

# 안개초(*Gypsophila paniculata*)로부터 Flavanone 3 $\beta$ -Hydroxylase 유전자의 분리 및 분석

민병환<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>상주대학교 생명자원과학대학 식물자원학과

## Molecular Cloning, Sequence Analysis, and *in Vitro* Expression of Flavanone 3 $\beta$ -Hydroxylase from *Gypsophila paniculata*

Byung-Whan Min<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Resources, Sangju National University, Gajang-Dong, Sangju, Kyungsangbuk-Do, Korea

**ABSTRACT** Flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase (FHT) is an enzyme acting in the central part of the flavonoid biosynthesis pathway. FHT catalyses the hydroxylation of flavanone to dihydroflavonols in the anthocyanin pathway. In this paper we describe the cloning and expression of the genes encoding the flavonoid-biosynthetic enzyme FHT in *Gypsophila paniculata* L. A heterologous cDNA probe from *Dianthus caryophyllus* was used to isolate FHT-encoding cDNA clones from *Gypsophila paniculata* L.. Inspection of the 1471 bp long sequence revealed an open reading frame 1047 bp, including a 190 bp 5' leader region and 288 bp 3' untranslated region. Comparison of the coding region of this FHT cDNA sequence including the sequences of *Arabidopsis thaliana*, *Citrus sinensis*, *Dianthus caryophyllus*, *Ipomoea batatas*, *Matthiola incana*, *Nierembergia sp.*, *Petunia hybrida*, *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* reveals a identity higher than 69% at the nucleotide level. 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, by *in vitro* expression yielding and enzymatically active hydroxylase, as indicated by the small dihydrokaempferol peak. Genomic southern blot analysis showed the presence of only one gene for FHT in *Gypsophila paniculata*.

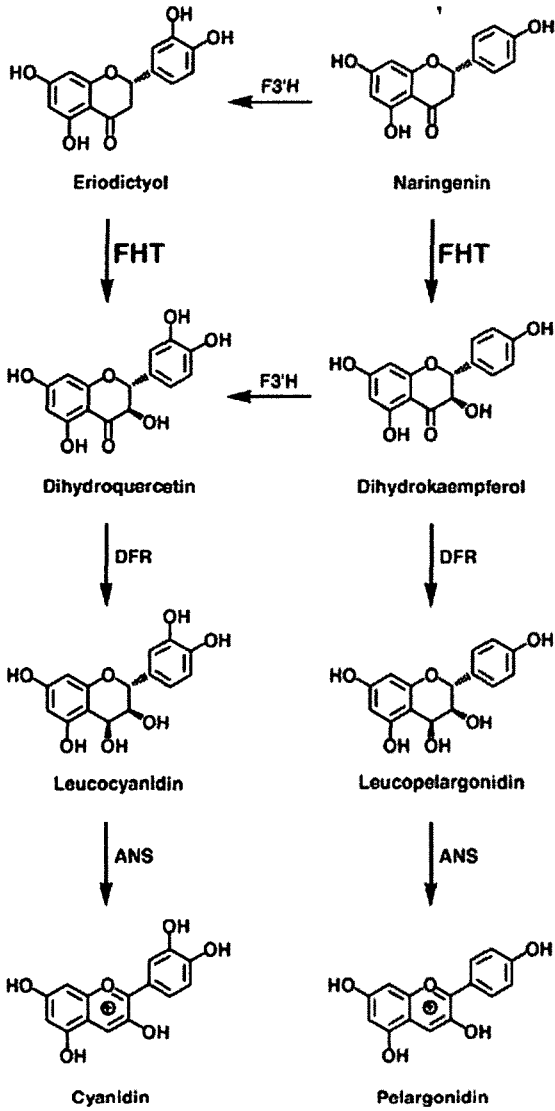
**Key words:** cDNA, codon, enzyme activity, expression, sequence

