

## 미치광이풀(*Scopolia parviflora*)의 모상근 배양에 의한 Tropane Alkaloid 생산

安 峻 徹·鄭 炳 均·白 允 雄·金 永 俊\*  
高 庚 珉·黃 聲 振·黃 柏

(全南大學校 自然科學大學 生物學科, \*東新大學校 食品營養學科)

### Production of Tropane Alkaloids by Hairy Root Cultures of *Scopolia parviflora*

Ahn, Jun Cheul, Byung Gyun Jung, Yun Woong Paek, Young Jun Kim\*,  
Kyeong Min Ko, Sung Jin Hwang and Baik Hwang

(Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju and

\*Department of Food Science and Nutrition, Dongshin University, Naju)

#### ABSTRACT

Transformed hairy roots of *Scopolia parviflora*, producing tropane alkaloids and native to Korea, were obtained following infection of rhizome segments with *Agrobacterium rhizogenes* A<sub>4</sub>. Each root tip induced from inoculum sites excised and cultured in MS agar or liquid medium. About seventy of hairy root clones were established. Among them, several fast growing hairy root clones were examined for alkaloid content. Two dimensional TLC analysis showed that the tropane alkaloid pattern of hairy root was more complicated than that in the rhizome of mother plant. On the other hand, some hairy root clones did not produce scopolamine and hyoscyamine. In HPLC analysis, some hairy root clones yield higher levels of scopolamine and hyoscyamine than those of mother plant rhizome which used for infection. Scopolamine and hyoscyamine were identified by comparison of their retention times and of their mass spectra data with those of authentic compounds.

#### 서 론

오래전부터 식물은 의약품, 식품, 향장품 등의 중요한 자원으로 이용되고 있으며, 의약품의 경우에 있어 미국을 예로 들면 각종 처방에 이용되는 약의 25%를 생약성분이 차지하고 있다(Farnsworth, 1984). 그중 식물에서 유래하는 alkaloids는 약 30여가지가 상업적으로 이용되고 있으며 (Verpoorte *et al.*, 1993), 본 실험으로 얻고자 하는 tropane alkaloids인 scopolamine과 hyoscyamine은 진통제와 진경제로 사용되는 의학적으로 중요한 약품으로 이들은 가지과 (*Solanaceae*)의 특징적인 2차대사산물로서 뿌리에서 합성되어 잎으로 수송되며(Endo and Yamada, 1984), 복잡한 화학구조에 기인한 경제적인 생합성이 어려워 오늘날도

*Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Hyoscyamus* 및 *Scopolia* 등의 식물체에서 추출하여 상업적으로 이용되고 있다. 하지만 유용물질을 생산하는 대부분의 식물체는 생육기간이 길고 지형학적 분포가 좁으며 기후의 변동 및 재배조건에 따르는 생약성분의 변이에 따르는 균질한 품질의 유지와 공급의 안정성 등의 문제점을 갖는다. 이의 대안책으로 식물세포 배양을 이용하여 유용한 2차대사물질을 얻고자하는 시도가 계속되고 있으며, 일부 성공사례(Fujita *et al.*, 1987)가 있기도 하다. 그러나 가지과 식물의 경우에는 캘러스 또는 세포현탁 배양을 이용하여 tropane alkaloids를 얻고자하는 대부분의 연구에서 이들 물질이 모식물체에 비하여 매우 낮은 수준이거나 또는 검출이 용이하지 않았다(Staba and Jindra, 1968; Street *et al.*, 1969; Yamada and Hashimoto,

