

야생 흰 제비꽃 (*Viola patrinii* DC.) 배양세포의 활성화에 미치는 다양한 현탁배양 방법

임현희 · 정용모¹ · 조영수 · 정정한 · 서정해² · 권오창*

동아대학교 생명자원과학부, ¹경남농업기술원 화훼시험장, ²경남정보대학 환경조경과

The Various Suspension Culture Methods on the Growth of Culture Cells of Wild Viola (*Viola patrinii* DC.)

IM, Hyun Hee · CHUNG, Yong Mo¹ · CHO, Young Su · CHUNG, Chung Han ·
SUH, Jung hae² · KWON, Oh Chang*

Dep. of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan, 604-714, Korea

¹Floricultural Experiment Station, Kyungnam ARES, ChangWon, 641-920, Korea

²Dep. of Environment Landscape architecture, KyungNam College of Information and Technology, Pusan, Korea

ABSTRACT This experiment was carried out to examine the effects of culture medium on cell growth of the viola (*Viola patrinii* DC.) suspension culture. The results are as follows: The greatest cell growth rates were found with MS medium, suggesting that this medium could be recommendable for the viola suspension cell culture. When the nitrogen sources (NH_4NO_3 and KNO_3) of MS salts were diluted at half concentrations, the cell growth rates were slightly increased, but when the combined concentration ratios of NH_4^+ and NO_3^- ions were 25 to 75, the greatest cell growth rates were obtained. This result implies that the nitrogen ion sources had slight influence on the rates. Another feature was that as the concentration of NH_4^+ ion lowered, the callus color changed to pale yellow with some red spots. The addition of casein hydrolysate (5 g/L) was more effective for the cell growth. On the basis of microscopic observation, the highest cell growth rates were detected during 2-4 weeks culture and after 6 weeks of the culture, some elongated and vacuolated cells were determined.

Key Words : compact callus, friable callus, suspension culture, *Viola patrinii* DC

서 론

1980년대 이후 야생화의 이용가치 및 우수성 등이 일반에 홍보되면서부터 점차 그 규모가 커져 화훼산업의 한 부분을 차지할 정도로 급속한 성장을 하고 있다. 현재 국내에는 약 4,600여종의 식물이 분포하고 있으나 이들 중 화단, 분화 및 절화 등의 관상용으로 이용이 가능한 것은 약 600여종으로

분류되고 있다. 한국에 있어서 제비꽃속도 약 60여종 이상이 자생하고 있으나 원예용으로 관상하고 있는 것은 그리 많지 않으므로 (이철희 1999), 앞으로 화형이 크고 향기가 있는 우수한 종류가 개발된다면 이용가치는 더욱 높아질 것이다. 따라서 산업적으로 육종하거나 재배적으로 이용하기 위해서는 식물유전자원 개개의 특성이 올바르게 평가되어 있어야 한다. 국내 자생 제비꽃에 관한 연구로는 분류, 생리, 생태, 성분, 번식, 개화 생리, 재배 및 형태학적 연구 (Kwon et al. 1990; Kim et al. 1980; Kim et al. 1996; Lee et al. 1972) 등 여러 분야에서 많은 연구가 이루어 졌으며, 최근 들어 callus로부터 식물체 재생 (Tadahiko Sato et al. 1995) 및 잡종식물 창

*Corresponding author. Tel 051-200-7500

E-mail ockwon@mail.donga.ac.kr

출을 위한 원형질 융합의 미세구조 관찰에 관한 연구 (Kwon et al. 1992; Kwon et al. 1992) 등 생물 공학적 기법을 이용한 연구까지 다양하게 진행되고 있는 실정이다.

우리 나라의 야생 *viola* 속을 개량하기 위한 기초연구로서 제비꽃 중 우리 나라에 자생하는 야생 흰 제비꽃 (*Viola patrinii* DC.)의 엽병조직으로부터 유도된 callus를 다년간 계대배양 하던 중 friable callus와 compact callus의 두 종류로 구분되어 성장함을 관찰하였다. Friable callus는 연초록색으로 부서지기 쉬운 부드러운 callus (비배발생 callus)이고, compact callus는 진녹색으로서 단단한 callus (배발생 callus)이다. Friable callus는 세포의 크기 및 수량이 부족하며, compact callus는 세포의 수가 많으며 세포가 크고 분열이 왕성하다. 일반적으로 callus 상태로 오랫동안 계대배양시 식물체 분화능력이 상실되거나 감소하므로 callus 배양이나 현탁배양을 이용하여 장기간 계대배양된 세포나 callus로부터 식물체를 분화시키기 위해서는 액포가 적고 전분립이 밀집하여 있고 균일한 세포 (Embryogenic 한 상태)로의 배양을 위한 배양방법 및 환경의 검토가 필수적이다.

따라서 본 실험에서는 friable callus를 compact callus화하기 위한 배양방법 및 compact callus의 세포활성화를 위한 각종 배양환경을 검토하였으며, 형태 및 해부학적 비교를 위한 조직관찰을 행하였다.

재료 및 방법

실험 재료는 야생 흰 제비꽃 (*Viola patrinii* DC.)의 엽병조직으로부터 callus를 유도하여 그 callus를 다년간 계대배양으로 증식시킨 callus mass를 사용하였다.

