

## 현사시나무에서 *Auxin/indole-3-acetic acid 1 (Aux/IAA1)* 유전자 분리 및 발현 특성 구명

배은경 · 최영임 · 이효신 · 최지원

### Isolation and characterization of *Auxin/indole-3-acetic acid 1 (Aux/IAA1)* gene from poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*)

Eun-Kyung Bae · Young-Im Choi · Hyoshin Lee · Ji Won Choi

Received: 10 August 2019 / Revised: 9 September 2019 / Accepted: 9 September 2019  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Auxin plays a crucial regulatory role in plant growth and development processes. Three major classes of auxin-responsive transcription factors controlled by the *Auxin/indole-3-acetic acid (Aux/IAA)*, *Gretchen Hagen 3 (GH3)*, and *small auxin up RNA (SAUR)* genes regulate auxin signaling. Aux/IAA, in particular, encodes short-lived nuclear proteins that accumulate rapidly in response to auxin signaling. In this study, we isolated a *PagAux/IAA1* gene from poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*) and investigated its expression characteristics. The *PagAux/IAA1* cDNA codes for putative 200 amino acids polypeptide containing four conserved domains and two nuclear localization signals (NLSs). Utilizing Southern blot analysis, we confirmed that a single copy of the *PagAux/IAA1* gene was present in the poplar genome. The expression of this gene is specific to leaves and flowers of the poplar. *PagAux/IAA1* expressed in the early exponential growth phase of cell-cultured in suspension. *PagAux/IAA1* expression level reduced in drought and salt stress conditions, and the presence of plant hormones such as abscisic acid. However, expression enhanced in cold stress, cambial cell division, and presence of plant hormones such as gibberellic acid and jasmonic acid.

Thus, these results suggest that *PagAux/IAA1* participates in cold stress response as well as developmental processes in the poplar.

**Keywords** Abiotic stress, auxin, cambial cells, *PagAux/IAA1*, *Populus alba* × *P. glandulosa*, suspension cell culture

#### 서 언

옥신(Auxin)은 식물의 생장과 발달 과정의 중요한 신호전달 물질로서 세포 분열, 확장 및 분화와 같은 세포 과정(cellular processes)에 영향을 미친다(Teale et al. 2006; Luo et al. 2018). 식물에서 알려진 초기 옥신 반응 유전자는 *Auxin/indole-3-acetic acid (Aux/IAA)*, *Gretchen Hagen 3 (GH3)*, 그리고 *small auxin up RNA (SAUR)*가 있다(Hagen and Guilfoyle 2002). 특히 *Aux/IAA* 유전자 패밀리는 여러 식물 종에서 발현되며, 도메인 구성에 따라 5개의 그룹으로 나누어진다(Wu et al. 2017).

*Aux/IAA* 단백질은 낮은 옥신 농도에서 초기 옥신 반응 유전자의 억제자로서 기능하고, 수명이 짧은 핵 단백질로서 4개의 보존된 도메인(Domain I ~ IV)과 2개의 nuclear localization signal (NLS) 서열을 가지고 있다. 특히 *Aux/IAA* 단백질의 도메인 III ~ IV에 옥신 반응 인자(auxin response factor, ARF)와 결합할 수 있는 아미노산 서열을 포함하고 있다(Abel et al. 1994; Dreher et al. 2006; Kim et al. 1997; Ulmasov et al. 1997b).

*Aux/IAA* 단백질과 ARF의 결합은 옥신 농도에 의해 조절된다. 세포 내 옥신 농도가 감소하면, *Aux/IAA* 단백질은 ARF 단백질에 결합하고 옥신 반응 유전자의 활성을 억제함으로써 전사 억제 인자로서 작용한다. 반대로 옥신 농도가 높아지면 *Aux/IAA* 단백질은 불안정해져 유비퀴틴-프로테아좀

E.-K. Bae (✉) · Y.-I. Choi · J. W. Choi  
국립산림과학원 산림생명공학연구과  
(Forest Biotechnology Division, National Institute of Forest Science, Suwon, 16631, Korea)  
e-mail: baek@korea.kr

H. S. Lee  
국립산림과학원 산림생명정보연구과  
(Forest Bioinformation Division, National Institute of Forest Science, Suwon, 16631, Korea)

시스템에 의해 분해되고 ARF 단백질은 초기 옥신 반응 유전자를 활성화시킨다(Calderón Villalobos et al. 2012; Parry et al. 2009; Tan et al. 2007; Weijers et al. 2005). 따라서 식물 성장과 발달은 식물 조직의 종류와 발달 과정에서 옥신 농도의 변화에 반응하여 옥신 신호전달경로에 의해 조절된다(Liscum et al. 2002; Luo et al. 2018)

식물의 스트레스 반응과 관련하여 *Aux/IAA* 유전자는 옥신 유전자 조절 네트워크와 상호 작용한다(Shani et al. 2017). 애기장대, 벼 및 수수에서 일부 *Aux/IAA* 유전자의 발현이 억제되었다(Du et al. 2013; Liscum et al. 2002; Jung et al. 2015; Song et al. 2009a; Wang et al. 2010). *AtIAA5*, *AtIAA6* 및 *AtIAA19* 유전자가 발현 억제된 애기장대는 건조에 대한 민감성이 증가된 반면 *OsIAA6* 유전자가 과발현된 벼는 건조에 대한 내성이 증가하였다(Jung et al. 2015; Shani et al. 2017). 그러나 건조, 염 및 저온과 같은 스트레스에 대한 *Aux/IAA* 유전자의 기능 분석 연구는 적어 더 많은 연구를 필요로 한다(Shani et al. 2017; Luo et al. 2018).

나무의 경우, 유칼립투스 그란디스(*Eucalyptus grandis*), 테다 소나무(*Pinus taeda*) 및 트리코카파 포플러(*Populus trichocarpa*)에서 형성층과 목부 발달에 관여하는 *Aux/IAA* 유전자 패밀리의 발현 연구가 보고되었다(Goldfarb et al. 2003; Nilsson et al. 2008; Yu et al. 2015). 특히 트리코카파 포플러의 genome에서 35개의 *Aux/IAA* 유전자가 동정되었고, *PtrIAA14.1* 유전자가 식물의 형태 변화에 기여하는 것으로 보고되었다. 이 사실은 *PtrIAA14.1*을 애기장대에 과발현시켰을 때 잎의 관다발 형태를 변화시켰으므로써 확인하였다(Kalluri et al. 2007; Liu et al. 2015). 그러나 나무의 *Aux/IAA* 유전자의 기능은 대부분 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 나무에서 기능이 잘 알려지지 않은 *Aux/IAA* 유전자를 현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)에서 분리하여 구조를 밝히고, 세포 성장, 형성층 발달, 비생물적 스트레스 및 식물호르몬 처리에 따른 발현 특성을 조사하였다. 이러한 결과를 토대로 *Aux/IAA* 유전자의 도입과 발현 조절을 통하여 바이오매스 증진 및 스트레스 저항성 나무 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)를 식물재료로 사용하였으며, 모든 시료는 채취 후 즉시 액체질소에 얼린 다음 -70°C에 보관하였다. 현사시나무 삼목묘는 1년생 줄기를 20 cm로 잘라 포트에 이식한 후 25°C, 광주기 16시간 조건의 온실에서 3개월 동안 생장시켰다. 잎, 줄기 및 뿌리는 1년생 삼목묘에서 각각 채취하였고, 꽃은 약 25년생의 현사시나무에

서 3월에 채취하였다(Bae et al. 2009). 형성층 발달을 관찰하기 위하여 Druart et al. (2007)의 방법으로 시료를 준비하였다. 형성층은 포지에서 생육 중인 2년생 현사시나무의 줄기에서 4월 12일부터 4월 21일까지 3일 간격으로 채취하였다.

