식물조직배양학회지 제25권 제5호
Korean J. Plant Tissue Culture
Vol. 25, No. 5, 323~327 (1998)

형질 전환된 페튜니아 식물체에서의 Flavonoid 3',5' -Hydroxylase 유전자의 분석

김영희
상명대학교 원예과학과

Analysis of Flavonoid 3', 5' -Hydroxylase Gene in Transgenic Petunia (*Petunia hybrida*) Plants

KIM, Young Hee
Department of Horticultural Science, Sangmyung University, Chonan 330-180, Korea.

The flavonoid biosynthetic pathway has been studied as a genetic model system, particularly in *Petunia hybrida*. In order to study the flavonoid biosynthetic pathway, we constructed a fusion gene system between Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter and eggplant flavonoid 3',5' -hydroxylase in pBI 121 plasmid. An optimal condition for plant regeneration was observed when internode explants were cultured on MS medium supplemented with IAA 0.2 mg/L plus BA 3 mg/L. For plant transformation internode explants of *Petunia hybrida* were precultured on BM medium supplemented with IAA 0.2 mg/L plus BA 3 mg/L. Putative transgenic plants were selected on medium containing kanamycin 50 mg/L plus cefotaxim 300 mg/L. Putative selected transformants were confirmed by amplification of selectable marker gene (*npt*II) by polymerase chain reaction (PCR) and Southern hybridization of flavonoid 3',5' -hydroxylase gene.

Key words: CaMV, transformation, PCR, Southern

Bioflavonoid는 유관속식물의 액포에 축적되는 2차 대사물질로써 flavones, flavanones, flavonols, 그리고 안토시아닌 등으로 분류되며 flavones과 flavanones 그리고 flavonol은 꽃색소에 간접적으로 영향을 미치며 안토시아닌은 꽃색깔에 직접적으로 영향을 미친다. 안토시아닌은 식물의 꽃, 잎, 줄기 등에 분포하며 식물에서 여러 다양한 기능을 가지고 있으므로 중요하다. 예로써 꽃잎에서의 안토시아닌의 합성은 pollinator를 유혹하고(Holton, 1995), 과일과 열매에서는 씨가 퍼질 수 있도록 도와주는 역할을 한다. 특히 완두 꽃색깔에 대한 멘델의 유전학연구가 시작된 이래 많은 다른 종류의 식물에서 색소생산에 대한 유전학과 생화학에 대한 연구가 활발하게 진행되었다. 식물에 있어서 꽃색깔은 안토시아닌의 다양성에 의해서 형성되는데 pelargonidin은 오렌지 색깔을 주고, cyanidin은 붉은 색깔을, delphinidin은 보라색을 준다. 실제로 꽃 색깔은 식물체내의 많은 다른 성분에 의존하는데 예를 들면 안토시아닌 화합물들 사이의 비라든가, pH, 카로티노이드와 같은 다른 성분들이 copigment로 작용한다(Hahlbrock, 1981). Anthocyanin을 함유하고 있는 꽃잎 세포내의 pH는 4-5 이하이므로 특별한 경우를 제외하고는 추출액 그대로 농축하거나 결정 상을 얻는 것은 거의 불가능하며 picrate나 chloride 등을 결합시켜 안정된 색소를 얻는다(Sun et al., 1996). 안토시아닌 생합성에 관련된 생화학 경로는 체계화되어 있는데(Mol et al., 1989: Forkmann, 1991), 유전학적으로 정의된 많은 돌연변이의 특징들이 이러한 경로에 대한 순서를 가능하게 하였는데 어떤 반응들은 유전학 연구의 기초 위에 가능하였지만 실험적으로는 아직 증명되지 않았다. 이들의 경로에 기여한 식물들은 주로 옥수수(*Zea mays*), snapdragon(*Antirrhinum majus*), 페튜니아(*Petunia hybrida*)들인데 이들은 서로 공통된 점을 가지고 있지만 이들 형태 중에서도 약간의 다른 차이점들이

