

Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas

MARÍLIA GASPAR¹

(recebido: 09 de novembro de 2011; aceito: 08 de dezembro de 2011)

ABSTRACT – (Aquaporins: from water channels to multifunctional transporters in plants). From the functional identification of the first plant aquaporin, in 1993, up to today, a lot of information about the structure, location and function of different members of this multigene family of membrane proteins was provided by the scientific community. Initially regarded as “simple water channels”, the aquaporins have been shown to transport gases and small neutral solutes such as glycerol, urea and silicon, transforming the concept of transmembrane transport. Due to the redundancy of aquaporin genes and their distribution in all organs and plant tissues, these proteins have been considered essential in maintaining vital functions in plants such as water and nutrient uptake in roots, seed germination, photosynthesis, transpiration and reproduction. This work presents a review on molecular and functional characterization of aquaporins and their relevance for plant development and in response to environmental stresses. Despite advances in research on plant aquaporins, there are few studies with native species from tropical regions and therefore there is a vast field of research to be explored, given the differences in water availability, the occurrence of various environmental stresses in tropical biomes, and the mechanisms employed by plants of these regions to be adapted to the wide variety of environmental conditions.

Key words - major intrinsic protein (MIP), solute transport, stress response, water balance

RESUMO – (Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas). Da identificação funcional da primeira aquaporina de plantas, em 1993, aos dias de hoje, uma grande quantidade de informações sobre a estrutura, a localização e a função dos diferentes membros desta família multigênica de proteínas de membrana foi disponibilizada pela comunidade científica. Inicialmente consideradas como “simples canais de água”, as aquaporinas se mostraram capazes de transportar gases e pequenos solutos neutros, como glicerol, uréia e silício, revolucionando o conceito de transporte transmembrana. Devido à redundância dos genes de aquaporinas e à sua distribuição em todos os órgãos e tecidos vegetais, essas proteínas têm sido consideradas essenciais na manutenção de funções vitais, como absorção de água e nutrientes em raízes, germinação de sementes, fotossíntese, transpiração e reprodução. O presente trabalho faz uma revisão sobre a caracterização funcional e molecular das aquaporinas e sua importância no desenvolvimento da planta e na resposta a estresses ambientais. Apesar dos avanços nas pesquisas com aquaporinas de plantas, existem poucos estudos com espécies nativas de regiões tropicais havendo, portanto, vasto campo de pesquisa a ser explorado, tendo em vista as diferenças na disponibilidade de água, a ocorrência de estresses ambientais diversos nos biomas tropicais e os mecanismos empregados pelas plantas dessas regiões para se adaptar à grande variedade de condições ambientais.

Palavras-chave - balanço hídrico, proteínas integrais de membrana (MIP), resposta a estresses, transporte de solutos

Introdução

Durante muito tempo, considerou-se que o transporte de água ocorria por simples difusão entre as moléculas lipídicas das membranas celulares, sem intervenção de um sistema de transporte específico. No entanto, as elevadas taxas de permeabilidade hídrica de algumas membranas, como as dos glóbulos vermelhos e células do epitélio renal, não poderiam ser explicadas somente por difusão (Macey 1984). Da mesma forma, diversos eventos, como alongamento celular, abertura

e fechamento dos estômatos, que demandam uma rápida translocação de água através das membranas vegetais, sugeriam a presença de canais específicos para esta função. A inibição do transporte de água na presença de íons mercúrio (Hg^{2+}), capazes de oxidar os grupos sulfidríla das proteínas, era um argumento extra a favor da existência de um sistema protéico de transporte (Macey 1984). Entretanto, até meados dos anos 80 nenhum grupo de pesquisa tinha sido capaz de identificar uma proteína canal de água e o tema era, ainda, bastante controverso.

Em 1991, Preston & Agre isolaram a partir de glóbulos vermelhos uma proteína de massa molecular 28 kDa, denominada CHIP28 (Channel Forming Intrinsic Protein of 28 kDa). A função de canal de água dessa

1. Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisas em Fisiologia e Bioquímica, Caixa Postal 68041, 04045-972 São Paulo, SP, Brasil. gaspar.marilia@gmail.com

proteína foi comprovada no ano seguinte, através da expressão em sistema heterólogo de ovócitos de *Xenopus laevis* (Preston *et al.* 1992). Esses autores demonstraram que a permeabilidade dos ovócitos que expressavam CHIP28 era cinco a oito vezes maior que aquela dos ovócitos controle e podia ser inibida de maneira reversível por HgCl₂. Esses resultados foram confirmados pela reconstituição de canais de água funcionais em lipossomos contendo a proteína CHIP28 purificada (Van Hoek & Verkman 1992, Zeidel *et al.* 1992). Em 2003, o Dr. Peter Agre foi agraciado com o prêmio Nobel de Química, como recompensa pela descoberta de proteínas que revolucionaram o conceito de transporte de água através das células. Devido à sua função, essas proteínas foram denominadas aquaporinas (AQPs). No entanto, sabe-se atualmente que as aquaporinas são capazes de transportar outras moléculas além da água, conforme será discutido adiante.

Desde sua descoberta, membros da família das proteínas canais de água, denominadas de MIPs (Major Intrinsic Proteins), foram encontrados em praticamente todos os organismos vivos. A abundância dessas proteínas em plantas foi sem dúvida uma das principais razões que permitiram sua identificação por técnicas bioquímicas e moleculares, antes que sua função fosse conhecida. A primeira MIP de plantas, identificada em feijão, representa aproximadamente 2% do total de proteínas extraídas do cotilédone desta espécie (Johnson *et al.* 1989). A função de canal de água foi demonstrada pela primeira vez em plantas para uma proteína isolada de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Maurel *et al.* 1993), abrindo novas perspectivas quanto à compreensão dos mecanismos que regulam o fluxo de água transmembrana em vegetais.

Estrutura molecular das aquaporinas e sua relação com a especificidade a diferentes substratos

A massa molecular média das aquaporinas, deduzida a partir das sequências de nucleotídeos, varia entre 26 e 34 kDa. Essas proteínas possuem uma estrutura bastante conservada, com seis hélices transmembrana, três alças extracelulares e duas intracelulares, e domínios N- e C-terminal citoplasmáticos. A sequência dessas proteínas mostra duas regiões homólogas em orientação inversa, cada uma constituída de três hélices transmembrana. Segundo Reizer *et al.* (1993), essa estrutura poderia ser resultante da duplicação de um gene ancestral procaríoto, ocorrida há 2,5 bilhões de anos, antes do aparecimento dos eucariotos. Após essa duplicação, teria ocorrido a diferenciação das regiões N- e C-terminal da proteína,

que diferenciam as subfamílias conhecidas atualmente (Reizer *et al.* 1993). Dois motivos conservados de aminoácidos, asparagina-prolina-alanina (NPA), estão localizados na primeira alça citoplasmática e na terceira alça extracelular, que se dobram e se inserem no centro da membrana, contribuindo para a formação do canal. Apesar da grande permeabilidade à água – AQP1 de mamíferos permite o transporte de 3×10^9 moléculas de água por monômero por segundo (Zeidel *et al.* 1992) – as aquaporinas bloqueiam o transporte de prótons, através da formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas de água e os resíduos de asparagina dos motivos NPA, impossibilitando a formação de pontes de hidrogênio entre as moléculas de água dentro do canal (Murata *et al.* 2000).