1982). 그에 반하여 뿌리배양과 겔러스에서의 기관분화에 의한 부정근 배양의 경우 원래 식물의 뿌리에 동일한 수준으로 alkaloids를 합성하였으며(Tabata and Hiraoka, 1974; Endo and Yamada, 1985), 특히 *Agrobacterium rhizogenes*에 의하여 형질전환된 모상근의 경우에는 부정근에 비하여 훨씬 빠른 성장을 보이는 것은 물론 원래 식물의 뿌리와 비교되는 수준으로 alkaloids를 함유하는 것으로 보고되었다(Flores and Filner, 1985; Knopp *et al.*, 1988; Christen *et al.*, 1989; Shimomura *et al.*, 1992). 현재는 *Datura*, *Hyoscyamus*, *Atropa* 등의 모상근 배양을 이용하여 tropane alkaloids를 얻고자하는 시도가 일본 등 세계 각국에서 활발히 진행되고 있으며, 여기에는 monoclonal 항체 등을 이용한 미량분석법에 따른 고생산주 선발방법의 개선(Hagemann *et al.*, 1992), 대량배양을 위한 생물발효의 최적화(Jung and Tepfer, 1987; Matsumoto and Tanaka, 1991), tropane alkaloids 생합성 효소(Peerless *et al.*, 1990) 및 유전자(Hashimoto *et al.*, 1990)의 파악과 관련 유전자의 조작(Saito *et al.*, 1992)에 따른 목표물질의 생산성을 높여려는 연구 등이 수행되고 있다.

본 실험에서는 현재 전량을 수입에 의존하고 있는 tropane alkaloids의 조직배양을 이용한 기내생산을 최종목적으로 하고 있으며, 일차적으로 hyoscyamine, scopolamine 고생산주의 선발이 선행되어야 할 것으로 보고 한국특산으로 근연종인 *Scopolia japonica*에 비교하여 tropane alkaloids의 함량이 우세한 것으로 알려진(Konoshima *et al.*, 1972) *Scopolia parviflora*를 재료로 하여 모상근을 유도·배양하고 고생산주의 선발 및 모상근에서의 hyoscyamine과 scopolamine 동정을 통하여 기내 생산성 여부를 조사하였다.

## 재료 및 방법

**식물재료 및 사용균주.** 광릉 수목원에서 분양받은 미치광이풀(*Scopolia parviflora* Nakai)의 근경을 70%(v/v) ethanol에 10분, 5%(v/v) NaOCl 용액에 15분간 표면살균하여 표피를 제거한 다음 균 접종에 이용하였다. 사용균주는 *Agrobacterium rhizogenes* A<sub>4</sub> strain이며, 감자추출배지(potato 2%, sucrose 1.5%, agar 1.2%)로 27°C 암소에서 2일간 배양하여 무균수로 약 10<sup>8</sup> bacteria/mL로 희석하여 사용하였다.

**모상근 유도 및 배양.** 표면살균한 근경은 0.5~0.8 cm 두께로 자른 다음 한쪽면에만 균을 접종하여 항생제(cefotaxime 300 mg/L)가 첨가된 MS 고형배지(Murashige and Skoog, 1962)에 치상하고, 27°C, 암소에서 균의 제거와 동시에 모상근을 유도하였다. 유도된 모상근은 생장점에서 1~2 cm 부위만을 절취하여 항생제(Cefotaxime 300 mg/L)

를 함유한 고형배지 또는 액체배지에 배양하여 균을 완전히 제거한 다음 항생제가 없는 액체배지에서 4주 간격으로 세대배양하였다.

**모상근 clone 선발.** 절편의 접종부위에서 유기된 모상근 중 활발히 자라는 뿌리만을 각각 따로 절취·배양하여 절취한 순서에 따라 SP1번부터 SP70번까지 임의로 선발·명명하였다.

**Opine 분석.** 모상근의 형질전환 확인은 Petit 등(1986)의 방법에 따라 paper electrophoresis를 이용하여 opine의 합성여부로 조사하였다.

**Tropane alkaloids의 분석.** Tropane alkaloids의 추출은 마쇄된 조직(건중량으로 0.2 g)을 EtOH : 28% NH<sub>4</sub>OH (9 : 1) 혼합액에서 24시간 냉침하여 추출한 후 추출액을 45°C에서 감압농축하였다. 농축액을 소량의 0.1 N HCl로 용해시킨 다음 0.5 M KOH로 pH를 12로 조정하고 동일한 부피의 CHCl<sub>3</sub>로 3회 추출하여 CHCl<sub>3</sub> 혼합액을 40°C에서 감압농축하였다. 농축액을 MeOH 0.5 mL에 녹여 0.45 μm membrane filter(Alltech)로 여과한 다음 TLC와 HPLC 및 GC-Mass 분석에 사용하였다. 표준인 scopolamine과 hyoscyamine은 Sigma사에서 구입하였으며, 소량의 MeOH에 용해시킨 후 표준액을 TLC상의 전개 및 HPLC의 retention time의 검증 및 검량선의 측정에 이용하였다.

