

## 배지응고제가 시호캘러스의 Saikosaponin 함량에 미치는 영향

성락선

식품의약품안전본부 생약규격과

### Effects of Gelling Agents on the Saikosaponin Content of *Bupleurum falcatum* Callus

Rack Seon Seong

Department of Herb Drug Standardization, Korea Food and Drug Administration, Choongbuk 373-850, Korea

**Abstract** - In order to product the saikosaponin which is one of the secondary product from *Bupleurum falcatum* efficiently through the tissue culture, several levels of agar and gellan gum as the gelling agent, 2,4-D as the growth regulator, and L-phenylalanine as the precursor were used with single or combination treatment on MS basal medium. Gellan gum was more effective than agar as the gelling agent in fresh and dry weight increase of callus induced from *Bupleurum falcatum* leaf segment. Gellan gum medium supplemented with L-phenylalanine produced 1.6 times of fresh weight more than that of agar. The fresh weight was remarkably high in gellan gum when the calli was treated with the combination of 2,4-D and L-phenylalanine similar to the single treatment of 2,4-D or L-phenylalanine. However, the saikosaponin content in callus was high in gellan gum with the single treatment of L-phenylalanine. Especially, the saikosaponin content in gellan gum supplemented with 1.0m g/L L-phenylalanine was 2 times(2.4 mg/g) higher than that in agar medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D(0.9 mg/g).

**Key words** - Gelling agents: L-phenylalanine; 2,4-D; saikosaponin.

배지의 물리성은 배지내 물질의 흡수, 이동, 보수력, 삼투압 등을 조절하여 캘러스 형성과 식물체 재분화에 커다란 영향을 미치는 요인중의 하나로서 인식되어지고 있다<sup>1)</sup>. 고체배지에 이용되는 배지 응고제로서 흔히 agar와 gellan gum을 이용하고 있는데, 벼 약배양에는 agar의 농도가 1.6%일때 식물체 재분화율이 증가하지만<sup>2)</sup> 경우에 따라서는 agar보다 0.8% gellan gum 첨가배지가 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 효과적일 경우도 있다.<sup>3)</sup> 또한 *Gossy-*

*pium hirsutum*의 배측배양에서 agar보다 gel-rite를 사용하므로써 캘러스를 효과적으로 유도할 수 있으며,<sup>4)</sup> *Olearia microdisca*의 shoot배양을 통해 보면 gellan gum의 농도가 높아짐에 따라 vitrification에 영향을 미치는 것으로 나타남으로써<sup>5)</sup> 배지 응고제의 종류와 처리농도가 캘러스의 형성과 분화에서 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있다. 그러나 배지 응고제에 따라서 이차대사산물의 함량에 영향을 미친다고 보고한 예는 아직 없는 것 같다.

따라서 본 실험은 시호(*Bupleurum falcatum*

\*교신저자 : Fax 0475-33-9118

L.) 켈러스 배양을 통하여 saikosaponin의 효율적인 생산을 위하여 배지내에 배지 응고제로서 agar와 gellan gum의 처리에 따른 켈러스 형성상태와 2,4-D 및 L-phenylalanine의 첨가에 의한 응고제와의 상호 작용에 따라 saikosaponin함량에 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

**켈러스의 유도 및 배양** - Jo 등<sup>6)</sup>의 실험에 사용한 시호(*Bupleurum falcatum* L.) 종자를 24시간 동안 증류수에 침지시킨 뒤 vermiculite를 채운 화분에 파종하여 25±1°C, 1,900 lux 연속형광하에서 50일간 재배하여 엽장이 40~50 mm정도된 잎을 채취하여 70% 에틸알콜에 1분간 일차살균한 후 2% sodium hypochlorite에 10분간 표면살균시킨 다음 멸균수로 씻어 절편의 크기를 4×5 mm로 하여 MS기본배지에 치상하였다. Agar 8 g/L, sucrose 30 g/L를 첨가하여 조제된 배지는 pH 5.6으로 조정된 후 121°C에서 15분간 멸균한 다음, 250 mL 삼각플라스크에 50 mL씩 분주하여 치상하였다. 배양 조건은 종자 파종시와 동일하게 하였다.

