

포도와 미국자리공 세포현탁배양계 안토시아닌과 베타시아닌에 미치는 광의 영향

최관삼* · 인준교 · 이영복¹
충남대학교 농과대학 농생물학과*, 원예학과¹

Effect of Light on Production of Anthocyanin and Betacyanin Through Cell Suspension Culture Systems in *Vitis vinifera* L. and *Phytolacca americana* L.

Kwan Sam CHOI*, Jun Kyo IN, and Young Bok LEE¹

Dept. of Agrobiolgy, and Dept. of Horticulture¹, College of Agriculture
Chungnam National University, Yuseong, 305-764 Taejon. *Corresponding author.

The effects of light on the production of anthocyanin and betacyanin in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* and *Phytolacca americana* were investigated. The cell growth of *V. vinifera* was little affected by exposure to light, but that of *P. americana* was markedly increased by light than in the dark. In suspension cultures of *V. vinifera* maximum accumulation of anthocyanin was observed during the stationary phase in continuous light. By contrast, in suspension cultures of *P. americana*, accumulation of betacyanin occurred in parallel with cell division which showed two peaks after 4 days and 8 days of culture in continuous light, whereas in continuous dark, accumulation of anthocyanin and betacyanin did not occur. However, treatment of light interrupting for 1, 12, and 24 h after 4 days in cell suspension cultures of *V. vinifera* showed a slight anthocyanin accumulation, but after 8 days of culture remarkably accumulated by light interrupting for more than 12 h. In cultures of *P. americana*, the light treatment was more effective at 4th day than at 7th day after culture, but betacyanin accumulation was decreased again in the dark after light treatment. These results indicate that the difference of light responses exist between the anthocyanin of *V. vinifera* and the betacyanin of *P. americana* through cell suspension culture systems.

Key words: light interrupting effect

식물유래의 이차대사산물은 예로부터 의약, 향신료, 기호식품, 염료 등과같이 인간생활에 매우 유익하게 사용되어져 왔다. 그러나 자원의 고갈과 환경의 파괴로 인하여 이들 천연의 이차대사산물을 필요한 시기에 원하는 만큼 대량으로 얻는다는 것은 매우 어려워지고 있다. 따라서, 최근 조직배양 기술과 유전 공학의 발달에 힘입어 세포배양계를 이용

한 이차대사산물의 대량생산 방법 및 기술개발에 관한 연구가 활발히 행해지고 있다(Fujita et al., 1981a, b; Lindsey et al., 1983; Neumann et al., 1983; Yamakawa et al., 1983).

고등식물에 있어서 이차대사산물의 축적이 세포생장 단계의 어떤 정해진 시기에 특수화한 조직 및 세포에서만 일어나기 때문에, 세포의 생장에 따른 증식 패턴과 분화라는

서로 상반된 생리현상에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 특히, 최근에는 이들 이차대사의 생합성경로와 여기에 관련된 주요 효소(key enzyme) 및 이에 관련된 유전자 탐색 등의 연구가 활발히 이루어지고 있다(Hirose et al., 1990; Choi et al., 1993; Ozeki et al., 1993).

이차대사산물중 고등식물에 가장 많이 포함되어 있는 anthocyanin은 phenylpropanoid 합성계를 거쳐 생합성되는 색소로서, phenylalanine ammonia-lyase(PAL)를 시작으로 하여 생합성 된다(Kakegawa et al., 1991). Betacyanin은 tyrosine을 전구체로 하여 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐 생성되는 betalain계 색소로서 이때 tyrosine ammonia-lyase(TAL)에 의한 탈아미노화로 p-coumarate가 생성된다는 것이 보고되고 있다(Sakuda et al., 1986; Scott et al., 1992).

식물의 세포현탁배양을 통한 색소의 생합성은 배양시 환경조건(호르몬, 영양원, 광 등)에 의해 현저히 영향을 받는 것으로 알려져 있다(In et al., 1993; Mancinelli., 1990; Sakuta et al., 1987; Takeda., 1990; Yamakawa et al., 1983). 특히, 광은 색소 형성에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있는데 anthocyanin생합성의 경우에는 UV-light 및 phytochrome의 red/far-red의 가역반응에 의한 trigger로서의 광신호적인 자극에 의해 생합성이 유도된다고 한다(Kakegawa et al., 1991; Mancinelli., 1990; Takeda., 1990). Betacyanin의 경우에 있어서도 Girod 등 (1987)이 red beet cell에서 광에 의한 betalain 생합성 유도를, Nicola 등 (1973)은 맨드라미의 유묘에서 far-red에 의한 betaxanthin의 생합성 촉진을, 그리고 Rast 등 (1973)은 betacyanin 생합성에 있어서 phytochrome을 통한 광효과가 cAMP의 대치 효과가 있다는 보고를 하였다. 최근, Yang(1993)은 미국자리공에서 청색광에 의한 색소생성 촉진을 보고하였다. 그러나 아직까지 식물의 세포현탁배양계에서 색소의 생합성 과정 및 생화학적 경로는 물론 광 및 기타 요인에 대한 영향에 관해서도 불분명한 점이 많다.

