

## *Agrobacterium* spp.에 의하여 형질전환된 독말풀(*Datura stramonium* var. *tatula* Torr.) 모상근의 성장과 tropane alkaloid의 생성

양덕조\* · 강현미 · 이강섭 · 김용해 · 양덕춘<sup>1</sup>  
충북대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>1</sup>한국인삼연초연구원

### Growth and Tropane Alkaloid Production of Hairy Roots of *Datura stramonium* var. *tatula* Torr. Transformed by *Agrobacterium* spp.

YANG, Deok Cho\* · KANG, Hyun Mi · LEE, Kang Seop · KIM, Yong Hae · YANG, Deok Chun<sup>1</sup>

School of Life Sciences, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, 360-763, Korea: and  
<sup>1</sup>Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea. \*Corresponding author

In order to elucidate the optimum medium on the growth and tropane alkaloid production of hairy roots, hairy roots were induced by inoculating leaf and stem of *Datura stramonium* var. *tatula* Torr. with *Agrobacterium* spp. Both *Agrobacterium tumefaciens* A<sub>4</sub>T and *A. rhizogenes* ATCC 15834 among tested strains were effective on hairy root formation. Among 23 clones selected in SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) liquid medium, DTLA9 clone was shown fast growth of hairy root and DTLE6 clone was shown high level production of tropane alkaloids. When both DTLA9 and DTLE6 clones were cultured in the GD (Gresshoff and Doy, 1972) medium, alkaloid production was higher than in 8 tested media. It was elucidated that optimum medium for root proliferation and for tropane alkaloid production is SH, GD medium, respectively.

**Key words :** *Datura stramonium* var. *tatula* Torr., alkaloid production, hairy roots,

2차대사산물인 tropane alkaloids는 진통, 진경, 가스해독, 부교감신경의 마비제 등 중요한 천연의약품으로 이용되어 오고 있다. Tropane alkaloids류의 천연물질은 독특한 분자구조 때문에 인위적 합성이 어려울 뿐만 아니라, 자생식물로부터 추출하는 방법은 내성성분의 양상이 환경적 영향을 받기 때문에 비경제적인 실정이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해서는 tropane alkaloids를 기내에서 배양세포로부터 대량생산하는 system의 확립이 필요하다. Tropane alkaloids는 *Hyoscyamus niger* (Yamada and Hashimoto, 1982)와 *Duboisia leichhardtii* (Yamada and Endo, 1984) 등의 배양세포로부터 추출된 바 있으나 함유량이 매우 낮았다. 그러나 *Atropa belladonna* (Kamada et al., 1986), *Duboisia leichhardtii* (Muranaka et al., 1993) 그리고 *Hyoscyamus muticus* (Jaziri et al., 1994) 등의 형질전환된 모상근배양으로부터 고품량의 tropane alkaloids가 검출한 바 있다.

모상근을 이용한 tropane alkaloids의 생성에 관한 연구는 *Datura*속의 *D. stramonium* (Payne et al., 1987), *D. innoxia*

(Ionkova et al., 1994), *D. candida* hybrid (Christen et al., 1990), *D. quercifolia* (Dupraz et al., 1994) 등 여러 식물에서 보고된 바 있다. 그러나, 독말풀 (*D. stramonium* var. *tatula* Torr.)의 모상근에서는 tropane alkaloids가 일정함량 생성되었다는 보고만 있을 뿐(Knopp et al., 1988), 생성에 미치는 여러 요인 등에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 독말풀(*Datura stramonium* var. *tatula* Torr.)에서 모상근을 유도하고, 이로부터 성장이 빠르고 tropane alkaloids를 많이 생성하는 세포주를 선별하고, 아울러 이들 세포주의 최적성장배지와 tropane alkaloids합성을 위한 최적 배지조성을 구명하고자 시도되었다.

