DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20210202

干旱胁迫下葡萄AQP 基因家族的 鉴定及转录调控网络预测

杨盛迪1.2,郭大龙1.2,裴茂松1.2,刘海楠1.2,韦同路1.2,余义和1.2*

('河南科技大学园艺与植物保护学院,河南洛阳 471023; 2河南省园艺植物品质调控工程技术研究中心,河南洛阳 471023)

摘 要:【目的】探究干旱胁迫下葡萄AQP的转录调控网络,为后续研究葡萄抗旱基因功能和转录调控机制提供理论 依据。【方法】通过生物信息学方法分析葡萄AQP基因家族成员的理化性质、系统进化和染色体定位,进行共线性分析 和转录因子调控预测,通过转录组数据分析该基因家族在干旱胁迫和脱落酸(abscisic acid, ABA)处理下的表达情 况。【结果】37个 VvAQP基因主要分为PIP、TIP、NIP、SIP 四类,分别分布在17条染色体上,复制分析结果表明,共有5 对节段复制和2对串联复制。蛋白序列分析表明,每个 VvAQP蛋白序列中均有1个植物AQP主要内在蛋白(major intrinsic proteins, MIP)的保守结构域特征。通过转录调控网络预测发现,靶向 VvAQP基因的转录调控因子主要分为16 类。干旱胁迫下,根和叶中大部分 VvAQP基因表达持续下调, VvPIP2-3、VvPIP2-6在根中持续上调,7个 VvAQP基因 受ABA显著诱导。干旱胁迫下15个差异表达的转录因子可能与13个 VvAQP基因存在调控关系。【结论】鉴定并提供 了葡萄 AQP基因家族成员的基本信息,通过转录组数据发现可能参与干旱胁迫的 VvAQP基因,并预测了这些基因的 转录调控网络。

关键词:葡萄;AQP;干旱胁迫;转录因子;调控 中图分类号:S663.1 文献标志码:A 文章编号:1009-9980(2021)10-1638-15

Identification of grapevine AQP family and prediction for transcriptional regulatory network under drought stress

YANG Shengdi^{1,2}, GUO Dalong^{1,2}, PEI Maosong^{1,2}, LIU Hainan^{1,2}, WEI Tonglu^{1,2}, YU Yihe^{1,2*}

('College of Horticulture and Plant Protection, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China; ²Henan Engineering Technology Research Center of Quality Regulation and Controlling of Horticultural Plants, Luoyang 471023, Henan, China) **Abstract:** [Objective] Grape is one of the oldest fruit crops in the world. Most of the grapes in the world are cultivated in arid and semi-arid areas. Facing with the increasingly severe environment on the earth, the grape industry will face a serious impact in the future, drought will become one of the key factors restricting grape production. The aim of this study was to identify members of the AQPs gene family in the whole grape genome. In addition, the transcriptional regulatory network of *VvAQPs* under drought stress was explored to provide theoretical basis for the subsequent research on the function and the transcriptional regulation mechanism of drought resistance genes in grape. [Methods] Through BLAST *Arabidopsis thaliana* AQP protein sequences and the HMM file (PF00230), 37 *VvAQPs* were identified based on the grape genome database. The phylogenetic analysis, gene structure and protein sequence analysis, chromosome location and series replication analysis, targeted *VvAQPs* transcriptional performed by using bioinformatics method, interspecific collinear analysis, targeted *VvAQPs* transcriptional collinear analysis, targeted *VvAQPs* transcriptional performed by using bioinformatics method, interspecific collinear analysis, targeted *VvAQPs* transcriptional performed by using bioinformatics method, interspecific collinear analysis, targeted *VvAQPs* transcriptional performed by using bioinformatics method, interspecific collinear analysis, targeted *VvAQPs* transcriptional performed by using bioinformatics method, interspecific collinear analysis, targeted *VvAQPs* transcriptional performation performed by using bioinformatics method, interspecific collinear analysis, targeted *VvAQPs* transcriptional performance performance performanc

收稿日期:2021-05-13 接受日期:2021-07-02

基金项目:国家自然科学基金(31701893);河南省高校科技创新人才计划(21HASTIT035);河南省高校科技创新团队支持计划(21IRT-STHN021);河南省高等学校青年骨干教师培养计划(No.81);洛阳市科技发展计划项目(2101102A)

作者简介:杨盛迪,男,在读硕士研究生,研究方向为园艺植物生长发育和逆境胁迫。Tel:18438615773,E-mail:yangshengdi2050@163. com

^{*}通信作者 Author for correspondence. E-mail: yuyihe@haust.edu.cn

tion factor regulatory network analysis. Through drought stress and ABA treatment to further identify the VvAQPs involved in drought, and explore possible transcriptional regulatory relationships. [Results] Thirty- seven VvAOPs members were identified from the grape genome. The sequence lengths of VvAQPs varied from 65 to 354, the molecular weights of VvAQPs varied from 6.79 to 37.33 kDa, and the isoelectric points of VvAQPs varied from 4.33 to 9.79. Most of the VvAQPs protein had 6 transmembrane domains. Phylogenetic analysis showed that the family was divided into PIPs, TIPs, NIPs and SIPs. These VvAQPs were distributed among 17 chromosomes, one VvAQP was distributed on 4, 11, 12, 18 random chromosome, and two on 2, 5, 9, 10, 16, 7 random, Un chromosome. There were 3 VvAOPs on 3, 6, 13, 14, and 15, 4VvAOPs on the chr8 chromosomes. VvAOPs were accompanied with 5 pairs of segmental copies and 2 pairs of tandem copies. There were 27 AQP homologous genes between grape and Arabidopsis thaliana, 31 AQP homologous genes in tomato, 36 AQP homologous genes in peach, 55 AOP homologous genes in poplar and 44 AOP homologous genes in kiwifruit, respectively. In addition, the number of homologous genes on the 6, 8 and 13 chromosomes of grape were large, 5 VvAQPs were direct homologous genes with other 6 species, and 7 VvAQPs were homologous with other 5 dicotyledons. Gene structure and protein sequence analysis showed that there was a conserved domain characteristic (MIP) of plant aquaporin in each grape AQP protein sequence and genes from the same subgroup had similar structures. The prediction of transcriptional regulatory network revealed that the transcriptional regulatory factors targeting VvAQPs were mainly divided into 16 types (HD-ZIP, MYB, ERF, bZIP etc.). Combined with transcriptome data, most VvAQPs were significantly down-regulated in roots and leaves under drought stress, and VvAQPs in most roots or leaves were not differentially expressed during the T1 period of drought stress. In roots, VvPIP3-1, VvNIP3-1, VvTIP1-2 and VvTIP2-1 were significantly down-regulated, while VvPIP2-3 showed the opposite trend and was significantly up-regulated. VvNIP2-3, VvPIP1-3, VvNIP1-1 and VvTIP4-1 were significantly down-regulated in the later stage of drought stress, and VvTIP2-2 was only significantly down-regulated in the M4 drought-tolerant genotype. In leaves, VvTIP1-4, VvTIP2-1 and VvPIP3-2 were significantly down-regulated, VvTIP1-2 and VvNIP3-1 were up-regulated first and then down-regulated, and most genes of grape PIP subfamily members were significantly down-regulated in later stages, such as VvPIP1-3, VvPIP1-5, VvPIP2-1, VvPIP2-2, VvPIP2-4 and VvPIP2-5. VvAOPs were induced by ABA in different tissues. In roots, 4 VvAQPs were significantly up-regulated after being induced by ABA, such as VvPIP3-1, VvPIP1-6, VvPIP2-2 and VvTIP3-1, and VvNIP4-2 was down-regulated after ABA treatment. In leaves, VvNIP1-1, VvPIP3-1 and VvTIP1-3 were induced to be up-regulated, while VvPIP2-2 was induced to be down-regulated. Combined transcriptome expression data with transcriptional regulatory network prediction results, 15 differentially expressed transcription factors may regulate 13 VvAOPs under drought stress. Under drought stress, HD-ZIP (VIT 16s0098g01170, VIT 04s0023g01330 and VIT 15s0048g02870) showed an up-regulation trend, and their target genes VvPIP2-1, VvPIP2-4 and VvTIP1-1 basically showed a trend of up-regulation first and then down-regulation. bZIP (VIT 01s0010g00930, VIT 18s0001g10450 and VIT 15s0046g01440) was all up-regulated. Their target genes VvTIP1-4, VvNIP1-1, VvPIP1-5, VvPIP1-4, VvPIP2-5, VvTIP1-3 and VvTIP1-1 basically showed a downward-regulation trend in roots and leaves under drought stress. VvTIP1-2 was first up-regulated and then down-regulated in the leaves, while it was continuously down-regulated in roots. NAC (VIT 01s0026g02710 and VIT 19s0014g03290) all showed an up-regulation trend, and they jointly targeted the VvTIP2-1, which was continuously down-regulated in roots and leaves under drought stress. In addition, VIT 11s0016g02410 (MYB related) and target gene VvNIP3-1 continued to be down-regulated in

