韓草誌 (J. Korean Grassl. Sci.) 27(4) : 241~248, 2007

내병성 목초 품종개량을 위한 *PR4* 유전자의 연구

차준영 · 네티엘마와티 · 정민희 · 김기용* · 손대영

Studies on a *PR4* Gene for Breeding Disease Resistant Forage Crops

Joon-Yung Cha, Netty Ermawati, Min Hee Jung, Ki-Yong Kim* and Daeyoung Son

ABSTRACT

Cytokinins are essential plant hormones that play crucial roles in various aspects of plant growth and development. By using mRNA differential display, we isolated a cytokinine-inducible cDNA encoding pathogenesis-related (PR) 4 from *Arabidopsis ampl* mutant. The full-length PR4 cDNA, designated *AtPR4*, contains an open reading frame of 212 amino acids with calculated molecular mass of 22,900 Da and isoelectric point (pI) of 7.89. Genomic DNA blotting showed that the *Arabidopsis* genome has one copy of *AtPR4*. *AtPR4* mRNA was induced by cytokinin and NaCl, but decreased by SA or JA treatment. PR proteins are induced in response to pathogen attack. Thus the *AtPR4* gene isolated in this study may be a useful candidate for genetic engineering of forage crops for increased tolerance against pathogen.
(**Key words** : *AtPR4*, Cytokinin, *ampl* mutant, Disease resistance)

Ⅰ. 서 론

목초와 사료작물은 미생물이나 동물과 달리 고착생활을 하기 때문에 생육기간 동안 지속적으로 병원균, 곰팡이 및 해충들의 공격을 받으며 자라게 된다. 목초와 사료작물은 다른 농작물에 비해 병해나 충해에 강한 편이지만, 일단 병해나 충해를 입게 되면 재배지 전체로 확산되어 수량 감소와 더불어 경제적 손실을 가져오게 된다. 김 등 (1987)은 오차드그라스에서 탄저병과 검은녹병, 브롬그라스에서 그물무늬병, 티모시에서 줄무늬마름병, 알팔파와 레드클로버에서 점무늬병 등의 발병내용을 보고한 바 있다. 목초가 이들 병원균에 감염되면 수량과 사료가치의 감소에 이어 최종적으로 가축의 기호성이 떨어지게 된다 (Hemken 등, 1979; Schmidt 등, 1982; Reed, 1994). 또한 감염정도가 높은 목초를 섭취하였을 경우, 암소의 임신율이 40~60%까지 저해되었다 (Schmidt 등, 1986).

Pathogenesis-related (PR) 단백질들은 병원균의 감염에 의하여 유도되는 단백질들로 그 기본 구조와 효소활성에 근거하여 17개의 family로 분류된다 (Bertini 등, 2006). 비록 많은 연구가 진행되고 있긴 하지만, 아직 몇몇 단백질들의

경상대학교 대학원 응용생명과학부, 식물분자생물학 및 유전자조작연구소, 환경생명과학 국가핵심 연구센터 (Division of Applied Life Science (BK21 program), PMBBRC, and EBNCRC, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)
* 농촌진흥청 축산과학원 (National Institute of Animal Science, Cheonan 330-801, Korea)
Corresponding author : Daeyoung Son, Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
Tel : +82-55-751-6028, Fax : +82-55-759-9363, E-mail : dyson@gnu.ac.kr

효소활성과 기능이 밝혀지지 않았기에 방어기작에서의 PR 단백질들의 정확한 역할에 대한 정의를 내리기는 쉽지 않다. PR 단백질들 중에서 PR2 family와 PR3 family는 가장 많이 연구되어 있으며, 이 효소들은 균사의 세포벽을 가수분해하여 균사의 성장을 방해할 뿐만 아니라, 방어기작에 관련된 신호전달 물질도 분비한다(Caruso 등, 2001). PR4 family에는 class I chitinase와 class II chitinase가 있는데(Bravo 등, 2003), class I chitinase를 코드하는 유전자는 감자에서 처음으로 분리되었으며(Stanford 등, 1989), 이 후 토마토(Joosten 등, 1990), 보리(Svensson 등, 1992), 애기장대(Potter 등, 1993) 등에서 class I과 class II chitinase의 PR4 유전자들이 분리되었다. PR4 단백질은 상처, 병원균의 감염 그리고 ethylene에 의하여 발현이 증가한다고 보고되어 있으나(Bravo 등, 2003) 식물호르몬의 하나인 cytokinin과의 연관성에 대한 보고는 미비한 실정이다.

