

## Research Report

# 일시적 고온 스트레스가 복색 장미 'Pinky Girl'의 화색 및 관련 유전자 발현에 미치는 영향

이슬기<sup>1</sup>, 김완순<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>서울시립대학교 환경원예학과

<sup>2</sup>서울시립대학교 자연과학연구소

## Floral Pigmentation and Expression of Anthocyanin-Related Genes in Bicolored Roses 'Pinky Girl' as Affected by Temporal Heat Stress

Seul Ki Lee<sup>1</sup> and Wan Soon Kim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Horticulture, The University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

<sup>2</sup>Natural Science Research Institute, The University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

**Abstract:** This study was conducted to investigate petal pigmentation and the expression patterns of anthocyanin-related genes in bicolored roses 'Pinky Girl' treated with temporal heat stress (THS). Cyanin accumulation in petals was correlated with floral bud development and started rapidly as floral buds began to open, defined as the 4<sup>th</sup> stage of floral bud development (S<sub>4</sub>). This stage seems to be most susceptible to petal pigmentation. The total of cyanin pigmentation at blooming was significantly decreased (by 45.5%) with exposure to THS (39/18°C for three days at S<sub>4</sub>) in comparison with control. Meanwhile, the expression of anthocyanin-related genes such as *CHS*, *CHI*, *F3'H*, *DFR*, *ANS*, *3GT*, and *5GT* was relatively promoted by THS. Only *F3H* was less expressed (by 26.7%) with THS treatment; thus, *F3H* could be a key gene for bicolor promotion in 'Pinky Girl' among anthocyanin-related genes. Overall, the expression pattern of the most anthocyanin-related genes did not match the trends of cyanin pigmentation in petals. These results suggest that floral pigmentation could be associated with other mechanisms related to anthocyanin biosynthesis such as post-translational effects and regulatory genes.

**Additional key words:** anthocyanin, cyanin, floral bud development, pelargonin

## 서 언

안토시아닌은 수분 매개체를 유인하거나 자외선과 같은 환경 스트레스에 대한 보호, 섭식 저해 등 다양한 기능을 가지고 있으며, 화색을 조절하는 안토시아닌의 생합성 활성화는 환경적 신호와 발달에 관여하는 신호 사이의 상호작용이 요구된다(Stommel et al., 2009). 페튜니아(*Petunia hybrida*)에서는 지베렐린, 광, 그리고 당 신호가 화관에서 안토시아닌 합성을 유도하는 전사조절자(master transcription regulators)

를 조절하기 위해서 상호작용한다(Weiss, 2000). 또한, 안토시아닌의 생합성은 액포 pH, 보색소, 금속이온, 당치환과 같은 내적 요인과 온도, 광도, 광질 등 환경적 요인에 의하여 조절된다(Kim, 1999). 특히 온도는 안토시아닌 축적에 직접적인 영향을 주는 대표적인 환경적 요인으로, 일반적으로 저온은 *phenylalanine ammonia-lyase(PAL)*, *chalcone synthase(CHS)*과 같은 안토시아닌 생합성 관련 유전자들의 전사 수준을 높임으로써 안토시아닌 함량을 증가시킨다(Christie et al., 1994; Leyva et al., 1995). 안토시아닌 함량을 증가시키

\*Corresponding author: wskim2@uos.ac.kr

※ Received 4 May 2015; Revised 6 August 2015; Accepted 14 August 2015. 본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ90701506)의 지원에 의해 이루어진 것임.

© 2015 Korean Society for Horticultural Science

는 저온의 범위는 식물에 따라 다양하다. 옥수수(*Zea mays* L.)에서는 15°C의 저온이 가장 효과적이었고, 지속적인 저온보다 단기간의 저온처리 이후 높은 온도로 전환해주는 것이 더 효과적이었다(Christie et al., 1994). 적정 저온(17/12°C)과 고온(32/27°C)에서 재배된 페튜니아의 *CHS* 발현량은 화관(corolla)의 발달 초기에는 저온에 의해 증가하였지만, 이후에는 차이를 보이지 않았다(Shvarts et al., 1997). 또한, *CHS* 발현에 관한 온도의 효과가 안토시아닌 축적과 항상 일치하지는 않았기 때문에 번역 이후의 효과(post-translational effect)가 있을 수 있다고 제안하였다(Shvarts et al., 1997). 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서는 광 유도유전자인 *PAL*과 *CHS*에 의해 저온이 항상 효과적이지는 않았다(Leyva et al., 1995).

고온에 관한 많은 연구는 지속적인 고온에 초점을 맞추었는데, 포도(*Vitis vinifera* L. × *Vitis labrusca* L.)에서 야간의 지속적인 고온은 *UDP-glucose flavonoid-3-O-glucosyltransferase (UGT)*의 활성 감소를 통하여 안토시아닌 축적을 억제했다(Mori et al., 2005). 반면 일시적인 고온에 관한 연구는 한정적으로 수행되었다. 72시간 고온처리를 받은 절화용 장미 'Jaguar'에서는 안토시아닌 함량이 감소하고, 처리 시기에 따라 cyanin과 pelargonin의 비율이 변화하였다(Dela et al., 2003). 7일간 고온처리를 받은 적색 국화에서는 안토시아닌 함량이 감소하고, *flavanone 3-hydroxylase(F3H)*, *dihydroflavonol 4-reductase(DFR)*, *anthocyanidin synthase(ANS)*의 발현량이 감소하였다. 하지만 *flavonoid 3'-hydroxylase(F3'H)*의 발현량은 품종에 따라 차이를 보였다(Huh et al., 2008).

