

통통마디로부터 염에 의하여 유도되는 Aldolase 유전자의 분리 및 발현분석

차준영², 네티 엘마와티^{1,2}, 김순길³, 이증주³, 임채오^{1,2}, 정우식^{1,2}, 이곤호^{1,2}, 손대영^{1,2*}

¹경상대학교 분자생물학과, ²경상대학교 PMBBRC, ³경상대학교 농생물학과

Molecular Cloning and Characterization of Salt-inducible Aldolase from *Salicornia herbacea*

Joon-Yung Cha², Netty Ermawati^{1,2}, Soon Gil Kim³, Jeung Joo Lee³, Chae Oh Lim^{1,2}, Woo Sik Chung^{1,2},
Kon Ho Lee^{1,2}, Daeyoung Son^{1,2*}

¹Department of Molecular Biology, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²PMBBRC, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

³Department of Agricultural Biology, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT Soil salinity is one of the most serious abiotic stresses limiting the productivity of agricultural crops. To cope with salt stress, plants respond with physiological, developmental and biochemical changes, including the synthesis of a number of proteins and the induction of gene expression. *Salicornia herbacea* is a halophytic plant that grows in salt marshes and on muddy seashores. In order to understand the biochemical and molecular mechanisms of salt tolerance in *S. herbacea*, we isolated several genes that involved in the salt tolerance by mRNA differential display. Here we report the cloning of a cDNA encoding fructose-1, 6-bisphosphate aldolase, named *ShADL*, which is 1293 bp long and contains an open reading frame consisted of 359 amino acids with calculated molecular mass of 39 kDa. *ShADL* protein showed 86% identity with Arabidopsis and 78% with aldolase of common ice plant. Northern blot analysis revealed that the transcript of *ShADL* gene was increased dramatically depending on the NaCl concentrations.

Key words: Salt stress, differential display, yeast spot assay

서 론

식물은 고착생활을 하기 때문에 건조, 토양 중의 염 농도, 저온 등 여러 가지 스트레스에 적응하여야 한다. 이들 환경스트레스 중에서도 염분 스트레스는 농작물의 생산성을 저하시키는 중요한 제한인자 중의 하나이다 (Boyer 1982). 관개농업 지역의 염 농도는 꾸준히 증가하고 있으며 이로 인한 작물의 생산량은 계속해서 감소하고 인류는 결국 심각한 식량난에 빠지게 될 것이다. 경제적으로 중요한 작물들의 대부분은 토양의 염 농도에 특히 민감하므로 효율적인 관개시설의 개선

과 함께 내염성 작물을 육종하기 위한 노력이 시급히 요구되고 있다.

식물이 염 스트레스를 받게되면 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

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

단백질과 mRNA의 발현을 증가시키는 기작으로, 식물 종에 따라 그 기작은 다르다 (Reviron et al. 1992).

염 스트레스에 대한 식물의 적응기작을 연구하기 위하여 지금까지 많은 연구가 수행되어져 왔으며, 염에 의하여 발현이 조절되는 유전자를 동정하여 그 특성을 연구하는 것은 고등 식물의 복잡한 내염성 기작을 이해하기 위한 중요한 방법 중의 하나이다. 최근에는 염에 아주 민감한 돌연변이체와 염생식물인 common ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*)의 내염성 관련 유전자의 연구가 활발하게 이루어지고 있다. Bohner et al. (1994)은 사막과 극지에 서식하는 염생식물인 common ice plant의 삼투압 조절제의 생합성에 관련된 유전자들이 애기장대의 genome에는 존재하지 않는다고 보고하였다. 이 결과는 내염성 작물을 육종하기 위해서는 애기장대나 다른 작물의 내염성 기작을 연구하기보다는 염생식물의 내염성 기작을 연구하여 그 system을 유용한 작물에 도입하는 것이 보다 효과적인 방법임을 시사하고 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 조절기작을 연구하는 것은 기초학문은 물론 내염성 작물의 분자 육종을 위해서도 매우 중요한 것이다. 본 연구에서는 통통마디에서 발현되고 있는 내염성 관련 유전자들을 mRNA differential display 방법으로 분리하였다. 그 중 fructose-1, 6-bisphosphate aldolase (E.C. 4.1.2.13)와 높은 유사성을 보이는 클론을 분리하여, 유전자의 특성 및 발현양상을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

