

Atropa belladonna 모상근의 생장량과 tropane alkaloid 생산에 관한 연구

한태완 · 오순자 · 김철수 · 허인옥
제주대학교 자연과학대학 생물학과

A study on the growth and tropane alkaloid
production of *Atropa belladonna* hairy root
cultured in various auxin concentration

Han, Tae-Wan · Soon-Ja Oh · Chul-Su Kim and In-Ok Heo

Abstract

The study aimed to measure growth rate of *Atropa belladonna* hairy root cultured under medium, various auxin(NAA, IBA, IAA, 2.4-D) and auxin concentration(0.01-100mg/l) and investigated tropane alkaloid content using HPLC.

The growth rate of hairy root cultured for 30 days in MS and NN liquid medium were higher in NN medium as 3.51g than MS medium. growth rate of *belladonna* hairy root cultured in NN medium added various auxin and auxin concentration was the most effective in low concentration than high concentration. especially, was best in the medium supplemented with 0.01mg/l 2.4-D.

Atropine content of hairy root cultured in 0.01mg/l and 0.1mg/l IAA produced 9-30 times than control and normal plant. scopolamine measured each 0.109%, 0.050% in control and normal plant. hairy root cultured in 0.01mg/l NAA produced 4-10 times than control and normal plant.

KEY WORDS : *Atropa belladonna*, *Agrobacterium rhizogenes*, Auxin,
Tropane alkaloid, Hairy root

서 론

식물이 생산하는 물질에는 의약, 향료, 색소,

농약, 향수, 비타민, 호르몬, 효소 등 인간의
생활과 밀접한 연관을 가지고 있는 것이 많으
며, 이들 물질의 대부분은 2차 대사산물로 존

재하고 있다. 필요성분의 수요에 대한 공급조절 역할을 할 수 있는 수단으로 식물 조직배양에 의한 유용물질 생산은 상업적으로 가치 있는 생화학산물을 기내에서 생산하고자, 많은 연구자들에 의해 식물 세포배양의 중요성이 점차적으로 증가되어 왔으며, 지금까지는 이러한 연구의 대부분이 동화 또는 부동화 세포배양을 통한 Callus 세포를 다루어 왔다 (Sauerwein *et al.*, 1992; Taya *et al.*, 1992). 세포배양을 통한 식물체의 이차산물 생산은 *Catharanthus roseus*의 현탁배양으로 부터 Indole alkaloid 고 생산성 세포주를 선발하였으며 (Kim *et al.*, 1992), *Phytolacca insularis*의 callus에서 Insularin의 높은 생산성의 세포를 선발하였고 (Lee and La, 1992), 세포배양에 의한 protoberberine alkaloid 생산을 연구하였고 (Park *et al.*, 1992). Kim 등은 *Lithopermun erythorhizon*의 세포배양에 의한 shikonin 생산에서 단세포 유래 시코닌 고생산주를 선발하였으나 (Kim and Yu, 1991), 세포의 괴사등 많은 문제점을 나타내었다.

따라서 이러한 문제점들을 극복하기 위하여 세포배양의 변형된 형태로서 형질이 전환된 모상근(transformed hairy root) 배양에 많은 관심을 갖게 되었다. *Agrobacterium rhizogenes*에 의하여 형질이 전환된 모상근은 모식물체와 비교할 수 있을 정도의 가치있는 물질들을 합성, 축적할 수 있는 능력이 있으며, 식물 호르몬이 없는 배지에서 빠른 생장율, 생화학적 및 유전적 안정성, 유전자 조작의 가능등의 장점을 가지고 있다 (Green and Thomas, 1992; Kondo *et al.*, 1989).

*Rhizobiace*에 속하는 *Agrobacterium*은 그람음성의 토양세균으로서 특정의 수주에 종양을 만드는 *A. rubi*, crown gall과 teratoma를 유발하는 *A. tumefaciens*

(Smith and Townsend, 1907) 및 모상근을 유발하는 *A. rhizogenes* (Ricker *et al.*, 1930)가 보고되고 있다. 이중 균주로서는 15834, A4, R1000등이 많이 사용되고 있다 (petit *et al.*, 1983).

