

研究报告 Original Papers

杜梨质膜水孔蛋白基因*PbPIP1*的克隆与表达分析

冉昆*, 孙晓莉*, 张勇, 王宏伟, 魏树伟, 王少敏**

山东省果树研究所, 山东泰安271000

摘要: 采用RT-PCR和RACE技术从杜梨(*Pyrus betulifolia*)根系中克隆得到1个质膜内在蛋白(plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)类的水孔蛋白基因全长cDNA序列, 命名为*PbPIP1*。该基因全长为1 297 bp, 包含1个870 bp的完整开放阅读框, 编码289个氨基酸。氨基酸序列分析表明, *PbPIP1*含有水孔蛋白家族高度保守的2个天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸基序(Asn-Pro-Ala, NPA)基序和6个跨膜区, 并具有高等植物特有的PIPs高度保守序列。聚类分析表明该基因编码蛋白属于PIP1亚家族。基因表达分析结果表明, *PbPIP1*在杜梨根、茎、叶中均有表达, 在根中表达量最高, 茎中最低。20% PEG处理时, 该基因在杜梨根系中的表达水平随胁迫时间的延长先上升后降低; 但在4℃低温、100 mmol·L⁻¹ NaCl处理时该基因的表达水平差异不明显。这说明*PbPIP1*可能主要在杜梨根系中发挥作用, 其表达丰度可能与杜梨的抗旱性密切相关。

关键词: 杜梨; 水孔蛋白; 克隆; 表达分析

水孔蛋白, 又称水通道蛋白(aquaporins, AQP), 是植物中定位于细胞核膜区域的小分子跨膜蛋白, 具有丰富的多样性, 其介导的水分跨膜运输是水分进出细胞的主要途径, 在调控植物的水分关系中具有重要作用(Zardoya 2005; 梅杨等2007; 冉昆等2015)。因此, 克隆杜梨与水分代谢密切相关的水孔蛋白基因并研究其功能, 对揭示杜梨的抗逆分子机制具有重要意义。

研究表明, AQPs属于MIP (major intrinsic protein)超家族, 除水分子外, 还允许甘油、CO₂、NH₃、尿素和H₂O₂等小分子溶质通过细胞膜(Zardoya 2005; Maurel等2008)。根据结构和功能的不同, AQPs可分为质膜内在蛋白(plasma membrane intrinsic protein, PIPs)、液泡膜内在蛋白(tonoplasmamembranet intrinsic protein, TIPs)、NOD26-like内在蛋白(NOD26-like intrinsic proteins, NIPs)和小的内在蛋白(small and basic intrinsic proteins, SIPs)等4个亚家族(Maurel等2008; 冉昆等2015)。AQPs与种子萌发、果实成熟和植物的抗逆性等密切相关(Bienert等2006; Kaldenhoff和Fischer 2006; Horie等2011; Maurel等2015)。其中, PIPs类水孔蛋白主要介导水分跨细胞膜的运输, 在维持植物发育过程中的水分平衡和各种逆境胁迫(低温、干旱、盐碱等)下细胞内水分的渗透调节及提高植物的抗逆性等方面具有重要作用(Sade等2010; Hove和Bhave 2011)。但目前对于杜梨质膜水孔蛋白基因的结构和功能未见报道。

为了探明杜梨质膜水孔蛋白的结构及其在逆

境胁迫应答中的作用, 本研究采用RT-PCR和RACE技术克隆了杜梨质膜水孔蛋白*PbPIP1*基因cDNA全长序列, 并对其结构特征、组织表达模式及逆境胁迫下的表达模式进行了分析, 以期为进一步研究该基因的功能及其调控的分子机制奠定基础。

材料与方法

1 材料

杜梨(*Pyrus betulifolia* Bunge)是我国北方广泛分布的梨野生种质资源, 普遍用作梨栽培品种的砧木, 其根系极发达, 对干旱、严寒和水涝等逆境具有较强的耐受性, 是梨矮化砧木和抗性育种中非常重要的亲本(蒲富慎和王宇霖1963; 宗宇等2013)。本试验以具6~8片真叶的杜梨幼苗为试材, 分离*PbPIP1* cDNA序列并进行表达分析。采用20% PEG6000模拟干旱胁迫、4℃低温和100 mmol·L⁻¹ NaCl处理, 分别在处理0、2、4、8、12、24、48和72 h取样, 液氮速冻后于-80℃冰箱保存备用。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5α、DL2000 Plus Marker购自北京全式金生物科技有限公司,

收稿 2015-12-04 修定 2016-04-06

资助 山东省自然科学基金(ZR2015YL075)、山东省农业科学院青年科研基金(2015YQN41)、山东省良种工程项目(梨优质矮化、多抗功能基因挖掘与种质创新利用 2014)、现代农业产业技术体系(CARS-29-31)和山东省果树研究所所长科研基金(2013KY03)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: sdipwsm@163.com)。

dNTP、LA Taq DNA Polymerase、pMD[®] 18-T vector等购自宝生物工程(大连)有限公司, 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品。引物合成及测序由宝生物工程(大连)有限公司完成。

