

## 저온 보존을 이용한 간편 중기 식물캘러스 저장법

박성철 · 박수현 · 김소영 · 정유정 · 김차영 · 정재철

# A simple mid-term preservation method (SMPM) of plant callus under low temperature conditions

Sung-Chul Park · Su Hyun Park · Soyoung Kim · Yu Jeong Jeong · Cha Young Kim · Jae Cheol Jeong

Received: 23 September 2022 / Revised: 27 September 2022 / Accepted: 27 September 2022  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** The repeated monthly or weekly subculture of plant callus is labor intensive and increases the risk of somaclonal variation from the parental callus line. The most effective method for preserving plant callus is cryopreservation, which involves storage in liquid nitrogen. However, this method cannot be applied to the callus of different plant species in the same manner, so it is difficult to develop a standardized cryopreservation method. In addition, the survival rate of the frozen callus after thawing and the regeneration rate after survival are uncertain. Therefore, it is necessary to develop a method to extend the subculture interval of plant callus in an active state. In this study, active plant calli of various species without freezing was incubated at 15°C for 4 to 12 weeks without subculture. After 12 weeks, 8 lines of plant callus grew less than 2-fold when cultured at 25°C, but at least 2 times as much when cultured at 15°C. Moreover, total antioxidant activity did not differ significantly between plant callus recovered at 25°C after culturing at 15°C or at 25°C. These results show that the subculture interval can be extended at a temperature of 15°C without need for modified medium composition or additional

processes. In addition, positive results in all calli of several plant species are expected to reduce labor as well as somaclonal variation by increasing the subculture.

**Keywords** Plant cell culture, Preservation, Low temperature, Recovery, Antioxidant activity

## 서론

식물은 오랜 시간 동안 인간생활에 영양 공급원으로 사용되었다. 그리고 phenolics, alkaloids, saponins, terpenes, lipids 등의 식물 2차 대사산물은 의약품, 식품 첨가물 및 화장품의 원료로 널리 사용되어지고 있다(Eibl et al. 2018). 하지만 농업 및 산업에 의한 특정 식물의 선택적 재배, 환경오염, 기후변화로 인해 식물 자원의 다양성은 위협받고 있다. 이에 대한 대안으로 최근 식물세포배양 기술이 주목받고 있으며 이는 통제된 환경에서 식물 세포, 조직 및 기관을 배양하여 희귀 또는 멸종 위기에 놓인 식물 중에서도 귀중한 식물 2차 대사산물의 지속 가능한 공급을 가능하게 할 수 있는 잠재력을 가지고 있다(Efferth 2019; Eibl et al. 2018; Krasteva et al. 2021).

식물의 상처회복이나 옥신 혹은 사이토키닌과 같은 성장 호르몬의 조절을 통하여 탈분화(dedifferentiation) 된 캘러스(callus)로 명명되는 식물세포형이를 유도할 수 있다(Chai et al. 2011; Feher 2019; Sugimoto et al. 2011). 이러한 캘러스는 목적에 따라 체세포 배발생을 통하여 완전한 식물체로 다시 분화시키거나 혹은 미분화 캘러스 자체를 배양하여 식물체내 유용 이차대사산물을 생산하는 목적으로 사용되기도 한다. 최근 Jeong et al. (2020)에 의해 포도의 캘러스를 이용하여 포도의 유용 2차 대사산물인 resveratrol과 viniferin을 생산한다는

S. -C. Park · S. H. Park · S. Kim · Y. J. Jeong · J. C. Jeong · C. Y. Kim (✉) · J. C. Jeong (✉)  
한국생명공학연구원 생물자원센터  
(Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongseup 56212, Republic of Korea)  
e-mail: kimcy@kribb.re.kr, jcjeong@kribb.re.kr

S. H. Park · S. Kim  
전남대학교 응용식물학과  
(Department of Applied Plant Science, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju, 61186, Republic of Korea)