Cytokinin은 세포의 분열과 기관형성의 촉진, 줄기의 성장과 분화, 스트레스와 병원균의 방어 및 잎의 노화를 지연시키는 등 식물의 성장과 발달에 매우 중요한 역할을 하는 호르몬임(Howell 등, 2003)에도 불구하고, 그 작용 기작은 명확히 밝혀져 있지 않다. 식물체내 cytokinin의 작용에 대한 이해를 높이기 위해 cytokinin 돌연변이체를 이용한 연구는 매우 유용한 연구결과를 도출할 수 있다. *amp1* (*altered meristem program1*)은 애기장대 돌연변이체 중의 하나로, cytokinin의 함량이 wild type 보다 6배나 높기 때문에(Chaudhury 등, 1993), *amp1*에는 cytokinin 생합성에 관여하거나 cytokinin 대사에 관여하는 효소를 조절하는 유전자가 많이 발현되어 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 *amp1* 돌연변이체에서 발현이 증가하는 PR4 단백질의 발현과 기능에 cytokinin이 어떤 역할을 하는지 밝히기 위한 첫 단계로, cytokinin에 의하여 발현이 증가하는 애기장대 PR4 유전자를 분리하여 특성과 발현 양상을 조사하였다. 내병성 유전자의 확보 및 기작에 관한 연구가 더 진전될 경우, 내병성 목초 품종 육성이 가능해질 것으로 사료된다.

II. 재료 및 방법

1. 재료식물의 생육조건 및 처리

애기장대(*Arabidopsis thaliana ecotype* Columbia) 야생종과 *amp1* 돌연변이 종자를 각각 100% 에탄올로 1분, 4% sodium hypochlorite 용액으로 5분간 살균한 다음 멸균수로 4~5회 충분히 세정하였다. 살균한 종자를 4℃에서 2일간 저온처리한 후 MS(Murashige와 Skoog, 1962) 한천 배지에 파종하여 1주일 혹은 3주일 동안 생육시켰다. 생장조절실 내의 환경조건은 16/8시간 명기/암기 주기로 조절된 광주기 하에서 온도는 25℃, 습도는 70%로 유지되도록 조절하였다. 호르몬과 스트레스 처리 실험을 하기 위해서는 살균한 종자를 B5 액체배지에 파종하여 1주일 동안 액체배양한 후 50 μM isopentenyladenine(iP), 100 μM abscisic acid(ABA), 150 mM NaCl, 2 mM salicylic acid(SA), 그리고 100 μM의 jasmonic acid(JA)를 각각 처리하였으며, 저온은 4℃ 배양실에서 빛을 조사하면서 정해진 시간동안 액체배양 하였다. 처리한 식물체는 수확하여 액체질소로 냉동시킨 후 −70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. Differential display

MS 한천 배지에서 1주일과 3주일 동안 키운 애기장대 야생종과 돌연변이체 whole plant로부터 total RNA를 phenol/LiCl 방법으로 분리하여(Ausubel 등, 1989) differential display 실험을 수행하였다. Differential display는 RNAimage kit (GenHunter, USA)를 사용하여 kit에 제공된 방법에 따라 수행하였다. 발현양의 차이가 있는 DNA 단편들은 pGEM-T vector kit (Promega,

USA)를 사용하여 클로닝하였다.

3. Southern blot 분석

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 ^{32}P로 표지하여 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℃에서 한 번 세척한 다음 Bio-imaging analyser (BAS-2000; Fuji Photo Film, Japan)로 분석하였다.

4. Northern blot 분석

B5 액체배지에 파종하여 1주일 동안 액체배양한 식물체에 여러 가지 스트레스 처리를 한 다음 whole plant로부터 RNA를 추출하여 1.2% formaldehyde agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane에 이동, 고정시켰다. Hybridization과 membrane의 세척은 기본적으로 Southern 분석과 동일한 방법으로 수행하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