Callus 계대배지는 Murashige T. and Skoog F. (MS 1962) 기본배지에 sucrose 30g/L, casein hydrolysate 3g/L, agar 8g/L, NAA 5×10^{-6} M + kinetin 5×10^{-7} M를 첨가하였으며, pH는 멸균하기 전에 5.8로 조절하였다. 배양조건은 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광도 3,000 lux의 형광등하에서 16시간 광배양조건으로 배양하였다. 세포 현탁배양은 agar만을 제외시킨 동일 조성의 액체배지에서 100 rpm의 진탕배양기에서 배양하였다.

배양방법 및 배양환경의 검토

균일하고 활성도 높은 세포집단을 얻기 위한 배양방법의 검토에서 배지의 종류 및 무기염의 농도, thiamin 및 casein hydrolysate의 적정농도, 배지 중의 NH_4^+ 와 NO_3^- 의 농도 및 농도비가 세포의 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

세포 접종시 배지량은 50 mL삼각 플라스크에 20 mL로 하고, 접종량은 20 mesh의 stainless steel망에 sieve시킨 callus를 0.4 g씩 접종하여 배양하였다.

세포의 성장측정은 생체중과 건물중으로 하였다. 생체중은

배양된 세포를 filtration (200 mesh nylon망)하여 측정하였으며, 건물중은 생체중을 측정된 다음 이를 60°C 에서 24시간 동안 건조시켜 측정하였다.

배지의 종류로는 MS, B5, R2, White배지를 사용하였다.

무기염의 농도는 MS basal, $1/2 \times \text{MS}$, $1/4 \times \text{MS}$, 무첨가 KNO_3 , $1/2 \text{NH}_4\text{NO}_3$ $1/2 \text{KNO}_3$, $1/4 \text{NH}_4\text{NO}_3$ $1/4 \text{KNO}_3$, $1/2 \text{KH}_2\text{PO}_4$ 로 하여 실험하였다.

질소원은 MS배지에 함유되는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , KNO_3 의 양을 달리하여 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 의 비율을 100:0 (30 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 75:25 (15 mM NH_4NO_3 , 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 50:50 (30 mM NH_4NO_3) 25:75 (15 mM NH_4NO_3 , 30 mM KNO_3), 0:100 (60 mM KNO_3)으로 변화시켰다. 또한 casein hydrolysate (Difco)를 0.5, 1, 3, 5, 7 g/L의 양으로 첨가하여 세포 성장에 미치는 영향을 조사하였다

조직학적 관찰

1주 간격으로 20 mesh의 stainless steel망을 통과시킨 균일한 배양세포괴를 선발하여 5% glutaraldehyde에 전고정 (24시간)한 다음 같은 buffer solution에 수세한 후, 2% OsO_4 로 후고정 (12시간)하였다. 그 후 acetone series (농도 상승순)에 탈수하여 propylene oxide에 치환한 후 spurr's resin에 포매하여 ultramicrotome (leicaultra-cut UCT)으로 550nm로 절편하였다. 염색은 1.5%의 Na_2CO_3 와 0.5% toluidine blue로 염색한 다음 영구표본을 만들어 광학 현미경 (Olympus BX50)으로 미세구조를 관찰하였다.

결 과

배지의 종류와 배양세포의 성장

Figure. 1, 2에서 보는 바와 같이 생체중에서는 MS배지, R2배지가 B5배지나 White 배지에 비하여 양호한 경향이었고 배양 4~5주째 최대 성장기였으며, 그 후에는 생장이 퇴화하였다. 그러나 White배지는 후기까지 지속적으로 성장하였다. 건물중에서도 생체중과 같은 경향이었고 최대성장기는 배양 3주부터 시작되었다. MS배지에서는 callus의 생체중이 현저하게 증가한 (평균 17배) 반면 white배지에서는 2배의 증가에 불과해 아주 저조한 callus 성장을 보였다.

MS, R2, B5 배지는 치상 1주후부터 점차 녹색을 띠기 시작했으나 White는 후기까지 흰색에 붉은 색소 (시코닌계 색소)를 띠는 callus로 성장하였다. 이 붉은 색소는 callus의 색이 가장 옅은 white배지에서 가장 많이 생성되었으며 R2배지, B5배지도 이 색소를 생성하는 것으로 나타났다.