본 실험은 anthocyanin을 생성하는 포도세포와 betacyanin을 생성하는 미국자리공 세포를 암소에서 현탁배양하면서 세포생장 및 분화에 따른 색소생성 촉진을 경시적으로 비교 분석하고, 이들의 색소 생합성에 대한 광반응의 차이를 알아 보고자 했다.

재료 및 방법

세포주의 유도 및 계대배양

포도(*Vitis vinifera* L.) 캘러스는 Yamakawa 등(1983)이 선발한 것을 사용하여, MS 기본배지에 2,4-D 2.3×10^{-7} M,

kinetin 9.3×10^{-7} M, sucrose 3%, gelite 0.4%를 첨가한 고체배지에서 계대배양을 하였다. 세포현탁배양은 gelite만을 제외시킨 동일 조성의 액체배지 50 mL를 200 mL 삼각 flask에 넣고 이 배지에 계대배양중이던 캘러스중에서 연한 절편만을 이식하여, 26°C에서 110 rpm의 진탕배양기(round shaking incubator)로 암배양하였다.

미국자리공(*Phytolacca americana* L.)은 충남대학교 구내 야산에서 자생하는 성숙한 개체의 잎을 채취하여, 70% 에탄올로 10초간, 10% Clorox에 15분간 멸균하여 2,4-D 4.6×10^{-6} M, kinetin 4.65×10^{-7} M, sucrose 3%, gelite 0.4%를 첨가한 MS 고체배지에서 캘러스를 유도하였다. 세포현탁배양의 유도는 MS 기본배지에 2,4-D 5×10^{-6} M 첨가된 액체배지 50 mL를 200 mL 삼각 flask에 넣고, 연한 캘러스 조직을 분리하여 26°C, 연속광 조사하에서 진탕배양 하였다 (110 rpm).

계대배양은 포도와 미국자리공 모두 7일 간격으로 200 mL 삼각플라스크에 액체배지 50 mL와, 세포현탁배양액 5 mL (1/11:세포수/배양액)를 넣어, 110 rpm으로 암배양하였다.

세포생장율의 측정

세포수의 측정을 위해 현탁배양중인 세포액 0.5 mL 취하여, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 침전된 pellet에 효소액(0.7 M sorbitol+driselase 2%+pectriase 0.1%)을 첨가하여 전체를 2.0 mL이 되도록 한다. 이 혼합액을 27°C, 120 rpm의 water shaking incubator에서 포도의 경우에는 30분, 미국자리공의 경우에는 2시간 진탕하여 원형질체를 분리시켰다. 분리된 원형질체는 100배의 현미경하에서 Tatai Eosinophil Counter(Kayagaki Irikakogyo CO., LTD)로 측정하여 1.0 mL당 세포수로 환산하여 측정했다.

Anthocyanin 및 Betacyanin의 측정

포도의 anthocyanin 색소 추출은 현탁배양세포액 0.5 mL를 취하여 원심분리(2,000 rpm)하여 상등액을 제거한 후, 1% HCl이 포함된 methanol용액 2.5 mL을 첨가하여 전체를 3.0 mL로 맞춘 다음 voltex mix하였다. 이 혼합액을 4°C 냉장고에 24시간 넣어 색소를 충분히 추출한 후 흡광도(A_{530nm})를 측정하였다. 미국자리공의 betacyanin의 경우에는 0.5 mL의 세포액에 80% methanol을 첨가하여 3 mL로 맞춘 다음 voltex mix하였다. 이를 4°C 냉장고에서 24시간 동안 넣어둔 후 흡광도(A_{535nm})를 조사하였다.

광조사 처리

포도와 미국자리공의 색소생성에 미치는 광처리 효과를

세포의 성장 및 분화와 관련하여 알아보기 위하여 세포생장곡선의 대수증식기에 해당되는 배양후 4일째와 생장이 끝나고 이차대사의 분화가 시작된다고 믿어지는 배양후 7일째에 각각 1, 12, 24시간씩 광조사를 한 후, 즉시 알루미늄호일로 광을 차단하여 26°C에서 암배양하였다(Fig. 1). 이때 처리한 광은 백색형광등(white fluorescent lamp 20W FL)으로 약 3,500 lux의 조도를 나타내었으며, 에너지로 환산하면 약 3.5 Watt/m² (3500 erg/cm²/sec)다.

