유묘기 양배추류에서 메틸자스모네이트에 의한 글루코시놀레이트 함량 변화 및 전사체 발현 분석

이정여 · 민성란 · 정재은 · 김혜란

Effect of methyl jasmonate on the glucosinolate contents and whole genome expression in *Brassica oleracea*

Jeongyeo Lee · Sung Ran Min · Jaeun Jung · HyeRan Kim

Received: 10 August 2019 / Revised: 29 August 2019 / Accepted: 30 August 2019

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract In this study, we analyzed the changes in glucosinolate content and gene expression in TO1000DH3 and Early big seedling upon methyl jasmonate (MeJA) treatment. Analysis of glucosinolate contents after MeJA treatment at 200 μ M concentration showed that the total glucosinolate content increased by 1.3–1.5 fold in TO1000DH3 and 1.3–3.8 fold in Early big compared to those before treatment. Aliphatic glucosinolates, progoitrin and gluconapin, were detected only in TO1000DH3, and the changes in the content of neoglucobrassicin were the greatest at 48 hours after MeJA treatment in TO1000DH3 and Early big. The transcriptomic analysis showed that transcripts involved in stress or defense reactions, or those related to growth were specifically expressed in TO1000DH3, while transcripts related to nucleosides or ATP biosynthesis were specifically expressed in Early big. GO analysis on transcripts with more than two-fold change in expression upon MeJA treatment, corresponding to 12,020 transcripts in TO1000DH3 and 13,510 transcripts in Early big, showed that the expression of transcripts that react to stimulus and chemical increased in TO1000DH3 and Early big, while those related to single-organism and ribosome synthesis decreased. In particular, the expression increased for all transcripts related to indole glucosinolate biosynthesis, which is associated with increase in glucobrassicin and neoglucobrassicin contents. Upon

MeJA treatment, the expression of *AOP3* (*Bo9g006220*, *Bo9g006240*), *TGG1* (*Bo14804s010*) increased only in TO1000DH3, while the expression of *Dof1.1* (*Bo5g008360*), *UGT74C1* (*Bo4g177540*), and *GSL-OH* (*Bo4g173560*, *Bo4g173550*, *Bo4g173530*) increased specifically in Early big.

Keywords Methyl jasmonate, Glucosinolate, Transcriptome, *Brassica oleracea*

서론

배추과(*Brassicaceae*) 식물은 350개의 속, 13개의 과로 구분되며, 약 3,200여종이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다(Kowalsky et al. 1994; Goncalves et al. 2012). 배추과에 속하는 양배추류(*Brassica oleracea*)는 양배추(*B. oleracea* var. *capitata*), 브로콜리(*B. oleracea* var. *italica*), 케일(*B. oleracea* var. *acephala*), 콜라비(*B. oleracea* var. *gongylodes*), 콜리플라워(*B. oleracea* var. *botrytis*), 방울양배추(*B. oleracea* var. *gemmifera*) 등 다양한 경제적 작물을 포함한다(Hagen et al. 2009; Lee et al. 1997). 양배추는 전 세계적으로 식용되고 있는 작물로서 시장규모가 매우 크며, 재배면적 기준으로 세계 4대 채소 작물로 구분될 만큼 주요 작물에 속한다. 영양학적 관점에서의 양배추는 칼슘, 칼륨, 마그네슘 등 다양한 미네랄과 비타민(A, B₁, B₂, C) 및 엽산을 상당량 함유하고 있다. 또한 식물 화학물질과 향체, 효소 및 호르몬을 생성하는데 필요한 필수 아미노산의 일종인 라이신(lysine)을 함유하고 있어 영양가치가 높다(Choi et al. 1995; Higdon et al. 2007). 특히 항암작용에 효과가 있는 글루코시놀레이트(glucosinolates, GSLs)를 많이 함

J. Lee · S. R. Min · J.-E. Jung · H.R. Kim (✉)
한국생명공학연구원
(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
Daejeon, Republic of Korea)
e-mail: kimhr@kribb.re.kr

유하고 있어 최근 암을 예방하는 대표적인 식품으로도 자리매김을 하고 있다(Rangkadilok et al. 2004; Li et al. 2010).

글루코시놀레이트는 질소와 황을 함유하는 이차대사산물로 현재까지 약 200종류 이상이 알려져 있으며, 이 중 30여종의 생리 활성 기능이 알려져 있다(Clarke 2010). 글루코시놀레이트는 전구체인 L-amino acid (methionine, tryptophan, phenylalanine) 종류에 따라 각각 aliphatic, indolyl, aromatic GSLs로 구분된다(Lim 2002; Sun et al. 2011). 글루코시놀레이트는 화학적으로 안정된 상태로 존재하지만 식물 조직이 손상을 받으면 myrosinase (EC 3.2.3.1)에 의해 가수분해되어 불안정한 thiohydroxamate-O-sulfonate를 형성하고, isothiocyanates, oxazolidine-2-thiones, indole-3-cabinol, nitriles, epithionitrile, thiocyanates 등과 같은 안정된 물질로 전환된다(Fahey et al. 2001; Halkier and Du 1997; Higdon et al. 2007; Keck and Finley 2004; Zhang et al. 2006). 특히 isothiocyanate는 세포 자멸과 세포주기 억제 기작을 통하여 방광암, 대장암, 폐암 등 항암효과가 뛰어나다고 보고되었다(Cartea et al. 2008; Hwang et al. 2012). 글루코시놀레이트는 glucuronyl transferase, glutathione-S-transferase 등 phase II detoxification 효소의 활성을 유도함으로써 항암 작용을 활성화하는 것으로도 알려져 있다(Holst and Williamson 2004; Keum et al. 2004). 또한 강한 항균, 살충 작용과 같은 생체 방어 반응에 관여하는 기능 또한 보고되어 왔다(Zhang and Talalay 1994).

식물의 이차대사산물은 세포가 영양분 고갈, 환경 변화, 미생물에 의한 오염과 같은 스트레스를 받을 때 식물체 내에 축적된다(Dixon and Paiva 1995). 메틸자스모네이트(MeJA)는 식물세포 내에 이차대사산물의 생성을 촉진시키는 대표적인 elicitor로서(Yukimune et al. 1996; Ketchum et al. 1999), 식물 세포 발달과정에 있어 종자 발달, 뿌리 성장, 과일 숙성과 노화를 조절하며, 외부 스트레스 자극에 의한 방어 기작을 유도하는 신호전달 물질로 잘 알려져 있다(Cheong and Choi 2003). 최근에 MeJA를 elicitor로 처리하여 다양한 이차대사산물의 합성 및 생산을 효율화한 연구들이 다양하게 보고되고 있다. MeJA를 처리한 결과 주목의 paclitaxel 합성이 촉진되었고(Yukimune et al. 1996; Ketchum et al. 1999), 인삼 부정근의 ginsenoside (Kim et al. 2004; Choi et al. 2005; Kim et al. 2007; Kim et al. 2009) 및 더덕 모상근의 사포닌 함량이 증가하였다(Kim et al. 2015). Elicitation은 목적하는 성분 함량을 식물체 내에서 증대시키기 위한 방법으로서 인간의 질병 예방과 건강유지에 중요한 기능성 물질을 대상으로 주로 적용되어 왔다. 최근에는 이런 점에 초점을 맞춰 생산 위주의 재배 환경 조절보다는 이차대사산물의 생합성을 증대시키는 재배환경을 제공하여 작물의 기능성 물질 함량을 증가시키기 연구 또한 활발히 진행되고 있다(Poiroux-Gonord et al. 2010; Rajashekar et al. 2009; Schreiner 2005).