생장조절물질과 전구물질의 영향을 밝히기 위하여 MS기본배지에 2,4-D는 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/L의 농도로, L-phenylalanine은 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L로 단독처리하였으며, 또한 2,4-D 0.1 및 1.0 mg/L와 L-phenylalanine 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/L를 조합처리하여 8주간 배양한 후 켈러스의 성장상태 및 saikosaponin 분석을 실시하였다.

**켈러스의 배양** - 배지 응고제와 성장조절물질에 따라서 켈러스의 배양에 미치는 영향을 밝히기 위하여 MS기본배지에 성장조절물질로서 2,4-D를 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/L의 농도로 처리한 것과, L-phenylalanine 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L로 처리한 것에 agar(BACTO-AGAR, DIFCO LAB., USA) 8g/L와 gellan gum(PHYTAGEL, SIGMA CHEM. Co., USA) 2 g/L를 각각 넣어 8주간 배양하여 배양상태를 관찰하였다. 또한 성장조절물질과 전구물질의 조합처리라 하더라도 배지 응고제를 다르게 사용하므로써 켈러스 유도 및 형성에 있어서 나타나는 영향을 조사하기 위하여 2,4-D 0.1, 0.2,

0.3 mg/L에 L-phenylalanine 0.1, 1.0, 2.0 mg/L와 조합한 것은 agar배지에, L-phenylalanine 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 mg/L와 조합한 것은 gellan gum배지에 위와 동일 조건에서 배양하였다.

**Saikosaponin의 정량분석** - 각의 조건에서 배양된 켈러스를 채취하여 59°C에서 24시간 건조시킨 후 가루로 한 다음 500 mg씩 칭량하여, 암모니아 메탄올 혼합액 35 mL를 넣어 3시간 동안 가열 환류하였다. 식힌 다음 메탄올로 50 mL가 되도록 하고 원심분리하여 상정액 30 mL를 취하여 감압농축하여 용매를 제거하였다. 잔류물에 메탄올 5 mL를 넣어 용해시킨 다음 0.45 m 여과지로 여과하여 정량분석용 시료로 사용하였다. 표준액으로서 표준품 saikosaponin a, c 및 d(Nacalai Tesque Co., Japan) 각각 10 mg을 칭량하여 메탄올 50 mL에 녹여 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)로 분석하였다. 분석조건으로는 column은  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (Merck사(USA),  $\phi$ 4 mm×250 mm), 이동상은 물·아세트니트릴(65:35)을 사용하여 자외선 검출기로 203 nm(Flow rate:1.0 ml/min, Injection Volume:20  $\mu$ l)에서 실온측정하였다. 분석에 사용한 HPLC기종은 Waters Model 244, Detector는 Waters 486, Data module은 Waters 746, System controller는 Waters 720을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

**생체중 및 건물중** - Agar와 gellan gum을 응고제로 하여 2,4-D(Table I)와 L-phenylalanine (Table II)을 각각 단독처리한 결과, 생체중은 agar나 gellan gum 배지 모두 2,4-D 0.1 mg/L의 농도에서 10.30 g 12.37 g으로 높게 나타났고 2,4-D의 농도가 높아짐에 따라 생체중은 약간씩 낮아졌다. 반면에 L-phenylalanine을 처리하였을 경우 생체중에 있어서 농도에 크게 영향을 받지 않는 경향이었으며 agar보다 gellan gum에서 생체중이 2배 정도 높게 나타났다. 건물중비율에서는 agar나 gellan gum 모두 L-phenylalanine처리구에서 약간씩 높게 나타났다. 동일 응고제 조건의 경우 gellan gum에 2,4-D나 L-phenylalanine을 처리한 것이 agar 쪽에서 보다 생체중이 높게 나타나

는 경향이었으며 또한 캘러스의 배양상태에 있어서도 gellan gum 처리가 엽록소 형성이 대체적으로 양호하였다. 이와 같은 결과는 목화 종자배축배양에서 agar보다 gellan gum 배지에서 캘러스유기가 효과적이라고 한 것<sup>4</sup>과도 일치한다. 또한 같은 응고제라 하더라도 L-phenylalanine을 처리했을 때가 캘러스로부터 shoot 또는 root로의 기관발생이 매우 좋았으며, gellan gum에 L-phenylalanine을

처리했을 때, 엽록소의 형성은 물론 기관발생에 좋은 영향을 미치는 것으로 나타났다(Fig. 1).

