

گزارش علمی کوتاه

مطالعه تغییرات میزان بیان دو ژن از خانواده ژنی ZmPIP تحت تنش‌های محیطی غیرزنده در برگ ذرت (*Zea mays* L. cv.704)اختر ایوبی^{۱*}، فاطمه رحمانی^۲

۱. دانش‌آموخته کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه.

۲. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۶/۱۷

چکیده

گیاهان پیوسته در معرض مجموعه‌ای از عوامل محیطی تنش‌زا قرار می‌گیرند که این عوامل تنش‌زا بسیاری از جنبه‌های ژنتیک و زیست‌مولکولی گیاه را تحت تاثیر خود قرار می‌دهند. در این بین شوری (NaCl, CaCl₂)، خشکی از مهمترین عوامل تنش‌زای محیطی به حساب می‌آیند. برای مقابله با این شرایط، گیاه باید قادر به درک، پاسخ‌دهی و سازگاری نسبت به این تغییرات محیطی باشد. مسیر signal transduction و ژن‌های مربوط به آن نقش مهمی در پاسخ به محرک‌های محیطی در گیاهان ایفا می‌کنند. AQPها، پروتئین‌های سرتاسری اصلی هستند که حرکت آب، CO₂ و دیگر مواد محلول کوچک را از طریق غشای زیستی تسهیل می‌کنند. در این مطالعه، میزان بیان ژن ۲ از خانواده ZmPIP(PIP)ها، پروتئین اصلی غشای پلاسمائی شامل ZmPIP1,5, ZmPIP1,2 تحت تاثیر تنش‌های شوری (NaCl (200mM), CaCl₂ (40mM)، خشکی (PEG6000(10%) برای دو دوره کوتاه مدت (۴ روزه) و بلندمدت (۸ روزه) در برگ ذرت ۴ هفته‌ای بررسی شد. طبق نتایج به دست آمده از آنالیز نیمه کمی RT-PCR میزان بیان این ژن‌ها در برگ گیاهانی که تحت تنش قرار گرفتند نسبت به برگ گیاهان شاهد الگوی بیان متفاوتی (کاهش یا افزایش) از خود نشان می‌دهند. نتایج ما نشان داد که ژن‌های خانواده ZmPIP برای دریافت موثر تغییرات محیطی ضرورت دارد.

واژه‌های کلیدی: ZmPIP، بیان ژن، تنش غیرزنده، RT-PCR، ذرت.

مقدمه

از طرفی شوری باعث کاهش میزان کلسیم و پتاسیم و افزایش سطح سدیم و کلر می‌شود. علاوه بر تمام این‌ها، تنش شوری تجمع گونه اکسیژن فعال (ROS) را باعث می‌شود که می‌تواند برای غشای لیبیدی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه زنده باشد (Bartels and Sunkars, 2005). ذرت (*Zea mays* L.)، سومین گیاه زراعی اصلی پس از گندم و برنج در دنیا محسوب می‌شود. این گیاه نه تنها محصول غذایی مهم برای مصرف بشر، بلکه یک غذای

تنش‌های زنده و غیرزنده از عوامل مهم کاهش تولید محصولات زراعی محسوب می‌شوند (Huang et al., 2008). تنش خشکی دامنه‌ای از پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در گیاهان القاء می‌کند. این پاسخ‌ها شامل بسته شدن روزنه‌ها، مهار رشد سلول، فتوسنتز و فعالیت تنفسی (Bartels and Sunkars, 2005)، کاهش در فعالیت‌های فتوشیمیایی، کاهش تثبیت CO₂، تجمع اسمولیت‌ها و محافظت‌کننده‌های اسمزی و تغییر در متابولیسم کربوهیدرات می‌باشد (Agarwal et al., 2010).

طی مطالعات مولکولی در این پژوهش، بیان ژن *ZmPIP* شامل *ZmPIP1,2* و *ZmPIP1,5* در برگ ذرت با استفاده از روش بیان ژن، مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز RT-PCR در این ژن‌ها عموماً تغییر بیان ژن (افزایش یا کاهش) را تحت تنش‌های شوری، میزان CaCl_2 ، خشکی در برگ‌های این گیاه را طی دوره کوتاه‌مدت یا بلندمدت اعمال تنش، نشان داد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در بهار و تابستان سال ۱۳۹۱ در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه انجام پذیرفت.

