

미치광이풀 모상근 배양에서 Tropane Alkaloids 생산성 증진을 위한 최적 생물학적 엘리시터 선발

정희영* · 강승미* · 강영민* · 김용덕* · 양재경* · 정영관* · 최명석*†

*경상대학교 산림과학부

Selection of Optimal Biotic Elicitor on Tropane Alkaloid Production of Hairy Roots in *Scopolia parviflora* Nakai

Hee Young Jung*, Seung Mi Kang*, Young Min Kang*, Yong Duck Kim*, Jae Kyung Yang*,
Young Gwan Chung*, and Myung Suk Choi*†

*Division of Forest Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea.

ABSTRACT : Scopolamine and hyoscyamine which belong to tropane alkaloids are the pharmaceutically valuable anticholinergic drugs. In order to increase the productivities, the effects of elicitation were investigated during hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. Biotic elicitors originated from 3 fungi and 1 yeast were prepared as homogenate and supernatant and added to 3-week-old cultures. Both of homogenate and supernatant of *Candida albicans* elicitors increased the scopolamine production. The production of hyoscyamine was enhanced by homogenate of *Fusarium solani* and supernatant of *C. albicans*. Most of the other fungal elicitors were also improved on the tropane alkaloid production compared to non-treatment. Among the elicitors tested, *C. albicans* was proved the optimal biotic elicitor on tropane alkaloids production. These results will be served mass production of tropane alkaloids by large-scale production.

Key words : tropane alkaloids, *Scopolia parviflora*, biotic elicitor, fungal elicitor

서 언

미치광이풀 (*Scopolia parviflora*)은 가지과 (Solanaceae)에 속하는 다년생 숙근류로서 경기 북부 일대 및 깊은 산골짜기에 서식하는 우리 나라 자생식물이다. 한방에서는 그 뿌리를 '낭탕근'이라 하여 예로부터 한약재로 널리 사용되어왔다. 미치광이풀의 약리학적 주요 성분은 scopolamine과 hyoscyamine과 같은 tropane alkaloids로 *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, 및 *Hyoscyamus* 등의 다른 가지과 식물에서도 생산되고 있다 (Kamada *et al.*, 1986; Zabetakis *et al.*, 1998). Scopolamine과 hyoscyamine

은 식물유래 세계 10대 의약품으로 중추 신경에 관여하여 진통 및 진정의 효과가 있어 멀미약, 안연고, 비경구 마취제, 및 감기약 등의 성분으로 널리 쓰이고 있다 (Yamada & Tabata, 1997). 그러나 우리나라에서는 미치광이풀만이 이러한 성분을 생산하지만 현재로는 재배가 되고 있지 않고 있으며, 호주, 스위스 등지에서 직접 재배된 식물추출물을 전량 수입하고 있다. 따라서 미치광이풀은 그 해 상황에 따라 가격변동이 크기 때문에 대체적인 생산 방법의 확립이 시급하다.

기내에서 식물 세포 및 조직 배양이 이에 대한 대안으로 여러 식물종에 대해 적용되어 오고 있다 (Kargi &

† Corresponding author: (Phone) +82-55-751-5493 (E-mail) mschoi@nongae.gsnu.ac.kr

Received September 18, 2003 / Accepted November 14, 2003

Rosenberg, 1987; Collins-Pavao *et al.*, 1996). 특히 tropane alkaloids는 탈분화된 조직에서는 합성이 일어나지 않고 뿌리에서 조직특이적으로 합성되기 때문에 모상근 배양이 적절하다 (Hashimoto *et al.*, 1993). 모상근 배양은 세포 배양보다 생장이 빠르고, 생장 및 생산이 안정적인 이점이 있다. 그러나, 모상근 배양을 비롯한 대부분의 기내 배양은 이차대사산물의 생산성이 모식물체보다 낮은 것으로 알려져 있다. 일반적으로 기내 배양을 통한 생산성 향상 기법으로 배양 조건의 최적화, 고생산성 세포주 선발, 고정화, 대사제어 및 elicitation 등이 있다. 이들 중 elicitation은 식물 세포 및 조직 배양물에 다양한 스트레스 원인을 가하여 이차대사산물의 생산성을 향상시키는 방법으로 이때 가해지는 스트레스원을 elicitor라 한다 (Roberts & Shuler, 1997). Elicitor는 크게 무생물 유래의 abiotic elicitor와 생물 유래의 biotic elicitor로 분류된다. Abiotic elicitor에는 중금속, 고농도염, UV광, ethylene 등이 있으며, biotic elicitor로는 미생물 추출물, 식물 및 미생물 유래 효소 및 내생 신호유도물질 등이 있다 (Pitta-Alvarez *et al.*, 2000).

