

대황 모상근의 배양에 의한 tannin 생산

황성진¹·나명석²·표병식¹·이종빈·황 백

Production of Tannin from Hairy Root Cultures of *Rheum undulatum* L.

Sung-Jin Hwang¹, Myoung-Suk Na², Byoung-Sik¹, Jong-Bin Lee and Baik Hwang

ABSTRACT : Hairy root cultures of *Rheum undulatum* L. induced by a co-culture with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 were established and the production of tannin in hairy roots was investigated. The growth of hairy roots was maximized in WPM liquid medium supplemented with 2 mg/L IAA, and 3% sucrose (pH 5.7). The highest yields of tannin were obtained from WPM medium containing 0.5 mg/L ABA, and 5% sucrose (pH 5.5). The growth and tannin production in hairy root cultures were influenced by the addition of elicitors to the medium. The addition of 50 mg/L chitosan enhanced the production of tannin with about 1.7 fold.

Key words : *Rheum undulatum* L. hairy root cultures, tannin, plant growth regulators, chitosan

서 언

대부분의 고등식물은 오랫동안 인류에게 의약품, 향신료, 색소 및 살충제 등의 제재로 사용되는 중요한 물질들의 공급원이 되어왔다. 그러나, 최근에 와서 자생지의 기후 변화, 오염, 인건비의 상승 등과 같은 제약 조건 때문에 이들 재료의 대량 채취에 어려움이 있

으며, 노지재배나 자생식물의 경우 서식지의 환경변화나 발달 단계에 따라 생합성량에 있어서 차이를 나타낸다는데에 문제가 제기되고있다. 따라서, 기내 (*in vitro*)에서 다양한 인공환경을 조성시켜 인위적으로 식물의 대사 및 성장 프로그램을 조절할 수 있는 식물 조직배양 및 유전자 조작기술은 약용식물에 있어서 우량종묘의 생산은 물론 식물체로부터 생합성되는 유용물질을 대량 생산할 수 있

¹동신대학교 식품생물공학과 (Dept. of Food and Biotechnology, Dongshin University)

²광주여대 생명과학과 (Dept. of Life Science, Kwang-ju Women University)

전남대학교 생물학과 (Dept. of Biology, Chonnam National University, Korea)

(2000. 7. 7 접수)

는 매우 효율적인 시스템으로 활용될 수 있다. 최근 자원식물의 탈분화된 세포로부터 형질전환된 뿌리에 이르기 까지 매우 다양한 소재를 배양하여 일부 제한적이기는 하지만 산업화 단계에 까지 이르고 있다 (Flores, 1987; Hasimoto et al., 1986).

대황 (*Rheum undulatum* L.) 은 마디풀과에 속하며 아시아의 온대와 아열대 지역에 서식하는 약용식물로 전통적으로 진정, 지혈, 구충, 항균, 항종양, 혈압강하 등에 효과가 있는 것으로 알려지고 있으며, 한방에서는 변비, 만성설사, 장염, 황달, 복막염, 담석증의 치료에 사용된다 (Kimura et al., 1996). 대황의 전초로부터 생합성되는 주요 약리물질로는 glycosides rhein-8-monoglucoside, physcion monoglucoside, aloemodin monoglucoside, emodine monoglucoside, chrysophenol monoglucoside, sennoside, tannin, gallic acid, calechin 등이 있다 (Zhu, 1998).

본 연구에서는 대황으로부터 유용약리물질을 기내 (*in vitro*) 에서 효율적으로 생산하기 위한 방법으로 *Agrobacterium rhizogenes*를 이용하여 형질전환을 유도하였으며, 형질전환된 조직이 최적 성장을 나타내고 지표물질인 tannin의 생합성량을 극대화할 수 있는 다양한 배양조건 즉, 배지성분, pH, 탄소원, elicitor의 처리, 그리고 식물성장조절물질의 효과 등에 대한 조사를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 식물 재료 및 균주

대황 (*R. undulatum* L.)의 종자는 농촌진흥청으로부터 분양받았다. 종자는 70% (v/v) ethanol에서 5분간, 5% (v/v) sodium hypochlorite 용액에서 10분간 표면 살균 처리 후, 무균수로 3회 이상 세척하였다. 표면 살

균된 종자는 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 1/2 MS배지에서 발아를 유도하고, 기내에서 약 3 cm 정도 자란 유묘는 0.5 mg/L BAP가 첨가된 MS배지로 옮겨 증식시켰다. 형질전환에 사용된 균주인 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834는 감자 추출물 배지 (200 g/L potato, 2% sucrose, 1.5% agar)에서 48시간 배양한 다음 사용하였다.