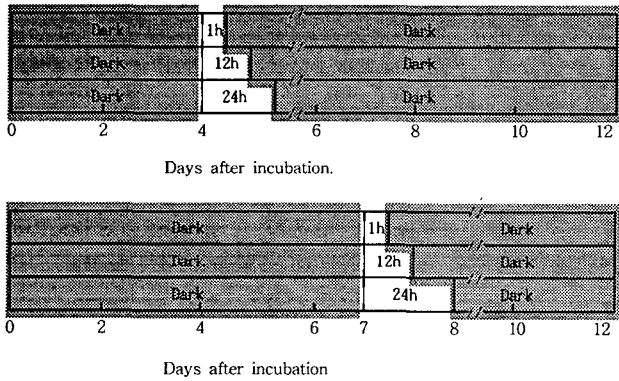


Figure 1. Schematic diagrams of light irradiation at the 4th day and the 7th days after subculture in the cell cultures of *Vitis vinifera* and *Phytolacca americana* L.

결과 및 고찰

세포의 증식 및 색소 축적에 미치는 광의 영향

Figure 2는 포도세포의 현탁배양중에 있어서의 성장곡선을 나타낸 것으로서 배양후 4일부터 10일째까지는 급격한 대수증식기를 보이며, 그 이후에 성장 정지기로 들어가는 전형적인 시그모이드형의 성장 곡선을 나타내었다. 생체중으로 본 생장에 있어서 광의 효과는 거의 없었다. Figure 3은 미국자리공세포의 성장패턴을 나타낸 것이다. 이 세포는 광조건하에서는 배양후 4일째에 첫번째 증식 피크를 보인 후 약간의 휴지기를 거쳐 8일째에 두번째의 증식피크를 보이는 2단계의 증식패턴을 나타내었다. 그러나, 암소에 있어서는 배양후 12일까지 집진적으로 증가하는 단순한 증식패턴을 보였다. 미국자리공의 경우에는 광조건하에서 배양된 세포의 액포화 및 색소 축적이 배양후 4일째에 일찍 일어나는 것으로 확인되었다(Fig. 4).

포도와 미국자리공 세포 현탁배양제에 있어서 세포의 생장이 색소 축적에 미치는 연속광 조사의 영향을 살펴보았다. 포도세포의 경우는 Figure 2에서 보여준 것과 같이 배양후 6일째까지는 별로 색소의 축적이 보이지 않았으나 배양

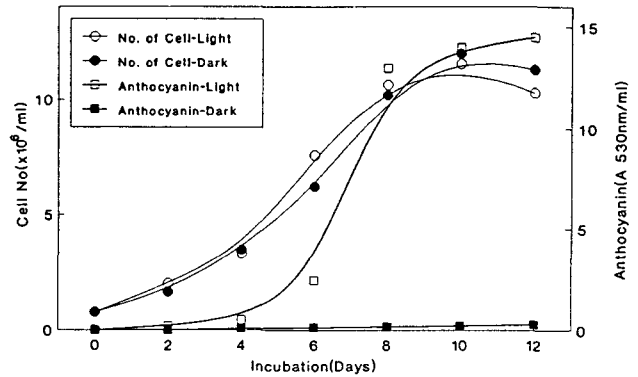


Figure 2. Effects of continuous light and darkness on the cell growth and anthocyanin accumulation in cell suspension cultures of *V. vinifera* L.

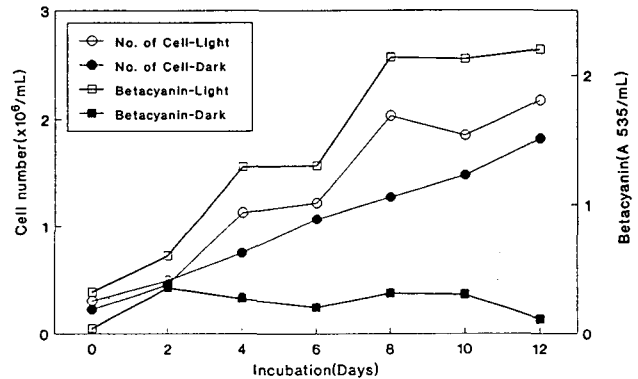


Figure 3. Effects of continuous light and dark on the cell growth and betacyanin accumulation in cell suspension cultures of *P. americana* L.

