잎의 발달단계의 leaf index를 조절하는 애기장대 *MACROPHYLLA/ROTUNDIFOLIA3* 유전자

전상은 · 투말라 찬드라세이커 · 조규형 · 이영병 · 형남인 · 남재성 · 김경태

MACROPHYLLA/ROTUNDIFOLIA3 gene of *Arabidopsis* controls leaf index during leaf development

Sang Eun Jun · Thummala Chandrasekhar · Kiu-Hyung Cho · Young Byung Yi · Nam-In Hyung · Jaesung Nam · Gyung-Tae Kim

Received: 8 November 2011 / Accepted: 22 November 2011

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract In plants, heteroblasty reflects the morphological adaptation during leaf development according to the external environmental condition and affects the final shape and size of organ. Among parameters displaying heteroblasty, leaf index is an important and typical one to represent the shape and size of simple leaves. Leaf index factor is eventually determined by cell proliferation and cell expansion in leaf blades. Although several regulators and their mechanisms controlling the cell division and cell expansion in leaf development have been studied, it does not fully provide a blueprint of organ formation and morphogenesis during environmental changes. To investigate genes and their mechanisms controlling leaf index during leaf development,

we carried out molecular-genetic and physiological experiments using an *Arabidopsis* mutant. In this study, we identified *macrophylla* (*mac*) which had enlarged leaves. In detail, the *mac* mutant showed alteration in leaf index and cell expansion in direction of width and length, resulting in not only modification of leaf shape but also disruption of heteroblasty. Molecular-genetic studies indicated that *mac* mutant had point mutation in *ROTUNDIFOLIA3* (*ROT3*) gene involved in brassinosteroid biosynthesis and was an allele of *rot3-1* mutant. We named it *mac/rot3-5* mutant. The expression of *ROT3* gene was controlled by negative feedback inhibition by the treatment of brassinosteroid hormone, suggesting that *ROT3* gene was involved in brassinosteroid biosynthesis. In dark condition, in addition, the expression of *ROT3* gene was up-regulated and *mac/rot3-5* mutant showed lower response, compare to wild type in petiole elongation. This study suggests that *ROT3* gene has an important role in control of leaf index during leaf expansion process for proper environmental adaptation, such as shade avoidance syndrome, via the control of brassinosteroid biosynthesis.

S. E. Jun[†] · T. Chandrasekhar[†] · K.-H. Cho · Y. B. Yi · J. Nam · G.-T. Kim (✉)

[†]These authors are equally contributed to this study.

동아대 생명자원과학대학 분자생명공학과
(Department of Molecular Biotechnology, Dong-A University,
Busan 604-714, Korea)
e-mail: kimgt@donga.ac.kr

T. Chandrasekhar
인도 요기 베마나대 생명과학대학
(School of Life Science, Yogi Vemana University, Kadapa
516-003, Andhra Pradesh, India)

K.-H. Cho
포항공과대 생명과학과
(Department of Life Science, Pohang University of Science and
Technology, Pohang, Korea)

N.-I. Hyung
상명대 산업대학 식물산업공학과
(Department of Plant Science and Technology, Sangmyung
University, Chonan 330-720, Korea)

Keywords Brassinosteroid, Heteroblasty, Leaf index, *macrophylla*, Shade avoidance

서론

식물의 잎은 정단분열조직에서 발생되어 복잡한 시스템의 조절을 받아 발달하며 (Avery 1993), 시간적, 공간적 요인과 엽신 (lamina)에서의 세포 분열 (cell division)과 증

