



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2018년 2월
석사학위 논문

애기장대의 *poltergeist* 돌연변이
배경에서 선별된 두 개의 약한
지상부 결함 돌연변이들의 특성 규명

조선대학교 대학원

생명과학과

윤 영 빈

애기장대의 *poltergeist* 돌연변이
배경에서 선별된 두 개의 약한 지상부
결함 돌연변이들의 특성 규명

Characterization of two weak shoot defective mutants
screened in the background of *poltergeist* in *Arabidopsis*

2018년 2월 23일

조선대학교 대학원

생명과학과

윤 영 빈

애기장대의 *poltergeist* 돌연변이
배경에서 선별된 두 개의 약한 지상부
결합 돌연변이들의 특성 규명

지도교수 송 상 기

이 논문을 이학석사학위 신청 논문으로 제출함

2017년 10월

조선대학교 대학원

생명과학과

윤 영 빈

윤영빈의 석사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	박현용	(인)
위 원	조선대학교	교수	조태오	(인)
위 원	조선대학교	교수	송상기	(인)

2017년 11월

조선대학교 대학원

CONTENTS

LIST OF TABLES.....	i
LIST OF FIGURES.....	ii
ABBREVIATIONS.....	iii
ABSTRACT.....	v
국문초록.....	viii
I. 서론.....	1
1. 모델식물 애기장대.....	1
2. 식물의 배 발생.....	2
3. CLAVATA 신호전달 경로.....	3
4. CLV-WUS 신호전달에 관여하는 <i>POLTERGEIST</i> 유전자.....	4
5. 식물의 탈리 현상.....	4
6. 꽃 기관의 탈리.....	6
7. IDA 신호전달 경로.....	8
8. 약한 경단분열조직 돌연변이의 선별의 필요성.....	10

II. 재료 및 방법	12
1. 식물재료 및 성장조건	12
2. Genomic DNA 추출	13
3. 중합효소연쇄반응	13
4. Thermal asymmetric interlaced PCR	14
5. PCR 산물의 정제와 전기영동	15
6. Ligation	15
7. 형질전환	16
8. 콜로니 PCR	16
9. Plasmid DNA prep	16
10. GUS 발현의 정성적 분석	17
11. Reverse Transcription PCR	17
III 결과	18
1. 35S enhancer 활성표지를 이용한 <i>pol-6</i> 배경에서 <i>fig-1</i> 돌연변이의 선별	18
2. <i>fig-1</i> 돌연변이의 T-DNA 삽입위치 확인	20

3. T-DNA 삽입 돌연변이 검정.....	22
4. 탈리대 관찰 결과.....	26
5. 탈리대 형성에 관여하는 리포터 유전자 발현 양상 확인.....	29
6. 약한 <i>pol</i> 과 <i>pll1</i> 돌연변이 대립유전자의 교차에 의한 비-유식물 치사성 <i>pol pll1</i> 이중 돌연변이 선별...	34
7. 후-배발생과정에서 <i>pol-6 pll1-4</i> 는 <i>wus</i> 의 표현형을 모사 3 9	39
8. PCR 및 염기서열분석을 통한 <i>pll1-4</i> 점 돌연변이의 확인.....	43
IV 논의.....	44
V 참고문헌.....	49

LIST OF TABLES

Table 1. PCR primers used in this study.....14

Table 2. Mean number of floral organs in *pol-6 pll1-4* and WT...42

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Inflorescence phenotype of <i>fig-1 pol-6</i> and <i>fig-1</i>	19
Fig. 2. A diagram of T-DNA insertion sites of <i>fig-1</i> and <i>stm-p</i> mutants.....	23
Fig. 3. Inflorescence phenotypes of the mutants possessing T-DNA insertions around <i>STM</i> promoter.....	24
Fig. 4. RT-PCR analysis of <i>STM</i> expression in <i>fig-1</i> and <i>stm-p</i> mutants.....	25
Fig. 5. Phenotype of abscission zones of <i>stm-p1</i> and <i>stm-p3</i>	27
Fig. 6. AZ and silique length of various <i>stm-p</i> mutants.....	28
Fig. 7. <i>HAESA</i> expression around the floral abscission zone of <i>stm-p1</i>	30
Fig. 8. <i>KNAT2</i> expression around the floral abscission zone of <i>stm-p1</i>	31
Fig. 9. <i>KNAT6</i> expression around the floral abscission zone of <i>stm-p1</i>	32
Fig. 10. <i>KNAT1</i> expression around the floral abscission zone of <i>stm-p1</i>	33
Fig. 11. A diagram of the T-DNA insertion alleles for <i>POL</i> and <i>PLL1</i>	35
Fig. 12. Phenotypes of weak <i>pol-6 pll1-4</i>	36
Fig. 13. Average root length of <i>pol pll1</i> double mutants.....	37
Fig. 14. The compromised expression patterns of <i>SCR</i> , <i>WOX5</i> , and <i>CLV3</i> in <i>pol-6 pll1-4</i> seedlings.....	38
Fig. 15. Phyllotaxis and inflorescence phenotypes of <i>pol-6 pll1-4</i> , <i>clv2-1 pol-6 pll1-4</i> , and <i>clv3-2 pol-6 pll1-4</i>	40
Fig. 16. Floral phenotypes of <i>pol-6 pll1-4</i> , <i>clv3-2 pol-6 pll1-4</i> , and <i>ag-1 pol-6 pll1-4</i>	41

ABBREVIATIONS

AG	AGAMOUS
AZ	Abscission zone
BOP	BLADE-ON-PETIOLE
BP	BREVIPEDICELLUS
CLV	CLAVATA
CRN	CORYNE
EXP	EXPANSIN
HAE	HAESA
HSL2	HAESA-LIKE2
IAA	Indoleacetic acid
IDA	INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION
KNAT	KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS
LRE	Lateral root emergence
LRR	Leucine rich repeat
NEV	NEVERSHED
NEV	NEVERSHED
PG	POLYGALACTURONASE
PLL1	POLTERGEIST LIKE1
POL	POLTERGEIST
PP2C	Protein phosphatase 2C
RAM	Root apical meristem
SAM	Shoot apical meristem

WUS

WUSCHEL

XTH

XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE

ABSTRACT

Characterization of weak shoot defective mutants in the background of *poltergeist* mutant in *Arabidopsis*

Young-Bin Yun

Advisor : Assistant Prof. Sang-Kee Song, Ph.D.

Department of Life Science,

Graduate School of Chosun University

Partial loss-of-function mutants could be useful to understand fine functions of a gene of which a null mutation leads to severe defects such as lethality and lack of organ development. *poltergeist* (*pol*) mutant provides a proper sensitized background to screen for weak shoot defective mutants that is hardly found in the wild-type background. Here, *filamentous gynoeceium-1* (*fig-1*) *pol-6* double mutant displaying slightly reduced floral meristem has been screened from a mutant pool induced by the introduction of activation tags in the *pol-6* background. The T-DNA insertion site was localized in the promoter region of a homeo-domain gene, *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) by using next generation sequencing analysis. *fig-1* single mutant exhibited

defects in floral organ abscission mainly due to the fusion of sepals. Two additional weak alleles, each possessing a T-DNA insertion in the promoter, *stm-p1* and *stm-p3* also exhibited weak inflorescence defects together with abscission defects. Furthermore, *stm-p1 pol-6* displayed filamentous gynoecium phenotype. The reverse-transcription PCR analysis showed that *STM* expression in *fig-1*, *stm-p1* and *stm-p3* was reduced compared with that in wild-type plants. Interestingly, the width of abscission zone (AZ) of *fig-1*, *stm-p1*, and *stm-p3* was shorter than that of WT while the length of the siliques. The expression pattern of floral abscission related genes such as *HAESApro:GUS*, *KNAT2pro:GUS*, *KNAT6pro:GUS*, and *KNAT1pro:GUS* in the *stm-p1* was not changed as compared with that in WT suggesting that *STM* is involved in the development of sepal boundary and the growth of AZ rather than in the canonical pathway for the floral AZ development.

POLTERGEIST (POL) and *POL-LIKE1 (PLL1)* coding for related protein phosphatase 2C (PP2C) are required for the establishment of shoot and root meristems during embryogenesis. As strong *pol pll1* double mutants are seedling-lethal due to the lack of vasculature along the embryo axis, their late vegetative and reproductive phenotypes could only be observed only after grafting. To avoid any artificial effect possibly led by grafting, a weak *pll1* allele (*pll1-4*) has been selected among the T-DNA insertion mutants and a partial loss-of-function double mutant (*pol-6 pll1-4*) has been prepared. About 10% of *pol-6 pll1-4* seedlings developed vasculature in the hypocotyl and were able to exhibit post-embryonic phenotypes

spontaneously. The above-ground organs of *pol-6 pll1-4* phenocopied *wuschel* mutant displaying adventitious phyllotaxis and inflorescence and defective flowers lacking any gynoecium together with reduced *CLV3pro:GUS* expression. The phenotypes of *pol-6 pll1-4 clv2-1* and *pol-6 pll1-4 clv3-2* were similar to that of *pol-6 pll1-4* suggestive of the epistasis between POL/PLL1 and CLVs. In addition, *pol-6 pll1-4* exhibited severely reduced root meristem as shown by the reduced expression of root meristem markers such as *WOX5pro:GUS* which was further confirmed with reporter expression such as *WOX5pro:GUS* and *SCRpro:GUS*. Unexpectedly, the *pll1-4* mutation leading to the weak *pol-6 pll1-4* was identified as a point mutation in an amino acid located in one of the conserved PP2C motifs instead of the T-DNA insertion localized in the promoter region of *PLL1*.

국문초록

애기장대의 *poltergeist* 돌연변이 배경에서 선별된 두 개의 약한 지상부 결함 돌연변이들의 특성 규명

윤영빈

지도교수 : 송상기

생명과학과

조선대학교 대학원

돌연변이가 치사성이나 기관의 소실 등의 심각한 결함을 초래하는 경우, 부분적인 기능 상실 돌연변이는 유전자의 정교한 기능을 이해하는데 유용하다. *poltergeist* (*pol*) 돌연변이는 야생형 배경에서는 거의 발견되기 어려운 미약한 경단 분열조직 돌연변이를 선별하기 위한 적절히 민감한 배경을 제공한다. 본 연구에서 *pol-6* 배경에 활성표지를 도입한 돌연변이 식물의 pool 에서 산발적으로 실 모양의 암술군을 형성하는 열성돌연변이인 *filamentous gynoeceium-1* (*fig-1*) *pol-6* 이중돌연변이를 선별하였다. 차세대 시퀀싱 분석을 이용하여 T-DNA 는 homeo-domain 전사인자를 암호화하는 *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*)의 프로모터에 삽입된 것을 확인하였다. *fig-1* 단일 돌연변이는 꽃 받침의 융합으로 인하여 꽃

기관의 탈리에 결함이 나타났다. *STM* 프로모터에서 T-DNA 가 삽입된 두 개의 약한 돌연변이인 *stm-p1* 과 *stm-p3* 도 꽃 기관의 탈리에 결함과 함께 약한 화서 결함 표현형을 나타냈다. 또한, *stm-p1 pol-6* 이중돌연변이는 실 모양의 암술군의 표현형을 재현하였다. Reverse-transcription PCR 의 결과 *fig-1*, *stm-p1*, 그리고 *stm-p3* 돌연변이에서는 야생형 식물에 비하여 낮은 수준으로 *STM* 이 발현되었다. 흥미롭게도 *fig-1*, *stm-p1* 및 *stm-p3* 의 탈리대의 폭은 야생형의 것에 비하여 감소한 반면, 세 돌연변이들의 silique 의 길이는 야생형의 것과 큰 차이가 없었다. 또한, *stm-p1* 돌연변이에서 *HAEpro:GUS*, *KNAT2pro:GUS*, *KNAT6pro:GUS* 및 *KNAT1pro:GUS* 등의 꽃 기관의 탈리대 관련 리포터 유전자들의 발현양상은 야생형에서의 발현양상과 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과들은 *STM* 이 전형적인 꽃 기관의 탈리대 발달 경로에 관여하기보다는 꽃받침의 경계형성과 탈리대의 성장에 관여한다는 것을 암시한다.

단백질 탈인산화효소를 암호화하는 *POLTERGEIST (POL)*와 *POL-LIKE1 (PLL1)*은 배발생과정에서 경단 및 근단분열조직의 형성에 필요하다. 강한 *pol p11* 이중돌연변이는 배의 중축에서 관다발을 형성되지 않기 때문에 유식물 치사성이며, 접목 없이는 후기 영양성장단계와 생식단계의 표현형을 관찰할 수 없다. 본 연구에서는 접목에 의해 야기되는 인위적인 효과를 피하고자, 약한 *p11* 대립유전자(*p11-4*)를 T-DNA 삽입 돌연변이들 중에서 선택하여 부분적인 기능상실 이중 돌연변이(*pol-6 p11-4*)를 제조하였다. *pol-6 p11-4* 의 유식물 중에서 약 10%가 관다발을 형성하여 자발적으로 성장하여 후배발생적 표현형을 나타냈다. *pol-6 p11-4* 의 지상부에서는 *CLV3pro:GUS* 의 발현이 감소하였고, 부정기적인 잎차례 및 꽃차례, 그리고 암술이 결핍된 결함이 있는 꽃의 표현형을 나타냈으며, 이는 *wuschel* 돌연변이의 표현형을 모사하는 것이었다. *pol-6 p11-*

clv2-1 과 *pol-6 pll1-4 clv3-2* 삼중돌연변이의 표현형은 *pol-6 pll1-4* 이중 돌연변이의 표현형과 대등하였으며, 이는 POL/PLL1 과 CLV 들 사이에 유전학적인 상위 관계가 있음을 암시한다. 또한, *pol-6 pll1-4* 에서는 근단분열조직이 심하게 감소되었는데 이러한 현상은 *WOX5pro:GUS* 와 *SCRpro:GUS* 같은 근단분열조직 표지 유전자의 발현이 감소된 것에서 잘 나타났다. 예상 밖의 현상으로, 약한 *pol-6 pll1-4* 이중돌연변이를 유도하는 *pll1-4* 돌연변이는 *PLL1* 프로모터 지역의 T-DNA 삽입에서 유래한 것이 아니라 보존된 PP2C 모티프의 점 돌연변이에서 유발된 것임을 확인하였다.

