

Stock(*Matthiola incana* R. Br.)으로부터 색소유전자의 분리 및 분석

민병환* · 김석원 · 오승철¹ · 유장렬¹

한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자원센터, ¹식물세포 및 분자생물학연구그룹

Cloning and Characterization of Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) from *Matthiola incana* R. Br.

MIN, Byung Whan* · KIM, Suk Weon · OH, Seung Cheol¹ · LIU, Jang Ryol¹

Genetic Resources Center, ¹Plant Cell and Molecular Biology R. U., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
KIST, Taejeon, 305-333, Korea. *Corresponding author

In this paper we describe the cloning and expression of the genes encoding the flavonoid-biosynthetic enzyme dihydroflavonol 4-reductase (DFR) in *Matthiola incana* R. Br. A heterologous cDNA probe from *Zea mays* was used to isolate full-size DFR cDNA clone from a corolla-specific cDNA library. Comparison of the coding region of this DFR cDNA sequence including the sequences of *Zea mays*, *Anthirrinum majus*, *Petunia hybrida*, *Callistephus chinensis*, *Dianthus caryophyllus* and *Rosa hybrida* reveals a identity higher than 61% at the nucleotide level. The DFR transcript is G/C rich in monocotyledonous plants show a strong codon bias preferring codons with a G or C in the third position. The function of this nucleotide sequences were verified by comparison with amino acid sequences of the amino-terminus and tryptic peptides from purified plant enzyme, by northern blotting with mRNA from wild type and mutant plants and by *in vitro* expression yielding an enzymatically active reductase. Genomic southern blot analysis showed the presence of one gene for DFR in *Matthiola incana*. Northern blot analysis of the DFR wild type and mutant lines showed that the lack of DFR activity in the stable acyanic mutant k17b is clearly by a transcriptional block of the DFR gene.

Key words : cDNA, sequence, codon, expression, mutant

꽃과 과일을 비롯한 여러 식물체의 화려한 색소는 이미 유전학자, 화학자 및 생화학자들의 관심의 대상이 되었으며 최근에 와서는 식물분자생물학의 발전에 따라 분자생물학자들의 연구대상으로 부각되고 있다. 아울러 지난 10여년간에는 계속적인 화훼시장에서의 수요의 증가에 따라 생산의 양적인 증가와 더불어 질적인 면에서 다양성을 추구하는 화훼육종의 필요성이 더욱 절실하며 이 분야의 선구자적인 위치에 있는 네덜란드의 화훼산업은 지속적인 발전을 하고 있다(Mol et al., 1989). 근래의 세계적인 동향을 살펴보면 전통적인 육종방법에 DNA재조합기술과 유전자전이 및 조직배양기술이 가미되어 새롭고 다양한 화색(花色)의 창출을 유도하는 효과적인 방법으로 각광을 받고 있으며 실제로 1987년에 독일 Max-Planck 식물육종학연구소의 Meyer그룹은 페튜니아에 옥수수의 A1유전자를 전이시켜 지구상에 존재하지않는 주홍색을 만들었다는 보고가 있고(Meyer et

al., 1987), 네덜란드 자유대학의 Mol그룹은 안토시아닌 생합성과정의 첫 번째 효소인 chalcone syntase (CHS) 유전자를 antisense로 전이시켜 역시 페튜니아의 다양한 색소변화를 관찰한 바 있다(Krol et al., 1988). 그러나 이러한 보고는 아직 기초적인 단계로써 색소유전자의 전이를 통하여 색소발현을 유도하는 가능성을 시사하였으며 최근에 와서는 다양한 색소유전자의 cloning과 inbreed line의 확보를 통하여 화훼산업의 발전에 새로운 장을 열었다.

일반적으로 자연계에 존재하는 색소는 크게 세종류 즉 flavonoids, carotenoids 그리고 betalains로 나눌 수 있으며 이들은 화학적인 구조상으로 차이를 나타내고 있고 상호간의 색소들이 서로 섞여서 다양한 색소발현을 나타내고 있다. 이 중 flavonoids는 꽃의 색소 중 가장 보편적이고 광범위하게 분포되어 있으며 그 결과 유전학적, 화학적 그리고 생화학적으로 가장 많이 연구되어 있다(Harborne 1988). 이러한

기초연구의 결과를 토대로 근래에는 색소유전자를 model system 으로 활용하여 유전자발현과 조절기작의 연구에 큰 공헌을 하였다.

