

통통마디로부터 색소체 외막 단백질 유전자의 분리 및 발현분석

네티 엘마와티, 차준영, 양영실, 정민희, 신동진, 이병현, 이근호, 손대영*
경상대학교 대학원 응용생명과학부, 경상대학교 PMBBRC

Molecular Cloning and Characterization of Outer Envelope Membrane Protein from *Salicornia herbacea*

Netty Ermawati, Joon-Yung Cha, Yingshi Liang, Min Hee Jung, Dongjin Shin,
Byung-Hyun Lee, Kon Ho Lee, Daeyoung Son*

Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
PMBBRC, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT Complementary DNA encoding chloroplast outer envelope membrane protein (OEP) from the halophyte *Salicornia herbacea* has been cloned and sequenced. The full length cDNA is 596 bp and encodes a polypeptide of 91 amino acid residues with a molecular mass of 8.9 kDa. The expression level of *ShOEP* increased by salt, drought and ABA treatments. *ShOEP* expression was largely induced in roots and shoots by high salts. The biological function of *ShOEP* was examined by yeast complementation. *ShOEP* can suppress Na^+ sensitivity of yeast mutant (*cnb1*) in the presence of salt. These results suggest that *ShOEP* is a salt inducible gene and may have functions in the regulation of plant salt stress.

Key words: Biological function, gene expression, halophyte, salt stress

서 론

식물은 다양한 환경 스트레스에 적응하며 살아가야 한다. 이들 환경 스트레스 중에서도 염분 스트레스는 농작물의 생산성을 저하시키는 중요한 제한인자 중의 하나이다 (Boyer 1982). 식물이 염 스트레스를 받게 되면 높은 삼투압으로 인해 수분부족 현상이 생기며 양분의 흡수가 어려워진다. 또한, Na^+ 이온의 과잉 축적으로 인하여 효소활성이 저해되고 전반적인 대사기능에 문제가 생긴다 (Wyn Jones 1981). 식물은 염 스트레스로부터 살아남기 위하여 여러 가지 서로 다른 내성 기작을 발달시키며 진화하여 왔다. 이들은 저분자 물질인 glycinebetaine, sugar alcohol, proline 등을 축적하여 외부의 높은 삼투압에도 불구하고 수분을 유지시키는 기작 (Delauney and Verma 1993;

Hanson et al. 1994)과, Na^+ 펌프를 가동하여 Na^+ 을 액포나 세포 밖으로 방출해 이온 평형상태를 유지시키는 기작 (Binzel et al. 1988; Garbarino and DuPont 1989), 그리고 특수한 단백질과 mRNA의 발현을 증가시키는 기작으로, 식물 종에 따라 그 기작은 다르다 (Reviron et al. 1992).

염생식물 (halophyte)은 일반 육상식물이 생육할 수 없는 고농도의 염분토양에서 서식하며, 높은 농도의 NaCl에 의하여 야기되는 이온과 삼투압의 불균형을 조절할 수 있을 뿐만 아니라 고유의 염분 적응 기작을 가지고 있다. 통통마디 (*Salicornia herbacea*)는 우리나라에서 자생하는 대표적인 염생식물로 서해안의 갯벌과 남해안 그리고, 제주도, 울릉도 백령도 같은 섬 지방의 바닷물이 닿는 해안이나 염전 주위에서 자생하는 1년생 초본식물이며, 고농도의 염이 존재하는 환경에서 자라기 때문에 염생식물의 연구를 위한 최적의 식물로 간주된다. 통통마디가 고농도의 염에서 적응하는 방법을 이해하고, 염 스트레스에 의해 특이적으로 발현하는 유전자의 분리와 이들 유전자의 기능과 조절기

*Corresponding author Tel 055-751-6028 Fax 055-759-9363
E-mail dyson@gsnu.ac.kr

작을 연구하는 것은 기초학문은 물론 내염성 작물의 분자 육종을 위해서도 매우 중요할 것이다. 본 연구에서는 통통마디에서 발현되고 있는 내염성 관련 유전자들을 mRNA differential display 방법으로 분리하였다. 그 중 세포질과 엽록체 사이의 수많은 이온과 대사산물의 교환을 조절하는 outer envelope membrane protein (OEP)과 높은 유사성을 보이는 클론을 분리하여, 유전자의 특성 및 발현양상을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

