

Diepoxybutane에 의해 유도된 애기장대 엽록체 돌연변이체의 분석

윤용휘 · 이정훈 · 박해진 · 강용원 · 이경민 · 신동현 · 이인중 · 김학운¹ · 김달웅*

경북대학교 농과대학 농학과
¹계명대학교 환경학부

Analysis of Chloroplast Mutants of Arabidopsis Induced by Diepoxybutane

Yong-Hwi Yoon, Jung-Hoon Lee, Hae-Jin Park, Yong-Won Kang, Kyung-Min Lee,
Dong-Hyun Shin, In-Jung Lee, Hak-Yoon Kim¹ and Dal-Ung Kim*

Department of Agronomy, College of Agriculture, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
¹Faculty of Environmental Studies, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

The *Arabidopsis* mutants involved in chloroplast development were induced by seed treatment of diepoxybutane which was rarely known mutagenic compound in plant mutagenesis. Three kinds of mutants designated as *im1*, *gev*, and *yev* were represented by the characteristics of variegated leaves, green vein with yellow leaves, and yellow green vein with green leaves respectively. We investigated the ultrastructure of chloroplast in mutated regions using transmission electron microscopy. The ultrastructure of chloroplast in wildtype showed regularly stacked grana thylakoid and stroma thylakoid while *im1*, *gev* and *yev* mutants displayed different shapes of grana stacking and stroma stacking of chloroplasts. Genetic analysis of three chloroplast mutants exhibit that divergent traits were ruled by a single recessive nuclear gene.

Key words – chloroplast mutants, diepoxybutane (DEB), mutagenesis

서 론

애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에 대한 분자생물학, 발생학적 지식은 주요 작물과 다른 식물의 연구에 중요한 기초자료가 되고 있다[9]. 애기장대는 유전체의 크기가 작고, 유전자의 반복 서열이 적으며, 세대가 짧고, 씨앗을 많이 생산하며, 좁은 공간에서 생육이 가능하기 때문에 식물 유전, 육종 분야의 모델 식물로서 많은 장점을 가지고 있다[10]. 이러한 장점으로 인해 애기장대는 돌연변이 유도가

쉬울 것으로 기대되고 실제로도 돌연변이체를 다른 식물보다 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있어 돌연변이 유기 재료로도 많이 사용되고 있다[18].

화학적 돌연변이 유기 물질인 diepoxybutane는 bi-functional alkylating 물질로 알려져 있으며 DNA의 가닥 내 혹은 다른 가닥의 염기와 결합하여 DNA 복제시에 복구 시스템에 영향을 주어 DNA의 삭제 또는 몇 개의 염기 서열에 역위를 일으키는 것으로 알려져 있다[15]. 그러나 정확히 어떻게 돌연변이를 일으키는지 그 기작은 밝혀져 있지 않지만 초파리 및 애기장대에서 돌연변이를 일으키는 것은 확실한 것으로 보고되었다[2,21].

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 053-950-5709, Fax : 053-958-6880
E-mail : dukim@knu.ac.kr

빛은 식물에서 광합성뿐만 아니라 발아, 색소체의 분화, 개화의 유도 등 많은 부분에서 영향을 미친다[8,20]. 식물은 blue light, UV, red light를 흡수하는 장치를 가지고 있으며 카로틴의 합성, 플라보노이드의 합성, 클로로필의 합성에 각각 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 고등 식물에서 원시 색소체로부터 엽록체로 분화하는데 결정적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다[20]. Neil 등에 의하면 엽록체와 잎의 발달은 서로 매우 밀접한 관계가 있고 엽록체의 발달은 핵내의 유전자와 엽록체가 가지고 있는 유전자에 의해 지배되지만 보다 결정적인 역할을 하는 것은 핵내의 유전자인 것으로 보고하였다[16]. Ronald 등에 의하면 엽록체의 발달은 초기단계, 광합성 기구 합성단계, 광합성단계, 노화단계 등 4 부분으로 나눌 수 있으며 초기 단계에서는 식물의 세포 분화가 거의 끝나고, 광합성 기구 합성 단계에서는 엽록체 수의 증가와 엽록체 크기의 증가로 잎의 크기와 부피가 증가하며, 광합성 단계에서는 광합성이 최대로 일어나고, 노화 단계에서는 광합성 기구와 잎의 노화가 함께 일어난다고 하였다[7,23]. Pyke와 Leech 등은 애기장대의 *Arc1* 돌연변이체를 분리하여 이 돌연변이체가 세포당 엽록체 수가 야생형에 비하여 많고 엽록체의 크기는 야생형에 비하여 작음을 밝혀 *ACC1* 유전자가 엽록체의 크기에 관여하는 유전자라고 하였다[19]. McCourt 등은 *FadD* 돌연변이체의 엽록체 미세구조가 리놀레닌산의 합성과 관련이 있다고 하였으며 지질의 합성에 관련된 유전자가 엽록체 발달에 영향을 주는 것으로 보고하였다[14]. Chory 등은 돌연변이체가 암상태에서도 명상태에 있는 것처럼 엽록체의 발달을 관찰하였고 *DET1* 유전자가 엽록체 발달에 깊은 관계가 있다고 주장하였다. Chory는 애기장대 하배축 길이에 관찰되는 돌연변이체를 분리하여 *HY1-HY6* 유전자가 엽록체의 미세구조에 영향을 미친다고 하였다[4]. Konez 등은 *chl* 돌연변이체를 분리하였고 이 돌연변이체들은 티라코이드 막과 관련된 돌연변이체라고 하였으며 전체적으로 연한 녹색을 나타낸다고 하였다[12]. Yoon 등은 애기장대 뿐만 아니라 다른 식물에서도 엽록체에 관련된 돌연변이체들은 엽록체의 정상적인 발달에 관여하는 유전자들과 이들의 상호작용을 밝혀 줄 수 있는 중요한 단서가 된다고 하였다[25]. 그러나 이미 보고된 엽록체에 관한 돌연변이체들은 모두 잎 전체, 또는 식물 전체의 엽록체 발달에 관여하는 돌연변이체들이다. 따라서 본 연구에서는 애기장대의

