

## 포도의 현탁세포배양에서 안토시아닌 생합성에 미치는 Salicylic Acid의 영향

신동호 · 유상렬 · 최관삼\*  
충남대학교 농과대학 농생물학과

### Effect of Salicylic Acid on Anthocyanin Synthesis in Cell Suspension Cultures of *Vitis vinifera* L.

Dong Ho SHIN, Sang Ryul YU, and Kwan Sam CHOI\*

Department of Agrobiolgy, College of Agriculture, Chungnam National University, Yuseong,  
Taejon, 305-764. \*Corresponding author.

Effects of salicylic acid (SA) on anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of grapes (*Vitis vinifera* L.) were investigated. Low concentrations (0.1 to 1  $\mu$ M) of SA did not affect the cell growth and anthocyanin accumulation, whereas high concentrations (5 to 10  $\mu$ M) of SA inhibited cell growth with increasement of anthocyanin synthesis. Five micromoles of SA promoted anthocyanin accumulation 4-folds compared to control cells. When SA was treated on the different culture times (0 to 7 day), the highest pigment accumulation was obtained at the treated cells of second day. A low productivity of anthocyanin under continuous dark incubation was also recovered by adding SA which mimicked light irradiation effect. These results suggest that SA is one of essential agents in anthocyanin biosynthesis.

**Key words:** cell growth, light irradiation, pigment accumulation

Anthocyanin은 식물이 생성하는 대표적인 이차대사산물의 일종으로 실험적 이용의 편리함과 시각적 변화의 관찰이 용이한 점 등으로 인해 천연 색소의 대량생산이라는 측면에서 많은 연구가 이루어 졌다. 지금까지 세포배양계를 통한 anthocyanin의 생성은 당근, 고구마, 과꽃, 알파파, 포도 등 다양한 식물에서 많은 연구가 이루어 졌다. 한편, 세포배양을 통한 anthocyanin 생성은 광조사(Mancinelli, 1990; Takeda, 1990), 식물 생장조절제(Ozeki and Komamine, 1986), 탄소원(Yamakawa et al, 1983; Ozeki and Komamine, 1985; Do and Comier, 1991; Inn et al, 1993) 등 배양 조건에 따라 큰 영향을 받는 것으로 알려지고 있다.

최근에 세포현탁배양에서 세포의 색소축적을 증가시키기 위한 많은 연구가 진행되고 있으며, Dougaill (1989)은 sinapic acid를 당근 현탁세포에 첨가하였을 때 색소의 축적이 크게 증가함을 발견하였다. 또한, Yamamoto 등(1989)은 *Euphorbia milli*의 세포배양에서 고농도의 색소 생성능을 가진 세포주를 선발 하였다. 최 등(1994)은 짧은시간의 광조사에도 세포에서의 anthocyanin 합성이 크게 증가함을 보고 하였다.

식물에 있어서 salicylic acid (SA)는 에틸렌 생합성의 억제(Leeslie and Romani, 1986)와 개화유도, 생물간 상호작용의 화학인자 자극(Raskin, 1992), K<sup>+</sup>흡수의 억제(Glass and Dunlop, 1974), 질소환원의 활성화(Jain and Stivastra, 1981) 등에서 그 효과가 알려져 있다. 특히, SA는 천남성과 식물의 개화시 열발생과 곤충 유인물질의 분비에 있어서 내생 조절자로서 작용하며(Raskin et al., 1987), 식물 병원균에 대한 저항성물질 생성의 유도인자(Yalpani et al., 1993)로서 기능을 하리라고 알려 졌다. 그러나 이차대사산물의 축적 및 색소생합성에 있어서의 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구는 포도 현탁배양세포의 anthocyanin축적과정에 있어서 SA의 처리와 광조사와의 상호작용 효과 및 세포의 aging에 따른 효과를 알아보고 하였다.