roots under drought stress, *VIT_16s0013g01000* (ERF) and target gene *VvPIP1-7* were continuously down-regulated in roots under drought stress, and *VIT_07s0197g00060* (G2- like) and target gene *VvTIP2-1* showed opposite trends in roots and leaves under drought stress. [Conclusion] The basic information about grape AQPs family members was identified and provided, and the *VvAQPs* involved in drought stress and the predicted transcriptional regulatory networks were further identified, which provided a theoretical basis for further study on grape AQPs involved in drought stress and transcriptional regulation mechanism.

Key words: Grapevine; AQP; Drought stress; Transcription factor; Regulation

水通道蛋白(aquaporin, AQP)是广泛存在于植 物中可以高效转运水的小分子蛋白,属于主要内在 蛋白(major intrinsic proteins, MIP)超家族,对维持 植物细胞水分平衡起到关键作用¹¹。研究表明,水 通道蛋白不仅可以运输水分子,还具有运输多种气 体分子、金属离子以及过氧化氢等物质的功能^[2]。 自从拟南芥中分离鉴定了第一个植物水通道蛋白γ-TIP以来¹³,水通道蛋白已经在拟南芥¹⁴、水稻¹⁵、鹰嘴 豆间、毛果杨四、陆地棉圆、番茄四、香蕉四等20多种植 物中发现并鉴定。植物 AQP 共有 7 类^{III},但在高等 植物和单子叶植物进化的过程中,类GlpF 膜内在蛋 白(glycerolfacilitato,GIP)、杂合内在蛋白(hybrid intrinsic proteins, HIP)和X内在蛋白(X intrinsic proteins, XIP)丢失^[12]。双子叶植物水通道蛋白一般通 过氨基酸序列同源性和蛋白质亚细胞定位分为4个 亚族^[13],分别是膜内在蛋白(plasmamembrane intrinsic proteins, PIP)、液泡膜内在蛋白(tonoplast intrinsic proteins, TIP)、类 Nodulin26(NOD26) 膜内在蛋 白(noduLin 26-like intrinsic proteins, NIP)和小的碱 性膜内在蛋白(small and basic intrinsic proteins, SIP)。植物水通道蛋白一般包含保守的Asn-Pro-Ala(NPA)motifs、Ar/R区域和跨膜结构域^[14]。不同 亚族的植物AQP特异性识别不同的运输底物,NPA 主要影响不同底物和水通道蛋白之间的特异性识 别,Ar/R主要通过控制水孔大小及疏水性决定底物 特异性,P1~P5的5个氨基酸残基决定运输水分子或 甘油分子[15-16]。

水通道蛋白能够通过水分子的跨膜运输来平衡 细胞的生命活动,对维持植物的生长、逆境胁迫等生 理过程至关重要^[15-17],而作为植物的主要水通道途 径,逆境胁迫下水通道蛋白的功能和调控研究一直 备受关注。在缺水条件下,部分*AQP*基因的上调表 达能够促进水分运输并维持正常的生理活动,而其 他AOP基因表达下调以降低渗透率来避免水分过 量流失[18-19],这种双向调控能保证植物更好的生存。 过表达水稻OsPIP1-1或OsPIP2-2可显著提高拟南 芥的干旱耐受能力[20]。与野生型相比,SIPIP2;1、SI-PIP2:7或SIPIP2:5的转基因拟南芥和番茄在正常和 干旱条件下均提高了水分传导能力和成活率[21]。在 烟草中过表达欧洲油菜 BnPIP1 可以提高分子水平 上的水分传导能力,从而增强植株的抗旱能力[22]。 在拟南芥中过表达黑籽南瓜CfPIP2;1提高了其在 干旱胁迫下的成活率[23]。小麦TaAQP7受干旱、脱落 酸(abscisic acid, ABA)和H₂O₂诱导,在烟草中过表 达TaAOP7可提高植株的干旱耐受能力[24]。香蕉的 MaPIP2-7过表达植株能够通过降低丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量和离子渗透率,提高叶绿素 以及ABA含量来增强植株抗旱能力^[25]。气孔运动 受多种因素调节,而干旱胁迫下植物可以通过气孔 运动来抑制植物的蒸腾作用[26]。最近有研究表明, 在鞭毛蛋白flg22侵染拟南芥早期阶段,细胞通过改 变AtPIP2;1亚细胞定位来调控水分运输,进而实现 气孔关闭(用flg22模拟病原菌入侵可以诱导气孔关 闭),这表明水通道蛋白在气孔运动中也发挥着关键 作用[27]。玫瑰 RhPIP2;1 与 MYB 转录因子 RhPTM 相 互作用,干旱胁迫诱导RhPIP2;1的273丝氨酸位点 发生磷酸化,影响RhPTM核易位,导致碳水化合物 代谢相关基因的表达变化来响应生存压力[28]。

