

구기자나무 유식물체를 이용한 식물체의 재분화와 극성과의 관계

윤의수*, 권혜경, 조이연¹
공주대학교 생명과학과, ¹공주대학교 생물교육학과

Correlation between *In vitro* Plant Regeneration and Polarity with Boxthorn (*Lycium chinense* Mill.) Seedlings

Eui Soo Yoon*, Hye Kyoung Kwon and Yi Yun Cho¹

Department of Biology, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

¹Department of Biology Education, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

Abstract - This experiment was conducted out to investigate the effect of plant growth regulators on callus and shoot formation. The callus formation was effective on 1/2 MS medium containing 2,4-D, while shoot formation was suppressed. Shoot formation and differentiation were the highest in combination 0.1 mg/L of IAA and 0.1 mg/L of BA. The polarity of explants was investigated from cotyledon, which excised 20% of each basal and terminal parts. Formation of shoot was induced from excised ends of the basal part. In excised ends of the basal part, callus was induced vigorously and shoots were produced lately. Root induction was easily achieved in 1/3 MS medium from the adventitious shoot and more than 90% of regenerated plantlets acclimatized successfully and flowered normally.

Key words - Polarity, Plantlet regeneration, *Lycium chinense*

서 언

가지과에 속하는 구기자나무(*Lycium chinense*)의 열매와 껍질에는 betain, zeaxanthin, physalein을 포함하고 있어 강장제, 해독제, 당뇨에 쓰이고 뿌리인 지골피는 소염, 해열, 폐결핵 등에 널리 쓰이는 한약재로서 중요한 가치를 지니는 식물자원이다(Yook, 1982). 최근에는 건강 보조식품 및 기호성 식품으로서 그 중요성이 확대되고 있다.

식물은 분화 전능성을 갖고 있기 때문에 조직배양기술을 이용하여 체세포배 발생이나, 기관분화를 통하여 모체 식물과 동일한 식물체를 절편체로부터 얻어 낼 수 있다. 식물조직배양에 첨가되는 생장조절물질과 배양조건에 따라서 체세포배 발생 및 기관분화가 결정되는 것으로 알려져 있다(Skoog and Miller, 1957). 식물은 거의 모든 부위에서 캘러스가 유도되나 기관 형성능력은 각각 다를 수 있으며, 세포나 조직에 따라서 식물체 재생 능력에 차이가 있고, 동일한 조직 내에서도 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Chu *et al.*, 1984; Kato, 1974). 구기자나무의 엽육조직을 침으로 상처를 준 후 zeatin을 단독

으로 처리한 3/2 MS배지에서 체세포배가 유도되기도 하였다(Kim *et al.*, 1993). 이처럼 기관의 분화에는 오옥신과 사이토키닌의 조합비율이 중요하며(Skoog and Miller, 1957; Cho and Soh, 1981; Cho, 1985), 동일한 종일지라도 배양절편체의 절편부위에 따라서 전형성능의 발현에 차이가 있다. 현재까지 목본류인 구기자나무(*L. chinense*)의 잎, 줄기 절편으로부터 식물체 재생에 미치는 생장조절제의 영향에 대한 연구는 비교적 많이 연구되어지고 있다(Kim *et al.*, 2001, 2002, Jo *et al.*, 2004). 또한 구기자나무로의 *rolC* 유전자의 도입에 대한 보고(Park *et al.*, 1995)도 있다.

식물의 기관 분화에는 오옥신과 사이토키닌의 조합 비율 뿐만 아니라 식물체의 극성과 절편 부위에 따라서도 분화능의 차이가 보여진다. 본 연구는 구기자나무의 형질전환에 여러 생명공학적인 방법을 응용하기 위한 기초 자료로서 활용하고자 *In vitro*에서 구기자의 유식물체로부터 얻어진 잎과 줄기를 절편체로 하여 이로부터 완전한 식물체를 재생시킬 수 있는 실험체계의 확립과 절편 부위 그리고 극성에 따른 분화조건을 규명하고 토양으로서 성공적인 순화체계를 확립하고자 실시하였다.