있다. 이러한 식물들은 또한 안토시아닌 생합성에 관련된 유전자와 생합성을 조절하는 유전자를 분리하는데 중요하다. 페튜니아에서는 최근에 안토시아닌 생합성에 관련된 유전자들이 분리되어 이들의 관계와 조절현상을 연구하는 선택된 유기체가 되었다. 페튜니아에서는 적어도 35개의 유전자가 화색에 영향을 미친다고 알려져 있고(Wiering and de Vlaming, 1984), 이러한 성분과 연관하여 최근의 식물유전공학의 발달로 안토시아닌 생합성에 관련된 유전인자들이 분리되어 기능들이 연구되고 있다. 최근에 페튜니아로부터 cytochrome P-450 유전자로 알려진 flavonoid 3',5'-hydroxylase 유전자가 cloning되었고(Holton et al., 1993), 또한 3',5'-hydroxylation의 활성을 갖는 flavonoid 3',5'-hydroxylase 단백질도 분리되었다(Menting et al., 1994a: Menting et al., 1994b). 또한 용담(*Gentiana triflora*)으로부터 flavonoid 3',5'-hydroxylase(F3',5'H) cDNA가 일본의 Tanaka 등(1996)에 의해서 분리되었다. 본 연구에서는 가지에서 분리된 F3',5'H cDNA(Toguri, 1993)를 CaMV 35S promoter의 통제하에 삽입하여 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 페츄니아로 형질 전환시켜, 페튜니아의 절간을 통한 형질전환의 최적조건을 택하여 형질전환식물체에서 F3',5'H 유전자의 발현정도를 분석하였다.

재료 및 방법

형질전환 식물재료

하얀 색의 페튜니아(SAKATA 종묘, 일본) 종자를 흥농종묘로부터 구입하여 95%의 에탄올에 30초 동안 침지시킨 뒤, 2% sodium hypochlorite 용액에 15분간 소독하여 멸균수로 3번 씻어 준 다음 MS배지에 치상하였다. 치상 일주일 뒤 발아가 되었고, 5주 정도된 식물체를 취해 실험 재료로 사용하였다. 지속적인 번식을 위해 4주 간격으로 계대배양을 실시하였다. 생육 조건은 24°C±1°C, 16명/8암, 4,000 Lux로 하였다.

유전자의 조작 및 선발법

가지로부터 분리된 1.7kb의 F3',5'H cDNA를 식물체 속으로의 도입을 위하여 binary vector pBI121으로 subcloning하였다. pBI121으로의 F3',5'H cDNA를 직접 삽입하기에는 적당한 효소자리가 없어 pUC18의 *Bam*HI과 *Kpn*I자리로 1차 cloning을 한 pYB3을 만들었다(Figure 1). pYB3로부터 F3',5'H를 포함하는 1.7kb의 DNA단편을 *Xba*I과 *Sac*I 제한효소로 분리하여 pBI121 binary vector를 같은 효소로 2.0 kilobase(kb)의 GUS gene을 삭제한 후 CaMV 35S promoter의 통제하에 삽입시켜 전체크기 12.5kb의 pYB4 plasmid를 얻었다(Stratagene ligation kit). 유전자의 도입여부를 확인하기 위하여 *Hin*dIII 제한효소를 사용하여 F3',5'H 유전자의 삽입을 확인하였다.

F3',5'H 유전자의 형질전환 및 재분화

F3',5'H유전자를 포함하고 있는 binary vector인 pYB4를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 freezing-thawing 방법에 의하여 형질 전환하였다(An et al., 1988). 형질 전환된 *Agrobacterium tumefaciens*를 kanamycin이 50 mg/L가 첨가된 YN media에 넣고 28°C, 220rpm에서 밤새도록 배양하였다. 기내에 도입된 페츄니아의 절간을 약 0.5-1 cm 크기로 잘라 재분화 배지(BM+IAA 0.2 mg/L, BA 3 mg/L)에 preculture하였다(Ledger et al., 1991). BM배지는 MS salts 4.3 g, thiamine-HCl 0.4 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L(pH 7.5)이다. 다음날 접종물 500 μL를 preculture된 절편체의 media에 첨가한다. 이것을 28°C 암조건에서 하룻밤 놓아둔 후 재분화 용액으로 씻어 준 다음 멸균된 여과지 사이에 접종된 절편 체를 넣어 습기를 제거한 후, carbenicillin 500 mg/L이 첨가된 재분화 배지에 치상하였다. 일주일 후 선발배지(BM+IAA 0.2 mg/L, BA 3 mg/L, kn 50 mg/L, cefotaxim 300 mg/L)로 옮겼다. 생육환경은 25°C, 16명/8암조건을 주었다.