شرایط رشد و تیمار

بذر گیاه ذرت (*Zea mays* L. cv.704) از موسسه تحقیقات کشاورزی تهیه شد. بذرها در خاکی با نسبت معین از پرلیت و ماسه، در فیتوترون در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰٪، نسبت طول روز به طول شب ۸:۱۶ با شرایط کشت یکسان برای همه گیاهان، کاشته شد. پس از گذشت ۲۱ روز از کشت، تیمار گیاهان آغاز گردید. تیمار به‌طور کوتاه‌مدت (۴ روزه) و بلندمدت (۸ روزه) برای سه تنش، شوری NaCl (200mM)، CaCl_2 (40mM) و خشکی (10%) PEG6000 اعمال شد.

استخراج RNA، ساخت cDNA و شرایط RT-PCR

کل RNA به روش تریزول از نمونه‌ها استخراج و کیفیت RNA از طریق اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد. cDNA با استفاده از RNA استخراج‌شده و کیت cDNA (Fermentas) طبق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. cDNA تک‌رشته‌ای در یک سیستم واکنش ۱۲ میکرو لیتری (Fermentas) شامل ۱ میکرو لیتر oligo dT و ۱۱ میکرو لیتر (یک میکرو گرم) RNA کل در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. پس از آن، ۲ میکرو لیتر dNTP، ۱ میکرو لیتر ترانس کریپتاز معکوس (Fermentas) M-MLV، ۱ میکرو لیتر مهارکننده RNase و ۴ میکرو لیتر بافر واکنش در ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت و در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه افزوده شد. PCR ها در تیوپ‌های ۲۵ میکرو لیتری حاوی ۱۲/۵ میکرو لیتر از مستر میکس PCR

اساسی برای خوراک دام و مواد خام برای تولید بسیاری از محصولات صنعتی می‌باشد (Salvador, 1997).

برگ‌ها ارگان‌های کلیدی برای تبخیر و فتوسنتز هستند و یک نقش حیاتی در رشد گیاهان ایفا می‌کنند. حرکت آب درون برگ‌ها توسط راه‌های مختلفی اتفاق می‌افتد از جمله اینکه آب می‌تواند از طریق مسیر آپوپلاستی دیواره سلولی جریان یابد یا از طریق مسیر سیمپلاستی و مسیرهای بین سلولی حرکت کند. گیاهان به‌عنوان ارگان‌سیم‌های فتوتروفیک با مسئله حداکثر جذب دی‌اکسید کربن برای فتوسنتز و حداقل آب ازدست‌رفته به اتمسفر مواجه هستند. برای حمایت از تبخیر ممتد در بخش‌های هوایی در نتیجه‌ی فتوسنتز تنها راه حل جذب آب به‌طور پیوسته از خاک و انتقال آن به برگ‌ها است.

آکوپورین‌ها (AQPs) پروتئین‌های سرتاسری اصلی هستند که حرکت آب، CO_2 و دیگر مواد محلول کوچک را از طریق غشای زیستی تسهیل می‌کنند. در گیاهان، آکوپورین‌ها تشکیل یک خانواده بزرگ ژنی می‌دهند؛ برای مثال، ۳۵ عضو در آرآبیدوپسیس (Johanson et al., 2001)، ۳۳ عضو در برنج (Sakurai et al., 2005) و حداقل ۳۳ عضو در ذرت (Chaumont et al., 2001) شناسایی شده است. بر اساس مقایسه توالی اسید آمینه، آکوپورین‌های گیاهی به چهار خانواده فرعی تقسیم شده است: پروتئین‌های ذاتی غشای پلاسمایی (PIPs)، پروتئین‌های ذاتی غشای تونوپلاستی (TIPs)، پروتئین‌های ذاتی NOD26 مانند (NIPs) و پروتئین‌های ذاتی عمومی کوچک (SIPs). زیرخانواده PIP، خود می‌تواند بر اساس تشابه توالی به ایزوفورم‌های PIP1 و PIP2 تقسیم می‌شود (Chaumont et al., 2001; Fetter et al., 2004). بیان آکوپورین‌های غشای پلاسمایی (PIP) ها، پروتئین‌های ذاتی غشای پلاسمایی در بخش‌های هوایی گونه‌های گیاهی مختلفی گزارش شده است (Maurel et al., 2002). SoPIP1,2 در اسفناج به‌طور بالائی در عناصر غربالی آوند آبکش و برگچه بیان می‌شود و همین‌طور در سلول‌های نگهبان حضور دارد (Fraysse et al., 2005). در آفتابگردان هدایت هیدرولیکی آب در برگ توسط تیمار HgCl_2 و ترکیبات شناخته‌شده برای توقف فعالیت اغلب AQP‌ها کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده‌ی درگیری آکوپورین‌ها در این پروسه است (Nardini et al., 2005).