Callus mass를 20 mesh로 sieve한 구와 sieve하지 않은 구의 생체중 및 건물중의 비교에는 sieve하지 않은 구는 3주

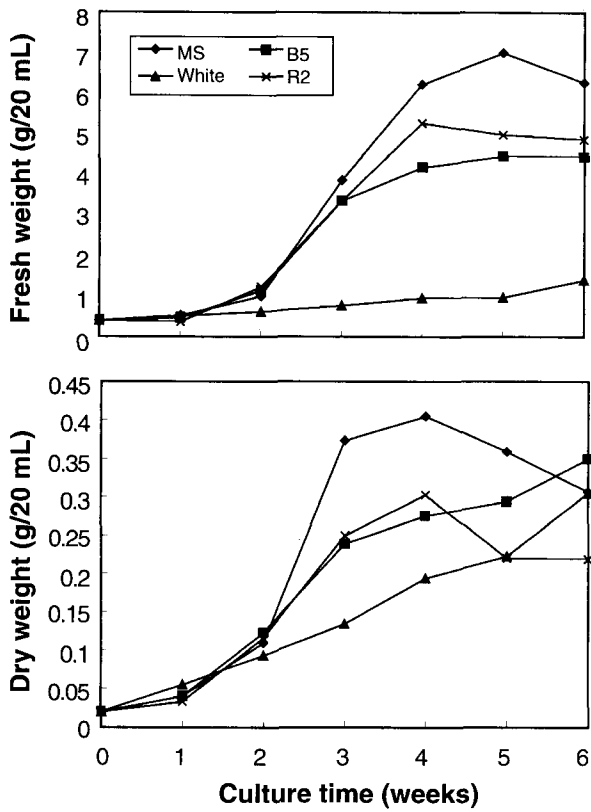


Figure 1. Effects of various media on growth of viola suspension culture cell (20 mesh sieve).

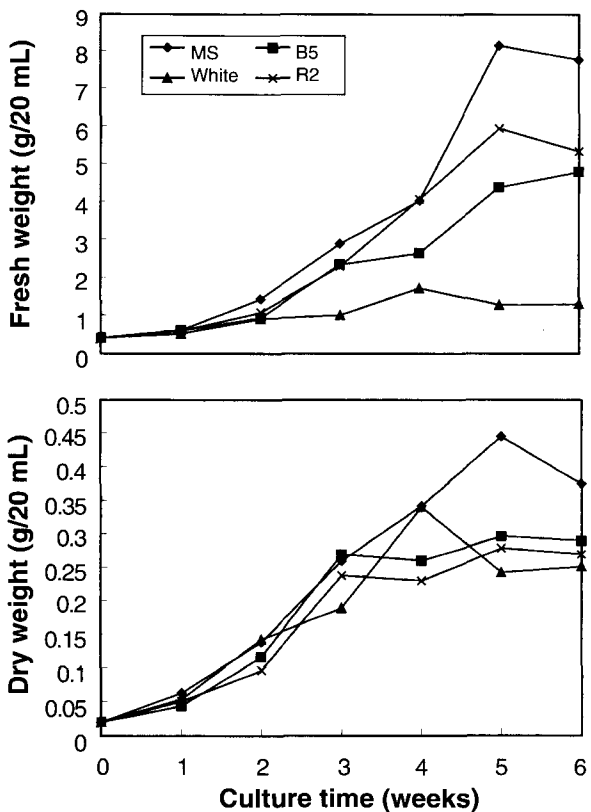


Figure 2. Effects of various media on growth of viola suspension culture cell (non-sieve).

이후 후기생육이 왕성한 경향을 보였고 sieve한 구에는 배양 2주 후부터 세포의 활성이 왕성하기 시작했다. 전반적으로 생체중, 건물중 모두 sieve하지 않은 구에서 모두 높게 나타났다.

무기염의 농도와 배양 세포의 생장

MS 배지의 무기염 농도를 여러 단계로 희석한 배지에 세포의 생체중 0.4 g / 20 ml을 접종하여 배양 기간별로 세포의 생장을 조사한 결과는 figure 3과 같다. 무기염의 농도를 희석할수록 세포의 생육이 느리고 저조했으며 세포의 표면이 초록색에서 연한 황색으로 변하였다. 배양 3주까지는 모든 배지에서 차가 없었으며 4주째부터 처리구간에 생장의 차이를 나타내기 시작하였다. 무기염이 희석된 배지에서 자란 callus는 6주까지도 mass크기가 작았고 세포의 조직도 MS 기본배지에 비해 치밀하지 못하였다. 생체중은 MS기본배지에서 건물중은 1/2 NH₄NO₃, 1/2 KNO₃가 가장 좋았다.

인산염과 질산염 농도도 낮을수록 생장이 저조하였다. 인산염의 농도는 그대로 두고 질산염만의 농도를 희석한 구는 인산염만의 농도를 희석한 구보다 생육이 느렸다.

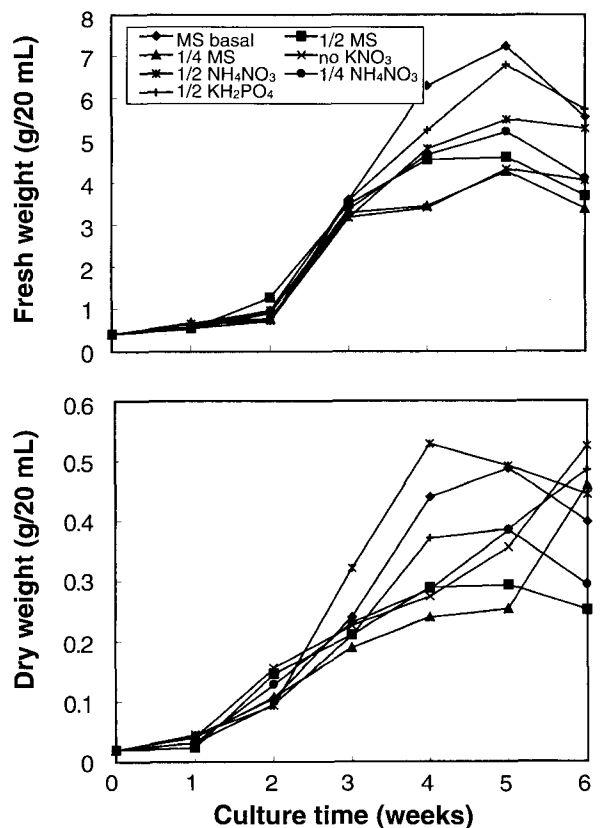


Figure 3. Effects of concentration MS basal salt on growth of viola suspension culture cell.

