배추 *SHORT VEGETATIVE PHASE* 유전자 발현이 배추 개화시기에 미치는 영향

홍준기 · 박상렬 · 서은정 · 박지희 · 이연희*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부

Effects of Overexpression of *Brassica Rapa* *SHORT VEGETATIVE PHASE* Gene on Flowering Time

Joon Ki Hong, Sang-Ryeol Park, Eun Jung Suh, Jihee Park, and Yeon-Hee Lee*

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

Abstract The *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) gene encodes a MADS-box gene family of transcription factors that repress floral transition. To explore the function of the *Brassica rapa* *SVP* (*BrSVP*) gene during the flowering time of this species, a construct containing *BrSVP* under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter was introduced into *B. rapa* via *Agrobacterium*-mediated transformation. The resulting transgenic plants showed delayed flowering time, and RT-PCR analyses further revealed that *BrSVP* repressed the expression of the floral integrator genes *AGL20*, *AGL24*, and *FT* during vernalization. Our data indicated that *BrSVP* acts as a negative regulator in the flowering time of *B. rapa* and that it may therefore be a useful genetic source for crop improvement with respect to flowering time regulation.

Keywords *Agrobacterium*, Floral transition, Flowering time, *SHORT VEGETATIVE PHASE*, Transformation, Transcription factor

Received on May 4, 2020. Revised on May 6, 2020. Accepted on May 21, 2020.

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

서 언

배추는 우리나라 주요 3대 작물 중의 하나로 가장 넓은 면적에 재배되는 채소로 육종과 신품종 개발이 꾸준히 진행되고 있다. 배추가 개화를 하기 위해서는 일정기간 이상의 저온처리(vernalization)를 필요로 하며 서늘한 기후에서 재배하기 적합한 작물이다. 우리나라에서는 급작스런 온도 변화로 저온에 감응하여 일찍 추대 현상이 일어나면서 배추의 상품성을 크게 떨어뜨린다. 작물에서 추대 및 개화시기에 관여하는 것으로 보고된 많은 유전자들의 발현 조절을 통한 개화시기 조절 연구는 환경변화에 적응 가능한 배추의 형질을 개량하여 품질 및 생산성을 높이는 데 중요하다고 할 수 있다.

개화는 식물이 영양생장에서 생식생장으로 전환되는 중요한 발달 단계로 주로 춘화처리 경로, 자발적 경로, 광주기 의존적 경로, 식물 호르몬인 지베렐린 연관 경로들이 밝혀졌다. 이들 중 봄에 꽃을 피우는 식물들은 가을에 개화가 억제되고 장기간의 저온기간인 겨울을 보내는 춘화처리가 개화를 유도 또는 촉진하기 위한 필수조건이다. 이러한 식물의 춘화처리에서 가장 중요한

역할을 하는 유전자는 개화 억제자로 알려진 *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*)이다. *FLC*는 MADS-box transcription factor로 식물이 저온처리를 받기 전에 발현이 되어 개화를 유도하는 floral integrator 유전자인 *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVER EXPRESSION OF CONSTANS 1*, *AGL20*, *AGAMOUS-LIKE 20*), *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) 유전자들의 발현을 정교하게 억제하여 개화를 억제한다(Michaels & Amasino 1999, Sheldon et al. 1999, 2000, He & Amasino 2005). 그 후 식물체가 장기간의 저온 처리를 받으면 *FLC* 발현이 억제되면서 개화 촉진 유전자들이 발현을 한다. 이러한 *FLC* 발현 억제는 저온 처리 이후에도 계속 유지가 되어 식물이 개화하는 것으로 알려져 있다. 장기간의 저온에 의하여 homeodomain finger 유전자인 *VIN3* (*VERNALIZATION INSENSITIVE 3*) 등의 발현이 유도되고 이로 인해 염색체 변형과 관련된 요인들이 작용하여 저온처리 후에도 *FLC* 유전자 발현 억제가 지속된다(Sung & Amasino 2005, Greb et al. 2007). 또 다른 MADS-box 유전자인 *SVP* (*SHORT VEGETATIVE PHASE*)는 *FLC*와의 상호작용에 의하여 주요 개화 유전자 *SOC1* 과 *FT* 유전자의 발현을 조절함으로써 개화 억제자로서의 역할을

수행 하는 것으로 나타났다(Hartmann et al. 2000, Michaels et al. 2003, Lee et al. 2007a, Li et al. 2008).

