

# 국내 자생 그늘썩 (*Artemisia sylvatica* MAX) 모상근의 대량배양을 위한 최적조건

신선희, 양덕조\*

충북대학교 자연과학대학 생명과학부

## Optimum Condition for Mass Culture of Hairy Roots from *Artemisia sylvatica* MAX

Sun-Hee Shin, Deok-Cho Yang\*

School of Life Science, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**ABSTRACT** This research aims the production of anti-tumor substances through *in vitro* culture of hairy roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* in *Artemisia sylvatica* MAX and the effect of culture conditions on optimum growth of hairy roots. We investigated the optimum medium, pH, carbon source, sucrose, light, Fe and polyamine conditions of various lines of hairy roots (NK3, NK4, YX, NK3-10) induced from *Artemisia sylvatica* to increase the optimum growth of hairy roots. MS medium was the best for optimum growth of hairy root clone, NK3-S10. The optimum culture period was 4 weeks for NK3-S10. The optimum sucrose concentration was 3.5 %. The optimum concentration of FeSO<sub>4</sub>, spermine and spermidine was 0.1 mM, 10 mM and 100 mM, respectively.

**Key words:** *Artemisia sylvatica* MAX, *Agrobacterium rhizogenes*, optimum growth, hairy root

### 서 론

그늘썩은 우리나라 산야에서 자라는 다년초로서 높이가 1 m에 달하고 가지에 거미줄 같은 털이 있는 식물로 최근 분리·동정된 sesquiterpene lactone 계통의 artemisinolide계의 성분은 farnesyl-protein transferase를 억제하는 것으로 밝혀졌다 (Lee et al. 2000). 그러나 이러한 약효를 가지고 있는 물질들은 식물체가 오랜 기간 자란 성숙한 식물에서 채취해야만 하고, 그 양도 아주 미량으로 존재한다.

이미 연구자들에 의해 실험실에서 sesquiterpene lactone의 artemisinin을 합성하려는 시도가 Xu 등 (1986), Avery 등 (1987)에 의하여 이루어졌으나 천연물에서 얻은 것보다 생산량이 낮고 합성에 더 많은 비용이 요구되는 것으로 보고되었

다 (Eu 1994). 또한 Norma 등 (1996)은 형질전환을 통한 *Artemisia annua*의 hairy root에서 sesquiterpene lactone (artemisinin)이 생성됨을 보고하였다.

형질전환 기법은 2차 대사산물의 생산성을 높이기 위한 방법으로 상용되고 있다. 형질전환체를 만들기 위해 활용되고 있는 vector system으로는 많은 쌍자엽 식물의 상처부위에서 모상근과 암종을 형성하는 그람음성 토양세균인 *rhizogenes*와 *A. tumefaciens*를 이용하고 있다. 이들 bacteria는 Ri (root inducing)-plasmid와 Ti (tumor inducing)-plasmid를 갖고 있으며, 이 Ri-, Ti-plasmid의 일부분인 T (transfer)-DNA가 식물세포의 유전자 내로 삽입된다. T-DNA의 일부 유전자가 식물 호르몬인 옥신과 시토키닌의 합성에 관여하는 효소의 합성 유전자를 encode하고 있어서 외부에서 호르몬 공급 없이도 이들 유전자의 발현에 의해 자체 합성된 호르몬의 조성에 의하여 모상근과 암종이 유도된다. Ri-, Ti-plasmid에 의하여 형질전환된 모상근과 암종은 식물호르몬이 없는 배지에서 정상 뿌리보다 훨씬 빠른 성장속도를 보이며 일반 체세포배양에

\*Corresponding author Tel 043-261-2293 Fax 043-261-2293  
E-mail dcyang48@hotmail.com

비하여 오랜 배양기간 동안에도 염색체의 구조나 핵형이 안정할 뿐만 아니라 2차대사산물의 형성에 있어서도 모식물체와 같거나 그 이상의 천연물질을 생산한다 (Yamada et al. 1994).

따라서 본 연구는 그늘썩에 *Agrobacterium rhizogenes*, NK3, NK4, YX 등을 접종하여 모상근 (hairy root)을 유기하고, 유기된 모상근의 대량배양을 위한 최적배지, harvesting time, 광 처리, pH, 탄소원 등 최적의 조건을 찾기 위해서 수행되어졌다.

## 재료 및 실험방법

### 식물재료 및 사용균주

모상근 유도를 위한 식물재료로는 다년생 초본인 그늘썩의 유식물체를 사용하였다. 유식물체의 소독은 2% NaOCl로 10분간 살균한 다음 멸균수로 씻어 사용하였다. 그늘썩의 유식물체는 한국생명공학원의 권병목 박사님으로부터 제공받았다. 모상근의 유도를 위해 균주는 *Agrobacterium rhizogenes* NK3를 YEB배지에서 25°C, 암(dark)조건에서 110 rpm의 회전 진탕기로 24시간 배양하였으며, 균체 농도를 10<sup>8</sup>/mL (spectrophotometer의 600 nm에서 OD가 1.2~0.7)로 조정하고 다음, 유식물체의 절편을 *Agrobacterium* 배양액에 침지하여 감염되도록 하였다.