### 현탁배양세포 배양

현탁배양세포는 잎을 이용하여 현탁배양배지에서 유도하였다. 현탁배양세포의 세포 생장은 Lee et al. (2007)의 방법으로 준비한 현탁배양세포를 사용하여 계대 후 28일 동안 4일 간격으로 현탁배양세포를 수거하고 생중량을 측정하여 조사하였다. 현탁배양배지는 sucrose 30 g/L와 2,4-D 1.0 mg/L, NAA 0.1 mg/L, 6-BAP 0.01 mg/L가 첨가된 MS배지(Murashige and Skoog 1962)를 pH 5.8로 조절하였다. 그리고 121°C에서 15분간 고압멸균하였다(Lee et al. 2005). 배양 온도와 광 조건은 각각 22 ± 1°C와 20 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>이었고, 진탕배양 속도는 130 rpm이었다(Lee et al. 2005).

### Total RNA 분리 및 cDNA합성

Total RNA는 acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 추출 방법(Chomczynski and Sacchi 1987)에 따라 TRI Reagent (TRI18, Molecular Research Center, USA)를 사용하여 분리하였다. 8일령의 현탁배양세포에서 분리한 1 μg의 total RNA를 주형으로 One Step RNA PCR kit (RR024, Takara, Japan)을 이용하여 매뉴얼에 따라 전장의 *Aux/IAA* cDNA를 합성하였다. 이 반응에 사용된 프라이머는 현탁배양세포 유래의 EST (expressed sequence tag) 분석(Lee et al. 2005)을 통해 선별한 *Aux/IAA* 유전자의 염기서열을 바탕으로 5'-AATATTGCAA CCCTTGCCCATCACC-3' (Forward)와 5'-TGGCAGCAGCA AATCTAACACATG-3' (Reverse)를 제작하였다.

### *Aux/IAA* 유전자의 염기서열 분석

*Aux/IAA* cDNA의 염기서열을 결정한 다음 Vector NTI v.10.0 (Invitrogen, USA)을 이용하여 예상 아미노산 서열 및 분자량을 조사하였다. 예상 아미노산 서열의 상동성 분석은 NCBI의 BLAST를 이용하여 수행하였다(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). 예상 아미노산 서열을 이용한 세포 내 위치 예측을 위하여 iPSORT program (<http://wolfsort.org/>)(Bannai et al. 2002)을 사용하였다. 이미 알려진 단백질 영역을 모아 놓은 PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>)를 이용하여 단백질에 존재하는 보존 영역을 조사하였다(Sigrist et al. 2005). 단백질의 상동성 분석은 Uniprot program (<http://www.uniprot.org/align/>)으로 ClustalW algorithm을 사용하였다. Phylogenetic trees는 MEGA4.1 (<http://www.megasoftware.net/index.html30>)을 사용하여 Neighbor-Joining 방법으로 작성하였다.

## Southern blot 분석

현사시나무 잎으로부터 MagaExtractor Plant Genome (NPK501, Toyobo, Japan)을 이용하여 매뉴얼에 따라 genomic DNA를 분리하였다. 10 µg의 genomic DNA를 10 U의 제한효소 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III 및 *Xba*I를 이용하여 각각 완전히 절단하였다. 제한효소로 절단된 genomic DNA를 에탄올 침전 방법으로 회수하고 1% agarose gel에 전기영동하였다. DNA를 capillary transfer 방법으로 nylon membrane (Hybond-XL, Amersham-Pharmacia Biotech, UK)에 전이시켰다(Southern 1975). Probe로 사용할 cDNA의 방사능 표지를 위하여 Multiprime labelling kit (Amersham, USA)를 이용하여 매뉴얼에 따라 반응시켰다. Membrane을 10 ml의 1× PerfectHYB plus hybridization buffer (Sigma, USA)에 넣고 68°C, 1시간 동안 전 처리하였다.  $\alpha$ -<sup>32</sup>P로 표지한 전장의 *PagAux/IAA1* cDNA probe를 hybridization 반응액에 첨가하고 68°C에서 12시간 동안 hybridization하였다. 반응이 끝난 membrane은 0.2× SSC-0.1% SDS 용액으로 65°C에서 15분간 3회 세정하였다. Membrane을 X-ray 필름에 부착한 다음 -70°C에서 3일간 노출시킨 후 현상하였다(Lee et al. 2005).

## 비생물적 스트레스 및 식물호르몬 처리

건조와 염 스트레스 처리를 위하여 현탁배양세포에 250 mM mannitol과 150 mM NaCl을 각각 처리한 다음 2시간과 10시간 동안 진탕배양하였다. 저온 처리는 현탁배양세포가 들어 있는 삼각플라스크를 2°C 얼음 수조에 정치하고 2시간과 10시간 동안 진탕배양하였다. 그리고 현탁배양세포를 건조, 염 및 저온 처리한 시간에 따라 각각 회수하였다. 식물호르몬 처리를 위하여 현탁배양세포에 25 µM abscisic acid (ABA), 20 µM gibberellic acid (GA), 10 µM jasmonic acid (JA) 및 20 µM salicylic acid (SA)를 각각 첨가하고 0.5시간과 5시간 동안 배양한 후에 회수하였다. 모든 배양세포는 진공펌프를 이용하여 배지를 제거하고 액체질소에 얼린 다음 -70°C에 보관하였다(Bae et al. 2009).

## Northern blot 분석

10 µg의 total RNA를 1.2% formaldehyde agarose gel에 전기영동한 다음 capillary transfer 방법을 이용하여 Hybond-XL nylon membrane에 전이시켰다. Probe 합성과 hybridization은 Southern blot 분석과 동일한 방법으로 실시하였다. Membrane을 X-ray 필름에 부착한 다음 -70°C에서 1일간 노출시킨 후 현상하였다. mRNA의 발현 정도를 ImageJ 1.4 software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)를 사용하여 산출하였다.

