

# 구기자나무 (*Lycium chinense* Mill.) 유식물체의 자엽하배축으로부터 고효율의 부정아 형성과 식물체 재생

조만현<sup>1</sup>, 함인기<sup>1</sup>, 이봉춘<sup>2</sup>, 김재훈<sup>3</sup>, 이원석<sup>3</sup>, 권석윤<sup>4</sup>, 이행순<sup>5</sup>, 박상수<sup>4\*</sup>  
충청남도농업기술원 <sup>1</sup>원예연구과, <sup>2</sup>청양구기자시험장, <sup>3</sup>(주)마이크로프랜즈,  
한국생명공학연구원 <sup>4</sup>환경생명공학연구소, <sup>5</sup>식물세포공학연구소

## High Frequency Shoot Formation and Plant Regeneration from Cotyledonary Hypocotyl Explants of Boxthorn (*Lycium chinense* Mill.) Seedlings

Man-Hyun Jo<sup>1</sup>, In-Ki Ham<sup>1</sup>, Bong-Chun Lee<sup>2</sup>, Jae-Whune Kim<sup>3</sup>, Won-Seok Lee<sup>3</sup>,  
Suk-Yoon Kwon<sup>4</sup>, Haeng-Soon Lee<sup>5</sup>, Sang-Soo Kwak<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Horticulture Research Division, <sup>2</sup>Chongyang Boxthorn Experiment Station,

Chungcheongnam-do Agricultural Research and Extension Services, <sup>3</sup>R&D Center, Microplants Co., LTD.

<sup>4</sup>Laboratory of Environmental Biotechnology, <sup>5</sup>Laboratory of Plant Cell Biotechnology, Korea Research Institute of Bioscience  
and Biotechnology (KRIBB), 52 Eoen-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

**ABSTRACT** To establish high frequency shoot formation from two cultivars (Cheongyangjaerae and Myungan) of boxthorn (*Lycium chinense* Mill.), hypocotyl segments with cotyledons from seedlings were used as explants. High frequency adventitious shoot formation (more than 80%) were obtained from hypocotyl segments with cotyledon on MS medium supplemented with 1.0 mg/L zeatin, when precultured for 3 weeks under dark conditions followed by transfer to light conditions. But there was no shoot induction in the explants cultured without preculture under dark conditions. Roots were induced from the shoots when transferred to rooting medium supplemented with 1.0 mg/L IAA for 4 weeks. Regenerated plantlets were grown to normal mature plants in soil.

**Key words:** Cotyledonary hypocotyl, light condition, *Lycium chinense*, pre-culture time, zeatin

### 서 론

구기자나무 (*Lycium chinense* Mill.,  $2n = 24$ )는 예로부터 간장질환, 고혈압 치료 및 해열, 강장 등의 탁월한 효능으로 각광을 받고 있는 귀중한 약용식물이다 (Hotta et al.

1989). 구기자나무 신품종 육성에는 돌연변이체 선발과 인공교배를 통한 우량 영양개체의 선발 (Lee et al. 2000a) 등이 관행적으로 이루어지고 있다. 그러나 탄저병, 흑용애 등의 병충해에 강하고 새로운 기능성물질을 생산하는 구기자나무를 육성하기 위해서는 유전체정보를 이용한 분자육종 방법 (Park et al. 1995; Lee et al. 2001)과 고효율 재분화시스템 확립이 선행 되어져야 할 것이다.