2. 형질전환

유식물체의 조직 절편과 균을 공조배양하는 방법을 이용하여 형질전환을 유도하였으며, 24-36시간 공조배양 후 조직 절편은 300 mg/L cefotaxime이 첨가된 기본배지에서 균을 제거하였다. 감염 부위로부터 배양 2주 후부터 형성되는 부정근은 근단으로부터 약 1.5 cm 가량 절 취하여 호르몬이 첨가되지 않은 1/2 MS배지로 옮겨 증식시켰다.

3. 모상근의 배양

증식된 모상근의 배양은 근단 부위가 포함된 시료 약 0.05 g (fresh weight)을 40 ml 액체 배지가 들어있는 100 ml Erlenmyer flask에 접종 하여 암소에서 100 rpm으로 배양 (25±1℃) 하였다. 배양체는 3주 간격으로 계대배양 하였으며, 모상근의 성장 및 물질의 생합성에 영향을 주는 배지조건 및 탄소원, pH 등을 조사하였다. 기본배지로는 MS 배지를 포함한 7종을 선택하여 사용하였고, 배지내 탄소원으로 sucrose를 2-8%까지 처리하였다. 배지의 초기 pH는 5.0에서 6.0까지 1N NaOH 로 조정하였다.

4. 식물성장조절물질 및 chitosan 처리

모상근의 성장과 물질의 생합성능을 증진시키기 위하여 IAA를 포함한 7종의 식물성장조절물질을 여과멸균 처리후 농도별로 배지에 첨가

하였으며, chitosan (Sigma) 은 10-500 mg/L의 농도 범위에서 배지에 첨가하였다.

5. Tannin 분석

배양조직으로부터 지표 물질인 tannin의 분석은 Bakkali 등 (1997) 과 Robbins 등 (1996) 의 방법에 따라 조직을 냉동 건조된 분말시료 20 mg에 2 ml MeOH을 가지고 상온에서 16시간 동안 추출한 다음 0.45 µm membrane filter를 통하여 여과 후 HPLC에서 분석 하였으며, 총 tannin은 UV/VIS scanning spectrophotometer를 사용하여 550 nm에서 흡광도 측정 하였다 (Bakkali et al., 1997; Robbins et al., 1996).

결과 및 고찰

1. 형질전환 유도 및 모상근의 배양

*Agrobacterium rhizogenes*에 의해서 유도되는 모상근은 배양 과정에서 식물성장조절물질을 첨가해 주지 않아도 지속적인 분지가 일어나며, 정상 뿌리보다 수십배 이상 빠른 성장을 기대할 수 있다. 또한 탈분화 된 배양세포와 달리 화학합성능이 유지되며 일종의 고정화세포 (immobilized cells)와 같은 특성을 나타낸다 (Flores, 1987; Shanks and Morgan, 1987; Toivonen, 1993). 그 실례로 Kittipongpatana 등 (1998) 에 따르면 *Solanum aviculare*의 조직배양에 의한 solasodine의 생산에서 켈러스나 현탁 배양세포에 비해 모상근에서 함량이 4배 이상임을 확인하였다. Fig. 1은 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834와 공조배양한 대황의 조직 절편으로부터 형성된 모상근을 근단 부위로부터 약 1.5 cm 가량을 절취하여 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 1/2 MS 고형배

