

홍경천(*Rhodiola sachalinensis* A. Bor)의 캘러스 배양에서 Salidroside 생산

김수정^{1*}, 황백¹, 황성진², 안준철³

¹전남대학교 생물학과, ²동신대학교 식품생명공학과, ³서남대학교 생명과학과

Production of Salidroside from Callus Culture of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor

Soo Jung Kim^{1*}, Baik Hwang¹, Sung Jin Hwang², Jun Cheul Ahn³

¹Department of Biology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

²Department of Food and Biotechnology, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

³Department of Life Sciences, Seonam University, Namwon 590-711, Korea

ABSTRACT Callus of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor were induced from leaf explant on 1/2MS solid supplemented with combination of auxin (2,4-D, NAA: 0.1~2 mg/L) and cytokinin (BA: 0.1~0.2 mg/L). The effects of various medium, culture conditions and phytohormones on the growth of callus were investigated. MS, WPM, B₅ medium and diluted or concentrated media (1/2X, 2X, 3X) were used to investigate the growth of callus on each media. Among these, the highest growth was observed when cultured in in 2B₅ medium containing 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA, 3% sucrose and 49.6 mM KNO₃ as nitrogen source, and 2.16 mM NaH₂PO₄ as phosphate source at 25°C in the dark. The calli cultured with 5% sucrose produced high salidroside content (0.41% on the basis of dry wt) than normal root (0.17%).

Key words: *Rhodiola sachalinensis*, callus culture, optimum growth, salidroside

서 론

홍경천 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor)은 다년생 초본식물로서 들나물과의 들꽃속식물이며 참돌꽃이라고도 부른다. 대부분은 해발 1,700-2,300 m사이의 주야 온도차가 큰 지역, 고산의 산소가 적고 저온, 건조, 광풍, 강자외선 등 혹독한 환경에서 석회암이나 화강암 등의 암석 사이에서 서식한다 (Jiang et al. 1994).

이 식물의 형태학적인 특징은 전체에 분백색이 돌고 밑부분은 갈색 인편으로 덮여 있으며 원줄기는 높이 7-30 cm에 이르고 총생한다. 잎은 호생이고 육질이며 도란형 또는 타원형이고 길이 1-3 cm, 나비 5-15 mm로서 끝이 둔하고 윗가장

자리에 둔한 톱니가 있다. 열매는 빨 모양으로 4-5개 열리며 길이 6-7 mm로서 직립한다 (Bae 2000; Lee 1996).

홍경천은 salidroside 성분을 함유한 중국산 약용식물이다. 전초를 약으로 쓸 수도 있지만 대개 굵은 뿌리를 약으로 쓴다. 민간에서는 진정제, 해열제, 수렴제로 쓰였으며, 중추신경계에 대한 긴장작용, 항 피로효과, 신경증과 고혈압에 대해 효과가 있다고 알려져 있다. 중국서장 지역에서는 천년 전부터 신체를 튼튼히 하고, 여러 혹독한 환경에 적응하는 약으로 이용되어 왔다 (Saratikov 1968; Kurkin 1986; Ming et al. 1988).

홍경천은 50년 전부터 구 소련 과학자들에 의해 인삼보다 우수한 면역작용이 보고되었고, 인삼이나 가시오가피와 유사하게 열악한 환경에서의 생체의 내성을 증진시키는 작용, 실험동물에 의한 항피로, 항방사선, 항산소 결핍증 등의 작용이 보고되어 있다 (Ming 1988; Petkov et al. 1986). 이러한 작용을 보이는 주요 활성성분은 salidroside와 p-tyrosol로 현재까지

*Corresponding author Tel 063-620-0256 Fax 063-620-0031
E-mail: jcahn@seonam.ac.kr

조사되고 있으며 (Linch et al. 2000), 이외에 전분, 단백질, 지방, 탄닌, 플라보류 화합물과 미량의 휘발성 물질, 아스파라긴산, 트레오닌, 글루타민산, 글리신 등 20여종의 아미노산이 함유되어있다. 또한 salidroside는 중추신경의 억제 작용, 강심작용, 아드레날린으로 인한 혈당 농도를 억제하는 작용도 알려져 있다 (Lee et al. 2000; Zong et al. 1991).