**Table 1** List of calli

KCTC No.	Name	Korean Name	Source	Culture conditions	Culture Media
PC4282	<i>Paeonia lactiflora</i>	작약	Immature embryo	25°C. Dark	MS1D
PC4289	<i>Ilex serrata</i>	낙상홍	Zygotic embryo	25°C. Dark	MS1D
PC4298	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	하늘타리	Leaf	25°C. Dark	MS1D
PC4306	<i>Hibiscus mutabilis</i>	부용	Petiole	25°C. Dark	MS1D
PC4319	<i>Capsicum annuum</i>	파프리카	Hypocotyl	25°C. Dark	MS1D
PC4321	<i>Capsicum annuum</i>	파프리카	Leaf	25°C. Dark	MS1D
PC4334	<i>Commelina communis</i>	닭의장풀	Hypocotyl	25°C. Dark	MS1D
PC4340	<i>Ajuga multiflora</i>	조개나물	Leaf	25°C. Dark	MS1D

보고에 이어 식물세포배양을 이용하여 paclitaxel, shikonin, rosmarinic acid, artemisinin, ginsenoside 등을 생산하는 연구가 지속적으로 보고되고 있다(Georgiew et al. 2009; Motolinia-Alcántara et al. 2021). 특히 paclitaxel의 경우 FDA 승인을 받은 항암제로 매년 1 ton 이상이 생산되어지고 있고, Docetaxel, rosmarinic acid, berberins, shikonin 등이 식물세포배양을 이용하여 산업화 목적으로 대량 생산이 진행되고 있다(Motolinia-Alcántara et al. 2021). 이러한 식물 조직 배양은 기초 과학 및 산업 응용 분야에서 중요한 기술로 주목받고 있다.

식물 캘러스의 2차 대사산물의 양과 품질은 식물의 품종, 기관, 발달 단계에 의해 영향을 받는다. 산업적으로 사용하기 위한 성장 속도가 빠르고, 안정적인 고품질 캘러스를 구축하기 위해서는 우수한 캘러스의 유도도 중요하지만 그의 보관 및 보존도 중요하다. 캘러스는 일반적으로 25°C에서 배양하며 성장 속도에 따라 2~4주 간격으로 계대배양을 실행한다(Murthy et al. 2014). 하지만 지속적인 계대배양은 조직배양에서 발생할 수 있는 유전적 변형인 somaclonal variation을 야기시켜 캘러스 생장 혹은 2차 대사산물의 생산량을 감소시킬 수 있으므로 somaclonal variation을 줄이는 것은 캘러스의 산업적 이용에 있어 아주 중요하다(Motolinia-Alcántara et al. 2021; Murthy et al. 2014). 이를 해결하기 위한 효과적인 방법은 최초 안정화된 모세포의 계대배양 간격의 증가를 통해 계대배양 회수를 줄여 변이를 최소화하는 것이다.

계대배양 간격을 증가시키는 방법의 선택은 의도한 보관 기간에 따라 다르다. 계대배양 간격을 최대한 증가시키는 가장 좋은 방법은 액체질소를 이용한 초저온 동결보존을 통한 보존방법이 있다. 현재 몇 가지 식물세포주들의 초저온 동결보존 방법들이 보고되어 있으나 보존재의 종류 및 동결 방법, 식물세포주의 다양한 특성때문에 보편적으로 적용할 수 있는 범용성 보존 프로토콜은 매우 제한적이다. 종 간의 차이 및 동일한 종의 다른 조직, 세포 분열 속도, 액포의 형성, 세포벽의 구조, 2차 대사산물의 종류의 따라서 동결보존재의 종류가 달라질 수 있는 것으로 보고되고 있다(Kulus 2019; Nausch and Buyel 2021). 다양한 특징의 식물세포주에 적용할 수 있는 새로운 범용 프로토콜의 개발은 많은 비용과

노동력을 소모하게 되어 많은 식물 캘러스를 다루는 경우 비효율적인 방법이 될 수 있다. 또한 동결보존 세포주의 해동 후 회복 시간이 장시간 소요되는 경우가 많아 동결보존 방법 개발 시 고려되어야 할 사항이다.