Next Generation Sequencing (NGS)은 전통적인 염기서열 분석 방법에 비해 빠르고 저렴한 비용으로 대용량의 단편 염기

서열 데이터를 얻을 수 있는 차세대 염기서열 분석 기술이다. NGS 기법을 응용한 RNA 시퀀싱(High-throughput mRNA sequencing, RNA-seq)은 전사체로부터 얻어진 cDNA를 시퀀싱 하는 방법으로, 전사체 발현량을 상대적으로 정량화할 수 있어, 유전자의 발현 정도나 각 조건에 따라 특이하게 발현하는 유용 유전자의 발굴에 활용 가능하며, 분석 대상의 reference 유전체 정보가 없어도 유전자 발현 분석이 가능하다(Kukurba and Montgomery 2015). 양배추류는 약 630 Mb로 유전체 크기가 측정되며, 85%의 유전체를 대표하는 양배추 (*B. oleracea* var. *capitata* (homozygous line 02-12) 유전체 정보와 488.6 Mb의 케일(Rapid cycling *B. oleracea* line TO1000DH3) 유전체 정보가 보고되었으며(Liu et al. 2014; Parkin et al. 2014), 최근에 3세대 염기서열분석 방법인 Nanopore 기반으로 브로콜리(*B. oleracea* HDEM)의 유전체 정보가 보고되어(Belser et al. 2018) 총 3개의 reference 유전체 정보가 존재한다. 이 풍부한 reference 정보 기반으로 양배추 기관별(잎, 뿌리, 꽃), 고온스트레스, CMS, 검은썩음병 및 위황병 저항성 관련 등 비교적 많은 형질에 대한 전사체 연구가 보고되어 왔다(Kim et al. 2014; Wang et al. 2011; Izzah et al. 2014; Xing et al. 2016). 글루코시놀레이트 생합성 관련해서는 브로콜리의 꽃봉우리의 발달단계 별, 종자 및 새싹에서의 글루코시놀레이트 성분과 함량 관련된 전사체 분석 연구가 수행되어(Li et al. 2019; Gao et al. 2014), 브로콜리 종자와 새싹으로부터 25개의 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자가 선발되어 종자보다 발아 후 새싹에서 발현량이 증가되는 것을 보고하였다. 특히 알리페틱 글루코시놀레이트 분해와 관련된 myrosinase 2 (*TGG2*)의 발현량이 늙은 잎 보다 어린 잎에서 약 20 ~ 130배 많아 글루코시놀레이트 breakdown product 함량이 종자 발아 및 어린 잎 발달 단계에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되었다(Gao et al. 2014). 또한 브로콜리 꽃봉우리 발달단계에서 glucoraphanin 합성과 관련된 10개 유전자(*CYP79F1*, *MAMI*, *MAM3*, *St5b-2*, *FMO_{GS-OXI}*, *MY*, *AOP2*, *ESP* 및 *ESMI*)의 발현 비교 분석을 통해 *CYP79F1* 유전자가 유일하게 다른 기관에서는 발현되지 않으며 어린 꽃눈에서만 발현이 증가되는 것을 확인하여 이 유전자가 화서의 sulforaphane 생성에 중요한 역할을 할 것으로 보고하였다(Li et al. 2019). 하지만, 현재까지 elicitor 처리에 따른 양배추의 글루코시놀레이트 함량 변화와 글루코시놀레이트 함량 변화에 따른 전사체 발현 변화 관련 분석은 아직 보고되지 않았다.

본 연구에서는 유전체 정보와 유전 분석 정보가 풍부한 *B. oleracea*의 국제 표준 유전 집단 양친 계통인 TO1000DH3 (*B. oleracea* var. *acephala*)와 Early big (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck)의 유묘를 대상으로 elicitor로서 MeJA 처리에 따른 글루코시놀레이트 함량 변화를 분석하고, elicitor 처리로 인한 글루코시놀레이트 성분의 함량 변화에 따른 전사체 발현을 비교 분석을 수행하였다. 이로부터 양배추류 식물체 내 글루코시놀레이트 생합성 유전 기작과 함량 증가와 관련

된 유전자를 발굴하고자 하였다. 본 연구 결과는 사람에게 유용한 기능성 물질인 글루코시놀레이트 성분의 함량이 증대된 양배추 소재 개발을 위한 기초 자료로 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

식물 재료 및 MeJA 처리

Rapid cycling *B. oleracea*인 TO1000DH3 (*Brassica oleracea* var. *acephala*)와 브로콜리 Early big (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck) 두 계통이 본 실험에 사용되었다. 종자를 상토에 파종하여 16시간의 광주기, 22°C와 50% 상대습도 조건에서 3주간 키웠다. 3주 자란 TO1000DH3와 Early big 유묘에 200 μ M의 MeJA를 분사하였고, 12, 24 및 48시간 후에 뿌리를 제거한 지상부를 채취하였다. MeJA를 처리하여 준비된 샘플은 글루코시놀레이트 함량 분석과 RNA 추출을 위하여 -80°C에 보관하였다.

글루코시놀레이트 추출 및 HPLC 분석

MeJA 처리 후 샘플링하여 얻은 시료는 동결건조하여 파쇄하였다. 건조된 분말 시료 100 mg을 2 mL 튜브에 넣고 끓는 70% (v/v) methanol을 1.5 mL 첨가하여 혼합하였다. 70°C에서 5분동안 글루코시놀레이트를 추출하여 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4°C) 후 상층액을 수거하였다. 동일한 과정으로 총 3회 추출하여 각 상층액을 모두 합하였다. 미니 칼럼 충전용 DEAE Sephadex A-25는 초순수에 녹여 sodium acetate 0.5M을 넣고 H⁺형태로 활성화시켰다. Mini-column에 상기의 활성화된 DEAE Sephadex A-25를 넣은 후 글루코시놀레이트 추출물을 로딩 후 추출물이 다 빠지면 증류수 2 mL을 로딩하여 컬럼을 세척하였다. Aryl sulfatase solution (115 mg/5 mL) 75 μ L를 넣은 후 16시간 동안 상온에서 정치하였다. 초순수 1.5 mL로 글루코시놀레이트를 용출하였고, 0.45 μ m hydrophilic PTFE syringe filter (직경 13 mm)로 여과한 후 HPLC용 vial병에 넣어 냉장 보관하였다.

글루코시놀레이트 함량 분석은 1200 series HPLC system (Agilent Technologies, CA, USA)를 사용하였고, 분석 컬럼은 Inertsil ODS-3 column (150 $\times$ 3.0mm I.d., particle size 3 μ m)을 사용하였다. 컬럼 온도는 40°C, 검출 파장은 227 nm, 유량은 0.2 mL/min로 설정하였고, 시료는 automatic injector를 사용하여 10 μ L 주입하였다. 초순수와 acetonitrile를 이동상 용액으로 사용하였다. Acetonitrile를 18분까지는 7 $\rightarrow$ 24%로 증가시키고, 32분까지는 24%를 유지시키고 32.1분에 24 $\rightarrow$ 7%로 감소, 40분까지 7%를 유지시켰다. 각 GSL 성분의 정량은 외부 표준물질인 sinigrin (0.1mg/mL)의 HPLC 피크 면적과 각 성분

의 면적을 비교하고 그 값에 response factor (Clarke, 2010)를 적용하여 정량화(μ mol/g dry wt.)하였다.

RNA 추출 및 전사체 분석

MeJA를 처리하여 준비한 TO1000DH3와 Early big 샘플로부터 TRIzol (Invitrogen, MA, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 전사체 정보 생산을 위해 Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (catalog #RS-122-2001; Illumina, CA, USA)를 이용하여 paired-end library를 제작하였으며, RNA-seq은 염기서열 생산은 HiSeq2500 platform을 이용하여 수행되었다. Short read의 전처리 과정을 위하여 SolexaQA에서 제공하는 DynamicTrim과 LengthSort 프로그램을 사용하였으며 phred score Q $\geq$ 20, short read length $\geq$ 25 기준으로 clean read를 선별하였다.

Quality trimming을 통해 얻은 clean read들은 Bowtie2 프로그램을 이용하여 TO1000DH3의 reference genome (GCA_000695525.1)에 mapping하여 유전자 발현양을 비교 분석하였다. 데이터의 편차에 대한 normalization은 DESeq library를 이용하여 수행하였다(Anders and Huber 2010). 획득한 전사체 중 글루코시놀레이트 생합성 경로 관련 유전자는 110개의 *Arabidopsis thaliana* 유전자를 이용하여 BLAST 분석(e-value 1^{e-10}, identity 70 이상)을 통해 선별하였다(Wang et al. 2011). 샘플 간 차별적으로 발현하는 유전자 (DEGs)는 발현값이 2배 이상 차이가 나는 $\geq$ 2 fold change와 FDR (False Discovery Rate)값 0.01 이하인 조건을 동시에 만족하는 전사체를 선별하여 분석하였다. 선별된 DEGs의 GO 분석은 web-based 분석 툴인 Plant Transcriptional Regulatory Map (<http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/go.php>)을 이용하여 cut-off value를 FDR값 0.05 이하로 설정하여 다중 비교 검정을 보정하였다.

