

기내배양 홍띠 단계별 재분화체의 기관분화 관련 유전자 발현과 ISSR에 기반한 유전적 안정성 분석

이예진¹, 강인진¹, 배창휴^{2,3*}

¹순천대학교 대학원 식물생산과학부, 대학원생, ²교수, ³순천대학교 농생명과학과 교수

Expression of Organogenesis-related Genes and Analysis of Genetic Stability by ISSR Markers of Regenerants Derived from the Process of *in vitro* Organogenesis in Japanese Blood Grass (*Imperata cylindrica* 'Rubra')

Ye-Jin Lee¹, In-Jin Kang¹ and Chang-Hyu Bae^{2,3*}

¹Graduate School Student and ²Professor, Department of Plant Production Sciences, Graduate School of Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

³Professor, Department of Agricultural Life Sciences, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

Abstract - The *in vitro* organogenesis is one of important issues in plant embryology, and somaclonal variations are existing in calli and/or regenerants induced from a process of the organogenesis with *in vitro* circumstances. In this study, expressions of organogenesis-related genes were evaluated and genetic stability of regenerants derived from the process of *in vitro* organogenesis were measured using ISSR markers in *Imperata cylindrica* 'Rubra', Poaceae. The expressions of organogenesis-related genes were detected all of regenerants at the process of the organogenesis. All ISSR markers produced with an average of 71 bands per *in vitro*-cultured regenerants, and the scorable bands were varied from two to eight with an average of 5.14 bands per a primer. The polymorphism rates of the *in vitro* regenerants were higher than that of mother plants (1.4%), showing 4.1% (pot-cultured regenerants), 4.3% (field-cultured regenerants), 4.2% (*in vitro*-cultured regenerants), 5.6% (calli with green shoots) and 1.4% (calli), respectively. The genetic similarity matrix (GSM) among all accessions ranged from 0.747 to 1.0 with a mean of 0.868. GSM of the regenerants showed differences (from 0.972 to 1.00) compared with that of mother plants (0.991). According to the clustering analysis, two independent groups were divided into; the one is mother plants and regenerants cultured at room and open field, the other is regenerants cultured *in vitro*. The results give a new insight for understanding the dynamics of organogenesis in monocot plant.

Key words - Genetic similarity matrix (GSM), *In vitro* organogenesis, Organogenesis-related genes, Plant embryology, Regenerants, Somaclonal variation

서 언

기내배양을 통한 식물체 재생과정에서는 기관분화에 관련된 유전자의 발현 등 분자생물학적 과정을 통하여 기능이 작동함으로써 식물체가 재발생된다(Hans *et al.*, 2014). 식물의 기내 배양에 따른 기관분화는 직접 재분화와 탈분화를 거쳐 재분화에 이르는 경로가 알려져 있다. 직접 재분화는 치상조직으로부터

터 지상부가 출현하고 지하부가 출현하는 과정을 통해 개체가 완성된다. 또한 탈분화세포인 캘러스를 통한 경로에는 식물체가 발생하는 체세포배발생 경로와 캘러스에서 지상부(신초)와 지하부(부정근)가 생성되는 경로로 알려져 있다(Cho and Byeon, 2011; Lee *et al.*, 2023c; Murashige and Skoog, 1962; Rebouillat *et al.*, 2009; Seo, 2018). 이처럼 일련의 기관분화의 단계에 따라서 기관분화와 관련된 유전자가 활성화되어 기관분화 관련 유전자가 작동하므로 이 과정에서의 관련 유전자 발현에 대한 동태파악으로 기관분화에 대한 이해를 높일 수 있다. 한편 기내

*교신저자: E-mail chbae@sunchon.ac.kr

Tel. +82-61-750-5183

© 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회지에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재생식물체의 경우 생장조절물질처리 및 기내 특수환경에 기인한 체세포영양계면이 등 변이가 보고되어 있으므로(Bednarek and Renata, 2020; Fatiha *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2023; Goh *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2023b; Mo *et al.*, 2009; Ramakrishnan *et al.*, 2014) 각 단계별 재분화체의 유전적 안정성에 대한 검토를 통하여 기내 대량식물체 증식에 활용하거나 식물의 유전적 개량(Ferreira *et al.*, 2023)에 이용된다.

기관분화와 관련된 다양한 식물종 및 유전자에 대한 자료가 보고되고 있다. 탈분화 관련 유전자로 애기장대 캘러스 발달(Bouyer *et al.*, 2011; Iwase *et al.*, 2013a), 뿌리 특이 발현 유전자로 단자엽식물(Rebouillat *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014) 및 애기장대(Liu *et al.*, 2018) 뿌리 발달, 신초 특이 발현 유전자로 애기장대(Lopes *et al.*, 2021), 체세포배발생 관련 유전자로 *LECI*, *BBMI* (Lewis *et al.*, 2010; Nic-Can *et al.*, 2013), 식물종 별로는 유채(Ouakfaoui *et al.*, 2010), 애기장대(Lewis *et al.*, 2010)등에서 다양한 기관분화 관련 유전자들의 기능이 보고되고 있다. 또한 Gallois *et al.* (2004)과 Lopes *et al.* (2021)은 신초형성과 체세포배발생에 공동 관여하는 유전자임을 보고하고 있다.

기내배양을 통한 기내식물체 대량번식시 안정적인 개체 생산이 요건이므로 기내배양에 따른 재분화 식물체의 유전적 변이와 안정성 관련 연구(Dewir *et al.*, 2018; Garcia *et al.*, 2019)는 화분과 식물에서도 ISSR 분석 등 다양한 방법(Goh *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2023b;

Ramakrishnan *et al.*, 2014)으로 진행되고 있다.

화분과 띠(*Imperata cylindrica* L.) 속의 원산지는 북아메리카, 아시아, 아프리카의 온대 및 열대 지방이며(Doopedio, 2008; Holm *et al.*, 1977), 띠 속의 다년생 식물인 홍피(*Imperata cylindrica* 'Rubra')는 잎의 상단부가 붉은색을 띤 관상 가치가 있는 조경용 식물자원으로 기내배양을 통한 대량생산으로 효율적인 활용이 가능하다(Kang *et al.*, 2021). 본 연구는 홍피(*Imperata cylindrica* 'Rubra')의 기내배양시 식물체 재생과정에서 기관분화 단계에 따른 재분화체의 기관분화 관련 유전자의 발현과 단계별 재분화체의 유전적 안정성에 대한 자료를 제공할 목적으로 기관분화 단계별 재분화체를 작성하여 기관분화 관련 유전자 발현과 ISSR 표지를 이용한 재생 단계별 재분화체의 유전적 안정성을 분석하였다.

