

배추 속 작물의 개화형 판별 마커 시스템 개발

김진아 · 김정선 · 홍준기 · 이연희 · 이수인 · 정미정

Development of a marker system to discern the flowering type in *Brassica rapa* crops

Jin A Kim · Jung Sun Kim · Joon Ki Hong · Yeon-Hee Lee · Soo In Lee · Mi-Jeong Jeong

Received: 18 September 2017 / Revised: 17 October 2017 / Revised: 25 October 2017 / Accepted: 26 October 2017
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Flowering is one of the most important development traits related to the production of *Brassica rapa* crops. After planting, a sudden low temperature triggers premature flowering, which leads to a reduction in the yield and quality of harvested production. Therefore, understanding the mechanism of flowering control is important in the agricultural productivity for preventing *Brassica rapa* crops. Vernalization is generally known as the main factor of flowering in the Brassica plant. However, in the subspecies of *Brassica rapa*, some accession such as Yellow sarson and Komatsuna display the flowering phenotype without vernalization. Circadian genes, which diurnally regulate plant physiology, have a role for photoperiodic flowering but are related to the regulation of the vernalization mechanism. In this report, the 22 *B. rapa* accession were divided into two groups, vernalization and non-vernalization, and the sequenced circadian gene, *BrPRR1s*. Among them, the *BrPRR1b* gene was found to have deletion regions, which could classify the two groups. The PCR primer was designed to amplify a short band of 422bp in the vernalization type and a long band of 451bp in the non-vernalization type. This primer set was applied to distinguish the flowering types in the 43 *B. rapa* accession and 4 *Brassica* genus crop, Broccoli, cabbage, mustard, and rape. The PCR analysis results and flowering time information of each crop demonstrated that the primer

set can be used as marker to discern the flowering type in *Brassica* crops. This marker system can be applied to the *B. rapa* breeding when selecting the flowering character of new progenies or introducing varieties at an early stage. In addition, these results displayed that the circadian clock genes can be a good strategy for the flowering control of *B. rapa* crops.

Keywords *Brassica rapa* accession, *BrPRR1*, Circadian clock genes, Molecular marker, Vernalization

서 언

개화는 식물에게 있어서 가장 중요한 발달 특성 중 하나이다. 개화시기는 내생요인과 환경 자극 등에 의해 조절되는데, 개화 조절 기작에 관여하는 많은 유전자들이 모델식물인 애기장대를 중심으로 밝혀져 왔으며 광주기(photoperiod), 춘화(vernalization), 내생(endogenous) 그리고 지베렐린(GA)에 의해 유도되는 기작에 관련된 유전자들에 대한 많은 연구가 있어왔다(Simpson et al. 1999; Mouradov et al. 2002; Jack 2004; Alexandre and Hennig 2008; Boss et al. 2004).

작물의 개화 조절 기작은 생산성과 연관되어 중요하게 여겨진다. 애기장대를 중심으로 밝혀진 다양한 개화조절 기작 연구를 작물로 확대하여 연구하는 시도가 이루어져 왔으며, 애기장대와 같은 십자화과(Brassicaceae)에 속하는 배추(*B. rapa*), 양배추(*B. oleracea*), 유채(*B. napus*) 등 배추속 작물들은 *FLC* 유전자가 관여하는 춘화를 통해 개화가 유도되는 작물로 잘 알려져 왔다(Osborn et al. 1997).

한국과 중국에서 소비량이 많은 배추 (Chinese cabbage)는 배추종(*Brassica rapa*)에 속하는 작물로, 배추(Chinese cabbage;

J. A. Kim (✉) · J. S. Kim · J. K. Hong · Y.-H. Lee · S. I. Lee · M. J. Jeong
농촌진흥청 국립농업과학원 생물소재공학과
(National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, 370, Nongsaeongmyeong-ro, Wansan-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, Korea, 560-500)
E-mail: jakim72@korea.kr

ssp. *pekinensis*), 박초이(Pak choi; ssp. *chinensis*), 우타카이(Wutacai; ssp. *narinososa*), 순무(Turnip; ssp. *rapa*), 카이신(Caixin; ssp. *parachinensis*), 미즈나(Mizuna; ssp. *nipposinica*), 브로콜리토(Broccoletto; ssp. *broccoletto*)를 비롯하여 순무평지(Turnip rape; ssp. *oleifera*)나 옐로우사순(Yellow sarson; ssp. *tricoloris*)과 같은 유지종자 작물 등이 이에 속한다. 이들 자연 발생 배추 종들(natural accessions)의 개화 기작은 춘화와 연관이 있는 것으로 알려져 있으나, 유채종의 하나로 알려진 Yellow sarson 이나 일본 겨자 시금치로 알려져 있는 Komatsuna 등은 저온처리 없이도 파종 후 40일 전후가 지나면 추대한다(Gómez-Campo 1999). 또한 노지에서 미성숙 시기에 저온을 만나 수량과 수확물의 질이 떨어지는 경우도 종종 발생하는 등 배추종 작물의 개화 조건과 그 기작은 작물의 작기와 수확량 확보에 중요한 요인이다(Yuan et al. 2009).

생체 시계는 지구의 자전에 의해 발생하는 일일주기에 맞춰 생물의 생리 및 행동에 생체리듬을 부여하며 이를 조절하는데 관여한다(Millar 2004; Eriksson and Millar 2003). 생체리듬은 식물의 성장과 발달에 직,간접적으로 관여하며 궁극적으로 진화과정상의 적응과 농작물의 생산량에 영향을 미친다(Dodd et al. 2005). 애기장대에서 *PRR1*(*Pseudo-Response Regulators1*)과 *LHY/CCA1*(*Late Elongated Hypocotyl/Circadian Clock Associated 1*)는 생체시계 조절 기작의 중심 유전자이다(Harmer 2009; Takata et al. 2010). *TOC1*(*TIMING OF CAB EXPRESSION 1*)로도 알려진 *PRR1* 유전자는 특이한 구조(pseudo-receiver domain과 CONSTANS motif)를 가진 애기장대 *PRR*(*pseudo-response regulator*)군 중 하나이다(Makino et al., 2000; Matsushika et al., 2000; Murakami et al., 2003; 2005). 5개로 되어 있어 “PRR quintet”로도 불리는 이 유전자의 mRNA는 해가 뜨고 난 후 순차적으로 발현이 축적이 되어 2~3시간 간격을 두고 *PRR9_PRR7_PRR5_PRR3_PRR1* 순으로 발현량이 최대가 되는 생체시계 유전자이다(Matsushika et al., 2000; Mizuno and Nakamichi, 2005). 피자 식물 진화계통에 보존되어 있으며, 벼(*Oryza sativa*)와 같은 외떡잎 식물과 포플라(*Populus trichocarpa*)와 같은 목본류의 식물 등에 잘 보존되어 있는 유전자로 진화과정을 거치면서 작물별로 보존된 유사유전자(paralogous genes)의 개수에 차이가 있다(Murakami et al. 2003; Ming et al. 2008; Ramírez-Carvajal et al. 2008; Takata et al. 2010). 배추 계통에서 발견된 *PRR*군 유전자는 11개이며, 그 중 *PRR1*은 2개(*BrPRR1a*와 *BrPRR1b*)로 일일 주기로 발현하는 생체시계 유전자임이 확인되었다(Lou et al. 2012; Kim et al. 2012).

