

Screening of Genes Which are Able to Affect *Kalanchoe* Vegetative ReproductionYuchul Jung¹, Youngjae Chung² and Donggiun Kim^{3*}¹Department of genetic engineering, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-745, Korea²Department of Life Science and Biotechnology, Shingyeong University, Hwaseong 445-741, Korea³Department of Biological Science, Silla University, Busan 617-736, Korea

Received April 21, 2011 / Accepted April 29, 2011

The genus *Bryophyllum* is best known for many of its species having the ability to produce plantlets on their leaves. This phenomenon is also known as vegetative reproduction. Differential expressed gene (DEG) detecting technique was applied in order to survey the genes involved in the process of asexual reproduction for plantlet formation. Based on homology search using the NCBI database after screening of genes, 38 genes were identified from a total of 69 DEGs. Most of these DEGs were related to cell division, to intercellular signal transduction, and to hormone (cytokinin and ethylene) signaling.

Key words : *Kalanchoe pinnata*, asexual, reproduction, plantlet, DEG

서 론

영양번식은 무성생식의 한 종류로서 영양번식 혹은 영양증식이라고도 한다. 이 과정은 씨앗이나 포자의 생산 없이 새로운 독립적인 식물을 발생시키는 과정으로 자연환경에서 많은 식물 중에서 발견되고 보고되었다. 자연에서 일어나는 영양번식은 대부분 초본에서 일어나는 현상으로 유전적으로 동일한 식물을 얻기 위한 좋은 방법으로 원예품종개발에 많이 적용되어 활용되고 있다[15,30]. 대부분의 영양번식은 구조적으로 줄기나 뿌리가 변형되어 번식이 일어나는 경우가 많다. 뿌리줄기(rhizome)는 영양생식 기관 중 가장 대표적인 사례이다. 감자의 괴근(tuber)처럼 뿌리에 영양분을 축적한 영양생식 구조도 있으며, 어떤 식물에서는 부정아(adventitious bud)라는 구조가 나타나서 잎에서부터 영양생식이 이루어진다. 이런 식으로 잎, 줄기, 뿌리 같은 영양기관에 양분이 모인 후 새로운 싹이 나서 다른 개체가 번식하는 방법으로 주로 영양생식이 이루어진다. 영양생식은 진정한 의미에서 개체의 생식이라 볼 수 없고 식물 스스로 생물질량(biomass)을 늘리기 위한 방법이라 볼 수 있다. 따라서 영양번식을 통해 생산된 새로운 개체는 동일한 유전자로 이루어져 있으면서 모체로부터는 독립적으로 분리된 독자적인 식물로 성장한다[3,12,28,35].

독특한 영양번식 방법으로, Epiphyllous budding 현상은 몇몇 식물 종에서만 관찰되는 형태발생적 현상이다. *Kalanchoe*의 foliar budding은 생식의 단계 중 개체 발생의 한 부분으로, 종에 따라 두 가지 발생 형태를 따르게 된다. Monophasic type의 발생 형태에서 bud 분화과정은 primordia에서 소식물체로 발생하는 초기 단계로부터 지속적으로 발생이 진행되는 형태

이며, biphasic type의 발생 형태에서 bud 분화과정은 첫 번째 단계로 생리적으로는 휴면 상태를 유지하지만 형태적으로는 완전한 외형을 갖춘 bud를 primordia에서 발생시키고 이후에 두 번째 단계로 잎의 분리에 의하여 완전 성숙이 일어나 소식물체를 발생시킨다. 더불어 두 번째 유형에 속하는 *Kalanchoe*의 소식물체 발생은 epiphyllous bud의 발생이 잎의 분리에 의한 신호와 동시에 잎의 성숙에 관련한 신호가 작용한다. 따라서 이러한 발생은 잎의 성숙 및 탈리와 관련한 일련의 두 가지 신호에 의하여 개시된다고 할 수 있다[39]. *K. pinnata*의 경우는 biphasic type의 소식물체 발생을 취한다.

일반적인 식물에서 phytohormone류 화학물질의 처리 실험은 효과적으로 식물의 성장이나 발생에 관한 하부 mechanism을 연구하는 방법을 제공하였다. 이러한 방법을 통하여 cytokinin과 ethylene은 성장과 성숙에 영향을 미친다는 것은 잘 알려진 사실이다. 다양한 실험을 통해 대부분의 식물 종에 있어서 cytokinin은 식물의 shoot의 발생과 성장을 촉진하고 뿌리의 발생을 억제한다고 알려졌다[47]. 마찬가지로 ethylene의 경우에는 일반적으로 잎의 성장을 저해하며, 뿌리의 확산을 촉진한다고 알려져 있다[33]. 두 가지 phytohormone은 잎의 성숙의 관점에서 cytokinin은 성숙을 지연시키고, ethylene은 성숙을 촉진하는 서로 상반된 효과를 가진다고 볼 수 있다[6,38,40].

이 논문에서는 *K. pinnata*의 잎 가장자리에서 나타나는 무성영양번식의 한 방법인 소식물체의 발생에 관련한 유전자를 탐색하고, 탐색된 유전자들에서 중요성 있는 유전자를 선별하여, 상호간의 신호 전달 체계에 대한 가능성을 논의하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-6933, Fax : +82-51-999-5176

E-mail : botanist@silla.ac.kr

재료 및 방법

*Kalanchoe pinnata*의 재배 조건

Viviparous 소식물체의 형성에 관련한 유전자의 분석을 위하여 *K. pinnata*를 독립된 화분에 심어 온도 38~40°C와 습도 70% 이상의 배양 조건에서 공기 순환을 통하여 신선한 공기가 지속적으로 유입 될 수 있도록 한 배양실에서 재배하였다. 광 주기는 광 조건 16시간, 암 조건 8시간으로 설정하였으며, 명 배양과 암 배양 간의 온도편차를 최소화하여 재배하였다. 배양실에서 재배한 *K. pinnata*의 성숙한 잎에서 소식물체의 발생이 이루어지지 않은 잎 가장자리, 발생 초기 단계의 잎 가장자리와 소식물체의 발생이 완료되어 viviparous 소식물체가 탈리 된 후의 잎 가장자리를 채취하였다. 조직의 특이성을 확보하기 위하여 잎 조직의 채취는 목표한 잎 가장자리를 포함하여 최소한의 범위로 가로세로 2 mm 정도의 정방형으로 조직을 잘라 곧바로 액체 질소에 얼려, 실험에 사용할 때까지 -80°C 초저온 냉동고에 보관하였다.