NH₄⁺/NO₃⁻ 율과 배양 세포의 성장

(NH₄)₂SO₄의 경우에는 농도가 증가할수록 callus의 생육이 저조하여 단용으로 사용한 배지에서는 세포의 생장이 거의 없었으며 연노랑의 치밀하지 못한 callus의 상태로 자랐다.

세포의 성장에 가장 양호한 비율은 NH₄⁺:NO₃⁻ 25:75 (1:3)이었다. NH₄⁺/NO₃⁻의 비율이 적당한 경우의 배양세포는 배양 3주경부터 급속한 성장을 하여 배양 4주째에 최대치를 나타내고 5주째 부터는 정지기에 들어갔다. 또한 이 경우는 배양세포의 녹화가 현저하고 단단하며 조직이 치밀하였으나 비율이 적당하지 못한 배지에서는 녹색이 퇴색한 연갈색의 callus로서 조직이 연화되었다 (Figure 4).

Casein hydrolysate의 농도와 배양 세포의 성장

세포의 활성화에 미치는 casein hydrolysate의 영향을 알아보기 위하여 그 농도를 0.5 g/L, 1 g/L, 3 g/L, 5 g/L, 7 g/L로 한 결과 그다지 큰 차이는 없었으나 생체중과 건물중 모두 5 g/L 일 때가 가장 좋은 것으로 나타났다 (Figure 5). 1g과 7g 첨가구는 배양 6주까지 지속적으로 성장하였다. 최대성장기는 3~4주까지이며 생체중에 있어서는 전형적인 시그모이드 (sigmoid) 곡선을 보였다. Casein의 양이 아주 적은 0.5 g/l일

때는 세포의 생육이 매우 저조하였고 세포의 조직도 치밀하지 못하였으며, 녹화가 되지 않은 황갈색의 callus였다. 반면 나머지 1, 3, 5, 7 g/L에서는 녹색이 짙고 단단하며 조직이 치밀한 callus였다.

조직학적 관찰

배양중인 compact callus는 약 1주 후부터 그 표면이 맑고 연한 녹색을 띠며 성장하였다. 세포의 성장과정은 전반적으로 유도기를 지나 배양 2주가 경과되면서 세포분열이 활발하여 3~4주에 최대성장기가 되었다가 배양 5주경이 경과되면서 생장이 완만해져 거의 정지상태에 도달하였다.

먼저 이식하는 정상기의 세포들은 액포가 많은 불규칙한 세포들이 관찰되었다. 세포가 성장하여 규칙적으로 되면서 점차 주변의 액포화된 callus 세포와 구별되는 형태를 갖추기 시작하였다. 2~4주간 된 callus는 대부분의 세포의 크기가 작고 세포질이 농후한 상태로 비교적 균일한 세포로 구성되어 있고 액포화가 거의 이루어지지 않은 상태로 세포의 분열이 왕성하게 이루어지고 있음을 관찰할 수 있었다 (A~D). 6주간 배양된 callus (F)는 신장되고 액포화된 세포들이 많이 관찰되었다. 진하게 염색된 일부의 세포는 배가 형성된 것이고 (e), 이러한 세포를 둘러싸고 있는 주변세포는 액포화가 많이 진전되어있어 분열력을 상실한 것처럼 보였다 (Figure 6).

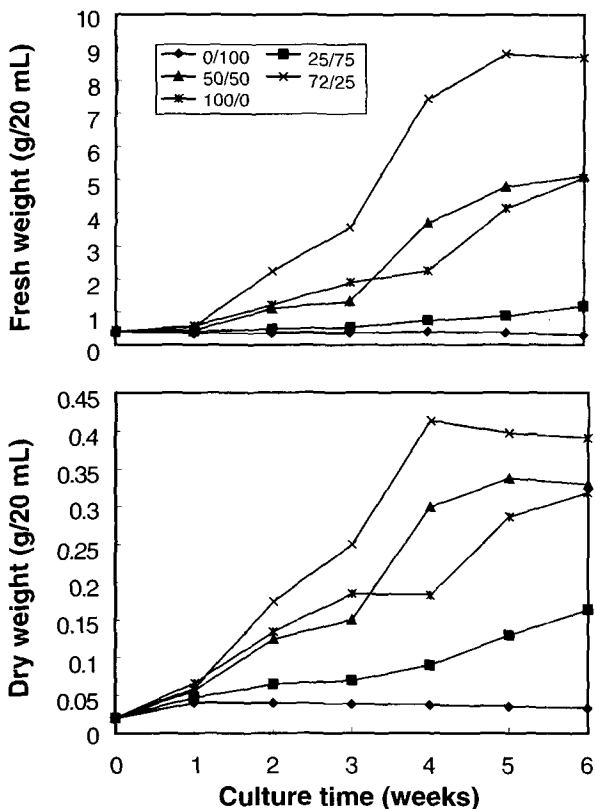


Figure 4. Growth of viola suspension culture cell on media varying in the ration of ammonium nitrogen to nitrate (NH₄⁺/NO₃⁻).

