

화훼작물의 향기 성분 증대를 위한 대사 공학

강승원 · 서상규 · 류소영 · 박천호 · 이금표

Improvement of floral scent of ornamentals via metabolic engineering

Seung Won Kang · Sang Gyu Seo · So Young Ryu · Chun Ho Pak · Gung Pyo Lee

Received: 5 March 2010 / Accepted: 17 March 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Floral scent emitted from many plants is the key factor for pollinator attraction and defense for survival in nature and is important industrial materials for perfumery as well. It is a complex mixture of various organic molecules with a high volatility or a high vapor pressure. In general, floral scents are divided into three categories, aliphatics, terpenoids, and phenylpropanoids/benzenoids, based on its origin. About 1,700 scent compounds have been identified and their biochemistry and molecular biology also have elucidated their biosynthesis from various flowering plants during the last ten years. In addition to improvement of vase life, flower color and shape, and/or disease resistance, floral scent is coming up to the major breeding target for improvement of marketability. Therefore, metabolic engineering can be an important tool in near future and may be able to facilitate the breeding program for novel cultivar selection and improvement of marketability of floricultural crops.

서론

우리나라 화훼류 시장규모는 2005년에 1조원 규모까지

지속적인 양적 성장을 이룬 후 3년간 다소 감소하여 2008년에 9천억원의 규모를 형성하고 있다(Table 1). 절화류 (cut flowers), 분화류 (pot plants), 초화류(herbaceous flowering plants), 관상수류 (ornamental plants), 화목류 (flowering trees and shrubs), 종자 (seeds) 및 구근류 (bulbs and tubers) 등의 작물 종류로 구분되어 생산 및 판매 현황에 대한 조사가 이루어지는데, 절화, 분화류 및 초화류가 재배면적의 약 56%, 판매량의 94%, 판매액의 87%를 차지하고 있다 (MIFAFF 2009). 우리나라는 대외 수출 7천6백만 불, 수입은 4천2백만 불의 무역규모를 가지고 있는데, 주요 수출 품목으로는 장미, 국화, 백합, 선인장, 양란을 포함한 난류 등으로, 지난 10년간 꾸준한 보합세를 나타내었던 장미 국화에 반해 난류, 선인장류, 백합류의 수출 금액이 급격히 상승하여 수출 주요 작목이 변화하는 모습을 나타내고 있다 (Fig. 1). 세계적인 화훼시장은 연 6-9%의 성장을 나타내는 것으로 추정되고 있으며, 잠재적인 성장가능성이 높은 지역으로 아시아, 동유럽 등이 세계 화훼시장의 성장을 이끌어 갈 것으로 내다보고 있다 (van Uffelen and de Groot 2005).

향기 성분을 포함한 volatile organic compounds (VOCs)에 대한 연구가 급증하고 있는데, ISI web of Knowledge (www.isiknowledge.com)에서 검색어 “floral scent”로 검색하면, 식물의 꽃 향기성분에 대한 연구결과가 증가하고 있는 것을 알 수 있다. 최근 10년간 출판된 편수는 연구 논문 355편, 리뷰 34편, 기타를 포함해 410여 편을 넘어서고 있다 (Fig. 2). 식물의 2차 대사산물인 VOCs (volatile organic compounds)에 대한 생합성 및 대사경로, 유전자에 관한 생화학, 분자생물학, 생태학적인 접근에 대한 연구의 관심도가 급격히 증가하면서 (Dicke and Loreto 2010; Kegge and Pierik 2009), 식물의 꽃 향기 성분에 대하여 식물 방어, 식물-식물 상호작용, 수분 매개자의 유인, 고온에 대한 내성 등과 같은 향기 성분의 생물적 기능에 대한

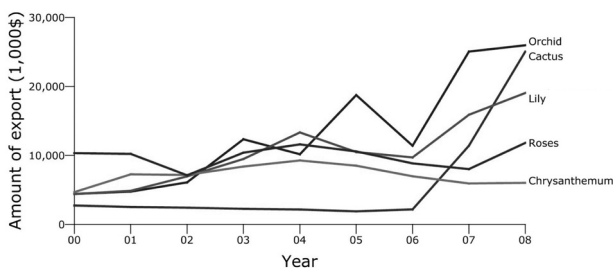
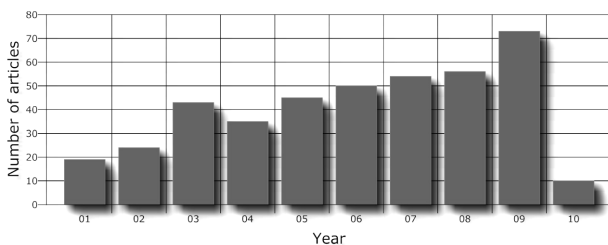
S. W. Kang · S. Y. Ryu · G. P. Lee (✉)
중앙대학교 식물응용과학과
(Department of Applied Plant Science, Chung-Ang University,
Ansung 456-756, Korea)
e-mail: gplee@cau.ac.kr

S. G. Seo
서울시립대학교 자연과학연구소
(Natural Science Research Institute, University of Seoul, Seoul
130-743, Korea)

C. H. Pak
고려대학교 생명과학대학 생명공학부
(Division of Biotechnology, College of Life Sciences and
Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, Korea)

Table 1 Status of floricultural industry of Korea in 2008 (MIFAFF, 2009)

| | Production area (ha, %) | Sales volume (million won, %) | Sales (0.1billion won, %) |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Cut flowers | 2,268 (32.1) | 1,240 (63.7) | 3,548 (39.3) |
| Pot plants | 1,283 (18.1) | 293 (15.0) | 3,323 (36.8) |
| Herbaceous flowering plants | 402 (5.7) | 297 (15.2) | 1,011 (11.2) |
| Ornamental plants | 1,997 (28.2) | 38 (2.0) | 556 (6.2) |
| Flowering trees and shrubs | 1,058 (15.0) | 49 (2.5) | 486 (5.4) |
| Seeds | 28 (0.4) | 19 (1.0) | 70 (0.8) |
| Bulbs and tubers | 39 (0.6) | 12 (0.6) | 45 (0.5) |
| Total | 7,075 (100) | 1,948 (100) | 9,039 (100) |

**Fig. 1** The amount of export of major floricultural crops from Korea**Fig. 2** Number of scientific articles extracted from the Web of Science with key words for "floral scent" (searched on 8 February, 2010). Papers include research articles, reviews and etc

중심의 연구가 주를 이루어 오고 있다 (Herde et al. 2008; Pichersky and Gershenzon 2002; Sasaki et al. 2007).

꽃의 향기성분은 작은 분자량을 가지면서 높은 증기압 (vapor pressure)이나 높은 휘발성을 가지고 있는 다양한 유기 화합물의 혼합을 의미하며, 대다수의 향기 성분은 지방족 화합물 (aliphatics), terpenoids, phenylpropanoids/benzenoids 등이다 (Pichersky et al. 2006). 1992년까지 약 60개 과 (family) 의 174속 (genus), 441개의 분류군 (taxon)에 속하는 식물들로부터 향성분 추출 방법인 head space 기술을 이용하여 추출 및 동정된 700여 종 이상의 향 성분이 정리되었다 (Knudsen et al. 1993). 그 후 head space 기술에 의해 추가적으로 알려진 향기성분은 1700여 종으로 증가 하였으며 (Knudsen et al. 2006), 향 성분에 대한 연구도 향 성분의 생산에 미치는 환경적인 요인, 향 성분의 발산의 주기성,

꽃의 노화와 수분 후 (post-pollination)의 향 발산, 화색과 향기와의 연관성 등과 같은 다양한 연구 분야에서 향기 성분에 대해 다루고 있다. 향기 성분의 분석을 위해 사용된 식물군도 다양하게 나타나는데, 난과 (Orchidaceae, 104속 417종), 천남성과 (Araceae, 10속 55종), 야자나무과 (Arecaceae, 18속 40종), 목련과 (Magnoliaceae, 3속 26종), 장미과 (Rosaceae, 8속 24종), 선인장과 (Cactaceae, 12속 21종), 운향과 (Ruytaceae, 3속 21종), 가지과 (Solanaceae, 8속 21종), 석죽과 (Caryophyllaceae), 분꽃과 (Nyctaginaceae) 등이 가장 많이 분석된 과로 나타났고, 전체적으로는 38목의 90여 개과의 991개의 식물 중에서 향 성분에 관련 물질의 동정 및 분석에 관한 연구가 이루어져 왔다 (Knudsen et al. 2006). 1700여 종의 향기 성분을 보다 쉽게 파악하기 위해 구조와 식물 2차 대사의 중요 경로를 기준으로 7개의 주요 그룹으로 분류하고, 각각의 그룹에 속하는 화합물들은 사슬의 길이와 골격 형태 및 작용기 (aldehydes, acids, alcohols, esters, ether, ketones, alkanes, alkenes, ether/epoxides, chloro) 등을 기준으로 하여 준 그룹으로 구분하였다.