다양한 화색에 대한 요구를 충족시킬 수 있는 복색화(bicolor flowers)는 두 가지 이상의 다른 색채를 가지는 꽃을 의미한다. 반점무늬(Iida et al., 2004), 꽃잎의 앞뒤 색이 다른 것(Quintana et al., 2007), 개화 당시의 색과 후기의 색이 다른 것(Vaknin et al., 2005)과 특정 부위의 문양(Saito et al., 2006) 모두 복색화라고 할 수 있다(Kim, 1999). 복색화는 반점 무늬와 부채꼴 무늬를 가지는 카네이션(*Dianthus caryophyllus*)(Itoh et al., 2002), 부위별 색이 다른 *Ipomoea* 속 식물들(Iida et al., 2004)과 페튜니아(Saito et al., 2006)에서 주로 연구되었다. 기부와 말단의 축을 따라 착색된 패턴은 세포분화 과정에서 색소 생합성을 조절하는 유전자로 transposons이 삽입되거나 제거되어 형성된다(Inagaki et al., 1994). 반면 축과 수직으로 착색된 패턴은 유전자 발현의 공간적, 일시적인 조절을 위한 새로운 메커니즘의 가능성을 제시하였고, 페튜니아 'Baccara Rose Picotee'에서 chalcone의 합성은 특정 공간적(site-specifically)으로 조절된다는 것

이 보고되었다(Saito et al., 2006).

복색 장미 'Pinky Girl'은 하나의 색을 가지는 단색 장미와는 다르게 백색인 기부와 분홍색인 가장자리로 구별이 가능한 장미이다. 최근 소비자의 다양한 화색의 요구가 높아지면서 복색 장미의 판매량이 증가하였다(Byun et al., 2005). 또한 저온 조건인 겨울철에는 복색 발현이 우수하므로 매우 높은 가격으로 거래되고 있다. 하지만 상승적으로 고온 스트레스에 노출되는 여름철에는 복색의 발현이 저하되어 상품성이 떨어지고 거래 가격이 낮아지는 등 농가에 직접적인 피해를 주고 있다(Kim and Lieth, 2012; Korea Agro-Fisheries & Food Trade Corporation, 2014). 따라서 본 연구는 복색 장미 'Pinky Girl'을 대상으로 꽃잎의 주요 색소와 착색 특성, 그리고 화아 발달 중 일시적인 고온 스트레스에 따른 화색 관련 유전자들의 발현 양상을 분석하여 고온기 복색 장미의 불량한 착색 기작을 이해함으로써 여름철 장미 절화 생산관리에 활용하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 식물 재료 및 온도 처리

식물 재료는 2010년 농촌진흥청에서 육성한 복색 장미 품종 'Pinky Girl'(*Rosa hybrida* L.)을 주·야간 온도 25/18°C, 습도 50 ± 10%, 광도 700 ± 100 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>으로 조절되는 생육상 환경에서 재배하였다. 화아의 발달 단계를 직경에 따라 6단계(S<sub>1</sub>: 4.5-7.5mm, S<sub>2</sub>: 7.5-10.5mm, S<sub>3</sub>: 10.5-13.5mm, S<sub>4</sub>: 13.5-16.5mm; S<sub>5</sub>: 16.5-19.5mm, S<sub>6</sub>: 19.5mm <)로 구분하였고, 온도처리는 꽃봉오리에서 꽃잎이 출현하기 직전 단계(S<sub>4</sub>)에서 3일간 엽소 현상이 발생하지 않는 최고 온도 조건인 39°C(고온처리구)와 25°C(대조구)로 처리하였다. 이때 야간온도는 고온처리구와 대조구 모두 18°C로 같게 유지하였다. 고온처리 후에는 다시 정상적인 온도인 25/18°C로 관리하여 개화를 유도하였고, 개화 시기인 S<sub>6</sub>에 도달한 꽃잎을 백색인 기부(basal part)와 분홍색인 가장자리(marginal part)를 구분하고 양측 단면부터 각각 10mm까지 부위를 채취하여 분석에 사용하였다.

### 광 흡수스펙트럼, 총 안토시아닌 함량 분석

채취한 꽃잎의 기부와 가장자리 부위 각 1g씩 세절하여 0.1% HCl methanol로 4°C 암소에서 24시간 추출한 후 UV-VIS spectrophotometer(UV-2450, Shimadzu, Japan)을 이용하여

400nm-700nm의 파장 범위에서 최대 흡수 파장과 흡광도를 측정하였다. 총 안토시아닌 함량은 530nm와 653nm에서 흡광도를 측정한 후 Total Anthocyanin =  $A_{530} \cdot 0.24 \times A_{653}$  식을 이용하여 구하였다(Murray and Hackett, 1991). 표준시약은 cyanidin-3,5-di-O-glucoside(cyanin), pelargonidin-3,5-di-O-glucoside(pelargonin)(Sigma, USA)를 사용하였다(Ogata et al., 2005).

### 화색 측정

화색은 색차 색도계(CR-10, MINOLTA, Japan)를 이용하여 L\*(darkness-brightness), a\*(green-red), b\*(blue-yellow)를 측정한 후, McGuire(1992)의 수식을 이용하여 C\*와 h\*값을 구하였다.

### High performance liquid chromatography

전처리하는 Longo and Vasapollo(2005)를 참고하여 액체질소로 동결시킨 꽃잎의 기부와 가장자리 각각 3g을 마쇄한 후 0.1% HCl methanol 20mL로 4°C 암소에서 22시간 3회 반복 추출하였다. 추출한 시료는 5,000rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하고 30mL의 상등액은 CCA-111(EYELA, Japan)을 사용하여 25°C에서 감압 농축시켰다. 색소 농축액은 2mL의 0.01% HCl methanol로 녹인 후, 활성화되어 있는 C18 Sep-Pak cartridge(Waters, Milford, USA)에 로딩시켰다. 4mL의 0.01% aqueous HCl로 세척하고, 4mL의 0.01% HCl methanol로 색소를 추출하였다. 색소 추출액은 감압 농축시킨 후 1.5mL의 0.01% HCl methanol로 녹이고 0.2μL syringe filter(Macherey-nagel, Duren, Germany)를 이용하여 여과한 후 Table 1의 조건으로 분석하였다. 표준시약은 cyanin과 pelargonin(Sigma,

**Table 1.** HPLC operating conditions for analysis of anthocyanin composition.

Instrument	LC-20 AD (Shimadzu, Japan)
Wavelength	520 nm
Mobile phase	A: aqueous 0.1% trifluoroacetic acid B: 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile
Linear gradient	0 min: 10% B 0-20 min: 10% B 30 min: 20% B 50 min: 30% isocratic
Column	Zorbax SB-C18 4.6 × 250 mm, 5 μm (Agilent Technologies, USA)
Injection volume	10 μL
Flow rate	1 mL·min <sup>-1</sup>

USA)을 사용하였다(Ogata et al., 2005).

