

청피홍심무우 (*Raphanus sativus* cv. Chungpihongsim)의 모상근 배양에 의한 안토시아닌 생성

安俊徹·白允雄·康榮薰*·黃 昶
(全南大學校 自然科學大學 生物學科, *延世大學校 理科學大學 生物學科)

Production of Anthocyanin by Culture of Hairy Roots of *Raphanus sativus* cv. Chungpihongsim

Ahn, Jun Cheul, Yun Woung Paek, Young Hee Kang* and Baik Hwang
(Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju and
Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

ABSTRACT

The hairy root culture of *Raphanus sativus* cv. Chungpihongsim was established by transformation with *Agrobacterium rhizogenes* A₄. The transformed roots grew well in adjusted Murashige and Skoog medium to 1/2 basal salts, pH 5.2, 3% sucrose. Agropine and mannopine, opine synthesized in the transformed tissue were detected in the extract of hairy roots. When 2, 4-D and kinetin were added in culture medium of hairy roots, the synthesis of anthocyanin was induced with disorganization of hairy root. Especially, addition of 0.45 μ M 2, 4-D and 2.3 μ M kinetin showed the maximum synthesis of anthocyanin. Pattern of anthocyanin synthesized in transformed roots was somewhat different from that of ordinary roots. However, aglycone part of all anthocyanin was identified as pelargonidin. The content of total anthocyanin in this sample was tentatively calculated 0.49 mg/g fresh weight.

서 론

식품에 첨가되는 색소는 그 특성상 소량 사용되며 기술 집약적이고 부가가치가 높은 고가 제품인데 그 생산방법에 따라 식물, 동물, 미생물에서 얻어지는 천연물질과 화학적으로 합성되는 합성물질로 대별된다. 천연색소는 일반적으로 안정성이나 선호도가 높은 반면 고가이고 환경적인 제약을 받으므로 공급이 불안정하다는 단점이 있어 저가에 안정적으로 공급될 수 있는 합성물이 대부분을 차지하고 있다. 그러나 이러한 합성색소의 일종인 Tar계 색소는 인체에 유해하기 때문에 우리나라에서도 1966년 이후 식용적색 1호, 4호 등을 규제하였고 최근에는 식용적색 3호의 사용을 규제하고 있다(Ahn *et al.*, 1989). 이러한 규제에 기인하여 천연색소에 대한 관심이 점차 증대되었으며 동시에 식물의 조직배양을 비롯한 관련 생명공학기술이 발전함에 따라 식물세포의 대량배양에 의하여 안토시아닌,

시코닌, 베타시아닌 등의 천연색소를 얻고자 하는 시도가 활발히 이루어지고 있다(Fujita *et al.*, 1987; Ozeki and Komamine, 1981; Girod and Zyrd, 1991; Kim and Yu, 1991).

그 중 안토시아닌은 식물의 꽃, 과일, 잎 등에 널리 존재하는 식물의 주요 색소원으로서 포도 또는 당근의 조직에서 유도된 칼루스 배양을 통하여 안토시아닌을 생성하려는 시도가 50년대 이후 계속되어 오고 있으며 배양 환경의 조절에 따라 색소의 생성능을 촉진시키기도 하였으나(Do *et al.*, 1989, 1991) 시코닌의 경우처럼 아직껏 상업적인 접근이 가능할 정도의 생산성을 이루진 못하였다.

한편, *Agrobacterium rhizogenes*가 가지고 있는 Ri-plasmid의 일부 유전자(T-DNA)가 식물체의 게놈내에 삽입되어 발현된 유전자의 일부산물이 식물호르몬의 생합성에 관여하므로써 유도된 부정근인 모상근의 배양을 통하여 약용, 방향성물질, 살충제, 색소 등의 다양한 2차대사산물을 얻고자 하는 많은 연구가 진행되고 있으며 대부분의 연구

에서 이들 모상근은 호르몬이 없는 배지에서 무한정 증식이 가능하고 지속적인 계대배양에도 유전적으로 안정하며 (Aird *et al.*, 1986; Christen *et al.*, 1989) 원 식물의 뿌리에 비교될 수 있는 수준으로 2차 대사산물을 합성 및 축적하는 것으로 보고되고 있다(Knopp *et al.*, 1988; Matsui *et al.*, 1986; Christen *et al.*, 1989).