화훼작물에 대한 대사공학적 연구는 화색의 조절을 위한 색소의 생합성과 관련된 유전자 재조합 연구가 주를 이루어 왔고, 이와 더불어 유전자 재조합 기술을 토대로 절화 수명의 증대, 꽃의 형태 등과 같은 품질적 향상에 초점이 맞춰져 있다. 그러나 최근에는 다양한 꽃 향기 성분의 생산과 관련된 유전자 및 대사경로들이 밝혀지면서 이와 동시에 화훼작물에 향 성분의 조절을 위한 유전자를 도입하려는 대사공학적 시도가 활발히 이루어지고 있다 (Tanaka et al. 2005).

향기성분의 채집과 검출 분석

방향 성분을 추출하는 다양한 기술들이 존재하는데 주로 용매추출 (solvent extraction), steam distillation, head space 등의 방법들을 이용하며, head space의 경우 solid phase microextraction (SPME)을 이용하는 static head space, 순환

식 시스템을 이용한 dynamic head space, 흡착제인 Tenax TA (2,6-diphenyl-*p*-phenylene oxide 수지) 등을 이용한 trapping 등이 있다. 기타 방법으로는 closed-loop, pull systems, push-pull systems 등이 있는데 이러한 기술을 이용하여 향 성분을 추출하거나 흡착하게 된다(Tholl and Röse 2006).

식물로부터 발산되는 휘발성 성분을 흡착하는 head space 는 비파괴적인 방법으로 한 개체의 식물로부터 반복적인 시료의 채취가 가능하다. SPME는 얇고 가늘며 긴 fiber를 이용한다. 이 fiber는 혼합 silica로 향 성분과 같은 휘발성 성분을 흡착하기 위한 흡착 polymer로 코팅되어 있다. 휘발성 물질을 추출하기 위한 고정상으로는 비극성인 Polydimethylsiloxane (PDMS)가 많이 이용되며, Divinylbenzene (DVB)가 혼합된 PDMS-DVB fiber의 경우 극성과 비극성 성분을 모두 가지고 있기 때문에 사용범위가 넓은 장점을 가지고 있다. 유기용매를 이용한 복잡한 전처리 과정을 거치지 않기 때문에 추출에 필요한 설비나 시약 구입과 같은 비용을 절감할 수 있다. 또한, 전처리 과정에서의 부산물 발생이나 시료 오염 등이 일어날 확률이 적기 때문에 재현성이 강하며, 사용이 간단하면서 0.05-0.3 ppb의 높은 검출한계를 가지고 있다. 대사체학 (metabolomics) 분야에서 다량의 시료를 분석하는 경우에 많이 이용되고 있다.

향기성분의 분리 및 검출을 위해 gas chromatography (GC)를 이용하게 되는데, 다량의 순수한 물질을 분리하거나, 또는 질량분석법 (mass spectrometry, MS), 적외분광법 (infrared spectrometry, IR), 핵자기공명법 (nucleomagnetic resonance, NMR) 등과 같은 분석기와 결합하여 물질을 다방면으로 해석하기 위해 GC를 이용한다. GC를 이용한 분리 피크의 향을 맡는 관능검사 방법으로는 GC-Olfactometry (GC-O) 시스템을 이용하기도 하는데, GC를 이용해 분리한 크로마토그램 (chromatogram)을 사람의 후각과 일치시키기 위한 목적을 가지고 있다. 향 성분에 대한 평가 이외에도 식품향료, 화장품향료 등의 향기 분석 등 다방면으로 이용되고 있다. 향기분석을 위한 검출기로 수소염이온화검출기 (flame ionization detector, FID)가 주로 사용된다. FID는 대부분의 유기물에 대해 감도를 가지고 있는데, 안정성이 좋고 감도가 비교적 높으며, 사용하기 쉬운 검출기로 때로는 0.01 ng 수준의 물질도 검출이 가능한 경우도 있다. 정성분석과 정량분석 시 각각의 분석을 위해 필요한 정보가 다른데 일반적으로 크로마토그래피에서는 정성정보로서 머무름 시간 (retention time), 정량정보로서 피크의 면적이나 높이를 이용한다. GC에 질량분석기 (mass spectrometry)를 결합한 GC-MS에서는 위의 정보와 더불어 시그널이 어떤 질량을 가진 이온에서 유래하는지에 대한 질량에 관한 정보를 얻을 수 있기 때문에 GC-MS의 정성능력이 GC보다 높다. GC-MS를 이용한 정성 분석 시 중요한 정보는 질량 스펙트럼 (mass spectrum)

인데, 이는 가로축에 이온의 질량전하비 (mass-to-charge ratio, m/z ; 이온의 질량 (m)을 전하비 (z)로 나눈 수치. 하전입자는 전장이나 자장 속에서 질량전하비의 수치에 따른 운동을 한다. 질량분석계는 이 움직임에 대한 차를 읽어 낸다. 질량전하비의 값에 이온가수를 곱하면 질량을 계산할 수 있다), 세로축에는 시그널강도를 나타내어 그래프화 한 것이다. 질량스펙트럼은 화학종마다 특징 (화학종마다 고유한 스펙트럼을 가지고 있는 것은 아니다)을 가지고 있기 때문에, 각 종에 대한 라이브러리의 구축이 가능하며 현재로는 electron ionization (EI)법을 이용한 라이브러리가 널리 이용되고 있다. 대표적인 라이브러리로 미국 국립표준기술연구소 (National Institute of Standards and Technology)에서 작성한 NIST 08 Mass Spectral Library (<http://www.nist.gov/index.html>), Wiley Registry of Mass Spectral Data (9th Edition, <http://as.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470520353.html>) 등이 시판되고 있는데, 전자는 20만여 종, 후자는 69만여 종의 화합물에 대한 스펙트럼이 수록되어 있어 향기 성분을 동정하는데 이용할 수 있다.

향기 성분의 생합성

식물의 방향 성분은 2차 대사산물로 분류되며, monoterpene 과 sesquiterpene 등을 포함하는 terpenoid (isoprenoid), malonic acid pathway에 의한 지방산에서 유래하는 지방족 화합물, shikimic acid pathway를 시작으로 생산되는 phenylpropanoids와 benzenoids, phenolic compounds 방향성 화합물 aromatic compounds, 등이 향을 이루는 주요한 3 그룹이다.

Terpenoid계 화합물은 향을 내기 위한 식품 첨가제등으로 이용되는 주요한 산물이며, 식물-곤충, 식물-병원균, 식물-식물 상호작용에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. Monoterpene류는 식물 기관에서 외부 스트레스에 대한 방어역할을 해왔던 것들이 꽃 향기로 진화되었을 가능성을 내포하고 있다 (Bohlmann et al. 2000). 환경에 대해 반응을 하기도 하는데 장미 (*Rosa hybrida* L. cv. Honesty)에서 발산되는 monoterpene은 일주기성 (diurnal rhythm)을 나타내기도 한다 (Helsper et al. 1998). 그 밖에도 기상 조건 (climatic conditions), 영양상태 (nutrient availability), 스트레스의 정도에 따라 식물로부터 방출되는 향 성분의 종류와 강도를 결정하는 중요한 요인들이 될 수 있다 (Arimura et al. 2008; Gouinguene and Turlings 2002).

