

생물반응기에서 형질전환된 식물조직 배양을 위한 기초연구

박 성 화 · 박 돈 희 · 김 재 형 · 허 병 기 · 조 영 일

진남대학교 화학공학과

*인하대학교 생물공학과

**연세대학교 화학공학과

Basic Studies on Cultivation of Transformed Plant Tissue in Bioreactor

Sung-Hwa Park, Don-Hee Park, Jae-Hyung Kim, Byung-Ki Hur*, Yung-Il Joe**

Department of Chemical Engineering, Chonnam National University

*Department of Biotechnology and Bioengineering, Inha University

**Department of Chemical Engineering, Yonsei University

ABSTRACT

Growth properties of carrot hairy roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* were compared in flask and bioreactor. Oxygen transfer coefficient K_{La} was measured during the cultivation in bioreactor. In flask cultures, initially sucrose 30 g / l were nearly exhausted after 20 days. pH was dropped from initially 5.8 to 4.79 after 4 days, but it is stable after that time. Finally, after 28 days, hairy roots were grown about twelve times. In view of the results studied optimum conditions, hairy roots were maintained high growth rates in sucrose 50 g / l, pH 5.8, total nitrogen 60mM.

Also in bioreactor cultures, fixed stainless sieve in bottom and aerated 0.31 vvm, the results of cultivation by the use of sucrose 50 g / l had grown about twenty-eight times and pH variations were liked in flask. As a results, growth rate of 1.756 g fresh weight / day / g inoculum in bioreactor were higher about three times than 0.57 g fresh weight / day / g inoculum in flask culture. K_{La} values were showed a tendency to decrease from 0.209 min⁻¹ to 0.068 min⁻¹.

서 론

1960년대 초부터 식물세포 배양기술이 식물을 이용한 화학원료를 생산하는데 기여하게 되었다. 식물은 제약(생약), 살충제, 향료, 향수, 색소를 포함한 천연화학원료의 근원이다. Farnsworth와 Morris(1)의 보고에 의하면 미생물 배양기술이 진보된 현재에도 제약원료의 25% 정도가 식물에서 추출하여 얻어내고 있다고 한다.

최근에 Fowler(1982)(2), Scragg와 Fowler(1985)(3)

는 유용물질 생산을 위한 식물세포 배양공정을 다음과 같은 장점으로 열거하였다.

1) 지역적, 계절적인 제한과 날씨에 영향을 받지 않아 안정된 자원세포를 공급할 수 있다.

2) 환경의 세이아 용이하므로 유용한 2차대사물의 축적을 조절할 수 있다.

그러나 이러한 장점이 있음에도 불구하고 Panyne(4)은 식물세포 배양에서 오염의 가능성은 더 높고, 계대배양중 생산능이 퇴화되는 경우가 있음을 지적하였

다. 그럼에도 불구하고 식물세포 배양에 성공한 예는 Mitsui Petrochemical Industry가 750 l 규모의 배양기를 이용하여 *Lithospermum erythrorhizon*으로부터 Shikonin을 생산하였다고 1983년 Curtin(5)은 보고한 바 있다. 또한, 성장이 느린 세포배양의 문제점을 극복하기 위하여 성장이 빠르고 동일한 2차대사물을 함유하는 hairy roots를 이용하면 단위 시간당 얻을 수 있는 대사산물이 높기 때문에 이에 대한 연구가 진행 되어오고 있다 (6).

*Agrobacterium rhizogenes*는 식물의 형질을 전환시켜 hairy roots disease(7, 8)를 일으키며 이는 *A. rhizogenes*에 있는 Ri Plasmid가 식물세포의 DNA로 삽입되어 형질 전환(9)을 일으키며, 이때의 hairy roots는 branching 되면서 자란다고 하였다.

hairy roots의 생물반응기 배양은 조직의 shear stress를 최소화하는 방향에 초점을 맞추어 대량배양에 적합한 반응기를 연구해 오고 있다. 일본의 Osamu Kondo(1989)(10)는 각종 반응기를 이용하여 hairy roots를 배양하였으며 스테인레스망 밑에 임펠러를 고정시킨 Turbine brade 반응기에서 10 g-dry cells / l로 가장 높은 성장을 하였다고 보고하였다.

미국의 Shuler(1986)(11)는 roots를 2개의 스테인레스스크린 사이에 고정화시켜 양파를 배양하였다.

본 연구에서는 형질전환된 당근 hairy roots의 플라스크와 생물반응기 배양의 성장특성을 관찰하였으며 성장에 적합한 반응기의 형태를 연구함에 있다.