TLC 분석은 pre-coated된 silica gel 60 F<sub>254</sub>(Merck Co.)를 plate로 사용하였으며, 재배근경의 추출시료는 10 μL를 그외 각 모상근의 추출시료는 15 μL를 점적하여 CHCl<sub>3</sub> : EtOH : 28% NH<sub>4</sub>OH(85 : 15 : 4, v/v/v)를 1차전개용매로, n-BuOH : AcOH : H<sub>2</sub>O(10 : 3 : 4)를 2차전개용매로 각각 전개하였다. 전개된 alkaloid의 발색확인에는 Dragendorff's 시약을 이용하였다.

HPLC 분석은 재배근경의 추출시료는 5 μL를 그외 모상근 추출시료는 10 μL를 주입하였으며, 장치로는 Waters의 injector(V6K), detector(Tunable Absorbance detector), integrator(741 Data module)를 사용하였고, column은 실온에서 Waters의 μ Bondapak C<sub>18</sub> Column(10 μm, 3.9×300 mm)을 사용하였다. 이동상으로는 10 mM Sodium-1-heptane sulfonate : methanol(6 : 4, v/v)를 1.4 mL/min의 속도로 하였으며 215 nm에서의 흡광도로 검출하였다.

GC-Mass 분석장치로는 (VG-250) mass data 분석기와 조합된 (Hewlett-Packard 5890)를 사용하였으며, Shimadzu capillary column HiCap-CAP1(0.2 mm ID×25 m)에 carrier gas로 He를 40 mL/min로 하였으며, injection temp.는 180°C; 35°C에서 2분간 isothermal, 35~300°C, 30°C/min; 300°C에서 isothermal; source temp.: 250°C, 이온화 에너지: 70 eV, electron multiplier: 2000 V의 조건으로 행하였다.

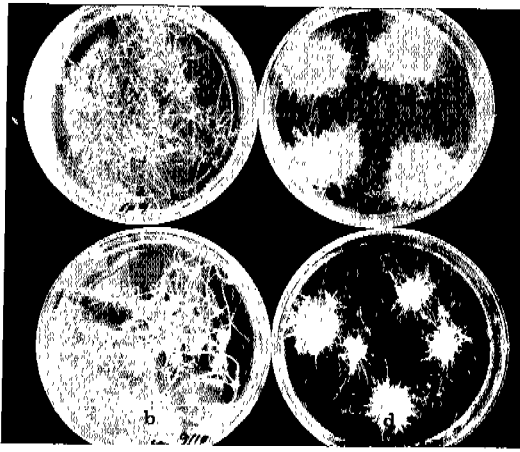


Fig. 1. Various hairy root clones of *S. parviflora* cultured on hormone-free MS agar medium. a, hairy root clone SP9; b, hairy root clone SP2; c, hairy root clone SP41; d, hairy root clone SP10.

결과 및 고찰

표면살균한 조직에 균을 감염시킨 후 곧바로 항생제가 함유된 고형배지에 치상한 결과 약 3~4주가 경과하면 절편의 균 감염부위에서 작은 tumor의 형성과 더불어 모상근이 활발히 유도되므로써, 항생제의 조기처리가 T-DNA 삽입 등 형질전환 과정에는 별다른 영향을 미치지 않으며, 이후 모상근의 무균배양을 위한 균의 제거에는 훨씬 용이한 것으로 확인되었다. 유도된 모상근을 절취하여 배양한 결과 모상근의 일반적인 특징인 많은 털뿌리(root hair)와 측뿌리(branching) 형성을 나타냈으며, 개개 선발 clone은 고형 배지 상에서 모상근이 자라는 형태나 측지능 등의 표현형으로 비교할 때, 뿌리의 성장과 분지능이 양호한 clone(a), 생장은 양호한 반면에 분지능이 떨어지는 clone(b), 모상근이 cluster를 형성하면서 성장하는 clone(c), 일부 캘러스화가 수반되며 모상근이 성장하는 clone(d) 등 독특한 성장형태를 보여주었다(Fig. 1). 전체적으로 볼 때 70개의 선발 clone에서 약 47%만이 지속적인 계대배양에서 안정된 성장을 나타냈으며, 28%는 뿌리가 더디게 자라고 일부 캘러스화가 수반되는 특징을 나타내며, 나머지는 생장이 극히 저조하거나 정지하여 *S. japonica*를 이용한 Mano 등 (1986)의 실험결과에 유사하였고, Hwang 등(1993)에 의한 *Beta vulgaris* 모상근 배양의 경우 동일 모식물에서 유도하여 각각 따로 절취, 배양한 모상근 선발 clone 모두가 고형배지상에서 독특한 성장형태를 나타내는 점 등에 일치하는 결과를 보였다. 이러한 모상근 clone 각각의 독특한 성장형태와 뒷부분에서 언급되는 모상근 clone간 물질생성능의 차이는 T-DNA의 무작위적인 삽입에 따른 계승내