본 논문에서는 배추 제능에 보존되어 있는 생체시계 유전자의 서열변이를 이용하여 배추속 식물의 개화형을 춘화형과 비춘화형으로 구분하여 주는 마커를 개발하였다. 이러한 연구결과는 배추속 식물의 생육 초기에 개화형을 판별하여 재배 작형 예측에 활용되어, 배추속 식물의 교배 육종 및 재배 시 선발에 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 또한 일

장형 개화 식물과 달리 생체시계 유전자와 춘화형 개화조절과의 관계는 많이 알려져 있지 않다. 본 연구의 결과는 작물의 개화조절과 생체시계 유전자와의 연관성을 밝히고 이를 이용하여 작물의 개화를 조절하려는 최근의 연구들에 기여할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

공시재료

배추 아종 43종(Table 1)과 배추 속 식물 브로콜리(*Brassica oleracea* var. *italica*), 양배추(*B. oleracea* var. *capitata*), 갓(*Brassica juncea* (L.) Czern.), 영산유채(*Brassica napus* L.) 및 애기장대(*Arabidopsis thaliana*, col-0)를 실험에 사용하였다. 배추 아종 30종의 종자는 네덜란드 유전자원 센터(Centre for Genetic Resources, the Netherlands, <http://www.cgn.wur.nl/UK>)에서 분양 받았으며(Table 1, No.1-30), 지부(Chiifu), 장원 모, 부(Jangwon female/male)본은 농촌진흥청이 보유한 종자(Table 1, No.31-33), 권심(KenshinA, B), Chil, Hiro, 청경채(PakChoi), 백경채(White PakChoi), 순무(TurnipA, B)와 배추종이 아닌 타작물로 배추속에 속하는 브로콜리(Broccoli)와 양배추(Cabbage), 갓(Leaf mustard), 유채(Rape) (Table 1, No. 34-45번)는 동부한농종묘에서 분양받았다. 네덜란드 유전자원 센터 자료를 참고하여 자원들의 개화형을 Table 1에 함께 표시하였다.

배추 아종 내 *BrPRR1b* 유전자의 변이 탐색

각 배추 아종 작물들의 종자를 파종하여 분엽이 3-5장 정도 되었을 때 잎과 줄기를 채취하였다. 채취한 잎과 줄기를 마쇄한 후 Kim et al. (2006)의 방법으로 게놈 DNA를 추출하고 농도를 50 ng/ml로 희석하였다. Table 2의 프라이머 세트(*BrPRR1a_L/R*와 *BrPRR1b_L/R*)를 이용하여 추출한 DNA 내 *BrPRR1b*(*Brassica rapa Pseudo-Response Regulators1b*) 유전자(Kim et al. 2008; 2012)의 염기서열분석을 수행하였다. 분리한 DNA 200ng은 95°C에서 5분 변성시킨 후 변성 95°C 45초, 어닐링 58°C 45초 및 신장 75°C 1분 30초의 과정을 35 사이클 반복한 후 다시 10분간 신장시켜 증폭하였다. 이렇게 증폭된 PCR 밴드를 분리하여 핵산서열 분석 후, DNASTAR Lasergene7을 사용하여 multi-alignment를 수행하고 변이 영역을 탐색하였다.

개화 일수 조사

배추 아종 43종 중 네덜란드 유전자원 센터에 개화형이 명시된 22종을 우선 선발하여 춘화형과 비춘화형 두 그룹으로 분

Table 1 List of accessions

No	Lab code	CGN ^a code	TAG2005 ^b code	Flowering types	No	Lab code	CGN code	TAG2005 code	Flowering types
1	WB04		L58	NV	25	LP08	CGN06835	YS-033	NV
2	WB05	CGN07211	PC-078	-	26	LP09	CGN06836	SO-034	NV
3	WB06	OCRI1757	OR-210	-	27	LP10	CGN06840	SO-038	NV
4	WB09	CGN17280	TG-129	V	28	LP21	CGN13924	PC-099	-
5	WB11	CGN06818	WO-024	NV	29	LP23	CGN15184	PC-107	-
6	WB12	CGN07222	WO-085	-	30	LP30		R-O-18	NV
7	WB13	CGN15202	KOM-118	V	31	Chiifu	-	CC-01	V
8	WB14	FIL500	YS-143	NV	32	Jangwon ♀	-	CC-02	V
9	WB15	CGN06841	SO-039	NV	33	Jangwon ♂	-	CC-03	V
10	WB16	CGN06842	SO-040	NV	34	Kenshin A	-	L58-01	V
11	WB17	CGN06790	MIZ-019	V	35	Kenshin B	-	L58-02	NV
12	WB18	CGN17279	MIZ-128	V	36	Chil1	-	Chil-01	-
13	WB20-1	CGN15171	PC-105	-	37	Chil2	-	Chil-02	-
14	WB20-2	CGN15171	PC-105	-	38	Chil3	-	Chil-03	-
15	WB21	CGN06828	BRO-029	-	39	Hiro1	-	Hiro-01	-
16	WB22	CGN06829	BRO-030	-	40	PakChoi	-	PC-01	V
17	WB23	CGN17278	BRO-127	-	41	White PakChoi	-	PC-02	-
18	WB24	CGN15199	VT-115	V	42	TurnipA	-	VT-01	V
19	WB25	CGN06720	VT-012	V	43	TurnipB	-	VT-02	V
20	WB26	CGN06709	VT-006	V	44	Broccoli	-	out-01	V
21	WB27	CGN06859	VT-044	V	45	Cabbage	-	out-02	V
22	LP04	CGN06718	VT-110	V	46	Leaf mustard	-	out-03	V
23	LP06	CGN06825	BRO-027	-	47	Rape	-	out-04	V
24	LP07	CGN06834	SO-032	-	48	Arabidopsis	-	out-05	-

^aCGN: Centre for Genetic Resources, The Netherlands. The accessions were obtained from CGN in Wageningen

^bTAG2005 code: Genotype names of *B. rapa* collections in Zhao et al. (2005)

^cabbreviation: BRO, Broccoletto; CC, Chinese cabbage; FT, fodder turnip; KOM, Komatsuna; Miz, Mizuna; PC, Pak choi, Caixin and Wutacai; SO, Spring turnip rape; TG, turnip green; VT, Vegetable turnip; WO, Winter turnip rape; YS, Yellow sarson.

