

## EST profiling을 통한 당근(*Daucus carota* var. *sativa*)의 종모 형성에 관련된 유전자 분석

황은미<sup>1</sup> · 오규동<sup>1</sup> · 심은조<sup>1</sup> · 전상진<sup>2</sup> · 박영두<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 원예생명공학과, <sup>2</sup>(주)캐로톱씨드 육종연구소

### Analysis of Seed Hair Formation Related Genes by EST Profiling in Carrot (*Daucus carota* var. *sativa*)

Eun-Mi Hwang<sup>1</sup>, Gyu-Dong Oh<sup>1</sup>, Eun-Jo Shim<sup>1</sup>, Sang-Jin Jeon<sup>2</sup>, and Young-Doo Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticultural Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

<sup>2</sup>Breeding Research Institute, Carrotop Seed Co., Anseong 456-933, Korea

**Abstract.** Carrot is one of the useful crops used abundantly in cooking in Western as well as Asia regions such as China and Korea. However, seed coats have hairs which should be removed to increase germination rate. Furthermore, because of seed hairs, farmers face several additional losses, such as time consumption, manpower, capital and so on, for seed handling. To prevent these problems, study of gene related hair formation using short-hair seed lines is required. We analyzed genes related to hair formation from seed through expressed sequenced tag (EST) profiling, based on the fact that the development of carrot seed hair is related to cellulose synthesis pathway in secondary cell wall synthesis stage. To study the gene expression related to hair formation of the carrot seed, a cDNA library was constructed by using the early maturation stage of the short-hair line (659-1) and hairy seed line (677-14). In short-hair (659-1) and hairy seed (677-14) lines, results from of EST profiling through BLASTX search analysis using the NCBI database showed that 172 and 224 unigenes had significant homology with known protein sequences, whereas 233 and 192 unigenes were not, respectively. All ESTs were grouped into 16 categories according to their putative functions. Twenty nine unigenes among all ESTs were considered to be genes regulating seed hair development from cellulose synthesis pathway during secondary cell wall synthesis stage; in results, 14 unigenes related to seed hair development were found only in hairy seed line.

**Additional key words:** cDNA library, cellulose, secondary cell wall, short-hair seed, sucrose synthase

## 서 언

당근(*Daucus carota* var. *sativa*)은 미나리과(Apiaceae)에 속하며  $\beta$ -carotene이 풍부한 녹황색 채소로서, 세계적으로 재배되는 주요한 채소 중에 하나이다. 당근의 종자는 수분 이후 수정의 성공 여부를 종자 표면의 모(毛)형성으로 판단할 수 있으며 종자모는 종자의 epidermal cell의 작은 돌출부에서 형성되기 시작한다(Menon과 Dave, 1989). 당근의 종자모는 파종 시에 서로 엉켜 파종을 균일하지 못하게 하고, 파종 후에는 토양과의 밀착 정도를 떨어뜨려 수분흡수를 방

해함으로써 종자발아율을 낮추는 요인이 된다(Park 등, 2002). 이로 인해 현재 시판 중인 당근 종자는 제모(除毛)가 된 상태로 판매가 이루어지고 있어, 제모과정으로 발생하는 종자의 물리적 손상과 경제적, 시간적 손실 등이 문제가 되고 있다. 반면에 단모종자(short-hair seed)의 경우 수정 이후 종자 표면의 모가 형성되나 성숙과정에서 모의 길이생장은 멈추고 퇴화되어 단모의 표현형을 나타낸다. 단모종자와 유모종자(hairy seed)개체의 EST profiling을 통해 종자모 형성과 관련한 유전자들의 분석과 단모형질의 원인 규명이 필요하다. 유전체 연구는 expressed sequence tag(EST)의 high-

\*Corresponding author: ydpark@khu.ac.kr

※ Received 8 November 2010; Accepted 13 November 2010. 본 연구는 농림수산식품부(농림, 식품, 수산) 기술개발사업과 농촌진흥청 바이오 그린 21사업(과제번호: 20070301034037008010) 지원에 의해 이루어진 것임.

throughout 분석 및 유전자 발현의 large-scale parallel 분석 등에 의한 기술의 이용을 통해 발달 하였다(Zhang 등, 2001). EST란 발현되는 유전자 단편으로 특정 조직이나 환경에서 발현되는 mRNA에 의해 합성된 cDNA의 5' 이나 3' 말단 부분의 염기서열분석을 통해 작성된다(Boguski와 Schuler, 1995). 개개의 유전자와 일치하는 EST의 수는 조직에서 발현되는 mRNA 발현 수준을 나타내며(Ewing 등, 1999; Uchimiya 등, 1992) 발현되는 유전자는 특정 조직이나 세포 및 성장단계에서 공통적으로 발현되는 유전자들과 조직 및 시기 특이적으로 발현되는 유전자들로 구분된다(Ogihara 등, 2003; Ronning 등, 2003). 또한 EST는 조직 및 시기 특이적으로 발현되는 유전자의 exon에 대한 정보를 제공해주고, intron 및 regulatory DNA에 대한 정보는 제공하지 못한다. 그럼에도 유전자 발현의 유무와 잠재적 코딩영역의 예측 및 유전자의 구조 분석이 가능하며, 확보의 용이성뿐만 아니라 비용과 시간의 효율성 때문에 cDNA library와 EST profiling의 구축은 증가하고 있다(Lee와 Lee, 2000). 더 나아가 EST profiling은 특이적으로 발현되는 유전자들의 양상에 관해 유전적 접근이 가능하므로 다양한 생물체의 유전자 발현 연구에 폭넓게 이용되고 있다(Adams 등, 1995; Pavy 등, 2005).