최근 자생 화훼류와 생약 및 약리성 자원식물에 대한 관심이 높아지면서, 이들 자원식물의 번식법 확립, 생리활성물질의 탐색, 세포배양을 통한 유용물질 생산 등에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 기내조직배양을 이용한 대량번식은 자연환경의 제약을 받지 않고 기내의 최적환경에서 원하는 시기에 대량생산이 가능하므로 상업적 이용이 가능하다.

따라서 본 연구는 환경 및 온도에 민감하여 증식이 용이하지 않은 홍경천의 켈러스 최적 배양 조건 및 중국산 뿌리와 유도 배양된 켈러스에서 생리활성물질인 salidroside의 생산여부를 확인하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 무균발아

본 연구에 사용된 홍경천 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor)은 농촌진흥청 작물과학원 특용작물과로부터 종자를 분양 받아 70% ethanol (v/v)로 3분간, 5% sodium hypochlorite (v/v)로 6분간 각각 표면살균 후, 멸균수로 3회 세척하였다. 무균발아에 사용한 배지는 생장조절제가 들어 있지 않는 MS 기본배지에 0.8% agar (w/v), 3% sucrose (w/v)를 첨가하였고 pH는 5.7-5.8 사이로 조정하였다. 배양조건은 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 광도 $50 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 16/8시간의 광주기하에서 발아시켰다.

켈러스 유도 및 배양

기내에서 무균배양 중인 식물체의 줄기와 잎을 절취하여 켈러스 유도배지에 치상하여 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 암조건에서 배양하였다. 켈러스 유도는 MS배지에 2,4-D와 NAA를 각각 0.1, 0.5, 1, 2 mg/L와, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/L를, BA를 각각 혼합한 16종의 배지를 조제하였고 1/2MS배지에 똑같은 농도의 2,4-D와 NAA를 BA와 각각 혼합한 16종의 배지를 조제한 후 줄기와 잎을 치상하였다. 배지의 멸균은 3% sucrose와 0.8% agar를 첨가한 후 pH를 5.7~5.8사이로 조절한 뒤 멸균한 후 petri dish (87×15 mm)에 30 mL씩 분주하여 사용하였다. 실험재료의 치상이 끝난 petri dish는 밀봉하여 25°C 에서 암배양하였으며, 배양 3주째에 켈러스 형성율을 조사하고, 유도된 켈러스를 식물체 절편으로부터 분리하여 동일 조성의 새로운 배지에 배양하였다.

유도된 켈러스의 다량증식용 액체배지에서의 배양에 적합한 생장조절제의 농도를 규명하기 위해 0.5~1 mg/L의 BA와

0.1~1 mg/L NAA가 첨가된 1/2MS 기본액체배지 (3% sucrose, pH 5.7)에 배양하였고, MS, WPM, B₅ 등의 배지를 이용하여 적정배지를 규명하였다.

최적 세포배양 조건 확립

생장율이 양호한 배지를 기준으로 하여 질소원인 $\text{NH}_4^+\text{NO}_3^-$ 의 비율 및 인산의 농도, 탄소원의 종류 및 농도, 화학적인 요인과 광조건 ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), pH, 암조건과 같은 물리적 변화가 켈러스 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 조사방법은 100 mL의 삼각플라스크에 30 mL 배지를 넣고 각각의 플라스크에 켈러스를 0.2 g (fresh wt)를 접종하여 회전교반기에서 100 rpm으로 3주간 진탕배양 후 수확하여 증류수로 세척 후, 흡습지에 습기를 제거하고 생체량을 측정하고, 동결건조기에 동결건조하여 건중량을 측정하였다. 모든 실험구의 pH는 5.7로 하였으며, 3회 반복하여 실험하였다.

