

## 미치광이풀 모상근의 배양조건 구명 및 XAD Resin 처리에 의한 Tropane Alkaloid 생산

정희영·강민정·강영민·<sup>1</sup>윤대진·<sup>1</sup>박정동·<sup>2</sup>정영관·†최명석  
경상대학교 산림과학부, <sup>1</sup>경상대학교 응용생명과학부, <sup>2</sup>경상대학교 농업생명과학연구원  
(접수 : 2002. 10. 24., 게재승인 : 2002. 12. 23.)

## Optimal Culture Conditions and XAD Resin on Tropane Alkaloid Production in *Scopolia parviflora* Hairy Root Cultures

Hee Young Jung, Min Jung Kang, Young Min Kang, Dae Jin Yun<sup>1</sup>, Jung Dong Bahk<sup>1</sup>, Young Gwan Chung<sup>2</sup>,  
and Myung Suk Choi†

Division of Forest Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>2</sup>Institute of Agriculture and Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

(Received : 2002. 10. 24., Accepted : 2002. 12. 23.)

The optimum culture conditions for tropane alkaloid production in hairy root cultures of Korea native *Scopolia parviflora* Nak. were investigated. Hairy root was induced from the rhizome of the mother plant on B5 medium containing 1.0 mg/L IBA. Among the culture media examined, 1/2 B5 medium was the best for tropane alkaloid production, whereas the growth of hairy root increased in SH medium. The best result on the growth of hairy root was obtained in 1.0 mg/L NAA, and tropane alkaloid production was obtained in plant growth regulator-free medium. Of the carbone sources tested, 3% sucrose promoted the growth of hairy root, whereas 5% sucrose increased tropane alkaloid production. Optimum inoculum densities for root growth and tropane alkaloid production were 0.5 g and 1 g, respectively. The addition of XAD resins (1% w/v) to hairy root cultures led to increases in tropane alkaloid production, and the release of alkaloid into the medium and its adsorption by the resin accounted for about 50 to 80% of total production. It is concluded that optimized culture conditions and the addition of XAD resins could be used in the development of a bioprocess for tropane alkaloid production in hairy root cultures of *S. parviflora* Nak.

**Key Words** : *Scopolia parviflora* Nak., tropane alkaloid, hairy roots, HPLC, XAD resin

### 서론

식물은 오랫동안 의약품, 향료, 염료 등의 광범위한 화학물질의 공급원으로 유용하게 이용되어져 왔다. 이러한 유용 식물은 생육기간이 길고, 기후의 변동 및 재배조건에 따라 공급에 문제점을 가진다. 따라서 식물 유래 유용물질을 공급하기 위해 기내배양법이 효율적인 대체 생산방법으로 인정되고 있다(1). 의약품은 약 25%가 현재 식물로부터 유래되어지며(2), 이 중 가장 널리 이용되는 scopolamine과 hyoscyamine은 tropane alkaloid로써 식물유래 세계 10대 의약품에 속한다.

이들 두 성분은 중추 신경에 관여하기 때문에 진통, 진경, 가스해독 및 부교감 신경의 마비 효과를 가지고 있다(3).

Tropane alkaloid는 복잡한 화학구조로써 인위적인 합성이 어려워 *Atropa*, *Hyoscyamus*, *Duboisia*, *Datura* 및 *Scopolia* 등의 가지과 식물에서 직접 추출하여 공급되고 있으나 공급상의 문제점을 가지고 있다(4).

Tropane alkaloid를 대량 생산하기 위해서는 고생산성 세포주를 배양 하는 것이 효율적이다. 그러나 tropane alkaloid를 탈분화된 세포배양을 통해서 생산이 용이하지 않다(5). 이들은 식물의 뿌리에서 합성되어 있으므로 수송되는 특성이 있어, tropane alkaloid 생산에는 모상근 배양이 효과적이다(6). 모상근 배양을 통한 tropane alkaloids 생산의 예는 *Atropa belladonna*(7), *Hyoscyamus muticus*(8), *Brugmansia candida*(9), 그리고 *Datura stramonium*(10) 등에서 hyoscyamine, littorine 및 scopolamine 생산에 관한 연구가 있다. 그러나 본 연구의

† Corresponding Author : Division of Forest Science, Gyeongsang National University, 900 Gazwa-Dong, Jinju 660-701, Korea  
Tel : +82-55-751-5493, Fax : +82-55-753-6015  
E-mail : mschoi@nongae.gsnu.ac.kr

재료인 미치광이풀에 관한 연구는 매우 미약한 실정이다. 미치광이풀(*Scopolia parviflora* Nak.)은 국내에서 유일하게 tropane alkaloid를 생산하는 자생식물로 현재 멸종희귀종으로 분류되어 있으며, 당탕근이라는 한약재의 원료로 널리 이용되어 왔으나 현재에는 이용되고 있지 않다. 본 연구는 자생식물인 미치광이풀의 모상근을 유도하고, 모상근 배양에 있어 성장과 tropane alkaloid 함량을 높이는 최적 배지 조성 및 XAD resin에 관한 영향을 구명하고자 행하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 수집

기내배양을 위해 2000년 9월 경기도 포천 소재 국립수목원에서 2-3년생 미치광이풀을 분양받아 시료로 사용하였다.

