

## 희수나무 캘러스로부터 기관분화에 의한 식물체 재분화

배대호\* · 박화식 · 황성진\* · 황 백\*†

\*전남대학교 생물학과, 전라남도 산림자원연구소

### Plant Regeneration through Organogenesis from Callus of *Camptotheca acuminata* Decaisne

Dae Ho Bae\*, Whoa-Shig Park, Sung Jin Hwang\*, and Baik Hwang\*†

\*Department of Biology and Institute of Plant Resources, Chonnam National Univ., Kwangju 500-757, Korea.  
Forest Resources Research Institute, JeollaNamdo, Korea.

**ABSTRACT :** *Camptotheca acuminata*, a native of South China is a well known natural source of monoterpene-indole alkaloid camptothecin(CPT), one of the most promising anti-tumoural compounds. This study was conducted to optimize plant growth regulators and culture conditions on plantlets regeneration through organogenesis from callus of *Camptotheca acuminata*. Callus were induced from various explants of *in vitro* germinated plantlets of *C. acuminata* using WPM medium containing 0.2 mg/L 2,4-D. Hypocotyl segments were exhibited higher embryogenic callus than the other explants. Shoot buds formation from embryogenic callus was affected by plant growth regulators, pre-treated dark condition and liquid culture. Organogenesis was optimal in WPM liquid medium containing 0.5 mg/L BA. The dark pre-treatment for 2 weeks before the solid culture was effective for organogenesis. The regenerated shoots were rooted in WPM medium with 0.2 mg/L NAA and successfully acclimated in green-house conditions.

**Key Words :** *Camptotheca acuminata*, Camptothecin, Organogenesis, Plant regeneration

## 서 언

희수나무 (*Camptotheca acuminata* Decaisne)는 중국 남쪽 지방에서 자생하고 있는 니사나무속의 낙엽교목이다. 희수나무는 중국에서 주로 암치료를 위한 한약재로 사용되고 있으며 뿌리, 줄기, 잎, 과실에서의 ethly alcohol 추출물은 각종 암세포에 대한 항균작용을 나타내고 있다 (Perdue *et al.*, 1970). 특히, 희수나무의 줄기와 수피에는 여러 종류의 alkaloid계통 화합물이 있는 것으로 밝혀져 있으며, 알려진 이차대사산물로는 venoterpine, 3,3',4-tri-o-methyllyellagic, sitosterol, camptothecin, hydroxycamptothecin, methoxycamptothecin, deoxycamptothecin, betulic acid, vincoside-lactam 등이 있다. 그 중 camptothecin (CPT)은 가장 잘 알려진 항암물질이며 (Hengel *et al.*, 1992), 이 물질을 이용한 많은 항암유도체가 개발되어 있다.

CPT계열의 항암제는 독성을 줄이고 수용성을 높이기 위하여 여러 연구를 거쳐 1994년 대장암에 효과가 있는 irinotecan (Camptosar, Japan)과 1995년에 난소암, 소세포 폐암에 효과가

있는 topotecan (Hycamtin, UK) 등이 개발되었다 (Chao and Joseph, 2001). 또한 국내에서는 난소암, 자궁경부암에 효과가 있는 belotecan (camptobel, Korea)과 irinotecan의 항암효과를 유지하면서 설사 등의 부작용을 개선한 SK 2134(SK 케미칼, Korea) 등이 상품으로 개발되었다 (Klaus and Peter, 2004). 그 외에도 Glaxo-Wallcome, Daiichi 등의 기업에서 개발하고 있는 약 10개의 유도체들이 임상실험 중에 있으며 (Choi and Byun, 2000), 앞으로도 CPT유도체는 간단한 반합성 과정을 통해서 CPT로부터 쉽게 만들어질 수 있기 때문에 더욱더 많은 상품이 개발 될 것으로 보인다.