안토시아닌 생합성의 중요한 중간기질인 dihydroflavonol로부터 flavan-3,4-diols로의 효소활성에 대한 연구는 *Pseudotsuga* 세포배양으로부터 분리한 효소로부터 최초로 행하여 졌고 (Stafford and Lester, 1982), Heller 등(1985)에 의하여 *Matthiola incana* 의 흰꽃의 돌연변이종을 연구한 결과 dihydroflavonol 4-reductase (DFR)이 안토시아닌 생합성에 관여 한다고 보고하였다. Dihydroflavonol 4-reductase는 dihydroflavonol로부터 flavan-3,4-diols로의 stereospecific reduction을 NADPH를 조효소로 사용하여 촉매하며 이미 꽃으로부터 DFR을 추출하여 효소활성에 대한 실험은 *Matthiola incana* 이외에도 *Callistephus chinensis* (Ruhnau and Forkmann, 1988), *Petunia hybrida* (Forkmann and Ruhnau, 1987) *Dahlia hybrida* (Fisher et al., 1988) 그리고 *Dianthus caryophyllus* (Stich et al., 1992) 등이 보고된 바 있다.

분자생물학적 접근을 위한 DFR 유전자의 분리에 대한 보고는 *Zea mays* (O' Reilly et al., 1985), *Antirrhinum majus* (Martin et al., 1985), *Petunia hybrida* (Beld et al., 1989), *Hordeum vulgare* (Kristiansen and Rohde 1991), *Arabidopsis thaliana* (Schirley et al., 1992), *Gerbera hybrida* (Helaruutta et al., 1993), *Lycopersicon esculentum* (Bongue-Bartelsman et al., 1994), *Rosa hybrida* (Tanaka et al., 1995), *Callistephus chinensis* (Min et al., 1995) *Dianthus caryophyllus* (Min et al., 1995) 등이 있다.

본 실험에 사용된 식물체인 stock은 다양한 색소발현과 진한향기를 가진 고급초화로서 선진국에서는 이미 꽃시장의 상당부분을 점유하고 있으며 이에 대한 생화학 및 유전학적 기초연구결과도 보고된 바 있다(Forkmann, 1977: Forkmann et al., 1980: Heller et al., 1985). 본 실험에서는 stock의 inbreed line에 색소유전자를 전이하여 새로운 색소 발현체계를 가진 품종을 육종하기 위하여 stock의 꽃봉오리로부터 mRNA를 분리하여 cDNA-library를 만들고 이 library로부터 DFR유전자를 cloning하였으며 염기서열분석을 통하여 그들의 염기서열을 분석하였고 나아가 분리유전자의 다양한 발현에 대한 실험을 수행하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

식물재료의 확보

Stock의 inbreed line k01, k17b, k18b, k19b, k24, k25 그리고 k28 등은 독일 뮌헨공과대학의 Forkmann 박사로부터 종자를 받아 기내에서 발아시켜 환경에 순화시킨 후 온실 (생명

공학연구소)에서 재배하였으며 각 조직별로 수확하여 바로 액체질소로 냉동 후 -70°C에 저장하여 필요에 따라 사용하였다(Figure 1).

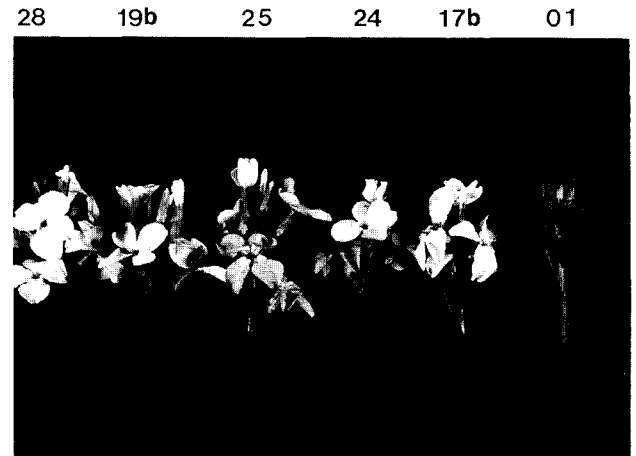


Figure 1. Wildtype and different mutant lines of *Matthiola incana*

mRNA의 분리 및 cDNA-library의 합성

10g의 stock의 꽃봉오리로부터 guanidine hydrochloride 방법(Logemann et al., 1987)을 변형하여 total RNA를 분리하였고 이 total RNA로부터 mRNA를 분리하기 위하여 oligo-dT-cellulose column (Sigma)을 사용하였고 bufferA (10mM Tris-HCl pH7.4, 0.4M NaCl, 0.2% SDS) 와 bufferB (10mM Tris-HCl pH7.4, 0.1M NaCl, 0.2% SDS)로 씻어준 후 분리하였다. 분리된 mRNA의 순도를 측정하기 위하여 UV-spectrophotometer를 통하여 확인하였다(Sambrook et al., 1989).

