

Ginkgo biloba 세포배양에서 배지 및 배양조건이 세포성장 및 Flavonol Glycosides 생합성에 미치는 영향

이 원 규 · 유 연 우 · 변 상 요 · *정 현 관

아주대학교 공과대학 생물공학과

*산림청 중부 육종장

Effects of Nutrients and Culture Conditions on the Cell Growth and the Flavonol Glycosides Production in Cell Cultures of *Ginkgo biloba*

Won Kyu Lee, Yeon Woo Ryu, Sang Yo Byun and *Hun Gwan Chung

Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon, Korea

*Interior Breeding Station, Institute of Forest Genetics, Forestry Administration, Chungju, Korea

ABSTRACT

Cell lines of *Ginkgo biloba* were derived from different plant parts and from ten varieties spanning various geographic locations. They had various properties of growth and product formation. More than three flavonol glycosides were present in low concentration in callus and suspension cultures. Cell growth and biosynthesis of flavonol glycosides were found to be affected by medium composition. Culture conditions which influenced cell growth and product formation were also examined. Light stimulated the flavonol glycosides biosynthesis and ten times higher flavonol glycosides content was obtained as compared with the result without light.

서 론

은행잎은 옛부터 한방에서 강장, 보혈 및 감기 등에 효험이 있는 것으로 알려져 왔다. 은행잎 엑기스의 유효한 성분은 kaempferol, quercetin, isorhamnetin 등의 flavon계 화합물이라고 알려져 있다(1). 이들 flavon계 화합물이 혈관에 미치는 영향에 대해 많은 연구가 거듭되어 이들이 생체내 산화 환원 반응에 관계한다는 사실이 보고되었다(2, 3). 은행잎에서 추출한 약효 성분 물질인 flavon은 식물의 잎에 널리 분포되어 있으며 anthocyanin과 마찬가지로 배당체(glycoside)로 존재하는 경우가 많다. Flavonol glycosides의 종류는 약 100가지 이상인

것으로 알려져 있으나 kaempferol, quercetin, myricetin의 3종류가 가장 많은 양을 차지하며 이들 3종류의 flavonol은 HPLC로 잘 분리된다. 이 이외의 flavonol은 상기 3개의 flavonol과 구조가 약간 다를 뿐이다. 즉, isorhamnetin 및 azaleatin은 quercetin의 3-methylether 및 5-methylether이며 gossypectin은 quercetin의 8번 위치에 수산기가 또 하나 도입된 것이다. 식물 중에는 상당수의 flavonol glycosides가 있으며 70개 이상의 quercetin glycoside가 보고된 바 있다(4, 7).

약리 효과로는 quercetin glycoside가 혈관류의 확장, 혈액 순환 촉진 등의 효과가 있고 kaempferol glycoside는 노폐물의 용해, 혈류 증가에 효과가 있

으며 isorhamnetin glycoside는 노폐물 흡착, 혈액의 점도 저하 등에 효과가 있다고 보고되고 있다. 또한 luteolin은 모세혈관 강화 작용이 있다고 보고하였으며 이외에 유사한 질병에 유효한 것으로 알려져 있다(1, 2, 3).

이들 혼합물의 추출은 주로 은행나무 잎을 이용하는데 이때 원료인 은행잎은 한국산이 큰 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 가을 전에 수확한 것이 유효 성분 함량이 높은 것으로 알려져 있다(8, 9). 그러나 은행잎에서 추출하는 방법은 원료의 공급과 수확시기 등이 제한되어 있다는 단점을 가지고 있다.