## 형성층의 해부학적 특성 조사

형성층의 해부학적 특성을 확인하기 위하여 채취한 줄기 시료를 0.5 × 0.5 cm 크기로 잘라서 고정액에 담아 48시간, 4°C에서 고정시켰다. 고정액은 2.5% glutaraldehyde와 1.6% paraformaldehyde를 포함하도록 제조하였다. 고정된 시료를 에탄올로 탈수한 다음 Technovit 7100 (Kulzer, Germany)을 침투시켜 블록을 제작하였다. 블록은 microtome (Leica RM 2165, Germany)으로 3 µm 두께로 잘라 슬라이드에 고정시켰다. 슬라이드는 0.1% periodic acid와 schiff 용액, toluidine blue O로 염색한 후에 광학현미경(Leica DMR, Germany)로 관찰하였다(Kang et al. 2004).

## 결과 및 고찰

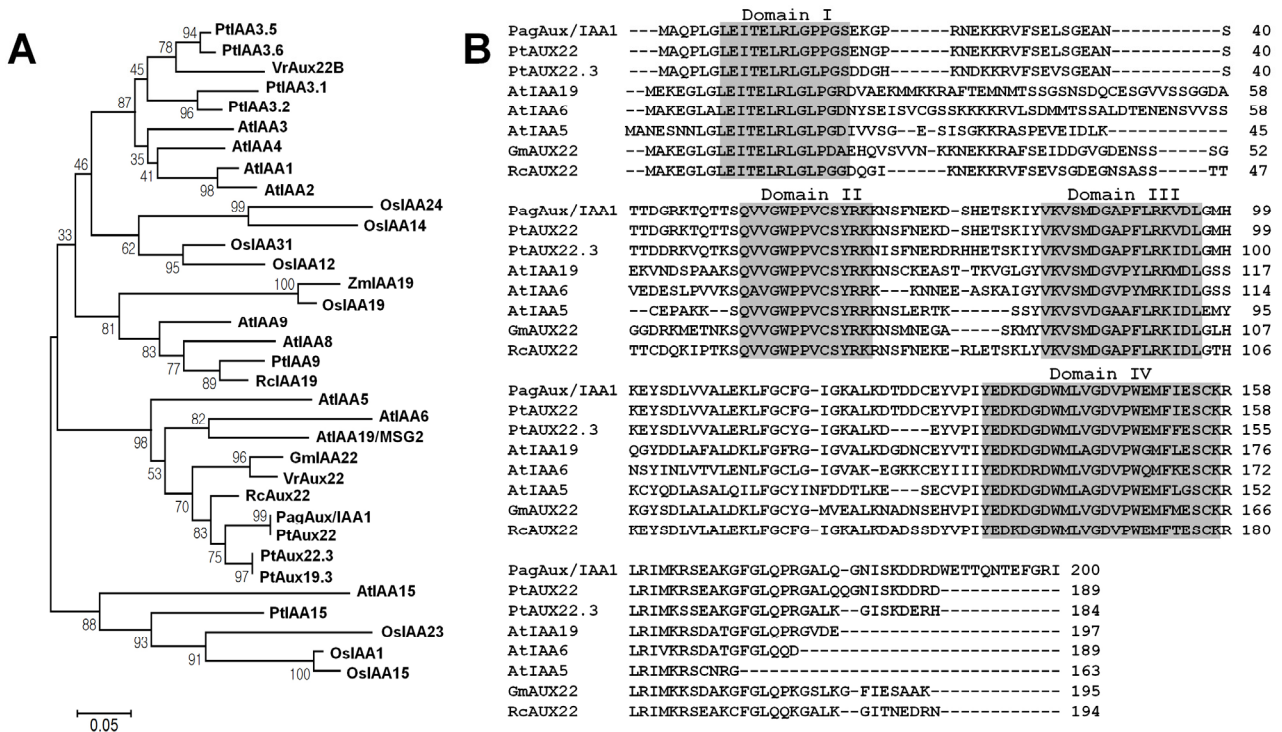
### *PagAux/IAA1* 유전자의 분리 및 아미노산 서열 특성 분석

현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*) 현탁배양세포 유래의 cDNA library (Lee et al. 2005)로부터 auxin 반응 유전자와 상동성을 나타내는 1개의 클론을 선발하였다. 이 유전자 서열을 바탕으로 840 base pair (bp)의 cDNA를 합성하여 염기서열을 결정하였다. 이 유전자는 603 bp의 open reading frame (ORF)을 가지는 200개의 아미노산으로 구성되며 아미노산의 예상 분자량은 22.7 kDa이다.

이 유전자의 아미노산 서열을 NCBI의 blastP를 이용하여 분석한 결과, 옥신 반응 유전자 중 *Auxin/Indole-3-Acetic acid* (*Aux/IAA*) 패밀리와 상동성이 높았다. 특히 *P. trichocarpa*의 *Aux/IAA* 도메인을 포함하는 기능이 알려지지 않은 PtAux22 (Potri.001G177500.1)와 99% 및 PtAux22.3 (Potri.003G056900.1)과 88%의 상동성을 나타내었다(Fig. 1A). 따라서 현사시나무에서 분리한 전장의 cDNA를 *PagAux/IAA1* (*Populus alba* × *Populus glandulosa* *Auxin/Indole-3-Acetic Acid 1*) (MN413593)으로 명명하였다.

다른 식물 유래의 *Aux/IAA* 단백질과 상동성을 분석한 결과, *PagAux/IAA1*의 아미노산 서열은 아주까리(*Ricinus communis*)와 옥수수(*Zea mays*)의 *Aux22*에 각각 77%와 68%의 상동성을 나타내었다. 또한 애기장대에서 보고된 29개 *IAA* 유전자 중 AtIAA19의 아미노산 서열과 61%의 상동성을 나타내었다(Fig. 1A). 따라서 *PagAux/IAA1* 단백질은 *Aux/IAA* 유전자 패밀리에 속하는 *Aux22*와 유사하였다.