모상근배양에 있어 biotic 또는 abiotic elicitation을 통해 tropane alkaloids를 생산한 예는 거의 없는 실정이다. 본 저자들은 이전의 연구에서 미치광이풀 모상근 배양에 여러 abiotic elicitor 처리가 tropane alkaloids 생산성에 영향을 미치지 않거나 오히려 생합성을 억제시킴을 확인하였다 (결과 미제시). 따라서 미치광이풀 모상근 배양에서 모상근에 해를 주지 않으면서 조제가 용이하고, 물질 생산성을 높일 수 있는 적절한 elicitor의 개발이 중요하다.

일반적으로 식물은 병원성 미생물의 감염 (침입) 이후 이차대사에 관련된 효소들의 활성이 더 높게 나타나는데 이러한 host-pathogen 관계를 기내 배양에 도입하면 이차대사산물의 생산을 증가시킬 수 있을 수 있다 (Funk *et al.*, 1987). 본 논문에서는 식물에 주로 발병하는 곰팡이와 효모를 supernatant와 homogenate로 조제하여 미치광이풀 모상근 배양물에 적용하여 tropane alkaloids 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료 및 모상근 배양

식물재료로 사용한 미치광이풀은 국립 수목원에서 2~3년생의 모식물체를 분양받아 시료로 사용하였으며, 모상근 유도와 배양은 Jung *et al.* (2002)의 방법으로 행하였다. 이전의 연구에서 구명된 바에 따라 모상근은 생장 및 생산에 대해 최적 배지 조건 (B5 배지, 5% sucrose, 0.1 mg/l IBA) 및 배양 조건 (25°C, 암배양)으로 rotary shaker에

서 배양되었으며, 4주 간격으로 계대 배양하였다.

2. Elicitor 조제

Elicitation 실험에 사용한 미생물로는 곰팡이 균주로 *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, 효모로 *Candida albicans*을 진주산업대학교의 서원택 교수로부터 분양받아 사용하였다. Elicitation 실험을 위해, YPD 고체 배지에서 배양된 미생물을 각각 80 ml의 동일한 YPD 액체 배지에 5×5 mm 크기로 자른 조각을 10개 접종한 후 25°C, 120 rpm의 조건으로 8일간 배양하였다. 배양 8일 후 이들 미생물은 Eilert *et al.* (1985)과 Wang *et al.* (2001)의 방법을 약간 변형하여 supernatant (상층액)와 homogenate (균체)로 elicitor를 조제하였다. Homogenate 조제는 8일 배양한 배양물을 filter paper에 여과한 후 증류수로 3회 이상 행구었다. 이후, 신선중 균체 5 g을 100 ml의 증류수에 다시 현탁한 후 Homogenizer를 이용하여 분쇄하였고, 이를 121°C에서 2 시간 동안 고압멸균하였다. Supernatant는 8일 배양된 배양물을 회수한 후 그 자체를 121°C에서 20분간 고압멸균하였다. 이것을 Homogenizer에서 분쇄한 후 다시 1분간 초음파 파쇄하였으며, 20분간 원심분리한 후 상등액만 취하여 다시 고압멸균하여 사용하였다.