우리나라 주요 재배품종은 재배지역의 지명을 딴 재래

\*Corresponding author Tel 042-860-4432 Fax 042-860-4608

E-mail sskwak@kribb.re.kr

종 (청양, 진도, 금산, 진부, 해남 등)과 근년에 품종개발된 육성종(유성 1호, 유성 2호, 청양, 불로, 장생 등)이 있다. 구기자나무의 조직배양에 대한 연구는 자엽, 잎 등 다양한 배양절편으로부터 캘러스와 부정아 형성 (Li and Zhang 1990; Yakov et al. 1990; Liu 1991; Kim et al. 1993; Jo et al. 2002b; Kim et al. 2002) 그리고 외래 유전자 도입에 의한 형질전환체 개발에 대한 연구가 이루어져 왔다 (Park et al. 1995; Lee et al. 2001). 구기자나무를 조직배양하였을 때 배양재료의 종류 및 품종간 재분화에 대한 차이가 많이 나는 것으로 보고되었고, 특히 구기자나무의 청양재래 품종의 여러 조직을 배양재료로 사용하였을 때 부정아 형성율이 자엽 (4%), 어린잎 (6.7%), 하배축 (44%) 등에서 낮게 나타내었다 (Lee et al. 2001; Kim et al. 2002). 구기자나무를 대상으로 분자유종에 의한 신품종을 육성하기 위해서는 모든 품종에 적용될 수 있는 효율적인 재분화 및 형질전환 시스템 구축이 필요하다.

본 연구팀은 오이 유식물체에서 자엽하배축 (cotyledonary hypocotyl) 절편체를 이용하여 고효율 부정아 형성 시스템을 확립한 바 있다 (Kim et al. 2000). 그러나 이 방법에 의해 다수의 종자식물로부터 부정아를 얻을 수 있었는데 일부 종자식물에서는 전혀 부정아를 얻을 수 없었다. 유식물체에서 자엽과 하배축의 생장 및 형태형성에 영향을 주는 여러 요인 요인이 있지만, 그 중에서 광은 식물의 생장과 분화에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Hachey et al. 1991; Fujiwara and Kozai 1995; Lee et al. 2000b). 구기자나무의 경우에도 오이와 같은 방식으로 전혀 부정아가 유도되지 않았지만 일정 기간 암소에서 배양하고, 광주진으로 옮겨주어야 하는 개량된 배양방법을 사용하였을 때 부정아를 쉽게 유도할 수 있었다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 배양조건

실험에 사용한 구기자나무 (*Lycium chinense* Mill.) 품종은 청양재래 (Cheongyangjaerae)와 명안 (Myungan)이며, 종자를 증류수에 3시간 동안 침지한 후 75% 에탄올에 30초, 1% sodium hypochlorite 용액에서 10분간 연속적으로 표면 살균하였다. 표면 살균된 종자는 멸균수로 3회 세척한 후, 수분을 제거하고 생장조절물질이 첨가되지 않은 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 치상하여  $15 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 16시간 광주기,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  배양조건 (이하 명조건은 모두 같은 조건)으로 발아시켰다. 유식물체의 하배축을 자엽절로부터 3-5 mm의 크기로 절단하여 자엽하배축 (자엽을 포함한 하배축, cotyledonary hypocotyl)의 절단면이 배지에 접하도록 배양하였다. 배양조건은 MS배지에 3%

sucrose와 0.4% phytagel을 첨가한 후 cytokinin (0.5, 1.0 mg/L BA 또는 0.5, 1.0, 2.0 mg/L zeatin)을 단독 또는 조합 첨가한 후 pH를 5.8로 조정하였다. 배양 절편은 페트리디쉬 ( $87 \times 15 \text{ mm}$ ) 당 5개씩 치상하였으며, 처리구당 약 50개의 절편을 사용하여 3회 실시하여 부정아 형성율을 조사하였다.

### 자엽 크기별 배양

구기자나무 하배축 절단면으로부터 부정아를 유도할 때 자엽크기가 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위해 Kim 등 (2000)의 방법으로 하배축이 절단된 유식물체의 2개 자엽중 1개를 먼저 제거하였다. 나머지 한개의 자엽은 3/4, 1/2, 1/3, 1/10 정도의 크기로 남기고 메스로 잘라낸 후 하배축이 배지에 접하도록 하여 0.5 mg/L와 1.0 mg/L zeatin이 첨가된 MS배지에서 배양하였다.