O diâmetro do poro de uma aquaporina clássica, como AQP1 de mamíferos, é de 3 Å, diâmetro próximo ao de uma molécula de água (2,8 Å), sendo que este valor pode variar conforme a especificidade de transporte da proteína (Murata *et al.* 2000). Além do diâmetro do poro, diferenças de conformação entre aquaporinas e transportadores de glicerol (aquagliceroporinas) foram identificadas nas alças extracelulares A, C e E (Gonen & Walz 2006). Segundo Wallace & Roberts (2004), a estrutura da proteína, juntamente com o motivo aminoácido aromático/arginina (ar/R), localizado na região de constrição do poro, determina a especificidade do substrato nos diferentes canais. Análises de alinhamento de sequências e modelagem molecular sugerem grande diversidade estrutural nas sequências envolvidas na formação do canal, permitindo separar as aquaporinas de *Arabidopsis* em oito grupos ar/R distintos com diferentes propriedades funcionais (Wallace & Roberts 2004). Segundo os autores, alguns grupos, como as proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIPs) de plantas, que possuem alta homologia na região do poro, atuam como aquaporinas ou aquagliceroporinas, enquanto grupos com sequências ar/R divergentes teriam funções de transporte distintas. No entanto, vale ressaltar que o transporte através das aquaporinas é regulado por outros fatores, como fosforilação e pH, e o efeito destes na estrutura do poro não foi, ainda, determinado.

Além de água e glicerol, o transporte de várias moléculas, como dióxido de carbono (CO₂), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), amônia (NH₃), arsenito (As(OH)₃), ácido bórico (B(OH)₃) e uréia já foi demonstrado para diversas aquaporinas vegetais. Ao comparar as características estruturais de AQPs de diferentes organismos, Wu & Beitz (2007) sugeriram que todas as aquaporinas, independente de sua sequência de aminoácidos, são permeáveis aos gases NO e CO₂,

moléculas pequenas capazes de atravessar os poros mais estreitos. No entanto, moléculas maiores como os ácidos salicílico e lático ou a uréia, só podem ser transportados por isoformas específicas (Wu & Beitz 2007). Geralmente, as aquaporinas estão inseridas na membrana em arranjos tetraméricos, sendo cada monômero uma unidade funcional independente (Groot & Grubmuller 2001). Essa associação em tetrâmeros poderia criar um quinto poro central, insensível aos inibidores comumente testados, representando uma rota alternativa de transporte pelas aquaporinas, conforme sugerido por diversos autores (Hub & Groot 2006, Bertl & Kaldenhoff 2007, Wang *et al.* 2007).

Por que são necessários tantos genes de aquaporinas em plantas?

As aquaporinas são particularmente abundantes em plantas superiores. Até o momento, 13 homólogos foram descritos em humanos (Magni *et al.* 2006). Os genomas de plantas superiores, como arroz, milho e *Arabidopsis*, possuem mais de 30 homólogos identificados (Chaumont *et al.* 2001, Johanson *et al.* 2001, Sakurai *et al.* 2005), sendo que em *Populus* e algodão foram identificados 55 e 63 genes de aquaporinas, respectivamente (Gupta *et al.* 2009, Park *et al.* 2010). Com base na similaridade da sequência de nucleotídeos, as aquaporinas vegetais foram classificadas inicialmente em quatro diferentes subfamílias, denominadas PIPs (Plasma membrane Intrinsic Proteins), TIPs (Tonoplast Intrinsic Proteins), NIPs (Nodulin26-like Intrinsic Proteins) e SIPs (Small basic Intrinsic Proteins) (Johanson *et al.* 2001) sendo esta divisão diretamente associada à localização subcelular específica dos membros de algumas subfamílias (membrana plasmática e tonoplasto). Recentemente, uma quinta subfamília, denominada XIPs (X Intrinsic Proteins), foi identificada em líquens e algumas espécies de plantas superiores (Danielson & Johanson 2008, Liénard *et al.* 2008).

Segundo Forrest & Bhave (2007), a natureza sésil das plantas e a ausência de um sistema circulatório são fatores que explicariam, ao menos em parte, o fato da superfamília MIP ser mais diversa e complexa nesses organismos do que em animais. Segundo Wudick *et al.* (2009), essa grande variedade de aquaporinas em plantas poderia estar relacionada à seletividade aos diferentes substratos, aos diversos padrões de localização celular e tecidual, ao alto nível de compartimentalização das células vegetais e às diversas funções celulares que promovem o equilíbrio hídrico e osmótico entre os compartimentos.

O papel das aquaporinas no crescimento e desenvolvimento em plantas

Na reprodução sexuada em plantas, o movimento de água e solutos é altamente regulado, sugerindo a presença de aquaporinas nas estruturas reprodutivas. Em tabaco, genes de aquaporinas de membrana plasmática (*PIP1* e *PIP2*) foram identificados durante o desenvolvimento da antera (Bots *et al.* 2005a), sendo que plantas de tabaco transgênicas com silenciamento do gene *PIP2* apresentaram desidratação mais lenta e atraso na deiscência das anteras (Bots *et al.* 2005b). Em *Arabidopsis*, foram identificados dois genes de aquaporinas de tonoplasto, denominados *TIP5;1* e *TIP1;3*, com alta expressão nos grãos de pólen maduros e capazes de transportar água e uréia quando expressos em ovócitos de *Xenopus* (Soto *et al.* 2008). Mutantes desses genes possuem tubos polínicos mais curtos quando germinados em meio com baixas concentrações de nitrogênio, sugerindo que nestas condições estes genes são importantes para o alongamento do tubo polínico (Soto *et al.* 2008). Ainda em *Arabidopsis*, oito genes *PIP* foram detectados nos botões florais, sugerindo o envolvimento das aquaporinas no desenvolvimento floral (Quigley *et al.* 2002). Em tulipas, mudanças de temperatura associadas a alterações na atividade de aquaporina foram relacionadas à abertura e fechamento das pétalas (Azad *et al.* 2004), enquanto em rosas, a inibição da expansão celular em pétalas em função do tratamento com etileno foi diretamente correlacionada a uma diminuição no teor de água deste tecido e, concomitantemente, à diminuição de expressão do gene *RhPIP2;1* (Ma *et al.* 2008).