全球葡萄生产多集中在干旱和半干旱区域,再加上地球资源的日益匮乏和环境的日益恶劣,未来葡萄产业将面临严重的冲击,因此干旱将成为制约葡萄生产的关键因素之一。对不同葡萄砧木基因型的生物化学和生理学研究表明,与基因型101.14(*V. riparia×V. rupestris*)相比,基因型M4[(*Vitis vinifera×V. berlandieri*)×*V. berlandieri*×Resseguier n. 1]显示出对水分胁迫和盐胁迫具有较高的耐受性,能

目前,尚未有关于 VvAQP基因家族系统的鉴定 和分析,响应干旱胁迫的葡萄AQP基因相关功能研 究也较少。笔者通过生物信息学方法对 VvAQP家 族进行全基因鉴定,并分析了 VvAQP 的系统发育 关系,VvAQP的基因结构、染色体分布、串联复制关 系以及靶向 VvAQP基因的转录因子预测,并依据前 人转录组分析结果,确定响应干旱胁迫的 VvAQP基 因以及可能靶向 VvAQP基因的转录调控因子,为进 一步研究该家族成员的生物学功能奠定基础,同时 为干旱胁迫下转录因子与 VvAQP基因的转录调控 机制研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 VvAQP家族成员的获取及进化树构建

利用拟南芥AQP序列为参照比对葡萄基因组 (http://plants.ensembl.org/Vitis_vinifera/Info/Index), 以E值为10⁻⁵截取;再利用pfam数据库的隐马尔可 夫模型文件(PF00230)进一步筛选葡萄基因组,并 以E值为10⁻³截取,将2种方法得到的蛋白序列提交 到Pfam和SMART网站分析候选的葡萄水通道蛋白 结构域。利用 MEGA 7对35个拟南芥AQP序列和 37个 VvAQP序列进行多序列比对,并运用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ, Bootstrap 设为1000,其他参 数为默认值)构建系统进化树,运用在线网站 EVOLVIEW (https://www.evolgenius.info/evolview/ #login/)进行进化树图绘制。

1.2 VvAQP基因家族的生物信息学分析

运用 Protparam (https://web.expasy.org/protparam)在线软件分析 VvAQP家族成员的氨基酸数 量、理论等电点和分子质量等理化性质。用 TMHMMServer v.2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/ TMHMM/)预测 VvAQP的跨膜结构。使用 MEME (http://meme-suite.org/tools/meme)网站对 VvAQP 的保守基序进行分析。利用在线网站GSDS(http:// gsds.cbi.pku.edu.cn/Gsdsabout.php)对 VvAQP基因结 构进行预测分析,结果见表1。从Ensembl数据库中 下载葡萄基因组文件并提取 VvAQP基因的染色体 位置信息进行染色体定位分析,使用 Tbtools v1.089 进行作图分析。根据以下2个标准确定VvAQP基因 重复:(1)较短序列长度>较长序列的75%;序列比 对的相似度>75%。(2)在100kb染色体片段中,相 邻或间隔不超过2个的基因被认为是串联重复基 因,此外,不同染色体片段上的2个基因为节段重复 基因。使用 MCScanX 软件(设置截取10^{-s}的阈值) 分析了葡萄(Vitis vinifera L.)、水稻(Oryza sativa L.)、拟南芥(Arabidopsis thaliana)、番茄(Solanum lycopersicum)、猕猴桃(Actinidia chinensis)、毛白杨 (Populus trichocarpa)和碧桃(Prunus persica) AQP基因之间的共线区域。所有物种的基因组文 件从 Ensembl(http://plants.ensembl.org/index.html) 数据库下载,并使用 Tbtools v1.089 绘制共线性图 片。

1.3 干旱胁迫和外源施加ABA对葡萄根和叶中 AQP基因表达模式的影响

根据 Corso 等^[30]的研究结果中显示(https://academic.oup.com/jxb/article/66/19/5739/695524#supplementary-data)的在干旱胁迫下不同基因型根和叶 的转录组数据文件,提取 *VvAQP*基因的 Log₂FC 值 和 *P*_{adj}值,利用 TBtools v1.089 绘制差异表达热图。 利用 NCBI 数据库的 GSE78798(葡萄不同组织在 ABA 处理下的表达)芯片数据进行归一化处理,提 取 *VvAQP*基因的表达矩阵并利用 Tbtools v1.089 绘 制表达热图。

1.4 靶向葡萄AQP基因的转录因子调控预测

利用 PlantTFDB 4.0 数据库葡萄转录因子信息, 用Hmmscan对参考基因组葡萄基因组序列(http:// plants.ensembl.org/index.html)中的所有基因进行转 录因子家族分析,通过Blast进行转录因子注释,截 取Hmmscan E 值≤0.05、Blast E 值≤0.05 为标准,鉴 定并统计所有转录因子。提取 VvAQP 基因的启动 子序列(上游2000 bp),并提交给PlantTFDB数据 库进行调控预测(http:// plantregmap.gao-lab.org)。 FIMO 用于判断启动子中的转录因子结合位点, 以105为截取阈值筛选预测结果。获取预测信息并 将其导入Gephi0.9.2软件,使用"Fruchterman Reingold"布局将数据可视化,计算节点的平均权重,以 区分节点的关键程度。差异转录因子的筛选基于 表格中不同干旱胁迫时间下根和叶中的差异表达 倍数 $\log_2 FC \ge 1$ 或 $\log_2 FC \le -1$ 且显著性 $P_{adj} \le$ 0.05 $^{\circ}$

2 结果与分析

2.1 葡萄基因组AQP基因家族成员鉴定和蛋白质 理化性质分析

利用隐马尔可夫模型(hidden markov model, HMM)和BLASTP的搜索结果以及SMART和Pfam 蛋白结构域验证后,最终获得37个葡萄AQP家族成员,与拟南芥35个AQP家族成员构建系统进化树显 示有4个分支(分别为SIP、NIP、TIP、PIP亚家族),并 参考拟南芥基因命名对VvAQP家族成员进行命名。如图1所示,VvAQP在不同亚族的分布并不均匀,SIP亚族中包含2个VvAQP家族成员。NIP、TIP、PIP分别含有10、11、14个VvAQP家族成员。

对葡萄AQP蛋白序列进行理化性质分析,结果 (表1)显示蛋白质序列长度为65~354 aa,分子质量 为6.79~37.33 kDa,等电点为4.33~9.79。跨膜结构 预测分析表明,大部分葡萄AQP蛋白有6个跨膜结 构域,VvPIP3-1、VvPIP3-2有7个,VvNIP5-1、



Fig. 1 Phylogenetic analysis of AQP in grape and Arabidopsis

表 1 葡萄 AQP 染色体位置的和氨基酸数量、预测的分子质量、等电点、跨膜结构域

Table 1 Chromosomal location of grape AQP and Amino acid numbers, putative MW, pI, THM

