

## Isolasi dan Karakterisasi Gen Penyandi Protein Intrinsik Membran Tonoplas dari Tanaman Halofit *Salicornia herbacea*

### *Isolation and Characterization of Gene Encoded Tonoplast Intrinsic Proteins from Halophyte Plant Salicornia herbacea*

Netty Ermawati

*Jurusan Produksi Tanaman, Politeknik Negeri Jember*

#### ABSTRACT

*Salicornia herbacea* is a succulent halophyte plant which grows optimally under 300 mM NaCl. These plants may have acquired specific genes that are essential for tolerating salt. To obtain insight into the comprehensive molecular characteristics related to the salt tolerance mechanism, we performed a screening of salt-inducible genes in *S. herbacea* shoots by differential display. A comparative analysis of gene expression between control and salt-stressed conditions led to the detection of 6 cDNA clones induced by salt. Sequence analysis and database searching revealed that all of the clones have homology with tonoplast intrinsic proteins. We designated them as ShTIP1 to ShTIP6 (*S. herbacea* Tonoplast Intrinsic Proteins). One the identified genes, ShTIP6 showed higher induced under salt stress compared to other ShTIP genes. In this study, we characterized the expression of ShTIP6 in different organs and stresses.

Keywords: Halophyte, gene expression, mRNA differential display, ShTIP, salt and osmotic stress

#### PENDAHULUAN

Pertambahan jumlah penduduk dan perluasan daerah perkotaan telah menggeser pertanian dari lahan subur ke lahan marginal. Lahan marginal ini dikenal sebagai lahan dengan produktivitas rendah dan bercirikan dari bahan penyusun tanah yang didominasi oleh lebih dari 80% pasir. Lahan yang termasuk dalam lahan marginal ini adalah lahan dengan kadar garam yang tinggi. Peningkatan produktivitas lahan ini banyak beberapa cara yang dilakukan, salah satunya adalah dengan mempelajari mekanisme ketahanan tanaman terhadap stres kegaraman dan membuat kultivar-kultivar baru yang mampu tumbuh baik pada lahan marginal (Follet *et al.* 1981).

Stres kegaraman terjadi akibat konsentrasi garam-garam terlarut berlebihan dalam sel tanaman. Stres garam umumnya terjadi pada tanaman yang tumbuh pada tanah berkadar garam tinggi, sedangkan pada tingkat konsentrasi garam tertentu akan menyebabkan kematian tanaman. Salinitas menekan pertumbuhan tanaman yang disebabkan oleh defisiensi air, yaitu konsentrasi garam terlarut yang tinggi menyebabkan menurunnya potensial air tanah sehingga tanaman kekurangan air. Selain itu, kandungan Na<sup>+</sup> yang tinggi dalam air tanah menyebabkan ketidakseimbangan ion dalam tanah karena

komplek serapan tanah dipenuhi oleh ion Na<sup>+</sup> sehingga meningkatkan persentase pertukaran Natrium (*Exchange Sodium Percentage, ESP*) dari tanah ke tanaman yang berakibat pada penurunan pertumbuhan tanaman (Serano & Rodriguez 2002).

Kemampuan tanaman untuk bertahan hidup pada lingkungan kegaraman tinggi dilakukan dengan mekanisme pengaturan potensial osmotik, kompartementasi melalui pengakumulasi zat-zat organik dalam sitoplasma seperti glycine betain, proline, dan gula terlarut untuk mempertahankan tekanan potensial, dan melalui integritas membran sel (Karimi *et al.* 2005).

Halofit adalah jenis tanaman yang tumbuh dengan baik di daerah atau lingkungan yang berkadar garam tinggi. Mekanisme ketahanan hidup tanaman ini pada lingkungan berkadar garam tinggi menjadi hal yang menarik untuk diteliti. *S. herbacea* adalah salah satu dari tanaman halofit sukulen yang termasuk dalam famili Chenopodiaceae. Tanaman ini tumbuh baik pada konsentrasi NaCl tinggi sampai dengan 500 mM. Pendekatan molekuler melalui skrining dilakukan pada tanaman ini untuk mengetahui gen-gen yang berperan dalam mekanisme ketahanan tersebut. Dengan metode *mRNA differential display*, didapatkan beberapa gen yang diinduksi oleh cekaman kegaraman dan menyandi untuk protein

intrinsik membran tonoplas (*Tonoplast Intrinsic Protein*, TIP).