Linalool, limonene, geraniol, myrcene, trans- β -ocimene 등과 같은 monoterpene, farnesene, nerol, caryophyllene 등과 같은 sesquiterpene류의 화합물이 terpenoid 계 향기의 대표적인 성분들이다. 1996년도에 미국 캘리포니아 지역의 자생종인 *Clarkia breweri*로부터 terpenoid 계 방향성 화합물인 S-linalool을 촉매하는 효소인 linalool synthase (LIS)를

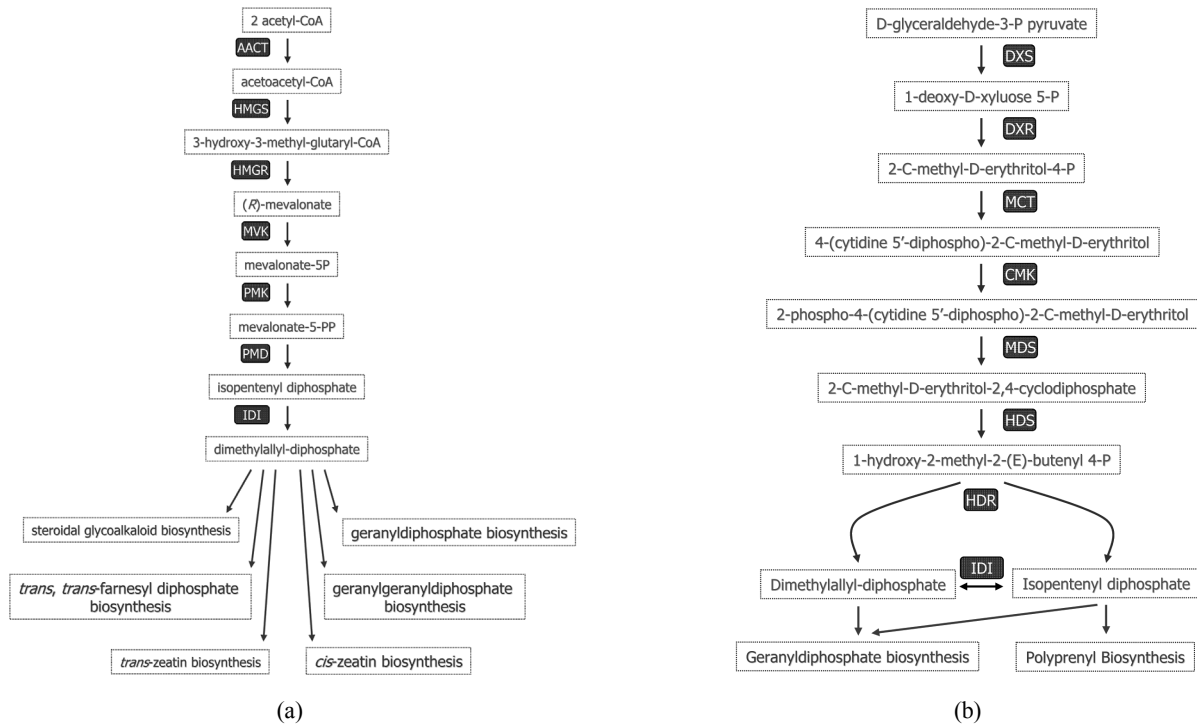


Fig. 3 MVA (a) and MEP (b) pathways for biosynthesis of IPP and DMAPP for plant volatile terpenoid production. Diagrams are extracted and modified from Plant Metabolic Network (PMN), <http://www.plantcyc.org:1555/PLANT/server.html> on www.plantcyc.org, February 20, 2010. Abbreviations are enzymes related to each step. For a) AACT, acetoacetyl CoA thiolase; HMGS, HMG-CoA synthase; HMGR, HMG-CoA reductase; MVK, MVA kinase; PMK, MVP kinase; PMD, MVPP decarboxylase; IDI, IPP isomerase and b) DXS, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase; DXR, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase; MCT, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase; CMK, 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl -D-erythritol kinase; MDS, 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase; HDS, (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase; HDR, 1-hydroxy-2-methyl-2,4-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase; IDI, isopentenyl diphosphate isomerase

encoding하는 유전자가 최초로 동정된 이래 (Dudareva et al. 1996), monoterpene synthase들에 관한 생화학적 분자생물학적 연구가 이루어져 왔다. 애기장대 계놈으로부터 32개의 terpene synthase gene이 밝혀졌으며 (Chen et al. 2003), 개뽕쑥 (*Artemisia annua*)에서 (-)- β -pinene의 생산에 관여하는 Q6H 유전자 (Lu et al. 2002), *Nicotiana suaveolens*의 1,8-cineole synthase (*CIN*) 유전자 (Roeder et al. 2007) 등 모델 식물 이외에서의 연구도 활발히 이루어지고 있다.

Terpenoids의 생합성은 mevalonate (MVA) pathway와 monoterpenes, 일부 sesquiterpenes, diterpenes, carotenoids, chlorophyll의 곁사슬 (side chain) 및 plastoquinone의 생합성에 필요한 전구물질의 합성에 연관되어 있는 2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway를 거쳐 생합성 된다 (Eisenreich et al. 1997). 오래 전부터 알려져 왔던 식물 세포의 MVA pathway는 세포질 (cytosol)에서 isopentenyl diphosphate (IPP, C₅)와 dimethylallyl diphosphate (DMAPP, C₃)를 생산한다. 세포질의 IPP와 DMAPP가 미토콘드리아에 유입되어 미토콘드리아 내에서 생산하는 terpenoid의 중간물질 역할을 하게 되며, 플라스티드 (plastid)의 IPP와 DMAPP는 MEP pathway에 의해 생산되어 terpenoid로 전환된다 (Rodriguez-

Concepción and Boronat 2002; Rohmer et al. 1996).

Monoterpene (C₁₀)과 sesquiterpene (C₁₅) 화합물의 생합성을 위한 중간물질 (intermediate)은 IPP와 IPP isomerase에 의해 전환된 isomer인 DMAPP로 terpenoid 생합성의 중요한 구성 단위 (building block)이다. Monoterpene은 plastid의 MEP pathway에서 유도되는 IPP가 geranyl diphosphate synthase (GPPS)에 의한 중간물질의 머리-꼬리 접합 (head-tail conjugation) 촉매 작용을 통해 형성된 geranyl diphosphate (GPP, C₁₀)로부터 합성된다. GPPS에 의해 형성된 GPP는 monoterpene synthase들에 의해 촉매 되어 geraniol (geraniol synthase, GES), (E)- β -ocimene (ocimene synthase, OCS), myrcene (myrcene synthase, MYS), linalool (linalool synthase, LIS) 등으로 구조적인 변화를 하게 된다. 다양한 terpene synthase (TPS)에 의해 합성된 monoterpeneoid들은 다양한 고분자의 화합물로 변형되기도 한다 (Lange et al., 2000). Cytochrome P450 hydroxylases 중 하나인 일일초 (*Catharanthus roseus*)의 geraniol 10-hydroxylase (G10H)는 geraniol의 10번 탄소를 수산화시켜(hydroxylation) 10-hydroxygeraniol을 합성하며 이 중간물질은 terpenoid indole alkaloid를 생합성 하는데 이용된다 (Collu et al. 2001).

일부 sesquiterpene은 두 개의 IPP와 DMAPP가 farnesyl diphosphate synthase (FPPS)에 의해 축매되는 접합반응을 통해 형성된 farnesyl diphosphate (FPP)로부터 합성되며, 세포질에서 mevalonate (MVA) pathway를 통해 생합성 된다 (McGarvey and Croteau 1995). geranyl geranyl diphosphate synthase에 의해 형성된 geranyl geranyl diphosphate (GGPP, C₂₀)는 diterpene류(C₂₀)와 tetraterpene류(C₄₀)를 합성하는 구성 단위이다. 식물에 따라서는 terpene synthase 유전자의 대립 유전자의 single nucleotide 돌연변이에 의해 sesquiterpene의 구성이 다양해지기도 한다(Kollner et al. 2004).

