

Ekspresi Gen *GFDD4-1* pada *Physcomitrella patens* dan Gen Homolog pada *Arabidopsis thaliana* dalam Respons terhadap Cekaman Abiotik

GFDD4-1 Gene Expression in Physcomitrella patens and Homologous Gene in Arabidopsis thaliana in Response to Abiotic Stress

DIAH RATNADEWI¹, WOLFGANG FRANK²

¹Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

²Institut für Pflanzenbiotechnologie, Albert-Ludwigs University of Freiburg, Jerman

Diterima 23 November 2004/Disetujui 7 Oktober 2005

A number of abiotic stress responsive genes have been identified from various plant species through reverse genetic strategy. A group of genes are involved in plant responses to stress; they are activated by diverse stress conditions and through different mechanisms. One single gene can be induced by several different stress factors; on the other hand, a number of genes can be up-regulated by a single factor. In *Physcomitrella patens*, through Northern hybridization, the transcript level of the gene *GFDD4-1* was detected to be markedly increased by ABA, dehydration and cold, but not by salinity and osmotic stress. In *Arabidopsis thaliana*, a homologous gene to *GFDD4-1* namely *At2g47770*, was confirmed to fulfill similar function as in *P. patens*: it is inducible by various abiotic stress treatments, i.e. ABA, dehydration, salinity, and cold. Inducible genes in response to abiotic stress factors may be responsible for plant tolerance to those factors.

PENDAHULUAN

Cekaman abiotik seperti kekeringan, kadar garam tinggi (salinitas), suhu tinggi atau rendah, keasaman tanah, tercatat menurunkan hasil pertanian dunia hingga lebih dari 50% (Bray *et al.* 2000). Berbagai cekaman tersebut mengakibatkan perubahan-perubahan pada morfologi, fisiologi, dan biokimia, yang akhirnya akan berpengaruh buruk pada pertumbuhan tanaman serta produktivitasnya.

Kekeringan, salinitas, temperatur ekstrem, dan cekaman oksidatif, seringkali saling berhubungan dan menginduksi kerusakan yang sama pada sel. Karena itu, banyak ilmuwan semakin yakin bahwa respons kompleks tumbuhan terhadap cekaman abiotik mengikutsertakan sejumlah gen atau keluarga gen atau sebaliknya, satu gen dapat diaktifkan oleh beberapa jenis cekaman. Mekanisme kontrol molekular untuk sifat toleran terhadap cekaman bersumber pada pengaktifan serta pengaturan pada gen-gen spesifik. Sejumlah gen terkait-cekaman abiotik telah berhasil diisolasi dari berbagai jenis tumbuhan tingkat tinggi. Pendekatan yang efektif untuk mengetahui fungsi biologis gen kini banyak menggunakan strategi genetika terbalik (*reverse genetic strategy*).

Respons sejumlah spesies tumbuhan terhadap cekaman abiotik sudah banyak diteliti. Tumbuhan yang menunjukkan resistensi terhadap kekeringan yang hebat antara lain *Craterostigma plantagineum* (Bartels & Salamini 2001) dan

jenis lumut *Tortula ruralis* (Oliver *et al.* 2000). *Physcomitrella patens*, briofita jenis lain, yang dikenal sebagai salah satu tumbuhan pionir, diyakini memiliki gen resisten yang menjadikannya mampu hidup dalam kondisi ekstrem. Hal itu kemudian dibuktikan oleh Frank *et al.* (2005), yang melaporkan bahwa *P. patens* menunjukkan toleransi yang tinggi terhadap berbagai cekaman abiotik, yakni kadar garam tinggi, dehidrasi, dan tingkat osmolaritas tinggi.

