

蚕豆类水孔蛋白基因的克隆及表达*

崔香环 郝福顺 陈 惠 蔡敬辉 陈 珈 王学臣**

中国农业大学生物学院植物生理生化国家重点实验室, 北京 100094

摘要 为了解水孔蛋白在气孔运动中的作用, 通过 5'/3'RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术从蚕豆(*Vicia faba*)叶片表皮 cDNA 中克隆出 1 个编码 290 个氨基酸的类水孔蛋白基因 *VfPIP1* (*Vicia faba* plasma membrane intrinsic protein gene), GenBank 登录号为 AY667436. 应用计算机软件对 *VfPIP1* 的氨基酸序列分析表明, *VfPIP1* 含 6 个跨膜区, 具有质膜水孔蛋白的特征信号序列 GGGANXXXXGY 和 TGI/TNPARSL/FGAAI/VI/VF/YN, 属于 PIP1 亚家族成员. 原位杂交及 Northern blot 分析显示, *VfPIP1* 在保卫细胞中有较强的表达信号, 并受脱落酸 (ABA) 诱导. 上述结果为研究水孔蛋白 *VfPIP1* 在气孔运动中的作用及其活性调节机制打下了基础.

关键词 ABA 水孔蛋白 基因克隆 蚕豆 保卫细胞

叶片表皮上的气孔由一对保卫细胞组成, 其关闭程度对植物的蒸腾, 光合作用等具有重要的调控作用. 保卫细胞水分跨膜进入或排出引起膨压变化是气孔张开或关闭的最根本原因. 过去人们一直认为水分是通过简单扩散作用进出细胞的, 然而这种方式运输水分的速率很小. 植物中水孔蛋白的发现为气孔运动过程中水分运输调节的研究提供了新的思路. 在植物中迄今已分离了 30 多种水孔蛋白基因^[1,2], 详细分析它们编码蛋白质的氨基酸序列发现, 其中 6 个跨膜区、较短的保守氨基酸基序 NPA 和信号序列 SGXHXNPA 是水孔蛋白运输水分所必需的^[3,4]. 根据水孔蛋白的分布及功能, 可将其分为 4 个亚类: 一类是位于质膜上的内在蛋白 PIPs (plasma membrane intrinsic proteins), 另一类是位于液泡膜上的内在蛋白 TIPs (tonoplast intrinsic proteins), 第三类主要指与大豆 (*Glycine max*) 根瘤菌周膜上水通道蛋白 NOD26 类似的通道蛋白 NLMS (NOD26-like intrinsic proteins), 还有一类是 SIPs (small basic intrinsic proteins)^[2,5]. 分析

GenBank 中水孔蛋白的数据库表明, 植物拥有比哺乳动物更多的水孔蛋白, 并且这些水孔蛋白在时空分布、蛋白活性及特定功能等方面存在差异^[6-8].

虽然目前已分离出多种水孔蛋白基因, 但其研究主要集中在根中^[9,10], 有关保卫细胞水孔蛋白的研究相对较少. 我们实验室曾用拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 水孔蛋白 RD28 的 DNA 探针和抗体检测到蚕豆保卫细胞中有水孔蛋白的存在^[11], 但究竟哪些水孔蛋白在保卫细胞中存在并起作用至今还不清楚. 据文献报道, 拟南芥质膜水孔蛋白 AtPIP1b, 蚕豆类水孔蛋白 bbaq1, 向日葵 (*Helianthus annuus*) 液泡膜水孔蛋白 SunTIP7 和 SunTIP20 可能在保卫细胞中表达^[12-14], 然而具体的情况仍不清楚. 为此我们以蚕豆叶片表皮为材料, 分离出 1 个蚕豆保卫细胞类水孔蛋白基因 *VfPIP1*, 并对其氨基酸序列的特性、转录表达及定位进行了分析, 初步证明它在保卫细胞中表达, 并具有质膜水孔蛋白的特征信号序列, 属于 PIP1 亚家族成员, 其表达受 ABA 诱导.