지에 치상하여 5주 배양된 대황의 모상근으로 정상근과 달리 매우 빠르게 성장하며, 가늘고 분지된 형태적 특징을 보여준다. 조직배 양에 있어서 배지 성분은 배양체의 성장은 물론 분화에 관여하는 가장 중요한 요소이며, 2차대 사물질의 형성에 또한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Toivonen et al., 1991; Weathers et al., 1997). 따라서, 조직배양식물 세포주에 따른 적절한 배지의 선택이 일차적으로 이루어져야 할 필요가 있다. 본 실험에서는 MS 배지를 포함하여 7종의 기본배지에서 대황의 모상근을 배양한 결과, WPM 배지에서 무기염의 농도가 절반으로 줄어든 1/2 MS배지의 약 1.4배, RCM 배지의 3.4배에 이르는 성장 효과를 보여주었으며 (Fig. 2), 지표 물질인 tannin의 생산능 역시 건물중으로 약 0.43 mg/g을 보여준 WPM 배지가 가장 적절한 것으로 나타났다 (Fig. 3). 일반적으로 뿌리의 초기 배양 및 증식은 무기염의 농도가 절반으로 줄어든 1/2 MS배지 또는 MS 배지를 대부분 사용하고 있으며, 물질 생산을 높이기 위해서는 RCM 배지를 포함한 무기성

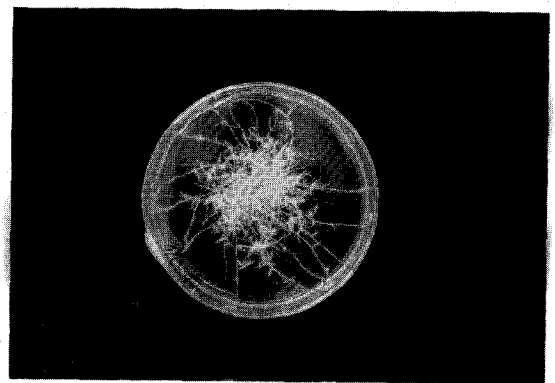


Fig. 1. Hairy roots of *Rheum undulatum* L. cultured on solid medium containing 3% sucrose, pH 5.8

분을 강조한 배지를 선택하고 있다(Bakkali et al., 1997; Toivonen, 1993; Toivonen et al., 1991). Merkli 등 (1997)은 *Trigonella foenum-graecum*의 모상근 배양에서 WPM를 사용하여 최적 성장을 유도하였고, 지표 물질인 diosgenin의 생산을 높이기 위해서 기본배지로부터 무기염의 농도를 절반으로 줄인 1/2 WPM배지를 사용하였다. 그러나, Ikenaga 등

(1995)은 *Solanum aculeatissimum*의 모상근 배양에 있어서는 B5 배지가 steroidal saponin의 생산 및 모상근 성장에 가장 적절한 것으로 보고하였다. 한편, 성장과 물질의 생산능에 있어서 각각 서로 다른 배지의 사용이 요구되는 경우나 배지 성분의 조정이 요구되는 경우에는 초기 배양을 모상근 성장에 필요한 증식 배지에서 배양한 후 물질합성을 극대화 할 수 있는 배지로 옮겨 배양을 하는 2단계 배양방법의 선택을 고려해 볼 수도 있다.

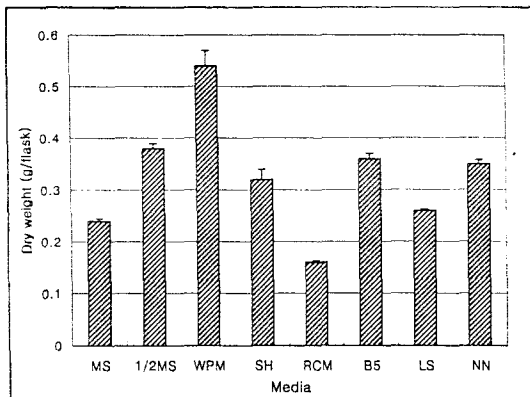


Fig. 2. Effects of media on hairy roots growth of *Rheum undulatum* L.