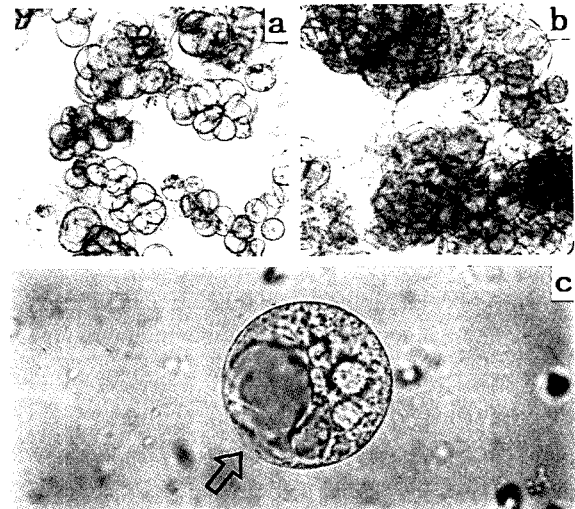


Figure 4. Cell clusters and a protoplast of *P. americana* incubated in different conditions.(a: Darkness for 4 days. b. Light for 4 days; c: Betacyanin accumulation after continuous light for 4 days)

후 8일째 부터 갑자기 약 70% 이상의 세포가 색소를 생성하여 배양 후 10일 이후의 생장정지기에서 최대의 anthocyanin 축적 효과를 나타내었다. 이때 배양 후 7일까지 연속 광을 처리한 세포라도 다시 암상태로 옮겨 배양했을 경우에는 anthocyanin 생성능이 크게 감소하는 것으로 나타나 적어도 7일 이후의 광조건이 색소생성에 매우 중요한 것으로 나타났다.

한편, 미국자리공의 세포배양에 있어서도 betacyanin 축적이 연속광 조사에 의하여 크게 증가하는 것으로 나타났으나(Fig. 3), 광을 완전히 차단한 암상태에서는 거의 색소가 형성되지 않았다. 연속광 조사하에서는 세포의 증식패턴과 동조적으로 색소 축적이 일어났다. 즉 배양 후 4일째와 8일째의 두번에 걸쳐 peak를 보여 세포생장과는 약간의 lag time을 두고 anthocyanin 색소의 생성이 이루어지는 포도와는 대조적인 것이었다(Fig. 2, 3). 이것으로 보아 미국자리공의 현탁배양세포에 대한 광의 효과는 betacyanin 색소의 축적은 물론 세포분열과도 매우 밀접한 관계를 갖고 있는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 Hirose 등(1990)이 포도의 경우 세포 생장정지기에서 최대의 anthocyanin의 축적을, 미국자리공의 경우에는 세포증식이 왕성한 대수증식기에서 최대의 betacyanin이 축적되었다고 보고한 것과 일치하였다. 이상의 결과로 미루어 이들 두가지 세포는 서로 다른 생합성 경로를 갖는 것은 물론 세포의 생장에 따른 광에 대한 감수 시기도 서로 다르다는 것을 의미한다.

Anthocyanin과 Betacyanin의 생합성에 미치는 광 중단 처리의 영향

포도와 미국자리공세포의 색소 생합성에 미치는 광효과의 차이를 알아보기 위해 4일과 7일동안 암배양한 현탁세포에 1, 12, 24시간의 광조사(백색 형광등 약 3.5W/m²)시간을 달리하여 광 중단 실험을 시행하였다.

그 결과 Figure 5a에 나타낸 것처럼 포도세포에 있어서는 배양 후 4일째에는 광처리시간을 달리하여 약간의 색소 축적밖에 일어나지 않았다. 그러나 배양 7일째에 12시간 이상의 광 중단 처리구에서는 뚜렷한 색소생성의 축진을 보였으며 24시간 광 중단 처리구에서는 연속광처리와 비슷한 수준까지 색소가 생성되었다(Fig. 1와 Fig. 5b). 이 결과로 미루어, 포도배양세포는 어느 일정한 aging에 도달하여야만 광을 받아 색소를 생성할 수 있는 생리적 상태에 놓여지게 됨을 의미한다. 이때 적어도 12시간 이상의 광조사가 필요한 것으로 사료되었다. 그러나 만약 7일과 8일 사이의 광에 대하여 민감한 특성의 감수시기가 있어 광신호적 전달체가 존재한다면 적어도 한시간정도의 짧은 광조사로도 충분히 색소생성 유도가 가능한지를 확인하기 위하여 1) 암배양