재료 및 방법

식물재료

공시재료는 재배식물로 개발된 홍피(*Imperata cylindrica* 'Rubra')로 '하늘정원야생화(대표 이동국)'에서 분양받았다. 기관분화 단계별 기관분화 관련 유전자 분석 시료는 5가지로 각 시료당 3개체씩 총 15개체를 공시하였다. 즉 대조구 모식물체 3개체, 캘러스 3개체, 뿌리가 발생한 캘러스 3개체, 신초가 발생한 캘러스 3개체, 재분화식물체 3개체를 공시하였다(Fig. 1, Lee *et al.*, 2023a). 또한, ISSR 분석용 시료로는 대조구 모식물

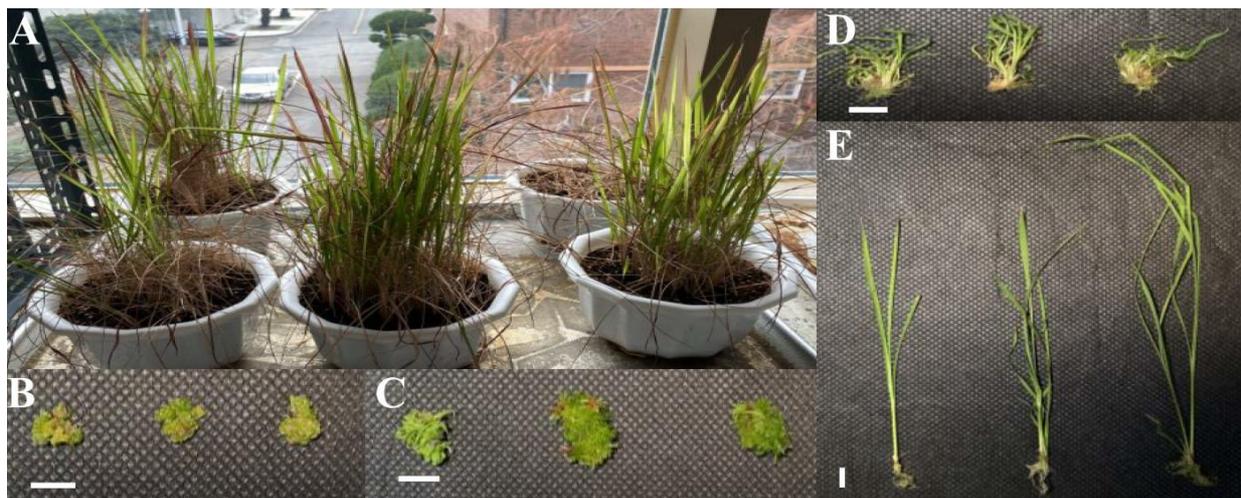


Fig. 1. Fifteen individual plant-materials used in reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) of organogenesis-related genes in *Imperata cylindrica* 'Rubra'. ^aA: Mother plants; B: Calli; C: Calli with adventitious roots; D: Calli with shoots; E: Regenerants with green. *Bars represent 10 mm, respectively.

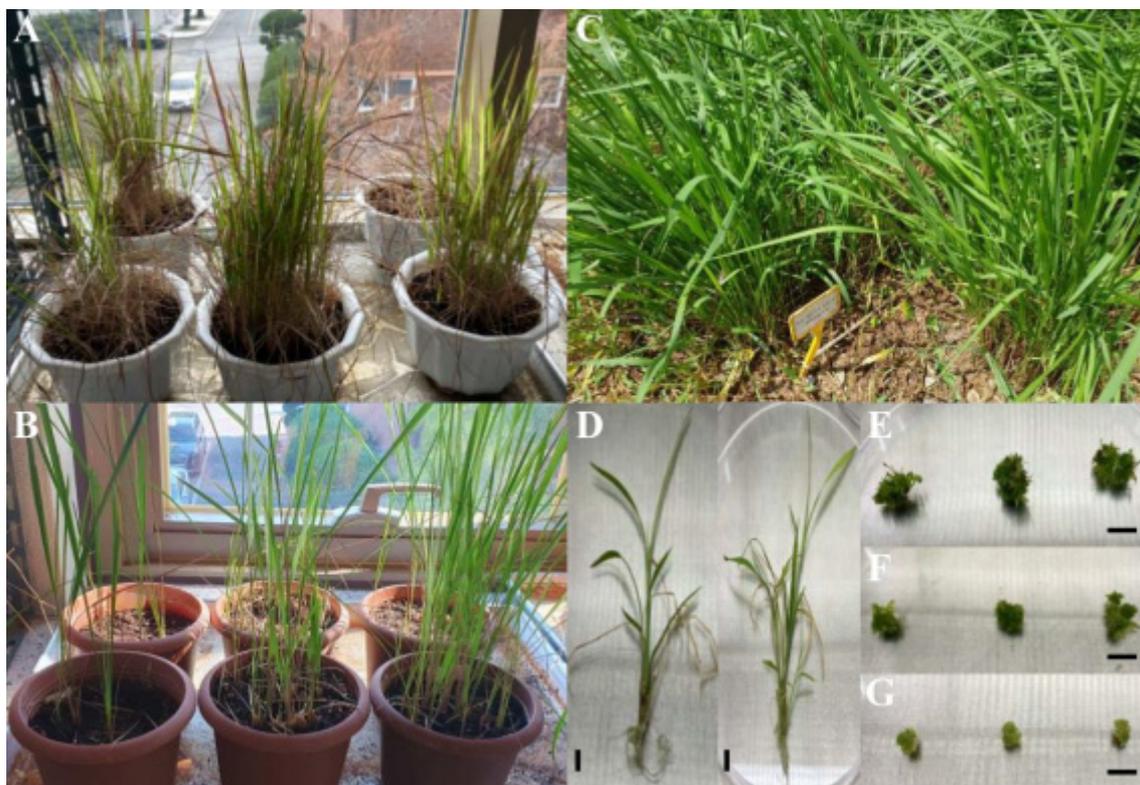


Fig. 2. Twenty one individual plant-materials used in ISSR analysis of *Imperata cylindrica* 'Rubra'. ^aA: Mother plants (control); B: Green-regenerants cultivated at culture room; C: Green-regenerants cultivated at field condition; D: *In vitro* regenerants with red shoots; E: Calli with green shoots; F: Calli with red shoots; G: Calli only. *Bars represent 10 mm, respectively.

체(mother plant) 3개체, 캘러스 3개체, 녹색 신초가 발생한 캘러스 3개체, 적색 신초가 발생한 캘러스 3개체, 기내배양으로 재분화된 홍띠(적색) 식물체 3개체, 실내포트에서 재배시킨 재분화 녹색 식물체 3개체, 1년간 노지에서 재배시킨 재분화 녹색 식물체 3개체로 7종류, 총 21개체를 공시하였다(Fig. 2).

기내배양과 기관분화 단계별 재분화체 작성

홍띠의 기부생장점 부위를 포함한 식물체를 70% 에탄올에서 30초간, 2% sodium hypochlorite에서 15분, 멸균증류수에서 1분간 침지한 다음 3회 수세 후 멸균된 여과지로 수분을 제거하여 표면 살균하였다. 기본배지로 MS 배지(Murashige and Skoog, 1962)를 사용하였고, pH는 멸균 전 5.80 ± 0.05 로 적정하여 12 $^{\circ}\text{C}$, 1.2기압 하에서 15분간 멸균하였다. 재분화 녹색 식물체 재생은 Umami *et al.* (2012)의 띠(congongrass)의 기내 배양사례를 일부 수정하여 MS 배지 + 0.1 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L BA 첨가 배지에 생장점을 포함한 부위를 치상하여 캘러스를 유도하고, 캘러스 증식은 0.1 mg/L 2,4-D를 포함한 MS배지에서, 신초 재분화는 0.05 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L BA를 포함한 MS배지에

서, 뿌리 재분화는 재분화된 신초를 MS에 이식하여 부정근을 유도하였다. 이들 기관분화 각 단계별 시료는 분석용 시료로 사용하였다. 신초 분화후 뿌리를 유도하고 재생된 유식물체는 인공상태에 이식하여 단계별로 순화, 활착시켰다(Kang *et al.*, 2021). 활착된 식물체의 일부는 노지에 이식하여 2년간 재배하여 식물체재료로 사용하였다. 배양은 $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $25 \mu\text{mol/s/m}^2$, 14h/10h (day/night)의 조건에서 실시하였다.