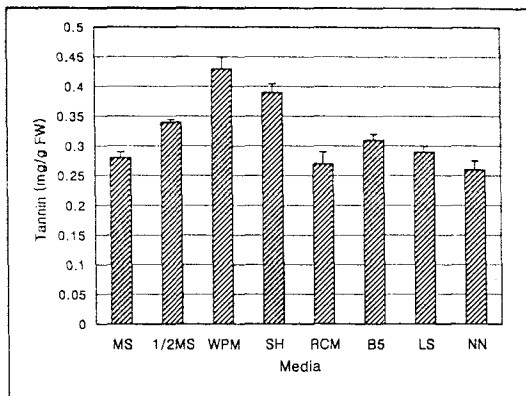


Fig. 3. Effects of media on tannin content in hairy root cultures of *Rheum undulatum* L.

2. 탄소원 및 pH

배지내 탄소원의 종류 및 농도는 타가영양체인 배양세포의 성장에 크게 영향을 줄 뿐만 아니라 대사물질의 합성에도 중요한 영향을 미치게 된다(Weathers et al., 1997). 대부분의 세포배양에 있어서 배지내 탄소원의 농도가 2-4% 내외일 경우 삼투 유지 및 최적 성장에 적절한 것으로 알려지고 있다. 본 연구 결과 대황 모상근의 성장에 필요한 배지내 탄소원의 초기 농도는 3-4%가 적정한 것으로 나타났으며, 배지내 sucrose의 농도가 5% 이상에서는 오히려 성장률이 억제 되었다(Fig. 4). 그러나 tannin의 생산은 5% sucrose에서 최대치를 나타내었다 (Fig. 4). 한편, glucose나 mannitol, sorbitol은 동일 농도에서 sucrose에 비해 유의적인 효과를 보여주지 않았다 (data not shown). Battat 등 (1989)은 *Dioscorea deltoidea*의 세포배양에서 배지내 sucrose의 초기 농도가 10% 이상일 때 생중량 대 건물중량의 비율 증가와 함께 대사물질의 최적 생산을 나타내었다고 보고한 바 있으나, Merkli 등 (1997)은 *Trigonella foenum-graecum*의 모상근 배양에서 diosgenin의 생산을 높이기 위해서는 오히려 배지내 sucrose의 농도를 1%로 낮추는게 바람직 하다고 보고하였다. 동일한 속의 식물로부터 유래한 모상근

배양에서도 서로 다른 sucrose 농도가 필요함을 보여주는 경우도 있다. Liu 등(1997)은 *Artemisia annua*의 모상근 배양시 7% sucrose 처리가 모상근의 성장 및 artemisinin의 생산량을 위한 최적 농도로 보았으나, Nin 등(1997)은 *Artemisia absinthium*의 모상근 배양에서 4% sucrose 농도가 성장 및 물질 생산에 모두 적정 농도로 보았다. 본 연구결과 대황의 경우 1% 이하나 7% 이상의 농도에서는 모상근의 성장이 지연되거나 분지의 장애를 받는 것으로 나타났다. 따라서, 배양체의 성장 및 물질의 생합성을 높이기 위해서는 적절한 농도의 탄소원이 공급되어야 할 것으로 사료된다.

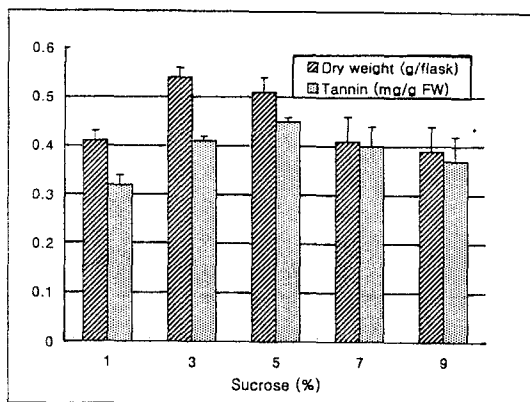


Fig. 4. Effect of sucrose concentration on growth of hairy roots and tannin production in *Rheum undulatum* L.

