

구기자나무 (*Lycium chinense*)의 모상근 유도 및 생물반응기 배양

배기화¹, 김윤수², 정재훈³, 김영선⁴, 최용의⁵, 윤의수^{6*}

¹마이크로프랜즈 부설연구소, ²중앙대학교 인삼산업연구센터, ³국립산림과학원 생물공학과,
⁴남도대학 약용자원원예개발과, ⁵강원대학교 산림과학대학 산림자원부, ⁶공주대학교 생물학과

Induction of Hairy Root and Bioreactor Culture of *Lycium chinense*

Ki-Hwa Bae¹, Yun-Soo Kim², Jae-Hun Jeong³, Young-Seon Kim⁴, Yong-Eui Choi⁵, Eui-Soo Yoon^{6*}

¹Microplants Co., LTD., Palbok-dong, Jeonju 561-203, Korea

²Korea Ginseng Institute, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

³Division of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon, Kyunggi-do 441-350, Korea

⁴Department of The Development of Medicinal Resources and Horticultural Industry, Namdo Provincial College of Jeonnam
Changhung 529-850, Korea

⁵Division of Forest Resources, College of Forest Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

⁶Department of Biological Science, Kong-ju National University, Gongju 314-701, Korea

ABSTRACT This article was conducted to induce the transgenic hairy roots and determine the effect of culture conditions on optimum growth of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes* strain, 15834 in *Lycium chinense* Miller. Hairy roots of *L. chinense* Miller. were induced from leaf segments by co-cultivation with *A. rhizogenes*. When the hairy roots were cultured in various MS medium strength and sucrose concentrations, the highest growth of hairy roots was observed in half-strength MS media supplemented with 3% sucrose, respectively. In air lift bioreactor cultures, the liquid medium contained with 1/2 MS and 3% sucrose was also the best for optimum growth of hairy roots.

Key words: Bioreactor, co-cultivation, *Lycium chinense* Miller, MS medium strength, *rolC* gene, sucrose

서 론

구기자나무 (*Lycium chinense* Miller)는 다년생 낙엽 관목으로 한국 전역과 중국, 일본 등의 동북아시아와 동남아시아 지역에 널리 분포하고 있는 중요한 약용식물이다. 구기자나무의 이용 형태로는 부위에 따라서 열매를 구기자(*lycii fructus*), 뿌리껍질을 지골피(*lycii cortex*), 잎을 구기잎(*lycii folium*)이라 구분하여 이용하고 있으며, 최근에는 건강보조 식품 및 기호성 식품으로 구기자의 수요량이 증

가하고 있다.

구기자나무의 뿌리인 지골피에는 2차 대사산물인 betaine 과 β -sitosterol이 25 mg/g 함유되어있다. 지골피의 betaine 은 간장과 위장의 기능을 촉진, 동맥경화와 고혈압의 예방, 근골강화와 빈혈예방에 효과가 있고, β -sitosterol은 콜레스테롤 및 고지방에 의한 성인병의 치료 및 예방효과에 뛰어난다는 보고가 있고 (Smirnova and Oktyabrosky 1995). 또한, 지골피에는 지방산과 sugiol, diterpen 등도 함유되어 있는 한편, 구기자나무 잎에는 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)을 비롯한 오갈피 (*Acanthopanax*)과 식물에 들어있는 daucosterol 등이 함유되어 있어서 미래의 고부가가치 약용자원으로써 가치가 크다 (Choi 1999). 그러나 구기자나무에서 지골피의 대량생산을 하기란 쉽지 않다. 목본류

*Corresponding author Tel 041-850-8502 Fax 041-850-8479

E-mail yes@kongju.ac.kr

인 구기자나무는 생장이 느린 반면에 재배 시에는 노동집약적이고 생산비용이 높아 지골피의 수확량이 한정되어 있기 때문이다 (Lee and Sheo 1986).

지금까지 구기자나무에 대한 조직배양학적 연구는 구기자나무의 자엽, 하배축 및 성장점 배양을 통하여 신초를 유도하거나 (Lee et al. 1984; Li and Zhang 1990; Yakov et al. 1990), 구기자나무의 잎 (Kim et al. 1993)과 신초 (Liu 1991)로부터 배발생 캘러스를 유도하여 체세포배를 발생 시킴으로써 식물체를 생산하고자 하는 방향으로 진행되었으며, 구기자 배양세포에서는 신경계에 작용하는 물질인 *cerebroside*를 분리한 바 있다 (Jang et al. 1998).