*PagAux/IAA1* 단백질은 기존에 알려진 *Aux/IAA* 유전자 패밀리와서와 같이 4개의 보존된 도메인(I~IV)과 2개의 nuclear localization signal (NLS) 서열을 가지고 있었다(Fig. 1A). *PagAux/IAA1* 단백질의 도메인 I은 “TELxLxLPG” 모티프를 가지고 있었다(Fig. 1B). *P. trichocarpa*에서 보고된 PtIAA의 도메인 I은 “LxLxL” 또는 “TELxLxLPG”로 구성되며, 애기장



**Fig. 1** Comparison of amino acid sequences in PagAux/IAA1 and other Aux/IAA homologues. (A) Phylogenetic tree based on PagAux/IAA amino acid sequence and Aux/IAA sequences from *Populus trichocarpa* (Pt), *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Zea mays* (Zm), *Ricinus communis* (Rc), *Glycine max* (Gm), and *Vigna radiata* (Vr). (B) Multiple alignment of deduced amino acid sequences of PagAux/IAA1 with Aux/IAA homologues from *Populus trichocarpa* (PtAux22, PtAux/IAA22.3), *Arabidopsis thaliana* (AtIAA5, AtIAA6, AtIAA19), *Glycine max* (GmAUX22), and *Ricinus communis* (RcAUX22). Amino acid domains (I: repression domain, II: F-box binding domain, III-IV: Dimerization domain) are indicated as shaded portions

대에서도 유사하였다(Kalluri et al. 2007). 특히 도메인 I에 포함된 “LxLxL” 모티프는 옥신 반응 인자(Auxin response factor, ARF)의 기능을 억제하는데 관여한다(Tiwari et al. 2004).

PagAux/IAA1은 “VGWPPV” 모티프를 가지고 있었다(Fig. 1B). Aux/IAA 단백질의 안정성과 관련된 도메인 II는 주로 “VGWPPV” 또는 “VGWPPI” 모티프를 가지고 있다. “VGWPPV”를 포함하는 13개의 degron 서열을 가진 단백질은 SCF E3 ubiquitin ligase 복합체의 표적이 되어 분해되는 것으로 알려져 있다(Dharmasiri et al. 2003; Reed 2001; Sato and Yamamoto 2008). 따라서 Aux/IAA 단백질의 분해율 감소와 옥신 반응은 잘 보존된 도메인 II의 변이와 관련이 있다(Ramos et al. 2001). 도메인 III과 IV는 Aux/IAA 단백질 또는 옥신 반응 인자들과 동형이합체화 또는 이형이합체화에 관여한다. 옥신 반응 유전자의 프로모터에는 옥신 반응 cis-element를 가지고 있다. 따라서 옥신 반응 인자에 결합하여 옥신 반응 유전자의 발현을 조절하게 된다(Kim et al. 1997; Ulmasov et al. 1997a; Ulmasov et al. 1997b).

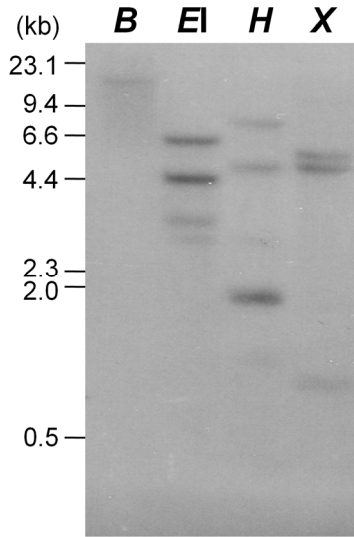
PagAux/IAA1 단백질은 2개의 NLS를 가지고 있다. NLS중 하나는 Aux/IAA 도메인 I/II 사이의 변하지 않는 KR쌍과 도메인 II에 걸쳐져 있고, 다른 하나는 Domain IV에 위치하였다(Fig. 1B). 이 결과는 목화, 토마토를 포함하는 다양한 식물

체의 Aux/IAA 도메인을 분석한 결과와 유사하였다(Han et al. 2012; Wang et al. 2005; Wu et al. 2017).

### Southern blot analysis

PagAux/IAA1 유전자의 copy 수를 확인하기 위하여 Southern blot 분석을 실시하였다. 현사시나무의 잎에서 분리한 genomic DNA를 제한효소 BamHI, EcoRI, HindIII 및 XbaI로 완전히 절단한 후 전장의 PagAux/IAA1 cDNA를 probe로 사용하였다. 그 결과 BamHI에서는 1개의 band가 나타났고 EcoRI, HindIII 및 XbaI에서는 3개의 band가 나타났다(Fig. 2). PagAux/IAA1의 cDNA 염기서열 상에 제한효소 EcoRI과 HindIII는 622 ~ 627 nt와 774 ~ 779 nt에 위치하였다.

PagAux/IAA1 유전자와 높은 서열 상동성을 보인 *P. trichocarpa*의 Aux/IAA (Potri.0001s17780.1)와 PtAux22.3 (Potri.003G056900.1)은 포플러 염색체 상에 single copy로 존재하며 인트론 부위에 제한효소 HindIII 자리를 각각 2개와 5개를 가지고 있다. 반면 제한효소 EcoRI과 XbaI은 *P. trichocarpa*의 Aux/IAA에서만 확인되었다. 이상의 결과는 PagAux/IAA1 유전자가 현사시나무의 genome 상에 single copy로 존재하는 것을 의미한다.



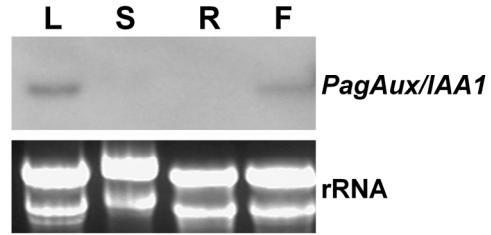
**Fig. 2** Genomic Southern blot analysis of *PagAux/IAA1* gene in the hybrid poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*). Genomic DNAs digested with *Bam*HI (B), *Eco*RI (EI), *Hind*III (H) or *Xba*I (X) were fractionated by electrophoresis on a 1.0% agarose gel and transferred onto a positively charged nylon membrane. <sup>32</sup>P-labeled full-length *PagAux/IAA1* cDNA hybridized the nylon membrane