基因名称 Gene name	蛋白名称 Sequence ID	染色体 Chromosome	位置 Localization	蛋白长度 Protein length/aa	分子质量 Molecular weight/kDa	等电点 pI	跨膜结构域数 Transmembrane domains
VvNIP5-1	VIT_02s0025g03260.t01	2	2 788 379~2 791 515	298	30.70	9.08	5
VvPIP1-6	VIT_02s0025g03390.t01	2	2 890 636~2 893 718	287	30.71	8.61	6
VvPIP3-1	VIT_03s0038g01390.t01	3	976 131~977 121	304	32.27	5.8	7
VvPIP3-2	VIT_03s0038g01410.t01	3	984 045~985 466	320	34.32	7.17	7
VvPIP2-4	VIT_03s0038g02520.t01	3	1 760 984~1 762 467	279	29.62	8.97	6
VvTIP4-1	VIT_04s0008g03550.t01	4	2 903 920~2 905 762	301	32.12	5.96	6
VvNIP7-1	VIT_05s0020g02740.t01	5	4 462 134~4 463 397	293	31.38	8.21	6
VvPIP1-4	VIT_05s0029g00510.t01	5	15 337 973~15 338 474	65	6.79	7.62	1
VvPIP2-1	VIT_06s0004g02850.t01	6	3 578 735~3 580 302	280	30.01	7.00	6
VvTIP1-2	VIT_06s0004g04120.t01	6	5 090 720~5 091 916	268	28.03	7.10	6
VvTIP1-4	VIT_06s0061g00730.t01	6	18 257 635~18 258 750	251	26.09	5.32	4
VvNIP2-1	VIT_07s0141g00080.t01	7_random	52 369~53 027	124	13.21	4.77	3
VvNIP2-2	VIT_07s0141g00160.t01	7_random	112 802~113 460	124	13.21	4.77	3
VvTIP1-1	VIT_08s0007g04780.t01	8	18 763 893~18 765 006	251	26.21	5.89	6
VvSIP1-1	VIT_08s0007g07680.t01	8	21 138 702~21 144 717	238	25.18	9.15	5
VvSlP2-1	VIT_08s0040g00400.t01	8	11 323 666~11 328 580	241	26.52	9.79	4
VvPIP2-3	VIT_08s0040g01890.t01	8	12 986 520~12 988 082	287	30.69	7.14	6
VvTIP2-1	VIT_09s0002g04020.t01	9	3 712 870~3 714 177	249	25.48	5.87	6
VvNIP6-1	VIT_09s0070g00080.t01	9	13012090~13014358	354	37.33	8.28	6
VvNIP1-1	VIT_10s0003g01830.t01	10	3 271 408~3 273 259	282	29.82	9.15	6
VvPIP2-5	VIT_10s0003g03580.t01	10	6 024 746~6 025 240	118	12.86	6.94	0
VvNIP2-3	VIT_11s0078g00490.t01	11	12 865 608~12 866 147	89	9.32	4.94	2
VvPIP1-1	VIT_12s0034g00250.t01	12	15 719 960~15 720 373	119	12.42	6.82	0
VvTIP1-3	VIT_13s0019g00330.t01	13	2 428 952~2 430 676	251	25.84	5.32	6
VvPIP2-2	VIT_13s0019g04280.t01	13	5 602 037~5 604 892	284	30.29	8.29	6
VvPIP1-7	VIT_13s0067g00220.t01	13	154 711~155 950	286	30.55	8.53	6
VvNIP4-2	VIT_14s0006g01540.t01	14	17 711 147~17 713 378	281	29.85	8.46	6
VvNIP4-1	VIT_14s0006g01560.t01	14	17 758 809~17 762 011	117	12.78	5.86	2
VvNIP3-1	VIT_14s0108g00700.t01	14	29 407 401~29 409 742	294	31.00	8.34	6
VvTIP5-2	VIT_15s0021g02420.t01	15	13 417 086~13 418 212	251	25.85	5.73	6
VvPIP1-3	VIT_15s0046g02410.t01	15	19 192 837~19 196 048	286	30.89	8.98	6
VvPIP1-5	VIT_15s0046g02420.t01	15	19 199 340~19 206 837	286	30.71	8.66	6
VvTIP5-1	VIT_16s0022g00330.t01	16	11 2478 76~11 248 951	249	25.49	5.73	6
VvTIP3-1	VIT_16s0039g00220.t01	16	102 284~103 573	259	27.42	7.11	6
VvPIP1-2	VIT_18s0001g06480.t01	18_random	4 857 859~4 858 322	141	14.93	6.39	0
VvTIP2-3	VIT_00s0229g00130.t01	Un	15 488 900~15 490 718	250	25.32	4.96	6
VvTIP2-2	VIT 00s2783g00010.t01	Un	42 956 119~42 956 496	124	12.60	4.33	3

VvSIP1-1 有 5 个, VvTIP1-2、VvSIP2-1 有 4 个, VvNIP2-1、VvNIP2-2、VvTIP2-2 有 3 个,6 个 葡 萄 AQP 蛋白序列中跨膜结构域数目≤2个。序列长度 最长的 VvNIP6-1 也具有6个跨膜结构域。

2.2 VvAQP基因的染色体定位分析和复制分析

根据葡萄基因组数据,对葡萄AQP基因家族成员进行染色体定位分析(图2)。VvAQP基因分

别分布在17条染色体上,其中有2条为短片段染色体。在Chr4、Chr11、Chr12、Chr18_random染色体上各分布1个,Chr2、Chr5、Chr9、Chr10、Chr16、Chr7_random、ChrUn染色体上各分布2个,Chr3、Chr6、Chr13、Chr14、Chr15染色体上各分布3个,Chr8染色体上有4个。复制分析结果表明,共有5对节段复制和2对串联复制,然而未发现有明显的





图 2 *VvAQP* 基因在染色体上的分布以及复制关系 Fig. 2 Distribution and replication relationship of *VvAQP* genes on chromosomes

基因簇存在,说明葡萄AQP基因家族在物种的分 化过程中相对较保守,并未发生较大的数量加倍 变化。

2.3 *VvAQP*基因家族的系统发育、保守结构域、保 守基序、基因结构分析

为了更好地解析葡萄AQP基因家族的相似性和多样性,笔者分析了系统发育树(图3-A)、保守基序和保守结构域(图3-B)以及外显子-内含子结构(图3-C)。基于蛋白序列构建的系统进化树分 支确定葡萄 AQP家族成员的分类,可分为 PIP、TIP、NIP、SIP共4类,其中 SIP 亚家族仅有2个葡萄 AQP 成员,PIP、TIP、NIP 亚家族分别包含14、11、10 个成员。保守结构域和保守基序分析表明,每个葡