3. Elicitation

Elicitation 실험을 위해 미치광이풀 모상근 0.5 g을 30 ml 배지에 접종하여 앞서 언급한 배양조건으로 3주간 배양하였다. 조제된 elicitor, 즉 supernatant와 homogenate는 각각 2 ml과 3 ml의 농도로 21일간 배양된 모상근 배양물에 처리되었다. 적정 elicitation 반응 시간을 구명하기 위해 elicitor 처리 후 12, 24, 48시간에 이를 각각 회수하여 모상근 생장 및 tropane alkaloids 생산정도를 HPLC로 함량분석 하였다. 이때 모든 실험은 3반복 이상 행하였으며, 각 반복수에 대한 평균값과 표준편차로 나타내었다.

4. 모상근 생장 조사

12, 24, 48 시간동안 elicitor를 처리한 모상근은 배지로부터 분리되었고, 모상근 표면의 잔존 배양액 및 elicitor를 제거하기 위해 증류수로 수세한 후 Kimtowel에서 blotting한 후, 신선중 (F.W., fresh weight)을 측정하였다. 건중량 (D.W., dry weight)은 신선중 측정 후 모상근을 50°C의 건조기에 넣고 48시간 동안 건조한 후 측정되었다. Elicitor 처리가 생장에 미치는 영향에 대해서는 아래의 식에 따라 growth index (GI)로 나타내었다.

$$\text{Growth index (GI)} = \frac{\text{최종 중량} - \text{초기 접종 중량}}{\text{초기 접종 중량}}$$

5. Tropane alkaloids 추출 및 분석

Tropane alkaloids 추출 및 분석은 Jung *et al.* (2002)의 방법으로 행하였다. 모상근 신선중 1 g을 추출 용매 (95% EtOH : 28% NH₄OH = 19 : 1) 10 ml에 넣고 Homogenizer로 20,000 rpm에서 분쇄한 후, 2 시간 동안 sonication하였다. 이후, 6,000 rpm으로 10 분간 원심분리한 후 상등액을 40°C에서 감압농축하여 건조시켰다. HPLC급 MeOH 400 μ l를 첨가하여 재용해하고, pre-filter (Φ 0.2 μ m, Supelco)로 여과한 후 HPLC로 분석하였다.

HPLC 분석 조건은 HPLC operating system (305 pump, Gilson), TSK gel ODS column (15 cm \times 4.6 mm, 5 μ m, Tosho), flow rate 1 ml/min, 그리고 215 nm UV이었다. 또한 이동상으로 phosphoric acid로 pH 3.0으로 조절된 50 mM dipotassium phosphate 용액과 acetonitrile의 혼합액 (78:22)에 각 sample 당 20 μ l를 주입하여 tropane alkaloids를 분석하였다.

Tropane alkaloids 정량 분석은 Sigma사에서 구입한 scopolamine과 hyoscyamine을 standard로 하여 검량선을 작성하여 행하였다. Scopolamine과 hyoscyamine의 검량선에 대한 correlation coefficient (R^2)는 각각 0.9987과 0.9984이었다. Tropane alkaloids의 확인은 retention time 및 standard와의 co-chromatography로 행하였다.

결과 및 고찰

1. 미치광이풀 모상근의 생장 및 생산

Elicitor가 첨가되지 않은 대조구의 모상근을 30일간 배양하였을 때, 모상근의 생장은 유도기 (0~4일), 지수기 (4~24일), 정지기 및 사멸기 (24~30일)의 양상을 보였다 (Fig. 1A). 본 배양기간 중 elicitation 실험은 후기 지수기 (21~24일) 동안 행하여졌다. 이 때 모상근의 생장은 24일 이후에는 더 이상 일어나지 않았으며, 반복 실험에서 거의 같은 경향을 보였다.

Tropane alkaloid 생산은 배양기간이 경과할수록 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 1B). 배양 8일까지는 물질 생산성의 변화가 없었지만 그 이후 배양 20일까지 물질 생산성이 급격히 증가하였다. 이후 물질 생산성은 25일까지는 감소하였으며, 이후 다시 급증하였다. 미치광이풀 모상근 배양에서 hyoscyamine은 scopolamine 보다 그 함량이 2배 정도 높았으며, 배양일수에 따른 물질 생산 양상은 비슷하였다.

