

# 柽柳 cDNA 文库的构建及 *ThAQP* 基因的表达

李慧玉,刘桂丰,刘菲菲,王 珊

(东北林业大学 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150040)

**【摘要】** **【目的】** 构建 NaCl 胁迫下柽柳根部 cDNA 文库,在盐胁迫下检测柽柳水通道蛋白(Aquaporins, AQP)基因的表达,探讨 AQP 与柽柳耐盐性的关系。**【方法】** 以 0.4 mol/L NaCl 胁迫处理的刚毛柽柳(*Tamarix hispida*)根部组织为试材,分别构建未经盐胁迫及胁迫 24,48 h 的 cDNA 文库,并测定文库滴度。对从文库中获得的 EST 序列进行拼接,获得刚毛柽柳 AQP(*ThAQP*)的单一序列,对其进行生物信息学分析。采用实时荧光定量 PCR 方法,研究 *ThAQP* 基因在盐胁迫后的刚毛柽柳根和叶中的表达情况。**【结果】** 构建的 NaCl 胁迫 0,24,48 h 3 个文库的初始滴度分别为  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.4 \times 10^6$  和  $1.2 \times 10^6$  pfu/mL,插入片段的平均长度分别为 0.8,0.9 和 0.85 kb,平均重组率为 98.2%。文库克隆随机测序获得了刚毛柽柳的 7 条 *ThAQP* 基因单一序列,这 7 条 *ThAQP* 基因分别与水通道蛋白的 4 个亚家族成员基因具有很高的同源性。在根和叶中,这 7 条 *ThAQP* 基因表达对盐胁迫的响应不同,在根部 *ThAQP1*~*ThAQP4* 相对表达量增多,而其他基因的相对表达量变化不明显;在叶部,*ThAQP7* 在胁迫 24 h 时相对表达量出现小幅度上升,而其他 6 条 *ThAQP* 的相对表达量则明显下降。**【结论】** *ThAQP* 基因可能与柽柳抵御盐胁迫有关。

**【关键词】** 柽柳;cDNA 文库;NaCl 胁迫;水通道蛋白

**【中图分类号】** Q786;S793.5

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2010)07-0161-06

## Construction of cDNA library of *Tamarix hispida* and expression of *ThAQP* genes

LI Hui-yu, LIU Gui-feng, LIU Fei-fei, WANG Shan

(Key Laboratory of Forest Tree Genetics Breeding and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China)

**Abstract:** **【Objective】** The study was to construct three cDNA libraries of root tissues of *Tamarix hispida*, to observe the expression of aquaporins under NaCl stress, and to study mechanisms of salt tolerance of aquaporins from *T. hispida*. **【Method】** Three cDNA libraries were constructed from the root tissues of *T. hispida* of well-watered and exposed to NaCl (0.4 mol/L) for 24 and 48 h, respectively (named as control, 24 and 48 h library, respectively). And the titers of unamplified libraries were performed; EST sequences from three libraries were assembled, then seven AQP unigenes were obtained and analyzed using bioinformatics, and the expression patterns of seven AQP genes under NaCl treatment were researched using real-time PCR. **【Result】** Average primary titer of the three libraries was  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.4 \times 10^6$  and  $1.2 \times 10^6$  pfu/mL, respectively, with a rate of recombination about 98.2%. PCR detection revealed that their average insert size was respectively 0.8, 0.9 and 0.85 kb. The seven *ThAQP* genes were obtained through random selection of sequencing process, and sequence analysis showed that the seven genes were highly similar to the members of four subfamilies of AQP genes respectively. The seven *ThAQP* genes had different expression patterns in roots and leaves under salt treatment. In root tissue, the expression of *ThAQP1*—*ThAQP4* was

\* [收稿日期] 2010-02-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30972386);中央高校基本科研业务费专项资金项目(DL09BA22)

[作者简介] 李慧玉(1978—),女,吉林长春人,讲师,博士,主要从事林木抗逆分子育种研究。

up-regulated, but those of the others remained basically stable under salt treatment. In contrast, in leaf tissue, in addition to *ThAQP7* gene whose expression was slightly up-regulated at 24 h of stress, the expression of other six *ThAQP* genes showed obviously down-regulation. 【Conclusion】 The *ThAQP* may be involved in the adaptation of plant salt tolerance.