(Fermentas)، ۰/۷۵ میکرو مولار از هر یک از آغازگرها، ۲ میکرولیتر از cDNA و ۹/۷۵ میکرولیتر H₂O انجام شد. شرایط PCR عبارت بود از دناتوراسیون ابتدائی در ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، بعد در ۹۵°C به مدت ۲۵ ثانیه، دمای annealing °C ۶۰-۵۲ به مدت ۲۰ ثانیه در ۲۸-۳۰ سیکل (جدول ۲)، دمای extension °C ۷۲ به مدت ۲۵ ثانیه و دمای extension نهایی °C ۷۲ به مدت ۷ دقیقه. ژن GAPDH به‌عنوان ژن رفرنس داخلی استفاده شد.

جدول ۱. توالی‌های جفت آغازگرهای استفاده‌شده برای RT-PCR.

Table 1. Primers used in semi-quantitative RT-PCR experiment

ژن‌ها Genes	توالی Primer sequence
ZmPIP1,2-FWD	5'-GGAGAATTTAAGTTATTATCCATTTG-3'
ZmPIP1,2-REV	5'-GAAACTGAAATCAAGAAAACCC-3'
ZmPIP1,5-FWD	5'-GAGCCGTGACTGATTATACG-3'
ZmPIP1,5-REV	5'-GGGAGTCTTCTTCTAACTTTCA-3'
GAPDH-FWD	5'-TTGCCATCAATGACCCCTTCA-3'
GAPDH-REV	5'-CGCCCCACTTGATTTTGA-3'

جدول ۲. دمای اتصال آغازگرها، اندازه باندها و تعداد چرخه‌های PCR.

Table 2. Annealing temperatures, bands size and cycles of PCR.

دمای اتصال Annealing temperature	ژن Gene	اندازه باند Band size	تعداد چرخه‌ها Cycles number
52°C	ZmPIP1-2	140 bp	28
52°C	ZmPIP1-5	404 bp	30
60°C	GAPDH	174 bp	30

که در گیاهانی که به‌طور کوتاه‌مدت (۴ روزه) تحت تنش شوری با NaCl(200mM) قرار گرفتند، بیان ژن ZmPIP1,2 در برگ افزایش معنی‌داری نشان داد، درحالی‌که بعد از سپری شدن ۸ روز تحت این شرایط بیان این ژن در گیاه تغییر مشخصی نکرد. همین‌طور ۴ و ۸ روز پس از اعمال تنش CaCl₂(40mM) افزایش بیان ژن در برگ مشاهده شد (شکل ۱ و ۲، الف).

بررسی بیان ژن ZmPIP1,5 تحت تیمار تنش‌های اعمال‌شده در گیاه ذرت در بررسی‌های انجام‌شده، طی ۴ روز تنش CaCl₂ (40 mM) و ۴ و ۸ روز تنش خشکی (10% PEG)، افزایش بیان ژن مشخصی در برگ گیاهان تحت تیمار مشاهده شد. درحالی‌که نتایج پس از ۸ روز تنش NaCl(200mM) کاهش بیان ژن در برگ را نشان داد که بیانگر تغییر روند مولکولی در گیاه، در پاسخ به