O desenvolvimento e a germinação de sementes representam outra etapa crucial do desenvolvimento vegetal, na qual a presença de aquaporinas pode regular o transporte de água requerido durante a embebição, o crescimento embrionário e a protrusão da radícula. No entanto, embora a primeira aquaporina identificada em plantas tenha sido isolada de sementes, ainda existem diversas lacunas sobre o papel das aquaporinas no desenvolvimento e germinação. Dois genes de aquaporinas isolados de sementes de canola (*Brassica napus* L.), *BnPIP1* e *BnTIP2*, foram relacionados a etapas distintas do processo germinativo (Gao *et al.* 1999). *BnPIP1* atuaria preferencialmente no transporte de água necessário para a ativação das enzimas e mobilização das reservas nos estágios iniciais da germinação, enquanto a expressão de *BnTIP2* foi correlacionada ao alongamento celular associado à protrusão da radícula (Gao *et al.* 1999). Estudos

realizados em sementes de ervilha demonstraram o envolvimento de aquaporinas no fluxo de água e solutos através da membrana das células parenquimáticas do tegumento, responsáveis pelo fornecimento de nutrientes para o desenvolvimento dos tecidos e para a síntese de compostos de reserva (Schuurmans *et al.* 2003). Além da função de transporte de água, uma aquaporina do tipo NIP, expressa especificamente no tegumento da semente, apresentou alta capacidade de transporte de glicerol quando testada em sistema heterólogo (Schuurmans *et al.* 2003). A expressão de genes de aquaporina associada à função de transporte de nutrientes também foi demonstrada durante o desenvolvimento de sementes de uma gimnosperma (*Picea abies* (L.) H. Karst.) (Hakman & Oliviusson 2002). Uma análise mais ampla do perfil de expressão de diversas aquaporinas de *Arabidopsis* pela técnica de microarranjo permitiu identificar genes expressos nas sementes quiescentes e germinantes. Os resultados mostraram dois genes *TIP3* e um *TIP5* altamente expressos na semente quiescente e uma mudança nesse padrão durante a germinação, com expressão preferencial de genes das subfamílias *TIP1* e *TIP2*. O acúmulo de transcritos do tipo *PIP* em sementes de *Arabidopsis* foi discreto, sendo observado um aumento de expressão somente durante a fase final de crescimento embrionário (Willigen *et al.* 2006). Em contraste ao observado em sementes de *Arabidopsis*, diversas isoformas *PIP* tiveram sua expressão modulada durante a germinação de sementes de arroz, com picos de acúmulo de transcritos nos embriões entre 36 e 72 horas após a embebição (Liu *et al.* 2007). A importância das *PIPs* na germinação de sementes de arroz foi confirmada por análise de plantas transgênicas antisense para o gene *OsPIP1;3*, que apresentaram taxas de germinação aproximadamente 30% menores do que as plantas controle, devido à diminuição da capacidade de absorção de água (Liu *et al.* 2007).

Ao ser absorvida do solo, a água percorre um trajeto radial até o centro da raiz e a seguir um trajeto axial ascendente nos vasos condutores do xilema. Devido à ausência de células, a contribuição das aquaporinas à via axial de transporte de água é insignificante. Já no trajeto radial, a contribuição das aquaporinas é fundamental na via denominada transcelular, na qual a água atravessa diversas camadas de células em série, passando obrigatoriamente pela membrana plasmática e, em alguns casos, pelo tonoplasto. Alternativamente, a água pode atravessar as membranas celulares através da via simplástica (pelos plasmodesmas), ou circular entre as células, por uma via denominada apoplástica (Steudle 2000). Devido à sua eficiência em bloquear os canais de

água, o efeito inibitório do cloreto de mercúrio (HgCl_2) foi bastante utilizado como ferramenta para estimar a contribuição das aquaporinas ao transporte de água em raízes de diversas espécies vegetais, com níveis de inibição da condutividade hidráulica entre 32 e 90% (revisto por Javot & Maurel 2002). No entanto, o uso desse inibidor não permite determinar com precisão o papel das aquaporinas no transporte de água em raízes, tendo em vista a presença de aquaporinas insensíveis ao mercúrio (Daniels *et al.* 1994), a baixa penetração deste nos tecidos (Gaspar *et al.* 2001) e seus efeitos tóxicos e inespecíficos, devido à propriedade do HgCl_2 de se ligar aos resíduos de Cys de quaisquer proteínas. Por essa razão, outras abordagens têm sido empregadas, como o uso de plantas transgênicas, confirmando o importante papel de algumas isoformas de aquaporinas em raízes. Estudos com *Arabidopsis* e tabaco antisense para os genes *PIP1* e *PIP2* demonstraram a contribuição destas duas subfamílias de aquaporinas para o transporte de água em raízes, sobretudo em situação de déficit hídrico (Kaldenhoff *et al.* 1998, Siefritz *et al.* 2002). A função específica de um gene de aquaporina altamente expresso em raízes de *Arabidopsis* (*PIP2;1*) no equilíbrio osmótico da seiva do xilema foi demonstrada através da análise de mutantes de inserção de T-DNA (Javot *et al.* 2003). A super-expressão de *PIP2;1* em arroz levou a um aumento de aproximadamente 150% na biomassa de raízes e na condutividade hidráulica. No entanto, o cultivo em 100 mM de NaCl levou a uma diminuição do crescimento após duas semanas, sugerindo uma maior sensibilidade das plantas transgênicas ao estresse salino (Katsuhara *et al.* 2003).

Variações de condutividade hidráulica em raízes (L_p_r) têm sido associadas a alterações de expressão de genes de aquaporinas neste órgão. Variações diuturnas de L_p_r são acompanhadas por variações no nível de transcritos de aquaporinas do tipo *PIP* em raízes de *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen, milho e *Pisum sativum* L. (Henzler *et al.* 1999, Lopez *et al.* 2003, Beaudette *et al.* 2007). A expressão dessas aquaporinas se mostrou dependente do tipo de raiz (primária ou secundária) (Beaudette *et al.* 2007) e do estágio de desenvolvimento das mesmas, sendo observado em geral um aumento de expressão na zona de alongamento celular e nas regiões mais maduras da raiz primária de milho, nas quais a presença de uma hipoderme e endoderme suberizadas dificultam o transporte de água (Hachez *et al.* 2006). Além de facilitar o transporte de água e solutos, as aquaporinas também poderiam atuar como sensores de pressão osmótica e de turgor, como observado em raízes de milho (Gaspar *et al.* 2001), tendo em vista que sua

capacidade de transporte de água é compatível com a estrutura de um sensor (Hill *et al.* 2004).