PCR 분석과 Southern hybridization

PCR분석을 위해 *npt*II 유전자로부터 유도된 두 개의 특이적 oligonucleotide를 primer로 합성하였다. 5' primer(5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3')와 3' primer (5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3')는 각각 *npt*II 유전자의 201-222와 879-900에 위치해 있다(Beck et al., 1982). PCR 시료조성은 Taq DNA polymerase 5 units와 2 μL의 10x buffer, 1 μL의 2.5 mM dNTP, 100 pM primer, 50ng genomic DNA를 포함하는 총 20 μL로 수행하였다. PCR은 94°C에서 pre-denature 45초, 55°C에서 primer의 annealing 30초, 72°C에서 elongation 10초, 94°C에서 denaturing 15초, 72°C에서 post-elongation 10초의 조건으로 45회 돌렸다. PCR후, sample을 분석하기 위해 4°C로 유지시켰고 1.5% agarose gel에 전기영동을 실시하였다. PCR로 분석된 식물체는 2주 후 Southern blot 분석(Rogers et al., 1988)을 하기 위하여 2 ug의 식물의 잎을 액체질소를 사용하여 분리한 후 *Bam*HI과 *Kpn*I으로 절단하여 전기영동하였다. 전기영동된 DNA를 nitrocellulose membrane(Biorad)에 옮긴 후 F3',5'H유전자를 pYB4 plasmid로 부터 *Bam*HI과 *Kpn*I을 사용하여 1.7kb fragment를 분리한 후 ^{32}P-dCTP를 사용하여 probe로 사용하였다(Maniatis et al., 1989).

결과 및 고찰

Binary vector construction

형질전환을 위한 유전자 조작으로 가지로부터 분리된 F3',5' H유전자 1.7kb를 일본의 Kirin Brewery 회사의 중앙연구소에 있는 Toguri박사(1993)로부터 분주받아 kanamycin 저항성을 가지고 있는 binary벡터 pBI121(12.8kb)으로 삽입하였다(Figure 1). 사용된 pBI121 vector는 kanamycin 저항성 유전자를 지니고 있어 형질전환체를 검정할 때 PCR 분석을 실시하였고, 외부유전자의 도입여부를 Southern 분석을 실시하여 좀 더 명확히 증명할 수 있었다(Jefferson, 1987).

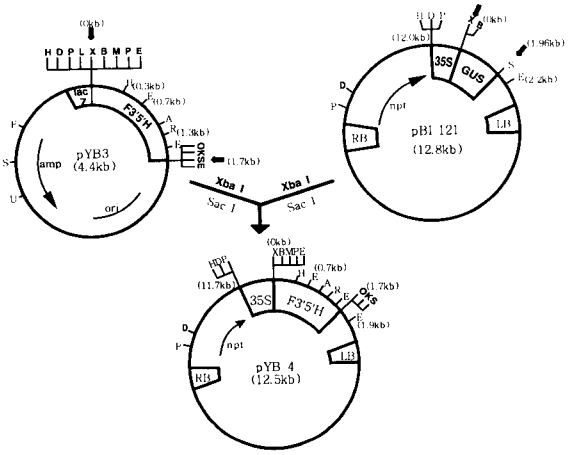
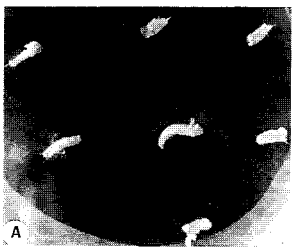


Figure 1. Insertion of Flavonoid 3',5'-Hydroxylase gene into binary vector pBI121 (pYB4). pBI121 was digested with *Sac*I and *Xba*I, and ligated with F3',5'-hydroxylase gene from pYB3. A:*Apa*I, B:*Bam*HI, D:*Sph*I, E:*Eco*RI, F:*Ssp*I, *Hin*dIII, *Kpn*I, *Sal*I, M:*Sma*I, O:*Xho*I, P:*Pst*I, R:*Eco*RV, S:*Sac* I, U:*Pvu*I, *Xba*I

형질전환과 재분화

1.7kb의 F3',5' H cDNA가 삽입된 변형된 pBI121인 pYB4를 *Agrobacterium tumefaciens*을 이용하여 페튜니아의 절간의 상처부위를 통해 감염시켰다. 효과적인 형질전환체의 선발을 위해 MS 기본배지(Murashige and Skoog, 1962)를 토대로 비타민 조성이 다른 BM(basal medium) 배지를 사용하였다. BM배지는 절간을 이용하여 형질전환체를 얻을 수 있는 효과적인 배지로 *Agrobacterium tumefaciens*를 접종하기 전에 절간을 preculture하면 바로 접종하는 것보다 상당한 효과를 준다(Ledger et al., 1991). 페튜니아의 절간으로부터 신초를 재분화하기 위하여 사용한 BM배지는 NAA 0.2 mg/L, BA 1.0 mg/L를 포함하고 있을 때 최적효과를 보여 주었고 2-3주 후 접종된 절편체에서 신초형성을 볼 수 있었고 65%이상의 신초형성율을 보여 주었다(Figure 2-A,



