

2006 년 2월
석사학위 논문

자색고구마 (*Ipomoea batatas* L.)
유래 습관성캘러스로부터
안토시아닌 생합성

Anthocyanin biosynthesis in habituated callus
derived from purple sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.)

조선대학교대학원

생물학과

김 윤 실

자색고구마 (*Ipomoea batatas* L.)

유래 습관성 캘러스로부터

안토시아닌 생합성

Anthocyanin biosynthesis in habituated callus
derived from purple sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.)

2006년 2월 24일

조선대학교대학원

생물학과

김윤실

자색고구마 (*Ipomoea batatas* L.)
유래 습관성캘러스로부터
안토시아닌 생합성

Anthocyanin biosynthesis in habituated callus
derived from purple sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.)

지도교수 박 현 용

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2005년 10월 27일

조선대학교대학원

생물학과

김 윤 실

김윤실의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선 대학교 교수 _____

위 원 조선 대학교 교수 _____

위 원 조선 대학교 교수 _____

2005년 11월 23일

조선대학교대학원

목 차

	page
도목차 (List of figure)	iii
표목차 (List of table)	v
Abstract	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
2.1 재료	4
2.1.1 식물 재료	4
2.1.2 습관성 켈러스의 유도	4
2.2 습관성 켈러스로부터 자색세포주의 선발	4
2.2.1 고체배지에서 성장조절제의 효과	4
2.2.2 현탁배양에서 성장조절제의 효과	5
2.2.3 현탁배양의 유지 및 증식	5
2.2.4 자색 켈러스의 성장곡선	5
2.2.5 안토시아닌 함량측정	5
2.3 선발된 자색세포주의 배양조건 확립	6
2.3.1 배지의 영향	6
2.3.2 당의 영향	6
2.3.3 접종량의 영향	6
2.3.4 성장조절제의 영향	7
2.4 자색 습관성 켈러스의 안토시아닌 분석	7

III. 결과 및 고찰	9
3.1 습관성 캘러스로부터 자색세포주의 선발	9
3.1.1 고체배지에서 성장조절제의 효과	11
3.1.2 현탁배양에서 성장조절제의 효과	14
3.1.3 현탁배양의 유지 및 증식	16
3.1.4 자색 캘러스의 성장 곡선	19
3.1.5 안토시아닌 함량측정	21
3.2 선발된 자색 세포주의 배양조건 확립	23
3.2.1 배지의 영향	23
3.2.2 당의 영향	25
3.2.3 접종량의 영향	28
3.2.4 성장조절제의 영향	30
3.3 자색 습관성 캘러스의 안토시아닌 분석	34
IV. 참고문헌	35

도 목 차 (*List of figures*)

page

- Figure 1.** External morphology of normal callus (A) and habituated callus (B, C) obtained from the tissue culture of sweetpotato 10
- Figure 2.** External morphology of habituated calli in various combination of media component of 2,4-D (0 ~ 100 μ M) and BA (0 ~ 50 μ M) after 4 weeks of culture 13
- Figure 3.** Changes in anthocyanin content during the suspension culture of purple habituated sweet-potato calli. 17
- Figure 4.** Color tones of anthocyanin accumulated in the storage roots of purple sweet potato cv. Jami (A), cv Borami (B), and purple habituated calli (C, D) in the suspension cultures. 18
- Figure 5.** Growth curve of fresh weights of the calli during the suspension culture of the purple habituated cell-line of the hormone free MS medium 20
- Figure 6** Changes in pigment accumulation in the purple habituated cell-line of purple sweet-potato, maintained in the hormone free MS medium. 22
- Figure 7.** Growth rate of suspension cultures and changes of pigment contents in the purple habituated calli cultured in the various culture media. 24
- Figure 8A.** Effect of various concentrations of sucrose and glucose on anthocyanin content and growth rate in the cell suspension culture of purple habituated cell-line at 12 days after inoculation. 26

Figure 8B. Infouence of various concentrations of sucrose and glucose on the anthocyanin content and growth rate in the cell suspension culture of purple habituated cell-line at 30 days after inoculation. 27

Figure 9. Effects of cell inoculum size on callus growth and anthocyanin contents and growth rate in cell suspension culture of purple habituated calli. 29

Figure 10. Effect of various concentrations of ABA on anthocyanin accumulation and growth rate in the suspension culture of the purple habituated calli. 31

Figure 11. Effect of different concentrations of jasmonic acid on anthocyanin content and growth rate in the suspension culture of the purple habituated calli. 33

표 목 차 (*List of table*)

	page
<i>Table 1.</i> Effect of 2,4-D and BA on callus growth of habituated callus in suspension culture at 26 °C in the dark.	15

ABSTRACT

*Anthocyanin biosynthesis in habituated callus derived from purple sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.)*

Kim, Yoon-sil

Advisor : Prof. Park, hyeon-yong Ph.D.

Department of Biology,

Graduate School of Chosun University

The tissue culture of leaf disks of purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) was studied to establish the optimal culture conditions for anthocyanin accumulation and selection of the cell line producing the anthocyanin. The high amount of anthocyanin producing cell line was selected from the suspension culture of habituated calli, which were grown fast on the hormone free Murashige and Skoog basal medium (MS medium). The high pigmented and habituated callus appeared in the suspension culture after 20 weeks subculturing in the MS medium, in which the ability of the cell line to produce a high amount of anthocyanin was maintained. The color value of the pigments extracted from the calli cultured in the MS medium was 1.1 mg/mL which was close to 1.3 mg/ mL that is the value of the pigment extracted from the storage roots of sweet potato. In a suspension culture of the habituated calli, the highest content of anthocyanin and the maximum rate of cell growth were obtained with addition of the 3% sucrose in the MS medium. The most significant enhancement in anthocyanin production was obtained

when the jasmonic acid was added to the MS medium. The highest anthocyanin content was 1.2 mg/mL obtained at 12 days after 5 uM jasmonic acid was added. This represented an 3-fold increase compared with the control culture. The maximum weight of the callus was 1.684 g measured at 30 days after 5 uM ABA was added to the MS medium. This value was 1.5-fold of that of the control. According to HPLC analysis, peonidin as a component of anthocyanin was isolated from the highly pigmented and habituated callus.

1. 서론

고구마 (*Ipomoea batatas* L.)는 중앙아메리카의 열대지방이 원산지로서 통화식물목 메꽃과에 속하는 다년생 초본식물이다 (Dodds et al. 1991). 괴근에 영양소를 저장하는 포복성 덩굴인 고구마는 감자, 카사바 등과 함께 단백질과 탄수화물의 중요한 공급원으로 중국을 비롯한 여러 개발도상국에서 재배되고 있다 (Phuc et al. 2001). 고구마는 단위 면적당 높은 수확량과 여러 환경조건 하에 잘 견디는 특성을 가진 식용과 사료작물로 재배되고 있다. 여러 품종 가운데 일본을 비롯한 호주, 국내 등지에서 다양한 색소를 생합성하는 유색 고구마로 육종되고 있다 (Valetudie et al. 1995). 육종된 품종 가운데 괴근의 육질전체에 진한 보라색 색소인 안토시아닌을 다량 함유한 자색 고구마는 well being 시대를 맞아 기능성 식품으로서 주목 받고 있다.

안토시아닌은 phenylalanine ammonia lyase (PAL)를 시작으로 phenyl propanoid 합성계를 거쳐 생합성 (Kakegawa et al. 1991) 되는 천연 색소 가운데 가장 잘 알려져 있는 색소이다. 자색고구마의 안토시아닌은 cyanidin-(3, 6)- α -D-glucopyranosyl -(1, 2)- β -D-fructofuranoside와 cyanidin-(3, 6)- α -D-glucopyranosyl-(5, 1)- α -D-xyloside로서 caffeic acid나 ferulic acid가 acylation된 형태라고 알려져 있다 (Tsukui et al. 1983). 최근 건강식품에 대한 소비자들의 선호도 증가와 더불어 인공합성색소의 안전성에 대한 논란으로 인하여 천연색소가 지니고 있는 기능성 및 이용성에 대한 가치가 재조명됨에 따라 각종 작물에 함유된 색소물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Francis 1987).

안토시아닌은 청량음료, 잼, 사탕 등 가공식품의 첨가제로 활용도가 높은 (Yoshimoto 2001) 천연색소로서의 기능 외에도 다양한 생리활성을 나타낸다. 현재까지 알려진 생리활성효과로는 경구 및 피하 지방층에 투여 시 항산화, 콜레스테롤 저하, 시력개선 효과, 혈관 보호 기능, 동맥경화, 심장병예방, 항궤양 기능, 항암, 항염증, 당뇨억제, 자외선 및 각종 환경 스트레스로부터의 보호기능 등이 보고되었다 (Scott 1999; Winkel 2001; Forkmann and

Martens 2001).

안토시아닌은 주로 포도, 양배추 등에서 경작지 재배방법에 의해 직접 추출하여 생산해 왔다 (Do and Cormier 1991). 이 방법은 기후, 토양, 계절, 병충해, 지리적 조건 등 환경적인 제약과, 공급의 불안정, 노동 집약적 등의 문제로 대량 생산에는 많은 어려움이 있어 (Yamakawa et al. 1983) 순수 천연 안토시아닌은 USD 2500kg⁻¹의 고가에 거래되어 왔다 (Hari et al. 1994). 이러한 문제점을 해결하고자 기내배양으로 천연 색소를 대량 생산하기 위해 strawberry (Mori et al. 1993), cranberry (Madhavi et al. 1995), purple sweet-potato (Konczak et al. 2000), grape berry (Hiratsuka et al. 2001), *Daucus carota* (Narayan et al. 2005), sour cherry (Blando et al. 2005) 등을 이용하여 색소 기내생산에 관한 연구가 진행 중에 있다.