Aquaporinas de raízes também são consideradas fundamentais no transporte de solutos e nutrientes. A capacidade das aquaporinas em transportar uréia foi primeiramente observada em células renais de animais (Ishibashi *et al.* 1994). Posteriormente, essa propriedade foi confirmada em plantas, com o isolamento de aquaporinas de membrana plasmática, (Otto & Kaldenhoff 2000, Gaspar *et al.* 2003) e de tonoplasto (Gerbeau *et al.* 1999, Liu *et al.* 2003) capazes de transportar uréia. Essas proteínas são reguladas diferencialmente em raízes na presença de nitrogênio, sendo que em milho *ZmPIP1;5* tem sua expressão induzida na presença de nitrato, enquanto três genes *TIP* tem sua expressão induzida em raízes de *Arabidopsis* em situação de déficit de nitrogênio (Gaspar *et al.* 2003, Liu *et al.* 2003). O gene *AtNIP5;1*, cuja capacidade de transporte de ácido bórico foi demonstrada em ovócitos de *Xenopus*, tem sua expressão induzida em resposta à deficiência de boro, sendo que plantas mutantes para este gene apresentam retardo no desenvolvimento radicular na ausência desse nutriente (Takano *et al.* 2006). Martínez-Ballesta *et al.* (2008) sugeriram o papel regulador do ácido bórico em algumas isoformas de aquaporinas como um dos possíveis mecanismos de tolerância ao estresse salino em raízes de milho. O papel de uma aquaporina do tipo NIP no transporte de ácido láctico foi evidenciado em raízes de *Arabidopsis* em situação de estresse anaeróbico (Choi & Roberts 2007). Mutantes de arroz deficientes para o gene *ls1*, que codifica uma NIP capaz de transportar silício, apresentam diminuição na capacidade de absorção desse mineral em raízes e, conseqüentemente, menor translocação de silício para a parte aérea (Ma *et al.* 2006).

Assim como em raízes, o fluxo radial de água em folhas, que é controlado pela evapotranspiração, implica no transporte de água através das membranas e, conseqüentemente, na presença de proteínas canais de água. Também em folhas, a expressão de diferentes aquaporinas obedece a um padrão de regulação temporal e espacial. Enquanto algumas isoformas são expressas em folhas jovens em expansão, outras são expressas preferencialmente em folhas completamente expandidas, sendo que as aquaporinas expressas nas folhas maduras estão provavelmente envolvidas em processos fisiológicos como carregamento do floema, perda de água do xilema, abertura e fechamento estomático, transporte de CO₂ na fotossíntese e movimento foliar (Heinen *et al.* 2009).

Sarda *et al.* (1997) identificaram dois genes de aquaporina expressos em folhas de girassol, mais

especificamente nas células-guarda dos estômatos, denominados *SunTIP7* e *SunTIP20*. Esses autores demonstraram que a variação no nível de transcritos de *SunTIP7* acompanhava as alterações de condutância estomática (g_s) ao longo do dia e aumentava em plantas submetidas ao déficit hídrico, sugerindo o papel desta aquaporina na modulação da abertura e fechamento estomático (Sarda *et al.* 1997). Aquaporinas expressas em células-guarda foram identificadas em diversas espécies, dentre as quais *Vicia faba* L., *Arabidopsis*, milho e espinafre (Kaldenhoff *et al.* 1995, Sun *et al.* 2001, Fraysse *et al.* 2005, Hachez *et al.* 2008). A expressão de aquaporinas também foi detectada em células da epiderme/periderme e tricomas. Em cevada, uma aquaporina funcional, HvPIP1;6, é expressa especificamente na epiderme foliar, com maior expressão na zona de alongamento, sugerindo a atuação dessa proteína no transporte de água associado ao crescimento celular (Wei *et al.* 2007). Aquaporinas potencialmente envolvidas nos processos de crescimento e divisão celular são expressas nas células do primórdio foliar e nas células meristemáticas em divisão (Jones & Mullet 1995, Yamada *et al.* 1997; Chaumont *et al.* 1998, Hachez *et al.* 2008). Além disso, aquaporinas estão envolvidas no movimento foliar, como evidenciado em *Samanea saman* (Jacq.) Merr. pelo isolamento de proteínas funcionais das células do pulvino, espessamento da base das folhas responsável pelo ajuste do posicionamento foliar em resposta a estímulos endógenos e ambientais (Moshelion *et al.* 2002). O padrão de expressão de *SsAQP2* variou durante o ciclo circadiano, com os maiores níveis de transcritos no período da manhã, provavelmente devido à alta demanda de fluxo de água durante a abertura do pulvino (Moshelion *et al.* 2002). A contribuição de aquaporinas no ajuste osmótico celular associado ao movimento foliar foi, também, demonstrada em tabaco e *Mimosa pudica* L. (Siefritz *et al.* 2004, Temmei *et al.* 2005).

A presença frequente de aquaporinas nos tecidos dos feixes vasculares, conforme observado nas células parenquimáticas do xilema e nas células companheiras do floema de milho e tabaco, sugere a atuação dessas proteínas no efluxo de água dos vasos do xilema e no carregamento do floema (Heinen *et al.* 2008). Estudos com *Vriesea gigantea* Mart. ex Schult. f., uma bromélia epífita com presença de tanque, mostraram que a absorção de uréia do tanque foi fortemente inibida (78%) pelo tratamento com HgCl₂, sugerindo a participação de aquaporinas no transporte desse nutriente (Inselsbacher *et al.* 2007). Dois genes de aquaporina com alta identidade de seqüência com um gene *PIP* e

um *TIP* para os quais a função de transporte de uréia foi previamente demonstrada, foram isolados da base das folhas de *V. gigantea* e tiveram sua expressão induzida na presença desse composto nitrogenado (Cambuí, Mercier & Gaspar, dados não publicados). Segundo essas mesmas autoras, a presença dessas isoformas na porção basal das folhas, que assume o papel fisiológico de raiz nessa espécie de bromélia, sugere a atuação das aquaporinas para maior eficiência na utilização dos recursos hídricos e nutricionais, que ocorrem de forma ocasional e temporária em seu ambiente natural.

