



黑果枸杞 *LrPIP1* 基因的克隆鉴定及外施水杨酸对其在干旱胁迫下表达的影响

马永慧¹,李进¹,可静²

(1. 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室,干旱区植物逆境生物学实验室,新疆师范大学 生命科学学院,乌鲁木齐 830054;2. 乌鲁木齐市十三中学,乌鲁木齐 830000)

摘要 植物膜水通道蛋白(plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)是一类参与植物众多生理活动的多功能蛋白。为探究 *PIP* 基因在黑果枸杞(*Lycium ruthenicum* Murr.)响应干旱胁迫中的作用,以黑果枸杞为试验材料分离得到 *PIP* 基因,命名为 *LrPIP1*。使用生物信息学方法对其编码蛋白的理化性质、序列进化进行分析,以及预测蛋白质的二级和三级结构并构建基因树等。将幼苗进行不同程度干旱胁迫与外施水杨酸处理,实时荧光定量 PCR 结果显示,无外源 SA 处理下,轻度干旱胁迫 D1 可诱导 *LrPIP1* 基因的相对表达量较 CK 处理显著上调,中度 D2、重度胁迫 D3 时, *LrPIP1* 基因的相对表达量较 CK 有一定程度的上调,但相较于 D1 表现为显著下降;外源喷施 SA 可影响干旱胁迫下黑果枸杞 *LrPIP1* 基因的相对表达量,轻度胁迫下,外源 SA 诱导 *LrPIP1* 基因表达量较 CK 下调;较 CK 处理,中、重度胁迫下 SA 可诱导 *LrPIP1* 基因表达量上调。上述表明, *LrPIP1* 基因可能在黑果枸杞非生物胁迫响应过程中发挥重要调控作用。

关键词 水通道蛋白; *LrPIP1* 基因; 干旱; 黑果枸杞; 水杨酸

中图分类号 Q943.2

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2022)03-0310-10

水通道蛋白(Aquaporins,简称 AQPs)即水孔蛋白,是主要内在蛋白(membrane intrinsic proteins, MIPs)超家族的成员之一^[1],正调控水分和其他小分子物质如甘油、CO₂、NH₃、尿素、硼和 H₂O₂ 等的跨膜运输^[2-3]。目前在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、白沙蒿(*Artemisia sphaerocephala* Krasch.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)、番茄(*Solanum lycopersicum* Mill.)等植物中均证实了水通道蛋白的存在^[4-6]。植物体内水分的长距离运输、细胞渗透平衡的调控和气孔运动等过程都有水通道蛋白的参与^[7]。AQPs 诱导气孔闭合推测是通过改变植物叶细胞的内外渗透势,如烟草 *NtAQPI* 基因在质膜以及叶绿体内膜上表达,对 CO₂ 电导率有一定影响^[8];向日葵(*Helianthus annuus* L.)保卫细胞中 *SunTIP7* 基因的表达量随着气孔关闭而增多^[9]。在植物生命进程中,水通道蛋白有其独特的表达模式响应非生物胁迫,如通过过量

表达 AQPs 基因提高植物的抗旱耐盐性^[10-11]。

黑果枸杞为茄科枸杞属落叶小灌木,是优秀的经济树种,可作为水土保持植物广泛种植,其果实富含花色苷、总黄酮、多糖等物质,具有降血脂、抗氧化等作用,并已有相关提取工艺报道^[12]。黑果枸杞浆果资源已具有一定的市场潜力,但黑果枸杞生长环境严苛,对其生态保护较少,加之人们过度开采等严重限制了黑果枸杞的生长、结实,人工种植也同样面临环境以及技术方面相关问题。

前期研究显示干旱胁迫会破坏黑果枸杞叶细胞中叶绿体和线粒体内膜致使气孔关闭^[13],外源 SA 可缓解干旱胁迫造成的生理伤害,这些宏观指标的变化是否与其中 *PIP1* 基因表达量的变化有关? 基于该问题,本研究从黑果枸杞叶片中克隆 *PIP1* 基因,并对其序列进行生物信息学分析,通过 RT-PCR 技术分析 *PIP1* 基因在干旱胁迫以及施加外源水杨酸下的表达情况,以期为探索黑

收稿日期:2021-01-22 修回日期:2021-04-25

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2014211A041)。

第一作者:马永慧,女,硕士研究生,从事植物逆境生理研究。Email:425927013@qq.com

通信作者:李进,男,教授,主要从事植物逆境研究。Email:xjcjlj4@xjnu.edu.cn

果枸杞耐旱分子机理及耐旱性改良等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr.) 种子采自新疆博湖县, 试验材料于新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室中培养。

选用饱满成熟种子置于 40 °C 水浴锅内预种, 进行 48 h 的打破种子休眠处理, 消毒后的种子放置适宜环境 (12 h 光照/12 h 黑暗, 25 °C 昼温/15 °C 夜温) 培育成幼苗, 每盆 5 株进行盆栽试验。黑果枸杞幼苗长至 15 cm 左右, 分别对其进行干旱胁迫与外施水杨酸诱导处理。

干旱胁迫处理: 每个处理花盆内均有烘干土壤 1 kg, 土壤体积质量 $1.23 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, 田间持水量为 20.16%。根据水分梯度设计 4 个水平, 分别是正常对照 CK (85%~90%)、轻度干旱胁迫 D1 (RWC 60%~65%)、中度干旱胁迫 D2 (RWC 40%~45%)、重度干旱胁迫 D3 (RWC 20%~25%), 干旱胁迫处理持续 28 d, 每个水平均设定 3 次重复。黑果枸杞幼苗均在同一环境下, 维持正常的光照以及空气流通。干旱胁迫采取不浇水自然消耗法, 达到设定标准后, 干旱胁迫处理开始。于每天的 20:00 称量, 待土壤持水量达到试验设定标准时, 摘取黑果枸杞叶片迅速进行液氮速冻处理, -80 °C 保存, 备用。水杨酸处理: 水杨酸 (salicylic acid, SA) 为分析纯, 处理浓度为 0.1、0.5 mmol · L⁻¹。试验第 1、3、5 天的 20:00, 处理组分别喷施 20 mL 的 0、0.1、0.5 mmol · L⁻¹ SA 药液^[13], 每个处理 3 次重复, 共 36 个处理。