이와 같이 다양한 작물을 이용한 천연색소 기내 생산을 위한 시도가 진행되고 있으며 고구마의 경우 약, 정단 분열조직 (Jarret et al. 1984; Liu et al. 1989; Min et al. 1994; Chee and Cantliffe 1988a 1988b; Chee and Cantliffe 1989; Otani and Shimada 1996), 잎, 줄기, 뿌리 (Liu and Cantliffe 1984), 엽병 및 측아 (Cantliffe et al. 1987; Tang et al. 1993; Desamero et al. 1994) 및 원형질체 (Otani et al. 1987)등을 이용한 기내배양 방법이 개발되어 있어 다른 작물과 비교하여 효과적이다. 그러나 고구마 조직배양의 경우 아주 낮은 빈도로 체세포배가 유도 되며, 매우 낮은 재분화율을 보이고 동일한 결과의 재현이 어려운 것으로 나타나고 있다 (Prakash and Varadarajan 1992; Newell et al. 1995).

표피뿐 아니라 육질 전체에 자색을 띠는 자색고구마는 안토시아닌 함량이 생체중의 약 3.7% 내외로 자색고구마의 cell line을 이용한 세포배양으로부터 안토시아닌의 생산은 저비용으로 높은 경제성을 지닐 것으로 추정된다. 그러나 2차 대사산물의 생산에 이용되는 대부분의 배양세포는 옥신과 사이토키닌의 조합 배지에서 유도되며 계대배양을 통해 유지되고 있다 (Anne et al. 2000). 장기간 배양 시에 주기적으로 배양세포를 다시 선발해야 하는 어려움이 있고, 배양에 사용되는 옥신과 사이토키닌 등의 식물 성장조절제가 인체에 미치는 안정성에 대한 문제점이 제기되고 있다.

그러나 조직 배양에서 유도된 캘러스들은 오랜 기간 동안 반복되는 계대배양 과정에서 옥신 혹은 사이토키닌 등이 결핍된 배지에서도 잘 성장할 수 있는 호르몬 독립성 캘러스가 유도되기도 하는데 이를 습관성 (habituation)이라한다 (Meins et al. 1980). 습관성은 조직배양에서 지적되는 몇 가지 문제점 즉, 낮은 성장률과 재분화률의 해결 방안으로 사용되기도 한다. 예를 들면, Goleniowski (2000)는 생장이 우수한 습관성 캘러스를 선발하여 taxol의 생산을 시도하였으며, Grevet 등 (2000)은 아스파라거스의 습관성배발생캘러스를 유도해 분자유종 기간을 단축시키고자 하였다. 또한, 기내 색소 생산 시 사용되는 성장조절제의 인체에 미치는 영향 등을 고려할 때 성장조절제의 첨가 없이 독립적으로 스스로 성장할 수 있는 습관성 캘러스를 이용한 기내배양을 통한 2차 산물의 생산방법이 가장 최적의 방법으로 사료된다.

이 연구는 국내 자색고구마의 품종인 자미의 i) 잎 조직배양으로부터 옥신과 사이토키닌에 습관성을 나타내는 생장이 왕성한 캘러스를 우선 유도하여 유지 증식시키며, ii) 이로부터 안토시아닌 함량이 높은 자색 습관성 세포주를 선발하고 iii) 이를 이용한 안토시아닌 기내 생합성을 위한 최적 배양조건을 확립하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

2.1.1 식물재료

재료 식물인 자색 고구마는 호남농업시험장 목포시험장에서 공급받은 품종인 자미로 완전히 전개된 잎을 2개 포함한 마디를 채취하여 70% ethanol에 1분, 2% sodium hypochlorite solution에 3분간 표면살균 후 3차 멸균수로 3회 수세하였다. 기본배지가 100 mL 분주된 1,000 mL 크기의 배양병에서 무균상태로 배양시켜 사용하였다. 실험에 사용된 기본배지는 3% sucrose, 0.3% phytigel, 0.1% myo-inositol이 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지를 사용하였다. 모든 배지는 멸균 전 pH를 5.8로 조정 한 후, 125℃에서 15분간 고압 멸균하여 사용하였다. 재료식물은 낮/밤이 26/20℃ 16/8 hr, 6000 lux cool-white 광조건에서 배양하였다.

2.1.2 습관성 켈러스의 유도

무균 생장한 자색고구마의 정단 조직에서 3 ~ 6번째 마디의 2 ~ 3 cm 크기의 잎을 가장자리와 주맥을 제거하고 0.5 × 0.5 cm 크기로 절단하여 켈러스 유도 배지에 4개씩 치상하였다. 켈러스 유도 배지는 1 μ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)가 첨가된 MS 기본배지로 멸균 후 직경 55 mm크기의 페트리 디쉬에 10 mL 씩 분주하여 사용하였다. 켈러스는 26℃, 3000 lux cool-white 광 조건에서 6 ~ 12 개월 배양하여 유도하였다. 유도된 습관성 켈러스는 MS 기본 배지에서 4주 마다 계대배양하며 유지 증식시켰다.

2.2 습관성 켈러스로부터 자색세포주의 선발

2.2.1 고체배지에서 생장조절제의 효과

선발된 습관성 켈러스를 $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ cm 크기로 잘라 0, 1, 10, 100 μM 의 2,4-D 와 0, 0.5, 5, 50 μM 의 6-benzylamino-purine (BA)를 조합 처리한 MS 배지에 4개의 절편을 치상하였다. 또한 동일한 농도의 naphthalene acetic acid (NAA) 와 BA를 조합 처리한 MS 배지에 치상하여 켈러스 생성 및 색소 생합성능을 조사하였다.

2.2.2. 현탁배양에서 성장조절제의 효과

MS 기본배지에서 6개월 이상 계대 배양하며 현탁 배양으로 유지해온 $0.1 \times 0.1 \times 0.1$ cm 크기의 습관성 켈러스를 0, 1, 10, 100 μM 2,4-D와 0, 0.5, 5, 50 μM BA가 조합 첨가된 MS 기본배지에 각각 0.1 g 씩 접종하여 켈러스의 성장과 안토시아닌 생합성을 조사하였다. 배지는 50 mL 삼각플라스크에 10 mL 씩 분주하여 사용했고 접종 후, 7일 간격으로 동일 배지에 계대배양 하였다.

2.2.3 현탁배양의 유지 및 증식

고체배지에서 유지된 습관성 켈러스를 $0.2 \times 0.2 \times 0.2$ cm 크기로 잘라 각각 3 g씩 채취해 50 mL의 MS 기본배지가 들어있는 250 mL 삼각플라스크에 담아 26°C, 120 rpm, 연속 암 조건에서 현탁 배양하였다. 2 개월 후 안정적으로 성장되면 켈러스를 1/2정도 잘게 잘라 1주일에 1회 계대배양을 시행하였다.

2.2.4 자색 켈러스의 성장곡선

성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지 10 mL를 50 mL 삼각플라스크에 분주하고 선발된 자색 습관성 켈러스를 $0.1 \times 0.1 \times 0.1$ cm 크기로 잘라 0.1 g 접종하여 30일간 배양하며 3일 간격으로 생체중량을 측정하였다.

2.2.5 안토시아닌 함량측정

선발된 자색 습관성 켈러스를 현탁 배양법에 따라 30일간 배양하는 동안 6일 간격으

로 안토시아닌 함량을 측정하였다. 안토시아닌 함량 측정법은 3 mm filter paper 이용하여 배양액을 제거한 후 켈러스를 잘게 잘라 즉시 추출액에 넣었다. 추출액은 0.1% citric acid가 첨가된 20% 에탄올을 사용했다. 24시간 동안 30℃에서 시료의 20배 추출액에서 추출하였다. 24시간 경과된 시료를 5초간 흔들어준 후 800 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 상등액을 취하여 스펙트로포토미터를 이용하여 530 nm에서 안토시아닌 함량을 측정하였다.

2.3 선발된 자색세포주의 배양조건 확립

2.3.1 배지의 영향

선발된 자색 습관성 켈러스를 0.1 × 0.1 × 0.1 cm 크기로 잘라, 10 mL의 배지가 분주된 50 mL 삼각 플라스크에 0.1 g 씩 접종하고 26℃, 120 rpm 암 조건으로 배양하였다. 여러 배양배지의 영향에 대한 실험을 위하여 사용된 배지의 종류는 MS, Gamborg et al. (B5 1968), Linsmaier and Skoog (LS 1965), Lindemann Orchid medium (LO)의 4가지로 MS 배지는 실험실에서 직접 제조하였으며, B5, LS, LO 배지는 Duchefa에서 구입하여 사용하였다. 각각의 배지에 3% sucrose를 첨가하였으며, 성장조절제는 첨가하지 않고 사용하였다. 배양 12일과 30일 후에 생체중과 안토시아닌 생합성량을 측정하였다.

2.3.2 당의 영향

선발된 습관성 켈러스를 2.3.1의 현탁 배양법에 따라 배양하였다. 당이 켈러스 형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 sucrose와 glucose를 사용하였으며, 각각의 농도는 0, 3, 6, 9 μM로 처리하여 배양하였다. 배양 후 12일과 30일에 생체중과 안토시아닌 생합성량을 조사하였다.

2.3.3 접종량의 영향

선발된 습관성 켈러스를 0.1 × 0.1 × 0.1 cm 크기로 잘라, 성장조절제가 첨가되지 않은

MS 기본배지 10 mL가 분주된 50 mL 삼각 플라스크에 켈러스를 각각 0.1 (1%), 0.25 (2.5%), 0.5 (5%), 1 (10%) g 접종한 후 26°C, 120 rpm, 암 조건에서 배양하였다. 배양 12일과 30일 후에 생체중량 증가율과 안토시아닌 생합성량을 측정하였다.

2.3.4 성장조절제의 영향

1) *Abscisic acid (ABA)*의 효과

선발된 습관성 켈러스를 0.1 × 0.1 × 0.1 cm 크기로 잘라 0, 5, 10, 20, 40 μM ABA가 첨가된 MS 기본배지 10 mL가 분주된 50 mL 삼각 플라스크에 0.1 g 씩 접종하고 26°C, 120 rpm, 암 조건으로 배양하였다. 배양 12일과 30일 후의 생체중량과 안토시아닌 생합성 변화를 측정하였다.

2) *Jasmonic acid* 효과

선발된 습관성 켈러스를 2.3.1과 동일하게 준비하여 0, 5, 10, 20 μM jasmonic acid가 첨가된 MS 기본배지 10 mL가 분주된 50 mL 삼각 플라스크에 0.1 g 씩 접종하고 26°C, 120 rpm, 암 조건으로 배양하였다. 배양 12일과 30일 후의 생체중량과 안토시아닌 생합성 변화를 측정하였다.