은행나무(*Ginkgo biloba*) 세포배양을 통하여 flavonol glycosides를 생산할 수 있으면 은행잎에서 추출하는 방법에서 야기되는 한계성을 극복할 수 있으며 외부환경의 영향을 배제하여 안정되고 연속적인 생산을 할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서는 은행나무로부터 여러 종류의 cell line을 유도하고 선별한 뒤 이의 세포배양에서 배지 및 배양조건 등이 세포생장 및 flavonol glycosides 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 이러한 실험을 통하여 flavonol glycosides의 생산성을 향상시킬 수 있는 방법을 연구하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배지의 조성

Ginkgo biloba 세포주(cell line)는 현재 국내에서 서식하는 10여 종의 은행나무를 대상으로 캘러스를 유도하여 계대배양 중이다. 세포생장과 flavonol 혼합체의 생성이 좋은 세포주들을 선발하여 실험에 이용하였다. 이들은 α -Naphthalene acetic acid(NAA) 10mg/1와 탄소원으로 sucrose 30g/1가 첨가된 Murashige Skoog(MS) 배지에서 유지 배양중이다. 배지의 pH는 1N KOH를 사용하여 5.8로 조정하였다. 고체배지의 경우는 agar를 0.5% 첨가하여 잘 혼합하면서 열을 가하여 완전히 녹인 후 고압멸균하여 petri dish에 분주하여 사용하였다. 현탁배양은 100ml, 250ml, 500ml 삼각 flask에 배지를 각각 40ml, 100ml, 200ml씩 넣고 cell을 접종하여 flask shaker에서 160rpm으로 진탕배양하였으며 배양실 온도는 25°C로 유지하였고 하루에 16시간씩 형광등 빛을 조사하였다. 계대배양은 10일 간격으로 하였으며 cell과 배지의 비율은 약 1:5 정도로 하였다.

시약

Quercetin과 kaempferol 및 배지제조에 사용하는 대부분의 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO., U. S. A.)로부터 구입하였고 고체 배지에 사용한 agar는 Difco Laboratories(Detroit, Mi., U. S. A.) 제품을 사용하였다. 또한 HPLC에 사용되는 methanol과 water 등의 용매는 Fisher Scientific (Rochester, NY., U. S. A.) 제품을 사용하였고 그 이외 모든 시약도 특급시약을 사용하였다.

세포 무게 측정 방법

세포의 생장을 알기 위하여 세포의 무게를 측정하였다. Fresh cell weight는 배양된 세포를 filtration (Whatman NO. 2)하여 측정하였다. Dry cell weight는 filtration한 세포를 60°C dry oven에서 30시간 이상 건조하여 측정하였다.

Flavonol glycosides 분석

Flavonol glycosides를 산으로 가수분해하여 당을 제거시킨 후 HPLC로 분석하였다. Fresh cell 1g을 취하여 methanol 10ml에 넣고 상온에서 30분간 sonication하여 추출한 후 3000rpm으로 5분 동안 원심분리된 상등액을 취하여 35% HCl 7.7ml를 가하고 70°C에서 1시간 30분간 sonication하여 가수분해 시킨 후 0.45 μ m membrane filter로 filtration하여 HPLC로 분석하였다.

HPLC분석은 UV 365nm에서 spectrophotometer(Water, 484, U. S. A.)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 전개용매로는 methanol과 1% 인산이 함유된 물을 이용하였는데 초기의 methanol 부피비율은 30%이었고 30분 후 70%가 되도록 증가시켰다. 분석 column은 C-18 reverse phase column (μ bondapak C18 125Å 10 μ 3.9×300mm)을 사용하였다.

당 농도 분석

배지의 당농도는 배지를 0.45 μ m membrane filter로 filtration하여 HPLC로 분석하였다. Detector는 RI detector(Showa Denko K. K., Tokyo, Japan)를 사용하였고 전개 용매로는 acetonitrile과 물을 80:20으로 유지하였으며 flow rate는 2.0ml/min이었다. 분석 column은 carbohydrate analysis column(Waters, U. S. A.)을 사용하였다.