### 모상근 배양 조건 확립

미치광이풀 지하경을 2~3 cm 절취하여 70%(v/v) ethanol에 1분, 3%(v/v) NaClO용액에 10분간 표면 소독한 후 멸균수로 5회 수세하였다. 표면 살균된 조직은 3%(w/v) sucrose, 1.0 mg/L IBA, 0.3%(w/v) gelita가 첨가된 B5배지에 치상하였다(11). 유도된 모상근은 모상근 유도시와 같은 배지에 계대 배양하였으며 25°C, 암상태로 배양하였다.

모상근의 성장과 tropane alkaloid 생산에 가장 적합한 배지를 선정하기 위하여 MS(12), WPM(13), SH(14), LP(15), NN(16), White(17)와 B5배지는 macro element를 1/4, 1/2, 2 및 4배로 조절된 B5 액체배지 30 mL가 든 100 mL 삼각 플라스크에 모상근 0.5 g을 각각 접종하여 4주간 암배양한 후 모상근 성장 및 tropane alkaloid 함량을 조사하였다.

성장조절제가 모상근의 성장과 tropane alkaloid 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 NAA, GA, IBA 및 BA를 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 mg/L를 각각 처리한 B5배지에 미치광이풀 모상근 0.5 g을 접종한 후 4주간 암배양하였다. 모상근의 성장과 tropane alkaloid 생산에 미치는 당 농도에 따른 영향을 알아보기 위하여 B5배지에 sucrose, fructose, glucose를 1, 3, 5, 7 및 9%(w/v)로 각각 처리하여 4주간 암배양 한 후 모상근 성장과 tropane alkaloid 함량을 측정하였다. 모상근 접종농도가 모상근의 성장과 tropane alkaloid 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 모상근 0.05, 0.25, 0.5, 1 및 2 g을 3% sucrose, 0.1 mg/L IBA가 첨가된 B5배지에 각각 접종하여 4주간 암배양 하였다.

처리구의 성장량 측정은 4주간 배양한 모상근을 배양 배지를 완전히 제거한 후 신선중량(fresh weight)을 측정하였고, 건중량(dry weight)은 배양된 모상근을 50°C 건조기에 넣고 24시간 동안 건조한 후 무게를 측정하였다. 모든 실험은 3반복 이상 행하였으며, 3반복에 대한 평균으로 나타내었다. 본 연구의 결과는 다음 공식에 의한 growth index(GI)로 나타내었다.

$$\text{Growth index} = \frac{\text{최종중량} - \text{초기 접종중량}}{\text{초기 접종중량}}$$

### XAD resin 처리

모상근 배양에서 물질 생산성을 증대시키고 배양배지내 방출되어 있는 tropane alkaloid를 회수하기 위해 polymeric resin을 처리하였다. 본 연구에서는 polymeric resin은 XAD-2, XAD-4(Fluka Co.)을 사용하였으며, resin을 메탄올로 수세한 후 사용하였다. Resin은 30 ml B5액체배지에 모상근을 2주간 배양한 후 0.1, 0.5, 1 g씩을 각각 첨가하였으며, 성장량 측정 및 tropane alkaloid 분석을 행하였다.

### Tropane alkaloid 추출 및 분석

신선 중량 0.5 g의 모상근을 파쇄하여 추출용매(ethanol : NH<sub>4</sub>OH, 19 : 1) 5 mL에 넣고 2시간 동안 sonication 시킨 다음 6,000 rpm에 10분간 원심분리하여 상등액을 취한 뒤 40°C에서 감압 농축하였다. 추출물은 HPLC급 methanol 200  $\mu$ L를 넣어 용해하고, pre-filer( $\phi$  0.2  $\mu$ m, Supelco)로 여과시킨 다음 HPLC 분석 시에 사용하였다.

