

## 양절형 밀 생장에 대한 온도의 영향과 유전자 발현 양상

허지혜<sup>1</sup> · 성혜주<sup>1</sup> · 양운호<sup>2</sup> · 정우석<sup>3,†</sup>

### Effect of Temperature on Growth and Related Gene Expression in Alternative Type Wheat Cultivars

Ji Hye Heo<sup>1</sup>, Hye Ju Seong<sup>1</sup>, Woon Ho Yang<sup>2</sup>, and Woosuk Jung<sup>3,†</sup>

**ABSTRACT** We have investigated the effects of ambient temperature on the growth of wheat in Korea. The differences in the growth phase of wheat were compared according to the temperature treatment. The productive tiller number and dry weight were decreased in a plot under a higher temperature treatment. We found that the growth of Jinpum was different from that of the alternative wheat cultivars, which were bred in Korea, at 50 days after treatment. While the Jinpum wheat grown at 17°C showed vegetative stage growth, that grown in the 23°C growth chamber entered the heading and flowering stage. The differences in the expression of 16 genes known to be involved in high-temperature responses were checked by using Jinpum wheat 50 days after two temperature treatments (17°C and 23°C), which showed apparent differences in expression between the higher and lower temperatures during the growth phase. In the 23°C treatment samples, the genes with increased expression were *HSP70*, *HSP101*, *VRN2*, *ERF1*, *TAA1*, *YUCCA2*, *GolS*, *MYB73*, and *Histone H2A*, while the genes with decreased expression were *VRN-A1*, *DREB2A*, *HsfA3*, *PIF4*, *PhyB*, *HSP17.6CII*, *rbcL*, and *MYB73*. *YUCCA2*, *HSP101*, *ERF1*, and *VRN-A1* showed a significant difference in gene expression between lower- and higher-temperature conditions. Overall, combining the means of the expression of various genes involved in thermosensing, vernalization, and abiotic stresses, it is possible to conclude that different sets of genes are involved in vernalization and summer depression of wheat under long term, high ambient temperature conditions.

**Keywords** : growth phase, high temperature, Jinpum wheat, *Triticum aestivum*

밀(*Triticum aestivum* L.)은 서늘하고 건조한 지대에서 잘 자라며, 여름철 고온 환경은 밀 생산의 제한요인 중 하나로 알려져 있다. 온도 상승은 밀의 생산성을 크게 감소시키며, 전 세계 평균 온도가 1°C 상승함에 따라 밀 생산량은 최대 6%까지 감소할 것으로 보고 되었다(Shpiler & Blum, 1991; Asseng *et al.*, 2014). 고온에 의한 식물의 반응은 생육 단계, 온도, 지속 기간 등의 조건에 따라 달라진다(Hasanuzzaman *et al.*, 2013). 고온에서 밀의 생리 변화는 엽록체의 구조 및 기능 상실, 엽록소 함량 감소로 인한 광합성 저하, 잎의 노화 및 탈리, 등숙 기간 감소, 종실의 전분 함량 감소와 단백질

질 함량 증가 등이 보고되었다(Thomason *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). 특히 생식생장기의 고온 스트레스로 인한 생산량의 감소는 영양생장기 보다 심하다고 알려져 있다(Farooq *et al.*, 2011).

식물의 고온 스트레스 반응 기작에는 *Heat Shock Transcription Factors (HSFs)*, *Heat Shock Proteins (HSPs)*, *Dehydration Responsive Element Binding Protein 2A (DREB2A)* 와 같은 전사 인자(Transcription factor)가 관여하며, 전사 조절 인자들의 단계적 발현으로 고온 스트레스에 관여하는 하위 유전자들의 발현이 이어진다(Ohama *et al.*, 2017). 밀

<sup>1</sup>건국대학교 식량자원과학과 석사과정 (Graduate Student, Department of Crop Science, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea)

<sup>2</sup>농촌진흥청 국립식량과학원 중부작물부 재배환경과 농업연구관 (Senior Research Scientist, Crop Cultivation & Environment Research Division, Department of Central Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 16429, Republic of Korea)

<sup>3</sup>건국대학교 식량자원과학과 교수 (Professor, Department of Crop Science, Konkuk University, Seoul 05029, Republic of Korea)

†Corresponding author: Woosuk Jung; (Phone) +82-2-450-3729; (E-mail) [jungw@konkuk.ac.kr](mailto:jungw@konkuk.ac.kr)

<Received 12 November, 2019; Revised 27 November, 2019; Accepted 6 December, 2019>

에서 개화를 조절하는 유전자 중 하나인 *VRN*은 온도에 따라 발현 양상이 달라지는데, 고온 조건에서 *VRN1*은 발현이 감소하고, *VRN2*는 발현이 증가한다(Dixon *et al.*, 2019). 애기장대의 유전자 발현 데이터를 분석하여 고온 조건에서 발현이 증가하거나 감소하는 유전자를 확인한 결과에 *PIF4*, *ERFs*, *MYBs*, *GolS*, *APX2*, *ZAT6*, *TCX2* 등의 유전자들에 대한 많은 보고가 있다(Ahn *et al.*, 2019a; Ahn *et al.*, 2019b). 유전자들의 발현 수준 변화는 식물의 생리적 반응과 관련이 있다(Zhang *et al.*, 2016). 애기장대에서 Phytochrome Interacting Factor 4 (PIF4)는 고온에서 활성이 증가하고 옥신 생합성 유전자 *TAA1*과 *YUCCA8*의 발현을 촉진시켜 체내 옥신 함량의 증가에 관여하는 것으로 알려져 있다(Franklin *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012). *Galactinol Synthase (GolS)*는 고온 스트레스 아래 발현이 증가하며, 체내 Galactinol과 Raffinose 함량의 증가로 이어진다(Nishizawa *et al.*, 2008).

본 연구에서는 온도 조건에 의해 생육단계 차이가 나타나는 밀 품종을 선정하여 고온 스트레스와 관련된 유전자 발현 차이를 비교, 분석하여 밀의 춘파 시 고온에 적응하는 밀 품종 선발을 위한 기초자료를 얻고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서 사용된 밀 품종은 파성이 3인 수안밀, 진품밀, 조은밀 3품종이며, 2018년 3월 중순 경기도 여주군 가남면 오산리에 위치한 건국대학교 여주 실습농장에서 파종하여, 같은 해 7월 초순에 수확된 것을 사용하였고, 해당 종자는 수확 후 탈곡하여 이듬해 파종기까지 4°C에서 냉장 보관되었다.

### 온도 처리

공시 재료는 경기 이천시 대월면 대흥리에 위치한 포장에 2019년 4월 4일 재식거리 45 × 15 cm (1주 2~3본)으로 점파하였다. 파종 29일 후 유묘기 개체를 7 × 20 cm 포트에 이식하여 건국대학교 생명환경과학대학 온실에서 2주간 재배하였고, 5월 13일 국립식량과학원 중부작물부 인공기상실에서 3일간 환경적응 기간을 거친 후, 5월 16일 온도 처리를 시작하였다. 온도 처리는 실험 개체들의 지상부 3엽 출현 이후 생육 단계상 분얼기에 시작되어 성숙기까지 유지되었다. 온도 처리는 일 평균온도를 각각 17°C (최저 13°C/최고 21°C), 20°C (최저 16°C/최고 24°C), 23°C (최저 19°C/최고 27°C), 26°C (최저 22°C/최고 30°C)로 설정하였으며, 습도는 65%로 유지하였다. 시료는 온도 처리 시작 전 1회,

온도 처리 후 각각 26일, 40일, 50일, 3시기에 걸쳐 잎을 포트 당 2~3개 채취하여 현장에서 액체질소에 보관하였고 이후 영하 70°C 초저온 냉동고에 보관하였다.