CPT는 항암제 연구에서 점점 더 활용도가 높아지고 있으며 세계시장 뿐 만 아니라 국내시장에서 항암제 상품 생산을 위한 원료로서 이용도가 높아지고 있는 추세다 (Maliepaard *et al.*, 2001). 그러나 야생의 희수나무로부터 CPT 생산은 생산지마다 현저한 차이가 있고 같은 지역에서도 일정한 CPT생산을 조절하기가 어렵다. 그 예로, 희수나무에는 잎의 반점과 뿌리의 썩음을 일으키는 주요 균들이 있으며, 이로 인하여 희수나무의 재배에 어려움을 줄 뿐만 아니라 CPT 함량도 감소시킨

†Corresponding author: (Phone) +82-62-530-0790 (E-mail) bdh110@hanmail.net  
Received 2009 March 10 / Revised 2009 May 12 / Accepted 2009 June 8

다는 보고가 있다 (Li *et al.*, 2005). 이 같은 문제 때문에 CPT의 높은 요구에도 불구하고 원료 확보에 어려움을 가지고 있다. 희수나무의 한정된 자생지를 극복하고 주요 균으로부터 피해를 막기 위한 방법뿐만 아니라 천연자원식물의 보존과 안정적인 원료 공급을 위하여 희수나무의 외부 환경조건을 적절히 조절할 수 있고 좁은 공간에서도 대량배양이 가능한 이점이 있는 기내배양 및 대량증식을 통한 연구가 필요하다 (Tuskan *et al.*, 1990).

희수나무의 조직배양에 관한 연구는 shoot buds와 axillary buds를 이용한 식물체의 대량화에 관한 보고 (Liu and Li., 2001; Wang *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2004)와 잎절편으로부터 기관형성을 통한 식물의 재분화에 관한 보고 (Zu *et al.*, 2005)가 있으며, 최근에는 temporary immersion system (TIS)에서 somatic embryogenesis을 통한 재분화 식물체 (Sankar-Thomas *et al.*, 2008)와 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 식물체가 얻어 졌다고 보고된 바 있다 (Wang and Zu, 2007).

희수나무의 대량증식 체계와 형질전환에 관한 연구는 외국에서 상당한 수준에 도달하고 있으나 국내에서는 아직도 희수나무의 대량증식과 형질전환에 관한 연구가 체계적으로 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 기내 배양된 희수나무의 캘러스로부터 신초 기관형성을 통한 식물체 재생에 적합한 조건을 구명하기 위하여 신초 재생에 미치는 성장조절제, 암조건, 액체배양 등의 영향을 조사하여 최적조건을 구명함으로써 국내에서 희수나무의 대량증식 뿐만 아니라 이를 자료로 하여 형질전환 식물체의 유도를 위한 연구에도 기초 자료를 제공하는데 그 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 식물재료

본 연구에 사용된 희수종자는 2007년 11월에 전남산림자원 연구소에서 분양 받았다. 종자는 휴면타파를 위해 흐르는 물에 5일 동안 담가 놓은 후 사용하였고, 종자의 표면살균은 과피와 외종피를 먼저 제거한 다음 70% ethanol에서 2분, 0.3% sodium hypochloride 용액에서 8분 동안 처리 후 멸균수로 3~4회 세척하였다. 사용된 배지는 3% sucrose, 0.3% phytagel (Sigma, USA)이 첨가된 MS기본배지(Murashige and Skoog, 1962)를 이용하였으며, pH는 멸균하기 전에 5.7로 적정한 후 멸균하여 사용하였다. 배양 조건은 광 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 광주기 16/8 h, 온도 25  $\pm$  1 $^{\circ}\text{C}$ 으로 하였다.