Phenylpropanoid metabolism은 복잡한 생화학적 경로를 가지고 있으며, 수 많은 화합물을 만들어 낸다. 이 화합물들은 리그닌, 수베린 및 세포 벽에 연관된 phenolics와 같은 세포의 구조 성분 합성을 위한 중간물질의 역할을 하거나 flavonoid나 anthocyanin과 같은 식물 색소의 구성 성분을 이룬다. Phenylpropanoids는 비휘발성이나 9번 탄소가 aldehyde, alcohol, alkane으로 변화하거나, 벤젠고리 (benzyl ring)의 hydroxyl기 또는 카르복실기에 alkyl기가 첨가되면 휘발성으로 변화게 된다 (Boatright et al. 2004; Dudareva and Pichersky 2006). 페놀계 화합물은 tryptophan, phenylalanine, tyrosine 등에서 유래하며, 대표적으로 methylbenzoate, isoeugenol, eugenol, methyleugenol, phenylacetaldehyde, 2-phenylethanol, phenylethylacetate, benzyl alcohol, benzaldehyde, methylbenzoate, benzylbenzoate 등을 예로 들 수 있다.

Benzenoid계와 phenylpropanoid계의 휘발성 화합물은 아미노산인 phenylalanine로부터 유도되며 식물의 향을 구성하는 주요 성분들이다 (Dudareva and Pichersky 2006; Pichersky et al. 2006). β -oxidative pathway 또는 non- β -oxidative pathway를 경유하여 phenylalanine의 propyl 곁사슬 (propyl side chain)을 2개의 탄소 단위로 축소시키는 것으로 추측되고 있다. *Nicotiana tabacum*의 잎에서 benzoic acid는 benzoyl-CoA를 합성하고 thioesterase에 의해 자유 benzoic acid로 가수분해하는 β -oxidative pathway를 거쳐 phenylalanine에서 유도되는 cinnamic acid로부터 생산된다 (Ribnicky et al. 1998). *Hypericum androsaemum*의 경우에는 nonoxidative pathway에 의해 cinnamic acid가 benzaldehyde로 전환 되기도 하며 (Abd El-Mawla and Beerhues 2002), 부가적으로 형성된 benzoic acid가 benzoyl-CoA로 전환된다 (Beuerle and Pichersky 2002).

식물에서 benzoic acid의 생합성 경로는 완전히 밝혀져 있지는 않지만, 동위원소 표지를 통하여 β -oxidative와 non β -oxidative경로가 모두 관여하는 것을 간접적으로 알 수 있다. 페튜니아를 대상으로 동위원소 표지를 통한 유량 분석 (flux analysis)을 이용하여 β -oxidative와 non- β -oxidative pathway 모두에서 benzenoid계 화합물을 생산하는데, benzaldehyde를 주요 중간물질로 이용하는 non- β -oxidative pathway의 유량이 β -oxidative pathway의 두 배 이상 차이가 나며, L-phenylalanine과 benzoic acid (BA) 사이

에 대체 중간물질로 benzylbenzoate가 이용된다 (Boatright et al. 2004).

페튜니아에서 Benzenoid 생산을 위한 주요 전구물질은 benzoic acid 이다. 페튜니아에서 3-ketoacyl-CoA thiolase (*PhKAT1*) 가 benzenoid의 생합성 경로와 benzoic acid의 생산에 관여한다. *PhKAT1*은 benzoyl-CoA와 연관된 화합물의 형성에 중요한 peroxisome에 국재하는 효소로, *PhKAT1*의 침묵 (silencing)이 일어나면 phenylpropanoid와 연관된 다른 화합물에 영향을 미치지 않은 채 benzoic acid의 생산을 억제하게 된다. *PhKAT1*은 꽃잎 특이적으로 발현하며, 활성은 주기성을 가지고 있다 (Moerkercke et al. 2009).

식물 체내에서의 phenylacetaldehyde (PAA)의 생합성에 관여하는 phenylacetaldehyde synthase (PAAS), methylbenzoate의 생합성에 관여하는 benzoic acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase (BSMT), isoeugenol의 생합성에 관여하는 isoeugenol synthase (IGS1), benzylbenzoate 및 phenylethyl benzoate의 생합성에 관여하는 benzoyl-CoA:benzalcohol/phenylethanol benzoyltransferase (*BPBT*) 등의 benzenoids 생산과 관여하는 유전자와 효소의 기능, 생합성 경로가 많이 알려져 있다. *BPBT*는 benzoyl-CoA, benzyl alcohol, 2-phenylethanol을 이용하여 benzylbenzoate와 phenylethyl benzoate를 생산한다(Boatright et al. 2004). *BPBT*의 발현이 억제되어 benzyl benzoate의 생산이 감소하면 benzoic acid pool과 methyl benzoate의 발산이 줄어들고, 그 반대 급부로 전구물질인 benzyl alcohol, benzaldehyde 및 2-phenylethanol의 함량이 증가하게 된다 (Dexter et al. 2008; Orlova et al. 2006). *PhBPBT*는 광의존적인 발현을 하며, *PhBPBT*의 발현이 감소함에 따라 산물인 benzyl benzoate발산도 감소한다. *PhBPBT* 전사의 조절은 식물의 노화, 성숙, 방어기작에 연관된 호르몬인 에틸렌에도 영향을 받는데, 잎에서는 에틸렌 처리에 의해 *PhBPBT*의 발현이 증가하며, 잎과 같은 영양기관과 더불어 화관 (corolla) 및 자방 (ovary) 등과 같은 생식기관에서도 일어나게 된다 (Dexter, et al. 2008). 일주기성을 가지고 있는 페튜니아의 *PhBSMT1*과 *PhBSMT2*의 발현은 에틸렌의 증가에 의해 억제되며 그 결과 페튜니아 화관의 methyl benzoate의 생산과 발산이 감소하게 된다 (Negre et al. 2003).

PAAS는 phenylalanine의 디카르복실화와 산화의 두 가지 기능을 가지고 있으며, 구조적으로 homotetramer를 형성하는 효소로 phenylacetaldehyde를 생산한다 (Kaminaga et al. 2006). 장미의 대표적인 향기 성분은 phenylacetaldehyde와 2-phenylethylalcohol이다. 장미 (*Rosa hybrida* L. cv. Fragrant Cloud)의 *RhPAAS*의 발현은 꽃 기관에 특이적으로 일어나며, 성숙한 꽃에서 최대로 발현하게 된다. 두 향기 성분의 생산과 *RhPAAS*의 발현은 일주기성을 갖는데, PAA와 PEA를 생산능력이 떨어지는 *ara10Δ yeast*에 장미의 *RhPAAS*를 도입하면 PAA와 PEA의 생산을 동시에 증

가시킨다(Farhi, et al. 2010).

향기성분 증대를 위한 대사공학적인 연구

1996년도에 *Clarkia breweri*에서 LIS가 최초로 동정되어 기능이 밝혀진 이래 (Dudareva et al. 1996), 향기 성분의 생산에 연관된 많은 유전자가 분리되었고, 기능이 밝혀져 왔다. 뿐만 아니라 향기 성분을 증대시키고자 이러한 유전자들을 다른 식물 종에 도입하여 향기 성분을 증대시키거나, 대사경로를 조절하기 위한 시도가 다방면으로 이루어지고 있다.