배지의 pH는 배양체의 성장 및 특정 대사물질의 생합성에 영향을 줄 수 있기 때문에 배양 초기는 물론 배양 전과정에서 적정 pH가 유지되어야 할 필요가 있다. Fig. 5는 대황 모상근 배양에서 배지의 초기 pH가 모상근의 성장 및 tannin의 생산에 미치는 효과를 나타낸 것으로 pH 5.7-5.8 범위 내에서 성장이 유의적인 차

이없이 높았으며, tannin의 생산에 미치는 pH의 효과를 조사한 결과 pH 5.5에서 건물중으로 약 0.46 mg/g의 tannin을 얻을 수 있었다. 그러나, pH 5.0 이하 또는 6.0 이상에서는 모상근의 성장 저하와 함께 tannin의 생산 저하를 가져왔다. 유사한 연구결과로 Merkli 등(1997)은 모상근배양에서 초기 pH가 4.8-5.7 일때 전 범위에 걸쳐 모상근의 성장에는 유의할만한 차이를 보이지 않았으나, diosgenin의 생합성에는 크게 영향을 미쳐 pH 5.0에서 최대치를 나타내었다고 보고하였다. 한편, 계대배양 과정에서 배지의 pH는 배양 12주까지 급격한 변화를 일으키지 않았다 (data not shown).

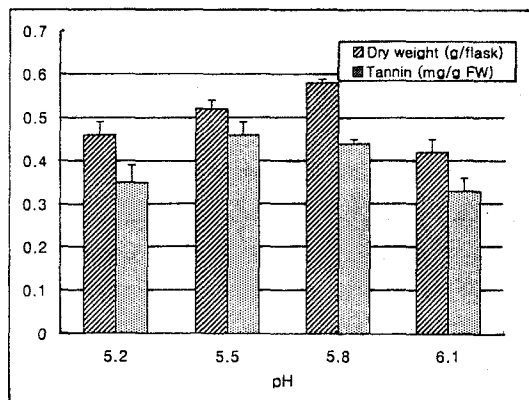


Fig. 5. Effect of medium pH on growth of hairy roots and tannin production in *Rheum undulatum* L.

3. 식물성장조절물질의 처리

모상근은 배지내 식물성장조절물질의 첨가 없이도 매우 빠른 성장 속도를 나타내나 외부에서 처리한 식물성장조절물질에 의해 배양 과정에서 뿌리의 분화나 발달과정이 변화될 수 있으며, 대부분이 2차 대사물질인 유용 물질

의 생합성에도 영향을 미치게 된다(Ozeki and Komamine, 1986). IAA나 NAA 등과 같은 오옥신류는 모상근 배양에서 분지를 촉진시키며, 특정 대사물질의 생합성에도 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다(Arro et al., 1995; Rhodes et al., 1994). Cytokinin류는 형질전환 근으로부터 신초의 분화가 촉진되거나 형태적 특성을 변화시키며 이로 인해 물질의 생합성이 영향을 받는 것으로 알려지고 있다(Aoki et al., 1997; Arro et al., 1995). 본 연구에서는 배지내 처리한 식물성장조 절물질이 대황 모상근의 성장 및 형태에 유의한 효과를 나타내었으며, tannin의 생합성에도 영향을 주는 것으로 나타났다(Table 1, 2). 배지내 auxin류의 과다한 처리나 cytokinin과의 혼합 처리는 캘러스화를 가져왔으며 계대배양 과정에서 괴사 현상을 유발 하였다. 2, 4-D, IBA, NAA의 처리구에서는 대부분 모상근의 분지화가 억제되고 캘러스화가 촉진 되었으나, 2 mg/L IAA 처리구에서는 분지화와 함께 식물성장물질을 처리하지 않은 대조구에 비해 약 1.7배 건물중의 증가를 가져왔다. Tannin의 생산에 있어서는 0.5 mg/L ABA 처리구에서 배양 12주 후 대조구에 비해 약 1.4배의 증가를 가져왔으나, GA는 대조구에 비해 유의적인 생산증가를 나타내지 않았다. *Rubia tinctorum*의 모상근 배양의 경우 배지내 IAA의 처리가 성장과 alkaloids의 생산을 높여 주며(Sato et al., 1991), *Hyosyamus*모상근 배양에서도 저농도의 auxin 처리가 분지화를 촉진 시키는 것으로 보고되었다(Hasimoto et al., 1986; Sauerwein et al., 1992). 그러나, Rhodes 등 (1994)은 형질전환근 배양에서 IAA의 유의적인 효과를 확인하지 못하였으며, Liu 등 (1997)은 오히려 auxin류가 모상근의 성장을 저해하고 대사물질의 생산량도 현저히 부정적인 영향을 미치는 것으로 보고하

Table 1. Effect of plant growth regulators on hairy roots growth of *Reum undulatum* L.