통통마디 (*S. herbacea* L.)의 종자를 버미큘라이트에 파종하여 온실에서 3 주간 키운 다음, Hogland 용액으로 옮겨 성장조절상 내에서 수경재배하였다. 5 일간 수경재배 시스템에 순화시킨 후 0, 100, 300, 500 그리고 700 mM의 NaCl을 각각 첨가하여 15 일간 배양한 다음 수확하여 액체 질소로 냉동시킨 후 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 성장조절상 내의 환경조건은 16/8시간 명기/암기 주기로 조절된 광주기 하에서 온도는 25°C, 습도는 70%로 유지 되도록 조절하였으며, 매 3 일마다 새로운 Hogland 용액을 공급하였다.

Differential display

Total RNA는 phenol/LiCl 방법으로 분리하였다 (Ausubel et al. 1989). 0, 100, 300, 500, 700 mM의 NaCl이 첨가된 Hogland 용액에서 15 일간 키운 식물체의 지상부로부터 분리한 total RNA로 differential display 실험을 수행하였다. Differential display는 RNAimage kit (GenHunter, USA)를 사용하여 kit에 제공된 방법에 따라 수행하였다. NaCl 농도에 따라 발현량이 차이가 나는 DNA 단편들은 pGEM-T vector kit (Promega, USA)를 사용하여 클로닝하였다.

cDNA library 제작

cDNA library 제작에 쓸 mRNA는 300 mM의 NaCl 용액에서 15 일간 키운 식물체의 지상부로부터 분리한 total RNA를 oligotex™ mRNA isolation kit (Qiagen, USA)로 분리하여 사용하였다. 1 µg의 mRNA를 ZAP-cDNA synthesis kit (Staratagene, USA)와 Uni-ZAP XR vector를 사용하여 2.8×10^5 pfu/µl의 cDNA library를 구축하였다. Differential display gel에서 분리한 DNA 단편을 probe로 하여 positive clone을 선발하였으며 *in vivo* excision한 후 얻은 플라스미드를 정제하여 염기서열을 결정하였다.

Southern 분석

통통마디의 지상부와 애기장대의 잎으로부터 genomic DNA를 Shure 등 (1983)의 방법으로 추출하여 적당한 제한효소로 절단한 다음 1% agarose gel에서 전기영동하였다. 크기 별로 분리된 DNA를 Sambrook과 Russell (2000)의 방법에 따라 nylon membrane에 이동시켜 blot을 만든 후 DNA probe를 ³²P로 표지하여 Church와 Gilbert (1984) 방법으로 hybridization하였다. Hybridization이 끝난 후의 membrane은 $2 \times$ SSC/0.1% SDS 용액으로 상온에서 두 번 세척하고 $0.1 \times$ SSC/0.1% SDS 용액으로 65°C에서 한 번 세척한 다음 Bio-imaging analyser (BAS-2000; Fuji Photo Film, Japan)로 분석하였다.

Northern 분석

여러 가지 스트레스 처리를 한 통통마디와 애기장대의 뿌리와 잎으로부터 추출한 15 µg의 RNA를 1.2% formaldehyde agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane에 이동, 고정시켰다. Hybridization과 membrane의 세척은 기본적으로 Southern 분석과 동일한 방법으로 수행하였다.

Yeast spot assay

*ShOEP*의 full length cDNA를 galactose inducible promoter와 URA3 selection marker가 들어있는 pYES vector에 subcloning한 다음 *cnbΔ* cell에 형질전환시켰다. 형질전환된 효모를 액체배양한 후 10, 100, 1000배 희석하여 uracil이 없는 배지와 NaCl을 첨가한 galactose 배지에 각각 치상하였다.