엽록체의 발달과 관련된 돌연변이체를 분리하였으며, 이들은 잎의 부위에 따라 엽록체 발달에 관여하는 유전자가 존재함을 밝혔고, 이들을 유전분석하여 핵내에 존재하는 단일 열성 유전자에 의해 유전됨을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

애기장대의 돌연변이 유기

본 연구에 공시된 애기장대는 생태형이 *Wassilewskija* (*Ws*)로서 *Arabidopsis* Biological Resource Center (*ABRC*)로부터 제공받았으며 돌연변이 유기원인 1,2,3,4-diepoxybutane (*DEB*)은 *Sigma* (*USA*)에서 구입하여 사용하였다. 애기장대 씨앗을 16시간 동안 수침 시킨 후 *DEB*가 18~22 mM로 조절된 용액에 25°C, 4시간 동안 처리한 다음 5회 수세하여 vermiculite와 peatmoss가 1:1로 혼합된 배양토를 넣은 플라스틱 파종상(70×40 cm)에 4-5립/cm²의 밀도로 파종하고 26°C, 24시간 연속광(8,000 Lux) 상태의 생장실에서 생육시켰다. 애기장대의 생장에 필요한 관수는 플라스틱 받침대를 이용하여 3일 간격으로 하부 관수를 하였으며 6일 간격으로 하이포넥스 용액을 희석하여 치비하였다. *M*₁ 개체에서 수확된 종자 중 일부를 포트 (15×15 cm)에 49립 파종하고 주요 형질별로 돌연변이의 출현정도를 조사하고 선발하였다. 선발된 돌연변이체는 다음 세대에서 개체별로 포트에 심어 돌연변이 형질이 계속 유전되는지를 조사하였다. 돌연변이가 유기된 주요 형질별로 *M*₂ 세대를 자식시키고 *M*₃ 세대에서 돌연변이체와 야생형과의 상호교배를 수행하여 그들의 *F*₁ 및 *F*₂ 집단을 양성하고 주요 형질별로 야생형과 돌연변이체의 분리비를 조사하였다[25].

실체 현미경적 관찰

야생형, *im1*, *gev*, *yev* mutants의 잎을 0.8% agarose 고체 배지 위에 두고 Zeiss stemi 200-C 실체현미경을 사용하여 1.6×10과 4×10의 배율로 관찰하고 사진촬영을 하였다.

주사 전자현미경적 관찰

애기장대를 파종하고 2주 후에 잎을 채취하고 가로 1 mm와 세로 3 mm 크기로 잘라 사용하였다. 식물 재료는 2.5% glutaraldehyde (v/v)를 0.1 M 용액에 고정된 후 phosphate buffer (pH 7.2)로 2회 세척하였다. 그리고 0.1% osmium tetroxide (w/v)를 0.1M phosphate buffer (pH

7.2) 용액에 밤새 두어 고정하였다. 그리고 초순수 물을 사용하여 20분간 세척하고 에탄올 농도를 10%, 20%에서 90%까지 점차 증가시키고 100%에서 overnight하여 탈수시켰다. 그 다음 에탄올을 100%에서 아세톤:에탄올의 비율을 4:1, 3:1, 2:1, 1:1로 하여 각각 1시간씩 둔 다음 100% 아세톤에 overnight시켰다. 아세톤을 제거하기 위하여 아세톤과 epon araldite를 1:1로 혼합한 용액에 overnight 시켜 튜브의 뚜껑을 열어 아세톤을 증발시키고 100% Epon Araldite 용액에 옮겼다. 그리고 2,3,6-tri-dimethylaminoethyl phenol과 혼합하고 mold에 넣고 37°C에 overnight시키고 60°C에서 48시간 두어 완전히 결정화시킨 다음 ultramicrotome으로 section하여 관찰하였다.