한편, 식물에 외래유전자를 삽입시키는 방법으로서 원형질체 융합과 DNA virus, RNA virus 및 califlower-mosaic virus 등이 도입 vector로서 보고되고 있으나 (Murphy and Thompson, 1988), 그 성공율이 낮고 제한적 실험 예가 있을 뿐이다. 그러나 최근 *Agrobacterim*을 이용한 외래유전자 도입방법이 보고되어 외래유전자 도입의 범위가 크며, 또한 사용법이 간단한 것으로 보고한 이래 (White and Nester, 1980), Ti plasmid와 Ri plasmid를 이용한 crown gall과 모상근의 배양은 표목의 발근, 내한성 및 생장촉진에 관한 연구 등에 이용되고 있다 (Rugini and Wang, 1986). 그리고 *A. rhizogenes*를 식물체에 접촉하여 유도된 모상근을 이용하여 기내배양을 통하여 antraquinone, alkaloid, ginsenoside 등과 같은 2차 대사산물을 효율적으로 얻고자 하는 시도가 이루어 지고 있다. 모상근의 2차 대사산물의 생산에 대해서는 인삼 (*Panax ginseng*)에서 ginsenoside의 생산성을 (Yosikawa and Furuya, 1987; Ko, 1990), 근대 (*Beta vulgaris*) 와 *Nicotiana rustica* 모상근에서 색소와 alkaloid의 함량을 측정하였고 (Hamil *et al.*, 1986), tropane alkaloid 생산은 다양한 식물 종들의 callus culture 에서 연구가 되고 있으나, 대량생산은 모든 경우에서 성공적이지 못하다고 보고되고 있다 (Hiraoka and Tabata, 1974; Hasimoto and Yamada, 1983; Gizella, 1988). 또한, Knop 등 (1988)은 몇몇 가지과 식물에서, Hirosh 등 (1986)은 *Atropa belladonna*에서 모상근을 가지고

tropane alkaloid에 대해 보고하고 있으며, 이밖에 사리풀(*Hyoscyamus niger*), *Datura candida*, *Duboisia leichhardtii* 등에서 2차 대사 산물이 원식물체보다 높거나 유사하게 나타난다고 보고되고 있다(Yamada *et al.*, 1982; Yasuyuki and Tsuyoshi, 1984; Christen *et al.*, 1989).

최근 들어서는 일관되게 배양된 모상근의 이용이 유용산물 또는 2차 대사산물의 대량생산(large-scale production)에 초점이 맞추어져 있으며(Uozumi *et al.*, 1992), 이를 위해서는 필요 성분의 생산량을 생물 공학적 방법을 통해 증대시키는 기술이 필요로 한다.

Atropa belladonna L.는 가지과 식물로서 유럽과 서아시아의 건조한 지대에 분포하고 있으며, 독성이 강하고 예로부터 약초로서 널리 사용되어 왔다. 함유물질로는 tropane alkaloid, 즉 atropine, scopolamine, hoysciamine, norhoysciamine 등이 존재하여, 진통, 진경, 최면약으로서 이용되고 있으며, 항아세틸콜린제, 부교감신경 억제제로 사용되고 있다(굴전 만 등, 1989; 한 등, 1988).

따라서 본 연구는 *belladonna* 유식물체에서 *Agrobacterium rhizogenes* R1000에 의해 유도된 모상근을 적정 배지와 호르몬 첨가에 따른 성장량과 주성분인 Tropane alkaloid의 함량을 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 고생산주를 찾고자 실시하였다.