카네이션은 본래 정향나무 (*Syzygium aromaticum*, syn. *Eugenia aromaticum* 또는 *Eugenia caryophyllata*)의 이름에서 유래한 eugenol의 함량이 매우 높은 식물이지만, 현재 재배되고 있는 대다수의 절화용 카네이션은 절화 수명 연장(vassal life), 병저항성 증대, 화색 또는 형태 등을 위해 육성되고 선발되면서 본래의 향 성분을 소실하게 되었다 (Zucker et al. 1998). Benzoic acid로부터 파생되는 benzyl benzoate, phenylethyl benzoate, methyl benzoate 등과 β -caryophyllene과 같은 sesquiterpene 류가 전체 향성분의 60%를 차지하지만, Monoterpene 을 생합성 하지 못하는 절화용 카네이션 품종인 'Eliat' (*Dianthus caryophyllus* cv. Eliat)에 CaMV 35S 프로모터에 *Clarkia breweri*의 LIS 유전자를 도입하여 전구물질인 GPP에서 monoterpene을 생합성하는 형질전환 작물을 도출 하였다 (Lavy et al. 2002). head space GC-MS기술을 이용하여 형질전환 작물의 잎과 꽃에서 발산하는 linalool 및 그 유도체인 *cis*-linalool oxide, *trans*-linalool oxide를 검출하는데 성공하였지만, 꽃잎의 추출물에서는 *trans*-linalool oxide만이 검출되었다. 과잉발현에 의해 linalool 등이 발산되었지만 사람의 후각이 감지할 수 있을 만큼의 수준으로는 도달하지 못했다.

카네이션의 화색변형을 위해 flavonoids pathway에 관련된 효소인 Flavonon-3 hydroxylase (*F3H*) 유전자의 down regulation을 야기하여 화색을 변화시킨 형질전환체 중 화색의 변이 정도가 강한 라인에서 methyl benzoate의 함량이 증가되었다 (Zucker et al. 2002). 야생형의 경우 전체 향 함량에서 methyl benzoate가 차지하는 비율이 약 9%이지만, 형질전환체 중 두 라인에서의 비율이 약 42, 45%로 증가하였다. Anthocyanin생합성과 benzoic acid 생산의 상위 경로에 phenylpropanoid생합성 경로가 존재하기 때문인 것으로 생각되어지는데, 이는 화색과 관련된 유전자 조작을 통해 식물의 향 성분의 함량을 증가시킬 수 있는 하나의 대안적인 방법이 될 가능성을 시사함과 동시에, 다양한 종류의 화색과 향 성분을 갖는 식물의 육종이 가능하게 될 수 있다.

페튜니아 (*Petunia hybrida* W115)에 *Clarkia breweri*의 S-linalool

synthase cDNA를 CaMV 35S 프로모터에 연결하여 유전자를 과발현하는 형질전환체의 모든 기관에서 유전자가 발현을 하였고, 그 중 잎 (leaf), 꽃받침 (sepal), 화관 (corolla), 자방 (ovary) 등의 기관에서 linalool을 합성하였으나, 내생 glucosyltransferase에 의해 비휘발성의 S-linalyl- β -D-glucopyranoside로 전환되었다 (Lücker et al. 2001). 많은 식물들의 terpenoid는 glucoside 형태로 존재하기 때문에 외부로 발산되지 못하지만, 당 부분 (moiety)을 가수분해하는 효소인 β -D-glycosidase첨가하여도 카네이션에서는 linalool의 뚜렷한 증가가 나타나지 않았다 (Lücker et al. 2001; Watanabe et al. 1993). 따라서 glycosylation이 terpenoid의 발산에 직접적인 원인이 될 수는 없지만 (Lavy et al. 2002), 협죽도과 (Apocynaceae) 식물인 워터 자스민 (*Wrightia religiosa*) 과 케이프 자스민 (*Ervatamia coronaria*), 꼭두서니과 (Rubiaceae)인 치자 (*Gardenia jasminoides*)의 3종의 식물 추출물에서 β -galactosidase의 활성에 따라 향성분의 발산에 차이가 나타났다. 이는 hydroxylase의 활성이 향 발산에 영향을 미치는 요인이 될 수 있다는 것을 시사하며 식물 종에 따라 차이가 나타나는 것을 암시한다 (Suntornwat and Koocharoensap 2005).

과실 특이적 프로모터인 E8 promoter에 *Clarkia breweri*의 LIS를 연결하여 토마토 (*Lycopersicon esculentum* Mill.)에 도입하여 *a*-tocopherol, γ -tocopherol, lycopene, β -carotene, lutein 등과 같은 기타 terpenoid의 함량에는 영향을 주지 않으면서, 성숙한 과실에서 S-linalool과 8-hydroxylinalool을 생합성하는 형질전환을 성공하였다 (Lewinsohn, et al. 2001). 이 형질전환 토마토는 표현형적인 차이가 야생형 (wild-type)과 차이가 나타나지 않았는데, 이는 다른 표현형질에는 변화를 주지 않은 채 목적하는 성분만을 증가시킨 획기적인 연구결과라 할 수 있으며, 원예식물의 향 성분 증대를 위한 대사공학적인 분야의 가능성을 높여주었다 할 수 있다.

*Clarkia breweri*의 benzyl alcohol acetyltransferase (BEAT) gene을 꽃도라지 (*Eustoma grandiflorum* cv. Royal Pink)에 도입하여 향기 성분을 조절하고자 하였지만 (Aranovich et al. 2007), 야생형 및 형질전환체 식물 모두에서 benzyl acetate가 검출될 만큼의 충분한 양이 발산되지 않았다. 그러나 개화에 이른 식물을 절단하여 알코올계 전구물질인 benzyl alcohol을 24시간 동안 공급하였을 경우 benzyl acetate의 함량이 급격히 증가하였다. hexanol, benzyl alcohol, isoamyl alcohol, phenethyl alcohol, cinnamyl alcohol 등과 같은 기타 알코올계 전구물질을 공급한 후에도 acetate계 화합물의 생합성이 증가하였다. 전구물질을 공급한 야생형 식물에서도 소량의 benzyl acetate의 생합성이 일어났는데, BEAT와 유사한 역할을 하는 효소가 존재하는 것을 시사하는 결과로, 향 성분의 생산을 위한 충분한 전구물질을 확보하지 못하는 것이 향 성분 소실의 원인 중 하나

가 될 수 있으며, 식물에 따라 전구물질의 공급만으로도 향기 성분의 생산과 발산을 조절 할 수 있을 것이다. 이와 같은 방법은 절화 식물에 대한 적용이 충분히 가능하며, 향기 성분의 생산과 관련된 생화학적, 분자생물학적 연구와 더불어 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

화훼작물로 이용되는 식물뿐만 아니라, 다른 원예작물에 대한 대사 공학 연구도 활발히 이루어지고 있다. 특히 세계적으로 주요 경제 작물의 하나인 토마토의 경우, 향기 성분의 발산은 소비자들이 상품을 선택하는데 있어 매우 중요한 요소 중의 하나이다 (Bruhn et al. 1991; Goff and Klee 2006). α -Zingiberene synthase (ZIS)는 FPP로부터 sesquiterpene인 α -Zingiberene을 생합성하는 효소이다. 레몬 바질 (*Ocimum basilicum* L.)에서 분리한 ZIS cDNA를 polygalacturoase (PG) promoter에 연결하여 토마토에 형질전환을 하였다 (Davidovich-Rikanati et al. 2008). 7-*epi*-sesquithujene, sesquithujene, *cis*- α -bergamotene, *trans*- α -bergamotene, *cis*- β -farnesene, *trans*- β -farnesene, α -acoradiene, curcumene, α -zingiberene, β -bisabolene, β -curcumene, β -sesquiphellandrene, *trans*- γ -bisabolene, *cis*- γ -bisabolene 및 unknown compound 등의 야생형 토마토 성숙한 과실에서는 나타나지 않는 15종의 sesquiterpene과 10종의 monoterpene (α -thujene, sabinene, β -pinene, β -myrcene, α -phellandrene, α -terpinene, *trans*- β -ocimene, γ -terpinene, terpinolene, terpinen-4-ol)을 새롭게 생합성 하는 형질전환 세대를 획득하였다. 특히, 형질전환 토마토에서 plastid에서 생합성 되는 tetraterpene인 carotenoid의 함량이 야생형에 비해 감소하였는데, ZIS의 발현이 monoterpene의 합성과 연관성이 있고, 일부 GPP가 ZIS의 활성에 영향을 미치고 있음을 시사한다. Chamomile의 FPP는 DMAPP보다 GPP에 대해 더 높은 기질 친화성을 가지고 있는 것으로 추정되고 있으며 (Adam et al. 1999), 이는 sesquiterpene 생합성 효소들의 넓은 기질 친화성을 가지고 있음을 시사한다.