*PagAux/IAA1* 유전자의 조직 특이적 발현

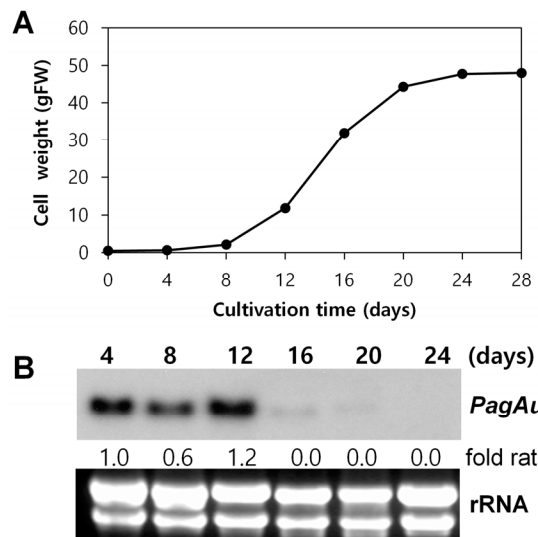
*PagAux/IAA1* 유전자의 조직 특이적 발현을 확인하기 위하여 현사시나무의 잎, 줄기, 뿌리 및 꽃으로부터 total RNA를 분리하여 northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과 *PagAux/IAA1* 은 잎과 꽃에서 발현되었다(Fig. 3). *Aux/IAA* 유전자 패밀리의 발현이 조직에 따라 차이를 보이는 것이 강낭콩, 대두, 목화, 벼 및 애기장대에서 보고되었다(Abel et al. 1995; Ainley et al. 1988; Han et al. 2012; Song et al. 2009b, Yamamoto et al. 1992). 특히 *Aux/IAA* 유전자는 애기장대에서 측근 형성, 정아 우세 및 잎의 형성과 관련이 있었다(Fukaki et al. 2002; Leyser et al. 1996; Rogg and Bartel 2001; Tian and Reed 1999; Timpte et al. 1995). 교잡종 사시나무(*Populus tremula* L. × *Populus tremuloides* Michx.)의 경우, 옥신을 처리하지 않은 어린 잎과 성숙 잎에서 *PttIAA* 유전자의 발현이 낮았다. 그러나 잎의 발달 단계에 따른 옥신 반응성을 분석한 결과, 대부분의 *PttIAA* 유전자들은 옥신을 처리한 어린 잎에서 발현이 증가되었으나 성숙 잎에서 발현이 억제되었다(Moyle et al. 2002). 이러한 결과는 *Aux/IAA* 유전자의 발현 조절이 조직 특이적 발현과 함께 발달 과정에서 옥신 신호전달경로의 반응 매커니즘의 조절과 관련되어 있음을 의미한다.

현탁배양세포의 성장 주기에 따른 *PagAux/IAA1* 유전자의 발현

현사시나무 현탁배양세포의 성장 주기에서 *PagAux/IAA1* 유전자의 발현 양상을 확인하기 위하여 각 시기별 현탁배양세



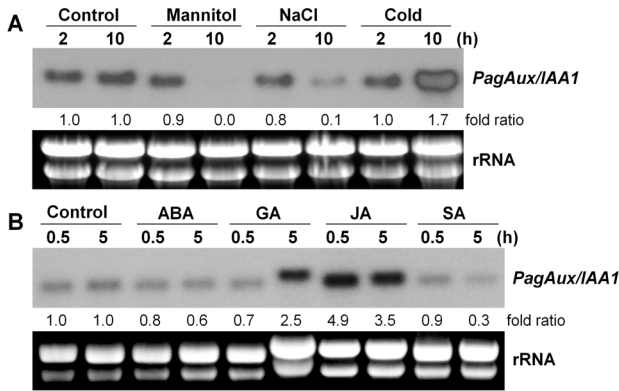
**Fig. 3** Tissue-specific expression of *PagAux/IAA1*. Northern blot analysis of total RNA extracted from mature leaves (L), stems (S), roots (R), and flowers (F) of the hybrid poplar. We used full-length *PagAux/IAA1* cDNA as the probe, and ethidium-bromide stained ribosomal RNA (rRNA) served as a loading control



**Fig. 4** Expression levels of *PagAux/IAA1* in hybrid poplar cells during the normal growth phase in suspension culture. (A) Growth kinetics of the hybrid poplar cells during suspension culture. We analyzed the fresh cellular mass by 28 days. (B) Northern blot analysis of total RNA extracted from cells at the indicated times. We used full-length *PagAux/IAA1* cDNA as the probe, and ethidium-bromide stained ribosomal RNA (rRNA) served as a loading control. Image J 1.4 software calculated the expression levels of the *PagAux/IAA1*

포로부터 total RNA를 분리한 다음 northern blot 분석을 실시하였다(Fig. 4). Fig. 4A에서 현사시나무의 현탁배양세포는 S 자형 성장 곡선을 나타내었다(Lee et al. 2007). 그리고 Fig. 4B에서 *PagAux/IAA1* 유전자는 현탁배양세포의 계대일로부터 12일까지 발현되었으나 12일 이후에는 발현이 감소하였다.

현탁배양세포에서 *PagAux/IAA1* 유전자는 세포 분열과 세포벽 형성이 활발히 이루어지는 유도기와 초기 대수증식기에 발현이 높게 나타났다. 옥신에 의해 유도된 *Aux/IAA* 단백질이 ARF 그리고 TIR-AFB와 복합체를 이루면 *Aux/IAA* 단백질의 분해가 시작되고 내분열기(endocycle)에서 유사분열기(mitotic cycle)로 전환되어 세포 분열이 이루어진다(Calderón Villalobos et al. 2012; Ishida et al. 2010; Parry et al. 2009; Tan et



**Fig. 5** Expression levels of *PagAux/IAA1* under various treatment conditions. (A) *PagAux/IAA1* expression in response to treatment with mannitol (250 mM), NaCl (150 mM), and cold temperature (2°C) for 2 and 10 h. Untreated control cells (Control) incubated for the same period. (B) *PagAux/IAA1* gene expression after exogenous application of plant hormones including ABA (25 μM), GA (20 μM), JA (10 μM), and SA (20 μM) for 0.5 and 5 h

al. 2007; Weijers et al. 2005). 반면, 세포 분열이 정지하거나 노화가 진행되는 안정기에는 발현이 되지 않았다. 이와 유사한 결과로 담배와 애기장대 잎의 노화 과정에서 대부분의 IAA 유전자의 발현이 감소된다는 것이 보고되었다(van der Graaff et al. 2006; Zhao et al. 2018). 따라서 *PagAux/IAA1* 유전자가 현사시나무의 세포 분열을 조절하는데 중요한 역할을 수행할 것으로 판단된다.

비생물적 스트레스 처리에 따른 *PagAux/IAA1* 유전자의 발현

*PagAux/IAA1* 유전자가 건조, 염 및 저온과 같은 비생물적 스트레스에 반응하여 발현되는지 확인하기 위하여 northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과 *PagAux/IAA1* 유전자는 건조 및 염 처리구 10시간에서 발현이 거의 나타나지 않은 반면 저온 처리구 10시간에서 발현이 1.7배 증가하였다(Fig. 5A). 이와 유사한 결과가 건조와 염 스트레스를 처리한 벼와 수수에서 보고되었다(Song et al. 2009a; Wang et al. 2010). 벼에서 식물호르몬과 스트레스 처리에 따른 유전자 발현을 분석한 결과 *OsIAA6*과 *OsIAA7*이 IAA, GA 및 JA에 의해 발현이 증가하였으나 건조와 염 스트레스 반응은 다르게 나타났다. *OsIAA6*는 건조 처리에 의해 발현이 증가한 반면 *OsIAA7*는 염 처리에 의해 발현이 감소하였다(Song et al. 2009a). 그리고 ABA 처리에 의해 발현이 감소한 *OsIAA4*, *OsIAA21*, *OsIAA31*은 건조와 염 스트레스에 다르게 발현되었다. *OsIAA4*와 *OsIAA21*은 건조 처리에 의해 발현이 증가하고, *OsIAA21*은 염 처리에 의해 발현이 감소하였다. 특히 *OsIAA31*은 건조와 염 처리 모두에서 발현이 감소하였다(Song et al. 2009a). 수수에서 보고된 *SbIAA* 유전자 대부분은 건조 처리에 의해 발현이 감소하였다. 그러나 *SbIAA8*, *SbIAA11*, *SbIAA22* 및 *SbIAA23*은 건조 처리한 잎에서 발현이 증가하였고, *SbIAA26*은 건조

