

배추 개화시기조절 관련 유전자의 실용화 연구  
Control of Flowering Time in Chinese Cabbage  
by the Regulation of Flowering Time Related  
Gene Expression

연구기관

농업생명공학연구원

농림자료실



0013470

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “배추 개화시기조절관련 유전자의 실용화 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 5월 23일

주관연구기관명 : 농업생명공학연구원

총괄연구책임자 : 이연희

세부연구책임자 : 이연희

연 구 원 : 서석철

연 구 원 : 김수윤

연 구 원 : 김정선

연 구 원 : 권수진

연 구 원 : 임명호

연 구 원 : 김들이

협동연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 박영두

연 구 원 : 이미경

연 구 원 : 김셋별

# 요 약 문

## I. 제 목

배추 개화시기조절관련 유전자의 실용화 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

배추, 양배추, 유채 등이 속하는 배추 (Brassica)과 작물은 세계 넓은 지역에 걸쳐 재배되고 있다. 이 중에서 배추는 우리나라의 주요 3대 작물 중의 하나이며 우리나라 고유의 김치 주재료로 가장 넓은 면적에 재배되는 채소로 그 육종과 재배에 있어서 꾸준한 연구가 진행 중이다. 또한 중국과 일본 등지의 동부 아시아에서 비타민, 칼슘, 무기질과 섬유질의 중요한 급원으로 유지와 건강식품으로서 중요성을 갖는다.

배추는 개화 및 생식생리가 특이하여 개화를 하기 위해서는 일정기간 이상의 저온조건 (vernalization)이 필요하며 고온 장일 조건에서 추대하며 자가 불화합성 특성을 갖는다. 배추는 서늘한 기후에 적합한 작물로 우리나라 여름철의 고온 다습한 환경에 생육이 저하되며 병해충의 피해를 쉽게 받는다. 또한 봄철에는 급작스런 온도 변화로 저온에 감응하여 추대하는 성질이 있어서 배추의 상품성을 크게 떨어뜨린다. 이러한 현상은 우리나라뿐만 아니라 우리나라와 비슷하거나 높은 위도에 있는 다른 나라에서도 해결해야 할 중요한 문제로 제시되고 있다. 이러한 추대 현상은 배추의 개화시기 및 화기발달과 관계가 있으며 이것은 온도와 일장 등의 환경적 요인과 호르몬, 식물의 나이 등에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 최근에 들어서는 분자생물학적 방법을 이용하여 애기장대에서 개화시기 및 개화와 관련된 유전자들이 많이 분리되고 있으며 이들 유전자들간의 상호관계에 관한 모델을 제시하고 있으나 아직도 이들 유전자들의 관계와 알려져 있지 않은 부분들이 많다. 또한 이러한 유전자들은 주로 애기장대를 중심으로 알려져 있는데 개화시기는 식물에 따라 작용기작이 아주 다양하여 애기장대의 유전자가 타 식물이나 작물에 그대로 응용될 수 있을 지는 의문이다. 최근에는 애기장대와 같은 과로 알려진 배추, 유채, 양배추 등

에서 개화관련 유전자들의 계층상에서의 비교분석과 유전자 분리가 이루어지고 있다. 특히 농업생명공학연구원의 배추 제늄팀에서는 개화관련 유전자들을 포함하고 있는 BAC클론을 스크리닝하여 확보하고 있으며 개화관련 유전자들을 중심으로 구조 유전체학으로 애기장대와의 비교계놈 분석을 하고 있다.

최근 배추의 육종은 무사마귀 병, 무름병 등의 병 저항성 형질 도입과 만추대성 등의 재배·환경적 형질 그리고 영양 및 외양적 개량을 위한 형질 도입 등에 중점을 두고 있다. 특히 김치의 상품화와 관련한 김치 품질의 표준화를 위해서 만추대성, 복합내병성, 내습성과 내서성이 있는 사계절용 배추 품종이 요구되고 있다.

봄철에 배추는 저온에 감응하여 추대하게 되면 영양 및 외양상 품질이 급격히 떨어지므로 상품성이 떨어지게 된다. 이러한 저온 추대성은 봄철 배추의 안정적 생산과 공급에 차질을 가져오며 농가의 수익에도 큰 타격을 주고 있다. 이러한 추대 문제를 해결하기 위해 주로 일부 남해 지방에서 재배되며 터널 및 가온 형식으로 육묘를 보호하고 있는데 이는 수송 및 재배비용을 가중시켜 결국 생산비용을 증대시키고 있는 실정이다. 따라서 추대가 억제되는 배추 개발은 상품성 및 상당한 비용절감 효과가 있을 것으로 기대된다.

본 연구팀에서는 우리나라 고유채소 작물인 배추로부터 개화시기의 여러 경로에서 중요한 역할을 하는 유전자들 (FLC, CO, VRN)을 분리하여 이들 유전자의 과발현(overexpression) 또는 발현억제 (silencing)를 통하여 배추의 개화시기조절에 관하여 연구하고 그 결과를 이용하여 배추에서 문제가 되는 저온 추대성을 억제하는 방법을 개발하고 개화시기가 조절될 수 있는 배추를 개발하고자 한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 배추의 개화시기조절에 관여하는 유전자들을 분리하여 발현 분석을 하고 이 유전자들의 과발현 또는 발현억제 기법을 이용하여 배추 상품성 등에 문제가 되는 저온 추대성을 방지하고 개화시기가 변형된 배추를 개발하는데 목적이 있으며 본 과제의 연구내용 및 범위는 다음과 같다.

## 1. 개화시기조절 관련 유전자 분리 및 발현 분석

### 가. 배추 FLC (FLOWERING LOCUS C) 유전자 분리

배추에서 FLC 유전자가 4-5 copy로 존재하는 것을 Southern 분석으로 확인하였다. FLC 유전자를 *Brassica rapa* L. ssp *pekinensis* (Chinese cabbage) inbred line Chiifu에서 제작한 HindIII BAC 클론의 염기서열 (NCBI accession number AC155344, AC155341, AC155342)을 이용하여 서로 다른 FLC 유전자 특이 primer를 작성하였다. 배추 품종 지부로부터 RT-PCR을 이용하여 BrFLC 1 (621bp), BrFLC 2 (591bp), BrFLC 3 (594bp) 유전자를 분리하여 유전자 등록을 하였다 (BrFLC1 DQ866874, BrFLC2 DQ866875, BrFLC3 DQ866876). 애기장대 FLC와 BrFLC 1, BrFLC 2, BrFLC 3의 MADS domain 부분은 96-100%의 상동성을 나타내었으며 MADS domain 외의 부분은 상동성이 77-83%였다.

### 나. 개화시기가 다른 배추품종 및 저온 처리 기간에 따른 FLC 유전자 발현 분석

개화시기가 빠른 조추대 (HN3B), 중간인 중추대 (DH01), 개화시기가 늦은 만추대 (DH03) 배추의 품종을 동부한농(주) 육종연구소로부터 분양 받아 저온처리 (4 °C) 전 후로 FLC와 AGL20 (AGAMOUS-LIKE 20) 유전자의 발현 양상을 조사하였다. FLC 유전자는 저온처리 전에는 발현양이 많다가 저온처리 기간이 길어짐에 따라 (10일, 40일) 현저히 감소하였다. 저온처리 10일, 40일에서 FLC 발현양은 조추대에서 보다 만추대에서 많았으며 저온처리 40일 후 상온 (24±1 °C)에서 30일 성장한 경우에는 조추대, 중추대, 만추대 배추 모두에서 FLC 발현이 거의 나타나지 않았다. 개화촉진과 관련된 AGL20 유전자 발현은 저온처리 40일 후에 높았으며 조추대에서 중추대나 만추대보다 발현양이 높았다.

### 다. 배추에서 BrFLC 1, BrFLC 2, BrFLC 3 유전자의 발현 분석

1) BrFLC 1, BrFLC 2, BrFLC 3 유전자의 PCR 산물의 크기가 다르도록 특이 primer를 작성하여 RT-PCR을 하였다.

2) 여러 배추 품종에서 저온처리를 하지 않은 경우와 저온처리를 10일, 40일 했을 때 모두 BrFLC 1과 BrFLC 2가 BrFLC 3보다 발현양이 높았으며 40일 저온처리에서 BrFLC 3 유전자는 발현이 거의 되지 않았다.

3) 개화시기가 다른 배추 품종에서 BrFLC1, BrFLC 2와 BrFLC 3 유전자 발현

양은 조추대에서 중추대와 만추대 보다 낮게 나타났다. 40일 동안의 vernalization 후에는 BrFLC1, 2, 3 모두의 발현양은 중추대, 만추대에서도 낮아졌으며 조추대에서는 거의 발현이 되지 않은 것을 알 수 있었다

4) 배추 잎과 정단부위 조직에서 BrFLC 1과 BrFLC 2 유전자가 BrFLC 3보다 발현양이 높았으며 뿌리에서는 BrFLC 3 유전자 발현이 거의 되지 않았다.

라. 배추 CO, VRN1 유전자 분리 및 발현 분석

1) 배추에서 BrCO (CONSTANS) 유전자는 4-5 copy, BrVRN1 (VERNALIZATION1) 유전자는 2-3 copy로 존재하는 것을 Southern 분석으로 확인하였다.

2) 분리된 BrCO 유전자는 966bp, BrVRN1 유전자는 990bp였으며 아미노산 서열을 애기장대의 것과 비교하여 본 결과 BrCO 유전자는 75%, BrVRN1은 89%의 상동성을 보였다.

3) 배추를 16시간 명, 8시간 암조건으로 일정하게 배양하고 3시간 간격으로 배추 잎을 채취하여 CO 유전자 발현을 확인하여 본 결과 빛이 들어오는 시점에서 감소하기 시작하고 광조건 하에서는 발현이 되지 않고 있다가 저녁시간이 되면서 발현양이 서서히 증가하여 밤 (24시, 3시)에 발현양이 가장 높았다. 이 결과 CO 유전자는 24시간 주기로 발현양이 다르게 변한다는 것을 알 수 있었다.

4) 만추대 배추에서 BrVRN1 유전자는 저온처리를 하지 않은 상태에서 시간이 경과함에 따라 발현이 증가하였으며 저온처리 시 (5일부터 40일)에도 발현양이 점점 높아졌다. 저온처리 후 상온에서 배양한 후에도 VRN1 유전자 발현은 높게 유지되었다. 이러한 발현은 조추대와 중추대에서도 비슷한 양상을 나타내었다.

## 2. 개화시기조절 유전자를 포함한 식물 형질전환용 벡터 제작 및 형질전환

가. BrFLC 유전자 과발현을 위한 식물 형질전환용 벡터 작성

배추로부터 분리한 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자 각각에 대한 기능 검정을 하기 위하여 식물 형질전환용 벡터를 작성하였다. 애기장대 형질전환체 선발을 용이하게 하기 위하여 형질전환체 선발마커로 제조제저항성 bar 유전자를 갖고 있는 유전자 과발현 벡터인 pB2GW7 (VIB, 벨지움)을 기본벡터로 사용하였다. 35S 프로모터에 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자가 융합된 pBrFLC1, pBrFLC2, pBrFLC3를 작성하였다. 배추 형질전환을 위해

서 형질전환체 선발마커가 하이그로마이신으로 되어있는 pCAMBIA 1302에 삽입하여 확인을 마친 후 각각 pFLC 1, pFLC 2 및 pFLC 3로 명명하였다.

나. 유전자 발현 억제를 위한 BrCO RNAi, BrVRN1 RNAi 벡터 작성

BrVRN1과 BrCO유전자를 RNAi vector인 pHANNIBAL vector에 cloning하고 이를 다시 hygromycin을 selection marker로 하는 pCAMBIA 1300에 삽입하였으며 최종 확인된 RNAi vector를 각각 pCHV(BrVRN1 유전자)와 pCHC(BrCO 유전자)로 각각 명명하였다.

다. 형질전환체 생산

배추 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자 기능 검정을 위하여 작성된 애기장대 형질전환용 벡터 pBrFLC1, pBrFLC2, pBrFLC3을 각각 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101에 도입한 후 애기장대 꽃에 *Agrobacterium*을 spray하여 애기장대를 형질전환하였다. 형질전환에 사용된 애기장대 ecotype으로는 FLC 유전자 발현량이 낮은 Columbia type과 FLC 유전자 발현이 존재하지 않는 Lansberg erecta, *FRIf/c* mutant를 사용하였다.

배추 형질전환은 FLC 과발현 벡터 pFLC 1, pFLC 2, pFLC 3와 BrCO, BrVRN1 RNAi 벡터 pCHC와 pCHV 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404에 도입한 후 배추 종자로부터 5-6일 발아한 배축을 사용하였다. 형질전환에 사용된 배추 품종으로는 삼진, 권심, inbred line DA001 (동부한농)을 이용하였다. 또한 두 유전자를 동시에 도입하기 위하여 BrFLC 과발현 벡터가 있는 아그로박테리움과 BrCO RNAi, BrVRN1 RNAi 벡터 포함 아그로박테리움을 동시에 배추에 형질전환시키는 co-transformation을 하였다.

### 3. 개화시기조절 유전자가 도입된 형질전환체 분석

가. BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자가 과발현된 애기장대 형질전환체 분석

애기장대 형질전환체는 제초제 처리로 선발하였으며 계놈으로의 유전자 도입은 Southern 분석으로 확인하였다. 도입된 FLC 유전자는 형질전환체로부터 분리된 RNA로 northern 분석을 하여 발현 확인을 하였다. 비형질전환체 애기장대 식물체에서 Columbia는 엽수가 8-12장, Landsberg는 7-8장, *FRIf/c* mutant는 8-12장 일 때 꽃눈이 보였다. BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 모두 개화시기를 늦추는 효과를 보였으나 BrFLC2와 BrFLC3

가 BrFLC1보다 개화지연 특성을 더 나타내었다. 형질전환체들 중에서 개화시기가 지연된 형질전환체 비율은 BrFLC1은 31%, BrFLC2는 32-50%, BrFLC3는 38-73% 정도로 분석되었다.

#### 나. BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자가 과발현된 배추 형질전환체 분석

애기장대에서 개화지연 효과가 가장 있는 것으로 확인된 BrFLC3 유전자를 우선 비교적 형질전환이 잘 되면서 개화시기가 서로 다른 권심과 삼진 배추에 형질전환하였다. 모든 형질전환체 유전자 도입을 Southern 분석으로 확인하였으며 T1에서 개화시기를 분석한 결과 권심에서 개화시기가 비형질전환체 보다 1일 - 36일 정도 늦어졌다. 삼진 배추의 경우 개화에 필요한 저온처리 기간은 권심보다 길으며 20일 동안의 vernalization 후 24일 - 32일 되어서 추대가 된다. BrFLC3 유전자가 도입된 T1 세대 삼진배추를 20일 저온처리 후 추대가 될 때까지 소요되는 시간을 조사한 결과 비형질전환체 삼진 배추보다 개화시기가 3일 - 40일 늦어진 것을 알 수 있었다. 보다 빠른 배추 품종 육성을 위해서는 배추의 inbred line에 유전자를 도입하는 것이 최선으로 본 연구에서는 inbred line에 유전자를 도입하였다. FLC 과발현 유전자가 도입된 inbred line 형질전환체 68개체를 획득하였고 이 중 31개체에서 개화지연 효과가 있었다.

#### 다. BrCO RNAi, BrCOVRN1 RNAi 벡터가 도입된 배추 형질전환체 분석

CO 유전자가 가장 많이 발현되는 밤(24시) 시간이 유전자 발현이 감소된 형질전환체에서 개화가 지연되는 것이 관찰되었다. 저온처리 20일 후 VRN1 유전자 발현양이 감소된 개체에서는 FLC 발현이 되었으며 AGL20 발현은 상대적으로 감소하였다. 이러한 유전자 발현양을 나타내는 개체에서 개화지연 효과가 있었다.

#### 라. FLC 과발현 벡터와 BrCO RNAi, BrVRN1 RNAi 벡터가 도입된 배추 형질전환체 분석

두 유전자가 동시에 도입된 inbred line 배추 형질전환체에서 개화가 지연되는 개체가 각각 10개체 이상 있었으며 대체로 두 유전자가 복합적으로 도입된 배추 형질전환체에서 개화가 지연되는 효과가 높은 것으로 관찰되었다.



#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 배추는 일정기간 동안의 저온처리 (vernalization)를 받은 후 장일에서 개화를 하는데 이러한 개화시기에 주요한 역할을 하는 것으로 알려진 FLC (FLOWERING LOCUS C) 유전자가 배추에서는 4-5 copy로 존재하였다. 각 FLC 유전자 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자를 지부 배추로부터 분리하였고 이 중 BrFLC1은 애기장대의 FLC 보다 10개의 아미노산을 더 함유하고 있었다. 각 유전자의 기능을 검증하기 위하여 애기장대에 형질전환하여 본 결과 각각의 BrFLC 1, 2, 3 유전자의 과발현이 개화지연에 모두 효과가 있었으며 특히 BrFLC2와 BrFLC3가 더 효과를 나타내었다.

2. 저온처리 동안에 배추의 개화조절에 필수적인 FLC 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 VRN1 (VERNALIZATION1)을 배추로부터 분리하였고 애기장대와의 상동성은 89% 정도였다. 배추에서 BrVRN1 유전자는 영양생장 동안에 발현이 되었으며 저온처리동안에 발현이 증가하였고 저온처리 후에도 발현이 지속되었다.

3. 일장에 의한 개화시기조절과 관련한 대표적인 CO (CONSTANS) 유전자를 배추에서 분리하였으며 애기장대에서도 같이 밤에 발현양이 가장 높았으며 하루를 주기로 하여 발현되었다.

4. 이와 같이 배추로부터 분리된 유전자들을 이용하여 배추 개화시기를 지연시키기 위해서 다음과 같이 벡터를 작성하였다. 저온처리 동안에 발현이 억제되는 FLC 유전자를 저온처리와 관계없이 발현시키기 위해서 35S 프로모터를 이용하여 과발현 벡터를 작성하였다. 저온처리 동안 FLC 유전자 발현을 억제시키는 VRN1 유전자를 억제시키고자 BrVRN1 RNAi 벡터를 제작하였으며, 저온처리 후 장일조건에서 개화를 촉진시키는 BrCO 유전자를 억제하기 위하여 BrCO RNAi 벡터를 작성하였다.

5. 작성된 벡터를 배추에 도입하여 유전자가 배추 계놈에 안정하게 도입된 것을 Southern 분석으로 확인하였다. 유전자 발현은 total RNA를 이용한 northern 분석을 하여 각 유전자의 발현 양상을 조사하였다. BrFLC 유전자가 도입된 삼진과 권심 배

추 모두에서 개화시기가 비형질전환체보다 수일에서 30-40일까지 지연되는 것을 관찰 할 수 있었으며 일부 형질전환체는 개화시기가 빨라진 것도 있었다. 또 다른 일부 형질전환체는 개화가 전혀 되지 않으면서 영양생장 일정기간이 지나자 시들어 죽는 개체들도 있었다.

6. BrCO RNAi, BrVRN1 RNAi 벡터가 도입된 배추 형질전환체에서 목적인 유전자 발현이 감소되는 것을 관찰 할 수 있었고 일부 형질전환체에서 개화시기가 지연되는 것으로 나타났다.

7. 이와 같은 결과를 볼 때 배추로부터 분리한 개화시기조절 유전자들은 배추와 비슷한 개화조절 기작을 갖고 있는 타 작물에 이용될 수 있으리라 사료된다. 특히 개화를 지연시키면서 영양생장 기간을 늘려 작물의 생산성을 높이하고자 할 때 이용될 수 있을 것이다. 또한 지구의 온난화 현상이 심해지면서 최근에 식물의 개화시기가 변하고 있다. 따라서 유용작물, 과수, 화훼 등에서 개화시기 문제가 대두될 수 있다는 점을 고려할 때 본 과제에서 연구한 개화조절에 관한 유전자 발굴 및 이용성 연구는 향후 타작물에 응용될 가능성이 있을 것으로 본다.

8. 현재까지 개화조절 유전자가 도입된 배추 inbred line은 세대를 진전시키면서 호모계통을 선발하고 궁극적으로는 품종화 개발을 추진하고자 한다.

# SUMMARY

## (영문요약문)

The timing of the transition from vegetative to reproductive development in plant is regulated by a combination of endogenous (hormone) and environmental factors (photoperiod and temperature). Low temperature treatment (vernalization) is required to induce flowering in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp *pekinensis*). FLC (FLOWERING LOCUS C) gene encoding a MADS box transcription factor plays an important role in control of flowering time as a floral repressor. The studies on the control of flowering time in Chinese cabbage are very important to understand flowering mechanisms and produce high yields of vegetative tissues. Exposure to cold temperature, known as vernalization and long day condition promotes flowering time of Chinese cabbage.

Chinese cabbage plants remain in the vegetative growth phase until they have experienced prolonged exposure to cold temperature, known as vernalization. This inhibition to flowering is due to high level of FLOWERING LOCUS C (FLC) expression. In order to increase product value of Chinese cabbage by inhibiting floral transition, three genes (BrFLC1, BrFLC2, and BrFLC3) homologues to AtFLC genes, a floral repressor, were isolated from Chinese cabbage Chiifu. These genes showed high similarity to AtFLC, except that putative BrFLC1 protein contained ten more residues than did AtFLC. These BrFLC genes were ubiquitously expressed, except that BrFLC3 expression was not detected in roots. BrFLC1 and BrFLC2 showed stronger expression than did BrFLC3 in unvernallized and vernalized Chinese cabbage plants. Expression levels of three BrFLC genes were lower in an early flowering of cultivar of Chinese cabbage plants, suggesting that BrFLC level is associated with flowering time of Chinese cabbage plants. In order to examine the expression of each BrFLC gene, upstream region (-2kb) was introduced into Arabidopsis, and GUS and gfp expression was observed in tissues. Constitutive expression of BrFLC genes

significantly delayed flowering in Arabidopsis. Delay in flowering was also observed in transgenic Chinese cabbage plants overexpressing BrFLC3. These results suggested that BrFLC genes act similarly as does AtFLC.

The VRN1 (VERNALIZATION 1), which functions to stably maintain FLC repression, is required for flowering in vernalization-responsive plant. BrVRN1 coding region isolated from Chinese cabbage was characterized showed 89% similarity to that of Arabidopsis. BrVRN1 expression in plants during vernalization was higher than that of unvernallized plant. RNAi vector containing partial coding region of BrVRN1 was constructed and introduced into Chinese cabbage. VRN1 transcript level in vernalized transgenic plants was reduced compared with vernalized nontransgenic plants and FLC gene was expressed whereas vernalized nontransgenic plants didn't show FLC expression. These results showed that reduced VRN1 transcript level had effects on the expression of FLC. The flowering time of transgenic Chinese cabbage showing reduced VRN1 transcript level was delayed compared to nontransgenic plant.

The CO (CONSTANS) having two zinc finger B-boxes near the amino terminus promotes flowering of Arabidopsis in response to long photoperiods. CO promotes flowering by up regulating the expression of FT and AGL20. BrCO was isolated from Chinese cabbage and showed 75% identity to that of AtFLC. Expression of BrCO was modulated by circadian clock and day length. BrCO transcript level was the highest at night and started to reduce at the dawn. Partial coding region of BrCO was used for the construction of BrCO RNAi vector and introduced into Chinese cabbage. Total thirty five transgenic plants were obtained and transcription levels were screened by northern blot analysis. Among these transgenic plants eleven transgenic plants showed delay in flowering time.