cDNA-library를 합성하기 위하여 Pharmacia (미국) 회사 제품인 cDNA-library 합성 kit를 사용하여 cDNA를 합성하고 이 ds-cDNA는 Lambda-ZAP II vector 에 삽입시킨 후 재조합시켰으며 재조합 된 Lambda-Zap II는 곧 바로 in vitro packaging (Stratagene)과 amplification을 통하여 cDNA-library를 완성하였다.

꽃잎 cDNA-library로부터 DFR 유전자의 screening

옥수수의 DFR 유전자인 A1 유전자를 probe로 사용하여 분리할 유전자를 가장 효과적으로 분리하기 위해 labelling 효과가 높은 *rediprime* labelling kit(Amersham)를 사용하였고 hybridization은 일반적인 방법에 의하여 수행하였다(Sambrook et al., 1989).

cDNA의 염기서열 분석

염기서열분석을 위하여 먼저 DFR유전자를 plasmid pUC19에 subcloning하여 Pharmacia의 T7 sequencing kit와 Nested deletion kit를 사용하였다.

유전자의 기내발현

분리한 stock의 DFR유전자가 목적했던 유전자임을 확인하기 위하여 분리유전자를 template로 T7 RNA polymerase를 사용하여 기내에서 transcription시키고 [³⁵S]-methionine (Amersham)을 사용한 reticulocyte lysate system (Promega)에 의해 translation시켜 기내발현을 수행하였다.

Genomic DNA의 분리 및 Southern blot 분석

유전자의 분석을 위하여 Stock의 어린꽃잎으로부터 Manning (1991)의 방법을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 stock의 DNA를 제한효소 *Bgl*III와 *Eco*RI으로 각각 절단한 후 0.8% agarose gel에 전기영동하고 이를 nylon membrane (Hybond-N, Amersham)으로 옮긴 후 stock의 DFR cDNA를 probe로 이용하여 Southern blot hybridization을 실행하였다 (Southern, 1975).

Northern blot 분석

Northern blot hybridization을 위해서는 서로다른 야생주와 돌연변이식물체의 어린 꽃봉오리로부터 total RNA의 추출은 Logemann 등(1987)의 방법에 준하여 하였으며 전기영동은 1.2% formaldehyde agarose gel상에서 수행하였고, Sambrook 등(1989)의 방법에 준하여 DFR cDNA의 1.5 kb 절편을 ³²P로 labeling하여 probe로 사용하였다. Hybridization은 50% formamide, 5 X SSC, 0.05M phosphate buffer, Denhardt's solution을 이용하여 42°C에서 수행하였다.

결과 및 고찰

DFR 유전자의 분리 및 염기서열 분석

10g의 꽃봉오리로부터 guanidium chloride방법을 사용하여 total RNA를 분리한 결과 4.841 mg을 얻었고 1차 oligo-dT-cellulose column을 통하여 38 µg의 mRNA를 얻었으며 2차 column을 통과한 후 15 µg의 순수한 mRNA를 분석하였다. 이 중 5 µg의 mRNA를 cDNA-library의 합성에 사용하였다. 합성된 cDNA-library로부터 옥수수의 DFR-cDNA(A1-gene)를 probe로 하여 screening하여 본 결과 6개의 positive

clone을 분리하였고 이것으로부터 phage-DNA를 분리하여 *Eco*RI으로 처리해 본 결과 6개 clone 모두 1.2kb-1.5kb 크기의 insert를 가지고 있었다. 이 clone들을 A1-gene을 probe로 Southern blot 분석을 통해 검정해 본 결과 모두 DFR유전자임을 확인하였다.