#### 재료 및 방법

포도 세포현탁배양계의 확립

포도세포의 캘러스는 3% sucrose, 100 mg/L myo-inositol, 1 mg/L thiamin-HCl, 0.05 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L kinetin과 0.8% agar가 첨가된 MS 배지에서 27°C, 16시간 광과 8시간 암의 광주기 조건하에서 배양하였다. 이때 광에너지는 백색형광등(white fluorescent lamp 20W FL)으로 약  $35 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$  이었다(Choi et al., 1994). 이들 배양된 캘러스 세포에서 색소 생성능이 높은 세포주를 계속 선발, 계대배양 함으로써 안정된 세포주를 확보하였다.

세포 현탁배양계의 확립을 위해, 100 mL의 삼각 플라스크에 캘러스 배양과 같은 조성의 20 mL MS 액체배지를 첨가하고 상기의 광배양 조건하에서 배양된 연화된 캘러스를 옮긴 후, 100 rpm, 27°C, 연속광 조건하에서 1주일 동안 현탁배양을 실시하였다. 유도된 현탁배양 세포를 50 mL의 새로운 배지에 옮긴 후 안정된 세포배양계의 확립을 위해 1주일 동안 상기와 동일한 조건하에서 배양하였다. 그 후 매 7일 마다 세포액 5 mL ( $2 \times 10^6$  cells)를 50 mL의 새로운 배지에 옮겨 계대배양 하였다.

### Salicylic Acid (SA)의 처리

SA의 처리를 위해, SA (Sigma Co., USA)를 멸균수에 녹인 후 pH 5.8로 조정하고 0.25  $\mu\text{m}$ 의 filter를 이용하여 여과하였다. 조제된 SA는 광과 암조건하에서 배양된 포도세포에 다양한 농도(0.1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ )와 계대배양후 배양 시기를 달리(1일부터 7일까지)하여 매일 첨가하였다.

### 세포 성장률의 측정

세포의 성장률은 배양된 포도세포의 원형질을 나출 시킨 후 haemocytometer을 이용하여 세포수를 측정하였다. 원형질체 분리를 위해 배양된 세포액 2 mL를 취하여 10,000 g로 5분 동안 원심하였다. 침전된 pellet를 1 mL의 효소 혼합액(1% cellulase, 0.05% macerozyme, 0.6 M manitol)에 재현탁시킨 후 0.6 M의 manitol을 첨가하여 2 mL로 조정하였다. 이들 혼합액을 30°C에서 4시간 동안 60 rpm으로 현탁배양하여 원형질 세포를 나출시켰다. 나출된 원형질체는 EKDS haemocytometer (Kayagaki Irikakogyo Co., Ltd.)를 이용하여 100배의 현미경하에서 세포수를 측정하였다.

### Anthocyanin 함량의 측정

세포의 anthocyanin 함량을 측정하기 위해, 시기별로 배양된 세포액 1 mL를 취하여 6,000 g에서 5분 동안 원심을 행하였다. 침전된 세포에 1 mL의 추출용액(1% HCl-methanol)을 첨가하여 가볍게 vortex하여 희석한 후, 4°C에서 하룻밤 정치시키고 5,000 g에서 5분간 원심하여 상층액을

