

## 야생 흰 제비꽃(*Viola patrinii* DC.) callus의 현탁배양 방법이 세포 활성에 미치는 영향

김두현 · 정용모 · 정정한\* · 이 인\*\* · 권오창†

동아대학교 원예학과  
동아대학교 농화학과\*  
인제대학교 기초과학연구소\*\*

## Effects of Suspension Culture Conditions on Cell Activity of Wild Viola(*Viola patrinii* DC.) Callus

Du-Hyun Kim, Yong-Mo Chung, Chung-Han Chung\*, Yeehn Yeeh\*\*, Oh-Chang Kwon†

Dept. of Horticulture† and Dept. of Agricultural Chemistry\*, Dong-A University, Pusan, 604-714, Korea  
\*\*Institute of Basic Sciences, Inje University, Obang-dong 18-3, Kimhae 621-749, Korea

### Abstract

To understand effect of inoculum size, cell density, sucrose concentration and concentrations of MS basal salts on suspension culture and protoplast isolation of wild viola (*Viola patrinii* DC.) callus from petiole segments this experiment was conducted.

In the lot of 30 mesh inoculum size, two observations were obtained ; One was that a considerable increase in the fresh and dry weight of callus was determined. Another was that the callus mass was relatively compact compared with others. A recommendable cell density was 0.4g for 20ml culture medium and the higher sucrose concentration, the higher fresh and dry weight were obtained. The dilution of MS basal salt was differently affected on fresh and dry weight ; the highest fresh weight was found in 1x MS salt, while the highest dry weight was in 1/3x dilution. The addition of casein hydrolysate(3g/L) was more effective to increase of both fresh and dry weight. The contents of protein was great in the inoculum lots with larger inoculum size and higher concentration of MS basal salts containing 3g/L of casein hydrolysate and higher sucrose compared with others.

The greatest protoplasts were isolated from the lot of 10 mesh size treated with 1% pectinase SE-150 and 2% cellulase YC. In general, for optimal protoplast isolation the following conditions were recommended ; 1) Use of smaller cell sizes cultured for 2-5 weeks, and 2) more than 5 hours incubation using the combined mixture of the enzymes with proper concentrations.

*Key words* : *Viola patrinii* DC. callus, cell suspension culture, protoplast

---

† Corresponding author

## 서 론

식물의 유용한 유전 자원의 확보와 종의 다양성을 유지하기 위한 자생 식물의 탐색, 수집, 보존은 시대적 과제로 되어지고 있다. 특히 환경파괴에 의하여 소실되고 있는 자생 식물을 인간의 노력으로 보존, 보호, 개발하여 자원화 및 관상용 식물로 전환 이용하려는 연구가 세계 각 나라들에 의해 광범위하게 수행되어지고 있다.

식물 세포는 전체형성능이 있어 세포를 배양하면 재분화할 수 있다는 Haberlandt<sup>1)</sup>의 예언 이후 지금은 번식이 불가능한 식물의 조직이나 세포를 배양하여 식물체로 분화시키는 연구는 활발히 시도되고 있으며, 식물에 따라 널리 실용화 되고 있다. 그러나, 한천을 첨가한 고체 배지에서 배양한 조직편 및 callus는 세포의 생장이 느리고 callus를 구성하고 있는 유세포의 생리적 상태나 연령이 다양하기 때문에, 현탁상태의 배양 세포보다 기관분화 및 원형질체 분리용으로는 적합하지 못하다. 이는 배양 세포 집단이 단세포군으로 구성되어 있고, 그 단세포도 분화 정도, 크기, 비중 등 생리 조건이 다양하기 때문에 실제 응용면에서는 세포의 현탁배양 방법이 균일한 세포 집단을 배양하기 위해서 널리 이용되고 있기 때문이다. 현탁세포 배양은 세포가 비교적 동질성의 집단으로 이루어져 있고, 균일하고 세포질이 풍부하며 작은 액포로 이루어져 있어 외부로부터 첨가된 화학 물질에 신속하고 균일하게 노출되기 때문에, 생리, 생화학적 연구의 재료로 뿐만 아니라, 세포의 활성이 높아 기관 분화도 높고, 효소의 유도과 유전자 발현, 첨가된 화합물의 대사나 분리 및 돌연변이체의 특성을 조사하는 실험 재료 및 2차 대사의 경로를 연구하는 대표적인 방법으로 이용되고 있다<sup>2,3)</sup>.

이와 같이 분열 활성이 높은 세포로부터 얻은 원형질체는 타식물의 원형질체와 융합하여 새로운 체세포 잡종 식물을 창출할 수 있는 연구 수단으로, 즉 DNA의 도입에 의한 유전적으로 변형된 식물체가 생산되는 기본적인 연구 뿐만 아니라, 세포 기관간에 결합하여 핵 이외의 유전 요소 인자들의 전이를 용이하게 할 수 있다. 그래서 최근에는 고등 식물의 내한성, 내서성, 약제의 내성, 유용물질의 생산, 품종개량 등에 시도되고 있다. 또한 원형질체를 이용한 단세포 배양이나 현탁배양에서 식물에 따라 embryogenesis에 대한 체계화<sup>4,5)</sup>, mass propagation 에 대한 실용적 배양

방법의 정착화가 활용되고 있다<sup>6,7)</sup>. 이 요인 중에는 조직편의 상태, 유전적 소질, 배지의 종류 및 배양 환경 등이 폭넓게 검토되고 있으며, 특히 callus의 크기, 접종량 외에도 회전 배양의 속도, 배양 온도 및 광조건 등의 다양한 요인들에 대해서 분석 검토되고 있다<sup>8-12)</sup>.