*교신저자(E-mail) : yes@kongju.ac.kr

재료 및 방법

실험재료 및 발아조건

본 실험에 사용한 식물재료는 98년도에 청양구기자 시험장에서 청양8호 구기자 종자를 채취하여 멸균된 증류수로 30분간 침지시킨 다음 70% EtOH에 10초간 표면 살균 후 1% sodium hypochlorite 용액에 15분간 멸균하였다. 그리고 멸균된 종자를 멸균수로 5회에 걸쳐 수세하여 sodium hypochlorite 용액을 완전히 제거한 수 멸균된 filter-paper 위에 올려놓아 물기를 제거하였다. 발아배지는 1/2 MS(Murashige and Skoog 1962)에 20g/L의 gelrite를 첨가한 다음 petri-dish(10×2cm)에 20mL씩 분주하였다. 표면 살균된 종자는 위에 배지가 첨가된 petri-dish당 10립씩 총 50립을 치상하였다. 종자는 22±1°C, 16/8시간 광주기, 2500Lux의 광도의 배양실 조건에서 발아를 유도하였다.

배지멸균 및 배양환경

배지의 멸균은 1.5기압, 121°C에서 15분간 고압고온 멸균하였다. 배양실의 조건으로서 온도는 22±1°C, 조도는 2500Lux, 일장주기는 16/8시간으로 하여 실험을 수행하였다.

생장조절제 종류에 따른 shoot 형성

생장조절제 종류에 따른 shoot 형성을 조사하기 위해 auxin류로는 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid), IBA(Indole-3-Butyric Acid), NAA(1-Naphtalene Acetic Acid)와 cytokinin류로 BA(6-Benzylaminopurine)와 Ki(Kinetin)를 사용하여 실험을 수행하였으며 이들을 단독 또는 혼용 처리하였다(Table 1). 위의 호르몬 처리한 배지는 1/2 MS 배지에 30 g/L의 sucrose를 첨가하고 교질재료인 gelrite는 3.5g/L를 첨가하여 배지를 조성하였다. 배지의 pH는 5.7로 조정하였고 petri-dish(10×2cm)에 20mL씩

각각 분주하였다. 발아 후 7일째인 유식물체를 자엽과 배축으로 구분하고 자엽은 5 × 5mm의 크기로, 배축은 5mm의 길이로 절단하여 petri-dish당 절편을 각각 5개씩 10개의 petri-dish에 치상하여 6주간 배양하였으며 3회에 걸쳐 반복실험을 행하였다.

절편체의 부위와 극성에 따른 영향

절편 부위와 극성에 따른 분화 상태를 규명하기 위하여 먼저 발아하여 7일째의 유식물체를 자엽(1), 배축(2), 뿌리(3)로 분리하여 각각을 절단하지 않은 것, 자엽(4)과 배축(5) 그리고 뿌리(6)를 상하 두 부분으로 절단한 것, 배축(7)과 자엽(8)의 기부부를 20% 제거한 것, 배축(9)과 자엽(10)의 말단부를 20% 제거한 것, 자엽(11)과 배축(12)의 기부와 말단부를 동시에 20% 제거한 것으로 구분(Fig. 1)하여 0.1mg/L IBA + 0.1mg/L BA의 배지에 편평하게 치상하였다. 각각의 조직은 10개체씩으로 3회 반복실험을 행하였으며 배양 조건은 위와 동일하게 수행하였다.

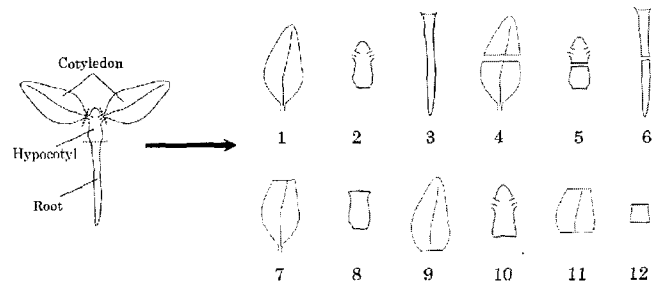


Fig. 1. Diagrammatic description excision treatments.

발근

형성된 shoot로부터 뿌리를 유도하여 완전한 식물체로 재생시키기 위하여 1/3 MS배지에 sucrose를 20g/L첨가하고 gelrite는 3.5g/L첨가하여 배지를 조성하였다. 위의 배지를 100

Table 1. Rate of callus induction and shoot formation from leaves and stem segments of *Lycium chinense* cultured on medium with different auxins and cytokinin concentrations.