In order to delay flowering time effectively, both BrFLC overexpression and BrCO RNAi vector, BrVRN1 RNAi vector were introduced into inbred line Chinese cabbage. Some transgenic plants showed delay in flowering time. The expression patterns of CO, VRN1, and AGL20 are being investigated.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Chapter 1. Outlines of research .....	17
1. Purposes and aims of research .....	17
Chapter 2. Current status of related research in Korea and other countries.....	20
1. Current status of research in foreign countries .....	20
2. Current status of research in Korea .....	22
Chapter 3. Methods and results of Research .....	23
1. Research methods .....	23
1.1. Isolation and analysis of flowering time genes .....	23
1.2. Expression analysis of flowering time genes .....	24
1.3. Construction of plant expression vectors .....	24
1.3.1. Construction of BrFLC overexpression vectors .....	24
1.3.2. Construction of BrCO RNAi and BrVRN1 RNAi vectors.....	26
1.4. Introduction of constructed vectors into <i>Agrobacterium</i> .....	27
1.5. Production of transgenic plants .....	28
1.5.1. Transformation of Arabidopsis .....	28
1.5.2. Transformation of Chinese cabbage.....	28
1.6. Molecular analysis of transgenic plants .....	29
1.7. Analysis of flowering time in transgenic plants .....	30
2. Research results .....	32
2.1. Isolation and analysis of flowering time genes .....	32
2.1.1. Isolation and analysis of BrFLC genes of Chinese cabbage .....	32
2.1.2. Isolation and analysis of BrCO gene of Chinese cabbage .....	45
2.1.3. Isolation and analysis of BrVRN1 gene of Chinese cabbage .....	49
2.2. Construction of plant expression vectors .....	53
2.2.1. Construction of BrFLC overexpression vectors .....	53
2.2.2. Construction of BrCO RNAi and BrVRN1 RNAi vectors.....	55

2.3. Analysis of transgenic plants .....	60
2.3.1. Analysis of transgenic plants with BrFLC overexpression gene.....	60
2.3.2. Analysis of transgenic plants with BrCO RNAi gene.....	70
2.3.3. Analysis of transgenic plants with BrVRN1 RNAi gene .....	72
2.3.4. Analysis of transgenic plants with BrFLC and BrCO RNAi gene .....	74
2.3.5. Analysis of transgenic plants with BrFLC and BrVRN1 RNAi gene .....	77
Chapter 4. Achievement of aims and contribution of related areas .....	78
1. Achievement of aims .....	78
2. Contribution of related areas .....	82
Chapter 5. Application of results .....	84
Chapter 6. Information collected from abroad during the research period .....	86
Chapter 7. References .....	87

# 목 차

제1장 연구개발 과제의 개요 .....	17
1. 연구개발의 목적 및 필요성 .....	17
가. 기술적 측면 .....	18
나. 경제·산업적 측면 .....	18
다. 사회·문화적 측면 .....	19
제2장 국내외 기술개발 현황 .....	20
1. 국외 관련 기술개발 현황 .....	20
2. 국내 관련 기술개발 현황 .....	22
제3장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	23
1. 연구개발 수행 방법 .....	23
가. 개화시기조절 관련 유전자 분리 및 분석 .....	23
1) 배추에서 개화시기조절 유전자 copy 수 확인 .....	23
2) 배추로부터 BrFLC, BrCO, BrVRN1 유전자 분리 .....	23
3) 분리된 유전자의 상동성 분석 .....	24
나. 배추에서 개화시기조절 유전자 발현 분석 .....	24
다. 개화시기조절 유전자 식물 형질전환용 벡터 작성 .....	24
1) BrFLC 과발현 벡터 작성 .....	24
가) 애기장대 형질전환용 벡터 작성 .....	24
나) 배추 형질전환용 벡터 작성 .....	25
2) BrCO RNAi, BrVRN1 RNAi 벡터 작성 .....	26
가) BrCO 유전자를 포함하는 RNAi 벡터 작성 .....	26
나) BrVRN1 유전자를 포함하는 RNAi 벡터 작성 .....	27
라. 작성된 벡터의 아그로박테리움으로의 형질전환 .....	27
마. 식물 형질전환 .....	28
1) 애기장대 형질전환 .....	28
2) 배추 형질전환 .....	28
바. 형질전환체에서 유전자 도입 및 발현 분석 .....	29

1) 유전자 도입 확인 .....	29
2) 유전자 발현 확인 .....	30
사. 형질전환체에서 개화시기 분석 .....	30
1) 애기장대 형질전환체에서 개화시기 분석 .....	30
2) 배추 형질전환체에서 개화시기 분석 .....	31
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	32
가. 배추 개화시기 조절관련 유전자 분리 및 분석 .....	32
1) 배추 FLC 유전자 분리 및 발현 분석 .....	32
가) 배추 BrFLC 유전자 분리 .....	32
나) 배추에서 BrFLC 유전자 발현 분석 .....	36
(1) 배추 BrFLC의 조직 특이 발현 .....	36
(2) 개화시기가 다른 배추 품종에서 BrFLC 발현 분석 .....	37
(3) Vernalization 기간에 따른 BrFLC 발현 분석 .....	37
(4) 배추 BrFLC1, 2, 3 유전자 프로모터 분석 .....	39
2) 배추 BrCO 유전자 분리 및 발현 분석 .....	45
3) 배추 BrVRN1 유전자 분리 및 발현 분석 .....	49
나. 개화시기조절 유전자의 식물형질전환용 벡터 작성 .....	53
1) BrFLC 유전자 과발현 벡터 작성 .....	53
가) 애기장대 형질전환용 벡터 작성 .....	53
나) 배추 형질전환용 벡터 작성 .....	53
2) BrCO RNAi, BrVRN RNAi 벡터 작성 .....	55
다. 개화시기 조절 유전자가 도입된 형질전환체 생산 및 분석 .....	60
1) BrFLC 유전자 과발현 형질전환체 생산 및 분석 .....	60
가) 애기장대 형질전환체 생산 및 분석 .....	60
나) 배추 형질전환체 생산 및 분석 .....	63
(1) BrFLC 유전자 과발현 배추 형질전환체 생산 및 유전자 도입 확인 .....	63
(2) 배추 형질전환체 개화시기 분석 .....	65
2) BrCO RNAi 벡터를 이용한 배추 형질전환체 생산 및 분석 .....	70
3) BrVRN RNAi 벡터를 이용한 배추 형질전환체 생산 및 분석 .....	72



4) BrFLC 과발현과 BrCO RNAi 벡터를 이용한 배추	
형질전환체 생산 및 분석 .....	74
5) BrFLC 과발현과 BrVRN RNAi 벡터를 이용한 배추	
형질전환체 생산 및 분석 .....	77
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	78
1. 연구 목표 달성도 .....	78
2. 관련분야에의 기여도 .....	82
제5장 연구개발결과의 활용계획 .....	84
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	86
제7장 참고문헌 .....	87

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 1. 연구개발의 목적 및 필요성

배추, 양배추, 유채 등이 속하는 배추 (Brassica)과 작물은 세계 넓은 지역에 걸쳐 재배되고 있다. 이 중에서 배추는 우리나라의 주요 3대 작물 중의 하나이며 우리나라 고유의 김치 주재료로 가장 넓은 면적에 재배되는 채소로 그 육종과 재배에 있어서 꾸준한 연구가 진행 중이다. 또한 중국과 일본 등지의 동부 아시아에서 비타민, 칼슘, 무기질과 섬유질의 중요한 급원으로 유지와 건강식품으로서 중요성을 갖는다.

배추는 개화 및 생식생리가 특이하여 개화를 하기 위해서는 일정기간 이상의 저온 조건 (vernalization)이 필요하며 고온 장일 조건에서 추대하며 자가 불화합성 특성을 갖는다. 배추는 서늘한 기후에 적합한 작물로 우리나라 여름철의 고온 다습한 환경에 생육이 저하되며 병해충의 피해를 쉽게 받는다. 또한 봄철에는 급작스런 온도 변화로 저온에 감응하여 추대하는 성질이 있어서 배추의 상품성을 크게 떨어뜨린다. 이러한 현상은 우리나라뿐만 아니라 우리나라와 비슷하거나 높은 위도에 있는 다른 나라에서도 해결해야 할 중요한 문제로 제시되고 있다. 이러한 추대현상은 배추의 개화시기 및 화기발달과 관계가 있으며 이것은 온도와 일장 등의 환경적요인과 호르몬, 식물의 나이 등에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 최근에 들어서는 분자생물학적 방법을 이용하여 애기장대에서 개화시기 및 개화와 관련된 유전자들이 많이 분리되고 있으며 이들 유전자들간의 상호관계에 관한 모델을 제시하고 있으나 아직도 이들 유전자들의 관계와 알려져 있지 않은 부분들이 있다 (그림1 참조). 또한 이러한 유전자들은 주로 애기장대를 중심으로 알려져 있으며 작물에서는 일부분의 유전자들의 분리와 기능 분석이 이루어지고 있다.

따라서 본 연구팀에서는 우리나라 고유채소 작물인 배추로부터 개화시기에 관련된 유전자를 분리하여 유전자 구조와 기능 분석을 하고자 하며, 이들 유전자의 과발현 (overexpression) 또는 발현억제 (silencing)를 통하여 배추의 개화시기조절에 관하여 연구하고 그 결과를 이용하여 배추에서 문제가 되는 저온 추대성을 억제하는 방법을 개발하고 개화시기가 조절될 수 있는 배추를 개발하고자 한다.

#### 가. 기술적 측면

최근 배추의 육종은 바이러스 병, 무사마귀 병, 무름병 등의 병 저항성 형질 도입과 만추대성, 내서성, 내습성 등의 재배·환경적 형질 그리고 영양 및 외양적 개량을 위한 형질 도입 등에 중점을 두고 있다. 특히 김치의 상품화와 관련한 김치품질의 표준화를 위해서 만추대성, 복합내병성, 내습성과 내서성이 있는 사계절용 배추 품종이 요구되고 있다.

교배와 선발에 의존한 재래의 육종 방법은 숙련된 기술을 필요로 하고 품종을 고정하고 보급하는데 까지 시간이 오래 걸리고 이에 따른 많은 비용을 필요로 한다. 특히 만추대성과 같이 특정 형질만 도입시키는 육종과정 중에서 특정 형질과 연관된 좋은 형질들은 유지시키면서 다른 형질을 도입하기 위하여 유전공학적 방법을 이용하고 있다.

배추에서 유전자 기능 분석 및 유용유전자를 도입하기 위해서 필수적인 배추 형질전환 방법이 이미 확립되어 있으며, BAC library, EST 클론 등을 이용하여 유용유전자를 분리할 수 있는 기반 재료와 기술이 이미 개발되어 있다.

#### 나. 경제·산업적 측면

우리나라를 대표하는 음식 중의 하나인 김치는 최근 기계화와 포장기술의 발달로 내수뿐만 아니라 수출도 증대되고 있다. 그러나 김치의 주재료가 되는 배추는 그 생리적 특성상 연중 동일한 품질의 재료를 제공하기 어렵기 때문에 김치의 상품화 및 수출에 큰 걸림돌이 되고 있다.

봄철에 배추는 저온에 감응하여 추대하게 되면 영양 및 외양상 품질이 급격히 떨어지므로 상품성이 떨어지게 된다. 이러한 저온 추대성은 봄철 배추의 안정적 생산과 공급에 차질을 가져오며 농가의 수익에도 큰 타격을 주고 있다.

이러한 추대 문제를 해결하기 위해 주로 일부 남해 지방에서 재배되며 터널 및 가온형식으로 육묘를 보호하고 있는데 이는 수송 및 재배비용을 가중시켜 결국 생산비용을 증대시키고 있는 실정이다.

따라서 추대가 억제되는 배추 개발은 상품성 및 상당한 비용절감 효과가 있을 것으로 기대된다.

다. 사회·문화적 측면

김치는 단순히 고부가가치 상품일 뿐만 아니라 우리나라와 우리 문화를 세계에 알릴 수 있는 문화 상품으로 우리나라를 대표하는 음식으로 중요성은 나날이 높아지고 있다. 김치는 세계적으로 건강과 미용에 좋은 발효식품으로 평가받았으나 그 상품화에 있어서는 다른 나라에 뒤져 있으므로 원만한 수출과 상품의 표준화를 위해서 김치 재료인 배추의 품종 향상의 문제가 시급하다고 할 수 있다.

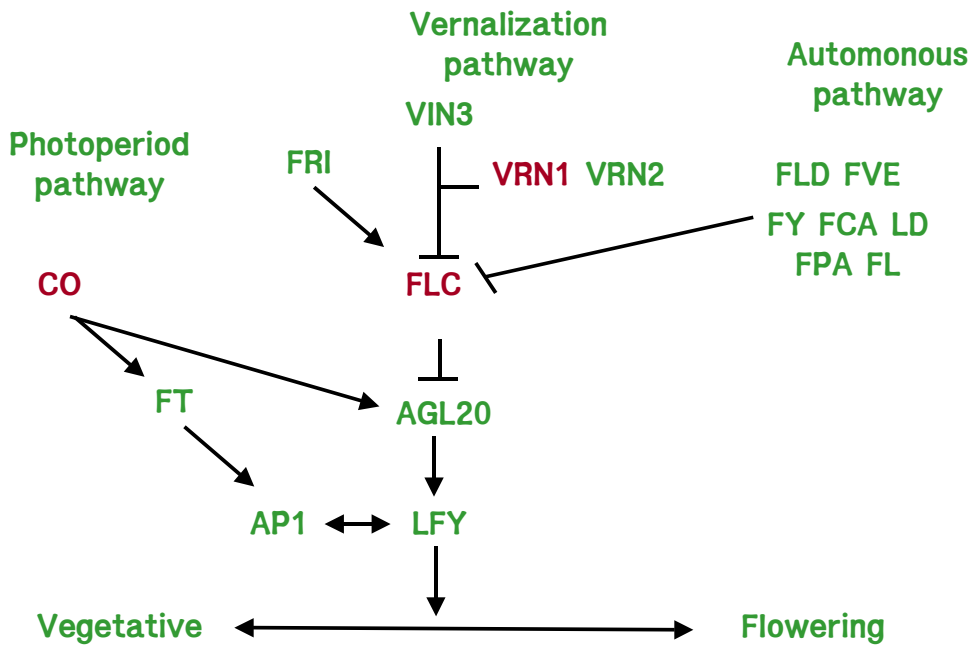


그림 1) 에기장대에서 개화발달관련 유전자들의 상호관계 (The Plant Cell 2004, 16:2553-2559)

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 국외 관련 기술개발 현황

식물의 영양생장에서 개화와 종자형성 단계인 생식발달 단계로 전환되는 시기는 식물 생장에 있어서 상당히 중요한 단계이며 이러한 단계는 식물 내부요인 뿐만 아니라 환경 등 여러 가지 요인에 의하여 조절된다. 이러한 개화 시기는 농작물의 생산성 및 상품성 등에 많은 영향을 주고 있다.

최근에 들어서 애기장대 돌연변이를 이용하여 개화시기를 조절하는 많은 유전자들이 분리되었으며 (Gorden 등 1999, Boss 등 2004), 이 개화시기를 조절하는 데는 photoperiod (광주기), vernalization (저온처리), GA (Gibberellins)와 autonomous pathway 등 여러 가지 경로가 관여한다는 것이 밝혀졌다 (Simpson 등 1999, Mouradov 등 2002, Jack 2004).

애기장대에서 조기개화를 하는 종과 개화가 늦은 종에서 유전분석을 하여 본 결과 이러한 개화시기조절에 MADS box를 포함하고 있는 전사조절 인자 FLC (FLOWERING LOCUS C) 유전자가 개화를 억제하는 억제자로서의 역할을 하면서 개화시기 조절에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다 (Sheldon 등 1999, 2000, He and Amasino 2005). 또한 FLC 발현에는 FRIGIDA (FRI, Johanson 등 2000) 유전자가 필요하며 FLC와 FRI 유전자가 우성으로 발현되는 애기장대는 개화가 늦었으며 열성인 *FRI/flc* 가 있는 애기장대의 개화시기는 빨랐다 (Lee and Amasino 1995). FRI 유전자 이외에도 FRL1, FRL2, VIP3, VIP4, ELF7, LF8, EF5와 PIE1 등의 유전자들이 FLC 발현을 촉진시키는 것으로 알려졌으며 FY, FCA, FLD, FVE, FPA, LD, FLK를 포함한 autonomous pathway에 있는 유전자들은 FLC 발현을 억제하는 것으로 나타났다 (He and Amasino 2005). 개화에 장기간의 저온처리 (vernalization)가 필요한 식물체에서 FLC 유전자 발현은 vernalization 동안 억제되어 개화촉진 유전자인 SOC1/AGL20과 FT 등의 유전자 발현을 유도하여 이로 인하여 개화가 촉진된다. Vernalization에 관여하여 개화와 연관된 유전자들로는 VIN3, VRN2와 VRN1 유전자가 밝혀졌으며 이들은 FLC 유전자의 발현을 억제하여 vernalization 후 개화를 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다 (Gendall 등 2001, Levy 등 2002, Sung and Amasino 2005). VRN1은 B3 도메인을 포함하고 있는 DNA 결합 단백질,

VRN2는 polycomb group 단백질, VIN3는 식물 homeodomain을 갖고 있는 단백질로 이들은 FLC 유전자의 chromatin 구조를 변형시킴으로서 저온처리 시 FLC 유전자 발현을 억제하는 것으로 알려졌다. 이러한 결과로 봄 때 vernalization을 받아야만 생식단계로 전환하는 식물에서는 FLC 유전자가 매우 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다. FLC 유전자는 발생초기부터 뿌리 및 잎 조직에 고르게 분포하며 개화의 중요한 요소인 저온에 대해서 그 발현양이 감소하는 부의 상관관계를 가지고 있다. 이와 같이 FLC 유전자는 여러 개화경로에 있는 유전자들로부터 영향을 받는 중심적인 유전자로 알려져 있다. 배추, 양배추가 속해 있는 배추과 작물들은 대부분이 vernalization에 반응하여 개화가 촉진되는 작물로 이들 작물에서도 FLC 유전자가 개화에서 주요한 역할을 하는 것으로 보고되어지고 있다 (Osborn 등 1997). 유채로부터 FLC 1 ~ FLC 5까지 5종류가 분리되었고 이들의 발현 양상이 분석되었다. 또한 애기장대 FLC를 유채에 도입시켜 본 결과 유채에서 개화시기가 2 ~ 6주 정도 늦어지는 것이 관찰되었다 (Tadege 등 2001). 양배추에서도 BoFLC3-2와 BoFLC4-1이 분리되었고 표지유전자를 이용하여 발현양상을 분석하여 양배추에서 vernalization과 관련한 개화조절 기작 연구를 하였다 (Lin 등 2005).

식물 개화는 광주기와도 밀접한 관계가 있는데 이 경로에서 가장 중심적인 역할을 하는 유전자는 CO (CONSTANS)로 알려져 있다. CO 유전자 발현은 circadian clock에 의해서 조절되는데 장일조건에서 낮 동안에는 발현양이 낮아지고 밤에 발현양이 높아지는 24시간을 주기로 발현양이 변화한다. CO 유전자 역시 AGL20과 FT 유전자의 활성을 촉진시켜 개화를 촉진하는 것으로 밝혀졌다 (Suarez-Lopez 등 2001). 이 CO 유전자를 과발현시 일장에 상관 없이 개화 촉진 효과가 있으며 CO 유전자 돌연변이는 개화지연 효과가 있는 것으로 보아 광주기와 관련해서 CO 유전자가 개화시기를 조절하는 것으로 사료된다 (Onouchi 등 2000, Suarez-Lopez 등 2001). 유채에서 분리된 BnCOa1 유전자는 애기장대 돌연변이체에서 발현되었을 때 돌연변이체의 개화시기를 정상으로 회복시켰으며 wild type에서 발현시켰을 때는 일장에 상관없이 wild type 보다 개화시기가 더 빨라졌다 (Robert 등 1998).

이외에도 개화시기 조절관련 유전자들의 탐색, 분리와 기능 분석, 그리고 유전자들의 상호 연관성에 대한 연구는 애기장대에서 꾸준히 연구되고 있으며 최근에 들어서는 애기장대에서 발견된 유전자들을 이용하여 배추과 작물과 벼, 밀 등의 곡류 작물에서도 유전자 발굴 및 응용연구가 활발히 전세계적으로 진행되고 있다 (Cockram

등 2007). 본 연구는 개화시기조절의 여러 경로에서 중요한 역할을 하고 있는 FLC, CO, VRN1 유전자를 배추에서 분리하여 배추에서 과발현 또는 발현억제를 시킴으로써 개화시기조절을 하였고 이러한 결과는 작물에서 수행되었다는 점에서 의미를 들 수 있다.

## 2. 국내 관련 기술개발 현황

국내에서도 애기장대의 돌연변이를 이용하여 개화시기 및 화기구조관련 유전자 분리 및 기능 분석 연구가 서울대, 고려대를 중심으로 활발히 진행되고 있다 (Lee등 2000, Yoo등 2005, Lee등 2007). 그러나 배추과 작물에서의 개화관련 유전자 연구는 아직 미비한 실정이라고 할 수 있다. 농촌진흥청 산하 농업생명공학연구원에서는 배추의 개화 및 화기조직을 중심으로 cDNA library를 제작하고 염기서열을 분석하여 EST 데이터를 축적하고 있으며 이를 데이터 베이스화 하고 있다.

현재 배추 BAC library에서 FLC, CO, VRN등의 개화조절 관련 유전자를 포함하는 clone들을 확보하고 있으며 염기서열 분석이 이루어지고 있다. 분석된 개화관련 유전자들은 애기장대에서 보고된 것과 높은 상동성을 나타내었다 (농업생명공학연구원). FISH 방법으로 분리된 배추 FLC 유전자의 염색체상의 위치를 확인한 결과 애기장대와는 달리 배추 2, 7, 9번 염색체에 3개 이상 존재한다는 것을 알 수 있었으며 염기서열은 87% 상동성을 보여 애기장대와 매우 유사한 것으로 나타났다 (농업생명공학연구원).

이러한 유전자를 이용하여 작물에서 개화시기를 조절하는 이용성 연구는 아직까지 많이 하고 있지 않고 유전자 개발을 중심으로 많은 연구가 이루어지고 있다.

작물에서 유전자 이용성 연구 및 형질전환체 생산에는 형질전환체 기술 확립이 필수적인데 국내에서는 배추 형질전환 기술이 확립되어 있다 (농업생명공학연구원, 경희대학교).

본 연구는 위와 같이 얻어진 결과를 바탕으로 개화시기 조절관련 상위유전자에 해당하는 유전자를 중심으로 유전자의 구조 분석 및 기능을 연구하였으며 이들 유전자의 과발현 또는 발현억제로 개화시기가 조절되는 배추를 개발 할 수 있는 가능성을 제시하였고 타 채소작물 및 화훼류 등에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 1. 연구개발 수행 방법

가. 개화시기 조절 관련 유전자 분리 및 분석

1) 배추에서 개화시기 조절 유전자 copy 수 확인

배추에서 개화시기 조절 유전자 FLC (FLOWERING LOCUS C), CO (CONSTANS), VRN1 (VERNALIZATION1) 유전자가 몇 copy로 존재하는 지를 알아보기 위하여 장원 배추 모본과 부분으로부터 genomic DNA를 분리하여 *Bam*HI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Eco*RV, *Xba*I, *Sca*I으로 절단하여 각각의 유전자를 탐침으로 하여 Southern 분석을 하였다.

2) 배추로부터 BrFLC, BrCO, BrVRN1 유전자 분리

각 FLC 유전자를 분리하기 위하여 배추 지부 BAC 클론 염기서열 (NCBI accession number AC155342, AC155341, AC146875, AC155344)을 이용하여 5'과 3' UTR 부분을 포함한 특이 프라이머를 작성하였다 (Table 1). 배추 품종 지부 잎으로부터 분리한 total RNA 1 $\mu$ g을 사용하여 44 $^{\circ}$ C 에서 1시간 동안 cDNA를 합성한 후 94 $^{\circ}$ C 1분 denature, 52  $^{\circ}$ C 1분 annealing, 72 $^{\circ}$ C 2분 extension을 30회 반복 (Takara RNA PCR kit)하였다. 이렇게 하여 RT-PCR 결과 얻어진 PCR 산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝하였다.

Table 1. Primer set for isolation of FLC genes from Chinese cabbage.

FLC genes	Primer sequence	PCR product size (bp)
BrFLC 1	F: 5'CGCAAAGCACTGTTGGAGA 3'	675
	R: 5'TCTCTTGACTTTTAGAATCAACCAAC 3'	
BrFLC 2	F: 5'GAGAGTTGAAACCGAACCTCA 3'	677
	R: 5'TCACAAGTTTTGGACTTAAGGTG 3'	
BrFLC 3	F: 5'ACTTGAACCGAACCTCTGGA 3'	677
	R: 5'TTTGATCAGCCCCGTCTAAC 3'	
BrFLC 5	F: 5'TTAATTAAGCAGCGGGAGA 3'	591
	R: 5'ATGGGAAGAAAAAACTAGAAATC 3'	



CO와 VRN1 유전자 분리를 위한 PCR primer set는 표 2와 같고 RT-PCR 조건은 FLC 유전자 분리와 같은 방법으로 하였다.

Table 2. Primer set for isolation of CO and VRN1 genes from Chinese cabbage.

Genes	Primer sequence	PCR product size (bp)
BrCO	F: 5' ATGTTGAAAGAAGAGAGTAA 3'	966
	R: 5' TTGGAAGGAAGGAACAATTC 3'	
BrVRN1	F: 5' ATGCCACGCCCTTCTTCC 3'	990
	R: 5' TCAGACGTACTCGTTGAC 3'	

### 3) 분리된 유전자의 상동성 분석

분리된 유전자의 염기서열을 확인한 후 NCBI 데이터 베이스에 있는 기존의 유전자들과 Megalain 프로그램 (DNASTAR)을 사용하여 유전자 상동성을 분석하고 phylogenetic tree를 작성하였다.

#### 나. 배추에서 개화시기 조절 유전자 발현 분석

배추로부터 분리한 BrFLC, BrCO와 BrVRN1 유전자들의 배추에서의 발현양상을 분석하기 위하여 동부 한농(주)으로부터 분양받은 개화가 빠른 조추대 (HN3B), 중간인 중추대 (DH01)와 늦은 만추대 배추 (DH03)에서 저온처리 (4 °C)를 하지 않은 경우와 저온처리 10일, 40일, 저온처리 40일 후 상온 (24±1 °C)에서 30일 배양 후 식물체로부터 total RNA를 분리하여 개화관련 유전자들의 발현을 알아보기 위하여 배추로부터 분리한 BrFLC, BrCO, BrVRN1 유전자를 probe로 하여 Northern 분석을 하였다. 또한 잎, 뿌리, 줄기등 식물 조직으로부터 total RNA를 분리하여 RT-PCR로 각 유전자 발현 양상을 분석하였다.

