

청피홍심무우의 모상근 배양에서 안토시아닌의 생성 및 PAL, CHS의 활성에 미치는 호르몬의 영향

안 준 철 · 백 운 응 · *조 혜 선 · 황 백
전남대학교 자연과학대학 생물학과, *한국과학기술원 유전공학연구소

Effect of Exogenous Hormones on Anthocyanin Accumulation and Phenylalanine Ammonia-lyase and Chalcone-synthase Activity in the Hairy Root Cultures of *Raphanus sativus* cv. Chungpiphongsim

Jun Cheul Ahn, Yun Woong Paek, *Hye Sun Cho and Baik Hwang

Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea
*Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejon 305-606, Korea

ABSTRACT

When effects of exogenous hormone on hairy root cultures of *Raphanus sativus* cv. Chungpiphongsim examined, the highest anthocyanin synthesis and disorganization were observed when 2, 4-D was supplemented to the culture medium. Cytokinins showed early weak induction after transfer and ABA showed inhibitory effect and GA₃ showed no effects in anthocyanin synthesis. Hormones except for 2, 4-D in 1 mg/ℓ concentration did not induce disorganization of hairy root and retarded growth of hairy root. Time-course changes in anthocyanin synthesis, phenylalanine ammonia-lyase activity and chalcone synthase activity were examined in culture condition containing 2, 4-D and kinetin. In a medium containing 2, 4-D, anthocyanin synthesis began to increase on the 9th day and reaching maxima on the 18th day after transfer. Maximum peak of PAL activity appeared on the 3-9th day and another minor peak appeared on the 18th day. CHS activity increased from 9th day, reaching maximum on the 18th day and remained at a relatively high level for culture period. In a medium containing kinetin, anthocyanin synthesis increased temporarily on the 6-9th days, early days after transfer and maintained at a low level for remaining culture period. Peak of PAL activity appeared on the 6th day and CHS activity increased from the 6th days, reaching maxima about 18th day and remained at a relatively high level. In particular, addition of kinetin after preculture in hormone free medium for 2 weeks which was thought of wound healing period showed no effects in anthocyanin synthesis. This results showed that stimulation of anthocyanin synthesis by 2, 4-D and kinetin was meaningfully connected with changes of PAL, CHS activity, and then suggested rate-limiting role of CHS on anthocyanin synthesis in that there is close correlation between anthocyanin synthesis and changes of CHS activity in time-course. Besides, it is considered that cytokinins involving kinetin stimulated anthocyanin synthesis be due to "wound response" by cutting of young roots, and that difference in time-course peak and PAL, CHS activities expressed by 2, 4-D and kinetin result from occurrence of isozyme which have different regulatory mechanism.