*SVP*는 영양생장 동안 정단분열조직과 앞에서 floral integrator 인 *SOCI*과 *FT*에 결합하여 활성을 억제하고 floral transition시기 까지 vegetative shoot identity를 유지하며 inflorescence identity 관련 경로를 촉진하는 *AGL24*와 상호작용으로 꽃 분열조직의 조기 분화를 억제하여 개화를 억제하는 역할을 담당한다(Yu et al. 2002, Gregis et al. 2009, Liu et al. 2009, Torti et al. 2012). 또한 저온에서 개화 억제를 담당하는 *SVP*는 식물체 주변 온도변화에 따라 *FT* 발현을 조절 함으로써 개화 시기를 조절할 수 있는 것으로 보고되었다(Blázquez et al. 2003, Lee et al. 2007a). 실제 *SVP*가 결실된 조기개화 유도 애기장대에서 *SVP*를 과발현시켰을 경우 개화가 지연 되었다(Hartmann et al. 2000, Gregis et al. 2006). Lee et al. (2007b)의 보고에 의하면 배추 *SVP* 유전자를 애기장대에 발현시켰을 때 개화가 지연 되는 것을 확인하였으며 *AtSVP* 유전자가 결실된 조기 개화하는 애기장대에 배추 *SVP*를 도입하였을 경우 정상적으로 개화가 유도하는 것으로 밝혀졌다. 이와 같이 *SVP*는 식물체에서 개화시기를 조절하는 중요한 유전자이다.

따라서 본 연구는 개화시기 경로에서 주요한 역할을 하는 배추 *SVP* 유전자를 배추에 형질전환하여 개화시기를 분석하였으며, *BrSVP* 유전자가 배추의 개화시기를 조절하여 농업적 형질을 개선하기 위한 주요한 후보 유전자로 이용될 수 있다는 것을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

식물 형질전환 벡터 제작

배추 형질전환을 위해서 *BrSVP* cDNA를 제조제 Phosphinothricin (ppt) 분해 유전자 Phosphinothricin N-acetyltransferase (*bar*-ppt resistance) 부위를 포함하는 pB2GW7 binary vector 벡터의 CaMV 35S 프로모터와 35S 터미널(35S-*ter*) 사이에 융합하여 식물 형질 전환용 벡터를 제작하였다(Fig. 1A). 제작된 벡터를 freeze thaw 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 도입하였으며 유전자 도입이 확인된 콜로니를 배추 형질전환에 사용하였다.

형질전환체 제작 및 세대 육성

배추 형질전환은 아그로박테리움을 이용한 Kim et al. (2007)의 방법과 유사하게 하였다. 배추는 만추대 특성을 가진 'inbred line DA001' 품종을 본 실험에 사용하였다(Lee et al. 2004).

표면 살균한 배추 종자를 MS 기본 배지에 과종하여 25°C 배양실에서 6-7일 발아시킨 후 하배축을 0.5 cm 크기로 절단하여 전배양 배지(MS basal medium, 1 mg/L NAA, 3 mg/L BA, 2 mg/L AgNO₃, 3% sucrose, and 0.8% Phytagar)에서 2일 동안 배양시켰다. 전배양된 하배축 조직을 아그로박테리움과 15-20분간 접촉시킨 후 25°C, 암 상태에서 공동배양 배지(MS basal medium, 1 mg/L NAA, 3 mg/L BA, 2 mg/L AgNO₃, 100 μM acetosyringone, 3% sucrose, and 0.8% Phytagar)에서 3일 동안 공동 배양하였다. 공동배양한 하배축을 100 mg/L carbenicillin, 250 mg/L cefotaxime 이 첨가된 멸균수로 5-6번 세척하여 아그로박테리움을 제거한 후 선발 배지(MS basal medium, 1 mg/L NAA, 3 mg/L BA, 2 mg/L AgNO₃, 3% sucrose, 4 mg/L ppt, 100 mg/L carbenicillin, 250 mg/L

Fig. 1. The expression of *BrSVP* in transgenic *B. rapa* plants. (A) Structure of the 35S-Pro::BrSVP construct. The *Bar* gene under the control of the nopaline promoter (*nos-pro*) serves as a selectable marker for *B. rapa* transformants. *BrSVP* was regulated by 35S-Pro. LB and RB indicate left and right borders of T-DNA, respectively. (B) The confirmation of the presence of *BrSVP* and *Bar* transgenes using genomic PCR analysis. (C) Semi-quantitative RT-PCR for determination of *BrSVP* expression in transgenic plants (upper panel). The expression level of *Bactin* was used as a quantitative control. Relative expression level of *BrSVP* transgene (lower panel). Error bars represent the standard error (SE). Wt, untransformed wild-type plants; lanes #1-#8, selected transgenic lines, respectively.

cefotaxime, and 0.8% Phytagar)에 치상하였다. 신토가 형성될 때까지 새로운 신토배지에서 2-3주 간격으로 계대배양하였다. 재분화 되어 나온 신토를 식물 생장조절제가 포함되어 있지 않은 MS 배지로 옮겨 뿌리 형성을 유도하였다. 뿌리가 형성되어 생육이 왕성한 형질전환체를 순화시켜 순화처리(4°C, 40일 처리) 후 온실에서 재배하여 뇌수분(bud pollination)으로 종자를 수확하여 세대를 진전시켰다. 형질전환체의 세대 진전을 위해 종자를 ppt 25 mg/L이 포함된 MS 기본 배지에 40개씩 파종하여 저항성을 나타내는 형질전환체만을 신토하여 온실로 옮겨 재배하였다.