Table 2 List of primers for PCR

Name of primers	Sequences (5'-3')
^a BrPRR1a_L	TGGTTTGGCCATGGAAGTAT
BrPRR1a_R	TGCTAAGCCAACATGAGCAG
^b BrPRR1b_L	TTTGCCATGAAAGTTGGAAG
BrPRR1b_R	TGAGTGAACATGATCAAACACATC
^c vernal_marker_L	GAAGAAAGCTGAGGACTCTCCA
vernal_marker_R	TCCAAGTGATCCAAACACAAA

^aprimer for isolation of BrPRR1a from *B. rapa* accession

^bprimer for isolation of BrPRR1b from *B. rapa* accession

^cprimer for amplification of variation region in BrPRR1b, marker primers

류하였다. 춘화형 그룹은 파종 2주 후에 45일간 저온(4°C)에 두어 춘화처리를 하였고, 비춘화형은 25°C 온실에서 생육하여 파종 후부터 개화까지의 소요 일수를 조사하였다.

개화형 판별용 PCR 마커 개발 및 확인

BrPRR1b 유전자의 변이 부분을 증폭할 수 있는 프라이머 세트(Table 2)를 개발하고 배추 아종 22종을 포함한 배추 아종 43종 및 기타 배추 속 식물(브로콜리, 양배추, 갓, 영산유채)에 대해서도 PCR 증폭을 수행하였다. 작물의 DNA를 주형으

로 하여 PCR 분석을 하였다. PCR 조건은 배추 아종 내 *BrPRR1b* 유전자의 변이 탐색과 같은 방법으로 수행하였으며, 29bp의 밴드 크기 차이를 보기 위하여 2.5% agarose gel electrophoresis에서 확인하였다.

결과 및 고찰

배추 아종 내 생체시계 유전자 *BrPRR1*군의 서열변이

네덜란드 유전자원 센터(Centre for Genetic Resources, the

Netherlands, <http://www.cgn.wur.nl/UK>)에서 분양 받은 종자 30 종과 농촌진흥청이 보유하고 있던 지부, 장원 모, 부분, 그리고 동부한농종묘에서 분양 받은 권심, Chil, Hiro, 청경채, 백경채, 순무에 보존되어 있는 *PRR1a*와 *1b* 두 유전자군의 염기서열 분석을 시도하였다. 염기서열분석이 잘 수행된 아종 내 *BrPRR1a*와 *1b* 유전자의 계통분석을 하였는데 아종별로 두 유전자가 잘 보존되었음을 확인하였다(Fig. 1). 그러나 일부 아종에 대하여는 염기서열분석이 잘 되지 못하였으며, *BrPRR1b*의 경우 각 아종별로 SNP(Single nucleotide polymorphism)와 삽입/결손 등 다양한 서열변이 영역이 발견되었다(Fig. 2).

개화형이 다른 아종 내 *BrPRR1b* 유전자의 변이 탐색

배추 아종들 대부분은 잎을 식용하므로 재배기 동안 화학 분화가 되지 않고 일반적으로 4°C 저온에 일정기간 춘화처리 후에 추대하는 것으로 알려져 있다(Osborn et al. 1997). 종자 수확을 위해 관행으로 춘화처리를 해오던 지부, 장원, 권심 등과 분양받은 종자의 개화형을 참고하여(Table 1), 개화를

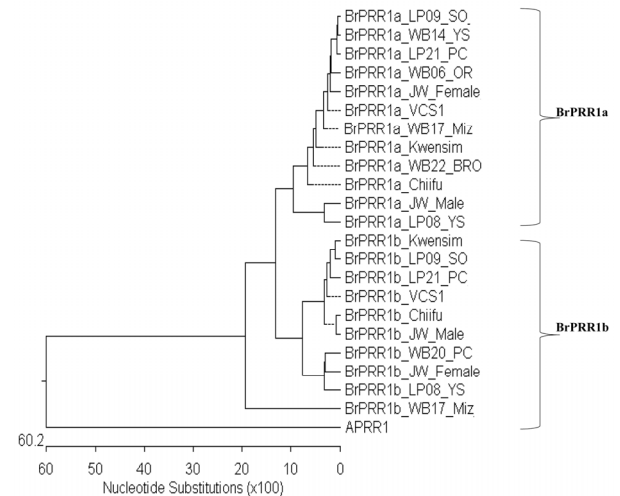


Fig. 1 Non-rooted neighborjoining phylogenetic tree of *BrPRR1a, 1b* in *B. rapa* accession Sequencing analysis were carried using *BrPRR1a* L/R and *BrPRR1b* L/R primer in Table 2. Using DNASTAR Lasergene7, sequenced data were used for multi-alignment and analysis