엽록체 돌연변이체의 유전분석

애기장대를 파종하고 약 3 주 후에 꽃이 피게 되는데, 완전히 개화하지 않은 꽃을 선택하여 제육하였다. 상호교배를 통하여 F₁ 종자를 얻고 이를 파종하여 F₁ 식물체를 얻은 다음, 이들을 자가수분 되도록 두어 F₂ 종자를 얻었다. F₂ 종자를 파종하고 4주 후에 분리비를 조사하였다. 그리고 야생형:돌연변이체의 분리가 3:1로 되는지 알기 위하여 χ^2 검정을 통하여 분리비가 유의성이 있는지를 검정하였고, 신뢰한계는 95% 이었다.

결과 및 고찰

DEB에 의해 유전된 엽록체에 관련된 돌연변이체의 종류 DEB가 처리된 M₂ 종자를 파종(4~5/cm²)하고 엽색과 관련된 돌연변이체를 조사한바 약 12,000개체 중에서 7개체가 선발되었는데 이중 3개 계통을 선발하여 엽록체의 전자현미경적 관찰과 유전분석을 하였다. 야생형 애기장대(생태형 Ws)의 잎은 진한 녹색을 띠며 rosette 잎이 타원형이며 trichome 들이 발달한다. Rosette 잎은 자엽이 출현한 후 분열조직 중앙에서 6~8 매 내외 엷갈리게 발생하며 중앙부위에서 bolting이 일어난다(그림 1. A, 그림 2. A). 엽록체에 관련된 돌연변이체 중 잎의 얼룩무늬(variegation)를 나타내는 돌연변이체가 선발되었는데 Redei가 연구한 *immutans* (*im*)와는 차이가 있는 것으로 사료되어 이미 명명된 돌연변이체에 번호를 주어 *im1*으로 명명하였다[22]. 이 돌연변이체의 자엽 조직은 야생형과 같은 형태를 보이

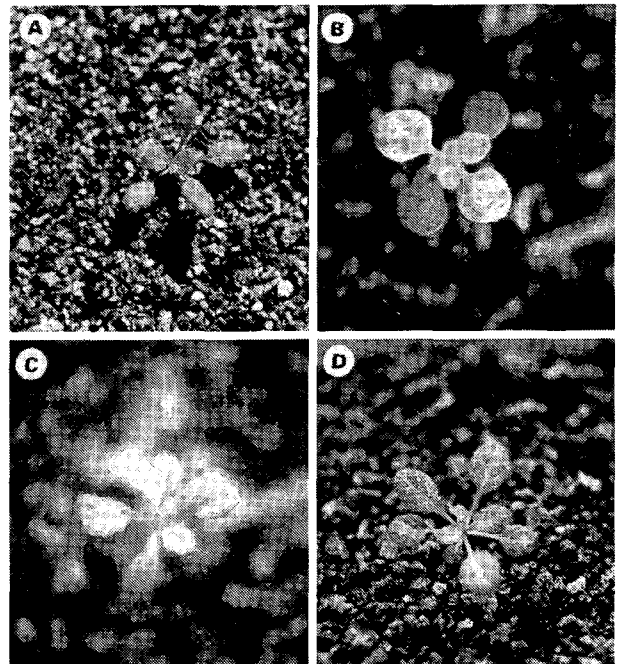


Fig. 1. Leaf phenotype of wild type, *iml*, *gev*, and *yev* seedling at 28 DAS.

The each chloroplast mutant was represented by (B); *iml*, (C); *gev*, (D)*yev*. Wild type arabidopsis (Ws) showed green leaves (A). Three chloroplast mutants were characterized by variegated leaves (*iml*), green vein with yellow leaves (*gev*), and yellow vein with green leaves (*yev*), respectively.

나 본엽이 출현하면서 잎에 얼룩무늬를 보이기 시작하였다 [3,22]. 잎은 야생형보다 약간 둥글며 잎자루가 야생형보다 짧고 식물체의 전체적인 형태가 Landsberg 생태형을 보이며 야생형의 평균 초장이 25~30 cm인데 비하여 15~20 cm정도로 작았다. 그리고 얼룩무늬 현상은 식물이 성장하면서 변화하였는데 빛이 강할수록 잎의 많은 부분이 흰색을 나타내게 되며 성장실 조건하에서 형광등 빛이 직접 도달하지 않을 때는 얼룩무늬 부분이 다시 연한 녹색을 나타내기도 하였다. 줄기는 대부분이 연한 녹색이지만 줄기에도 얼룩무늬를 나타내며 빛의 강약에 따라 잎과 비슷한 양상을 나타내었다. 꽃받침과 꽃 봉우리도 연한 녹색을 띠며 얼룩무늬는 나타나지 않았다. *im1*은 주로 잎 조직에 있어서 plastid 분화가 정지되어 색소를 형성할 수 없는 세포와 형성할 수 있는 세포가 서로 혼합되어 녹색과 백색의 얼룩무늬 잎을 형성하는 것으로 보인다 (그림 1. B, 그림 2. B). 그러나 silique에서는 전체적으로 색소가 결핍되어 엷