통통마디 (*Salicornia herbacea* L.)의 종자를 버미큘라이트에 파종하여 온실에서 3주간 키운 다음, Hogland 용액으로 옮겨 생장조절상 내에서 수경재배하였다. 5일간 수경재배 시스템에 순화시킨 후 0, 100, 300, 500 그리고 700 mM의 NaCl을 각각 첨가하여 15일간 배양한 다음 수확하여 액체질소로 냉동시킨 후 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 생장조절상 내의 환경조건은 16/8시간 명기/암기 주기로 조절된 광주기 하에서 온도는 25°C, 습도는 70%로 유지되도록 조절하였으며, 매 3일 마다 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 15일간 키운 식물체의 지상부로부터 분리한 total RNA로 differential display 실험을 수행하였다. Differential display는 RNImage (GenHunter, USA) kit를 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 15일간 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 선별하였으며 *in vivo* excision한 후 얻은 플라스미드를 정제하여 염기서열을 결정하였다.

Southern 분석

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

Northern 분석

각각의 농도에서 키운 통통마디의 지상부로부터 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

NaCl 농도에 따라 발현량이 차이가 나는 full length cDNA 들을 galactose inducible promoter와 URA3 selection marker가 들어있는 pYES2 vector에 subcloning한 다음 YP9 cell에 형질전환시켰다. 형질전환된 yeast cell을 액체배양한 후 10, 100, 1000 배 희석하여 uracil이 없는 배지와 NaCl을 첨가한 galactose 배지에 각각 spotting하였다.

결과 및 고찰

종자로부터 발아, 생육시킨 통통마디의 유식물체를 NaCl이 농도별로 첨가된 영양액에 옮겨 수경재배를 실시한 결과, NaCl을 첨가하지 않은 용액에서 키운 식물체의 경우는 생육속도가 현저히 떨어져 수경재배 15일째부터 고사하기 시작하였다. 한편 100 mM과 300 mM의 NaCl을 첨가한 경우는 생장량이 크게 증가하였으며, 바닷물과 비슷한 농도인 500 mM NaCl 용액에서도 성장하는 것으로 나타났다. 700 mM의 NaCl이 첨가된 용액에서 키운 통통마디는 생장속도는 느리지만 고사하지 않고 생장을 지속하였으며, 근부에서 새 뿌리가 나는 것이 관찰되었다 (Figure 1).

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 12개의 cDNA 단편들을 얻었다. 이들 DNA를 probe로 하여 Northern 분석을 한 결과 (Figure 2) 최종적으로 NaCl에 의하여 발현량이 증가되는 5개의 클론들과 감소되는 1개의 클론을 얻었으며, 이들을 플

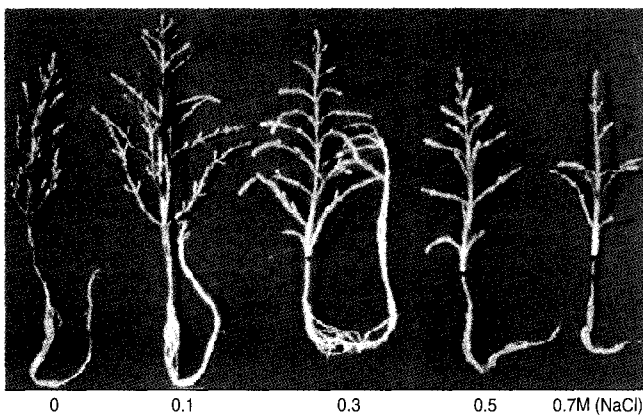


Figure 1. Effect of NaCl on growth of *S. herbacea*. Seeds of *S. herbacea* were grown in vermiculite for 3 weeks and then transferred to an aerated hydroponic system in Hoagland's nutrients in a growth chamber under fluorescent light on a 16 h photoperiod. Fresh culture medium was supplied every 3 days. For salt treatment plants were grown for 15 days in medium with 0.1, 0.3, 0.5, and 0.7 M NaCl, respectively. Plants grown without NaCl were used as a control.

