LED 광원의 다양한 광질이 배추 유묘의 유전자 발현에 미치는 영향

김진아^{1*} · 이연희¹ · 홍준기¹ · 홍성창² · 이수인¹ · 최수길¹ · 문이슬¹ · 구본성¹

¹농촌진흥청 국립농업과학원 생물소재공학과, ²농촌진흥청 국립농업과학원 기후변화생태과

Effects of Light Quality Using LEDs on Expression Patterns in *Brassica rapa* Seedlings

Jin A Kim^{1*}, Yeon-Hee Lee¹, Joon Ki Hong¹, Sung-Chang Hong²,
Soo In Lee¹, Su Gil Choi¹, Yi-seul Moon¹, and Bon-Sung Koo¹

¹Functional Biomaterial Division, National Academy of Agricultural Science,
Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

²Climate Change & Agroecology Division, National Academy of Agricultural Science,
Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

Abstract. Light with two faces, beneficial and harmful effects is an important signal for every living cell. Optimal adaptation to light environment enhances the fitness of an organism and survival in nature. Understandings of light quality and plant growth provide with the economical guides for artificial light sources like LEDs. Compared with those under white light, the 1 week seedlings of Chinese cabbage (*Brassica rapa*) under monochromatic red and blue light showed normal development and growth. In contrast to extremely long and etiolated hypocotyls of the seedlings under dark, those under far-red etiolated were extremely short. Based on the microarray analysis, blue light induced the vigorous development and growth and two fold changes of transcripts than red light condition. To have insight of gene products under different light qualities conditions, GO term enrichments were calculated and each gene according to their GO terms were categorized. The blue and red lights affected the expressions of genes related to biological process. Especially, the genes related to metabolic process and developmental process and plastid and chloroplast in the cellular component category were induced under blue light. This study provided the molecular biological evidence for various light qualities on the growing process of *B. rapa*.

Additional key words: Chinese cabbage, genes, GO (gene ontology), microarray

서 언

주위 환경에 대한 정보를 얻는 것은 모든 살아 있는 유기체의 생존에 있어 매우 중요하다(Molas et al., 2006). 식물에게 있어 광은 중요한 환경 신호이며, 일차적인 에너지원으로서 광의 강도, 광질과 광 조사 기간은 대부분의 식물 발달 단계를 조절하고 광합성 효율을 유지시키는 역할을 한다(Hangarter, 1997). 종자 발아, 하배축 신장, 자엽의 확장, 엽록체 발달, 개화 시기, 식물의 형태 형성 등은 모두 광의 조절을

받는 과정들이며(Chen et al., 2004), 조사되는 광질은 양분의 흡수와 동화작용에도 영향을 미친다(Blum et al., 1992).

폐쇄형 온실이나 비가림 시설 등에서 작물을 재배하는 경우 시설물에 가려 광이 부족한 경우가 종종 있는데 고압나트륨등, 메탈할라이드등, 형광등과 같은 다양한 인공광원을 이용하여 보광을 한다(Kim, 2010). LED등(light emitting diode)은 무 수은으로 환경친화적이고 전력절감이 탁월하며 수명이 길면서도 구동회로가 간단하여 최근 수요가 늘고 있다(Hwang et al., 2004). 특히 특정 광질을 선택적으로 조사

*Corresponding author: jakim72@korea.kr

※ Received 20 September 2012; Revised 2 May 2013; Accepted 6 May 2013. 본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 연구과제(과제번호: PJ907049)와 차세대바이오그린 21사업(PJ009557)의 지원에 의해 수행되었음.

할 수 있는 LED등은 작물 재배 목적과 시기에 따라 맞춤형 광질 제어가 가능하므로, 이를 더 효과적으로 이용하기 위해 LED 광원과 작물 발아, 생장 및 기능성물질의 함유량과의 상관관계를 밝히려는 연구들이 많이 시도되고 있다(Heo et al., 2010). LED등과 작물 생육에 대한 연구결과에 의하면, 적/청/녹색광을 함께 조사할 경우 단일 파장의 광이나 자연광보다 방울토마토 유묘의 생육이 더 짧고 강하며 광합성 색소 및 광합성 효율이 높았다(Liu et al., 2011). 또한 기능성 물질과 LED와의 상관관계에 대해서는, 단일 청색광이나 적/청 혼합광을 함께 조사한 경우 아마란스 새싹의 총페놀함량이 형광등 조건에서 발아한 경우보다 더 높았으며(Cho et al., 2008), Heo et al.(2010)은 청/적 혼합광을 처리하여 관엽식물인 피커스 ‘멜라니’(*Ficus elastica* ‘Melany’) 식물체 내 질소 흡수 및 이용을 증가시켰고 단일 적색 및 적/청 혼합광 처리가 디펜바키아 ‘카멜라’(*Dieffenbachia amoena* ‘Cmella’)의 카로티노이드 함량을 증가시킴을 보고하였다.

