhPIP1* in *Vitis heyneana* and its expression under drought stress. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42 ( 2 ): 221-232
- [ 21 ] 杨菲, 李蓓蓓, 何辰宇. 高温干旱对茶树生长和品质影响机理的研究进展. 江苏农业科学, 2017, 45 ( 3 ): 10-13, 40
- Yang F, Li B B, He C Y. Research progress on the mechanism of the effect of high temperature and drought on the growth and quality of tea plants. Jiangsu Agricultural Science, 2017, 45 ( 3 ): 10-13, 40
- [ 22 ] Yue C, Cao H, Wang L, Zhou Y, Hao X, Zeng J, Wang X, Yang Y. Molecular cloning and expression analysis of tea plant aquaporin ( *AQP* ) gene family. Plant Physiology and Biochemistry, 2014, 83: 65-76
- [ 23 ] Postaire O, Verdoucq L, Maurel C. Aquaporins in plants: from molecular structures to integrated functions. Advances in Botanical Research, 2007, 46: 75-136
- [ 24 ] Mitani-Ueno N, Yamaji N, Zhao F J, Ma J F. The aromatic/arginine selectivity filter of NIP aquaporins plays a critical role in substrate selectivity for silicon, boron, and arsenic. Journal of Experimental Botany, 2011, 62 ( 12 ): 4391-4398
- [ 25 ] Engel A, Fujiyoshi Y, Agre P. The importance of aquaporin water channel protein structures. Embo Journal, 2000, 19 ( 5 ): 800-806
- [ 26 ] 韩晓毓, 张林森, 王俊峰, 杨小妮, 李喜凤, 胡景江, 韩明玉. 不同苹果矮化砧木导水特性与水通道蛋白基因表达对干旱胁迫的响应. 西北农业学报, 2015, 24 ( 10 ): 109-117
- Han X Y, Zhang L S, Wang J F, Yang X N, Li X F, Hu J J, Han M Y. Hydraulic characteristic and aquaporin expression of several apple dwarf rootstocks in responses to drought stress. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2015, 24 ( 10 ): 109-117
- [ 27 ] 岳川, 曹红利, 王赞, 陈丹, 林宏政, 孙云, 叶乃兴. 茶树水通道蛋白基因的克隆与表达分析. 西北植物学报, 2018, 38 ( 8 ): 51-59
- Yue C, Cao H L, Wang Z, Chen D, Lin H Z, Sun Y, Ye N X. Cloning and expression analysis of aquaporin protein genes in tea plant ( *Camellia sinensis* ). Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2018, 38 ( 8 ): 51-59
- [ 28 ] Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. Plant and Cell Physiology, 2005, 46

- (9); 1568-1577
- [29] Jeff A, Armand S V. Watch water flow. *Science*, 2013, 340: 1294-1295
- [30] Li R, Wang J F, Li S T, Zhang L, Qi C D, Weeda S, Zhao B, Ren S X, Guo Y D. Plasma membrane intrinsic proteins SIPIP2; 1, SIPIP2; 7 and SIPIP2; 5 conferring enhanced drought stress tolerance in tomato. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31814
- [31] 巩樵, 宋继玲, 甘晓燕, 陈虞超, 郭志乾, 宋玉霞. 模拟干旱胁迫下马铃薯 *StNCED1* 表达量及与 ABA 含量的相关性分析. *植物遗传资源学报*, 2018, 19(3): 189-195
- Gong L, Song J L, Gan X Y, Chen Y C, Guo Z Q, Song Y X. Correlation analysis of *StNCED1* expression level and ABA content of potato under simulated drought stress. *Journal of Plant Genetic Resource*, 2018, 19(3): 189-195
- [32] 王俊斌, 丁博, 李欣, 吴天文, 陈小强, 谢晓东. 磷脂酶 D 在 ABA 调控气孔运动中的作用. *植物生理学报*, 2006, 52(6): 861-867
- Wang J B, Ding B, Li X, Wu T W, Chen X Q, Xie X D. Roles of phospholipase D in ABA-regulated stomatal movement. *Plant Physiology Journal*, 2006, 52(6): 861-867
- [33] Joan L, Hacke U G, Silvia M. The role of water channel proteins in facilitating recovery of leaf hydraulic conductance from water stress in *Populus trichocarpa*. *PLoS ONE*, 2014, 9(11): e111751
- [34] Alexandersson E, Fraysse L, Sjoval-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology*, 2005, 59(3): 469-84
- [35] Zupin M, Sedla A, Kidric M, Meglic V. Drought-induced expression of aquaporin genes in leaves of two common bean cultivars differing in tolerance to drought stress. *Journal of Plant Research*, 2017, 130(4): 735-745
- [36] Johanson U. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology*, 2001, 126(4): 1358-1369
- [37] 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. *Planta*, 2013, 238(4): 669-681
- [38] Gupta A B, Sankaramakrishnan R. Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: Characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biology*, 2009, 9(1): 134
- [39] Park W, Scheffler B E, Bauer P J, Campbell B T. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 142