### 모상근 유도 및 선발

*Agrobacterium rhizogenes* NK3가 접종된 유식물체 절편을 MS 고체 배지에 치상하여 상온에서 3일간 정치시킨 후, 1000 mg/L carbenicillin이 첨가된 MS 고체배지에서 유식물체 절편의 표면에 잔류해 있는 균주를 제거하였다. 잔류 균주를 제거한 유식물체 인편을 3% sucrose와 1000 mg/L carbenicillin이 첨가된 MS 고체배지에 옮겨 25°C, 암 상태 조건에서 4주간 배양하였다. 균을 접종하고 14일 경과 후, 유도되는 모상근의 선단 부위를 1~1.5 cm 크기로 절단하여 동일한 MS 고체배지에서 2주 간격으로 3~4회 계대 배양하면서 높은 생장을 보이는 모상근 세포주를 선발하였다. 선발된 모상근은 MS고체배지와 액체배지에서 25°C, 암 상태로 각각 3~4주 간격으로 계대 배양하였다. 모상근 세포주 선발은 50 mL의 MS 액체배지를 넣은 100 mL 삼각 flask에 모상근을 치상하여 유도된 모상근의 root tips (1.5 cm) 10개를 치상하여 25°C, 암상태로 20일간 진탕배양하여 건물중이 높은 세포주를 선발하였다.

### 최적배지와 성장 주기 측정

그늘썩 모상근의 생장에 미치는 배지의 효과를 알아보고자

SH (Schenk and Hildebrandt 1972), MS (Murashige and Skoog 1962), White (White 1943), LS, LP6, N65%, N63% 배지를 사용하여 모상근의 root tips (1.5 cm) 10개를 접종해 암상태에서 4주간 진탕배양 하였다. 그 후에 모상근의 생장률은 40°C dry oven에서 24시간 건조시킨 후 건중량을 측정하였다. 또한 주기별 생장을 알아보려고 MS배지 50 ml이 들어있는 100 mL 삼각 flask에 생체량 0.3 g을 접종하여 암상태에서 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6주 별로 진탕배양 후 생장률을 측정하였다.

### 광과 pH의 영향

광처리 유무에 따른 모상근의 생장률을 알아보려고 MS 기본배지 50 ml이 들어있는 100 ml 삼각플라스크에 생체량 0.3 g을 접종하여 각각 명과 암 상태에서 4주간 진탕 후 생장률을 측정하였다. 그리고 배지의 pH 변화에 의한 모상근 생장에 대한 영향을 알기 위해서 pH 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 6.4로 조절된 MS 기본배지 50 mL이 들어있는 100 mL 삼각 flask에 생체량 0.3 g을 접종하여 4주간 진탕 배양 후 생장률을 측정하였다.

### 탄소원과 sucrose의 영향

모상근의 생장에 미치는 탄소원의 영향을 알아보려고 가장 잘 쓰이는 탄소원 sucrose, maltose, lactose, glucose를 각각 3% 처리한 MS배지 50 mL이 들어있는 100 mL 삼각플라스크에 생체량 0.3 g을 접종하여 각각 암 상태에서 4주간 진탕 배양한 후 생장률을 측정하였다. 그 결과를 바탕으로 sucrose의 농도가 모상근의 생장에 미치는 영향을 알기 위해서 sucrose 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5%로 조절한 MS배지 50 mL이 들어있는 삼각 flask 100 mL에 생체량 0.3 g을 접종하여 암상태에서 4주간 진탕 배양한 후 생장률을 측정하였다.

### Fe 효과

MS 배지에 FeSO<sub>4</sub>/EDTA (pH 5.8)의 농도를 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mM로 조절한 MS배지 50 mL이 들어있는 삼각 flask 100 mL에 생체량 0.3 g을 접종하였다. 암상태에서 4주간 진탕 배양한 후 생장률을 측정하였다.

### Spermine과 spermidine의 효과

Spermine이 0, 1, 10, 100, 1000 mM 의 농도로 첨가된 MS 배지 50 ml이 들어있는 삼각플라스크 100 mL에 생체량 0.3 g을 접종하였다. 암상태에서 4주간 진탕배양한 후 생장률을 측정하였다. 그리고 spermidine이 생장에 미치는 효과를 알아보려고 spermidine 0, 1, 10, 100, 1000 mM의 농도로 첨가된 MS 배지 50 mL이 들어있는 삼각 flask 100 mL에 생체량 0.3 g을

접종하였다. 암상태에서 4주간 진탕배양 후 성장률을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 모상근의 유기 및 선발