그러므로, 본 연구자들은 우리 나라의 자생 야생 제비꽃 중 흰 제비꽃(*Viola patrinii* DC.)을 이용하여 원예 재배용으로 개량하기 위한 여러 가지 기초 연구가 수행되어 졌으며<sup>13,14)</sup>, 본 실험에서는 야생 흰 제비꽃의 엽병조직편에서 얻어진 callus를 다년간 계대배양한 과정<sup>15)</sup> 중 분화능을 소실한 callus를 현탁배양에서 분열 활성 및 분화능이 높은 균일한 세포 집단을 선발하기 위하여 여러 가지 배양 방법 및 환경 등을 검토하였으므로, 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 배양 조건

실험 재료는 1990년 야생 흰 제비꽃(*Viola patrinii* DC.)의 엽병으로부터 callus를 유도하여, 6-8주 간격으로 계대배양으로 증식한 callus mass를 사용하였다<sup>15)</sup>.

Callus 증식 배지는 Murashige & Skoog (MS, 1962)<sup>16)</sup> 기본 배지에 thiamin 1mg/l, Fe-EDTA 78.4mg/l, myo-inositol 200mg/l, 당 30g/l, casein hydrolysate 3g/l, 한천 8g/l를 첨가하여 pH 5.8로 조절하였다. 식물생장조절제로는 NAA  $5 \times 10^{-6}$ M + Kinetin  $5 \times 10^{-7}$ M을 혼용하여 첨가하였고, 배양 온도는  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에 3000lux로 16h/8h (명/암)조건으로 배양하였다. 세포현탁배양은 한천만을 제외 시킨 동일한 액체 배지를 조성하였으며, 배양 온도는  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 16시간 광조건에서 100 xg의 진탕배양기에서 배양하였다.

세포피의 크기에 관한 실험은 10, 20, 25, 30, 40 mesh의 stainless steel망(Sigma, USA)을 통과시켜 생체중 0.4g을 50ml 삼각flask에 3% 당이 첨가된 20ml의 MS기본 배지의 세포현탁배양액에 접종하여 배양하였다.

접종량은 sieve한 callus피 생체중 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8g을 접종하였다.

현탁배양의 적정 밀도를 알아보기 위해 50ml 삼각 플라스크에 배지량을 10, 20ml로 각각하고, 여기에 20mesh stainless steel망으로 분쇄한 세포피를 생체중 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8g씩 접종하였다.

당농도의 영향에 관한 실험은, MS기본 배지에 당 농도를 1, 3, 5, 7, 9%로 하여 각각에 20mesh망으로 분쇄한 세포의 생체중 0.4g씩 접종하였다. 또 MS 무기염의 농도를 달리한 실험에서는 무기염을 1X, 2/3X, 1/3XMS로 희석하였다.

세포의 성장 증식은 생체중과 건물중으로 측정하였고, 건물중은 생체중을 평량한 후 이를 60°C에서 24시간 동안 건조한 다음 건물중을 측정하였다.

**조직학적 관찰**

배양 세포의 조직 관찰을 위해 배양 30일 후, 각 현탁배양 세포를 FAA (Formalin-Acetic-Alcohol)액에 고정하여, 알콜 농도 상승순 과정을 거쳐 탈수시킨 다음, paraplaste (OXFORD, USA, M.P. 56°C)에 매몰시켜 회전마이크로톰 (Anglia Scientific, England)으로 8µm두께의 절편을 만들었다. 염색은 Foster<sup>17)</sup>의 Tannic acid 및 Ferric chloride와 Johensen<sup>18)</sup>의 safranin 및 picric acid의 방법으로 염색한 다음 영구 조직 표본을 만들어 광학현미경(OLYMPUS, BH-2)으로 관찰하였다.

**단백질 추출**

각 처리구가 최고 건물중을 나타낼 때, 생체중 0.2g씩을 채취한 후 액체 질소에 급냉하여 -70°C에 보관해 두었다가 마쇄한 다음, 0.1M potassium phosphate (pH 7.2), 400mM NaCl, 10mM 2-mercaptoethanol 추출 buffer에 넣어 잘 혼합해 4°C에서 30분동안 처리한 후, 15,000 xg에 30분 동안 원심 분리하여 그 상등액을 정량에 사용하였다. 단백질의 정량은 각각 Bradford<sup>19)</sup>에 의해 개발된 dye binding 방법을 사용하였다.

**Protoplast의 분리**

Callus를 각 10, 20, 25, 30, 40mesh로 크기를 동조시켜 20ml의 MS기본 배지에서 현탁배양한 세포를 7일 간격으로 효소 처리를 하였다. 현탁배양된 세포의 생체중 0.2g에 2ml의 효소 용액을 처리하여 protoplast를 분리한 후, 세척액(0.5M mannitol+10mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O)을 이용하여 200 mesh의 nylon망으로 거른 후, 100 xg에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리후 상등액을 조심해서 제거한 다음 1ml의 세척액으로 침전된 protoplast를 서서히 분산시킨 후 protoplast의 수를 조사하였다. 이때 효소는 2% cellulase YC와 1% pectinase SE-150을 단용 및 혼용 처리를 하였

으며, 효소 처리 시간은 2, 5, 7시간으로 하였다. 분리된 원형질체수는 hemocytometer로 측정하여 1.0ml당 protoplast로 환산하였다.

**결 과**

**Mesh의 크기와 배양 세포의 성장**

Callus를 각각 10, 20, 25, 30, 40mesh 별로 sieve하여 0.4g을 MS현탁배지 20ml에 접종하여 배양한 결과는 그림 1과 같다. Mesh의 크기가 10, 20 mesh 일 때 배양 세포는 녹색으로 짙어지며 단단하고 활성이 높았으며, 생체중은 유도기를 지나 배양 15일부터 세포 분열이 활발한 지수기에 들어가면서 30일이 지난 후 부터는 완만한 성장을 나타내면서 정지기에 도달하였다.

