

ISOLASI DAN ANALISIS GEN YANG RESPONSIF TERHADAP CEKAMAN KEKERINGAN PADA TEBU

Wiwit Budi Widyasari*, Bambang Sugiharto**, Cahya Ismayadi***, Kabul Wahjudi, dan Untung Murdiyatmo*

*Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia, Jl. Pahlawan 25 Pasuruan

**FMIPA-Biologi Universitas Jember, Jember

***Pusat Penelitian Perkebunan Kopi dan Kakao, Jl. PB. Sudirman Jember

ABSTRACT

This study was aimed to isolate and identify a gene that was responsive to drought stress in sugar cane variety M442-51, a variety that is widely used in pastures or dry land. Under drought stress, M442-51 showed an enhance expression of several proteins. One of the protein, namely dip22, (drought inducible protein, with a molecular weight of 22KDa) was isolated and analyzed. Amino acid sequence of this protein showed some homology with several stressed related proteins (OsAsr 1 from *Oryza sativa* leaves, ZM Bss1 of *Zea mays* leaves, LeAsr 1, LeAsr 2 and LeAsr 3 of *Lycopersicum lycopersicon* leaves). The 343 bp of dip22-cDNA fragment was obtained using RT PCR from mRNA of sugar cane leaves that has been exposed to drought stress. The results indicated that the gene dip22 plays an important role as a regulatory protein that are usually nested within cytoplasmic matrix or in the nucleus.

Key words: *Saccharum officinarum*, drought inducible protein, dip22-cDNA, RT-PCR

PENGANTAR

Tanaman mengalami dehidrasi atau cekaman air tidak hanya karena kondisi kekeringan dan salinitas tinggi tetapi juga karena suhu rendah (*frost*). Tanaman menanggapi dan beradaptasi terhadap cekaman air untuk mempertahankan diri dari cekaman lingkungan tersebut. Cekaman air sering menyebabkan hambatan pertumbuhan, produksi, dan bahkan menyebabkan kematian. Agar tetap dapat hidup dalam kondisi kekurangan air, maka tanaman harus memiliki sistem pertahanan terhadap cekaman lingkungan tersebut.

Stres air menyebabkan sel tanaman kehilangan air dan menurunkan tekanan turgor. Kondisi semacam ini menyebabkan terjadinya beberapa perubahan proses fisiologis, metabolisme, dan ekspresi beberapa gen yang diduga memainkan peran penting dalam respons adaptasi tanaman terhadap cekaman air. Beberapa gen yang responsif terhadap cekaman kekeringan, kadar garam tinggi, dan suhu dingin pada level transkripsi (mRNA) sudah banyak dilaporkan (Ingram dan Bartels, 1996; Shinozaki dan Shinozaki, 1997). Jumlah mRNA dari gen yang responsif terhadap cekaman air menurun jika cekaman pada tanaman dihentikan. Hal ini merupakan bukti yang menunjukkan bahwa gen-gen tersebut terinduksi oleh cekaman air atau dehidrasi pada lingkungan tumbuh tanaman. Fungsi dari produk beberapa gen tersebut sudah diprediksi berdasarkan kesamaan urutan asam aminonya, yaitu mempunyai peran melindungi sel-sel tanaman pada kondisi dehidrasi (Bray, 1996).

Pola ekspresi gen yang diinduksi cekaman air sangat kompleks. Beberapa gen menanggapi cekaman air sangat cepat, sedangkan yang lainnya diinduksi lambat setelah ABA endogen terakumulasi. Sebagian besar dari gen-gen yang responsif terhadap kekeringan, salinitas tinggi, dan suhu dingin juga diinduksi oleh aplikasi ABA eksogen (Shinozaki dan Shinozaki, 1997; Bray, 1996). Contoh gen semacam ini adalah *RAB/LEA* (*responsive to ABA/late embryogenesis abundant*) (Chandler dan Robertson, 1994), gen biosintesis prolin (Yoshida *et al.*, 1995) dan protein kinase *Pkaba1* (Hollapa dan Simmon, 1995). Hormon ABA yang levelnya meningkat pada kondisi tanaman mengalami cekaman air berperan sebagai mediator induksi ekspresi gen-gen yang responsif terhadap kekurangan air (Bray, 1996).