I. 서론

1. 모델식물 애기장대

애기장대(*Arabidopsis thaliana* (L) Heynh)는 배추과에 속하는 쌍자엽식물로서 짧은 생활주기, 자가수분능력, 다수확성, 왜소성 등의 특징들로 인하여 제한된 공간에서 용이하게 배양할 수 있어서 많은 식물학자들이 모델 식물로 활용하고 있다(Somerville and Koornneef, 2002). 또한 애기장대는 고위도에서 중위도에 걸쳐져 있는 다양한 환경에서 성장하고 있어서 다수의 생태형(accession)이 확보할 수 있어 유전적인 변이성을 연구하기에 적합한 식물이다. 애기장대는 유전체의 염기서열이 완전하게 밝혀진 최초의 식물이다(Kaul et al., 2000). 애기장대의 유전체는 약 2만 5,000개의 유전자를 포함하는 5쌍의 염색체로 구성되어있고, 유전체에 반복되는 DNA가 비교적 적게 포함되어 있어 유전자들을 분리하는 것이 용이하여, 토양세균인 *Agrobacterium*을 이용하여 쉽게 형질전환할 수 있다. 애기장대는 식물의 발달과정에서 작동하는 분자적, 세포적 메커니즘을 연구하는 데 매우 중요한 도구로 사용되고 있으며, 다른 식물 중에서 발견되는 유전자와 유사하기 때문에 식물 연구에 많이 활용되고 있다. 최근에는 1000개 이상의 생태형의 완전한 염기서열이 밝혀져 유전자형과 표현형의 상관관계를 연구하는데 새로운 지평이 열려진 상태이다(Consortium, 2016).

2. 식물의 배 발생

동물과 식물의 초기 배 발생은 세포분열, 패턴화와 기관형성, 분화와 생장이라는 동일한 원리로 시작된다. 동물은 배 발생 과정에서 모든 조직과 기관이 거의 완전하게 형성되지만 식물의 경우에는 배 발생의 결과로 모든 기관이 형성되지 않고 매우 단순한 구조의 유식물이 만들어지며 일생 동안 새로운 기관들을 새롭게(*de novo*) 형성한다. 이러한 식물의 후-배발생적인 기관형성은 배 축의 양 말단에 위치하는 정단분열조직(*apical meristem*)의 작용을 통해서 이루어진다(Kaur et al., 2009). 이들은 각각 정단분열조직과 근단분열조직이라고 부르며 대부분의 성숙한 식물 기관의 원천으로 작용한다. 정단분열조직은 자엽과 하배축을 제외한 식물의 지상부의 전 기관을 형성하고 근단분열조직은 지하부를 형성한다(Beeckman et al., 2002).

애기장대의 배발생은 접합자의 차등 분열로 정단세포(*apical cell*)와 기저세포(*basal cell*)를 형성하면서 시작된다. 정단세포(*apical cell*)는 분열 과정을 거쳐 거의 모든 배의 전체를 형성하는 반면, 기저세포(*basal cell*)는 수차례의 분열을 거쳐 배병(*suspensor*)을 형성한다. 기저세포의 최상단세포는 32~64 세포기의 구형배시기에 비대칭적인 분열을 통해서 렌즈형 세포를 형성하며 배의 일부로 편입된다. 이 렌즈형 세포는 정지중심부(*quiescent center*)의 시원세포로 작용하며 나머지 세포는 근관세포의 기원이 된다. 정지중심부는 이후에 주변을 둘러싼 줄기세포의 분화를 억제하여 근단분열조직을 유지하는 줄기세포 영역(*niche*)의 중요한 요소로 작용한다. 한편 정단분열조직의 경우 심장형 배의 형성을 전후해서 형성되는 것으로 알려져 있다(Kaur et al., 2009).

3. CLAVATA 신호전달 경로

식물이 일생 동안 새로운 기관을 형성하기 위해서는 분열조직에서 세포증식과 분화 사이의 균형과 기관의 생성과 소실 사이의 균형이 요구된다. 균형을 유지하기 위해서는 식물의 분열조직 내에서 적절한 숫자의 줄기세포를 유지해야 하며, 동시에 새로운 잎이나 꽃 원시세포로 분화할 때 분열조직 경계에서 세포의 정체성과 위치를 정밀하게 제어해야만 한다(Butenko and Simon, 2015). 애기장대에서 경단분열조직의 항상성은 분화를 촉진하는 central zone의 신호전달 요소인 CLAVATA (CLV1)와 미분화 세포의 증식을 촉진하는 rib zone의 homeo-domain을 포함하는 전사인자인 WUSCHEL (WUS)에 의해 조절된다(Stahl and Simon, 2005). CLV 신호 전달 구성요소는 leucine rich repeat (LRR) 영역을 포함하는 receptor-like kinase인 CLV1, LRR 영역을 갖지만 kinase 영역이 없는 receptor-like protein인 CLV2, 짧은 LRR 영역을 가진 kinase인 CORYNE (CRN) 및 CLV1에 대한 리간드로써 성숙과정을 거쳐 12개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드로 완성되는 CLV3로 구성되는데, 이러한 CLV의 신호는 WUS의 발현영역을 제한하도록 유도하고 WUS은 다시 CLV3의 발현을 촉진한다(Yadav et al., 2011). 이와 같이 CLV와 WUS 사이에 존재하는 음성적인 되먹임 조절작용과 양성적인 되먹임 작용에 의해서 적절한 숫자의 stem cell의 형성을 안정적으로 유지하게 된다(Mayer et al., 1998; Schoof et al., 2000).

4. CLV-WUS신호전달에 관여하는 *POLTERGEIST* 유전자

poltergeist (*pol*) 돌연변이는 *clv1* 돌연변이의 억제 돌연변이(suppressor)로 선별되었으며(Yu et al., 2000), *POL*은 단백질 탈인산화효소 2C (protein phosphatase 2C, PP2C)를 암호화하는 것으로 보고되었다(Lita et al., 2003). *POL*은 myristoylation 됨으로써 막에 결합하는 막 단백질로 알려져 있다(Gagne and Clark, 2010). *POL*의 유사 유전자인 *POL-Like 1* (*PLL1*)은 *POL*과 기능이 중첩되어 있으며 *pol pll1* 이중 돌연변이의 경우 중심주의 관다발이 형성되지 않아서 유식물 치사성 표현형을 나타내며, 접붙이기를 통해서만 꽃대, 꽃, 열매 등의 후기 발달과정을 관찰할 수 있으며 후기 발달과정은 *wus* 돌연변이 표현형을 모사하는 것으로 보고된 바 있다. 또한 *pol pll1* 이중 돌연변이의 배에서는 근단분열조직의 중심이 되는 정지중심부가 정상적으로 발달하지 않고 *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5* (*WOX5*)의 발현이 소실되어 뿌리의 생장이 거의 일어나지 않는다(Song and Clark, 2005; Song et al., 2006). 이를 통해서 *POL/PLL1*은 경단 및 근단분열조직의 생성과 유지에 공통적으로 필요한 유전자들임을 알 수 있다.

5. 식물의 탈리 현상

식물에서 어떤 기관이 떨어지는 현상을 탈리(abscission)라고 한다. 탈리는 감염되거나, 죽거나, 기능이 없는 기관의 제거에 있어서 식물에게 중요하지만, 과일과 종자를 떨어트리거나 더 이상 기능을 수행하지 못하는

건강한 기관의 탈리를 위해서도 중요하다(Bleecker and Patterson, 1997; Sexton and Roberts, 1982). 기관의 탈리가 일어나는 위치를 탈리대(abscission zone, AZ)라고 부른다(González-Carranza et al., 1998; Sexton and Roberts, 1982; Taylor and Whitelaw, 2001). AZ는 발달 및 환경 조건에 의해 탈리가 시작될 때까지 주변 세포처럼 확대되지 않는 작은 세포질로 뻗뻗하게 구성된 세포로 이루어진 몇 개의 세포층이다(Bleecker and Patterson, 1997; Roberts et al., 2002). 탈리가 개시되면 *EXPANSIN (EXP)*과 *XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE (XTH)* 같은 가수분해 효소를 암호화하는 유전자의 조절이 일어나 세포의 팽창을 허용하는 AZ 세포벽의 재구성을 유도한다(Cai and Lashbrook, 2008; Cosgrove, 1998; Ogawa et al., 2009). 그 결과 POLYGALACTURONASE (PG)와 같은 펙틴 가수분해효소에 의해서 펙틴이 탈메틸화되어 분리층에서 균열이 형성되어 층층이 용해된다(Cai and Lashbrook, 2008; González-Carranza et al., 2007; Ogawa et al., 2009; Sexton and Roberts, 1982). 또한 기관이 분리될 때, 병원균의 침입, 물과 영양분의 손실을 피하기 위해 코르크층이 줄기를 가로질러 형성된다(Patterson, 2001).

에틸렌과 옥신과 같은 호르몬 수준의 변화는 에틸렌에 의한 탈리의 활성화 및 탈리 시기를 조절하는데 중요하다(Osborne and Morgan, 1989; Taylor and Whitelaw, 2001). 그러나 옥신의 일종인 인돌 아세트산(indoleacetic acid, IAA)은 탈리의 시기를 조절할 뿐만 아니라 세포벽이 분해되는 속도를 조절하는데 관여하며 기관의 탈리를 위해서 기능적 IAA 신호전달경로의 필요하다는 것이 최근에 입증되었다(Basu et al., 2013). 측근의 출현 (lateral

root emergence, LRE)에서 옥신의 유입은 세포 분리 과정에서 옥신의 역할을 더욱 확장시키고 초기 측면 뿌리를 덮는 세포층을 분리하는 과정의 시발점으로 나타났다(Kumpf et al., 2013).

6. 꽃 기관의 탈리

꽃 기관의 탈리는 꽃의 분열조직에서 파생된 것으로 여겨지는 꽃의 AZ에서 꽃잎, 수술 및 꽃받침과 같은 꽃 기관이 이탈하는 과정이다(Gawadi and Avery Jr, 1950; Patterson, 2001; van Nocker, 2009). 애기장대에서 꽃 기관은 수분 이후에 분리된다(Patterson, 2001). 꽃의 탈리과정에 관여하는 다양한 유전자에 대한 지식은 꾸준히 증가하고 있으며, 식물 발달의 가장 중요한 조절인자로서 에틸렌 및 옥신과 같은 고전적인 식물 호르몬의 역할에 도전하고 있다(Butenko et al., 2009; Stahl and Simon, 2010).

애기장대의 *BLADE-ON-PETIOLE1* (*BOP1*)와 *BOP2*에서 보존된 BTB/POZ 도메인 및 안키린 반복을 갖는 2개의 NPR1 유사 신호전달 단백질(Hepworth et al., 2005; McKim et al., 2008)이 *BOP1* 및 *BOP2* 기능의 손실로 인해서 AZ 세포의 적절한 구조 형성을 방해하여 꽃 기관의 AZ 세포의 분화를 촉진시키는 것으로 밝혀졌다(Hepworth et al., 2005; McKim et al., 2008).

INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA) 펩타이드는 탈리 과정의 최종단계에서 일어나는 세포벽의 분해에 의한 실제 세포분리에 관여하는 것으로 알려져 있는데, 이는 *ida* 돌연변이에서 AZ는 성숙과정을 거치지만 기관의 탈리는 발생하지 않는 표현형을 통해서 확인된 바

있다(Butenko et al., 2003). IDA는 AZ의 감작 직후에 발현되며 기관의 탈리에 앞서 세포벽의 이완에 관여하고 있으며, 조기에 분화된 꽃 기관의 탈리를 보여 기관 분리지점에서 AZ 세포의 확대를 과대발현 시킨다(Butenko et al., 2003; Butenko et al., 2006; Stenvik et al., 2006). IDA의 초기 및 정상적인 발현은 *bop1 bop2*에서 탈리를 촉진 할 수 없었다(McKim et al., 2008). 따라서 BOP1 및 BOP2에 의해 제공되는 분화된 AZ 세포의 존재는 IDA 펩타이드가 꽃 기관의 탈리를 촉진시키는데 필수적이다(McKim et al., 2008; Shi et al., 2011).

후기 골지망에 위치한 ADP-ribosylation factor GTPase 활성 단백질인 *NEVERSHED (NEV)* 유전자는 IDA가 탈리를 조절하는 것과 같은 단계에서 작용한다고 알려져 있다(Liljegren et al., 2009). *NEV*의 상실은 꽃 기관의 불완전한 탈리를 나타내고 AZ 세포의 IDA 이소성 확장의 과대발현을 유발한다(Liljegren et al., 2009; Liu et al., 2013). 투과전자현미경 사진은 *nev* 돌연변이의 꽃받침 AZ에서 변화된 골지구조와 골지망의 위치를 나타내었고, 세포분화에 관여하는 것으로 알려진 유전자는 *nev* 돌연변이에서 하향조절 되는 것이 밝혀졌다(Liu et al., 2013). 따라서 NEV는 막 수송 운반을 조절하고, 골지조직의 적절한 구성을 유지하고 중요한 세포분화와 탈리의 진행을 위한 골지망의 올바른 위치를 선정한다(Liljegren et al., 2009; Stefano et al., 2010). NEV는 IDA가 세포분리를 촉진하는 동안 세포확장의 억제자 역할을 수행하는 것으로 보이고, NEV와 IDA 모두 세포분리의 촉진과 억제에 필요하다(Butenko et al., 2003; Butenko et al., 2006; Liljegren et al., 2009; Liu et al., 2013; Stenvik et al., 2006).