형질전환 배주에서 유전자 도입 및 발현 분석

Genomic DNA PCR과 RT-PCR을 통해 *BrSVP* 유전자 삽입 유무와 발현을 각각 확인하였다. 형질전환 배주 잎으로부터 genomic DNA를 분리하였다(DNeasy Plant Kit, Qiagen, Hilden, Germany). 분리된 genomic DNA 50 ng을 사용하여 형질전환 확인용 벡터 특이 프라이머 Gw-SF/Gw-SR를 이용한 PCR (95°C에서 3분, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초, 35 사이클, 72°C 10분)로 식물체내 유전자 도입을 확인하였다(Table 1).

도입된 유전자 발현을 확인하기 위하여 형질전환 식물체의 잎으로부터 Hong et al. (2013) 방법과 유사하게 total RNA를 분리한 후 역전사 효소(MMLV transcriptase RNase free, Toyobo, Osaka, Japan)를 이용하여 total RNA 5 µg을 cDNA 라이브러리로 제작하고 1 µl를 PCR 증폭에 사용하였다(Hong et al. 2017).

유전자 특이 프라이머를 이용하여 PCR (95°C에서 3분, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초, 25 사이클, 72°C 10분 조건)로 유전자 발현을 확인하였고 염기서열 분석을 통해 도입된 유전자의 발현을 최종 확인하였다(Table 1). *Bactin* 유전자는 발현 수준을 확인 하기 위하여 정량적 대조군으로 사용되었으며 모든 실험은 3 반복으로 수행하였다(Hong et al. 2010, Yao et al. 2005).

개화 관련 유전자 발현 분석

형질전환체에서 개화 조절 유전자들의 발현 수준을 확인하기 위하여 Kim et al. (2007)의 방법을 기본으로 하여 저온처리 (4°C)를 하지 않은 경우와 저온처리 20일, 40일, 저온처리 40일 후 상온에서 10일 생육 된 형질전환체의 잎으로부터 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 total RNA를 분리 하였다. 개화 관련 유전자 특이 프라이머들을 사용하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다(Table 1). Semi-quantitative RT-PCR 결과로부터 Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, USA; Liang et al. 2011)과 GelQuant.NET (<http://biochemlabolutions.com/GelQuantNET.html>)을 이용하여 상대적 발현 수준을 측정하였으며 모든 실험은 3반복으로 수행하였다.

형질전환체에서 개화시기 분석

형질전환체에서 개화 일수를 확인하기 위하여 Kim et al.

Table 1. Oligonucleotide primers used in RT-PCR

Target	Acc. No.	Primer sequences	Expected size (bp)
<i>BrAGL20</i>	Bra000393	5'-ATGGTGAGGGGCAAACTCAGATGAAG-3' 5'-TCACTTTCTTGAAGAACAAGGTAACCC -3'	642
<i>BrAGL24</i>	Bra019221	5'-ATGGCGAGAGAAGATAAGG -3' 5'-TCATTCCCAAGATGGAAGCCC-3'	666
<i>BrFCL1</i>	Bra028599	5'-ATGGGGAGGAAGAACTTGAAATCAAG-3' 5'-CTATAAAAAATTCCACTCCCACTAACC-3'	621
<i>BrFT1</i>	Bra022475	5'-ATGTCCTTAAGTAATAGAGATCCTC-3' 5'-CTAACTTCTTCGTCCTCCGAGCCAC-3'	528
<i>BrSVP</i>	Bra038511	5'-ATGGCGAGAGAAAAGATTGAGATCAGG-3' 5'-CTAACCACCATACGGTAAGCCGAGCC -3'	726
<i>Bactin</i>		5'-TGGCATCACACTTTTCTACAA-3' 5'-CAACGGAATCTCTCAGCTCC-3'	516
<i>Gw-S</i>		5'-ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT-3' 5'-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'	779
<i>LB1</i>		5'-TTCAAGCACGGGAAGTGGCATGAC-3'	
<i>LB2</i>		5'-GTTTCTGGCAGCTGGACTTC-3'	
<i>RB1</i>		5'-AGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAG-3'	
<i>RB2</i>		5'-AAACCCCTAGTATGTATTTGTATTGT-3'	

(2007, 2011)이 기술한 방법으로 최종 선발된 계통의 배추 종자를 전라북도 전주시 국립농업과학원 농업생명자원부 GM온실에 2019년 1월 4일에 파종하여 본엽이 4·5장 되었을 때인 1월 16일에 선발 계통 별로 5개체씩 4℃에서 40일 동안 춘화처리 후 2월 25일에 GM온실로 옮겨 상온에서 재배 하였다. 형질전환 배추의 추대시기는 꽃봉오리가 배추기부에서 육안으로 보이는 때까지 소요되는 일수로 조사 하였으며 대조군으로는 같은 시기에 파종하여 저온 처리한 비형질전환체 5개체가 사용되었다.