결과 및 고찰

MeJA 처리에 따른 글루코시놀레이트 함량 변화

MeJA 처리가 유묘기 TO1000DH3와 Early big의 글루코시놀레이트 함량 변화에 영향을 주는지 알아보기 위하여 3주 자란 유묘기 식물체에 MeJA를 분사하여 글루코시놀레이트 함량 변화를 검사하였다. TO1000DH3와 Early big 유묘기 식물체에서 알리페틱 글루코시놀레이트 3종류(progoitrin, sinigrin, gluconapin)와 인돌 글루코시놀레이트 3종류(glucobrassicin, 4-methoxyglucobrassicin, neoglucobrassicin)가 검출되었다(Fig. 1, Supplemental Table 1). 이 결과는 Robin et al. (2016)과 Bhandari et al. (2015)에서 보고한 양배추의 주요 글루코시놀레이트 성분과 일치하는 것으로 나타났다. 글루코시놀레이트 총 함량은 MeJA를 처리함으로써 TO1000DH3와 Early big에서 시

Fig. 1 Glucosinolate contents ($\mu\text{mol/g dry wt.}$) in TO1000DH3 and Early big seedlings at 0, 12, 24, and 48 hours after 200 μM methyl jasmonate treatment. The seedlings were grown for three weeks. *, Significant differences between MeJA treatments at $P < 0.05$

간 별로 각각 1.3 (12h)~1.5배 (24h), 1.3 (12h)~3.8배 (24h) 증가하였는데, MeJA 처리 후 24시간 샘플에서 TO1000DH3는 $25.646 \pm 1.282 \mu\text{mol/g dry wt.}$, Early big은 $32.366 \pm 1.618 \mu\text{mol/g dry wt.}$ 로 글루코시놀레이트 총 함량이 가장 많이 증가되었다(Fig. 1, Supplemental Table 1). MeJA를 처리하기 전 알리페틱 글루코시놀레이트 함량은 Early big ($0.539 \pm 0.027 \mu\text{mol/g dry wt.}$)보다 TO1000DH3 ($12.678 \pm 0.633 \mu\text{mol/g dry wt.}$)에서 약 23.5배 많았고, progoitrin과 gluconapin은 TO1000DH3에서만 검출되었다. 인돌릭 글루코시놀레이트 함량은 TO1000DH3 ($3.255 \pm 0.162 \mu\text{mol/g dry wt.}$)보다 Early big ($7.813 \pm 0.390 \mu\text{mol/g dry wt.}$)에서 약 2.4배 많았다. TO1000DH3에서 MeJA 처리에 의해 progoitrin 함량은 12시간 후 유의하게 19.2% 감소하였지만 48시간 후 처리 전보다 11.3% 증가하였다. Sinigrin의 함량 변화는 MeJA 처리에 의해 12시간째 TO1000DH3와 Early big에서 23.7%, 60.2% 증가하였다. 그러나 TO1000DH3에서는 MeJA 처리 후 24시간(7.7%), 48시간(29.0%) 후 지속적으로 감소하는 경향을 보였고, Early big에서는 MeJA 처리

후 24시간(8.9%), 48시간(58.8%) 증가하였다. TO1000DH3에서 gluconapin 함량 변화는 MeJA 처리 후 48시간 샘플에서 23.6% 유의하게 감소하였다. Glucobrassicin과 neoglucobrassicin 함량 변화는 MeJA 처리 후 24시간이 지났을 때 TO1000DH3와 Early big에서 공통적으로 가장 많이 증가하였다(Fig. 1). 특히 glucobrassicin 함량이 Early big에서 MeJA 처리에 의해 24시간째 3.4배로 크게 증가하였는데, glucobrassicin의 분해 산물인 indole-3-cabinoI은 사람 또는 동물 세포에서 항암 물질로 알려져 있다(Keck and Finley 2004; Kim and Milner 2005; Zhang and Talalay 1994). 4-methoxyglucobrassicin 함량은 TO1000DH3에서는 MeJA 처리 후 12시간 샘플에서 유의하게 40.4% 증가하였고, Early big에서는 MeJA 처리 후 24시간 샘플에서 57.8%로 가장 많이 증가하였다 (Fig. 1). 8일 자란 브로콜리, 순무, 적무 새싹에 6 종류의 biotic elicitor (25 μM methyl jasmonate, 150 μM jasmonic acid, 100 μM salicylic acid, 277 mM glucose, 146 mM sucrose, 5 mM methionine)를 처리한 결과 글루코시놀레이트 함량이 증가된 결과가 보고되었다

(Baenas et al. 2014). 보고된 연구에서는 MeJA와 JA에 의해 글루코시놀레이트 총 함량과 glucoraphanin (MeJA를 처리한 브로콜리와 적무), glucobrassicin (MeJA 처리한 순무) 함량이 증가됨을 보여줬다. 본 결과를 통해 200 μ M MeJA 처리는 3주 자란 유묘기 TO1000DH3와 Early big의 글루코시놀레이트 총 함량과 각 성분들의 함량 증가에 영향을 주며, 함량 증가 정도는 두 계통에 다르게 나타나고, Early big에서 처리 전에 검출되지 않았던 progoitrin과 gluconapin은 처리 후 감소되는 경향을 보이는 것을 확인하였다.

TO1000DH3와 Early big의 유묘기 유전자 발현 차이

유묘기 TO1000DH3와 Early big 식물체에 MeJA 처리 후 12, 24, 48시간까지의 전사체 정보 생산을 수행하였다. TO1000DH3는 4.0~4.5 Gb, Early big은 4.1~4.4 Gb의 raw data를 생산하여, Q30 이상의 우수한 질의 전사체 정보를 선별하여 생산 데이터의 93.2~94.3%의 정보를 확보하였다(Table 1). 생산된 정보는 quality trimming 후 assembly하여 reference gene sequence에 매치된 유전자들 중 raw read counts (>150)와 FDR 값 (<0.01)을 만족시키는 전사체를 총 59,225개 선별하였다. 이 중 모든 샘플에서 FPKM값이 0인 전사체를 제외하여 40,503개를 선별하여 발현양 비교분석에 사용하였다. MeJA를 처리하기 전 TO1000DH3와 Early big의 발현양을 비교한 결과 TO1000DH3 특이적으로 발현하는 전사체는 1,672개, Early big 특이적으로 발현하는 전사체는 1,116개, 공통적으로 발현하는 전사체는 28,337개였다(Fig. 2A). TO1000DH3와 Early big 특이적으로 발현하는 전사체의 기능적 분류를 위하여 Plant Transcriptional Regulatory Map을 이용하여 GO 분석을 수행하였다. GO term은 세 개의 주된 category (biological process, cellular component, and molecular function)로 나눌 수 있으며, 총 39개의 sub-category로 GO enrichment 되었다(Table 2). TO1000DH3 특이적으로 발현하는 1,672개 전사체의 GO 분석 결과 biological process의 하위로는 response to stress (GO:0006950), defense response (GO:0006952), lipid transport (GO:0006869), lipid localization (GO:0010876) 및 regulation of

shoot system development (GO:0048831)가 enrich된 그룹이었다. Molecular function에서는 O-methyltransferase activity (GO:0008171)가 가장 큰 그룹이었고, cellular component에서는 DNA-directed RNA polymerase I, II complex (GO:0005736, GO:0005665)에 enrichment 되었다(Table 2). Early big 특이적으로 발현하는 1,116개 전사체의 GO 분석 결과 biological process의 하위로는 purine nucleoside monophosphate biosynthetic process (GO:0009127), ATP biosynthetic process (GO:0006754)가 많은 비중을 차지하는 그룹이었다. Molecular function에서는 cation-transporting ATPase activity (GO:0019829), ATPase activity (GO:0042625, GO:0044769)가 가장 큰 그룹이었고, cellular component에서는 proton-transporting two-sector ATPase complex (GO:0016469)가 enrichment 되었다(Table 2). GO enrichment 분석 결과 MeJA 처리하기 전 TO1000DH3 특이적으로 발현하는 전사체는 주로 stress나 defense 반응에 관여하거나, 성장과 관련되었고, Early big 특이적으로 발현하는 전사체는 주로 nucleoside 또는 ATP 생합성 관련 기능으로 특징이 구분되었다.