재료 및 방법

1) 종자발아

동경 약용식물원에서 분양 받은 *A. belladonna* 종자를 증성세제에 15분동안 세척한후, 에탄올에서 10분, tween 20 1-2

방울이 첨가된 1% sodium hypochlorite 에서 15분간 침지한후 멸균수로 3-4회 세척하였다. 살균된 종자를 호르몬이 첨가되지 않은 MS(Murashige *et al.*, 1963)배지에 이식하고 25℃, 16hr, 6,000 lux하에서 20일간 무균발아 시켰다.

2) 균주배양

일본 동경대학교에서 분양받은 *A. rhizogenes* strain R1000을 YEP배지(Bacto extracts 5g, Bacto yeast extracts 1g, Peptone 5g, Magnesium sulfate 0.24g, Agar 15g, pH 7.2)에서 25℃의 암조건하에서 3일간 배양하였다.

3) 모상근 유도 및 배양

3주후에 무균발아된 *belladonna* 유식물체의 줄기에 3일간 배양한 균주를 direct infection법(Ko, 1991)으로 감염시켜 모상근을 유도하였다. 유도된 모상근에서 *Agrobacterium* 을 제거하기 위해 claforan(300mg/l)이 들어 있는 MS배지, 암조건하에서 1주간격으로 2주간 계대배양하였다.

4) 형질전환의 확인

A. rhizogenes strain R1000에 의해 유도된 모상근의 형질전환은 opine 존재여부에 따라 확인하였으며, opine 분석은 Petit (1983)등의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양한 모상근 100mg을 0.1N HCl 100ul에서 분쇄한 후, 20,000xg에서 10분간 원심분리하고 상징액을 전기영동 시료로 사용하였다. 전기영동은 상징액과 표준 opine을 3MM Whatman 여과지에 2-10ul 점적한 후, methylene blue를 maker로 하여 600v에서 2시간 실시하였고 전극조 완충용액은 3% formic acid-6% acetic acid 용액을 pH 2.8로 조정하여 사용하였다. 전기영동

한 Whatman 여과지의 염색은 0.2% silver nitrate 용액에서 1분, 2% NaOH를 함유하는 90% 에탄올 용액에서 10분, 그리고 10% sodium thiosulfate 용액, 1.5% sodium dimetasulfate 용액에서 20분간 염색한 후, 흐르는 물로 세척하였다.

5) 배양조건별에 따른 모상근의 생장량 측정

*Agrobacterium*이 제거된 모상근을 가지고 생장량을 측정하기 위해 4주동안 액체배지에서 배양하였으며, 배양조건은 배지별(MS, NN medium), 여러가지의 auxin(NAA, IAA, IBA, 2,4-D) 및 농도별(0.01-100 mg/l)에 따라 생장량을 측정하였다.

6) Tropane alkaloid 함량 측정

유도된 모상근을 배지별, auxin 및 auxin 농도별에 따라 4주간 배양하여 tropane alkaloid 성분을 HPLC를 이용하여 함량을 측정하였다. 모상근과 원식물체를 동결건조시켜 전체량 각 1g을 균질화 시킨 후 추출하였다(Hiroshi *et al.*, 1986). 추출용매(Chloroform:MeOH:NH₄OH=15:5:1)를 가하여 12시간 진탕한 후, 여과하여 45°C에서 감압농축하였다. 여기에 chloroform과 1N H₂SO₄를 2:1로 첨가하여 혼합한 후, 상층액을 따서 28% NH₄OH로 pH10으로 조정하였다. 다시 chloroform을 가하여 3회 반복하여 추출하였다. 이것을 감압농축 시킨 후, 1ml MeOH로 녹인 후 이중 10ul를 injection하였다. HPLC에 의한 alkaloid 분석조건은 10mM sodium glycolate(pH4.0)와 MeOH를 6:4로 혼합하여 추출용매로 사용하였으며, column은 *u*-Bondapak C₁₈, 254nm에서 검출하였다.