형질전환 식물을 이용해 자가수정 및 교잡 (crossing)을 통한 선발과 선발된 식물의 유전형질을 동일하게 유지하기 위해 무성번식 (삽목 등)을 이용해 개체를 증식할 수 있는 가능성도 열려 있다. (*Citrus limon* L. Burm. f.)에서 분리한 gamma-terpinene cyclase (*TER*), (+)-limonene cyclase 1 (*LIM*) 및 (-)-beta-pinene cyclase (*PIN*) 등의 monoterpene cyclase 유전자를 담배에 도입하여 각각의 형질전환 식물을 획득하였다 (Lücker et al. 2004). 이들 형질전환 식물을 이용해 selfing과 crossing을 통해 3개의 유전자가 동시에 도입되어 있는 담배를 육종하여, monoterpene 화합물의 양적인 증대와 구성을 바꾸어 주었다. 특히 대부분의 화훼작물의 증식은 무성번식을 이용하므로 형질전환체의 증식을 위한 기술로 보다 집중적인 연구가 이루어져야 할 것이라 생각한다.

유전자의 기능에 대한 연구를 위해 과발현 내지는 RNAi를 이용한 유전자 발현을 억제하는 형질전환체를

이용할 수 있으나, 바이러스를 이용하여 다량의 유전자에 대한 기능을 보다 빠른 시간 내에 동정할 수 있다. 그 중 Virus-induced gene silencing (VIGS)은 식물 유전자의 transcript를 억제하여 그 유전자의 기능을 연구할 수 있는 기술이다. 시퀀싱 기술의 발달에 따른 많은 식물의 게놈 및 EST 연구를 통한 유전자의 서열 정보는 셀 수 없이 늘어날 것으로 예상되는데, 이러한 수많은 유전자에 대한 각각의 기능을 밝히기 위한 기능체유전학 분야에서 가장 눈에 띄는 주목을 받을 수 있는 기술이 VIGS이다 (Becker and Lange 2010). 넓은 기주 범위와 높은 silencing 효과를 가지고 있는 Tobacco Rattle Virus (TRV)에 기반한 벡터가 VIGS에 많이 이용되는데 (Burch-Smith et al. 2006; Liu et al. 2002; Ratcliff et al. 2001), TRV는 Tobravirus 속에 속하며 bipartite positive-sense RNA를 가지고 있다 (MacFarlane 1999). TRV의 RNA1과 RNA2의 cDNA 클론을 35S 프로모터와 연결하여 T-DNA에 클로닝한 pTRV1과 pTRV2의 벡터가 필요하다 (Liu et al. 2002). pTRV1의 RNA1은 복제 단백질 (replication proteins), 이동단백질 (movement protein)과 16kD의 Cys-rich 단백질 (Cys-rich protein) 암호화 하며, pTRV2의 RNA2는 외피단백질 (coat protein)을 암호화 하고, 외래유전자를 삽입하는 구역인 multiple cloning sites (MCS)로 구성되어 있다.

pTRV2에 chalcone synthase (*CHS*, 페튜니아 꽃에서 VIGS 효과를 검증하기 위한 control로 사용되었다)와 S-adenosyl-L-methionine:benzoic acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase (*BSMT*) gene의 부분 서열을 연결한 혼합유전자를 삽입하여 페튜니아에 대한 *CHS:BSMT*의 VIGS감염을 통해 *CHS* 및 *BSMT*의 발현을 억제하여 methylbenzoate (MeBA)와 methylsalicylate (MeSA)의 생산이 감소되는 것을 확인하였다 (Spitzer, et al. 2007). Benzaldehyde, benzyl alcohol, phenylethyl alcohol, phenylacetaldehyde, benzylbenzoate 등의 기타 향 성분의 생산에 영향을 미치지 않은 채, 목표로 하는 유전자의 transcript에 대한 억제 효과만을 나타내어 향 성분의 연구를 위한 VIGS의 응용 가능성을 제시하였다. 추가적인 연구로 phenylacetaldehyde를 생산하는 phenylacetaldehyde synthase (*PAAS*) 유전자의 transcript에 대한 억제에 성공하였고, phenylacetaldehyde를 기질로 하여 합성되는 phenylethyl alcohol의 생산도 억제되는 부가적인 효과를 가져 왔다. 또한 전사인자 (transcription factor) 조절에 대한 VIGS 연구를 위해 식물에서 phenylpropanoid 화합물의 생산을 조절하는 전사인자로 알려져 있는 *ODO1* (Verdonk, et al. 2005)에 대한 실험을 통해 benzaldehyde, benzyl alcohol, phenylacetaldehyde, phenylethyl alcohol 등의 생산이 감소되는 것을 확인하여, 향 성분의 생산에 관련된 유전자의 연구에 대한 VIGS의 적용 가능성을 확인하였다.

모델식물이 아닌 식물 종에서의 향 성분의 생합성 및

생합성에 관련된 유전자의 탐색에 이용할 수 있는 방법으로 향기 성분을 발산하는 주요 기관인 꽃잎에 대한 cDNA 라이브러리의 구축, 발현해석 등을 통해 꽃 향기 성분의 연구를 위한 많은 EST가 구축되어 오고 있으며, 많은 식물들에서 연구가 진행되어 왔으며, 앞으로도 이에 대한 연구는 더욱 늘어날 것이다 (Guterman et al. 2002; Boatright et al. 2004). 성숙한 페튜니아 꽃의 경우 향 성분의 주는 benzoids이다. DNA-microarray 기술을 이용해 benzoid 생합성에 관여하는 유전자의 발현은 발산이 진행되면서 증가하는 동시에 upregulation 된다. 즉 향기 성분을 발산이 약한 시간대에 저장을 해두는 것이 아니라 발산이 활발히 이루어지는 시간대에 새로이 생산되는 것임을 알 수 있다 (Verdonk et al. 2003). 향기를 발산하거나 하지 않는 장미 품종에서 약 2100여 개의 유전자에 대한 EST 데이터 베이스를 구축하여, DNA 칩을 제조 해 발현 해석을 하여 향 성분의 동정 및 그와 연관된 유전자들을 결합하여 향 성분의 생합성과 관련된 후보 유전자들을 찾아 내었다 (Guterman et al. 2002). 뿐만 아니라 장미의 향기 성분과 관련된 EST library (Channelière et al. 2002), 난과(Orchidaceae) 식물인 *Phalaenopsis bellina*와 *Phalaenopsis equestris*의 EST library 구축을 통한 Monoterpene 합성경로의 연구 (Hsiao et al. 2006). 금어초에서의 EST 라이브러리 구축 (Dudareva et al. 2000), MVA pathway 및 MEP pathway의 대사를 저해하는 물질인 lovastatin과 fosmidomycin 처리 후 GeneChip (Affymetrix) microarray를 이용한 발현 해석과 대사산물에 관한 연구 등을 통해 유전자의 발현과 향기 성분의 생산 및 발산과의 연관성을 찾으려는 시도가 활발히 이루어 지고 있으며 (Laule et al. 2003), 형질전환체의 2차 산물에 대한 대사체학적 분석을 통해 새로운 라인을 선발할 수 있는 가능성도 제시되고 있다 (Bottcher et al. 2008; Ma et al. 2009).

앞으로의 전망

지금까지 알려진 화합물에 대해 약 5%미만의 유전자만이 알려져 있다 (Vainstein et al. 2001). 그러나 단일 유전자에 대한 분리, 동정, 기능의 연구 뿐만 아니라, 오믹스를 기반으로 한 유전자와 유전자 산물 간의 상호작용의 복잡성에 대한 연구가 활발히 이루어지면서 화훼작물에 대한 대사 공학적 시도의 범위가 넓어지고 있다 (Tanaka et al. 2005). 향기 성분의 생산 조절을 위한 대사공학 뿐만 아니라 2차 대사산물에 대한 대사공학적인 범위를 넓혀본다면, 향기 뿐만 아니라 측지분화를 억제하여 굳게 신장하여 절화 품질의 향상을 도모할 수도 있다 (Akiyama et al. 2005; Gomez-Roldan et al. 2008; Umehara et al. 2008).