활성 상태의 식물세포주의 단기 및 중기 계대배양 보존의 경우 성장 억제제를 사용하여 계대배양 간격을 증가시킬 수 있다. 배양 중 성장을 억제하는 방법으로는 abscisic acid와 같은 성장 조절제를 첨가하거나 탄소원인 sucrose 농도를 낮추거나, mannitol과 같은 삼투 활성 물질을 배양 배지에 첨가하는 방법이 있다(Vidyagina and Shestibratov 2018). 또한 호흡을 억제하는 방법으로 저온 단일 처리 혹은 phosphate를 제한한 배지, 오일, 실리콘처리와 저온을 동시처리를 통하여 식물 캘러스의 계대배양 간격을 3개월에서 6개월가량 증가시키는 연구가 진행되었다(Augereau et al. 1986; Boisson et al. 2012; Guo et al. 2013; Moriguchi et al. 1988). 하지만 대부분의 연구들은 2~3개 특정 식물세포주를 대상으로 한 제한적인 방법이며 좀 더 다양한 식물세포주에 적용을 할 수 있는 방법은 아직 보고된 바 없다.

본 연구에서는 배지 조성 변화없이 온도조절을 통해 고체 배지 상에서 식물 캘러스의 보존을 범용적으로 8~12주 중기 보존할 수 있음을 실험을 통해 증명하였다. 또한 25°C와 15°C에서 식물세포주를 보관한 후 8주 12주 후 회복 및 대사물질 함량의 변화를 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

실험에 사용된 식물세포주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양 받은 작약(PC4282), 낙상홍(PC4289), 하늘타리(PC4298), 부용(PC4306), 파프리카(PC4319, PC4321), 닭의장풀(PC4334), 조개나물(PC4340)을 사용하였다. 식물 캘러스 유도 기원조직 및 배양배지 정보는 Table 1에 정리하였다. 분양 받은 식물세포주는 1 mg/L의 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D)와 4 g/L의 gelite가 포함된 MS배지(Murashige and

**Table 2** Weight (in grams) of callus after appropriate time at the specified temperature

Callus	25°C			15°C			
	4 weeks	8 weeks	12 weeks	4 weeks	8 weeks	12 weeks	
작약	PC4282	5.38 ± 0.79	4.32 ± 0.92	3.79 ± 0.62	2.70 ± 0.84	4.36 ± 0.75	3.88 ± 0.43
낙상홍	PC4289	15.90 ± 3.88	10.79 ± 0.89	7.94 ± 1.51	4.36 ± 1.49	10.23 ± 1.90	8.98 ± 1.80
하늘타리	PC4298	9.65 ± 0.71	8.40 ± 0.81	7.67 ± 1.20	2.74 ± 0.45	3.77 ± 0.61	3.99 ± 1.45
부용	PC4306	7.41 ± 1.97	9.59 ± 1.19	8.51 ± 0.98	1.10 ± 0.23	1.59 ± 0.86	1.53 ± 0.79
파프리카	PC4319	2.95 ± 0.76	4.81 ± 1.11	5.73 ± 0.25	0.80 ± 0.09	0.96 ± 0.18	1.08 ± 0.32
파프리카	PC4321	8.19 ± 1.68	12.18 ± 1.58	10.09 ± 2.22	0.87 ± 0.04	1.21 ± 0.25	0.83 ± 0.07
닭의장풀	PC4334	11.05 ± 2.17	10.79 ± 0.64	10.22 ± 3.52	1.84 ± 0.19	3.28 ± 0.71	2.76 ± 0.66
조개나물	PC4340	13.88 ± 1.37	11.20 ± 1.28	8.50 ± 0.89	5.90 ± 1.24	9.40 ± 1.65	8.84 ± 1.02

Skoog 1962)에 2주 간격으로 계대배양하여 증식 후 실험에 사용하였다.

