

매향 딸기로부터 anthocyanin 합성 유전자의 분리 및 과실발달 과정에서의 발현 분석

배기석 · 김준영 · 피재호*

단국대학교 분자생물학과, BK21 RNA 전문인력양성팀, 나노센서바이오텍연구소

Received January 31, 2008 / Accepted February 20, 2008

A Set of Anthocyanin Biosynthetic Genes are Differentially Expressed in Strawberry (*Fragaria x ananassa* cv Maehyang) during the Fruit Development Process. Kisuk Bae, Joon Yeong Kihl and Jaeho Pyee*. Department of Molecular Biology, BK21 Graduate Program for RNA Biology and Institute of Nanosensor and Biotechnology, Dankook University, Yongin-si, 448-701, Korea - Anthocyanin synthesis in strawberry (*Fragaria x ananassa* cv Maehyang) begins approximately 26 days postflowering and continued throughout fruit ripening. A set of cDNA clones encoding the anthocyanin biosynthetic enzymes were isolated from strawberry. A pair of primers were designed for polymerase chain reaction (PCR) through the comparison of the nucleotide sequences of homologous genes from diverse plants. Reverse transcriptase-PCRs were performed using cDNA synthesized from ripe fruit total RNA and the primers corresponding to each gene. Eight genes of the anthocyanin pathway were cloned and confirmed by sequencing to code for phenylalanine ammonia lyase (PAL), 4-cummarate CoA ligase (4CL), chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavanone-3-hydroxylase (F3H), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), anthocyanidine synthase (ANS), UDP-glucose:flavonoid-3-O-glucosyltransferase (UGT). Northern analyses showed that the corresponding genes were differentially expressed during the fruit development process. All genes except PAL were predominantly expressed in fruit. Expression of PAL, DFR and ANS was detected 10 days postflowering at the early stage of fruit development, declined for a while and sharply increased 22 days postflowering then showed a peak 34 days postflowering. The other genes, however, were not expressed up to 22 or 30 days postflowering when the initial fruit ripening events occur at the time of initiation of anthocyanin accumulation. The onset of anthocyanin synthesis in ripening strawberry coincides with a coordinated induction of the anthocyanin pathway genes, suggesting the involvement of regulatory genes. We propose that at least two different regulatory mechanisms play a role in the biosynthesis of anthocyanin during color development of strawberry.

Key words : Maehyang strawberry, anthocyanin biosynthetic genes, fruit development, regulation of gene expression

서 론

딸기(*Fragaria x ananassa* Duch.)는 생과 및 가공 원료로 이용되고 있는 과채류로서, 특히 비타민 C와 함께 항산화 활성이 있는 다양한 페놀성 화합물을 함유하고 있다[11]. 이에 따라 품종[11,14]이나 생장 온도[3,15], 그리고 수확 후 저장 조건[7,16,18] 등에 따른 항산화 활성 및 페놀성 성분의 함량에 대한 연구가 많이 수행되어 왔다. 그러나 이와 같은 페놀성 화합물의 다양한 생리 활성에도 불구하고, 안토시아닌 등 각 성분의 생합성 과정에 대한 연구는 그리 활발하게 이루어지지 못했다. 그동안 보고된 딸기의 안토시아닌 합성 유전자는 phenylalanine ammonia lyase (PAL), chalcone synthase (CHS) [10], dihydroflavonol 4-reductase (DFR) [12] 등, 구조 유전자와 이들 유전자의 조절에 관여하는 전사인자 *FaMYB1* [1]가 있다. 그 외 Gene bank에는 chalcone isomerase (CHI) [AY017478],

flavanone 3-hydroxylase (F3H) [AY017482], UDP-glucose:flavonoid-3-O-glucosyltransferase (UGT) [AY575056] 등이 등록되어 있다. 이와 더불어 최근 Almeida 등[2]이 'Queen Elisa' 품종으로부터 여러가지 flavonoid 합성 유전자를 분리하면서, 딸기의 안토시아닌 생합성에 대한 연구가 더욱 활발해지고 있다. 이들은 과실 발달 단계별로 안토시아닌 합성에 관여하는 주요 유전자의 발현량을 조사하였는데, 'Chandler' 품종에서 기존에 보고된 DFR 유전자의 발현 양상과는 일부 다른 결과를 보여주었다[12]. 딸기 품종에 따라 안토시아닌 합성 유전자의 발현 profile이 조금씩 다르다는 것을 알 수 있다.

한편, 국내에서의 딸기에 관한 연구는 식품 가공에 국한되어 왔으며, 이에 따라 품종 개량 및 품질 향상을 위한 기초 자료로 삼을 만한 기능성 성분의 생합성 유전자에 대한 정보는 거의 없는 실정이다. 특히 과실 발달 과정에서 이들 유전자의 발현 특성에 대한 통합적인 검토가 이루어진 적이 없다. 더군다나 국내에서 선발·육종된 '매향' 딸기를 모델로 이러한 연구가 수행된 경우는 전무하다. 따라서 본 연구에서는 '매향' 딸기의 품질을 높이고 유용 성분을 이용한 다양한

*Corresponding author

Tel : +82-31-8005-3197, Fax : +82-31-8005-3191

E-mail : jpyee1@dankook.ac.kr

식품 소재로 활용하기 위해, 안토시아닌 생합성에 관여하는 주요 유전자를 분리하고 과실 발달과정에서 이들의 발현 양상을 분석하였다.

재료 및 방법

실험 재료

충청남도 논산의 딸기 재배농가로부터, 국내산 '매향' 딸기를 개화시기부터 시작하여 과실 발달 단계별로 수확한 다음, 각각 액체 질소로 급냉시킨 뒤, -80°C에 보관하였다.