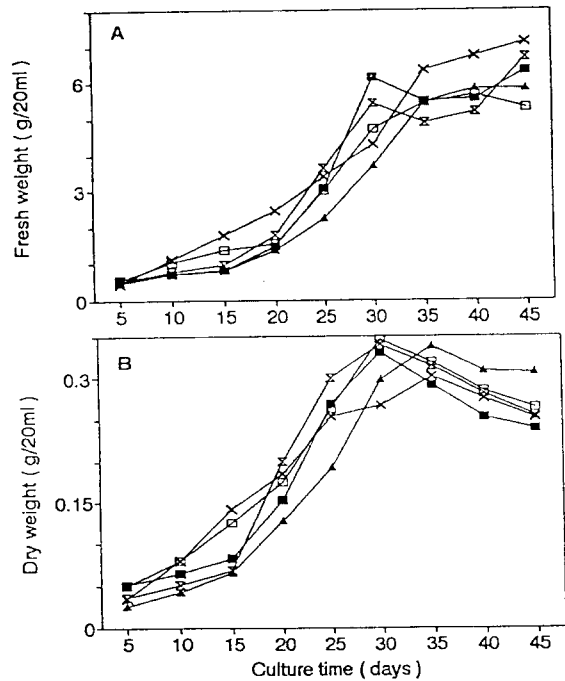


Fig. 1. Effects of inoculum size on growth of Viola cell suspension cultures. (A: Fresh weight, B: Dry weight, ■; 10mesh, □; 20mesh, ▲; 25mesh, ×; 30mesh, ☆; 40mesh)

건물중에 있어서는 배양 20일후 부터 급성장을 하였으며 배양 30일경에 최대치를 나타내었고, 30일 이후로는 감소하였다.

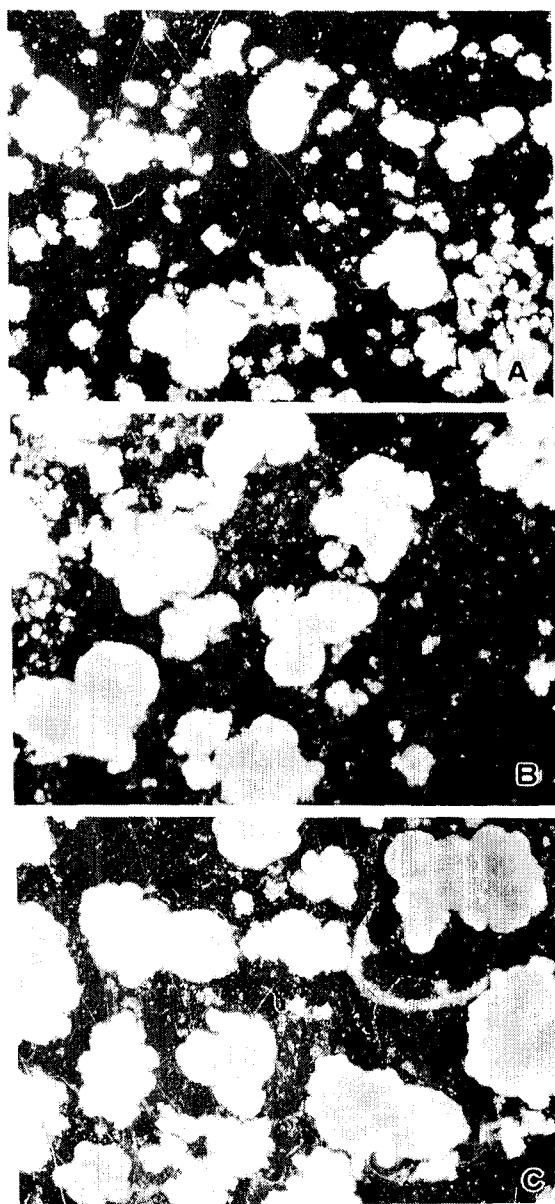


Fig. 2. Light microscopic observation of callus masses. The callus masses were formed from *Viola patrinii* DC. Cell suspension passed through 20 mesh sieve. A ; the callus mass formed after 10 days, B ; after 20 days, C ; after 30 days

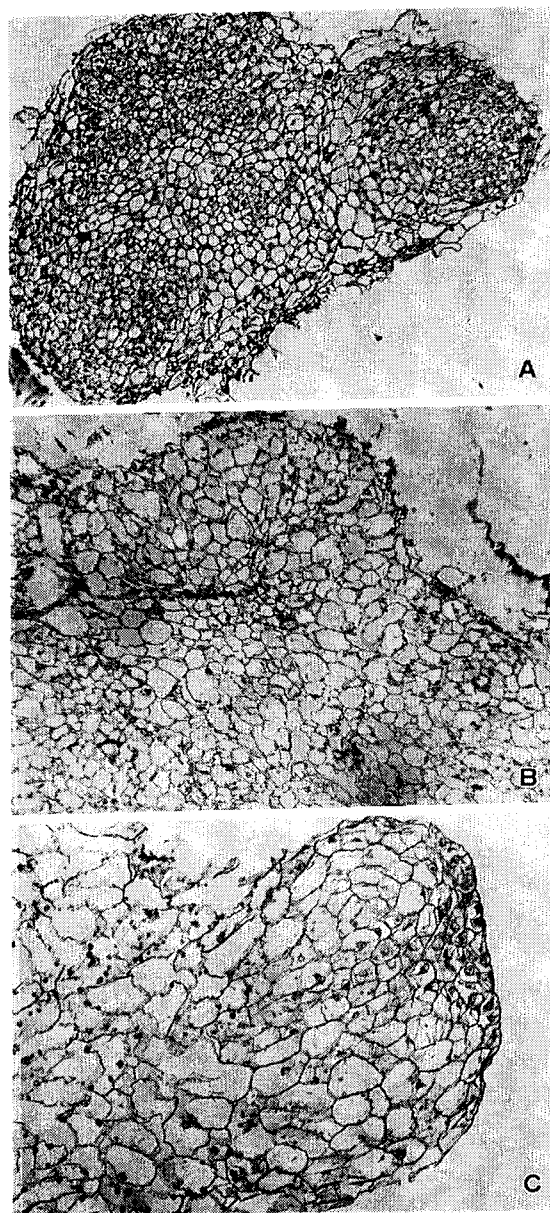


Fig. 3. Histological observation of callus masses. The callus masses were formed from *Viola patrinii* DC. Cell suspension passed through 20 mesh sieve. A ; the callus mass formed after 10 days(x40), B ; after 20 days(x40), C ; after 30 days(x40)