결과 및 고찰

Cell line과 배지 선정

지역별로 유도된 세포주 각각의 flavonol glycosides 생성능력을 조사하기 위하여 유지 배양되던 13종류의 캘러스를 MS 고체배지에서 35일간 배양한 후 quercetin과 kaempferol의 생성량을 측정하였다. Fig. 1과 같이 나타난 결과에서 여러 세포주 중 Table 1.에서 표기한 1번과 9번 세포주가 quercetin과 kaempferol의 생성이 다른 세포주에 비해 좋은 것으로 나타났다. 그러나 세포성장상은 충북 청

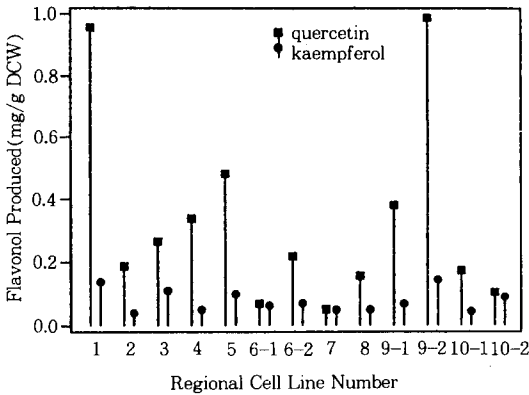


Fig. 1. Accumulation of flavonol glycosides in different cell line from various geographic location.

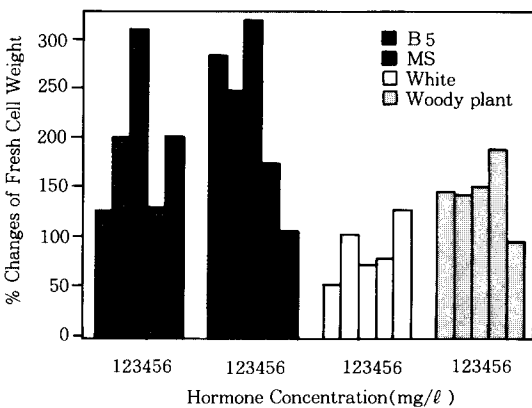


Fig. 2. Culture medium and hormone effect on cell growth. (1=NAA 0.1ppm, 2=NAA 1ppm, 3=NAA 10ppm, 4=NAA 0.1ppm kinetin 0.5ppm, 5=NAA 1ppm kinetin 0.5ppm, 6=NAA 10ppm kinetin 0.5ppm).

Table 1. The sampling region of *Ginkgo biloba*

Cell line NO.	지 역	수 령
1	강원도 평창군 대화면 신리	100년
2	"	80년
3	"	50년
4	충남 천안군 성합읍 학정리	70년
5	"	55년
6	"	60년
7	충남 천안군 성합읍 대정리	120년
8	수원시 권선구 오목천동	40년
9	"	40년
10	충북 청원군 오창면 성대리	50년

원군 오창면 성대리에서 유도한 것이 우수하였다. 위의 13종류의 캘러스는 기후와 토양의 상태가 틀린 5개 지역(Table 1)에서 자라던 각기 수령이 틀린 은행나무 10종류에서 유도한 것이므로 각각 성질이 틀린 것으로 나타났다. 또한 같은 지역의 것이라도 은행나무의 부위별로 캘러스의 성질에 차이가 있었다. 이후 본 연구에서는 충북 청원군 오창면 성대리에서 유도한 10-2 세포주의 캘러스 및 현탁 세포를 이용하였다.

배지의 종류와 hormone의 종류와 농도가 세포 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포성장이가 가장 좋은 10-2(충북 청원군 오창면 성대리에서 유도한 것) 세포주를 이용하여 실험을 수행하였다. 각기 다른 hormone 농도를 가진 4종류의 배지에 캘러스를 접종하여 세포 성장에 대한 영향을 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 전반적으로 MS와 B5배지에서 배양한 세포의 성장이 다른 배지의 것보다 좋은 것으로 나타났다. 이는 white와 woody plant 배지에 비해 MS와 B5배지의 nitrate 농도가 높는데 nitrate의 농도가 높으면 *Ginkgo biloba*의 성장을 향상시키는 것으로 추정된다. 또한 hormone의 농도가 높을수록 세포 성장이 좋은 것으로 나타났는데 이는 세포주마다 차이는 있지만 본 연구 결과로 *Ginkgo biloba*는 NAA의 농도를 증가시키면 성장이 촉진되는 것으로 판단되었다. 한편 세포 성장에 대해 kinetin은 별로 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