2004-08-06 收稿, 2004-10-18 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划 (批准号: G1999011700, 2003CB114307) 和国家自然科学基金 (批准号: 30370129) 资助项目

** 通讯作者, E-mail: xcwang@cau.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

蚕豆种子种在生长室中. 生长条件: 光/暗周期为 12 h / 12 h, 光照强度为 $200 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 温度为 22/17°C. 取 3 周龄展开的叶片, 撕取表皮条, 用 Trizol 法提取蚕豆叶片表皮的总 RNA (GIBCO-BRL 试剂盒).

1.2 *VfPIP1* cDNA 的克隆

1.2.1 *VfPIP1* EST 序列的克隆 以 oligo(dT)₁₈ 为引物, 用 M-MLV 反转录酶合成 cDNA. 通过比较几种植物水孔蛋白的保守氨基酸序列, 设计兼并引物 1 和 2^[15].

引物 1: 5'-(AT)GG(TA)CACAT(TC)AAC-CCAGC-3'

引物 2: 5'-AG(AG)CT(GA)GC(CGT)GGGT-TGATGCC-3'

以该对引物经 PCR 扩增其 EST 序列. 将其产物克隆到 pMD18-T-vector 中, 由 Bioasia 公司测序.

1.2.2 *VfPIP1* 全长 cDNA 的克隆 根据以上的 EST 序列, 设计 5' 端的两条下游特异引物 (GSP1 和 GSP2) 和 3' 端的两条上游特异引物 (GSP3 和 GSP4):

GSP1: 5'-CCACCGCCTTTCGCACCGAAGA-AGGC-3'

GSP2: 5'-CTTGTTAGAGACAGTTTCCTC-GCC-3'

GSP3: 5'-TGGAATCTCTGGGGGTCACAT-AAACCC-3'

GSP4: 5'-GCCACTGATGCCAAACGTAGT-GCCAG-3'

用 5'/3'-RACE 试剂盒 (ClonTech) 分别扩增 *VfPIP1* 的 5' 和 3' 端的序列, 分别将其克隆到 pMD18-T vector 中由 Bioasia 公司测序. 将测序的序列与其 EST 拼接, 根据拼接的全长序列, 设计 *VfP1* 和 *VfP2* 两条特异引物:

VfP1: 5'-ACGCGGGGATAGCATTTCATAT-TC-3'

VfP2: 5'-GAATAAACACATGATCCAGA-

TCTCTC-3'

用 pfu DNA 聚合酶从蚕豆叶片表皮 cDNA 中扩增出 *VfPIP1* 的全长 cDNA 序列, 按上述方式克隆和测序.

1.3 Northern 杂交

将生长 3 周的蚕豆苗用 $100 \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 分别处理 0.5, 1, 2, 3, 5 h, 未处理的作为对照, 用 Trizol 试剂盒 (GIBCO-BRL) 提取总 RNA. 按照 Tsang 等^[16]的方法, 进行 RNA 的凝胶电泳, 并将其转移到尼龙膜上^[17]. 按照 TaKaRa 随机引物标记试剂盒的说明, 用 ³²P 标记 *VfPIP1* 的 3'-UTR 序列作为杂交探针. 65°C 在 Church 缓冲液中 ($0.25 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH7.2, $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{EDTA}$, 7% SDS, 1% BSA) 进行预杂交和杂交, 用高强度的 SSC 溶液洗杂交膜 ($2 \times \text{SSC}$, 0.5% SDS, $1 \times \text{SSC}$, 0.5% SDS), -80°C 曝光 3 d.

1.4 原位杂交

原位杂交按照 Marrison 等的方法^[18], 并做了一些修改. 生长 3 周的蚕豆叶片在 FAA 固定液 (50% 乙醇, 5% 醋酸, 3.7% 甲醛) 中真空抽气 15 min, 室温固定 6 h. 按照常规方法进行石蜡切片. 以 PCR 扩增 3' 末端 cDNA 特异片段, 用地高辛 RNA 标记试剂盒 (Boehringer Mannheim) 合成 *VfPIP1* 的正义和反义探针. 将 200—400 ng · mL⁻¹ 探针与组织切片在杂交缓冲液 ($6 \times \text{SSC}$, 3% SDS, 50% formamide, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ tRNA) 中 50°C 孵育 20 h. 经用洗脱缓冲液 ($2 \times \text{SSC}$, 50% formamide) 50°C 洗两次后, 用含 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNase A 的 $2 \times \text{SSC}$ 液 37°C 处理切片 30 min; 50°C 用洗脱缓冲液处理 1 h; 经过上述处理的切片在含 0.5% 封闭液的 TBS 中封闭 1 h, 再在含 1% BSA 和 0.3% Triton X-100 的 TBS 中处理 30 min; 然后用 TBS 按 1/3000 将碱性磷酸酶结合的抗体稀释成抗体溶液, 用此抗体溶液处理材料 90 min. 再用马来酸缓冲液 ($0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 马来酸, $0.15 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$, pH7.5) 洗去未结合的抗体, 然后室温下在显色液 ($100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Tris-HCl}$, pH 9.5, $0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$, $50 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$, 1/50 NBT/BCIP) 中反应 10 h, 检测 *VfPIP1* 的 mRNA 信号. 用光学显微镜 (Optiphot-2, Nikon) 照相.