재료 및 방법

균 주

본 실험에 사용한 균주는 *Agrobacterium rhizogenes* A4 Strain이며 이는 전남대학교 생물학과 식물생리학실험실에서 분양받은 것으로 감자추출 사면배지(감자 20 0g / l, sucrose 2g / l, agar 4%)에 2일간 27±1℃에서 배양한 후 무균수에 희석하여 사용하였다.

hairy roots 유도

당근뿌리 단면에 형성층(Cambium)이 뚜렷하게 나타나는 재료를 선정하여 다음과 같은 방법으로 균을 접종하였다. 먼저 당근을 흐르는 물에서 깨끗이 세척한 후 4% 유한락스용액에 30분 동안 표면 살균한 다음 무균수로 3회 이상 세척하여 1-1.5cm 두께로 절단한다. 절단한 당근뿌리의 아래부분에 희석된 균을 접종하여 27±1℃, 어두운 곳에서 배양하여 hairy roots를 유도하였다.

회분식 배양

균 접종시킨 후 3-4주 사이에 나타나는 hairy roots는 무균적인 hairy roots를 선택하여 초기 성장을 유지하기 위하여 0.8% agar가 포함된 뿌리배양배지(12)에 접종하여 오염이 안된 부분만 연속적으로 계대배양하였다. 이후 M. S. O(MS medium not contained plant hormone) 액체배지(13)를 이용하여 실험에 사용되기까지 진탕배양기에서 온도 27±1℃와 회전속도 100rpm으로 계대배양하였다. 본 실험에서 행한 배양조건은 초기 hairy roots의 양 1g을 사용하였으며 250ml 플라스크에서 60ml M. S. O 배지를 사용하였다.

생물반응기 배양

hairy roots 배양에 있어서 예로적인 shear stress의 영향을 최소화 하기 위하여 다음의 두가지 형태의 반응기를 사용하였다. 첫번째 형태는 혼합반응기 용기안에 테프론수지로 만든 하나의 단을 터빈임펠러 위에 부착하였다. 그 크기는 직경 10cm, 높이 5cm의 원통형으로서 배지와와의 접촉과 산소전달을 충분히 해주기 위해 단의 전체면에 직경 0.7mm의 구멍을 내었다. 두번째 형태는 임펠러를 떼어내고 밑바닥에 Ring sparger로 통기시키고 바닥에서 3cm높이로 구멍직경 0.7mm의 스테인레스망을 부착하여 조직 배양에 사용하였다. 전체적인 생물반응기의 모식도는 Fig. 1과 같다. 이 반응기에서의 배양조건은 pH 5.8, 배양온도 27℃, 통기속도 0.32vvm 배지의 양은 3.2 l이며 초기 hairy roots의 양은 5g fresh weight이다.

생체량 측정

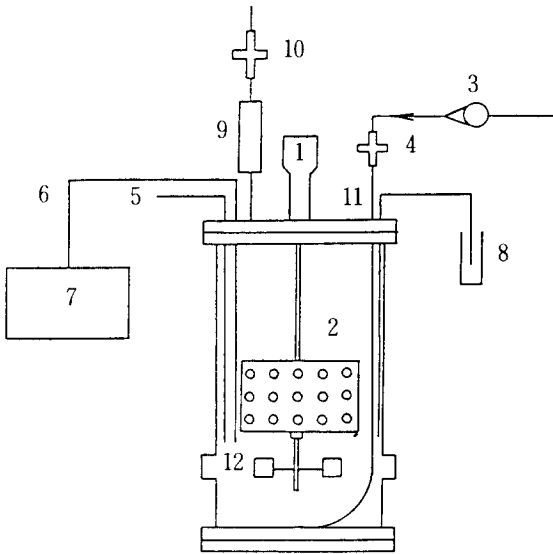
배양된 hairy roots를 3-4겹의 멸균된 여과지가 깔린 1회용 petridish상에서 조심스럽게 수분을 충분히 제거한 다음 Mettler balance상에서 시료의 무게를 측정하여 생체량으로 삼았다.

총당 및 환원당 분석

총당농도는 페놀 황산법(14)으로 환원당은 G. L. Miller (15)가 발표한 DNSA법으로 측정하였다.

Anthocyanin 분석

hairy roots 1g(fresh weight)에 1% HCl이 함유된 메탄올 5ml를 첨가하여 4℃, 40rpm의 진탕반응기에서 24시간 동안 색소를 추출한 후 3600rpm에서 원심분리한 후 530nm 파장의 흡광도를 Anthocyanin 농도(16)를 측정하였다.