### 서 론

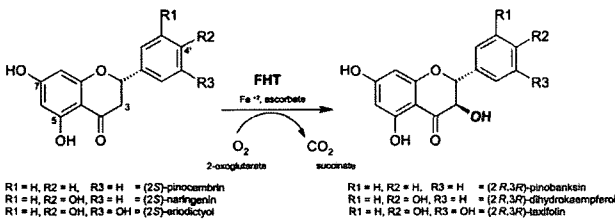
Flavonoids는 phenylpropanoid 화합물로 일반적으로 수용성이며 식물의 액포에 저장된다. flavonoids는 꽃의 색소 중 가장 보편적이고 광범위하게 분포되어 있으며 그 결과 유전학적, 화학적 그리고 생화학적으로 많은 연구가 되어져 있다 (Heller and Forkmann 1993). 화색을 발현하는 가장 대표적인 그룹은 anthocyanin이며 이러한 anthocyanin과 tannin, flavone 및 flavonol glycosides와의 co-pigmentation을 통하여 다양한 화색을 나타낸다 (Figure 1). FHT는 식물의 flavo-

noid 생합성 경로에 있어서 (2S)-flavanones으로부터 (2R,3R)-dihydroflavonols로의 hydroxylation을 통한 전환을 촉매하는 역할을 한다 (Figure 2). Co-factor의 요구도에 따라 분류하면 FHT는 2-oxoglutarate dependent dioxygenases에 속하는 것으로 알려져 있다 (Britsch *et al.* 1993). 이 그룹에 속하는 효소는 식물, 곰팡이 및 세균의 1차와 2차대사에 중추적인 역할을 담당하고 있으며 근래에 와서는 이 그룹에 속하는 효소들의 기작에 대해서 많은 연구가 이루어지고 있다 (Turnbull *et al.* 2004). 분자생물학적 접근을 위한 FHT 유전자의 분리에 대한 보고는 금어초 (Forkmann *et al.* 1981), 페튜니아 (Britsch *et al.* 1992), 카네이션 (Dedio *et al.* 1995), 과꽃 (Dedio *et al.* 1993), stock (Dedio *et al.* 1993), 장미 (Dedio *et al.* 1993), 옥수수 (Deboo *et al.* 1995), 알팔파 (Charrier *et al.*

\*Corresponding author Tel 054-530-5203 Fax 054-530-5209  
E-mail: minbw@sangju.ac.kr



**Figure 1.** Schematic flavonoid pathway FHT: flavanone 3β-hydroxylase, F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase DFR: dihydroflavonol 4-reductase, ANS: anthocyanidin synthase.



**Figure 2.** Stereospecific hydroxylation of (2S)-flavanones resulting in the formation of (2R,3R)-dihydroflavonols catalyzed by flavanone 3β-hydroxylase. The (2S)-configuration of the substrate changes to the (2R)-conformation in the product as a consequence of the introduction of the hydroxyl group at C-3. The optical activity is usually levorotatory for the (2S)-flavanones and dextrorotatory for the (2R,3R)-dihydroflavonols.

