

# 香石竹水孔蛋白基因的克隆及表达分析

孔维龙, 胡 瑞, 包满珠, 傅小鹏\*

(华中农业大学园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

**摘 要:** 以香石竹 (*Dianthus caryophyllus*) ‘马斯特’为试验材料, 在分析香石竹和石竹转录组数据的基础上克隆得到 10 个水孔蛋白(AQP)基因, 7 个属于 PIP 亚家族, 3 个属于 TIP 亚家族; 其中 *DcaAQP1*、*DcaAQP2*、*DcaAQP3*、*DcaAQP4*、*DcaAQP6*、*DcaAQP8* 和 *DcaAQP10* 在萼片中优势表达, *DcaAQP5* 在茎和花瓣中优势表达, *DcaAQP7* 在叶中优势表达, *DcaAQP9* 在各个组织中表达均比较低; 在切花开放萎蔫过程中, *DcaAQP1*、*DcaAQP3* 和 *DcaAQP6* 的表达量从花蕾期开始升高, 半开期达到最高, *DcaAQP4*、*DcaAQP7*、*DcaAQP9* 和 *DcaAQP10* 在盛花期表达量达到最高; *DcaAQP2* 在花蕾期表达量最高, *DcaAQP5* 在开始萎蔫期表达量达到最高, 表明多个 AQP 基因协同作用来维持切花开放萎蔫过程中花瓣细胞水分吸收和营养物质转运。

**关键词:** 香石竹; 水孔蛋白; 基因克隆; 表达分析

**中图分类号:** S 681.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2017) 03-0515-13

## Cloning and Expression Analysis of the Aquaporin Genes in Carnation

KONG Weilong, HU Rui, BAO Manzhu, and FU Xiaopeng\*

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Ten aquaporin genes were cloned from *Dianthus caryophyllus* ‘Master’ based on the analysis from *D. caryophyllus* and *D. chinensis* transcriptome, 7 genes belonged to PIP subfamily and another 3 belonged to TIP subfamily; *DcaAQP1*, *DcaAQP2*, *DcaAQP3*, *DcaAQP4*, *DcaAQP6*, *DcaAQP8* and *DcaAQP10* had advantage expression in sepals, and *DcaAQP5* had predominant expression in stem and petals; *DcaAQP7* had advantage expression in leaves; while the *DcaAQP9* expressed low in all tissues; During the flowers opening and wilting process, the expression levels of *DcaAQP1*, *DcaAQP3* and *DcaAQP6* increased from flower bud stage and to the highest at half bloom stage; *DcaAQP4*, *DcaAQP7*, *DcaAQP9* and *DcaAQP10* expressions were the highest at full bloom stage. *DcaAQP2* had the highest expression at flower bud stage; *DcaAQP5* reached the highest level at the beginning of wilting stage. Indicating multiple AQP genes acted synergistically to maintain the water uptake and nutrients transport during the flowers opening and wilting process.

**Keywords:** carnation; aquaporin; cloning gene; expression analysis

收稿日期: 2016-10-09; 修回日期: 2017-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31000918); 中央高校基本科研业务费专项 (2662015PY052; 2662016PY041)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fuxiaopeng@mail.hzau.edu.cn)

研究发现, 由于花瓣细胞的生长和扩张致使切花开放, 而花瓣细胞的生长与扩张与水孔蛋白(aquaporin, AQP)转运水分进入花瓣细胞密切相关(Harada et al., 2010)。切花的衰老主要是由于花瓣细胞水分代谢失调、营养物质匮乏造成的, 而其中涉及的水分吸收、营养物质运输也都与 AQP 相关, 所以 AQP 作为植物体内的高效水分和小分子运输蛋白被持续关注(Benga, 2012; Li et al., 2015; Azad et al., 2016; Yde et al., 2016)。根据氨基酸序列的相似性、结构特征及其亚细胞定位特点, 植物 AQP 被分为 7 类: 质膜内在蛋白(plasma membrane intrinsic proteins, PIPs), 液泡膜内在蛋白(tonoplast intrinsic proteins, TIPs), 类 Nod26 膜内在蛋白(nodulin 26-like intrinsic proteins, NIPs), 小分子碱性膜内在蛋白(small basic intrinsic proteins, SIPs), 类 GlpF (glycerol facilitator, GIPs)膜内在蛋白(GlpF-like intrinsic proteins, GIPs), 以及最近发现的 HIPs(hybrid intrinsic proteins)和 XIPs(X intrinsic proteins)蛋白(Gustavsson et al., 2005; Postaire et al., 2008; Wudick et al., 2009; Anderberg et al., 2011, 2012; Lopez et al., 2012)。它们在植物水分运输、渗透调节和生长发育等生理活动方面有重要作用(Postaire et al., 2008; Yool & Campbell, 2012)。

目前植物中越来越多的 AQP 同源基因被报道。拟南芥中已鉴定有 35 个 AQP 基因(Johanson et al., 2001), 玉米有 31 个(Chaumont et al., 2001), 水稻有至少 34 个(Guo et al., 2006; Mosa et al., 2012), 大豆有 41 个(Ariani & Gepts, 2015), 马铃薯有 41 个(Venkatesh et al., 2013), 杨树和白菜分别为 65 和 53 个(Gupta & Sankararamakrishnan, 2009; Tao et al., 2014), 咖啡 9 个(Miniussi et al., 2015), 江南卷柏 19 个(Anderberg et al., 2012)。已在橡胶树(王进 等, 2014; Zou, 2015)、枇杷(张燕 等, 2014)、羊草(张旸 等, 2014)、野生毛葡萄(颜培玲 等, 2015)、辣椒(Yin et al., 2015)等多个物种中克隆得到 AQP 基因。在观赏植物中素心蜡梅(方子义 等, 2013)、唐菖蒲(林燕飞 等, 2012)、洋桔梗(丁岳炼 等, 2012)、百合(李红梅 等, 2011b; Tong et al., 2013)、白姜花(丁岳炼 等, 2011)、郁金香(Azad et al., 2012)等也有相关基因的克隆或表达分析的报道。另外, 月季中的 AQP 经研究证明与乙烯调控路径有关, 调控花瓣细胞的扩张(Ma et al., 2008)。栀子花 AQP 与果实的成熟密切相关(Gao & Guo, 2013)。

香石竹(*Dianthus caryophyllus*)是研究切花衰老机制的重要模式植物(Tanase et al., 2012), 但对香石竹 AQP 的研究较少, 仅有 *DcPIP1* 和 *DcPIP2* 基因的相关报道。*DcPIP1* 与花瓣细胞生长与扩张有关(Harada et al., 2010), *DcPIP2* 在香石竹切花的叶片、茎颈部、花瓣、雌蕊、雄蕊和萼片中均有表达, 在雌蕊中表达量最高(李红梅 等, 2011a)。与其他植物相比, 香石竹的 AQP 没有被完全鉴定, 而且其组织表达情况以及切花开放和萎蔫过程中表达规律的全面细致的研究尚未见报道。本研究利用本地 BLAST 程序对香石竹(Tanase et al., 2012)和石竹转录组进行了 BLASTn 分析, 对 AQP 基因进行了鉴定, 对得到的 AQP 基因进行了聚类与特征分析, 深入全面分析其不同组织中表达和花瓣开放衰老过程中的表达规律。为香石竹和其他鲜切切花保鲜研究提供一定的理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

以香石竹‘马斯特’(Master)为研究材料, 将其种植于华中农业大学花卉基地(中国, 武汉), 采用常规栽培管理措施。

2014 年 3 月, 选择健壮无病害的单株, 取其叶片、茎段和花朵混合样液氮速冻,  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用, 用于总 RNA 提取, 反转录后用于后期 AQP 基因的全长克隆。

2014 年 3 月选取处于花蕾期的香石竹, 分离茎、叶、萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊; 2014 年 5 月取 60 枝花蕾期‘马斯特’切花插于纯净无菌水中, 分别取 6 个时期花瓣, 所有样品以液氮速冻,  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用, 用于后期 AQP 的表达量分析。