식물체에 조사된 여러가지 파장의 광은 파이트크롬(phytochrome), 크립토크롬(cryptochromes), 포토트로핀(phototropins)과 같은 수용체에 의해 감지되고(Lin and Shalitin, 2003; Molas et al., 2006; Takemiya et al., 2005), 이 광 신호는 많은 신호전달 유전자를 통해 단계적으로 전달되어 식물체의 다양한 반응을 유도한다. 최근 연구에서 신호전달 유전자가 많이 동정되었으며 각각의 요소들의 역할을 규명하여 광과 식물의 반응과의 상호작용을 연구하려는 노력이 수행되고 있다(Molas et al., 2006). 또한 다양한 광질 조건에서 발달한 벼와 애기장대 유묘의 유전자 발현 양상을 연구한 Jiao et al.(2005)은 벼와 애기장대 전체 제논의 20%가 백색광에 의해 조절되며 대부분의 대사 기작과 광형태형성 관련 유전자 발현에 대한 광질의 효과는 두 종간에 비슷하게 나타났으나 전사인자의 발현 양상은 서로 많이 다르다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 광질과 배추 초기 유묘 생육과의 상관관계에 대해 관심을 두고 표현형과 연관된 유전자 발현 변화를 추적하였다. 배추는 제논 서열분석이 완료(Wang et al., 2011)되어 광에 따른 식물의 형태적, 생리적 변화를 유전자 수준에서 해석할 수 있는 좋은 재료이며, 유채, 브로콜리, 갓 등 새싹채소로 각광받고 있는 작물(Lee et al., 2007)과 같은 배추 속(Kim et al., 2012; Nagaharu, 1935)에 속하여 연구 결과의 응용성이 높을 것으로 사료된다.

재료 및 방법

식물 생장 및 광조건

18시간 동안 물에 침지시킨 배추(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) 종자를 파종한 칼라포트를 LED(light emitting

diode) 전구가 장착된 30cm × 40cm × 30cm 생장상에 넣고 단일광을 조사하였다. 배추 종자는 동부한농(東富韓農)에서 제공받은 순계(inbred line), DH03을 이용하였다. 적색광은 632nm, 청색광은 460nm, 초적외광은 730nm로 오차범위가 0.5nm 이하로 조절하였으며, 대조구로 백색광(458nm)과 암배양을 함께 수행하였다. LED 처리조건은 종자시료의 약 30cm 높이에 광원을 설치하여 조광 16시간, 암조건 8시간으로, 온도는 주간 25°C, 야간 18°C로 조절하였다.

시료 채취 및 RNA 분리

각각의 광조건에서 7일간 재배한 배추 유묘의 지상부를 채취한 후 즉시 액체질소에 얼려 막사사발로 마쇄하였다. 마쇄한 시료는 RNeasy plant mini kits(Qiagen, Germany)를 이용하여 총 RNA를 추출하고 마이크로어레이 분석에 적합하도록 $1\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 이상으로 농도를 맞추었으며 각 처리에 대해 2반복으로 준비하였다.

마이크로어레이 분석

총 RNA로부터 cDNA를 합성하기 위해 RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas, Lithuania)를 사용하였다. MinElute Reaction Cleanup Kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 cDNA를 정제하고 $1\mu\text{g}$ 의 cDNA에 30μL의 Cy3-9mer primers(Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 넣고 98°C에서 10분간 열처리하여 Cy3 표지된 DNA를 합성하였다. 10μL의 50X dNTP mix(각 10mM)와 2μL의 Klenow fragment($50\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, Takara, Japan)를 넣고 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 표지된 DNA를 isopropanol로 침전시켜 13μL의 물로 녹였다. Spectrophotometer로 농도를 측정하여 10mg의 DNA만을 마이크로어레이 혼성화에 이용하였다. 각 샘플에 혼성화 완충액(Nimblegen, U.S.A.)를 넣고 마이크로어레이와 함께 42°C에서 16-18시간 동안 MAUI chamber(Biomicro, U.S.A.) 내에서 혼성화반응을 진행하였다. Wash I, II, III(Nimblegen, U.S.A.)로 세척하여 남아있는 Cy3를 제거하고 건조시킨 후, GenePix scanner 4000B(Axon, U.S.A.)로 Cy3 신호를 스캔하였다. 분석에 사용된 마이크로어레이는 NimbleGen Inc(<http://www.nimblegen.com>)에서 제작되었으며 혼성화 반응과 데이터 분석은 GGBIO(<http://www.ggbio.com>)에서 수행되었다.

데이터 분석

혼성화 반응은 Nimblescan(Nimblegen, U.S.A.)로 분석하였다. 데이터의 정규화 및 분석은 cubic spline normalization와 Robust Multi-Chip Analysis(RMA)를 이용하였다(Irizarry et al., 2003; Workman et al., 2002). 다중분석(Smyth, 2004)

수행 후 P-Value 0.05 이하인 값을 취하고 다른 광 조건에서의 데이터와 비교하여 2배 이상 발현 증가 혹은 2배 이하 발현 감소 한 유전자만을 선별하여 Acuity 3.1(Axon Instruments)로 통계분석을 하였다. *Arabidopsis thaliana* TAIR9(<http://www.arabidopsis.org>)를 기반으로 하여 배추 유전자와 match된 유전자 수는 총 18,725개이며, GOMINER(Ashburner et al., 2000; Zeeberg et al., 2003)(<http://www.geneontology.org>, <http://discover.nci.nih.gov/gominer/>)로 유의한 GO(Gene ontology) term을 분석하였는데 GO term과 expression mode(Under, Over, Change)에 따라 각 유전자를 분류하였다. One-sided Fisher의 유의성 검정방법으로 P-value를 계산하였고, 100개를 무작위로 취해서 False discovery rate(FDR) 값이 0.05 미만인 GO term을 추출하였고, 생물학적 과정(biological processes), 분자 기능(molecular function), 그리고 세포 요소(cellular component) 세 가지로 분류하였다.