저온 보존 처리

식물세포주의 성장을 측정하기 위하여 1 plate에 약 1.8 g의 식물 캘러스(0.2 g/캘러스)를 치상 후 25°C에 1주일간 배양하여 오염 유무 및 식물 캘러스의 생착을 확인하였다. 이후 식물 캘러스를 25°C와 15°C에 보존하며 4주, 8주, 12주 후 성장을 증중량을 측정함으로 확인하였다. 또한 4, 8, 12주 동안 25°C와 15°C에 보관 후 동일한 무게로 계대 하여 25°C에서 이들의 회복을 관찰 및 증중량을 측정하였다. 모든 시료를 무게를 측정 후 동결건조하여 이 후 실험에 사용하였으며 각 조건당 5개의 plate를 사용하여 실험을 수행하였다.

DPPH radical 소거 활성

DPPH assay는 Sachett et al. (2021)의 방법을 이용하였다. 80% 메탄올을 이용하여 동결건조된 식물 캘러스에서 추출물을 추출 후 100 ug의 추출물과 100 μM DPPH 용액을 1시간 반응시킨 후 517 nm spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 inhibition %로 계산 후 대조군(25°C 4주 계대배양)과 15°C 조건에서 8주 12주 배양 후 25°C에서 4주 간 회복배양한 샘플들의 상대적 값으로 표현하였다.

결과 및 고찰

저온 보존 기간 중 식물 캘러스의 성장

캘러스의 보존 온도와 호흡 저해에 따른 캘러스의 보존 효율 및 회복을 0.8 bar 진공 조건과 4°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C 조건에서 실험을 수행하였다. 그 결과 진공 처리하지 않은 15°C 보관 조건에서 4개의 식물 캘러스 중 3개의 캘러스가

회복되는 것을 확인하였다. 20°C 역시 좋은 회복 효율을 보였으나 2~3개월 보존시 배지가 고갈되는 것을 확인하였다 (data not shown).

위 결과를 바탕으로 여러 캘러스를 15°C 조건에서 식물세포주의 보존 및 회복을 확인하기 위하여 작약(PC4282), 하늘타리(PC4298), 낙상홍(PC4289), 부용(PC4306), 파프리카(PC4319, PC4321), 닭의장풀(PC4334), 조개나물(PC4340) 캘러스를 각 15°C, 25°C에 보관 후 성장을 관찰하였다. 25°C에서 캘러스의 성장은 4주 배양시 최초 계대배양시 무게에 비해 최소 파프리카(PC4319) 2.95배에서 최대 낙상홍(PC4289) 15.9배로 증가하였으며, 캘러스 종류별로 큰 차이를 보였다. 부용(PC4306)과 파프리카(PC4319, PC4321) 이외의 캘러스는 배양 4주에 가장 높은 biomass를 보였으며 8주, 12주에서 mass가 감소하는 경향을 보였다. 부용(PC4306)과 파프리카(PC4319, PC4321)경우 8주에 가장 높은 biomass를 보였다 (Table 2).

15°C에서 캘러스의 성장은 전체적으로 25°C에 비해 저해되었다. 4주간 배양시 생장은 파프리카(PC4319) 최소 0.80배에서 조개나물(PC4340) 최대 5.9배로 증가하였으며 대부분의 캘러스는 배양 8주에 최대 10.23배(낙상홍)로 가장 높은 biomass를 보였다. 부용(PC4306)과 파프리카(PC4319, PC4321) 경우 15°C 배양 조건에서 biomass는 2배 미만의 성장을 보였으며 나머지 캘러스는 3배 이상의 성장을 보였다. 온도별 동일한 캘러스의 성장변화가 관찰되었다. 파프리카(PC4321)는 25°C 조건에서 15°C에 비해 최대 10배 이상 biomass 증가가 관찰되었고 작약(PC4282)과 낙상홍(PC4289)의 경우 0.5배 미만의 biomass 차이를 보였다.