식 (cell proliferation) 패턴의 차이가 잎의 최종 모양과 크기를 결정하는데 기여하는 것으로 알려져 왔다 (Maksymowych 1963; Sunderland 1960). 따라서 잎은 정단분열조직의 주변 지역에서 잎 원기의 형태로 발생하여 서서히 잎몸 (leaf blade)과 잎자루 (leaf petiole)의 형태를 형성하고 크기를 조절하며 잎 기관의 하부 조직들, 털과 엽맥 등을 갖춘다 (Cunninghame and Hyndon 1986; Steeves and Sussex 1989). 애기장대의 잎은 2개의 자엽과 환경조건에 따라 8-12개 정도의 로제트 잎, 그리고 몇 개의 경엽으로 이루어 지는데, 각각의 잎에 따라 잎의 모양과 크기가 조금 달라지는 경향을 보이고 있다. 예를 들어, 로제트 잎 (rosette leaf)은 잎몸과 잎자루의 형태와 크기 면에서 자엽 (cotyledon)과 다른 특징들을 보이며 이는 발생순서 즉, 잎차례에 따라 로제트 잎들 사이에서도 각각의 특징을 나타낸다 (Tsukaya et al. 2000). 또한 하나의 로제트 잎에서도 잎 폭이 가장 넓은 부분은 잎이 성장함에 따라서 잎몸의 기부부분 (basal region)에서 윗부분으로 옮겨가거나, 전체 잎에서 잎자루의 비중이 점차 줄어들거나, 둥글고 납작한 형태의 잎몸이 점차적으로 타원형의 톱니바퀴 형태로 바뀌거나, leaf index, 즉 잎몸의 길이에 대한 잎몸의 폭 비율도 발달 단계마다 달리 조절된다 (Ashby 1948; Tsukaya 2002). 잎의 형태에 따라 대체적으로 애기장대의 로제트 잎을 1-2번, 3-4번, 5-6번, 7-8번, 그리고 9번 등으로 대표적인 잎의 모양과 크기를 분류할 수 있다. 즉 heteroblasty는 잎의 발달 과정 동안, 발달 시기와 잎의 형태 사이의 적절한 균형을 유지시키기 위해 성장기와 성숙기를 거치면서 일어나는 잎 크기와 모양의 변화를 일컫는 현상으로 식물 잎 기관의 고유 특징이며 곧 각각의 식물 종의 독자적인 특징이라 할 수 있다 (Tsukaya et al. 2000). 잎 발달 동안의 heteroblasty는 외부 환경에 대한 식물의 형태적 적응 방법과 그에 따른 기관 내 세포의 증식 및 확장 (cell expansion)을 매우 잘 반영한다 (Tsukaya et al. 2002). 결국, leaf index 등의 잎 기관의 형태 및 모양의 변화는 잎몸에서의 세포 증식과 세포 확장의 두 요인에 의해 결정된다 (Arkebuer and Norman 1995; Cho et al. 2007). 비록 세포의 증식과 확장을 조절하는 유전자와 조절 기작들이 연구되고 있으나 큰 청사진을 그리기에는 아직 미흡하다. 그러므로 heteroblasty에 대한 해부학적 또는 분자적 연구는 세포의 증식과 세포의 확장에 관여하는 유전자와 그들의 경로를 밝히고 외부 환경과 식물 간의 상호 반응 체계와 잎 발달의 구조적 또는 유전적 진행 경로를 이해하는데 중요한 역할을 할 것이다. 한편, 다양한 식물 호르몬은 내, 외부 환경의 변화를 세포에 까지 전해주고 적절한 대응을 이끌며 heteroblasty를 포함한 식물 대부분의 생체 과정을 조절하는 중요한 요인이다. 식물 발달 과정에서도 식물 호르몬이 세포의 증식과 확장을 촉진하거나 저해하는 많은 연구들이 발표되어 왔다 (Kozuka et al. 2010). 최근

한 연구는 식물 호르몬 옥신에 관여하는 인자, *AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)*가 잎 세포의 운명 결정에 관여함으로써 heteroblasty를 조절한다고 보고하였다 (Hunter et al. 2006).

본 연구는 잎의 발달과정에 관여하는 유전자를 찾아내는 것에 초점을 맞추었다. 특히 잎의 발달과정 중 leaf index 조절에 관여하는 유전자를 밝히고 그 조절기작을 알아내기 위해 ethylmethansulphate (EMS) 돌연변이원을 처리한 애기장대에서 돌연변이체를 선발하여 유전학적 그리고 생리화적인 실험을 진행하였다. 그 결과로 잎몸이 커지고 heteroblasty가 변화된 표현형을 갖는 *macrophylla (mac)*를 선발하여, 잎과 잎 세포의 신장과정의 이상과 더불어 leaf index의 변화로 인하여 heteroblasty에 이상이 있다는 사실을 규명하였다. 이 돌연변이체는 분자유전학적 분석 결과, *rotundifolia3 (rot3)* 돌연변이체의 대립형질인 것으로 판명되었다. 본 논문에서는 잎의 leaf index의 조절에 관여하는 유전자 분석을 통하여 애기장대에서 잎의 확장과정에서 *ROT3* 유전자가 중요한 역할을 수행하며 브라시노스테로이드 (brassinosteroid) 호르몬을 조절함으로써 음지회피성과 같은 환경조절에 관여하고 있다는 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료

애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 야생형 Columbia-0 (Col-0)와 돌연변이체 *mac/rot3-5*가 이용되었으며, 식물의 종자는 NaClO 용액을 이용하여 멸균한 후, 3일 동안 암조건으로, 4°C에서 저온처리 하였다. 종자를 2% (w/v) gelangum, MS salt, 그리고 2% sucrose (w/v)를 포함한 MS배지 (Murashige and Skoog 1962)에 파종한 후, 암면 (rockwool) 또는 질석을 포함한 작은 플라스틱 pot에서 키웠다. 성장 기간 동안, 온도조건은 22°C, 연속광조건 (67.4±14.0 μmol/s/m²)이 유지되었다. *mac/rot3-5*는 애기장대에 ethylmethansulphate (EMS)를 이용하여 돌연변이를 유발한 돌연변이 계통에서 선발된 열성돌연변이체로서 분석을 수행하기 전에 야생형인 Col-0에 backcross하여 사용하였다.