- | | |
|--------------------|----------------------|
| 1. Agitation motor | 7. Recorder |
| 2. Teflon sieve | 8. Sample port |
| 3. Flow meter | 9. Exhaust condenser |
| 4. Air filter | 10. Exhaust filter |
| 5. pH meter | 11. Ring sparger |
| 6. D.O. meter | 12. Turbine impeller |

Fig. 1. Schematic diagram of the cultivation system.

물질전달계수(K_{La}) 측정

식물들은 산소의 공급이 필수적이기 때문에 산소 물질 전달계수 K_{La}는 중요한 의미를 갖는다. 이러한 산소물질전달계수는 온도, 교반속도, 통기속도에 영향을 받는다(17). K_{La} 측정방법(18)은 크게 나누어 모델계와 배양계로 나누어 측정된다. 이들 각각의 방법마다 측정 치들이 약간씩 차이가 나지만 본 연구에서 사용한 측정 방법은 모델계에서는 Gassing-in liquid법과 배양계에서는 Dynamic법을 사용하였다.

Gassing-in liquid법에 의한 전달계수 측정

기상과 액상이 완전 혼합상태이고 비배양계(모델계) 이면 배양조 단위 부피당 산소전달량은

$$\frac{dC_L}{dt} = K_{La} (C^* - C_L) \text{ ----- (1)}$$

여기서 C*는 시간이 무한대에서 포화산소농도이고 C_L는 시간에 따른 산소 농도이다. t=0에서 t=t까지 그리고 C_{L0}에서 C_L까지 적분하면 아래식이 성립된다.

$$\ln \frac{C^* - C_{L0}}{C^* - C_L} = K_{La} \cdot t \text{ ----- (2)}$$

배양조에 산소농도가 0이 될때까지 질소를 불어 넣은 다음 질소공급을 중단하고 공기를 불어 넣어 액상의 산소농도가 시간에 따라 증가하는 곡선상에서 얻은 기울기가 물질전달계수 K_{La}가 된다.

Dynamic법에 의한 전달계수 측정

이 방법은 배양중에 통기를 중단하면 액중의 산소농도는 시간에 따라 -Q_{O2}×의 속도로 감소한다. 산소가 한계농도 근처로 떨어졌을때 다시 공기를 불어넣어 액중 산소의 농도를 원상복귀시키며 이때의 액중의 산소농도 변화는 다음식으로 표현된다.

$$\frac{dC_L}{dt} = K_{La} (C^* - C_L) - Q_{O2} \times \text{ ----- (3)}$$

여기에서 ×는 Biomass의 농도이고 Q_{O2}는 비호흡속도 (mmoles of oxygen g⁻¹ biomass h⁻¹)이다. 그리고 식(3)을 변형하면 다음과 같이 된다.

$$C_L = -1 / K_{La} (dC_L / dt + Q_{O2} \times) + C^* \text{ ----- (4)}$$

식(4)에서 C_L대 (dC_L/dt + Q_{O2}×)의 플롯트에서 기울기가 -1/K_{La}이고 절편이 C*가 된다.

결과 및 고찰

회분식 배양결과

성장 특성

Agrobacterium rhizogenes 균을 접종하여 형질전환 시킨 결과를 보면 Fig. 2와 같으며, hairy roots의 branching 하는 특성을 나타내 보이고 있다. 형질전환된 hairy roots를 계대배양하여 사용하였으며, 그것의 성장곡선을 Fig. 3에 보인 바와 같이 배양후 8일까지는 초기부계 1g fresh weight에서 약 2.38g으로 성장이 적었으나 이후 20일까지 빠른 성장을 보여주고 있음을 알 수 있다. 결과적으로 28일간 배양한 hairy roots의 최종부계는 12.12g fresh weight로 약 12배의 성장률을 보였다. 이는 3주간 배양했을때 *Panax ginseng*이 3.75배의 성장률(19)보다는 높으나, 20배의 *Beta vulgaris*(20)와 60배의 *Atropa belladonna*(21)의 성장률보다는 낮은 편이다. 또한 hairy roots의 Anthocyanin 함량은 배양 20일까지는 일정하다가 그 이후에 증가를 보여주고 있다. 배양중 pH는 4일까지 4.89까지 급격하게 감소하다가 이후 일정한 값을 유지하고 있으며 총당은 배양 20일 이후에 거의 고갈 되어진다. 그리고 배양중 생성되는 환원당의 농도

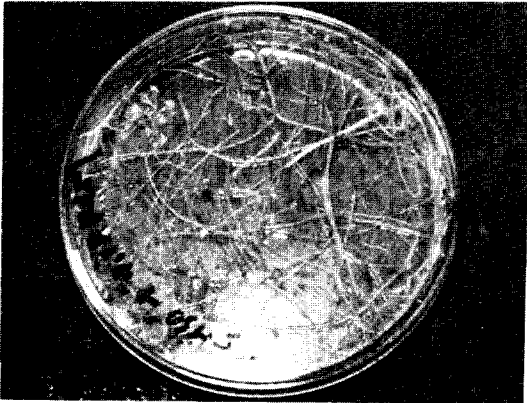


Fig. 2. Hairy roots growing on petridish.