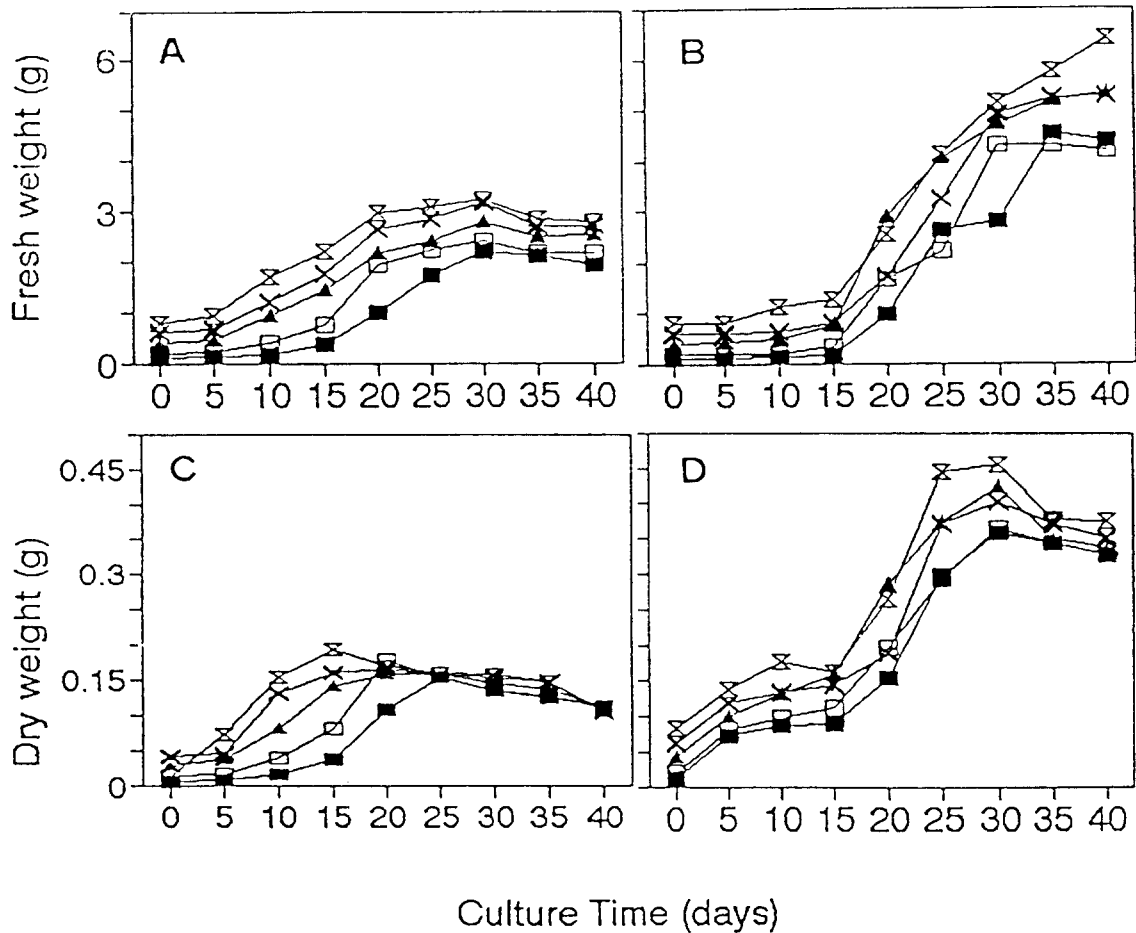


Fig. 4. Effects of inoculum density on growth of Viola cell suspension cultures.

20mesh크기의 callus를 10일(A), 20일(B), 30일(C)간 배양한 형태(그림 2)에서 배양 기간이 경과함에 따라 20 mesh가 타 mesh보다 callus피가 녹색으로 짙어졌으며 조직이 단단하고 치밀함이 관찰되었고, 특히 30일(C)경에 최고치에 도달하였다. 배양 callus의 조직 관찰(그림 3)에 있어서도 20mesh 크기의 callus mass를 10일(A), 20일(B), 30일(C)간 배양했을 때, callus피 중심 세포와 주변 유세포가 치밀하고 균일하였으며 분열도 왕성하였다.

#### 세포접종량과 배양 세포의 성장

세포의 활성을 증가시키고 생산성의 변화를 조사하기 위해 배지의 량과 세포의 접종량과의 관계에 대한 실험의 결

과는 그림 4와 같다. 배지의 량이 10ml 일 때, 세포유도기는 5일인데 비하여 20ml 일 때는 15일 이었다. 지수기를 지난 이후의 성장은 배지의 량이 20ml일 때가 10ml일 때 보다 양호한 경향이였다. 건물중은 10ml 배지량에 있어서 배양중기에서 후기까지 건물중이 큰 차가 없었으나 20ml 배지량에 있어서는 25일부터 30일 사이에 최대치를 나타내었다.

#### 당농도와 현탁배양 세포의 성장

배양기간 중의 당농도가 배양 세포의 성장에 미치는 영향을 측정된 결과, 그림 5에서 나타낸 바와 같이, sucrose 농도가 증가할수록 정지기에 도달하는 일수가 길어졌으며,

3%, 5%에서는 30일 이후에, 7%, 9%에서는 40일까지 지수기를 나타내다가 그 후 정지기에 도달하였다. 그러나 저농도인 1%에서 배양한 세포는 갈변하여 성장이 둔화되었다.