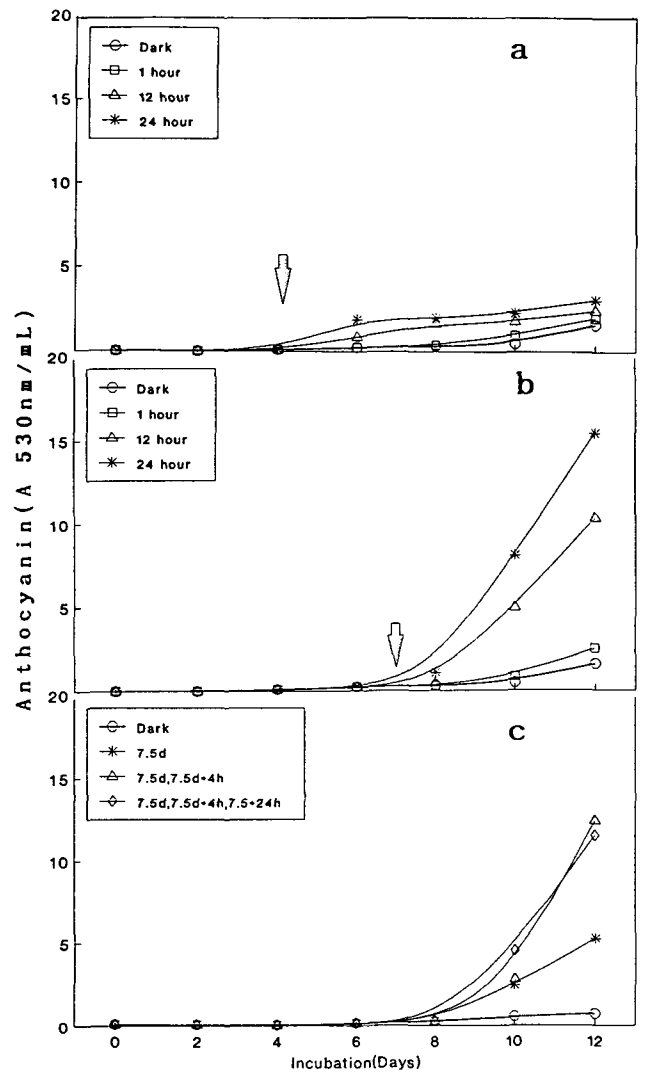


Figure 5. Effects of different times of light interrupting on accumulation of anthocyanin during cell suspension culture of *Vitis vinifera* L. (a. Light was irradiated for 1, 12, 24h on 4th day after dark incubation. b. Light irradiated for 1, 12, 24h on 7th day after dark incubation. c. Effects of different times irradiation on 7.5 days after dark incubation by one hour light interrupting. Light exposed one time at 7.5 day, two times at 7.5 day and 7.5 day+4h, three times at 7.5 day, 7.5 day+4h and 7.5+24h).

후 7.5일에 한시간 1회 광처리, 2) 7.5일에 1시간 그리고 7.5일+4시간 후에 각각 한시간씩 2회 처리 그리고 3) 7.5일, 7.5일+4시간후, 그리고 24시간 후에 각각 한시간씩 세번을 처리한 결과, 2회 이상 광처리에서는 연속광조사시와 거의 비슷한 결과를 얻었다(Fig. 5c). 이 점으로 미루어 보아 포도 배양 세포의 생합성 기작에 관여하는 광은 장시간의 광조사 보다는 어떤 특정 시간대에 효과적인 광신호 전달적인 trigger에 의하여 유도되는 것이 시사되었다. 실제로, 최근

Ozeki 등(1993)은 당근의 세포현탁배양계를 이용하여 배양 후 8일째의 세포생장 정지기에서 안토시아닌의 생합성에 직접 관여 하는 것으로 믿어지는 PAL효소의 유전자 분리에 성공하여 이 유전자가 배양 직후의 회색효과에 의한 stress inducible PAL gene이 아닌 색소 생합성에만 관련된 PAL효소의 유전자임을 보고하였다. 또한 그는 이 유전자가 Takeda 등(1990)이 보고한 phytochrome반응에 있어서 신호적 정보전달기작에 관여했던 것과 동일한 유전자일 가능성이 매우 높은 것으로 고찰하였다(Ozeki, 1993). 최근 국내에서도 이러한 관점에서, 최 등(1993)이 포도의 세포현탁배양계에서 색소생성에 관련된 PAL 유전자를 탐색하고 있다.

한편, 미국자리공에 있어서는 Figure 6a에서 나타난 것처럼, 4일째에 행한 12, 24시간 광 중단 조사에 의하여 뚜렷한 색소생성의 촉진을 보였다. 그리고 배양 후 7일째에 1, 12시간의 광 중단 조사에서는 4일째에 비하여 약간의 색소의 생성만을 나타내었다. 즉 미국자리공의 현탁배양세포는 배양 후 4일째에 주어진 12시간 이상의 광 중단 조사효과가 7일째에 조사한 것보다 더욱 효과적이었다. 이것은 포도의 경우는 배양 후 7일이 지나 세포가 어느 일정한 aging 또는 성장 정지기에 있을 때 광이 조사되면 즉시 색소가 생합성 되는 것에 비해 미국자리공의 경우에는 배양 후 4일째의 성장 초기에 해당되는 대수증식기에 광이 큰 효과를 나타내었다.