식물의 세포벽은 애기장대 줄기에서의 trichome과 목화에서의 종자 표피 trichome인 fiber의 성장에 관여하며, 이 trichome은 cell wall의 압력과 연관된 효소의 활성 차이 및 구조적 차이에 의해 세포마다 성장양상의 변화로 각각의 조직 및 기관에서 독특한 모습을 나타낸다(Brett와 Waldron, 1996). Trichome은 'growth of hair'라는 의미로 식물의 epidermal hair과 같은 섬유로 된 부산물을 뜻하며 일반적으로 trichome이라 함은 잎과 줄기의 모(毛), 목화의 종자모, 뿌리털 등을 의미한다(Betancur 등, 2010). Trichome의 대표적 유형인 목화 fiber의 주요 구성 성분인 cellulose의 합성은 2차 세포벽의 합성 동안 이루어지며, fiber의 형성을 위해 많은 양의 cellulose의 합성과 축적이 요구된다(Gou 등, 2007). Fiber의 길이는 cellulose의 합성에 의한 길이 성장 단계에 의해 결정되며, 강도는 2차 세포벽의 합성과 cellulose의 배열과 관련이 있다(Applequist 등, 2001). Cellulose synthase에는 UDP-glucose와 glycosyltransferase family II의 1,4-β-D- glucosyltransferase enzyme이 있다(Somerville, 2006). 목화와 애기장대에 의한 cellulose synthase gene의 cloning은 주목할 만한 업적이며 식물의 cellulose 합성 연구의 새로운 장을 열었다(Arioli 등, 1998; Pear 등, 1996).

목화의 개화기 동안 각각의 fiber cell의 발생 과정은 배주 표면에 epidermal cell의 돌출과 부피 성장에 관련이 있다(Basra와 Malik, 1984). Sucrose synthase의 발현은 fiber cell

발생 과정 시작의 첫 번째 신호 중 하나이며(Nolte 등, 1995), 이는 cellulose의 합성과 밀접한 상관관계가 있다(Amor 등, 1995; Ruan 등, 1997). Sucrose synthase는 sucrose와 UDP를 UDP-glucose와 fructose로의 가역 변환을 촉진시키고 식물 세포의 대사 및 구조 그리고 저장의 기능들을 포함하는 다양한 pathway상의 energy metabolism에 중요한 역할을 한다. 이 효소는 fiber의 cellulose 합성을 위한 직접적인 전구체로, UDP-glucose와 fructose의 합성을 위해 sucrose degradation을 우선적으로 촉진시킨다(Amor 등, 1995). Amor 등(1995) 연구에서는 fiber 발달 과정의 초기 세포단계의 이해와 무모종자의 cellulose의 합성 동안 주요하게 감소되는 sucrose의 손실에 따른 대사단계의 변화를 조사하였다. Fiber의 결핍과 무모종자의 sucrose의 감소는 seed coat에 sucrose의 발현 수준을 감소시키는 원인이 되며, 또한 초기 발달 동안 무모종자의 seed coat와 자엽에서 starch의 발현이 감소하는 것은 sucrose synthase의 발현이 감소되기 때문이다(Ruan과 Chourey, 1998). 이는 옥수수과 감자의 sucrose synthase가 결핍된 돌연변이체에서 보고된 바 있다(Chourey와 Nelson, 1976; Zrenner 등, 1995).

본 연구에서는 당근의 단모종자와 유모종자 개체를 이용하여 EST profiling을 수행하였으며 이를 바탕으로 종자모형성에 관련된 유전자를 분석하였다. 이는 단모형질의 유전적 근거를 제시함으로써 당근의 무모종자 개발에 있어 유용한 자료로 이용될 수 있을 것이다.

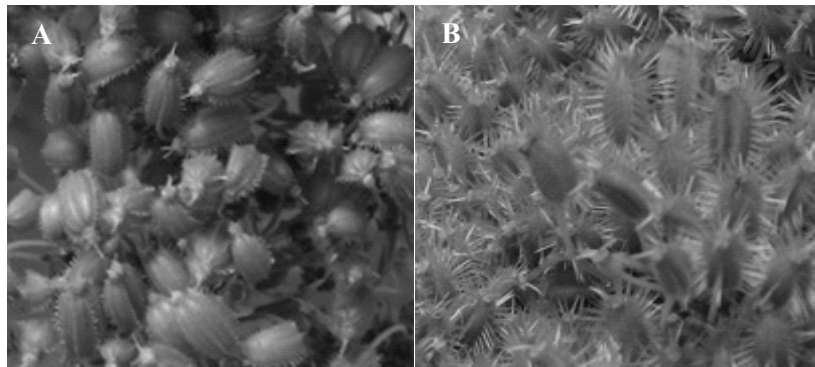
## 재료 및 방법

### 식물재료

실험에 사용된 당근은 CT-SMR 616계통으로 뿌리의 색은 붉은색이고 형태는 세장형이며 비대성은 중생인 것이 특징이다. 실험 재료는 2009년도에 CT-SMR 616계통의 단모종자 389-1개체를 자가수정으로 획득한 단모종자 표현형의 659-1개체와, 대조군으로는 2009년도에 CT-SMR 616계통의 유모종자 616-33개체에서 획득된 유모종자 표현형의 677-14개체를 사용하였다. 당근 종자에 관련한 cDNA library의 제작을 위해 자가수정 이후 종자모가 형성되기 시작하는 성숙 초기 단계의 단모종자 659-1개체와 대조군으로 유모종자 677-14개체를 채종하였다(Fig. 1).

### RNA 추출과 cDNA library 구축

단모종자 659-1개체와 유모종자 677-14개체에서 각각 Fruit-mate(TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)와 RNAiso Plus (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) kit를 이용하여 total RNA



**Fig. 1.** Seeds of the early maturation stage used for cDNA library construction. A, 659-1 (short-hair seed line); B, 677-14 (hairy seed line).

추출 하였다. 각 샘플당 300ug 이상의 total RNA를 이용해서 mRNA 분리를 진행하였다. mRNA isolation kit는 PolyAtract mRNA Isolation Systems(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하였다. 분리된 3ug 이상의 Poly (A)<sup>+</sup> mRNA를 이용하여 *Xho* I-Oligo(dT) linker-primer와 reverse transcriptase를 통해 first strand의 cDNA 합성을 진행하였으며 cDNA 합성은 ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit(Stratagene, LaJolla, CA, USA)를 사용하였다. 마지막으로 합성한 first strand의 cDNA와 DNA polymerase I을 이용하여 double strand의 cDNA를 합성하였다.

#### EST sequencing

다양한 크기의 cDNA는 gel filtration을 통하여 size fraction한 다음 0.5kb 크기 이상의 cDNA를 pBluscript SK(-) vector Phagemid에 ligation한 후 plasmid는 *E.coli* SOLR strain에 transformation하였다. 단모종자 659-1개체와 유모종자 677-14개체의 library에서 임의적으로 cDNA clone을 선발하여 5'

end부터 sequencing하였고 획득한 sequence는 vector 부분과 low quality sequence를 제거하고 남은 sequence를 분석하였다. Sequence data는 six reading frame으로 번역하였고, 번역된 아미노산 sequence는 단백질 sequence database와 비교해주는 NCBI의 BLASTX를 사용하여 분석하였다. 분석한 sequence는 16개의 functional group과 비교하여 여러 개의 일치하는 부분들을 하나로 분류하는 과정인 EST clustering을 실시하였다.