#### 재료 및 방법

#### 식물재료 및 균의 배양

실험재료는 일년생 초본인 독말풀(*Datura stramonium* var. *tatula* Torr.)의 유식물을 사용하였다. 종자를 4°C에서 20일간 저온처리하여 발아시키고, 발아 후 약 3개월경에 6-7장의 본엽을 가진 유식물의 잎과 줄기를 10 x 10 mm의 크기로 잘게 자른 후, 70% 에탄올에 1분, 1% sodium hypochlorite에 10분간 침적시켜 살균한 후 멸균수로 3-4회 세척하여 *Agrobacterium* spp.의 접종 재료로 사용하였다. 실험에 사용된 균주는 *Agrobacterium tumefaciens* A4T와 *A. rhizogenes* 8196, 13257, 15834, 43057로 YEB배지에서 25°C, 암조건하에서 110 rpm의 회전전당기에서 24시간 배양하여 10<sup>8</sup>/mL개로 조정하여 사용하였다.

## 모상근의 유도

독말풀의 줄기와 잎을 주사바늘로 상처를 낸 후, 5 µL의 균을 상처부위에 접종하였다. 접종된 절편은 1,000 mg/L carbenicillin이 첨가된 호르몬 무첨가 MS (Murashige and Skoog, 1962) 고체배지에서 배양하였다. 배지는 MS기본배지에 30 g/L sucrose, 8 g/L agar를 첨가하고 pH는 5.8로 조정하고, 120°C에서 고압멸균하여 사용하였다. 균을 접종하고 7-10일 경과한 후에 유도된 모상근을 500 mg/L의 carbenicillin이 첨가된 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) 액체배지에 이식하여 균을 제거한 후, 이를 항생제 및 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 SH액체배지에 이식하여 25°C, 암상태의 조건하에서 배양하였다. 모상근의 최적성장배지 및 tropane alkaloids의 함량을 조사하기 위하여, MS와 SH배지외에 White (White, 1963), B5 (Gamborg et al., 1968), M9 (Fujita et al., 1981), LS (Linsmaier and Skoog, 1965), N6 (Chu, 1978), GD (Gresshoff and Doy, 1972), E<sub>1</sub> (Gamborg et al., 1983) 배지를 사용하였다.

## 모상근의 선별

식물체의 잎에서 유도된 모상근의 근단 10개를 약 1.5 cm의 크기로 잘게 잘라 50 mL의 액체배지가 포함된 100 mL 삼각 플라스크에 이식하여 25°C의 암상태의 조건에서 25일간 진탕배양하였다. 세포주의 성장률 측정은 40°C의 dry oven에서 24 시간 건조시킨 후 건조량으로 측정하였다.

## Tropane alkaloids의 추출

Tropane alkaloids의 추출은 Mano 등 (1986)의 방법을 변형하여 수행하였다. 건조된 시료를 마쇄한 후 건조량 50 mg을 취하여 10 mL의 용매(EtOH와 28% NH<sub>4</sub>OH 혼합액, 19:1, v/v)에 넣어 4°C에서 overnight시켰다. 추출된 용매를 4,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 40°C에서 잠

암증발시킨 후, 2.5 mL의 0.1N HCl을 첨가하고 4,000 rpm으로 10분 동안 원심분리시킨 후 2M carbonate buffer (NaCO<sub>3</sub>)를 300 µL 첨가하여 알칼리로 만들어 10 mL의 CHCl<sub>3</sub>로 elution시켰다. Elution된 용액을 취하여 40°C에서 증발시킨 후, 70% MeOH 1 mL에 녹여 정량분석 시료로 사용하였다. 한편, 배지내의 tropane alkaloids의 함량측정을 위하여 배양이 완료된 배지를 수거하여 filter paper (Whatman No.2)로 여과한 후, 배양 배지에 0.1N NaOH를 첨가하여 pH 10의 알칼리 용액으로 만든 후 chloroform과 1:1(v/v)로 혼합하였다. Chloroform층을 분획하여 감압증발시킨 후, 시료에서의 경우와 동일한 방법으로 정량분석을 실시하였다.