Tropane alkaloid 분석은 HPLC operating system(305 pump, Gilson)을 이용하였다. Column은 TSK gel ODS(15 cm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m, Tosho)를 사용하였으며, eluents는 50 mM dipotassium phosphate 용액(phosphoric acid로 pH 3.0으로 조정)과 acetonitrile을 78 : 22로 혼합한 용액을 사용하였다. Flow rate는 0.8 mL/min, absorbance는 UV 215 nm, injection volume은 10  $\mu$ L, 분석시간은 30분으로 하였다. Tropane alkaloid 정량분석은 2가지 표준물질의 검량선을 작성하여 행하였다. 이때 2종의 tropane alkaloid(1-100 ppm)의 correlation coefficient(r)는 0.99였으며, 3반복에 대한 편차는  $\pm 0.001\%$ 이었다. Hyoscyamine과 scopolamine의 확인은 chromatography of the retention time 및 표준물질과의 co-chromatography로 행하였다.

## 결과 및 고찰

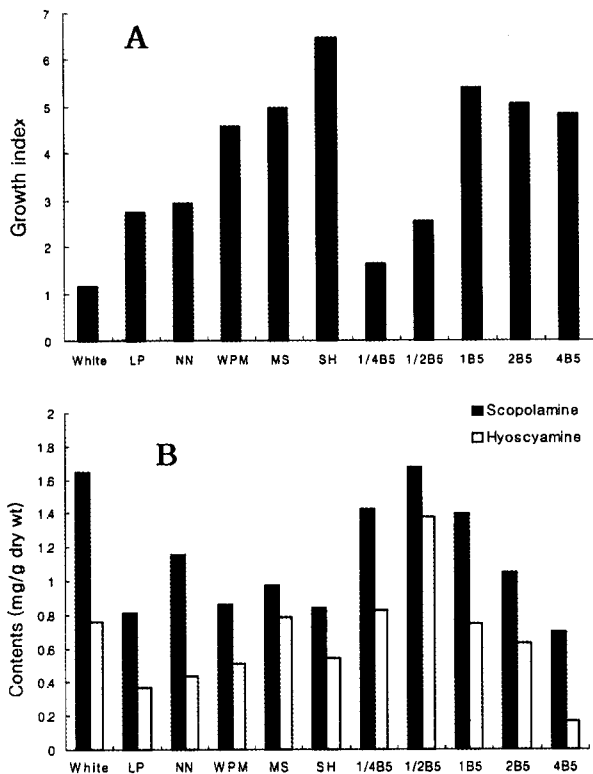
### 모상근 유도 및 배양

미치광이풀 지하경으로부터 모상근을 유도한 결과 1.0 mg/L IBA를 함유한 B5배지에서 배양 2주만에 새로운 측근을 얻었다. 모상근은 같은 배지에서 계대배양하였을 때 왕성한 성장을 보였으며, 새로운 측근이 계속 발생되었다. 모상근은 고체 배지에서 배양된 모상근을 액체 배지로 옮겨 주었을 때 보다 왕성한 성장을 보였다(data not shown).

미치광이풀 모상근에서 hyoscyamine의 함량은 g 건물 중 당 0.2-0.8 mg이었으며, scopolamine의 함량은 0.5-2.0 mg이었다. 미치광이풀 모상근의 tropane alkaloid 함량은 모식물체 뿌리의 함량인 hyoscyamine 2.5 mg과 scopolamine 3.1 mg보다 낮은 함량이다.

### 배양 조건의 확립

유도된 모상근의 성장과 tropane alkaloid 생산에 적합한 배양 배지를 구명하기 위하여 MS, WPM, SH, NN, LP, White와 B5배지의 macro element를 1/4, 1/2, 2, 4배로 각각 희석한 배지에서 모상근을 4주간 배양하였다. 모상근 생장이 가장 양호한 배지는 SH배지로 나타났으며, 4B5, 2B5, MS배지 순으로 나타났다(Figure 1). 그러나 1/4B5, White, NN배지에 배양한 모상근의 생장은 매우 저조하였다. 배양 배지별 tropane