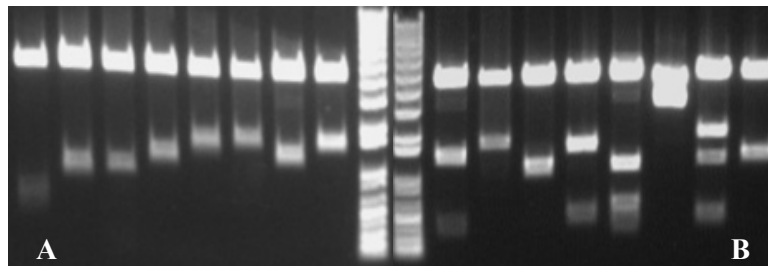
### 결과 및 고찰

#### cDNA library 구축

단모종자 659-1개체와 유모종자 677-14개체에서 각각 추출한 total RNA는 NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000을 이용하여 농도와 순도를 측정하였고(Table 1), agarose gel에서 전기영동하여 RNA 상태를 확인하였다. Total RNA에서 분리한 mRNA를 이용하여 cDNA를 합성한 후, 구축한 2개체의 cDNA

**Table 1.** Total RNA concentration of short-hair seed line No. 659-1 and hairy seed line No. 677-14 by NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer.

Phenotype	Line No.	Concentration (ng·μL <sup>-1</sup> )	A260/A280	Total volume (μL)	Total quantity (μg)
Short-hair seed	659-1	2536	1.99	400	1000
Hairy seed	677-14	2172	1.94	450	1000



**Fig. 2.** The cDNA fragment inserted to pBluscript vector. Plasmid DNA was digested with *Eco*RI and *Xho*I, and loaded on a 1% agarose gel. A, 659-1 (short-hair seed line); B, 677-14 (hairy seed line).

library에서 각각 임의적으로 8개의 colony를 선택하여 plasmid DNA를 분리하였고 *EcoRI*와 *XhoI*를 처리한 후 1% agarose gel에 전기영동하여 0.5-4.0kb 크기의 cDNA가 삽입되었음을 확인하였다(Fig. 2).

### EST profiling 분석

단모종자 659-1개체와 유모종자 677-14개체의 cDNA library 작성 후 각 개체의 EST sequencing을 실시하였다. 이 결과로 659-1개체의 572개 sequence에서 total 360,443bp를, 677-14개체의 573개 sequence에서 total 442,959bp를 획득하였다. 이후 sequence cleaning process 과정을 거친 뒤 cluster assembly를 통해 각각 659-1개체에서 42개의 contig와 363개의 singleton의 결과를 얻었고, 677-14개체에서는 38개의 contig와 378개의 singleton의 결과를 얻었다(Table 2).

단모종자 659-1개체와 유모종자 677-14개체의 sequence data는 아미노산 sequence로 번역하여 단백질 서열 database와 비교해주는 NCBI의 BLASTX program를 사용하여 분석하였다. 분석 결과, 659-1개체와 677-14개체는 애기장대 및 담배등과 같은 작물과 각각 42%, 54%의 상동성을 보였다. 이들 발현정보를 각각 16개의 기능적 category로 분류한 결과, ‘protein with binding function or cofactor requirement (structural or catalytic)’, ‘metabolism’, ‘subcellular localization’과 같은 3개의 category에 659-1개체의 경우 57%, 677-14개체는 64%로 가장 많이 포함되었다(Table 3). 두 개체간 동일한 BLASTX 결과를 보인 283개 EST sequence 정보를 제외하고 659-1개체에서만 발현된 140개 EST sequence와 677-14개체에서만 발현된 154개 EST sequence의 발현하는 양상을 비교 분석하였다. 그 결과, 각각의 category에서 659-1개체

**Table 2.** EST sequencing, cleaning process and assembly results of short-hair seed line No. 659-1 and hairy seed line No. 677-14.

Results	659-1		677-14	
	No. of Reads	Total bp	No. of Reads	Total bp
Seed line	576	360,443	576	442,959
After 3730 sequencing	572		573	
After sequence cleaning process (minimum length : 200)	Valid reads	543	573	
	Trimmed reads of valid reads			127
Trashed reads	Short of trashed reads			21
	Low quality of trashed			0
	Dust of trashed reads	29		0
	Short quality of trashed reads		12	1
After Lucy cleaning process (minimum length : 200)	Valid reads	529	542	
	Trashed reads	14	9	
After clustering	Contig	42	38	37,892
	Singletons	363	378	298,928

**Table 3.** Functional categorization of EST sequences of short-hair seed line No. 659-1 and hairy seed line No. 677-14 based on BLASTX results.

No.	Category	EST number	
		No. 659-1 (Short-hair seed)	No. 677-14 (Hairy seed)
1	<b>Metabolism</b>		
1	Metabolism	22	33
1.01	Amino acid metabolism	2	8
1.02	Nitrogen, Sulfur and selenium metabolism	1	3
1.04	Phosphate metabolism	2	1
1.05	C-Compound and carbohydrate metabolism	20	18
1.06	Lipid, Fatty acid and isoprenoid metabolism	6	12
1.2	Secondary metabolism	3	3

**Table 3.** Functional categorization of EST sequences of short-hair seed line No. 659-1 and hairy seed line No. 677-14 based on BLASTX results. (Continued)