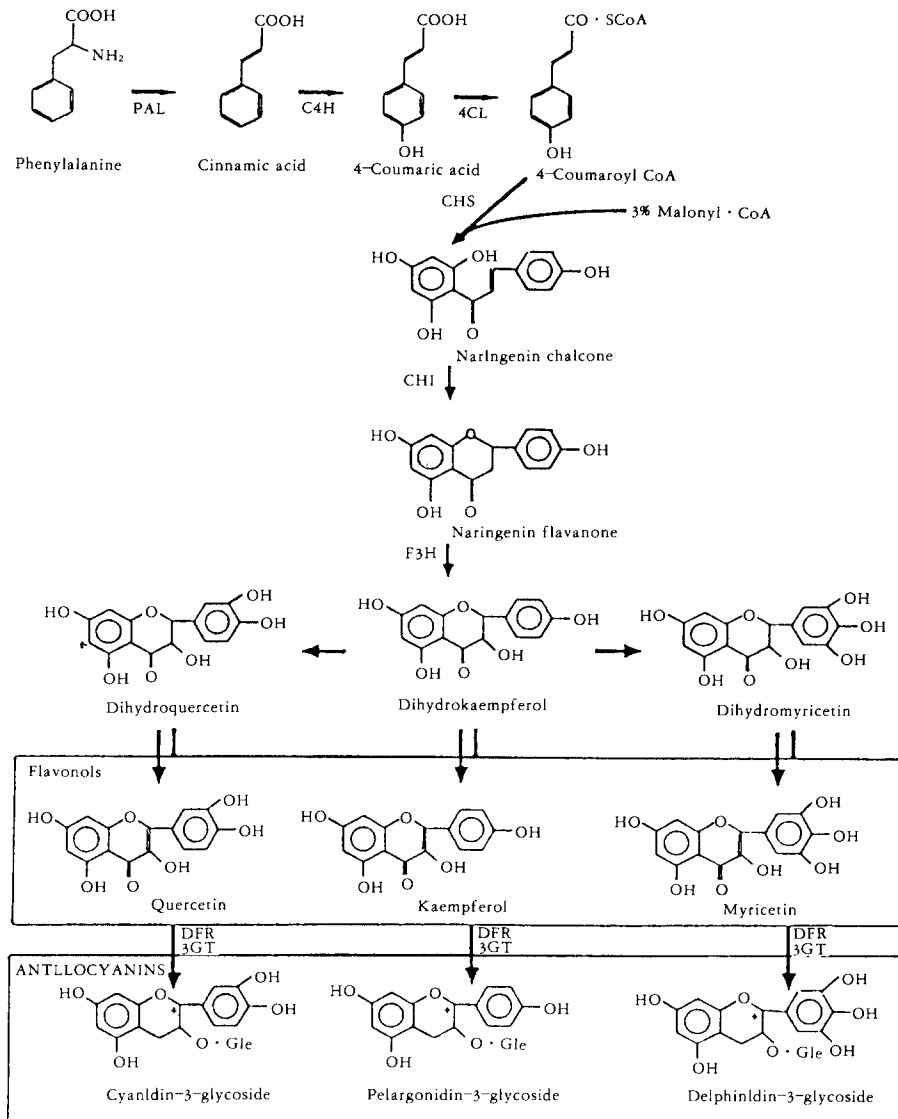


Fig 1. Schematic representation of the flavonoid biosynthesis pathway. Enzymes are abbreviated as follows: PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate:CoA ligase; CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone flavonone isomerase; F3H, Flavanone 3-hydroxylase; DFR, dihydroflavonol-4-reductase; 3GT, UDP-glucose:3-O-flavonoid glucosyltransferase.

서론

거의 모든 세포에서 항상성을 갖는 1차 대사산물과는 달리 식물에서의 2차 대사물질은 특정한 기관

또는 조직에 편재하거나 발달상의 특정한 시기에 일시적으로 존재하기도 하며 스트레스 등의 특정한 환경하에서 생성이 촉진되는 매우 복잡한 발현양상을 갖는 것으로 밝혀져 있다(1). 이러한 2차 대사산물

의 생합성 부위, 세포내 분포위치, 기능적 분화 및 생합성 조절기작 등에 많은 연구를 하고 있지만, 아직껏 명확한 해답을 얻지는 못하고 있다(2). 특히 탈분화된 세포배양에서는 에너지의 대부분이 세포의 성장과 유지에 사용되기 때문에 이들 물질을 생성하는 2차대사계의 활성이 모식물체보다 저하되며(3), 일부 물질의 생성은 세포의 조직이나 기관으로서 세포의 특정한 분화와 연관을 나타낸다(4, 5, 6). 따라서 세포배양에서의 물질 생산성을 높이기 위해서는 세포의 성장에 최적인 배양조건의 규명과 더불어 얻고자 하는 물질의 생성능력을 향상시키는 배지조성이나 배양환경의 파악이 요구되며(6), 2차대사물질의 생산의 궁극적인 조절에 접근하기 위해서는 배양 세포에서의 2차대사계의 생합성 경로와 발현기작을 이해하는 것이 필요하다 하겠다. 주요한 2차대사산물로 천연색소로서의 이용 가능성이 기대되는 안토시아닌에 대한 연구는 매우 활발하며, 현재는 안토시아닌을 생성하는 많은 종의 세포배양이 시도되고 있으며(7, 8, 9), 생합성 경로의 효소(10, 11) 및 유전자의 발현양상(12)이 점차 밝혀지고 있다. 안토시아닌의 발현조절에 관여하는 요인은 매우 다양한 것으로 밝혀지고 있으며, 이에 는 노화, 상처, UV조사, 빛 조사, 성장조절제, phytoalexin elicitors 등이 알려져 있다(13).

한편, 최근에는 생합성 경로의 파악에 있어 세포 배양외에 모상근 배양을 이용하는 등(14) 이차대사에 관련된 제반연구에 있어 세포배양보다 좋은 실험 재료가 될 것으로 기대되고 있다. 특히 모상근은 모식물의 어린 뿌리와 유사한 어느 정도의 세포분화상태를 보여줌으로써(15) 탈분화된 세포배양과는 달리 상처반응(wound-response) 등에 따른 2차대사계의 조절에 관여하는 요인의 조사가 가능할 것으로 생각되고 있다.

안토시아닌 생합성에 관련된 효소 중에서(Fig. 1) phenylalanine ammonia-lyase(PAL)와 chalcone synthase(CHS)는 flavonoid 생합성에 관련된 효소로 PAL은 phenylpropanoid 대사(group 1)의 첫 번째 단계를 촉매하는 효소로 두 효소 모두 각 단계 반응의 주요 조절효소의 역할을 하는 것으로 알려져 있다(10). 세포배양에서 이들 효소의 발현에 관한 연구는 일부 연구그룹에 의해 행하여졌으며, 이에 는 당근 현탁배양에서 2, 4-D의 제거에 의한 안토시아닌의 생성 및 PAL과 CHS의 활성조절(16), 동세포 배양에서의 빛에 의한 조절(17)이 보고되었다. 그 외 roselle 세포배양에서 2, 4-D의 첨가와 빛의 조사에 의한 안토시아닌의 생성과 PAL, CHS의 활성

조절 등이 보고되었다(11).