BREVIPEDICELLUS (BP)/KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS

*THALIANA1 (KNAT1)*은 KNOX 유전자 패밀리로써, 꽃 기관 탈리에서 형태적으로 구별되는 AZ세포의 확대에 대한 적절한 시기와 조절에 중요한 역할을 한다고 제안되었다(Shi et al., 2011; Wang et al., 2006). IDA 기능의 획득과 마찬가지로 *KNAT1* 기능의 상실은 꽃 기관의 탈리가 일어난 위치에서 AZ 세포의 확대 및 조기 세포벽의 이완으로 이어진다(Shi et al., 2011). 두 개의 다른 *KNAT* 유전자인 *KNAT2* 와 *KNAT6*(Mukherjee et al., 2009; Scofield and Murray, 2006)는 세포벽 재구성 유전자들을 직접적으로 활성화시켜 탈리를 촉진하는 것으로 여겨지며, 차례로 *KNAT1*에 의해 조절될 것으로 제안되었다(Ragni et al., 2008; Shi et al., 2011).

7. IDA 신호전달 경로

꽃 기관의 탈리에 작용하는 것으로 밝혀진 많은 다른 유전자들도 같은 경로에서 작용한다. 꽃의 탈리 및 세포 분리를 유도하는 가장 잘 연구된 신호 전달 경로들 가운데 하나는 IDA 신호전달 경로로써 IDA와 Leucine rich repeat (LRR) 모티프를 가진 수용체 유사 키나아제인 HAESA (HAE)와 HAESA-LIKE 2 (HSL2) 수용체가 출발점이 된다(Butenko et al., 2009; Cho et al., 2008; Stenvik et al., 2008). 기능적인 IDA 펩타이드가 결여되면 silique의 탈리대에서 모든 꽃 기관이 부착되어 유지된다(Butenko et al., 2003). *HAE*와 *HSL2*는 꽃 기관의 AZ에서 IDA 펩타이드와 유사한 패턴으로 발현되고 *hae hsl2* 이중 돌연변이는 *ida* 돌연변이와 동일한 표현형을 보여준다(Butenko et al., 2003; Jinn et al., 2000).

IDA는 HAE/HSL2와 결합하는 능력을 가진 AZ의 세포에서 분비되어 번역 후 수정된 작은 펩타이드일 가능성이 높으며, 반응 조직의 세포에서는 HSL2에 비하여 낮은 친화도로 인하여 HAE를 보다 더 높은 수준으로 필요할 수 있다(Butenko et al., 2003; Butenko et al., 2014; Matsubayashi, 2011; Stenvik et al., 2006; Stenvik et al., 2008). 완전히 활성화된 펩타이드를 얻기 위해서는 *IDA* 유전자에 의해 암호화 된 77개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드가 적당한 크기로 축소 및 변형되어야 한다(Matsubayashi, 2011). PIP 및 PIPPo는 HAE를 효율적으로 활성화시킬 수 없으며, 또한 HAE 수용체에 결합하는 IDA의 수정 또는 보완 수용체의 존재가 필요할지도 모른다(Butenko et al., 2014).

INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION-LIKE (*IDL*) 1-5 펩타이드를 암호화하는 유전자는 모두 생물정보학적 선별 과정에서 발견되었으며 보존된 EPIP 모티프를 공유하므로 RLKs에 결합하는 신호전달 펩타이드로 작용할 가능성이 있다(Stenvik et al., 2008). *IDL* 유전자의 발현양상은 AZ에서 발현되는 *IDA*와 유사하지만, *IDL* 발현은 *IDA*와는 대조적으로 기관 탈리 후 정점에 도달한다(Stenvik et al., 2008).

HAE HSL2는 Mitogen-Activated Protein Kinase4 (MKK4)와 MKK5 그리고 이들의 2개의 표적으로 알려진 Mitogen-Activated Protein Kinase3 (MPK3) 과 MPK6를 포함한 세포질에서 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 연쇄 신호전달경로를 통해 IDA 신호전달을 시작하는 것으로 생각된다(Cho et al., 2008; Kim et al., 2011; Tena et al., 2001). 항시적으로 발현될 때 MKK4와 MKK5가 *ida*의 표현형을 회복시킬 수 있었고 *mpk3*

돌연변이는 *hae hsl2* 그리고 *MPK6* 형질전환 유전자와 함께 탈리 결함을 보여주어 IDA-HAE-HSL2 통로에서 탈리의 양성적인 조절자의 역할을 수행한다(Cho et al., 2008). MAPK 연쇄 신호전달경로의 활성화는 IDA 및 HAE HSL2의 하류에서 기능하는 것으로 밝혀진 KNAT1을 직접 또는 간접적으로 하향 조절한다고 여겨진다(Shi et al., 2011). 유전적 상호작용 연구는 KNAT1이 *KNAT2*와 *KNAT6*를 음성조절하는 IDA 펩타이드와 HAE HSL2 수용체의 하류에서 작용하는 탈리의 음성 조절자로서 역할을 수행한다(Shi et al., 2011). *knat2 knat6*와 *bp-3 ida-2 knat2 knat6* 돌연변이 모두 탈리지연을 보였으며, *KNAT6*와 *KNAT2*의 결여가 아래로 향하는 siliques의 *knat1* 표현형을 회복시켜 KNAT1의 다운스트림인 KNAT2와 KNAT6의 역할을 지지한다(Ragni et al., 2008; Shi et al., 2011). 또한 *KNAT2* 및 *KNAT6*의 발현 수준은 *knat1* 돌연변이에서 증가하는 반면, *ida* 및 *hae hsl2* 돌연변이에서는 야생형에 비해 발현수준이 가장 풍부하다(Shi et al., 2011). 이것은 IDA와 HAE HSL2의 작용의 하류 효과로서 *Cell wall remodeling (CWR)* 유전자의 유도에 의한 탈리의 양성 조절자로서 작용하는 KNAT2 및 KNAT6의 가설을 더 지지한다(Shi et al., 2011).

8. 약한 경단분열조직 돌연변이의 선별의 필요성

CLV1/2는 막성 단백질이고 WUS는 전사인자로서 핵에 위치한 것으로 알려져 있다. 따라서 CLV의 신호는 궁극적으로 핵으로 이동되거나 이동성이 있는 WUS의 이동을 차단하는 것으로 예상할 수 있다. 이러한 역할을 보다 잘 이해하기 위해서는 CLV의 하류에 위치하는 잠정적인 신호 유전자를 선별할

필요성이 있다. 이러한 발견을 위해서 이미 경단분열조직의 활성이 약화되었지만 종자 수확이 용이한 *pol* 돌연변이 배경에 35S 활성 표지를 도입하여 새로운 경단분열조직의 조절 유전자를 선별하고자 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물 재료와 성장조건

본 연구에서 사용된 애기장대 야생형은 Col-0 (Columbia-0), Ler-0 (Landsberg *erecta*)를 이용하였고, *pol-6*와 *PLL1*의 프로모터 주변에 T-DNA 삽입을 가지고 있는 돌연변이 SAIL_60_G09, SALK_090306, GABI_288A11, FLAG_376F06, *STM* 프로모터 지역에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 SALK_084696, SALK_081370, SALK_066173, SALK_102981, SALK_030041 그리고 At1g73875에 삽입된 SALK_120072를 *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC)에서 주문하였다. 애기장대를 흙에서 배양하는 경우 Osmocote 14-14-14 약 1g/pot를 함유하는 1:1:1 흙:펄라이트:질석 혼합물 (Sunshine Mix #5, Sungro)에 파종하여 5일간 4°C 조건하에 stratification 시킨 후 22°C 배양상의 백색 형광등에서 배양하였다. 무균상태로 애기장대를 배양하기 위해서는 종자를 0.7% NaOCl 용액으로 표면 살균한 다음 증류수로 5회 세척하여 파스퇴르 파이펫을 사용하여 1/2 MS배지에 파종하여 3일간 4°C 조건하에 stratification시킨 후 22°C 식물 배양상에서 생육시켜 관찰한 후, 발아 후 약 9-10일 후에 유식물을 배양토로 이식하였다.

2. Genomic DNA 추출

애기장대의 야생형과 돌연변이체의 어린 잎에서 Genomic DNA prep kit (SolGent)를 사용하였고, genotyping을 위한 genomic DNA의 추출(Edwards et al., 1991)은 어린 잎을 잘라서 1.5 ml eppendorf tube에 extraction buffer (200 mM Tris HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS)를 넣고 blue pestle을 이용하여 열이 발생하지 않게끔 분쇄하여 vortexing 시켜준 다음 원심분리(14,000 rpm)를 4°C, 5분간 시행하고, 150 μ l의 supernatant에 isopropanol 150 μ l를 섞고 상온에서 2분간 반응시켰다. 다시 원심분리(14,000 rpm)를 상온에서 2분간 시행하고, supernatant를 제거한 후 70% ethanol을 넣고, 원심분리(14,000 rpm)을 시행하였다. Ethanol을 제거하고, 15분간 건조한 뒤 멸균된 증류수 50 μ l로 elution 하여 genomic DNA를 추출하였다.

3. 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)

야생형과 돌연변이체에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 특정한 primer (Macrogen)를 이용하여 Taq Plus polymerase, Premium-Pfu polymerase (Nanohelix)를 사용하여, 94°C에서 3분, 94°C 30초, 52°C에서 30초, 72°C에서 1분을 25회 진행하고 72°C에서 5분간 반응하였다.

Table 1. PCR primers used in this study

Target gene	primer	Sequence
<i>stm-p1</i>	<i>stm-p1LP</i>	5'-TTGATGTGATGTCATGATGGG-3'
	<i>stm-p1RP</i>	5'-CCTATTGACAAAAGCGAATCC-3'
<i>stm-p2</i>	<i>stm-p2LP</i>	5'-ATGATTTGATGGGTTCCTTG-3'
	<i>stm-p2RP</i>	5'-TCTAACATTTGATTGCAATCAAAG-3'
<i>stm-p3</i>	<i>stm-p3LP</i>	5'-TAAGCATGGGACACCTGTACC-3'
	<i>stm-p3RP</i>	5'-CGCAGCGCAATTA AAAATAAC-3'
<i>stm-p4</i>	<i>stm-p4LP</i>	5'-TGCTAAAAGCCCACCAATATG-3'
	<i>stm-p4RP</i>	5'-GTTCCAGTTGAGGATCTTCCC-3'
<i>stm-p5</i>	<i>stm-p1LP</i>	5'-CCCAACCTAGCTGTCTTCAAC-3'
	<i>stm-p1RP</i>	5'-TTTCGACGCTCCTATTGAAAC-3'

4. Thermal asymmetric interlaced PCR

TAIL-PCR (Liu et al., 1995)은 아래와 같은 방법으로 수행하였다. pSKI015 vector (Weigel et al., 2000)의 left border의 3종류의 프라이머 (AtLB1, AtLB2, AtLB3)를 사용하였다. 1차 PCR에서는 93°C에서 1분, 95°C에서 1분간 반응한 다음, 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 2분 30초를 5회 동안 진행하였고, 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 25°C에서 72°C까지 0.2°C/sec의 조건으로 3분간 반응시켰다. 그리고 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 2분 30초, 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 2분 30초 반응시켰고, 94°C에서 30초, 44°C에서 1분, 72°C에서 2분 30초를 15회 진행하고, 72°C에서 5분간 반응하였다. 2차 PCR에서는 1차 PCR의 product를 1/50 희석시켜 사용하여 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서

2분 30초, 94℃에서 30초, 60℃에서 1분, 72℃에서 2분30초를 진행하고, 94℃에서 30초, 44℃에서 1분, 72℃에서 2분 30초를 12회 진행하고, 72℃에서 5분동안 반응하였다. 3차 PCR에서는 2차 PCR의 product를 1/10 희석시켜 사용하여 94℃에서 30초, 44℃에서 1분, 72℃에서 2분 30초를 20회 진행하고, 72℃에서 5분간 반응하였다.

5. PCR 산물의 정제와 전기영동

PCR을 반응을 통해 증폭된 DNA의 정제는 purification kit (Nanohelix)를 이용하였다. 정제된 산물은 Neogreen (NeoScience)을 10ml/0.5 μ l 사용하여, 1% TBE agarose gel을 만들어 전기영동을 진행하여, 1kb(+) DNA ladder marker (Enzymomics)를 사용하여 확인하였다.

6. Ligation

Ligation에는 ligase (Roche)와 CloneJET pcr cloning kit (Thermo)를 사용하여 총량 10 μ l를 만들어 상온에서 16시간 동안 반응을 진행하였다.

7. 형질전환

Ligation된 플라스미드를 *E.coli* (*Escherichia coli*)에 도입시키는 방법(Hanahan, 1985)이다. 배양된 DH5 α 에 $CaCl_2$ 를 처리하여 $-80^\circ C$ deep freezer에 보관하던 수용성 세포(competent cell) 100 μ l를 ligation 산물

5 μ l에 첨가하고 얼음에서 10분간 반응 시킨 후 42 $^{\circ}$ C 항온수조에서 42초간 heat shock을 가하고 얼음에 2분 동안 넣어둔 뒤, LB 액체배지를 500 μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C 배양기와 진탕 배양기에서 각각 30분씩 총 1시간을 배양했다. 사용한 vector에 따라 ampicillin 또는 kanamycin이 함유된 LB 고체배지에 도말하여 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 16시간을 배양하였다.

8. 콜로니 PCR

형질전환 후 항생제 배지에서 자란 콜로니를 주형으로 사용하고 해당 유전자의 프라이머를 이용하여 콜로니 PCR을 실시하여 insert DNA가 제대로 삽입이 된 콜로니를 선별하였다.

