배추 *GROWTH-REGULATING FACTOR* 유전자 발현이 유채 기관크기에 미치는 영향

홍준기 · 서은정 · 이승범 · 윤혜진 · 이연희*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부

Effects of Overexpression of *Brassica rapa* *GROWTH-REGULATING FACTOR* Genes on *B. napus* Organ Size

Joon Ki Hong, Eun Jung Suh, Seung-Bum Lee, Hye-Jin Yoon, and Yeon-Hee Lee*

Agricultural Biotechnology Department, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, 370 Nongsaengmyeong-ro, Jeonju-si, Jeollabuk-do, 54874, Republic of Korea

Abstract *GROWTH-REGULATING FACTOR* (GRF) genes encode plant-specific transcription factors and play critical roles in regulating the growth and development of lateral organs. In order to explore the agricultural potential of *Brassica rapa* GRF genes (*BrGRFs*), we constructed two *BrGRF*-overexpressing *B. napus* plants (*BrGRF3-1OX* and *-9OX*). *BrGRF3-1OX* and *-9OX* developed larger cotyledons, leaves, and seeds than the wild type. The increased organs' sizes were due to increases in cell number, but not due to cell size alterations. RT-PCR analysis revealed that *BrGRFs* regulated the expression of a wide range of genes that are involved in gibberellin-, auxin-, cell division-related growth processes. Taken together, our data indicate that *BrGRFs* act as positive regulators of *B. napus* growth, thus raising the possibility that they may serve as a useful genetic source for crop improvement with respect to organ size and seed production.

Keywords Cell division, Cell number, *GROWTH-REGULATING FACTOR*, Organ size, Transcription factor

Received on July 31, 2018. Revised on August 6, 2018. Accepted on August 24, 2018.

* Corresponding Author (E-mail: yhl2222@korea.kr, Tel: +82-63-238-4690, Fax: +82-63-238-4654)

서 언

식물체 성장 범위와 방향은 기관의 크기와 모양을 결정하는데 큰 영향을 미친다. 기관의 생장과 발달에서 세포의 증식과 확장은 기관들의 최종 크기와 모양에 영향을 주지만 이 과정들에 대한 연구는 많이 보고되어 있지 않다(Horiguchi et al. 2005). *GROWTH-REGULATING FACTOR* (GRF)는 식물 특이적 전사조절인자로 식물의 생장과 발달에서 중요한 역할을 담당하는 유전자로 알려져 있으며 벼에서 식물 호르몬인 지베렐린(GA)에 의해 유도되는 줄기 길이 생장에서 중요한 역할을 하는 것으로 처음 보고되었다(Kim & Tsukaya 2015, Van der Knaap et al. 2000). 보고된 GRF 단백질은 아미노산-말단 부분에 잘 보존된 QLQ (Gln, Leu, Gln)와 WRC (Trp, Arg, Cys) 도메인을 가지고 있다. QLQ 도메인은 GRF-INTERACTING FACTORS (GIFs)와 결합하여 복합체로 전사조절 공동활성인자 역할을 수행하며 WRC 도메인은 GRF 단백질을 핵으로 유도하는 서열(NLS)과 DNA 결합 기능을 가진 zinc-finger (C₃H) 영역을 포함하는 2개의 독특한 구조를 가지고

있다(Horiguchi et al. 2005, Kim & Kende 2004, Van der Knaap et al. 2000). 또한 GRF 단백질 카복시-말단은 전사촉진 활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.

GRF 유전자들은 애기장대, 배추, 유채, 대두, 감자, 벼, 옥수수, 이끼 등 다양한 육상 식물들에서 분리되어 기능이 연구되었다(Kim & Tsukaya 2015, Omidbakhshfard et al. 2015). GRF 유전자는 성장·발달 중인 줄기분열 조직, 화아, 미성숙 잎에서 강하게 발현되어 세포증식을 촉진하며 자엽, 잎, 꽃 등 기관의 크기를 결정하는데 중요한 역할을 담당한다(Horiguchi et al. 2005, Kim & Kende 2004, Kim et al. 2003, Liu et al. 2009, Wang et al. 2014). 또한, 암술 생식기관의 발달 및 종자의 성장과 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 예측되었다(Liang et al. 2014, Ye et al. 2004, Zhang et al. 2008). 특히 잎의 원기세포에서 세포증식 촉진을 통해 잎의 크기를 조절하는 것으로 보고되었다(Kim & Kende 2004). 유채 *BnGRF2*는 세포 수와 광합성을 증가시킴으로써 종자 무게 및 기름생산을 증가시키는 것으로 보고되었다(Liu et al. 2012).