유전자 발현 정량분석

마이크로어레이 분석에서 선별된 유전자들에 대해 정량

분석을 수행하였다. 배추 EST 데이터베이스에서 해당 유전자 서열을 추출한 뒤 특이 프라이머를 디자인하여 RT-PCR 및 qRT-PCR을 수행하였다(Table 2). EcoDry™ Premix(TAKARA, 일본)를 이용하여 총 RNA 5μg을 42°C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 합성한 뒤 Tag DNA polymerase(GeNet Bio, 한국)로 각 유전자를 증폭하였다. 증폭 조건은 94°C에서 5분간 이중나선분리; 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분의 증폭 조건으로 25번 반복; 72°C에서 10분간 반응시킨 후 EtBr로 염색하여 전기영동하였다. 또한 백색, 적색 및 청색광 조건에서 자란 유묘에 대해서는 qRT-PCR을 수행하였는데 Bio-Rad 시스템과 SYBR Green I master mix를 사용하여 20μL로 맞춰 3반복으로 실험을 수행하였다.

결과 및 고찰

배추 유묘 발달에 영향을 주는 광질의 효과

초기 1주 동안 단일 광질에 노출된 배추 유묘의 생장을

Fig. 1. Light-regulated morphological changes of *B. rapa* seedlings: *B. rapa* seeds were sown in soil and cultivated under 4 different light quality and dark conditions during 1 week (A). Pots and samples were arranged from left, white, blue, red, far-red and dark condition. The growth of seedlings under white, red, and blue light conditions was shown in detail (B). The lengths of aerial part (C) and leaf areas (D) were measured with 5 (C) and 3 (D) biological replications. Vertical bars represent means $\pm$ standard errors.

보면 백색광과 적색광 조건에서 성장한 유묘의 하배축 길이가 비슷한 반면, 청색광 조건에서는 하배축이 길었다(Figs. 1A and 1C). 암상태에서 자란 묘는 키가 크고 황화(etiolation)되었으나 초적외광에서 자란 유묘는 암상태의 식물과 같이 황화되었음에도 하배축이 거의 신장하지 않았다. 이러한 결과는 초적외광이 하배축의 신장, 정단 후크 열림, 자엽 확장, 안토시아닌 축적 등을 저해하고 잎이 녹색되는 것을 막는다는 기존의 보고와 일치하며(Wang et al., 2002; Whitlam et al., 1993), 가시적으로 보이는 광은 거의 없으나 초적외광 고유의 효과가 있음을 보여주는 것이다. 또한 청색 단일광 조건에서 자란 유묘는 자엽이 넓게 발달하고 본엽이 가장 먼저 발달하기 시작하여 총 엽면적과 자엽면적이 다른 광 조건에 비해 컸다(Figs. 1B and 1D). 이러한 청색광의 효과는 청색광이 광 포획과 CO₂ 고정 효율을 높여 광합성을 최적화하며, 애기장대 청색광 수용체인 phototropin 유전자가 기능을 잃은 돌연변이체의 경우 잎 말림현상이 심해 광에 노출되는 엽면적이 50%까지 감소되며 광합성 효율이 낮아진다는 보고와 상응한다(Takemiya et al., 2005).

다양한 광질 조사에 의한 유전자 발현 양상

암조건과 비교하여 적, 청, 초적외광 및 백색광에서 자란 유묘의 유전자 발현 변화를 보면 백색, 적색, 청색 및 초적외광에서 발현이 2배 이상 증가 또는 감소하는 유전자의 수는 각각 1662, 3531, 2432, 1187개이며 마이크로어레이 상의 전체 배추 제능 유전자(47553개)의 18.5% 정도의 유전자가 광에 반응하는 것을 알 수 있었다. 광질에 따라서는 백색광 조건에서 보다 적, 청색광에서 발현변화를 보인 유전자 수가 더 많았다(Fig. 2A). 또한 초적외광 조건에서는 발현억제된 유전자가 많았지만 단일광 조건에서는 발현이 증가한 유