1995) 등이 있으며 이들의 보고에 의하면 FHT 유전자는 대부분 single gene으로 존재한다고 알려져 있다. FHT 유전자의

발현에 관여하는 조절기작에 대한 연구는 다양하게 보고되었는데, 금어초의 Delila 유전자의 경우 FHT 유전자 외에 DFR (dihydroflavonol 4-reductase) (Dooner *et al.* 1991; Martin *et al.* 1991)과 같이 flavonoids 생합성의 downstream에 관여하는 유전자의 발현을 조절하며 (type A), 페튜니아(Quattrocchio *et al.* 1993)의 경우 FHT 유전자가 독립적으로 발현하거나 (type F), 아라비도시스의 경우에는 ttg 유전자와 같은 조절유전자에 의해 FHT 유전자와 함께 upstream 유전자인 CHS (chalcone synthase)와 CHI (chalcone isomerase)가 조절된다고 보고되고 있다 (Pelletier and Shirley 1996). 근래에 와서는 FHT 유전자의 발현정도가 기질로서의 flavanone의 사용에 있어 중요한 요소로 작용한다는 사실도 알려졌다 (Pelt *et al.* 2003). 본 실험에 사용된 식물체인 안개초는 명명으로 baby's breath으로 불리워지며 이미 꽃시장의 상당부분을 점유하고 있는 상업성이 높은 고급초화이나 이에 대한 생화학 및 분자생물학적 기초연구는 거의 이루어지지 않았다. 또한 안개초는 화색의 종류가 다양하지 못하여 핑크색의 색소발현체계를 가진 품종인 Flamingo와 Red Sea를 제외하고는 전부 백색의 표현형을 나타내고 있어 고전 육종의 중요한 표지식물로 가치가 있는 것으로 알려져 왔다. 이러한 특징을 가진 안개초에 적합한 flavonoids 생합성 관련 유전자를 형질전환을 통해 도입하여 색소발현체계를 변환시키면 상업적 측면에서 매우 가치있는 시도라고 사료된다. 본 실험에서는 백색계통의 안개초에 색소유전자를 전이하여 새로운 색소발현체계를 가진 품종을 육종하기 위하여 핑크색 계통의 품종인 Red Sea의 꽃봉오리로부터 mRNA를 분리하여 cDNA-library를 만들고, 이 library로부터 FHT 유전자를 cloning 하였으며 sequencing을 통하여 그들의 염기서열을 분석하였고 나아가 분리유전자의 다양한 발현에 대한 실험을 수행하였기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 식물재료의 확보

안개초 (*Gypsophila paniculata* L) 품종 중 핑크색의 색소발현체계를 가진 “Red Sea”는 남원 고령지 화훼시험장의 정동춘박사로부터 식물체를 받아 학교 내의 온실에서 화분에 심어 재배하였으며 cDNA-library의 제작을 위한 재료 및 효소활성 측정을 위한 재료로 사용하였다. 또 다른 핑크색의 색소발현체계를 가진 “Flamingo”와 일반적으로 가장 많이 재배하는 품종인 백색의 “Bristol Fairy”는 필요에 따라 화원에서 구입하여 사용하였으며 Northern blot 분석 등에 사용하였다. 재료는 각 조직별로 수확하여 바로 액체질소로 냉동 후 -70℃

에 저장하여 필요에 따라 사용하였다.

### mRNA의 분리

10 g의 stock의 꽃봉오리로부터 guanidine hydrochloride 방법 (Logemann *et al.* 1987)을 변형하여 total RNA를 분리하였고, 이 total RNA로부터 mRNA를 분리하기 위하여 oligo-dt-cellulose (Sigma, USA)를 사용하였고 buffer A (10 mmol Tris-HCl pH 7.4, 0.4 mol NaCl, 0.2% SDS)와 buffer B (10 mmol Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mol NaCl, 0.2% SDS)로 씻어준 후 분리하였다. 분리된 mRNA의 순도를 측정하기 위하여 UV-spectrophotometer를 통하여 확인하였다 (Sambrook *et al.* 1989).

### cDNA-library의 합성

안개초 cDNA-library 구축을 위하여 핑크색의 색소발현체를 가진 품종인 Red Sea의 꽃봉오리로부터 5  $\mu$ g의 poly(A<sup>+</sup>)-mRNA를 분리하여 사용하였다. cDNA-library를 합성하기 위하여 Pharmacia (USA) 제품인 cDNA-library 합성 kit를 사용하여 cDNA를 합성하고 이 ds-cDNA는 Lambda-ZAP II vector에 삽입시킨 후 재조합시켰으며 재조합된 lambda-zap II는 *in vitro* packaging (Stratagene, USA)과 amplification을 통하여 cDNA-library를 완성하였다.