### Primer 디자인

고온 스트레스 반응에 관여한다고 알려진 유전자 16개를 선택하여(Table 1), NCBI Primer-blast 프로그램(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)을 이용해 gene specific primer를 제작하였다(Table 2). 제작된 primer가 특정 유전자만을 특이적으로 인식하는지는 ABI StepOne real time system (Applied Biosystem)의 melting curve analysis에서 one-peak test를 통해 확인하였다.

### Reverse transcription quantitative PCR

온도 처리 50일 후 17°C와 23°C 처리구의 진품밀 잎에서 RNA를 추출하였다. RNA는 RNeasy plant mini kit (Qiagen)을 이용하여 추출하였으며, Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)은 AccuPower® GreenStar™ RT-qPCR Master Mix (Bioneer, Korea)를 사용하여 수행되었다. 총 volume은 20 µl로서 total RNA 53 ng, gene specific primer 20 pmole, AccuPower® GreenStar™ RT-qPCR 2X Master Mix 10 µl, 50X Rox dye 0.4 µl, DEPC-water 3.6 µl를 첨가하여 혼합

**Table 1.** List of genes studied in this experiment.

Gene symbol	NCBI Gene Accession Number	Reference
<i>Actin</i>	AB181991.1	Giménez <i>et al.</i> , 2011
<i>DREB2A</i>	HQ171443.1	Ohama <i>et al.</i> , 2017
<i>ERF1</i>	XM_020302834.1	Cheng <i>et al.</i> , 2013
<i>GolS</i>	AB250356.1	Pillet <i>et al.</i> , 2012
<i>Histone H2A</i>	L75824.1	Boden <i>et al.</i> , 2013
<i>HsfA3</i>	DR740109.1	Schramm <i>et al.</i> , 2008
<i>HSP17.6CII</i>	AK450979.1	Giorno <i>et al.</i> , 2010
<i>HSP70</i>	AF005086.1	Ohama <i>et al.</i> , 2017
<i>HSP101</i>	AF083344.2	Campbell <i>et al.</i> , 2001
<i>MYB73</i>	JN969051.1	Albihlal <i>et al.</i> , 2018
<i>PhyB</i>	AY888046.1	Paik <i>et al.</i> , 2017
<i>PIF4</i>	XM_020325989.1	Gangappa <i>et al.</i> , 2017
<i>rbcL</i>	NC_002762.1	Hasanuzzaman <i>et al.</i> , 2013
<i>TAA1</i>	KY435985.1	Franklin <i>et al.</i> , 2011
<i>VRN-A1</i>	KR422423.1	Dixon <i>et al.</i> , 2019
<i>VRN2</i>	MH264456.1	Deng <i>et al.</i> , 2015
<i>YUCCA2</i>	XM_020323480.1	Blakeslee <i>et al.</i> , 2019

**Table 2.** Sequences of primers designed from wheat genes related to heat stress.

Gene symbol	Primer sequence (5'→3')	GC (%)	PCR condition (°C)
<i>Actin</i>	GTC GGT GAA GGG GAC TTA CA	55.0	58.1°C
	TGT GCC AAA AGG AAA AGC TGA	42.9	
<i>DREB2A</i>	GAC GGT AGA TCG GAA GGA CG	60.0	59.0°C
	CCG GGT ACT TTC CTC TGC TC	60.0	
<i>ERF1</i>	CGG CGT CGC TAA CTT CTT GA	55.0	59.8°C
	AGT CGG TAG AGC CAG TGG AG	60.0	
<i>GolS</i>	ATG CTC AAG GGG ATC GTG GAG	57.1	61.0°C
	GAG TGG GTA GGC GGA GTT GA	60.0	
<i>Histone H2A</i>	CAA TGA CGA GGA GCT GAC CAA	52.4	59.4°C
	GTG GAC ACC TTG GAG GAA GAG	57.1	
<i>HsfA3</i>	CAG CTT CGT TGT GTG GAA CC	55.0	59.8°C
	AAC AGA GGA CTG GGC AGT GA	55.0	
<i>HSP17.6CII</i>	GAG AAG GAG GAC GCC AAG TA	55.0	58.1°C
	TCT TCT CCA TGT CGG CGT TC	55.0	
<i>HSP70</i>	CAA GAA CCA GGT CGC CAT GA	55.0	59.4°C
	AGA ACC TCC TGC CAA TCA GC	55.0	
<i>HSP101</i>	AGG TGA GGA GGC ACT TCA GG	60.0	61.0°C
	GGA CAG CGG GTC GAA GAT CA	60.0	
<i>MYB73</i>	GAC AGC TTC TGG TCG GAG AC	60.0	59.4°C
	CTC GAC GAC GGC GAT AAA CT	55.0	
<i>PhyB</i>	CAC GAT GAT GAG CAT GGG GA	55.0	59.0°C
	ATG CCT GCG GGA TAT CAG TG	55.0	
<i>PIF4</i>	GCC TAG GGT CCA ATC TCC AG	60.0	59.0°C
	AGG GTT TCT TGG CTC ACC AC	55.0	
<i>rbcL</i>	AGG GGA ACG CGA AAT GAC TT	50.0	59.0°C
	ATA CCG CGA GCA CGA TCT TT	50.0	
<i>TAA1</i>	ACG GCG ACG ACT ACA TTG AG	55.0	59.2°C
	CCG GAC TTG GAC TTG AGG AC	60.0	
<i>VRN-A1</i>	CTG AAG CGG ATC GAG AAC AAG	52.4	58.7°C
	TTC TTG AGA AGC CCC GAG C	57.9	
<i>VRN2</i>	CAC CAC ATG AAC TCA CCC GT	55.0	59.4°C
	CCT TGG GCG AAG AAC TGG TA	55.0	
<i>YUCCA2</i>	AGA GGG GGC TCT ACT CAG TC	60.0	59.2°C
	TTC CCT TCA GCA CCC AAC TG	55.0	

하였다. 실시간 증폭 반응은 ABI StepOne real-time system (Applied biosystem)을 사용하여 수행하였다. RT-qPCR condition은 reverse transcription은 50°C에서 15분, pre-denaturation은 95°C에서 5분 수행한 후, Denaturation은 95°C에서 15초, annealing/extension은 55~60°C에서 1분 과정을 35회 수

행하였다. 결과는 상대적 유전자 발현 변화 분석에 적합한 Comparative  $C_T(2^{-\Delta\Delta C_T})$  방법을 사용하였다. Reference gene으로 housekeeping gene인 *Actin*을 이용하여 target gene의 발현양을 normalization 하였다. 본 실험에서 적용되는 식은 다음과 같다.

$$\Delta C_T = C_{T,Target} - C_{T,Actin}$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,Sample} - \Delta C_{T,Control}$$

$$\text{Amount of target} = 2^{-\Delta \Delta C_T} \quad (\text{Livak, 2001})$$

위 식에서  $C_{T,Target}$ 은 target gene의  $C_T$ 값,  $C_{T,Actin}$ 은 *Actin*의  $C_T$ 값을 의미한다.  $\Delta C_{T,Sample}$ 는 실험군의  $C_{T,Target} - C_{T,Actin}$  값,  $\Delta C_{T,Control}$ 는 대조군의  $C_{T,Target} - C_{T,Actin}$  값을 의미하며, 상대적 유전자 발현량은  $2^{-\Delta \Delta C_T}$  값으로 비교되었다. 결과를 통해 17°C와 23°C 처리구의 진품밀에서 온도와 관련된 생리대사에 관여한다고 알려진 유전자 16개의 발현 양상을 분석하여 두 처리구 간 유전자 발현 수준 차이를 비교하였다.

