Journal of Radiation Industry 6 (2) : 147~152 (2012)

감마선 변이체 스프레이 국화 'ARTI-purple'의 화색 관련 유전자 발현 분석

성상엽[1,2] · 이유미[1] · 김상훈[1] · 하보근[1] · 강시용[1]
김진백[1] · 김홍기[2] · 김동섭[1,*]

[1]한국원자력연구원 방사선과학연구소, [2]충남대학교 응용생물학전공

Expression Analysis of Flower Color Related Genes in Spray-type 'ARTI-purple' Developed by Gamma-ray Mutagenesis

Sang Yeop Sung[1,2], Yu-Mi Lee[1], Sang Hoon Kim[1], Bo-Keun Ha[1], Si-Yong Kang[1], Jin-Baek Kim[1], Hong Gi Kim[2] and Dong Sub Kim[1,*]

[1]*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea*
[2]*Department of Agricultural Biology, Graduate School, Chungnam National University, Daejeon, Korea*

Abstract - Anthocyanins are major plant pigment and produced through phenylpropanoid pathway. In this study, anthocyanin biosynthesis mechanisms of chrysanthemum flowers were studied using 'Argus' and flower color mutant 'ARTI-purple' which were induced by 40 Gy gamma irradiation (Co^{60}). And, three chrysanthemums, 'Ford', 'Yeonja' and 'Orando' were additionally used as the check varieties to understand the relationship between flower color and expression patterns of genes. The expression patterns of the anthocyanin biosynthetic genes were matched with the flower color of the check varieties. High anthocyanin concentration of 'Orando' showed the high expression of anthocyanin biosynthetic genes. In the white flower of 'Ford', expressions of *CHI*, *DFR* and *ANS* were not identified. Despite different flower color, 'Argus' and 'ARTI-purple' showed different expression patterns compared with the check varieties. From the dot blot analysis, we screened the seven genes showing the different expressions between 'Argus' and 'ARTI-purple'.

Key words : Chrysanthemum, Authocyanin, Flower, Gamma irradiation, Expression

서 론

국화 (*Chrysanthemum* × *morifolium*)는 장미 등과 함께 화훼시장에서 높은 시장가치를 가지는 화훼류로서, 다양한 화형과 화색으로 분류되고, 화색은 안토시아닌 및 카로티노이드 등의 색소의 구성 및 함량에 따라 결정된다. 화려한 화색과 화형은 소비자의 선호도에 가장 큰 영향을 미치는 요소로 현재까지 일부 연구가 이루어졌다 (Schwinn *et al.* 1993; Hayashi and Todoriki 1996; Ohmiya

* Corresponding author: Dong Sub Kim, Tel. +82-63-570-3311, Fax. +82-63-570-3319, E-mail. bioplant@kaeri.re.kr

et al. 2006). 여러 색소 중 안토사이닌은 페닐프로파노이드(phenylpropanoid) 경로에서 유도되는 제일 크고 아주 다양한 식물 색소 그룹이다. 수산기와 메틸기의 수와 위치에 따라 또한 glycosylation과 방향족 또는 지방족 acylation에 따라 색과 안정성이 다른 다양한 형태의 안토시아닌 분자가 되며, 붉은색, 노란색, 보라색 등이 대표적으로 확인된다(Springob *et al.* 2003). 안토시아닌은 국화의 화색을 결정하는 주요 색소임에도 불구하고, 각 성분의 생합성 과정에 대한 연구는 국화에서 활발하게 이루어지지 못했다. 그 동안 국화의 안토시아닌 합성 유전자는 chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavonoid-3-hydroxylase (F3H), flavonoid-3′-hydroxylase (F3′H), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), anthocyanidin synthase (ANS), anthocyanidin 3-O-glucoside-6″-O-malonyltransferase (3MaT1), anthocyanidin 3-O-glucoside-3″, 6″-O-dimalonyltransferase (3MaT2) 등, 구조 합성 효소가 확인 되었다(Suzuki *et al.* 2004; Seo *et al.* 2007). 하지만 국화에서 화색에 따른 이러한 유전자의 발현양상에 대한 연구는 미비하다.