한편, agar를 배지 응고제로 하여 2,4-D와 L-phenylalanine을 조합처리하여 캘러스의 생체중 및 건물중에 미치는 효과를 조사한 결과 2,4-D 단독 처리에서와 마찬가지로 2,4-D의 농도가 높을 때보다 2,4-D 0.1 mg/L로 낮을 때 생체중 및 건물중이 대체적으로 높게 나타났다(Table III). Gellan gum을 응고제로 사용했을 경우, agar에서와 같이 2,4-D의 농도에 따른 차이를 보이며 2,4-D의 농도가 0.1에서 0.3 mg/L로 높아질 경우 생체중은 평균 2배정도로 낮아졌다. 그리고 L-phenylalanine의 농도가 높아감에 따라서 캘러스에 엽록소 형성이 잘 되었고 생육상태도 좋았다(Table IV). 그러나 건물중 비율에 있어서는 거의 동일한 수치를 보이는데, 이것은 캘러스의 배양상태에 있어서 2,4-D의 농도가 낮을 경우, 수분흡수가 좋아 캘러스의 상태도 양호하였고, 반면에 2,4-D의 농도가 0.1에서 0.3 mg/L로 조금씩 높아질수록 캘러스 증식은 되는 편이나, 캘러스의 부피는 적고 쉽게 갈변하였으며, 부숴지기

**Table I.** Effect of 2,4-D levels combined with agar and gellan gum on the fresh and dry weight of callus from leaf segment of *Bupleurum falcatum*.

2,4-D (mg/L)	Agar			Gellan gum		
	FW(g)	DW(g)	D/F	FW	DW(g)	D/F(%)
0.0	7.07	0.52	7.35	9.83	0.64	6.43
0.1	10.30	0.45	4.38	12.37	0.50	4.05
0.2	9.65	0.43	4.46	9.27	0.37	3.95
0.3	8.63	0.39	4.54	9.22	0.34	3.70
0.4	8.79	0.38	4.28	7.92	0.31	3.95
0.5	8.53	0.35	4.10	7.59	0.29	3.79

FW: Fresh weight, DW: Dry weight, D/F: Dry/Fresh weight ratio.

**Table II.** Effect of L-phenylalanine levels combined with agar and gellan gum on the fresh and dry weight of callus from leaf segment of *Bupleurum falcatum*.

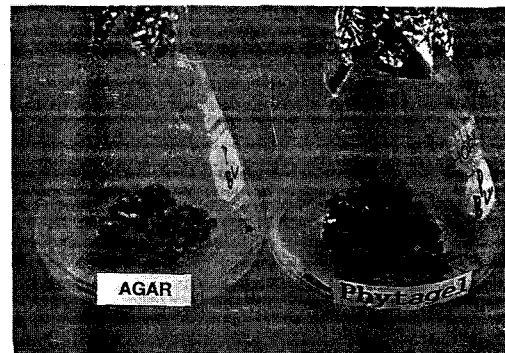
PAL (mg/L)	Agar			Cellan gum		
	FW(g)	DW(g)	D/F	FW(g)	DW(g)	D/F(%)
0.0	6.41	0.42	6.61	10.63	0.70	6.65
0.1	6.15	0.47	7.67	11.22	0.64	5.77
0.5	7.84	0.55	7.05	10.43	0.61	5.83
1.0	6.24	0.42	6.66	11.00	0.61	5.58
1.5	6.68	0.41	6.18	10.41	0.61	5.89
2.0	6.77	0.38	5.65	10.80	0.59	5.83

PAL: L-phenylalanine, FW: Fresh weight, DW: Dry weight, D/F: Dry/Fresh weight ratio.