### 2. 캘러스 유도를 위한 식물생장조절제 처리와 최적 배지 선발

캘러스 유도를 위해 기내발아 후 3주 동안 기내에서 배양된 식물체를 자엽, 배축, 뿌리를 절취하여 캘러스 유도에 이용하였다. 캘러스 유도배지는 3% sucrose, 0.3% phytagel이 첨가

된 MS 기본배지에 IAA, NAA, 2,4-D를 각각 0.2, 1.0, 3.0, 10.0 mg 처리한 것을 사용하였다. 배지별 캘러스 성장률을 보기 위하여 식물 절편으로부터 유도된 캘러스를 5  $\times$  5 mm 크기로 분할하여 3% sucrose, 0.3% phytagel과 2,4-D 0.2 mg/L을 함유한 MS, B<sub>5</sub> (Gamborg *et al.*, 1968), WPM (Lloyd and McCown, 1980), SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) 배지에 캘러스를 치상하였다. 치상된 절편은 2주 후 동일 조성의 새로운 배지에 계대 배양하였고, 4주 후 식물체 절편에 따른 캘러스 유도, 식물생장조절제에 따른 캘러스 유도 및 배지별 캘러스 성장률을 조사하였다. 배양조건은 25  $\pm$  1 $^{\circ}\text{C}$ , 암조건에서 배양하였다.

### 3. 신초 기관형성 유도 및 식물체 재분화

신초 기관형성을 위해 기내에서 4주 동안 증식시킨 캘러스를 이용하였고 이를 기관형성 유도 배지에 옮겼다. 기관형성 유도배지는 3% sucrose, 0.3% phytagel이 첨가된 WPM 배지를 기본 배지로 사용하였으며, 여기에 시토키닌, NAA와 BA의 조합 처리, 암배양, 액체배양을 실시하였다. 시토키닌류는 BA, TDZ, Zeatin을 각각 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 첨가하였으며, NAA와 BA는 각각 1.0, 5.0, 10.0 mg/L와 0.5, 1.0, 2.0 mg/L를 조합첨가한 배지를 이용하였다. 암처리는 무처리와 1~4주간 암처리한 후 명조건 상태로 옮겼으며, 액체배양은 phytagel이 첨가되지 않은 WPM 배지에 BA 0.5, 1.0, 2.0 mg/L를 첨가한 배지를 이용하였다. 배양조건은 광 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 광주기 16/8 h, 25  $\pm$  1 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였으며, 치상된 캘러스는 2주간격으로 동일 조성의 새로운 배지에 계대 배양하였고, 배양기간이 4주가 되었을 때, 신초 재분화를 조사하였다.

뿌리 유도를 위해 3% sucrose, 0.3% phytagel이 첨가된 WPM 배지에 NAA를 0.2 mg/L 첨가한 배지를 사용하였으며, 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 광주기 16/8 h, 25  $\pm$  1 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다. 뿌리가 발생한 식물체는 배지를 완전하게 씻어 낸 다음, 식물체의 잎을 1/2 정도 제거 하고 버뮤클라이트가 담긴 화분으로 이식한 후에 랩으로 덮어 상대습도 85%로 유지하면서 약 2주간 순화시켰다.

## 결과 및 고찰

### 1. 캘러스 유도

발아 후 3주 동안 기내에서 배양된 식물체로부터 얻은 각 식물체 절편 부위와 식물생장조절제에 따른 캘러스유도를 알아 본 결과(Table 1), 식물체 절편별 캘러스 유도는 치상 후 1주 후부터 절단 부위에서 캘러스가 형성되기 시작하였으며, 배축 절편에서 가장 많은 캘러스가 생성되었다. 그러나 뿌리 절편에서는 캘러스가 형성 되지 않았고 갈변화 되었다. 식물생장조절제에 따른 캘러스 유도는 0.2 mg/L 2,4-D에서 가장

**Table 1.** Effect of plant growth regulators on callus induction from various explants types of *C. acuminata* after 4 weeks culture.