MeJA 처리에 의해 변화하는 Differentially expressed genes (DEGs) 분석

식물에 MeJA를 처리하면 에틸렌 생합성과 옥신 반응성 및 수송을 저해하고, 세포 내에서 이차대사계를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Gutjahr et al. 2005; Soto et al. 2012). TO1000DH3와 Early big에 MeJA를 처리하여 발현이 변하는 전사체를 분석하기 위하여, MeJA 처리 전 샘플과 비교했을 때 MeJA 처리에 의해 발현이 2배 이상 변하는 전사체를 TO1000DH3에서 12,020개(up-regulated transcript 5,887개, down-regulated transcript 6,133개), Early big에서 13,510개(up-regulated transcript 6,955개, down-regulated transcript 6,555개)를 선별하였다(Fig. 2B). TO1000DH3와 Early big에서 MeJA 처리 후 12, 24, 48 시간에 따라 2배 이상 발현이 변한 전사체의 GO 분석을 수행하였다. Up-regulated된 전사체를 비교해보면 TO1000DH3와 Early big에서 공통적으로 response to stimulus (GO:0050896),

Table 1 Summary of transcriptome sequencing

Sample Name		Yield (Mb)	No of Reads	>=Q30 Bases (%)	Mean quality Score (PF)
TO1000DH3	0 h	4,018	39,781,624	93.2	37.425
	12 h	4,499	44,548,290	94.1	37.705
	24 h	4,450	44,055,948	93.9	37.640
	48 h	4,525	44,807,256	93.6	37.555
Early big	0 h	4,369	43,258,974	93.8	37.615
	12 h	4,186	41,439,280	94.3	37.765
	24 h	4,426	43,823,826	94.2	37.745
	48 h	4,446	44,016,610	94.3	37.765

Fig. 2 Venn diagram represents the number of differentially expressed genes identified through pairwise comparisons. (A) Differentially expressed genes between TO1000DH3 and Early big. (B) Number of up- (red) and down-regulated (blue) transcripts in different pairwise comparisons under MeJA treatment

response to chemical (GO:0042221), response to oxygen-containing compound (GO:1901700), response to acid chemical (GO:0001101) 및 oxidoreductase activity (GO:0016491)에 GO enrichment 되었다(Table 3). 2배 이상 발현이 증가한 전사체의 GO enrichment 결과 response to organic substance (GO:0010033), organic acid metabolic process (GO:0006082), oxoacid metabolic process (GO:0043436), tetrapyrrole binding (GO:0046906), oxygen binding (GO:0019825) 및 dioxygenase activity (GO:0051213)는 TO1000DH3에서만 확인되었다. 반면에 response to organic substance (GO:0010033), response to jasmonic acid (GO:0009753), ion binding (GO:0043167), transferase activity (GO:0016740) 및 transcription factor activity (GO:0003700)는 Early big에서만 확인되었다(Table 3). MeJA 처리에 의해 2배 이상 발현이 감소한 전사체의 GO enrichment 결과 single-organism process (GO:0044699), response to stimulus (GO:0050896), ribosome biogenesis (GO:0042254), protein binding (GO:0005515), DNA binding (GO:0003677), transcription factor activity (GO:0003700), protein dime-

rization activity (GO:0046983), transferase activity (GO:0016741), structural constituent of ribosome (GO:0003735), rRNA binding (GO:0019843) 및 snoRNA binding (GO:0030515)는 TO1000DH3와 Early big 공통적으로 enrichment 되었다(Table 4). MeJA 처리 후 2배 이상 발현이 감소한 전사체 중 TO1000DH3에서는 regulation of transcription (GO:0006355)과 binding 관련(ion binding, ADP binding), metabolic process (nucleic acid metabolic process, RNA metabolic process, ncRNA metabolic process, rRNA metabolic process) 관련 GO term이 주로 enrichment 되었다. Early big에서는 스트레스 관련(response to abiotic stimulus, response to organic substance, response to chemical, response to hormone), 광합성 관련(photosynthesis, plastid organization, carbon fixation), 펩타이드 합성 관련(amide biosynthetic process, translation) GO가 enrichment 되었다(Table 4).

유묘기 TO1000DH3와 Early big에 MeJA를 처리하였을 때 글루코시놀레이트 함량과 연관되어 발현이 변화하는 전사체를 선별하기 위하여, 글루코시놀레이트 분석 결과 유의하

Table 2 GO enrichment results of TO1000DH3 and Early big seedling specific expressed transcripts (FDR<0.05). GO term enrichments were calculated with the Plant Transcriptional Regulatory Map (<http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/go.php>). BP, biological process; MF, molecular function; CC, cellular component

GO terms	GO ID	Count	p-value	Aspect
TO1000DH3 specific expressed transcripts				
Response to stress	GO:0006950	116	0.00269	BP
Defense response	GO:0006952	63	0.00048	BP
Lipid transport	GO:0006869	14	0.00012	BP
Lipid localization	GO:0010876	14	0.00056	BP
Regulation of shoot system development	GO:0048831	14	0.00062	BP
Regulation of leaf development	GO:2000024	6	0.00071	BP
Alkaloid metabolic process	GO:0009820	5	9e-05	BP
Alkaloid biosynthetic process	GO:0009821	4	0.00024	BP
Positive regulation of response to biotic stimulus	GO:0002833	4	0.00209	BP
Defense response to insect	GO:0002213	4	0.00144	BP
Regulation of leaf senescence	GO:1900055	4	0.00174	BP
Response to salt	GO:1902074	3	0.0023	BP
Entrainment of circadian clock by photoperiod	GO:0043153	2	0.00189	BP
O-methyltransferase activity	GO:0008171	8	4.5e-06	MF
Amine-lyase activity	GO:0016843	5	6.2e-05	MF
Strictosidine synthase activity	GO:0016844	5	2.3e-05	MF
DNA-directed RNA polymerase I complex	GO:0005736	4	0.0013	CC
DNA-directed RNA polymerase II, core complex	GO:0005665	4	0.0018	CC
Early big specific expressed transcripts				
Purine nucleoside monophosphate biosynthetic process	GO:0009127	9	1.7e-05	BP
Purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	GO:0009168	9	1.7e-05	BP
Ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	GO:0009156	9	0.00011	BP
ATP biosynthetic process	GO:0006754	8	3.6e-06	BP
Purine nucleoside triphosphate biosynthetic process	GO:0009145	8	8.9e-06	BP
Purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	GO:0009206	8	8.9e-06	BP
Ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	GO:0009201	8	2.2e-02	BP
Nucleoside triphosphate biosynthetic process	GO:0009142	8	4.8e-05	BP
energy coupled proton transport, down electrochemical gradient	GO:0015985	7	5.4e-06	BP
ATP synthesis coupled proton transport	GO:0015986	7	5.4e-06	BP
Energy coupled proton transmembrane transport, against electrochemical gradient	GO:0015988	6	8.7e-05	BP
ATP hydrolysis coupled proton transport	GO:0015991	6	8.7e-05	BP
Cation-transporting ATPase activity	GO:0019829	9	3.6e-05	MF
ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions	GO:0042625	9	0.00011	MF
ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, rotational mechanism	GO:0044769	7	2.5e-05	MF
Proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	GO:0046933	6	7.9e-06	MF
Proton-transporting two-sector ATPase complex	GO:0016469	7	0.00013	CC
Proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)	GO:0045261	6	1.3e-07	CC
Proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain	GO:0033178	6	4.1e-06	CC
Proton-transporting ATP synthase complex	GO:0045259	6	6.1e-05	CC
Mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex	GO:0005753	5	6.9e-05	CC
Mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)	GO:0000275	4	3.3e-06	CC

Table 3 GO enrichment results of up-regulated differentially expressed genes by MeJA treatment (FDR<0.05)