MVA pathway와 MEP pathway를 통해 생합성되어 향기 성분을 생산하는데 중요한 역할을 하는 전구물질인 IPP, FPP 등에 대한 carbon flow의 조절, 외래 유전자의 도입을 통한 계통 육성, 보유한 유전자의 업/다운 조절을 통한 계통 육성, 전구물질의 함량을 증대시키기 위한 대사 경로의 조작을 통해서도 terpenoid 생산을 증가시킬 수 있을 것이다 (Aranovich et al. 2007; Wu et al. 2006).

카네이션, 장미, 양난, 등과 같은 많은 화훼작물은 화색 (flower color), 수확 후 저장성 증대 (long life, shelf life, post-harvest life), 색이나 모양과 같은 시각적 가치 증대 (morphology), 수송성 및 병 저항성 (disease resistance) 향상 등의 목표에 초점을 맞춘 육종 프로그램에 의해 선발 및 고정되어 왔다 (Zuker et al. 1998). 이와 같은 육종 프로그램에서 목적하고자 하는 형질을 가지고 있지 않은 자식 세대의 식물은 선발을 통해 걸러지게 되어 이러한 과정에서 각각의 식물이 가지고 있는 고유의 향을 소실하게 되었다. 수확 후 저장성 증대에 따른 향기 성분의 소실 (Vainstein et al. 2001)되거나 화색이 열리면 특정 향 성분이 증가되는 것을 보면 향기 성분을 잃어버리게 된 이유를 짐작할 수 있다 (Zuker et al. 2002).

꽃 향기는 수많은 화합물의 구성으로 이루어져 있으며, 복잡한 대사 경로를 거쳐 생산된다. 또한 사람이 느끼는 향기 역시 복합적인 반응에 의해 이루어지기 때문에 향 성분의 증대는 어려운 과제라 할 수 있다. 단일의 향 성분을 증대 시킨다 하더라도 사람이 느끼는 반응에는 차이가 나타나지 않을 수 있다. 이와 같은 화훼작물의 꽃 향기에 대한 소비자의 인식, 선호도 및 시장성, 화훼작목의 다양화, 강화되는 유전자 변형산물에 대한 법적 규제, 단일 유전자 조작 및 복잡한 대사 경로의 조작을 위한 복합적인 유전자 조작 기술의 확립과 같은 과제들이 남아있다. 최근의 소비자들에 있어서 가격보다는 품질을 더 중요시 하는 경향이 나타나고 있으며, 식용으로 사용되는 작물에 비해 유전자 변형 산물에 대한 일반 시민들의 거부감이 적기 때문에 화훼류에 대한 유전자 변형 산물의 산업화 과정은 식량작물에 비해 수월 하다고 할 수 있다 (Kim and Choi 2007). 또한 화훼산업 및 소비는 소비자의 수입 및 재산의 증가, 경제가 발전할수록 증가하는 특성을 가지고 있기 때문에, 경제개발 속도 및 소득 상승 수준이 빠른 아시아, 라틴아메리카, 동유럽 국가들 처럼 아직 포화되지 않은 시장에서의 수요의 증가가 예상되고 있다. 따라서, 대사공학을 통한 향기 성분의 조절 또는 생산의 증대는 화색 조절, 수명 증대 등과 더불어 장기적 관점에서 상품성 증대를 위한 부가가치를 부여해 줄 수 있으며, 유전자 변형을 통한 화훼작물은 앞으로 더 더욱 증가할 것이다.

사사

“이 논문은 2007년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2007-352-F00034).”

인용문헌

- Abd El-Mawla A, Beerhues L (2002) Benzoic acid biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *Planta* 214:727-733
- Adam K-P, Thiel R, Zapp J (1999) Incorporation of 1-[1-¹³C] deoxy-D-xylulose in chamomile sesquiterpenes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 369:127-132
- Akiyama K, Matsuzaki K-i, Hayashi H (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435:824-827
- Aranovich D, Lewinsohn E, Zaccari M (2007) Post-harvest enhancement of aroma in transgenic lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) using the *Clarkia breweri* benzyl alcohol acetyltransferase (*BEAT*) gene. *Postharvest Biology and Technology* 43:255-260
- Arimura G-i, Kopke S, Kunert M, Volpe V, David A, Brand P, Dabrowska P, Maffei ME, Boland W (2008) Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves: IV. Diurnal and nocturnal damage differentially initiate plant volatile emission. *Plant Physiol* 146:965-973
- Becker A, Lange M (2010) VIGS - genomics goes functional. *Trends in Plant Science* 15:1-4
- Beuerle T, Pichersky E (2002) Purification and characterization of benzoate:coenzyme A ligase from *Clarkia breweri*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 400:258-264
- Boatright J, Negre F, Chen X, Kish CM, Wood B, Peel G, Orlova I, Gang D, Rhodes D, Dudareva N (2004) Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiol* 135:1993-2011
- Bohlmann J, Gershenzon J, Aubourg S (2000) Biochemical, molecular, genetic and evolutionary aspects of defense-related terpenoid metabolism in conifers. *Recent Advances in Phytochemistry* 34:109-150
- Bottcher C, von Roepenack-Lahaye E, Schmidt J, Schmotz C, Neumann S, Scheel D, Clemens S (2008) Metabolome analysis of biosynthetic mutants reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in arabidopsis. *Plant Physiol* 147:2107-2120
- Bruhn CM, Feldman N, Garlitz C, Haewood J, Ivans E, Marshall M, Riley A, Thurber D, Williamson E (1991) Consumer perceptions of quality: Apricots, cantaloupes, peaches, pears, strawberries, and tomatoes. *Journal of Food Quality* 14:187-195
- Burch-Smith TM, Schiff M, Liu Y, Dinesh-Kumar SP (2006) Efficient virus-induced gene silencing in arabidopsis. *Plant Physiol* 142:21-27
- Channelière S, Rivière S, Scalliet G, Szecsi J, Jullien F, Dolle C, Vergne P, Dumas C, Bendahmane M, Hugueney P, Cock JM (2002) Analysis of gene expression in rose petals using expressed sequence tags. *FEBS Letters* 515:35-38
- Chen F, Tholl D, D'Auria JC, Farooq A, Pichersky E, Gershenzon J (2003) Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from arabidopsis flowers. *Plant Cell* 15:481-494
- Collu G, Unver N, Peltenburg-Looman AMG, van der Heijden R, Verpoorte R, Memelink J (2001) Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Letters* 508:215-220
- Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E, Bar E, Iijima Y, Pichersky E, Sitrit Y (2008) Overexpression of the lemon basil α -zingiberene synthase gene increases both mono- and sesquiterpene contents in tomato fruit. *The Plant Journal* 56:228-238
- Dexter RJ, Verdonk JC, Underwood BA, Shibuya K, Schmelz EA, Clark DG (2008) Tissue-specific *PhBPBT* expression is differentially regulated in response to endogenous ethylene. *Journal of Experimental Botany* 59:609-618
- Dicke M, Loreto F (2010) Induced plant volatiles: from genes to climate change. *Trends in Plant Science* In Press, DOI: 10.1016/j.tplants.2010.01.007
- Dudareva N, Cseke L, Blanc VM, Pichersky E (1996) Evolution of floral scent in *Clarkia*: Novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell* 8:1137-1148
- Dudareva N, Murfitt LM, Mann CJ, Gorenstein N, Kolosova N, Kish CM, Bonham C, Wood K (2000) Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. *Plant Cell* 12:949-961
- Dudareva N, Pichersky E (2006) Floral scent metabolic pathways: Their regulation and evolution. In *Biology of floral scent*, N. Dudareva and E. Pichersky, eds., Boca Raton, FL., CRC Press, USA
- Eisenreich W, Sagner S, Zenk MH, Bacher A (1997) Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin. *Tetrahedron Letters* 38:3889-3892
- Goff SA, Klee HJ (2006) Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value? *Science* 311:815-819
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot J-P, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J-C, Bouwmeester H, Becard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455:189-194
- Gouinguene SP, Turlings TCJ (2002) The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiol* 129:1296-1307
- Guterman I, Shalit M, Menda N, Piestun D, Dafny-Yelin M, Shalev G, Bar E, Davydov O, Ovadis M, Emanuel M, Wang J, Adam Z, Pichersky E, Lewinsohn E, Zamir D, Vainstein A, Weiss D (2002) Rose scent: Genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell* 14:2325-2338
- Herde M, Gartner K, Kollner TG, Fode B, Boland W, Gershenzon J, Gatz C, Tholl D (2008) Identification and regulation of TPS04/GES, an *Arabidopsis* geranylinalool synthase catalyzing the first step in the formation of the insect-induced volatile C₁₆-Homoterpene TMTT. *Plant Cell* 20:1152-1168
- Hsiao Y-Y, Tsai W-C, Kuoh C-S, Huang T-H, Wang H-C, Wu T-S,