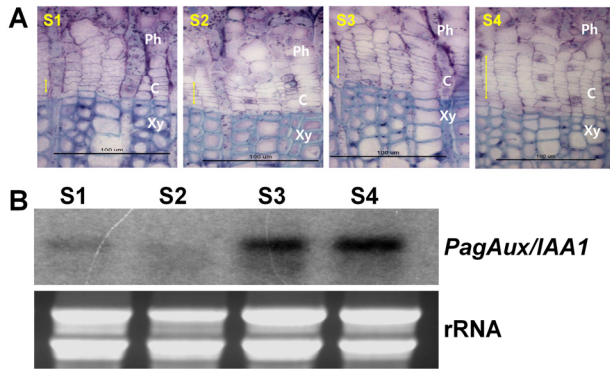
처리한 뿌리에서 증가하였다(Wang et al. 2010). 그리고 저온 처리한 애기장대의 뿌리에서 옥신 농도가 증가하고 GUS로 표지된 auxin responsive marker *AtIAA2*의 발현이 증가하면서 뿌리 생장이 저해되었다(Shibasaki et al. 2009). 따라서 *PagAux/IAA1* 유전자가 건조, 염 및 저온 스트레스에 반응하여 다르게 조절되고 현사시나무의 성장을 조절하는데 관여할 것으로 판단된다.

식물호르몬 처리에 따른 *PagAux/IAA1* 유전자의 발현

식물호르몬 처리에 따른 *PagAux/IAA1* 유전자의 발현 변화를 조사하기 위하여 abscisic acid (ABA), gibberellic acid (GA), jasmonic acid (JA) 및 salicylic acid (SA)를 처리한 현탁배양세포에서 분리한 total RNA를 사용하여 northern blot 분석을 실시하였다. *PagAux/IAA1* 유전자의 발현은 ABA와 SA 처리 5시간에서 대조구에 비해 0.6배와 0.3배 감소하였다(Fig. 5B). 반면 *PagAux/IAA1* 유전자의 발현은 GA 처리 5시간에서 대조구에 비해 2.5배 증가하였고, JA 처리 30분과 5시간에서 대조구에 비해 4.9배와 3.5배 증가하였다(Fig. 5B).

저온 스트레스에 반응하는 유전자와 달리 건조와 염 스트레스에 반응하는 유전자는 ABA 신호전달경로에 의해 조절된다(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000). 이와 관련하여 *PagAux/IAA1* 유전자의 발현을 분석한 결과 건조와 염 스트레스뿐만 아니라 ABA 처리에 의해서도 발현이 감소하였다. Du et al. (2013)에 따르면 애기장대에서 건조, 저온 및 열 스트레스에 반응하여 내인성 옥신 및 JA가 다르게 조절된다. 애기장대는 건조 스트레스에 반응하여 옥신 농도가 감소한 반면 저온 및 열 스트레스에 반응하여 옥신 농도가 증가하였다. JA 농도는 건조와 저온 스트레스에 반응하여 증가한 반면 열 스트레스에 반응하여 감소하였다. 그리고 옥신 생합성 또는 대사 관련 유전자의 발현은 저온과 열 스트레스에 의해 상향 조절되지만 건조 스트레스에 의해 억제되었다(Du et al. 2013). 또한 애기장대에 methyl jasmonic acid을 처리하면 뿌리에서 옥신 수송 단백질 및 생합성 유전자가 조절되어 옥신이 축적되고 측근이 유도되었다(Sun et al. 2009). 따라서 비생물적 스트레스 및 JA 처리에 따른 *PagAux/IAA1* 유전자의 발현 차이는 옥신 신호전달경로와 관련이 있을 것으로 판단된다.

*PagAux/IAA1* 유전자는 GA 처리에 의해 발현이 증가한 반면 SA 처리 및 노화된 현탁배양세포에서 발현이 감소하였다. GA는 애기장대의 뿌리와 교잡종 사시나무(*Populus tremula L. × tremuloides Michx.; clone T89*)의 형성층에서 PIN의 발현을 자극시켜 줄기 내 옥신 농도를 증가시킨다(Björklund et al. 2007; Willige et al. 2011). 반면 SA는 애기장대에서 Aux/IAA 단백질을 안정화시키면서 옥신의 신호전달경로를 방해하여 성장을 저해한다(Reitz et al. 2015; Wang et al. 2007). 따라서 현사시나무의 세포 성장과 관련하여 *PagAux/IAA1* 유전자의



**Fig. 6** *PagAux/IAA1* expression induced during cambial cell division. (A) A transverse section of the differentiation of cambium in hybrid poplar stems. We observed an increasing number of cell layers in the cambium (S1-S4). Ph: Phloem, C: cambium, Xy: xylem. Double yellow arrows indicate cambial cell layers. (B) Northern blot analysis of total RNA extracted from the cambium in hybrid poplar stem (S1-S4)

발현 차이는 옥신 신호전달경로의 조절과 관련이 있을 것으로 판단된다.

#### 형성층에서 *PagAux/IAA1* 유전자의 발현

형성층 발달에 따른 *PagAux/IAA1* 유전자를 분석하기 위하여 줄기의 형성층이 발달하기 시작하는 4월에 샘플을 채취하였다. S1 단계에서 형성층 세포의 분열이 시작되고 S2 단계 이후 형성층 세포 수가 증가하였다(Fig. 6A). 특히 *PagAux/IAA1*은 3개월 동안 성장한 삼목묘 줄기에서 발현이 나타나지 않는 반면 포지에서 성장한 2년생 줄기에서 형성층 세포가 발달함에 따라 발현이 증가하였다(Fig. 3과 Fig. 6B).