Beberapa protein yang diinduksi oleh cekaman lingkungan meningkatkan sifat toleransi tanaman terhadap cekaman lingkungan tersebut. Contohnya padi transgenik yang membawa gen *HVA1*, yaitu gen yang mengkode protein *LEA* kelompok 3 yang diisolasi dari barley menunjukkan peningkatan sifat toleransinya terhadap cekaman kekeringan dan garam (Xu *et al.*, 1996). Protein *LEA* lainnya yaitu LE25 dari tomat diekspresikan pada yeast memberikan sifat toleransi terhadap salinitas dan suhu dingin (Imai *et al.*, 1996). Tembakau transgenik yang mengekspresikan prolin, dapat tumbuh lebih baik pada kondisi cekaman kekeringan (Kishore *et al.*, 1996).

Permasalahan utama yang dihadapi jika tebu ditanam di lahan kering adalah keterbatasan air yang tersedia bagi tanaman. Hal ini mengakibatkan tebu tidak dapat tumbuh

secara optimal. Di lahan kering penurunan kristal gula dapat mencapai 2,1 ton/ha sampai 3,5 ton/ha (Laporan intern Padrik Gula Kedawung, 2000). Masalah ini dapat diatasi dengan menanam varietas tebu yang lebih toleran terhadap cekaman kekeringan. Peningkatan sifat toleransi terhadap cekaman kekeringan pada varietas tebu unggul diperlukan untuk mengatasi rendahnya produktivitas kristal gula. Pemahaman mengenai mekanisme pertahanan tebu terhadap cekaman kekeringan pada varietas toleran merupakan langkah awal yang sangat penting dalam program pemuliaan tebu untuk merakit varietas toleran kekeringan melalui rekayasa genetika.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan karakterisasi gen yang responsif terhadap cekaman kekeringan pada tebu varietas M 442-51. Pada penelitian terdahulu, dari 23 klon tebu yang diuji, varietas M 442-51 menunjukkan karakter paling tahan terhadap cekaman kekeringan dan kadar garam tinggi berdasarkan pengamatan morfologi dan fisiologi dibandingkan varietas uji yang lain (Widyasari *et al.*, 2000). Oleh karena itu, varietas M 442-51 digunakan sebagai sumber genetik pada penelitian ini.

BAHAN DAN CARA KERJA

Persiapan bahan tanam

Bahan tanam berupa bibit bagal tebu mata satu varietas M 442-51 yang sebelum ditanam dalam pot dikecambahkan terlebih dulu untuk mendapatkan tanaman yang mempunyai pertumbuhan seragam. Setelah umur 1 bulan, dipilih tanaman dengan pertumbuhan yang seragam kemudian dipindahkan ke rumah kaca, dan ditanam dalam pot yang berisi media campuran tanah dan pupuk kandang (2 : 1). Tanaman dirawat dengan perawatan baku sampai umur 2 bulan, kemudian diberi perlakuan cekaman kekeringan dengan cara menghentikan penyiraman. Sampel berupa daun +1 dipanen setelah gejala kelayuan muncul yang ditunjukkan dengan terjadinya proses penggulungan pada daun +1.