Total RNA 분리

-80°C에 보관되어 있는 재료로부터 5 g을 채취하여 막자 사발에 옮겨 고운 가루로 만든 후, 25 ml의 extraction buffer (2% CTAB, w/v; 1.4 M NaCl; 1% PVP, w/v; 0.2% β -mercaptoethanol, v/v; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 0.4 g PVPP/g)를 첨가한 다음, 40 ml의 polypropylene tube로 옮겨 70°C의 항온 수조에서 5분간 정치시켰다. 이후 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1, v/v/v)을 첨가하여 혼합시킨 뒤 13,000 rpm에서 원심 분리하였다. 상층액을 새로운 tube로 옮겨서 0.6배의 isopropanol을 넣고, -20°C에서 30분간 침전시킨 뒤, 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리 하였다. Pellet에 0.6 ml의 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 처리 멸균 증류수를 넣고 녹인 후 Eppendorf tube로 옮겼다. 동량의 4 M LiCl를 넣고 4°C에서 12~14시간 정치시킨 다음 원심 분리하였다. Pellet을 70% ethanol로 씻고, 30~50 μ l의 DEPC 처리 멸균 증류수에 녹여서 -80°C에 보관하며 사용하였다. Total RNA는 UV Spectrophotometer (BIORAD)를 사용하여 정량하였으며, 1.8%의 formaldehyde-agarose gel에서 RNA 상태를 확인하였다.

RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

딸기에서 분리한 2 μ g의 total RNA로부터 oligo (dT)-adaptor primer (CTGTGAATGCTGCGACTACGATT₁₈)를 이용하여 cDNA를 합성한 다음, PCR의 주형으로 사용하였다. 여러 식물체로부터 분리된 anthocyanin 생합성 경로에 관여하는 주요 유전자의 염기 서열을 비교하여, 유사성에 따라 단일 혹은 degenerate primer를 제작하여 forward primer로 사용하였다. Antisense primer는 cDNA 합성 시 사용한 adaptor에 대한 상보적인 primer를 제작하여 사용하였다. PCR 반응은 94°C에서 30 초, 52°C에서 40초, 그리고 72°C에서 50 초의 반응을 30 cycle 반복하는 것을 기본으로, 제작된 primer의 annealing 온도에 맞게 변형하였다. PCR 반응으로 얻어진 산물을 정제하여 pCR 2.1 TOPO vector에 ligation한 후 *E.coli* TOP10에 형질전환 하였다.

염기서열 작성 및 분석

Dideoxy chain termination 방법을 이용하여 각 클론의 염기서열을 작성하였으며, NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)와 TIGR (<http://www.tigr.org/>) database를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

Northern blot 분석

발달 단계별 과실 시료로부터 추출한 RNA 20 μ g에 loading buffer를 넣고 70°C에서 10분간 처리한 후, 1 μ l의 ethidium bromide (0.1 mg/ml)와 함께 1.8% formaldehyde가 포함되어 있는 1.3% agarose gel에서 50 V로 전기영동하였다. 전기영동한 gel을 DEPC-water로 15 분간 세척하고 20용액으로 20분 동안 침윤시킨 뒤, Sambrook 등[13]의 방법으로 membrane에 옮긴 후, UV cross linker (Fisher)로 고정시켰다. Membrane을 5 \times SSC, 0.1% (w/v) N-lauroylsarcosine, 0.2% (w/v) SDS, 1% blocking reagent가 포함된 pre-hybridization 용액에 넣고 60°C에서 2시간 동안 교반시켰다. 전혼성화반응이 끝난 뒤, probe를 넣고 55°C에서 18시간 hybridization 반응을 시켰다. 각각의 유전자에 대한 cDNA clone을 주형으로 DIG-dUTP (Roche)와 함께 PCR을 수행한 다음 PCR product를 probe로 사용하였으며, primer를 포함한 반응조건은 RT-PCR 실험과 동일하였다. 혼성화 반응이 끝난 후 1차 washing buffer (2 \times SSC, 0.1% SDS)로 실온에서 15분씩 3회 세척하고, 다시 2차 washing buffer (0.5 \times SSC, 0.1%)로 55°C에서 15분간 세척하였다. CSPD detection kit (Roche)을 사용하여 X-ray film에 감광시켰다.

결과 및 고찰

'매향' 딸기의 과실발달 과정

개화시기부터 시작하여 개화 후 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 40일이 경과된 '매향' 딸기를 수확하였다. '매향' 딸기는 개화 후 22일이 경과하면 크기가 거의 최대에 이르며, 26일경부터 안토시아닌의 축적이 시작된다. 그리고 개화 후 40일이 지나면 숙기가 완성된다. 이러한 과실 발달 특성을 'Queen Elisa' 품종과 비교하면, 안토시아닌의 축적은 하루 늦게 시작하고, 숙기 완성은 약 10일 늦게 일어난다[2].

안토시아닌 생합성 유전자의 분리 및 염기서열 분석

안토시아닌 생합성에 대해서는 *Arabidopsis*, 페튜니아, 옥수수, 포도 등 여러 식물체를 대상으로 오랫동안 연구되어 왔으며, 지금까지 상당한 연구 진척이 있었다[8]. 안토시아닌 합성에 관여하는 유전자는 크게 두 가지로, 그 중 하나는 생합성 과정에 직접적으로 관여하는 효소를 암호화하는 구조 유전자이며, 또 다른 하나는 이들 구조 유전자의 발현을 제어하는 조절 유전자이다. 식물의 종류에 따라 최종 산물의

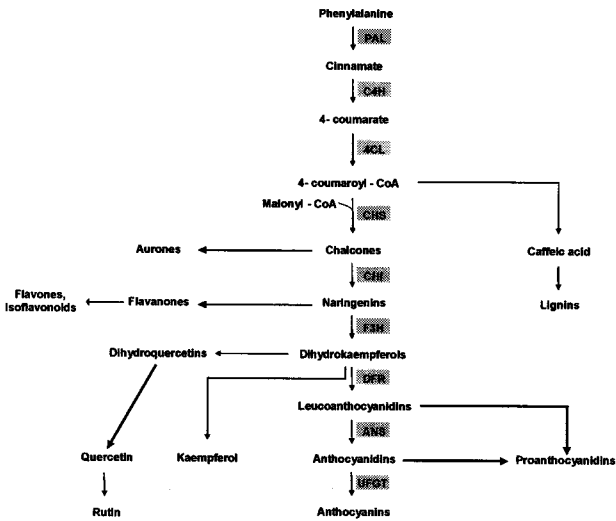


Fig. 1. The anthocyanin biosynthesis pathway. This diagram has been modified from a published paper [4] to account for the major products in strawberry.