#### 다. 개화시기 조절 유전자 식물 형질전환용 벡터 작성

##### 1) FLC 과발현 벡터 작성

##### 가) 애기장대 형질전환용 벡터 작성

애기장대 형질전환을 위한 과발현 벡터 작성은 gateway system (Invitrogen)을 이용하였다. 애기장대 형질전환체 선발을 용이하게 하기 위하여 형질전환체 선

발마커로 제초제 저항성 bar 유전자를 갖고 있는 유전자 과발현 벡터인 pB2GW7 (VIB, 벨지움)을 기본벡터로 사용하였다. Gateway system은 크게 BP 반응과 LR 반응으로 나눌 수 있는데, attB sequence를 가지고 있는 유전자의 PCR 반응액을 pDNOR201 벡터 (invitrogen) 와 BP 반응을 시켜 중간 벡터를 만들었고, 이 산물을 최종 운반체와 LR 반응을 하여 원하는 최종 형질전환용 벡터를 얻었다. 35S 프로모터에 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자가 융합된 pBrFLC1, pBrFLC2, pBrFLC3를 작성하였다.

나) 배추 형질전환용 벡터 작성

BrFLC 1, 2, 3 단편은 *BgIII*와 *PmlI* restriction enzyme site가 5'와 3' 양 끝에 부착되게 디자인한 primer인 BrFLC 1-F와 BrFLC 1-R (Table 3)를 이용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 PCR product는 전기영동으로 size를 확인한 후 gel elution하여 *SmaI*으로 절단한 pBluescriptII KS(+)에 blunt end로 ligation시킨 후 *E. coli*에 형질전환하여 IPTG와 X-gal이 도포된 ampicillin (50mg/L) 고체 LB배지에서 배양하여 white colony만을 선발하였다. 선발된 colony는 sequencing으로 정확한 염기서열을 확인한 후 다시 *BgIII*와 *PmlI*으로 절단하고, pCAMBIA1302에서 *BgIII*와 *PmlI*으로 *gfp* reporter gene을 제거한 그 위치에 ligation시킨 후 *E. coli*에 형질전환하였다. 형질전환된 *E. coli*는 kanamycin (50mg/L) 고체 LB배지에서 배양하여 저항성을 보이는 colony만을 선발하였다. 선발된 colony는 restriction enzyme으로 정확한 삽입이 이루어졌는지 확인하였으며 최종 확인된 overexpression vector는 pFLC 1, 2, 3로 명명하였다.

Table 3. Primer set for construction of overexpression vector with BrFLC genes.

Primer	Sequence
BrFLC 1-F	5'-CCCAGATCTACTAGTATGGGGAGGAAGAAACTT-3'
BrFLC 1-R	5'-CCCCACGTGCTATAAAAAATTCCTCC-3'
BrFLC 2-F	5'-CCCAGATCTACTAGTATGGGAAGAAAGAACTA-3'
BrFLC 2-R	5'-CCCCACGTGCTAATAAAGCAGTCGGAG-3'
BrFLC 3-F	5'-CCCAGATCTACTAGTATGGGAAGAAAAAACTA-3'
BrFLC 3-R	5'-CCCCACGTGCTAATTAAGCAGTGGGAG-3'

2) BrCO RNAi, BrVRN1 RNAi 벡터 작성

Down regulation을 위하여 삼진배추에서 분리한 BrVRN1과 BrCO유전자를 RNAi vector인 HANNIBAL vector에 cloning하고 배추 형질전환을 하기 위해 다시 hygromycin을 selection marker로 하는 pCAMBIA 1300에 삽입하였다. Cloning을 위해 두 유전자에 각각 *Cla*I, *Xba*I과 *Xho*I, *Kpn*I enzyme site를 포함하는 primer (Table 4)로 PCR로 증폭하여 enzyme site를 일치시켰다.

Table 4. Primer sets for sense- or antisense-oriented gene construction

Primer	Sequence
VRNRNAi <i>Xba</i> I	5' - CCCGGGTCTAGAATGCCACGCCCTTTCTTCCA-3'
VRNRNAi <i>Cla</i> I	5' - GGGCCCATCGATAGGTCTTTCAAACAAACGGGG-3'
VRNRNAi <i>Xho</i> I	5' - CCCGGGCTCGAGATGCCACGCCCTTTCTTCCA-3'
VRNRNAi <i>Kpn</i> I	5' - GGGCCCGGTACCAGGTCTTCAAACAAACGGGG-3'
CORNAi <i>Xba</i> I	5' - CCCGGGTCTAGAGGGTTCTTGTTTGGTGTGAG-3'
CORNAi <i>Cla</i> I	5' - GGGCCCATCGATTCTCAGGACTCTAGCTTCCC-3'
CORNAi <i>Xho</i> I	5' - CCCGGGCTCGACGGGTCTTGTTTGGTGTGAG-3'
CORNAi <i>Kpn</i> I	5' - GGGCCCGGTACCTCTCAGGACTCTAGCTTCCC-3'

가) BrCO 유전자를 포함하는 RNAi 벡터 제작

CO 유전자를 이용한 RNAi vector 제작은 VRN1과 동일하게 진행하였다. 삼진배추에서 분리한 CO 유전자를 HANNIBAL vector에 construction 하기 위해 각각 *Cla*I, *Xba*I과 *Xho*I, *Kpn*I enzyme site를 포함하는 primer (Table 4)로 PCR 하였다. PCR 후 각각의 유전자를 sense와 antisense로 클로닝 한 pGem-T 벡터에서 *Cla*I *Xba*I과 *Xho*I *Kpn*I으로 insert를 확인하였다. pGem-T 벡터로의 CO gene insert를 제한효소와 sequencing을 통해 확인 후 HANNIBAL vector에 삽입하였다. 먼저 HANNIBAL vector를 *Cla*I과 *Xba*I로 digestion한 후 antisense insert를 삽입하였다. 같은 방법으로 HANNIBAL+antisense vector를 *Xho*I과 *Kpn*I으로 절단하여 sense-oriented insert와 ligation한 후 transformation 하였다. 그 후 HANNIBAL+CO 유전자 단편의 sense와 antisense 방향을 enzyme방법으로 mapping하였다. Sense와 antisense방향으로 HANNIBAL vector에 클로닝 된

유전자는 *SmaI*과 *SacI*으로 절단한 후 hygromycin을 selection marker로 하는 CAMBIA 1300에 클로닝하였고 enzyme mapping 방법으로 확인하였다. 최종 확인된 RNAi vector는 pCHV으로 명명하였다.

#### 나) BrVRN1 유전자를 포함하는 RNAi 벡터 제작

삼진배추에서 분리한 VRN 유전자를 RNAi vector인 HANNIBAL vector에 construction 하기 위해 *ClaI*, *XbaI*과 *XhoI*, *KpnI* enzyme site를 포함하는 primer (Table 4)로 PCR하였다. PCR 후 VRN 1 유전자를 sense와 antisense로 클로닝한 pGem-T 벡터에서 *ClaI*, *XbaI*과 *XhoI*, *KpnI*으로 insert를 확인하였다. pGem-T 벡터로의 VRN1 유전자 insert를 제한효소와 sequencing을 통해 확인 후 HANNIBAL vector에 삽입하였다. 먼저 HANNIBAL vector를 *ClaI*과 *XbaI*로 digestion 한 후 antisense insert를 ligation 한 후 HANNIBAL에 삽입된 antisense insert를 확인하였다. 같은 방법으로 HANNIBAL+antisense vector를 *XhoI*과 *KpnI*으로 절단하여 sense-oriented insert와 ligation 한 후 transformation하였다. 그 후 HANNIBAL+VRN1 유전자 단편의 sense와 antisense 방향을 enzyme방법으로 mapping하였다. Sense와 antisense방향으로 HANNIBAL vector에 클로닝 된 유전자는 *SmaI*과 *SacI*으로 절단한 후 hygromycin을 selection marker로 하는 CAMBIA 1300에 클로닝하였고 enzyme mapping 방법으로 확인하였다. 최종 확인된 RNAi vector는 pCHV으로 명명하였다.

#### 라. 작성된 벡터의 아그로박테리움으로의 형질전환

YEP 배지 2ml에 아그로박테리움 (strain GV3101, LBA4404)을 접종하여 28 °C에서 하루 배양한 아그로박테리움을 50ml YEP배지가 있는 250ml 플라스크에 2ml를 접종하여 O. D. 0.6-1.0이 되도록 28 °C에서 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 모은 아그로박테리움 세포에 차갑게 한 0.15M NaCl 10ml를 넣어 잘 현탁한 후 ice에서 10동안 처리하였다. 처리 후 다시 원심분리하여 침전된 아그로박테리움에 차갑게 한 20mM CaCl<sub>2</sub>를 1ml 첨가하여 ice에서 10-20분 정도 두었다. 이와 같이 competent cell로 만든 아그로박테리움 100 $\mu$ l에 위에서 작성된 식물형질전환용 벡터 DNA 1  $\mu$ g을 넣었다. 아그로박테리움과 벡터 DNA가 있는 tube를 액체질소에 넣어 5분 동안 얼린 후 37 °C에서 녹인 다음 다시 액체질소에 넣어 얼렸다. 이 freeze-thaw 과정을 다시 한번 반복한 후 YEP배지를 1ml 첨가하여 28 °C에서 2시간 배양 배양하였다.

원심분리하여 침전된 아그로박테리움을 100  $\mu\text{l}$  첨가하여 현탁한 후에 적당한 항생제를 포함하고 있는 선발배지에 도말하여 28  $^{\circ}\text{C}$ 에서 2일간 배양하였다. 애기장대 형질전환 벡터는 아그로박테리움 GV3101에, 배추 형질전환용 (FLC 과발현, CO, VRN1 RNAi) 벡터는 LBA 4404에 각각 도입하였다.

#### 마. 식물 형질전환

##### 1) 애기장대 형질전환

형질전환에 사용한 애기장대는 Columbia, Landsberg *erecta*, *FRI flc* mutant를 사용하였다.

애기장대 형질전환용 BrFLC 과발현 벡터도입이 확인된 아그로박테리움을 spectinomycin 50 mg/l, rifampicin 50 mg/l, gentamycin 25 mg/l 가 함유된 LB 배지에 접종하여 28  $^{\circ}\text{C}$ 에서 3-4일 정도 배양하였다. 완전히 자란 아그로박테리움을 원심분리하여 침전시킨 후 5% sucrose 용액 18 ml에 잘 현탁하였다. 현탁액에 2 ml의 Tween 20 (2500ppm)을 넣어 잘 혼합하였다. 이 아그로박테리움 현탁액을 애기장대 꽃에 잘 spray하여 25  $^{\circ}\text{C}$  dew chamber (RH 100%)에서 24시간 둔 후 성장실로 옮겼다. 3-4일 후에 형질전환을 다시 하여 같은 과정을 반복하여 성장실에서 종자를 수확하였다. 수확된 종자를 토양에 뿌려 자엽이 나온 어린 식물에 제초제 바스타를 처리하여 살아남은 개체 (T1세대)를 선발하여 다시 종자를 수확하였고 호모계통을 선발하였다.

##### 2) 배추 형질전환

본 연구에서 제작된 5종류의 유전자를 각각 운반하는 *Agrobacterium* LBA4404를 이용하여 형질전환을 실시하였다. 배추 품종은 동부한농(주) 육종연구소에서 제공한 inbred line DA001을 이용하였으며 기내에서 발아된 배추를 형질전환을 위한 절편체로 사용하였다. 재조합 vector로 형질전환된 *A. tumefaciens*는 50mg/L kanamycin과 25mg/L rifampicin이 첨가된 YEP배지에 streaking한 후 30 $^{\circ}\text{C}$  조건에서 36시간 배양하였다. 증식된 single colony는 kanamycin (50mg/L)과 rifampicin (25mg/L)이 첨가된 액체 YEP배지에 접종하여 30 $^{\circ}\text{C}$ 의 진탕 배양기에서 225rpm의 속도로 OD<sub>600</sub>=0.8-1.0가 되도록 배양하였다. 배양 후 5000rpm의 속도로 배양액을 원심분리하여 분리된 *A. tumefaciens* pellet을 항생제가 첨가되지 않은 액체 YEP배지로 세척하였으며 동일한 방법으로 2회 더 세척한 후 배추 접종에 사용하였다. 배추

을 절단하여 *A. tumefaciens* 용액에 30초간 접종시킨 후 멸균된 여과지에서 건조하여 5.0 mg/L BA, 1.0 mg/L NAA가 첨가된 MS 기본배지 (sucrose 3%, agarose 0.8%)에 절편체를 치상하여 3일간 암상태에서 공동 배양하였다. 공동배양을 마친 배측은 5.0 mg/L BA, 1.0 mg/L NAA 및 200mg/L cefotaxim이 첨가된 액체 MS배지로 세척하여 절편체 표면에 잔류하는 *A. tumefaciens*를 완전히 제거한 후 멸균된 여과지에 건조시켰다. 이를 5.0 mg/L BA, 1.0 mg/L NAA, 200mg/L cefotaxim, 10mg/L hygromycin이 첨가된 1차 선발배지에 치상하여 25±1℃, 16 시간 일장 조건으로 배양실에서 배양하였다. 1차 선발배지에서 재분화된 신태는 일정기간 성장시킨 후 10mg/L hygromycin이 포함된 2차 선발배지를 거쳐 1/2 MS배지에 10mg/L hygromycin, 200mg/L cefotaxim이 첨가된 최종 선발배지에서 뿌리를 유도하였다. 그 결과 *A. tumefaciens*에 의해 형질전환되어 5.0 mg/L BA, 1.0 mg/L NAA, 10mg/L hygromycin 및 cefotaxim 200mg/L가 포함되어 있는 선발 배지에 치상되었던 배측에서 약 4주의 배양 후에 절편체 끝부분에 callus가 발생하였으며 8-10주 후에 shoot가 유도되었다. 이렇게 유도된 shoot를 1/2 MS 기본배지에 10mg/L hygromycin, 200mg/L cefotaxim이 첨가된 발근배지로 옮겨 뿌리를 유기하였다. 선발 항생제를 PPT (phosphinothricin)으로 할 경우에 선발 농도를 4 mg/L로 하였다. BrFLC 과발현벡터 (선발마커로 제초제저항성인 pFLC1, 2, 3)가 도입된 아그로박테리움과 BrCO RNAi, BrVRN1 RNAi 벡터 (선발마커가 하이그로마이신)가 도입된 아그로박테리움을 같은 농도로 혼합하여 배추 배측에 접종 후 공동배양하는 co-transformation을 실시하여 PPT와 하이그로마이신 모두가 첨가된 선발배지에서 형질전환체를 선발하였다.

#### 바. 형질전환체에서 유전자 도입 및 발현 분석

##### 1) 유전자 도입 확인

Genomic PCR 분석 : 배추 형질전환 여부를 밝히기 위한 PCR 검정을 위하여 형질전환시켜 발근유도 배지에서 발근된 개체로부터 잎을 채취하여 genomic DNA를 추출하였다. 형질전환된 배추의 genomic DNA를 분리하기 위하여 잎 조직 1g을 액체질소에서 고온 가루가 될 때까지 분쇄하고, 여기에 homogenization [1M NaCl, 0.2M sucrose, 0.01M EDTA, 0.03M Tris-HCl(ph 8.0)]과 lysis buffer [0.25M EDTA, 2.5% SDS, 0.5M Tris-HCl(ph 9.2)]를 첨가하여 65℃에서 30분간 처리하였

다. 30분 후 3M potassium acetate(pH4.7)을 첨가하고 얼음에서 30분간 방치한 후 4°C, 12000rpm으로 원심분리하고 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액에 100% EtOH를 넣고 상온에서 2분간 방치하고 4°C, 12000rpm으로 원심분리하여 DNA pellet을 분리하였다. 분리된 DNA pellet은 70% EtOH로 세척하고 멸균수에 녹였다. PCR은 HPT 유전자로부터 specific한 primer를 제작하여 수행하였다. PCR 반응은 준비된 genomic DNA와 dNTP, 각 유전자의 primer, *Taq* polymerase, 10×buffer, MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O를 혼합하여 thermocycler (Biometra, U.S.A)로 반응을 수행하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 3분간/1회 최초 변성한 후 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 하여 34 cycle이 되게 하고 마지막으로 72°C에서 5분간/1회 최종 연장시키도록 하였다. 증폭된 PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 100V로 1시간 전기영동 하였다.

Southern 분석 : 목적하는 유전자가 식물 계놈에 완전히 삽입되었는지를 확인하기 위하여 형질전환체로부터 genomic DNA를 분리하여 적당한 효소로 절단하였다. 절단된 DNA를 나일론 membrane (Amersham Co.)에 옮긴 후 Church buffer (Church and Gilbert 1984)를 사용하여 혼성화 반응을 하였다. 애기장대 형질전환체의 경우 사용된 탐침으로는 bar 유전자를 사용하였고 배추 형질전환체는 하이그로마이신을 탐침으로 사용하였다.

## 2) 유전자 발현 확인

형질전환체에서 유전자 발현은 식물체로부터 분리한 total RNA 10-15  $\mu$ g을 사용하였으며 각각의 개화조절 유전자를 탐침으로 하는 northern 분석을 하였다. 제초제 저항성 유전자 발현은 bar strip (Strategic Diagnostics Inc.)으로 반응하여 확인하였다.

## 사. 형질전환체에서 개화시기 분석

### 1) 애기장대 형질전환체에서 개화시기 분석

애기장대에서 개화시기는 16시간 light/ 8시간 dark 조건의 성장상에서 재배하면서 꽃봉오리가 명확하게 보이기 시작할 때의 엽수 (rosette leaves)와 일수로 개화시기를 조사하였다.

2) 배추 형질전환체에서 개화시기 분석

배추에서 개화시기분석은 본엽이 4-5장 되었을 때 4 ℃에서 10일, 20일, 30일, 40일 동안 처리한 후 상온에서 재배 후 꽃봉오리가 보이는 꽃대가 추대되기 시작했을 때의 일수로 하였다.



## 2. 연구수행 내용 및 결과

배추에서 개화는 일정한 장기간의 저온처리를 받은 후에 시작되는데 이 과정에서 중요한 역할을 하는 유전자는 FLC (FLOWERING LOCUS C)로 알려져 있다. FLC 유전자 발현이 억제되면서 개화가 촉진되는데 이 FLC 유전자를 억제시키는데 VRN1 (VERNALIZATION1) 유전자 발현이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 FLC는 개화과정에서 autonomous pathway에 관여하는 유전자들에 의해서도 발현의 영향을 받으면서 개화조절에 관여한다. 개화는 광주기에 의해서도 조절되는데 CO (CONSTANS) 유전자 발현에 의해서 AGL20 (AGAMOUS LIKE 20)과 FT (FLOWERING LOCUS T) 유전자 발현이 되면서 개화가 촉진되는 것으로 알려져 있다.

본 연구과제의 연구내용은 만추대성 배추를 육성하여 배추의 생산을 안정적으로 하기 위해 배추의 개화 관련 유전자를 분석하고 유전자를 과발현 혹은 발현억제를 시킨 형질전환체를 생산하여 궁극적으로 배추의 개화시기가 조절되어 추대가 억제되는 배추를 개발하는 데 있다. 따라서 본 연구과제의 목표는 다음과 같다.

- 배추개화조절의 상위유전자에 속하는 FLC, CO, VRN1 유전자의 구조 및 기능분석.
- 각각의 유전자가 과발현 또는 발현억제되는 배추 형질전환체 생산 및 후대분석.
- 개화조절유전자의 집적화에 의한 추대억제배추 개발.

### 가. 배추 개화시기조절 관련 유전자 분리 및 분석

#### 1) 배추 FLC (BrFLC) 유전자 분리 및 발현 분석

##### 가) 배추 BrFLC 유전자 분리

배추에 있는 FLC 유전자의 copy수를 확인하기 위하여 장원배추의 모본과 부분으로부터 genomic DNA를 *Bam*HI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Eco*RV, *Xba*I, *Sca*I 제한효소를 사용하여 절단한 후 Southern 분석을 한 결과 5 copy 정도로 나타났다 (Fig. 1). FLC1, FLC2, FLC3, FLC5 유전자를 분리하기 위하여 배추 지부 BAC 클론 염기서열 (NCBI accession number AC155342, AC155341, AC146875, AC155344)을 이용하여 5'과 3' UTR 부분을 포함한 특이 프라이머를 작성하여 RT-PCR을 한 결과 그림 2와 같은 PCR 산물을 얻을 수 있었고 이를 pGEM-T 벡터에 클로닝하여 염기서열 분석을 하여 본 결과 FLC1, FLC2, FLC3 유전자임을 확인할 수 있었고

FLC5는 분리하지 못하였다. 분리된 BrFLC 유전자를 NCBI에 등록하였다 (BrFLC1 DQ866874, BrFLC2 DQ866875, BrFLC3 DQ866876).

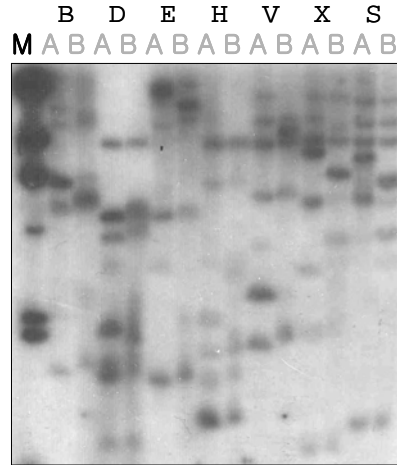


Fig. 1. Copy number of *FLC* genes of *Brassica rapa* L. ssp *pekinensis*.

M: Size marker A: Jangwon mother line, B: Jangwon father line, B: *Bam*HI D: *Dra*I E: *Eco*RI H: *Hind*III V: *Eco*RV X: *Xba*I S: *Sca*I

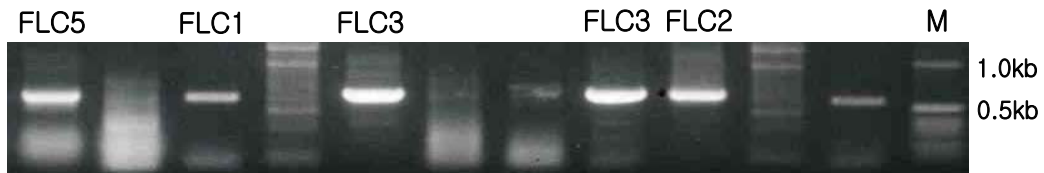


Fig. 2. RT-PCR products of *FLC* genes from Chiifu Chinese cabbage.

분리된 유전자의 길이는 각각 BrFLC 1은 621bp, BrFLC 2는 591bp, BrFLC 3은 594bp로 구성되었으며 BrFLC 1 유전자는 애기장대 *AtFLC* 보다 30bp가 더 길었다. 이들 유전자들의 상동성을 아마노산 서열을 기준으로 분석하여 본 결과 *FLC* 유전자를 구성하고 있는 MADS 도메인은 애기장대의 것과 96-100%의 상동성을 나타내었으나 MADS 도메인외의 부분은 상동성이 77-83%였다. 이들 3개의 BrFLC 중에서 BrFLC3이 애기장대 *AtFLC*와 가장 높은 상동성을 나타내었으며 BrFLC1은

C-terminal 쪽으로 10개의 아미노산이 더 존재하였다 (Fig. 3).

```

BrFLC2      MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSKRRNGLIEKARQLSVLCDASVALLVVSASCKLYNFSAG 60
BrFLC3      MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSKRRSGLIEKARQLSVLCDASVALLVVSASSCKLYSFSAG 60
BrFLC1      MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSKRRNGLIEKARQLSVLCDASVALLVVSASCKLYSFSSG 60
AtFLC       MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSKRRNGLIEKARQLSVLCDASVALLVVSASCKLYSFSAG 60
*****_*****:*****:**

BrFLC2      DNLVKILD RYKQKHADDL KALDLQSKAPKYCSHHELLELVESKLVESNSD-VSVD SLVQL 119
BrFLC3      DNLVRI LD RYKQKHADDL KALN LQSKALSYCSHHELLELVDSKLVESNVGCVSVD TLVQL 120
BrFLC1      DNLVKILD RYKQKHDDDL KALDRQSKALDCGSHHELLELV ECKLEESNV DNVSVGSLVQL 120
AtFLC       DNLVKILD RYKQKHADDL KALDHQSKALNYCSHYELLELVDSKLVGSNVK NWSIDALVQL 120
****:***** *****: **** . *** *****: .** ** **:.:****

BrFLC2      EDHLETALSVTRARKTEMLMLKLVDSLKEKEKLLKEENQGLASQMEKNNLACAEADKMEMS 179
BrFLC3      EGVLENALSLTRARKTEMLMLKLVDSLKEKEKLLKEENQALAGQKEKKNLACAEADNMEMS 180
BrFLC1      EEHLENALSVTRARKTEMLMLKLVENLKEKEKLL EENHVLASQMEKSNLVR A EADNMDVS 180
AtFLC       EEHLETALSVTRARKTEMLMLKLVENLKEKEKMLKEENQVLASQMENNHVGA EAE-MEMS 179
* **_***:***:*****: .*****: *:***: **_* *:.: . ***: *::*

BrFLC2      P-GQISDINRPVTLRLLY----- 196
BrFLC3      P-GQISDINLPVTLPLLN----- 197
BrFLC1      P-GQISDINLPVTLPLLKGLVGV EFL 206
AtFLC       PAGQISD-NLPVTLPLLN----- 196
* ***** * **** **

```

Fig. 3. Alignment of predicted amino acid sequences of AtFLC and the three BrFLC genes.