전자들이 더 많았다. 단일광에 의해 발현 조절된 유전자들을 암조건과 비교하여 계층군집화(Hierarchical clustering)한 결과를 보면 백색, 적색, 청색광에서 발현 유도 및 억제되는 양상이 세 조건간에 매우 비슷하며 초적외광 조건의 경우 암조건에 비해 발현 양상의 차이가 크지 않은 것으로 나타났다(Fig. 3A). 암조건과 비교 분석한 결과는 광질 고유의 효과 보다는 광 조사 여부에 따른 유전자 발현 효과를 반영할 수 있을 것이라고 판단되어 각각의 단일광과 암조건을 자연광과 가장 유사한 백색광 조건과 비교하였다. 적, 청, 초적외광의 단일 광조건과 백색광 조건을 비교하면, 적색광의 경우는 총 137개 유전자가 발현이 변화하였고, 청색광 조건에서는 256개 유전자가 발현 변화를 보인 반면, 암조건과 초적외광의 경우는 각각 1047개, 2227개 유전자가 발현 변화를 보였다(Fig. 2B). 적색광은 유묘의 생장에 주로 이용되는 광으로 식물은 주변의 적색광/초적외광 비율을 감지하여 낮과 밤을 인지하며 발아, 그늘회피(shade avoidance), 개화 등의 다양한 반응을 유도한다(Neff et al., 2010). 본 실험에서도 초기 유묘 생장기 동안에는 적색 단일광에서 자란 유묘의 생장이 백색광 조건에서 자란 유묘에 비해 전체적으로 크기는 작았으나 형태적인 차이가 거의 없었으며 발현 변화된 유전자의 수도 가장 적었다. 특히 청색광의 경우는 발현 증가한 유전자의 수가 적색광 조건보다 2배 이상 많았고, 유묘의 하배축이 길고 떡잎이 잘 발달되었으며 본엽도 가장 먼저 발달하였다(Figs. 1B and 2B). 계층군집화 결과 역시 적색광에서는 발현이 유도 또는 억제되었으나 청색광에서는 변화가 없거나 반대로 청색광에서 발현 변화를 보인 유전자들이 적색광에서는 변화가 없는 유전자들이 뚜렷이 구분되었는데(Fig. 3B), 유전자들의 발현 양상이 광질에 따라 다르게 나타난 것으로 보아 식물의 발달과 생장에 대한

Fig. 2. Light-regulated Gene expression changes: Numbers show expressed genes up-regulated (white square) and down-regulated (black quality) more than two fold by each light quality condition (P value < 0.05). Expressed genes in 7-day old seedlings of *B. rapa* under red (R), blue (B), and far-red (FR) were compared to dark (D) (A) and white (W) (B). W/D, continuous white light versus dark; R/D, continuous red light versus dark; B/D, continuous blue light versus dark; FR/D, continuous far-red light versus dark; D/W, continuous dark versus white light; R/W, continuous red light versus white light; B/W, continuous blue light versus white light; FR/W, continuous far-red light versus white light.

광 파장 고유의 영향이 있을 것으로 판단되었다. 초적외광 조건에서의 유전자 발현 변화를 암 조건과 비교한 경우 386 개, 백색광 조건과 비교한 경우 816개의 유전자가 발현이 증가하였다(Figs. 2A and 2B). 또한 계층군집화 결과에도 초적외광에서만 발현이 증가 또는 억제되는 유전자들이 있었고 암조건과 비교하여서도 발현 조절된 유전자들이 많았는데(Fig. 3A), 가시적인 빛이 없고 생육도 매우 저조했으나 초적외광이 내는 파장은 식물의 유전자 발현에 영향을 주는 것으로 추정되며 이러한 영향이 식물의 발달과 어떻게 연결되는지에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

발현 유전자 기능 비교

단일광에서 유도 또는 억제된 유전자들을 기능별로 분류하여 광질에 영향을 받는 생리기작을 유추하고자 GO(gene ontology) 분석을 수행하였다. 백색광과 비교하여 각 광질 조건에서 발현이 증가하거나 억제되는 유전자들을 애기장대 유전자 데이터베이스(Arabidopsis TAIR9)와 서열을 비교하여 이중상동성 유전자(orthologs)를 조사한 후, GOMINER를 이용하여 FDR 값이 0.05 미만인 GO term을 추출하였다. 적색광 조건에서는 87개 유전자가 발현 유도되었는데, 청색광 조건에서는 226개로 적색광 조건과 비교해 3배 정도 많

Fig. 3. Overview of light-regulated genome expression by cluster display: Hierarchical clustering analysis was performed with genes up or down regulated more than twofold by each light quality condition. Genes of P Value below 0.05 were collected. For hierarchical clustering analysis, we used average log2 ratios. The color scales were shown at the bottom. Positive numbers represented fold of up-regulation (red color) and negative numbers represented fold of down-regulation (green color). Expressed genes in 7-day old day seedlings of *B. rapa* under red (R), blue (B), and far-red (FR) were compared to dark (D) (A) and white (W) (B). D/D, continuous dark versus dark; W/D, continuous white light versus dark; R/D, continuous red light versus dark; B/D, continuous blue light versus dark; FR/D, continuous far-red light versus dark; W/W, continuous white light versus white light; D/W, continuous dark versus white light; R/W, continuous red light versus white light; B/W, continuous blue light versus white light; FR/W, continuous far-red light versus white light.

Table 1. GO analysis of genes significantly regulated by each light quality condition. The number of *B. rapa* genes which have orthologues in Arabidopsis TAIR9 genes were calculated. With False Discovery Rate < 0.05, GOMINER categorize each gene according to mode of gene expressions either up- or down- regulation.

Sample set ²	Up regulation	Down regulation	Total significant genes
D/W	340	707	1,047
R/W	87	50	137
B/W	226	30	256
FR/W	600	1,627	2,227

²D/W, continuous dark versus white light; R/W, continuous red light versus white light; B/W, continuous blue light versus white light; FR/W, continuous far-red light versus white light.