Analisis pola protein

Analisis pola protein daun sebelum dan setelah induksi kekeringan dilakukan menggunakan metode *two-dimension polyacrylamide gel electrophoresis* (2D-PAGE) Buffer ekstraksi untuk isolasi protein daun M 442-51 adalah

0.1 M tris-HCl, pH 7.0 yang mengandung 1% (v/v) Triton X-100 dan 50 mM DTT. Bahan yang tidak larut dipisahkan dengan sentrifuse dan protein dipresipitasi dengan aseton dingin (-20° C). Pelet diresuspensi dengan sample buffer yang mengandung 9.5 M urea, 2% (w/v) Nonidet P-40 dan 100 mM DTT. Protein dipisahkan pada dimensi pertama selama semalam dalam *rod gel* menurut O'Farel (1975). Setelah *isoelectric focusing*, gel direndam dalam *equilibrium buffer* yang mengandung 63 Mm Tris-HCl, Ph 6.8, 2% SDS, 20% (v/v) gliserol dan 50 mM DTT. *Rod gel* dipasang pada 13% SDS-poliakrilamide dan dielektroforesis pada dimensi kedua selama 4-5 jam pada 24 mA. Protein di-staining dengan *commasie-blue*.

Sikuensing asam amino

Protein *dip22* yang telah terpisah selanjutnya diisolasi dari gel. Kemudian dilakukan fraksinasi, dan masing-masing fraksi di-sikuens dengan menggunakan alat *protein sequencer*. Semua pekerjaan ini dilakukan dengan bantuan Universitas Nagoya, Jepang.

Isolasi RNA total dan pemurnian mRNA

Isolasi RNA total jaringan daun dari sumber genetik terpilih yaitu M 442-51 dengan dan tanpa induksi stres kekeringan dilakukan dengan metode ekstraksi guanidium-thiocyanate yang diikuti dengan ultra sentrifugasi dalam cesium chloride (Sambrook *et al.*, 1989). Setelah diperoleh total RNA kemudian diisolasi mRNA menggunakan kolom afinitas oligo-DT (Qiagen).

RT-PCR dan Kloning cDNA

Dengan menggunakan enzim reverse-transcriptase yang dikombinasikan dengan polymerase dan primer (*forward* dan *reverse primers*) yang diturunkan dari urutan asam amino protein *dip22*, fragmen *cDNA-dip22* dapat disintesis dengan PCR. Berdasarkan urutan asam amino *dip22* dirancang 4 macam primer (*2 forward* dan *2 reverse*), yaitu primer Dip 1 (5'-AAG CAY CAY CAY CAY CTB TT- 3'), Dip2 (5'-AAG CAY CAY CAY CAY TTR TT- 3'), Dip3 (5'-CTG GTG GAA NGG GAA NCC NCC-3'), Dip4 (5'-GCN GCS ACC TCC TCC TCR AT-3'). PCR dilakukan sebanyak 40 kali siklus reaksi, masing-masing siklus terdiri atas 3 tahap, yaitu tahap ke-1 94° C 1 menit, tahap ke-2 50° C 2 menit, dan tahap ke-3 68° C 2 menit. Susunan reaksi PCR disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Proses reaksi reverse transcriptase PCR (*Reverse Transcriptase PCR reaction*)

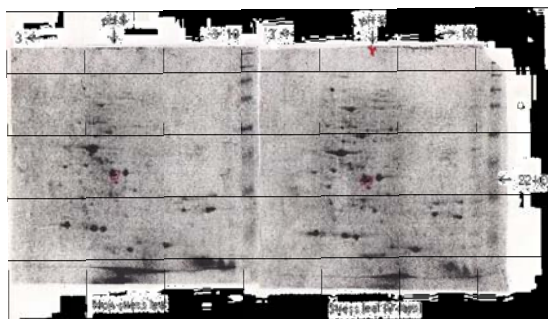
Bahan	DIP 1/3 Reaksi 1	DIP ¼ Reaksi 2	DIP 2/3 Reaksi 3	DIP 2/4 Reaksi 4
Water	23 ul	23 ul	23 ul	23 ul
Amv/tfl 5x buffer	10 ul	10 ul	10 ul	10 ul
DNTP mix	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul
Downstream primer	5 ul (Dip3)	5 ul (Dip4)	5 ul (Dip3)	5 ul (Dip4)
Upstream primer	5 ul (Dip1)	5 ul (Dip1)	5 ul (Dip2)	5 ul (Dip2)
25 mM MgSO4	2 ul	2 ul	2 ul	2 ul
Amv	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul
R.Transcriptase				
Tfl DNA polimerase	1 ul	1 ul	1 ul	1 ul
RNA sample	2 ul	2 ul	2 ul	2 ul
<i>Total</i>	<i>50 ul</i>	<i>50 ul</i>	<i>50 ul</i>	<i>50 ul</i>