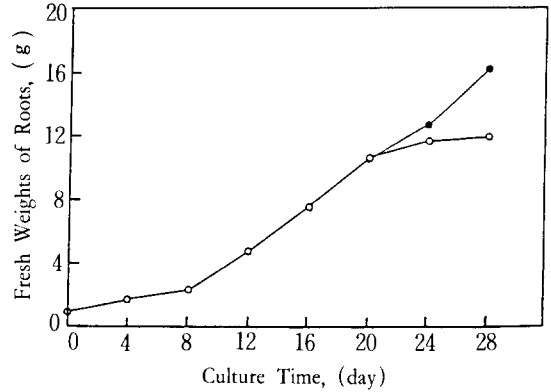


Fig. 4. Comparison of one step and two step cultivation on growth of hairy roots.

- One step cultivation
- Two step cultivation

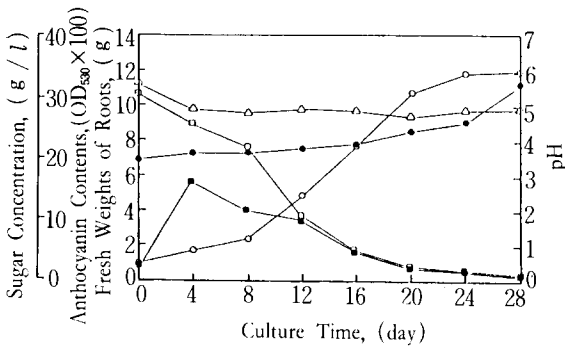


Fig. 3. Growing properties of hairy roots cultured for 28 days in flask.

- Fresh weights of roots
- Total sugar
- Reducing sugar
- Anthocyanin contents
- △ pH

는 4일후에 가장 많이 환원되었다가 이후 감소하고 있음을 알 수 있다.

배양기질인 sucrose가 전부 소요되는 기일이 Fig. 4에서와 같이 20일후가 되며, 이에 따른 새로운 배지로 교체하여 배양시킨 결과 28일간의 hairy roots, 생체량이 16.34 g의 성장을 보여, 유가배양을 시도하면 원하는 생체량을 계속 생산시킬 수 있음을 알 수 있다.

hairy roots 성장에 대한 비성장속도를 구하면 Fig. 5와 같으며, 이때 비성장속도 μ 는 0.084day^{-1} 와 0.178day^{-1} 사이에 있음을 알 수 있다. 이는 목암 연구소 김(19

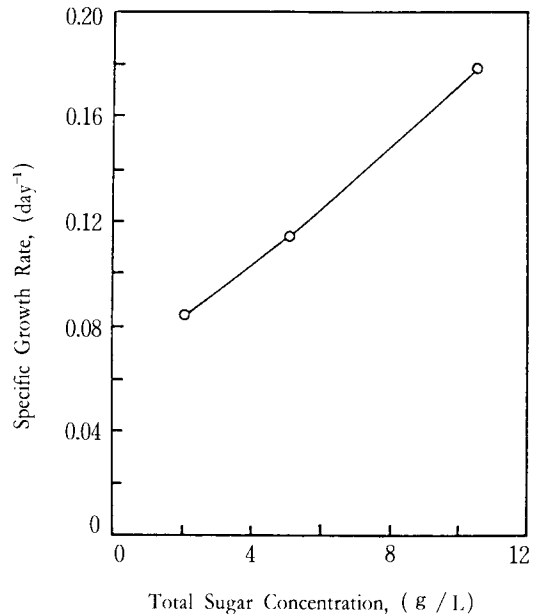


Fig. 5. Specific growth rate vs. total sugar concentration.

89)(22)의 *Thalictrum rugosum* 현탁 배양에서 0.2~0.25 day^{-1} 값보다 적은 값을 나타내고 있다. 이것은 식물세포와 형질전환된 식물조직의 hairy roots 배양과의 차이

에 의한 것으로 사료된다.