Growth regulators	Concentration (mg/L)	callus induction (%)			shoot formation (%)		
		leaf	stem	root	leaf	stem	root
NAA	0.1	24.3	28.6	16.8	0	0	0
	1	76.2	78.4	56.6	0	0	0
2,4-D	0.1	42.0	50.7	36.5	0	0	0
	1	88.7	92.3	74.4	0	0	0
IBA	0.1	18.6	22.5	18.9	12.3	10.1	0
	1	32.3	44.8	22.4	3.8	0	0
BA	0.1	0	0	0	16.4	3.2	0
	1	0	0	0	17.4	7.7	0
Ki	0.1	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0

mL의 배양병에 30mL 분주하여 부정아 절편을 1개씩 치상하여 발근을 유도하였다. 배양조건은 위와 동일하게 수행하였다.

토양순화

발근하여 2주간 배양한 완전한 식물체절편을 온도가 30±5℃로 유지되고 습도는 60%로 일정한 온실의 비열균 토양에 이식시켰다. 이식작업은 뿌리 부위에 묻어있는 배지를 증류수로 2~3회 깨끗이 수세한 다음 이루어졌다. 생존율은 100개체를 이식하여 6주간의 생장한 구기자나무의 생존 개체를 평균하여 나타내었다.

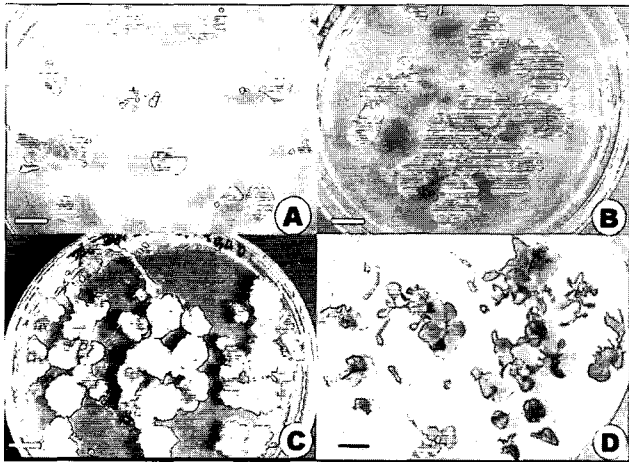


Fig. 2. Leaves and stem segments of *Lycium chinense* cultured on 1/2 MS medium with various growth regulators. A; Hormone free medium (1/2 MS sucrose 20 g/L), B; 1 mg/L NAA (auxin), C; 1 mg/L 2,4-D (auxin), D; 1 mg/L BA (cytokinin), Bars represent 0.7cm.

결과 및 고찰

생장조절제에 따른 부정아의 형성

종자로부터 발아하여 1주일 된 유식물체를 자엽과 배축으로 구분한 다음 5 × 5mm로 절단하여 생장호르몬이 단독 또는 혼용 처리된 배지에 치상하여 6주간 배양한 후 절편에 따른 부정아의 형성을 조사하였다. 생장호르몬을 첨가하지 않은 배지의 경우는 약간 붉은색을 띠면서 결국에는 고사하였으며(Fig. 2A), 오옥신류를 단독 처리한 경우 2,4-D와 NAA 0.1~1mg/L 농도에서는 shoot가 전혀 유도되지 않았으나, 캘러스의 형성이 높은 비율로 형성되었다. IBA가 0.1mg/L 처리된 배지에서 shoot의 유도가 보였다. 2,4-D와 NAA가 1mg/L 첨가된 배지는 캘러스가 다량으로 유도되었으나, 이 캘러스들은 매우 부드럽고 부스러지기 쉬운 모양으로 shoot는 전혀 형성되지 않았다(Table 1). 형성된 캘러스의 색에 있어서 NAA를 포함하는 배지에서는 붉은 색을 강하게 띄었으나 2,4-D를 포함하는 배지에서는 흰색의 캘러스를 형성(Fig. 2B, C)하였으며 시간이 지남에 따라 갈색으로 변화하였다. 반대로 BA를 단독으로 처리한 0.1~1mg/L 농도의 배지에서는 약간의 캘러스의 분화는 보였으나 이 캘러스는 비교적 부드럽고 녹색을 띠면서 shoot가 분화되었다(Table 1, Fig. 2D).

