

카네이션 (*Dianthus caryophyllus*)의 색소 발현체계 분석

허설혜 · 안병준 · 정향영 · 형남인 · 민병환

Characterization of flavonoids specific gene expression in the petals of *Dianthus caryophyllus* (carnation)

Suel Hye Hur · Byung Joon Ahn · Hyang Young Joung · Nam In Hyung · Byung Whan Min

Received: 22 December 2009 / Accepted: 29 December 2009

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study aimed to develop carnation cultivars with new coloring system. We used four genes of *Petunia hybrida* - chalcone synthase (CHS), flavanone 3-hydroxylase (FHT), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), and anthocyanidin synthase (ANS) - as probes, in order to isolate four genes from carnations (*Dianthus Caryophyllus*). The isolated genes were used as probes in order to select mutants out of collected carnations, using Northern blot analysis. The Northern blot analysis revealed 10 DFR mutants - Gumbyul, Eunbyul, Ballatyne, Crystal, Eugenia, Koreno, Imp. White Sim, West Crystal, White Alpine, and White Charlotte. Six among the selected 10 cultivars were excluded from the target cultivars, because Eugenia, Imp. White Sim, and White Alpine were proved to be double mutants of DFR and ANS, Koreno was considered to be a double mutant of DFR and CHS, and Gumbyul and Ballatyne were proved to be double mutants of DFR and CHI (Chalcone isomerase). Consequently, we selected

five DFR mutants, including Virginie, which was already selected as a DFR mutant. Finally, we measured DFR activities in order to confirm the selection, and the results showed that all of the five cultivars - Eunbyul, Crystal, West Crystal, White Charlotte, and Virginie - had got no DFR activity.

서론

자연계에 존재하는 식물의 색소는 크게 플라보노이드, 카로티노이드, 베타레인으로 구분할 수 있다. 그 중 플라보노이드는 생화학, 유전학 및 분자생물학에 있어서 가장 광범위하게 연구가 되어 있고 적색, 청색 및 황색을 비롯한 모든 화색의 색소 발현에 관여를 하고 있으며 나아가 백색계통의 꽃에 있어서 그 명암에도 영향을 미치고 있다. 17세기 사람들은 이미 꽃으로부터 플라보노이드를 추출하는 방법을 알고 있었으며 본격적인 연구는 19세기 생화학적연구의 시작을 계기로 chromatography 기술과 NMR spectroscopy에 의해 발전하였다. 근래에 와서는 3500개 이상의 서로 다른 플라보노이드가 모든 식물체로부터 밝혀졌다 (Harborne, 1988). 근래의 세계적인 동향을 살펴보면 전통적인 육종방법에 DNA재조합기술과 유전자전이 및 조직배양기술이 가미되어 새롭고 다양한 화색의 창출을 유도하는 효과적인 방법으로 각광을 받고 있으며 실지로 1987년에 독일 Max-Planck 식물육종학연구소의 Meyer그룹은 페튜니아의 DFR 돌연변이체에 옥수수의 A1유전자를 전이시켜 지금까지 지구상에 존재하지 않는 pelargonidin type의 페튜니아를 만들었다는 보고가 있고 (Meyer et al. 1987), 네덜란드 자우대학의 Mol그룹은 안토시아닌 생합성과정의 첫 번째 효소인 CHS 유전자를 antisense로 전이시켜 역시 페튜니아의 다양한 색소발현

S.-H. Hur · B.-W. Min (✉)
경북대학교 생태환경대학 생태환경시스템학부
(Division of Ecological & Environmental System, Kyungpook National University)
e-mail: minbw@knu.ac.kr

B.-J. Ahn
단국대학교 생명자원과학대학 환경원예학과
(Division of Biotechnological Resources, Dan Kook University)

H.-Y. Joung
국립원예특작과학원 화훼과
(Floriculture Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science)

N.-I. Hyung
상명대학교 산업대학 식물산업공학과
(Department of Plant Science and Technology, Sang Myung University)