본 연구에서는 이러한 모상근 system을 이용하여 안토시아닌의 생산 가능성 확인을 목적으로 뿌리에 안토시아닌을 축적하는 품종으로 알려진 청피홍심무우(일명 red radish)를 재료로 모상근을 유도 및 배양하였으며, 배양조건에 따라서는 다량의 색소형성을 보였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료 및 사용균주. 청피홍심무우(*Raphanus sativus* cv. Chungpiphongsim)의 종자를 무균 발아시킨 유식물체와, 포장에 8월에 파종하여 11월에 수확한 뿌리를 70% (v/v) ethanol로 10분, 5% (v/v) NaOCl 용액에 15분간 살균한 다음 무균수로 3회 세척하여 균점종에 이용하였다.

사용균주는 *Agrobacterium rhizogenes* A₄ strain이며, 감자추출배지(potato 2%, sucrose 1.5%, agar)로 27°C 암소에서 2일간 배양하여 무균수로 약 10⁸ bacteria/ml로 희석하여 사용하였다.

모상근의 유도 및 배양. 유식물체는 1~2 cm 길이로 절단하여 절단부위에 균을 접종하였으며, 표면살균한 뿌리는 0.5~1 cm 두께로 자른다음 기부면에만 균을 접종하여 항생제(cefotaxime 300 mg/l)가 첨가된 MS 고형배지(Murashige and Skog, 1962)에 치상하여, 27°C, 암소에서 모상근을 유도하였다. 유도된 모상근은 생장점에서 1~2 cm 부위만을 절취하여 항생제를 함유한 고형배지에 계대배양하여 균을 제거한 다음 항생제가 없는 액체배지로 3주간격으로 계대배양하였다.

배지별 생장비를 조사하기 위하여 MS, AA(Müller and Grafe, 1978), N₆(Chu *et al.*, 1975), White(White, 1963) 등의 배지를 사용하였으며, MS 배지를 기본배지로 하여 pH의 변화, sucrose 및 기본염의 농도변화에 따른 모상근의 생장에 미치는 효과를 조사하였다.

조사방법은 30 ml의 배지를 함유한 100 ml 삼각플라스크에 0.5 g(f.w.)의 모상근을 접종하여 회전교반기(60 rpm)에서 3주간 진탕배양한 후 생중량을 측정하였다.

Opine 분석. Mannopine과 agropine의 분석은 Petit 등(1986)의 방법에 의하였다. 1 g(f.w.)의 시료를 1 ml의 에탄올을 용매로 균질화한 다음 15000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액만을 Freeze dryer에서 감압증발시킨 후 20 µl의 증류수로 재용해시켜 5~10 µl를 Whattman 3

MM paper에 점적하고 horizontal electrophoresis system (LKB CO. Model 2217)를 사용하여 1500 V로 50분간 전기영동하였다. 완충용액은 formic acid : acetic acid : distilled water를 30 : 60 : 910의 비율로 조성하였고 전기영동이 끝난 후 paper를 건조, 염색액 A(1 g AgNO₃를 소량의 증류수에 녹인 후 200 ml의 acetone을 가한다)에 담구어 30분 정도 염색시킨 다음 다시 건조, 염색액 B(2% NaOH in MeOH)에 담구어 발색건조하여 NH₄OH로 여분의 AgNO₃를 씻고 5% Na₂S₂O₃ 용액에 고정하여 1시간 이상 흐르는 물로 세척하였다. 대조구로는 무균 발아시킨 유식물체의 뿌리조직만을 시료로 하였으며 표준 mannopine은 Sigma에서 구입하였으며 agropine은 mannopine을 재료로 합성하여 사용하였다(Petit *et al.*, 1983).

호르몬 첨가에 따른 안토시아닌 형성. 2, 4-D의 0, 0.45, 0.9, 1.35, 2.25 µM의 농도와 kinetin의 0, 0.46, 0.92, 1.38, 2.3 µM의 농도를 조합한 고형배지에 계대배양한 후 3일 경과한 생장이 활발한 모상근을 점종하여 암상태에서 각 처리구의 색소 형성능을 조사하였다.