이들 BrFLC와 NCBI 데이터 베이스에 등록된 FLC 유전자들과의 관계를 Megalian 프로그램 (DNASTAR)으로 분석하여 본 결과 배추에서 분리된 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자는 유채등의 같은 *Brassica* 종에서 분리된 FLC와 상당히 유사하였으며 애기장대의 것과 유사한 유전자인 MAF1-5와는 거리가 있는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

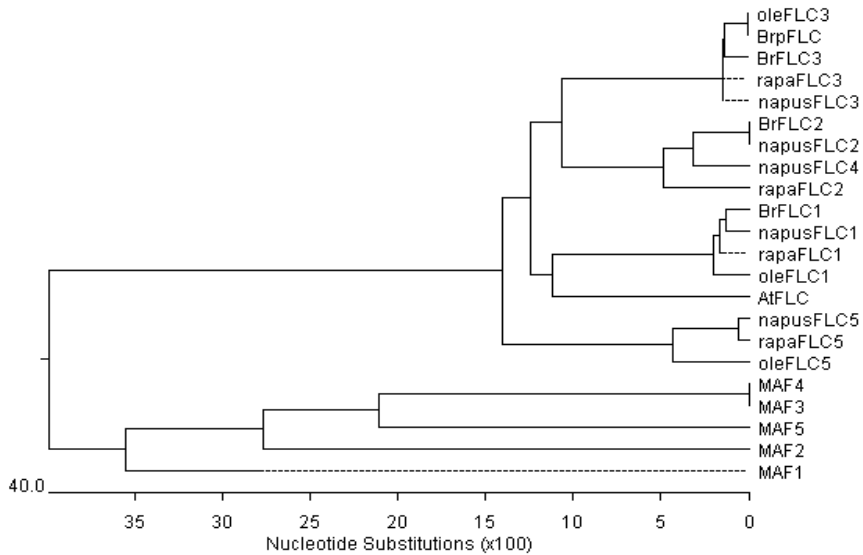


Fig. 4. Phylogenetic relationships between Chinese cabbage BrFLC 1, 2 and 3 and other FLC proteins. Partial amino acid sequence without exon 1 were analyzed by use of Megalign program (DNASTAR). Br: *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* inbred line 'Chiifu.' rapa: *Brassica rapa*, napus: *Brassica napus*, Brp: *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*, ole: *Brassica oleracea*, At: *Arabidopsis*, MAF: MADS affecting FLC.

Accession numbers are as follows (in parentheses): BrFLC1 (DQ866874), BrFLC2 (DQ866875), BrFLC3 (DQ866876) rapaFLC1 (AAO13159), rapaFLC2 (AAO86066 and AAO86067), rapaFLC3 (AAO13158), rapaFLC5 (AAO13157), napusFLC1 (AAK70215), napusFLC2 (AAK70216), napusFLC3 (AAK70217), napusFLC4 (AAK70218), napusFLC5 (AAK70219), BrpFLC (AAS55409), oleFLC1 (AAN87902), oleFLC3 (AAN87901), oleFLC5 (AAN87900), At: *Arabidopsis* (NP\_196576), MAF1 (AAK37527), MAF2 (AAO65307), MAF3 (AAO65310), MAF4 (AAO65315), MAF5 (AAO65320).

나) 배추에서 BrFLC 유전자 발현 분석

(1) 배추 BrFLC의 조직 특이 발현

분리된 BrFLC 1, BrFLC 2, BrFLC 3 유전자 발현을 배추 조직별로 발현 차이를 보기 위하여 표 5와 같이 각각의 유전자 특이 primer를 작성하여 각 조직으로부터 분리된 total RNA 1 $\mu$ g을 사용하여 44 $^{\circ}$ C 에서 1시간 동안 cDNA를 합성한 후 94 $^{\circ}$ C 30초 denature, 52  $^{\circ}$ C 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C 1분 extension을 23회 반복하였다. 그 결과 BrFLC1과 BrFLC2는 잎, shoot tip과 뿌리에서 모두 발현되었으나 BrFLC3는 뿌리에서 발현률이 상당히 낮았으며 대체적으로 모든 조직에서 BrFLC1과 BrFLC2 발현율이 BrFLC3보다 높게 나타났다 (Fig. 5).

Table 5. Primer set for detection of three FLC genes from chinese cabbage.

FLC genes	Primer sequence	PCR product size (bp)
BrFLC 1	F: 5'CAAGCGAATTGAGAACAAAA3'	594
	R: 5'GAGTCGACGCTTACATCAGA 3'	
BrFLC 2	F: 5'CAAGCGAATTGAGAACAAAA3'	321
	R: 5'GGCATTTC AAGGACACC 3'	
BrFLC 3	F: 5'CAAGCGAATTGAGAACAAAA3'	357
	R: 5'AAAAATTCCTCCACTCCACTAACC3'	

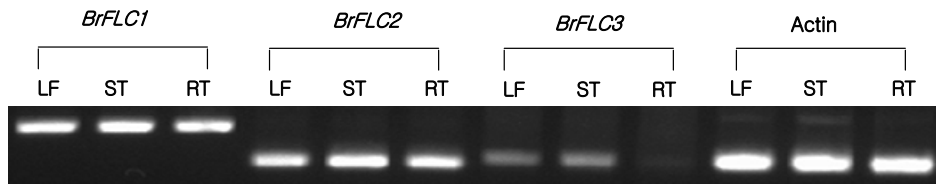


Fig. 5. RT-PCR analysis of transcription of BrFLC genes in tissues of *B. rapa* L. ssp. *pekinensis* inbred line 'Chiifu'. LF, leaf; ST, shoot tip; RT, root. Actin was used as a control to demonstrate equal RNA loading.

## (2) 개화시기가 다른 배추 품종에서 BrFLC 발현 분석

배추에서 개화시기가 빠른 조추대 (HN3B), 중간 정도인 중추대 (DH01), 개화시기가 늦은 만추대 (DH03)를 vernalization 하기 전 (0dV)과 4 °C에서 40일 동안 vernalization 했을 때 (40dV)와의 FLC 유전자 발현을 RT-PCR로 분석하였다. 그 결과 모든 배추에서 BrFLC 1과 BrFLC 2 발현양이 BrFLC3 보다 높았으며 조추대에서 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 발현양은 중추대와 만추대보다 더 낮게 나타났다. 40일 동안의 vernalization 후에는 BrFLC1, 2, 3 모두의 발현양은 중추대, 만추대에서도 낮아졌으며 조추대에서는 거의 발현이 되지 않은 것을 알 수 있었다 (Fig. 6). 이러한 결과로 볼때 BrFLC 유전자 발현양은 vernalization 기간과 작물의 개화시기와 상당한 관계가 있다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 6).

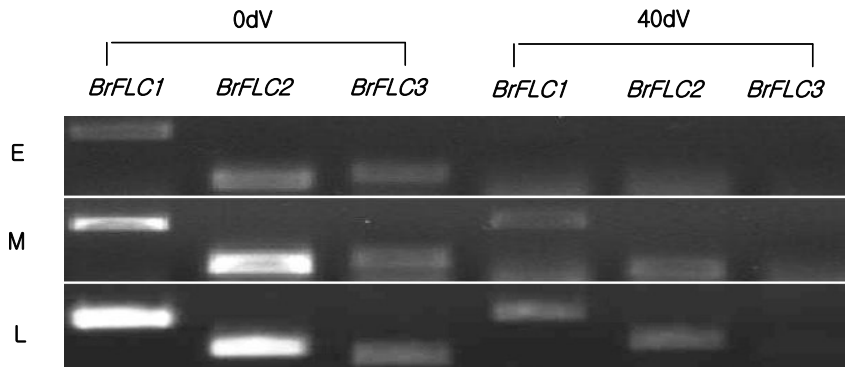


Fig. 6. RT-PCR analysis of levels of BrFLC transcripts in *B. rapa* L. ssp. *pekinensis*. 0dV: unvernalized plants, 40dV: 40-day exposure to 4°C, E, early-flowering plant (HN3B); M, intermediate-flowering plant (DH01); L, late-flowering plant (DH03).

## (3) Vernalization 기간에 따른 BrFLC 발현 분석

추대 및 개화가 빠른 조추대 (HN3B), 중간인 중추대 (DH01)와 늦은 만추대 (DH03) 배추에서 저온처리 (4 °C)를 하지 않은 경우와 저온처리 10일, 40일, 저온처리 40일후 상온 (24±1 °C)에서 30일 배양 후 개화관련 유전자들의 발현을 알아보기 위하여 배추로부터 분리한 BrFLC 1과 개화촉진 유전자로 알려진 AGL20 유전자

를 probe로 northern 분석을 하였다 (Fig. 7). 저온처리를 10일 동안 받은 조추대에서 FLC 유전자 발현은 현저히 감소하였으며 저온처리 40일 후에는 거의 발현이 없었다. 중추대에서도 저온처리 10일, 40일에서 FLC 유전자 발현이 현저히 감소하였다. 만추대에서는 저온처리 10일에서 발현이 되었고 40일에서 발현이 감소하였으나 약한 발현양을 보였다. 세 품종 모두 저온처리 40일 후 상온 (24±1 °C)에서 30일 성장한 경우에는 FLC 유전자 발현이 거의 없었다. 따라서 FLC 유전자의 발현은 개화 시기가 다른 품종과 저온처리 기간에 따라서 발현양과 억제 정도가 다르게 나타났다. FLC 유전자 발현으로 down regulation 되고 FLC 유전자 발현이 억제되면 발현되는 AGL20 유전자는 저온처리 40일부터 발현되기 시작하였으며 중추대나 만추대보다 조추대에서 발현양이 월등히 많았다. 이러한 FLC와 AGL20 유전자 발현은 본 연구에서 형질전환에 사용하는 동부 inbred line에서도 비슷한 양상을 나타내었다 (Fig. 8).

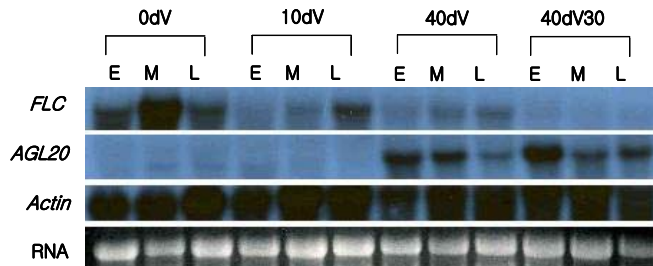


Fig. 7. Levels of FLC and AGL20 transcripts in unvernallized and vernalized Chinese cabbage. Total RNA (20 µg) was used for northern hybridization. 0dV, unvernallized plant; 10dV, 10-day exposure to 4°C; 40dV, 40-day exposure to 4°C; 40dV30, 30 days at 25°C after a 40-day exposure to 4°C; E, early-flowering plant (HN3B); M, intermediate-flowering plant (DH01); L, late-flowering plant (DH03). FLC, AGL20, and Actin indicate the use of BrFLC1, AGL20, and Actin (isolated from *B. rapa* L. ssp. *pekinensis*) as probes.

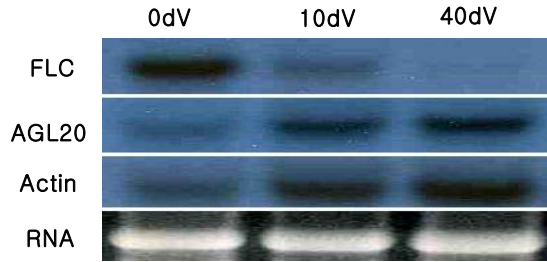


Fig. 8. Transcript level of FLC and AGL 20 genes in unvernallized and vernalized cultivars of Chinese cabbage inbred line. Total RNA 20  $\mu$ g was used for northern hybridization. 0dV: unvernallized plant, 10dV: 10 day exposure to 4°C, 40dV: 40 day exposure to 4°C.

(4) 배추 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자 프로모터 분석

배추 BrFLC 유전자 각각의 발현을 알아보기 위하여 배추 BAC 클론의 염기서열을 참고로 하여 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 프로모터 부분의 특이 primer를 작성하여 배추 BAC 클론으로부터 -2kb의 프로모터를 분리하였다 (Table 6).

Table 6. Primer design to isolate promoter region of each BrFLC gene.

Primer	Sequence
PBrFLC1-L	5' - AACCATGTCGTACATTCACC - 3'
PBrFLC1-R	5' - GGCTTCTGTCTCCAACAGT - 3'
PBrFLC2-L	5' - CTCGCGTTCTAAAGTTGAAT - 3'
PBrFLC2-R	5' - TTCTCGGAGACAGAAGCC - 3'
PBrFLC3-L	5' - CCACTTCTGGATTTAGCATC - 3'
PBrFLC3-R	5' - GGTTTCTGTCTCCAAGTGGT - 3'

분리된 프로모터 발현 분석을 위하여 제초제 저항성 선발마커와 리포터 유전자로 GFP와 GUS를 포함하고 있는 pBGWFS7 (VIB, 벨지움) 벡터에 각각의 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 프로모터 (2kb)를 융합하여 pPBrF1, pPBrF2, pPBrF3 벡터를 작성하였다 (Fig. 9).



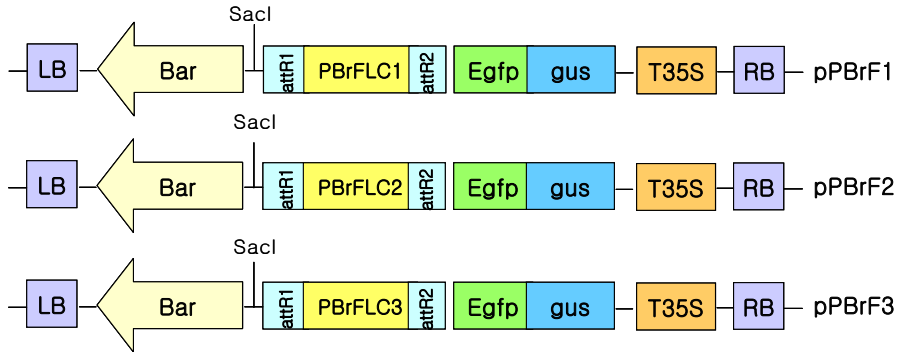


Fig. 9. Construction map of promoter analysis vectors. LB: left border, RB: right border, attR1 and attR2: attachment region, PBrFLC1, PBrFLC2, PBrFLC3: promoter region (-2kb) of FLC genes from *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*, T35S: CaMV 35S terminator, Tnos: nos terminator, Bar: Pnos-phosphinotricin acetyltransferase gene-Tnos.

① 애기장대에서 BrFLC 프로모터 분석

작성된 벡터를 애기장대에 형질전환하여 형질전환체에서 프로모터 발현을 GFP와 GUS 염색으로 조사하였다 (Fig. 10).

형질전환 애기장대에서 pBrF1에 의한 GUS 발현은 종자 치상 후 3일에는 자엽과 뿌리에서, 5일에는 자엽과 기부, 뿌리에서 발현하였으며 15일에는 자엽, 본엽과 성장점에서 발현하고 뿌리에서는 발현하지 않았다 (Fig. 10, B, C, D). pBrF2에 의한 발현은 3일에 뿌리에서 발현하였고 5일과 15일에도 뿌리에서 발현하였다 (Fig. 10, F, G, H). pBrF3에 의한 GUS 발현은 pBrF1 발현과 비슷하게 3일에 자엽과 뿌리에서 발현하고 5일에 자엽과 기부, 뿌리에서 발현하였으며 15일에는 자엽과 본엽, 성장점에서 발현하고 뿌리에서는 GUS가 관찰되지 않았다 (Fig. 10, J, K, L). GFP의 발현은 3일에 pBrF1과 pBrF3에 의해 자엽, 뿌리를 포함한 전체에서 관찰되었고, pBrF2에서는 뿌리에서만 발현되었다 (Fig. 11, N, R, U). 이는 GUS와 같은 발현양상을 나타내었다. 5일과 15일에는 엽록소의 영향으로 자엽에서는 관찰이 어려웠으나 뿌리와 기부에서는 GUS의 발현과 일치되게 발현되었다.

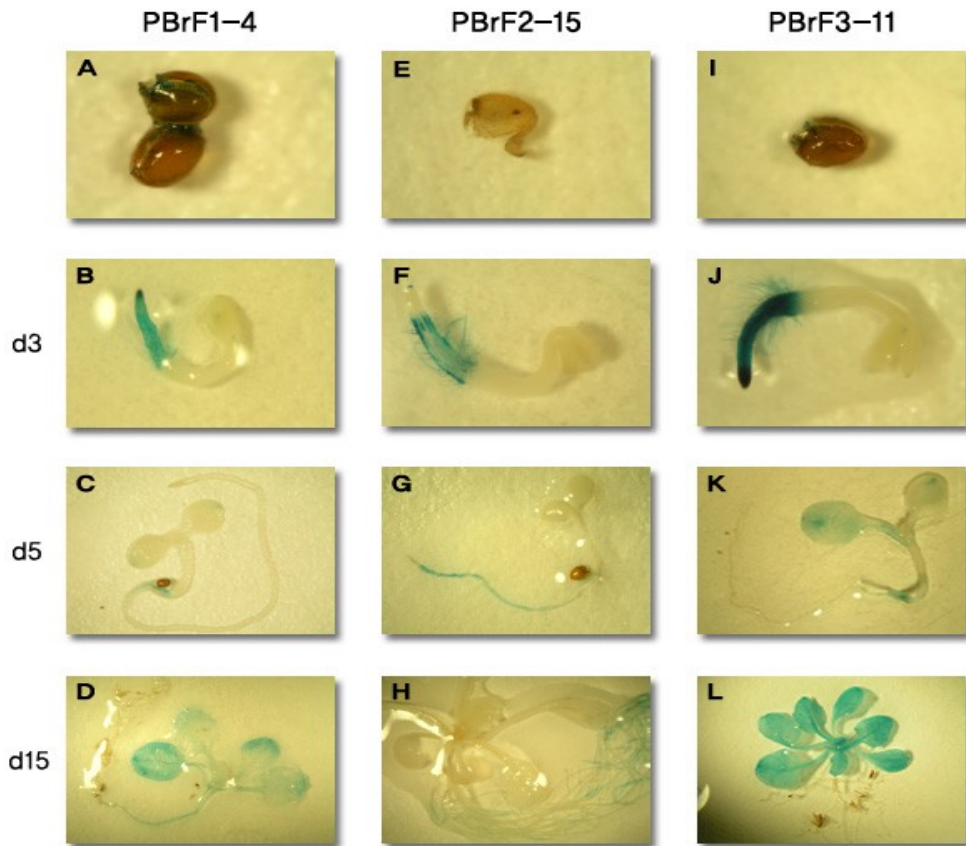


Fig. 10. GUS expression in transgenic *Arabidopsis* harboring pPBrF1, pPBrF2 and pPBrF3 respectively. d3 : 3 days after germination, d5: 5 days after germination, d15: 15 days after germination.

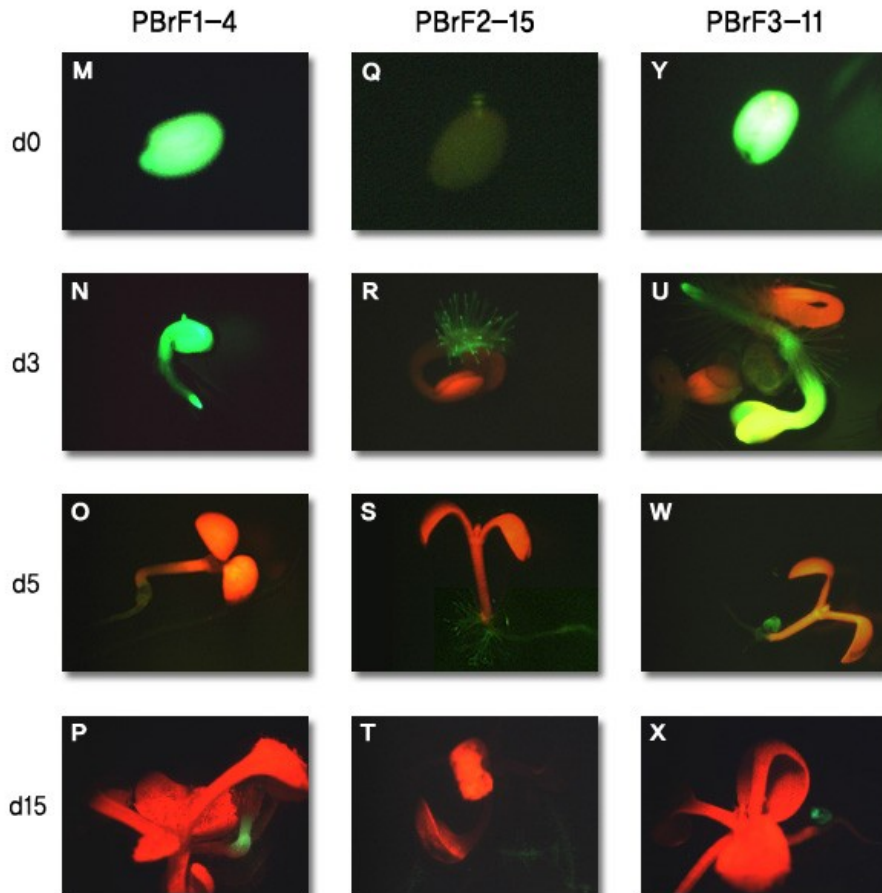


Fig. 11. GFP expression in transgenic *Arabidopsis* harboring pPBrF1, pPBrF2 and pPBrF3 respectively. d3 : 3 days after germination, d5: 5 days after germination, d15: 15 days after germination.

② 배추 형질전환체에서 BrFLC 프로모터 분석

배추에서 각각의 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자 프로모터 발현을 보기 위하여 pPBrF1, pPBrF2, pPBrF3가 도입된 배추 형질전환체를 제초제 저항성 선발로 획득하였다. 형질전환체는 bar strip (Strategic Diagnostics Inc.)으로 반응하여 확인하였다 (Fig.12). 형질전환체로부터 T1종자를 획득하였고 종자 발아 3일, 5일 후 그리고 식물체가 성장하여 본엽이 4-5엽 전개되었을 때 GUS와 GFP 발현을 조사하였다. (Fig. 13). PBrF1에 의한 GFP 발현은 종자 치상 후 3일에는 자엽과 기부에서 관찰되었다. PBrF2에 의한 GFP 발현은 3일에 자엽과 뿌리 끝 성장점 부위에서 관찰되고 PBrF3에 의한 GFP 발현은 자엽과 뿌리 끝에서 발현하였다. 본엽이 4-5엽이 될 때인 20일 성장 후에는 PBrF1에 의한 GUS의 발현은 기부 및 성장점에서 발현하는 것을 확인 할 수 있었고 뿌리에서는 관찰 할 수 없었다. PBrF2에 의한 GUS의 발현은 모든 부위에서 관찰되지 않았고 PBrF3에 의한 GUS의 발현은 자엽과 본엽 기부 성장점에서 관찰되었다.

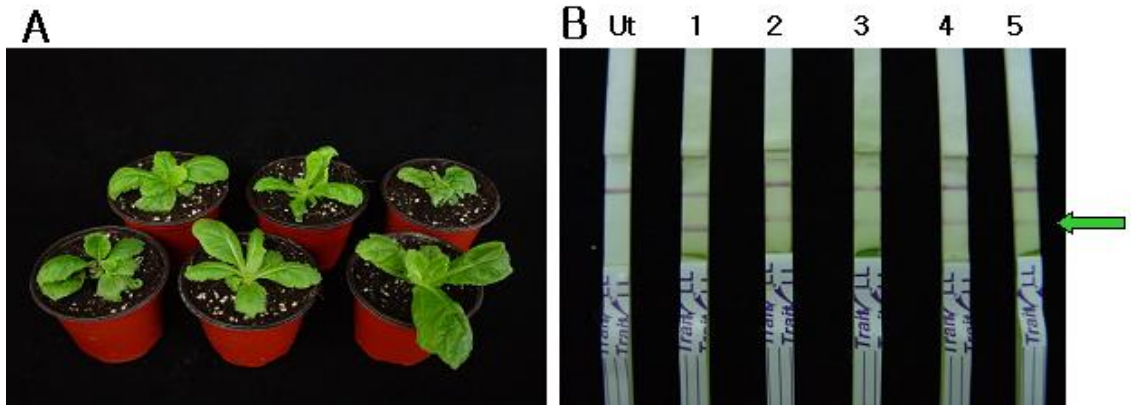


Fig. 12. Transgenic Chinese cabbage transformed with promoter analysis vectors (pPBrF1, pPBrF2, pPBrF3). A: Transgenic plants, B: response of bar strip, arrow: specific band for *ppt* protein. Ut: untransformed plant, 1, 2, 3, 4 and 5: transgenic plants.