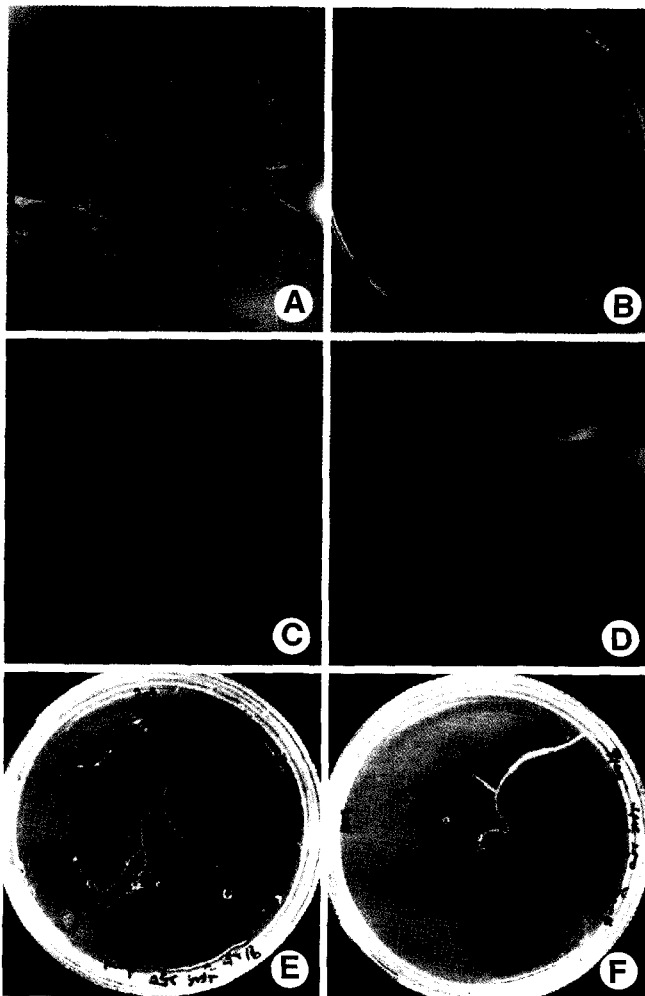
그늘썩으로부터 모상근을 유기하고자 NaOCl로 표면 살균된 유식물체의 절편을 만든 후 *Agrobacterium rhizogenes* NK3를 접종하였던 바, 접종 7일 후 줄기 절편으로부터 모상근이 유기되었다 (Figure 1). 유도된 모상근은 대체적으로 굵기가 보통의 다른 식물의 모상근에 비해 가는 것이 특징이었다. 모상근의 형태에 있어서는 분지를 많이 하는 것, 분지를 하지 않는 것, 그리고 굵기가 다소 더 굵은 것, 모상근에 root hair가

많은 것 등으로 다양하게 관찰되었다 (Figure 1). 유기된 모상근 clone은 MS 기본배지에 접종한 후 성장률이 우수한 세포주 NK3-10, NK4-1, NK3-11, NK3-6 라인을 선발하였다 (Figure 2).

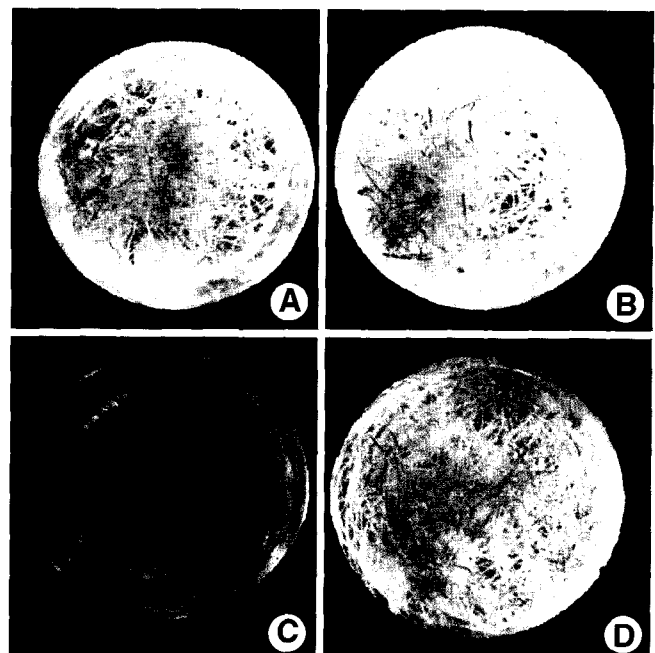
### 최적배지와 성장주기 측정

성장률이 우수한 3~10 colon을 이용하여 조직 배양 배지로 많이 사용되는 4개의 배지에 접종한 결과 모상근의 생장은 MS배지에서 성장이 0.015 g dry wt/flask로 가장 좋았으며, 그 다음으로 N6 배지 sucrose 5%에서 0.014 g dry wt/flask로 생장이 좋았다. 반면에 LP<sup>b</sup>가 0.002 g dry wt/flask로 가장 저조한 성장을 보였다 (Figure 3). 또한 같은 N6 배지의 sucrose 농도를 달리한 경우 N6 5%가 N6 3%에 비해 두 배의 높은 성장을 보였다. 이는 아마도 그늘썩의 모상근은 sucrose 농도에 의해 영향을 많이 받는 것으로 생각된다.