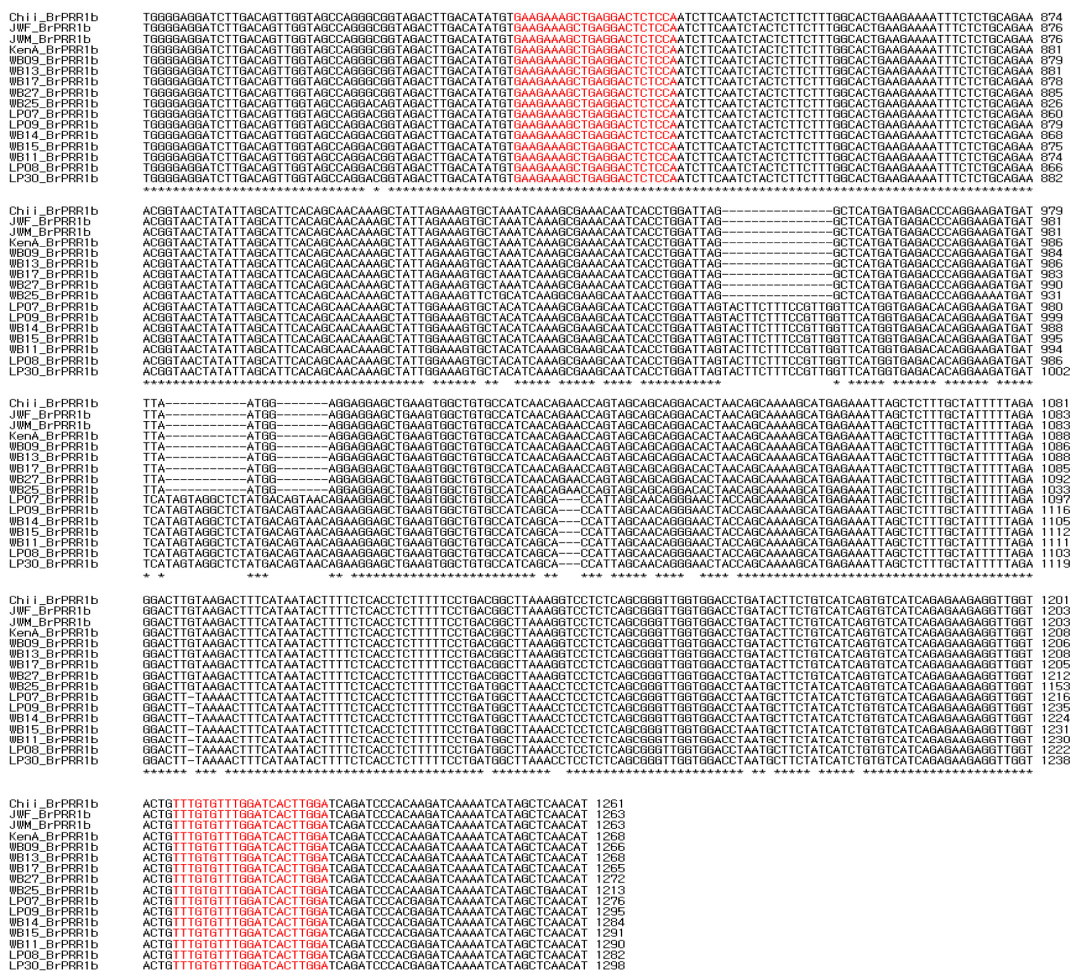


Fig. 2 Sequence variations of each *BrPRR1b* in *B. rapa* accession Primers to amplify the region of variation were designed (red characters). Alignment of sequences were carried by Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

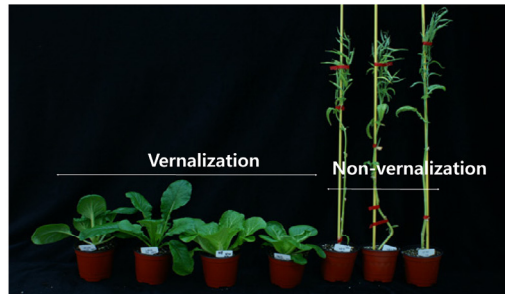
Table 3 Flowering time in 22 *B. rapa* accession

Non-vernalization type			Vernalization type		
Lab code	English name	^a Days for flowering	Lab code	English name	^b Days for flowering
WB04	Rapid cycling	38	WB13	Komatsuna	NS
WB11	Winter turnip rape	37	WB17	Mizuna	90
WB14	Yellow sarson	48	WB18	Mizuna	NS
WB15	Spring turnip rape	37	WB24	Vegetable turnip	105
WB16	Spring turnip rape	NS	WB25	Vegetable turnip	90
LP07	Spring turnip rape	48	WB09	turnip green	99
LP08	Yellow sarson	38	WB26	Vegetable turnip	105
LP09	Spring turnip rape	37	WB27	Vegetable turnip	110
LP30		41	LP04	Vegetable turnip	105
KwenshinB	Chinese cabbage	41	KwenshinA	Chinese cabbage	82
			Jangwon ♀	Chinese cabbage	95
			Chiifu	Chinese cabbage	95

^aDays for flowering: Screening for flowering time in *B. rapa* accession. Seeds were imbibed in water for 1day and planted in soil. The time point checked when the first premature flower buds were come out without vernalization treatment. Flowering time was calculated number from planting to premature buds.

^bDays for flowering: Screening for flowering time in *B. rapa* accession. Seeds were imbibed in water for 1day and planted in soil. The time point checked when the first premature flower buds were come out with 45 days vernalization treatment. Flowering time was calculated number from planting to premature buds.

A



B

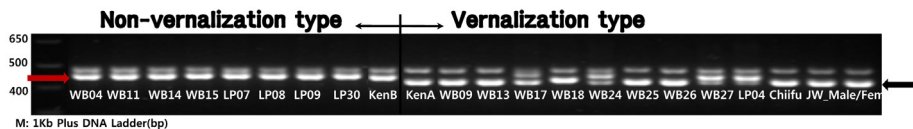


Fig. 3 Development of marker system to discern the flowering type Some *B. rapa* accessions were divided into two groups according to the flowering type, vernalization (Left) which need long term cold treatment for flowering and non-vernalization (Right) which can bolt without cold treatment. Picture showed the morphologies after 40th days plant from planting (A). PCR banding patterns generated with the primer combination vernal_marker_L/R. Red and black arrows indicate the 451 bp fragment linked to non-vernalization *BrPRR1b* locus and 422 bp fragment linked to vernalization *BrPRR1b* locus, respectively.

위해 일정기간(약 45일)의 저온처리가 필요한 춘화형과 발아 후 약 40일 전후 장일 조건에서 개화하는 비춘화형 배추 아종 22개를 선발하여 개화조사를 실시하였다. 조속종인 LP30(R-O-18)을 비롯하여 비춘화형으로 분류된 아종은 파종 후 38일부터 48일 사이에 추대하여 개화하였으나 춘화형으로 분류된 아종은 추대하지 않았으며, 45일 춘화처리 후에

37일부터 65일 사이에 개화하였다(Table 3, Fig. 3A).

또한 춘화형 배추 아종의 *BrPRR1b* 유전자의 핵산서열 내에 총 46bp의 결손(deletion) 영역이 확인되었다(Fig. 2). 이 결손 영역을 증폭하여 비춘화형 아종의 경우 451bp의 긴 PCR 밴드만, 춘화형 아종은 422 bp의 짧은 PCR 밴드만 확인되도록 프라이머 세트(Table 2)를 디자인하였으며, 22 아종을 대

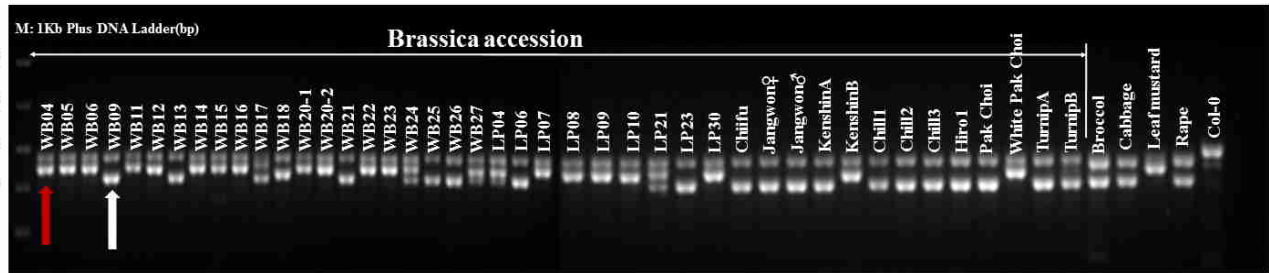


Fig. 4 Distributions of PCR banding patterns in *Brassica rapa* varieties and several Brassica crops Red and white arrows indicate the 451 bp fragment linked to non-vernalization *BrPRR1b* locus and 422 bp fragment linked to vernalization *BrPRR1b* locus, respectively