1.2 方法

1.2.1 *PIP1* 基因的克隆 根据文献获知的 *PIP1* 基因序列, 将其保守域在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对, 获得一个与植物中 *PIP1* 基因序列同源性较高但功能未知的 mRNA 序列。使用软件 Primer premier 5 设计引物, (5'-F: CGCTCTGTTTCTTTCACTGCC-3'; R: 5'-GGGGTG-GTTGATAACACTTGCT-3'); 使用 OMEGA 公司的 Plant RNA Kit 试剂盒提取黑果枸杞叶片总 RNA; 使用 OMEGA 公司的 Gel Extraction Kit 试剂盒反转录合成 cDNA; PCR 扩增以黑果枸杞叶片 cDNA 为模板进行, 退火温度设定为

55 °C。产物经回收后连接至 pMD-18T 载体 (TaKaRa), 送华大基因科技股份有限公司进行测序。

1.2.2 *LrPIP1* 生物信息学分析 使用 NCBI 网站提供的在线分析工具 ORF Finder (<http://ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 对 *LrPIP1* 蛋白进行测序结果分析, 确定序列的起始密码子、终止密码子和开放阅读框长度, 确保是完整的 *LrPIP1* 基因; 使用 BLAST 功能对黑果枸杞 *LrPIP1* 基因翻译出的氨基酸序列进行分析, 使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/prot-param/>) 对 *LrPIP1* 蛋白进行特性预测分析; 使用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 对其亲疏水性序列谱进行绘制, 图像可直观地反映出水环境下 *LrPIP1* 蛋白质的折叠情况; 使用软件 KinasePhos 对其磷酸化位点进行预测分析; 使用 NetNES 分析信号肽位点; 使用 NPSA 在线分析工具 (<http://npsa-prabi.ibcp.fr/>) 中 MRLC 方法对其二级结构进行预测分析; 使用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 对其三级结构进行预测分析及同源建模, 使用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树。

1.2.3 表达模式分析 根据黑果枸杞 *PIP1* 基因序列设计引物, F: 5'-GCATTTCTGGCGGT-CACA-3'; R: 5'-TGTAACCA GGTGCCA-CAAAGT-3'。以 18sRNA 作为内参 (F: 5'-GCGAAATGCGATAA GTAGTGTG-3'; R: 5'-GCAA TGTGCGTTCAAAGATTTC-3')^[14]。不同处理下的黑果枸杞叶片 cDNA 为模板, 反应体系为 2 × Master Mix 10 μL, 10 μmol · L⁻¹ 的 PCR 特异引物 F 0.5 μL, 10 μmol · L⁻¹ 的 PCR 特异引物 R 0.5 μL, 加水至总体积为 18 μL。反应程序为 95 °C 30 s; 40 个循环: 95 °C 5 s, 60 °C 40 s (收集荧光)。为建立 PCR 产物的熔解曲线, 待扩增反应结束后, 按 95 °C 10 s; 60 °C 60 s; 95 °C 15 s; 并从 60 °C 缓慢升温到 99 °C (仪器自动进行—Ramp Rate 为 0.05 °C · s⁻¹)。每个反应 3 次生物学重复, 3 次技术重复, 并计算 *PIP1* 基因的相对表达量。

1.2.4 数据分析及图表处理 使用 Microsoft Office Excel 2010 进行试验数据计算整理以及图表制作, 采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 不同胁迫间进行 One Way ANOVA 和 Duncan's 多重比较 ($P < 0.05$) 以及相关性分析。

2 结果与分析

2.1 黑果枸杞 *LrPIP1* 基因的克隆与序列分析

使用同源克隆的方法,运用 RT-PCR 技术,从黑果枸杞叶片中获得一个功能未知的 *PIP1* 基因,命名为 *LrPIP1* (GenBank 登录号为 KY230166),该基因完整的开放阅读框长度为 852 bp。使用 Prot-Param 软件对 *LrPIP1* 蛋白保守区进行预测分析,结果表明在 101~109 氨基酸处含有 1 个与 MIPs 蛋白家族保守信号序列

HINPAVTFG 相匹配的序列及物质膜水通道蛋白的特征序列 GGGANFVQPG 和 TGI,研究发现 *LrPIP1* 蛋白有 6 个跨膜域,是典型的水通道蛋白跨膜结构,证明 *LrPIP1* 蛋白为跨膜蛋白且具有典型的水通道蛋白跨膜结构。

2.2 黑果枸杞 *LrPIP1* 基因保守域分析

使用 CDD 软件分析黑果枸杞 *LrPIP1* 基因序列的保守域^[15],结果如图 1 所示,黑果枸杞 *LrPIP1* 基因具有水通道蛋白结构域,其中核酸结合区域较为保守,是水通道蛋白,属于 MIPs 大家族。