최근 염색체 염기서열이 완료된 배추에서 17개의 *BrGRF* 유전자가 규명 되었으며(Wang et al. 2014) 이들 유전자들은 애기장대에 존재하는 9개 *AtGRF* 유전자들과 높은 유사성을 나타내었다. *BrGRF* 유전자들은 조직 및 기관 특이적 발현 양상을 나타내고 있는데 식물 호르몬인 지베렐린(GA)에 의해 발현이 강하게 유도되었다. 이들 중 *BrGRF8*을 애기장대에 발현시켰을 때 세포 크기 보다는 세포 수 증가에 의해 잎의 크기를 증가시키는 것으로 확인되었다(Wang et al. 2014). Hong et al. (2017)은 배추로부터 *BrGRF3-1*, *3-2*, *5*, *7*, *8-1*, *8-2*, *9*을 분리하여 애기장대에 발현시켰을 때 세포 수 증가에 의해 자엽, 잎, 꽃, 종자의 크기가 커졌고 종자에 존재하는 지질의 함량이 증가한 것을 확인하였으며, *BrGRF* 유전자는 기관의 생장 발달에 관여하는 식물 호르몬 지베렐린(GA)과 옥신(auxin) 및 세포 분열에 관련된 유전자들의 발현을 촉진한다는 결과를 보고하였다. 이와 같이 *BrGRF* 유전자는 식물체에서 세포증식을 통한 기관 생장과 발달을 조절하는 중요한 유전자로 사료된다.

유채는 주요한 기름 생산 작물로 2017년 생산량이 2800만톤 이상 되었을 정도로 세 번째로 많은 식물성 기름 공급원이다. 또한 유채 기름은 석유 연료의 대체로서 이용되고 있다. 유채의 종자당 기름 생산량은 종자의 크기, 무게, 기름 함량에 따라 결정된다. 따라서 최근에는 대부분의 유전자 연구와 육종 프로그램이 유채의 종자 크기, 무게, 기름 함량 증가에 초점을 맞추고 있다. 따라서 본 연구는 식물체 기관 크기 증대에 효과가 있는 것으로 보고된 배추 유래 *BrGRF3-1*과 *BrGRF9*을 유채에 형질전환하여 생장 발달 및 형태적 특성에 미치는 영향을 분석하였으며, *BrGRF* 유전자가 유채의 농업적 형질을 개선하기 위한 주요한 후보 유전자로 이용될 수 있다는 것을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

식물 형질전환 벡터 제작

식물 형질전환을 위해서 *BrGRF3-1*과 *BrGRF9* cDNA를 항생제 하이그로마이신 분해 유전자(*HPTII*) 부위를 포함하는 pCAMBIA 벡터의 CaMV 35S 프로모터와 nopaline synthase 터미널(*nos-ter*)사이 에 융합하여 식물 형질전환용 벡터 *35SP::BrGRF3-1*과 *35SP::BrGRF9*을 제작하였다. 제작된 벡터를 freeze thaw 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 도입하였으며 유전자 도입이 확인된 콜로니를 유채 형질전환에 사용하였다(Hong et al. 2017).

형질전환체 제작 및 세대 육성

유채 형질전환은 아그로박테리움을 이용한 Hong et al. (2013)의 방법과 유사하게 하였다. 유채는 ‘영산’ 품종을 본 실험에 사용하였다. 유채 종자를 MS 기본 배지에(Murashige & Skoog 1962) 과중하여 25°C 배양실에서 6-7일 발아시킨 후 하배축을 0.5 cm 크기로 절단하여 전배양 배지(MS basal medium, 1 mg/L NAA, 2 mg/L BA, 2 mg/L AgNO₃, 3% sucrose, and 0.9% plant agar)에서 2일 동안 배양시켰다. 전배양된 하배축 조직을 아그로박테리움과 25°C, 암 상태에서 공동배양 배지(MS basal medium, 1 mg/L NAA, 2 mg/L BA, 2 mg/L AgNO₃, 100 μ M acetosyringone, 3% sucrose, and 0.9% plant agar)에서 3일 동안 공동 배양하였다. 공동배양한 하배축을 100 mg/L carbenicillin, 250 mg/L cefotaxime이 첨가된 멸균수로 5-6번 세척하여 아그로박테리움을 제거한 후 선발배지(MS basal medium, 1 mg/L NAA, 2 mg/L BA, 2 mg/L AgNO₃, 3% sucrose, 15 mg/L hygromycin, 100 mg/L carbenicillin, 250 mg/L cefotaxime, and 0.9% plant agar)에 치상하였다. 신토가 형성될 때까지 새로운 선발배지에서 2-3주 간격으로 계대배양하였다. 재분화되어 나온 신토를 식물 생장조절제가 포함되어 있지 않은 MS 배지로 옮겨 뿌리 형성을 유도하였다. 뿌리가 형성되어 생육이 왕성한 형질전환체를 순화시켜 준화처리(4°C, 30일 처리) 후 온실에서 재배하여 종자를 수확하여 세대를 진전시켰다. 형질전환체의 세대 진전을 위해 종자를 하이그로마이신 30 mg/L이 포함된 MS 기본 배지에 40개씩 과중하여 저항성을 나타내는 형질전환체만을 선별하여 온실로 옮겨 재배하였다. 온실에서 지속적으로 형태적 특징을 나타내는 형질전환 유채를 선별하여 T₃ 세대까지 진전시켰다.