2 总RNA提取及逆转录反应

总RNA的提取采用改进快速CTAB法(Ran等2014), 用DNase I进行纯化。然后用Eppendorf Bio Photometer Plus核酸蛋白测定仪测定RNA含量, 1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性。采用TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (Code No. DRR019S)合成cDNA第一链, 稀释至同一浓度。

3 *PbPIP1*基因的克隆

根据GenBank登录的*PIP*基因的保守序列设计上、下游引物S1和A1 (表1)。以杜梨根系的cDNA为模板, 扩增*PbPIP1*中间片段。在20 μ L反应体系中进行PCR扩增, 扩增程序为: 95°C预变性5 min; 95°C变性45 s, 56°C退火50 s, 72°C延伸1 min, 35个循环; 72°C延伸10 min; 4°C保存。

根据获得的中间片段序列, 设计3' RACE引物F1、F2和5' RACE引物R1、R2 (表1), 分别进行3' RACE和5' RACE扩增, 步骤参照3'-Full RACE Core Set with PrimeScript[™] RTase (Takara, Code No. 6106)和5'-Full RACE Kit (Takara, Code No. 6107)说明。用DNAstar软件进行序列拼接, 获得*PbPIP1*全长cDNA序列。设计引物S2和A2 (表1), 以cDNA为模板进行PCR扩增, 回收产物并测序验证。

表1 PCR扩增及基因表达所用引物

Table 1 Primers used for PCR amplification and expression analysis

引物用途	引物名称	引物序列(5'→3')
扩增中间片段	S1	GGCTCAGACCCAGGACGAA
	A1	CCCAATGAACGGTCCAAC
3' RACE	F1	GCCGTGTTCTTGGTGCAC
	F2	TGGGGCAGCACTTGCAGCT
5' RACE	R1	TGAATCCCGACCGTTGTGC
	R2	ACGTCAGCTCACCGGGCTC
全长扩增	S2	TGGGAACCGCAAATACAT
	A2	GAAGGAATGGAGGGCCCT
qRT-PCR	PbS	ATGGAGGGCAAGGAAGAGG
	PbA	AACAGGAAAGTGGCGATGAA
半定量RT-PCR	PbF	GGAGGGCAAGGAAGAGG
	PbR	ACGAGGGCGAAGATGG
β -actin	ActinF	GGCTCCTCTCAATCCTAAG
	ActinR	TTGGCAGTCTCAAGTCTCT

4 PCR产物的纯化与测序

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 切取目的条带, 回收、纯化后, 连接到pMD18-T克隆载体上, 用热激法导入到DH5 α 感受态细胞中, 进行Amp抗性筛选, 挑选白色菌落, 提取质粒, 经PCR和酶切鉴定后, 将阳性重组质粒送至宝生物工程(大连)有限公司测序。

5 生物信息学分析

用DNAMAN软件预测氨基酸序列并进行氨基酸同源性分析。将核苷酸及氨基酸序列提交至NCBI进行BLAST分析, 检索该基因与其他物种的同源性。通过Conserved Domains Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行蛋白保守域分析。使用Clustal X软件进行氨基酸序列比对, 采用MEGA软件包中的邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树, 校验参数Bootstrap重复1 000次。ProtParam (<http://web.expasy.org/prot-param/>)计算该基因编码蛋白的等电点和分子量。通过WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>)生成logo图谱, 展示保守结构域各位点的保守性。运用SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)软件预测氨基酸序列的二级结构。PrediSi (<http://www.predisi.de/>)预测基因的信号肽。利用SoftBerryProtComp 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic>)进行亚细胞定位预测。TMHMM 2.0软件分析基因的亲水性和预测跨膜结构。

6 基因表达分析

6.1 半定量PCR

根据*PbPIP1*序列设计一对特异引物PbF/PbR (表1), 进行半定量PCR分析。以看家基因 β -actin (GenBank登录号AB190176.1)为内参基因, 设计引物ActinF/ActinR (表1)。调整cDNA模板用量使PCR产物条带亮度一致, 然后进行表达分析。反应程序为: 94°C预变性5 min, 94°C变性30 s, 退火30 s, 72°C延伸45 s, 72°C延伸10 min; 其中, β -actin扩增循环数为28, *PbPIP1*扩增循环数为35。

6.2 实时荧光定量PCR

使用Bio-Rad iQ5荧光定量PCR仪, 采用实时荧光定量PCR (qRT-PCR)对*PbPIP1*的表达量进行分析, 利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据的相对定量分析。以PbS/PbA为*PbPIP1*的扩增引物, β -actin内参引物同

1.6.1 (表1), 反应体系为20 μ L。反应程序: 95°C预变性30 s; 95°C变性5 s, 55°C退火35 s, 72°C延伸30 s, 40个循环, 同时在60~95°C进行融解曲线分析。每个样品进行3次重复。