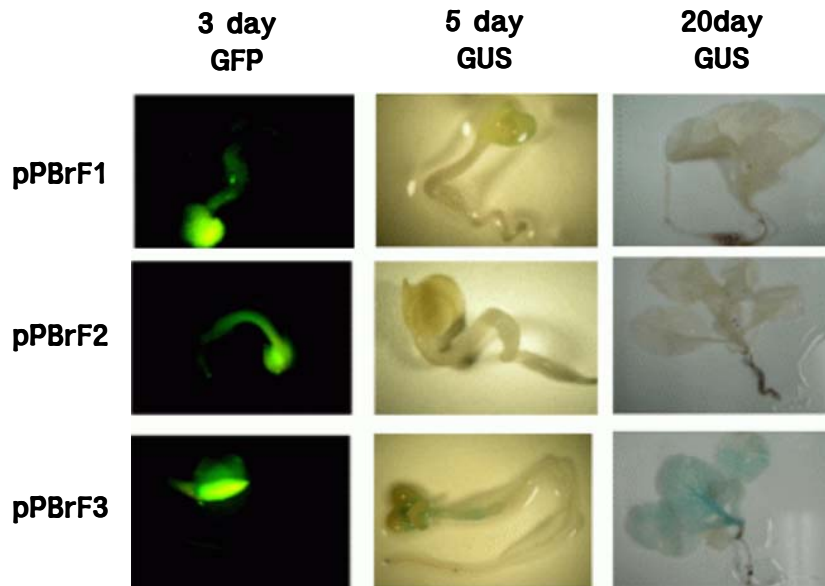


Fig. 13. GFP and GUS expression in transgenic Chinese cabbage harboring pPBrF1, pPBrF2 and pPBrF3 respectively.

2) 배추 BrCO 유전자 분리 및 발현 분석

배추에 존재하는 CO 유전자 copy 수를 알아보기 위하여 장원배추의 모본과 부분으로부터 genomic DNA를 *Bam*HI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Eco*RV, *Xba*I, *Sca*I 제한 효소를 사용하여 절단한 후 Southern 분석을 하였다. CO 유전자는 각각 4 - 5 copy 정도로 존재하는 것으로 나타났다 (Fig. 14).

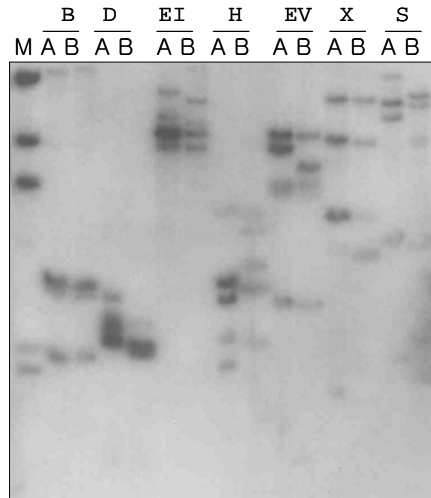


Fig. 14. BrCO gene copy numbers in Jangwon (*Brassica rapa* L ssp. *pekinensis* ) parental lines. M: Size marker A: Jangwon mother line B: Jangwon father line B: *Bam*HI D: *Dra*I E: *Eco*RI H: *Hind*III V: *Eco*RV X: *Xba*I S: *Sca*I.

삼진 배추 잎 조직으로부터 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 하여 본 결과 예상되는 크기에서 PCR 산물을 얻을 수 있었다 (Fig. 15). 분리된 유전자들을 pGEM-T 벡터에 클로닝하여 염기서열을 확인한 결과 966bp로 구성되었다 (Fig. 16). 아미노산 서열을 비교 분석한 결과 BrCO 유전자는 애기장대 CO 유전자와 75%의 상동성을 나타내었다 (Fig. 17). 기존에 이미 등록된 CO 유전자들과의 연관성을 조사한 결과 애기장대의 COL2 유전자와 상관성이 가장 높게 분석되었다 (Fig. 18).

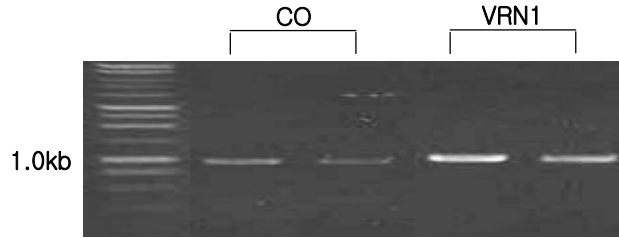


Fig. 15. RT-PCR products of CO (CONSTANS) genes from Chinese cabbage.

```

AtCO      ATGTTGAAAGAAAGACAGTAATGACAGTGGTACTTGGCCACGAGCATGTGACACTTTGCGT 60
BrSjCO    ATGTTGAAAGAAAGACAGTAATGACAGTGGTGGT---ACACGAGCATGTGACACATGTCGT 57
*****

AtCO      TCAGCCCGCTGCACCTGTCTACTGTGAAGCCGACTCTGCCTACTTTGCCACCACCTGTGAT 120
BrSjCO    TCAGCCCGCTGCACCTATCTACCCTGAAGCTGATTTCTACCTACTTTGCCACCACCTGGCAT 117
*****

AtCO      GCTTCGAGTTCACGCCACCCAAACCGTGTTCCTTCTGCCCATGAACGTCTTCCTGTCTGTCAG 180
BrSjCO    GCTTCGAGTTCACGCCACCCAA-----ACGTCTCCCTGTCTGCCAC 156
*****

AtCO      TCATGTGAGTCTGCCCCAGCTGCGTTTTTTGTGTAAGCAGACCGCTGCGTCTCTTTGTACA 240
BrSjCO    TCATGCCAGTCTGCCCCGCTGCGTTTTTTCTGTAAGCAGACCGCTGCGTCTCTTTGTACA 216
*****

AtCO      GCTTGTGATGCGACAGATTCATTCCGCCAAACCCACTAGCTAGACGTCATCAGCGAGTTCCG 300
BrSjCO    GCTTGTGATGCTGAGATCCATTCCGCCAAACCCCTAGCTAGACGTCATCAACGTTGCGCT 276
*****

AtCO      ATTCTTCCATTATCTGCAAACTCTTGCAGCTCCATGGCCCAAGTGAGACTGATGCGTG-- 358
BrSjCO    AT-----AACTTCAAACCTCTTGCCTCCATGGCCCACTGATGGAGATAAATATGTC 327
** * * * * *

AtCO      ATAACGATGAC-----GATGATCGAGAGCTTGCCTTCCTGCTTACTCCCTAAT 405
BrSjCO    ATGATGGTCACTCAAGAAAAGAGGATCCGGATCAGCTGCGTTCCTCGTTGATGCTTAAAT 387
** * * * * *

AtCO      CCAGCGAAAACATCGGTAATCACAATAATGGGTTCTTCTTGGTGTGACTACCTTGCAT 465
BrSjCO    CCAGCGAAAAC-----AATCACAATAATGGGTTCTTCTTGGTGTGACTATCTTCAT 441
*****

AtCO      CTGTGGATTACAGCTCCAGCATGGACAACCAATTCGAACATAATCAGTACACTCACTAC 525
BrSjCO    CTGTGGACTACAGCTCCAGCATAGACAACCAAGTTCGAACA---TCAGTACACTAAATAC 498
*****

AtCO      CAGAGGAGCTTTGG-----AGGAGATGGAGTTGCGCCCTTCAAGTTGAAGAATCA--- 576
BrSjCO    CATAGGAGCTTTGCTGGAGGACAAGATGGACTTGTGCCACTTCAACTTGAAGAATCATCA 558
** * * * * *

AtCO      ACAAGTCACTGCAACAAAGCCAAACAAACTTTCAGTTGGGTATCAACTATGGATTCTCC 636
BrSjCO    ACAAGTCACTGCAACAAAGCCAAACAAACTTTCATTTGGGTATTAAGTATGGTTACTCT 618
*****

AtCO      TCAGGAGCTCACTACAACAACAACCTCCTTAAAGGACCTAAACCATAGCGCATCCGTTTCA 696
BrSjCO    ACAGAACCTCAGTACAGCTAGC----- 640
** * * * * *

AtCO      TCAATGGACATCAGTGTGTGCCAGAGTCAACTGCAAGTGCATAACAGTCCAAACACCCA 756
BrSjCO    -----TTAGTCTTGTGCCAGACTCA---TAACTGACACACAGTCCAAACAC--- 684
* * * * *

AtCO      AGAACTACTAAAAGACAGCGATAGACCAACTATCTGGTCTCCTACTCAGGTGCTGCAACAG 816
BrSjCO    -----GCTAAAAGACACAATAGACCAAGTATGTGCCCCACCTACTCAGATGCTGCAAGCAG 738
*****

AtCO      CTTACTCCAATCGACAGGGAGGCTAGGGTCTGTGATACAGACAGAGCAAGCAAGCAAGG 876
BrSjCO    CTAACCTCAGCTGACAGGGAAGCTAGAGTCTTGAGATACAGACAGAGCAAGCAAGGAGG 798
** * * * * *

AtCO      AAATTTGACAAGACAATAAGATATGCTTCAAGAAAAGGCATATCCACAGATAAGACCACGG 936
BrSjCO    AAGTTTCAAGACAATAAGATATGCTTCAAGAAAAGGCCTTATCCACAGCTAAGACCACGG 858
** * * * * *

AtCO      ATCAAGGGCAGATTCGCAAGAGCATAGAAAAGTGAAGCTGAGGCTCAAGAAATCTTCTCA 996
BrSjCO    ATCAAGGGCCGTTTCGCAAGAGCATAGATAAGGAGCTGATCCAGAAACACTTCTCTCA 918
*****

AtCO      ACATCGCTAATCTCTGAGACTGGATATGGAATTCCTCCTCCTTCTAA 1044
BrSjCO    ACATCAGTAATCTCCAATACCAGTTATGGAATTCCTCCTCCTTCTAA 966
*****

```

Fig. 16. DNA sequence alignment of AtCO and BrCO genes.

```

AtCO      MLKEESNESGTWARACDTCRSAACTVYCEADSAYLCTTCDARVHAANRVASRHERVVCQ 60
BrSjCO    MLKEESNESC-GTRACDTCRSAACTIYREADSTYLCTTCDARVHAAK-----RVRVCD 52
          *****   ;*****;*  ****;*****:         *****:

AtCO      SCESAPAAFLCKADAASLCTACDAEIHSAANPLARRHQVVPILPLSANS CSSMAPSETD-- 118
BrSjCO    SCESAPAAFFCKADAASLCTACDAEIHSAANPLARRHQVVPIT---SN SCGSMATDGMNV 109
          *****;*****                                         ;**_.**_. :

AtCO      ---ADNDEDDREVASWLLPNPCKNIGNQNNCGFLGVEYLDLVDYSSSMNQFEDNQYTHY 175
BrSjCO    MMVSEBKEDADEVASWMLNPKGN--NQNNCGFLGVEYLDLVDYSSSIDNQFED-QYSKY 166
          :;:.* **   *****;   *****   *****;*****;***** **;:.*

AtCO      QRSFGC--DGVVPLQVEES-TSHLQQSQNFQLGINYGFSSCAHYNNNSLKDLMHSASVS 232
BrSjCO    HRSFGGGE DGVVPLQLEESSTSHMQSQHNFHLGVNYYCSTEPQYS----- 212
          :*****  *****;***   **;****;*:;*;*;*:;*:_.:*.

AtCO      SMDISVVPESTASDITVQHPRTTKETIDQLSGPPTQVVQQLTPMEREARVLRYREKTKR 292
BrSjCO    --YVSVVPES-LSDTTVQH---AKETIDQVCGPPTQHVQQLTPADREARVLRYREKKRR 266
          :*****  **   ****  :*****;.*****;***** :*****

AtCO      KFDKTIRYASRKAYAEIRPRIKGRFAKRITAEABAEIFSTSLMSETGYGIVPSF 347
BrSjCO    KFEKTIRYASRKAYAEVRPRIKGRFAKRIDMEADAEQLFSTVMSNTSYGIVPSF 321
          **;*****;*****; *****; **;*:;****;*:;*   *****
  
```

Fig. 17. Amino acid sequence alignment of AtCO and BrCO genes.



Fig.18. Phylogenetic relationships between Chinese cabbage BrCO and other CO and CO Like genes. amino acid sequence were analyzed by use of Clorustal W. BrCO: *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* 'Samjin.' AtCOL2: *Arabidopsis* CO-Like 2. AtCO: *Arabidopsis* CO, AtCOL3: *Arabidopsis* CO-Like 3, AtCOL5: *Arabidopsis* CO-Like 5, AtCOL6: *Arabidopsis* CO-Like 6, OsAd(Ha1): *Oryza Sativa* CO, AtCO: *Arabidopsis* CO, BnCO: *Brassica napus* CO, AtCOL1: *Arabidopsis* CO-Like 1, BnCOLa: *Brassica napus* CO-Like a, BnCOLb: *Brassica napus* CO-Like b.



BrCO 유전자 발현을 보기 위하여 16시간 light 8시간 dark 일장 조건하에서 성장한 배추 잎을 빛이 들어오는 시간을 기준으로 하여 3시간 간격으로 채취하여 total RNA를 분리한 후 BrCO 유전자를 탐침으로 하여 northern 분석을 하였다. 그 결과 CO 유전자 발현양은 빛이 들어오는 시점에서 감소하기 시작하고 광조건 하에서는 발현이 되지 않고 있다가 저녁시간이 되면서 발현양이 서서히 증가하여 한 밤중이라 할 수 있는 0시 (24시)에서 발현양이 가장 높았다. 이 결과 CO 유전자는 24시간 주기로 발현양이 다르다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 19).

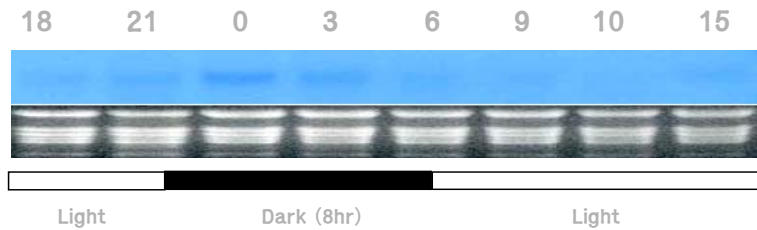


Fig. 19. Transcript levels of CO genes in Chinese cabbage.

3) 배추 BrVRN1 유전자 분리 및 발현 분석

배추에 존재하는 VRN1 유전자 copy 수를 알아보기 위하여 장원배추의 모본과 부분으로부터 genomic DNA를 *Bam*HI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Eco*RV, *Xba*I, *Sca*I 제한효소를 사용하여 절단한 후 Southern 분석을 하였다. VRN1 유전자는 각각 2 - 3 copy 정도로 존재하는 것으로 나타났다 (Fig. 20).

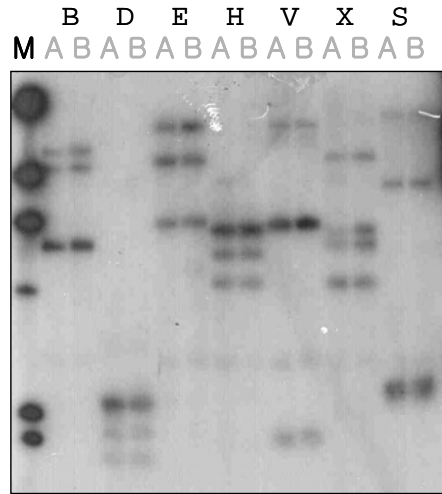


Fig. 20. BrVRN1 gene copy numbers in Jangwon (*Brassica rapa* L ssp. *pekinensis*) parental lines. M: Size marker A: Jangwon mother line B: Jangwon father line B: *Bam*HI D: *Dra*I E: *Eco*RI H: *Hind*III V: *Eco*RV X: *Xba*I S: *Sca*I.

VRN1 유전자를 분리하기 위하여 권심과 삼진 배추 잎 조직으로부터 total RNA를 분리하여 RT-PCR 한 결과 990bp였고 (Fig. 21) 아미노산 서열을 비교 분석한 결과 VRN1 유전자는 애기장대 VRN1 유전자와 89%의 상동성을 나타내었다 (Fig. 22, 23). 애기장대, 보리와 밀에서 분리된 VRN 유전자와의 연관성을 full length로 하여 분석한 결과 이들 유전자와 연관성이 많지 않은 것으로 나타났다 (Fig. 24).

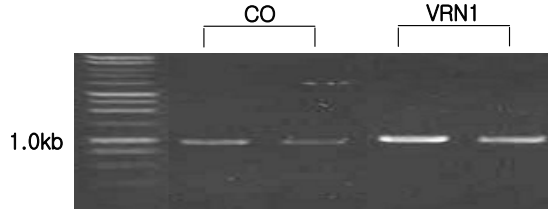


Fig. 21. RT-PCR products VRN1 genes from Chinese cabbage.

```

AtVRN1      ATGCCACGGCCCTTCTCCATAAGTTGATTTTCTCATCCACTATCCAAGAAAAACGCTCG 60
BrSjVRN1   ATGCCACGGCCCTTCTCCACAAGCTGATTTTCTCATCCACTATCCAAGAAAAACGCTCG 60
*****

AtVRN1      AGGCTCCAGATAACTTTGTGACTAAATTC AAGGATGAGCTTTCGGTTCGCTTGCACCTC 120
BrSjVRN1   AGACTTCCAGATAACTTTGTGACTAAATTC AAGGACGAGCTATCGGTTGCAGTTGCACCTC 120
*****

AtVRN1      ACAGTACCTGATGCTCATCTTTGGCCTCTAGGACTAAGCAAAGCTGACAACAA-----A 174
BrSjVRN1   ACAGTACCCGATGCTCATCTTTGGCCTCTAGGACTAAGCAAAGCTGACAACAAACAACAAG 180
*****

AtVRN1      ATTTGGTTTCAAGATGCTTGGCAAGAGTTTCTTGACCCCTTACTCCATTCCGATTGGTAT 234
BrSjVRN1   ATTTGGTTTCAAGATGCTTGGCAAGAGTTTCTTGACCCCTTACTCCATCCGCAITGGCTAC 240
*****

AtVRN1      CTTTGTATTTTATAGATATCAAGGAAACTCTGCCTTCAGCGCTTACATTTTCAATTTATCC 294
BrSjVRN1   CTTTGTATTTTATAGATACCAAGGCAACTCTGCCTTCAGCGCTTGCATTTACAACCTTACCA 300
*****

AtVRN1      CACTCTGAGATCAATTACCAITTCACCGGCTCTCATGGATTCCGGCTC-----ACAACAC 348
BrSjVRN1   CACTCCGAGATTAACTACCAITTCACCGGCTCTCATGGACTCTGCATCACACAACAACACAC 360
*****

AtVRN1      TTCAAACGCGCCCGTTTGTGTTGAAGACCTTGAAGATGAAGATGCCGAGGCTCATCTTTCT 408
BrSjVRN1   TTCAAACGCTCCCGCTTTCTTGAAGACCTTGAAGATGAAGATGCTGAGA-----TTCAG 409
*****

AtVRN1      TCTTCTGCTACCCATCACCACTTCTCTGACTTACAGTACCAGCCAAACAAGGGTATGCT 468
BrSjVRN1   ---CTCTGCACACA--ACCGCTTC-----TTCAGTACCAGCCAAACAAGGGTATGCT 428
*****

AtVRN1      AGTTCAGCCATCCAAACCTTGTTCACCTGGACCAGTTAAAGCTGAAGAGCCAAACGCCAAC- 527
BrSjVRN1   ----AGCCATCCAGAGCTTCTTCACCTGGACCCTGTTAAAGCTGAAGAGCCAAACACCAACA 483
*****

AtVRN1      AGTTCAGCCATCCAAACCTTGTTCACCTGGACCAGTTAAAGCTGAAGAGCCAAACGCCAAC- 527
BrSjVRN1   ----AGCCATCCAGAGCTTCTTCACCTGGACCCTGTTAAAGCTGAAGAGCCAAACACCAACA 483
*****

AtVRN1      -----CCCAAAAATACCTAAAAAGACAGCCAGCAACAACAAAAATCCTGATC---CTGAC 579
BrSjVRN1   CAAACCTCAAAGTTCTCAAAGAGAGAGGAGGAAGAAGAAATGCTGATCATCTCTGAG 543
*****

AtVRN1      GAAATAAATCATCAGCTCCGCGAGATGATGATCCAGAGAACCGTTCAAAGTTCTACGAG 639
BrSjVRN1   GAAGTAAATCATCTGCCCCGAGAGATGATGATCCAGAGAACCGTTCAAAGTTCTACGAG 603
*****

AtVRN1      ACTGCTTCTGCCAGAAAGAACCCCTGACTGCGAGAAAGAGAGAGAGCCATCAATGCA 699
BrSjVRN1   ACTGCTTCTGCCAGAAAGAACACTCAATGCTGAAGAGAGAGAGAGGCTCTTAATGCA 663
*****

AtVRN1      GCCAAAACGTTTCAACCAACAACCCCTTTCTTCAGAGTGGTTCTCCGACCATCCTATCTA 759
BrSjVRN1   GCCAAAACGTTTGAAGCCAAACAACCCCTTTCTTCAGAGTGGTTCTTCAGAGCCTCTATCTA 723
*****

AtVRN1      TACAGAGTTGCATCATGTATCTTCTTCTGCGGTTTGTCTGAGAAGTACCTAAGTGGGATC 819
BrSjVRN1   TACAGAGTTGCATCATGTATTTGCCTTCTGCGGTTTGTCTGAGAAGTACTAAGTGGGATC 783
*****

AtVRN1      TCCGGTTTCATCAAAGTCCAGCTTGGCGAGAAACAATGGCCCTTTCGATGCTCTTACAAA 879
BrSjVRN1   TCCGATTTCATCAAAGTCCAGCTTAGGGAGAAACAATGGCCCTTTCGATGCTCTTACAAA 843
*****

AtVRN1      CCGGGAGACCCCAAATTCAGTCAAGCATGCTACCAATTCACCTTACAGAAACAACCTTAGCA 939
BrSjVRN1   CGAGGGAGAGCTAAGTTTCAGTCAAGCTTGCATGAGTTCACTCTGAGAAACAACCTTAGCA 903
*****

AtVRN1      GAAGGAGACCTCTCTCTTTGACCTGCTCAGAACCAAGACATTTCCCTTTGAAACTGACA 999
BrSjVRN1   GAAGCTGATCTCTGCTCTTTGACCTGCTCAGAACCAAGACATTTCCCTTTGAAACTGAC 963
*****

AtVRN1      GCCTTTCAGCTCAACGAGTACGCTCTGA 1026
BrSjVRN1   CCTATCCAGCTCAACGAGTACGCTCTGA 990
*****

```

Fig. 22. DNA sequence alignment of AtVRN1 and BrVRN1 genes



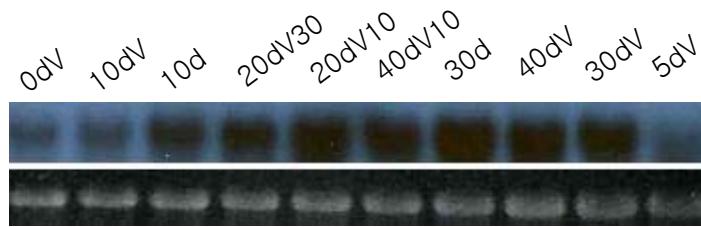


Fig. 25. Transcript level of VRN1 gene in unvernallized and vernalized late-flowering chinese cabbage. Total RNA 15  $\mu$ g was used for northern hybridization. 0dV: unvernallized plant, 5dV, 10dV: 5day and 10 day exposure to 4°C, 10d, 30d: unvernallized plant, 20dV30, 20dV10: 30 days and 10 days at 25°C after 20 day exposure to 4°C, 40dV10: 10 days at 25°C afte 40 day exposure to 4°C, 30dV, 40dV: 30 day and 40 day exposure to 4°C.

나. 개화시기조절 유전자의 식물형질전환용 벡터 작성

1) BrFLC 유전자 과발현 벡터 작성

가) 애기장대 형질전환용 벡터 작성

애기장대 형질전환용 벡터는 형질전환체 선발을 용이하게 하기 위하여 제초제 저항성 *bar* 유전자를 갖고 있는 유전자 과발현 벡터인 pB2GW7 (VIB, 벨지움)을 기본벡터로 사용하였다. Gateway system을 이용하여 35S 프로모터에 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자가 융합된 pBrFLC1, pBrFLC2, pBrFLC3을 작성하였다 (Fig. 26).