	PGR (mg/L)	Fresh weight (g/flask)	Dry weight (g/flask)
IAA	0.5	15.1±0.2	0.43±0.01
	1	17.2±0.3	0.59±0.01
	2	18.3±0.2	0.72±0.02
IBA	0.5	15.6±0.2	0.42±0.01
	1	14.4±0.4	0.44±0.02
	2	14.8±0.2	0.41±0.02
NAA	0.5	13.8±0.4	0.34±0.02
	1	14.0±0.2	0.37±0.01
	2	14.2±0.3	0.38±0.03
2, 4-D	0.5	13.6±0.3	0.34±0.02
	1	12.4±0.2	0.28±0.02
	2	11.8±0.4	0.24±0.03

Table 2. Effect of plant growth regulators on tannins content in hairy root cultures of *Rheum undulatum* L.

	PGR (mg/L)	Total tannin (mg/g FW)
IAA	0.5	0.56±0.02
	1	0.53±0.03
	2	0.54±0.02
ABA	0.5	0.67±0.02
	1	0.54±0.03
	2	0.52±0.02
GA	0.5	0.51±0.03
	1	0.52±0.03
	2	0.49±0.02
BA	0.5	0.54±0.04
	1	0.51±0.03
	2	0.46±0.03

였다. *Panax ginseng*과 *Lotus corniculatus*의 경우에는 IBA와 BA가 각각 대사물질의 생합성을 높여주었으며 (Inomata et al., 1993; Robbins et al., 1991), *Datura stramonium*의 경우에는 GA의 처리가 효과적인 것으로 보고되었다 (Sato et al., 1991). 따라서, 모상근의 성장을 촉진 시키고 특정 대사물질의 생합성량을 높이기 위해서는 모상근의 생리유전학적 특성에 부합 할 수 있는 적절한 농도의 식물성장조절물질의 배지내 첨가가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

4. Chitosan의 처리

Chitosan은 β -1, 4-D-glucosamine 중합체로 키틴의 가수분해로부터 얻어진다. 이와같은 chitosan은 이차대사물질의 유도체로 작용하는 것으로 알려지고 있다 (Hashimoto et al., 1986). 배지에 농도별로 첨가한 chitosan은 대황 모상근의 성장에 크게 작용을 하지 못하는 것으로 나타났으나, 50 mg/L 처리구에서 대조구에 비해 약 1.7배의 tannin 생합성 증대 효과를 보였다 (Fig. 6). Merkli 등 (1997)은 배지내 40 mg/L chitosan을 처리하였을 때 대조구에 비해 3배 이상의 물질생산을 가져 왔다고 보고한 바 있으나, Sauerwein 등 (1991)은 저농도 (0.2-10 mg/L)의 chitosan 처리만으로 5배의 hernandulcin의 생합성 증가를 확인한 바 있다. 그러나, Bourgaud 등 (1999)은 *Psoralea*의 모상근 배양에서 chitosan 처리 29일 후 약 1%의 flavonoid 생산증대 효과를 가져왔으나 배양 기간이 길어질수록 오히려 저해작용이 나타남을 확인하였다. 본 연구에서는 chitosan 처리에 의한 tannin 물질의 배지내로의 용출은 이루어지지 않음을 확인할 수 있었으며, 배양 초기에 배지내 고농도의 chitosan 처리는 모상근의 성장을 억제하여 결과적으로 물질의 생산에도 부정적인 결과를