기관분화 관련 유전자 Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

기관분화 관련 유전자는 NCBI (National Center for Biotechnology Information; NCBI)에서 탐색한 후 Macrogen사 (Korea)에 의뢰하여 primer를 합성하였다.

RNA 추출: RNA를 추출하기 위하여 식물체 시료를 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 유지한 1 × PBS로 2회 세척한 후 RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 total RNA를 추출하고, DNase I (ThermoFisher)을 처리하였다.

cDNA 합성 및 확인: 추출한 1 μg 의 total RNA를 사용하여

SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher) 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였다. 추출한 cDNA는 Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Netherlands)로 농도를 측정하여 50 ng/μL로 희석하였고, 1.5%의 agarose gel에서 전기영동하여 밴드를 확인하였다.

RT-PCR 및 증폭산물 확인: PCR은 PCR Master Mix Kit (Promega Co., Madison, WI, USA)를 이용하여 수행하였고, 사용된 primer는 Table 1에서와 같이 기관분화 관련 유전자를 디자인하여 사용하였다. cDNA 50 ng/μL, 2X PCR Premix (Lugen™), 10 pmol 프라이머로 총 20 μL되게 혼합하여 사용하였다. *RAP2-4 (WIND1)*, *FIE*, *BBMI*, *SERK1* 4개 프라이머에 대한 PCR 반응은 Gene Amp 2700 (Applied Biosystem)을 사용하여 94°C에서 5분간 초기 변성시킨 후 94°C에서 20초간 denaturation, 56°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 60초 extension 과정을 40회 수행한 후 최종적으로 72°C에서 7분간 반응시킨 후 종료하였다. *OsSCR*, *WOX11*, *WUS*, *LEC1B* 4개의 프라이머의 경우 annealing 온도 60°C를 제외한 나머지 조건은 앞의 PCR 반응 조건과 같게 진행하였다. RT-PCR이 완료된 후 증폭산물 15 μL를 RedSafe Nucleic Acid Staining Solution 20,000X (Intron Biotechnology, Inc.)를 첨가한 1.2% agarose gel에

loading하여 전기영동(50V, 60분)한 다음 Digital GelDoc System (GDS200D, Korea)을 사용하여 주요 밴드를 확인하였다.

Genomic DNA 추출 및 ISSR 분석

gDNA는 식물체의 잎 부위를 CTAB 방법(Fang *et al.*, 1992)에 따라 추출하여 0.8%의 agarose gel에서 전기영동하여 밴드를 확인하고, Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Netherlands)로 농도를 측정하여 최종농도는 50 ng/μL로 희석하였다.

ISSR 분석은 총18개의 ISSR 프라이머(UBC primer Set No. 9, University of British Columbia, Canada)로 예비실험 후 밴드가 명확한 14개의 프라이머를 선발하여 ISSR 분석에 이용하였다(Table 1). PCR 반응액은 주형 DNA 50 ng/μL, 2X PCR Premix (Lugen™), 10 pmol 프라이머로 총 20 μL로 혼합하여 사용하였다. PCR 반응은 Gene Amp 2700 (Applied Biosystem)을 사용하여 94°C에서 5분간 초기 변성시킨 후 94°C에서 45초간 denaturation, 52°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 90초간 extension 과정을 40회 수행한 후 최종적으로 72°C에서 7분간 반응시킨 후 종료하였다. PCR이 완료된 후의 증폭산물 15 μL를 RedSafe Nucleic Acid Staining Solution 20,000X (Intron

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used for RT-PCR analysis of regeneration and dedifferentiation related genes in the *Imperata cylindrica* 'Rubra'

Gene name	Sequence (5'-3')	Function at organogenesis	Gene accession No.
<i>RAP2-4(WIND1)-F</i>	AAGGCCAGAAAGGGTTGTTT	Explants/Callus development	XM015770385
<i>RAP2-4(WIND1)-R</i>	AAAAGGGGTGCTTTTTGGAT		
<i>FIE-F</i>	CATTCGGGTCATCAACTGTG	Callus development	AY456262
<i>FIE-R</i>	CTCCTGCTCCAGCAAAAATC		
<i>OsSCR-F</i>	GCCACTCCCTCTACGATGTC	Root development	AB180961
<i>OsSCR-R</i>	CTCGCTGTAACCTCGCATCAA		
<i>WOX11-F</i>	GTGCTCTTCTCCAGCCAAC	Root development	XM015790233
<i>WOX11-R</i>	ATCTGATCCAACGGACAAGG		
<i>WUS-F</i>	TTCCACTCTTCCCAGTCGTC	Shoot regeneration/Somatic embryogenesis	XM015779885
<i>WUS-R</i>	AAGTTGTGCTGCTGCAAATG		
<i>BBMI-F</i>	TCTCGTGGTGCATCCAAATA	Somatic embryogenesis	XM015780067
<i>BBMI-R</i>	GCTCATGTGCAAGTTGGTGA		
<i>SERK1-F</i>	CTCCAACCTCTGTGCAGTCA	Somatic embryogenesis	AB188247
<i>SERK1-R</i>	CAGCAGGCACATCAAAGAAA		
<i>LEC1B-F</i>	GTACTACGGCGGGATGTACG	Somatic embryogenesis	AY062184
<i>LEC1B-R</i>	ATCTGCATGCGATACGTGTG		

Biotechnology, Inc.)를 첨가한 1.2% agarose gel에 loading하여 전기영동(50V, 60분)한 다음 GelDoc (GDS200D, Korea)을 사용하여 주요 밴드를 확인하였다(Lee *et al.*, 2023b).

Data 분석

ISSR로 분석된 DNA 밴드 양상은 이진수를 이용하여 밴드 유·무에 따라 1과 0으로 data를 표시하여 Jaccard 계수 (Jaccard coefficient)로 유전적 유사도지수를 산출하고 평균연결법 (Average linkage method)으로 군집분석을 하였다. 모든 통계 처리는 SPSS V.12 (SPSS Inc., USA)를 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

기내 기관분화 단계별 재분화체의 기관분화 관련 유전자의 발현

공시한 15개체에 대하여 기관분화 관련 유전자(Table 1)의 발현을 확인한 결과는 Fig. 3과 같다. 캘러스 발생 유전자인 *FIE*는 모식물체 1번을 제외한 14개의 식물체에서 모두 관찰되었으며, 100~300 bp에 존재하였다. 또한, 뿌리 발생 관련 유전자인 *WOX11*은 15개의 모든 식물체에서 발현되었으며, 600~700 bp에 존재하였다. 신초 재분화 및 체세포 발생 관련 유전자인 *WUS*에서도 15개의 식물체에서 모두 발현하였으며, 각 처리구별로 비슷한 양상의 밴드를 형성하는 것을 확인하였다. 체세포 발생 유전자인 *LEC1B*는 15개 식물체에서 모두 발현하였고, 각 처리구별 비슷한 양상으로 비교적 약하게 밴드가 형성되었고, 100~300 bp에 존재하였다.