최근에 구기자 나무를 재료로 하여 내염성 유전자 (Lee et al. 2001)와 *rolC* 유전자 (Park 1995)가 유입된 식물체 재분화에 대한 보고가 있었다. 하지만 약용가치가 우수한 구기자 나무의 뿌리를 대량생산하고자 하는 연구는 아직 보고된 바가 없다. 현재 식물체로부터 유용물질을 대량생산하고자 특정 형태의 뿌리를 유도, 증식하려는 노력은 여러 약용작물에서 시도되고 있다. 그 가운데 *Agrobacterium rhizogenes*를 이용하여 모상근을 대량생산하는 연구는 인삼 (Yang et al. 1996)을 비롯한 대황 (Hwang et al. 2000) 등의 약용식물에서 이미보고 된 바 있다. 그리고 Van der Heijden 등 (1994)은 *Rubiatinctorum*의 모상근 배양을 통하여 얻어진 생산물이 유전적으로 비교적 안정된 형태를 나타내고 있다고 보고하였으며, Christen 등 (1990)도 *Datura candida*의 모상근은 유전적으로 안정되었을 뿐만 아니라 배양을 통해서 생산되는 *alkaloid*의 함량은 모식물체의 뿌리와 거의 동일하다고 발표하였다. 또한 이러한 모상근은 T-DNA 상에 존재하는 식물 호르몬 합성에 관여하는 효소 유전자의 발현으로 외부 식물생장조절제의 공급이 없이도 빠른 생장을 나타내는 장점도 가지고 있다 (Knopp et al. 1988).

따라서 본 연구에서는 약용가치가 우수한 구기자나무의 뿌리를 대량생산하기 위하여 구기자나무의 잎 절편으로부터 모상근을 유도하고, 이렇게 유도된 모상근을 대량생산하기 위하여 최근 여러 약용식물의 대량생산에 이용되고 있는 생물반응기 (bioreactor) (Paek et al. 2001)를 적용함으로써 구기자나무 모상근의 대량생산 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 사용한 구기자나무 (*L. chinense* Miller) 종자는 청양 구기자 시험장에서 채취한 청양 8호이며, 채취한 종자는 멸균된 증류수로 30분간 침지시킨 다음 70% (v/v) EtOH에 10초간 침지한 후 1% (v/v) sodium hypochlorite

용액에 15분간 표면살균하였다. 그리고 살균된 종자를 멸균된 증류수로 5회 수세한 후 1/2 MS (Murashige and Skoog 1962)에 2% (w/v)의 sucrose와 0.3% (w/v)의 gelrite를 첨가한 배지에 접종하여 발아된 식물체를 사용하였다.

구기자나무의 모상근 유도 및 증식

구기자나무의 잎 절편을 LB배지에서 24시간동안 배양 ($27 \pm 1^\circ\text{C}$)한 *Agrobacterium rhizogenes* strain, 15834와 공동배양 한 다음 멸균된 filter paper 위에 20분간 잎 절편을 건조시킨 후 MS 고체 배지 위에서 3일 간 공조배양 하였다. 사용된 배지의 pH는 5.7로 조정하였고, 121°C 에서 15분간 고압 멸균하여 사용하였다. 배양실의 온도는 $25 \pm 3^\circ\text{C}$ 으로 조절하였으며 광도는 $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ 으로 하여 16시간의 명조건, 8시간의 암조건으로 배양하였다. 이후 MS 고체 (Gelrite 0.3%) 배지에 500 mg/L cefotaxime, 3% (w/v) sucrose 첨가하여 모상근을 유도하였다. 유도된 구기자나무 모상근을 cefotaxime이 500 mg/L 들어간 MS 고체배지에서 2주 간격으로 5회 계대배양하여 균을 제거하였다. 이후 cefotaxime이 첨가되지 않은 배지에서 박테리아의 생장이 이루어지지 않은 것을 확인한 라인인 cefotaxime이 첨가되지 않은 고체배지에 배양하여 모상근 라인을 유지 하였다.