결과 및 고찰

통통마디의 내염성 관련 유전자를 분리하기 위하여 0, 100, 300, 500, 그리고 700 mM의 NaCl 용액에서 키운 식물체의 지상부로부터 RNA를 추출하여 differential display 실험을 수행하였으며, 이를 통해 발현량에 차이가 나는 cDNA 단편들을 얻었다. 이들 DNA를 probe로 하여 northern 분석을 하여 NaCl에 의하여 발현량이 변화되는 클론들을 플라스미드 벡터에 클로닝하였다. Differential display를 통하여 얻어진 cDNA 단편들의 크기가 약 300~450 bp이었으므로 full length 클론을 얻기 위하여 cDNA library로부터 스크리닝을 하였다. cDNA library는 통통마디가 가장 왕성하게 자란 300 mM의 NaCl 용액에서 키운 식물체로부터 분리한 mRNA로 구축하였다. 각각의 DNA 단편을 probe로 사용하여 full length 클론을 스크리닝 하였으며, 5' 과 3' 의

염기 서열을 결정하여 BLAST 프로그램으로 분석하였다. 이들 중 NaCl 농도에 의하여 발현량이 증가하는 한 유전자가 식물유래의 outer envelope membrane protein과 높은 유사성을 보였으므로 이를 *ShOEP*로 명명하였다.

OEP는 엽록체의 외막에 존재하는 단백질 중의 하나이다.

ggcagcaggggcaacagacccaactccaagtcctaagaacatttg	45
ataaaataaaccacttcattacaataatattcttctcaaaacc	90
accaacaaactaagcaaaagATGGGGAACCCAGATGGAGGAAAGGA	135
M G N P D G G K E	9
GGTTCAGTGAAGCAAACCTGCAATTGTGGTGAAGTGTCTAGCAGT	180
V P V K Q T A I V V S V L A V	24
TGGGTGGTTAGCCATTGCTTTGCTCTCAAGCCTTTTCTCAACAA	225
G W L A I Q F A L K P F L N K	39
GAAGAAAGAGGATTCTCCGGTTCAGACAATCCTGAAAGCAAGGG	270
K K E D S S G S D N P E S K G	54
TACTACCGGTTCCAGCAAATCCGATCCTCCGCCGCCACCGCCCC	315
T T G S A K S D P P P A T A P	69
ACCAGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCATCATCCCAAGGCAC	360
P A A A A A A P A P S S Q G T	84
CTCCAGTCCAGCTCCAGCCTCAaagaatatgcattttttttct	405
S S P A P A S *	91
tgccctgttattttgtatgtatgaaatgaaccattatttcatgt	450
ttgtgttccagagttttcccttctgtgtttatgtctttaaatt	495
tctgtgtgtctttttttgggggggtgtgtcttatggttatg	540
tcaagaactctttatgtgtgttgagtataaataaagtaaataaa	585
gtgtgtcttgg	596

Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *ShOEP*. The amino acid residues are indicated by single letter code. The transmembrane domain is underlined. The nucleotide sequence of *ShOEP* was deposited in GenBank with accession number AY817017.

엽록체는 광합성, 전분의 합성, 질소와 황산염의 환원등과 같은 식물의 생명유지에 필요한 많은 생합성이 일어나는 세포내 작은 기관으로 외막과 내막의 이중막으로 둘러싸여 있다 (Ferro et al. 2002; Flügge 2000; Linke et al. 2000). 엽록체 총 단백질의 약 1 - 2%가 존재하는 엽록체막은 주로 세포질과 엽록체 사이의 이온과 대사산물의 교환을 조절하고 세포질에서 합성된 엽록체 단백질을 인지하여 엽록체내로 끌어들이는 역할을 한다 (Fischer et al. 1994). 엽록체에서의 생합성이 원활하게 이루어지기 위해서는 이온과 대사산물의 교환이 활발하여야한다. OEP는 세포질과 엽록체 사이의 수많은 이온과 대사산물의 교환을 조절하는데 관여하는 것으로 알려져 있다 (Flügge 2000).