实验结果

1 *PbPIP1*基因cDNA全长的获得

以杜梨根系cDNA为模板, 用引物S1/A1进行扩增, 获得约770 bp的中间片段(图1-A)。用引物F1/F2

和R1/R2分别进行3' RACE和5' RACE扩增, 分别得到一条大小约300 bp (图1-B)和350 bp (图1-C)的片段, 经过回收、测序、拼接得到基因全长。设计全长引物S2/A2进行扩增, 得到约1 300 bp的条带(图1-D), 回收目的条带, 测序得到1 297 bp的cDNA全长序列, 该基因命名为*PbPIP1*。分析表明, *PbPIP1*cDNA全长序列包含一个870 bp的完整开放阅读框(open reading frame, ORF), 编码289个氨基酸; 3'非编码区及5'非编码区长度分别为257和170 bp。

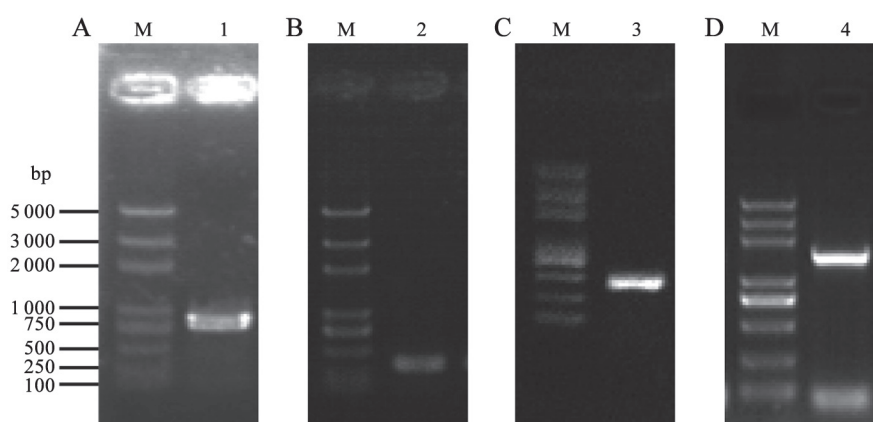


图1 杜梨*PbPIP1*基因扩增结果

Fig.1 PCR product of *PbPIP1* gene from *P. betulifolia*

A: 中间片段扩增; B: 3' RACE; C: 5' RACE; D: 全长cDNA扩增; M: DNA Marker DL2000 Plus; 1: 中间片段序列; 2: 3'序列; 3: 5'序列; 4: 全长cDNA序列。

2 *PbPIP1*基因序列及结构分析

利用ProtParam分析*PbPIP1*编码蛋白的理论等电点(pI)为9.21, 蛋白质分子量为30 861.8 Da, 分子式为 $C_{1433}H_{221}O_{362}N_{387}S_5$, 负电荷氨基酸残基总数(Asp+Glu)为19, 正电荷氨基酸残基总数(Arg+Lys)为24, 不稳定系数为28.78, 是一类稳定蛋白, 亲水性平均数为0.373, 为脂溶性蛋白。SOPMA预测该基因编码蛋白的二级结构, 结果表明, *PbPIP1*含有39.10%的不规则卷曲、25.26%的 α 螺旋、25.95%的延伸链和9.69%的 β 转角。PrediSi分析结果显示该蛋白不含信号肽, 是一类膜蛋白。SoftBerryProtComp 9.0亚细胞定位预测表明, *PbPIP1*定位于质膜上。TMHMM2.0分析表明, *PbPIP1*具有水孔蛋白典型的6个跨膜区(分别位于氨基酸序列第57~79、94~116、136~153、181~198、211~233和259~281位)。

通过Conserved Domains Database (CDD)鉴定蛋白保守结构域, 并在WebLogo中标注。结果表明,

*PbPIP1*含有MIP蛋白家族特有的两个高度保守的NPA (Asn-Pro-Ala)基序, 分别位于N端和C端; 以及主要内在蛋白家族特有的SGGHINPAVT序列和高等植物特有的PIPs高度保守序列GGGANXXXXGY和TGINPARSLGAA (图2), 因此判定*PbPIP1*为质膜内在蛋白。

3 *PbPIP1*同源序列和系统进化分析

利用NCBI Blast检索*PbPIP1*的同源序列, 发现该基因与其他物种PIP核苷酸序列的同源性在76%~99%。其中, 与白梨(*Pyrus bretschneideri*, XM_00935-2611.1)和西洋梨(*Pyrus communis*, AB058679.1)的同源性最高。氨基酸序列的同源性多在85%以上, 其中与白梨(*Pyrus bretschneideri*, XP_009350886.1)的同源性达100%; 与西洋梨(*Pyrus communis*, BAB-40142.1)、碧桃(*Prunuspersica*, BAF62342.1)和草莓(*Fragaria ananassa*, ACU81080.1)同源性依次为99%、96%和90%。氨基酸序列分析结果表明,



图2 PbPIP1氨基酸序列Logo图谱分析

Fig.2 The sequence logo analysis of PbPIP1 by WebLogo

虚线框表示MIP超家族的保守结构域SGXHXNPAVT; 实线框表示质膜水孔蛋白的保守序列GGGANXXXXGY和TGINPARSLGAA; 黑色下划线表示MIP家族特有的NPA基序。