분리한 6개의 서로 다른 크기의 DFR유전자를 각각 M1-M6로 명명하였고 vector pUC19에 cloning하여 염기서열분석을 수행한 결과 1.5kb 크기의 clone M6만이 full size clone임을 확인하였다. 염기서열 분석 결과를 보면 stock의 DFR유전자는 1450 bp이며 이 중 coding region은 1029bp였고 343 amino acid를 인지하였다. 또 이 유전자는 133bp의 leader sequence와 288bp의 trailer sequence를 갖고있었다(Figure 2).

```

1  TAAACTTTAATACACCAGGGTGTGTTTCTACTTTTCATTTATTAACCTTGGAGTTCAGTGTATGTTACCATAAATAAGTAGTATATATATGGAA
101  ACTTCTCTTGAAATGTGAGGAAAGGAGATGATGCTTCTCCACAGAGACCGTGTGGTAAACCGGGCGTGGGATTCATTCCTCATATGCTACTGCTAGTGA
    M V A R R E T V C V T G A S G F I G S W L V M
201  TGGGATTCAGTGAACCGGCTACTTTTGTGGCCACGACCGTAAATTTGAGAAAGTCAGCAGCTCTTGTGACTGCCAACGGCAGAC
    R L L E R G Y F V R A T V R E P G N L K K V Q H L L D L P N A K T
301  GCAACTCAGCTTTATGGAAGCGCGATTTATCTGAGAGGGAAGTATGATGACCGCTAAAGCGTGGAGCGATTTTCCAGTGGCACTCCATGAT
    Q L T L W K A D L S D E G S Y D D A V N G C D G I F H V A T P M D
401  TTTGAAACAAGGATCTGAGAAATGAGTTATAAAACCCAGAGTGAATGAGTCTGGGATATGAAAGCCCTGTGTTAAGACAAAACCGTTCGGAGA
    F E S K D P E N E V I K P T V N G V L G J M K A C V K T K T V S E S
501  GTCAATTTCTGCTGCTGAGACATTCAGATGTTGAGAACATCAGAAAGATGATATGATGACAAAAATGGAGTATCTGAGTTATCATCTCCAA
    Q L S S L A G T F N V E E H Q K N V Y D E Q N W S D L E F I I S K
601  GAGATGACTGGATGATGATTTCTGTGAAAAGCTTAGGGAGAAAGCAGCATGGATATGCGAAAAGAAACCGAATGATTTCTGATGATCAT
    K M T G W M Y F L S K T L A E K A A R D Y A K E N G I D F I S I J
701  CCAAGTGTGGTATGATGATCAATTCATACACATCTATGCGGCTAGCCCTCATCAGCCGGCTCTCTCTATCATCTGAAAGCGAGCAGATATGATGATCA
    P T L V I G P F I T T S M P P S L I T G L S P I T R N E A H Y S I I
801  TAAGCCAGGACAGTATGTGCATTTGGACGCTTATGCAATGCTCATATAATCTGTGACAGCAAGTCGACGAGGGGGTATGGTTTCTCTCTCA
    R Q G D Y V H L D D L C N A H I E L Y E Q A A A K G R Y V C S S H
901  CGATGGCAGCTTTTACCATCTCTAAAATCTCAGGCCAAAAGTACCCAGAAATATAAGTGTGCTTCAAGCTTTGAGGTGTGGATGAGAACTAAAAGT
    D A T I L T I S K I L R Q K Y P E Y N V P S T F E G V D E N L K S
1001  GTTGTGTTTCAAGGACCTGATGAGATGGGATTTAACTTCAAGTGTACTAGAGACATGACCTGGAAATCTATGAGACTTGTGTGGAAGG
    V F F S S R K L I E M G F N F K Y V L E D M Y V E S I E T C R K R G
1101  GTTTTCTGAGTGTGAGAACAAAGTCCAGCTAGTGTGACAGCGAGCAAAAGCTTAGCTGGATTAAGTGTGCTACGATGCTGTGAGAGAC
    F L P V S E N K G P T S D D S E H K T
1201  AGAAGAGAAACCGATCTGCAATGGCCACAGCAGATGTGCTTGAATAATGAAACCCCTACTCTTTCATGCTGTGCTATGTTGTGTATCGGTTACT
1301  GTTTGAGGTGTGATGTTGGTGGCTTGGCTTCTCTTTTCTTTTCTTTTATCATAAATATATATATATGAGAACCGTATGAGCGTTTATGATGATTTGGA
1401  TGTGAGTGAACAGTATCACTTTCATATATAAGAACCAGAGTGTG
  
```

Figure 2. Nucleotide and predicted amino-acid sequence of DFR-cDNA clone from *Matthiola incana*. The start (ATG) and stop (TGA) codons are underlined.