세포 성장과 flavonol glycosides 생성과의 관계

시간에 따른 세포 성장과 flavonol glycosides 생성과의 관계를 알아보기 위하여 10mg/l의 NAA가 함유된 40ml의 MS배지가 담겨 있는 100ml 삼각 flask에 10-2 현탁 세포를 3.5g씩 접종하여 25°C로

유지되는 배양실에서 배양하면서 시간별로 세포 성장과 flavonol glycosides 생성량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 배양 시작일로부터 4일째에 lag phase가 끝나고 exponential phase가 시작하였으며 12일째부터 stationary phase가 시작되어 약 4일 후에 decline phase로 접어들어 알 수 있었다. 이로써 일반적으로 subculture는 stationary phase가 시작되기 전 즉 exponential phase 말기에 실시하여 주는 것이 바람직하므로 배양 시작일로부터 10일째 되는 날 실행하는 것이 좋은 것으로 나타났다. Cell mass가 접종량의 2배로 증가하는 데는 약 8일 정도가 소요되며 최고 약 2.3배까지 증가하는 것을 알 수 있다. Flavonol glycosides 생성은 세포 성장이 decline phase에 접어들어 후에 갑자기 증가하는 것으로 보아 *Ginkgo biloba*의 flavonol glycosides 생성은 non growth associated라 생각되며 배양 시작일로부터 6일째되는 날까지는 flavonol glycosides의 생성이 증가하나 exponential phase인 6일째부터 12일째까지는 flavonol glycosides 생성량이 적은것으로 보아 왕성한 세포성장 중에는 flavonol glycosides의 생성이 활발하지 않은 것으로 추정된다.

시간별 당 소모량을 보면(Fig. 4) 세포배양 시작 후 12일째에 모두 소모됨을 알 수 있다. 이것 때문에 14일 이후에는 세포의 성장이 줄어들어 decline phase로 접어드는 것으로 추정된다. 배지에 첨가된 sucrose는 배양이 시작되면서 glucose와 fructose로 분해됨을 알 수 있으며 glucose보다는 fructose를 먼저 소모함을 알 수 있다. Fructose가 모두 소모되고 나면 glucose 소모가 촉진되며 glucose를 소모할 때 보다 fructose의 소모가 많을 때 세포성장이 빠른 것으로 보인다.

Carbon source 종류에 따른 세포성장과 flavonol glycosides의 생성에 대한 영향

*Ginkgo biloba*가 glucose보다 fructose를 선호하는 것으로 나타났으므로 sucrose와 그 이외의 여러 종류의 당이 세포성장과 flavonol glycosides 생성에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여 sucrose, glucose, fructose, sorbitol, mannitol을 30g/l의 농도로 첨가한 MS배지에 *Ginkgo biloba* 현탁세포를 19일 동안 배양한 후 세포성장과 flavonol glycosides 생성을 측정하였다. Fig. 5는 그 결과이며 sucrose, glucose, fructose를 첨가한 배지에서 자란 세포는 연두빛으로 성장하는데 비해 sorbitol과 mannitol을 첨가한 배지에서 자란 세포는 세포가 갈색으로 변하는 것을 볼

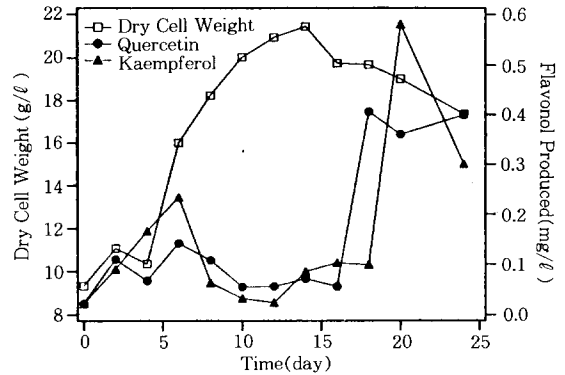


Fig 3. Time course changes of cell growth and flavonol glycosides production.