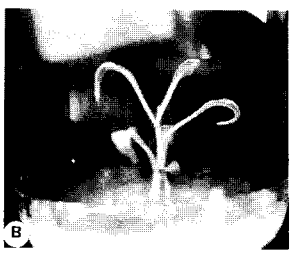


Figure 2. Shoot induction from transformed internodes of *Petunia hybrida*. A: shoot formation from internodes on regeneration medium containing 500 mg/L carbenicillin after cultivation for 2 to 3 weeks. B: 1.5 cm height shoot formation on regeneration medium containing 500 mg/L carbenicillin and 50 mg/L kanamycin after cultivation for 1 month

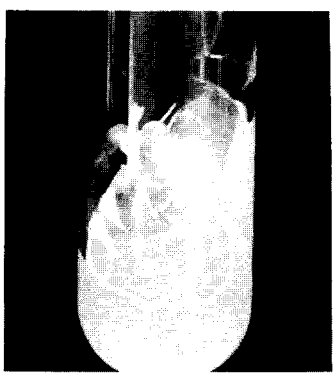


Figure 3. Root formation of transgenic plant. Transgenic plants cultured on hormone free MS medium containing 100 mg/L kanamycin.

B). 그리고, 발생된 신초로부터 뿌리를 유도하기 위해 생장조절제가 없는 MS 배지로 옮겨 뿌리를 유도하였더니 신초형성 3-4주 후 뿌리가 발달하였다. 페튜니아의 형질전환체를 캘루스를 이용하여 유도하였을 때 신초들의 많은 수가 형질전환체가 아니라는 보고(Chung et al., 1992: Aeom et al., 1996)와 일치하게도 kanamycin을 포함하는 MS 배지에서 유도된 신초들이 형질전환체가 아님을 발견하였다. Kanamycin을 함유하는 신선한 MS배지에서 선발된 형질전환식물체로부터 뿌리를 유도한(Figure 3)후 3주 후 순화시키는 과정에서 형질전환체가 환경에 잘 적응하지 못하는 현상을 관찰하였다.

형질전환체의 검정

Kanamycin 100 mg/L이 첨가된 배지에서 선발된 페튜니아의 잎조직으로부터 외부로부터 도입한 F3',5' H유전자와 *npt*II 유전자가 식물의 genome속으로 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 PCR 분석을 수행하였다. PCR은 기내에서 specific DNA를 증폭할 수 있으므로 두개의 *npt*II 유전자 특유의 primer들을 이용한 PCR에 의해 증폭된 DNA의 band는 3번, 6번, 8번을 제외한 lane들에서 *npt*II유전자

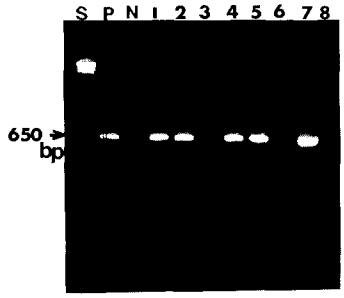


Figure 4. Electrophoregram of amplified *npt*II genes by PCR from leaves of transgenic plants with *npt*II primers. Lanes S: standard λ*Hin*dIII molecular marker, P:pBI121(Positive control), N: non-transgenic plant 1-8:transgenic plants.

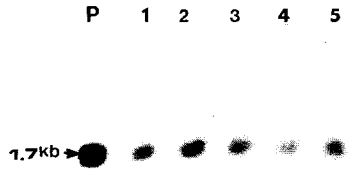


Figure 5. Southern blot hybridization. Leaves of transgenic plants were used to isolate genomic DNA ,and digested with *Bam*HI and *Kpn*I restriction endonucleases. Digested DNA was electrophoresised on agarose gel and transferred to nylon membrane and hybridized with 1.7kb F3',5'H probe labelled with ^{32}P-dCTP. P:pYB4 plasmid was digested with *Bam*HI and *Kpn*I(Positive control), lanes 1-5 are transgenic plants from PCR analysis of 1,2,4,5 and 7 of Figure 4.