안토시아닌 추출 및 분석. 시료는 1% HCl/methanol을 용매로 마쇄하여 24시간 냉암소에 보관하였다. 냉암소에서 추출된 색소액은 여과한 후 30±5°C에서 감압농축하여 그 양을 줄인 다음 Fig. 1에서 처럼 Yoon 등(1978)의 방법에 따라 ethyl ether, ethyl acetate 순으로 세척하여 안토시아닌을 분리 정제하였다. 분리된 색소는 polyphenol의 제거를 위하여 chloroform를 처리하였으며, 색소층은 감압농축하여 Amberite CG-50를 충진한 칼럼에 주입하여 증류수로 수용성 당류, 유기산, 아미노산 등을 제거하였다. 다음에 0.25% HCl/methanol로 흡착된 색소를 용출하여 감압농축하였다. Aglycone은 농축된 색소 1~2 mg에 2 N HCl을 1~2 ml 가하여 100°C에서 1시간 동안 가수분해한 후 isoamyl alcohol 1 ml를 첨가하여 glycosides로부터 분리하였다. 색소의 분석은 UV-Vis spectrophotometer(Gilford Model Response)를 통한 200~600 nm의 scanning과 5% AlCl₃의 첨가 후 최대흡수파장(λ_{max})의 이동 등의 색소의 광학적 특성과 Table 1에 표시된 전개용매를 이용하여 paper chromatography(Whattman No. 1)를 통한 뿌리추출색소와 조직배양에서 형성된 색소의 전개양상의 비교 및 Thin layer chromatography(Silica gel 60 F₂₅₄)로는 제라늄(*Pelargonium inquinans* AIT)의 꽃에서 추출한 색소의 aglycone인 pelargonidin를 표준물질로 하여 R_f값을 비교하는 등의 방법을 사용하였다.

총 안토시아닌 함량은 2, 4-D와 kinetin이 각각 0.45, 2.3 µM 첨가된 배지에 모상근을 배양하여 2주 경과한 시료를 상기 방법에 의하여 추출한 1% HCl/methanol의 색소용액을 같은 용매로 추출한 Cranberry 안토시아닌의 extraction coefficient(E_{1cm}^{1%}=98.2 at 535 nm)를 이용하여 계산

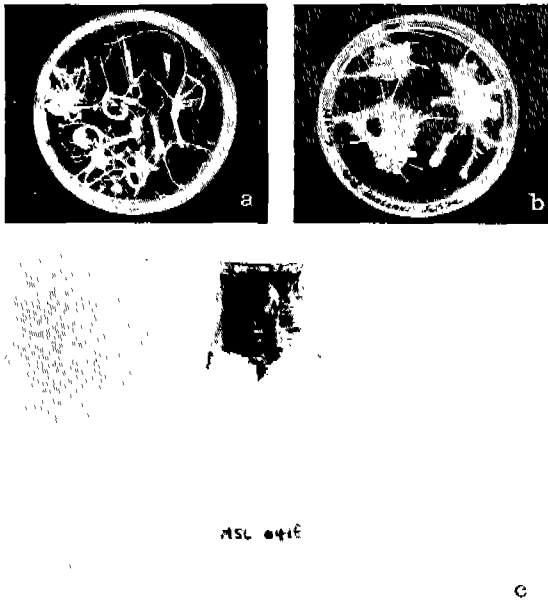


Fig. 2. a, Hairy rot induced from plantlet fragment of *R. sativus*; b, Hairy roots induced from root discs of *R. sativus*; c, Hairy root culture in a liquid medium.

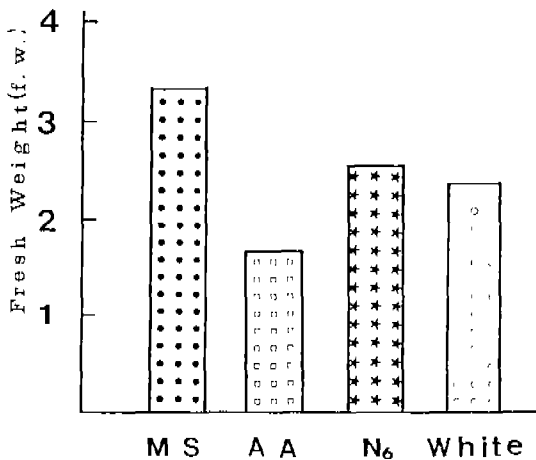


Fig. 3. Effect of various media (sucrose 3%, pH 5.8, white pH 4.8) on growth of hairy roots. 0.5 g (f.w.) of hairy roots was inoculated and cultured for 3 weeks.