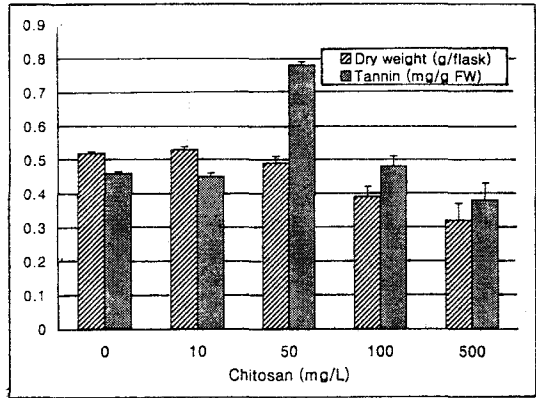


Fig. 6. Effect of chitosan on growth of hairy roots and tannin production in *Rheum undulatum* L.

가져왔기 때문에 배양 1-2주 후에 첨가해 주는 것이 바람직할 것으로 사료되었다.

적 요

약용식물의 기내 (*in vitro*) 배양에 의한 유용물질의 생산을 위하여 대황 (*Rheum undulatum* L.)의 유묘 조직 절편에 *Agrobacterium rhizogenes* A4를 감염시켜 형질전환을 유도하였다. 형질전환된 부정 근인 모상근은 WPM 배지에서 RCM 배지의 3.4배의 성장률 증가를 나타내었으며, 지표 물질인 tannin의 생산량 또한 동일 배지에서 가장 높았다. 배지내 식물성장조절물질의 처리에 의한 모상근의 성장 및 tannin 생산촉진 효과는 식물성장조절물질을 처리하지 않은 대조구에 비해 2 mg/L IAA 처리구와 0.5 mg/L ABA 처리구에서 각기 1.7배의 성장 (0.72 g dry weight/flask) 과 1.4배의 tannin (0.67 mg/g fresh weight)의 생산량 증가를 가져왔다. 배지내 탄소원인 sucrose는 3%와 5%에서 최대 성장 (0.54 g dry weight/flask) 과 tannin 생산 (0.46 mg/g fresh weight)을 보였으며,

chitosan의 농도는 50 mg/L 처리구에서 tannin의 생합성에 영향을 주었다.

사 사

본 연구과제는 1998년도 전남대 학술연구비 지원에 의해 수행 되었음.

LITERATURE CITED

- Aoki, T., H. Matsumoto, Y. Asako, Y. Matsumoto and K. Shimomura. 1997. Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy roots and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. *Plant Cell Rep.* 16 : 282-286.
- Arro, R. R. J., A. Develi, H. Meijers, E. van der Westerlo, A. K. Cores and G. J. Wullems. 1995. Effects of endogenous auxin on root morphology and secondary metabolism in *Tagetes patula* hairy root cultures. *Physiol. Plant.* 93 : 233-240.
- Bakkali, A. T., M. Jaziri, K. Ishimaru, N. Tanaka and K. Shimomura. 1997. Tannin production in hairy root cultures of *Lawsonia inermis*. *J. Plant Physiology* 151 : 505-508.
- Battat, E., J. S. Rokem and I. Goldgerg. 1989. Growth of *Dioscorea deltoidea* at high sugar concentrations. *Plant Cell Rep.* 7 : 652-654.
- Bourgau, F., V. Bouque and A. Guckert. 1999. Production of flavonoids by *Psoralea* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.* 56 : 97-104.
- Flores, H. E. 1987. Use of plant cell and organ culture in the production of biological chemicals. *In Applications of Biotechnology to Agricultural Chemistry.* American Chemical Society Symposium Series, vol. 334. H. Lebaron, R. O. Mumma, R. C. Honeycutt and J. H. Duesing ed. American Chemical Society, Washington DC, pp. 66-68.
- Funk, C. and P. Brodelius. 1990. Influence of PGR and an elicitors on phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry* 29 : 845-848.
- Hashimoto, T., Y. Yukimune and Y. Yamada (1986) Tropane alkaloid production in *Hyosyamus* root cultures. *J. Plant Physiol.* 124 : 61-75.
- Ikenaga, T., T. Oyama and T. Muranaka. 1995. Growth and steroidal saponin production in hairy root cultures of *Solanum aculeatissimum*. *Plant Cell Rep.* 14 : 413-417.
- Inomata, S., M. Yokoyama, Y. Kozu, T. Shimizu and M. Yanagi. 1993. Growth pattern and ginsenoside production of *Agrobacterium* transformed *Panax ginseng* roots. *Plant Cell Rep.* 12 : 681-686.
- Kimura, T., P. H. B. Paul, K. S. Chung and B. H. Han. 1996. *In International collection of traditional and folk medicine.* World Sci. pp. 18-20.
- Kittipongpatana, N., R. S. Hock and J. R. Porter. 1998. Production of solasodine by hairy root, callus, and cell suspension cultures of *Solanum aviculare* Forst. *Plant Cell, Tissue, Organ Culture* 52 : 133-143.
- Liu, C. Z., Y. C. Wang, F. Ouyang, H. C. Ye and G. F. Li. 1997. Production of artemisinin by hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnology Letter* 19 : 927-929.
- Merkli, A., P. Christen and I. Kapetanidis. 1997. Production of diosgenin by hairy root cultures of