## METODE

### Tempat dan kondisi pertumbuhan tanaman

Benih *S. herbacea* L. disemaikan dalam media perkecambahan di rumah kaca Pusat Penelitian Bioteknologi dan Biologi Molekuler Tanaman Gyeongsang National University Korea. Tanaman yang telah berumur 30 hari dipindahkan ke media hidroponik dengan penambahan larutan Hoagland. Setelah dua minggu diadaptasikan, tanaman diperlakukan dengan penambahan NaCl dan KCl dengan konsentrasi 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 M dan diinkubasikan berturut-turut selama 15 dan 7 hari. Tanaman dipanen dengan memisahkan bagian tunas dan akar, kemudian dibekukan dalam nitrogen cair untuk keperluan isolasi total RNA.

### Isolasi RNA dan analisis mRNA differensial display

Total RNA diisolasi dari tanaman tanpa perlakuan dan tanaman hasil perlakuan (0.3 M NaCl) menggunakan metode ekstraksi fenol (Ausubel *et al.* 1989), dipakai sebagai material dalam analisa mRNA *differensial display* dengan memakai RNImage kit (GenHunter, Nashville, USA), berdasarkan pada instruksi produk. Produk PCR hasil *differensial display* ini dipakai untuk skrining di pustaka cDNA, yang dikonstruksi melalui Poly (A)<sup>+</sup> RNA dari ekstrak tanaman *S. herbacea* dengan perlakuan NaCl 300 mM. Poly (A)<sup>+</sup> RNA diisolasi dengan menggunakan metode oligo(dT)-cellulose chromatography (Sambrook & Russell 2001), dan digunakan untuk mengkonstruksi pustaka cDNA dalam vector Uni-ZAP XR (Stratagene, USA).

### Analisis Northern Blot

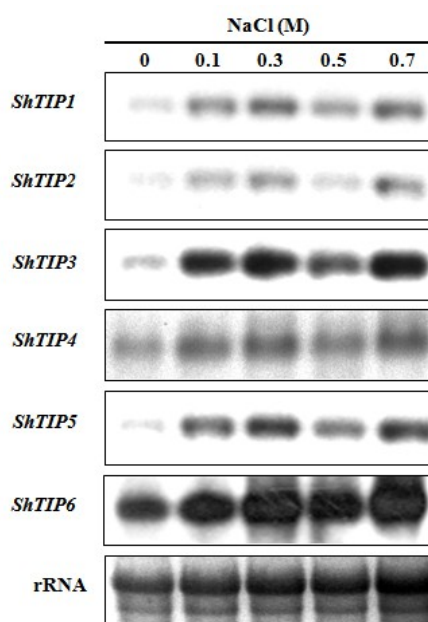
Analisis Northern Blot dilakukan dengan fraksinasi 15 µg RNA dari tanaman *S. herbacea* dengan perlakuan dan tanaman control pada agarose (1,2%) yang telah didenaturasi dengan formaldehyde. Selanjutnya RNA ditransfer ke nylon membrane (Hybond-N<sup>+</sup>) untuk keperluan deteksi dengan pemakaian probe yang telah dilabel dengan <sup>32</sup>P-dCTP radioaktif. Setelah hibridisasi selama kurang lebih 16 jam pada suhu 65°C, membran dicuci dan diekspose pada X-ray film selama 24 jam.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi dan karakteristik dari gen *ShTIP6*

mRNA *differensial display* adalah metode yang dikembangkan berdasarkan pada PCR (*Polymerase Chain Reactions*) yang memberikan secara luas analisis ekspresi gen dari beberapa macam populasi sel. Metode ini telah berkembang dan banyak digunakan untuk

menjawab permasalahan dalam bidang biologi diantaranya mengenai sistem dari mamalia, termasuk untuk mengetahui sel differensiasi, sel aktivasi, stres pada sel dan identifikasi target keracunan pada sel. Metode mRNA *differensial display* pada penelitian ini dipakai untuk mengidentifikasi gen-gen yang berbeda meregulasi tanaman halofit *S. herbacea* selama stres kegaraman.