한편, 국화 화훼 품종의 개발은 주로 전통 육종 방법인 교배육종을 비롯하여 방사선을 이용한 돌연변이 육종을 통해 이뤄지고 있으며, 최근에는 형질전환 기술을 통해서도 시도되고 있다. 특히, 자연 돌연변이 빈도는 지극히 낮은 확률로 발생되며, 돌연변이의 빈도를 증가시키기 위하여 감마선, 이온빔, 전자선 등을 이용한 방사선 돌연변이 육종법은 다른 화학적 돌연변이 유기보다 돌연변이 처리 과정이 안전하고 용이하다. 국화의 다양한 화형, 화색 품종의 개량 및 품질 향상을 위해 방사선 돌연변이 육종 기술이 이용되고 있으며, 전 세계 화훼 시장에서 돌연변이 육종에 의해 등록된 화훼류는 약 600여 품종으로 확인되며, 그 가운데 254개가 국화 품종이며, X선과 γ선을 이용하여 50% 이상이 네덜란드와 인도에서 개발되었다(FAO-IAEA; http://www.mvgs.iaea.org/MVD/Default.htm) (Yamaguchi *et al.* 2008). 최근 일본에서도 ‘Imajin’, ‘Arajin’, ‘Emi-akari’, ‘Princess kagawa’, ‘Dreaming’, ‘Ray Sunrise’ 등 ion beam과 X선 조사를 통한 품종개발이 보고된 바 있으며 국내에서도 조직배양 기술과 감마선 돌연변이 육종 기술을 접목하여 국화 신품종 개발을 위한 육종 연구가 보고되고 있다(Park 2005; Park *et al.* 2007; Lee *et al.* 2008).

본 연구에서는 ‘Argus’ 국화와 이로부터 유기된 돌연변이 품종 ‘ARTI-purple’을 활용한 국화 화색 관련 유전자 연구를 ‘Ford’, ‘Orando’, ‘Yeonja’ 품종과 비교하여 실시했으며, 국화 화색을 결정하는 안토시아닌 생합성에 관여하는 주요 유전자의 발현 양상을 확인하고, 추가로 안토시아닌 함량에 영향을 미치는 것으로 추정되는 잠재적 유전자를 추가로 분리하고 발현양상을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

국화 ‘Argus’ 품종을 2005년에 줄기의 기내배양을 통해 대량 증식한 후, 유식물체에 한국원자력연구원 저준위 감마선 조사시설(^{60}Co)에서 40 Gy를 조사하여 3주간의 발근 후 방사선육종시험장 온실에 정식하였다. 그리고 2006년에서 2007년 사이에 삽목 증식을 통해 고정된 ‘ARTI-purple’ 품종을 육성하였다(Park *et al.* 2007). 그리고 대조군으로 ‘Ford’ ‘Orando’, ‘Yeonja’를 사용하였다.

2. Total RNA 분리

국화는 개화 후 약 20일이 경과하면 국화 화형 및 화색이 완성된다. 그리고 이 후로 시간이 진행되면 꽃잎에서 안토시아닌 침적이 나타나며, 노화가 진행된다. 국화 샘플링은 개화 후 20일째 만개한 꽃잎(Ray floret)을 채취하였으며, −80°C에 보관하였다. 채취한 꽃잎(Ray floret) 2 g을 막자 사발로 곱게 갈은 후, 10 ml의 Trizol regeant를 이용하여 제안된 protocol을 따라 RNA를 추출하였다(Invitrogen, USA). 이후 DNase 처리 및 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)을 이용하여 정량을 하였다.

3. Dot blot 분석

1) Preparation of membrane

분리된 cDNA clones로부터 유전자 발현 차이의 확인을 위해, reverse dot blot hybridization을 수행하였다. 먼저 국화 꽃잎으로부터 수집된 cDNA library clone을 50 µl volume으로 saturation PCR을 하였고, 이를 Hybond N+ membranes (Amersham, Germany)에 vacuum blotter (Gibco BRL)을 이용하여 blotting 하였다. 그리고 CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP Inc, England)을 이용하여 고정하고 4°C에서 digoxigenin-labeled cDNA를 hybridization 하기 전까지 보관하였다.

2) Probe synthesis and hybridization of membranes

‘Argus’와 ‘ARTI-purple’의 total RNAs을 분리하고 DIG DNA labeling kit (Roche, Switzerland)을 이용하여 digoxigenin-labeled cDNAs을 합성하였다. 그리고 4°C에서 보관중인 membrane을 2시간동안 62°C에서 pre-hybridiza-

tion한 후 digoxigenin-labeled cDNAs 1 μg을 16시간동안 62°C에서 hybridization 하였다. DIG Nucleic acid detection kit (Roche, Switzerland)을 이용하여 membranes을 세척하고, X-ray films에 30분간 노출하였다. 그리고 최종적으로 'Argus'와 'ARTI-purple'으로부터 얻어진 두 장의 membrane에 각각 clone을 비교하였다.