액체 배양시 세포가 정상적으로 1, 2차 대사 활동을 수행하기 위해서는 세포의 생리·생화학적인 반응이 계속될 수 있도록 배지를 교체해야 하는데 이 시기를 generation time이라 한다. 따라서 generation time을 조사하여 접종한 모상근의 최적 harvesting time을 규명하고자 하였다. 모상근을 접종한 후 1주일 간격으로 건물중을 측정한 결과 1~2주 사이에는 85% 성장 증가를 나타내었으며 2~3주에는 130%, 3~4주 사이에는 44% 성장이 증가하였다. 4~5주 사이에는 26%, 5~6주 사



**Figure 1.** Photographs of plant (A) and hairy roots (B, C, D, E, F) induced from stem segments of *Artemisia sylvatica* MAX. Hairy roots cultured on MS solid medium (B, C, E, F) supplemented with 1000 mg/L carbenicillin and MS liquid medium (D). D, hairy root induced from stem inoculated with *A. rhizogenes* NK3; E, inoculated with *A. rhizogenes* A<sub>4</sub>; F, inoculated with *A. rhizogenes* Yx.



**Figure 2.** Various clone of hairy roots of *Artemisia sylvatica* MAX cultured in MS liquid medium for 25 day at 25°C. A, NK4-1 is hairy root induced from stem inoculated with *A. rhizogenes* NK4; B, NK3-10 is inoculated with *A. rhizogenes* NK3; C, NK3-11 is inoculated with *A. rhizogenes* NK3; D, NK3-6 is inoculated with *A. rhizogenes* NK3.

이에는 7% 성장이 증가하였다 (Figure 4). 이러한 결과는 싸리풀 모상근의 성장주기 (Choi et al. 1999)와 일치한다. 또한 본 결과로 추론하면 5~6주에 모상근을 수확하는 것이 건물 중량 증가에 따른 생산성 증가가 예상이 되지만, 액체배양 과정 중 영양분의 공급이 원활하지 못하여 갈변현상이 유발되고 장기간 배양에 따른 미생물 오염 등의 생산공정 관리와 고가의 대형설비 활용 측면에서 볼 때 비효율적이므로 4주가 생산성을 극대화 할 수 있는 최적 배양 기간임을 알 수 있었다.

광과 pH의 영향

빛은 보통 성장, 기관형성, 식물의 일·이차 대사산물의 형성에 중요한 요인으로 작용한다 (Liu 2002). 광처리가 그늘쪽 모상근의 성장에 미치는 효과를 알아본 결과 암처리구 모상

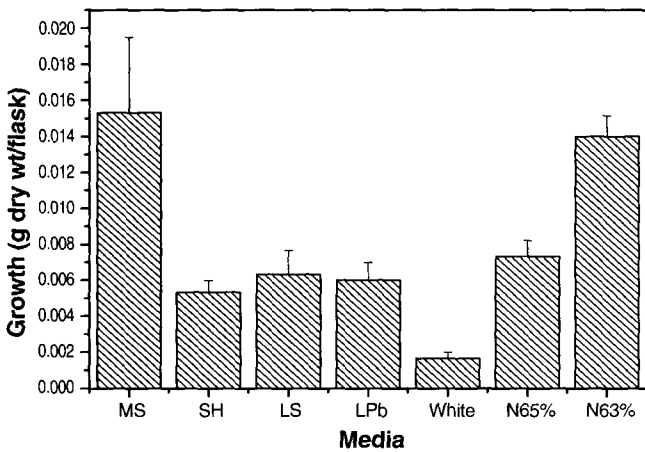


Figure 3. Effect of media on the growth of hairy roots induced from *Artemisia sylvatica* MAX. The data were measured after 28 days of culture in MS liquid medium at 25°C in dark condition. Inoculum size culture per was 0.3 g hairy root.

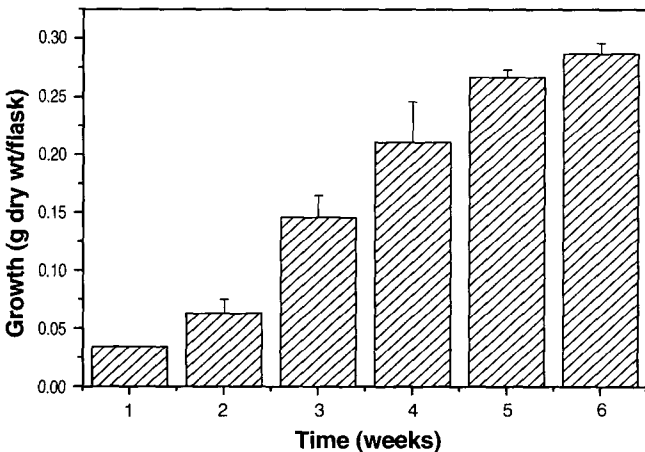


Figure 4. Effect of time on the growth of hairy roots induced from *Artemisia sylvatica* MAX. The data were measured after 28 days of culture in MS liquid medium at 25°C in dark condition. Inoculum size culture per was 0.3 g hairy root.