을 관찰한 바 있다 (Krol et al., 1988). 그러나 이러한 보고는 아직 기초적인 단계로써 색소유전자의 전이를 통하여 색소발현을 유도하는 가능성을 시사하였으며, 근래에 와서는 다양한 색소유전자의 클로닝과 계통의 확보를 통하여 화훼산업의 발전에 새로운 장을 열었다. 예를 들어 오스트레일리아의 Florigene사와 일본의 Suntory사가 카네이션에 delphinidin유도체를 도입하여 보라색의 카네이션을 개발하고 상품화 하였으며 Davies 등은 1998년에 알팔파에서 분리한 chalcone ketide reductase (CHKR) 유전자를 페튜니아에서 발현시켜 노란색의 색소발현을 유도하였다. 그러나 이러한 대사공학을 이용한 화색 변환의 궁극적인 초점은 항상 청색의 색소 발현을 하는 고급초화 즉 장미, 카네이션, 백합 그리고 국화 등에 맞추어져 있다. 청색의 화색과 delphinidin 유래 안토시아닌과의 관계는 매우 밀접하게 연관되어 있다. 대부분의 가장 경제적이고 상업적인 가치를 가진 고급초화는 delphinidin을 생성할 수 없어서 청색이 결핍되어 있다. 근래에 와서는 이러한 식물 즉 장미, 카네이션, 백합 그리고 국화 등에 flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3',5'H) 유전자를 도입하여 청색의 발현을 시도하고 있다. 그러나 delphinidin 유도의 안토시아닌이 존재한다고 해서 전부 청색의 화색을 발현하는 것은 아니다. Tulipa, Impatiens, Cyclamen, Eustoma 그리고 Pelargonium 등은 모두 dephinidin 유도물질을 생성하나 청색은 발현되지 않고 있다 (Geneve et al., 1997). 나아가 청색은 예외적이긴 하지만 delphinidin type이 아닌 식물체로부터도 나타나고 있다. 예를 들어 꽃잎의 주색소가 청색인 *Centaurea cyanus*의 경우 acylated cyanidin 3,5-diglycoside이고 Ipomoea의 푸른색 꽃잎으로부터 분리된 청색 안토시아닌은 6개의 glucose분자와 3분자의 caffeic acid가 결합된 peonidin으로 이루어져 있다 (Goto and Kondo, 1991). 그 외에도 최근에 와서는 적색의 카네이션에 유전자를 도입하여 delphinidin의 발현을 강화하고 그 결과 자주색의 카네

이션으로 변환시켰다는 보고도 있으며 (Brugliera et al., 2000), cyanidin과 delphinidin의 발현을 동시에 강화하여 흑색에 근접한 색소의 발현을 유도하였고 (Koes et al., 2000), 장미에 있어서도 대사공학을 이용한 delphinidin 색소발현의 유도로 청색에 근접한 장미의 개발에 성공했다는 보고도 있다 (Katsumoto et al., 2007). 그러나 현재 상업화되고 있는 청색 카네이션의 경우 청색이라기 보다 보라색에 가까워 상품적인 가치에 있어 소비자들의 욕구를 충족시키기에는 부족한 것은 사실이다. 이러한 원인은 cyanidin색소의 발현이 background로 나타나 cyanidin과 delphinidin의 발현이 혼합되어 보라색의 발현을 나타내는 것으로 사료된다. 이러한 문제점을 해결하고 상업성을 가진 청색의 발현을 유도하기 위해서는 색소의 생합성경로를 잘 이해하는 것이 매우 중요하다. 이러한 대사공학을 이용하여 색소의 발현을 강화시키거나 새로운 색소발현을 유도하여 원예적인 가치를 높이는 시도는 매우 의미 있는 일이라 사료된다. 본 실험에서는 카네이션에 있어서 상품성이 높은 청색의 발현을 유도하기 위하여 delphinidin의 발현을 유도하고 보라색 색소 발현의 원인이 되는 cyanidin의 발현을 억제하여 기존의 보라색이 아닌 청색의 색소발현을 위한 기초연구로써 Northern blot 분석과 효소의 활성 분석을 통하여 플라보노이드 생합성 관련 유전자가 blocking된 돌연변이체를 구명하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

식물재료의 확보

유전자원의 유전자분석을 위하여 33종의 카네이션 품종 및 계통의 꽃잎을 수집하였다 (표 1). 꽃잎은 완전 개

Table 1 List of collected carnation cultivars

Cultivar	Phenotype	Cultivar	Phenotype	Cultivar	Phenotype
Jinju	White	Daring	Red	Enged	Yellow
West alpine	White	Sanho	Dark Pink	Gumbyul	Yellow
Lena	Pink	Shingibo	Pink	Eunbyul	White
Y-Intermazzo	Yellow	Diamond	Pink	Malaga	Red
Aicardi	Pink	W-charotte	White	Koreno	Yellow
Aicardi(2)	Pink	Eugenia	White	Interme	Yellow
Imp.whitesim	White	C-Intermezzo	L- Green	Ballatyne	Yellow
Imp. White	White	Crystal	White	Peach mambo	Pink
Imp. White(2)	White	Dallas	Yellow	Ellips	White
00568-1 sp	White	Flamengo	Pink	Desio	Red
Massda	Pink	West crystal	White	Venus	Dark Pink

화된 것은 제외하고 작은 봉오리부터 개화되기 직전의 꽃잎만 수집하였고 암술과 수술을 제거한 후 액체질소에 급속 냉동한 후 -70°C 에 보관하고 필요에 따라 유전자 분석에 사용하였다. 수집을 위한 기준은 주 목적이 DFR 돌연변이체를 선별하는 것이므로 대부분 백색의 품종 및 계통을 수집하였고 대조구로 적색을 수집하였다. DFR 유전자가 blocking된 경우 화색의 발현은 백색을 나타내며 CHI 유전자가 불안정할 경우 황색이 약하게 발현될 경우도 있다. 유전자원의 수집은 국립원예특작과학원의 온실에서 선별 수집하였다.