형질전환 유채 유전자 도입 및 발현 분석

Genomic DNA PCR과 RT-PCR을 통해 *BrGRF3-1*과 *BrGRF9* 유전자 삽입 유무와 발현을 각각 확인하였다. 유채 식물체 잎으로부터 genomic DNA를 분리하였다(DNeasy Plant Kit, Qiagen). 분리된 genomic DNA 500 ng을 사용하여 유전자 특이 프라이머를 이용한 PCR (95°C에서 3분 1 사이클, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 45초, 35 사이클, 72°C 10분 1 사이클 조건)로 식물체내 유전자 도입을 확인하였다(Table 1).

형질전환체에 도입된 유전자 발현을 확인하기 위해 3-5 주간 재배한 형질전환 식물체의 잎을 채취한 후 즉시 액체질소에 얼려 막사발로 마쇄하였다. 마쇄한 시료로부터 Hong et al. (2013) 방법과 유사하게 total RNA를 분리하였다. Semi-quantitative

RT-PCR 분석을 위해 역전사 효소(MMLV transcriptase RNase free, Toyobo)를 이용하여 total RNA 2 μ g을 cDNA 라이브러리로 제작하고 3배 희석하여 2 μ l를 PCR 증폭에 사용하였다(Table 1, Hong et al. 2017). 유전자를 확인할 수 있는 유전자 특이 프라이머를 이용하여 PCR (95°C에서 3분 1 사이클, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 45초, 30 사이클, 72°C 10분 1 사이클 조건)로 유전자 발현을 확인하였고 DNA 염기서열 분석을 통해 도입된 유전자의 발현을 최종 확인하였다. *Bactin* 유전자 발현 수준은 정량적 대조군으로 사용되었으며 모든 실험은 3반복으로 수행하였다(Hong et al. 2010, Yao et al. 2005).

생장 관련 유전자 발현 분석

형질전환 식물체에서 세포분열 및 생장 관련 식물 호르몬 조절 유전자들의 발현 수준을 확인하기 위하여 35일 자란 형질전환 식물체의 3번째 잎으로부터 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 total RNA를 분리하였다. 유전자 특이 프라이머

들(Table 1, 1개 GA 관련 유전자; Fleet & Sun 2005, 6개 auxin 관련 유전자; Li et al. 2007, 5개 세포분열 관련 유전자; Gonzalez et al. 2009, Krizek 2009)을 사용하여 semi-quantitative RT-PCR 을 수행하였다(Table 1). Semi-quantitative RT-PCR 결과로부터 Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; Liang et al. 2011)과 GelQuant.NET (<http://biochemlabsolutions.com/GelQuantNET.html>)을 이용하여 상대적 발현 수준을 측정하였으며 모든 실험은 3반복으로 수행하였다.

형질전환 유채 특성 분석

형질전환 유채의 생장 특성 분석은 대부분 형질이 고정된 대표 계통의 T₃ 세대를 32공 트레이를 사용하여 계통별로 10개체씩 원예용 상토에서 4주 키운 후 18 cm 화분에 옮겨 심어 재배하면서 조사하였다.

식물체로부터 채취한 자엽, 1차 및 3차 잎을 스캐너를 이용하여 디지털 이미지로 획득한 뒤 이미지 분석 프로그램 ImageJ (Version

Table 1. Oligonucleotide primers used in RT-PCR.