근의 생장률이 0.2186 g dry wt/flask로 광처리구 모상근의 생장률 0.2025 g dry wt/flask 보다 높게 나타났다 (Figure 5). 이러한 결과는 자리공 모상근 (Yang et al. 1999)이나 인삼 모상근 (Choi 1997)의 결과와 비슷한 결과를 나타내었다. 대부분의 모상근은 광상태보다 암상태에서 더 좋은 성장을 보이는데 그늘쪽 모상근은 이에 비해서 광상태와 암상태에서의 차이가 미비하였다. 이는 모상근은 광 상태에서 생성된 산화제들이 내성 황산화제 및 황산화 효소의 활성을 억제시켜 생장이 감소한다 (Yang et al. 1999). 그런데 썩은 황산화 효소의 활성이 높기 때문에 (Pack et al. 1999) 모식물체와 비슷한 생리적 특성을 가지는 모상근 역시 황산화효소의 활성에 의해 산화제의 피해를 적게 보는 것 같다.

모상근이 가장 잘 자라는 pH는 MS 배지의 pH인 pH 5.8에서 0.163 g dry wt/flask로 성장이 가장 좋았다. 또 pH 5.2 이하와 pH 6.2 이상에서는 모상근의 성장이 저조하게 나타났다 (Figure 6). 이러한 결과는 그늘쪽 모상근의 성장이 pH가 5.6~6.2인 범위에서 양호함이 확인되었다. pH 6.0에서 0.063 g dry wt/flask로 가장 저조한 성장률을 나타내었으나 이는 모상근의 실험이 root tip을 자른 것이 아니고 생체량을 일정량 사용하였기 때문이라고 상대적으로 모상근의 성장이 일어나는 root tip 부분이 적어서 나타난 결과라 생각된다.

탄소원과 sucrose의 영향

탄소원은 식물체의 기내 생육에 있어서 모상근의 성장과 발달을 위해 배지에 반드시 첨가해야 하는 중요한 성분이다 (Kang 1997). 탄소원에 의한 모상근의 성장 효과를 알아본 결과 MS 3% sucrose에서 1.239 g dry wt/flask로 성장이 가장 좋았다. 이는 가장 저조한 maltose의 0.021 g dry wt/flask보다 약 6배 정도 성장이 양호한 것으로 나타났다 (Figure 7). 이러한

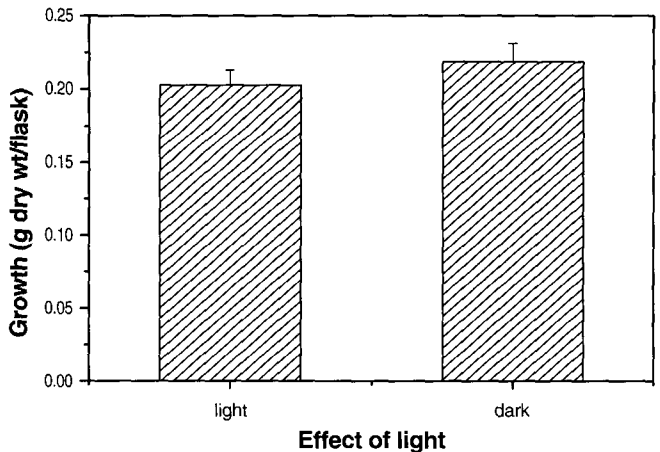


Figure 5. Effect of light on the growth of hairy root induced from *Artemisia sylvatica* MAX. The data were measured after 28 days of culture in MS liquid medium at 25°C in dark condition. Inoculum size culture per was 0.3 g hairy root.

결과는 *Datura stramonium* 모상근의 경우와 유사함을 알 수 있었으며 (Payne et al. 1987), *Hyoscyamus* spp (Choi 1998)에서도 같은 결과를 얻었다.

Sucrose 농도가 모상근의 성장에 미치는 영향을 알아본 결과 sucrose 3.5%에서 0.212 g dry wt/flask로 가장 성장률이 좋았으며, sucrose 2%에서 0.047 g dry wt/flask로 성장이 가장 저조하였다 (Figure 8). 이러한 결과는 이미 보고된 연구결과 (Kim et al. 1998)와 (Song et al. 2001)와 유사하다.