Opine의 확인. Agropine type인 *A. rhizogenes* A₄ strain에 의하여 형질전환된 조직에서 합성되는 특이한 화합물인 mennopine과 agropine의 존재 유무를 확인한 결과 형질전환된 모상근에서만 표준시료로 사용한 mannopine, agropine과 같은 위치에서 염색된 band를 확인할 수 있었으며, 반면에 형질전환되지 않은 조직인 대조구에서는

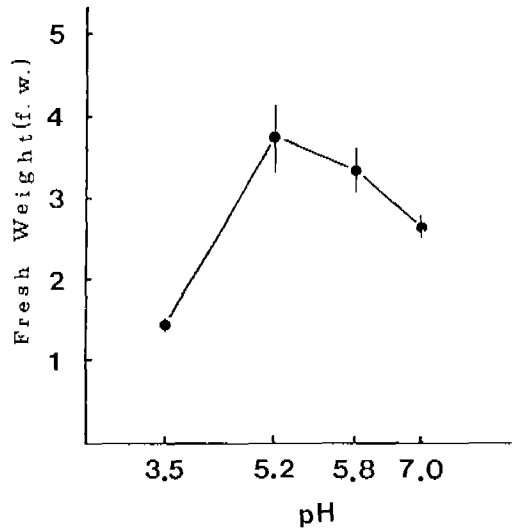


Fig. 4. Effect of pH (MS basal medium, sucrose 3%) on growth of hairy roots. 0.5 g (f.w.) of hairy roots was inoculated and cultured for 3 weeks.

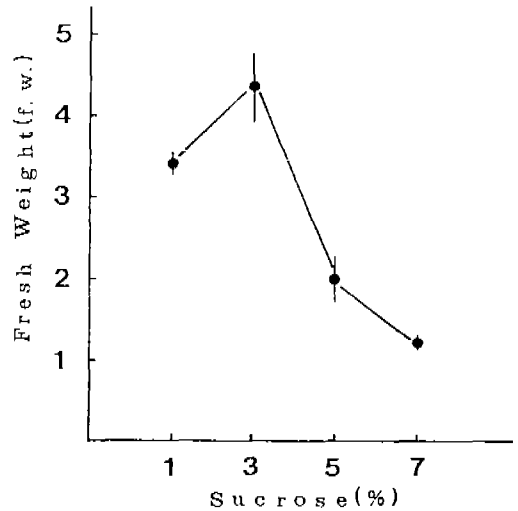


Fig. 5. Effect of sucrose (MS basal medium, pH 5.2) on growth of hairy roots. 0.5 g (f.w.) of hairy roots was inoculated and cultured for 3 weeks.

동일한 위치에서 band가 존재하지 않음을 확인하였다(Fig. 7).

호르몬 첨가에 따른 색소 형성. 2,4-D를 0.45, 0.9, 1.35, 2.25 μ M의 농도별로 첨가할 경우 0.45, 0.9 μ M에서는 칼루스는 형성하나 색소의 형성은 일어나지 않았으며 1.35, 2.25 μ M의 경우는 칼루스의 형성 및 색소의 형성 모두 일어나지 않았다. Kinetin의 경우는 0.46, 0.92, 1.38 μ M

