

# 구기자나무 (*Lycium chinense*)의 효과적인 재분화 및 내염성 유전자가 도입된 형질전환체의 개발

이진숙 · 권기원<sup>1</sup> · 배창휴<sup>2</sup> · 양덕춘\*

한국인삼연구소, <sup>1</sup>충남대학교 산림자원학과, <sup>2</sup>순천대학교 농업생명과학대학

## Advanced Regeneration and Genetic Transformation of *Lycium chinense* Harboring Salt Tolerance Genes

LEE, Jin Suk · KWON, Ki Won<sup>1</sup> · BAE, Chang-Hyu<sup>2</sup> · YANG, Deok Chun\*

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea

<sup>1</sup>Department of Forest Resources, Chungnam National University, Taejon, Korea

<sup>2</sup>Research Institute of Agricultural Science, Sunchon National University, Sunchon, 540-742, Korea

**ABSTRACT** *Bet A* and *Bet B* genes related to salt resistance were introduced into *Lycium chinense* through high efficiencies of plant regeneration. The explants were precultured on the shooting medium which is consisted of MS medium added 1mg/L kinetin and 0.05mg/L IBA for 2 days. After pre-culture, they were immersed in LB media containing *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Bet* genes, and cultured on the same medium. Putative transformants could be selected after cocultivation of the explants with *Agrobacterium* on the shooting medium supplemented with 30mg/L kanamycin. The presence of both *Bet A* and *Bet B* genes from the transgenic plants were confirmed by PCR amplification with the gene specific primers and subsequent PCR-Southern blot with labeled *Bet* genes probe. The expression of *Bet A* and *Bet B* genes in the transgenic plants were observed by RT-PCR method.

**Key words:** *Agrobacterium*, *Bet A* and *Bet B* genes, regeneration, transformation

### 서 론

구기자나무 (*Lycium chinense*)는 가지과에 속하는 낙엽성 관목으로 내한성이 매우 강하여, 우리나라 전역에서 재배가 가능하며 중국, 대만, 일본 등 동남아 지역에도 자생하거나 식재되고 있는 대표적인 약용식물 중 하나이다. 최근에는 국민소득이 증가하고 생활 수준이 향상되면서 과일차, 액상차, 그리고 각종 청량음료제로 가공되어 판매되고 있으며 건강식품을 이용한 성인병예방 등에 일반인들의 관심이 높아지면서

구기자나무의 수요는 점차 증가하고 있는 추세이다. 구기자나무의 재분화에 대한 연구는 Lee 등 (1984)이 자엽, 생장점, 하배축으로부터 캘러스를 유도한 바 있고, Park 등 (1993)이 구기자나무 엽육 캘러스로부터의 기관형성에 의한 재분화를 보고하였다. 그러나 형질전환 연구의 경우 Park 등 (1995)이 구기자나무에 *rolC* 유전자를 도입한 연구사례 정도만 보고되어 있으며 최근까지도 유용 유전자의 도입은 이루어져 있지 않다.

내염성 식물은 염류 농도의 변화, 즉 외부 삼투압의 변화에 따라 세포 내의 삼투압을 유지하기 위한 특별한 화합물인 양립용질 (compatible solute)을 합성하는 기작을 가지고 있는데 비내염성 식물에서도 염류의 스트레스를 받게 되면 저항성의 기작으로 이러한 유기 용질 (organic solute)을 체내로 축적한다 (Anthony et al. 1998; Hayashi et al. 1997).

