

3cm

11-1543000  
-002625-01

4cm

발간등록번호

11-1543000-002625-01

유전체교정기술을 이용한 배추  
만추대 엘리트 계통 육성

최종보고서

(견고타  
14p)

2019  
(견고타13p)

농림축산식품부

5cm

3

cm

(견고타  
17p)

농생명산업기술개발 R&D Report

(견고타  
25p)

( 견 고 타 3 1 p )

5cm

유전체교정기술을 이용한 배추  
만추대 엘리트 계통 육성  
최종보고서

(0.1cm)

2019. 03. 20.

0.15cm

(견고타15p)

(별색바탕 : C50, M20, Y59, K0)

주관연구기관 / 농우바이오  
협동연구기관 / 한국생명공학연구원

cm

(견고타 15.5p)

(백색바탕)

농림축산식품부

(견고타 20p)

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유전체교정 기술을 이용한 배추 만추대 엘리트 계통 육성”(개발기간 : 2016. 09. 05~ 2018. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 14.

주관연구기관명 : 농우바이오 (대표자) 이병각 (인)  
협동연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자) 김장성 (인)



주관연구책임자 : 김 운 성  
협동연구책임자 : 조 혜 선

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116091-03-3-SB010	해당 단계 연구 기간	2016. 09. 05~ 2018. 12. 31	단계 구분	(해당단계)/ (총 단계)
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	유전체교정 기술을 이용한 배추 만추대 엘리트 계통 육성			
연구책임자	김윤성	해당단계 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 29명 내부: 16명 외부: 13명	총 연구개발비	정부:583,000천원 민간:195,670천원 계:778,670천원
연구기관명 및 소속부서명	농우바이오 생명공학연구소			참여기업명: 농우바이오	
국제공동연구	해당없음			해당없음	
위탁연구	해당없음			해당없음	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 보안 등급
-------------------------	----------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		10-2 018- 0153 751									
		10-2 018- 0153 757									
	doi : 10.100 7/s11 816-0 16-04 21-8										
	DOI: 10.338 9/fpls .2017. 01250										
	doi.or g/10.9 787/K JBS.2 017.49 .4351										
	doi : 10.217 4/138 92029 18666 17070 51519 01.										
	DOI https: //doi. org/1 0.1007 /s118 16-01 8-050 0-0										

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

<p>요약</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배추유전자 편집을 위해 먼저 엘리트 계통 형질전환 시스템 구축하였음.</li> <li>○ 유전자 편집을 통한 배추 만추대 계통 육성 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 타겟 유전자로 배추 개화 핵심 유전자 선별</li> <li>- 2개 이상의 유전자에 대한 기능 상실 유전자편집체 생산 (T0 기준 9 개체)</li> <li>- 생산된 유전자편집체 추대 특성 확인; 세대 진전 시에도 형질 및 돌연변이 유지 확인</li> </ul> </li> <li>○ 배추작물의 개화 특성 및 계층수준 발현체 분석을 통한 배추 개화조절기작에 대한 연구 기반 구축 및 활성화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 배추 개화형질 특성 규명: 저온처리에 의한 배추 추대특성 규명</li> <li>- 배추 개화유전자군 분류체계 확립: 223개의 배추 개화유전자 발굴 및 관련 기작분류</li> <li>- 배추 주요 개화조절 유전자발현 분석: qRT-PCR을 통한 주요 개화유전자발현 분석</li> </ul> </li> <li>○ 추대형질 계통 간 발현체 분석을 통한 배추 개화기작 규명 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 추대형질 계통 간 저온에 의한 개화특성 비교분석: 계통 간 저온에 의한 추대형질 특성 규명</li> <li>- 만추대-특이적 개화유전자 DEGs 발굴: 추대 형질에 관여하는 개화유전자 선별</li> <li>- 정량적 유전자발현 비교분석을 통한 배추개화조절기작 규명: 계통 간 배추 주요 개화유전자군의 qRT-PCR분석으로 만/조추대간 주요 개화조절기작 차이점 및 공통점을 규명하고 개화형질을 조절하는 핵심개화유전자를 발굴함</li> </ul> </li> <li>○ 배추-특이적 개화유전자의 기능분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 모델식물에 없는 multi copy 주요 개화유전자의 분자특성 규명: qRT-PCR분석을 통한 유전자발현 차이 비교분석</li> <li>- 모델식물 돌연변이체를 이용한 multi copy 유전자의 개화조절 기능분석: multi copy 유전자 간 기능적 차이를 확인함</li> <li>- 배추작물의 개화조절 핵심 유전자를 발굴함 &gt;5점 이상.</li> </ul> </li> </ul>	<p>보고서 면수 95페이지</p>
--	-------------------------

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>목적: 유전자 가위로 개화 유전자를 수정하여 배추 만추대 계통 육성</p> <p>주요내용:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배추 개화유전자 타깃 선정</li> </ul>
------------------------	--

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 애기장대 개화유전자로부터 배추개화유전자 확보</li> <li>- 개화조절기작 분석 및 유전자 편집할 타겟 유전자 선정</li> <li>○ 개화 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 엘리트 계통 및 유전자 교정체 저온처리 후 개화시기 분석</li> </ul> </li> <li>○ 개화유전자 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 저온 처리 후 RNA-seq을 통해 개화유전자 발현 패턴 분석</li> <li>- 만추대, 조추대 계통 개화유전자 발현 차이 분석</li> <li>- Re-sequencing을 통한 만추대, 조추대 간 개화유전자 변이 분석</li> <li>- 타겟 유전자를 애기장대에 발현시켜 기능 확인</li> </ul> </li> <li>○ 수정된 개화유전자를 가진 만추대 계통 육성 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존 엘리트라인 중 추대가 빠른 계통 선정</li> <li>- 형질전환을 통해 타겟 유전자가 수정된 계통 육성</li> <li>- 타겟 유전자 분석</li> <li>- 개화 특성 분석</li> <li>- 외부유전자 제거된 계통 선발</li> </ul> </li> </ul>
<p style="text-align: center;">연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배추 엘리트 계통 형질전환 시스템 구축</li> <li>○ 유전자 편집을 통한 배추 만추대 계통 육성 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 배추 개화 핵심 유전자 선별</li> <li>- 2개 이상의 유전자에 대한 기능 상실 유전자편집체 생산 (T0 기준 9 개체)</li> <li>- 생산된 유전자편집체 추대 특성 확인; 세대 진전 시에도 형질 및 돌연변이 유지 확인</li> </ul> </li> <li>○ 배추작물의 개화 특성 및 개능수준 발현체 분석을 통한 배추 개화조절기작에 대한 연구 기반 구축 및 활성화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 배추 개화형질 특성 규명: 저온처리에 의한 배추 추대특성 규명</li> <li>- 배추 개화유전자군 분류체계 확립: 223개의 배추 개화유전자 발굴 및 관련 기작분류</li> <li>- 배추 주요 개화조절 유전자발현 분석: qRT-PCR을 통한 주요 개화유전자발현 분석</li> </ul> </li> <li>○ 추대형질 계통 간 발현체 분석을 통한 배추 개화기작 규명 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 추대형질 계통 간 저온에 의한 개화특성 비교분석: 계통 간 저온에 의한 추대형질 특성 규명</li> <li>- 만추대-특이적 개화유전자 DEGs 발굴: 추대 형질에 관여하는 개화유전자 선별</li> <li>- 정량적 유전자발현 비교분석을 통한 배추개화조절기작 규명: 계통 간 배추 주요 개화유전자군의 qRT-PCR분석으로 만/조추대간 주요 개화조절기작 차이점 및 공통점을 규명하고 개화형질을 조절하는 핵심개화유전자를 발굴함</li> </ul> </li> <li>○ 배추-특이적 개화유전자의 기능분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 모델식물에 없는 multi copy 주요 개화유전자의 분자특성 규명: qRT-PCR분석을 통한 유전자발현 차이 비교분석</li> </ul> </li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 모델식물 들연변이체를 이용한 multi copy 유전자의 개화조절 기능분석: multi copy 유전자 간 기능적 차이를 확인함</li> <li>- 배추작물의 개화조절 핵심 유전자를 발굴함 &gt;5점 이상.</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 다양한 특성의 만추대 계통 육성</li> <li>○ 신규 F1 품종 개발</li> <li>○ 배추 유전자 편집 기반 구축</li> <li>○ 개화조절 메커니즘 이해</li> <li>○ 십자화과 작물 만추대 계통 육성 기반 구축</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	배추	만추대	계통육성	유전자편집	개화유전자
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Chinese cabbage	Late bolting	Line development	Genome editing	Flowering time gene

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....
  2. 연구수행 내용 및 결과 .....
  3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....
  4. 연구결과의 활용 계획 등 .....
- 붙임. 참고 문헌 .....

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서



# 1. 연구개발과제의 개요

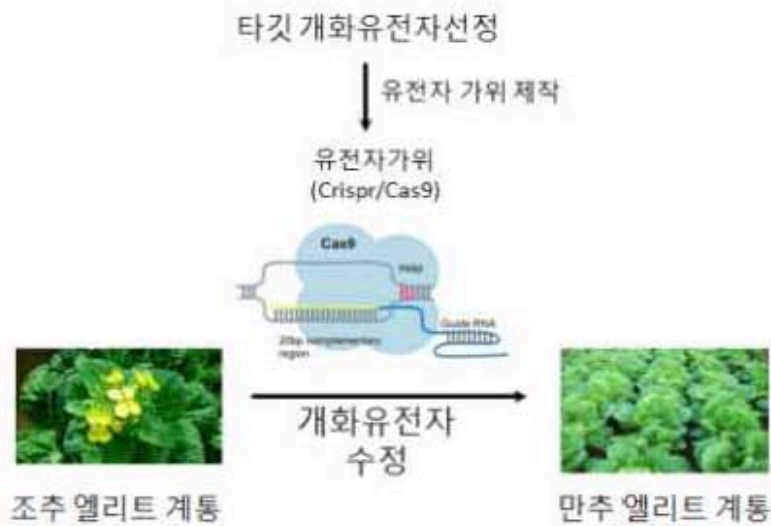
## 1-1. 연구개발 목적

- 유전자 가위로 개화 조절 유전자를 교정하여 조추대 엘리트 계통을 만추대 엘리트 계통으로 육성함.

## 1-2. 연구개발의 필요성

### 1) 연구개발의 개요

○ 연구개발 개요: 추대가 빠른 엘리트 계통에서 유전자 가위를 활용하여 개화유전자의 수정을 통해 만추대 엘리트 계통을 육성 함.



### ○ 핵심기술:

- 배추 개화유전자 타깃 선정: 개화관련 유전자 중 어떤 유전자를 수정할 것인지 선정
- 유전자 가위: 유전자를 수정할 가위 선택
- 조직배양: 원형질체 배양 혹은 형질전환을 통해 유전자가위를 식물체에 도입하는 기술

## 2) 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

### ○ 국내 배추시장 현황

- 배추는 김치의 주재료로 고추, 무 등과 함께 국내에서 가장 많이 소비되는 채소임.
- 13세기 경 중국에서 도입된 것으로 알려져 있으며 고려시대 향약구급방에 기록된 것으로 보아 그 이전부터 재배되었을 것으로 추정됨.
- 1850년경 서울배추, 개성배추의 재종법이 확립되었고 1960년대 이후부터 국내품종들이 육성 보급되기 시작하였음.
- 국내에서는 봄 하우스 재배, 봄 터널 재배, 봄 노지 재배, 여름 고랭지 재배, 가을 김장용 재배, 겨울 원동 재배 등 다양한 작형으로 연중 재배되고 있음.
- 재배면적은 연중 등락이 있으나 감소하는 추세임. 2000년 이전에는 50,000ha 이상 재배 되었으나 2012년에는 35,000ha로 감소하였음.
- 종자 시장에서 작형별 전체 요구 수량에서 차지하는 비율을 보면 가을배추가 62%로 가장 많고 여름배추 14%, 봄배추 13%, 겨울배추 11% 순임.
- 그러나 금액대비 구성비를 보면 가을배추가 51%, 여름배추 21%, 봄배추 17%, 겨울배추 11%임. 봄, 여름, 겨울 배추 종자가 가을배추 종자보다 비쌌.

#### ○ 배추 만추대 품종 육성

- 봄, 겨울 배추의 경우 저온(13도 이하)에 노출되어 추대될 가능성이 있음. 이 경우 결구에 필요한 잎 수 분화가 충분히 일어나지 못해 상품성 있는 배추를 수확하지 못할 수 있음.
- 따라서 봄, 겨울 배추는 만추대 특성을 갖추어야 함.
- 기존에 개발되어 있는 품종들도 있음. 농협종묘의 경우 봄 배추로 CR-강춘, 진광, 춘노랑 등이 있으며 겨울배추로 월동대왕 등이 있음.
- 그러나 만추 특성에는 다수의 유전자가 관여하기 때문에 새로운 계통 및 품종을 육성하기가 쉽지 않음.
- 여러 좋은 원예적 형질을 가지고 있는 계통에 만추 특성을 도입하는 것은 쉽지 않음.

#### ○ 배추 개화유전자

- BrFLC에 의한 개화조절에 대한 연구가 수행됨 (김수윤, 2002년). BrFLC1,2 유전자 발현이 BrFLC3 유전자보다 높았으며 조추대에서 만추대 보다 발현양이 낮았음. 또한 저온 처리 시 발현양이 감소하였음.
- 김수윤 등은 배추에서 분리한 개화 관련 유전자 (BrVRN, BrCO)등에 대해 연구하였음 (원예과학기술지, 2007년). 배추 BrCO는 애기장대와 비교해 볼 때 84%의 상동성이 있었음. 밤에 발현양이 가장 높고 하루 주기로 발현양이 변하였음. BrVRN1은 애기장대 유전자와 74%상동성이 있으며 저온처리를 하면 발현양이 증가하였음.
- BrCO RNAi, BrVRN1 RNAi 유전자를 도입한 배추는 개화지연 특성을 나타내었음.
- 허윤강 교수팀(충남대)는 조추대, 만추대 배추에서 마이크로 어레이를 이용하여 유전자 발현차이를 연구하였음 (Plant Breeding Biotech, 2016). 개화조절 주요 유전자인 BrFT, BrSOC1, BrFLC의 발현차이를 조사하였음. 개화촉진 유전자인 BrFT, BrSOC1의 발현양은 조추대에서 높았으며 BrFLC는 만추대에서 발현이 높았음. 특이한 점은 photoperiod pathway 유전자는 차이가 없었음.

○ 배추 형질전환

- 국내 유전자 도입 형질전환 배추 현황 (최근 5년)

소속	연구자	도입 유전자
경희대학교	박영두 등	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 향암물질 (phenylethylisothiocyanate) 합성 유전자</li> <li>• 염 스트레스 내성 유전자</li> <li>• 저온 스트레스 내성 유전자</li> <li>• 개화시기 조절 유전자</li> </ul>
경북대학교	한증술 등	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 건조 스트레스 내성 유전자</li> </ul>
경북대학교	민병환 등	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mannose 선발</li> <li>• 고온 스트레스 내성 유전자</li> <li>• 병 저항성 유전자</li> </ul>

- 재분화 시스템과 형질전환 시스템은 1990년대부터 많은 연구가 이루어져 시스템이 확립되어 있다고 할 수 있음
- 유용 유전자가 도입된 형질전환에 대한 보고가 되어 있음.
- 한 품종에 대한 재분화 시스템을 확립하여 여러 유전자를 도입하였음. 품종에 따라 재분화 효율이 많이 상이하야 새로운 품종을 연구할 경우 반드시 재분화 시스템의 확립이 필요함.
- 농진청 자료에 따르면, 정부가 지난 20여년간 국내 형질전환 식물 개발을 지원하여 국내에서 개발되고 있는 배추는 7종이며, 이들 가운데 개발의 마지막 관문에 해당하는 '안전성 평가'가 진행 중인 배추는 1종임.
- 지금까지 GMO에 대한 안전성과 표시제도 논란으로 인한 논란은 끊이지 않고 있음. 이 같은 논란과 우려를 없앨 수 있는 유전자를 교정(genome editing)에 의한 새로운 육종 방법에 대한 기술 개발이 필요하다고 보임.

○ 유전자 가위

- 국내의 유전자 가위 연구수준은 상당히 높은 것으로 알려져 있음.
- 김진수 교수(서울대/IBS): 유전체 교정 IBS 사업단에서는 유전체교정 기술 개발과 적용 연구를 수행중임.
- 최근에는 유전체 교정 사업단의 김상규 박사팀에서 Crispr/Cas 시스템을 식물에서 발현시킬 수 있는 벡터를 개발하였음 (JIPB, 2016).
- 최성화 교수(서울대): 상추 protoplast에 gRNA/Cas9 complex를 직접 도입하였고 재분화시킨 식물체 중 46%가 유전자 수정이 되었음. 동일 연구팀은 Crispr/Cas9 기술을 적용한 인간화 식물체 개발 및 교부가 단백질 생산 기반 구축 과제 수행 중 (중견연구자지원, 2015)
- 이광주 교수팀은 페튜니아에서 원형질체를 분리하여 Crispr/Cas 시스템을 도입하고 배

양 후 타깃 유전자인 nitrate reductase 유전자에 변이가 최대 12%까지 생성되는 것을 확인하였음 (한국육종학회, 2015). 동일 연구팀은 가지과 원예작물 토마토 유전자가위 적용 형질교정 연구를 수행중임 (차세대바이오그린21). 또한 식물기반 유전자가위의 변이유도 시스템 구축 과제를 수행하였음 (2012, 차세대바이오그린21).

- ㈜틀젠에서는 1세대 유전자 가위인 Zinc finger부터, 2세대인 TALEN, 3세대인 현재의 RGEN을 독자적으로 개발해 오고 있음. 동일 회사의 김석중 박사 연구팀은 식물 유전정보 편집을 위한 유전자가위 최적화 연구를 수행 하였음 (2014, 차세대바이오그린21).
- ㈜ 지플러스생명과학에서는 민간투자주동형 기술창업지원으로 식물 유전자가위 기술개발 고기능성 신품종 및 바이오의약품 개발 과제를 수행중임.
- 현재 십자화과를 대상으로 한 연구는 없으며 특히 종자회사가 보유한 엘리트 계통을 이용하여 기존의 육종법을 개선하고자 하는 연구는 없음.

#### ○ 선행특허분석

- 배추에서 유전자가위로 유전자교정을 내용으로 하는 특허는 없음.
- 배추 개화 관련특허로는 개화시기 판별용 조성물이나 마커에 대한 특허는 있으나 본 과제와의 관련성은 떨어지는 것으로 판단됨.

#### 나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

##### ○ 국외 배추 시장 현황

- 전세계의 배추 재배 면적은 약 300만 헥타임.
- 그 중 약 50% 이상이 중국에서 생산됨. 그 다음으로 인도, 러시아, 한국 순임.
- 대륙별로 보면 전체 재배면적의 2/3정도를 아시아에서 차지함.
- 그러나 시장규모로 보면 아시아와 유럽이 비슷함.
- 배추 종자 시장규모로 보면 약 1,900억원(2010년 기준)이며 이 중 중국이 82% 정도를 차지함.
- 중국의 배추는 봄배추, 남방계 여름배추, 가을배추, 월동용 배추, 소형 와와채 등으로 나뉘어짐. 가을배추가 주종을 이루며 전체 재배면적의 80%를 차지함.
- 일본은 다양한 종류의 품종을 생산함. 재해가 많은 특성상 병에 강하고 재배하기가 용이한 품종이 많음.
- 동남아 지역은 기후 특성 상 배추종자 생산이 어려워 100% 수입에 의존함.
- 유럽에서는 아시아계 이민 인구에 의한 수요가 있음.

##### ○ 배추 개화유전자

- Wu 등(2012)은 9개의 배추 계통에서 BrFLC2의 변이를 연구하였음. 57bp가 결실된 allele을 발견하였으며 이러한 결실은 주로 oil 타입의 배추계통에서 발견되었으며 개화시

기와 잘 일치하였음.

- Xiao 등은(JEB,2013) QTL, eQTL 분석을 통해 BrFLC2, BrCO, BrSOC1, BrFT 등이 배추 개화시기 결정에 중요한 역할을 할 것으로 주장하였음.
- Frank 등은(PeerJ, 2015) 다양한 종자가 섞인 컬렉션에서 개화시기 및 BrSOC1, BrFLC 발현을 조사하였음. BrSOC1은 세 개가 있는데 그중 두 개는 개화시기와 잘 일치하였으나 한 유전자는 잘 일치하지 않았음. 특이하게도 BrFLC는 발현이나 서열상 큰 차이점이 발견되지 않았음.

○ 배추 형질전환

- 국외 유전자 도입 형질전환 배추 현황 (최근 5년)

국가	연구자	도입 유전자
중국	Yuke He 등	• 조기출하 조절 유전자
중국	Qu, Shu-Ping 등	• 무름병 저항성 유전자
중국	Xilin Hou 등	• Gultamine 생합성 관련 유전자 • 병 저항성 유전자
중국	Limei Yang 등	• BT균 저항성 유전자
일본	Yutaka Tabei 등	• 제조제 저항성 유전자
네덜란드	Robert Verpoorte 등	• 병 저항성 유전자

- 배추는 아시아에서도 특히 중국, 일본, 한국에서 겨울철에 주로 소비되는 채소들 중 가장 중요한 작물로 배추 육종 기술 및 유전자 도입 등의 연구도 중국 및 일본에서 많은 발달과 진보를 가져왔음.
- 최근 5년간 대부분의 연구는 중국에서 이루어지고 있음.
- 재분화 및 형질전환 시스템 확립 이후 1단계적 병·충해 스트레스에 내성을 나타내는 유전자 도입의 연구가 주로 이루어지고 있었음.

○ 유전자 가위

- 2013년까지는 주된 유전자 가위는 ZFN과 TALEN이었음. 두가지 모두 DNA결합 부위를 제한효소와 결합시킨 것임.
- 그 이후 나온 것이 지금 사용되는 가이드 RNA에 의한 유전자 가위임. 가장 널리 사용하는 시스템인 Crispr/Cas9은 *Streptococcus pyogenes*의 것임.
- 2013년도에만 CRISPR/Cas9을 이용한 식물 유전자 수정 논문이 5편이 보고되었음. 애기장대 뿐만 아니라 *Nicotiana benthamiana*, rice등에서 성공적으로 적용되었음.
- 주요 타겟은 PDS, MLO, IPK, ADH1, BRI1, MYB1, ARF 등임.
- 최근에 Ning(2015) 등이 애기장대에서 시도한 예가 있으나 배추에서 개화유전자를 타겟으로 한 예는 아직 없음.

- Bortesi and Fischer (2015)가 보고한 CRISPR/Cas9을 이용한 식물연구 리스트는 다음과 같음.

Table 2  
CRISPR/Cas-mediated HDR in stable transduction.

Species	Transformation method	Cell/codon optimization	Primers (Cas9 gRNA)	Target	Maximum frequency	Detection method	Off-target detection method	Multiplex (deletion)	Transposon in progeny	Reference
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Agro-transformation by floral dip	Human	AtHBQ1, AtB18	Co-transcribed GUS	805 (25/44)	Surveyor assay				Ma et al. (2013)
<i>A. thaliana</i>	Agro-transformation by floral dip	Human	AtHBQ1, AtB18	TTA, OX1, OX12	19-805	Herzenberg surveyor assay, sequencing		Yes (230 bp)		Ma et al. (2013)
<i>A. thaliana</i>	Agro-transformation by floral dip	Arabidopsis (Hickler)	AtHBQ4-2	AtRH1, TTA, RBE1	0.042	PCR + deep sequencing				Fischer et al. (2014)
<i>A. thaliana</i>	Agro-transformation by floral dip	Arabidopsis	AtHBQ4-2	AtRH1, TTA, RBE1	24.7%	PCR + deep sequencing		Yes		Fischer et al. (2014)
<i>A. thaliana</i>	Agro-transformation by floral dip	Arabidopsis (Hickler)	AtHBQ4-2	AtRH1	42.83 (paired Hickler)	PCR + deep sequencing		Yes		Ichard et al. (2014)
<i>A. thaliana</i>	Agro-transformation by floral dip	<i>C. reinhardtii</i>	CaMV35S, AtB18	co-transcribed GFP	543 (35/40)	GFP fluorescence		Yes		Je et al. (2014)
<i>A. thaliana</i>	Agro-transformation by floral dip	Human	ZsCasM35S, AtB18, G4JAZ	AtRH1	100 (8/20-442/19/19)	PCR + SE		Yes		Feng et al. (2014)
<i>Vigna sativa</i>	Particle bombardment of callus	Rice	ZsCasM35S	OsPDS, OsMMD2	7.13 (4/57)-9.45 (7/96)	PCR + SE				Shan et al. (2013)
<i>O. sativa</i>	Agro-transformation of callus	Human	OsUHQ, OsU3	OsMFP7	505 (10/20)	Surveyor assay				Ma et al. (2014)
<i>O. sativa</i>	Agro-transformation of callus	Rice	ZsUHQ, OsU3	OsMFP7, OsMFP7	83.3% (25/30)-(91.66/11/12)	PCR + sequencing				Ma et al. (2013)
<i>O. sativa</i>	Agro-transformation of callus	Human	CaMV35S, AtB18	PKCS, SP, YSA	55 (1/21)-75% (2/32)	PCR + SE				Feng et al. (2013)
<i>O. sativa</i>	Agro-transformation of callus	Rice	ZsCasM35S, ZsUHQ	PDS, PKCS, SP, YSA, DEET, MSH1, MRE1, MRE1, PKCS, SP, YSA	21.1-46.7%	PCR + sequencing	No whole-genome sequencing	Yes	Yes	Shan et al. (2014)
<i>O. sativa</i>	Agro-transformation of callus	Plant	ZsCasM35S, AtB18	BA1	2% (2/94)-10% (14/81)	PCR + sequencing	No (3 sites), PCR + sequencing			Yu et al. (2014)
<i>O. sativa</i>	Agro-transformation of callus	Human	ZsCasM35S, AtB18	BA1	0% (0/56)-20 (2/56)	PCR + sequencing				Yu et al. (2014)
<i>O. sativa</i>	Agro-transformation of callus	Rice	ZsUHQ, OsU3	SWEET1a-1b-11-13	12.5% (2/16)-100% (8/8)	T7E1 assay + sequencing	No (6 sites), PCR + sequencing		Yes	Zhou et al. (2014)
Sorghum (factor)	Agro-transformation of immature embryos	Monocot	DsAct1, DsAR	Co-transcribed DsRed	245 (3/18)	DsRed fluorescence				Je et al. (2014)
Intensin	Hay100 transformation	Verticillium	CaMV35S	GFP, 300	n.d.	RE + PCR, phenotype				Ree et al. (2014)
Scopulariopsis (factor)	Agro-transformation of mycelium	Human	NIE							Ree et al. (2014)
<i>S. scopulariopsis</i>	Agro-transformation of mycelium	Human	ZsCasM35S, AtB18	SHG7, ScerpinG41778, Scy-1752/1770, Scer1294242	75 (6/8)-100% (20/20, 8/8)	phenotype, PCR + sequencing		Yes (94-143 bp)	Yes	Ree et al. (2014)
<i>A. thaliana</i>	Agro-transformation of leaf discs	Tobacco	ZsCasM35S, AtB18	PDS, PKCS	82% (9/11)-84% (14/16)	Phenotype, PCR + SE	No (3 sites), PCR + SE		Yes	Gu et al. (2014)
<i>T. aestivum</i>	Particle bombardment of embryonic	Plant	ZsUHQ, TdAR	MG-A1	5.50 (4/72)	T7E1			Yes	Shan et al. (2014)
Mercurialis polytricha	Agro-transformation of sporangia	Human	CaMV35S or MyEE, MyEE	AtB1	11% (5/45)	Phenotype, PCR + sequencing				Loggini et al. (2014)

AtHBQ1, Os = *A. thaliana* ubiquitin 1 or 18 promoter; AtHBQ4-2 = *P. trichocarpa* polyubiquitin promoter; CaMV35S = promoter of the 35S gene of the cauliflower mosaic virus; Zs35S/CaMV = 35S promoter with duplicated enhancer; OsUHQ, Act1, U3, 18 = *O. sativa* Ubiquitin 1, actin 1, 18 or 18 promoter; ZsUHQ, U3 = *Z. mays* ubiquitin 1 or 18 promoter; TdAR = *T. aestivum* Ubiquitin promoter; PCR = polymerase chain reaction; SE = restriction enzyme digestion; T7E1 = T7 endonuclease I assay; n.d. = not determined.

Table 3  
CRISPR/Cas-mediated HDR in transient transduction experiments.

Species	Transformation method	Cell/codon optimization	Primers (Cas9 gRNA)	Target	Maximum frequency	Detection method	Off-target (no. of sites analyzed)	Detection method	Multiplex (deletion)	Reference	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PEG-protoplast transfection	Arabidopsis (with sense)	CaMV35SPDS, AtB18	PDS, PDS	1.1-5.6%	PCR + sequencing				Li et al. (2011)	
<i>A. thaliana</i>	Leaf epigenitization	Arabidopsis (with sense)	CaMV35SPDS, AtB18	PDS	2.7%	PCR + sequencing			Yes (48 bp)	Li et al. (2011)	
<i>A. thaliana</i>	PEG-protoplast transfection	Arabidopsis (with sense)	CaMV35SPDS, AtB18	BNX1, BNX1	2.5-2.7%	PCR + sequencing	No (1 site)		PCR + sequencing	Li et al. (2011)	
<i>A. thaliana</i>	Leaf epigenitization	<i>C. reinhardtii</i>	CaMV35S, AtB18	Co-transcribed GFP	n.d.	Pre-digested PCR + SE				Jiang et al. (2013a, 2013b)	
<i>Nicotiana benthamiana</i>	PEG-protoplast transfection	Arabidopsis (with sense)	CaMV35SPDS, AtB18	PDS	17.7-85.3%	PCR + sequencing				Li et al. (2011)	
<i>N. benthamiana</i>	Leaf epigenitization	Arabidopsis (with sense)	CaMV35SPDS, AtB18	PDS	4.8%	PCR + sequencing				Li et al. (2011)	
<i>N. benthamiana</i>	Leaf epigenitization	Human	CaMV35S, AtB18	PDS	1.8-2.4%	PCR + SE	No (18 sites)		PCR + SE	Hellmann et al. (2013)	
<i>N. benthamiana</i>	Leaf epigenitization	<i>C. reinhardtii</i>	CaMV35S, AtB18	Co-transcribed GFP	n.d.	pre-digested PCR + SE				Jiang et al. (2013a, 2013b)	
<i>N. benthamiana</i>	Leaf epigenitization	Human	CaMV35S, AtB18	PDS	12.7-13.8%	PCR + SE				Opitzky et al. (2013)	
<i>Nicotiana glauca</i>	PEG-protoplast transfection	Tobacco	ZsCasM35S, AtB18	PDS, PKCS	14.27-20.3%	PCR + SE			Yes (1.4 kb)	Gu et al. (2014)	
<i>Dryas octopetala</i>	PEG-protoplast transfection	Rice	ZsCasM35S, AtB18	PDS, BARD1, MPK2, OsU3	14.5-38.0%	PCR + SE	No* (3 sites)		PCR + SE	Shan et al. (2014)	
<i>O. sativa</i>	PEG-protoplast transfection	Human	CaMV35S, OsU3 or OsU3	MPK5	3-8%	RE + qPCR and T7E1 assay	No (2 sites)	Yes (1 site with a mismatch at position 12)		RE + PCR	Kie and Kang (2013)
<i>O. sativa</i>	PEG-protoplast transfection	Rice	CaMV35S, OsU3	SWEET1a	n.d.	pre-digested PCR + SE				Jiang et al. (2013a, 2013b)	
<i>O. sativa</i>	PEG-protoplast transfection	Rice	ZsUHQ, OsU3	NDX, KDS1, LPM6, CYP94A2, CYP94A3, CYP94A4	n.d.	PCR + sequencing			Yes (1.15, 1.76, 245 kb)	Zhou et al. (2014)	
<i>Trichostema aestivum</i>	PEG-protoplast transfection	Rice	ZsCasM35S, ZsUHQ	MG-A1	28.5%	PCR + SE				Shan et al. (2014)	
<i>T. aestivum</i>	PEG-protoplast transfection	Plant	ZsUHQ, ZsUHQ	MG-A1	3.6%	T7E1				Wang et al. (2014a, 2014b)	
<i>T. aestivum</i>	Agro-infection of callus from immature embryos	Human	CaMV35S, AtB18	PDS, BARD1	19-22%	PCR + sequencing				Opitzky et al. (2013)	
<i>T. aestivum</i>	Agro-infection of callus from immature embryos	Human	CaMV35S, AtB18	BARD1		PCR + sequencing	No*		PCR + SE	Yes (3.7 kb)	Opitzky et al. (2013)
<i>Zebrua</i>	PEG-protoplast transfection	Rice	ZsCasM35S, AtB18	PKC	18.4-18.7%	PCR + SE				Jiang et al. (2014)	
<i>Citrus sinensis</i>	Leaf epigenitization	Human	ZsUHQ, ZsUHQ, CaMV35S	PDS	3.2-5.8%	PCR + SE	No (8 sites)		PCR + SE	Je et al. (2014)	

PEG = polyethylene glycol; CaMV35S = promoter of the 35S gene of the cauliflower mosaic virus; Zs35S/CaMV = 35S promoter with duplicated enhancer; CaMV35SPDS = hybrid promoter; 35S enhancer fused to the maize CaMV35S basal promoter; AtB18 = *A. thaliana* Ubiquitin promoter; OsU3, U3 = *O. sativa* Ubiquitin 1 or 18 promoter; ZsUHQ, U3 = *Z. mays* ubiquitin 1 or 18 promoter; TdAR = *T. aestivum* Ubiquitin promoter; PCR = polymerase chain reaction; SE = restriction enzyme digestion; \* If at least 1 mismatch in the 12 nt seed sequence.

3) 연구개발의 중요성

- 국내에서 배추는 주로 김치로 소비되는 주요 채소로 한국인이 가장 많이 소비하는 것 중 하나임.
- 국내 종자시장 규모(2013년 기준)로 보면 고추, 무, 양파, 토마토에 이어 5번째로 큰 시장을 형성하고 있음.



- 또한 이웃하고 있는 중국은 세계에서 가장 큰 배추시장임.
- 작형은 봄,여름,가을,겨울로 나뉘어지며 봄, 겨울배추는 저온에 노출될 경우 추대할 가능성이 있어 만추대 특성을 가져야 함.
- 관행 육종으로 만추대 배추를 만들기 위해서는 교배를 통해 만추 특성을 도입해야 함.
- 그러나 이를 위해 만추특성을 가진 재료를 먼저 순계로 만들어야 함. 8세대 이상을 selfing 해야 하므로 478년 정도 소요되고 그 과정에서 특성이 많이 약해질 가능성도 있음.
- 다시 기존의 엘리트 계통과 만추계통을 교배해야 하고 엘리트 계통의 특성과 만추특성을 모두 가진 개체를 선발해야 하나 두 특성을 온전히 가지는 개체를 선발하는 것은 상당히 어려움.
- 마커를 사용할 경우 관행 육종에 비해 육종 효율이 증진되나 현재는 만추특성을 추적할 수 있는 마커도 없고 마커가 있다고 하여도 두 계통의 특성을 모두 가지는 계통 선발이 여전히 어려운 것은 동일함.
- 유전자 가위를 사용할 경우 교배를 하지 않고 기존의 엘리트 계통의 특성을 그대로 유지하면서 만추 특성을 도입하는 것이 가능해짐. 따라서 더 좋은 특성을 가진 만추 계통을 더 빨리 육성할 수 있게 됨. 결과적으로 만추 품종 육성 기간이 짧아지고 더 우수한 품종을 개발하는 것이 가능해 짐으로 경쟁력 있는 품종을 확보하게 됨.
- 특히 세계에서 가장 큰 배추 시장인 중국이 바로 옆에 있으므로 중국에서 경쟁력을 가지는 만추품종을 빨리 개발 할 수 있게 됨으로써 수출에도 크게 기여할 것으로 생각됨.
- 본 과제가 성공적으로 마무리 될 경우 기존 육종에 상당한 파급력을 보일 것으로 생각됨. 육종의 패러다임이 바뀔 것임.