결과 및 고찰

1) 모상근 유도

*A. belladonna*의 모상근 유도는 표면살균된 종자를 25°C, 6,000lux, 16시간 조명하에서 3주간 배양하여 유식물체를 얻었고, 발아된 유식물에 YEB배지에서 3일간 배양한 *A. rhizogenes* strain R1000을 direct infection법으로 상처부위에 감염시켜 광조건하에서 배양하였다. 3-4주후 균을 접종한 상처부위에서 tumor조직이 형성되고 모상근이 유도되었다(Fig. 1).



Fig. 1. Hairy root induced by *A. rhizogenes* strain R1000
HR: hairy roots

2) 형질전환의 확인

유도된 모상근에서 형질전환의 여부를 확인하기 위해 모상근 추출액을 전기영동 실시한 결과 agropine과 mannopine의 band를 확인할 수 있었다(자료 미제시).

3) 모상근 배양

A. belladonna 유식물체에서 strain R1000을 처리하여 모상근을 유도하고 유도된 모상근의 적정배양 조건을 설정하기 위해

배지별(MS, NN medium), 여러종류의 auxin과 auxin농도별(0.01 - 10mg/l)에 따라 4주간 액체배지 상태에서 배양하여 성장량을 측정하였다.

(1) 배지별에 따른 성장량

배지별에 따른 성장량을 측정하기 위해 MS, NN 액체배지에서 모상근을 치상하여 4주간 25°C, 암상태에서 배양한 결과 MS배지에서 2.95g(F.W.)과 NN배지에서 성장량이 3.51g(F.W.)으로 나타났다(Fig. 2). 특히 NN배지에서의 성장량은 초기 배양상태일때보다 약 30배의 성장량을 나타냈다. 이는 MS배지와 NN배지를 비교해볼때 NN배지가 조성성분인 질소원과 탄소원의 함량이 많기때문에 나타난 결과라고 사료된다(Ko, 1990; Hamil *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 1991).

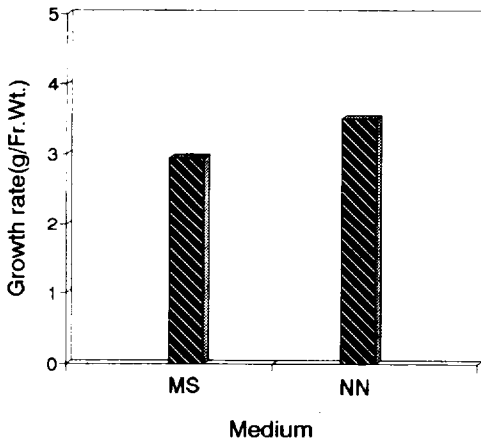


Fig. 2. Growth rate of *A. belladonna* hairy roots cultured in MS and NN medium

(2) auxin종류별에 따른 성장량

형질전환된 모상근의 배양조건을 확립하기 위해 auxin류의 일종인 NAA, IBA, 2,4-D, IAA를 처리하여 4주후의 성장량을 비교

하였으며(Fig. 3). 또한 각 농도별(0.01, 0.1, 1, 10, 100mg/l)로 처리하여 10일 간격으로 성장량을 측정하였다.



Fig. 3. culture of *A. belladonna* hairy roots in NN liquid medium added IBA

A: control, B: 0.01mg/l,
C: 0.1mg/l, D: 1mg/l,
E: 10mg/l, F: 100mg/l

① NAA 농도별에 따른 성장량

NAA가 첨가된 NN 액체배지에서 배양한 모상근의 4주간 성장량을 보면(Fig. 4), 대조구에서 1.24g, NAA 0.01과 0.1mg/l에서 각각 1.21g, 1.20g으로 호르몬이 첨가되지 않은 대조구와 NAA 저농도를 처리한 처리구에서 대체적으로 성장양상이 비슷하게 나타났다. 고농도로 갈수록 성장량이 억제되는 것으로 나타났다.

