

PLANT & FOREST

Increasing plant yield by modulating root hair development in *Brachypodium distachyon*

Chul Min Kim*

Division of Horticulture Industry, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea

*Corresponding author: chulmin21@wku.ac.kr

Abstract

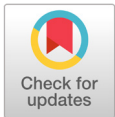
Root hair development has the potential to increase crop yields and at the same time to decrease fertilizer use, which will be required in the next 30 years to meet the demand for crop-derived commodities in a world with decreasing available natural resources. Root hair defective six (RHD6) encoding a basic helix-loop-helix transcription factor, is associated with root hair differentiation, and its roles are root hair initiation and elongation. Grass plants, rice and *Brachypodium* have been used as model plants to study the gene function of the root hair defective six like (*RSL*) subfamily which is orthologous to *AtRHD6*. The *RSL* subfamily has an identical gene function with *AtRHD6* which is involved with root hair differentiation as well. Plants with longer root hairs within a species should have an improved Pi uptake efficiency; therefore, we would expect that a plant with a high Pi uptake could contribute to increasing the plant yield. We achieved increased root hair length by manipulating the *RSL* subfamily genes. It is expected that in these transgenic plants, the long root hairs would be sufficient to improve the Pi uptake and hence improve biomass and yield component (tiller, spikelet number, and spikelet weight) of the plant. Here, we demonstrate that *Brachypodium* transgenic plants overexpressing the *BdRSL* subfamily genes have an improved biomass and grain yield. The result of this study could be applied to important crop plants like rice.

Keywords: *Brachypodium*, plant biomass, root hair, *RSL* (root hair defective six like), yield

Introduction

뿌리털은 뿌리표피의 특정 단일세포가 성장하여 형성된 것으로, 식물의 토양과 접촉 면적을 증가시켜 토양 양분의 흡수에 중요한 역할을 한다(Itoh and Barber, 1983; Clowes, 2010). 특히 토양 이동성이 적은 인산의 흡수 능력을 결정하는 중요한 결정 요인이다(Gahoonia et al., 1997).

작물인 보리(*Hordeum vulgare* L.)에서 뿌리털의 발생이 저해된 돌연변이 식물체 *Hvbrb* (*bald root barley*)를 낮은 인산 조건에서 재배하였을 때 심각한 성장 저해가 나타났으며(Gahoonia and Nielsen, 2003), 보리의 품종별 뿌리털의 길이차이와 각 품종별 인산 공급량에 따른 곡물 생산량의 변화를 관찰한 실험에서는 뿌리털의 길이와 곡물 생산량이 정의 상관관계가 있음이 보고되었다(Gahoonia and Nielsen, 2004).



 OPEN ACCESS

Citation: Kim CM. 2020. Increasing plant yield by modulating root hair development in *Brachypodium distachyon*. Korean Journal of Agricultural Science 47:305-313. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20200021>

Received: March 16, 2020

Revised: April 27, 2020

Accepted: April 28, 2020

Copyright: © 2020 Korean Journal of Agricultural Science



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Brachypodium distachyon*은 화본과 식물의 생물학적 연구에 적합한 모델식물로 밀, 보리 등과 진화학적으로 밀접한 관계가 있는 식물로 분류된다(Opanowicz et al., 2008). 농업적으로 중요한 대부분의 작물이 큰 게놈 크기와 긴 생활환을 갖는 반면 *Brachypodium*은 상대적으로 게놈(~ 275 Mb) 크기가 작아 화본과 작물의 생물학적 연구에 적합한 조건을 갖추고 있다(Garvin et al., 2008; Brkljacic et al., 2011). 또한 식물체의 크기도 기내 실험에서 다루기가 용이하며, *Agrobacterium*을 이용한 형질전환도 용이하여 유전공학 연구를 위한 식물 재료로서 큰 장점을 갖고 있다(Alves et al., 2009).