\*Corresponding author. Tel 042-866-5434 Fax 042-862-2522  
E-mail dcyang@gtr.kgtri.re.kr

한편 여러 종류의 미생물은 proline, glycine, betaine, polyols, sugar 등을 체내에 축적함으로써 고농도의 염류에 견디는 것으로 알려져 있으며, 이 중 본 연구에 사용된 glycine betaine은 미생물에서 2단계 반응을 통해 choline에서 합성되는데, 그 첫 단계는 choline dehydrogenase (CDH)에 의해 촉매되고 (이것은 *bet A* : choline dehydrogenase 유전자에 의해 수행), 두 번째 단계로는 *bet B* 유전자의 산물인 betain aldehyde dehydrogenase (BADH)에 의해 수행되는 것으로 알려져 있다 (Apse et al. 1999; Bordás et al. 1997). 내염성 유전자는 건조에 의한 스트레스와 더불어 식물의 성장을 억제시키는 주된 환경에 내성을 나타내는 유전자이며 아직 이를 사용하여 구기자나무에 형질전환 시킨 예는 전혀 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 캘러스 유도 배지를 통한 배양 기간을 생략하고 구기자나무의 절편체를 재분화배지에 치상하여 절편체로부터 직접 신초를 유도하는 방법을 이용하여 식물체 재생을 단축시키고자 하며, 이러한 재분화체계를 바탕으로 구기자나무에 염류 관련 유전자 (*bet A*, *bet B*) 도입을 위한 효과적인 형질전환체계를 연구하고자 수행하였던 바, 그 결과에 대해 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 발아조건

청양 구기자시험장 포장에 재식된 청양1호와 청양재래품종의 종자를 70% EtOH로 30초간 침적시킨 후 2% sodium hypochlorite 용액에 15분간 표면살균하여 멸균수로 3회 수세하였다. 표면살균된 종자를 3% sucrose, 0.7% agar가 첨가된 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에 치상하였다. 종자는  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 16시간 광주기의 배양실에서 약 7~10일 동안 발아시켰다.

### 식물체 재분화 조건 확립

약 7~10일 동안 자란 유식물체의 자엽과 하배축 절편체를 여러 가지 농도의 kinetin, zeatin, BA, IAA, NAA, IBA, 2,4-D, CPA가 첨가된 MS기본배지에 치상한 후  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 16시간 광주기의 배양실에서 신초를 유도하여 재분화에 최적인 성장조절제와 그 농도 조합을 선별하였다. 그 후 유도된 신초의 발근을 위하여 1/2 MS배지에 IAA와 NAA를 각각 0, 0.1, 0.5 및 1 mg/L로 첨가하여 신초의 발근양상을 조사하였다.

### Kanamycin이 구기자나무 절편체에 미치는 영향

신초 유도 배지에 kanamycin을 0, 10, 30, 50, 100mg/L로 여과처리 하였고, 자엽과 하배축 절편을 1~2cm로 하여 20반복으로 치상하였다. 배양 4주 후 kanamycin 농도에 따른 절편의 생존, 신초형성 유무를 조사하여 형질전환체 선발을 위한 최적농도를 결정하였다.

### 염류 (NaCl)가 구기자나무에 미치는 영향

정상적인 구기자나무절편에 미치는 염류스트레스 (NaCl)의 최소억제농도를 조사하기 위해서 신초 유도 배지에 NaCl을 0, 1, 1.5, 2%로 처리하여 15개의 절편을 치상하였다. 배양 4주 후 절편체의 재분화율을 조사하였다.

### 형질전환 및 재분화

형질전환에 사용된 내염성 유전자 (*bet A*, *bet B*)는 glycine betaine A, B gene이 함유된 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404)를 임업연구원에서 분양받아 사용하였다. 형질전환방법은 구기자나무 유식물체의 자엽 ( $0.5 \text{ cm}^2$ )과 하배축 (0.5~1 cm)을 침으로 자극한 후 preculture를 0, 12, 24, 36, 48, 72시간별로 또한 배지조건은 MS기본배지, MS+2,4-D 1 mg/L, MS+kinetin 1 mg/L, IBA 0.05 mg/L로 나누어 배양하였다. 다음 *A. tumefaciens* 배양액에 10~15분간 공조배양하여 이것을 다시 kanamycin이 함유된 신초 유도 선발 배지에 옮겨 광조건하에서 배양하였다. 신초 유도 선발 배지에서 재분화된 줄기는 6~8주 후 발근 선발 배지에 옮겨 배양하였다.