Dari tumbuhan lumut *P. patens* yang mengalami desikasi, beberapa gen yang terinduksi ekspresinya berhasil diisolasi dengan metode genetika terbalik. Salah satu gen baru yang berhasil diidentifikasi dan diisolasi oleh Frank W (dokumen tidak dipublikasikan), yang diyakini berperan untuk sifat toleran tumbuhan tersebut terhadap kekeringan sementara ini diberi nama *Genefishing Differential Display, clone 4-1 (GFDD4-1)*. Dalam penelitian ini, potongan gen *GFDD4-1* digunakan untuk memastikan keberadaan gen homolog pada *Arabidopsis thaliana*, sebagai wakil tumbuhan tingkat tinggi, yang mungkin berfungsi serupa di bawah kondisi tercekam secara abiotik.

Percobaan ini bertujuan mengetahui aktivitas gen *GFDD4-1* pada *P. patens* dan gen homolognya pada *A. thaliana* ketika tumbuhan tersebut merespons berbagai cekaman abiotik yang diberikan. Gen yang membangun sifat toleran terhadap kondisi yang tidak menguntungkan dapat diduga dari peningkatan ekspresinya yang terinduksi oleh kondisi tersebut. Induksi gen dipastikan dengan hibridisasi gen pelacak pada hasil *Northern blot*.

*Penulis untuk korespondensi, Tel./Fax. +62-251-345011,
E-mail: dratnadewi@yahoo.com

BAHAN DAN METODE

Perlakuan Cekaman pada *P. patens* dan *A. thaliana*.

Physcomitrella patens tipe liar dipelihara dalam media cair Knop (KH_2PO_4 250 mgL^{-1} , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250 mgL^{-1} , KCl 250 mgL^{-1} , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1000 mgL^{-1} , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.5 mgL^{-1} , pH 5.8) tanpa hormon. Dua minggu setelah subkultur terakhir, tanaman lumut itu dipanen secara aseptik dan dipindahkan segera ke dalam media dengan komposisi dasar yang sama tapi dengan tambahan bahan penghasil kondisi mencekam, yaitu NaCl (300 mM), sorbitol yang menciptakan osmolaritas tinggi (600 mM), dan ABA (asam absisat, 50 μM). Perlakuan dehidrasi diberikan dengan cara menyaring lumut tersebut melalui kertas saring dalam corong Buchner, kemudian membiarkannya mengering dalam cawan Petri yang terbuka. Perlakuan dilakukan selama 1, 2, 4, dan 8 jam pada suhu 25 ± 1 °C dengan intensitas cahaya 55 $\mu\text{mol m}^{-2}$ detik $^{-1}$. Perlakuan suhu rendah dilakukan dengan menempatkan tanaman pada suhu 4 °C segera setelah subkultur ke media dasar. Sebagai kontrol digunakan tanaman yang tidak mendapatkan perlakuan cekaman. Pada akhir perlakuan bahan tanaman segera dibekukan dalam nitrogen cair dan disimpan pada suhu -80 °C sampai saat RNA total diisolasi dari bahan tersebut.

Tanaman *A. thaliana* berumur tiga minggu dipelihara secara hidroponik dalam cawan plastik yang berisi 15 ml larutan air yang mengandung bahan pencekam, yakni NaCl (250 mM), sorbitol (500 mM), atau ABA (100 μM). KOH 1 mM dan akuades digunakan sebagai media kontrol bagi tanaman (larutan KOH 1 mM digunakan sebagai pelarut ABA), selain tanaman perbandingan yang tidak dipelihara secara hidroponik. Sistem ini diletakkan di dalam lemari pertumbuhan pada suhu 22 °C dan cahaya redup. Perlakuan dehidrasi dilakukan pada tanaman yang dibebaskan dari media tumbuhnya, lengkap bersama seluruh akarnya, kemudian ditempatkan pada cawan Petri yang terbuka di dalam lemari pertumbuhan yang sama. Perlakuan suhu rendah diberikan dengan memasukkan tanaman dalam pot ke dalam inkubator bersuhu 4 °C. Kondisi cekaman tersebut dilakukan selama 1, 2, 4, 12, dan 24 jam. Setelah itu, bahan dibekukan dalam nitrogen cair dan disimpan pada -80 °C untuk kemudian diisolasi RNA totalnya.