성분은 다르지만, 안토시아닌 합성은 기본적으로 Fig. 1과 같은 경로를 거친다[4,5,6].

‘매향’ 딸기로부터 안토시아닌 합성 유전자를 분리하기 위해, PCR용 forward primer를 디자인하였다. 딸기에서 이미 분리된 유전자나, 다른 식물체에서 보고된 유사 유전자의 염기서열을 활용하여 유사도가 가장 높은 conserved region에 대한 primer를 제작하였다. PAL 및 4CL 유전자의 경우, degenerate primer를 제작하였고, 나머지 유전자의 경우에는 특이적인 단일 primer를 사용하였다(Table 1). 그리고 reverse primer로는 reverse transcriptase 반응에 사용한 oligo (dT)-adaptor의 adaptor에 상보적인 primer를 제작하여 사용하였다. 숙기의 딸기 RNA로부터 합성된 cDNA와 각 primer set를 이용하여 RT (reverse transcriptase)-PCR을 수행한 결과, 안토시아닌 합성에 관여하는 8개의 주요 유전자에 대한 partial cDNA를 얻을 수 있었다. 각 유전자의 동정은 이러한 partial cDNA에 대한 염기서열을 분석함으로써 확인하였다. 이들은 각각 안토시아닌 생합성에 관여하는 phenylalanine ammonia lyase (PAL), 4-cummarate CoA ligase (4CL),

```

ATGTCACACTCTTTGGGGCTGATTTTCGTACGAAAACTGCAAGAAGCAGTTGACATACTGA 60
V N S L G L I S S R K T A E A V D I L
AGTCATGCTTCCACATTTTTGGTAGCGCTTTGCCAAGCCATTGATTTGAGCCATTTGG 120
K L M S S T F L V A L C Q A I D L R H L
AGGAGAAGCTGAAGAGCAGGTTAAGAACACTGTGAGTCAGTTGCCAAGAGGCCTTTTAA 180
E E N L K S T V K N T V S Q L A K R L L
CTACCGGGTGAATGGAGACTTCACCCTTCGAGGTTCTGTGAGAAGGATTTGCTTATGG 240
T T G V N G E L H P S R F C E K D L L M
TTGTCGAAAAGGAGTACCTTTTCGCTACATTCAGCATCTTCAGCGCTACATATCCGT 300
V V E K E Y L F A Y I D D P C S A T Y P
TGATGCAAGGCTAAGGCAAGTGTGTGAACACGCTTGACAATGGTGAAGATGAGA 360
L M Q R L R Q V L V E H A L T N G E N E
AGAACGCAACACTTCAATTTTCCAAAGATTTCCGCATTGAGGAAGAGCTTAAGACCA 420
K N A N T S I F Q K I S A F E E E L K T
TTTTGCTAAAGAGGTTGAGAGCGTAGGGCTGCATGCGAGAGCGGTAATGCGGGGATTTC 480
I L P K E V E S A R A A C E S G N A A I
CAAAACAGAAATCATCGAGTGCAGGTCATATCCTTTGTACAAAATTTGTGAGGGAGGATTGG 540
P N R I I E C R S Y P L Y K F V R E E L
GGGAGAGTCTTTCAGCGGCGAAAAGGTCAGGTCACCCGGGAGGAGTGTGACAAGGTAT 600
G G E F L T G E K V R S P G E E C D K V
TCACAGCTATGTCAGGGGAAAATCATTTGATCCAAATTCGATTGCGCTCAGTGGTTGGA 660
F T A M C Q G K I I D P I L D C L S G W
ACGGTGAACCTCTCCGATATGCTAGCtttctgctgccgattctttgatgtgtgcat 720
N G E P L P I C *
tctgttccactctctctgctccatagtcttaagtttgatgaggattcctagctttaa 780
gtgtgactataataacctatagaatgtaaacatattgtttatttgaatgattcatcttt 840
ctcagcttaatagtaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 872
    
```

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of PAL gene obtained from the Maehyang strawberry. The 3'-untranslated region is indicated in lower-case letters. The underlined sequences indicate a putative poly-adenylation signal. The star designates the stop codon. Identity of PAL gene obtained from the Maehyang strawberry with *Fragaria x ananassa* (AB360390) is sixty-one percent.

chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavanone-3-hydroxylase (F3H), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), anthocyanidine synthase (ANS) 그리고 UDP-glucose:flavonoid-3-O-glucosyltransferase (UFGT) 효소에 해당된다. 각 clone의 길이는 PAL 872 bp, 4CL 842 bp, CHS 466 bp, CHI 388 bp, F3H 533 bp, DFR 729 bp, ANS 810 bp, UFGT 612 bp이었다. ‘Queen Elisa’ 등, 다른 딸기 품종으로부터 기존에 분리된 유전자의 염기서열과 비교한 결과, 56%(4CL)~98%(CHS) 정도 유사하였다(Fig. 2~Fig. 9). 이러한 결과로부터, 각 품종 간 안토시아닌 합성에 관여하는 구조 유전자의 염기서열 차이가 상당하다는 것을 알 수 있다. 뿐만 아니라 Almeida 등[2]의 보고에 따르면, ‘Queen Elisa’ 딸기의 genome 상에는 ANS, DFR, 그리고 F3H 유전자의 유사유전자가 각각 4~5개씩 존재한다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 시료로 사용한 ‘매향’의 경우에도, 숙기 과실에

