

冷胁迫下大麦幼苗根质膜水通道蛋白基因的表达

段瑞君^{1*}, 熊辉岩², 且原真木³

青海大学¹生态环境工程学院, ²农牧学院, 西宁810016; ³冈山大学资源植物科学研究所, 日本仓敷710-0046

摘要: 植物质膜水通道蛋白(plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)是位于细胞质膜上具有选择性、高效转运水分的一类膜内在蛋白, 参与植物生长发育的多个生理活动。本研究以大麦 ‘Haruna-nijo’ 为材料, 对水培幼苗进行4 °C冷胁迫, 采用实时荧光定量PCR技术对胁迫期(4 °C, 48 h)和温度恢复期(16 °C, 48 h)两个过程的水通道蛋白PIPs基因表达进行了分析; 同期测定了根水导度(Lpr)、根长和苗高, 分析冷胁迫下大麦根PIPs基因的表达与水分生理的关系。结果表明: 大麦幼苗经4 °C低温胁迫48 h后, 苗的生长明显受抑, 根的生长无显著变化; 温度恢复48 h后, 苗恢复生长, 根的生长无显著变化; 根水导度在胁迫期下降, 恢复期急剧升高, 均无显著差异。实时荧光定量PCR结果显示, 根中表达量最高的是HvPIP1;2和HvPIP1;3, 最低的是HvPIP1;1和HvPIP2;3; 冷处理后HvPIPs表达量与对照比较总体下降, 其中HvPIP1;2、HvPIP1;3、HvPIP1;4、HvPIP1;5、HvPIP2;1、HvPIP2;2明显下调。恢复后大多数HvPIPs表达量增加, HvPIP1;1、HvPIP1;2、HvPIP1;5、HvPIP2;3显著增加, HvPIP1;4、HvPIP2;5表达量降低, 但无显著差异。研究发现, 冷胁迫后大麦根HvPIPs的表达情况总体下调, 恢复生长大部分HvPIPs上调, 结合根水导度的变化, 推测大麦HvPIPs在抗冷反应中的作用复杂, 冷害的不同阶段HvPIPs对水分吸收所起的作用不同。

关键词: 大麦; 水通道蛋白; 冷胁迫; 基因表达

Expression of Root HvPIPs of Barley Seedling under Chilling Stress

DUAN Rui-Jun^{1*}, XIONG Hui-Yan², Maki Katsuhara³

¹College of Eco-Environmental Engineering, ²College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Qinghai 810016, China; ³Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Kurashiki 710-0046, Japan

Abstract: The plant plasma membrane aquaporin (plasma membrane intrinsic proteins, PIPs) is a kind of membrane intrinsic proteins which has high selectivity and water transport. They play important roles in many physiological activities in plant growth and development. In this study, seedlings of barley variety ‘Haruna-nijo’ were treated with chilling stress. Expression of water channel protein PIPs of root in two processes which were stress period (4 °C, 48 h) and recovery period (16 °C, 48 h) were analyzed with quantitative real-time reverse transcriptase PCR (qRT-PCR). And root hydraulic conductivity (Lpr), root length and seedling height were analyzed at the same time. The results showed that: after 4 °C and 48 h stress, the growth of the barley seedlings was significantly inhibited, but root growth was no significant changed; after 16 °C, 48 h recovery, shoot height of stressed-seedling caught up that of control seedlings and root growth did not change significantly; root hydraulic conductivity decreased in the period of chilling stress and increased rapidly in recovery period but there were no significant difference. The results of qRT-PCR showed: the highest expression were HvPIP1;2 and HvPIP1;3, the lowest expression were HvPIP1;1 and HvPIP2;3. Compared with the control group, HvPIPs expression were decreased in all after cold treatment, in which HvPIP1;2, HvPIP1;3, HvPIP1;4, HvPIP1;5, HvPIP2;1, HvPIP2;2 were down-regulated significantly. In recovery period, most of HvPIPs expression were increased, especially HvPIP1;1, HvPIP1;2, HvPIP1;5, HvPIP2;3 were up-regulated significantly, but HvPIP1;4, HvPIP2;5 were down-regulated. This study found that HvPIPs expressions of barley root were down-regulated overall in chilling stress and in recovery growth most HvPIPs were up-regulated. Combined with changes of root hydraulic conductivity and plant growth, the role of barley HvPIPs in chilling resistance reaction speculated that HvPIPs effected water absorption were different in different stages.