② IAA 농도별에 따른 성장량

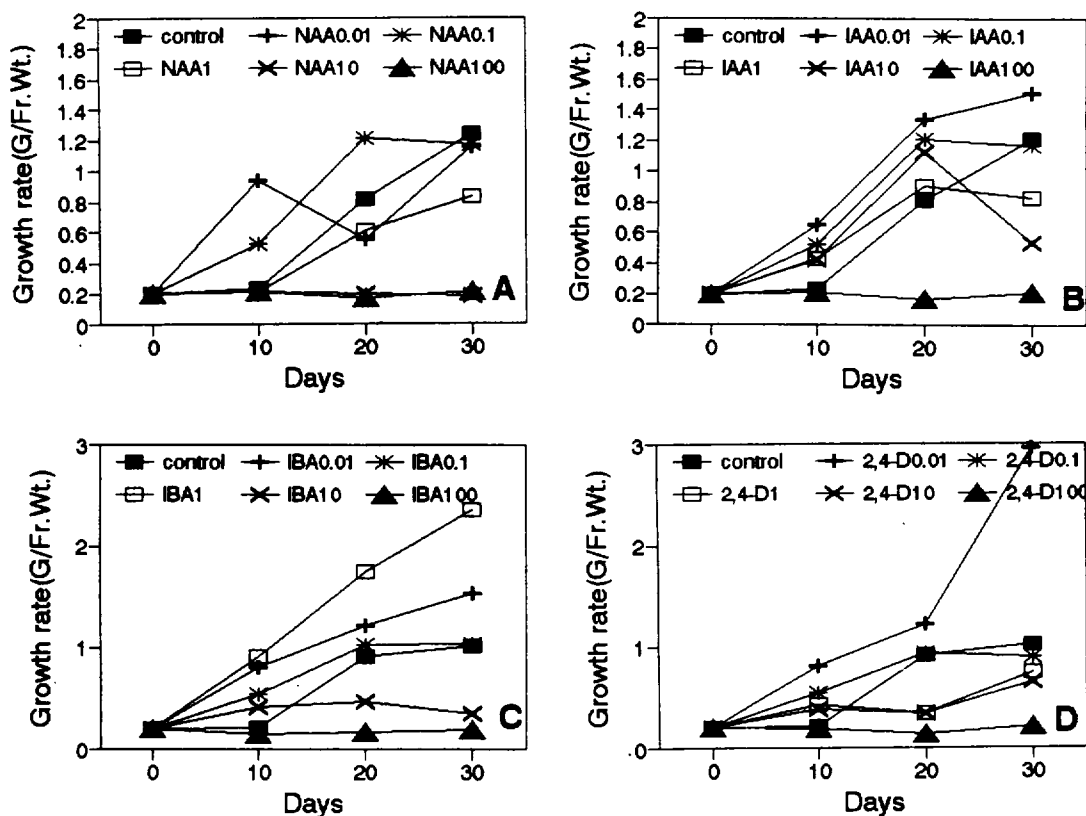


Fig. 4. Growth rate of *A. belladonna* hairy roots cultured in various auxin and auxin concentration
A: NAA, B: IAA, C: IBA, D: 2,4-D

IAA가 첨가된 배지에서 성장량은 IAA 0.01mg/l에서 1.51g, 대조구 1.21g으로 나타났으며, IAA 10mg/l 처리구에서는 20일까지는 성장량이 양호하게 나타났으나 20일 이후 부터는 성장량이 급격히 감소하는 경향이 나타났으며, 고농도 처리구에서는 성장량이 불량함을 알 수 있었다(Fig. 4).

③ IBA 농도별에 따른 성장량

IBA가 첨가된 배지에서 성장량은 대체적으로 저농도일때가 성장량이 양호하였으며, 대조구에서 1.02g, IBA 1mg/l 처리구에서 2.36g으로 가장 높게 나타났으며, 고농도 IBA 처

리구에서는 생장이 억제되었다(Fig. 4).