Evidências indiretas de que as aquaporinas também poderiam modular a condutância das células do mesófilo foliar (g_m) foram fornecidas por Terashima & Ono (2002), após tratarem folhas de *Vicia faba* e *Phaseolus vulgaris* L. com $HgCl_2$. Além de diminuir em 70 a 80% a condutividade hidráulica foliar, o tratamento com $HgCl_2$ inibiu a fotossíntese, sendo observada diminuição nas taxas de assimilação de CO_2 e de transporte de elétrons. Devido à sua capacidade de transporte de CO_2 em sistema heterólogo, a aquaporina NtAQP1 foi considerada potencial candidata à modular a condutância das células do mesófilo foliar (Uehlein *et al.* 2003). Esta hipótese foi confirmada posteriormente por análises de plantas transgênicas com expressão constitutiva ou ausente de *NtAQP1*, que apresentaram 20% de aumento e 13% de diminuição, respectivamente, nas taxas de assimilação fotossintética, quando comparadas aos respectivos controles (Flexas *et al.* 2006). Medidas de fluorescência da clorofila e discriminação isotópica de ^{13}C indicaram que as diferenças na fotossíntese se devem a alterações na condutância do mesófilo foliar ao CO_2 , que foi 30% menor nas plantas antisense e 20% maior nas plantas com super-expressão de *NtAQP1* (Flexas *et al.* 2006). A determinação da localização subcelular de NtAQP1 na membrana interna dos cloroplastos, além de demonstrar pela primeira vez a presença de aquaporinas na membrana de organelas, permitiu atribuir a essa proteína um importante papel fisiológico *in vivo*, o de facilitar o transporte de CO_2 para seu sítio de fixação no estroma dos cloroplastos (Uehlein *et al.* 2008). Esses estudos, em conjunto, confirmam o importante papel das aquaporinas permeáveis ao CO_2 , ou “ CO_2 aquaporinas” como sugerido por alguns autores, na regulação da fotossíntese em plantas.

Aquaporinas e resposta a estresses ambientais

Embora as aquaporinas tenham um papel chave na regulação do transporte de água, resultados contrastantes têm sido observados em situação de estresse ambiental.

Como relatado acima, a condutividade hidráulica de raízes é regulada parcialmente por aquaporinas, mais especificamente por PIPs (Javot *et al.* 2003, Postaire *et al.* 2010). No entanto, não é possível encontrar uma resposta comum dessa classe de proteínas em raízes submetidas a uma situação de déficit hídrico. Resultados de nove estudos em que a expressão de genes *PIP* foi analisada em condição de seca mostraram que, dos 37 genes *PIP* estudados, 15 tiveram sua expressão diminuída, 13 tiveram aumento de expressão e nove mantiveram seus níveis de transcritos inalterados, indicando que cada gene *PIP* deve ter uma função específica na resposta ao estresse (Aroca *et al.* 2011).

Da mesma forma, respostas diferenciais à seca foram observadas em plantas transgênicas com inibição ou indução de determinadas isoformas de PIP. Plantas antisense de tabaco e *Arabidopsis* com silenciamento de genes *PIP* apresentaram queda na capacidade de recuperação após imposição de déficit hídrico (Martre *et al.* 2002, Siefritz *et al.* 2002), enquanto plantas de tabaco e arroz com aumento de expressão de aquaporinas *PIP1* e *PIP2*, respectivamente, se mostraram hipersensíveis aos estresses hídrico e salino (Aharon *et al.* 2003, Katsuhara *et al.* 2003). Com relação às aquaporinas de tonoplasto, comportamentos diferenciais das plantas transformadas também foram observados. Sade *et al.* (2009) demonstraram que a expressão constitutiva de *TIP2;2* em plantas de tomate foi capaz de modular a transpiração em diferentes situações ambientais e manter as funções fisiológicas, crescimento e produtividade em níveis normais, mesmo em condições de estresse hídrico e salino. Contrariamente ao observado em tomate, plantas de *Arabidopsis* super-expressando uma *TIP* de soja se mostraram mais suscetíveis à desidratação (Wang *et al.* 2011). Segundo Hussain *et al.* (2011), existem atualmente interpretações divergentes dos resultados obtidos com plantas transgênicas. Para alguns autores, o aumento nos níveis de aquaporina melhora a capacidade das plantas em lidar com o estresse hídrico, enquanto outros acreditam que as plantas evitam perdas excessivas de água ao “desligar” as aquaporinas durante a desidratação.

Além da seca, diversas isoformas de aquaporinas são moduladas por estresse salino e osmótico, por frio e por fitormônios, com grande variedade de respostas, como observado para o déficit hídrico (Suga *et al.* 2002, Jang *et al.* 2004, Sakurai *et al.* 2005, Yu *et al.* 2006, Peng *et al.* 2007). Plantas de *Arabidopsis* transformadas com aquaporinas de *Rhododendron catawbiense* Michx., cuja expressão se mostrou inibida em folhas com o aumento da tolerância ao frio, foram menos tolerantes ao congelamento do que as plantas controle (Peng *et*

al. 2008). Análises anatômicas revelaram aumento do tamanho e espessura das folhas, como consequência de um aumento no tamanho das células da camada paliçádica e do mesófilo esponjoso, indicando que essas plantas, devido ao maior volume celular, estariam mais propensas a sofrer danos mecânicos durante a contração celular observada no processo de congelamento (Peng *et al.* 2008).

No entanto, é importante ressaltar a complexidade dos mecanismos de resposta à seca e aos demais estresses, sendo que outros fatores, em conjunto com as aquaporinas, são responsáveis pela resposta de tolerância. Esse fato é bastante evidente em plantas de *Eragrostis nindensis* Ficalho & Hiem, tolerantes à dessecação, cujas folhas apresentaram, durante o processo de desidratação, diversas modificações anatômicas, bioquímicas e funcionais, como o dobramento da parede celular de células epidérmicas e do mesófilo e a formação de inúmeros pequenos vacúolos acumuladores de metabólitos osmoreguladores (prolina, proteínas e sacarose), associados ao aumento da expressão de *TIP3;1* nos vacúolos dos tecidos desidratados (Willigen *et al.* 2004).