cDNA-library의 제작 및 염기서열 분석

강한 적색 발현을 나타내는 품종인 Desio의 꽃봉오리 10 g으로부터 guanidine hydrochloride 방법을 변형하여 total RNA를 분리한 후 이 total RNA로부터 mRNA를 분리하기 위하여 oligo-dt-cellulose (Sigma)를 사용하였고 bufferA (10 mM Tris-HCl pH7.4, 0.4M NaCl, 0.2% SDS)와 bufferB (10 mM Tris-HCl pH7.4, 0.1M NaCl, 0.2% SDS)로 씻어준 후 분리하였다. 분리된 mRNA의 순도를 측정하기 위하여 UV-spectrophotometer를 통하여 확인하였다. cDNA-library를 합성하기 위하여 Pharmacia (미국) 회사 제품인 cDNA-library 합성 kit를 사용하여 cDNA를 합성하고 이 ds-cDNA는 Lambda-ZAP II vector에 삽입시킨 후 재조합시켰으며 재조합된 lambda-zap II는 곧 바로 *in vitro* packaging (Stratagene) 과 amplification을 통하여 cDNA-library를 완성하였다. 카네이션의 플라보노이드 생합성 관련 유전자의 분리를 위하여 페튜니아의 유전자를 probe로 사용하였으며 분리할 유전자를 가장 효과적으로 분리하기 위해 labelling 효과가 높은 rediprime labelling kit (Amersham)를 사용하였고 hybridization은 일반적인 방법에 의하여 수행하였다. 이러한 방법을 통하여 CHS, CHI, FHT, DFR, 그리고 ANS 유전자를 분리하였다.

Northern blot 분석

Northern blot분석을 위해서는 서로 다른 야생주와 돌연변이식물체의 어린 꽃봉오리로부터 total RNA의 추출은 Logemann 등 (1987)의 방법에 따라 하였으며 전기영동은 1.2% formaldehyde agarose gel상에서 수행하였고, Sambrook 등 (1989)의 방법에 준하여 DFR cDNA의 1.5 kb절편을 ^{32}P 로 labelling하여 probe로 사용하였다. Hybridization은 50% formamide, 5 X SSC, 0.05M phosphate buffer, Denhardt's solution 을 이용하여 42°C 에서 수행하였다.

DFR 효소 활성의 측정

DFR 효소활성 측정은 Heller (1985) 등의 방법에 의하

여 수행하였다. 기본적인 효소활성의 측정을 위해서 전체 용량을 50 μl 로 하였으며 자세한 조성은 5-50 μl 의 효소 추출액, 0.04 nM 방사성기질 ($[^{14}\text{C}]$ -dihydrokaempferol, 167 Bq), 250 nM NADPH, 2.8 mM 2-mercaptoethanol을 첨가한 0.1 M McIlvaine buffer (pH 6.8) 그리고 10% (v/v) glycerol. 등이다. 이 혼합물을 25°C 에서 30 분간 항온기에서 각각의 반응을 유도한 후 즉시 2번 (50 and 30 μl) 반복하여 ethyl acetate로 추출한 후 추출액은 Thin layer chromatography (TLC)를 통하여 분석하였고 여기에 사용된 solvent system은 chloroform/acetic acid/water (10:9:1)로 혼합하였다. TLC 위의 방사선의 정량분석은 TLC analyzer (Berthold, Germany)을 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

카네이션으로부터 flavonoids 생합성 관련 유전자의 분리

10 g의 꽃봉오리로부터 guanidium chloride방법을 사용하여 total RNA를 분리한 결과 5.821 mg을 얻었고 1차 oligo-dt-cellulose column을 통하여 52 μg 의 mRNA를 얻었으며 2차 column을 통과한 후 18 μg 의 순수한 mRNA를 분리하였다. 이 중 5 μg 의 mRNA를 cDNA-library의 합성에 사용하였다. 합성된 cDNA-library로부터 페튜니아의 CHS, FHT, DFR 그리고 ANS cDNA를 probe로 하여 screening 해 본 결과 각각 positive clone들을 분리하였고 이것으로부터 phage-DNA를 분리하여 EcoRI으로 처리하고 그 중 1.0 kb-1.5 kb 크기의 insert만 분리하였다. 이 clone 들을 벡터 pUC19 에 cloning 하여 염기서열분석을 수행한 결과 모두 full size clone임을 확인하였다.

수집한 카네이션 품종과 계통에 대한 DFR Northern 분석

본 실험에서는 궁극적으로 DFR유전자가 blocking된 계통을 선별하고 이러한 카네이션계통에 F3',5'H유전자를 도입하여 청색 발현을 유도하는 기질인 delphinidin의 함량을 증가시키는 것이 목적이므로 DFR 돌연변이체의 분리는 가장 중요한 단계이다. 이를 위해 분리한 카네이션 DFR 유전자를 probe로 사용하여 원예연구소에서 수집한 33품종 및 계통에 대한 Northern blot 분석을 수행하였다. Northern blot 분석 결과 wildtype의 카네이션인 Malaga와 Daring은 강한 DFR 활성을 나타내고 있고 적색 발현을 나타내는 Desio의 경우 발현이 나타나지 않았는데 이는 아마 재료의 수집에 오류가 있는 것으로 사려된다. 일반적으로 DFR의 발현은 아주 어린 봉오리 단계에서는 발현이 되지 않다가 꽃봉오리가 개화되기 직전에 발현하기 때문에 재료를 수집할 때는 다양한 단계별 수집이 중요