기관분화와 관련된 유전자와 관련하여 체세포배발생 관련 유전자의 발현은 *BBM1*, *SERK1*, *LEC1B*, *MEA* 유전자에서 보고되었고(Hu *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2000; Nic-Can *et al.*, 2013; Ouakfaoui *et al.*, 2010), *SERK*(Lewis *et al.*, 2010; Nic-Can *et al.*, 2013), *WUS*(Gallois *et al.*, 2004; Nic-Can *et al.*, 2013)는 신초분화에도 관여하는 것으로 보고되었다. 탈분화 세포인 캘러스에서는 *FIE*, *RAP2-4 (WIND1)* 유전자가 관여한 것으로 보고되었으며(Iwase *et al.*, 2013b), *WUS*(Gallois *et al.*, 2004; Hans *et al.*, 2014)는 재생식물체와 캘러스+신초유도체, *OsSCR*(Kamiya *et al.*, 2003; Rebouillat *et al.*, 2009), *WOX11*(Cheng *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2009)은 캘러스+부정근체에서 보고되고 있다. 그러나 본 연구에서는 탈분화, 신초분화 및 부정근 재분화와 관련하여 기관분화 특이적으로 발현하지 않고 단계별 재분

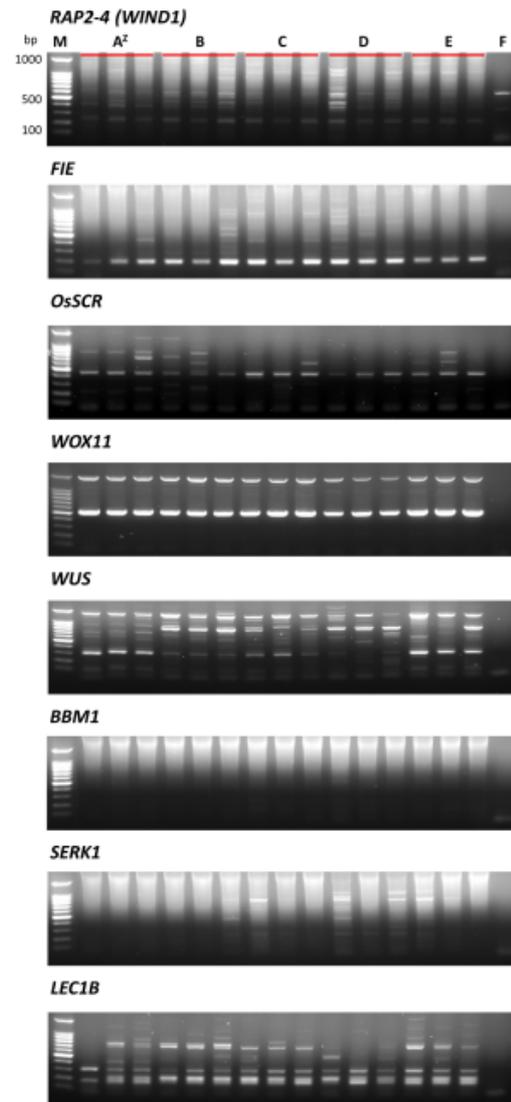


Fig. 3. Electrophoresis profiles of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) products produced by organogenesis-related genes in plan-materials of the *Imperata cylindrica* 'Rubra'. Sequences of 8 oligonucleotide primers were shown in Table 1 and plant-materials were in Fig. 1 (Lane M: 100 DNA marker, Lanes A: Mother plants; B: Calli; C: Calli with adventitious roots; D: Calli with shoots; E: Regenerants with green; F: Negative control).

화체 전체에 대하여 발현하였으므로 향후 각 기관분화 관련 유전자별 실시간 발현량에 대한 검토를 통하여 관련 기관분화 관련 유전자 발현에 대한 상세한 동태 파악이 필요할 것으로 판단된다. 한편 Zhao *et al.* (2009)은 *WUS*와 *WOX 11*의 homeobox 유전자로서 기능을 보고하고 있어서 생체내에서 부정근/신초 재분화시 유전자 기능이 연결되어 작동함을 보고하고 있다.

ISSR분석에 따른 기관분화 단계별 및 재분화체의 DNA 밴드 양상

재분화 녹색 식물체를 실내에서 재배한 3개체와 녹색 재분화 식물체를 포장에서 재배한 3개체, 기내배양으로 재분화된 홍피(적색) 식물체 3개체, 녹색 신초가 발생한 캘러스 3개체, 적색 신초가 발생한 캘러스 3개체, 캘러스 3개체, 그리고 대조구로 모식물체 3개체, 총 21개체를 시료로 하여 재현성이 높은 14개의 ISSR 프라이머를 선발하여 분석하였다(Table 2, Fig. 4).

ISSR 분석 결과, 대조구 3개체에서 밴드 수는 최저 3개(UBC 824, UBC 853, UBC 866)에서 최고 7개(UBC 810, UBC 843, UBC 847)로 한 프라이머 조합당 평균 밴드 수는 5.14개였다. 1개 프라이머(UBC 854)에서 1개의 다형성 밴드로 프라이머당

0.07개가 검출되었다(Table 2, Fig. 4).

실내재배 재분화 녹색 식물체에서 밴드 수는 최저 3개(UBC 824, UBC853, UBC 866)에서 최고 8개(UBC 843)로 한 프라이머 조합당 5.28개였으며, 다형성 밴드 수는 최저 0개(UBC 810, UBC 813, UBC 815, UBC 824, UBC 826, UBC 847, UBC 848, UBC 853, UBC 857, UBC 862, UBC 866, UBC 889)에서 최고 2개(UBC 843)였다. 2개 프라이머(UBC 843, UBC 854)에서 3개의 다형성 밴드로 프라이머당 0.21개가 검출되었다(Table 2, Fig. 4).

노지재배 재분화 녹색 식물체에서 밴드 수는 최저 2개(UBC 824)에서 최고 7개(UBC 843, UBC 847)로 한 프라이머 조합당 4.93개였으며, 다형성 밴드 수는 최저 0개(UBC 810, UBC 813,