### 형질전환여부검정

잠정적인 형질전환체의 *bet A*, *bet B* 유전자의 도입 여부를 확인하기 위해 PCR을 수행하였다. DNA는 Edward 등 (1991)의 방법으로 추출하였으며, PCR 반응조건은  $94^\circ\text{C}$ 에서 2분간 pre-denaturation한 후,  $96^\circ\text{C}$ 에서 30초간 변성,  $60^\circ\text{C}$ 에서 30초간 annealing,  $72^\circ\text{C}$ 에서 15분간 post-extension 시키는 조건으로 하였다. PCR 증폭에 사용한 primer는 *bet A* 유전자(457 bp)의 증폭을 위해서 5'-GAGTTTGATATTCC GC TGGTGC-3'와 5'-GGGTGATGCGAATTGCGTTCG-3'을 사용하였고, *bet B* 유전자 (335 bp)의 증폭을 위해서는 5'-GGCAATATCTGACCGAGCATCC-3'와 5'-GTTAGTTT GCGGATCGAAAACG-3'을 사용하였다. 합성된 DNA 밴드는 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 크기를 확인하였다. PCR 산물은 전기영동된 겔을 nylonmembrane에 blot 시키고, Megaprime<sup>TM</sup> DNA labeling system으로 labeling된 *bet A*, *bet B* probe를 사용하여 hybridization을 수행하였다.

형질전환체의 *bet A*, *bet B* 유전자의 발현여부를 확인하기 위해서는 형질전환된 구기자나무의 잎을 액체질소를 첨가하면서 마쇄한 후, Total RNA isolation kit (Advanced biotechnologies)를 이용하여 총 RNA를 추출하고 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다. PreMix™-RT/PCR kit (Bioneer)를 이용하여 first-strand cDNA를 합성한 후 전술한 *bet A*, *bet B* primer를 사용하여 상용의 방법으로 RT-PCR 반응을 수행하였다.

**결과 및 고찰**

**재분화조건 확립과 재분화양상**

약 7~10일 동안 발아시킨 유식물체에서 절취한 자엽과 하배축을 여러 가지 농도의 kinetin, zeatin, BAP와 같은 cytokinin류와 IAA, NAA, IBA, 2,4-D, CPA와 같은 auxin류로 단독·혼용처리한 결과 kinetin과 IBA가 첨가된 혼용처리구에서 줄기 재분화율이 양호하게 관찰되었다 (Figure 1A, B). 이에 따라 구기자의 분화에 미치는 kinetin과 IBA의 효과를 좀 더 구체적으로 확인하기 위하여 kinetin 1 mg/L와 IBA 0.05 mg/L를 기점으로 좀 더 농도를 세분하여 조사하였는데 IBA 농도가 높아질수록 캘러스만 유기된 상태로 shoot 발생은 없었으며 kinetin의 농도가 높아질수록 잎과 줄기의 형성률이 적어지는 경향이 관찰되었다. 이상의 실험을 종합하여 볼 때 kinetin 1 mg/L, IBA 0.05 mg/L의 혼용처리배지에서 배양 10일경 가장 빨리 절단면과 상처낸 부위에서 캘러스가 유도되면서 shoot가 분화되었으며 배양 20일경에 분화된 shoot는 배양 30일 후에는 본엽 5~7개로 성장되어 구기자의 줄기 재분화에 가장 양호한 식물호르몬 조성임을 알 수 있었다.