았다. 또한 초적외광 조건과 암배양 조건에서는 각각 600개, 340개의 유전자가 발현 유도되었다(Table 1). GO 분석을 통해 추출된 유전자들을 기능별로 생물학적으로 다양한 목적에 대하여 다루는 생물학적 과정(biological process), 생화학 수준에서 유전자 생산물에 대하여 다루는 분자 기능(molecular function), 그리고 유전자 생산물의 위치에 대하여 다루는 세포 요소(cellular component) 이렇게 세 가지로 분류하였다. 각각의 단일 광 조건에서 자란 배추 유묘의 발현 유전자 변화 양상을 기능별로 보면 광 반응이나 광합성, 2차 대사산물 생산 기작 등 생물학적 과정에 관여하는 유전자의 변화가 가장 컸는데, 암조건에서는 136개, 적색광과 청색광에서는 각각 28개와 85개였고, 세포막이나 세포 소기관 형성에 관여하는 세포요소로 분류되는 유전자와 효소 활성 등에 관여하는 분자 기능으로 분류되는 유전자의 발현 변화는 상대적으로 적었다(Fig. 4). 특히 적색광 조건에서는 세포요소와 분자기능으로 분류된 유전자가 각각 5개와 6개로 백색광 조건과 비교해 유전자의 발현 변화는 거의 없었다(Fig. 4). 유전자 발현 변화로 보면 단일 적색광은 배추 초기 유묘 재배에 있어 백색광을 대신하여 이용할 수 있는 광 조건으로 보이며, 실제로 적색광에서 1주간 자란 유묘는 초장이 조금 짧았으나 형태와 발달 양상이 다른 광 조건에 비해 백색광에서 자란 1주째 유묘와 가장 비슷했다. 또한

Fig. 4. GO term enrichments analysis of genes regulated by each light quality condition: GO term enrichments were calculated with GOMINER (Ashburner et al., 2000; Zeeberg et al., 2003; <http://discover.nci.nih.gov/gominer/>). The 18,725 genes were used as total gene set in GOMINER for Arabidopsis. GO terms of which FDR are less than 0.05 at least are collected. Analysis was performed in comparison with White to D, R, B, and FR. GOMINER categorize each gene according to their GO terms, biological processes, cellular component, and molecular function and mode of gene expressions either up- or down- regulation. Modes of expressions are denoted as Under, Over, and Change. We described the total number of change which contained up- and down- regulation by light conditions. Each color bar indicated biological processes (white square), cellular component (grey square), and molecular function (black square), respectively.

발아, 화아분화와 측지 형성 등 다양한 기작에 영향을 주는 것으로 알려진 초적외광에 대해서는 다른 단일 파장 광 조건 보다 총 유전자 발현 변화 수도 많았는데 그 중 분자 기능에 관여하는 유전자의 변화(434개)가 두드러졌고, 이 밖에도 다양한 대사기작에 관여하는 유전자들이 발현 변화하는 것으로 분석되었다(Fig. 4 and Table 1).

종자 발아와 유묘의 생장을 촉진하는 것으로 알려져 있는 적색광과 본 실험에서 유묘의 생육에 가장 큰 영향을 준 청색광 조건에서 발현이 증가한 유전자들의 GO term을 웹사이트 기반 프로그램인 BAR(Bio-Array Resource for Plant Biology; http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi)을 이용하여 세분해 보면 두 광 조건에서 모두 외부 자극(abiotic or biotic stimulus, stress)에 반응하는 유전자들의 발현 변화가 두드러진 것을 알 수 있으며, 그 외에도 전반적으로 발현 변화된 유전자들의 경향이 비슷했다(Figs. 5A and 5B). 그러나 생물학적 과정 중 대사과정(metabolic process)과 발달과정(developmental process) 등의 변화는 청색광이 적색광 조건에서 보다 더 많았으며, 세포 요소 그룹에서도 색소체(plastid)나 엽록체(chloroplast) 관련 유전자들의 변화가 더 많았다(Fig. 5B). 청색광은 균류의 카로티노이드 대사를 촉진시키는 신호로 알려져 있으며(Avalos and cerda-Olmedo, 2004; Avalos et al., 1993), 식물의 경우도 아마란서스의 새싹 생산 시 총페놀화합물의 함량과 항산화 활성을 증가시켰고(Cho et al., 2008), 피커스 ‘멜라니’ 분화 식물의 체내 당 함량을 높이는데 영향을 주었다(Heo et al., 2010). 청색광 조건에서 2배 이상 발현 증가된 유전자들 중 대사기작에 관여할 것으로 추정되는 유전자를 선별하여 RT-PCR 분석을 수행하였다(Table 2). Brapa_ESTC001112는 phenylpropanoid 합성 기작에 관여하는 애기장대 AT2G37040와 상동성을 보인 유전자로서 백색광 조건에서보다 청색광과 적색광에서의 발현량이 각각 2배와 4배 증가하였다. 또한 식물 발달과 대사 및 스트레스에 반응하는 전사인자로 알려진 Myb39(AT5G61420)(Dubos et al., 2010)와 상동성을 보인 Brapa_ESTC033197 역시 적색광과 청색광 조건에서 백색광 보다 발현량이 증가하였다(Figs. 6A, 6B, and 6C). 이러한 결과는 적색광과 청색광이 2차 대사산물 대사에 관여하는 유전자의 발현을 유도하거나 촉진한다는 것을 보여준 것이며, 토마토의 안토시아닌 함량이 청색광에 의해 증가되었으며(Giliberto et al., 2005), 적색광은 β -carotene 발현을 유도하였다는(Wu et al., 2007) 이전의 생리학적 연구와도 상응한다. 적색광 조건에서보다 청색광과 백색광에서 발현량이 더 많았던 Brapa_ESTC000682는 FeSOD(iron-superoxide dismutase)의 이중상동성 유전자(AT4G25100)

Fig. 5. GO term enrichments analysis of genes induced by red (A) and blue (B) light conditions: Functional distribution, normalized frequency, and bootstrap standard deviation (SD) of genes in 7-day old day *B. rapa* seedling changed by red light relative to *Arabidopsis* was determined using the categories classification from the classification SuperViewer from bio-array resource for *Arabidopsis* functional genomics for gene ontology (Provar and Zhu, 2003).