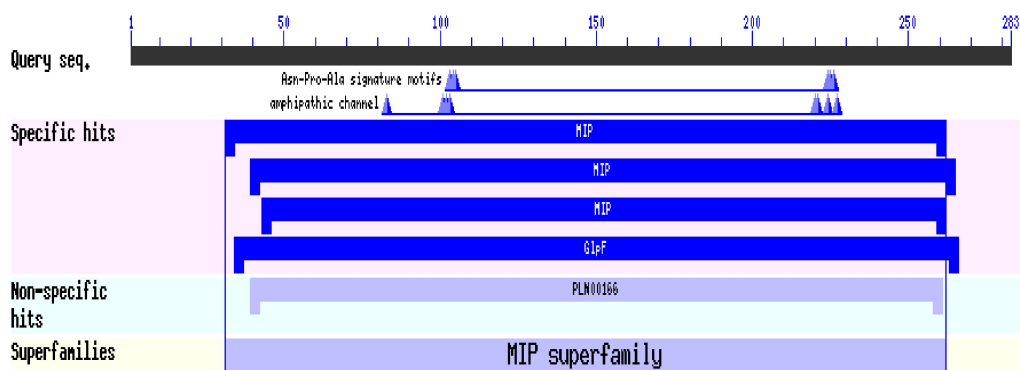


图 1 *LrPIP1* 基因保守结构域分析

Fig. 1 Analysis of conserved domain prediction of *L. ruthenicum LrPIP1*

2.3 黑果枸杞 *LrPIP1* 蛋白质理化性质和亲疏水性分析

使用 ProtParam 软件分析发现,黑果枸杞 *LrPIP1* 基因编码的蛋白质分子式为 $C_{1401}H_{2163}O_{364}S_{11}$,分子质量为 30 268.46 u,理论等电点 pI 为 9.36,*LrPIP* 蛋白含有 15 个带负电

荷的氨基酸残基(Asp + Glu)和 22 个带正电荷的氨基酸残基(Arg + Lys),消光系数为 41 035。脂肪指数为 102.72。总平均亲水性为 0.506,证明 *LrPIP1* 蛋白是疏水性蛋白。不稳定指数为 31.87,证明 *LrPIP1* 蛋白稳定性较好。使用 ProScale 工具预测 *LrPIP1* 蛋白的亲水性和疏水

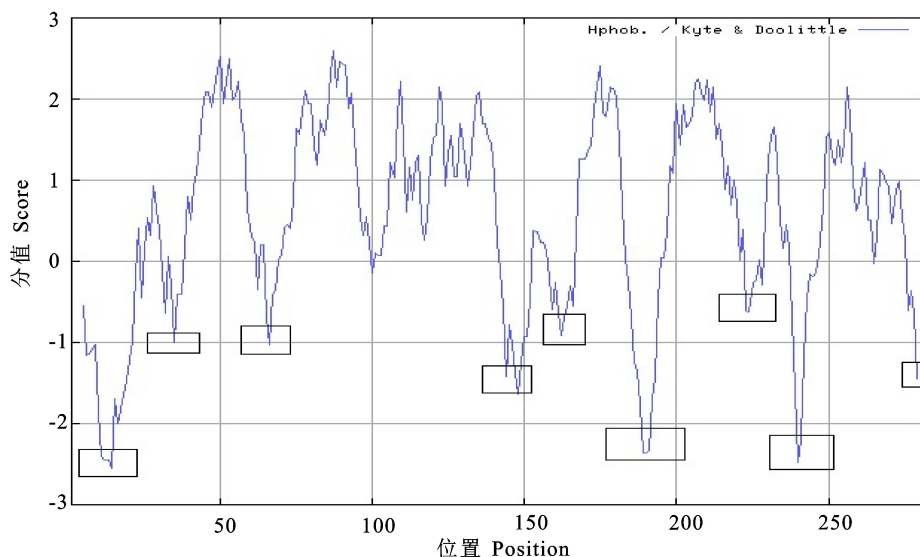


图 2 黑果枸杞 *LrPIP1* 蛋白亲水性和疏水性预测

Fig. 2 Prediction of hydrophobicity and hydrophilicity of *L. ruthenicum LrPIP1*

性,其他设置采用默认,选信号最显著的 Kyte & Doolittle 氨基酸标度值,表明 *LrPIP1* 有 9 个低分

2.4 黑果枸杞 *LrPIP1* 蛋白磷酸化位点分析

应用 KinasePhos 对黑果枸杞 *LrPIP1* 蛋白

进行磷酸化分析,结果如图 3,表明黑果枸杞 *LrPIP1* 蛋白在第 18 位含有一个酪氨酸,丝氨酸位于第 98、117、194、278 位,推测其可能是 *LrPIP1* 的潜在磷酸化位点。

query						
Locations (AA)	Phosphorylated Sites	HMM Bit Score	E-value	Catalytic Kinases	Predictive Models	
					HMMs	Logo
18	HGKDYVDP	-0.9	4.9	EGFR	HMM	
18	HGKDYVDP	-3.1	29	INSR	HMM	
18	HGKDYVDP	1.9	1	Jak	HMM	
18	HGKDYVDP	4.7	0.64	Other_MDD	HMM	
98	TAGISGGHI	-3.9	15	ATM	HMM	
117	ARKVSLIRA	0.5	2.2	CaM-II	HMM	
117	ARKVSLIRA	-0.9	3.5	PKG	HMM	
194	SARDSHVPV	-4.8	15	PKG	HMM	
279	GSFRSNPSN	-1.7	10	IKK	HMM	

图 3 黑果枸杞 *LrPIP1* 蛋白磷酸化位点分析

Fig. 3 Putative phosphorylation sites of *L. ruthenicum* *LrPIP1* by KinasePhos prediction

2.5 黑果枸杞 *LrPIP1* 蛋白信号肽预测和分析

使用基于神经网络模型 (Neural Networks models) 和隐马可夫模型 (Hidden Markov Models) 的 NetNES1.1 server,对 *LrPIP1* 蛋白中富含亮氨酸的核输出信号进行预测分析^[16]。结果如图 4 所示,*LrPIP1* 蛋白于序列第 56 位有富含亮氨酸的核输出信号。