Start codon과 stop codon을 살펴보면 start codon은 ATAATGG로 Kozak (1984, 1986)이 발표한 식물체의 고유의 codon과 일치하며 ATG의 -3위치에 purin염기가 나타났다. Stop codon의 경우에 있어서 옥수수와 보리와 같은 외자엽식물의 DFR유전자는 TAA로 끝나는데 반하여 stock의 경우에는 TGA를 stop codon으로 갖고있었다. 이들 유전자의 염기서열의 일치성을 *Antirrhinum majus* (Martin et al., 1985), *Zea mays* (O' Reilly et al., 1985), *Petunia hybrida* (Beld et al., 1989), *Hordeum vulgare* (Kristiansen and Rohde, 1991), *Gerbera hybrida* (Helariutta et al., 1993), *Callistephus chinensis* (Min et al., 1995), *Dianthus caryophyllus* (Min et al., 1995) 등의 DFR유전자의 coding region과 비교해 보면 nucleotide level에서는 각각 67%, 61%, 66%, 61%, 67%, 67%, 66%를 나타내었고 amino acid level에서도 역시 같은 수치의 유사도를 나타내었다. 이러한 수치에서 보듯 외자엽 식물에서 보다 같은 쌍자엽식물에서 5%-6%정도 높게 나타

났다. 유사한 결과는 다른 색소유전자인 CHS의 염기서열분석에서도 보고된 바 있으며(Niesbach-Kl sgen et al., 1987) 식물분류학이나 진화학적 측면에 큰 의미가 있다고 사료된다.

DFR유전자의 G/C 함량 분석

분리한 stock의 DFR cDNA의 coding region의 염기배열을 분석하여 G와 C의 함량을 조사한 결과 44.5%를 나타내었고 이것은 이미 밝혀진 다른 쌍자엽식물의 DFR 유전자와 유사한 수치(41.5%-45.1%)를 보였으며, 외자엽식물인 옥수수(65.2%)와 보리(64.0%)에 비해 현저하게 낮은 함량을 보였다. 이러한 차이는 특히 세 번째 codon의 G/C 함량에 있어서 더욱 확실하여 쌍자엽식물의 경우는 40.8%-48.5%의 함량을 보인 반면 외자엽식물인 보리와 옥수수의 경우는 각각 89.3%, 89.4%의 높은 함량을 나타내었다.

비슷한 결과는 anthocyanin 합성의 중요한 유전자 중의 하나인 chalcone synthase(CHS)의 경우에도 나타나게 되는데 stock의 CHS(Epping et al., 1990) 유전자의 G/C 함량은 56.1% 로 다른 쌍자엽식물이 43.8%-53.9%에 비해 높은 편이나 역시 외자엽식물인 보리(65.7%), 옥수수(69.3%)에 비해 낮은 수치를 보였으며 세 번째 codon의 G/C 함량은 stock의 경우 68.8%인 반면 보리(Rohde et al., 1987)와 옥수수(Niesbach-kl sgen et al., 1987)는 각각 92.7%, 97.7%의 높은 함량을 나타내었다.

유전자의 기내 발현

분리한 유전자의 발현을 증명하기 위하여 먼저 유전자를 Bluescript KS⁺ vector에 sense와 antisense방향으로 cloning 한 후 T7-RNA-Polymerase와 T3-RNA-Polymerase를 이용하여 transcription시키고 생성된 mRNA를 다시 reticulocyte system과 [³⁵S]-Methionine labelling을 이용하여 translation을 유도한 후 생성된 protein을 SDS-PAGE를 통해 확인해 본 결과 분리한 DFR유전자와 같은 42-44kDa 크기의 protein을 확인하였으며 (Figure 3), negative control로 사용한 antisense 방향에서는 protein이 합성되지 않았다.