Target	Acc. No.	Primer sequences	Expected size (bp)
<i>BrGRF3-1</i>	Bra023066	5'-ATGGATTTGCAACTGAAACAATGGAGGAG-3' 5'-TCAATGAAAAGGCTTGCGTTGAAACACCGA-3'	1107
<i>BrGRF9</i>	Bra039334	5'-ATGGAAGAAAAGAAACACAGTTTACAAAG-3' 5'-TTAAACACCTGAAGAACAATGACAAGA-3'	1317
<i>Bn-MYM65</i>	XM_022719798	5'-ATGAGTTACACGGCTGAGAGTGATG-3' 5'-AATCATCACATCAGATGGATGTTGG-3'	867
<i>Bn-IAMT1</i>	XM_013870746	5'-ATGGGTTCGAAGGGAGACAACGTTG-3' 5'-ACAAGCTTCTCAATGGTGAAGGAGC-3'	923
<i>Bn-SUR2</i>	NM_001316270	5'-TGACAATCTCACTGGTCTTAGTGCG-3' 5'-TGCCTCCTTGGTGCAAGGACGAGGTG-3'	816
<i>Bn-IAA3</i>	XM_013846673	5'-ATGGATGAGTTTGTTAACCTCAAGG-3' 5'-TCATACACCAGAGCCTAAACACCTGG-3'	555
<i>Bn-IAA6</i>	XM_013845663	5'-ATGGCAAAGGAGGGTTTAGGACTTG-3' 5'-ATCTGATCTCTTCACGATCCTCAGC-3'	564
<i>Bn-IAA17</i>	XM_013809370	5'-ATGATGGGCACTGTCGAGCTGAATC-3' 5'-ACGTCGCCGACGAGCATCCAGTCACC-3'	687
<i>Bn-AXR</i>	XM_022691599	5'-AGCACACCGTAATTGACTCGAAGCC-3' 5'-AGCAACCACATGAAGCTCTGAGGCAC-3'	947
<i>Bn-CYCB2;1</i>	XM_013868490	5'-ATGGCGACGAGAACCAACATGCCTG-3' 5'-ACAGTCAAGTACCACTCGAGGTTCC-3'	908
<i>Bn-DA1</i>	XM_013786453	5'-TCTCTGAGTACGAGTTCTCAACGTC-3' 5'-TCCACGCGTGCATCATCTCATGAGC-3'	660
<i>Bn-DWF4</i>	XM_022718959	5'-AACCAACGATTGTATCAGCTGATGC-3' 5'-ATCGGATCTCAAGATGCTCTTCCC-3'	787
<i>Bn-EXOR</i>	XM_013856760	5'-ACCAACCATCTGTGGCCACGTGGTG-3' 5'-ACGTTGTAGGATCATACAACGCAGG-3'	681
<i>Bn-PVP1</i>	XM_013786026	5'-TGGTTCATCGTCTCTCGAGTTAGAG-3' 5'-AAGTGCAGCACACGATGCTTCAGCG-3'	846
<i>Bactin</i>		5'-TGGCATCACACTTTTCTACAA-3' 5'-CAACGGAATCTCTCAGCTCC-3'	516

1.50i, NIH, USA; <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>)를 사용하여 자엽과 잎의 면적을 측정하였다(Gonzalez et al. 2010). 식물 조직의 세포 수와 크기는 Visikol VSKP-100을 사용하여 투명하게 만든 식물조직을 Axio imager M1 현미경(Carl Zeiss Jena GmbH, Germany)에서 관찰하여 Axiovision4 microscopy 프로그램을 이용하여 측정하였다(Hong et al. 2017). 세포 수는 자엽과 잎의 최대폭에서 가로축을 따라 또는 주맥 옆에서 세로축을 따라 정렬된 아표피층 밑 책상조직 세포를 측정하였다. 세포 면적은 잎 주맥과 잎 둘레의 1/2영역에서 가장 넓은 지점의 세포 20개를 이미지분석 프로그램 ImageJ를 이용하여 측정하였으며 모든 실험은 3반복으로 수행되었다. 이렇게 측정된 기관과 세포의 면적을 세포 총계를 계산하는데 사용하였다.

결과 및 고찰

BrGRF 유전자 과발현이 유체 성장발달에 미치는 영향

배추에서 분리된 *BrGRF*는 QLQ와 WRC 도메인을 갖고 있는 식물 특이적 전사조절인자로 식물의 성장과 발달에 중요한 조절 인자이다(Hong et al. 2017). 선행 연구 결과에서 식물체 기관 크기 증대에 효과가 있는 것으로 보고된 *BrGRF*를 작물에 형질전환하여 성장 발달 및 형태적 특성에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. *BrGRF3-1*과 *BrGRF9* 유전자와 선발 항생제 하이그로마이신을 포함한 두 종류의 식물 형질전환 벡터를 제작하였다

(Fig. 1A). 작성된 벡터를 포함하고 있는 아그로박테리움 GV3101을 사용하여 유체 ‘영산’에 형질전환을 하였다. 하이그로마이신에 저항성을 보이는 형질전환체를 선발한 후 자가수분으로 종자를 수확하였다. T_0 종자를 하이그로마이신 30 mg/L에서 발아시켜 항생제 저항성과 감수성을 조사하여 비율이 3:1로 나타나면서 큰 형태적 특징을 보이는 독립 계통에서 3 개체씩을 T_1 으로 선발하였다. T_1 식물체 중에서 자엽, 잎이 큰 형태적 특징을 지속적으로 강하게 나타내는 형질전환 계통을 선발하여 T_2 와 T_3 로 전개시켰다. T_3 식물체에서 각 유전자의 특이 프라이머를 이용한 semi-quantitative RT-PCR로 *BrGRF3-1*과 *BrGRF9* 유전자 과발현을 최종 확인하였다(Figs. 1B, 1C).