2.6 黑果枸杞 *LrPIP1* 蛋白二级结构分析

使用 NPSA 在线分析工具提供的 MRLC 方法对其二级结构进行预测分析。结果显示 (图 5),该蛋白由 43.46% 的 α 螺旋,14.13% 的 β 折叠和 42.40% 的无规则卷曲 3 种形式构成。其 N 端主要由无规则卷曲结构分布,C 端主要由 α 螺旋分布。

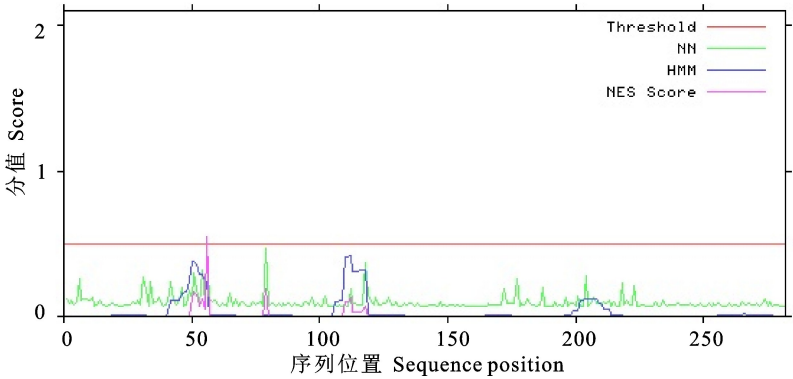


图 4 黑果枸杞 *LrPIP1* 蛋白核输出信号预测

Fig. 4 Prediction of nuclear export signal of *L. ruthenicum* *LrPIP1*

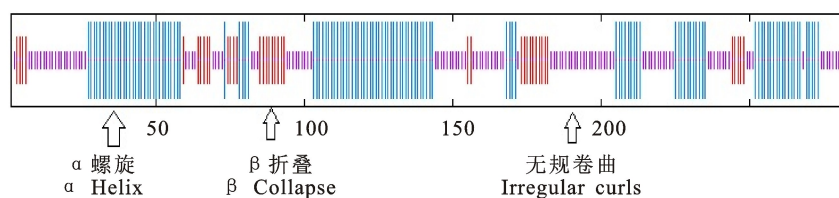


图5 黑果枸杞 LrPIP1 二级结构预测

Fig. 5 Predicted secondary structure of *L. ruthenicum* LrPIP1

2.7 黑果枸杞 LrPIP1 三级结构模型分析

使用 SWISS-MODEL 对 LrPIP1 蛋白质结构做同源建模^[17],建模方式采用自动方式。首先将蛋白质序列进行 Blast 比对,结果显示 *LrPIP1* 与数据库中 Spinach aquaporin SoPIP2;1 的结构最相似(82.92%);其次对目标序列和模板序列结构进行比对,将完全一致的氨基酸序列区域建立一致的三级结构,并将其叠和;根据网络综合服务器算法构建蛋白质模型,先找出主链结构,再进行侧链建模,并通过能量计算优化结构,最后使用全局法中的 QMEANscore4 记分值估算该模型的建模质量。

构建的蛋白质三维结构如图 6 所示,可信度值较高为 0.56,模板序列方法使用 X-ray,分辨率为 2.10 Å,比对的范围在第 23~277 个氨基酸,覆盖度达到 99%。

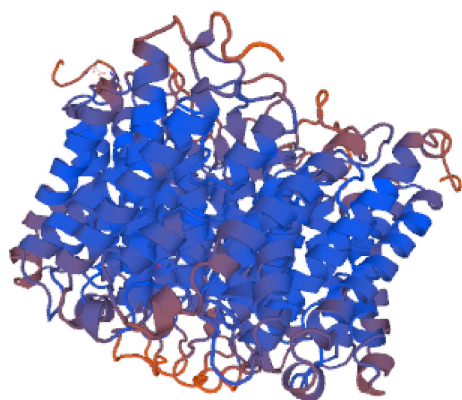


图6 LrPIP1 蛋白质的三维结构模型

Fig. 6 Three-dimensional structure model of LrPIP1

2.8 同源性分析和基因树构建

将 LrPIP1 蛋白质序列与马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)、烟草(*Nicotiana tabacum* L.)等茄科植物和拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)、苹果(*Malus domestica* B.)、葡萄(*Vitis vinifera* L.)等双子叶植物,以及水稻(*Oryza brachyantha* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)、玉米(*Zea*

mays L.)、甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)等单子叶植物的水通道蛋白 PIPs 进行多序列比对。BLAST 同源性分析结果显示(图 1),黑果枸杞 *LrPIP1* 基因编码氨基酸序列与多种植物相比均具有较高的同源性,其中与马铃薯的同源性高达 99%;使用 ClustalW 软件进行多序列比对,选取比对结果中保守区段较为相近的 22 种蛋白质序列进行构建基因树的准备;使用 MEGA 7.0 软件采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树;对于参数选项设置:为了确保基因树分枝的稳定,选择“Bootstrap method”的检验方法,其他设置采用默认,重复 1 000 次。如图 7 所示,这 22 种不同物种的水通道蛋白基因大致聚合为 4 大族群,其中黑果枸杞 *LrPIP1* 与同为枸杞属的马铃薯亲缘关系最近,聚为一类,与拟南芥、甘蔗的亲缘关系相对较远。