No.	Category	EST number	
		No. 659-1 (Short-hair seed)	No. 677-14 (Hairy seed)
2	<b>Energy</b>		
2.01	Glycolysis and gluconeogenesis	4	6
2.07	Pentose-Phosphate pathway	-	4
2.1	Tricarboxylic-Acid pathway (Citratecycle, Krebscycle, TCA cycle)	3	4
2.3	Photosynthesis	4	8
10	<b>Cell cycle and DNA processing</b>		
10.01	DNA processing	-	1
11	<b>Transcription</b>		
11	Transcription	1	9
11.02	RNA synthesis	4	19
11.04	RNA processing	1	1
12	<b>Protein synthesis</b>		
12	Protein synthesis	12	13
12.04	Translation	3	3
14	<b>Protein Fate (Folding, Modification, Destination)</b>		
14	Protein fate (Folding, Modification, Destination)	8	13
14.01	Protein folding and stabilization	1	5
14.04	Protein targeting, Sorting and translocation	5	7
14.07	Protein modification	7	11
14.13	Protein/Peptide degradation		1
16	<b>Protein with binding function or cofactor requirement (Structural or catalytic)</b>		
16.01	Protein binding	14	21
16.03	Nucleic acid binding	14	37
16.06	Motor protein binding	-	1
16.07	Structural protein binding	2	2
16.09	Lipid binding	4	4
16.11	Amino acid/Amino acid derivatives binding	1	-
16.13	C-Compound binding	2	2
16.17	Metal binding	27	38
16.19	Nucleotide/Nucleoside/ Nucleobase binding	24	32
16.21	Complex cofactor/ Cosubstrate/ Vitamin binding	13	20
18	<b>Regulation of metabolism and protein function</b>		
18.01	Regulation by	16	22
18.02	Regulation of protein activity	-	3
20	<b>Cellular transport, Transport facilities and transport routes</b>		
20	Cellular transport, Transport facilities and transport routes	15	16
20.01	Transported compounds (Substrates)	14	13
20.03	Transport facilities	4	1
20.09	Transport routes	2	3

**Table 3.** Functional categorization of EST sequences of short-hair seed line No. 659-1 and hairy seed line No. 677-14 based on BLASTX results. (Continued)

No.	Category	EST number	
		No. 659-1 (Short-hair seed)	No. 677-14 (Hairy seed)
30	<b>Cellular communication/ Signal transduction mechanism</b>		
30	Cellular communication/ Signal transduction mechanism	3	3
30.01	Cellular signaling	6	7
30.05	Transmembrane signal transduction	1	2
32	<b>Cell rescue, Defense and virulence</b>		
32.01	Stress response	7	7
32.07	Detoxification	3	5
34	<b>Interaction with the environment</b>		
34.11	Cellular sensing and response to external stimulus	1	-
36	<b>Systemic interaction with the environment</b>		
36.2	Plant/ Fungal specific systemic sensing and response	1	-
36.25	Animal specific systemic sensing and response	1	-
40	<b>Cell fate</b>		
40.1	Cell death	1	1
41	<b>Development (Systemic)</b>		
41	Development (Systemic)	1	-
42	<b>Biogenesis of cellular components</b>		
42	Biogenesis of cellular components	1	-
42.01	Cell wall	1	1
42.19	Peroxisome	-	1
42.04	Cytoskeleton/ Structural proteins	2	-
42.27	Extracellular/ Secretion proteins	1	2
70	<b>Subcellular localization</b>		
70.01	Cell wall	1	2
70.03	Cytoplasm	7	11
70.04	Cytoskeleton	1	2
70.1	Nucleus	7	2
70.16	Mitochondrion	8	21
70.25	Vacuole or lysosome	2	5
70.26	Plastid	6	17
70.27	Extracellular/ Secretion proteins	4	1
Total		327	487

의 발현이 677-14개체의 발현보다 50%이상 높은 category가 14개, 677-14개체의 발현이 659-1개체의 발현보다 50% 이상 높은 category가 10개인 것을 확인하였다(Table 4). 이를 통해 발현수의 차이가 나는 기능이 단모종자 형질에 깊이 관여 할 것으로 판단되며 유의성 있는 category에 속하는 유전자 중 종자모 발달에 영향을 미칠 수 있는 후보군을 분

석하였다.

#### 종자모 형성에 관련된 유전자 탐색

EST profiling을 이용하여 종자모 형성에 관련된 유전자의 탐색을 위해 유모종자 개체의 모 형성 형태를 현미경을 이용해 관찰하였다(Fig. 3).

**Table 4.** Categories showing difference of expression level more than 50% between short-hair seed line No. 659-1 and hairy seed line No. 677-14.

No. 659-1 > No. 677-14 Categories of 14	No. 659-1 < No. 677-14 Categories of 10
Phosphate metabolism	Nitrogen, sulfur, and selenium metabolism
Glycolysis and gluconeogenesis	Pentose-phosphate pathway
Photosynthesis	DNA processing
RNA synthesis	RNA processing
Protein folding and stabilization	Protein / peptide degradation
Protein targeting, sorting and translocation	Nucleic acid binding
Lipid binding	Regulation of protein activity
Complex cofactor / cosubstrate / vitamin binding	Extracellular / secretion proteins
Transported compounds (substrate)	Cell wall
Cellular signaling	Extracellular / secretion proteins
Stress response	
Detoxification	
Cytoplasm	
Mitochondrion	



**Fig. 3.** Morphological analysis of hairy seed using microscope (Video Microscope System, ALPHASYSTEC). Carrot seed hairs initiation starts from epidermal cell. A, 40X magnifications; B, 100X magnifications.

유모종자의 모(毛)는 종자의 epidermal cell이 세포의 분열 및 신장으로 돌출된 형태이다. 반면에 단모종자의 모 형성은 종자의 성숙과정에서 epidermal cell의 모 형성 발달에 관여하는 세포의 분열 및 신장이 중단되어, 종자모는 퇴화되는 것으로 보인다. 당근의 종자모와 목화의 fiber의 생성부터 발달과정이 유사하며 이를 바탕으로 당근 종자모의 발달과 2차 세포벽의 형성은 밀접한 연관관계가 있는 것으로 추정하였다(Arpat 등, 2004; Brown 등, 2005). 따라서 2차 세포벽의 주요 구성 요소인 cellulose의 합성에 관련한 유전자들을 단모 및 유모종자의 EST profiling 결과를 통해 비교 분석하였다. 또한 cellulose 합성에 관여하는 유전자 분석의 정확성을 높이기 위하여, 목화의 fiber EST profiling 정보를 비교하여 분석 결과를 확인하였다(Wanjie 등, 2005; Yves 등, 2009). 첫 단계로 유전적 배경이 상이한 단모종자 659-1 개체와 유모종자 677-14개체로부터 수집된 EST profiling 정보를 바탕으로 cellulose 합성에 관여하는 유전자들을 조사하였다(Table 5). 조사한 유전자들에 관하여 functional

category의 16개 그룹에 분포도를 분석한 결과, 'metabolism' category에서 가장 많았으며, 특히 cellulose의 합성에 관여하는 유전자들은 'metabolism' category에서도 metabolism 과 c-compound와 carbohydrate 부분에 많은 것을 확인하였다(Fig. 4). 이는 cellulose 합성에 따른 종자모 형성과 발달이 'metabolism'과 관련이 있는 것으로 생각되며, 차후 'metabolism'에 포함되는 유전자들과 cellulose의 합성에 관련된 유전자들의 정밀한 분석을 하고자 한다.