萄AQP蛋白序列中均有1个MIP保守结构域特征, MEME分析结果(图3-D)显示,多个motif基序位 于MIP保守结构域中,如motif1、motif2、motif4、 motif5、motif6、motif7。进一步分析发现,motif3、 motif9、motif10、motif11、motif15只在PIP亚家族中 出现,motif14只在NIP亚家族中出现。基因结构分 析表明*VvNIP6-1*基因序列最长,包含3个外显子, *VvPIP1-4*基因序列最短,只包含1个外显子,而 *VvPIP2-5、VvPIP1-1、VvPIP1-2、VvTIP2-2*无外显 子,*VvAQP*基因的外显子数量在0~5之间,其中 *VvPIP1-4*中只有1个外显子,2个内含子的成员包 含12个,3个内含子的成员有10个,4个内含子的 成员有7个。



A. 系统发育分析; B. 保守基序 MEME 分析和结构域分析; C. 基因结构分析; D. MEME 分析结果的保守序列的 logo 信息。

A. Phylogenetic analysis; B. MEME analysis of conserved motifs and structural domain analysis; C. Gene structure analysis; D. Logo information of conserved sequences as a result of MEME analysis.

图 3 *VvAQP* 基因家族的系统发育、保守基序、保守结构域和基因结构分析 Fig. 3 Phylogeny, conserved motif, conserved domain and gene structure analysis of *VvAQP* gene family

2.4 AQP基因的多物种共线性分析

为了进一步研究 VvAQP基因家族的遗传机制, 笔者鉴定了6种代表性植物与 VvAQP基因家族的同 源基因,这些植物包括毛果杨、猕猴桃、碧桃、拟南 芥、番茄和水稻(图4-A~B)。与单子叶植物水稻的 14对同源基因相比,双子叶植物和葡萄具有更多的 AQP同源基因,拟南芥27对、番茄31对、桃36对、毛 果杨和猕猴桃分别为55对和44对,根据葡萄染色体 位置将这些同源基因划分成不同区域,如图4-C发 现 Chr6、Chr8、Chr13 染色体上的同源基因数量较 多,说明这些基因所在的染色体的片段可能存在连 锁遗传。此外,在葡萄和其他6个物种之间发现了5 个直系同源基因(图4-D),这表明这些同源基因在 祖先分化之前就已经存在,并在植物中发挥了关键 作用。此外,还发现7个*VvAQP*基因与其他5个双 子叶植物有同源关系(图4-D)。但并未出现在单子 叶水稻中,表明这些基因对是在双子叶和单子叶分 化后产生的。

2.5 *VvAQP*基因在干旱胁迫、ABA处理下的表达 模式

干旱胁迫下 VvAQP 基因在干旱敏感型(101.14) 以及抗旱型(M4)根和叶中的差异表达(图 5-A)显示,干旱胁迫下大部分 VvAQP 基因在根和叶中均显 著下调,并且在干旱胁迫的T1时期大部分根或叶中 的 VvAQP 基因不表达。在根部, VvPIP3-1、VvNIP3-1、VvTIP1-2、VvTIP2-1 显著下调,而 VvPIP2-3 呈现

1645



A. 拟南芥(*At*)、番茄(*St*)、水稻(*Os*)与葡萄(*Vv*)的 *AQP* 基因共线关系; B. 毛果杨(*Pt*)、猕猴桃(*Ac*)、碧桃(*Pp*)与葡萄(*Vv*)的 *AQP* 基因共线 关系; C. 葡萄每个染色体上的 *AQP* 基因与其他物种共线基因的数量; D. 不同物种与葡萄 *AQP* 共线基因的韦恩图。

A. The collinearity of AQP genes between Arabidopsis (At), tomato (SI), rice (Os) and grapevine (Vv). B. Populus trichocarpa (Pt), kiwifruit (Ac), peach (Pp) and grapevine (Vv) AQP genes collinear relationship. C. The number of AQP genes on each chromosome of grape with other species; D. Venn diagram of AQP collinear genes between different species and grape.



相反的显著上调趋势,*VvNIP2-3、VvPIP1-3、VvNIP1-1、VvTIP4-1*在干旱胁迫后期显著下调,*VvTIP2-2*只 在M4抗旱基因型中显著下调。在叶片中,*VvTIP1-4、VvTIP2-1、VvPIP3-2*显著下调,*VvTIP1-2、VvNIP3-1*先上调后下调,大部分葡萄PIP亚家族成员基因在 后期显著下调,如*VvPIP1-3、VvPIP1-5、VvPIP2-1、 VvPIP2-2、VvPIP2-4、VvPIP2-5*。总的来说,*VvTIP2-1*在不同基因型的根和叶中均持续显著下调, *VvTIP1-2*在不同基因型的根中持续显著下调,在叶中先上调后下调,*VvPIP3-1*在不同基因型的根中持续显著下调,而在叶中表达差异不显著,而*VvPIP3-2*在不同基因型的叶中显著下调,在根中差异并不显著。

大量研究结果表明,水分胁迫下ABA在抗旱中的作用对植物抗旱具有重要意义,而且ABA诱导H₂O₂和NO的产生参与了气孔的关闭,此外,外源

ABA 能够增加气孔阻力,降低叶片蒸腾速率,使用 ABA 处理葡萄果实、叶片、根、茎前后的表达热图 (图5-B)显示, VvAQP 基因在不同组织中受到ABA 诱导,在根部,4个 VvAQP 基因受到ABA 诱导后显 著上调,例如 VvPIP3-1、VvPIP1-6、VvPIP2-2、 VvTIP3-1,而 VvNIP4-2在ABA 处理后被诱导下调。 在叶片部位, VvNIP1-1、VvPIP3-1、VvTIP1-3 被诱导 上调,而 VvPIP2-2 被诱导下调。

2.6 靶向 VvAQP基因的转录因子调控预测分析

基于 PlantTFDB 数据库预测了靶向葡萄 AQP 家族成员的转录因子基因,阈值控制在10⁻⁵截取,预

测 VvAQP基因启动子区域(上游 2000 bp)中可能的 调控转录因子并绘制网络调控。图6显示,NAC、 MYB、ERF、WRKY等多种转录因子可以调控 VvAQP基因。为了进一步缩小范围,笔者筛选了预 测结果中干旱胁迫下差异表达($\log_2FC \ge 1$ 或 $\log_2FC \le -1$ 且 $P_{adj} \le 0.05$)的转录因子,并绘制了调 控VvAQP基因的转录因子调控网络,预测了51个可 能参与干旱胁迫下调控的转录因子。参考干旱胁迫 下VvAQP基因的表达情况,在干旱胁迫下,VvPIP3-I、VvPIP3-2、VvNIP3-1、VvTIP1-4、VvTIP2-1、 VvTIP2-3 这些基因在根或者叶中具有显著差异,网



图 5 *VvAQP* 基因在干旱胁迫和 ABA 处理下的表达模式 Fig. 5 The expression pattern of the *VvAQP* genes under drought stress (A) and ABA treatment (B)