9. Plasmid DNA prep

14 ml round-bottom tube (Falcon)에 항생제가 들어간 LB 액체배지를 3 ml 선별된 콜로니를 접종하여 37 $^{\circ}$ C 진탕 배양기에서 16시간을 배양을 하고 Plasmid extraction mini kit (Pavorgen)를 이용하여 플라스미드를 정제하였다.

10. GUS 발현의 정성적 분석

GUS 염색 시약(100 mM Na₂PO₄ pH 7.0, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100)에 1 mM X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucurionide cyclo hexeyl

ammonium salt)을 유식물, 꽃과 함께 28℃에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 15%, 30%, 50%, 70%, 90% ethanol을 사용하여 엽록소를 제거하고 실체현미경(Leica, MZ10F) 또는 광학현미경(Zeiss, Axioskop)으로 GUS 염색 패턴을 관찰하였다.

11. Reverse Transcription PCR

식물용 RNeasy kit (Qiagen)를 이용하여 제조사의 실험방법에 따라 야생형과 돌연변이 유식물에서 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 Biophotometer (Eppendorf)를 사용하여 정량하고, 정량된 1 μ g의 RNA를 DNaseI (Invitrogen)을 처리하여 genomic DNA를 분해하였다. 반응은 상온에서 15분동안 진행하였으며 EDTA 용액을 첨가 후 65℃의 heating block에 10분간 처리하여 반응을 끝냈다. cDNA 합성은 Accuscript cDNA합성 kit (Agilent)를 이용하여 제조사의 실험방법에 따라 42℃에서 1시간동안 배양하여 1st strand cDNA를 제조하고 이를 주형으로 사용하고, 유전자 특이적인 프라이머 조합을 이용하여 94℃에서 3분동안 변성시킨 다음 94℃에서 1분, 52℃에서 1분, 72℃에서 1분을 30회 반응시켰다.

III. 결과

1. 35S enhancer 활성표지를 이용한 *pol-6* 배경에서 *fig-1* 돌연변이의 선별

애기장대 *pol-6* 돌연변이는 표현형상으로는 야생형과 거의 차이가 없으므로 종자를 풍부하게 생산할 수 있다(Fig. 1A,B). 열성인 *wus*이나 *pl1*의 표현형이 *pol-6* 배경에서는 준우성으로 나타나 일시적인 경단분열조직의 소실 또는 선형의 축소된 암술을 형성하게 된다(Song et al., 2006; Yu et al., 2000). 따라서 *pol-6* 돌연변이는 경단분열조직에서 새로운 돌연변이를 선별하기 위해 적절한 민감한 배경(sensitized background)라고 할 수 있다. 이러한 *pol-6* 돌연변이의 배경에 pSKI015 벡터의 35S enhancer 활성 표지를 형질전환을 통하여 도입하여 다량의 T₁ 종자를 확보하였고 1차적으로 약 500개의 BASTA 저항성 T₁ 식물을 선별하였다. 이들의 다음 세대인 T₂ 식물의 표현형을 조사하는 과정에서 가는 실모양의 암술(*filamentous gynoeceium*)을 간헐적으로 형성하는 *fig-1* 돌연변이를 선별하였다(Fig. 1C). *fig-1* 돌연변이를 *pol-6* 배경에서 분리하여(Fig. 1D) 단일 돌연변이의 표현형을 관찰한 결과 꽃 기관의 탈리에 결함이 나타나는 것을 관찰하였다(Fig. 1E).



Figure 1. Inflorescence phenotype of *fig-1 pol-6* and *fig-1*.

(A) Wild type (WT), (B) *pol-6*, (C) *fig-1 pol-6*, (D) F₁ progeny of *fig-1* crossed to WT (E) *fig-1*. Scale bars=10 mm.

2. *fig-1* 돌연변이의 T-DNA 삽입위치 확인

fig-1 돌연변이의 유전학적인 특성을 이해하고자 *fig-1 pol-6* 이중 돌연변이를 *pol-1*과 교배 후 F₂ 세대에서 분리 비를 조사하였을 때, 약 1/4의 빈도로 *fig* 표현형이 나타남을 확인하였다. 이 결과로 *fig-1* 돌연변이는 열성이라는 것을 확인할 수 있었다. *fig-1 pol-6* 이중 돌연변이를 또 다른 야생형 배경인 *Ler*과 교배하였을 경우 F₂ 세대에서 약 1/16의 빈도로 *fig* 돌연변이 표현형이 관찰되었다. 이러한 결과들은 *fig* 표현형은 *pol* 돌연변이 배경에 의존적이며 *fig-1*은 *pol*과 독립적으로 분리됨을 의미한다. pSKI015의 LB 지역의 3종류의 프라이머들을 사용하여 TAIL-PCR을 수행한 결과, 하나의 T-DNA가 At1g73875 유전자에 삽입된 것으로 확인되었다. 따라서 해당 유전자에 T-DNA가 삽입된 SALK_120072를 주문하여 동형접합 돌연변이를 선별하였으나 *fig-1* 돌연변이의 표현형이 관찰되지 않았다. 반복된 TAIL-PCR의 결과는 항상 동일한 좌위에 있는 T-DNA 삽입만을 선별하였기 때문에 이러한 문제를 해결하기 위하여 마이크로젠에 의뢰하여 차세대 시퀀싱(next generation sequencing; NGS) 분석을 시행하였다. *fig-1*의 게놈 DNA로 shotgun library를 제조한 다음, pSKI015의 LB 지역에 상보적인 프라이머를 활용하여 총 4.7 gigabyte의 데이터를 생산한 다음, mapping 작업을 수행하여 애기장대와 벡터 염기서열에 부분적으로 일치하는 orphan read들을 확보하였다. 그 결과 두 좌위에서 유의미한 삽입 지역의 인접 서열을 얻을 수 있었다. 하나는 1번 염색체의 27,781,891~27,782,966 지역으로 기존의 T-DNA 삽입지역인 At1g73875로 드러났고, 다른 하나는 1번 염색체의 23,065,811~23,066,886 지역으로 homeo-domain 전사인자를

암호화하는 *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*, At1g62360) 의 프로모터
지역에 해당되었다.

3. T-DNA 삽입 돌연변이 검정

STM (At1g62360)의 프로모터 지역에 T-DNA가 삽입된 5종류의 돌연변이인 SALK_084696, SALK_081370, SALK_066173, SALK_102981 SALK_030041의 종자를 주문하여 genotyping을 시행한 결과 동형접합 돌연변이들을 선별하였고 이들을 각각, *stm-p1*, *stm-p2*, *stm-p3*, *stm-p4* 및 *stm-p5*라고 명명하였다(Fig. 2). 이들의 표현형을 관찰한 결과, *stm-p1*과 *stm-p3*에서 꽃 기관의 탈리에 결함이 나타나는 것을 확인하였고(Fig. 3A,B), 화서가 일정간격으로 배열된 야생형과는 달리 *stm-p1* *stm-p3*에서는 화서가 간헐적으로 모여서 발달하는 양상을 나타냈다(Fig. 3B,D). 실제로 T-DNA 삽입 돌연변이 라인들의 유식물에서 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행한 결과, 탈리 이상 표현형의 식물에서 *STM*의 발현수준이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4). *stm-2* 같은 기능 상실형 *stm* 돌연변이의 경우 경단 분열조직이 소실되면 정상적인 경단 분열조직과 꽃 기관이 형성되지 않기 때문에 탈리 결함 표현형을 관찰하기 어려운 반면, 프로모터에 T-DNA가 삽입된 일련의 돌연변이들은 *STM*의 기능이 완전히 상실된 것이 아니라 전사 수준이 일정 수준 감소됨으로써 경단분열조직이 유지될 수 있어서 정상적인 꽃 기관을 형성하였고, 탈리대 형성 결함과 같은 미세한 표현형을 관찰할 수 있었다고 생각할 수 있다.

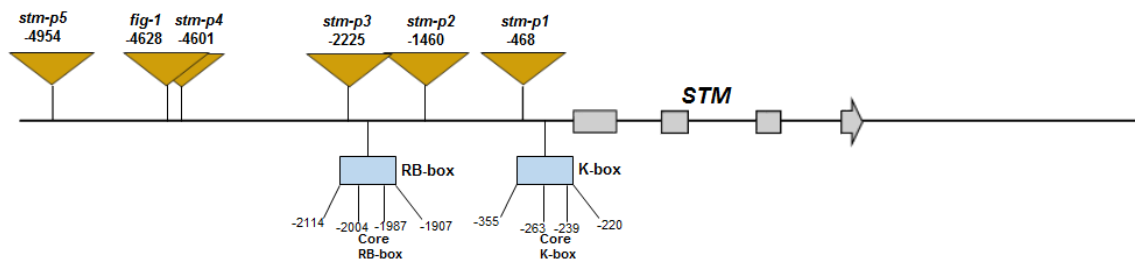


Figure 2. A diagram of T-DNA insertion sites of *fig-1* and *stm-p* mutants. Each number indicates the relative position from the initiation codon of *STM*. RB-box and the K-box (Aguilar-Martínez et al., 2015) are indicated as boxes below the horizontal line.

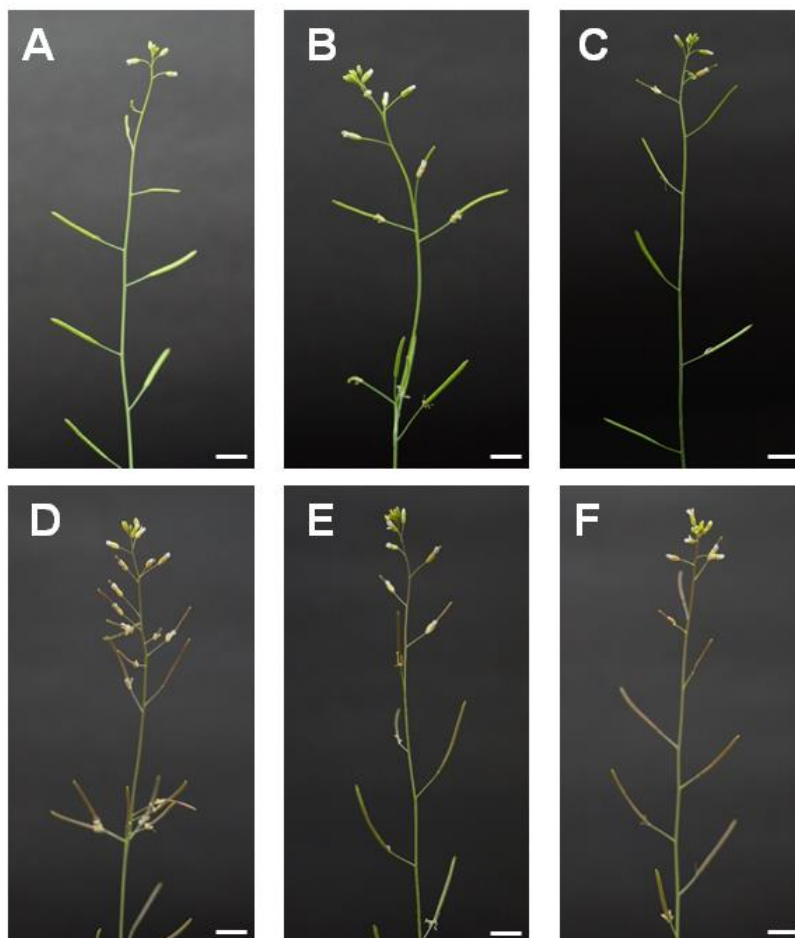


Figure 3. Inflorescence phenotypes of the mutants possessing T-DNA insertions around *STM* promoter.

(A) WT, (B) *stm-p1*, (C) *stm-p2*, (D) *stm-p3*, (E) *stm-p4*, (F) *stm-p5*.

Scale bars = 10 mm.

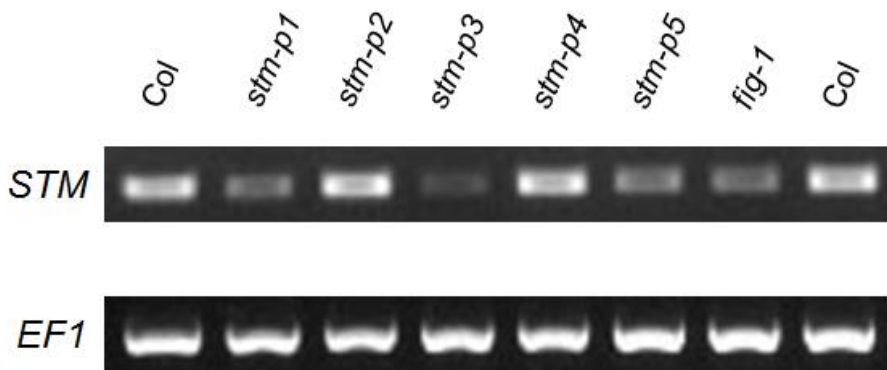


Figure 4. RT-PCR analysis of *STM* expression in *fig-1* and *stm-p* mutants. Total RNA extracted from the 5-d-old seedlings was used for 30-cycle reactions. *EF1* was used a control.

4. 탈리대 관찰 결과

$stm-p1$ 와 $stm-p3$ 돌연변이는 꽃 기관의 탈리가 야생형에 비하여 비효율적으로 진행되었기 때문에 탈리대 영역을 상세하게 관찰하여 야생형의 탈리대와 어떤 차이가 있는지를 관찰하였다(Fig. 5). 야생형의 경우 개화 후 8번째의 silique에서 대체로 꽃 기관의 탈리가 관찰되기 때문에, 각 식물의 개화 후 8번째의 silique를 주로 관찰하였다. 야생형이나 $stm-p1$ 및 $stm-p3$ 돌연변이 모두 꽃받침의 탈리대의 표면에서 형성되는 절단면 세포의 형태에서는 명확한 차이를 관찰할 수 없었지만 (data not shown), 꽃받침의 탈리대 및 부착된 소화경의 말단이 둥글고 부풀어 있는 야생형에 비하여(Fig. 5G). $stm-p1$ 과 $stm-p3$ 에서는 상흔(scar) 형태로 좁은 폭으로 유지되고 있었다(Fig. 5H,I). 따라서 꽃받침이 분리되지 않고 하나의 화관으로 연결되어 있어서 다른 꽃 기관의 탈리도 억제하고 있는 것으로 보이며 꽃받침의 측면을 절개할 경우 꽃받침을 포함한 다른 꽃 기관이 신속하게 탈리되는 것을 관찰할 수 있었다. 다양한 $stm-p$ 돌연변이들의 AZ 폭과 silique의 평균 길이를 측정한 결과, AZ 폭은 *STM*의 발현 수준과 상관 관계가 있지만(Fig. 6A), silique의 길이는 관계가 없는 것으로 보인다(Fig. 6B).