품종별 부위별 배양효과를 조사하고자 청양1호와 청양재래 품종의 종자를 1/3 MS 발아배지에 치상하여 약 7~10일된 식물체의 하배축과 자엽을 kinetin 1 mg/L, IBA 0.05 mg/L의 혼용처리배지에 치상하여 6주 후에 관찰하였다. 품종별로는 청양1호가 청양재래보다 재분화율이 양호하였고, 배양 중 절편체의 비대 성장과 신초 유도 후 신장 생장이 보다 빠르게 일어났다 (Figure 1). 부위별로는 하배축이 자엽에 비하여 재분화율이 현저하게 높게 조사되었으며 이로 인해서 하배축이 식물체 재생에 있어서 효과적인 재료임을 알 수 있었다 (Table 1). 위의 실험 결과에서 구기자나무의 품종별과 절편체 부위에 따라 auxin과 cytokinin에 대한 반응이 다르게 나타났으므로 식물체 재분화에 있어 품종과 부위에 따라 성장 조절물질의 종류와 적정농도를 구명할 필요가 있을 것으로 생각되었다.

기내 발근에 효과적인 auxin 종류를 구명하고자 구기자나무 경우의 기준에 보고되어 있는 (Kim et al. 1993; Park et al. 1995) 발근 배지의 hormone 조성을 근거로하여 0, 0.1, 0.5, 1 mg/L로 NAA와 IAA의 농도를 달리하여 배양하였다 (Table 2). NAA와 IAA 1 mg/L 농도로 처리한 처리구에서 약 90% 이상의 발근율을 나타낸 반면 저농도의 처리구에서는 상대적으로 낮은 발근율을 나타내었다. 유도된 뿌리는 IAA의 경우 1차근으로 2~3개씩 내렸으나 NAA가 처리된 배지에서는 1차 근의 수가 특히 저조했다. 이는 IAA 처리시 신초 기부에 callus 발생률이 적는데 비해 NAA 처리구에서는 다량의 callus가 발생되어 발근이 저해된 것으로 생각되었다. Hammerschlag 등 (1987)은 고농도의 auxin이 신초 기부

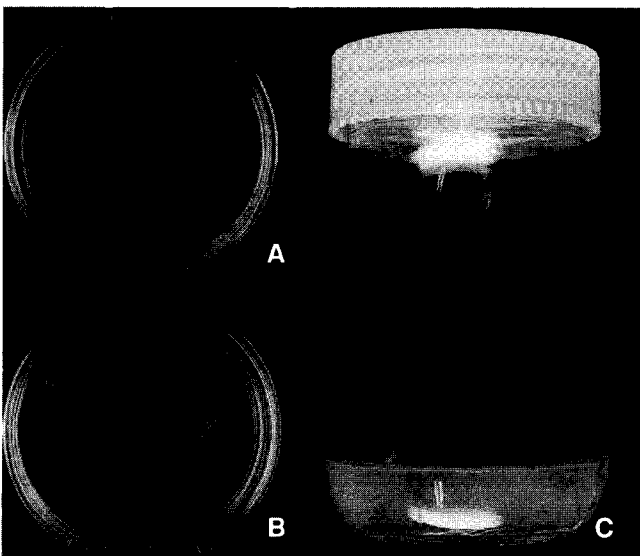


Figure 1.

**Table 1.** Effects of cultivars and explants on the shoot regeneration of *Lycium chinense*.

Cultivars	Explants	No. of cultured explants	No. of regenerated shoots (%)
Chungyang 1Ho	Cotyledon	50	12 (24)
	Hypocotyl	50	36 (72)
Chungyang Jaerae	Cotyledon	50	2 (4)
	Hypocotyl	50	22 (44)

**Table 2.** Effect of phytohormone on rooting of regenerated shoots of *Lycium chinense*.

phytohormone	Concentration (mg/L)	Rooting rate	No. of root formation
NAA	0	++	+
	0.1	++	+
	0.5	++	+
	1.0	+++	+
	0	++	+
IAA	0.1	++	+
	0.5	++	++
	1.0	+++	+++

+ : moderate, ++ : good, +++ : very good

에 다량의 callus를 유기할 뿐만 아니라 신장되는 뿌리의 길이도 짧게 한다고 하였다. 따라서 같은 농도의 auxin이라도 상대적으로 활성이 높은 NAA처리에서 다량의 callus가 발생되고 이것이 발근에 부정적으로 작용한 것으로 판단된다. 따라서 구기자나무의 발근은 발근율과 뿌리수를 감안하여 볼 때 1 mg/L의 IAA가 첨가된 MS배지에서 가장 양호하게 조사되었다 (Figure 1C).