Auxins (mg/L)	Callus formation		
	Cotyledon segments	Hypocotyl segments	Root segments
IAA	0.2	-	-
	1.0	-	-
	3.0	-	-
	10.0	-	-
NAA	0.2	+	+(AR)
	1.0	++	+++
	3.0	+	+
	10.0	-	-
2,4-D	0.2	+++	+++
	1.0	+	+
	3.0	-	-
	10.0	-	-

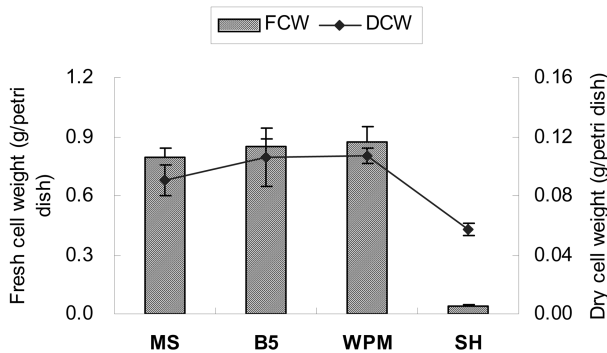
† MS basal medium containing 3% sucrose, 0.3% phytigel. (AR): Adventitious root formation. Callus formation, +: poor, ++: moderate, +++: good, -: not-detected.

**Table 2.** Effects of cytokinines on shoot buds formation from embryogenic callus of *C. acuminata* after 4 weeks culture in light condition.

Plant growth regulators cytokinines (mg/L)	Callus growth	Organogenesis induction	No. of explants	No. of shoot buds (%)
BA	0.5	+	30	8(26.7)
	1.0	+	30	5(16.7)
	2.0	+	30	3(10.0)
TDZ	0.5	+++	30	-
	1.0	++	30	-
	2.0	++	30	-
Zeatin	0.5	+++	30	-
	1.0	++	30	-
	2.0	++	30	-

† WPM basal medium containing 3% sucrose, 0.3% phytigel. Callus formation, +: poor, ++: moderate, +++: good, -: not-detected.

SH 배지에서는 0.057 g로 가장 저조하였다. 이 결과로 희수나무의 캘러스유도 최적배지는 0.2 mg/L 2,4-D가 함유된 WPM 배지로 판단되었고 이후 이를 실험에 반영하여 WPM 배지를 희수나무 기본배지로 사용하였다.



**Fig. 1.** Effects of various media on callus growth of *C. acuminata* after 4 weeks culture. All media contain 0.2 mg/L 2,4-D.

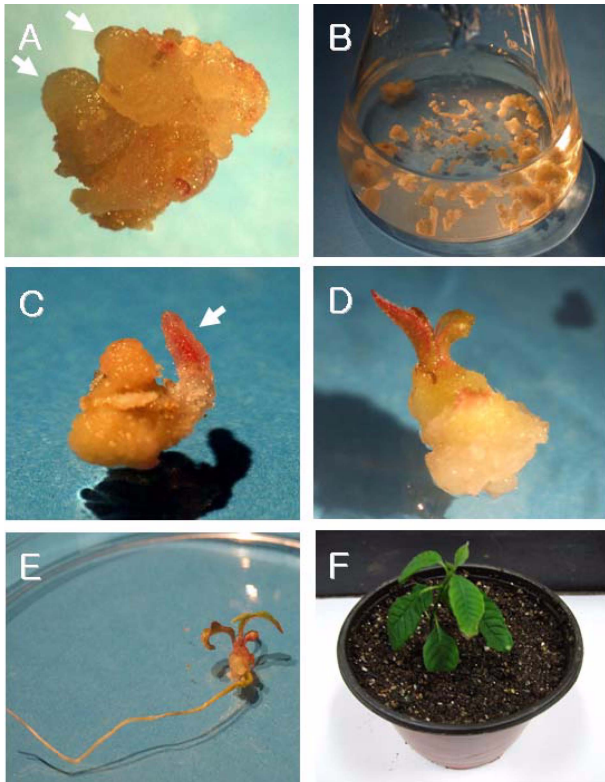
활발하게 나타났으며, 다음으로 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L 2,4-D, 3.0 mg/L NAA 순으로 캘러스의 유도가 일어났다. 유도된 캘러스는 반투명한 색을 띄고 있었으며 쉽게 부서졌고 수분을 많이 포함한 부드러운 세포괴를 형성하였다. 반면 IAA와 고농도의 10.0 mg/L NAA, 3.0 mg/L 2,4-D와 10.0 mg/L 2,4-D에서는 캘러스가 형성되지 않고 갈변화 상태로 변화하였으며, 0.2 mg/L NAA 배측에서는 부정근이 발생하였다. 배측 절편으로부터 유도된 캘러스를 0.2 mg/L의 2,4-D를 첨가한 배지에 치상하였을 때, 캘러스의 성장량 (Fig. 1)은 WPM 배지에서 0.870 g으로 가장 높았고, B<sub>5</sub> 배지 (0.850 g)와 MS 배지 (0.799 g)는 비교적 양호한 성장을 보였다. 반면 SH 배지는 0.042 g 정도로 가장 낮았다. 또한 캘러스의 건조량에서도 WPM 배지와 B<sub>5</sub> 배지에서 각각 0.107 g과 0.106 g로 많았고