**Table III.** Effect of the combined levels of 2,4-D and L-phenylalanine in the medium solidified with agar on the fresh and dry weight of callus formed from leaf segment of *Bupleurum falcatum*.

PAL (mg/L)	2,4-D(mg/L)								
	0.1			0.2			0.3		
	FW(g)	DW(g)	D/F(%)	FW(g)	DW(g)	D/F(%)	FW(g)	DW(g)	D/F(%)
0.1	9.17	0.42	4.58	9.05	0.38	4.20	8.05	0.35	4.35
1.0	10.13	0.45	4.44	9.91	0.40	4.04	8.24	0.38	4.61
2.0	9.11	0.42	4.61	9.37	0.39	4.16	8.61	0.35	4.07

PAL: L-phenylalanine, FW: Fresh weight, DW: Dry weight, D/F: Dry/Fresh weight ratio.

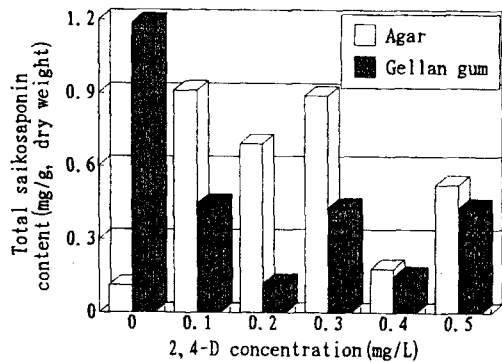


**Fig. 1.** Effect of gelling agents on proliferation of callus induced from leaf segment of *Bupleurum falcatum*.

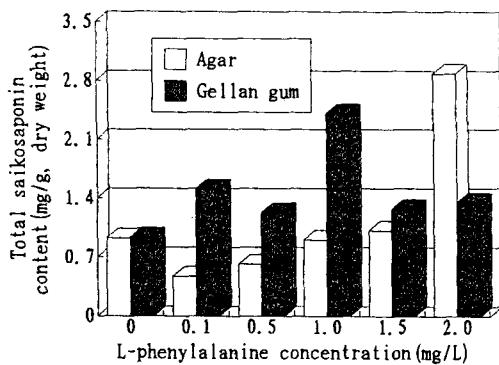
**Table IV.** Effect of the combined levels of 2,4-D and L-phenylalanine in the medium solidified with gellan gum on the fresh and dry weight of callus from leaf segment of *Bupleurum falcatum*.

PAL (mg/L)	2,4-D(mg/L)								
	0.1			0.2			0.3		
	FW(g)	DW(g)	D/F(%)	FW(g)	DW(g)	D/F(%)	FW(g)	DW(g)	D/F(%)
1.0	15.39	0.59	3.83	12.70	0.45	3.54	7.96	0.31	3.38
3.0	14.43	0.50	3.47	11.92	0.42	3.52	8.09	0.28	3.46
5.0	16.06	0.61	3.80	11.04	0.39	3.53	10.49	0.37	3.53
7.0	17.97	0.65	3.62	11.36	0.38	3.34	9.70	0.33	3.40

PAL: L-phenylalanine, FW: Fresh weight, DW: Dry weight, D/F: Dry/Fresh weight ratio.



**Fig. 2.** Effect of 2,4-D levels combined with agar and gellan gum on the total saikosaponin contents in the callus of *Bupleurum falcatum*.



**Fig. 3.** Effect of L-phenylalanine levels combined with agar and gellan gum on the total saikosaponin contents in the callus of *Bupleurum falcatum*.

쉬운 상태를 나타내 상대적으로 수분흡수가 저해되고 조직이 경화된 결과가 아닌가 생각된다. 이와 같은 결과는 단자엽식물인 벼의 약배양에 있어서도 gellan gum을 배지 응고제로 사용했을 경우에, agar를 사용했을 때보다 캘러스 배양에서 엽록소

형성은 물론, 개체발생으로의 기관 재분화가 촉진적이라<sup>7,8)</sup>고 하였으며, 감자의 약배양에서도 배발생이 효과적<sup>9)</sup>이라고 하는 것으로 보아 단자엽식물의 배양<sup>1)</sup>뿐만 아니라 쌍자엽식물인 시호의 배양에 있어서도 효과적이라고 판단된다.