0.1mg/L의 IBA를 처리한 배지와 BA를 단독처리한 배지에서 shoot의 형성이 보였으므로 이를 중심으로 생장호르몬의 조합에 의한 캘러스의 형성률과 shoot의 형성률(Table 2) 그리고 shoot의 개체수(Fig. 3)를 조사하였다. IBA와 BA 그리고 NAA와 BA를 포함하는 배지는 모든 배지에서 캘러스의 형성이 양호 하였으며 비교적 부드러운 녹색을 띠는 캘러스들이 형성되었다. 2,4-D를 포함하는 배지는 단독배지와 마찬가지로 캘러스의 형성은 양호하였으나 부드럽

Table 2. Callus induction and shoot formation from leaves, stem and root segments of *Lycium chinense* cultured on medium with auxin and cytokinin

Growth regulators (mg/L)	callus induction (%)			shoot formation (%)		
	leaf	stem	root	leaf	stem	root
IBA(0.1)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IBA(0.1)+BA(0.1)	84.3	82.1	43.6	94.3	87.6	12.3
IBA(0.1)+BA(1)	93.5	94.6	87.4	84.2	67.8	8.4
IBA(0.1)+BA(3)	75.4	82.0	43.8	43.7	32.6	0.8
IBA(0.1)+BA(5)	56.4	48.2	33.7	12.4	10.3	0.2
IBA(0.1)+Ki(0.1)	82.1	84.3	54.2	12.3	8.4	0.5
IBA(0.1)+Ki(1)	93.7	95.8	92.4	22.2	18.6	0.3
IBA(0.1)+Ki(2)	95.4	95.2	93.6	35.6	22.9	1.0
BA(0.1)+NAA(0.01)	89.3	89.5	85.1	30.5	18.4	0.1
BA(0.1)+NAA(0.1)	97.9	95.3	88.3	72.3	65.9	4.4
BA(0.1)+NAA(1)	95.6	97.2	90.4	18.5	10.7	0.1
BA(0.1)+2,4-D(0.01)	89.5	89.0	90.8	7.5	6.0	0.0
BA(0.1)+2,4-D(0.1)	97.4	98.3	92.6	1.4	0.5	0.0

고 부스러지기 쉬운 모양으로 shoot의 형성이 거의 보이지 않았다. IBA와 BA를 포함하는 모든 배지에서 shoot의 형성률과 발생된 shoot의 개체수가 많았으나 0.1mg/L IBA + 0.1mg/L BA를 포함하는 배지에서 shoot의 형성률(Table 2)이 가장 높았으며 형성된 개체수(Fig. 3)도 가장 많았고 BA의 농도가 증가 될수록 그 형성률은 현저하게 낮아졌다. 0.1mg/L NAA + 0.1mg/L BA를 포함하는 배지에서도 shoot의 형성률이 높았으나 IBA와 BA를 포함하는 배지에 비하여는 형성된 개체 수에 있어서 훨씬 낮은 결과를 보여주었다. 또한 모든 경우에 있어서 배축보다는 자엽에서 shoot 형성빈도와 개체수가 많았다(Table 2, Fig. 3).

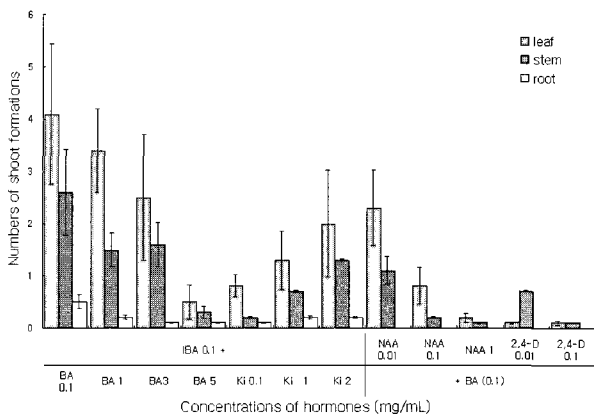


Fig. 3. Number of shoot induced from leaves, stem and root segments of *Lycium chinense* cultured on medium with different auxin and cytokinin concentrations.