*ShOEP*는 596 bp 길이로 91개의 아미노산으로 번역되는 open reading frame을 가지고 있으며 (Figure 1), 이로부터 예상되는 분자량은 8.9 kDa이고 등전점은 8.03이었다. *ShOEP*의 예상 아미노산 서열을 NCBI에서 제공하는 blastp 프로그램을 이용하여 등록된 단백질의 아미노산 서열과 유사성을 비교한 결과 (Altschul et al. 1990), 애기장대의 OEP7 (CAB43440)과 40.6%의 유사성을 보였고, 시금치 (AAA34034), *Erysimum* (AAK52964), 완두 (JQ1181)의 OEP와도 각각 40.3%, 38%, 25.3%의 유사성을 나타내었다 (Figure 2). 다른 OEP들과 마찬가지로 *ShOEP*에도 transmembrane domain이 존재하였는데 이 domain들 간의 유사성은 시금치와는 51.4% 그리고 완두와는 41.2%로 더욱 높게 나타났다.

NaCl 농도에 따른 *ShOEP*의 발현량의 변화를 조사하기 위하여 4 주령의 통통마디에 NaCl을 처리하여 northern 분

ShOEP	----- GNPDGGKVEVPVKQ-TA VVSVLAVGWLAI FALKPFLNKK ED-SSGSDNP	50
SpOEP6.7	-----MESVAKPATTKEGSAKQ-AA VVGVLA GWFAI AFILPLFNK RGGGS DKKD --	52
EcOEP	-MEKSGDDV KFK EKP GKKQTATVVVGVLA VGWLA IELVFKPLFKK SS - KDKSD --	56
AtOEP7	----- GKT GAKQ ATVVV A A GWLAIE AFKPFLDKERS SS - IDKSD --	43
AtOEP	MVEKSGGE VNFK EKP GKKQTATVVVGVLA VGWLA IELVFKPLFKK SSS - KDKSD --	57
PsOEP14	----- GK --- AK AVVAGALAFV WLA IELAFKPF LSQ TRDS - IDKSD RP	42
ShOEP	ESKGTG----SAK S D PP EATAPPAA AAAPAP SQGTSSPAPAS	91
SpOEP6.7	----- DDVNA F TE P DT -----	62
EcOEP	----- S ----- DDASATAPPASDA -----	71
AtOEP7	----- PTKDP DD FD TAA TAT SKEGL -----	64
AtOEP	----- S ----- DD -- ATV PE PE GA-----	69
PsOEP14	GILTMLLLLLLLKL PEM E TK TT DD LS A V VT I P FLHS V FR-----	82

Figure 2. The deduced amino acid sequence *ShOEP* was aligned with sequences obtained from public databases and refer to the following: SpOEP6.7, Spinach OEP (accession no. AAA34034); EcOEP, *Erysimum cheiri* OEP (accession no. AAK52964); AtOEP7, *Arabidopsis* OEP7 (accession no. CAB43440); AtOEP, *Arabidopsis* OEP (accession no. AAM64361) and PsOEP14, pea OEP14 (accession no. JQ1181). Gaps represented by dashes were introduced to produce the best match among the six OEP homologs. The box represents the highly conserved sequence among OEP homologs.