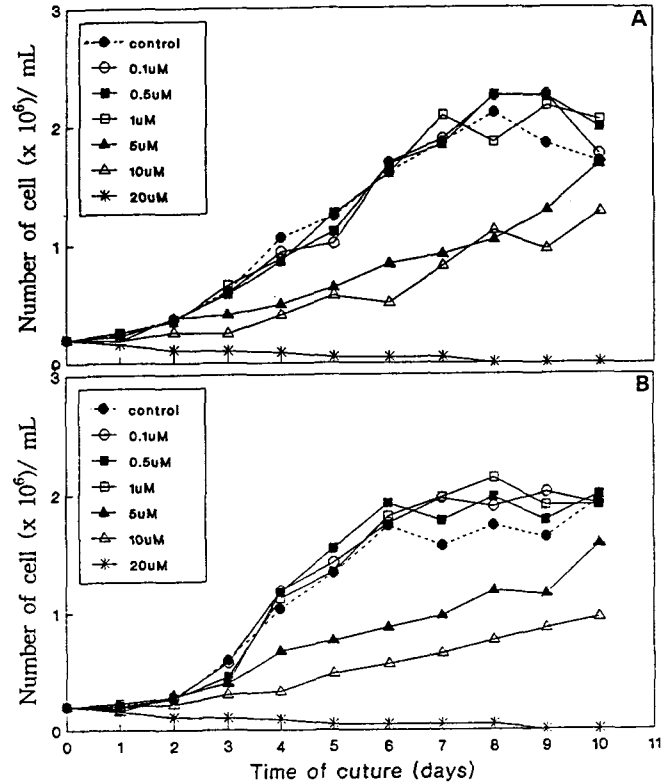


Figure 1. Effects of salicylic acid on the cell growth in suspension cultures of *V. vinifera*. A: Light condition; B: Dark condition.

회수하였다. 이들 색소 추출액은 spectrophotometer (CECIL102)를 이용하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 같은 용매로 추출한 cranberry anthocyanin의 extraction coefficient ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 98.2$ )를 이용하여 세포의 anthocyanin 함량을 측정하였다(Fransis, 1982).

## 결 과

### 세포생장에 있어서 SA의 효과

포도세포의 생장에 있어서 SA의 영향을 보기 위하여, 다양한 농도의 SA를 광과 암조건하에서 배양중인 세포에 처리하였다. SA를 1  $\mu\text{M}$  이하의 낮은 농도로 첨가하였을 경우 포도세포의 생장은 어떤 영향도 받지 않았으나, 5  $\mu\text{M}$  이상의 높은 농도를 처리하였을 경우에는 세포의 생장이 크게 억제되었고, 20  $\mu\text{M}$ 의 농도에서는 세포의 생장은 정지되며 죽는 현상까지 보였다. 또한, 이러한 현상은 암배양하의 세포에서도 동일한 결과를 보였다(Fig. 1).

### Anthocyanin의 합성에 있어서 SA의 효과

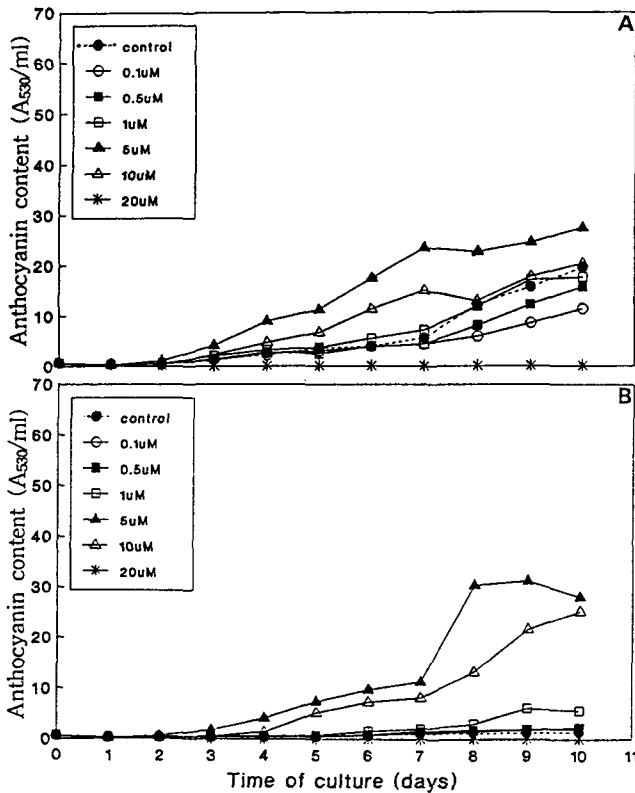


Figure 2. Effects of salicylic acid on the anthocyanin biosynthesis in cell suspension cultures of *V. vinifera*. A: Light condition; B: Dark condition.