Cytokinin은 목초와 사료작물의 성장과 발달을 조절하는 중요한 호르몬이다. 그러므로 cytokinin에 의해 발현이 유도되는 유전자와 단백질의 기능분석은 cytokinin의 작용기작을 이해하는데 매우 중요하다. 본 연구에서는 cytokinin에 의하여 발현이 조절되는 유전자들을 분리하기 위하여 애기장대 야생종과 *amp1* 돌연변이체로부터 RNA를 추출하여 differential display 실험을 수행하였으며, 이를 통해 발현양의 차이가 있는 cDNA 단편들을 얻었다. Differential display를 통하여 분리한 cDNA 단편들의 크기가 약 300~450 bp이었으므로, full length 클론을 얻기 위하여 애기장대 cDNA library로부터 스크리닝을 하였다. 각각의 DNA 단편을 probe로 사용하여 full length 클론을 스크리닝 하였으며, 5'과 3'의 염기 서열을 결정하여 BLAST 프로그램으로 분석하였다. 이들 중 3주령의 *amp1*에서 발현양이 크게 증가하는 한 개의 유전자가 애기장대의 PR4 *(AtPR4)*인 것으로 나타났다.

*AtPR4*는 애기장대의 3번 chromosome에 존재하며, 998 bp의 염기로 구성되어있는데, 이는 212개의 아미노산으로 번역되며 예상되는 분자량은 22.9 kDa이고 등전점은 7.89이었다. 다른 식물 유래의 PR4 유전자들과의 유사성을 비교하기 위해 NCBI-GenBank에 등록된 PR4 유전자들을 검색한 후, EBI-ClusterW와 ClusterX에서 multiple alignment를 수행하였다. 아미노산 서열 분석 결과, *AtPR4*와 고추냉이(*Eutrema wasabi*)의 hevein-like protein의 경우 다른 PR4 유사 단백질들과는 달리 N-말단에 chitin binding domain이 보존되어 있어, 이들이 class I chitinase에 속함을 알 수 있었으며, 모든 PR4 단백질의 C-말단에는 Barwin domain이 잘 보존되어있었다 (Fig. 1A). 유사성 분석 결과, *AtPR4*는 고추냉이의 hevein-like protein과 84%로 가장 높은 유사성을 보였고, 보리의 Barwin 단백질과는 72%, 담배 PR4a와 65%, 그 외의 PR4 단백질들과는 60% 정도의 유사성을 나타내었다. 분석에 사용한 PR 단백질들을 계통발생학적 분류를 한 결과, *AtPR4*는 유사성 결과와 마찬가지로 고추냉이와 발생학적으로 가장 근접한 것으로 나타났으며 단자엽과 쌍자엽 PR4 단백질들 간의 분화도 확인할 수 있었다 (Fig. 1B). 애기장대에 존재하는 5개의 PR family의 단백질들은 C-말단에 각각 특징적인 domain을 가지고 있는데 (Fig. 1C) 이 domain들이 여러 종류의 생물적 혹은 비생물적 스트레스에 반응