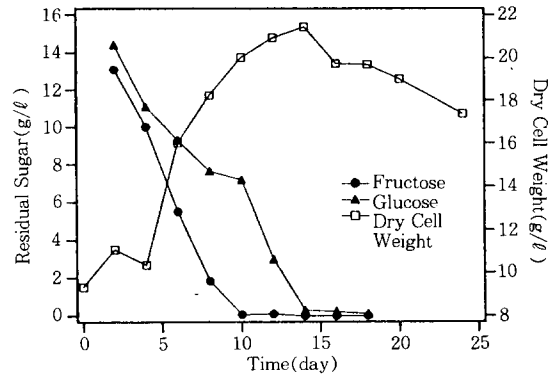


Fig 4. Time course changes of cell growth and sugar consumption.

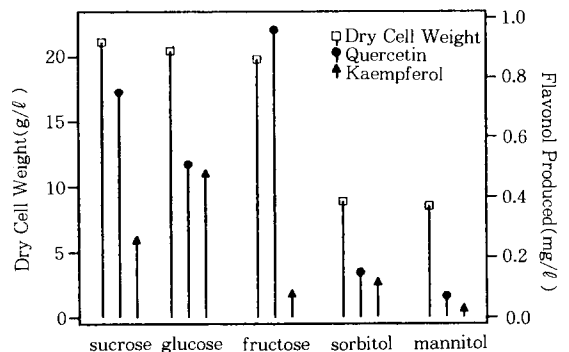


Fig 5. The effect of various carbon sources on the growth and the flavonol glycosides production.

수 있었다. 세포성장도 sucrose, glucose 그리고 fructose를 첨가한 배지에서 우수하였으나 sorbitol과 mannitol의 경우 세포성장을 저해하였다. Flavonol glycosides 생성을 살펴보면 quercetin의 생성은 fructose 첨가 배지에서 가장 좋았지만 kaempferol의 생성은 glucose 첨가 배지에서 가장 우수하였다. Sucrose 첨가 배지의 경우 quercetin 및 kaempferol의 생성이 양호하였다. 이 실험 결과 sucrose가 *Ginkgo biloba*의 성장과 flavonol glycosides 생성면에서 가장 적합한 carbon source로 생각된다(10).

세포성장과 flavonol glycosides 생성에 대한 초기 sucrose 농도가 미치는 영향

탄소원으로서 sucrose는 세포배양 배지성분중 가장 중요한 성분의 하나이다. 탄소원의 초기농도가 세포성장과 flavonol glycosides 생성에 미치는 영향에 대하여 알아보기 위하여 다양한 농도의 sucrose를 넣어준 MS배지에 *Ginkgo biloba*를 배양하여 배양 시작일로부터 19일째 시료를 취하여 분석하였다. 그 결과 Fig. 6과 같이 초기 sucrose 농도가 3%일 경우가 세포성장은 가장 좋은 것으로 밝혀졌다. Quercetin과 kaempferol의 생성은 초기 sucrose 농도가 6%일 때가 좋았으며 특히 초기 sucrose 농도가 10%일 경우에 quercetin의 생성이 높음을 알 수 있었다. 일반적으로 당 농도를 높여 주는 것이 이차대사 산물 생성에 도움이 된다고 알려져 있다(11, 12, 13). 이는 당농도의 영향이라기 보다는 배지내의 고농도의 당이 삼투활성을 높이는 물질로 작용하기 때문이다(14). 또한 초기 sucrose 농도가 6%일 경우부터는 fructose와 glucose를 배양기간 내에 전부 사용하지 못하였고 초기 sucrose 농도가 10%일 경우부터는 sucrose를 glucose와 fructose로 모두 분해하지 못하는 것으로 나타났다.

초기 sucrose 농도가 증가할수록 fresh cell weight/dry cell weight의 값이 줄어드는 것을 알 수 있었다. Drapeau등(15)은 sugar 농도에 의해 fresh cell weight와 dry cell weight의 비가 변화함을 보여주었고, *Phytolacca americana* 배양에서 sucrose 농도 증가에 따라 세포수가 증가하고 세포 크기가 감소하는 현상이 관찰되었다(16). 이로써 *Ginkgo biloba*도 배지의 sucrose 농도가 증가할수록 cell size 또는 cell aggregation size가 감소하는 것으로 보인다.