청피홍심무우의 모상근 배양에서 2, 4-D는 안토시아닌의 생성을 촉진하고 동시에 모상근의 탈분화를 일으킴을 보고한 바 있다(18). 본 실험에서는 2, 4-D는 물론 세포배양에서 사용하는 몇몇 호르몬에 대한 청피홍심무우 모상근의 반응을 살펴 보고 그 중 색소발현의 변화를 보이는 2, 4-D와 kinetin을 처리하여 시간경과에 따른 안토시아닌 함량 변화 및 PAL, CHS의 활성을 조사함으로써, 이들 식물호르몬이 뿌리의 성장과 안토시아닌 생성에 미치는 영향 및 PAL, CHS의 활성변화에 미치는 영향을 알아보았다.

재료 및 방법

모상근의 유도 및 배양

모상근의 유도 및 배양은 Ahn 등(18)의 방법에 의하였으며, 유기된 모상근은 각각 따로 절취 배양하였으며, 그중 생장이 양호한 단일 clone을 본 실험에 이용하였다. 모상근의 배양은 MS배지(sucrose 3%, pH 5.8)로 27°C, 암소에서 수행하였다.

실험구의 설정

외재호르몬에 대한 모상근의 반응을 조사하기 위하여 각 호르몬을 0.45 μ M로 첨가한 MS배지에 0.2g(F. W)의 모상근을 이식하고 3주간 배양하여 1주간격으로 생장비와 색소생성비를 조사하였다. 2, 4-D와 kinetin 처리구에 대한 시간경과에 따른 생장비와 PAL, CHS의 활성변화를 조사하기 위하여 이들 호르몬이 각 0.45 μ M로 함유한 배지에 동일한 상태의 모상근 0.5g(F. W)를 접종하여 24일간 배양하였다. 시료는 배양 3일 간격으로 채취한 후 여과지로 습기를 충분히 제거하여 생중량을 신속히 측정하고 다음 안토시아닌 함량과 PAL, CHS의 활성 조사에 사용하기 위하여 -70°C deep freezer에 보관하였다. 각 처리구에 접종할 모상근의 상태는 동일성을 유지하기 위하여 100ml 삼각플라스크에서 3주간 전배양하여 가위로 균일하게 분할하여 사용하였다.

안토시아닌 함량 측정

각 시료에서의 색소는 0.1 g(F. W)를 5ml의 1% HCl/methanol를 사용하여 4°C에서 24시간 동안 추출하였으며, 함량은 추출한 색소의 원심분리 상등액을 분광광도계를 이용하여 535nm에서의 흡광도로 측정하였다.

효소의 추출 및 활성 측정

전체적인 효소활성의 측정은 Kakegawa 등(19)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 동결건조 시료 0.1g(F. W)을 0.3ml의 extraction buffer(PAL의 측정을 위한 extraction buffer는 1.4mM 2-mercaptoethanol를 함유하는 0.2M K-Pi buffer(pH 7.5)이며, CHS는 1.4mM 2-mercaptoethanol를 함유하는 0.1M K-Pi buffer(pH 8.0)를 각각 사용)에서 완전히 마쇄하였다. 마쇄액은 6,500rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상등액을 동일 extraction buffer로 equilibration한 Dowex 1×2 10mg과 혼합하여 잘 섞은 다음 6,500rpm에서 10분간 원심분리하여 resins를 제거하고 상등액을 효소활성 분석에 이용하였다. PAL의 활성은 Zucker(20)의 방법에 의한 분광광도계를 이용하여 조사하였다. 반응혼합액에는 2.7ml의 0.1M borate-Na buffer(pH 8.8), 0.3ml의 동일 buffer의 0.1M L-phenylalanine, 30 μ l의 효소추출액 등을 혼합하여 30°C에서 1시간 동안 반응을 진행시킨 후 2M perchloric acid 0.5ml를 첨가하여 반응을 중지시킨 후 290nm로 고정한 분광광도계(Gilford-Model-Response)에서 흡광도를 측정하였다. CHS의 활성은 Kreuzaler와 Hahlbrock(21)의 방법에 의하였으며, 반응혼합액에는 30 μ l의 2.8mM 2-mercaptoethanol이 포함된 K-Pi buffer(pH 8.0), 2 μ l의 0.5nm p-coumaroyl CoA(pH 4.0), 2 μ l의 25nCi 0.55 nmol(2-¹⁴C) malonyl-CoA(pH 4.0), 30 μ l의 효소추출액(ca 6.25 μ g protein) 등을 혼합하여 30°C에서 30분간 반응을 시킨 후 EtOAc 2ml를 추가하여 반응을 중지시킨 다음 상층액(organic layer)만을 취하여 cocktail solution 10ml과 혼합하여 scintillation counter(Packard, Model 1500)로 counting하였다. 단백질의 정량은 Lowary 등(22)의 방법을 이용하여 비색정량하였다.

결과 및 고찰

모상근의 생장과 안토시아닌 생성에 미치는 호르몬의 영향

R. sativus cv. Chungpihongsim의 모상근 배양에서, 재배한 뿌리에서의 높은 색소 함량에 비하여 미세근인 모상근의 경우 일반적인 식물세포 배양에 이용되는 MS, B₅, White 등의 배지하에서 색소능이 거의 없거나 생장의 정체기에서 소량의 색소가 형성되는 등 안토시아닌 생성이 매우 빈약하였다(18).