Table 2. List of genes used in RT-PCR analysis. Putative genes were significantly up-regulated by blue light condition.

ID of <i>B. rapa</i> gene	<i>A. Thaliana</i> homologue	Swiss_protein_id	Description	Forward primer 5'-3' Reverse primer 5'-3'
Brapa_ESTC001112	AT2G37040	P35510 PAL1_ARATH	Phenylalanine ammonia-lyase 1	5'-ACGACAACCCTTTGATCGAC-3' 5'-TCCTCGAAGCGTTAGGTTA-3'
Brapa_ESTC033197	AT5G61420	Q8GWP0 MYB39_ARATH	Transcription factor MYB39	5'-GCAAAAGATGGGACACCAGTT-3' 5'-CTTCATTGCGAATCTGCTCA-3'
Brapa_ESTC000682	AT4G25100	P21276 SODF_ARATH	Superoxide dismutase [Fe], chloroplast precursor	5'-TGGAGGAAAACCATCAGGAG-3' 5'-GGGTTACAGCATTGGAGT-3'
Brapa_ESTC017042	AT2G28470	Q9SCV4 BGAL8_ARATH	Beta-galactosidase 8 precursor	5'-TCACGAGCCTGAGAAGAACA-3' 5'-CGCCTTAAATGGTTCGTTGT-3'

로 엽록체에 주로 존재하며 광합성, 호흡, 산화스트레스, 그리고 호르몬 신호전달 동안 발생하는 전자의 산화, 환원 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다(Katyshev et al., 2006; Morgan et al., 2003; Raven et al., 1999)(Table 2). 적색광에서보다 청색광과 다양한 광질이 섞인 백색광에서 더 발현량이 많았던 것으로 미루어 Brapa_ESTC000682의 발현에 청색광이 영향을 주었을 것으로 추정된다(Fig. 6D). 본 실험의 결과가 청색광의 광합성 촉진에 기인한 것인지 고에너지광에 대한 유묘의 스트레스 반응인지에 대해서는 좀 더 많은

연구가 필요할 것이다. Brapa_ESTC017042는 애기장대 Beta-galactosidase 8 precursor(AT2G28470)의 이중상동성 유전자로 과일의 숙성과 노화 동안 세포벽의 다당류(polysaccharides)의 가수분해에 관여하는 것으로 알려져 있는데 화분과 같은 기관의 형성에도 관여하며 식물의 발달 동안 세포벽을 느슨하게 하여 세포의 신장에도 관여한다(Minic and Jouanin, 2006; Rogers et al., 2001)(Table 2). 이 유전자 역시 백색광과 청색광 조건에서 발현량이 많았고 적색광에서는 발현이 저조하였다(Fig. 6E). 적색광 조건보다 백색광과 청색광에서

Fig. 6. Quantitative PCR analysis of genes expressed by light conditions: genes listed in Table 2 were quantitatively analyzed. RT-PCR products for genes up-regulated by five light quality, white, red, blue, far-red, and dark (A). Quantitative RT-PCR of mRNA by regulated by white, red, and blue light quality; Brapa_ESTC001112 (B), Brapa_ESTC033197 (C), Brapa_ESTC000682 (D), Brapa_ESTC017042 (E). qRT-PCR were carried qRT-PCR reaction were performed with 3 technical replication using Bio-Rad system and the SYBR Green I master mix in a volume 20 μ L.

떡잎과 본엽이 넓게 발달하였는데 이러한 현상에 관여하는 유전자 중에 하나인 것으로 추정된다. Brapa_ESTC000682와 Brapa_ESTC017042 두 유전자 모두 청색 단독광이나 청색광 파장을 포함하고 있는 백색광에서 발현이 증가한 것으로 보아 유전자 발현에 영향을 준 광이 청색광일 가능성이 있다고 사료된다. 청색광 조건이 대사과정과 색소체 관련 유전자들의 발현에 영향을 주었음을 확인한 본 실험의 결과는 이전의 연구결과를 분자생물학적으로 뒷받침한 것으로, 유묘 재배에 청색광을 적절히 활용한다면 초기 유묘의 생장을 촉진하면서 동시에 2차 대사산물의 대사를 촉진하여 유묘의 영양성분 함량에도 유리한 변화를 유도할 수 있음을 보여주었다.

본 연구는 배추 유묘의 초기 생육 동안 다양한 광질에 반응하는 유전자들을 분석하여 기능별로 분류함으로써 광질과 연관된 배추의 생리기작을 알아보고자 수행되었다. 이 결과들은 생육 단계와 목적형질에 적합한 광질을 선택하는데 분자생물학적 근거를 제공할 수 있을 것으로 사료된다. 온실이나 식물 공장에서 주, 조보 광원으로 이용이 늘고 있

는 LED 광원은 다양한 파장의 광을 선택적으로 이용할 수 있다. 식물의 생육단계와 목적하는 대사물의 생산 시기에 맞춰 관련 유전자들의 발현을 향상시킬 수 있는 광질과 조사 시기 및 조사량에 대한 연구와 함께 구체적인 대사 기작과의 관계를 규명하는 실험이 더 필요할 것이며, 이러한 연구들은 기존의 LED 광 이용 효율을 더 높이고 고품질의 균일한 작물을 생산하는데 도움을 줄 것이다.