2.4 자색 습관성 켈러스의 안토시아닌 분석

괴근과 자색 켈러스 6 g을 0.1 × 0.1 × 0.1 cm로 잘게 잘라, 1% (v/v) HCL MeOH 용액 100 mL에서 침지시켜 4°C 암소에서 12시간 방치한 후, 색소를 추출하였다. 추출액을 Whatman No. 1 여과지를 사용한 Buchner funnel을 사용하여 흡인 여과하여 잔사는 시료의 색소가 완전히 제거될 때까지 동일 용매를 사용하여 반복 추출하였다. 이렇게 얻어진 추출액을 회전감압농축기를 사용하여 농축한 후, 농염산을 첨가하여 100°C의 water bath에서 1시간 정도 가열하여 색소를 완전히 가수분해하였다. 가수분해한 색소액을 냉각 후, 물을 첨가하여 원래 양의 2배로 희석하고, 희석액에

isoamylalcohol를 첨가하여 강하게 흔든 후, 잠시 방치해 두면 aglycone은 상층의 알코올 층으로 전용된다. 상층의 알코올 층을 다른 비이커에 옮긴 다음, ether 혹은 벤젠을 첨가하여 여러 지질성분을 제거하는 과정을 3회 반복하여 실행하였다. 이렇게 정제된 색소액에 소량의 isoamylalcohol을 첨가하여 상층의 aglycone 부분을 취하여 high performance liquid chromatography (HPLC) 시료로 사용하였으며, 이때 색소 성분을 확인하기 위해 표준물질의 aglycone (cyanidin, peonidin)을 구입하여 사용하였다. HPLC 분석은 Instrument - Shimadzu LC10ADVP, Detector - UV detector, Wavelength - 520 nm, Mobile phase - H₂O:MeOH:CH₃COOH=63:35:2 (v/v/v), Column - Capcell Pak C18 SG120 (4.6mmI.D.×250mm), Flow rate - 1.0ml/min 등의 조건에서 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 습관성 캘러스로부터 자색세포주의 선발

자색고구마의 잎 조직을 1 μ M 2,4-D가 첨가된 MS 기본배지에 치상하여 26°C, 6000 lux의 연속 광 조건에서 6개월 이상 배양하여 선발하였다. 선발 당시 캘러스의 형태는 Fig. 1에서 보는 바와 같이, 일반적으로 조직배양으로 성장할 수 있는 최대크기인 직경이 1.5 cm (Fig. 1. A)에 비교하여 3 ~ 5배 크기로 성장하였다 (Fig. 1. B, C).

일반적으로 습관성캘러스 형성의 결정은 유전자형 (종, 변종), 세포와 조직의 발달단계 등이 작용하는 것으로 보고되고 있는데 (Meins 1989), 설탕 무의 경우 호르몬과 저온 처리로 (Greef and Jacobs 1979), 고추는 고농도의 cytokinin의 처리로 습관성 캘러스 유도는 가능하였다 (Kintzios et al. 1996). 본 실험에서 사용된 자색고구마는 저농도의 2,4-D를 첨가하여 6개월 이상 배양한 결과 성장조절제가 첨가되지 않는 MS 기본배지에서 빠르게 성장하는 습관성 캘러스를 선발하였다. 자색고구마로부터 선발된 습관성 캘러스는 MS 기본배지에서 4주 간격으로 계대배양하며 유지 증식시켰다.

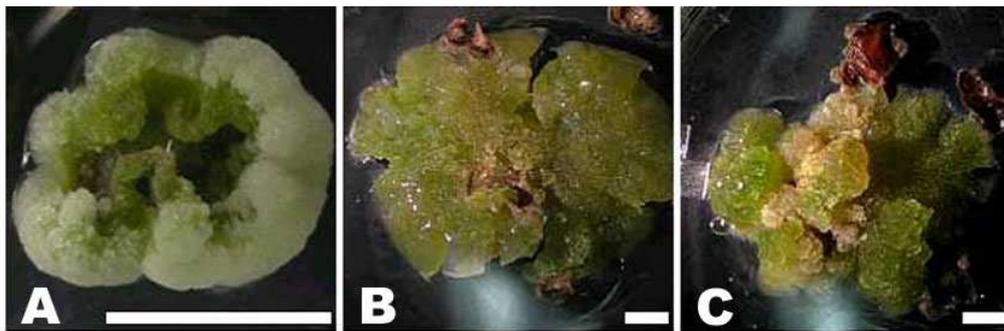


Figure 1. External morphology of normal callus (A) and habituated calli (B, C) from the tissue cultures of leaf disks of sweetpotato. Bars=1 cm.

(A) : Four-week-old non-embryogenic callus induced from the leaf tissue culture on the MS medium supplemented with 1 μ M 2,4-D and 0.5 μ M BA.

(B, C) : Six-month-old habituated calli cultured on the hormone free MS medium. The size of habituated calli (B, C) was 5 times larger than that of the normal callus (A).

3.1.1 고체배지에서 성장조절제의 효과

선발된 습관성 켈러스를 이용하여 4주 간격으로 3회 MS 기본배지에서 배양한 후, 2,4-D와 BA가 조합 처리된 고체배지에서 4주간 배양하여 켈러스 형성을 조사한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 배양 3주 이후 육안으로 성장 구별이 가능하게 변화하였는데, MS 기본배지와 0.5 ~ 50 μ M BA 단독 처리구에서 생장이 양호하였으며, 1 μ M 2,4-D 첨가 시 생장이 감소하였다. 10 μ M 2,4-D 처리구의 경우 배양 초기에는 켈러스가 증식하였으나, 3주 이후 생장이 멈추고 갈변하였으며 배양이 지속되면서 점차 괴사하였다. 이러한 현상은 100 μ M 2,4-D 처리구에서도 나타났다. 즉, 2,4-D와 BA의 첨가 없이 생장이 가능한 습관성 켈러스이지만 고농도의 2,4-D 처리 시에는 자색고구마의 잎이나 괴근을 이용한 조직배양과 유사하게 켈러스가 갈변하며 괴사하였다 (Park et al. 2003). 그러나 잎과 괴근 조직유래 켈러스와 달리 본 연구에서 선발한 습관성 켈러스는 10 μ M 2,4-D 이상의 고농도에서 배양 직후 갈변 괴사하는 것이 아니라 배양 3주간은 생장이 양호하여 각종 배양 환경의 스트레스에 대한 내성이 강한 것으로 추측되었다.

한편, 1 ~ 10 μ M 2,4-D 단독 처리구, 1 ~ 10 μ M 2,4-D와 0.5 ~ 5 μ M BA 조합 처리구에서는 부분적으로 주황색 켈러스가 형성되어 색소의 생합성을 기대하였으나, 지속적인 계대배양 결과 그 이상의 색소 침착과 켈러스 생장이 일어나지 않았다. 또한, 2,4-D와 BA 조합 처리 시와 동일한 농도로 NAA와 BA를 조합 처리한 결과, 2,4-D와 BA 조합 처리와 유사한 성장 양상을 나타냈으나, 주황색 켈러스 및 자색 켈러스는 형성되지 않았다.

Nozue 등 (1987)은 자색고구마의 괴근에서 유래된 켈러스의 호르몬 처리에 의한 안토시아닌 생합성량과 성장률 조사실험에서 cytokinin은 안토시아닌 생합성량과 성장률에 영향을 주지 않으며 IAA나 NAA에 비교하여 2,4-D처리에서 성장률과 안토시아닌 생산량이 뛰어나나 높은 농도에서는 오히려 안토시아닌 생합성을 방해한다고 보고했다. 그러나 본 실험에서는 성장조절제가 참가되지 않은 조건과, cytokinin의 첨가 조건에서 켈러스 생장이 양호하였으나 자색을 띠는 켈러스를 유도할 수 없었다. 10 μ M 2,4-D 이상 처리구에서는 위의 보고 내용과 같이 켈러스의 생장이 중지되고 괴사하였다.

본 실험의 결과 성장조절제의 첨가를 통해 색소의 생합성은 유도할 수 없었으나, 성장조절제가 첨가되지 않은 조건에서 성장한 습관성 켈러스는 일반적으로 고구마에서 유래한 켈러스의 성장과 비교하여 3~5 배의 높은 성장률을 나타냈다. 고구마 유래 켈러스의 일반적인 성장량에 크게 앞서는 습관성 켈러스는 여러 가지 적합한 배양 조건을 조성할 수만 있다면 목적으로 하는 2차 대사산물의 생산을 위한 안정적인 재료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

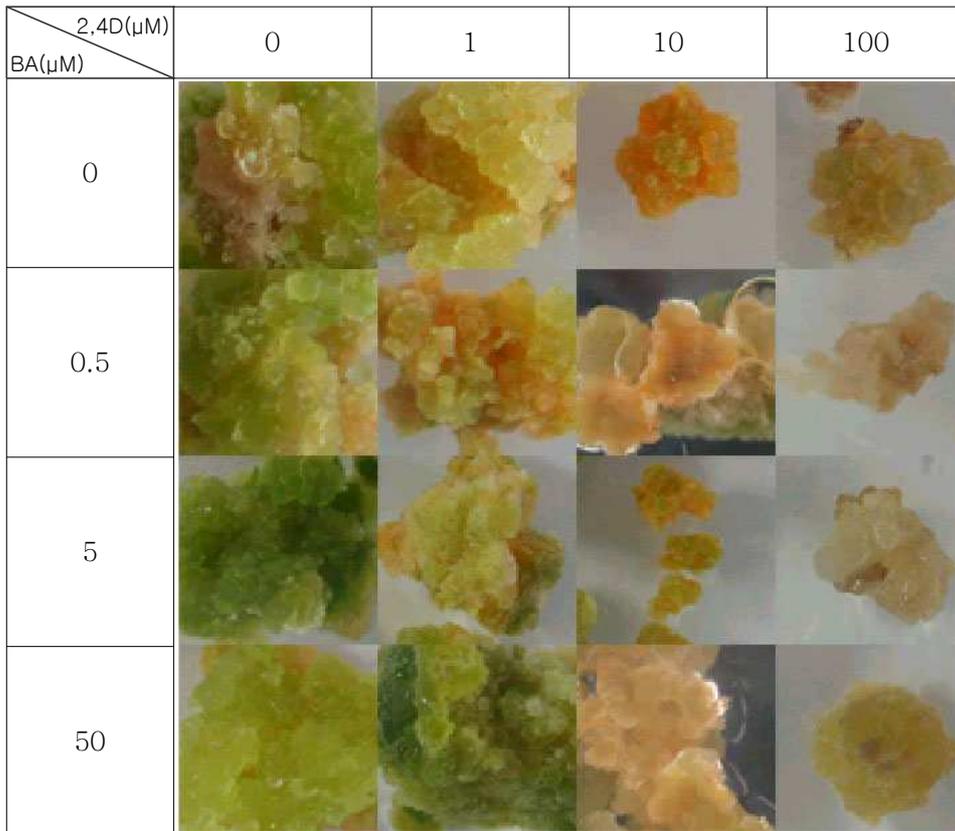


Figure 2. External morphology of the habituated calli cultured in various combination of media components of 2,4-D (0 ~ 100 μM) and BA (0 ~ 50 μM)

after 4 weeks of culture. The hormone free MS medium was the best culture of callus growth.