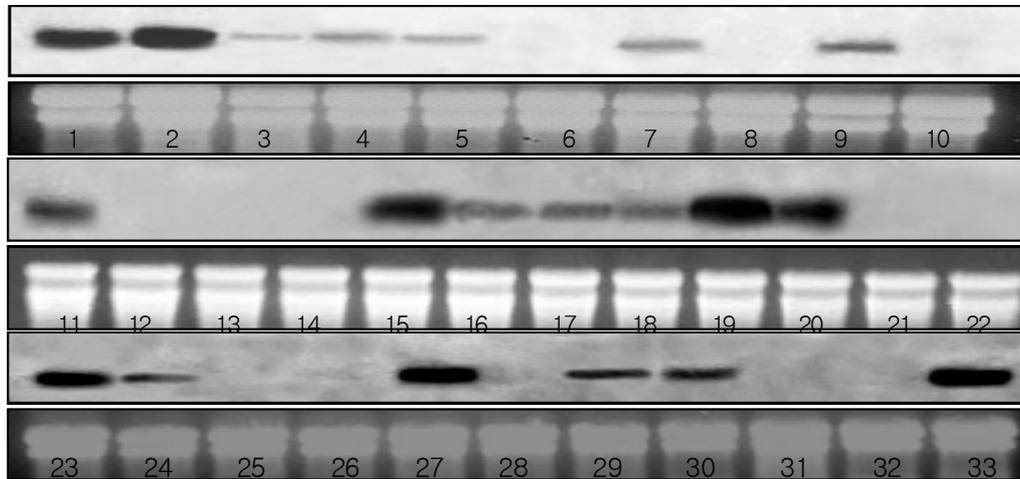


Fig. 1 Northern blot analysis of DFR in various carnation cultivars. 1.Malaga 2.Daring 3.Gumbyul 4.Yellow intermezzo 5.Lena 6. West alpine 7.Shingibo 8.Creame intermezzo 9.Flamengo 10.Imp.white 11. Malaga 12.Eugenia 13.Jinju 14.Sanho 15.Peach mambo 16.Enged 17.Aicardi 18.Interme 19.Messda 20.00568-1 21.White charotte 22. Desio 23.Malaga 24.West crystal 25.Balltyne 26.Imp.white.sim. 27. Diamond 28.Koreno 29.Crystal 30.Ellips 31.Dallas 32.Eunbyul 33.Venus

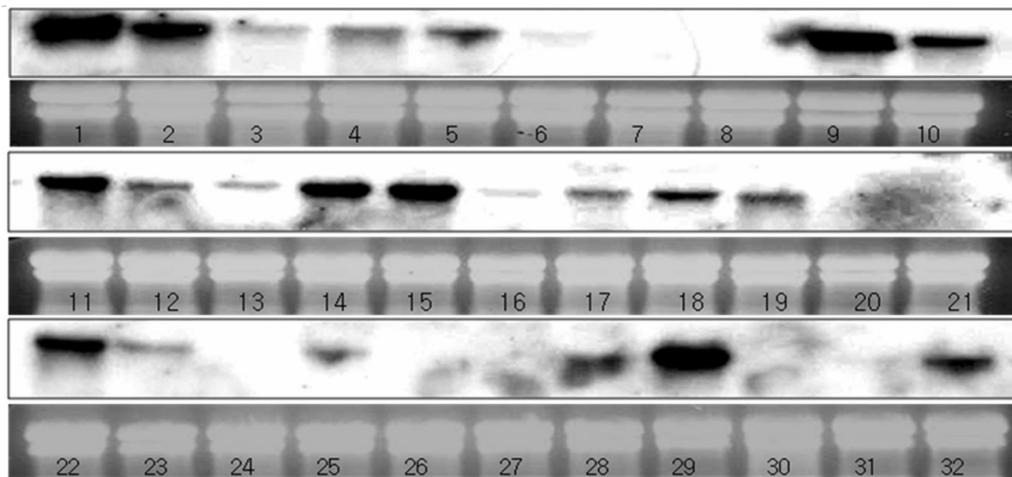


Fig. 2 Northern blot analysis of ANS in various carnation cultivars. 1.Daring 2.Malaga 3.Korena 4.Gumbyul 5.Eunbyul 6.Flamengo 7. Creame intermezzo 8.Imp.white 9.West crystal 10.Peach mambo 11.Daring 12.Balltyne 13.Ellips 14.00568-1 15.Yellow intermezzo 16.Sanho 17.Interme 18.Lena 19.Aicardi 20.Dallas 21.Shingibo 22.Daring 23.Venus 24. West alpine 25.Crystal 26.Jinju 27.Imp. white.sim. 28.Enged 29.Messda 30. Eugenia 31.White charlotte 32.Diamond

하다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 West alpine, Imp.white, Eugenia, 진주, White charotte, West crystal, Imp. white sim., Crystal, 은별, 금별 등 10품종이 DFR 유전자가 blocking된 것으로 추정되나 또 다른 유전자가 이중으로 변이가 일어났을 가능성을 배제하지 못해 DFR이외의 유전자로 Northern 분석을 하여 정확한 결과를 도출하고자 하였다. 이러한 DFR 유전자에 대한 Northern blot 분석은 적색의 색소발현을 유도하는 전략에 있어 매우 중요한 기초연구이므로 정확한 연구결과는 매우 중요하다.