Key word: barley; aquaporins; chilling stress; gene expression

植物水通道蛋白(aquaporins, AQPs)又称为水孔蛋白, 是位于质膜和液泡膜上运输水分及一些

收稿 2014-05-15 修定 2014-06-16

资助 国家自然科学基金(31160036)。

* 通讯作者(E-mail: ruijunduan@163.com; Tel: 0971-5310086)。

小分子物质的主要内在蛋白(Chrispeels等1999; Krane和Kishore 2003; Maurel等2009; Verkman 2011; 朱美君等1999)。物质膜水通道蛋白即质膜内在蛋白(plasma membrane intrinsic proteins, PIPs)是水通道蛋白的一个亚家族,分PIP1和PIP2两个亚类,二者N端和C端不同,PIP1比PIP2具有较长的N端和较短的C端,各自拥有相应的保守氨基酸序列(Postaire等2008; Wudick等2009; 李红梅等2010)。植物水通道蛋白在植物中广泛分布,参与种子萌发、细胞伸长、花粉开裂、气孔运动等过程的水分跨膜运输(Tyerman等1999; Johansson等2000)。目前对植物水通道蛋白的研究主要集中在拟南芥等模式植物和水稻、烟草、玉米等重要作物(Liu等1994; Yamada等1997; Higuchi等1998; Johanson等2001; Sakurai等2005, 2008; Zelazny等2009; Rae等2011)上。植物通过控制AQP的活性来抵御各种逆境胁迫,已报道的逆境胁迫因子包括干旱、冷害、高盐、机械损伤、渗透胁迫、重金属和淹水缺氧等非生物因子(Katsuhara 2007; Katsuhara和Shibasaka 2007; Mahdih等2008; 杨淑慎和崔丽荣2009),报道了水通道蛋白AQP基因与各种逆境胁迫之间的应答关系(Forrest和Bhave 2007; 李红梅等2010; Hove和Bhave 2011)。大麦水通道蛋白PIPs的研究最初发现的10个大麦PIP基因中,PIP1和PIP2亚族各有5个基因,并报道了盐胁迫下PIP基因响应(Katsuhara等2002, 2003a, b, 2007, 2008; Hanba等2004; Ligaba和Katsuhara 2010)。

本研究以大麦‘Haruna-nijo’为材料,研究冷胁迫对大麦水分生理指标及根水通道蛋白PIPs基因的影响,分析冷胁迫下水通道蛋白PIPs基因的表达模式,为冷胁迫下大麦PIPs基因的表达与水分生理的相关性提供理论参考。

材料与方 法

1 试验材料与处理

大麦(*Hordeum vulgare* L.)品种‘Haruna-nijo’,由日本冈山大学资源植物科学研究所提供。种子用10%过氧化氢消毒10 min,浸没在蒸馏水1 d,萌发后将发芽的种子转入0.25 mmol·L⁻¹ CaSO₄水溶液中培养2 d,然后转入Hoagland培养液中培养,整个培养过程保证通气,每2 d更换一次培养液。培

养条件:温度(16±0.5) °C,湿度75%,光强1 200 μmol·m⁻²·s⁻¹。

幼苗生长至6 d后放置4 °C冷库进行冷胁迫处理2 d,第8天后返回正常条件,培养2 d。

2 测定方法

2.1 根长度和苗高度测定

分别在冷处理前(6 d)、处理后(8 d)和恢复后(10 d)三个时期,测定对照和冷处理幼苗的根长和苗高。

2.2 根水导度的测定

大麦根水导度(root hydraulic conductivity, Lpr)按Horie等(2011)方法进行测量。将幼苗茎固定在金属夹具中,夹具和样品之间的空隙充满了牙胶(PROVIL_novo Light; Heraeus Kulzer产品)。固定的样品放在充满了营养液或补充了NaCl溶液的压力腔室中。使用空气压缩机(Super Oil Free Bebicom; Hitachi, Ltd.)施加压力(*P*)到所述腔室,然后在每个压力点将渗出的汁液收集到玻璃毛细管中。样品的液流速率(*J*)是通过单位时间测量渗出汁液的重量的重量决定的。样本根的表面积(*A*)使用WinRHIZO系统(Regent Instruments Inc.)进行测定。以*J/A*和*P*为坐标作图,在*P*=0.15 MPa和*P*=0.25 MPa之间确定回归直线。根的Lpr计算为该回归直线的斜率。