### 부정아 유도 및 식물체 재분화

자엽하배축의 절단면이 배지에 접하게 하여 암소에서 0, 1, 2, 3, 4주 배양한 후, 명소로 옮겨 배양하여 하배축 절단면으로부터 부정아 유도율을 조사하였다. 명 배양 3주후 유식물체의 자엽하배축 절단면에서 유도된 부정아를 절단하여 1.0 mg/L IAA가 첨가된 MS배지에 옮겨 소식물체를 얻었다. 잎이 5-6매 나온 소식물체 (크기 5-8 cm)는 원예용상토가 든 화분에 옮겨 고농도의 습도를 유지하면서 순화시켰다.

## 결과 및 고찰

### 자엽하배축 절단면으로부터 부정아 유도시 암배양 효과

오이 (*Cucumis sativus* L.)와 동일 방법으로 (Kim et al. 2000) 구기자나무 (청양재래 Cheongyangjaerae, 명안 Myungan) 유식물체로부터 절단한 자엽하배축 (cotyledonary hypocotyl)을 명소에서 배양하였을 때에는 부정아가 전혀 유도되지 않았으나, 일정기간 암소에서 전 배양한 (1, 2, 3, 4주) 후 명소에 옮겨 배양하면 부정아가 고빈도로 형성되는 것을 관찰되었다 (Table 1). 암소에서 1주 이상 배양한 후 명소로 옮겨 배양하였을 때 자엽하배축 절단면으로부터 부정아가 2 품종 모두에서 형성되었고, 특히 암소에서 3주간 배양한 후 명소로 옮겨 배양하였을 때 청양재래에서 88% 그리고 명안에서 82%로 가장 높은 부정아 형성율을 나타내었다 (Table 1). 그러나 4주간 암소에서 배양한 후 명소로 옮겨 배양할 경우 부정아 형성율이 현저하게 감소하여 청양재래와 명안에서 각각 32%와 20%를 나타내었다.

**Table 1.** Effect of pre-culture time under darkness on frequency (%) of shoot formation from the excised cotyledonary hypocotyls of two boxthorn cultivars ('Cheongyangjaerae' and 'Myungan').

Cultivars	Light <sup>a</sup>	Pre-culture time in darkness (weeks) <sup>b</sup>			
		1	2	3	4
Cheongyangjaerae	0%	26%	58%	88%	32%
Myungan	0%	16%	44%	82%	20%

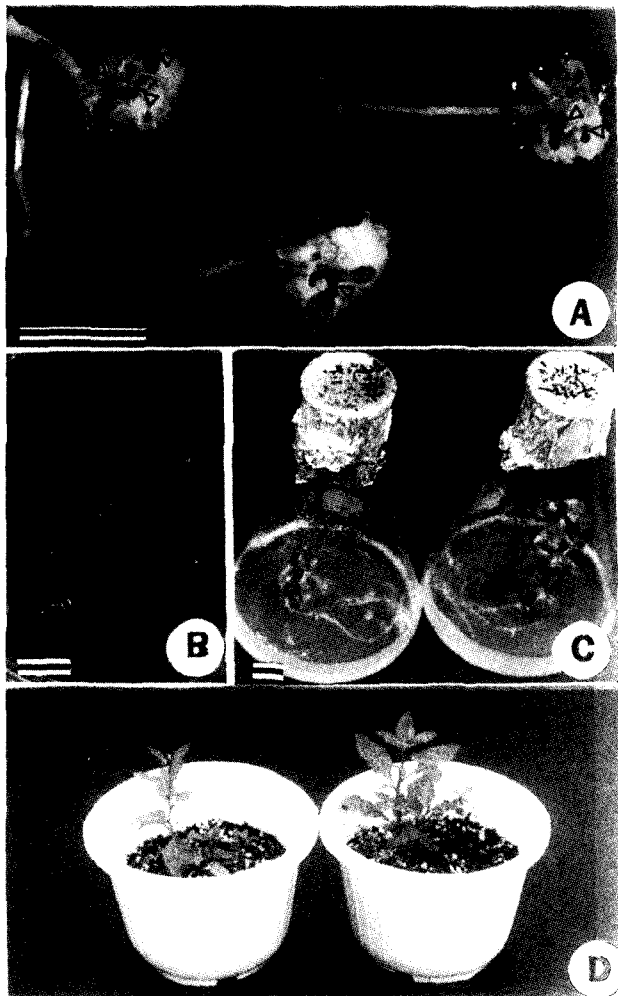
<sup>a</sup>The explants cultured under light conditions without preculture of dark conditions

<sup>b</sup>The explants precultured under dark conditions were transferred to light conditions.