잎의 해부학적 분석

해부학적 분석을 위해 완전히 성숙한 다섯 번째 로제트 잎을 채취하여 고정액 (5% (v/v) 초산, 5% (v/v) 포름알데하이드, 45% (v/v) 에탄올)에 담근 후, 50% (v/v) 에탄올에서 100% (v/v) 에탄올까지 순차적으로 에탄올로 치환하였다. 시료는 Technovit 7100 (Kulzer & Co. GmbH, Wehrheim,

Germany)을 이용하여 박편을 만들었다. 횡단면 분석을 위해서 잎몸의 중앙 부분을, 종단면 분석을 위해서 잎몸의 엽맥을 따라서 절단하였다. 절편은 0.1% toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하고 촬영하였다.

잎 길이의 측정

앞서 제시한 방법으로 생육된 식물체를 발아 후 나타나는 첫 번째 잎부터 아홉 번째 로제트 잎까지 나타나는 시기부터 35일까지의 잎을 채취하여 잎몸과 잎자루의 길이를 측정하였다. 그리고, 잎몸의 폭이 가장 넓은 곳을 잎몸의 폭으로, 잎몸의 중앙 엽맥이 지나가는 부분을 잎몸의 길이로 측정하였다.

유전자 발현량의 정량적 분석

*ROT3*의 mRNA 발현량을 정량하기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하였다 (Hunter et al. 2006). 식물체의 잎으로부터 total RNA를 RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 분리, 정제하고 그 중 1–2 mg의 total RNA에 60°C에서 1 시간 동안 DNase I (Invitrogen, Carlsbad, Canada)을 처리하였다. One Step RT-PCR kit (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여, 역전사 반응이 50°C에서 30분 동안 이루어졌다. 그 후, 중합효소반응은 먼저, 94°C에서 2분간 변성 후, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분을 1 cycle로 총 30 cycles, 마지막 72°C에서 2분간 반응으로 행해졌다. *ROT3* mRNA 증폭을 위해 sense1: 5'-CGCGGATC CAGTTATTCCCAAGAAACCGG-3'과 antisense1: 5'-CGCG

GATCCCTTCTCTGCTTCCTCTTTGC-3' primers를 사용하였다. Control유전자로서 β -*TUB4*의 증폭을 위해 TUB4-sense: 5'-AGAGGTTGACGAGCAGATGA-3'과 TUB4-antisense: 5'-CCTCTTCTTCCTCCTCGTAC-3'를 사용하였다.

명/암 반응 실험

앞서 설명한 방법을 이용하여 멸균과 저온 처리된 종자는 앞서 제시한 배지와 동일한 배지에 파종되어 22°C에서 생육되었다. 단, 빛과 암 조건에 따른 잎의 발달 차이를 알아보기 위해 식물의 종자는 빛 장치 아래 및 암 상태 조건에서 5일 동안 성장하였다. 이 조건에서 성장한 식물체로부터 잎몸과 잎자루의 길이를 측정하였다.

결과 및 고찰

mac 돌연변이체의 잎 표현형

야생형에 EMS 돌연변이원을 처리한 돌연변이체 집단으로부터 야생형에 비해서 전체적으로 큰 잎을 가지는 열성돌연변이체인 *mac* 돌연변이체를 선발하였다. *mac* 돌연변이체는 야생형에 비해 전체적으로 큰 잎몸 (leaf blade)을 가지지만 그에 비해 짧은 잎자루 (leaf petiole)을 가지고 있어 야생형에 비해 둥근 모양의 잎 형태를 갖추고 있다 (Fig. 1A). *mac* 돌연변이체는 수행된 실험 조건하에서 2개의 자엽 (cotyledon), 평균 13개의 로제트 잎 (rosette leaf) 그리고 3개의 경엽 (cauline leaf)을 가지는 것

Fig. 1 Morphology of *mac* mutant plant. (A) The leaf morphology of *Arabidopsis* wild type, Col-0 (left) and *mac* mutant (right) on 40 days after sowing (DAS). (B) Heteroblasty in *Arabidopsis* wild type, Col-0 (top) and *mac* mutant (bottom). From left, 2 cotyledons, rosette leaves, and cauline leaves are shown. Bars, 1 cm. (C–F) Transverse (C, E) and longitudinal (D, F) sections of the 5th rosette leaf of wild type, Col-0 (C, D) and *mac* mutant (E, F) at the stage when leaves were fully expanded. Bar, 50 μ m

으로 확인 되었으며, 야생형에 비해서 평균 1-2개의 잎을 더 만드는 것으로 나타났다 (Fig. 1B). 또한 야생형은 성장기에서부터 성숙기까지 잎차례가 진행되는 동안 각 시기에 따라 잎의 형태, 특히 잎몸의 형태에서 폭보다는 길이 방향의 신장이 크게 변화하여 둥근 형태부터 타원형까지 다양한 모양의 잎몸 형태를 나타내는데 비해, *mac* 돌연변이체는 잎차례가 진행되는 동안 잎몸의 전체 크기가 커지고 특히 길이 방향에 비해 폭 방향으로 크게 증가하여 야생형에 비해 대체로 둥근 형태의 잎몸 모양을 보였다 (Fig. 1B). 이는 *mac* 돌연변이체에서 잎의 방향에 따른 극성 신장에 변화가 일어났고 이로 인해 heteroblasty에 이상이 생겼음을 시사한다. 그러나 plate에 파종 된지 9 일된 *mac* 돌연변이체의 배축 (hypocotyl)과 주근 (primary root)의 길이를 야생형과 비교하였을 경우, 배축의 길이와 주근 (primary root)의 생장률은 야생형과 큰 차이를 보이지 않았다 (data not shown).