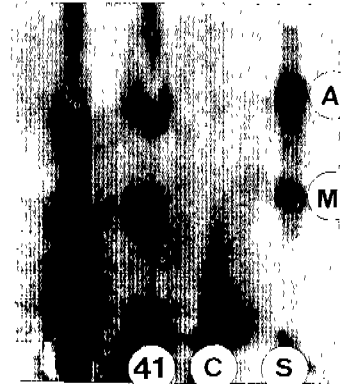


Fig. 2. Paper electrophoresis of extracts from cultivated rhizome and hairy roots of *S. parviflora*. Lane S, authentic mannopine (M) and agropine (A); Lane C, cultivated rhizome; Lane 1, hairy root clone SP1; Lane 41, hairy root clone SP41.

T-DNA 위치의 다양성 및 다양한 copy 수 등에 기인하는 것으로 고찰한 Taya 등(1992)에 동의하며, 오랜 계대배양 시에도 이러한 특징은 안정성이 있는 것으로 확인되어 모상근의 유전적, 생화학적 안정성에 대한 Aird 등(1986)의 보고 및 삽입된 T-DNA의 안정성(Tepfer *et al.*, 1984)에 따르는 것으로 생각된다.

본 실험에 이용한 균주인 *A. rhizogenes* A<sub>4</sub> strain은 agropine 타입으로 형질전환된 식물체에서 agropine, mannopine, mannopinic acid, agropinic acid이라는 식물체에서는 일반적으로 발견되지 않는 특이한 아미노산 유도체를 생성하는 것으로 알려져있다(Petit *et al.*, 1983). 선발된 모상근 clone인 SP1, SP41를 시료로 하여 agropine과 mannopine의 합성여부를 paper electrophoresis로 조사하였던 바, 형질전환되지 않은 미치광이풀 근경의 경우 표품과 동일한 R<sub>f</sub>치에서 opine이 검출되지 않은 반면에, SP1과 SP41에서는 표품인 mannopine과 agropine의 R<sub>f</sub>에 거의 일치하는 silver nitrate에 염색되는 spot가 분리되어 이들 두 clone의 경우 Ri-plasmid에 의해 형질전환이 되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

동일기간 동안 배양한 모상근 중 비교적 생장이 양호한 모상근 clone SP1, SP41, SP65, SP70 그리고 미치광이풀의 근경에서 추출한 alkaloids 분획을 CHCl<sub>3</sub>:EtOH:28% NH<sub>4</sub>OH(85:15:4, v/v/v)를 1차전개용매로, n-BuOH:AcOH:H<sub>2</sub>O(10:3:4)를 2차전개용매로 TLC한 후 dragendorff's 시약에 의한 발색에 의해 표품과의 전개치를 비교한 결과, Fig. 3에서 보는 것처럼 각 clone에 따라 dragendorff's에 양성반응을 보이는 다양한 숫자의 spot를 관찰할 수 있었으며 이들 대부분이 오렌지색으로 발색되어 alkaloid