저온은 식물의 성장을 저해하는 중요한 요인 중 하나이다. 저온(0~15°C) 조건에서 식물은 시들거나(wilting), 백화(chlorosis), 괴사(necrosis) 현상이 일어난다(Ruelland and Zachowski 2010). 이러한 현상은 세포벽 구조변화, 지질의 조성 변화를 일으키며 장기간 노출시 식물은 죽게 된다(Theocharis et al. 2012). 하지만 본 연구의 결과에서 15°C 저온조건에서는 25°C에 비해 세포의 성장은 1.5배~10배까지 차이가 나지만

**Table 3** Weight (in grams) of callus after 4 weeks of recovery culture following indicated storage conditions

Callus	Recovery at 25°C after incubation						
	25°C			15°C			
	4 weeks	8 weeks	12 weeks	4 weeks	8 weeks	12 weeks	
작약	PC4282	3.9 ± 0.47	1.09 ± 0.43	0.9 ± 0.01	3.97 ± 0.81	3.33 ± 0.27	2.43 ± 0.23
낙상홍	PC4289	1.34 ± 0.71	0.42 ± 0.02	0.48 ± 0.06	8.26 ± 3.78	4.46 ± 2.31	2.17 ± 0.16
하늘타리	PC4298	7.62 ± 0.94	1.85 ± 0.39	1.13 ± 0.04	8.7 ± 0.81	5.28 ± 1.34	2.15 ± 0.63
부용	PC4306	10.19 ± 1.64	1 ± 1	1.05 ± 0.18	11.04 ± 3.44	10.49 ± 1	10.25 ± 0.66
파프리카	PC4319	2.6 ± 0.3	1.67 ± 0.67	1.75 ± 0.46	2.51 ± 0.28	3.99 ± 0.81	3.06 ± 0.98
파프리카	PC4321	6.58 ± 0.74	1.44 ± 0.34	0.92 ± 0.09	3.02 ± 0.98	4.98 ± 2.15	2.97 ± 1.64
닭의장풀	PC4334	6.77 ± 1.15	2.98 ± 0.75	0.87 ± 0.17	8.26 ± 1.43	3.5 ± 2.23	2.56 ± 1.4
조개나물	PC4340	15.8 ± 2.35	1 ± 1	0.77 ± 0.04	15.32 ± 1.84	8.25 ± 1	6.75 ± 2.92

모든 캘러스가 15°C 저온조건에서도 최고 biomass는 최초 계대시점의 캘러스보다 증가하는 것을 확인하였다. 이는 15°C 저온조건이 성장은 억제하나 2~3개월간의 기간 동안 식물 캘러스를 괴사시키지 않음을 보여준다. 이런 현상은 식물 캘러스마다 차이가 있을 것으로 예상하며 이를 확인하는 실험이 필요할 것으로 예상된다.