图 6 转录因子靶向 *VvAQP* 基因的调控网络 Fig. 6 Transcription factors target the regulatory network of *VvAOP* genes

络预测结果图(6-B)中,*VvNIP3-1、VvTIP1-4、VvTIP2-1、VvPIP3-2*为多种转录因子的靶向节点,调控这些靶点的转录因子类型主要有MYB、Dof、NAC、bZIP、bHLH、ERF、MYB_related。 靶向*VvTIP1-4*的转录因子类型包括MYB、Dof、bZIP、bHLH、MYB_related,靶向*VvPIP3-2*的转录因子类型只有Dof,靶向*VvTIP2-1*的转录因子类型包括MYB_related、Dof。这些结果表明在干旱胁迫下,*VvAQP*基因可能受到多种转录因子的调控。

2.7 差异转录因子的表达趋势分析

为了观察转录因子与*VvAQP*基因之间的表达 模式关系,基于图 6-B的网络调控关系和表格中根 和叶在不同干旱胁阶段下的差异倍数、显著性(*P*adj</sub>) 值绘制了表达模式网络调控图。如图7所示,将根 和叶中差异表达倍数高(红色、绿素越深)且*P*adj值 (黑色越深)越小的转录因子和*VvAQP*基因标注成 红色,不同干旱胁迫阶段下差异倍数高且*P*adj小的转 录因子和*VvAQP*基因标注为红色,这些转录因子主 要为HD-ZIP、MYB、ERF、bZIP等,干旱胁迫下HD-ZIP转录因子在根和叶片中(*VIT_16s0098g01170、VIT_04s0023g01330、VIT_15s0048g02870*)均呈上调 趋势,其靶向基因*VvPIP2-1、VvPIP2-4、VvTIP1-1*基 本呈现出先上调后下调的趋势。bZIP转录因子 (*VIT_01s0010g00930、VIT_18s0001g10450、VIT_15s0046g01440*)均呈上调趋势,其靶向基因中, VvTIP1-4、VvNIP1-1、VvPIP1-5、VvPIP1-4、VvPIP2-5、VvTIP1-3、VvTIP1-1在干旱胁迫下的根和叶中基 本呈下调趋势,VvTIP1-2在叶中先上调后下调,而根 中持续下调。NAC转录因子(VIT_01s0026g02710、 VIT_19s0014g03290)均呈上调趋势,其共同靶向为 VvTIP2-1,该基因在干旱胁迫的根和叶中持续下 调。此外,VIT_11s0016g02410(MYB_related)转录 因子和靶基因VvNIP3-1在干旱胁迫下的根中持续 下调,VIT_16s0013g01000(ERF)转录因子和靶基因 VvPIP1-7在干旱胁迫下的根中持续下调,而VIT_ 07s0197g00060(G2-like)转录因子和靶基因VvTIP2-1在干旱胁迫下的根和叶中呈相反的趋势。这些结 果表明,多种转录因子的转录受干旱胁迫诱导,并通 过影响下游的调控基因(AQP)的表达来响应干旱胁 迫。

2.8 靶向AQP基因的候选转录因子调控位点预测

根据不同干旱胁迫阶段下的差异倍数以及显著性,进一步筛选关键转录因子,并通过PlantTFDB预测转录因子与靶基因的结合位点。共筛选出15个转录因子与13个葡萄AQP靶基因的结合位置并绘制转录因子与靶基因的结合位点图。如图8所示, VvPIP1-4、VvTIP1-2、VvTIP1-4、VvTIP1-1、VvPIP2-5、VvTIP1-3、VvPIP1-5、VvNIP1-1基因启动子中有 bZIP转录因子的结合位点,VvPIP2-5、VvPIP1-5、 VvPIP2-1、VvPIP1-7的启动子序列中有ERF转录因 子的结合位点,而VvTIP2-1的启动子中有NAC、G2-



1649



三角热图的左上角代表 Paid 值(越小颜色越深),右下角表示差异倍数,差异上调为红色,下调为绿色,颜色越深说明差异倍数越大。

The upper left corner of the triangular heat map represents the P_{adj} value (the smaller the value the darker the colour). The lower right corner represents log₂FC, the difference is up-regulated to red and down-regulated to green. The deeper the color is, the greater the difference multiple is.

图 7 转录因子和 VvAOP 基因调控网络中的差异表达分析







Fig. 8 Combined site prediction of candidate transcription factors in *VvAQP* genes promoters

like转录因子的结合位点。此外,还有一部分 VvAQP基因的启动子中有MYB、HSF、HD-ZIP转录 因子的结合位点。

3 讨 论

先前已有的研究表明,通过BLAST初步鉴定了 28个葡萄AOP基因家族成员,并在葡萄浆果生长发 育的多个阶段检测发现多个PIP和TIP家族基因在 葡萄浆果不同的发育阶段中高表达,为葡萄AQP基 因参与浆果发育提供了理论依据³¹¹。VvPIP1a和 VvPIP1b参与葡萄果实成熟,并通过将 VvPIP1a和 VvPIP1b的cRNA注射爪蟾卵母细胞中探究水通道 蛋白在果实生理学中的潜在作用,发现注射 VvPIP1b对渗透性没有影响,而 VvPIP1a 能够抑制 爪蟾卵母细胞对尿素的摄取,并且对HgCl敏感^[32]。 这些研究更进一步验证了葡萄AQP基因在浆果发 育中发挥关键作用。此外,AQP广泛参与植物的多 种生理活动,除了生长发育外也包括非生物胁迫。 笔者在本研究中通过 HMM 和 BLAST 的方法更加 全面地鉴定了葡萄AOP基因家族,并通过系统发 育、种间串联复制等生物信息学分析方法描述了葡 萄AQP基因家族成员的基本特点,结合干旱转录组 和芯片数据进一步挖掘可能受干旱诱导的 VvAQP 基因,最后通过预测 VvAQP 基因的上游调控转录因 子,构建了干旱胁迫下的转录调控网络。

使用HMM和BLAST搜索葡萄基因组序列,并 通过pfam进行保守结构域鉴定,最终筛选了37个 VvAQP基因,与拟南芥的35个AtAQP基因^[13]相比, 葡萄中AQP基因并没有发生明显扩张,当某基因家 族在染色体上出现明显的基因簇时,往往伴随着串 联复制基因扩张机制^[33],而染色体定位分析和串联 复制分析结果中,VvAQP基因并未存在明显的基因 簇,这为以上观点提供了证据。利用MCScanX进行 多物种AQP基因同源性分析,结果表明,VvAQP基 因与毛果杨AQP基因同源关系更近,这与目前植物 演化中的意见一致。基因结构分析表明,外显子和 内含子的数量和长度在每个亚家族中相对保守。保 守基序分析表明,葡萄AQP的每个亚家族都有相同 的保守基序。保守基序和基因结构分析进一步支持 系统发育分类的结果。