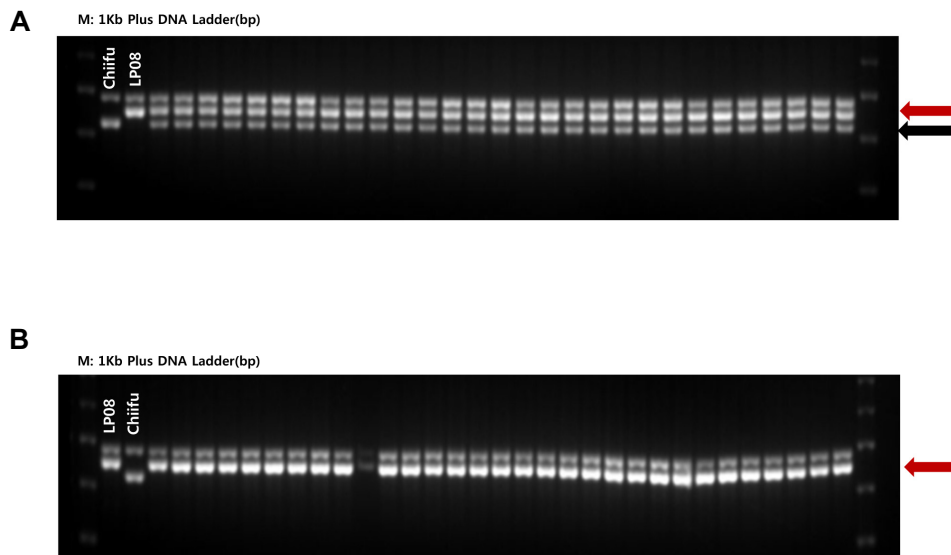


Fig. 5 Screening for flowering types in the F1 progeny populations F1 progeny were generated from a cross between Chiifu and LP08 (A) and between LP08 and Chiifu (B) using PCR marker. Red and black arrows indicate the 451 bp fragment linked to non-vernalization *BrPRR1b* locus and 422 bp fragment linked to vernalization *BrPRR1b* locus, respectively.

상으로 PCR 분석을 수행하였다(Fig. 3B). 개화 일수가 100일 이상의 극만추대형(WB24, WB27 및 LP04) (Table 1, 3)의 경우에는 두 밴드가 모두 관찰되었는데 이는 자연상태에서 두 타입의 *BrPRR1b* 유전자를 모두 가지고 있는 hetero allele로 추정된다. 이들 아종의 경우 염기서열분석에 실패하였는데 이는 사용했던 프라이머로는 각각의 유전자를 따로 분리할 수 없었던 것으로 사료된다.

43개 배추 아종을 대상으로 PCR 분석을 수행한 결과 모든 배추 아종에서 밴드를 확인하였으며 451 bp 밴드가 나온 아종은 비춘화형, 422 bp 밴드 단독 또는 451 bp와 422 bp 두 밴드가 함께 나온 아종은 춘화형으로 확인되었다(Table 1, Fig. 4). 종이 다른 배추속 작물인 브로콜리, 양배추, 갓, 유채에 대해서도 PCR 분석을 수행한 결과 관행으로 춘화처리를 해왔던 배추속 작물은 춘화형으로 확인되었으며, 여름에 불시추대를 한다고 알려진 갓은 451 bp 밴드를 가지는 비춘화형임을 확인할 수 있었다.

춘화형과 비춘화형의 교배 후대 분석

춘화형 배추와 비춘화형 배추를 교배하여 후대 분석을 시도하였다. 지부를 모본으로 하고, LP08 (YS-033)을 부분으로 하여 교배하였고, 모본과 부분을 바꾸어 교배한 F1의 개화형과 마커 PCR 결과를 비교하였다. 그 결과, 지부를 모본으로 하고 LP08을 부분으로 하여 교배한 경우는 춘화형이며 422 bp과 451 bp 두 밴드를 모두 가지고 있었고(Fig. 5A), 모본과 부분을 바꿔 교배한 경우는 451bp 밴드만을 보였으며 비춘화형이었다(Fig. 5B). LP08 아종이나 *PRR1b* 유전자가 모계 유전의 특징을 가진 것인지, 아니면 화분의 퇴화나 활력 또는 수정 능력의 차이에 기인한 의한 것인지(Kim et al., 2010)의 여부는 *PRR1b* 유전자의 기능과 연관하여 차후의 연구가 더 필요할 것이다.

422 bp과 451 bp 두 밴드를 모두 보인 F1을 자가수분하여 F2를 육성하였으며, PCR 증폭을 시도하였다. Fig. 6A의 결과에서 91개 F2 중 68개체는 422 bp 밴드를 보이거나(15개) 422