## 1.2 生物信息学分析

### 1.2.1 香石竹 AQP 基因的确

以拟南芥 *AtPIP1;1* (NCBI No: CAB71073)、*AtTIP1;1* (NCBI No: AAD31569)、*AtNIP1;1* (NCBI No: CAA16760)、*AtSIP1;1* (NCBI No: AAF26804) 和番茄 *SlXIP1;1* (DDBJ No: AB845635) 为查询序列, 利用本地 BLAST 程序, 对香石竹转录组和石竹转录组进行 BLASTn 搜索。并利用 Pfam 和 SMART 程序对所有检索到的序列进行保守结构域验证, 剔除保守结构域 (NPA motif) 缺失的序列。

### 1.2.2 香石竹 AQP 基因的特征分析

利用 NCBI 网站上的 ORF finder 对 10 个 AQP 进行编码区序列分析; 用 DNAMAN 软件进行多序列比对分析; 利用 MEGA5 软件将香石竹 10 个 AQP 氨基酸序列与拟南芥 AQP 的氨基酸序列进行 Clustal W 序列比对, 使用 Neighbor-joining Tree 进化树算法构建系统发育树。利用 ProtParam 在线程序预测氨基酸分子量; 利用在线程序 Plant-mPLoc server 进行亚细胞定位预测; 利用 SignalP 4.1 Server 在线程序分析蛋白信号肽; 利用 KinasePhos 在线程序分析蛋白质磷酸化位点; 利用 TMHMM Server v. 2.0 在线程序对跨膜区进行预测。

## 1.3 总 RNA 提取和相关基因 cDNA 全长克隆

用 RNAiso Plus 试剂盒 (宝生物工程有限公司, 大连), 提取香石竹总 RNA。用反转录试剂盒进行 cDNA 第 1 链的合成。将反转录产物使用 ddH<sub>2</sub>O 适当稀释后作为模板进行 RT-PCR 扩增。20  $\mu\text{L}$  反应体系, PCR 反应程序为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 1 min,  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $58 \sim 63^{\circ}\text{C}$  退火 40 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。RT-PCR 扩增终产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (爱思进生物技术有限公司, 杭州) 回收目的片段, 并转化大肠杆菌感受态细胞, 挑选菌落 PCR, 经检测阳性克隆后, 送往武汉擎科创新生物科技有限公司测序。

所用引物均用 Primer 5.0 设计。基因克隆引物根据香石竹和石竹转录组序列设计; 半定量与定量引物根据 DNAMAN 对比结果, 在特异区设计。引物由上海生工合成 (表 1)。

## 1.4 基因表达和含水量测定

以 *DcaGAPDH* 为内参基因对香石竹 10 个 AQP 基因在不同组织中的表达进行半定量 RT-PCR 分析。反应程序为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s, 共 24 ~ 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

参考 Hossaina 等 (2006) 和 Harada 等 (2010) 的方法, 将香石竹切花开放过程分为花蕾期、花朵半开期、花朵全开期、开始萎蔫期、半萎蔫期和完全萎蔫期 6 个时期 (图 1)。采用实时荧光定量 PCR 方法, 对香石竹 10 个 AQP 基因在花开放萎蔫过程中的表达进行分析。实时荧光定量 PCR 的反应体系 10  $\mu\text{L}$ , 按照 TaKaRa SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒说明书进行配制, 每个样品均设置 3 次生物学重复和 3 次技术重复, 在 7500 Fast 实时荧光定量 PCR 系统 (赛默飞, 新加坡) 上进行扩增。扩增程序为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s;  $95^{\circ}\text{C}$  变性 3 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法分析各基因的相对表达量。各个阶段各取 3 朵香石竹切花, 分别称花瓣质量, 于  $80^{\circ}\text{C}$  烘箱烘干后称其干质量, 计算含水量。

表 1 本研究中所用的引物  
Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	基因克隆用引物 Cloning primer	半定量/定量引物 Semi-quantitative/quantitative primer
<i>DcaAQP1</i> -F1	GCACACCCTCATCATCCACAC	TGGATCTTCTGGGTGGGACC
<i>DcaAQP1</i> -R1	GCGGCACAAATTAACAACACTCT	GCGGCACAAATTAACAACACTCTA
<i>DcaAQP2</i> -F1	GAAAATACACATATACACTCCTC	TGGGTTTGCCGTGTTTATGG
<i>DcaAQP2</i> -R1	CCCGAAAATGCAATAAAAACTAAA	GCTTCGGAACGATCCTAGAGC
<i>DcaAQP3</i> -F1	CAATTAATCACAATGACAAAGGAAG	AGTGGGAAGCCCTATGTGGAC
<i>DcaAQP3</i> -R1	TTACTACGGAATGATCCAAGAGC	CCAGTTTGTTTCTTGTGACCGA
<i>DcaAQP4</i> -F1	AACAAACAAACCATTTCTAAACCCT	CCGTAAAGACTACAGCGACCCCT
<i>DcaAQP4</i> -R1	ACCATAACATGCTTCAATTCGG	AATACCGAGAATGCCGACACC
<i>DcaAQP5</i> -F1	AAACCAAACATTTCCAAGCACA	ACCGACCCTAAACGAAGTGCT
<i>DcaAQP5</i> -R1	CAATCAATTCAACGGGGTCTTC	GCCGACCCAGAAGATCCAGT
<i>DcaAQP6</i> -F1	AGAACTCAAACAATGACAAAAGATG	GCAATAGCGGCATTCTACCATC
<i>DcaAQP6</i> -R1	ATAAACTGCAAAGCAAACCCAC	AAACTGCAAAGCAAACCCACAT
<i>DcaAQP7</i> -F1	TGTGAAACGAAGCAAAACAAATGAC	CAGCCGTGACATTCCGGGTTA
<i>DcaAQP7</i> -R1	ATTTACACCCACCCGTACACAGAAC	CGCCACCACCAAAAGTCGT
<i>DcaAQP8</i> -F1	CCAAGAAGGCTAGAGTTGTTAAGAA	CAACATCTTAGCGGGTGGGG
<i>DcaAQP8</i> -R1	GCCAAGTTTACAAGCATTACCC	ATCAACGAGCAGACGAGGGA
<i>DcaAQP9</i> -F1	AGTGGAGAGTTGAGAAAGCCATACC	TTACCCCTTTCGACGATGCC
<i>DcaAQP9</i> -R1	GCGATAATTTAACATCATAACACCCAT	GAGATAAACTCCGCCAGACCC
<i>DcaAQP10</i> -F1	ATGGCAATAGCCTTTGGTAGAT	GCTTCTTGGTGCTGTTGCTGG
<i>DcaAQP10</i> -R1	ATTCATAAGGGTAGAAACATCAAAC	TGTAGACGAGGGCGAATGTGA
<i>DcaGAPDH</i> -F	CGGAAAGTTGACTGGTATGGC	CGGAAAGTTGACTGGTATGGC
<i>DcaGAPDH</i> -R	CATCCTCGGTGTAGCCCAAAT	CATCCTCGGTGTAGCCCAAAT

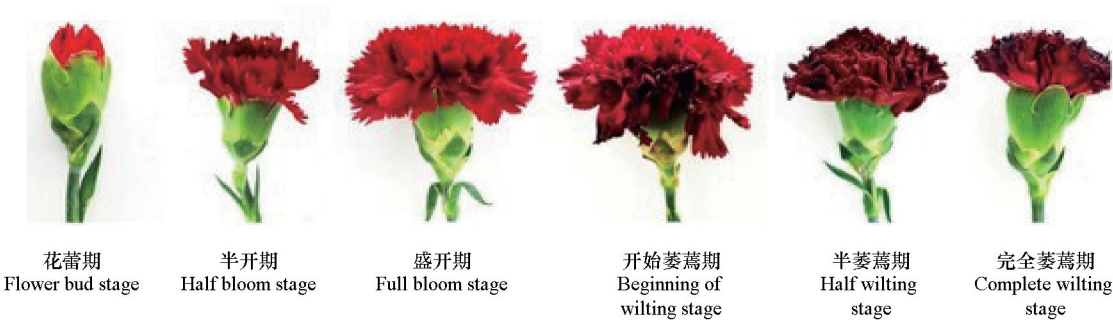


图 1 香石竹切花开放阶段划分  
Fig. 1 Different stages of carnation flowers during the opening process