## Tropane alkaloids의 정량분석

Tropane alkaloids의 분석은 UV detector가 장착된 HPLC (Pharmacia LKB, Sweden)를 이용하였다. Column은 Shim-pack CLC-ODS (Shimadzu Co., Japan, 5 µm, 4.6 × 250 mm)를 사용하였으며, eluents는 methanol과 10 mM의 sodium-1-heptane sulfonate를 48:52(v/v)로 혼합하여 acetic acid로 pH를 4.0으로 조정하여 사용하였다. Injection양은 20 µL로 하였고 flow rate는 분당 1 ml로 하여 215 nm에서 얻어진 chromatogram의 peak height를 표준품과 비교하여 tropane alkaloids를 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### 모상근의 유도

독말풀(*Datura stramonium* var. *tatula* Torr.)의 줄기와 잎에 *Agrobacterium tumefaciens* A4T와 *A. rhizogenes* strain 8196, 13257, 15834 그리고 43057의 균을 접종한 결과, 접종 후 7 일경에 모상근이 유도되기 시작하였다. 잎으로부터 모상근의 유도는 균주 15834, A4T 그리고 8196을 접종하였을 때 가장 양호하였으며, 줄기의 경우에는 균주 A4T와 15834를 접종한 경우에 양호하였다(Fig. 1), 그리고 사용된 여러 균주에 의한 모상근의 유도는 줄기에 비하여 잎에서 훨씬 더 양호하였다(Table 1). 따라서 모상근의 유도가 사용된 균주의 종류 및 식물체의 부위에 따라 다름을 알 수 있는데, 이와같은 결과는 *Datura stramonium*에서의 경우와 유사하였다(Maldonado-Mendoza et al., 1993).

### 고성장 및 고함량 tropane alkaloid 모상근 세포주의 선별

유도된 모상근을 무균상태로 SH액체배지에서 수차례 계대배양하여 관찰한 결과, 측근(lateral root)과 근모(root

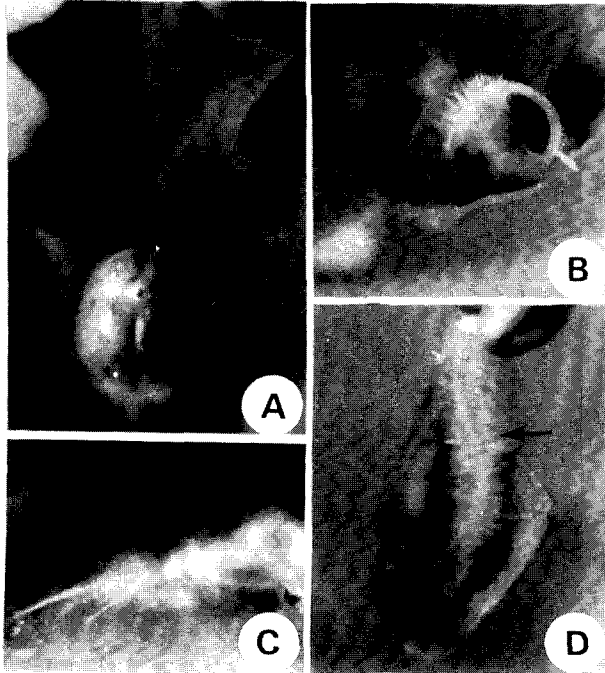


Figure 1. A normal plant (A) with a fruit and hairy roots (arrows) induced from leaf of *Datura stramonium* var. *tatula* Torr. inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 8196 (B), 15834 (C) and *A. tumefaciens* A:T (D).

Table 1. Frequency(%) of hairy root induction from leaf and stem of *Datura stramonium* var. *tatula* Torr. inoculated with *Agrobacterium* spp.

Strains	Hairy root formation(%) in	
	Leaf	Stem
<i>A. tumefaciens</i> A:T	17/22 <sup>a</sup> (77.0)	4/15 (26.7)
<i>A. rhizogenes</i> 8196	16/22 (72.7)	0/15 (0)
13257	5/22 (22.7)	0/15 (0)
15834	18/22 (81.8)	4/15 (26.7)
43057	2/22 (9.0)	1/15 (6.7)

<sup>a</sup>No. of explant inducing hairy root / No. of explant inoculated with *Agrobacterium* spp.

hair)가 형성되었다. 이들은 동일한 균주에 의하여 유도된 경우라 할지라도 형태적으로 독특한 특징을 나타내었으며, 성장의 속도도 매우 다르게 나타났다. 유사한 결과는 *Hyoscyamus muticus*에서도 관찰된 바 있다(Jaziri et al., 1994). 본 연구결과에 제시된 모상근의 형태 및 생리학적 차이는 T-DNA의 무작위적인 삽입에 따른 genome내 T-DNA의 다양성 및 다양한 copy수 등에 기인하는 것으로 유추된다(Taya et al., 1992; Payne et al., 1987).

