

벼 엽록체 small HSP의 과발현에 의한 형질전환 식물체의 내열성 증가

원성혜¹ · 조진기¹ · 이병현*

¹경북대학교 농업생명과학대학 동물공학과, 농업과학기술연구소
^{*}경상대학교 응용생명과학부(BK21) 축산과학부, 식물분자생물학 및 유전자조작연구소

Overexpression of Rice Chloroplast Small Heat Shock Protein Increases Thermotolerance in Transgenic Plants

Sung-Hye Won¹, Jinki Jo¹ and Byung-Hyun Lee*

¹Department of Animal Science and Biotechnology, and Institute of Agricultural Science and Technology, College of Agriculture & Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

^{*}Faculty of Animal Science, Division of Applied Life Science (BK21 Program), and Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract

To investigate the function of chloroplast small heat shock protein (HSP), transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L, cv. SR-1) that constitutively overexpress the rice chloroplast small HSP (Oshsp26) were generated. Effects of constitutive expression of the Oshsp26 on thermotolerance were investigated with the chlorophyll fluorescence. After 5-min incubation of leaf discs at high temperatures, an increase in the Fo level, indication of separation of LHCII from PSII, was mitigated by constitutive expression of the chloroplast small HSP. When tobacco plantlets grown in Petri dishes were incubated at 52°C for 45 min and subsequently incubated at 25°C, leaf color of wild-type plant became gradually white and all plantlets were finally died. Under the conditions in which all the wild-type plants died, more than 80% of the transformants remained green and survived. It was also found that the levels of Oshsp26 protein accumulated in transgenic plants were correlated with the degree of thermotolerance. These results suggest that the chloroplast small HSP plays an important role in protecting photosynthetic machinery, as a results, increases thermotolerance of whole plant during heat stress.

Key words – Chloroplast, photosynthesis, small HSP, transgenic plant, thermotolerance

서 론

생물체에 있어서 내열성 또는 치사될 수 있는 고온환경

내에서 생존할 수 있는 능력은 heat shock protein (HSP) 이라 불리는 단백질이 세포 내에서 유도발현됨으로써 주어진다 [11]. 진핵생물 내에서 합성되는 주요 HSP에는 각각의 단백질의 분자량의 크기에 따라 크게 5 종류로 분류되어 있는데, 주로 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 및 분자량 15~30 kDa의 저 분자량 HSP (small HSP)로 분류된다

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-55-751-5418, Fax : 82-55-751-5410
E-mail : hyun@nongae.gsnu.ac.kr

[11]. 이들 중 식물에 있어서 가장 많이 발견되는 것이 small HSP들이며 분자량 20 kDa 내외의 HSP20 super family를 형성한다[20,23].

식물에 있어서 small HSP 유전자들은 핵에 code되어 있으며, 그들 단백질이 존재하는 세포 내의 부위에 따라 cytosol, chloroplast, endoplasmic reticulum (ER) 및 mitochondrium에 존재하는 형태로 나누어진다[23]. 포유동물과 효모의 small HSP에서 알려진 바와 같이 식물의 small HSP들도 그 단백질의 C-말단에 약 100개의 아미노산으로 구성되는 consensus I 및 II라 불리는 상동성이 높은 보존영역을 가지고 있다[20,22,23]. 한편, 엽록체에 존재하는 small HSP는 세포질에서 precursor 단백질로 합성된 후 최종적으로 엽록체로 수송되어 기능한다[21]. 이 단백질의 특징으로는 다른 small HSP가 공통으로 가지는 consensus I, II 외에 N-말단 쪽에 consensus III라 불리는 methionine 잔기가 많은 또 하나의 보존영역을 가진다[2]. 그러나 아직까지 이 단백질의 기능에 대해서는 확실히 밝혀져 있지 않다. 최근의 연구에 의하면 small HSP는 heat stress 하에서 분자량 200~800 kDa의 복합체를 형성하여 세포 내 단백질의 변성방지 및 단백질간의 응집 등을 방지하는 molecular chaperone으로서 기능 하는 것이 밝혀져 있다[10,11,17,23]. 또한 특정한 HSP들의 세포 내 축적과 식물의 내열성 획득 사이에 상관관계가 있음이 보고되고 있다[1,3,4,10,16]. 이러한 결과들은 small HSP가 식물의 내열성 획득에 있어서 중요한 기능을 담당하고 있음을 의미한다.