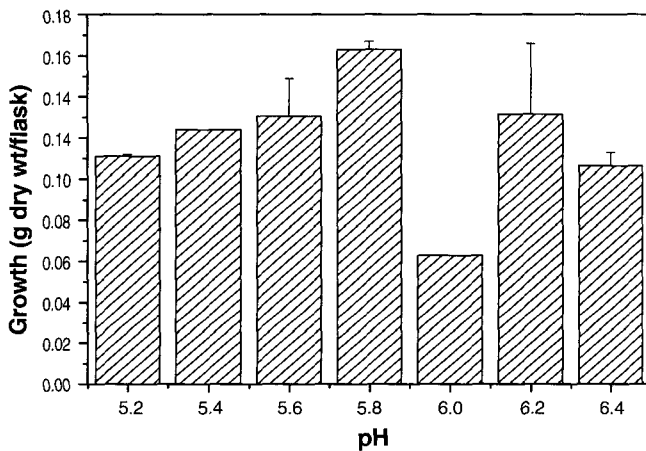
### Fe 효과

모상근은 외부로부터 탄소원을 공급받아 성장하는 종속영양생장 (heterotrophic growth)을 하며 식물체가 자라는 재배 환경에 비하면 높은 스트레스 특히 산화스트레스 조건에서

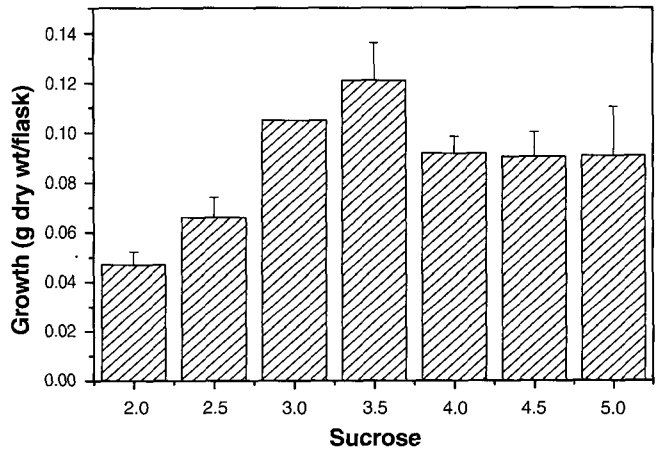
배양되고 있다 (Lee et al. 2002). Fe은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 H<sub>2</sub>O와 O<sub>2</sub>로 분해하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 독성을 방지하는 효소인 카탈라아제와 과산화효소 (peroxidase)의 구성성분이다. 또한 Fe은 식물체에서 광합성과 미토콘드리아 호흡에서 활성적인 시토크롬 및 페레독신 같은 전자전달계의 여러 효소와 단백질 구성에 참여하며, Fe<sup>2+</sup>와 Fe<sup>3+</sup>의 상호전환을 통하여 전자운반의 기능을 갖게 한다. 따라서 Fe<sup>2+</sup> 이온 농도에 따른 모상근의 성장률을 조사한 결과 농도 0.1 mM에서 0.267 g dry wt/flask로 모상근 성장이 가장 우수하였다 (Figure 9). 이러한 결과는 인삼 모상근의 철 농도에 의한 성장에 대한 결과와 일치한다 (Choi 1997).

### Spermine과 Spermidine의 효과

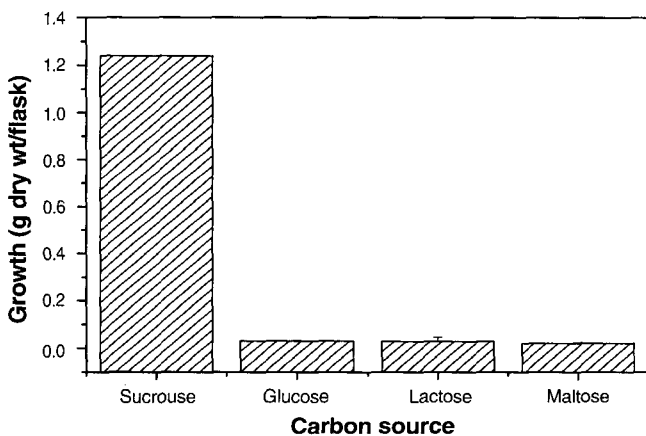
Polyamine의 함량은 물질대사가 활발한 조직에서 그 양이



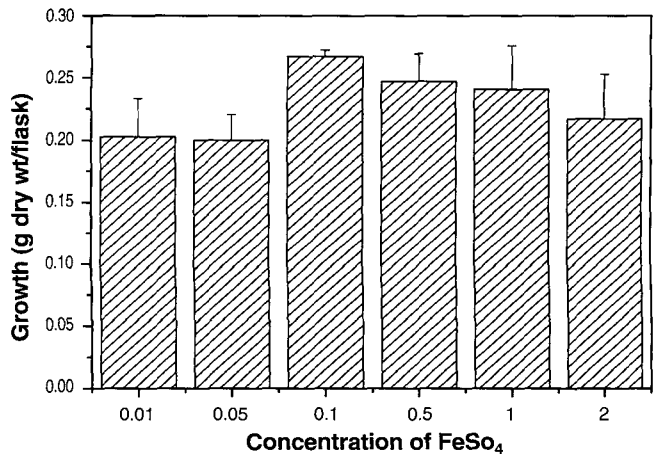
**Figure 6.** Effect of pH on the growth of hairy root induced from *Artemisia sylvatica* MAX. The data were measured after 28 days of culture in MS liquid medium at 25°C in dark condition. Inoculum size culture per was 0.3 g hairy root.