SH액체배지에서 선별된 23개의 hairy root clone을 배양한 결과, 성장이 양호한 모상근은 세포주 DTLA9 와 DTLB5이었다(Fig. 2). 한편, 23개의 clones중에서 성장이 비교적 양호

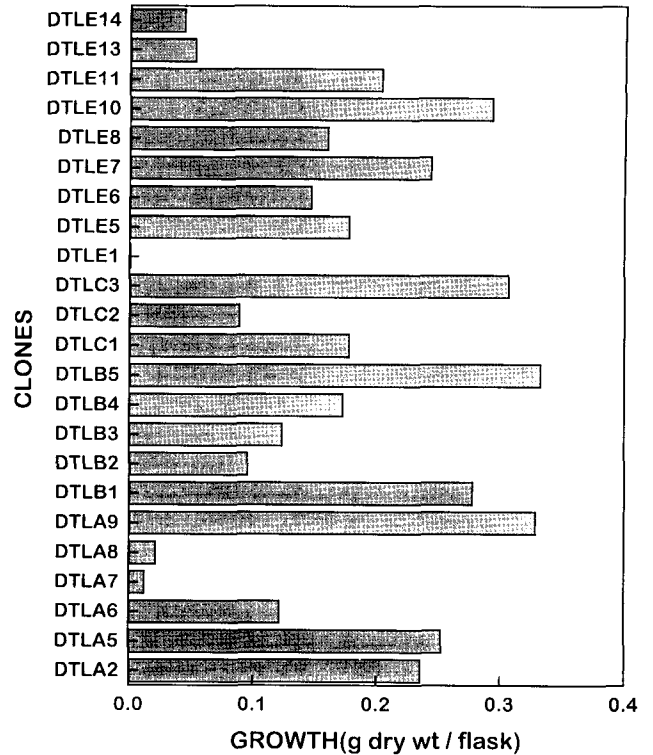


Figure 2. Growth frequency of 23 selected-hairy roots induced from *Datura stramonium* var. *tatula* Torr. Data were measured after 25 days of culture in SH liquid medium at 25°C in dark condition, initial inoculum per clone was 10 root tips (size: 1.5 cm). DT: *Datura stramonium* var. *tatula*, L: leaf, S: stem, A-E indicate *Agrobacterium* strains used for hairy root induction. A, *tumefaciens* A:T (A), *A. rhizogenes* 8196 (B), 13257 (C), 15834 (E).

한 세포주 19개를 취하여 계대배양한 후 tropane alkaloids의 함량을 조사한 결과(Fig. 3), hyoscyamine과 scopolamine의 두 종류의 tropane alkaloids가 모상근 및 배양배지에서 검출되었는데, 두 종류 공히 배지에서 보다 모상근에서 더 높게 나타났다. 모상근에서 hyoscyamine의 함량은 scopolamine의 함량보다 세포주에 상관없이 현저히 높게 나타나는 경향이 있었다. 모상근 및 배지에서 검출된 tropane alkaloids의 전체 함량을 비교하여 보면, DTLE6 > DTLA8 순으로 두 세포주에서 높게 나타났으며, 특히, DTLE6 세포주의 경우 0.389 mg/g dr wt로 가장 높은 함량을 나타내었으며, DTLE10 세포주의 경우는 0.042 mg/g dr wt로 가장 적은 함량을 나타내었다(Fig. 3). 이상의 결과로부터 모상근에서 성장이 양호한 세포주(DTLA9, DTLB5)와 tropane alkaloids의 함량이 높은 세포주(DTLE6)가 서로 다름을 알 수 있다. 이와같은 결과는 모상근의 성장과 tropane alkaloids함량간에 부의 상관관계가 있음을 시사하므로, 모상근의 성장과 tropane alkaloids의 생성을 위한 최적배지는 동일하지 않음을 추론할 수 있다.