2.3 实时荧光定量PCR

从不同处理收集根组织并立即在液氮中冷冻。采用RNeasy植物总RNA提取小型试剂盒(Qiagen)提取大麦根总RNA。qRT-PCR操作过程参照Mahdih等(2008)的方法进行绝对定量。*HvPIPs*的实时定量分析使用基因特异性引物(表1)。

实验结果

1 冷胁迫下大麦幼苗根长和苗高的变化

大麦萌发后第6天进行根长和苗高的第1次测量,在第8天后进行了第2次测量,第3次测量是在第10天(图1)。结果表明,大麦幼苗经4 °C低温胁迫48 h,根长基本没有变化,未出现受抑的趋势,而苗高的增加明显受抑,且差异显著;恢复生长温度至16 °C,生长48 h后,根长变化趋势与胁迫期基本相同,而苗高急剧升高,与胁迫期的高度比较差异显著,基本能恢复到对照的水平(图1-A、B)。从结果

表1 qRT-PCR中所用的特异性引物

Table 1 Gene-specific primer pairs used in qRT-PCR analysis

基因名称	引物序列
<i>HvPIP1;1</i>	ATGGGGCAAAGGACAATGAT CATTITAGGTCCTGACACAC
<i>HvPIP1;2</i>	CGCGTATTGTTCAACCA GCATTGCTTACGAAAGAGAG
<i>HvPIP1;3</i>	TCATCGTCGACCGATCATG CATAATATGCACGCTGGAT
<i>HvPIP1;4</i>	TTGAATGCTTCCGTTACG CCCACATACACCTGAAGAT
<i>HvPIP1;5</i>	TACCAAAGCCGATCGGAATA TGAATTACACACACGAGTCT
<i>HvPIP2;1</i>	GCTAGCTTAGCAATGGCCAAGGAC GTCGGACTGGTGTGTACC
<i>HvPIP2;2</i>	CAGTGTCTGTGCATGCATGT GTTCAATCCAACACCAACAC
<i>HvPIP2;3</i>	TCCTTCGGTAGGAGCTAGA AGGCATCCAAATTCCTCAAC
<i>HvPIP2;4</i>	TTTCTCTACCGATCGAGTGT ATCAGATTGCTGGTAGGGA
<i>HvPIP2;5</i>	TGCAACTTCTCGACAGTTCA AATCTTTGCTTGCGGATT

分析可知冷胁迫下, 低温造成的水分运输的变化, 对幼苗根系的生长而言并未受到影响, 根的生长并未处于真正缺水状态; 而苗高明显减弱, 恢复后生长加速, 能达到与对照基本没有差距的水平, 说明在冷胁迫过程, 水分的变化对苗的生长影响明显。

2 冷胁迫下大麦根水导度的变化

冷胁迫处理48 h, 大麦根水导度(Lpr)有下降趋势, 无显著变化, 但在恢复生长48 h后, Lpr出现急剧升高(图2), 但与对照组相比差异不显著。表明胁迫下, 根系的水分吸收仍然保持基本不变, 可能通过其他渗透调节机制维持根系的吸水, 结合植株生长的变化情况, 虽然根系本身的缺水不明显, 但推测水分从根部向地上部的运输不力, 造成苗的生长受抑制; 恢复生长后, 根部水分传导加剧, 尽快补充造成的水分吸收运输的不平衡, Lpr迅速升高。

3 冷胁迫下大麦根水通道蛋白PIPs基因的变化

根中表达量最高的是*HvPIP1;2*和*HvPIP1;3*, 最低的是*HvPIP1;1*和*HvPIP2;3* (图3-A、B)。冷处理后*HvPIPs*表达量总体下降, 出现显著差异的有*HvPIP1;2*、*HvPIP1;3*、*HvPIP1;4*、*HvPIP1;5*、