**Figure 8.** Effect of sucrose on the growth of hairy root induced from *Artemisia sylvatica* MAX. The data were measured after 28 days of culture in MS liquid medium at 25°C in dark condition. Inoculum size culture per was 0.3 g hairy root.

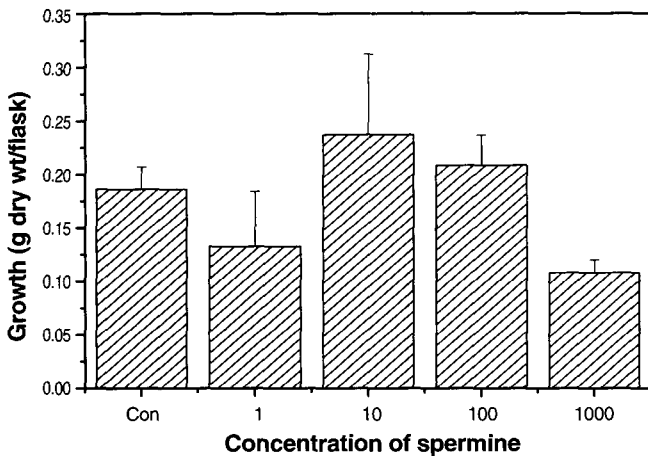


**Figure 7.** Effect of carbon source on the growth of hairy root induced from *Artemisia sylvatica* MAX. The data were measured after 28 days of culture in MS liquid medium at 25°C in dark condition. Inoculum size culture per was 0.3 g hairy root.

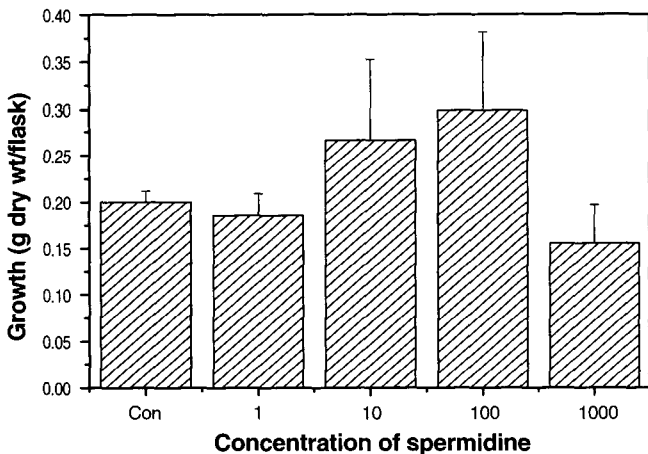


**Figure 9.** Effect of FeSO<sub>4</sub> on the growth of hairy roots induced from *Artemisia sylvatica* MAX. The data were measured after 28 days of culture in MS liquid medium at 25°C in dark condition. Inoculum size culture per was 0.3 g hairy root.

증가한다 (Palavan and Gaslston 1982). 식물에서 polyamine의 양은 이들을 합성하는 효소 활성도에 의해 좌우되며, 이에 따라 조직세포의 proliferation 성장과 분화에 아주 밀접히 연관되어 있다 (Cohen 1971). 이런 사실을 바탕으로 모상근에 폴리아민류인 spermine과 spermidine을 농도별로 처리하여 성장에 미치는 효과를 확인하였다. 그 결과 spermine은 10 mM에서 0.237 g dry wt/flask로 가장 좋은 성장을 보였으며 (Figure 10), spermidine은 100 mM에서 0.298 g dry wt/flask로 생장이 가장 우수하였다 (Figure 11). 또한 두 처리구 공히 1000 mM이상에서는 대조구 보다 성장이 억제됨을 알 수 있었다. 또한 polyamine이 다른 호르몬에 비해 이렇게 높은 농도에서 효과를 보이는 것은 polyamine은 그들의 활성 대사와정에 직접적으로 관련 없는 다른 세포 내에 있기 때문에 생리적 활성에 비해 고농도에서 활성을 보이는 것으로 생각된다.



**Figure 10.** Effect of spermine on the growth of hairy roots induced from *Artemisia sylvatica* MAX. The data were measured after 28 days of culture in MS liquid medium at 25°C in dark condition. Inoculum size culture per was 0.3 g hairy root.



**Figure 11.** Effect of spermidine on the growth of hairy roots induced from *Artemisia sylvatica* MAX. The data were measured after 28 days of culture in MS liquid medium at 25°C in dark condition. Inoculum size culture per was 0.3 g hairy root.