Table 1. Lists of primers used for gene cloning by RT-PCR

Genes		Primer sequence	Annealing Tm (°C)
PAL	Forward	5' -GCNGASSARCAYAAAYCARGA-3'	56.4
4CL	Forward	5' -CAGGGDTAYGGDATGACNGA-3'	56.8
CHS	Forward	5' -CCCAGCAATTCTGGACCAAGT-3'	57.8
CHI	Forward	5' -CATTGACGATTGGCTTCTCC-3'	55.4
F3H	Forward	5' -GTGACTGAGTGACCATTAACATACG-3'	67.2
DFR	Forward	5' -CCACCAAGCCTCATATCTGG-3'	57.5
ANS	Forward	5' -ACTGAGCATACTCTCACTTGGC-3'	58.1
UFGT	Forward	5' -GCTAGCTGAAGCTCTGGAG-3'	57.1
	Reverse	5' -CTGTGAATGCTGCCACTACGAT-3'	58.1

```

AACTTGTGGAATGGTTTCACTTGAGAATCCAAGAGAAGGATCTCCATTTCCGGTTC AAC 60
T C G M V S L E N P R E G S P F S G S T
CGGCATCTTGTCCCGGAATCGAATCTCGGATAATTAAGTCTCGCACCCCTCAAGCTCT 120
G T L A P G I E S R I I S L D T L K A L
TCCACCTAATGAATGGGAGAAATATGGGTTAGAGACCAAAATATGATGCAAGGTTATTA 180
P F N E L G E I W V R G P N M M Q G Y Y
TAATAATCCAGAAGCCAGCAAGTTGACTATAGATAAAACAGGTCGGGTACACACTGGAGA 240
N N P E A T K L T I D K Q G R V H T G D
TCTTGGACTTTGATGAAGAGGGAAGATGATGTTGTTGGATCGGCTCAAAGAGTCAT 300
L G Y F D E E G R L Y V V D R L K E L I
CAAGTCTTATGTTATCAGGTTGCCCGCAGCAGGCTGAAGGGCTTTTACTTTTCACCC 360
K S Y G Y Q V A P A E L E G L L L S H P
CGAAATCTGGATGCAGCTGTAATCCATTTCCGGATGCTAAAGCCGGTGGGTTCCGAT 420
E I L D A A V I P F P D A K A G E V P I
TGCTTATGTTGTTGCGCACCAATAGCTTGCTAACTGAACAAGACATCTAAAATGTTGT 480
A Y V V R A P N S L L T E Q D I L K C V
GGAGAAGCTGGTTGCACCATCAAAAGACTGCGGAGCATAACGTTTGAACCGTTC 540
E K L V A P F K R L R S I T F V T S V P
AAAGGCCCTTCGGAAAGATTTGAGACGGGAGCTTATACAGAAAAGTCGGTCAACAT 600
K A A S G K I L R R E L I Q K S R S N M
GTAATTTtagtgatccttttagccttatcagtgatataatttggctcaactaaat 660
*
gggcatatgtaattgcttaacacagtggttgggtggaattcacctctttttttttt 720
tatcataatgtagtgaccttatgagcttctccagtttccggttttcttaaaaaaaaa 780
aaaaaaaaaaaaaaaaa 842
    
```

Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *4CL* gene obtained from the Maehyang strawberry. The 3'-untranslated region is indicated in lower-case letters. The underlined sequences indicate a putative poly-adenylation signal. The star designates the stop codon. Identity of *4CL* gene obtained from the Maehyang strawberry with *Rubus idaeus* (AF239686) is fifty-six percent.

```

TGAAGCTAAATGGCCCTCAAGCCTGAGAAGTTAGAAGCCACAAGGCATATCCTATCCGA 60
E A K L A L K P E K L E A T R H I L S E
GTATGGAACACATCTAGTCTGTTGTGTTGTTTATTTGGAGCAAGTCAGGAGGAAGTC 120
Y G N M S S A C V L F I L D E V R R K S
TGCAGCTAATGGGCACAGACCACCGAGAGGGCTGGAGTGGGTTCTTATTTGGGTT 180
A A N G H K T T C G E G L E W G V L F G F
TGGGCTGGGCTCACTGTCGAGACCTGCTGCTTACAGTGTATCTGCTTGAACtttaag 240
G P G L T V E T V V L H S V S A *
gcacccgggtgtagtcgagtgatctctcctagatttggcttatatttggattatttcc 300
attcactttctggctataatttggctttttgaaattttttctagtaaaccttcattt 360
gggcatctcgaggtaaaacttcaaaaataatgagccatgccatgtagcaatatatgta 420
ttgatgataatgcaattccacatataactaaaaaaaaaaaaaaaaa 466
    
```

Fig. 4. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *CHS* gene obtained from the Maehyang strawberry. The 3'-untranslated region is indicated in lower-case letters. The underlined sequences indicate a putative poly-adenylation signal. The star designates the stop codon. Identity of *CHS* gene obtained from the Maehyang strawberry with *Fragaria x ananassa* (AY997297) is ninety-eight percent.

```

AAAGATGGTTGCATACCCGAGTTGGGAATGCGGTGATGAAAACAAGCTACTTTTCAGAG 60
K D G C I P E V G N A V I E N K L L S E
TCAGTCTCGAGTCAATTAATGGGAAGCAAGGTTTCTCTGAAAGCAAGGAAAAGTGTG 120
S V L E S I I G K Q G V S P E A R K S V
GCTACAAGGCTATCAGAAATGTTGGAAGCAGTATGATGTTGTTGGCCGGAATGGGAAA 180
A T R L S E L L E D S D H C V A G N G K
GTGGACGATGCACAAAGGAGCAGAAGTCAAGGCATGAAactgagcctattctgtactt 240
V D E C T K E A E V K A *
caaggcctgcttctgattctagatctcttcccatataagcttttcttctgcttcaaaa 300
agactcaagcatgcttctgattctgctgttttcttatatgtagtcttattttgtaattga 360
gggctgctttaaaaaaaaaaaaaaaaaa 388
    
```