일반적으로 Jo *et al.*(2004)은 구기자나무의 유식물체를 절단한 자엽 배축을 암소에서 배양하면 부정아가 80% 이상의 높은 비율로 형성되며 zeatin을 첨가한 배지에서 부정아가 형성됨을 보고하였다. 또한 Kim *et al.*(2001)은 캘러스의 유도는 0.5mg/L NAA + 0.2mg/L BA가 첨가된 배지에서 효율적으로 유도되고, shoot는 0.01mg/L NAA와 0.2 mg/L BA가 첨가된 배지에서 양호하다고 보고하였다. 또한 Park *et al.*(1995)은 구기자나무 잎에 상처를 주었을 경우 0.05 μ M 2,4-D와 0.001 μ M BA조합에서 암상태로 배양한 경우 캘러스의 유기가 양호하다고 보고하였다. 본 실험에서는 2,4-D나 NAA 단독배지에서 혼합배지에서보다 높은 캘러스의 형성이 보였다. 기관의 분화는 오옥신과 사이토키닌의 비율에 따라 좌우된다는 것이 일찍부터 알려졌다(Skoong and Miller 1957), Kim *et al.*(2001)의 실험 보고에서도 2,4-D를 첨가하는 경우 구기자에서 shoot의 발생이 저조함을 보였다. 일반적으로 shoot의 형성은 고농도의 cytokinin과 저농도의 auxin을 혼용하였을 때 좋은 결과가 보이는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 BA 단독배지 보다는 IBA와 BA의 혼합배지에서 높은 분화율을 보였지만, cytokinin과 auxin 모두 저농도로 혼용하였을 경우 더 좋은 shoot의 분화율을 보였다. 본 연구의 결과로는 오옥신류로는 IBA가 사이토키닌류로는 BA가 저농도로 첨가된 배지에서 shoot의 형성이 양호하였으며 식물체로의 분화도 정상적이었다.

절편체의 부위와 극성에 따른 영향

절편체가 지니는 극성의 효과를 알아보기 위하여 12가지의 절단처리를 한 결과(Fig. 1, Table 3) 캘러스의 형성과 shoot의 형

Table 3. Effect of polarity of explant on adventitious shoot formation from *Lycium chinense*

No. of excision treatment	Shoot formation (%)		No. of shoot / explant		Callus formation (%)		
	basal part	lower part	basal part	lower part	basal part	lower part	
1	0	12	0	1.4	0	78	
2	89	47	2.6	2.4	0	87	
3	8	0	0.2	0	68	15	
4	upper	0	63	0	3.2	89	
	under	76	32	7.8	2.8	92	84
5	upper	82	12	1.8	0.2	0	68
	under	53	37	3.2	0.6	43	57
6	upper	12	0	0.4	0	37	38
	under	8	0	0	0	24	4
7	89	34	8.7	4.5	95	95	
8	78	66	5.3	1.7	68	97	
9	0	48	0	2.3	0	64	
10	78	22	1.3	1.3	0	57	
11	93	36	7.6	1.8	67	94	
12	89	12	6.8	0.8	72	89	

¹⁾Mean separation with columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

성에 있어서 차이점들이 있었으며 극성을 보였다. 자엽과 배축, 뿌리 모두 절단하지 않은 경우와 자엽과 배축, 뿌리를 두 부분으로 자른 조직들(Fig. 1-1, 2, 3, 4, 5, 6) 그리고 말단부 20%를 제거한 자엽(Fig. 1-9)도 모두 상처부위에서만 캘러스의 형성과 shoot의 재분화를 보였다(Fig. 4A, B, C). 배축의 경우(Fig. 1-2, 5, 10) 성장점 부위가 제거되지 않아 Shoot의 형성률은 높았으나 shoot의 분화율은 매우 낮았다. 자엽과 배축의 기부 또는 말단부 20% 절단한 경우와 기부와 말단부를 모두 20% 절단한 경우(Fig. 1-7, 8, 11, 12)에는 배양의 초기에는 절단면의 하부 쪽은 주로 캘러스가 기부 쪽은 Shoot의 재분화가 되는 극성을 나타내었다(Fig. 4D, E). 가장 극성이 강하게 보인 경우는 기부와 말단부를 모두 20% 정도 절단한 경우로 기부는 93% 정도의 shoot 분화율을 말단부는 94%의 캘러스 형성률을 보였다(Table 3). Debergh와 Wael(1977)은 *Ficus lyrata*의 옆편을 여러 부위로 구분하여 절취, 치상 하였던 옆면 조직에서 Shoot 형성이 가장 양호하다고 하였으며, 이 원인을 Kuku *et al.*(1977)은 식물 조직내에 내생 성장조절물질이 함유 되어 있기 때문이라고 보고한 바 있다. 또한 Chen *et al.*(1989)은 *Pinelliaternata*의 조직 부위에 따라 부정아의 출현율 정도가 주아(bulbil)에서 100%, 근단(root tip)에서 84%, 미성숙 종자에서 48%였다고 보고한 바 있는데, 이처럼 식물체 조직의 유연성 정도에 따라 계대 배양에 있어서 반응의 차이가 다양함을 보이는 예는 적지 않다(Choi and Rha, 1986; Tsay *et al.*, 1982). 사과 자엽 절편체의 경우 shoot 형성은 기부 쪽에서만 발생한다는 보고(Kouider *et al.*, 1984, An *et al.*, 2000)와 유사하지만, 구기자자의 경우에는 시간의 경과에 따라 하부 쪽의 캘러스로부터도 shoot의 형성이 보였다(Fig. 4F).