삽입유전자 염기서열분석(Flanking DNA sequencing)

형질전환체에서 도입 유전자를 포함하는 T-DNA의 genomic DNA내 삽입된 위치를 확인하기 위해 분리된 genomic DNA (100ng/μl) 20 μl를 *HincII*와 *HaeIII* 제한효소로 자르고 adaptor와 ligation 시켰다. T-DNA와 adaptor의 특정 프라이머 LB1/RB1과 A1를 이용하여 1차 PCR을 수행하였다(Table 1). 정확한 T-DNA 주변 염기서열을 분석하기 위하여 1차 PCR산물을 LB2/RB2와 A2 프라이머를 사용하여 2차 PCR을 수행하였다(Table 1). 2차 PCR 산물의 염기서열을 확인 하였으며 Brassica database (<http://brassicadb.org/brad/>)에서 T-DNA 삽입 인접 염기서열 부분을 확인하였다.

결과 및 고찰

BrSVP 유전자 배추 형질전환 및 개화시기 분석

저온에 감응하여 추대하는 특성을 가진 배추는 급작스런 온도 변화로 저온에 반응하여 조기 추대가 유도되면 배추의 상품성 저하를 가져오기 때문에 국내·외적으로 해결해야 될 중요한 문제로 제시되고 있다(Kim et al. 2011). 이러한 현상을 해결하기 위해 작물에서 추대 및 개화시기에 관여하는 유전자들을 활용하여 환경변화에 적응 가능한 작물을 개발하는 연구가 진행 중이다. *SVP* 유전자는 작물이 영양생장에서 생식생장으로 전환하는 단계에서 적절한 시기에 개화를 할 수 있도록 개화를 억제하는 기능으로 개화시기 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Gregis et al. 2009, Liu et al. 2009). 배추로부터 분리한 *SVP*는 애기장대에서 과발현 되었을 때 개화가 지연 되는 것으로 나타났다(Lee et al. 2007b). 따라서 본 연구에서는 애기장대에서 개화억제 기능이 확인된 배추 *SVP*를 배추에 도입하여 추대 시기가 지연된 형질전환체를 세대별로 선발하여 추대가 지연된 고정 계통을 최종 육성하고자 하였다. *BrSVP* 유전자와 제초제 성분인 Phosphinothricin (ppt) 분해 유전자(*Bar*)를 포함한 식물 형질전

환 벡터를 제작 후 아그로박테리움을 사용하여 배추에 형질전환 하였다. ppt에 저항성을 보이는 형질전환체를 선발한 후 너수분으로 종자를 수확하였다. 169 계통 T₀ 종자를 ppt 25 mg/L에서 발아시켜 제초제 저항성과 감수성을 조사하여 비율이 3:1로 나타나는 35 계통을 선발하여 각 계통 당 5 개체를 온실에서 재배하여 종자를 확보하였다. 확보한 종자를 파종하여 전개된 T₂ 식물체에서 제초제 저항성을 모두 나타내면서 개화시기가 지속적으로 지연된 독립된 T₂ 세대 8계통을 최종 선발하였다. T₂ 종자를 파종하여 T₃ 세대 식물체에서 각 유전자의 특이 프라이머를 이용해 genomic DNA PCR로 *BrSVP* 유전자 도입을 확인하였다(Fig. 1B). Semi-quantitative RT-PCR로 유전자 발현을 확인한 결과 비형질전환체에 비하여 형질전환체에서 *BrSVP* 유전자 발현이 월등히 높았다(Fig. 1C). 이 결과 T₃ 세대 식물체에서 모두 도입된 유전자가 안정적으로 삽입되어 유전되었다는 것을 알 수 있었다.