**생육 단계 및 표현형 조사**

온도 처리 동안 주 1회 생육 조사를 실시하여 개체의 생육 발달 단계를 조사하였다. 개체들이 생육 단계상 성숙기에 접어들었을 때 지상부를 채취하여, 지상부 건물중을 조사하였고 무효분얼수와 유효분얼수를 측정하여 무효분얼수에 대한 유효분얼수 비율을 계산하였다. 모든 측정은 3반복 이상 이루어졌으며, 통계분석은 SAS 프로그램의 Analysis of variance

(ANOVA), Fisher’s least significant difference procedure (LSD)를 이용하여  $p < 0.05$  유의성 수준에서 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**고온 스트레스에 의한 생육 특성 변화**

생육 기간 일평균 온도를 17°C, 20°C, 23°C, 26°C로 설정하여 밀 품종의 생육상 차이를 관찰한 결과, 온도 처리 후 45일을 기준으로 26°C 처리구는 다른 온도 처리구에 비해 잎의 황화, 시듦 현상이 뚜렷이 나타났다. 온도 처리 50일 후 진품밀, 조은밀에서는 고온에 의해 개체 간 생육단계 차이가 확연히 나타났다(Fig. 1). 진품밀의 경우 20°C 이상 온도 처리구에서 출수하였으며, 조은밀은 17°C에서 열자한 개에서만 출수하였다. 공시품종들은 출수에 필요한 저온 기간 측정 결과 모두 파성 3에 해당하는 것으로 알려져 있으나 온도 조건에 따른 생육상이 다르게 나타나는 것은 파성과 고온과의 연관성 또는 파성을 결정하는 요소들의 영향이 서로 다른 것에 기인하는 것으로 추측된다. 온도에 의한 개화 속도의 차이는 *VRN-A1* 유전자의 missense mutation

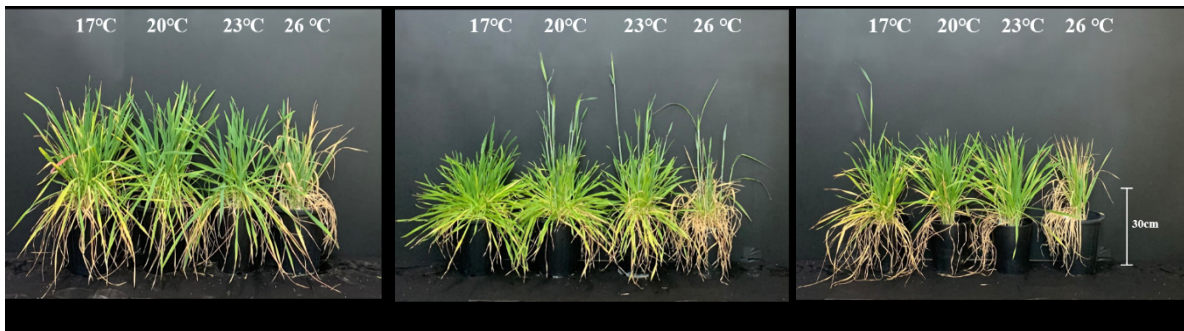


Fig. 1. Growth of wheat samples after 50 days under temperature treatments (from left to right) 17°C, 20°C, 23°C, and 26°C.

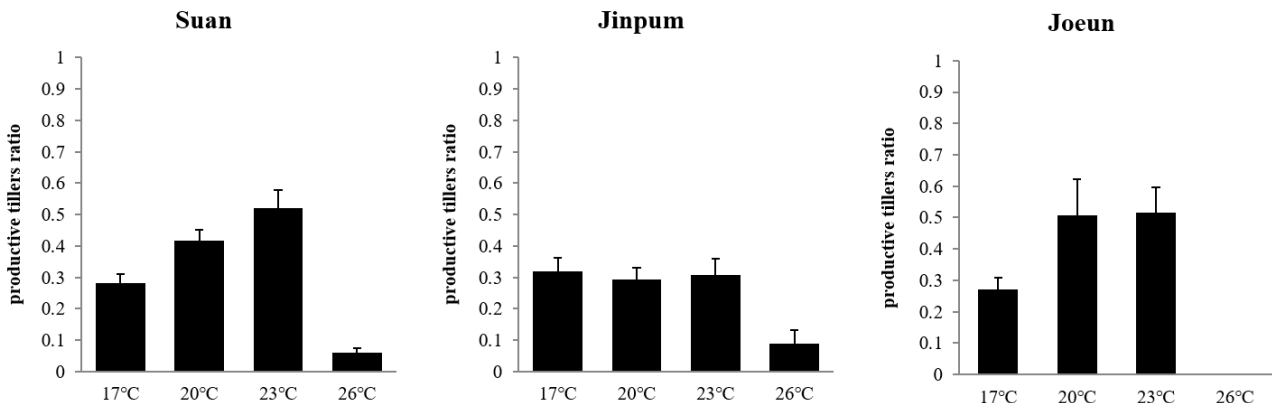


Fig. 2. Ratio of productive tiller number to non-productive tiller number measured at the ripening stage ( $n \geq 3$ ) in three wheat cultivars under four temperature treatments.

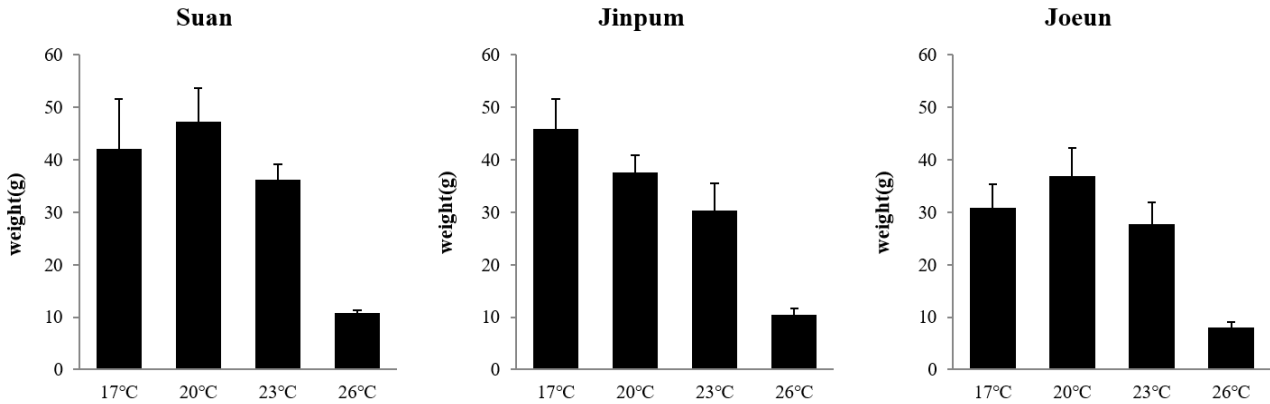


Fig. 3. Weight of the aerial part at the ripening stage of three wheat cultivars ( $n \geq 3$ ).