분리유전자의 Southern blot 분석

분리한 stock의 DFR 유전자가 genome에 얼마나 존재하는지 확인하기 위하여 Southern blot 분석을 수행하였다. 여섯종류의 서로 다른 야생주와 돌연변이주의 꽃잎으로부터 DNA를 분리한 후 제한효소인 EcoRI과 BgIII로 처리하여 자르고 DFR cDNA를 probe로 hybridization을 해 본 결과 모든 lane에 동일한 크기와 강도를 가진 한 개의 band를 보였다. Figure 4 에서 보는 바와 같이 제한효소 EcoRI 과 BgIII 로 자른 경우 각각 3.8kb, 4.8kb 크기의 band를 나타낸

으로써 stock의 DFR 유전자는 genome 내에 오직 한 개가 존재한다는 것을 알 수 있다. Beld 등(1989)의 보고에 의하면 *Petunia hybrida*의 경우 적어도 8개의 CHS유전자와 2개의 CHI(chalcone flavanone isomerase)유전자가 존재하며 DFR유전자는 3개의 copy를 보였으나 실제로 오직 하나의 유전자 DFR-A 만이 DFR 기능을 가지고 있음을 증명하였고 *Rosa hybrida* (Tanaka et al., 1995)의 경우 많은 copy 수를 확인하였으나 재료식물 자체가 inbreed line이 아니며 tetraploid 식물이기 때문에 정확한 copy 수를 단정하기 힘들다는 어려움이 있고 *Gerbera hybrida* (Helariutta et al., 1993)의 genome에는 다양한 수의 DFR 유전자가 존재함이 보고 되었으나, 그 외 *Antirrhinum majus* (Martin et al., 1985), *Zea mays* (Schwarz-Sommer et al., 1987), *Hordeum vulgare* (Kristiansen and Rohde, 1991), *Arabidopsis thaliana* (Shirley et al., 1992)와 *Lycopersicon esculentum* (Bongue-Bartelsman et al., 1994) 등의 식물의 genome에는 단지 하나의 DFR 유전자가 있음이 보고되었다.

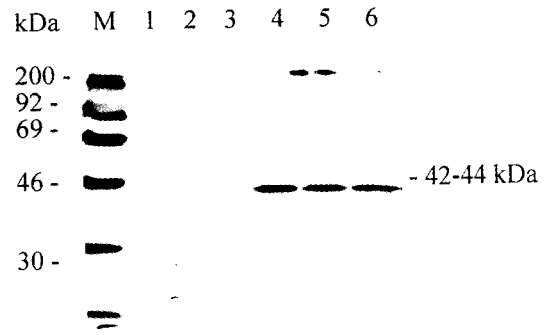


Figure 3. In vitro expression of DFR cDNA clone of *Matthiola incana*. M: [¹⁴C]-methylated markerprotein 1,2,3: Antisense mRNA as negative control 4,5,6: sense mRNA

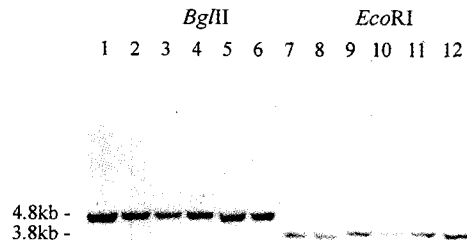


Figure 4. Southern blot analysis of different wild type lines of *Matthiola incana*. Probed with the 1.5kb DFR cDNA. The genomic DNA was digested by BgIII (lane 1-6) and EcoRI (lane 7-12).

서로 다른 stock line 의 Northern blot 분석

Stock에 있어서 생화학적검정을 거쳐 이미 유전적으로 정의되어 있는 6개의 line 즉 k01, k17b, k19b, k24, k25, k28을 확인하기 위하여 앞의 실험에서 분리한 stock의 DFR유전자를 probe로 Northern blot 분석을 수행하였다. Figure 5에서 보는 바와 같이 야생주인 line k01은 1.4kb크기의 강한 signal을 보였고 돌연변이 line인 k19b 역시 강한 signal을 보인 반면 line k17b는 mRNA단체에서 아무런 signal을 보이지 않았다. 두 line k24와 k25는 약한 signal이 나타났고 line k28은 line k17b와 마찬가지로 아무런 signal을 보이지 않았다. 이러한 결과로 분석해 본 결과 line k17b는 DFR유전자가 blocking 되어 안토시아닌을 합성하지 못하므로 하얀색의 꽃을 보이며 line k19b의 경우 역시 안토시아닌을 합성하지 못하나 DFR이 아닌 다른 유전자의 blocking을 추측할 수 있었다. Heller 등(1985)의 보고에 의하면 stock에 있어서 안토시아닌합성에 관여하는 4개의 서로 다른 locus (*E/e*, *F/f*, *G/g'*/*g*, *Z/z*)가 존재하며, 유전자 *F*는 CHS의 활성화에 관여하며 유전자 *E*는 DFR의 활성화에 연관성이 있음을 시사하였으나 유전자 *G*와 *Z*의 역할에 대해서는 밝혀지지 않았다. 다만 이 실험에서 line k24, k25 그리고 k28은 DFR유전자는 이상이 없으나 line k24와 k25는 약간의 안토시아닌을 생성하여 밝은 보라색의 꽃을 보이며 line k28의 경우는 유전자 *E*를 갖고 있음에도 불구하고 하얀꽃을 보이므로 DFR유전자의 활성화에 관여하는 유전자 *E*가 유전자 *G*와 *Z*에 의해 조절됨을 추측할 수 있었다.