도입한 *BrSVP*가 형질전환 배추의 개화시기 조절에 미치는 영향을 분석하고자 본엽이 4·5장으로 생장된 T₃ 형질전환 배추를 40일 동안 저온처리(춘화처리) 후 온실에서 재배한 날부터 꽃봉오리가 배추 기부에 육안으로 보일 때까지의 소요된 일수를 조사하였다. Table 2는 *BrSVP* 유전자가 도입된 T₃세대에서 계통별로 각 계통 내에 있는 개체들에서 개화시기에 소요되는 평균일수를 나타낸 것으로 선발된 계통 모두 대조군보다 개화시기가 늦었다. 비형질전환 배추는 16일째 모든 개체에서 꽃봉오리가 관찰되었으나 형질전환 배추는 평균 21·24일이 소요되었으며 모든 계통 들에서 개화시기가 지연된 것을 확인 하였다(Table 2, Fig. 2). 선발된 계통 내에서 가장 빠른 개체의 개화시기 소요일수는 19일이었으며 가장 늦은 개체의 개화시기 소요일수는 25일이었고 비형질전환체보다 3·9일 정도 개화시기가 지연되는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통하여 배추에서 분리된 *SVP*유전자는 기존에 보고된 애기장대에서뿐만 아니라 배추에 도입되었을 때도 안정적으로 발현하여 개화시기를 지연시키는 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

개화시기를 조절하는 연구는 많은 작물에서 수행되었으며 배추속 작물 및 다양한 작물에 개화 촉진이나 억제 유전자를 활용하여 개화 시기를 조절하는 연구가 보고되었다(Jung & Müller 2009). 배추 개화 억제 유전자 *BrFLC1*과 *BrFLC3*가 형질전환된 배추는 평균적으로 개화시기가 3·23일 지연되었다(Kim et al. 2011). 개화 촉진 유전자 *BrAGL20* 유전자가 과발현된 유체는 저온처리가 없는 상태에서 비형질전환체 비하여 11·37일 정도 개화시기가 빨라진 현상을 나타내었다(Hong et al. 2013). 겨자(*S. alba*)의 *FUL*-like MADS-box 유전자 *MADSB*가 도입된 여름형 유체는

Table 2. Phenotypes of flowering time in *B. rapa* transgenic plants after vernalization. Transgenic plants transformed with the *BrSVP* gene were exposed to low temperature (4°C) for 40 days.

Genes	Line	Plant line	Days to visible flower bud in plants
No gene inserted	Wt	<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	16(16±0) ^z
<i>BrSVP</i> genes	Line	Transgenic plant lines	Days to visible flower bud in transformants
<i>bar-35S::BrSVP</i>	#1	32(T ₀)-1(T ₁)-3(T ₂)-1~5(T ₃)	19-22(21±1.4*)
	#2	33-2-5-1~5	22-25(24±1.6*)
	#3	58-1-1-1~5	19-22(21±1.6*)
	#4	64-1-1-1~5	19-25(22±2.5*)
	#5	121-1-2-1~5	22(22±0)
	#6	135-1-3-1~5	19-22(21±1.6*)
	#7	138-1-3-1~5	22(22±0)
	#8	164-1-3-1~5	22-23(22±0.5*)

^z(parentheses): The range of values obtained by mean±SD with 95% confidence limits (*; *p*-value <0.01, Student's *t*-test).

Fig. 2. Flowering-time phenotype of *BrSVP* overexpressing transgenic plants. 40dV23, 23 days at 25°C after a 40-day exposure to 4°C; 40dV28, 28 days at 25°C after a 40-day exposure to 4°C. Wt, untransformed wild-type plants; Transgenic lines, *BrSVP* overexpressing transgenic plants.

개화시기가 3-15일 빨라지고 종자 성숙이 촉진되었으며 겨울형 유체는 개화에 필요한 엄격한 춘화처리 조건이 일부 낮게 완화되었다(Chandler et al. 2005). 또한 애기장대 *AtFLC*가 도입된 여름형 유체에서는 개화가 지연되었다(Tadege et al. 2001). 최근에는 사과나무 등의 다년생 과수 작목에서 농업적 형질을 개선하

기 위해 *SVP*유전자의 발현 조절을 통해 개화 시기 조절 및 목본식물의 줄기 생장 등을 조절하는 연구가 수행되었다(Wu et al. 2017). 본 연구 결과에서도 *BrSVP*를 배추에서 과발현 시켰을 때 개화가 지연되는 특성을 나타냈으며 이러한 결과들은 *BrSVP*의 발현 조절을 통해 작물에서 개화시기 조절이 가능하여 작물의 생산성, 상품가치 등의 형질 특성을 향상시킬 수 있을 것이다.