4. 프라이머 제작 및 relative RT-PCR 분석

실험에 이용한 프라이머는 cDNA library를 통해 확인된 시퀀스를 이용하여 gene specific primer를 Primer 3 Software (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi)를 통해 제작하였다. Relative RT-PCR은 Pfaffl (2001)의 실험을 참조하여 진행하였다. 분리된 RNA를 100 ng μl^{-1}로 정량하고 α-tubulin을 reference 유전자로 이용하였다. 그리고 Eco™ Real-Time PCR system을 통해 SYBR green II fluorescence dye (Takara, Japan)을 이용하여 발현을 검정하였다.

결과 및 논의

1. 안토시아닌 생합성 유전자의 분리 및 발현 분석

안토시아닌 생합성 유전자의 연구는 아라비돕시스, 페튜니아, 옥수수, 포도 등 여러 식물체에서 오랫동안 연구되어 왔으며, 지금까지 상당한 연구의 결과가 누적되었다 (Yamaguchi *et al.* 1999; Kobayashi *et al.* 2001; Park *et al.* 2008). 안토시아닌 합성은 크게 Phenylpropanoid biosynthesis 경로에서 안토시아닌 전구체인 Cinnamoyl-CoA가 합성되며, Flavonoid biosynthesis 경로를 통해 naringenin에서 안토시아닌 전구체 flavonoid류와 이들의 복합적 구조체인 안토시아닌 생합성이 이루어진다 (Castañeda-Ovando *et al.* 2009).

국화 'Argus'와 이로부터 유기된 보라색 화색 변이체 'ARTI-purple'의 안토시아닌 합성 유전자의 발현 양상을 확인하기 위해 추가적인 대조군으로 흰색 꽃잎, 분홍색 꽃잎, 자홍색 꽃잎의 색상을 가지는 'Ford', 'Yeonja', 'Orando' 세 품종의 발현 양상을 함께 비교분석 하였다 (Fig. 1). 안토시아닌 합성 유전자의 발현양상을 확인하기 위해, 'Argus'와 'ARTI-purple' 그리고 이미 분리된 유전자를 활용하여 유사도가 가장 높은 conserved region에 대한 프라이머를 80～200 bp 사이로 제작하였다 (Table 1). 분석 결과, 대조군으로 확인한 'Ford', 'Yeonja', 'Orando' 세 품종에서 CHI, F3H, DFR, ANS의 발현 양상이 국화 꽃잎에서 나타나는 안토시아닌 함량과 유사하게 증가하는 패턴으로 확인이 되었으며, 흰색 꽃잎의 'Ford'는 F3H, DFR, ANS의 유전자 발현이 확인되지 않았다 (Fig. 2). 하지만 'Argus'와 'ARTI-purple'에서 유전자의 발현 양상은 큰 차이가 없이 나타나거나 CHI, F3H의 발현은 보라색 꽃잎을 가지는 'ARTI-purple'에서 오히려 감소

'Argus' 'ARTI-purple' 'Ford' 'Yeonja' 'Orando'

Fig. 1. Used plant materials.

Table 1. Summary of differential expression in qPCR of the five chrysanthemum varieties. Clone number was arbitrarily annotated in clones of cDNA library. All of genes description is best matched with NCBI *blastx* databases

Clone No.	Accession No.	Annotation [*Species*]	E-value
EA0505	AAD39103.1	LIM domain protein WLIM-1 [*Helianthus annuus*]	2E-99
EF0212	ADD79961.1	14-3-3 family protein [*Dimocarpus longan*]	1E-127
EG0505	ACK37352.1	S-adenosyl-L-methionine synthetase [*Chrysanthemum coronarium*]	0.0
ED0208	ACW83616.2	mevalonate diphosphate decarboxylase [*Panax ginseng*]	1E-132
EF0208	XP_002510738.1	phosphofructokinase, putative [*Ricinus communis*]	2E-55
EA0105	ACF17637.1	putative arogenate dehydratase [*Capsicum annuum*]	1E-80
EB0807	ACN38271.1	glutathione S-transferase [*Vitis amurensis*]	1E-81