1-3. 연구개발 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
타깃선정 및 벡터제작	기존 애기장대 및 배추에서 수행된 결과를 근거로 타깃 선정. 벡터제작은 유전자 클로닝 방법으로 진행.	-애기장대에서 개화 조절 핵심 유전자로 FT, CO, SOC1 등이 있음. 실제 배추에서도 이들 유전자가 중요한 역할을 한다는 것이 보고되어 있어 이들 세 유전자를 일차 타겟으로 선정함. -배추 게놈에는 FT, CO, SOC1이 여러 카피 있는 것으로 알려져 있어 각각에 대한 sgRNA를 디자인 하였고 2개 이상의 유전자에 타겟팅하는 sgRNA도 디자인하여 벡터에 삽입하였음.
유전자 교정체 선발	배추 잎 혹은 배축을 재료로 형질 전환하여 유전자 교정체 선발	- 제작한 벡터는 <i>Agrobacterium</i> 에 형질전환하였으며 배추 1계통을 재료로 잎 혹은 배축을 재료로 형질전환을 하였음.
유전자 교정확인	NGS	- shoot이 나온 형질전환체는 Cas9이나 선발마커에 대한 PCR을 수행하여 형질전환 여부를 확인하였음. 타깃 유전자의 돌연변이 여부를 확인하기 위해 타깃 지역 근처에서 PCR을 한 후 NGS를 수행하였음.
배추 조추대/만추대 계통간 개화 형질분석	-배추 종자에서 개화시기까지 실험실 내 배양조건을 조사 -저온처리 조건과 기간에 따른 개화형질 관찰 -개화형질 지표를 위한 시기별 잎 수 및 잎 수 조사	-육종 현장에서 개발된 만추대와 조추대 형질 계통을 대상으로 실험실 조건에서 개화를 유도하는 저온처리 기간 및 개화형질 분석 지표 시스템을 구축함
만/조추대 형질 계통간 RNA-seq 분석	-RNA sequencing & genome mapping	-만추대/조추대 계통간 저온처리 0, 35 days 4개 샘플의 반복실험, 총 8개 샘플에 대한 RNA-Seq 분석 및 assembly 수행 -Read count에 따른 유전자발현 정도를 저온처리 0일을 기준으로 35일의 저온처리 기간



		<p>을 비교분석함</p> <p>-만추대/조추대 계통 간 저온처리 0일 과 35일을 각각 DEG 분석함</p>
저온 처리별 두 계통 간 비교 DEGs 분석을 통한 특이 적 발현유전자 발굴	-DEG Seq분석	<p>-DESeq library에 포함된 방법론을 사용하여 두 계통간 DEGs 유전자선발 (&gt; 2 fold change, adjust p-value (FDR)이 0.01 이하를 만족하는 binomial test 방법을 동시에 사용)</p>
RNA-seq에 의한 배추 개화유전자군 분류	<p>-모델식물 애기장대 개화유전자 Blast</p> <p>-무 개화유전자군을 분류체계 구축</p>	<p>-Weiger 애기장대 174개 기능 분석된 개화유전자를 분류하고, 배추 RNA-Seq 데이터에 BLAST(70% identity)하여 223개 배추 homolog 개화유전자를 분류함</p>
배추 주요 개화유전자의 발현수준 분석	<p>-분류된 배추 주요 개화유전자의 분자특성 을 이해하기 위해 저온에 대한 유전자발 현 정량을 qRT-PCR에 의해 분석함</p>	<p>-저온처리 0일과 35일 샘플로부터 주 요 개화유전자 발현수준을 qRT-PCR 로 3반복 실험하여 검증</p>
배추 추대 계통 간 주요 개화조절기작 비교분석	<p>-모델식물 애기장대의 개화조절 기작GA, photoperiod, vernalization pathway 개 화유전자를 기반으로 qRT-PCR 방법으로 조사함</p>	<p>-RNA-Seq 및 qRT-PCR 정량 분석 결 과를 기반으로 개화형질 계통 간 개화 조절기작을 규명</p>
배추 multi copy 개화유전자의 특성분석	<p>-Multi copy를 갖는 주요 개화유전자의 분자특성을 이해하기 위해 저온에 대한 유전자발현 정량을 qRT-PCR에 의해 분석함</p>	<p>-저온처리 0일과 35일 샘플로부터 주 요 개화유전자 발현수준을 qRT-PCR 로 3반복 실험하여 검증</p> <p>-Multi copy 유전자가 각기 동일/다른 발현조절을 보이는지 조사함</p>
십자화과 무-배추 작물의 개화조절기작 비교 분석	<p>-모델식물 애기장대의 개화조절 기작GA, photoperiod, vernalization pathway 개 화유전자를 기반으로 qRT-PCR 방법으로 조사함</p>	<p>-RNA-Seq 및 qRT-PCR 정량 분석 결 과를 기반으로 무/배추 작물 간 개화 조절기작을 규명</p>
배추 개화유전자의 모델식물 을 이용한 기능분석	<p>-모델식물 핵심개화유전자의 KO돌연변이체를 스크리닝하고 종자를 증식</p> <p>-배추 개화 multi copy를 클로닝</p>	<p>-CO, SOC1, FT, FLC homozygous 돌연변이체를 종자 를 증식하여 기능분석에 사용함</p>

## 2. 연구수행 내용 및 결과

[제1세부과제: 농우바이오]

### (1) 실험재료

- 실험을 위해 확보한 엘리트 계통과 개화특성 (육성가 데이터)은 아래표와 같다.
- 이 계통들 일부는 실제 상용 F1 품종 생산에 사용되는 엘리트 계통들이다.

계통명	개화특성
4402	조추
4404	조추
032	만추
10	만추
20	조추
30	조추
40	만추
50	조추
05	만추

### (2) 타겟 유전자 선정 및 gRNA 디자인

#### ① 배추 개화유전자

- 배추 개화유전자를 확보하기 위해서 먼저 같은 십자화과에 속하는 애기장대 개화유전자를 확보하였다.
- 자료조사를 통해 본 연구팀이 확보한 애기장대 개화유전자는 총 212개였다.

표 1. 애기장대 개화유전자 리스트

ABH1/ENS	CRY2	FVE	MAF3	SHP1_AT3G58780.3	WNK1
AGL12	Cstf64	FWA	MAF5_AGL68	SHP2_AT2G42830.2	ZTL
AGL14	Cstf77	FY	MBD9	SKB1_AT4G31120.1	
AGL15	CUL4	GA2_KS	MYB33	SLY1	
AGL16	DDF1	GA20ox1	MYB65	SMZ	
AGL17	DDF2	GA20ox2	NF-YB2	SOC1_AGL20	
AGL18	DDL	GA2ox1	NF-YB3	SPA1	
AGL19	EBS	GA2ox2	NF-YA1	SPA3	
AGL24	EFS	GA2ox3	NFYA4	SPA4	
AGL6	ELF3	GA2ox4	NFYB1/HAP3A	SPL_AT4G27330.1	
AMP 1	ELF4	GA2ox6	NFYC1/HAP5A	SPL15	
AP1_AGL7	ELF5	GA2ox7	NFYC2/HAP5B	SPL3	
AP2	ELF6	GA2ox8	NFYC3/HAP5C	SPL4	
AP3	ELF7	GA3	NFYC9	SPL5	

ARP4	ELF9	GA3ox1	PFT1	SPL9	
ARP6	EMF1	GA3ox2	PHYA	SPY_AT3G11540.1	
ARR3	EMF2	GAI	PHYB	SRR1	
ATGRP7	ESD1	GI	PHYC	SUF4_AT1G30970.1	
ATH1	ESD4	GID1A	PHYD	SVP	
ATX1	FCA	GID1B	PHYE	TEM1	
BR11	FD	GID1C	PI	TEM2	
CAL	FES1	GNC	PIE1	TFL1	
CBF1	FIE	GNL	PIF3	TFL2	
CBF2	F101	HUA2	PNF	TIC	
CCA1	FIP1	HUB1	PNY	TOC1	
CDF1_5g62430	FIP2	HUB2	PRR1	TOE1	
CDF5	FKF1	HYL1_DRB1	PRR3	TOE2	
CHE	FLC	JMJ14	PRR5	TOE3_AT5G67180.1	
CIB1	FLD	LCL1	PRR7	TPS1_AT1G78580.1	
CIR1	FLK	LD	PRR9	TSF	
CKB3	FLL1_AT3G14750.1	LDL2	REF6	UBC1	
CLF	FLL2_AT1G67170.1	LFY	RF12	UBP26	
C0	FLL3_AT1G55170.1	LHP1	RGA	VEL1_VIL2	
COL1	FLL4_AT5G61920.1	LHY	RGL1_AT1G66350.1	VIL1	
COL2	FLP1	LIP1	RGL2_AT3G03450.1	VIN3	
COL3	FLX_AT2G30120.2	LKP2	SAP18	VIP3_AT4G29830.1	
COL4	FPA	LMI1	SDG10_AT4G02020.1	VIP4_AT5G61150.1	
COL5	FPF1	LUX_PCL1	SDG26	VIP5_AT1G61040.1	
COL9	FRI	LWD1_ATAN11	SEF	VIP6_ELF8_AT2G06210.1	
COP1	FRL1	LWD2	SEP1_AT5G15800.2	VRN1	
CPS1/GA1	FT	MAF1_FLM	SEP2_AT3G02310.1	VRN2	
CRY1	FUL	MAF2	SEP3	VRN5	

- 각 개화유전자의 CDS 서열을 확보하였다.

- 배추 개화유전자의 서열을 확보하기 위해 먼저 BRAD(Brassica database, <http://brassicadb.org/brad/>)에 접속하여 배추 개화유전자 리스트를 다운로드 하였다. 여기에는 141개의 배추 개화유전자 및 그와 상동성이 있는 애기장대 유전자 이름이 있었다. 그러나 애기장대 개화유전자 수를 감안해 볼 때 BRAD에 있는 배추 개화유전자 수는 적다고 판단되었으며 실제로 애기장대 개화유전자 중 상당수는 그 리스트에 없었다.

- 보다 정확한 배추 개화유전자 리스트는 협동과제에서 blast를 통해 확보하였다.

표 2. 배추 개화유전자 (BRAD)

애기장대 유전자		배추 유전자	애기장대 유전자		배추 유전자
AGL24	AT4G24540	Bra019221	GID1C	AT5G27320	Bra003520
		Bra013891			Bra007722

AP1	AT4G24540	Bra038326	GNC	AT5G56860	Bra002788		
		Bra004007			Bra006851		
		Bra011021			Bra035633		
				Bra029347	GNL	AT4G26150	Bra019118
				Bra012997			Bra026461
				Bra035952	LD	AT4G02560	Bra018540
				Bra004361	LFY	AT5G61850	Bra029305
AP2	AT4G36920	Bra011741	Bra019619				
		Bra017809	LHP1	AT5G17690	Bra013958		
ARP6	AT3G33520	Bra030818			Bra023629		
		Bra029261			Bra006417		
CDF1	AT5G62430	Bra010082	PHYA	AT1G09570	Bra020013		
CO	AT5G15840	Bra008669			Bra031672		
		Bra023541	PHYB	AT2G18790	Bra022192		
COP1	AT2G32950	Bra005541	PRC2(CLF,EMF2)	AT2G23380	Bra032169		
		Bra021818	PRC2(CLF,EMF2)	AT5G51230	Bra015200		
CRY1	AT1G04400	Bra030568	PRC2(CLF,EMF2)	AT5G51230	Bra022541		
		Bra015313	PRC2(CLF,EMF2)	AT5G51230	Bra029179		
CRY2	AT4G08920	Bra037880	RGA	AT2G01570	Bra024875		
CSTF64	AT1G71800	Bra003913			Bra017443		
CSTF64	AT1G71800	Bra007985	SMZ	AT3G54990	Bra007123		
CSTF77	AT1G17760	Bra016588	SNZ	AT2G39250	-		
DHF	AT3G19140	-	SOC1	AT2G45660	Bra004928		
FCA	AT4G16280	Bra038446			Bra004927		
FD	AT4G35900	Bra010504			Bra000392		
		Bra011648			Bra000393		
		Bra017735			Bra039324		
FKF1	AT1G68050	Bra038831	SPA	AT2G46340	Bra004545		
		Bra038830			Bra000420		
		Bra038832			Bra035252		
FLC	AT5G10140	Bra009055			Bra027259		
		Bra028599			Bra021100		
		Bra006051	Bra027259				
		Bra022771	Bra021100				
FLD	AT3G10390	Bra001357			Bra038098		

FLK	AT3G04610	Bra001111	SPL	AT2G47070	Bra041037
FLM	AT1G77080	Bra024350	SPY	AT3G11540	Bra034832
FPA	AT2G43410	Bra004761			Bra001408
FRI	AT4G00650	Bra035723	SVP	AT2G22540	Bra038511
FT	AT1G65480	Bra022475			Bra030228
		Bra004117	TEM1	Bra024735	
		Bra015710		Bra011002	
		Bra010052		Bra038346	
Bra031085	AT1G25560	Bra019821			
Bra040678		Bra026917			
Bra036717		Bra026509			
Bra011133		TEM2	Bra038346		
Bra040681	Bra024735				
Bra006202	AT1G68840		Bra011002		
Bra023416			Bra026917		
Bra036239		Bra019821			
Bra000864		Bra026509			
GAI	AT1G14920	Bra024875	T0E1	AT2G28550	Bra011939
		Bra017443			Bra000487
GI	AT1G22770	Bra024536	T0E2	AT5G60120	Bra002510
GID1A	AT3G05120	Bra039460			Bra020262
		Bra009970	T0E3	AT5G67180	Bra012139
		Bra003520	TPS1	AT1G78580	Bra035049
		Bra040420			Bra008366
		Bra007722			Bra026011
GID1B	AT3G63010	Bra040420	VIN3	AT5G57380	Bra019043
		Bra007722			Bra026010
		Bra003520	VRN1	AT3G18990	Bra020445
		Bra009970			Bra006824
		Bra039460			Bra037544
GID1C	AT5G27320	Bra009970	VRN2	AT4G16845	Bra022376
		Bra039460			Bra001729
		Bra040420	Bra021078		

② 개화 유전자 변이 분석

- 조, 만추대 배추 계통의 개화유전자 변이 분석을 하기 위해 Re-sequencing을 수행하였다. 실험재료로는 4가지 계통(4402, 4004, 05, 50)을 사용하였다. 4402, 50은 만추, 05, 4004 계통은 조추대 계통이다. (4402의 경우 육성가는 조추 특성을 가졌다고 했으나 실험결과 만추특성을 가지고 있었음: 협동과제 결과) 조, 만추대 평균 개화시기는 각각 18.5일과 35일로 상당한 차이를 보여준다.
- Re-seq은 (주)마크로젠에 의뢰하여 진행하였으며 실험 결과는 아래 표와 같다.

표3. Mapped data

Sample	Ref.Length	Total read	Mapped read	Mapping rate	Mean depth
50	273,225,096	192,714,748	166,473,725	86.4	79
4404	273,225,096	204,739,450	175,225,161	85.6	84
4402	273,225,096	237,755,772	194,214,268	81.7	93
05	273,225,096	276,545,912	208,887,679	75.5	102

- seq 된 결과를 바탕으로 variant(SNP, Indel)을 조사한 결과 각 계통별로 아래 표와 같이 나왔다. SNP 및 Indel의 수는 각 계통간 큰 차이는 없었다.

표4. Summary of variant calling

Sample	No. SNP	No. insertion	No. deletion
50	1,688,505	108,849	108,619
4404	1,654,104	105,449	105,426
4402	1,656,641	105,541	105,860
05	1,644,446	105,321	105,300

- 각 계통별 주요 개화유전자 변이를 알아보기 위해 배추 SOC1, FT, CO, FLC homolog들의 서열을 확보하고 SNP, indel을 조사하였다 (표5). 가장 많은 변이를 보인 유전자는 CO로 전체 4개의 homolog 중 세 개 유전자에서 변이를 보였으며 변이의 수 또한 상대적으로 많았다. 한편 FLC의 경우 가장 적은 변이를 보였다.

표5. 계통간 개화유전자 변이

애기장대 유전자	배추 유전자	05	50	4404	4402	비고
SOC1	Bra000392	-	-	-	-	Proteinseq.차이없음
	Bra000393	-	-	2	2	
	Bra000394	1	1	8	8	
	Bra004927	-	-	-	-	

	Bra004928	-	-	-	-	
CO	Bra008668	17	17	-	-	
	Bra008669	-	-	-	-	
	Bra021464	25	14	-	-	
	Bra023541	12	-	10	10	
FT	Bra004117	2	-	-	-	Proteinseq.차이없음
	Bra010052	-	-	6	6	Proteinseq.차이없음
	Bra015710	-	-	-	-	
	Bra022475	-	-	-	-	
FLC	Bra009055	-	-	-	-	
	Bra028599	-	-	-	-	
	Bra006051	1	1	1	1	
	Bra022771	-	-	1	1	Proteinseq.차이없음

- CO homolog 중에서도 Bra008668, Bra021464, Bra023541이 가장 변이를 많이 보였다. 좀 더 상세하게 들여다보기 위해 이들 유전자의 아미노산 서열을 계통별로 비교해 보았다 (그림1).

CO_Bra008668	
Ref._CDS	MLKQEGNWAQTCDTCRSAACTVYCRPDSAYLCTSCDAQIHEANRLASRHERVRVCQSCER
B-rapa05	MLKQEGNWAQTCDTCRSAACTVYCRADSAYLCTSCDAQIHAANRLASRHERVRVCQSCER
B-rapa50	MLKQEGNWAQTCDTCRSAACTVYCRADSAYLCTSCDAQIHAANRLASRHERVRVCQSCER
B-rapa4404	MLKQEGNWAQTCDTCRSAACTVYCRPDSAYLCTSCDAQIHEANRLASRHERVRVCQSCER
B-rapa4402	MLKQEGNWAQTCDTCRSAACTVYCRPDSAYLCTSCDAQIHEANRLASRHERVRVCQSCER
	*****
Ref._CDS	APAAFFCKADAASLCTACDSQIHSANPLARRHQVRVPLPISGSMVTNHSSSETTEAEDIVV
B-rapa05	APAAFFCKADAASLCTACDSQIHSANPLARRHQVRVPLPISGSMVTNPSSSETSEAEDIVV
B-rapa50	APAAFFCKADAASLCTACDSQIHSANPLARRHQVRVPLPISGSMVTNPSSSETSEAEDIVV
B-rapa4404	APAAFFCKADAASLCTACDSQIHSANPLARRHQVRVPLPISGSMVTNHSSSETTEAEDIVV
B-rapa4402	APAAFFCKADAASLCTACDSQIHSANPLARRHQVRVPLPISGSMVTNHSSSETTEAEDIVV
	*****
Ref._CDS	VGQEEDEAEAAASWLLPTSVKNCGDNNNNNNSQDNRFVSGEEYLDLVDYSKYQQDYNVP
B-rapa05	VGQEEDEAEAAASWLLPTSVKNCGDNNNNNNSQDNRFVSGEEYLDLVDYSKYQQDYNVP
B-rapa50	VGQEEDEAEAAASWLLPTSVKNCGDNNNNNNSQDNRFVSGEEYLDLVDYSKYQQDYNVP
B-rapa4404	VGQEEDEAEAAASWLLPTSVKNCGDNNNNNNSQDNRFVSGEEYLDLVDYSKYQQDYNVP
B-rapa4402	VGQEEDEAEAAASWLLPTSVKNCGDNNNNNNSQDNRFVSGEEYLDLVDYSKYQQDYNVP
	*****
Ref._CDS	QRRSYVADGVVPLQVEVSKSLSHMHHEQHNFQFGFTNVSSEASP IHMVSLVPESTLSETT
B-rapa05	QRRSYVADGVVPLQVEVSKSLSHMHHEQHNFQFGFTNVSSEASP IHMVSLVPESTLSETT
B-rapa50	QRRSYVADGVVPLQVEVSKSLSHMHHEQHNFQFGFTNVSSEASP IHMVSLVPESTLSETT

B-rapa4404	QRRSYVADGVVPLQVEVSKSLSHMHHEQHNFQFGFTNVSSEASP IHMVSLVPESTLSETT
B-rapa4402	QRRSYVADGVVPLQVEVSKSLSHMHHEQHNFQFGFTNVSSEASP IHMVSLVPESTLSETT *****
Ref._CDS	VSNPRSPKAATEELPEAPVQMLSPMERKARVMRYREKKKTRKFEKT IRYASRKEYAEKRP
B-rapa05	VSHPRSPKAAMEELPEAPVQMLSPMERKARVMRYREKKKTRKFEKT IRYASRKEYAEKRP
B-rapa50	VSHPRSPKAAMEELPEAPVQMLSPMERKARVMRYREKKKTRKFEKT IRYASRKEYAEKRP
B-rapa4404	VSNPRSPKAATEELPEAPVQMLSPMERKARVMRYREKKKTRKFEKT IRYASRKEYAEKRP
B-rapa4402	VSNPRSPKAATEELPEAPVQMLSPMERKARVMRYREKKKTRKFEKT IRYASRKEYAEKRP ** : ***** *****
Ref._CDS	RIKGRFAKPNEVDAAEADKAFSSMVMFDTGYG I VPSF
B-rapa05	RIKGRFAKPNEVDAAEADKAFSSMVMFDTGYG I VPSF
B-rapa50	RIKGRFAKPNEVDAAEADKAFSSMVMFDTGYG I VPSF
B-rapa4404	RIKGRFAKPNEVDAAEADKAFSSMVMFDTGYG I VPSF
B-rapa4402	RIKGRFAKPNEVDAAEADKAFSSMVMFDTGYG I VPSF *****

그림1. 배추 Bra008668 아미노산 서열 비교. 4가지 계통(05,50,4404,4404)의 Bra008668 단 백질서열을 비교하였음.

- 특이한 점 중 하나는 아미노산이 차이가 나는 경우 05와 50계통이 동일하고 4404와 4402 계통이 동일한 경우가 많았다는 것이다. 이러한 현상은 Bra021464에서도 나타났다 (그림2). 05계통에서 가장 많은 변이를 발견하였으나 상당수의 경우 05, 50이 같은 아미노산을 4404, 4402가 동일한 아미노산을 가지고 있었다.

<b>CO_Bra021464</b>	
Ref._CDS	MLKEESNESGGTRACDTCRSACT I YREADSTYLCTTCDARVHAAKRVRVCDSCESAPAA
B-rapa05	MLKEESNESGGTRACGTCRSACT I YREADSTYLCTTCDARVHAAKRVRVCDSCESAPAE
B-rapa50	MLKEESNESGGTRACDTCRSACT I YREADSTYLCTTCDARVHAAKRVRVCDSCESAPAA
B-rapa4404	MLKEESNESGGTRACDTCRSACT I YREADSTYLCTTCDARVHAAKRVRVCDSCESAPAA
B-rapa4402	MLKEESNESGGTRACDTCRSACT I YREADSTYLCTTCDARVHAAKRVRVCDSCESAPAA ***** . *****
Ref._CDS	FFCKADAASLCTACDAE I HSANPLARRHQVRP I TSNSCGSMATDGDNNVMMVSEEKEDAD
B-rapa05	FFCKADAASLCTACDAE I HSANPLARRHQVRP I SANSCGSMATDGDNNVMMVGEEEKED
B-rapa50	FFCKADAASLCTACDAE I HSANPLARRHQVRP I TSNSCGSMATDGDNNVMMVSEEKEDAD
B-rapa4404	FFCKADAASLCTACDAE I HSANPLARRHQVRP I TSNSCGSMATDGDNNVMMVSEEKEDAD
B-rapa4402	FFCKADAASLCTACDAE I HSANPLARRHQVRP I TSNSCGSMATDGDNNVMMVSEEKEDAD ***** : ***** . ***** *



Ref ._CDS	EVASWLMLNPGKNNQNGFLFGVEYLDLVDYSSSIDNQFEDQYSKYHRSGGGEDGVVPL
B-r apa05	EVASWLMLN <b>Q</b> GKNNQNGFLFGVEYLDLVDYSS <b>GT</b> DNQFEG <b>QYSQY</b> QRSFGGGEDGVVPL
B-r apa50	EVASWLMLNPGKNNQNGFLFGVEYLDLVDYSSSIDNQFEDQ <b>YNHY</b> QRSFGGGEDGVVPL
B-r apa4404	EVASWLMLNPGKNNQNGFLFGVEYLDLVDYSSSIDNQFEDQYSKYHRSGGGEDGVVPL
B-r apa4402	EVASWLMLNPGKNNQNGFLFGVEYLDLVDYSSSIDNQFEDQYSKYHRSGGGEDGVVPL
	***** *****. *****.***.:*****
Ref ._CDS	QLEESSTSHMQQSQHNFHLGVNYGYSTEPQYSYVSVVPE-SSSDTTVQHAKETIDQVCGP
B-r apa05	<b>E</b> LEESSTSHMQQSQHNFHLGVNYGYSTEPQYSYVSVVPE-SSSDTTVQHAKETIDQV <b>SGP</b>
B-r apa50	QLEEST <b>-</b> SHMQQSQHNFHLGVNY <b>G</b> STEPHYSYISVVPE <b>ST</b> SSSDTTVQHAKET <b>M</b> DQV <b>SGP</b>
B-r apa4404	QLEESSTSHMQQSQHNFHLGVNYGYSTEPQYSYVSVVPE-SSSDTTVQHAKETIDQVCGP
B-r apa4402	QLEESSTSHMQQSQHNFHLGVNYGYSTEPQYSYVSVVPE-SSSDTTVQHAKETIDQVCGP
	:****: *****:****:***:***** :*****:***.***
Ref ._CDS	PTQMVQQLTPADREARVLRREKRRKFEKIRYASRKAYAEVRPRIKGRFAKRIDMEA
B-r apa05	PTQMVQQLTPADREARVLRREKRRKFEKIRYASRKAYAEVRPRIKGRFAKRIDMEA
B-r apa50	PTQMVQQLTPADREARVLRREKRRKFEKIRYASRKAYAEVRPRIKGRFAKRIDMEA
B-r apa4404	PTQMVQQLTPADREARVLRREKRRKFEKIRYASRKAYAEVRPRIKGRFAKRIDMEA
B-r apa4402	PTQMVQQLTPADREARVLRREKRRKFEKIRYASRKAYAEVRPRIKGRFAKRIDMEA
	*****
Ref ._CDS	DAEQLFSTSLMSNTSYGIVPSF
B-r apa05	DAEQLFSTSLMSNTSYGIVPSF
B-r apa50	DAEQLFSTSLMSNTSYGIVPSF
B-r apa4404	DAEQLFSTSLMSNTSYGIVPSF
B-r apa4402	DAEQLFSTSLMSNTSYGIVPSF
	*****

그림2. 배추 Bra021464 아미노산 서열 비교. 4가지 계통(05,50,4404,4404)의 Bra021464 단 백질서열을 비교하였음.

- 배추 개화유전자에 대한 보다 상세한 연구가 있어야 하겠으나 현재 분석한 결과로는 CO homolog가 배추 개화차이에 상당한 기여를 할 것으로 예상된다.

### ③ 타겟 유전자 선정

- 배추는 애기장대와 같은 십자화과에 속한다.
- 또한 애기장대 개화유전자의 거의 대부분이 배추에도 있는 것을 알 수 있었다.
- 이러한 결과는 애기장대의 개화조절 핵심 유전자가 배추에서도 비슷한 기능을 할 것으로 추정할 수 있었다. 제한된 연구기간 등을 감안해 볼 때 핵심 유전자를 먼저 테스트 해 보는 것이 가장 합리적인 접근방법이라고 판단하였다.

- 애기장대의 대표적인 핵심 개화조절유전자는 FT, SOC1, CO 등이다. 이들 유전자는 특히 floral integrator로서 여러 신호를 받아 최종적으로 개화 유무를 결정하는 데 있어 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- 따라서 이들 세 유전자를 일차적인 타겟으로 선정하였다.
- 배추에는 FT가 4개, SOC1이 5개, CO가 4개 있는 것으로 추정되었다.

#### ④ gRNA 디자인 및 벡터 제작

- FT, SOC1, CO에 대한 gRNA를 제작하였다.

Construct No.	애기장대 유전자	배추 유전자	sgRNA 서열	방향
1	CO	Bra008668	GGCTGATCGGCATGTGTCACAGG	+
2	CO	Bra008668	AGACAGTGCATGCGGCTGATCGG	+
3	CO	Bra008669	GTAGTGAAGAGAACAACACCGGG	+
4	CO	Bra008669	CCGCGAGCTTGTGACACATGCGG	+
5	CO	Bra008669	CCGCATGTGTCACAAGCTCGCGG	-
6	CO	Bra021464	TTCACGGTAGATAGTGCAGGCGG	-
7	CO	Bra021464	AGCTTCACGGTAGATAGTGCAGG	-
8	CO	Bra021464	TGCGTGAACCTCGAGCATCGCAGG	-
9	CO	Bra023541	ACACGGTGCATGCGGCTGAACGG	-
10	CO	Bra023541	AGAATCAGCTCGGCAGTACACGG	-
11	CO	Bra023541	ACAAGTAGGCAGAATCAGCTCGG	-
12	FT	Bra004117	CAGAGATCCTCTTGTGGTAGGGG	+
13	FT	Bra004117	AGAGATCCTCTTGTGGTAGGGG	+
14	FT	Bra004117	CTTGTGGTAGGGGGAGTGATAGG	+
15	FT	Bra010052	CTAATAGTGGGAAGAGTGATAGG	+
16	FT	Bra010052	GTGACTCTCATAGTCACTTGG	-
17	FT	Bra010052	TCCAACACAGTCGTCTCCAATGG	+
18	FT	Bra015710	GGCAAAGACAGATAACTAATGG	+
19	FT	Bra015710	TTCCATTAGTTATCTGTCTTTGG	-
20	FT	Bra015710	TAACTAATGGAATGGATCTAAGG	+
21	FT	Bra022475	ATAGAGATCCTCTTGTGGTAGGG	+
22	FT	Bra022475	CTTGTGGTAGGGGAGAGTTGTAGG	+
23	SOC1	Bra000392	ACCGTTCTCTGAGCAATAGTAGG	+
24	SOC1	Bra000392	GCCTACTATTGCTCAGAGAACGG	-
25	SOC1	Bra000392	TCTTGAAAAATGAGCTTGAAGG	+
26	SOC1	Bra000392	ATGAGCTTGAAGGAACTGCTAGG	+
27	SOC1	Bra000393	AGTCAGCAGCAAACCGTTTCGG	+
28	SOC1	Bra000393	AGAAAAGTGGACGAGGTGACGAGG	+
29	SOC1	Bra004927	TATCTTGTGGGTATTCTTAAAGG	+
30	SOC1	Bra004927	TGGAGAAGATATTGGAGAAATGG	+
31	SOC1	Bra004927	CGTGAAGCAACTGCAAGCGTTGG	+
32	SOC1	Bra004927	AGCAACTGCAAGCGTTGGAGCGG	+
33	SOC1	Bra004928	-	
34	SOC1	Bra039324	GCTCTCAGTGCTTTGTGATGCGG	+
35	SOC1	Bra039324	TCGAGCAAGAACAAGAAAGTGG	+
36	SOC1	Bra000393,	TCTGATCATCTTCTCTCTAAGG	+

		004928, 039324		
37	SOC1	Bra000392, 004927	CTCTACGAGTTCGGCAGTGTCGG	+
38	SOC1	Bra000392, 004927	CTCATCGTCTTCTCTAGCCGCGG	+
39	FT	Bra004117, 022475	AAGCCAAGAGTTGAGATTGGTGG	+
40	FT	Bra004117, 022475	CCTAAGGAACTTCTATACTTTGG	+
41	SOC1 + FT	37 + 39		
42	5개 SOC1	36 + 37		
43	3개 SOC1	37 + 27		

- 각 타겟 유전자당 2~3개의 gRNA를 디자인 하였다. Bra004928의 경우 이 유전자 특이적인 gRNA를 디자인 할 수 없었다. 과제 초기에는 유전자 각각에 대해 KO(knock-out) 시킬 수 있는 gRNA를 제작하고 실험에 사용하였으나 전체 gRNA 숫자가 많고 (35개) 형질전환에 사용한 계통의 형질전환 효율이 낮아 접근방법을 전환하였다.

- 애기장대와는 달리 각 유전자가 한 개 이상의 homolog를 가지고 있으므로 적어도 두 개 이상의 유전자를 KO해야 원하는 만추대를 얻을 가능성이 높았다. 또한 각 유전자의 발현을 조사해 보았을 때 (협동과제) FT 유전자의 경우 두 개 유전자만 저온처리 (춘화처리) 후 발현이 증가하여 이들 유전자에 대해서만 gRNA를 제작하였다. SOC1의 경우 모든 유전자가 춘화처리에 반응하였다.

- 2개 이상의 유전자를 타겟팅하는 gRNA는 각 유전자의 서열을 비교하여 100% 서열이 일치하는 부분을 찾고 그곳에서 gRNA를 디자인 하였다. FT의 경우 Bra004117과 Bra022475에서 gRNA를 디자인 할 수 있었고 SOC1의 경우 Bra000393, Bra004928, Bra039324는 서로 유사한 부분이 있었다. SOC1 유전자 중 Bra000392, Bra004927은 나머지 세 유전자와 서열이 유사한 부분이 짧아 같이 묶어서 gRNA를 디자인 하지 못하였으나 이들 두 유전자간에는 유사한 부분이 충분히 길어 두 유전자를 동시에 타겟팅하는 gRNA를 디자인 할 수 있었다.

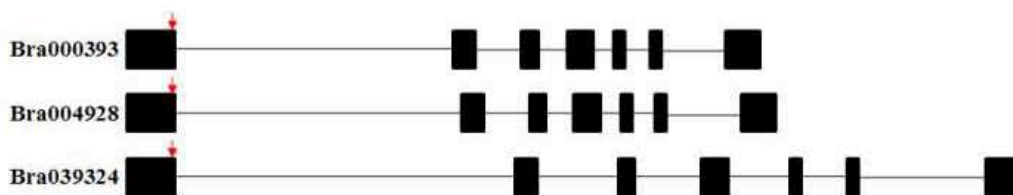


그림3. SOC1 세 유전자를 동시에 타겟팅하는 gRNA 위치 (빨간 화살표). 사각형 도형은 엑손, 실선은 인트론을 나타냄.

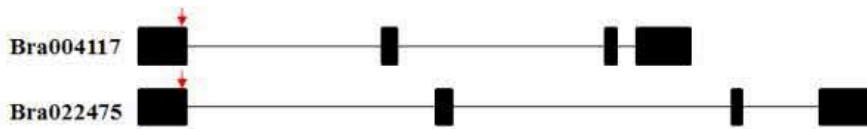


그림4. FT 두 유전자를 동시에 타겟팅하는 gRNA 위치 (빨간 화살표). 사각형 도형은 엑손, 실선은 인트론을 나타냄.

- 연구초기에 수행한 형질전환에서는 각 유전자별 gRNA를 사용하였으나 2017년부터는 다중타겟 gRNA만 실험에 사용하였다.
- gRNA 및 Cas9을 발현시키기 위한 벡터는 pHATc를 사용하였다. 벡터는 *AarI*를 처리하고 올리고로 합성한 gRNA를 annealing하여 벡터에 삽입하였다. 이 벡터는 hygromycin 선발 마커를 가지고 있으며 gRNA는 AtU6 프로모터, Cas9은 35S 프로모터를 사용한다.

### (3) 형질전환

#### ① 재분화 조건 최적화

- 기존에 확립한 재생 시스템을 기반으로 농협종묘 배추 계통을 가지고 재분화를 실시하였다.
- 신초 재생에 있어서 주요 요인인 절편체 부위, 성장조절제, 기타 첨가물 등의 효율적인 조건을 확립하고자 하였다.
- 종자발아 5-7일 된 절편체를 사용하였으며, 절편체는 주맥을 중심으로 5 x 5 mm로 절단하고 모든 실험을 암배양 3주 후 명배양 하였다.
- 기존 재생 시스템을 확인한 결과 농협종묘 배추 품종에는 적합하지 않아 효율적인 조건을 확립하고자 절편체 부위와 성장조절제 및  $AgNO_3$  농도 실험을 실시하였다. 절편체 부위는 자엽 및 배축 모두 캘러스가 유도되었으며, 성장조절제에서도 효율적인 농도를 찾을 수 있었다. 또한 inbred line 종자의 수급 문제로 인하여 조직배양체인 본엽을 절편체로 사용하고 자 성장조절제 농도 실험을 실시하였다. 본엽을 통한 신초 재생을 확인할 수 있었다.

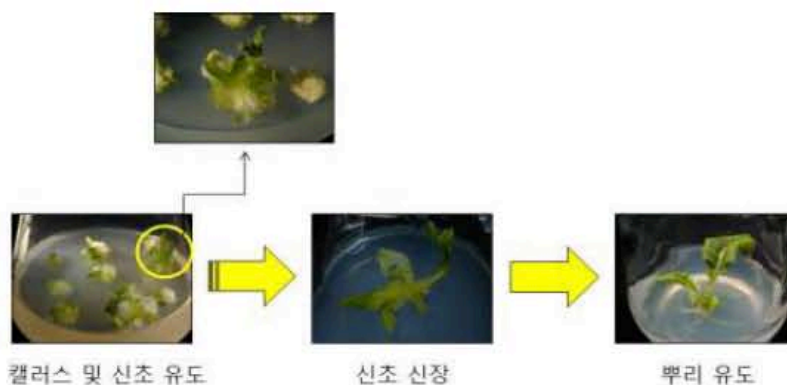
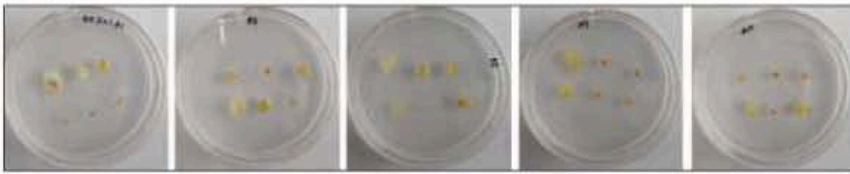


그림5. 배추 절편체로부터 신초 재생 과정

자엽



배축



1 3 5 7 10 mg/L

그림6. 배추 신탄 재생에 미치는 AgNO3의 영향

배축



자엽



본엽



B 5 + N 0.01 B 5 + N 0.01 B 10 + N 0.01

그림7. 배추 신탄 재생에 미치는 생장조절제의 영향



그림8. 배추 본엽을 이용한 신탄 재생

② 형질전환

- 형질전환의 주재료로 20번을 사용하였다. 이는 육성가와 의논한 결과 만추대 특성을 도입할 경우 가장 활용도가 높을 것으로 예상되는 계통이다. 또한 실험결과 만추대가 될 경우 바로 신품종 육성에 사용할 수 있을 것으로 생각되었다.
- 연구초기에는 재료를 원활하게 공급하기 위해 본엽 절편을 실험에 사용하였다. 식물체는 배지에서 발아시켜 3주째, 3~6번째 잎을 주맥을 중심으로 5X5 mm로 잘라서 사용하였다. 그러나 형질전환 효율이 좋지 않아 배축 절편체를 사용하는 방법을 병행하였다. 이를 위해 종자를 암 조건에서 발아시켜 5~7일 후 배축을 0.5~1 cm 크기로 잘라서 사용하였다.