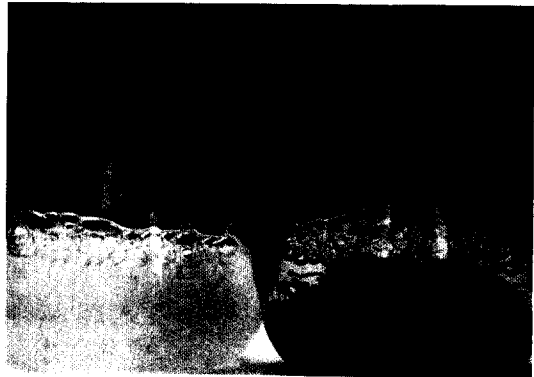


Fig 2. Hairy root culture of *R. sativus* in MS liquid medium(left), disorganization and anthocyanin appearance of hairy root in liquid medium containing 0.45 μ M 2, 4-D (right).

Table 1. Effects of exogenous growth regulators on the anthocyanin accumulation and hairy root growth in hairy root culture of *Raphanus sativus* cv. chungpihongsim.

Treatment (mg/l)		Hairy root growth	Pigment accumulation		
			7days	14days	21days
Auxin	2, 4-D	-(callus forming)	+	+++	++++
	IAA	++++	+	+	+
	NAA	+++	+	+	+
cytokinin	Kinetin	++	++	++	+
	BAP	+	++	++	+
	zeatin	++	++	++	+
GA ₃		+++	+	+	+
ABA		+	-	-	-
control		++++	+	+	+

^hhairy root growth degree: -, none, +; rare, ++; moderate, +++; good; ++++; very good, +++++; excellent.

^ppigment accumulation degree: -, none, +; rare, ++; moderate, +++; good, ++++; excellent.

이에 따라 모상근에서의 색소 생성을 촉진하고자 몇 가지 호르몬에 대한 반응을 조사했던 바, 일부 호르몬의 첨가는 모상근의 탈분화를 일으켰으며, 동시에 높은 색소 생성을 유도하는 등 몇 가지 주목되는 결과를 나타내었다(Fig. 2). Table 1에 나타난 것처럼 다른 호르몬 처리구와 달리 옥신류 중의 2, 4-D는 모상근의 탈분화를 일으켰으며, 색소의 생성을 월등하게 촉진하였다. IAA와 NAA는 2, 4-D의 작

용과는 다르게 뿌리의 탈분화를 일으키지 않았으며 색소생성에 있어서도 별다른 영향을 미치지 않았다. Kinetin, BAP, zeatin 등의 cytokinin류는 모두 모상근의 생장을 억제하였으며 모상근의 이식 후 초기의 색소 생성에 대조구는 물론 다른 처리구에 비하여 다소 두드러지는 cytokinins 처리구의 공통적인 특징을 나타내었다. 그외 GA_3 는 모상근의 생장을 억제하고 색소의 침적에는 변화를 주지 않았으며, ABA 역시 모상근의 생장을 억제하였으며 특히 색소의 생성을 대조구 이하로 억제하는 효과를 나타내었다.

세포배양에서의 안토시아닌 생성에 대한 Auxins의 효과는 종에 따라 촉진과 억제의 상반된 작용이 있으며, 특히 2, 4-D에 의한 촉진효과는 *Catharanthus roseus*, *Vitis sp.* 및 *Ipomoea tabatas* 등의 세포배양에서, 2, 4-D의 억제효과는 *Daucus carota*, *Strobilanthes dyeriana* 및 *Mattiola incana* 등에서 보고된 바가 있다(8). 본 실험에서의 경우는 2, 4-D에 의해 색소의 발현이 촉진되는 전자군에 속하며, 특기할만한 점으로는 뿌리의 형태가 탈분화되면서 동시에 색소가 형성되며 이미 탈분화된 세포에 2, 4-D의 계속적인 처리는 더이상 색소의 생성을 유도할 수 없는 점이다. 이는 *Daucus carota*의 경우에 2, 4-D의 제거와 더불어 2, 4-D 제거에 따른 탈분화된 세포의 형태에서 배형성단계(Embryogenesis)로의 전이인 형태적인 분화와 대사적 분화로 보이는 안토시아닌이 형성이 밀접히 관련이 있었던 점(6)에 반하는 결과로 2, 4-D에 의한 안토시아닌 생합성의 촉진은 종에 따라서는 분화 및 탈분화 상태로의 전이와 관련된 종에 따른 특이성을 갖는 것으로 생각되어진다. 배양된 세포에서의 안토시아닌 생성에 대한 zeatin를 비롯한 cytokinins의 촉진효과 역시 종에 따라 상반된 작용을 나타내며, 촉진효과는 *Daucus carota*, *Helianthus tuberosus*(23), *Haplopappus gracilis*(24) 등에서, 억제효과는 *Daucus carota*(25)에서 보고된 바 있다. 본 실험의 경우 cytokinins의 처리는 모상근의 생장을 다소간 억제하지만 뿌리 형태의 탈분화를 일으키지 않았으며 이식 후 초기에 비교적 소량의 색소생산을 촉진하였다. 안토시아닌 생성에 있어 GA_3 의 일반적인 억제효과(8)에 비하여 본 실험의 경우 생장은 억제하지만 색소 생성에는 영향을 미치지 않았으며, ABA는 산소와 구리이온의 존재하에서 안토시아닌의 분해에 작용하는 것으로 알려져 있으며(26), 본 실험에서도 모상근의 생장은 물론 색소 생성에 현저한 억제작용을 나타내었다. ABA의 이러한 효과가