PbPIP1与其他近缘物种具有高度保守的功能域(图3, 黑色区域所示), 进一步说明PbPIP1为水孔蛋白。

利用Clustal X和MEGA软件对PbPIP1和其他近缘物种PIPs氨基酸序列构建系统进化树。结果(图4)显示, 15种不同植物PIPs被聚合为两大类群, 其中PbPIP1与白梨、西洋梨和苹果的亲缘关系较

近, 被聚为一类; 而与胡杨、陆地棉和拟南芥等物种的亲缘关系较远, 被聚为另一类。

4 PbPIP1的表达模式分析

对杜梨不同组织PbPIP1的表达水平进行qRT-PCR分析, 发现PbPIP1在根、茎、叶中均有表达, 为组成型表达, 且在根中表达量最高(图5), 由此可

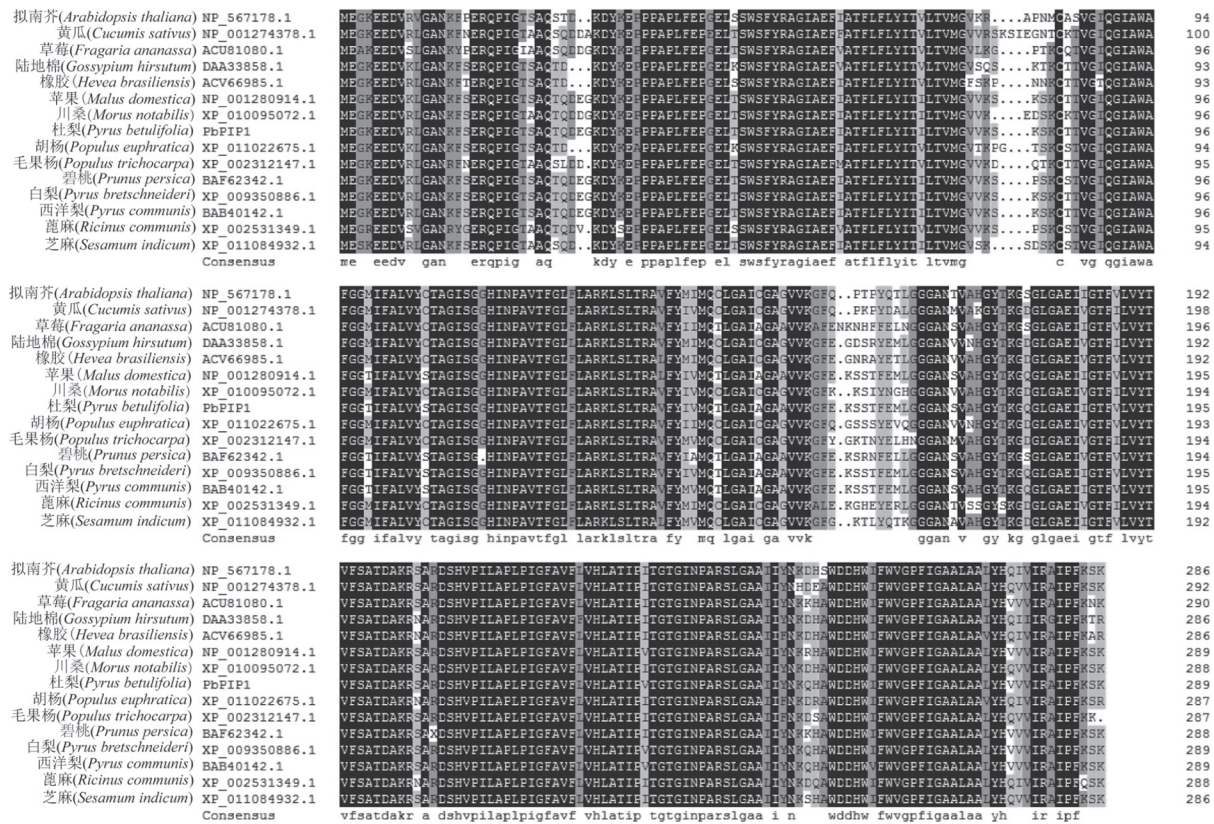


图3 PbPIP1与其它近缘物种氨基酸序列同源性分析

Fig.3 Homology analysis of PbPIP1 amino acid sequence with other PIPs

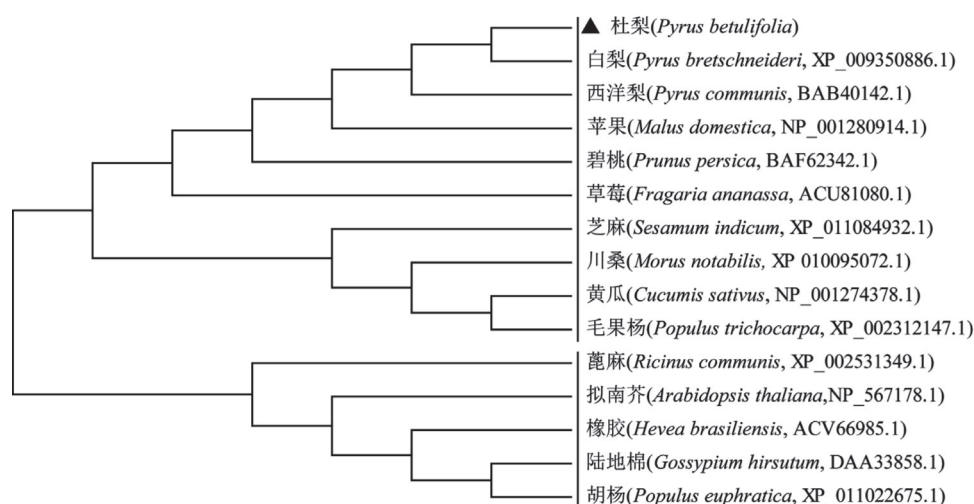
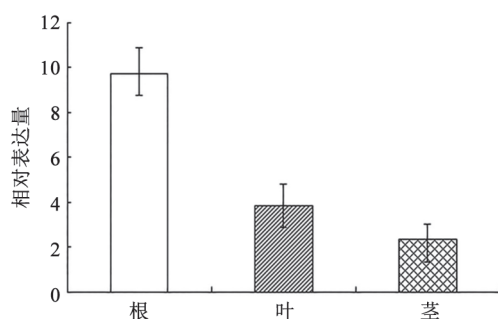


图4 PbPIP1与其他PIPs蛋白的系统进化分析