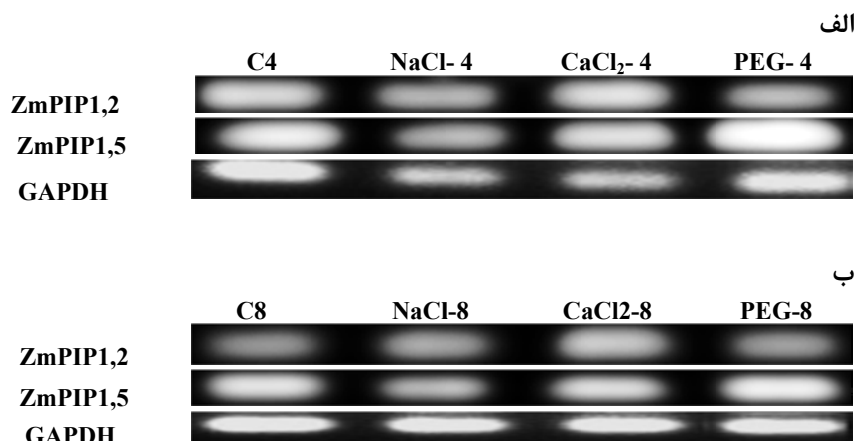
توالی‌های جفت آغازگرهای اختصاصی ژن‌ها که برای PCR استفاده‌شده‌اند، در جدول ۱ قید شده است. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر جداسازی و با استفاده از سیستم Gel Logic 212 Pro Carestream, USA عکس‌برداری شدند. آزمایش‌ها ۳ بار با شرایط مشابه تکرار شد. شدت (intensity) باندها با استفاده از نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری و نمودارها با استفاده از excel 2007 رسم شد. آنالیز آماری با نرم‌افزار SPSS انجام شد. داده‌ها میانگین \pm Standard Deviation را نشان می‌دهند.

نتایج و بحث

بررسی بیان ژن ZmPIP1,2 تحت تیمار تنش‌های اعمال‌شده در گیاه ذرت نتایج ما نشان داد

ژن‌های ZmPIP به‌طور وسیعی در برگ ذرت بیان می‌شوند. آنالیز نیمه کمی RT-PCR برای بیان ژن‌های PIP در برگ ۳ گونه ذرت مورد ارزیابی قرار گرفته است.

تنش‌های مختلف محیطی، طی مدت‌زمان‌های متفاوت اعمال تنش بر گیاه است (شکل ۱ و ۲، ب). در سایر تیمارها، بیان ژن، تغییرات قابل‌توجهی نسبت به گیاهان شاهد نشان نداد.



شکل ۱. الگوی بیان ژن‌های ZmPIP در برگ گیاه ذرت و بررسی RNA آن توسط RT-PCR تحت تنش‌های: الف: کوتاه‌مدت (۴ روزه) و ب: بلندمدت (۸ روزه).

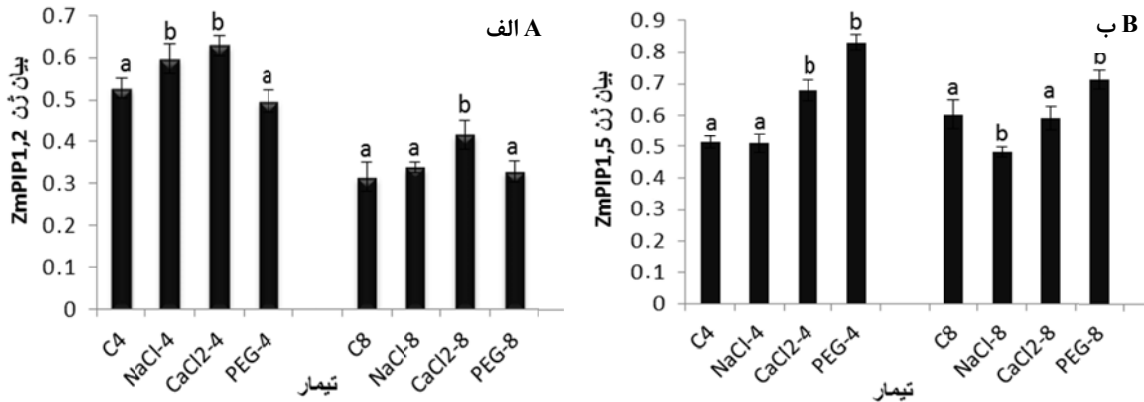
Figure 1. Gel graph of ZmPIPs genes expression in maize leaves and their mRNA levels analyzed by RT-PCR. Maize plants exposed to stresses for A: short time (4 days) and B: long time (8 days).