라스미드 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. 데이터베이스 검색결과, NaCl에 의하여 발현이 증가되는 유전자들은 이미 알려진 유전자들과 유사성이 높은 것으로 나타났으나, NaCl에 의하여 발현량이 감소하는 *Sh541*은 애기장대의 가상의 단백질과 유사성이 높은 것으로 나타났다 (Table 1). 이들 중 NaCl 농도가 증가함에 따라 발현량이 증가하는 *Sh791*은 완두콩 (*Pisum sativum* L.)의 fructose-1, 6-biphosphate aldolase (accession number X89828)와 85%의 유사성을 보이는 것으로 나타났으므로 *ShADL*로 명명하였다. Aldolase는 해당과정의 네 번째 과정에서 fructose-1, 6-bisphosphate (FBP)를 절단하여 D-glyceraldehyde-3-phosphate (GAP)와 dihydroxyacetone phosphate (DHAP)가 생성되는 반응을 촉매하는 효소이다 (Rutter 1964). *ShADL*은 1293 bp 길이로 359개의 아미노산으로 번역되는 open reading frame을 가지고 있으며, 이로부터 예상되는 분자량은 39 kDa이고 등전점은 7.5이었다. *ShADL*의 예상 아미노

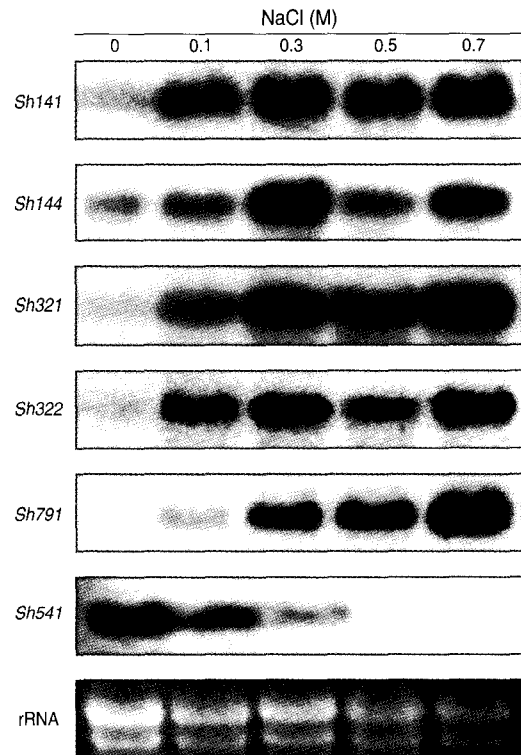


Figure 2. Northern blot analysis of *S. herbacea* genes obtained by differential display. Fifteen micrograms of total RNA were separated in a 1.2% formaldehyde agarose gel, blotted onto a Hybond N⁺ nylon membrane, and hybridized with ³²P-labeled DNA.

산 서열을 NCBI에서 제공하는 blastp 프로그램을 이용하여 등록된 단백질의 아미노산 서열과 유사성을 비교한 결과 (Altschul et al. 1990), 애기장대의 putative fructose-1,6-bisphosphate aldolase (NP_194383)와 가장 높은 86%의 유사성을 보였고, common ice plant (T12416)와 옥수수 (P08440)의 세포질 형태의 aldolase와도 각각 78%와 75%의 유사성을 보였다. 고등식물에는 세포질 형태와 엽록체 형태의 두 종류의 aldolase가 존재하는데 (Leberher et al. 1984), 세포질에 존재하는 aldolase는 산소 결핍 상태에서 발현이 유도되는 유전자로 산소가 부족하게 되면 해당과정을 자극하여 ATP를 생산하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Russell et al. 1990; Mujer et al. 1993; Andrews et al. 1994; Umeda and Uchimiya 1994). 엽록체에 존재하는 aldolase는 광합성의 탄소 환원 회로 (Calvin cycle)와 당 생합성에 관여하여 GAP와 DHAP로부터 FBP의 합성을 촉매하며, 빛에 의하여 발현이 조절되는 것으로 보고되었다 (Kagaya et al. 1995). 또한 aldolase는 촉매반응의 기작에 따라 class I과 II로 나뉘어지는데, class I은 기질과 Schiff base를 형성하며 class II의 경우는 촉매 반응에 2개의 금속이온을 필요로 한다. 고등식물과 녹조류, 동물 그리고 몇 종류의 박테리아는 class I 형태의 aldolase만을 가지고 있지만, 곰팡이와 대부분의 미생물은 class II aldolase만을 가지고 있다 (Schnarrenberger et al. 1992). 그러나 비광합성 조류는 유전적으로 매우 다양해서 class I과 II 한 가지씩 혹은 두 가지 다를 가지고 있는 경우가 있다 (Gross et al. 1994). 이 두 class의 aldolase는 유사성이 거의 없으므로 두 종류의 독립된 단백질 가족에 의하여 암호화될 것으로 추측된다 (Marsh and Leberher 1992). 통통마디의 aldolase는 다른 고등식물의 aldolase와 마찬가지로 기질과 Schiff base를 형성하는 Lys-225와 그 주위의 아미노산이 잘 보존되어 있었다 (Kelly and Tolan 1986). 옥수수의 aldolase의 52번째 아미노산인 알기닌과 142번째 아미노산인 리신은 fructose-1, 6-bisphosphate aldolase의 C1 인산그룹과 그리고 103번째인 리신은 C6 인산그룹과 상호 작용하는 것으로