따라서 본 연구에서는 엽록체에 존재하는 small HSP의 기능을 밝히고자 이 유전자를 발현하는 형질전환 식물체를 제조하여 상온에서 축적된 small HSP가 식물체에 내열성을 부여할 수 있는지 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

형질전환 식물체의 제작

벼 (*Oryza sativa* L., cv. Nackdongbyeon)의 cDNA library로부터 분리한 엽록체 small HSP cDNA[9]를 식물 발현 vector인 pIG121Hm[7]에 도입한 후, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환 시켰다. Leaf disc를 이용한 담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR-1)의 형질전환은 Lee 등[8]의 방법으로 하였다. 재분화된 형질전환 식물체 (T₁)는

100 μ g/ml의 kanamycin이 함유된 MS배지[14]에서 선발한 후 자가수정을 통하여 종자 (T₂)를 채종하였다. T₂ 종자를 100 μ g/ml의 kanamycin이 함유된 MS배지에 무균 파종하여 kanamycin 내성개체를 선발하여 생장시켜 종자 (T₃)를 채종한 후, 다시 선발배지에 파종하여 전 개체가 kanamycin 내성을 가지는 순계를 선발하여 실험에 사용하였다.

Southern blot, Northern blot 및 PCR 분석

형질전환 식물체에 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위하여 Lee 등[8]의 방법에 준하여 genomic DNA를 분리한 후 Southern blot 분석으로 확인하였다. 도입된 유전자가 구성적으로 발현하는지를 Northern blot 분석으로 확인하였다. Total RNA는 guanidine thiocyanate 법[12]으로 분리하였다. Total RNA (5 μ g)를 0.6 M formaldehyde를 함유한 1% agarose gel로 전기영동 후, nylon membrane (Bio-dyne A, Pall BioSupport, NY)에 transfer하여 ³²P로 labeling한 Oshsp26 cDNA의 5'-영역의 specific probe로 hybridization하였다. Hybridization은 50% formamide가 포함된 hybridization buffer에서 42°C, 16시간 동안 실시하였다. Membrane은 0.2×SSC와 0.1% SDS로 65°C에서 1시간 washing 후 X-ray film 또는 imaging plate에 노출시켜 image analyzer (BAS2000, Fuji Film, Tokyo)로 분석하였다. PCR분석은 forward primer로는 CaMV 35S promoter의 3'-영역의 sequence인 Pfw primer (5'-CCCACCCACGAGGAGCATC-3') 및 Oshsp26 cDNA의 coding region의 sequence인 Prv primer (5'-CACGCCGTTCTTGAGCTCG-3')를 각각 사용하였다. 증폭된 산물은 1.0% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

단백질 추출 및 immunoblot 분석

단백질 추출을 위하여 식물체의 잎을 액체질소로 마쇄한 다음 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5% (w/v) PVP, 300 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM PMSF 및 10% glycerol을 포함한 50 mM HEPES (pH7.5) buffer로 추출하여 16,000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 단백질은 12% SDS-전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane (Protran, Schleicher & Schell, Germany)에 blotting

하여 Oshsp26 항체 [9]를 이용하여 immunoblot 분석을 하였다.

Chlorophyll 형광 측정 및 내열성 검증

식물체의 잎으로부터 직경 20 mm의 leaf disc를 분리하여, 온도가 조절되는 aluminum block위에 놓은 후, 암상태에서 PAM101을 이용하여 chlorophyll 형광을 측정하여 각각의 처리 온도에 따른 Fo, Fv 및 Fm치의 값을 비교하여 분석하였다[13].