2.9 黑果枸杞 LrPIP1 基因干旱胁迫和施加外源水杨酸响应的 Real-time PCR 分析

本试验探究黑果枸杞 *LrPIP1* 基因在干旱胁迫下的表达情况,检测 *LrPIP1* 基因在叶片中的相对表达量。以黑果枸杞叶片 cDNA 为模板进行 RT-PCR 反应,18S 作为内参基因。结果如图 8 所示,干旱胁迫下黑果枸杞 *LrPIP1* 基因相对表达量在不同处理下具有明显差异。轻度干旱胁迫可诱导 *LrPIP1* 基因的相对表达量显著上调($P < 0.05$),*LrPIP1* 基因的快速上调,推测可能是黑果枸杞响应干旱胁迫从而大量表达 *LrPIP1* 蛋白,以此摄入更多水分从而适应干旱,增强抗旱性;中度胁迫 D2 时,*LrPIP1* 基因的相对表达量较 CK 有一定程度的上调,但相较于 D1 表现为显著下降($P < 0.05$);重度胁迫 D3 时,*LrPIP1* 基因相对表达量较 D2 有显著性上升($P < 0.05$)。前有研究证明外源 SA 可促进细胞内 H_2O_2 积累,诱导 PIP1 在细胞内在化定位进行重定位,调节质膜渗透性从而应答环境胁迫^[18]。本研究发现,外源 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 时,随着胁迫程度加

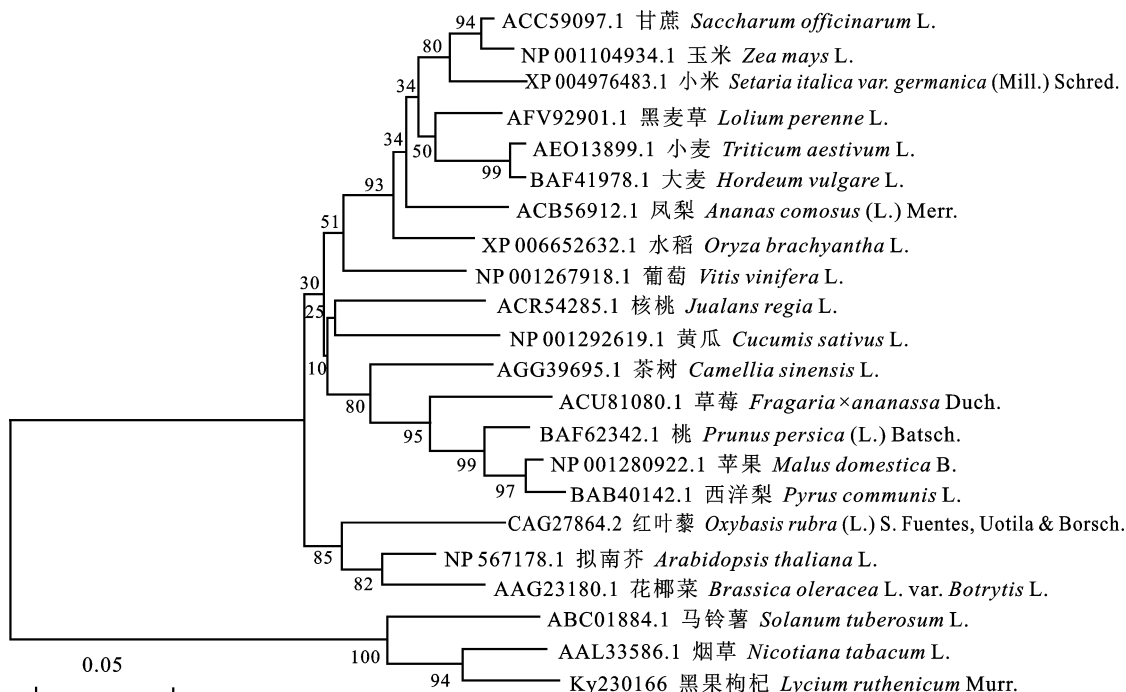
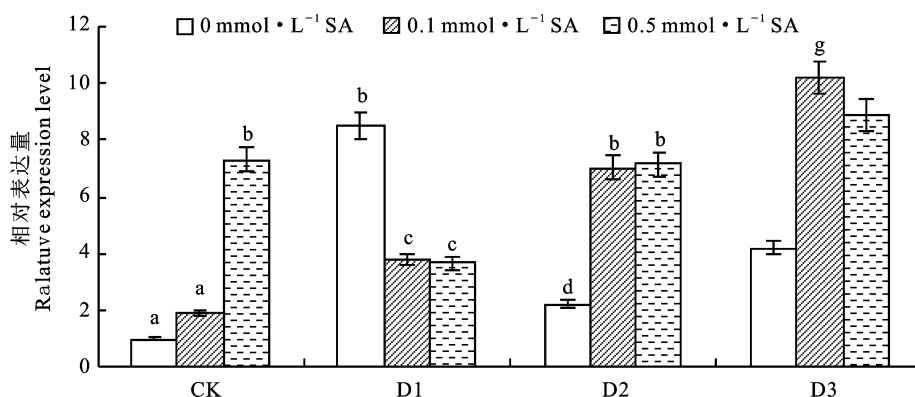


图 7 不同植物 PIPs 蛋白质序列基因树

Fig. 7 Phylogentic tree constructed by PIPs protein sequence in plant

不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments at 0.05 level

图 8 干旱和水杨酸处理下黑果枸杞 *LrPIP1* 基因相对表达量Fig. 8 Expression analysis of *LrPIP1* gene in *L. ruthenicum* under water stress and exogenous SA

深, *LrPIP1* 基因相对表达量呈现线性递增且差异显著 ($P < 0.05$); 外源喷施 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 时, *LrPIP1* 基因相对表达量较 CK 显著增加 ($P < 0.05$)。结果说明 *LrPIP1* 基因的相对表达受到外源 SA 的影响, 推测外源 SA 可引起 *LrPIP1* 基因在细胞内的重定位, 使其在重度胁迫下大量表达。综合表明, 轻度胁迫下黑果枸杞具有一定的耐逆性, 重度胁迫下外源 SA 可诱导 *LrPIP1* 基因大量表达, 增强黑果枸杞的抗旱性。