**Kanamycin이 구기자나무 절편체의 생장에 미치는 영향**

정상적인 구기자나무 절편체의 kanamycin에 대한 선발 농도를 조사한 결과 하배축은 10 mg/L까지는 캘러스가 정상적으로 형성되면서 신초가 형성되었으나, 30 mg/L부터는 전혀 캘러스 형성이 없었고 자엽의 경우에는 하배축에 비해 kanamycin에 더 감수성이 강해 10 mg/L부터 전혀 분화가 일어나지 않았다. 이 결과로 볼 때 형질전환체 선발을 위하여 kanamycin처리 최소 농도는 절편체에 관계없이 30 mg/L농도면 충분하다고 생각되어 kanamycin 30 mg/L농도를 선발 농도로 정하였다 (Table 3).

**염류(NaCl)가 구기자나무 절편체의 생장에 미치는 영향**

염류스트레스 (NaCl)에 대한 구기자나무 절편체의 최소 억제 농도를 조사하기 위해 실험한 결과는 다음과 같았다 (Table 4). NaCl 1%는 캘러스는 정상적으로 생성되었으나 shoot가 분화되지 않았고, NaCl 1.5%부터는 전혀 캘러스나 shoot가 분화되지 않으며 모두 고사하였다. 이 결과로 형질전환체의 엽절편에서 부정아 유도를 위한 구기자의 염류 (NaCl)처리에 의한 선발농도는 NaCl 1.5%이면 충분하다고

**Table 3.** Effect of kanamycin on the growth of cotyledon and hypocotyl explants of *Lycium chinense*.

KanamycinConc. (mg/L)	Explants	shoot regeneration (%)
0	cotyledon	100
	hypocotyl	100
10	cotyledon	0
	hypocotyl	100
30	cotyledon	0
	hypocotyl	0
50	cotyledon	0
	hypocotyl	0

**Table 4.** Effect of NaCl on the inhibition of regeneration from leaf explants of *Lycium chinense*.

NaCl (%)	No. of explants	Shoot formation (%)
0	15	20
1	15	0
1.5	15	0
2	15	0

사료된다.

**구기자나무의 형질전환 및 재분화**

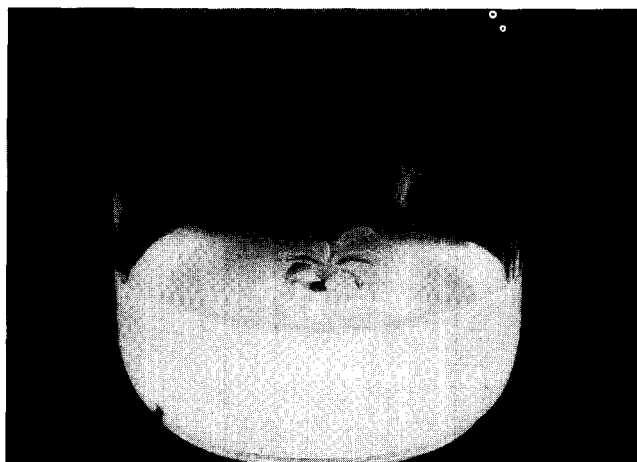
위와 같은 재분화 조건을 바탕으로 형질전환을 수행하였다. 구기자 유식물체의 자엽 (0.5×0.5 cm)과 하배축 (0.5~1 cm) 절편체를 무균상에서 절단하여 침으로 자극한 후 진탕배양된 *bet* 유전자가 함유된 *Agrobacterium* 균주와 공조배양하기 전의 전배양기간과 배지조건이 구기자의 형질전환율에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 실험한 결과는 다음과 같다 (Table 5). MS기본배지나 2,4-D 1 mg/L가 함유된 배지에 전배양한 경우에는 전배양 기간에 상관없이 전혀 캘러스나 줄기가 분화되지 않고 모두 갈변하거나 백화되며 고사한 반면, 재분화배지 조건에 전배양을 한 경우에는 형질전환체의 경우 약 10일 후에 캘러스가 유도되기 시작하면서 약 4~5주 후에는 shoot가 단독 또는 쌍으로 작게 형성되었다 (Figure 2).