Salidroside 분석

Salidroside의 추출 및 분리 과정은 Wenzhe 등 (2001)의 방법에 의하였다. 유식물체의 뿌리와 현탁배양세포를 동결건조 후 건조시료 1 g을 methanol (MeOH) 2-3 mL로 추출하여 감압농축 하였다. 농축된 시료를 H_2O 와 CH_2Cl_2 (1:1) 혼합한 후 분리된 수층에 ethyl acetate (EtOAc)를 1:1의 비율로 혼합한 후 EtOAc층만 분리하여 rotary evaporator로 농축시켰다. 농축된 시료를 MeOH 0.5 mL로 녹여 TLC와 HPLC분석에 사용하였다.

TLC분석은 고정상으로 silicagel 60 F₂₅₄ (Merck) plate에 농축액 약 3 μL 를 점적하여, 이동상으로 CHCl_3 -MeOH- H_2O (70:30:4 v/v/v)를 사용하여 전개시켰다. 10% sulfuric acid를 분무하여 가열 발색시켜 salidroside의 함유 여부를 확인하였다.

HPLC 분석은 Waters (Water Co., U.S.A)를 이용하였으며, 컬럼은 μ -Bondapak C18을, 이동상으로는 20% MeOH을 사용하였다. 시료 5 μL 주입 후, 1 mL/min의 속도로 214 nm에서의 자외선 흡광도로 검출하였다. TLC와 HPLC의 분석에 이용한 salidroside 표준품은 Linch 등 (2000)의 방법에 의하여 홍경천 뿌리에서 분리한 후 NMR, IR 등으로 동정한 다음 본 실험에 이용하였다 (현재 투고중).

결과 및 고찰

켈러스 유도

기내에서 무균배양 중인 유식물체의 줄기와 잎을 절취하여 MS 및 1/2MS배지에 2,4-D와 NAA를 각각 0.1, 0.5, 1, 2 mg/L를 BA를 0.1, 0.5, 1, 2 mg/L를 각각 혼합한 16종의 배지

(Table 1)에 치상하여 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 암조건에서 배양 후 캘러스의 유도율을 조사하였다. 그 결과 1/2MS 기본배지에 NAA 0.5 mg/L와 BA 1 mg/L로 조성된 배지에서 캘러스 유도율이 높았다. 그러나 2,4-D와 BA를 혼합한 1/2MS 기본배지 조건에서는 2,4-D 0.1 mg/L 와 BA 1 mg/L 에서 캘러스가 형성되었지만 갈변화 되어 성장하지 못했다. 한편 캘러스 유도에 대한 성장조절제의 영향은 옥신 (IBA, IAA, NAA)류의 단독 첨가구에서는 캘러스의 유도율이 저조한 반면 상대적으로 부정근의 발생율이 높게 나타났다.

캘러스 현탁배양

유도된 캘러스의 대량증식을 위해 고체배지에서 탈분화되어 발생한 캘러스를 NAA 0.5mg/L와 BA 1 mg/L 첨가된 1/2MS기본배지에서 현탁배양을 실시하였다. 고체배지에서 성장 중인 캘러스는 노랑 색의 덩어리진 모양으로 활발하게 증식되었으나, 캘러스들이 갈변되며 성장율도 좋지 않았다. 그러나 NAA 0.5 mg/L와 BA 1 mg/L 첨가된 2B₅배지에서 현탁배양을 실시한 결과 현탁배양 초기에는 캘러스의 성장율이 좋지 않았지만 계속적으로 계대배양을 실시하면 노랑 색의 세포들이 재생성 되면서 성장율도 회복되었다. 이렇게 얻어진 현탁세포의 성장조건을 규명하기 위해 0.5~1 mg/L의 BA와 0.1~1 mg/L NAA가 첨가된 2B₅ 액체배지(3% sucrose, pH 5.7)에 3주간 배양조사한 결과, 캘러스 유기시와 같은 처리구에서 성장역시 가장 좋았다.