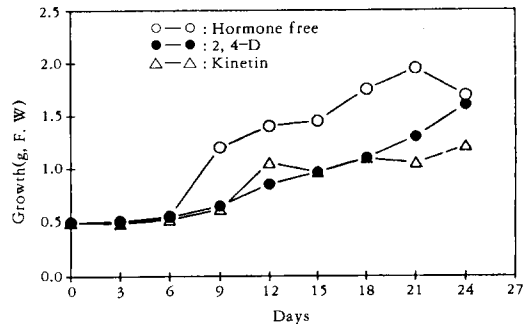


Fig. 3. Time-course of changes in growth of hairy root.

Hairy root was cultured in the medium lacking(○) or containing $0.45 \mu M$ 2, 4-D (●), $0.45 \mu M$ kinetin(△).

안토시아닌 생합성에 관련된 유전자의 발현억제 또는 효소의 활성저하에서 오는지 또는 안토시아닌의 빠른 분해에서 오는지에 대한 것을 알 수는 없으며 이에 대한 더 많은 자료의 조사 및 실험이 있어야 할 것으로 생각된다.

2, 4-D와 Kinetin의 처리 후 시간경과에 따른 안토시아닌의 생성과 PAL, CHS 활성변화

2, 4-D와 kinetin을 처리하여 호르몬을 처리하지 않은 대조구에 비교하여 시간경과에 따른 모상근의 생장, 색소 함량의 변화 및 PAL과 CHS의 활성변화를 측정하였다.

Fig. 3에서 보는 것처럼 대조구에서는 다른 처리구에 비하여 보다 분명한 "S"자형 생장곡선을 보여 주며 6일에 대수기가 시작되고 21일에 모상근의 생장이 정체기에 이르렀다. 2, 4-D 처리구는 모상근의 생장은 없지만 탈분화에 따르는 세포분열로 서서히 생중량이 증가되어 24일에는 대조구와 거의 동일한 양에 이르렀다. 반면에 kinetin은 대조구에 비하여 모상근의 생장을 억제하였으며, 2, 4-D와는 달리 탈분화를 일으키지도 않아 전체적인 생중량이 감소되었다.

Fig. 4는 이들 처리구에 대한 안토시아닌의 함량변화를 보여주는 것으로 대조구에서는 새로운 배지로 모상근의 이식 후 6일에서 소폭의 색소 축적만이 있게 되고 곧이어 이식 수준으로 감소하게 된다. 2, 4-D 처리구는 이식 후 6일부터 급격한 색소의 축적이 일어나고 18일경에 최고치를 보이고 이후 서

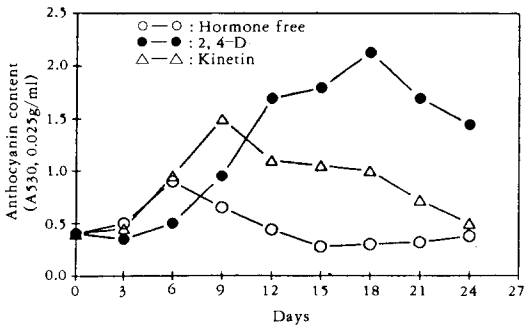


Fig 4. Time-course of changes in anthocyanin accumulation.
 Hairy root was cultured in the medium lacking (○) or containing 0.45 μM 2, 4-D (●), 0.45 μM kinetin (△).

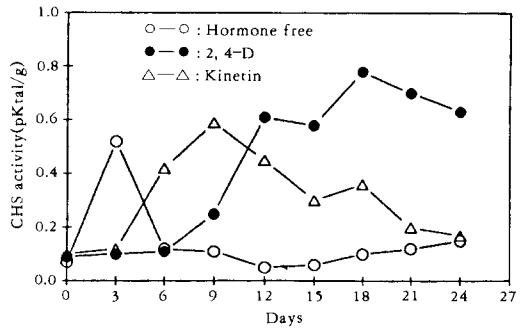


Fig 6. Time-course of changes in CHS activity.
 Hairy root was cultured in the medium lacking (○) or containing 0.45 μM 2, 4-D (●), 0.45 μM kinetin (△).