**Saikosaponin 함량** - Agar와 gellan gum을 배지로 하여 2,4-D를 처리했을 때 saikosaponin 함량은 agar쪽에서 평균 0.5 mg/L로 대체로 높게 나타났다(Fig. 2). 반면에 L-phenylalanine을 처리하였을 경우 gellan gum배지에서 saikosaponin 함량이 2,4-D처리에 비하여 평균 1.5 mg/L로서 대체적으로 3배정도 높게 나타났다. 그러나 agar 배지의 경우는 L-phenylalanine의 농도가 높아짐에 따라서 saikosaponin의 함량도 일정하게 높아지는 경향을 나타내어 2.0 mg/L의 농도에서는 saikosaponin의 농도가 2.9 mg/L의 농도로 높게 나타나는 양상을 보였다(Fig. 3). 이때의 saikosaponin 총함량은 비록 약간의 shoot나 root로의 분화과정중에 있는 것을 포함한 캘러스 상태임에도 불구하고 로지재배 2년근이나 부정근만의 것<sup>6)</sup>보다도 현저하게 높으며, 특히 agar를 응고제로 하여 L-phenylalanine 2.0 mg/L 단독처리시에는 조합처리한 것보다 약 10배 정도의 saikosaponin 고함량을 보여주고 있다.

그러나 agar와 gellan gum을 배지로 하여 2,4-D와 L-phenylalanine을 조합처리할 경우에는 단독처리에 비하여 saikosaponin 함량이 전반적으로 1/10정도로 현저하게 낮게 나타났으며(Fig. 4), 특히 이러한 경향은 agar에서 보다 gellan gum을 배지 응고제로 사용하였을 경우에 크게 차이가 나는 것을 볼 수 있다(Fig. 5). 그렇지만 로지재배를 통해 형성된 2년근에서의 saikosaponin 총함량과는 비

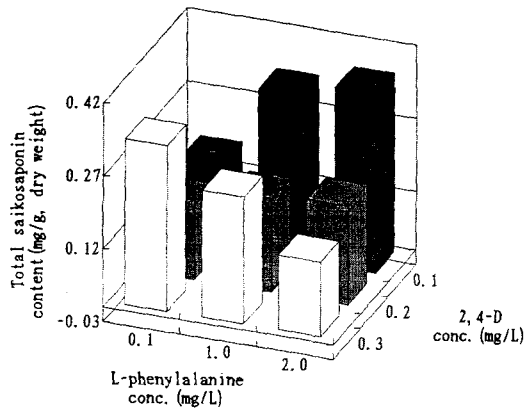


Fig. 4. Effect of the combined levels of 2,4-D and L-phenylalanine on the total saikosaponin contents in the callus cultured on medium with agar.

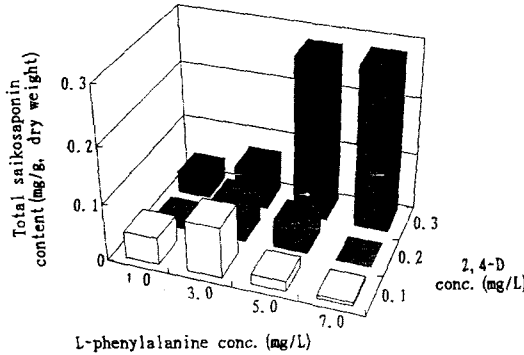


Fig. 5. Effect of the combined levels of 2,4-D and L-phenylalanine on the total saikosaponin contents in the callus cultured on medium with gellan gum.