Table 1. Effects of BA, 2,4-D and NAA on the callus induction from *in vitro* leaf explants of *R. sachalinensis*. Explants were cultured on 1/2MS medium without growth regulators.

Growth regulators(mg/L)		Callus growth ^a	Growth regulators(mg/L)		Callus growth ^a
BA	NAA	NAA	BA	2,4-D	2,4-D
0.1	0.1	+(R)	0.1	0.1	+
0.1	0.5	-	0.1	0.5	+
0.1	1	+(R)	0.1	1	+
0.1	2	-	0.1	2	-
0.5	0.1	+(R)	0.5	0.1	-
0.5	0.5	+(R)	0.5	0.5	+
0.5	1	++	0.5	1	+
0.5	2	-	0.5	2	++
1	0.1	++(R)	1	0.1	++
1	0.5	+++	1	0.5	-
1	1	-	1	1	++
1	2	-	1	2	+
2	0.1	++(R)	2	0.1	-
2	0.5	++(R)	2	0.5	-
2	1	+++	2	1	-
2	2	-	2	2	-

^a -, no callus induction; +, poor; ++, moderate; +++, good; R, adventitious root

최적배지 조건

캘러스는 배지의 성분이나 물리적, 화학적인 배양조건에 따라 성장과 2차 대사산물 합성에 영향을 받기 때문에 배양조건은 조직배양에 있어서 아주 중요하다 (Sakurai et al. 1997). 따라서 본 실험에서는 캘러스의 성장에 가장 적합한 배지를 선정하기 위하여 같은 농도의 호르몬이 처리된 (BA 1 mg/L, NAA 0.5 mg/L) 1/4MS, 1/2MS, MS, 1/2WPM, WPM, 2WPM, 3WPM, 1/4B₅, 1/2B₅, B₅, 2B₅, 3B₅ 배지 (sucrose 3%)에 3주간 배양한 캘러스의 성장율을 조사한 결과, MS와 WPM 배지류 (데이터 미제시)에 비교하여 2B₅배지가 다른 배지에 비하여 성장율이 월등히 높았으므로 2B₅배지를 최적배지로 선택하였다 (Figure 1).

탄소원과 sucrose의 영향

식물은 종에 따라 탄소원의 종류 및 이용률이 다르게 나타나기 때문에 본 실험에서는 적정 탄소원 및 적정농도의 규명을 위하여 서로 다른 탄소원에서 캘러스의 성장율을 조사하였다. 배지에 첨가되는 탄소원으로는 조직배양시 가장 널리 쓰이는 sucrose와 glucose, fructose, sorbitol를 성장조절제 (BA 1 mg/L, NAA 0.5 mg/L)가 처리된 2B₅배지에 각각 3%로 사용하였다. 그 결과 sucrose가 다른 탄소원에 비하여 월등히 높은 성장을 보였으며 sorbitol이 첨가된 처리구에서는 세포의 생장이 거의 이루어지지 않았다 (데이터 미제시). 조사된 탄소원 중 sucrose에서 가장 높은 성장을 보여 2B₅ 배지에 sucrose농도를 1~5%까지 변화시켜 배양한 결과 3%의 농도로 첨가했을 때 가장 높은 성장율을 보였으며 농도가 높아짐에 따라 성장율이 낮아지는 것으로 나타났다 (Figure 2). 일반적으로 세포배양에 있어서 배지 내 탄소원의 농도가 2~4% 경우 삼투압의 유지 및 배양세포의 최적 성장에 적절한 것으로 보고되어지고 있다 (Weathers et al. 1997). 또한, 높은 농도의 sucrose