2 结果与分析

2.1 香石竹 AQP 生物信息学分析

2.1.1 香石竹 AQP 基因的确定

共克隆得到 10 个香石竹 AQP 基因（表 2）。将 10 个 AQP 的预测氨基酸序列与模式植物拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）AQP 氨基酸序列进行聚类分析，10 个 AQP 分别属于 PIP 和 TIP 亚家族，PIP 亚家族又进一步分为 PIP1 和 PIP2 亚类，TIP 亚家族进一步分为 TIP1 和 TIP2 亚类。其中 PIP1 亚类有 *DcaAQP1*，PIP2 亚类有 *DcaAQP2*、*DcaAQP3*、*DcaAQP4*、*DcaAQP5*、*DcaAQP6* 和 *DcaAQP7* 共 6 个基因，TIP1 亚类包含 *DcaAQP8* 和 *DcaAQP9*，TIP2 亚类有 *DcaAQP10*（图 2）。

表 2 香石竹 AQP 基因的确定  
Table 2 Identity of carnation AQP genes

亚家族 Subfamily	亚组 Subgroup	基因名 Gene	转录组序列号 Transcriptome No.	cDNA/bp	ORF/bp	氨基酸数 Total number of amino acid	文献 Reference
PIP	PIP1	<i>DcaAQP1</i>		918	870	289	Harada et al., 2010 李红梅 等, 2011
	PIP2	<i>DcaAQP2</i>		920	858	285	
		<i>DcaAQP3</i>	FX297112.1	873	861	286	
		<i>DcaAQP4</i>	FX297693.1	892	837	278	
		<i>DcaAQP5</i>	FX298065.1	880	843	280	
		<i>DcaAQP6</i>	FX302411.1	873	861	286	
		<i>DcaAQP7</i>		908	888	295	
TIP	TIP1	<i>DcaAQP8</i>	FX296505.1	783	759	252	
	TIP2	<i>DcaAQP9</i>		876	762	253	
		<i>DcaAQP10</i>		744	744	247	

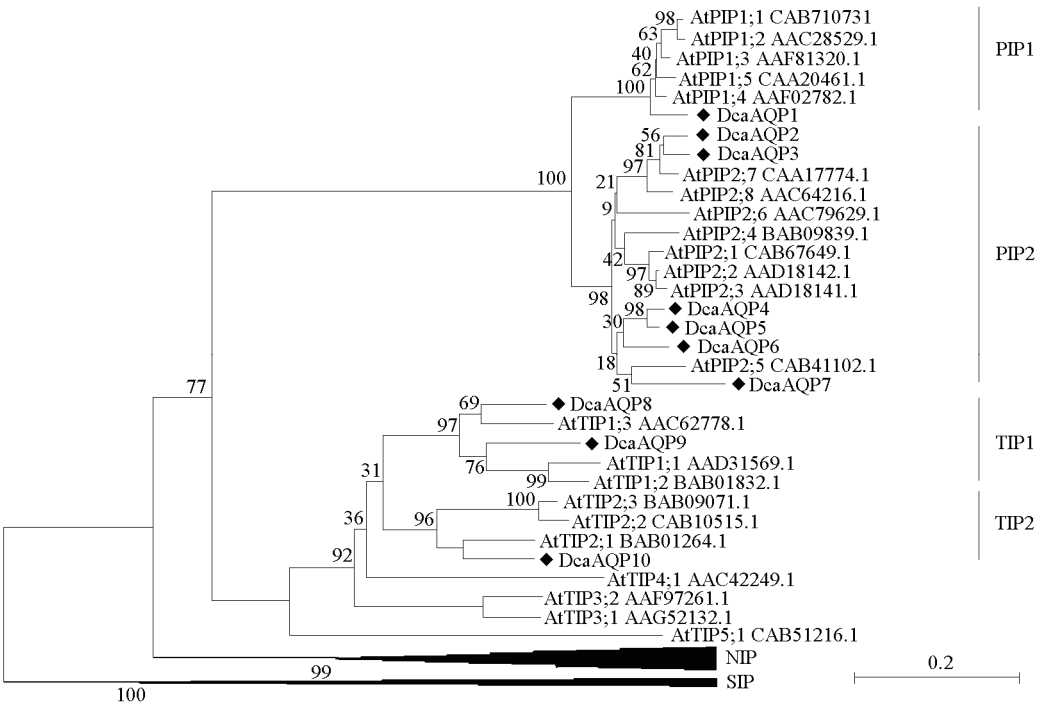


图 2 香石竹 AQP 氨基酸序列聚类分析

图中树枝上的数字表示重复 1 000 次后该树枝可信度的比例。

Fig. 2 Cluster analysis of carnation 10 AQP based on amino acid

The branches in figure showed that the proportion of credibility after repeated 1 000 times.

2.1.2 香石竹 AQP 氨基酸序列对比分析

香石竹的 10 个 AQP 基因都有 AQP 基因家族基因的两个非常保守的 NPA (Asn-Pro-Ala) 基序, 以及 MIP 超家族基因的特征基序 SGXHXNPAVTFG (图 3), 并且 7 个 PIP 类 AQP 都有高等植物 PIP 所特有的两个保守基序 GGGANXXXXGY 和 TGINPARSL/FGAAI/VI (图 3)。