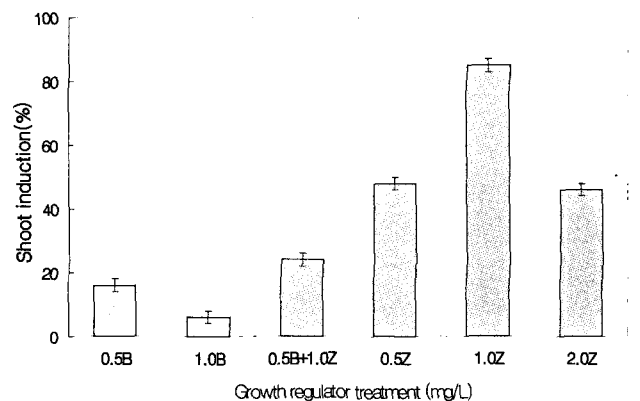
따라서 구기자나무 유식물체의 자엽하배축으로부터의 부정아 형성은 약 3주간 암소에서 배양한 후 명소로 옮겨 배양하는 것이 가장 효과적이라고 사료된다. 1주 정도 암소에서 배양한 후 명소로 옮겨 배양할 경우에는 자엽하배축 절단면에서 부정아가 유도되었지만, 암소에서 2-3주 정도 배

양할 경우에는 자엽하배축 절단면에서 캘러스가 생성되었고, 이들로부터 3-5개 정도의 부정아가 유도되었다 (Figure 1A). 유식물체의 자엽절편을 배양재료로 사용할 경우 부주의에 의해 유식물의 측아(자엽과 배축 사이의 분열조직)가 붙은 자엽절편을 사용하게 되는 문제점이 있지만 (Gambley and Dodd 1990; Dong and Jia 1991; Colojin-Hooymans et al. 1994), 유식물체의 하배축 절단면을 배양할 경우 이러한 문제점이 없다. 즉 암소에서 자엽하배축을 배양하면 정아나 측아는 생장이 되지 않고, 자엽아래의 하배축만이 1-2 cm 정도로 성장하였다. 그리고 하배축 맨 아래부분의 절단면에서 캘러스가 유도되었고, 이들을 명소로 옮기면 캘러스로부터 수개의 부정아가 발생된다 (Figure 1A). 또한 구기자나무의 잎 조직 절편이나 캘러스로부터 유도된 부정아는 미분화 상태이거나 또는 집단 왜소화현상이 나타나는데 자엽하배축을 배양할 경우 이러한 현상이 거의 나타나지 않았다. 따라서 유식물체의 자엽하배축 절편체를 배양하여 부정아를 유도하는 방법은 여러 품종의 구기자나무 재분화에 모두 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

자엽하배축으로부터 부정아 발생에 미치는 성장조절제의 영향을 조사한 결과 BA보다 zeatin이 부정아 발생률이 훨씬 높았다 (Figure 2). 특히 BA 첨가 배지에서는 부정아 형성율이 매우 낮고, 비정상적인 형태를 가진 부정아가 많았다. 반면 zeatin 첨가배지에서는 대부분 정상적인 형태의 부정아가 유도되었다. 따라서 구기자나무의 자엽하배축으로



**Figure 1.** Shoot formation and plant regeneration from excised cotyledonary hypocotyl explants of boxthorn (*Lycium chinense* Mill.). (A) Shoots (arrowheads) induced from the excised cotyledonary hypocotyls (3~5 mm in length) cultured on MS medium containing 1.0 mg/L zeatin. (B) Shoots induced from the cotyledonary hypocotyls transferred on rooting medium. (C) Plantlets with roots and leaves. (D) Plants regenerated in pots. Bars = 10 mm.



**Figure 2.** Effect of the different concentrations (mg/L) of BA (B) and Zeatin (Z) on shoot formation from the excised cotyledonary hypocotyls of boxthorn (Cheongyangjaerae) plants.