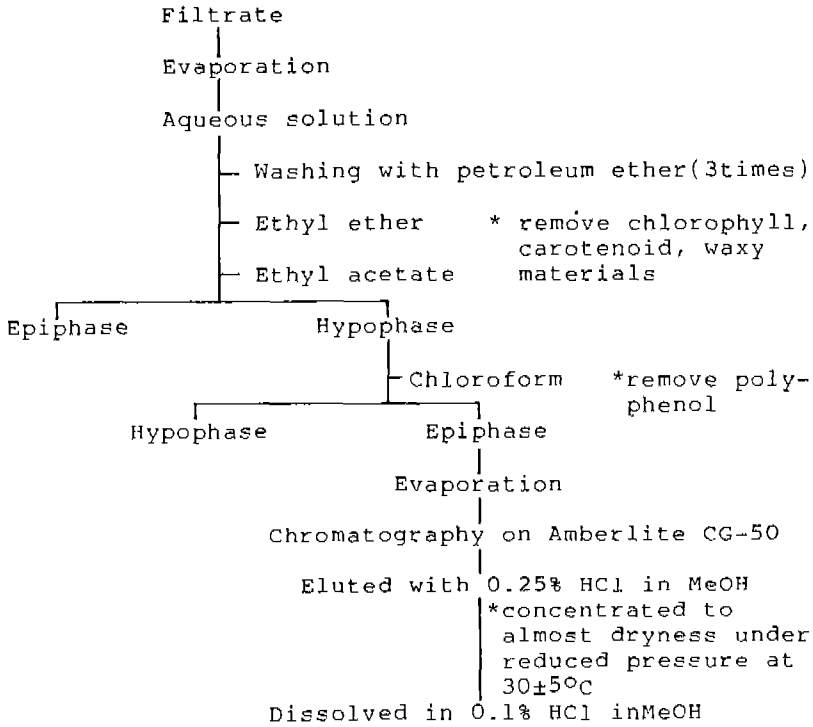


Fig. 1. Flow diagram for the separation of *Raphanus sativus* anthocyanins by organic solvents and column chromatography.

Table 1. Solvent systems used for chromatography

Abbreviations	Phase used	Composition(V/V)
BFW ^a	Upper phase	n-butanol : formic acid : water(100 : 25 : 60)
BAW ^a	Upper phase	n-butanol : acetic acid : water(4 : 1 : 5)
1%HCl	Miscible	water : concHCl(97 : 3)
IBAW	Miscible	isobutanol : acetic acid : water(8 : 2 : 3)
AWH	Miscible	acetic acid : water : concHCl(15 : 82 : 3)
Forestal	Miscible	acetic acid : water : concHCl(30 : 10 : 3)

^aBAW and BFW were used within 1~2 hr of mixing for R_f value measurement.

하였다(Fransis, 1982).

결과 및 고찰

모상근 유도 및 배양. 유식물체와 뿌리절편 모두에서 균을 접종한 후 2~3주 경과했을 때 절단면의 균집중부위에서 모상근이 유도되었다(Fig. 2a, b). 항생제가 첨가된 고형배지에서 2주간 배양하여 균은 제거되었으며, 액체진탕배양에서 보다 활발한 성장을 보였다(Fig. 2c). Fig. 3은 모상근의 배지별 성장비를 조사한 것으로 그 중 MS 배지가 가장 적합하여 Hwang 등(1989, 1990)에 의한 당근, 도라

지의 경우와 일치하였으며, pH는 5.2(Fig. 4), sucrose는 3% (Fig. 5)에서 최적생장을 보여 당근의 경우 pH 4~8의 넓은 범위에서도 모상근의 성장에 큰 차이가 없는점과 sucrose 농도는 당근 5%, 도라지 6%에서 최적생장을 보인점에 다소 차이가 있음을 보여주었다. Fig. 6는 MS 배지의 염농도의 변화에 따른 성장을 비교하여 본 것으로 기본 염농도를 1/2로 희석한 농도에서 최적생장을 보여 Parr 등(1988)의 *Catharanthus roseus* 모상근 배양에서 B₅ 배지의 염농도를 1/2로 희석하여 생장이 가능하였던 점 등 중에 따른 모상근의 배양시 최적 염농도에 차이가 있음을 보여주었다.

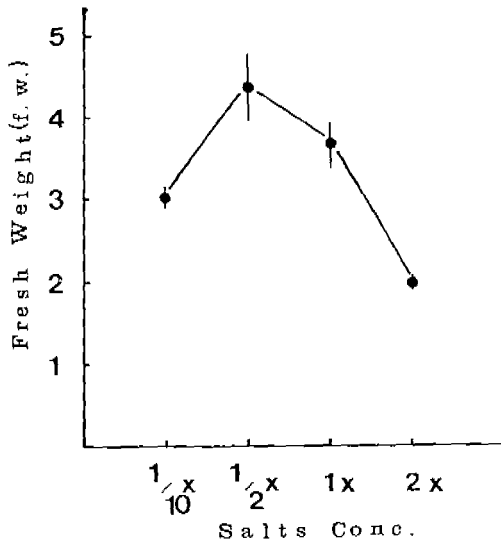


Fig. 6. Effect of salt concentration (MS basal medium, sucrose 3%, pH 5.2) on growth of hairy roots. 0.5 g (f.w.) of hairy roots was inoculated and cultured for 3 weeks.