수집한 카네이션 품종과 계통에 대한 ANS Northern 분석

무색의 leucoanthocyanidin으로부터 유색의 anthocyanidin

3-glucoside로의 전환은 적어도 2개의 유전자 즉 ANS와 flavonoid 3-O-glucosyl transferase (FGT)가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 이 단계가 안토시아닌 생합성과정에 있어서 색소발현에 가장 중요한 단계임에도 불구하고 생화학적 기작에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않았다 (Nakajima et al., 2001). 분리한 카네이션의 ANS 유전자를 probe로 사용하여 수집한 33품종 및 계통에 대한 Northern blot 분석을 수행하였다. 적색의 색소 발현을 보이는 카네이션인 Malaga와 Daring은 역시 강한 ANS 활성을 나타내고 있고 그 밖에 품종 및 계통은 다양한 발현 양상을 보였다 (Fig. 2). Creame intermezzo, Imp. white, West alpine, Eugenia등이 ANS 유전자가 blocking된 것으로 추정되나 또 다른 유전자가 이중으로 변이가 일어났을 가능

성을 배제하지 못해 역시 ANS이외의 유전자로 Northern blot분석을 할 필요가 있다.

수집한 카네이션 품종과 계통에 대한 CHS Northern 분석

Flavonoids의 생합성에 있어서 제일 먼저 관여하는 유전자는 CHS이다. 이 유전자는 3분자의 malonyl-CoA와 coumaroyl-CoA의 탈수축합반응에 의해 기본적인 구조를 갖추는데 관여하는 유전자이기 때문에 flavonoids 생합성에 있어서 가장 중요한 유전자중의 하나로 여겨지고 있다. 분리한 카네이션의 CHS유전자를 probe로 사용하여 국립원예특작과학원에서 수집한 품종 및 계통에 대한 Northern blot 분석을 수행하였다. 일반적으로 CHS유전자는 매우 안정적이기 때문에 염기서열의 비교에 있어서도 일치성이 높으며 변이가 잘 일어나지 않는 것으로 알려져 있다 (Niesbach-Klosgen et al., 1987). 대조구로 사용된 적색 발현 카네이션인 Malaga와 Daring은 CHS 활성을 나타내고 있고 그 밖에 품종 및 계통도 대부분 발현 양상을 보였다 (Fig. 3). Korena, Creame intermezzo 등이 CHS 유전자가 blocking된 것으로 추정되나 또 다른 유전자가 이중으로 mutation이 일어났을 가능성을 배제하지 못해 CHS이외의 유전자로 Northern 분석을 할 필요가 있다.

수집한 카네이션 품종과 계통에 대한 FHT Northern 분석

FHT는 식물의 플라보노이드 생합성 경로에 있어서 (2S)-flavanones 으로부터 (2R,3R)-dihydroflavonols로의 hydroxylation을 통한 전환을 촉매하는 역할을 한다. 근래에 와서는 FHT 유전자의 발현 정도가 기질로서의 flavanone의 사용에 있어 중요한 요소로 작용한다는 사실도 알려졌다

(Pelt et al., 2003). 수집한 33품종 및 계통에 대한 FHT유전자가 blocking된 변이체를 분리하기 위해 이미 분리한 카네이션의 FHT 유전자를 probe로 사용하여 Northern blot 분석을 수행하였다. 적색의 색소 발현을 나타내는 Malaga와 Daring은 예상한 바와 같이 FHT 활성을 나타내고 있고, 그 외 대부분의 카네이션 품종과 계통도 FHT 활성에 있어서는 문제가 없는 것으로 나타났다. 다만 백색의 화색 발현을 보이는 Eugenia의 경우 FHT 유전자가 blocking된 변이체로 나타났다 (Fig. 4). Eugenia의 경우에도 다른 유전자가 이중으로 mutation이 일어났을 가능성을 배제하지 못해 FHT이외의 유전자로 Northern 분석을 할 필요가 있다.

돌연변이 품종 및 계통의 특성과 선발

수집한 33품종 및 계통의 카네이션을 중심으로 그들의 색소발현체계를 Northern blot 분석을 통하여 검정하고 그 결과를 토대로 DFR유전자가 blocking된 돌연변이 계통을 선발하여 형질전환을 위한 목적식물로 사용하였다. Northern 분석을 위한 probe로 이미 본 실험에서 분리하여 염기서열분석을 마친 카네이션의 CHS, FHT, DFR 및 ANS를 사용하여 수행하였고 명확한 실험결과를 위하여 반복실험을 통하여 확인하였다. Northern blot 분석을 통하여 우선적으로 DFR유전자가 blocking된 돌연변이체를 선발하였고, 선발된 DFR유전자를 중심으로 다른 유전자의 돌연변이 여부를 조사하여 형질전환을 위한 목적식물을 결정하였다. 표 2에서 보는 바와 같이 DFR 돌연변이체로는 금별, 은별, Ballatyne, Crystal, Eugenia, Koreno, Imp. white sim., West crystal, White alpine 및 White charotte등 10개 품종이 선발되었고 이 중 Eugenia, Imp. white sim. 및 White alpine