2. Elicitor 처리에 따른 모상근 생장의 영향

Supernatant와 homogenate elicitor 처리는 전반적으로

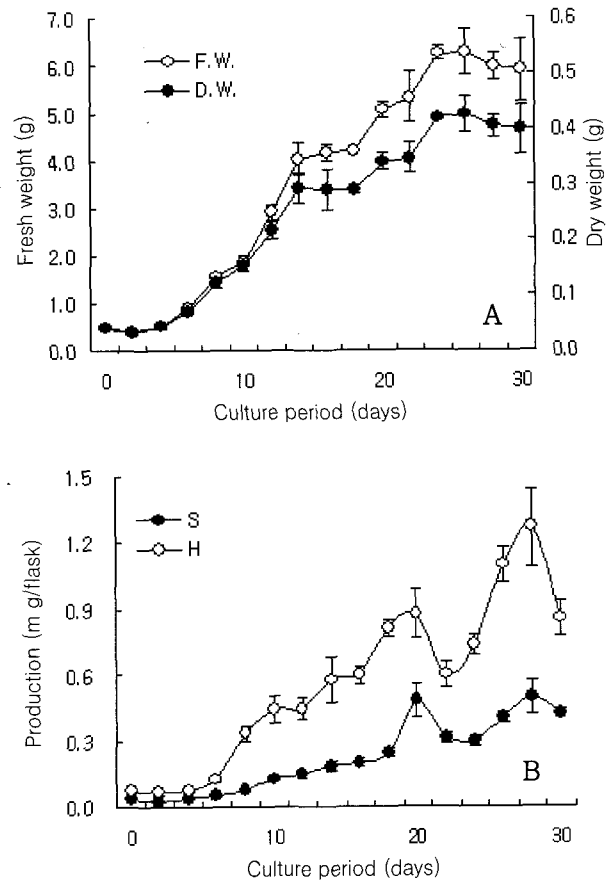


Fig. 1. The growth profile (A) and hyoscyamine (H) and scopolamine (S) production (B) in an hairy root culture of *S. parviflora*.

모상근의 생장을 저해하지 않고 대조구와 비슷한 수준으로 나타나거나 약간 증대시켰다 (Fig. 2). 특히 homogenate 처리 결과 처리 0 시간에 elicitor 처리구에서의 모상근의 생장이 대조구보다 낮았지만, 24 시간 이후에는 오히려 모든 처리구의 모상근 생장이 더 좋게 나타났다.

일반적으로 기내 배양에서 외부에서 영양분이 아닌 다른 성분들이 첨가되었을 때, 식물 세포는 생장을 일시 혹은 영구히 정지시키고, 외부의 자극에 대한 방어 반응과 관련된 대사를 행하는 것으로 알려져 있다 (Leon *et al.*, 2001). 일일초 현탁 세포 배양물에 12종의 fungal elicitor를 처리한 결과 세포의 색깔변화와 더불어 처리 3일 후에는 세포생장이 저해됨을 관찰하였다 (Zhao *et al.*, 2001). 그러나 본 연구에서 모상근의 생장이 대조구에 비해 저해되지 않은 것은 세포배양체보다 외부 자극에 보다 덜 민감한 모상근이며, 처리시간이 48시간 이내로 짧았기 때문으로 보인다. 또한 모상근의 생장이 거의 완료되고 식물 대사산물의 축적 및 분해 단계인 지수기에 elicitor를 처리하였기 때문인 것으로도 사료된다.