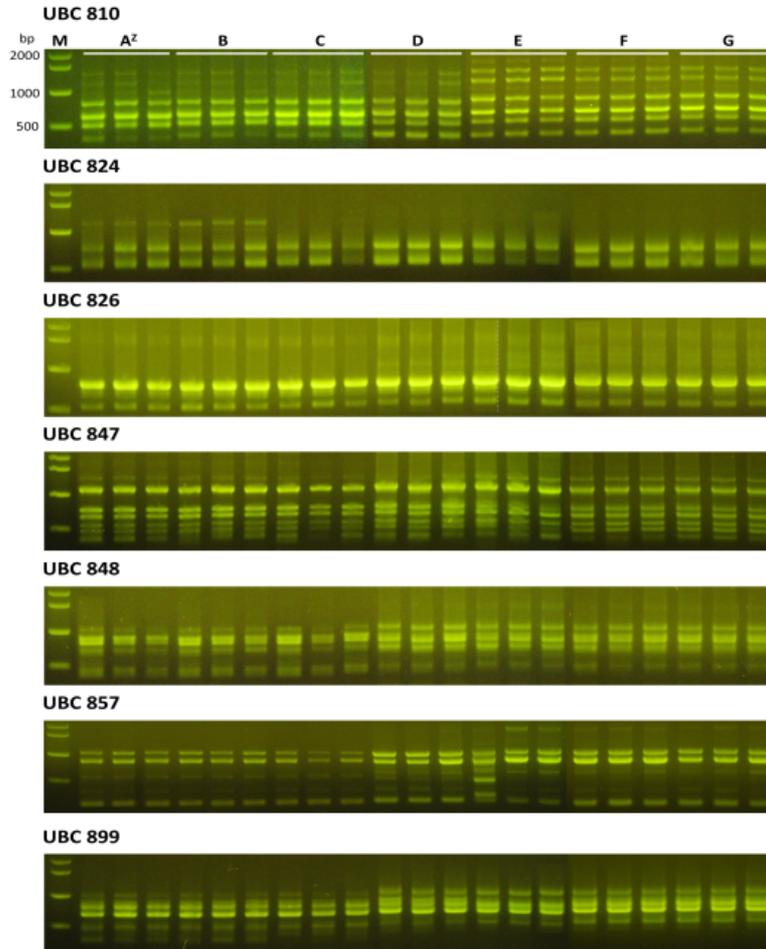


Fig. 4. ISSR electrophoresis profiles of 21 individual accessions of *Imperata cylindrica* 'Rubra'. Amplification products were separated on 1.2% agarose gels in 1×TAE buffer and photographed using gel documentation system (Bio-rad, USA). Lane M: 1kb ladder marker, Lanes A: Mother plants, B: Regenerants cultivated at culture room, C: Regenerants cultivated at field condition, D: *In vitro* regenerants with red plants, E: Calli with green shoots, F: Calli with red shoots, G: Calli. All the primer names were Included in Table 1.

Table 2. Sequences of the 14 ISSR primers, numbers of total bands and polymorphic bands amplified by each primers across all 21 individuals of *Imperata cylindrica* 'Rubra'

Primer	Sequence ^z	No. of total bands						No. of polymorphic bands						Polymorphism rate (%)										
		Conty	ReR	ReF	ReRP	CG	CR	C	Cont	ReR	ReF	ReRP	CG	CR	C	Cont	ReR	ReF	ReRP	CG	CR	C		
UBC 810	(GA) ₈ T	7	7	6	6	8	8	7	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
UBC 813	(CT) ₈ T	5	6	5	5	6	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
UBC 815	(CT) ₈ G	4	4	4	3	3	3	3	0	0	1	0	1	0	0	0.0	0.0	25.0	0.0	33.3	0.0	0.0	0.0	
UBC 824	(TC) ₈ G	3	3	2	2	2	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0.0	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
UBC 826	(AC) ₈ C	4	4	4	4	4	3	4	0	0	0	0	0	1	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	
UBC 843	(CT) ₈ RA	7	8	7	7	5	5	5	0	2	0	0	0	0	0	0.0	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
UBC 847	(CA) ₈ RC	7	7	7	8	7	8	8	0	0	1	0	0	0	0	0.0	0.0	14.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
UBC 848	(CA) ₈ RG	6	6	6	6	6	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
UBC 853	(CT) ₈ RT	3	3	3	3	2	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	33.3	0.0	0.0	0.0	0.0
UBC 854	(CT) ₈ RG	6	6	6	5	5	5	5	1	1	0	0	0	0	0	16.7	16.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
UBC 857	(AC) ₈ YG	5	5	5	6	8	6	6	0	0	0	0	2	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0
UBC 862	(AGC) ₆	6	6	6	7	7	6	6	0	0	0	2	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	28.6	0.0	0.0	0.0	0.0
UBC 866	(CTC) ₆	3	3	3	4	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
UBC 889	DBD(AC) ₇	6	6	5	5	5	5	5	0	0	0	0	1	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Total		72	74	69	71	72	70	69	1	3	3	3	4	0	1	1.4	4.1	4.3	4.2	5.6	0.0	0.0	1.4	0.0

^zTUB base code: Y(C,G), R(A,G), D(A,G,T), B(C,G,T), ^yCont: Mother plants, ReR: Regenerants cultivated at culture room, Ref: Regenerants cultivated at field condition, ReRP: *In vitro* regenerants of red plants, CG: Calli with green shoots, CR: Calli with red shoots, C: Calli.

UBC 826, UBC 843, UBC 848, UBC 853, UBC 854, UBC 857, UBC 862, UBC 866, UBC 889)에서 최고 1개(UBC 815, UBC 824, UBC 847)였다. 3개 프라이머(UBC 815, UBC 824, UBC 847)에서 3개의 다형성 밴드로 프라이머당 0.21개가 검출되었다(Table 2, Fig. 4).

기내배양 홍피(적색) 식물체에서 밴드 수는 최저 2개(UBC 824)에서 최고 8개(UBC 847)로 한 프라이머 조합당 5.07개였으며, 다형성 밴드 수는 최저 0개(UBC 810, UBC 813, UBC 815, UBC 824, UBC 826, UBC 843, UBC 847, UBC 848, UBC 854, UBC 857, UBC 866, UBC 889)에서 최고 2개(UBC 862)였다. 2개 프라이머(UBC 853, UBC 862)에서 3개의 다형성 밴드로 프라이머당 0.21개가 검출되었다(Table 2, Fig. 4).

녹색 신초가 발생한 캘러스에서는 밴드 수는 최저 2개(UBC 824, UBC 853)에서 최고 8개(UBC 810, UBC 857)로 한 프라이머 조합당 5.14개였으며, 다형성 밴드 수는 최저 0개(UBC 810, UBC 813, UBC 824, UBC 826, UBC 843, UBC 847, UBC 848, UBC 853, UBC 854, UBC 862, UBC 866)에서 최고 2개(UBC 857)였다. 3개 프라이머(UBC 815, UBC 857, UBC 889)에서 4개의 다형성 밴드로 프라이머당 0.29개가 검출되었다(Table 2, Fig. 4).

적색 신초가 발생한 캘러스에서는 밴드 수는 최저 2개(UBC 824, UBC 853)에서 최고 8개(UBC 810, UBC 847)로 한 프라이머 조합당 5.00개였으며, 다형성 밴드는 검출되지 않았다(Table 2, Fig. 4).

캘러스에서는 밴드 수는 최저 2개(UBC 824, UBC 853)에서 최고 8개(UBC 847)로 한 프라이머 조합당 4.93개였으며, 다형성 밴드 수는 최저 0개(UBC 810, UBC 813, UBC 815, UBC 824, UBC 843, UBC 847, UBC 848, UBC 853, UBC 854, UBC 857, UBC 862, UBC 866, UBC 889)에서 최고 1개(UBC 826)였다. 1개 프라이머(UBC 826)에서 1개의 다형성 밴드로 프라이머당 0.07개가 검출되었다(Table 2, Fig. 4).