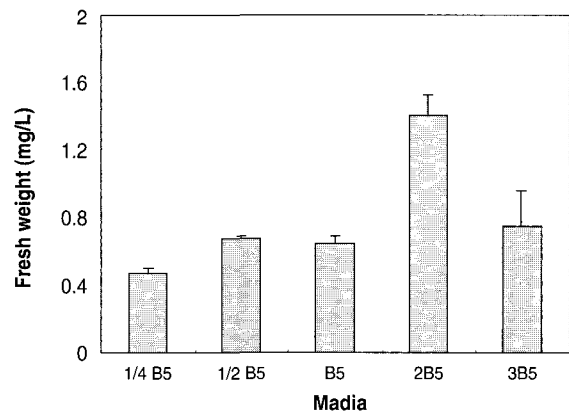


Figure 1. Effect of strength of B₅ medium on callus growth of *R. sachalinensis* after 3 weeks culture. Each medium was containing 3% sucrose, 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA.

는 osmotic stress를 받는다는 본 연구의 결과는 이전의 연구 결과와도 유사하게 나타났다 (Xu et al. 1999).

질소원과 인산의 영향

식물이 이용하는 질소원은 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 가 주로 사용된다. 식물은 종과 발달 단계에 따라 질소원의 흡수능력과 이용형태도 다르다 (Touria and Douglas 1998). 흡수된 질소는 동화과정을 거쳐, 단백질 및 핵산, 아민류, 엽록소와 조효소등의 주요 성분으로 식물생육에 지대한 영향을 미친다. 또한 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 의 비율은 성장과 물질의 생산뿐만 아니라 식물의 형태 발생에도 영향을 미치는 것으로 보고 되고 있다 (Choi and Soh 1997). 생장율이 가장 좋은 B5배지의 질소원의 농도를 기준으로 하여 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 의 비율을 달리하여 배양한 결과, NO_3^- 는 B5 배지 농도보다 2배 높은 49.6 mM (2X), NH_4^+ 도 B5 배지 농도보다 2배 높은 2.0 mM (2Y)가 첨가되었을 때 캘러스의 생장이 가장 좋았으며, NH_4^+ 단독처리구에서는 생장이 감소되었으나,

현저한 차이는 나타나지 않았다 (Figure 3).

인산은 세포 내 분자의 구성 성분 뿐만 아니라 핵산대사 및 인지질의 생합성을 위한 전구물질이며 생체내의 수많은 대사 경로와 활성을 조절하는 것으로 알려져 있어 (Brodelius and Vogel 1985) 적정 인산 농도의 규명이 필수적이다. 따라서 B5 배지의 인산 농도를 기준(1.08 mM)으로 0.5X, 1X, 2X, 4X로 달리 배양한 결과 2.16 mM (2X)에서 가장 높은 생장을 보였으나 현저한 차이는 나타나지 않았다 (Figure 4).

광과 pH의 영향

광조건 ($50 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$), 암조건 및 pH등 물리적인 요소가 생장율에 미치는 영향을 보기 위하여 광배양과 암배양을 실시한 결과 암배양에서 생장율이 좋았다 (Figure 5). 캘러스의 생장에 미치는 pH의 영향은 pH 5~6에서 최대생장을 나타냈으며 pH 4.5 이하와 pH 6.5 이상에서는 캘러스의 생장이 급격하게 감소되었다 (Figure 6). 식물에 따라서 최적산도가 다

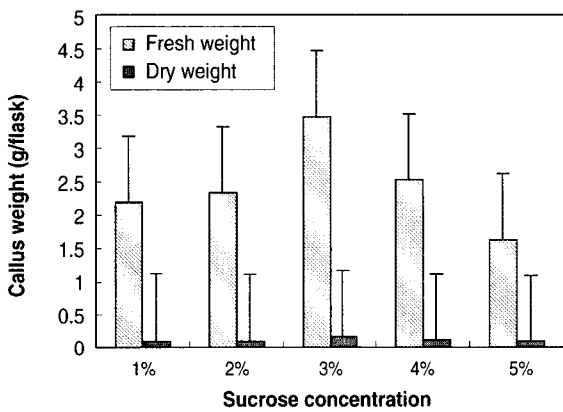


Figure 2. Effect of sucrose concentration on the growth of *R. sachalinensis* callus in 2B5 liquid medium containing 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA after 3 weeks culture.