### Real-Time PCR

장미 안토시아닌 생합성 과정에서 확인된 9가지의 유전자 *CHS*, *chalcone isomerase(CHI)*, *F3H*, *F3'H*, *DFR*, *ANS*, *flavonol synthase(FLS)*, *flavonoid 3-glucosyltransferase(3GT)*, *flavonoid 5-glucosyltransferase(5GT)*의 발현양상을 분석하기 위해 액체질소로 동결시킨 꽃잎 기부와 가장자리를 분쇄한 다음 Plant RNA mini Kit(PhileKorea Technology, Korea)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. Total RNA 1μg, random primer, 10mM dNTP를 혼합하고, 최종부피가 10μL가 되도록 DEPC 처리된 dH<sub>2</sub>O를 넣고 잘 섞은 후 합성 반응액을 65°C에서 5분, 얼음에서 2분간 반응시켰다. 합성 반응액에 5xRT Buffer와 RNase inhibitor 10 unit과 역전사 중합효소 200 unit을 첨가하고 최종 부피가 10μL가 되도록 DEPC 처리된 dH<sub>2</sub>O를 넣고 잘 섞은 후 37-45°C에서 30-60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. PCR은 1/10 희석한 cDNA 3μL에 QuantiSpeed SYBR Master Mix 10μL, forward primer 1μL, reverse primer 1μL, RNase-free water 5μL를 혼합한 후 Eco Real-Time PCR(Illumina, USA)을 사용하여 수행하였다. 실험에 사용된 primer는 Table 2와 같고, 각 실험의 결과는 Eco software v4.0.7(Illumina, USA)을 이용하여 분석하였다.

### 통계처리

통계분석용 프로그램인 SAS package(Statistical analysis system, version 9.2, SAS Institute Inc., USA)를 이용하여 ANOVA(Analysis of variance) 분석을 실시하였으며 각 처리간의 유의성은 DMRT(Duncan's new multiple range test) 5% 수준으로 하였다.

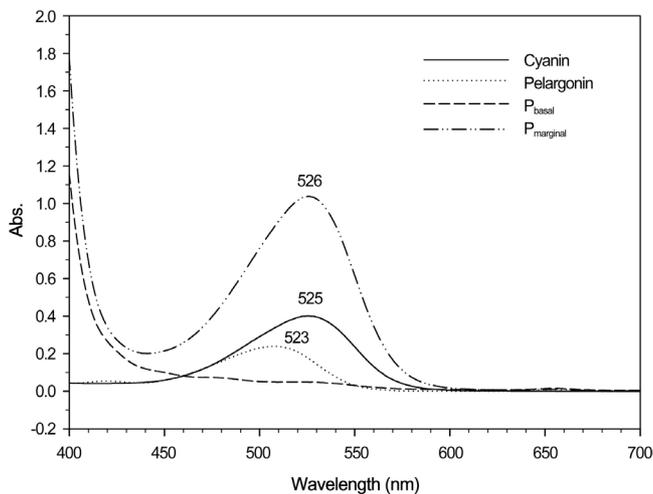
## 결과 및 고찰

### 장미 화색소 구성과 화아 발달 단계별 착색특성

복색 장미 'Pinky Girl'의 꽃잎 부위에 따라 함유하고 있는 주된 색소를 알아보기 위하여 400-700nm의 파장 범위에서 흡광도를 측정하였다. Cyanin 표준시약은 525nm, pelargonin 표준시약은 523nm에서 최대 흡광도를 나타냈으며, 꽃잎 가장자리 부위 역시 526nm에서 최대 흡광도를 나타냈다(Fig. 1). 이와 같이 표준시약과 꽃잎 가장자리 부위의 흡광 경향

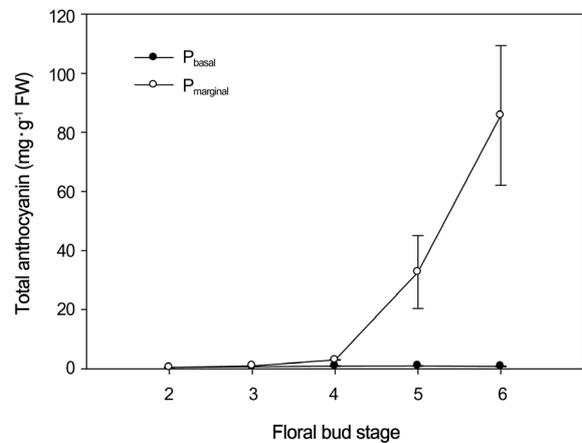
**Table 2.** Primers for Real Time-PCR analysis.