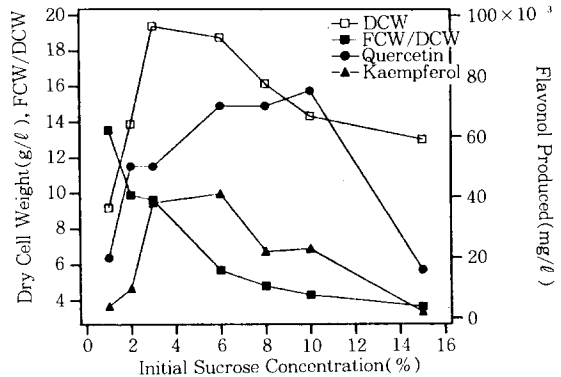


Fig. 6. Cell growth and flavonol glycosides production at various initial sugar concentrations in suspension culture of *Ginkgo biloba*.

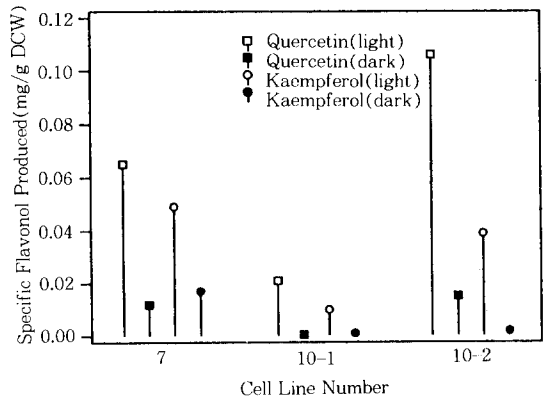


Fig. 7. Light effects on flavonol glycosides production in callus cultures and suspension culture.

세포성장과 flavonol glycosides 생성에 미치는 빛의 영향

세포배양에 필요한 여러 외부 배양조건중 빛의 영향을 조사하기 위해서 MS 고체배지에서 30일 동안 명조조건과 암조조건에서 배양한 7, 10-2 세포와 MS 액체배지에서 12일 동안 명조조건과 암조조건에서 배양한 10-1 세포를 취하여 dry oven에서 건조시킨후 flavonol glycosides의 양을 측정하여 보았으며 이때 빛의 강도는 2μEi/m²s로 하였다. 그 결과 Fig. 7과 같이 세포성장과 flavonol glycosides 생성에서 모두 명조조건에서 배양한 세포가 암조조건에서 배양한 세포에 비하여 좋은 것으로 나타났다. 이는 빛이 세포성장과 flavonol glycosides의 생성을 촉진시키는 것으로 추

정된다. 특히 10-2의 경우 명조건에서 배양한 세포의 flavonol glycosides 생성량이 암조건에서 보다 10배 이상의 증가를 보이고 있다. 이것으로 빛의 영향이 세포주간에 특이성이 있다는 것을 보여 주며 고체배지에서 키운 세포가 액체배지에서 현탁배양한 세포보다 빛에 대한 영향이 큰 것으로 나타났다.

시간별로 빛이 세포성장과 flavonol glycosides 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 명조건에서 배양하던 10-2 세포를 MS 배지에 3g씩 접종하여 명조건과 암조건에서 배양하였다. Fig. 8과 같이 명조건에서 배양한 세포는 암조건에서 배양한 세포와는 달리 12일 이후 세포성장과 flavonol glycosides 생성이 더욱 촉진되었다. 반면에 암조건에서 배양한 세포는 시간이 지남에 따라 flavonol glycosides의 생성이 줄어들음을 알 수 있다. 특히 kaempferol의 생성이 현저한 감소를 보였다. 반면에 명조건에서는 kaempferol의 생성이 12일 이후 quercetin보다 더욱 촉진되는 것을 볼 수 있다. 이것으로 kaempferol의 생성이 quercetin의 생성보다 빛에 대한 영향이 큰 것으로 생각된다. 일반적으로 flavonoid의 생성은 빛에 의해 촉진된다고 보고되고 있는데(17, 18) *Ginkgo biloba*의 경우에도 유사한 결과를 볼 수 있었다.