PCR 분석

유도된 모상근에서 *Agrobacterium rhizogenes* strain, 15834의 *rolC* 유전자 도입여부를 확인하기 위하여 모상근과 기내에서 종자로부터 받아서 식물체의 뿌리절편에서 genomic DNA를 분리한 다음 (Murray and Thompson 1980), PCR 분석을 통하여 비교분석하였다. PCR 분석에 사용된 primer는 총 500 bp의 PCR 산물을 증폭하도록 제작한 forward primer (5'-ATG GCT GAA GAC GAC CTG TGT T-3')와 reverse primer (5'-TTA GCC GAT TGC AAA CTT GCA C-3')를 이용하였다. PCR은 template DNA 100 ng, dNTP 0.4 μM , primer 10 pmoles, *Taq* DNA polymerase 2 unit 등의 조성으로 총 반응액을 50 μL 로, 95°C 에서 5분간 pre-denaturation을 거친 후, 95°C 에서 30초간 denaturation 하였으며, annealing은 55°C 에서 30초, polymerization은 72°C 에서 1분간 하여 36 cycle 을 하였으며, extension은 72°C 에서 5분간하여 반응을 마친 후, 전기영동하여 결과를 확인하였다.

모상근의 최적 현탁배양 조건

현탁배양시 모상근의 최적 배양조건을 찾기 위해 생장이 왕성한 한가지 모상근 라인을 재료로하여 각각 생장조절물

질이 첨가되지 않은 1/5 MS, 1/4 MS, 1/3 MS, 1/2 MS, MS (sucrose는 모든 배지에 3%로 동일하게 처리하였음) 액체 배지에 모상근의 절편체를 약 1 g씩 각각 접종하였다. 배양은 각각의 배지가 100 mL씩 포함된 250 mL 삼각플라스크에서 이루어졌으며, rpm은 110으로 조정하여 실시하였다. 또한 모상근의 현탁배양시 sucrose의 농도가 모상근의 생장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1/2 MS 액체배지에서 sucrose의 농도를 0%, 1%, 3%, 5%, 7% (w/v)로 달리 하여 실험을 하였다. 위의 실험은 온도가 25 ± 3°C로 조절되는 배양실에서 16시간의 명조건, 8시간의 암조건으로 4주간 배양하였으며, 각각 3회 수행하였다.

모상근의 생물반응기 배양

모상근의 생물반응기 배양에서 배지조건을 최적화하기 위하여, 배지는 1/2 MS와 MS배지를 이용하였으며 sucrose의 농도를 각각 3과 5% (w/v)로 첨가하여 수행하였다. 생물반응기는 10 L의 air lift bioreactor (balloon type, Figure 1E)(Paek et al. 2001)를 이용하였으며 각각의 배지는 7 L씩 만들어 분주하였다. 그리고 구기자 모상근은 각 생물반응기에 40 g씩 접종하여 배양하였다. 배양기내의 공기주입량은 0.1 vvm (air volume/culture medium volume/min)으로 하고 배지의 pH는 5.7로 조정하여 온도가 25 ± 3°C로

조절되는 배양실에서 16시간의 명조건, 8시간의 암조건으로 4주간 배양하였다.

결과 및 고찰

모상근의 유도, 증식 및 확인

구기자나무의 잎 절편체로부터 모상근을 유도하고자 *Agrobacterium rhizogenes* 15834와 공동배양한 결과, 모상근은 배양 2주 후부터 절편체의 절단부위에서 유도되었다. 이렇게 유도된 모상근은 500 mg/L의 cefotaxime이 첨가된 MS 고체배지에 2주 간격으로 5번 계대배양하여 선발, 증식하였다. 유전자가 삽입되지 않은 종자유래 뿌리 절편은 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서는 측근이 유도되지 않았지만 (Figure 1A), 형질전환된 모상근 절편에서는 측근이 활발히 유도되었다 (Figure 1B). 항생제 (cefotaxime)가 첨가된 배지에서 약 5번 이상 계대배양한 후 항생제가 제거된 배지에 옮겨 더이상 박테리아 생장이 이루어지지 않는 라인을 선발하고 유지 하였으며 이 라인들은 페트리디쉬 및 삼각플라스크에 옮겨 유지하였다 (Figure 1C,D).

증식된 모상근의 genome에 외래의 *rolC* 유전자가 정상적으로 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 PCR분석을 실시한 결과, 대조구인 부정근 (Figure 2의 lane N)에서는 *rolC* 유전자를 확인할 수 없었으나, 선발된 구기자나무의 모상근 (Figure 2의 lane 1, 2, 3)에서는 0.5 kb에서 모두 단편을 확인하여 유전자가 도입되었음을 알 수 있었다 (Figure 2).