### 유전자의 기내발현

분리한 안개초의 FHT 유전자가 목적했던 유전자임을 확인하기 위하여 분리유전자를 template로 T7 RNA polymerase를 사용하여 기내에서 transcription 시키고 [<sup>35</sup>S]-methionine (Amersham, USA)을 사용한 reticulocyte lysate system (Promega, USA)에 의해 translation 시켜 기내발현을 수행하였다. *In vitro* translation을 위하여 2  $\mu$ l의 1 mmol amino acid mixture (Promega, USA), 5  $\mu$ g의 poly(A<sup>+</sup>) RNA 및 40  $\mu$ l reticulocyte lysate (Promega, USA)를 혼합한 후 이 혼합물은 1 시간 동안 30°C에서 incubation 하고 Sephadex G50 (Pharmacia, USA) column을 사용하여 전체량을 1 ml에 맞추고 enzyme buffer (0.1 mol Tris/HCl, pH 7.5, 20 mmol sodium ascorbate)를 통하여 정제하였다.

### Genomic DNA의 분리 및 Southern blot 분석

유전자의 분석을 위하여 안개초의 어린꽃잎으로부터 Manning (1991)의 방법을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다.

분리된 안개초의 DNA를 제한효소 *EcoRV* 와 *XhoI* 으로 각각 절단한 후 0.8% agarose gel에 전기영동하고 이를 nylon membrane (Hybond-N, Amersham, USA)으로 옮긴 후 안개초의 FHT cDNA를 probe로 이용하여 Southern blot hybridization을 실행하였다 (Southern, 1975).

### Northern blot 분석

Northern blot 분석을 위해서는 핑크색의 품종인 Flamingo와 Red Sea 및 백색의 Bristol Fairy의 어린 꽃봉오리로부터 total RNA를 추출하였고 (Logemann *et al.* 1987), 전기영동은 1.2% formaldehyde agarose gel 상에서 수행하였으며 Sambrook (1989) 등의 방법에 준하여 안개초의 FHT cDNA의 1.4 kb 절편을 <sup>32</sup>P로 labeling하여 probe로 사용하였다. Hybridization은 50% formamide, 5 X SSC, 0.05 mol phosphate buffer, Denhardt's solution을 이용하여 42°C에서 수행하였다.

### FHT 효소 활성의 측정

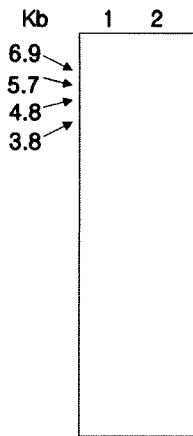
FHT 효소활성 측정은 Britsch (1986)의 방법에 의하여 수행하였다. 기본적인 효소활성의 측정을 위해서 전체 용량을 100  $\mu$ l로 하였으며 자세한 조성은 5-50  $\mu$ l의 효소추출액, 100 pmol 방사성기질 (<sup>14</sup>C]-naringenin, 167Bq), 0.1 mol Tris-HCl, 0.4% sodium ascorbate, 500  $\mu$ mol 2-oxoglutarate와 100  $\mu$ mol FeSO<sub>4</sub> 등이다. 이 혼합물을 30°C에서 30 분간 항온기에서 각각의 반응을 유도한 후 즉시 2번 (50 and 30  $\mu$ l) 반복하여 ethyl acetate로 추출한 후 추출액은 Thin layer chromatography (TLC)를 통하여 분석하였고 여기에 사용된 solvent system 은 chloroform/acetic acid/water (10 : 9 : 1)로 혼합하였다. TLC 위의 방사선의 정량분석은 TLC analyzer (Berthold, Germany)을 사용하여 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 안개초로부터 FHT 유전자의 분리 및 염기서열 분석