**Key words:** *Taraxacum* sp.; cDNA library; NaCl treatment; aquaporin

第一个植物水通道蛋白(Aquaporins, AQP)  $\gamma$ -TIP 是从拟南芥中分离出来的<sup>[1]</sup>, 通过爪蟾卵母细胞表达系统分析, 确认  $\gamma$ -TIP 蛋白具有运输水的专一性功能。AQP 基因是广泛存在于植物中的多基因家族, 迄今已从拟南芥中分离出了 35 种 AQP 基因<sup>[2-3]</sup>, 从小麦(*Triticum aestivum*)中分离了 33~38 种<sup>[4-5]</sup>, 从玉米(*Zea mays*)中分离了 36 种<sup>[6]</sup>, 从番茄(*Solanum lycopersicum*)中分离了 37 种<sup>[7]</sup>。这些 AQP 基因的主要功能是促进水分的长距离运输和细胞内外的跨膜水运输, 调节细胞的胀缩及运输其他小分子物质<sup>[8-9]</sup>。AQP 基因家族不仅在植物生长发育过程中的水分运输方面起关键性作用, 而且在植物对因盐分和干旱引起的渗透胁迫应答方面也起着重要作用<sup>[5]</sup>。

怪柳(*Taraxacum* sp.) 属怪柳科怪柳属植物, 具有抗旱、耐盐碱、耐沙埋、耐贫瘠等特点, 广泛分布于砾石戈壁、黏土、砂土、流沙及各种不同程度盐渍化土壤中, 在各种典型的盐土上都有分布, 其耐盐碱和耐干旱特性已受到人们的广泛关注<sup>[10-12]</sup>。基于此, 本研究通过对 NaCl 胁迫下刚毛怪柳 cDNA 文库的构建及对 cDNA 克隆的随机测序, 获得了 7 条怪柳 AQP 基因(*ThAQP*)单一序列(Unigene), 并通过实时荧光定量 PCR 技术, 研究在 NaCl 胁迫条件下该基因家族在刚毛怪柳叶和根组织中的表达情况, 以期明确 AQP 与怪柳耐盐性的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试材料 温室中盆栽的刚毛怪柳(*Taraxacum hispida*)幼苗经草炭土、淡水培养生长 2 个月后, 用 0.4 mol/L NaCl 溶液分别胁迫处理 24 和 48 h, 取其根和叶部组织, 迅速用双蒸水将泥土清洗干净并拭干, 立刻用液氮冷冻, 置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.1.2 试剂 cDNA 文库构建试剂盒为 Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit (CLONTECH 公司); DNA 测序试剂盒为 DY-Enamic™ ET dye terminator kit (Amersham Phar-

macia Biotech); MegaBACE™ Long Read Matrix (Amersham Pharmacia Biotech); Ex Taq 酶购自宝生物工程(大连)有限公司。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

实时荧光定量 PCR 采用购自 TaKaRa 公司的 SYBR Premix EX Taq™, 在 OPTICON 2 实时荧光定量 PCR 仪(MJ Research)上进行。