2 结果和分析

2.1 蚕豆叶片表皮 *VfPIP1* 基因的克隆

以引物 1 和 2 经 RT-PCR 从蚕豆叶子表皮 cDNA 中扩增出一个 0.39 kb 的 EST 序列. BLAST 分析表明它具有水孔蛋白的保守区. 按照 5'/3'-RACE 试剂

盒的说明分别用 5' 端的两条特异引物 (GSP1 和 GSP2) 和 3' 端的两条特异引物 (GSP3 和 GSP4) 扩增出 *VfPIP1* 的 5' 和 3' 末端的序列. 最后以 VfP1 和 VfP2 为特异引物, 用 pfu DNA 聚合酶从蚕豆叶片表皮 cDNA 中扩增出 *VfPIP1* 的全长 cDNA 序列 (图 1 (a)). 序列分析表明, 它长 1.039 kb, 包含 47 bp 的前导序

```
ACGCGGGGATAGCAATTCATATTCCTCCATTCATCAAGAGAGTGAGAAATCGAAGCAAAGGAACAAGATGTTT
CACTTGGAGCCAACAAATTCCAGAGAGACAACCCATCGGTATTGCAGCTCAGAGCCATGACGACGGAAAAG
GACTATAAGGAACCACTCCAGCACCGTTGTTTCGAGCCTTCTGAACTCACTTCATGGTCTTTCTACAGAGCT
GGGATAGCCGAGTTCGTCGCAACTTTCTGTTTCTACATCACCATCTTGACTGTCATGGGTGTCAACAAA
TCTCAGTCCAAGTGTGCAACTGTTGGTATTCAAGGAATCGCTTGGTCTTTCCGGTGGCATGATCTTTGCCCTT
GTTTACTGCACCGCTGGAATCTCTGGGGGTACATAAAACCCGGCAGTGACATTCGGTTTGTCTTGGCGAG
GAAACTGTCTCTAACAAGAGCAGTGTCTACATCGTGATGCAGGTTCTCGGTGCTATCTGTGGTGCTGGTGT
GGTTAAGGGTTTTGAAGGAAAAGCCTTCTTCGGTGAAAAAGGCGGTGGTGCTAATTTGTTGCTCCTGGTT
ACACAAAAGGAGATGGACTTGGTGCTGAGATTATGGTACCTTTGTTCTTGTTTACACCGTTTTCTCAGCCA
CTGATGCCAAACGTAGTGCCAGAGACTCTCACGTTCTATTTGGCTCCTTTGCCAATTGGGTTTGCTGTGT
TTTTGGTTCATTTGGCCACTATTTCCAATCACTGGAACCTGGTATCAACCCTGCTAGGAGTCTTGGTGCTGCA
TTATCTTCAACCAAGATCGTGGCTGGAATGATCAGTGGATTTCTGGGTTGGACCATTCAATTGGTGCAGCAC
TTGCAGCACTTTACCACACAGTTGTGATCAGAGCCATTCCTTTCAAGTCCAGATCCATGATTTGATTTCTTCT
TTATAAAACTTCATTGTTGCATCTTGGATTGTAATTGAGCTTGAAAATATTTGAGAGATCTGGATCATGTGTTT
ATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

(a)