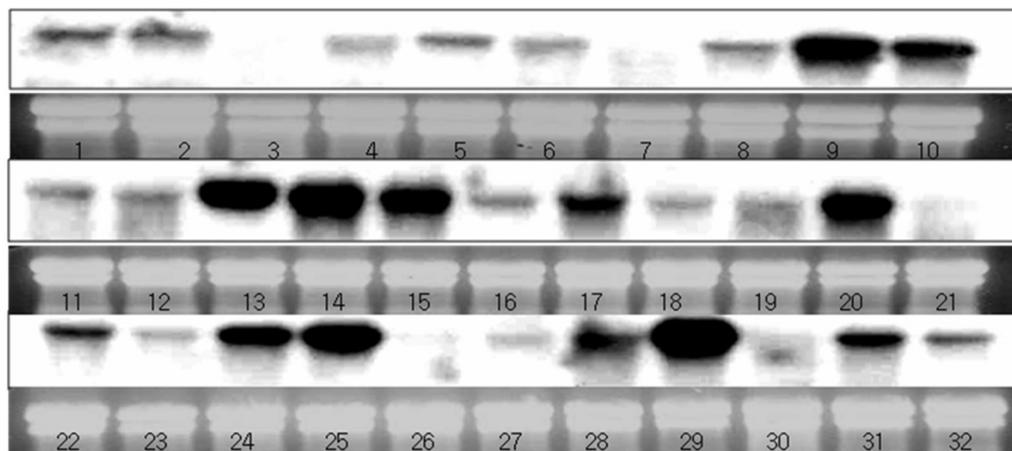


Fig. 3 Northern blot analysis of CHS in various carnation cultivars. 1.Daring 2.Malaga 3.Korena 4.Gumbyul 5.Eunbyul 6.Flamengo 7. Creame intermezzo 8.Imp.white 9.West crystal 10.Peach mambo 11.Daring 12.Balltyne 13.Ellips 14.00568-1 15.Yellow intermezzo 16.Sanho 17.Interme 18.Lena 19.Aicardi20.Dallas 21.Shingibo 22.Daring 23.Venus 24. West alpine 25.Crystal 26.Jinju 27.Imp. white.sim. 28.Enged 29.Messda 30. Eugenia 31.White charlotte 32.Diamond

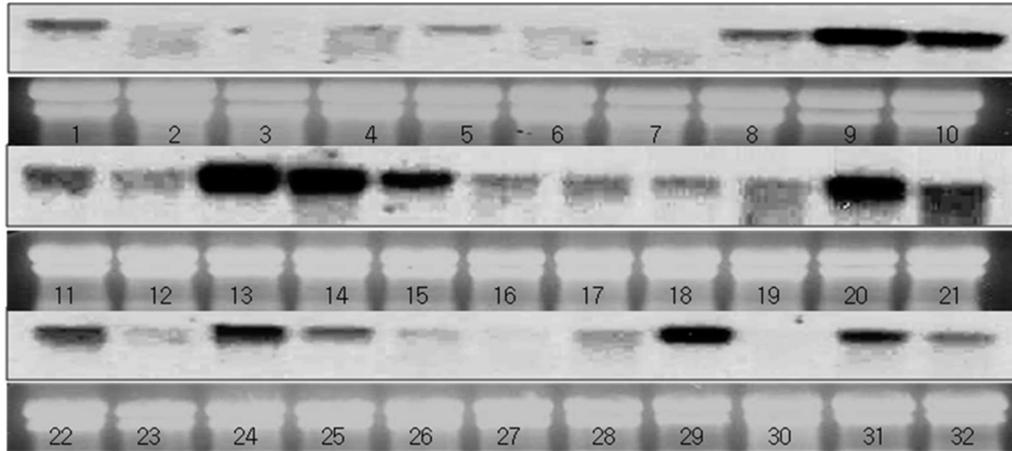


Fig. 4 Northern blot analysis of FHT in various carnation cultivars. 1.Daring 2.Malaga 3.Korena 4.Gumbyul 5.Eunbyul 6.Flamengo 7. Creame intermezzo 8.Imp.white 9.West crystal 10.Peach mambo 11.Daring 12.Ballatyne 13.Ellips 14.00568-1 15.Yellow intermezzo 16.Sanho 17.Interme 18.Lena 19.Aicardi 20.Dallas 21.Shingibo 22.Daring 23.Venus 24. West alpine 25.Crystal 26.Jinju 27.Imp. white.sim. 28.Enged 29.Messda 30. Eugenia 31.White charlotte 32.Diamond