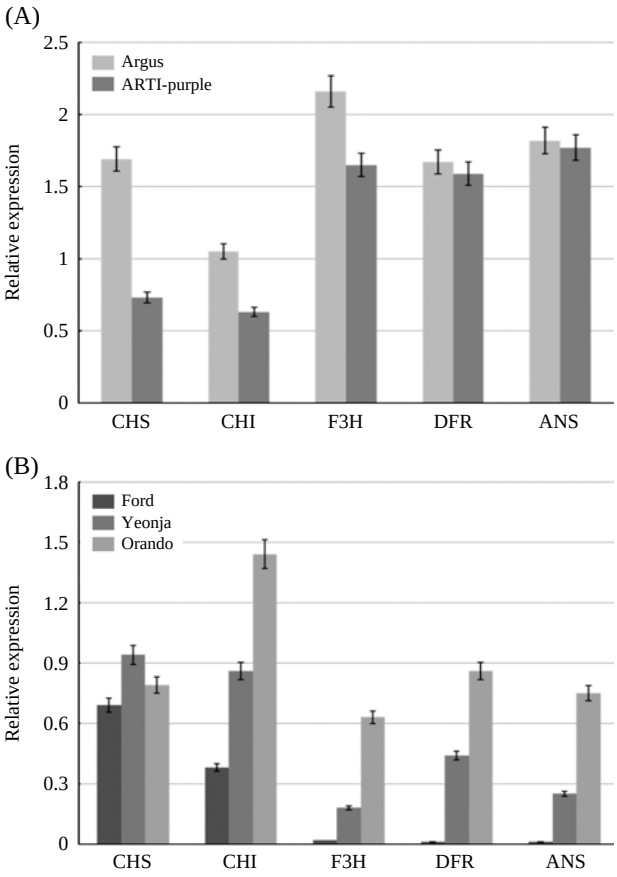

Fig. 2. Relative expressions of the anthocyanin biosynthetic genes in five chrysanthemums. A: qPCR of 'Argus' and 'ARTI-purple', B: qPCR of check varieties.

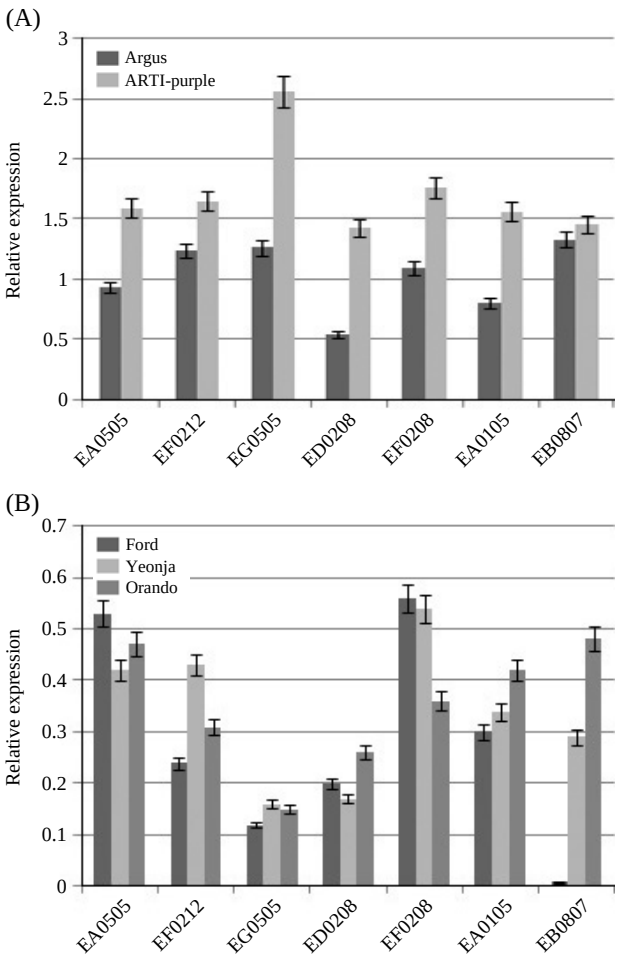

Fig. 3. Relative expressions of differentially expressed seven genes by dot blot analysis between 'Argus' and 'ARTI-purple', in five chrysanthemums. A: qPCR of 'Argus' and 'ARTI-purple', B: qPCR of check varieties.

하는 것으로 확인이 되었다. 이러한 사실로부터 'Argus' 품종은 colorless의 안토시아닌류를 가지거나, 꽃잎에서 안토시아닌의 합성이 다른 이화작용과 함께 일어나 꽃잎에서 안토시아닌이 축적이 되지 못하는 것으로 추정되었다. 즉 'Argus'와 'ARTI-purple'에서 나타나는 화색의 차이는 대조군에서 확인된 안토시아닌 합성 유전자의 발현 양상에 따른 안토시아닌 함량의 차이가 아니라 다른 요인이 추가적으로 작용할 가능성이 있는 것으로 확인되었다.