Gene	Accession No.	Primer Sequence (5' to 3')		Product (bp)
		Forward	Reverse	
<i>CHS</i>	AB038246.1	TTATCCGAGTACGGCAATATGTC	AGTGGTCTTGTGCCATTAG	93
<i>CHI</i>	AY040321.1	ATGTGTGGCTACAAGGCTATC	CCTTTCTCAGTTTCATGCCTTAAC	106
<i>F3H</i>	EU078685.1	TTGAGATCGCCCGTCATAAG	CCAAGCCCATCTAAGCAAGTA	108
<i>F3'H</i>	AX028830.1	GTGCACCACAAATGCCTTATC	CTCCAGCACCATGTCTTAAA	103
<i>DFR</i>	AB239796.1	CCCAGTACAATGTTCTTACAA	TGAACTCGAACCTGTTTCC	100
<i>ANS</i>	AB239791.1	CAAATGGGTGACAGCGAAATG	CCCTGTGAAGAAATGCTCTTGTA	104
<i>FLS</i>	AB038247.1	CAAGGTGGTGGAGAAGCTATT	TTGAGAAGGTACACCAAGTCATC	105
<i>3GT</i>	AB239792.1	GCGTCTGTAGTGTATGTGAGTT	GTTCCGAAGAGACCACAAGAA	117
<i>5GT</i>	AB239793.1	AGATGGCTCCGAACAAGTTAAG	TTCGTCATGAGGTTGGTTAAGG	99
<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	AB370119.1	CTTGAGGCACTTGACCAAATC	CAGTTCCAATGCCACCAATC	100

**Fig. 1.** Absorbance spectra of basal and marginal parts of petal in bicolor rose 'Pinky Girl', cyanin and pelargonin obtained by UV-Vis spectrophotometer.  $P_{\text{basal}}$ : basal part of petal;  $P_{\text{marginal}}$ : marginal part of petal.

이 유사하므로 'Pinky Girl'의 화색소는 cyanin과 pelargonin으로 구성되어 있고, Ogata et al.(2005)이 장미에서 첫 번째로 안정적인 화색소를 cyanin이라고 보고한 점을 고려할 때 cyanin이 'Pinky Girl'의 화색을 결정하는데 주요한 역할을 한다고 판단된다(Kim, 1999). 한편 가시적인 착색을 확인할 수 없었던 꽃잎 기부에서는 가장자리와는 달리 cyanin과 pelargonin의 최대 흡광도를 보이지 않았다(Fig. 1).

화아 발달 단계 중 꽃잎의 기부와 가장자리를 구분할 수 있는  $S_2$ 부터 부위별 총 안토시아닌 함량을 측정된 결과, 기부에서는 발달 단계에 따라 가시적으로 색 변화를 관찰할

**Fig. 2.** Concentration of total anthocyanin in basal and marginal parts of petals in bicolor rose 'Pinky Girl' at different floral bud developmental stages.  $P_{\text{basal}}$ : basal part of petals;  $P_{\text{marginal}}$ : marginal part of petal. Vertical bars represent the standard errors of means ( $n = 5$ ).

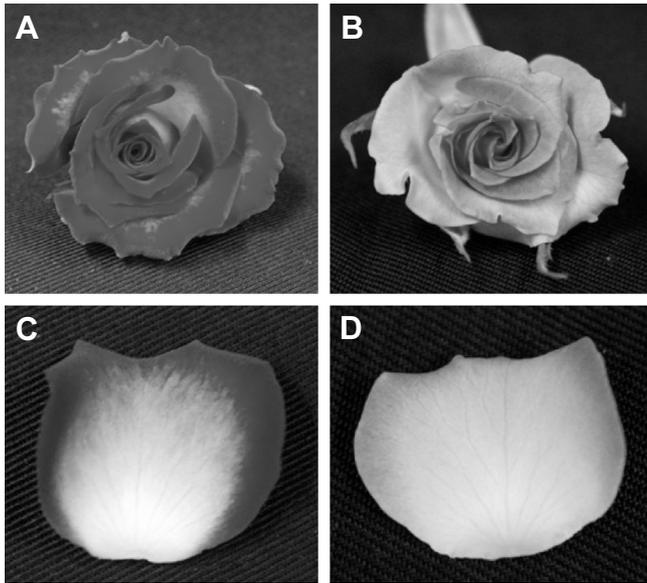
수 없었던 것과 마찬가지로 총 안토시아닌 함량이 유의적으로 증가하지 않았다. 반면에 가장자리에서는  $S_2$ 부터 옅은 분홍색을 보이고 점차 진한 분홍색으로 착색되는 것을 관찰할 수 있었고, 총 안토시아닌 함량 역시 유의적으로 증가하였다. 특히 꽃봉오리가 열리기 직전 단계인  $S_4$ 부터는 함량이 급격하게 증가하기 시작하여 복색 발현이 뚜렷하게 나타났고,  $S_6$ 에서는 기부의 100배 이상인  $85.731\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 의 함량이 측정되었다(Fig. 2). 이러한 가장자리에서의 착색은 적색 장미 'Jaguar'에서 꽃봉오리가 터지기 직전인  $S_3$ 와  $S_4$ 에서 안토시아닌 축적이 가장 빠르게 진행된 결과와 일치하였다 (Dela et al., 2003).

**고온처리에 따른 화색 발현과 안토시아닌 축적 특성**

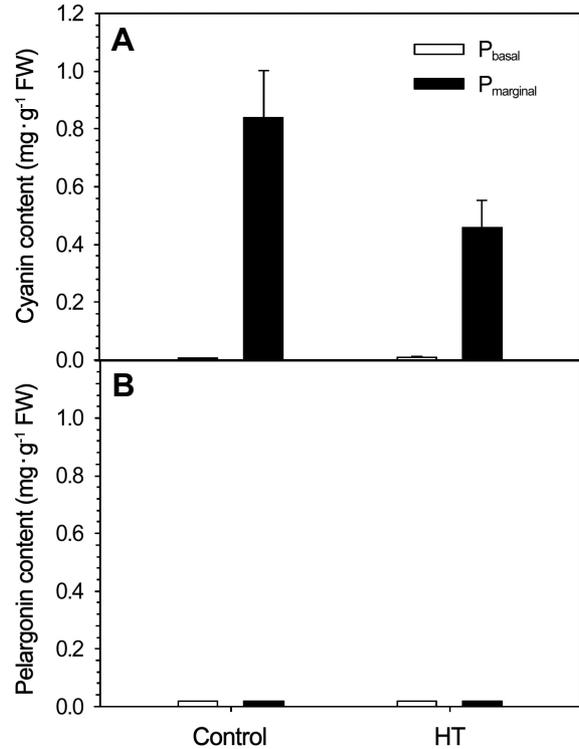
고온이 화색 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 꽃봉오리가 터지기 직전인 S<sub>4</sub>에서 3일 간 고온 처리(39/18°C) 후 S<sub>6</sub>에서 화색을 관찰한 결과, 가장자리의 색이 옅어졌고 전반적으로 꽃잎의 화색 발현이 현저히 저하되었다(Fig. 3). 고온 처리로 꽃잎 가장자리의 L\*값은 61.3으로 증가하여 밝아졌고, a\*값은 41.8로 감소하여 적색 발현이 현저하게 저하되었음이 확인되었다. 채도를 나타내는 C\*값 또한 41.8로 감소하여 고온처리로 화색이 품종 고유색에서 상대적으로 멀어졌음을 알 수 있었다(Table 3). 분홍색의 아시아틱 나리(*Lilium* × *elegans* Thumb.) ‘Brindisi’ 역시 여름철에 재배했을 때 겨