هفته تنش شوری افزایش بیان ژن‌های ZmPIP مشاهده شده است (Aroca et al., 2007; Kawasaki et al., 2001)؛ درحالی‌که یافته‌های مربوط به تحمیل کوتاه‌مدت تنش شوری (کمتر از ۲ روز) با آن تناقض دارد (Boursiac et al., 2005). این فاز در پاسخ PIP ها به استرس شوری می‌تواند این‌گونه تعبیر گردد: اولاً مهار بیان می‌تواند به دلیل یک مکانیسم جلوگیری کننده از کاهش آب سلولی باشد. ثانیاً افزایش بیان می‌تواند به دلیل آماس سلول‌ها پس از رخداد تجمع باشد (Boursiac et al., 2005). علاوه بر این فراوانی پروتئین‌های PIP در بافت تحت تیمار شوری افزایش یافته است، اگرچه این افزایش برای پروتئین‌های آکوپورین که توسط آنتی‌بادی‌های PIP2 و ZmPIP2,1 شناخته شده‌اند، بیشتر بوده است. تغییر الگوی بیان ژن‌های خانواده ZmPIP در ریشه گیاه ذرت گزارش شده است. مطالعه روی بیان ژن‌های ZmPIP2,5، ZmPIP2,6، ZmPIP2,1، ZmPIP1,1 و ZmPIP1,2 در ریشه ذرت‌های ۳ هفته‌ای با اعمال ۴ روز متناوب تنش شوری (NaCl 150mM) بررسی شده است (Marulanda

گزارش شده است همه ژن‌های ZmPIP به‌جز ZmPIP2,7 در برگ‌های متنوع ذرت نسخه‌برداری می‌شوند که شامل ZmPIP1,1، ZmPIP1,2، ZmPIP1,3، ZmPIP2,1، ZmPIP2,2 هستند (Chaumont et al., 2001). قبلاً برای بافت اولیه ریشه ذرت نسخه‌برداری همه ژن‌های ZmPIP به‌طور خودبه-خودی گزارش شده است. این اطلاعات همچنین با الگوی بیان ژن طبیعی ژن‌های PIP که در برگ‌های آراییدوپسیس گزارش شده است، تطابق دارد (Alexandersson et al., 2004; Jang et al., 2005). واکنش فیزیکی بین ZmPIP1 و ZmPIP2 برای تنظیم ترافیک ایزوفورم PIP1 برای غشای پلاسمایی و برای اصلاح نفوذپذیری آب نشان داده شده است (Fetter et al., 2004; Zelazny et al., 2007). طبق بررسی‌های انجام‌شده، ZmPIP2,5 ظرفیت بالایی در انتقال آب دارد و در مناطق بالغ ریشه تجمع می‌یابد و با تمرکز در قسمت خارجی سلول اپیدرمی نقش بسیار مهمی در حمل‌ونقل آب در ریشه ایفا می‌نماید (Fetter et al., 2004). در مطالعات صورت گرفته طی یک

ZmPIP1,5 در ریشه تحت این تنش کاهش نشان داده است (Marulanda et al., 2010) که دقیقاً این نتیجه با نتایج این مطالعه که پس از ۸ روز اعمال تنش در بیان ژن ZmPIP1,5 در برگ کاهش مشاهده شد مطابقت دارد (شکل ۲، ب).

(et al., 2010). طبق نتایج تنش شوری بیان ژن‌های ZmPIP1,1، ZmPIP1,2، ZmPIP2,5 و ZmPIP2,6 را در ریشه افزایش داده است. نتایج این پژوهش نیز بعد از ۴ روز اعمال تنش شوری افزایش در بیان ژن ZmPIP1,2 نشان داد (شکل ۲، الف).



شکل ۲. میزان بیان نسبی mRNA ژن‌های A: ZmPIP1,2 و B: ZmPIP1,5 در برگ ذرت (*Zea mays* cv.704): مقادیر با GAPDH مقایسه شده‌اند. آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام گردید. بارها نشانگر $\pm SE$ می‌باشند. میانگین و انحراف معیار بر روی هر ستون نشان داده شده است. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین تیمارها است ($P < 0.05$).

Fig. 2. Relative transcript levels of A: ZmPIP1-2, B: ZmPIP1-5 genes using semi-quantitative RT-PCR in *Zea mays* leaves. The 21 day old maize plants were exposed to non-treatment (C), NaCl (200 mM), CaCl₂ (40 mM) and PEG 6000(10%) for duration of 4 and 8 days. Values were compared with GAPDH gene and experiments carried out with three replications. Values were normalized to control. Different letters show significant differences.