Table 2 Characterization of wildtype and mutant in various carnation cultivars

Cultivar	DFR	CHS	FHT	ANS	Cultivar	DFR	CHS	FHT	ANS
Gumbyul	-	+	+	+	Koreno	-	-	+	+
Eunbyul	-	+	+	+	Imp.W-Sim.	-	+	+	-
Ballatyne	-	+	+	+	W-crystal	-	+	+	+
Crystal	-	+	+	+	W-alpine	-	+	+	-
Eugenia	-	+	+	-	W-charotte	-	+	+	+
					Desio	+	+	+	+

은 DFR과 ANS의 이중돌연변이체로 밝혀졌고 Koreno는 DFR과 CHS의 이중돌연변이로 사려되며, 금별, Ballatyne 은 chalcone의 축적으로 인하여 황색의 색소 발현을 보이므로 DFR, CHS의 이중 돌연변이체로 판명되어 목적식물에서 제외되고 최종적으로 은별, Crystal, West crystal, White charotte 그리고 이미 유전적으로 DFR 돌연변이체로 선발된 Virginie를 포함하여 총 5품종의 카네이션이 목적식물로 선발되었다 (Lee et al., 2006).

DFR 유전자의 효소 활성 측정

Northern blot 분석을 통하여 DFR돌연변이체로 판명된 카네이션 품종 은별, Crystal, West crystal, White charlotte, Virginie가 DFR유전자가 blocking된 돌연변이임을 증명하기 위하여 DFR유전자의 효소활성을 측정하였다. 각각의 품종으로부터 1.0g의 꽃잎을 취하여 buffer와 함께 저온에서 분쇄하고 원심분리를 한 후 상층액을 다시 Sephadex G50 columns을통해 정제하여 DFR 활성 실험을 수행하였다.DFR 활성은 NADPH를 cofactor로 사용하여 (14 C)dihydrokaempferol이 (14 C)leucopelargonidin으로 전이되는 양을 TLC 위에서 측정하였다. Fig. 5의 결과에서 보는 바와 같

이 positive control로 사용한 적색발현의 Malaga의 경우 leucopelargonidin (Lpg) peak을 나타냄으로서 기대했던 DFR 효소 활성을 보였고 (Fig. 5a), negative control 로 reticulocyte lysate만 넣어준 경우는 전혀 효소 활성을 보이지 않았다 (Fig. 5b). 반면에 DFR 돌연변이체로 선발된 은별, Crystal, West crystal, 그리고White charlotte의 꽃으로부터 분리한효소를 사용한 활성 측정의 결과는 negative control 과 같이 DFR 활성을 나타내지 않았다 (Fig. 5c, 5d, 5e, 5f). 이러한 결과를 종합하면 Northern blot분석을 통하여 규명된 DFR 돌연변이체들은 이미 DFR 돌연변이체로 규명된 Virginie와 같이 DFR유전자가 blocking된 돌연변이체임을 확인할 수 있었다 (Lee et al. 2006). 이러한 돌연변이체에 향 후 페튜니아의 DFR유전자와 F3',5'H유전자를 형질전환을 통하여 delphinidin의 함량을 증가시켜 기존의 보라색이 아닌 경제성이 있는 청색발현을 하는 새로운 카네이션 품종의 개발을 기대하고 있다.

적 요

본 연구에서는 색소유전자의 전이를 통하여 새로운 색소 발현체계를 가진 품종을 육종하기 위한 기초연구로 카네

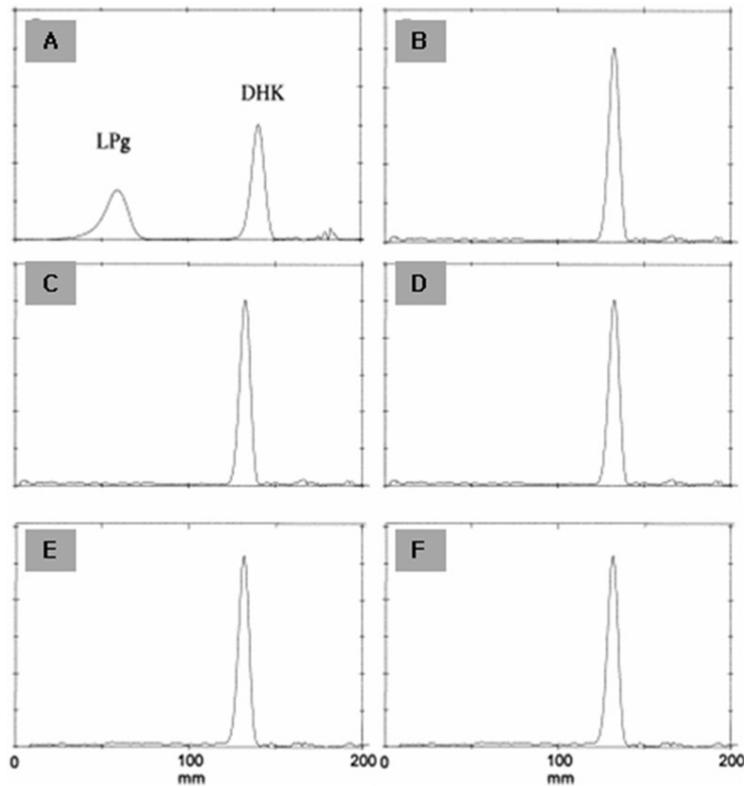


Fig. 5 Detection of substrate (DHK) and product (LPg) after TLC separation by autoradiography. The diverse crude DFR extracts were incubated with $[^{14}\text{C}]\text{DHK}$ in the presence of NADPH. A: Crude extract carnation wildtype “Malaga” (positive control) B: No crude extract as negative control C: Crude extract carnation DFR mutant “Eunbyul” D: Crude extract carnation DFR mutant “Crystal” E: Crude extract carnation DFR mutant “West crystal” F: Crude extract carnation DFR mutant “White charlotte”. DHK: Dihydrokaempferol LPg: Leucopelargonidin