Fig. 5. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *CHI* gene obtained from the Maehyang strawberry. The 3'-untranslated region is indicated in lower-case letters. The underlined sequences indicate a putative poly-adenylation signal. The star designates the stop codon. Identity of *CHI* gene obtained from the Maehyang strawberry with *Fragaria x ananassa* (AB201755) is ninety-four percent.

```

CACATTATTTGGGTGATGGAACAGTTCCTGAGCAATGGGAGGTTCAAGAATGCTGATCAC 60
H I I W V M E Q F L S N G R F K N A D H
CAGGCGGTGGTGAACCTAAAACACAGCAGGTTGCCATAGCGACATCCAGAACCCAGCT 120
Q A V V N S N H S R L S I A T F Q N P A
CAGGAGCGGATAGTGTACCCTGAAGTTCAGAGAAAGGAGAGAAACCAATTTGGGAGG 180
Q E A I V Y P L K V R E G E K P I L E E
CCGATGACTTACACTGAGATGTACAAGAAAGATGACTAAGACCTTAGCTAGCCAGG 240
P M T Y T E M Y K K K M S K D L E L A R
CTAAAGAAAGCATGCAAAGGAGCAACTGCAGGATTCAGAGAAAACCAACTTGAGGCCAAG 300
L K K H A K E Q L Q D S E K T K L E A K
CCAGTGGACGATATCTTTGCTTAAgctatgctatctatcttaactggtattatgact 360
P V D D I F A *
agtagtgtgatctcgagtgagtaacctttatgcatggtttggtatggaatgaaatgaata 420
ggtcaaaaaaaacgctttatggtctggttatggagcctccatgcaagatgataactgct 480
gtgcaaatgcaaacacctagtacaatttatcggaaaaaaaaaaaaaaaaaa 533
    
```

Fig. 6. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *F3H* gene obtained from the Maehyang strawberry. The 3'-untranslated region is indicated in lower-case letters. The underlined sequences indicate a putative poly-adenylation signal. The star designates the stop codon. Identity of *F3H* gene obtained from the Maehyang strawberry with *Fragaria x ananassa* (AB201760) is seventy-two percent.

```

ACTTTCACCCTCACTGGAATGAAGCTCATTATGGGATTATAAGCAATGCCAATACGT 60
L S P L T G N E A H Y G I I K Q C Q Y V
TCACCTAGATGATCTCGCAATCTCATATATTCCTCTACGAGCATCCGAAAGCCGAGGG 120
H L D D L C Q S H I F L Y E H P K A E G
CGGTAGCATCTGTTTCATCACAGATGCCAGATTCAGAGATTTGGGAAATTTGATGAT 180
R Y I C S S H D A T I H D I A K L L N E
AAAATACCCCAAGTATAATGTTCTTAAGAAGTTCAGGGCATTTGAGGAGAACTTGACAAA 240
K Y P K Y N V P K K F K G I E E N L T N
TATCCATTTTCTTCAAAGAAGCTGAAAGAGATGCGGTTTGAAGTTCAAACACAGCTTGA 300
I H F S S K K L K E M G F E F K H S L E
GGACATGTTTACTGGGGCTGTGATGCTTGCAGAGAAAAGGTTCTGCTTCCATTCACCA 360
D M F T G A V D A C R E K G L L P L P Q
GGAAGAAGAAGTCAAAAGCCGAGGCTGGTTAGCgagtggttcatgcaatggctccga 420
E E E T E K R R A G *
tccagtcgaagtatcatatattctcagttacattttttttttttctgagaatgac 480
atctcagttaccttcatctctctattggtgagaattcaaaaagttggttggattt 540
gaatcaattgatgagtggtctactcattcaagctcctcgtttgatgagtaattgt 600
gcttaagaataaataattactctatgctcaagagtagtgaaacaactttttgtatggtac 660
ggtataatgttaaagtaattttgggaaattatggttttgaatcaaaaaaaaaaaaaa 720
aaaaaaaaa 729
    
```

Fig. 7. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *DFR* gene obtained from the Maehyang strawberry. The 3'-untranslated region is indicated in lower-case letters. The underlined sequences indicate a putative poly-adenylation signal. The star designates the stop codon. Identity of *DFR* gene obtained from the Maehyang strawberry with *Fragaria x ananassa* (AF029685) is eighty-eight percent.

서 분리된 위의 유전자 외에도 각각 몇 개씩의 유사 유전자가 존재할 가능성이 높다. '매향' 딸기로부터 이러한 유사 유전자가 분리되고 구조적인 특성이 밝혀지면, 앞으로 품종 간 계통학적인 연관 관계를 규명하고, 우량 품종을 발굴하는데 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