GO terms	GO ID	TO1000DH3			Early big		
		12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
Biological Process							
Single-organism process	GO:0044699	1,859	963		2,107	1,270	1,083
Single-organism cellular process	GO:0044763	1,419			1,623	974	
Response to stimulus	GO:0050896	1,238	649	569	1,357	770	708
Single-organism metabolic process	GO:0044710	964	528		1,064	652	
Response to stress	GO:0006950	712		353	811	474	447
Response to chemical	GO:0042221	675	365	313	693	415	386
Response to abiotic stimulus	GO:0009628	477			548		
Response to organic substance	GO:0010033	477		235			
Response to oxygen-containing compound	GO:1901700	412	225	197	435	263	250
Response to acid chemical	GO:0001101	329	194	167	349	225	210
Response to organic substance	GO:0010033				503		
Response to endogenous stimulus	GO:0009719		243	218			255
Organic acid metabolic process	GO:0006082		212				
Oxoacid metabolic process	GO:0043436		211				
Response to wounding	GO:0009611		75	63		75	
Secondary metabolic process	GO:0019748			109		125	123
Response to hormone	GO:0009725			205			239
Response to jasmonic acid	GO:0009753						69
Molecular Function							
Catalytic activity	GO:0003824	1,503	772		1,760	1,055	
Transporter activity	GO:0005215	315			322	200	
Oxidoreductase activity	GO:0016491	194	383	208	379	251	222
Active transmembrane transporter activity	GO:0022804	164			164	109	
Transmembrane transporter activity	GO:0022857	131	275		280	179	157
Tetrapyrrole binding	GO:0046906	77	116	67			
Iron ion binding	GO:0005506	64	65			77	73
Drug transporter activity	GO:0090484	43					30
Ion binding	GO:0043167				1,189		
Transferase activity	GO:0016740				770		
Transcription factor activity, sequence-specific	GO:0003700				406		222
DNA binding							
Secondary active transmembrane transporter activity	GO:0015291		115	65	121	79	80
Heme binding	GO:0020037		67	72		77	
Monooxygenase activity	GO:0004497		57	59			66
Oxygen binding	GO:0019825		44	50			
Dioxygenase activity	GO:0051213		32				
Drug transmembrane transporter activity	GO:0015238			40			29
Cellular Component							
Intracellular	GO:0005622	2,115					
Cytoplasm	GO:0005737	1,365					
Membrane	GO:0016020	1,345			1,467	828	699
Intrinsic component of membrane	GO:0031224	957			1,065	607	524
Integral component of membrane	GO:0016021	914			1,034	592	511
Cell periphery	GO:0071944	630	292		668	387	
Plasma membrane	GO:0005886	514			553		
Vacuole	GO:0005773	233	138	105		161	120
Cell wall	GO:0005618		85				
External encapsulating structure	GO:0030312		85				
Endoplasmic reticulum lumen	GO:0005788		13				
Anthranilate synthase complex	GO:0005950		6			6	6
ER body	GO:0010168		6	6			
Integral component of plasma membrane	GO:0005887					49	41
Apoplast	GO:0048046			51			
Extracellular space	GO:0005615			24			
Lytic vacuole	GO:0000323						13
CCAAT-binding factor complex	GO:0016602						7

Table 4 GO enrichment results of down-regulated differentially expressed genes by MeJA treatment (FDR<0.05)

GO terms	GO ID	TO1000DH3			Early big		
		12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
Biological Process							
Single-organism process	GO:0044699	1,417			1,591		
Response to stimulus	GO:0050896	864			942		
Regulation of transcription, DNA-templated	GO:0006355	409					
Organic cyclic compound metabolic process	GO:1901360				807		
Heterocycle metabolic process	GO:0046483				763		
Heterocycle biosynthetic process	GO:0018130				519		
Response to abiotic stimulus	GO:0009628				351		
Response to organic substance	GO:0010033				350		203
Photosynthesis	GO:0015979				71	78	
Plastid organization	GO:0009657				70		
Carbon fixation	GO:0015977				17		
Nucleic acid metabolic process	GO:0090304		273	234			
RNA metabolic process	GO:0016070		245	207			
Cellular component biogenesis	GO:0044085		124				
Ribosome biogenesis	GO:0042254		73			143	86
ncRNA metabolic process	GO:0034660		60				
rRNA metabolic process	GO:0016072		48				
Ribosomal large subunit biogenesis	GO:0042273		19				
Organonitrogen compound biosynthetic process	GO:1901566					336	214
Amide biosynthetic process	GO:0043604					254	
Translation	GO:0006412					249	158
Peptide biosynthetic process	GO:0043043					249	158
Nucleobase-containing compound metabolic process	GO:0006139			248			
Transcription, DNA-templated	GO:0006351			156			
Cell cycle	GO:0007049			49			
Response to endogenous stimulus	GO:0009719						182
Response to hormone	GO:0009725						172
Cell cycle process	GO:0022402			40			
RNA biosynthetic process	GO:0032774			158			
Nucleobase-containing compound biosynthetic process	GO:0034654			169			
Response to chemical	GO:0042221						249
Nucleic acid-templated transcription	GO:0097659			158			
Mitotic cell cycle process	GO:1903047			28			
Molecular Function							
Protein binding	GO:0005515	896			987		
Ion binding	GO:0043167	845					
DNA binding	GO:0003677	410		149	390		
Transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	GO:0003700	306		105	283		
Molecular transducer activity	GO:0060089	76					
Signal transducer activity	GO:0004871	68					
ADP binding	GO:0043531	44					
Catalytic activity	GO:0003824				1,339		
Protein dimerization activity	GO:0046983		55		117		
Transferase activity, transferring one-carbon groups	GO:0016741		38		81		
Single-stranded RNA binding	GO:0003727				23		
Structural constituent of ribosome	GO:0003735		63			206	139
rRNA binding	GO:0019843		20			74	49
snoRNA binding	GO:0030515		12			9	

Table 4 GO enrichment results of down-regulated differentially expressed genes by MeJA treatment (FDR<0.05) (Continued)

GO terms	GO ID	TO1000DH3			Early big		
		12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
RNA binding	GO:0003723					202	
Unfolded protein binding	GO:0051082					22	
Large ribosomal subunit rRNA binding	GO:0070180					10	7
Poly-pyrimidine tract binding	GO:0008187					9	
Poly(U) RNA binding	GO:0008266					9	
C-22 sterol desaturase activity	GO:0000249					4	
Motor activity	GO:0003774			14			
Copper ion binding	GO:0005507						34
Microtubule binding	GO:0008017			15			
Cytoskeletal protein binding	GO:0008092			23			
Tubulin binding	GO:0015631			16			
Antioxidant activity	GO:0016209						22
Xyloglucan:xyloglucosyl transferase activity	GO:0016762						11
Ribulose-bisphosphate carboxylase activity	GO:0016984						4
Xyloglucan endotransglucosylase activity	GO:0080039						4
Cellular Component							
Intracellular	GO:0005622	1,495					
Organelle	GO:0043226	1,302					
Intracellular organelle	GO:0043229	1,300					
Membrane-bounded organelle	GO:0043227	1,250			1,617		
Nucleus	GO:0005634	654		244			
Plasma membrane	GO:0005886	389					
Plastid	GO:0009536				590	559	
Chloroplast	GO:0009507				577	546	
Plastid stroma	GO:0009532				229		
Chloroplast stroma	GO:0009570				218	217	
Intracellular non-membrane-bounded organelle	GO:0043232		169				
Non-membrane-bound organelle	GO:0043228		169				219
Ribonucleoprotein complex	GO:0030529		102				181
Ribosome biogenesis	GO:0042254		73				
Nucleolus	GO:0005730		70				
Cytosolic part	GO:0044445		58			173	132
Cytosolic ribosome	GO:0022626		57			173	131
Ribosomal subunit	GO:0044391		55			170	
Large ribosomal subunit	GO:0015934		43				
Cytosolic large ribosomal subunit	GO:0022625		36				66
Ribosome	GO:0005840					226	157
Thylakoid	GO:0009579					202	
Intracellular non-membrane-bounded organelle	GO:0043232						219
Cytoskeletal part	GO:0044430			24			
Cytosolic small ribosomal subunit	GO:0022627						46
Kinesin complex	GO:0005871			11			

계 함량이 증가하거나 감소한 샘플에서 MeJA 처리 전보다 발현이 2배 이상 증가 또는 감소하는 전사체를 선발하였다 (Fig. 3). MeJA에 의해 glucobrassicin, neoglucobrassicin 함량과 연관되어 발현이 2배 이상 증가한 434개의 전사체는 secondary metabolic process (GO:0019748), glucosinolate metabolic process (GO:0019760), response to wounding (GO:0009611) 및 response to jasmonic acid (GO:0009753)에 enrichment되었다. 특히 인돌릭 글루코시놀레이트 생합성과 관련된 *MYB34* (Bo7g098110),

IGMT2 (Bo8g070650), *CYP81D1* (Bo6g056440), *CYP81D4* (Bo7g118500), *CYP81F4* (Bo1g004730, Bo01007s020), *CYP81G1* (Bo4g154660), *CYP83B1* (Bo8g024390) 및 *CYP91A2* (Bo1g003710)가 MeJA에 의해 발현이 TO1000DH3와 Early big에서 모두 증가하였다. 산화를 통해 핵심구조 (core structure)를 형성하는 Cytochrome P450 (*CYP*)는 heme을 prosthetic group으로 갖는 superfamily 효소군으로 환경 자극이나 외부 물질에 대해 산화 대사 작용을 수행하는 필수 촉매 효소로 알려져 있다