석을 하였다 (Figure 3). *ShOEP*는 0 M NaCl 처리에서는 거의 발현되지 않았으나 0.1 M 처리부터 증가하기 시작하여 0.3 M 처리에서 가장 많이 발현되었으며 그 이상의 농도에서 점차 감소하였다. *ShOEP*의 기관 특이적인 발현양상을 조사하였다 (Figure 4). 통통마디는 고농도의 NaCl을 첨가한 배지에서는 잘 생육하였으나 KCl을 첨가한 배지에서는 잘 자라지 못하여 KCl 처리 후 7 일후부터 고사하기 시작하였으므로 15일간 0.3 M의 NaCl을 처리한 식물과 7 일간 0.3 M KCl을 처리한 식물체로부터 RNA를 분리하여 northern 분석을 하였다. *ShOEP*는 NaCl과 KCl을 처리하지 않은 경우에는 뿌리와 지상부 두 기관에서 발현이 되지 않았으나 이들 salt 처리에 의하여 발현이 증가하였다 (Figure 4). 염생식물인 통통마디의 OEP (*ShOEP*)와 비염생식물인 애기장대 OEP (*AtOEP*)의 기능을 분석하기 위하여 통통마디와 애기장대에 여러 가지 스트레스를 처리한 다음 각각의 스트레스 하에서의 발현정도를 비교하였다 (Figure 5). *ShOEP*의 경우 PEG 처리 후 급격히 발현이 증가하는 반면 *AtOEP*는 거의 차이가 없었으며 오히려 시간이 경과함에 따라 감소하였다. 애기장대의 OEP는 NaCl 처리에 의하여 잎에서와 뿌리에서의 발현양상이 다르게 나타났는데 잎에서는 처리 후 8 시간째에 발현이 많이 된 반면 뿌리에서는 처리 후 1 시간부터 조금씩 발현이 증가하기 시작하여 지속적으로 발현함을 알 수 있었다. 이는 OEP가 염생식물과 비

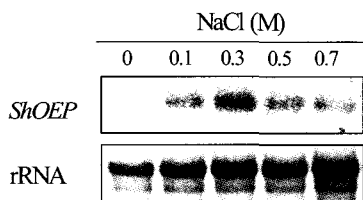


Figure 3. Expression of *ShOEP* under salt stress. Four-week-old seedlings of *Salicornia* were treated with NaCl for the indicated concentration (M) for 15 days. Total RNA (15 μ g) were subjected to northern blot analysis.

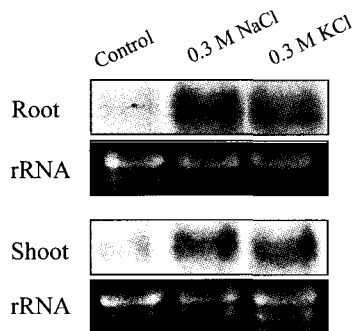


Figure 4. Expression patterns of *ShOEP* in root and shoot of *Salicornia*. Four-week-old *Salicornia* seedlings were treated with 0.3 M NaCl for 15 days or 0.3M KCl for 7 days. Total RNA (15 μ g) was analyzed by northern blot analysis using *ShOEP* cDNA insert as a probe.

염생식물에서 뿐만 아니라 같은 식물에서도 기관에 따라 기능이 다를 수 있음을 암시한다.

통통마디 게놈상에 존재하는 *ShOEP* 유전자의 copy 수를 확인하기 위하여 Southern 분석을 수행하였다 (Figure 6). 통통마디로부터 분리한 genomic DNA를 *ShOEP*의 cDNA를 자르지 못하는 *Bam*HI, *Eco*RV, *Xba*I의 세 가지 효소로

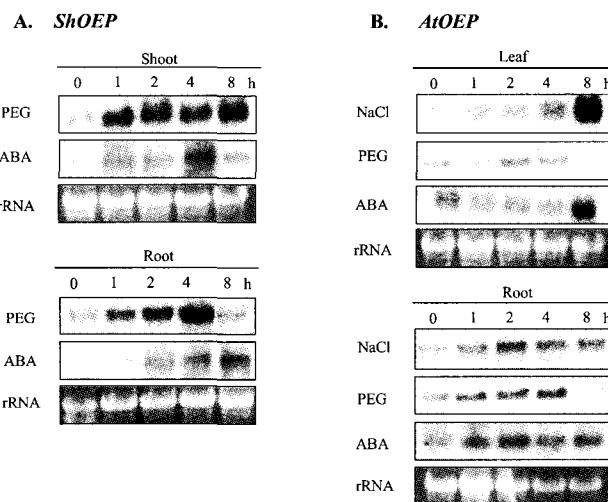


Figure 5. Effects of ABA, NaCl and PEG treatments on expression of *ShOEP* (A) and *AtOEP* (B). Four-week-old seedlings of *Salicornia* and *Arabidopsis* were treated with 15% PEG 6000, 250 mM NaCl (for *Arabidopsis*) and 100 μ M ABA for the indicated time periods (h). Total RNA (15 μ g) extracted from roots and shoots were subjected to northern blot analysis.