개화조절 관련 유전자 발현 분석

배추는 춘화처리가 개화를 유도 또는 촉진하기 위한 필수조건이다. *SVP*는 배추 춘화처리에서 가장 중요한 역할을 하는 유전자인 *FLC*와 상호작용에 의하여 개화 억제자로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Hartmann et al. 2000, Lee et al. 2007a, Li et al. 2008). 이들의 상호 조합은 개화를 유도하는 floral integrator 유전자인 *AGL20*, *AGL24*, *FT*의 활성을 억제하여 개화를 억제한다고 보고 되었다(Michaels & Amasino 1999, Sheldon et al. 1999, 2000, He & Amasino 2005). 따라서 *BrSVP*가 형질전환 배추에서 floral integrator 관련 유전자들의 발현 조절을 통해 개화 시기에 영향을 주었을 것으로 예상되어 이들 유전자들의 발현 양상을 조사하였다. 배추 유전체 정보로부터 *AGL20*, *AGL24*, *FT*, *FLC* 유전자들의 특이 프라이머를 제작하여 형질전환체를 춘화처리 전, 춘화처리 20일과 40일, 춘화처리 후 10일째 앞에서 시료를 확보하여 RT-PCR을 수행하였다(Table 1, Fig. 3). 개화시기가 늦은 형질전환 배추에서 *AGL20*은 춘화처리 전과 춘화처리 20일까지 비형질전환체 보다 발현량이 감소하였다(Fig. 3). *AGL24*는 춘화처리 전과 춘화처리 20일, 40일까지 비형질전환체보다 발현량이 상당히 감소하였다. 개화경로에서

Fig. 3. Expression patterns of floral regulator genes in *B. rapa* transgenic plants transformed with *BrSVP*. *FLC*, *FLOWERING LOCUS C*; *AGL20* and *AGL24*, *AGAMOUS-LIKE 20* and *24*; *FT*, *FLOWERING LOCUS T*. 0dV, 20 day-old plants before cold treatment (4°C); 20dV, 20-day exposure to 4°C; 40dV, 40-day exposure to 4°C; 40dV10, 10 days at 25°C after a 40-day exposure to 4°C. Wt, untransformed wild-type plants; lanes #1-#8, selected transgenic lines, respectively.

가장 중요한 역할을 하는 floral integrator인 *FT*은 춘화처리 전과 춘화처리 20일째까지 발현을 확인 할 수 없었으나 처리 40일째부터 발현을 확인할 수 있었으며 개화시기가 늦은 형질전환체에서 *FT* 발현량은 비형질전환체보다 현저히 감소한 것으로 나타났다. 춘화처리가 시작되면서 발현이 되지 않는 것으로 알려진 *FLC1*은 비형질전환체와 형질전환 배추에서 모두 춘화처리 이후 발현을 확인 할 수 없었다. *FLC1*은 *SVP* 보다 상위 유전자로 *SVP* 과발현이 *FLC1*의 발현에 직접 영향을 주지 않았다. 따라서 형질전환 배추에서 도입된 *BrSVP* 유전자는 *AGL20*, *AGL24*, *FT* 유전자들의 발현을 억제시킴으로써 개화시기 지연 효과를 나타냈다.

식물체에서 floral transition 동안 개화시기 조절 유전자 *FCL*, *SVP*, *AGL20*(*SOC1*), *AGL24*, *FT* 유전자들은 floral organ identity에 관여하는 다양한 유전자들과 상호작용에 의해 조절된다. 춘화처리 개화유도 경로에서 *SVP*는 저온에 노출되었을 때 *API*과 결합하여 *AGL20*의 활성을 억제하고 동시에 *AGL24*와 결합하여 적절한 개화시기까지 개화 조직의 발달을 억제 시키는 역할을

수행한다고 보고되었다(Gregis et al. 2009, Torti et al. 2012, Yu et al. 2002). 또한 이 경로에서 *SVP*와 *FLC*의 결합은 주요 개화 유전자인 *FT*의 발현을 감소 시켜 개화를 억제한다(Lee et al. 2007b, Li et al. 2008, Michaels et al. 2003). Liu et al. (2008)은 *SVP*가 *AGL24*와 *SOC1*과 함께 결합하여 개화되는 적절한 시기까지 꽃 분열조직의 조기 분화를 억제하고 floral transition에서 *SVP*의 활성이 억제될 때 *AGL24*와 *FT*가 *SOC1* (*AGL20*)의 발현을 촉진시키는 것으로 보고 하였다. Lee et al. (2007b)은 배추 *SVP*유전자를 형질전환 하여 개화가 지연된 애기장대에서 도입된 배추 *SVP*가 애기장대 *FT*와 *SOC1* 발현을 억제하는 것으로 보고 하였다. 따라서 형질전환 배추에 도입된 *SVP* 유전자는 기존 연구와 유사하게 춘화처리 동안 floral integrator 유전자들의 발현을 억제시키고 있으며 특히 *AGL24*와 *FT*의 발현을 더 강하게 억제함으로써 개화시기 지연을 유도하는 것으로 예상할 수 있다.

본 연구 결과 배추 *SVP* 유전자는 배추에서 춘화처리 동안 floral integrator 유전자들의 발현에 영향을 주어 개화시기를 조절 할 수 있는 유용 유전자로서의 기능을 할 수 있을 것이다.

