

## *Aloe vera* L.로부터 캘러스의 유도 및 배양

김명욱<sup>1</sup> · 이신영\*

<sup>1</sup>(재)경북해양바이오산업연구원, 강원대학교 생물공학과

### Induction and Cultivation of Callus from *Aloe vera* L.

Myung-Uk Kim<sup>1</sup> and Shin-Young Lee

<sup>1</sup>Gyeongbuk Institute for Marine Bioindustry

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University

#### Abstract

A callus formation from *Aloe vera* L. was induced, and the tissue cultivation of induced callus was investigated. As a result of using a combined growth factors kinetin and NAA (or 2,4-D) varying from 0.5 to 30  $\mu$ M and 3% sucrose in MS solid medium, the callus grew better than using either kinetin or auxins alone. Supplementation of 2,4-D in the combined growth factor formulation showed an enhanced callus growth. The maximum callus growth occurred when kinetin 5  $\mu$ M and 2,4-D 30  $\mu$ M were added in the MS medium. The optimal culture conditions for the callus growth were 25°C, pH 5.5 and 8-10 weeks of cultivation, yielding callus weight of 11.03 mg/aloe tissue (0.5 cm<sup>2</sup>). Water or ethanol (60%, v/v) extracts from Aloe callus contained the bioactives contents of fresh *Aloe vera* gel such as glucomannan, and the level of total phenolics content was much higher than that of *Aloe vera* whole leaf, suggesting the possibility as an alternative production method of *Aloe vera* bioactives.

**Key words:** *Aloe vera* L., callus induction, tissue culture, bioactives, glucomannan

## 서 론

알로에는 식물분류학상 백합과에 속하는 상록의 다년초이다(Reynolds and Dweck, 1999). 다육질의 열대 식용 및 약용작물로 대표적인 CAM(Crassulacean Acid Metabolism) 식물의 하나이며, 건조에 대한 내성이 매우 강하다(Bharucha and Joshi, 1957; Denius et al., 1972; Kluge et al., 1979).

이들 알로에는 열대 및 아열대 지방에서 자연상태로도 잘 번식되지만 재배기간은 3-5 년이나 되어 매우 길고, 또 그 번식속도도 매우 느리다.

따라서 현재 전 세계적인 알로에 잎의 생산은 그의 산업적 요구도를 충족시키기에는 공급이 부족한 상황이다(Aggarwal and Barna, 2004). 또한, 알로에는 대부분 옹성 불임으로 종자번식을 못하므로 잎이나 선단부위를 잘라서 삽목번식에 의해 여러번 pruning하여 3-5 년간을 키우는데, pruning의 횟수에 따라 성분의 변화가 심하여 상업적인 균

일한 품질의 확보가 매우 어려운 상황이다(Chausser-Volfson and Gutterman, 2004).

이러한 재배방법에 부가하여 산지나 수확시기 및 수확 후 알로에의 취급법, 사용부위, 가공방법 및 안정화 방법 등에 따라서도 품질의 차이가 현저하므로, 고품질의 균일한 식물체로서의 상업적인 요구도를 충족시키기 위한 각종의 검토가 필요한 실정이다. 특히, 현재 제주도 및 거제도 등에서 널리 재배되고 있는 국내산 *Aloe vera*와 *Aloe arborescens* 종의 경우, 열대식물이므로 동절기의 재배에 너지 소비가 높아 비경제적이다. 또, 지역, 계절, 재배조건 및 수확시기별로도 품질의 변화가 있어 이에 대한 대책강구도 절실한 실정이다.

지금까지의 연구에 의하면 알로에는 200 여 종의 광범위한 범위의 성분을 포함하지만 종에 따라 95-99%는 물이므로 유효 고형분의 함량은 매우 낮다(Grindlay and Reynolds, 1986; Reynolds and Dweck, 1999). 특히, 대표적인 종인 *Aloe vera*의 경우, 겔의 수분함량은 99.5%로 고형분 함량이 0.5%에 불과하며, 다시 유효성분인 아세틸화된 다당의 함량은 고형분의 10-30%에 불과하므로 알로에 기반의 기능성 제품화를 위해서는 유효 다당함량의 획기적인 증가나 수율의 향상이 매우 중요하다.

따라서 알로에의 일반적 품질 및 치료적 성질의 지표가

\*Corresponding author: Shin-Young Lee, Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Tel: +82-33-250-6273; Fax: +82-33-243-6350

E-mail: sylee@kangwon.ac.kr

Received July 23, 2012; revised August 22, 2012; accepted August 23, 2012

되는 유효 다당성분의 양과 질을 최대화할 수 있는 효율적이고 적절한 알로에 가공공정의 기술개발이 필요하나, 이러한 효율적 가공법의 개발은 기술적 한계가 있고 몇몇 방법에 제한되었다.