Gambar 1. Ekspresi dari gen *ShTIP1- ShTIP6* pada tanaman *Salicornia* dibawah perlakuan 300 mM NaCl. RNA diekstrak dari tanaman *Salicornia* berumur 4 minggu. Total RNA sebanyak 15 µg digunakan untuk analisa Northern Blot. rRNA dipakai sebagai kontrol untuk mengetahui kesamaan jumlah RNA yang diloading.

Tahap pertama yang dilakukan adalah mempersiapkan untuk analisa RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reactions*) menggunakan RNA yang diisolasi dari tanaman *S. herbacea* dengan atau tanpa perlakuan NaCl 300 mM. Dengan menggunakan satu set anchored oligo(dT) primer, cDNA yang telah siap diamplifikasi dari parsial random sekuen dari dengan metode PCR. Radioaktif <sup>35</sup>S dipakai untuk melabel cDNA yang telah teramplifikasi sehingga meskipun sekuen DNA-nya pendek masih dapat terdeteksi pada gel sekuensing. Hasil

*mRNA differensial display* ini diperoleh fragmen DNA dengan panjang 300 bp yang setelah sekuensing diketahui menyandi untuk putatif protein membran tonoplas (*Tonoplast Intrinsic Protein*, TIP). Fragmen ini kemudian dipakai sebagai probe untuk mengisolasi klon-klon dari pustaka cDNA tanaman *S. herbacea*. Enam klon yang didapatkan dari hasil skrining di pustaka cDNA, dinamakan sebagai *ShTIP1 – ShTIP6*, dan ekspresi masing-masing klon disajikan pada Gambar 1. Ekspresi gen *ShTIP1*, *ShTIP2*, *ShTIP4* dan *ShTIP5* mengalami peningkatan lebih sedikit dibandingkan dengan ekspresi *ShTIP3* dan *ShTIP6* pada perlakuan stres NaCl. Sedangkan ekspresi gen *ShTIP6* meningkat secara signifikan selama periode stres NaCl. Hasil sekuensing dari keenam gen tersebut didapatkan bahwa hanya *ShTIP6* yang mengkode *full length* gen. Sehingga karakterisasi selanjutnya dilakukan untuk mengetahui fungsi dari *ShTIP6*.

*Full length* dari gen *ShTIP6* mempunyai ORF (*Open Reading Frame*) sebesar 1014 bp dan menyandi untuk 254 asam amino dengan prediksi berat molekul protein sebesar 26 kDa

(Gambar 2). Profil hidrofobik dari protein *ShTIP6* yang dikalkulasi dengan *ProtScale* program dengan *ExPasy* server (Geneva, Switzerland) menunjukkan 6 daerah hidrofobik berhubungan dengan membran-spanning  $\alpha$ -helices yang merupakan ciri khas dari aquaporin protein yang dalam sekuennya ditunjukkan dengan motif Asn-Pro-Ala (NPA) (Gambar 2).