RNA의 추출과 differential expressed genes의 검출

Differential expressed gene (DEG) 검출 실험을 수행하기 위하여 budding이 되지 않은 *K. pinnata*와 소식물체가 발생한 *K. pinnata*에서 총 RNA를 분리하여 실험을 시행하였다. 엽육 식물종인 *K. pinnata*에서 RNA의 순수분리를 위하여 본 실험에서는 guanidinium hydrochloride와 PEG를 이용한 총 RNA 추출 방법을 적용하였다[17]. 발생단계 별로 채취 된 조직에서 분리된 RNA를 사용하여서 발생 단계에 따라 발현 차이를 보이는 유전자를 확인하기 위하여 GeneFishing™ DEG Premix Kit (Seegene Co., Korea)를 사용하였다. 각 단계에서 추출한 총 RNA 3 µg을 사용하여 20 µl의 반응 최종 반응액에 2 mM dNTPs 5 µl, 5× reaction buffer 4 µl, Moloney murin leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RTase, Takara-bio Inc., Japan) 1 µl와 Kit에서 제공되는 dT-ACP (Deoxythymidine-Annealing Control Primer) 1 primer (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXX(T)18-3') 2 µl를 첨가하여 42°C에서 90분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 first-strand cDNA에 80 µl의 DEPC 처리된 고순도 증류수를 넣어 5배로 희석하여 -70°C에 보관, 사용하였다. Differentially expressed genes을 검출하기 위하여 GeneFishing™ DEG Kit의 ACP-based PCR을 수행하였다. 총 20 µl의 반응액에 4 µl의 희석한 first-strand cDNA를 주형으로 하고, 1 µl의 dT-ACP2 (5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXX(T)15-3')와 2 µl의 arbitrary ACP를 첨가하고 10 µl의 2× SeeAmp™ ACP™ master mix를 첨가하여 PCR 반응을 수행하였다. 94°C로 예열된 PCR 기계(PTC-0200, MJ research Co., Germany)에 반응용액을 넣고 94°C에서 5분, 50°C에서 3분, 72°C에서 1분간 반응한 뒤, 94°C에서 40초, 65°C에서 40초, 72°C에서 40초 반응을

40회 반복한 후 72°C에서 5분간 최종 반응시켜 PCR을 종료하였다. 증폭된 PCR 결과물을 2% agarose gel에 전기 영동하여 각 primer에 따라 band의 상이한 패턴을 확인하였다.

DEG PCR 결과물의 전기영동을 통하여 서로 다른 발현 양상이 확인된 band를 HiYield™ Gel / PCR DNA Extraction Kit (Real Biotech Co., Taiwan)를 이용하여 분리하여 pGEM-T easy Vector (Promega Co., USA)에 클로닝하여 보관하였다. PCR 결과물과 ligation된 pGEM-T easy Vector를 *E. Coli* DH5 α 형질 전환하여 형질 전환체를 선발하고 plasmid를 추출하여 염기서열 분석을 의뢰하였다. 분석된 염기서열을 바탕으로 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 중 nucleotide blast (BlastN)와 blastX program을 이용하여 algorithm analysis를 시행하였다.

Real-time PCR을 통한 선발된 DEG유전자 발현 양 분석

검출된 DEG의 확인을 위하여 분석된 유전자 염기서열을 기준으로 PCR 결과물의 크기가 150~200 bp 사이가 될 수 있도록 PCR primer를 작성하였다(Table 3). 반응 혼합물 총 20 µl에 10 µl의 SYBR Premix Ex Taq™ (Takara-bio Inc., Japan)과 제작한 10 uM Real-time PCR용 primer를 forward와 reverse를 0.4 µl씩 첨가하고 각각 sample의 cDNA를 0.2 µg을 주형으로 하여 Rotor-Gene™ 3000 real-time PCR 기계(Corbett Life Science Co., Australia)를 사용하여 real-time PCR을 수행하고 결과를 Roter-Gene™ (v6.034) software를 이용하여 Delta-Delta-CT 방법으로 분석하였다[10].

결 과

잎 가장자리 유사분열조직의 관찰

관찰된 잎의 가장자리는 budding이 준비되는 단계에 따라 왕성한 체세포분열의 양상을 보이며, 이후 세포의 분열이 집중되는 유사분열조직(meristemoid)의 형태로 분화되는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 이후 유사분열조직의 왕성한 세포분열을 통하여 budding이 일어나 발생단계인 heart stage의 embryo 형태의 소식물체를 관찰할 수 있었다.

Differentially expressed gene (DEG)의 검출

총 120 조합의 ACP primer를 이용한 DEG PCR을 통하여 채취 조직에 따라 서로 다른 유전자 발현 양상을 보이는 66개의 DEG 후보 군을 확인하였다(대표 예, Fig. 2A). 선발된 DEG 후보 군의 염기서열을 확보하였다(Table 1). 유전자 염기서열을 바탕으로 BlastN program을 이용한 분석에서 유전자 서열 database와 유의성을 보이는 clone은 23개였으며 나머지 43개의 clone의 염기서열은 유의성을 보이는 정보를 얻지 못하였다. 동일한 DEG 염기서열을 BlastX program을 통해 번역된

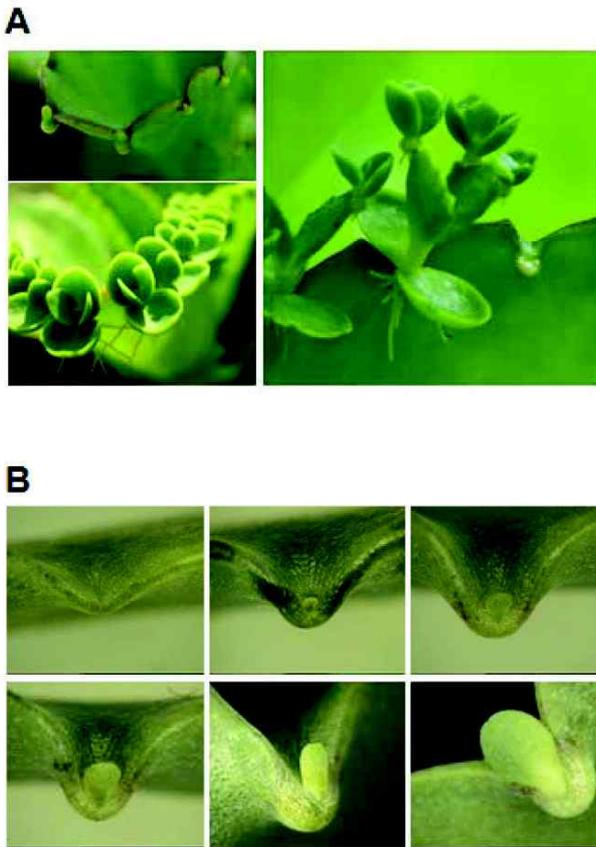


Fig. 1. Plantlet formation on leaf crenate margin in *K. pinnata*. (A) Overview of asexual reproduction in *K. pinnata* leaf crevice notch. (B) Exchange of external structure during plantlet formation on leaf crenate margin.