초 록

광은 모든 살아 있는 세포에 있어서 매우 중요한 신호이며 생물체에게 이익이 되면서 동시에 해가 되기도 하는데, 광 환경에 잘 적응한 유기체는 자연에서의 경쟁에서 더 잘 살아남을 수 있다. 광질과 식물 생육에 대한 정보는 LED와 같은 인공광을 효율적으로 사용하게 하여 경제적인 손실을 줄일 수 있다. 초기 1주 동안 단일 광파장에 노출된 배추 유묘의 생장을 보면 백색광 조건에서 생장한 묘와 비교했을 때 적색광과 청색광 조건에서는 유묘의 발달과 생육이 정상

이었다. 암조건에서 자란 유묘는 하배축이 길고 황화된 반면, 초적외광 조건에서 자란 유묘는 황화되었으나 하배축이 거의 신장하지 않았다. 마이크로어레이를 이용하여 유전자 대량 발현분석 실험을 수행한 결과, 청색광 조건에서 유묘의 생육이 가장 왕성하였으며 적색광 조건과 비교하여 발현 변화를 보인 유전자의 수가 2배 많았다. 각각의 광질 조건에서 발현 증가 된 유전자들을 기능별로 분류해 보면(GO 분석) 적색광과 청색광은 생물학적 과정(biological process)과 관련된 유전자의 발현에 영향을 많이 주었다. 특히 대사과정(metabolic process)과 발달과정(developmental process) 그리고 세포 요소(cellular component) 중 색소체(plastid)나 엽록체(chloroplast)관련 유전자들의 발현이 청색광 조건에서 더 많이 증가하였다. 또한 초적외광 조건에서도 다양한 유전자들이 발현 변화를 보였다. 본 논문은 다양한 배추 유묘의 생장에 대한 광질의 영향을 분자생물학적으로 증명하기 위해 수행되었으며 유묘의 배양에 LED 광원이 효율적으로 이용될 수 있음을 보여 주었다.

추가 주요어 : 배추, 유전자, GO(gene ontology), microarray

인용문헌

Ashburner, M., C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin, and G. Sherlock. 2000. Gene ontology: Tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25:25-29.

Avalos, J., E.R. Bejarano, and E. Cerda-Olmedo. 1993. Photo-induction of carotenoid biosynthesis. *Methods Enzymol.* 214: 283-294.

Avalos, J. and E. Cerda-Olmedo. 2004. Fungal carotenoid production, pp. 367-378. In: D.K. Arora, P.D. Bridge, and D. Bhatnagar (eds.). *Handbook of fungal biotechnology*. Marcel Dekker, New York.

Blum, D.E., J.T. Elzenga, P.A. Linnemeyer, and E. Van Volkenburgh. 1992. Stimulation of growth and ion uptake in bean leaves by red and blue light. *Plant Physiol.* 100:1968-1975.

Chen, M., J. Chory, and C. Fankhauser. 2004. Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.* 38:87-117.

Cho, J.Y., D.M. Son, J.M. Kim, B.S. Seo, S.Y. Yang, B.W. Kim, and B.G. Heo. 2008. Effects of LEDs on the germination, growth and physiological activities of amaranth sprouts. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 26:106-112.

Dubos, C., R. Stracke, E. Grotewold, B. Weisshaar, C. Martin, and L. Lepiniec. 2010. MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 15:573-581.

Giliberto, L., G. Perrotta, P. Pallara, J.L. Weller, P.D. Fraser, P.M. Bramley, A. Fiore, M. Tavazza, and G. Giuliano. 2005. Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2

in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content. *Plant Physiol.* 137:199-208.

Hangarter, R.P. 1997. Gravity, light and plant form. *Plant Cell Environ.* 20:796-800.

Hwang, M.K., C.S. Huh, and Y.J. Seo. 2004. Optic characteristics comparison and analysis of SMD type Y/G/W HB LED. *J. KIIIEE* 18:15-21.

Heo, J.W., Y.B. Lee, D.E. Kim, Y.S. Chang, and C.H. Chun. 2010. Effects of supplementary LED lighting on growth and biochemical parameters in *Dieffenbachia amoena* 'Camella' and *Ficus elastica* 'Melany'. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:51-58.

Irizarry, R.A., B.M. Bolstad, F. Collin, L.M. Cope, B. Hobbs, and T.P. Speed. 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 31:e15.

Jiao, Y., L. Ma, S. Elizabeth, and X.W. Deng. 2005. Conservation and divergence of light-regulated genome expression patterns during seedling development in rice and Arabidopsis. *Plant Cell* 17:3239-3256.

Katyshev, A.I., I.B. Rogozin, and Yu.M. Konstantinov. 2006. Identification of new superoxide dismutase transcripts in plants by EST analysis: alternative polyadenylation and splicing events. *Comput. Struct. Funct. Genomics Transcr.* 1:61-64.