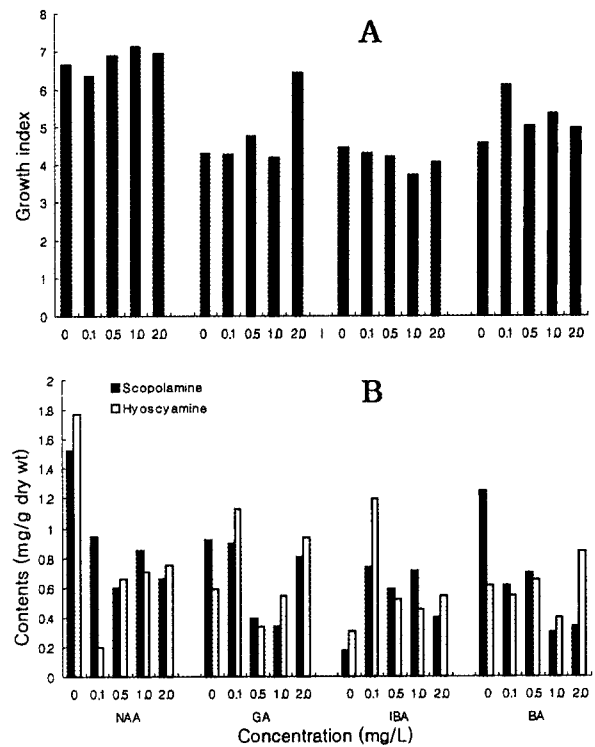


**Figure 1.** Effects of culture media on growth and production of tropane alkaloid in hairy roots. 0.5 g of hairy roots were cultured for 4 weeks in 100 mL flask containing 30 mL of various culture media. Each values are the mean of three replicates. A : growth of hairy roots and B : contents of tropane alkaloids

alkaloid 함량은 scopolamine이 hyoscyamine 보다 높았다. Scopolamine 함량이 가장 높았던 처리구로는 1/2B5, White, 1/4B5배지 순으로 나타났고, 4B5, LP, SH, WPM배지에서는 함량이 매우 낮았다. 배양 배지는 기내배양을 통한 유용물질 생산에 매우 중요한 것으로 알려져 있다(18). 모상근 성장과 물질생산에 적합한 배지가 다르게 나타난 바 미치광이풀 모상근 배양에 의한 tropane alkaloid 생산에는 보다 자세한 배양배지의 구명이 필요하다. 즉 SH 배지는 무기염의 농도가 낮은 배지이며, B5배지는 질소원의 조성이 매우 높은 배지이다(19). 따라서 배지의 macro 및 micro element의 종류나 농도에 따른 조건 구명이 필요하다.

4종의 성장조절제를 각각 농도별로 처리하여 미치광이풀 모상근의 성장과 tropane alkaloid 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Figure 2). 모상근의 성장은 성장조절제 종류와 농도에 따라 각기 다르게 나타났다. 모상근 성장에 가장 좋은 성장조절제로는 NAA로 나타났으며, 전처리구에서 비교적 양호한 성장을 보였으며, 특히 1.0 mg/L NAA 처리구에서 GI가 7.12로 매우 왕성한 성장을 보였다.

한편 tropane alkaloid 함량은 성장조절제를 처리하지 않은 처리구에서 높았으며, 농도가 증가할수록 다소 감소하는 경향을 보였다(Figure 2). 일반적으로 오옥신류는 세포생장을 촉진하지만 물질 생산을 억제하는 것으로 알려져 있다(20). 그러나 본 연구에서는 오옥신인 NAA 처리구에서 물질 생산 억제 현상이 나타나지 않았다.



**Figure 2.** Growth and tropane alkaloid production of hairy roots cultured on B5 liquid medium containing various plant growth regulators. 0.5 g of hairy roots was cultured for 4 weeks in 100 mL flask containing 30 mL of 1/2B5 medium with various growth regulators. A : growth of hairy roots, and B : contents of tropane alkaloids

Sucrose, glucose, fructose를 1, 3, 5, 7 및 9%로 각각 첨가한 1/2B5배지에 미치광이풀 모상근을 4주간 배양하여 성장률과 물질 생산성을 조사하였다(Figure 3). 그 결과 모상근 성장에는 sucrose 처리가 가장 양호하였으며, 3% sucrose 처리구는 배양 4주 후 GI는 5.2로 다른 처리구에 비하여 생장이 가장 높게 나타났다.

Tropane alkaloid 함량은 성장과 마찬가지로 sucrose, glucose, fructose 순으로 나타났으며, 5% sucrose 처리구는 배양 4주 후에 g 건물 중 당 3.3 mg로 다른 처리구에 비하여 물질함량이 가장 높았다(Figure 3). 본 연구 결과 당의 농도가 높을수록 성장감소가 나타났는데 이것은 삼투압 증가에 따른 영향으로 보인다. 일반적으로 당의 농도가 높을수록 물질생산성이 높다고 알려져 있는데 미치광이풀 모상근 배양에서도 같은 양상을 보였다. Zhao 등(21)도 일일초 세포현탁배양에서 5-6%의 sucrose 처리가 물질생산 및 biomass 증식에 효과적이었다고 보고한 바 있다.

모상근 성장과 물질생산에 양호한 B5액체배지 30 mL에 모상근을 0.05, 0.25, 0.5, 1 및 2 g 씩 접종하여 4주간 배양한 후 모상근의 성장과 tropane alkaloid의 생산을 조사하였다(Figure 4). 모상근의 성장은 접종농도가 높을수록 급격히 증가하였다. 그러나 모상근을 접종 4주 후 수확된 최종 모상근의 성장률은 오히려 접종농도가 낮을수록 높았다.