3.1.2 현탁배양에서 성장조절제의 효과

성장조절제로서 2,4-D와 BA를 첨가한 배지에서 현탁 배양한 후 7일 간격으로 4주 동안 계대배양하며 캘러스의 성장과 안토시아닌 생합성여부를 육안으로 관찰하였다. 대체로 BA 단독 처리구에서 캘러스의 생장이 양호하며 단단한 밀집형 캘러스를 형성하였고, 1 μM 2,4-D 처리에서는 캘러스가 부스러지기 쉬운 형태로 변하였다. 이 결과는 습관성 캘러스를 이용한 고체배지에서의 성장조절제 효과와 유사하였다. 2,4-D는 농도가 높아질수록 생장이 지연되어 100 μM 2,4-D 처리 구에서는 계대배양 3주 후 모두 괴사하였다 (Table 1).

4주 동안 안토시아닌이 합성된 자색 캘러스는 관찰 되지 않았다. Konczak 등(2000)은 2,4-D 첨가배지에서 안토시아닌 생합성 세포주를 얻었으나, 2,4-D의 존재가 안토시아닌 생합성을 저해하는 문제가 있다는 결과도 보고되고 있다 (Ozeki and Komamine 1981). 본 실험에서 선발한 습관성 캘러스는 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서 성장하기 때문에 성장조절제에 의존하지 않는 효과적인 방안이 될 것으로 사료된다.

Table 1. Effect of 2,4-D and BA on the growth rate of the habituated calli in the suspension culture at 26°C in the dark.

2,4D(μ M) BA(μ M)	0	1	10	100
0	++++	+++	+	-
0.5	+++	++++	+	-
5	++	+++	+	-
50	++	+++	+	-

calli growth rate : -, none; +, rare; ++, moderate; +++, good; +++++, excellent.

3.1.3 현탁배양의 유지 및 증식

현탁 배양은 고체 배지 상에서 유도된 습관성 켈러스를 이용하여 시도하였다. 습관성 켈러스를 액체배지로 옮겨 배양 후 4주가 경과하면 엽록소가 감소되면서 켈러스 표면의 녹색이 황색으로 변하고 8주 후부터 안정적으로 성장하였다. 1주마다 계대배양을 실시하여 20회 계대배양이 경과하면서 안토시아닌 생합성을 통해 표면이 자색으로 변화하는 켈러스들이 출현하기 시작하였으며 지속적인 계대배양을 통해 선발, 증식 유지하였다.

계대배양 20회부터 안토시아닌의 생합성량을 1주일 간격으로 30회까지 측정하였다 (Fig. 3). 안토시아닌 생합성량은 20회 계대배양 시에 0.119 mg/mL, 28회에 0.313 mg/mL로 주기적으로 변화하지만 미세하게 계속하여 증가하였다. 선발을 계속하여 계대배양 40회 경과 후에는 육안으로도 관찰이 가능한 뚜렷한 자색 표면을 가진 습관성 켈러스들을 얻었다 (Fig. 4 C, D).

본 실험에서 선발한 습관성 켈러스에서의 안토시아닌 생합성량은 Fig. 3 에서 보는 바와 같이 약 4주를 주기로 하여 변화하면서 계속하여 조금씩 증가하는 결과를 나타냈다. 따라서 이를 이용하면 안토시아닌을 대량생산할 수 있는 가능성은 매우 높을 것으로 사료된다.

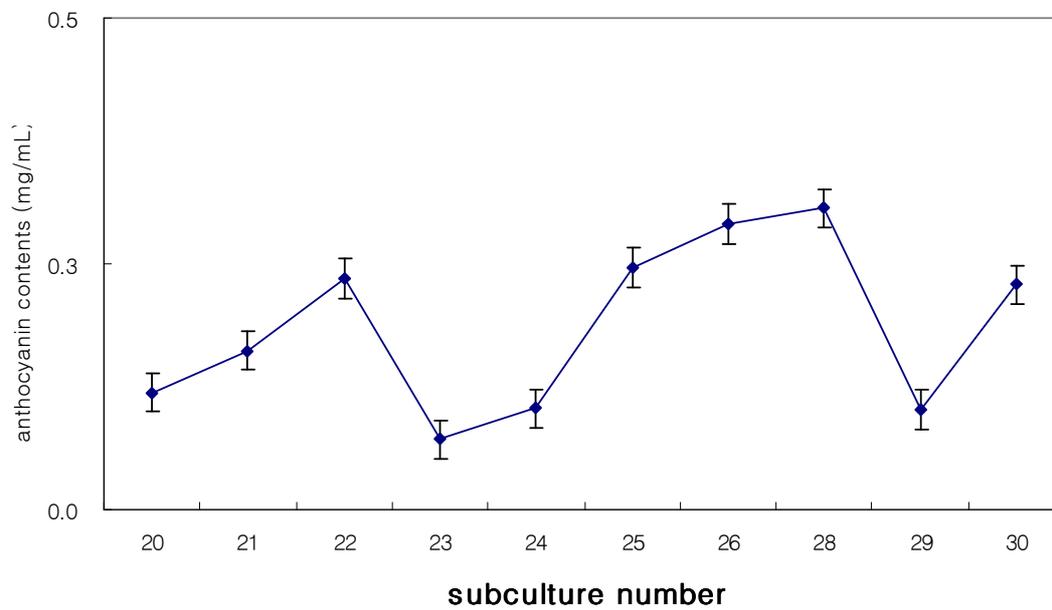


Figure 3. Changes in anthocyanin content during the suspension culture of purple habituated sweet-potato calli. The calli were subcultured in the hormone free MS liquid medium at intervals of 7 days. Vertical bars represent standard deviation of four replications. Anthocyanin content was gradually enhanced.

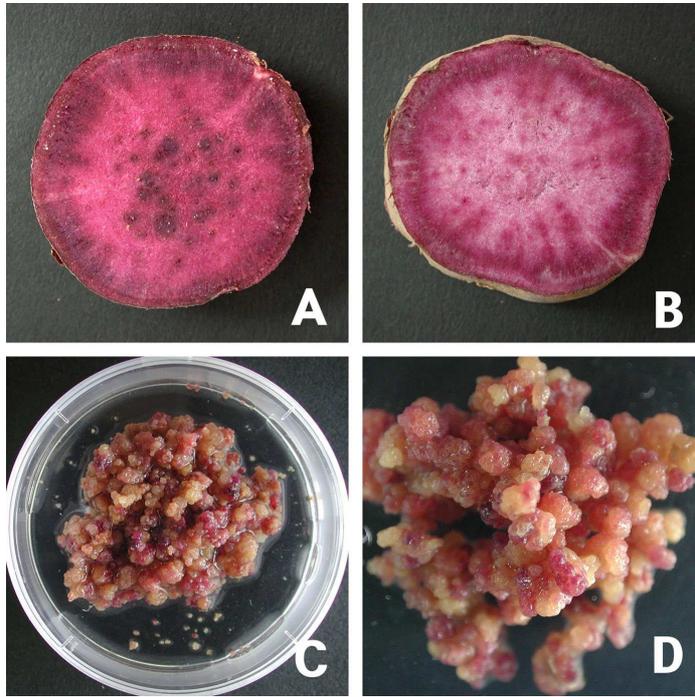


Figure 4. Color tones of anthocyanin accumulated in the storage roots of purple sweetpotato cv. Jami (A), cv. Borami (B), and purple habituated calli (C, D) in the suspension cultures. The color tones of A and B were very similar to those of C and D.

3.1.4 자색 켈러스의 성장 곡선

3일 간격으로 생체중량을 측정한 결과는 Fig. 5에서 보는바와 같이 전형적인 성장곡선으로 나타나는데 접종 시 생체중량 (0.1 g)이 12일 (생체중량 0.244 g)까지 거의 변화가 없는 lag phase (준비기)를 거친 후, 성장이 빨라져 21일에는 생체중량이 0.556 g, 30 일에는 1.704 g이 되어 처음 체중의 17배 이상이 되는 rapid growth phase (성장기)를 지나 생체중이 최대 증가 (33일 생체중량이 1.897 g)한 뒤, 이후는 stationary phase (안정기)를 나타내고 있다.

본 실험에서 선발한 자색 고구마 유래 습관성 켈러스가 12일부터 30일까지 활발한 성장을 보이는 결과는 아스파라가스에서 유래된 습관성 켈러스 성장 조사 결과 보고 (Grevet AL et al. 2000)에서 20 ~ 30일에 가장 활발한 성장을 하는 것과 유사하였다.

습관성 켈러스가 일반적인 켈러스보다 빠른 성장률을 보이는 것에 대하여 Poder 등 (1998)은 산소요구량이 많아 성장이 빠르다고 추측하였다. 본 실험에서 선발한 자색의 습관성 켈러스는 배양 30일 후 각각 초기의 약 15~17배 성장률을 보인 세포주를 얻었다.