안토시아닌 생합성 유전자의 발현 분석

'매향' 딸기의 과실 발달 단계별로 안토시아닌 생합성 유전자의 발현량을 조사하였다. Northern 분석을 위한 probe 로는, 각각의 cDNA clone을 주형으로 DIG-dUTP (Roche)와 함께 PCR을 수행한 다음, PCR product를 사용하였다. 이때 primer는 이미 염기서열이 확인된 각 clone으로부터 적당한 부위를 선택하여 제작하였다(Table 2). Northern blot 분석

```

TTGGGATTAGAAGAAGGGAGGCTGGAGAAGGAGGTGGTGGACTCGAAGAACCTCCTCTG 60
L G L E E G R L E K E V G G L E E L L L
CAAATGAAGATCACTACTACCCAAAATGCCTCAGCCGGAACCTGCACCTCGCGGTGGAA 120
Q M K I N Y Y P K C P Q P E L A L G V E
GCTCATACAGACATAAGTGCACCTCACCTCCACAAACATGGTCCCGGCGCTGCAG 180
A H T D I S A L T F I L H N M V P G L Q
CTCTTACGGCGGCAAAATGGGTGACAGCGAAGTGGCTACCCAACTCCATCGTCATGCAC 240
L F Y G G K W V T A K C V P N S I V M H
ATAGCGACACCTTAGAGATTCTAAGCAACGGCAAGTACAAGAGCATTCTTACACGGGG 300
I G D T L E I L S N G K Y K S I L H R G
CTCGTCAACAAGGAGAAGGTGAGGATCTCGTGGGCGGTTTTCTGTGAGCCGCCAAGGAG 360
L V N K E K V R I S W A V F C E P P K E
AAGATCATCCTTAAGCCGCTACCGGAAACTGTCTCCGAGGAGGAGCGCGGATCTCCCA 420
K I I L K P L P E T V S E E E P A I F P
CCACGGACTTTCTTCGAGCATATCCAGCACAACTGTTCAGGCAGAGCCAGGAAGCTCTC 480
P R T F F E H I Q H K L F R Q S Q E A L
GCTCTACCAAGAATCTGCCGCCCTCAAAGCACTAAAGAATCTGCCCTCAAAGCACT 540
V S T K E S A A L K S T K E S A L K S T
AAAGAAGCTGCTCATCTCACTAATTAAGTgcttcaatcaatcaagcgctgttaatta 600
K E A A L I S T N *
tgggtgcatgaattaattaattagggtgatgtgcatgtgtgcatcctaagatttcttt 660
ggttgggtttgaaaagcagatgttgacaggggagactgggctatatattaagttgttt 720
tcgggtgcatgattgatcttcgagcagtgatatacctgcttatgataaattaattgta 780
ttttcttctcaaaaaaaaaaaaaaaaa 810
    
```

Fig. 8. Nucleotide and deduced amino acid sequences of ANS gene obtained from the Maehyang strawberry. The 3'-untranslated region is indicated in lower-case letters. The underlined sequences indicate a putative poly-adenylation signal. The star designates the stop codon. Identity of ANS gene obtained from the Maehyang strawberry with *Fragaria x ananassa* (AY695817) is ninety-six percent.

```

GCCAGTAGGGTTCATCTTGTGGTCACTTCGGGACAACCTAAAGAACCACAGCTAGAT 60
A S R V P P F L W S L R D N L K N P Q L D
GAATTCCTAAGCAAAGGAAATGAACGGAATGGTGGTGCCTTGGCGCCACAACCACAG 120
E F L S K G K L N G M V V P W A P Q P Q
GTCCTGGCGCATGGTTCAGTTGGAGCCTTTGTAACACATTCGCGTTGGAACCTCGGTGCTT 180
V L A H G S V G A F V T H C G W N S V L
GAGAGCGTAGCAGGTGGAGTGCCTTTGATTTGCAGGCCTTTCTTCGCGCATCAGAAACTT 240
E S V A G G V P L I C R P F F G D Q K L
AACCGGAGGATGGTAGAGATGTGTGGAAATTTGGTCTCAGGTGGGGGTGGGGTTTTTC 300
N A R M V E D V W K I G L R L G G G V F
ACCAAGAATGGCATGCTTAAAGAGTTTGGACATGCTATTATCACAAGACAAGGGACCAAA 360
T K N G M L K S L D M L L S Q D K G T K
ATGAAAACAGATCCACACTAAACAACTCGCACACAGGCGGTAGAACCAAAAGGG 420
M K N K I H T L K Q L A Q O A V E F K G
AGCTCCACTAGGAACCTTGGATCATTTGGAAATGGCTACAACCAATTAagtaacaacta 480
S S T R N F E S L L E M A T T N *
caactatattcccaagaatataaagaatttggcttcttataaaacttggatataatc 540
aagttttgaaaatatacaagatataatagcctaagagtttctgggagtttaaaaaaaaa 600
aaaaaaaaaa 612
    
```

Fig. 9. Nucleotide and deduced amino acid sequences of UFGT gene obtained from the Maehyang strawberry. The 3'-untranslated region is indicated in lower-case letters. The underlined sequences indicate a putative poly-adenylation signal. The star designates the stop codon. Identity of UFGT gene obtained from the Maehyang strawberry with *Fragaria x ananassa* (AY695815) is ninety-seven percent.

결과, 안토시아닌 생합성 유전자는 모두 과실 발달 과정에서 시기적으로 조절되었다(Fig. 10). 특히 PAL을 제외한 모든 유전자는 과실에서만 주로 발현되었다. PAL, DFR 그리고 ANS 유전자는 과실 초기 발달 단계인 개화 후 10일에 검출된 후 약간 감소하다가, 22일에 다시 증가하기 시작하여 34일에 최대가 되었다. 이러한 two-phase 발현 패턴은 안토시아닌 합성 유전자가 갖는 공통적인 특징 중의 하나이다[5,12]. 반면, 세 유전자를 제외한 나머지 유전자들은 초기에는 발현되지 않다가, 과실의 숙기와 함께 안토시아닌이 축적되기 시작하