울철과 비교하면 꽃잎의 L\*값이 증가하고 a\*값과 b\*값이 감소하는 등 색상 발현이 저하되었다(Burchi et al., 2010). 따라서 화아 발달 과정 중 고온 노출은 이후 꽃잎의 착색에 부정적인 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.

한편 색차계 수준의 화색변화가 실제 화색소의 축적과 관련이 있는지를 확인하고자, 꽃잎의 기부와 가장자리를 나누



**Fig. 3.** Effect of high temperature treatment on the petal color of bicolor rose ‘Pinky Girl’. A and C: Control (25/18°C); B and D: High temperature treatment (39/18°C).



**Fig. 4.** Effect of high temperature treatment on pigmentation of cyanin (A) and pelargonin (B) in bicolor rose ‘Pinky Girl’. Control: 25/18°C; HT: high temperature treatment (39/18°C). P<sub>basal</sub>: basal part of petal; P<sub>marginal</sub>: marginal part of petal. Vertical bars represent the standard errors of means (n = 5).

**Table 3.** Effect of high temperature treatment on the petal color of bicolor rose ‘Pinky Girl’.

Treatment	Part of petals <sup>x</sup>	Petal color <sup>y</sup>				
		L*	a*	b*	C*	h*
Control (25/18°C)	P <sub>basal</sub>	77.9 a <sup>z</sup>	7.9 c	26.4 a	28.9 c	70.5 a
	P <sub>marginal</sub>	46.0 c	55.5 a	4.8 c	55.7 a	4.9 b
High Temperature (39/18°C)	P <sub>basal</sub>	78.2 a	11.0 c	19.6 b	24.0 c	53.9 a
	P <sub>marginal</sub>	61.3 b	41.8 b	0.6 c	41.8 b	1.3 b

<sup>z</sup>Different letters within columns indicate significant differences based on Duncan’s new multiple range test at p = 0.05 (n = 5).

<sup>y</sup>L\* indicates the brightness and ranges from 0 to 100. a\* and b\* range from -100 to 100, where negative a\* indicates green, positive a\* indicates red, negative b\* indicates blue and positive b\* indicates yellow. C\* indicates the hypotenuse of a right triangle formed by joining points (0, 0), (a\*, b\*) and (a\*, 0). h\* indicates angle between the hypotenuse and 0° on the a\* axis.

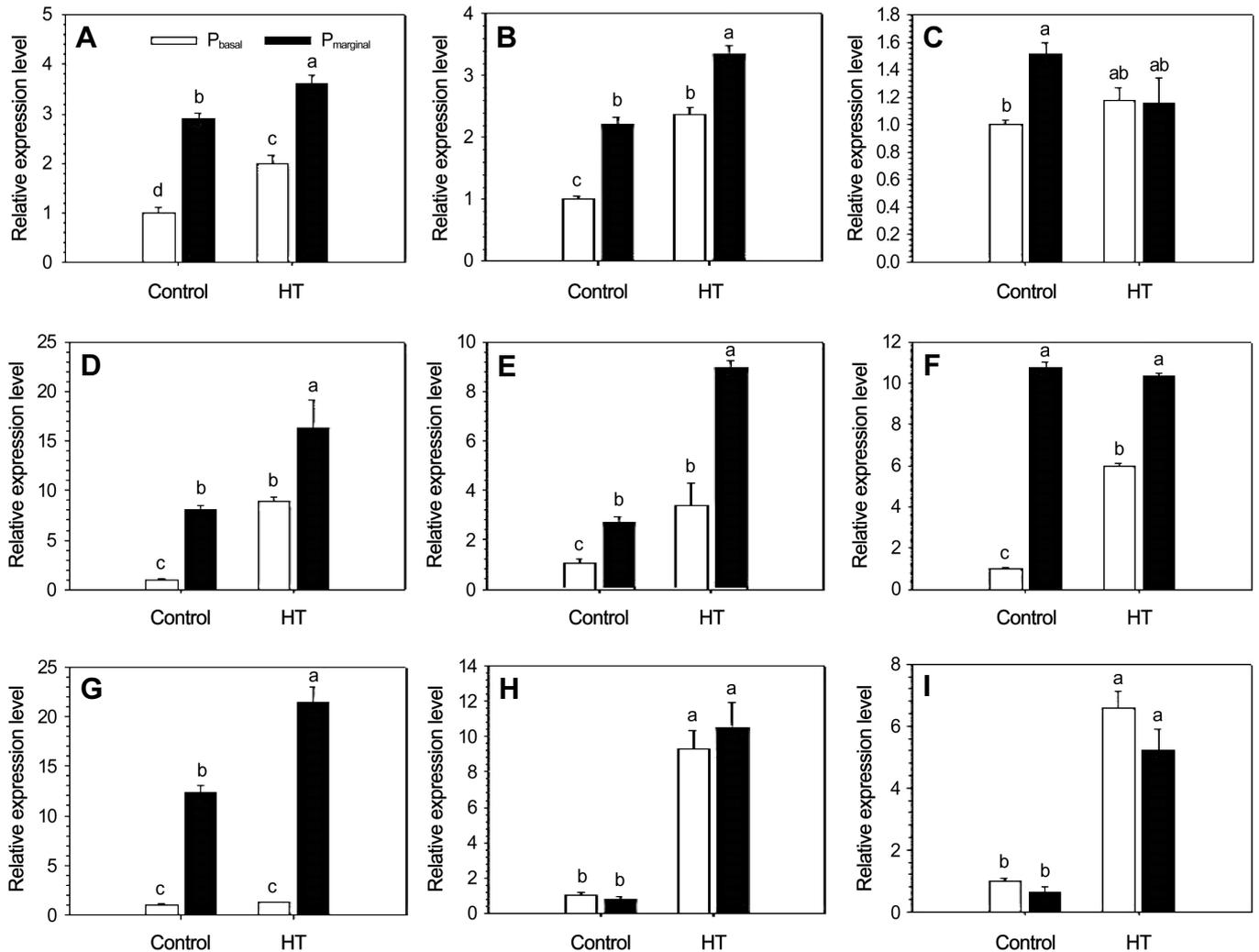
<sup>x</sup>P<sub>basal</sub>: basal part of petal; P<sub>marginal</sub>: marginal part of petal.