탄소원의 영향

Fig. 6에서 탄소원인 sucrose 농도가 5%(w/v)일때 가장 좋은 성장속도를 보여주고 있으며, 그 때 MSO 기본배지 20일간에 배양된 hairy roots가 약 118 g으로 3%와 7%에 비하여 생체량이 약간 크다. 영국의 AFRC 식품연구소의 Wilson(23)의 최근 보고서에 의하면 *Datura stramonium*을 회분식 배양할 때 Gamborg B5배지에서 sucrose 최적농도가 3%(w/v)임을 발표하였다.

본 연구와 비교하면 당근의 hairy roots 배양에서는 탄소원이 더 많이 필요로 하고 있음을 알 수 있다. Anthocyanin 함량은 10 g / l sucrose에서 약간 높은 농도를 보여주고 있으나 다른 기질 농도 변화에 따른 큰 영향은 없었다.

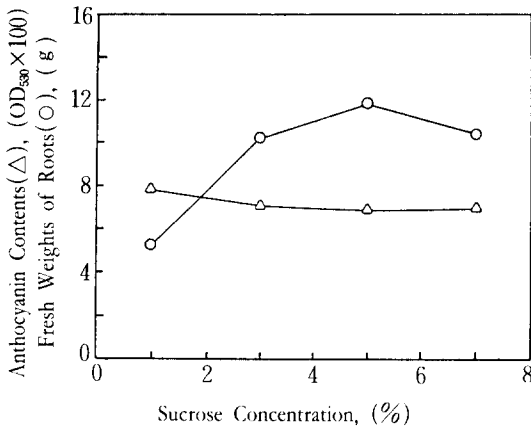


Fig. 6. Effects of sucrose on growth and anthocyanin contents of hairy roots cultured for 20 days in flask.

질소원 및 pH 영향

Fig. 7.과 같이 총질소농도가 60mM MSO 기본배지에서 hairy roots 성장은 10.5 g으로 최대를 보였으며 10 0mM 이상에서는 오히려 성장이 억제된 것으로 보였다. Anthocyanin 함량은 그 반대의 경향을 보이고 있다. Fig. 8에서는 당근의 hairy roots성장이 pH에 큰 영향을 보이지 않고 있음을 나타내고 있다. 이것은 전담대 황(1989)(24)의 보고와 비슷한 경향을 보여 주었다.

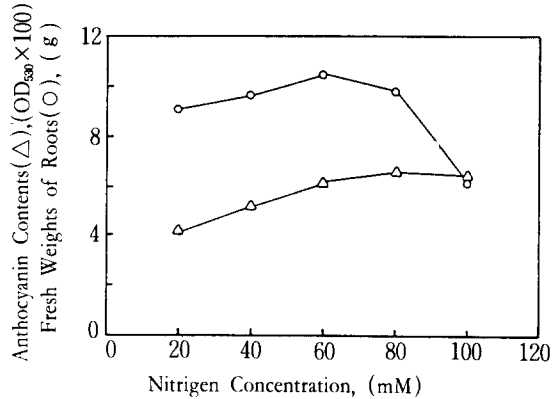


Fig. 7. Effects of nitrogen concentration on growth and anthocyanin contents of hairy roots cultured for 20 days in flask.

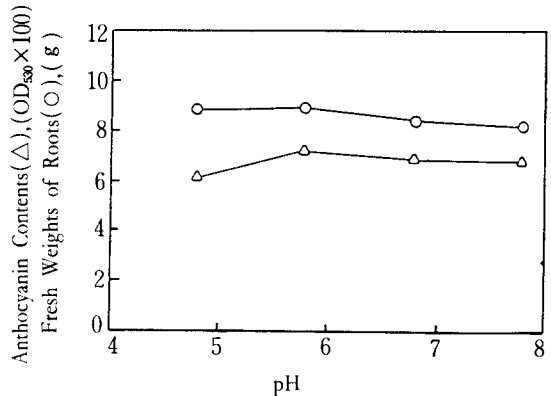


Fig. 8. Effects of pH on growth and anthocyanin contents of hairy roots cultured for 20 days in flask.

물질전달계수(K_{La}) 측정결과

Fig. 9.는 Stainless sieve가 고정된 반응기(Type 2)에서 통기속도에 따른 K_{La} 값의 변화를 gassing-in liquid 법으로 측정해본 결과이며 교반을 시키지 않고 통기속도 0.16-0.63 v.v.m 사이에서 산소 전달계수 0.0898-0.3377 min⁻¹에서 측정되었고 통기량 증가에 따라 일정하게 증가하는 경향을 보여주었으며 이는 물질전달 속도가 통기속도의 함수라는 M. Johnson(25)의 보고와 일치하였다.