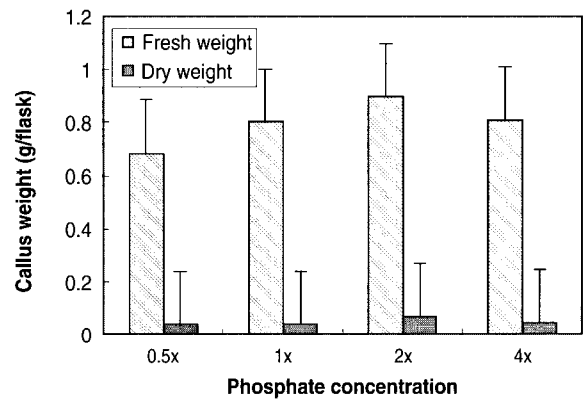


Figure 4. Effect of phosphate concentration on the growth of *R. sachalinensis* callus in 2B5 liquid medium containing 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum; 0.2 g (fresh weight), 1X = 1.08 mM NaH_2PO_4

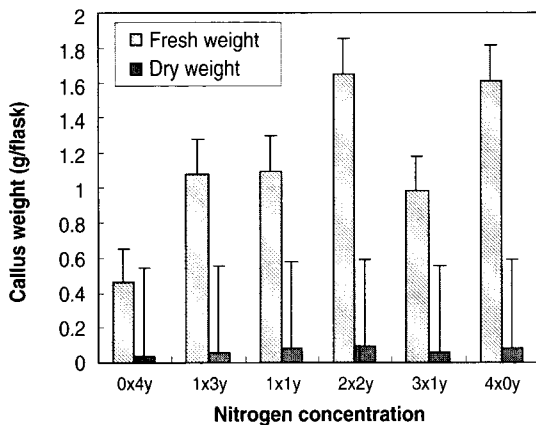


Figure 3. Effect of nitrogen concentration on the growth of *R. sachalinensis* callus in 2B5 liquid medium containing 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum; 0.2 g (fresh weight), 1X=24.8 mM KNO_3 , 1Y = 1.0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

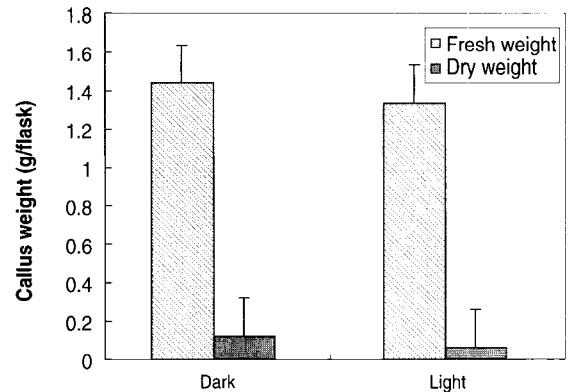


Figure 5. Effect of light on the growth of *R. sachalinensis* callus in 2B5 liquid medium containing 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum; 0.2 g (fresh weight).

르게 나타나는데, 홍경천의 캘러스는 pH 6에서 최대생장을 나타내었다.

유식물체 및 Callus로부터 Salidroside 분석

TLC 분석

TLC plate 상에 나타난 각각의 salidroside 표품의 Rf값은 0.65로 나타났으며, 자연산 뿌리 및 캘러스의 sucrose의 농도 별, dark/light에서 salidroside와 같은 위치에서 밴드가 나타났으며, 다른 몇몇의 밴드도 확인되어었다 (데이터 미 제시).