어 앞서 확인된 주색소 cyanin과 pelargonin의 함량을 HPLC로 측정하였다(Kim, 1999). Cyanin과 pelargonin의 피크는 각각 12분, 19분대에서 검출되었다. Cyanin의 함량은 꽃잎 기부에서는 유의적 차이를 보이지 않았지만 가장자리에서는 고온처리구가 대조구보다 45.5% 감소하였다(Fig. 4A). 한편 Pelargonin의 함량은 cyanin에 비해 현저히 낮았으며 기부와 가장자리 모두 유의적 차이를 보이지 않았다(Fig. 4B). 한편 cyanin과 pelargonin 색소를 모두 가진 적색 장미 ‘Jaguar’에서 꽃잎이 출현하기 직전 단계에서 고온 스트레스를 받았을 때 pelargonin과 비교해 cyanin이 상대비율이 낮아지며 적색 발현이 저하되었다(Dela et al., 2003). 한편 분홍색이며

기부가 백색인 복색 ‘Pinky Girl’은 ‘Jaquar’에 비해 cyanin이 상대적으로 적고 pelargonin은 거의 검출되지 않아 두 화색 소간 상대 비율의 변화보다는 cyanin의 감소가 착색불량의 직접적인 원인으로 판단된다.

#### 안토시아닌 생합성 관련 유전자 발현 양상

고온에 의한 화색소 축적 감소와 안토시아닌 생합성 관련 유전자들의 발현과의 관계를 살펴보았다. 먼저 대조구에서는 3GT와 5GT를 제외한 나머지 안토시아닌 생합성 유전자들은 꽃잎 기부보다 가장자리에서 더 많이 발현되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 꽃봉오리 발달 초기에 발현하는 EBGs(early



**Fig. 5.** Relative expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in bicolor rose ‘Pinky Girl’ in response to heat stress for three days. Control: 25/18°C; HT: high temperature treatment (39/18°C). P<sub>basal</sub>: basal part of petal; P<sub>marginal</sub>: marginal part of petals. A: *CHS*; B: *CHI*; C: *F3H*; D: *F3'H*; E: *DFR*; F: *FLS*; G: *ANS*; H: *3GT*; and I: *5GT*. Different letters within columns indicate significant differences based on Duncan's new multiple range test at  $p = 0.05$ . Vertical bars represent the standard errors of means ( $n = 5$ ).

biosynthetic genes)인 *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'H*의 발현이 상대적으로 기부에서 낮았기 때문에 당이 결합하지 않은 anthocyanidins의 함량이 기부에서 적었을 것이라고 예상할 수 있다. 한편 glucose와의 결합을 통해 안토시아닌을 생성 및 안정화하는 *3GT*와 *5GT*의 발현 정도가 비슷함에도 불구하고 꽃잎 기부에서 안토시아닌이 매우 적기 때문에(Fig. 2) 거의 검출되지 않은 결과로도 해석할 수 있다(Jeon, 2001).

*DFR*의 기질인 dihydrokaempferol을 flavonol의 한 종류인 kaempferol로 전환시켜 anthocyanidins 생성을 저하하는 *FLS* 발현은 예상과는 다르게 기부보다 가장자리에서 현저하게 높았다. 이러한 결과는 분석 시점이 꽃봉오리 발달 초기가 아닌 후기이기 때문일 가능성이 있으며, 복색 장미 'Pinky Girl'의 총 안토시아닌 축적은 *FLS*보다는 앞에서 언급한 EBGs인 *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'H*에 의한 영향이 더 크기 때문으로도 생각된다.

꽃잎 기부와 가장자리 부분을 나누어 비교해 보면, 기부에서는 *F3H*와 *ANS*를 제외한 *CHS*, *CHI*, *F3'H*, *DFR*, *FLS*, *3GT*, *5GT* 모두 고온 처리구에서 높게 발현되었다. 가장자리에서는 *F3H*와 *FLS*를 제외한 모든 유전자가 역시 고온 처리구에서 높았다(Fig. 5). 이러한 발현 패턴은 Fig. 4에서 보면 cyanin과 pelargonin의 함량 패턴과는 일치하지 않았는데 그 원인으로 다음 몇 가지 가능성을 제시할 수 있다.