염기서열과 단백질 database와의 유의성 검색하였다. 이 결과에서는 nucleotide database 검색과는 달리 총 35개의 유의성 있는 clone이 선발되었다. 이것은 염기서열에서는 유의성을 보이지 않으나 단백질 서열로 번역하였을 때 확인되는 단백질 아미노산 서열이 유의성을 보인다는 것으로서 12개의 clone에서 이와 같은 결과가 도출되었다. 유의성 분석으로 선발된 유전자는 신호체계에서의 위치를 파악할 수 있는 선행 논문을 기초로 분석되었다.

Real-time PCR을 이용한 DEG clone의 발현 양상 분석

기능이 알려져 있는 유전자인 NAC-domain 단백질, Cytochrome p450, Metallothionein, rpL2, rpL32 유전자를 대표적으로 선발하여, 모체 식물의 crenate margin 부위에서 발생하는 소식물체의 발생단계에 따라 각각의 유전자의 발현 양상의 변화를 quantitative real-time PCR을 이용하여 분석하였다. 18S ribosomal RNA를 기준으로 delta-delta CT 분석법으로 각 유전자의 발현양을 분석한 결과 Fig. 2B에 나타난 바와 같이 소식물체가 발생하지 않은 비유도성 단계의 조직을

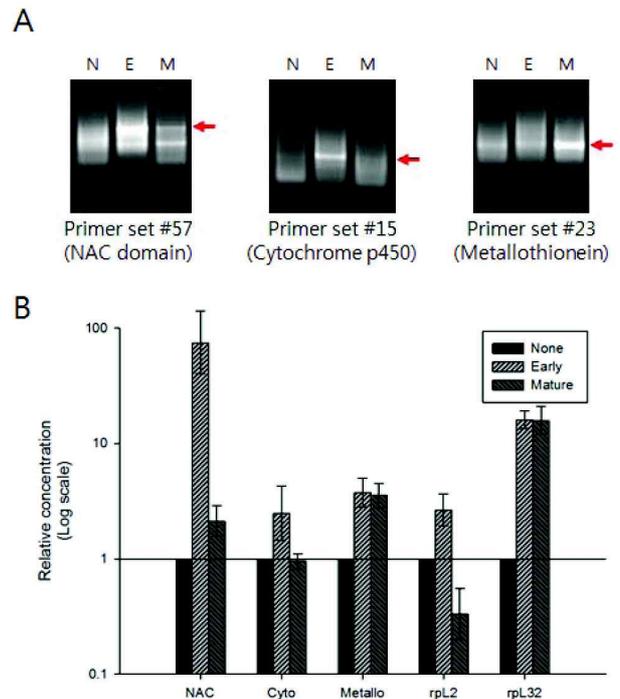


Fig. 2. Screening of differentially expressed genes (DEGs). Target tissues were harvested at different stage during plantlet formation on leaf crenate margin in *K. pinnata*. Total RNAs were extracted from these tissues and used for DEG PCR screening (A) and quantitative real-time PCR (B). (A) The PCR amplicon was used to three different random primer set (#15, #23, #57). (B) Relative concentration of DEG candidates. N: none-induced, E: Early point induced, M: Mature formation of plantlet

기준으로 발생의 초기 단계에 높은 수준으로 발현 양이 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 유전자를 cloning할 때 사용한 DEG의 결과와 동일하거나 유사하였다. 특히 NAC domain 단백질의 경우에는 초기 발현이 급격히 증가하였고, 이후 소식물체가 성숙된 이후에도 비유도성 단계보다 발현을 높게 유지함을 확인할 수 있었다. 이러한 발현의 양상은 cytochrome p450에서도 확인되었다. Metallothionein과 rpL32의 경우, 소식물체의 발생 초기에 높아진 유전자의 발현이 이후 꾸준히 유지되고 있음을 확인할 수 있었다. 특히 할만한 것은 rpL2의 경우는 소식물체의 발생 초기단계에는 그 발현 양이 증가되는 것으로 확인되었으나, 이후 소식물체의 발생이 완료된 성숙 단계에서는 오히려 발현 양이 비유도성 단계보다 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

고 찰

유사분열조직의 발생

*Kalanchoe pinnata*는 주변 환경에 따라 잎의 톱니형 가장자

Table 1. Clone list of Differentially expressed gene (DEG)