Analisis menggunakan program *ClustalW* pada software yang disediakan *EMBL-EBI* (<http://www.ebi.ac.uk>) menunjukkan bahwa sekuen asam amino dari *ShTIP6* memiliki homologi yang tinggi dengan protein intrinsik membran tonoplas dari tanaman *Arabidopsis thaliana* (AtTIP 68%), *Mesembryanthemum crystallinum* (McTIP 78%), *Oryza sativa* (OsTIP 71%) dan *Zea mays* (ZmTIP1 70%) (Gambar 3). Protein *ShTIP6* memiliki homologi yang tinggi dengan protein McTIP dari tanaman *M. crystallinum* atau sering dikenal dengan nama common ice, dan keduanya merupakan tanaman dari golongan CAM (*Crassulacean acid metabolism*).

```

1  ccgggctgcaggaatcgggcacgagggcctcgtgcccgaatcgggcacgagggcacaattac
61  aaatccaattttcaattaaaaaaatgcccgatcaacagaatagcagtaggaacaaccgaag
      M P I N R I A V G T T E 13
121  ATGCCGACACCCGAAACACGCTAAAAGCGGGTTTGGCAGAAATTCATCTCGACCTGATAT
      D A R H P N T L K A G L A E F I S T L I 33
181  TCGTCTACGCGGGTCAGGGTTCCGGGTATGGCTTTCGCAAAGCTGACTGCTGGAGCGGCTA
      F W Y A G Q G S G M A F A K L T A G A A 53
241  ACACCTCCAGCAGGGCTTGTGGCGGCGGCATCTCTCATGGGTTCCGCCCTGTTTGTGGCGG
      N T P A G L V A A A I S H G F A L F V A 73
301  TGGCTGTCCGAGCTAACATCTCCGGCGGACACGTCAACCCCTGCCGTCAATTCGGTGCCTT
      V A V G A N I S G G H V [N P R] V T F G A 93
351  TTATTGGCGGGAATATCACCCTCCCTTAATGGCATTGTTTACTGGATTGCTCAGCTTCTTG
      F I G G N I T L L N G I V Y W I A Q L L 113
421  GCTCTACTGTTGCCTGTTTGTGCTTAAAGTTCTCTACTGGTGGCTTGCAAACATCTGCCT
      G S T V A C L L L K F S T G G L Q T S A 133
481  TTGCTCTTTGTGAAGGCGAAACCGTATGGGGCGCTTTTGTGATGGAGATTGTGATGACCT
      F A L C E G E T V W G A F V M E I V M T 153
541  TTGGACTAGTGTACACCGTATACGCAACCGCATTGGACCCAAAGAAGGGCAACATCGGGA
      F G L V Y T V Y A T A L D P K K G N I G 173
601  TCATTGGCGCCCTAGCCATTGGTTTAAATCGTCCGGTCCAAACATCTTAGCCGGTGGTGCAT
      I I A P L A I G L I V G A N I L A G G A 193
661  TTGACGGTGCCTCCATGAACCCAGCTGTATCTTTCGGGCCAGCCTTGGTTAGCTGGAACCT
      F D G A S M [N P R] V S F G P A L V S W N 213
721  GGGCCAACCATTTGGATCTATTGGGCTGGCCCACTCATTGGTGGCTGGAATTTGCTGGTCTTA
      W A N H W I Y W A G P L I G A G I A G L 233
781  TCTATGAGTTTATCTTTATGGGAAGCACATGATTCTACTTCAACTGACTACCAAAGACTCT
      I Y E F I F M G S T D S T S T D Y Q R L 253
841  CTGCTtaagccc tgtt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt tagggaaaaaaataaaaaatc
      S A * 254
901  atgc atgt gttt tgc t attt t g t g g t c t a a t t t t a g a a g g g a c t t t a c t t t t c c t t t g c
961  agat t a t t g t a g t t t c g t a a t t t g t g g a g g t t g a a t t t g t g a t t g t g c c a t a
    
```

Gambar 2. Sekuen asam nukleat dan asam amino dari *ShTIP6*. Motif Asn-Pro-Ala (NPA) yang terdapat dalam kolom adalah menunjukkan membran-spanning  $\alpha$ -helices yang merupakan ciri spesifik protein yang menyandi aquaporin. Jumlah asam nukleat dan asam amino yang menyusun *ShTIP6* berturut-turut ditunjukkan disisi kiri dan kanan sekuen.