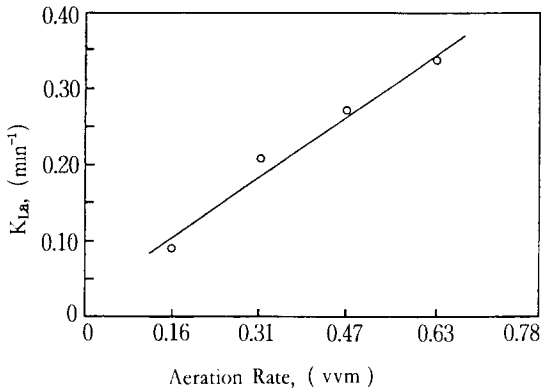


Fig. 9. Effects of aeration on K_{La} in bioreactor equipped stainless sieve.

생물반응기 배양결과

생물반응기(Type 1)

테프론으로 만든 쟁반형 단에서의 sucrose 30 g / l 농도에서 hairy roots 배양의 성장 특성은 Fig. 10과 Fig. 11에 나타내었으며, 16일 배양하여 38.8 g의 hairy roots가 얻어져 초기 접종량의 약 8배의 성장율을 보였다. 그리고 총당농도는 배양초기 28.7 g / l에서 16일 후 12.9 g / l로 소비되었고 pH는 초기 3일까지 4.79까지 떨어졌다가 이후 일정한 값을 나타내어 플라스크와 비슷한 경향을 보여주고 있다. 또한 Anthocyanin 함량은

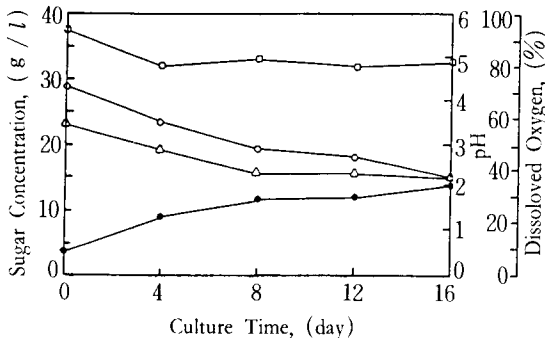


Fig. 10. Growth properties of hairy roots cultured for 16 days in bioreactor equipped teflon sieve (sucrose 30 g / L).
 ○ Total sugar ● Reducing sugar
 □ pH △ D.O.

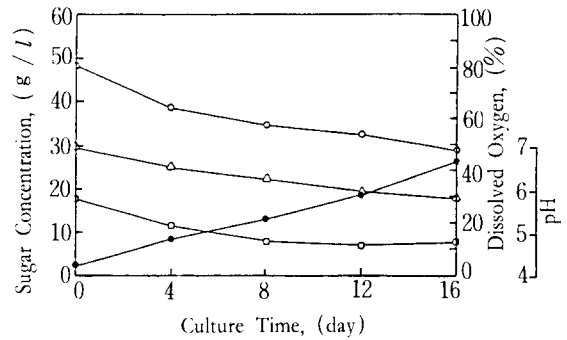


Fig. 11. Growth properties of hairy roots cultured for 16 days in bioreactor equipped teflon sieve (sucrose 50 g / l).

○ Total sugar ● Reducing sugar
 □ pH △ D.O.

초기 0.06 OD₅₃₀에서 배양후 0.103 OD₅₃₀의 흡광도를 나타내었다.

당농도는 배양 16일이 지나 28.9 g / l이 남아있고 이때의 당은 거의 환원되어짐을 알 수 있다. 그리고 pH는 배양 6일까지 4.8까지 떨어졌고, 이후 일정한 값을 유지하였으며 16일 배양 후 45 g fresh weight가 얻어져 약 9배의 성장을 하였고 초기 색소함량이 0.064에서 0.126의 흡광도를 나타내어 성장율은 플라스크에서와 비슷하였으나 Anthocyanin 함량은 플라스크에서 보다 높은 값을 보였다. 결과적으로 생물반응기에서 sucrose 최적 농도는 플라스크에서와 동일한 5% (w/v)임을 알 수 있었다.

생물반응기(Type 2)

생물반응기(Fig. 12)의 실험결과는 Fig. 13에서 보는바와 같으며 초기 50 g / l sucrose는 배양 16일 동안에 약 25 g / l가 소비되었고, pH는 초기 4일까지 4.67까지 떨어지다가 이후 완만하게 상승하는 경향을 보여주었다.