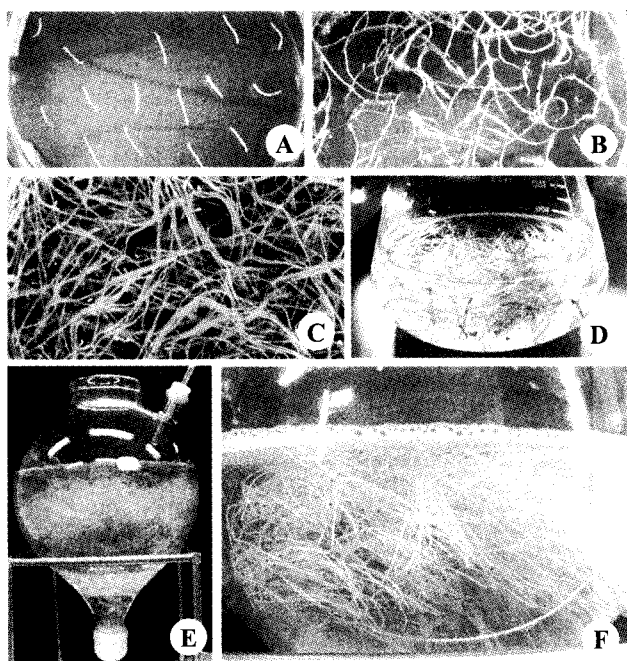


Figure 1. Induction and proliferation of hairy roots of *L. chinense*. A, Root segments of non-transformed seedlings on hormone-free MS medium with 500 mg/L cefotaxime. B, Active lateral root formation from hairy root segments on MS medium with 500 mg/L cefotaxime. C, Proliferation of hairy roots on 1/2MS liquid medium in Erlenmeyer flask. D, Mass production of hairy roots in 10 L air lift bioreactor. E, Enlarged view of hairy roots.

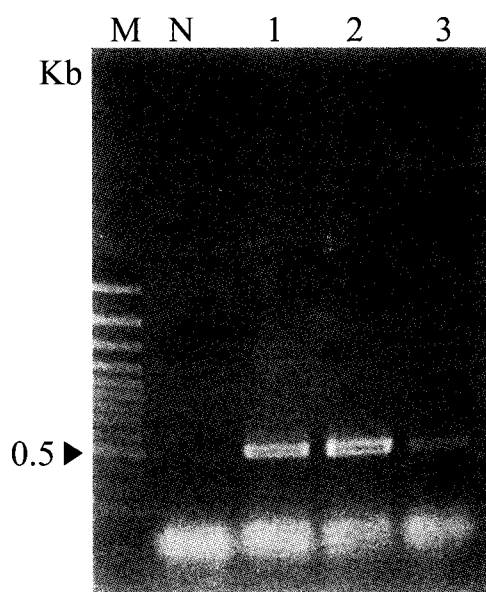


Figure 2. Genomic DNA PCR analysis of *rolC* genes in transgenic *L. chinense*. M, size markers; N, root explants of non-transformed plantlet; lane 1-3, individual hairy roots; arrowhead expected 0.5 kb fragments of *rolC* genes, respectively.

모상근의 최적 현탁배양 조건

삼각플라스크에서 액체배양에 의하여 증식된 구기자나무 모상근 절편을 생장조절물질이 첨가되지 않은 1/5 MS, 1/4 MS, 1/3 MS, 1/2 MS, MS의 액체배지에 각각 생체중 1 g 씩 넣어 4주간 현탁배양한 결과, 1/2 MS 배지에서의 생체중 12.3 g와 건물중 1.4 g으로 가장 높았으며, 그 다음으로 MS 배지로 생체중 8.3 g와 건물중 1.0 g으로 생장이 높게 나타났다 (Figure 3). 반면에 1/2보다 낮은 농도에서는 농도가 감소될수록 모상근의 생장은 저조한 생장을 나타내는 것으로 나타났다 (Figure 3). 이와 같이 MS배지에서보다 1/2 MS에서 생장이 증가한 결과는 배지 내 주공급원인 질소원에 의한 것으로 생각된다. 배지 내 질소원은 NH₄⁺와 NO₃⁻이며, 이들은 세포 및 조직의 성장과 유용물질 생산에 상당한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Liu and Zhong 1997; Kwon et al. 2003). 특히, 모상근 배양 시 NH₄⁺는 생장을 억제하는 것으로 잘 알려져 있다 (Hwang et al. 2002). 본 실험에서도 1/2 MS배지보다 상대적으로 NH₄⁺가 많이 함유되어 있는 MS배지에서 구기자나무 모상근의 생장을 억제하였을 것으로 생각된다. 그리고 대부분 처리에서 생체중에 대한 건물중의 비율은 약 10% 이상으로 나타났다 (Figure 3).