유전공학의 발달로 작물에서 뿌리털 발달에 관련된 연구도 상당히 진행되고 있다(Dolan, 2017). 작물의 뿌리털 발달에 중요한 유전자인 *RSL* (root hair defective six like) 유전자가 rice와 *Brachypodium*에서 각각3개의 유전자가 존재하는 것이 확인되었으며, 이들 유전자의 기능에 대한 연구도 수행되고 있다(Kim and Dolan, 2016; Kim et al., 2017). *RSL* 유전자는 단자엽 식물에서 뿌리털의 발생과 길이 생장에 중요한 역할을 하는 것이 증명되었으며, *RSL* 유전자의 과발현 식물체에서는 뿌리털의 수와 길이가 대조계통(control)과 비교하여 상당히 증가한 것이 관찰되었다. 또한 *Brachypodium RSL* 유전자 그룹(*BdRSL1*, *BdRSL2*, *BdRSL3*)에 옥수수 UBI 프로모터(*Zae mays Ubiquitin promoter*)로 조절되는 과발현 식물체를 생산하고, 이들 식물체를 이용한 양분흡수 능력을 평가하는 연구에서도 유전자의 과발현으로 뿌리털이 신장된 식물체에서 양분의 흡수능력이 증가한 것이 보고되었다(Kim and Dolan, 2016; Zhang et al., 2018).

본 연구에서는 *Brachypodium*에서 *RSL* 유전자 그룹에 속하는 유전자를 과발현한 형질전환식물체를 이용하여 뿌리털 길이의 신장 및 수의 증가가 *Brachypodium*의 수확량 증가에 미치는 영향을 평가하였다.

Materials and Methods

식물재료 및 재배방법

Brachypodium distachyon (line Bd21)을 실험의 재료로 사용하였다(Garvin et al., 2008). 종자를 0.1% Triton X-100가 첨가된 10% 차염소산나트륨에서 5분간 소독한 후 멸균수로 세척하였다. 균일한 발아를 위해 젖은 멸균페이퍼 위에 종자를 올려놓은 후 5°C에서 2일간 처리하였다. 소독된 종자는 1%의 sucrose와 0.5% phytigel이 첨가된 phosphate 배지(Ma et al., 2001)에서 발아시켜 5일 후 뿌리털의 발생과 길이를 관찰하였다. 또한 토양 파종을 위한 종자는 소독 후 23°C 인큐베이터에서 2일간 발아과정을 거쳐 종자를 John Innes Composts no. 1 (0.6 kg ground limestone per bag, 1.2 kg hoof and horn meal per bag, 1.2 kg superphosphate per bag, 0.6 kg potassium sulphate per bag) 상토에 파종하고, 23°C, 16/8시간(light/dark) 일장조건에서 생장시켰다.

형질전환체 제작

형질전환 *Brachypodium* 식물체는 Dr. Philippe vein 그룹(John Innes Centre, Norwich, UK)에서 분양받은 pVec8 vector를 사용하여 제작되었다.

Brachypodium (*Brachypodium distachyon* 21 inbred line) 종자를 70% ethanol과 5% 차염소산나트륨으로 소독한 후 멸균수로 세척하여 상토에서 7 - 9주 동안 키웠다. 이삭이 출현하면 멸균 상태에서 0.3 mm 길이의 immature embryo를 분리하여 MSB3 배지(100 mL Macro MS salts stock solution, 10 mL Micro MS salts stock solution, 10 mL Fe-EDTA stock solution, 30 g sucrose, 2.5 mL 2,4-D [$1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$], 2 g Phytigel, pH 5.8) 위에 올려 25°C 암조건에서 캘러스가 형성될 때까지 6주 동안 계대배양(3주/2주/1주)을 하였다. Ti-plasmid vector가 도입된 *A. tumefaciens* cell은 MGL 배지에서 OD600 = 1로 조정된 후, 캘러스와 함께 7분간 감염 후 MSB3 배지에 옮겨 2일간 공동 배양하였다.

*Agrobacterium*에 의해 감염된 캘러스는 40 mg·L⁻¹ hygromycin과 700 mL의 Timentin (320 mg·mL⁻¹)이 포함된 MSB3 배지에 옮겨 형질전환 캘러스를 선발하였다. 선발된 캘러스를 MSR26 (100 mL Macro MS salts stock solution, 10 mL Micro MS salts stock solution, 10 mL Fe-EDTA stock solution, 30 g sucrose, 2 mL kinetin [0.1 mg·mL⁻¹], 10 mL M5 vitamins stock solution, 400 mL hygromycin B [50 mg·mL⁻¹], 700 mL timentin [320 mg·mL⁻¹] 2 g Phytigel, pH 5.8)에 옮겨 신태를 형성시켰고, MS 배지에서 발근시킨 후 순화과정을 거쳐 포트에 이식하였다(Kim and Dolan, 2016). 선발된 T₂ 종자를 뿌리털의 발달과 식물체의 건물중 및 수량 구성요소의 측정에 사용하였다.