**2. 신초 기관형성 유도를 위한 시토키닌류의 효과**

배양 중인 캘러스로부터 신초 기관형성 유도하기 위해 BA, TDZ, Zeatin이 포함된 고체배지에 치상하여 명조건에서 4주간 배양한 결과는 Table 2와 같다. BA 처리구에서는 캘러스의 생장은 비교적 낮은 편이었지만 치상 2주후에 배발생 캘러스를 볼 수 있었다 (Fig. 2A). 그 중 0.5 mg/L BA처리구에서 26.7%로 가장 양호한 shoot buds를 유도되었으며 BA의 농도가 증가함에 따라 그 수는 감소하였다. 초기 발생된 배발생 캘러스는 대부분 반투명한 구형 형태였으며, 점차 성장함에 따라 빨간 색소가 생성되어 붉은 색을 띄었다 (테이더 미세시). 반면 TDZ와 Zeatin에서는 캘러스 성장만 하였고 shoot buds로는 유도 되지 않았다. Gultai와 Jaiwal (1992)은 *Vigna radiata*의 잎 절편 배양에 있어서 시토키닌이 단독으로 첨가되었을 경우 캘러스의 형성과 신초의 재분화율이 좋았으나 NAA와 BA가 조합된 배지에서는 신초의 증식과 뿌리의 분화가 일어나지 않는다고 보고하였고, Eun 등 (1994)은 *Pelargonium citrosa*의 잎 절편 배양에 있어서 2,4-D와 BA를 이용한 배지 조성에서 BA가 신초의 분화에 효과적이라고 보고한 바 있다. 본 연구에서 BA가 배발생 캘러스 유도에 영향을 미치는 사실을 알 수 있었지만 이 캘러스는 정상적인 신초로 발달하지 못하였다.

**3. 신초 재분화 유도를 위한 BA와 NAA의 조합 효과**

캘러스로부터 신초 재분화 유도에 미치는 BA와 NAA의 조



**Fig. 2.** Plantlets regeneration from embryogenic callus of *C. acuminata*. (A) Shoot bud formation from pre-embryogenic callus, (B) Embryogenic callus in WPM liquid medium containing 0.5 mg/L BA, (C) Adventitious shoot from pre-embryogenic callus, (D) Shoot regeneration from embryogenic callus after 6 weeks, (E) Rooted plantlets from regenerated shoots of *C. acuminata* after 3 weeks, (F) Acclimatized plant of *C. acuminata* after 6 weeks.