Embora inúmeros grupos de pesquisa tenham se dedicado ao estudo das aquaporinas de plantas nos últimos 20 anos, e múltiplas funções dessa família de proteínas tenham sido desvendadas, ainda restam lacunas na compreensão de seu funcionamento e interação com o ambiente. Sobretudo se considerarmos que a grande maioria dos trabalhos foi realizada com plantas modelo e espécies temperadas de interesse comercial. Dessa forma, espécies de regiões tropicais, distribuídas em ambientes com diferentes situações de disponibilidade de água, ou com variação sazonal desse recurso, além de espécies com adaptações morfológicas e bioquímicas que promovem melhor utilização dos recursos hídricos e nutricionais, têm sido negligenciadas. Mecanismos reprodutivos peculiares e ciclos de vida longos, associados à dificuldade de regeneração e cultivo *in vitro*, dificultam a obtenção de plantas transgênicas e, conseqüentemente, análises funcionais em espécies nativas de ambientes tropicais. A disponibilização de bancos de dados genômicos de algumas espécies, associada ao advento de técnicas de sequenciamento em larga escala, deve compensar, em médio prazo, a escassez de dados moleculares sobre as aquaporinas de plantas tropicais.

Agradecimentos – À editora-chefe da Revista Brasileira de Botânica, Dra. Sônia Machado de Campos Dietrich, pelo convite para publicação do artigo; à Dra. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros, membro do Corpo Editorial,

pela revisão criteriosa do manuscrito; à Dra. Kelly Simões, pelas valiosas sugestões e auxílio na formatação do texto e às Dras. Camila Aguetoni Cambuí e Helenice Mercier, pela preciosa colaboração nas pesquisas com aquaporinas de bromélias. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo auxílio financeiro (05/04139-7; 06/50549-5).

Referências bibliográficas

- AHARON, R., SHAHAK, Y., WININGER, S., BENDOV, R., KAPULNIK, Y. & GALILI, G. 2003. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *The Plant Cell* 15:439-447.
- AROCA, R., PORCEL, R. & RUIZ-LOZANO, J.M. 2011. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. First published online September 13, 2011 doi:10.1093/jxb/err266 (acesso em 19/10/2011).
- AZAD, A.K., SAWA, Y., ISHIKAWA, T. & SHIBATA, H. 2004. Phosphorylation of plasma membrane aquaporin regulates temperature-dependent opening of tulip petals. *Plant Cell Physiology* 45:608-617.
- BEAUDETTE, P.C., CHLUP, M., YEE, J. & EMERY, R.J.N. 2007. Relationships of root conductivity and aquaporin gene expression in *Pisum sativum*: diurnal patterns and the response to HgCl₂ and ABA. *Journal of Experimental Botany* 58:1291-1300.
- BERTL, A. & KALDENHOFF, R. 2007. Function of a separate NH₃-pore in aquaporin TIP2;2 from wheat. *FEBS Letters* 581:5413-5417.
- BOTS, M., FERON, R., UEHLEIN, N., WETERINGS, K., KALDENHOFF, R. & MARIANI, T. 2005a. PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development. *Journal of Experimental Botany* 56:113-121.
- BOTS, M., VERGELDT, F., WOLTERS-ARTS, M., WETERINGS, K., VAN, A.S.H. & MARIANI, C. 2005b. Aquaporins of the PIP2 class are required for efficient anther dehiscence in tobacco. *Plant Physiology* 137:1049-1056.
- CHAUMONT, F., BARRIEU, F., HERMAN, E.M. & CHRISPEELS, M.J. 1998. Characterization of a maize tonoplast aquaporin expressed in zones of cell division and elongation. *Plant Physiology* 117:1143-1152.
- CHAUMONT, F., BARRIEU, F., WOJCIK, E., CHRISPEELS, M.J. & JUNG, R. 2001. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiology* 125:1206-1215.
- CHOI, W.G. & ROBERTS, D.M. 2007. *Arabidopsis* NIP2;1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. *Journal of Biological Chemistry* 282:24209-24218.

- DANIELS, M.J., MIRKOV, T.E. & CHRISPEELS, M.J. 1994. The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiology* 106:1325-1333.
- DANIELSON, J.A.H. & JOHANSON, U. 2008. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology* 8:45.
- FLEXAS, J., RIBAS-CARBO, M., HANSON, D.T., BOTA, J., OTTO, B., CIFRE, J., MCDOWELL, N., MEDRANO, H. & KALDENHOFF, R. 2006. Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ *in vivo*. *The Plant Journal* 48:427-439.
- FORREST, K.L. & BHAVE, M. 2007. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: A complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Functional & Integrative Genomics* 7:263-289.
- 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.
- GAO, Y-P, YOUNG, L. BONHAM-SMITH, P. & GUSTA L.V. 1999. Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions. *Plant Molecular Biology* 40:635-644.
- GASPAR, M., BOUSSER, A., SISOËFF, I., ROCHE, O., HOARAU, J. & MAHE A. 2003. Cloning and characterization of ZmPIP1-5b, an aquaporin transporting water and urea. *Plant Science* 165:21-31.
- GASPAR, M., SISOËFF, I., BOUSSER, A., ROCHE, O., MAHÉ, A. & HOARAU, J. 2001. Transient variations of water induced by HgCl₂ in excised roots of young maize plants: new data on the inhibition process. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 1175-1186.
- GERBEAU, P., GÜCLÜ, J., RIPOCHE, P. & MAUREL, C. 1999. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant Journal* 18:577-87.
- GONEN, T. & WALZ, T. 2006. The structure of aquaporins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 39:361-396.
- GROOT, B.L. & GRUBMULLER, H. 2001. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* 294:2353-2357
- GUPTA, A.B. & SANKARARAMAKRISHNAN, R. 2009. Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biology* 9:134.
- HACHEZ, C., HEINEN, R.B., DRAYE, X. & CHAUMONT, F. 2008. The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. *Plant Molecular Biology* 68:337-353.
- HACHEZ, C., MOSHELION, M., ZELAZNY, E., CAVEZ, D. & CHAUMONT, F. 2006. Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Molecular Biology* 62: 305-323.
- HAKMAN, I. & OLIVIUSON, P. 2002. High expression of putative aquaporin genes in cells with transporting and nutritive functions during seed development in Norway spruce (*Picea abies*). *Journal of Experimental Botany* 53:639-649.
- HEINEN, R.B, YE, Q. & CHAUMONT, F. 2009. Role of aquaporins in leaf physiology. *Journal of Experimental Botany* 60:2971-2985.
- HENZLER, T., WATERHOUSE, R.N., SMYTH, A.J., CARVAJAL, M., COOKE, D.T., SCHAFFNER, A.R., STEUDLE, E. & CLARKSON, D.T. 1999. Diurnal variations in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots of *Lotus japonicus*. *Planta* 210:50-60.
- HILL, A.E., SHACHAR, H.B. & SHACHAR, H.Y. 2004. What are aquaporins for? *Journal of Membrane Biology* 197:1-32.
- HUB, J.S. & GROOT, B.L. 2006. Does CO₂ permeate through Aquaporin-1? *Biophysical Journal* 91:842-848.
- HUSSAIN, S.S., IQBAL, M.T., ARIF, M.A. & AMJAD, M. 2011. Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants *via* protective proteins and aquaporins. *Biologia Plantarum* 55:401-413.
- INSELSBACHER, E., CAMBUI, C.A., RICHTER, A., STANGE, C.F., MERCIER, H., & WANEK W. 2007. Microbial activities and foliar uptake of nitrogen in the epiphytic bromeliad *Vriesea gigantea*. *New Phytologist* 175:311-320.
- ISHIBASHI, K., SASAKI, S., FUSHIMI, K., UCHIDA, S., KUWAHARA, M., SAITO, H., FURUKAWA, T., NAKAJIMA, K., YAMAGUCHI, Y. & GOJOBORI, T. 1994. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:6269-6273.
- 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* 54:713-25.
- JAVOT, H. & MAUREL, C. 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany* 90:301-13
- JAVOT, H., LAUVERGEAT, V., SANTONI, V., MARTIN-LAURENT, F., GÜCLÜ, J., VINH, J., HEYES, J., FRANCK, K.I., SCHÄFFNER, A.R., BOUCHEZ, D. & MAUREL, C. 2003. Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *Plant Cell* 15:509-22