광배양중인 세포에 SA를 첨가 했을 경우 포도 세포의 anthocyanin 합성은 세포 성장과 같이 낮은 농도에서는 큰 변화가 없었으나, 5 μM 이상의 높은 농도의 첨가시에는 색소의 합성이 크게 증가하였다(Fig. 2A). 특히, 5 μM의 첨가에서는 SA가 처리되지 않은 세포주에 비하여 7일째에 색소의 합성이 약 2.5배 이상 증가 하였다. 또한, 색소 생성의 대수 증가 시점이 SA가 처리되지 않은 세포주에서는 7일후에 나타나는데 비하여 SA의 첨가시에는 3일째에 나타났다.

광배양중인 포도세포를 암배양으로 전환하였을 경우, 세포의 anthocyanin 합성은 크게 억제되었으나 7일 이후의 배양에서는 약간 합성되기 시작하였다. 암배양에서 SA를 처리하였을 경우, 낮은 농도에서는 광배양조건과 동일하게 별로 영향을 미치지 못했으나, 5 μM 이상의 농도에서는 암조건에서의 낮은 색소 생합성능이 회복되어 7일 이후부터는 오히려 SA를 넣지 않고 광만을 처리했을 때의 색소의 합성량보다 더 높은 색소의 합성을 보였다(Fig. 2B).

#### SA의 처리시기에 따른 Anthocyanin 합성의 변화

Anthocyanin 합성을 위한 SA 처리의 최적 시기를 알기 위하여, 5 μM의 SA를 계대배양후 24시간 간격으로 7일간

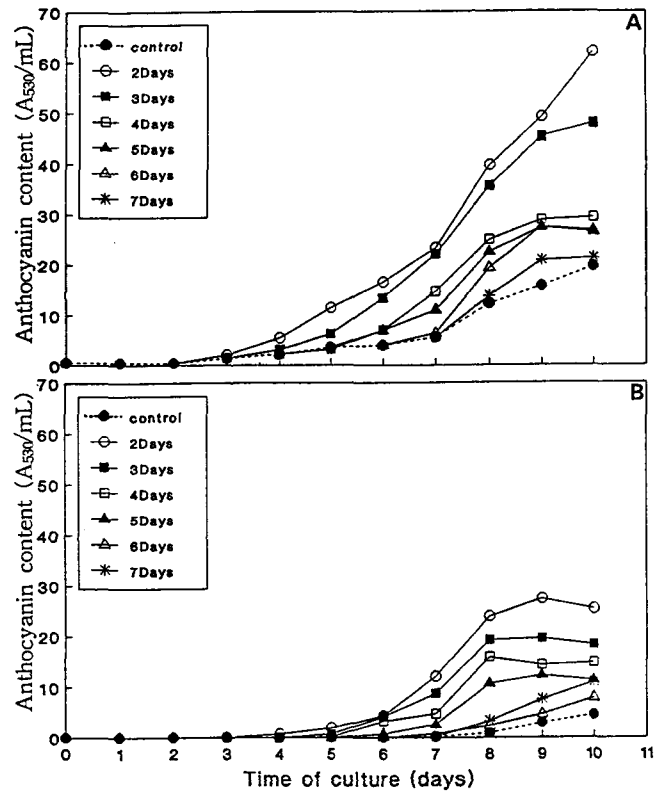


Figure 3. Effects of addition time of salicylic acid on the anthocyanin biosynthesis in cell suspension cultures of *V. vinifera*. A: Light culture; B: Dark culture.

처리하였다. 광배양 세포에서 anthocyanin의 생합성은 SA의 처리 순간부터 크게 증가하였다. 그리고, 계대배양시 동시에 SA를 처리하는 것보다 계대배양 2일째에 처리한 세포에서 가장 높은 색소 합성량을 보였으며, 그 후 처리시간이 늦을수록 색소의 합성량은 낮아졌다(Fig. 3A). 또한, 암배양중인 세포에서도 광배양과 비슷한 결과가 나타났으며, 계대배양 후 2일째에 처리한 세포에서는 무처리 세포에 비해 처리후 5일(배양후 7일)이후부터 4배 이상의 높은 색소 합성을 보였다(Fig. 3B).