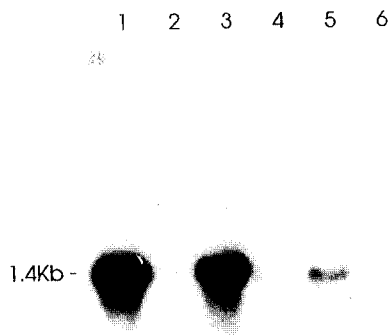


Figure 5. Northern blot analysis of poly(A⁺)RNA from the wildtype and stable mutants of *Matthiola incana*. 2 μ g poly(A⁺)RNA per lane was hybridized to the [³²P]-labelled full-length DFR cDNA of *Matthiola incana*. lane 1: 01, lane 2: 17b, lane 3: 19b, lane 4: 24, lane 5: 25, lane 6: 28

적 요

색소유전자의 전이를 통하여 새로운 색소발현체계를 가진 품종을 육종하기 위한 기초연구로 stock (*Matthiola incana* R. Br.)의 꽃봉오리로부터 cDNA-library를 합성하였고 screening을 통하여 anthocyanin 합성경로의 중요효소의 하나인 DFR (dihydroflavonol 4-reductase) 유전자를 분리하였다. 염기서열분석을 수행하여 분리유전자의 크기가 1450 bp이며 이 중 coding region은 1029 bp임을 확인하였다. 이미 밝혀진 다른 식물체의 DFR 유전자와 서로 염기서열의 일치성을 비교해 본 결과 외자엽식물인 옥수수와 보리와는 각각 61%를 보였으며, 쌍자엽식물인 페튜니아, 금어초, 거베라, 과꽃 그리고 카네이션 등 과는 66%-67%의 일치성을 나타내었다. 아울러 염기서열의 G/C 함량분석을 통하여 쌍자엽식물의 G/C 함량은 외자엽식물의 그것에 비해 매우 낮은 수치를 나타내었다. 분리유전자의 발현을 확인하기 위하여 인위적으로 기내에서의 전사와 해석을 수행한 결과 42-44 kd 크기의 단백질을 확인하였다. Southern blot 분석의 결과 DFR 유전자는 stock의 genome에 다른 대부분의 식물체와 유사하게 한 개가 존재하며 야생종과 돌연변이종의 stock을 분리 DFR 유전자를 probe로 Northern blot 분석을 수행하여 돌연변이종인 lineK17b가 DFR 돌연변이임을 확인하였다.

시사 - 본 연구는 충북대학교 첨단원예기술연구개발센터의 연구비 지원에 의해 수행된 연구 결과의 일부임

인용 문헌

- Beld M, Martin C, Huits H, Stuitje AR, Gerats AGM (1989) Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol 4-reductase genes. *Plant Mol Biol* 13: 491-502
- Bongue-Bartelman M, O' Neill SD, Tong Y, Yoder JI (1994) Characterization of the dihydroflavonol-reductase gene in tomato. *Gene* 138: 153-157
- Epping B, Kittel M, Ruhnau B, Hemleben V (1990) Isolation and sequence analysis of a chalcone synthase cDNA of *Matthiola incana* R. Br. (*Brassicaceae*). *Plant Mol Biol* 14: 1061-1063
- Fisher D, Stich K, Britsch L, Grisebach H (1988) Purification and characterization of (+) dihydroflavonol (3-hydroxyflavanone) 4-reductase from flower of *Dahlia varabilis*. *Arch Biochem Biophys* 264: 40-47
- Forkmann G (1977) Precursors and Genetic Control of Anthocyanin Synthesis in *Matthiola incana* R. Br. *Planta* 137:159-163
- Forkmann G, Heller W, Grisebach H (1980) Anthocyanin biosynthesis