Kim, J.A., J.S. Kim, J.K. Hong, Y.H. Lee, B.S. Choi, Y.J. Seol, and C.H. Jeon. 2012. Comparative mapping, genomic structure, and expression analysis of eight pseudo-response regulator genes in *Brassica rapa*. *Mol. Genet. Genomics* 287:373-388.

Kim, J.W. 2010. Trend and direction for plant factory system. *J. Plant Biotechnol.* 37:442-455.

Lee, J.J., Y.M. Lee, H.D. Shin, Y.S. Jeong, and M.Y. Lee. 2007. Effects of vegetable sprout power mixture on lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 36:965-974.

Lin, C. and D. Shalitin. 2003. Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:469-496.

Liu, X.Y., S.R. Guo, Z.G. Xu, and X.L. Jiao. 2011. Regulation of chloroplast ultrastructure, cross-section anatomy of leaves, and morphology of stomata of cherry tomato by different light irradiations of light-emitting diodes. *Hortscience* 46:217-221.

Minic, Z. and L. Jouanin. 2006. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol Biochem.* 44:435-49.

Molas, M.L., J.Z. Kiss, and M.J. Correll. 2006. Gene profiling of the red light signalling pathways in roots. *J. Exp. Bot.* 57:3217-3229.

Morgan, J.F., E.K. James, M.C. Rubio, G. Sarath, R.V. Klucas, and M. Becana. 2003. Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules. *Plant Physiol.* 133:773-782.

Nagaharu, U. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan. J. Bot.* 7:389-452.

Neff, M.M., F. Christian, and C. Joanne. 2010. Light: An indicator of time and place. *Genes Dev.* 14:257-271.

Provart, N. and T. Zhu. 2003. A browser-based functional classification SuperViewer for *Arabidopsis* genomics. *Curr. Computational Mol. Biol.* 2003:271-272.

Raven, J.A., M.C.W. Evans, and R.E. Korb. 1999. The role of

- trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynth. Res.* 60:111-149.
- Rogers, H.J., S.L. Maund, and L.H. Johnson. 2001. A beta-galactosidase-like gene is expressed during tobacco pollen development. *J. Exp. Bot.* 52:67-75.
- Smyth, G.K. 2004. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Applications Genet. Mol. Biol.* 3(1):3.
- Takemiya, A., S. Inoue, M. Doi, T. Kinoshita, and K. Shimazaki. 2005. Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* 17:1120-1127.
- Wang, H., L. Ma, J. Habashi, J. Li, H. Zhao, and X.W. Deng. 2002. Analysis of far-red light-regulated genome expression profiles of phytochrome a pathway mutants in *Arabidopsis*. *Plant J.* 32:723-733.
- Wang, X., H. Wang, J. Wang, R. Sun, J. Wu, S. Liu, Y. Bai, J.H. Mun, I. Bancroft, F. Cheng, S. Huang, X. Li, W. Hua, M. Freeling, J.C. Pires, A.H. Paterson, B. Chalhoub, B. Wang, A. Hayward, A.G. Sharpe, B.S. Park, B. Weisshaar, B. Liu, B. Li, C. Tong, C. Song, C. Duran, C. Peng, C. Geng, C. Koh, C. Lin, D. Edwards, D. Mu, D. Shen, E. Soumpourou, F. Li, F. Fraser, G. Conant, G. Lassalle, G.J. King, G. Bonnema, H. Tang, H. Belcram, H. Zhou, H. Hirakawa, H. Abe, H. Guo, H. Jin, I.A. Parkin, J. Batley, J.S. Kim, J. Just, J. Li, J. Xu, J. Deng, J.A. Kim, J. Yu, J. Meng, J. Min, J. Poulain, K. Hatakeyama, K. Wu, L. Wang, L. Fang, M. Trick, M.G. Links, M. Zhao, M. Jin, N. Ramchiary, N. Drou, P.J. Berkman, Q. Cai, Q. Huang, R. Li, S. Tabata, S. Cheng, S. Zhang, S. Sato, S. Sun, S.J. Kwon, S.R. Choi, T.H. Lee, W. Fan, X. Zhao, X. Tan, X. Xu, Y. Wang, Y. Qiu, Y. Yin, Y. Li, Y. Du, Y. Liao, Y. Lim, Y. Narusaka, Z. Wang, Z. Li, Z. Xiong, and Z. Zhang. 2011. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nat. Genet* 43: 1035-1039.
- Whitelam, G.C., E. Johnson, J. Peng, P. Carol, M.L. Anderson, J.S. Cowl, and N.P. Harberd. 1993. Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* 5:757-768.
- Workman, C., L.J. Jensen, H. Jarmer, R. Berka, L. Gautier, H.B. Nielser, H.H. Saxild, C. Nielsen, S. Brunak, and S. Knudsen. 2002. A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments. *Genome Biol.* 3:1-16.
- Wu, M.C, C.Y. Hou, C.M. Jiang, Y.T. Wang, C.Y. Wang, H.H. Chen, and H.M. Chang. 2007. A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. *Food Chem.* 101:1753-1758.
- Zeeberg, B.R., W. Feng, G. Wang, M.D. Wang, A.T. Fojo, M. Sunshine, S. Narasimhan, D.W. Kane, W.C. Reinhold, S. Lababidi, K.J. Bussey, J. Riss, J.C. Barrett, and J.N. Weinstein. 2003. GoMiner: A resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol.* 4:R28.