질소원이 대부분인 무기성분 다음으로 MS배지 내에서 생장에 중요한 영향을 미치는 성분은 유기성분인 탄소원이다. 이러한 탄소원의 대부분은 인위적으로 첨가하는 sucrose라고 할 수 있다. 본 실험에서 sucrose가 구기자나무 모상근의 생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배지 내 sucrose의 농도를 다양하게 첨가한 결과 (Figure 4), sucrose가 3%로 처리되었을 때 모상근의 생체중은 24.9 g으로 가장 높게 나타났으며 건물 중 역시 2.5 g으로 가장 높게 나타났다. 그러나 sucrose 농도가 5%이상으로 증가하면서 모상근의 생장이 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 배지 내 sucrose의 농

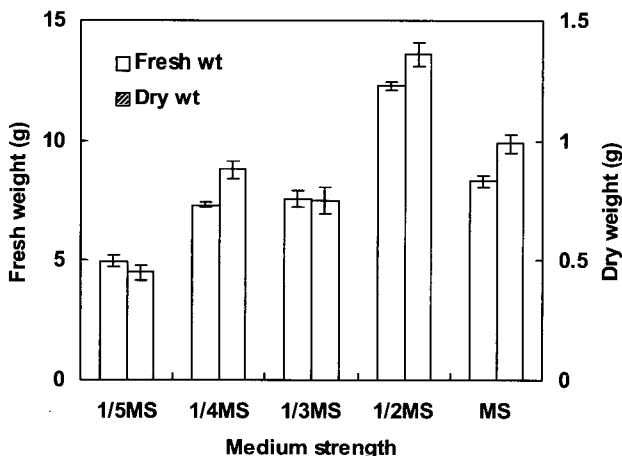


Figure 3. Effect of inorganic salts on the growth of hairy roots of *L. chinense* after 4 weeks of culture in 100 mL liquid media.

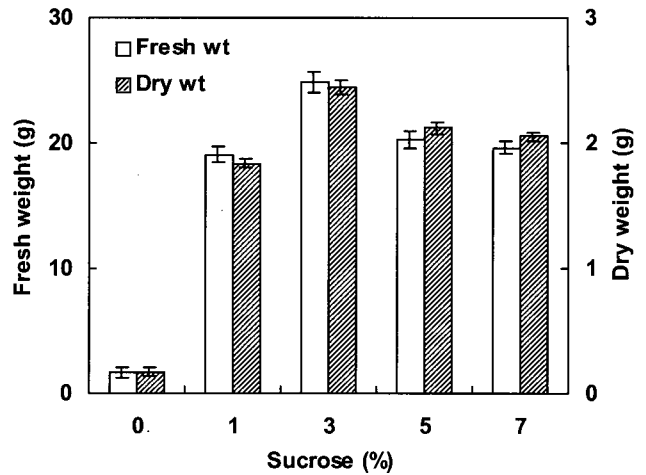


Figure 4. Effect of sucrose on the growth of hairy roots induced from *L. chinense* after 4 weeks of culture in 100 mL of 1/2 MS liquid media.

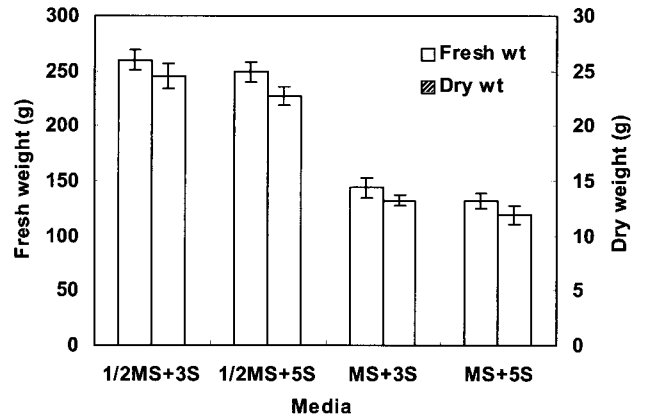


Figure 5. Effect of MS medium strength and sucrose on the growth of hairy roots induced from *L. chinense* after 4 weeks of culture in 10 L air lift bioreactors contained with 7 L liquid medium. MS and S in figure represented MS medium strength and sucrose concentration (%), respectively.