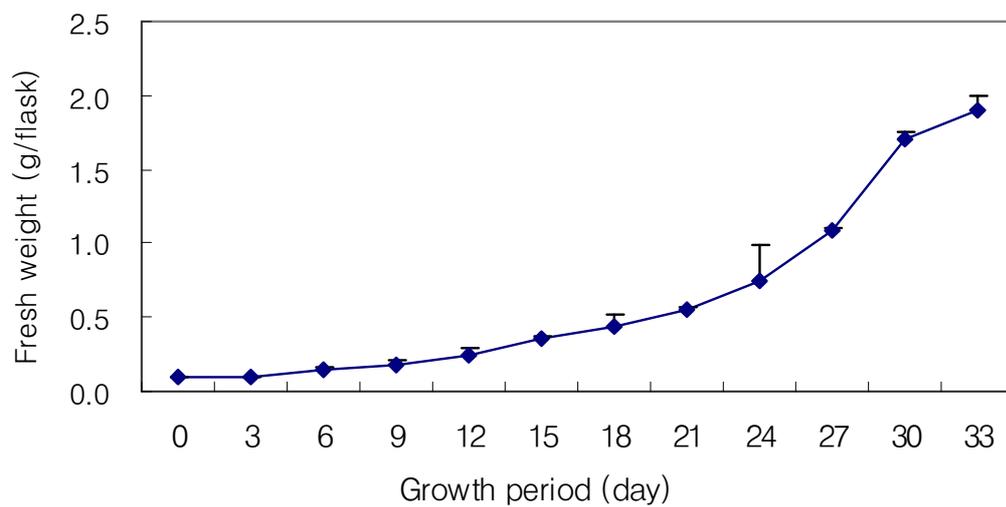


Figure 5. Growth curve of fresh weights of the calli during the suspension cultures of the purple habituated cell-line in the hormone free MS medium. Bars represent a standard deviation of four replications. The cell growth shows a typical curve with the induction period at 12 days and the exponential phase between at 12 and 30 days after inoculation. Maximal fresh weight was observed on the 33th day.

3.1.5 안토시아닌 함량 측정

6일 간격으로 안토시아닌 함량을 측정한 결과 생합성량 변화는 lag phase에 안토시아닌 생합성량이 급격히 증가하여 초기배양 시 생합성량 (0.266 mg/mL)에 비해 6일에 0.817 mg/mL로 가장 높은 안토시아닌 생합성량을 보이며, 12일은 0.730 mg/mL, 18일에는 0.556 mg/mL 등으로 낮아져 30일에 0.1 mg/mL으로 가장 낮게 생성 된다 (Fig. 6). 자색 습관성 켈러스를 이용한 이 측정 결과는, 당근의 고체와 액체 배양을 이용한 안토시아닌 생산에서 성장조절제의 내부기작을 연구 중인 Narayan 등 (2005)의 결과 보고 내용인 현탁 배양 후 12일에 안토시아닌 생합성량이 최대인 것과는 약간의 차이가 있다.

자색고구마를 이용하여 안토시아닌의 기내 생산에 대한 연구를 하고 있는 Konczak 등 (2000)의 보고에 따르면, 괴근 유래 cell line으로 2 mg/l의 2,4-D가 첨가된 조건에서 27일간 배양하여 배양 초기의 3.5배의 생합성량을 보인 cell line을 얻은바 있다. 본 실험에서는 배양초기의 4배의 안토시아닌 생합성량을 보여 안토시아닌 기내 생산에 더 효율적일 것으로 판단된다.

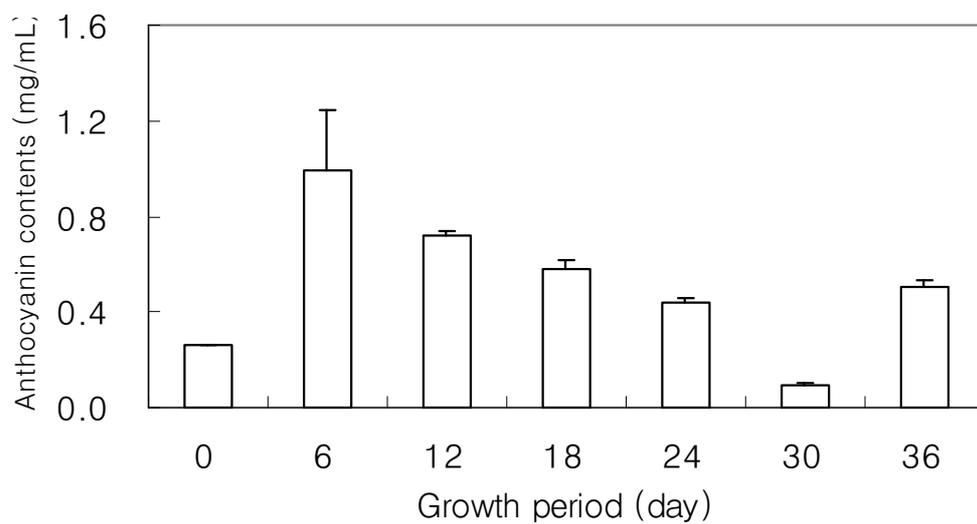


Figure 6. Changes of pigment accumulation in the purple habituated cell-line of purple sweet-potato, maintained in the hormone free MS medium. Bars represent a standard deviation of four replications. The highest anthocyanin content was observed on the 6th day.

3.2 선발된 자색 세포주의 배양조건 확립

3.2.1 배지의 영향

MS, LO, LS, B5배지에서 나타난 켈러스 생체중량과 안토시아닌 생합성에 대한 결과는 Fig. 7에서 보는바와 같다. 배양 12일 후, 켈러스 생체량은 MS배지에서 0.178 g, LO 배지에서 0.217 g, LS 배지에서 0.124 g, B5배지에서 0.192 g 으로 LO 배지에서 2.2배로 가장 많이 증가하였고 MS, B5, LS 배지 순이다. 안토시아닌 생합성량은 MS에서 0.970 mg/mL, LO에서 0.553 mg/mL, LS에서 0.342 mg/mL, B5 배지에서 0.180 mg/mL 으로 MS 배지에서 가장 높게 나타났다.

배양 30일 후, 켈러스 생체량이 MS, LO, LS, B5 배지에서 각각 0.560, 0.399, 0.152, 0.157 g으로 배양 초기와는 달리 MS 배지가 약 6배로 가장 큰 성장을 나타냈으며, 안토시아닌 생합성은 MS, LO, LS, B5 배지에서 각각 0.670, 0.195, 0.279, 0.218 mg/mL로 MS 배지에서 가장 높게 나타났다.

결과적으로 습관성 켈러스는 다른 배지에 비교하여 MS 배지에서 높은 성장률과 안정적인 안토시아닌 생합성량을 나타냈다. 따라서 MS 배지가 선발된 자색 습관성 켈러스를 유지하기에는 적당하다고 판단된다.

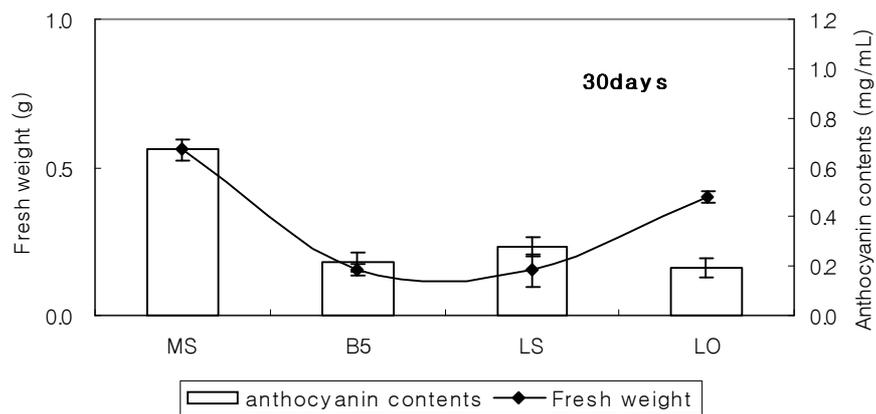
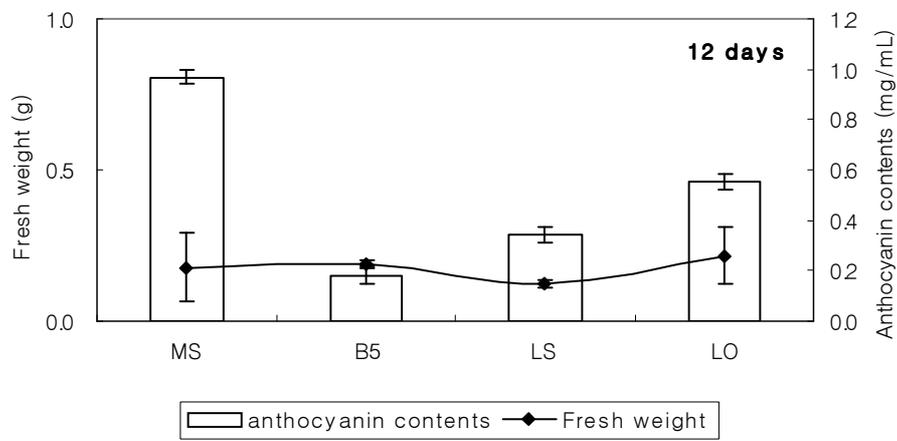


Figure 7. Growth rate of suspension cultures and changes of pigment contents in the purple habituated calli cultured in the various culture media. The results show that the MS medium was the most excellent. **B**ars represent a standard deviation of four replications.

3.2.2 당의 영향

당의 종류와 농도를 달리했을 때 자색 습관성 켈러스의 생체중과 안토시아닌 생합성량 변화를 조사한 결과는 배양 12일 후, 켈러스 성장량은 0, 3, 6, 9% sucrose, 3, 6, 9% glucose에서 각각 0.067, 0.240, 0.107, 0.087, 0.079, 0.065, 0.068 g으로 MS 배지에 기본적으로 첨가되었던 3% sucrose 에서 2.4배의 증가로 가장 많이 성장하였다. 안토시아닌 생합성량은 0, 3, 6, 9% sucrose, 3, 6, 9% glucose에서 각각 0.276, 0.696, 0.477, 0.411, 0.335, 0.652, 0.440 mg/mL으로 3% sucrose 처리 시에 가장 많았다 (Fig. 8A).