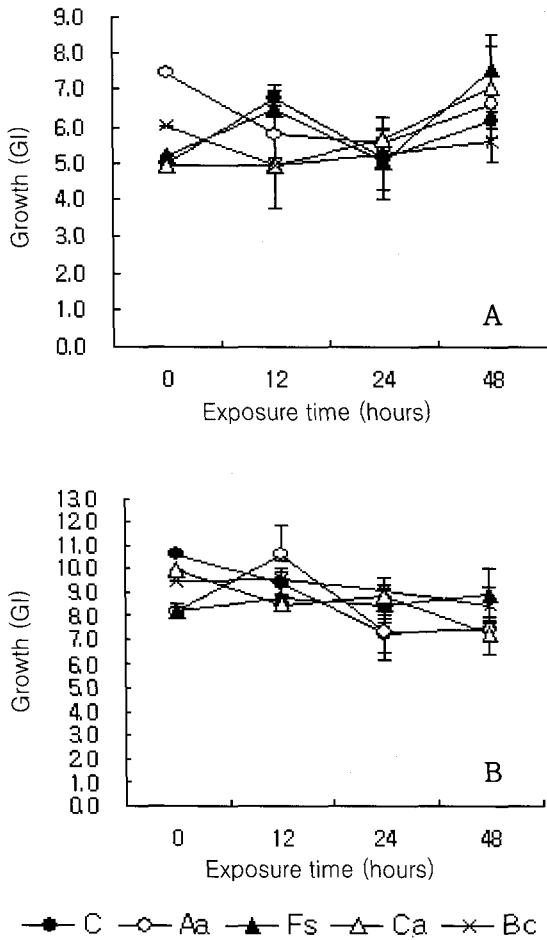


Fig. 2. The effects of supernatant (A) and homogenate (B) biotic elicitors on the growth of *S. parviflora* hairy roots. C, control; Aa, *A. alternata*; Fs, *F. solani*; Bc, *B. cinerea*, and Ca, *C. albicans*.

3. TA 생산성에 미치는 supernatant의 영향

여러 elicitor supernatant 처리는 대조구에 비해 물질 생산성을 증가시켰으며, elicitor의 종류에 따라 다른 양상을 보였다 (Fig. 3). 물질 생산성은 전반적으로 supernatant 처리시간이 경과하면서 증가하였다. 그러나 같은 처리구에서 scopolamine과 hyoscyamine 생산은 일치하지 않았다. 4종의 elicitor supernatant 중에서 scopolamine 생산에 효과적인 elicitor로는 *C. albicans*로 나타났다. Scopolamine은 *C. albicans* supernatant 처리 24시간만에 대조구보다 2.2배 이상 증가하였다 (Fig. 3A).

Hyoscyamine 생산 역시 각 처리구간 함량변이가 심하였으며, 대조구와 비슷하거나 약간 증가되었다. *A. alternata*와 *B. cinerea* supernatant 처리는 처리 24시간에 대조구보다 1.25 및 1.50배 각각 증가되었으나, 이후 48시간에 대조구와 비슷한 수준으로 감소하였다 (Fig. 3B).