### 1.2 怪柳 cDNA 文库的构建

采用 CTAB 法分别提取用 0.4 mol/L NaCl 溶液处理 0, 24, 48 h 的怪柳根部组织总 RNA。根据 Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit 用户手册, 取 1.5  $\mu$ g 总 RNA 进行反转录第 1 链 cDNA 和第 2 链的合成。合成的 cDNA 经蛋白酶 K 消化后, 用 *Sfi* I 进行酶切, 酶切后的 cDNA 片段再经 CHROMA SPIN-400 分级分离, 收集大于 500 bp 的片段直接克隆到 pDNR-LIB 载体上, 分别构建 NaCl 胁迫 0, 24, 48 h 刚毛怪柳的 cDNA 文库。以 pDNR-LIB 载体两端的测序引物 M13<sup>+</sup>、M13<sup>-</sup>为 PCR 扩增引物, 对文库插入片段长度进行 PCR 检测。文库滴度测定按 Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit 用户手册进行操作, 采用 PCR 方法检测文库插入片段长度。用牙签随机挑取 10 个单菌落, 放入装有 LB (含氯霉素 35 mg/mL) 的小瓶中, 37 °C、220 r/min 离心过夜; 吸取 20  $\mu$ L 菌液于 PCR 管, 98 °C 裂解 5 min; 以其为模板, 用载体两端的测序引物 M13<sup>+</sup>、M13<sup>-</sup>为引物, 用 PCR 检测文库插入片段的长度。PCR 反应体系为: PCR 缓冲液(10 $\times$ ) 2  $\mu$ L, dNTP(2.5 mmol/L) 1.6  $\mu$ L, Ex Taq 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, 引物 M13<sup>+</sup>和 M13<sup>-</sup>(10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 模板(40 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, 去离子水补足 20  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。反应结束后电泳检测插入片段的长度。

### 1.3 *ThAQP* 基因序列的获得与分析

用 CAP3 对 3 个 cDNA 文库中获得的 EST 序列进行拼接, 通过 BLASTX 和 BLASTN 比对分析进行 EST 的功能注释, 最终确定获得 7 条 AQP 的

单一序列(Unigene),命名为 *ThAQP1~ThAQP7*。采用 NCBI 中的 BLASTX 程序进行同源性比较,用 NCBI ORF Finder 程序查找序列的 ORF;用软件 Clustalw 1. 8. 1 进行多序列比对;用软件 Prot-Param (<http://au. expasy. org/tools/protparam. html>)计算蛋白的分子质量和理论等电点;用

表 1 AQP 基因及内参基因 18S rRNA 实时荧光定量 PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences of water channel proteins and 18S rRNA in real-time quantitative PCR

| 基因<br>Gene    | 上游引物序列(5'→3')<br>Upstream primer sequence(5'→3') | 下游引物序列(5'→3')<br>Downstream primer sequence(5'→3') |
|---------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <i>ThAQP1</i> | GACAACCAATAGGAACAGCAGC                           | GCAATTCCTGGAATACCAACC                              |
| <i>ThAQP2</i> | CTGCACTGCTGGAATTTCTGG                            | AGCACCGAGAGCTGTCCACC                               |
| <i>ThAQP3</i> | CATCCTTTCATGTCCGGTGG                             | TTGTAGTTCCCTGCTGCAATGG                             |
| <i>ThAQP4</i> | CATGTGGGTATGGTCAAGTCC                            | ATTCCCAGAAAAGACCACCAGC                             |
| <i>ThAQP5</i> | GTTTGATGACTCGTTCTGCTGG                           | GAGCCAATCCAAAGGTGACC                               |
| <i>ThAQP6</i> | CTGGTGCCAACTATACTGGACC                           | CCTTCTGCATTTTTGGCTGCG                              |
| <i>ThAQP7</i> | GCTTACGGATGACGGATCAGC                            | GAAGTTGAGGAGCAGGCAGG                               |
| 18 S rRNA     | GTAGTTGGACCTTGGGGTGG                             | CATTACTCCGATCCCGAAAGCC                             |