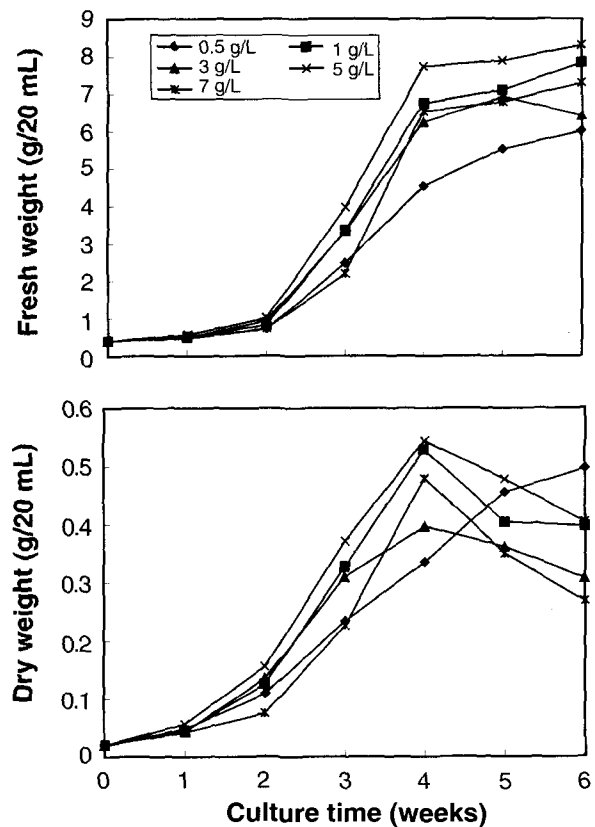


Figure 5. Effects of casein hydrolysate on growth of viola suspension culture cell.

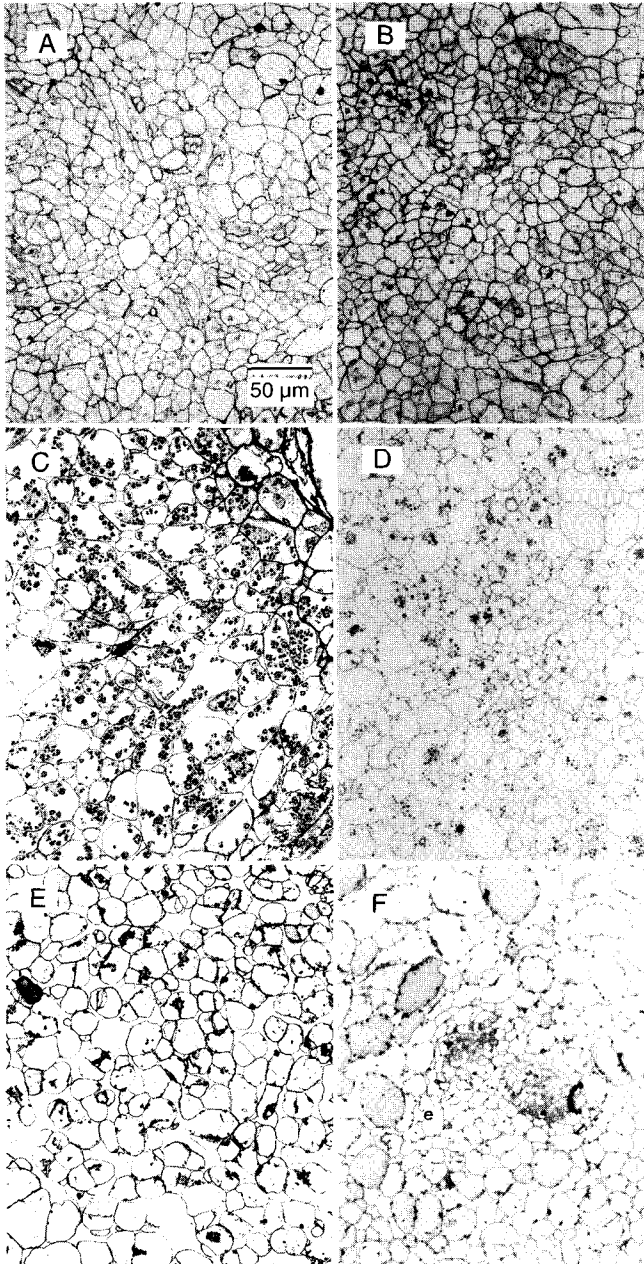


Figure 6. Histological observation of callus mass of viola suspension culture cell. Callus mass observation after 1 week(A), 2weeks(B), 3weeks(C),4weeks(D), 5weeks(E), 6weeks(F). e:embryo.