mac 돌연변이체의 잎 기관의 생장분석

앞선 figure 1B에서 본 *mac* 돌연변이체 잎에서의 형태 변화를 자세히 분석하기 위해서 잎의 확장 기간 동안 야생형과 *mac* 돌연변이체의 대표적 로제트 잎의 성장 (폭과 길이의 신장) 양상을 분석하였다 (Fig. 2). Heteroblasty에 의해 대체적으로 애기장대의 로제트 잎을 1-2번, 3-4번, 5-6번, 7-8번, 그리고 9번 등으로 대표적인 잎의 모양과 크기를 분류할 수 있기 때문에, 잎의 확장 기간 동안 야생형과 *mac* 돌연변이체의 첫 번째, 세 번째, 다섯 번째, 일곱 번째, 그리고 아홉 번째의 로제트 잎을 이용하여 잎몸의 길이와 폭의 성장에 대한 분석을 시도하였다 (Fig. 2). *mac* 돌연변이체 잎의 성장은 어떤 잎에서든지 잎몸의 폭과 길이가 잎의 확장시기 동안 야생형에 비해 더 빠르게 성장하여 전체 크기에서 폭과 길이가 모두 길어지는 비슷한 패턴을 보였다. 잎몸의 확장기간은 야생형과 *mac* 돌연변이체 모두 잎 발생 후 첫 번째 잎이 20일 까지, 세 번째 잎이 25일 까지, 다섯 번째 잎이 28일 까지, 그리고 일곱 번째 잎이 30일 까지 확장하여 야생형과 *mac* 돌연변이체 사이에 어떠한 차이도 발견되지 않았다 (Fig. 2). 그러나 흥미롭게도 *mac* 돌연변이체는 야생형과의 비교에서 잎몸의 폭과 길이 방향의 신장 변화에 있어서 다른 변화를 보였다. 즉, 잎의 폭과 길이의 변화량을 비교했을 때, *mac* 돌연변이체는 야생형에 비해 길이 방향의 성장 변화량 보다 폭 방향의 성장 변화량이 더 컸다 (Fig. 2). 그러므로 *mac* 돌연변이체에서는 잎몸의 확장기간이 길어져서가 아닌 잎몸의 폭과 길이의 성장속도가 야생형과 달라졌기 때문에, 이에 잎의 형태 변화가 발생하였다. 이는 앞서 알려진 둥근 모양의 잎몸을 가지지만 잎 세포의 길이방향의 신장에 결점을 갖는 *rot3-1* null 돌연변이체와

Fig. 2 Growth curve of leaf blade in the length (A) and width (B) direction of the 1st, 3rd, 5th, 7th, and 9th rosette leaves of wild type (Col-0) and *mac* mutant. Closed square and open circular are indicating the wild type (Col-0) and *mac* mutant, respectively. Measurements were carried out with 5 independent plants from leaf primordial stage to 35 DAS

는 조금 다른 표현형과 생장곡선을 가진 것으로 판명되었다 (Kim et al. 2005a).

한편, *mac* 돌연변이체는 잎몸의 표현형이 잎 차례와 상관없이 로제트 잎에서 서로 비슷한 둥근 잎몸으로 나타나고 있는데 (Fig. 1B), 이를 상세히 성장단계별로 조사한 결과 잎의 모양을 나타내는 지표인 leaf index (잎몸의 길이를 폭으로 나눈 값, (Tsukaya 2002))가 야생형과는 다르게 나타났다. 첫 번째 잎에서 아홉 번째 잎의 원기의 leaf index의 전체적인 비율은 큰 차이를 나타내지 않고 있어서 처음 잎이 나올 때는 야생형과 *mac* 돌연변이체 간에

Table 1 Leaf index of wild type (Col-0) and *mac* mutant plant

	Leaf index* at leaf primordia stage		Leaf index* at fully expanded stage		Leaf index ratio ¹	
	wt (Col-0)	<i>mac</i>	wt (Col-0)	<i>mac</i>	wt (Col-0)	<i>mac</i>
1st leaf	1.07	0.95	0.99	0.99	107.96	95.67
3rd leaf	1.07	0.85	1.18	1.07	88.38	79.46
5th leaf	0.97	0.86	1.63	1.32	60.04	64.94
7th leaf	1.00	1.00	1.76	1.53	72.77	69.74
9th leaf	1.00	1.00	2.07	1.68	48.35	59.67