첫 번째로 안토시아닌 관련 유전자들의 번역 이후의 다른 메커니즘 관여이다. 열대 과수 리치(*Litchi chinensis* Sonn.) 'Sanyuehong'과 'Guinuo' 두 품종 사이에 안토시아닌 축적과 생합성 관련 유전자 발현 양상이 상호 반대의 경향을 보였다. 안토시아닌 함량은 'Guinuo'에서 약 4배 정도 높았지만, *LcCHS*, *LcCHI*, *LcF3H*, *LcANS*의 발현은 'Sanyuehong'에서 더 높았다(Wei et al., 2011). 열은 분홍색인 국화 'Argus'는 보라색인 'ARTI-purple'보다 안토시아닌 함량은 현저하게 낮았지만, 생합성 관련 유전자 발현은 더 높게 나타났다(Sung et al., 2013). 이러한 결과들은 안토시아닌 축적이 생합성 관련 유전자들과는 별개로 번역 이후의 다양한 메커니즘에 의해서 조절될 수 있다는 것을 보여준다.

두 번째는 *MYB*와 같은 조절유전자의 관여이다. 안토시아닌 생합성은 flavonoid pathway에서 구조유전자들을 활성화하는 *MYB*, basic helix-loop-helix(*bHLH*) 그리고 WD40 repeat protein으로 구성된 전사복합체에 의해 조절된다(Koes et al., 2005). Yamagishi(2011)는 오리엔탈 나리에서 흰색 품종 'Siberia'와 'Rialto'에서 *MYB12*의 발현은 차이를 보였지만 *CHS*는 차이를 보이지 않았다고 하였는데, 이러한 결과는 *MYB*가

종과 품종에 따라 다른 유전자들의 전사를 조절한다는 것을 의미한다. 이럴 경우 복색 장미 'Pinky Girl'에서도 고온 스트레스를 받은 시점에서의 조절유전자 발현 분석이 필요할 수 있다.

안토시아닌 생합성에 중요한 역할을 하는 생합성 관련 유전자는 종, 품종에 따라 매우 다양하다. 배 'Yunhongli No.1'에서는 *PpCHS*, *PpANS*, *PpUGFT*가 안토시아닌 생합성에 중요한 유전자로 알려졌다(Zhang et al., 2012). 노란색 꽃잎에 보라색 반점이 있는 팬지에서는 안토시아닌 함량이 급격하게 증가할 때 보라색 반점 부위에서 각각 73배, 62배나 발현되는 *VwDFR*, *VwANS*이 중요하다(Li et al., 2014). 복색 장미 'Pinky Girl'의 경우 9개의 유전자 중에서 *F3H*의 꽃잎 기부에 대한 가장자리 발현은 대조구에서 1.514배였던 반면 고온처리구에서는 0.985배로 낮아졌으며, 특히 가장자리의 발현은 다른 8개의 유전자에서는 증가했던 것과 달리 26.7% 감소하였다. 이처럼 *F3H* 발현 양상이 고온 처리구에서 뚜렷하게 구별되므로 'Pinky Girl'의 복색을 나타내는데 의미 있는 유전자로 판단된다.

이상에서 복색 장미 'Pinky Girl'의 착색 시점은 꽃봉오리가 터지기 직전으로 이 시기 고온 스트레스에 노출될 경우 cyanin의 축적이 현저하게 저하되어 복색 발현이 불량하게 된다. 이러한 착색반응은 안토시아닌 생합성 관련 유전자들의 발현과 연관성이 있는 것으로 확인되었으나, 'Pinky Girl'에서는 앞에서 언급한 리치(Wei et al., 2011)에서와 같이 예외적으로 일치하지 않았다. 화색소 축적과정은 여러 단계에서 다양한 유전자들이 관여하고 있기 때문에 개별 유전자의 발현 유무와 화색소 축적간의 직접적인 연관성에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## 초 록

본 연구는 일시적인 고온 스트레스 처리가 복색 장미 'Pinky Girl'의 화아 착색과 안토시아닌 생합성 관련 유전자들의 발현 양상에 미치는 영향을 알아보고자 수행되었다. 꽃잎에서 cyanin의 축적은 화아의 발육단계와 연관이 있으며 화아 발육 과정에서 꽃잎이 출현하는 4단계(S<sub>4</sub>)에서 급격하게 일어났다. 따라서 S<sub>4</sub> 단계가 꽃잎 착색에 가장 민감한 시기로 판단된다. S<sub>4</sub> 단계에서 3일간 고온 스트레스(39/18°C)를 받은 고온처리구에서 개화 당시 꽃잎의 cyanin 착색이 대조구와 비교하여 45.5% 감소하였다. 한편, 안토시아닌 생합성 관련 유전자인 *CHS*, *CHI*, *F3'H*, *DFR*, *ANS*, *3GT*, *5GT*의 발현은

고온처리구에서 오히려 촉진되었다. 예외적으로 *F3H*의 발현은 고온처리구에서 26.7% 감소하여 'Pinky Girl'의 복색 발현에 의미 있는 유전자로 확인되었다. 하지만 대부분 안토시아닌 생합성 관련 유전자들의 발현은 꽃잎에서의 cyanin 착색 경향과 비례적이지 않았다. 따라서 장미 꽃잎의 화색 소 축적은 번역 이후 효과와 조절유전자와 같은 안토시아닌 생합성과 관련된 다른 복잡한 메커니즘이 연관되어 있을 것으로 판단되었다.