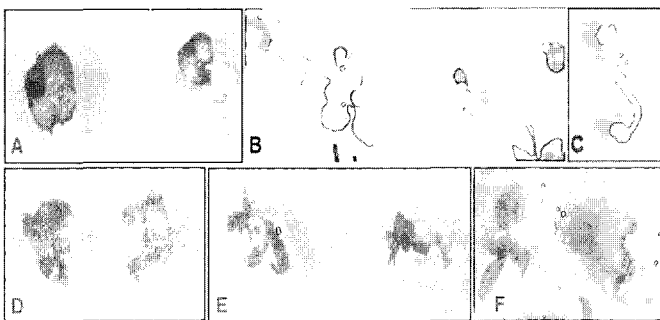


Fig. 4. Effect of polarity of explant on callus and shoot formation from *Lycium chinense*. Callus induction from excised ends of cotyledon (A), hypocotyl (B) and root (C). The polarity from cotyledon which excised each 20% of the basal and terminal part (D). The polarity from hypohcotyl which excised each 20% of the basal and terminal part (E). In excised ends of basal part, callus were induced vigorously and shoot were produced lately (F).

발근유도

호르몬이 첨가되지 않은 1/3 MS(sucrose 30g/L) 배지에서 발근을 유도 하였는데, 모든 shoot에서 발근이 이루어졌다(Fig. 5B).

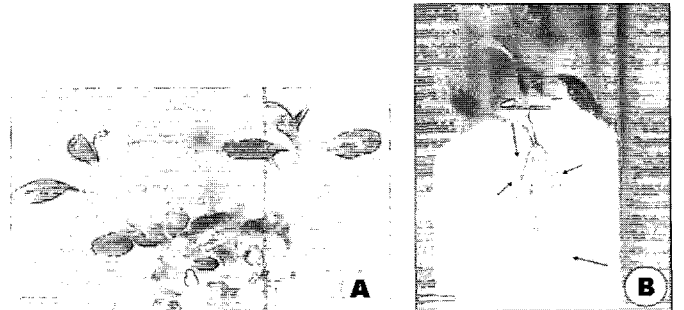


Fig. 5. Root induced from adventitious shoot. A; Adventitious shoot induced in petri-dish, B; Root induced from a adventitious shoot. Rateral roots induction (arrows). Bars represent 0.6cm (A), 0.3cm (B).

본 실험에서 배양은 주로 염의 농도를 1/2로 감량한 배지를 사용하였으며 보통 성장조절 물질은 초기, 증식, 신초신장, 발근 등 배양단계별에 따라 종류와 농도를 달리하기 때문에(Sadamatsu, 1987), 초기배양은 고농도의 cytokinin류와 저농도의 auxin류를 주로 사용하고(Choi *et al.*, 1992; Lane and Mcdogald, 1982), 신초신장 및 발근 유도시는 저농도의 cytokinin류와 auxin류가 주로 첨가(Sasahara *et al.* 1981)되었는데, 특히 발근시에는 저농도의 auxin류, 혹은 성장조절 물질을 첨가하지 않은 배지를 사용하였다(Kuroi and Sawada, 1985). 이와 같은 성장조절물질의 적용 정도는 배양식물의 종류에 따라 차이가 나타났으며, 재분화율, 증식정도, 성장능력, 즉 배양효율에서 많은 차이를 나타내었다. 특히 구기자자의 경우 배양단계별 무기염의 농도는 차이를 두지 않았으나 발근시에는 1/3의 MS배지를 사용하였다. 본 연구의 결과 재분화에 있어서는 성장조절물질의 구성에 따라 shoot와 캘러스의 분화율에 있어서 많은 차이를 보였으므로 앞으로 배지의 종류와 무기염류의 농도에 따른 분화율에 대한 검토가 더욱 필요하다고 보여 진다.