*Definition of leaf index is leaf length/ leaf width in developmental stages

¹Definition of leaf index ratio is the percentage of leaf index at leaf primordial stage/ leaf index at fully expanded stage

잎의 모양이 거의 비슷하다는 것을 보여주고 있다. 야생형의 첫 번째 잎의 원기단계(leaf primordia stage)의 leaf index는 1.07이고 점점 나중의 잎으로 갈수록 1.00에 가까운 수치를 나타내었다 (Table 1). 반면 *mac* 돌연변이체의 첫 번째 잎의 leaf index는 0.95로 야생형보다는 낮고, 나중의 잎은 0.99를 나타내었다 (Table 1). 그러나 작은 변화를 살펴보면, 야생형의 첫 번째 잎은 잎 발생 초기에 폭이 길이에 비해 더 크지만 성장하면서 폭 보다 길이 방향으로 더 빠르게 확장되는 반면, *mac* 돌연변이체는 그 차이가 작지만 야생형과는 반대로 길이 방향보다는 폭 방향으로의 확장이 더 빨랐음을 보여준다. 그리고 이러한 변화는 잎 차례로 아홉 번째 잎까지 잎의 확장이 진행되는 동안 더 심화되어서, 야생형이 첫 번째 잎에서 0.99, 세 번째 잎에서 1.18, 다섯 번째 잎에서 1.63, 일곱 번째 잎에서 1.76, 아홉 번째 잎에서 2.07로 나중의 잎으로 가면 갈수록 잎몸의 길이가 폭에 비해 상대적으로 많이 커지는 반면에, *mac* 돌연변이체의 첫 번째 잎은 0.99로 야생형과 비슷하지만, 세 번째 잎은 1.07, 다섯 번째 잎은 1.32, 일곱 번째 잎은 1.53, 아홉 번째 잎에서 1.68로 leaf index가 야생형에 비해서 크게 줄어들어 있는 것을 알 수 있다 (Table 1). 이 결과는 *mac* 돌연변이체의 확장단계의 잎은 상대적으로 길이방향이 폭 방향에 비해 길어지지 않고 있다는 것을 의미한다. Table 1과 figure 2를 종합할 때, 야생형에서 각각의 잎이 폭보다 길이 방향으로 확장을 가속화하는 동안에 *mac* 돌연변이체에서는 야생형에 비해 잎의 폭과 길이 방향 모두 확장 속도가 증가하지만, 폭 방향의 확장 속도변화가 길이방향을 확장속도변화에 비해 더 컸음을 알 수 있다. 이를 상세히 알기 위해서 잎의 원기단계의 leaf index에 비해서 확장단계의 leaf index가 생장에 따라 얼마나 차이를 보이는가를 비율 (leaf index ratio)로 조사한 결과 야생형은 잎에 따라서 107.96에서 48.35로 변화량이 55%에 이르는데 비해서 *mac* 돌연변이체는 95.67에서 59.67로 변화량이 38%로 야생형에 비해 변화량이 감소하였다 (Table 1). 이는 야생형이 보이는 잎의 크기와 모양의 다양성에 비해서 *mac* 돌연변이체는 다양성이 크지 않다는 것을 의미한다. 이 결

과로 *mac* 돌연변이체는 잎의 leaf index의 변화로 인해 heteroblasty가 조절되었음을 알 수 있고, *mac* 돌연변이체의 원인 유전자를 탐색함으로써 leaf index 조절을 통한 잎의 형태 형성과 heteroblasty의 정립에 중요한 역할을 수행하는 인자를 발견할 수 있으리라 예상된다.

mac 돌연변이체의 해부학적 분석

앞선 분석을 통해 *mac* 돌연변이체에서 잎몸의 폭과 길이 방향으로의 확장에 각기 다른 변화가 일어났음을 알았다. 이러한 변화의 원인을 잎 기관 내부의 세포 수준에서 관찰하기 위해 완전히 성숙한 다섯 번째 로제트 잎에 대해 해부학적 연구를 수행하였다. 야생형과 *mac* 돌연변이체의 잎에 대해 잎몸의 폭 방향과 길이 방향으로 세포 수준에서의 형태를 관찰한 결과, *mac* 돌연변이체의 잎몸의 두께와 잎 세포의 폭과 길이가 야생형에 대해 약 112%로 증가하였다 (Fig. 1C-F). 세포 수는 잎의 폭 방향과 길이 방향으로 큰 변화를 보이지 않았다 (Fig. 1C-F). 이는 *mac* 돌연변이체의 잎몸의 크기 특히 폭 방향으로 큰 확장 변화가 세포의 크기 증가와 길이 방향으로의 세포 분열 억제에 의한 것임을 시사한다. 이러한 변화는 비록 잎의 성장 곡선에서 다른 형태를 보이지만 역시 잎의 길이 방향의 극성신장조절에 실패한 *rot3* null 돌연변이체와 유사한 양상을 보였다 (Tsuge et al. 1996). 따라서 *mac* 돌연변이체에서 *ROT3* 유전자의 염기 서열과 발현 패턴을 비교 분석하였다.