뿌리털 길이 측정

발아후 5일 된 식물체의 뿌리를 Nikon Eclipse E600 epifluor-escence light microscope (Nikon, Tokyo, Japan) 장비를 사용하여 관찰하고 Leica DFC310 FX 카메라를 통해 촬영하였다. 촬영을 통해 확보한 ImageJ 프로그램(<https://imagej.net/>)을 통해 분석하였다.

건물중 및 수량구성요소 측정

종자소독 후 실내에서 발아시킨 종자를 John Innes Composts no. 1 (0.6 kg ground limestone per bag, 1.2 kg hoof and horn meal per bag, 1.2 kg superphosphate per bag, 0.6 kg potassium sulphate per bag) 상토에 파종한 후, 23°C와 16/8시간 (light/dark) 일장조건에서 6주간 재배하며 생육을 관찰하였다. 식물체 지상부의 건물중과 수량구성요소(분얼수, 이삭수, 이삭무게)는 토양 이식 후 8주간 재배하여 완전히 건조시킨 각 라인별 10개 식물체를 이용하여 측정하였고, 엑셀프로그램(Excel 2013, Microsoft, Washington, D.C., USA)을 이용하여 통계 분석을 수행하였다.

Results and Discussion

BdRSL 그룹 유전자의 발현과 뿌리털 생장

BdRSL 그룹 유전자(*BdRSL1*, *BdRSL2*, *BdRSL3*)의 뿌리털 발달과의 상관관계를 조사하기 위해 *BdRSL* 과발현 vector *pVec8:BdRSL*을 이용하여 *Brachypodium* (*bd21* inbred line)에 형질전환을 수행하였다(Kim and Dolan, 2016).

유전자의 도입이 확인된 형질전환식물(T₀)은 토양에 순화하여 재배한 후 종자를 수확하였고, 수확한 종자를 hygromycin이 포함된 배지에 파종하여 T₁ 식물을 선발하였다. 선발된 T₁ 세대 형질전환식물에서의 *BdRSL* 그룹 유전자의 발현량은 quantitative real-time PCR을 수행하여 분석하였고 발현값 보정에는 내부 대조 유전자인 *Ubiquitin* 유전자를 이용하였다(Table 1). 그 결과 형질전환식물에서의 *BdRSL1*, *BdRSL2*, *BdRSL3* 그룹 유전자의 발현은 대조 계통(wild-type) 대비 각각 50, 200, 600배 증가하였다(Table 1). 또한 선발된 형질전환식물의 뿌리털 길이를 측정 한 결과, *BdRSL1*, *BdRSL2*, *BdRSL3* 그룹 유전자가 각각 도입된 모든 형질전환식물에서 대조 계통에 비해 100% 이상 증가한 것으로 나타났다(Fig. 1; Kim and Dolan, 2016). 반면 뿌리의 생장은 대조계통에 비해 짧아진 것이 관찰되었다(Table 1). 뿌리생장이 짧아진 원인을 확인하기 위하여 뿌리 표피세포의 길이를 측정해 본 결과 뿌리털의 길이 생장으로 뿌리표피세포에서 대조계통에 비해 세포의 길이 생장이 이루어지지 않아 전체적인 뿌리의 생장이 짧아진 결과를 가져왔음을 확인할 수 있었다.

이와 같은 결과는 basic helix-loop-helix transcription factor인 *BdRSL* 그룹 유전자가 뿌리털의 길이 생장에 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

Table 1. Summary of mRNA level, root hair length, and root length on *Brachypodium distachyon* lines compared with wild-type (WT).

Line	RNA quantity vs wild-type	Root hair length (um)	Root length (mm)
Wild-type	-	676.0 ± 11.1 ^y	62.5 ± 0.8 ^z
<i>UBI:BdRSL1</i>	X50	1294.8 ± 29.9**	39.1 ± 1.1**
<i>UBI:BdRSL2</i>	X200	1387.9 ± 32.6**	37.3 ± 1.3**
<i>UBI:BdRSL3</i>	X600	1257.3 ± 40.1**	32.9 ± 1.0**

^y Values are shown the means ± SD from 10 plants (100 hairs·root⁻¹).