```
MEAKEQDVS LGANKFPERQPIGIAAQSHDDGKDYKEPPPAPLFEPELTSWSFYRAGIAEFVATFLFLYITILTVM
GVNKSQSKCATVGIQGIAWSFGGMIFALVYCTAGISGGHINPAVTFLGLFLARKLSLTRA VFYIVM QV LGAICGAG
VVKGFEGKAFFGEKGGGANFVAPGYTKGDGLGAEIIGTFVLVYTVFSATDAKRSARDSHVPILAPLPIGFAVFLV
HLATIPITGTGINPARSLGAAIIFNQDRGWNQWIFWVGFPGAALAAALYHTTVIRAIPFKSRS
```

(b)

图 1 *VfPIP1* cDNA 序列和氨基酸序列

(a) *VfPIP1* 的全长 cDNA 序列; (b) *VfPIP1* 相应的氨基酸序列, 框内分别表示 MIP 家族信号序列 SGxHxN-PAVT 和典型的质膜信号序列 GGGANXXXXGY 及 TGI/TNPARSL/FGAAI/VI/VF/YN, 框中 S 分别表示一个潜在的 PKA 磷酸化位点 (Ser131) 和一个潜在的 PKC 磷酸化位点 (Ser205)

列、870 bp 的开放阅读框及 122 bp 的 3'-非编码区. *VfPIP1* cDNA 序列已递交 GenBank, 登录号为 AY667436. 编码 290 个氨基酸的 VfPIP1 具有 6 个跨膜区 (图 2), MIP 家族的信号序列 SGXHXNPAVT, 植物质膜水孔蛋白的特征信号序列 GGGANXXXXGY 和 TGI/TNPARSL/FGAAI/VI/VF/YN (图 1 (b)), 分子量约 30.7 ku. 此外, VfPIP1 具有 1 个磷酸激酶 A (PKA) 的磷酸化位点 (Ser131) 和 1 个磷酸激酶 C (PKC) 的磷酸化位点 (Ser205) (图 1 (b)). 与 4 种植物水孔蛋白 (拟南芥 *AtPIP1b*, 蚕豆 *CAB93959*, 烟草 (*Nicotiana tabacum*) *NtAQP1* 和玉米 (*Zea mays*) *ZmPIP1-2*) 的氨基酸序列进行比较, 发现它们的同源

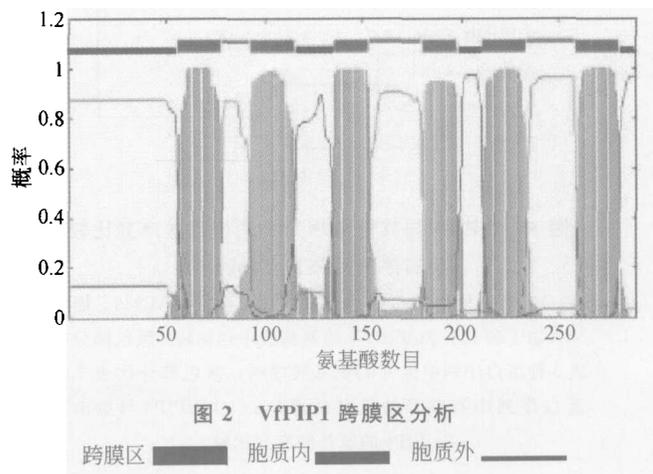


图 2 *VfPIP1* 跨膜区分析

跨膜区 胞质内 胞质外

性都在81%以上(分别为84.48%, 84.14%, 81.1%和87.24%), 并且在水孔蛋白的功能区, 氨基酸序列都是高度一致的, 序列差异主要出现在N端(图3(a)),

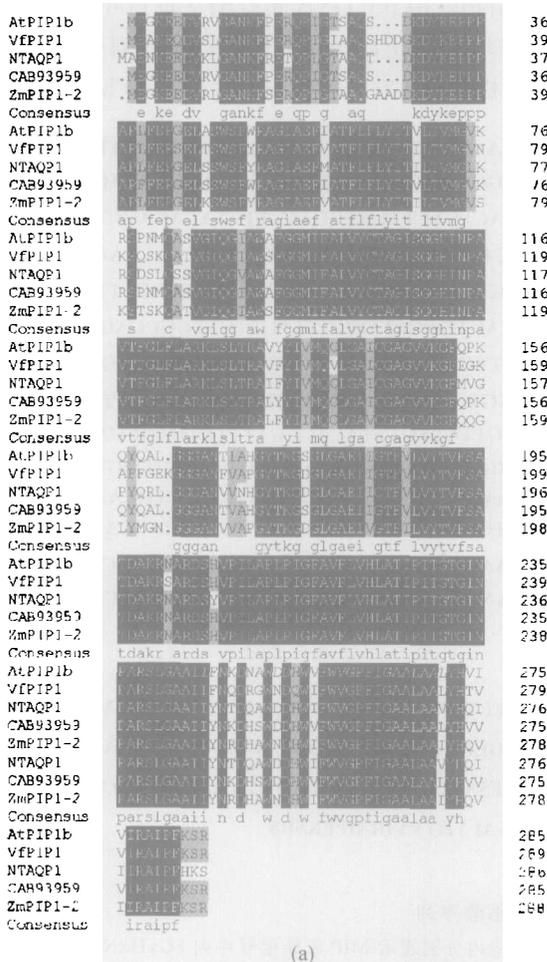


图3 VfPIP1与其他植物PIP的氨基酸序列比较
(所有序列均来自 GenBank)

(a) VfPIP1 分别与拟南芥 AtPIP1b, 蚕豆 CAB939, 烟草 NtAQP1 和玉米 ZmPIP1-2 的氨基酸序列比较. 黑色部分代表 5 种蛋白序列中保守的氨基酸序列, 灰色部分代表 5 种蛋白序列中有差异的氨基酸序列; (b) VfPIP1 与拟南芥 PIPs 的氨基酸序列比较

这可能与亚细胞定位有关. 与已鉴定的拟南芥质膜水孔蛋白氨基酸序列比较, 发现 VfPIP1 与 AtPIP1b 的同源性最高(84.48%)(图3(b)), 并且 VfPIP1 的 N 端比 AtPIP2 长 16 个氨基酸, 因此属于 PIP1 亚家族成员.

2.2 VfPIP1 的表达特性

以 VfPIP1 的 3'非编码区作为探针, 用 Northern blot 杂交研究了 VfPIP1 mRNA 在根、茎和叶中的表达. 结果表明, VfPIP1 在根、叶中的表达较茎中的高(图4(a)). 用 Northern 杂交进一步分析 ABA 处理的蚕豆叶片总 RNA, 发现 ABA 处理 1 h 时 VfPIP1 转录开始增加, 随着处理时间的延长, 转录继续增加, 5 h 达到最大, 如图 4(b). 这表明 VfPIP1 是一个受 ABA 上调的基因.

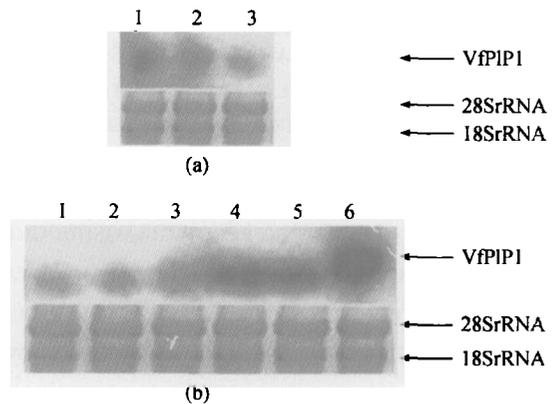


图4 Northern blot 杂交分析 VfPIP1 在蚕豆中的转录表达
(a) 1—3 分别为根、叶、茎; (b) ABA 处理的叶片 VfPIP1 的 mRNA 信号. 1, 对照; 2, 处理 0.5 h; 3, 处理 1 h; 4, 处理 2 h; 5, 处理 3 h; 6, 处理 5 h