- Leu Y-L, Chen W-H, Chen H-H (2006) Comparison of transcripts in *Phalaenopsis bellina* and *Phalaenopsis equestris* (Orchidaceae) flowers to deduce monoterpene biosynthesis pathway. *BMC Plant Biology* 6:14
- Kaminaga Y, Schnepf J, Peel G, Kish CM, Ben-Nissan G, Weiss D, Orlova I, Lavie O, Rhodes D, Wood K, Porterfield DM, Cooper AJL, Schloss JV, Pichersky E, Vainstein A, Dudareva N (2006) Plant phenylacetaldehyde synthase is a bifunctional homotetrameric enzyme that catalyzes phenylalanine decarboxylation and oxidation. *Journal of Biological Chemistry* 281:23357-23366
- Kegge W, Pierik R (2009) Biogenic volatile organic compounds and plant competition. *Trends in Plant Science* In Press, DOI: 10.1016/j.tplants.2009.11.007
- Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, Ståhl B (2006) Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review* 72: 1-120
- Knudsen JT, Tollsten L, Bergstr LG (1993) Floral scents--a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry* 33:253-280
- Kollner TG, Schnee C, Gershenzon J, Degenhardt J (2004) The Variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. *Plant Cell* 16:1115-1131
- Lange BM, Rujan T, Martin W, Croteau R (2000) Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13172-13177
- Laule O, Fürholz A, Chang H-S, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Grüssler W, Lange M (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:6866-6871
- Lavy M, Zuker A, Lewinsohn E, Larkov O, Ravid U, Vainstein A, Weiss D (2002) Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene. *Molecular Breeding* 9:103-111
- Lewinsohn E, Schalechet F, Wilkinson J, Matsui K, Tadmor Y, Nam K-H, Amar O, Lastochkin E, Larkov O, Ravid U, Hiatt W, Gepstein S, Pichersky E (2001) Enhanced levels of the aroma and flavor compound S-Linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiol* 127:1256-1265
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP (2002) Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIMI* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 30:415-429
- Lu S, Xu R, Jia J-W, Pang J, Matsuda SPT, Chen X-Y (2002) Cloning and functional characterization of a β -pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression. *Plant Physiol* 130:477-486
- Lücker J, Bouwmeester HJ, Schwab W, Blaas J, Plas LHWvd, Verhoeven HA (2001) Expression of *Clarkia* S-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of S-linalyl- β -D-glucopyranoside *The Plant Journal* 27:315-324
- Lücker J, Schwab W, van Hautum B, Blaas J, van der Plas LHW, Bouwmeester HJ, Verhoeven HA (2004) Increased and altered fragrance of tobacco plants after metabolic engineering using three monoterpene synthases from lemon. *Plant Physiol* 134: 510-519
- Ma C, Wang H, Lu X, Wang H, Xu G, Liu B (2009) Terpenoid metabolic profiling analysis of transgenic *Artemisia annua* L. by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Metabolomics* 5:497-506
- MacFarlane SA (1999) Molecular biology of the tobamoviruses. *J Gen Virol* 80:2799-2807
- McGarvey DJ, Croteau R (1995) Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7:1015-1026
- Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (MIFAFF) (2009). Status of floriculture production in 2008. Rpt. 11-1541000-000017-10, Seoul
- Moerkercke AV, Schauvinhold I, Pichersky E, Haring MA, Schuurink RC (2009) A plant thiolase involved in benzoic acid biosynthesis and volatile benzenoid production. *The Plant Journal* 60:292-302
- Negre F, Kish CM, Boatright J, Underwood B, Shibuya K, Wagner C, Clark DG, Dudareva N (2003) Regulation of methylbenzoate emission after pollination in snapdragon and petunia flowers. *Plant Cell* tpc.016766
- Orlova I, Marshall-Colon A, Schnepf J, Wood B, Varbanova M, Fridman E, Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS, Rhodes D, Pichersky E, Dudareva N (2006) Reduction of benzenoid synthesis in petunia flowers reveals multiple pathways to benzoic acid and enhancement in auxin transport. *Plant Cell* 18:3458-3475
- Pichersky E, Gershenzon J (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5:237-243
- Pichersky E, Noel JP, Dudareva N (2006) Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science* 311:808-811
- Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC (2001) Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal* 25:237-245
- Ribnicky DM, Shulaev V, Raskin I (1998) Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 118:565-572
- Rodriguez-Concepción M, Boronat A (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* 130:1079-1089
- Roeder S, Hartmann A-M, Effmert U, Piechulla B (2007) Regulation of simultaneous synthesis of floral scent terpenoids by the 1,8-cineole synthase of *Nicotiana suaveolens*. *Plant Molecular Biology* 65:107-124
- Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S, Sahn H (1996) Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 118:2564-2566
- Sasaki K, Saito T, Lamsa M, Oksman-Caldentey K-M, Suzuki M,

- Ohyama K, Muranaka T, Ohara K, Yazaki K (2007) Plants utilize isoprene emission as a thermotolerance mechanism. *Plant Cell Physiol* 48:1254–1262
- Spitzer B, Zvi MMB, Ovadis M, Marhevka E, Barkai O, Edelbaum O, Marton I, Masci T, Alon M, Morin S, Rogachev I, Aharoni A, Vainstein A (2007) Reverse genetics of floral scent: Application of tobacco rattle virus-based gene silencing in petunia. *Plant Physiol* 145:1241–1250
- Suntornwat O, Koocharoensap S (2005) β -glucosidase activity and scent production in some flowers. *Acta Hort* 679:195–199
- Tanaka Y, Katsumoto Y, Brugliera F, Mason J (2005) Genetic engineering in floriculture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 80:1–24
- Tholl D, R ose UR (2006) Detection and identification of floral scent compounds. In *Biology of floral scents*. N. Dudareva and E. Pichersky eds. Boca Raton FL, CRC Press, USA
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyoizuka J, Yamaguchi S (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455:195–200
- Vainstein A, Lewinsohn E, Pichersky E, Weiss D (2001) Floral fragrance. New inroads into an old commodity. *Plant Physiol* 127:1383–1389
- van Uffelen RLM, de Groot NSP (2005) Floriculture world wide; production, trade and consumption patterns show market opportunities and challenges. LEI paper 29148:
- Verdonk JC, Haring MA, van Tunen AJ, Schuurink RC (2005) *ODORANTI* regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers. *Plant Cell* 17:1612–1624
- Watanabe N, Watanabe S, Nakajima R, Moon J-H, Shimokihara K, Inagaki J, Etoh H, Asai T, Sakata K, Ina K (1993) Formation of flower fragrance compounds from their precursors by enzymic action during flower opening. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 57:1101–1106
- Wu S, Schalk M, Clark A, Miles RB, Coates R, Chappell J (2006) Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nat Biotech* 24:1441–1447
- Zuker A, Tzfira T, Ben-Meir H, Ovadis M, Shklarman E, Itzhaki H, Forkmann G, Martens S, Neta-Sharir I, Weiss D, Vainstein A (2002) Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene. *Molecular Breeding* 9:33–41
- Zuker A, Tzfira T, Vainstein A (1998) Genetic engineering for cut-flower improvement. *Biotechnology Advances* 16:33–79