#### SA처리에 따른 세포내 색소 축적량의 변화

Figure 4는 광과 암배양중인 세포에 5 μM의 SA를 처리하였을 경우, 포도세포의 세포내 색소 축적량의 증가를 나타낸 것이다. 세포내 색소의 축적은 광과 암조건 모두 SA의 첨가에 의해 색소의 축적량이 크게 증가하였다. 특히, 무처리 세포주의 세포당 색소축적능은 배양후 7일까지 거의 일정하다가 세포의 분열이 거의 안정기에 도달한 7일 이후에서 서서히 증가하였다. 그러나, SA가 처리된 세포의 경우 색소의 축적은 처리 순간부터 크게 증가하여 8일 이후에는 세포내 색소의 축적이 일어나 10일 이후까지 계속 증가하였

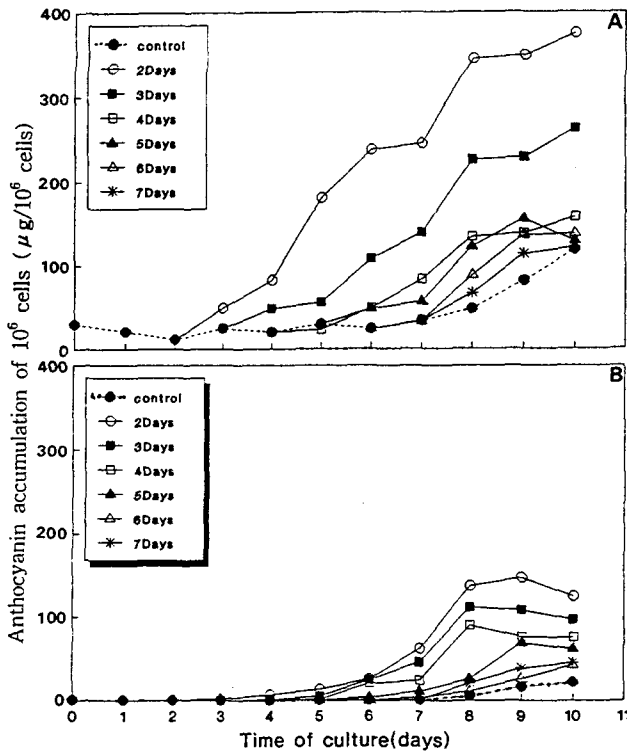


Figure 4. Effects of salicylic acid on the anthocyanin accumulation in cell suspension culture of *V. vinifera*. A: Light condition; B: Dark condition.

다.

Figure 5는 SA를 처리(배양후 2일째 처리)한 세포와 광배양, 암배양한 세포의 색소축적 양상을 현미경으로 관찰한 것이다. 암배양 중인 세포에서는 색소의 축적이 거의 억제되며 단지 7일째 이후의 세포에서만 조금씩 색소가 생성되고 있다. 그러나, 광배양 중인 세포에서는 배양 초기부터 색소의 축적이 나타남을 알 수 있다. 또한, SA를 처리한 암배양 세포주에서는 세포내 색소의 축적이 크게 증가하여 배양후 5일째부터 강한 색소 축적을 보였다.

### 고 찰

식물에 있어서 SA의 영향은 내생조절자(Raskin et al., 1987)로서의 역할과 식물의 과민감반응을 유도하는 신호(Malamy et al., 1990; Enyedi et al., 1992; Yalpani et al., 1993; Silvermann, 1993) 작용에 있어 많은 연구가 수행되었다.