그러므로 보다 근원적인 문제점의 해결을 위해서는 알로에의 전통적인 식물 육종법에서 제한되는 여러 요인을 극복할 수 있는 기술이 필요하다. 통상, 식물의 조직배양은 그 동안 이러한 요구를 충족시킬 수 있고, 가장 적합하게 이용될 수 있는 기술수단의 하나로 제안되었으며, 최근 많은 발전이 이루어졌다.

특히, 식물조직배양은 micropropagation, 체세포 유도, transgenic plant의 재생 등에 이용되었으며, 세포 및 조직배양은 이미 생산성 향상에 상당한 기여를 하는 등 미래의 잠재성이 매우 큰 실정이다(Brown and Thorpe, 1995; Akin-Idowu et al., 2009).

그 동안 알로에의 조직배양 관련 연구는 몇몇 연구자들에 의해 보고되었는데, callus 배양은 *Aloe saponaria*(Yagi, 1983), *Aloe bellatura*(Konishi and Amano, 1985), *Aloe barbadensis*(Sanchez et al., 1988; Natali et al., 1990; Cho and Shim, 1997; Aggarwal and Barna, 2004) 및 *Aloe arborascens*(Kawai et al., 1993)에 대해 이루어진 바 있다.

하지만 알로에의 경우 폐쇄성 물질의 분비로 세포 사멸율이 높아 제한성을 보였으며(Vanisree and Tsay, 2004), 주로 식물체 종묘 대량 생산을 위한 현탁배양 확립의 재료나 장기간 배양 등의 안정성 때문에 stock으로 이용되었고, 화학물질 생산의 수단으로는 사용되지 않았다.

또, 이들 callus는 완전한 식물체와는 달리, 주로 대부분이 다당류로 이루어진 1 차 세포벽을 갖는 세포로 구성된 균일계를 나타내어 다당류의 합성에도 매우 생산적임에도 불구하고 이의 연구는 매우 미미한 실정이다(Talmadge et al., 1973; Chukwujekwu et al., 2002).

따라서 이러한 다당이나 2 차 대사산물 생산의 수단으로서의 알로에 callus 배양은 *Aloe saponaria* callus의 열수 추출물 유래 다당의 특성보고(Baek et al., 2009)만 있을 뿐 알로에 베라 중에 대해서는 이루어진 바 없다.

본 연구에서는 효율적인 알로에 다당 생산의 일환으로 *Aloe vera*의 callus를 유도하였고, callus 배양의 최적 배지 조성 및 배양조건을 검토하였으며, callus의 다당생산 가능성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에 사용한 알로에는 (주)김정문 알로에의 제주농장에서 재배한 3 년생의 알로에 베라(*Aloe vera* Linne)로 농장으로부터 직접 제공받아 4°C의 저온실에 보존하면서 실험에 사용하였다.

### 알로에 세척 및 치상

3 년생 *Aloe vera*를 흐르는 물에 깨끗이 세척하고, Tween 80(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)을 2-3 방울 첨가한 증류수에서 20 분 동안 교반하였다. 다시 70% 에탄올 수용액에 넣어 1분간 살균처리 하였고, 1% sodium hypochlorite(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) 1 L 수용액에서 30분간 교반한 다음 클린벤치 내에서 멸균된 증류수로 4 회 반복 세척하였다.

햇빛에 노출되지 않아 흰색을 띠며, 잎의 다른 부위에 비해 조직이 무르고 줄기와 접하는 안쪽 잎 부분을 0.5 cm로 떼어내어 치상하였으며, callus 유도배양의 재료로 사용하였다.

### 알로에의 callus 배양

*Aloe callus* 유도를 위한 배양배지는 통상 식물의 조직을 배양하는데 널리 사용되는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 배지(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)를 기본배지로 하여 여기에 3%의 당(sucrose)과 0.8%(w/v)의 환천을 첨가하였고, 식물성장 조절제로서 kinetin(Sigma Chemical Co.) 5 μM 및 NAA(α-naphthalene acetic acid, Sigma Chemical Co.) 또는 2,4-D(2,4-dichlorophenoxy-acetic acid, Sigma Chemical Co.)의 첨가량을 0.5-30 μM 범위 내에서 조정하여 사용하였다. 이때, pH는 1 N NaOH 용액으로 4.5-6.5 범위에서 조절하였고, 15-35°C의 dark room에서 배양하여 callus를 유도하였다. 현탁배양은 알로에의 callus 배양으로부터 유도한 callus를 무균적으로 파쇄한 후, 이를 callus 배양의 최적배지로 선정한 2,4-D 30 μM(또는 NAA 30 μM), kinetin 5 μM 및 sucrose 3%를 첨가한 MS 기본 배양액(pH 5.5) 40 mL를 함유한 100 mL의 플라스크에 접종하고, 25°C의 암소에서 100 rpm으로 진탕하면서 2 주간 배양하였다. 이 때, callus 생장을 측정은 현탁배양 세포의 건조중량(dry cell weight)으로 측정하였다. 즉, 현탁배양액을 여지(Whatman No.1 paper)로 여과한 후의 fresh cell을 70°C의 건조오븐에서 24 시간 건조 후 건조세포무게로 측정하였다.