도가 일정 수준이상으로 증가하게 되면 배지내 삼투물랄농도 (osmolality)가 증가하여 세포의 생장을 억제하기 때문에 발생하는 것으로 생각된다 (Tian and Russell 1999). Zhang 등 (1995)의 실험에서도 *Panax notoginseng*의 세포 배양시 높은 초기 삼투압이 세포의 생장을 억제한다고 발표하였다. 이상의 결과에서 알 수 있듯이, 배지 내 sucrose는 3% 이상의 농도에서 생장에 미치는 영향은 무기성분이 모상근의 생장에 미치는 영향처럼 극적이지는 않지만 구기자나무 모상근의 생장에 영향을 주는 것으로 나타났다.

모상근의 생물반응기 배양

생물반응기를 이용한 구기자나무 모상근의 대량배양시 (Figure 1E, F), 배지내 적절한 무기물과 sucrose의 농도를 규명하기 위하여 생장이 비교적 양호하였던 1/2 MS와 MS

에 sucrose 농도를 각각 3과 5%로 조정하여 실험을 실시한 결과는 Figure 5와 같다. 현탁배양의 결과와 마찬가지로 생물반응기를 이용한 배양에서도 역시 고농도의 무기물 농도는 모상근의 생장을 억제한 것으로 나타났고, 무기물 농도가 낮은 1/2 MS와 3% sucrose의 조합에서 생중량 (260.2 g)과 건물중 (24.5 g)이 높게 나타났다. 1/2 MS배지에 5%의 sucrose가 첨가된 배지에서도 생체중과 건물중이 각각 249.1 g와 22.7 g으로 양호하게 나타났으나 생산성 측면에서 보면 sucrose를 적게 사용하는 3%처리구가 유리하다고 생각된다. 하지만, 이러한 결과는 생산규모가 증가하면서 달라질 수 있는 가능성을 가지고 있다. *Panax ginseng*의 경우 생물반응기 배양에서 배양규모가 증가 (scale-up)하면서 sucrose의 요구도가 증가하여 5% 이상의 sucrose 공급시 동일 배양기간동안에 생장이 상당히 증가한 사실을 보고하고 있다 (Hahn et al. 2003). 따라서 향후 배양규모를 증가시키고자할 때 sucrose의 농도는 재고하여야 할 것으로 생각된다.

적 요

구기자나무의 잎 절편을 *A. rhizogenes* strain, 15834와 공동배양하여 유도된 모상근의 최적배양조건을 결정하기 위하여 MS배지와 sucrose의 농도를 다양하게 처리한 결과, 1/2 MS 배지에서 생체중 (12.3 g)과 건물중 (1.4 g)으로 가장 높게 나타났으며, 탄소원으로 사용된 sucrose에서는 3% 농도에서 생체중과 건물중이 가장 양호하게 나타났다. 이와 같이 결정된 MS농도와 sucrose의 농도를 이용하여 대량배양을 하고자 10 L의 air lift bioreactor에서 대량배양한 결과 역시 1/2 MS와 3% sucrose의 농도를 사용한 처리구에서 가장 높은 생체중과 건물중의 증가를 보였다. 하지만, 1/2 MS에 5% sucrose를 처리한 bioreactor배양에서도 3% sucrose처리에서와 마찬가지로 생체중과 건물중이 높게 나타났다.

사 사

본 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 중점연구소 지원사업 (KRF-99-F0003) 및 바이오그린 21사업에 의하여 지원되었음.