### Ekspresi gen *ShTIP6* dibawah pengaruh stres kegaraman dan osmotik

Protein membran intrinsik tonoplas (*AtTIP*) dari Arabidopsis diketahui sebagai protein yang diinduksi ekspresinya oleh stres kegaraman. Berdasarkan pada kesamaan sekuen asam amino antara *AtTIP* dan *ShTIP6*, maka dilakukan analisa ekspresi dari gen *ShTIP6* pada stres kegaraman dengan Northern Blot. Total RNA diekstrak dari tunas dan akar tanaman *S. herbacea* yang diperlakukan baik dengan 300 mM NaCl atau 300 mM KCl. Hasil analisis Northern Blot menunjukkan bahwa gen *ShTIP6* diekspresikan di tunas dan akar pada kondisi stres maupun dalam kondisi normal. Hal yang menarik dari analisa tersebut bahwa pada kondisi normal tanpa stres, gen *ShTIP6* diekspresikan lebih tinggi ditunas daripada di akar (Gambar 4A). Setelah perlakuan dengan NaCl dan KCl, gen *ShTIP6* diekspresikan meningkat drastis di akar dibandingkan di tunas. Perlakuan dengan 0.3 M NaCl meningkatkan tingkat ekspresi gen *ShTIP6* pada akar 5 kali lebih tinggi dan di tunas 2 kali lebih tinggi dibandingkan kondisi tanpa perlakuan. Pola ekspresi dari *ShTIP6* setelah perlakuan KCl menunjukkan kesamaan dengan pola ekspresi gen *ShTIP6* setelah perlakuan NaCl.

Hasil ini mengindikasikan bahwa induksi ekspresi gen *ShTIP6* dapat dipengaruhi oleh NaCl ataupun KCl. Sejalan dengan hasil ini, Yeo (1998) menyatakan bahwa tanaman halofit adalah tanaman yang mampu menyerap ion  $\text{Na}^+$  dan mengatur distribusinya dalam organ-organ tanaman yang berbeda. Sehingga peningkatan secara cepat ekspresi dari *ShTIP6* karena peningkatan stres kegaraman memberi kemungkinan bahwa *ShTIP6* terlibat dalam regulasi pendistribusian  $\text{Na}^+$  pada tanaman halofit *S. herbacea*. Lebih lanjut Niu *et al.* (1995) menyatakan bahwa keseimbangan intraseluler  $\text{K}^+$  dan  $\text{Na}^+$  adalah penting untuk mengatur aktifitas banyak enzim sitosolik dan juga untuk mengatur potensial membran ataupun osmotikum yang tepat untuk regulasi volum sel. Kondisi stres kegaraman pada ion  $\text{Na}^+$  yang berkompetisi dengan ion  $\text{K}^+$  untuk diserap oleh akar-akar tanaman. Akan tetapi, pada tanaman halofit, NaCl maupun KCl dapat diserap oleh akar tanaman pada waktu yang bersamaan, dimana keberadaannya mampu mengaktifkan kerja hormon Gibberalin untuk menginduksi pemanjangan sel pada tanaman (Kawasaki *et al.* 1978). Namun demikian,

fungsi ini kemungkinan juga tergantung dari kapasitas tanaman untuk mempertahankan penyerapan  $\text{K}^+$  di bawah kondisi stres kegaraman. Protein intrinsik membran tonoplas adalah termasuk dalam aquaporin yaitu protein *water channel* pada membran yang memfasilitasi pergerakan air menuju membran dengan peningkatan penyerapan air dari membran (Chrispeels *et al.* 2001). Air bukanlah satu-satunya molekul yang mampu diangkut melalui aquaporin. Beberapa aquaporin mampu memfasilitasi pergerakan bahan-bahan terlarut seperti gliserol (Dean *et al.* 1999), urea (Liu *et al.* 2003), ammonium dan karbon dioksida (Tyerman *et al.* 2002). Gambar 4A menunjukkan bahwa transkrip dari *ShTIP6* pada tanaman *S. herbacea* tidak hanya dipacu oleh NaCl tapi juga KCl, hal ini memungkinkan bahwa *ShTIP6* mempunyai kemampuan yaitu selain mengangkut ion  $\text{Na}^+$ , juga secara bersamaan mampu mengangkut ion  $\text{K}^+$  ke dalam vakuola tanaman. Peningkatan konsentrasi KCl sampai 0.3 M menyebabkan tanaman layu lebih cepat dibandingkan peningkatan konsentrasi NaCl pada tanaman *S. herbacea*.