^z Values are shown the means ± SD from 10 plants.

** denote significant differences for the calculated values $p < 0.01$.

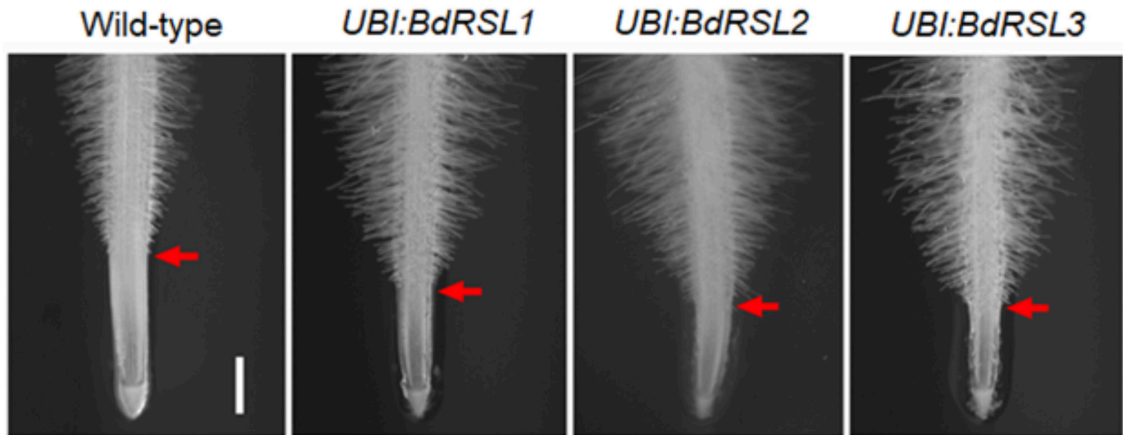


Fig. 1. Root hair phenotype on different root types of *Brachypodium* lines grown in media. Red arrows indicate the root hair initiation point. Scale: 500 μm.

형질전환식물의 biomass 변화

BdRSL 그룹 유전자가 과발현된 형질전환식물의 양분 흡수능력을 평가한 연구에서 형질전환식물의 인산 이용 효율이 높아짐이 보고된바 있다(Zhang et al., 2018). 인산의 이용효율이 높아진 형질전환식물은 식물체의 biomass도 증가할 것으로 추정하고 *BdRSL* 그룹 유전자가 과발현된 *Brachypodium* 형질전환식물의 biomass 분석 관련 실험을 수행하였다.

종자 파종 후 8주간 재배한 형질전환식물을 완전히 건조된 상태로 수확하여 biomass를 측정하였다. 완전 건조된 식물체는 지상부가 증가된 표현형이 관찰되었고(Fig. 2), 각 형질전환식물을 계통 별로 10개체의 무게를 측정한 결과 대조계통(wild-type)의 무게가 1.64 ± 0.13 g인 것에 비해 *UBI:BdRSL1*, *UBI:BdRSL2*, *UBI:BdRSL3*는 각각 2.96 ± 0.51 g, 3.59 ± 0.54 g, 4.28 ± 0.62 g으로 지상부의 무게가 증가한 것으로 나타났다. 통계 분석 결과 형질전환식물의 지상부 무게는 대조계통에 비해 유의한 차이로 증가되었음이 확인되었다(Fig. 3).

본 결과는 동일 품종의 식물에서 뿌리털의 길이가 길어진 계통은 양분의 이용 효율이 증가되어 결과적으로 지상부의 건물중이 증가될 수 있음을 시사한다.