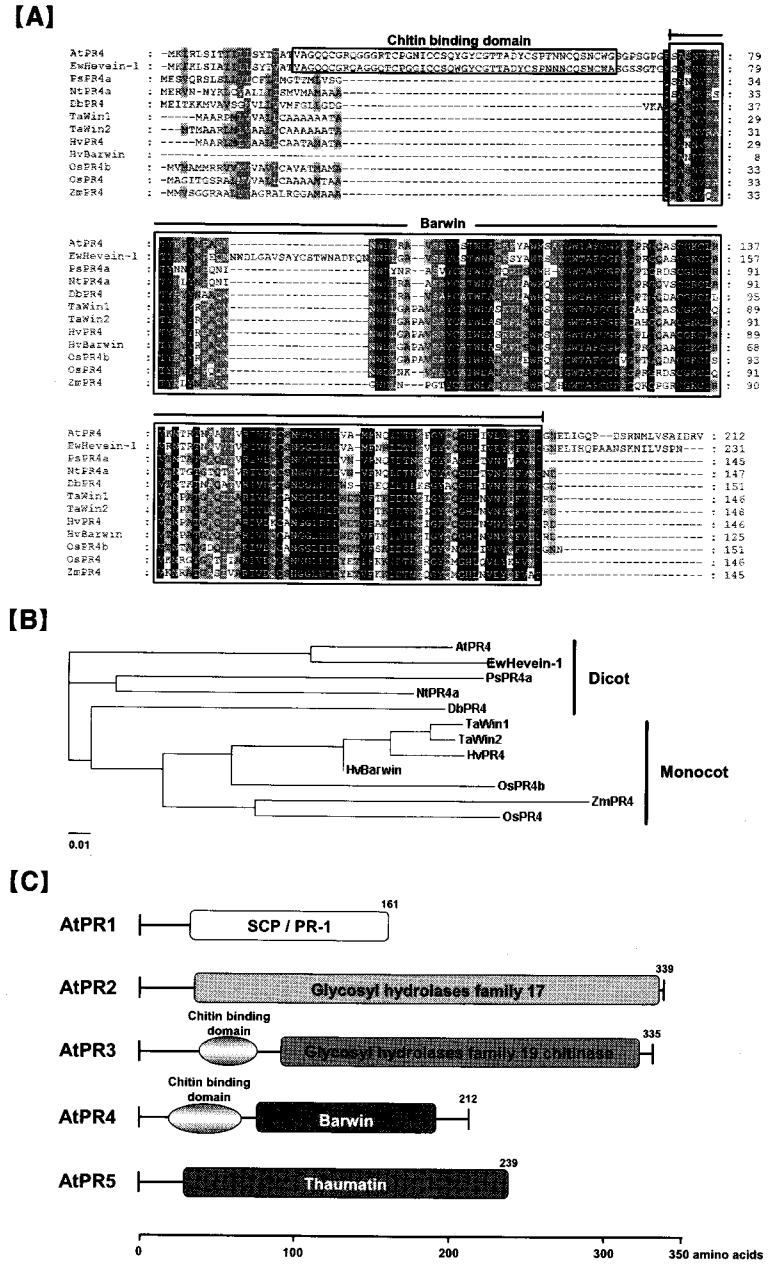

Fig. 1. Comparison of the amino acid sequence of *AtPR4* with other plant specific PR4 homologs.

[A] Sequence alignment of PR4 homologs. Accession numbers in the GenBank and EMBL databases for the protein sequences are as follows: *AtPR4* (*Arabidopsis thaliana* PR4, NP_187123), EwHevein-1 (*Eutrema wasabi* hevein-like portein, BAC16357), PsPR4a (*Pisum sativum* PR4a, AAF61434), NtPR4a (*Nicotiana tabacum* PR4a, CAA41438), DbPR4 (*Dioscorea bulbifera* PR4, AAB94514), TaWin1 (*Triticum aestivum* win1, O64392), TaWin2 (*Triticum aestivum* win2, O64393), HvPR4 (*Hordeum vulgare* PR4, CAA71774), HvBarwin (*Hordeum vulgare* barwin, AAA03274), OsPR4b (*Oryza sativa* PR4b, AAR08364), OsPR4 (*Oryza sativa* PR4, AAL11444) and ZmPR4 (*Zea mays* PR4, CAA57674). Thick bar marks Barwin domain and chitin binding domain is boxed. Gaps represented by dashes were introduced to maximize alignment. [B] Phylogenetic tree analysis of plant PR4 homologs by ClustalW alignments. [C] The conserved domain architecture of Arabidopsis PR proteins. The aligned PR proteins were from AtPR1 (NP_179068), AtPR2 (NP_191285), AtPR3 (P19171), AtPR4 (NP_187123) and AtPR5 (NP_177641).

하는 것으로 보고되어 있다(Uknes 등, 1992; Yun 등, 1997).

애기장대 야생종과 *amp1*에서의 *AtPR4*의 발현양상을 조사하기 위하여 1주일 혹은 3주일 키운 whole plant로부터 total RNA를 분리하여 Northern blot 분석을 실시하였다(Fig. 2A). *AtPR4*는 1주령의 야생종과 *amp1*에서는 발현양의 차이가 거의 없었으나 시간이 지남에 따라 *amp1*에서 더욱 많이 발현됨을 알 수 있었다. 따라서, *AtPR4*는 cytokinin과 식물성장에 관련이 있을 것으로 추측된다. Cytokinin의 처리에 따른 *AtPR4*의 발현양의 변화를 조사하기 위하여 1주령의 애기장대에 iP를 처리하여 Northern 분석을 하였다(Fig. 2B). *AtPR4*는 cytokinin 처리 10분 이내에 급격하게 발현이 증가하였다가 이후부터 서서히 감소하였다.