Figure 5. Phenotype of abscission zones of *stm-p1* and *stm-p3*.

Silique images at the position 8 from the flower at the anthesis. (A, D, G) WT. (B, E, H) *stm-p1*. (C, F, I) *stm-p3*. Corollas were removed to observe the abscission zones (E, F, H, I). Scale bars of = 1 mm (A-C); 0.1 mm (D-F); 0.1 mm (G-I). Arrowheads indicates sepal abscission zone (AZ).

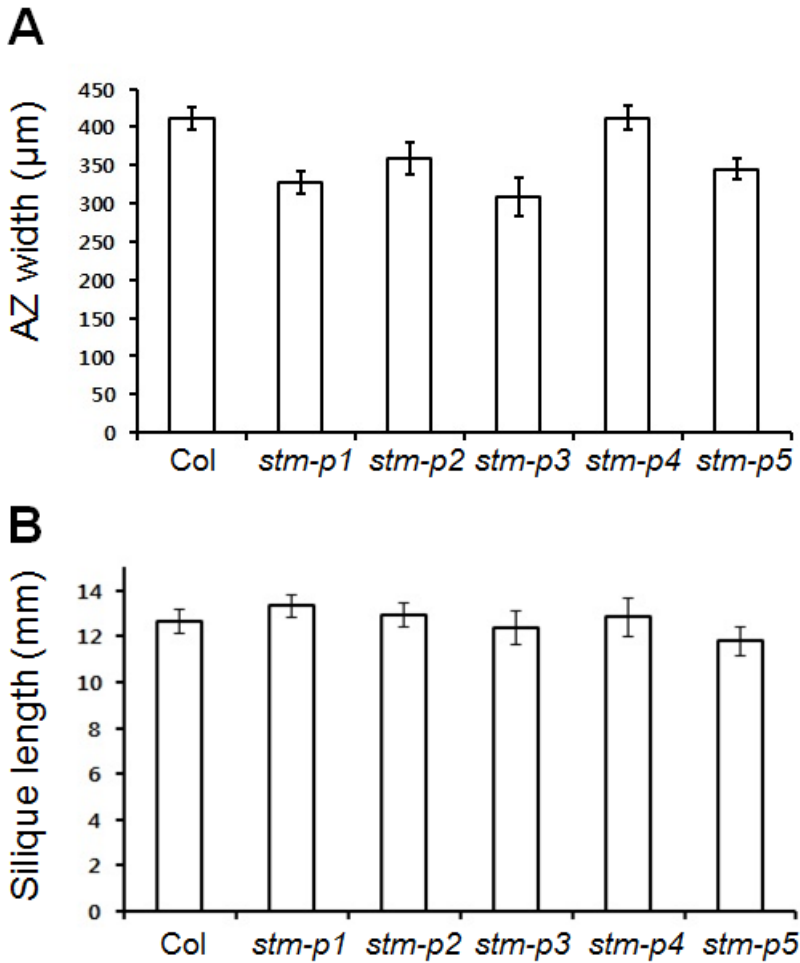


Figure 6. AZ and silique length of various *stm-p* mutants.

Average AZ width (A) silique length (B) of at least 8 siliques of various *stm-p* mutants at the position 8. Error bars indicate standard deviation

5. 탈리대 형성에 관여하는 리포터 유전자 발현 양상 확인

*stm-p1*에서 꽃 기관의 탈리가 저해되는 원인을 이해하고자 꽃 기관의 탈리대 형성에 관여하는 것으로 알려진 *HAE*, *KNAT1*, *KNAT2*와 *KNAT6*의 프로모터에 의해서 발현되는 *uidA* (GUS) 리포터 유전자의 발현 양상을 *stm-p1* 돌연변이배경에서 조사하였다(Cho et al., 2008; Jinn et al., 2000; Ori et al., 2000; Ragni et al., 2008). 그 결과 탈리를 촉진하는 것으로 알려진 *HAEpro:GUS* (Fig. 7), *KNAT2pro:GUS* (Fig. 8)와 *KNAT6pro:GUS* (Fig. 9)의 탈리대에서의 발현은 야생형 배경과 *stm-p1* 돌연변이 배경하에서 큰 차이를 나타내지 않았고, 탈리를 억제하는 것으로 알려진 *KNAT1p:GUS*의 발현 또한 야생형 배경(Fig. 10A)과 *stm-p1* 돌연변이 배경(Fig. 10B)에서 차이가 나타나지 않았다.

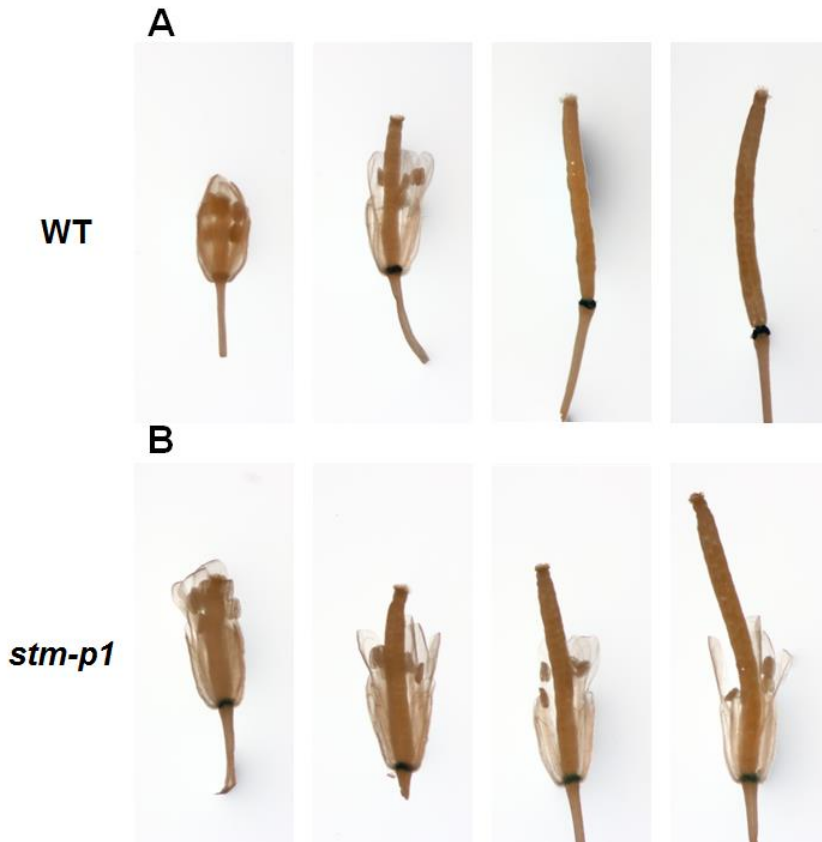


Figure 7. *HAE* expression around the floral abscission zone of *stm-p1*.
HAEpro::GUS expression in the flower and siliques of WT (A) and *stm-p1* (B)



Figure 8. *K NAT2* expression around the floral abscission zone of *stm-p1*.
*K NAT2**pro*:*GUS* expression in the flower and siliques of WT (A) and *stm-p1* (B)

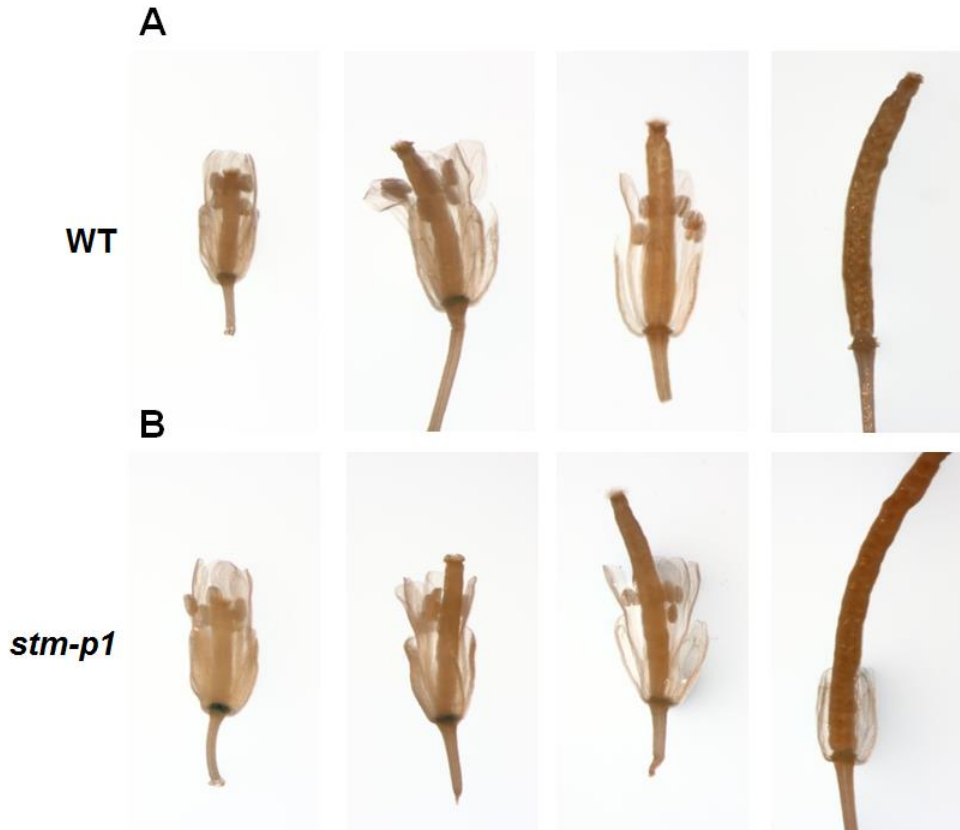


Figure 9. *K NAT6* expression around the floral abscission zone of *stm-p1*.
K NAT6pro:GUS expression in the flower and siliques of WT (A) and *stm-p1* (B)

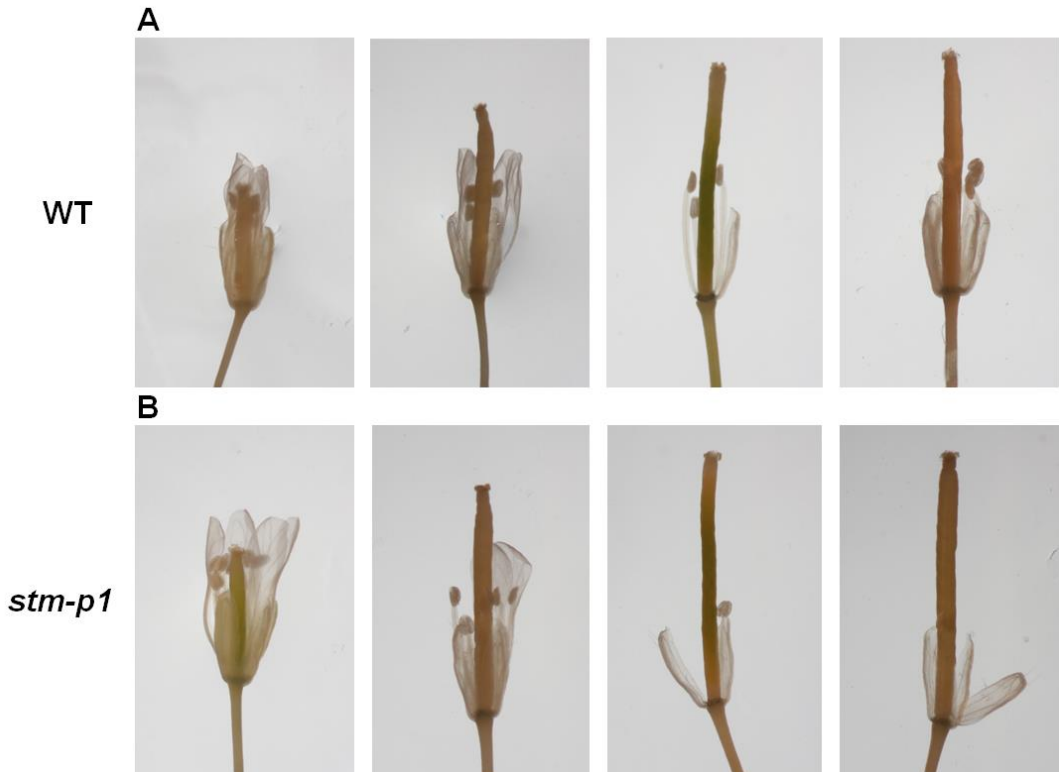


Figure 10. *K NAT1* expression around the floral abscission zone of *stm-p1*.
*K NAT1**pro::GUS* expression in the flower and siliques of WT (A) and *stm-p1* (B)

6. 약한 *pol*과 *pll1* 돌연변이 대립유전자의 교차에 의한 비-유식물 치사성 *pol pll1* 이중 돌연변이의 선별

기존의 강한 *pol-6 pll1-1* 이중 돌연변이의 경우 중축의 관다발 부재로 인한 유식물 치사성을 나타내기 때문에 접붙이기를 통해서 유식물 이후의 표현형을 관찰할 수 밖에 없었다. 이러한 난점을 극복하기 위하여 새로운 약한 이중 돌연변이를 선별 하기 위해 *PLL1*의 프로모터 주변에 T-DNA 삽입을 가지고 있는 돌연변이들을 활용하여(Fig. 11), *pol-6*와 교배하여 새로운 이중 돌연변이 조합을 분리하였다. 이들 중에서 *pol-6 pll1-1* (Fig. 12A)과 *pol-6 pll1-3* (Fig. 12B)는 유식물 치사성의 표현형이 나타났고, 약 10%의 *pol-6 pll1-4*는 부분적인 기능상실 돌연변이 표현형을 가지고 있어서 중축의 관다발을 형성함으로써 자생적으로 뿌리를 생성할 수 있었고(Fig. 12C), 11dag에서는 측근이 발달하는 것을 확인하였다(Fig. 12D). 유식물의 뿌리길이를 측정 한 결과, 뿌리가 전혀 자라지 못한 *pol-6 pll1-1* 에 비해 *pol-6 pll1-4*에서는 짧지만 뿌리가 자라는 것을 확인할 수 있었다.(Fig. 13) 근단분열조직의 리포터 유전자 *SCARECROWpro:GUS* (Fig. 14A,B), 정지중심부(quiescent center, QC)의 리포터 유전자 *WOX5pro:GUS* (Fig. 14C,D), 경단분열조직의 리포터 유전자 *CLV3pro:GUS* (Fig. 14E,F)의 발현 양상을 *pol-6 pll1-4* 이중 돌연변이에서 조사한 결과 야생형 배경에 비해서 크게 감소한 것을 확인할 수 있었다.