TO1000DH			Early big			No. transcripts	Correlated glucosinolates	Enriched GO terms
12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h			
>2 fold up	>2 fold up	>2 fold up	>2 fold up	>2 fold up	>2 fold up	434	Glucobrassicin, Neoglucobrassicin	Secondary metabolic process (GO:0019748) Glucosinolate metabolic process (GO:0019760) Response to wounding (GO:0009611) Response to jasmonic acid (GO:0009753)
>2 fold down	>2 fold down	>2 fold down	>2 fold down	>2 fold down	>2 fold down	10		Intracellular signal transduction (GO:0035556) Phosphorelay signal transduction system (GO:0000160) Cytokinin-activated signaling pathway (GO:0071368)
	>2 fold up			>2 fold up	>2 fold up	808	4-methoxyglucobrassicin	Secondary metabolic process (GO:0019748) Response to chemical (GO:0042221) Response to acid chemical (GO:0001101)
	>2 fold down			>2 fold down	>2 fold down	218		Response to hormone (GO:0009725) Response to endogenous stimulus (GO:0009719) Cytokinin-activated signaling pathway (GO:0009736) Carbon fixation (GO:0015977)
		>2 fold up				166	Gluconapin	Regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051171) Regulation of shoot system development (GO:0048831) Transcription factor activity (GO:0003700)
		>2 fold down				395		Cell division (GO:0051301) Nuclear division (GO:0000280) Mitotic cell cycle process (GO:1903047) Protein-disulfide reductase activity (GO:0047134)
>2 fold up	>2 fold up	>2 fold up	>2 fold up		>2 fold up	28	Sinigrin	Phosphorelay signal transduction system (GO:0000160) Ethylene-activated signaling pathway (GO:0009873) Calcium ion binding (GO:0005509)
>2 fold down	>2 fold down	>2 fold down	>2 fold down		>2 fold down	6		Single organism signaling (GO:0044700) Cell communication (GO:0007154) Protein binding (GO:0005515)
>2 fold up		>2 fold up				76	Progoitrin	Glyphosate metabolic process (GO:0018920) 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase activity (GO:0003866)
>2 fold down		>2 fold down				175		Cell cycle (GO:0007049) Nucleic acid metabolic process (GO:0090304) Nuclear division (GO:0000280) Maintenance of inflorescence meristem identity (GO:0010077) Organelle fission (GO:0048285) Organic cyclic compound metabolic process (GO:1901360) Meiotic chromosome segregation (GO:0045132) Protein dimerization activity (GO:0046983)

Fig. 3 GO enrichment of DEGs correlated with glucosinolate content changes following MeJA treatment (FDR<0.05). GO term enrichments were analyzed using the Plant Transcriptional Regulatory Map (<http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/go.php>)

(Schlichting et al., 2000). *BrCYP79F1*은 청색광과 적색광에 노출된 배추 유묘에서 발현이 유도되었으며 글루코시놀레이트 합성을 촉진시킬 수 있다는 연구 결과가 보고되었다 (Moon et al., 2015). Glucobrassicin, neoglucobrassicin 함량과 연관되게 MeJA 처리 후 모든 샘플에서 발현이 2배 이상 감소한 전사체 10개는 intracellular signal transduction (GO:0035556), phosphorelay signal transduction system (GO:0000160) 및 cytokinin-activated signal pathway (GO:0071368)에 enrichment 되었다(Fig. 3). 4-methoxyglucobrassicin 함량이 유의하게 변한 TO1000DH3의 24시간 샘플과 Early big 24, 48시간에서 발현이 증가한 전사체 808개는 주로 chemical에 반응하는 전사체였고(GO:0042221, GO:0001101), 발현이 감소한 218개 전사체는 호르몬에 반응

하고(GO:0009725), cytokinin-activated signaling pathway (GO:0009736)에 포함되며 carbon fixation (GO:0015977)에 관련된 기능을 하였다. TO1000DH3에만 분포하는 gluconapin 함량과 관련하여 발현이 증가한 전사체 166개는 regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051171), regulation of shoot system development (GO:0048831) 및 transcription factor activity (GO:0003700)에 관련되었고, 발현이 감소한 395개 전사체는 세포분열(GO:0051301, GO:0000280, GO:1903047)과 protein-disulfide reductase activity (GO:0047134)에 enrichment 되었다. Sinigrin 함량과 관련하여 발현이 증가한 28개 전사체는 phosphorelay signal transduction system (GO:0000160), ethylene-activated signaling pathway (GO:0009873) 및 calcium ion binding (GO:0005509) 기

능을 하였고, 발현이 감소한 6개 전사체는 신호전달(GO:0044700, GO:0007154)과 protein binding (GO:0005515)에 관련되었다. Progoitrin 함량과 연관되게 발현이 증가한 76개 전사체는 gly-phosphate metabolic process (GO:0018920), 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase activity (GO:0003866)에 enrichment 하였고, 발현이 감소한 175개 전사체는 cell cycle (GO:0007049), nucleic acid metabolic process (GO:0090304), nuclear division (GO:0000280), maintenance of inflorescence meristem identity (GO:0010077), organelle fission (GO:0048285), organic cyclic compound metabolic process (GO:1901360), meiotic chromosome segregation (GO:0045132) 및 protein dimerization activity (GO:0046983) 기능에 관련되었다.

MeJA 처리에 따른 글루코시놀레이트 생합성 경로 관련 유전자 발현 profiling

TO1000DH3와 Early big에서 글루코시놀레이트 생합성 경로 관련 유전자를 선별하기 위하여 *Arabidopsis thaliana*에서 보고된 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자 110개의 염기서열의(Wang et al. 2011) ortholog 전사체 104개를 선별하였다(Fig. 4). Transcription factor 중 MeJA를 처리하기 전 MYB28의 발현양이 가장 많았고, Bo2g161590과 Bo9g014610은 TO1000DH3와 Early big에서 공통적으로 MeJA를 처리 후 12시간째 발현양이 각각 4.7배, 3.3배 감소하였고, 이후 발현양은 다시 증가하는 경향을 보였다. Bo7g098590은 반대로 MeJA 처리 후 12시간이 지나면서 TO1000DH3와 Early big에서 발현양이 1.4배, 4.1배 증가하였다. MYB29 (Bo9g175680), MYB34 (Bo2g161180, Bo2g161170, Bo7g098110, Bo9g014380), MYB51 (Bo8g067910, Bo8g104300), MYB122 (Bo6g118350), Dof1.1 (Bo8g010700, Bo8g112940)의 발현양은 MeJA 처리 후 12시간째 가장 높았다. Dof1.1 (Bo5g008360)은 TO1000DH3보다 Early big에서의 발현양이 3.4~9.0배 많이 발현하여 MeJA 처리에 의해 Early big 특이적으로 발현하는 transcription factor로 분석되었다. Side-chain elongation 기능을 하는 대부분의 전사체가 TO1000DH3와 Early big에서 공통적으로 MeJA 처리 후 12시간에 발현양이 증가하는 경향을 보였다. 그러나 BCAT3 (Bo8g078930)의 발현은 TO1000DH3에서는 MeJA 처리 후 1.6~3.4배 증가하였지만, Early big에서는 오히려 MeJA 처리에 의해 발현이 1.3~1.5배 감소하였다. Core structure formation과 관련된 전사체 다수가 MeJA 처리에 의해 발현이 증가하였고, UGT74C1 (Bo4g177540)은 Early big 특이적으로 발현하였으며 MeJA 처리 후 12시간에 8.0배 증가하였다. Side chain modification 관련된 전사체 중 AOP1, IGMT1, IGMT2, CYP81F1 및 CYP81F2의 발현은 매우 낮았다. AOP3 (Bo9g006220, Bo9g006240)는 TO1000DH3 특이적으로 MeJA 처리에 의해 발현이 증가하였고, GSL-OH (Bo4g173560, Bo4g173550, Bo4g