Table 3. Developmental stage and heading status of the experimental samples at 50 days of temperature treatment. The samples in bold are used in the RT-qPCR experiment. ‘Prostrate’ means that a plant grew only vegetatively and eventually died without heading and flowering. DAT: Days After Treatment.

Date	Variety	17°C	20°C	23°C	26°C
50 DAT	Suan	Vegetative growth	Vegetative growth	Vegetative growth	Vegetative growth
	Jinpum	<b>Vegetative growth</b>	Heading	<b>Heading</b>	Heading
	Joeun	Booting stage	Vegetative growth	Vegetative growth	Prostrate

에 의한 것으로 보고된 바 있어(Díaz *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2015; Dixon *et al.*, 2019), 추후 파성 관련 유전자에 대한 심층적 생리, 유전학 분야의 연구가 필요한 것으로 생각된다.

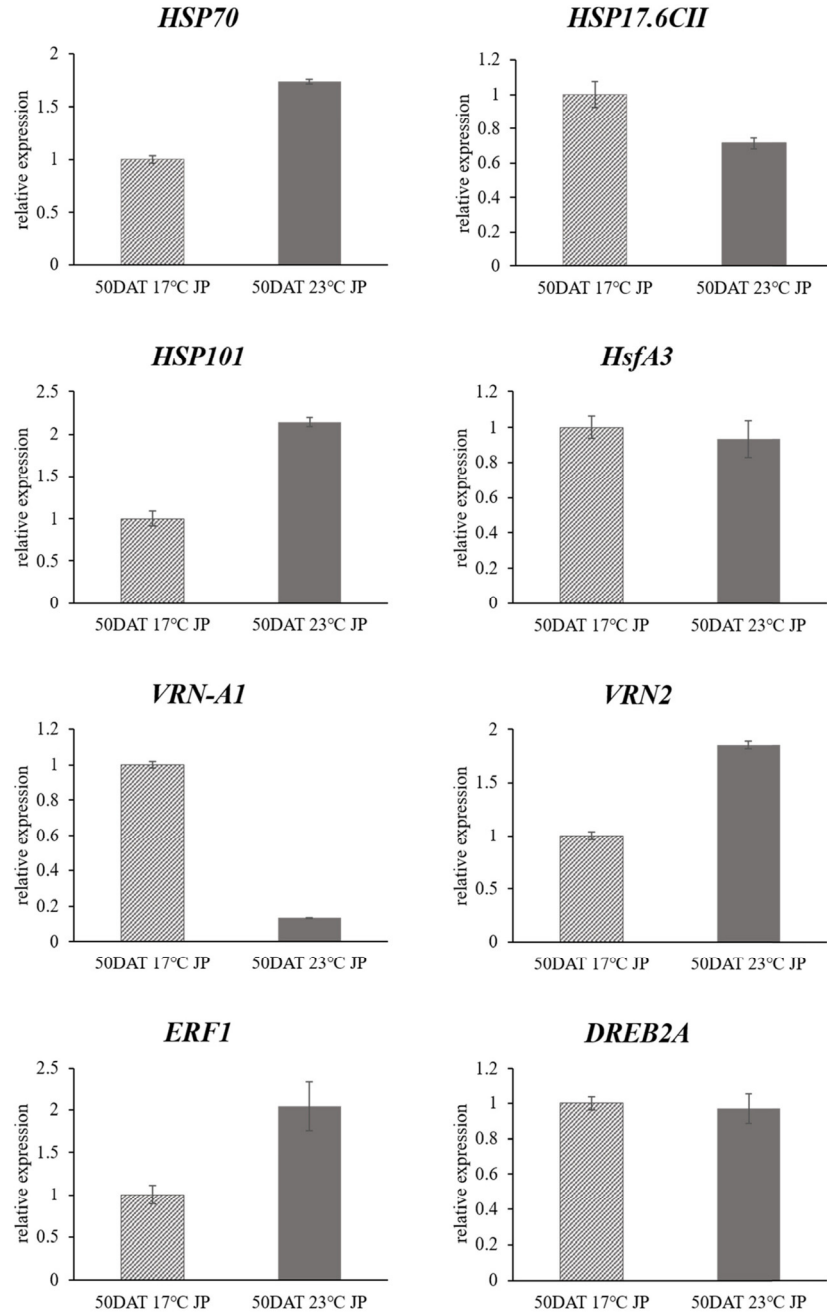
유효 분얼수 비율은 수안밀, 진품밀, 조은밀의 경우 17°C에서 23°C까지 비율이 증가하거나 유사한 수준을 보였고 26°C 처리구에서 급격히 감소하였다(Fig. 2). 지상부 건물중은 유효분얼수 비율과 유사한 경향을 보였다. 수안밀, 진품밀, 조은밀의 건물중은 26°C에서 다른 온도 처리구에 비해 3배 이상 급격히 감소하였다(Fig. 3). 따라서 고온에 저항성이 있는 춘파성 밀 품종 육성을 위하여 고온 조건인 26°C에서도 건물중 함량이 떨어지지 않는 계통을 선발하는 것이 필요하다고 판단된다.

**고온 스트레스에 의한 유전자 발현 변화**

생육 기간 온도 처리에 따른 실험 밀 품종들의 생육 단계는 Table 3에 나타난 바와 같다. 세 가지 품종 중 진품밀에서 온도 처리에 따른 생육상의 차이가 가장 뚜렷하게 나타났으며, 진품밀은 수안밀, 조은밀과는 온도반응이 다르게 나타나는 것으로 보인다. 본 실험의 온도 처리 후 50일 단계에서 출수의 한계 처리 온도라고 볼 수 있는 20°C 처리구의 경우 진품밀은 출수가 이루어진 반면 수안밀과 조은밀은 출수로 진행되는 과정이거나 출수이전의 상태에 머물러 있

어 출수와 온도반응에 관련된 유전자들의 발현이 어떠한 반응을 보이는지 관찰하기 위하여 진품밀에서의 유전자 발현을 관찰하였다. 따라서 온도 처리 50일 후 상대적으로 저온 처리구인 17°C 개체와 고온 처리구인 23°C 진품밀 개체의 잎에서 RNA를 추출하였고, RT-qPCR을 통해 고온 스트레스 반응과 관련 있다고 알려진 16개 유전자의 발현 양상을 비교 분석하였다(Fig. 4). 17°C 처리구에 비해 23°C 처리구에서 발현이 증가한 유전자는 *HSP70*, *HSP101*, *VRN2*, *ERF1*, *MYB73*, *TAA1*, *GolS*, *Histone H2A*, *YUCCA2*가 있었고, 발현이 감소한 유전자에는 *VRN-A1*, *DREB2A*, *HsfA3*, *PIF4*, *PhyB*, *HSP17.6CII*, *rbcL*이 있었다.