또한 cellulose의 합성에 관여하는 유전자들을 유모종자 677-14개체와 단모종자 659-1개체에서 비교한 결과, 677-14개체에서만 발현되는 유전자들을 탐색할 수 있었다(Table 6). 목화 fiber 합성에서 2차 세포벽의 cellulose와 pectin의 합성 경로에 관한 연구(Gou 등, 2007)를 바탕으로 677-14개체에서만 발현되는 유전자들은 2차 세포벽의 형성 동안 cellulose와 pectin의 합성에 관여하는 유전자와 일치하거나 근접한 것으로 확인되었다(Fig. 5). 이와 반대로 단모종자 659-1개체의 EST profiling에서는 cellulose와 pectin의 합성에 관여

**Table 5.** EST sequences information related seed hair synthesis genes from hairless seed line No. 659-1 and hairy seed line No. 677-14.

Line	EST ID	Gene bank accession numbers	Gene name
659-1	659-1_03-C10-R.ab1	Q8GT20	Benzoyl coenzyme A: benzyl alcohol benzoyl transferase
	659-1_01-E07-R.ab1	A7X331	Expansin-like protein
	659-1_06-B12-R.ab1	Q9M6S6	Polygalacturonase A (Fragment)
	659-1_06-E09-R.ab1	Q8VZW3	Putative uncharacterized protein At5g05270 (Contains similarity to chalcone-flavonone isomerase) (Chalcone isomerase)
	659-1_04-G03-R.ab1	Q9M3U4	Beta 1-3 glucanase
	659-1_01-C12-R.ab1	Q8RVT5	Acyl-CoA-binding protein
	659-1_05-B02-R.ab1	P52581	Isoflavone reductase homolog
	659-1_05-D10-R.ab1	Q9SB27	Chalcone synthase
	659-1_02-B02-R.ab1	A7Y7F6	Acyl-CoA oxidase
	659-1_03-B12-R.ab1	A8J6X1	Bergaptol O-methyltransferase
677-14	677-14_06-C02-R.ab1	Q2PEV9	Putative galactose kinase
	677-14_01-C05-R.ab1	O81355	Isoflavone reductase related protein
	677-14_03-D06-R.ab1	Q84R10	Pectinesterase PPE8B precursor
	677-14_04-G07-R.ab1	A8CA61	Exo-polygalacturonase
	677-14_01-F12-R.ab1	Q9SWY3	Acyl carrier protein
	677-14_06-C02-R.ab1	Q9SWY3	similar to galactokinase
	677-14_01-C07-R.ab1	Q5S267	Farnesyl diphosphate synthase
	677-14_04-C06-R.ab1	Q2PCE0	Type 1 non specific lipid transfer protein
	677-14_05-H04-R.ab1	Q19TV8	UDP-glucose pyrophosphorylase
	677-14_05-F10-R.ab1	Q6JSK3	Betaine aldehyde dehydrogenase
	677-14_02-D10-R.ab1	Q9SEK3	Hexokinase-1
	677-14_06-H01-R.ab1	P42495	Cinnamyl-alcohol dehydrogenase 1
	677-14_03-D06-R.ab1	A0ZNJ9	Pectinesterase
	677-14_06-H11-R.ab1	Q42941	Ascorbate peroxidase
	677-14_01-E02-R.ab1	Q2L8A7	Acetoacetyl-CoA thiolase
	677-14_06-H12-R.ab1	Q2VEY4	Putative isopentenyl pyrophosphate isomerase
	677-14_03-D02-R.ab1	O48937	NADPH cytochrome P450 reductase
	677-14_03-B12-R.ab1	Q8RVP5	Class III peroxidase
	677-14_04-C04-R.ab1	O82520	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase

하는 유전자들의 발현이 적은 것으로 보아 종자모 형성 발달에 중요한 cellulose의 합성이 원활히 이루어지지 않아 종자모 형성이 퇴화하는 것으로 추정된다. 이는 목화의 무모종자 돌연변이 개체의 종자모 형성에 관한 연구에서 보고된 바와 같이 cellulose의 합성 동안 sucrose synthase의 발현이 상으로 인한 UDP-glucose와 fructose의 합성이 원활히 진행되지 못하고, 이에 따라 cellulose의 합성에 영향을 주어 최종적으로는 종자모의 형성을 방해하는 것으로 추정된다. 이러한 결과는 유모종자 677-14개체에서만 확인된 cellulose의 합성에 관여하는 유전자들의 sequences 정보 분석을 통해 primer를 제작하고 이를 이용해 real-time PCR을 진행하여 단모종자 659-1개체에서의 발현여부를 상호 확인하여 검