본 연구에서 사용된 *Datura stramonium* var. *tatula* Torr.

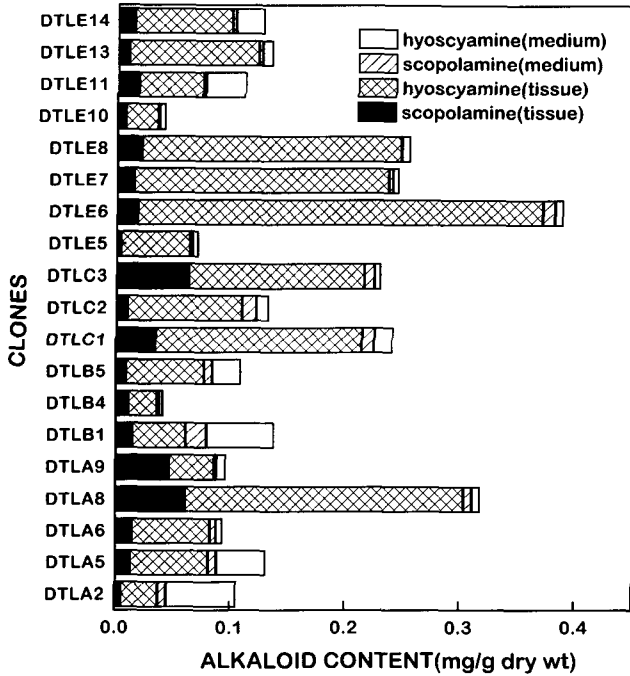


Figure 3. Tropane alkaloid content of 19 selected-hairy root clones induced from *Datura stramonium* var. *tatula* Torr. Data were measured after 25 days of culture in SH liquid medium at 25°C in dark condition, initial inoculum per clone was 10 root tips (size: 1.5 cm). DT: *Datura stramonium* var. *tatula*, L: leaf, S: stem, A-E indicate *Agrobacterium* strains used for hairy root induction. A. *tumefaciens* A:T (A), A. *rhizogenes* 8196 (B), 13257 (C), 15834 (E).

의 모상근에서 hyoscyamine과 scopolamine이 모상근의 clone에 따른 함량차이는 있지만 모두 검출되었다. 이러한 결과는 *Datura stramonium*의 모상근을 배양할 때 hyoscyamine만 검출된 경우(Payne et al., 1987; Knopp et al., 1988)와 scopolamine만 검출된 경우(Jaziri et al., 1988)와 비교하면 상반되는 결과이지만, 두 종류의 tropane alkaloids가 모두 검출된 경우(Knopp et al., 1988)와 매우 일치되어 사용된 균주의 종류 및 식물의 종에 따른 차이로 생각된다.

모상근 성장의 최적배지 조사

모상근의 성장과 tropane alkaloids함량간에 부의 상관관계가 인정되므로, 이러한 현상이 배지조성을 달리하였을 때, 어떻게 나타나는지를 구명할 필요성이 요구된다. 따라서 선별된 두 종류의 세포주 즉, DTLA9와 DTLE6를 9종류의 서로 다른 배지에 각각 배양하였다. 그 결과, 두 세포주가 공히 SH 및 MS배지(SH > MS순으로)에서 성장률이 높게 나타났으며, SH 배지에서 성장률이 좋았던 DTLA9 세포주가 tropane alkaloids의 함량이 높았던 DTLE6 세포주에 비하여 역시 SH배지에서 성장률이 높게 나타났다(Fig. 4). GD 배지에서는 모상근의 갈변현상이 심하게 나타났다. 본