Peranan *ShTIP6* pada ketahanan stress dapat dikethui dengan jelas dengan ekspresi dari gen *ShTIP6* juga diinvestigasi dengan perlakuan stres osmotik (15% PEG 6000) dan pemberian hormon ABA (Abscisic Acid, 100  $\mu$  M) yang diperkirakan berperan dalam respon tanaman terhadap stres kegaraman dan osmotik. Ekspresi gen *ShTIP6* pada tunas dan akar meningkat pesat 2 jam setelah perlakuan dengan NaCl, kemudian berangsur-angsur menurun setelah 8 jam perlakuan. Jaringan akar pada pola ekspresi *ShTIP6* saat perlakuan PEG memiliki kesamaan dengan pola pada perlakuan NaCl. Namun demikian *ShTIP6* menunjukkan ekspresi yang konstan setelah 2 jam perlakuan PEG pada tunas (Gambar 4B). Ekspresi dari *ShTIP6* sepertinya tidak berubah nyata saat diberikan perlakuan hormon ABA. Transkrip *ShTIP6* di tunas meningkat tipis saat perlakuan ABA, sedangkan ekspresi di akar meningkat setelah 8 jam perlakuan. Menurut Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki (1993), selama periode stres kegaraman dan air, banyak gen-gen pada tanaman yang ekspresinya dipengaruhi oleh ABA. Namun demikian ada beberapa gen yang ekspresinya diinduksi oleh beragam stres tapi tidak dipengaruhi oleh ABA. Perbedaan dalam pengaruh waktu induksi dari gen *ShTIP6* oleh



stres kegaraman dan ABA, menunjukkan bahwa kecepatan induksi dari gen *ShTIP6* yang disebabkan oleh cekaman kegaraman adalah tidak dipengaruhi oleh penambahan *exogenous* ABA.

Tanaman yang toleran terhadap konsentrasi NaCl tinggi, mampu mengatur tingginya konsentrasi sodium dalam sel-sel individunya, dan menunjukkan kekhususannya dalam efisien pengakumulasian ion Na<sup>+</sup> dalam vakuola (Parks *et al.* 2002). Peningkatan ekspresi gen *ShTIP6* pada jaringan tunas dan akar pada tanaman halofit ini berhubungan dengan toleransinya terhadap stres kegaraman. Toleransi ini mungkin diindikasikan dengan pengaturan *gradient osmotic* atau dengan peningkatan pengangkutan ion Na<sup>+</sup> dalam vakuola melalui protein intrinsik membran tonoplas atau *water channel*. Tanaman glikofit memiliki sifat sensitif terhadap kondisi kegaraman berhubungan dengan ketidakmampuannya secara efektif membuang ion-ion sodium dari sitoplasma ataupun vakuola (Parks *et al.* 2002). Sehingga hal ini menyebabkan penurunan regulasi dari gen-gen yang menyandi protein intrinsik membran tonoplas pada tanaman glikofit dibawah cekaman osmotik (Pih *et al.* 1999). Mekanisme ini bertujuan untuk mengurangi kehilangan air dari, dan membatasi pemasukan sodium kedalam vakuola (Pardo *et al.* 1998). Fungsi gen *ShTIP6* dan regulasinya pada tanaman dapat diketahui dengan detail, perlu kiranya dibuat transgenik tanaman overekspresi gen *ShTIP6*.