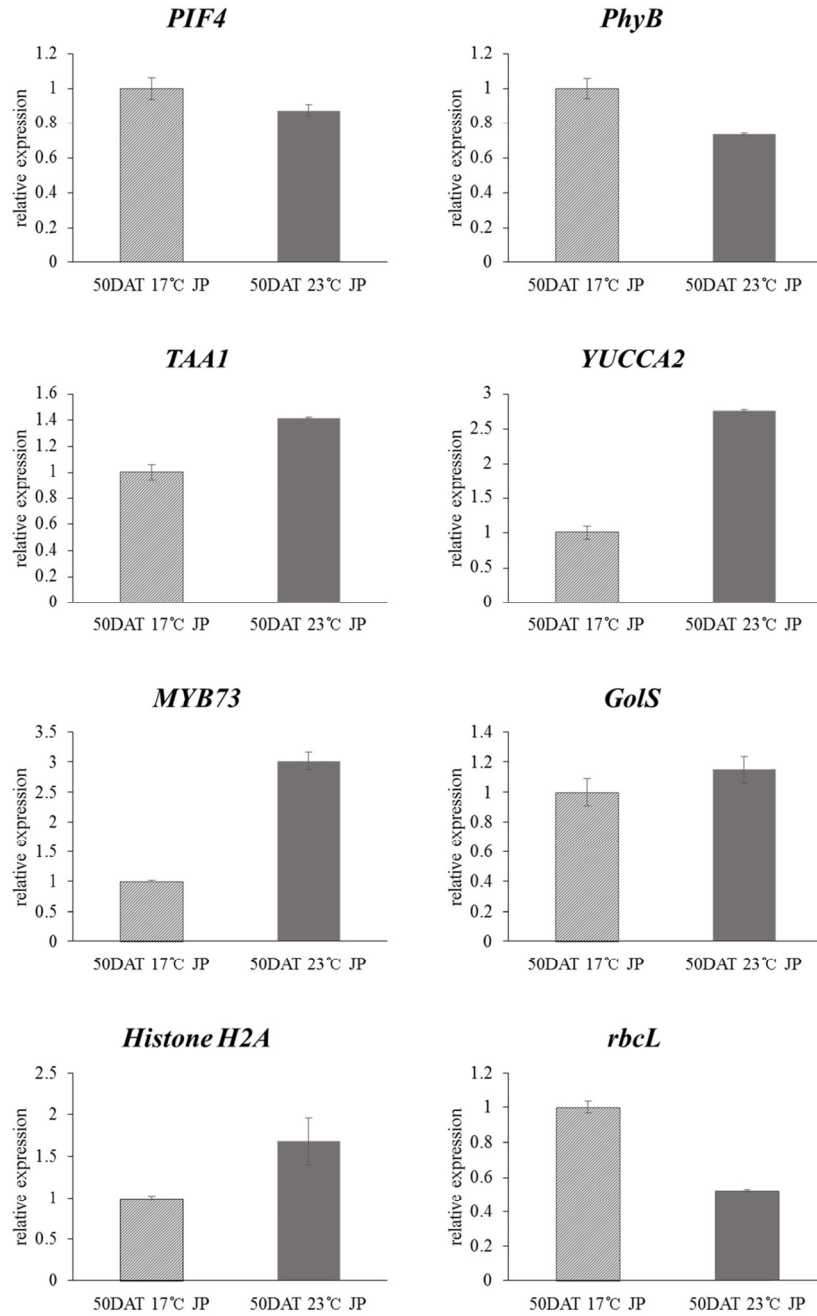
*Heat Shock Protein 70 (HSP70)*과 *Heat Shock Protein 101 (HSP101)*은 밀과 옥수수에서 고온 처리로 인해 발현이 증가하는 것으로 보고 되었으며(Young *et al.*, 2001; Duan *et al.*, 2011), 본 실험 결과에서는 온도 처리 50일 후 17°C에 비해 23°C 처리구에서 *HSP70*과 *HSP101*의 발현양이 높게 나타났다. 진품밀 23°C 처리구에서 *HSP70*, *HSP101* 발현의 증가는 *HSP*의 하위 유전자 발현을 증가시켜 고온에 대한 식물의 저항성을 증진시킬 것으로 추측된다. 반면 *Heat Shock Protein 17.6 Class II (HSP17.6CII)*는 17°C보다 23°C 처리구에서 발현이 감소하였으며, 이 같은 결과는 벼의 뿌리와 잎을 37°C 이상의 고온에 30분간 노출시켰을 때 *AtHSP17.6CII*의 homologue인 *HSP18.0CII*의 발현이 증



**Fig. 4.** Differences in relative expression of 16 genes (*HSP70*, *HSP17.6CII*, *HSP101*, *HsfA3*, *VRN-A1*, *VRN2*, *ERF1*, *DREB2A*, *PIF4*, *PhyB*, *TAA1*, *YUCCA2*, *MYB73*, *GolS*, *Histone H2A*, *rbcL*) using the method.  $C_T$  values of these genes are normalized to the *Actin* gene. DAT: Days After Treatment, JP:Jinpum. Slash-lined bar refers to the 17°C treatment and the black bar refers to the 23°C treatment.

가한다는 결과(Sarkar *et al.*, 2009)와 상이했다. *Heat Shock Transcription Factor A3* (*HsfA3*)는 애기장대에서 고온 스트레스에 의해 발현이 증가한다고 알려져 있는 반면(Schramm *et al.*, 2007), 본 실험에서는 17°C에 비해 23°C 처리구에서 *HsfA3*의 발현양이 낮게 관찰되었다. 이러한 결과는 1개월

된 밀 잎에 3일 동안 36°C의 고온 처리를 하여 *HsfA3*의 발현양을 측정된 결과 대조구에 비해 발현양이 감소하였다는 결과와 유사하였다(Xue *et al.*, 2014). 본 실험 결과에서 *Dehydration Responsive Element Binding Protein 2A* (*DREB2A*)는 17°C 처리구에 비해 23°C 처리구에서 발현양이 감소하



**Fig. 4.** Differences in relative expression of 16 genes (*HSP70*, *HSP17.6CII*, *HSP101*, *HsfA3*, *VRN-A1*, *VRN2*, *ERF1*, *DREB2A*, *PIF4*, *PhyB*, *TAA1*, *YUCCA2*, *MYB73*, *GolS*, *Histone H2A*, *rbcL*) using the method.  $C_T$  values of these genes are normalized to the *Actin* gene. DAT: Days After Treatment, JP:Jinpum. Slash-lined bar refers to the 17°C treatment and the black bar refers to the 23°C treatment (Continued).

였다. 벼 모종에서 42°C의 고온 처리 의해 20분까지는 발현이 증가했지만, 20분 이후에 서서히 발현이 감소하여 처리 후 5시간부터는 대조구보다 발현이 감소한다는 보고와 유사하였다(Matsukura *et al.*, 2010). 또한 애기장대에서 고온 스트레스에 순응하는 과정에 유도되는 전사체 발현을

비교한 결과, *DREB2A*는 온도 처리에 의해 발현이 증가한 후 시간이 지남에 따라 발현양이 점점 감소하는 경향을 보였다. 그러나, 온도 처리 후 시간이 지나도 발현양이 감소하지 않고 유지되거나 오히려 증가하는 양상을 보이는 유전자들이 있었다. 특정 자극에 대한 유전자들의 발현양 변

화는 시간에 따라 달라질 수 있으며, 각자의 세포 환경에서 서로 다른 경로를 통하여 결정된다는 것을 예측할 수 있다 (Lim *et al.*, 2006).