슷한 수준을 보여 주고 있다. 이와 같은 결과로 미루어보아 배지 응고제가 캘러스의 생장은 물론, 이차 대사산물의 축적과도 관련되어지는 것으로 생각된다. 이러한 현상에 대하여 Ozeki 등<sup>10)</sup>이 인삼배양 세포에서 안토시아닌합성 유도를 위하여 PAL (phenylalanine ammonia-lyase)에 대한 효소 활성을 조사해 본 결과 2,4-D를 함유한 배지에서는 PAL에 대한 mRNA, PAL단백질 등의 활성이 나타나지 않았으나, 2,4-D를 함유하지 않은 배지의 어느 캘러스에서도 PAL mRNA가 유도되어 PAL단백질이 합성되며 PAL의 활성이 상승하는 것과 마찬가지로, 본 실험의 경우에 있어서 이미 보고<sup>11)</sup>한 바와 같이 2,4-D와 L-phenylalanine을 조합처리할 경우 2,4-D에 의하여 대사활성을 제어하는 작용이 있기

Table 5. Effect of the combined levels of 2,4-D and L-phenylalanine on the saikosaponin contents from *Bupleurum falcatum* callus cultured on MS medium solidified with agar.

2,4-D (mg/L)	Saikosaponin	L-phenylalanine(mg/L)		
		0.1	1.0	2.0
0.1	a	0.140	0.135	0.122
	c	0.035	0.066	0.037
	d	ND	0.137	0.209
	total	0.175	0.338	0.368
0.2	a	0.117	0.124	0.157
	c	0.030	0.029	0.047
	d	0.008	0.039	ND
	total	0.155	0.192	0.204
0.3	a	0.193	0.187	ND
	c	ND	0.022	0.153
	d	0.148	0.052	ND
	total	0.341	0.261	0.153

ND: Not detected.

때문에 캘러스내에 saikosaponin의 축적을 저해하는 것이라고 판단되며, 또한 이러한 영향은 배지 응고제에 따라서도 saikosaponin 등의 이차대사산물 축적에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 또한 saikosaponin을 종류별로 분석하였을 경우 agar에서는 saikosaponin이 거의 종류별로 검출되었으며 그중 a의 함량이 가장 두드러지게 높게 나타났다(Table V). 반면에 gellan gum배지에서는 saikosaponin a만이 검출되었고, c와 d는 거의 검출되지 않았다(Table VI). 이와 같은 경향은 Kim et al.<sup>12)</sup>이 시호 캘러스배양에서 saikosaponin 중 c는 배양 60일경에 그 함량이 가장 높다가 떨어지며, a와 d는 배양 90일경부터 함량이 높아지는 것으로 보고한 것과는 차이가 있는 것으로서 배양시기에 따른 성분함량의 차이는 물론 배양배지에 따른 성분함량의 차이에 대해서도 상세한 연구가 요구된다.

따라서 이상과 같은 결과로 볼 때 캘러스의 증식에 있어서는 2,4-D에 L-phenylalanine과 같은 물질을 혼합 사용하여 gellan gum을 배지응고제로 하는 것이 캘러스의 양적으로나 질적인 면에 있어서 효과적일 것으로 보이며, 일정의 목적성분만을 위해서는 유도된 캘러스에 L-phenylalanine과 같은 물질을 적정농도로 gellan gum배지에 단독처리하는 것이 캘러스내에서의 이차대사를 촉진하여 saikosaponin과 같은 물질을 효율적으로 얻을 수 있을

**Table VI.** Effect of the combined levels of 2,4-D and L-phenylalanine on the saikosaponin contents from *Bupleurum falcatum* callus cultured on MS medium solidified with gellan gum.

2,4-D (mg/L)	Saikosaponin	L-phenylalanine(mg/L)			
		0.1	3.0	5.0	7.0
0.1	a	0.047	0.088	0.017	0.006
	c	ND	ND	ND	ND
	d	ND	ND	ND	ND
	total	0.047	0.088	0.017	0.006
0.2	a	0.010	0.065	0.047	ND
	c	ND	ND	ND	ND
	d	ND	ND	ND	ND
	total	0.010	0.065	0.047	ND
0.3	a	0.039	0.070	0.100	0.164
	c	ND	ND	ND	ND
	d	ND	ND	0.180	0.118
	total	0.039	0.070	0.280	0.282

ND: Not detected.

것으로 판단되나 이러한 현상에 대해서는 계속적으로 검토되어야 할 것으로 생각된다

우에서 대체적으로 높게 나타나는 경향을 보였다.