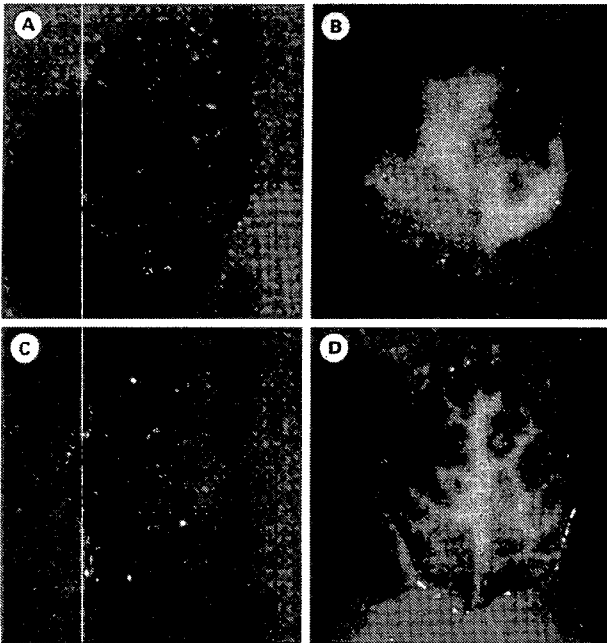


Fig. 2. Stereoscopic morphology of leaves of wild-type (A), *im1* (B), *gev* (C) and *yev* (D) mutants, respectively.

은 연두색을 띠며, 잎의 얼룩무늬는 고정적인 것이 아니라 성장함에 따라 조금씩 변화하였다. Redei에 의해 선발된 *var*는 X-ray와 EMS 처리에 의해 유도되어 4번 염색체 상에 mapping 되어 있는데 이 변이체에서는 ribonuclease 활성과 무기 인산이 축적됨으로써 비정상적인 RNA 대사가 비정상적인 엽록체와 직접적으로 관련되어 있다고 보고하였다[22]. Davies 등은 T-DNA에 chalcone synthase 유전자를 cloning하여 애기장대에 형질 전환하여 homozygote를 얻고 이를 야생형과 교배하였을 때 F₁에서 얼룩무늬를 보이는 돌연변이체를 선발하였다고 보고하였다[6]. 이런 결과는 *CHS* 유전자가 발현되어 일어난 결과라고 하였으며 이는 *CHS* 유전자도 잎의 얼룩무늬 현상에 영향을 줄 수 있다는 것을 시사한다. Sakamoto 등은 *chm* 돌연변이체가 얼룩무늬 현상을 보이는데 이는 미토콘드리아에 있는 유전자에 돌연변이가 일어났다고 보고하였고, 멘델의 방식으로 유전되지 않는다고 하였다[24]. 본 연구에서 선발된 *im1* 돌연변이체는 멘델의 방식으로 유전하는 것으로 보아 핵내에 있는 유전자에 의해 조절되는 것으로 사료되며 핵내의 유전자와 엽록체 발달과의 관계를 밝혀 줄 수 있는 중요한 돌연변이체로 사료된다(표1).

Table 1. Genetic segregation of wild type and *im1* (= 3 : 1).

| cross | generation | total | wild-type | <i>im1</i> -type | $\chi^2(3:1)$ value |
|-------------------------|----------------|-------|-----------|------------------|---------------------|
| <i>im1</i> / <i>im1</i> | | | | | |
| × | F ₁ | 18 | 18 | 0 | |
| + / + | | | | | |
| + / <i>im1</i> | | | | | |
| × | F ₂ | 176 | 130 | 46 | 0.12* |
| + / <i>im1</i> | | | | | |

*Significant at 5% level.

gev 돌연변이체 (그림1. C)는 엽록체의 돌연변이 현상이 잎맥을 따라 녹색을 나타내고 잎맥을 제외한 나머지 부분은 연한 녹색을 나타내었다. 이런 특징을 green vein이라고 하고 이 돌연변이체를 *gev*라 명명하였다. *gev*의 전체적인 크기는 약 10~12 cm 정도로 야생형에 비하여 작았고 줄기 및 화아도 연한 녹색이었으며 빛의 강도에 따라서는 돌연변이 형질이 영향을 받지 않았다(그림2. C). 그리고 엽병도 야생형보다 굵고 짧으며 녹색이었고 rosette 잎 수도 야생형 보다 4~5매 정도로 작고 rosette 잎의 크기도 야생형의 1/2 정도로 작으며 꼬투리도 연한 녹색이었는데 이와 같은 *gev*의 특성은 지금까지 보고된 적이 없는 엽록체 돌연변이체로 사료되며 *gev* 또한 핵내에 존재하는 유전자로서 엽록체와 잎의 발달에 관여하는 유전자의 관계를 밝혀 줄 수 있는 중요한 단서가 될 것이다.