### Callus 추출물 및 시료의 조제

*Aloe callus*의 추출은 다음과 같이 용매(냉수 및 에탄올) 추출하였다. 즉, callus의 건조분말 시료 20 g을 cold water 및 60% ethanol 용액 200 mL에서 각각 실온으로 2 시간동안 2 회 반복 추출하였다. 추출액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리(Super 25 K, Hanil Science Co., Ltd., Incheon, Korea)하였으며, 상등액을 회전진공농축기(Eyela Co., N-N Series, Tokyo, Japan)로 70°C에서 1/3 정도로 농축하였다. 이를 동결건조(Ilshin Lab. Co., Yangju, Korea: 0.5 torr, 72 시간)하고 밀봉하여 desiccator에 보관하였고 실험 시 증류수에 녹여서 사용하였다.

Callus 추출물의 분석

Callus 추출물의 glucomannan,, 페놀성화합물, 플라보노이드 및 환원당 함량을 각각 Ebarandu et al.(2005)의 비색법, Bray & Thorpe(1954)의 총 페놀함량 측정법, Parthasarathy et al.(2009)의 총 플라보노이드 함량 측정법 및 Miller et al.(1959)의 DNS(dinitrosalicylic acid) 법에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

알로에 callus 유도의 최적 부위 선정

*Aloe vera*로부터 callus 유도의 최적 부위를 선별하기 위하여 알로에 잎의 하단에서부터 5 cm씩 잘라 치상하고 유도된 callus의 무게를 5 회 반복 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다.

알로에 잎의 하단에서 5 cm 사이(inferior leaf)의 부위에서 callus양이 가장 높았으며, 위쪽으로 갈수록 callus양이 감소하는 것으로 확인되었다. 잎 하단의 5 cm 사이 부위는 stalk 부위와 접하는 부위로, 햇볕에 노출되지 않아 흰색을 띄며, 잎의 다른 부위 비해 무른 특징을 갖는데, Cho & Shim(1997)도 알로에의 superior, middle 및 inferior leaf로부터의 callus 형성 실험결과, 이 inferior leaf 부위에서 callus가 가장 왕성하게 형성됨을 보고한 바 있다.

Kawai et al.(1993)은 *Aloe arborascence*의 조직배양에서 상부 줄기에서 callus 형성이 가장 높았는데 이 부위의 핵이 가장 풍부하고, 또 핵분열이 높다고 하였다.

본 실험의 경우도 Fig. 2에서 보는 바와 같이, 하부 줄기에서 가장 핵이 풍부하여 Fig. 1의 결과와 잘 일치하였다.

Sanchez et al.(1988) 및 Cavallini et al.(1993)도 핵 함량 및 DNA 함량이 callus 형성에 중요한 역할을 한다고 하였다.

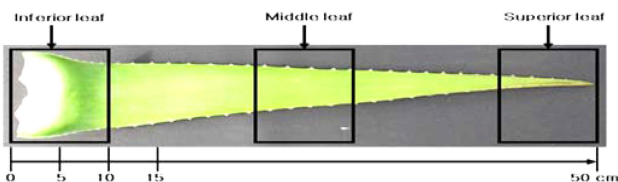
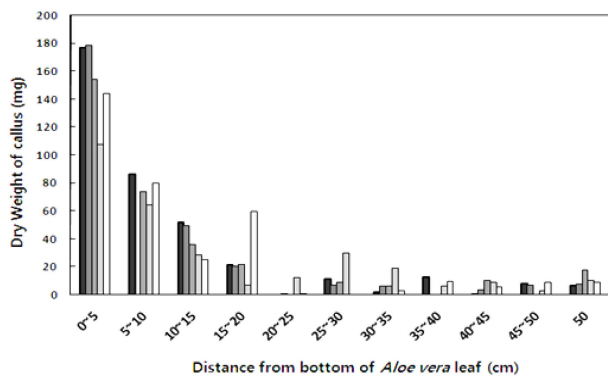


Fig. 1. Leaf site for the induction of callus and dry weight of callus at different distances from bottom of *Aloe vera* leaves.