합처리의 영향을 알아 본 결과 (Table 3), shoot buds는 BA 0.5 mg/L와 NAA 5.0 mg/L에서 30.0%로 가장 높게 나타났으며, BA 0.5 mg/L이 함유된 조합배지에서 대체로 양호하게 형성되었고 BA 농도가 BA 0.5 mg/L보다 증가함에 따라 shoot buds 수는 감소되는 경향을 나타냈다. 이결과는 Wang 등 (2006)의 의해 연구된 잎 절편으로부터 희수나무의 재분화에 관한 연구에서 보여준 결과와 유사하였으며, 이 농도의 BA가 희수나무의 shoot buds에 최적의 농도라고 보고된바있다. 또한 NAA 1.0 mg/L의 농도에서는 캘러스의 생장이 더 높게 나타나는 모습을 볼 수 있었다. 이는 *Oryza sativa*에서 1.0 mg/L 농도의 옥신류가 캘러스 분화 및 발달에 유리하고 신초의 분화에는 옥신에 비해 시토키닌이 요구된다는 연구와 유사한 결과를 보였다 (Chen *et al.*, 1985). 그러나 BA와 NAA의 조합 처리에서는 기관형성에 영향을 미쳤지만 완전한 신초로 발달은 보이지 않았다. 이러한 이유로 Konan 등 (1997)은 세포배양을 통한 기관발생이나 체세포배발생에서 먼저 기관이 탈분화되기 때문에 세포가 갖는 특성상 여러 가지 변이체가 나타

**Table 3.** Effects of auxins and cytokinines on plantlet formation via organogenesis from embryonic callus of *C. acuminata* after 4 weeks culture in light condition.

Plant growth regulators (mg/L)		No. of explants	Callus growth	No. of shoot buds (%)
BA	NAA			
0.5	1.0	30	++	7(23.3)
	5.0	30	++	9(30.0)
	10.0	30	+	5(16.7)
1.0	1.0	30	++	4(13.3)
	5.0	30	+	1(3.3)
	10.0	30	-	-
2.0	1.0	30	-	-
	5.0	30	-	-
	10.0	30	-	-

† WPM basal medium containing BA 0.5 mg/L, 3% sucrose, 0.3% phytigel. Callus formation, +: poor, ++: moderate, +++: good, -: not-detected.

**Table 4.** Effects of dark pre-treatments on plantlet formation via organogenesis from embryonic callus of *C. acuminata* after 4 weeks culture.

Dark treatment (weeks)	No. of explants	No. of shoot buds (%)
0	30	7(23.3)
1	30	10(33.3)
2	30	15(50.0)
3	30	14(46.7)
4	30	15(50.0)

† WPM basal medium containing BA 0.5 mg/L, 3% sucrose, 0.3% phytigel.

날 수 있는 가능성이 있고 계대배양 기간이 길어질수록 부정아 형성능력이 감소할 뿐만 아니라 배수체, 이수체 등의 유전적으로 비정상적인 세포의 발생 빈도가 높다고 보고한 바 있으며, Kim 등 (1997)은 높은 농도의 옥신활성으로 인한 캘러스화가 신초의 발달 및 생장을 저해한다고 보고한 결과와 유사한 결과를 얻었다.

#### 4. 신초 재분화 유도를 위한 암배양 처리 효과

암배양 조건에서 신초 재분화 유도를 알아보기 위하여 Table 4와 같이 4주 동안 처리 하여 관찰하였다. 그 결과 암배양 2주 후 이상에서 비교적 높은 shoot buds 유도율을 확인할 수 있었다. 암배양 2~4주 처리에서 50.0%로 가장 높은 shoot buds을 보였으며, 암배양처리 1주에서는 33.3%, 무처리에서는 23.3%로 낮은 유도율을 보였다. Dufour (1990)은 사과 잎에서 유도된 캘러스로부터 2주간 암배양 시 가장 많은 재분화 신초을 얻었다고 보고했으며 또한 Lee와 Bae (1999)는 배양 초기 단계에 암처리 시 *Gypsophia puniculata*의 잎절편으로부터

**Table 5.** Effects of BA on plantlet formation via organogenesis from liquid cultured callus of *C. acuminata* after 4 weeks culture in light condition.

BA (mg/L)	No. of explants	No. of shoot buds (%)	No. of shoots regeneration (%)
0.5	15	8(53.3)	3(20.0)
1.0	15	6(40.0)	1(6.7)
2.0	15	2(13.3)	-

† WPM basal medium containing BA 0.5 mg/L, 3% sucrose.