DcaAQP1	MEGKEECVXLGANKYSEKQ.FIGTSAQTKYKFFPAFLFEFEGELKSWSFYRAGIAEFATLFLFYITVTVMGVXKRAFM.....CASVGVGGIAWAFGGMIFALVYC	103
DcaAQP2	...MTREVVEEGG.....HQQCQCGKCYVDPPAPLLDMGELKQWSFYRALIAEFATLFLFYITVTVMGVXKRAFM.....CDGVGLGIAWAFGGMIFALVYC	95
DcaAQP3	...MTREVVEEGG.....HQQCQCGKCYVDPPAPLLDMGELKQWSFYRALIAEFATLFLFYITVTVMGVXKRAFM.....CDGVGLGIAWAFGGMIFALVYC	101
DcaAQP4	...MSXVDEAVT.....RKDYSEFPSPFLDIEELTKWFSFYRALIAEFATLFLFYITVTVMGVXKRAFM.....DCGGVGLGIAWAFGGMIFALVYC	88
DcaAQP5	...MAGGEMEQAAV.....VXLYKDPSPSPFLDIEELTKWFSFYRALIAEFATLFLFYITVTVMGVXKRAFM.....ECGGVGLGIAWAFGGMIFALVYC	90
DcaAQP6	...MTKCVDEAEGG.....PEYSTKCYHDPSPFLDIEELTKWFSFYRALIAEFATLFLFYITVTVMGVXKRAFM.....ECGGVGLGIAWAFGGMIFALVYC	98
DcaAQP7	...MTANVVKSPAT.....GRNYKDPSPSPFLDIEELTKWFSFYRALIAEFATLFLFYITVTVMGVXKRAFM.....ECGGVGLGIAWAFGGMIFALVYC	90
DcaAQP8	...MAVERLEVGSAAISLSPSTFKAAALAEFISMLIFVFAGEGSGMAFAYSKLTENG.....GATPAGLVAAASISHAFALEFVAVSV	75
DcaAQP9	...MFLERISIGRPEEAYVFNILKAGLAEFISTLLIFVFAGEGSGMAFAXLTDGA.....AATPAGLVAAASISHAFALEFVAVSV	75
DcaAQP10	...MAIAFRGFEDESFLASFKAYLAEFISTLLIFVFAGEGSCIAYNKLTADA.....ALSPGLVAVAVCHAFALFVAVAI	72
Consensus	a eef f g f v	
DcaAQP1	TAGSGGHINPAVTGLLLARKLSLIRAVFYIMQCLGAICGAGVVGKGFSPSEYVGGANVNVNPGYTXGDLGAEIVGTFVLYTVFS.ATDAPRSARDSHVFLAFL	212
DcaAQP2	TAGSGGHINPAVTGLFLARKVSLIRALTYMISQCLGAICGAGVVGKGFSPSEYVGGANVNVNPGYTXGDLGAEIVGTFVLYTVFS.ATDAPRSARDSHVFLAFL	204
DcaAQP3	TAGSGGHINPAVTGLFLARKVSLIRAVFYIMQCLGAICGAGVVGKGFSPSEYVGGANVNVNPGYTXGDLGAEIVGTFVLYTVFS.ATDAPRSARDSHVFLAFL	210
DcaAQP4	TAGSGGHINPAVTGLLLGRKLSLIRAVFYIMQCLGAICGAGVVGKGFSPSEYVGGANVNVNPGYTXGDLGAEIVGTFVLYTVFS.ATDAPRSARDSHVFLAFL	197
DcaAQP5	TAGSGGHINPAVTGLLLGRKLSLIRAVFYIMQCLGAICGAGVVGKGFSPSEYVGGANVNVNPGYTXGDLGAEIVGTFVLYTVFS.ATDAPRSARDSHVFLAFL	199
DcaAQP6	TAGSGGHINPAVTGLFLARKVSLIRALTYMISQCLGAICGAGVVGKGFSPSEYVGGANVNVNPGYTXGDLGAEIVGTFVLYTVFS.ATDAPRSARDSHVFLAFL	207
DcaAQP7	TAGSGGHINPAVTGLLLARKLSLIRAVFYIMQCLGAICGAGVVGKGFSPSEYVGGANVNVNPGYTXGDLGAEIVGTFVLYTVFS.ATDAPRSARDSHVFLAFL	199
DcaAQP8	GANSGGHVNPVAVTGALLIGKISLIRAVFYIMQCLGAICGAGVVGKGFSPSEYVGGANVNVNPGYTXGDLGAEIVGTFVLYTVFS.ATDAPRSARDSHVFLAFL	177
DcaAQP9	GANSGGHVNPVAVTGALLIGKISLIRAVFYIMQCLGAICGAGVVGKGFSPSEYVGGANVNVNPGYTXGDLGAEIVGTFVLYTVFS.ATDAPRSARDSHVFLAFL	177
DcaAQP10	GANSGGHVNPVAVTGALLIGKISLIRAVFYIMQCLGAICGAGVVGKGFSPSEYVGGANVNVNPGYTXGDLGAEIVGTFVLYTVFS.ATDAPRSARDSHVFLAFL	174
Consensus	a lsggr nparvlg y q g k e1 tf lvytv a d k f	
DcaAQP1	PIGFVAVFVHLATIPITGTGINFARSLGAATVFNREHANWDCWIFWVGPFAGALAAAYHQCIVIRAFPFKS.GSRSTI.....	289
DcaAQP2	PIGFVAVFVHLATIPITGTGINFARSLGAATVFNREHANWDCWIFWVGPFAGALAAAYHQCIVIRAFPFKS.GSRSTI.....	285
DcaAQP3	PIGFVAVFVHLATIPITGTGINFARSLGAATVFNREHANWDCWIFWVGPFAGALAAAYHQCIVIRAFPFKS.GSRSTI.....	287
DcaAQP4	PIGFVAVFVHLATIPITGTGINFARSLGAATVFNREHANWDCWIFWVGPFAGALAAAYHQCIVIRAFPFKS.GSRSTI.....	278
DcaAQP5	PIGFVAVFVHLATIPITGTGINFARSLGAATVFNREHANWDCWIFWVGPFAGALAAAYHQCIVIRAFPFKS.GSRSTI.....	280
DcaAQP6	PIGFVAVFVHLATIPITGTGINFARSLGAATVFNREHANWDCWIFWVGPFAGALAAAYHQCIVIRAFPFKS.GSRSTI.....	286
DcaAQP7	PIGFVAVFVHLATIPITGTGINFARSLGAATVFNREHANWDCWIFWVGPFAGALAAAYHQCIVIRAFPFKS.GSRSTI.....	294
DcaAQP8	ATGLIVGANILAGGAFSGASMNFAVSFGPAVVS...WTWENHWVYVWGLGPFAGAAIAALYHVFIX...F.DNVEELPSSAR.....	252
DcaAQP9	ATGLIVGANILAGGAFSGASMNFAVSFGPAVVS...WTWENHWVYVWGLGPFAGAAIAALYHVFIX...F.DNVEELPSSAR.....	253
DcaAQP10	ATGLIVGANILAGGAFSGASMNFAVSFGPAVVS...WTWENHWVYVWGLGPFAGAAIAALYHVFIX...F.DNVEELPSSAR.....	247
Consensus	ig v l g npa s g a w w q p g a	

图3 香石竹 AQP 氨基酸序列比对

双线方框内的序列表示 MIP 超家族保守结构域 SGXHXNPAVT；单线方框的序列表示 PIP 亚家族保守结构域 GGGANXXXXGY 和 TGINPARSL/FGAAI/VI；\*\*\*表示 NPA 保守结构域。

Fig. 3 Alignment of amino acids of AQP

SGXHXNPAVT, GGGANXXXXGY and TGINPARSL/FGAAI/VI, the signature sequence of MIP and PIP were in double lines box and single line boxes respectively; The NPA conserved motif were shown with \*\*\*.

## 2.2 香石竹 AQP 基因的全长克隆及编码蛋白理化性质分析

以香石竹混合组织总 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板，扩增得到 10 个香石竹 AQP 基因的编码区全长（表 2，图 4）。10 个 AQP 基因编码的蛋白质分子量在 25.20 ~ 32.69 kD 之间（表 3），理论等电点（pI）介于 5.04 ~ 9.28 之间。除 *DcaAQP4* 编码的蛋白为不稳定蛋白（不稳定系数为 40.83）外，其他 9 个均为稳定蛋白（不稳定系数为 23.49 ~ 39.76）。10 个 AQP 基因编码的蛋白亲水性平均值均为正值，表明它们都属于疏水性蛋白，符合膜蛋白的特征。TIP 类基因编码的蛋白亲水平均值都在 0.8 以上，疏水性明显高于 PIP 类基因编码的蛋白。用 Plant-mPLOC server 软件进行亚细胞定位预测，表明 PIP 亚家族成员主要定位于细胞膜上，而 TIP 亚家族成员定位于液泡膜上。

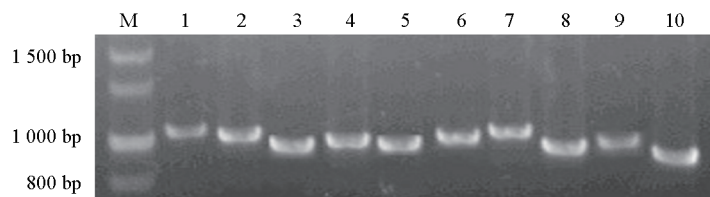


图4 香石竹 10 个 AQP 基因的编码区全长扩增

Fig. 4 Amplification of full-length coding sequences of 10 aquaporin genes

表 3 香石竹 AQP 的理化性质分析  
Table 3 Physical and chemical properties analysis of carnation aquaporins

基因 Gene	分子式 Molecular formula	分子量/kD Molecular weight	pI	不稳定系数 Instability index	亲水性 Grand average of hydropathicity	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>DcaAQP1</i>	C <sub>1427</sub> H <sub>2203</sub> N <sub>365</sub> O <sub>379</sub> S <sub>10</sub>	30.86	9.14	33.17	0.411	细胞膜 Cell membrane
<i>DcaAQP2</i>	C <sub>1418</sub> H <sub>2190</sub> N <sub>364</sub> O <sub>373</sub> S <sub>10</sub>	30.63	9.23	32.06	0.406	细胞膜 Cell membrane
<i>DcaAQP3</i>	C <sub>1436</sub> H <sub>2192</sub> N <sub>366</sub> O <sub>371</sub> S <sub>10</sub>	30.84	9.20	34.64	0.458	细胞膜 Cell membrane
<i>DcaAQP4</i>	C <sub>1385</sub> H <sub>2125</sub> N <sub>341</sub> O <sub>370</sub> S <sub>8</sub>	29.73	8.80	40.83	0.561	细胞膜 Cell membrane
<i>DcaAQP5</i>	C <sub>1407</sub> H <sub>2161</sub> N <sub>349</sub> O <sub>367</sub> S <sub>9</sub>	30.13	9.28	39.76	0.509	细胞膜 Cell membrane
<i>DcaAQP6</i>	C <sub>1434</sub> H <sub>2187</sub> N <sub>359</sub> O <sub>378</sub> S <sub>8</sub>	32.69	7.70	32.53	0.467	细胞膜 Cell membrane
<i>DcaAQP7</i>	C <sub>1465</sub> H <sub>2275</sub> N <sub>369</sub> O <sub>386</sub> S <sub>11</sub>	31.59	9.21	36.98	0.602	细胞膜 Cell membrane
<i>DcaAQP8</i>	C <sub>1212</sub> H <sub>1814</sub> N <sub>289</sub> O <sub>328</sub> S <sub>7</sub>	25.93	5.43	23.49	0.821	液泡膜 Vacuole
<i>DcaAQP9</i>	C <sub>1212</sub> H <sub>1865</sub> N <sub>293</sub> O <sub>328</sub> S <sub>4</sub>	25.92	5.04	24.24	0.860	液泡膜 Vacuole
<i>DcaAQP10</i>	C <sub>1177</sub> H <sub>1792</sub> N <sub>284</sub> O <sub>318</sub> S <sub>6</sub>	25.20	5.76	24.06	0.911	液泡膜 Vacuole