Fragmen *cDNA-dip22* yang diperoleh kemudian diklon pada vektor yang sesuai (*pGEM-T-easy vector*, Promega) dan selanjutnya dilakukan sikuensing.

HASIL

Analisis pola protein M 442-51 sebelum dan setelah induksi stres kekeringan

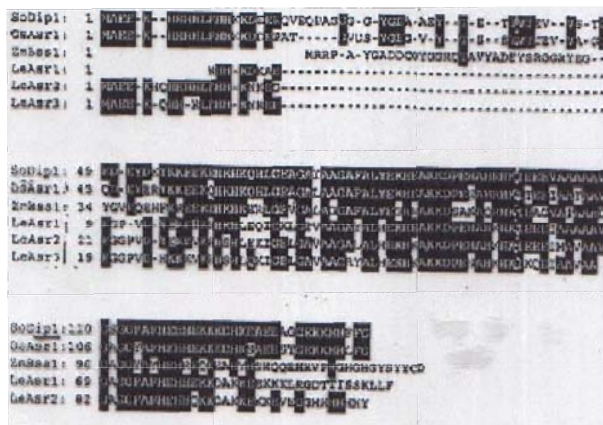
Untuk mengetahui perbedaan pola protein daun M 442-51 sebelum dan setelah perlakuan cekaman kekeringan dilakukan analisis protein dengan teknik 2D-PAGE. Hasil elektroforesis ditunjukkan pada Gambar 1.

**Gambar 1.** Pola protein M 442-51 sebelum dan setelah induksi stres kekeringan (*Protein pattern of M 442-51 under drought stress and non drought stress*)

Pada Gambar 1 nampak protein yang spesifik, yaitu protein dengan berat molekul 22 kDa dan titik isoelektrik (pI) 6.0 terakumulasi pada saat tebu mengalami stres kekeringan. Selanjutnya protein yang terakumulasi tersebut diberi nama *dip22*.

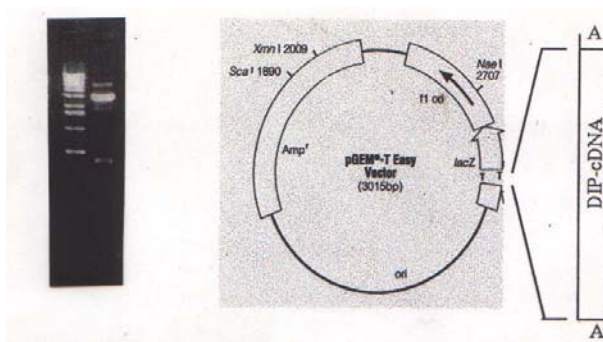
Sikuens asam amino protein *dip22*

Hasil analisis urutan asam amino *dip22* dan perbandingan urutan asam amino *dip22* dengan tanaman lain dapat dilihat pada Gambar 2.

**Gambar 2.** Perbandingan urutan asam amino protein *dip22* (*SoDip1*) tebu dengan *OsAsr1* (padi), *ZmBss1* (jagung) dan *LeAsr1*, *LeAsr2*, *LeAsr3* dari tomat. Asam amino yang identik dan terkonservasi ditandai dengan kotak hitam (*Comparison of the amino acid sequence of dip22 protein for sugarcane and OsAsr1 (rice), ZmBss1 (maize), LeAsr1, LeAsr2, LeAsr3 (tomato). Identical and conservative amino acid residues are boxed and shaded*)