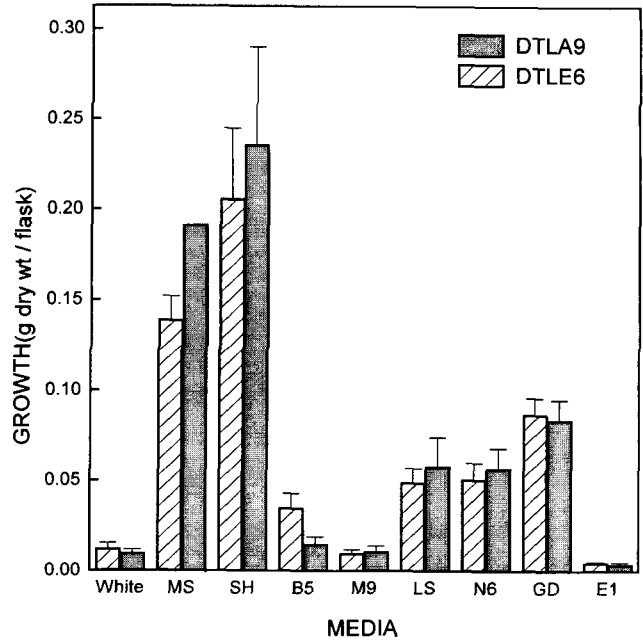


Figure 4. Effects of various media on the growth of hairy root clones of DTLA9 and DTLE6. Data indicate the mean ± SE of triplicates measured after 25 days of culture in SH liquid medium at 25°C in dark condition, initial inoculum per treatment was 10 root tips (size: 1.5 cm).

연구에서 모상근의 성장은 SH배지에서 가장 양호한 반면 B5배지에서는 매우 저조하여, *Datura stramonium*의 경우 B5배지에서 양호하였다는 보고(Maldonado-Mendoza et al., 1993)와 매우 상이한 경향을 보였다.

Tropane alkaloids함량의 최적배지 조사

SH 배지에서 모상근의 성장은 저조하지만 tropane alkaloids의 함량이 높았던 DTLE6 세포주와 성장은 양호하나 tropane alkaloids의 함량이 저조하였던 DTLA9 세포주의 최적 tropane alkaloids생성을 위한 배지를 구명하기 위하여, 이 둘 두 세포주를 9종류의 배지에 각각 배양하여 tropane alkaloids의 함량을 조사하였다. 그 결과, 두 세포주 모두 GD > B5 > LS 배지순으로 다른 6개의 배지에 비하여 tropane alkaloids의 함량이 높게 나타났다. 두 세포주중 전자의 경우 SH배지에서 tropane alkaloids의 함량은 약 0.333 mg/g dr wt이었지만, 배지를 달리하여 배양하면, tropane alkaloids의 함량이 GD배지에서는 약 0.582 mg/g dr wt, B5배지에서는 약 0.477 mg/g dr wt, 그리고 LS배지에서는 약 0.41 mg/g dr wt로 함량이 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 5). 후자의 경우 tropane alkaloids의 함량은 SH배지에서 약 0.233 mg/g dr wt로 저조하였으나, GD배지에서는 약 0.636 mg/g dr wt를, B5배지에서는 약 0.47 mg/g dr wt를, 그리고 LS배지에서는 약 0.42 mg/g dr wt로 나타나 배지의 조성을

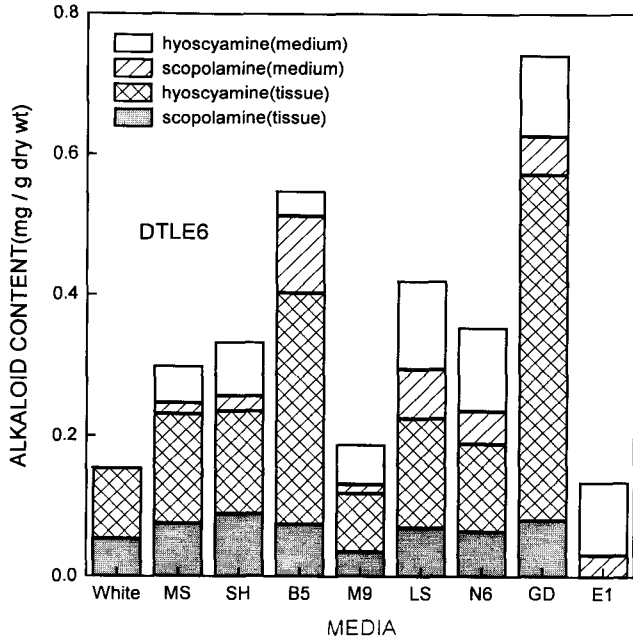


Figure 5. Effects of various media on the tropene alkaloid production of hairy root clone DTLE6. Data indicate the mean of triplicates measured after 25 days of culture at 25°C in dark condition.