2.3 香石竹 AQP 跨膜区的预测分析和磷酸化分析

10 个 AQP 蛋白均有 6 个跨膜区：H1、H2、H3、H4、H5 和 H6（表 4）。这 10 个 AQP 大多在膜上呈对称分布，含有较长的 N - 末端和较短的 C - 末端。10 个 AQP 都有丝氨酸磷酸化位点，除 *DcaAQP10* 之外均有苏氨酸磷酸化位点；另外 TIP 家族的 3 个成员均有酪氨酸磷酸化，PIP 家族成员只有 *DcaAQP4* 有酪氨酸磷酸化位点。

表 4 香石竹 AQP 各区域的氨基酸数统计和磷酸化分析  
Table 4 Amino acid number statistics for each domain of AQP sequences and Phosphorylation Analysis in carnation

基因 Gene	跨膜结构域及 N - 末端、C - 末端的氨基酸数 Amino acid number of each domain						磷酸化位点 Phosphorylation site		
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	N - 末端 N-terminal	C - 末端 C-terminal	
<i>DcaAQP1</i>	23	23	18	18	23	23	51	12	Y <sub>30</sub> , Y <sub>157</sub> , Y <sub>171</sub> , S <sub>108</sub> , S <sub>127</sub> , S <sub>283</sub>
<i>DcaAQP2</i>	23	23	23	20	23	23	43	16	Y <sub>22</sub> , Y <sub>70</sub> , S <sub>100</sub> , S <sub>119</sub> , S <sub>129</sub> , S <sub>158</sub>
<i>DcaAQP3</i>	23	23	23	20	23	23	49	12	Y <sub>28</sub> , Y <sub>76</sub> , S <sub>24</sub> , S <sub>106</sub> , S <sub>125</sub> , S <sub>164</sub> , S <sub>262</sub>
<i>DcaAQP4</i>	23	23	23	23	23	23	31	16	Y <sub>13</sub> , Y <sub>147</sub> , T <sub>9</sub> , S <sub>14</sub> , S <sub>19</sub> , S <sub>59</sub> , S <sub>93</sub> , S <sub>112</sub> , S <sub>189</sub> , S <sub>274</sub>
<i>DcaAQP5</i>	23	23	23	20	23	23	36	16	Y <sub>15</sub> , S <sub>21</sub> , S <sub>61</sub> , S <sub>64</sub> , S <sub>95</sub> , S <sub>114</sub> , S <sub>191</sub> , S <sub>276</sub>
<i>DcaAQP6</i>	23	23	23	23	23	23	58	14	Y <sub>19</sub> , Y <sub>166</sub> , S <sub>103</sub> , S <sub>122</sub> , S <sub>199</sub>
<i>DcaAQP7</i>	23	23	23	23	23	23	36	31	Y <sub>15</sub> , Y <sub>50</sub> , Y <sub>158</sub> , S <sub>8</sub> , S <sub>61</sub> , S <sub>95</sub> , S <sub>114</sub> , S <sub>277</sub>
<i>DcaAQP8</i>	23	23	23	23	23	23	21	12	Y <sub>244</sub> , T <sub>54</sub> , S <sub>15</sub> , S <sub>99</sub>
<i>DcaAQP9</i>	23	23	23	23	23	23	22	12	Y <sub>15</sub> , T <sub>54</sub> , S <sub>194</sub>
<i>DcaAQP10</i>	23	23	23	23	23	23	19	10	T <sub>127</sub> , S <sub>51</sub> , S <sub>191</sub>

2.4 组织特异性表达分析

如图 5 所示，*DcaAQP1*、*DcaAQP2*、*DcaAQP3*、*DcaAQP5*、*DcaAQP8*、*DcaAQP9* 和 *DcaAQP10* 在叶片、茎、萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊 6 个组织中均有表达；*DcaAQP4* 在茎和 4 轮花器官中均有表达，但在叶中没有表达；*DcaAQP6* 在萼片、雄蕊和雌蕊中特异性表达；*DcaAQP7* 仅在茎和叶中特异性表达。另外，*DcaAQP1*、*DcaAQP2*、*DcaAQP3*、*DcaAQP4*、*DcaAQP6*、*DcaAQP8* 和 *DcaAQP10* 这 7 个基因均在萼片中优势表达；*DcaAQP5* 在花瓣中优势表达；*DcaAQP8* 在除了萼片以外的其他组织中相对表达量均较低；*DcaAQP9* 在各个组织中的表达均较低，在雌蕊中几乎不表达；*DcaAQP10* 在花瓣和雄蕊中优势表达。



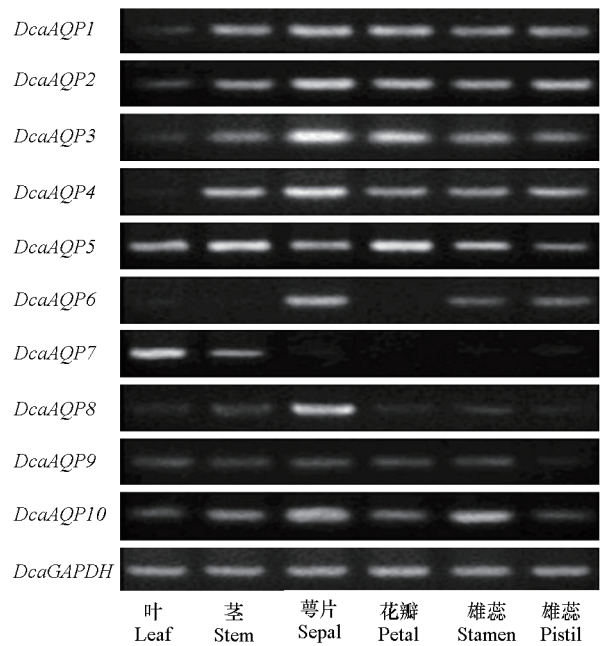


图 5 香石竹 10 个 AQP 基因在香石竹的不同组织中的表达  
Fig. 5 The expression of 10 AQP genes in different tissues of carnation

2.5 切花开放过程中 AQP 基因的表达分析

香石竹 10 个 AQP 在切花开放和萎蔫过程中表达量实时定量 RT-PCR 分析(图 6)表明:*DcaAQP1*、*DcaAQP3* 和 *DcaAQP6* 表达量从花蕾期开始升高,半开期达到最高;而 *DcaAQP4*、*DcaAQP7*、*DcaAQP9* 和 *DcaAQP10* 在盛花期达到最高的表达量;*DcaAQP2* 在花蕾期表达量最高,在随后的几个时期,表达量逐渐降低。*DcaAQP5* 比较特殊,在开始萎蔫期达到最高,*DcaAQP8* 在前 3 个时期表达量差异不大,后 3 个时期表达量亦差异不大,但是前 3 个时期和后 3 个时期呈现阶梯下降表达。