④ 2,4-D 농도별에 따른 성장량

2,4-D가 첨가된 NN 액체배지에서 배양한 모상근의 성장량은 저농도 처리구가 고농도 처리구 보다 성장량이 양호하였으며, 특히 2,4-D 0.01mg/l 처리구에서 4주째의 성장량은 대조구가 1.02g인 반면에 2.96g으로 가장 높게 나타났다(Fig. 4).

결과를 종합해 볼때 NAA, IBA, 2,4-D, IAA를 처리한 NN액체배지에서 4주간 배양한 모상근의 성장율은 2,4-D를 처리한 배지

에서 성장율이 2.96g으로 가장 양호하였으며, 이는 처음 배양했을때보다 14.8배의 성장을 나타내었다. 또한 NAA, IAA에서는 1.31g, 1.24g으로 6.5배, 6.2배로 나타났으며, 식물체의 뿌리분화에 영향을 미치는 IBA는 다른 auxin보다 생장이 저조하였다. 이러한 성장정도는 인삼에서 3배(Yoshikawa and Furuya, 1987), 당근에서 10배(Hwang *et al.*, 1989), 근대와 담배에서 20배(Hamill *et al.*, 1986), 그리고 까마중에서 52배의 성장율과 비교해 볼때 유의할 만한 성장량을 보여 주었다.

각 호르몬의 농도별에 따른 성장율은 공히 모두 고농도일때보다 저농도일때가 활발한 성장량을 보였으며, 특히 2,4-D 0.01mg/l첨가한 배지에서 20일 후의 성장량이 급격하게 증가함을 알 수 있었다. 그러나 고농도의 2,4-D를 처리한 배지에서는 생장이 억제되었으며, 0.1mg/l에서는 모상근이 callus화 하였고 1-10mg/l의 고농도에서는 괴사하는 경향이 보였다. 다른 NAA와 IBA등에서도 이와 유사한 경향이 나타났다. 이와 같은 결과는 인삼의 모상근은 호르몬이 없는 배지에서 잘 분지하여 성장하며(Ko, 1990), 도라지에서 호르몬이 첨가되지 않은 배지에서가 생장이 양호하다는 결과(Kim *et al.*, 1990)와 일치하지 않았으나, 당근과 인삼의 모상근 배양에서 외부 호르몬인 IBA와 Kinetin를 첨가했을때 생장이 촉진된다는 결과와 일치함을 나타냈으며(Yoshikawa and Furuya, 1987; Hwang *et al.*, 1989), Shen등(1988)이 벌노랑이에서 유도된 모상근은 원식물체의 뿌리보다 auxin이 첨가된 처리구에서 생장이 효과적이었다는 결과와도 일치하였다.

4) Tropane alkaloid 분석

원식물체와 호르몬이 첨가되지 않은 배지

에서 배양한 모상근(대조구), 그리고 각 auxin농도별에 따라 NN30 배지에서 30일 동안 배양한 모상근의 함량을 분석한 결

Table 1. Tropane alkaloid contents of *A. belladonna* hairy root cultured in various auxin and auxin concentration

alkaloid (%/g. D.W.) hormone (mg/l)	Atropine	Scopolamine
normal plant	0.059	0.050
control	0.141	0.109
NAA 0.01	1.814	0.505
NAA 0.1	0.405	0.312
NAA 1	N.D.	N.D.
NAA 10	0.149	0.037
NAA 100	0.205	0.043
IBA 0.01	0.122	0.056
IBA 0.1	0.135	0.181
IBA 1	0.048	0.037
IBA 10	N.D.	N.D.
IBA 100	0.178	0.043
IAA 0.01	0.048	0.112
IAA 0.1	1.378	0.218
IAA 1	0.032	N.D.
IAA 10	0.240	0.127
IAA 100	N.D.	N.D.
2,4-D 0.01	0.081	0.075
2,4-D 0.1	0.187	0.103
2,4-D 1	N.D.	N.D.
2,4-D 10	N.D.	N.D.
2,4-D 100	N.D.	N.D.

D.W.: Dry weight.

N.D.: None Detected.