온도에 감응하여 개화·출수를 조절하는 유전자 중 하나인 *VRN*에는 *VRN1*, *VRN2*, *VRN3*가 알려져 있다. *VRN1*은 저온 처리에 의해 발현이 증가하고, 개화 촉진 유전자 *VRN3* (*FT*)를 억제하는 *VRN2*의 작용을 막아 영양생장에서 생식생장으로 이행을 촉진시킨다. 반면 고온 처리에 의해 *VRN1*의 발현은 감소하고, *VRN2*의 발현은 증가한다고 보고되었다 (Dixon *et al.*, 2019). 본 실험 조건 아래 *VRN-A1*은 17°C 처리구에 비해 23°C 처리구에서 발현이 현저히 낮았으며, *VRN2*는 23°C 처리구에서 발현이 더 높았다. 온도처리에 따른 유전자의 발현양을 비교할 때 *VRN-A1* 유전자는 본 실험에서 검정한 16개의 유전자 중 상대적으로 저온과 고온조건에서의 발현양에 큰 차이를 보였다.

식물체 내 신호 전달 과정에 관여한다고 알려진 *Phytochrome Interacting Factor 4* (*PIF4*)는 고온 처리에 의해 발현이 촉진되어 식물의 성장과 생육 발달 단계의 이행을 촉진시킨다고 알려져 있으며 (Gangappa *et al.*, 2017), 적색광에 감응한 활성 *Phytochrome B* (*PhyB*)는 *PIF4*의 전사 활성 및 단백질 안정성을 저해하여 *PIF4*활성을 억제하거나 분해를 촉진한다고 알려져 있다 (Paik *et al.*, 2017). 이에 반해 고온 환경 아래에서는 *PhyB*의 활성이 억제되어 *PIF4*의 활성이 증가하고 *TAA1*, *CYP79B2* 등의 하위 유전자 발현이 증가한다고 알려져 있다 (Paik *et al.*, 2017). 본 실험 결과에서는 *PIF4*와 *PhyB* 모두 17°C 처리구에 비해 23°C 처리구에서 발현양이 감소하였다. 벼의 고온 스트레스에 관한 연구에서 고온에 의해 *PIF4*와 *PhyB*의 발현이 감소한 유사한 보고가 있다 (Jeong & Choi, 2013). 옥신 생합성 유전자 *Tryptophan Aminotransferase of Arabidopsis 1* (*TAA1*)은 애기장대에서 28°C의 고온 아래 발현이 증가한다고 보고되었다 (Franklin *et al.*, 2014). 본 실험 결과에서는 기존 애기장대에서의 결과와 비슷하게 17°C 처리구보다 23°C 처리구에서 *TAA1*의 발현양이 더 높게 나타났다. 다른 옥신 생합성 유전자 *YUCCA2*는 고온 처리에 의해 보리와 애기장대에서 발현이 억제된다고 보고되었으나 (Blakeslee *et al.*, 2019; Ozga *et al.*, 2017), 본 실험에서는 17°C 처리구에 비해 23°C 처리구에서 *YUCCA2*의 발현양이 높게 나왔다. 식물 호르몬 자스모네이트와 에틸렌 상위 신호전달에 관여하는 *Ethylene Response Factor1* (*ERF1*)은 밀에서 건조, 염, 저온 스트레스뿐만 아니라 고온 스트레스 반응에도 관여한다고 보고되었다 (Ergün *et al.*, 2014). 본 실험에서는 *ERF1*의 상대적 발현양이 23°C 처리구에서 더 높았다. 23°C 고온 처리구에

서 옥신 생합성 유전자 *TAA1*, *YUCCA2*, 그리고 에틸렌 신호전달 유전자 *ERF1*의 발현 증가는 여러 식물 호르몬이 고온 스트레스에 대해 복합적으로 방어 기작을 가진다고 예측되며, 애기장대에서 스트레스 환경 아래 에틸렌과 옥신 합성 관련 유전자의 발현이 모두 증가한다는 결과와 유사하였다 (Li *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2018).

*TaMYB73* 유전자는 고온 조건 아래에서 발현이 증가하고, *TaMYB73*의 발현이 높은 품종이 스트레스 환경 아래 높은 저항성을 가질 것으로 예측된다는 보고가 있다 (Ergun *et al.*, 2014). 본 실험에서도 *MYB73*은 17°C 처리구에 비해 23°C 처리구에서 발현양이 증가하는 것으로 나타났다.

*Galactinol Synthase* (*GolS*) *GolS1*과 *GolS2*는 애기장대에서 고온에 의해 발현이 증가하지만 (Nishizawa *et al.*, 2008; Ahn *et al.*, 2019b), 밀의 유묘에 3시간 동안 42°C 고온 처리를 했을 때 *GolS1*과 *GolS2* 모두 발현이 유도되지 않았다 (Shimosaka & Ozawa, 2015). 본 실험에서는 애기장대의 결과와 유사하게 17°C에 비해 23°C 처리구에서 *GolS*의 발현이 다소 증가하였다. *H2A.Z*는 고온 스트레스에 의해 발현이 변화하는 유전자들의 전사를 조절하는데 관여한다고 알려져 있는데 (Boden *et al.*, 2013), 본 실험에서도 17°C 처리구보다 23°C 처리구에서 *Histone H2A* 유전자의 발현양이 높게 나타났다.

고온 스트레스 반응의 결과로 나타나는 광합성 저하의 원인에는 엽록소 함량 감소, 틸라코이드 막 손상, *Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* (*Rubisco*) large subunit와 small subunit의 감소가 있다 (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). 본 실험 결과에서 *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Large subunit* (*rbcl*)의 발현양은 17°C에 비해 23°C 처리구에서 감소한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 고온 스트레스에 의한 광합성 관련 요소들의 손상 및 활성 저하에 의한 것으로 생각된다.

이들 유전자 중 밀에서 알려진 전사조절 유전자는 *VRN-A1*, *VRN2*, *DREB2A* 등이 있다. 이들 전사조절단백질에 의해 발현이 조절된다고 알려진 유전자들은 밀의 경우 *Flowering Locus T*, *ODDSOC2*가 있다 (Pearce *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Dixon *et al.*, 2019). 밀에서 전사조절 유전자로서 기능한다고 알려지지 않은 *PIF4*, *HsfA3*, *ERF1*, *MYB73*은 벼, 보리, 귀리, 호밀 등의 맥류나 애기장대에서 *FT*, *TAA1*, *YUCCAs*, *CYP79B2*, *Small Auxin Up RNA* (*SAUR*), *IAA19*와 같은 하위 유전자 집단에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Franklin *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2015).

밀에서 온도 신호를 어느 물질들이 처음 감지하고, 신호 전달을 거쳐 누적된 생리 기작의 결과로 인해 어떻게 출수



가 조절되는지는 본 실험으로 결론지을 수는 없으나, 온도 조건에 따라 반응하는 다양한 지표 역할을 하는 유전자들이 다르게 발현되는 것이 관찰되었으며, 이들의 발현이 하위 유전자들의 발현에 영향을 미쳤을 것이라고 추측된다.