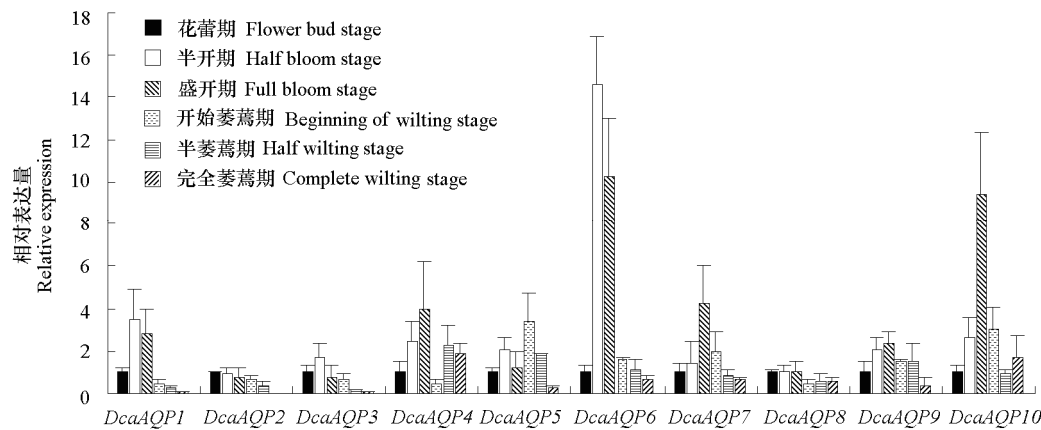


图 6 香石竹花开放萎蔫过程中花瓣 AQP 基因的表达量变化  
Fig. 6 Expression changes of AQP in theflowers during the opening and wilting process



## 2.6 香石竹在切花开放萎蔫过程中的花瓣含水量变化分析

香石竹花瓣的含水量从花蕾期到盛开期呈缓慢上升趋势, 到盛花期时达到最高, 随后萎蔫期开始, 含水量缓慢下降, 至完全萎蔫期迅速下降到 60% 以下。

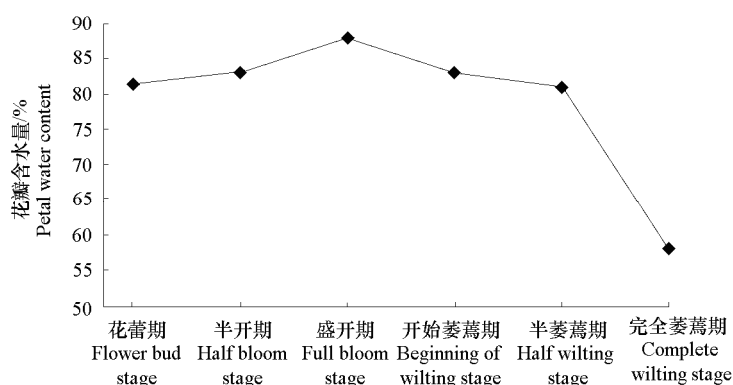


图 7 香石竹切花开放萎蔫过程中的花瓣含水量变化

Fig.7 Changes of moisture content in petals of carnation flowers during the opening and wilting process

## 3 讨论

### 3.1 AQP 的分布及结构特征

AQP 广泛分布于植物中, 在植物中 AQP 的数量是不固定的, 基因重复事件和异缘杂交都能导致 AQP 基因的扩张, 产生新功能、亚功能基因或无功能假基因 (Lynch & Conery, 2000; Flagel & Wendel, 2009; Severing et al., 2009; Magadum et al., 2013)。本研究在分析香石竹和石竹转录组的基础之上共得到 10 个 AQP 基因, 这 10 个基因分属于 PIP 和 TIP 亚家族, 其他亚家族基因暂时未能得到, 究其原因可能是由于转录组选取的材料不全, 有些在根中表达的基因就不存在于转录组数据库中, 也可能其他家族基因表达较少或在特定生长时期、特殊环境 (如外源刺激, 逆境胁迫) 下表达, 由于转录效率低, 所以也不能在转录组数据库中鉴定到 (Venkatesh et al., 2013; Martins et al., 2015)。

对香石竹 10 个 AQP 基因编码的氨基酸序列的疏水区进行预测后, 发现它们都具有 6 个跨膜区, 但是它们的 N - 末端都比 C - 末端长。不同 AQP 的跨膜螺旋结构并不完全相同, 每个跨膜区的氨基酸数目上存在一定差异, 表明香石竹的 10 个 AQP 可能在不同的组织中发挥作用, 参与不同底物的物质运输。此外, Niittylä 等 (2007) 研究发现, 不同的 AQP 中, N - 末端和 C - 末端都有丝氨酸磷酸化位点的存在, 且丝氨酸被磷酸化后可以显著提高水转运活性。本研究中香石竹 10 个 AQP 基因均有丝氨酸磷酸化位点, 这可能与提高水分转运活性有关。

### 3.2 AQP 基因在不同组织的表达情况

AQP 在植物体内具有高效转运水分子的能力, 它们存在于植物体的绝大部分器官和组织之中, 在水分代谢中具有关键作用。不同物种中, AQP 基因表达量最高的部位也不相同。如白姜花 *HcPIP2* 在花梗和苞片中的表达水平最高 (丁岳炼 等, 2011), *EgPIP1;3* 在洋桔梗茎中表达量最高 (丁岳炼 等, 2012), 龙眼在根中表达量最高 (陈虎 等, 2012)。荔枝 4 个 AQP 基因在果皮中大量表达, 2

个 AQP 基因在花中特异表达 (王凌云 等, 2013)。本研究中发现 *DcaAQP2* 基因在各个器官中的表达量为: 萼片 > 雌蕊 > 花瓣/茎 > 雄蕊 > 叶片, 而前人发现 *DcPIP2* 基因 (即本试验中的 *DcaAQP2* 基因) 在各个器官中的表达量为: 雌蕊 > 花瓣 > 雄蕊 > 萼片 > 茎颈部 > 叶片 (李红梅 等, 2011)。两个结果略有不同, 究其原因发现, 本研究中取样于花蕾期, 而前人取样于盛花期。不同时期的差异表明 *DcaAQP2* 在切花整个开放过程和多个组织都起作用, 并且随着花朵的开放, 其优势表达和主要作用的组织有所转移。

本研究中还发现 10 个 AQP 基因在香石竹的叶片、茎、萼片、花瓣、雌蕊和雄蕊中存在表达差异。其中 *DcaAQP1*、*DcaAQP2*、*DcaAQP3*、*DcaAQP5*、*DcaAQP8*、*DcaAQP9* 和 *DcaAQP10* 在 6 个组织中均有表达, 表明这几个 AQP 基因对整个植物的生长发育起组成型作用, 在植物整个生命阶段的生长发育和物质转运中都起着不可或缺的作用。*DcaAQP4* 优势表达于萼片, 在茎中也有较高表达, 表明其可能与香石竹的水分与营养物质的极性运输以及萼片伸展有关。*DcaAQP7* 特异表达于茎和叶组织, 表明其可能是一个重要的水分和物质转运蛋白。*DcaAQP6* 在萼片、雄蕊和雌蕊中特异性表达, 而在叶片和茎中不表达, 表明其特异作用于萼片、雄蕊和雌蕊的生长发育和物质运输, 而不承担营养器官的物质转运功能。

### 3.3 AQP 基因在切花开放萎蔫过程中的表达变化

各个 AQP 基因在同一组织中不同时期的表达变化, 可以推测它们在香石竹花瓣开放萎蔫过程的不同作用。*DcaAQP1*、*DcaAQP3* 和 *DcaAQP6* 表达量从花蕾期开始升高, 半开期达到最高, 盛花期也维持相对较高水平。而这两个阶段切花开放需要巨大的水分供应, 来维持花瓣细胞的膨胀和生长。表明这 3 个基因具有良好的水分运输能力, 涉及花瓣细胞的膨胀与生长。其中, 本研究中的 *DcaAQP1* 基因促进水分进入花瓣细胞, 帮助花瓣细胞膨胀与生长的功能已被 Harada 等 (2010) 利用抑制性消减杂交法证实。在切花半开期到盛花期, *DcaAQP4*、*DcaAQP7*、*DcaAQP9* 和 *DcaAQP10* 表达量逐渐升高, 至盛花期时达到最高表达水平; 而 *DcaAQP1*、*DcaAQP3* 和 *DcaAQP6* 还维持相对较高表达水平; 与此同时, 花瓣含水量在半开期到盛花期这一过程中急剧升高。此外, 香石竹 *DcaAQP9* 基因的同源基因 *RhTIP1;1* 也被证明了涉及月季切花开放过程中的水分转运, 对花瓣细胞的扩张起重要作用 (Xue et al., 2009)。以上结果表明, 切花在不断开放的过程中需要越来越多的水分和营养物质, 而仅 *DcaAQP1*、*DcaAQP3* 和 *DcaAQP5* 这 3 个基因不能满足切花开放过程中的旺盛需求, 需要更多 AQP (*DcaAQP4*、*DcaAQP9* 和 *DcaAQP10*) 的协同作用来完成切花盛开。Fetter (2004) 等已经报道过 AQP 之间协同作用能增强水分转运能力, 如 PIP1 和 PIP2 亚家族成员形成异源四聚体能促进水分运输作用 (Fetter et al., 2004; Zelazny et al., 2007, 2009)。爪蟾卵母细胞试验也证明了 PIP1 和 PIP2 异源四聚体能使原来无水分渗透性的 PIP1 水分渗透性增强、运输能力提高 (Daniels et al., 1994; Yamada et al., 1995; Chaumont et al., 2000; Yaneff et al., 2014)。另外, *DcaAQP2* 在花蕾期表达量最高, 而在随后的几个时期, 表达量逐渐降低。表明 *DcaAQP2* 可能涉及早期花蕾的发育, 对营养物质吸收和转运起重要作用。*DcaAQP5* 比较特殊, 它在开始萎蔫期 (大部分 AQP 家族基因开始下调表达时), 其表达量达到最高, 表明 *DcaAQP5* 可能与切花形态的维持、花瓣质地保持和水分的吸收有关。这些结果说明, 在香石竹切花盛开萎蔫的过程, 各 AQP 基因既有协同互作, 又有部分基因在特定时期和阶段其关键作用。