- in flowers of *Matthiola incana*. Flavanone 3--and flavonoid 3'-hydroxylases. *Z Naturforsch* **35c**: 691-695
- Forkmann G, Ruhnau B** (1987) Distinct substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase from flowers of *Petunia hybrida*. *Z Naturforsch* **42c**: 1146-1148
- Harborne JB** (1988) Flavonoid checklists. In: *The Flavonoids*. Ed. Harborne, J.B. Chapman and Hall, London
- Helariutta Y, Elomaa P, Kotilainen M, Seppänen P, Teeri TH** (1993) Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol 4-reductase and characterization of *dfi* expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae). *Plant Mol Biol* **22**: 183-193
- Heller W, Britsch L, Forkmann G, Grisebach H** (1985) Leucoanthocyanidines as intermediates in anthocyanidin biosynthesis in flower of *Matthiola incana* R. Br. *Planta* **163**: 191-193
- Kozak M** (1984) Complication and analysis of sequence upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* **12**: 857-872
- Kozak M** (1986) Pointmutations define a sequence flanking the AUG initiation codons that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283-292
- Kristiansen KN, Rohde W** (1991) Structure of the *Hordeum vulgare* gene encoding dihydroflavonol 4-reductase and molecular analysis of *ant18* mutants blocked in flavonoid synthesis. *Mol Gen Genet* **230**: 49-59
- Krol AR van der, Lenting PE, Veenstra J, van der Meer IM, Koes RE, Gerats AGM, Mol JNM, Stuitje AR** (1988) An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* **333**: 866-869
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L** (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Anal Biochem* **163**: 16-20
- Manning K** (1991) Isolation of nucleic acid from plants by differential solvent precipitation. *Anal Biochem* **195**: 45-50
- Martin C, Carpenter R, Sommer H, Saedler H, Coen E** (1985) Molecular analysis of instability in flower pigmentation of *Antirrhinum majus*, following isolation of the pallida locus by transposon tagging. *EMBO J* **4**: 37-49
- Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, Saedler H** (1987) A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* **330**: 677-678
- Min BW, Sommer H, Forkmann G** (1995) *Callistephus chinensis* mRNA for dihydroflavonol 4-reductase. accession number Z67981 EMBL-library
- Min BW, Sommer H, Forkmann G** (1995) *Dianthus caryophyllus* mRNA for dihydroflavonol 4-reductase. accession number Z67983 EMBL-library
- Mol JNM, Stuitje TR, Gerats AGM, van der Krol AR, Jorgensen R** (1989) Saying it with genes: Molecular flower breeding. *Trends in Biotechnol* **7**: 148-153
- Niesbach-Klösgen U, Barzen E, Bernhardt J, Rohde W, Schwarz-Sommer Zs, Rief HJ, Wienand U, Saedler H** (1987) Chalcone synthase genes in plants: a tool to study evolutionary relationships. *J Mol Evol* **26**: 212-225
- O'Reilly C, Shephard N, Pereira A, Schwarz-Sommer Zs, Bertram I, Robertson DS, Peterson PA, Saedler H** (1985) Molecular cloning of the *a1* locus of *Zea mays* using the transposable elements En and Mu1. *EMBO J* **4**: 877
- Rohde W, Barzen E, Marocco A, Schwarz-Sommer Zs, Saedler H, Salamini F** (1987) Isolation of genes that could serve as traps for transposable elements in *Hordeum vulgare*. *Barley Genetics* **5**: 533-541
- Ruhnau B and Forkmann G** (1988) Flavan-3,4-diols in anthocyanin biosynthesis, enzymatic formation with flower extracts from *Callistephus chinensis*. *Phytochemistry* **27**: 1035-1039
- Sambrook J, Fritsch, EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, NY
- Shirley B, Hanley S, Goodman HM** (1992) Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis thaliana* transparent testa mutations. *Plant Cell* **4**: 333-347
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517
- Stafford HA, Lester HL** (1982) Enzymic and nonenzymic reduction of (+)-dihydroquercetin to its 3,4-diol. *Plant Physiol* **70**: 695-698
- Stich K, Eidenberger T, Wurst F, Forkmann G** (1992) Enzymatic conversion of dihydroflavonols to flavan-3,4-diols using flower extracts of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). *Planta* **187**: 103-108
- Tanaka Y, Fukui Y, Fukuchi-Mizutani M, Holton TA, Higgins E, Kusumi T** (1995) Molecular cloning and characterization of *Rosa hybrida* dihydroflavonol 4-reductase gene. *Plant Cell Physiol* **36**: 1023-1031