Isolasi RNA Total (menurut metode Pawlowski *et al.* 1994). Dalam keadaan beku, bahan tanaman dihaluskan dalam mortar porselen. Sekitar 1 g bubuk halus beku tersebut dihomogenasi dalam 3 ml larutan penyangga pengeksktraksi (Tris-HCl 50 mM pH 9.0, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM) dan 0.7 ml SDS 10% (w/v). Segera ke dalam campuran tersebut ditambahkan fenol 7 mL, lalu dikocok selama 15 menit untuk kemudian disentrifugasi pada 3000 xg selama 10 menit. Selanjutnya, ekstraksi dilakukan dengan campuran fenol:kloroform:isoamilalkohol (25:24:1) sebanyak dua kali. Pencucian dilakukan dalam kloroform, dan presipitasi dalam LiCl 5 M selama semalam. Setelah itu, pencucian dengan etanol 70% dilakukan dengan sentrifugasi pada suhu 4 °C. Pelet yang didapatkan dikeringanginkan dalam suhu ruang, kemudian

dilarutkan kembali dengan air-DEPC ($\text{H}_2\text{O} + \text{DEPC}$ 0.1%). RNA total yang didapat disimpan pada suhu -80 °C.

Penyiapan Gen Pelacak. Gen *GFDD4-1* yang digunakan berbentuk klon cDNA. Klon cDNA ini dicari dari data dasar *PpEST* (Universitas Freiburg - BASF Plant Science GmbH, Rensing *et al.* 2002) dengan menggunakan urutan gen *GFDD4-1* sebagai *query*. Selanjutnya berdasarkan nomor-nomor yang keluar dari data dasar, klon-klon tersebut diambil dari koleksi yang tersimpan dalam stok bakteri *E. coli* dalam gliserol. Setelah plasmid diisolasi dan dimurnikan (Qiagen kit), klon cDNA diamplifikasi melalui PCR dengan menggunakan primer baku M13-20 dan M13-rev untuk mendapatkan fragmen DNA terpanjang. Selanjutnya dari hasil pengurutan, dipilih satu klon cDNA dengan panjang penuh, yang digunakan dalam penelitian ini.

Dari klon terpilih, melalui PCR dengan menggunakan primer yang dirancang dari urutan DNAnyanya yaitu 5'-GGATCCATGAATTCGAGGGTCTT-3' dan 5'-GGTACCATGACCAC CACGACTATTC-3', diperoleh potongan gen sebesar 600 pb, yang kemudian diisolasi dan dimurnikan dengan QIAEX II (Qiagen) dari gel agarosa. Fragmen gen ini akan digunakan sebagai pelacak pada hibridisasi RNA dari *P. patens* yang mendapat perlakuan cekaman.

Dengan menggunakan urutan protein yang dideduksi dari klon cDNA *P. patens* terpilih tersebut sebagai *query*, dilakukan pelacakan pada BLASTP *A. thaliana* dari data dasar publik (NCBI). Apabila tersedia protein homolog, data yang tersaji dilengkapi dengan urutan DNAnyanya. Berdasarkan urutan tersebut, disusun primer *forward* dan *reverse* yang akan digunakan untuk mengisolasi daerah penyandi melalui PCR dari DNA genom *A. thaliana*. Pengurutan dilakukan dari ujung -5' dan -3' untuk memastikan urutan DNA. Potongan gen hasil PCR kemudian diekstrak dan dimurnikan dengan QIAEX II (Qiagen) dari gel agarosa dan digunakan sebagai pelacak pada hibridisasi RNA dari *A. thaliana* yang diberi perlakuan cekaman.