mac 돌연변이체의 유전체 분석

앞선 잎과 세포의 분석 결과를 토대로 *mac* 돌연변이체에서 잎의 길이 방향으로의 극성신장 조절에 관여하는 *ROT3* 유전자의 서열을 분석한 결과, *ROT3* 유전자의 점 돌연변이 (point mutation)가 발견되었다. Figure 3에서 보는 바와 같이, *mac* 돌연변이체는 *ROT3* 전사산물의 시작 코돈으로부터 135번째 염기서열에서 아데닌 (A)에서 티민 (T)으로의 치환이 발견되었다. 결과적으로 염기서열

Fig. 3 (A) The structure of *ROT3* gene and the partial nucleotide and amino acid sequences of *ROT3* from wild-type, Col-0 and *mac/rot3-5* mutant. In *mac/rot3-5* mutant, the 135th nucleotide (square box) in the anchor region of *ROT3* is substituted from adenine (A) to thymine (T), resulting in mutation from leucine (L) to phenylalanine (F) of the 45th amino acid (square box). Black boxes are indicating the conserved domains, such as anchor domain, proline rich domain, dioxygen- and heme- binding domains, and substrate recognition sites (SRSs) of steroid hydroxylase in *ROT3* protein. (B, C) Analysis of *ROT3* mRNA expression level using Reverse Transcriptase-PCR. *ROT3* mRNA expression level in leaves of wild type after treatment of mock (MS0), 10^{-7} M castasterone (CS), and 10^{-7} M brassinolide (BL) for 2 days (B) and wild type seedlings grown in suspension condition and dark condition, *gal-2* and *gai* mutants of gibberellin biosynthesis and signaling, and *cpd* mutant of brassinosteroid biosynthesis (C)

의 변화에 의해 45번째 아미노산이 루신 (L)에서 페닐알라닌 (F)으로 치환되었다 (Fig. 3A). 이러한 결과를 바탕으로 *mac* 돌연변이체는 *rot3* 돌연변이체들의 대립형질 (allele)로써 *rot3-5*로 명명되었다. 따라서, *mac/rot3-5* 돌연변이체의 표현형은 *ROT3* 유전자 (Kim et al. 1999; Kim et al. 1998)의 기능 변화에 의한 것으로 사료된다. 앞선 연구들을 통해, *ROT3* 유전자는 동물과 식물의 steroid hydroxylases와 유사한 도메인을 갖는 cytochrome P450 family에 속하는 CYP90C1을 암호화하며 잎 세포의 극성생장 조절에 관여하고 있다고 밝혀져 있다 (Kim et al. 1999). 이러한 잎의 길이 방향의 극성신장조절에 관여하는 *ROT3* 유전자의 기능으로 유추하면 *mac/rot3-5* 돌연변이체는 잎몸의 길이방향 조절에 실패함으로써 간접적으로 잎몸의 폭을 조절하는 표현형을 가지거나 새로운 기능을 획득한 것으로 사료된다.

ROT3 유전자의 mRNA 발현분석

ROT3 유전자는 이전 연구를 통해서 브라시노스테로이드 (brassinosteroid) 생합성 과정에 관여하는 Cytochrome P450을 코딩하는 것으로 알려져 있다 (Kim et al. 2005a; Ohnishi et al. 2009). 이를 다시 확인하기 위하여 파종 후

10일 된 야생형을 브라시노스테로이드 호르몬 생합성과정의 최종산물인 brassinolide (BL)와 최종산물의 바로 앞 중간산물인 castasterone (CS) 10^{-7} M가 포함된 MS 액체배지에서 1시간 진탕 배양한 후 로제트 앞에서 *ROT3* 유전자의 mRNA 발현을 분석하였다 (Fig. 3B). 그 결과 처리하지 않은 대조구에 비해서, 호르몬 산물을 처리한 후에 *ROT3* 유전자의 mRNA 발현이 감소하는 것으로 밝혀졌다 (Fig. 3B). 이 결과는 브라시노스테로이드 호르몬 생합성과정의 최종산물과 바로 전 중간산물에 의해서 *ROT3* 유전자가 피드백 (feed-back) 조절을 받는 것을 의미하며 브라시노스테로이드 호르몬 생합성과정에 관여하고 있다는 사실을 검증하고 있다 (Tanaka et al. 2005).