以不同处理时间(NaCl 处理 0,24,48 h)刚毛柽柳的不同组织(根、叶)cDNA 为模板,以 18 S rRNA (EF416283)作为内参基因,分别扩增 7 个 *ThAQP* 基因和 18 S rRNA,每个反应均设 3 次重复。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L: SYBR Premix EX *Taq*(2 $\times$ )10  $\mu$ L,cDNA 2  $\mu$ L,上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L,其余用去离子水补足。反应程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 30 s;94  $^{\circ}$ C 变性 12 s,58  $^{\circ}$ C 45 s,72  $^{\circ}$ C 45 s,78.5  $^{\circ}$ C 读板 1 s,45 个循环。反应结束后,以 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。利用 OpticonMonitor 2. 02 软件对扩增数据进行保存和分析,根据下式确定该基因在不同胁迫处理时间下的相对表达量: $X=2^{-\Delta\Delta CT}$  值。式中: $X$  为相对表达量; $CT$  为 PCR 扩增过程中,扩增产物的荧光信号达到设定阈值时所经历的扩增循环次数<sup>[13]</sup>。

2 结果与分析

2.1 柽柳 cDNA 文库的构建及插入片段长度的检测

将合成的 cDNA 第 1、第 2 链产物用 8 g/L 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,发现其最大转录长度远超过 1 kb,平均长度集中在 1 kb 左右(图 1)。滴度测定结果表明,NaCl 胁迫 0,24,48 h 的柽柳 cDNA 文库初始滴度分别为  $1.0\times10^6$ , $1.4\times10^6$  和  $1.2\times10^6$  pfu/mL,重组率为 98.2%。以 NaCl 胁迫 0 h 文库为例,采用 PCR 检测文库平均插入片段长度,结果显示,10 个克隆的 PCR 产物长度为 0.4~1.5 kb,除去载体序列 0.12 kb,平均插入片段长度为 0.8 kb(图 2)。同样方法测得 NaCl 胁迫 24,48 h 时

BLASTP 预测保守区;用 Motif Scan 程序(<http://au. expasy. org/prosite>)进行结构域和基序分析。

1.4 *ThAQP* 家族的实时荧光定量 PCR 分析

在 7 个 *ThAQP* 基因的开放阅读框内,设计实时荧光定量 PCR 引物(表 1),引物由上海生工生物工程技术有限公司进行合成。

的柽柳 cDNA 文库平均插入片段长度分别为 0.9 和 0.85 kb。

2.2 AQP 基因 EST 序列的特点

从 3 个柽柳根的 cDNA 文库中共获得 11 条编码 AQP 基因的 EST 序列,经序列拼接后获得了 7 条 AQP 的单一序列(*ThAQP1~ThAQP7*),其中 *ThAQP4* 为全长序列,其他 6 条为部分序列(表 2)。经 BLASTX 序列比对,这 7 个 *ThAQP* 基因编码蛋白的氨基酸序列分别与水通道蛋白 4 个亚家族成员有很高的同源性,其中 *ThAQP1*、*ThAQP2* 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、胡桃(*Juglans regia*)的质膜内在蛋白(*Plasma intrinsic protein*,PIPs)的同源性分别为 90%和 91% *ThAQP5*、*ThAQP7* 与蓖麻(*Ricinus communis*)、毛白杨(*Populus trichocarpa*)的液泡膜内在蛋白(*Tonoplast intrinsic protein*,TIPs)的同源性分别为 88%和 89%;*ThAQP3* 与滨藜(*Atriplex nummularia*)根瘤菌共生膜上的 NOD26 内在蛋白(*Nodulin-like intrinsic protein*,NIPs)的同源性达到 82%;*ThAQP4* 和 *ThAQP6* 与毛白杨(*Populus trichocarpa*)、葡萄(*Vitis vinifera*)的小分子碱性内在蛋白(*Small basic intrinsic protein*,SIPs)的同源性分别为 60%和 61%。BLASTP 分析结果(图 3)表明,这 7 条 AQP 基因编码的蛋白质氨基酸序列都含有膜内在蛋白(*Membrane intrinsic protein*,MIP)家族的保守区,并且大部分基因含有 MIP 基因家族信号位点(HIN-PAVTFG)和保守的 NPA 基序(asparagines-proline-alanine)。