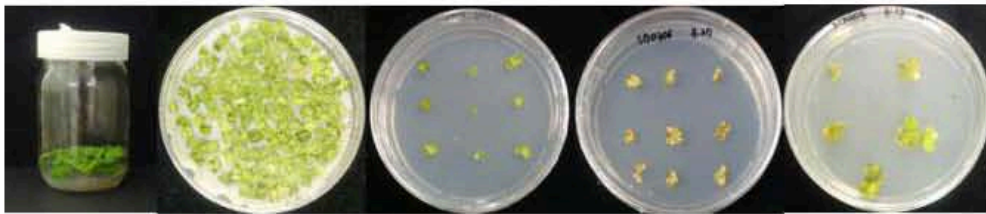


그림9. 배추 본엽 형질전환 과정



그림10. 배추 배축 형질전환 과정

- LBA4404 균주 이용 본엽과 배축 절편체의 유전자 도입 실험을 실시한 결과, 선발배지 배양 8주 기준 캘러스 형성율이 본엽에서는 3.7%, 배축에서는 33.3%로 가장 높게 나타났다. 본엽 절편체에 비해 배축 절편체의 캘러스 효율이 약 10배 이상 높았다.

표6. 계통20번 본엽을 이용한 형질전환 효율

Construct No.	No. of explants (A)	No. of callus (B)	Callus formation(B/A %)
36	463	17	3.7
37	737	14	1.9
38	704	23	3.3
39	602	10	2.3
40	1047	12	1.2

표7. 계통20번 배축을 이용한 형질전환 효율

Construct No.	No. of explants (A)	No. of callus (B)	Callus formation(B/A %)
36	481	160	33.3
37	314	65	20.7
38	481	6	1.3
39	342	28	8.2
40	394	42	10.6

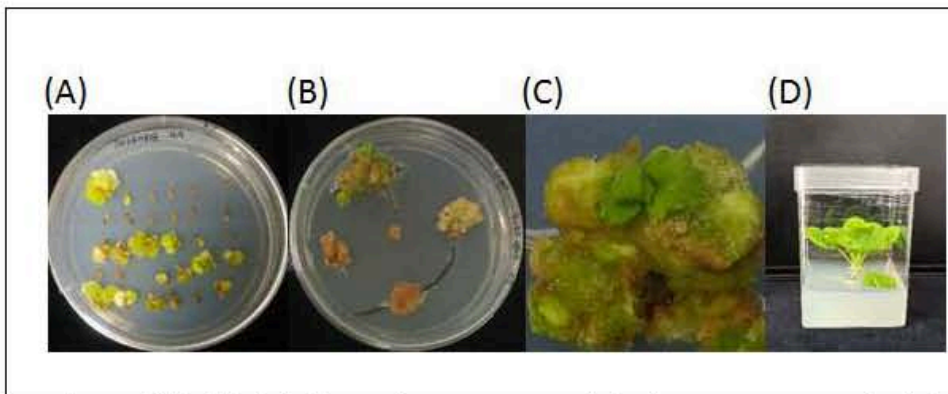


그림11. 배추 형질전환. 39번 construct 사용 (FT double KO). (A) 배양 3주후 캘러스 (B) 배양 10주후 (C) shoot 이 더 성장한 상태 (D) 뿌리유도된 식물체

- 현재까지 얻어진 유전자 교정 식물체는 아래 표와 같다 (표8).

표8. 현재까지 얻어진 유전자 편집체 현황

Construct No.	Target gene	shoot	T0	T1
36	SOC1(Bra000393,004928,039324)	2	3	20
37	SOC1 (Bra000392,004927)			
38	SOC1 (Bra000392,004927)		1	
39	FT(Bra004117, 022475)			
40	FT(Bra004117, 022475)		1	
41	SOC1+FT(37 + 39)		1	
42	SOC1(36 + 37)		1	
43	SOC1(37 + Bra000393)		3	

- 36번 벡터는 현재 **shoot**을 두 개 확보하고 있고 **T0** 단계 유전자 편집체 **3**개체, **T1** 유전자 편집체 **20**개체를 확보하고 있다.
- 37번과 38번은 동일한 유전자를 타겟으로 하는 서로 다른 유전자 가위가 들어간 벡터로서 38번에서만 **T0** 유전자 편집체를 확보하였다.
- 36번 벡터의 **shoot 2**개체는 아직 유전자 교정 여부가 확인되지 않았으나 나머지 개체들은 전부 **NGS**를 통해 유전자 교정이 확인되었다.

**(4) 유전자 교정체 분석**

- 얻어진 각 유전자 교정체는 타겟 유전자 교정 유무를 분석하였다.
- 타겟 유전자의 교정 위치를 중심으로 앞뒤로 약 100bp 정도 길이로 DNA 절편을 PCR로 증폭하였다. 증폭된 PCR 절편은 NGS를 통하여 교정 유무 및 돌연변이 종류를 판별하였다. Sanger sequencing으로도 교정유무를 판별하기도 하지만 교정된 정도가 낮을 경우 제대로 된 결과를 얻지 못할 가능성도 있고 얻어진 유전자 교정체의 수가 많지 않았기 때문에 바로 NGS로 분석하였다.
- 얻어진 결과는 아래 그림과 같다. 그림의 윗부분은 돌연변이 서열을 나타내었고 그 아래에 는 서열의 돌연변이된 결과로 얻어지는 아미노산 서열을 표시하였다.



그림12. Bra004117/Bra022475 double mutant (FT; 40번 벡터)를 타겟으로 하는 유전자 교정체 서열 분석 결과

Bra004117

guide RNA                      PAM

CCAAGAGTTGAGATTGGTGGAGAAGACCTAAGGAACTTCTATA-CTTTGGTTCTTACATTTAAACTCTCTG

WT            CCAAGAGTTGAGATTGGTGGAGAAGACCTAAGGAACTTCTATA-CTTTGGTTCTTACATTTAAACTCTCTG 0

Variant 1    CCAAGAGTTGAGATTGGTGGAGAAGACCTAAGGAACTTCTATACTTTGGTTCTTACATTTAAACTCTCTG +1

Variant 1	7,994/8,786 (90.99%)
-----------	----------------------

guide RNA                      PAM

5' - CCAAGAGTTGAGATTGGTGGAGAAGACCTAAGGAACTTCTATACTTTGGTTCTTACATTTAAACTCTCT - 3'

WT            P R V E I G G E D L R N F Y T L V L T F K L S

Variant 1    P R V E I G G E D L R N F Y I F G S Y I \* T L

\*: Stop codon

Bra022475

guide RNA                      PAM

AGTTGAGATTGGTGGAGAAGACCTAAGGAACTTCTATAC-TTTGGTTCTTACATTTAAACTCTCTTTTGTCTC

WT            AGTTGAGATTGGTGGAGAAGACCTAAGGAACTTCTATAC-TTTGGTTCTTACATTTAAACTCTCTTTTGTCTC

Variant 1    AGTTGAGATTGGTGGAGAAGACCTAAGGAACTTCTATACCTTTGGTTCTTACATTTAAACTCTCTTTTGTCTC

Variant 2    AGTTGAGATTGGTGGAGAAGACCTAAGGAACTTCTAT-C-TTTGGTTCTTACATTTAAACTCTCTTTTGTCTC

Variant 1	5,447/11,887 (45.8%)
Variant 2	5,405/11,887 (45.5%)

guide RNA                      PAM

5' - GTTGAGATTGGTGGAGAAGACCTAAGGAACTTCTATACTTTGGTTCTTACATTTAAACTCTCTTTTGTCT - 3'

WT            V E I G G E D L R N F Y T L V L T F K L S F V

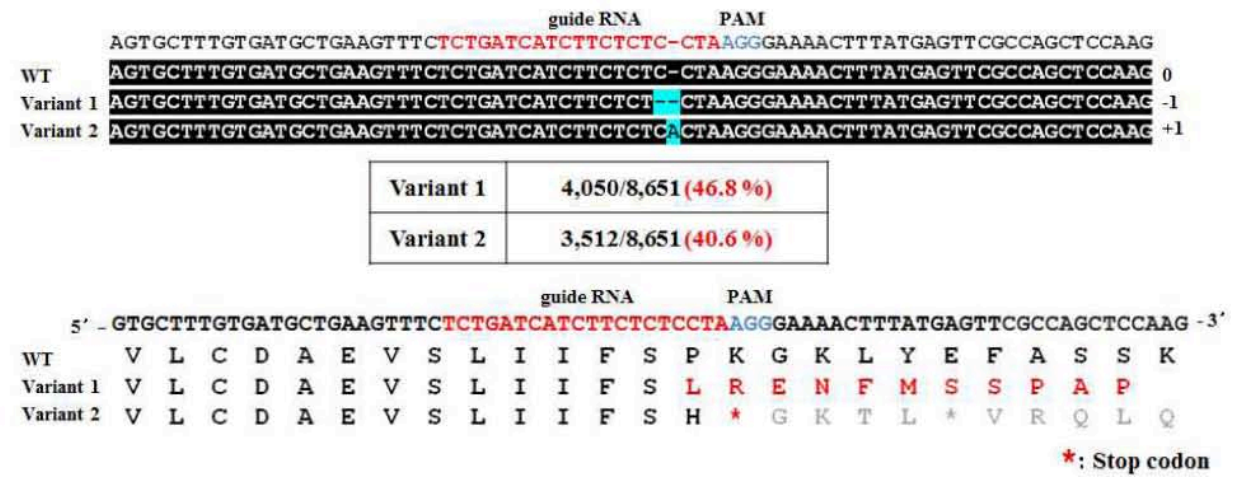
Variant 1    V E I G G E D L R N F Y T F G S Y I \* T L F C

Variant 2    V E I G G E D L R N F Y L W F L H L N S L L S

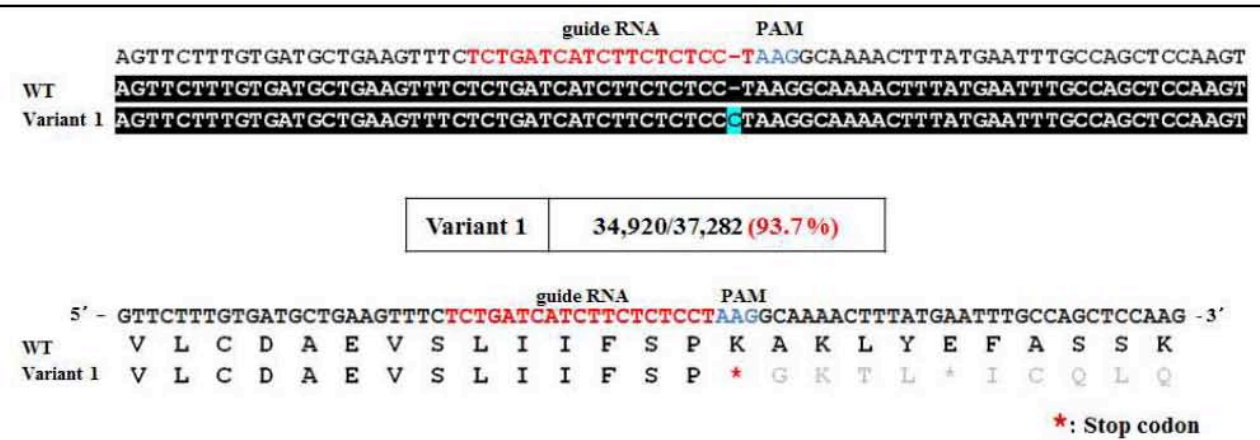
\*: Stop codon

그림13 . Bra000393/Bra004928/Bra039324 triple mutant (SOC1; 36번 벡터: 36-1 개체)를 타겟으로 하는 유전자 교정체 서열 분석 결과

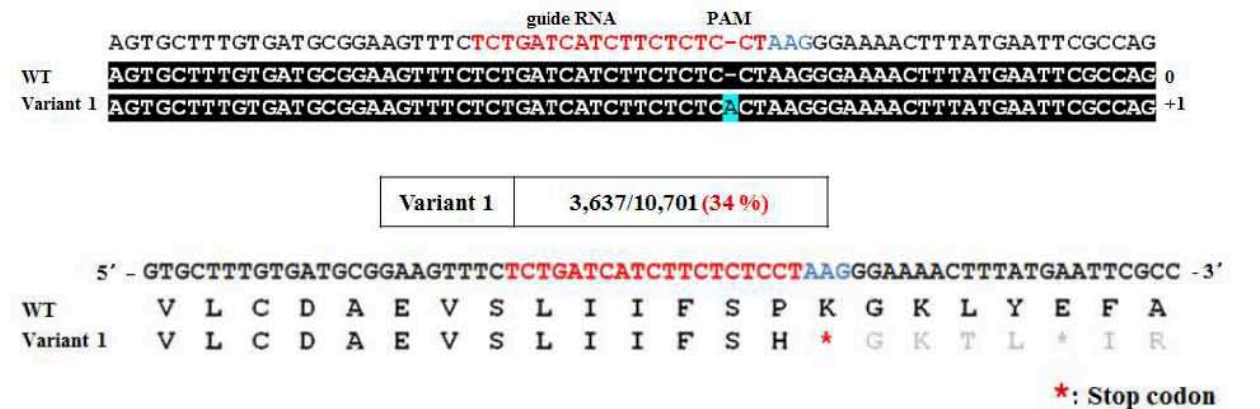
Bra000393



Bra004928



Bra039324



- FT 두 유전자를 타겟으로 만들어진 유전자 교정체는 1 개체가 얻어졌다 (그림 12). Bra0041

17은 한 가지 insertion 이 확인되었으나 Bra022475에서는 두 가지 종류의 deletion 이 확인되었다. sgRNA의 타겟이 아닌 두 FT 유전자 (Bra010052, Bra015710)의 서열도 NGS로 분석한 결과 대부분 WT으로 나타나 디자인 한 sgRNA가 타겟 특이적으로 잘 작동했음을 확인할 수 있었다.

- 한편 **SOC1 triple mutant** (그림 13)에서는 Bra000393의 경우 insertion 1가지, deletion 1가지가 발견되었으며 Bra004928, Bra039324에서는 공히 1가지 종류의 insertion만 발견되었다. 특이한 점은 Bra039324의 경우 오직 약 34%만 변이가 일어났고 나머지는 WT로 나타났다는 점이다. 나머지 두 유전자의 경우 90%이상에서 돌연변이가 확인되었다. 이렇게 변이 비율이 낮은 경우 다음세대로 넘어갔을 때 어떻게 될지 궁금하였다. 나중에 결국 확인되었지만 90% 이상의 비율로 변이를 보이는 개체와 그렇지 않은 개체가 모두 확인되었다.
- **SOC1 triple mutant**의 경우 총 6개체가 얻어졌고 한 개의 shoot을 확보하고 있다. 초기에 얻어진 3개에 대해서 상세한 분석이 이루어 졌다. 이중 36-1번 mutant는 위의 그림13과 같은 결과를 얻었으나 나머지 두 개체는 다른 결과를 보여주었다. 36-2번의 경우는 KO된 유전자가 하나도 없었으며 36-3번에서는 Bra000393만 KO된 것을 확인하였다 (data not shown).
- 또한 Bra000392, Bra004927 두 유전자를 타겟으로 하는 mutant 1개체도 얻어졌으나 Bra000392만 deletion이 확인되었다 (data not shown).

#### (5) 세대진전

- 현재 세대진전이 된 것은 36번 벡터에서 얻어진 36-1번 유전자 편집체가 유일하다. 나머지 개체들은 개화를 유도하기 위해 저온처리 중이며 올해 (2019년) 종자를 받아 세대진전을 할 예정이다.

그림 14. T0 유전자 편집체

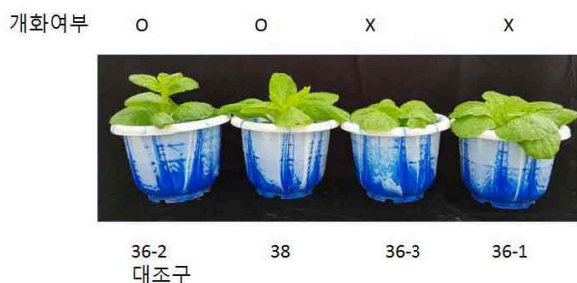


그림 15. T0 유전자 편집체



- 그림 14는 초기에 얻어진 유전자 편집체 사진이다. 36번 벡터에서는 3개체가 얻어졌는데 36-1번은 3개 유전자가 교정된 것이 확인되었고 36-2는 교정된 것이 없어서 대조구로 사용하였다. 36-3에서는 유전자 하나만 교정되었다. 38번 벡터에서 얻어진 38번 식물체도 2개 타겟 유전자 중 한 개만 교정되었다.
- T0 세대에서 저온처리 후 하우스로 옮겼을 때 대조구와 38번 식물체는 개화되었고 나머지 36-1, 36-3번 개체는 개화하지 않았고 이후에 36-3, 36-1 순으로 개화되었다.

- 그림 15는 하우스로 옮겨서 채종하기 위해 재배 중인 것을 보여주고 있다.
- 종자를 받기 위해 교배를 시도하였으나 (육성가 도움으로 진행) 36-1, 36-2번만 종자를 획득하였다.
- 36-2번은 유전자 교정된 것이 없어서 더 이상 실험을 진행하지 않았으며 36-1번은 얻어진 종자 (20립)을 전부 받아서 형질 및 유전자 교정 여부를 분석하였다.
- 4도에서 37일간 저온처리 후 개화여부를 조사해 본 결과 36-1번 T1 식물체 20개 전부 대조구에 비해 개화가 늦어짐을 확인하였다 (그림 16)

그림 16. 36-1 T1 유전자 편집체



대조구 유전자 편집체

- 현재 36-1 T1 식물체에서 종자를 받기 위해 저온처리 중이며 올해 (2019년) T2 종자를 받을 예정이다.
- 36-1 T1 식물체 20개체에 대해 타겟 유전자에 대한 NGS 분석을 수행하였으며 그 결과를 아래 표에 정리하였다.

표 9. 36-1 T1 식물체 타겟 유전자 (SOC1) NGS 분석 결과

식물체	Bra000393	Bra004928	Bra039324
1	-1bp (47.7%)	+1bp (95.8%)	+1bp (48.2%)
	+1bp (47.2%)		
2	-1bp (94.9%)	+1bp (93.1%)	+1bp (42.3%)

3	+1bp (95.6%)	+1bp (95.3%)	+1bp (68%)
4	-1bp (95%)	+1bp (95.9%)	+1bp (42.9%)
5	-1bp (47.5%)	+1bp (95.3%)	+1bp (48.2%)
	+1bp (47.5%)		
6	+1bp (95.1%)	+1bp (41.7%)	+1bp (11%)
7	-1bp (95%)	+1bp (95%)	+1bp (42.2%)
8	-1bp (95.5%)	+1bp (65.9%)	+1bp (86.1%)
9	+1bp (95.7%)	+1bp (95.7%)	+1bp (9.5%)
10	+1bp (95.8%)	+1bp (95.7%)	+1bp (96.5%)
11	-1bp (95.2%)	+1bp (69.2%)	+1bp (11.4%)
12	-1bp (48.3%)	+1bp (95.1%)	+1bp (48.6%)
	+1bp (46.9%)		
13	+1bp (95.2%)	+1bp (95.9%)	+1bp (53.8%)
14	-1bp (96.1%)	+1bp (95.6%)	+1bp (85.3%)
15	-1bp (48.2%)	+1bp (96%)	+1bp (51.7%)
	+1bp (47.5%)		
16	-1bp (47.6%)	+1bp (95.9%)	+1bp (5.3%)
	+1bp (47.6%)		-1bp (5.2%)
17	+1bp (95.7%)	+1bp (94.4%)	+1bp (53.1%)
18	-1bp (51.7%)	+1bp (94%)	+1bp (90.8%)
	+1bp (47.6%)		
19	+1bp (96.3%)	+1bp (94.6%)	+1bp (52.8%)
20	-1bp (47.7%)	+1bp (59.8%)	+1bp (90.9%)
	+1bp (48.2%)		

- 36-1 개체의 T0 NGS 분석 결과는 그림 13에 있다. Bra00393은 처음부터 2가지 변이가 확인되었고 T1 식물체에서 각 조합별로 생길 수 있는 것이 다 확인되었다 (표9). 한편 Bra004928은 한가지 변이만 있었고 동일한 변이가 T1에서도 확인되었다. 특이한 점은 변이가 약 50% 밖에 없는 개체가 4개 정도 보인다는 점이다.
- Bra039324는 T0에서 약 34%만 변이가 확인되었다. T1에서는 다양한 수준의 변이율(9.5~96.5%)이 확인되었다 (표9).
- 이상의 결과를 보면 T1 식물체에서 Bra00393, Bra004928, Bra039324 triple mutant 뿐 아니라 Bra00393, Bra004928 double mutant를 얻을 수 있었다고 생각된다. 이들 개체는 다시 selfing을 하여 T2 세대에서 한번 더 NGS 분석을 할 예정이다.
- 본 연구에서는 Agrobacterium을 이용하여 형질전환하였다. 타겟 유전자가 교정된 것을 확인하였으므로 T-DNA가 없는 개체를 선발하고자 하였다. T1 개체 20개에 대해 Hyg 선발마커와 Cas9 유전자가 있는지 여부를 PCR로 확인한 결과 모든 개체에서 T-DNA가 있는 것으로 나타났다. 이는 36-1 개체에 T-DNA가 multi copy로 들어갔을 가능성을 시사하는 것으로 생각된다.
- copy수를 확인하기 위해 Southern blot을 수행하였으나 확실한 결과를 얻지는 못하였다 (협동과제). 이 부분은 실험을 더 수행할 필요가 있고 T2 개체가 얻어지면 다시 확인이 될 것으로 생각한다.

- 본 연구에서 조추대 엘리트 계통을 만추대 엘리트 계통으로 만드는 것은 성공하였으나 나머지 형질들이 변화가 없는지 조사해 볼 필요가 있다. T2 세대 종자가 받아지면 대비종과 비교하여 조사해 볼 계획이다.

**[협동과제: 한국생명공학연구원]**

**1) 배추 조추대/만추대 계통 간 개화 형질분석**

배추의 조추대/만추대 두 계통 간 개화 형질을 분석하기 위해서 농협종묘로부터 개화시기가 다른 두 계통의 배추 종자를 분양받았다. 추대가 늦게 형성되어 개화가 늦는 만추대 (02, C1, C2) 계통과 추대가 일찍 형성되어 조기 개화하는 형질을 가진 조추대 (42, 40, CR1, CR2, CR3) 계통을 실험 재료로 이용하였다.

- 만추대와 조추대 계통 종자를 멸균된 원예용 상토에 과종한 뒤 발아를 위해 암조건 상태로 저온실(4°C)에 4일 처리한 후에 식물 배양실(23°C, 12시간 광조건/12시간 암조건)에서 5일 동안 발아시켰다. 춘화처리 후 두 계통의 개화특성을 알아보기 위해 발아된 유식물체를 저온실(4°C, 12시간 광조건/12시간 암조건)에서 35일 동안 춘화처리 후 다시 정상조건의 배양실에서 생육하였다. 배양실에서 추대가 올라오는 기간까지의 일(day) 수와 당시 잎 수를 조사하여 배추 계통 간 개화 형질을 비교분석하였다.

- 계통 간 35일 동안 춘화처리 후 배양실 조건에서 생육한 지 27일째에 추대 형성의 차이를 나타내었다 (그림 1). 기존에 만추대로 알려진 02, C1과 C2 계통의 경우 40계통과 마찬가지로 추대가 일찍 형성되어 개화가 일어나는 것을 확인 할 수 있었다. 반면 조추대 CR2, 42 계통의 경우 다른 조추대 계통과는 달리 추대가 형성되지 않아, 제1세부과제에서의 포장 조건과 본 연구결과인 식물배양실 조건에서의 개화형질은 차이를 나타내고 있다.

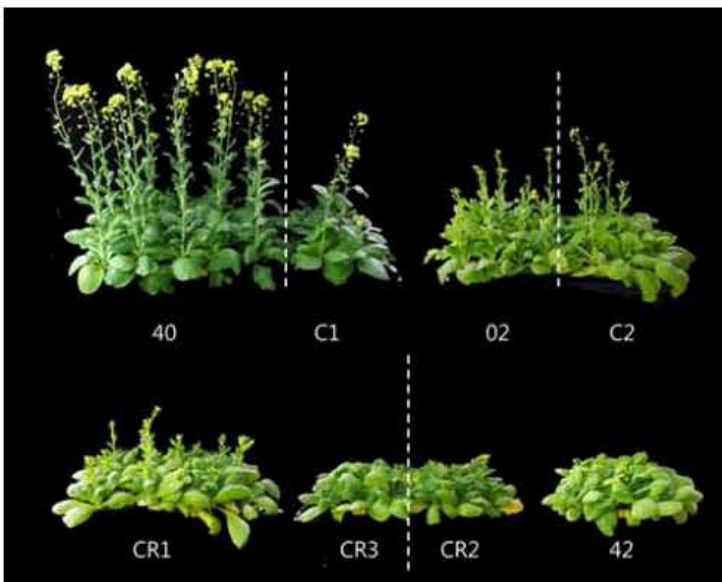
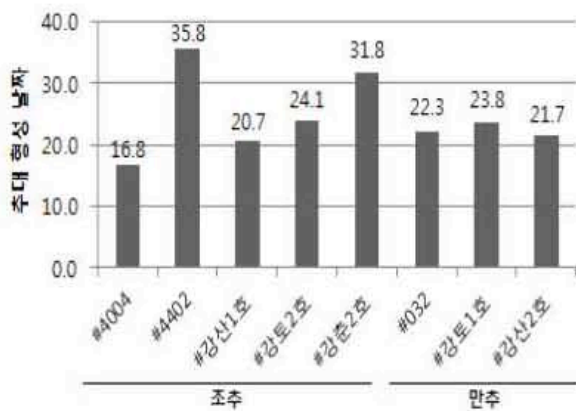


그림 1. 춘화처리 이후 조추대 만추대 두 계통의 추대 표현형

- 개화 특성을 35일간 춘화처리 후, 조추대와 만추대 두 계통간의 추대 형성 날짜와 개화시기와 관련 있는 특성인 로제트 잎의 수를 비교하였다 (그림 2). 춘화처리 후 45일 후에 모든 식

물체의 추대형성률이 100%에 도달하였고, 각 계통(40, 42, C1, CR2, CR3, 02, CR1와 C2)에 대하여 n개체(n=20, 16, 7, 12, 12, 16, 18 and 12) 식물체를 대상으로 조사하였으며 이의 평균값을 나타내었다. 조추대 40 계통은 춘화처리 후 평균 16일째에 가장 일찍 추대가 형성되었다. 다른 조추대 CR1, C2 계통과 만추대 02, CR1, C2 계통의 경우 춘화처리 후 20~24일째에 추대가 형성된다. 반면 조추대 42, CR3 계통의 경우 추대 형성까지 30일 이상 걸리는 것을 확인하였다 (그림 2A). 또한 추대가 형성된 시기에 개화와 관련된 특징 중의 하나인 로제트 잎 수를 측정하였다. 40, CR1, C2, 02, C1, CR2는 평균 잎 수가 12-13장 일 때 추대를 형성함을 보였다. 상대적으로 추대형성이 늦은 42, CR3의 경우 일찍 추대를 형성하는 계통보다 로제트 잎 수가 3-4장이 많았다 (그림 2B).

A.



B.

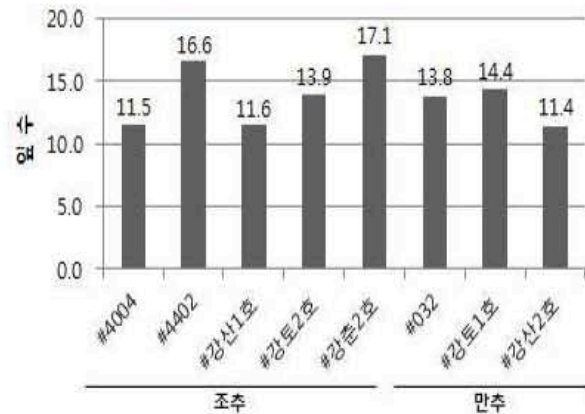


그림 2. 조추대 만추대 두 계통간의 추대 형성 날짜와 잎 수 비교

- 저온 처리기간에 의한 배추 추대형질을 분석하기 위해 조추대 계통 40를 대상으로 저온처리 0, 15, 20, 35일 간격으로 저온처리한 후 일반 배양조건에서 30일간 생육하였다 (그림 3). 배추는 개화유도를 위해 최소한 20일 이상의 저온처리가 필수적이며, 35일간의 춘화처리는 개화에 충분한 일 수임이 확인되었다.

그림 3. 저온처리 기간에 따른 배추 추대형질 표현형



2) 만/조추대 형질 계통 간 RNA-seq 분석: 만/조추대 계통 간 고유 식물체를 대상으로 저온 처리에 따른 RNA 분리 및 NGS sequencing

- 만추대 (50 계통)과 조추대 (40 계통)의 개화시기에 대한 저온처리 영향을 확인하기 위해 2주간의 발아기간과 초기 성장 후 저온처리 (4°C)를 수행하기 전 샘플링 (0 day)을 하고, 35일 저온처리를 하고 샘플링을 하였으며 (35 days), 저온처리 전을 대조군으로 하여 각각 샘플을 비교 분석하였다. 또한 생물학적 반복실험을 위해 2회에 걸쳐 샘플링을 반복 수행 하였다. 전체 8개의 샘플들은 즉시 액체질소에 저장하였으며, RNA-Seq 분석에 사용하였다. RNA sequencing은 Illumina HiSeq2000을 이용하여 수행하였다.

- 두 계통의 저온처리 8개 샘플들로부터 전체 421,910,414 reads를 생산하였으며, 아래와 같은 조건으로 전처리를 수행하고 최종적으로 전체 reads의 대략 90.25% 정도의 300,322,688 cleaned reads를 확보하였다 (표 1과 2). Illumina HiSeq2000으로 생산된 short reads (101bp)의 전처리 과정을 위하여 SolexaQA (v.1.13) package의 DynamicTrim과 LengthSort 프로그램을 사용하였다. DynamicTrim은 phred score에 따라 short read의 양쪽 끝의 bad quality base를 잘라내고 양질의 cleaned read로 정제하는 과정을 수행하며, DynamicTrim의 phred score는 20 이상을 적용하였다. LengthSort는 DynamicTrim에서 너무 많은 base가 잘린 짧은 read들을 제거하는 과정을 수행하며, LengthSort 과정은 short read length가 최소 25bp 이상을 적용하였다.

- 전처리 과정을 통과한 cleaned reads를 배추 Brapa sequence v1.5 CDS 41,020에 mapping하여 유전자가 발현되는 정도를 나타내는 발현값 (read counts)을 측정하였다 (표 3). Read mapping은 bowtie2 (v2.1.0) software (mismatch ≤ 2bp, penalty 방식으로 계산)를 사용하였으며, 발현 값은 각 유전자에 mapping된 reads의 총 수로 계산하였다. 분석에 사용한 표준 유전자 41,020개 중 발현하는 유전자는 37,691개이며, 그 중 functional description을 가진 유전



자는 35,997개로 확인되었다.

표 1. RNA-Seq을 통한 raw sequencing data의 short reads 통계

File name	Sample description	Number of reads	Average length	Total length (bp)
TN1612R1307_1.fq	D0_4004	24,598,099	101	2,484,407,999
TN1612R1307_2.fq		24,598,099	101	2,484,407,999
TN1612R1308_1.fq	D0_4004_2	25,375,998	101	2,562,975,798
TN1612R1308_2.fq		25,375,998	101	2,562,975,798
TN1612R1309_1.fq	D35_4004	24,749,290	101	2,499,678,290
TN1612R1309_2.fq		24,749,290	101	2,499,678,290
TN1612R1310_1.fq	D35_4004_2	24,034,409	101	2,427,475,309
TN1612R1310_2.fq		24,034,409	101	2,427,475,309
TN1704R1192_1.fq	D0_50	27,344,449	101	2,761,789,349
TN1704R1192_2.fq		27,344,449	101	2,761,789,349
TN1704R1193_1.fq	D0_50_2	27,559,937	101	2,783,553,637
TN1704R1193_2.fq		27,559,937	101	2,783,553,637
TN1704R1194_1.fq	D35_50	30,049,245	101	3,034,973,745
TN1704R1194_2.fq		30,049,245	101	3,034,973,745
TN1704R1195_1.fq	D35_50_2	27,243,780	101	2,751,621,780
TN1704R1195_2.fq		27,243,780	101	2,751,621,780
<b>Total</b>	<b>Sea</b>	<b>421,910,414</b>	<b>101</b>	<b>42,612,951,814</b>

표 2. 표 2. RNA sequencing data의 trimming 수행 후 cleaned short reads 통계

Sample description	Number of reads	Average length	Total length (bp)
D0_4004	17,837,999	91.87	1,638,796,126
	17,837,999	86.8	1,548,394,361
D0_4004_2	15,734,146	93.65	1,473,551,208
	15,734,146	86.7	1,364,132,943
D35_4004	18,635,739	91.49	1,705,043,930
	18,635,739	88.02	1,640,322,241
D35_4004_2	18,373,292	90.47	1,662,235,236
	18,373,292	87.8	1,613,139,011
D0_50	19,001,035	92.04	1,748,898,074
	19,001,035	89.95	1,709,231,822
D0_50_2	19,621,403	92.1	1,807,227,274
	19,621,403	90.53	1,776,255,523
D35_50	21,686,460	92.41	2,004,116,861
	21,686,460	89	1,930,064,830
D35_50_2	19,271,270	91.64	1,765,990,802
	19,271,270	89.62	1,727,105,892
<b>Sea</b>	<b>300,322,688</b>	<b>90.25</b>	<b>27,114,506,134</b>

표 3. Cleaned short read의 mapping 통계

Sample description	Number of reads	Average length	Total length (bp)
D0_4004	17,837,999	91.87	1,638,796,126
	17,837,999	86.8	1,548,394,361
D0_4004_2	15,734,146	93.65	1,473,551,208
	15,734,146	86.7	1,364,132,943
D35_4004	18,635,739	91.49	1,705,043,930
	18,635,739	88.02	1,640,322,241
D35_4004_2	18,373,292	90.47	1,662,235,236
	18,373,292	87.8	1,613,139,011
D0_50	19,001,035	92.04	1,748,898,074
	19,001,035	89.95	1,709,231,822
D0_50_2	19,621,403	92.1	1,807,227,274
	19,621,403	90.53	1,776,255,523
D35_50	21,686,460	92.41	2,004,116,861
	21,686,460	89	1,930,064,830
D35_50_2	19,271,270	91.64	1,765,990,802
	19,271,270	89.62	1,727,105,892
<b>Sea</b>	<b>300,322,688</b>	<b>90.25</b>	<b>27,114,506,134</b>

- RNA-Seq 데이터는 샘플의 양에 따라 데이터 편차가 존재하기 때문에 이 샘플들 간의 유의한 유전자 발현 값을 계산하기 위해 총 발현량에 대한 normalization 보정을 R package의 DESeq library를 통해서 수행하였다. 비교되는 두 샘플 간 유의하게 발현되는 유전자 (DEGs; Differentially Expressed Genes) 선별은 DESeq library에 포함된 방법론을 사용하여 분석하였다. 적용 방법론은 각 유전자에 mapping된 발현 값이 샘플 간 비교에서 2배 이상 발현의 차이를 구분하는 2 fold change (FC) 방법과, adjust P-value (FDR)이 0.01 이하를 만족하는 binomial test 방법을 동시에 사용하였다. 본 분석에서는 기준을 만족하는 유전자 중에서  $\log_2$  (Fold Change)의 값이 1보다 크면 up-regulation, -1보다 작으면 down-regulation되었다고 판정하였다. 전체 sampling과 RNA-Seq 전체 분석 방법은 그림 4에 나타내었다.

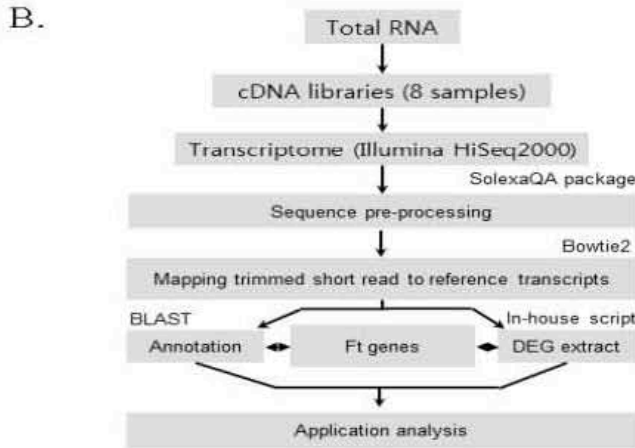


그림 4 RNA-Seq 분석 전체 Flowchart

- 두 계통의 저온 처리에 따른 시간별 샘플들의 발현변화에 대한 두 계통 간 비교분석을 수행하였다 (그림 5). 전체적인 비교 발현 양상은 50계통이 40계통에 비해 저온 처리 전/후에 유전자의 발현변화가 1.6배 정도 많은 것으로 확인되었다. 50 계통에서는 저온처리 35일에서 up-regulated 유전자의 수가 down-regulated 유전자보다 약간 적었으며, 반면에 40 계통에서는 저온처리 후 down-regulated 유전자의 수가 비율적으로 더 많이 나타났다 (그림 6).