한편, 어느 조건에서 *ROT3* 유전자의 발현이 조절되는지를 알아내기 위하여 suspension배양조건, 암조건, 그리고 지베렐린 생합성 및 신호전달 돌연변이체인 *gal-2*, *gai* 돌연변이체 (Phillips et al. 1995)와 브라시노스테로이드 생합성 돌연변이체인 *cpd* 돌연변이체 (Bancos et al. 2002; Szekeres et al. 1996)에서의 *ROT3* 유전자의 mRNA 변화를 살펴보았다 (Fig. 3C). 그 결과 암조건과 *cpd* 돌연변이체에서 *ROT3* 유전자의 mRNA 발현이 상당히 증가하는 것으로 밝혀졌다 (Fig. 3C). 이 결과는 *ROT3* 유전자가 브라시노스테로이드 생합성을 조절하여 암 조건에서 잎의 길

Fig. 4 Growth rate of the length of leaf blade and petiole of wild type and *mac/rot3-5* mutant in white light and dark conditions. After treatment of white light and dark condition for 35 days, the length of leaf blades and petioles of wild type and *mac/rot3-5* mutant were measured

이를 길어지게 하는 음지회피성 (shade avoidance) 현상 (Kim et al. 2005b)에 관여할 가능성이 높다는 사실을 의미하고 있다.

mac/rot3-5 돌연변이체의 명암조건에 따른 생장분석

본 연구결과는 *ROT3* 유전자가 음지회피성 현상 조절에 관여할 가능성을 나타내었기에 명조건 및 암 조건에서의 *mac/rot3-5* 돌연변이체의 잎몸과 잎자루의 생장반응을 조사하였다 (Fig. 4). 그 결과 명 조건에서는 야생형과 비교해 *mac/rot3-5* 돌연변이체의 잎의 생장반응이 큰 차이를 보이지 않았으나, 암 조건에서 *mac/rot3-5* 돌연변이체의 잎자루는 잎몸에 비해 길이 방향의 신장률이 크게 저하되는 것으로 밝혀졌다 (Fig. 4). 이는 *mac/rot3-5* 돌연변이체가 암 상태의 빛 환경 변화를 감지하는데 실패했음을 나타낸다. 따라서 이 실험결과는 *ROT3* 유전자는 암 조건에서 잎의 길이, 특히 주로 잎자루의 길이를 조절함으로써 음지회피성 현상에 적극적으로 관여하고 있다는 사실을 나타내고 있다. 본 연구 결과들을 종합할 때, *ROT3* 유전자는 잎의 길이 방향으로의 극성생장조절과 세포의 크기 조절에 관여하며 빛 상태를 감지하여 브라시노스테로이드를 통한 음지회피성 반응을 이끄는 데 중요한 역할을 수행함을 알 수 있다. 현재까지 음지회피성에는 파이토크롬 (phytochrome) 유전자 및 옥신, 지베렐린, 브라시노스테로이드 등의 식물호르몬이 이 과정에 관여하고 있는 것으로 밝혀지고 있다 (Kim et al. 2005b; Kozuka et al. 2005). 앞으로 *ROT3* 유전자 및 하류 조절인자에 대한 좀 더 상세한 연구가 호르몬과 신호전달과정을 통해 잎몸과 잎자루의 음지회피성과정의 차이가 어떻게 다르게 조절되는지에 대해 실마리를 제공해주기를 기대한다. 그리고 *mac/rot3-5*

돌연변이체의 leaf index 조절에 대한 본 연구를 통하여 얻은 성과는 작물의 잎의 크기를 조절함으로써 바이오매스 및 작물의 크기를 제어할 수 있는 지식을 제공하고, 나아가 형질전환을 통한 작물의 분자육종에 크게 공헌하리라 기대한다.

적 요

식물 잎의 발달과정에서 heteroblasty는 외부 환경에 대한 식물의 형태적 적응 방법을 매우 잘 반영하며 이에 따른 변화는 기관의 최종 형태와 크기에 영향을 미친다. Heteroblasty를 나타내는 인자 중에서 leaf index는 단엽식물의 잎의 최종 모양과 크기를 나타내는 대표적인 인자이다. Leaf index는 결국 잎몸에서의 세포 증식과 세포 신장의 두 요인에 의해 결정된다. 비록 세포의 증식과 신장을 조절하는 유전자와 조절 기작들이 연구되고 있으나 큰 청사진을 제시하기에는 아직 미흡하다. 본 연구에서는 발달과정 중 잎의 leaf index 조절에 관여하는 유전자를 밝히고 그 조절 기작을 알아내기 위하여 애기장대 돌연변이체를 이용한 분자유전학적, 생리화학적 실험을 수행하였다. 잎과 잎 세포가 커지는 돌연변이체인 *macrophylla* (*mac*)를 선발하여 잎의 확장과정과 leaf index의 이상으로 인해 잎 기관의 모양뿐만 아니라 heteroblasty에 변화가 발생했다는 사실을 밝혀냈다. 또한 이 돌연변이체는 기존에 알려진 *ROTUNDIFOLIA3* (*ROT3*) 유전자의 점 돌연변이에 의해 일어났다고 판명되었고 *mac/rot3-5*로 명명되었다. 브라시노스테로이드 처리로 인해 *ROT3* 유전자의 발현이 음성 되먹임 저해를 받는 것으로 보아 *ROT3* 유전자가 브라시노스테로이드 생합성에 관여함을 제시하였다. 또한 암상태에서 *ROT3* 유전자의 발현이 증가하며, *mac/rot3-5* 돌연변이체가 야생형보다 암반응이 약하게 나타났다. 이러한 분석 결과를 토대로 본 논문은 *ROT3* 유전자가 잎의 확장과정에서 잎의 leaf index 조절과 고유한 heteroblasty의 정립에 중요한 역할을 수행하며, 브라시노스테로이드 호르몬의 조절을 통하여 음지회피성과 같은 환경조절반응을 수행하고 있다는 새로운 사실을 제시하였다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업 (2011-0701-305-632-001-03-00)의 지원에 의해서 이루어진 것임. 또한 이 논문은 2011년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업 (2011-0011884)임.