植物水通道蛋白作为水分运输的关键途径之 一,但植物体的水稳态往往涉及多个复杂的调控网 络[34-35]。不同植物组织中AOP基因的表达模式往往 有所差异,这也说明不同的水通道蛋白在植物体内 可能具有不同功能。在干旱胁迫下,烟草NtPIP1:1 和NtPIP2:1的转录水平显著下调,而NtAOP1的转 录水平上调^[19]。在向日葵中,液泡膜内在蛋白Sun-TIP7在干旱胁迫下,其转录物会发生积累¹³⁰。香蕉 中部分MAOP基因在不同应激处理后表现出不同的 表达模式,并且在不同组织中具有组织特异性表 达^[10]。在本研究中,干旱胁迫下大部分 VvAOP 基因 总体呈现下调趋势, VvPIP2-3 在根中差异表达并持 续上调,叶片中的表达差异并不显著, VvTIP2-1在根 和叶片中均显著下调, VvTIP1-2在根中持续显著下 调,叶片中呈现先上调后下调的趋势。这些 VvAOP 基因的不同表达模式表明,其在转录水平上表达下 降或上调导致其蛋白活性下降或升高,从而维持水 分平衡,降低植物体内水分的流失或促进水分的运 输,共同维持植物体内的水稳态,保证植物体正常的 生命活动:同时也间接反映了AOP基因在不同组织 中的作用也有差异,这表明AOP基因的不同表达模 式具有不同生物学功能,这与其他研究结果一 致^[10, 18, 35]。进一步研究发现,大部分 VvAQP 基因在 干旱胁迫下的T1时期并未受到诱导表达,只有少部 分 VvAQP 基因具有显著差异,这可能说明部分 VvAQP基因的表达能够保持短期的干旱胁迫下植 物体内的水分运输,然而在长期干旱胁迫下,需要更 多的 VvAOP 基因参与响应才能维持植物体的正常 生命活动。葡萄抗旱品种 M4 在早期干旱时, VvAOP基因并未受到显著诱导,而栽培种101.14在 早期干旱胁迫下有部分 VvAOP 基因表达下调,在干 旱胁迫下不同抗旱品种中AQP基因的表达模式显 然不同,这说明AQP基因可能介导了不同抗旱品种 的抗旱机制。

AQP是植物体多种重要的生理反应过程中的 膜功能性蛋白,越来越多的研究表明,植物水通道蛋 白主要通过转录调控、翻译后修饰以及亚细胞定位 来发挥关键作用^[36-37]。此外,这不仅仅是针对植物体 水分的稳态,同时也涉及了多种小分子物质的运输, 如金属离子、H₂O₂以及气体分子等^[3],这些运输物遍 布植物体的多种关键通路,如信号传导、防御机制、 渗透胁迫和光合作用等^[17]。而转录调控是植物水通 道蛋白响应多种通路的关键调控之一。在ABA处 理下,转录因子*ABI3*结合并激活拟南芥原生质体中

的TIP3:1和TIP3:2启动子来维持种子寿命[16]。拟南 芥转录因子 XNDI 为根导水率的负调控因子,能影 响水通道蛋白基因表达,从而负调控导水率和干旱 耐受性^[37]。在花生中过表达拟南芥转录因子AtH-DG11诱导花生水通道蛋白基因的表达,并提高花生 的耐旱和耐盐能力。利用 ChIP-seg 数据分析得出, 新型番茄转录因子ASRI能与水通道蛋白基因启动 子发生相互作用^[37]。本研究中,通过 VvAOP 基因的 启动子序列预测可能与其结合的转录调控因子,并 借助转录组数据进一步分析了关键的候选转录调控 关系,通过分析干旱胁迫下靶向 VvAOP 基因转录因 子的调控网络,筛选出了15个可能调控VvAOP基因 的关键转录因子,分别属于HD-ZIP、MYB、ERF、 bZIP、G2-like、HSF转录因子家族,这些调控关系的 建立可为研究植物干旱胁迫下的转录调控机制提供 参考依据[31]。

4 结 论

(1)在葡萄基因组数据库中共检索到37个AQP 基因,编码氨基酸序列长度为65~354 aa,分子质量 变化范围为6.79~37.33 kDa,24个 AQP 至少包括5 个跨膜结构域。

(2)葡萄AQP基因有5对节段复制和2对串联 复制,共线性分析说明葡萄与毛果杨和猕猴桃具有 较高同源性,其中5个VvAQP基因在祖先分化之前 就已经存在,7个VvAQP基因在双子叶和单子叶植 物分化后产生。

(3)在根和叶中分别有25和16个*VvAQP*基因 受到干旱显著诱导,7个*VvAQP*基因受ABA诱导。 通过转录调控网络预测,发现靶向*VvAQP*基因的转 录调控因子主要分为16类,结合转录组数据发现干 旱胁迫下15个差异表达的转录因子可能与13个 *VvAQP*基因存在调控关系。

参考文献 References:

- [1] TYERMAN S D, BOHNERT H J, MAUREL C, STEUDLE E, SMITH J A C. Plant aquaporins: Their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations[J]. Journal of Experimental Botany, 1999, 50(90001): 1055-1071.
- [2] BIENERT G P, CHAUMONT F. Plant aquaporins: Roles in water homeostasis, nutrition, and signaling processes[M]// GEILER M, VENEMA K. Transporters and pumps in plant signaling. Berlin: Springer, 2011.
- [3] MAUREL C, REIZER J, SCHROEDER J I, CHRISPEELS M J.

The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus oocytes*[J]. Embo Journal, 1993, 12 (6):2241-2247.

- [4] JOHANSON U, KARLSSON M, JOHANSSON I, GUSTAVS-SON S, KJELLBOM P J. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants[J]. Plant Physiology, 2001, 126(4): 1358-1369.
- [5] JUNKO S, FUMIYOSHI I, TOMOYA Y, MATSUO U, MA-SAYOSHI M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function[J]. Plant & Cell Physiology, 2005, 46(9):1568-1577.
- [6] DEOKAR A A, TAR'AN B. Genome-wide analysis of the aquaporin gene family in chickpea (*Cicer arietinum* L.)[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7:1802.
- [7] GUPTA A B, SANKARARAMAKRISHNAN R. Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: Characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective[J]. BMC Plant Biology, 2009, 9 (1):1566-1577.
- [8] 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.)[J]. BMC Plant Biology,2010,10(1):142.
- [9] REUSCHER S, AKIYAMA M, MORI C, AOKI K, SHI-RATAKE K. Genome-wide identification and expression analysis of aquaporins in tomato[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79052.
- [10] HU W, HOU X, CHAO H, YAN Y, WEIWEI T, DING Z, WEI Y, LIU J, MIAO H, LU Z. Genome-wide identification and expression analyses of aquaporin gene family during development and abiotic stress in banana[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(8): 19728-19751.
- [11] ABASCAL F, IRISARRI I, ZARDOYA R. Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2014, 1840(5):1468-1481.
- [12] DANIELSON J, JOHANSON U. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*[J].
 BMC Plant Biology, 2008, 8(1):45.
- [13] JOHANSON U, KARLSSON M, JOHANSSON I, GUSTAVS-SON S, SJÖVALL S, FRAYSSE L, WEIG AR, KJELLBOM P. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants[J]. Plant Physiology, 2001, 126 (4):1358-1369.
- [14] HOVE R M, BHAVE M. Plant aquaporins with non-aqua functions: Deciphering the signature sequences[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(4/5):413-430.
- [15] 安慧,赵彤,宋跃,庞秋颖,阎秀峰. NaCl 胁迫对菊芋悬浮细胞 中 TIP 家族基因表达的影响[J]. 植物生理学报,2020,56(11): 2373-2382.