HPLC 분석

자연산 홍경천의 뿌리와 기내에서 배양된 캘러스로부터 추출한 추출물을 μ -Bondapak C₁₈컬럼을 사용하여 salidroside의 함량을 정량한 결과, 자연산 홍경천 뿌리에서 0.17% (dry wt) 인데 비해, 현탁배양세포에서는 0.41% (dry wt)로 자연산 홍경천의 뿌리에 비하여 현탁배양세포에서 salidroside의 함량이 높은 것으로 나타났다 (Figure 7). 한편 캘러스의 최대생장을 보인 pH 6과 암조건에서의 함량이 더 높게 나타났다 (데이터 미 제시). 이는 Xu 등 (1999)의 보고에서 제시한 여러 조건에서의 *Rhodiola sachalinensis* 캘러스 현탁세포에서의 함량 (0.25%~0.8%)에 비해서는 낮은 값이다. 따라서, 본 연구의 결과를 토대로 추후 배양 환경의 적절한 조절로 salidroside의 함량 및 생산성의 개선을 이루고자 한다.

가장 잘 자라는 성장조건을 찾기 위해 수행되었다. 실험 결과를 종합해 보면 캘러스의 증식을 위한 배양조건은 최적배지를 조사한 결과, 2B₅배지에서 생장율이 가장 좋았으며, 탄소원으로는 sucrose를 3%로 첨가했을 때 생장율이 가장 높았다. 질소원으로서는 49.6 mM KNO₃와 2.0 mM (NH₄)₂SO₄를 첨가했을 때 생장율이 가장 좋았으며, 인산의 농도는 2.16 mM에서 높은 생장율을 보였다. 암배양과 광배양을 비교했을 때 암배양의 경우가 생장율이 높았으며, pH 6에서 세포의 생장율이 가장 좋은 조건임을 확인되었다. 기내에서 배양된 캘러스와 자연산 뿌리는 TLC로 분석하여 salidroside를 확인하였으며, HPLC로 salidroside를 정량한 결과, 자연상태 홍경천의 뿌리는 건중량 당 0.17%으로 나타났으며, 5% sucrose 처리구에서 0.41%의 생산성을 보여, 자연산 홍경천의 뿌리에 비하여 캘러스에서 salidroside의 함량이 높은 것으로 나타났다.

사사 - 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

Bae KH (2000) The medicinal plants of Korea. Kyohak Publishing, Seoul, p200
 Brodelius P, Vogel HJ (1985) A phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of phosphate uptake and storage in cultured *Catharanthus roseus* and *Daucus carota* plants cells. J Biol Chem 260: 3556-3560
 Choi YE, Soh WY (1997) Effect of ammonium ion on morphogenesis from cultured cotyledon explants of *Panax ginseng*. J Plant Biol 40: 21-26
 Jiang M, Zhong W, Han H (1994) Studies on producing effective

적 요

본 실험은 기내 배양된 홍경천으로부터 캘러스를 유도하고

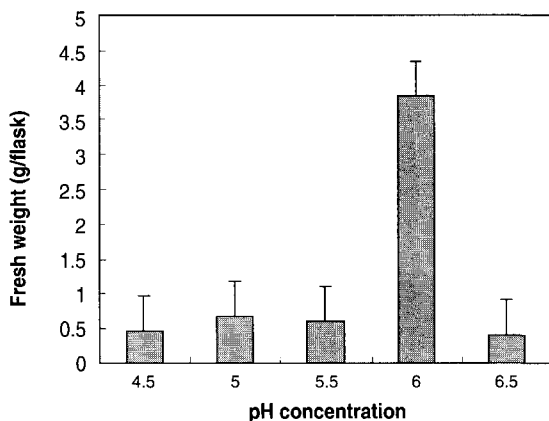


Figure 6. Effect of pH on the growth of *R. sachalinensis* callus in 2B₅ liquid medium containing 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA after 3 weeks of culture. Initial inoculum; 0.2 g (fresh weight)