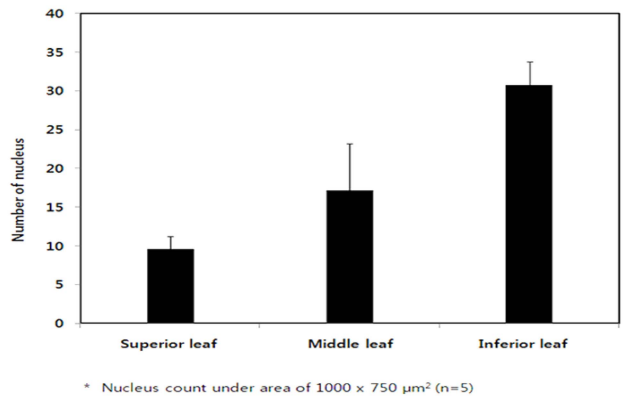
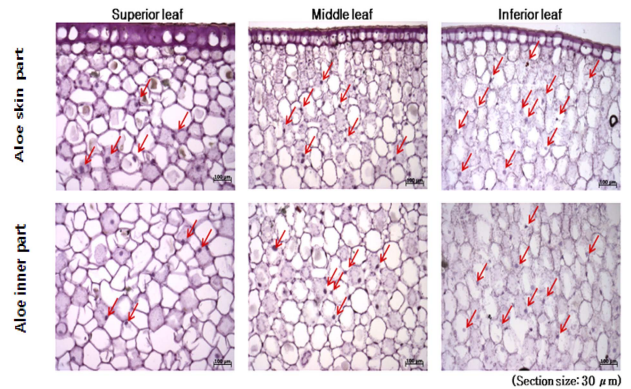


Fig. 2. Hematoxylin and eosin stained specimens of *Aloe vera* leaf and number of nucleus from superior, middle and inferior leaves of *Aloe vera* L. Arrow(→) represents nuclei.

한편, Fig. 3은 알로에로부터 callus의 형성 및 형성된 callus 외관과 색택의 사진이다. 사진에서 보는 바와 같이, 유도된 callus는 백색, 황색 및 갈색의 3 가지 색깔을 띄었으며, 이 중 갈색의 callus 생육이 가장 높았다. 따라서 이 갈색의 callus를 선정하여 이하의 실험에 사용하였다.

Callus 배양의 최적 배지 조성

Callus 유도에서 배지성분은 매우 중요하며, 특히 성장조절제는 가장 중요한 인자이다. 통상, 이들 성장조절제로는 단일의 cytokinin류나 auxin류 만을 요구하는 것이 아니고 이들 두 가지 모두를 요구하는 경우도 있어 충분한 검토가 필요하다.

Cytokinin류는 핵산을 구성하는 염기중의 하나인 아데닌(adenine)의 유도체로서 세포의 분화상태에 따라 다르다. 따라서 분열하지 않는 세포에서는 세포증식을 촉진하는 효과가 있으나 왕성하게 분열하는 성장점 세포에서는 분열을 억제한다. 가장 널리 사용되는 키네티(kinetin)은 식물의 세포분열을 촉진하는 호르몬으로 눈의 형성을 유도, 잎의 성장촉진과 노화 지연, 광발아종자가 암흑 속에서의 발아촉진 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

한편, auxin은 인돌아세트산(IAA)으로 트립토판으로부터 합성되는데, callus 부정근의 분화 발달촉진을 야기하는

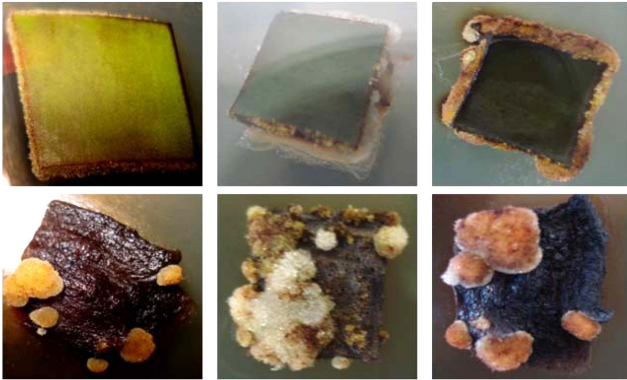


Fig. 3. Callus formation and their appearance colors from explants of *Aloe vera* L.

auxin류로는 NAA, 2,4-D 등이 잘 알려져 있다.

따라서 이들 kinetin(3-7  $\mu$ M), NAA 및 2,4-D(3-7  $\mu$ M)의 농도별 callus 성장률을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 4와 같다.

먼저, kinetin의 농도별 callus 성장률은 3  $\mu$ M로부터 5  $\mu$ M의 농도까지 서서히 증가하였으나 이 이상의 6 및 7  $\mu$ M에서의 성장률은 거의 미미하여 5  $\mu$ M을 최적 농도로 결정하였다.