스트레스 하에서의 *AtPR4*의 발현정도를 조사하기 위하여 1주일 동안 B5 배지에서 액체 배양한 식물체에 스트레스를 처리한 후 whole plant로부터 RNA를 분리하여 분석한 결과 *AtPR4*는 NaCl 처리에 의해서만 발현이 증가하였다(Fig. 2C). Potter 등(1993)은 turnip crinkle virus를 처리한 애기장대 잎에서 *AtPR4*가 증가하였으며 병원균의 감염으로 인해 증가하는 에틸렌에 의해서도 이 유전자의 발현이 증가하는 것으로 보고하였다. 고무나무의 *hevein*은 ABA에 의해서 약하게 증가하였으며(Broekaert 등, 1990) *WjAMP1*은 JA에 의해서는 강하게 발현된 반면 SA 처리에 의한 발현양의 차이는 없는 것으로 나타났다(Kiba 등, 2003). 본 연구에

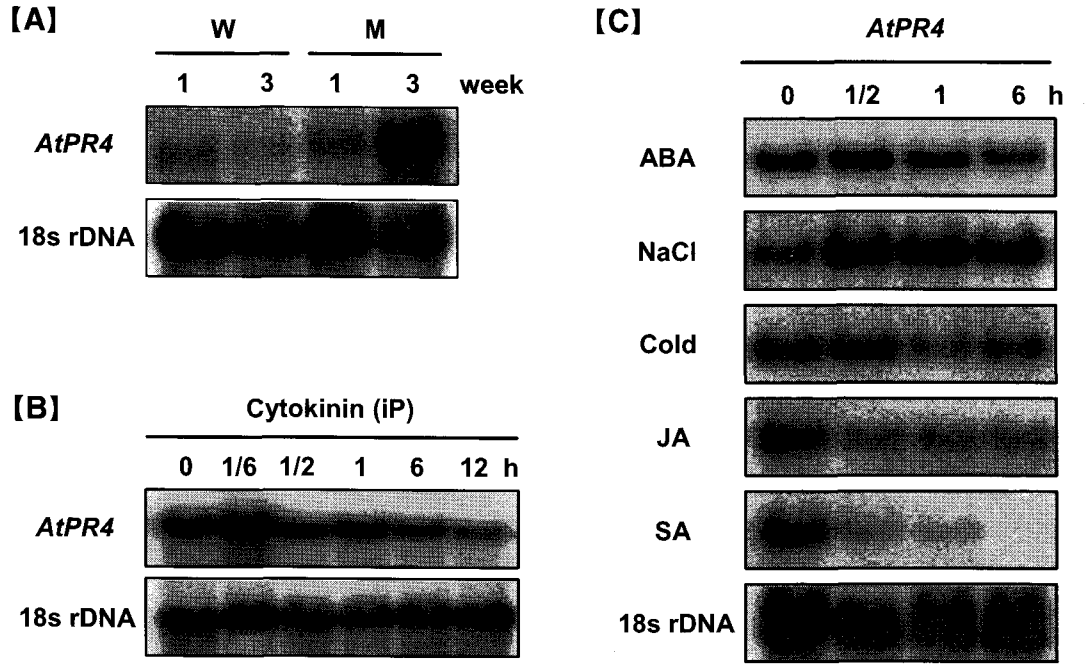

Fig. 2. Northern blot analysis of *AtPR4*.

[A] Expression of *AtPR4* in wild type (W) and *amp1* mutant (M) plants grown in MS medium for one or three weeks. [B] Expression of *AtPR4* in response to cytokinin treatment. Isopentenyladenine (iP, 50 μM) was applied to 1-week-old seedlings grown in B5 liquid medium. [C] Induction of *AtPR4* in response to various plant hormones and environmental stresses. Total RNA was extracted from 1-week-old *Arabidopsis* seedlings after treatment with abscisic acid (ABA, 100 μM), salicylic acid (SA, 2 mM), jasmonic acid (JA, 100 μM), NaCl (150 mM) and cold (4℃ under light) in B5 liquid medium for indicated period of time. 18S rDNA was used to monitor equal loading of total RNA (15 μg) in each lane.

서 *AtPR4*는 ABA처리 후 6시간부터 발현이 감소하였으며 JA와 SA의 경우는 처리와 동시에 발현이 급격히 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2C). MS 한천배지에서 생육시킨 식물체와는 달리 액체배양한 식물체의 대조구에서 *AtPR4*의 발현양이 증가한 것은 액체배양이 스트레스로 작용하였기 때문일 것으로 추측된다. 또한 유사성이 높은 단백질들이 같은 호르몬의 처리에 대해 상이한 결과가 나타난 것은 실험에 사용한 식물의 생육 조건과 연령, 그리고 처리 방법의 차이에 기인된 것으로 판단된다.