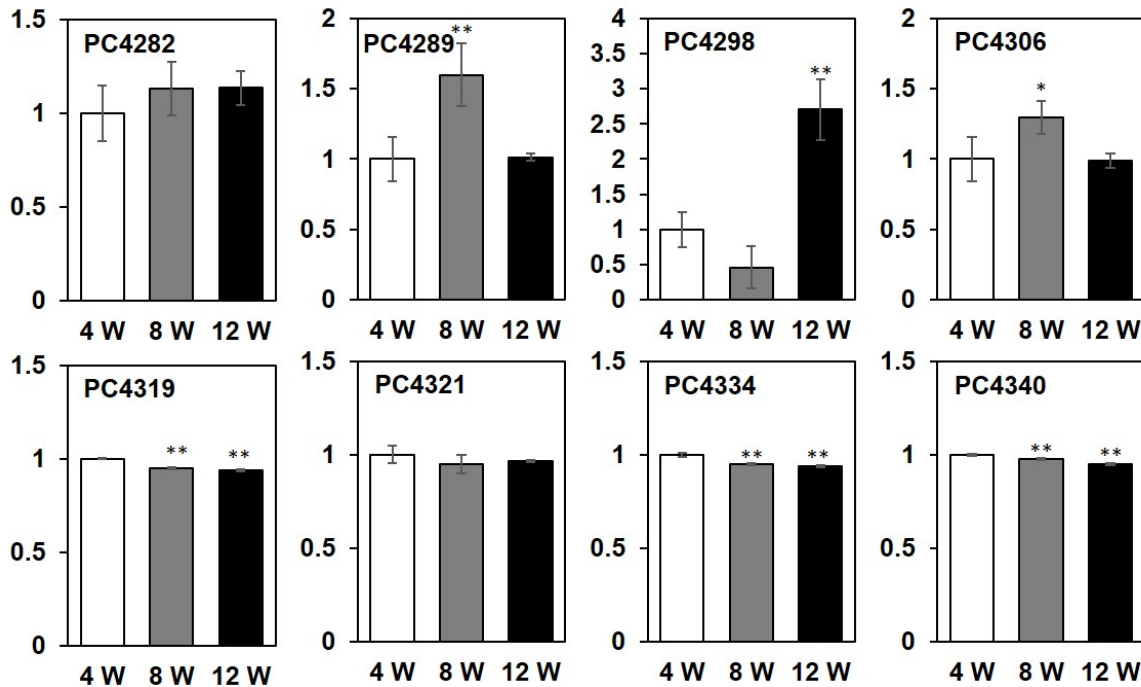
#### 식물 캘러스 회복

기존 보편적인 캘러스 보존 온도인 25°C와 저온 조건 15°C에서 4, 8, 12주간 보관한 캘러스를 다시 각각 계대하여 모두 25°C에서 4주간 회복하여 이들의 변화를 관찰하였다(Table 3). 대조군으로는 4주 동안 25°C에서 계대배양한 캘러스를 사용하였다. 25°C와 15°C 조건에서 4주간 보존한 캘러스는 8종류 모두 25°C 회복 조건에서 2배 이상의 biomass 증가를 보이며 캘러스 회복이 확인되었다. 하지만 25°C에서 8주간 배양시 작약(PC4282), 하늘타리(PC4298), 파프리카(PC4319, PC4321), 닭의장풀(PC4334) 5개 세포주만이 최초 계대한 캘러스 보다 무게가 증가하며 회복이 되었다. 그중 닭의장풀(PC4334)만 약 3배의 무게 성장을 보였으며, 나머지 7개의 캘러스는 2배 미만의 무게 변화를 보였다. 12주 배양 후 25°C에서 회복시킨 경우 하늘타리(PC4298), 부용(PC4306), 파프리카(PC4319) 3개 캘러스만 최초 계대한 캘러스에 비해 biomass가 증가되는 것을 확인하였으며 2배 이상의 biomass가 증가를 보인 캘러스는 관찰되지 않았다. 15°C에서 8주간 배양 후 25°C에서 4주간 회복한 캘러스는 8개 캘러스 모두 초기 무게보다 3배 이상 증가하였으며 12주 배양 후 25°C에서 4주간 회복한 캘러스는 초기 배양보다 2배 이상 증가를 보였다. 특히 부용(PC4306)은 12주 배양 후 25°C에서 4주간 회복된 캘러스는 초기 배양시보다 10배 이상 biomass가 증가하였으며, 조개나물(PC4340)은 6배 이상, 파프리카(PC4319)의 경우 3배

이상의 무게 증가를 보였다.