## References

- Anderberg H I, Danielson J A, Johanson U. 2011. Algal MIPs, high diversity and conserved motifs. BMC Evolutionary Biology, 11 (1): 1 - 15.

- Anderberg H I, Kjellbom P, Johanson U. 2012. Annotation of *Selaginella moellendorffii* major intrinsic proteins and the evolution of the protein family in terrestrial plants. *Frontiers in Plant Science*, 3 (33): 1 – 14.
- Ariani A, Gepts P. 2015. Genome-wide identification and characterization of aquaporin gene family in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 290 (5): 1771 – 1785.
- Azad A K, Ahmed J, Alum M A, Hasan M M, Ishikawa T, Sawa Y, Katsuhara M. 2016. Genome-wide characterization of major intrinsic proteins in four grass plants and their non-aqua transport selectivity profiles with comparative perspective. *PLoS ONE*, 11 (6): 1 – 30.
- Azad A K, Yoshikawa N, Ishikawa T, Sawa Y, Shibata H. 2012. Substitution of a single amino acid residue in the aromatic /arginine selectivity filter alters the transport profiles of tonoplast aquaporin homologs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818: 1 – 11.
- Benga G. 2012. On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives). *Molecular Aspects of Medicine*, 33: 514 – 517.
- Chaumont F, Barrieu F, Jung R, Chrispeels M J. 2000. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiology*, 122: 1025 – 1034.
- Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels M J, Jung R. 2001. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiology*, 125 (3): 1206 – 1215.
- Chen Hu, He Xin-hua, Luo Cong, Deng Li-bao, Hu Ying, Li Ming-juan, Yang Li-tao. 2012. Cloning and expression of longan an aquaporin (*DLPIPI*) gene. *Journal of Fruit Science*, 29 (2): 225 – 230. (in Chinese)
- 陈 虎, 何新华, 罗 聪, 邓立宝, 胡 颖, 李明娟, 杨丽涛. 2012. 龙眼水通道蛋白基因 (*DLPIPI*) 的克隆与表达分析. *果树学报*, 29 (2): 225 – 230.
- Daniels M J, Mirkov T E, Chrispeels M J. 1994. The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiology*, 106 (4): 1325 – 1333.
- Ding Yue-lian, Li Hong-mei, Lin Yan-fei, He Sheng-gen, Huang Xin-min. 2012. Expression analysis of *EgPIPI;3* gene in cut eustoma flowers by semi-quantitative RT-PCR. *Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering*, 25: 6 – 10. (in Chinese)
- 丁岳炼, 李红梅, 林燕飞, 何生根, 黄新敏. 2012. 半定量 RT-PCR 法分析水孔蛋白基因 *EgPIPI;3* 在洋桔梗切花中的表达. *仲恺农业工程学院*, 25: 6 – 10.
- Ding Yue-lian, Lin Yan-fei, He Sheng-gen, Li Hong-mei. 2011. Cloning and expression analysis of *HcPIP2* from cut *Hedychium coronarium*. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (Supplement): 2618 – 2618. (in Chinese)
- 丁岳炼, 林燕飞, 何生根, 李红梅. 2011. 白姜花切花 *HcPIP2* 基因的克隆及表达分析. *园艺学报*, 38 (增刊): 2618 – 2618.
- Fang Zi-yi, Song Xiao-xi, Zhao Shi-ping, Wang Qian-li, Zhao Kai-ge, Chen Long-qing. 2013. Cloning and sequence analysis of aquaporin gene in *Chimonanthus praecox* cv. Lutelus. *Northern Horticulture*, (21): 99 – 104. (in Chinese)
- 方子义, 宋晓惜, 赵世萍, 王倩丽, 赵凯歌, 陈龙清. 2013. 素心蜡梅水孔蛋白基因的克隆与序列分析. *北方园艺*, (21): 99 – 104.
- Fetter K, van Wilder V, Moshelion M, Chaumont F. 2004. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell*, 16: 215 – 228.
- Flagel L E, Wendel J F. 2009. Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytologist*, 183: 557 – 564.
- Gao L, Guo YJ. 2013. Isolation of a fruit ripening-related tonoplast aquaporin (*GjTIP*) gene from *Gardenia jasminoides*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19 (4): 555 – 561.
- Guo L, Wang Z Y, Lin H, Cui W E, Chen J, Liu M, Chen Z L, Qu L J, Gu H. 2006. Expression and functional analysis of the rice plasma-membrane intrinsic protein gene family. *Cell Research*, 16 (3): 277 – 286.
- Gupta A B, Sankararamkrishnan R. 2009. 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*, 9 (1): 1 – 28.
- Gustavsson S, Lebrun A S, Nordén K, Chaumont F, Johanson U. 2005. A novel plant major intrinsic protein in *Physcomitrella patens* most similar to bacterial glycerol channels. *Plant Physiology*, 139: 287 – 295.
- Harada T, Yorri Y, Morita S, Masumura T, Satoh S. 2010. Differential expression of genes identified by suppression subtractive hybridization in petals of opening carnation flowers. *Journal of Experimental Botany*, 61: 2345 – 2354.