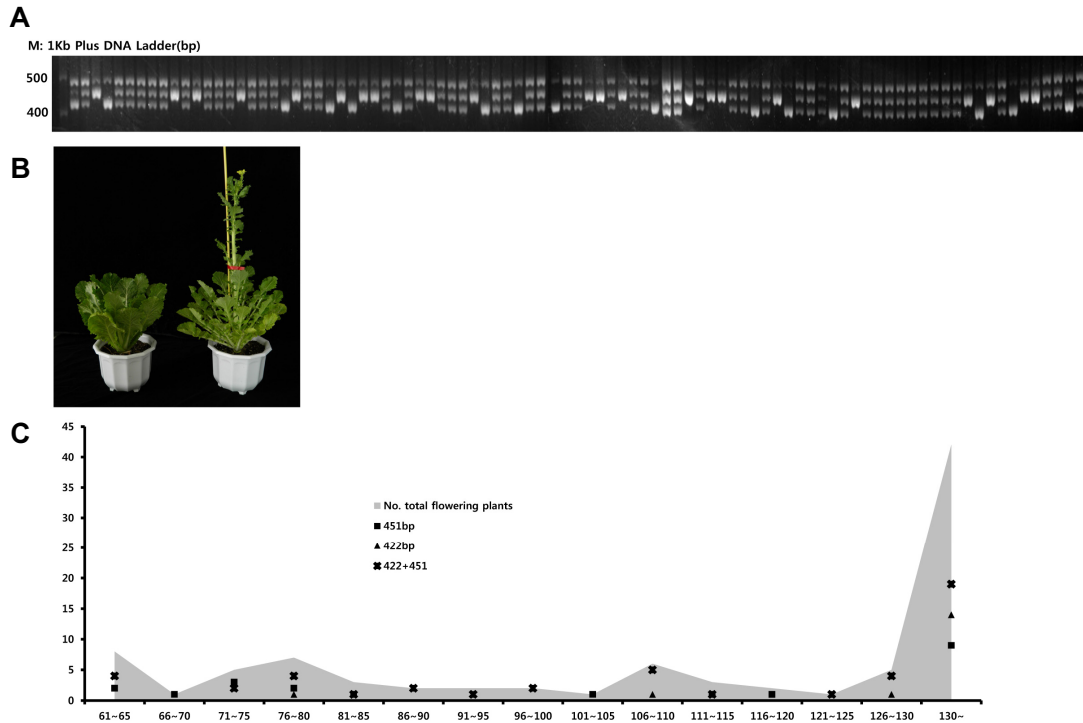


Fig. 6 Flowering types in the F2 progeny populations of a cross between Chiifu and LP08 Screening for flowering types in the F2 progeny population using PCR marker (A) Typical flowering phenotypes of F2 progeny. After 85 days from planting in soil, plants containing 422 bp band only or 422 bp and 451 bp together didn't bolt (Left) but plants containing 451 bp band only had flower (Right) (B) Screening for flowering time in the F2 progeny populations without vernalization treatment. Seeds were imbibed in water for 1 day and planted in soil. The time point checked when the first premature flower buds were came out. Flowering time was calculated number of the days from planting to first premature flower buds. Gray region shows the total flowered plants. Square, triangle and x show the plants containing PCR marker band 451 bp, 422 bp, and 422 + 451 bp, respectively

와 451 bp (53개) 밴드를 모두 보였고, 23개체는 451 bp 밴드를 보여 춘화형과 비춘화형의 분리비가 3:1이 됨을 확인하였다. 또 다른 시도에서는 90개체 중 21개체는 451 bp 밴드를 23개체는 422 bp 밴드만을 보였으며, 두 밴드를 모두 보인 개체 수는 46으로 역시 PCR 결과상으로는 춘화형과 비춘화형은 3:1의 분리비를 보였다. 두 세트의 실험결과에서 422 bp 밴드를 단독으로 가진 개체수는 15개와 23개체로 상이하였다. 식물체의 모양은 대부분 PCR 분석의 결과에 상응하여 춘화형으로 판별된 경우는 지부배추의 모양과 비슷하고 같은 기간 경과 후 추대하지 않았으나, 비춘화형으로 판별된 경우는 유묘 때 하배축이 긴 LP08의 특징을 보였으며, 일정 기간 경과 후 특별한 처리 없이 개화하였다(Fig. 6B). 422 bp만 가진 개체 23개, 두 밴드를 모두 가진 개체 46개, 451 bp만 가진 개체 21개로 1:2:1의 분리비를 보인 F2 집단의 개화일수를 조사하였다. 젖은 3M 페이퍼에서 2일간 발아시킨 후 토양에 이식한 날로부터 춘화처리 없이 꽃봉오리가 생기는 날까지의 일수를 조사하였으며 130일까지 관찰하고 이후는 개화하지 않는 것으로 분류하였다. 마커 PCR 결과 451 bp 밴드를 보여 비춘화형으로 분류된 21개의 F2 식물체들 중 12개는 120일 이전에 개화하였고 9개 식물체는 개화하지 않았으며, 개화

한 식물체의 대부분이 85일 이전에 개화하였다. 단독으로 422 bp 밴드만을 보인 23개 식물체중 14개가 그리고 422 bp와 451 bp 두 PCR 밴드를 모두 가지는 46개 식물체중 19개가 개화를 하지 않았고 개화한 경우도 대부분 이식 후 100일이 지난 이후에 개화하였다(Fig. 6C).

애기장대 생체시계 유전자 *PRR*군은 생체리듬을 조절하는 기능 외에도 다양한 기능을 가지고 있음이 보고되고 있다. 사탕무(*Beta vulgaris* L.)의 춘화반응에 대한 자연변이는 *BOLTING TIME CONTROL1 (BTC1)* 유전자좌와 연관되어 있으며 이는 애기장대의 *PRR3*와 *PRR7* 유전자좌와 상동성을 보이는 *PRR*군 유전자임이 확인되었다(Ream et al. 2016; Omolade et al. 2016). 또한 *BvPRR7*은 일일주기로 발현되며 저온에 반응할 뿐만 아니라 개화시기 조절에 직접적으로 관여하고 알려져 있다(Omolade et al. 2016). 벼(*Oryza sativa*)의 *PRR37* 유전자 역시 *Early heading7-2(EH7-2)/Heading date2(Hd2)* QTL과 연관되어 이들 유전자들의 기능을 잃은 경우 극단적으로 이른 개화를 보였다(Koo et al. 2013).

조속형 배추IMB211 (rapid cycling Chinese cabbage (ssp. *pekinensis*))와 유지종자형 배추R500 (Yellow Sarson oilseed (ssp. *trilocularis*))의 재조합육성계통 집단의 QTL 분석을 시

도한 이전의 연구에서 *PRR7*와 *FLC*가 염색체 A02와 A10에 매우 가까이 있음이 보고되었다. 또한 지부 배추에서도 *BrPRR7a*와 *BrPRR7b*가 염색체 A02와 A10에 각각 *BrFLC2*와 *BrFLC1* 유전자와 매우 가깝게 위치해 있는 것이 확인되었다 (Kim et al. 2012). *PRR7*과 *PRR9*은 고온에서의 생체리듬 주기 조절과 관련이 있는 것으로도 알려져 있다 (Salomé et al. 2010).

생체시계 유전자와 배추 아종의 개화 생리

배추는 약 17-20MY 전에 애기장대에서 분리된 이후 진화과정 동안 세 번의 WGD(Whole genome duplicate)를 겪었으며 (Lysak et al. 2005; Town 2006; Yang 2006) 이배체화(diploidization) 되어 배추 계통 내 애기장대 유전자의 상동유전자 수는 평균 2배로 보존되어 있다 (Mun et al. 2009). 보존되어 있는 유전자들이 서로 중복된 기능을 가지고 유전자량 효과(dosage effect)를 보이는 경우가 매우 많으나 (Edger and Pires, 2009), 진화과정 동안 전혀 다른 새로운 기능(neo-functional)을 가지는 경우도 발견되고 있다 (McClung 2010).