**추가 주요어 :** 안토시아닌, 시아닌, 화아발육, 펠라고닌

## 인용문헌

- Burchi, G., D. Prisa, A. Ballarin, and P. Menesatti. 2010. Improvement of flower color by means of leaf treatments in lily. *Sci. Hortic.* 125:456-460.
- Byun, M.S., K.N. Chang, J.S. Kim, M.J. Kim, and K.W. Kim. 2005. Changes tendency of the flower colors in cut *Rosa hybrida* cultivars. *J. Korean Flower Res. Soc.* 13:347-353.
- Christie, P.J., M.R. Alfenito, and V. Walbot. 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194:541-549.
- Dela, G., E. Or, R. Ovadia, A. Nissim-Levi, D. Weiss and M. Oren-Shamir. 2003. Change in anthocyanin concentration and composition in 'Jagure' rose flowers due to transient high-temperature conditions. *Plant Sci.* 164:333-340.
- Huh, E.J., H.K. Shin, S.Y. Choi, O.G. Kwon, and Y.R. Lee. 2008. Thermosusceptible developmental stage in anthocyanin accumulation and color response to high temperature in red chrysanthemum cultivars. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 26: 357-361.
- Iida, S., Y. Morita, J.D. Choi, K.I. Park, and A. Hoshino. 2004. Genetics and epigenetics in flower pigmentation associated with transposable elements in morning glories. *Adv. Biophys.* 38:141-159.
- Inagaki, Y., Y. Hisatomi, T. Suzuki, K. Kasahara, and S. Iida. 1994. Isolation of a suppressor-mutator/enhancer-like transposable element, Tpn1, from Japanese morning glory bearing variegated flowers. *Plant Cell* 6:375-383.
- Itoh, Y., D. Higeta, A. Suzuki, H. Yoshida, and Y. Ozeki. 2002. Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Cell Physiol.* 43:578-585.
- Jeon, W.H. 2001. Molecular characterization of an UDP-glucose flavonoid glucosyl transferase (ufgt) gene during the colour development in fruits and flowers. MS thesis, Dankook Univ., Korea.
- Kim, J.H. 1999. The nature of flower color. JinSol Ltd. Seoul, Korea.
- Kim, W.S. and J.H. Lieth. 2012. Simulation of year-round plant growth and nutrient uptake in *Rosa hybrida* over flowering cycles. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 53:193-203.
- Korea Agro-Fisheries & Food Trade Corporation. 2014. The auction market price of flowers from 2013 to 2014. <http://www.yfmc.co.kr>.
- Koes, R., W. Verweij, and F. Quattrocchio. 2005. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.* 10:236-242.
- Leyva, A., J.A. Jarillo, J. Salinas, and J.M. Martinez-Zapater. 1995. Low temperature induces the accumulation of *phenylalanine ammonia-lyase* and *chalcone synthase* mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol.* 108:39-46.
- Li, Q., J. Wang, H.Y. Sun, and X. Shang. 2014. Flower color patterning in pansy (*Viola × wittrockiana* Gams.) is caused by the differential expression of three genes from the anthocyanin pathway in acyanic and cyanic flower areas. *Plant Physiol. Biochem.* 84:134-141.
- Longo, L. and G. Vasapollo. 2005. Anthocyanins from bay (*Laurus nobilis* L.) berries. *J. Agric. Food Chem.* 53:8063-8067.
- McGuire, G.R. 1992. Reporting of objective color measurements. *Hortic. Sci.* 27:1254-1255.
- Mori, K., S. Sugaya, and H. Gemma. 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci. Hortic.* 105:319-330.
- Murray, JR. and W.P. Hackett. 1991. Dihydroflavonol reductase activity in relation to differential anthocyanin accumulation in juvenile and mature phase *Hedera helix* L. *Plant Physiol.* 97:343-351.
- Ogata, J., Y. Kanno, Y. Itoh, H. Tsugawa, and M. Suzuki. 2005. Anthocyanin biosynthesis in roses. *Nature* 435:757-758.
- Quintana, A., J. Albrechtova, R.J. Griesbach, and R. Freyre. 2007. Anatomical and biochemical studies of anthocyanidins in flowers of *Anagallis monelli* L. (Primulaceae) hybrids. *Sci. Hortic.* 112:413-421.
- Saito, R., N. Fukuta, A. Ohmiya, Y. Itoh, Y. Ozeki, K. Kuchitsu, and M. Nakayama. 2006. Regulation of anthocyanin biosynthesis involved in the formation of marginal picotee petals in *Petunia*. *Plant Sci.* 170:828-834.
- Shvarts, M., A. Borochoy, and D. Weiss. 1997. Low temperature

- enhances petunia flower pigmentation and induces chalcone synthase gene expression. *Physiol. Plant.* 99:67-72.
- Stommel, J.R., G.J. Lightbourn, B.S. Winkel, and R.J. Griesbach. 2009. Transcription factor families regulate the anthocyanin biosynthetic pathway in *Capsicum annuum*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 134:244-251.
- Sung, S.Y., S.H. Kim, V. Velusamy, Y.M. Lee, B.K. Ha, J.B. Kim, S.Y. Kang, H.G. Kim, and D.S. Kim. 2013. Comparative gene expression analysis in a highly anthocyanin pigmented mutant of colorless chrysanthemum. *Mol. Biol. Rep.* 40:5177-5189.
- Vaknin, H., A. Bar-Akiva, R. Ovadia, A. Nissim-Levi, I. Forer, D. Weiss, and M. Oren-Shamir. 2005. Active anthocyanin degradation in *Brunfelsia calycina* (yesterday-today-tomorrow) flowers. *Planta* 222:19-26.
- Wei, Y.Z., F.C. Hu, G.B. Hu, X.J. Li, X.M. Huang, and H.C. Wang. 2011. Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes in relation to anthocyanin accumulation in the pericarp of *Litchi chinensis* Sonn. *PLoS One.* 6:e19455.
- Weiss, D. 2000. Regulation of flower pigmentation and growth: Multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. *Physiol. Plant.* 110:152-157.
- Yamagishi, M. 2011. Oriental hybrid lily Sorbonne homologue of LhMYB12 regulates anthocyanin biosyntheses in flower tepals and tepal spots. *Mol. Breed.* 28:381-389.
- Zhang, D., B. Yu, J. Bai, M. Qian, Q. Shu, J. Su, and Y. Teng. 2012. Effects of high temperatures on UV-B/visible irradiation induced postharvest anthocyanin accumulation in 'Yunhongli No. 1' (*Pyrus pyrifolia* Nakai) pears. *Sci. Hortic.* 134:53-59.