온도 조건에 의한 밀의 생리적 반응을 추적한 보고는 다른 연구분야에 비해 상대적으로 많지 않다. 기존 밀 연구에는 37/28°C 고온 조건으로 20일간 온도처리를 하여 성숙기 밀에서 종실의 발달 속도와 형태적 특성을 관찰한 바 있다 (Rahman *et al.*, 2009). 밀에 35±2°C의 조건으로 4시간, 8시간 고온 처리하여 SOD, CAT 활성과 DNA, RNA 함량을 측정된 연구 결과도 있다(Khalil *et al.*, 2009). 고온 조건으로 36°C를 2시간 동안 처리하여 1.5시간, 5시간, 3일 후의 *Heat shock factor*의 발현양을 관찰한 연구결과가 있으며(Xue *et al.*, 2014), 30°C (16시간)/25°C (8시간)의 고온 조건을 파종기에서 등숙기까지 처리하여 장기적인 고온 스트레스 하에서 곡물의 source-sink 관계를 연구한 결과가 있다(Hütsch *et al.*, 2018). 그러나 본 실험과 같이 생육 초기부터 성숙기까지 지속적으로 저온과 고온 조건을 처리하여 출수 정도를 비교하고 지표 유전자 발현양을 관찰한 보고한 예는 찾기 어려웠다.

온도에 의한 진품밀의 출수 표현형은 평균온도 17°C와 20°C 사이에서 결정적으로 나타나는 것으로 보인다. 20°C 처리결과에 근거하여 이삭의 50%가 노출된 시점인 7월 4일(온도 처리 50일 후)을 출수시로 설정하면, 지상부 3엽 출현부터 출수시까지를 적산온도로 표시할 때 대략 1,121~1,271°C 사이로 추정된다.

## 적 요

국내에서 육성된 파성3으로 분류된 밀의 생장에 대한 고온의 영향을 알아보기 위해 분얼기부터 등숙기까지 일평균 17°C, 20°C, 23°C, 26°C 온도 처리에 의해 나타나는 밀의 생육 특성과 유전자 발현양의 변이를 분석하였다.

1. 밀의 생산성과 밀접한 연관이 있는 유효분얼수, 건물중은 수안밀과 조은밀은 일평균 온도 23°C 이상에서 감소하였고, 진품밀은 20°C 이상에서 감소하였다.
2. 진품밀의 경우 온도 처리 50일 후 온도 조건에 따라 생육상이 뚜렷이 구분되었는데, 17°C에서 영양생장 단계를 보였고, 20°C 이상에서 출수·개화 단계를 나타냈다.
3. 온도와 관련된 생리대사에 관여한다고 알려진 유전자 16개를 대상으로 RT-qPCR을 진행하여 온도 처리 50일 후 진품밀의 17°C와 23°C 처리구에서 유전자 발현 수준의

차이를 확인해본 결과, 23°C 처리구에서 발현이 증가한 유전자에는 *HSP70*, *HSP101*, *VRN2*, *ERF1*, *TAA1*, *YUCCA2*, *GolS*, *MYB73*, *Histone H2A*이 있고, 감소한 유전자에는 *VRN-A1*, *DREB2A*, *HsfA3*, *PIF4*, *PhyB*, *HSP17.6CII*, *rbcL*이 있다.

4. 16개 유전자 중 *MYB73*, *YUCCA2*, *HSP101*, *ERF1*, *VRN-A1*이 저온과 고온 조건 사이에서 유전자 발현양에 큰 차이를 보였다.
5. 온도에 의한 진품밀의 출수 표현형은 평균온도 17°C와 20°C 사이에서 결정적으로 나타나는 것으로 보이며, 온도에 의한 생육상과 형태적 특성의 차이는 단일 유전자 발현이 아닌 고온 스트레스 반응과 관련된 여러 유전자의 복합적인 메커니즘에 의해 영향을 받을 것으로 생각된다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 북방지대 지역별 맥류 최적 재배기술 설정, 세부과제번호: PJ01246503 2019)에 의해 이루어졌습니다.

## 인용문헌(REFERENCES)

- Ahn, H., K. Jo, D. Jeong, M. Pak, J. Hur, W. Jung, and S. Kim. 2019a. PropaNet: Time-varying condition-specific transcriptional network construction by network propagation. *Front. Plant. Sci.* 10 : 698.
- Ahn, H., I. Jung, H. Chae, D. Kang, W. Jung, and S. Kim. 2019b. HTR gene: a computational method to perform the integrated analysis of multiple heterogeneous time-series data: case analysis of cold and heat stress response signaling genes in *Arabidopsis*. *BMC Bioinformatics.* 20(S16) : 588.
- Albihlal, W. S., I. Obomighie, T. Blein, R. Persad, I. Chernukhin, Crespi, M., and P. M. Mullineaux. 2018. *Arabidopsis* heat shock transcription factor1b regulates multiple developmental genes under benign and stress conditions. *J. Exp. Bot.* 69(11) : 2847-2862.
- Asseng, S., F. Ewert, P. Martre, R. P. Rötter, D. B. Lobell, D. Cammarano, and J. W. White, *et al.* 2014. Rising temperatures reduce global wheat production. *Nature Climate Change.* 5(2) : 143-147.
- Blakeslee, J. J., T. Spatola Rossi, and V. Kriechbaumer. 2019. Auxin biosynthesis: spatial regulation and adaptation to stress. *J. Exp. Bot.* 70(19) : 5041-5049.
- Boden, S. A., M. Kavanová, E. J. Finnegan, and P. A. Wigge. 2013. Thermal stress effects on grain yield in *Brachypodium distachyon* occur via H2A.Z-nucleosomes. *Genome Biol.*