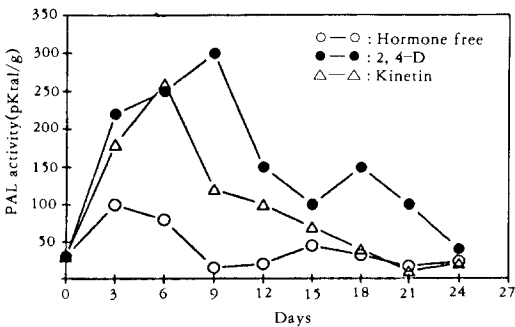


Fig 5. Time-course of changes in PAL activity.
 Hairy root was cultured in the medium lacking (○) or containing 0.45 μM 2, 4-D (●), 0.45 μM kinetin (△).

서히 감소된다. Kinetin 처리구는 대조구와 마찬가지로 6일부터 색소함량이 증가하다가 대조구는 이후 감소하였던 반면에 9일까지 0.D가 약 1.5까지의 증가를 보이게 된다. 이후 색소량의 증가는 더 이상 되지 않고 서서히 감소되다가 24일에는 대조구와 같은 수준으로 감소하게 된다.

Fig. 5는 PAL의 활성변화를 조사한 것으로서, 대조구에서는 3일에서 소량의 활성 증가를 나타낸 이외에는 배양기간 동안 낮은 활성을 유지하였다. 2, 4-D의 경우 3일에서부터 높은 활성의 증가를 나타내고 9일에 가장 높은 활성을 보였다가 이후 서서히 감소하며 18일에 다시 소폭으로 증가하였다가 24일

에는 이식수준으로 감소하게 된다. Kinetin의 경우 역시 3일에서부터 활성의 증가를 보이고 6일에 가장 높은 활성을 보이다가 이후 서서히 감소하게 된다. 각 처리구에 대한 PAL의 활성변화에 있어 주목되는 점으로는, 대조구나 kinetin 처리구는 3~6일 사이의 동일한 기간에 peak를 이루었고 대조구의 낮은 활성 증가에 비하여 kinetin 처리구에서는 비교적 강하게 나타났으며 증가된 활성의 감소 정도가 비교적 완만하였다. 또한 2, 4-D 처리구는 활성의 증가 기간이 보다 길고 배양 후기에 들어서는 또 한번의 소량의 활성증가가 있다는 점을 들 수 있다.

Fig. 6은 CHS의 활성변화를 조사한 것으로서, 대조구에서는 PAL과 마찬가지로 이식초기인 6일의 전 후로 아주 짧은 기간 동안만의 활성 증가를 보여 주며 이후 계속 이식수준의 낮은 활성을 유지하게 된다. 2, 4-D의 경우 PAL과는 다르게 이식 후 9일경부터 활성이 증가되어 배양기간의 중반기인 12일에서 중반기인 24일까지 계속 높은 활성을 나타냈다. Kinetin 처리구의 경우 6~9일 사이에서 활성의 증가를 보이다가 이후 서서히 감소하여 24일에는 이식 초기의 수준으로 감소하는 활성변화를 보였다. CHS의 활성변화를 볼 때, 대조구와 kinetin 처리구의 경우 배양초기에 활성의 증가를 보이다가 이후 감소하는 반면에 2, 4-D 처리구는 배양 중반기부터 증가되어 활성이 높게 지속되는 등 각 처리구에 있어 활성의 증가 폭과 peak를 보이는 날짜가 달랐으며, 시간경과에 따른 CHS의 활성 변화와 안토시아닌의 생성양상은 상당한 일치를 나타냈다.

UV를 포함하는 빛에 의한 안토시아닌의 생성은

1~2일 내에 색소의 증감이 확인되며, 2, 4-D 등의 호르몬에 의한 색소의 조절은 약 3~4주의 기간이 소요되는 것으로 알려져 있다(17, 19, 27). 청피홍심무우의 모상근은 빛에 의한 안토시아닌의 조절은 영양을 받지 않았으며(18) 2, 4-D 및 일부 호르몬에 의해 야기되는 색소 생성의 조절은 1주일에서 4주일까지의 긴 기간이 요구되는 앞선 보고들에 일치함을 보였다. 2, 4-D의 증감에 의한 안토시아닌 생성의 조절은 PAL, CHS의 활성조절(11, 27) CHS mRNA 전사의 변화(28, 29)에 의해 연과되어 있으며, 본 연구에서도 마찬가지로 2, 4-D의 첨가에 따른 안토시아닌의 생성은 시간경과에 따른 이들 효소활성의 증감에 유의적인 연결을 나타내었다. 그의 hormone free 처리구나 cytokinins 처리구에 대한 안토시아닌 함량의 초기 증가 역시 처리 후 시간경과에 따른 효소활성의 변화에 연관되는 것으로 확인되었다. 2, 4-D는 가장 큰 폭의 PAL과 CHS의 활성증가를 유도하며, PAL의 활성은 이식초기에의 강한 증가와 세포 생장의 말기에 소폭의 활성 증가로 나타나 roselle 세포배양에서의 2, 4-D의 첨가에 의한 반응(11)과 유사한 결과를 보였으며, CHS의 경우 이식 초기에 한번의 활성 증가만을 보이고 이후 낮게 유지되는 roselle 세포배양과는 다르게 중반기부터 증가한 활성이 계속 높게 유지되었다. 따라서 2, 4-D에 의한 색소의 생성 촉진은 PAL과 CHS 둘 다의 활성 증가에 기인하며 특히 CHS의 활성 변화는 시간경과에 따른 색소 생성에 매우 밀접하게 비례하는 것으로 나타나 CHS가 색소 생성에 rate-limiting으로 작용하는 것으로 사료되었다. 뿌리형태를 유지하며 성장하는 대조구나 kinetin처리구의 경우 이식의 초기에 소량의 색소 축적 및 PAL, CHS의 활성 증가가 두드러지며 이는 계대배양시 이식(접종)량에 반비례하는 안토시아닌의 합성을 보이는 "transfer effect" 또는 "dilution effect"(3, 16, 30) 인지 또는 뿌리조직의 절단에 따른 상처반응에 의한 안토시아닌 생성을 보이는 것인지 단언을 할 수는 없지만 이식의 초기부터 뿌리 형태의 탈분화가 촉진되는 2, 4-D 처리구의 경우 초기 색소 발현을 보이지 않으며, 이식시의 뿌리 상처가 회복되기에 충분한 기간으로 생각되는 동일 배지에서 2주의 기간이 지난 다음 뿌리를 새로운 배지로 옮겨도 색소의 발현을 유도하지 않는 점으로 미루어 본 실험에서의 초기의 색소 발현은 모상근의 이식시 생기는 상처에 따른 "wound-response"에 의하여 색소 생성이 촉진되는 것으로 생각되며 이는 처리 후 비교적 짧은