그리고 용존산소는 초기 50.8%에서 27.5%까지 떨어지고 있음을 알 수 있고 이는 hairy roots가 자라면서 산소전달에 장애가 되고 있으므로 사료된다. 배양중에 측정된 K_{La} 값들의 변화는 Fig. 14에서 나타낸바와 같이 초기 0.209 min^{-1} 에서 0.067 min^{-1} 까지 감소하고 있음을 알 수 있다. 이는 포르투갈 E. Lima Costa(26)가 2 l 교반반응기에서 *Cynara cardunculus*의 배양중에 있어서 0.1-0.23 min^{-1} 의 K_{La} 값보다 약간 작게 측정되었다.

생물반응기 Type 2 배양 16일 동안 140.5 g이 얻어졌

는데 이는 초기 hairy roots 양의 28배에 해당되는 성장을 보여주었고 Type 1의 반응기 보다 거의 3배에 가까운 성장을 하였다. 그리고 Anthocyanin 함량은 초기 0.062 OD₅₃₀ 배양후 0.143 OD₅₃₀ 을 나타내 플라스크와 Type 1의 반응기에서보다 높은 색소 함량을 보여주었다.

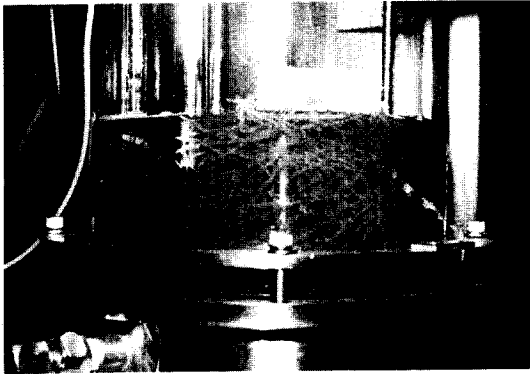


Fig. 12. Hairy roots for 16 days in bioreactor equipped stainless sieve.

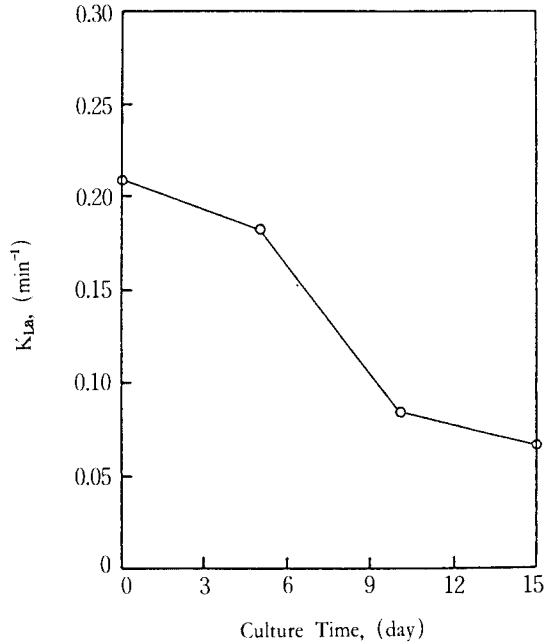


Fig. 14. Measurement of K_La during the cultivation for 16 days in bioreactor equipped stainless sieve.

요 약

*Agrobacterium rhizogenes*에 의해 형질전환된 당근 모상근(hairy roots)를 회분식인 플라스크와 생물반응기에서 배양하여 각각의 성장 특성을 비교하였다. 그리고 배양중 반응기에서의 산소의 물질전달계수 K_{La} 를 측정하였다.

플라스크에서 초기 30 g/l sucrose는 배양 20일 후 거의 고갈되었고 pH는 초기 5.8에서 4일후 4.79까지 급격하게 떨어지다가 그 이후에서 거의 일정한 값을 유지하여 배양 28일 동안에 약 12배의 성장을 보여주었다. 그리고 최적배지를 조사한 결과 sucrose 50 g/l, pH 5.8, 총질소농도 60mM에서 hairy roots는 높은 성장율을 유지하였다.