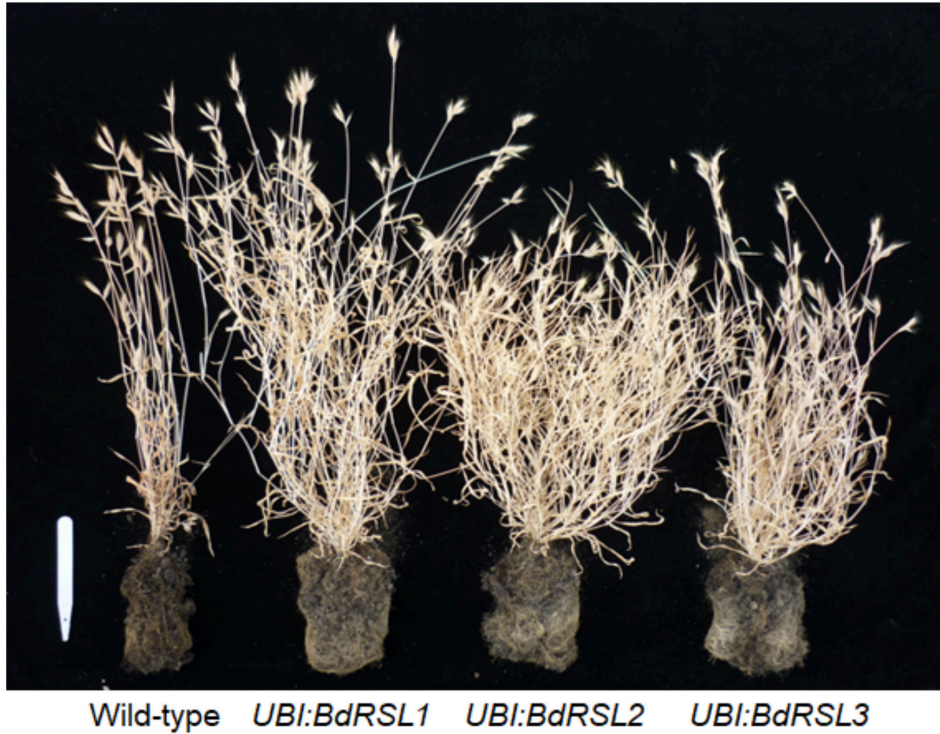


Fig. 2. Plant phenotypes of wild-type, *UBI:BdRSL1*, *UBI:BdRSL2*, and *UBI:BdRSL3* grown on John Innes Centre (JIC) no. 1 soil for 8 weeks.

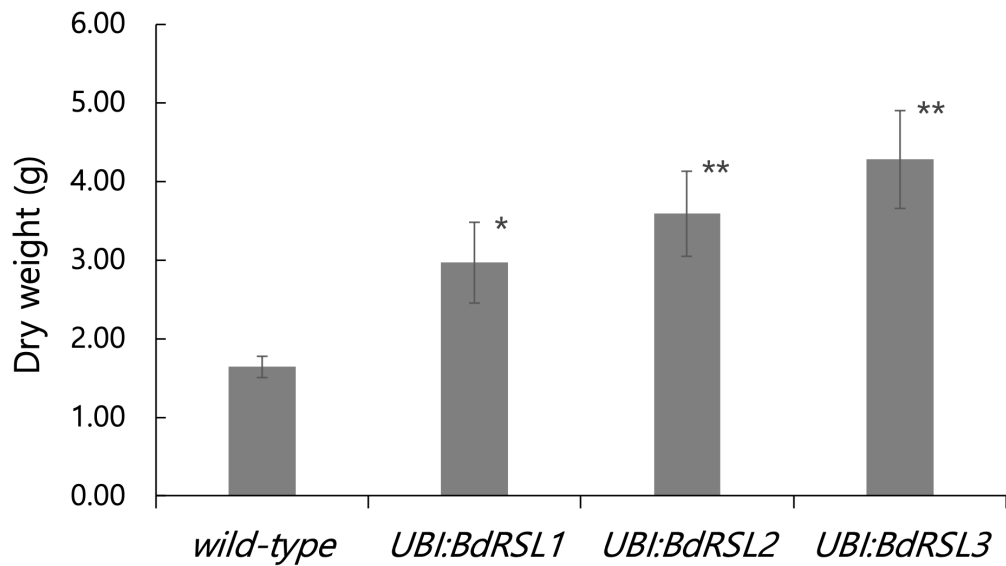


Fig. 3. Dry weights of *Brachypodium* lines (wild-type, *UBI:BdRSL1*, *UBI:BdRSL2*, and *UBI:BdRSL3*). Data shown are means \pm SE (n = 10). *, ** denote significant differences for the calculated values $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively.

형질전환식물의 수량 구성 요소 변화

작물에서의 분얼 수, 이삭 수 및 이삭의 무게는 중요한 수량 구성 요소들이다.