2. 'Argus'와 'ARTI-purple'에서 다르게 발현되는 유전자 분석

추가적으로 'Argus'와 'ARTI-purple' 사이에 화색의 차이, 즉 안토시아닌의 함량의 차이가 나타나는 원인을 추적하기 위해서 'Argus'와 'ARTI-purple' 간에 발현적 차이를 보이는 유전자를 dot blot hybridization을 통해 발현을 스크린하였으며, 그 결과로부터 발현에서 차이를 보인 7개 유전자를 대조군 국화 품종과 함께 real-time PCR분석을 수행하였다 (Table 1). LIM domain protein WLIM-1, 14-3-3 family protein, S-adenosyl-L-methionine synthetase, mevalonate diphosphate decarboxylase, phosphofructokinase, arogenate dehydratase, glutathione S-transferase는 모두 'ARTI-purple'에서 발현이 증가한 것으로 확인되었다. 특히 glutathione S-transferase는 페튜니아의 AN9과 높은 homology를 가지고 있었으며 (positive identities; 81%), 대조군 세 품종에서 발현 양상은 안토시아닌 함량과 매우 유사하게 변화하는 것을 확인할 수 있었으나, 'Argus'와 'ARTI-purple' 사이에서는 발현 차이가 크게 나타나지 않았다. 또한 S-adenosyl-L-methionine synthetase는 대조군 품종에서 매우 낮은 발현 양상('Argus' 대비 10%, 'ARTI-purple' 대비 5% 수준)을 띄고, 'ARTI-purple'에서 발현이 가장 큰 폭으로 증가한 것을 확인할 수 있었다 (약 2배). 그리고 'Argus'와 'ARTI-pur-

ple' 사이에서 Mevalonate diphosphate decarboxylase의 발현이 가장 큰 폭의 증가를 보였다(Fig. 3).

결 론

안토시아닌은 가끔 어린 식물조직에서 나타나며, 조직이 성숙함에 따라 사라지기도 한다. 일반적으로 안토시아닌의 기능은 가시광선과 자외선을 흡수하기 때문에 조직을 보호하기 위해 차광역할을 하는 것으로 추정되며, 또한 산화방지 능력이 있어 산화적인 피해로부터 세포를 보호하는 것으로 추정된다(Mol *et al.* 1998; Winkel-Shirley 2002; Zhang *et al.* 2004). 가시적으로 나타나는 안토시아닌 함량의 손실은 엽록소의 증가, 안토시아닌 생합성 유전자의 발현감소, 광보호제가 필요하지 않을 때의 식물의 안토시아닌 분해능력 증가 등의 복합요인에 기인된 것으로 추정되며, 반대로 낙엽과 같이 조직의 노후와 함께 확인되는 안토시아닌의 증가는 여전히 확실한 해답을 찾지 못하고 있는 실정이다. 최근 안토시아닌의 연구는 안토시아닌 생합성 유전자에 의존적으로 이루어졌으나, 브룬펠시아 꽃잎에서 안토시아닌의 분해 가능성을 처음으로 제시 및 확인하였다(Vaknin *et al.* 2005; Oren-Shamir 2009; Bar-Akiva *et al.* 2010). 본 연구에서 우리는 국화로부터 안토시아닌의 생합성에 관여하는 주요 유전자를 분리하고, 발현 양상을 확인하였으며, 국화 꽃잎에서 나타나는 안토시아닌 함량과 비교하여 유전자 발현 양상을 비교한 결과, 대조군에서는 안토시아닌 함량과 유사하게 합성 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었으나, 'Argus' 품종과 감마선 돌연변이체 'ARTI-purple'에서는 이러한 특성을 확인할 수 없었다. 이러한 결과는 국화 꽃잎에서 나타나는 안토시아닌 함량은 추가적으로 안토시아닌 함량 제어에 관여된 메커니즘의 존재나 안토시아닌의 분해, 또는 colorless anthocyanin의 존재 가능성을 시사한다. 그리고 추가적으로 확인한 유전자의 발현 양상 확인을 통해 확인된 glutathione S-transferase는 안토시아닌의 channel protein으로 알려진 페튜니아의 AN9 유전자와 ortholog의 가능성이 있을 것으로 판단되며, 그 외 확인된 유전자에 대해 추가적인 연구를 통해서 국화에서 안토시아닌 함량에 영향을 미치는 추가적인 요소 또는 메커니즘 연구를 진행할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

Bar-Akiva A, Ovadia R, Rogachev I, Bar-Or C, Bar E, Freiman Z, Nissim-Levi A, Gollop N, Lewinsohn E, Aharoni A, Weiss D, Koltai H and Oren-Shamir M. 2010. Metabolic networking in brunfelsia calycina petals after flower opening. *Journal of Experimental Botany* **61**(5):1393-1403.

Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández MdL, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA and Galán-Vidal CA. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**(4):859-871.

Hayashi T. and Todoriki S. 1996. Sugars prevent the detrimental effects of gamma irradiation on cut chrysanthemums. *HortScience* **31**(1):117-119.

Kobayashi S, Ishimaru M, Ding CK, Yakushiji H and Goto N. 2001. Comparison of udp-glucose:Flavonoid 3-o-glucosyltransferase (ufgt) gene sequences between white grapes (vitis vinifera) and their sports with red skin. *Plant Science* **160**(3): 543-550.

Lee GJ, Chung SJ, Park IS, Lee JS, Kim JB, Kim DS and Kang SY. 2008. Variation in the phenotypic features and transcripts of color mutants of chrysanthemum (Dendranthema grandiflorum) Derived from Gamma ray Mutagenesis. *J Plant Biol.* **51**(6):418-423.

Mol J, Grotewold E and Koes R. 1998. How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* **3**(6):212-217.

Ohmiya A, Kishimoto S, Aida R, Yoshioka S and Sumitomo K. 2006. Carotenoid cleavage dioxygenase (cmccd4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiology* **142**(3):1193-1201.

Oren-Shamir M. 2009. Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Science* **177**(4):310-316.

Park IS and Song HS. 2005. Current trends of mutation breeding by radiation technology at domestic and foreign ornamentals. *J. Kor. Flower Res. Soc.* **13**(3):184-200.

Park IS, Lee GJ, Kim DS, Chung SJ, Kim JB, Song HS, Goo DH and Kang SY. 2007. Mutation breeding of a spray chrysanthemum 'Argus' by gamma-ray irradiation and tissue culture. *Flower Res. J.* **15**(1):52-57.

Park J-S, Kim J-B, Cho K-J, Cheon C-I, Sung M-K, Choung M-G and Roh K-H. 2008. Arabidopsis r2r3-myb transcription factor atmyb60 functions as a transcriptional repressor of anthocyanin biosynthesis in lettuce (lactuca sativa) *Plant Cell Reports* **27**(6):985-994.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time rt–pcr. *Nucleic Acids Research* **29**(9): e45.

Schwinn KE, Markham KR and Giveno NK. 1993. Floral flavonoids and the potential for pelargonidin biosynthesis in commercial chrysanthemum cultivars. *Phytochemistry* **35**(1):145-150.

Seo J, Kim S, Kim J, Cha H and Liu J. 2007. Co-expression of

flavonoid 3′5′-hydroxylase andflavonoid 3′-hydroxylase accelerates decolorization in transgenic chrysanthemum petals. *Journal of Plant Biology* **50**(6):626-631.

Springob K, Nakajima J-i, Yamazaki M and Saito K. 2003. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Natural Product Reports* **20**(3):288-303.

Suzuki H, Nakayama T, Yamaguchi M-a and Nishino T. 2004. Cdna cloning and characterization of two dendranthema × morifolium anthocyanin malonyltransferases with different functional activities. *Plant Science* **166**(1):89-96.

Vaknin H, Bar-Akiva A, Ovadia R, Nissim-Levi A, Forer I, Weiss D and Oren-Shamir M. 2005. Active anthocyanin degradation in brunfelsia calycina (yesterday-today-tomorrow) flowers. *Planta* **222**(1):19-26.

Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* **5**(3):218-223.

Yamaguchi H, Shimizu A, Degi K and Morishita T. 2008. Effects of dose and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum. *Breeding Science* **58**(3):331-335.

Yamaguchi M-A, Oshida N, Nakayama M, Koshioka M, Yamaguchi Y and Ino I. 1999. Anthocyanidin 3-glucoside malonyltransferase from dahlia variabilis. *Phytochemistry* **52**(1): 15-18.

Zhang Z, Pang X, Xuewu D, Ji Z and Jiang Y. 2004. Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry* **90**(1-2):47-52.

Manuscript Received: March 26, 2012
Revised: April 12, 2012
Revision Accepted: May 22, 2012