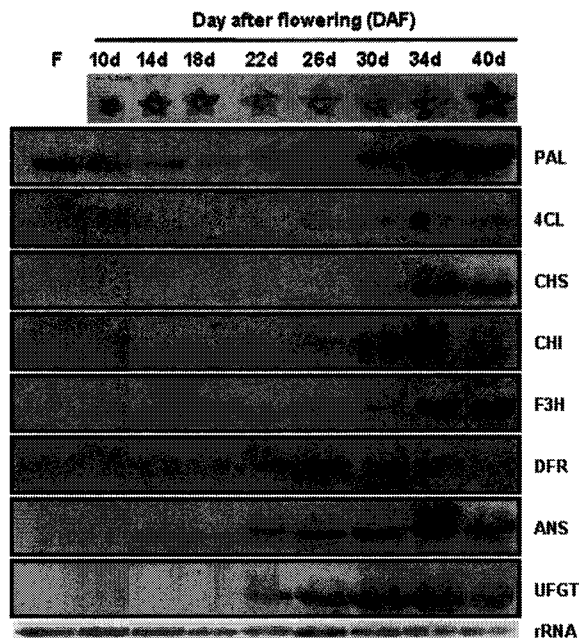


Fig. 10. Northern analysis of anthocyanin gene expression during the strawberry fruit development process. Total RNAs were isolated from flower (F) and fruit samples taken at intervals throughout development of 'Maehyang' strawberry, subjected to electrophoresis, transferred to nylon membranes and probed with DIG-labeled PCR products PAL, 4CL, CHS, CHI, F3H, DFR, ANS and UFGT. The numbers indicate days postflowering at which the total RNA was extracted from strawberry. Ribosomal RNA (rRNA) is shown as an RNA loading control for one of the gels.

는, 개화 후 22~30일에 처음으로 검출되었다. 과실 발달 단계 초기부터 발현되던지, 아니면 발달 후기인 숙기에 발현되던지 상관없이, 모든 유전자는 개화 후 34일에 가장 많이 발현되고, 안토시아닌이 최대 축적되는 그 이후에는 도리어 발현량이 감소하였다. 이러한 발현 현상은 기존에 보고된 연구 결과와 일부 일치하지 않는다. 즉 Almeida 등[2]에 따르면, PAL, CHS, 4CL 유전자는 과실 발달 초기에 발현되다가 W stage (20 days postflowering)에는 도리어 감소하며 다시 숙기에 증가하였다. CHS 유전자도 이와 같은 two-phase 발현 패턴을 보였지만, DFR과 UFGT 유전자는 개화 후 25일에 발현이 최대에 달하고, 이후 발현량이 그대로 유지되었다[2]. 그러나 Moyano 등[12]의 보고에 의하면, DFR 유전자는 본 연구에서와 마찬가지로 초기에 발현되기 시작하여 감소하다가 다시 숙기에 발현이 증가하는 현상을 보였다. 이처럼 품종에 따라 각 유전자의 발현타이밍이 약간씩 다른데, 이것이 품종별 과실발달 시기의 차이 때문인지, 아니면 이들 유전자를 조절하는 전사인자의 발현 타이밍 등 다른 이유 때문인지는 확실치 않다.

본 연구를 통해, 딸기 과실 발달과정에서 안토시아닌 생합

Table 2. Lists of sequence-specific primers used to produce probes for northern blot analysis

Genes		Primer sequence	Annealing Tm (°C)	Product size (bp)
PAL	Forward	5' -ACGGTTAAGAACACTGTGAGTC-3'	56.3	200
	Reverse	5' -GCGTGTTCACAAGCACTTG-3'	55.4	
4CL	Forward	5' -GTAATCCCATTTCGGATGCTA-3'	56.3	206
	Reverse	5' -TTCTGTATAAGCTCCCGTCTCA-3'	56.3	
CHS	Forward	5' -AGAAGCCACAAGGCATATCCTA-3'	56.3	198
	Reverse	5' -CAACCAGATACACTGTGAAGCA-3'	56.3	
CHI	Forward	5' -TTCAGAGTCAGTTCCTCGAGTCA-3'	56.3	200
	Reverse	5' -AAGCAGGCCTTGAAGTACAGA-3'	55.9	
F3H	Forward	5' -GGGTGATGGAACAGTTTCIGA-3'	55.9	182
	Reverse	5' -GTAAGTCATCGGCTCCTCA-3'	57.5	
DFR	Forward	5' -ACGATTCACGACATTGCGAA-3'	53.3	200
	Reverse	5' -AGCAGACCCTTTCTCTGCA-3'	55.4	
ANS	Forward	5' -ACATAGGCGACACCTTAGAGA-3'	55.9	196
	Reverse	5' -AAGAAAGTCCGTGGTGGAA-3'	55.4	
UFGT	Forward	5' -GGGTCCATTCTGTGGTCAC-3'	57.8	200
	Reverse	5' -CAAAGGCACTCCACCTGCTA-3'	57.5	

성 과정에 관여하는 여러 유전자가 과실 숙기에 함께 조절되는 현상을 알 수 있다. 이러한 연구 결과는 딸기에 안토시아닌 합성과정을 제어하는 조절 유전자가 있다는 것을 시사한다. 그리고 딸기의 안토시아닌 생합성 유전자를 발현 패턴으로 분류하면 크게 두 가지로 나눌 수 있는 것으로 보아, 딸기에는 적어도 두 가지 서로 다른 조절 기작이 관여하여 색소 발달 과정을 제어할 것으로 보인다. Almeida 등[2]도 이와 비슷한 결론을 제시하였다. 실제로 *Arabidopsis*, 옥수수, 패튜니아 등에서 MYB, MYC, WDR 등 세 가지 종류의 전사인자가 작용하여 flavonoid 경로를 조절한다고 알려져 있다[8]. 다만, 특이한 것은 딸기에서 처음으로 분리된 전사인자 FaMYB1을 담배에서 발현시키면, 형질전환체 내에서 안토시아닌 축적이 도리어 억제된다는 점이다[1]. 딸기에서 생합성 유전자를 제어하는 다른 조절 인자가 분리되고, 그것의 조절 기작이 밝혀지면 이에 대한 명확한 이유를 알 수 있을 것이다.