RSL 그룹 유전자가 도입된 형질전환식물 *UBI:BdRSL1*, *UBI:BdRSL2*, *UBI:BdRSL3* 계통 각각 10개체를 대상으로 수량 구성요소를 조사하였다. 분얼 중 유효분얼은 이삭의 수를 결정하는 중요한 표현형 중의 하나이다. *Brachypodium*에서 유효분얼을 발생시키는 요인에 대한 연구가 부족하지만 형질전환식물은 대조계통 (wild-type)의 유효분얼에 비해 유의한 차이로 증가되었음이 확인되었다. 따라서 형질전환 식물의 유효분얼경 수의 증가가 유전자의 발현과 밀접한 관계가 있다고 할 수 있다.

UBI:BdRSL1, *UBI:BdRSL2*, *UBI:BdRSL3*의 분얼경의 수는 대조계통에 비해 각각 84, 91, 114% 증가되었다. 결과를 student t-test로 통계분석하여 $p < 0.01$ 수준의 유의차를 보이며 증가된 것을 확인하였다(Fig. 4).

이삭의 수와 무게를 조사한 결과, 이삭 수는 *UBI:BdRSL1*, *UBI:BdRSL2*, *UBI:BdRSL3* 형질전환식물에서 대조계통에 비해 각각 62, 102, 104% 증가된 결과를 보였고(Fig. 5A), 이삭의 무게에서도 각각 24, 44, 31%의 증가가 확인되었다(Fig. 5B).

이들 결과에서 뿌리털의 수가 증가하고 길이 생장이 촉진된 형질전환 식물은 수량 구성 요소가 통계적으로 유의하게 증가됨이 확인되었고, 이는 뿌리털의 수 및 길이의 생장은 양분 흡수 효율성을 증가시켜 식물의 biomass 함량을 증가시키는데 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

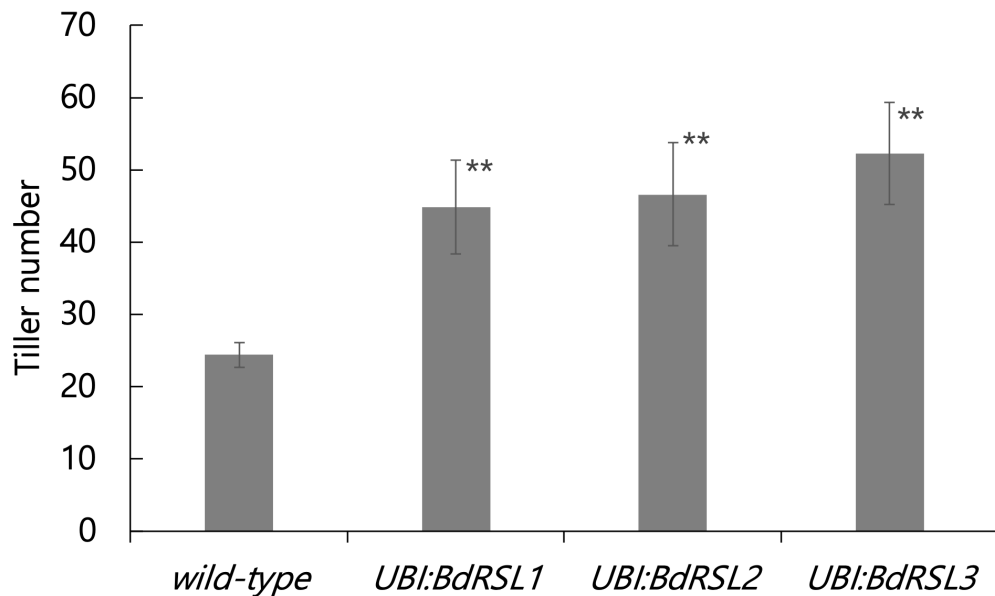


Fig. 4. Total tiller number of *Brachypodium* lines (wild-type, *UBI:BdRSL1*, *UBI:BdRSL2*, and *UBI:BdRSL3*). Data shown are means \pm SE (n = 10). ** denote significant differences for the calculated values $p < 0.01$.