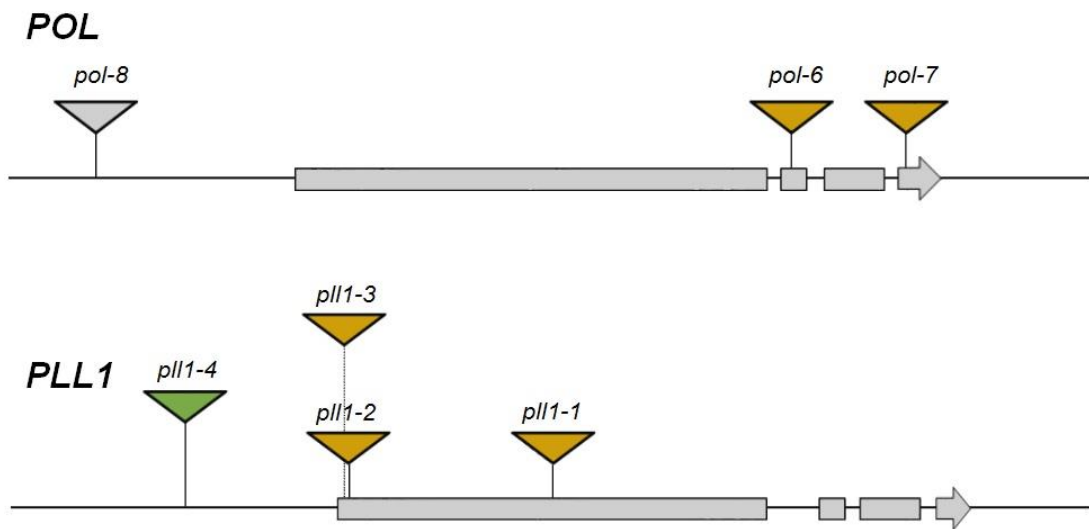


Figure 11. A diagram of the T-DNA insertion alleles for *POL* and *PLL1*.

T-DNA insertion mutant alleles used for the screening of weak non-seedling-lethal *pol pll1*

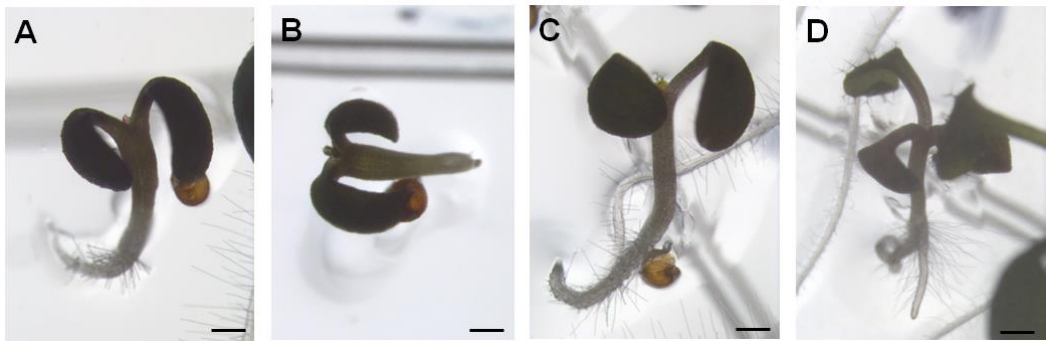


Figure 12. Phenotypes of weak *pol-6 pll1-4*.

(A) *pol-6 pll1-1*. (B) *pol-6 pll1-3*. (C, D) *pol-6 pll1-4*.

5-d-old (A-C) and 11-d-old (D) seedling were grown vertically

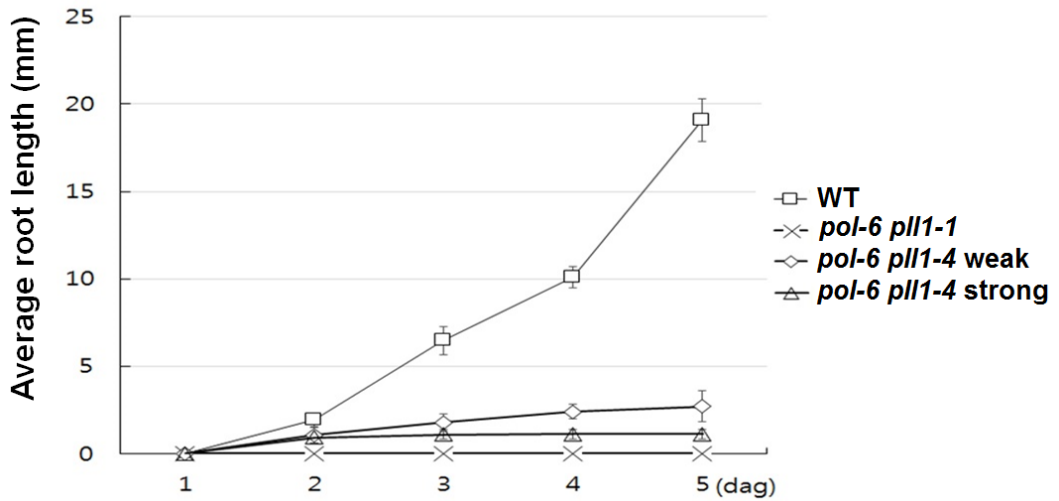


Figure 13. Average root length of *pol pll1* double mutants.

pol-6 pll1-4 weak and strong indicate non-seedling-lethal and seedling-lethal, respectively. At least 10 seedlings were measured for each mean. Error bars indicate standard deviation.

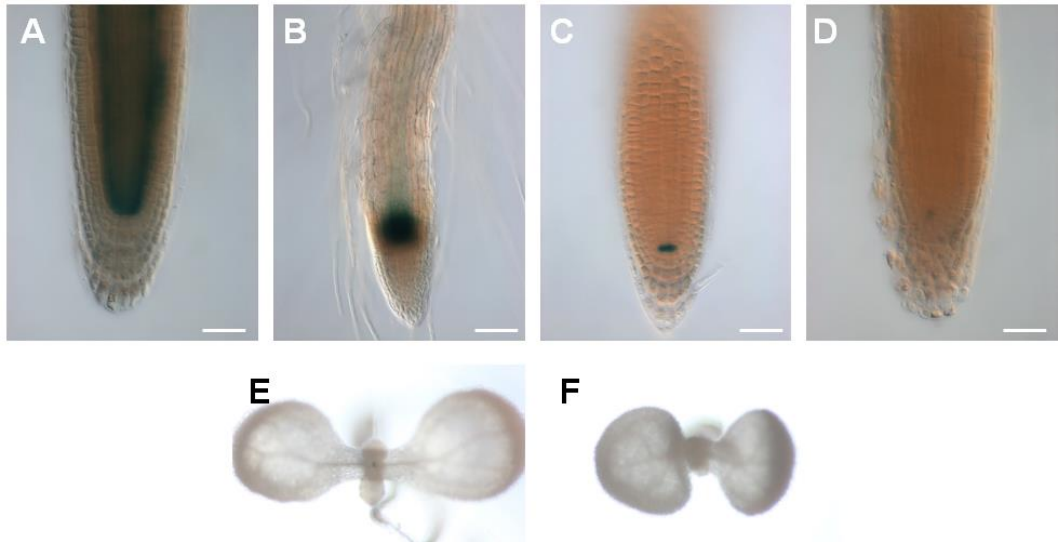


Figure 14. The compromised expression patterns of *SCR*, *WOX5*, and *CLV3* in *pol-6 pll1-4* seedlings.

SCRpro:GUS (A-B), *WOX5pro:GUS* (C-D), *CLV3pro:GUS* (E-F) expression was observed in WT (A, C, E) and *pol-6 pll1-4* (B, D, F) seedling at 4 days after germination.

7. 후-배발생과정에서 *pol-6 pll1-4*는 *wus*의 표현형을 모사

*pol-6 pll1-4*의 후-배발생적인 기관들을 관찰한 결과, *pol-6 pll1-4*의 후배표현형은 야생형(Fig. 15A-C)과 달리 경단분열조직이 소실되거나 암술이 없는 *wus*과 매우 유사하다(Fig. 15D-F). *clv2 pol-6 pll1-4*와 *clv3 pol-6 pll1-4*의 3중 돌연변이를 제조하여 표현형을 관찰한 결과 지상부의 표현형이 회복되지 않는 것을 영양생장단계, 화서형성단계 및 꽃 기관의 형성단계에서 확인할 수 있었다. 3중 돌연변이들의 후기 발달과정을 관찰한 결과, 지상부가 발달하여 화서를 형성하였다(Fig. 15G-I). 또한 꽃을 발달하는 ABC모델에서 C기능을 담당하면서 꽃 기관에서의 *WUS* 발현을 억제하는 *AGAMOUS (AG)* 유전자와 *POL/PLL1* 사이의 유전학적인 상호작용을 조사하기 위하여 *ag-1 pol-6 pll1-4*의 삼중돌연변이를 제조한 결과, *ag-1* 돌연변이에서 생성되는 무한한 꽃받침과 꽃잎의 형성 반복이(Fig. 16C) 삼중돌연변이 배경에서는 중단된 것으로 나타났다(Fig. 16F). *pol-6 pll1-4*와 야생형의 꽃에서의 기관 수를 계수한 결과, 꽃받침, 꽃잎은 이중 돌연변이와 야생형이 큰 차이가 없고, 수술은 야생형에 비해 감소하였으며, 암술은 이중 돌연변이에서는 존재하지 않는 것을 확인할 수 있었다(Table 2). 이러한 실험 결과는 *POL/PLL1*이 *CLV2*, *CLV3* 및 *AG*에 대해 유전학적으로 상위에 있음을 의미한다.

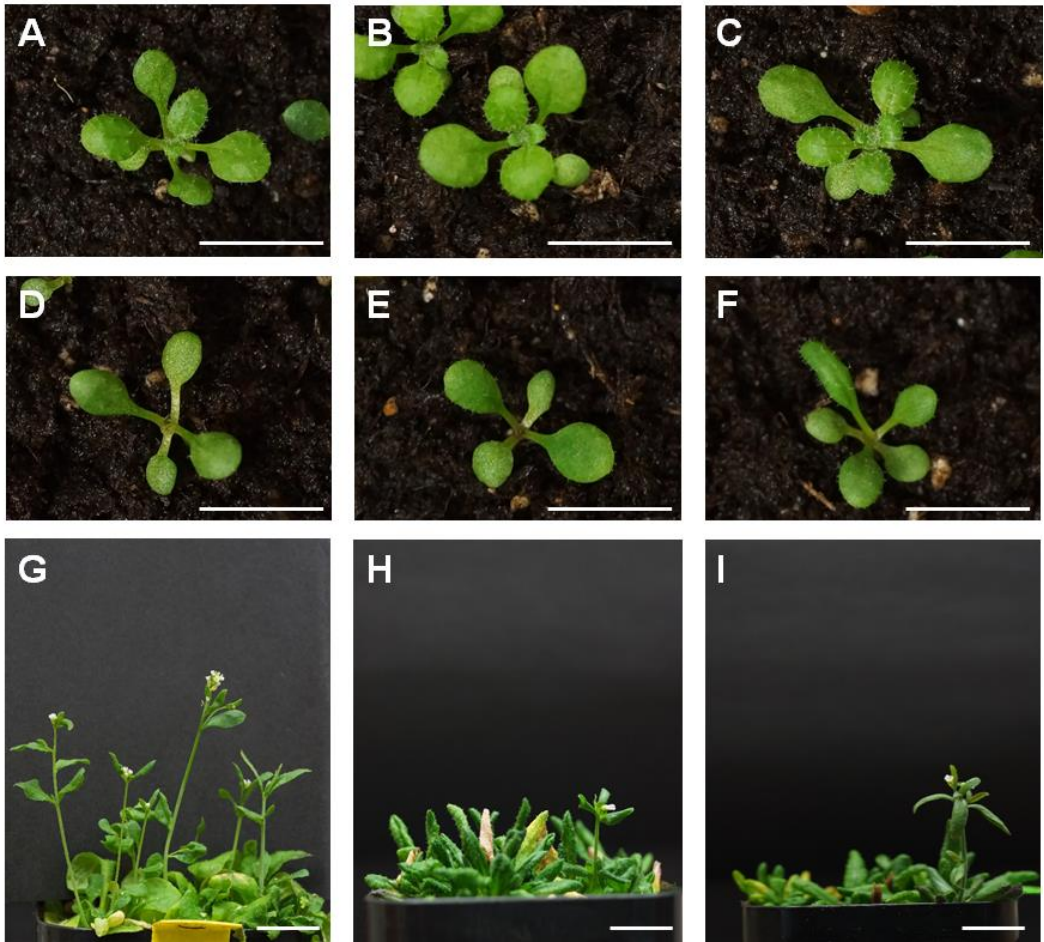


Figure 15. Phyllotaxis and inflorescence phenotypes of *pol-6 pll1-4*, *clv2-1 pol-6 pll1-4*, and *clv3-2 pol-6 pll1-4*.