2.3 VfPIP1 的定位

用原位杂交对 VfPIP1 在叶中进行了组织定位(图5). 观察发现 VfPIP1 mRNA 在保卫细胞中的信号最强, 叶肉细胞中信号较弱, 而在表皮细胞中没有检测到信号.

3 讨论

保卫细胞中水孔蛋白的发现为研究气孔运动调控的机理提供了新的思路. 在此我们克隆了一个新的蚕豆保卫细胞类水孔蛋白基因 VfPIP1. 由于 VfPIP1 具有水孔蛋白典型的 6 个跨膜区, 与

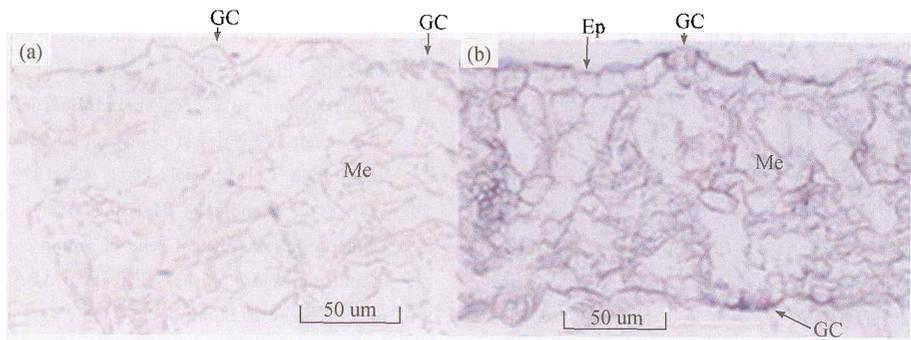


图5 原位杂交在蚕豆叶组织中定位 *VfPIP1* mRNA

(a) 对照用正义 RNA 探针杂交; (b) 反义 RNA 探针杂交的信号, GC, 保卫细胞; Me, 叶肉细胞; Ep, 表皮细胞

AtPIP1b, *ZmPIP1-2* 和 *NtAQP1* 水孔蛋白功能区的氨基酸序列完全一致, 并且还具有植物质膜水孔蛋白典型的特征信号序列 GGGANXXXXGY 和 TGI/TNPARSL/FGAAI/VI/VF/YN, 因此 *VfPIP1* 应属于 PIP1 亚家族成员。

尽管我们实验室曾报道保卫细胞中存在水孔蛋白并参与了气孔运动调节^[11], 然而至今报道保卫细胞水孔蛋白的文献仍然很少。Kaldenhoff 等^[12] 将 *AtPIP1b* 基因的启动子与 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)基因构建成融合基因转化拟南芥, 发现 *AtPIP1b* 主要存在于分化的细胞及新形成的组织中, 且在保卫细胞中也发现了 GUS 的存在。Sun 等^[13] 和 Sarda 等^[14] 分别利用原位杂交技术证明在蚕豆和向日葵保卫细胞中有类水孔蛋白基因 *bbaq1*, 液泡膜水孔蛋白基因 *SunTIP7* 和 *SunTIP20* 的 mRNA 信号。上述研究更进一步确证了保卫细胞中存在水孔蛋白。在此我们从研究气孔运动的模式材料蚕豆中分离出一个类质膜水孔蛋白基因 *VfPIP1*, 组织表达分析表明它不是一个特异表达的基因, 根和叶中的表达较茎中的高。在叶中的定位研究表明, 它在保卫细胞中有较强的表达信号, 这意味着 *VfPIP1* 可能在保卫细胞的水分跨膜运输中起重要作用。

水孔蛋白活性的调节是水分运输调节的重要因素。研究表明, 植物水孔蛋白的活性受环境因子、激素、磷酸化、 Ca^{2+} 和 pH 等因素的调节^[19-24]。我们分离的 *VfPIP1* 受激素 ABA 诱导。ABA 是植物体内极重要的逆境响应激素, 它既是环境胁迫信号的诱导产物, 又是胁迫信号的传导者, 最终通过调节气孔的开度来维持植物水分平衡^[25, 26]。由于 *Vf-*

PIP1 与 *ZmPIP1-2* E 环上被激活的几个氨基酸一致^[27], 它可能与 *ZmPIP1-2* 的活性调节方式相似, 即通过与其他水孔蛋白的亚基形成杂多聚体的形式被激活。此外, *VfPIP1* 具有 1 个 PKA 的磷酸化位点和 1 个 PKC 的磷酸化位点, 可能存在着磷酸化的活性调节机制。并且已有研究表明在 ABA 调节的气孔运动过程中有蛋白激酶和蛋白磷酸酶的参与^[28]。上述分析表明 *VfPIP1* 基因既在保卫细胞中表达又受 ABA 诱导, 并且序列分析支持它还具有潜在的被激活的序列特征, 可能参与了 ABA 调节的气孔运动。但其具体功能还需要用转基因的材料进一步验证。

参 考 文 献

- 1 Quigley F, Rosenberg J M, Shachar-Hill Y, et al. From genome to function: The *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol*, 2002, 3: 1-17
- 2 Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, et al. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol*. 2001, 125: 1206-1215