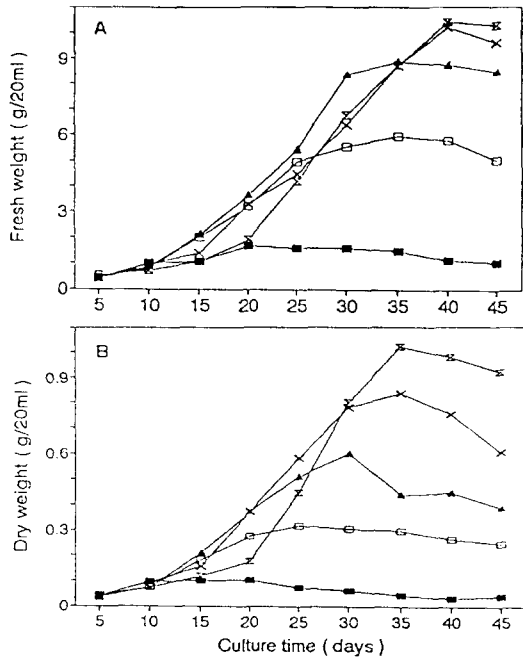


Fig. 5. Effects of sucrose concentration on growth of *Viola* cell suspension cultures. (A : Fresh weight, B : Dry weight, ■ : 1%, □ : 3%, ▲ : 5%, × : 7%, ☆ : 9%)

배양 세포의 성장은 배양 10일후 까지는 당의 농도에 의해서 큰 영향을 받지 않았으나, 배양 후기의 세포 성장은 당이 고농도일 수록 양호한 경향이었다.

#### 무기염 농도 및 Casein hydrolysate의 첨가

MS 무기염의 농도를 1/3×, 2/3×, 1× 3단계로 희석한 액체현탁배지에 20mesh stainless steel 망으로 동조한 세포의 생체중 0.4g을 접종하여 배양시간별 세포의 성장을 조사한 결과는 그림 6와 같다. 무기염의 농도가 낮아짐에 따라 생체중에서는 세포의 성장 속도가 늦어졌으며, 세포표의 표면이 초록색에서 연한 황색으로 변화하였다. 그러나, 건물중은 배양 기간이 20일부터 30일까지 최성기이었고 배

양 후기는 낮은 경향이었다.

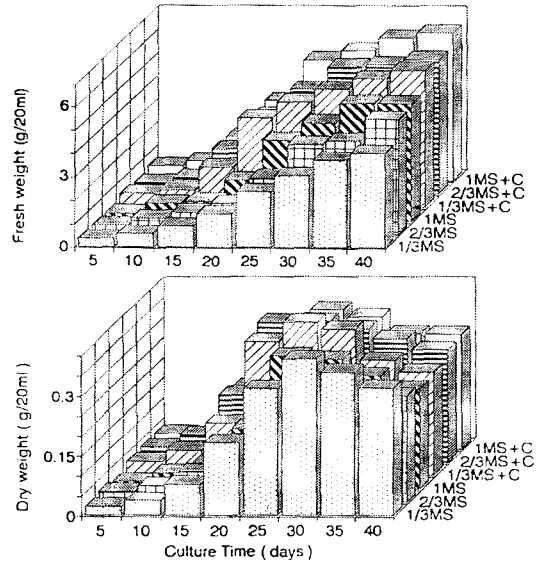


Fig. 6. Effects of concentration of MS basal salts and casein hydrolysate on growth of *Viola* cell suspension cultures. (A : Fresh weight, B : Dry weight, 1MS+C : 1MS+casein hydrolysate, 2/3MS+C : 2/3MS+casein hydrolysate, 1/3MS+C : 1/3MS+casein hydrolysate, 1MS : 1MS without casein hydrolysate, 2/3MS : 2/3MS without casein hydrolysate, 1/3MS : 1/3MS without casein hydrolysate, ■ : 1MS+C, □ : 2/3MS+C, ▲ : 2/3MS, × : 2/3MS, ☆ : 1/3MS)

또, casein hydrolysate의 첨가가 무첨가에 비하여 배양 세포의 성장이 양호하였으며 생체중은 배양 기간이 경과함에 따라 증가하였다.

#### 현탁배양세포의 단백질 함량

배양 재료의 크기에 따른 현탁배양에서는 배양 재료의 크기가 클 수록 단백질 함량이 높았다(그림 7). 당농도별 배양에서는 당의 농도가 높을 수록 단백질 함량이 높았으며 1% sucrose 농도에서 단백질 함량이 제일 낮았다(그림 8). MS 배지의 무기염 농도를 1×, 2/3×, 1/3×MS로 희석하여 배양하였을 때 무기염의 농도가 높을 수록 단백질 함

량이 높았으며, casein hydrolysate 첨가구가 무첨가구보다 단백질 함량이 높았다 (그림 9).

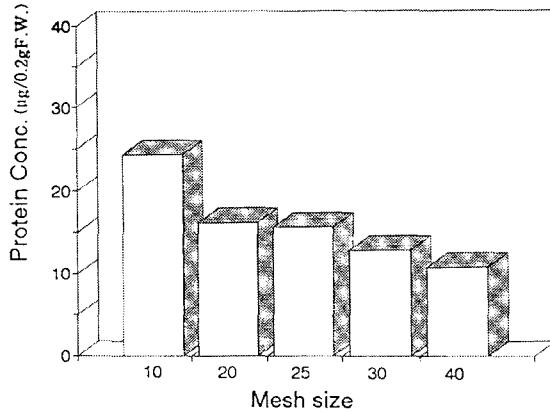


Fig. 7. Effects of inoculum size on protein content.

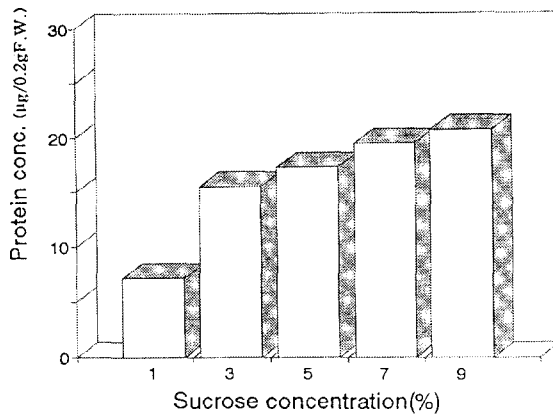


Fig. 8. Effects of sucrose concentration on protein content.