이상과 같이 유전적 다형성 비율은 재분화 발생 부위 별 재분화체 및 순화 재분화체[실내포트 재배식물체 4.1%, 노지 재배식물체 4.3%, 기내배양 홍피(적색)식물체 4.2%, 녹색신초 발생 캘러스 5.6%, 캘러스 1.4%]에서 대조구인 모식물체 (1.4%)보다 같거나 높게 나타났으며, 적색신초 발생 캘러스는 0.0%로 대조구보다 낮게 나타났다.

이러한 결과는 옥수수(Ramakrishnan *et al.*, 2014), 바나나 재분화체(Ray *et al.*, 2006), 3.1%~4.1%의 홍피 재분화체(Kang *et al.*, 2021)에서와 유사한 경향을 보였다. 재분화체에서 모식

물체보다 변이성이 높은 이유로는 생장조절물질 처리(Garcia *et al.*, 2019)나 노지와는 다른 기내환경(Bednarek and Renata, 2020; Goh *et al.*, 2011; Ramakrishnan *et al.*, 2014) 등에 기인한 것으로 사료된다. 한편 종자유래 갈대의 재분화체 17% (Ryu *et al.*, 2013)보다는 낮은 결과로서 종자의 다양한 유전적 배경 때문으로 사료된다.

기관분화 단계별 재분화체의 유전적 유사도 지수

총 21개체 간의 유전적 유사도 지수는 최소 0.747(5번과 13번/실내재배 재분화 녹색 식물체 2번과 녹색신초 발생 캘러스 1번)에서 최대 1.000 (1번과 2번, 7번과 9번 외) 사이로 21개체간 유전적 유사도 지수의 평균은 0.868이었다. 모식물체 간 유전적 유사도 지수는 0.991, 실내재배 재분화 녹색 식물체 간 0.973, 노지재배 재분화 녹색 식물체 간 0.981, 기내배양 홍피 식물체 간 0.972, 녹색 신초 발생 캘러스 간 0.972, 적색 신초 발생 캘러스 간 1.000, 캘러스 간 0.990으로 나타났다(Table 3).

이는 다양한 단계별 재분화체에서 얻은 것으로 Kang *et al.* (2021)이 보고한 같은 식물에서 유래한 녹색 재분화 식물체에서 보다는 다소 낮게 나타난 결과이다. 또한 재분화식물체 초본(Aversano *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011) 및 목본의 결과(Vijayan *et al.*, 2015)보다는 낮은 결과이다.

기관분화 단계별 재분화체의 군집분석

ISSR 마커 밴드 양상을 기반으로 평균연결법(Average linkage method)으로 군집 분석한 결과(Fig. 5), 모든 개체는 유사도 지수 0.809~1.000 내에 분포하였다. 유전적 유사도 지수 0.809에서 2개 그룹으로 유집되었으며, 모식물체(1~3번)와 실내재배(4~6번), 노지재배 재분화 녹색 식물체(7~9번)가 함께 그룹화되었고, 기내배양 중인 홍피 식물체(10~12번), 녹색 신초(13~15번), 적색신초 발생 캘러스(16~18번), 캘러스(19~21번)가 속한 그룹은 유전적 유사도 지수 0.869에서 두 개의 그룹으로 세분화되었다.

이상에서와 같이 재분화체 중 기내식물체가 독립적으로 유집된 것은 생장조절물질 처리나 특수한 기내환경(Bednarek and Renata, 2020; Garcia *et al.*, 2019; Goh *et al.*, 2011; Ramakrishnan *et al.*, 2014) 등에 따른 변이의 축적에 기인한 것으로 사료된다. 또한 가지과(Aversano *et al.*, 2009), 옥수수(Ramakrishnan *et al.*, 2014), Innula 식물체(Amin *et al.*, 2018) 기내배양체의 ISSR분석 시 모식물체와 재분화체가 같은 그룹으로 유집된 결과와는 다른 결과이다.

Table 3. Genetic similarity matrix of 21 accessions derived from in vitro organogenesis in *Imperata cylindrica* 'Rubra' revealed by ISSR analysis^z

No. ^z	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	1.000																				
2	1.000	1.000																			
3	0.986	0.986	1.000																		
4	0.986	0.986	0.973	1.000																	
5	0.946	0.946	0.959	0.959	1.000																
6	0.973	0.973	0.986	0.986	0.973	1.000															
7	0.944	0.944	0.958	0.932	0.919	0.945	1.000														
8	0.917	0.917	0.931	0.904	0.892	0.918	0.971	1.000													
9	0.944	0.944	0.958	0.932	0.919	0.945	1.000	0.971	1.000												
10	0.880	0.880	0.868	0.868	0.833	0.857	0.904	0.903	0.904	1.000											
11	0.855	0.855	0.844	0.844	0.810	0.833	0.878	0.877	0.878	0.972	1.000										
12	0.842	0.842	0.831	0.831	0.797	0.821	0.865	0.863	0.865	0.958	0.986	1.000									
13	0.788	0.788	0.778	0.778	0.747	0.768	0.785	0.782	0.785	0.844	0.868	0.880	1.000								
14	0.795	0.795	0.785	0.785	0.753	0.775	0.792	0.789	0.792	0.829	0.853	0.865	0.958	1.000							
15	0.795	0.795	0.785	0.785	0.753	0.775	0.792	0.789	0.792	0.829	0.853	0.865	0.958	1.000	1.000						
16	0.808	0.808	0.797	0.797	0.765	0.788	0.805	0.803	0.805	0.842	0.867	0.878	0.919	0.931	0.931	1.000					
17	0.808	0.808	0.797	0.797	0.765	0.788	0.805	0.803	0.805	0.842	0.867	0.878	0.919	0.931	0.931	1.000	1.000				
18	0.808	0.808	0.797	0.797	0.765	0.788	0.805	0.803	0.805	0.842	0.867	0.878	0.919	0.931	0.931	1.000	1.000	1.000			
19	0.805	0.805	0.795	0.795	0.763	0.785	0.803	0.800	0.803	0.865	0.890	0.903	0.918	0.930	0.930	0.971	0.971	0.971	1.000		
20	0.818	0.818	0.808	0.808	0.775	0.797	0.816	0.813	0.816	0.878	0.904	0.917	0.932	0.944	0.944	0.958	0.958	0.958	0.986	1.000	
21	0.805	0.805	0.795	0.795	0.763	0.785	0.803	0.800	0.803	0.865	0.890	0.903	0.918	0.930	0.930	0.971	0.971	0.971	0.971	0.986	1.000

^zGenetic similarity was calculated on the basis of Jaccard coefficients. 1-21: Accessions numbers shown in Table 1.