한편 단위 세포당 flavonol glycosides의 생성량도 암조건에 비해 명조건에서 배양한 세포가 더욱 많았으며 역시 명조건에서는 시간이 지남에 따라 생성이 촉진되는 한편 암조건에서는 감소하였다(Fig. 9). 이로써 명조건에서의 flavonol glycosides의 생성이 세포의 성장에 의한 것이 아니고 세포 자체의 생산성이 증가했음을 알 수 있었다.

당의 소모는 Fig. 10과 같이 명조건의 경우가 암조건의 경우보다 빠른 것으로 나타났다. 이것은 명조건에서 배양한 세포의 성장이 암조건보다 우수한 것과 일치된다.

배양온도가 세포성장과 flavonol glycosides 생성에 미치는 영향

배양온도의 변화에 따른 세포성장과 flavonol glycosides 생성의 변화를 알아보기 위해 MS 배지에 현탁 세포를 3.5g 접종한 후 12일 동안 25℃에서 배양하다가 각각 15℃, 25℃, 34℃에서 2일 동안 배양한 후 세포성장과 flavonol glycosides 생성을 측정하여 보았다. 세포성장은 15℃에서 배양한 세포가 약간 많이 자랐으며 34℃에서 배양한 세포가 가장 적은 성장을 보였다. 반면 flavonol glycosides 생성은 25℃에서 좋았고 34℃와 15℃에서는 약간 저하되었으며

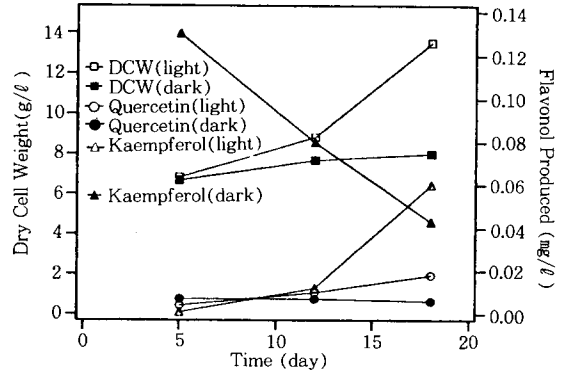


Fig. 8. Light effects on cell growth and flavonol glycosides production in suspension cultures.

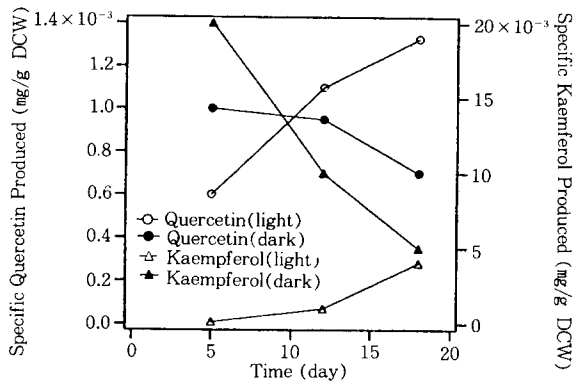


Fig. 9. Light effects on specific flavonol glycosides production.

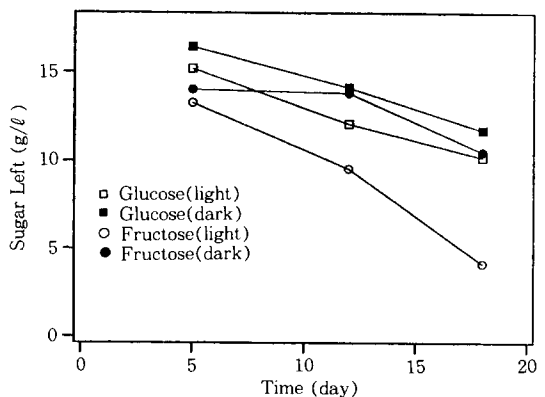


Fig. 10. Light effects on sugar consumption.