고 찰

메밀의 callus의 생장률은 B5배지보다는 MS배지와 NN배지에서, 담배는 B5배지 및 NN배지에 비하여 MS배지에서 callus의 생체중이 현저하게 증가한다고 보고되었다 (Shin 1993). 또한 쪽세포와 당근 callus 생장에 B5배지가 우수한 생장을 보였다고 했으며, white배지는 아주 저조한 callus 생장을 보여 callus 생장이나 세포분열에는 적당하지 않으나 안토시아닌 생성에 있어서는 아주 우수하다고 보고했다 (Jun et

al. 1998). 은행 세포배양에서도 MS배지와 B5배지에서 세포 생장이 우수하다는 보고가 있어 (Lee et al. 1993) 이 실험의 결과와 유사하였다. 그러나 R2배지를 이용한 예는 거의 없다. 이처럼 callus생장에는 MS배지와 B5배지에서 양호하다는 결과가 많은데, 본 실험에서는 MS배지와 R2배지에 접종하였을 때 생체중과 건물중이 높고 조직도 치밀하다는 결과가 나왔다. 이는 MS배지와 R2배지가 다른 배지에 비해 nitrate 농도가 높는데 nitrate 농도가 높으면 배양세포의 생장을 향상시키는 것으로 보인다. White배지에서는 흰색에 붉은 색소를 띠는 callus로 생장했는데 이는 white배지에는 NH_4^+ 가 들어 있지 않고 질소원이 NO_3^- 만으로 구성되어 있기 때문이다. Sieve한 구와 sieve하지 않은 구의 경우에는 sieve하지 않은 구에서 생체중과 건물중이 모두 높게 나타났다. 그러나 당근 현탁배양에서는 세포의 크기가 작을수록 생체중 및 배발생이 효과적이었다고 하였다. 이는 식물의 종류에 따라 세포의 크기에 따른 생육이 다르기 때문인 것으로 보인다.

일일초는 무기염의 농도가 낮아짐에 따라 세포의 성장속도가 늦어지며 또한 최종세포의 농도도 감소한다고 했다 (Jung et al. 1991). 두릅나무 현탁배양에서 1/4×MS배지가 배형성과 생육에 가장 효과적이었고 2×MS, 1/8×MS에서는 배형성이 억제된다 (Jhang et al. 1994). 이와 마찬가지로 본 실험에서는 MS 무기염의 농도를 희석하였을 때 세포의 생장이 감소하였다. 이는 무기염의 농도가 희석될 경우 세포의 대사작용이 원활하지 못하고 배양의 생육에 필요한 양분공급에 차질이 있기 때문으로 본다.

인은 광합성, 호흡 및 막의 성분인 인지질의 구성요소로 세포 구조 및 대사에 관여하므로 세포 생장에 중요한 요소가 된다. 인산염의 농도를 1/2로 희석한 경우 세포의 생장률이 떨어지는 것으로 보아 인산염의 농도가 증가할수록 세포 생장이 촉진된다는 보고와 일치한다 (Dougall et al. 1989). 인산염의 농도를 증가시키면 *Daucus carota* 세포생장이 촉진된다고 했다 (Yun et al. 1990). 또한 *Nicotiana tabacum*의 경우에도 인산염의 농도 증가는 생산량에 커다란 효과를 나타내었고 (Ikeda et al. 1976), *Vitis* cells에서도 인산염의 양을 늘렸을 때 역시 생장이 더 좋았다고 보고하여 (Chung et al. 1994) 이 결과와 일치함을 보였다. 질소원의 농도도 희석할수록 세포의 생장이 저조했다. 인산염인 KH_2PO_4 의 농도를 1/2로 희석하였을 경우보다 인산염의 농도는 그대로 두고 질소원의 농도를 희석한 경우 세포의 생장이 낮은 것으로 보아 세포의 생장에는 인산염보다는 질소원이 크게 관여하는 것을 알 수 있다. 특히 KNO_3 가 제외되었을 경우의 세포의 생장이 가장 낮았다. 이 결과로 세포의 생장에는 무기염중 질소원 특히 NO_3^- 가 가장 큰 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. 그러나 배지조성에 따른 세포생장의 차이는 어느 한 가지 성분 때문에 좌우되는 것이 아니라 다른 여러 무기염류 및 비타민들의 상호작용 또는 길항작용에 의해 차이가 있는 것으로 판단된다.

질소는 단백질이나 핵산의 성분원소로서 또한 아미노산이나 효소 등의 성분요소로서 생화학적으로 매우 중요한 역할을 하고 있다. 배지에서 질소급원은 주로 NH_4^+ (ammonium)와 NO_3^- (nitrate)이다. 질소원은 배양세포의 증식에는 필수적일 뿐만 아니라 callus의 형성이나 재분화에도 커다란 영향을 주므로 세포생장에는 두 요소 모두 필요하다. 또한 체세포 배 발생에는 무기질소의 총합량과 무기질소원으로서의 NH_4^+ : NO_3^- 의 비율이 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이 두염의 비율은 배지의 pH와 관련되어 매우 중요하며 (Rose 1975) 암모니움 질소의 농도가 증가할수록 세포생장은 현저하게 감소한다는 보고가 많다 (Chi et al. 1991; Ikeda et al. 1976; Nakagawa et al. 1984; Yamakawa et al. 1983). 쪽 세포생장에 있어 질산태 질소 (KNO_3)와 암모니아태 질소 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)의 농도가 영향을 미치며, 질산태 질소 단독처리 시 세포생장이 가장 좋았으며 (Collin 1987) 암모니아태질소 농도가 증가할수록 세포생장이 감소하는 것은 흰 제비꽃 세포 배양에서도 마찬가지였으며 이는 암모니아태질소가 배양액의 pH를 상승시키는 작용이 있기 때문으로 본다. 본 실험에서는 NH_4^+ 의 양이 적을 때보다 NO_3^- 의 양이 적을 경우 생육이 저조한 결과로 미루어보아 현탁배양 세포는 NO_3^- 에 의해 성장하는 것으로 보인다. *Daucus carota*의 세포생장에는 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 1:2일 때 가장 좋았다고 했으며 (Yun et al. 1990) 대부분 그 농도비가 1:3일 때가 세포의 생장에 우수하다고 보고하고 있어 (Kim 1994) 이 실험과 유사한 결과를 보이고 있다.