과(Table 1). atropine이 원식물체에서

0.059%, 대조구의 0.141%로 나타났으며, NAA처리구에서는 0.01mg/l에서 함량이 1.814%, 10mg/l에서는 0.149%로 분석되었으며, NAA 1mg/l에서는 검출되지 않았다. 또한 IAA 0.1mg/l처리구에서는 1.378%로 나타났으며, IBA와 2,4-D 처리구에서는 대체적으로 함량이 낮게 나타나거나 검출되지 않았다. scopolamine에서는 원식물체와 대조구에서 0.050%, 0.109%로 나타났으며, NAA 0.01mg/l에서 0.505%로 가장 높게 분석되었으며, 2,4-D와 IAA 처리구에서는 고농도로 갈수록 검출이 되지 않았다.

위와 같은 결과를 볼때 Hirosh등(1986)이 동식물체에서 유도한 모상근에서 0.024%의 함량을 보인데 반해 약 9배정도의 차이를 나타나고 있으며, Jung등(1987)에서 scopolamine 함량이 0.07-0.09%인 것과 본 연구에서는 IBA 0.1mg/l 처리구에서 0.181%로 2.5배의 생산량을 나타냈다. 그러나 첨가된 auxin농도에 따라 성장량이 양호한 처리구에서는 대체적으로 Tropane alkaloid 함량이 적게 나타나고 있고 성장량이 다소 떨어지는 처리구에서가 더 많은 함량을 생산한다는 결과는 앞으로 더 연구해야할 과제라고 생각되며, 본 연구 결과를 토대로 여러가지의 배양조건과 생합성 전구물질 처리등을 통한 고생산주 식물체를 생산할 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

- 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 Rep.*, 8:75-77.
- Garfinkel, D. J., Simpson, R. B., Ream, L. W., White, F. T., Gordon, M. P., Nester, E. W. 1981. cell. 27:143-153.
- Green, K. D. and Thomas, N. H. 1992. Product enhancement and recovery from transformed root culture of *Nicotiana glauca*. *Biotech and Bioeng.* 39:195-202.
- Hamill, J. D., A. J. Parr, R. J. Robins and M. J. C. Rhodes. 1986. Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.*, 5:111-114.
- 韓大錫, 金鐘源, 金昌玟, 陸昌洙, 成忠基, 都象學, 裴基煥, 申順姬, 林種弼, 韓普燮. 1988. 生藥學. 東明社, p.208.
- Hasimoto, T. and Y. Yamada. 1983. Scopolamine production in suspension cultures and redifferentiated roots of *Hyoscyamus niger*. *Planta Med.*, 47:195-199.
- Hiroshi, K., 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.
- Hiraoka, N. and M. Tabata. 1974. Alkaloid production by plants regenerated from cultured cells of *Datura innoxia*. *Phytochemistry*, 13:1671-1675.
- 堀田 萬, 緒方 健, 新田あや, 星川清親, 柳 宗民, 山崎耕宇, 淺山英, 岩槻邦勇, 大橋廣好, 柏谷博之, 北川尚史, 小山鐵夫, 小山博滋.