삽입유전자 염기서열분석(Flanking DNA sequencing)

T-DNA을 이용한 형질전환은 외래 또는 변형된 유전자를 식물에 도입하여 식물 기능을 변경하거나 분자 육종을 목적으로 사용되는 주요 접근법이다. 그러나 T-DNA는 형질전환체의 게놈에 무작위로 삽입되어 여러 개의 유전자 좌에 삽입되거나 여러 개의 T-DNA가 삽입될 수 있고 특정 유전자에 삽입되어 고유한 특성이 변이된 돌연변이체를 생성하기도 한다(De Buck et al. 2009, Oltmanns et al. 2010). 형질전환 식물체에서 T-DNA 삽입을 통한 유전자들의 결실과 이로 인해 유도된 특성 변화를 확인하기 위해 게놈 DNA에서 T-DNA 삽입 인접 염기서열 분석이 필요하며 삽입 부위에 관한 정보는 형질전환 식물체의 안정성 평가를 위한 중요한 분자생물학적 정보를 제공한다(Spalinska et al. 2013). 따라서 개화시기가 지연된 형질전환 배추 3계통(#3, #6, #7)에서 도입된 *BrSVP*의 genomic DNA내 삽입된 위치를 확인하기 위해 T-DNA 삽입 인접 염기서열 분석을 하였다. 분석 결과 각각의 형질전환 배추에서 염색체 5번의 2567129bp-2567394bp사이, 염색체 9번의 14851639bp-114851368bp사이, 염색체 9번의 19565583bp-19565861bp사이에서 T-DNA삽입을 확인 하였으며 이들은 Bra004936, Bra017384, Bra027996 유전자 전사시작점의 상위 1.5kb, 2.6kb, 18kb 위치에 도입된 것으로 확인되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 T-DNA가 다른 유전자 전사영역에서

Fig. 4. Structure and position of T-DNA insertion in *BrSVP* overexpressing transgenic plants. Black boxes indicate genes. Numbers indicate chromosome positions. LB and RB indicate left and right borders of T-DNA, respectively. #3, #6, and #7, selected transgenic plant lines.

벗어나 삽입된 것을 알 수 있으며 직접적으로 유전자 결실이나 변이는 유도하지 않았다. 따라서 형질전환 배추에 삽입된 T-DNA는 각각의 유전자 좌에서 주위 유전자들의 변이 없이 도입된 *BrSVP* 유전자의 과발현을 통해 floral integrator 관련 유전자의 발현을 억제시킴으로써 개화시기를 지연시키는 것으로 나타났다.

적 요

*SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*는 MADS-box를 갖고 있는 식물 전사조절인자로 *FLC*와 상호작용에 의하여 개화 억제자로서 역할을 하고 있다. 배추로부터 분리된 *BrSVP* 유전자를 35S 프로모터에 결합시켜 식물 형질전환 벡터를 제작한 후 아그로박테리움을 이용하여 배추에 형질전환하였다. 선발된 형질전환체의 특성을 분석한 결과 춘화처리 후에도 개화시기가 지연되는 것으로 나타났다. RT-PCR로 유전자 발현을 분석한 결과 *BrSVP* 유전자는 floral integrators *AGL20*, *AGL24*, *FT* 유전자의 발현을 감소 시킴으로써 배추의 개화 및 추대시기를 지연시키는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구 결과로부터 *BrSVP* 유전자는 생명공학기술을 활용하여 개화시기를 조절할 수 있는 유용 유전자원으로 이용될 수 있을 것이다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 어젠다사업(과제번호: PJ014174)의 지원에 의해 이루어진 것이다. 또한 본 연구는 2020년도 농촌진흥

청 국립농업과학원 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것이다.