밝혀졌는데 (Kelly and Tolan 1986) 통통마디에서도 이들 아미노산들이 잘 보존되어 있었다. 그리고, 모든 aldolase의 C-terminal의 마지막 아미노산은 tyrosine이었다 (Figure 3). ShADL은 세포질에 존재하는 aldolase와는 75% 이상의 유사성을 보인 반면, 시금치의 엽록체에 존재하는 aldolase (CAA47293)와는 45%로 유사도가 낮았다. 이 결과는 aldolase의 경우, 같은 식물의 aldolase일지라도 식물체 내에서 존재하는 위치가 다르면 유사성이 낮다는 것을 암시한다.

통통마디 게놈상에 존재하는 *AhALD* 유전자의 copy 수를 확인하기 위하여 Southern 분석을 수행하였다. 통통마디로부터 분리한 genomic DNA를 *ShALD*의 cDNA를 자르지 못하는 *Bam*HI, *Eco*RV, *Xba*I의 세 가지 효소로 절단한 다음 전기영동하여 분석한 결과, 각 제한효소 lane에 두 개의 band가 검출되었다 (Figure 4). 따라서 *ShADL* 유전자는 게놈에 두 개의 copy로 존재하는 것으로 추정된다. 시금치 aldolase의 경우 세포질에 존재하는 aldolase와 엽록체에 존재하는 aldolase의 유사성이 54%이나 각각의 genomic pattern이 다른 것으로 보아 세포질과 엽록체의 aldolase는 서로 다른 유전자에 의해서 암호화된다고 보고되었다 (Pelzer-Reith et al. 1993). 그러므로 통

Table 1. Sequence characteristics of cDNA detected by differential display in *S. herbacea*.

Gene name	Best homology	Accession number
<Up-regulated>		
Sh141	Mouse virion-associated nuclear shuttling protein	AY012159
Sh144	Arabidopsis senescence associated protein	T02338
Sh321	Ice plant methionine adenosyltransferase	U79767
Sh322	Rice putative uridine kinase	AAL87159
Sh791	Pea fructose-1, 6-bisphosphate aldolase	X89828
<Down-regulated>		
Sh541	Arabidopsis hypothetical protein	B86304

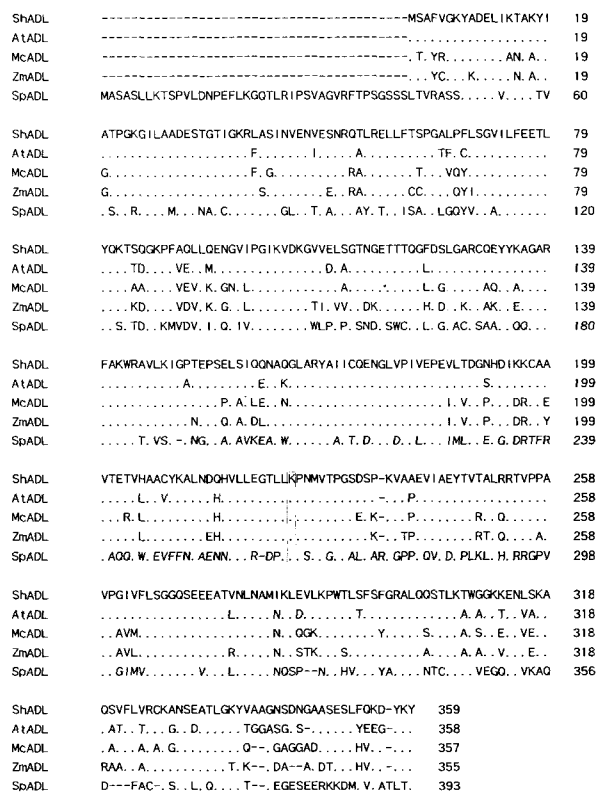


Figure 3. Amino acid sequence alignment of ShADL (Genbank accession number AY494598) with aldolases from Arabidopsis (AtADL, AAN72017), common ice plant (McADL, AAB61592), corn (ZmADL, AAA33435), and spinach (SpADL, CAA47293). The boxed sequence indicates aldolase class I active site. Gaps are marked by dash. Identical residues with ShADL are replaced by dots.