- 3 Park J H, Saier M H. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J Membr Biol*, 1996, 153: 171-180
- 4 Baiges I, Schaffner A R, Affenzeller M J, et al. Plant aquaporins. *Physiologia Plantarum*, 2002, 115: 175-182
- 5 Schaffner A R. Aquaporin function, structure and expression: Are there more surprises to surface in water relations. *Planta*, 1998, 204: 131-139
- 6 Johnson K D, Herman E M, Chrispeels M J. An abundant, highly conserved tonoplast protein in seeds. *Plant Physiol*, 1989, 91: 1006-1013
- 7 Yamada S, Katsuhara M, Kelly W B, et al. A family of tran-

- scripts encoding water channel proteins; Tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell*, 1995, 7: 1129—1142
- 8 Daniels M J, Chaumont F, Mirkov T E. Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. *Plant Cell*, 1996, 8: 587—599
- 9 Javot H, Maurel C. The role of aquaporins in root water uptake. *Ann Bot*, 2002, 90: 301—313
- 10 Melkonian J, Yu L X, Setter T L. Chilling responses of maize (*Zea mays* L.) seedlings: Root hydraulic conductance, abscisic acid, and stomatal conductance. *J Exp Bot*, 2004, 55: 1751—1760
- 11 Huang R F, Zhu M J, Kang Y, et al. Identification of plasma membrane aquaporin in guard cells of *Vicia faba* and its role in stomatal movement. *Acta Bot Sin*, 2002, 44: 42—48
- 12 Kaldenhoff R, Kolling A, Meyers J, et al. The blue light-responsive *AthH2* gene of *Arabidopsis thaliana* is primarily expressed in expanding as well as in differentiating cells and encodes a putative channel protein of the plasmalemma. *Plant J*, 1995, 7: 87—95
- 13 Sun M H, Xu W, Zhu Y F, et al. A simple method for *in situ* hybridization to RNA in guard cells of *Vicia faba* L.: The expression of aquaporins in guard cells. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001, 19: 129—135
- 14 Sarda X, Tusch D, Ferrare K, et al. Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *Plant J*, 1997, 12: 1103—1111