Clone	Expression stage	Size	BlastN search result	BlastX search result
1	E-stage Up	700	Unknown sequence	Unknown protein
2	E-stage Up	300	Heat shock protein	Heat shock protein
3	L-stage Up	400	Unknown sequence	Unknown protein
4	L-stage Up	500	Unknown sequence	Heme binding protein
5	N,E-stage only	300	Al-induced protein	Al-induced protein
6	N,E-stage only	600	Unknown sequence	SH3
7	N-stage UP	300	Unknown sequence	No significant similarity found
8	E-stage Up	400	Unknown sequence	Dimeric α - β barrel
9	E-stage only	500	Unknown sequence	No significant similarity found
10	E-stage only	500	Unknown sequence	MYB transcription factor
11	E-stage only	800	Unknown sequence	Unknown protein
12	L-stage only	1000	Cytochrome p450	cytochrome p450
13	L-stage only	900	Unknown sequence	Unknown protein
14	E,L-stage only	500	Unknown sequence	Metallothionein
15	L-stage Over	300	Unknown sequence	No significant similarity found
16	L-stage over	500	Unknown sequence	Unknown protein
17	E-stage only	300	Unknown sequence	No significant similarity found
18	L-stage only	500	Unknown sequence	Unknown protein
19	N,E-stage only	300	Unknown sequence	rpL31
20	L-stage over	400	ACC Oxidase	ACC Oxidase
21	L-stage over	600	S-adenosylmethionine decarboxylase	S-adenosylmethionine decarboxylase
22	L-stage over	1000	ARG10	ARG10
23	E-stage only	600	Unknown sequence	Unknown protein
24	E-stage over	300	Unknown sequence	Unknown protein
25	L-stage only	400	Unknown sequence	Pectinesterase PECS-c2
26	E-stage over	250	rpL2	rpL2
27	E,L-stage only	1200	Unknown sequence	Exonuclease
28	N,E-stage only	800	Cellulose synthase-like A1	Cellulose synthase-like protein
29	L-stage only	700	Unknown Sequence	Unknown protein
30	E-stage over	700	ly200, rpL32	ly200, rpL32
31	E-stage only	300	Acyl-CoA binding protein	Acyl-CoA binding protein
32	N-stage only	700	Unknown sequence	Unknown protein
33	E-stage only	600	Unknown sequence	Dicarboxylate carrier protein
34	L-stage only	700	Ribosomal protein L26	Ribosomal protein L24/26
35	N-stage over	1000	Unknown sequence	Unknown protein
36	E-stage over	500	Unknown sequence	Unknown protein
37	E-stage over	1000	ZIP	Leucine zipper protein (ZIP)
38	E-stage over	500	Heat shock protein	Heat shock protein 18
39	E-stage over	900	Unknown sequence	NAC-domain protein (NAM protein)
40	L-stage over	500	Unknown sequence	Unknown protein
41	L-stage over	500	Unknown sequence	Unknown protein
42	N,L-stage only	500	Unknown sequence	Cytochrom p450
43	E-stage over	300	Unknown sequence	No significant similarity found
44	E-stage over	500	Photosystem I subunit	Photosystem I subunit
45	E-stage over	500	Unknown sequence	No significant similarity found
46	N,E-stage only	700	Heat shock protein	Heat shock protein
47	N,L-stage only	300	Unknown sequence	No significant similarity found
48	E-stage only	200	Unknown sequence	Unknown protein
49	E-stage over	500	Chlorophyll a/b-binding protein	Chlorophyll a/b-binding protein
50	N-stage only	600	Unknown sequence	Isoflavone reductase-like protein
51	E-stage over	600	Chlorophyll a/b-binding protein	Chlorophyll a/b-binding protein
52	E-stage only	200	Unknown sequence	No significant similarity found
53	E-stage over	800	Carboxypeptidase	Serine carboxypeptidase
54	E-stage over	1000	Leucine zipper protein	Leucine zipper protein
55	L-stage over	400	Unknown sequence	Unknown protein
56	E-stage over	600	Athb-10, ribosomal protein S17	Ribosomal protein S17
57	N,L-stage only	400	Unknown sequence	RAV transcription factor
58	E-stage over	500	Unknown sequence	Unknown protein
59	N,L-stage only	600	Unknown sequence	Unknown protein
60	L-stage over	300	Unknown sequence	No significant similarity found
61	E-stage over	400	Peptidylprolyl isomerase	Peptidylprolyl isomerase
62	L-stage only	500	Translation initiation factor SUI1	Translation initiation factor SUI1
63	E-stage over	400	Cullin 3	Cullin
64	L-stage over	500	dehydration protein	No significant similarity found
65	N,L-stage over	400	Unknown sequence	Unknown protein
66	E-stage only	500	Unknown sequence	Unknown protein
67	E-stage over	1200	Unknown sequence	Unknown protein
68	L-stage over	1100	Serine/threonine protein kinase	Serine/threonine protein kinase
69	E-stage over	400	Unknown sequence	No significant similarity found

리 부위(crenate margin)에서 소식물체를 무성영양번식을 통하여 생산한다. Fig. 1A에서 확인 되는 바와 같이 잎 가장자리 부위에서 발생하는 소식물체는 완전한 식물체로 분화된다. 또한 모체에서 탈리 되지 않은 상태의 소식물체에서도 환경 여건에 따라 다시 소식물체를 발생시키는 현상을 관찰할 수 있다. 발생된 core가 점차 세포분열을 진행하면서 분열조직(meristem)의 형태로 분화하는 모습을 보여 주었다. 이러한 분열조직은 일반적으로 apical, basal, axillary meristem에서 나타나는 것으로 알려져 있으나 *K. pinnata*에서는 이러한 분류에 속하지 않은 meristem의 형태를 나타내었다. 이후 생성된 meristem 유사 조직에서 급속하게 분열한 세포들이 somatic embryo의 형태로 발생되어 이후 진충조직(complementary tissue)과 비슷한 형태로 잎의 표피를 뚫고 나와 소식물체를 형성하는 것으로 생각된다.

특이한 것은 budding되는 소식물체가 배발생의 과정을 거치는 것으로 관찰된다는 것인데, 이러한 특징은 애기장대를 비롯한 모델 식물에서의 *in vitro* culture 동안 관찰되는 직접적인 somatic embryogenesis [20]와 유사성을 가지는 발생의 형태이나 외부 조절에 영향 없이 식물 자체에서 나타나는 차별화된 somatic embryogenesis의 발생 단계를 거친다.

잎의 가장자리에서 발생하는 소식물체 발생에 관련한 유전자의 검색

DEG PCR을 통하여 총 67개의 budding 단계에 따라 다른 발현 양상을 보이는 유전자를 검출하였고(Table 2) NCBI database와 유사성 검색 결과 38개의 유의성 있는 유전자를 검출할 수 있었다(Table 3). Blastn과 blastx의 database 검색 결과 중 최대 검색 점수가 전체 nucleotide sequence의 60% 미만이거나 e-value가 $1e-05$ 이상의 값을 가지는 결과는 알려지지 않은 sequence로 분류하였으며, search 결과 중 식물에 관련한 유전자가 검색되지 않을 경우도 알려지지 않은 sequence로 표기하였다. 14개의 clone에서 blastX와 blastN 검색에서 상이한 결과를 나타냈으며, blastX의 검색을 기준으로 DEG 유전자의 기능을 예상하였다. Table 2에서는 검색된 DEG 유전자의 식물 발생 혹은 cell cycle에 관련한 기능을 표기하였다.

유전자의 기능별로 구분하였을 때, 크게 cytokinin 관련된 유전자집단과 ethylene 관련된 유전자 집단과 세포성장에 관련한 유전자 집단으로 분류되었다.