3 讨论

干旱胁迫会严重影响黑果枸杞的生长、结实, 从而对黑果枸杞的产量与品质有一定影响。因此, 探究黑果枸杞抗逆基因, 培育抗逆性良好的黑果枸杞品种至关重要。干旱胁迫影响黑果枸杞的生长发育的原因在于能够引起黑果枸杞细胞失水, 水是植物生长发育过程中的重要因子, 水通道蛋白特异的水分运输的通道, 对于植物体内水分

的长距离运输和细胞水分的跨膜运输具有一定促进作用,可调节植物体内和细胞间水分平衡。因此,研究 PIP 在黑果枸杞响应干旱胁迫方面具有重要意义。

该研究通过同源克隆的方法,从黑果枸杞叶中克隆获得黑果枸杞水通道蛋白基因 *LrPIP1* (登录号:KY230166),预测其蛋白的保守域显示,*LrPIP1* 基因有 6 个跨膜区,并且含有 MIPs 蛋白家族保守信号序列和质膜水通道蛋白的特征序列,这是 MIPs 大家族和质膜水通道蛋白的最基本特征。通过亚细胞定位预测,*LrPIP1* 基因位于质膜上,推测可能是与细胞水分运输功能有关,使其更高效地进行细胞水分的调控。*LrPIP1* 与其他植物 PIPs 蛋白质氨基酸序列同源性很高,证明 *LrPIP1* 蛋白为质膜水通道蛋白。在 *LrPIP1* 的 N 端和 C 端都分布着高度保守的 NPA 序列,这种高度保守的结构是水通道蛋白家族的基序,是其功能密切相关的^[19]。

LrPIP1 蛋白二级结构预测结果显示,其是由 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲 3 种结构元件构成。三维结构预测显示 *LrPIP1* 蛋白以 4 个单体形成同源四聚体的形式存在,这种高度保守的结构对保持结构的稳定以及高效准确地行使功能具有重要生物学意义。蛋白质磷酸化是蛋白质翻译后重要的修饰方式,在调控蛋白质的活力与功能、细胞信号转导的过程中具有重要作用。Maurel 等^[20]、Van Wilder 等^[21]研究发现,磷酸化是生物体内 AQPs 调节活性的方式,植物体内的 AQPs 磷酸化主要发生在位于 N 端或 C 端的丝氨酸残基上。在本研究中,*LrPIP1* 蛋白磷酸化位点结果分析显示其主要分布在丝氨酸上,有 4 个丝氨酸位点,推测其可能是蛋白质磷酸化的作用位点。

聚类分析结果表明,黑果枸杞 *LrPIP1* 基因与同科的马铃薯 PIPs 遗传距离最近,而与单子叶植物甘蔗、玉米等亲缘关系相对较远,此聚类结果符合遗传进化的关系,亲缘关系近的物种同源性较高,亲缘关系相对较远的物种同源性则较低。

前有研究证明水通道蛋白可调控植物水分运输,水分胁迫诱导 PIPs 的上调表达也可抑制表达^[22]。Barrieu 等^[23]研究发现,在轻度干旱胁迫下,花椰菜 (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* L.) 细胞中水通道蛋白 BobTIP26-1 基因在失水、复水中都具有调控作用;Mahdiah 等^[24]研究发现,烟草 NtPIP1;1 和 NtPIP2;1 基因的转录水平

在干旱胁迫下明显下调,而 *NtAQP1* 基因的转录水平则有所上调;干旱胁迫下 5 种苹果矮化砧木的水通道蛋白基因 *PIPs* (MpPIP1;1、MpPIP2;1),既有上调表达,也有下调表达^[25];干旱胁迫诱导黄瓜叶细胞中质膜水通道蛋白表达上调^[26]。香蕉 (*Musa acuminata* L.) 叶和根中, MaPIP1;1 基因相对表达量随着土壤含水量的减少呈递增的趋势,但在重度胁迫下表达量下降,低于轻、中度胁迫处理但高于对照^[27],这与本试验中 *LrPIP1* 基因在干旱胁迫下相对表达量的变化情况相同。研究发现,黑果枸杞 *LrPIP1* 基因在轻度胁迫 D1 下显著上调表达,中度 D2、重度胁迫 D3 下 *LrPIP1* 基因表达呈现下调趋势,但仍高于对照 CK。

已有众多研究证明,植物激素(包括脱落酸、生长素、水杨酸和赤霉素)可以调控水通道蛋白的表达。例如:水稻 OsPIP2;6 基因表达受到 GA、IAA、ABA 的诱导^[28],白桦幼树叶中 FPS 在 Me-JA 和 SA 处理下表达上调^[29]。已有研究表明,水杨酸可作为信号分子协助 AM 真菌促进水稻多胺代谢,提高水稻低温抗性^[30];张静等^[31]发现,外源 SA 处理下,水稻叶中 OsAQP 基因表达上调,相对表达量是正常对照 CK 的 2.93 倍。目前关于干旱胁迫下黑果枸杞 PIPs 基因相对表达量对外源水杨酸的响应相关研究较少,本研究发现外源 SA 处理可诱导 *LrPIP1* 基因的相对表达,在轻度胁迫下,外源喷施 SA 诱导 *LrPIP1* 基因表达下调,在中、重度胁迫下,SA 可诱导 *LrPIP1* 基因表达量上调,且重度胁迫下上调最多;与无外源 SA 处理情况下干旱胁迫诱导 *LrPIP1* 基因表达量结果不同,推测可能是黑果枸杞可以抵御轻度的干旱胁迫,而外源 SA 诱导 *LrPIP1* 蛋白的重定位导致结果不同,但其具体的调控机理还待进一步研究。