- 15 Weig A, Deswarte C, Chrispeels M J. The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol*, 1997, 114: 1347—1357
- 16 Tsang S, Yin X, Guzzo-Arkun C, et al. Loss of resolution of gel electrophoresis of RNA: A problem associated with the presence of formaldehyde gradients. *Bio-Techniques*, 1993, 14: 380—381
- 17 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 7. 21—7. 45
- 18 Marrison J L, Leech R M. The subcellular and intra-organelle recognition of nuclear and chloroplast transcripts in developing leaf cells. *Plant J*, 1994, 6: 605—614
- 19 Suga S, Komatsu S, Maeshima M. Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 1229—1237
- 20 Wan X C, Steudle E, Hartung W. Gating of water channels (aquaporins) in cortical cells of young corn roots by mechanical stimuli (pressure pulses): Effects of ABA and of HgCl₂. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55: 411—422
- 21 Siefritz F, Biela A, Eckert M, et al. The tobacco plasma membrane aquaporin NTAQP1. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52: 1953—1957
- 22 Johansson I, Karlsson M, Shukla V K, et al. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell*, 1998, 10: 451—459
- 23 Gerbeau P, Amodeo G, Henzler T, et al. The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J*, 2002, 30: 71—81
- 24 Tournalre-Roux C, Sutka M, Javot H, et al. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature*, 2003, 425: 393—397
- 25 Harris M J, Outlaw W H. Rapid adjustment of guard-cell abscisic acid levels to current leaf-water status. *Plant Physiol*, 1991, 95: 171—173
- 26 Wilkinson S, Davies W J. Xylem sap pH increase: A drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiol*, 1997, 113: 559—573
- 27 Fetter K, Wilder V V, Moshelion M, et al. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell*, 2004, 16: 215—228
- 28 Schmidt C, Schelle I, Liao Y J, et al. Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 9535—9539