유전자의 기능 검색 과정에서 초기단계에서 유도되거나 높은 발현율을 갖는 유전자의 대부분이 cytokinin과 연관되었다. 식물호르몬인 cytokinin은 세포분열과 발생에 관여하며, 특히 분열조직의 발생이나 액아생성 개시에 결정적인 호르몬으로 작용한다[20]. 이에 따라 초기단계에서 유도 혹은 높은 발현율을 갖는 유전자와 cytokinin과의 연관성을 검색하였다. Cytochrome p450과 유의성을 갖는 12번, 42번 Clone은 비유도성단계와 말기단계에서 발현을 보였다. Cytochrome p450

은 wound stress에 직접 반응하여 세포분열을 조절하며, cytokinin의 축적에 연관되어 있다. Budding을 준비하는 단계에서 초기에 cytokinin의 세포 내 합성을 촉진하여 이후의 발생 단계를 유도하는 것으로 생각된다. 더불어 cytochrome p450은 ethylene에 의하여 조절된다[36]. Ethylene은 식물의 성숙에 관여하므로 이 시기에 cytochrome p450은 세포질량증가에 관여하는 것으로 예상된다. 따라서 초기에 발현되는 cytochrome p450은 cytokinin과 연관되어 세포분열을 유도하며 이후 ethylene에 의하여 재 유도된 cytochrome p450은 세포성장에 관련하여 작용한다고 생각된다[21]. NAC-domain 단백질과 MYB 전사요소는 cytokinin에 의해 조절되어 세포분열에 관여한다고 알려져 있다[23]. 또한 다양한 leucine zipper protein (ZIP)은 전사요소로 유전자의 발현을 조절한다[18]. 다양한 ZIP protein family 중에 class III HD ZIP은 cytokinin에 영향을 받아 목부와 사부의 발생에 관여한다고 알려져 있다[49]. Budding의 초기단계에서 이상의 3가지 DEG clone들이 cytokinin의 down-regulation을 받는 것으로 예상된다. Budding의 과정에서 cytokinin의 축적을 확인하기 위하여 소식물체의 발생에 따라 축적되는 anthocyanin을 측정하였다. 발생 단계에 따른 anthocyanin의 축적은 cytokinin에 의해 조절된다 [11].

*Kalanchoe pinnata*에서도 budding의 단계가 진행될수록 anthocyanin이 축적되는 양상을 확인하였고, 이러한 결과를 통해 간접적으로 소식물체 발생의 초기단계부터 cytokinin이 관여함을 예상할 수 있었다. Anthocyanin의 축적은 cytokinin외에 ethylene에 의해 유도되기도 하는데[40], 본 실험에서 20번 DEG clone은 ethylene의 생합성에 결정적 효소인 ACC Oxidase와 유의성을 가지며 budding 전 단계에 걸쳐 발현되고 특히 후기 발생 단계에서 높은 발현을 보였다. Budding의 단계에서 *K. pinnata*의 잎에 축적되는 anthocyanin은 1차적으로는 meristemoid가 형성되는 잎의 margin 부분에 축적되며 이후 소식물체의 발생이 완료된 후에 성숙 단계에서 잎의 전체적으로 anthocyanin의 축적이 일어나는 표현형이 공통적으로 관찰되므로 anthocyanin의 축적에 cytokinin이 ethylene보다 upstream에 있다고 가정할 수 있으며, 세포분열의 과정에 cytokinin이 위치한다는 것을 뒷받침한다.

ROF1 (peptidylprolyl isomerase, clone #61)은 환경적인 stress에 의해 식물의 발생에 관여한다고 알려져 있으며[47], 또한 NAC-domain 단백질과 연관되어 있음이 보고되어 있다[2]. 비슷하게 isoflavone reductase (clone #50)도 비생물학적 stress에 의해 유도되고[45] 발현한 isoflavone reductase가 이차물질대사에 관여한다고 알려져 있다[42]. 따라서 budding의 초기에 높은 발현을 보여준 isoflavone reductase는 meristemoid의 세포분열단계에서 upstream에 위치한다고 여겨진다.

ACC oxidase (clone #20)에 의해 생성된 ethylene은 antho-

Table 2. The expected function of DEG clones

Clone number	Primer set	Significant alignments	Function	Reference
2	3	Heat shock protein	Stress response and influence the efficiency of protein import to mitochondrial matrix	[13]
4	6	Heme binding protein	Cytochrome C maturation in plant mitochondria	[43]
5	8	Stem-specific protein TSJT1	Unknown or unclassified function	Accession number ABG22364
6	8	SH3; clathrin-binding	Formation, fission, and uncoating of clathrin-coated vesicle	[26]
8	11	Dimeric α - β barrel	Related embryonic factor 1	[19]
10	14	MYB transcription factor	The aerial plant epidermis development	[41]
12	15	Cytochrome p450	Related cell mass production	[21]
14	23	Metallothionein	Ethylene-promoted leaflet abscission	[8]
19	33	rpL31	Chloroplast 50S ribosomal protein subunit	Accession number NP565109
20	33	ACC Oxidase	Ethylene biosynthesis	[33]
21	35	S-adenosylmethionine decarboxylase	Key enzyme of polyamine biosynthetic pathway	[16]
22	35	ARG10	Auxin down-regulation involved in elongation growth	[15]
25	37	Pectin methylesterase	Involved in developmental processes (cellular adhesion and stem elongation)	[32]
26	38	rpL2	Peptidyltransferase activity	[29]
27	39	Exonuclease	Process mature 3'-ends of mRNA	[7]
28	40	Cellulose synthases-like protein	Cell wall formation	[4]
30	41	rpL32	Potential transcriptional regulator in nucleus	[22]
31	43	Acyl-CoA binding protein	Membrane-associated acyl-CoA transfer/metabolism	[27]
33	45	Dicarboxylate carrier protein	Organic acid flux to of from mitochondria, and fatty acid elongation	[37]
34	45	rpL24/26	Key factor for translation reinitiation of downstream ORFs	[34]
37	55	Leucine zipper protein	Transcription factor and related meristem development	[18]
38	57	Heat shock protein	Stress response and influence the efficiency of protein import to mitochondrial matrix	[13]
39	57	NAC-domain protein	Develop shoot apical meristems, shoot, and leaves	[14]
42	64	Cytochrome p450	Related cell mass production	[21]
44	65	Photosystem I subunit	Related light reaction	[31]
46	66	Heat shock protein	Stress response and influence the efficiency of protein import to mitochondrial matrix	[13]
49	74	Chlorophyll a/b-binding protein	Related light reaction	[31]
50	76	Isoflavone reductase-like protein	Drought-responsive protein, and related pollen tube growth	[45]
51	80	Chlorophyll a/b-binding protein	Related light reaction	[31]
53	82	Serine carboxypeptidase	Related reproductive and vegetative development	[5]
54	83	Leucine zipper protein	Transcription factor and related meristem development	[18]
56	91	rpS17	Post-transcriptional processed	[44]
57	93	RAV transcription factor	Related ER homeostasis and inhibition of post-germinative growth	[48]
61	101	Peptidylprolyl isomerase (ROF1)	Developmentally regulated protein folding, signal transduction and chaperone activity	[2]
62	105	Translation initiation factor SUI1	Accurate initiator codon recognition during translation initiation	Accession number NP175831
63	108	Cullin	SCFs subunit. Light-regulated gene expression of development	[16]
64	108	Dehydration protein	Related abiotic and biotic stress	[1]
68	118	Serine/threonine protein kinase	Related cell cycle with plant development	[20]