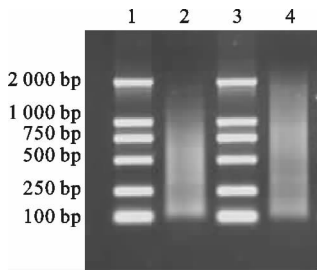


图 1 刚毛柃柳 cDNA 第 2 链的电泳检测  
1,3. DNA Marker DL2000;2. 对照刚毛柃柳的 ds cDNA;  
4. 胁迫 48 h 刚毛柃柳的 ds cDNA

Fig. 1 The gel electrophoresis detection of  
ds cDNA of *T. hispida*

1,3. DNA Marker DL2000;2. ds cDNA of *T. hispida*  
of well-watered;4. ds cDNA of *T. hispida*  
exposed to NaCl for 48 h

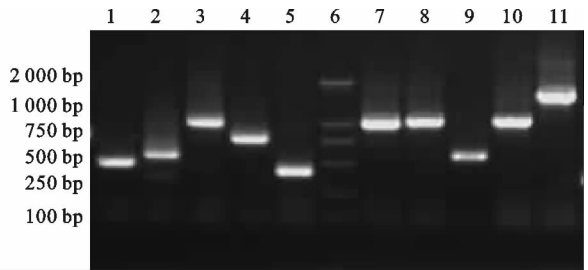


图 2 NaCl 胁迫 0 h 刚毛柃柳 cDNA 文库  
插入片段的 PCR 检测  
1~5,7~11. 重组克隆的 PCR 产物;6. DNA Marker DL2000

Fig. 2 PCR detection of inserts sizes of cDNA  
library of *T. hispida* under NaCl stress  
1-5,7-11. PCR detection of reconstructed  
clones;6. DNA Marker DL2000

表 2 7 个刚毛柃柳水通道蛋白的特征

Table 2 Characteristics of seven AQPs from *T. hispida*

| 蛋白<br>Protein | GenBank<br>注册号<br>GenBank No. | 基因注释<br>Gene<br>annotation | 氨基酸长度/个<br>Amino<br>acid length | 分子量/u<br>Molecular<br>weight | 等电点<br>Isoelectric<br>point |
|---------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| ThAQP1        | EG971612                      | PIP1;5                     | 175                             | 18 552.9                     | 9.60                        |
| ThAQP2        | EG969276                      | PIP2;4                     | 208                             | 21 918.7                     | 9.25                        |
| ThAQP3        | EG973440                      | NIP1-2                     | 140                             | 14 667.1                     | 8.13                        |
| ThAQP4        | EG969022                      | SIP subfamily              | 128                             | 26 463.2                     | 9.85                        |
| ThAQP5        | EG972096                      | TIP, putative              | 105                             | 10 807.5                     | 5.97                        |
| ThAQP6        | EG972618                      | SIP 1                      | 93                              | 10 552.4                     | 9.47                        |
| ThAQP7        | EG973248                      | TIP                        | 165                             | 16 923.8                     | 6.27                        |