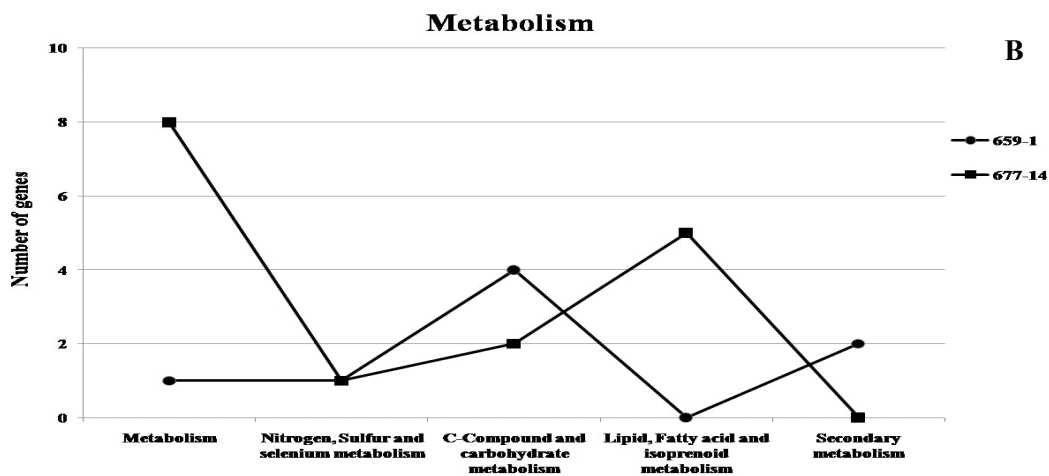
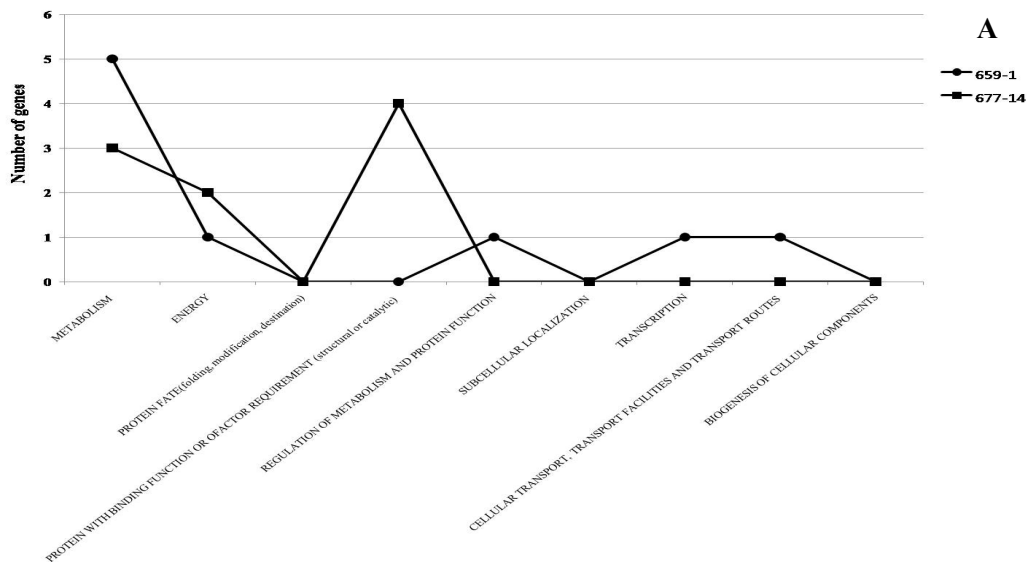
정할 수 있으리라 기대된다.

본 연구는 당근의 종자 모 형성에 관련된 유전자들의 연관관계 및 발현양상을 분석함으로써 궁극적으로는 무모종자의 완전한 유전정보를 밝혀 높은 경쟁력을 갖춘 무모종자 개발에 크게 기여할 것이다.

## 초 록

당근은 서양뿐만 아니라 중국 및 한국과 같은 아시아 전역에서 요리로 많이 이용되는 유용한 작물 중 하나이다. 그러나 당근 종자 표면에는 모(毛)가 존재하고 이 종모는 발아율을 증가시키기 위해 제거해야 한다. 더욱이 종모 처리는

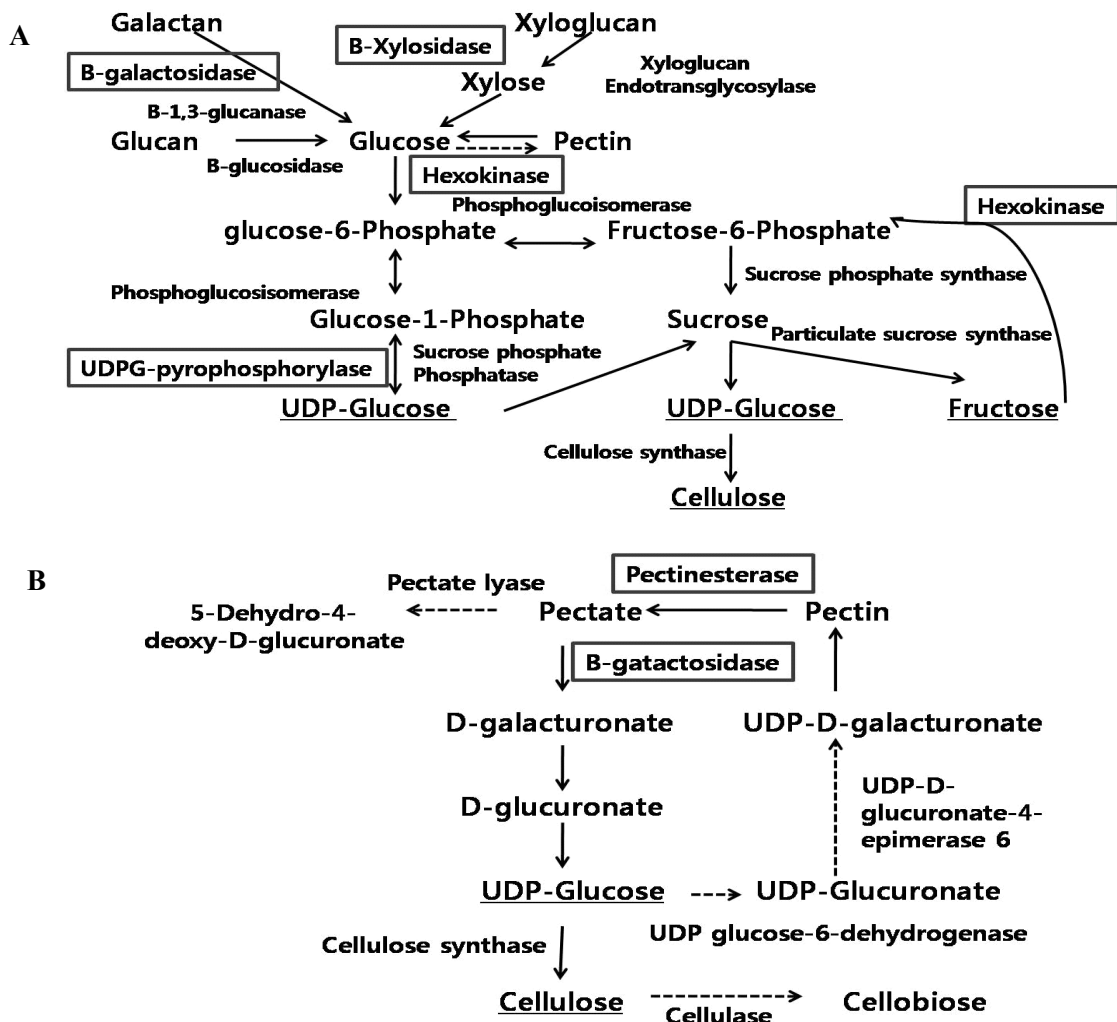




**Fig. 4.** Analysis of EST sequences difference related to seed hair synthesis between hairy seed line No. 677-14 and hairless seed line No. 659-1 using functional categorization. A, The genes related to cellulose synthesis are classified into the 9 functional categories; B, Particularly, these genes are correlated with metabolism and c-compound and carbohydrate in the metabolism function category.