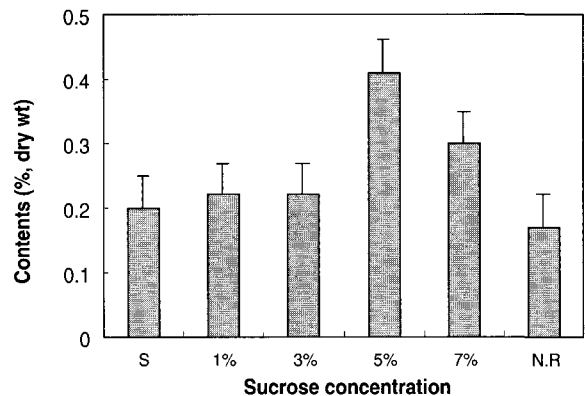


Figure 7. Effect of sucrose concentration on salidroside contents in suspension cultured cells of *R. sachalinensis*. S, standard; 1%-7%, sucrose concentration; N.R, normal root.

- medicinal ingredients of *Rhodiola sachalinensis* by tissue culture. Chin J Shen Univ 25: 355-359
- Kurkin VA (1986) The chemical composition and pharmacological properties of *Rhodiola* plant. J Pharm Chem 20: 1231-1235
- Lee MW, Lee YH, Park HM, Tosh SH, Lee EJ, Jang HD, Kim YH (2000) Antioxidant phenolic compounds from the roots of *Rhodila sachalinensis* A. Bor. Arch Pharm Res 23: 455-458
- Lee UC (1996) Standard illustrations of Korean plant. Academy Publishing, p144
- Linch PT, Kim YH, Hong SP, Jian JJ, Kang JS (2000) Quantitative determination of salidroside and tyrosol from the underground part of *Rhodiola rosea* by high performance liquid chromatography. Arch Pharm Res 23: 349-352
- Ming HQ, Xia GC, Zhang RD (1988) Advanced research on *Rhodiola*. Chin Trad Herbal Drugs 19: 229-234
- Petkov VD, Yonkov D, Mosharoff A, Kambourova T, Alova L, Petkov V, Todorov I (1986) Effects of alcohol aqueous extract from *Rhodiola rose* L. root on learning and memory. Act physiol Pharmacol Bulg 12: 3-16
- Saratikov AS (1968) Rhodioloside, a new glycoside from *Rhodiola rosea* and its pharmacological properties. Pharmazie 69: 394-398
- Sakurai M, Ozeki Y, Mori T (1997) Induction of anthocyanin accumulation in rose suspension-cultured cells by conditioned medium of strawberry suspension cultures. Plant Cell Tiss Org Cult 50: 211-214
- Touria EJ, Douglas C (1998) Effect of plant age on nitrogen uptake and distribution by greenhouse plants. J Plant Nutr 21: 1005-1006
- Weathers PJ, Hemmavarn DD, Walcerz DB, Cheetham RD and Smith TC (1997) Interactive effects of nitrate and phosphate salts, sucrose, and inoculum culture age on growth and sesquiterpene production in *Artemisia annua* hairy root cultures. In vitro cell Dev Biol Plant 33: 306-312
- Wenzhe F, Yasuhiro T, Khin MN and Shigetoshi K (2001) Prolyl endopeptidase Inhibitors from the underground part of *Rhodila sachalinensis*. Chem Pharm Bull 49: 396-401
- Xu JF, Ying PQ, Han AM and Su ZG (1999) Enhanced salidroside production in liquid-cultivated compact callus aggregates of *Rhodila sachalinensis*: Manipulation of plant growth regulators and sucrose. Plant Cell Tiss Org Cult 55: 53-58
- Zong Y, Lowell K, Ping JA, Che CT, Pezzuto JM, Fong HH (1991) Phenolic constituents of *Rhodila coccinea* a tibetan folk medicine. Plana Med 57: 589

(접수일자 2003년 12월 10일, 수리일자 2004년 3월 10일)