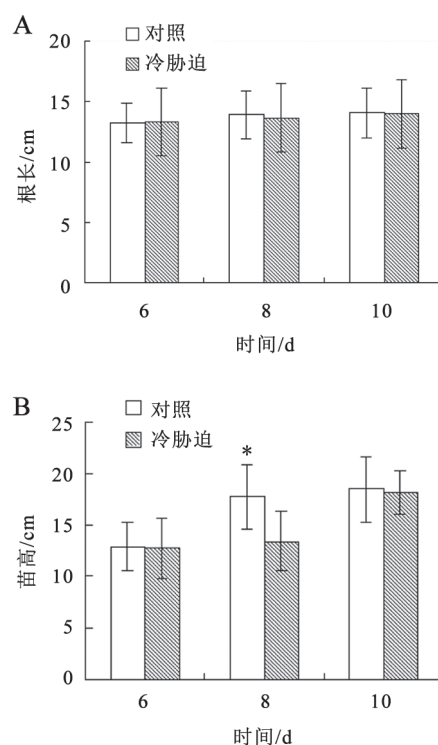


图1 冷胁迫下大麦的根长(A)和苗高(B)和变化
Fig.1 Changes of root length (A) and shoot height (B) under chilling stress

数据为平均值±标准差($n=15$), 采用 t -检验进行显著性分析, *表示冷处理组与对照组存在显著差异($P<0.05$)。

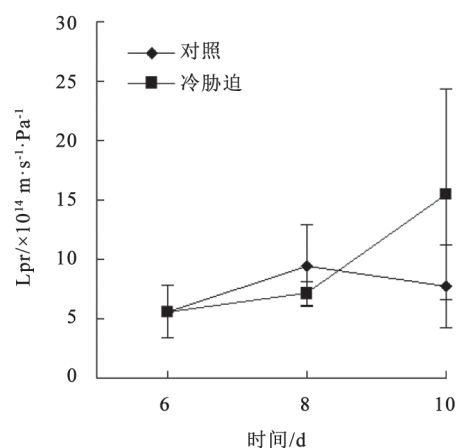


图2 冷胁迫下大麦的根水导度变化
Fig.2 Changes in Lpr under chilling stress

数据为平均数±标准误($n=5$)。

HvPIP2;1、*HvPIP2;2*。恢复后大多数*HvPIPs*表达量增加, 出现显著差异的有: *HvPIP1;1* (图3-C)、*HvPIP1;2*、*HvPIP1;5*、*HvPIP2;3* (图3-D), 表达量降低的有: *HvPIP1;4*、*HvPIP2;5*, 但无显著差异。