Table 3. Sequence of oligonucleotide primers used for real-time PCR analysis

Name	Sequence of oligonucleotide (5'-3')	Size (mer)
18S_R_S	TTCTTGATTCTATGGGTGGTGGT	23
18S_R_A	CAGGCTGAGGTCTCGTTCGT	20
NAC_R_S	CGGGATAGACCGCAAGATTAC	21
NAC_R_A	AGTCAGTCCTGGTCCCTTGTTA	23
Cyto_R_S	GGGCTATGGCTGAGATTGTGA	21
Cyto_R_A	GCATTGGAGGTATGGAAGGTTT	22
Meta_R_S	TCCGCCTGCGCTAACTG	17
Meta_R_A	GGAGCATCCACCACAACG	18
rpL2_R_S	TGGCTAGGTAAGCGTCTGT	20
rpL2_R_A	CTACGGCGACGAAGAATCA	19
rpL32_R_S	TTTGTGGTGCACAATGTCAA	20
rpL32_R_A	TTCATCCTCCTGGCTCCTAA	20

cyanin을 축적시키는 것 외에 metallothionein (clone #14)과 serine/threonine protein kinase (clone #68)을 유도 한다 [8,40]. Metallothionein은 일반적으로 중금속의 흡착과 관련되어 있다고 알려져 있으나[24] ethylene과 연관되어 잎의 성숙에 관여한다고도 보고되어 있다[8]. Serine/threonine protein kinase도 ethylene의 신호기작과정에 연결되어 잎 노화에 관여한다고 보고되어 있다[40]. Ethylene의 신호기작과정과 연관되어 발생단계에서 빛 조절을 담당하는 SCF subunit인 CULLIN (clone #63) [16]은 발생의 전 단계에 걸쳐 고루 발현하고 특히 세포분열의 단계에서 높은 발현율을 보였다.

세포분열단계에 관여한다고 생각되어지는 줄기에만 특이하게 발현되는 단백질; TSJT1 (clone #5), SH3 (clone #6), dimeric α - β barrel (clone #8), ribosomal 단백질 L2, L31, L32, S17 (clone #26, #19, #30, #56), cellulose synthases-like protein (clone #28), acyl-CoA binding protein (clone #31), dicarboxylate carrier protein (clone #33), photosystem I subunit (clone #44), chlorophyll a/b-binding protein (clone #49), serine carboxypeptidase (clone #53)은 세포의 성장에 관련되어진 유전자로 검색되었다. 특히 dimeric α - β barrel은 embryo를 생성하는 단계에서 발현된다고 알려져 있고[25], serine carboxypeptidase은 체세포 성장에 관련되어 있으며 [5], 세포벽의 합성에 관련한 cellulose synthases-like protein[4]의 발현들이 관찰됨으로써 budding 단계 중 초기단계에서 잎의 가장자리 부분에서 세포분열이 활발하게 일어나고 있음을 증명하고 있다.

발생의 후반기에 높은 발현을 보이는 S-adenosylmethionine decarboxylase (clone #21), ARG10 (clone #22), pectin methylesterase (clone #25), ribosomal protein L24/26 (clone #34), RAV transcription factor (clone #57)은 세포의 성장에 관련하며, 식물체의 성숙을 유도하는 것으로 예상된다. ARG10과 pectin methylesterase는 세포의 신장에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이 단계에서도 세포벽의 합성

에 관여하는 cellulose synthases-like protein이 발현됨을 확인하였다. 이러한 세포 성장에 관련한 유전자 group은 비유도성 단계에서는 발현을 보이지 않다가 초기단계나 말기단계에서 고루 발현하는 현상을 보였다.

*Kalanchoe pinnata*에서 budding 과정을 거쳐 식물체의 발생에 cytokinin과 ethylene이 주요 hormone으로 작용한다고 예상되며, 각 유전자 간의 연관성을 인용논문을 기준으로 하여 DEG clone 간의 예상되는 과정을 Fig. 3에 표시하였다.

무성영양번식의 방법은 모체의 유전정보를 그대로 유지한 채 새로운 개체를 생산할 수 있는 주목할 만한 특징을 갖는다. 보통의 경우, 이러한 무성영양번식은 특정 세포의 조직분화를 통해 이루어지는데 반하여, *K. pinnata*의 경우에는 완전한 유식물체를 체세포조직에서 발생시킨다는 독특한 특징을 보인다. 본 연구에서는 이러한 *K. pinnata*의 독특한 무성영양번식과 관련한 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 각 시기별 유전자 발현양의 변화를 검출할 수 있는 DEG PCR 방법을 이용하여 유전자의 검색을 시도하였다. 검출된 DEG 중 많은 경우에 있어서 기존 database와 유의성을 갖지 못하였으나, 알려진 기능의 분석을 토대로 발현된 유전자간의 상호신호전달 네트워크를 예상해 보았을 때 검색된 유전자의 대부분이 cell division과 관련된 신호전달 체계에 위치하고 있음을 확인할 수 있었다. 그 중 NAC-domain protein의 경우 세포 분화에 관련된 유전자로서 활성이 알려져 있고, 체세포에서의 발현양은 미미하다고 보고가 되어 있으나, *K. pinnata*의 유사분열조직에서 높은 수준으로 발현이 향상됨을 확인할 수 있었다. 이와 같이 분열조직과 달리 체세포조직에서의 발현이 높지 않은 유전자들이 유식물체의 발생 단계에 따라 그 발현양의 변화를 보임을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 *K. pinnata* 잎의 톱니형 가장자리부분이 새로운 형태의 유사분열조직(meristemoid)으로 특징지어질 수 있음을 시사한다. 본 연구를 통하여 *K. pinnata*의 무성영양번식과 관련한 모든 유전자의 신호전달 체계를 설명할 수는 없지만, 계속 이어지는 연구를 통하여 각