지금까지 식물에 영향을 주는 SA의 농도는, *Lemma gibba*에서 5.6 µM의 SA 처리 되었을 때 개화가 유도되었고, 오이는 14.5 mM의 높은 농도의 SA 처리에 의해 *Collectotrichum langenarium*에 대한 전신획득저항성 (SAR)을 나타내었다 (Me'traux et al., 1990). 포도세포에서는 단지

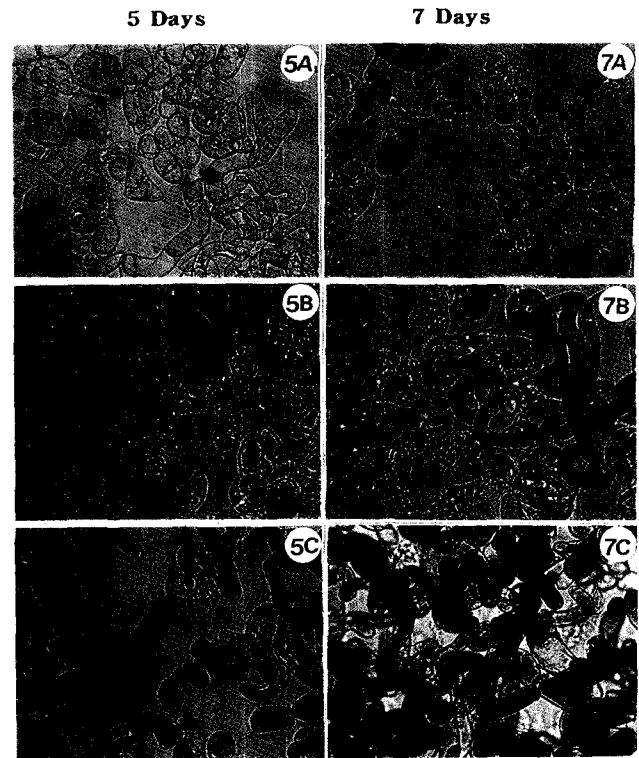


Figure 5. Photograph of anthocyanin accumulation in suspension cultured cells of *V. vinifera*. A: Dark cultured cells; B: Light irradiated cells; C: SA treated cells on 2nd day. All cells were harvested at 5 and 7 days after subculture.

5 µM의 SA처리가 anthocyanin 생합성을 크게 증가시켰으나, 20 µM의 농도에서는 세포의 생장이 완전히 억제되었다.

또한, 1 µM의 농도에서는 세포의 성장 뿐만이 아니라 색소 합성에도 어떤 영향도 주지 않았다(Fig. 1, 2). 이상의 결과로 미루어보아 현탁배양의 포도세포는 SA처리에 민감하다는 것을 알 수 있다.

일반적으로 anthocyanin의 생합성은 광량과 광질에 의해서도 영향을 받으며(Mancinelli, 1990), 290-300 nm의 UV 광(Beggs and Wellman, 1985)에 의해 크게 촉진된다. Takeda (1990)는 당근의 세포배양에서 광조사가 anthocyanin의 합성에 있어서 필수적이라고 주장하였다.

본 연구 결과, 포도세포의 anthocyanin합성은 암배양 상태가 광에 비하여 색소의 합성이 매우 낮게 나타났다. 이때 암배양중인 세포에도 SA를 첨가해 주면, 낮은 anthocyanin 생합성능이 회복되어 계대배양후 7일 이후에는 오히려 광만을 처리했을 때의 색소 축적보다 더욱 높은 색소 축적량을 보였다(Fig. 3B). 또한, 암배양세포에서는 세포내 색소의 축적량이 계대배양후 7일까지는 거의 일정하다가 SA를 처리해 주면 즉시 세포내의 색소 축적량은 크게 증가하였다(Fig. 4). 이상의 결과는 포도세포의 anthocyanin합성에 있어서 광은 필수적인 요소이지만, SA는 단지 색소의 합성을 더

속 촉진하는 activator의 역할을 하는 것으로 간주된다. 사실, 광배양중인 세포에 SA를 처리해 주면 색소의 축적량은 더욱 촉진되어 광배양중인 SA무처리 세포주에 비하여 4배 이상 높은 색소 합성량을 보였다(Fig. 3A). 이것은 광조사와 SA처리의 상호작용에 의한 상승효과의 결과로 생각된다.