통통마디의 세포질에는 또 다른 aldolase가 존재할 것으로 추측된다.

통통마디 aldolase의 생물학적 기능을 조사하기 위하여 *ShADL* 유전자를 효모 발현벡터에 subcloning한 다음, 효모의 calcineurin B 유전자가 deletion된 mutant (YP9)에 형질전환하였다. NaCl sensitive strain인 YP9의 생육정도에 *ShADL*이 어떻게 영향을 미치는지를 0.8 M NaCl, 1 M KCl, 50 mM LiCl, 1 M mannitol이 첨가된 배지에 spotting하여 생육정도를 조사하였다. 그 결과 *ShADL*을 발현시킨 효모는 높은 농도의 NaCl 환경에서 잘 적응하며 살아간다는 것을 알 수 있었다 (Figure

5). *ShADL*은 KCl과 mannitol에는 영향을 받지 않고 NaCl에만 특이적이었으므로, 식물의 salt stress 내성 기작에 직접적으로 관여하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 *ShADL*은 통통마디의 염분 스트레스에 반응하여 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. *ShADL*의 식물체내에서의 기능에 대한 연구는 과발현 또는 knock-out mutant를 제작하여, 이들 형질전환식물체를 대상으로 수행되어야 할 것이다.

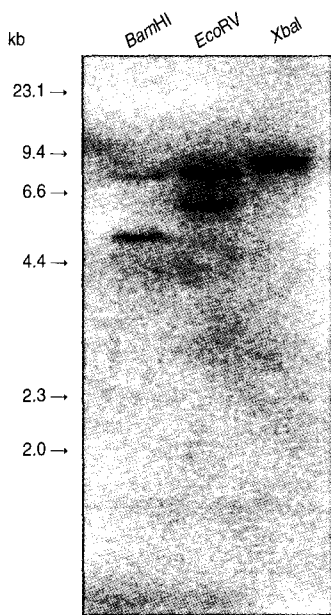


Figure 4. Genomic Southern blot analysis of *ShADL*. Genomic DNA (5 µg) digested with *Bam*HI, *Eco*RV, or *Xba*I were separated by electrophoresis in a 1.0% agarose gel. The gel was blotted onto a Hybond N⁺ nylon membrane, and hybridized with ³²P-labeled DNA.

적 요

토양 내의 고농도의 염은 심각한 환경스트레스 중의 하나로 농작물의 생산을 감소시킨다. 식물은 염 스트레스로부터 벗어나기 위하여 많은 단백질을 합성한다든지 유전자들의 발현을 조절하는 등 여러 가지 생리, 생화학적 변화를 일으킨다. 통통마디는 우리나라에 자생하는 염생식물로 갯벌과 염전 주위에서 생육한다. 통통마디의 생화학적, 분자생물학적 내염성 기구를 이해하기 위하여 differential display 방법으로 NaCl에 의하여 발현이 증가되는 cDNA들을 분리하였다. 본 연구에서는 그 중 하나인 *ShADL*의 특성을 조사하였다. *ShADL*은 fructose-1, 6-bisphosphate aldolase와 높은 유사성을 보였다. 이 유전자는 1293 bp 길이에 359개의 아미노산으로 구성된 open reading frame을 포함하고 있으며, 이로부터 추정되는 분자량은 39 kDa이었다. *ShADL* 단백질은 애기장대의 aldolase와 86%의 높은 유사성을 나타내었으며 같은 염생식물인 common ice plant의 adolase와는 78%의 유사성을 보였다. Northern 분석결과, *ShADL* 유전자는 NaCl의 농도가 증가함에 따라 발현량이 급격히 증가하는 것으로 나타났다.