이선 (*Dianthus caryophyllus*)의 꽃봉오리로부터 cDNA-library를 합성하였고 페튜니아의 CHS, FHT, DFR, ANS 유전자를 probe로 사용하여 anthocyanin 합성경로의 중요 유전자들인 카네이션의 CHS, FHT, DFR, 그리고 ANS 유전자를 분리하였다. 수집한 카네이션 품종 및 계통으로부터 돌연변이체를 선별하기 위해 분리한 유전자들을 probe로 사용하여 Northern blot 분석을 수행하여 DFR 돌연변이체로는 금별, 은별, Ballatyne, Crystal, Eugenia, Koreno, Imp. white sim., W-crystal, W-alpine 및 White charlotte 등 10개 계통이 선별되었고 이 중 Eugenia, Imp. white sim. 및 W-alpine은 DFR과 ANS의 이중돌연변이체로 밝혀졌고 Koreno는 DFR과 CHS의 이중돌연변이로 사려되며, 금별, Ballatyne은 DFR, CHI의 이중 돌연변이체로 판명되어 목적식물에서 제외되고 최종적으로 은별, Crystal, West crystal, White charlotte 그리고 이미 유전적으로 DFR 돌연변이체로 선별된 Verginie를 포함하여 총 5계통의 카네이션이 목적식물로 선별되었다. 선별된 DFR 돌연변이체의 확인을 위하여 유전자의 효소활성을 측정해 본 결과 5품종의 카네이션 모두 DFR 활성을 가지고 있지 않음을 확인하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 사업단의 지원을 받아 수행하였다.

인용문헌

- Brugliera F, Tull D, Holton TA, Karan M, Treloar N, Simpson K, Skurozynska J, and Nason JG (2000) Introduction of a cytochrome b5 enhances the activity of flavonoid 3'5' in transgenic carnation. Sixth International Congress of Plant Molecular Biology. University of Laval, Quebec, 6-8
- Davies K, Bloor S and Spiller G (1998) Production of yellow colour in flower: redirection of flavonoid biosynthesis in petunia. *Plant J* 13:259-266
- Geneve RL, Preece JE and Merkle SA (1997) Flower colour, In: *Biotechnology of ornamental plants*. GAB International 259-294
- Goto T and Kondo T (1991) Structure and molecular stacking of anthocyanins flower colour variation. *International Edition in English* 30:17-33

- Harborne JB (1988) Flavonoid checklists. In: The Flavonoids. Ed. Harborne, J.B. Chapman and Hall, London, 539
- Heller W, Forkmann G, Britsch L and Grisebach H (1985) Enzymatic reduction of dihydroflavonols to flavan-3,4-cis-diols with flower extracts from *matthiola incana* and its role in anthocyanin biosynthesis. *Planta* 165:284-287.
- Heller W and Forkmann G (1994) In: The Flavonoids. 499-536, Chapman and Hall, London.
- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton TA, Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Togami J, Pigeaire A, Ashikari T, Kusumi T, Mason JG and Tanaka Y (2007) Engineering of the rose flavonoid biosynthesis pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiol* 48(11):1589-1600
- Koes R, De Vetten N and Mol J. (2000) Cytochrome b5 from petunia. PCT-international Patent Application No. WO 00/09720
- Krol AR, van der Lenting PE, Veenstra J, van der Meer IM, Koes RE, Gerats AGM, Mol JNM and Stuitje AR (1988) An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 333:866-869
- Lee HJ, Nahm SH, Ahn BJ, Joung HY and Min BW (2006) Cloning of cDNA Coding for Dihydroflavonol-4-reductase (DFR) and Characterization of *dfi* Expression in the Petals of *Dianthus caryophyllus* (carnation). *J. Kor. Hort. Sci.* 45:49-54
- Logemann J, Schell J and Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Anal. Biochem.* 163:16-20
- Meyer P, Heidmann I, Forkmann G and Saedler H. (1987) A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* 330:677-678
- Niesbach-Kloesgen U, Barzen E, Bernhardt J, Rhode W, Schwarz-Sommer Zs, Reif HJ, Wienand U and Saedler H (1987) Chalcone synthase genes in plants: a tool to study evolutionary relationships. *J. Mol. Evol.* 26:212-225
- Pelt JL, Downes WA, Schoborg RV, McIntosh CA (2003) Flavanone 3-hydroxylase expression in *Citrus paradisi* and *Petunia hybrida* seedlings. *Phytochem.* 64:435-444
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.