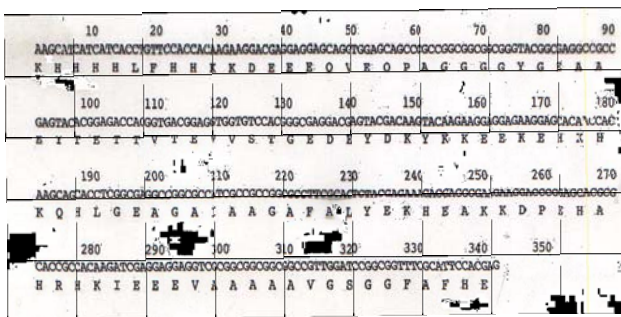
RT-PCR dan Kloning cDNA

Isolasi gen *dip22* dimulai dengan cara mensintesis fragmen *cDNA-dip22* dengan metode RT PCR. Diperoleh *cDNA-dip22* berukuran lebih kurang 343 bp, yang selanjutnya diklon ke dalam *pGEM-T easy vector* dan hasilnya ditunjukkan pada Gambar 3.

**Gambar 3.** *cDNA-dip22* hasil RT-PCR (kiri) yang di-klon pada plasmid *pGEM-T-easy vector* (kanan) (*Cloning of cDNA-dip22 produced from RT-PCR on pGEM-T-easy vector*)

Selanjutnya *pGEM-T* yang membawa *cDNA-dip22* ditransformasi ke *E. coli* (JM 109) dan diseleksi menggunakan metode *blue white screening* untuk memilih klon yang mengandung DNA *insert*. Dari hasil seleksi diperoleh 30 klon berwarna putih. Setelah dilakukan digesti dengan enzim restriksi *EcoRI* diperoleh 15 klon positif yang mengandung *insert* dengan 4 macam ukuran sesuai dengan klon yang merupakan produk reaksi RT-PCR (data tidak disajikan). Plasmid rekombinan dari klon-klon terpilih tersebut selanjutnya dikirim ke Lembaga Eijkman, Jakarta

untuk analisis sikuensing DNA. Sikuens fragmen *cDNA-dip22* yang diperoleh disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil sekuensing fragmen *cDNA-dip22* dan urutan asam aminonya (*DNA sequence of cDNA-dip22 fragment and its deduced amino acid sequence*)

PEMBAHASAN

Perbedaan pola protein pada gel 2-Dancow (Gambar 1) sangat penting karena memberikan informasi ada tidaknya protein spesifik yang responsif terhadap cekaman kekeringan. Salah satu pendekatan yang dapat dilakukan untuk mengisolasi gen yang berkaitan dengan sifat toleransi stres kekeringan adalah dengan cara isolasi protein spesifik yang responsif cekaman kekeringan. Protein yang diinduksi cekaman kekeringan tersebut harus bersifat spesifik yaitu dari varietas yang telah terbukti mempunyai tingkat toleransi terhadap stres kekeringan yang tinggi dan dapat diinduksi oleh perlakuan stres kekeringan. Pada varietas tebu yang peka kekeringan, protein tersebut tidak tampak atau tampak tetapi terbatas kandungannya pada saat tanaman diberi perlakuan cekaman kekeringan.

Berdasarkan analisis protein pada gel 2-dimensi, dapat disimpulkan bahwa selama mendapat cekaman kekeringan, varietas M442-51 mengekspresikan protein spesifik dengan berat molekul (BM) 22 kD dan titik isoelektrik (pI) 6,0. Selanjutnya protein tersebut (diberi nama *dip22*) diisolasi dan dikarakterisasi untuk mengetahui urutan asam aminonya. Urutan asam amino yang dihasilkan dari sikuensing berupa 142 asam amino disajikan pada Gambar 2 (baris pertama, diberi tanda SoDip1). Dengan program *Clustal X*, urutan asam amino tersebut dibandingkan dengan sikuens protein yang ada di *database*. Hasil analisis menunjukkan bahwa fragmen protein *dip22* tersebut memiliki homologi 73% dengan protein *OsAsr1* dari padi, 45% dengan *ZmBss1* dari jagung dan 39% dengan *LeAsr1*, 42% dengan *LeAsr2*, dan 26% dengan *LeAsr3* dari tomat.