고온처리에 대한 내성조사는 MS배지[14]에서 무균적으로 2주간 생장시킨 유식물체를 52℃에서 45분간 처리한 후, 25℃의 growth chamber에서 10일간 배양한 후 살아남은 식물체의 비율을 조사하였다.

결과 및 고찰

벼로부터 분리한 엽록체 small HSP의 full-length cDNA (Oshsp26) [9]를 발현 vector인 pIG121Hm[7]에 도입하여 발현 vector pIGhsp26을 구축하였다 (Fig. 1A). 구축한 발현 vector를 *Agrobacterium*에 도입한 후 담배의 leaf disc에 형질전환하여 총 32개의 1차 형질전환 식물체 (T₁)를 얻은 후, 종자를 채종하여 파종과 kanamycin 또는 hygromycin 배지에서의 선발 및 Northern 분석과정을 반복하여 최종적으로 Oshsp26의 발현량이 서로 다른 3종류의 순계 (T₃)를 확립하여 실험에 이용하였다. Oshsp26 유전자가 형질전환 식물체의 genome내로 도입되었는지 여부를 확인하기 위하여 genomic DNA를 분리한 후 Southern blot 분석 (결과 미제시) 또는 PCR분석을 통하여 확인하였다 (Fig. 1B). 그 결과 Fig. 1B에 나타낸 바와 같이 wild-type의 경우 증폭산물이 관찰되지 않았으나, 각각의 형질전환 식물체의 genomic DNA로부터 0.9 kb의 DNA 단편이 증폭되었다. 이러한 결과는 발현벡터의 Oshsp26 유전자가 형질전환 식물체의 genome에 성공적으로 도입되었으며 반복적인 자가수정도 불구하고 후대에 전달되었음을 나타낸다.

도입된 유전자, Oshsp26의 상온 (25℃)에서의 발현을 먼저 Northern blot 분석으로 확인하였다. Fig. 2에서 나타낸 바와 같이, wild-type 담배 식물체의 경우 25℃의 온도에서는 Oshsp26 transcript가 전혀 관찰되지 않았으나 (Fig. 2A, lane 1), 형질전환 식물체의 경우 고온처리를 하지 않은 2

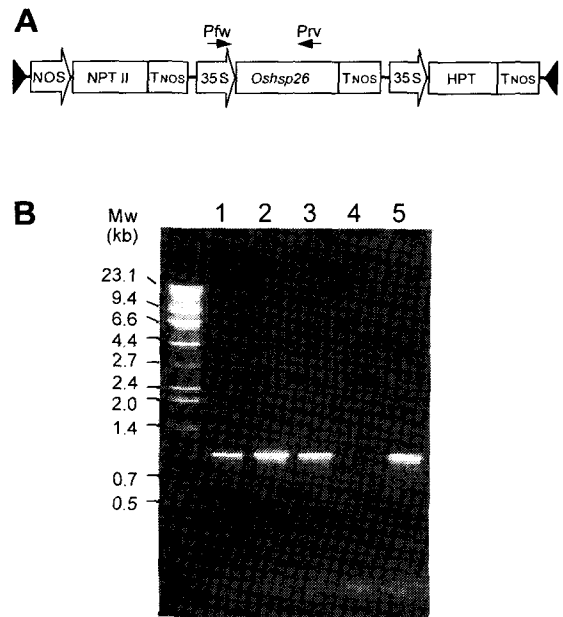


Fig. 1. Schematic diagram of the expression vector and PCR analysis of the homozygous transgenic tobacco plants. A. Schematic diagram of the expression vector, pIGhsp26, used for the transformation of tobacco. Arrowheads represent the positions and orientations of primers used for PCR. B. PCR analysis. Genomic DNAs from wild-type and transgenic plants were used as templates, and oligonucleotide Pfw and Prv were used as primers. lane 1, transgenic plant 1; lane 2, transgenic plant 2; lane 3, transgenic plant 3; lane 4, wild-type plant; lane 5, plasmid DNA of pIGhsp26.