75% 정도로 재분화율이 증가했다고 보고했다. 본 실험에서 암처리 효과 2주 이상처리 했을 때 shoot buds 유도율이 무처리보다 약 2.1배 정도 높은 효과가 있음을 확인했으며, 시토키닌류의 BA 0.5 mg/L에서 shoot buds 유도율과 비교했을 때에도 1.9배 정도 높은 효과를 알 수 있었다. 하지만 암처리 조건에서도 완전한 신초 재분화는 유도 되지 않았다.

**5. 신초 재분화 유도를 위한 액체배양 효과**

액체배양에서 캘러스로부터 식물체의 재분화 유도를 알아보기 위해 BA를 농도별로 처리한 WPM 액체배지에 배양하여 Table 5과 같은 결과를 얻었다. Shoot buds 유도는 BA 0.5 mg/L에서 53.3%로 가장 높았으며, BA 1.0 mg/L에서 40.0%, BA 2.0 mg/L에서는 13.3% 정도로 관찰되어 BA와 NAA의 조합처리와 암처리보다 액체배양에서 높은 shoot bud가 유도된다는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2B). 액체배양에서 배양 2주 후 신초의 성장을 보였고 (Fig. 2C), 6주 후 정상적인 신초의 재분화를 관찰하였다 (Fig. 2D). 또한 0.5 mg/L BA에서 20.0%와 1.0 mg/L BA에서 6.7%로 신초 재분화율을 보였다 (Table 5). 이 결과는 Cheng 등 (2007)의 *Schisandra chinensis*를 재료로 하여 체세포배발생과 식물의 재분화에 관한 연구에서 2,4-D를 첨가한 MS 액체배지를 통한 액체배양 시 배발생세포가 빠르게 성장하였고 분화하였다고 보고와 Mythili 등 (1999)의 *Sorghum dimidiatum*의 배발생세포를 액체배양하여 신초로 재분화 하였다는 보고와 유사한 결과로 희수나무의 캘러스로부터 액체배양이 신초 재분화에 가장 적합한 처리라고 사료된다. 또한 재분화된 신초의 뿌리 유도는 WPM 기본배지에 NAA를 0.2 mg/L의 농도로 첨가하여 치상 12일 후 부정근을 확인 했으며 (Fig. 2E), 뿌리가 발생한 식물체는 버미큐라이트가 담긴 화분으로 이식한 후 랩 (wrap)으로 덮어 상대습도를 85%로 유지시키면서 약 6주간 순화시켰을 때, 완전히 활착한 희수나무를 관찰하였다 (Fig. 2F).

**감사의 글**

본 연구는 전남대연구비(관리번호 : 2007-0647) 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

**LITERATURE CITED**

Chao HH and Joseph T. (2001). New Advances in Long Cancer Chemotherapy: Topotecan and the Role of Topoisomerase I Inhibitors. *Oncology*. 61:14-24.

Chen TH, Lam L and Chen SC. (1985). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured inflorescence of *Oryza sativa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 4:51-54.

Cheng HL, Niu Y, Zhao B, Ghimire BK, Kil HY, Heo K, Kim MJ, Eom SH, Cho DH and Yu CY. (2007). Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures of *Schisandra chinensis* Baill. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15(5):346-351.

Choi H and Byun SY. (2000). Enhanced production of anticancer agent camptothecin by double elicitors in suspension cultures of *Camptotheca acuminata*. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*. 15(5):428-433.

Dufour M. (1990). Improving yeild of adventitious shoots in apple. *Acta Horticulturae*. 280:51-61.

Eun JS, Ko JA, Kim YS and Kim MJ. (1994). Micropropagation by leaf and meristem cultures of *Pelargonium citrosa* Van leenen. *Korean Journal of Plant Tissue Culture*. 21:247-252.

Gamberg OL, Miller RA and Ojima K. (1968). Natural requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 50:148-151.