전배양시간은 24시간 이상 재분화배지에 치상하여 전배양을 실시한 후에 LB 배지에서 현탁 배양한 *Agrobacterium* 과 10~15분 동안 공조배양을 한 경우에만 선발배지에서 절편체로부터 분화가 이루어졌다. 전배양은 48시간이 청양1호의 경우 20~30%로 매우 높은 잠정적 형질전환율을 보였고 더 이

**Table 5.** Effect of growth regulators and pre-culture time on the transformation of *Lycium chinense*.

Hour	Media	MS	MS + 2,4 - D 1mg/L	MS + kinetin 1mg/L IBA 0.05mg/L
0		-	-	-
12		-	-	-
24		-	-	+
36		-	-	++
48		-	-	+++
72		-	-	+++

- : 0%, + : 5~10%, ++ : 10~20%, +++ : 20~30%



**Figure 2.**

상 전배양시간이 길어져도 형질전환율은 같게 측정되었다 (Table 5). 그러나 전배양시간이 길어질수록 *bet A*, *bet B* 유전자에 의한 형질전환체일 확률보다 절편체에서 이미 분화조직이 만들어진 상태에서 kanamycin이 첨가된 선발배지에 배양하였기에 분화가 계속 이루어졌을 가능성이 있으므로 이에 대한 좀더 복잡한 분자수준의 유전분석확인이 요구된다. 이상의 결과는 구기자의 형질전환은 절편체가 호르몬을 adaptation하여 세포의 분화능이 어느 정도 촉진된 후에 균과 공조 배양을 해야만 효과적이며, 이는 절편체의 발육상태에 의해 기인된 것으로 생각된다.

6~8주 후 재분화된 싹은 발근배지에 계대하여 유지하였고, 증식된 식물체의 발근은 약 1주일 후 가능하였으며, 2주일 후에는 많은 뿌리가 형성되었다 (Figure 2). 차후 포트묘 육성, 포장 이식 등을 통해 계속 관찰이 요구되며, 실제 이러한 염류내성유전자 *bet A*, *bet B* 유전자에 의한 형질전환식물체의 염류내성정도 조사가 필요할 것으로 생각된다.

형질전환 여부 검증

재분화된 유식물체 내로의 *bet* 유전자 삽입 여부를 확인하기 위해 genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 형질전환체에서는 *bet A* (457 bp) 유전자나 *bet B* (355bp) 유전자를 확인할 수 있었으나 정상 식물체에서는 아무런 band도 나타나지 않았다. 또한 *Vir G* (837 bp) primer에 의한 유전자 증폭을 볼 수 없었으므로 이 결과가 *Agrobacterium*의 오염에 의해 나타난 결과가 아님을 확인할 수 있었다 (Figure 3A). 구기자나무의 *bet* 유전자를 Probe로 사용하여 PCR 증폭 DNA 단편에 대한 Southern blot 분석을 실시한 결과 동일한 위치에서 band를 확인할 수 있었다