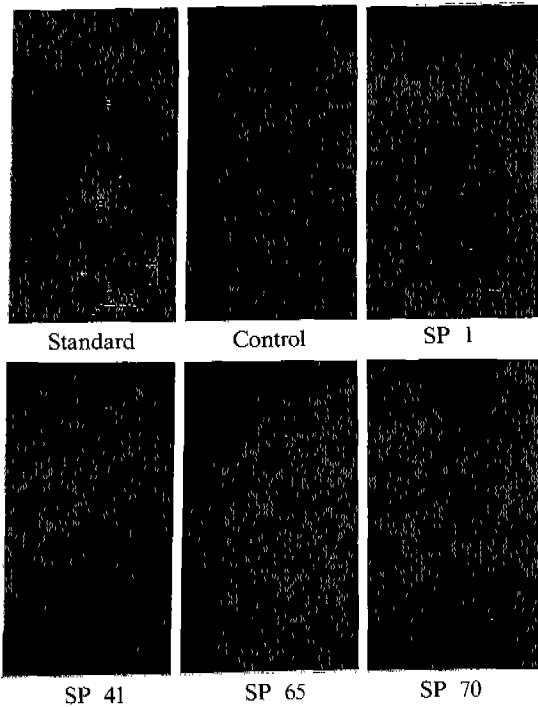


Fig. 3. Thin layer chromatogram of tropane alkaloids extracted from cultivated rhizome and hairy roots of *S. parviflora*. Standard, authentic scopolamine (S) and hyoscyamine (H); Control, cultivated rhizome; SP1, 41, 65, 70, hairy root clones.

성분으로 추정할 수 있었다. 특히 배양한 모상근에 있어서는 재배근경에 비하여 일반적으로 alkaloid spot의 숫적인 증가를 보여, 주요 alkaloid인 hyoscyamine과 scopolamine 이외에도 다수의 소수 alkaloid가 생성되는 것으로 추정할 수 있었다. 이러한 결과는 Christen 등(1990)에 의한 *Datura candida* hybrid 모식물과 모상근의 tropane alkaloids 양상에 현저한 차이가 있었다는 내용과 Kyo 등(1990)에 의한 선발된 모상근 clone 간의 성장비와 물질생성능의 차이에 대한 실험결과에 일치됨을 보인다. 그중 추출하여 약리적으로 사용이 가능한 scopolamine과 hyoscyamine의 성분만을 비교하여 볼 때 spot의 크기로 추정한 재배근경의 alkaloid 성분은 대부분 hyoscyamine이 차지하고 있으며, 비교적 적은 양의 scopolamine을 생성하는 것으로 나타났다. 마찬가지로 SP1, SP41, SP70 역시 spot의 크기로 보아 대조구와 마찬가지로 scopolamine에 비교하여 hyoscyamine의 양이 상대적으로 높은 것으로 나타났으며, SP65의 경우는 표준인 scopolamine, hyoscyamine과 같은 전개치에서 거의 발색이 없는 것으로 보아 이들 물질의 생성능이 아주 저조한 것으로 나타났다. 특히 SP65의 이러한 특징은 이

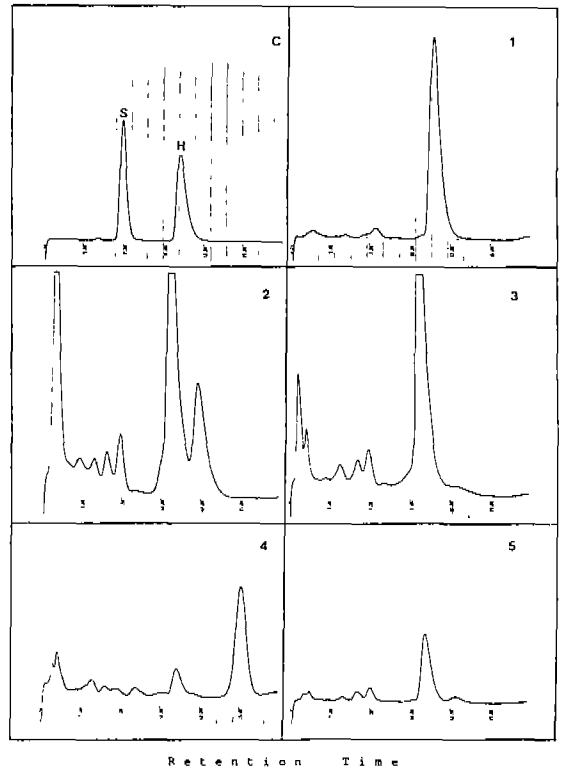


Fig. 4. High performance liquid chromatogram of tropane alkaloids extracted from cultivated rhizome and hairy roots of *S. parviflora*. C, standard scopolamine (S) and hyoscyamine (H); 1, cultivated rhizome; 2, hairy root clone SP70; 3, hairy root clone SP41; 4, hairy root clone SP15; 5, hairy root clone SP63.