5℃에서도 상당한 양의 transcript가 모든 형질전환 식물체에서 축적되었다. 즉, 형질전환 식물체 1 (Fig. 2A, lane 2)의 경우는 가장 높은 발현정도를, 형질전환 식물체 2 (Fig. 2A, lane 3)의 경우 중간정도의 발현정도를, 형질전환 식물체 3 (Fig. 2A, lane 4)의 경우는 낮은 발현정도를 나타내어 42℃ 30분간 처리한 벼의 잎에서의 발현량 (Fig. 2A, lane 5)과 같은 수준의 transcripts가 축적되었다. 한편 형질전환 식물체에서 상온에서 발현된 Oshsp26 transcript가 실제로 단백질로 번역되어 기능하는지 여부를 조사하기 위하여 이들로부터 추출한 total protein을 이용하여 immunoblot 분석으로 조사하였다 (Fig. 2B). 대조구로는 42℃에서 5시간 처리한 벼의 잎에서 추출한 단백질을 사용하였다. 벼의 경

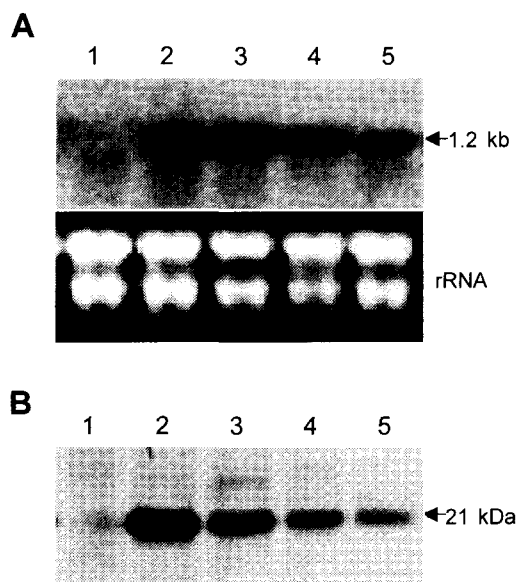


Fig. 2. Expression of the rice chloroplast small HSP in transgenic plants. Expression of the Oshsp26 gene was analyzed by Northern blot (A) and immunoblot (B) analyses. Lane 1, wild-type plant; lane 2, transgenic plant 1; lane 3, transgenic plant 2; lane 4, transgenic plant 3; lane 5, rice leaves exposed to 42°C for 30 min for Northern blot and 42°C for 5 h for immunoblot analysis.

우 42°C에서 5시간의 고온처리에 의해 분자량 약 21 kDa의 Oshsp26 단백질 band가 관찰되었다 (Fig. 2B, lane 5). 이는 다른 식물로부터 보고된 엽록체 small HSP의 크기와 일치하였다[2,15]. 또한 지금까지 보고된 *in vitro* translation 및 엽록체로의 transport 실험 결과 precursor인 24~26 kDa 단백질이 엽록체로 transport된 후에는 20~22 kDa 크기의 mature protein으로 processing 된다는 보고와 일치한다[2, 15,20]. 반면에 25°C에서 성장시킨 wild-type 담배에서는 특이적인 band가 관찰되지 않았다 (Fig. 2B, lane 1). 한편 형질전환 식물체의 경우 상온에서도 이와 동일한 분자량의 21 kDa band가 관찰되었으며 Oshsp26 cDNA에 code된 239개의 아미노산으로부터 추정되는 26 kDa[9]의 band는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 상온에서 발현된 Oshsp26 transcript가 단백질로 정상적으로 번역되었을 뿐만 아니라, 엽록체로 transport되어 mature protein으로 processing 되었음을 나타낸다. 또한 Oshsp26 단백질의 축적량은 transcript의 발현량과 거의 일치하였다.