Scopolamine 생산에 적합한 접종농도는 1 g 처리구로 g 건물 중 당 2.5 mg으로 높게 나타났고, hyoscyamine의 생산에

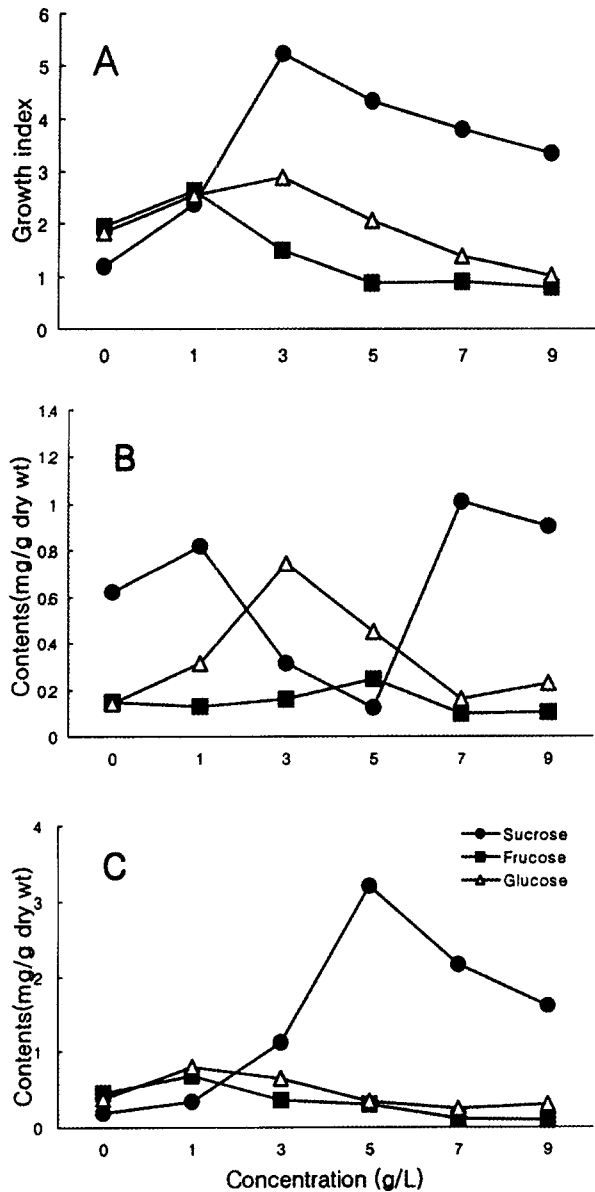


Figure 3. Effects of different carbon sources on growth and tropane alkaloid production of *S. parviflora* hairy root cultures. 0.5 g of hairy roots was cultured for 4 weeks in 100 mL flask containing 30 mL of 1/2B5 basal medium with various carbone sources. A : growth of hairy roots, B : content of hyoscyamine, and C: content of scopolamine

는 0.5 g일 때 g 건물 중 당 0.9 mg을 나타내었다.

**XAD resin의 효과**

XAD 처리는 모상근 생장에 영향을 미치지 않았으며, 미량의 XAD 처리는 오히려 모상근의 생장을 촉진시켰다(Figure 5). Tropane alkaloid 생산성은 XAD 처리농도에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다(Figure 5). Hyoscyamine 생산은 배양 20일까지는 큰 변화가 없었으나 배양 25일에는 1 g XAD 처리구에서 g 건물 중 당 3.3 mg으로 생산성이 증대되는 것으로 나타났다. Scopolamine은 배양 15일에 함량이 증가하였다가 다시 감소하였고, 배양 25일에 다시 증가하는 경향을 보였다. 이러한 경향은 무처리구와 XAD처리구 모두에서 관찰