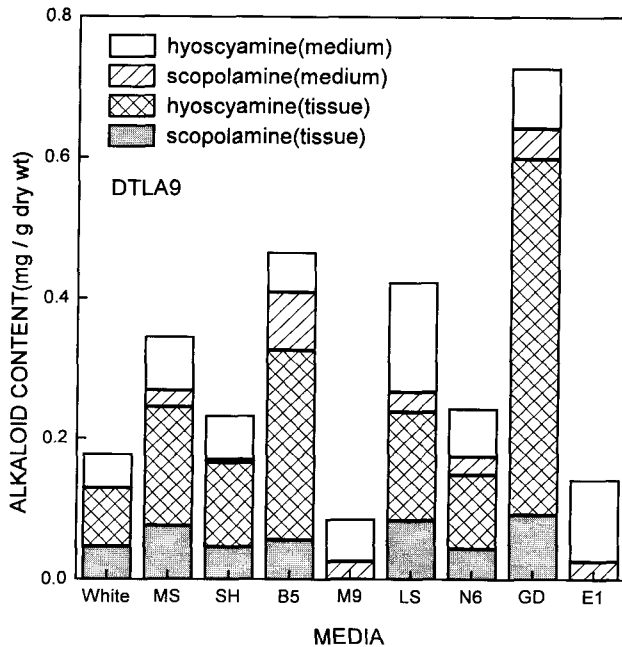


Figure 6. Effects of various media on the tropene alkaloid production of hairy root clone DTLA9. Data indicate the mean of triplicates measured after 25 days of culture at 25°C in dark condition.

달리할 경우에 tropene alkaloids의 함량이 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 6). 이러한 결과는 특정배지에서 성장이 우수할

지라도 tropene alkaloids의 함량을 높이기 위해서는 또 다른 배지가 요구됨을 시사하고 있으며, 또한 특정배지에서 tropene alkaloids의 함량이 양호했음지라도 배지조성을 달리 하면, 더 높은 양의 tropene alkaloids의 생산을 유도할 수 있기 때문에 tropene alkaloids의 생산은 효과적인 배지조성에 따라 향상될 수 있을 것으로 판단된다. 이러한 결과는 *Lithospermum erythrorhizon*에서 세포의 성장과 shikonin의 생성에서 배지를 각각 달리한 경우(Fujita et al., 1981)와 *Hyoscyamus muticus*의 모상근에서도 성장과 tropene alkaloids생성에 있어 배지를 각각 달리 함으로써 2차대사산물을 효과적으로 생산할 수 있었던 경우와 유사함을 알 수 있다(Jaziri et al., 1994).

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 독말풀(*Datura stramonium* var. *tatula* Torr.) 모상근의 성장을 위한 최적배지는 SH배지로 구명되었으며, tropene alkaloids함량을 위한 최적배지는 GD배지로 구명되었다. 따라서, 고함량의 tropene alkaloids를 기내에서 대량 생산하려면 모상근을 SH배지에서 성장시킨 후 GD배지에 옮겨 2단계 연속배양을 수행하여 배양기간을 효율적으로 조절하면 가능할 것으로 생각된다.