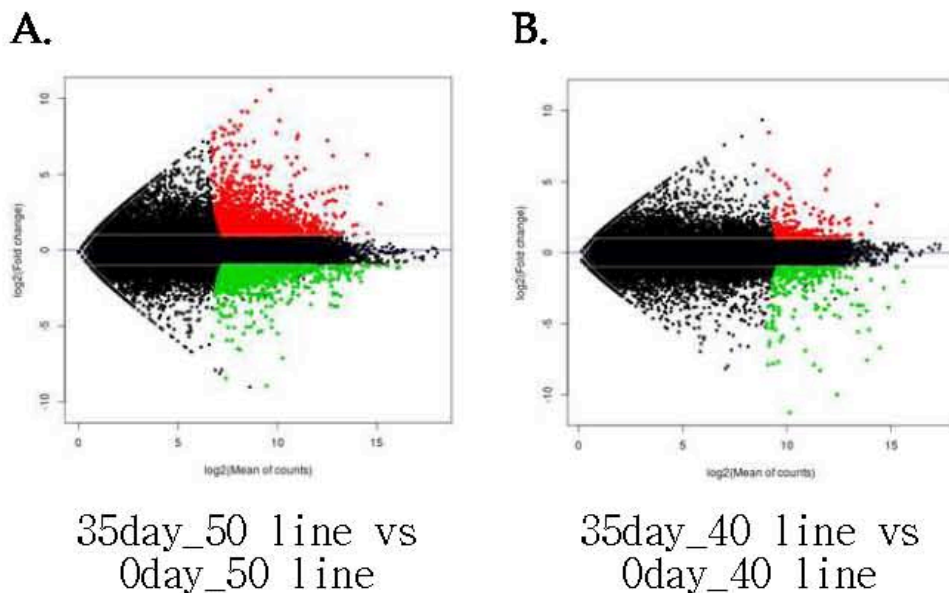


그림 5. 두 계통의 저온 처리에 따른 DEGs 분석한 MA plot 결과

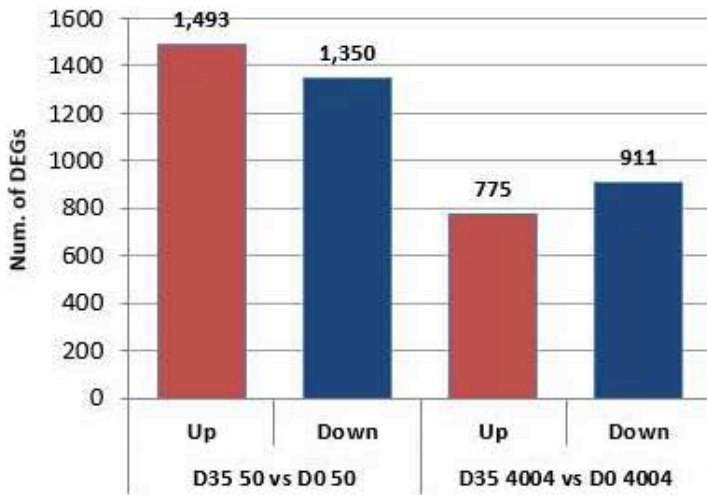
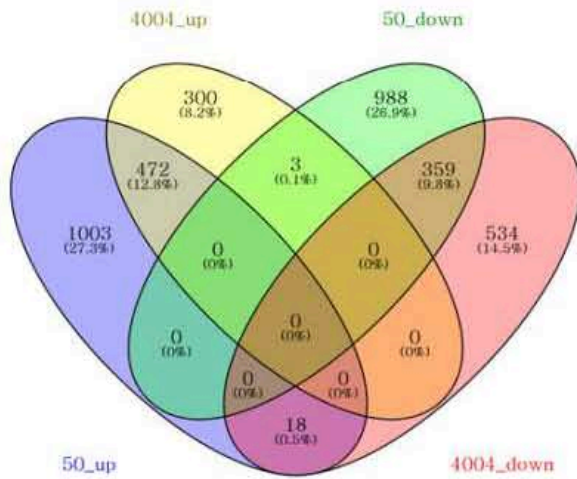


그림 6. 두 제통의 저온처리에 따른 DEGs 비교분석을 통한 유전자의 수

- 두 제통의 저온처리에 따른 DEGs의 비교분석을 통한 특징적인 유전자들을 선별하고자 Venn diagram을 통해 분류하였고 (그림 7A), 50 제통에서 1003개의 유전자가 up-regulation을 나타내었고, 40에서는 300개의 유전자가 up-regulation을 나타내었다. 또한 두 제통에서 함께 up-regulation된 유전자는 472개로 확인되었다. 반대로 down-regulation되는 유전자들은 두 제통 공통으로 356개, 50 제통에서 988개 그리고 40 제통에서 534개로 확인되었다. 여기에서 각 제통 특이적 발현을 나타내는 유전자들을 후보유전자로 확보하였다. 특히적으로 두 제통에서 반대되는 발현을 나타내는 유전자 3개(50에서 up되고 40에서 down됨)와 18개(50에서 down되고 4004에서 up됨)를 확인하였다. 더불어 그 DEGs에 대한 GO 분석 (표4)을 비교하였으며, 특히하게 50 제통에서만 확인되며 up-regulation되는 GO term은 “nucleobase-containing compound metabolic process (GO:0006139)”, “phosphorus metabolic process (GO:0006793)”, “response to organonitrogen compound (GO:0010243)”, “substrate-specific transmembrane transporter activity (GO:0022891)” 그리고 “response to starvation (GO:0042594)”로 확인되었다. 반대로 40 제통에서만 확인되면서 up-regulation되는 GO term은 단지 “vegetative to reproductive phase transition of meristem (GO:0010228)”로 확인되었다.

A.



B.

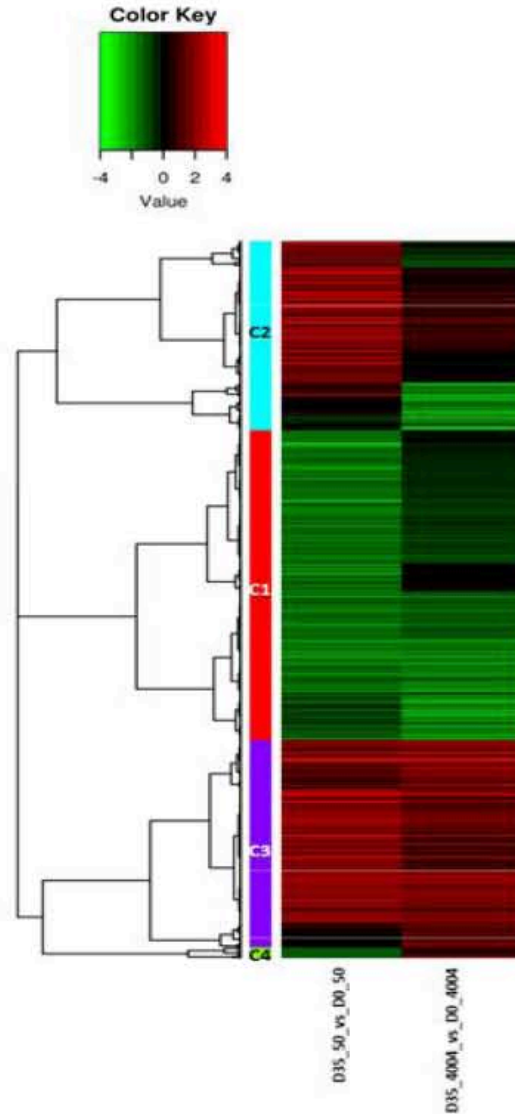


그림 7. 저온처리 시기별 두 계통간 비교를 통한 DEGs sets의 벤다이어그램과 Clustering set의 heatmap.

- Up-regulation되는 유전자들은 35일의 저온처리에 의해 발현이 증가하는 패턴을 나타낸다. 이러한 유전자들은 각 배추 계통에서 저온처리에 의해 특이적 발현을 나타낼 것으로 생각되며 배추의 저온처리에 대한 기작을 이해하는데 도움이 될 것이다. 다음으로 pathway 비교분석을 수행하여 두 계통에서 차이 나는 유전자들에 대한 정보를 확인하였다 (표5). 특이적 sub-classification은 “Replication and repair”였으며, 50 계통에서만 DEGs이 확인되었다. 그리고 major classification의 metabolism에서 전체적으로 50 계통이 40 계통에 비해 비울적으로 up-regulation에 더 많은 유전자들이 확인되었다. 또한, 각 계통별 저온처리에 의한 DEGs의 clustering 분석을 수행하여, 각 계통에 특이적인 유전자군 들을 4개의 cluster로 구분하여 확보

하였다 (그림 7B).

표 4. 두 계통의 시기에 따른 DEGs 유전자군의 GO 비교분석

Category	GO ID	GO Term	50 line		40 line	
			Up (%)	Down (%)	Up (%)	Down (%)
BP	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	6.80	12.67	9.33	13.21
BP	GO:0006139	nucleobase-containing compound metabolic process	<b>18.96</b>	0.00		
BP	GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	6.18	10.17	0.00	14.29
BP	GO:0006629	lipid metabolic process	8.31	15.02	0.00	12.86
BP	GO:0006790	sulfur compound metabolic process	5.01	10.32		
BP	GO:0006793	phosphorus metabolic process	<b>13.94</b>	0.00		
BP	GO:0006810	transport	26.44	15.86	25.78	25.71
BP	GO:0006952	defense response	16.90	6.98	15.56	20.36
BP	GO:0006970	response to osmotic stress	11.40	5.54	12.89	11.79
BP	GO:0006979	response to oxidative stress	0.00	3.26	3.11	4.29
BP	GO:0007049	cell cycle	0.00	4.40		
BP	GO:0007154	cell communication	18.96	12.75	17.78	0.00
BP	GO:0007275	multicellular organismal development	11.26	16.16	19.11	8.93
BP	GO:0008219	cell death	8.17	2.58	6.22	0.00
BP	GO:0009266	response to temperature stimulus	3.98	0.76	6.67	1.43
BP	GO:0009409	response to cold			3.11	1.07
BP	GO:0009414	response to water deprivation	3.57	1.21	5.78	3.57
BP	GO:0009415	response to water	3.57	0.00	5.78	0.00
BP	GO:0009617	response to bacterium	6.66	3.57	4.44	6.79
BP	GO:0009620	response to fungus	7.90	1.75	7.11	4.64
BP	GO:0009725	response to hormone	18.96	14.49		
BP	GO:0009698	phenylpropanoid metabolic process			1.33	4.64
BP	GO:0009791	post-embryonic development	6.32	8.12	11.56	0.00
BP	GO:0009826	unidimensional cell growth	0.27	3.79		
BP	GO:0010228	vegetative to reproductive phase transition of meristem			<b>3.56</b>	0.00
BP	GO:0009887	organ morphogenesis	1.30	3.26		
BP	GO:0010015	root morphogenesis	0.00	3.72		
BP	GO:0010243	response to organonitrogen compound	<b>6.18</b>	0.00		
BP	GO:0010817	regulation of hormone levels	0.00	4.17	4.44	10.36
BP	GO:0015979	photosynthesis	1.10	4.78	0.89	3.21
BP	GO:0016570	histone modification	0.00	17.30	<b>3.11</b>	0.00
BP	GO:0019748	secondary metabolic process	7.21	5.46	0.00	17.14
BP	GO:0040008	regulation of growth	0.34	3.19		
BP	GO:0042594	response to starvation	<b>3.09</b>	0.00		
BP	GO:0045087	innate immune response	12.29	3.57	10.22	10.71
BP	GO:0048364	root development	1.72	4.55		
BP	GO:0048367	shoot system development	4.74	7.74		
BP	GO:0048513	organ development	5.98	10.39		
BP	GO:0048519	negative regulation of biological process	11.20	5.84		

BP	GO:0048608	reproductive structure development	4.05	3.87	<b>8.89</b>	0.00
BP	GO:0048869	cellular developmental process	0.00	8.73		
BP	GO:0051301	cell division	0.69	3.34		
BP	GO:0055085	transmembrane transport	7.49	2.05	9.33	3.93
BP	GO:0055114	oxidation-reduction process			0.44	4.29
BP	GO:0071555	cell wall organization	1.24	3.64	5.33	2.14
BP	GO:0071669	plant-type cell wall organization or biogenesis	4.40	2.50	3.56	0.00
BP	GO:0090626	plant epidermis morphogenesis	0.00	3.64		
CC	GO:0005618	cell wall	1.58	4.86	3.11	2.86
CC	GO:0005737	cytoplasm	40.18	46.89	49.78	64.29
CC	GO:0009579	thylakoid	1.17	<b>7.51</b>	<b>8.00</b>	2.86
CC	GO:0042651	thylakoid membrane	0.00	5.84	0.89	8.21
CC	GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	62.71	0.00	65.33	0.00
MF	GO:0000166	nucleotide binding	10.23	9.03	16.44	8.57
MF	GO:0003676	nucleic acid binding	12.50	7.97	13.33	0.00
MF	GO:0016746	transferase activity, transferring acyl groups	1.65	3.11	3.11	0.00
MF	GO:0016757	transferase activity, transferring glycosyl groups	2.40	3.03	4.44	2.50
MF	GO:0016772	transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	<b>7.76</b>	0.00	0.00	3.93
MF	GO:0016788	hydrolase activity, acting on ester bonds	3.91	5.54	0.00	6.79
MF	GO:0016798	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	3.16	3.87	<b>5.78</b>	0.00
MF	GO:0022891	substrate-specific transmembrane transporter activity	<b>7.49</b>	0.00		
MF	GO:0043169	cation binding	0.00	15.33	0.00	17.50

표 5. 배추 두 계통의 저온처리에 따른 DEGs에 대한 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway 비교분석 결과

Major Classification	Sub Classification	50 line		40 line	
		Up (%)	Down (%)	Up (%)	Down (%)
Cellular Processes	Transport and catabolism	3.23	2.12	0.78	2.37
Environmental Information Processing	Membrane transport	1.28	0.15	3.50	0.00
Environmental Information Processing	Signal transduction	5.59	5.62	4.28	3.32
Genetic Information Processing	Folding, sorting and degradation	3.23	1.46	3.50	0.95
Genetic Information Processing	Replication and repair	0.67	2.34	-	-
Genetic Information Processing	Transcription	0.54	1.39	8.17	0.71
Genetic Information Processing	Translation	1.01	2.26	10.51	10.19
Metabolism	Amino acid metabolism	8.68	8.10	25.29	47.39
Metabolism	Biosynthesis of other secondary metabolites	33.98	37.01	12.84	11.14

Metabolism	Carbohydrate metabolism	10.36	11.24	1.17	2.37
Metabolism	Energy metabolism	1.68	2.92	1.66	1.66
Metabolism	Glycan biosynthesis and metabolism	0.74	1.68	6.06	4.74
Metabolism	Lipid metabolism	7.27	7.46	1.96	2.37
Metabolism	Metabolism of cofactors and vitamins	1.76	2.70	6.06	1.66
Metabolism	Metabolism of other amino acids	3.30	0.80	2.72	1.90
Metabolism	Metabolism of terpenoids and polyketides	3.23	1.97	0.39	1.90
Metabolism	Nucleotide metabolism	0.61	1.17	2.33	6.21
Metabolism	Overview	6.32	6.62	9.73	1.42
Organismal Systems	Environmental adaptation	7.64	4.01	7.40	1.78

### 3) 저온 처리별 두 계통 간 비교 DEGs 분석을 통한 특이적 발현유전자 발굴

- 각 계통의 저온 처리 전과 후 샘플들의 계통간 비교에 따라 발현 변화를 타나내는 유전자를 먼저 선별하고 각 시점에 변화되는 유전자들의 세트를 두 계통간 차이를 비교분석하였다. 첫째로 저온 처리 전 (0일) 샘플간 두 계통의 비교분석, 둘째로 저온 처리 후 35일 샘플간 두 계통 비교분석에서 다른 발현을 나타내는 유전자들을 선별하였다 (그림 8).

- 각 저온처리시간에 계통별 비교에서 선별된 DEGs에서 발현변화의 차이는 유전자들을 찾 고자 두 계통의 비교결과를 비교분석하였다 (그림 9). 두 계통은 0일과 35일 각각의 DEGs결과 에서 유전자 수의 비교에서 저온 처리전 2배 이상 많은 뚜렷한 차이를 나타내었다. 반면 저온 처리 전과 후 모두에서 DEGs의

수는 down-regulation된 50계통이 약간 많은 것을 확인하였다. 또한 저온처리 후에 비해 저온 처리 전의

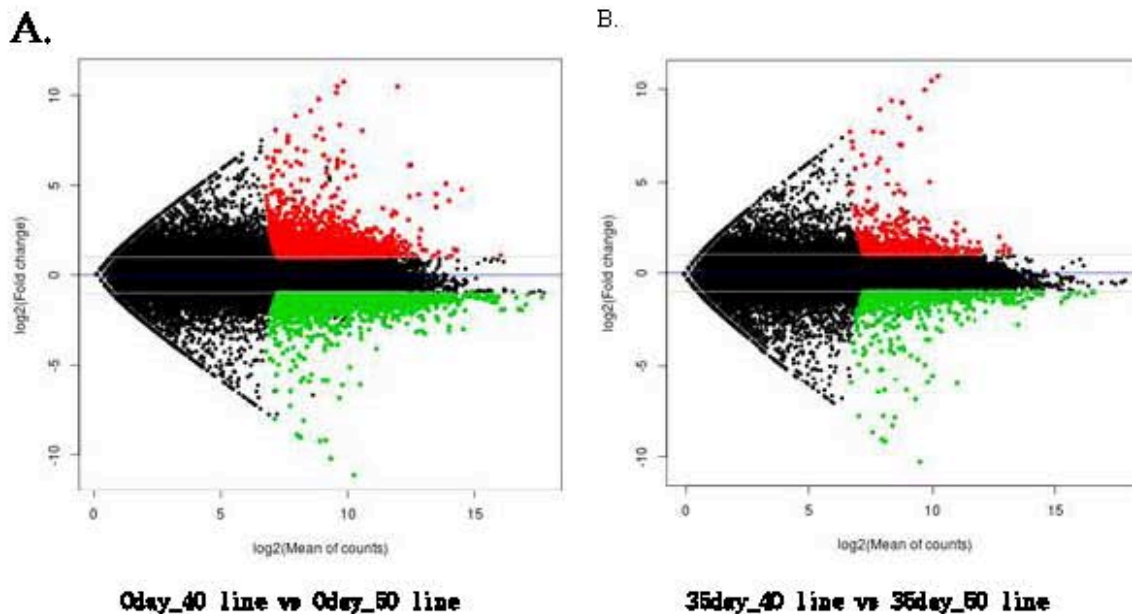


그림 8. 각 저온 처리 기간별 두 계통 간 비교 DEGs의 발현을 비교분석한 MA plot 결과



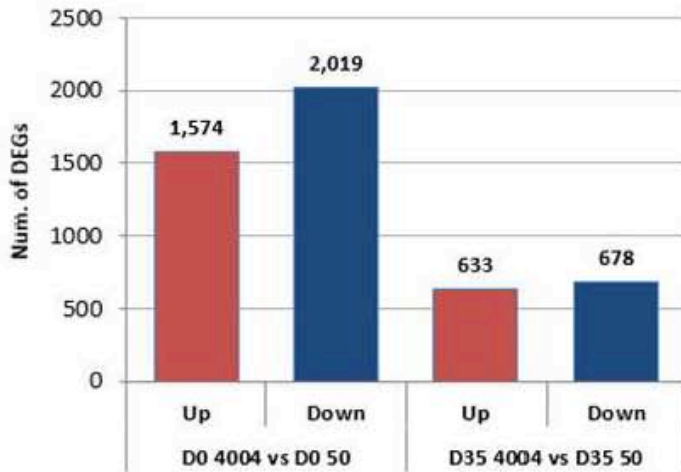


그림 9. 저온 처리기간에 따른 계통간 샘플들을 비교한 각 DEGs set의 비교

발현변화가 많이 일어나고 있음을 알 수 있었다. 결과적으로 두 계통은 저온처리에 대해 다른 반응을 보일 것으로 생각되며, 저온처리 후 35일의 유전자 발현양상에서 차이가 나는 유전자들 후보 유전자로 확보하였다. 따라서 추가적인 분석을 통해 각각에 특징적인 유전자들을 발굴하고자 하였다 (그림 10).

- 저온처리전과 저온처리 후 35일의 계통간 비교분석을 통한 DEGs set들의 GO 분석을 수행하였으며, 저온처리 전 비교에서는 8개(GO:0006790, GO:0006793, GO:0048513, GO:0048519, GO:0016772, GO:0016817, GO:0022891 and GO:0043169)의 GO term에서 4004 계통에서만 up-regulation된 유전자들을 확인 하였으며, 반대로 6개(GO:0009725, GO:0019222, GO:0019538, GO:0044262, GO:0048869 and GO:0042651)의 GO term에서는 50 계통에서만 up-regulation된 유전자들을 확인하였다. 또한 저온처리 35일에서의 DEGs 비교에서는 40 계통에서만 6개의 GO term에 up-regulation된 유의성 있는 유전자들을 확인 할 수 있었고, 50 계통에서는 5개의 term에서 확인하였다. 이러한 각 계통에서만 나타나는 GO term들에 포함된 유전자들은 저온 처리에 따른 특이발현 후보유전자로 선발되었다.

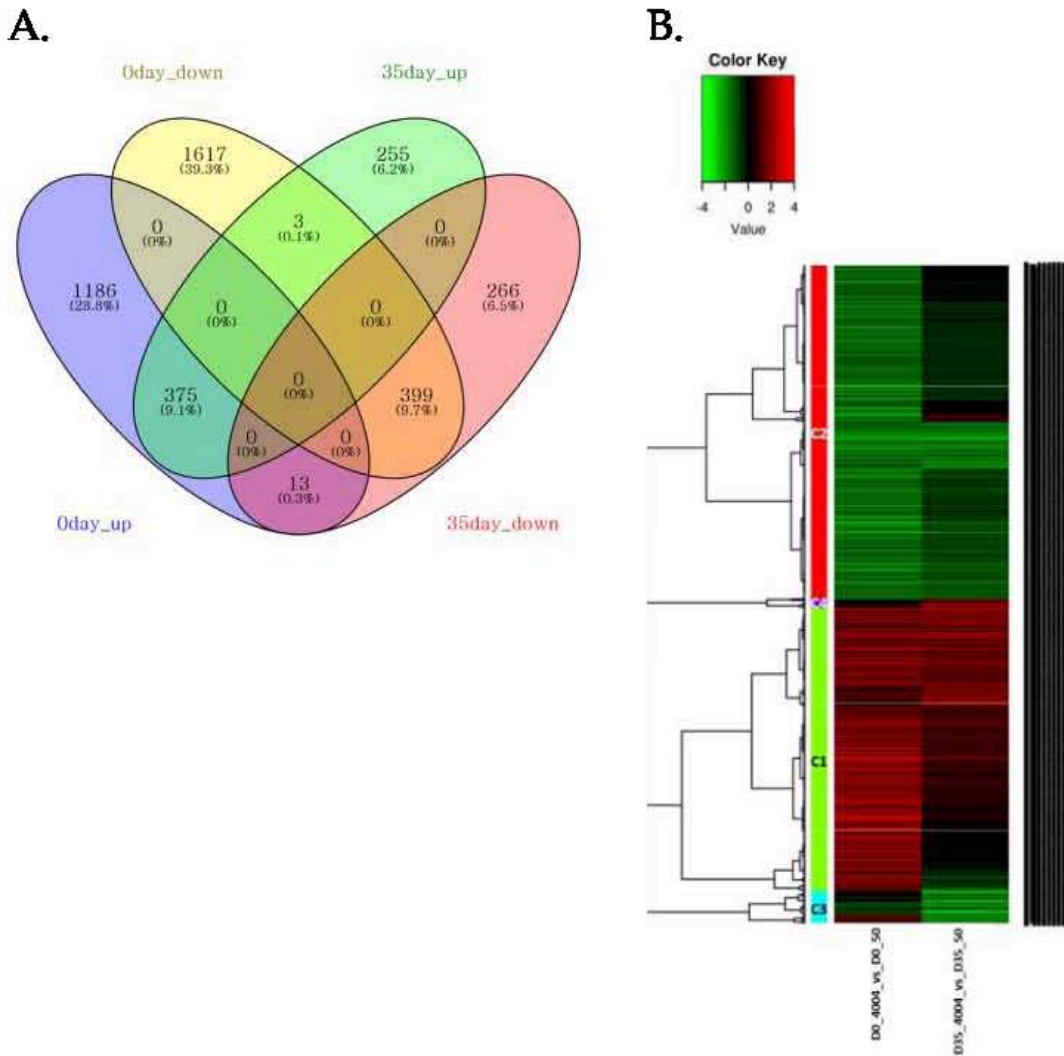


그림 10. 저온처리 전과 저온처리 후 35일의 각 계통 비교분석을 통한 DEGs set들의 비교 벤 다이어그램 과 Clustering sets의 heatmap.

- 저온처리전과 후 각각의 계통간 비교분석을 통한 DEGs set들의 KEGG pathway 분석을 수행하였으며, 0일의 DEGs 비교에서 가장 주요한 차이는 “Translation (brp03010, Ribosome)”에서 확인되며, 다음으로는 “Energy metabolism (brp00195, Photosynthesis)”과 “Environmental adaptation (brp04626, Plant-pathogen interaction)”에서 각 pathway와 연관된 유전자들을 확인 할 수 있었다. 그리고 35일의 DEGs 비교에서는 “Biosynthesis of other secondary metabolites (brp01100, Metabolic pathways)”가 가장 큰 차이를 나타내었으며, “Environmental adaptation (brp00195, Photosynthesis)”과 “Energy metabolism (brp04626, Plant-pathogen interaction)”이 다음으로 확인되었다. 이러한 유전자들은 저온처리 기간별 특이유전자들의 후보유전자로 선발되었다.

표 6. 저온 처리 시기에 따른 두 계통 비교 DEGs 유전자군의 GO 비교분석

Category	GO ID	GO Term	0 day (%)		35day (%)	
			Up (40_up)	Down (50_up)	Up (40_up)	Down (50_up)
BP	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	7.96	11.58	7.58	8.04
BP	GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	6.99	11.13		
BP	GO:0006629	lipid metabolic process	8.22	15.63	<b>7.41</b>	0.00
BP	GO:0006790	sulfur compound metabolic process	5.76	0.00		
BP	GO:0006783	phosphorus metabolic process	12.62	0.00	<b>12.03</b>	0.00
BP	GO:0006810	transport	19.74	19.22	14.66	27.98
BP	GO:0006952	defense response	13.20	8.85	8.40	16.85
BP	GO:0006970	response to osmotic stress	8.09	5.26	2.47	6.96
BP	GO:0007154	cell communication	17.80	11.84	0.00	<b>17.77</b>
BP	GO:0007275	multicellular organismal development	11.97	15.28	11.70	12.83
BP	GO:0008219	cell death	6.28	4.15	3.46	8.50
BP	GO:0009617	response to bacterium	4.08	5.87	2.97	9.27
BP	GO:0009620	response to fungus	5.95	3.24	3.62	7.57
BP	GO:0009725	response to hormone	0.00	13.00	0.00	<b>17.62</b>
BP	GO:0009791	post-embryonic development	7.57	6.93	<b>7.74</b>	0.00
BP	GO:0015979	photosynthesis	0.65	11.99	1.32	12.52
BP	GO:0019222	regulation of metabolic process	0.00	17.20		
BP	GO:0019538	protein metabolic process	0.00	30.25	0.00	<b>25.50</b>
BP	GO:0019748	secondary metabolic process	7.31	4.75	0.00	<b>7.42</b>
BP	GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	0.00	5.77		
BP	GO:0045087	innate immune response	9.06	5.67	6.10	11.13
BP	GO:0048367	shoot system development	5.83	8.95		
BP	GO:0048513	organ development	6.54	0.00		
BP	GO:0048519	negative regulation of biological process	8.03	0.00	<b>8.40</b>	0.00
BP	GO:0048869	cellular developmental process	0.00	7.08		
BP	GO:0055085	transmembrane transport	6.34	3.09		
CC	GO:0005737	cytoplasm	40.13	64.85	33.44	52.70
CC	GO:0005840	ribosome	0.45	10.93		
CC	GO:0009579	thylakoid	1.10	15.02	0.00	<b>12.67</b>
CC	GO:0042651	thylakoid membrane	0.00	12.24	0.49	10.36
CC	GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	62.14	72.94	57.83	64.30
MF	GO:0000166	nucleotide binding	15.21	9.76	20.26	8.50
MF	GO:0003676	nucleic acid binding	11.39	17.80	12.69	10.66
MF	GO:0016772	transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	8.16	0.00		
MF	GO:0016788	hydrolase activity, acting on ester bonds			5.11	2.16
MF	GO:0016817	hydrolase activity, acting on acid anhydrides	5.31	0.00	<b>5.44</b>	0.00
MF	GO:0022891	substrate-specific transmembrane transporter activity	6.28	0.00	<b>5.11</b>	0.00
MF	GO:0043169	cation binding	13.98	0.00		

표 7. 저온 처리 시기에 따른 두 계통 비교 DEGs에 대한 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway 비교분석 결과

Major Classification	Sub Classification	Oday		35day	
		Up (%)	Down (%)	Up (%)	Down (%)
Cellular Processes	Transport and catabolism	3.15	2.33	1.87	2.02
Environmental Information Processing	Membrane transport	1.23	0.10	1.02	0.16
Environmental Information Processing	Signal transduction	5.25	3.49	5.11	3.57
Genetic Information Processing	Folding, sorting and degradation	1.69	3.10	3.41	2.33
Genetic Information Processing	Replication and repair	2.04	2.52	4.26	2.48
Genetic Information Processing	Transcription	1.05	1.41	2.21	0.62
Genetic Information Processing	Translation	1.69	13.92	3.41	4.50
Metabolism	Amino acid metabolism	7.99	4.17	11.07	4.50
Metabolism	Biosynthesis of other secondary metabolites	36.00	31.13	23.68	36.28
Metabolism	Carbohydrate metabolism	9.33	9.21	8.69	9.46
Metabolism	Energy metabolism	1.69	7.47	1.19	9.92
Metabolism	Glycan biosynthesis and metabolism	1.34	1.45	2.21	2.17
Metabolism	Lipid metabolism	5.43	2.91	4.09	2.48
Metabolism	Metabolism of cofactors and vitamins	1.52	2.76	0.68	1.24
Metabolism	Metabolism of other amino acids	2.80	1.07	2.21	1.40
Metabolism	Metabolism of terpenoids and polyketides	3.03	1.16	3.07	2.17
Metabolism	Nucleotide metabolism	1.69	1.79	2.90	0.62
Metabolism	Overview	5.83	7.71	4.77	8.99
Organismal Systems	Environmental adaptation	7.12	2.18	14.14	5.12

#### 4) RNA-seq에 의한 배추 개화유전자군 분류

- Weiger의 이전 연구로부터 확보된 애기장대의 개화 시기관련 174개의 유전자로부터 유사성 검색(Blast)을 통해 배추 발현체에서 135개의 애기장대 유전자에 대한 223개의 homolog 유전자들을 확보하였다 (표 8). Identity는 평균적으로 85.8%를 나타내었으며, 70% 이상을 cutoff 기준으로 하였다. 또한 E-value는  $1e^{-25}$  이하를 cutoff 기준으로 하였으며, 대략 70.4% (157 유전자) 정도의 유전자가 E-value=0의 값을 나타내었다. Pathway는 9개로 나누었으며, 첫 번째로 30% (67 유전자)로 가장 많은 개수의 유전자가 PHOTOPERIOD PATHWAY에서 확인되었다. 다음으로는 VERNALIZATION PATHWAYS로 22% (49 유전자), CIRCADIAN CLOCK PATHWAY의 유전자가 확인되었다.