또한 스테인레스망을 하부에 고정하고 0.31 vvm 으로 통기시킨 생물반응기에서 50 g/l sucrose를 사용하여 배양해본 결과 배양 16일 동안에 약 28배의 성장을 보여 플라스크의 0.57 g-fresh weight/day/g inoculum의 성장율보다 생물반응기에서 1.756 g-fresh weight/day/g

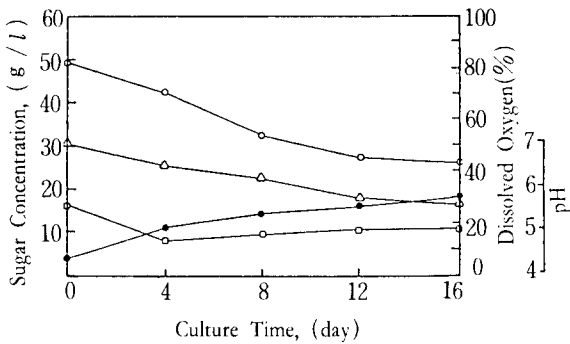


Fig. 13. Growth properties of hairy roots cultured for 16 days in bioreactor equipped stainless sieve(sucrose 50 g/l).
 ○ Total sugar ● Reducing sugar
 □ pH △ D.O.

g inoculum 으로 약 3배정도 더 성장하였다. pH의 변화는 플라스크에서와 비슷한 결과를 보여 주었으며 배양 중 산소물질전달계수 K_{La} 값은 0.209 min^{-1} 에서 0.068 min^{-1} 까지 감소하는 경향을 보였다.

감 사

본 연구는 90년도 한국과학재단 연구비 지원으로 수행되었으며, 식물조직 형질전환에 많은 도움을 주신 전남대 황백 교수님과 생물반응기 제작에 협조하여 주신 한국 발효기 유대환 사장님께 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. R. N. Farnsworth, and P. M. Morris, (1976).
2. M. W. Fowler, (1983), Plant Biotechnology, S. H. mantell & H. H. Smith, 3-37, Cambridge University Press.
3. F. Constabel and Indra K. Vasil (1988), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, **5**, P.103, Academic Press, N. Y.
4. G., Panyne, M. L. Shuler, and P. Brodelius, (1987), Large Scale Cell Culture Technology, Lyderson, B. K., P. 193 Hanser Publ.
5. M. E. Curtin, (1983), arvesting profitable products from plant tissue culture, Biotechnology, 648-657.
6. G. Jung and D. Tepper (1987), Plant Science, **50**, 1 45.
7. F. F. White, and E. W. Nester(1980), J. Bacteriol, **1 41**, 1134.
8. F. F. White, B. H. Taylor, G. A. Huffman, M. Gorden and E. Nester(1985), J. Bacteriol., **164**, 33.
9. M. Chilton, D. A. Tepper, A. Petit, C. David, and J. Tempe(1981), Nature, **295**, 432.
10. Osama Kondo, Hiroyuki Honda, Masahito Taya, and Takeshi Kobayashi (1989), Appl. Microbiol. Biotechnol., **32**, 291.
11. Michael I. Shuler (1990), Proc. APBioChEC '90, 2 2, Seoul.
12. S. John Pirt(1975), Principles of microbe and cell culture, wiley, 4
13. John Draper, Roderick Scott and Philip Armitage (1988), Plant Genetic Transformation and Gene Expressin, Blackwell Scientific Publications, 142.
14. 주현규, 안병진, 이형환(1985), 미생물 유전학 실험, 문운당, 157, 서울
15. G. L. Miller(1959), Analytical Chemistry, **31**, 426.
16. N. Masayuki, and Y. Hitoshi (1985), Plant Cell Culture, **4**, 252.
17. P. F. Stanbury and A. Whitaker (1984), Principles of Fermentation Technology, 173-176.
18. Sung-W. Park(1990), Thesis, Dept. of Chemical Engin., Chonnam Nat. Univ., Kwangju.
19. Takafumi Yoshikawa and Tsutomu Furuya(1987), Plant Cell Culture, **31**, 449.
20. J. D. Hamill, A. J. Parr, R. J. Robins, and M. J. C. Rhodes (1986), Cell Culture, **5**, 111.
21. Hiroshi Kamada and Nobuyuki Okamura (1986) Plant Cell Reports, **5**, 239.
22. Dong-Il Kim (1989), Korea J. Biotechnol. Bioeng., **4**(3) 271.
23. P. D. G. Wilson, M. G. Holton, P. T. H. Meehan, C. R. Waspe and M. J. C. Rhodes (1990), VIIth International Congress on Plant Tissue and Plant Cell Culture, Amsterdam June 338.
24. Baik Hwang(1989), Korea J. Biotechnol. Bioeng., **4** (3), 246.
25. M. Johnson, G. Andre, C. Chavarie, and J. Archambalt (1990), Biotech. and Bioeng., **35**, 43.
26. E. Lima Costa, E. A. Faria, M. S. S. Pais and J. M. S. Cabral(1990), VIIth International Congress on Plant Tissue and Plant Cell Culture, Amsterdam June 340.

(Received; November 10, 1990, Accepted; November 30, 1990)