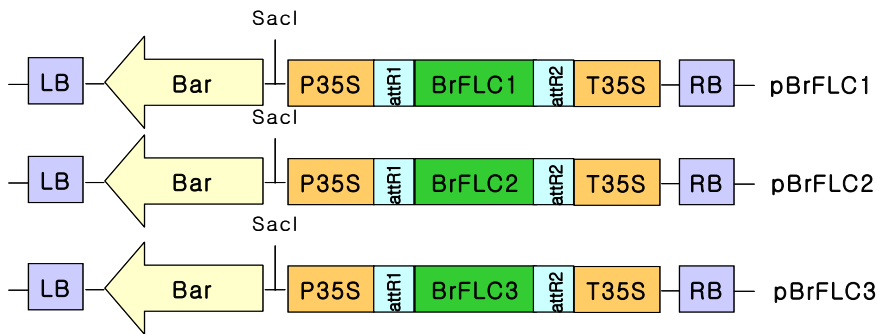
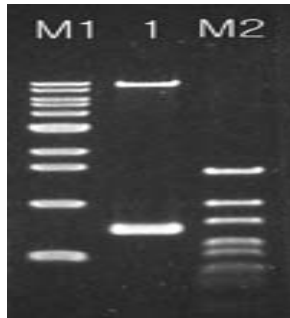


Fig. 26. Construction map of plant expression vectors. LB: left border, RB: right border, P35S: cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter, attR1 and attR2: attachment region, BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3: FLC genes from *Brassica rapa ssp. pekinensis*, T35S: CaMV 35S terminator, Tnos: nos terminator, Bar: Pnos-phosphinotricin acetyltransferase gene-Tnos.

나) 배추 형질전환용 벡터 작성

BrFLC 1, 2, 3 단편은 pBluescriptII KS(+)에 삽입시킨 후 sequencing으로 정확한 염기서열을 확인한 후 다시 *Bgl*II와 *Pml*I으로 절단하여 pCAMBIA1302에서 *Bgl*II와 *Pml*I으로 *gfp* reporter gene이 제거된 위치에 삽입시켰다. 벡터를 *E. coli*에 형질전환하여 kanamycin (50mg/L) 고체 LB배지에서 배양하여 저항성을 보이는 colony만을 선발하였다. 선발된 colony는 restriction enzyme으로 정확한 삽입이 이루어졌는지 확인하였으며 최종 확인된 overexpression vector는 pFLC 1, 2, 3로 명명하였다 (Fig. 27, 28, 29)..



**pFLC 1**

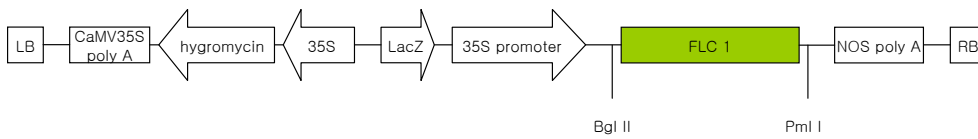
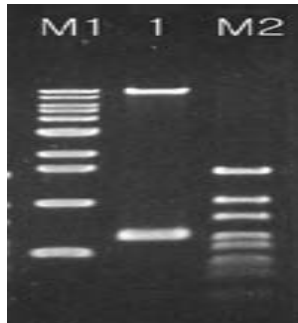


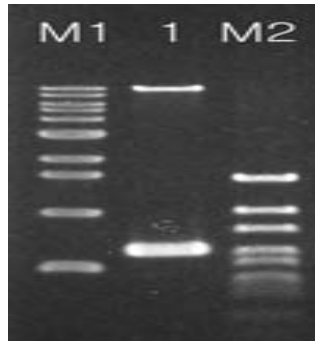
Fig. 27. Restriction mapping of pFLC1 with BrFLC 1 gene (621bp). M1: 1Kb DNA ladder marker, 1: pFLC1 (*BglII/PmlI*), M2: 100bp DNA ladder marker.



**pFLC 2**



Fig. 28. Restriction mapping of pFLC2 with BrFLC 2 gene (591bp). M1: 1Kb DNA ladder marker, 1: pFLC 2 (*BglII/PmlI*), M2: 100bp DNA ladder marker



### pFLC 3

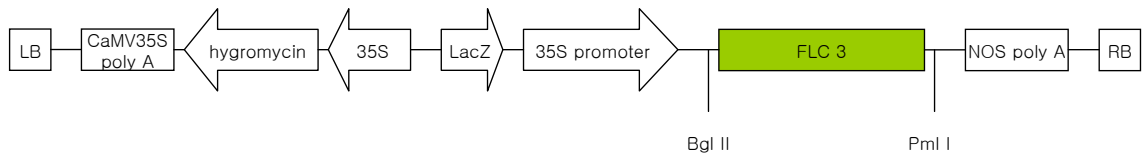


Fig. 29. Restriction mapping of pFLC3 with BrFLC 3 gene (594bp). M1: 1Kb DNA ladder marker, 1: pFLC 3 (*BglII/PmlI*), M2: 100bp DNA ladder marker

### 2) BrCO RNAi, BrVRN1 RNAi 벡터작성

BrCO와 BrVRN1 유전자의 RNAi 벡터를 작성하기 위해서 각 유전자 ORF의 일부분을 사용하였는데 BrCO 유전자는 435bp (Fig. 30), BrVRN1 유전자는 387bp (Fig. 31)를 RNAi vector인 HANNIBAL vector에 cloning하고 배추 형질전환을 하기 위해 다시 hygromycin을 selection marker로 하는 pCAMBIA 1300에 삽입하였다 즉, sense와 antisense 방향으로 HANNIBAL vector에 클로닝 된 유전자는 *SmaI*과 *SacI*으로 절단한 후 hygromycin을 selection marker로 하는 CAMBIA 1300에 클로닝하였다 (Fig. 32). 유전자의 sense와 antisense 클로닝 확인은 HANNIBAL 벡터와 최종 CAMBIA 벡터에서 enzyme mapping 방법으로 확인하였다 (Fig. 33, 34, 35, 36). 최종 확인된 RNAi vector는 BrCO 유전자의 RNAi 벡터는 pCHC, BrVRN1 유전자의 RNAi 벡터는 pCHV로 명명하였다.



```

AtCO          MLKEESNESGCTWARACDTCRSAACTVYCEADSAYLCTTCDARVHAANRVASRHERVRVCQ 60
BrSjCO       MLKEESNESG-CTRACDTCRSAACTIYREADSTYLCTTCDARVHAAK-----RVRVCD 52
*****      .:*****: * ****:*****: *****:

AtCO          SCESAPAAFCKADAASLCTACDAEIHSAPLARRHQRVPILPLSANSSCSSMAPSETD-- 118
BrSjCO       SCESAPAAFCKADAASLCTACDAEIHSAPLARRHQRVPIT--SNSCGSMATDCDNNV 109
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

AtCO          ---ADNDEDDREVASWLLPNPKNIGNQNNGFLFCVEYLDLVDYSSMDNQFEDNQYTHY 175
BrSjCO       MMVSEEKEDADEVASWLMNPKN--NQNNCFLFCVEYLDLVDYSSIDNQFED-QYSKY 166
: : : * * *****: ***** *****:*****:*****:*****:*****:*****:

AtCO          QRSFGG--DCVVPLQVEES-TSHLQSQNQFLGGINYCFSSCAHYNNNSLRDLNHSASVS 232
BrSjCO       HRSFGCGEDCVVPLQLEESTSHMQSQHNFHLGVNYCYSTEEQYS----- 212
: ***** *****: * * * * * : *****: * * : * * * * * : * * * * * : * * : * * :

AtCO          SMDISVVPESTASDITVQHPRTTKETIDQLSCPPTQVVQQLTPMEREARVLRVREKKTR 292
BrSjCO       --YVSVVPES-LSDTTVQH--AKETIDQVCGPPTQMVQQLTPADREARVLRVREKKRR 266
: ***** * * * * * : *****: *****:*****:*****:*****:*****:

AtCO          KFKDRTIRYASRKAYAEIRPRIKGRFAKRIETEARAEHIFSTSLMSETGYGIVPSF 347
BrSjCO       KFEKTIRYASRKAYAEVRPRIKGRFAKRIDMEADAEQLFSTSVMSNTSYGIVPSF 321
* : *****:*****:*****: * * : * * : * * * * * : * * : * * :

```

Fig. 30. Partial coding region (box region) of BrCO gene was used for RNAi vector construction.

```

BrSjVRN1     MPPRPFHKLIFSSTIQEKRLRVPDKFVSKFDELSVAVALTPDGHVWRVGLRKADNNNK 60
BrKsVRN1     MPPRPFHKLIFSSTIQEKRLRVPDKFVSRFDELSVAVALTPDGHVWRVGLRKADNNNK 60
AtVRN1       MPPRPFHKLIFSSTIQEKRLRVPDKFVSKFDELSVAVALTPDGHVWRVGLRKADN--K 58
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

BrSjVRN1     IWFQDGWQEFVDRYSIRIGYLLIFRYECNSAFSVCIYNLPQSEINYHSTGLMDSASHNNH 120
BrKsVRN1     IWFQDGWQEFVDRYSIRIGYLLIFRYECNSAFSVCIYNLPQSEINYHSTGLMDSASHNNH 120
AtVRN1       IWFQDGWQEFVDRYSIRIGYLLIFRYECNSAFSVYIFNLSHSEINYHSTGLMDSA--HNH 116
*****:*****:*****: * * * * * : *****:*****:*****:*****:*****:

BrSjVRN1     FKRPRLFEDLEDEDAETLHTT-----ASAIQSFFTGPVKPEATPT 161
BrKsVRN1     FKRPRLFEDLEDEDAETLHTT-----ASAIQSFFTGPVKPEATPT 161
AtVRN1       FKRARLFELEDEDAEVIFPSSVYPSPLPESTVPANKGYASSAIQLFTGPKAEPTP- 175
* * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :

BrSjVRN1     QTSKVPKRCRKKKNADHPEEVNSAPRDDDPESRSKFYESASARKCTVMAEERERAVNA 221
BrKsVRN1     QTSKVPKRCRKKKNADHPEEVNSAPRDDDPESRSKFYESASARKRTVMAEERERAVNA 221
AtVRN1       -TPKIPKRCRKKKNAD-PEINSSAPRDDDPENRSKFYESASARKRTVTAEBERERAINA 233
* . : *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

BrSjVRN1     AKTFEPTNPFFRVVLRPSYLYRGCIMYLPSCFAEKYLSCISCFIKVLGEKQVPVRCLYK 281
BrKsVRN1     AKTFEPTNPFFRVVLRPSYLYRGCIMYLPSCFAEKYLSCISCFIKVLGEKQVPVRCLYK 281
AtVRN1       AKTFEPTNPFFRVVLRPSYLYRGCIMYLPSCFAEKYLSCISCFIKVLAEKQVPVRCLYK 293
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

BrSjVRN1     AGRAKFSQGWYEFTVENNLGEGDVCVFELLRTRDFVLKVTAYRVNEYV 329
BrKsVRN1     AGRAKFSQGWYEFTVENNLGEGDVCVFELLRTRDFVLKVTAYRVNEYV 329
AtVRN1       AGRAKFSQGWYEFTLENNLGEGDVCVFELLRTRDFVLKVTAFRVNEYV 341
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:

```

Fig. 31. Partial coding region (box region) of BrVRN1 gene was used for RNAi vector construction.

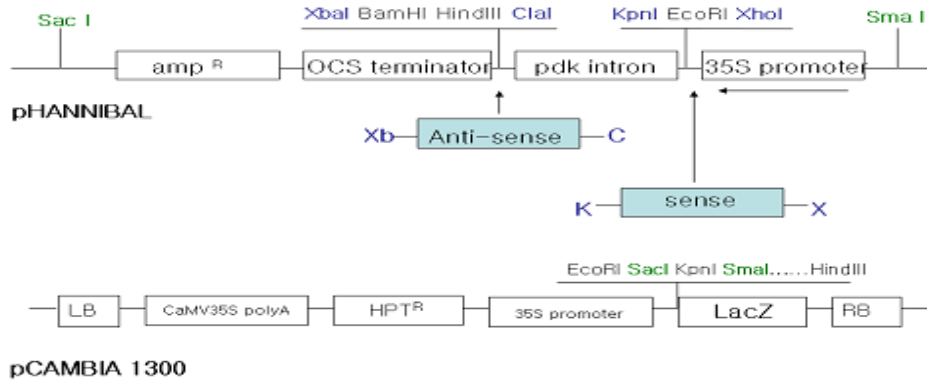


Fig. 32. pHANNIBAL and pCAMBIA 1300 used to construct down-regulation vector (RNAi vector). HANNIBAL +sense and antisense-oriented genes were digested with *Sca*I/*Sma*I and inserted into CAMBIA 1300 digested with same enzymes.

M 1 2 3 4 5 6 M



Fig. 33. Restriction enzyme mapping of HANNIBAL vector with sense- and antisense-oriented BrCO gene. M: 1Kb ladder, 1: Digesting HANNIBAL + sense and antisense CO gene with *Xho*I, 2: Digesting HANNIBAL + sense and antisense CO gene with *Xba*I, 3: Digesting HANNIBAL + sense and antisense CO gene with *Kpn*I, 4: Digesting HANNIBAL + sense and antisense CO gene with *Xho*I/*Kpn*I, 5: Digesting HANNIBAL + sense and antisense CO gene with *Xba*I/*Kpn*I, 6: Digesting HANNIBAL + sense and antisense CO gene with *Xho*I/*Xba*I.



Fig. 34. Restriction enzyme mapping of pCHC vector with HANNIBAL + sense- and antisense-oriented BrCO genes. M: 1Kb ladder, 1: Digesting with *SacI*, 2: Digesting with *SacI/XhoI*, 3: Digesting with *SacI/KpnI*, 4: Digesting with *SacI/ClaI*, 5: Digesting with *SacI/XbaI*, 6: Digesting with *XhoI/KpnI*, 7: Digesting with *XbaI/ClaI*, M:  $\lambda$  DNA digested with *HindIII*.

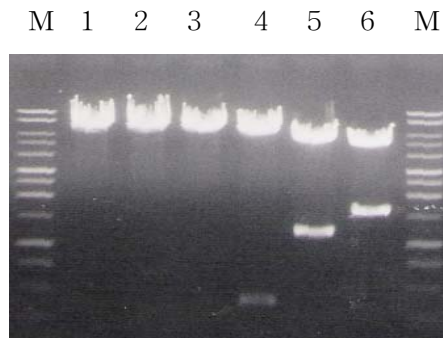


Fig. 35. Restriction enzyme mapping of HANNIBAL vector with sense- and antisense-oriented VRN1 gene. M: 1Kb ladder, 1: Digesting HANNIBAL + sense and antisense VRN1 gene with *XhoI*, 2: Digesting HANNIBAL + sense and antisense VRN1 gene with *XbaI*, 3: Digesting HANNIBAL + sense and antisense VRN1 gene with *KpnI*, 4: Digesting HANNIBAL + sense and antisense VRN1 gene with *XhoI/KpnI*, 5: Digesting HANNIBAL + sense and antisense VRN1 gene with *XbaI/KpnI*, 6: Digesting HANNIBAL + sense and antisense VRN1 gene with *XhoI/XbaI*.

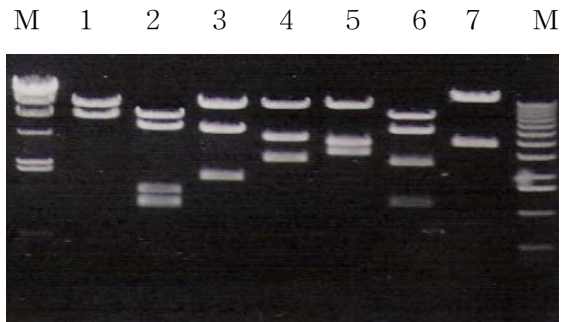


Fig. 36. Restriction enzyme mapping of pCHV vector with HANNIBAL + sense- and antisense-oriented VRN1 gene. M:  $\lambda$  DNA digested with *HindIII*, 1: Digesting pCHV with *SacI*, 2: Digesting pCHV with *SacI/XhoI*, 3: Digesting pCHV with *SacI/KpnI*, 4: Digesting pCHV with *SacI/ClaI*, 5: Digesting pCHV with *SacI/XbaI*, 6: Digesting pCHV with *XhoI/KpnI*, 7: Digesting pCHV with *XbaI/ClaI*, M: 1Kb ladder.

#### 다. 개화시기조절 유전자가 도입된 형질전환체 생산 및 분석

##### 1) BrFLC 과발현 형질전환체 생산 및 분석

###### 가) 애기장대 형질전환체 생산 및 분석

애기장대 형질전환을 위해 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자를 포함하고 있는 pBrFLC1, pBrFLC2, pBrFLC3 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101에 도입한 후 애기장대 꽃에 *Agrobacterium*을 spray하여 애기장대에 도입하였다. 형질전환에 사용된 애기장대 ecotype으로는 FLC 유전자 발현량이 낮은 Columbia type과 FLC 유전자 발현이 존재하지 않는 Landsberg erecta, *FRIflc* mutant를 사용하였다. 형질전환 후 종자를 수확하여 체초제 저항성으로 형질전환체 (T1 세대)를 선별하여 각각의 BrFLC의 기능을 검증하기 위하여 애기장대의 꽃눈이 보일 때까지의 엽수와 날짜를 기준으로 개화시기를 조사하였다 (Table 7). 비형질전환체 애기장대 식물체에서 Columbia는 엽수가 8-12장, Landsberg는 7-8장, *FRIflc* mutant는 8-12장 일 때 꽃눈이 보였다. BrFLC1 유전자가 도입된 애기장대 Columbia는 rosette 잎의 수가  $29 \pm 0.6$  (means $\pm$ SE)일 때 꽃눈이 보이기 시작하여 개화시기가 wild type에 비해 늦어졌다. BrFLC2 유전자가 도입되었을 경우에는 Columbia  $53 \pm 24.1$ , Landsberg  $28 \pm 7.4$ , *FRIflc* mutant  $33 \pm 9.5$ 의 rosette 잎 수가 되었을 때 꽃눈이 보였다. BrFLC3 유전자가 도입된 애기장대 형질전환체에서는 rosette 잎 수가 Columbia  $36 \pm 17.7$ , Landsberg  $28 \pm 10.9$ , *FRIflc* mutant  $47 \pm 22.7$ 일 때 꽃눈이 보였다 (Table 7). 이러한 결과로 볼 때 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 모두 개화시기조절과 관련한 기능을 한다는 것을 알 수 있었으며 과발현시 개화시기가 현저히 늦어지는 것을 알 수 있었다 (Fig. 37). BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 모두 개화시기를 늦추는 효과를 보였으나 BrFLC2와 BrFLC3가 BrFLC1보다 개화지연 특성을 더 나타내었다. 형질전환체들 중에서 개화시기가 지연된 형질전환체 비율은 BrFLC1은 31%, BrFLC2는 32-50%, BrFLC3는 38-73% 정도로 분석되었고 BrFLC2와 BrFLC3가 도입된 형질전환체에서 엽수가 많은 것을 알 수 있었다.

Table 7. Flowering time of *Arabidopsis* plants (T<sub>1</sub>) transformed with BrFLC1, BrFLC2, and BrFLC3 genes, respectively.

<i>BrFLC</i> genes	<i>Arabidopsis</i> plants	No. of T <sub>1</sub> transformants showing late-flowering/total transformants (%)	No. of rosette leaf in late-flowering transformants	Days to visible flower bud in late-flowering transformants
<i>35S::BrFLC1</i> (pBrFLC1)	Columbia	6/19(31%)	14-48(29 ±0.6) <sup>a</sup>	31-53(39 ±6.9) <sup>a</sup>
<i>35S::BrFLC2</i> (pBrFLC2)	Columbia Landsberg <i>FRI flc</i>	12/49(32%) 5/10(50%) 21/40(53%)	14-121(53 ±24.1) 14-36(28±7.4) 14-82(33 ±9.5)	26-→60 <sup>b</sup> 31-→60 28-→60
<i>35S::BrFLC3</i> (pBrFLC3)	Columbia Landsberg <i>FRI flc</i>	10/26(38%) 11/15(73%) 6/13(46%)	14-89(36 ±17.7) 12-59(28±10.9) 14-82(47 ±22.7)	32-45(39±8.3) 30-50(40±3.6) 25-46(38 ±6.7)
No gene inserted	Columbia Landsberg <i>FRI flc</i>		8-12(10 ±0.8) 7-8(7.8±0.2) 8-12(10 ±0.8)	19-31(21 ±1.4) 17-18(17±0.2) 20-21(21 ±0.6)

<sup>a</sup>(parentheses): The range of values obtained by mean ±SE with 96% confidence limits.

<sup>b</sup>Some plants did not flower during experiment.



Fig. 37. Effects of BrFLC overexpression on the flowering times of transgenic *Arabidopsis thaliana* Columbia-ecotype lines.

BrFLC 유전자가 개화시기에 영향을 주는지를 northern 분석을 통하여 확인하였다. 분석 결과 개화시기가 가장 늦게 관찰되는 형질전환체에서 FLC 발현양이 가장 높았으며 반면 형질전환체 중에서도 FLC가 거의 발현되지 않은 형질전환체의 개화시기는 비형질전환체와 비슷하였다 (Fig. 38). 이러한 결과는 FLC 발현양과 개화시기와의 정관계를 나타낸다고 할 수 있다. T1에서 개화시기가 늦어진 개체들로부터 다시 수확하여 얻은 T2 식물체들은 거의 개화시기가 늦는 표현형을 나타내었으며 일부 개체는 resette 잎 수가 252장 일 때 개화가 되었다.

형질전환체에서 유전자 copy수를 알아보기 위하여 genomic DNA를 *HindIII* 로 digestion 한 후 bar 유전자를 탐침으로 하여 Southern 분석을 한 결과 유전자가 1 copy부터 8, 9 copy 까지 도입된 것을 알 수 있었고 대체로 1-3 copy로 도입된 형질전환체에서 FLC 유전자 발현 효과가 있었으며 high copy (>5 copy)로 도입된 형질전환체에서는 FLC 유전자 발현이 되지 않는 silencing 현상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 39).



Fig. 38. Northern blot analysis of *FRIfLC* Arabidopsis transgenic plants transformed with BrFLC2 (A) or BrFLC3 (B). Ut, nontransgenic plant. (A) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, and 10 correspond to transgenic plants with 82, 79, 72, 48, 33, 36, 34, 28, 9, and 10 rosette leaves, respectively. (B) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9 correspond to transgenic plants with 82, 71, 51, 46, 16, 14, 11, 10, and 10 rosette leaves, respectively.

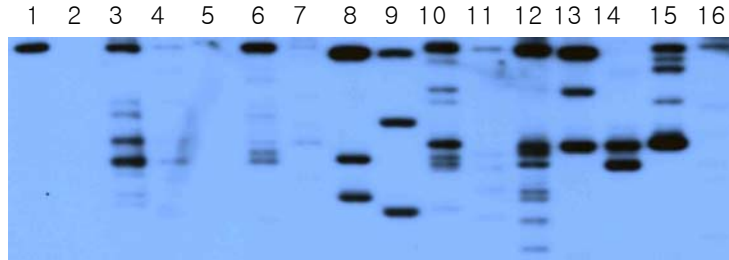


Fig. 39. Southern hybridization of *FRIfc* *Arabidopsis* transgenic plants transformed with *BrFLC2* gene. Total DNA (1  $\mu$ g) was digested with *HindIII* and hybridized with bar gene as a probe. Lane 1: pBrFLC2 plasmid, lane 2: untransformed plant, lane 3, 4, 6, 7, 10, 12 and 15: transgenic plants with 13, 9, 9, 10, 9, 10 and 9 leaf number respectively. Lane 5, 8, 9, 11, 13, 14 and 16: transgenic plants with 72, 15, 82, 43, 19, 33 and 27 leaf number, respectively.

#### 나) 배추 형질전환체 생산 및 분석

##### (1) BrFLC 유전자 과발현 배추 형질전환체 생산 및 유전자 도입 확인

배추로부터 분리한 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자가 각각 도입되어 제작된 형질전환 벡터 pFLC1, pFLC2, pFLC3을 운반하는 *Agrobacterium* LBA4404를 이용하여 형질전환을 실시하였다. 배추 형질전환체 생산시 빠른 시일 내에 신품종을 육성하기 위해서는 종자생산에 직접 사용되는 배추의 inbred line에 유용한 유전자를 도입시키는 것이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 동부한농(주) 육종연구소에서 제공한 inbred line DA001을 이용하였으며 기내에서 발아된 배추를 형질전환을 위한 절편체로 사용하였다. 또한 배추 품종 중에서 비교적 형질전환 효율이 높고 재분화 기간도 짧은 삼진과 권심을 형질전환에 사용하였는데 이 경우에는 애기장대 형질전환체에서 개화시기를 늦추는데 가장 효과적으로 나타난 BrFLC3 유전자를 도입하였다. *A. tumefaciens*에 의해 형질전환되어 5.0 mg/L BA, 1.0 mg/L NAA, 10mg/L hygromycin 및 cefotaxim 200mg/L가 포함되어 있는 선발 배지에 치상되었던 배추에서 약 4주의 배양 후에 절편체 끝부분에 callus가 발생하였으며, 8-10주 후에 shoot가 유도되었다. 이렇게 유도된 shoot를 1/2 MS 기본배지에 10mg/L hygromycin, 200mg/L cefotaxim이 첨가된 발근배지로 옮겨 뿌리를 유기하였다 (Fig. 40). 뿌리가 유기된 형질전환체는 순화단계를 거쳐 온실에서 재배되었다 (Fig. 41)..