표 9. 저온처리에 의해 발현되는 배추 개화 조절 유전자들

Br ID	Gene name	Tair ID	Pathway*	Br ID	Gene name	Tair ID	Pathway*	Br ID	Gene name	Tair ID	Pathway*
Bra029424	AGL14	AT4G11880	D/M	Bra005468	FES	AT2G33835	V	Bra002512	PRR3	AT5G60100	C/L/P
Bra011509	AGL16	AT3G57230	A	Bra023933	FIE	AT3G20740	A	Bra009768	PRR5	AT5G24470	C/L/P
Bra014628	AGL18	AT3G57390	C/L/P	Bra030323	FIO1	AT2G21070	C/L/P	Bra029407	PRR5	AT5G24470	C/L/P
Bra007324	AGL18	AT3G57390	C/L/P	Bra006566	FIP1	AT2G06005	V	Bra036517	PRR5	AT5G24470	C/L/P
Bra003279	AGL18	AT3G57390	C/L/P	Bra040110	FIP2	AT4G17060	V	Bra004507	PRR9	AT2G46790	C/L/P
Bra019343	AGL19	AT4G22950	V	Bra038831	FKF1	AT2G18915	C/L/P	Bra019821	RAV1	AT1G13260	C/L/P
Bra019221	AGL24	AT4G24540	C/L/P	Bra038830	FKF1	AT2G18915	C/L/P	Bra026917	RAV1	AT1G13260	C/L/P
Bra011403	ATH1	AT4G32980	D/M	Bra038832	FKF1	AT2G18915	C/L/P	Bra018060	REF6	AT3G48430	C/L/P
Bra021721	ATX1	AT2G31650	C/L/P	Bra009055	FLC1	AT5G10140	V	Bra004926	SAP18	AT2G45640	D/M
Bra033615	BRI1	AT4G39400	A	Bra028599	FLC2	AT5G10140	V	Bra036300	SDG10	AT4G02020	V
Bra011862	BRI1	AT4G39400	A	Bra006051	FLC3	AT5G10140	V	Bra015723	SDG26	AT1G76710	V
Bra010684	BRI1	AT4G39400	A	Bra022771	FLC5	AT5G10140	V	Bra020826	SEP2	AT3G02310	D/M
Bra004503	CCA1	AT2G46830	C/L/P	Bra001357	FLD	AT3G10390	A	Bra032814	SEP3	AT1G24260	D/M
Bra029221	CDF1	AT5G23040	C/L/P	Bra001111	FLK	AT3G04610	A	Bra030032	SEP3	AT1G24260	D/M
Bra028437	CDF2	AT5G39660	C/L/P	Bra004761	FPA1	AT2G43410	A	Bra010955	SEP3	AT1G24260	D/M
Bra025655	CDF2	AT5G39660	C/L/P	Bra035723	FRI	AT4G00650	V	Bra024484	SLY1	AT2G17980	G/M
Bra010082	CDF3	AT3G47500	C/L/P	Bra008624	FRL1	AT5G16320	V	Bra024023	SKB1	AT4G31120	A
Bra018141	CDF3	AT3G47500	C/L/P	Bra031085	FVE	AT2G19520	A	Bra007123	SMZ	AT3G54990	C/L/P
Bra019118	CGA1	AT4G26150	D/M	Bra040678	FVE	AT2G19520	A	Bra004928	SOC1	AT2G45660	I
Bra026461	CGA1	AT4G26150	D/M	Bra036717	FVE	AT2G19520	A	Bra000393	SOC1	AT2G45660	I
Bra022223	CHE	AT3G17590	C/L/P	Bra011133	FVE	AT2G19520	A	Bra039324	SOC1	AT2G45660	I
Bra011540	CIB1	AT4G34530	C/L/P	Bra040681	FVE	AT2G19540	A	Bra004545	SPA1	AT2G46340	C/L/P
Bra034636	CIB1	AT4G34530	C/L/P	Bra006202	FY	AT5G13480	A	Bra000420	SPA1	AT2G46340	C/L/P
Bra039503	CIR1	AT5G37260	C/L/P	Bra023416	FY	AT5G13480	A	Bra035252	SPA2	AT4G11110	C/L/P
Bra007520	CKB3	AT3G60250	C/L/P	Bra036239	GAI	AT4G02780	G/M	Bra027259	SPA3	AT3G15354	C/L/P
Bra003407	CKB3	AT3G60250	C/L/P	Bra000864	GAI	AT4G02780	G/M	Bra021100	SPA3	AT3G15354	C/L/P
Bra032169	CLF	AT2G23380	V	Bra009285	GA2ox3	AT5G07200	G/M	Bra041037	SPL1	AT2G47070	D/M
Bra008669	CO	AT5G15840	C/L/P	Bra032354	GA2ox2	AT1G30040	G/M	Bra021880	SPL3	AT2G33810	D/M
Bra023541	COL1_1	AT5G15850	C/L/P	Bra030187	GA2ox2	AT1G30040	G/M	Bra005470	SPL3	AT2G33810	D/M
Bra008668	COL1_2	AT5G15850	C/L/P	Bra010802	GA2ox2	AT1G30040	G/M	Bra039656	SPL4	AT1G53160	D/M
Bra021464	COL2	AT3G02380	C/L/P	Bra033324	GA2ox6	AT1G02400	G/M	Bra038101	SPL5	AT3G15270	D/M
Bra032061	COL3	AT2G24790	C/L/P	Bra024875	GAI/RGA	AT2G01570	G/M	Bra016891	SPL9	AT2G42200	Aging
Bra020425	COL5	AT5G57660	C/L/P	Bra017443	GAI/RGA	AT2G01570	G/M	Bra004674	SPL9	AT2G42200	Aging
Bra002709	COL5	AT5G57660	C/L/P	Bra024536	GI	AT1G22770	C/L/P	Bra034832	SPY	AT3G11540	G/M
Bra040020	COL9	AT3G07650	C/L/P	Bra039460	GID1A	AT3G05120	G/M	Bra001408	SPY	AT3G11540	G/M
Bra029666	COL9	AT3G07650	C/L/P	Bra040420	GID1B	AT3G63010	G/M	Bra038511	SVP	AT4G24540	V
Bra001264	COL9	AT3G07650	C/L/P	Bra009970	GID1C	AT5G27320	G/M	Bra030228	SVP	AT4G24540	V
Bra005541	COP1	AT2G32950	C/L/P	Bra002788	GNC	AT5G56860	D/M	Bra024735	TEM1	AT1G25560	C/L/P
Bra021818	COP1	AT2G32950	C/L/P	Bra006851	GNC	AT5G56860	D/M	Bra011002	TEM1	AT1G25560	C/L/P
Bra037880	CRY1	AT4G08920	C/L/P	Bra035633	GNC	AT5G56860	D/M	Bra038346	TEM2	AT1G68840	C/L/P
Bra030568	CRY2	AT1G04400	C/L/P	Bra031210	GRP7	AT2G21660	A	Bra013958	TFL2/LHP1	AT5G17690	C/L/P
Bra015313	CRY2	AT1G04400	C/L/P	Bra030284	GRP7	AT2G21660	A	Bra023629	TFL2/LHP1	AT5G17690	C/L/P
Bra003913	Cst f64	AT1G71800	V	Bra029359	HUA2A	AT5G23150	V	Bra001866	TIC	AT3G22380	C/L/P
Bra016588	Cst f77	AT1G17760	V	Bra030874	HUB2	AT1G55250	V	Bra000547	TIC55	AT2G24820	C/L/P
Bra036257	CUL1	AT4G02570	C/L/P	Bra013461	JMJ14	AT4G20400	C/L/P	Bra035933	TOC1	AT5G61380	C/L/P
Bra034597	CUL1	AT4G02570	C/L/P	Bra018540	LD	AT4G02560	A	Bra012964	TOC1	AT5G61380	C/L/P
Bra033363	CUL1	AT4G02570	C/L/P	Bra033291	LHY	AT1G01060	C/L/P	Bra011939	TOE1	AT2G28550	C/L/P
Bra032576	CUL1	AT4G02570	C/L/P	Bra030496	LHY	AT1G01060	C/L/P	Bra000487	TOE1	AT2G28550	C/L/P
Bra028442	CUL1	AT4G02570	C/L/P	Bra018204	LUX/PCL1	AT3G46640	C/L/P	Bra002510	TOE2	AT5G60120	C/L/P
Bra018706	CUL1	AT4G02570	C/L/P	Bra033809	LUX/PCL1	AT3G46640	C/L/P	Bra020262	TOE2	AT5G60120	C/L/P
Bra000874	CUL1	AT4G02570	C/L/P	Bra024350	MAF3	AT5G65060	V	Bra012139	TOE3	AT5G67180	C/L/P
Bra024680	CUL3	AT1G26830	V	Bra031884	MAF4	AT5G65070	V	Bra035049	TPS1	AT1G78580	Aging
Bra016291	CUL3	AT1G26830	V	Bra024351	MAF4	AT5G65070	V	Bra008366	TPS1	AT1G78580	Aging
Bra022023	CUL4	AT5G46210	C/L/P	Bra040518	MBD9	AT3G01460	A	Bra015390	UBC1	AT1G14400	V
Bra001792	DDL	AT3G20550	D/M	Bra034842	MYB65	AT3G11440	G/M	Bra016264	UBC1	AT1G14400	V
Bra015678	EFS	AT1G77300	A	Bra023378	NF-YA1	AT5G12840	C/L/P	Bra016703	UBC1	AT1G14400	V
Bra034284	ELF3	AT2G25930	C/L/P	Bra008878	NF-YA1	AT5G12840	C/L/P	Bra016704	UBC1	AT1G14400	V
Bra007774	ELF3	AT2G25930	C/L/P	Bra005397	NF-YA4	AT2G34720	C/L/P	Bra026222	UBC1	AT1G14400	V
Bra017035	ELF4	AT2G40080	C/L/P	Bra005074	NF-YB1	AT2G38880	C/L/P	Bra026833	UBC1	AT1G14400	V
Bra004991	ELF4	AT2G40080	C/L/P	Bra017473	NF-YB2	AT5G47640	C/L/P	Bra041162	UBP26	AT3G49600	V
Bra000165	ELF4	AT2G40080	C/L/P	Bra031651	NF-YC9	AT1G08970	C/L/P	Bra019603	UBP26	AT3G49600	V
Bra009474	ELF6	AT5G04240	C/L/P	Bra030749	NF-YC9	AT1G08970	C/L/P	Bra017972	UBP26	AT3G49600	V
Bra009582	ELF7	AT1G79730	A	Bra018589	NF-YC9	AT1G08970	C/L/P	Bra020445	VIN3A	AT5G57380	V
Bra013162	ELF8	AT2G06210	A	Bra024737	PFT1	AT1G25540	C/L/P	Bra006824	VIN3B	AT5G57380	V

Bra006104	EMF1	AT5G11530	V	Bra020013	PHYA	AT1G09570	C/L/P	Bra035940	VIP4A	AT5G61150	V
Bra023327	EMF1	AT5G11530	V	Bra031672	PHYA	AT1G09570	C/L/P	Bra031459	VIP5	AT1G61040	V
Bra015200	EMF2	AT5G51230	V	Bra022192	PHYB	AT2G18790	C/L/P	Bra037544	VRN1	AT3G18990	V
Bra030818	ESD1	AT3G33520	V	Bra039485	PHYC	AT5G35840	C/L/P	Bra022376	VRN1	AT3G18990	V
Bra038062	ESD4	AT4G15880	V	Bra020017	PIF3	AT1G09530	C/L/P	Bra001729	VRN1	AT3G18990	V
Bra038446	FCA	AT4G16280	A	Bra031668	PIF3	AT1G09530	C/L/P	Bra021078	VRN2	AT4G16845	V
Bra010504	FD	AT4G35900	C/L/P	Bra000283	PIF4	AT2G43010	C/L/P	Bra015039	VRN5	AT3G24440	V
Bra011648	FD	AT4G35900	C/L/P	Bra037742	PIF4	AT2G43010	C/L/P	Bra040414	WNK1	AT3G04910	C/L/P
Bra017735	FD	AT4G35900	C/L/P	Bra033856	PRR1	AT1G32100	C/L/P	Bra001129	WNK1	AT3G04910	C/L/P
Bra022958	FES	AT2G33835	V	Bra023237	PRR1	AT1G32100	C/L/P				
Bra022957	FES	AT2G33835	V	Bra020263	PRR3	AT5G60100	C/L/P				

- C/L/P: CIRCADIAN CLOCK, LIGHT SIGNALING and PHOTOPERIOD PATHWAYS

- D/M: DEVELOPMENT and MERISTEM RESPONSE

- G/M: GIBBERELLIN SIGNALING and METABOLISM

- I: FLORAL INTEGRATOR

- V: VERNALIZATION PATHWAY

### 5) 배추 주요 개화유전자의 발현수준 분석

- 조추대 만추대 두 계통의 배추 유식물체에서 식물의 개화조절 기작에 관여하는 유전자의 발현 수준을 확인하기 위하여 애기장대의 개화 시기관련 유전자로부터 유사성 검색(BLAST)를 통해 배추의 개화 관련 유전자들을 BrassicaDB (<http://brassicadb.org/brad/flowerGene.php>)에서 확보하였다 (표 10). Identity는 평균적으로 86.94%를 나타내었고, 70% 이상을 cutoff 기준으로 하였다. E-value는  $1e^{-25}$  이하를 cutoff 기준으로 하였으며, 대략 85% (81 유전자) 정도의 유전자가 E-value=0의 값을 나타내었다. 확보한 개화조절 기작에 관여하는 유전자들 중 주요 유전자들(*FLC*, *CO*, *SOCI*, *FT*)의 유전자발현 수준을 저온처리 전, 후의 배추 유식물체를 통해 확인하였다. *FLC*, *SOCI*과 *FT* 유전자는 개화조절 유전자 네트워크의 주요 유전자이며 *CO* (*CONSTANS*)는 광주기성 개화기작에 관여하는 유전자이다. 주요 개화 유전자 발현 분석에 사용된 primer 정보는 표 11에 나타내었다.

표 10. BLAST 분석 결과로부터 선발된 개화 유전자 목록

Index	Gene symbol	Annotation	At ortholog	Gene (B. rapa)	Identity	E-value
1	AGL24	AGAMOUS LIKE 24	AT4G24540	Bra019221	89.28	0
2	ap1	APETALA 1	AT1G69120	Bra038326	92.87	0
3	ap1	APETALA 1	AT1G69120	Bra004007	91.18	0
4	ap1	APETALA 1	AT1G69120	Bra004361	95.32	0
5	AP2	APETALA 2	AT4G36920	Bra011741	89.43	0
6	AP2	APETALA 2	AT4G36920	Bra017809	88.24	0
7	CDF1	CYCLING DOF FACTOR1	AT5G62430	Bra029261	83.46	0
8	CDF1	CYCLING DOF FACTOR1	AT5G62430	Bra010082	87.37	2.00E-122
9	CO	CONSTANS	AT5G15840	Bra008669	80.54	0
10	COP1	CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1	AT2G32950	Bra005541	89.72	0
11	COP1	CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1	AT2G32950	Bra021818	91.13	2.00E-107

12	CRY1	CRYPTOCHROME1	AT1G04400	Bra030568	87.4	0
13	CRY1	CRYPTOCHROME1	AT1G04400	Bra015313	86.61	0
14	CRY2	CRYPTOCHROME2	AT4G08920	Bra037880	89.87	0
15	CSTF64	-	AT1G71800	Bra003913	83.82	0
16	CSTF64	-	AT1G71800	Bra007985	85.2	0
17	CSTF77	-	AT1G17760	Bra016588	91.44	0
18	FCA	-	AT4G16280	Bra038446	87.74	0
19	FD	-	AT4G35900	Bra010504	85	4.00E-155
20	FD	-	AT4G35900	Bra011648	80.2	4.00E-135
21	FD	-	AT4G35900	Bra017735	81.33	8.00E-157
22	FLC	FLOWERING LOCUS C	AT5G10140	Bra009055	87.82	0
23	FLC	FLOWERING LOCUS C	AT5G10140	Bra028599	87.94	0
24	FLC	FLOWERING LOCUS C	AT5G10140	Bra006051	87.6	0
25	FLD	FLOWERING LOCUS D	AT3G10390	Bra001357	83.46	0
26	FLK	FLOWERING LOCUS KH DOMAN	AT3G04610	Bra001111	91.47	0
27	FPA	-	AT2G43410	Bra004761	84.58	0
28	FRI	FRIGIDA	AT4G00650	Bra035723	81	4.00E-148
29	FT	FLOWERING LOCUS T	AT1G65480	Bra022475	88.55	0
30	FT	FLOWERING LOCUS T	AT1G65480	Bra004117	86.91	8.00E-170
31	FVE	-	AT2G19520	Bra031085	90.09	0
32	FVE	-	AT2G19520	Bra040678	90.21	0
33	FVE	-	AT2G19520	Bra036717	92.48	0
34	FY	-	AT5G13480	Bra006202	90.24	0
35	FY	-	AT5G13480	Bra023416	89.68	0
36	GA1	GA REQUIRING 1	AT4G02780	Bra036239	87.85	0
37	GA1	GA REQUIRING 1	AT4G02780	Bra000864	87.17	0
38	GAI	GA INSENSITIVE	AT1G14920	Bra024875	82.53	0
39	GAI	GA INSENSITIVE	AT1G14920	Bra017443	83.28	0
40	GI	GIGANTEA	AT1G22770	Bra024536	87.19	0
41	GID1A	GIBBERELLIN	AT3G05120	Bra009970	82.06	0
42	GID1B	GIBBERELLIN	AT3G63010	Bra040420	86.67	0
43	GID1C	INSENSITIVE DWARF 1	AT5G27320	Bra009970	87.3	0
44	GNC	GATA,NITRATE-INDUCIBLE,CARBON-METABOLISM	AT5G56860	Bra002788	83.76	0
45	GNC	GATA,NITRATE-INDUCIBLE,CARBON-METABOLISM	AT5G56860	Bra006851	83.03	0
46	GNC	GATA,NITRATE-INDUCIBLE,CARBON-METABOLISM	AT5G56860	Bra035633	84.71	0
47	GNL	GNC-LIKE	AT4G26150	Bra019118	82.69	2.00E-68
48	GNL	GNC-LIKE	AT4G26150	Bra026461	83.39	2.00E-69
49	LD	LUMINDEPENDENS	AT4G02560	Bra018540	88.09	0
50	LFY	LEAFY	AT5G61850	Bra029305	87.72	0
51	LFY	LEAFY	AT5G61850	Bra019619	88.35	0
52	LHP1	LIKE HETEROCHROMATIN 1	AT5G17690	Bra013958	79.11	0
53	LHP1	LIKE HETEROCHROMATIN 1	AT5G17690	Bra023629	83.93	8.00E-104

54	PHYA	PHYTOCHROME A		AT1G09570	Bra020013	87.9	0
55	PHYA	PHYTOCHROME A		AT1G09570	Bra031672	87.29	0
56	PHYB	PHYTOCHROME B		AT2G18790	Bra022192	85.25	0
57	PRC2 (CLF,EMF2)	Polycomb repressine complex 2 (Curly Leaf, Embryonic Flowering 2)		AT2G23380	Bra032169	87.42	0
58	PRC2 (CLF,EMF2)	Polycomb repressine complex 2 (Curly Leaf, Embryonic Flowering 2)		AT5G51230	Bra015200	90.51	0
59	PRC2 (CLF,EMF2)	Polycomb repressine complex 2 (Curly Leaf, Embryonic Flowering 2)		AT5G51230	Bra022541	87.48	0
60	PRC2 (CLF,EMF2)	Polycomb repressine complex 2 (Curly Leaf, Embryonic Flowering 2)		AT5G51230	Bra029179	83.87	0
61	RGA	REPRESSOR OF GA1-3		AT2G01570	Bra024875	87.14	0
62	RGA	REPRESSOR OF GA1-3		AT2G01570	Bra017443	86.61	0
63	SMZ	SCHLAFMUTZE		AT3G54990	Bra007123	86.49	0
64	SOC1	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1		AT2G45660	Bra004928	93.65	0
65	SOC1	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1		AT2G45660	Bra000393	93.02	0
66	SOC1	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1		AT2G45660	Bra039324	92.87	0
67	SPA	SUPPRESSOR OF PHYA-105		AT2G46340	Bra004545	86.56	0
68	SPA	SUPPRESSOR OF PHYA-105		AT2G46340	Bra000420	87.57	0
69	SPA	SUPPRESSOR OF PHYA-105		AT4G11110	Bra035252	89.4	0
70	SPA	SUPPRESSOR OF PHYA-105		AT3G15354	Bra027259	88.87	0
71	SPA	SUPPRESSOR OF PHYA-105		AT3G15354	Bra021100	88.88	0
72	SPA	SUPPRESSOR OF PHYA-105		AT1G53090	Bra021100	82.4	0
73	SPA	SUPPRESSOR OF PHYA-105		AT1G53090	Bra038098	78.78	3.00E-155
74	SPL	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE		AT2G47070	Bra041037	85.52	0
75	SPY	SPINDLY		AT3G11540	Bra034832	92.32	0
76	SPY	SPINDLY		AT3G11540	Bra001408	91	0
77	SVP	PHASE		AT2G22540	Bra038511	88.58	0
78	SVP	PHASE		AT2G22540	Bra030228	89.53	0
79	TEM1	TEMPRANILLO 1		AT1G25560	Bra024735	85.4	0
80	TEM1	TEMPRANILLO 1		AT1G25560	Bra011002	81.4	0
81	TEM2	TEMPRANILLO 2		AT1G68840	Bra038346	82.43	0
82	TOE1	TARGET OF EAT 1		AT2G23550	Bra011939	82.05	0
83	TOE1	TARGET OF EAT 1		AT2G23550	Bra000487	88.97	2.00E-144
84	TOE2	TARGET OF EAT 2		AT5G60120	Bra002510	90.19	0
85	TOE2	TARGET OF EAT 2		AT5G60120	Bra020262	93.81	6.00E-175
86	TOE3	TARGET OF EAT 3		AT5G67180	Bra012139	82.47	0
87	TPS1	TREHALOSE 6 PHOSPHATE SYNTHASE 1		AT1G78580	Bra035049	89.56	0
88	TPS1	TREHALOSE 6 PHOSPHATE SYNTHASE 1		AT1G78580	Bra008366	90.38	0
89	TPS1	TREHALOSE 6 PHOSPHATE SYNTHASE 1		AT1G78580	Bra026011	76.8	0
90	VIN3	VERNALIZATION INSENSITIVE 3		AT5G57380	Bra020445	83.8	0
91	VIN3	VERNALIZATION INSENSITIVE 3		AT5G57380	Bra006824	85.27	0
92	VRN1	VERNALIZATION 1		AT3G18990	Bra037544	89.8	0
93	VRN1	VERNALIZATION 1		AT3G18990	Bra022376	89.62	3.00E-162



94	VRN1	VERNALIZATION 1	AT3G18990	Bra001729	87.79	0
95	VRN2	VERNALIZATION 2	AT4G16845	Bra021078	83.18	0

- 사용된 식물체는 발아 후 춘화처리를 하지 않고 2주 동안 배양실 조건(23°C, 12시간 광조건 /12시간 암조건)에서 키운 배추 유식물체의 잎을 샘플링 하여 사용하였다. *FLC*는 모든 계통에서 발현하는 것을 확인할 수 있었으며 조추대와 만추대 두 계통을 구분 짓는 특징적인 발현양상은 보이지 않았다. *CO*와 *FT*의 경우 *FLC*와 다르게 몇 계통에서만 매우 약하게 발현하는 것을 확인하였다. *CO*와 *FT* 역시 마찬가지로 조추대와 만추대의 특징적인 발현양상은 확인할 수 없었다 (그림 11). 그림 3에서 표1의 primer set로 PCR반응을 수행하였을 때 PCR 밴드가 확인되지 않거나 product size가 다른 경우는 나타내지 않았다.

표 11. 주요 개화조절 유전자 Primer set list

Name	F(5'-3')	R(5'-3')	Product size (bp)
<i>BrCO_1</i>	ACTGAAACTCTTGCAGCTCCT	TCTGGTACGGTGCAGTCTTGTT	275
<i>BrCO_2</i>	TTGAAACAAGACCGTAACTGGACA	GAGGAGATTGGCAGAATAGGAACA	302
<i>BrFLC_1</i>	TTGAGAACA AAAAGTAGCCGACAAG	CTTCCACAAGTTCCAGTAGCTCA	274
<i>BrFLC_2</i>	TTGAGAACA AAAAGTAGCCGACAAG	AACCATACTTCGGAGCTTTTACT	248
<i>BrFLC_3</i>	GCTGATGATCTTAAAGCCCTGAA	AGCCAAAGCCTGATTCTCTTCTT	266
<i>BrFLC_4</i>	GCCCTGGCAGA ACTAATGT TAAA	GGAAGATTGATGTCGGAGATTTG	170
<i>BrFT_1</i>	CCGAGAATATCTTCACTGGTTGG	AAGCCGAGATTGTATAGGGAAG	220
<i>BrFT_2</i>	TAAGGGTTACATACGGCCAAAGA	ATCAGTCACCAACCAATGGAGAT	194
<i>BrFT_3</i>	TACCTGCCACA ACTGGAACATCT	CGAACTCACGAGTGTGAACCTT	165
<i>BrFT_4</i>	AATTCCAACACAGTCGTCTCCAA	TTAGGCGTTTCGTATCTCACCA	243
<i>BrSOCl_1</i>	CCAGCTCCAATATGCAAGATACC	CCTATGCCTTCTCCAAGAGTTT	178
<i>BrSOCl_2</i>	CTCGACAACGGAAGACACAAGTT	CTGAATCAGGATGAGAAGGCTGA	222
<i>BrSOCl_3</i>	AGGAGGTGACAAAGCTCAAATCC	TTATGTCTCCGAGTTGCCTTTCA	231
<i>BrACT2</i>	ATGGTGTATGGTTGGGATGAAC	AAGAGGAGCCTCGGTAAGAAGAA	209

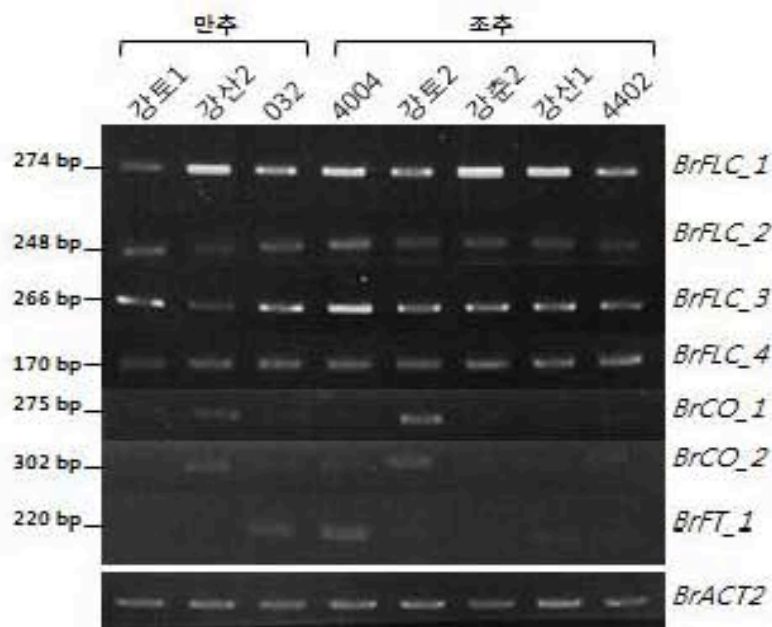


그림 11. 춘화처리를 하지 않은 배추유식물체의 개화유전자

발현

- 춘화처리에 의한 개화유전자의 발현 양상을 확인하기 위하여 발아 후 35일 동안 저온실(4°C, 12시간 광조건/12시간 암조건)에서 춘화처리 후 다시 정상조건의 배양실에서 생육한 배추의 잎을 샘플링 하여 유전자 발현분석에 사용하였다. 춘화처리를 하지 않은 샘플과 달리 춘화처리된 배추의 잎에서 CO와 SOC1의 발현이 증가함을 보였다. FT는 몇 계통에서만 발현되는 것을 확인하였다. 그러나 확실하게 조추대와 만추대 두 계통의 차이를 보이는 개화유전자의 발현양상은 확인할 수 없었다 (그림 12).

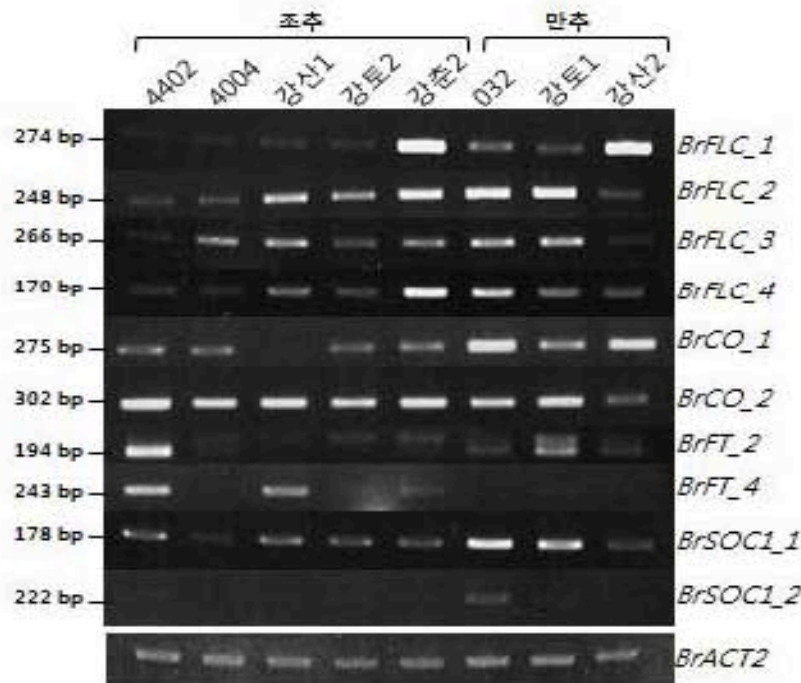


그림 12. 춘화처리 한 배추유식물체의 개화유전자

발현

표 12. qRT-PCR에 사용한 개화조절 유전자 Primer set list

RefID	Name	F (5'-3')	R (3'-5')	Product size (bp)
Br085728	<i>BrFLC</i>	AGTTTACTTACAAGGGGCGCAAG	AATCCATACTCGMAAAGCTGGAG	282
Br022475	<i>BrFT</i>	TGAGATTGGTGGAGAGACTAAG	CGTTGGACTCTCGTAAGACACAAT	179
Br088626	<i>BrFT</i>	CAATGAGCTCCAAAGAAAGGAGA	AGAGCATGTATGGATGCTGGATT	189
Br008669	<i>BrCO</i>	CAGGCTGTGATTAGAGGTTCACT	TCCATACTCGAGTGTAAACAGCA	286
Br029605	<i>BrLFLY</i>	AAGGTTTCAAGAGTGGCTTATTC	CGGTGTAAAAACGTACACCGTAA	189
Br087544	<i>BrFRAB</i>	CAAGAAAACGCTCTGAGAGTCCA	GTAATGTAGACGCGAAGGCAGA	249
Br021078	<i>BrFRAB</i>	CAGAAAACGTAAGTACCGAGAAT	TTCTCTGATGGTTGACTTCTTCC	206
Br020445	<i>BrFRAS</i>	ACTGGTCTAGCCAAAACAAAACTC	ACACTTCTGCAAAAAGGTATCTTC	189
Br024586	<i>BrFT</i>	GCTTTCAGAGGCTAAGGCTGTATC	GATCTCTGAGTAGCAATGGTAGGT	199
Br088511	<i>BrFT</i>	GCGAGACAAGTAAAGTTCACAAA	CTTCTCCAGTTCCTTGAAGTCCAA	189

- 주요 개화 관련 유전자(*FLC*, *CO*, *FT*, *SOC1*) 이외에도 개화와 관련된 다른 유전자(*FRI*,

*FT, AP1, LFY, VRN1, VRN2, VIN3, GI, SVP*들의 발현 양을 확인하기 위해서 정량적 reverse transcription PCR (qRT-PCR)을 수행하였다. qRT-PCR방법에 사용한 각 유전자 특이적인 primer를 제작하여 실험을 수행하였으며 이는 표 3에 나타내었다. *BrACT2* primer를 이용하여 주형으로 사용한 cDNA의 양을 정규화 하였다.

- 개화를 억제하는 유전자인 *FLC*를 조절하는 *FRI*의 경우 춘화처리 이후에 전체적으로 발현이 증가하는 양상을 보였으며 특이적으로 40, 42 계통에서 높은 발현 값을 보였다. 개화 조절의 중요한 integrator인 *FT*도 40, 42 계통에서 춘화처리 이후에 발현 값이 증가한 것을 확인하였다. 또 다른 integrator인 *LFY*는 춘화처리 전 샘플에서만 발현이 되는 것을 확인하였는데, 이는 춘화처리를 한 배추의 경우 4°C 조건에서 성장속도가 느려지기 때문에 *LFY*의 발현이 매우 낮은 것으로 보인다. 춘화처리에 의해 개화시기를 조절하는 유전자 *VRN1, VRN2* 그리고 *VIN3*의 경우 계통간의 유전자 발현 양의 차이점은 확인할 수 없었다. *VIN3*의 경우 40와 02 계통에서 춘화처리 이후 발현양이 2배로 증가하였고, *VRN1*은 오히려 춘화처리 이후 유전자 발현이 감소하는 양상을 보인다. 다른 개화조절 유전자인 *AP1, CO, GI*와 *SVP*의 경우에도 마찬가지로 두 계통의 특징적인 발현 양상은 보이지 않았다 (그림 13).

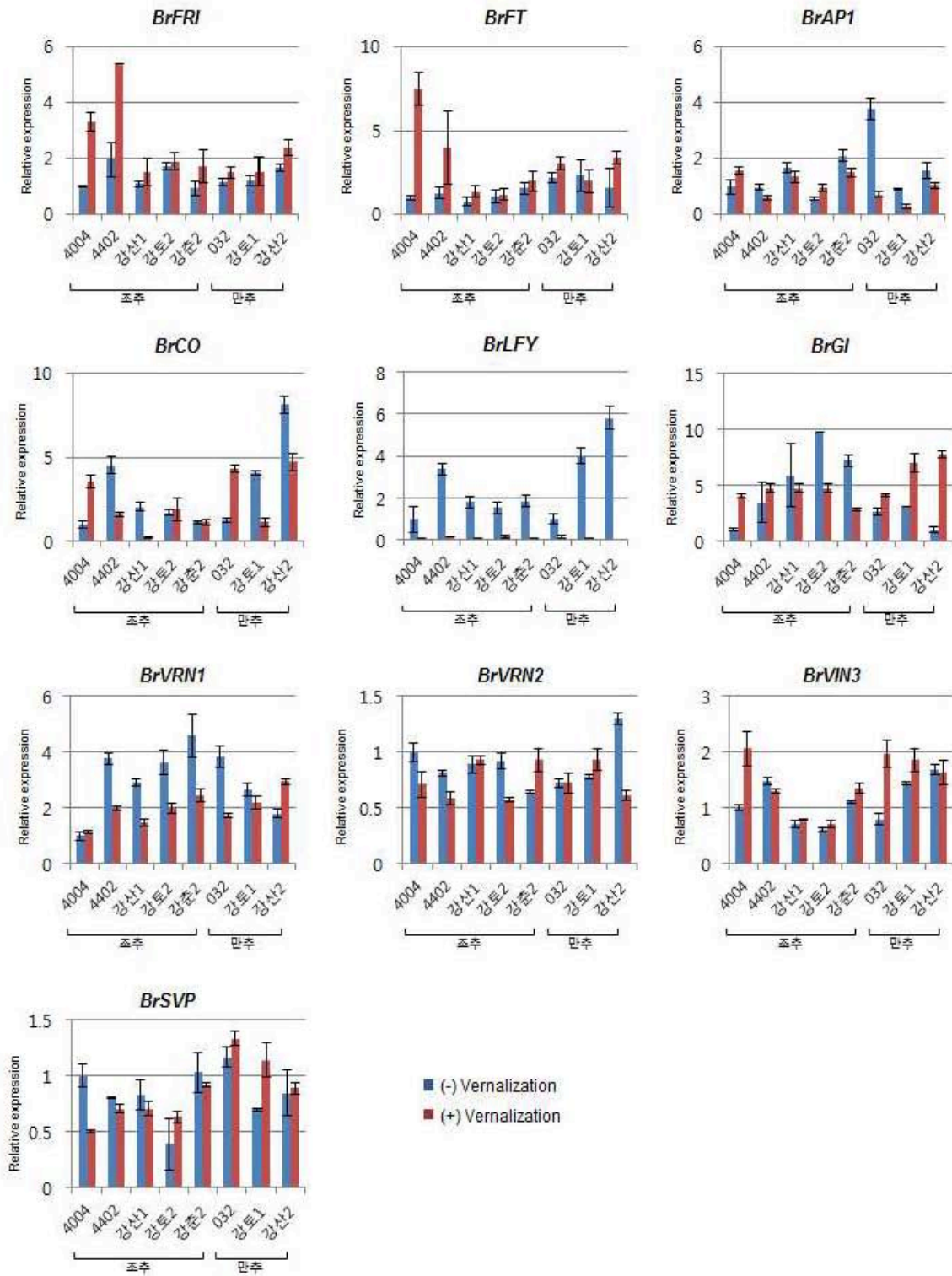


그림 13. 정량적 reverse transcription PCR (qRT-PCR) 방법을 이용한 개화유전자 발현분석

6) 배추 추대 계통 간 주요 개화조절기작 비교분석

- 두 추대형질 계통에서 주요 개화 조절기작에 관여하는 유전자의 발현량을 비교함으로써 배추 개화기작을 모델식물 애기장대와 비교분석하였다.
- 크게 세 개의 개화기작, photoperiod/circadian pathway, vernalization pathway, gibberellin pathway의 핵심조절 유전자를 qRT-PCR로 발현 값을 정량화하여 그림 14에 나타내었다.
- 대부분의 조절 유전자의 발현이 두 계통간 큰 차이를 보이지 않았으며, 조추대에서는 floral activator 인 *CO*, *FT*, *SOCL*, *API*, *AGL18*, *VIN3* 유전자의 발현이 만추대보다 높게 발현되는 양상을 보여주어 개화 형질과 일치하는 결과를 나타내었다. 특히 florigen으로 알려진 *FT* 발현이 저온에 의해 조추대에서 크게 증가되는 것으로 보아 만추대 계통 보다는 개화를 촉진하는 신호가 있을 통해 정단분열조직으로 빠르게 이동할 것으로 예측된다.
- 반면, floral activator *CCA1*과 *GID1A* 유전자발현이 만추대 보다는 조추대에서 낮게 나타나 발현의 정도나 반복 실험을 통해 두 유전자가 개화에 미치는 영향을 확인할 예정이다.

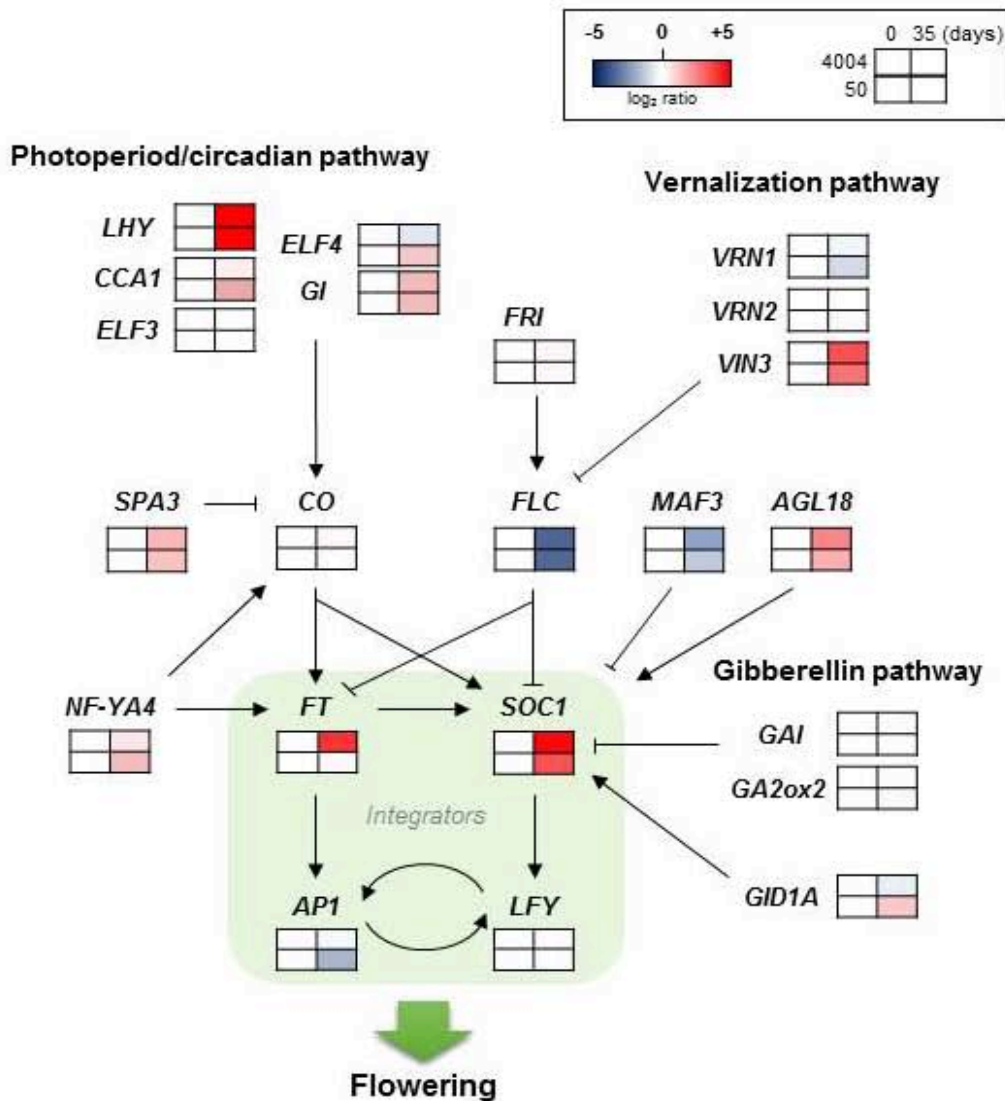


그림 14. 단/조추대 형질의 배추와 무의 개화조절 유전자 네트워크 비교

7) 배추 multi copy 개화유전자의 특성분석

- 배추는 작물 특성상 모델식물에는 1-2개 존재하는 개화유전자가 여러개의 copy로 존재하고 있으며, 경우에 따라서는 여러 개가 개화기작에 같은 기능을 또는 각기 다른 기능을 할 수 있을 것으로 예상된다.
- 멀티 개화유전자의 특성을 조사하기 위해 저온처리 0일, 35일째 조건에서 유전자의 발현을 qRT-PCR로 정량 분석하였다 (그림 15).
- *SOC1*은 배추에서 3개의 전사체가 확인되었으며, *BrSOC1-1*과 *BrSOC1-2* 유전자는 저온에 의해 발현량이 크게 증가되나, *BrSOC1-3* 유전자는 저온에 크게 발현이 변화되지 않는 상이성을 보여주어 두 유전자와는 다른 기능을 할 것으로 판단된다.
- *FLC* 유전자는 애기장대와는 달리 4개의 유전자가 발현되며, 모두 저온에 의해 유전자발현이 크게 감소하는 개화억제 유전자 고유의 특성을 모두 보여주었다 *BrFLC1~4*.
- *FT* 역시 4개의 유전자가 모두 발현되었으며, 일반적인 저온에 의한 유전자발현 증가는

*BrFT1*과 *BrFT2*에서만 관찰되었고, *BrFT3*와 *BrFT4*는 저온에 의해 큰 변화는 없었다

- *CO* 유전자는 두 개가 그리고 *COL*과 상동성을 갖는 *COL1-1* 유전자가 확인되었다. 두 개의 *CO*중 하나만이, *BrCO2*, 저온에 크게 발현량이 증가하였고 나머지 하나의 유전자는 저온에 영향을 받지 않는 특장을 나타내었다. *BrCOL1-1* 유전자도 저온에 의한 영향은 미미하였다.