(A-F) Phyllotaxis of *Ler* (A), *clv2-1* (B), *clv3-2* (C), *pol-6 pll1-4* in *Ler* background (D), *clv2-1 pol-6 pll1-4* (E), *clv3-2 pol-6 pll1-4* (F). Scale bars = 0.5 mm. (G-I) Inflorescence of *pol-6 pll1-4* in *Ler* background (G), *clv2-1 pol-6*. Scale bars = 1 cm

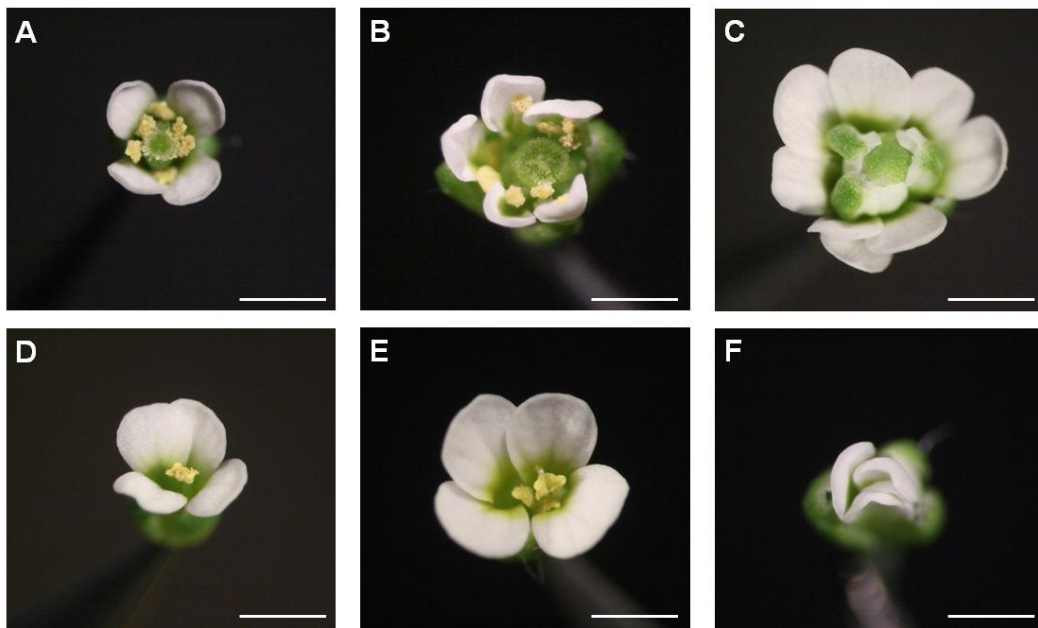


Figure 16. Floral phenotypes of *pol-6 pll1-4*, *clv3-2 pol-6 pll1-4*, and *ag-1 pol-6 pll1-4*.

Representative flower images of *Ler* (A), *clv3-2* (B), *ag-1* (C), *pol-6 pll1-4* (D), *clv3-2 pol-6 pll1-4* (E), and *ag-1 pol-6 pll1-4* (F). Scale bars = 0.5 mm.

Table 2. Mean number of floral organs in *pol-6 pll1-4* and WT

	sepals	petals	stamens	carpels
Genotype				
Col	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0
<i>pol-6 pll1-4 ER</i>	3.8 ± 0.5	3.8 ± 0.5	4.0 ± 1.0	0.0 ± 0.0
Ler	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	5.9 ± 0.3	2.0 ± 0.0
<i>pol-6 pll1-4 Ler</i>	3.8 ± 0.6	3.9 ± 0.5	2.9 ± 0.8	0.0 ± 0.0
<i>clv3-2</i>	5.5 ± 0.8	4.7 ± 0.6	8.9 ± 0.9	6.8 ± 0.8
<i>pol-6 pll1-4 clv3-2</i>	3.9 ± 0.4	3.6 ± 0.8	3.7 ± 1.0	0.0 ± 0.0

Values indicate the mean ± standard deviation. At least 20 flowers were counted for each mean.

8. PCR 및 시퀀싱을 통한 *pII1-4* 점 돌연변이의 확인

pol-6 pII1-4 이중 돌연변이는 *pol-6 pII1-1/+*에 *pII1-4*를 교배하여 약한 돌연변이를 선별하여 얻을 수 있었다. *pII1-4*는 SAIL_889_A08 라인으로써 삽입된 T-DNA는 제초제인 BASTA에 저항성을 가지고 있다. 그렇지만 약한 돌연변이 표현형을 나타내는 *pol-6 pII1-4*는 실제로 BASTA에 대한 저항성을 나타내지 않았다. 한편 *pol-6*와 *pII1-4*를 직접 교배하여 얻은 이중 돌연변이는 여전히 유식물 치사성 표현형을 나타냈다. 이러한 결과는 *pII1-4*에는 적어도 두 종류의 돌연변이가 존재할 수 있다는 것을 암시한다.

SAIL_889_A08 라인에 또 다른 돌연변이가 있는가를 확인하기 위해 SAIL_889_A08 라인에서 게놈 DNA를 추출하여 프로모터 영역과 암호화 영역에 대한 PCR을 수행하였고 염기서열을 분석한 결과 프로모터에 삽입된 T-DNA외에도 첫 번째 exon의 말단 부분에서 점 돌연변이를 확인하였다. 야생형 *PLL1*의 544번째 아미노산을 암호화하는 염기서열은 AGT로써 Ser을 암호화하는데, *pII1-4* 돌연변이에 해당되는 염기서열은 AAT로써 Asn을 암호화하고 있었다. 또한 약한 *pol-6 pII1-4*를 유도하는 약한 *pII1-4* 돌연변이에서는 삽입되었던 T-DNA가 소실된 것으로 볼 때, 인접한 두 돌연변이 좌위간에 DNA의 잭합이 발생하여 프로모터 영역에 T-DNA가 삽입된 기존의 *pII1-4*에 비하여 현저히 약한 돌연변이가 분리되었던 것이라고 설명할 수 있다.

IV. 논의

경단분열조직의 발달과정을 상세하게 이해하기 위해서는 기존에 분리된 *wus*이나 *clv1*, *clv2*, 및 *clv3* 같은 강한 표현형을 가진 돌연변이들(Clark et al., 1997; Fletcher et al., 1999; Jeong et al., 1999; Mayer et al., 1998) 외에도 redundancy로 인하여 표현형이 잘 나타나지 않는 새로운 돌연변이를 선별할 필요가 있다. 본 실험에서는 미약한 표현형을 가진 돌연변이를 선별하기 위하여 민감성 배경인 *pol-6*를 활용하였다. CaMV 35S 활성표지(Weigel et al., 2000)를 *pol-6*에 도입한 결과, 간헐적으로 실 모양의 암술군을 형성하는 미약한 *fig-1 pol-6* 돌연변이를 선별하는데 성공하였다. 실제로 *fig-1* 단일 돌연변이는 경단부나 암술대의 발달과정에서 결함을 관찰할 수 없는 매우 미약한 돌연변이로써 *STM*의 발현이 감소한 돌연변이인 것으로 밝혀졌다(Fig. 4) 이렇게 미약한 표현형을 가진 *fig-1* 돌연변이도 *pol-6* 돌연변이 배경에서는 암술의 형성에 결함을 나타냈기 때문에 표현형의 관찰을 통해서 선별할 수 있었다. 이러한 결과는 *pol* 돌연변이가 미약한 경단부 돌연변이를 선별하기 위한 적절한 민감성 배경을 제공한다는 것을 입증하는 사례이다.

기존의 TAIL-PCR 방법으로는 At1g73875에 대한 삽입지역만을 찾을 수 있었지만, 마크로젠에서 제공하는 새로운 NGS 분석 방법으로는 TAIL-PCR로는 찾을 수 없었던 새로운 T-DNA 삽입지역도 찾을 수 있었다. 이를 통해서 흥미로운 표현형을 가지고 있었음에도 LB의 삽입지역이 온전하지 않아서 연속적인 TAIL-PCR이 불가능하거나 재조합으로 인해 LB 지역의 방향성에 문제가 있는 경우에도 새로운 NGS 분석방법을 활용하면 추가적인 T-DNA의 삽입

지역을 찾을 수 있을 것으로 예상된다.

At1g62360의 프로모터 지역에 T-DNA가 삽입된 돌연변이에서는 화서의 발달과 꽃 기관의 탈리에 결함이 나타났다. At1g62360은 homeo-domain 전사 인자를 암호화하는 *STM* 유전자였다. 강한 *stm-1* 돌연변이나 상대적으로 약한 돌연변이라고 알려진 *stm-2* 돌연변이는 경단분열조직 및 꽃 기관에 심각한 결함이 발생한다. 따라서 이러한 강한 *stm* 돌연변이(Clark et al., 1996; Endrizzi et al., 1996)에서는 꽃 기관의 탈리 현상과 같은 약한 표현형을 관찰할 수 없었다. 프로모터 지역에 T-DNA가 삽입된 6종류의 돌연변이들에 대한 동형접합 돌연변이들을 확보한 결과(Fig. 2) *stm-p1*과 *stm-p3*에서 꽃 기관의 탈리에 결함이 관찰되었다(Fig. 3B,D). 한편, *stm-p1 pol-6* 이중 돌연변이를 제조한 결과, *fig-1 pol-6*에서 관찰된 실 모양의 암술 표현형이 재현되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 *fig-1* 표현형이 실제로 매우 약한 *stm* 돌연변이에 의해서 유발된다는 것을 입증한다.

*stm-p1*과 *stm-p3*의 경우 각각 개시코돈으로부터 -468 bp와 -2225 bp 상류에 T-DNA가 삽입되었고 화서의 발달과 꽃 기관의 탈리에 결함이 나타난 반면, *stm-p2*의 경우 이들의 중간에 위치한 -1460 bp 상류에 T-DNA가 삽입되었지만 야생형과 구별되는 표현형이 나타나지 않았다. 또한 RT-PCR의 결과는 *stm-p* 돌연변이들의 표현형은 *STM*의 발현 수준이 낮을수록 강해지는 것을 보여준다(Fig. 3, Fig. 4). *stm-p3*의 경우 *stm-p2*에 비해서 더 긴 프로모터 지역을 가지고 있음에도 불구하고 상대적으로 낮은 수준으로 *STM*이 발현되며, 보다 강한 돌연변이 표현형을 나타냈다. 그 원인은 두 돌연변이의 T-DNA 삽입지역들의 사이에 위치한 RB-box의 존재 때문인 것으로 설명할 수

있다. RB-box는 경단분열조직 이외의 조직에서 *STM*이 발현되는 것을 억제하는 cis-요소를 포함하고 있어서(Aguilar-Martínez et al., 2015) 프로모터 영역이 더 짧은 *stm-p2*의 경우에 도리어 높은 수준으로 *STM*이 발현되어 야생형과 유사한 탈리대가 형성된 것으로 보인다.

흥미롭게도 *stm-p1* 및 *stm-p3* 돌연변이 탈리대의 폭은 야생형의 탈리대에 비하여 감소한 반면, *stm-p1* 및 *stm-p3* 돌연변이 silique의 길이는 야생형의 것과 큰 차이가 없었다. 이러한 결과는 *STM*이 silique의 길이 성장에는 큰 영향을 미치지 못하지만 탈리대의 폭이나 탈리대 영역의 부피성장에는 관여하고 있다는 것을 의미한다. 따라서 탈리대의 발달과정에서 *STM*이 어떻게 발현되는지 조직특이적인 발현양상을 조사할 필요가 있다.

한편, *stm-p1* 돌연변이에서 *HAEpro:GUS*, *KNAT2pro:GUS*, *KNAT6pro:GUS* 및 *KNAT1pro:GUS* 등 잘 알려진 꽃 기관의 탈리대 형성에 관여하는 리포터 유전자들의 발현양상을 조사한 결과, 야생형에서 나타나는 발현양상과 명확한 차이를 관찰할 수 없었다. *stm-p1*의 탈리대의 표면에 존재하는 절단면 세포들은 야생형과 유사한 형태로 성숙하기 때문에(date not shown) 이러한 리포터 유전자들의 발현 양상과 일치하는 결과라고 설명할 수 있다. 이러한 결과들을 종합해 보면, *STM*은 전형적인 꽃 기관의 탈리대 형성과정에 직접적으로 관여하기보다는 꽃받침의 경계 형성과 탈리대의 부피 성장을 통해서 꽃받침 whorl의 분리에 관여할 가능성이 높다.

강한 *pol-6 pll1-1* 이중 돌연변이는 중축에서 관다발을 형성하지 못하여 유식물 치사성의 표현형을 나타내기 때문에 접붙이기를 통해서만 유식물 이후의 표현형을 관찰할 수 있었다(Fig. 12A). 접붙이기 방법을 사용하면 인위적인

환경을 제공하기 때문에 식물의 발달에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 단점을 극복하고자 *PLL1*의 프로모터 주변에 T-DNA 삽입을 가진 돌연변이(Fig. 11)들을 활용하여 교배를 통해 자생적으로 후-배발생적인 기관들을 생성하는 *pol-6 pll1-4* (Fig. 12C,D)를 선별하였다. 선별된 *pol-6 pll1-4*에서 경단 및 근단분열조직의 리포터 유전자의 발현 양상을 확인한 결과, 야생형 배경(Fig. 14A,C,E)에 비하여 경단 및 근단분열조직, 정지중심부의 미분화 지역이 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 14B,D,F). 일반적으로 한 유전자의 프로모터에 T-DNA가 삽입되어 전사 수준이 낮아질 경우, 약한 돌연변이를 선별할 수 있다고 예상할 수 있다. 이와 같은 이중 돌연변이의 제조과정에서도 *pol-6*는 새로운 약한 돌연변이를 선별하기 위한 민감성 배경으로 적절하게 활용되었다.