综上所述,轻度干旱胁迫下黑果枸杞具有一定的抗旱性,上调 *LrPIP1* 基因以适应逆境胁迫;但在中、重度胁迫下,黑果枸杞叶细胞中 *LrPIP1* 基因呈现下调趋势;外源 SA 处理可诱导黑果枸杞叶 *LrPIP1* 表达上调,水杨酸诱导 H_2O_2 积累导致细胞膜发生去极化导致细胞膜的透性改变,引起电导率升高、气孔关闭,然而 PIPs 有转运 H_2O_2 的能力,从而增强黑果枸杞的耐旱性。关于水通道蛋白调控机理,运动轨迹以及水杨酸对其表达量变化的直接作用机理等仍需进一步研

究,以期为该基因在响应水分亏缺等非生物胁迫中的深层次机制提供重要的前期参考。

致谢:感谢新疆师范大学“十三五”校级重点学科生物学学科资助。该研究得到新疆师范大学沙漠藻研究院的大力支持和帮助,在此表示衷心的感谢。

参考文献 Reference:

- [1] SINGH R K, DESHMUKH R, MUTHAMILARASAN M, *et al.* Versatile roles of aquaporin in physiological process and stress tolerance in plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 149: 178-189.
- [2] KAPILAN R, VAZIRI M, ZWIAZEK J J. Regulation of aquaporins in plants under stress[J]. *Biological Research*, 2018, 51(1): 4.
- [3] MAUREL C, BOURSIAIC Y, LUU D T, *et al.* Aquaporins in plants[J]. *Physiological Reviews*, 2015, 95(4): 1321-1358.
- [4] 唐思如, 王铁娟. 干旱胁迫下白沙蒿 *SIP2-1* 的表达和序列分析[J]. 内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版), 2020, 49(5): 447-452.
TANG S R, WANG T J. Analysis of sequence and expression of *SIP2-1* in *Artemisia sphaerocephala* under drought stress[J]. *Journal of Inner Mongolia Normal University (Natural Science Edition)*, 2020, 49(5): 447-452.
- [5] 李青云. 普通烟草中水通道蛋白基因家族的鉴定和转录组分析[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2020.
LI Q Y. Genome-wide identification and transcriptome analysis of aquaporin gene family in *Nicotiana tabacum* [D]. Tai'an Shandong: Shandong Agricultural University, 2020.
- [6] 周启政. 野生大豆 *GsPIP1-4* 基因提高大豆耐旱性的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
ZHOU Q ZH. Studies on the *GsPIP1-4* gene from wild soybean (*Glycine soja* L.) enhanced drought tolerance in soybean (*Glycine max* L.) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [7] 徐 德, 徐建俊, 李 彪, 等. 植物水通道蛋白研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(14): 4674-4678.
XU D, XU J J, LI B, *et al.* Research advances for plant aquaporins[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(14): 4674-4678.
- [8] UEHLEIN N, OTTO B, HANSON, *et al.* Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability[J]. *Plant Cell*, 2008, 20(3): 648-657.
- [9] SARDA X, TOUSCH D, FERRARE K, *et al.* Two *TIP*-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells[J]. *Plant Journal*, 1997, 12(5): 1103-1111.
- [10] 杜爽爽, 张玉玲, 田书军, 等. 小麦水通道蛋白基因 *TaTIP1-1c-4BL* 的克隆与表达分析[J]. 西北农业学报, 2020, 29(12): 1-9.
- [11] DU SH SH, ZHANG Y L, TIAN SH J, *et al.* Cloning and expression analysis of wheat aquaporin gene *TaTIP1-1c-4BL* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2020, 29(12): 1-9.
- [12] 彭静静, 张 静, 王美娜, 等. 过表达水稻 OsAQP 增强转基因拟南芥耐盐性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(6): 678-686.
PENG J J, ZHANG J, WANG M N, *et al.* Overexpression of rice OsAQP enhances salt tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 35(6): 678-686.
- [13] 李 进, 李淑珍, 冯 文, 等. 黑果枸杞叶总黄酮的体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(13): 259-262.
LI J, LI SH ZH, FENG W, *et al.* In vitro antioxidant and free radical scavenging activities of total flavonoids from the leaves of *Lycium ruthenicum* Murr. [J]. *Food Science*, 2010, 31(13): 259-262.
- [14] 可 静, 李 进, 吕海英, 等. 不同条件下黑果枸杞叶片气孔开度和超微结构的变化[J]. 干旱区研究, 2017, 34(6): 1362-1370.
KE J, LI J, LÜ H Y, *et al.* Change of stomatal aperture and ultrastructure on *Lycium ruthenicum* Murr. leaves under different conditions[J]. *Arid Zone Research*, 2017, 34(6): 1362-1370.
- [15] 焦志军. 大针茅干旱胁迫下 qRT-PCR 内参基因的筛选及 *PIP2s* 基因的表达分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
JIAO ZH J. Selection of reference gene of *Stipa grandis* in qRT-PCR under drought stress and analysis of expression of *PIP2s* gene [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014.
- [16] ARON M B, LU S, ANDERSON J B, *et al.* CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39: 225-229.
- [17] COUR T L, KIEMER L, MOLGAARD A, *et al.* Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals[J]. *Protein Engineering Design & Selection*, 2004, 17(6): 527-536.
- [18] KONSTANTIN A, LORENZA B, K JÜRGEN, *et al.* The Swiss-Model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195-201.
- [19] MARTINIERE, ALEXANDRE, LI X, *et al.* Salt stress triggers enhanced cycling of *Arabidopsis* root plasma-membrane aquaporins[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7(4): 529-532.
- [20] TORNROTH-HORSEFIELD S, WANG Y, HEDFALK K. Structural mechanism of plant aquaporin gating[J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 688-694.
- [21] MAUREL C, VERDOUCQ L, LUU D T. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated func-