- Trigonella foenum-graecum* L. Plant Cell Rep. 16 : 632-636.
- Nin, S., A. Bennici, G. Roselli, D. Mariotti, S. Schiff and R. Magherini. 1997. Agrobacterium mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. and production of secondary metabolites. Plant Cell Rep. 16 : 725-730.
- Ozeki, Y and A. Komamine. 1986. Effects of growth regulators on the induction of anthocyanin synthesis in carrot cell suspension cultures. Plant Cell Physiol. 27 : 1361-1368.
- Rhodes, M. J., A. J. Parr, A. Giulietti and E. L. Arid. 1994. Influence of exogenous hormones on the growth and secondary metabolite formation in transformed root cultures. Plant Cell, Tissue, Organ Culture 38 : 143-151.
- Rhodes, M. J., R. J. Robins, J. D. Hamill, A. J. Parr, M. J. Hilton and N. J. Walton. 1990. Properties of transformed root cultures. In Secondary products from Plant Tissue Culture. B.V. Charlwood and M.J. Rhodes, eds. Clarendon Press, Oxford. pp. 201-225.
- Robbins, M. P., T. E. Evans and P. Morris. 1996. The effect of plant growth regulators on growth, morphology and condensed tannin accumulation in transformed root cultures of *Lotus corniculatus*. Plant Cell, Tissue, Organ Culture 44 : 219-227.
- Robins, R. J., E. S. Bent and M. J. C. Rhodes. 1991. Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids by *Datura stramonium* L. transformed root cultures. 3. The relationship between morphological integrity and alkaloid biosynthesis. Planta 185 : 385-390.
- Sato, K., T. Yamazaki, E. Okuyama, K. Yoshihara and K. Shimomura. 1991. Anthraquinone production by transformed root cultures of *Rubia tinctorum*. Influence of phytohormones and sucrose concentrations. Phytochemistry 30 : 1507-1509.
- Sauerwein, M., M. Wink and K. Shimomura. 1992. Influence of light and phytohormones on alkaloid production in transformed root cultures of *Hyoscyamus albus*. J. Plant Physiol. 140 : 147-152.
- Sauerwein, M., T. Yamazaki and K. Shimomura. 1991. Hernandulcin in hairy root cultures of *Lippia dulcis*. Plant Cell Rep. 9 : 579-581.
- Shanks, J. V. and J. Morgan. Plant hairy root culture. Current Opinion in Biotechnology 10 : 151-155.
- Toivonen, L. 1993. Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. Biotechnol. Prog. 9 : 12-20.
- Toivonen, L., M. Ojala and V. Kaupinnen. 1991. Studies on the optimization of growth and indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnol. and Bioeng. 37 : 673-680.
- Weathers, P. J., D. D. Hemmavanh, D. B. Walcerz, R. D. Cheetham and T. C. Smith. 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.
- Zhu, Y. P. 1998. In Chinese materia medica. Harwood Acad. Press. pp. 231-238.