و بلندمدت برای برخی ژن‌ها متفاوت مشاهده شد، این مسئله بیانگر تغییر روند مولکولی در گیاه طی مدت‌زمان‌های متفاوت اعمال تنش بر آن، در پاسخ به تنش‌هاست. از آنجایی‌که تاکنون مطالعه کمی بر روی این دسته از ژن‌ها در گیاه ذرت تحت شرایط تنش‌زای محیطی صورت گرفته است، برای اثبات این رابطه بررسی‌های بیشتر نیز ضرورت خواهد داشت.

سپاس‌گذاری

از پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه که طی انجام این مطالعه، کمال همکاری را داشتند تشکر می‌کنیم.

نتیجه‌گیری

در نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، مشاهده شد با اعمال تنش روی گیاه الگوی بیان ژن در خانواده ZmPIP تغییر کرد، در بین تنش‌های اعمال‌شده با توجه به آنالیز RT-PCR و بررسی میزان بیان نسبی ژن‌ها، تنش CaCl₂(40mM) و به‌خصوص خشکی (PEG(10%)) دارای اثرات مشخصی در تغییر الگوی بیان ژن‌های بررسی‌شده داشتند که نشان‌دهنده اثرگذاری این تیمارها بر بیان ژن‌ها است. به‌طورکلی افزایش یا کاهش میزان بیان ژن نشان‌دهنده درک تنش توسط گیاه و پاسخ به آن می‌باشد. جالب‌توجه اینکه حتی الگوی بیان ژن تحت تیمار کوتاه‌مدت

منابع

- Agarwal, P.K., Gupta, K., Jha, B., 2010. Molecular characterization of the *Salicornia brachiata* SbMAPKK gene and its expression by abiotic stress. *Molecular Biology Reports*. 37, 981–986.
- Alexandersson, E., Fraysse, L. Sjøvall-Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., 2005. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology*. 59, 469–484.
- Aroca, R., Porcel, R., Ruiz-Lozano, J.M., 2007. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist*. 173, 808–816.
- Bartels, D., Sunkars, R., 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science*. 24, 23–58.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D.T., Sorieul, M., Van den Dries, N., Maurel, C., 2005. Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology*. 139, 790–805.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M.J. and Jung, R. 2001. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiology* 125, 1206–1215.
- Fetter, K., Van Wilder, V., Moshelion, M., Chaumont, F., 2004. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *The Plant Cell*. 16, 215–228.
- Fraysse, L.C., Wells, B., McCann, M.C., Kjellbom, P., 2005. Specific plasma membrane aquaporins of the PIP1 subfamily are expressed in sieve elements and guard cells. *Biology of the Cell*. 97, 519–534.
- Huang, D.Q., Wu, R., Abrams, S.R., Cutler, A.J., 2008. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany*. 59, 2991–3007.
- Jang, J.Y., Kim, D.G., Kim, Y.O., Kim, J.S., Kang, H., 2004. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 54, 713–725.
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., 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 Physiology*. 126: 1358–1369.
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kwai, K., Galbraith, D., Bohnert, H.J., 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell*. 13, 889–90.
- Marulanda, A., Azcón, R., Chaumont, F., Ruiz-Lozano, J.M., Aroca, R., 2010. Regulation of plasma membrane aquaporins by nodulation with a *Bacillus megaterium* strain in maize (*Zea mays* L.) plants under unstressed and salt-stressed conditions. *Planta*. 232, 533–543.
- Maurel, C., Javot, H., Lauvergeat, V., Gerbeau, P., Tournaire, C., Santoni, V., 2002. Molecular physiology of aquaporins in plants. *International Review of Cytology*. 215, 105–148.
- Nardini, A., Salleo, S., Andri, S., 2005. Circadian regulation of leaf hydraulic conductance in sunflower (*Helianthus annuus* L. & cv. Margot). *Plant Cell and Environment*. 28, 750–759.
- Sakurai, J., Ishikawa, F., Yamaguchi, T., Uemura, M. and Maeshima, M., 2005. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiology*. 46: 1568–1577.
- Salvador, R.J., 1997. Maize. In: The encyclopedia of culture and society of Mexico. Fitzroy Dearborn Publisher.
- Zelazny, E., Borst, J. W., Muylaert, M., Batoko, H., Hemminga, M.A., Chaumont, F., 2007. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. the Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 104, 12359–12364.