다음, auxin류의 농도별로 callus 성장률을 보면, NAA 및 2,4-D 모두 시료간의 많은 차이를 보이지 않으며 30  $\mu$ M 농도 이상에서는 그 이하의 20 및 25  $\mu$ M 농도보다 더 좋은 callus의 성장률을 보였다. 특히, 이들 농도 이상에서도 성장률의 큰 증가 없이 서로 비슷한 성장률을 나타내었으므로 두 시료의 최적 첨가농도는 30  $\mu$ M로 결정하였다.

하지만 2,4-D와 NAA의 callus 성장률은 각각 9.9 및 9.4 mg/aloe tissue(0.5  $\text{cm}^2$ )로 2,4-D에서 다소 더 우수한 성장률을 보였으므로 2,4-D 첨가를 auxin류로 선정하였다. Otsuji et al.(1995)은 식물세포배양에 의한 다량 생산에서 고농도 2,4-D와 mineral salt의 첨가는 배지점도를 감소시켜 생산성을 향상시킨다고 하였다.

한편, 일반적으로 단자엽식물은 auxin류 만을 요구하나 cytokinin과 auxin의 두 가지 모두를 요구하는 경우도 있으므로 이들의 혼합사용 시 callus 성장률을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 5와 같다.

NAA만을 단독으로 사용한 경우의 callus 성장률은 9.40 mg/aloe tissue(0.5  $\text{cm}^2$ )이었으나 kinetin과 NAA를 혼합 사용한 경우의 callus 성장률은 11.97 mg/aloe tissue(0.5  $\text{cm}^2$ )으로 혼합사용 시 callus 성장률이 약 27%나 더 향상되었다.

또한 2,4-D만을 단독 사용한 경우의 callus 성장률과 kinetin과 2,4-D를 혼합사용한 경우의 callus 성장률은 각각 9.90 및 12.47 mg/aloe tissue(0.5  $\text{cm}^2$ )으로 역시 혼합사용 시 callus 성장률이 약 27% 더 우수하였다. 특히, kinetin/2,4-D 혼합사용시 성장률 값[12.47 mg/aloe tissue (0.5  $\text{cm}^2$ )]은

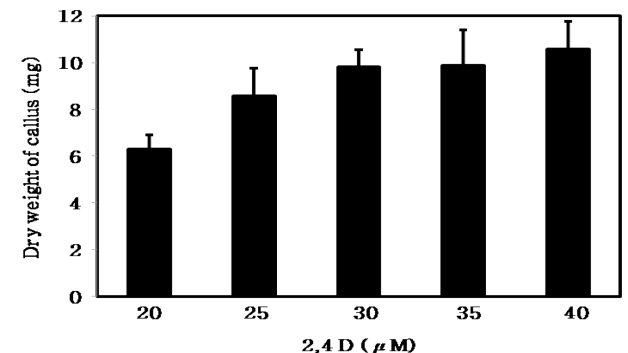
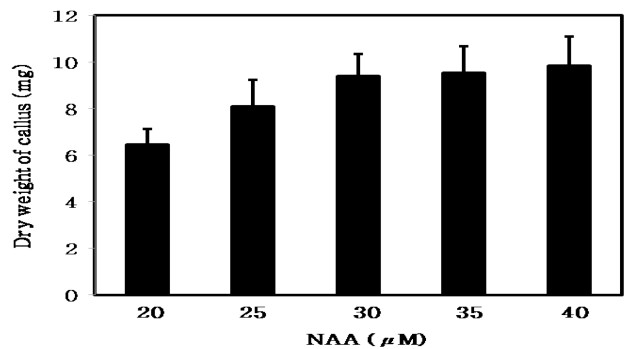
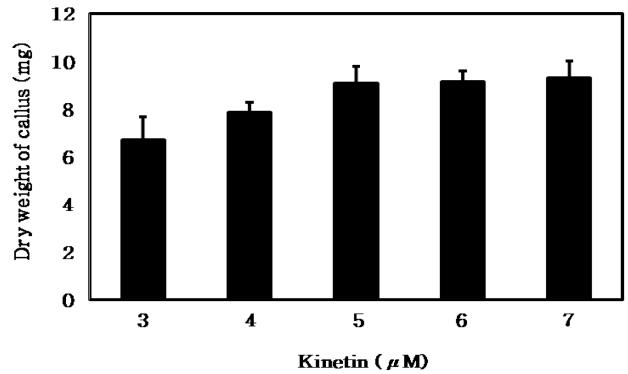


Fig. 4. Effect of kinetin, NAA and 2,4-D with different concentrations on dry weight from *Aloe vera* callus.

kinetin/NAA의 callus 성장률 값[11.97 mg/aloe tissue(0.5  $\text{cm}^2$ )]보다 다소 높았으므로 kinetin/2,4-D의 혼합사용이 callus 성장에 가장 우수한 것으로 판단하였다.