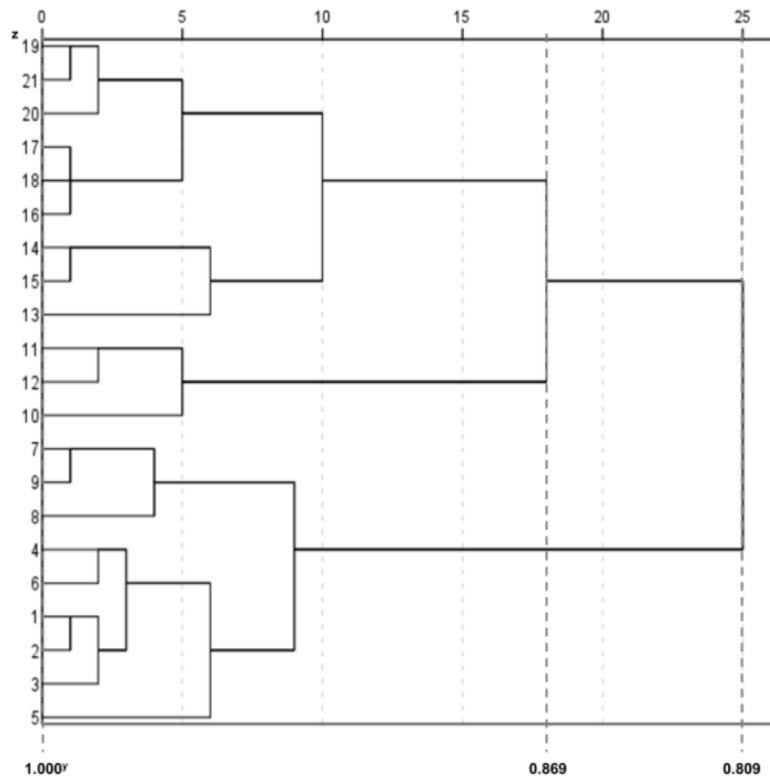


Fig. 5. Dendrogram illustrating genetic relationships among 21 accessions of *in vitro* cultured *Imperata cylindrica* ‘Rubra’ generated by cluster analysis with average linkage method. ¹1-3: Mother plants, 4-6: Regenerants cultivated at culture room, 7-9: Regenerants cultivated at field condition, 10-12: *in vitro* regenerants of red plant, 13-15: Calli with green shoots, 16-18: Calli with red shoots, 19-21: Calli, ²Genetic distance.

적 요

화본과 식물 홍피(*Imperata cylindrica* ‘Rubra’)의 기관분화 관련 유전자의 동태와 기내재생체의 유전적 안정성을 조사하고자 기관분화 단계별 재분화체를 작성하여 기관분화 관련 유전자 발현과 ISSR 마커 기반 변이성을 조사하였다. 5종류 총 15개체의 기관분화 단계별 재분화체에서 캘러스 발생 유전자인 *FIE*는 모식물체 1번을 제외한 14개의 식물체에서 모두 발현되었으며, 뿌리 발생 유전자인 *WOX11*도 15개의 모든 단계별 재분화체에서 발현하였다. 체세포 발생 유전자인 *LEC1B*는 15개 식물체에서 모두 발현하였으나 비교적 약하게 발현하였다. 7종류 총 21개체의 기관분화 단계별 재분화체 및 재분화식물체에 대하여 ISSR 분석한 결과, 유전적 다형성은 기관분화 단계별 재분화체 및 순화 재분화체(실내포트 재배식물체 4.1%, 노지 재배식물체 4.3%, 기내배양 홍피(적색)식물체 4.2%, 녹색신초 발생 캘러스 5.6%, 캘러스 1.4%)에서 대조구인 모식물체(1.4%)와 같거나 높게 나타났다. 또한, 유전적 유사도 지수는 0.747~1.0 사이에 분

포하며, 평균 0.868로 나타났다. 군집분석 결과 유전적 유사도 지수 0.809에서 기외 식물체(모식물체, 실내재배 및 노지재배 재분화 녹색 식물체)와 기내식물체 및 재분화 과정상의 분화체(기내배양 중인 홍피 식물체, 녹색 신초, 적색신초 발생 캘러스, 캘러스)는 독립적인 2개 그룹으로 유집되었다. 이상의 결과는 화본과 식물의 기내배양 시 재분화 과정에서 일어나는 일련의 유전학적 기초자료를 제공해 준다.

사 사

이 논문은 2020년 순천대학교 학술연구비(과제번호: 2020-0202)공모과제로 연구되었음.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Amin, S., T.A. Wani, Z.A. Kaloo, S. Singh, R. John, U. Majeed and G.A. Shapoo. 2018. Genetic stability using RAPD and ISSR markers in efficiently *in vitro* regenerated plants of *Inula royleana* DC. *Meta Gene* 18:100-106.
- Aversano, R., S. Savarese, J.M. De Nova, L. Frusciante, M. Punzo and D. Carputo. 2009. Genetic stability at nuclear and plastid DNA level in regenerated plants of *Solanum* species and hybrids. *Euphytica* 165:353-361.
- Bednarek, P.T. and O. Renata. 2020. Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 140:245-257.
- Bouyer, D., F. Roudier, M. Heese, E.D. Andersen, D. Gey, M.K. Nowack, J. Goodrich, J.-P. Renou, P.E. Grini, V. Colot and A. Schnittger. 2011. Polycomb repressive complex 2 controls the embryo-to-seedling phase transition. *PLoS Genet.* 7(3):e1002014.
- Cheng, S., F. Tan, Y. Lu, X. Liu, T. Li, W. Yuan, Y. Zhao and D.-X. Zhou. 2018. *WOX11* recruits a histone H3K27me3 demethylase to promote gene expression during shoot development in rice. *Nucleic Acids Res.* 46(5):2356-2369.
- Cho, J.-H. and J.-H. Byeon. 2011. Establishment of callus induction and plant regeneration system from mature seeds of *Miscanthus sinensis*. *Korean J. Plant Res.* 24(5):628-635.
- Dewir, Y.H., Nurmansyah, Y. Naidoo and J.A.T. da Silva. 2018. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures. *Plant Cell Rep.* 37:1451-1470.
- Doopedio. 2008. <http://www.doopedia.co.kr>.
- Fang, G., S. Hammar and R. Grumet. 1992. A quick inexpensive method of removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 13:52-55.
- Fatiha, B., S.-R. Carolina and M. Carmen. 2019. Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on genetic stability. *Sci. Hortic.* 251:260-266.
- Ferreira, M.D.S., A.D.J. Rocha, F.D.S. Nascimento, W.D.D.S. Oliveira, J.M.D.S. Soares, T.A. Rebouças, L.S.M. Lino, F. Haddad, C.F. Ferreira, J.A.D. Santos-Serejo, J.S. Fernández and E.P. Amorim. 2023. The role of somaclonal variation in plant genetic improvement: A systematic review. *Agronomy* 13(3):730. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030730>
- Gallois, J.-L., F.R. Nora, Y. Mizukami and R. Sablowski. 2004. *WUSCHEL* induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes Dev.* 18:375-380.
- Garcia, C., A.-A.F. de Almeida, M. Costa, D. Brito, R. Valle, S. Royaert and J.-P. Marelli. 2019. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: An overview. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 137:193-212.
- Goh, E.J., E.S. Seong, J.H. Yoo, H.Y. Kil, J.G. Lee, I.S. Hwang, N.-j. Kim, B.K. Ghimire, M.J. Kim, J.K. Lee, J.D. Lim, N.Y. Kim and C.Y. Yu. 2011. Effect of plant growth regulators and media on regeneration of *Sorghum bicolor* (L) Moench. *Korean J. Plant Res.* 24(2):168-173.
- Hans, M., V. Danny, G. Danny and W. Stefann. 2014. The molecular path to *in vitro* shoot regeneration. *Biotechnol. Adv.* 32:107-121.
- Holm, L.G., D.L. Pucknett, J.B. Pancho and J.P. Herberger. 1977. *The World's Worst Weeds. Distribution and biology.* Univ. Press of Hawaii, Honolulu, HI (USA).
- Hu, H., L. Xiong and Y. Yang. 2005. Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. *Planta* 222: 107-117.
- Iwase, A., N. Mitsuda, M. Ikeuchi, M. Ohnuma, C. Koizuka, K. Kawamoto, J. Imamura, H. Ezura and K. Sugimoto. 2013a. *Arabidopsis WIND1* induces callus formation in rapeseed, tomato, and tobacco. *Plant Signal. Behav.* 8(12):e27432.
- Iwase, A., N. Mitsuda, T. Koyama, K. Hiratsu, M. Kojima, T. Arai, Y. Inoue, M. Seki, H. Sakakibara, K. Sugimoto and M. Ohme-Takagi. 2013b. The AP2/ERF transcription factor *WIND1* controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 21: 508-514.
- Jin, S., R. Mushke, H. Zhu, L. Tu, Z. Lin, Y. Zhang and X. Zhang. 2008. Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Rep.* 27:1303-1316.
- Kamiya, N., J.-I. Itoh, A. Morikami, Y. Nagato and M. Matsuoka. 2003. The *SCARECROW* gene's role in asymmetric cell divisions in rice plants. *Plant J.* 36:45-54.
- Kang, I.-J., Y.-J. Lee and C.-H. Bae. 2021. *In vitro* regeneration and genetic stability analysis of the regenerated green plants in Japanese blood grass (*Imperata cylindrica* 'Rubra'). *Korean J. Plant Res.* 34(2):156-165 (in Korean).
- Lee, H., R.L. Fischer, R.B. Goldberg and J.J. Harada. 2003. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *PNASU.* 100(4):2152-2156.
- Lee, Y.-J., E.-Y. Kim and C.-H. Bae. 2023a. Expression of organogenesis-related genes of the plant-materials induced in the process of *in vitro* organogenesis of Japanese blood grass, and organogenesis-related genes in plants. *Proceeding of the Plant Resources Society of Korea.* April 27~28, 2023. Pyeong-Chang, Korea. p. 34 (in Korean).