새롭게 선별된 약한 *pol-6 pll1-4* 이중 돌연변이는 삽입된 T-DNA에 의해서 BASTA 저항성을 가지고 있어야 하지만, 실제로는 BASTA 저항성이 사라졌으며, *pol-6*와 기존의 *pll1-4*를 직접 교배하여 얻은 이중 돌연변이에는 기존에 삽입된 T-DNA가 소실되었고 오직 첫 번째 엑손에 점 돌연변이만이 남아있었고, 기존의 *pll1-4*에는 T-DNA와 점 돌연변이가 모두 존재하였다. 이를 통해서 약한 *pll1-4* 돌연변이는 T-DNA의 삽입이 아닌 숨겨진 점 돌연변이에 기인하는 것을 알 수 있었다. 식물의 PP2C는 11개의 보존된 아미노산 서열 모티프가 존재하는데(Xue et al., 2008), *pll1-4*의 점 돌연변이는 3번 모티프 영역에 존재하며, 해당 아미노산은 POL/PLL1의 아미노산 서열뿐만 아니라 PLL2~PLL5(Song and Clark, 2005)에 이르기까지 공통적으로 잘 보존되어 있어서 PP2C의 활성이 상당부분 소실된 것으로 예상된다. 이러한 PP2C의 활성변화를 측정하기 위해서는 점 돌연변이의

재조합 단백질을 순수 분리하여 야생형 재조합 단백질과의 활성을 비교함으로써 검증할 필요가 있다. 한편, 이러한 점 돌연변이가 PLL1 단백질의 구조를 변화시켜 약한 돌연변이 표현형을 나타냈을 가능성도 배제할 수 없다.

V. 참고문헌

- Aguilar-Martínez, J. A., Uchida, N., Townsley, B., West, D. A., Yanez, A., Lynn, N., Kimura, S. and Sinha, N.** (2015). Transcriptional, posttranscriptional, and posttranslational regulation of SHOOT MERISTEMLESS gene expression in *Arabidopsis* determines gene function in the shoot apex. *Plant physiology* **167**, 424-442.
- Basu, M. M., González-Carranza, Z. H., Azam-Ali, S., Tang, S., Shahid, A. A. and Roberts, J. A.** (2013). The manipulation of auxin in the abscission zone cells of *Arabidopsis* flowers reveals that indoleacetic acid signaling is a prerequisite for organ shedding. *Plant Physiology* **162**, 96-106.
- Beeckman, T., Przemeck, G. K., Stamatou, G., Lau, R., Terry, N., De Rycke, R., Inze, D. and Berleth, T.** (2002). Genetic complexity of cellulose synthase a gene function in *Arabidopsis* embryogenesis. *Plant Physiol* **130**, 1883-1893.
- Bleecker, A. B. and Patterson, S. E.** (1997). Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 1169-1179.
- Butenko, M. A., Patterson, S. E., Grini, P. E., Stenvik, G.-E., Amundsen, S. S., Mandal, A. and Aalen, R. B.** (2003). Inflorescence deficient in abscission controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands in plants. *The Plant Cell* **15**, 2296-2307.
- Butenko, M. A. and Simon, R.** (2015). Beyond the meristems: similarities in the CLAVATA3 and INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION peptide mediated signalling pathways. *J Exp Bot* **66**, 5195-5203.
- Butenko, M. A., Stenvik, G.-E., Alm, V., Sæther, B., Patterson, S. E. and Aalen, R. B.** (2006). Ethylene-dependent and-independent pathways controlling floral abscission are revealed to converge using promoter:: reporter gene constructs in the ida abscission mutant. *Journal of experimental botany* **57**, 3627-3637.
- Butenko, M. A., Vie, A. K., Brembu, T., Aalen, R. B. and Bones, A. M.** (2009). Plant peptides in signalling: looking for new partners. *Trends in plant science* **14**, 255-263.

- Butenko, M. A., Wildhagen, M., Albert, M., Jehle, A., Kalbacher, H., Aalen, R. B. and Felix, G.** (2014). Tools and strategies to match peptide-ligand receptor pairs. *The Plant Cell* **26**, 1838-1847.
- Cai, S. and Lashbrook, C. C.** (2008). Stamen abscission zone transcriptome profiling reveals new candidates for abscission control: enhanced retention of floral organs in transgenic plants overexpressing *Arabidopsis* ZINC FINGER PROTEIN2. *Plant physiology* **146**, 1305-1321.
- Cho, S. K., Larue, C. T., Chevalier, D., Wang, H., Jinn, T.-L., Zhang, S. and Walker, J. C.** (2008). Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 15629-15634.
- Clark, S. E., Jacobsen, S. E., Levin, J. Z. and Meyerowitz, E. M.** (1996). The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 1567-1575.
- Clark, S. E., Williams, R. W. and Meyerowitz, E. M.** (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-585.
- Consortium, G.** (2016). 1,135 genomes reveal the global pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **166**, 481-491.
- Cosgrove, D. J.** (1998). Cell wall loosening by expansins. *Plant physiology* **118**, 333-339.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research* **19**, 1349.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J. Z. and Laux, T.** (1996). The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *The plant journal* **10**, 967-979.
- Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R. and Meyerowitz, E. M.** (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* **283**, 1911-1914.

- Gagne, J. M. and Clark, S. E.** (2010). The *Arabidopsis* stem cell factor POLTERGEIST is membrane localized and phospholipid stimulated. *The Plant Cell* **22**, 729-743.
- Gawadi, A. G. and Avery Jr, G. S.** (1950). Leaf Abscission and the So-Called" Abscission Layer". *American Journal of Botany*, 172-180.
- González-Carranza, Z. H., Elliott, K. A. and Roberts, J. A.** (2007). Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* **58**, 3719-3730.
- González-Carranza, Z. H., Lozoya-Gloria, E. and Roberts, J. A.** (1998). Recent developments in abscission: shedding light on the shedding process. *Trends in Plant Science* **3**, 10-14.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation of E. coli. *DNA cloning* **1**, 109-135.
- Hepworth, S. R., Zhang, Y., McKim, S., Li, X. and Haughn, G. W.** (2005). BLADE-ON-PETIOLE-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**, 1434-1448.
- Jeong, S., Trotochaud, A. E. and Clark, S. E.** (1999). The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *The Plant Cell* **11**, 1925-1933.
- Jinn, T.-L., Stone, J. M. and Walker, J. C.** (2000). HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes & Development* **14**, 108-117.
- Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L. J., Feldblyum, T., Nierman, W., Benito, M. I. and Lin, X.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *nature* **408**, 796-815.
- Kaur, N., Reumann, S. and Hu, J.** (2009). Peroxisome biogenesis and function. *The Arabidopsis book*, e0123.
- Kim, S.-H., Woo, D.-H., Kim, J.-M., Lee, S.-Y., Chung, W. S. and Moon, Y.-H.** (2011). *Arabidopsis* MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. *Biochemical and biophysical research communications* **412**, 150-154.

- Kumpf, R. P., Shi, C.-L., Larrieu, A., Stø, I. M., Butenko, M. A., Péret, B., Riiser, E. S., Bennett, M. J. and Aalen, R. B.** (2013). Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 5235-5240.
- Liljegren, S. J., Leslie, M. E., Darnielle, L., Lewis, M. W., Taylor, S. M., Luo, R., Geldner, N., Chory, J., Randazzo, P. A. and Yanofsky, M. F.** (2009). Regulation of membrane trafficking and organ separation by the NEVERSHED ARF-GAP protein. *Development* **136**, 1909-1918.
- Lita, P. Y., Miller, A. K. and Clark, S. E.** (2003). POLTERGEIST encodes a protein phosphatase 2C that regulates CLAVATA pathways controlling stem cell identity at *Arabidopsis* shoot and flower meristems. *Current Biology* **13**, 179-188.
- Liu, B., Butenko, M. A., Shi, C.-L., Bolivar, J. L., Winge, P., Stenvik, G.-E., Vie, A. K., Leslie, M. E., Brembu, T. and Kristiansen, W.** (2013). NEVERSHED and INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABCISSION are differentially required for cell expansion and cell separation during floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* **64**, 5345-5357.
- Liu, Y. G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. and Whittier, R. F.** (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* **8**, 457-463.
- Matsubayashi, Y.** (2011). Small post-translationally modified peptide signals in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*, e0150.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G. and Laux, T.** (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**, 805-815.
- McKim, S. M., Stenvik, G.-E., Butenko, M. A., Kristiansen, W., Cho, S. K., Hepworth, S. R., Aalen, R. B. and Haughn, G. W.** (2008). The BLADE-ON-PETIOLE genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*. *Development* **135**, 1537-1546.
- Mukherjee, K., Brocchieri, L. and Bürglin, T. R.** (2009). A comprehensive classification

and evolutionary analysis of plant homeobox genes. *Molecular biology and evolution* **26**, 2775-2794.

- Ogawa, M., Kay, P., Wilson, S. and Swain, S. M.** (2009). *ARABIDOPSIS* DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**, 216-233.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J. L. and Hake, S.** (2000). Mechanisms that control knox gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* **127**, 5523-5532.
- Osborne, D. J. and Morgan, P. W.** (1989). Abscission. *Critical Reviews in Plant Sciences* **8**, 103-129.
- Patterson, S. E.** (2001). Cutting loose. Abscission and dehiscence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**, 494-500.
- Ragni, L., Belles-Boix, E., Günl, M. and Pautot, V.** (2008). Interaction of KNAT6 and KNAT2 with BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE in *Arabidopsis* inflorescences. *The Plant Cell* **20**, 888-900.
- Roberts, J. A., Elliott, K. A. and Gonzalez-Carranza, Z. H.** (2002). Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annual review of plant biology* **53**, 131-158.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F., Jürgens, G. and Laux, T.** (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**, 635-644.
- Scofield, S. and Murray, J. A.** (2006). KNOX gene function in plant stem cell niches. *Plant molecular biology* **60**, 929-946.
- Sexton, R. and Roberts, J. A.** (1982). Cell biology of abscission. *Annual Review of Plant Physiology* **33**, 133-162.
- Shi, C.-L., Stenvik, G.-E., Vie, A. K., Bones, A. M., Pautot, V., Proveniers, M., Aalen, R. B. and Butenko, M. A.** (2011). *Arabidopsis* class I KNOTTED-like homeobox proteins act downstream in the IDA-HAE/HSL2 floral abscission signaling pathway. *The Plant Cell* **23**, 2553-2567.

- Somerville, C. and Koornneef, M.** (2002). A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature reviews. Genetics* **3**, 883.
- Song, S.-K. and Clark, S. E.** (2005). POL and related phosphatases are dosage-sensitive regulators of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Developmental biology* **285**, 272-284.
- Song, S.-K., Lee, M. M. and Clark, S. E.** (2006). POL and PLL1 phosphatases are CLAVATA1 signaling intermediates required for *Arabidopsis* shoot and floral stem cells. *Development* **133**, 4691-4698.
- Stahl, Y. and Simon, R.** (2005). Plant stem cell niches. *Int J Dev Biol* **49**, 479-489.
- Stahl, Y. and Simon, R.** (2010). Plant primary meristems: shared functions and regulatory mechanisms. *Current opinion in plant biology* **13**, 53-58.
- Stefano, G., Renna, L., Rossi, M., Azzarello, E., Pollastri, S., Brandizzi, F., Baluska, F. and Mancuso, S.** (2010). AGD5 is a GTPase-activating protein at the trans-Golgi network. *The Plant Journal* **64**, 790-799.
- Stenvik, G.-E., Butenko, M. A., Urbanowicz, B. R., Rose, J. K. and Aalen, R. B.** (2006). Overexpression of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION activates cell separation in vestigial abscission zones in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18**, 1467-1476.
- Stenvik, G.-E., Tandstad, N. M., Guo, Y., Shi, C.-L., Kristiansen, W., Holmgren, A., Clark, S. E., Aalen, R. B. and Butenko, M. A.** (2008). The EPIP peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION is sufficient to induce abscission in *Arabidopsis* through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2. *The Plant Cell* **20**, 1805-1817.
- Taylor, J. E. and Whitelaw, C. A.** (2001). Signals in abscission. *New Phytologist* **151**, 323-340.
- Tena, G., Asai, T., Chiu, W.-L. and Sheen, J.** (2001). Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current opinion in plant biology* **4**, 392-400.
- van Nocker, S.** (2009). Development of the abscission zone. *Stewart Postharvest Review* **5**.
- Wang, X. Q., XU, W. H., Ma, L. G., Fu, Z. M., Deng, X. W., Li, J. Y. and Wang, Y. H.** (2006). Requirement of KNAT1/BP for the development of abscission zones in

Arabidopsis thaliana. *Journal of integrative plant biology* **48**, 15-26.

- Weigel, D., Ahn, J. H., Blázquez, M. A., Borevitz, J. O., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Ferrándiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E. J. and Neff, M. M.** (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **122**, 1003-1014.
- Xue, T., Wang, D., Zhang, S., Ehling, J., Ni, F., Jakab, S., Zheng, C. and Zhong, Y.** (2008). Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis*. *BMC genomics* **9**, 550.
- Yadav, R. K., Perales, M., Gruel, J., Girke, T., Jonsson, H. and Reddy, G. V.** (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes Dev* **25**, 2025-2030.
- Yu, L., Simon, E. J., Trotochaud, A. E. and Clark, S. E.** (2000). POLTERGEIST functions to regulate meristem development downstream of the CLAVATA loci. *Development* **127**, 1661-1670.