따라서 이하의 callus 배양에서는 최적 배지조성으로 5  $\mu$ M의 kinetin과 30  $\mu$ M의 2,4-D를 혼합하여 callus를 유도하였다.

### Callus 배양의 최적 배양조건

Callus 유도를 위한 최적 배양온도를 측정하기 위해서 최적 배지조성으로 나타난 MS 기본배지, 3% 당(sucrose: w/v), 0.8% 한천(w/v), 5  $\mu$ M kinetin 및 30  $\mu$ M의 2,4-D를 포함하는 배지를 제조한 후, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C 및 35°C에서 callus 성장의 최적온도를 측정하였다.

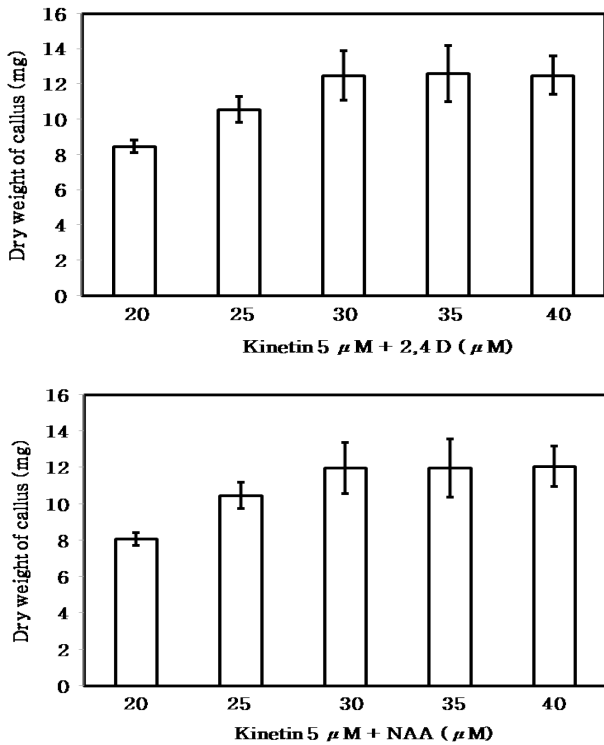


Fig. 5. Effect of mixtures of auxin(NAA or 2,4-D) and kinetin on dry weight from *Aloe vera* callus.

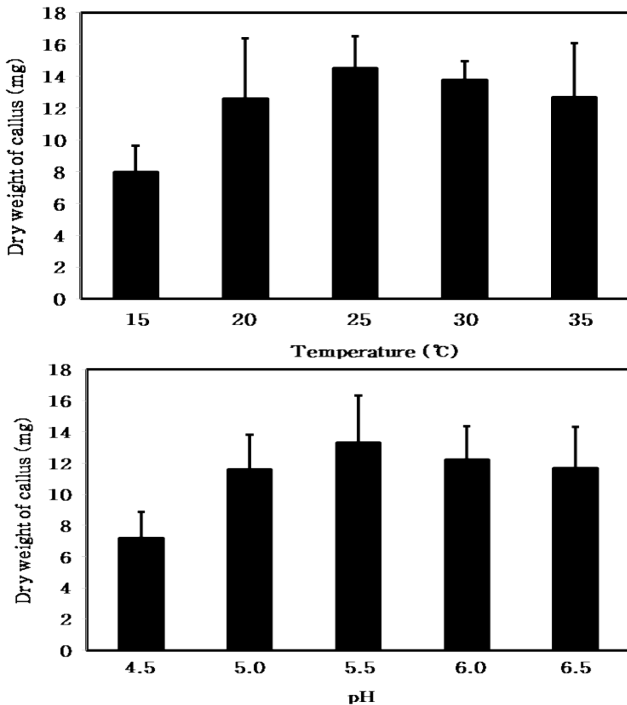


Fig. 6. Effect of temperature and pH on growth(dry weight) from *Aloe vera* callus.