상온에서 구성적으로 발현된 Oshsp26 단백질이 실제로 식물체의 내열성의 증가에 관여하는지 여부를 조사하기 위하여 형질전환 식물체의 내열성을 광화학계의 활성변화로 조사하였다. 식물에 있어서 고온처리는 광화학계 II에 결합되어 있는 chlorophyll *a*로부터 여기되는 형광의 Fo 값 (minimum fluorescence)을 증가시키며 Fv (variable fluorescence) 값을 감소시키는데, 이들은 각각 광화학계 II (PSII)로부터 light harvesting complex (LHC) II의 분리에 의한 것과 PSII의 전자전달반응의 불활성화에 의한 것으로 알려져 있다[18]. 따라서 고온 스트레스 하에서의 Fo 값의 증가 정도를 측정하면 고온에 가장 민감한 광화학계 II를 중심으로 한 광합성계의 내열성 정도를 판단할 수 있는 것으로 알려져 있다[18]. Fig. 3에 나타난 바와 같이 wild-type과 형질전환 식물체 1에 있어서 각각의 처리온도에 따른 Fo 값의 변화를 측정하였다. 그 결과 wild-type 식물체의 경우, 40°C 이상의 온도에서 5분간의 고온처리에 의해 Fo 값은 급격히 증가하였다 (Fig. 3). 따라서 wild-type 식물체의 광합성기구는 40°C 이상의 온도에서 불활성화되기 시작함을 알 수 있다. 반면 상온에서 Oshsp26의 축적량이

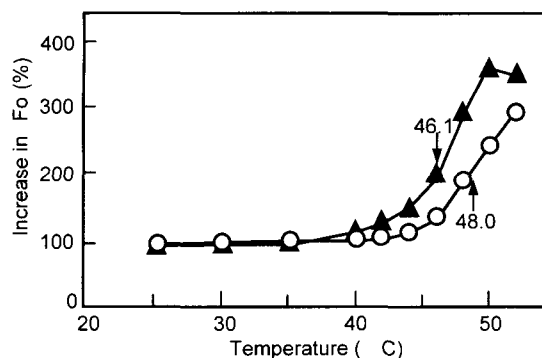


Fig. 3. Changes in the Fo level of chlorophyll fluorescence after heat treatment of leaf discs from wild type (▲) and transgenic plant 1 (○). Leaf discs were placed on a temperature-controlled aluminium block, covered with a plastic plate and incubated at designated temperatures in darkness. After 5-min incubation, the chlorophyll fluorescence was measured using a modulation fluorometer, PAM101 equipped with PAM103 and KL1500 as a light source for saturated pulses. Arrowheads represent the temperatures at which Fo level was doubled.

가장 많았던 형질전환 식물체 1의 경우는 45°C 이상의 온도에서 Fo 값의 증가가 관찰되었다. 한편 Fo치가 2배에 도달하는 온도를 비교한 결과 wild-type의 경우 46.1°C이었으며, 형질전환체의 경우 48°C로서 약 2°C의 차이를 나타내었다. 따라서 wild-type과 형질전환 식물체의 광화학계의 내열성 정도를 비교하기 위하여 48°C에서의 Fo 값의 증가 정도를 조사하였다 (Table 1). Wild-type의 경우 25°C에서의 Fo 값을 100% 기준으로 할 때 48°C에서 314%까지 증가하였으나, 형질전환 식물체들의 Fo 값의 증가율은 현저히 감소하였다. 그 중에서 Oshsp26의 축적량이 가장 많았던 형질전환 식물체 1의 경우 203% 까지만 증가하였다. 이러한 결과는 상온에서 축적된 Oshsp26 단백질이 고온 스트레스 조건 하에서 광화학계 II로부터 LHCII가 분리되어 불활성화되는 것을 완화시키는 기능으로 작용했을 가능성을 나타낸다. 엽록체 small HSP의 고온 스트레스 하에서의 광합성 전자전달계의 보호기능에 대해서는 이미 보고된 바 있으나 아직까지 구체적인 기작에 대해서는 알려져 있지 않다[6].