인용문헌

- Arkebuer TJ, Norman JM (1995) From cell growth to leaf growth: I. Coupling cell division and cell expansion. *Agron. J* 87:99–105
- Ashby E (1948) Studies in the morphogenesis of leaves. I. An essay on leaf shape. *New Phytol* 47:153–176
- Avery GS JR (1933) Structure and development of the tobacco leaf. *Amer. J Bot* 20:565–592
- Bancos ST, Nomura T, Sato G, Molnar G, Bishop J, Koncz C, Yokota T, Nagy F, Szekeres M (2002) Regulation of transcript levels of the *Arabidopsis cytochrome p450* genes involved in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol* 130:504–513
- Cho KH, Jun SE, Jeong SJ, Yi YB, Kim GT (2007). Regulation of cell size and cell number by *LANCEOLATA1* gene in *Arabidopsis*. *Kor J Life Science* 17:1–5
- Cunningham ME, Hyndon RF (1986) The relationship between the distribution of periclinal cell divisions in the shoot apex and leaf initiation. *Ann Bot* 57:737–746
- Hunter C, Willmann MR, Wu G, Yoshikawa M, de la Luz Gutierrez-Nava M, Poethig RS (2006) Trans-acting siRNA-mediated repression of *ETTIN* and *ARF4* regulates heteroblasty in *Arabidopsis*. *Development* 133:2975–2981
- Kim GT, Fujioka S, Kozuka T, Tax FE, Takatsuto S, Yoshida S, Tsukaya H (2005a) CYP90C1 and CYP90D1 are involved in different steps in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 41:710–721
- Kim GT, Tsukaya H, Saito Y, Uchimiya H (1999). Changes in the shapes of leaves and flowers upon overexpression of the novel cytochrome P450 in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 96:9433–9437
- Kim GT, Tsukaya H, Uchimiya H (1998) The *ROTUNDIFOLIA3* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells. *Genes Dev.* 12:2381–2391
- Kim GT, Yano S, Kozuka T, Tsukaya H (2005b) Photomorphogenesis of leaves: shade-avoidance and differentiation of sun and shade leaves. *Photochem Photobiol Sci* 4:770–774
- Kozuka T, Horiguchi G, Kim GT, Ohgishi M, Sakai T, Tsukaya H (2005) The different growth response of the *Arabidopsis thaliana* leaf blade and the petiole during shade avoidance are regulated by photoreceptors and sugar. *Plant Cell Physiol* 46:213–223
- Kozuka T, Kobayashi J, Horiguchi G, Dnura T, Sakakibara H, Tsukaya H, Nagatani A (2010) Involvement of auxin and brassinosteroid in the regulation of petiole elongation under the shade. *Plant Physiol* 153:1608–1618
- Maksymowych R (1963) Cell division and cell elongation in leaf development of *Xanthium pensylvanicum*. *Amer J Bot* 50: 891–901
- Murashige T, Skoog G (1963) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Ohnishi T, Szatmari AM, Watanabe B, Fujita S, Bancos S, Koncz C, Lafos M, Shibata K, Yokota T, Sakata K, Szekeres M, Mizutani M (2009) C-23 hydroxylation by *Arabidopsis* CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 18:3275–3288
- Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NE, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P (1995) Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 108:1049–1057
- Steeves TA, Sussex IM (1989) Patterns in plant development. (2nd eds), Cambridge University Press, New York, pp 147–175
- Sunderland N (1960) Cell division and expansion in the growth of the leaf. *J. Exp. Bot.* 11:68–80
- Szekeres M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Rédei GP, Nagy F, Schell I, Koncz C (1996) Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* 85:171–182
- Tanaka K, Asami T, Yoshida S, Nakamura Y, Matsuo T, Okamoto S (2005) Brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis* is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism. *Plant Physiol* 138:1117–1125
- Tsuge T, Tsukaya H, Uchimiya H (1996) Two independent and polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Development* 122:1589–1600
- Tsukaya H (2002) The leaf index: heteroblasty, natural variation, and the genetic control of polar processes of leaf expansion. *Plant Cell Physiol* 43:372–378
- Tsukaya H, Kozuka T, Kim GT (2002) Genetic control of petiole length in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43: 1221–1228
- Tsukaya H, Shoda K, Kim GT, Uchimiya H (2000) Heteroblasty in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 210:536–542