**Table 6.** EST sequences information related seed hair synthesis genes from hairy seed line No. 677-14 except for hairless seed line No. 659-1.

EST ID	Gene bank accession numbers	Gene name
677-14_06-C02-R.ab1	Q2PEV9	Putative galactose kinase
677-14_01-C07-R.ab1	Q5S267	Farnesyl diphosphate synthase
677-14_04-C06-R.ab1	Q2PCE0	Type 1 non specific lipid transfer protein
677-14_05-H04-R.ab1	Q19TV8	UDP-glucose pyrophosphorylase
677-14_05-F10-R.ab1	Q6JSK3	Betaine aldehyde dehydrogenase
677-14_02-D10-R.ab1	Q9SEK3	Hexokinase-1
677-14_06-H01-R.ab1	P42495	Cinnamyl-alcohol dehydrogenase 1
677-14_06-H11-R.ab1	Q42941	Ascorbate peroxidase
677-14_01-E02-R.ab1	Q2L8A7	Acetoacetyl-CoA thiolase
677-14_06-H12-R.ab1	Q2VEY4	Putative isopentenyl pyrophosphate isomerase
677-14_03-D02-R.ab1	O48937	NADPH cytochrome P450 reductase
677-14_04-C04-R.ab1	O82520	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase
677-14_03-D06-R.ab1	Q84R10	Pectinesterase PPE8B precursor
677-14_06-C02-R.ab1	Q9SWY3	similar to galactokinase



**Fig. 5.** Proposed cellulose and pectin synthesis metabolism in the secondary cell wall synthesis stage in carrot (*Daucus carota* var. *sativa*) based on EST profiling in this study. A, Cellulose synthesis metabolism pathway; B, Cellulose synthesis from pectin metabolism pathway.

시간과 인력 및 자본의 소비와 같은 추가적인 손실을 동반하였다. 이러한 문제점을 방지하기 위해 단모종자를 이용하여 모형성과 관련된 유전자의 연구가 필요하다. 당근 종모의 발달은 2차 세포벽의 합성단계 동안 cellulose의 합성 과정과 연관되어 있음을 바탕으로, EST profiling을 통해 종모와 관련된 유전자를 탐색하고자 하였다. 당근 종모 형성에 관련된 유전자 발현을 조사하기 위해, 성숙 초기 단계의 단모종자 659-1개체와 유모종자 677-14개체를 이용하여 cDNA library를 구축하였다. 단모종자 659-1개체와 유모종자 677-14개체에서 확보된 EST 염기서열의 NCBI database BLASTX 분석을 통한 EST profiling 결과, 172개와 224개의 unigene은 이미 알려진 단백질 염기서열과 상동성을 보였으며 나머지 233개와 192개의 unigene은 확인되지 않는 유전자들이었다. EST는 추정되는 기능에 따라 16개의 category로 그룹화되었다. 전체 EST 중 29개의 unigene이 2차 세포벽 합성

단계 동안 cellulose의 합성 pathway상의 종모 형성을 조절하는 유전자로 추정되며, 실제로 종모 발달과 관련된 14개의 unigene이 유모종자 계통에서만 발견되었다.

**추가 주요어 :** cDNA 라이브러리, 셀룰로오스, 2차 세포벽, 단모종자, 자당 합성효소

## 인용문헌

- Adams, M.D., A.R. Kerlavage, R.D. Fleischmann, R.A. Fuldner, C.J. Bult, N.H. Lee, E.F. Kirkness, K.G. Weinstock, J.D. Gocayne, O. White, G. Sutton, J.A. Blake, R.C. Brandon, M.W. Chiu, R.A. Clayton, R.T. Cline, M.D. Cotton, J.E. Hughes, L.D. Fine, L.M. Fitzgerald, W.M. FitzHugh, J.L. Fritchman, N.S.M. Geoghagen, A. Glodek, C.L. Gnehm, M.C. Hanna, E. Hedblom, P.S. Hinkle Jr., J.M. Kelley, K.M. Klimek, J.C. Kelley, L.I. Liu, S.M. Marmaros, J.M. Merrick,