Berdasarkan komposisi asam amino dari protein *dip22*, yang terdiri dari Glu (20%), His (13%), Lys (13%) dari total asam amino), dan memiliki sangat sedikit asam amino yang bermuatan netral yaitu hanya sebesar 7%, serta kekurangan

Cys, Asn dan Trp, maka disimpulkan bahwa protein *dip22* bersifat hidrofilik.

RT-PCR yang dilakukan telah menghasilkan fragmen *cDNA-dip22* berukuran 343 bp (Gambar 3) dan sikuens nukleotida fragmen *cDNA* tersebut disajikan pada Gambar 4. Dari analisis perbandingan urutan nukleotida *cDNA-dip22* dengan *database* GeneBank, diperoleh indikasi bahwa *cDNA* tersebut mempunyai homologi yang tinggi dengan gen *Asr* pada tanaman tomat, gen *OsAsr1* dari padi varietas Pokkali yang toleran terhadap cekaman garam, dan gen *DS2* dari kentang liar yang toleran cekaman kekeringan (data tidak ditampilkan). Dengan adanya data homologi ini, dapat ditarik kesimpulan bahwa *cDNA-dip22* mempunyai peranan yang diduga mirip dengan gen-gen yang sebelumnya sudah diidentifikasi tersebut.

Sikuens *OsAsr1* mengkode protein hidrofilik dengan berat molekul 15,4 kD dan mempunyai daerah yang terkonservasi dan homolog dengan protein *ASR*. *OsAsr1* hibrid dengan transkrip 0,8 kb yang diekspresikan secara konstitutif, level ekspresinya dapat ditingkatkan oleh perlakuan ABA eksogen dan stres osmotik yang diinduksi oleh manitol dan garam. Sikuens nukleotida *cDNA OsAsr1* yang utuh menunjukkan bahwa *OsAsr1* mengkode polipeptida yang terdiri atas 138 asam amino dengan berat molekul 15,4 kD dan mempunyai komposisi asam amino yang bias (kekurangan *tryptophan* dan *sistein*) dan merupakan protein yang sangat hidrofilik. Protein hidrofilik secara alami menunjukkan bahwa protein tersebut bentuknya terlarut dan terdapat dalam matriks sitoplasma atau inti sel. *OsAsr1* sama dengan semua protein *Asr* yaitu sebagai protein kinase yang potensial, hidrofilik dan diduga mempunyai struktur heliks alpha yang dominan. Tempat miristoilasi yang potensial terletak pada *glysin* 68 dalam sikuens *OsAsr1* terkonservasi pada semua protein *Asr* di lokasi yang sama. Konservasi ini menunjukkan peran penting miristoilasi terhadap fungsi protein. Residu *myristoyl* dapat berikatan pada kantong hidrofobik dan memberikan stabilitas struktural protein (Vaidyanathan *et al.*, 1999). Proses miristoilasi menunjukkan peranannya dalam mengikat membran plasma dan sering ditemukan pada protein yang keluar masuk menyeberangi membran, di mana residu miristoil menyisip ke lapisan lipid dalam membran plasma dan memudahkan interaksi membran. Protein *Asr* pada tomat adalah protein yang berada dalam inti (Iusem *et al.*, 1993) dan kemungkinannya adalah bahwa *moiety* yang dimiristoilasi membantu dalam *targetting* inti. Menurut Silhavy *et al.*, (1995), berdasarkan analisis sikuens DNA *DS2*, gen ini mengkode protein yang pada urutan asam amino ke-20 yang pertama homolog dengan famili protein *ASR* (ABA, *water stress* dan *ripening*) pada tomat.