후의 실험목표가 될 수 있는 유전자조작에 의한 목표물질의 생성능 향상에 있어 scopolamine과 hyoscyamine의 생합성에 관련된 유전자의 파악에 있어 일종의 mutant로 활용이 가능할 것으로 기대되고 있다. 모식물체에 비하여 형질전환된 모상근에 있어서의 이러한 물질생성능의 변화 및 다양화는 T-DNA의 감염에 의한 세포내 물질대사의 변화에 기인하는 것으로 생각되며, 이점은 생리적으로 알려지지 않은 물질의 생성에 대한 장점과 단점이 될 가능성이 있다고 하겠다. 장점으로는 목표가 되는 생리활성물질의 함량이 높아진 고생산주의 선발 가능성과 또한 기존의 생리활성물질보다 강력한 유도체의 생성 가능성을 들 수 있겠다. 단점으로는 모상근에서 얻어지는 생리활성물질의 순수정제가 필요하며 그 외 모식물체에서 발견되지 않은 물질에 대한 안전성에 대한 검사가 요구된다는 점이다.

Fig. 4는 미치광이풀의 근경과 배양한 모상근에서 추출한 tropane alkaloids를  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column을 이용하여

Table 1. Comparison of scopolamine and hyoscyamine content of *S. parviflora* mother plants rhizome, callus and hairy root clones

	Alkaloids (% dry wt)		Ratio S/H ( $\times 100$ )
	Scopolamine	Hyoscyamine	
Mother plants			
rhizome	0.016	0.550	2.9
Callus <sup>a</sup>	N.D <sup>c</sup>	N.D	—
SP1	0.022	0.18	12.2
SP15	0.0043	0.0008	538
SP41	0.01	0.273	3.6
Hairy root clones <sup>b</sup>			
SP51	0.0025	0.005	59
SP63	0.0001	0.008	1.2
SP65	N.D	N.D	—
SP70	0.013	0.573	2.2

<sup>a</sup>Data from Konoshima et al. (1972), <sup>b</sup>Hairy roots cultured for 4 weeks in liquid medium, <sup>c</sup>N.D=not determinable (less than 10~5%).

10 mM sodium-1-heptane sulfonate : methanol(6 : 4, v/v)를 이동상으로 하여 HPLC한 것으로서 scopolamine과 hyoscyamine의 retention time이 각각 7.5분과 11.25분에 분리되었다. TLC상에서와 마찬가지로 HPLC에서도 미치광이풀의 근경에서는 scopolamine과 hyoscyamine 외에 minor alkaloids이 비교적 적은 반면에, 모상근 clone에 있어서는 일반적으로 scopolamine, hyoscyamine 외에 많은 minor alkaloids 의 peak를 나타내었다. 재배근경의 경우 건조량 당 hyoscyamine이 약 0.55%, scopolamine이 0.016%인 scopolamine : hyoscyamine의 비(S/H $\times 100$ )가 2.9였으며, 모상근 clone들은 scopolamine · hyoscyamine의 함량과 비율에서 모두다 변이가 매우 다양하였다. 예를 들면 SP41은 hyoscyamine 0.273%와 scopolamine 0.01%로 S/H 비가 3.6이며 SP51은 0.005와 0.0025%로 SH 비가 59로 나타나고, 그중 함량이 가장 우수한 clone인 SP70의 경우는 hyoscyamine이 0.573%, scopolamine 0.013%, S/H 비는 2.2로 각각 측정되었다(Table 1). 이는 Endo와 Yamada(1984)에 의한 *Duboisia leichhardtii* 모상근 배양에서 모식물에 비하여 hyoscyamine에 대한 scopolamine의 비가 전체적으로 높아지는 결과 및 Mano 등(1986)에 의한 *S. japonica* 모상근 배양에서 일부 clone의 경우 모식물체 근경 이상의 scopolamine 또는 hyoscyamine를 생성하였다는 결과와 일치하였다.