애기장대 게놈상에 존재하는 *AtPR4* 유전자의 copy 수를 확인하기 위하여 Southern 분석을 수행하였다(Fig. 3). 애기장대 잎으로부터 분리한 genomic DNA를 *AtPR4* cDNA를 자르지 못하는 *Eco*RI, *Bam*HI, *Eco*RV의 세 가지 효소로 절단한 다음 전기영동하여 분석한 결과, 각 lane에서 한 개씩의 band가 검출되었다. 따라서 *AtPR4* 유전자는 애기장대 게놈에 한 개의 copy로 존재할 것으로 추정된다. 담배의 PR4의 경우 3~4개의 copy가 존재하며 감자의 경우도 반수체 당 최소한 5 copy인 반면 애기장대와 고추냉이의 경우는 single gene으로 존재하였다(Friedrich 등, 1991; Stanford 등, 1989; Kiba 등, 2003).

Sano 등(1994)은 담배에 small GTP binding protein을 발현시키면 cytokinin의 함량이 높아지고 이로 인해 acidic PR 단백질 유전자의 발현이 증가함과 동시에 SA의 생산이 증가하여 담배 모자이크 바이러스의 감염에 대한 내성이 높아진다고 보고하였다. 그러나 아직까지 식물이 병원균에 대한 내성을 획득하는데 cytokinin이 어떤 역할을 하는지 구체적으로 밝혀지지 않고 있다. 본 연구에서 분리한 *AtPR4*는 cytokinin의 생체방어기작에서의 역할을 구명할 수 있는 좋은 재료가 될 뿐만 아니라 내병성 목초 품종의 육성을 위한 새로운 재료로 사용될 수 있음을 시사하고 있다.

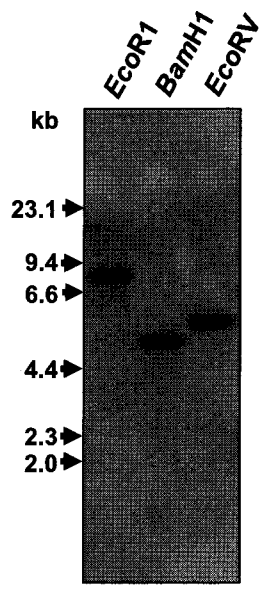

Fig. 3. Southern blot analysis of *AtPR4* gene.

Genomic DNA (15 μg) isolated from *Arabidopsis* leaves was digested with the indicated restriction enzymes, separated by agarose gel electrophoresis (1% gel) and transferred to a nylon membrane. The membrane was hybridized with ^{32}P-labeled *AtPR4* cDNA. The size of the markers is shown in the left side of the autoradiogram.

Ⅳ. 요 약

Cytokinin은 식물의 성장과 발달에 중요한 역할을 하는 필수 호르몬이다. mRNA differential display 방법으로 애기장대 *amp1* 돌연변이체로부터 cytokinin에 의하여 발현이 유도되는 PR4 유전자를 분리하였다. *AtPR4*로 명명한 애기장대 PR4 유전자는 212개의 아미노산으로 구성되어 있었으며 분자량은 22,900이고 등전점은 7.89로 추정되었다. Genomic DNA 분석결과, *AtPR4*는 single copy 유전자인 것으로 나타났다. *AtPR4*의 mRNA는 cytokinin과 NaCl에 의해서는 발현이 유도되었지만 SA와 JA에 의해서는 발현이 억제되었다. PR 단백질은 내병성 등 생체방어기작에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 분리한 애기장대 PR4 유

전자는 내병성 목초 품종의 개발에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (20050401034703)과 한국학술진흥재단 목적기초연구 (KRF-2003-F00001) 지원으로 수행되었습니다.