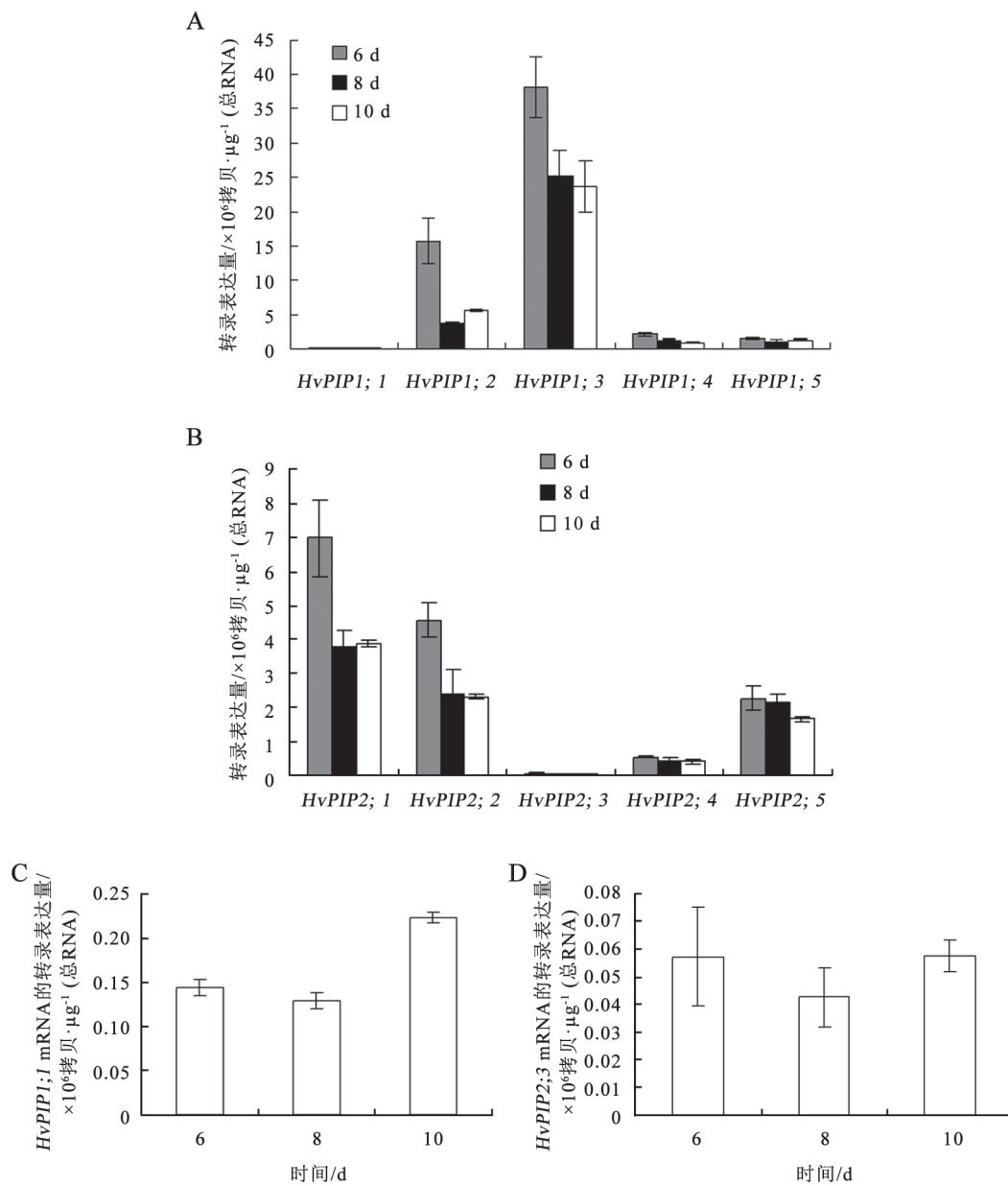
图3 冷胁迫下大麦根水通道蛋白PIP_s基因的变化

Fig.3 Changes of barley PIPs genes in barley under chilling stress

A: PIP1家族基因; B: PIP2家族基因; C: *HvPIP1;1*基因; D: *HvPIP2;3*基因。数据为平均数±标准误(n=3)。

表明冷胁迫下大麦水通道蛋白PIP_s基因基本受抑制,当温度恢复时大多表达水平增加,少数基因继续下降。

讨 论

植物在生长发育过程中遇到冰点以上的低温胁迫时,保持植株地下部分和地上部分的水分平

衡对植物的存活至关重要,冷害产生的原因之一就是地下部分根系水分吸收和地上部分水分散失间的失衡(Sanders和Markhart 2001),造成植物细胞的缺水,而影响了生长。水通道蛋白控制了植物众多生理过程的水分运输,研究植物受到低温胁迫时水通道蛋白的变化对于理解植物对冷害的适应和抗性具有重要意义。

在本研究中, 讨论的焦点就是冷胁迫下大麦幼苗根水导度变化与PIP_s基因的表达。Lpr是根系水分吸收能力大小除水势差外的另一个决定因素, 水通道蛋白的活性和丰度会导致Lpr的改变。在低温处理及恢复过程中, 大麦Lpr的趋势可以看出, 胁迫期根系水分运输的调节机制不仅仅依靠质膜水通道蛋白改变Lpr, 满足根系生长的水分需求还需要渗透调节发挥作用; 恢复期则水通道的变化造成了Lpr的急剧升高, 调节水分吸收, 弥补地上部的水分供应。从水分分配的角度来看, 胁迫时植株首先满足了对根系伸长的水分要求。在以前的报道中, 玉米(de Juan Javier等1997)、菠菜(Fennell和Markhart 1998)和菜豆(Vernieri等2001)在低温胁迫过程中的根水导度都剧烈下降, 这与本文大麦研究的结果有所不同。大麦的盐胁迫研究表明幼苗根在盐胁迫(100 mmol·L⁻¹ NaCl)时Lpr变化不大, 早期虽然根水导度发生了变化, 但根系吸水并没有发生大的变化, 维持根系吸水依靠通过渗透物的调节建立细胞内外的水势差(Katsuhara和Shibasaka 2007)。