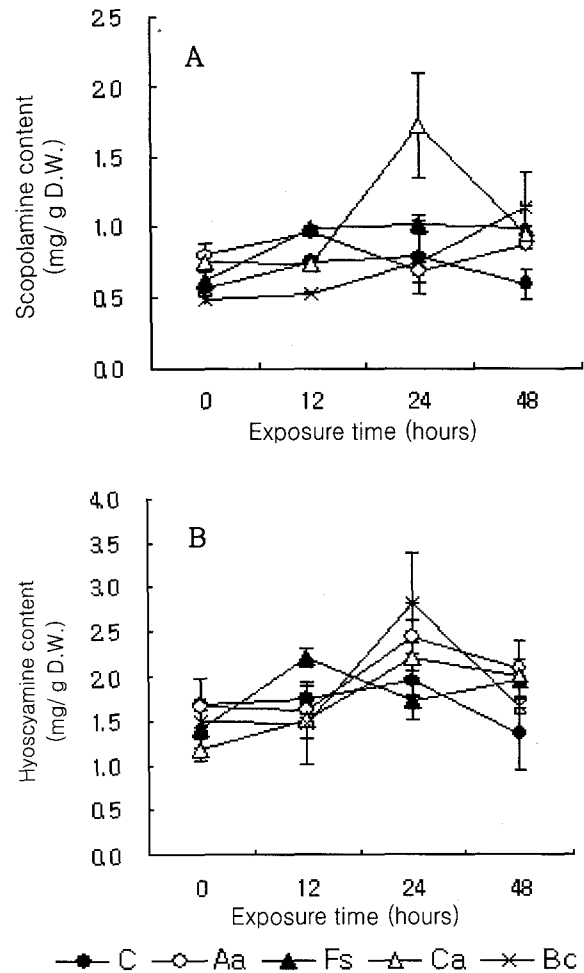


Fig. 3. The effects of supernatant biotic elicitors on scopolamine (A) and hyoscyamine (B) content. C, control; Aa, *A. alternata*; Fs, *F. solani*; Bc, *B. cinerea*, and Ca, *C. albicans*.

4. TA 생산성에 미치는 homogenate의 영향

4종의 elicitor homogenate를 처리하였을 때, scopolamine 생산에 효과적인 elicitor는 *C. albicans*로 나타났다 (Fig. 4A). Homogenate 처리 직후인 0시간에 대조구와 각 elicitor 처리구간의 scopolamine 함량은 거의 같았으나, 처리 시간이 증가함에 따라 *C. albicans* 처리구는 점차 증가하였다. Homogenate 처리 24시간에는 대조구에 비해 1.42배 까지 증가하였으며, 처리 48시간 후에는 24시간과 비슷하게 유지되었다. 그러나 다른 3종의 fungal homogenate는 오히려 대조구보다 scopolamine 생산이 낮게 나타났다. 이들 처리구는 처리 직후 비슷하게 나타났던 scopolamine 함량이 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 보였다. 그러나 *F. solani*, *A. alternata* 및 *B. cinerea*는 scopolamine 생산에 그다지 효과가 없었다.

Hyoscyamine 생산에 있어서는 각 처리구간 함량차이가 심하였으나, 전반적으로 처리 24시간까지 대조구보다 높은 함량을 보였으며, 이후 48시간에는 모두 대조구보다 함량이 낮았다 (Fig. 4B). Hyoscyamine 생산에 가장 적합한 elicitor로는 scopolamine 생산에 효과적이었던 *C. albicans*로 나타났으며, 처리 24시간에 가장 높은 함량을 보였다. *F. solani* 또한 비교적 hyoscyamine 생산에 적합하였고, 처리 24시간에 가장 높은 함량을 보였다. 그러나 *A. alternata*와 *B. cinerea*는 대조구와 비슷한 결과를 보였다. 처리 48시간 후에는 모든 elicitor 처리구에서 함량이 급격히 감소하여 대조구보다 낮게 나타났다.