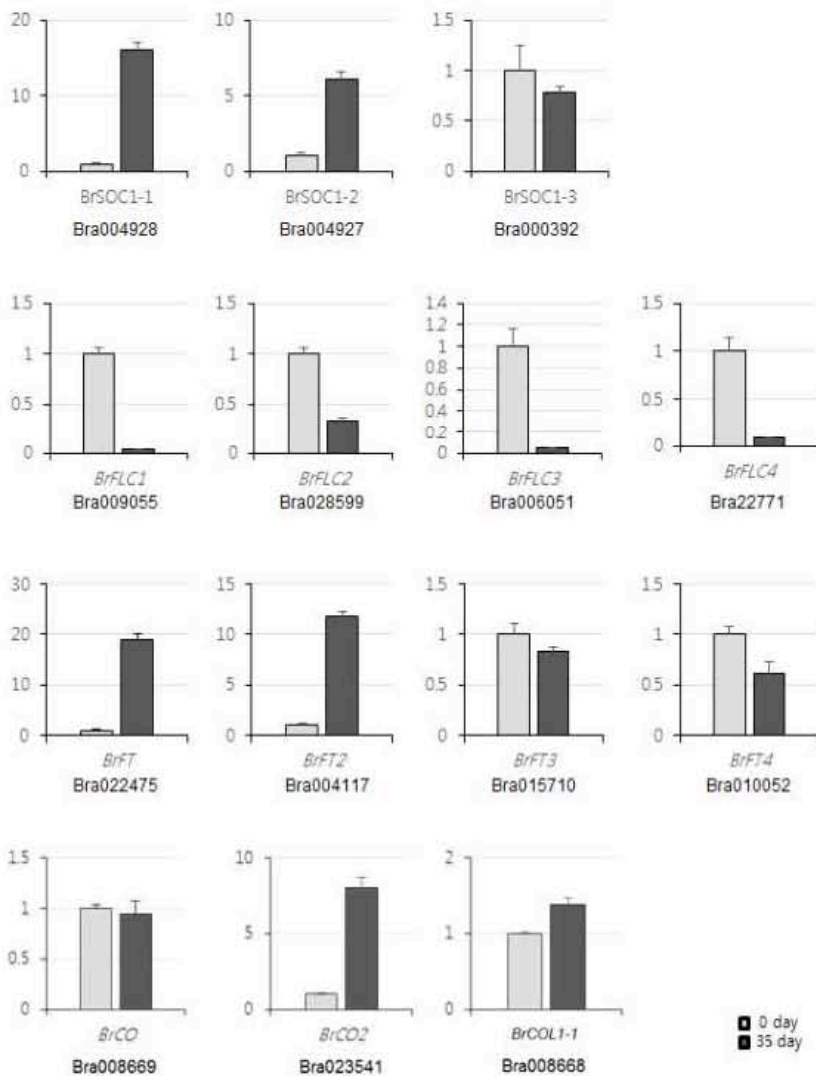


그림 15. Multi copy 배추 개화유전자의 저온에 의한 유전자발현 분석

#### 8) 십자화과 무-배추 작물의 개화 조절기작 비교분석

- 본 연구팀은 이전의 연구에서 무 작물의 저온처리에 의한 대응량 발현체분석을 수행하고 주요 개화유전자의 유전자발현을 확인하였다
- RNA-Seq의 발현 데이터를 기반으로 두 십자화과 주요작물, 배추와 무의 주요 개화유전자에 대한 발현의 차이를 비교분석 확인하고자 추대 형질이 유사한 조추대 계통 무 NH-JS2와 배추 4004의 RNA-seq 결과를 참고하여 주요 개화유전자발현을 qRT-PCR로 정량분석 하였다 (그림 16).



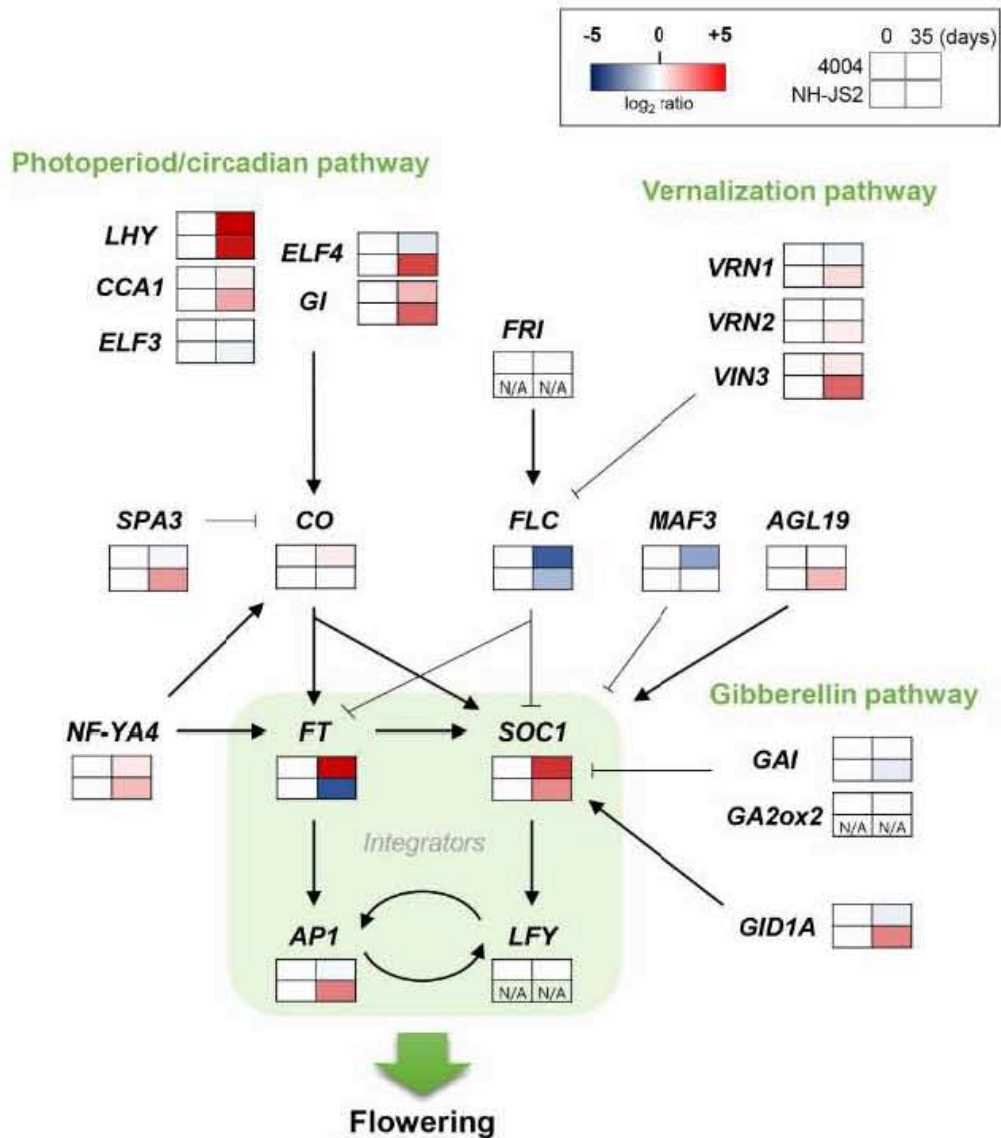


그림 16. 무 배추 작물의 개화조절기작 비교분석

- Photoperiod pathway 유전자발현 비교분석에서 *LHY*, *CCA1*, *GI* 유전자는 발현정도의 차이는 있지만 저온에 의해 발현양이 증가되는 비슷한 양상을 두 계통 간 나타내었고, *ELF3* 유전자는 배추 4004에서는 변화가 없었으며 무에서는 발현양이 저온에 의해 감소하였다. *ELF4* 유전자는 저온에 의해 두 작물 간 반대의 발현 값을 보여 배추에서는 0일 대비 발현이 감소하고, 무에서는 저온에 의해 발현이 증가하는 상반된 값을 보여주었다. 또한 *SPA3* 유전자의 저온에 대한 발현도 두 작물 계통 간 상이하였다. 배추에서는 저온에 발현이 감소한 반면 무에서는 증가하였다.
- Vernalization pathway 유전자발현 비교분석에서 가장 큰 차이점은 무 작물이 *FRI* 상위조절 유전자가 존재하지 않는다는 점이다. 무 계통 분석 결과 *FRI* 유전자 존재가 확인되지 않았으며 본 연구팀의 RNA-seq 결과에서도 확인되지 않았다. 개화 핵심 repressor인 *FLC1*의 발현은 두 작물에서 유사하였으

나 activator인 *VRN1*의 경우 배추에서는 저온에 발현이 감소하지만 a에서는 반대로 증가하였다. *VRN2*의 경우도 배추는 저온에 영향을 받지 않았으나 무 작물에서는 저온에 의해 발현이 증가되는 일반적인 양상을 나타내었다. *VIN3*, *AGL19* activator는 배추보다는 무 작물에서 저온에 의해 크게 발현증가를 보였다. Repressor *MAF3*가 배추에서는 저온에 크게 감소하지만 무에서는 거의 영향이 없었다.

- **Gibberellin pathway** 유전자발현 비교분석 결과, repressor인 *GAI*, *GA2ox20* 유전자발현 모두 저온에 의해 배추에서는 증가 그리고 무에서는 감소하거나 반응하지 않는 반대의 패턴을 보여주었다. 반면, activator인 *GID1A* 유전자발현은 두 작물 간 큰 차이가 있었다. 배추에서는 저온에 의해 감소하지만 무에서는 저온처리에 의해 발현이 크게 증가하였다.

- 여러 개화조절기작의 신호를 통합하는 floral integrator 유전자발현 분석결과, florigen *FT* 유전자가 배추에서는 저온에 크게 증가되는 일반적인 양상을 보이는 반면 무에서는 오히려 감소하는 흥미로운 결과를 확인하였다. 또한 꽃기관 발달에 기능하는 *API* 유전자도 두 작물간 상이한 발현양상을 나타내었다. 배추에서는 저온에 감소하고 무에서는 반대로 증가되었다.

- 이상의 결과로부터 십자화과 무 배추 작물 간 개화조절기작은 모델식물과는 다른 기작이 존재할 가능성이 있으며, 두 작물 사이에도 외부 환경 또는 내제적 요인에 의해 조절되는 개화기작에 차이가 존재할 수 있음을 시사하고 있다.

- 배추 개화기작에 대한 연구는 각 유전자의 기능이 모델식물과 유사한지 아니면 다른 기능을 하는 지에 대한 기능유전체분석이 필수적으로 수행되어야 할 것이다

#### 9) 배추 개화유전자의 모델식물을 이용한 기능분석

- 배추 발현체에서 발굴된 주요 개화유전자의 기능분석을 위해 모델식물 애기장대의 들연변이체를 스크리닝하고 이를 이용해 배추 유전자가 complementation 되는지 관찰하고자 한다.

- 주요 애기장대 개화유전자 *AtFT*, *AtSOC1*, *AtFLC*, *AtCO*의 SALK T-DNA knock out mutant를 탐색하였다 (그림 17).

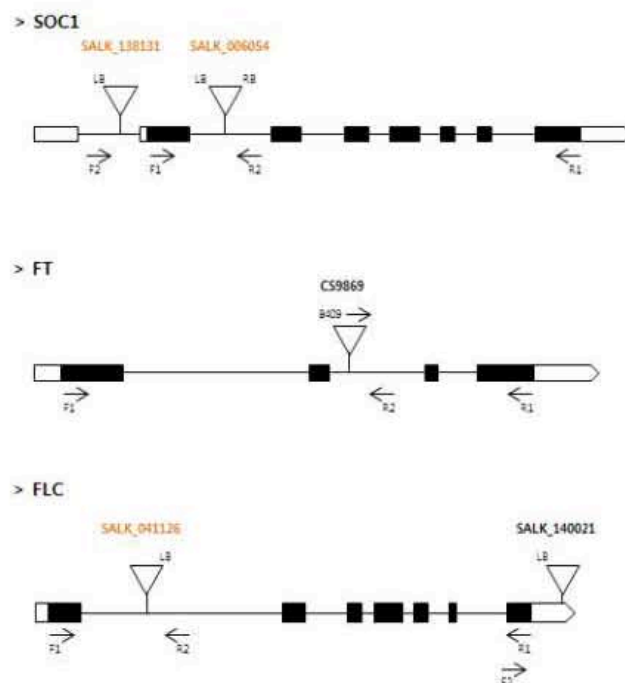


그림 17. 애기장대 주요 개화유전자의 T-DNA knock out position 및 들연변이체 정보

- 주로 homozygous 들연변이체 종자를 분양받아 유전형과 유전자발현을 분석하였고 대부분의 들연변이

체가 homozygous 상태임을 확인하였다. 배양실 조건에서 activator인 CO, SOC1 그리고 FT 돌연변이체는 대조구에 비해 개화가 매우 지연되는 반면, repressor인 FLC 돌연변이체는 개화시기가 대조구보다 크게 빠름을 확인하였다 (그림 18).

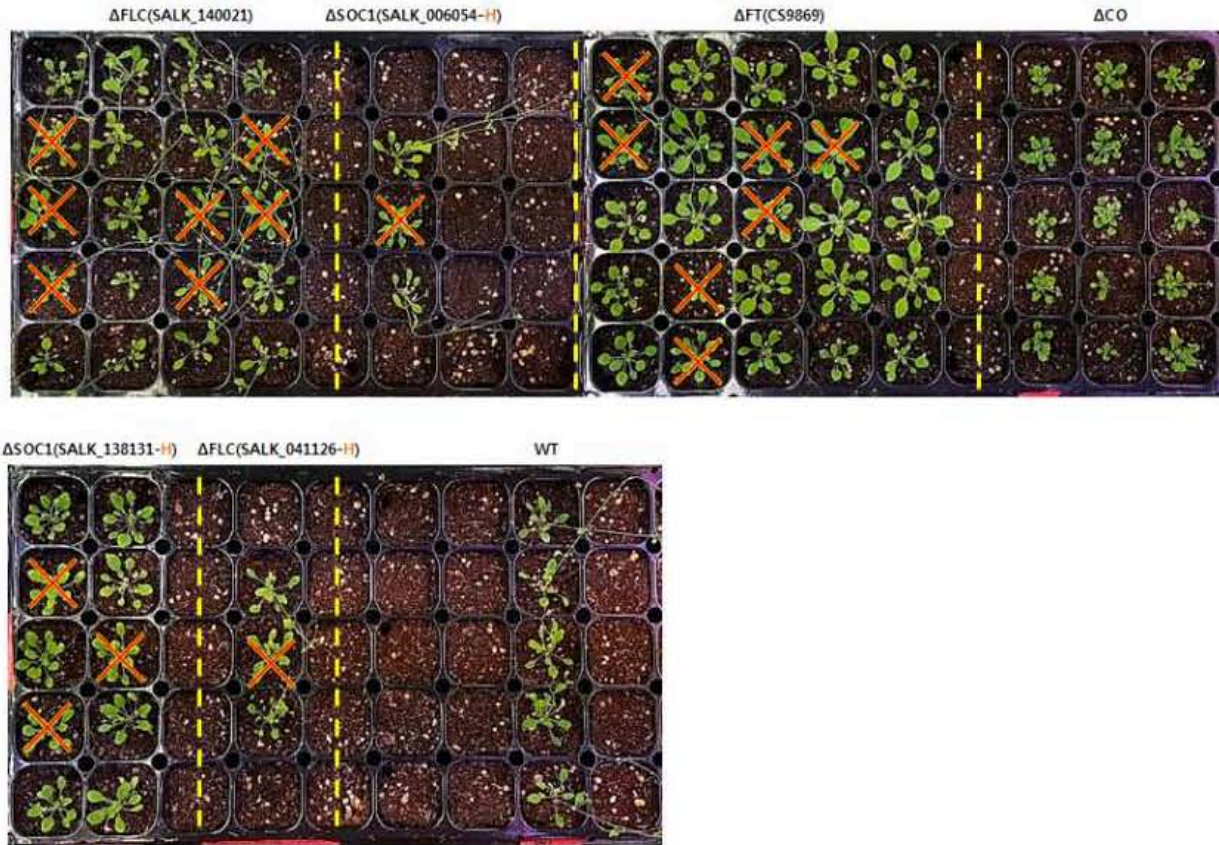


그림 18. 애기장대 주요 개화유전자 돌연변이체 표현형

#### 10) 만/조추대 형질 계통 간 RNA-seq 추가 분석

- 최근 연구동향에 있어 RNA-seq 분석으로 생물학적 반복실험을 최소 3회 이상 요구하는 경우가 많아, 앞선 만추대 (50 계통)과 조추대 (40 계통)을 대상으로 같은 저온처리 조건에서 생물학적 반복실험을 1회 더 샘플링을 통해 수행하였다. 추가된 4개의 샘플들을 바로 액체질소에 저장하였으며, RNA-seq 분석에 사용하였다. RNA sequencing은 Illumina HiSeq2000을 이용하여 수행하였다.
- 두 계통의 저온처리 4개 샘플들로부터 185,830,050 reads를 생산했으며, 아래와 같은 조건으로 전처리를 수행하고 최종적으로 전체 reads의 대략 92.05%인 121,249,574 cleaned reads를 확보하였다. (표 13, 14, 15). 전처리 과정을 진행한 과정으로서 앞서 2회 생물학적 반복실험을 진행했을 때의 과정 순서대로 진행하였다 (2017년 연차보고서 기술).
- 전처리 과정을 통과한 cleaned reads를 배추 Brapa sequence v1.5 CDS 41,020에 mapping하여 유전자가 발현되는 정도를 나타내는 발현 값 (read counts)을 측정하였다. (표 16). Read mapping은 bowtie2 (v2.1.0) software (mismatch ≤ 2 bp, penalty 방식으로 계산)를 사용하였

으며, 발현 값은 각 유전자에 mapping된 reads의 총 수로 계산하였다. 3회 생물학적 반복실험 결과, 분석에 사용한 표준 유전자 41,020개 중 발현하는 유전자는 38,008개이며, 그 중 functional description을 가진 유전자는 36,285개로 확인 되었다.

표13. RNA-seq을 통한 raw sequencing data의 short reads 통계

File name	Sample description	Num. of reads	Avg. length	Total length (bp)
TN1801R0872_1.fq	D0_4004_3	23,011,611	101	2,324,172,711
TN1801R0872_2.fq		23,011,611	101	2,324,172,711
TN1801R0873_1.fq	D35_4004_3	25,594,873	101	2,585,082,173
TN1801R0873_2.fq		25,594,873	101	2,585,082,173
TN1801R0870_1.fq	D0_50_3	21,304,081	101	2,151,712,181
TN1801R0870_2.fq		21,304,081	101	2,151,712,181
TN1801R0871_1.fq	D35_50_3	23,004,460	101	2,323,450,460
TN1801R0871_2.fq		23,004,460	101	2,323,450,460
Total	4 ea	185,830,050	101	18,768,835,050

표14. RNA sequencing data의 trimming 수행 후 cleaned short reads 통계

Sample description	Num. of reads	Avg. length	Total length (bp)
D0_4004_3	17,873,649	101	1,805,238,549
	17,873,649	101	1,805,238,549
D35_4004_3	19,556,881	101	1,975,244,981
	19,556,881	101	1,975,244,981
D0_50_3	14,400,467	101	1,454,447,167
	14,400,467	101	1,454,447,167
D35_50_3	14,114,434	101	1,425,557,834
	14,114,434	101	1,425,557,834
4 ea	131,890,862	101	13,320,977,062

표15. Cleaned short read의 mapping 통계

Sample description	Num. of reads	Avg. length	Total length (bp)
D0_4004_3	16,605,764	94.56	1,570,243,971
	16,605,764	91.49	1,519,193,845
D35_4004_3	18,160,027	93.31	1,694,535,198
	18,160,027	90.53	1,644,045,567
D0_50_3	12,789,963	94.86	1,213,221,217
	12,789,963	88.37	1,130,234,739
D35_50_3	13,069,033	93.14	1,217,270,764
	13,069,033	90.10	1,177,525,291
4 ea	121,249,574	92.05	11,166,270,592

표16. 표준유전자 세트분석을 통한 유전자 발현 값 측정

	분석에 사용된 유전자 수	발현 값을 가진 유전자 수	Total annotation (Phytozome DB)
Total transcripts (Brapa_sequence_v1.5_CDS)	41,020	38,008	36,285(95.46%)

- 전체 sampling 및 RNA-seq 분석방법은 그림 1에 표기하였으며, 앞서 분석한 방법과 동일하게 normalization 보정을 진행하고 3회 생물실험 반복 데이터를 대상으로 비교되는 두 샘플 간 유의하게 발현되는 유전자 (DEGs; Differentially Expressed Genes) 선발을 DESeq library에 포함된 방법론을 이용하여 분석하였다. 적용 방법론은 앞서 2회 생물실험 반복 데이터와 같다. 그리고 3회 생물실험 반복 데이터가 재현성이 있는지 확인하기 위해 그림 2의 pairs plot을 통해 진행하였으며, 진행 결과 반복 샘플 간 재현성이 0.93~1.00 정도의 높은 수치를 보임으로서 재현성이 있음을 보였다.

그림 19. RNA-seq 분석 Flowchart

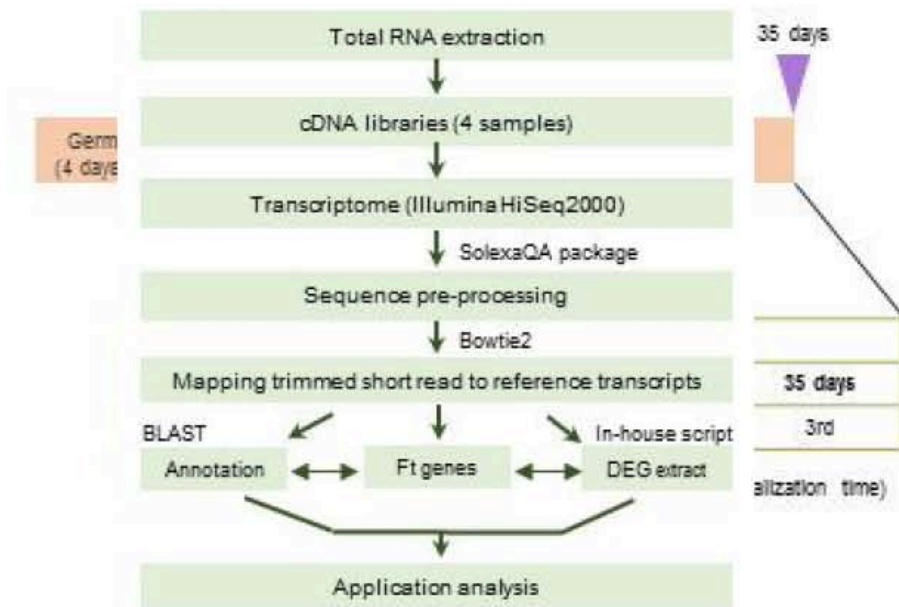
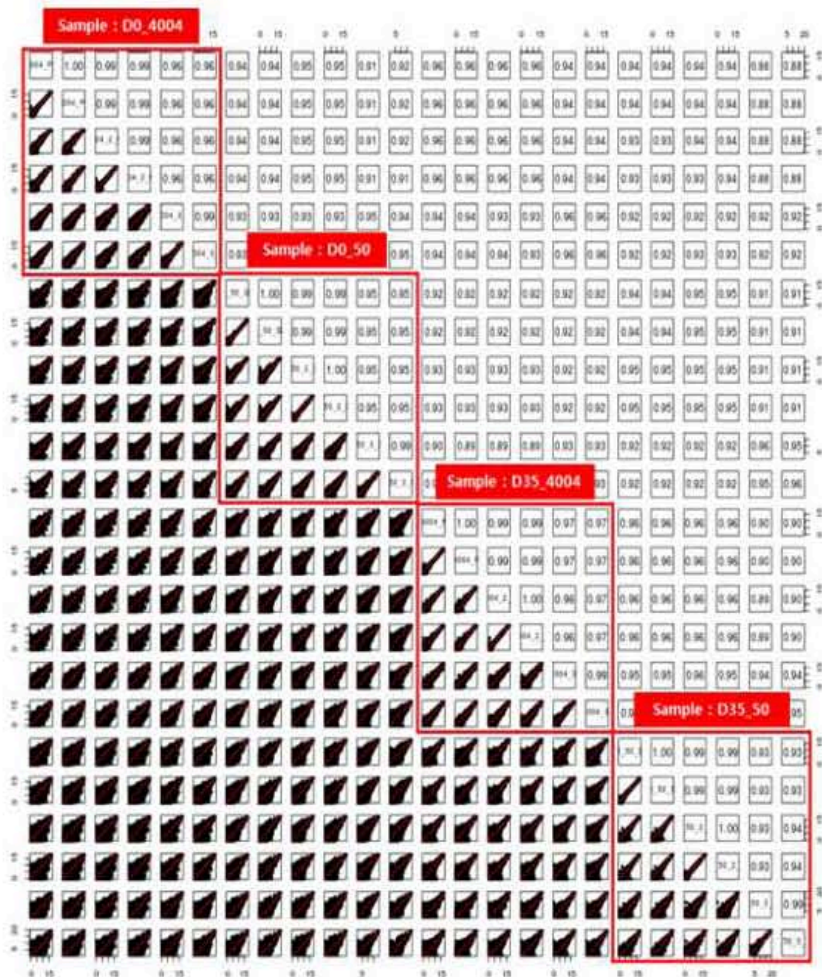


그림 20. 반복샘플의 재현성 확인을 위한 Pairs plot 분석



- 1회 생물학적 반복실험이 추가되었으나 GO 분류 및 KEGG 분석에서 앞서 분석한 2회 생물학적 반복실험 결과 앞의 결과와 큰 차이가 있지 않았으며, 그림 20의 Pairs plot 분석결과를 토대로 3회 생물학적 반복실험이 재현성이 있음을 보였다.

11) 개화유전자에 대한 DEGs 분석

- 앞서 확보한 3회 생물학적 반복실험 결과 및 배추 발현체에서 얻은 223개의 homolog 유전자들을 대상으로 개화 유전자에 특이적인 DEGs 분석을 진행하였다. DEGs 분석은 첫째, 각 라인 (50 및 40)에서 저온처리 기간에 따른 방법 (시기에 따른 분류), 둘째, 저온처리 전과 후에 따른 50과 40 사이에 따른 방법 (품종에 따른 분류)으로 진행하였다. 분석 기준으로서 각 유전자에 mapping된 발현 값이 샘플 간 비교에서 2배 이상 발현의 차이를 구분하는 2 fold change (FC) 방법과, adjust P-value (FDR) 이 0.01 이하를 만족하는 binomial test 방법을 동시에 사용하였다.

- 그림 21의 경우, 저온처리 후 up-regulation 되는 개화유전자의 DEGs 수는 50 라인이 40 라인에 비해 40% 많은 것으로 확인되었으며 (49 vs 35), down-regulation 되는 유전자의 수 (즉, 저온 처리 전의 발현이 높은 경우)는 거의 차이가 없음을 확인할 수 있었다 (12 vs 13). 또한 벤-다이어그램 분석에서 50라인과 40라인에서 공통적으로 up-regulation되는 DEGs 수가 26개임을 확인하였으며, 공통적으로 down-regulation 되는 DEGs 수가 5개임을 확인하였다. 그리고 *BrMAF2* (Bra024350) transcript의 경우 만추 계통인 50라인에서는 저온처리 시 down-regulation 되나 조추 계통인 40라인에서 저온처리 시 up-regulation되는 것을 보였다.

- 그림 22에서는 저온처리 전 (D 0)에서 up-regulation 되는 개화유전자의 DEGs 수는 40라인이 50라인에 비해 4.3배 많은 것으로 확인되었으며 (43 vs 10), 저온처리 후 (D 35)에서 up-regulation 되는 개화 유전자 역시 40라인이 50라인에 비해 3.8배 많은 것으로 확인되었다 (19 vs 5). 40라인은 시기에 상관없이 10개의 DEGs를 지니는 것으로 확인되었으며, 50라인은 2개의 DEGs가 지니는 것으로 확인되었다. 또한 *BrFES* (Bra022958)는 저온 처리 전 50 라인에서 up-regulation 되나 저온 처리 후 40라인에서 up-regulation 되는 것으로 보였으며, *BrCIR1* (Bra039503)은 저온 처리 전 40 라인에서 up-regulation 되나 저온 처리 후 50 라인에서 up-regulation 되는 것으로 확인되었다.

그림 21. 저온처리 시기별 개화 유전자 DEGs 비교를 통한 표 및 벤-다이어그램

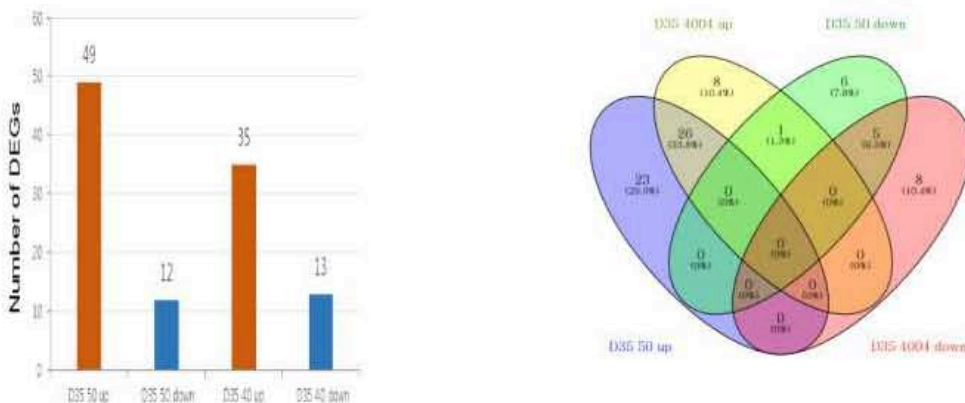
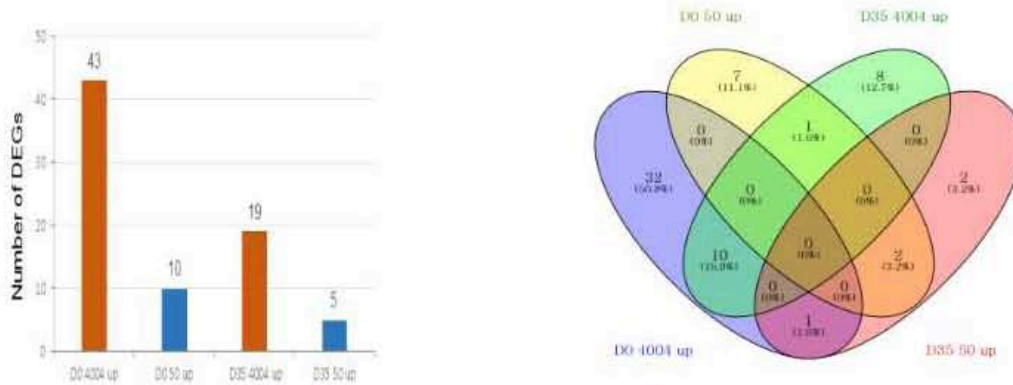


그림 22. 품종별 개화 유전자 DEGs 비교를 통한 표 및 벤-다이어그램



12) 두 계통 간 개화 DEGs의 flowering pathway 차이 분석

- 개화 유전자에 특이적인 DEGs 분석 결과 나온 유전자가 어떤 flowering pathway에 속해 있는지 확인하여 표 17를 통해 정리하였다.