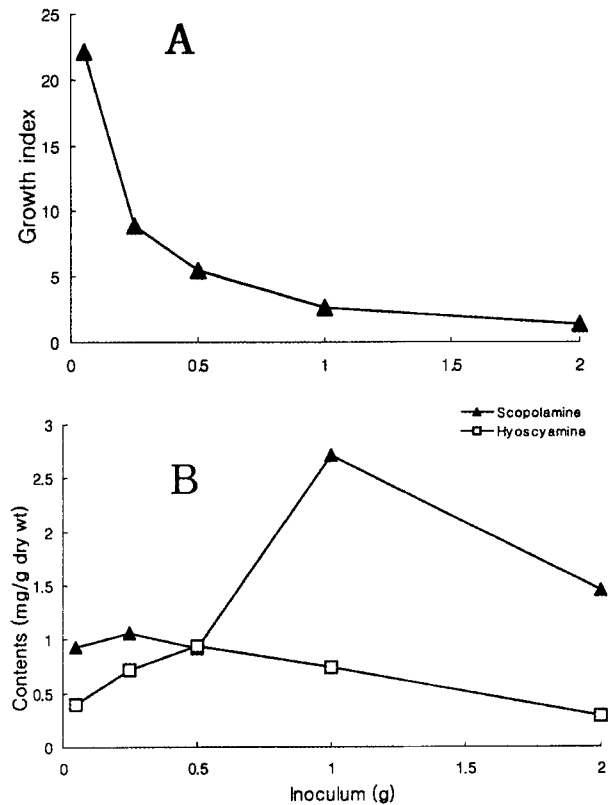


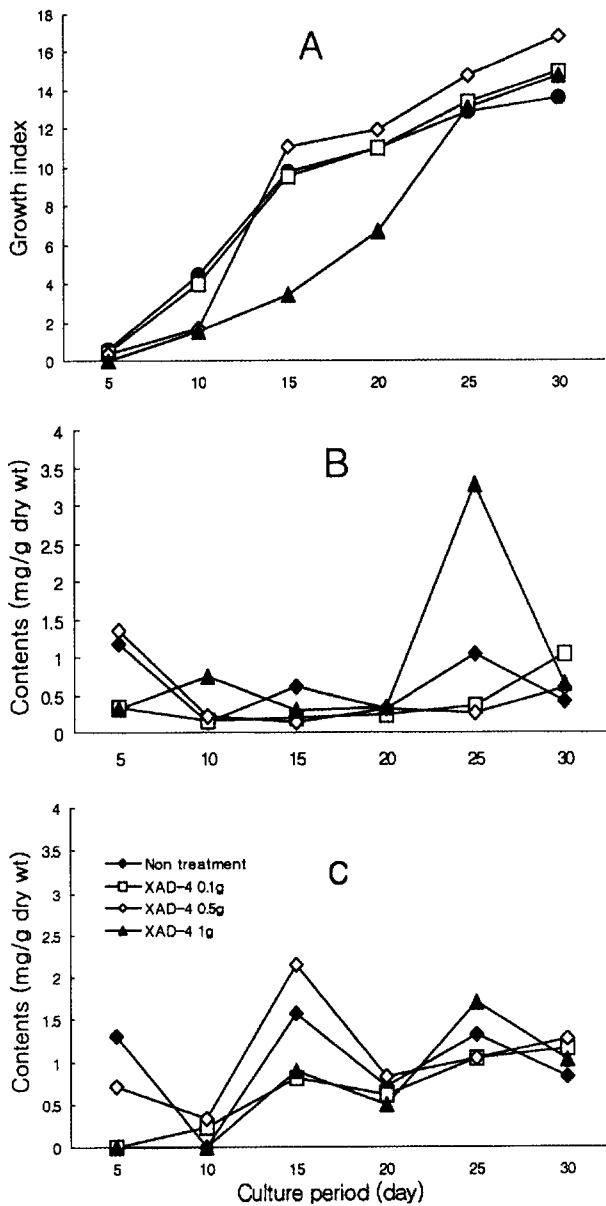
Figure 4. Effects of inoculum density on growth and tropane alkaloid production. Various inoculum of hairy roots was cultured for 4 weeks in 100 mL flask containing 30 mL of 1/2B5 basal medium without growth regulators. A : growth of hairy roots, and B : contents of tropane alkaloids

되었다. Scopolamine 생산에는 배양 15일까지는 0.1 g 처리구가 좋았으나 그 이후에는 1g 처리구가 생산을 촉진하는 것으로 나타났다.

XAD resin 내에 흡착된 tropane alkaloid 함량을 조사한 결과 1 g XAD 처리구에서 가장 높게 나타났다(Figure 6). Hyoscyamine은 배양 5일에 가장 높은 물질 흡착력을 보였고, 그 이후에는 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 scopolamine은 배양초기에 회수한 resin에서는 검출되지 않았으나, 20-30일 후에 검출되기 시작하여, 배양 28일에 가장 많이 검출되었다.

한편, 배양배지 내 scopolamine과 hyoscyamine 함량은 대체로 같은 경향을 보였다(data not shown). 30 mL 배양배지의 hyoscyamine 함량은 1.0 mg 미만이었으며, 배양 30일에 2.3 mg으로 급증하였다. Scopolamine 함량도 배양 30일 이전까지는 1.0 mg 미만이었다가 배양 30일에 2.3 mg으로 증가되었다. 배양배지로 방출된 tropane alkaloid는 XAD resin 처리로 50-80% 정도를 회수할 수 있었다.