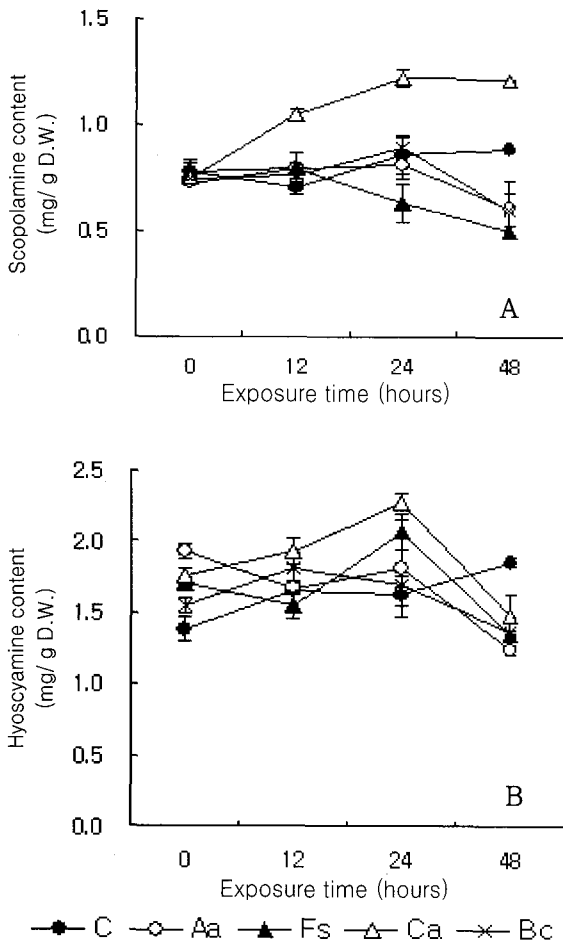


Fig. 4. The effects of homogenate biotic elicitors on scopolamine (A) and hyoscyamine (B) content. C, control; Aa, *A. alternata*; Fs, *F. solani*; Bc, *B. cinerea*, and Ca, *C. albicans*.

Elicitation은 식물의 기내배양에서 이차대사산물의 생성 기간을 단축시킬 수 있을 뿐 아니라 대조구보다 다량의 대사물을 생산할 수 있다. 본 연구에서도 구명된 elicitor는

미치광이풀 모상근 배양에 있어 이차대사산물의 생산성을 단시간에 증가시킬 수 있었다. 그러나 elicitation에 따른 물질 생산성 향상에 있어 작용기작에 대해서는 그다지 밝혀지지 않았다. 특히 본 연구에서와 같이 물질생산성을 증진시킨 elicitor의 supernatant나 homogenate는 단일물질이 아닌 구성성분이 다양하기 때문에 구체적인 작용 기작이 복잡할 것으로 추정되며, 특정 성분 구명 등 보다 자세한 연구가 요망된다.

Elicitor는 그것의 조제형태에 따라서도 성장 및 물질함량의 변이를 보이는 것으로 알려져 있다. Zhao *et al.* (2001)은 일일초 (*Catharanthus roseus*) 현탁 배양물에 12종의 곰팡이 elicitor 중 homogenate를 처리하였을 때 대부분이 물질생산성이 증가되었으나, supernatant 처리는 5종의 elicitor만이 물질 생산성을 증가시켰다고 하였다. Elicitor는 식물 세포와 개체간의 종 선택성이 존재하며, 특히 병원성 fungal elicitor는 병원균과 식물 세포 사이의 선택성이 이차대사산물 생산에 중요하게 관여한다. Wang *et al.* (2001)은 Taxol (paclitaxel) 생산에 있어 주목 (*Taxus chinensis*)에 내생하는 곰팡이인 *Aspergillus niger*를 수피 내부에서 분리하여 elicitor로 사용한 결과 생산성이 증가하였다고 보고한 바도 있다.

물질 생산성 증진을 목적으로 배양에 첨가되는 elicitor는 기본적으로 식물세포에 해를 주지 않으면서도 조제가 용이하여야 한다. 이러한 관점에서 본 연구에서 가장 효과적이었던 *C. albicans*는 tropane alkaloids 생산에 적합한 elicitor라 할 수 있다. Fungal elicitor의 경우 배양시 wall growth, 느린 성장과 elicitor 조제의 복잡성 등의 이유로 elicitor로서 효율적이지 못하다. 그러나 본 연구에서의 효과적인 효모 elicitor는 비교적 빠른 성장과 wall growth를 형성하지 않고 자라기 때문에 매우 효율적인 elicitor로 사료된다. 본 저자들은 이전의 연구에서 bacterial elicitor를 처리하여 tropane alkaloids 생산성 증가를 보고한 바 있다 (Jung *et al.*, 2003). 그러나 생산성을 증진시켰던 bacterial elicitor는 고압멸균하지 않은 상태로 첨가하였을 때만 효과가 있었고, 고압멸균하여 처리하였을 때는 효과를 보이지 않았다. 그러나 본 연구에 사용된 *C. albicans*는 고압멸균하여 처리하였을 때 효과를 보이고, 성장 저해도 일어나지 않았기 때문에 매우 효과적인 elicitor라 할 수 있다.