#### 배양 세포에서 protoplast의 분리

배양 재료의 크기 별로 처리된 현탁배양에서 배양 시기, 효소의 종류, 및 효소의 처리 시간에 따라 원형질체의 분리를 실시한 결과, 40mesh에서 배양 2주째 1% pectinase SE-150 와 2% cellulase YC 5시간 효소 처리에서 가장 많은 원형질체를 얻었다(표 1). 즉, 원형질체 분리에 적합한 배양 시기는 대부분 2주까지로 그 이후에는 원형질체 분리가 저조하였다. 효소의 종류에서는 1% pectinase SE-150과 2% cellulase YC의 각 단용구 보다는 혼용구에서

분리 효과가 뛰어 났으며, 효소 처리 시간은 5시간 이상이 좋았다.

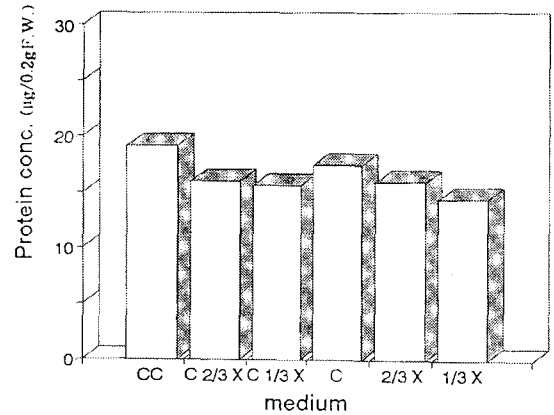


Fig. 9. Effects of concentration of MS basal salts on protein content.

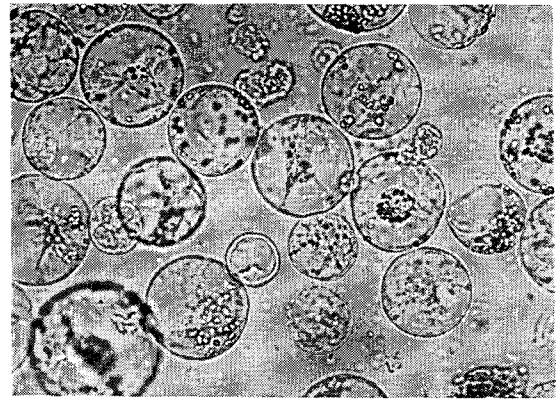


Fig. 10. Isolated protoplasts from callus masses formed from *Viola patrinii* DC. cell suspension. The protoplasts were isolated from the lot of 20 mesh inoculum sizes cultured for 2 weeks using the combined mixture of 1% pectinase SE - 150 and 2% cellulase YC by incubating for 5 hours.

#### 고 찰

야생 흰 제비꽃의 callus로부터 분열 활성이 높고 균일한 세포주의 생산성 향상을 위한 현탁배양 방법에서 세포괴의

크기, 접종량, 배지량, 당의 농도 및 무기염의 농도가 현탁 배양 세포의 성장에 미치는 영향에 관하여 조사하였다.

세포피의 크기가 세포 활성화에 미치는 영향은 현탁배양이 진행됨에 따라 다양한 크기의 배양 세포가 응집이 많은 세포피로 형성하면서 균일한 세포의 크기로 성장함이 육안으로도 구별되었다. 세포피의 크기가 20mesh로 sieve 하였을 때 배양 세포는 짙은 녹색으로, 세포피는 단단하게 성장하였고 조직 관찰에서도 세포가 치밀하였다. 그러나 배양 후반에서는 세포피의 크기가 작을 수록 생체중이 증가하였다. 이는 당근 현탁배양에서 세포의 크기가 작을 수록 생체중 및 배발생이 효과적이었다는 보고<sup>20)</sup>와 일치한 경향이었다.

배양중의 세포의 밀도를 낮게 하면 배지 내로 유출되는 세포 대사 물질의 양이 감소되고, 세포의 밀도가 높을 경우에는 세포분열시 대사물질이 배지 내로의 유출 및 세포내 대사 물질의 생산이 서로 균형을 이루어 세포 분열과 배발생이 촉진된다고 하였으며<sup>21)</sup>, 접종 밀도를 증가시키므로써 배양 기간을 대폭 단축시키고<sup>22)</sup> 또한 배지내 산소 공급량은 flask의 크기와 배지량과의 산소공급률에 영향을 준다고 하였다<sup>2)</sup>.

본 실험에서는 50ml 삼각flask에 10ml의 배지량에서는 0.2g이, 20ml 배지량에서는 0.4g이 전형적인 시그모이드 곡선을 보이며 성장하였으며, 접종량은 10ml보다 20ml가 더욱 양호한 경향이었다.

Fujita 등<sup>23)</sup>은 고농도의 염분과 당은 고장액으로 작용하여 세포의 생리적 수분 결핍과 함께 원형질 분리 현상을 일으키며, 또한, 세포 내의 효소활성, 막기능의 변화를 초래하여 세포내에 잠재해 있던 새로운 유전자의 활성화로 mRNA나 단백질의 발현에도 큰 영향을 미치는 것으로 보고하고 있으며, 또 당농도가 높을 수록 생육 후기까지 계속 성장을 계속하여 maximum biomass에 도달하는데 더 긴 시간이 요구되어 진다<sup>24)</sup>.

본 실험에서도 당의 농도가 증가함에 따라 생체중 및 건물중이 증가하였으며, 그 예로서 감초에서는 고농도의 당농도가 삼투압에 불구하고 억제시키지 않았다<sup>25)</sup>. 또 Paul 등<sup>7)</sup>은 사과(golden delicious)미숙 집합자 배의 자엽배양에서 3% 이상의 당농도일때 뿌리형성과 배축형성율이 높았다.

무기염 농도가 세포현탁배양의 성장에 미치는 영향을 살펴본 본 실험에서는 MS배지의 무기염의 농도를 1/3×, 2/3×, 1×로 희석하였을 때 1/3×에서 건물중이 높았으며,

1×, 2/3×는 비슷한 성장을 보였다. 또 Mac carthy 등<sup>26)</sup>은 phosphate의 농도가 증가하면 성장이 연장되며 세포 수가 증가하였으며, 본 실험은 MS배지의 무기염의 농도를 희석하였을 때 세포의 생장이 감소했으나, 최종 세포농도는 접종량이 적을 경우 무기염 농도의 영향이 크지 않으나, 접종량이 많아지면 무기염 농도가 높아짐에 따라 최종 세포 농도가 증가하는 것으로 여겨진다.