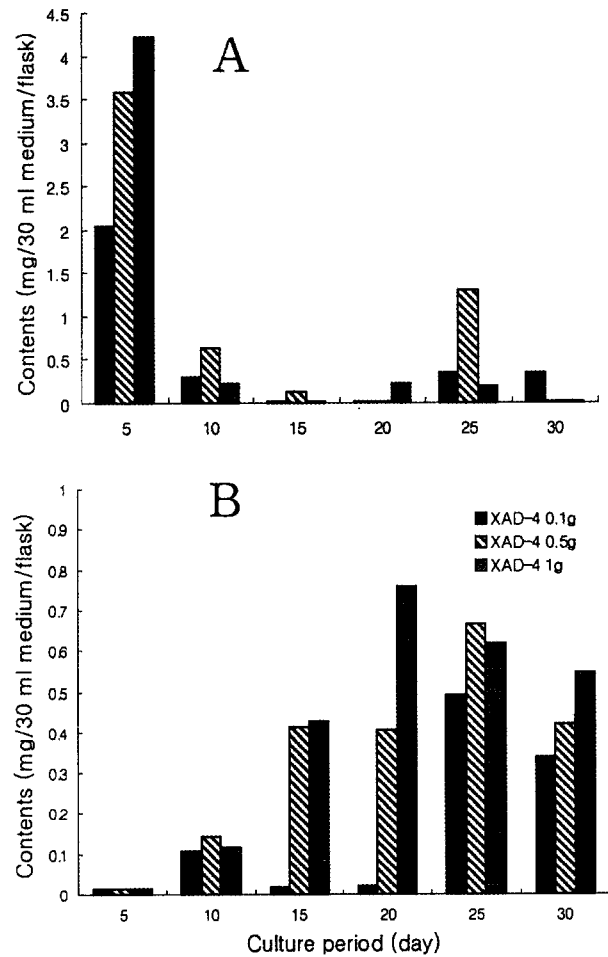
XAD resin은 물질생산성을 증대시킬 뿐만 아니라 생산 억제 물질과 생산된 물질의 분해를 촉진하는 물질을 흡착하여 물질의 feedback을 조절하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있다(22). 본 연구에서도 XAD resin 처리는 tropane alkaloid 물질 생산을 촉진하였다. XAD resin 처리는 생산 물질의 resin 내 흡착보다는 미치광이풀 모상근의 물질 생산성을 촉



**Figure 5.** Effects of XAD on growth and tropane alkaloid production in the hairy root cultures. 0.5 g of hairy roots was cultured for 4 weeks in 100 mL flask containing 30 mL of 1/2B5 basal medium with various XAD resin. A : growth of hairy roots, and B : content of hyoscyamine, and C : content of scopolamine.

진시키는데 것으로 나타났다. 이것은 모상근 배양에 처리된 XAD resin이 생산된 물질의 흡착보다는 오히려 elicitor의 역할을 수행하였음을 나타내준다고 볼 수 있다. 그러나 tropane alkaloid의 생산성을 보다 증가시키기 위해서는 보다 다양한 농도 및 polymeric resin을 대상으로 자세한 연구가 요망된다.

본 연구에서 구명되어진 최적 성장 및 물질 생산조건은 tropane alkaloid생산을 위한 2단계 배양에 응용될 수 있다. 차후의 연구는 이러한 배양 토대 위에 고생산성 세포주 선발, 물질 생합성에 관여하는 유전자 등을 이용한 대사공학적인 연구 등을 행할 예정이다.



**Figure 6.** Recovery yield of tropane alkaloid by adsorption of XAD resin. 0.5 g of hairy roots was cultured for 4 weeks in 100 mL flask containing 30 mL of 1/2B5 basal medium with various XAD resin. XAD resin was extracted with MeOH and then analysed by HPLC. Each values are the mean of three replicates. A : content of hyoscyamine, and B : content of scopolamine.