水通道蛋白基因对低温有响应, 在拟南芥中PIP₂亚家族的表达分析也发现所有13个成员都对冷胁迫产生响应, 除了*AtPIP2;5*的表达上调外, 其他成员的表达都受冷害抑制(Jang等2004)。余歆(2004)通过Western印迹检测2个抗冷性不同的水稻品种根系PIP₁蛋白的表达, 结果表明2个品种根系的PIP₁蛋白表达在低温处理9 h时无明显变化, 到处理24 h后其表达明显下降。推测水孔蛋白与植物的冷适应有关, 但在低温胁迫的早期, 水通道蛋白可能不是参与水稻抗冷反应的关键因素。本研究中大麦幼苗根中PIP_s表达量最高的是*HvPIP1;2*和*HvPIP1;3*, 最低的是*HvPIP1;1*和*HvPIP2;3*。研究报道盐胁迫(100 mmol·L⁻¹ NaCl)中*HvPIP1;2*、*HvPIP1;3*、*HvPIP1;4*、*HvPIP2;1*、*HvPIP2;2*、*HvPIP2;3*下调, *HvPIP1;1*、*HvPIP1;5*、*HvPIP2;4*、*HvPIP2;5*的表达几乎没发生改变(Horie等2011; Katsuhara和Hanba 2008), 与冷胁迫下PIP_s的表达基本一致。在低温胁迫期, 大部分PIP_s下调, 但Lpr的变化不大, 说明植物通过调控水通道蛋白降低细胞转运水分的能力, 但尚未影响到根部水分的传导, 植物通过抑制苗的生长而保证了根部的需

水; 恢复期PIP_s上调, Lpr急剧升高, 说明植物为了恢复正常生长而调控水通道蛋白的表达, 从而影响到了根部水分的传导, 进一步为苗的生长恢复提供了水分。要充分认识大麦在冷害中水分吸收的策略, 对Lpr在水分运输的变化和PIP_s的表达调控进行同步分析是十分必要的。