Gultai A and Jaiwal PK. (1992). *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration from shoot tips of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 29:199-205.

Hengel AJ, Harkes MP, Wichers HJ, Hesselink PGM and Buitelaar RM. (1992). Characterization of callus and camptothecin production by cell lines of *camptotheca acuminata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 28:11-18.

Kim KS, Seung NS, Kim MW, Pyo BS, Hwang B. (1997). Micropropagation of *Achyranthes japonica* through axillary buds culture. *Koeran Journal of Plant Tissue Culture*. 24:357-360.

Klaus MD and Peter HK. (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*. 23:2960-2966.

Konan NK, Schopke C, Carcamo R and Beachy RN. (1997). An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. *Plant Cell Reports*. 16:444-449.

Lee SW and Bae JJ. (1999). *In vitro* regeneration using leaf segment in *Gypsophila paniculata* L. 'Bristol Fairy'. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*. 17:765-767.

Li S, Zhang Z, Cain A, Wang B, Long M and Taylor J. (2005). Antifungal activity of camptothecin, trifolin, and hypiroside isolated from *Camptotheca acuminata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:32-37.

Liu, Z and Li Z. (2001). Micropropagation of *Camptotheca acuminata* Decaisne from axillary buds, shoot tips, and seed embryos in a tissue culture system. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*. 37:84-88.

Lloyd GB and McCown BH. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the

- use of shoot top culture. Combined proceedings, International Plant Propagators' Society. 30:421-437.
- Lu L, Zhu D and Zhao D.** (2004). Tissue culture of shoot-tip and plantlet regeneration of *Camptotheca acuminata*. Peop. Rep. China. Zhongcaoyao. 35:682-684.
- Maliepaard M, van Gastelen MA, Tohgo A, Hausheer FH, van Waardenburg RCAM and de Jong LA.** (2001). Circumvention of breast cancer resistance to camptothecins *in vitro* using nonsubstrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918. Clin. Cancer Research. 7:935-941.
- Murashige T and Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15:473-497.
- Mythili PK, Seetharama N and Reddy VD.** (1999). Plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures of wild sorghum (*Sorghum dimidiatum* Stapf). Plant Cell Reports. 18: 424-428.
- Perdue, RE, Smith RL, Wall ME, Hartwell JL and Abbott BJ.** (1970). *Camptotheca acuminata* Decaisne(Nyssaceae), Source of Camptothecin, an antileukemic alkaloid. Technical Bulletin No. 1415. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington, D.C. U.S.
- Sankar-Thomas YD, Saare-Surminski K and Lieberei R.** (2008). Plant regeneration via somatic embryogenesis of *camptotheca acuminata* in temporary immersion system(TIS). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 95:163-173.
- Schenk RU and Hildebrandt AC.** (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous. Plant Cell Cultures. Canadian Journal of Botany. 50:199-204.
- Tuskan GA, Sagent WA, Rensema T and Walla JA.** (1990). Influence of plant growth regulators, basal media and carbohydrate levels on the *in vitro* development of *Pinus ponderosa*(Dougl. ex Law) cotyledon explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 20:47-52.
- Wang, HM, Zu YG, Dong FL and Zhao XJ.** (2005). Assessment of factors affecting *in vitro* shoot regeneration from axillary bud explant of *Camptotheca acuminata*. Journal of Forestry Research. 16:52-54.
- Wang, HM, Zu YG, Wong WJ, Wu SX and Dong FL.** (2006). Establishment of *Camptotheca acuminata* regeneration from leaf explants. Biologia Plantarum. 50:725-728.
- Wang HM and Zu YG** (2007). Agrobacterium mediated genetic transformation of *Camptotheca acuminata*. Journal of Forestry Research. 18:316-318.
- Zu Y, Wang H, Wang W, Dong F, Yu J and Yang F.** (2005). A culture medium for high efficiency induction of adventitious bud regeneration of excised leaf of *Camptotheca acuminata*. Northeast Forestry University, Peop. Rep. China p. 7.