부터 부정아 유도에는 BA 첨가배지보다 zeatin 첨가 배지를 사용하는 것이 효과적이었다. 특히 zeatin이 1.0 mg/L 첨가된 배지에서 약 88%로 부정아 형성율이 가장 높았다 (Figure 2). 이와 같은 배양조건에서 오이의 경우에는 2.0 mg/L zeatin의 경우 부정아 유도율이 가장 높았는데 (Kim et al. 2000), 본 실험의 구기자나무의 경우는 오이보다 낮은 zeatin 농도에서 부정아 유도율이 높았다. 이것은 식물종자 크기와 자엽 및 하배축 내부의 생리적인 차이에 의한 것으로 사료된다 (Choi et al. 1999).

유식물체에서 자엽과 하배축의 생장 및 형태형성에 영향을 주는 환경요인은 온도, 상대습도, 수분포텐셜, 광, CO<sub>2</sub> 농도, 배지의 무기영양분 등 여러 요인이 있지만, 그 중에서 광은 식물의 생장과 분화에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다 (Jeong et al. 1995; Ham et al. 1999; Lee et al. 2000b; Jo et al. 2002a). 광이 식물체에 미치는 영향은 광도, 광질, 광주기 등 3가지 요인으로 분리하여 다루고 있다 (Hachey et al. 1991; Fujiwara and Kozai 1995). 구기자나무에 있어서 자엽하배축의 재분화효율이 높은 것은 광의 신호전달과 구기자 나무 식물체의 내재호르몬이 관여하는 것으로 사료된다. 구기자나무의 자엽하배축을 배양할 경우 암처리를 해야만 부정아가 유도되는지에 대한 연구는 급후의 연구과제로 생각된다.

자엽하배축 절단면에서의 부정아 유도시 자엽크기의 영향

오이 유식물체의 자엽크기가 하배축 절단면으로부터 부정아 유도에 영향이 있음을 나타내었다 (Kim et al. 2000). 유식물체의 자엽 및 종자의 자엽을 배양재료로 사용하여 부정아를 유도하였을 경우 자엽의 크기가 부정아 형성에 영향을 주는 것으로 보고되었다 (Choi et al. 1998; Choi et al. 2003). 구기자나무에서 더 구체적으로 자엽크기가 부정아 유도에 미치는 영향을 조사하기 위해 자엽하배축 (3~5 mm 크기)이 절단된 유식물체의 2개 자엽중 1개를 제거하고 나머지 한개의 자엽을 3/4, 1/2, 1/3, 1/10크기로 잘라 0.5 mg/L와 1.0 mg/L zeatin이 첨가된 MS배지에서 배양하

였다. 자엽크기가 작아질수록 유식물체의 하배축에서 부정아 유도율이 낮아지는 경향을 보였다 (Figure 3). 그러나 두 조건의 경향은 상반되게 zeatin의 함량이 적은 배지 (0.5 mg/L)에서 부정아 형성율이 1/2자엽 크기 일 때를 기점으로 더 높은 비율로 나타났다 (Figure 3). 1.0 mg/L zeatin이 첨가된 배지에서는 자엽의 크기가 작아질수록 (1/3자엽 이하) shoot의 유도율이 현저히 낮아지고 대신 녹색의 캘러스가 왕성히 유도되었다. 이러한 현상은 자엽의 크기가 너무 작으면 배지의 1.0 mg/L zeatin이 기관분화에 적합하지 않고, 탈분화 되도록 하는 것으로 사료된다. 따라서 본 실험에서 자엽의 크기가 작을수록 부정아 유도율이 낮다는 것은 자엽의 존재가 부정아 유도에 필수적인 것으로 사료된다.