- R.F. Moreno-Palanques, L.A. McDonald, D.T. Nguyen, S.M. Pellegrino, C.A. Phillips, S.E. Ryder, J.L. Scott, D.M. Saudek, R. Shirley, K.V. Small, T.A. Spriggs, T.R. Utterback, J.F. Weidman, Y. Li, R. Barthlow, D.P. Bednarik, L. Cao, M.A. Cepeda, T.A. Coleman, E.J. Collins, D. Dimke, P. Feng, A. Ferrie, C. Fischer, G.A. Hastings, W.W. He, J.S. Hu, K.A. Huddleston, J.M. Greene, J. Gruber, P. Hudson, A. Kim, D.L. Kozak, C. Kunsch, H.J. Ji, H.D. Li, P.S. Meissner, H. Olsen, L. Raymond, Y.F. Wei, J. Wing, C. Xu, G.L. Yu, S.M. Ruben, P.J. Dillon, M.R. Fannon, C.A. Rosen, W.A. Haseltine, C. Fields, C.M. Fraser, and J.C. Venter. 1995. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377:173-174.
- Amor, Y., C.H. Haigler, S. Johnson, M. Wainscott, and D.P. Delmer. 1995. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:9353-9357.
- Applequist, W.L., R. Cronn, and J.F. Wendel. 2001. Comparative development of fiber in wild and cultivated cotton. *Evol. Dev.* 3:3-17.
- Arioli, T., L. Peng, A.S. Betzner, J. Burn, W. Wittke, W. Herth, C. Camilleri, H. Hofte, J. Plazinski, R. Birch, A. Cork, J. Glover, J. Redmond, and R.E. Williamson. 1998. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science* 279:717-720.
- Arpat, A.B., M. Waugh, J.P. Sullivan, M. Gonzales, D. Frisch, D. Main, T. Wood, A. Leslie, R.A. Wing, and T.A. Wilkins. 2004. Functional genomics of cell elongation in developing cotton fibers. *Plant Mol. Biol.* 54:911-929.
- Basra, A.S. and C.P. Malik. 1984. Development of the cotton fiber. *Int. Rev. Cytol.* 89:65-113.
- Betancur, L., B. Singh, R.A. Rapp, J.F. Wendel, M.D. Marks, A.W. Roberts, and C.H. Haigler. 2010. Phylogenetically distinct cellulose synthase genes support secondary wall thickening in *Arabidopsis* shoot trichomes and cotton fiber. *J. Integr. Plant Biol.* 52:205-220.
- Boguski, M.S. and G.D. Schuler. 1995. EST ablissing a human transcript map. *Nat. Genet.* 10:369-371.
- Brett, C.T. and K.W. Waldron. 1996. *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*, 2nd ed. Chapman and Hall. London.
- Brown, D.M., L.A. Zeef, J. Ellis, R. Goodacre, and S.R. Turner. 2005. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell* 17:2281-2295.
- Chourey, P.S. and O.E. Nelson. 1976. The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken 1 mutation in maize. *Biochem. Genet.* 14:1041-1055.
- Ewing, R.M., A.B. Kahla, O. Poirot, F. Lopez, S. Audic, and J.M. Claverie. 1999. Large-scale statistics analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Res.* 9:950-959.
- Gou, J.Y., L.J. Wang, S.P. Chen, W.L. Hu, and X.Y. Chen. 2007. Gene expression and metabolite profiles of cotton fiber during cell elongation and secondary cell wall synthesis. *Cell Res.* 17:422-434.
- Lee, P.S. and K.H. Lee. 2000. Genomic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:171-175.
- Menon, A.R.S. and Y. Dave. 1989. Micromorphology of hairs and spines on ovary and fruit of *Daucus carota* L. var. *sativa* (The cultivated carrot). *Bot. Mat. Tokyo* 102:503-509.
- Nolte, K.D., D.L. Hendrix, J.W. Radin, and K.E. Koch. 1995. Sucrose synthase localization during initiation of seed development and trichome differentiation in cotton ovules. *Plant Physiol.* 109:1285-1293.
- Ogihara, Y., K. Mochida, Y. Nemoto, K. Murai, Y. Yamazaki, I.T. Shin, and Y. Kohara. 2003. Correlated clustering and virtual display of gene expression patterns in the wheat life cycle by large-scale statistical analyses of expressed sequence tags. *Plant J.* 33:1001-1011.
- Park, Y., M.S. Cho, Y.S. Kim, and S.G. Park. 2002. A promising carrot mutant, spineless seeds. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 43: 707-709.
- Pavy, N., C. Paule, L. Parsons, J.A. Crow, M.J. Morency, J. Cooke, J.E. Johnson, E. Noumen, C. Guillet-Claude, Y. Butterfield, S. Barber, G. Yang, J. Liu, J. Stott, R. Kirkpatrick, A. Siddiqui, R. Holt, M. Marra, A. Seguin, E. Retzel, J. Bousquet, and J. MacKay. 2005. Generation, annotation, analysis and database integration of 16,500 white spruce EST clusters. *BMC Genomics* 6:144.
- Pear, J.R., Y. Kawagoe, W.E. Schreckengost, D.P. Delmer, and D.M. Stalker. 1996. Higher plants contain homologs of the bacterial celA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:12637-12642.
- Ronning, C.M., S.S. Stegalkina, R.A. Ascenzi, O. Bougri, A.L. Hart, T.R. Utterbach, S.E. Vanaken, S.B. Riedmuller, J.A. White, J. Cho, G.M. Perrea, Y. Lee, S. Karamycheva, R. Sultana, J. Tsai, J. Quackenbush, H.M. Griffiths, S. Restrepo, C.D. Smart, W.E. Fry, R. Van Der Hoeven, S. Tanksley, P. Zhang, H. Jin, M.L. Yamamoto, B.J. Baker, and C.R. Buell. 2003. Comparative analyses of potato expressed sequence tag libraries. *Plant Physiol.* 131:419-429.
- Ruan, Y.L. and P.S. Chourey. 1998. A fiberless seed mutation in cotton is associated with lack of fiber cell initiation in ovule epidermis and alterations in sucrose synthase expression and carbon partitioning in developing seeds. *Plant Physiol.* 118: 399-406.
- Ruan, Y.L., P.S. Chourey, D.P. Delmer, and L. Perez-Grau. 1997. The differential expression of sucrose synthase in relation to diverse patterns of carbon partitioning in developing cotton seed. *Plant Physiol.* 115:375-385.
- Somerville, C. 2006. Cellulose synthesis in higher plants. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:53-78.
- Uchimiya, H., S. Kiou, T. Shimazaki, S. Aotsuka, S. Takamatsu, R. Nishi, H. Hashimoto, Y. Matsubayashi, N. Kidou, M. Umeda, and A. Kato. 1992. Random sequencing of cDNA libraries reveals a variety of expressed genes in cultured cells of rice. *Plant J.* 2:1005-1009.
- Wanjie, S.W., R. Welti, R.A. Moreau, and K.D. Chapman. 2005. Identification and quantification of glycerolipids in cotton fibers: reconciliation with metabolic pathway predictions from DNA databases. *Lipids* 40:773-785.
- Yves, A.G., S. Bourot, T. Arioli, E.S. Dennis, and J.L. Danny. 2009. Transcript profiling during fiber development identifies

- pathways in secondary metabolism and cell wall structure that may contribute to cotton fiber quality. *Plant Cell Physiol.* 50:1364-1381.
- Zhang, L., X.L. Ma, Q. Zhang, C.L. Ma, P.P. Wang, Y.F. Sun, Y.X. Zhao, and H. Zhang. 2001. Expressed sequence tags from a NaCl-treated *Suaeda salsa* cDNA library. *Gene* 267:193-200.
- Zrenner, R., M. Salanoubat, L. Willimitzer, and U. Sonnewald. 1995. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* 7:97-107.