## 적 요

모상근의 성장을 위한 최적배지 및 tropene alkaloids함량을 위한 최적배지를 구명하기 위하여, 독말풀(*Datura stramonium* var. *tatula* Torr.)의 잎과 줄기에 *Agrobacterium* spp.를 접종하였다. 접종된 균주 중 모상근의 유도에 효과적인 균주는 *Agrobacterium tumefaciens* AT와 *A. rhizogenes* ATCC 15834이었다. SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) 액체배지에서 선발된 23개의 clone중 성장이 양호한 clone은 DTLA9 이었으며, tropene alkaloids의 함량이 양호한 clone은 DTLE6 이었다. 이들 두 종류의 세포주를 9 종류의 서로 다른 액체배지에 각각 배양하여 성장 및 tropene alkaloids의 함량을 조사한 결과, 모상근의 성장은 두 세포주 모두 SH와 MS배지(SH > MS배지순)에서 다른 7개의 배지에서 보다 양호하였다. 한편, tropene alkaloids의 함량은 두 세포주 공히 GD와 B5 배지(GD > B5배지순)에서 다른 7개의 배지에서 보다 높게 나타났다. 따라서 SH배지에서 모상근을 성장시킨 후, GD배지에 옮겨 2단계 연속배양하면 tropene alkaloids의 함량을 높일 수 있을 것으로 확인되었다.

시사-본 논문은 한국학술진흥재단의 '96 국내 박사후 연수지원에 의해 수행된 연구결과이며, 연수지원에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Christen P, Roberts ME, Phillipson JD, Evans WC (1990) Alkaloids of hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. *Plant Cell Reports* 9: 101-104
- Chu CC (1978) The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. *In* Proceeding of Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Peking, pp 43-50
- Dupraz JM, Christen P, Kapetanidis I (1994) Tropane alkaloids in transformed roots of *Datura quercifolia*. *Planta Med* 60: 158-162
- Fujita Y, Hara Y, Suga C, Morimoto T (1981) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports* 1: 61-63
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158
- Gamborg OL, Davis BD, Stahlhut RW (1983) Somatic embryogenesis in cell cultures *Glycine* species. *Plant Cell Reports* 2: 209-212
- Gresshoff PM, Doy CH (1972) Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. *Aust J Biol Sci* 25: 259-264
- Ionkova I, Witte L, Alfermann A (1994) Spectrum of tropane alkaloids in transformed roots of *Datura innoxia* and *Hyoscyamus x gyorffyji* cultivated *in vitro*. *Planta Med* 60: 382-384
- Jaziri M, Legros M, Homes J, Vanhaelen M (1988) Tropane alkaloid production by hairy root cultures of *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*. *Phytochemistry* 27: 419-420
- Jaziri M, Homes J, Shimomura K (1994) An unusual root tip formation in hairy root culture of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell Reports* 13: 349-352
- Kamada H, Okamura N, Satake M, Harada H, Shimomura K (1986) Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Reports* 5: 239-242
- Knopp E, Strauss A, Wehrli W (1988) Root induction on several *Solanaceae* species by *Agrobacterium rhizogenes* and the determination of root tropane alkaloids content. *Plant Cell Reports* 7: 590-593
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirement of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18: 100-127
- Maldonado-Mendoza IE, Ayora-Talavera T, Loyola-Vargas VM (1993) Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Characterization and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 33: 321-329
- Mano Y, Nabeshima S, Matsui C, Ohkawa H (1986) Production of tropane alkaloids by hairy root culture of *Scopolia japonica*. *Biol Chem* 50: 2715-2722
- Muranaka T, Kazuoka T, Ohkawa H, Yamada Y (1993) Characteristics of scopolamine-releasing hairy root clones of *Duboisia leichhardtii*. *Biosci Biotech Biochem* 57: 1398-1399
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-479
- Payne J, Hamill JD, Robins R, Rhodes MJC (1987) Production of hyoscyamine by hairy root cultures. *Planta Med* 53: 474-478
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204
- Taya M, Mine K, Kino-oka M, Tone S, Ichi T (1992) Production and release of pigments by culture of transformed hairy root of red beet. *J Fermentation and Bioengineering* 73: 31-36
- White PR (1963) *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. 2nd. edition. Ronald Press, New York
- Yamada Y, Endo T (1984) Tropane alkaloid production in cultured cells of *Duboisia leichhardtii*. *Plant Cell Reports* 3: 186-188
- Yamada Y, Hashimoto T (1982) Production of tropane alkaloids in cultured cells of *Hyoscyamus niger*. *Plant Cell Reports* 1: 101-103

(1997년 1월 3일 접수)