- 田村道夫, 千原光雄, 椿 啓介, 光田重幸, 村田 源, 山崎 敬, 湯淺浩史. 1989. 世界 有用 植物 事典, p.131.
- Kim, S. G. and Yu, H. J. 1991. Production of shikonin derivations by cell lines of *Lithopermum erythrorhizon*: selection for high shikonin production in lines of single cell origin. *Korean J. Plant Tissue Culture*. 18(5):277-281.
- Kim, S. W., Jung, K. H., Kwak, S. S., Choi, H. S., Choi, C. Y. and Liu, J. R. 1991. Selection of protoplast-derived cell lines for high yields indole alkaloids from suspension cultures of Vinca(*Catharanthus roseus*). *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 6(1):1-7.
- 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 Rep.*, 7:590-593.
- Ko, K. S. 1989. Study on the secondary products formation and plant transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. Graduation thesis, pp 53-64.
- Kondo, O., Honda, H., Taya, M. and Kobayashi, T. 1989. Comparison of growth property of carrot hairy root in various bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 32:291-294.
- Lee, C. H. and La, Y. J. 1992. Selection of high insularin-producing cell line from *Phytolacca insularis* callus. *Korean J. of Plant Tissue Culture*. 19(6):331-335.
- Murashige, T. and K. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15:473-497.
- Park, J. C., Kim, L. S. and Choi, Y. W. 1992. Production of protoberberine-type alkaloid from cell culture. II. culture methods for effective berberine production. *Korean J. of Plant Tissue Culture*. 19(6):323-329.
- Rogers, S. O., Benclch A. J., 1988. Extraction of DNA from plant tissues. *plant Molecular Biology Manual*. 6:1-10.
- Rugini, E. and X. S. Wang. 1986. Abstract in VI IUPAC Congress. University of Minnesota., 374.
- Sauerwein, M., Yoshimatsu, K., Shimomura, K. 1992. Further approaches in the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. *Plant Tissue Culture Letters*. 9:1-9.
- Southern E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:505-517.
- Taya, M., Mine, K., Kino-oka, M. Tone, s. and Ichi, T. 1992. Production and release of pigments by culture of transformed hairy root of red beet. *J. Ferment Bioeng.* 73:31-36.
- Uozumi, N., Nakashimada, Y. and Shimomura, K. 1992. Production of artificial seed from horseradish

- hairy root. *J. Ferment Bioeng.* 74:21-26.
- White, F. F. and E. W. Nester. 1980. Hairy root: plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.*, 141:1134-1141.
- Wen H. S., Annik P., Jean G. and Jacques T., 1988. Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proc. Natl. Sci. USA.* 85:3417-3421.
- 梁寬八, 高京秀, 許仁玉, 李雲鎮, 金昌敏, 趙弼衡. 1991. *Agrobacterium rhizogenes* 를 이용한 까마중의 形質傳換과 毛相根 培養. *Kor. J. Pharmacoh.*, 22(1):26-32.
- Yasuyuki, Y. and T. Endo. 1984. Tropane alkaloid production in cultured cells of *Duboisia leichhardtii*. *Plant Cell Rep.*, 3:186-188.
- Yasuyuki, Y. and T. Hashimoto. 1982. Production of tropane alkaloids in cultured cells of *Hyoscyamus niger*. *Plant Cell Rep.*, 1:101-103.
- Yoshikawa, T. and T. Furuya. 1987. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with

Agrobacterium rhizogenes. *Plant Cell Rep.*, 6:449-453.

적 요

Agrobacterium rhizogenes strain R1000에 의해 유도된 *Atropa belladonna* 모상근을 배지별, NAA, IBA, IAA, 2,4-D 를 농도별(0.01 - 100 mg/l)로 첨가한 NN 액체배지에서 성장량과 tropane alkaloid 함량을 HPLC로 이용하여 정량하였다.

모상근 배양 30일째의 각 auxin의 농도별에 따른 성장율은 고농도보다 저농도일때 대체적으로 양호하였으나, 0.1mg/l 2,4-D 농도에서는 callus화 하였고 10mg/l 2,4-D, 1mg/l IBA일때 2.96g, 2.36g으로 대조구보다 2.3배의 성장량을 보였다.

농도별에 따른 Tropane alkaloid 함량은 atropine이 대조구 0.141%, 원식물체가 0.059%로 나타났으며, 0.01mg/l NAA와 0.1mg/l IAA에서 배양한 모상근이 각각 1.378%, 1.814%의 생산을 보여 대조구와 원식물체보다 9-30배의 생산을 보였다. 또한 scopolamine 함량은 대조구와 원식물체는 각각 0.109%, 0.050%에 비해 0.01mg/l NAA에서 배양한 모상근에서 0.505%로 대조구, 원식물체보다 4-10배의 생산량을 보였다.