34℃ 배양과 15℃ 배양에서의 flavonol glycosides의 생성을 비교해 보면 quercetin 생성은 15℃에서 kaempferol의 생성은 34℃에서 좋았다. Motsumoto 등(19)은 담배 callus 배양에서 25℃가 최적 성장온도가 아니라 32℃라고 보고하였다. 또한 *Peganum* callus 배양에서는 최적 성장온도는 30℃임에 비해 alkaloid 생성은 25℃에서 최적이며 그 이상의 온도에서는 생산성이 저하된다고 보고되었다(20). 그러나 *Ginkgo biloba*에서 보인 변화는 극히 적은 양이었다. 이는 세포가 온도 변화에 민감하지 않다는 것을 의미하며 kaempferol의 생성이 quercetin의 생성에 비해 온도에 약간 민감한 것으로 나타났다.

요 약

*Ginkgo biloba*의 세포배양을 통하여 세포성장과 flavonol glycosides의 생성에 영향을 미치는 여러 조건들을 연구하였다. 다양한 지역으로부터 유도된 세포주들의 세포성장과 flavonol glycosides의 생합성 능력은 서로 차이가 있었다. 이들의 캘러스 및 현탁 세포는 배지조건과 배양조건에 따라 성장 및 flavonol glycosides 생합성에 많은 영향을 받았었다. 특히 배양조건 중 빛의 영향은 현저하여 명조조건에서의 flavonol glycosides의 생성은 암조조건보다 10배 이상 증가함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 서울대학교 농업 생물신소재 연구센터의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Von R. Peter, J. Fisel and W. Weisser(1966), *Arzenimittel-Forsch*, **16**, 719.
2. Von R. Hammer, and O. Tzavellas(1967), *Arzenimittel-Forsch*, **17**, 491.
3. M. F. Auguet, V. Defeudis, F. Clostre and R. Deghenghi(1982), *Gen. Phamac.*, **13**, 225.

4. T. Kariyone, H. Kimura and I. Nakamura (1958), *Yakugaku Zasshi*, **78**, 1152.
5. M. Muruyama(1967), *Tetrahedron Letters*, **14**, 309.
6. M. C. Woods(1967), *Tetrahedron Letters*, **14**, 321.
7. T. J. Mabry, K. R. Markham and M. B. Thomas(1970), *The systemetic identification of flavonoid*, Springer Verlag. NY.
8. K. Peter, and J. Hermann(1972), *Ger. offen.*, **2**, 117, 429.
9. W. Schwabe, and P. Kloss(1972), *Ger. pat.*, **1**, 767,098.
10. F. B. Salisbury and C. W. Ross(1987), *Plant Physiology*, 3rd ed., p. 96, Wadsworth Pub, Belmont.
11. Y. Fujita, Y. Hara, T. Ogino, and C. Suga (1981), *Plany Cell Rep.*, **1**, 59.
12. B. Tal, J. Gressel, and I. Goldberg(1982), *Planta Med*, **44**, 111-115.
13. G. Wilson and C. Balague(1985), *J. Exp. Bot.*, **36**, 485-493.
14. M. Sakuta, T. Takagi, and A. Komamine (1986), *J. Plant Physiol.*, **125**, 337.
15. D. Drapeau, H. W. Blanch, and C. R. Wilke (1986), *Biotech. Bioeng.*, **28**, 1555.
16. J. M. Merillion, M. Rideau, and J. C. Chenieux(1984), *Planta Med*, **48**, 497.
17. S. H. Mantell, and H. Smith(1983), *Plant Biotechnology*(S. H. mantell and H. Smith, eds.), p. 75, Cambridge University Press, Cambridge.
18. F. Kreuzaler and K. Hahlblock(1973), *Phytochemistry*, **12**, 1149-1152.
19. T. Matsumoto, K. Ohunishi, T. Yoshioka, T. Morimoto, Y. Fujita, and Y. Yamata(1972), *J. Chem.*, **36**, 2177.
20. L. Nettleship, and M. Slaytor(1974), *J. Exp. Bot.*, **25**, 1114.