본 논문의 *BrPRR1b* 유전자는 애기장대 *TOC1*의 배추 계통 내 상동 유전자 중 하나로 일일주기로 발현하며 계속 광에서도 주기를 유지하는 생체시계 유전자이다 (Kim et al. 2007; Kim et al. 2012). 배추 염색체 A09에 위치하며 *BrFLC*와 가깝게 있지는 않으나 *PRR7*, *PRR9*과 함께 개화 조절을 하는 것으로 알려진 *PRR5*의 상동 유전자인 *BrPRR5a*와 바로 인접해 있다 (Nakamichi et al. 2007; Kim et al. 2012). 또한 애기장대의 *TOC1*은 식물체가 저온에 노출되었을 때 발현이 변화하는 것으로도 알려져 있다 (Michael et al. 2003; Bieniawska et al. 2008).

본 논문은 생체시계 유전자 *BrPRR1b*가 배추 아종과 배추속 식물에서 춘화와 관련된 개화 기작과 연관되어 있을 수 있음을 제시하였다. 또한 이를 이용하여 배추속 식물의 개화형을 춘화형과 비춘화형으로 구분하여 주는 마커를 개발하였다. 이 마커는 개화 생리를 생육 초기에 예측하게 하여 배추속 식물의 교배 육종 및 채종 재배 시 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 그러나 *BrPRR1b*가 개화관련 유전자와 단순히 가깝게 연관되어 있는 유전자인지 아니면 배추속 식물의 개화 기작에 직접적으로 관여하는지 여부는 분명하지 않다. 배추속 식물의 개화 조건과 기작은 작기와 수확량 확보에 중요한 요인으로 현재까지는 *FLC*가 관여하는 기작 (Kim et al. 2007)이 잘 알려져 있고 이 유전자의 발현을 조절하여 개화 시기를 조절하려는 시도들이 있었다. 본 논문은 배추속 작물의 개화와 생체시계와의 연관 가능성을 제시하였다. 앞으로 *BrPRR1b* 유전자를 비롯한 생체시계 유전자의 기능 연구가 좀더 필요하며, 이러한 연구들은 개화 조절을 작물의 생산성을 증대시키는 전략에 새로운 가능성을 줄 수 있을 것이다.

적 요

개화는 배추속 작물의 생산성과 연관된 중요 발달 특성 중 하나이다. 이식 후, 갑작스러운 저온에 노출되어 때 이른 개화를 하게 되면 수확되는 생산물의 양과 질이 떨어지게 된다. 따라서, 개화 조절 메커니즘을 이해하는 것은 배추속 작물의 농업적 생산성을 향상시키는데 도움을 줄 것이다. 춘화는 배추속 작물에서 일반적으로 알려져 있는 개화를 유도하는 중요한 요소이다. 그러나 엘로우 사순이나 코마수나와 같은 배추 아종은 춘화처리 없이도 개화한다. 1일을 주기로 하여 생물의 생리기작을 조절하는 생체시계 유전자는 일장 감응형의 개화 조절에 중요한 역할을 하지만 춘화처리를 통해 개화를 유도하는 기작과도 연관되어 있다. 본 논문에서는 22개의 배추 아종을 개화에 춘화처리가 필요한 춘화형과 춘화처리 없이도 개화하는 비춘화형으로 나누어 보존된 생체시계 유전자, *BrPRR1* 군의 염기서열 분석을 수행하였다. 그 중 *BrPRR1b* 유전자의 결손 영역으로 춘화형과 비춘화형 두 그룹을 구분할 수 있었다. 이 서열변이를 증폭할 수 있는 PCR 프라이머를 디자인하여 비춘화형 배추 아종에서는 451 bp의 긴 밴드를, 춘화형 배추에서는 422 bp의 작은 크기의 밴드를 증폭할 수 있었다. 이 프라이머 세트는 43개 배추 아종과 4개의 배추속 작물, 브로콜리, 양배추, 갓, 그리고 유채의 개화형을 구분하는데 적용되었다. 각 작물의 PCR 결과와 개화시기에 대한 정보를 통하여 프라이머 세트가 개화형을 판별할 수 있는 마커로 이용될 수 있음이 확인되었다. 이 마커 시스템은 배추속 작물 육종에 유묘 단계에서 개화형을 판단하는데 이용할 수 있을 것이다. 또한 이 결과들은 생체시계 유전자가 배추속 작물의 개화를 조절하는 좋은 전략이 될 수 있음을 보여주었다.

추가 주요어: 배추 아종 집단, *BrPRR1*, 생체시계 유전자, 분자마커, 춘화

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 연구과제(과제번호: PJ01247203)와 차세대바이오그린 21사업(PJ01106902)의 지원에 의해 수행되었음.

References

- Alexandre CM, Hennig L (2008) FLC or not FLC: the other side of vernalization. *J Exp Bot* 59:1127–1135
- Bieniawska Z, Espinoza C, Schlereth A, Sulpice R, Hinch DK, Hannah MA (2008) Disruption of the Arabidopsis circadian clock is responsible for extensive variation in the cold-responsive