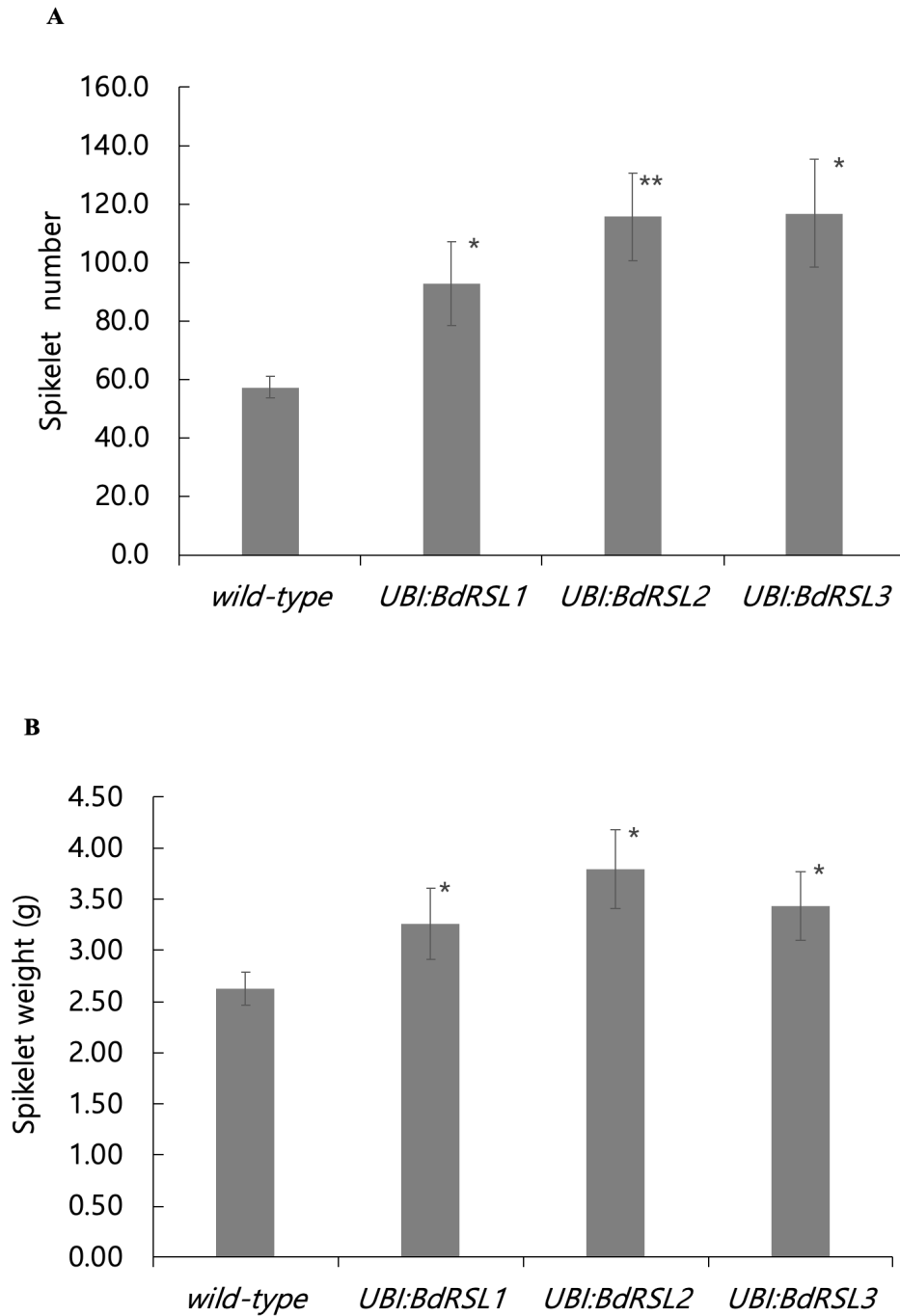


Fig. 5. Grain yield components. (A) Total spikelet number of *Brachypodium* lines (wild-type, *UBI:BdRSL1*, *UBI:BdRSL2*, and *UBI:BdRSL3*). (B) Spikelet weight of *Brachypodium* lines (wild-type, *UBI:BdRSL1*, *UBI:BdRSL2*, and *UBI:BdRSL3*). Data shown are means \pm SE (n = 10). *, ** denote significant differences for the calculated values $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively.

Conclusion

뿌리털의 길이와 수확량의 연관관계에 대한 연구는 작물(보리, 옥수수)을 중심으로 수행되어 왔고, 뿌리털의 길이가 길어진 품종에서 인산의 흡수와 수확량이 증가됨이 보고된바 있다(Gahoonia and Nielsen, 2004).