VI. 인 용 문 헌

1. 김동암, 권찬호, 김병호, 김창주, 김대진, 김문철, 배동호, 서 성, 안계수, 이인덕, 이효원, 전병태, 전우복, 정재록, 조무환, 조진기, 허삼남. 1987. 초지학총론. 선진문화사. 서울. pp. 323-331.
2. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingstone, D.D. Moore, J.G. Seidmanm, J.A. Smith and K. Struhl. 1989. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, pp. 4.3.1-4.3.4.
3. Bertini, L., A. Cascone, M. Tucci, R. D'Amore, I. Di Berardino, V. Buonocore, C. Caporale and C. Caruso. 2006. Molecular and functional analysis of new members of the wheat PR4 gene family. Biol. Chem. 387:1101-1111.
4. Bravo, J.M., S. Campo, I. Murillo, M. Coca and B. San Segundo. 2003. Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. Plant Mol. Biol. 52: 745-759.
5. Broekaert, W., H.I. Lee, A. Kush, N.H. Chua and N. Raikhel. 1990. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7633 - 7637.
6. Caruso, C., L. Bertini, M. Tucci, C. Caporale, M. Nobile, L. Leonardi and V. Buonocore. 2001. Recombinant wheat antifungal PR4 proteins expressed in *Escherichia coli*. Protein Expr. Purif. 23:380-388.
7. Chaudhury, A.M., S. Letham, S. Craig and E.S. Dennis. 1993. *ampl*: A mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. Plant J. 4:907-916.
8. Church, G.M. and W. Gilbert. 1984. Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995.
9. Friedrich, L., M. Moyer, E. Ward and J. Ryals. 1991. Pathogenesis-related protein 4 is structurally homologous to the carboxy-terminal domains of hevein, Win-1 and Win-2. Mol. Gen. Genet. 230: 113-119.
10. Hemken, R.W., L.S. Bull, J.A. Boling, E. Kane, L.P. Bush and R.C. Buckner. 1979. Summer fescue toxicosis in lactating dairy cows and sheep fed experimental strains of ryegrass-tall fescue hybrids. J. Anim. Sci. 49:641-646.
11. Howell, S.H., S. Lall and P. Che. 2003. Cytokinins and shoot development. Trends Plant Sci. 8:453-459.
12. Joosten, M.H., C.J. Bergmans, E,J, Meulenhoff, B.J. Cornelissen and P.J. De Wit. 1990. Purification and serological characterization of three basic 15-kilodalton pathogenesis-related proteins from tomato. Plant Physiol. 94:585-591.
13. Kiba, A., H. Saitoh, M. Nishihara, K. Omiya and S. Yamamura. 2003. C-terminal domain of a hevein-like protein from *Wasabia japonica* has potent antimicrobial activity. Plant Cell Physiol. 44:296-303.
14. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
15. Potter, S., S. Uknes, K. Lawton, A.M. Winter, D. Chandler, J. DiMaio, R. Novitzky, E. Ward and J. Ryals. 1993. Regulation of a hevein-like gene in *Arabidopsis*. Mol. Plant-Microbe Interact. 6:680-685.
16. Reed, K.F.M. 1994. Improved grass cultivars increase milk and meat production-a review. N Z J. Agric. Res. 37:277-286.
17. Sambrook, J. and D.W. Russell. 2000. Molecular cloning: A laboratory manual. Ed 3 Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
18. Sano, H., S. Seo, E. Orudgev, S. Youssefian, K.

Ishizuka and Y. Ohashi. 1994. Expression of the gene for a small GTP binding protein in transgenic tobacco elevates endogenous cytokinin levels, abnormally induces salicylic acid in response to wounding, and increases resistance to tobacco mosaic virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10556-10560.

19. Schmidt, S.P., C.S. Hoveland, E.M. Clark, N.D. Davis, L.A. Smith, H.W. Grimes and J.L. Holliman. 1982. Association of an endophytic fungus with fescue toxicity in steers fed Kentucky 31 tall fescue seed or hay. J. Anim. Sci. 55: 1259-1263.
20. Schmidt, S.P., D.A. Danilson, J.A. Holliman, H.W. Grimes and W.B. Webster. 1986. Fescue fungus suppresses growth and reproduction in replacement beef heifers. Highlights Agric. Res. 33:15.
21. Shure, M., S. Wessler and N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus in maize. Cell 35:225-233.
22. Stanford, A., M. Bevan and D. Northcote. 1989. Differential expression within a family of novel wound-induced genes in potato. Mol. Gen. Genet. 215:200-208.
23. Svensson, B., I. Svendsen, P. Hojrup, P. Roepstorff, S. Ludvigsen and F.M. Poulsen. 1992. Primary structure of barwin: A barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. Biochemistry 31:8767-8770.
24. Uknes, S., B. Mauch-Mani, M. Moyer, S. Potter, S. Williams, S. Dincher, D. Chandler, A. Sulsarenko, E. Ward and J. Ryals. 1992. Acquired resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell. 4:645-656.
25. Yun, D., R.A. Bressan and P.M. Hasegawa. 1997. Plant antifungal proteins. Plant Breed. Rev. 14: 39-88.