Northern Blot dan Hibridisasi. Sebanyak 10-20 μg RNA total dari setiap sampel dimigrasikan pada *Northern blot*, menggunakan 1% (w/v) gel agarosa pengurai yang mengandung formaldehid. Jumlah RNA dipastikan sama untuk setiap gel, yang akan diterakan pada masing-masing gambar di bagian hasil. Selanjutnya pita-pita RNA hasil *Northern blot* dipindahkan ke membran nilon Hybond N+ (Amersham Biosciences) (Sambrook & Russel 2001), dan difiksasi di bawah sinar UV. Hibridisasi dilakukan dalam kondisi yang sangat ketat dengan menggunakan gen pelacak yang dilabel dengan ^{32}P (Rediprime II, Amersham) dalam larutan penyangga Church yang dimodifikasi (EDTA 1 mM, Na fosfat 0.5 M pH 7.2, SDS 7% (w/v), DNA sperma salmon yang terurai 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pada suhu 68 °C. Membran hibridisasi dicuci dengan 1x SSC (NaCl 115 mM, Na sitrat 14.5 mM, pH 7.0) dan SDS 0.1% pada suhu 68 °C selama 10 menit, diikuti dengan 3 tahap pembilasan dengan 0.5 X SSC dan SDS 0.1% pada 68 °C, masing-masing selama 10 menit. Kemudian membran diletakkan di atas piring pencitraan dan dipayar (*scan*) menggunakan alat *Molecular Imager FX System* (Bio-Rad, Jerman).

HASIL

Pencarian klon cDNA dari data dasar *PpEST* dengan sekuens *GFDD4-1* sebagai *query* menghasilkan tiga nomor klon, yakni PP001088038, PP004071329, dan PP004083128. Dari koleksi klon cDNA diperoleh ketiga klon tersebut dalam bentuk stok gliserol. Hasil pengurutan DNA menunjukkan bahwa klon PP004071329 memiliki urutan dengan panjang penuh 1041 bp, dan selanjutnya klon tersebut digunakan dalam penelitian ini. Untuk hibridisasi *Northern* terhadap pita-pita RNA tanaman lumut *P. patens* yang mendapat berbagai perlakuan cekaman, potongan 600 pb yang diisolasi dari klon cDNA tersebut digunakan sebagai pelacak.

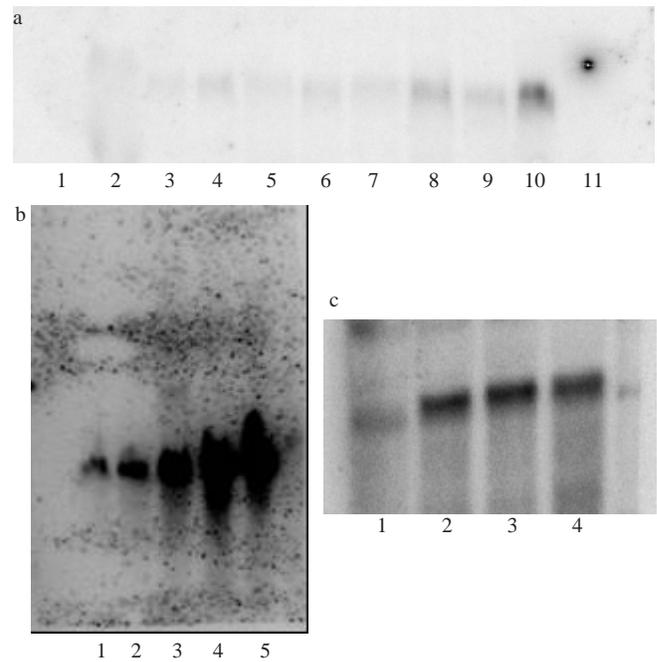
Hasil pelacakan pada BLASTP *A. thaliana* dari data dasar publik, dengan menggunakan urutan protein yang dideduksi dari PP004071329 sebagai *query*, satu gen homolog berhasil diidentifikasi dengan nomor aksesori AC005309 (Altschul *et al.* 1997) dan bernama *At2g47770*. Gen tersebut (600 pb) kemudian diisolasi dari DNA genom *A. thaliana* dengan bantuan primer 5'-CTCAGGACATCAGATACCGC-3' dan 5'-CACGCGACTGCAAGCTTTAC-3' melalui PCR dan berfungsi sebagai pelacak bagi RNA *A. thaliana*.