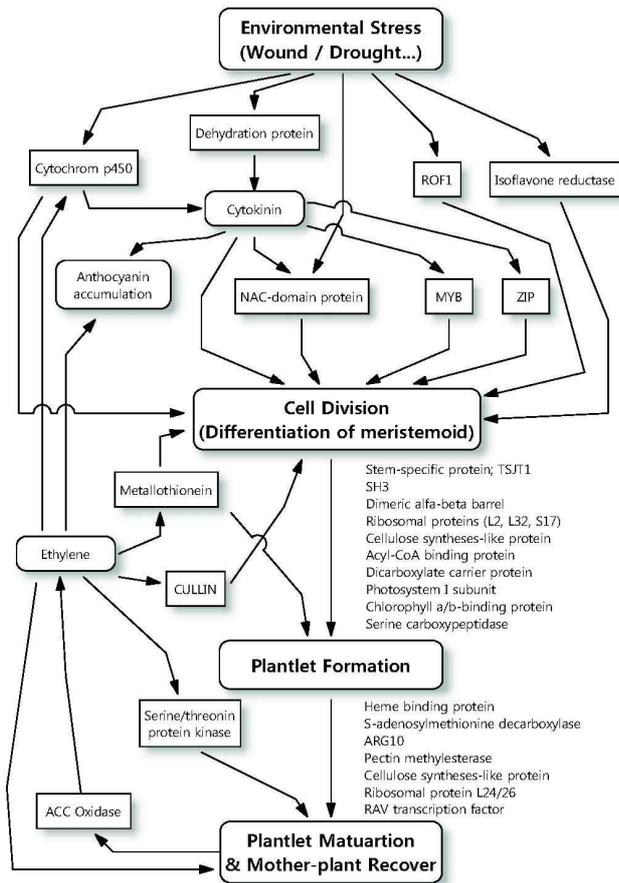


Fig. 3. Hypothesis of gene expression network for budding reproduction.

유전자의 선택적 발현을 통해 무성영양번식의 주요 신호전달 방법을 예측할 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Agarwal, P., M. Reddy, and S. Sopory. 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep* **25**, 1263-1274.
2. Aviezer-Hagai, K., J. Skovorodnikova, M. Galigniana, O. Farchi-Pisanty, E. Maayan, E. Bocovza, Y. Efrat, P. von Koskull-Dring, N. Ohad, and A. Breiman. 2007. *Arabidopsis* immunophilins ROF1 (AtFKBP62) and ROF2 (AtFKBP65) exhibit tissue specificity, are heat-stress induced, and bind HSP 90. *Plant Mol. Biol.* **63**, 237-255.
3. Bobich, E. G. and P. S. Nobel. 2001. Vegetative reproduction as related to biomechanics, morphology and anatomy of four cholla cactus species in the Sonoran Desert. *Annals Bot.* **87**, 485-493.
4. Brown, D. M., L. A. H. 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.

5. Cercós, M., C. Urbez, and J. Carbonell. 2003. A serine carboxypeptidase gene (PsCP), expressed in early steps of reproductive and vegetative development in *Pisum sativum*, is induced by gibberellins. *Plant Mol. Biol.* **51**, 165-174.
6. Chang, C. 1996. The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis*: an emerging paradigm? *Trends Biochem. Sci.* **21**, 129-133.
7. Chiba, Y., M. A. Johnson, P. Lidder, J. T. Vogel, H. van Erp, and P. J. Green. 2004. AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in *Arabidopsis*. *Gene* **328**, 95-102.
8. Coupe, S. A., J. E. Taylor, and J. A. Roberts. 1995. Characterisation of an mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted abscission of *Sambucus nigra* L. leaflets. *Planta* **197**, 442-447.
9. de Almeida Engler, J., R. De Groot, M. Van Montagu, and G. Engler. 2001. *In situ* hybridization to mRNA of *Arabidopsis* tissue sections. *Methods* **23**, 325-334.
10. Debrektion, A, T. Habtemariam, S. Wilson, D. Nganwa, and T. Yehualaeshet. 2007. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Mol. Cell. Probes* **21**, 177-181.
11. Deikman, J. and P. E. Hammer. 1995. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **108**, 47-57.
12. Devkota, M. P. and G. Glatzel. 2007. Comparative haustorium morphology and vegetative reproduction in the Old World genus *Scurrula* L. (Loranthaceae) from the Central Nepal Himalayas. *Flora - Morphology, Distribution. Funct. Ecol. Plants* **202**, 179-193.
13. Dudley, P., C. K. Wood, J. R. Pratt, and A. L. Moore. 1997. Developmental regulation of the plant mitochondrial matrix located HSP70 chaperone and its role in protein import. *FEBS Lett.* **417**, 321-324.
14. Duval, M., T. F. Hsieh, S. Y. Kim, and T. L. Thomas. 2002. Molecular characterization of AtNAM: a member of the *Arabidopsis* NAC domain superfamily. *Plant Mol. Biol.* **50**, 237-248.
15. Elster, C. and L. Perdomo. 1999. Rooting and vegetative propagation in *Laguncularia racemosa*. *Aquatic Bot.* **63**, 83-93.
16. Ge, C., X. Cui, Y. Wang, Y. Hu, Z. Fu, Zhang, D. Z. Cheng, and J. Li. 2006. *BUD2*, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for *Arabidopsis* growth and development. *Cell Res.* **16**, 446-456.
17. Gehrig, H. H., K. Winter, J. Cushman, A. Borland, and T. Taybi. 2000. An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Rep.* **18**, 369-376.
18. Green, K. A., M. J. Prigge, R. B. Katzman, and S. E. Clark. 2005. CORONA, a Member of the Class III Homeodomain Leucine Zipper Gene Family in *Arabidopsis*, Regulates Stem Cell Specification and Organogenesis. *Plant Cell* **17**, 691-704.
19. Han, B. W., C. A. Bingman, D. K. Mahnke, R. M. Bannen, S. Y. Bednarek, R. L. Sabina, and G. N. Phillips Jr. 2006. Membrane association, mechanism of action, and structure