그 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이, 25°C에서 14.50 mg/aloë tissue(0.5 cm<sup>2</sup>)으로 가장 우수한 callus 성장률을 나타내

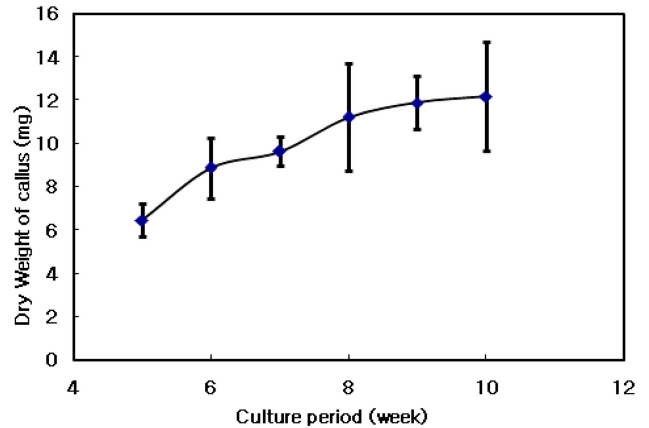


Fig. 7. Variation of dry weight/aloë tissue of 0.5 cm<sup>2</sup> from *Aloe vera* callus.

었고, 최적 pH는 pH 5.5에서 13.30 mg/aloë tissue(0.5 cm<sup>2</sup>)으로 가장 우수한 callus 성장률을 나타내었으므로 최적 pH는 5.5로 하였다.

이상의 최적 배지조성 및 배양조건하에서 5-10 주간 배양하며 1 주 간격으로 callus 무게의 경시변화를 측정하여 최적 배양기간을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 7과 같다.

5 주차부터 callus 성장이 관찰되었으며, 이후 서서히 증가하여 8 주에서 11.21 mg/aloë tissue(0.5 cm<sup>2</sup>)의 성장률을 보였다. 9 주 및 10 주에서도 각각 11.90 및 12.17 mg/aloë tissue(0.5 cm<sup>2</sup>)으로 미미한 증가경향을 보였으나 성장률(기울기값)은 낮아지는 경향을 보였다.

따라서 callus 고체배양의 배양기간은 성장률이 둔화되기 시작하는 8 주가 최적인 것으로 판단되었다.

#### 알로에 callus 추출물의 성분분석

알로에 callus의 알로에 유래 생물활성 성분을 살펴보기 위해 실온에서 2 시간 동안 물 및 에탄올(60%, v/v)로 추출하여 callus의 추출물을 얻었으며 이들 성분을 조사하였다. 즉, *Aloe vera* 잎의 주 활성성분이 되는 glucomannan과 phenolics 등의 성분을 측정하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다.

각 시료 모두 환원당은 거의 함유하지 않았으나 callus로부터 물 및 에탄올로 용매 추출한 추출물의 세포내 다당 함량은 15.4-19.2%(d.b)로, *Aloe vera*의 유효 활성성분인 glucomannan을 함유하였으며 알로에 생잎 겔의 14.7%(w/v)보다 다소 높은 값 범위이었다.

β-1,4-glucomannan은 알로에의 생의학적 활성성분이며, 광범위한 분자크기로 존재하는데, 생잎 겔에서의 β-1,4-glucomannan은 총 다당 함량의 약 1/3이며, 650 mg/L로 매우 낮다(Pugh et al., 2001).

한편, 페놀성 화합물(6.7-7.5%)은 callus의 용매추출 분획에서 *Aloe vera* 잎(1%)보다 훨씬 더 높은 함량을 함유하



**Table 1. Composition of the water or ethanol extracts from *Aloe vera* callus.**

	Percent composition of dry weight (%)			
	Glucomannan	Phenolics	Flavonoid	Reducing sugar
EtOH (60%,v/v) extract	15.4±0.2	7.5±0.6	2.3±0.4	0.01
Water extract	19.2±0.8	6.7±1.7	1.7±0.3	0.01

는 것으로 나타났고, 60%(v/v) 에탄올 추출물(7.5%)이 물 추출물(6.7%)보다 다소 높아 일반적 경향과 잘 일치하였다 (Luta & McAnalley, 2005).

따라서 본 연구의 알로에 callus는 알로에 유효성분의 생산수단으로서의 추가 검토 필요성이 충분한 것으로 판단하였으며, 추후 callus의 현탁배양방법과 같은 효율적 생산방법 연구의 필요성이 높은 것으로 판단되었다.

## 결 론

본 연구에서는 *Aloe vera*의 callus를 유도하고, 이제까지 보고된 바 없는 최대의 callus 생성을 위한 배양조건 및 유효성분 함량을 조사, 검토하였다. 그 결과, *Aloe vera*로부터 callus 유도의 최적 배지조성은 kinetin 5 µM과 2,4-D 30 µM 이었다. 또, callus 배양의 최적 배양조건을 조사한 결과, 배양온도는 25°C, pH는 5.5에서 가장 우수하였고, 최대성장 기간은 8-10 주이었다. 이 때, callus의 성장 무게는 11.03 mg/aloe tissue(0.5 cm<sup>2</sup>)이었다. 또, 본 연구에서 얻은 callus의 물 혹은 에탄올(60%, v/v) 추출물은 알로에의 생물활성성분인 glucomannan, total phenolics 및 flavonoid의 함량이 높아서 알로에 식물로부터의 이들 생산을 대체할 수 있는 새로운 수단으로서의 가능성을 보였다.