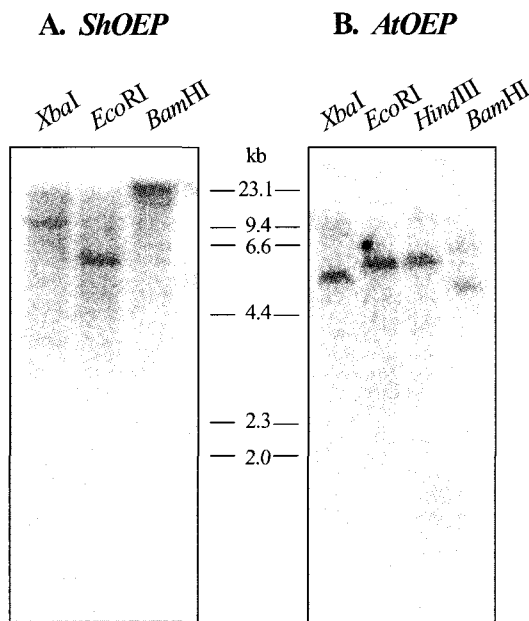


Figure 6. Genomic Southern blot analysis of *ShOEP* and *AtOEP*. *Salicornia* (A) and *Arabidopsis* (B) genomic DNA (5 μ g) digested with *Xba*I, *Eco*RI, *Bam*HI and *Hind*III were separated by electrophoresis in 1.0% agarose gel and transferred to a nylon membrane. Hybridizations were carried out with *ShOEP* or *AtOEP* cDNA inserts.

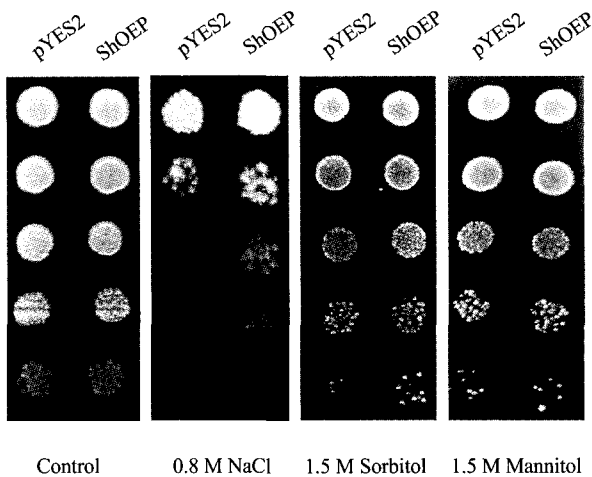


Figure 7. Complementation of the calcineurin mutant by *ShoEP* in yeast cells. The *ShoEP* gene was introduced into calcineurin mutant (*cnbΔ*), and the complementation of transformed cells were examined. The transformed cells were grown in the standard synthetic medium lacking uracil overnight at 30°C. The overnight cultures were serially diluted and grown on YPG plate containing 0.8 M NaCl, 1.5 M Sorbitol, and 1.5 M Mannitol, respectively.

절단한 다음 전기영동하여 분석한 결과, 각 제한효소 lane 에 한 개씩의 band가 검출되었다. 따라서 *ShoEP* 유전자는 게놈에 한 개의 copy로 존재하는 것으로 추정된다. 한편 비 엽생식물인 애기장대에서는 두 개의 *OEP*가 존재하는 것으로 나타났다. Data base 검색 결과 애기장대의 게놈에는 *OEP7* 외에 분자량이 7.2인 또 하나의 *OEP*가 있는 것으로 나타났으며, 이 두 단백질 간의 유사성은 40.5%였다.