더 나아가 elicitation 기법에 다른 배양공학적 기법을 도입함으로써 elicitor 단독 처리구보다 생산성을 더욱 증가시킬 수 있을 것이다. 즉, *in situ* extraction법 등 기타 배양법을 병용하였을 때 물질생산의 효율을 증진시킬 수 있을 것이다. 향후의 연구는 물질생산에 관여하는 단일물질의 동정과 작용기작에 관한 연구를 수행할 예정이며, bioreactor

를 이용한 대량배양에 elicitor를 적용하여 물질생산성을 증진할 예정이다. 본 연구 결과는 미치광이풀 모상근 배양을 통한 tropane alkaloids 생산에 기여할 것이다.

적 요

미치광이풀의 모상근 배양에 의해 의학적으로 중요한 물질인 scopolamine과 hyoscyamine 생산을 증진시키기 위해 3종의 곰팡이와 1종의 효모 유래의 생물학적 elicitor를 supernatant와 homogenate의 형태로 처리하였다. Elicitor 중 *Candida albicans*는 supernatant와 homogenate 모두 scopolamine 생산성을 증가시켰다. *Fusarium solani*의 homogenate와 *C. albicans*의 supernatant 처리로 hyoscyamine 함량이 증가되었다. 그러나 나머지 fungus strain도 대조구에 비해 tropane alkaloids의 생산을 다소 증가시켰다. 본 연구에서는 *C. albicans*가 tropane alkaloids 생산에 적합한 elicitor임으로 구명되었다. 본 연구 결과는 미치광이풀 모상근 대량배양에 의한 tropane alkaloids 대량생산에 기여할 것이다.

사 사

본 연구는 경상대학교 농업생명과학원 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사한다.

LITERATURE CITED

Collins-Pavao M, Chin CK, Pedersen H (1996) Taxol partitioning in two-phase plant cell cultures of *Taxus brevifolia*. J. Biotechnol. 49:95-100.

Eilert U, Kurz WGW, Constabel F (1985) Stimulation of sanguarine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors. J. Plant Physiol. 119:65-76.

Funk C, Gugler K, Brodelins P (1987) Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor).

Phytochem. 26:401-405.

Hashimoto T, Yun DJ, Yamada Y (1993) Production of tropane alkaloids in genetically engineered root culture. Phytochem. 32:713-718.

Jung HY, Kang MJ, Kang YM, Yun DJ, Bahk JD, Chung YG, Choi MS (2002) Optimal culture conditions and XAD resin on tropane alkaloid production in *Scopolia parviflora* hairy root cultures. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 17:525-530.

Jung HY, Kang SM, Kang YM, Kang MJ, Yun DJ, Bahk JD, Yang JK, Choi MS (2003) Enhanced production of scopolamine by bacterial elicitors in adventitious hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. Enzyme Microb. Technol. 33:987-990.

Kamada H, Okamura N, Satake M, Harada H, Shimomura K (1986) Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. Plant Cell Rep. 5:239-242.

Kargi F, Rosenberg MZ (1987) Plant cell bioreactors : present states and future trends. Biotechnol. Prog. 3:1-8.

Leon J, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ (2001) Wound signalling in plants. J. Exp. Bot. 52:1-9.

Pitta-Alvarez SI, Spollansky TC, Giulietti AM (2000) The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Enzyme and Microb. Technol. 26:252-258.

Roberts SC, Shuler ML (1997) Large-scale plant cell culture. Curr. Opin. Biotechnol. 8:154-159.

Wang C, Wu J, Mei Z (2001) Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55:404-410.

Yamada Y, Tabata M (1997) Plant biotechnology of tropane alkaloids. Plant Biotechnol. 14:1-10.

Zabetakis I, Edwards R, Hamilton JIG, O'Hagan D (1998) The biosynthetic relationship between littorine and hyoscyamine in transformed roots of *Datura stramonium*. Plant Cell Rep. 18:341-345.

Zhao J, Zhu WH, Hu Q (2001) Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture. Enzyme Microb. Technol. 28:666-672.