배양 30일 후 결과는 Fig. 8B에서 보는 바와 같이 0, 3, 6, 9% sucrose, 3, 6, 9% glucose 처리시의 습관성 켈러스의 생체중은 각각 0.068, 0.700, 0.391, 0.113, 0.070, 0.094, 0.072 g으로 3% sucrose 첨가 시 생체중이 7배 성장하였으며, 안토시아닌 생합성량은 3, 6, 9% sucrose 첨가 시 0.393, 0.435, 0.242 mg/mL로 나타났다.

이 실험 결과는 Nozue (1987) 등이 실시한 자색고구마 괴근에서 유래된 켈러스의 안토시아닌 생성과 생체중량 조사에서 대체로 sucrose 농도가 높을수록 안토시아닌 함량이 높아지며, 세포 생장은 3% sucrose 농도에서 가장 높고, 9% sucrose 첨가 시에서는 안토시아닌 함량과 성장률 모두가 감소한 결과와 유사하였다.

sucrose를 고농도로 함유한 배지에서 세포 성장률이 감소하는 이유는 삼투압의 증가나 배지의 높은 점성도 때문에 영양물질의 흡수가 방해받기 때문이다 (Sato et al. 1996). 결과적으로 당의 영향으로는 3% sucrose 첨가가 선발된 습관성 자색 켈러스의 성장과 유지 및 안토시아닌 생합성에 가장 적합하다고 사료된다.

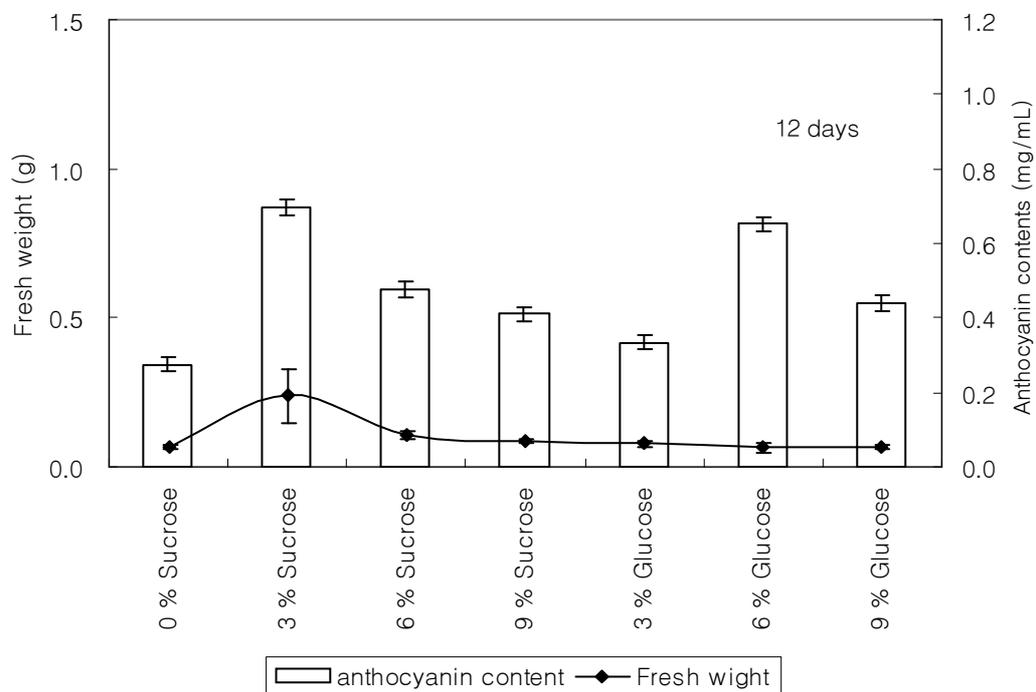


Figure 8A. Effect of various concentrations of sucrose and glucose on anthocyanin content and growth rate in the cell suspension culture of the purple habituated cell-line at 12 days after inoculation. Bars represent a standard deviation of four replications. The highest anthocyanin content and the maximum cell growth were obtained with addition of the 3% sucrose.

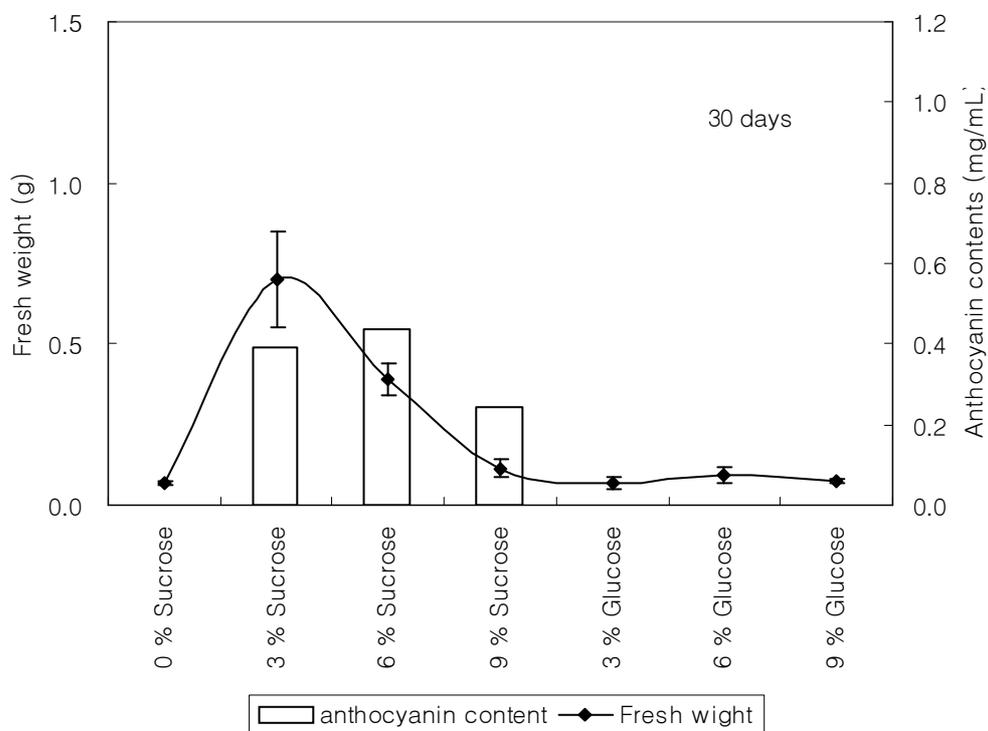


Figure 8B. Influence of various concentrations of sucrose and glucose on the anthocyanin content and growth rate in the cell suspension cultures of the purple habituated cell-line at 30 days after inoculation. Bars represent a standard deviation of four replications. The maximum callus growth was obtained with addition of the 3% sucrose. The highest anthocyanin content was obtained with addition of the 6% sucrose.

3.2.3 접종량의 영향

켈러스 접종량에 따른 성장률에 대한 결과는 Fig. 9와 같다. 배양 12일 후 켈러스 성장 증가율을 보면, 배양액 당 켈러스 비율이 1%의 경우 1.3 배, 2.5% 접종 시 2.8 배, 5%의 경우 2.6 배, 10% 접종 시 2.2 배의 증가율을 보였다.

안토시아닌 생합성량에 있어서도 2.5% 켈러스 접종 시 0.741 mg/mL를 생합성 하여 가장 높게 나타났다. 1 g (10%) 접종 시 배양 배지의 탁한 정도가 다른 처리구보다 심하며 켈러스가 무르게 변화하여 켈러스 조직 갈변과 괴사가 12일 이내에 시작된 것으로 추측된다. 따라서 켈러스 접종량을 배지의 10% 이상으로 할 경우 최대 12일 이내에는 계대배양을 시행해야 할 것으로 판단된다.

배양 30일 후의 생체중량 변화는 1 ~ 10% 접종 시 각각 6.7, 6.5, 4.0, 2.2배 증가하여 0.1% 접종이 30일 가장 장기간 배양 할 경우 유리하게 판단된다 (Fig 9). 안토시아닌 생합성량은 12일에 비교하여 약 50% 감소하여 5% 접종 시 0.442 mg/mL로 가장 양호하게 나타났다. 이는 생장이 낮고 또한 켈러스 유지 형태가 무르게 변화되어 그 이후 계대배양 할 경우 갈변 괴사율이 높아 비효율적이었다.

12일 이내, 즉 단기간에 높은 성장률을 얻기 위해서는 2.5%로 접종하는 것이 생체중량 증가에 효과적이고, 켈러스를 유지시키기 위해서는 1%로 접종하여 성장 속도를 조절하여 계대배양 횟수를 줄이는 것이 효과적인 것으로 판단된다.