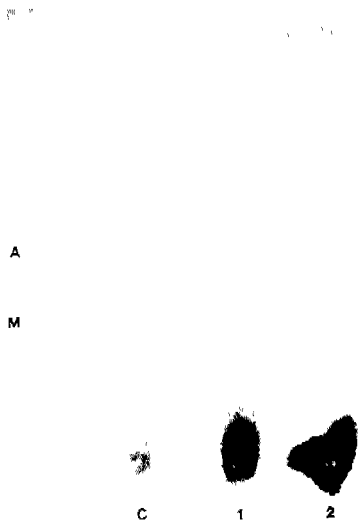


Fig. 7. Paper electrophoresis of extracts from ordinary and hairy roots of *R. sativus*. M, Authentic mannopine; A, Authentic agropine; Lane C, Ordinary root; Lane 1, 2, Hairy root.

첨가의 경우에 대조구보다는 저조하지만 모상근은 생장하였고 2.3 μ M 첨가의 경우 모상근의 생장은 정지되었으며

Table 2. Effects of 2,4-D and kinetin on synthesis of anthocyanin in hairy root of *Raphanus sativus*

kinetin(μ M)	2,4-D(μ M)	0	0.46	0.92	1.38	2.30
0	-	HG	HG	HG	HG	HG
0.45	+	CF	CF	CF	CF	CF
0.90	-	CF	CF	CF	CF	CF
1.35	-	NCF, NCH	CF	CF	CF	CF
2.25	-	NCF, NCH	CF	CF	CF	CF

CF, callus formation; NCF, non callus formation; HG, hairy root growth; NHG, non hairy root growth. Anthocyanin accumulation: -, none; +, rate; ++, moderate; +++, good; +++++, excellent.

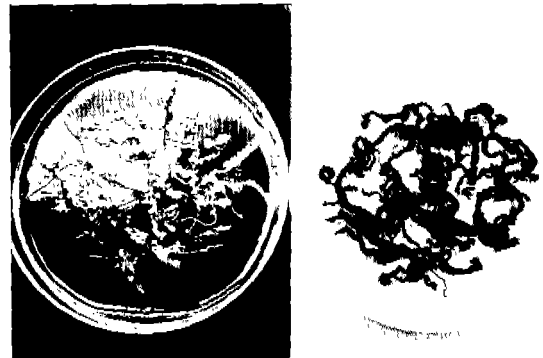


Fig. 8. Disorganization and anthocyanin appearance in *R. sativus* hairy roots following culture of hormone free (Left) and its transfer into medium containing 2,4-D 0.45 μ M and kinetin 2.30 μ M (Right).

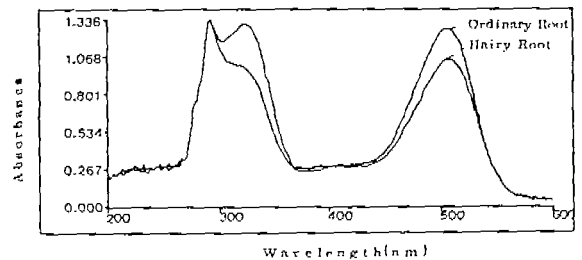


Fig. 9. Spectrometric scanning (200~600 nm) of 0.01% HCl/methanol extract (anthocyanin). The crude extracts obtained from callus induced in hairy roots and ordinary roots of *Raphanus sativus*.

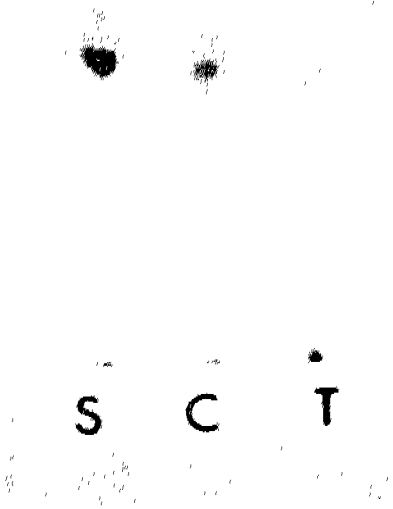


Fig. 10. Thin layer chromatogram of aglycone isolated from anthocyanin in ordinary and hairy roots of *R. sativus*. S, Authentic pelargonidin; C, Ordinary root; T, Hairy root.