이러한 결과는 미국자리공이 연속광 조건하에서 두번의 성장 피크를 보이는데 비하여, 암배양에서는 한번만의 성장 피크만을 보이는 것과 비교해 볼 때, 연속광 조건하에서는 광이 세포분열을 촉진할 뿐만 아니라 색소의 축적도 촉진하는 것으로 나타났다. 실제로 암배양하에서는 세포의 생장이 약간 느리고 색소의 축적도 거의 이루어지지 않고 있다. 최근 양 등(1993)도 모상근에서 성장점 부근에만 색소가 생성되는 것을 확인한 바 있어 세포의 분열과 색소생성이 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 보면 포도의 안토시아닌 색소와 미국자리공의 베타시아닌 색소는 모두 적색 색소를 띄고 있으며, 그 축적부위도 액포라는 것은 이미 잘 알려져 있으나, 미국자리공의 경우처럼 세포현탁배양계에서 광배양 후 4일만에 이미 세포의 분열과 동시에 색소가 액포에 축적되는 것을 확인한 예는 극히 드물다(Fig. 4c). 특히 이들의 세포분열과 성장 및 분화에 따른 색소축적의 양상은 광반응성에서 크게 다르다는 것을 알 수 있었다. 즉, 안토시아닌 색소의 생합성의 경우에는 배양 후 8일 이상이 지난 세포는 1시간 이상의 광 중단 조사처리를 몇 번만 해주어도 생합성유도기작이 trigger로서 작용하여 대사의 흐름을 이차대사산물 생산쪽으로 바꿀 수 있다는 것을 시사해 주었다. 이에 반하여, 베타시아닌의 경우에는 Figure 7에 나타난 것처럼 연속광하에서 생성된 색소라 할지라도 배양 후 2, 6, 8일

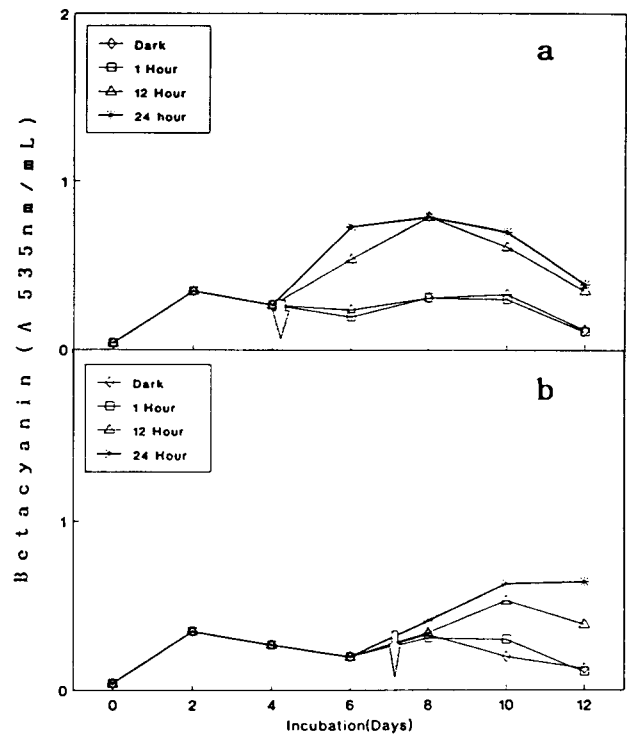


Figure 6. Effects of light interrupting on betacyanin accumulation during cell suspension culture of *P. americana* L. (a. Light was irradiated for 1, 12 and 24h on 4th day after dark incubation. b. Light irradiated for 1, 12 and 24h on 7th day after dark incubation).

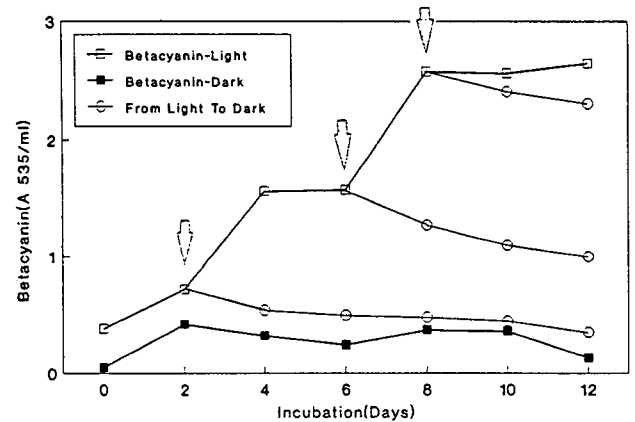


Figure 7. Effects of transfer on betacyanin accumulation which from light to dark at 2nd, 6th and 8th day during cell suspension culture of *P. americana* L.