yev 돌연변이체(그림2. D)는 엽록체가 잎맥을 따라 연한 녹색을 나타내며 잎맥을 제외한 나머지 부분에서는 야생형과 같은 진한 녹색이었다. 이런 특징을 본 연구에서는 yellow vein (그림3. D)이라 표현하였고 이 돌연변이체를 *yev*로 명명하였다. *yev*는 엽병, 잎 모양 등은 야생형과 같고 초장도 야생형과 같으며 줄기와 꼬투리는 엽록체 결핍이 없었지만 줄기가 야생형에 비하여 가늘고 종자 수가 적은 것이 특징이었다. *gev*는 잎맥을 따라 엽록체가 발달하고 *yev*는 잎맥을 따라 엽록체가 발달하지 않는 특성을 나타내므로 잎맥을 따라 엽록체의 발달에 관여하는 유전자가 존재함을 알 수 있었다. 이들의 표현형을 비교하여 보면 엽록체의 발달이 대조적이라는 것을 알 수 있으며 *GEV* 유전자는 잎맥을 제외한 엽육 조직의 엽록체 발달을 유도하고 *YEV* 유전자는 잎맥에 존재하는 엽록체 발달을 유도한다고 가정할 수 있다. *GEV*와 *YEV* 유전자는 지금까지 보고된

적이 없는 유전자로서 핵내에서 조절되는 엽록체 발달 기구를 설명할 수 있는 중요한 돌연변이체라 사료된다.

야생형 애기장대와 *im1*, *gev*, *yev* 엽록체의 전자 현미경적 관찰

1) 야생형 애기장대 엽록체의 전자 현미경적 관찰

야생형 애기장대를 성장실 조건에서 키운 다음 엽육조직의 엽록체를 전자현미경으로 관찰하였다(그림3. A). 야생형 애기장대의 엽록체는 티라코이드 모양이 규칙적인 배열을 하고 있으며 4~5개의 전분립이 관찰되었다. 티라코이드에는 10개 이상의 그라나가 쌓여 있고 세포당 엽록체(그림3. B)가 약 100여개가 존재한다고 알려져 있으며[11, 17], ultrathin section 했을 때 약 10~12개 정도가 노출되었는데 세포 당 엽록체 수는 거의 일정하였고 모두 블록

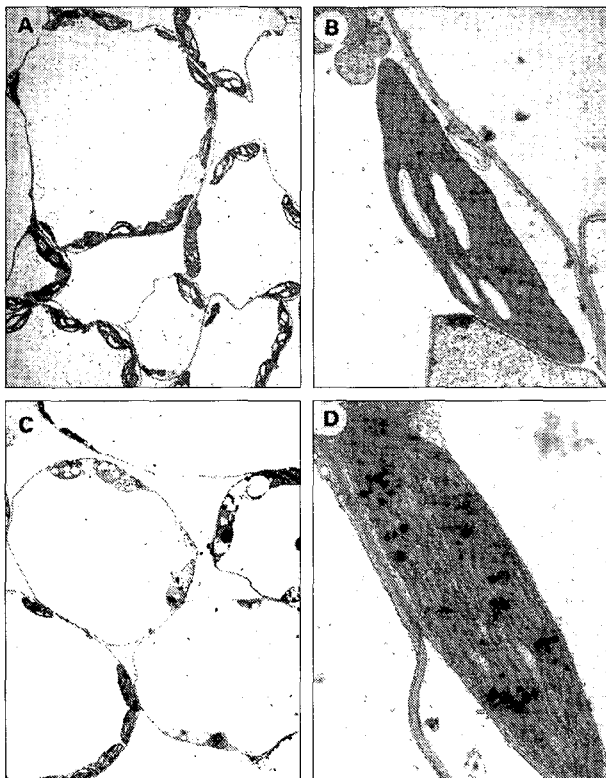


Fig. 3. The morphological differences between wild type (A and B) and *im1* mutant (C and D) was shown in the shape of chloroplast, grana, stroma, starch grain, and lipid body by transmission electron microscopy (TEM).

렌즈 모양을 하고 있었다. 그리고 엽록체의 크기는 약 6~7 μ m였고, 세포당 엽록체가 분화된 정도도 일정하였으며 엽록체 내에 있는 lipid body들이 3~4개 정도 발견되었다.

2) *im1* 돌연변이체 엽록체의 전자 현미경적 관찰

im1 돌연변이체의 엽육조직은 녹색 부분과 흰색 부분으로 나누어져 있으며 잎의 흰색 부분은 거의 엽록체가 없거나 미분화된 색소체로 보이는 세포 내 기관들이 관찰되었다(그림3. C). 세포 당 관찰되는 엽록체 수는 일정하지 않으며 크기도 야생형 엽록체보다 10 μ m로 약간 크며 엽록체의 모양은 야생형이 렌즈 모양으로 되어 있는 반면 *im1* 돌연변이체의 엽록체 모양은 소시지 형태로 발견되었다(그림3. D). 엽록체 내의 전분립의 저장 형태도 야생형에 비하여 불규칙적이며 크기는 작은 편이나 엽록체 내에 lipid body들이 야생형에 비해 많이 존재하는 것이 관찰되었다. 그러나도 규칙적으로 쌓여 있지 않고 기울어져 있으며 스트로마와 그라나의 연결도 야생형과 비교하여 불규칙적이었다. 그러나 티라코이드의 stacking도 야생형이 4~10개 이상인데 비하여 3~5개 정도로 관찰되었다.