AN Hui, ZHAO Tong, SONG Yue, PANG Qiuying, YAN Xiu-

- [16] MAO Z, SUN W. Arabidopsis seed-specific vacuolar aquaporins are involved in maintaining seed longevity under the control of ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(15):4781-4794.
- [17] AFZAL Z, HOWTON T C, SUN Y, MUKHTAR M S. The roles of aquaporins in plant stress responses[J]. Journal of Developmental Biology, 2016, 4(1):9.
- [18] MAUREL C, BOURSIAC Y, LUU D T, SANTONI V, SHAHZAD Z, VERDOUCQ L. Aquaporins in plants[J]. Physiological Reviews, 2015, 95(4), 1321-1358.
- [19] MAHDIEH M, MOSTAJERAN A, HORIE T, KATSUHARA M. Drought stress alters water relations and expression of PIPtype aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants[J]. Plant & Cell Physiology, 2008, 49(5): 801-813.
- [20] GUO L, WANG Z Y, LIN H, CUI W E, CHEN J, LIU M, CHEN Z L, QU L J, GU H. Expression and functional analysis of the rice plasma- membrane intrinsic protein gene family[J]. Cell Research, 2006, 16(3):277-286.
- [21] LI R, WANG J, LI S, LEI Z, QI C, WEEDA S, BING Z, REN S, GUO Y D. Plasma membrane intrinsic proteins *SlPIP2;1, Sl-PIP2;7* and *SlPIP2;5* conferring enhanced drought stress tolerance in tomato[J]. Scientific Reports, 2016,6(1):191-198.
- [22] YU Q, HU Y, LI J, QI W, LIN Z. Sense and antisense expression of plasma membrane aquaporin BnPIP1 from *Brassica napus* in tobacco and its effects on plant drought resistance[J]. Plant Science, 2005, 169(4):647-656.
- [23] 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[J]. Plant & Cell Physiology, 2007, 48(9):1331-1339.
- [24] ZHOU S, HU W, DENG X, MA Z, CHEN L, HUANG C, WANG C, WANG J, HE Y, YANG G, HE G. Overexpression of the wheat aquaporin gene, TaAQP7, enhances drought tolerance in transgenic tobacco[J]. PLoS One, 2012, 7(12):e52439.
- [25] XU Y, HU W, LIU J, SONG S, HOU X, JIA C, LI J, MIAO H, WANG Z, TIE W, XU B, JIN Z. An aquaporin gene MaPIP2-7 is involved in tolerance to drought, cold and salt stresses in transgenic banana (*Musa acuminata* L.)[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 147:66-76.
- [26] QI J, SONG C P, WANG B, ZHOU J, KANGASJÄRVI J, ZHU J K, GONG Z. Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack[J]. Journal of Integrative Plant Biology,2018,60(9):805-826.
- [27] CUI Y, ZHAO Y, LU Y, SU X, CHEN Y, SHEN Y, LIN J, LI X. *In vivo* single-particle tracking of the aquaporin *AtPIP2*; *1* in stomata reveals cell type-specific dynamics[J]. Plant Physiolo-

gy,2021,185(4):1666-1681.

- [28] ZHANG S, FENG M, CHEN W, ZHOU X, LU J, WANG Y, LI Y, JIANG C Z, GAN S S, MA N, GAO J. In rose, transcription factor PTM balances growth and drought survival *via* PIP2;1 aquaporin[J]. Nature Plants, 2019, 5(3):290-299.
- [29] MEGGIO F, PRINSI B, NEGRI A S, LORENZO G S D, LUC-CHINI G, PITACCO A, FAILLA O, SCIENZA A, COCUCCI M, ESPEN L. Biochemical and physiological responses of two grapevine rootstock genotypes to drought and salt treatments[J]. Australian Journal of Grape & Wine Research, 2014, 20(2): 310-323.
- [30] CORSO M, VANNOZZI A, MAZA E, VITULO N, MEGGIO F, PITACCO A, TELATIN A, D'ANGELO M, FELTRIN E, NE-GRI A S, PRINSI B, VALLE G, RAMINA A, BOUZAYEN M, BONGHI C, LUCCHIN M. Comprehensive transcript profiling of two grapevine rootstock genotypes contrasting in drought susceptibility links the phenylpropanoid pathway to enhanced tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(19): 5739-5752.
- [31] FOUQUET R, LÉON C, OLLAT N, BARRIEU F. Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(9):1541-1550.
- [32] PICAUD S, BECQ F, DEDALDECHAMP F, AGEORGES A, DELROT S. Cloning and expression of two plasma membrane aquaporins expressed during the ripening of grape berry[J]. Functional Plant Biology, 2003, 30(6):621-630.
- [33] SIMÕES M S, CARVALHO G G, FERREIRA S S, HER-NANDES- LOPES J, DE S N, CESARINO I. Genome- wide characterization of the laccase gene family in *Setaria viridis* reveals members potentially involved in lignification[J]. Planta, 2020,251(2):46.
- [34] YANG S S, SHAN L, GUO A G, SUN D Q, SHAO Y J. Aquaporins and drought resistance of the plant[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2005, 23(6):214-218.
- [35] TANG N, SHAHZAD Z, LONJON F, LOUDET O, VAILLEAU F, MAUREL C. Natural variation at *XND1* impacts root hydraulics and trade-off for stress responses in *Arabidopsis*[J]. Nature Communications, 2018, 9(7): 1321-1358.
- [36] RICARDI M M, GONZÁLEZ R M, ZHONG S, DOMÍNGUEZ P G, DUFFY T, TURJANSKI P G, SALGADO S J D, ALLEVA K, CARRARI F, GIOVANNONI J J, ESTÉVEZ J M, IUSEM N D. Genome-wide data (ChIP-seq) enabled identification of cell wall-related and aquaporin genes as targets of tomato ASR1, a drought stress-responsive transcription factor[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1):29.
- [37] VERDOUCQ L, RODRIGUES O, MARTINIÈRE A, LUU D T, MAUREL C. Plant aquaporins on the move: reversible phosphorylation, lateral motion and cycling[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2014, 22: 101-107.