- tions[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 595-624.
- [21] VAN WILDER V, MIECIELICA U, DEGAND H, *et al.* Maize plasma membrane aquaporins belonging to the PIP1 and PIP2 subgroups are in vivo phosphorylated[J]. *Plant Cell Physiology*, 2008, 49: 1364-1377.
- [22] 陈露倩, 赖梦霞, 樊怀福, 等. 黄瓜 *PIP2;4* 基因生物信息学及干旱胁迫下的诱导表达分析[J]. 四川农业大学学报, 2020, 38(5): 538-544.
- CHEN L Q, LAI M X, FAN H F, *et al.* Induced expression in drought stress and bioinformatic analysis of *PIP2;4* gene in Cucumber[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2020, 38(5): 538-544.
- [23] BARRIEU F, MARTY-MAZARS D, THOMAS D, *et al.* Desiccation and osmotic stress increase the abundance of mRNA of the tonoplast aquaporin BobTIP26-1 in cauliflower cells[J]. *Planta*, 1999, 209: 77-86.
- [24] MAHDIEH M, MOSTAJERAN A, HORIE T, *et al.* Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2008, 49(5): 801-813.
- [25] 韩晓毓, 张林森, 王俊峰, 等. 不同苹果矮化砧木导水特性与水通道蛋白基因表达对于干旱胁迫的响应[J]. 西北农业学报, 2015, 24(10): 109-117.
- HAN X Y, ZHANG L S, WANG J F, *et al.* Hydraulics characteristic and aquaporin expression of several apple dwarf rootstocks in responses to drought stress[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2015, 24(10): 109-117.
- [26] 禹州. 黄瓜叶片质膜水通道蛋白基因的表达分析与克隆[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2014.
- YU ZH. Expression and cloning of plasma membrane aquaporin gene from cucumber leaf[D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2014.
- [27] XU Y, HU W, LIU J H, *et al.* A banana aquaporin gene, *MaPIP1;1*, is involved in tolerance to drought and salt stresses[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 59.
- [28] 李蝶, 牛向丽, 苗雁文, 等. 水通道蛋白基因 *OsPIP2;6* 的功能分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(15): 3079-3086.
- LI R, NIU X L, MIAO Y W, *et al.* Functional characterization of the plasma intrinsic protein gene *OsPIP2;6* in rice [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(15): 3079-3086.
- [29] 李春晓. MeJA 和 SA 对白桦幼树三萜合成调控及 *FPS* 基因克隆[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.
- LI CH X. Study on triterpenoid biosynthesis regulation in birch saplings by MeJA and SA and the key enzyme gene *FPS* cloning[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2012.
- [30] LIU Y J. Metabolism and interaction of C and N in the arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(3): 903.
- [31] 张静, 梁卫红. 2 种非生物胁迫和 7 种激素对水稻 *Os-AQP* 基因表达的影响[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2016, 44(1): 105-109.
- ZHANG J, LIANG W H. Effects of seven phytohormones and two abiotic stresses on the expression of rice *OsAQP* gene[J]. *Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition)*, 2016, 44(1): 105-109.

Cloning and Identification of *LrPIP1* Gene of *Lycium ruthenicum* and Effect of Exogenous SA on Its Expression under Drought Stress

MA Yonghui¹, LI Jin¹ and KE Jing²

(1. Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conversation and Regulatory, Key Laboratory of Plant Stress Biology in Arid Land, College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi Xinjiang 830054, China;

2. Urumqi 13th Middle School, Urumqi Xinjiang 830000, China)

Abstract Plasma membrane intrinsic proteins (PIPs) is an essential multifunctional protein involved in many physiological activities of plants. To investigate the role of *Lycium ruthenicum* Murr. PIP gene in response to drought stress. In this study, we cloned a PIP gene in *Lycium ruthenicum* Murr. named as *LrPIP1*. Bioinformatics were used to systematically analyze characteristics and phylogeny, predict secondary and three dimensional protein structure, and construct phylogenetic tree of *LrPIP1* protein. *Lycium ruthenicum* seedlings were treated with drought stress and salicylic acid (SA) in different gradients and the expression levels of *LrPIP1* gene were checked by Real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The results showed that transcripts of *LrPIP1* gene expression were significantly raised under light drought stress compared with CK treatments without SA treatments, and the expression of *LrPIP1* was up-regulated compared with CK under moderate and severe stresses and down-regulated significantly compared with CK. Under drought stress, SA can regulate the expression of *LrPIP1* gene, compared with CK the transcripts of which were down-regulated under mild drought stress, but up-regulated under moderate and severe drought stresses, the expression of *LrPIP1* was significantly improved. Taken together, these results demonstrated that the *LrPIP1* gene might play a crucial role in regulating the abiotic stress response in *Lycium ruthenicum*. Thus, this study lays the foundation for further illustrating functions of *LrPIP1* gene.

Key words Aquaporins; *LrPIP1* gene; Drought; *Lycium ruthenicum* Murr.; Salicylic acid

Received 2021-01-22

Returned 2021-04-25

Foundation item Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2014211A041).

First author MA Yonghui, female, master student. Research area: plants adversity physiology. E-mail: 425927013@qq.com

Corresponding author LI Jin, male, professor. Research area: plant stress physiology. E-mail: xjcjlj4@xjnu.edu.cn

(责任编辑:顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)