째에 암소로 옮겨 배양하면, 옮긴 이후엔 색소 생합성이 일어나지 않고 오히려 감소하였다. 이러한 점으로 미루어 보아도 이들의 색소 생합성 축적과정에는 지속적인 광조사가 필요한 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 Figure 6a, b에

서 보이는 것처럼 배양 후 4일째 및 7일째의 광 중단 조사로 인해 축적되었던 색소들도 시일이 지남에 따라 감소되는 현상으로도 이 사실을 확인할 수 있었다. 따라서 안토시아닌 색소의 생합성에서와 같은 단 한번의 trigger에 의한 신호전달적인 광정보 효과보다는 어느 정도의 연속조사에 의한 고에너지반응이 관여하는 것으로 사료되었다. 현재 우리는 이에 관한 상세한 정보를 얻기 위해 단색광조사에 의한 색소 생합성 조절의 기작에 관한 실험을 행하고 있다.

마지막으로 포도의 조직배양으로부터 안토시아닌 색소를 효율적으로 생산하기 위해서는 배양 후 7일까지는 암배양 하였다가 8일째에 광조사를 행하여 한꺼번에 모두 색소를 형성시켜 균일화하는 것이 좋을 것으로 사료된다. 미국자리공의 베타시아닌 색소는 배양 초기부터 광조사하에서 배양할 필요가 있음을 본 실험을 통해 알 수 있었다. 그러나, 이번 실험을 통해 알았듯이 이들 세포가 성장과 함께 광 및 영양원에 대한 반응이 달라지기 때문에(In et al., 1993), 생합성기작을 보다 엄밀히 해석하기 위해서는 배양 시기에 따른 세포군의 분류 즉, 동조 배양실험계를 확립할 필요가 있다.

적 요

본 실험은 포도와 미국자리공의 세포현탁배양계에서 세포생장과 anthocyanin 및 betacyanin 색소생성에 미치는 광의 영향을 조사하였다. 그 결과, 포도의 세포현탁배양계에서의 세포증식 패턴은 광의 효과가 미약하였으나, 미국자리공의 경우는 암배양에 비하여 광조사구에서 뚜렷한 세포증식 패턴을 나타내었다. 포도세포는 12일간의 배양기간중 한번의 성장 피크를 보여주는데 비하여 미국자리공의 배양세포는 두번의 증식 피크를 보여 광이 세포의 성장 및 분열 주기를 촉진시킬 뿐만 아니라 색소의 축적도 촉진시키는 것으로 나타났으며, 미국자리공 배양세포는 배양 후 4일째에 액포화에 따른 색소의 축적이 확인 되었다. 한편, 색소생성에 미치는 광의 영향은 포도 현탁배양계에서는 배양 후 6일째부터 생성되기 시작하여 배양 후 10일 전후에 최고치를 보이는데 비하여, 미국자리공의 현탁배양계에서는 세포증식 패턴에 따라 배양 후 4일째와 8일째에 두번의 피크를 보였다. 그러나 이들 두가지 모두 암배양하에서는 거의 색소 생합성이 이루어지지 않고 광상태하에서만 색소의 축적을 볼 수 있었다. 한편, 포도 세포배양계에서는 배양 후 4일째에 처리한 광은 약간의 효과가 있었으나, 배양 후 7일째 12시간 이상의 광에 의하여 색소생성이 크게 촉진되는 것을 알 수 있었다. 미국자리공의 경우에는 배양 후 7일째보다는 오히려 배양 후 4일째에 광이 더욱 효과적이었다. 이상의 사실은 이들 두가지 색소의 생합성과정에는 광이

절대적으로 필수적이지만 광을 필요로 하는 시기 및 요구하는 광량 등이 서로 다르다는 것을 시사해 준다.

사 사

본 실험은 문교부 학술진흥재단 유전공학연구비(1992. 4-1993. 3)의 지원된 연구중의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다. 또한 포도의 컬러스를 분양해 준 일본 동북대학 Komamine교수께도 심심한 사의를 표합니다.