Northern Blot dan Hibridisasi. Hasil hibridisasi *Northern* menunjukkan bahwa ekspresi gen *GFDD4-1* terlihat pada *P. patens* yang diinduksi oleh ABA, dehidrasi, dan suhu rendah, tapi tidak terinduksi ekspresinya pada tanaman yang diberi perlakuan kadar garam tinggi dan sorbitol (osmolaritas tinggi) (Gambar 1). Dehidrasi dan suhu rendah menginduksi transkripsi gen tersebut 1-2 jam setelah perlakuan diberikan. Intensitasnya meningkat sejalan dengan lamanya pemberian perlakuan, sedangkan ABA 50 μ M sedikit menginduksi ekspresi gen ini.

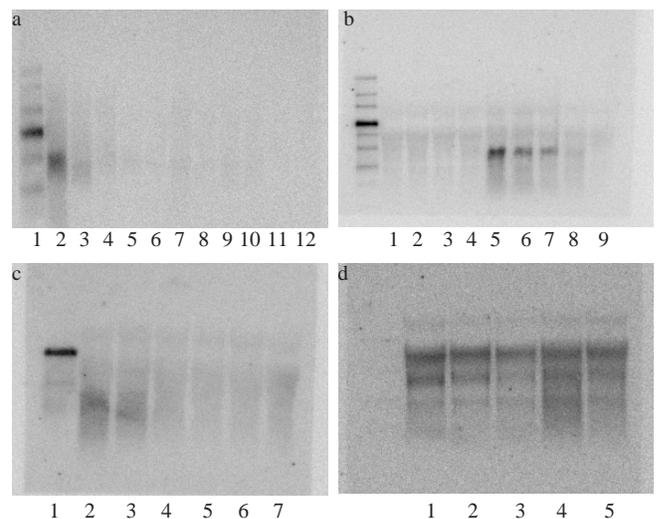
Pada *A. thaliana*, gen homolog *At2g47770* terinduksi ekspresinya dalam responsnya terhadap ABA serta dehidrasi segera (1-2 jam) setelah kondisi cekaman diberikan, sedangkan respons terhadap salinitas dan suhu rendah lebih lambat, yakni setelah 12 jam (Gambar 2). Hasil hibridisasi RNA dari perlakuan dehidrasi memperlihatkan lebih dari satu pita, yang mengindikasikan adanya suatu famili gen yang sekaligus terekspresi karena faktor cekaman tersebut. Kontrol air dan kontrol larutan KOH 1 mM tidak menginduksi gen.

PEMBAHASAN

Gen homolog dari *GFDD4-1* pada tumbuhan *A. thaliana* (*At2g47770*) ternyata juga terinduksi ekspresinya oleh cekaman abiotik, yaitu dehidrasi, ABA, kadar garam tinggi serta suhu rendah; sedangkan *GFDD4-1* sendiri pada tumbuhan aslinya *P. patens* hanya terinduksi dalam responsnya terhadap dehidrasi, ABA, dan suhu rendah. Hal tersebut menunjukkan bahwa kedua gen homolog itu mempunyai fungsi sama sampai pada batas-batas tertentu ketika merespons kondisi tak menguntungkan. Bahkan *At2g47770* berfungsi dalam rentang kondisi tercekam yang lebih luas daripada *GFDD4-1*. Perlakuan ABA seringkali diterapkan untuk menciptakan kondisi mencekam, yaitu kondisi metabolik yang diakibatkan oleh kekeringan atau keadaan terdehidrasi.