## 결 론

시호의 조직배양을 통하여 이차대사산물의 하나인 saikosaponin을 보다 효과적으로 생산할 목적으로 MS기본배지에 agar와 gellan gum을 응고제로 하여 성장조절물질로서 2,4-D와 전구물질로서 L-phenylalanine을 단독 및 조합처리하여 saikosaponin형성에 영향을 미치는지를 조사하였다. 배지응고제로서 gellan gum을 사용하였을 경우 생체중 및 건물중에서 agar보다 효과적이었으며, gellan gum배지에 L-phenylalanine을 처리하였을 때 생체중은 agar배지에 비하여 1.6배 이상 높았다. 2,4-D와 L-phenylalanine을 조합하였을 경우도 단독처리하였을 경우와 비슷하게 gellan gum배지에서 생체중이 현저하게 높았다. Saikosaponin함량의 경우도 생체중과 마찬가지로 gellan gum배지에 L-phenylalanine을 단독처리할 경우 대체적으로 높게 나타났으며, L-phenylalanine 1.0 mg/L 첨가에서 saikosaponin함량이 2.4 mg/g으로 agar 배지의 2,4-D 0.1 mg/L에서 0.9 mg/g인 것보다 3배이상 높았다. 2,4-D와 L-phenylalanine을 조합처리했을 경우 생체중은 단독처리에서와 마찬가지로 gellan gum에서 보다 현저하게 높게 나타났으나 saikosaponin함량에서는 agar의 경

## 인용문헌

1. Lee, J. H. and Lee, S. Y. (1995) Effects of gelling agents and growth regulators on rice anther culture. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 22: 35-39.
2. Moon, H. P., Choi, S. H., Cho, S. Y. and Son, Y. H. (1988) Effect of high agar medium on plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.) anther culture. *Kor. J. Breeding* 20: 335-340.
3. Yang, S. J. and Oh, B. G. (1994) Effect of gelrite as gelling agents on rice anther culture efficiency. In Abstract. *Spring Cong. Korean Soc. Plant Tissue Culture*, 53.
4. Zimmerman, T. W. and Robacker, C. D. (1988) Media and gelling agent effect on cotton callus initiation from excised seed hypocotyls. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 15: 269-274.
5. Williams, R. R. and Taji, A. M. (1991) Effect of temperature, gel concentration and cytokinins on vitrification of *Olearia microdisca* (J.M. Black) *in vitro* shoot cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26: 1-6.
6. Jo, P. H., Seong, R. S., Bae, H. H., Soh, W. Y. and Cho, D. Y. (1990) Saikosaponin contents in *Bupleurum falcatum* root produced by tissue culture. *Kor. J. Pharmacogn.* 21: 205-209.
7. Hiraoka, N. and Tabata, M. (1974) Alkaloid production by plants regenerated from cultured cells of *Datura innoxia*. *Phytochem.* 13: 1671-

- 1675.
8. Ikuta, A., Syono, K. and Furuya, T. (1974) Alkaloids of callus tissues and redifferentiated plantlets in the *Papaveraceae*. *Phytochem.* 13: 2175-2179.
  9. Calleberg, E. K., Kristjansdottir, I. S. and Johansson, L. B. (1989) Anther cultures of tetraploid *Solanum* genotypes, the influence of gelling agents and correlations between incubation temperature and pollen germination temperature. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 189-197.
  10. Ozeki, Y., Komamine, A. and Tanaka, Y. (1990) Induction and repression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase enzyme proteins and mRNAs in carrot cell suspension cultures regulated by 2,4-D. *Physiol. Plant.* 78: 400-408.
  11. Seong, R. S. (1996) Effects of L-phenylalanine on the saikosaponin content of *Bupleurum falcatum* callus. *Kor. J. Pharmacogn.* 27: 354-358.
  12. Kim, S. G., Cho, D. Y. and Soh, W. Y. (1995) Saikosaponin content in adventitious root formed from callus of *Bupleurum falcatum* L. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 22: 29-33.

(1996년 12월 9일 접수)