토양순화

발근배지에서 4주간 배양하여 얻은 재분화체를 습도가 60%, 온도가 25±1℃로 일정하게 유지되는 온실의 비 멀균토양에 이식하여 4주후에 생존률을 관찰한 결과 90% 이상의 높은 생존률을 나타내었으며 개화가 이루어졌다(Fig. 6). 구기자나무 재분화 식물체의 포장 생육특성에 대하여는 이미 Kim *et al.*(2002)이 자세히 보고한 바 있다. 임목의 조직배양에서 가장 큰 문제점은 발근이 쉽지 않으며 순화가 용이하지 않다는 점을 지적하였지만

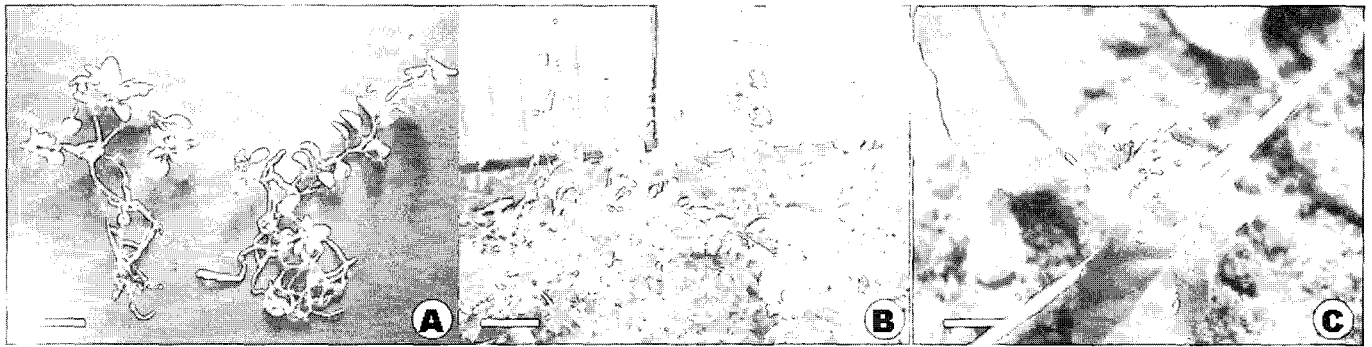


Fig. 6. Acclimatized plantlets of *Lycium chinense*. A; Soil transferred plantlets after 2 weeks. B; An acclimatized *Lycium chinense* in the green house. C; Flower formation of *Lycium chinense* from regenerated plant. Bars represent 0.8cm (A), 12cm (B) and 1.2cm (C).

(Sankara, 1988), 본 연구에서는 구기자나무 유식물체의 잎과 줄기 절편체에서 재분화체가 유도되고 토양에 완전하게 활착시킬 수 있었는데, 이는 기내에서도 뿌리의 유도가 잘 되어졌고 또한 구기자나무의 증식은 삼목에 의하여 잘 이루어지기 때문으로 생각되어 진다.

적 요

구기자나무로부터 캘러스의 형성과 shoot의 형성에 미치는 생장조절제의 영향을 연구한 결과 캘러스의 형성은 2,4-D를 포함하는 배지에서 효과적이었으나 shoot의 형성에는 억제효과를 보였다. Shoot의 형성은 0.1mg/L IAA + 0.1mg/L BA의 배지에서 형성률과 절편당 형성 개체수가 가장 높은 분화율을 보였다. 절편체의 부위에 극성에 다른 캘러스의 형성과 shoot의 재분화에 있어서는 자엽의 기부와 말단부를 20% 절제한 절편의 기부의 절단면에서는 shoot의 형성이, 하부의 절단면에서는 캘러스의 형성이 높았으며 시간이 경과함에 따라 하부에서도 shoot의 형성이 보였다.

재분화식물은 1/3 MS 배지에서 뿌리가 양호하게 발달하였으며 토양 순화과정에서도 90% 이상의 생존율을 보여 개화가 이루어졌다.

사 사

본 연구는 KOSEF(R01-2003-000-11683-0)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

An, H.J., B.W. Yau, Y.P. Lim and Y.U. Shin. 2000. Correlation between *In vitro* plant regeneration of apple cotyledon and light condition, polarity of explant. Kor. J. Plant. Tiss. Cult.