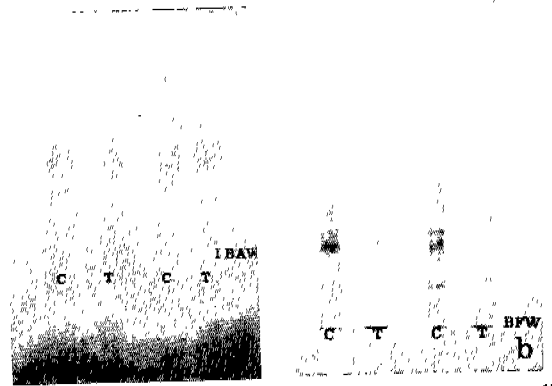


Fig. 11. Paper chromatogram of anthocyanin from ordinary and hairy roots in *R. sativus*. Paper, Whatman NO. 3 MM; Solvent, a, IBAW; b, BFW; C, ordinary root; T, hairy root.

형성과정에서 유도되는 색소는 292, 316, 508 nm에서 흡수 peak를 보여 약간 다른 양상을 보이고는 있지만, 510~530 nm에 흡수 peak의 특성을 이루는 안토시아닌임을 확인하였다. 이러한 색소는 AlCl_3 의 첨가에 따른 최대흡수파장 (λ_{max})의 무변화 및 제라늄의 꽃에서 추출한 색소의 aglycone인 pelargonidin를 표준물질로 하여 BAW를 전개용매로 TLC 하였을 때 동일한 R_f 값을 보여(Fig. 10) 뿌리와 모상근의 탈분화시 유도되는 색소는 모두 pelargonidin 계열의 색소임을 알 수 있었다. 색소를 Fig. 11에서와 같이 PC 하였을 때 뿌리의 추출색소와 시험관 내에서 유도된 색소의 전개양상은 다소 차이를 보였으며, 이러한 차이와 acyl화의 유무를 나타내는 UV 영역에서 흡광도에 차이가 있는 것으로 보아, pelargonidin에 결합된 배당체의 종류 및 수와 acyl화의 유무 및 종류에 기인한 어느 정도의 차이가 있는 것으로 생각되며, 기내 배양조건에 따른 안토시아닌 조성의 변화를 조사한 Do와 Cormier(1991)의 보고에서 처럼 배양조건 및 특정 stress에 기인한 색소의 분포가 변할 것으로 사료된다.

모상근의 탈분화와 동시에 유도된 안토시아닌 함량은 0.49 mg/g(f.w.)로 계산되었으며, 이는 안토시아닌 함유량이 풍부한 품종인 꽃 일 멘드라미 꽃 일 부분의 1.02 mg/g(f.w.) (Yoon *et al.*, 1978)의 색소함량에 비교되는 비교적 높은 안토시아닌 함량을 생성하였다.

적 요

A. rhizogenes A₁ 균주를 접종하여 청피홍심무우(*Raphanus sativus* cv. Chungpihongsim)의 모상근 배양을 확립하였다. 형질전환된 뿌리는 MS 배지의 기본염을 1/2로 희석하고, pH는 5.2, sucrose는 3%로 조정된 배양조건에서

칼루스화는 일어나지 않았으나 모상근에 소량의 색소가 축적되었다. 2,4-D와 kinetin이 조합될 경우 뿌리의 탈분화, 즉 칼루스화가 일어났으며 동시에 색소도 축적되기 시작하여 계대배양 후 15일 정도 경과하면 최대 색소축적을 보였고 그 중, 2,4-D와 kinetin의 각각 0.45, 2.3 μM 처리구에서 최대 색소농을 보였다(Table 2). Fig. 8에서는 모상근을 접종하여 2주 경과한 호르몬을 첨가하지 않은 대조구와 2,4-D, kinetin의 각각 0.45, 2.3 μM 처리구에서의 색소형성에 차이를 보여주었다. 이러한 호르몬 처리에 따른 색소형성은 3주 이후에는 색소축적이 없는 세포의 분열로 이어져 전체적인 색소축적은 감소되었다. 당근 세포배양에서 2,4-D는 안토시아닌 합성에 저해효과를 보였으며, 반면에 zeatin을 비롯한 cytokinin류는 색소형성을 촉진하였다는 Ozeki 등(1981)의 보고와는 달리 두가지 호르몬의 적절한 조합에 따라 색소가 형성되며 2주 정도에 색소는 최대 축적을 보이고 이후 다시 퇴화하는 것으로 보아 2,4-D와 kinetin의 조합에 의한 호르몬 작용에 의하여 뿌리의 탈분화에 기인한 어떤 stress가 색소의 발현을 일시적으로 유도하는 것으로 사료된다.