본 연구에서 15°C에서 여러 식물 캘러스를 2-3개월 보존이 가능함을 확인하였다. 이러한 중기 보존이 식물 캘러스가 가지는 물질함량에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 DPPH radical 소거능을 이용한 항산화 변화를 측정하였다. 대조군으로 25°C에서 4주 배양한 캘러스를 사용하였으며 15°C에서 8주, 12주 배양 후 25°C에서 4주간 회복된 캘러스를 비교하였다. DPPH radical 소거능은 낙상홍(PC4289) 캘러스에서 대조군에 비해 8주 배양 후 회복된 캘러스에서 약 1.5배 증가하였으며, 하늘타리(PC4298)에서 대조군에 비해 12주 배양 후 회복된 캘러스에서 3배의 증가를 보였다. 이를 제외하고 15°C에서 8주, 12주에서 배양 후 25°C에서 4주간 회복된 캘러스와 대조군 캘러스가 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

저온에서 식물 캘러스의 보관을 통한 계대배양 간격을 증가시키는 것은 몇몇 연구에서 시도되었다. Augereau et al (1986)에 따르면 *C. roseus*, *V. Thouarsill*, *C. Arabica* 품종들은 15°C에서 4개월간 보존이 가능한 것을 확인 하였으며 초저온동결보존에 대한 대안으로 저온에서 생육을 지연시키는 방법이 많은 캘러스의 보존에 유리할 것이라고 제안 하였다. Boisson et al. (2012)은 *Arabidopsis cell suspension culture*에서 phosphate free 배지에서 5°C 배양시 6개월간 생존 및 회복이 가능함을 확인하였다. 또한 양버즘나무(sycamore)와 *Arabidopsis*의 cell suspension culture시 22°C보다 5°C 조건에서 약 5배가량의 산소(O<sub>2</sub>)이온의 소비량이 줄어드는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 저온에서 호흡의 양이 줄어들면서 캘러스의 성장이 감소하고 결론적으로 계대배양 간격을 늘릴 수 있음을 시사한다. 본 실험에서 또한 8개의 캘러스에서 일반적 배양 온도인 25°C 보다 저온 조건인 15°C 조건에서 계대배양 간격을 2배에서 3배가량 늘릴 수 있음을 보여줌으로 보다 많은 캘러스에 적용할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.



**Fig. 1** DPPH radical scavenging activity of control (4 weeks interval subculture) and test plant callus lines recovered at 25°C after 8 or 12 weeks of 15°C culture. All experiment were performed in triplicate. Data are expressed as mean ± SD. Asterisks indicate a significant difference between control and recovery lines at \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 by LSD test

**적 요**

식물 캘러스의 월간 또는 주간의 반복적인 계대배양은 노동 집약적이며 모 세포주로부터 somaclonal variation 발생 위험을 증가시킨다. 식물 캘러스를 보존하기 위한 가장 효과적인 방법은 액체질소에 저장하는 초저온동결보존 방법이다. 하지만 초저온동결보존 방법은 동일한 방법으로 여러 식물의 캘러스에 적용할 수 없어 보존 방법 개발에 많은 어려움이 따른다. 또한 해동 후 냉동되어진 캘러스의 생존과 생존 후 재생 속도가 불확실 하다는 단점이 있다. 그러므로 활성 상태의 식물 캘러스의 계대배양 간격을 증가시키는 방법의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 냉동과정 없는 활성상태의 다양한 종의 식물 캘러스를 계대배양 없이 4주에서 12주 동안 15°C에서 배양하였다. 25°C에서 12주간 배양한 8종류의 식물 캘러스들은 모두 2배 이하의 성장을 보였으나 15°C에서 12주간 배양 조건에서는 8종류의 식물 캘러스들은 최소 2배 이상의 성장을 하였다. 또한 15°C에서 배양 후 25°C에서 회복시킨 캘러스들 사이의 항산화 활성 역시 크게 변화하지 변하지 않았다. 이러한 결과는 배지조성이나 특별한 새로운 과정없이 15°C 저온으로 계대배양 간격을 증가시킬 수 있음을 보여준다. 또한 여러 식물 종의 캘러스들 모두에서 긍정적인 결과는 여러 캘러스들에 동일한 방법으로 계대배양 간격을 증가시킴으로 노동력 감소는 물론 somaclonal variation을 상대적으로 줄여 줄 것으로 예상된다.