- 14(6) : R65.
- Campbell, J. L., N. Y. Klueva, H. Zheng, J. Nieto-Sotelo, T. H., Ho, and H. T. Nguyen. 2001. Cloning of new members of heat shock protein HSP101 gene family in wheat (*Triticum aestivum* (L.) Moench) inducible by heat, dehydration, and ABA. *Biochim. Biophys. Acta.* 1517(2) : 270-277.
- Cheng, M. C., P. M. Liao, W. W. Kuo, and T. P. Lin. 2013. The *Arabidopsis* ethylene response factor1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiol.* 162(3) : 1566-1582.
- Deng, W., M. C. Casao, P. Wang, K. Sato, P. M. Hayes, E. J. Finnegan, and B. Trevaskis. 2015. Direct links between the vernalization response and other key traits of cereal crops. *Nat. Commun.* 6 : 5882.
- Díaz, A., M. Zikhali, A. S. Turner, P. Isaac, and D. A. Laurie. 2012. Copy number variation affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*). *PlosOne.* 7(3) : e33234.
- Dixon, L. E., I. Karsai, T. Kiss, N. M. Adamski, Z. Liu, Y. Ding, V. Allard, S. A. Boden, and S. Griffiths. 2019. Vernalization1 controls developmental responses of winter wheat under high ambient temperatures. *Development.* 146(3) : dev172684.
- Duan, Y. H., J. Guo, K. Ding, S. J. Wang, H. Zhang, X. W. Dai, Y. Y. Chen, F. Govers, L. L. Huang, and Z. S. Kang. 2011. Characterization of a wheat *HSP70* gene and its expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses. *Mol. Biol. Rep.* 38(1) : 301-307.
- Ergün, N., S. Özçubukçu, M. Kolukirik, and Ö. Temizkan. 2014. Effects of temperature-heavy metal interactions, antioxidant enzyme activity and gene expression in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Acta Biol. Hung.* 65(4) : 439-450.
- Farooq, M., H. Bramley, J. A. Palta, and K. H. M. Siddique. 2011. Heat stress in wheat during reproductive and grain-filling phases. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 30(6) : 491-507.
- Franklin, K. A., S. H. Lee, D. Patel, S. V. Kumar, A. K. Spartz, C. Gu, S. Ye, P. Yu, G. Breen, J. D. Cohen, P. A. Wigge, and W. M. Gray. 2011. Phytochrome-Interacting Factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(50) : 20231-20235.
- Gangappa, S. N., S. Berriri, and S. V. Kumar. 2017. PIF4 Coordinates Thermosensory Growth and Immunity in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 27(2) : 243-249.
- Giménez, M. J., F. Pistón, and S. G. Atienza. 2011. Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the *Triticeae*. *Planta.* 233(1) : 163-173.
- Giorno, F., M. Wolters-Arts, S. Grillo, K. D. Scharf, W. H. Vriezen, and C. Mariani. 2010. Developmental and heat stress-regulated expression of HsfA2 and small heat shock proteins in tomato anthers. *J. Exp. Bot.* 61(2) : 453-462.
- Hasanuzzaman, M., K. Nahar, M. Alam, R. Roychowdhury, and M. Fujita. 2013. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14(5) : 9643-9684.
- Hütsch, B. W., D. Jahn, and S. Schubert. 2018. Grain yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under long-term heat stress is sink-limited with stronger inhibition of kernel setting than grain filling. *J. Agron. Crop Sci.* 205(1) : 22-32.
- Islam, M. R., B. Feng, T. Chen, L. Tao, and G. Fu. 2018. Role of abscisic acid in thermal acclimation of plants. *J. Plant Biol.* 61(5) : 255-264.
- Jeong, J., and G. Choi. 2013. Phytochrome-interacting factors have both shared and distinct biological roles. *Mol. Cells.* 35(5) : 371-380.
- Khalil, S. I., H. M. S. El-Bassiouny, R. A. Hassanein, and H. A. Mostafa. 2009. Antioxidant defense system in heat shocked wheat plants previously treated with arginine or putrescine. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 3(3) : 1517-1526.
- Kumar, S. V., D. Lucyshyn, K. E. Jaeger, E. Alós, E. Alvey, N. P. Harberd, and P. A. Wigge. 2012. Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature.* 484(7393) : 242-245.
- Li, J., H. H. Xu, W. C. Liu, X. W. Zhang, and Y. T. Lu. 2015. Ethylene inhibits root elongation during alkaline stress through AUXIN1 and associated changes in auxin accumulation. *Plant Physiol.* 168(4) : 1777-1791.
- Lim, C. J., K. A. Yang, J. K. Hong, J. S. Choi, D. J. Yun, J. C. Hong, W. S. Chung, S. Y. Lee, M. J. Cho, and C. O. Lim. 2006. Gene expression profiles during heat acclimation in *Arabidopsis thaliana* suspension-culture cells. *J. Plant Res.* 119(4) : 373-383.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods.* 25(4) : 402-408.
- Matsukura, S., J. Mizoi, T. Yoshida, D. Todaka, Y. Ito, K. Maruyama, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. Comprehensive analysis of rice *DREB2*-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. 2010. *Mol. Genet. Genomics.* 283(2) : 185-196.
- Nishizawa, A., Y. Yabuta, and S. Shigeoka. 2008. Galactinol and Raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* 147(3) : 1251-1263.
- Ohama, N., H. Sato, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. (2017). Transcriptional regulatory network of plant heat stress. *Trends Plant Sci.* 22(1) : 53-65.
- Ozga, J. A., H. Kaur, R. P. Savada, and D. M. Reinecke. 2017. Hormonal regulation of reproductive growth under normal and heat-stress conditions in legume and other model crop species. *J. Exp. Bot.* 68(8) : 1885-1894.
- Paik, I., P. K. Kathare, J.-I. Kim, and E. Huq. 2017. Expanding roles of PIFs in signal integration from multiple processes. *Mol. Plant.* 10(8) : 1035-1046.
- Pearce, S., N. Kippes, A. Chen, J. M. Debernardi, and J. Dubcovsky.

2016. RNA-seq studies using wheat *Phytochrome B* and *Phytochrome C* mutants reveal shared and specific functions in the regulation of flowering and shade-avoidance pathways. *BMC Plant Biology*. 16 : 141.
- Pillet, J., A. Egert, P. Pieri, F. Lecourieux, C. Kappel, J. Charon, E. Gomes, F. Keller, S. Delrot, and D. Lecourieux. 2012. *VvGOLS1* and *VvHsfA2* are involved in the heat stress responses in grapevine berries. *Plant Cell Physiol*. 53(10) : 1776-1792.
- Sarkar, N. K., Y.-K. Kim, and A. Grover. 2009. Rice *sHsp* genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. *BMC Genomics*. 10(1) : 393.
- Schramm, F., J. Larkindale, E. Kiehlmann, A. Ganguli, G. English, E. Vierling, and P. Von Koskull-Döring. 2008. A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of *Arabidopsis*. *Plant J*. 53(2) : 264-274.
- Shimosaka, E. and K. Ozawa. 2015. Overexpression of cold-inducible wheat galactinol synthase confers tolerance to chilling stress in transgenic rice. *Breed. Sci*. 65(5) : 363-371.
- Shpiler, L. and A. Blum. 1991. Heat tolerance for yield and its components in different wheat cultivars. *Euphytica*. 51(3) : 257-263.
- Thomason, K., M. A. Babar, J. E. Erickson, M. Mulvaney, C. Beecher, and G. MacDonald. 2018. Comparative physiological and metabolomics analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) following post-anthesis heat stress. *PLoS ONE*. 13(6) : e0197919.
- Wang, X., L. Hou, Y. Lu, B. Wu, X. Gong, M. Liu, J. Wang, Q. Sun, E. Vierling, and S. Xu. 2018. Metabolic adaptation of wheat grain contributes to a stable filling rate under heat stress. *J. Exp. Bot*. 69(22) : 5531-5545.
- Xue, G. P., S. Sadat, J. Drenth, and C. L. McIntyre. 2014. The heat shock factor family from *Triticum aestivum* in response to heat and other major abiotic stresses and their role in regulation of heat shock protein genes. *J. Exp. Bot*. 65(2) : 539-557.
- Young, T. E., J. Ling, C. J. Geisler-Lee, R. L. Tanguay C. Caldwell, and D. R. Gallie. 2001. Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein, *HSP101*. *Plant Physiol*. 127(3) : 777-791.
- Zhang, N., E., Vierling, and S. J. Tonsor. 2016. Adaptive divergence in transcriptome response to heat and acclimation in *Arabidopsis thaliana* plants from contrasting climates. *Biorxiv*. 044446.