최종 선발된 *BrGRF3-1*과 *BrGRF9* 도입 T_3 형질전환 유체를 생장 발달 단계에 따라 자엽, 잎, 종자의 dimensional parameter를 분석하였다. 종자 발아 후 10일부터 생장발달 동안 지속적으로 전체적인 식물의 크기가 큰 특징을 나타냈으며 자엽, 잎, 종자의 크기에 영향을 주는 다형질발현성(pleiotropism) 변이를 보였다(Fig. 2). 형질전환체 자엽의 면적을 비교 분석한 결과, 비형질전환체보다 24.8-39.5% 정도 크기가 증가한 것을 확인할 수 있었다(Figs. 2A, 3A). 또한, 영양생장 동안 잎의 크기는 비형질전환체보다 크게 나타났다(Figs. 2B-2D). 발아 후 5주, 7주된 형질전환 유체의 첫 번째, 세 번째 잎의 크기를 각각 비교 분석한 결과, 비형질전환체보다 첫 번째 잎은 13-15.3%, 세 번째 잎은 11.0-20.3% 정도 면적이 증가하였다(Fig. 3B). 이러한 결과는 *AtGRF*와 *BrGRF*

Fig. 1. Construction of expression vectors and expression patterns of *BrGRFs* in transgenic *B.napus* plants. (A) Structure of the 35S-Pro::BrGRF constructs. The *HygR* gene under the control of the CaMV 35S promoter (35S-Pro) serves as a selectable marker for *B. napus* transformants. *BrGRFs* are regulated by 35S-Pro. LB and RB indicate left and right borders of T-DNA, respectively. (B) Semi-quantitative RT-PCR for determination of *BrGRF* expression in transgenic plants. The expression level of *Actin* was used as a quantitative control. Lanes: Wt, untransformed wild-type plants; the numbers above indicate line numbers of *BrGRF* overexpressors. (C) Relative expression level of transgenes. Error bars represent the standard error (SE). Wt, untransformed wild-type plants; the numbers at X axes indicate line numbers of *BrGRF*-OX.

Fig. 2. Phenotypes of *BrGRF*-OX plants. (A) Cotyledon at 10 days. Bar, 1 cm. (B) and (C) Leaf size and morphology at 5 and 7 week, respectively. Bar, 1 cm. (D) Comparison of soil-grown plants at the same age. Bar, 1 cm. (E) Phenotypic characters of seeds. Bar, 1 mm. Wt, untransformed wild-type plants; the numbers indicate line numbers of *BrGRF*-OX.

과발현 애기장대에서 잎의 크기와 면적이 증가한 것과 유사한 형태적 특성을 보여주었다(Hong et al. 2017, Horiguchi et al. 2005, Kim et al. 2003). 또한 Wang 등(2014)은 배추 *BrGRF8* 유전자를 애기장대에서 과발현시킨 결과 세포증식에 의해 잎 등의 식물기관들의 크기가 증가하였다고 보고하였다.

BrGRF 형질전환 유체의 종자 길이와 무게를 분석한 결과, 비형질전환체보다 종자 길이가 6.7-11.4% 증가하였으며 무게 또한 9.5-22.1% 증가하였다(Figs. 2E, 3C). 그러나 형질전환체의 꼬투리당 종자 수는 비형질전환체와 유사하게 나타났다(data not shown). 이러한 결과는 벼에서 *OsGRF4*와 애기장대에서 *BrGRF2*가 과발현되었을 때 종자의 크기와 무게가 증가한 특성들과 유사하다고 할 수 있다(Che et al. 2016, Duan et al. 2016, Hu et al. 2015, Li et al. 2016, Liu et al. 2012). 본 연구의 선행 연구 결과에서도 *BrGRF* 계열 유전자들(*BrGRF3-1*, 3-2, 5, 7, 8-1, 8-2, 9)을 애기장대에서 과발현시켰을 때 자엽, 잎, 종자 등 식물체 기관의 크기가 커지는 특징을 강하게 보였다

(Hong et al. 2017). 이러한 결과들은 *BrGRF* 유전자가 과발현된 형질전환 유체에서 자엽, 잎, 종자의 크기가 증가하는 특성과 유사하다고 할 수 있으며, 도입된 *BrGRF3-1*과 *BrGRF9* 유전자는 자엽, 잎, 종자 등 식물체 기관의 크기 증가를 유도하는 것으로 사료된다.

형질전환 유체에서 기관 세포 특성 분석

식물체 기관의 최종 크기는 세포 분열과 세포 증식 두 과정의 상호작용 결과로 결정된다(Gonzalez et al. 2010). *AtGRF* 유전자가 식물 기관의 크기를 증가시키는 것은 세포 크기의 증가보다는 세포 수 증가에 의한 것이라고 보고되었다(Kim & Lee 2006). 이러한 결과를 바탕으로, 형질전환 유체의 자엽과 잎의 항축 책상 세포(adaxial palisade cells)의 형태를 분석한 결과, *BrGRF* 형질전환 애기장대와 유사하게 비형질전환체와 유사한 세포의 크기 및 형태를 보여 주었고 세포 면적 정량 분석 결과도 비형질전환체와 유사하게 나타났다(Figs. 4, 5). 그러나, 자엽, 첫 번째

Fig. 3. Quantification of dimensional parameters of *BrGRF-OX* organs. (A) Cotyledons at 10 days. (B) The 1st and 3rd leaves at 3 and 5 week, respectively. (C) Phenotypic characters of seeds. Wt, untransformed wild-type plants; the numbers at X axes indicate line numbers of *BrGRF-OX*. Error bars represent the standard error (SE).