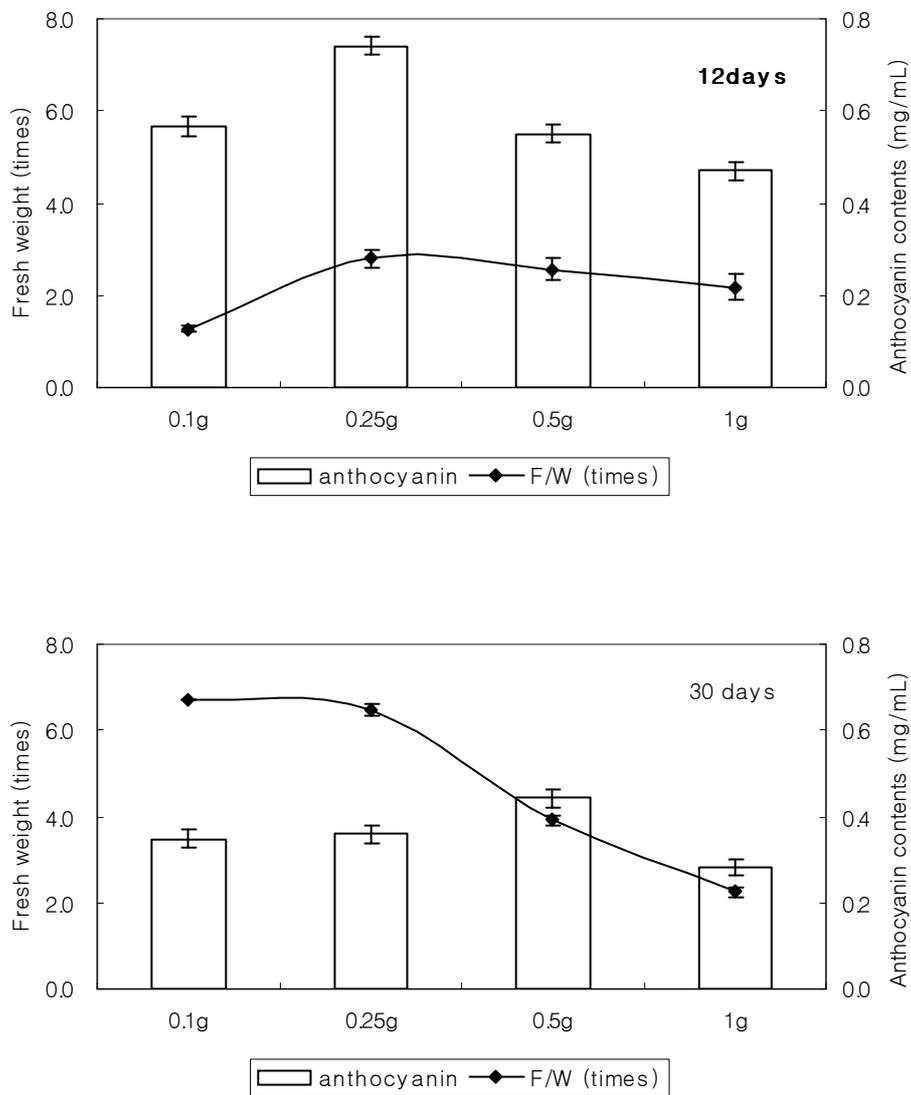


Figure 9. Effects of cell inoculum size on callus growth and anthocyanin contents and growth rate in the cell suspension cultures of the purple habituated calli. Bars represent a standard deviation of four replications.

3.2.4 생장조절제의 영향

1) ABA의 효과

자색고구마 조직배양과 현탁 배양에서 ABA 처리는 2,4-D, BA, jasmonic acid 처리에 비교하여 캘러스 성장과 안토시아닌 색소 생합성에 큰 효과가 없는 것으로 나타났다.

ABA 첨가 시 6일째까지는 거의 변화가 나타나지 않았다. 배양 12일 후, 자색 습관성 캘러스의 생체량은 0, 5, 10, 20, 40 μM ABA 처리구에서 각각 0.406, 0.487, 0.550, 0.633, 0.460 g으로 MS 기본배지 (대조구)의 생체중량에 비교하여 20 μM ABA 처리 시 1.5배 이상 크게 증가하는 높은 성장 결과를 보였다 (Fig. 10). 안토시아닌 생합성량은 0, 5, 10, 20, 40 μM ABA 처리구에서 각각 0.728, 0.602, 0.485, 0.436, 0.516 mg/mL로 MS 기본배지가 높았다. 이 실험 결과는 ABA가 산소와 구리이온의 존재 하에서 안토시아닌을 분해 작용하는 것으로 보고 (Markakis 1982)된 예를 보여준다.

배양 30일 후, 0, 5, 10, 20, 40 μM ABA의 농도에서 생체중은 각각 1.360, 1.684, 1.549, 1.562, 1.430 g으로 특히 5 μM ABA 처리에서 가장 높게 증가했다. 안토시아닌 함량은 12일에 비해 전체적으로 더 낮아져 각각 0.359, 0.373, 0.283, 0.312, 0.251 mg/mL이었다.

ABA 첨가 시 나타나는 효과는 단기간에 높은 성장을 유도 할 수 있는 성장배지로 ABA가 첨가된 배지를 사용한 후, 이를 다시 안토시아닌 생합성능이 높은 생산 배지로 계대 배양하면 안토시아닌을 대량생산 할 수 있을 것으로 기대된다.

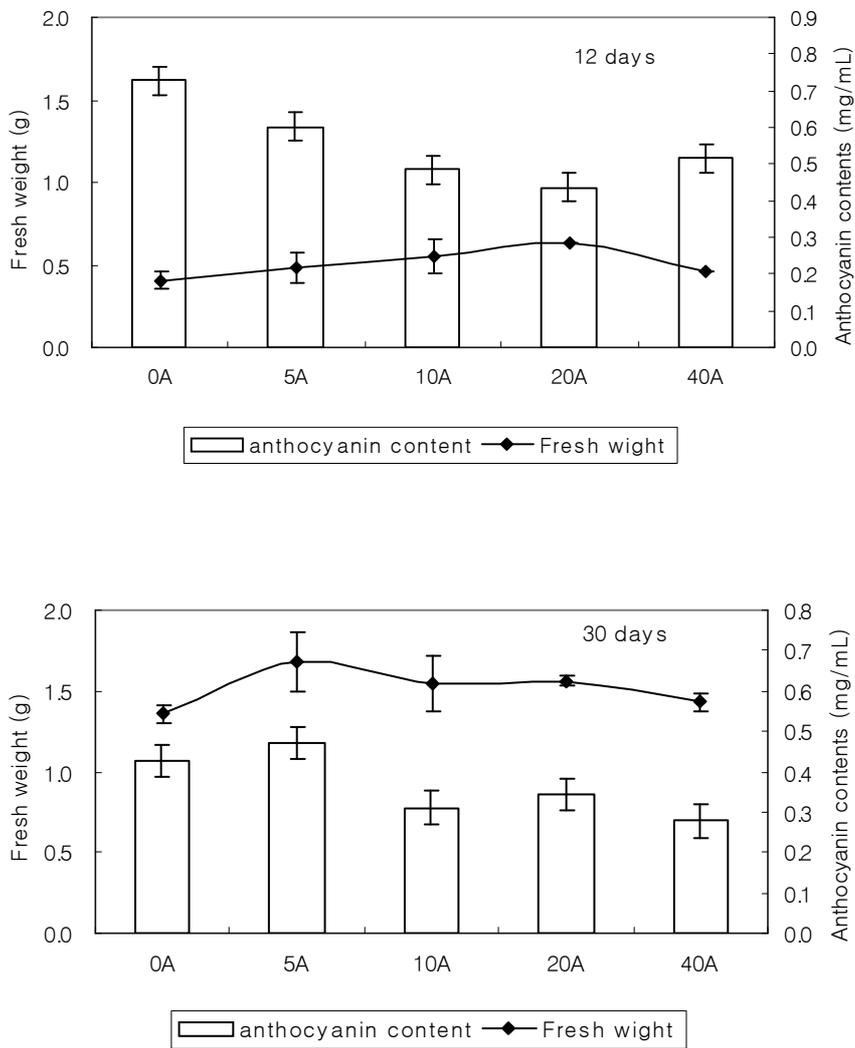


Figure 10. Effect of various concentrations of ABA on the anthocyanin accumulation and growth rate in the suspension culture of the purple habituated cell-line. Bars represent a standard deviation of four replications. The maximum cell growth was obtained with addition of 5 μ M ABA.

2) *Jasmonic acid* 효과

자색 습관성 켈러스에 *jasmonic acid*를 처리한 결과 배양 12일 후 0, 5, 10, 20 μM *jasmonic acid* 처리 시 켈러스 생체량이 0.141, 0.304, 0.210, 0.303 g으로 대조구의 3 배, 안토시아닌 생합성량은 0.460, 1.068, 0.921, 0.905 mg/mL로 대조구의 2.5배 증가하는 결과를 나타냈다 (Fig. 11). 안토시아닌 생합성량의 증가와 더불어 생체중량도 증가된 이 실험 결과는 포도의 현탁 배양에서 *jasmonic acid* 첨가 시 안토시아닌 생합성은 증가하나 켈러스의 성장량은 저해된다는 Zhang 등 (2002)의 보고와는 매우 다른 결과이다.

배양 30일 후에도 켈러스 생체중량은 0, 5, 10, 20 μM *jasmonic acid* 처리 시 각각 1.306, 1.328, 1.412, 1.278 g으로 14배 증가하여 *jasmonic acid*는 켈러스 성장에 아주 효과적이었다. 안토시아닌 생합성량은 각각 0.399, 0.399, 0.335, 0.460 mg/mL로 선발된 습관성 자색 켈러스에서 *jasmonic acid* 처리는 성장량 증가와 안토시아닌의 대량 생산에 많은 도움을 줄 것으로 기대된다.

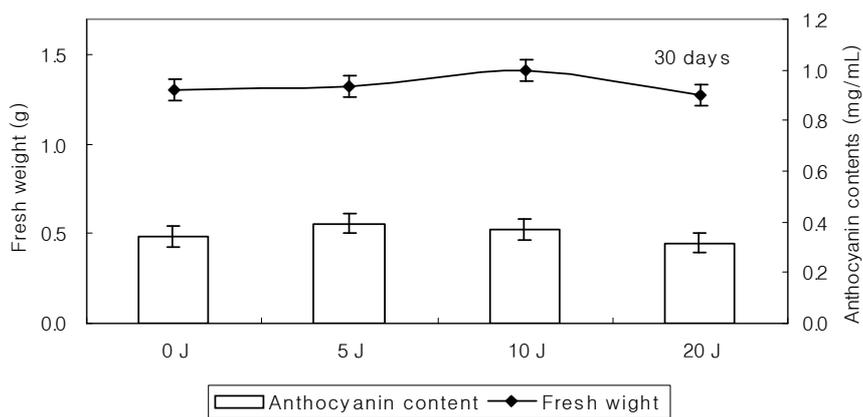
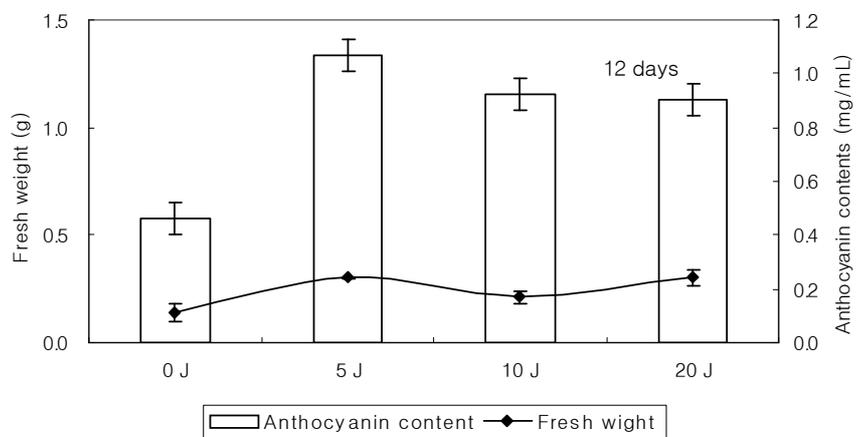


Figure 11. Effect of different concentrations of jasmonic acid on anthocyanin content and growth rate in the suspension culture of the purple habituated calli. Bars represent a standard deviation of four replications. Anthocyanin content was the highest at 5 μ M jasmonic acid.