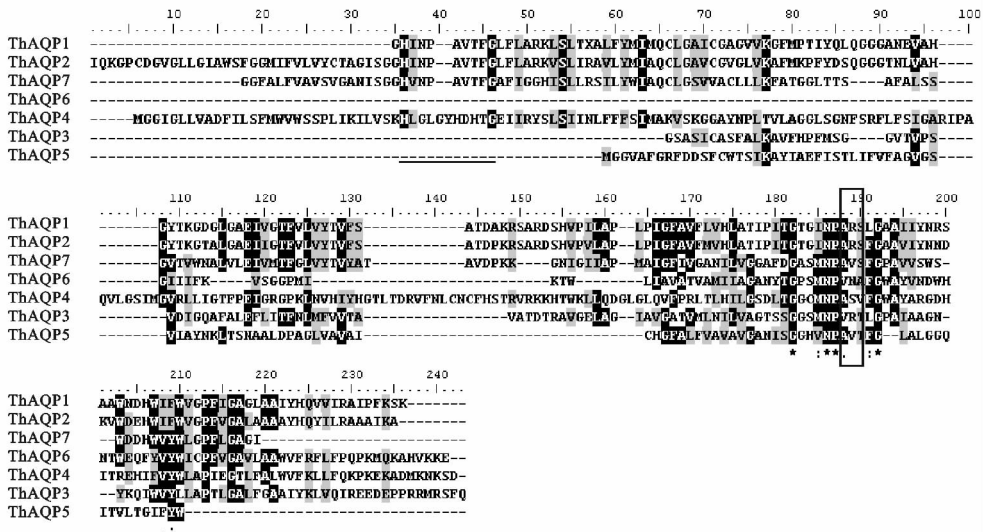


图 3 7 个刚毛柃柳水通道蛋白氨基酸序列的比对

下划线部分为 MIP 家族的保守序列;□部分为保守的 NPA 基序;黑色背景为同源性比较高的序列;  
灰色背景为同源性比较低的序列

Fig. 3 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences from the seven AQPs of *T. hispida*

Conserved sequence of MIP family is present in underlined;Conserved NPA motif is present in square frame;

High homology and low homology of sequences are present in black and gray background, respectively

## 2.3 NaCl 胁迫下 *ThAQP* 基因家族的表达分析

2.3.1 在根中的表达模式 使用实时荧光定量 PCR 技术,对刚毛柾柳在 0.4 mol/L NaCl 胁迫下水通道蛋白基因家族 7 个成员的表达模式进行分析,*ThAQP1*~*ThAQP7* 基因在根中的表达情况如图 4 所示。由图 4 可以看出,7 个水通道蛋白在盐胁迫刚毛柾柳的根部均被诱导而高表达,其中 *ThAQP1*~*ThAQP4* 被强烈诱导,相对表达量最高值均出现在胁迫 24 h 时(是对照(胁迫 0 h)的 4.4~10.9 倍);盐胁迫 48 h 时,这 4 条基因的相对表达量有所下降,但仍高于对照(是对照的 2.2~4.0 倍)。*ThAQP5*~*ThAQP7* 基因在盐胁迫过程中相对表达量变化不明显,基本趋于平稳,胁迫 24 h 时,其相

对表达量是对照的 1.5~2.3 倍;胁迫 48 h,其相对表达量又接近于对照,是对照的 1.1 倍左右。

2.3.2 在叶中的表达模式 在刚毛柾柳叶部,盐胁迫使水通道蛋白的表达受到抑制,胁迫时间越长,相对表达量下降越明显(图 4)。在叶部,除了 *ThAQP7* 在胁迫 24 h 时相对表达量出现小幅度上升(为对照的 1.1 倍),而在胁迫 48 h 相对表达量又下降到低于对照外,其他 6 条 *AQP* 基因均随着胁迫时间的延长,其相对表达量呈下降趋势,在胁迫 24 h 时下降为对照的 33%~88%,在胁迫 48 h 时下降为对照的 6%~36%,尤以 *ThAQP1*~*ThAQP4* 下降幅度较大。