## 참고문헌

- Aggarwal D, Barna K. 2004. Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe vera* Linn. J. Plant Biochem. & Biotechnol. 13: 77-79.
- Akin-Idowu PE, Ibitoye DO, Ademoyegun OT. 2009. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. African J. Biotechnol. 8: 3782-3788.
- Baek JH, Kim MU, Kang TS, Hur W, SY Lee. 2009. Polysaccharide characteristics from hot water extract of *Aloe saponaria* callus. KSBB Journal. 24: 59-64.
- Bharucha FR, GV Joshi. 1957. Effect of prolonged darkness on acid metabolism in the leaves of *Aloe Vera* Linn. Science and Culture 22: 389-393
- Bray HC, Thorpe WW. 1954. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. Methods in Biochemical Analysis 1: 27-54.
- Brown DCW, Thorpe TA. 1995. Crop improvement through tissue culture. J. Microbiol. Biotechnol. 11: 409-415.
- Cavallini A, Natali L, Cionini G, Sassoli O, Castorena-Sanchez I. 1993. *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill.: quantitative DNA variation in regenerated plants. Plant Sci. 91: 223-229.
- Chausser-Volfson E, Guterman Y. 2004. Using aloe plants growing in Israel as a source for the cosmetic and medicinal industries and as ornamental plants. Biochemical Systematics and Ecology. 28: 825-828.
- Cho KH, Shim CS. 1997. Mass growing method of Aloes. Korea patent S0133344.
- Chukwujekwu JC, Fennell CW, van Staden J. 2002. Optimization of the tissue culture protocol for the endangered *Aloe polyphylla*. South Afr. J. Botany 68: 424-429.
- Denius HRJr, Homann PH. 1972. The Relation between photosynthesis, respiration, and crassulacean acid metabolism in leaf slices of *Aloe arborescens* Mill. Plant Physiology 49: 873-880.
- Ebarandu AR, Luta, G, Edwards JA, McAnalley BH, Davis B. 2005. Quantitative colorimetric analysis of aloe polysaccharides as a measure of Aloe vera quality in commercial products. J. A.O.A.C. Inter. 88: 684-691.
- Grindlay D, Reynolds T. 1986. The *Aloe vera* phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. J. Ethnopharmacol. 16: 117-151.
- Kawai K, Beppu H, Koike T, Fujita K, Marunouchi T. 1993. Tissue culture of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger. Phytotherapy Research 7: 5-10.
- Kluge MI, Knapp I, Kramer D, Schwerdtner I, Ritter H. 1979. Crassulacean acid metabolism (CAM) in leaves of *Aloe arborescens* mill. Planta 145: 357-363.
- Konishi T, Amano M. 1985. Callus formation in stamens of *Aloe bellatula*. Ann. Tsukuba Bot. Garden 3: 19-26.
- Luta G, McAnalley BH. 2005. *Aloe vera*: chemical composition and methods used to determine its presence in commercial products. GlycoSci Nutr 6: 1-12.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31: 426-428.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantaru 15: 473-497.
- Natali L, Sanchez IC, Cavallini A. 1990. *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill.: Micropropagation from vegetative meristems. Plant Cell Tissue and Organ. Culture 20: 71-74.
- Otsuji K, Honda Y, Sugimura Y, Takei A, Tejima T. 1995. Production of polysaccharides by plant cell culture and their applications to cosmetics. Plant Tissue Culture Letters 12: 8-15.
- Parthasarathy S, Azizi JB, Ramanathan S, Ismail S, Sreenivasan S. 2009. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from *Mitragyna Speciosa* (Rubiaceae Family) Leaves. Molecules 14: 3964-3974.
- Reynolds T, Dweck AC. 1999. *Aloe vera* leaf gel: A review update. J. Ethnopharmacol. 68: 3-37.
- Sanchez IC, Natali L, Cavallini A. 1988. *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill.: morphogenetic ability and nuclear DNA content. Plant Sci. 55: 53-59.

- Talmadge KW, K. Keegstra. Bauer WD, Albersheim P. 1973. The structure of plant cell walls. 1. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol.* 51: 158-173.
- Vanisree M, Tsay HS. 2004. Plant cell cultures-An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering* 1: 29-48.
- Yagi A, Shoyama S, Nishioka I. 1983. Formation of tetrahydroanthracene glucosides by callus tissue of *Aloe saponaria*. *Phytochemistry* 22: 1483-1484.