본 연구에서는 유전자 기능연구를 기반으로 최신 형질전환기술을 활용하여 뿌리털이 길어진 화본과 작물의 수량성 증가에 대해 평가하였다. 유전자의 조절로 현대 육종가들이 원하는 길어진 뿌리털의 초형을 갖는 식물체를 만들고, 개선된 형질을 이용하여 뿌리털과 수량증가와의 상관관계를 분석하여 생명공학기술로 뿌리털의 형태를 조절하여 수량을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 연구의 재료로 이용된 *Brachypodium*은 단자엽 식물의 모델식물로 전세계적으로 단자엽 식물연구에 활용가치가 높은 화본과 식물이다. *Brachypodium*은 거의 모든 화본과 식물의 유전자를 포함하고 있어 유전체 연구를 위한 좋은 재료이다. 화본과 모델식물인 *Brachypodium*에서의 유전체 연구는 진화학적으로 최근에 분리된 식량작물인 벼, 밀, 보리, 옥수수에 활용이 가능하다는 장점을 갖추고 있다.

Acknowledgements

이 성과는 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단(National Research Foundation of Korea)의 지원을 받아 수행된 연구임(2019R1F1A1063818).

Author Information

Chul Min Kim, <https://orcid.org/0000-0002-6661-0974>

References

- Alves SC, Worland B, Thole V, Snape JW, Bevan MW, Vain P. 2009. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nature Protocol* 4:638-649.
- Brkljacic J, Grotewold E, Scholl R, Mockler T, Garvin DF, Vain P, Brutnell T, Sibout R, Bevan M, Budak H, Caicedo AL, Gao C, Gu Y, Hazen SP, Holt BF, Hong SY, Jordan M, Manzaneda AJ, Mitchell-Olds T, Mochida K, Mur LAJ, Park CM, Sedbrook J, Watt M, Zheng SJ, Vogel JP. 2011. *Brachypodium* as a model for the grasses: Today and the future. *Plant Physiology* 157:3-13.
- Clowes FA. 2010. Pattern in root meristem development in angiosperms. *New Phytologist* 146:83-94.
- Dolan L. 2017. Root hair development in grasses and cereals (Poaceae). *Current Opinion Genetics and Development* 45:76-81.
- Gahoonia TS, Care D, Nielsen NE. 1997. Root hairs and phosphorus acquisition of wheat and barley cultivars. *Plant Soil* 191:181-188.
- Gahoonia TS, Nielsen NE. 2003. Phosphorus (P) uptake and growth of a root hairless barley mutant (bald root barley, brb) and wild type in low- and high-P soils. *Plant Cell Environment* 26:1759-1766.
- Gahoonia TS, Nielsen NE. 2004. Barley genotypes with long root hairs sustain high grain yields in low-P field. *Plant Soil* 262:55-62.
- Garvin DF, Gu YQ, Hasterok R, Hazen SP, Jenkins G, Mockler TC, Mur LAJ, Vogel JP. 2008. Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research. *Crop Science* 48:69-84.
- Itoh S, Barber SA. 1983. A numerical solution of whole plant nutrient uptake for soil-root systems with root hairs. *Plant Soil* 70:403-413.

- Kim CM, Dolan L. 2016. Root hair defective six-like class I genes promote root hair development in the grass *Brachypodium distachyon*. *PLoS Genetics* 12:1006211.
- Kim CM, Han CD, Dolan L. 2017. RSL class I genes positively regulate root hair development in *Oryza sativa*. *New Phytologist* 213:314-323.
- Ma Z, Bielenberg DG, Brown KM, Lynch JP. 2001. Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environment* 24:459-467.
- Opanowicz M, Vain P, Draper J, Parker D, Doonan JH. 2008. *Brachypodium distachyon*: Making hay with a wild grass. *Trends Plant Science* 13:172-177.
- Zhang C, Simpson RJ, Kim CM, Warthmann N, Delhaize E, Dolan L, Byrne ME, Wu Y, Ryan PR. 2018. Do longer root hairs improve phosphorus uptake? Testing the hypothesis with transgenic *Brachypodium distachyon* lines overexpressing endogenous RSL genes. *New Phytologist* 217:1654-1666.