- Lee, Y.-J., I.-J. Kang and C.-H. Bae. 2023b. Genetic stability of the plant-materials induced in the process of *in vitro* organogenesis of Japanese blood grass. Proceeding of the Plant Resources Society of Korea. April 27~28, 2023. Pyeong-Chang, Korea. p. 35 (in Korean).
- Lee, Y.-J., K.S. Hwang and P.S. Choi. 2023c. Effect of carbon sources on somatic embryogenesis and cotyledon number variations in carrot (*Daucus carota* L.). *J. Plant Biotechnol.* 50:89-95.
- Lewis, M.W., M.E. Leslie, E.H. Fulcher, L. Darnielle, P. Healy, J.-Y. Youn and S.J. Liljeren. 2010. The SERK1 receptor-like kinase regulates organ separation in *Arabidopsis* flowers. *Plant J.* 62(5):817-828.
- Liu, F., L.-L. Huang, Y.-L. Li, P. Reinhoud, M.A. Jongsma and C.-Y. Wang. 2011. Shoot organogenesis in leaf explant of *Hydrangea macrophylla* 'Hyd1' and assessing genetic stability of regenerants using ISSR markers. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 104:111-117.
- Liu, J., X. Hu, P. Qin, K. Prasad, Y. Hu and L. Xu. 2018. The *WOX11-LBD16* pathway promotes pluripotency acquisition in callus cells during *de novo* shoot regeneration in tissue culture. *Plant Cell Physiol.* 59(4):739-748.
- Lopes, F.L., C. Galvan-Ampudia and B. Landrein. 2021. *WUSCHEL* in the shoot apical meristem: Old player, new tricks. *J. Exp. Bot.* 72(5):1527-1535.
- Luo, M., P. Bilodeau, E.S. Dennis, W.J. Peacock and A. Chaudhury. 2000. Expression and parent-of-origin effects for *FIS2*, *MEA*, and *FIE* in the endosperm and embryo of developing *Arabidopsis* seeds. *PNASU.* 97(19):10637-10642.
- Mo, X.Y., T. Long, Z. Liu, H. Lin, X.Z. Liu, Y.M. Yang and H.Y. Zhang. 2009. AFLP analysis of somaclonal variations in *Eucalyptus globulus*. *Biol. Plant.* 53(4):741-744.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nic-Can, G.I., A. López-Torres, F. Barredo-Pool, K. Wrobel, V.M. Loyola-Vargas, R.R. Rojas-Herrera and C. De-la-Peña. 2013. New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *Plos One* 8(8): e72160.
- Ouakfaoui, S.E., J. Schnell, A. Abdeen, A. Colville, H. Labbé, S. Han, B. Baum, S. Laberge and B. Miki. 2010. Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant Mol. Biol.* 74:312-326.
- Ramakrishnan, M., S.A. Ceasar, V. Durairandiyani and S. Ignacimuthu. 2014. Efficient plant regeneration from shoot apex explants of maize (*Zea mays*) and analysis of genetic fidelity of regenerated plants by ISSR markers. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 119:183-196.
- Ray, T., I. Dutta, P. Saha, S. Das and S.C. Roy. 2006. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 85:11-21.
- Rebouillat, J., A. Dievart, L. Verdeil, J. Escoute, G. Giese, J.C. Breitler, P. Gantet, S. Espeout, E. Guiderdoni and C. Périn. 2009. Molecular genetics of rice root development. *Rice* 2:15-34.
- Ryu, J.H., E.H. Kim, H.S. So, M.Y. Chung, W.S. Song and C.H. Bae. 2013. Plant regeneration and genetic diversity of regenerants from seed-derived callus of reed (*Phragmites communis* Trinius). *Korean J. Plant Res.* 26(2):320-327 (in Korean).
- Seo, P.-J. 2018. Epigenetic mechanism related to dedifferentiation in plants. *Molecular and Cellular Biology Newsletter*, 2018. September, pp. 1-6 (in Korean).
- Umami, N., T. Gondo, H. Tanaka, M.M. Rahman and R. Ajashi. 2012. Efficient nursery plant production of dwarf cogongrass (*Imperata cylindrica* L.) through mass propagation in liquid culture. *Grassl. Sci.* 58:201-207.
- Vijayan, A., P.P. Pillai, A.S. Hemanthakumar and P.N. Krishnan. 2015. Improve *in vitro* propagation, genetic stability and analysis of corosolic acid synthesis in regenerants of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. by HPLC and gene expression profiles. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 120:1209-1214.
- Wu, S., C.-M. Lee, T. Hayashi, S. Price, F. Divol, S. Henry, G. Pauluzzi, C. Perin and K.L. Gallagher. 2014. A plausible mechanism, based upon short-root movement, for regulating the number of cortex cell layers in roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(45):16184-16189.
- Zhao, Y., Y. Hu, M. Dai, L. Huang and D.-X. Zhou. 2009. The *WUSCHEL*-related homeobox gene *WOX11* is required to activate shoot-borne crown root development in rice. *Plant Cell* 21:736-748.

(Received 7 June 2023 ; Revised 17 August 2023 ; Accepted 31 August 2023)