인 용 문 헌

- Choi KS, In JG, Lee YB (1993) A study on selection of the high and stable variations of betacyanin producing strains through genetic engineering technics in *Phytolacca americana* L. *Proc Mol Biol & Genet* 8: 17-18
- David W, Abraham H, Halvey (1991) The role of light reactions in the regulation of anthocyanin synthesis in *petunia* corollas. *Physiol Plant* 81: 127-133
- Fujita Y, Hara Y, Ogino T, Suga C (1981) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*: I. Effects of nitrogen sources on the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Rep* 1: 59-60
- Fujita Y, Hara Y, Suga C, Morimoto M (1981) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*: II. A new medium for the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Rep* 1: 61-63
- Girod PA, Zryd JP (1987) Clonal variability and light induction of betalain synthesis in red beet cell cultures. *Plant Cell Rep* 6: 27-30
- Hirose M, Yamakawa T, Kodama T, Komamine A (1990) Accumulation of betacyanin in *Phytolacca americana* cells and of anthocyanin *Vitis* sp. cells in relation to cell division in suspension cultures. *Plant Cell Physiol* 31(2): 267-271
- In JG, Choi KS, Lee YB (1993) Effects of salt concentrations on accumulation of pigments in the cell suspension cultures of *Vitis vinifera* and *Phytolacca americana* L. *Jour Agri Sci Chungnam Nat Univ* 20: 34-42
- Kakegawa K, Hattori E, Koike K (1991) Introduction of anthocyanin synthesis and related enzyme activities in cell cultures of *Centaurea cyanus* by UV-light irradiation. *Phytochemistry* 30: 2271-2273
- Lindsey L, Yeoman MM (1983) The relationship between rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *J of Exp Botany* 34(145): 1055-1065
- Mancinelli AL (1990) Interaction between light quality and light

- quantity in the photoregulation of anthocyanin production. *Plant Physiol* **92** : 1191-1195
- Neumann D, Krauss G, Hieke M, Groger D** (1983) Indole alkaloid formation and storage in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med.* **48** : 20-23
- Nicola MG, Piattelli M, Amino V** (1973) Effect of continuous far-red on betaxanthin and betacyanin synthesis. *Phytochemistry* **12** : 2163-2166
- Nigra HM, Alvarez MA, Giuliotti AM** (1989) The influence of auxins, light and cell differentiation on solasodine production by *Solanum eleagnifolium* Cav. calli. *Plant Cell Rep* **8** : 230-233
- Ozeki Y, Komamine A** (1986) Effects of growth regulators on the induction of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultures. *Plant Cell Physiol* **27** : 1361-1368
- Ozeki Y, Komamine A, Tanaka Y** (1990) Induction and repression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthesis enzyme protein and mRNAs in carrot suspension culture regulated by 2,4-D. *Physiol Plant* **78** : 400-408
- Ozeki Y** (1993) Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during anthocyanin synthesis and transfer effect in carrot cell suspension cultures. In W. Y. Soh, J. R. Lin, A. Komamine, eds, *Advances in Developmental Biology and Biotechnology of Higher Plant*, Korean soc. *Plant Cell and Tissue Culture*, Taejon, pp. 474-484
- Ozeki Y, Davies E, Takeda J** (1993) Structure and expression of chalcone synthesis gene in carrot suspension cultured cells regulated by 2,4-D. *Plant Cell Physiology* **34**(7) : 1029 - 1037
- Rast D, Skrivanova R, Bachofen R** (1973) Replacement of light by dibutyryl-cAMP and cAMP in betacyanin synthesis. *Phytochemistry* **12** : 2669-2672
- Sakuta M, Takagi T, Komamine A** (1986) Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. *J Plant Physiol* **125** : 337-343
- Sakuta M, Takagi T, Komamine A** (1987) Effects of sucrose on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum* **71** : 455-458
- Scott DA, Hammond PM, Brearly GM, Price CP** (1992) Identification by high performance liquid chromatography of tyrosin ammonia-lyase activity in purified fractions of *Phaseolus vulgaris* phenylalanine ammonia-lyase. *J Chromatography* **573** : 309-312
- Takeda J** (1990) Light-induced synthesis of anthocyanin in carrot cell in suspension. II Effects of light and 2,4-D on induction and reduction of enzyme activities related to anthocyanin synthesis. *J of Exper Bot* **41** : 749-755
- Yamakawa T, Ishida K, Kato S, Kodama T, Minoda Y** (1983) Formation and identification of anthocyanin in cultured cells of *Vitis* sp. *Agric Biol Chem* **47** : 997-1001
- Yamakawa T, Kato S, Ishida K, Kodama T, Minoda Y** (1983) Production of anthocyanin by *Vitis* cells in suspension culture. *Agric Biol Chem* **47** : 2185-2191
- Yamakawa T, Onomichi K, Kodama T, Minoda Y** (1985) Application of feeder method for improved colony formation of grape cells and protoplasts at low cell density. *Agric Biol Chem* **49** : 3583-3585
- Yang DC, Lee SJ, Yun KY, Chae Q** (1993) Blue light-dependent betalain synthesis in hairy root. II. Influence of the activator/inhibitor of signal transduction on the betalain synthesis. *Korean J Plant Tissue Culture* **20** : 63-73

(1993년 12월 30일 접수)