Fig. 5. Numbers and sizes of adaxial palisade cells in cotyledons and leaves. (A) Cotyledons at 10 days. (B) and (C) The 1st and 3rd leaves at 3 and 5 week, respectively. Error bars represent the standard error (SE). Wt, untransformed wild-type plants; the numbers at X axes indicate line numbers of *BrGRF-OX*.

Fig. 4. Microscopic views of adaxial palisade cells in cotyledons and leaves of *BrGRF-OX*. Wt, untransformed wild-type plants; the numbers indicate line numbers of *BrGRF-OX*. Bar, 10 μm.

있, 세 번째 잎의 총 세포 수는 비형질전환체 보다 각각 29.144.6%, 15.0-20.3%, 15.6-27.4%로 증가하였다(Fig. 5). 이러한 결과들은 *BrGRF* 형질전환 유채에서 기관들의 크기가 증가한 것은 세포 크기 증가가 아니라 세포 수 증가에 의한 것으로 생각할 수 있었다. 지금까지 보고된 경우를 보면, *AtGRF*, *BnGRF*, *BrGRF8* 유전자의 과발현은 세포 증식을 촉진하여 총 세포 수를 증가시켰고 최종적으로 기관 크기를 증가시킨다고 확인하였다(Hong et al. 2017, Kim & Lee 2006, Liu et al. 2012, Wang et al. 2014). 따라서 본 연구에 사용된 *BrGRF3-1*과 *BrGRF9* 유전자는 기존 연구와 유사하게 형질전환 유채에서 세포 증식 과정을 촉진하는 역할을 담당하고 있으며 식물체 기관의 크기에 영향을 주는 유전자일 것으로 사료된다.

식물생장호르몬과 세포분열 관련 유전자 발현 분석

선행 연구 결과에서 *BrGRF* 유전자가 과발현되어 기관 크기가 증대된 애기장대에서 세포 및 기관 발달에 관련된 GA, 옥신, 세포 분열 관련 유전자들의 발현이 증가되었다(Hong et al. 2017).

따라서 *BrGRF3-1*과 *BrGRF9* 형질전환 유채에서도 *BrGRF* 형질전환 애기장대와 유사하게 GA와 옥신 및 세포 분열 관련 유전자들의 발현이 기관 크기에 영향을 주었을 것으로 예상되었다. 유채 유전체 정보로부터 GA, 옥신, 세포 분열 관련 유전자의 특이 프라이머를 제작하여 형질전환체 앞에서 RT-PCR을 수행하였다(Table 1). 형질전환 유채의 앞에서 GA관련 *MYB65*와 옥신 관련 *IAMT1/SUR2/IAA3/IAA17/AXR* 및 세포 분열 관련 *CYCB2;1/DA1/DWF4/PVP1* 유전자들은 비형질전환체 보다 발현양이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 그러나 옥신 관련 *IAA6*와 세포 분열 관련 *EXOR* 유전자의 발현량은 비형질전환체와 유사하게 나타났다(data not shown).

GA와 옥신은 식물의 형태발생 및 세포 분열 과정에 중요한 호르몬으로 이들 호르몬 생합성, 전이, 반응 등에 관련된 유전자 일부는 형태발생 세포 분열에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되었다(Fleet & Sun 2005, Li et al. 2007). 지금까지 보고된 경우를 보면, GA 관련 유전자의 과발현은 잎 열편(leaf lobe) 형성과 식물 성장을 촉진시켰으며 옥신 관련 유전자들은 세포

Fig. 6. Expression patterns of GA-, auxin-, and cell division-related genes. (A) Semi-quantitative RT-PCR for determination of *BrGRF* expression in transgenic plant leaves. The expression level of *Actin* was used as a quantitative control. Lanes: Wt, untransformed wild-type plants; the numbers above indicate line numbers of *BrGRF* overexpressors. (B) Relative expression level. Error bars represent the standard error (SE). Wt, untransformed wild-type plants; the numbers at X axes indicate line numbers of *BrGRF*-OX. *AXR1*, *AUXIN RESISTANT 1*; *B2;1*, *CYCLIN-B2-1*; *DA1*, *Protein DA1*; *DWF4*, *DWARF 4*; *MYB65*, *MYB DOMAIN PROTEIN 65*; *IAA3* and *17*, *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 3* and *17*; *IAMT1*, *IAA CARBOXYLMETHYLTRANSFERASE 1*; *PVP1*, *PYROPHOSPAHTE-ENERGIZED VACUOLAR MEMBRANE PROTON PUMP 1*; *SUR 2*, *SUPERROOT 2*.