Gambar 1. Hasil hibridisasi *Northern* dengan pelacak *GFDD4-1* (potongan 600 pb dari PP004071329) pada *Physcomitrella patens* yang diberi berbagai perlakuan cekaman. a. Hasil dari 20 μ g RNA. 1 = RNA penanda, 2 = NaCl 8 jam, 3 = NaCl 4 jam, 4 = NaCl 2 jam, 5 = sorbitol 8 jam, 6 = sorbitol 4 jam, 7 = sorbitol 2 jam, 8 = ABA 8 jam, 9 = ABA 4 jam, 10 = ABA 2 jam, 11 = kontrol; b. Hasil dari 15 μ g RNA. 1 = kontrol, 2 = dehidrasi 1 jam, 3 = dehidrasi 2 jam, 4 = dehidrasi 4 jam, 5 = dehidrasi 8 jam; c. Hasil dari 15 μ g RNA. 1 = kontrol, 2 = 4 $^{\circ}$ C 2 jam, 3 = 4 $^{\circ}$ C 4 jam, 4 = 4 $^{\circ}$ C 8 jam.



Gambar 2. Hasil hibridisasi *Northern* dengan pelacak potongan 600 bp (ORF) dari *At2g47770* pada *Arabidopsis thaliana* yang mendapat berbagai perlakuan cekaman. a. Hasil dari 10 μ g RNA. 1 = RNA penanda, 2 = NaCl 24 jam, 3 = NaCl 12 jam, 4 = NaCl 4 jam, 5 = NaCl 2 jam, 6 = NaCl 1 jam, 7 = air 24 jam, 8 = air 12 jam, 9 = air 4 jam, 10 = air 2 jam, 11 = air 1 jam, 12 = kontrol; b. Hasil dari 20 μ g RNA. 1 = KOH 12 jam, 2 = KOH 4 jam, 3 = KOH 2 jam, 4 = KOH 1 jam, 5 = ABA 12 jam, 6 = ABA 4 jam, 7 = ABA 2 jam, 8 = ABA 1 jam, 9 = kontrol; c. Hasil dari 20 μ g RNA. 1 = RNA penanda, 2 = 4 $^{\circ}$ C 24 jam, 3 = 4 $^{\circ}$ C 12 jam, 4 = 4 $^{\circ}$ C 4 jam, 5 = 4 $^{\circ}$ C 2 jam, 6 = 4 $^{\circ}$ C 1 jam, 7 = kontrol; d. Hasil dari 20 μ g RNA. 1 = dehidrasi 24 jam, 2 = dehidrasi 12 jam, 3 = dehidrasi 4 jam, 4 = dehidrasi 2 jam, 5 = dehidrasi 1 jam.

Percobaan ini dilakukan dalam kondisi lingkungan subtropis, dengan suhu ruang antara 5-20 °C dan kelembaban nisbi tidak lebih dari 60%. Hal tersebut barangkali mengakibatkan munculnya ekspresi gen terkait secara ringan pada tanaman yang tidak mendapat perlakuan cekaman, seperti terlihat dengan adanya bercak dari sampel tanaman kontrol (Gambar 1b & c).

GFDD4-1 dikonstruksikan dengan cara *reverse genetic approach*, yaitu dari mRNA tanaman *P. patens* yang mendapat perlakuan desikasi (Frank W, dokumen tidak dipublikasikan). Dari penelitian itu diketahui bahwa gen ini ternyata tidak hanya tereksresi dalam kondisi kekeringan tapi juga oleh perlakuan ABA serta suhu rendah. Dengan demikian satu gen tunggal terinduksi ekspresinya oleh beberapa kondisi lingkungan yang diberikan.

Physcomitrella patens terbukti sangat toleran terhadap kadar garam dan osmolaritas tinggi, selain desikasi, seperti dilaporkan oleh Frank *et al.* (2005), sedangkan hibridisasi menunjukkan hasil negatif pada perlakuan salinitas dan cekaman osmotik. Hal tersebut meyakinkan kita bahwa pada *P. patens* terdapat beberapa gen lain yang bekerja bersama-sama dalam responsnya terhadap berbagai cekaman abiotik.