Fig.4 The phylogenetic tree analysis based on alignment of amino acid between PbPIP1 and other PIPs

图5 *PbPIP1*的组织表达分析Fig.5 Tissue-specific expression analysis of *PbPIP1*

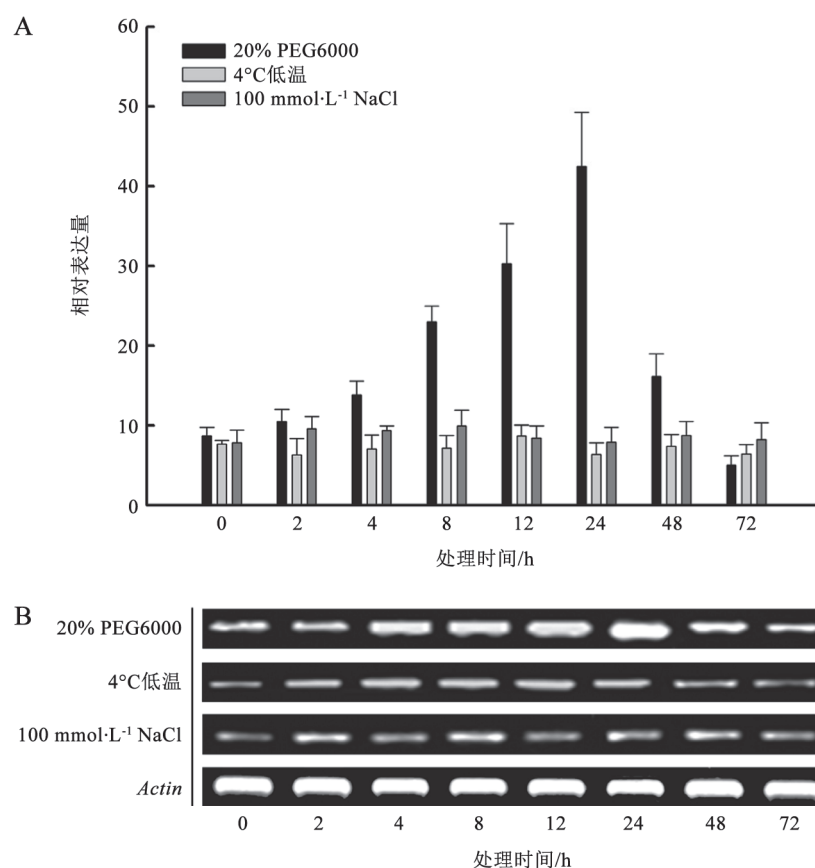
推测*PbPIP1*主要在杜梨植株的地下部发挥作用。

因杜梨广泛用作梨的砧木,其根系对逆境胁迫的适应能力很大程度上决定了栽培品种的抗性,因此采用qRT-PCR结合半定量RT-PCR技术检测了不同胁迫处理下杜梨根系中*PbPIP1*表达水平的变化。结果(图6)表明,20% PEG6000处理时,杜梨根系中*PbPIP1*的表达水平随胁迫时间的延长呈先上升后降低的趋势,其表达量在处理24 h时达到最高,与未经胁迫处理时相比表达量提高了4.88倍(图6-A)。而在4°C低温处理72 h内,杜梨根系中*PbPIP1*的表达水平基本稳定,相比未经胁迫处理时表达水平变化不明显(图6-B);当用100 mmol·L⁻¹ NaCl处理72 h时,*PbPIP1*的表达水平基本上也没有显著差异(图6)。上述结果表明,*PbPIP1*对逆境胁迫的响应因胁迫方式的不同而发生变化,其表达受PEG胁迫的显著诱导,表达丰度可能与杜梨抗旱性密切相关。