### KESIMPULAN

Enam klon *ShTIP1 – ShTIP6* yang menyandi protein intrinsik membran tonoplas diperoleh dari hasil skrining di pustaka cDNA tanaman *S. herbacea* dengan menggunakan partial probe hasil mRNA differensial display. Ekspresi dari *ShTIP1 – ShTIP6* meningkat selama stres kegaraman, dan *ShTIP6* adalah yang paling tinggi peningkatan ekspresinya selama periode stres. Perlakuan stres osmotik dengan NaCl, KCl dan PEG mampu meningkatkan ekspresi dari gen *ShTIP6* dan mengakumulasikan ekspresinya pada jaringan tunas dan akar tanaman *S. herbacea*. Hasil ini mengindikasikan bahwa gen *ShTIP6* terlibat dalam regulasi ketahanan cekaman keragaman dan osmotik.

### Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Daeyoung Son atas bimbingannya dalam riset ini. Penelitian ini didanai oleh Grant dari BioGreen 21 Program (20050401034703) dan BK21 Program dari Pemerintah Korea melalui Menteri Pendidikan dan Sumberdaya Manusia untuk Gyeongsang National University, Korea.

### DAFTAR PUSTAKA

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, New York.
- Chrispeels MJ, Morillon R, Maurel C, Gerbeau P, Kjellbom P, Johansson I. 2001. Aquaporins of Plants; Structure, Function, Regulation, and Role in Plant Water Relations. *Curr. Topic Membr.* **51**:277-334.
- Dean RM, Rivers RL, Zeidel ML, Roberts DM. 1999. Purification and Functional Reconstitution of Soybean Nodulin 26, an Aquaporin with Water and Glycerol Transport Properties. *Biochem.* **38**:347-353.
- Follet R, Danahue R & Murphy L. 1981. *Soil and Soil Amendments*. Prentice Hall Inc. New Jersey.
- Karimi G, Ghorbanli M, Heidari H, Khavari Nejad RA, Assareh MH. 2005. The effects of NaCl on Growth, Water Relations, Osmolytes and Ion Content in *Kochia prostrata*. *Biol. Plant.* **49**:301-304.
- Kawasaki H, Takada H, Kamisaka S. 1978. Requirement of Sodium Chloride for the Action of Gibberellic Acid in Stimulating Hypocotyls eElongation of a Halophyte *Salicornia herbacea* L. *Plant Cell Physiol.* **19**:1415-1425.
- Liu LH, Ludewig U, Gassert B, Frommer WB, Wrenn NV. 2003. Urea Transport by Nitrogen-Related Tonoplast Intrinsic Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **133**:1220-1228.
- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM. 1995. Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiol.* **109**:735-742.
- Pardo JM, Reddy M, Yang S, Maggio A, Huh GH, Matsumoto T, Coca MA, Koiwa H, Yun DJ, Watad AA, Bressan RA, Hasegawa PM. 1998. Stress Signaling through Ca<sup>+</sup> Calmodulin-Dependent Protein Phosphate Calcineurin Modulates Salt Adaptation in Plants. *Proc. natl. Acad. Sci.* **95**: 9681-9686.
- Parks GE, Dietrich ME, Schumaker KS. Increased Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange Activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in Response to NaCl. *J. exp. Bot.* **53**:1055-1065.
- Pih KT, Kabilan V, Lim JH, Kang SG, Piao HL, Jin JB & Hwang I. 1999. Characterization of Two New Channel Protein Genes in Arabidopsis. *Mol. Cells* **9**:84 - 90.

- Sambrook J & Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> Ed. Cold Spring harbor Laboratory Press. New York.
- Serrano R, Rodriguez PL. 2002. Plants, Genes and Ions. *EMBO J*. **3**:116-119.
- Tyerman SD, Niemietz CM, Mramley H. 2002. Plant Aquaporins: Multi-functional Water and Solute Channels with Expanding Roles. *Plant Cell Environ*. **25**:173-194.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1993. Characterization of the Expression of a Desiccation-responsive *rd29* Gene of *Arabidopsis thaliana* and Analysis of Its Promoter in Transgenic Plants. *Mol. Gen. Genet*. **236**:331-340.
- Yeo AR. 1998. Molecular Biology of Salt Tolerance in the Context of Whole-plant Physiology. *J. exp. Bot*. **49**:915-929.