부정아로부터 식물체 재분화

자엽하배축 절단면에서 유도된 부정아의 잎이 1-2매 정도 발달하였을 때 이들을 분리하여 0.3 mg/L NAA가 첨가된 MS배지에 옮겨 배양하였다 (Figure 1B). 이 조건에서 2주간 배양하면 뿌리가 쉽게 유도되었고, 부정아 의 신장이 느린 개체는 1.0 mg/L IAA가 함께 첨가된 배지에 이식하여 발근시켜 소식물체로 만들었다 (Figure 1C). 잎이 5-6매 나온 소식물체는 원예용상토가 든 화분에 옮겨 약 80% 정도의 습도를 유지하면서 순화시킨 후 온실에 정식하여 완전한 식물체를 얻었다 (Figure 1D). 구기자나무의 잎절편체나 자엽절편 등을 배양하였을 때 유도된 부정아는 여러 겹의 잎만이 겹쳐져 shoot apex가 발달하지 않는 집단왜소화 현상이 자주 나타나 완전한 식물체로 재분화시키는데 어려움이 많다 (Kim et al 2002). 그러나 자엽하배축 절단면에서 유도된 부정아는 왜소화 현상이 거의 나타나지 않고 모든 개체가 정상적인 형태로 성장하였다. 따라서 유식물체의 자엽하배축 절편을 배양하여 부정아를 유도하는 방법은 모든 구기자나무의 재분화시스템 확립에 적용될 수 있을 것이며, *Agrobacterium* 공동배양방법에 의한 구기자나무 형질전환 시스템 확립에도 활용 될 수 있을 것으로 사료된다.

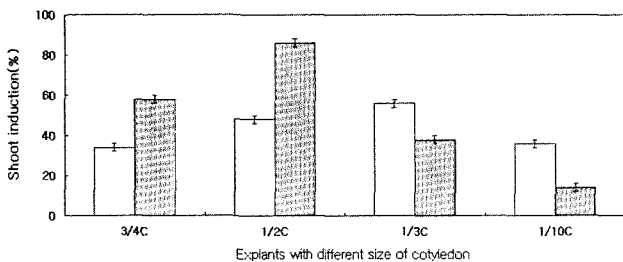


Figure 3. Effect of cotyledon size (3/4, 1/2, 1/3, 1/10) on shoot induction from the excized cotyledonary hypocotyls (3 mm in length) of boxthorn (*Lycium chinense* Mill.) plants cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L zeatin (□) and 1.0 mg/L zeatin (▨).

적 요

두 품종 (청양재래, 명안)의 구기자나무 (*Lycium chinense* Mill.) 유식물체를 자엽하배축의 자엽 일부분만 남기고 절단 후, 절단면이 1.0 mg/L zeatin이 첨가된 MS배지에 접하도록 하여 암소에서 3주 배양한 후 명소로 옮겨 배양하였을 때 자엽하배축 절단면으로부터 부정아가 고빈도 (80% 이상)로 유도되었다. 그러나 자엽하배축절편을 암소에서 전 배양하지 않고, 명소에서만 배양 하였을 경우 부정아는 유도되지 않았다. 자엽하배축 절단면에서 유도된 부정아를 분리하여 1.0 mg/L IAA가 함유된 발근배지에서 4주간 배양

하여 뿌리를 유도하였다. 잎과 뿌리가 잘 발달한 소식물체는 화분에 옮겨 키웠을 때 정상적인 형태의 재분화 식물체로 성장하였다.

## 사 사

본 연구는 과학기술부 자생식물이용기술개발사업 (PF0330602-00)의 연구비 지원을 받아 수행되었다.