10 g의 꽃봉오리로부터 guanidium chloride 방법을 사용하여 total RNA를 분리한 결과 4.841 mg을 얻었고 1차 oligo-dt-cellulose column을 통하여 38  $\mu$ g의 mRNA를 얻었으며 2차 column을 통과한 후 15  $\mu$ g의 순수한 mRNA를 분석하였다. 이 중 5  $\mu$ g의 mRNA를 cDNA-library의 합성에 사용하였다. 합성된 cDNA-library로부터 카네이션의 FHT-cDNA를 probe로 하여 screening하여 본 결과 5개의 positive clone을 분리하



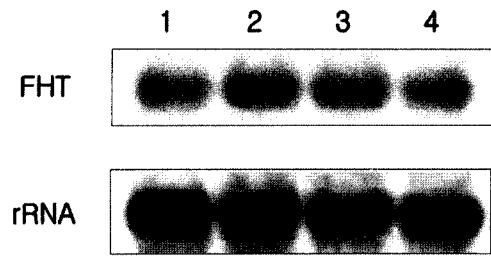


**Figure 6.** Southern blot analysis of genomic DNA from wild type *Gypsophila paniculata*. 1: Digestion with *EcoRV*. 2: Digestion with *XhoI*.

는지 확인하기 위하여 Southern blot 분석을 수행하였다. cDNA-library 제작에 사용하였으며 핑크색의 색소발현체계를 가진 Red Sea의 꽃잎으로부터 DNA를 분리한 후 cDNA상에 1개의 cutting site를 가진 제한효소인 *EcoRV*과 *XhoI*으로 처리하여 자르고 FHT cDNA를 probe로 hybridization을 해 본 결과 각각의 lane에 동일한 강도를 가진 두개의 band를 보였다. Figure 6에서 보는 바와 같이 제한효소 *EcoRV* 으로 자른 경우 각각 6.9 kb, 3.8 kb 크기의 band가, *XhoI* 로 자른 경우 각각 5.7kb, 4.8kb 크기의 band를 나타냄으로써 안개초의 FHT 유전자는 genom 내에 오직 한 개가 존재한다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 이미 보고된 금어초 (Forkmann *et al.* 1981), 페튜니아 (Britsch *et al.* 1992), 카네이션 (Dedio *et al.* 1995), 과꽃 (Dedio *et al.* 1995), stock (Dedio *et al.* 1995), 장미 (Dedio *et al.* 1995), 옥수수 (Deboo *et al.* 1995), 알팔파 (Charrier *et al.* 1995) 등과 일치하며 *Ipomoea batatas* (Shiokawa *et al.* 1999)의 경우는 3개의 서로 다른 염기서열을 가진 FHT 유전자를 분리했다는 보고가 있다. 다른 flavonoid 생합성 관련 유전자의 경우 Beld 등 (1989)의 보고에 의하면 페튜니아는 적어도 8개의 CHS 유전자와 2개의 CHI 유전자가 존재하며 DFR 유전자는 3개의 copy를 보였으나 실제로 오직 하나의 유전자 *DFR-A* 만이 DFR 기능을 가지고 있음을 증명하였고, 장미 (Tanaka *et al.* 1995)의 경우 많은 copy 수를 확인하였으나 재료식물 자체가 inbred line이 아니며 tetraploid 식물이기 때문에 정확한 copy 수를 단정하기 힘들다는 어려움이 있고 거베라 (Helariutta *et al.* 1993)의 genome에는 다양한 수의 DFR 유전자가 존재함이 보고 되었으나, 그 외 대부분 식물의 genome 에는 단지 하나의 DFR 유전자가 있음이 보고되었다.