参考文献

- 李红梅, 万小荣, 何生根(2010). 植物水孔蛋白最新研究进展. 生物化学与生物物理进展, 37 (1): 29~35
- 杨淑慎, 崔丽荣(2009). 水孔蛋白在细胞延长、盐胁迫和光合作用中的作用. 生物工程学报, 25 (3): 321~327
- 余歆(2004). 水孔蛋白与植物对干旱和低温胁迫响应关系的研究 [博士学位论文]. 北京: 中国科学院研究生院
- 朱美君, 康蕴, 陈珈, 王学臣(1999). 植物水通道蛋白及其活性调节. 植物学通报, 16 (1): 44~50
- Chrispeels MJ, Crawford NM, Schroeder JI (1999). Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *Plant Cell*, 11: 661~667
- de Juan Javier P, José IJ, Manuel SD (1997). Chilling of drought-hardened and non-hardened plants of different chilling-sensitive maize lines changes in water relations and ABA contents. *Plant Sci*, 122 (1): 71~79
- Fennell A, Markhart AH (1998). Rapid acclimation of root hydraulic conductivity to low temperature. *J Exp Bot*, 49 (322): 879~884
- Forrest 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
- Hanba YT, Shibasaka M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K, Terashima I, Katsuhara M (2004). Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol*, 45: 521~529
- Higuchi T, Suga S, Tsuchiya T, Hisada H, Morishima S, Okada Y, Maeshima M (1998). Molecular cloning, water channel activity and tissue specific expression of two isoforms of radish vacuolar aquaporin. *Plant Cell Physiol*, 39 (9): 905~913
- Horie T, Kaneko T, Sugimoto G, Sasano S, Panda SK, Shibasaka 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: 413~430
- Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H (2004). An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 54 (5): 713~725
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjovall S, Fraysse L, Weig AR, 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 Physiol*, 126: 1358~1369
- Johansson I, Karlsson M, Johanson U, Larsson C, Kjellbom P (2000). The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim Biophys Acta*, 1465 (1-2): 324~342
- Katsuhara M (2007). Molecular mechanisms of water uptake and transport in plant roots: research progress with water channel aquaporins. *Plant Root*, 1: 22~26
- Katsuhara M, Akiyama Y, Koshio K, Shibusaka M, Kasamo K (2002). Functional analysis of water channels in barley roots. *Plant Cell Physiol*, 43: 885~893
- Katsuhara M, Chung GC, Sakurai J, Murai M, Izumi Y, Tsumuki H (2007). Low temperature and aquaporins, a molecular mechanism of water transport. *Cryobiol Cryotechnol*, 53: 21~32
- Katsuhara M, Hanba TY (2008). Barley plasma membrane intrinsic proteins (PIP aquaporins) as water and CO₂ transporters. *Pflugers Arch*, 456 (4): 687~691
- Katsuhara M, Hanba TY, Shiratake K, Maeshima M (2008). Expanding roles of plant aquaporins in plasma membranes and cell organelles. *Funct Plant Biol*, 35: 1~14
- Katsuhara M, Koshio K, Shibusaka M, Hayashi Y, Hayakawa T, Kasamo K (2003a). Over-expression of a barely aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol*, 44: 1378~1383
- Katsuhara M, Koshio K, Shibusaka M, Kasamo K (2003b). Expression of an aquaporin at night in relation to the growth and root water permeability in barley seedlings. *Soil Sci Plant Nutr*, 49: 883~888
- Katsuhara M, Shibusaka M (2007). Barley root hydraulic conductivity and aquaporins expression in relation to salt tolerance. *Soil Sci Plant Nutr*, 53: 466~470
- Krane CM, Kishore BK (2003). Aquaporins: the membrane water channels of the biological world. *Biologist*, 50 (2): 81~86
- Ligaba A, Katsuhara M (2010). Insights into the salt tolerance mechanism in barley (*Hordeum vulgare*) from comparisons of cultivars that differ in salt sensitivity. *J Plant Res*, 123: 105~118
- Liu Q, Umeda M, Uchimiya H (1994). Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein. *Plant Mol Biol*, 26: 2003~2007
- Mahdieh MN, 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: 801~813
- Maurel C, Santoni V, Luu DT, Wudick MM, Verdoucq L (2009). The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Curr Opin Plant Biol*, 12 (6): 690~698
- Postaire O, Verdoucq L, Maurel C (2008). Aquaporins in plants: From molecular structure to integrated functions. *Adv Bot Res*, 46: 75~136
- Rae L, Lao NT, Kavanagh TA (2011). Regulation of multiple aquaporin genes in *Arabidopsis* by a pair of recently duplicated DREB transcription factors. *Planta*, 234 (3): 429~444
- Sakurai J, Ahamed A, Murai M, Maeshima M, Uemura M (2008). Tissue and cell-specific localization of rice aquaporins and their water transport activities. *Plant Cell Physiol*, 49 (1): 30~39
- 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
- Sanders PL, Markhart AH (2001). Root system functions during chilling temperatures: injury and acclimation. In: Basra S (ed). *Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress*. New York: Haworth Press, 77~108
- Tyerman SD, Bohnert HJ, Maurel C, Steudle E, Smith JAC (1999). Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J Exp Bot*, 50: 1055~1071
- Verkman AS (2011). Aquaporins at a glance. *J Cell Sci*, 124 (13): 2107~2112
- Vernieri P, Lenzi A, Figaro M, Tognoni F, Pardossi A (2001). How the roots contribute to the ability of *Phaseolus vulgaris* L. to cope with chilling-induced water stress. *J Exp Bot*, 52: 2199~2206
- Wudick MM, Luu DT, Maurel C (2009). A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytol*, 184 (2): 289~302
- Yamada S, Komori T, Myers PN, Kuwata S, Kubo T, Imaseki H (1997). Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol*, 38: 1226~1231
- Zelazny E, Miecielica U, Borst JW, Hemminga MA, 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. *Plant J*, 57 (2): 346~355