또한, casein hydrolysate가 세포 성장에 미치는 영향은 생체중은 casein hydrolysate 첨가구에서 증가하였고, 건물중은 첨가구와 무첨가구 모두 1/3×MS배지에서 높았다. Tanaka<sup>10)</sup>는 사과에서 casein hydrolysate 500mg/l 사용시 체세포형성율이 높았으나 1000mg/l 사용시에는 체세포형성율이 감소하였고, 또 Hitoshi 등<sup>27)</sup>은 벼 callus배양 시에는 casein hydrolysate를 2g/l를, 식물체 재생 시에는 1g/l를 사용하였다. 이처럼 제비꽃에서도 casein hydrolysate의 첨가가 세포의 생장이 양호한 경향이었으나 앞으로는 농도별 영향에 관한 연구도 검토가 필요하리라고 생각되어진다.

배양 조건에 따라 새로운 단백질 합성의 유도, 일부 단백질 합성의 억제, 감소 및 증대 등 다양한 단백질 유형의 변화가 일어난다. Robertson 등<sup>28)</sup>은 일부 단백질의 합성, 감소 또는 증대를 성장 호르몬이나 저온 조건의 환경에 두었을 때 이에 적응하려는 복잡한 대사 작용의 변화라고 하였으며, Sung 과 Okimoto<sup>29)</sup>는 당근에서 체세포배발생에 관련된 특이 단백질을 분리한 바가 있고, 소 등<sup>2)</sup>은 셀러리에서는 단백질 분석 결과 체세포배 발생 중에 단백질이 동시에 합성되거나 억제되는 현저한 변화를 보고한 바가 있다. 또한 벼 배양 세포 단백질의 이차원 전기 영동에서 이 배양 세포에 고중력을 처리했을 때 생존의 극한 상황에서 특정의 단백질이 사라지거나 다시 생성되는 것으로 보아 배양 세포의 생존력 및 활력은 배양세포내 단백질의 변화와 밀접한 관련이 있으며, 이때 새로이 합성된 단백질의 일부가 분화된 식물체에서도 계속 유지되고 있는 것은 일시적인 고중력스트레스에 의해 변화된 단백질 패턴이 세포가 생육하여 재 분화하는 과정 중에도 보통의 세포와는 다른 형태의 단백질 패턴을 유지하며 이들 단백질은 생존 세포의 계속적인 성장에 관여할 수 있다고 보고하였다<sup>21)</sup>.

이처럼 배양 환경에 따른 배양 세포의 생존 및 활력과 밀접한 관련이 있는 단백질을 정량한 결과, 본 실험에서는



배양세포가 크고 당농도는 고농도가 단백질량이 높았으며, 무기염의 농도별 배양에서는 무기염의 농도가 높을 수록, casein hydrolysate가 첨가된 구가 단백질 함량이 많았다.

활발하게 자라는 어린 세포현탁배양은 많은 양의 원형질체의 분리에 이상적인 재료이다. 그러나 세포의 나이, 재료의 특성에 따라 약간의 차이가 있으며, 오래된 현탁배양세포는 효소로 제거하기 어려운 두꺼운 세포벽을 가진 거대한 세포 형태로 이루어져 있으므로 원형질체의 분리가 잘되지 못한다. 그러나 세포현탁은 성장의 지수기에 있는 세포는 비교적 세포막이 얇고 섬유소로 되어 있어 분리에 시간이 적게 걸린다. 이와 같이 본 실험에서도 배양 시기가 오래된 현탁배양세포보다 활발하게 생장을 하는 배양 1-2주의 지수기의 세포가 원형질체 분리에 효과적이었다.

밀의 원형질체 분리에서는 세포현탁의 계대배양후 5일보다 오래된 것은 원형질체 생산량이 감소하였는데<sup>30)</sup>, 본 실험에서도 접종원의 크기에 따른 각각의 지수기인 2주체에 분리가 잘되었고, 효소의 처리 시간은 현탁배양에서는 4-5시간 처리<sup>30)</sup>에서 16-18시간 처리<sup>31)</sup>까지 작물에 따라 다양한데 본 실험에서는 5시간 이상 처리가 효과적이었다.

## 요 약

야생 흰 제비꽃(*Viola patrinii* DC.) 현탁배양시 세포의 활성에 미치는 세포피의 크기, 세포의 밀도, 당의 농도 및 배지 조성이 배양 세포의 성장과 protoplast분리에 미치는 영향을 알기 위하여 실험한 결과를 요약하면 다음과 같다.

세포피의 크기는 30mesh일 때 생체중과 건물중이 증가하였고, 세포피의 조직도 치밀하였다. 세포 밀도는 배지량에 따라 적정량이 달랐으며, 20ml배지량에서는 0.4g의 세포 밀도가 적합하였다. 당의 농도가 높아짐에 따라 생체중과 건물중이 증가하였으며 배양 후기는 생장이 현저히 양호하였다.

MS배지 내의 무기성분의 량을 1×, 2/3×, 1/3× MS로 하였을 때, 생체중은 1MS가 건물중은 1/3× MS일 때 가장 높았다. casein hydrolysate은 첨가구가 생체중 및 건물중 모두가 높았다.

단백질 정량은 mesh크기가 큰 배양세포일 수록, 무기염 농도가 높을 수록, casein hydrolysate 첨가구가, 그리고 당 농도가 높을 수록 단백질 함량이 많았다.

protoplast의 분리는 10mesh크기의 세포를 1주간 배양

한 후, 1% pectinase SE-150 와 2% cellulase YC 혼용하여 2시간 처리했을 때 가장 많은 양을 얻었다. 그러나 전반적으로 배양 세포의 크기가 작을 수록, 효소 처리 시간은 5시간 이상, 효소 종류는 혼용구가, 배양 시기는 2주체가 원형질체 분리에 효과적이었다.