Nozue 등(1993)은 고구마의 현탁세포에서 아주 진한 색소를 함유한 anthocyanoplast가 존재함을 발견하였고, 이들은 빠르게 증가하여 5일 후에는 전체 세포의 80%를 차지한다고 보고하였다. 또한 고구마의 세포에서 이 anthocyanoplast가 색소 축적의 장소라고 주장하였다. 그러나, 포도의 세포 배양계에서 anthocyanoplast는 7일 이후의 몇몇 세포에서만 관찰되었고, SA의 처리에 의해 80% 이상의 거의 대부분 세포에 색소가 축적되었지만 이들 anthocyanoplast의 생성과 증가는 관찰할 수 없었다(Fig. 5). 따라서 식물의 현탁세포 배양계에서 색소의 축적이 anthocyanoplast라는 작은 액포에 의존한다는 것에 대해서는 추후 자세한 검토가 요구되었다. 그렇지만, 색소의 축적이 세포의 액포에서 이루어지고 이 액포가 크게 비대해짐을 확인할 수 있었다.

SA는 식물의 다양한 신호전달경로에서 중요한 기능을 하는 것으로 생각된다. 특히, 식물의 전신획득저항성(SAR) 유도에 있어서 어떤 내적 신호로서의 기능이 많이 연구되었다(Enyedi et al., 1992; Sivermann et al., 1993). 식물의 병원균에 대한 저항성 유도와 anthocyanin 생합성 대사계는 페놀 대사계와 깊은 관련이 있고, 페놀화합물의 일종인 SA는 이들 대사계에 큰 영향을 미칠 것으로 사료된다. 포도의 현탁배양계에서 SA 처리에 의해 anthocyanin 생합성이 크게 촉진되고, 암배양에 의한 색소합성 억제효과가 회복되었지만 SA가 색소 생합성을 위한 어떤 signal로서 작용한다고 보기는 어렵다. 다만, SA가 anthocyanin 생합성 대사계에서 매우 촉진적인 역할을 수행하는 것으로 사료되었으며 특히 세포분열이 왕성한 배양초기(계대배양 이틀후)에 처리해 준 것이 효과적이었던 것으로 미루어 계대배양 초기에 생성되는 PAL 및 CHS의 활성을 촉진시킬 것으로 사료되었다.

## 적 요

포도의 현탁배양계에서 안토시아닌 색소의 축적에 미치는 salicylic acid (SA)의 영향을 알아보기 위하여 다양한 농도의 SA를 계대배양시에 함께 처리한 결과 1  $\mu\text{M}$  이하의 낮은 농도에서는 세포의 성장 및 색소의 축적에 있어서 어떤 영향을 미치지 않았다. 그러나, 5  $\mu\text{M}$ 와 10  $\mu\text{M}$ 의 농도에서는 세포의 성장은 일시적으로 억제되지만 색소의 축적은 크게 증가한다. 또한 20  $\mu\text{M}$ 의 고농도에서는 세포의 성장은 완전히 억제되어 세포가 죽기까지 하는 결과를 나타내었다. 암배양 상태의 세포에서도 SA를 처리해 주면, 암배양에 의한

안토시아닌 색소 생합성능의 저하는 회복되어, SA처리없이 광처리만 해준 세포보다도 더 높은 색소의 축적을 보였다. 5  $\mu\text{M}$ 의 SA를 계대배양후 시일별로 처리한 결과, 처리후 24시간 이후에 급격한 색소의 축적을 나타내었지만 계대배양 후 2일째에 처리한 세포에서 가장 높은 색소의 축적을 보였으며, 처리후 5일째가 되면 SA는 무처리구의 암배양세포(7일째 세포)에 비해 4배 이상의 색소의 축적을 보였다.

사 사-본 연구는 문교부 학술진흥재단 유전공학 연구비와 충남대학교 학술연구비의 지원에 의해 수행된 연구중 일부이며, 연구비 지급에 감사 드립니다.