인용문헌

Choi OJ (1999) A component and use of medicinal herbs. Ilweolseogak, Seoul, pp 632-634

- Christen P, Margaret F, Phillipson JD, Evans WC (1990) Alkaloids of hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. *Plant Cell Rep* 8: 250-252
- Hahn EJ, Kim YS, Yu KW, Jeong CS, Paek KY (2003) Adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer and ginsenoside production through large-scale bioreactor system. *J Plant Biotech* 5: 1-6
- Hwang OJ, Kim YJ, Sung NS, Ahn JC, Kim SE, Hwang B (2002) Optimization of major culture elements on growth and shikonin production in the *Lithospermum erythrorhizon* hairy root culture. *Korean J Medicinal Crop Sci* 10: 243-248
- Hwang SJ, Na MS, Pyo BS, Lee JB, Hwang B (2000) Production of tannin from hairy root culture of *Rheum undulatum* L. *Korean J Plant Res* 8: 250-258
- Jang YP, Lee YJ, Kim YC, Huh H (1998) Production of a hepatoprotective cerebroside from suspension cultures of *Lycium chinense*. *Plant Cell Rep* 18: 252-254
- Kim BW, Choi MS, Roh KS, Park YG (1993) Somatic embryogenesis from leaf callus of *Lycium chinense* Mill. *Kor J Plant Tiss Cult* 20: 91-96
- Knopp E, Strauss A, Wehli W (1988) Root induction on several salanaceae species by *Agrobacterium rhizogenes* and determination of tropane alkaloid content. *Plant Cell Rep* 7: 590-593
- Kwon JH, Chen HC, Yang DJ (2003) Production of ginsenoside in callus of ginseng hairy roots. *J Ginseng Res* 27: 78-85
- Lee JS, Kwon KW, Bae CH, Yang DC (2001) Advanced regeneration and genetic transformation of *Lycium chinense* harboring salt tolerance genes *Kor J Plant Tiss Cult* 28: 47-52
- Lee MS, Kim DC, Kim JH, Lim WJ (1984) Studies on the tissue culture of *Lycium chinense* Mill. *Bul Agr Wonkwang Univ* 7: 261-275
- Lee MY, Sheo HJ (1986) Quantitative analysis of total amino acid and free sugars in *Lycium fructus*. *J Korean Soc Food Natr* 15: 249-252
- Li W, Zhang DW (1990) Medical and aromatic perennial crops. In: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Yamada Y, (eds), *Handbook of plant cell culture*, vol6, McGraw-Hill, USA, pp. 116-126
- Liu CS (1991) An efficient method for selecting embryogenic callus from *Lycium chinense* L. *Plant Sci* 79: 99-103
- Liu S, Zhong JJ (1997) Simultaneous production of ginseng saponin and polysaccharide by suspension cultures of *Panax ginseng*: Nitrogen effects. *Enzyme Microb Technol* 21: 518-524
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Planta* 15: 487-497
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 4321-4325.
- Paek KY, Hahn EJ, Son SH (2001) Application of bioreactors

- for large-scale micropropagation systems of plants. In *Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 149-157
- Park YG, Choi MS, Kim BW, Chung WI, Noh KS (1995) Factors affecting introduction of *rolC* gene in *Lycium chinense* Mill. *Kor J Plant Tiss Cult* 22: 329-334
- Smirnova G, Oktyabrosky O (1995) Betaine modulates intracellular thiol and potassium levels in *Escherichia coli* in medium with high osmolarity and alkaline pH. *Acra Soc Bot Poloniae* 50: 399-404
- Tian HQ, Russel SD (1999) Culture-induced changes in osmolality of tobacco cell suspension using four exogenous sugars. *Plant Cell Tiss Org Cult* 55: 9-13
- Van der Heijden R, Verpoorte R, Hoekstra SS, Hoge HJC (1994) Nordamnacanthal, a major anthraquinone from an *Agrobacterium rhizogenes* induced root culture of *Rubiatinctorum*. *Plant Physiol Biochem* 32: 399-404
- Yakov IR, Vladimir AR, Nickolai MP (1990) Regeneration of *Lycium barbarum* L. plant from leaf tissue, callus culture and callus protoplasts. *Plant Cell Rep* 9: 84-87
- Yang DJ, Choi HY, Kim YH, Yang KY, Yang DC (1996) Growth and ginsenoside production of hairy root (*Panax ginseng* C.A. Meyer) via light energy. *Korean J Ginseng Sci* 20: 318-324
- Zhang YH, Zhong JJ, Yu JT (1995) Effect of osmotic pressure on cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharide in suspension cultures of *Panax notoginseng*. *Biotechnol Lett* 17: 1347-1350

(접수일자 2004년 8월 30일, 수리일자 2004년 11월 30일)