3.3 자색 습관성 켈러스의 안토시아닌 분석

자미 괴근과 선발된 자색 고탐유 세포주의 안토시아닌을 HPLC 분석하여 비교한 결과, 괴근의 경우 cyanidin glucoside가 7.1 ppm/g, peonidin glucoside가 2.15 ppm/g 함유되어 있는 것으로 조사되어 자색 고탐유 세포의 안토시아닌 함량 분석에서 cyanidin glucoside가 peonidin glucoside보다 많은 양이 함유되었다는 Nozue 등 (1987)의 보고와 일치하나 본 실험에서 선발된 자색 습관성 켈러스는 cyanidin glucoside가 검출되지 않았으며, 단지 peonidin glucoside만 0.55 ppm/g 으로 분석되었다.

spectrophotometer를 이용한 정량분석에서는 자색 고탐유 자미 괴근의 안토시아닌 함량은 1.3 mg/mL 함유되어 있는 것으로 조사되었고, 선발된 자색 습관성 켈러스의 안토시아닌 함량은 1.1 mg/mL 함유되어 있는 것으로 나타났다.

안토시아닌 전체 함량은 유사하나 선발된 자색 습관성 켈러스의 안토시아닌은 본래 괴근의 조직배양에서 생합성 축적된 안토시아닌 종류인 cyanidin glucoside와 peonidin glucoside와는 달리, cyanidin glucoside이 검출되지 않았으며, peonidin glucoside가 소량 검출 되어 안토시아닌 전구체 물질이 상당량 축적되어 있는 것으로 추측되었다. 따라서 자색 습관성 켈러스에 함유된 전구체 물질을 안토시아닌으로 전환시키기 위한 조건 확립이 요구된다.

4. 참고문헌

- Anne LG, Sotta B, Brown S, Jullien M (2000) Amalysis of Habituated embryogenic lines in lines in *Asparagus officinalis* L. growth characteristics, hormone content and ploidy level of calli and regenerated plants. *Plant Science* 160: 15-26
- Blando F, Scardino AP, De Bellis L, Nicoletti I, Giovinazzo G (2005) Chracterization of in vitro anthocyanin-producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus culture. *Food Res Int* 38(8-9): 937-942
- Chalker SL (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem Photobiol* 70: 1-9
- Cantliffe DJ, Liu JR, Schultheis (1987) Development of artificial seeds of sweet-potato from clonal propagation through somatic embryogenesis. In: Smith WH Smith, Frand JR, (eds), *Methane from Biomass: A System Approach*, Elsevier Applied Sci, New York, PP 183-195
- Chee RP, Cantliffe DJ (1988) Somatic embryony patterns and plant regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. *In Vitro Cell Biol* 24: 955-958
- Chee RP, Cantliffe DJ (1988) Selective enhancement of *Ipomoea batatas* Poir embryogenic and non-embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. *Plant Cell Tissue Organ* 15: 149-159
- Chee RP, Cantliffe DJ (1989) Composition of embryogenic susepension cultures of *Ipomoea batatas* Poir and production of indivisualized embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 17: 39-52
- Desamero NV, Rhodes BB, Decoteau DR, Bridges WC (1994) Picolinic acid-induced direct somatic embryogenesis in sweetpotato. *Plant Cell Tissue Organ Cult*

37: 103-111

- Greef DW, Jacobes M (1979) *In Vitro* culture of sugar beet: Description of a cell line with high regeneration capacity. *Plant Sci Lett* 17: 55-61
- Do CB, Cormier F (1991) Effects of high ammonium concentrations on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension cultured in a production medium. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 27: 169-174
- Dodds JH, Merzdorf C, Zambrano V, Siguenas C, Jaynes J (1991) Potential use of *Agrobacterium*-mediated gene transfer to confer insect resistance in sweet potato. In: Jansson RK, Raman KV(eds). *Sweetpotato pest management: a global perspective*. Westview, Boulder, Colo: 203-219
- Forkmann G, Martens S (2001) Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr Opin Biotech* 12: 155-160
- Francis FJ (1987) Lesser-known food colorants. *Food Technology* 41: 61-68
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-8
- Goleniowski ME (2000) Cell lines of *Taxus* species as source of the anticancer drug taxol. *Biocell* 24(2): 137-44
- Grevet AL, Sotta B, Brown S, Jullien M (2000) Analysis of habituated embryogenic lines in *Asparagus officinalis* L.: growth characteristics, hormone content and ploidy level of calli regenerated plants. *Plant Sci* 160: 15-26
- Hari PK, Patel TR, Martin AM (1994) An overview of pigment production in biological systems: function, biosynthesis and applications in food industry. *Food Rev Int* 10: 40-70
- Hiratsuka S, Onodera H, Kawai Y, Kubo T, Itoh H, Wada R (2001) ABA and sugar effects on anthocyanin formation in grape berry cultured in vitro. *Scientia Horticulturae* 90: 121-130

- Jarret RL, Salazar S, Fernandez R (1984) Somatic embryogenesis in sweetpotato. Hortscience 19: 397-398
- 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 20: 2271-2273
- Kintzios S, Drossopoulos J, Manousaridou M, Holevas CD (1996) Competence for callus induction on mature Pepper leaves depends upon specific developmental stages of the donor plant. Scientia Horticulturae 65 : 341-347
- Konczak I, Yoshinaga M, Nakatani M, Yamakawa O, Terahara N (2000) Establishment and characteristics of an anthocyanin-producing cell line from sweetpotato storage root. Plant Cell Rep 19: 472-477
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol Plant 18: 100-27
- Liu JR, Cantliffe DJ (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweetpotato (*Ipomoea batatas* Poir). Plant Cell Rep 3: 112-115,
- Liu JR, Cantliffe DJ, Simonds SC (1989) High frequent somatic embryogenesis from cultured shoot apical meristem domes of sweetpotato (*Ipomea batatas*). SABRAO J 21: 93-101
- Madhavi DL, Smith MAL, Berber-Jimenez MD (1995) Expression of anthocyanins in callus cultures of cranberry (*Vaccinium macrocarpa* Ait.). J Food Sci 60: 351-355
- Markakis P (1982) Stability of anthocyanin in Foods. Academic Press, New York 171
- Meins F (1989) Habituation: heritable variation in the requirement of cultured plant cells for hormones. Annu. Rev. Genet. 23: 395-408
- Meins FJ, Lutz J, Binns AN (1980). Variation in the competence of tobacco pith cells for

cytokinin habituation in culture. *Differentiation* 16: 71-7

- Min SR, Liu JR, Rho TH, Kim CH, Ju Ji (1994) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of Korean cultivar sweetpotato. *Korean J Plant Tissue Cult* 21: 157-160
- Mori T, Sakurai M, Shigeta J, Yoshida K, Konda T (1993) Formation of anthocyanins from cell cultured from different parts of strawberry plants. *J Food Sci* 58: 788-792
- Murashige T, Skoof F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Narayan MS, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N (2005) Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *daucus carota*. *Process Biochemistry* 40(1): 351-358
- Newell CA, Lowe J, Merrywether A, Rooke LM, Hamilton WDO (1995) Transformation of sweetpotato (*Ipomoea batatas*(L.) Lam.) with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin. *Plant Sci* 107: 214-227
- Nozue M, Kawai J, Yoshitama K (1987) Selection of a high anthocyanin-producing cell line of sweetpotato cell cultures and identification of pigments. *J. Plant Physiol* 129: 81-88
- Otani M, Shimada T, Nizeki H (1987) Mesophyll protoplast culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Sci* 53: 157-160
- Otani M, Shimada T (1996) Efficient embryogenic callus formation in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotech* 15: 11-16
- Ozeki Y, Komamine A (1981) Induction of anthocyanin synthesis in relation to

- embryogenesis in a carrot suspension culture: Correlation of metabolic differentiation with morphological differentiation. *Physiol Plant* 53: 570-577
- Park HJ, Ahn YS, Jeong BC, Park HY (2003) Plant regeneration derived from leaf disk cultures in purple sweetpotato. *Kor J Plant Biotech* 30(3): 245-249
- Prakash CS, Varadarajan U (1992) Genetic transformation of sweetpotato by particle bombardment. *Plant Cell Rep* 11: 53-57
- Poder D, Omarzad O, Hagège D (1998) Comparative study of respiratory metabolism in three types of sugarbeet calli, a normal and two habituated ones (organogenic and non-organogenic). *Plant Biology and pathology* 321: 479-483
- Phuc JE, Lindberg B, Ogle, Thomke S (2001) Determination of the nutritive value of tropical biomass products for monogastrics using rats. Part 2. Effects of drying temperature. *Asian-Australian J Anim Sci* 14: 994-1002
- Sato K, Kakayama K, Shigeto J (1996) Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. *Plant Sci.* 113: 91-98
- Scott LC (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem. Photobiol.* 70: 1-9
- Tang F, Li K, Lan L, Zheng Q (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration in sweetpotato. *Acta Agro Sinica* 19: 372-375
- Tsukui A, Kuwano K, Mitamura T (1983) Anthocyanin pigment isolated from purple root of sweetpotato. *Kaisegaku Zasshi* 34: 153
- Valetudie JCL, Guadeloupe P, Colonna B, Bouchet DJ (1995) Gallant gelatinization of sweet potato, tania and yam tuber starches. *Starch* 47 :298
- Winkel SB (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* 126: 485-493
- 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

Yoshimoto M (2001) New trends of processing and use of sweet potato in Japan. *Farming Jpn* 35(6): 22-28

Zhang Wei, Curtin Chris, Kikuchi Mami, Franco Chris (2002) Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Sci.* 162: 459-468