**요약**

멸종위기의 자생식물인 미치광이풀로부터 중요 의약품인 tropane alkaloid를 대량 생산하기 위한 연구의 일환으로 모상근의 최적 배양조건 및 XAD를 이용한 물질 생산 최적 조건을 확립하였다. 모상근은 표면 살균된 지하경을 1.0 mg/l IBA가 첨가된 B5배지에 배양하여 유도하였으며, 다양한 배양조건에서 성장된 모상근의 hyoscyamine과 scopolamine 함량은 HPLC로 분석하였다. 모상근의 성장에 적합한 배지로는 SH배지로 구명되었고, tropane alkaloid 생산을 위한 최적 배지로는 1/2B5배지로 나타났다. 모상근 성장에 가장 좋은 성장조절제로는 NAA로 나타났으며, 물질생산에는 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서 좋았다. 모상근 성장에 적합한 탄소원으로는 3% sucrose였으며, 물질생산에는 5% scurose가 가장 좋았다. 모상근의 성장에 가장 양호한 접종농도는 0.5 g였으며, 물질생산에는 1 g 처리구에서 좋았다. XAD 처리는 tropane alkaloid 생산성을 증가시켰으며, 배지내 물질방출을 유도하였으며, 총생산 물질의 50-80%를 회수하는 것으로 나

타났다. 본 연구 결과는 미치광이풀 모상근 배양을 통한 tropane alkaloid 생산을 위한 생물공정 발전에 기여할 것이다.

### 감 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용기술개발사업단의 연구비지원(과제 번호# PF003103-00)에 의해 수행되었으며 이에 감사한다.

### REFERENCES

- Fowler, M. W. (1985), Commercial applications and economic aspects of mass plant cell culture. In *Plant Biotechnology*, S. H. Mantell and H. Smith, Eds., pp3-37, Cambridge Univ. Press, London.
- Verpoorte, R. R. and J. S. van der Heijden (1993), Plant cell biotechnology for the production of alkaloids present status and prospects. *J. Nat Prod.* **56**, 186-207.
- Hilton, M. G. and M. J. C. Rhodes (1990), Growth and hyoscyamine production of hairy root cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 132-138.
- Aoki, J., H. Matsumoto, Y. Asako, Y. Matsunaga, and K. Shimomura (1997), Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots regenerated plants of *Atropa belladonna* with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. *Plant Cell Rep.* **16**, 282-286.
- Yamada, Y. and T. Hashimoto (1982), Production of tropane alkaloids in cultured cells of *Hyoscyamus niger*. *Plant Cell Rep.* **1**, 101-102.
- Endo, T. and Y. Yamada (1984), Tropane alkaloid production in cultured cells of *Duboisia*. *Phytochem.* **24**, 1233-1236.
- Kamada, H., N. Okamura, M. Satake, H. Harada, and K. Shimomura (1986), Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Rep.* **5**, 239-242.
- Oksman-Caldentey K. M. and R. Hiltunen (1996), Transgenic crops for improved pharmaceutical products. *Field Crops Res.* **45**, 57-69.
- Pitta-Alvarez, S. I., T. C. Spollansky, and A. M. Giuliatti (2000), Scopolamine and hyoscyamine production by hairy root cultures of *Brugmansia candida* : influence of calcium chloride, hemicellulase and theophylline. *Biotechnol. Lett.* **22**, 1653-1656.
- Zabetakis, I., R. Edwards, J. T. G. Hamilton, and D. O'Hagan (1998), The biosynthetic relationship between littorine and hyoscyamine in transformed roots of *Datura stramonium*. *Plant Cell Rep.* **18**, 341-345.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima (1968), Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**, 151-158.
- Murashige, E. and F. Skoog (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
- Lloyd, G. and B. McCown (1981), Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel(*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Proc. Inc. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* **30**, 421-427.
- Schenk, R. U. and A. C. Hildebrandt (1972), Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* **50**, 199-204.
- Quoirin, M. and P. Lepoivre (1977), Improved media for in vitro culture of *Prunus* sp. *Acta Hort.* **78**, 437-442.
- Nitsch, J. P. and C. Nitsch. (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* **163**, 85-87.
- White, P. R. (1963), *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. 2nd ed. Romald Press, New York.
- George, E. F. and P. D. Sherrington (1984), *Plant Propagation by Tissue Culture*. pp 184-244, Exogenetics Ltd. London.
- Choi, M. S., D. I. Shin, and Y. G. Park (1996), Berberine production by cell cultures of cork tree (*Phellodendron amurense* Rupr.). *Kor. J. Pharmacogn.* **27**(1), 32-36.
- Stafford, A., L. Smith, and M. W. Fowler (1985), Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharanthus roseus*(L) G. Don. growth-related indole alkaloid accumulation in batch cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **4**, 83-94.
- Zhao, J., W. H. Q. Zhu, X.W. He, J. Zhao, W. H. Zhu, Q. Hu, and X. W. He (2001), Enhanced indole alkaloid production in suspension compact callus clusters of *Catharanthus roseus*: impacts of plant growth regulators and sucrose. *Plant Growth Regulation* **33**(1), 33-41.
- Maisch, R., B. Kroop, and R. Beiderbeck (1986), Adsorbent culture of tobacco cell suspensions with different adsorbants. *Z. Naturforsch.* **41C**, 1040-1044.