딸기의 분자생물학적 연구

딸기는 전형적인 nonclimacteric fruit의 하나로, 과실 발달에 대한 분자생물학적인 연구 모델로 포도와 함께 많이 사용되기 시작하였다[9,17]. 특히 딸기가 속한 장미과(Family Rosaceae)에는 경제적으로 중요한 작물이 많이 들어 있어서, 기능성 소재인 페놀성 화합물의 생합성 유전자에 대한 분자생물학적인 연구 결과가 많이 축적되면 앞으로 크게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

‘매향’ 딸기의 안토시아닌 생합성은 개화 후 26일째 시작되

어 과실의 성숙기 동안 계속된다. 딸기로부터 안토시아닌의 생합성에 관여하는 주요 유전자를 분리하였다. 각각의 유전자에 대해, 다양한 식물체의 유사 유전자의 염기서열을 비교하여 PCR (polymerase chain reaction) primer를 제작하였다. 숙기의 딸기에서 분리된 total RNA로부터 합성된 cDNA와 각 primer를 이용하여 RT (reverse transcriptase)-PCR을 수행하였다. 각 cDNA clone의 염기서열을 작성하여 분석한 결과, 이들은 안토시아닌 생합성에 관여하는 phenylalanine ammonia lyase (PAL), 4-cummarate CoA ligase (4CL), chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavanone-3-hydroxylase (F3H), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), anthocyanidine synthase (ANS) 그리고 UDP-glucose:flavonoid-3-O-glucosyltransferase (UFGT) 효소에 해당되었다. Northern blot 분석 결과, 이들 유전자는 과실 발달 과정에서 시기적으로 조절되었다. 특히 PAL을 제외한 모든 유전자는 과실에서만 주로 발현되었다. PAL, DFR 그리고 ANS 유전자는 과실 초기 발달 단계인 개화 후 10일에 검출된 후 감소하다가, 22일에 다시 증가하기 시작하여 34일에 최대가 되었다. 한편, 다른 유전자들은 초기에는 발현되지 않다가, 안토시아닌이 축적되기 시작하는 개화 후 22~30일에 처음으로 검출되었다. 본 연구를 통해, 딸기 과실 발달과정에서 안토시아닌 생합성 과정에 관여하는 여러 유전자가 과실 숙기에 함께 조절되는 현상을 알 수 있다. 이러한 연구 결과는 안토시아닌 합성과정을 제어하는 조절 유전자가 존재한다는 것을 시사한다. 그리고 딸기의 안토시아닌 생합성 유전자의 발현 패턴을 크게 두 가지로 나눌 수 있는 것으로 보아, 딸기의 안토시아닌 생합성에는 적어도 두 가지 서로 다른 조절 기작이 관여하여 색소 발달 과정을 제어할 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 단국대학교 교내 연구비의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Aharoni, A., C. H. De Vos, M. Wein, Z. Sun, R. Greco, A. Kroon, J. N. Mol and A. P. O'Connell. 2001. The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J.* **28**, 319-332.
- Almeida, J. R., E. D'Amico, A. Preuss, F. Carbone, C. H. de Vos, B. Deiml, F. Mourgues, G. Perrotta, T. C. Fischer, A. G. Bovy, S. Martens and C. Rosati. 2007. Characterization of major enzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **465**, 61-71.
- Cordenunsi, B. R., M. I. Genoves, J. R. O. Nascimento, N. M. A. Hsaaimorro, R. J. Santos and F. M. Lajolo. 2005. Effect of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chem.* **91**, 113-121.
- Davies, K. M. and K. E. Schwinn. 2006. Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. pp. 143-218, In Anderson, O. M. and K. R. Markham (eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Taylor & Francis, Boca Raton.
- Halbwirth, H., I. Puhl, U. Haas, K. Jezik, D. Treutter and K. Stich. 2006. Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1479-1485.
- Holton, T. A. and E. C. Cornish. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1071-1083.
- Kurata, H., A. Mochizuki, N. Okuda, M. Seki and S. Furusaki. 2000. Intermittent light irradiation with second- or hour-scale periods controls anthocyanin production by strawberry cells. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 621-629.
- Lepiniec, L., I. Debeaujon, J. M. Routaboul, A. Baudry, L. Pourcel, N. Nesi and M. Caboche. 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 405-430.
- Manning, K. 1998. Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta.* **205**, 622-631.
- Mori, T., M. Sakurai and M. Sakuta. 2001. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. *Plant Sci.* **160**, 355-360.
- Meyers, K. J., C. B. Watkins, M. P. Pritts and R. H. Liu. 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6887-6892.
- Moyano, E., I. Portero-Robles, N. Medina-Escobar, V. Valpuesta, J. Muñoz-Blanco and J. L. Caballero. 1998. A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. *Plant Physiol.* **117**, 711-716.
- Sambrook, J. and D. W. Russel. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. pp. 7.35-7.40, 3rd eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Wang, S. Y. and H. S. Lin. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry raspberry and strawberry varies with cultivars and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 140-146.
- Wang, S. Y. and W. Zheng. 2001. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4977-4982.
- Wicklund, T., H. J. Rosenfeld, B. K. Martinsen, M. W. Sundfor, P. Lea, T. Rruun, R. Blomhoff and K. Haffner. 2005. Antioxidant capacity and colour of strawberry jam as influenced by cultivar storage conditions. *Lebensm-Wiss. u-Technol.* **38**, 387-392.
- Wilkinson, J. Q., M. B. Lanahan, T. W. Conner and H. J. Klee. 1995. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Molecular Biology.* **27**, 1097-1108.
- Youn, S. J., J. G. Cho, U. K. Choi and D. J. Kwoen. 2007. Change of biological activity of strawberry by frozen storage and extraction method. *J. Life Sci.* **17**, 1734-1738.
- Zhang, Y., N. P. Seeram, R. Lee, L. Feng and D. Heber. 2008. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J. Agric. Food Chem.* Epub 2008 Jan. 23.