REFERENCES

- Blázquez MA, Ahn JH, Weigel D. 2003. A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 33: 168-171.
- Chandler J, Corbesier L, Spielmann P, Dettendorfer J, Stahl D, Apel K, Melzer S. 2005. Modulating flowering time and prevention of pod shatter in oilseed rape. *Mol Breeding* 15: 87-94.
- De Buck S, Podevin N, Nolf J, Jacobs A, Depicker A. 2009. The T-DNA integration pattern in *Arabidopsis* transformants is highly determined by the transformed target cell. *Plant J* 60: 134-145.
- Greb T, Mylne JS, Crevillen P, Geraldo N, An H, Gendall AR, Dean C. 2007. The PHD finger protein VRN5 functions in the epigenetic silencing of *Arabidopsis FLC*. *Curr Biol* 17: 73-78.
- Gregis V, Sessa A, Colombo L, Kater MM. 2006. AGL24, SHORT VEGETATIVE PHASE, and APETALA1 redundantly control AGAMOUS during early stages of flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1373-1382.
- Gregis V, Sessa A, Dorcaforrell C, Kater MM. 2009. The *Arabidopsis* floral meristem identity genes *API*, *AGL24* and *SVP* directly repress class B and C floral homeotic genes. *Plant J* 60: 626-637.
- Hartmann U, Hhmann S, Nettesheim K, Wisman E, Seadler H, Huijser P. 2000. Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J* 21: 351-360.
- He Y, Amasino RM. 2005. Role of chromatin modification in flowering time control. *Trends Plant Sci* 10: 30-35.
- 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 Genom* 32: 309-317.
- 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.
- 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.
12. Jung C, Miller AE. 2009. Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends Plant Sci* 14: 563-573.
 13. Kim SY, Park BS, Kwon SJ, Kim J, Lim MH, Park YD, Kim DY, Suh SC, Jin YM, Ahn JH, Lee YH. 2007. Delayed flowering time in *Arabidopsis* and *Brassica rapa* by the overexpression of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* homologs isolated from Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep* 26: 327-336.
 14. Kim SY, Kim JS, Kim JA, Park BS, Hong JK, Park YD, Lee YH. 2011. Induction of *Brassica rapa* transgenic plant line showing delayed bolting time using overexpression of *BrFLC* genes. *Korean J Int Agri* 23: 218-225.
 15. Lee M-K, Kim H-S, Kim J-S, Kim S-H, Park Y-D. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation system for large-scale production of transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) plants for insertional mutagenesis. *J plant Biol* 47: 300-306.
 16. Lee JH, Park S, Lee JS, Ahn JH. 2007a. A conserved role of *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* in controlling flowering time of Brassica plants. *Biochim Biophys Acta* 1769: 455-461.
 17. Lee JH, Yoo SJ, Park S, Hwang I, Lee JS, Ahn JH. 2007b. Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 21: 397-402.
 18. Li D, Liu C, Shen L, Wu Y, Chen H, Robertson M, Helliwell CA, Ito T, Meyerowitz E, Yu H. 2008. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 15: 110-120.
 19. 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.
 20. Liu C, Chen H, Er HL, Soo HM, Kumar PP, Han J, Liou Y, Yu H. 2008. Direct interaction of *AGL24* and *SOC1* integrates flowering signals in *Arabidopsis*. *Development* 135: 1481-1491.
 21. Liu C, Xi WY, Shen LS, Tan CP, Yu H. 2009. Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Dev Cell* 16: 711-722.
 22. Michaels SD, Amasino RM. 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11: 949-956.
 23. Michaels SD, Ditta G, Gustafson-Brown C, Pelaz S, Yanofsky M, Amasino RM. 2003. *AGL24* acts as a promoter of flowering in *Arabidopsis* and is positively regulated by vernalization. *Plant J* 33: 867-874.
 24. Oltmanns H, Frame B, Lee LY, Johnson S, Li B, Wang K, Gelvin S. 2010. Generation of backbone-free, low transgene copy plants by launching T-DNA from the *Agrobacterium* chromosome. *Plant Physiol* 152: 1158-1166.
 25. Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, Peacock WJ, Dennis ES. 1999. The *FLF* MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell* 11: 445-458.
 26. Sheldon CC, Rouse DT, Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. 2000. The molecular basis of vernalization: the control role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3753-3758.
 27. Spalinskas R, Bulcke M, Eede G, Milcamps A. 2013. LT-RADE: an efficient user-friendly genome walking method applied to the molecular characterization of the insertion site of genetically modified maize MON810 and rice LLRICE62. *Food Analytical Methods*. 6: 705-713.
 28. Sung S, Amasino RM. 2005. Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization. *Annu Rev Plant Biol* 56: 491-508.
 29. Tadege M, Sheldon CC, Helliwell CA, Stoutjesdijk P, Dennis ES, Peacock WJ. 2001. Control of flowering time by *FLC* orthologues in *Brassica napus*. *Plant J* 28: 545-553.
 30. Torti S, Fornara F, Vincent C, Andrés F, Nordström K, Göbel U, Knoll N, Schoof H, Coupland G. 2012. Analysis of the *Arabidopsis* shoot meristem transcriptome during floral transition identifies distinct regulatory patterns and a leucine-rich repeat protein that promotes flowering. *Plant Cell* 24: 444-462.
 31. Wu R, Tomez S, Karunairetnam S, Tustin SD, Hellens RP, Allan AC, Macknight RC, Varkonyi-Gasic E. 2017. *SVP*-Like MADS box genes control dormancy and budbreak in apple. *Front Plant Sci* 8: 477.
 32. 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.
 33. Yu H, Xu Y, Tan EL, Kumar PP. 2002. *AGAMOUS-LIKE24*, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16336-16341.