- JOHANSON, U., KARLSSON, M., JOHANSSON, I., GUSTAVSSON, S., SJOVALL, S., FRAYSSE, L., WEIG, A.R. & 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 Physiology* 126:1358-1369.
- JOHNSON, K.D., HERMAN, E.M. & CHRISPEELS, M.J. 1989. An abundant, highly conserved tonoplast protein in seeds. *Plant Physiology* 91:1006-1013.
- JONES, J.T. & MULLET, J.E. 1995. Developmental expression of a turgor responsive gene that encodes an intrinsic membrane-protein. *Plant Molecular Biology* 28:983-996.
- KALDENHOFF, R., GROTE, K., ZHU, J.-J., & ZIMMERMANN, U. 1998. Significance of plasmalemma aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 14:121-128.
- KALDENHOFF, R., KOLLING, A., MEYERS, J., KARMANN, U., RUPPEL, G. & RICHTER, G. 1995. 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. *The Plant Journal* 7:87-95.
- KATSUHARA, M., KOSHIO, K., SHIBASAKA, M., HAYASHI, Y., HAYAKAWA, T. & KASAMO, K. 2003. Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiology* 44:1378-1383.
- KATSUHARA, M., KOSHIO, K., SHIBASAKA, M., HAYASHI, Y., HAYAKAWA, T. & KASAMO, K. 2003. Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiology* 44:1378-1383.
- LIÉNARD, D., DURAMBUR, G., KIEFER-MEYER, M.-C., NOGUÉ, F., MENU-BOUAOUICHE, L., CHARLOT, F., GOMORD, V. & LASSALLES, J.-P. 2008. Water transport by aquaporins in the extant plant *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* 146:1207-1218.
- LIU, H.-Y., YU, X., CUI, D.-Y., SUN, M.-H., SUN, W.-N., TANG, Z.-C., KWAK, S.-S. & SU, W.-A. 2007. The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. *Cell Research* 17:638-649.
- LIU, L.-H., LUDEWIG, U., GASSERT, B., FROMMER, W.B. & VON WIREN, N. 2003. Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133:1220-1228.
- LOPEZ, F., BOUSSER, A., SISOEFF, I., GASPAR, M., LACHAISE, B., HOARAU, J. & MAHE, A. 2003. Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. *Plant Cell Physiology* 44:1384-1395.
- MA, J.F., TAMAI, K., YAMAJI, N., MITANI, N., KONISHI, S., KATSUHARA, M., ISHIGURO, M., MURATA, Y. & YANO, M. 2006. A silicon transporter in rice. *Nature* 440:688-691.
- MA, N., XUE, J., LI, Y., LIU, X., DAI, F., JIA, W., LUO, Y. & GAO, J. 2008. *Rh-PIP2;1*, a rose aquaporin gene, is involved in ethylene-regulated petal expansion. *Plant Physiology* 148:894-907.
- MACEY, R.I. 1984. Transport of water and urea in red blood cells. *American Journal of Physiology* 246:195-203.
- MAGNI, F., SARTO, C., TICOZZI, D., SOLDI, M., BOSSO, N., MOCARELLI, P. & KIENLE, M.G. 2006. Proteomic knowledge of human aquaporins. *Proteomics* 6:5637-5649.
- MARTÍNEZ-BALLESTA, M.C., BASTÍAS, E., SCHÄFFNER, A., ZHU, C., GONZALEZ-MORO, B., GONZALEZ-MURUA, C. & CARVAJAL, M. 2008. Boric acid and salinity on maize roots. Response of aquaporins ZmPIP1 and ZmPIP2 and ATPase in relation to water and nutrient uptake. *Physiologia Plantarum* 132:479-490.
- MARTRE, P., MORILLON, R., BARRIEU, F., NORTH, G.B., NOBEL, P.S. & CHRISPEELS, M.J. 2002. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology* 130:2101-2110.
- MAUREL, C., REIZER, J., SCHROEDER, J.I. & CHRISPEELS, M.J. 1993. The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO Journal* 12:2241-2247.
- MOSHELION, M., BECKER, D., BIELA, A., UEHLEIN, N., HEDRICH, R., OTTO, B., LEVI, H., MORAN, N. & KALDENHOFF, R. 2002. Plasma membrane aquaporins in the motor cells of *Samanea saman*: diurnal and circadian regulation. *The Plant Cell* 14: 727-739.
- MURATA, K., MITSUOKA, K., HIRAI, T., WALZ, T., AGRE, P., HEYMANN, J.B., ENGEL, A. & FUJIYOSHI, Y. 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407:599-605.
- OTTO, B. & KALDENHOFF, R. 2000. Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasmamembrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta* 211:167-172.
- PARK, W., SCHEFFLER, B.E., BAUER, P.J. & CAMPBELL, B.T. 2010. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biology* 10:142.
- PENG, Y.H., ARORA, R., LI, G., WANG, X. & FESSEHAIE, A. 2008. *Rhododendron catawbiense* plasma membrane intrinsic proteins are aquaporins, and their over-expression compromises constitutive freezing tolerance and cold acclimation ability of transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant, Cell and Environment* 31:1275-1289.
- PENG, Y.H., LIN, W.L., CAI, W.M. & ARORA, R. 2007. Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta* 226:729-740.