GC-Mass 분석에서 hyoscyamine과 scopolamine의 retention time이 각각 14.61과 12.56에서 검출되며, mass spectrum을 살펴보면 hyoscyamine은 M<sup>+</sup>가 m/z 289에서 scopolamine은 303으로 나타나고 그 외 mass fragmentation

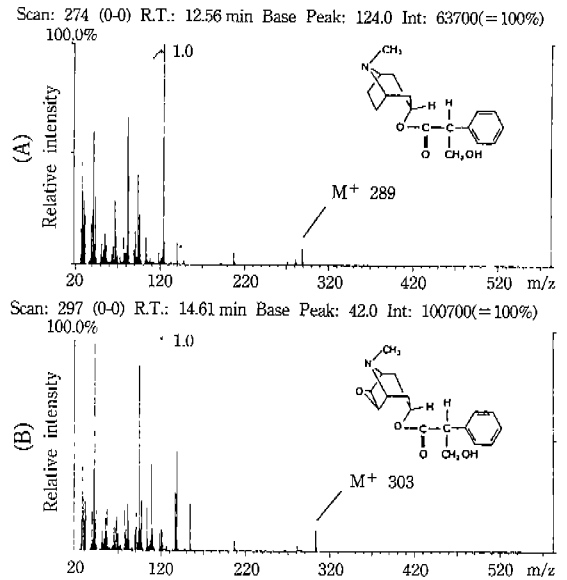


Fig. 5. Mass spectra of hyoscyamine (A)/scopolamine (B) extracted from hairy root clone SP70 of *S. parviflora*.

pattern에서도 표준과 거의 일치하는 양상을 보여주어 모상근에서 합성하는 주요 alkaloids는 재배근경의 주요 알칼로이드인 hyoscyamine 및 scopolamine과 동일함을 확인하였다(Fig. 5).

## 적 요

*Agrobacterium rhizogenes*를 이용하여, 한국특산으로 tropane alkaloids를 생성하는 미치광이풀(*Scopolia parviflora*)의 형질전환된 모상근 배양이 확립되었다. 접종부위에서 유기된 모상근 각각은 절취하여 MS 고형 또는 액체배지에 배양하였다. 약 70개의 모상근 clone을 선발하였고, 그중 생장이 양호한 일부 모상근 clone의 alkaloids 함량이 조사되었다. 2차 TLC 분석에서, 모상근에서의 tropane alkaloids의 생성양상이 모식물 근경에서보다 복잡한 양상을 보였고, 일부 모상근은 scopolamine과 hyoscyamine을 생성하지 않았다. HPLC 분석을 통하여, 몇몇 모상근 clone은 접종에 이용하였던 모식물 근경 이상의 hyoscyamine과 scopolamine을 생성함을 확인하였다. GC-MS 분석을 통하여, 모상근에서 생성되는 hyoscyamine과 scopolamine을 retention time과 질량분석을 비교하여 표준과 동일함을 확인하였다.