- Hossaina Z, Mandal A K A, Datta S K, Biswas A K. 2006. Decline in ascorbate peroxidase activity-a prerequisite factor for tepal senescence in gladiolus. *Plant Physiology*, 163: 186 – 194.
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Frayssé L, Weig A R, Kjellbom P. 2001. 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*, 126 (4): 1358 – 1369.
- Li Hong-mei, Ding Yue-lian, Huang Xin-min, Lin Yan-fei, Zou Jie-yun, He Sheng-gen. 2011b. Cloning and characterization of aquaporin gene *DcPIP2* in cut carnations. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (11): 2199 – 2208. (in Chinese)  
李红梅, 丁岳炼, 黄新敏, 林燕飞, 邹洁云, 何生根. 2011b. 香石竹切花水孔蛋白基因 *DcPIP2* 的克隆及特征分析. *园艺学报*, 38 (11): 2199 – 2208.
- Li Hong-mei, Ding Yue-lian, Lin Yan-fei, Chen Wei-wen, Huang Xin-min, He Sheng-gen. 2011a. Cloning and bioinformatics analysis of a tonoplast aquaporin gene *LITIP2* in *Lilium longiflorum*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 32 (10): 1868 – 1872. (in Chinese)  
李红梅, 丁岳炼, 林燕飞, 陈伟文, 黄新敏, 何生根. 2011a. 麝香百合液泡膜水孔蛋白基因 *LITIP2* 的克隆及生物信息学分析. *热带作物学报*, 32 (10): 1868 – 1872.
- Li J, Yu G, Sun X, Liu Y, Liu J, Zhang X, Jia C, Pan H. 2015. *AcPIP2*, a plasma membrane intrinsic protein from halophyte *Atriplex canescens*, enhances plant growth rate and abiotic stress tolerance when overexpressed in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 34 (8): 1401 – 1415.
- Lin Yan-fei, Ding Yue-lian, Huang Xin-min, Wang Cong, He Sheng-gen, Li Hong-mei. 2012. Cloning and analysis of the *GhTIP1* promoter from *Gladiolus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (Supplement): 2742. (in Chinese)  
林燕飞, 丁岳炼, 黄新敏, 王 聪, 何生根, 李红梅. 2012. 唐菖蒲切花 *GhTIP1* 基因及其启动子的克隆与分析. *园艺学报*, 39 (增刊): 2742.
- Lopez D, Bronner G, Brunel N, Auguin D, Bourgerie S, Brignolas F, Carpin S, Tournaire-Roux C, Maurel C, Fumanal B, Martin F, Sakr S, Label P, Julien J L, Gousset-Dupont A, Venisse J S. 2012. Insights into populus XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. *Journal of Experimental Botany*, 63: 2217 – 2230.
- Lynch M, Conery J S. 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290: 1151 – 1155.
- Ma N, Xue J, Li Y, Liu X, Dai F, Jia W, Luo Y, Gao J. 2008. *Rh-PIP2; 1*, a rose aquaporin gene, is involved in ethylene-regulated petal expansion. *Plant Physiology*, 148 (2): 894 – 907.
- Magadum S, Banerjee U, Murugan P, Gangapur D, Ravikesavan R. 2013. Gene duplication as a major force in evolution. *Journal of Genetics*, 92: 155 – 161.
- Martins Cde P, Pedrosa A M, Du D, Gonçalves L P, Yu Q, Gmitter F G Jr, Costa M G. 2015. Genome-wide characterization and expression analysis of major intrinsic proteins during abiotic and biotic stresses in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.). *PLoS ONE*, 10 (9): 1 – 17.
- Miniussi M, Del Terra L, Savi T, Pallavicini A, Nardini A. 2015. Aquaporins in *Coffea arabica* L.: identification, expression, and impacts on plant water relations and hydraulics. *Plant Physiology and Biochemistry*, 95: 92 – 102.
- Mosa K A, Kumar K, Chhikara S, Mcdermott J, Liu Z, Musante C, White J C, Dhankher O P. 2012. Members of rice plasma membrane intrinsic proteins subfamily are involved in arsenite permeability and tolerance in plants. *Transgenic Research*, 21 (6): 1265 – 1277.
- Niittylä T, Fuglsang A T, Palmgren M G, Frommer W B, Schulze W X. 2007. Temporal analysis of sucrose-induced phosphorylation changes in plasma membrane proteins of *Arabidopsis*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6 (10): 1711 – 1726.
- Postaire O, Verdoucq L, Maurel C. 2008. Aquaporins in plants: from molecular structures to integrated functions. *Advances in Botanical Research*, 46: 75 – 136.
- Severing E I, van Dijk A D, Stiekema W J, van Ham R C. 2009. Comparative analysis indicates that alternative splicing in plants has a limited role in functional expansion of the proteome. *BMC Genomics*, 10: 154.
- Tanase K, Nishitani C, Hirakawa H, Isobe S, Tabata S, Ohmiya A, Onozaki T. 2012. Transcriptome analysis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) based on next-generation sequencing technology. *BMC Genomics*, 13 (1): 1 – 11.
- Tao P, Zhong X, Li B, Wang W, Yue Z, Lei J, Guo W, Huang X. 2014. Genome-wide identification and characterization of aquaporin genes (AQPs) in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Molecular Genetics and Genomics*, 289 (6): 1131 – 1145.

- Tong Z, Li Q H, Yang Y J, Dai F W, Gao J P, Hong B. 2013. Isolation and expression analysis of *LoPIP2*, a lily (*Lilium Oriental Hybrids*) aquaporin gene involved in desiccation-induced anther dehiscence. *Scientia Horticulturae*, 164: 316 – 322.
- Venkatesh J, Yu J W, Park S W. 2013. Genome-wide analysis and expression profiling of the *Solanum tuberosum* aquaporins. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73: 392 – 404.
- Wang Jin, An Feng, Cai Xiu-qing, Zou Zhi, Zhang Wei, Lin Wei-fu. 2014. Functional characterization and expression analysis of aquaporin genes (*HbPIP1* and *HbPIP2*) in *Hevea brasiliensis*. *Scientia Silvae Sinicae*, 50: 69 – 75. (in Chinese)
- 王 进, 安 锋, 蔡秀清, 邹 智, 张 薇, 林位夫. 2014. 橡胶树水通道蛋白基因 *HbPIP1* 和 *HbPIP2* 的功能鉴定及其表达分析. *林业科学*, 50: 69 – 75.
- Wang Ling-yun, Sun Jin-hua, Liu Bao-hua, Wang Jia-bao. 2013. Cloning and tissue specificity expression of the aquaporin genes from litchi. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (8): 1456 – 1464. (in Chinese)
- 王凌云, 孙进华, 刘保华, 王家保. 2013. 荔枝水孔蛋白基因 *LcPIP* 的克隆与组织特异性表达研究. *园艺学报*, 40 (8): 1456 – 1464.
- Wudick M M, Luu D T, Maurel C. 2009. A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytologist*, 184: 289 – 302.
- Xue J, Yang F, Gao J. 2009. Isolation of *Rh-TIP1;1*, an aquaporin gene and its expression in rose flowers in response to ethylene and water deficit. *Postharvest Biology and Technology*, 51: 407 – 413.
- Yamada S, Katsuhara M, Kelly W B, Michalowski C B, Bohnert H J. 1995. A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *The Plant Cell*, 7 (8): 1129 – 1142.
- Yan Pei-ling, Pan Xue-jun, Zhang Wen-e. 2015. Cloning of aquaporin gene *VhPIP1* in *Vitis heyneana* and its expression under drought stress. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (2): 221 – 232. (in Chinese)
- 颜培玲, 潘学军, 张文娥. 2015. 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*, 42 (2): 221 – 232.
- Yanef A, Sigaut L, Marquez M, Alleve K, Pietrasanta L I, Amodeo G. 2014. Heteromerization of PIP aquaporins affects their intrinsic permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (1): 231 – 236.
- Yde J, Moeller H B, Dalsgaard P, Fenton R A. 2016. Involvement of bile acids in regulation of water channel expression in colon epithelial cells. *The FASEB Journal*, 30 (Supplement): 968.
- Yin Y X, Wang S B, Zhang H X, Xiao H J, Jin J H, Ji J J, Jing H, Chen R G, Arisha M H, Gong Z H. 2015. Cloning and expression analysis of *CaPIP1-1* gene in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Gene*, 563 (1): 87 – 93.
- Yool A J, Campbell E M. 2012. Structure, function and translational relevance of aquaporin dual water and ion channels. *Molecular Aspects of Medicine*, 33: 553 – 561.
- Zelazny E, Borst J W, Muyalaert M, Batoko H, Hemminga Chaumont F. 2007. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 12359 – 12364.
- Zelazny E, Micciolica U, Borst J W, Hemminga M A, Chaumont F. 2009. An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins *ZmPIP2;4* and *ZmPIP2;5* to the plasma membrane. *The Plant Journal*, 57: 346 – 355.
- Zhang Yan, Li Juan, Yao Qing, Chen Jie-zhong, Hu You-li. 2014. Cloning of a plasma membrane aquaporin gene *EjPIP1* in *Eriobotrya japonica* leaves and its expression analysis after AM fungi inoculation. *Scientia Agricultura Sinica*, 47 (7): 1387 – 1396. (in Chinese)
- 张 燕, 李 娟, 姚 青, 陈杰忠, 胡义厘. 2014. 枇杷质膜水孔蛋白基因 *EjPIP1* 的克隆及 AM 真菌对其表达的影响. *中国农业科学*, 47 (7): 1387 – 1396.
- Zhang Yang, Sun Tian-xu, Tang Ming-wei, Guo Bo-yu, Xie Li-nan, Li Yu-hua. 2014. Cloning and expression analysis of *LcPIP* cDNA from *Leymus chinensis*. *Plant Physiology Journal*, 50 (10): 1585 – 1592. (in Chinese)
- 张 阳, 孙天旭, 汤明威, 郭勃予, 解莉楠, 李玉花. 2014. 羊草水孔蛋白基因 *LcPIP* 的克隆与表达分析. *植物生理学报*, 50 (10): 1585 – 1592.
- Zou Z, Gong J, An F, Xie G, Wang J, Mo Y, Yang L. 2015. 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. *BMC Genomics*, 16 (1): 1 – 18.