## 참 고 문 헌

- Haberlandt, G. : Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen, Sitzungsber, Math Naturwiss Kl. Kais. Akad Wiss Wien, 111, 69(1902).
- Soh W. Y., Yeo, U. D. , So, S. S. and Cho, D. Y. : Protein synthesis during somatic embryo development and artificial seed germination of *Apium graveolens* L. after abscisic acid or cold treatment. *Kor. J. Plant Tissue Culture*, 21, 15(1994).
- Larkin P. J. and Scowcroft, W. R. : Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Gene*, 60, 197 (1981).
- Vijendra, K., Jethwani S. V. and Kothari, S. L. : Embryogenesis in suspension cultures of *Datura innoxia* Mill. *Plant Cell Reports*, 12, 581(1993).
- Kim, E. S., Kim, M. W., Kang, Y. H., and Han, T. J. : Growth and differentiation of suspension cultured carrot cells. II. Alteration in energy metabolism enzyme activity and aromatic amino acid content during somatic embryogenesis. *Kor. J. Plant Tissue Culture*, 20, 227(1993).
- Kim, Y. H., Kim, H. I., Kim, M. S. and Harn, C. Y. : Callus induction, plant regeneration of lettuce and organogenesis from its suspension cultured cells. *Kor. J. Plant Tissue Culture*, 13, 23(1986).
- Paul, H., M. Belaizi and Sangwan-Norreel, B. S. : Somatic embryogenesis in apple. *J. Plant Physiol.*, 143, 78(1994).
- Snape, J. B., Thomas, N. H. and Callow, J. A. : How suspension culture of *Catbarantbus roseus* respond to oxygen limitation : small-scale tests with application to large-scale cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 1058 (1989).
- Blom, T. J. M., Kreis, W., F. Van Iren F. and Libbenga, K. R. : A non-invasive method for the routine estimation of fresh weight of cells grown in batch suspension cultures. *Plant Cell Report*, 11, 146(1992).
- Tanaka, H. : Technological problems in cultivation of plant cells at high density. *Biotechnol. Bioeng.*, 23,

- 1203(1981).
11. Choi, K. S., In, J. Y., and Lee, Y. B. : Effect of light on production of anthocyanin and betacyanin through cell suspension culture systems in *Vitis vinifera* L. and *Phytolacca americana* L. *Kor. J. Plant Tissue Culture*, 21, 47(1994).
  12. Shizuka, O. : Scanning electron microscopy of shoot differentiation in vitro from leaf explants of the African violet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36, 157(1994).
  13. Kwon, O. C., Chung, C. H., Park, J. K., Taniguchi T., and Maeda, E. : Electrofusion of protoplast from wild Viola and Pansy and the ultrastructure of the fusion products. *Kor. J. Plant Tissue Culture*, 19, 125 (1992).
  14. Sato, T., Taniguchi, T. and Maeda, E. : Ultrastructure of electrofused products from pansy (*Viola tricolor*) mesophyll and wild viola(*V. patrinii*) petiole callus protoplasts. *Jpn. J. Crop Sci.*, 61, 439(1992).
  15. 한성호, 이정숙, 권오창. : 야생 흰 제비꽃(*Viola patrinii* DC.)의 염병조작으로부터 callus유기에 관한 연구. 동아대, 농대, 한농연보, 11, 13(1990).
  16. Murashige, T. and Skoog, F. : A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue. *Physiol. Plant*, 15, 473(1962).
  17. Foster, A. S. : The use of tannic acid iron chloride for staining cell walls in meristematic tissue. *Univ. Okla. Stain Technology*, IX, 91(1934).
  18. Johansen, D. A. : *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York(1940).
  19. Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248(1976).
  20. Paek, K. Y., Lee, C. H. and Hwang, J. K. : Effects of cell size, density, conditioned media and pH on carrot (*Daucus carota* L.) cell embryogenesis. *Kor. J. Bot.*, 28, 141(1985).
  21. Wetherell, D. F. : *In vitro embryo formation in cell derived from somatic plant tissues*. In, *Propagation of higher plants through tissue culture*. K. W. Hughes, R. Hende and M. Constanin(eds), V.S.D.O.E., Washington, 102(1978).
  22. Seon, J. H and Chung, J. D. : Mass production and identification of antocyanin in cell cultures of *Euphorbia splendens* Bojer. *Kor. J. Plant Tissue Culture*, 21, 77(1994).
  23. Yasuhiro F., Yasusiro H., Chuzo, S., and Tejiro, M. : Production of shikoin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. II. a new medium for the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Reports*, 1, 61(1981).
  24. Arias-Castro, C., A. H. Scragg and M. A. Rodriguez-Mendiola : The effect of cultural conditions on the accumulation of formation by suspension cultures of *Glycyrrhiza glabra*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34, 63(1993).
  25. Arias-Castro, C., A. H. Scragg, A. H., Stafford and M. Rodriguez-Mendiola, : Growth characteristics of *Glycyrrhiza glabra* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34, 77(1993).
  26. Mac Carthy, J. J., Ratcliffe, D. and Street, H. E. : The effect of nutrient medium composition on the growth cycle of *Catharanthus roseus* G. Don cells grown in batch culture. *J. Exp. Bot.*, 31, 1315(1980).
  27. Hitoshi, K., Mitsuyoshi, O. and Takayasu, H. : Enhancement of plantlet regeneration by medium exchange in liquid regeneration culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Jpn. J. Breed*, 42, 583(1992).
  28. Robertson A, Gusta, L. V., Reaney M. J. T., and Ishikawa, M. : Protein synthesis in Bromegrass(*Bromus inermis* Leyes) cultured cells during the induction of freeze tolerance by abscisic acid or low temperature. *Plant Physiol.*, 84, 1331(1987).
  29. Sung, Z. R., and Okimoto, R. : Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 80, 2661(1981).
  30. Zong-yi, L., Guang-min, X. and C. Hui-min, G. : Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic cell suspensions of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 79(1992).
  31. Simmonds, D. H., Long N. E., and Keller, W. A. : High plating efficiency and plant regeneration frequency in low density protoplast cultures derived from an embryogenic *Brassica napus* cell suspension. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27, 231(1991).