한편 이러한 고온 스트레스 하에서의 엽록체 small HSP의 광합성계에 대한 보호작용이 식물체 전체에 대한 내열성을 부여할 수 있는지를 조사하기 위하여 기내에서 성장시킨 wild-type과 형질전환 유식물체를 치사온도인 52°C에서 45분간 처리한 후, 25°C에서 성장시켰다. Wild-type 식물의 경우 고온처리한 식물체는 모든 식물체가 점점 탈색되어 1주일 이내에 전부 고사하였으나, 형질전환 식물체의 경우 약 80%가 녹색을 유지한 채 생존하였다 (Fig. 4). 이러한 결과는 상온에서 발현된 Oshsp26 단백질이 고온 스트레스 하에서 정상적으로 기능하여 엽록체를 보호함으로써 식물체 전체의 내열성도 증가시켰음을 의미한다.

지금까지의 연구에 의하면 엽록체 small HSP는 엽록체의 stroma에서 thylakoid membrane에 약하게 결합된 상태

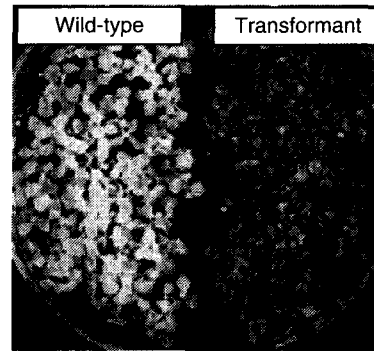


Fig. 4. Thermotolerance of wild-type and transgenic plants. Plantlets grown for 2 weeks at 25°C on MS medium were subjected to heat treatment at 52°C for 45 min, and then subsequently incubated under normal growth conditions. Photographs were taken 10 days after heat treatment.

로 존재하는 것으로 알려져 있다[5]. 또 이 small HSP는 고온 스트레스 하에서 광합성 전자전달계의 구성성분을 보호할 가능성이 *in vitro* 실험을 통하여 보고된 바 있으며[6], 고온 스트레스 이외에 강광 조건하에서도 발현된다는 보고도 있다[19]. 이러한 결과들과 본 실험의 결과로부터 엽록체 small HSP는 고온 스트레스 하에서 고온 그 자체에 대한 단백질들의 보호기능 뿐만 아니라 고온 스트레스와 빛 조건에 의해 생길 수 있는 oxidative stress에 의한 손상을 막아주는 기능도 수행할 것으로 판단된다. 금후의 형질전환 식물체를 이용한 엽록체 small HSP에 대한 생화학적 실험이 보다 구체적인 광합성계 보호 기작과 내열성 획득 기작의 해명에 기여할 수 있을 것이다.

요 약

엽록체 small HSP의 기능을 조사하기 위하여 벼로부터 분리한 엽록체 small HSP를 구성적으로 발현하는 형질전환 식물체를 제작하였다. 먼저 고온 스트레스 조건하에서의 형질전환 식물체의 내열성을 chlorophyll 형광으로 측정하여 분석하였다. Leaf disc를 고온 스트레스 조건에서 5분간 처리한 후, 광화학계 II의 불활성화를 나타내는 Fo 값의 증가치를 조사하였다. 형질전환 식물체는 고온 스트레스 하에서의 Fo 값의 증가가 현저하게 감소하였다. 또한 무균적으로 Petri dish에서 재배한 유식물체를 치사온도인

Table 1. Heat sensitivity of transgenic tobacco plants.

Plant	Fo increase ± S.E. (%)
Wild-type	314 ± 5
Transformant-1	203 ± 6
Transformant-2	217 ± 4
Transformant-3	246 ± 5

52℃에서 45분간 처리한 후, 25℃에서 계속적으로 배양하였을 때, wild-type 식물체는 전부 고사하였으나, 형질전환 식물체의 약 80%는 정상적으로 생존하였다. 또한 과발현된 Oshsp26 단백질의 축적량이 많을수록 내열성의 정도도 증가하였다. 이러한 결과는 엽록체 small HSP가 고온 스트레스 하에서 광합성기구를 보호함으로써 식물체의 내열성을 증가시키는데 있어서 중요한 기능을 담당하고 있음을 나타낸다.