분열과 세포 확장을 조절함으로써 식물의 생장과 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Fleet & Sun 2005, Li et al. 2007, Perrot-Rechenmann 2010). 또한 세포분열 관련 *CYCB2;1* 유전자는 세포증식 활성을 조절하며 *DWF4* 과발현은 긴 잎자루와 함께 거대 잎의 형성과 기관 생장을 촉진한다(Choe et al. 2001, Lee et al. 2009). 옥신 전이를 조절하는 *PVP1*은 세포 수 증가에 의한 기관 발달을 활성화하고, *DA1*은 세포 증식을 조절하여 기관 및 종자의 크기를 결정하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Li et al. 2005, Li et al. 2008). 이러한 결과 *BrGRF3-1*과 *BrGRF9* 유전자는 GA와 옥신 및 세포 분열 관련 유전자들의 발현을 직·간접적으로 조절함으로써 세포 수 증가에 의한 기관 크기 증대를 유도한다는 사실을 예상할 수 있다.

본 연구 결과 *BrGRF3-1*과 *BrGRF9* 유전자는 작물의 생장·형태 발달에 영향을 주어 기관 및 종자 크기 증대를 유도할 수 있는 유용 유전자로서의 기능을 할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

GROWTH-REGULATING FACTOR (GRF) 유전자는 QLQ와 WRC 도메인을 갖고 있는 식물 특이적 전사조절인자로 식물 기관들의 생장과 발달에 중요한 역할을 하고 있다. 배추로부터 분리된 *BrGRF3-1*과 *BrGRF9* 유전자를 각각 35S 프로모터에 결합시켜 두 종류의 식물 형질전환 벡터를 제작한 후 아그로박테리움을 이용하여 유채에 형질전환하였다. 선발된 형질전환체의 특성을 분석한 결과 세포 크기 보다는 세포 수 증가에 의해 자엽, 잎, 종자의 크기가 커지는 것으로 나타났다. RT-PCR로 유전자 발현을 분석한 결과 *BrGRF3-1*과 *BrGRF9* 유전자는 기관 생장 발달에 관여하는 지베렐린(GA), 옥신(auxin), 세포분열 관련 유전자들의 발현을 조절함으로써 유채 기관의 생장과 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다. 따라서 본 연구결과로 *BrGRF* 유전자는 생명공학기술을 활용하여 작물의 농업적 형질을 개선하기 위한 유전자원으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 어젠다사업(과제번호: PJ011813)의 지원에 의해 이루어진 것이다. 또한 본 연구는 2018년도 농촌진흥청 국립농업과학원 박사후 연수과정지원사업에 의해 이루어진 것이다.

REFERENCES

1. Choe S, Fujioka S, Noguchi T, Takatsuto S, Yoshida S, Feldmann KA. 2001. Overexpression of *DWARF4* in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant J* 26: 573-582.
2. Che R, Tong H, Shi B, Liu Y, Fang S, Liu D, Xiao Y, Hu B, Liu L, Wang H, Zhao M, Chu C. 2016. Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses. *Nature Plants* 2: 15195.
3. Duan P, Ni S, Wang J, Zhang B, Xu R, Wang Y, Chen H, Zhu X, Li Y. 2016. Regulation of OsGRF4 by OsMIR396 controls grain size and yield in rice. *Nature Plants* 2: 15203.
4. Fleet CM, Sun TP. 2005. A DELLAcate balance: the role of gibberellins in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* 8: 77-85.
5. Gonzalez N, De Bodt S, Sulpice R, Jikumaru Y, Chae E, Dhondt S, Van Daele T, De Milde L, Weigel D, Kamiya Y, Stitt M, Beemster GT, Inzé D. 2010. Increased leaf size: different means to an end. *Plant Physiol* 153: 1261-1279.
6. Gonzalez N, Beemster G, Inzé D. 2009. David and Goliath: what can the tiny weed *Arabidopsis* teach us to improve biomass production in crops? *Curr Opin Plant Biol* 12: 157-164.
7. Hong JK, Kim JS, Kim JA, Lee SI, Lim MH, Park BS, Lee YH. 2010. Identification and characterization of *SHI* family genes from *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Genes* 32: 309-317.
8. Hong JK, Kim S-Y, Kim K-S, Kwon S-J, Kim JS, Kim JA, Lee SI, Lee Y-H. 2013. Overexpression of a *Brassica rapa* MADS-box gene, *BrAGL20*, induces early flowering time phenotypes in *Brassica napus*. *Plant Biotechnol Rep* 7: 231-237.
9. Hong JK, Oh S-W, Kim JH, Lee SB, Suh EJ, Lee Y-H. 2017. Overexpression of *Brassica rapa* *GROWTH-REGULATING FACTOR* genes in *Arabidopsis thaliana* increases organ growth by enhancing cell proliferation. *J Plant Biotech* 44: 271-286.
10. Horiguchi G, Kim GT, Tsukaya H. 2005. The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 43: 68-78.
11. Hu J, Wang Y, Fang Y, Zeng L, Xu J, Yu H, Shi Z, Pan J, Zhang D, Kang S, Zhu L, Dong G, Guo L, Zeng D,