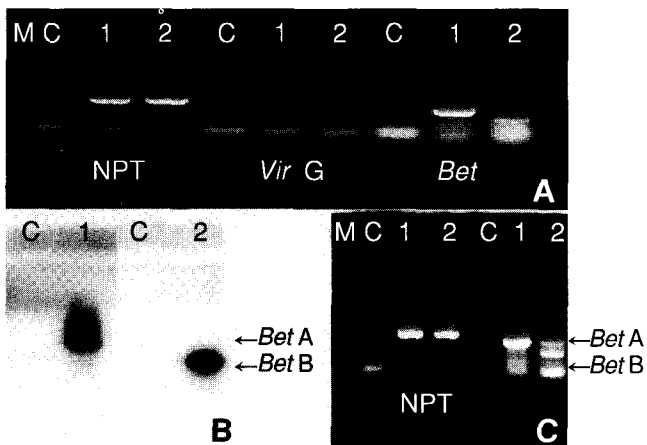


Figure 3. PCR (A), Southern blot analysis (B) and RT-PCR (C) from transgenic and nontransgenic plants. (A) Agarose gel electrophoresis of PCR product of nontransgenic plants (lane c) and transgenic Plants (lane 1,2); (B) Southern blot analysis of PCR products from control (lane c) and *Bet A* transgenic plants (lane 1) *Bet B* transgenic plants (lane 2); (C) RT-PCR product of untransgenic plants (lane c) and transgenic plants (lane 1,2)

(Figure 3B). 이것은 형질전환체 게놈 안으로 *bet* 유전자가 안정적으로 도입되었음을 나타내는 결과이다. 또한, 형질전환된 구기자나무에서 *bet* 유전자의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 형질전환체에서는 *bet A* (457 bp) 유전자나 *bet B* (355 bp) 유전자를 확인할 수 있었으나 정상식물체에서는 아무런 band도 나타나지 않았다 (Figure 3C). 이상의 결과로 구기자나무에 도입된 *bet* 유전자가 안정적으로 발현되고 있는 것을 확인할 수 있었다.

적 요

구기자나무의 효과적인 재분화조건을 바탕으로 염류내성유전자인 *Bet A*와 *Bet B* 유전자의 도입을 시도하였다. 구기자나무의 절편체를 재료로 kinetin 1 mg/L, IBA 0.05 mg/L가 첨가된 MS배지에 2일간 전배양한 후 *Agrobacterium*과 공조배양 및 선발배지에서의 배양으로 kanamycin에 내성을 갖는 잠정적인 형질전환체를 유도하였다. 형질전환체는 PCR 기법 및 Southern blot 분석으로 *Bet A*와 *Bet B* 유전자 전이를 확인하였고, 도입된 유전자의 발현은 RT-PCR 방법을 사용하여 확인하였다.

인용문헌

Anthony Y (1998) Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology 323:915-928

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. Science 285:1256-1258

Bordas M, Montesinos C, Dabauza M, Salvador A, Roig LA, Serrano R, Moreno V (1997) Transfer of yeast salt tolerance gene *HAL 1* to *Cucumis melo* L. cultivars and *in vitro* evaluation of salt tolerance. Transgenic Res. 6:41-50

Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res 19:1349

Hammerschlag FA, Bauchan GR, Scorza R (1987) Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of peach cultivars. Plant Cell Tiss Org Cult 8:235-242

Hayashi H, Mustardy P, Deshniem M, Alia L, Murata N (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *cod A* gene for choline oxidase; accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. Plant J 12:133-142

Lee MS, Kim DC, Kim JH, Lim WJ (1984) Studies on the tissue culture of *Lycium chinense* Mill. Kor J Plant Tiss Cult 7:261-274

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-

497

**Park YG, Kim BW, Choi MS, Roh KS** (1993) *In vitro* organogenesis from leaf callus of *Lycium chinense* Mill. Kor J Plant Tiss Cult **20**:85-89

**Park YG, Choi MS, Kim BW, Chung WI, Noh KS** (1995) Factors affecting introduction of *rol* C gene in *Lycium chinense* Mill. Kor J Plant Tiss Cult **22**:329-334

(접수일자 2001년 2월 27일)