3) *gev* 돌연변이체 엽록체의 전자 현미경적 관찰

gev 돌연변이체는 잎맥을 따라서 녹색을 나타내며 이를 제외한 부분에서는 연한 녹색을 나타내었다. *gev* 돌연변이체 엽육조직의 엽록체는 크기가 야생형은 6 μ m 내외인데 비하여 4 μ m~12 μ m 크기로 일정하지 않으며 불규칙한 starch 모양이 관찰되었다(그림4. A). 세포 내의 엽록체의 형태는 분화 정도가 다른 것으로 사료되며 렌즈 모양과 S자 모양, 불규칙한 모양을 나타내기도 하였다. 불규칙한 엽록체에서는 규칙적인 것보다 많은 수의 lipid body를 나타내기도 하고(그림4. B) 티라코이드의 stacking정도도 그라나가 4개에서 10개까지 쌓여 있어서 야생형과도 차이를 나타내었으나 스트로마 티라코이드들이 연결된 상태를 나타내었다.

4) *yev* 돌연변이체 엽록체의 전자 현미경적 관찰

yev 돌연변이체의 잎맥은 연한 녹색을 띠며 그 이외의 부분은 정상적으로 녹색을 나타내었다. *yev* 돌연변이체의 엽록체 크기는 5~10 μ m 정도로 일정하지 않고 렌즈형과 부정형 등도 관찰되었다(그림4. C). 전분립도 엽록체 내에서 발견되었고 모양은 야생형에 비하여 불규칙적이었다. 그리고 각 세포마다 엽록체의 형태가 부정형을 보이기도

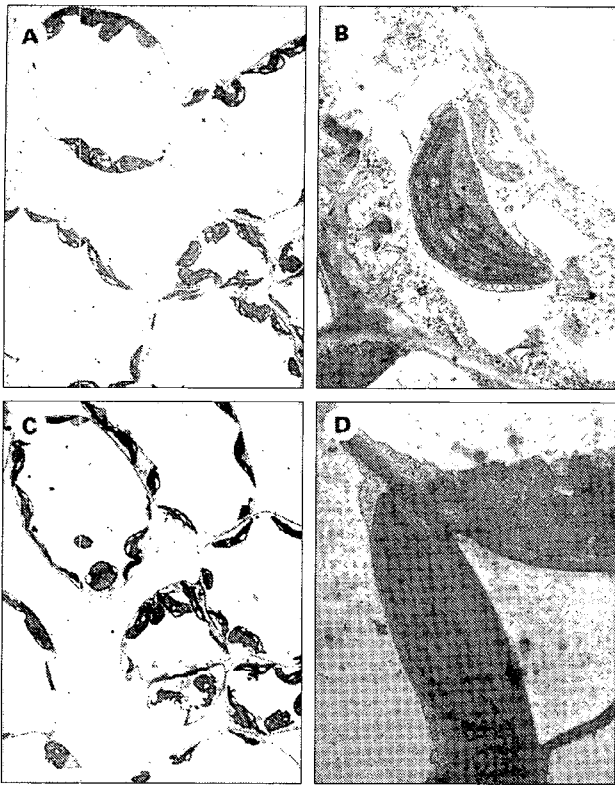


Fig. 4. The morphological differences between *gev* (A and B) and *yev* mutant (C and D) was shown in the shape of chloroplast, grana, stroma, starch grain, and lipid body by transmission electron microscopy (TEM).

하였고 그라나의 stacking은 4~5개정도 쌓여 있으며 그라나의 길이도 길었으며(그림4. D) lipid body도 야생형에 비하여 수가 많은 것으로 관찰되었다.

im1, gev, yev 돌연변이체의 유전 분석

im1 돌연변이체를 유기하고 M₄ 세대에서 야생형과 교배하여 F₁을 얻었다[5]. F₁ 식물체는 모두 야생형이었으며 상호교배를 하였을 때도 같은 결과를 나타내었다. F₁을 자가수분하여 F₂ 씨앗을 얻고 이를 전개하여 F₂세대에서 표현형의 분리비를 조사하여 본 결과 야생형과 *im1* 돌연변이체 비율이 3:1로 분리하였으며, 통계적으로 유의성이 있는지는 χ^2 검정을 이용하였다(표1). 이 결과로 미루어 보아 *im1* 돌연변이는 엽록체나 미토콘드리아에 존재하는 유전자의 돌연변이가 아니고 핵내에 있는 유전자에 돌연변이가 일어난 것을 알 수 있었다. *gev, yev* 돌연변이체도 F₂ 세대에서 χ^2