27: 19-23 (in Korean).
 Chen, C.C., T.G. Gau and H.S. Tsay. 1989. Studies on the callus formation and plant regeneration of *Pinellia ternata*. J. Agric. Res. China. 38: 30-41.
 Cho, D.Y. 1985. Distribution and quantitative determination of IAA by HPLC concerning adventitious root formation in *Azuki epicotyl* cutting. Kor. J. plant Tiss Cult 12: 79-87 (in Korean).
 Cho, D.Y. and W.Y. Soh. 1981. Adventitious root formation from the hypocotyl of *phaseolus phaseolus vulgaris*. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 12: 79-87 (in Korean).
 Choi, I.M., N.I. Hyung and S.B. Kim. 1992. Effects of medium compositions and shoot multiplication and rooting in shoot tip cultures of 'Kyoho' and 'Campbell Eaely' grapes. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 19: 59-66 (in Korean).
 Choi, J.S. and E.S. Rha. 1986. Studies on the mass propagation of *Pinellia ternata* Breit *In vitro*. Kor. J. Crop Sci. 31: 30-42 (in Korean).
 Chu, C.C., C.S. Sun, X. Chen, W.X. Zhang and Z.H. Du. 1984. Somatoc embryogenesis and plant regeneration in callus from in florescences of *Hondeum Vulgarex Trificum aestivum* hybrids. Theor Appl Genet. 68: 375-379.
 Debergh, P. and J.D. Wael. 1977. Mass propagation of *Ficus lyrata*. Acta Hor. 78: 361-364.
 Jo, M.H., I.K. Ham, B.C. Lee, J.W. Kom, W.S. Lee, S.Y. Kwon, H.S. Lee and S.S. Kwak. 2004. High frequency shoot formation and plant regeneration from cotyledonary hypocotyl explants of Boxthorn (*Lycium chinense* Mill.) seedling. Kor. J. Plant Biotechnol. 31: 203-207 (in Korean).
 Kato, Y. 1974. Bud formation on excised *Hetoniopsis* leaf flag-

- ment: Effects of leaf age and the midrib. plant cell physical. 15: 363-372.
- Kim, B.W., M.S. Choi, K.S. Roh and Y.G. Park. 1993. Somatic embryogenesis from leaf callus of *Lycium chinense* Mill. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 20: 91-96 (in Korean).
- Kim, D.C., H.J. Chung, B.H. Min and D.C. Yang. 2001. Plant regeneration from explant types and cultivars of Boxthorn (*Lycium chinense* Mill.). Kor. J. Plant Biotechnol. 29: 15-18 (in Korean).
- Kim, D.C., H.J. Chung, B.H. Min, D.C. Yang, S.D. Kim and B.C. Lee. 2002. Characteristics on the field growth of plantlets regenerated from leaf segment cultures Boxthorn (*Lycium chinense* Mill.). Kor. J. Plant Biotechnol. 29: 129-134 (in Korean).
- Kouider, M, S.S.,Korban, R.M. Skirvin and M.C. Chu. 1984. Influence of embryonic dominance and polarity on adventitious shoot formation from apple cotyledons *In vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109: 381-385.
- Kuku, czanka. K., K.Klimaszewska and H. Pluta. 1977. Regeneration of entire plant of *Peperomia scandens* Ruiz. from different parts of leaves *In vitro*. Acta Hort. 78: 365-369.
- Kuroi, J.P. and Y. Sawada. 1985. Appropriate concentration of a naphthaleneacetic acid and 6-benzylaminopurine for the apex culture of axillary buds of 'Kyoho' vines. J. Japan Soc. Hort. Sci. 58: 1-8.
- Lane, W.D. and J.M. Mcdougald. 1982. Shoot tissue culture of apple: Comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. Can. J. Plant Sci. 62: 689-694.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Physiol Plant. 15: 473-779
- Park, Y.G., M.S. Choi, B.W. Kim, W.I. Chung and K.S. Noh. 1995. Factors affecting introduction of *rolC* gene in *Lycium chinense* Mill. Kor. J. Plant. Tiss. Cult. 22: 329-334 (in Korean).
- Sadamatsu, M.O. 1987. Virus free stock production by shoot-tip culture of grape. Plant Production. 41: 418-422.
- Sankara Rao, K. 1988. *In vitro* meristem cloning of *Eucalyptus tereticornis* Sm. Plant Cell Rep. 7: 546-549.
- Sasahara, H., K. Takada, M. Iri, T. Takezawa and M. Yazaki. 1981. Regeneration of plantlets by meristem tip culture for virus free grapevine. J. Japan Soc. Hort. Sci. 50: 169-175.
- Skoog, F. and C. Miller. 1957. Chemical regeneration of growth and organ formation in plant tissue cultural *In vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-130.
- Tasay, H.S., P.C. Lai and L.J. Chen. 1982. Organ differentiation from callus derived from: anther, stem and tuber of sweet potato. J. Agric. Res. China. 31: 191-198.
- Yook, C.S. 1982. Pharmacological component of Chinense (herb) medicine. Key chook culture Co. pp. 399-747.

(접수일 2006.3.2 ; 수락일 2006.4.4)