- of *Arabidopsis* embryonic factor 1 (FAC1). *J. Biol. Chem.* **281**, 14939-14947.
20. Inze, D. and L. De Veylder. 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Rev. Gen.* **40**, 77-105.
 21. Ito, T. and E. M. Meyerowitz. 2000. Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, CYP78A9, induces large and seedless fruit in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 1541-1550.
 22. Jing, W., Y. Sheng, and S. Jang. 2006. The ribosomal protein L32-2 (RPL32-2) of *S. pombe* exhibits a novel extraribosomal function by acting as a potential transcriptional regulator. *FEBS Lett.* **580**, 1827-1832.
 23. Kim, Y. R., J. S. Kim, S. H. Lee, W. R. Lee, J. N. Sohn, Y. C. Chung, H. K. Shim, S. C. Lee, M. H. Kwon, and Y. S. Kim. 2006. Heavy and light chain variable single domains of an anti-DNA binding antibody hydrolyze both double- and single-stranded DNAs without sequence specificity. *J. Biol. Chem.* **281**, 15287-15295.
 24. Komsta-Szumaska, E. and J. Chmielnicka. 1983. Effect of zinc, cadmium or copper on mercury distribution in rat tissues. *Toxicol. Lett.* **17**, 349-354.
 25. Kuroha, T., C. Ueguchi, H. Sakakibara, and S. Satoh. 2006. Cytokinin Receptors are required for Normal Development of Auxin-transporting Vascular Tissues in the Hypocotyl but not in Adventitious Roots. *Plant Cell Physiol.* **47**, 234-243.
 26. Lam, B. C., T. L. Sage, F. Bianchi, and E. Blumwald. 2001. Role of SH3 domain-containing proteins in clathrin-mediated vesicle trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 2499-2512.
 27. Li, H. Y. and M. L. Chye. 2003. Membrane localization of *Arabidopsis* acyl-CoA binding protein ACBP2. *Plant Mol. Biol.* **51**, 483-492.
 28. Li, S., L. Yin, E. S. Cole, R. A. Udani, and K. M. Karrer. 2006. Progeny of germ line knockouts of ASI2, a gene encoding a putative signal transduction receptor in *Tetrahymena thermophila*, fail to make the transition from sexual reproduction to vegetative growth. *Develop Biol.* **295**, 633-646.
 29. Ludwig, A. and R. Tenhaken. 2001. Suppression of the ribosomal L2 gene reveals a novel mechanism for stress adaptation in soybean. *Planta* **212**, 792-798.
 30. Malagnac, F., H. Lalucque, G. Lepere, and P. Silar. 2004. Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 982-997.
 31. Merchant, S. and M. R. Sawaya. 2005. The light reactions: A guide to recent acquisitions for the picture gallery. *Plant Cell* **17**, 648-663.
 32. Micheli, F. 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* **6**, 414-419.
 33. Millenar, F. F., M. C. Cox, Y. E. van Berkel, R. A. Welschen, R. Pierik, L. A. Voesenek, and A. J. M. Peeters. 2005. Ethylene-induced differential growth of petioles in *Arabidopsis*. Analyzing natural variation, response kinetics, and regulation. *Plant Physiol.* **137**, 998-1008.
 34. Nishimura, T., T. Wada, and K. Okada. 2004. A key factor of translation reinitiation, ribosomal protein L24, is involved in gynoecium development in *Arabidopsis*. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 611-613.
 35. Pfeiffer, T. 2007. Vegetative multiplication and patch colonisation of *Asarum europaeum* subsp. *europaeum* L. (Aristolochiaceae) inferred by a combined morphological and molecular study. *Flora-Morphology, Distribution. Funct. Ecol. Plants* **202**, 89-97.
 36. Pi, Y., Z. Liao, Y. Chai, H. Zeng, P. Wang, Y. Gong, Y. Pang, X. Sun, and K. Tang. 2006. Molecular cloning and characterization of a novel stem-specific gene from *Camptotheca acuminata*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **39**, 68-75.
 37. Picault, N., L. Palmieri, I. Pisano, M. Hodges, and F. Palmieri. 2002. Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* **277**, 24204-24211.
 38. Sakakibara, H. and L. Gerald. 2005. Cytokinin biosynthesis and regulation. pp. 271-287. *Vitamins and hormones*. Vol. 72, Academic press.
 39. Sawhney, N. and S. Sawhney. 2002. Local anaesthetic lidocaine modulates epiphyllous bud differentiation in *Kalanchoe pinnata*. *Plant Growth Regul.* **38**, 45-49.
 40. Schaller, G. E. 1997. Ethylene and cytokinin signaling in plants: the role of two-component systems. *Essays Biochem.* **32**, 10-11.
 41. Serna, L. and C. Martin. 2006. Trichomes: different regulatory networks lead to convergent structures. *Trends Plant Sci.* **11**, 274-280.
 42. Shoji, T., R. Winz, T. Iwase, K. Nakajima, Y. Yamada, and T. Hashimoto. 2002. Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco. *Plant Mol. Biol.* **50**, 427-440.
 43. Spielewoy, N., H. Schulz, J. M. Grienberger, L. Thony-Meyer, and G. Bonnard. 2001. CCME, a nuclear-encoded heme-binding protein involved in cytochrome c maturation in plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**, 5491-5497.
 44. Thompson, M. D., C. M. Jacks, T. R. Lenvik, and J. S. Gantt. 1992. Characterization of rps17, rp19 and rpl15: three nucleus-encoded plastid ribosomal protein genes. *Plant Mol. Biol.* **18**, 931-944.
 45. van Eldik, G. J., R. K. Ruiters, P. H. W. N. Colla, M. M. A. van Herpen, J. A. M. Schrauwen, and G. J. Wullems. 1997. Expression of an isoflavone reductase-like gene enhanced by pollen tube growth in pistils of *Solanum tuberosum*. *Plant Mol. Biol.* **33**, 923-929.
 46. Weber, H., A. Chetelat, P. Reymond, and E. E. Farmer. 2004. Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *Plant J.* **37**, 877-888.
 47. Werner, T., V. Motyka, V. Laucou, R. Smets, H. Van Onckelen, and T. Schmulling. 2003. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**, 2532-2550.
 48. Zeng, Y. and A. R. Kermode. 2004. A gymnosperm ABI3 gene functions in a severe abscisic acid-insensitive mutant

of *Arabidopsis* (*abi3-6*) to restore the wild-type phenotype and demonstrates a strong synergistic effect with sugar in

the inhibition of post-germinative growth. *Plant Mol. Biol.* **56**, 731-746.

초록 : *Kalanchoe* 식물의 영양 번식에 영향을 줄 수 있는 유전자들의 선발

정유철¹ · 정영재² · 김동균^{3*}

(¹성균관대학교 유전공학과, ²신경대학교 생명공학과, ³신라대학교 생물학과)

Bryophyllum 속에서 그것들의 잎으로부터 소식물체를 생산하는 능력을 갖고 있는 많은 종들이 잘 알려졌다. 이러한 현상은 또한 식물 영양생식으로 알려져 있다. DEG 유전자 감지 기술이 소식물체 형성을 위한 무성생식과정에 관련된 유전자의 조사에 적용되었다. 탐색된 유전자들은 NCBI 데이터베이스를 사용한 검색법을 기반으로, 총 69 DEGs에서 38 유전자가 발견되었다. 대부분의 이러한 DEGs는 호르몬(cytokinin과 에틸렌) 신호, 세포 신호 전달, 그리고 세포 분열과 관련된 유전자들이었다.