173530)은 Early big 특이적으로 발현하였다. Co-substrate pathway에 해당하는 전사체 대부분 MeJA 처리에 의해 발현이 증가하였으며 특히 12시간 후 발현양이 가장 높았다. Early big에서 MeJA 처리에 따라 함량 증대가 가장 컸던 glucobrassicin의 상위 유전자인 APK1 (Bo9g022580, Bo3g088400)의 발현은 MeJA 처리 후 24시간이 지나면서 TO1000DH3에서는 3.2~4.3배 증가하였고, Early big에서는 5.2~5.4배 증가하였다. 이러한 전사체의 발현양 증가는 MeJA 처리에 의한 글루코시놀레이트 함량 증가에 영향을 줄 수 있는 것으로 여겨진다. 글루코시놀레이트 분해 산물 형성과 관련된 myrosinase 중 TGG1 (Bo14804s010)은 TO1000DH3에서만 MeJA에 의해 1.1~1.5배 증가하였고, TGG4는 TO1000DH3와 Early big에서 발현양이 매우 적었다(Fig. 4). 브로콜리 새싹에서 글루코시놀레이트 breakdown product 함량과 myrosinase의 발현양이 연관되어 있음이 보고되었고(Gao et al. 2014), *Arabidopsis thaliana*에서 ABA와 MeJA signaling에 의해 크게 증가한 TGG1의 발현양이 공변세포 조절과 관련되었음이 보고되었다(Zhao et al. 2008; Islam et al. 2009). 본 실험 결과 양배추에서 메틸사메노이트 처리에 의해 증가한 글루코시놀레이트 함량과 myrosinase 발현양 변화가 관련되어 있음을 생각해볼 수 있다. Epithioester protein 중 NIT1 (Bo2g013450), PEN3 (Bo6g079920), ESM1 (Bo5g130540) 및 MVP1 (Bo6g050840)은 MeJA 처리에 의해 TO1000DH3와 Early big에서 공통적으로 발현이 증가하였다(Fig. 4). 유묘기 TO1000DH3와 Early big에서 공통적으로 MeJA 처리에 의해 글루코시놀레이트 함량이 증가한 결과(Fig. 1)와 마찬가지로, 대부분의 글루코시놀레이트 생합성 경로 관련 전사체의 발현 또한 MeJA 처리에 따라 증가하는 경향을 보였다. Transcription factor 중 MYB29, TFL2, Dof1.1은 MeJA 처리 후 발현이 증가하였고, MYB28, MYB51은 감소하였으며, MYB34, MYB122는 MeJA 처리 후 12시간에서 증가하였다 감소하는 패턴을 보였다. Side chain elongation, core structure formation 및 co-substrate pathway 관련 전사체들은 TO1000DH3와 Early big에서 모두 MeJA 처리 후 12시간에 발현이 증가하였다 감소되는 패턴을 보였다. Side chain modification 관련 전사체 중 FMO_{GS-OX1}, IGMT2, CYP81F4, GSL-OH는 MeJA 처리 후 12시간에서 가장 많이 증가 후 감소하였다. Myrosinase 중 TGG1은 TO1000DH3 특이적으로 발현이 증가했으며, epithioester protein 중 NIT1, MVP1은 MeJA 처리 후 12시간에서 증가하였다 감소하는 패턴을 보였다. PEN3는 12시간에서 감소 후 증가하는 경향을 보였고, ESM1은 증가하였다. 본 연구에서 전사체 분석을 통해 얻어진 유묘기 TO1000DH3와 Early big에서 MeJA 처리 시간에 따라 증가 또는 감소되는 전사체 및 글루코시놀레이트 생합성 경로 관련 전사체의 발현 및 정보는 기능성 물질 함량이 증대된 양배추 소재 개발에 기초 자료가 될 것으로 사료된다.

Fig. 4 Expression patterns of glucosinolate biosynthesis pathway transcripts in response to MeJA treatment. The heat map was generated using FPKM values of the selected transcripts. Columns represent samples from different points in time after MeJA treatment, and colors represent the expression profile

적 요

본 연구의 목적은 유묘기 TO1000DH3와 Early big에서 MeJA 처리에 의해 글루코시놀레이트 함량 변화 및 유전자의 발현 변화를 분석하기 위하여 수행되었다. 200 μ M 농도의 MeJA를 처리하여 글루코시놀레이트 함량을 분석한 결과, 글루코시놀레이트 총 함량이 처리 전보다 TO1000DH3에서 1.3~1.5배, Early big에서 1.3~3.8배 증가하였다. 알리페틱 글루코시놀레이트인 progoitrin과 gluconapin은 TO1000DH3에서만 검출되었으며, neoglucobrassicin 성분의 함량 변화가 MeJA 처리 48시간 후 TO1000DH3와 Early big에서 가장 크게 증가되었다. 전사체 분석을 통해 TO1000DH3에서는 stress나 defense 반응에 관여하거나, 생장과 관련된 전사체가 특이적으로 발현하고, Early big에서는 nucleoside 또는 ATP 생합성 관련 전사체가 특이적으로 발현하는 것을 알 수 있었다. MeJA를 처리함에 따라 발현이 2배 이상 변한 전사체를 TO1000DH3에서 12,020개, Early big에서 13,510개를 선별하여 GO 분석한 결과 stimulus, chemical에 반응하는 전사체의 발현이 공통적으로 증가하였고, single-organism 및 ribosome 합성 관련 전사체의 발현이 공통적으로 감소하였다. 특히 glucobrassicin, neoglucobrassicin 함량과 연관되어 발현이 증가한 인돌릭 글루코시놀레이트 생합성 관련 전사체의 발현이 모두 증가하였다 (*MYB34* (Bo7g098110), *IGMT2* (Bo8g070650), *CYP81D1* (Bo6g056440), *CYP81D4* (Bo7g118500), *CYP81F4* (Bo1g004730, Bo01007s020), *CYP81G1* (Bo4g154660), *CYP83B1* (Bo8g024390) 및 *CYP91A2* (Bo1g003710)). 글루코시놀레이트 생합성 경로 관련 유전자를 대표하는 전사체 104개를 선별하여 발현 양상을 분석한 결과 transcription factor에 속하는 *MYB28*, *MYB51*의 발현은 MeJA 처리 전에 비해 처리 후 발현양이 감소하였지만, 대부분의 전사체의 발현은 MeJA 처리에 의해 증가하였다. MeJA 처리에 의해 *AOP3* (Bo9g006220, Bo9g006240), *TGG1* (Bo14804s010)는 TO1000DH3에서만 특이적으로 발현이 증가하였고, *Dof1.1* (Bo5g008360), *UGT74C1* (Bo4g177540), *GSL-OH* (Bo4g173560, Bo4g173550, Bo4g173530)는 Early big 특이적으로 발현이 증가하였다. MeJA 처리 전 두 계통에서 발현이 가장 높은 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자는 *GSTU20*이었고, MeJA 처리에 의해 12시간 후 TO1000DH3에서 *CYP79B2* (Bo7g118840), Early big에서는 *CYP79B3* (Bo4g149550)의 발현이 가장 많이 증가하였다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부 Golden Seed 프로젝트(213007-05-1-SB610)와 한국생명공학연구원 연구사업의 지원에 의해 수행되었다.

References

- Baenas N, García-Viguera C, Moreno DA (2014) Biotic elicitors effectively increase the glucosinolates content in *Brassicaceae* sprouts. *J Agric Food Chem* 62:1881–1889
- Belser C, Istace B, Denis E, Dubarry M, Baurens FC, Falentin C, Genete M, Berrabah W, Chèvre AM, Delourme R, Deniot G, Denoeud F, Duffé P, Engelen S, Lemainque A, Manzanares-Dauleux M, Martin G, Morice J, Noel B, Vekemans X, D'Hont A, Rousseau-Gueutin M, Barbe V, Cruaud C, Wincker P, Aury JM (2018) Chromosome-scale assemblies of plant genomes using nanopore long reads and optical maps. *Nat Plants* 4:879–887
- Bhandari SR, Jo JS, Lee JG (2015) Comparison of glucosinolate profiles in different tissues of nine *Brassica* crops. *Molecules* 20:15827–15841
- Cartea ME, Velasco P, Obregón S, Padilla G, Haro A (2008) Seasonal variation in glucosinolate content in *Brassica oleracea* crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry* 69:403–410
- Cheong JJ, Choi YD (2003) Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet* 19:409–413
- Choi DW, Jung JD, Ha YI, Park HW, In DS, Chung HJ (2005) Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites. *Plant Cell Rep* 23:557–566
- Choi YH, Park KY, Lee SM, Yoo MA, Lee WH (1995) Inhibitory effect of the fresh juice of kale on the genotoxicity of aflatoxin B1. *Korean J Genetic* 17:183–190
- Clarke DB (2010) Glucosinolates, structures and analysis in food. *Anal Methods* 2:310–325
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085–1097
- Fahey JW, Zalcman AT, Talalay P (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5–51
- Gao J, Yu X, Ma F, Li J (2014) RNA-seq analysis of transcriptome and glucosinolate metabolism in seeds and sprouts of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *PLoS One* 9(2): e88804
- Goncalves ÁLM, Lemos M, Niero R, Andrade SF, Maistro EL (2012) Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. in different cells of mice. *J Ethnopharmacol* 143:740–745
- Gutjahr C, Riemann M, Müller A, Dücking P, Weiler EW, Nick P (2005) Cholodny-Went revisited: a role for jasmonate in gravitropism of rice coleoptiles. *Planta* 222:575–585
- Hagen SF, Borge GIA, Solhaug KA, Bengtsson GB (2009) Effect of cold storage and harvest date on bioactive compounds in curly kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Postharvest Biol Technol* 51:36–42
- Halkier BA, Du L (1997) The biosynthesis of glucosinolates. *Trends Plant Sci* 2:425–431

- Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH (2007) Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacol Res* 55: 224–236
- Holst B, Williamson G (2004) A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat Prod Rep* 21:425–447
- Hwang ES, Hong EY, Kim GH (2012) Determination of bioactive compounds and anti-biocancer effect from extracts of Korean cabbage and cabbage. *Korean J Food Nutr* 25:259–265
- Islam MM, Tani C, Watanabe-Sugimoto M (2009) Myrosinases, TGG1 and TGG2, redundantly function in ABA and MeJA signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Cell Physiol* 50:1171–1175
- Izzah NK, Lee J, Jayakodi M, Perumal S, Jin M, Park BS, Ahn K, Yang TJ (2014) Transcriptome sequencing of two parental lines of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) and construction of an EST-based genetic map. *BMC Genomics* 15:149
- Keck AS, Finley JW (2004) Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integr Cancer Ther* 3:5–12
- Ketchum REB, Gibson DM, Croteau RB, Shuler ML (1999) The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnol Bioeng* 62:97–105
- Keum YS, Jeong WS, Kong ANT (2004) Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 555: 191–202
- Kim JA, Bae KH, Choi YE (2015) Effect of elicited by methyl jasmonate on the saponin contents of *Codonopsis lanceolate*. *J Plant Biotechnol* 42:265–270
- Kim OT, Bang KH, Kim YC, Hyu DY, Kim MY (2009) Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 98:25–33
- Kim OT, Bang KH, Shin YS, Lee MJ, Jung SJ, Hyun DY, Kim YC, Seong NS, Cha SW (2007) Enhanced production of asiaticoside from hairy root cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell Rep* 26:1941–1949
- Kim YS, Hahn EJ, Murthy HN, Paek KY (2004) Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate. *Biotechnol Lett* 26:1619–1622
- Kim YS, Milner JA (2005) Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention. *J Nutr Biochem* 16:65–73
- Kim YW, Jung HJ, Park JI, Hur Y, Nou IS (2014) Response of NBS encoding resistance genes linked to both heat and fungal stress in *Brassica oleracea*. *Plant Physiol Biochem* 86:130–136
- Kowalsky SP, Lan TH, Feldmann KA, Paterson AH (1994) Comparative mapping of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*. *G3* 138:499–510
- Kukurba KR, Montgomery SB (2015) RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc* 11:951–969
- Lee SM, Rhee SH, Park KY (1997) Antimutagenic effect of various cruciferous vegetables in salmonella assaying system. *J Food Hyg Saf* 12:321–327
- Li Y, Zhang T, Korkaya H, Liu S, Lee HF, Newman B, Yu Y, Clouthier SG, Schwartz SJ, Wicha MS, Sun D (2010) Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 16:2580–2590
- Li Z, Liu Y, Li L, Fang Z, Yang L, Zhuang M, Zhang Y, Lv H (2019) Transcriptome reveals the gene expression patterns of sulforaphane metabolism in broccoli florets. *PLoS ONE* 14(3): e0213902
- Lim HS (2002) The study for contents of sinigrin in dolsan leaf mustard kimchi during fermentation periods. *Korean J Life Sci* 12:523–527
- Liu S, Liu Y, Yang X, Tong C, Edwards D, Parkin IAP, Zhao M, Ma J, Yu J, Huang S, Wang X, Wang J, Lu K, Fang Z, Bancroft I, Yang TJ, Hu Q, Wang X, Yue Z, Li H, Yang L, Wu J, Zhou Q, Wang W, King GJ, Pires JC, Lu C, Wu Z, Sampath P, Wang Z, Guo H, Pan S, Yang L, Min J, Zhang D, Jin D, Li W, Belcram H, Tu J, Guan M, Qi C, Du D, Li J, Jiang L, Batley J, Sharpe AG, Park BS, Cheng PRF, Waminal NE, Huang Y, Dong C, Wang L, Li J, Hu Z, Zhuang M, Huang Y, Huang J, Shi J, Mei D, Liu J, Lee TH, Wang J, Jin H, Li Z, Li X, Zhang J, Xiao L, Zhou Y, Liu Z, Liu X, Qin R, Tang X, Liu W, Wang Y, Zhang Y, Lee J, Kim HH, Denoeud F, Xu X, Liang X, Hua W, Wang X, Wang J, Chalhoub B, Paterson AH (2014) The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nat Commun* 5:3930
- Moon J, Jeong MJ, Lee SI, Lee JG, Hwang H, Yu J, Kim YR, Park SW, Kim JA (2015) Effect of LED mixed light conditions on the glucosinolate pathway in *Brassica rapa*. *J Plant Biotechnol* 42:245–256
- Parkin IAP, Koh C, Tang H, Robinson SJ, Kagale S, Clarke WE, Town CD, Nixon J, Krishnakumar V, Bidwell SL, Denoeud F, Belcram H, Links MG, Just J, Clarke C, Bender T, Huebert T, Mason AS, Pires JC, Barker G, Moore J, Walley PG, Manoli S, Batley J, Edwards D, Nelson MN, Wang X, Paterson AH, King G, Bancroft I, Chalhoub B, Sharpe AG (2014) Transcriptome and methylome profiling reveals relics of genome dominance in the mesopolyploid *Brassica oleracea*. *Genome Biol* 15:R77
- Poiroux-Gonord F, Bidel LP, Fanciullino AL, Gautier H, Lauri-Lopez F, Urban L (2010) Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *J Agr Food Chem* 58:12065–12082
- Rajashekar CB, Carey EE, Zhao X, Oh MM (2009) Health-promoting phytochemicals in fruits and vegetables: Impact of abiotic stresses and crop production practices. *Functional Plant Sci Biotechnol* 3:30–38
- Rangkadilok N, Nicolas ME, Bennett RN, Eagling DR, Premier RR, Taylor PW (2004) The effect of sulfur fertilizer on glucoraphanin levels in broccoli (*B. oleracea* L. var. *italica*) at different growth stages. *J Agric Food Chem* 52: 2632–2639
- Robin AHK, Yi GE, Laila R, Yang K, Park JI, Kim HR, Nou IS (2016) Expression profiling of glucosinolate biosynthetic

- genes in *Brassica oleracea* L. var. *capitata* inbred lines reveals their association with glucosinolate content. *Molecules* 21: 787–805
- Schlichting I, Berendzen J, Chu K, Stock AM, Maves SA, Benson DE, Sweet RM, Ringe D, Petsko GA, Sligar SG (2000) The catalytic pathway of cytochrome P450cam at atomic resolution. *Science* 287:1615–1622
- Schreiner M (2005) Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *European J Nutr* 44:85–94
- Soto A, Ruiz KB, Ziosi V, Costa G, Torrigiani P (2012) Ethylene and auxin biosynthesis and signaling are impaired by methyl jasmonate leading to a transient slowing down of ripening in peach fruit. *J Plant Physiol* 169:1858–1865
- Sun B, Liu N, Zhao Y, Yan H, Wang Q (2011) Variation of glucosinolates in three edible parts of Chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey) varieties. *Food Chem* 124:941–947
- Wang H, Wu J, Sun S, Liu B, Cheng F, Sun R, Wang X (2011) Glucosinolate biosynthetic genes in *Brassica rapa*. *Gene* 487:135–142
- Xing M, Lv H, Ma J, Xu D, Li H, Yang L, Kang J, Wang X, Fang Z (2016) Transcriptome profiling of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* in Cabbage (*Brassica oleracea*) roots. *PLoS One* 11(2):e0148048
- Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y (1996) Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and ba-catin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat Biotechnol* 14:1129–1132
- Zhang Y, Talalay P (1994) Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: Chemistry and mechanisms. *Cancer Res* 54: 1976–1981
- Zhang Z, Ober JA, Kliebenstein DJ (2006) The gene controlling the quantitative trait locus epithiospecifier modifier1 alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:1524–1536
- Zhao Z, Zhang W, Stanley BA, Assmann SM (2008) Functional proteomics of *Arabidopsis thaliana* guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. *Plant Cell* 20:3210–3226