## 사 사

본 연구는 1993년도 전남대학교 학술진흥재단 해외과전

연구비 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- 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.
- Christen, P., M.F. Roberts, J.D. Phillipson and W.C. Evans. 1990. Alkaloids of hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. 1990. *Plant Cell Reports* **9**: 101-104.
- Endo, T. and Y. Yamada. 1984. Tropane alkaloid production in cultured cells of *Duboisia leichhardtii*. *Plant Cell reports* **3**: 186-188.
- Endo, T. and Y. Yamada. 1985. Alkaloid production in cultured roots of three species of *Duboisia*. *Phytochemistry* **24**: 1233-1236.
- Farnsworth, N.R. 1984. How can the well be dry when it is filled with water? *Economic Botany* **38**: 4-13.
- Flores, H.E. and P. Filner. 1985. Hairy root of *Solanaceae* as a source of Alkaloids. *Plant Physiol.* **77**: 4 suppl. 12.
- Fujita, Y., Y. Hara and T. Morimoto. 1987. Production of shikonin derivatives by cell suspension culture of *Lithospermum erythrorhizon*. V. Difference in the production between callus and suspension cultures. *Plant Cell Reports* **6**: 8-11.
- Hagemann, K., K. Piek, J. Stöckigt and E.W. Weiler. 1992. Monoclonal antibody based enzyme immunoassay for the quantitative determination of the tropane alkaloid, scopolamine. *Planta Med.* **58**: 68-72.
- Hashimoto, T., J. Matsuda, S. Okabe, Y. Amano, D.J. Yun, A. Hayashi and Y. Yamada. 1990. Molecular cloning, and tissue- and cell-specific expression of hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase. In, *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, H.J.J. Nijkamp, L.H.W. van der Plas, and J. van Aartrijk (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 775.
- Hwang, B., Y.W. Paek, J.C. Ahn, B.G. Jung, Y.H. Kang. 1993. Betalain production by hairy root cultures of red beet (*Beta vulgaris*). *Korean J. Plant Tissue Culture* **20**: In press.
- Jung, G. and D. Tepfer. 1987. Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* grown *in vitro*. *Plant Sci.* **50**: 145-151.
- Knopp, E., A. Stauss 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.
- Konoshima, M., M. Tabata, H. Yamamoto and N. Hiraoka. 1972. Organization and alkaloid production in tissue cultures of *Scopolia parviflora*. *Phytochemistry* **11**: 949-955.
- Kyo, M., Y. Miyauchi, T. Fujimoto and S. Mayama. 1990. Production of nematocidal compounds by hairy root cultures of *Tagetes patula* L. *Plant Cell Reports* **9**: 393-397.
- Mano, Y., S. Nabeshima, C. Matsui and Ohkawa. 1986. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2715-2722.
- Matsumoto, T. and N. Tanaka. 1991. Production of phytoecdysteroids by hairy root cultures of *Ajuga reptans* var. *atropurpurea*. *Agri. Biol. Chem.* **55**: 1019-1025.
- Mursshige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Peerless, A.C.J., A.J. Walton and R.J. Robins. 1990. Enzymes of N-methylputrescine biosynthesis in relation to hyoscyamine formation in transformed root cultures of *Datura stramonium* and *Atropa belladonna*. *Planta* **182**: 136-141.
- Petit, A., A. Berkaloiff 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: plasmid in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.* **190**: 204-213.
- Saito, K., M. Yamazaki and I. Murakoshi. 1992. Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. *J. of Natural Products* **55**: 149-162.
- Shimomura, K., T. Aoki and P. Christen. 1992. Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyoscyamus albus* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A<sub>4</sub>. *Plant Cell Reports* **11**: 597-600.
- Staba, E.J., and A. Jindra. 1968. *Datura* tissue cultures: production of minor alkaloids from chlorophyllous and non-chlorophyllous strains. *J. Pharm. Sci.* **57**: 701-704.
- Street, H.E., S.B. Raj Bhandary, H.A. Collin, E. Thomas and H.E. Street. 1969. Root, callus, and cell suspension cultures, from *Atropa belladonna*, L. and *Atropa belladonna*, Cultivar lutea döll. *Ann. Bot.* **33**: 647-656.
- Tabata, M. and N. Hiraoka. 1974. Alkaloid production by plants regenerated from cultured cells of *Datura innoxia*. *Phytochemistry* **13**: 1671-1675.
- Taya, M., K. Mine, M. Kino-oka, S. Tone and T. Ichi. 1992. Production and release of pigments by culture of trans-

- formed hairy root of red beet. *J. of Fermentation and Bioengineering* **73**: 31-36.
- Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* **37**: 959-967.
- Verpoorte, R., R. van der Heijden and J. Schripsema. 1993. Plant cell biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. *J. of Natural Products* **56**: 186-207.
- Yamada, Y. and T. Hashimoto. 1982. Production of tropane alkaloids in cultured cells of *Hyoscyamus niger*. *Plant Cell Reports* **1**: 101-103.

(1993. 5. 19 接受)