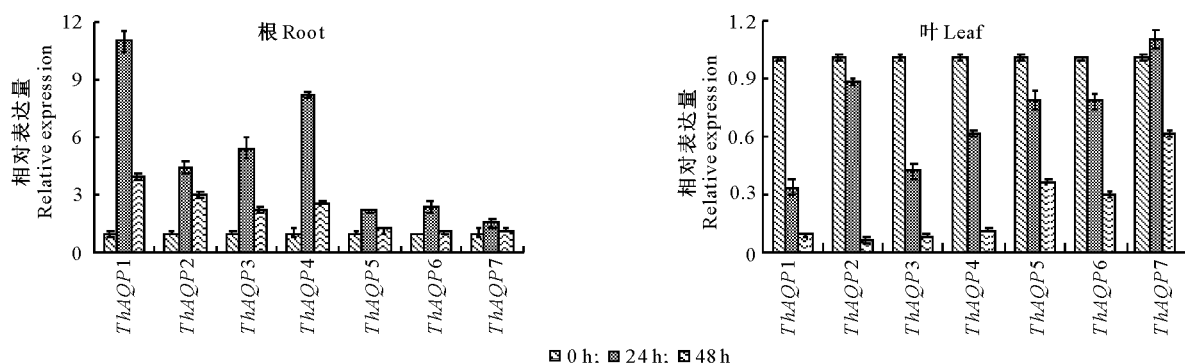


图 4 刚毛柾柳 7 个水通道蛋白基因在叶、根中表达模式的实时荧光定量 PCR 分析

Fig. 4 Expression pattern of seven *ThAQP* genes in leaf and root of *T. hispida* using real-time quantitative PCR analysis

## 3 讨论

植物 AQP 是一类能促进水、甘油和其他小的中性溶质运输的膜通道蛋白家族,它的发现使人们对细胞内和细胞间的水分子运动有了突破性的认识。根据 AQP 的亚细胞定位并结合序列同源性,所有植物的 AQP 均分为质膜内在蛋白(PIPs)、液泡膜内在蛋白(TIPs)、NOD26 类似内在蛋白(NIPs)及 SIP 内在蛋白(SIPs)<sup>[2,14]</sup>。本研究从刚毛柾柳根的 cDNA 文库中获得的 7 条 AQP 基因,分属于这 4 个蛋白基因亚家族。通过序列分析发现,这 7 个 AQP 基因编码蛋白的氨基酸序列分别含有 1~4 个 Cys 残基。有研究发现,这些 Cys 残基是 MIP 类似蛋白行使转运功能所必需的,其对汞敏感,通过与 Hg<sup>2+</sup> 结合,导致 AQP 的构象改变,从而影响水的转运及甘油的吸收<sup>[15]</sup>。

植物根系能感应周围土壤水分及盐浓度的变化,合成并输出化学信号物质,通过木质部输送到叶片,从而调节地上部分的生理过程<sup>[16-17]</sup>。在本研

究刚毛柾柳的根中,7 条 AQP 基因在 NaCl 处理后短时间(24 h)内相对表达量开始增大,且相对表达量在整个胁迫过程中最高。AQP 基因的快速响应可能是刚毛柾柳根部细胞在外界渗透压改变时为了防止胞内的离子浓度(如 Na<sup>+</sup>)过高而发生的应激反应。但随着胁迫时间的延长,为减少细胞膜对水分的渗透性,保持细胞内的水分,机体需要关闭水通道,此时 AQP 基因的相对表达量下降。由此可以推断,刚毛柾柳的耐盐性与水通道蛋白的表达有关。

不同物种、组织间的水通道蛋白及其家族成员对外界各种胁迫的响应是不同的。拟南芥的 PIPs 对于干旱胁迫的响应较盐胁迫更为明显,且各 PIP 亚家族成员间在不同组织中的表达模式有明显的差异<sup>[18]</sup>。Liu 等<sup>[19]</sup>从水稻中分离到 2 个水通道蛋白基因 *rMip1* 和 *rTip1*,在苗期,在水分胁迫、盐胁迫及外源 ABA 作用下,*rTip1* 在叶片和根部的表达增强,而 *rMip1* 只在叶片中表达<sup>[19]</sup>。本研究发现,刚毛柾柳中的 7 个水通道蛋白对于盐胁迫的响应有所不同,在盐胁迫作用下,根中 *ThAQP1*~*ThAQP4*

的表达量增多,而 *ThAQP5*~*ThAQP7* 的表达量变化不明显;在叶中,*ThAQP7* 在胁迫 24 h 时表达量出现小幅度上升,其他 6 个 *ThAQP* 的表达量则明显下降。