검정결과 통계적으로 유의하게 3:1로 분리하는 것으로 보아 *gev, yev* 형질을 지배하는 유전자도 역시 핵내에 존재하는 것을 알 수 있었다(표2, 표3). *im1, gev, yev*의 유전적 관계를 분석하기 위하여 *gev*×*yev*, *im1*×*gev*, *im1*×*yev*를 교배하여 F₂ 세대의 분리비를 조사하였다. *gev*×*yev*를 교배하였을 때 F₁은 모두 야생형이었으며 *gev, yev*의 double mutant를 얻지 못하여 정확하게 F₂ 세대에서 9:3:3:1로 분리하는 지는 알 수 없었다. 그러나 F₂의 분리비로 보아 *gev*와 *yev*가 교배되었을 때는 치사인자가 되는 것으로 사료되나 이 두 유전자가 서로 매우 가까운 위치에 연관되어 있어 F₂에서 double mutant가 출현하지 않았을 가능성도 있다. *im1*×*gev*를 교배하였을 때 F₂에서 9:3:3:1로 분리하였고 *im1, gev*의 double mutant를 얻었으며 이 double mutant는 *im1*과 *gev*의 특성을 모두 나타내고 있는데 *gev*의 특성인 잎맥을 따라서는 진한 녹색을 나타내고 잎의 가장자리에서는 *im1*의 특성을 나타내었다. 그러나 *gev*의 특성은 잎맥을 따라 진한 녹색을 나타내는데 비해 double mutant에서는 잎의 중앙 위쪽이 *gev*의 특성이 제한되고 *im1*의 특징을 나타내게 된다. *im1*의 특성인 얼룩무늬 현상도 *gev*에 의해 잎맥 부위에서는 전혀 나타나지 못하지만

Table 2. Genetic segregation of wild type and *gev* (= 3 : 1).

| cross | generation | total | wild-type | <i>gev</i> -type | $\chi^2(3:1)$ value |
|-------------------------|----------------|-------|-----------|------------------|---------------------|
| <i>gev</i> / <i>gev</i> | | | | | |
| × | F ₁ | 35 | 35 | 0 | |
| + / + | | | | | |
| + / <i>gev</i> | | | | | |
| × | F ₂ | 316 | 241 | 75 | 0.26* |
| + / <i>gev</i> | | | | | |

*Significant at 5% level.

Table 3. Genetic segregation of wild type and *yev* (= 3 : 1).

| cross | generation | total | wild-type | <i>yev</i> -type | $\chi^2(3:1)$ value |
|-------------------------|----------------|-------|-----------|------------------|---------------------|
| <i>yev</i> / <i>yev</i> | | | | | |
| × | F ₁ | 11 | 11 | 0 | |
| + / + | | | | | |
| + / <i>yev</i> | | | | | |
| × | F ₂ | 168 | 127 | 41 | 0.027* |
| + / <i>yev</i> | | | | | |

*Significant at 5% level.

잎 전체적으로는 *im1*의 특성도 나타내었다. *im1*×*yev*의 교배에서도 F₂ 세대의 분리비가 9:3:3:1로 나타났으며 *im1*, *yev*의 double mutant를 얻을 수 있었다. 이 double mutant는 *im1*과 *yev*의 특성을 동시에 가지고 있으며 중앙 잎맥을 따라서는 *yev*의 특성을 나타내지만 중앙 잎맥을 제외한 엽조직에서는 *yev*의 특성을 나타내지는 못하였다. 그러나 *im1*의 특성은 *yev* 유전자에 관계없이 잎 전체적으로 나타내어 *im1* 유전자가 *yev* 유전자 보다 상위에 존재하는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 DEB를 애기장대 종자에 처리하여 엽록체 발달에 관련된 돌연변이체들을 분리하였다. 이들은 각각 그 특징에 따라 *im1*, *gev*, *yev*로 명명하였으며 *im1*은 잎에 얼룩무늬를 나타내는 돌연변이체이며, *gev*는 엽맥에만 녹색을 나타내고 이외의 잎에서는 연한녹색을 나타내며, *yev*는 엽맥은 연한녹색을 나타내고 엽맥 이외의 잎에서는 녹색을 나타내었다. 주사 전자현미경을 이용하여 엽록체 상세구조를 관찰하여 본 결과 야생형 엽록체의 그라나 티라코이드의 모양은 규칙적인 배열하는 그라나가 쌓여 있었으나, *im1*, *gev*, *yev* 돌연변이체에서는 그라나 티라코이드의 모양이 불규칙하며 그라나의 수도 불규칙하며 스트로마 티라코이드의 연결도 야생형과 상이함을 보였다. 그리고 이들을 유전분석한 결과 야생종과 돌연변이체의 F₂에서 3:1의 분리비를 나타내어, 이들 돌연변이들은 핵내에 존재하는 유전자에서 돌연변이가 일어났음을 알 수 있었고, 단일 열성으로 유전됨이 밝혀졌다.