- Zhang G, Xie L, Xiong G, Li J, Qian Q. 2015. A rare allele of GS2 enhances grain size and grain yield in rice. *Mol Plant* 8: 1455-1465.
12. Kim JH, Choi D, Kende H. 2003. The *AtGRF* family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis*. *Plant J* 36: 94-104.
13. Kim JH, Kende H. 2004. A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13374-13379.
14. Kim JH, Lee BH. 2006. *GROWTH-REGULATING FACTOR4* of *Arabidopsis thaliana* is required for development of leaves, cotyledons, and shoot apical meristem. *J Plant Biol* 49: 463-468.
15. Kim JH, Tsukaya H. 2015. Regulation of plant growth and development by the GROWTH-REGULATING FACTOR and GRF-INTERACTING FACTOR duo. *J Exp Bot* 66: 6093-6107.
16. Krizek BA. 2009. Making bigger plants: key regulators of final organ size. *Curr Opin Plant Biol* 12: 17-22.
17. Lee BH, Ko J-H, Lee S, Lee Y, Pak J-H, Kim JH. 2009. The *Arabidopsis GRF-INTERACTING FACTOR* gene family performs an overlapping function in determining organ size as well as multiple developmental properties. *Plant Physiol* 151: 655-668.
18. Li J, Yang H, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Titapiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards EL. 2005. *Arabidopsis* H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science* 310: 121-125.
19. Li LC, Kang DM, Chen ZL, Qu LJ. 2007. Hormonal regulation of leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* 49: 75-80.
20. Li S, Gao F, Xie K, Zeng X, Cao Y, Zeng J, He Z, Ren Y, Li W, Deng Q, Wang S, Zheng A, Zhu J, Liu H, Wang L, Ping Li. 2016. The OsmiR396c-OsGRF4-OsGIF1 regulatory module determines grain size and yield in rice. *Plant Biotech J* 14: 2134-2145.
21. Li Y, Zheng L, Corke F, Smith C, Bevan MW. 2008. Control of final seed and organ size by the *DAI* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 22: 1331-1336.
22. Liang G, He H, Li Y, Wang F, Yu D. 2014. Molecular mechanism of microRNA396 mediating pistil development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 164: 249-258.
23. Liang YC, Jeon Y-A, Lim S-H, Kim JK, Lee J-Y, Kim Y-M, Lee Y-H, Ha S-H. 2011. Vascular-specific activity of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase 7 gene promoter. *Plant Cell Rep* 30: 973-980.
24. Liu D, Song Y, Chen Z, Yu D. 2009. Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in *Arabidopsis*. *Physiol Plantarum* 136: 223-236.
25. Liu J, Hua W, Yang HL, Zhan GM, Li RJ, Deng LB, Wang XF, Liu GH, Wang HZ. 2012. The *BnGRF2* gene (*GRF2*-like gene from *Brassica napus*) enhances seed oil production through regulating cell number and plant photosynthesis. *J Exp Bot* 63: 3727-3740.
26. Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473-497.
27. Omidbakhshfard MA, Proost S, Fujikura U, Mueller-Roeber B. 2015. Growth-Regulating Factors (GRFs): a small transcription factor family with important functions in plant biology. *Mol Plant* 8: 998-1010.
28. Perrot-Rechenmann C. 2010. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001446.
29. Van der Knaap E, Kim JH, Kende H. 2000. A novel gibberellin induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant Physiol* 122: 695-704.
30. Wang F, Qiu N, Ding Q, Li J, Zhang Y, Li H, Gao J. 2014. Genome-wide identification and analysis of the growth-regulating factor family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *BMC Genomics* 15: 807.
31. Yao K, Lockhart KM, Kalanack JJ. 2005. Cloning of dehydrin coding sequences from *Brassica juncea* and *Brassica napus* and their low temperature-inducible expression in germinating seeds. *Plant Physiol Biochem* 43: 83-89.
32. Ye R, Yao QH, Xu ZH, Xue HW. 2004. Development of an efficient method for the isolation of factors involved in gene transcription during rice embryo development. *Plant J* 38: 348-357.
33. Zhang DF, Li B, Jia GQ, Zhang TF, Dai JR, Li JS, Wang SC. 2008. Isolation and characterization of genes encoding GRF transcription factors and GIF transcriptional coactivators in maize (*Zea mays* L.). *Plant Sci* 175: 809-817.