카제인의 첨가 농도에 따라 큰 차이를 보이지는 않았으나 5 g/L의 고농도에서 세포의 생장이 우수한 것으로 나타났다. 야생 흰 제비꽃에 있어서 카제인의 첨가가 세포의 생장에 양호하다는 보고는 이미 밝혀진바 있으며 (Kim et al. 1996), 마늘 callus도 타식물에 비해 유연한 callus를 생산하기 위해서는 상당히 고농도의 카제인이 필요하다고 한다 (Choi et al. 1993). 사과에서 카제인 가수분해물 500 mg/L사용시 체세포 배 형성률이 높았으나 1,000 mg/L사용시에는 감소하였으며 (Tanaka 1994), 벼 callus배양시에는 카제인 2 g/L를 식물체 재생시에는 1 g/L를 사용하였다 (Hiroshi et al. 1992). 카제인 첨가구가 무첨가구에 비해 신초증식배수가 높은 것으로 보아 카제인 같은 가수분해물이 성장촉진 역할을 담당하고 있다고 보고했다 (Jun et al. 1998).

세포이식 후 최초의 유도기에서는 세포질 내용물의 합성이 왕성하여 대수기에 이르러 세포질이 농후한 상태로 나타나고 액포가 작다. 그 후 세포분열의 속도가 줄고 세포용적이 확대함에 따라 세포질 내용물은 줄고 액포가 발달하기 시작한다. 이것은 참당귀세포에서도 관찰할수 있어서 계대배양한 지 4 주되는 callus는 비교적 균일한 배형성 세포로 구성되고 8주간 배양한 callus는 신장되고 액포화된 세포가 많이 관찰된다는 보고가 본 실험과 일치하고 있다 (Choet et al. 1993). Callus가 증식된 후 노화된 callus에서는 체세포배를 발생시

키지 못하는 세포는 빠르게 신장되거나 액포화가 일어나서 배형성능을 상실하는 것으로 볼 수 있다. 시호의 callus에서도 callus표면 및 내부세포에서 형태형성능을 갖지 않는 주변의 세포와는 달리 세포질이 풍부하고 액포화되지 않은 크기가 작은 세포들이 부정근의 세포배열을 활발히 하는 시원세포가 되는 것으로 보고하고 있다 (Bae et al. 1994).

적 요

야생 흰 제비꽃 (*Viola patrinii* DC.)의 callus로부터 분열 활성이 높고 균일한 세포주의 생산성 향상을 위한 현탁배양 방법이 세포의 생장에 미치는 영향에 관하여 조사한 결과는 다음과 같다.

Compact callus의 세포생장을 위해서 배지의 종류를 MS, B5, R2, White 배지로 나누어서 실험한 결과 MS배지와 R2 배지의 callus생육이 양호하였으며, White배지를 사용시에는 흰 callus에 붉은 색소 (시코닌계 색소)가 생산되었다.

무기염의 농도에서는 생체중은 MS기본배지에서 건물중은 1/2 NH_4NO_3 , 1/2 KNO_3 가 가장 좋았다.

배지중의 NH_4^+ 와 NO_3^- 농도비를 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100로 한 결과 25:75의 비에서 생육이 가장 양호하였으며, NH_4^+ 의 농도가 낮아질수록 세포에 붉은 색소가 생성되는 경향을 보였다.

Casein Hydrolysate (CH)의 농도가 세포의 생장에 미치는 영향은 5 g/L 첨가시 생체중, 건물중 모두 높았다.

조직학적 관찰에 있어서는 2~4주간 된 callus는 대부분의 세포의 크기가 작고 세포질이 농후한 상태로 비교적 균일한 세포로 구성되어 있고 액포화가 거의 이루어지지 않은 상태로 세포의 분열이 왕성하게 이루어지고 있음을 관찰할 수 있었고, 6주간 배양된 callus는 신장되고 액포화된 세포들이 많이 관찰되었다.

인용문헌

- 이철희 (1999) 자생제비꽃속의 원예작물화, 야생화 연구지 1
- Bae H.H., D.Y.Cho, S.G.Kim, W.Y. Soh, and R.S.Seong (1994) Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on Adventitious Root Formation from Callus of *Bupleurum falcatum*.L. and Its Histological Observation. Kor J. Plant Tissue Culture 21(41):41-46
- Chi B.D., Francois C. (1991) Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. Plant Cell Reports 9:500-504
- Choi S.Y., Peak K.Y., Jo J.T. (1993) Plantlet Production through Callus Culture in *Allium sativum* L. J. Kor Soc. Hort. Sci