참 고 문 헌

- Aluru, M. R., H. Bae, D. Wu and S. R. Rodermel. 2001. The *Arabidopsis thaliana* *immutans* mutation affects plastid differentiation and the morphogenesis of white and green sectors in variegated plants. *Plant Physiology* **127**, 67-77.
- Carmical J. R., A. Kowalczyk, Y. Zou, B. Van Houten, L. V. Nechev, C. M. Harris, T. M. Harris and R. S. Lloyd. 2000. Butadiene-induced intrastrand DNA cross-links: a possible role in deletion mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 19482-19489.
- Chen, M., M. Jensen and S. Rodermel. 1999. The *yellow variegated* mutant of *Arabidopsis* is plastid autonomous and delayed in chloroplast biogenesis. *J. Heredity* **90**, 207-214.
- Chory, J. and C. A. Peto. 1990. Mutations in the DET1 gene affect cell-type-specific expression of light-regulated genes and chloroplast development in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 8776-8780.
- Csaba K., J. Shell, and N. H. Chua. 1992. *Methods in Arabidopsis research*. pp. 16~82, World scientific publishing Co. Pte. Ltd.
- Davis, G. J., M. A. Sheikh, O. J. Ratcliffe, G. Goupland and I. J. Furner. 1997. Genetics of homology-dependent gene silencing in *Arabidopsis*; a role for methylation. *Plant Journal* **12**, 791-804.
- Dinkins R., M. S. Reddy, M. Leng and G. B. Collins. 2001. Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* MinD1 gene alters chloroplast size and number in transgenic tobacco plants. *Planta* **214**, 180-188.
- Dirk, L. M. A., M. A. Williams and R. L. Houtz. 2001. Eukaryotic peptide deformylases. Nuclear-encoded and chloroplast-targeted enzymes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**, 97-107.
- Hong M. 1994. The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analyses. *Genes & development* **8**, 745-756.
- Kang, H. G. and H. G. Nam. 1989. *Arabidopsis thaliana*: A new model system for molecular genetics. *Biochemistry News of Kor. Biochem. Soc.* **3**, 188-200.
- Kinsman, E. A. and K. A. Pyke. 1998. Bundle sheath cells and cell-specific plastid development in *Arabidopsis* leaves. *Development* **125**, 1815-1822.
- Koncz, C., R. Mayethofer, Z. Konz-kalman, C. N. Reiss, G. P. Redei and J. Schell. 1990. Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* **9**, 1337-1346.
- Koornneef, M., E. C. Hanbart, P. Stam, F. J. Braaksma and W. J. Feenstra. 1983. Linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *J. Heredity* **74**, 265-272.
- McCourt P., L. Kunst, J. Browse and C. R. Somerville. 1987. The effects of reduced amounts of lipid unsaturation on chloroplast ultrastructure and photosynthesis in a mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **84**, 353-360.
- Millard, J. T. and E. E. Wilks. 2001. Diepoxybutane and diepoxyoctane interstrand cross-linking of the 5S DNA nucleosomal core particle. *Biochemistry* **40**,

- 10677-10685.
16. Neil, P. S., T. P. Brutnell, A. Allen, S. L. Dellaporta, T. Nelson and J. Chen. 1996. Leaf permease1 gene of maize is required for chloroplast development. *Plant Cell* **8**, 463-475.
 17. P. Jarvis. 2001. Intracellular signalling: The chloroplast talks!. *Current Biology* **11**, 307-310.
 18. Park, S. K., Y. H. Yoon, B. C. Kim, Y. H. Hwang, I. K. Chung, H. G. Nam and D. U. Kim. 1996. Pollen of a male-sterile mutant of *Arabidopsis thaliana* isolated from a T-DNA insertion pool is not effectively released from the anther locule. *Plant Cell Physiol.* **37**, 580-585.
 19. Pyke, K. A. 1999. Plastid division and development. *Plant Cell* **11**, 549-556.
 20. Pyke, K. A. and R. Leech. 1991. Rapid image analysis screening procedure for identifying chloroplast number mutants in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Plant Physiol.* **96**, 1193-1195.
 21. Reardon, J. T., C. A. Liljestrand-Golden, R. L. Duesenbery and P. D. Smith. 1987. Molecular analysis of diepoxybutane-induced mutations at the *rosy* locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **115**, 323-331
 22. Redei, G. P. 1967. Biochemical aspects of a genetically determined variegation in *Arabidopsis*. *Genetics* **56**, 431-443.
 23. Ronald, E. S., M. F. M. Ausbel and J. Chory. 1993. Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* **74**, 784-799.
 24. Sakamoto, W., H. Kondo, M. Murata and R. Motoyoshi. 1996. Altered mitochondrial gene expression in maternal distorted leaf mutant of *Arabidopsis* induced by chloroplast mutator. *Plant Cell* **8**, 1377-1390.
 25. Yoon, Y. H. and D. U. Kim. 1997. Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* by diepoxybutane and mutant analysis. *Korean J. Breed.* **29**, 301-307.

(Received April 16, 2002 ; Accepted August 9, 2002)