교잡종 사시나무(*Populus tremula* L. × *Populus tremuloides* Michx.)의 형성층 발달에 관한 연구에 따르면 옥신은 수층분열(anticlinal division)에 관여한다(Björklund et al. 2007; Moyle et al. 2002; Nilsson et al. 2008). 그리고 *PttIAA1-PttIAA8*의 8개의 유전자는 형성층 및 형성층 발달 과정에서 각각 특이적으로 발현하였다(Moyle et al. 2002). *PttIAA* 유전자는 형성층이 활성 상태에서 휴면 상태로 전이 될 때 발현이 감소하였다. 그리고 *PttIAA5*를 제외한 *PttIAA* 유전자는 분열 세포를 가지는 형성층과 세포 분열과 팽창이 일어나는 목부 조직에서 발현이 증가하였다. 특히 *PttIAA3*는 줄기의 피층, 섬유세포 및 사부 세포에서 발현이 나타나지 않았다(Moyle et al. 2002). 옥신 유도성 *PttIAA*의 조직 특이적 발현 차이 및 휴면 전이 동안의 발현 변화는 옥신 및 목부 발달에 대한 형성층 반응을 매개하는데 이들 유전자들이 관여하는 것을 의미한다(Moyle et al. 2002). 따라서 형성층 세포가 분열할 때 발현이 증가하는 *PagAux/IAA1* 유전자는 형성층 발달에 관여할 것으로 판단된다.

이상의 결과와 연구사례들은 *Aux/IAA* 유전자가 다양한 비

생물적 스트레스 및 식물호르몬에 대하여 다르게 반응하고 식물의 성장과 발달 과정을 조절하는데 기여하는 것을 보여주었다. 특히 현사시나무에서 세포 성장과 형성층 발달 그리고 저온 스트레스에 반응하여 *PagAux/IAA1* 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 성장 조절 및 저온 스트레스 반응과 관련된 *PagAux/IAA1* 유전자의 조절 기작을 구명하기 위해서는 *PagAux/IAA1* 유전자의 발현이 조절된 형질전환체를 이용한 기능 분석이 필요하다. 이는 향후 *PagAux/IAA1* 유전자의 발현 조절을 통하여 저온 스트레스 내성 증진 및 바이오매스가 증가된 임목을 개발하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

#### 적 요

옥신은 식물의 성장과 발달 과정에서 중요한 조절자로서 기능한다. 옥신 신호전달 과정은 3개의 주요 옥신 반응 전사인자인 *Auxin/indole-3-acetic acid (Aux/IAA)*, *Gretchen Hagen 3 (GH3)*, 그리고 *small auxin up RNA (SAUR)* 유전자에 의해 조절된다. 특히, *Aux/IAA*는 옥신 신호에 반응하여 빠르게 축적되는 수명이 짧은 핵 단백질이다. 이 실험에서 우리는 현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)로 부터 *PagAux/IAA1* 유전자를 분리하고 발현 특성을 분석하였다. *PagAux/IAA1* cDNA는 4개의 보존된 도메인과 2개의 nuclear localization sequence (NLS)을 포함한 200개의 아미노산을 암호화하고 있다. Southern blot 분석으로 현사시나무 genome에 *PagAux/IAA1* 유전자가 single copy로 존재하는 것을 확인하였다. *PagAux/IAA1* 유전자는 잎과 꽃에서 특이적으로 발현되었다. 그리고 *PagAux/IAA1* 유전자는 현탁배양세포의 성장 과정에서 초기 지수생장기에 발현되었다. *PagAux/IAA1* 유전자의 발현을 분석한 결과, 건조와 염 스트레스 및 식물호르몬인 ABA 처리에 의해 발현이 감소된 반면 저온 스트레스, 형성층의 세포 분열 과정 그리고 식물호르몬인 GA와 JA 처리에서 발현이 증가하였다. 따라서 *PagAux/IAA1* 유전자가 현사시나무에서 저온 스트레스 반응뿐 아니라 성장 과정에 관여할 것으로 판단된다.

#### Reference

- Abel S, Oeller PW, Theologis A (1994) Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. Proc Natl Acad Sci USA 91:326-330
- Abel S, Nguyen MD, Theologis A (1995) The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. J Mol Biol 251(4):533-549
- Ainley WM, Walker JC, Nagao RT, Key JL (1988) Sequence and characterization of two auxin-regulated genes from soybean. J Biol Chem 263(22):10658-10666

- Bae EK, Lee H, Lee JS, Noh EW (2009) Differential expression of a poplar SK2-type dehydrin gene in response to various stresses. *BMB Rep* 42(7):439–443
- Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18(2):298–305
- Björklund S, Antti H, Uddestrand I, Moritz T, Sundberg B (2007) Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. *Plant J* 52(3):499–511
- Calderón Villalobos LI, Lee S, De Oliveira C, Ivetac A, Brandt W, Armitage L, Sheard LB, Tan X, Parry G, Mao H, Zheng N, Napier R, Kepinski S, Estelle M (2012) A combinatorial TIR1/AFB–Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat Chem Biol* 8(5):477–485
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156–159
- Du H, Liu H, Xiong L (2013) Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Front Plant Sci* 4:397
- Dreher KA, Brown J, Saw RE, Callis J (2006) The Arabidopsis Aux/IAA protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness. *Plant Cell* 18(3):699–714
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Jones AM, Estelle M (2003) Auxin action in a cell-free system. *Curr Biol* 13(16):1418–1422
- Druart N, Johansson A, Baba K, Schrader J, Sjödin A, Bhalerao RB, Resman L, Trygg J, Moritz T, Bhalerao RP (2007) Environmental and hormonal regulation of the activity-dormancy cycle in the cambial meristem involves stage-specific modulation of transcriptional and metabolic networks. *Plant J* 50(4):557–573
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant J* 29(2):153–168
- Goldfarb B, Lanz-Garcia C, Lian Z, Whetten R (2003) Aux/IAA gene family is conserved in the gymnosperm, loblolly pine (*Pinus taeda*). *Tree physiol* 23(17):1181–1192
- Hagen G, Guilfoyle T (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* 49(3–4):373–385
- Han X, Xu X, Fang DD, Zhang T, Guo W (2012) Cloning and expression analysis of novel Aux/IAA family genes in *Gossypium hirsutum*. *Gene* 503(1):83–91
- Ishida T, Adachi S, Yoshimura M, Shimizu K., Umeda M, Sugimoto K. (2010) Auxin modulates the transition from the mitotic cycle to the endocycle in *Arabidopsis*. *Development* 137(1):63–71
- Jung H, Lee DK, Choi YD, Kim JK (2015) OsIAA6, a member of the rice Aux/IAA gene family, is involved in drought tolerance and tiller outgrowth. *Plant Sci* 236:304–312
- Kalluri UC, Difazio SP, Brunner AM, Tuskan GA (2007) Genome-wide analysis of Aux/IAA and ARF gene families in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol* 7:59. doi:10.1186/1471-2229-7-59
- Kang HJ, Mon HK, Park SY, Kim PG (2004) Anatomical characteristics of hyperhydric shoots occurring in *in vitro* culture of peace poplar. *Kor J Plant Biotechnol* 31(2):145–149
- Kim J, Harter K, Theologis A (1997) Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(22):11786–11791
- Lee H, Bae EK, Park SY, Sjödin A, Lee JS, Noh EW, Jansson S (2007) Growth-phase-dependent gene expression profiling of poplar (*Populus alba* × *Populus tremula* var. *glandulosa*) suspension cells. *Physiol Plant* 131(4):599–613
- Lee H, Lee JS, Noh EW, Bae EK, Choi YI, Han MS (2005) Generation and analysis of expressed sequence tags from poplar (*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*) suspension cells. *Plant Sci* 169(6):1118–1124
- Leyser HM, Pickett FB, Dharmasiri S, Estelle M (1996) Mutations in the AXR3 gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. *Plant J* 10(3):403–413
- Liscum E, Reed J (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* 49:387–400
- Liu S, Hu Q, Luo S, Li A, Yang X, Wnag X, Wang S (2015) Expression of wild-type PtrIAA14.1, a poplar Aux/IAA gene causes morphological changes in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 6:388. doi:10.3389/fpls.2015.00388
- Luo J, Zhou JJ, Zhang JZ (2018) Aux/IAA gene family in plants: molecular structure, regulation, and function. *Int J Mol Sci* 19(1):259. doi:10.3390/ijms19010259
- Moyle R, Schrader J, Stenberg A, Olsson O, Saxena S, Sandberg G, Bhalerao RP (2002) Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the Aux/IAA gene family in hybrid aspen. *Pant J* 31(6):675–685
- Murashige T, Skoog FA (1962) Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497
- Nilsson J, Karlberg A, Antti H, Lopez-Vernaza M, Mellerowicz E, Perrot-Rechenmann C, Sandberg G, Bhalerao RP (2008). Dissecting the molecular basis of the regulation of wood formation by auxin in hybrid aspen. *Plant Cell* 20:843–855
- Parry G, Calderon-Villalobos LI, Prigge M, Peret B, Dharmasiri S, Itoh H, Lechner E, Gray WM, Bennett M, Estelle M (2009) Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(52):22540–22545
- Ramos JA, Zenser N, Leyser O, Callis J (2001) Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. *Plant Cell* 13(10):2349–2360
- Reed JW (2001) Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 6(9):420–425
- Reitz MU, Gifford ML, Schafer P (2015) Hormone activities and the cell cycle machinery in immunity-triggered growth inhibition. *J Exp Bot* 66(8):2187–2197
- Rogg LE, Bartel B (2001) Auxin signaling: derepression through regulated proteolysis. *Dev Cell* 1(5):595–604
- Sato A, Yamamoto KT (2008) Overexpression of the non-canonical