표 17. 선별된 개화유전자 DEGs transcripts 목록

D35 50 up				D35 50 down			
Br ID	Gene name	Tair ID	Pathway*	Br ID	Gene name	Tair ID	Pathway*
Bra011509	AGL16	AT3G57230	A	Bra010504	FD	AT4G35900	C/L/P
Bra000487	TOE1	AT2G28550	C/L/P	Bra023237	PRR1	AT1G32100	C/L/P
Bra001264	COL9	AT3G07650	C/L/P	Bra023629	TFL2/LHP1	AT5G17690	C/L/P
Bra002709	COL5	AT5G57660	C/L/P	Bra033856	PRR1	AT1G32100	C/L/P
Bra003279	AGL18	AT3G57390	C/L/P	Bra005470	SPL3	AT2G33810	D/M
Bra004503	CCA1	AT2G46830	C/L/P	Bra021880	SPL3	AT2G33810	D/M
Bra004507	PRR9	AT2G46790	C/L/P	Bra009285	GA20ox3	AT5G07200	G/M
Bra005397	NF-YA4	AT2G34720	C/L/P	Bra008051	FLC3	AT5G10140	V
Bra007324	AGL18	AT3G57390	C/L/P	Bra009055	FLC1	AT5G10140	V
Bra008668	COL1_2	AT5G15850	C/L/P	Bra022771	FLC5	AT5G10140	V
Bra008669	CO	AT5G15840	C/L/P	Bra024350	MAF3	AT5G65080	V
Bra010082	CDF3	AT3G47500	C/L/P	Bra028599	FLC2	AT5G10140	V
Bra012964	TOC1	AT5G61380	C/L/P				
Bra014628	AGL18	AT3G57390	C/L/P				



Bra018204	LUX/PCL1	AT3G46640	C/L/P
Bra018589	NF-YC9	AT1G08970	C/L/P
Bra019821	RAV1	AT1G13260	C/L/P
Bra020013	PHYA	AT1G09570	C/L/P
Bra020017	PIF3	AT1G09530	C/L/P
Bra020425	COL5	AT5G57660	C/L/P
Bra021100	SPA3	AT3G15354	C/L/P
Bra021464	COL2	AT3G02380	C/L/P
Bra023541	COL1_1	AT5G15850	C/L/P
Bra025655	CDF2	AT5G39660	C/L/P
Bra026917	RAV1	AT1G13260	C/L/P
Bra027259	SPA3	AT3G15354	C/L/P
Bra028437	CDF2	AT5G39660	C/L/P
Bra029666	COL9	AT3G07650	C/L/P
Bra030496	LHY	AT1G01060	C/L/P
Bra030749	NF-YC9	AT1G08970	C/L/P
Bra031672	PHYA	AT1G09570	C/L/P
Bra038832	FKF1	AT2G18915	C/L/P
Bra039503	CIR1	AT5G37260	C/L/P
Bra040020	COL9	AT3G07650	C/L/P
Bra000864	GA1	AT4G02780	G/M
Bra036239	GA1	AT4G02780	G/M
Bra040420	GID1B	AT3G63010	G/M
Bra000393	SOC1	AT2G45660	I
Bra004928	SOC1	AT2G45660	I
Bra039324	SOC1	AT2G45660	I
Bra006104	EMF1	AT5G11530	V
Bra006824	VIN3B	AT5G57380	V
Bra015390	UBC1	AT1G14400	V
Bra016703	UBC1	AT1G14400	V
Bra016704	UBC1	AT1G14400	V
Bra020445	VIN3A	AT5G57380	V
Bra022957	FES	AT2G33835	V
Bra026222	UBC1	AT1G14400	V
Bra026833	UBC1	AT1G14400	V

D35 4004 up				D35 4004 down			
Br ID	Gene name	Tair ID	Pathway*	Br ID	Gene name	Tair ID	Pathway*
Bra001264	COL9	AT3G07650	C/L/P	Bra010504	FD	AT4G35900	C/L/P
Bra002709	COL5	AT5G57660	C/L/P	Bra011002	TEM1	AT1G25560	C/L/P
Bra003279	AGL18	AT3G57390	C/L/P	Bra017035	ELF4	AT2G40080	C/L/P
Bra004503	CCA1	AT2G46830	C/L/P	Bra017735	FD	AT4G35900	C/L/P
Bra004507	PRR9	AT2G46790	C/L/P	Bra023237	PRR1	AT1G32100	C/L/P
Bra008668	COL1_2	AT5G15850	C/L/P	Bra033856	PRR1	AT1G32100	C/L/P
Bra008669	CO	AT5G15840	C/L/P	Bra021880	SPL3	AT2G33810	D/M
Bra012964	TOC1	AT5G61380	C/L/P	Bra038101	SPL5	AT3G15270	D/M
Bra020425	COL5	AT5G57660	C/L/P	Bra009285	GA2ox3	AT5G07200	G/M
Bra021100	SPA3	AT3G15354	C/L/P	Bra010802	GA2ox2	AT1G30040	G/M
Bra023541	COL1_1	AT5G15850	C/L/P	Bra030187	GA2ox2	AT1G30040	G/M
Bra025655	CDF2	AT5G39660	C/L/P	Bra032354	GA2ox2	AT1G30040	G/M
Bra027259	SPA3	AT3G15354	C/L/P	Bra031884	MAF4	AT5G65070	V
Bra028437	CDF2	AT5G39660	C/L/P				
Bra029666	COL9	AT3G07650	C/L/P				
Bra035933	TOC1	AT5G61380	C/L/P				
Bra039485	PHYC	AT5G35840	C/L/P				
Bra040020	COL9	AT3G07650	C/L/P				
Bra010955	SEP3	AT1G24260	D/M				
Bra029424	AGL14	AT4G11880	D/M				
Bra030032	SEP3	AT1G24260	D/M				
Bra032814	SEP3	AT1G24260	D/M				
Bra000864	GA1	AT4G02780	G/M				
Bra036239	GA1	AT4G02780	G/M				
Bra000393	SOC1	AT2G45660	I				
Bra004928	SOC1	AT2G45660	I				
Bra039324	SOC1	AT2G45660	I				
Bra001729	VRN1	AT3G18990	V				
Bra015390	UBC1	AT1G14400	V				
Bra016703	UBC1	AT1G14400	V				

		0	
Bra016704	UBC1	AT1G1440 0	V
Bra022958	FES	AT2G3383 5	V
Bra024350	MAF3	AT5G6506 0	V
Bra026222	UBC1	AT1G1440 0	V
Bra026833	UBC1	AT1G1440 0	V

DO 4004 up				DO 50 up			
Br ID	Gene name	Tair ID	Pathway*	Br ID	Gene name	Tair ID	Pathway*
Bra018540	LD	AT4G0256 0	A	Bra026461	CGA1	AT4G2615 0	D/M
Bra000420	SPA1	AT2G4634 0	C/L/P	Bra009285	GA20ox3	AT5G0720 0	G/M
Bra001264	COL9	AT3G0765 0	C/L/P	Bra001729	VRN1	AT3G1899 0	V
Bra004503	CCA1	AT2G4683 0	C/L/P	Bra006051	FLC3	AT5G1014 0	V
Bra004991	ELF4	AT2G4008 0	C/L/P	Bra009055	FLC1	AT5G1014 0	V
Bra007324	AGL18	AT3G5739 0	C/L/P	Bra022771	FLC5	AT5G1014 0	V
Bra008668	COL1_2	AT5G1585 0	C/L/P	Bra022958	FES	AT2G3383 5	V
Bra009768	PRR5	AT5G2447 0	C/L/P	Bra024350	MAF3	AT5G6506 0	V
Bra010504	FD	AT4G3590 0	C/L/P	Bra024351	MAF4	AT5G6507 0	V
Bra011002	TEM1	AT1G2556 0	C/L/P	Bra028599	FLC2	AT5G1014 0	V
Bra011648	FD	AT4G3590 0	C/L/P				
Bra014628	AGL18	AT3G5739 0	C/L/P				
Bra015313	CRY2	AT1G0440 0	C/L/P				
Bra017035	ELF4	AT2G4008 0	C/L/P				
Bra017735	FD	AT4G3590 0	C/L/P				
Bra018204	LUX/PCL1	AT3G4664 0	C/L/P				
Bra019821	RAV1	AT1G1326 0	C/L/P				
Bra020013	PHYA	AT1G0957 0	C/L/P				
Bra023541	COL1_1	AT5G1585 0	C/L/P				
Bra024536	GI	AT1G2277 0	C/L/P				
Bra029666	COL9	AT3G0765 0	C/L/P				
Bra030496	LHY	AT1G0106 0	C/L/P				
Bra030568	CRY2	AT1G0440 0	C/L/P				

Bra031672	PHYA	AT1G09570	C/L/P
Bra036517	PRR5	AT5G24470	C/L/P
Bra039503	CIR1	AT5G37260	C/L/P
Bra040020	COL9	AT3G07650	C/L/P
Bra038101	SPL5	AT3G15270	D/M
Bra039656	SPL4	AT1G53160	D/M
Bra009970	GID1C	AT5G27320	G/M
Bra010802	GA2ox2	AT1G30040	G/M
Bra030187	GA2ox2	AT1G30040	G/M
Bra032354	GA2ox2	AT1G30040	G/M
Bra033324	GA2ox6	AT1G02400	G/M
Bra036239	GA1	AT4G02780	G/M
Bra040420	GID1B	AT3G63010	G/M
Bra000393	SOC1	AT2G45660	I
Bra004928	SOC1	AT2G45660	I
Bra039324	SOC1	AT2G45660	I
Bra006104	EMF1	AT5G11530	V
Bra006824	VIN3B	AT5G57380	V
Bra020445	VIN3A	AT5G57380	V
Bra031884	MAF4	AT5G65070	V

D35 4004 up				D35 50 up			
Br ID	Gene name	Tair ID	Pathway*	Br ID	Gene name	Tair ID	Pathway*
Bra018540	LD	AT4G02560	A	Bra009055	FLC1	AT5G10140	V
Bra040518	MBD9	AT3G01460	A	Bra009285	GA2ox3	AT5G07200	G/M
Bra010504	FD	AT4G35900	C/L/P	Bra023237	PRR1	AT1G32100	C/L/P
Bra015313	CRY2	AT1G04400	C/L/P	Bra033856	PRR1	AT1G32100	C/L/P
Bra036517	PRR5	AT5G24470	C/L/P	Bra039503	CIR1	AT5G37260	C/L/P
Bra039485	PHYC	AT5G35840	C/L/P				
Bra005470	SPL3	AT2G33810	D/M				
Bra010955	SEP3	AT1G24260	D/M				
Bra021880	SPL3	AT2G33810	D/M				

		0	
Bra030032	SEP3	AT1G2426 0	D/M
Bra032814	SEP3	AT1G2426 0	D/M
Bra038101	SPL5	AT3G1527 0	D/M
Bra039656	SPL4	AT1G5316 0	D/M
Bra000864	GA1	AT4G0278 0	G/M
Bra036239	GA1	AT4G0278 0	G/M
Bra000393	SOC1	AT2G4566 0	I
Bra004928	SOC1	AT2G4566 0	I
Bra039324	SOC1	AT2G4566 0	I
Bra022958	FES	AT2G3383 5	V

### 13) 개화유전자DEGs의 flowering pathway 분석

- 각 DEGs가 기능하는 flowering pathway를 파악하기 위해 선별된 DEGs 중에서 그림 5와 그림 24의 원 그래프를 통해 주를 이루고 있는 pathway를 확인하였다.
- 그림 23의 저온 처리 후의 DEGs 분석으로부터 저온 처리 시, 만추대 50라인과 조추대 40라인이 공통적으로 C/L/P (Circadian clock, light signaling and photoperiod) pathway의 DEGs가 up-regulation되는 것을 보였다. 그 다음으로는 V (Vernalization) pathway DEGs가 up-regulation 되는 분포를 나타내었다.
- Down-regulation DEGs의 경우 pathway의 차이를 보였는데, 50라인에서는 V pathway가 가장 많고, 그 다음이 C/L/P pathway 였으나, 40라인에서는 C/L/P pathway가 가장 많고 그 다음이 G/M (Gibberellin signaling and metabolism) pathway가 이에 해당되었다.
- 그림 24의 품종에 따른 DEGs 분석으로부터 저온 처리 전 50 라인 및 40 라인 확인 결과, 조추대 40 라인에서는 C/L/P pathway의 DEGs가 높았으며 *FD* 및 *COL(CO-LIKE)* 등의 positive regulator와 I (Integrator) pathway의 *SOC1*이 up-regulation 되는 것을 보임으로서 조추의 표현형과 일치했다.
- 반면, 만추대 50 라인에서는 V pathway의 DEGs가 높았으며 *FLC* 및 *MAF*에 의한 개화 억제현상이 강한 것을 알 수 있었다. 이를 달리 표현하면 만추대 50 라인에서는 조추대 40 라인의 up-regulation transcripts들이 down-regulation됨으로서 개화현상이 억제되고 있으며 반면 조추대 40 라인에서는 만추대 50라인의 up-regulation transcripts인 *FLC* 및 *MAF*가 억제되고 있어 개화현상이 촉진되고 있음을 뜻한다.
- 저온 처리 후의 50 라인은 C/L/P pathway가 두드러졌지만 transcripts 수가 5개로 매우 적었기에 40 라인에 비해 up-regulation 되는 transcripts 수가 극히 적음을 확인할 수 있다. 40 라인에서는 D/M (Developmental and metabolism) pathway의 transcripts 들의 up-regulation 이 두드러짐을 확인하였다.
- 특히 FT, SOC1의 영향을 받는 것으로 알려진 *SEP*, *SPL* transcripts의 up-regulation을 확인되었으며, 이는 만추대 50 라인보다 조추대 40 라인이 저온처리에 좀 더 민감하게 반응하는 것이라 볼 수 있다 (A; Aging pathway).

그림 23. 저온 처리에 따른 개화 유전자 DEGs Flowering pathway 원 그래프

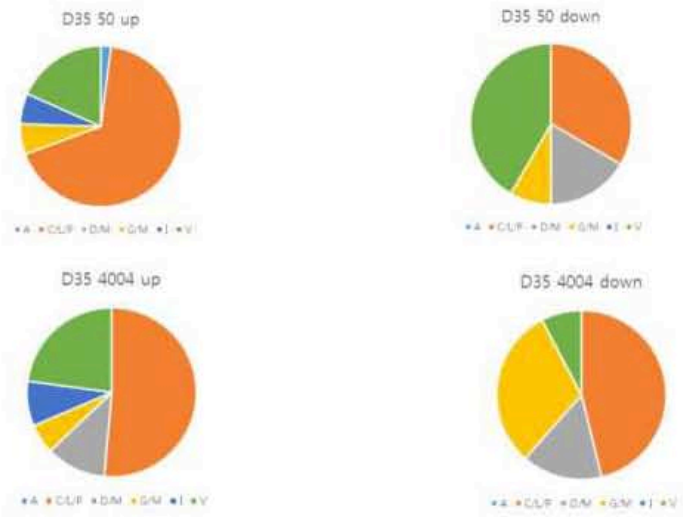


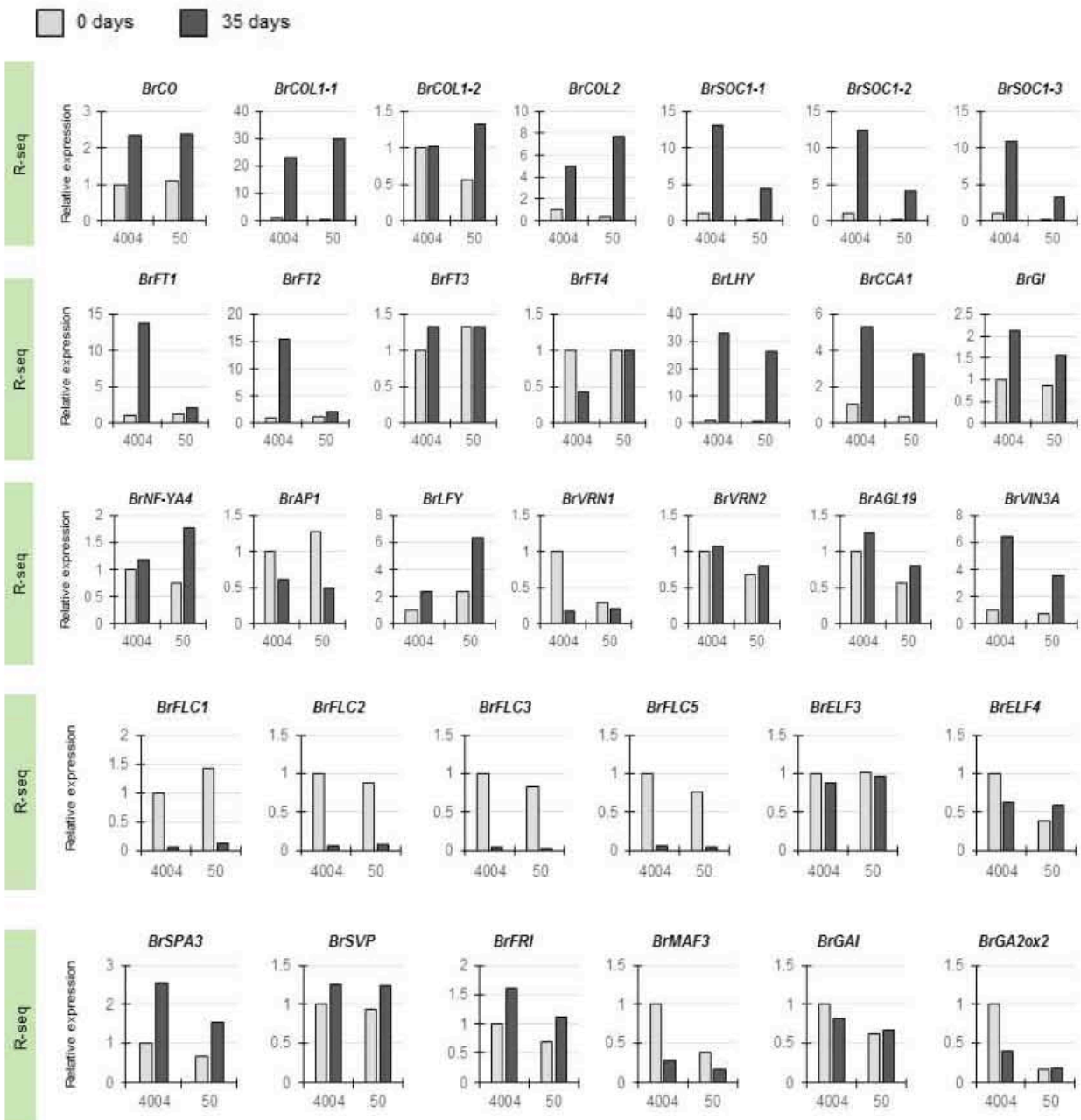
그림 24. 품종에 따른 개화 유전자 DEGs flowering pathway 원 그래프



#### 14) 개화 유전자 RNA-seq data 분석

- 앞서 분석한 개화 유전자 DEGs를 대상으로 qRT-PCR validation을 위해 transcripts ID로부터 애기장대 개화 유전자와 annotation을 확인하였으며, enhancer/repressor로서 알려진 유전자를 대상으로 RNA-seq data 분석을 진행하였다. 본 보고서에는 아직 transcripts ID로서 확인 중인 *FT transcripts ID*까지 추가하여 진행하였다. 그림 7을 통해 분석 결과를 나타냈으며, 애기장대 유전자와 달리 다배체성을 띄는 유전자들의 실제 flowering pathway에서 실제 역할을 수행하는지에 대한 기능 연구가 수반되어야 한다.

그림 7. 두 계통 간 DEGs 개화유전자들의 RNA-seq에 의한 유전자발현 비교분석

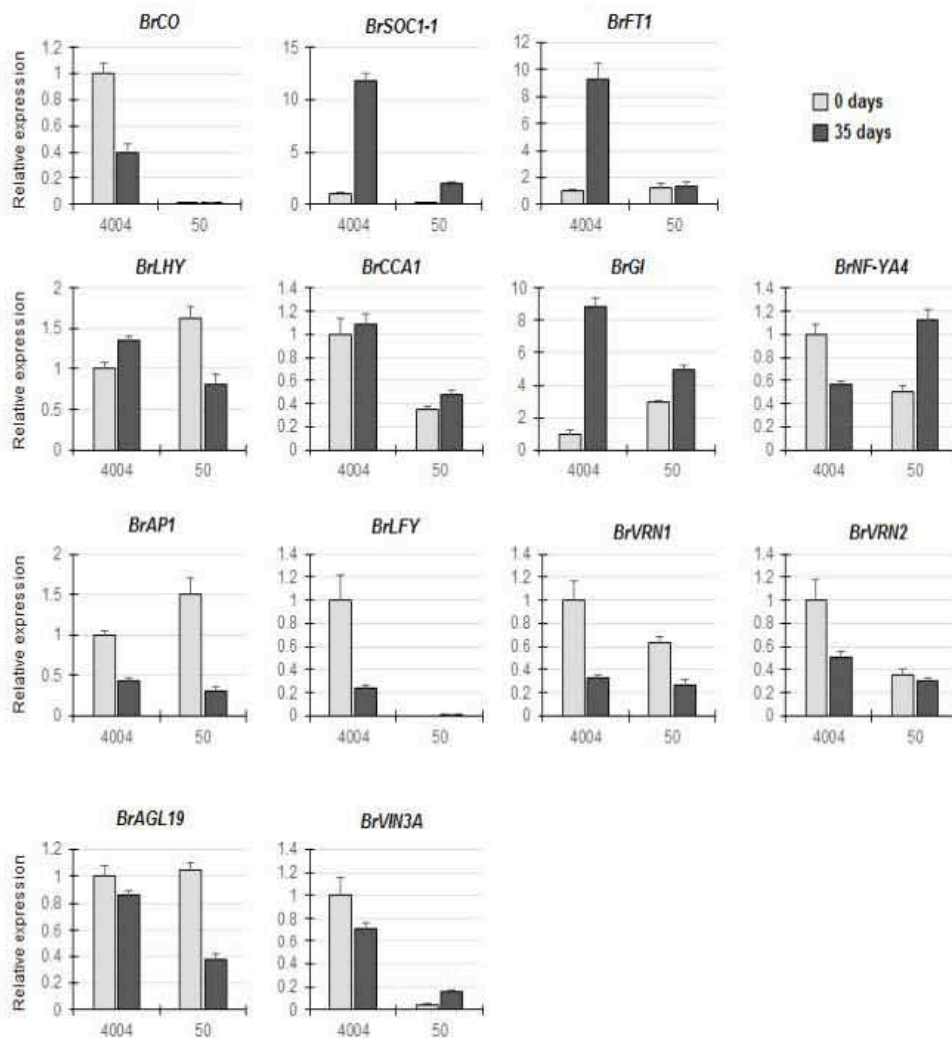


14) 배추 주요 개화기작 유전자의 qRT-PCR 분석

- 두 계통 (조추:40, 만추:50) 간 춘화처리에 의한 주요 개화유전자의 정량적 발현을 비교하기 위해 주요 개화조절유전자군의 qRT-PCR 실험을 수행하였다. 샘플 준비는 발아 후 35일 동안 저온실 (4°C, 12시간 광조건/12시간 암조건)에서 춘화처리 후 정상조건인 배양실 (23°C, 16시간 광조건/8시간 암조건)에서 2주 동안 생육한 배추의 잎 (35 days)과 춘화처리 하지 않고 배양실에서 2주 생육한 배추의 잎 (0 days)을 각 계통별로 샘플링 하여 사용하였다.

- 개화 기작의 주요 pathway인 photoperiod/circadian pathway, vernalization pathway, gibberellin pathway의 핵심 조절 유전자를 중심으로 qRT-PCR을 수행하였으며, enhancer gene, repressor gene 두 그룹으로 나누어 발현 값을 그림 26과 그림 27에 나타내었다.

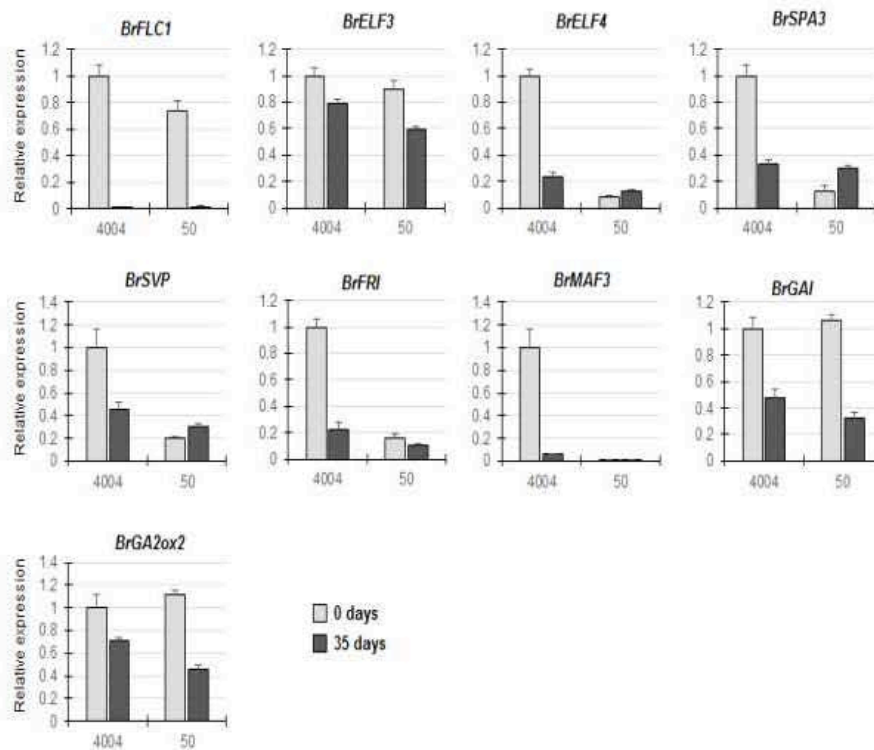
그림 26. 춘화처리에 따른 두 계통 간 개화 enhancer gene의 qRT-PCR 발현 양상 비교





- 두 추대형질 계통에서 대부분의 개화 enhancer gene의 발현양상은 여러 패턴으로 나타난다 (그림 26). 춘화처리 이후 유전자의 발현양이 감소하는 유전자 그룹 (*BrCO*, *BrAPI*, *BrLFY*, *BrVRN1*, *BrVRN2*, *BrAGL19*), 발현양이 증가하는 유전자 그룹 (*BrSOC1*, *BrFT1*, *BrCCA1*, *BrGI*), 서로 반대되는 양상을 보이는 유전자 그룹 (*BrLHY*, *BrNF-YA4*, *BrVIN3A*)으로 나누어진다.
- 조추 40 계통에서 floral activator 인 *BrSOC1*과 *BrFT1*, *BrGI* 유전자의 발현이 춘화처리 이후 매우 높게 (*BrSOC1*의 경우 약 12배, *BrFT1*과 *BrGI*의 경우 약 9배) 발현되는 양상을 보여준다. 만추 50 계통 또한 춘화처리 이후 *BrSOC1* 유전자와 *BrGI* 유전자의 발현양이 증가하였으나 조추에 비해 상대적으로 매우 낮게 반응하였다. 특히 *BrFT1*은 만추대개 계통에서는 저온에 거의 반응하지 않았음.
- 반대로 두 계통 모두 춘화처리 이후 *BrCO*, *BrAPI*, *BrLFY*, *BrVRN1*, *BrVRN2*, *BrAGL19* 유전자들의 발현양이 감소하였다.
- *BrLHY* 유전자는 춘화처리 후 조추 40 계통에서 발현양이 증가하였으나 만추 50 계통에서는 발현양이 감소함을 보여주었다. 이와 반대로 *BrNF-YA4*, *BrVIN3A* 유전자는 춘화처리 후 조추 40 계통에서 발현양이 감소하였으나 만추 50 계통에서는 증가하는 발현 패턴을 확인하였다.

그림 27. 춘화처리에 따른 두 계통 간 개화 repressor gene의 qRT-PCR 발현 양상 비교

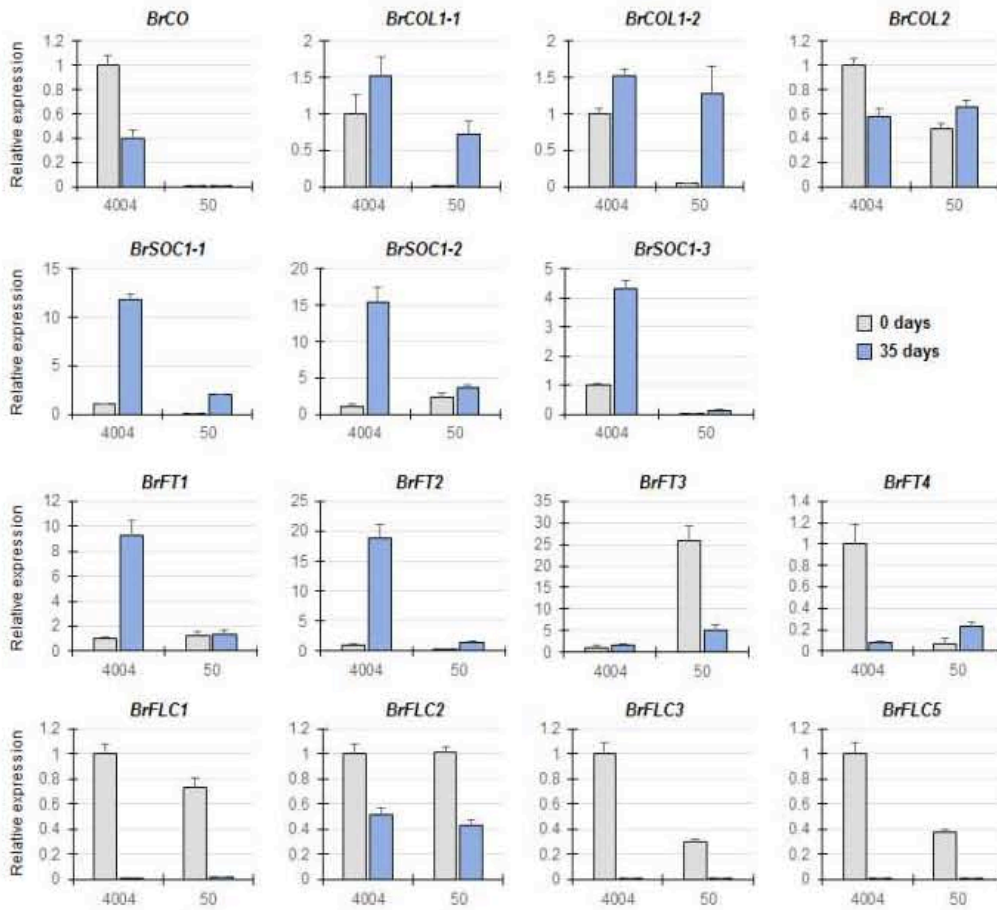


- 다음으로 두 추대형질 계통에서 대부분의 개화 repressor gene의 발현양상을 비교하였다 (그림 27). 발현양의 차이는 있으나 춘화처리 이후 대부분의 repressor 유전자들의 발현패턴이 유사함을 확인하였다.
- 대표적인 개화 repressor gene인 *BrFLC1*은 춘화처리 이후 발현양이 감소함을 보여주는데 40 계통의 경우 약 277배 (Relative expression 값 : 0 days;1, 35 days;0.00361), 50 계통은 약 47배 (Relative expression 값 : 0 days;0.7395, 35 days;0.0156)로 크게 감소함을 확인하였다.
- Photoperiod/circadian pathway 관련 유전자인 *BrLF3*, gibberellin pathway 관련 유전자 *BrGAI*, *BrGA2ox2* 또한 두 계통에서 춘화처리 이후 유전자 발현이 감소하는 양상을 보였다.

#### 16) 두 계통 간 multiple flowering genes 발현 비교분석

- 배추 작물은 다배체로 주요 개화유전자인 *SOC1*, *FLC*, *FT*가 여러 copy로 존재하고 있다는 것을 확인하였다. *SOC1*은 배추에서 3개의 유전자를 확인하였으며, *FLC*는 4개, *FT* 역시 4개의 유전자가 발현됨을 확인하였다.
- 두 추대형질 계통에서 multi copy로 존재하는 주요 개화유전자 발현을 비교분석을 위해 위 실험과 동일하게 샘플을 준비, qRT-PCR을 통해 유전자의 발현을 정량 분석하였다 (그림 28).
- *BrCO* 유전자 한 개와 *CO*와 유사한 *BrCOL1-1*, *BrCOL1-2*, *BrCOL2* 유전자를 확인하였다. *CO* 유전자는 50 계통에서는 거의 발현되지 않으며, 40에서 저온에 의해 유전자의 발현이 감소함을 보였다. *BrCOL1-1*, *BrCOL1-2*의 발현양상은 저온에 의해 발현이 증가됨을 두 품종에서 확인하였다. *BrCOL2* 유전자는 40에서 *CO* 유전자와 비슷하게 저온에 의해 발현이 감소하였으나 50에서는 오히려 발현양이 증가하였다.
- *SOC1* 유전자는 배추에서 3개의 유전자가 발현되며, 저온에 의해 두 계통 모두 *BrSOC1-1*, *BrSOC1-2*, *BrSOC1-3* 유전자의 발현양이 증가함을 확인하였다.
- *FT* 유전자는 애기장대와 달리 4개의 유전자가 발현되며, 40 계통의 저온에 의한 유전자발현 증가는 *BrFT1*과 *BrFT2*에서 관찰되었고, 특이하게도 50 계통에서 *BrFT4*가 저온에 의해 발현이 증가됨을 보였다. 반면 40에서 *BrFT4*는 저온에 의해 발현양이 약 12배 감소함 (Relative expression 값 : 0 days;1, 35 days;0.0792)을 보였다.
- *FLC* 유전자도 4개의 유전자(*BrFLC1*, *BrFLC2*, *BrFLC3*, *BrFLC5*)가 모두 발현되며, 모두 저온에 의해 유전자발현이 크게 감소하는 개화억제 유전자 고유의 특성을 보여주었다.

그림 28. 개화유전자 qRT-PCR 결과



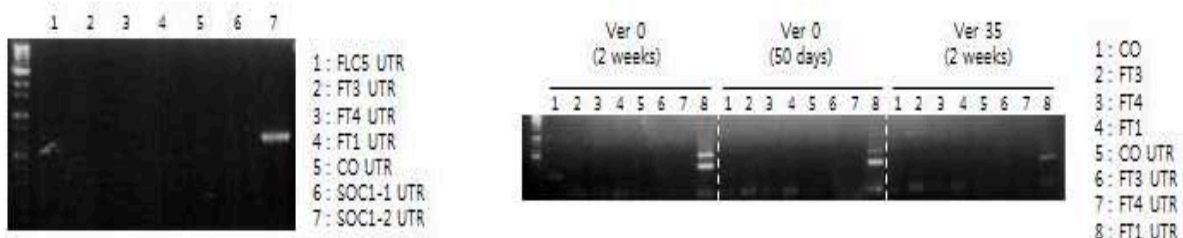
17) 모델식물 (예기장대) 내 배추 multi copy 개화유전자 도입

- 배추 주요 개화유전자의 기능분석을 위해 모델식물 예기장대의 T-DNA 돌연변이체를 이용하였다. 예기장대 FT, SOC1 돌연변이체에 배추의 *BrFTs*, *BrSOC1s* 개화유전자를 도입하여 각 돌연변이체의 개화 표현형이 complementation 되는지 분석을 통해 각 multi copy 유전자가 기능하는지를 확인하였다. 선별된 SALK T-DNA knock out mutant 돌연변이체 *AtFT* (CS9869), *AtSOC1* (SALK\_006054)에 각각 배추의 *BrFTs* (*BrFT1*, *BrFT2*, *BrFT3*, *BrFT4*), *BrSOC1s* (*BrSOC1-1*, *BrSOC1-3*)을 아그로박테리아를 이용하여 형질전환체를 제작하였다.

- 배추의 FT 유전자는 총 4개, SOC1 유전자는 총 3개로 배추 Brassica DB (<http://brassicadb.org/brad/>)에서 각 genomic DNA 와 CDS sequence 정보를 받아 다음과 같은 유전자에 대하여 specific한 primer 쌍을 주문하였다 : Bra022475 (*BrFT1*), Bra004117 (*BrFT2*), Bra015710 (*BrFT3*), Bra010052 (*BrFT4*), Bra004928 (*BrSOC1-1*), Bra000393(*BrSOC1-2*), Bra039324 (*BrSOC1-3*).

- 총 7개 개화유전자에 대하여 CDS region의 PCR을 수행하였다. Bra004117(*BrFT2*)과 Bra039324(*BrSOC1-3*)은 PCR 밴드가 확인되어 cloning을 완료하였으나, 다른 개화 유전자들의 PCR product가 확인되지 않았다. 배추의 cDNA를 교체(vernialization 주기별/시기별 샘플링한 DNA 사용), Primer 교체(Long primer/UTR region primer 주문)하여 PCR을 다시 수행한 결과 *BrSOC1-2*(그림 29, left lane 7)와 *BrFTX*(그림 29, right lane 8)의 PCR product를 얻을 수 있었다 (그림 29). 하지만 여러 조건을 변경했음에도 *BrFTs*의 multi gene의 클로닝에 어려움이 있어 CDS region이 아닌 gDNA region으로 타겟을 변경하였고, *BrSOC1s*은 Bra004928 (*BrSOC1-1*) CDS 유전자 합성을 의뢰하였다.

그림 29. Cloning : 개화유전자 PCR band 확인

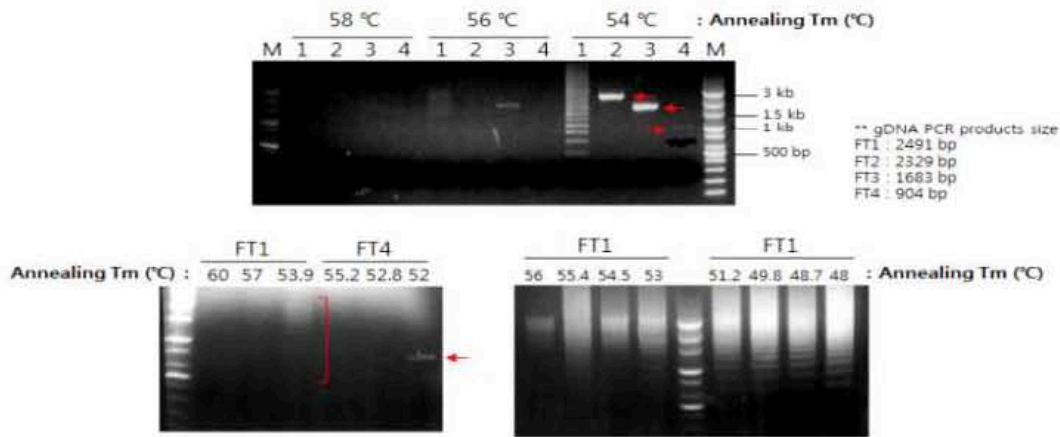


- *BrFTs*의 multi gene 클로닝을 위하여 gDNA region을 타겟으로 PCR을 수행하였다.

Annealing 온도를 여러 조건으로 다르게 하여 PCR 수행 결과 annealing 온도 54°C에서 *BrFT2*와 *BrFT3* PCR product가 확인되었다. *BrFT1*과 *BrFT4*는 annealing 온도의 폭을 넓혀 PCR 수행한 결과, *BrFT1*의 경우 multi PCR band가 확인되며, *BrFT4*는 annealing 온도 52°C에서 PCR band를 확인하였다 (그림 30).

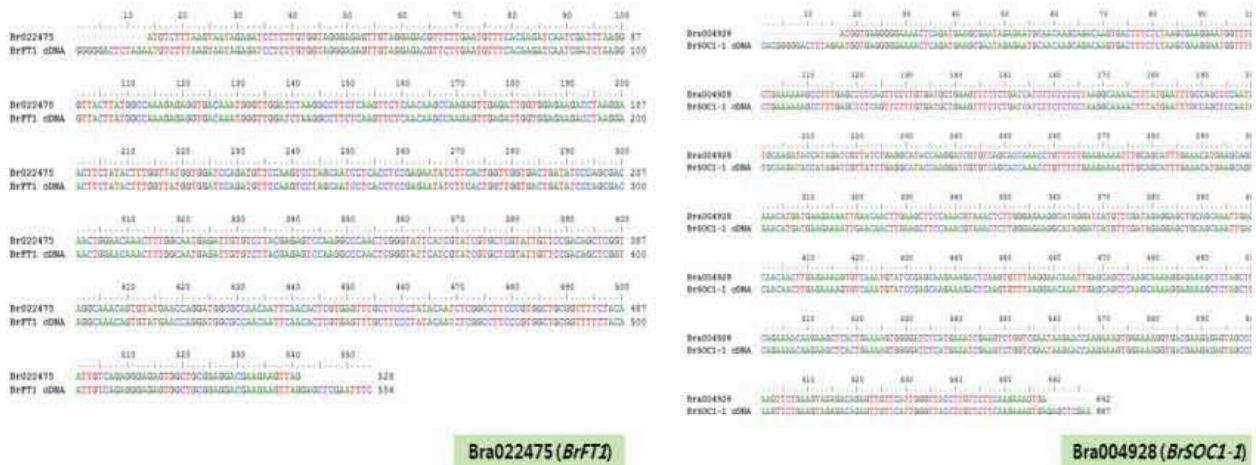
*BrFT1*의 gDNA PCR 결과 multi band가 형성되어 cloning에 어려움이 있어 *BrFT1* 유전자의 CDS 부위 합성을 의뢰하였다.

그림 30. BrFTs 유전자의 gDNA region PCR band 확인



- 클로닝 한 construct에 sequence error가 없는지 확인하기 위한 alignment를 수행하였다. *BrFT1*과 *BrSOC1-1* 유전자의 CDS region을 합성한 template (Bioneer)를 이용하여 Cloning 한 결과, sequence가 100% 일치함을 확인하였다 (그림 31).