## 적 요

본 실험은 그늘썩을 *Agrobacterium*을 통해 형질전환체인 모상근을 유기하고 모상근의 대량배양을 위해 모상근이 가장 잘 자라는 성장 조건을 찾기 위해 수행되었다. 실험 결과를 종합해 보면 선발된 그늘썩 모상근 세포주의 대량 생산을 위한 최적 배지는 MS 기본 배지임을 확인하였다. 또한 최적의 harvesting time 모상근의 성장률이 좋고 갈변과 배지의 미생물 오염도가 적은 4주가 적당한 것으로 판단된다. 그리고 광 처리 하에서 모상근을 배양하는 것보다는 암상태에서 모상근을 키우고 pH는 5.8 정도가 탄소원은 sucrose로 3.5%가 모상근을 대량배양시 최적조건임을 확인되었다. 미량원소인 Fe<sup>2+</sup>은 0.1 mM을 처리하는 것이 모상근의 성장을 촉진하였으며 spermine과 spermidine은 각각 10 mM와 100 mM로 처리하는 것이 모상근의 성장을 높일 수 있다. 앞으로 연구는 이 결과를 토대로 모상근 대량 배양을 위한 scale up조건과 bioreactor의 설계에 관한 연구가 필요하다.

사사 - 이 논문은 2001년 과학재단 특정기초 과제(R01-2000-000-00153-0) 연구비에 의하여 연구되었습니다.

## 인용문헌

- Avery MA, Jennings-White C, Chong WKM (1987) The total synthesis of (+)-artemisinin and (+)-9 dimethylartemisinin. *Tetrahedron Lett* 28: 4926-4632
- Choi CH (1998) Tropane alkaloids production in transgenic tissue induced by *Agrobacterium*. PhD thesis, Chungbuk National University, Cheongju, 92-100
- Choi CH, Kim YH, Yang DC (1999) Effect of media, culture periods, sucrose and dextrose on tropane alkaloid production in hairy root cultures of *Hyoscyamus niger* L. *Korean J Plant Tiss Cult* 26: 77-83
- Choi HY (1997) Physiological characteristics of ginseng hairy root via light energy, MS thesis, Chungbuk National University, Cheongju, 55-61
- Cohen SS (1971) Introduction to polyamines. Prentice-Hall, New Jersey 179
- Eu SL (1994) Establishment of cell and tissue culture systems and investigations of medicinal substances in *Artemisia princeps* var. MS thesis, Chungnam National University, Daejeon, 10-17
- Kang HM (1997) Tropane alkaloid production from transformed tissue of *Datura* Spp., MS thesis, Chungbuk National University, Cheongju, 58-62
- Kim YH, Yun KY, Yang DC (1998) Effect of media and elicitor on betalain and phytoaccsides production in hairy root cultures of

- Phytolacca esculenta* van Houtte, Korean J Plant Tiss Cult 25: 507-514
- Lee HS, Kim KY, Kwon SY, Kwak SS (2002) Development of industrial transgenic plant using antioxidant enzyme genes, J Plant Biotech 29: 69-77
- Lee SH, Kang HM, Song HC, Lee HS, Lee UC, Son KH, Kim SH, Kwon BM(2000) Sesquiterpene lactones, Inhibitors farnesyl protein transferase isolated from the flower of *Artemisia sylvatica*, Tetrahedron 56: 4711-4715
- Liu CZ, Chen GZ, Wang YC, Fan (2002) Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. Biochemistry 38: 581-585
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue, Physiol Plant 15: 473-497
- Norma B, Planiego, Giulietti M (1996) Artemisinin production by *Artemisia annua* L-transformed organ cultures, Enzyme Microb Technol 18: 526-530
- Pack SW, Kim KH, Jung DY, Min TJ (1999) Cytotoxicity of *Artemisia argyi* extract against H9 (ATCC HTB 176) cell and antioxidant enzyme activities, Yankhak Hoeji 43: 598-60
- Palavan N, Gaslston AW (1982) Polyamine biosynthesis and titer during various development stage of *Phaseolus vulgaris*. Physiol Plant 55: 438-444
- Payne J, Hamill JD, Robins R, Rhodes MJC (1987) Production of hyoscyamine by hairy root cultures, Planta Med 53: 474-4785
- Schenk RC, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, Can J Bot 50: 199-204
- Song NH, Yang KJ, Bae CH, Yang DC (2001) Analysis and culture conditions for biosynthesis of polyacetylene from callus of ginseng superior lines, Korean J Plant Tiss Cult 28:123-128
- White PR (1943) A handbook of plant tissue culture, Jacques Cottell Press, Lancaster, Pennsylvania
- Yamada Y, Yun DJ, Hashimoto T (1994) Advances in plant biotechnology, Elsevier, 83-93
- Yang DC, Kim YH, Choi KM, Yun KY, Yang DC (1999) Effect of electron acceptor, electron transport inhibitors and antioxidants on growth and ginsenosides production in hairy root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer. J Ginseng Res 23: 205-210
- Xu XX, Zhu J, Huang DZ, Zhou WS (1986) Total synthesis of artemisinin and deoxiartemisinin. Tetrahedron Lett 42: 819-824

(접수일자 2002년 9월 12일, 수리일자 2003년 3월 12일)