- Aux/IAA genes causes auxin-related aberrant phenotypes in *Arabidopsis*. *Physiol Plant* 133(2):397-405
- Shani E, Salehin M, Zhang Y, Sanchez SE, Doherty C, Wang R, Mangado CC, Song L, Tal I, Pisanty O, Ecker JR, Kay SA, Pruneda-Paz J, Estelle M (2017) Plant stress tolerance requires auxin-sensitive Aux/IAA transcriptional repressors. *Curr Biol* 27(3):437-444
- Shibasaki K, Uemura M, Tsurumi S, Rahman A (2009) Auxin response in *Arabidopsis* under cold stress: underlying molecular mechanisms. *Plant Cell* 21(12):3823-3838
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3(3):217-223
- Sigrist CJ, De Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Le Saux V, Bairoch A, Hulo N (2005) ProRule: a new database containing functional and structural information on PROSITE profiles. *Bioinformatics* 21(21):4060-4066
- Song Y, Wang L, Xiang L (2009a) Comprehensive expression profiling analysis OsIAA gene family in developmental processes and in response to phytohormone and stress treatments. *Planta* 229:577-591
- Song Y, You J, Xiong L (2009b) Characterization of OsIAA1 gene, a member of rice Aux/IAA family involved in auxin and brassinosteroid hormone responses and plant morphogenesis. *Plant Mol Biol* 70(3):297-309
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98(3):503-517
- Sun J, Xu Y, Ye S, Jiang H, Chen Q, Liu F, Zhou W, Chen R, Li X, Tietz O, Wu X, Cohen JD, Palme K, Li C (2009) *Arabidopsis* ASA1 is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation. *Plant Cell* 21(5):1495-1511
- Tan X, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, Zheng N (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446(7136):640-645
- Teale WD, Paponov IA, Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(11):847-59. doi:10.1038/nrm2020
- Tian Q, Reed JW (1999) Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* SHY2/IAA3 gene. *Development* 26(4):711-721
- Timpte C, Lincoln C, Pickett FB, Turner J, Estelle M (1995) The AXR1 and AUX1 genes of *Arabidopsis* function in separate auxin-response pathways. *Plant J* 8(4):561-569
- Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* 16(2):533-543
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997a) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276(5320):1865-1868
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997b) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9(11):1963-1971
- van der Graaff E, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flügge U-I, Kunze R (2006) Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol* 141(2):776-792
- Wang D, Pajeroska-Mukhtar K, Culler AH, Dong X (2007) Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* 17(20):1784-1790
- Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latché A, Pech JC, Bouzayen M (2005) The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* 17(10):2676-2692
- Wang S, Bai Y, Shen C, Wu Y, Zhang S, Jiang D, Guilfoyle TJ, Chen M, Qi Y (2010) Auxin-related gene families in abiotic stress response in *Sorghum bicolor*. *Funct Integr Genomics* 10(4):533-546
- Weijers D, Benkova E, Jäger KE, Schlereth A, Hamann T, Kientz M, Wilmoth JC, Reed JW, Jürgens G (2005) Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J* 24(10):1874-1885
- Willige BC, Isono E, Richter R, Zourelidou M, Schwechheimer C (2011) Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23(6):2184-2195
- Wu W, Liu Y, Wang Y, Li H, Liu J, Tan J, He J, Bai J, Ma H (2017) Evolution analysis of the Aux/IAA gene family in plants shows dual origins and variable nuclear localization signals. *Int J Mol Sci* 18(10):2107. doi:10.3390/ijms18102107
- Yamamoto KT, Mori H, Imaseki H (1992) cDNA cloning of indole-3-acetic acid-regulated Genes: Aux22 and SAUR from Mung Bean (*Vigna radiata*) hypocotyl tissue. *Plant Cell Physiol* 33(1):93-97
- Yu H, Soler M, San Clemente H, Mila I, Paiva JA, Myburg AA, Bouzayen M, Grima-Pettenati J, Gassan-Wang H (2015) Comprehensive genome-wide analysis of the Aux/IAA gene family in *Eucalyptus*: evidence for the role of EgrIAA4 in wood formation. *Plant Cell Physiol* 56(4):700-714
- Zhao Z, Li Y, Zhao S, Zhang J, Zhang H, Fu B, He F, Zhao M, Liu P (2018) Transcriptome analysis of gene expression patterns potentially associated with premature senescence in *Nicotiana tabacum* L. *Molecules* 23(11):2856. doi:10.3390/molecules231128526