시일에서 색소의 축적, 즉 효소활성의 증가를 보인다. 특히 kinetin 처리구에서는 대조구에 비하여 보다 강한 초기 색소의 축적과 PAL, CHS의 활성 증가를 나타내, kinetin를 포함한 cytokinins은 상처에 의해 유도되는 PAL, CHS 활성의 촉진효과가 있는 것으로 생각되며 PAL, CHS mRNA 전사수준에서의 연구가 이에 대한 보다 명확한 해답을 줄 것으로 기대된다. Phenylpropanoid 대사에 속하는 효소군이 flavonoid 대사에 속하는 효소군보다 시간적으로 빨리 유도되는 경우는 parsley(10)와 roselle 세포현탁배양(11)에서 보고되었고 차이가 없는 경우는 carrot 현탁배양(27)에서 보고된 바 있다. 본 실험에서는 2, 4-D와 cytokinins 처리구 모두에서 phenylpropanoid 대사의 PAL이 flavonoid 대사의 CHS보다 빨리 활성화되는 후자군에 속하는 것으로 확인되었다. 이외에 대조구와 2, 4-D 및 kinetin 처리 후 시간경과에 따른 효소의 발현양상이 차이나는 것은 Ishizuka 등(31)의 상처를 받은 감자구근에서 시간별로 발현되는 약 8개의 PAL 동위효소(isozyme)의 존재 확인과 Ozeki 등(27)에 의한 당근 현탁배양에서 여러 개의 PAL 유전자의 존재를 보고한 바에 비추어 청피홍심무우 모상근에서의 2, 4-D에 의한 색소 생성과 상처반응에 따른 색소 생성에 관여하는 PAL, CHS 역시 다른 기작에 의하여 조절을 받으며 발현이 시기적으로 차이가 나는 isozyme의 존재에 의한 것으로 추정된다.

적 요

청피홍심무우의 모상근 배양에서 몇 가지 외재 호르몬에 대한 반응을 조사하였던 바, auxins중의 2, 4-D는 안토시아닌의 생성을 촉진하였으며 동시에 뿌리의 탈분화를 유도하였다. Cytokinins은 이식 초기의 비교적 소량의 색소 축적효과를 나타내었으며, ABA는 색소의 발현억제 효과를 보이고 GA₃는 색소 생성에 별다른 영향을 미치지 않았다. 1mg/l의 농도에서 2, 4-D 이외의 호르몬은 모상근의 탈분화를 유도하지 않았으며, 모상근의 성장을 대조구 이하로 억제하였다.

2, 4-D와 kinetin를 처리하여 시간경과에 따른 안토시아닌 함량의 변화와 PAL, CHS의 활성변화를 조사하였다. 색소농도의 변화를 볼 때, 대조구는 6일에서 kinetin은 6~9일의 이식초기에 일시적인 색소의 증가를 보였으며, 2, 4-D 처리구는 9일부터 증

가하여 18일경에 peak를 보이며 가장 높은 색소 생성을 나타내었다. PAL의 활성 변화에 있어서는, 대조구에 비하여 kinetin, 2, 4-D처리구 둘 다 활성의 증가를 보이고 kinetin은 6일에서 2, 4-D는 9일에서 각각 활성의 peak를 나타내었으며, 특히 2, 4-D의 경우는 18일에서 또 한번의 약한 활성 증가를 보였다. CHS는, 대조구에서는 이식 후 3일에 활성의 일시적인 증가가 있을 뿐 이후 계속 낮은 상태를 유지하였고 Kinetin 처리구는 6일에서 활성이 증가하여 9일에 최대활성을 보이고 이후 감소하게 된다. 2, 4-D 처리구는 9일부터 활성이 증가하여 18일경 최대활성을 나타내고 이후 비교적 높은 활성수준에서 유지되었다. 이외에 이식 후 hormone free 배지에서 2주간의 전배양 후 kinetin의 처리는 색소축적에 별다른 영향을 미치지 않았다.