讨 论

水分通过液泡膜和质膜的跨膜运输途径,是水分在植物组织内的主要运输方式之一,主要以两种方式进行,即通过脂双层的自由扩散运输和水孔蛋白的跨膜运输,其中水孔蛋白介导的途径是水分进出细胞的主要途径(Kaldenhoff和Fischer 2006; Maurel等2015)。水孔蛋白可以有效调节水分的快速跨膜运输,保持细胞内外的渗透平衡,保证细胞内水分的有效利用和快速调节,是调节水分在植物细胞间以及体内水分平衡的分子基础,且还具有参与渗透胁迫应答、调节气孔运动等功能,对于植物的生理活动起着关键作用(Sakurai等2005; 梅杨等2007; Abramson和Vartanian 2013)。

研究表明,水孔蛋白属于多基因家族,并具有高度保守的结构特征(Hove和Bhave 2011; 李仁等2012; 林燕飞等2013; Maurel等2015)。本研究从杜梨根系中克隆获得水孔蛋白基因*PbPIP1*,其氨基酸序列的N端和C端各分布1个水孔蛋白家族的NPA (Asn-Pro-Ala)特征基序,并具有MIP家族信号序列SGGHINPAVT以及高等植物特有的PIPs高度保守序列GGGANXXXXGY和TGINPARSLGAA(图2),这些特征序列是鉴别水孔蛋白重要标准之一,也是执行和调控水孔蛋白功能的重要序列单元(Postaire等2008; Hove和Bhave 2011; 冉昆等2015)。应用BLAST软件对*PbPIP1*进行氨基酸同源性分析,进一步表明*PbPIP1*为PIP1亚类质膜水

图6 不同胁迫处理下*PbPIP1*在杜梨根系中的表达分析Fig.6 Expression profile analysis of *PbPIP1* in the root of *P. betulifolia* under different stress treatments

孔蛋白, 并与白梨和西洋梨的亲缘关系最近(图3和4)。

作为介导水分快速跨膜运输的主要蛋白, 水孔蛋白几乎存在于植物各个器官和组织中, 但各类水孔蛋白在植物不同器官和组织中的表达存在一定的差异, 也因胁迫方式的不同而发生变化(Hachez等2006; Foppest和Bhave 2007; Wudick等2009; 张燕等2014)。研究表明, 干旱胁迫下, 烟草*NtPIP1;1*通过降低其表达水平及蛋白活性以提高对干旱环境的适应能力(Mahdih等2008)。甘露醇模拟干旱胁迫时, 黑麦草叶片中*LpAQP*的表达量呈先增加后降低的趋势(周春蕾等2013)。而NaCl胁迫时, 大麦根系中*HvPIP1;3*和*HvPIP1;5*表达量几乎没有变化(Katsuhara等2002)。而且, 在植物中过量表达*PIPs*能够提高转基因植物对干旱等逆境胁迫的耐受性(Hu等2012; Zhou等2012)。本研究发现, *PbPIP1*在杜梨根、茎和叶中都有表达, 但根中的表达量最高, 可见*PbPIP1*可能主要在杜梨的

地下部发挥作用。另外, 20% PEG6000处理时, *PbPIP1*在杜梨根系中的表达水平随胁迫时间的延长先上升后降低; 但在4°C低温和100 mmol·L⁻¹ NaCl处理时该基因的表达水平差异不明显, 这意味着*PbPIP1*的表达受PEG模拟干旱胁迫的诱导, 其丰度可能与杜梨的抗旱性密切相关。

水孔蛋白主要参与水分的吸收和外排, 在根部水分的吸收和运输中具有重要作用(Maurel等2008; Postaire等2008; Aroca等2012)。在植物生长及响应外界胁迫的过程中, *PIPs*表达上调, 使膜对水分子的透性增强, 从而增加对水分的吸收; 但*PIPs*表达量越高, 细胞因水分的外排而失水的可能性就越大, 因此植物体又会通过降低*PIPs*表达以减少水分的外排, 从而增强对外界胁迫的耐受能力(Aroca等2012; 李仁等2012; 颜培玲等2015)。本研究中, 20% PEG6000处理初期(0~24 h), 杜梨根系中*PbPIP1*表达量随着胁迫时间的延长而迅速上调, 可能是因为此时根系周围的水势仍高于根系组织

水势, 基因表达上调可以增加PbPIP1蛋白活性, 从而促进根系通过共质体途径吸收周围的水分(Aroca等2012; 颜培玲等2015)。而随着胁迫时间的延长(48~72 h), *PbPIP1*表达量迅速下降, 可能是由于此时根尖的水势低于周围的水势, 导致PbPIP1蛋白活性降低, 从而减少水分的外排, 尽可能维持植物体内水分的平衡, 减少外界胁迫对植株造成的伤害。由此推测, 在PEG胁迫初期, 杜梨地下部先感知胁迫信号, 上调*PbPIP1*表达, 从而促进根系对水分的吸收; 而在胁迫后期, PbPIP1蛋白活性降低并减少水分的外排, 从而提高杜梨对逆境胁迫的适应能力, 这对于生产上主要作为砧木的杜梨而言尤为重要(Hachez等2006; 余丽娟等2013; Maurel等2015)。