**백색의 Bristol Fairy 의 Northern blot 분석**

본 실험의 최종적인 목적은 현재 백색과 핑크색의 색소발

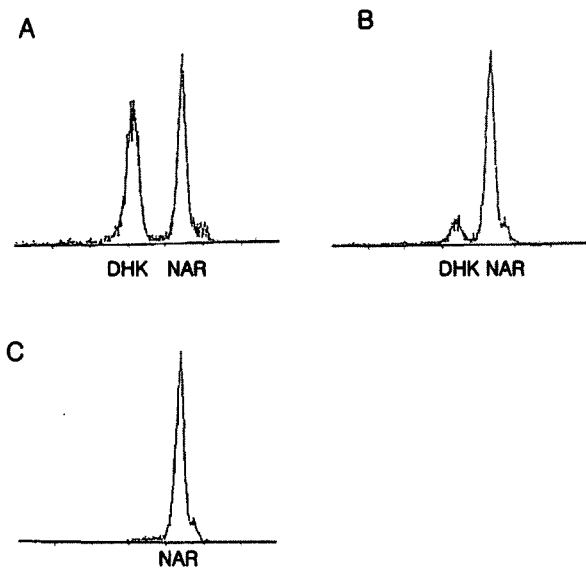


**Figure 7.** Northern blot analysis of poly(A<sup>+</sup>)RNA from the wild type and mutant of *Gypsophila paniculata*. 1: Wild type cultivar “Flamingo” (pink) 2: Wild type cultivar “Red Sea” (pink) 3, 4: Mutant cultivar “Bristol Fairy” (white) Hybridization of the same blot with a rRNA probe was performed to test equal loading.

현체계를 가진 안개초를 적합한 유전자의 형질전환을 통하여 다양한 색소발현체계를 가진 품종의 육성이므로 기존의 백색 안개초에 대한 발현 검정은 필수적인 기초실험이다. 우선 현재 가장 많이 재배되고 있는 안개초 품종인 Bristol Fairy에 있어 어떠한 유전자가 blocking되어 백색을 나타내는지 검정하기 위하여 본 실험에서 분리한 안개초의 FHT cDNA를 probe로 사용하여 FHT 유전자의 발현을 Northern blot 분석을 통하여 조사하였다. Bristol Fairy의 꽃봉오리로부터 mRNA를 분리하고 Northern blot 분석을 수행한 결과 Figure 7에서 보는 바와 같이 1.4 kb크기의 강한 signal을 보였고, positive control로 사용한 핑크빛의 색소발현체계를 가진 Flamingo와 Red Sea의 경우도 동일한 결과를 나타내었다. 이러한 결과로 분석해 보면 백색의 안개초인 Bristol Fairy의 FHT 유전자는 적어도 flavonoid 생합성 과정에서 온전하게 발현됨을 알 수 있었다. FHT 유전자를 제외한 다른 flavonoid 생합성 관련 유전자의 blocking 가능성을 추측할 수 있는데 FHT 이후의 유전자인 DFR, ANS (anthocyanidin synthase), FGT (flavonoid glucosyl transferase) 유전자 중 하나의 유전자가 blocking되거나 혹은 double blocking의 가능성도 생각할 수 있다. CHS 유전자의 경우는 진화학적으로 매우 안정되어 있기 때문에 blocking될 가능성이 희박하며, CHI 유전자가 blocking될 경우는 chalcone의 축적에 의해 황색의 색소발현을 나타내므로 역시 blocking될 가능성이 적다 (Heller 1993). 적어도 본 실험에서는 FHT 유전자는 정상적으로 발현하고 있음을 증명하였고 그 밖의 유전자는 계속적으로 분리하고 있으므로 앞으로 분석을 수행할 예정이다.

**FHT 유전자의 효소 활성 측정**

본 실험에서 분리한 안개초의 FHT cDNA의 효소활성을 측정하기 위하여 translation mixture를 Sephadex G50 column을 통해 purify한 후 FHT 효소활성 측정을 수행하였다 (Dedio



**Figure 8.** Radioscan of TLC (Thin Layer Chromatography) on cellulose from FHT assays using [ $^{14}$ C]-naringenin as substrate. **A.** Assay with crude extract of wild-type *Gypsophila* as a positive control **B.** Assay with *in vitro* synthesized FHT using poly(A<sup>+</sup>)RNA from flower buds of wild-type *Gypsophila*. **C.** Assay with reticulocyte lysate as a negative control.