안토시아닌 추출 및 분석. 정제된 색소를 0.01% HCl/methanol로 용해시켜 200~600 nm의 흡광도 spectrum을 비교하여 볼 때(Fig. 9) 292, 324, 506 nm에서 흡수 peak를 보이는 뿌리의 추출색소에 비하여 모상근의 칼루스

최적생장을 보였다. 형질전환된 조직에서 합성되는 물질인 opine, 즉 agropine과 mannopine이 모상근의 추출액에서 검출되었다. 배지에 2, 4-D와 Kinetin이 첨가될 경우 모상근의 탈분화와 더불어 세포내에 안토시아닌의 합성이 유도되었으며, 그 중 2, 4-D 0.45 μ M과 kinetin 2.3 μ M의 첨가에서 최대의 색소 축적능을 보였다. 모상근의 탈분화와 함께 유도되는 안토시아닌의 paper chromatography 전개 양상은 경작뿌리에서 추출한 색소에 비하여 다소 차이를 보였지만 모든 안토시아닌의 aglycone은 pelargonidin으로 확인되었다. 이러한 시료의 총 안토시아닌 함량은 0.49 mg/g(f.w.)로 계산되었다.

참 고 문 헌

- Ahn, I.O., K.T. Choi and B.D. Kim. 1989. Identification of anthocyanin pigments from the tissue of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Kor. J. Plant Tissue Cult.* **16**: 115-122.
- Aird, E.L.H., J.D. Hamill and M.J.C. Rhodes. 1988. Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **15**: 47-57.
- Christen, P., M.F. Roberts, J.D. Phillipson and W.C. Evans. 1989. High-yield production of tropane alkaloids by hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. *Plant Cell Reports* **8**: 75-77.
- Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu and F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* **18**: 659-668.
- Do, C.B. and F. Cormier. 1991. Effects of low nitrate and high sugar concentration on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. *Plant Cell Reports* **9**: 500-504.
- Do, C.B., Cormier and H.A. Crevier. 1989. Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. *Can. J. Bot.* **68**: 1822-1825.
- Francis, J.F. 1982. Analysis of anthocyanins. In: Anthocyanin as Food Colors, P. Markakis (ed.). Academic Press, London. pp. 181-208.
- Fujita, Y., Y. Hara and T. Morimoto. 1987. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. V. Difference in the production between callus and suspension cultures. *Plant Cell Reports* **6**: 8-11.
- Girod, P.A. and J.P. Zryd. 1991. Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: Differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* **25**: 1-12.
- Hwang, B., B.R. Kim and J.H. Lee. 1990. Culture of hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* in *Platycodon grandiflorum* DC. *Korean J. Bot.* **33**: 183-188.
- Hwang, B., J.C. Ahn and J.H. Lee. 1989. Physiological studies on the formation of hairy root by the *Agrobacterium rhizogenes*. IV. Culture of hairy root and survey of the culture condition. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **4**: 246-252.
- Kim, S.G. and H.J. Yu. 1991. Production of shikonin derivatives by cell lines of *Lithospermum erythrorhizon*; selection for high shikonin production in lines of single cell origin. *Korean J. Plant Tissue Cult.* **18**: 313-321.
- Knopp, E., A. Strauss and W. Wehrli. 1988. Root induction on several Solanaceae species by *Agrobacterium rhizogenes* and the determination of root tropane alkaloid content. *Plant Cell Reports* **7**: 590-593.
- Matsui, C., Y. Mano., S. Nabeshima and H. Ohkawa. 1986. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2715-2722.
- Müller, A.J and R. Grafe. 1978. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.* **161**: 67-76.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Ozeki, Y. and A. Komamine. 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.
- Parr, A.J., A.C.J. Peerless, J.D. Hamill, N.J. Walton, R.J. Robins, and M.J.C. Rhodes. 1988. Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports* **7**: 309-312.
- Petit, A., A. Berkaloff and J. Tempe. 1986. Multiple transformation of plant cells by *Agrobacterium* may be responsible for the complex organization of T-DNA in crown gall and hairy root. *Mol. Gen. Genet.* **161**: 67-76.
- Petit, A., C. David, G.A. Dahl, J.G. Ellis and P. Guyon. 1983. Further Extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.* **190**: 204-214.
- White, P.R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. 2nd. edition. Ronald Press, New York.
- Yoon, J.H., S.J. Lee and K.S. Kim. 1978. Studies on the utilization of plant pigments. I. Isolation and identification of anthocyanin pigments in *Ganges amaranth*. *Kor. J. Sci. Technol.* **10**: 194-202.