사사 - 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

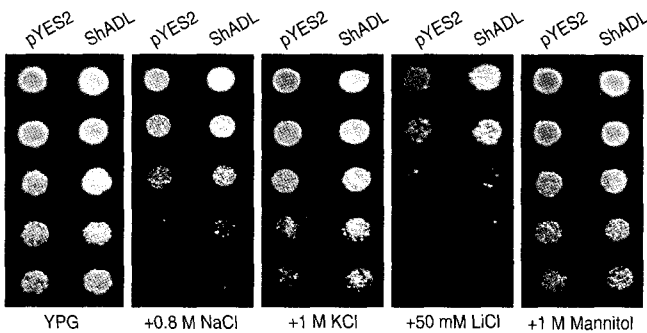


Figure 5. Complementation of the calcineurin mutant by *ShADL* in yeast. The *ShADL* gene was introduced into calcineurin mutant (YP9) cells, and the complementation of transformed cells were examined in the presence of different ions. The transformed cells were grown in the standard synthetic media lacking uracil overnight at 30°C. The overnight cultures were serially diluted and grown on YPG plates containing no salt, 0.8 M NaCl, 1 M KCl, 50 mM LiCl, and 1 M mannitol, respectively.

인용문헌

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Andrews DL, MacAlpine DM, Johnson JR, Kelley PM, Cobb BG, Drew MC (1994) Differential induction of mRNAs for the glycolytic and ethanolic fermentative pathways by hypoxia and anoxia in maize seedlings. *Plant Physiol* 106: 1575-82
- Ausubel FM, Brent R, Kingston 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

- Bohnert HJ, Thomas JC, DeRocher EJ, Michalowski CB, Breiteneder H, Vernon DM, Deng W, Yamada S, Jensen RG (1994) Responses to salt stress in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. In: Cherry JH (ed), Biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance in plant. Springer-Verlag, Berlin, pp 415-428
- 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
- Garbarino J, DuPont FM (1989) Rapid induction of Na⁺/H⁺ exchange activity in barley root tonoplast. *Plant Physiol* 89: 1-4
- Gross W, Bayer MG, Schnarrenberger C, Gebhart UB, Maier TL, Schenk H (1994) Two distinct aldolases of class II type in the cyanoplasts and in the cytosol of the alga *Cyanophora paradoxa*. *Plant Physiol* 105: 1393-1398
- 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
- Kagaya Y, Nakamura H, Hidaka S, Ejiri S, Tsutsumi K (1995) The promoter from the rice nuclear gene encoding chloroplast aldolase confers mesophyll-specific and light-regulated expression in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet* 248: 668-74
- Kelly PM, Tolan DR (1986) The complete amino acid sequence for the anaerobically induced aldolase from maize derived from cDNA clones. *Plant Physiol* 82: 1076-1080
- Lebherz HG, Leadbetter MM, Bradshaw RA (1984) Isolation and characterization of the cytosolic and chloroplast forms of spinach leaf fructose diphosphate aldolase. *J Biol Chem* 259: 1011-1017
- Marsh JJ, Lebherz HG (1992) Fructose-bisphosphate aldolases: an evolutionary history. *Trends Biochem Sci* 17: 110-113
- Mujer CV, Rumpho ME, Lin JJ, Kennedy RA (1993) Constitutive and inducible aerobic and anaerobic stress proteins in the Echinochloa Complex and rice. *Plant Physiol* 101: 217-226
- Pelzer-Reith B, Penger A, Schnarrenberger C (1993) Plant aldolase: cDNA and deduced amino-acid sequences of the chloroplast and cytosol enzyme from spinach. *Plant Mol Biol* 21: 331-40
- Reviron MP, Vartanian N, Sallantin M, Huet JC, Pemollet 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
- Russell DA, Lee DM, Wong, Sachs MM (1990) The anaerobic responses of soybean. *Plant Physiol* 92: 401-407
- Rutter WJ (1964) Evolution of aldolase. *Fed Proc* 23: 1248-1257
- Sambrook J, Russell DW (2000) Molecular cloning: A laboratory manual, Ed 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Schnarrenberger C, Gross W, Pelzer-Reith B, Wiegand S, Jacobshagen S (1992) The evolution of isozymes of sugar phosphate metabolism in algae. In: Stabenau H (ed) Phylogenetic changes in peroxisomes of algae. Phylogeny of Plant Peroxisomes. University of Oldenburg, Oldenburg pp 310-329
- Shure M, Wessler S, Fedoroff N (1983) Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35: 225-33
- Umeda M, Uchimiya H (1994) Differential transcript levels of genes associated with glycolysis and alcohol fermentation in rice plants (*Oryza sativa* L.) under submergence stress. *Plant Physiol* 106: 1015-1022
- Wyn Jones RG (1981) In: Johnson CB (ed) Physiological processes limiting plant productivity. Butterworths, London, pp271-292

(접수일자 2003년 12월 4일, 수리일자 2003년 12월 6일)