**NAR:** naringenin, **DHK:** dihydrokaempferol.

*et al.* 1995). FHT 활성은 ( $^{14}$ C)naringenin을 기질로 사용하여 naringenin이 dihydrokaempferol로 변하는 양을 TLC를 통하여 측정하였다. Positive control로 핑크색의 발현을 하는 안개초 품종 Red Sea의 꽃봉오리에서 추출한 crude extract를 purify하여 FHT 효소 활성을 보였고 negative control로는 translation mixture를 넣지 않고 reticulocyte lysate만 첨가하여 측정하였다. Figure 8에서 보는바와 같이 positive control의 경우 매우 강한 FHT 활성을 보였으며 (Figure 8a), translation mixture의 경우 작은 dihydrokaempferol peak을 보였다(Figure 8b). Negative control의 경우는 예상한 바와 같이 FHT 효소 활성을 전혀 보이지 않았다 (Figure 8c). 이와 같은 결과를 통해 본 실험에서 분리한 FHT 유전자는 효소활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

## 적 요

Flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase (FHT)는 flavonoid 생합성 경로의 가장 중심부에 작용하는 효소로 flavanone으로부터 dihydroflavonol으로의 변환을 촉매하는 역할을 한다. 본 연구에서는 색소유전자의 전이를 통하여 새로운 색소발현체계를 가진 품종을 육종하기 위한 기초연구로 숙성안개초 (*Gypsophila paniculata* L.)의 꽃봉오리로부터 cDNA-library를 합성하였고 카네이션의 FHT 유전자를 probe로 사용하여 anthocyanin 합

성경로의 중요 효소의 하나인 FHT 유전자를 분리하였다. 염기서열분석을 수행하여 분리유전자의 크기가 1471 bp이며 이 중 coding region은 1047 bp임을 확인하였다. 이미 밝혀진 다른 식물체의 FHT 유전자와 서로 염기서열의 일치성을 비교해 본 결과 아라비도시스, 오렌지, 카네이션, 고구마, 스톡, 페튜니아, 감자 및 포도에서 각각 69% 이상을 나타내었다. 분리유전자의 발현을 확인하기 위하여 Northern blot 분석 및 인위적으로 기내에서의 transcription과 translation을 수행하였고, 분리한 유전자의 효소활성을 측정해 본 결과 dihydrokaempferol의 작은 peak을 확인하였다. Southern blot 분석의 결과 안개초의 FHT 유전자는 다른 대부분의 식물체와 유사하게 한 개가 존재함을 확인하였다.

## 인용문헌

- Beld M, Martin C, Huits H, Stuitje AR and Gerats AGM (1989) Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol 4-reductase genes *Plant Mol. Biol.* 13: 491-502
- Betz GA, Knott J, Forkmann G (2002) *Solanum tuberosum* flavanone 3-hydroxylase mRNA. accession number AY10-2035 EMBL-library
- Britsch L, Grisebach H (1986) Purification and characterization of (2S)-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrida*. *Eur. J. Biochem.* 156: 569-577
- Britsch L, Ruhnau-Brich B, Forkmann G (1992) Molecular cloning, sequence analysis and *in vitro* expression of flavanone 3-hydroxylase from *petunia hybrida*. *J. Biol. Chem.* 267: 5380-5387
- Britsch L, Dedio J, Saedler H, Forkmann G (1993) Molecular characterization of flavanone 3-hydroxylases. Consensus sequence, comparison with related enzymes and the role of conserved histidine residues. *Eur. J. Biochem.* 217(2); 745-754
- Charrier B, Coronado C, Kondorosi A, Ratet P (1995) Molecular characterization and expression of alfalfa flavanone 3-hydroxylation and dihydroflavonol 4-reductase encoding genes. *Plant Mol. Bio.* 29: 773-786
- Deboo BG, Albertsen MC, Taylor LP (1995) Flavanone 3-hydroxylase transcripts and flavonol accumulation are temporally coordinated in maize anthers. *Plant J.* 7: 703-713
- Dedio J, Saedler H, Forkmann G (1995) Molecular cloning of the flavanone 3-hydroxylase (FHT) gene from carnation and analysis of stable and unstable FHT mutants. *Theo. Appl. Genet.* 90: 611-617
- Dooner HK, Robins T, Jorgensen RA (1991) Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Ann. Re. Genet.* 25: 173-199
- Forkmann G and Stotz G (1981) Genetic control of flavanone 3-hydroxylase activity and flavonoid 3'-hydroxylase activity in *Antirrhinum majus*. *Z. Naturforsch.* 36c:

- 411-416
- Heller W, Forkmann G (1993) In: The Flavonoids. Advances in research since 1986 (Harborne JB, Ed) Chapman and Hall, London, 399-425
- Helariutta Y, Elomaa P, Kotilainen M, Seppänen P and Teeri TH (1993) Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol 4-reductase and characterization of dfr expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae). Plant Mol. Biol. 22: 183-193
- Joshi CP (1987a) An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. Nucl. Acids Res. 15: 6643-6653
- Joshi CP (1987b) Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: A compilation and analysis. Nucl. Acids Res. 15: 9627-9640
- Lee HJ, Nahm SH, Ahn BJ, Joung HY, Min BW (2004) Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol 4-reductase (DFR) and characterization of dfr expression in carnation petals. 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
- Manning K (1991) Isolation of nucleic acid from plants by differential solvent precipitation. Analytical Biochem. 195: 45-50
- Martin C, Prescott A, Mackay S, Bartlett J, Vrijlandt E (1991) Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. Plant J. 1: 37-49
- Moriguchi T, Kita M, Tomono Y, Endo-Inagaki T, Omura M (2001) Gene expression in flavonoid biosynthesis: Correlation with flavonoid accumulation in developing citrus fruit. Physiol. Plantarum 111: 66-74
- Niesbach-klösgen U, Barzen E, Bernhardt J, Rohde W, Schwarz-Sommer Zs, Rief HJ, Wienand U and Saedler H (1987) Chalcone synthase genes in plants: a tool to study evolutionary relationships. J. Mol. Evol. 26: 212-225
- Pelletier MK, Shirley BW (1996) Analysis of flavanone 3-hydroxylase in *Arabidopsis seedlings*. Plant Physiol. 111: 339-345
- Pelt JL, Downes WA, Schoborg RV, McIntosh CA (2003) Flavanone 3-hydroxylase expression in *Citrus paradisi* and *Petunia hybrida* seedlings. Phytochem. 64: 435-444
- Quattrocchio F, Wing JF, Leppen HTC, Mol JNM, Koes R (1993) Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionary conserved among plant species and have distinct sets of target genes. Plant Cell 5: 1497-1512
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, NY.
- Shiokawa k, Murata T, Noguchi H, Hoshino A, Iida S (1999) *Ipomoea batatas* f3h mRNA for flavanone 3-hydroxylase. accession number AB023788 EMBL-library
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517
- Sparvoli F, Martin C, Scienza A, Gavazzi G, Tonelli C (1994) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape. Plant Mol. Biol. 24(5): 743-755
- 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(6): 1023-1031
- Turnbull JJ, Nakajima J, Welford RWD, Yamazaki M, Saito k, Schofield CJ (2004) Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis. J. Biol. Chem. 279: 1206-1216
- Ueyama Y, Katsumoto Y, Fukui Y, Ohkawa H, Kusumi T, Tanaka Y (2002) *Nierembergia sp.* NB17 f3h mRNA for flavanone 3-hydroxylase. accession number AB078513 EMBL-library
- Yamada k, Liu SX, Sakano H (2002) *Arabidopsis thaliana* putative flavanone 3-hydroxylase mRNA. accession number AF360338 EMBL-library

(접수일자 2006년 7월 6일, 수리일자 2006년 9월 4일)