在盐胁迫过程中,7 个水通道蛋白表达量的变化表明,水通道蛋白与刚毛柽柳的耐盐性有关,而有关其深层的分子调控机制及其与其他耐盐基因的协同作用,尚有待于进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Maurel C, Reizer J, Schroeder J I, et al. The vacuolar membrane protein  $\gamma$ -TIP creates water specific channels in *Xenopus oocytes* [J]. Europe Molecular Biology Journal, 1993, 12: 2241-2247.
- [2] Johanson U, Karlsson M, Johansson I, et al. 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 Physiol, 2001, 126: 1358-1369.
- [3] Quigley F, Rosenberg J M, Shachar-Hill Y, et al. From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins [J]. Genome Biol, 2002, 3(1): RESEARCH0001.
- [4] Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, et al. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function [J]. Plant Cell Physiol, 2005, 46: 1568-1577.
- [5] Forrest K L, Bhavé M. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype [J]. Funct Integr Genomics, 2007, 7: 263-289.
- [6] Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, et al. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize [J]. Plant Physiol, 2001, 125(3): 1206-1215.
- [7] Sade N, Vinocur B J, Diber A, et al. Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SL-TIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? [J]. New Phytol, 2009, 181(3): 651-661.
- [8] Martinez-Ballesta M C, Bastías E, Zhu C, et al. Boric acid and salinity effects on maize roots. Response of aquaporins ZmPIP1 and ZmPIP2, and plasma membrane  $H^+$ -ATPase, in relation to water and nutrient uptake [J]. Physiol Plant, 2008, 132(4): 479-490.
- [9] Katsuhara M, Hanba Y T. Barley plasma membrane intrinsic proteins (PIP Aquaporins) as water and  $CO_2$  transporters [J]. Pflügers Arch, 2008, 456(4): 687-691.
- [10] 曾凡江, 张希明, 李小明. 柽柳的水分生理特性研究进展 [J]. 应用生态学报, 2002, 13(5): 611-614.

Zeng F J, Zhang X M, Li X M. A review on the water physiological characteristics of *Tamarix* and its prospect [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(5): 611-614. (in Chinese)

- [11] 王霞, 侯平, 尹林克, 等. 土壤缓慢水分胁迫下柽柳植物内源激素的变化 [J]. 新疆农业大学学报, 2000, 23(4): 41-43.  
Wang X, Hou P, Yin L K, et al. Change of hormone of *Tamarix* under slow soil-water stress [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2000, 23(4): 41-43. (in Chinese)
- [12] 王燕凌, 刘君, 郭永平. 不同水分状况对胡杨、柽柳组织中几个与抗逆能力有关的生理指标的影响 [J]. 新疆农业大学学报, 2003, 26(3): 47-50.  
Wang Y L, Liu J, Guo Y P. Effects of different water conditions on several physiological indexes related to resistant ability in *Populus euphratica* and *Tamarix* L. leaves [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2003, 26(3): 47-50. (in Chinese)
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [14] Zardoya R. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family [J]. Biol Cell, 2005, 97(6): 397-414.
- [15] 于秋菊, 吴琦, 林忠平, 等. 植物水孔蛋白研究进展 [J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2002, 38(6): 855-866.  
Yu Q J, Wu Q, Lin Z P, et al. Advance of plant aquaporins research [J]. Universitatis Pekinensis: Acta Scientiarum Naturalium, 2002, 38(6): 855-866. (in Chinese)
- [16] Netting A G. pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions: cellular responses to stress and their implication for plant water relations [J]. J Exp Bot, 2000, 51(343): 147-158.
- [17] 郭安红, 李凤民, 李召祥, 等. 表土干旱和根信号对春小麦产量形成的影响 [J]. 应用生态学报, 1999, 10(6): 689-695.  
Guo A H, Li F M, Li Z X, et al. Effect of top soil draught and root signals on yield formation of spring wheat [J]. Chinese-Journal of Applied Ecology, 1999, 10(6): 689-695. (in Chinese)
- [18] Jang J Y, Kim D G, Kim Y O, et al. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54: 713-725.
- [19] Liu Q, Umeda M, Uchimiya H. Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein [J]. Plant Mol Biol, 1994, 26(6): 2003-2007.