**사 사**

본 연구는 KRIBB 기관고유사업(KGM5382212, KGM5282223) 및 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기술개발사업의(2020M3A9I4038354) 지원을 받아 수행된 연구임.

**References**

Augereau JM, Courtois D, Petiard V (1986) Long term storage of callus cultures at low temperatures or under mineral oil layer. *Plant Cell Reports* 5:372-376

Boisson AM, Gout E, Bigny R, Rivasseau C (2012) A simple and efficient method for the long-term preservation of plant cell suspension cultures. *Plant Methods* 8:4

Chai M, Jia Y, Chen S, Gao Z, Wang H, Liu L, Wang P, Hou D (2011) Callus induction, plant regeneration, and long-term maintenance of embryogenic cultures in *Zoysia matrella* [L.] Merr. *Plant cell Tiss Organ Cult* 104:187-192

Efferth T (2019) Biotechnology applications of plant callus culture. *Engineering* 5:50-59

Eibl R, Meier P, Stutz I, Schildberger D, Huhn T, Eibl D (2018) Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:8661-8675

Feher A (2019) Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of

- molecular plant biology. *Frontiers in Plant Science* 10:536
- Georgiev MI, Weber J, Maciuk A (2009) Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds *Appl Microbiol Biotechnol* 83: 809-823
- Guo B, Stiles AR, Liu CZ (2013) Low-temperature preincubation enhances survival and regeneration of cryopreserved *Saussurea involucrate* callus *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 49: 320-325
- Jeong YJ, Park SH, Park SC, Kim S, Kim TH, Lee J, Kim SW, Ryu YB, Jeong JC, Kim CY (2020) Induced extracellular production of stilbenes in grapevine cell culture medium by elicitation with methyl jasmonate and stevioside. *Bioresour Bioprocess* 7:38
- Krasteva G, Georgiev V, Pavlov A (2021) Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods. *Engineering in Life Sciences (Eng Life Sci)* 21:68-76
- Kulus (2019) Managing plant genetic resources using low and ultra-low temperature storage: a case study of tomato. *Biodiversity and Conservation* 28:1003-1027
- Moriguchi T, Kozaki I, Matsuta N, Yamaki S (1988) Plant regeneration from grape callus stored under a combination of low temperature and silicone treatment. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 15:67-71
- Motolinía-Alcántara EA, Castillo-Araiza CO, Rodríguez-Monroy M, Román-Guerrero A, Cruz-Sosa F (2021) Engineering Considerations to Produce Bioactive Compounds from Plant Cell Suspension Culture in Bioreactors. *Plants* 10:2762.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Murthy HN, Lee EJ, Paek KY (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 118:1-16
- Nausch H, Buyel JF (2021) Cryopreservation of plant cell cultures-Diverse practices and protocols. *New Biotechnology* 62:86-95
- Sachett A, Gallas-Lopes M, Conterato GMM, Herrmann AP, Piato A (2021) Antioxidant activity by DPPH assay: in vitro protocol. *protocols.io* <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.btbpnimn>
- Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz (2011) Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation. *Trends in Cell Biology* 21:212-218
- Theocharis A, Clement C, Barka EA (2012) Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures *Planta* 235:1091-1105
- Vidyagina EO, Shestibratov KA (2018) Efficient technique for long-term in vitro storage of transgenic aspen genotypes. *American Journal of Plant Sciences* 9:2593-2600