## 인용문헌

- Choi YE, Yang DC, Yoon ES, Choi KT (1999) Plant regeneration via direct embryo axis-like shoot and root formation from excised cotyledon explants of ginseng seedlings. In *Vitro Cell Dev Biol* 35: 210-213
- Choi YE, Yang DC, Yoon ES, Choi KT (1998) Plant regeneration via adventitious bud formation from cotyledon explants of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Plant Cell Rep* 17: 731-736
- Choi PS, Cho DY, Soh WY (2003) Plant regeneration from immature embryo cultures of *Vigna unguiculata*. *Biol Plantarum* 47: 305-308
- Colojin-Hooymans CM, Hakkert JC, Jansen J, Custers JBM (1994) Competence for regeneration of cucumber cotyledons is restricted to specific development stages. *Plant Cell Tiss Org Cult* 39: 211-217
- Dong JZ, Jia SR (1991) High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.). *Plant Cell Rep* 9: 559-562
- Fujiwara K, Kozai T (1995) Physical microenvironment and its effects. In: J Aitken-Christie, T Kozai, ML Smith, Automation and environmental control in plant tissue culture, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 319-369
- Gambley RL, Dodd WA (1990) An in vitro technique for the production de novo of multiple shoots in cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 20: 177-183
- Ham IK, Kim HS, Lee MA, Jo MH, Lee EM (1999) Growth characteristics of tissue cultured plantlets by lighting direction and light intensity. *Korean J Plant Res* 12: 139-144
- Hachey JE, Sharma KK, Moloney MM (1991) Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured in vitro. *Plant Cell Rep* 9: 549-554
- Hotta M, Ogata K, Nitta A, Hosikawa K, Yanagi M, Yamazaki K (1989) Sekai yuhyou-shokubutu jiten (useful plant of the world). Heibonsha, Tokyo, pp 640-641
- Jeong BR, Fujiwara K, Kozai T (1995) Environmental control and photoautotrophic micropropagation. *Hort Rev* 17: 125-172
- Jo MH, Ham IK, Lee MA, Lee EM, Song NH, Han GH, Woo IS (2002a) Effects of sealing materials and photosynthetic photon flux of culture vessel on growth and vitrification in carnation plantlets in vitro. *J Korean Soc Hort Sci* 43: 133-136
- Jo MH, Ham IK, Park SK, Lee BC, Han GH, Woo IS (2002b) Plant regeneration through leaf explant culture of boxthorn. *Korean J Hort Sci Technol* 20 (suppl. II): 134
- Kim BW, Choi MS, Roh KS, Park YG (1993) Somatic embryogenesis from leaf callus of *Lycium chinense* Mill. *Kor J Plant Tissue Cult* 20: 91-96
- Kim DC, Chung HJ, Min BH, Yang DC (2002) Plant regeneration from explant types and cultivars of boxthorn (*Lycium chinense* Mill.). *Korean J Plant Biotechnology* 29: 15-18
- Kim JW, Han SK, Kwon SY, Lee HS, Lim YP, Liu JR, Kwak SS (2000) High frequency shoot induction and plant regeneration from cotyledonary hypocotyl explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *J Plant Physiol* 157: 136-139
- Lee BC, Kim SD, Yun TS, Lee BH, Ra SW, Park YC, Woo IS, Kim DH, Jeon TS (2000a) Production of new cultivar in boxthorn (*Lycium chinense* Mill.). Research reports of Chungcheongnam-do Agriculture Research and Extension Services, Yesan, Korea, pp 417-424
- Lee EM, Jo MH, Song NH, Woo IS, Lee YB, Kwak SS (2000b) Light influences, morphogenesis and protein content on callus differentiation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Korean J Plant Tiss Cult* 27: 213-217
- Lee JS, Kwon KW, Bae CH, Yang DC (2001) Advanced regeneration and genetic transformation of *Lycium chinense* harboring salt tolerance genes. *Korean J Plant Tiss Cult* 28: 47-52
- Li W, Zhang DW (1990) Medical and aromatic perennial crops. In: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Yamada Y, Handbook of plant cell culture, Vol 6, McGraw-Hill, USA, pp 116-126
- Liu CS (1991) An efficient method for selecting embryogenic callus from *Lycium chinense* Mill. cell culture. *Plant Sci* 79: 99-103
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Park YG, Choi MS, Kim BW, Chung WI, Noh KS (1995) Factors affecting introduction of rolC gene in *Lycium chinense* Mill. *Korean J Plant Tiss Cult* 22: 329-334
- Yakov IR, Vladimr AR, Nickolai MP (1990) Regeneration of *Lycium barbarum* L. plant from leaf tissue, callus culture and callus protoplasts. *Plant Cell Rep* 9: 84-87

(접수일자 2004년 5월 17일, 수리일자 2004년 8월 31일)