Pada *A. thaliana* dikenal dua gen *RC12A* dan *RC12B* yang terinduksi oleh berbagai cekaman abiotik, terutama oleh suhu rendah, dehidrasi, dan ABA, tapi tidak oleh kadar garam tinggi (Capel *et al.* 1997). Homolog dari keluarga gen *RC12* yang terdapat pada spesies tumbuhan lainnya terbukti terkait juga dengan respons tumbuhan terhadap cekaman abiotik. Hal yang menarik adalah bahwa gen-gen homolog tersebut memiliki pola regulasi yang berbeda-beda dari satu spesies ke spesies lainnya. Pada *P. patens*, dua gen homolog dari *RC12A* dan *RC12B* yang menyandikan protein kecil hidrofobik dan diberi nama *PpSHP1* dan *PpSHP2*, dilaporkan oleh Kroemer *et al.* (2004) sangat responsif terhadap cekaman suhu rendah, salinitas, desikasi, ABA serta cekaman osmotik. Demikian pula pada tanaman *barley*, gen homolog *blt101.1* dan *blt101.2* hanya diaktifkan oleh suhu rendah, tapi tidak oleh dehidrasi, ABA, ataupun salinitas (Goddard *et al.* 1993; Brown 1998).

Menurut Wang *et al.* (2003), sejumlah gen yang responsif terhadap cekaman abiotik mempunyai mekanisme pengendalian yang berlainan yang secara bersama dapat menciptakan pemantapan homeostasis sel, misalnya dengan terpeliharanya fungsi serta struktur protein dan membran.

Mekanisme yang kompleks tersebut diduga menghasilkan sifat toleran tumbuhan terhadap cekaman abiotik. Dengan demikian, paling tidak gen *GFDD4-1* dan *PpSHP1* serta *PpSHP2* bekerja secara bertumpang-tindih dan sekaligus secara komplemen satu sama lain, sehingga *P. patens* memiliki toleransi yang tinggi terhadap aneka cekaman abiotik.

DAFTAR PUSTAKA

- Altschul F *et al.* 1997. Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acid Res* 25:3389-3402.
- Bartels D, Salamini F. 2001. Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiol* 127:1346-1353.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. 2000. Responses to abiotic stresses. Di dalam: Gruissem W, Buchanan B, Jones R (ed). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville MD: Amer Soc Plant Physiologists. hlm 1158-1249.
- Brown A. 1998. A biomolecular analysis of the control of expression and function of a low temperature responsive barley gene [Disertasi]. United Kingdom: University of Newcastle upon Tyne.
- Capel J, Jarillo JA, Salinas J, Martinez-Zapater JM. 1997. Two homologous low-temperature-inducible genes from *Arabidopsis* encode highly hydrophobic proteins. *Plant Physiol* 115:569-576.
- Frank W, Ratnadewi D, Reski R. 2005. *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta* 220:384-394.
- Goddard NJ *et al.* 1993. Molecular analysis and spatial expression pattern of a low-temperature-specific barley gene, *blt101*. *Plant Mol Biol* 23:871-879.
- Kroemer K, Reski R, Frank W. 2004. Abiotic stress response in the moss *Physcomitrella patens*: evidence for an evolutionary alteration in signaling pathways inland plants. *Plant Cell Rep* 22:864-870.
- Oliver MJ, Velten J, Wood AJ. 2000. Bryophytes as experimental models for the study of environmental stress tolerance: *Tortula ruralis* and desiccation-tolerance in mosses. *Plant Ecol* 151:73-84.
- Pawlowski K, Kunze R, de Vries S, Bisseling T. 1994. Isolation of total, poly(A) and polysomal RNA from plant tissues. Di dalam: Gelvin SB, Schilperoot RA (ed). *Plant Molecular Biology Manual*. Dordrecht: Kluwer Acad Publ. hlm 29-44.
- Rensing SA, Rombauts S, Van de Peer Y, Reski R. 2002. Moss transcriptome and beyond. *Trends Plant Sci* 7:535-538.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab Pr.
- Wang W, Vinocur B, Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1-14.