통통마디 *OEP*의 생물학적 기능을 조사하기 위하여 *ShoEP* 유전자를 효모 발현벡터에 subcloning한 다음, 효모의 calcineurin B 유전자가 deletion된 mutant (*cnbΔ*)에 형질전환 하였다. NaCl sensitive strain인 *cnbΔ*의 생육정도에 *ShoEP* 가 어떻게 영향을 미치는지를 0.8 M NaCl, 1.5 M mannitol, 1.5 M sorbitol이 첨가된 배지에 spotting하여 생육정도를 조사하였다. 그 결과 *ShoEP*를 발현시킨 효모는 높은 농도의 NaCl 환경에서 잘 적응하며 살아간다는 것을 알 수 있었다 (Figure 7). *ShoEP*는 mannitol과 sorbitol에는 영향을 받지 않고 NaCl에만 특이적이었으므로, 식물의 salt stress 내성 기작에 직접적으로 관여하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 *ShoEP*는 통통마디의 염분 스트레스에 반응하여 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. *ShoEP*의 식물체내에서의 기능에 대한 연구는 돌연변이체 또는 형질전환체를 대상으로 수행되어야 할 것이다.

적 요

Differential display 방법으로 NaCl에 의하여 발현이 증가 되는 cDNA들을 분리하였으며 그 중 하나가 식물유래의

outer envelope membrane protein과 높은 유사성을 보였으므로 이를 *ShoEP*로 명명하였다. *ShoEP*는 1293 bp 길이에 359개의 아미노산으로 구성된 open reading frame을 포함하고 있으며, 이로부터 추정되는 분자량은 8.9 kDa이었다. *ShoEP* 단백질은 애기장대의 *OEP*와는 40.6%, 시금치와는 38%의 유사성을 나타내었다. Northern 분석결과, *ShoEP* 유전자는 NaCl의 농도가 증가함에 따라 발현량이 급격히 증가하는 것으로 나타났다. 엽생식물인 통통마디의 *OEP*는 PEG에 의하여 발현이 증가하는 반면 비엽생식물인 애기장대의 *OEP*는 큰 차이를 보이지 않았다. 효모 complementation 실험결과 *ShoEP*는 NaCl에 특이적이었으며 식물의 염분 스트레스 내성 기작에 직접적으로 관여하고 있음을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
 Ausubel FM, Brent R, Kingstone RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1989) *Current protocols in molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York
 Binzel ML, Hess FD, Bressan RA, Hasegawa PM (1988) Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol* 86: 607-614
 Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448
 Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1991-5
 Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 4: 215-223
 Ferro M, Salvi D, Rolland HR, Vermat T, Berny DS, Grunwald D, Garin J, Joyard J, Rolland N (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: Identification and subcellular localization of new transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11487-11492
 Fischer K, Weber A, Arbingner B, Brink S, Eckerskorn C, Flügge UI (1994) The 24 kDa outer envelope membrane protein from spinach chloroplasts: molecular cloning, *in vivo* expression and import pathway of a protein with unusual properties. *Plant Mol Biol* 25: 167-177
 Flügge UI (2000) Transport in and out of plastids: does the outer envelope membrane control the flow? *Trends Plant Sci.* 5(4): 135-137

- Garbarino J, DuPont FM (1989) Rapid induction of Na^+/H^+ exchange activity in barley root tonoplast. *Plant Physiol* 89: 1-4
- Hanson AD, Rathinasabapathi B, Rivoal J, Burnet M, Dillon MO, Gage DA (1994) Osmoprotective compounds in the *Plumbaginaceae*: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 306-310
- Linke D, Frank J, Holzwarth JF, Soll J, Boettcher C, Fromme P (2000) In vitro reconstitution and biophysical characterization of OEP16, an outer envelope pore protein of pea chloroplasts. *Biochemistry* 39: 11050-11056
- Reviron MP, Vartanian N, Sallantin M, Huet JC, Pernollet JC, Vienne D (1992) Characterization of a novel protein induced by progressive or rapid drought and salinity in *Brassica napus* leaves. *Plant Physiol* 100: 1486-1493
- Sambrook J, Russell DW (2000) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Ed 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Shure M, Wessler S, Fedoroff N (1983) Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35: 225-33

(접수일자 2004년 11월 25일, 수리일자 2004년 12월 6일)