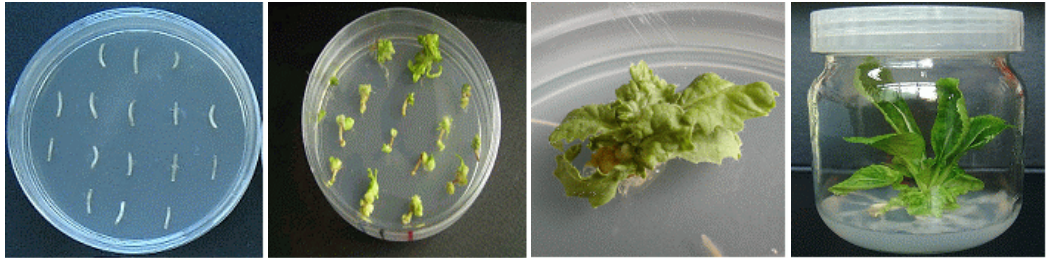


Fig. 40. Regeneration of Chinese cabbage transgenic Chinese cabbage plants from hypocotyls transformed with BrFLC genes.



Fig. 41 Growth of Chinese cabbage transgenic Chinese cabbage plants in the green house.

애기장대 형질전환체에서 개화시기를 늦추는데 가장 효과적으로 나타난 BrFLC3 유전자를 삼진과 권심 배추에 도입하여 총 36개체의 독립된 형질전환체를 얻었으나 이 중에서 권심 7 개체, 삼진 10 개체로부터 후대 종자를 획득하였고 이들 종자로부터 형질전환체를 선발하여 유전자 도입 및 개화시기를 분석하였다. BrFLC3 유전자의 배추 계놈으로의 도입은 하이그로마이신 hpt 유전자를 탐침으로 Southern 분석하여 본 결과 1 - 3 copy의 유전자가 도입되었음이 확인되었다 (Fig. 42).

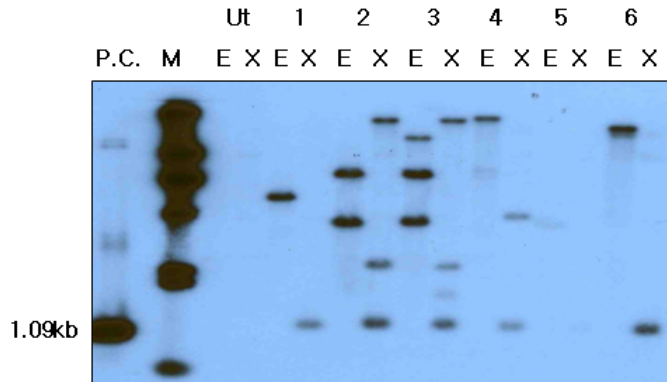


Fig. 42. Southern blot analysis of transgenic lines of *B. rapa* L. ssp. *pekinensis* cv. 'Samjin.' Genomic DNA (10  $\mu$ g) was digested with *Eco*RI or *Xho*I. The  $^{32}$ P-labeled hpt gene was used as a probe. P.C., positive control (plasmid); M, *Hind*III marker; E, *Eco*RI X, *Xho*I Ut, nontransgenic plant. 1, 2, 3, 4, 5, and 6 correspond to the transgenic Chinese cabbage 'Samjin'.

배추 inbred line DA001에는 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자를 각각 도입하여 총 31 개체의 형질전환체를 획득하여 하이그로마이신을 이용한 genomic PCR로 유전자 도입을 확인하였다 (Fig. 43).

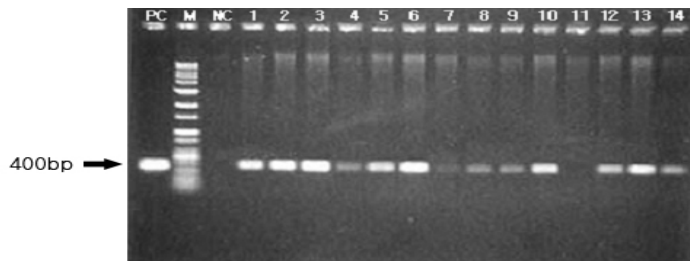


Fig. 43. Confirmation of hygromycin gene by PCR in transgenic Chinese cabbage inbred line transformed with BrFLC3.

(2) 배추 형질전환체 개화시기 분석

배추에서 개화시기는 꽃눈이 있는 꽃대가 나타나면서 위로 자라는 때 (추

대, bolting)까지 소요되는 기간으로 하여 개화시기를 조사하였다. 개화에 필요한 vernalization 기간이 비교적 짧은 권심 배추는 10일 동안의 vernalization 후 24 일째 추대가 일어난다. BrFLC3 유전자가 도입된 T1 세대의 권심 배추 19개체에 대해서 개화시기를 조사하여 본 결과 같은 조건에서 14개체가 10일 동안의 vernalization 후 25일 - 60일 되어서 추대가 이루어졌다. 즉 개화시기가 비형질전환체 보다 1일 - 36 일 정도 늦어졌다는 것을 알 수 있었다. 5개체는 비형질전환체보다 개화시기가 오히려 빨라진 것으로 나타났다 (Fig. 44 A, Fig. 45). 삼진 배추의 경우 개화에 필요한 저온처리 기간은 권심보다 길며 적어도 20일 이상을 필요로 한다. 20일 동안의 vernalization 후 24일 - 32일 되어서 추대가 된다. BrFLC3 유전자가 도입된 T1 세대 삼진배추를 20일 저온처리 후 추대가 될 때까지 소요되는 시간을 조사한 결과 30 개체 중에서 27 개체가 33일 - 70일이 되어서 추대가 되었으며 이는 비형질전환체 삼진 배추보다 개화시기가 3일 - 40일 늦어진다는 것을 의미한다. 3개체는 비형질전환체보다 개화시기가 더 빨라졌다 (Fig. 44B). 저온처리 기간을 30일로 하면 추대에 소요되는 기간이 현저히 감소된다. 그러나 11개체는 비형질전환체보다 개화시기가 늦어지는 것으로 나타났다 (Fig. 44 C). 이러한 결과로 볼 때 저온처리와 상관없이 항상성으로 발현되는 BrFLC 유전자가 배추의 개화시기를 어느 정도 늦추는데에 효과가 있다는 것을 알 수 있다. 그러나 저온처리 기간이 길어짐에 따라 이러한 BrFLC 유전자 과발현 효과가 감소하는 것으로 보아 또 다른 경로로 개화를 유도하는 것으로 사료된다.

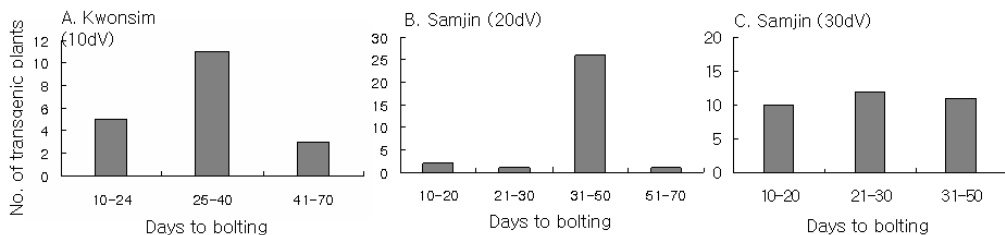


Fig. 44. Flowering-time phenotypes of T1 transgenic Chinese cabbage (*B. rapa* L. ssp. *pekinensis*) plants after cold treatment (4°C). (A) Transgenic 'Kwonsim' plants were vernalized for 10 days. Transgenic 'Samjin' plants were vernalized for 20 days (B) or 30 days (C).

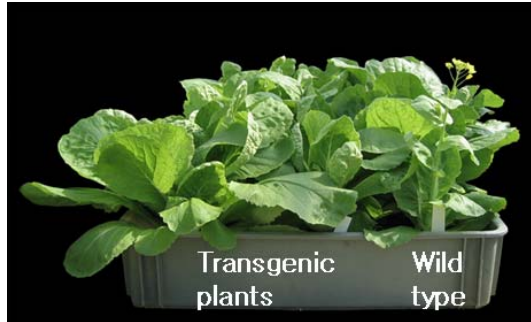


Fig. 45. Flowering-time phenotypes of transgenic Chinese cabbage (*B. rapa* L. ssp. *pekinensis* cv. 'Kwonsim') after ten days of exposure to cold (4°C).

FLC 유전자에 의해서 조절을 받는 AGL20 유전자의 발현을 semi-quantitative RT-PCR로 조사하였다. 비형질전환체에서 FLC 유전자 발현은 저온처리전에는 높았다가 저온처리 기간이 길어짐에 따라서 감소하였고 AGL20은 반대로 저온처리 기간이 길어지면서 발현양이 증가하였다 (Fig. 46). 35S::BrFLC3 유전자로 형질전환되어 개화시기가 늦어진 삼진배추 (SJ-19와 SJ-33)에서 BrFLC 유전자 발현은 저온처리와 상관없이 높은 발현양을 나타냈고 AGL20 유전자는 저온처리 기간이 길어짐에 따라 발현양이 증가하였으나 비형질전환체보다는 발현양이 낮았다 (Fig. 46). 이러한 결과는 저온처리 기간이 30일로 길어졌을 때 개화시기가 저온처리 20일 보다 더 빨라지는 결과 (Fig. 44)와 일치하였다.

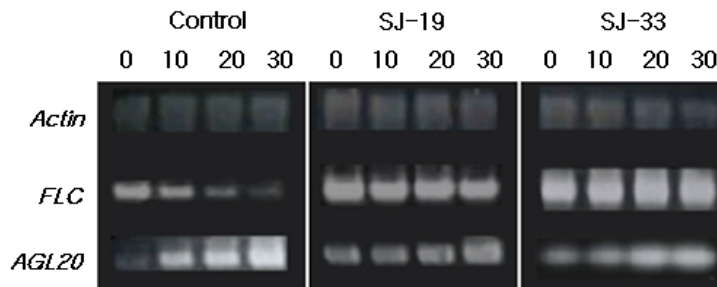


Fig. 46. RT-PCR analysis of levels of the BrFLC3 transcript in transgenic Chinese cabbage 'Samjin' plants. Wild-type and transgenic plants were exposed to cold (4°C) for 10, 20, or 30 days.

BrFLC 유전자가 도입된 inbred line 0001 형질전환체 총 68개체 (BrFLC1 10개체, BrFLC2 1개체, BrFLC3 57개체)를 획득하였고 FLC 유전자 발현과 개화시기를 분석하였다. 그 결과 비형질전환체 배추에서 FLC 유전자들은 저온에서 감소되는 특성을 보이지만 BrFLC 과발현 형질전환체에서는 저온 20일 후에도 35S promoter에 의해 각각의 BrFLC 유전자들의 발현이 지속되는 것을 관찰 할 수 있었고 형질전환체 대부분에서 control에 비해 개화가 지연되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 47). 비형질전환체의 경우 저온처리 40일 후 상온에서 42일 동안 성장하였을 때 개화를 하였다. BrFLC3 과발현 형질전환체 57개체를 획득하였고 30개체가 비형질전환체와 비슷한 시기에 또는 빨리 개화하였으며 27개체가 1-36일 가량 지연되었다. BrFLC1 과발현 형질전환체에서 1, 2, 3, 4번 형질전환체는 개화하는데 각각 47, 53, 50, 55일이 소요 되었으며 7, 9번 형질전환체는 저온처리 후 현재까지 개화가 되지 않았으며 개화 조사 중에 있다 (Fig. 48).

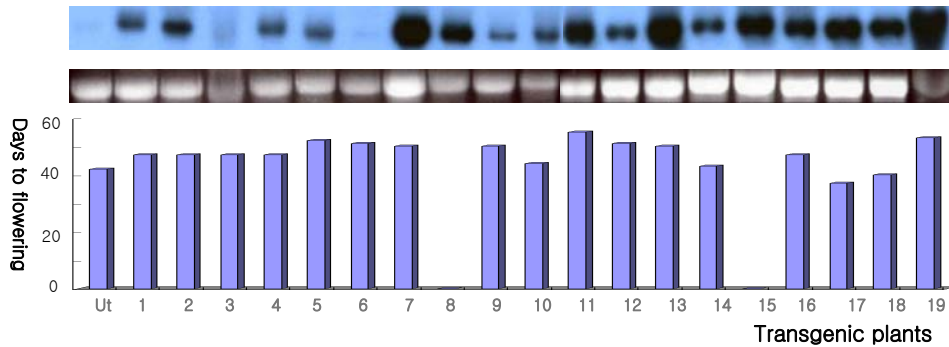


Fig. 47. Flowering time phenotype in transgenic Chinese cabbage inbred line DA001 showing BrFLC3 overexpression. Ut: nontransgenic plant, 1-19: transgenic plants.

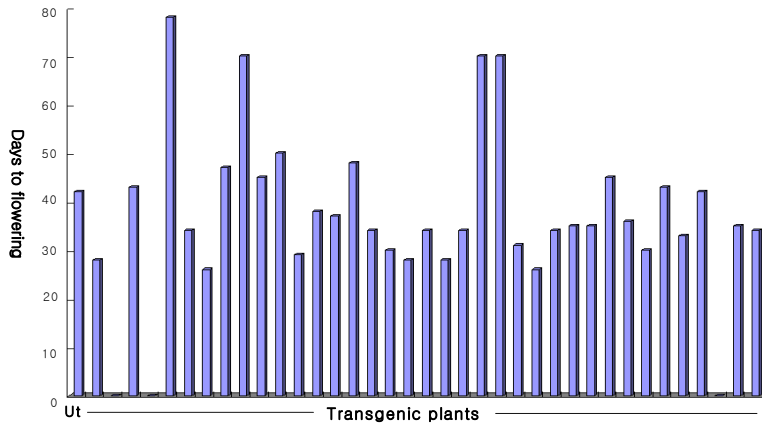


Fig. 48. Flowering time phenotype in transgenic Chinese cabbage inbred line DA001 showing BrFLC3 overexpression. Ut: nontransgenic plant.

BrFLC 유전자가 도입된 inbred line DA001 형질전환체 현재의 상태는 표 8과 같다 (Table 8).

Table. 8. BrFLC 과발현 벡터가 도입된 배추 inbred line DA001 형질전환체 현황

유전자	재배중인 배추 형질전환체 수	현재 형질전환체 현황
BrFLC1	10	종자수확 중 : 6 개화 및 성장 중 : 4
BrFLC2	1	종자수확 중 : 1
BrFLC3	57	종자수확 중: 26 개화 및 성장 중 : 31

## 2) BrCO RNAi 벡터를 이용한 배추 형질전환체 생산 및 분석

CO 유전자 발현이 억제되는 배추를 획득하기 위해 pCHC 벡터를 *Agrobacterium* LBA4404를 이용하여 동부 inbred line에 형질전환 하였다. 총 35개의 형질전환체를 얻었으며 17개체가 종자 수확 중이거나 개화 조사가 완료된 상태이며 18개체는 개화 조사 중이다 (Table 9). Genomic DNA를 *Clai*으로 digestion 한 후 hpt 유전자를 탐침으로 하여 Southern 분석을 한 결과 대체로 1-3 copy로 도입된 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 49)

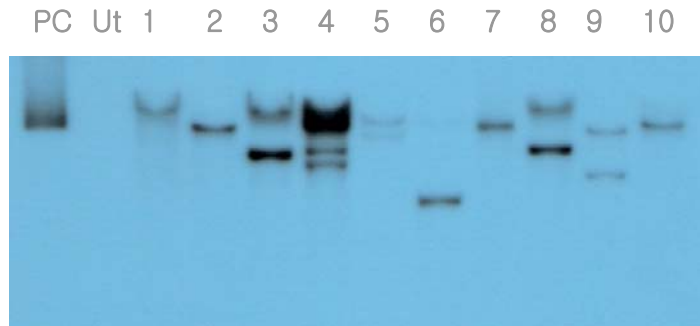


Fig. 49. Southern blot analysis of transgenic Chinese cabbage inbred line transformed with pCHC (BrCO RNAi) vector. PC: positive control plasmid, Ut: nontransgenic plant. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 : transgenic plants.

BrCO RNAi 벡터에 의해 CO 유전자가 억제 되는 것을 확인하기 위해 T0 형질전환체에서 BrCO 유전자 탐침을 이용하여 northern 분석을 하였다. CO 유전자가 가장 많이 발현하는 밤시간 (24시)에 잎을 채취하여 CO 유전자의 발현량을 조사하였다. 비형질전환체에 비해 CO 발현이 감소된 형질전환체 2번 개체에서 개화시기가 지연된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 50). BrCO RNAi 형질전환체들은 재분화되어 나온 시기가 다른 관계로 총 35개의 형질전환체 중에서 6개체는 저온 40일 후 20일 이상 온실에서 가온 재배되었다. 이 경우에 비형질전환체는 저온 처리 후 3일후 꽃눈이 분화하여 기부에서 꽃봉오리가 관찰되었으며 12일 후에 개화 하였다. (Fig. 50). 또 다른 일부 형질전환체는 40일 저온처리 후 10일간 온실에서 성장한 후 노지 하우스에 이식되어 재배되었는데 이 경우 비형질전환체의 평균 개화 일수는 42일이었으

며 형질전환체의 개화는 2-16일 정도 지연되는 것을 관찰 할 수 있었다.

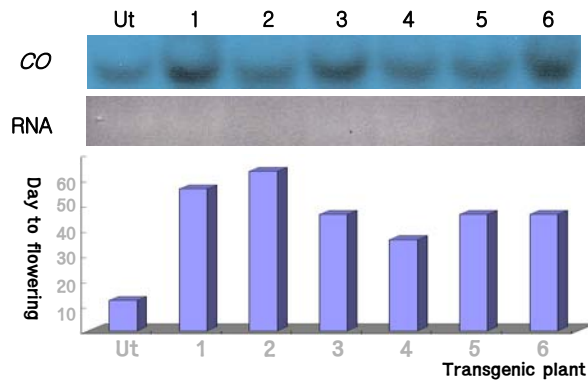


Fig. 50. Northern blot hybridization and flowering phenotype of transgenic Chinese cabbage inbred line plants transformed with BrCO RNAi gene. Ut: nontransgenic plant, 1 - 6: transgenic plants.

Table. 9. BrCO RNAi 벡터가 도입된 배추 inbred line DA001 형질전환체 현황

유전자	재배중인 배추 형질전환체 수	현재 형질전환체 현황
BrCO RNAi	35	종자수확 중 : 17 개화 및 성장 중 : 18



### 3) BrVRN1 RNAi 벡터를 이용한 배추 형질전환체 생산 및 분석

BrVRN1 RNAi 유전자를 포함하고 있는 pCHV 벡터를 *Agrobacterium* LBA4404를 이용하여 동부 inbred line에 형질전환 하였고 총 39개의 형질전환체를 얻었다. 현재 33개의 형질전환체가 교배 후 종자 수확 중이거나 개화 조사가 완료된 상태이며 6개는 개화 조사 중이다 (Table 10). Genomic DNA를 *Clai*으로 digestion 한 후 hpt 유전자를 탐침으로 하여 Southern 분석을 한 결과 대체로 1-3 copy로 도입된 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 51).

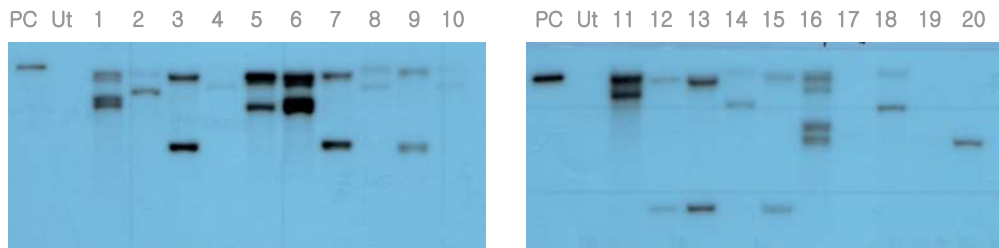


Fig. 51. Southern blot analysis of transgenic Chinese cabbage inbred line transformed with pCHV (BrVRN1 RNAi) vector. PC: positive control plasmid, Ut: nontransgenic plant. 1 - 20 : transgenic plants.

저온처리 기간 (vernalization) 중에 VRN 유전자는 발현양이 증가하여 FLC 유전자의 chromosome 상태를 heterochromatin 상태로 유지하게 하여 FLC 유전자의 transcription이 이루어지지 않게 한다. 이렇게 FLC 유전자 발현이 되지 않으면 개화를 유도하는 AGL20 유전자 발현이 일어나게 되어 저온처리 후에 개화가 유도된다. 비형질전환체와 형질전환체를 저온처리 20일 후 VRN, FLC, AGL20 유전자를 탐침으로 하여 northern 분석을 하였다 (Fig. 52). 그 결과 비형질전환체에서는 정상적으로 VRN 유전자 발현이 높았고 FLC 유전자는 발현하지 않았으며 개화유도와 관련한 AGL20 유전자가 발현되는 것을 알 수 있었다. 그러나 BrVRN RNAi 유전자가 도입된 형질전환체에서는 VRN 유전자 발현이 감소하였으며 FLC 유전자가 발현되었고 AGL20 유전자의 발현도 억제된 것을 알 수 있었다. 14개의 형질전환체에서 VRN1 유전자가 control에 비하여 감소했거나 비슷한 경향을 보였으며 VRN1 유전자 발현의 감소로 인하여 저온에서 FLC 발현을 보이는 개체들을 관찰 할 수 있었다.

또한 저온 처리 중에 FLC의 감소에 의해 증가하는 하위 유전자 AGL20을 분석했을 때 FLC 유전자 발현으로 AGL20 발현이 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 저온 40일 처리 후 20일간 온실에서 가온하여 재배한 비형질전환체는 평균 20일 전후에 개화하였다. 저온 20일에서 FLC 유전자 발현을 보이면서 AGL20 유전자가 억제된 대부분의 형질전환체에서 개화 시기가 늦어지는 경향을 볼 수 있었다 (Fig. 52).

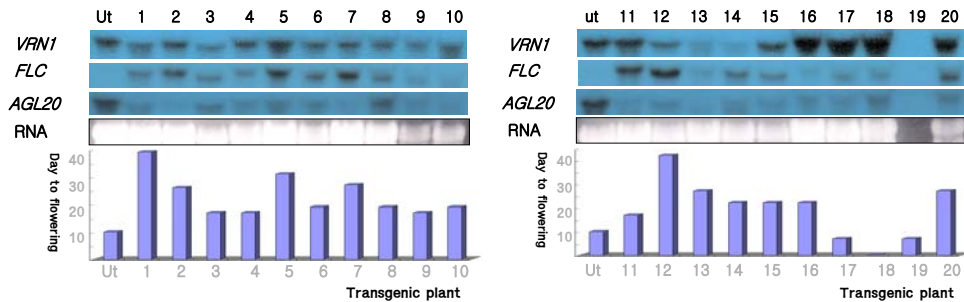


Fig. 52. Northern blot hybridization and flowering phenotype of transgenic Chinese cabbage inbred line plants transformed with VRN RNAi gene. Ut: nontransgenic plant, 1 - 20: transgenic plants.

Table. 10. BrVRN RNAi 벡터가 도입된 배추 inbred line DA001 형질전환체 현황

유전자	재배중인 배추 형질전환체 수	현재 형질전환체 현황
BrVRN RNAi	39	종자수확 중 : 33 개화 및 성장 중 : 6

#### 4) BrFLC 과발현과 BrCO RNAi 벡터를 이용한 배추 형질전환체 생산 및 분석

개화를 조절하는 두 유전자를 동시에 도입시키기 위하여 BrFLC 과발현 벡터와 BrCO RNAi 벡터를 배추 inbred line DA001에 co-transformation을 하였다. 형질전환체는 하이그로마이신과 제초제 ppt가 첨가된 배지에서 선발하였으며 형질전환 효율 (치상된 explant 당 최종 shoot 형성율)은 2-3%로 나타났다. CO 유전자 발현량이 가장 높은 24시에 배추 잎으로부터 RNA를 분리하여 northern 분석을 하여 본 결과 CO 발현량이 크게 감소하지는 않았으나 개화시기가 지연되는 것을 알 수 있었다. 이 효과는 FLC 유전자 발현도 원인이 될 수 있을 것으로 생각된다 (Fig. 53, 54). 모두 121개체의 형질전환체를 획득하였고 (Table 11) 이 중에서 100개체의 개화조사가 진행 중이며 control과 비교하여 볼 때 36개의 형질전환체가 control 보다 일찍 개화하였고 48개가 control 보다 늦게 개화 하였다 (Fig. 55). 이들 형질전환체에서 유전자 발현 분석은 FLC 와 CO 유전자, 하위의 AGL20과 FT 유전자 발현양도 확인하여야 할 것으로 사료되고 앞으로 진행할 예정이다.