作为重要的膜功能性蛋白, 近年来PIP蛋白的研究备受关注, 随着越来越多的植物PIP分离、功能鉴定及调控机理的解析, 人们逐步对其在物质跨膜转运和外界胁迫响应过程中的作用有了深入了解。今后还需要通过酵母双杂交、转基因等手段对*PbPIP1*的功能进行深入研究, 以进一步揭示其介导杜梨生长发育及逆境胁迫响应的作用机制。

参考文献

- Abramson J, Vartanian AS (2013). Watch water flow. *Science*, 340 (6138): 1294–1295
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2012). Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *J Exp Bot*, 63 (1): 43–57
- Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*, 1758: 994–1003
- Foppest KL, Bhavne M (2007). Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Funct Integr Genomics*, 7: 263–289
- Hachez C, Zelazny E, Chaumont F (2006). Modulating the expression of aquaporin genes in plant: a key to understand their physiological functions. *Biochim Biophys Acta*, 1758: 1142–1156
- Horie T, Kaneko T, Sugimoto G, Sasano S, Panda SK, Shibusaka M, Katsuhara M (2011). Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots. *Plant Cell Physiol*, 52 (4): 663–675
- Hove RM, Bhavne M (2011). Plant aquaporins with non-aqua functions: deciphering the signature sequences. *Plant Mol Biol*, 75 (4–5): 413–430
- Hu W, Yuan Q, Wang Y, Cai R, Deng X, Wang J, Zhou S, Chen M, Chen L, Huang C, et al (2012). Overexpression of a wheat aquaporin gene, *TaAQP8*, enhances salt stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol*, 53: 2127–2141
- Kaldenhoff R, Fischer M (2006). Aquaporins in plants. *Acta Physiol*, 187: 169–176
- Katsuhara M, Akiyama Y, Koshio K, Shibusaka M, Kasamo K (2002). Functional analysis of water channels in barley roots. *Plant Cell Physiol*, 43 (8): 885–893
- Li R, Wu XX, Li W, Yang RC, Zhao YQ, Wen CL, Zhao B, Guo YD (2012). Cloning and sequence analysis of the aquaporins gene *SLAQP* in tomato. *Sci Agr Sin*, 45 (2): 302–310 (in Chinese with English abstract) [李仁, 吴新新, 李蔚, 杨荣超, 赵永钦, 温常龙, 赵冰, 郭仰东(2012). 番茄水通道蛋白基因*SLAQP*的克隆与序列分析. *中国农业科学*, 45 (2): 302–310]
- Lin YF, Li HM, Ding YL, Huang XM, Xian XJ, He SG (2013). Cloning and expression analysis of a plasma membrane aquaporin gene *GhPIP1;1* in cut gladiolus flowers. *Acta Hort Sin*, 40 (1): 145–154 (in Chinese with English abstract) [林燕飞, 李红梅, 丁岳练, 黄新敏, 洗锡金, 何生根(2013). 唐菖蒲质膜水孔蛋白基因*GhPIP1;1*的克隆及表达分析. *园艺学报*, 40 (1): 145–154]
- Mahdieh M, Mostajeran A, Horie T, Katsuhara M (2008). Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell Physiol*, 49 (5): 801–813
- Maurel C, Boursiac Y, Luu DT, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L (2015). Aquaporins in plants. *Physiol Rev*, 95 (4): 1321–1358
- Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008). Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 595–624
- Postaire O, Verdoucq L, Maurel C (2008). Aquaporins in plants: from molecular structures to integrated functions. *Adv Bot Res*, 46: 75–136
- Pu FS, Wang YL (1963). *Pomology of China*. Vol. 3. Pears. Shanghai: Shanghai Sci and Technol Press (in Chinese) [蒲富慎, 王宇霖 (1963). 中国果树志·第三卷: 梨. 上海: 上海科学技术出版社]
- Ran K, Wei SW, Wang HW, Zhang Y, Wang SM (2015). Bioinformatics analysis of physical and chemical properties and structure characteristics of aquaporins in 22 kinds of plants. *Plant Physiol J*, 51 (1): 97–104 (in Chinese with English abstract) [冉昆, 魏树伟, 王宏伟, 张勇, 王少敏(2015). 22种植物水孔蛋白理化性质及其结构特征的生物信息学分析. *植物生理学报*, 51 (1): 97–104]
- Ran K, Yang HQ, Sun XL, Li Q, Jiang QQ, Zhang WW, Shen W (2014). Isolation, characterization, and structure analysis of a vacuolar processing enzyme gene (*MhVPEγ*) from *Malus hupehensis* (Pamp) Rehd. *Appl Biochem Biotech*, 173 (2): 579–595
- Sade N, Gebretsadik M, Seligmann R, Schwartz A, Wallach R, Moshelion M (2010). The role of tobacco aquaporin1 in improving water use efficiency, hydraulic conductivity, and yield production under salt stress. *Plant Physiol*, 152 (1): 245–254
- Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M (2005).

- Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol*, 46 (9): 1568–1577
- Wudick MM, Luu DT, Maurel C (2009). A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytol*, 184 (2): 289–302
- Yan PL, Pan XJ, Zhang WE (2015). Cloning of aquaporin gene *Vh-PIP1* in *Vitis heyneana* and its expression under drought stress. *Acta Hort Sin*, 42 (2): 221–232 (in Chinese with English abstract) [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]
- Mei Y, Li HL, Yang SY, Luo HY (2007). Plant aquaporin function research. *Plant Physiol Commun*, 43 (3): 563–568 (in Chinese with English abstract) [梅杨, 李海蓝, 杨尚元, 罗红艺(2007). 植物水孔蛋白的功能. 植物生理学通讯, 43 (3): 563–568]
- Yu LJ, Tian YS, Zhang CS, Xu QW, Mu ZX (2013). Genetic variation of aquaporin *PIP2* gene expression in wheat against drought stress. *J Nor West Univer A&F (Nat Sci Ed)*, 41 (3): 105–110 (in Chinese with English abstract) [余丽娟, 田又升, 张成双, 徐齐雯, 慕自新(2013). 小麦根系*PIP2*基因表达响应干旱-复水的遗传差异研究. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 41 (3): 105–110]
- Zardoya R (2005). Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol Cell*, 97 (6): 397–414
- Zhang Y, Li J, Yao Q, Chen JZ, Hu YL (2014). Cloning of a plasma membrane aquaporin gene *EjPIP1* in *Eriobotrya japonica* leaves and its expression analysis after AM fungi inoculation. *Sci Agr Sin*, 47 (7): 1387–1396 (in Chinese with English abstract) [张燕, 李娟, 姚青, 陈杰忠, 胡又厘(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]
- Zhou CL, Li R, Wu XX, Yang RC, Zhang HJ, Zhang N, Zhao B, Guo YD (2013). Cloning and functional analysis of the plasma membrane aquaporin gene in *Lolium perenne* L. *Sci Agr Sin*, 46 (12): 2412–2420 (in Chinese with English abstract) [周春蕾, 李仁, 吴新新, 杨荣超, 张海军, 张娜, 赵冰, 郭仰东(2013). 多年生黑麦草质膜型水通道蛋白基因*LpAQP*的克隆及功能分析. 中国农业科学, 46 (12): 2412–2420]
- Zhou S, Hu W, Deng X, Ma Z, Chen L, Huang C, Wang C, Wang J, He Y, Yang G, et al (2012). Overexpression of the wheat aquaporin gene, *TaAQP7*, enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *PLoS ONE*, 7 (12): e52439
- Zong Y, Sun P, Niu QF, Teng YW (2013). Distribution situation and assessment of morphological diversity of wild *Pyrus betulaefolia* in Northern China. *J Fruit Sci*, 30 (6): 918–923 (in Chinese with English abstract) [宗宇, 孙萍, 牛庆丰, 滕元文(2013). 中国北方野生杜梨分布现状及其形态多样性评价. 果树学报, 30 (6): 918–923]

Cloning and expression analysis of a plasma membrane aquaporin gene *PbPIP1* in *Pyrus betulifolia*

RAN Kun*, SUN Xiao-Li*, ZHANG Yong, WANG Hong-Wei, WEI Shu-Wei, WANG Shao-Min**

Shandong Institute of Pomology, Shandong, Taian 271000, China

Abstract: A plasma membrane intrinsic proteins (PIPs) gene, designated *PbPIP1*, was cloned from the root of *Pyrus betulifolia* by RT-PCR and RACE methods. The full cDNA sequence of *PbPIP1* was 1 297 bp, containing a complete open reading frame of 870 bp and encoding a putative protein with 289 amino acids. Bioinformatics analysis demonstrated that *PbPIP1* exhibited two highly conserved NPA (Asn-Pro-Ala) motifs and a typical structure with six transmembrane domains, as well as the highly conserved sequence of higher plant specific PIPs. Phylogenetic analysis showed that *PbPIP1* was belonged to PIP1 family. Gene expression analysis results showed that *PbPIP1* was expressed in roots, stems and leaves, and the expression level was the highest in roots, and the lowest in stems. Under 20% PEG treatment for 72 hours, the expression level of *PbPIP1* in the root of *P. betulifolia* was changed with time extension, which was firstly raised and then dropped. However, the expression level of *PbPIP1* under 4°C temperature or 100 mmol·L⁻¹ NaCl treatment had no significant changes. These results indicated that *PbPIP1* might play a role mainly in the root, and the expression abundance was closely related to drought resistance of *P. betulifolia*.

Key words: *Pyrus betulifolia*; aquaporin; clone; expression

Received 2015-12-04 Accepted 2016-04-06

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong (Grant No. ZR2015YL075), Youth Research Foundation of Shandong Academy of Agricultural Sciences (Grant No. 2015YQN41), Shandong Agricultural Good Cultivar Project (Mining of functional genes with high-quality, dwarfing and multiple resistance characteristics and germplasm innovation use of pear, 2014), China Agriculture Research System (CARS-29-31) and Director Fund of Shandong Institute of Pomology (2013KY03).

*Co-first author.

**Corresponding author (E-mail: sdipwsm@163.com).