이러한 결과에 따라, 2, 4-D, kinetin에 의한 안토시아닌 생성의 촉진효과는 PAL, CHS의 활성 증가와 유의적인 연관을 나타내었으며, 특히 시간경과에 따른 CHS의 활성 변화와 색소의 축적은 비례하여 색소 생성에 있어 CHS의 rate-limiting 역할을 제시하였다. Kinetin를 포함하는 cytokinins은 뿌리의 상처에 의한 "wound-response"에 따른 배양초기의 색소 발현을 촉진하는 작용을 하는 것으로 사료되었다. 2, 4-D와 kinetin에 의해 발현되는 PAL, CHS의 활성증가의 정도는 물론 peak를 보이는 경과시간에서의 차이는 각기 다른 조절기작을 갖는 isozyme의 존재에 의한 것으로 추정되었다.

참고문헌

1. Y. Ozeki, K. Matsui, M. Sakuta, M. Matsuoka, Y. Ohashi, Y. Kano-Murakami, N. Yamamoto and Y. Tanaka(1990), *Physiol. Plantarum*, **80**, 379.
2. M. Nozue and H. Yamada(1985), *Plant Cell Reports*, **4**, 252.
3. M. J. M. Hagendoorn, J. L. M. Zethof, E. van Hunnik and L. H. W. van der Plas (1991), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **27**, 141.
4. Y. Yamada and T. Hashimoto(1982), *Plant Cell Reports*, **1**, 101.
5. T. Endo and Y. Yamada(1985), *Phytochemistry*, **24**, 1233.
6. Y. Ozeki and A. Komamine(1981), *Physiol. Plant.*, **53**, 570.
7. T. Yamakawa, H. Ohtsuka, K. Onomichi, T. Komada and Y. Minoda(1982), "Intl. Congress Plant Tissue and Cell Culture" p. 273, Tokyo, Japan.
8. H. Mizukami, K. Tomita, H. Ohashi and N. Hiraoka(1988), *Plant Cell Reports*, **7**, 553.
9. C. B. Do and F. Cormier(1990), *Plant Cell Reports*, **9**, 143.
10. K. Hahlbrock, K. H. Knoblock, F. Kreuzaler, J. R. M. Polls and E. Wellmann(1976), *Eur. J. Biochem.*, **61**, 199.
11. H. Mizukami, K. Tomita and H. Ohashi (1989), *Plant Cell Reports*, **8**, 467.
12. A. R. van der Krol, L. A. Mur, M. Bled, J. N. M. Mol and A. R. Stuitje(1990), *The Plant Cell*, **2**, 291.
13. H. Grisebach(1982), Biosynthesis of Anthocyanins, p. 87, Academic Press, New York.
14. J. R. Robins, A. J. Parr, E. G. Bent and M. J. C. Rhodes(1991), *Planta.*, **183**, 185.
15. D. N. Buther and H. E. Street(1964), *Bot. Rev.*, **30**, 523.
16. Y. Ozeki and A. Komamine(1985), *Plant Cell Physiol.*, **26**, 903.
17. J. Takeda(1990), *J. Exp. Bot.*, **41**, 749.
18. J. C. Ahn, Y. W. Paek, Y. H. Kang and B. Hwang(1992), *Korean J. Bot.*, **35**, 37.
19. K. Kakegawa, E. Hattori, K. Koike and Takeda(1991), *Phytochemistry*, **30**, 2271.
20. M. Zucker(1965), *Plant Physiol.*, **40**, 779.
21. F. Kreuzaler and K. Hahlbroock(1975), *Eur. J. Biochem.*, **56**, 205.
22. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall(1951), *J. Bio. Chem.*, **193**, 265.
23. R. K. Ibraim, M. L. Thakur and B. Permanand (1971), *Lloydia*, **34**, 175.
24. F. Constabel, J. P. Shyluk and O. L. Gamborg (1971), *Planta.*, **96**, 306.
25. A. M. Kinnersley and D. K. Dougall(1980), *Ibid.*, **149**, 200.
26. P. Markakis(1982), Stability of Anthocyanin in Foods, p. 171, Academic Press, New York.
27. Y. Ozeki, A. Komamine, H. Noguchi and U. Sankawa(1987), *Physiol. Plantarum*, **69**,

- 123.
28. D. N. Khun, J. Chappell, A. Boudet and K. Hahlbrock(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, **81**, 1102.
29. F. Kreuzaler, H. Ragg, E. Fautz, D. W. Kuhn and K. Hahlbrock(1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 2591
30. K. Hahlbrock and E. Wellmann(1973), *Biochem. Biophys. Acta*, **304**, 702