- 34(1):16-28
- Choi Y. E. and Soh W. Y.** (1993) Effects of Culture period on somatic embryo formation from callus culture of *angelica gigas nakai*. Kor J. Plant Tissue Culture 20(4):199-204
- Chung E.S. and Chae Y.A.** (1994) Factors Affecting Cell Growth in Suspension culture of *Polygonum tinctorium* Lour. Kor J. Breed. 26(2):172-176
- Collin H.A.** (1987) Determinants of yield of secondary products in plant tissue cultures. Advances in Botanical Research 13:145-187
- Dougall D.K., Frazier G.C.** (1989) Nutrient utilization during biomass and anthocyanin accumulation in suspension cultures of wild carrot cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 18:95-104
- Hiroshi, K., O. Mitsuyoshi and H. Takayasu** (1992) Enhancement of plantlet regeneration by medium exchange in liquid regeneration culture of rice (*Oryza sativa* L.). Jpn. J. Breed. 42:583-594
- Ikeda T., Matsumoto T., Noguchi M.,** (1976) Effects of nutritional factors on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. Agr. Biol. Chem. 40(9):1765-1770
- Jhang H.H., C.H. Park, Y.S.Lee and Y.B. Shin** (1994) Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Suspension Cultures of *Aralia elata* S.. Kor J. Plant Tissue Culture 21(3):167-171
- Jun J.H., Chung K.H., Kang S.J., Park S.Y., Yae B.W** (1998) Influence of medium composition, carbon source, addition Agent and Explant Orientation of Shoot Proferation *Prunus persica* in vitro. Kor J. Plant Tissue Culture 25(2):99-102
- Jung K.H., S.S.Kwak, S.W.Kim, C.Y. Choi, and J.R. Liu** (1991) Improvement of Indole Alkaloid Productivity by Optimization of Medium Concentration and Cell Inoculum Size in Suspension Cultures of Vinca (*Catharanthus roseus*). Kor J. Plant Tissue Culture 18(4):263-269
- Kim C.M., Ko W.J.** (1980) Chemotaxonomic Study on the Genus Viola in Jeju Island. Kor J Bot 23:85-90
- Kim D.H., Y.M. Chung, C.H. Chung, Y. Yeeh, O.C. Kwon** (1996) Effects of suspension culture conditions on cell activity of wild viola (*Viola patrinii* DC.) callus. Kor J. Life Sci 6(2): 94-103
- Kim H.H. and Y.A. Chea** (1994) Effects of Carbon and Nitrogen Sources, Cytokinin and Antibiotics on Corn Formation in In Vitro Culture of *Pinellian ternata* (Thunb.) Breit.. Korean J. Breed. 26(3):276-281
- Kwon O.C., C.H. Chung, J.K. Park, T. Sato, T. Taniguchi, and E. Maeda** (1992) Electrofusion of Protoplasts from Wild Viola and Pansy and the Ultrastructure of the Fusion Products. Korean J. Plant Tissue Culture 19(3):125-132
- Kwon O.C., C.H. Chung, T. Sato, T. Taniguchi, and E. Maeda** (1992) Ultrastructure of Electrofused Products from Pansy (*Viola tricolor*) Mesophyll and Wild Viola (*V. patrinii*) petiole callus protoplasts. Jpn J. Crop Sci 61:469-475
- Kwon. O.K., Kim K.S., Hong Y.P., Han I.S.** (1990) Effect of Daylength and GA3 on the Conversion from Cleistogamy to Chasmogamy in *Viola mandshurica* W.Becker. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 31(3):305-310
- Lee W.K., Y.W. Ryu, S.Y. Byun and H.G. Chung** (1993) Effects of Nutrients And Culture Conditions On The Cell Growth And the Flavonol Glycosides Production in Cell Cultures of *Ginkgo biloba*. Kor J. Biotl. Bioeng. 8(1):55-61
- Lee W.T. and Yook C.S.** (1972) A study of the Genus Viola in Korea(1) -of Sect. Vaginatae-. Kor. J. Plant Tax. 14(1)
- Murashige T** Plant propagation through tissue culture., Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-166
- Nakagawa K, Fukui H., Konagai A., Tabata M.** (1984) Release and crystallization of berberine in the liquid medium of T *Halictrum minus* cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 3:254-257
- Rose, Mrrtin sS.M.** (1975) Effect of ammonium on growth of plant cell(*Ipomea* sp.) in suspension cultures. Can J. Bot. 53:1942-1949
- Shin Y.B.** (1993) Chromosomal Variation in Crops by Para-Fluorophenylalanine(PFP) 1. Effects of culture media, PFP and Hormones on the Induction and Growth of Callus of Buckwheat and Tobacco. Kor J. Breed 23(2):145-152
- Tadahiko Sato, Kwon oh-chang, Hiroshi Miyake, Takeshi Taniguchi and Eizo MAEDA** (1995) Regeneration of plantlets from petiole callus of wild viola (*Viola patrinii* DC.). Plant Cell Reports 14:768-772
- Tanaca H,** (1994) Technological problems in cultivation of plant cells at high density. Biotechnol. Bioeng. 143:78-86
- Yamakawa T., Kato S., Ishida K., Kodama T., Minoda Y.** (1983) Production of anthocyanins by *Vitis cells* in suspension culture. Agric. Biol. Chem. 47(10):2185-2191
- Yun J.W., J.H. Kim, Y.J. Yoo, and S.Y. Byun** (1990) Effects of Nutrients and Cell Aggregate Size on the Biosynthesis of Carotenoid in *Daucus carota* Suspension Culture. Kor J. Plant Tissue Culture 5(4):347-353