(650bp)의 존재를 확인할 수 있었다 (Figure 4). 정상식물체(N)인 non-transformant에서는 kanamycin저항성 유전자인 *npt*II 유전자의 PCR product가 발견되지 않았다. PCR에 의하여 분석된 5개의 개체를 외부유전자인 F3',5' H 유전자가 식물의 게놈 속으로 안정하게 삽입되었는지 확인하기 위하여 수행한 Southern hybridization 분석에서 PCR에서 확인된 개체 모두에서 F3',5' H 유전자의 삽입을 확인할 수 있었다 (Figure 5). 이 결과는 positive control인 pYB4를 절단하여 얻은 1.7kb DNA 크기(Figure 5의 P)와 일치한다.

적 요

페튜니아에서의 안토시아닌 생합성 경로는 하나의 중요한 유전적인 모델시스템으로 연구되어 왔다. 본 연구에서는 이 경로에 대한 유전자를 연구하기 위하여 CaMV 35S promoter와 가지로부터 분리된 flavonoid 3',5' -hydroxylase cDNA를 pBI121 플라스미드에서 fusion gene 시스템을 만들었다. 형질전환된 페튜니아를 얻기 위한 최적조건이 페튜니아 절간을 IAA 0.2 mg/mL, BA 3 mg/mL를 혼용한 MS배지에서 얻었다. 효과적인 형질전환을 위하여 페튜니아 절간을 IAA 0.2 mg/L와 BA 3 mg/L를 혼용한 BM배지에서 *Agrobacterium tumefaciens*를 접종하기 전에 절편체를 preculture하였다. 형질전환체는 50 mg/L kanamycin과 cefotaxim 300 mg/L을 포함하는 배지에서 선발하였다. PCR과 Southern hybridization분석에 의하여 형질전환체를 검증하였다.

사사 - 이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 자유공모과제(01-D-0563)연구비에 의하여 지원되었고, 1995년도 농림수산부의 특정연구과제 연구비에 의해 부분적으로 지원되었습니다.

인 용 문 헌

Aeom SI, Park SK, Lim YP, Lee CH, Kim HJ, Kim HR, Lee HY (1996) Development of Bialaphos-Resistant *Petunia hybrida* by Introduction of the bar Gene Using *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J Plant Tissue Culture **23**:177-181

An G, Ebert P, Mitra A, Ha S (1988) Binary vectors. In Plant Mol. Biol. Manual. Kluwer Academic Pub **A3**:1195-1203

Beck E, Ludwig G, Averswaqld EA, Reiss B, Schaller H (1982) Nucleotide sequence and exact localization of the neomycinphosphotransferase from transposon Tn5. Gene **19**:327-336

Chung JD, Kim CK, Kwon MY, Jee SO (1992) Putative GUS(β-glucuronidase) gene transfer into *Petunia hybrida* using *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J Plant Tissue Cult **19**:7-11

Forkman G (1991) Flavonoids as flower pigments: The formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. Plant Breeding **106**:1-26

Hahlbrock K (1981) Flavonoids. In: Stumpf, P. K. and Conn, E. E. (eds) The Biochemistry of Plants vol 7. Academic Press, New York, pp 425-456

Holton TA, Brugilera F, Leste DR, Tanaka T, Hyland CD, Menting JGT, Yi CY, Farcy E, Stevenson TW, Cornish EC (1993) Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. Nature **366**:276-279

Holton TA, Cornish EC (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. The Plant Cell **7**:1071-1083

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO J **6**:3901-3907

Ledger SE, Deroles SC, Given NK (1991) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. Plant Cell Reports **10**:195-199

Maniatis T, Fritisch EF, Sambrook J (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press pp 1.38-1.39

Menting JGT, Edwina C, Scopers RK (1994) Purification and partial

characterization of NADPH-cytochrome c reductase from *Petunia hybrida* flowers. Plant Physiol **106**:643-650

Menting JGT, Scopes RK, Strevenson TW (1994) Characterization of flavonoid 3',5'-hydroxylase in microsomal membrane fraction of *Petunia hybrida* flowers. Plant Physiol **106**:633-642

Mol J, Stuitje A, van der Krol A, Jorgensen, R (1989) Saying it with genes: Molecular flower breeding. Trends Biotechno **17**:148-153

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant **15**:473-496

Rogers SO, Bendich AJ (1988) Extraction of DNA from plant tissue. In Plant Molecular Biology manual A6/1-10, ed, Kluwer Academic Publisher. Dordrecht

Sun J, Chung J (1996) Useful compositions and characterization of higher plants. In Recent Biological Engineering, Plant part II, Chung JD, eds(Gyungbuk National Univ Press) pp 285-321

Tanaka Y, Yonekura K, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Fujiwara H, Ashikari T, Kusumi T (1996) Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora*. Plant Cell Physiol **37**:711-716

(1998년 6월 20일 접수)