## 인 용 문 헌

- Beggs CJ, Wellmann E (1985) Analysis of light controlled anthocyanin formation in coleoptiles of *Zea mays* L.: The role of UV-B, blue, red and far-red light. *Photochem. Photobiol.* 41: 481-486
- Choi KS, Inn JK, Lee YB (1994) Effects of light on production of anthocyanin and betacyanin through cell suspension culture systems in *Vitis vinifera* L. and *Phytolacca americana* L. *Korean J Plant Tissue Culture* 21: 47-53
- Do CB, Cormier F (1991) Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell Reports* 9: 500-504
- Dougall DK (1989) Sinapic acid stimulation of anthocyanin accumulation in carrot cell cultures. *Plant Science* 60: 259-262
- Enyedi AT, Yalpani N, Silverman P, Raskin I (1992) Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2480-2484
- Francis JP (1982) analysis of anthocyanin: In anthocyanin as food colors. P Markakis, ed, Academic Press, London, pp 181-208
- Glass ADM, Dunlop J (1974) Influence of phenolic acid on iron uptake: IV. Depolarization of membrane potentials. *Plant Physiol* 54: 855-858
- Jain A, Srivastava HS (1981) Effects of salicylic acid on nitrate reductase activity in maize seedlings. *Physiol Plant* 51: 339-342
- Inn JK, Lee YB, Choi KS (1993) Effects of salt concentration on accumulation of pigments in cell suspension cultures of *Vitis Vinifera* and *Phytolacca americana* L. *Jour Agri Sci, Chungnam Nat'l Univ, Korea* 20: 34-42
- Leslie CA, Romani RJ (1986) Salicylic acid: A new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Reports* 5: 144-146
- Malamy J, Carr JP, Klessig DE, Raskin I (1990) Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1003
- Mancinelli AL (1990) Interaction between Light Quality and Light

- Quantity in the Photoregulation of Anthocyanin Production. *Plant Physiol* **92**: 1181-1190
- Me'traux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Bezz M** (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1006
- Mizukami H, Tomita K, Ohashi H** (1989) Anthocyanin accumulation and change in roselle (*Hibiscus sabdaritta* L.) callus cultures. *Plant Cell Reports* **8**: 467-410
- Nozue M, Kubo H, Nishimura M, Katou A, Hattori C** (1993) Characterization of intravascular pigmented structures in anthocyanin-containing cells of sweet potato suspension cultures. *Plant Cell Physiol* **34**: 803-808
- Ozeki Y, Komamine A** (1985) Effects of inoculum density, zeatin and sucrose on anthocyanin accumulation in a carrot suspension culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **5**: 45-53
- 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
- Raskin I, Ehmman A, Melander WR, Meeuse BTD** (1987) Salicylic acid : A natural inducer of heat production in *Arum lilies*. *Science* **237**: 1601-1602
- Raskin I** (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Physiol, Plant Mol Biol* **43**: 439-463
- Silvermann P, Nuckles E, Ye XS, Kuc J, Raskin I** (1993) Salicylic acid, ethylene and pathogen resistance in tobacco. The American Phytopathological Society, *MPMI* **6**: 775-781
- Takeda J** (1990) Light induced synthesis of anthocyanin in carrot cells in suspension II. Effects of light and 2,4-D on induction and reduction of enzyme activities related to anthocyanin synthesis. *Journal of Experimental Botany* **41**: 749-755
- Yalpani N, Silverman P, Wilson TMA, Kleier DA, Raskin I** (1993) Salicylic acid in a systemic signal and an inducer of Pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *The Plant Cell* **3**: 809-818
- Yamakawa T, Ishida K, Kato S, Kodama T, Minoda Y** (1983) Formation and identification of anthocyanins in cultured cell of *Vitis sp.* *Agric Biol Chem* **47**: 997-1001
- Yamamoto Y, Kinoshita Y, Watanabe S, Yamada Y** (1989) Anthocyanin production in suspension cultures of high producing cells of *Euphorbia millii*. *Agri Biol Chem* **53**: 417-423

(1994년 12월 26일 접수)