감사의 글

이 연구는 교육부 BK21 program 및 경북대 Post-Doc. 연수지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Banzet, N., C. Richaud, Y. Deveaux, M. Kazumaier, J. Gagnon and C. Triantaphylides. 1998. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *Plant J.* **13**, 519-527.
- Chen, Q. and E. Vierling. 1991. Analysis of conserved domains identifies a unique structural feature of a chloroplast heat shock protein. *Mol. Gen. Genet.* **226**, 425-431.
- Chou, M., Y. Chen and C. Lin. 1989. Thermotolerance of isolated mitochondria associated with heat shock proteins. *Plant Physiol.* **89**, 617-621.
- Downs, C. A. and S. A. Heckathorn. 1998. The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants. *FEBS Lett.* **430**, 246-250.
- Glaczinski, H. and K. Kloppsteck. 1988. Temperature-dependent binding to the thylakoid membranes of nuclear-coded chloroplast heat-shock proteins. *Eur. J. Biochem.* **173**, 579-583.
- Heckathorn, S. A., C. A. Downs, T. D. Sharkey and J. S. Cleman. 1998. The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. *Plant Physiol.* **116**, 439-444.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of boundaries of the T-DNA. *Plant J.* **6(2)**, 271-281.
- Lee, B. -H., Y. Tanaka, T. Iwasaki, N. Yamamoto, T. Kayano and M. Miyao. 1998. Evolutionary origin of two genes for chloroplast small heat shock protein of tobacco. *Plant Mol. Biol.* **37**, 1035-1043.
- Lee, B. -H., S. -H. Won, H. S. Lee, W. I. Chung, I. J. Kim and J. Jo. 2000. Expression of the chloroplast-localized small heat shock protein by oxidative stress in rice. *Gene* **245(2)**, 283-290.
- Lee, G. J., N. Pokala and E. Vierling. 1995. Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* **270**, 10432-10438.
- Lindquist, S. and E. A. Craig. 1988. The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631-677.
- McGookin, R. 1984. RNA extraction by the guanidine thiocyanate procedure. pp. 113-116, *In* Walker, J. M. (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. **2**, Humana Press, New Jersey.
- Miyao-Tokutomi, M., B. -H. Lee, N. Mizusawa and N. Yamamoto. 1998. Active oxygen and photoinhibition of photosystem II. Mechanisms and Effects. pp. 2097-2102, *In* Garab G. (ed.), *Photosynthesis*, Vol. **3**, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
- Nieto-Sotelo, J., E. Vierling and H. T. -H. David. 1990. Cloning, sequence analysis, expression of a cDNA encoding a plastid-localized heat shock protein in maize. *Plant Physiol.* **93**, 1321-1328.
- Park, S., R. Shivaji, J. V. Krans and D. S. Luthe. 1996. Heat-shock response in heat-tolerant and nontolerant variants of *Agrostis palustris* Huds. *Plant Physiol.* **111**, 515-524.
- Parsell, D. A. and S. Lindquist. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of proteins. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 437-496.
- Pospisil, P., J. Scotnica and J. Naus. 1998. Low and high temperature dependence of minimum Fo and maximum Fm chlorophyll fluorescence *in vivo*. *Biochem. Biophys. Acta* **1363**, 95-99.
- Schuster, G., D. Even, K. Kloppsteck and I. Ohad. 1988. Evidence for protection by heat-shock proteins

- against photoinhibition during heat shock. *EMBO J.* **7**, 1-6.
20. Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 579-620.
21. Vierling, E., R. T. Nagao, A. E. DeRocher and L. M. Harris. 1988. A heat shock protein localized to chloroplasts is a member of an eukaryotic superfamily of heat shock proteins. *EMBO J.* **7**, 575-581.
22. Waters, E. R. 1995. The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. *Genetics* **141**, 785-795.
23. Waters, E. R., G. J. Lee and E. Vierling. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **47**, 325-338.

(Received November 4, 2002; Accepted February 17, 2003)