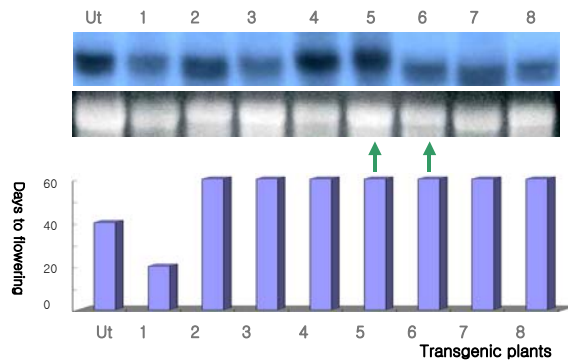


Fig. 53. Northern blot hybridization and flowering phenotype of transgenic Chinese cabbage inbred line plants transformed with BrFLC and BrCO RNAi genes. Ut: nontransgenic plant, 1 - 8: transgenic plants. Arrow: transformants did not flower during experiment.



Transgenic plants CON — Transgenic plants —

Fig. 54. Flowering phenotype of transgenic Chinese cabbage inbred line plants transformed with BrFLC and BrCO RNAi genes in the field.

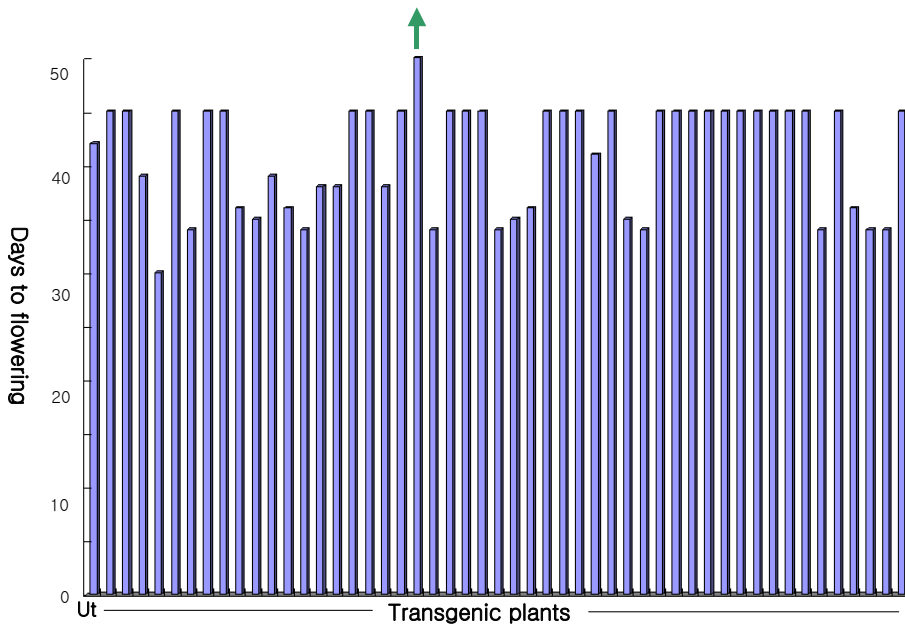


Fig. 55. Flowering phenotype of transgenic Chinese cabbage inbred line plants transformed with BrFLC and BrCO RNAi genes. Ut: nontransgenic plant. Arrow: transformant did not flower during experiment.

Table. 11. BrFLC 과발현 벡터와 BrCO RNAi 벡터가 도입된 배추 inbred line DA001 형질전환체 현황

유전자	재배중인 배추 형질전환체 수	현재 형질전환체 현황
BrFLC1+ BrCO RNAi	4	종자수확 중 : 4 개화 및 성장 중 :
BrFLC3+ BrCO RNAi	121	종자수확 중 : 49 개화 및 성장 중 : 72

5) BrFLC 과발현과 BrVRN1 RNAi 벡터를 이용한 배추 형질전환체 생산 및 분석

효과적으로 개화를 조절하고자 FLC3 과발현된 벡터와 VRN1 유전자를 억제시키는 RNAi 벡터를 co-transformation으로 배추 inbred line DA001에 형질전환하였다. 총 130 개체의 형질전환체를 획득하였고 현재의 상태는 표 12와 같다. 평균 42일에 개화하는 control과 비교하여 볼 때 34개의 형질전환체가 control 보다 일찍 개화하였고 36개가 늦게 개화하였다 (Fig. 56). 형질전환체에 대해서 VRN과 AGL20 유전자 발현양을 분석할 예정이다.

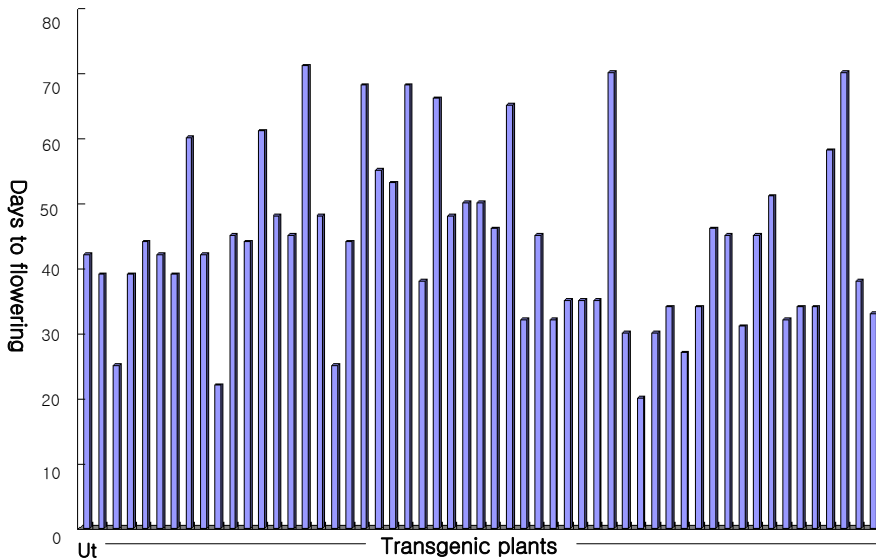


Fig. 56. Flowering phenotype of transgenic Chinese cabbage inbred line plants transformed with BrFLC and BrVRN RNAi genes. Ut: nontransgenic plant.

Table. 12. BrFLC 과발현 벡터와 BrVRN RNAi 벡터가 도입된 배추 inbred line DA001 형질전환체 현황

유전자	재배중인 배추 형질전환체 수	현재 형질전환체 현황
BrFLC1+ BrVRN RNAi	7	종자수확 중 : 7 개화 및 성장 중 :
BrFLC3+ BrVRN RNAi	123	종자수확 중 : 70 개화 및 성장 중 : 53

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연구 목표달성도

본 과제의 연구목표와 목표 달성도를 아래 표에 나타내었다.

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
○ 개화시기조절 관련 유전자 분리 - 배추 FLC, CO, VRN1 유전자	○ 배추로부터 BrFLC1, BrFLC2, BrFLC3 유전자 분리 및 유전자 등록 ○ 배추로부터 BrCO 유전자 분리 및 애기장대 유전자와 비교 분석 ○ 배추로부터 BrVRN1 유전자 분리 및 애기장대 유전자와 비교 분석	100
○ 분리된 유전자의 발현 양상 분석 - 배추에서 BrFLC, BrCO, BrVRN1 유전자의 발현 양상 분석	○ 개화시기가 다른 조추대, 중추대, 만추대 배추에서 BrFLC1, 2, 3 유전자발현 분석 ○ 저온처리 전, 후와 저온처리 기간에 따른 BrFLC와 AGL20 유전자 발현분석 ○ 배추 조직부위에 따른 BrFLC 유전자 발현 분석 ○ 배추 잎에서 BrCO 유전자 발현 양상 분석: circadian clock과 하루주기로 발현 함 ○ BrVRN1은 저온처리 전 후에도 모두 발현하나 저온처리 기간 동안에는 발현 양이 높아짐	100
○ 식물 형질전환용 벡터작성 - BrFLC 과발현 벡터 작성 - BrCO RNAi, BrVRN1 RNAi 유전자 발현 억제 벡터 작성	○ BrFLC 과발현 벡터 작성 - 애기장대 형질전환을 위해서 선발 마커로 제초제 저항성 유전자를 포함하는 BrFLC1, 2, 3 과발현 벡터 작성 - 배추 형질전환을 위해서 선발마커로 하이그로마이신을 포함하는 BrFLC1, 2, 3 과발현 벡터 작성 ○ pHANNIBAL과 pCAMBIA 벡터를 이용한 하이그로마이신 선발마커를 갖는 BrCO RNAi와 BrVRN1 RNAi 벡터 작성	100

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
<p>○ 배추 형질전환체 획득 및 유전자 도입 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- BrFLC 과발현 벡터로 배추 및 애기장대 형질전환</li> <li>- BrCO RNAi 벡터로 배추 형질전환</li> <li>- BrVRN1 RNAi 벡터로 배추 형질전환</li> <li>- BrFLC 과발현 벡터와 BrCO RNAi 벡터로 동시에 배추 형질전환</li> <li>- BrFLC 과발현 벡터와 BrVRN1 RNAi 벡터로 동시에 배추 형질전환</li> </ul>	<p>○ BrFLC1, 2, 3 유전자 과발현 애기장대 형질전환체 획득, 제초제 처리로 형질전환체 선발 및 호모계통 육성</p> <p>○ BrFLC1, 2, 3, 과발현 벡터가 도입된 배추 inbred line 형질전환체 68개체 획득 후 genomic PCR과 Southern 분석으로 유전자 도입 확인</p> <p>○ BrFLC3 과발현 벡터가 도입된 배추 삼진 10 계통과 권심 7 계통 형질전환체 획득 및 T1 종자 획득</p> <p>○ BrCO RNAi 벡터가 도입된 배추 inbred line 형질전환체 35개체 획득 및 Southern 분석으로 유전자 도입 확인</p> <p>○ BrVRN1 RNAi 벡터가 도입된 배추 inbred line 형질전환체 39개체 획득 및 Southern 분석으로 유전자 도입 확인</p> <p>○ BrFLC와 BrCO RNAi 벡터로 co-transformation한 배추 형질전환체 125 개체 획득 및 bar strip으로 유전자 도입 확인</p> <p>○ BrFLC와 BrVRN1 RNAi 벡터로 co-transformation한 배추 형질전환체 130 개체 획득 및 bar strip으로 유전자 도입 확인</p>	100
<p>○ 배추 형질전환체에서 개화시기조절 유전자 발현 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 형질전환체에서 개화시기조절관련 유전자 발현 분석</li> </ul>	<p>○ BrFLC 과발현 유전자가 도입된 애기장대 형질전환체 :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 형질전환체 (Landsberg, <i>FRIfc</i> mutant)에서 FLC 유전자 northern 분석으로 유전자 발현 확인</li> </ul> <p>○ BrFLC3 유전자가 과발현된 삼진과 권심 형질전환 배추 :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 저온처리기간 동안 35S 프로모터의 효과로 유전자가 발현됨을 northern 분석으로 확인</li> </ul>	100



목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
<p>○ 배추 형질전환체에서 개화 시기조절 관련 유전자 발현 분석</p> <p>- 형질전환체에서 개화시기 조절관련 유전자 발현 분석</p>	<p>- FLC 유전자에 의해 발현이 조절되는 AGL20 유전자 발현 분석</p> <p>○ BrFLC 유전자가 과발현된 inbred line 배추 형질전환체 :</p> <p>- 저온처리 기간 동안 35S 프로모터의 효과로 FLC 유전자가 발현됨을 northern 분석으로 확인</p> <p>○ BrCO RNAi 유전자가 도입된 inbred line 배추 형질전환체 :</p> <p>- CO 유전자 northern 분석으로 유전자의 발현 확인</p> <p>○ BrVRN RNAi 유전자가 도입된 inbred line 배추 형질전환체 :</p> <p>- 저온처리 중에 VRN 발현이 줄어든 개체에서 FLC 유전자 발현이 되고 AGL20 발현은 감소함</p> <p>○ BrFLC 과발현 벡터와 BrCO RNAi, BrVRN1 RNAi 벡터가 동시에 도입된 inbred line 배추 형질전환체 :</p> <p>- FLC, CO, VRN, AGL20 유전자로 유전자 발현양 확인</p>	<p>100</p>

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
<p>○ 개화시기가 조절된 형질전환 배추 획득</p> <p>- 배추 형질전환체를 vernalization 후 개화시기를 조사하여 비형질전환체보다 개화시기가 지연된 배추 획득</p>	<p>○ BrFLC 과발현 유전자가 도입된 애기장대 형질전환체 :</p> <p>- BrFLC1, 2, 3 형질전환체 모두 엽수가 많고 개화시기가 지연되는 효과가 있었음.</p> <p>- BrFLC 2와 3에서 개화가 지연된 형질전환체가 더 많음.</p> <p>○ BrFLC3 유전자가 과발현된 삼진과 권심 형질전환 배추 :</p> <p>- 권심은 1-36일, 삼진은 3-40일 정도 비형질전환체보다 개화시기가 지연되었음</p> <p>○ BrFLC 유전자가 과발현된 inbred line 배추 형질전환체 중 27개체에서 개화지연이 나타났음</p> <p>○ BrCO RNAi, BrVRN1 RNAi 유전자가 각각 도입된 inbred line 배추 형질전환체에서 11개체, 9개체가 개화지연 특성을 나타냄</p> <p>○ BrFLC 과발현 벡터와 BrCO RNAi, BrVRN1 RNAi 벡터가 동시에 도입된 inbred line 배추 형질전환체에서 개화가 지연되는 개체가 각각 10개체 이상 있었음</p> <p>○ 두 유전자가 복합적으로 도입된 배추 형질전환체에서 개화가 지연되는 효과가 높은 것으로 관찰됨</p>	<p>95</p>

## 2. 관련 분야에의 기여도

### 가. 연구성과 활용실적

1) 학술지 논문게재 (SCI) : 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 Report* (2007) 26: 327-336

### 2) 학술회의 발표

- Isolation and differential expression of *FLOWERING LOCUS C* gene in *Brassica rapa* L.ssp. *pekinensis* (2005) 한국식물생명공학회 추계 학술 대회

- Regulation of flowering time in *Arabidopsis* and Chinese cabbage by *FLOWERING LOCUS C (FLC)* isolated from *Brassica rapa* L.ssp. *pekinensis* and effects on flowering time in Chinese cabbage (2006) 한국식물생명공학회 (우수발표논문상)

- Agrobacterium-mediated transformation of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) with flowering time control gene (2007) 국제 식물형질전환학회

### 나. 기술적 측면

○ 배추 형질전환은 2001년에 처음 보고되었고 형질전환 효율 문제로 많은 유용 유전자가 도입되지 못하였다. 배추 형질전환은 품종에 따라 형질전환 효율이 상당히 다르게 나타난다. 일부 품종에서는 shoot 형성은 잘 되나 뿌리 유기가 되지 않는 경우가 있다. 본 연구에서는 개화시기조절 유전자를 inbred line에 도입하였는데 shoot 형성율은 높았으나 shoot로부터 뿌리 유기가 용이하지 않았으나 배지에 첨가되는 무기물을 변형시킨 결과 뿌리 형성율이 월등히 높아졌다. 따라서 본 연구를 통하여 효율적인 배추 형질전환체 생산 방법이 제시되어 보다 높은 빈도로 배추로의 유전자 도입이 이루어질 수 있을 것으로 기대된다.

○ 개화시기조절 관련 유전자들에 대한 연구는 모델식물인 애기장대를 중심으로 이루어졌고 유전자도 애기장대에서 분리되어 연구가 수행되었다. 배추의 경우 애

기장대와 같은 과에 속해 있으나 진화를 거듭하면서 계놈상의 유전자가 애기장대보다 복잡하게 구성되어 있을 것으로 추정된다. 따라서 여러 copy로 존재하는 유전자의 발현 및 기능 분석은 의미가 있다고 할 수 있다. 본 연구에서는 배추에 4-5 copy로 존재하는 FLC 유전자들 중에서 FLC1, 2, 3에 해당하는 유전자를 분리하여 각각의 기능을 분석하였다. 실제로 이들 유전자는 비슷한 효과를 나타내었으나 발현 효율은 약간 다르게 나타났다. 따라서 FLC 이외에도 배추 개화시기와 관련된 유전자 분리 및 구조분석, 유전자 도입으로 인한 유전자 발현분석으로 개화관련 유전자들 간의 상호연관관계를 봄으로서 배추의 개화조절에 관한 분자생물학적 해석이 가능할 것으로 기대된다.

○ 본 연구에서는 개화시기조절 유전자를 단독 또는 두개의 유전자를 동시에 배추에 도입시켰다. 여러 개의 유전자를 한 식물에 집적하여 유전자들의 발현 안정성 및 유전자들 간의 상호 연관성을 분석함으로써 여러 유전자의 다중발현 방법을 제시할 것으로 기대된다.

#### 다. 경제 · 산업적 측면

○ 배추는 우리나라의 주요한 3대 고유 채소작물로 가장 넓은 재배면적을 차지하고 있으며 김치의 주재료로서 농가소득증대에 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 우리나라는 봄철에 있는 저온현상으로 추대현상이 일어나 상품성 가치가 떨어지고 생산량이 감소되는 있는 문제가 발생하고 있는데 본 연구의 결과로 개화시기가 조절되어 추대가 억제되는 배추가 개발된다면 생산성 향상 및 상품가치도 상승되는 효과가 있을 것이며 외국으로부터 수입되는 작물로부터 우리 고유 작물의 보호 효과가 있을 것이다

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1. 추가연구의 필요성

본 연구에서 배추 inbred line을 이용한 형질전환체 생산 시스템이 확립되었다. 이러한 inbred line을 형질전환체 생산에 사용할 경우 새로운 품종 육성에 곧바로 이용될 수 있다는 점에서 중요하다. 배추에서 개화시기를 늦추기 위한 하나의 시도로 개화를 하도록 유도하는데 중요한 역할을 하는 FLC, CO, VRN1 유전자를 배추로부터 분리하여 애기장대의 것과 비교 분석하였다. 그러나 잘 알려진 바와 같이 개화유도는 환경적 요인, 호르몬, 광주기등 여러 경로에 의하여 조절되고 있다. 본 연구에서는 배추의 개화유도에 필수적인 vernalization에서 중요한 역할을 하는 FLC와 VRN 유전자, 광주기에서 개화유도를 하는 CO 유전자의 발현을 조절함으로써 배추의 개화시기조절을 유도하였다. 이외에도 개화에는 여러 유전자가 관여하고 있다는 것이 애기장대에서 많이 알려져 있다. 또한 작물의 경우는 아직까지도 알려지지 않은 다른 유전자들이 관여할 것으로 추정된다. 최근에 들어서는 지구의 온난화 등에 의하여 화훼 및 작물의 개화시기가 달라지는 예가 생기고 있다. 따라서 작물의 개화시기는 과수나 화훼, 채소등 농업 생산성에 영향을 미칠 것으로 예상되며 이에 관한 연구가 지속적으로 수행될 필요가 있을 것으로 사료된다.

본 연구로부터 생산된 개화시기조절 유전자가 도입된 형질전환 배추로부터 완전한 고정계통을 확보하여 실제로 field에서 개화시기를 검정하는 단계가 있어야 할 것이다. FLC, VRN1, CO 유전자 이외에도 개화시기를 조절하는 유전자를 추가로 분리하여 분석 후 배추에 도입하여 유전자 발현 및 개화시기 분석을 통하여 배추에서 개화에 관한 조절 메카니즘 연구를 계속한다면 배추와 비슷한 조건하에서 개화를 하는 타 작물에서의 응용성이 충분히 있을 것으로 기대된다.

### 2. 타연구에의 응용

개화시기를 조절하는데 관여하는 유전자는 각각의 특징적인 도메인을 갖고 있으면서 작용을 한다. 이들 유전자들을 과발현시키거나 발현을 억제할 경우 세포내에 있는 다른 여러 기작들에 영향을 줄 것이다. 따라서 이들 각각 또는 여러개의 유전자가 도입된 형질전환체에서 microchip 등을 이용하여 유전자들의 발현 양상을 분석

한다면 개화와 다른 여러 환경요인들과의 복잡한 관계 등을 연구하는데 응용될 수 있을 것으로 예상된다.

본 연구에서 사용한 배추로부터 분리한 개화조절 유전자들과 이를 이용하여 작성된 벡터들은 곧바로 유채, 양배추, 무 등에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

개화조절 관련 유전자 분리 및 기능 연구는 애기장대의 mutant를 이용하여 이루어져 왔다. 개화조절은 autonomous pathway, vernalization, photoperiod pathway에서 작용하는 많은 유전자들이 밝혀져 왔다. 배추과 작물에서는 유채에서 FLC 유전자가 분리되어 발현양상을 분석하였고 양배추에서도 2 종류의 FLC 유전자가 분리되어 유전자 기능 분석이 이루어졌다. 배추과 작물에서 개화유도에는 vernalization이 필요하다. 따라서 이 과정에서 중심역할을 하는 FLC 유전자에 관한 연구가 많이 이루어졌다. FLC 유전자 발현은 chromosome remodelling에 관여하는 여러 요인들이 작용하는 histone deacetylation과 methylation 기작에 의하여 조절되는 것으로 최근에 밝혀졌다. 또한 vernalization과 연관해서 FLC 상위에서 유전자 발현을 조절하는 VIN3 등의 유전자가 분리되었다. 이와 같이 개화조절 유전자는 계속적으로 새롭게 분리되어 기작연구가 활발히 진행되고 있다고 할 수 있다. 이러한 개화조절은 작물의 영양생장 및 생식생장에 영향을 주어 작물의 생산성에 중요한 영향을 줄 수 있다. 특히 벼, 밀, 보리가 속해 있는 곡물에서 개화시기를 조절하는 유전자들의 분리 및 기능분석이 이루어지고 있다.

## 제 7 장 참고문헌

- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C (2004) Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *The Plant Cell* 16: S18-S31
- Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *PNAS* 81: 1991-1995
- Cockram J, Jones H, Leigh FJ, Sullivan D, Powell W, Laurie DA (2007) Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. *Journal of Experimental Botany* 58(6): 1231-1244
- Gordon G, Simpson AR, Gendall, Caroline D (1999) When to switch to flowering. *Annu Rev Cell Dev Biol* 99: 519-550
- He Y, Amasino RM (2005) Role of chromatin modification in flowering-time control. *Trends in Plant Science* 10: 30-35
- Hepworth SR, Valverde F, Ravenscroft D, Mouradov A, Coupland G (2002) Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *The EMBO Journal* 21: 4327-4337
- Jack T (2004) Molecular and genetic mechanisms of floral control. *The Plant Cell* 16: S1-S17
- Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R, Dean C (2000) Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science* 290: 344-347
- Lee H, Suh SS, Park E, Cho E, Ahn JH, Kim SG, Lee JS, Kwon YM, Lee I (2000) The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. *Genes Dev* 14: 2366-2376
- Lee I, Amasino RM (1995) Effect of vernalization, photoperiod, and light quality on the flowering phenotype of Arabidopsis plants containing the FRIGIDA gene. *Plant Physiology* 108: 157-162
- Lee YH, Lee SB, Suh SC, Byun MO, Kim HI (2000) Herbicide-resistant cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*) plants by *Agrobacterium*-mediated



- transformation. *J Plant Biotechnology* 2: 35-41
- Li Z, Zhao L, Cui C, Kai G, Zhang L, Sun X, Tang K (2005) Molecular cloning and characterization of anti-bolting related gene (BrpFLC) from *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*. *Plant Science* 168:407-413
- Lin SL, Wang JG, Poon SY, Su CI, Wang SS, Chiou TJ (2005) Differential regulation of FLOWERING LOCUS C expression by vernalization in cabbage and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137: 1037-1048
- Michaels SD, Amasino RM (1999) FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell* 11: 949-956
- Mouradov A, Cremer F, Coupland G (2002) Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell*: S111-S130
- Osborn TC, Kole C, Parkin IAP, Sharpe AG, Kuiper M, Lydiate DJ, Trick M (1997) Comparison of flowering time genes in *Brassica rapa*, *B. napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 146: 1123-1129
- Ratcliffe OJ, Nadzan GC, Reuber TL, Riechmann JL (2001) Regulation of flowering in *Arabidopsis* by an FLC homologue. *Plant Physiology* 126: 122-132
- Schranz ME, Quijada P, Sung SB, Lukens L, Amasino R, Osborn TC (2002) Characterization and effects of the replicated flowering time gene FLC in *Brassica rapa*. *Genetics* 162: 1457-1468
- 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. *The Plant Cell* 11: 445-458
- Sheldon CC, Rouse DT, Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (2000) The molecular basis of vernalization: the control role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *PNAS* 97: 3753-3758
- Shore P, Sharrocks AD (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* 229 (1): 113
- Shure M, Wesslers S, Federoff N (1983) Molecular identification of the waxy locus in maize. *Cell* 35: 225-233

- Simpson GG, Gendall AR, Dean C (1999) When to switch to flowering. *Annu Rev Cell Dev Biol* 99: 519-550
- Sung S, Amasino RM (2005) Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization. *Annu Rev Plant Biol* 56: 491-508
- Tadege M, Sheldon CC, Helliwell CA, Stoutjesdijk P, Dennis ES, Peacock WJ (2001) Control of flowering time by FLC orthologues in *Brassica napus*. *The Plant Journal* 28(5): 545-553
- Verwoerd TC, Dekker BMM, Hoekema A (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acid Research* 17: 2362