Pada bagian internal sikuens asam amino, terdapat 155 asam amino yang secara struktural serupa dengan protein *LEA* spesifik dan 88 asam amino pada ujung terakhir homolog dengan sikuens famili protein *ASR* dan dengan fragmen cDNA parsial yang diisolasi dari akar padi. Daerah N-terminal pada protein *DS2* adalah hidrofilik dengan 10 motif asam amino yang masing-masing terdiri atas 13-mer dan mempunyai struktur *coil* yang acak. Sebaliknya, C-terminal menunjukkan *heliks a* dan memiliki motif seperti pada sikuens protein inti sel. Data ini menunjukkan bahwa fungsi protein *DS2* diduga melindungi DNA inti dari cekaman kekeringan.

Tersedianya data yang menunjukkan adanya kesamaan antara *cDNA-dip22* dengan gen-gen *Asr* dari tanaman lain telah memberikan informasi penting dan indikasi mengenai peranan dari gen *dip22* yang diisolasi dari tebu varietas M442-51. Diduga produk dari gen *dip22* berupa protein hidrophilik dalam bentuk terlarut dan terdapat dalam matriks sitoplasma atau inti sel. Tersedianya fragmen *cDNA-dip22* selanjutnya dapat digunakan sebagai *probe*/pelacak DNA untuk mendapatkan *cDNA-dip22* yang utuh (*full size*) dan karakteristik ekspresi gen *dip22* untuk mengetahui peranan gen *dip22* tersebut secara lebih terinci dalam kaitannya dengan peningkatan kemampuan tebu menghadapi kondisi kekeringan.

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa produk gen *dip22* diduga mempunyai peranan yang sama dengan famili protein *Asr* dari padi dan tomat, dan protein *DS2* dari kentang, yaitu sebagai protein regulator yang terkait dengan mekanisme pertahanan terhadap stres kekeringan, dan yang berlokasi dalam matriks sitoplasma atau inti sel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi yang telah memberi dana untuk penelitian ini melalui program Riset Unggulan Terpadu (RUT).

DAFTAR PUSTAKA

- Bray EA, 1996. Drought-and ABA-induced changes in polypeptide and mRNA accumulation in tomato leaves. *Plant Physiol.* 88: 1210-1214.
- Chandler PM and Robertson M, 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Ann.Rev.plant physiol.Plant Mol Biol.* 45: 113-141.
- Hollapa LD and Walker Simmon MK, 1995. The wheat abscisic acid-responsive protein kinase mRNA kinase, pKABAI, is upregulated by dehydration, cold temperature and osmotic stress. *Plant Physiol.*108: 1203-1210.
- Imai R, Chang L, Ohta A, Bray EA, and Takagi M, 1996. A leaf-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when over-expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 170: 243-248.
- Ingram J and Bartels D, 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 47: 377-403.
- Iusem ND, Bartholomew DM, Hitz WD, and Scolnik, 1993. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant physiol* 102: 1353-1354
- Kishore PBK, Hong Z, Guo-Hua Miao, Chein-An Hu, and Verma DPS, 1996. Overexpression of d-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108: 1387-1394.
- Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K, 1997. Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol.* 115: 327-334.
- Silhavy D, Hutvagner G, Barta E, and Banfalvi Z, 1995. Isolation and characterization of water stress inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Mol Biol.* 27: 587-595.
- Widyasari WB, Ismayadi C, Sugiharto B, dan Wahyudi KA, Handojo T, 2000. Drought stress induced tissue-specific protein in sugarcane. *Proceeding on International seminar on Plant molecular biology.* Univ. of Jember. Jember.
- Xu DP, Duan X, Wang B, Hong B, David Ho T, and Wu R, 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant physiol.* 110: 249-257.
- Yoshiba Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Harada Y, and Shinozaki K, 1995. Correlation between the induction of a gene for pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *A. thaliana* under osmotic stress. *Plant Journal.* 7: 751-760.

Reviewer: **Prof. Dr. Sutiman B Sumitro**