- transcriptome. *Plant Physiol* 147:263-279
- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C (2004) Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* 16 Suppl:S18-S31
- Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AA (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 309:630-633
- Edger PP, Pires JC (2009) Gene and genome duplications: the impact of dosage-sensitivity on the fate of nuclear genes. *Chromosome Res* 17:699-717
- Eriksson ME, Millar AJ (2003) The circadian clock: a plant's best friend in a spinning world. *Plant Physiol* 132:732-738
- Gómez-Campo C (1999) Developments in plant genetics and breeding, vol 4. *Biology of Brassica coenospecies*. Elsevier, Amsterdam Lausanne New York Oxford Shannon Singapore
- Harmer SL (2009) The circadian system in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 60:357-377
- Jack T (2004) Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* 16 Suppl:S1-S17
- Kim JA, Kim JS, Hong JK, Lee YH, Choi BS, Seol YJ, Jeon CH (2012) Comparative mapping, genomic structure, and expression analysis of eight pseudo-response regulator genes in *Brassica rapa*. *Mol Genet Genomics* 287:373-388
- Kim JA, Yang TJ, Kim JS, Park JY, Kwon SJ, Lim MH, Jin M, Lee SC, Lee SI, Choi BS, Um SH, Kim HI, Chun C, Park BS (2007) Isolation of circadian-associated genes in *Brassica rapa* by comparative genomics with *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cells* 23:145-153
- Kim JK, Ahn DC, Oh HJ, Kim KH, Choi YM, Oh SY, Kang NJ, Jeong BR, Kim ZH, Park YH (2010) Skewed Inheritance of EST-SSR Alleles in Reciprocal Crosses of Cut Roses. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:618-626
- Kim JS, Chung TY, King GJ, Jin M, Yang TJ, Jin YM, Kim HI, Park BS (2006) A sequence-tagged linkage map of *Brassica rapa*. *Genetics* 174:29-39
- Kim SY, Park BS, Kwon SJ, Kim J, Lim MH, Park YD, Kim DY, Suh SC, Jin YM, Ahn JH, Lee YH (2007) Delayed flowering time in *Arabidopsis* and *Brassica rapa* by the overexpression of FLOWERING LOCUS C (FLC) homologs isolated from Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep* 26:327-336
- Koo BH, Yoo SC, Park JW, Kwon CT, Lee BD, An G, Zhang Z, Li J, Li Z, Paek NC (2013) Natural variation in OsPRR37 regulates heading date and contributes to rice cultivation at a wide range of latitudes. *Mol Plant* 6:1877-1888
- Lou P, Wu J, Cheng F, Cressman LG, Wang X, McClung CR (2012) Preferential retention of circadian clock genes during diploidization following whole genome triplication in *Brassica rapa*. *Plant Cell* 24:2415-2426
- Lou P, Xie Q, Xu X, Edwards CE, Brock MT, Weinig C, McClung CR (2011) Genetic architecture of the circadian clock and flowering time in *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet* 123:397-409
- Lysak MA, Koch MA, Pecinka A, Schubert I (2005) Chromosome triplication found across the tribe Brassicaceae. *Genome Res* 15:516-525
- Makino S, Kiba T, Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, Hanaki N, Nakamura A, Suzuki T, Taniguchi M, Ueguchi C, Sugiyama T, Mizuno T. (2000) Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 41:791-803
- Matsushika A, Makino S, Kojima M, Mizuno T (2000) Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol*. 41:1002-1012
- McClung CR (2010) A modern circadian clock in the common angiosperm ancestor of monocots and eudicots. *BMC Biol* 8:55
- Michae TP, Salomé PA, McClung CR (2003) Two *Arabidopsis* circadian oscillators can be distinguished by differential temperature sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6878-6883
- Millar AJ (2004) Input signals to the plant circadian clock. *J Exp Bot* 55:277-283
- Ming R, Hou S, Feng Y, Yu Q, Dionne-Laporte A, Saw JH, Senin P, Wang W, Ly BV, Lewis KL, Salzberg SL, Feng L, Jones MR, Skelton RL, Murray JE, Chen C, Qian W, Shen J, Du P, Eustice M, Tong E, Tang H, Lyons E, Paull RE, Michael TP, Wall K, Rice DW, Albert H, Wang ML, Zhu YJ, Schatz M, Nagarajan N, Acob RA, Guan P, Blas A, Wai CM, Ackerman CM, Ren Y, Liu C, Wang J, Wang J, Na JK, Shakhov EV, Haas B, Thimmapuram J, Nelson D, Wang X, Bowers JE, Gschwend AR, Delcher AL, Singh R, Suzuki JY, Tripathi S, Neupane K, Wei H, Irikura B, Paidi M, Jiang N, Zhang W, Presting G, Windsor A, Navajas-Pérez R, Torres MJ, Feltus FA, Porter B, Li Y, Burroughs AM, Luo MC, Liu L, Christopher DA, Mount SM, Moore PH, Sugimura T, Jiang J, Schuler MA, Friedman V, Mitchell-Olds T, Shippen DE, dePamphilis CW, Palmer JD, Freeling M, Paterson AH, Gonsalves D, Wang L, Alam M. (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* 452:991-996
- Mizuno T, Nakamichi N (2005) Pseudo-response regulators (PRRs) or true oscillator components (TOCs). *Plant Cell Physiol*. 46:677-685
- Mouradov A, Cremer F, Coupland G (2002) Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* 14:Suppl:S111-S130
- Murakami M, Ashikari M, Miura K, Yamashino T, Mizuno T (2003) The evolutionarily conserved OsPRR quintet: rice pseudoresponse regulators implicated in circadian rhythm. *Plant Cell Physiol* 44:1229-1236
- Murakami M, Matsushika A, Ashikari M, Yamashino T, Mizuno T (2005) Circadian-associated rice pseudo response regulators (OsPRRs): insight into the control of flowering time. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:410-414
- Mun JH, Kwon SJ, Yang TJ, Seol YJ, Jin M, Kim JA, Lim MH, Kim JS, Baek S, Choi BS, Yu HJ, Kim DS, Kim N, Lim KB, Lee SI, Hahn JH, Lim YP, Bancroft I, Park BS (2009) Genome-wide comparative analysis of the *Brassica rapa* gene space reveals

- genome shrinkage and differential loss of duplicated genes after whole genome triplication. *Genome Biol* 10:R111
- Nakamichi N, Kita M, Niinuma K, Ito S, Yamashino T, Mizoguchi T, Mizuno T (2007) *Arabidopsis* clock-associated pseudo-response regulators PRR9, PRR7 and PRR5 coordinately and positively regulate flowering time through the canonical CONSTANS dependent photoperiodic pathway. *Plant Cell Physiol* 48:822–832
- Omolade O, Müller AE, Jung C, Melzer S (2016) BvPRR7 is a cold responsive gene with a clock function in beet. *Biologia Plantarum* 60:95–104
- Osborn TC, Kole C, Parkin IAP, Sharpe AG, Kuiper M, Lydiate DJ, Trick M (1997) Comparison of flowering time genes in *Brassica rapa*, *B. napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 146:1123–1129
- Ramírez-Carvajal GA, Morse AM, Davis JM (2008) Transcript profiles of the cytokinin response regulator gene family in *Populus* imply diverse roles in plant development. *New Phytol* 177:77–89
- Ream TS, Woods DP, Amasino RM (2013) The molecular basis of vernalization in different plant groups. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2012. 77:105–115
- Simpson GG, Gendall AR, Dean C (1999) When to switch to flowering. *Annu Rev Cell Dev Biol* 99:519–550
- Takata N, Saito S, Saito CT, Uemura M (2010) Phylogenetic footprint of the plant clock system in angiosperms: evolutionary processes of pseudo-response regulators. *BMC Evol Biol* 10:126
- Town CD, Cheung F, Maiti R, Crabtree J, Haas BJ, Wortman JR, Hine EE, Althoff R, Arbogast TS, Tallon LJ, Vigouroux M, Trick M, Bancroft I (2006) Comparative genomics of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana* reveal gene loss, fragmentation, and dispersal after polyploidy. *Plant Cell* 18:1348–1359
- Yang TJ, Kim JS, Kwon SJ, Lim KB, Choi BS, Kim JA, Jin M, Park JY, Lim MH, Kim HI, Lim YP, Kang JJ, Hong JH, Kim CB, Bhak J, Bancroft I, Park BS (2006) Sequence-level analysis of the diploidization process in the triplicated FLOWERING LOCUS C region of *Brassica rapa*. *Plant Cell* 18:1339–1347
- Yuan YX, Wu J, Sun RF, Zhang XW, Xu DH, Bonnema G, Wang XW (2009) A naturally occurring splicing site mutation in the *Brassica rapa* *FLC1* gene is associated with variation in flowering time. *J Exp Bot* 60:1299–1308