그림 31. CDS 합성 유전자의 sequence 확인 (left: *BrFT1*, right: *BrSOC1-1*)



- 배추의 개화유전자 *BrFTs*의 경우 gDNA 유전자의 size가 약 1Kb ~ 2.3Kb로 PCR error를 확인하기 위하여 배추의 DB(<https://genomevolution.org/coge/>)의 sequence와 비교하고자 하였다. 배추 DB에서 확인한 결과 Bra004117 (*BrFT2*), Bra015710 (*BrFT3*)의 경우 gDNA의

Exon 부위의 sequence만 확인할 수 있었으며 intron 부위의 sequence는 unknown으로 gDNA 전체를 정확하게 비교할 수 없었다 (그림 22). *BrFT2*, 3 유전자의 intron region을 제외한 Exon region의 sequence로 alignment 수행 결과, exon region sequence는 100% 일치함을 확인하였다. *BrFT4*와 *BrSOC1-3* 또한 sequence의 error 없이 클로닝 되었음을 확인하였다 (그림 23).

그림 32. 배추 DB에서 *BrFT2*와 *BrFT3*의 gDNA sequence 확인 (intron region: unknown)



### 18) 모델식물 (애기장대) 내 배추 multi copy 개화유전자의 기능분석

- 배추는 *FT* 유전자를 4개 가지고 있으며, 저온처리 후 조추 4004 계통에서 서로 다른 발현양상을 보이며 이는 추대형성에 서로 다른 기능을 할 것이라 추측할 수 있다 (그림 28). 따라서 *FT* 유전자 3개(*BrFT2*, *BrFT3*, *BrFT4*)를 binary vector (pRG)에 클로닝 하여 형질전환체를 만든 후, 배양실조건에서 3주 키운 T1 세대에서 표현형을 확인하고 (그림 33), 추대 형성 날짜와 잎 수를 비교하였다 (그림 34). 각 라인별로 10개체의 식물체를 대상으로 조사하였으며 이의 평균값을 나타내었다.

- *BrFT2* 형질전환체의 경우 대조구에 비해 추대형성이 20일 가량 빠른 것을 확인하였다. 반면, *BrFT3* 과 *BrFT4* 형질전환체의 추대형성은 대조구와 비슷하였다. 또한 개화와 관련된 특징 중의 하나인 로제트 잎 수를 측정하였다. 로제트 잎 수는 *BrFT2* 형질전환체가 평균 13개, 대조구와 *BrFT3*, *BrFT4* 형질전환체는 평균 27개로 *BrFT2* 형질전환체보다 2배가 더 많았으며 추대 형성 날짜와 일치하는 결과를 나타내었다.

그림 33. *BrFTs* complementation 형질전환체 표현형 확인

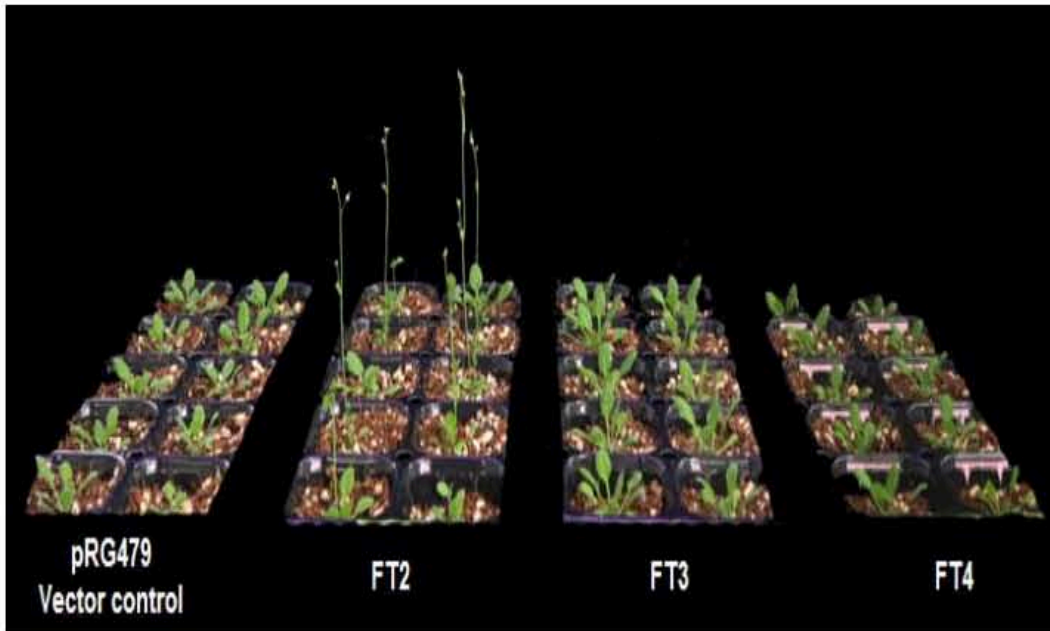
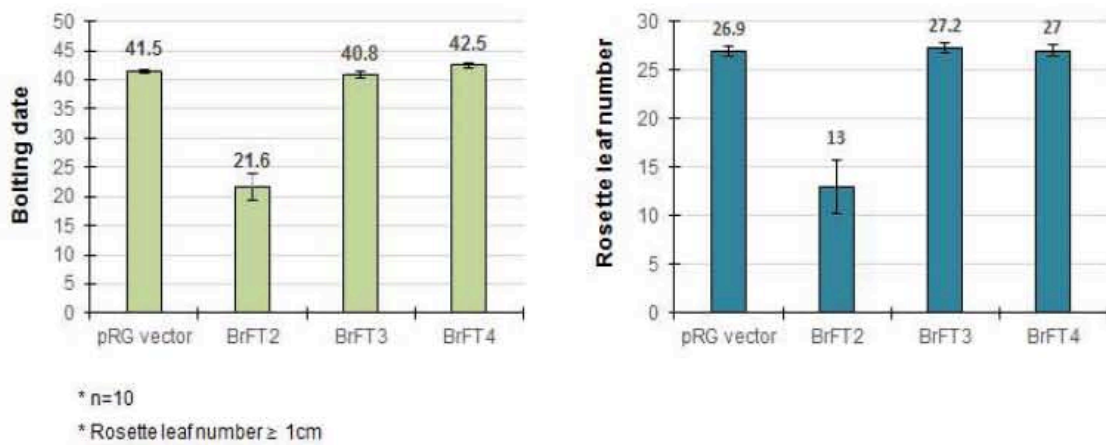


그림 34. *BrFTs* complementation 형질전환체의 추대 형성 날짜와 잎 수 비교



- 현재 *BrFT1* 형질전환체와 *BrSOC1-1*, *BrSOC1-3*의 형질전환체를 제작중에 있으며 추후 배추의 개화유전자 기능 분석을 수행할 예정이다 (그림 35).

그림 35. *BrFT1*(왼)와 *BrSOC1-1*, *BrSOC1-3*(오) complementation 형질전환체



19) 제1세부 유전자교정 식물체 분석

- CRISPR/Cas9 system을 이용한 유전자교정을 통해 조추계통 30, 20에 각각 배추 주요 개화유전자 *CO*, *SOC1*의 기능 knock-out 돌연변이체를 제작하였다. 유전자교정 식물체의 추대 표현형 분석을 위해 종자를 멸균된 원예용 상토에 파종한 뒤 발아를 위해 암조건 상태로 저온실(4°C)에 4일 처리한 후에 식물 배양실(23°C, 16시간 광조건/8시간 암조건)에서 2주 동안 생육하였다. 춘화처리 후 두 계통의 개화특성을 알아보기 위해 유식물체를 저온실(4°C, 12시간 광조건/12시간 암조건)에서 35일 동안 춘화처리 후 다시 정상조건의 배양실에서 생육하였다. 배양실에서 추대가 올라오는 기간까지의 일(day) 수와 당시 로제트 잎 수를 조사하여 대조구와 유전자교정 배추 간 개화형질을 비교하였다.

그림 36. 유전자교정 배추의 추대 표현형 (저온처리 후 25일째)





- Brad36-1은 조추 20 계통에 유전자교정을 통해 개화유전자 SOC1의 기능을 Knock-out 시킨 식물체로, 저온처리 후 배양실에서 25일째 생육한 결과 대조구와 추대형성의 차이를 보였다 (그림 36). 반면 S70306은 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다.
- 추대형성날짜와 로제트 잎의 수를 비교하였다 (그림 37). 춘화처리 후 25일째 데이터를 기준으로 표를 작성하였으며 추대형성날짜와 잎 수 모두 추대 표현형과 일치하는 결과를 보여주었다.

그림 37. 유전자교정 배추의 추대형성 날짜와 잎 수 비교 (저온처리 후 25일째)

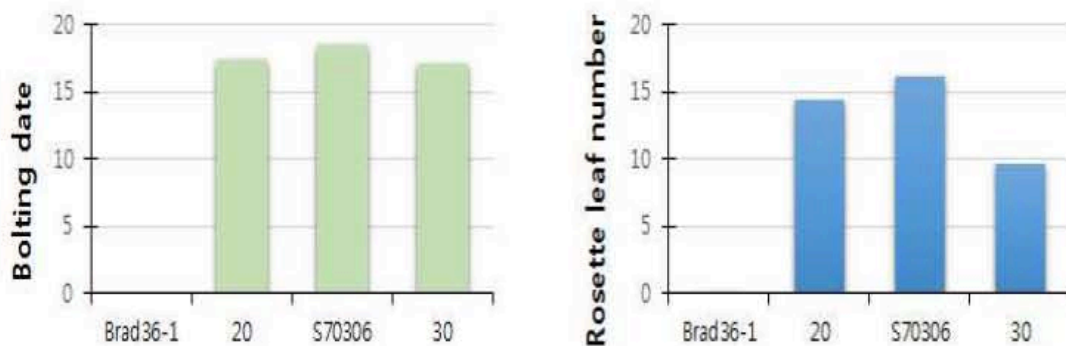
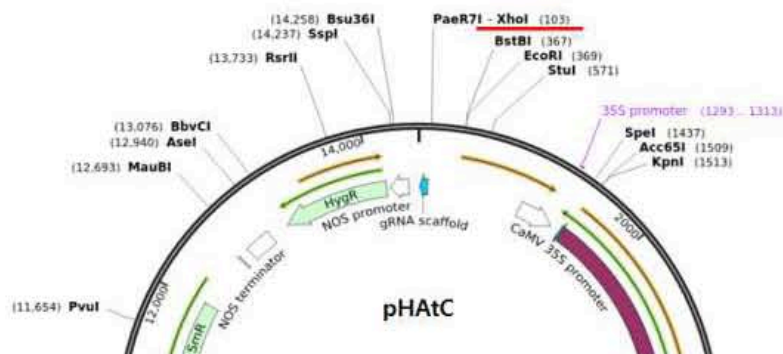


그림 37. Vector map : Xho I Enzyme site 결정



20) 유전자교정 식물체의 copy 수 분석

- CRISPR/Cas9 system을 이용한 유전자교정을 통해 만들어진 Brad36-1의 CRISPR/Cas9 vector copy number를 확인하기 위하여 southern blot을 수행하고자 하였다. Vector map 확인 후, probe로 사용할 Hygromycin B resistant gene 내부에 없는 제한효소인 Xho I을 선택하였다 (그림 38).
- 유전자교정 식물체의 잎을 샘플링하여 gDNA를 extraction을 진행하였다. positive를 제외하고 각 라인별로 gDNA를 15 µg씩 사용하였다. 제한효소 XhoI 처리 후 37°C incubator에서 이틀 간 방치 후 southern blot을 수행하였다 (그림 39).
- Gel loading 및 membrane detection 결과 Positive control (pHAtC vector control : 100 pg 사용)과 36-1#1, 36-1#7, 36-1#13 각 라인에서 동일한 위치에 probe detection 되는 것을 확인하였다. 그러나 gel image 상에서 gDNA가 제한효소에 제대로 잘리지 않고 큰 size로 많은 양이 남아있음을 확인하였다. 이를 해결하기 위하여 다른 제한효소의 사용, 2개 이상의 제한효소 사용, gDNA extraction method 변경 등 다양한 방법을 시도해 보았으나 잘리지 않은 form의 gDNA가 gel 상에 많이 남아있는 현상이 지속되는 것을 확인하였다 (그림 40).

그림 39. 유전자교정 배추 식물체 Southern Blotting 결과

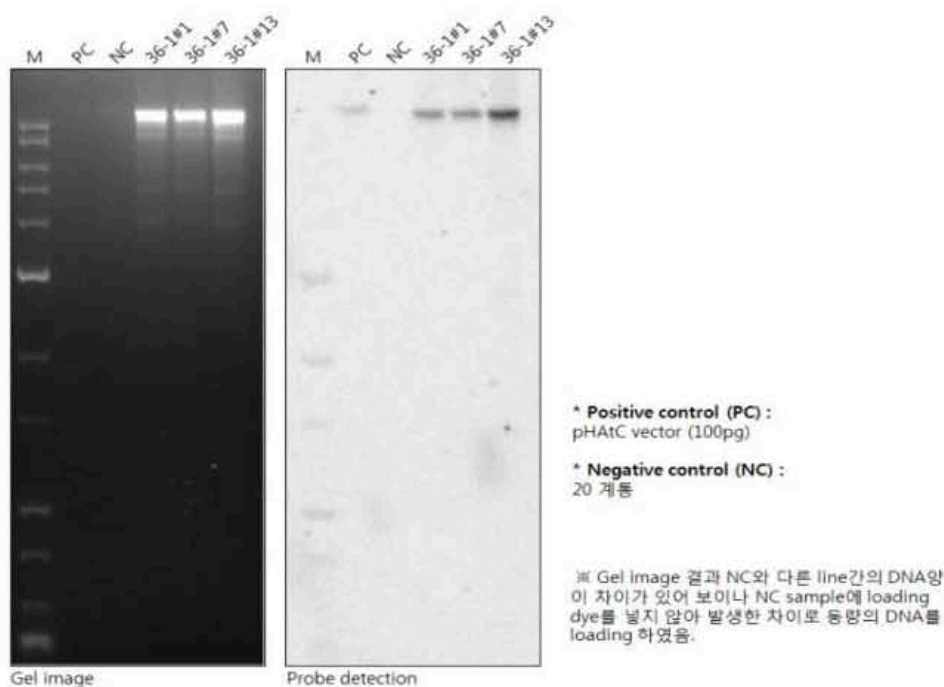
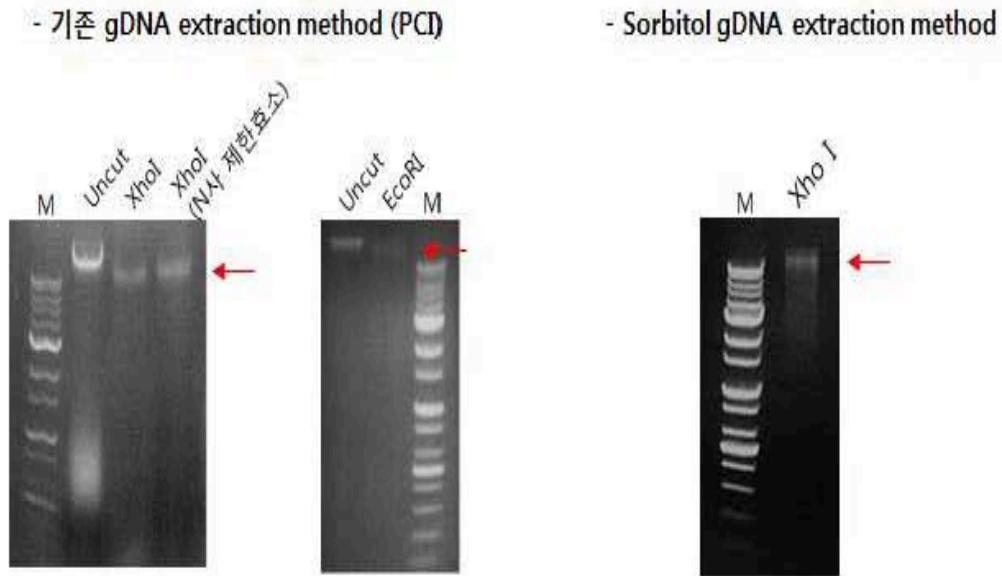


그림 40. 제한효소 처리 후 gDNA 확인



□ 연구개발 성과  
가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	코트번호		C-06-01		
					국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Comparative transcriptome profiling and SSR marker identification in three Jerusalem artichoke ( <i>Helianthus tuberosus</i> L.) cultivars exhibiting phenotypic variation	Plant Biotechnol Report	WY Jung, SS Lee, HJ Park, CW Kim, S-Y Kwon, J-H Jeon, H-S Kim, HS Cho	10	대한민국	Springer	SCI	2016.12.22	
2	Overexpression of Golgi Protein CYP21-4 Improves Crop	Frontiers in Plant Science	HJ Park, A Lee, SS Lee, D-J An,	e01250	Switzerland	Frontiers	SCI	2017.07.20	

	Productivity in Potato and Rice by Increasing the Abundance of Mannosidic Glycoproteins		K-B Moon, JC Ahn, H-S Kim, HS Cho						
3	개화시기가 상이한 두 개의 무계통간 개화유전자 서열변이 분석	Korean journal of science breeding	김윤성, 정원용, 정선금, 서정팔, 이재용, 조혜선	49(4)	대한민국	한국육종학회	SCI	2017.12.13	
4	Genomewide analysis of alternative splicing in an inbred cabbage line 'HO' in response to heat stress	Current genomics	SE Lee, WY Jung, HJ Park, A Lee, SY Kwon, HS Kim, HS Cho	19		Bentham science	SCI	2018.01.08	
5	Genome-wide identification of flowering time genes associated with vernalization and the regulatory flowering networks in Chinese cabbage	Plant biotechnology reports	정원용, 이아름, 문채선, 김윤성, 조혜선	12	대한민국	Springer	SCI	2018.10.29	

나. 국내 및 국제학술회의 발표

			코드번호		C-06-02
No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국식물생명공학회	정선금, 김윤성	2017.6.8	대전 인터시티	한국
2	2017 한국육종학회	정원용	7월 5-6일	대구 엑스코	한국
3	2018 한국육종학회	정선금, 김윤성	2018.01.12	제주라마다플라자	한국
4	유럽식물학회	조혜선	2018.08.18	코펜하겐	덴마크

다. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

			코드번호		C-06-04				
No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	FT유전자를 교정하여 만추성 형질을 가지는 유전체 교정 배추 식물체의	대한민국	농우바이오외 1명	2018.12.03	10-2018-0153751				100

	제조방법 및 그에 따른 식물체								
2	SOC1유전자를 교정하여 만추성 형질을 가지는 유전체 교정 배추 식물체의 제조방법 및 그에 따른 식물체	대한민국	농우바이오 외 1명	2018.12.03	10-2018-0153757				100

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

○ 최종 목표

- 만추대 배추 계통 육성

○ 평가 방법

- 타겟 유전자가 편집된 만추대 배추 계통 확보 유무

#### 3-2. 목표 달성여부

가. 연차별 성과목표 및 개발내용

연차	목표	개발내용	가중치	달성도(%)
1	타겟설정 및 유전자기 제작	-개화유전자확보 -타겟유전자선정 -gRNA 디자인 -벡터제작	10	100
	배추 개화형질분석	-계통간 추대형질분석 -개화유전자 발현분석	10	100
2	유전자교정체 선발 및 분석	- 유전자교정체 선발 - 유전자교정 확인 - 유전자교정체 형질분석	30	100
	배추 개화유전자 기능분석	- 계통간 RNA-seq 분석 - 만추대 후보 유전자 발굴 - 계통간 개화유전자 발현 분석	15	100
3	유전자교정체 세대 진전 및 분석	- 유전자교정체 재배 - 유전자 교정체 선발	20	100
	만추대 특이적 발현 개화유전자 발굴	- 배추 개화조절 기작 및 신호전달체계 분석 - 만추대 특이적 발현 개화유전자 분석	15	100

나. 성과목표 및 평가방법

성과목표	평가방법
타겟설정 및 유전자가위 제작	- 타겟 설정 여부 - 유전자 가위 및 벡터 제작 여부
배추 개화형질분석	- 배추 개화형질 분석 여부
유전자교정체 선발 및 분석	- 유전자교정체 확보 여부
배추 개화유전자 기능분석	- 배추 개화유전자 발현 조사 여부
유전자교정체 세대진전 및 분석	- 유전자 교정체 세대 진전 여부
만추대 특이적 발현 개화유전자 발굴	- 만추대 특이적 발현 개화유전자 조사 여부

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 해당사항 없음

4. 연구결과의 활용 계획 등

○ 활용방안

- 본 연구를 통해 얻은 만추대 배추 계통은 향후 만추대 F1 품종 육성에 사용될 수 있음.
- 실험에 엘리트 라인을 활용하였으므로 얻어진 유전자 교정체는 곧바로 품종육성에 사용가능함.
- 또한 다른 계통들에 대해서도 동일한 방법으로 만추대 계통으로 육성할 수 있어 다양한 만추대 F1 품종육성이 가능해질 것임.

○ 타 연구에의 응용

- 본 연구결과에 사용된 개화 유전자들은 다른 작물에서도 발견되며 아마도 비슷한 기능을 할 것으로 추정됨. 따라서 양배추, 당근, 양파 등 만추대성이 필요한 작물에 동일한 접근법을 적용가능할 것임.

○ 사업화 추진방안

- 현재 얻어진 만추대 계통에 대해 한 세대 더 종자를 받아 형질 확인작업을 할 예정임. 이때 만추 특성 이외의 다른 특성이 바뀌지 않았는지 확인하고 만약 다른 특성은 바뀌지 않았다는 것이 확인된다면 F1 조합작성을 통해 새로운 F1 품종을 개발할 것임. 특히 유전자 교정 전 후의 계통 간 물질분석을 통해 식품영양학적 가치가 변하지 않았는지 시험할 계획임.
- 이 품종은 기존 품종개발 단계에 따라 지역적응성 시험, 지역연락시험 등을 거쳐 사업화할 수 있을 것으로 기대됨.

## 붙임. 참고문헌

Zhang et al. (2000) Agrobacterium-mediated transformation of cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) Plant Cell Rep. 19(6):569-575

김수윤 등. (2002) FLC 유전자에 의한 배추의 개화조절. 한국식물생명공학회 정기총회. Vol2002. p122

조이남 등 (2002) Ascorbic acid 생합성 관련 GLOase 유전자를 이용한 배추의 형질전환. 원예과학기술지 20(1):77

노태경 등 (2003) 배추형질전환의 선발마커로 PMI 유전자와 Mannose의 이용. 원예과학기술지 21(2):65

노태경 등 (2003) 아그로박테리움을 이용한 L-Gluono-Lactone Oxidase (GLOase) 유전자의 배추 형질전환 21(1):9-13

김수윤 등. (2007) Effects of BrVRN and BrCO genes from *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* on flowering time phenotypes in Chinese cabbage. 한국원예학회. Vol2007, p154

Tseng et al. (2008) Tolerance to sulfur dioxide in transgenic Chinese cabbage transformed with both the superoxide dismutase containing manganese and catalase genes of *E. coli*. Sci. Horti. 115(2):101-110

Wu et al. (2012) A naturally occurring Indel variation in BraA.FLC.b (BrFLC2) associated with flowering time variation in *Brassica rapa*. BMC Plant Biol. DOI:10.1186/1471-2229-12-151

Gao et al. (2012) Genetic transformation of chinese cabbage (*Brassica rapa pekinensis*) with floral-dip method. Agri. Biotech. 1(4):22-24

Xiao et al. (2013) The brassica rapa FLC homologue FLC2 is a key regulator of flowering time, identified through transcriptional co-expression networks. J. Exp. Bot. 64(14):4503-4516

Bai et al. (2013) In planta transformation of *Brassica rapa* and *B. napus* via

- vernalization-infiltration methods. Protocol Exchange. DOI:10.1038/protex.2013.067
- Lee et al. (2014) Gene expression and phenotypic analysis of transgenic chinese cabbage over-expressing the cold tolerance gene, BrSCR. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 32(5):684-693
- 정성진 등 (2014) PEG법을 이용한 유전자가위의 페튜니아 원형질체. 원예과학기술지 32(2):197
- Woo et al. (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Nat. Biotechnol. 33(11):1162-4
- Bortesi and Fischer (2015) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnol. Adv. 33(1):41-52
- Franks et al. (2015) Variation in the flowering time orthologs BrFLC and BrSOC1 in a natural population of Brassica rapa. PeerJ. DOI:10.7717/peerj.1339
- Song et al. (2016) Differential expression of flowering genes between rapid and slow-cycling Brassica rapa. Plant Breed. Biotech. 4(2):145-157
- Park et al. (2016) Stable inheritance of an integrated transgene and its expression in phenylethylisothiocyanate-enriched transgenic chinese cabbage. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 34(1):112-121
- Lee et al. (2016) Target-directed gene-editing approach for developing a new horticultural crop. Acta Hort. 1127:289-294
- Lee et al. (2017) A co-expression network of drought stress-related genes in Chinese cabbage. Hort. Sci. Technol. 35(2):243-251
- 전예인 등 (2017) CRISPR-Cas9 system을 적용한 Petunia x hybrida의 화기구조 생성 관련 유전자 교정. 원예과학기술지 35(2):206



## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 유전체교정 기술을 이용한 배추 만추대 엘리트 계통 육성														
	(영문) Development of Chinese cabbage elite line with late bolting by genome editing technology														
주관연구기관	농우바이오		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 농우바이오											
참 여 기 업	농우바이오		총 연 구 기 간	(성명) 김 윤 성											
총연구개발비 (778,670 천원)	계	778,670	총 참 여 연 구 원 수	2016. 09 .~ 2018. 12.( 2년 4월)											
	정부출연 연구개발비	583,000		총 인 원	29										
	기업부담금	195,670		내부인원	16										
	연구기관부담금	-		외부인원	13										
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 목표: 유전자교정을 통한 배추 만추대 계통 육성</li> <li>- 성과: 조추대 배추 계통에서 개화핵심유전자를 유전자 교정하여 기능을 상실케 함으로써 만추대 계통으로 육성할 수 있었음. 더불어 조만추대 계통간 개화유전자 차이를 분석하여 핵심 유전자들이 중요한 기능을 수행함을 알 수 있었음.</li> </ul> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%; text-align: center;">연구내용</th> <th style="text-align: center;">연구결과</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>유전자가위 디자인 및 벡터 개발</td> <td>- 배추 핵심 개화유전자 (FT, SOC1)에 대한 sgRNA를 디자인 하여 벡터에 삽입하였음.</td> </tr> <tr> <td>유전자 교정체 선발 및 확인</td> <td>- 개발된 벡터를 Agrobacterium을 이용하여 배추 계통에 형질전환. FT 두 개 유전자 knock-out된 교정체와 SOC1 세 개 유전자가 knock-out된 교정체 선발되었음. - SOC1 교정체의 경우 세대진전을 하여 다음세대에서도 개화가 늦어지는 것을 확인하였고 유전자 교정도 유지되는 것을 확인하였음. FT 교정체의 경우 유전자 교정확인 되었으며 종자를 받기위해 저온 처리 중임.</td> </tr> <tr> <td>배추 저온처리에 의한 개화 특성 분석</td> <td>-배추작물은 개화를 위해 춘화처리가 필수적이며, 처리 기간은 적어도 20일 이상을 필요로 함을 확인함 -추대형질 계통 간 개화특성을 3차 반복실험으로 분석함 -만/조추대 형질을 갖는 계통 선별</td> </tr> <tr> <td>발현체분석에 의한 추대형질 계통 간 DEGs 발굴</td> <td>-개화형질 계통 간 RNA-Seq 분석을 수행하고, 저온처리 기간별 (0, 35일) DEG를 대량 분석함 -저온처리시 FT, SOC1 등의 핵심유전자 발현이 증가하고</td> </tr> </tbody> </table>						연구내용	연구결과	유전자가위 디자인 및 벡터 개발	- 배추 핵심 개화유전자 (FT, SOC1)에 대한 sgRNA를 디자인 하여 벡터에 삽입하였음.	유전자 교정체 선발 및 확인	- 개발된 벡터를 Agrobacterium을 이용하여 배추 계통에 형질전환. FT 두 개 유전자 knock-out된 교정체와 SOC1 세 개 유전자가 knock-out된 교정체 선발되었음. - SOC1 교정체의 경우 세대진전을 하여 다음세대에서도 개화가 늦어지는 것을 확인하였고 유전자 교정도 유지되는 것을 확인하였음. FT 교정체의 경우 유전자 교정확인 되었으며 종자를 받기위해 저온 처리 중임.	배추 저온처리에 의한 개화 특성 분석	-배추작물은 개화를 위해 춘화처리가 필수적이며, 처리 기간은 적어도 20일 이상을 필요로 함을 확인함 -추대형질 계통 간 개화특성을 3차 반복실험으로 분석함 -만/조추대 형질을 갖는 계통 선별	발현체분석에 의한 추대형질 계통 간 DEGs 발굴	-개화형질 계통 간 RNA-Seq 분석을 수행하고, 저온처리 기간별 (0, 35일) DEG를 대량 분석함 -저온처리시 FT, SOC1 등의 핵심유전자 발현이 증가하고
연구내용	연구결과														
유전자가위 디자인 및 벡터 개발	- 배추 핵심 개화유전자 (FT, SOC1)에 대한 sgRNA를 디자인 하여 벡터에 삽입하였음.														
유전자 교정체 선발 및 확인	- 개발된 벡터를 Agrobacterium을 이용하여 배추 계통에 형질전환. FT 두 개 유전자 knock-out된 교정체와 SOC1 세 개 유전자가 knock-out된 교정체 선발되었음. - SOC1 교정체의 경우 세대진전을 하여 다음세대에서도 개화가 늦어지는 것을 확인하였고 유전자 교정도 유지되는 것을 확인하였음. FT 교정체의 경우 유전자 교정확인 되었으며 종자를 받기위해 저온 처리 중임.														
배추 저온처리에 의한 개화 특성 분석	-배추작물은 개화를 위해 춘화처리가 필수적이며, 처리 기간은 적어도 20일 이상을 필요로 함을 확인함 -추대형질 계통 간 개화특성을 3차 반복실험으로 분석함 -만/조추대 형질을 갖는 계통 선별														
발현체분석에 의한 추대형질 계통 간 DEGs 발굴	-개화형질 계통 간 RNA-Seq 분석을 수행하고, 저온처리 기간별 (0, 35일) DEG를 대량 분석함 -저온처리시 FT, SOC1 등의 핵심유전자 발현이 증가하고														

	FLC와 같은 저해 유전자 발현이 감소하는 것을 알 수 있었음.
배추 추대형질 계통 간 주요 개화유전자발현 비교분석 및 개화조절 기작 규명	-RNA-seq DEG 분석결과로부터 두 계통간 주요 개화유전자 발현을 비교분석하였음 -모델식물 개화조절 기작과 비교하여 두 계통간 차이가 나는 유전자를 발굴하였음. 개화 핵심 유전자 중 특히 FT 발현이 큰 차이를 보였음.
<p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 본 연구를 통해 얻은 만추대 배추 계통은 향후 만추대 F1 품종 육성에 사용될 수 있음.</li> <li>- 또한 다른 계통들에 대해서도 동일한 방법으로 만추대 계통으로 육성할 수 있어 다양한 만추대 F1 품종육성이 가능해질 것임.</li> <li>- 본 연구결과에 사용된 개화 유전자들은 다른 작물에서도 발견되며 아마도 비슷한 기능을 할 것으로 추정됨. 따라서 양배추, 당근, 양파 등 만추대성이 필요한 작물에 동일한 접근법을 적용 가능할 것임.</li> </ul>	

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	116091-03-3-SB010		
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	유전체교정 기술을 이용한 배추 만추대 엘리트 계통 육성			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	농우바이오			연구책임자	김 윤 성
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016.09~12	83,000	27,670	110,670
	2차연도	2017.01~12	250,000	84,000	334,000
	3차연도	2018.01~12	250,000	84,000	334,000
	4차연도	-	-	-	-
	5차연도	-	-	-	-
	계		583,000	195,670	778,670
참여기업	농우바이오				
상대국	-	상대국연구기관	-		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019.01.31

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
농우바이오	수석연구원	김 윤 성

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	--

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구결과 유전자교정을 통해 조추대 배추 계통을 만추대 계통으로 육성할 수 있었음. 이러한 결과는 전세계적으로 유전자교정을 배추 상용 계통에 적용하여 유의미한 결과를 얻은 최초의 사례임.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구결과는 배추의 다른 계통에 적용하여 다양한 만추대 배추 계통을 빨리 확보할 수 있게 되었으며 다른 작물에도 비슷한 방식을 적용하여 만추대 계통을 확보할 수 있을 것으로 기대됨.  
- 또한 유전자교정을 채소과 작물에 적용하여 유용한 계통을 얻을 수 있다는 결과를 보여줌으로써 유전자교정 기술을 다양하게 활용하게 되는 계기가 될 것임.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 동일한 배추 계통에 그대로 적용가능 할 것이며 기타 다른 작물에도 본 연구에서 활용한 타겟 유전자를 이용하여 비슷한 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대됨.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구결과를 얻기 위해 육성과 긴밀하게 협조하여 진행하였으며 협동기관인 한국생명공학연구소와 유기적인 협력관계를 유지하였음. 최종 목표를 달성하기 위하여 연구 중간 결과에 따라 적극적으로 연구방법을 수정하여 진행하였고 유전자 교정체를 얻기위해 2년 이상 배추 형질전환을 수행하였음. 연구재료로 엘리트 라인을 사용하여 형질전환 효율이 낮았지만 끈기있게 실험을 수행하여 유전자교정체를 확보할 수 있었음.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구결과 논문 5편, 특허 2건 출원, 학술대회 발표 4건의 성과를 얻었음.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
타깃설정 및 유전자가위 제작	10	100	FT, SOC1 등 타깃 유전자 설정 및 유전자 가위 제작 완료
배추 개화형질분석	10	100	저온처리 기간 등에 따른 다양한 계통의 개화형질 분석 완료
유전자교정체 선발 및 분석	30	100	FT, SOC1 등에 대한 유전자교정체 선발 및 유전자교정 유무 확인 완료
배추 개화유전자 기능분석	15	100	저온처리 전후 개화유전자의 발현조사를 통한 핵심 개화유전자의 발현 분석 완료
유전자교정체 세대진전 및 분석	20	100	SOC1 유전자교정체 세대진전 및 형질분석, 교정유무 분석 완료
만추대 특이적 발현 개화유전자 발굴	15	100	조만추대 배추 계통 간 개화유전자 발현차이 조사 완료
합계	100점		

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 연구결과 유전자교정을 활용하여 조추대 계통을 만추대 계통으로 육성하는 것이 가능함을 확인할 수 있었음. 그러나 실제 F1 품종 육성에 활용하기 위해서는 한 세대 더 진전하여 형질이 안정적으로 전달되는지, 다른 형질은 달라지지 않았는지 등 확인작업이 더 필요함.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 없음

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 다양한 배추 계통을 만추대 계통으로 전환하여 다양한 만추대 F1 품종육성에 활용가능함.
- 배추 조만추대간 추대형질이 차이나는 원인에 대한 분자생물학적인 연구가 이루어졌고 향후 배추 등 작물에서 만추대 계통 육성에 활용될 수 있을 것임.
- 상당수의 작물(당근, 상추 등)에서 추대 안정성이 아주 중요한 특성으로 본 연구 결과를 활용하여 다른 작물에서도 만추대 계통을 동일한 방식으로 육성하는 것이 가능할 것임.

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농생명산업기술개발	
연구과제명	유전자교정 기술을 이용한 배추 만추대 엘리트 계통 육성			
주관연구기관	농우바이오		주관연구책임자	김운성
연구개발비 (천원)	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	583,000	195,670-		778,670
연구개발기간	2016. 09 ~2018. 12			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체 활용 ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유: )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 타깃설정 및 유전자가위 제작	FT, SOC1 등 타깃 유전자 설정 및 유전자 가위 제작 완료
② 배추 개화형질분석	저온처리 기간 등에 따른 다양한 계통의 개화형질 분석 완료
③ 유전자교정체 선발 및 분석	FT, SOC1 등에 대한 유전자교정체 선발 및 유전자교정 유무 확인 완료
④ 배추 개화유전자 기능분석	저온처리 전후 개화유전자의 발현조사를 통한 핵심 개화유전자의 발현 분석 완료
⑤ 유전자교정체 세대진전 및 분석	SOC1 유전자교정체 세대진전 및 형질분석, 교정유무 분석 완료. FT 유전자교정체는 세대진전 진행중
⑥ 만추대 특이적 발현 개화유전자 발굴	조만추대 배추 계통 간 개화유전자 발현차이 조사 완료

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI							
단위	2건	-	-	건	백만 원	백만 원	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	2 건	1 건	4건	명	건	건			
가중치	50													50						
최종목표	2											3	1	4						
연간내 달성실적	2											4	1	4						
달성율(%)	100											130	100	100						

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	타겟 유전자 선정
②	유전자 가위 디자인
③	형질전환

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술					✓					
②의 기술					✓					
③의 기술					✓	✓				

\* 각 해당란에 v 표시

### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	다른 배추 계통에도 적용. 다른 작물에서도 비슷한 결과를 기대함.
②의 기술	다른 타겟 유전자에 대한 유전자 가위 디자인에 활용
③의 기술	다른 배추 계통에서 유전자편집 적용 시 활용



7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	전수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	30	20												50					
최종목표	2	2									3	1		4					
연구기간내 달성실적	2	-									4	1		4					
연구종료 후 성과창출 계획	-	2									1	-		-					

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>			

## <뒷면지>

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.