- POSTAIRE, O., TOURNAIRE-ROUX, C., GRONDIN, A., BOURSIAC, Y., MORILLON, R., SHÄFFNER, A.R. & MAUREL, C. 2010. A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 152:1418-1430.
- PRESTON, G.M. & AGRE, P. 1991. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:11110-11114.
- PRESTON, G.M., CAROLL, T.P., GUGGINO, W.B. & AGRE, P. 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256:385-387.
- QUIGLEY, F., ROSENBERG, J.M., SHACHAR-HILL, Y. & BOHNERT, H.J. 2002. From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biology* 3:1-17.
- REIZER, J., REIZER, A. & SAIER JUNIOR, M.H. 1993. The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 28:235-257.
- SADE, N., VINOCUR, B.J., DIBER, A., SHATIL, A., NISSAN, H., WALLACH, R., KARCHI, H. & MOSHELION, M. 2009. Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin *SITIP2;2* a key to isohydric to anisohydric conversion. *New Phytologist* 181:651-661.
- 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 and Cell Physiology* 46:1568-1577.
- SARDA, X., TOUSCH, D., FERRARE, K., LEGRAND, E., DUPUIS, J.M., CASSE-DELBART, F. & LAMAZE, T. 1997. Two TIP-like genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells. *Plant Journal* 12:1103-1111.
- SCHUURMANS, J.A., VAN DONGEN, J.T., RUTJENS, B.P., BOONMAN, A., PIETERSE, C.M. & BORSTLAP, A.C. 2003. Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies. *Plant Molecular Biology* 53:633-645.
- SIEFRITZ, F., OTTO, B., BIENERT, G.P., VAN DER KROL, A. & KALDENHOFF, R. 2004. The plasma membrane aquaporin NtAQPI is a key component of the leaf unfolding mechanism in tobacco. *The Plant Journal* 37:147-155.
- SIEFRITZ, F., TYREE, M.T., LOVISOLO, C., SCHUBERT, A. & KALDENHOFF, R. 2002. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* 14:869-876.
- SOTO, G., ALLEVA, K., MAZZELLA, M.A., AMODEO, G. & MUSCHIETTI, J.P. 2008. *AtTIP1;3* and *AtTIP5;1*, the only highly expressed *Arabidopsis* pollen-specific aquaporins, transport water and urea. *FEBS Letters* 582:4077-4082.
- STEUDLE, E. 2000. Water uptake by roots: effects of water deficit. *Journal of Experimental Botany* 51:1531-1542.
- SUGA, S., KOMATSU, S. & MAESHIMA, M. 2002. Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant Cell Physiology* 43:1229-1237.
- SUN, M.H., XU, W., ZHU, Y.F., SU, W.A. & TANG, Z.C. 2001. 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* 19:129-135.
- TAKANO, J., WADA, M., LUDEWIG, U., SCHAAF, G., VON WIR, E.N.N. & FUJIWARA, T. 2006. The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18:1498-509.
- TEMMEI, Y., UCHIDA, S., HOSHINO, D., KANZAWA, N., KUWAHARA, M., SASAKI, S. & TSUCHIYA, T. 2005. Water channel activities of *Mimosa pudica* plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation. *FEBS Letters* 579:4417-4422.
- TERASHIMA, I. & ONO, K. 2002. Effects of HgCl₂ on CO₂ dependence of leaf photosynthesis: evidence indicating involvement of aquaporins in CO₂ diffusion across the plasma membrane. *Plant and Cell Physiology* 43:70-78.
- UEHLEIN, N., LOVISOLO, C., SIEFRITZ, F. & KALDENHOFF, R. 2003. The tobacco aquaporin NtAQPI is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* 425:734-737.
- UEHLEIN, N., OTTO, B., HANSON, D.T., FISCHER, M., MCDOWELL, N. & KALDENHOFF, R. 2008. Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO₂ permeability. *The Plant Cell* 20:648-657.
- VAN HOEK, A.N. & VERKMAN, A.S. 1992. Functional reconstitution of the isolated erythrocyte water channel CHIP28. *Journal of Biological Chemistry* 267:18267-18269.
- WALLACE, I.S. & ROBERTS, D.M. 2004. Homology modeling of representative subfamilies of *Arabidopsis* major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiology* 135:1059-1068.
- WANG, X., LI, Y., JI, W., BAI, X., CAI, H., ZHU, D., SUN, X.-L., CHEN, L.-J. & ZHU, Y.-M. 2011. A novel *Glycine soja* tonoplast intrinsic protein gene responds to abiotic stress and depresses salt and dehydration tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 161:1241-1248.

- WANG, Y., COHEN, J., BORON, W.F., SCHULTEN, K. & TAJKHORSHID, E. 2007. Exploring gas permeability of cellular membranes and membrane channels with molecular dynamics. *Journal of Structural Biology* 157:534-544.
- WEI, W., ALEXANDERSSON, E., GOLLDACK, D., MILLER, A.J., KJELLBOM, P.O. & FRICKE, W. 2007. *HvPIP1;6*, a barley (*Hordeum vulgare* L.) plasma membrane water channel particularly expressed in growing compared with non-growing leaf tissues. *Plant and Cell Physiology* 48:1132-1147.
- WILLIGEN, C.V., PAMMENTER, N.W., MUNDREE, S.G. & FARRANT, J.M. 2004. Mechanical stabilization of desiccated vegetative tissues of the resurrection grass *Eragrostis nindensis*: does a TIP 3;1 and/or compartmentalization of subcellular components and metabolites play a role? *Journal of Experimental Botany* 55:651-661.
- WILLIGEN, C.V., POSTAIRE, O., TOURNAIRE-ROUX, C., BOURSIAC, Y. & MAUREL, C. 2006. Expression and inhibition of aquaporins in germinating *Arabidopsis* Seeds. *Plant Cell Physiology* 47:1241-1250.
- WU, B. & BEITZ, E. 2007. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64:2413-2421.
- WUDICK, M.M., LUU, D.-T. & MAUREL, C. 2009. A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytologist* 184: 289-302.
- YAMADA, S., NELSON, D.E., LEY, E., MARQUEZ, S. & BOHNERT, H.J. 1997. The expression of an aquaporin promoter from *Mesembryanthemum crystallinum* in tobacco. *Plant and Cell Physiology* 38: 1326-1332.
- YU, X., PENG, Y.H., ZHANG, M.H., SHAO, Y.J., SU, W.A. & TANG, Z.C. 2006. Water relations and expression analysis of plasma membrane intrinsic proteins in sensitive and tolerant rice during chilling and recovery. *Cell Research* 16:599-608.
- ZEIDEL, M.L., AMBUDKAR, S.V., SMITH, B.L. & AGRE, P. 1992. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* 31:7436-7440.