

## 할미꽃 기내발근에 미치는 식물생장조절제의 영향

윤의수\*<sup>†</sup> · 권혜경\* · 조이연\*\*

\*공주대학교 생명과학과, \*\*공주대학교 생물교육학과

### Effects of Plant Growth Regulation on Adventitious Root Formation of *Pulsatilla koreana* Nakai

Eui Soo Yoon\*<sup>†</sup>, Hye Kyoung Kwon\*, and Yi Yun Cho\*\*

\*Department of Biology, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea.

\*\*Department of Biology Education, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea.

**ABSTRACT** : To acquire the normal regeneration of plantlets, we investigated combinations and concentrations of plant growth regulations for optimal conditions of adventitious root formation. Based on the previous study, we performed callus and shoot induction. When induced shoot was transferred into a rooting medium containing plant hormones, it wilted and died. Thus, the shoot proliferated on 1/2 MS medium for 10 days and was then treated with MS medium supplemented with 3.0 mg/L NAA for 3 days. Adventitious root formations were observed after shoot plantlets were transferred to 1/3 MS medium. The concentrations of salt and sucrose were gradually reduced in MS medium and the rooted plantlets were transferred for acclimatization into a mixture of peatmoos : perlite (3 : 2).

**Key Words** : plantlet regeneration, adventitious root formation, *Pulsatilla koreana* Nakai

## 서 언

우리나라 전역에 자생하는 할미꽃은 5종으로 가는할미꽃, 분홍할미꽃, 산할미꽃, 할미꽃, 동강할미꽃이 있다. 이중 할미꽃은 미나리 아재비과의 다년생 초본으로 노파의 백발을 연상시켜 “할미꽃”이라 불리며 국내에서만 자생하는 우리나라 고유 야생화이다. 꽃의 모양이 아름다워 야생상태로 화분에 심어서 감상하기도 하고 튼튼한 뿌리를 노출시켜 초물분재로 이용하기도 한다. 야생자원의 수집보존 및 개량이라는 입장에서 뿐 아니라 할미꽃이 가지는 약용성분을 이용하는데 그 효용 가치가 매우 높으며, 한방과 민간에서 약재로 쓴다 (태, 1998). 최근들어 할미꽃에 함유되어있는 생리활성물질과 그 효능에 관한 연구가 이루어지고 있는데, deoxypodophyllotoxin은 항암 치료 효과(Kim *et al.*, 2002), 2,3,11,14,20,22-hexahydroxy-5-cholest-7-en-6-one은 당뇨치료 효과 (조 등, 1998), 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid와 3,4-dihydroxycinnamic acid의 항미생물 활성 (이 등, 1998), 그리고 pulsaquinone은 항균효과 (박 등, 2001)를 각각 가지고 있는 것으로 보고된 바 있다. 또한 할미꽃을 산업에 응용하려는 시도가 활발하게 이루어져 간장 (손, 2002a)과 레토르 식품 (손, 2002b)으로도 개발되었다.

산업적으로 대량생산이 요구되고 있으나 할미꽃의 종자는 자연조건에서 수명이 6주 정도에 불과한 단명종자이다 (Sang *et al.*, 1993). 따라서 번식이 어려워 기내배양의 연구가 시도되고 있다(Lee and Oh, 1993). 조직배양에서 옥신류 (특히 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; 2,4-D)와 시토키닌류 (6-benzyladenine; BA)와 polyvinylpyrrolidone-40T (PVP)에서 재분화식물체까지의 최적조건에 대해서는 이미 검토가 되었다 (Yoon, 1996). 뿌리의 발근에 대한 연구는 고추나물 (김 등, 2006), 동백 (김 등, 2005) 등에서의 보고가 있다. 그러나 아직까지 할미꽃은 발근을 지조로 재분화체 획득이 어려워, 본 실험에서는 재분화체의 발근유도에 식물호르몬이 미치는 영향에 대해 조사하였다.

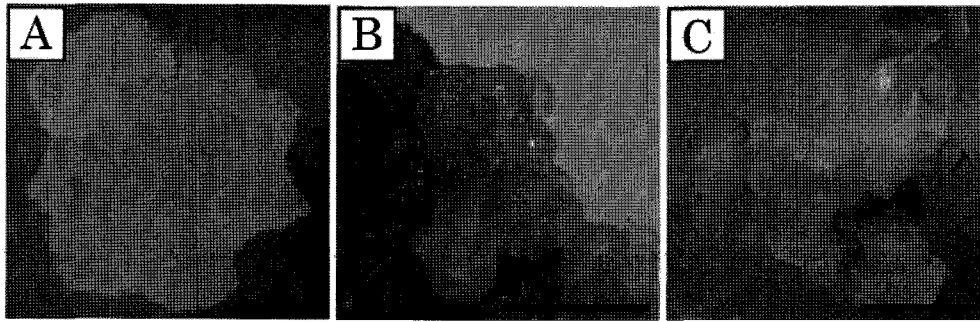
## 재료 및 방법

### 1. 캘러스의 유기

실험 재료는 충남 청양군 칠갑산 일대에서 채취하여 공주대학교에서 관리하고 있는 할미꽃 (*Pulsatilla koreana* NAKAI)을 이용하였다. 잎과 엽병을 채취하여 70% 에탄올에 10초간 침지한 후 1% sodium hypochlorite 수용액에 20분간 침지하

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-41-850-8502 (E-mail) yes@kongju.ac.kr

Received May 22, 2006 / Accepted July 28, 2006



**Fig. 1.** Induction of callus and shoot from leaf and petiole of *Pulsatilla koreana*. A, Callus induction on MS medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BA; B, Callus growth under the combination of 2.0 mg/L PVP and 1.0 mg/L BA; C, Shoot formation. Bar; 0.5 cm (A, B), 1 cm (C).

여 살균하였다. 이때 교반기로 가볍게 회전시켜 살균 효과를 높였다. 표면살균 후 재료를 멸균 증류수로 4회 세척하였고 마지막 세척시 10분 이상 방치하였다. 배지는 MS (3% sucrose) 배지를 기본으로 하여 Yoon (1996)에 의해 선행된 연구를 토대로 최적조건인 1.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BA를 혼합 처리한 0.3% gelite 배지를 pH 5.7로 조절한 후 1기압 121°C로 15분간 고압 증기 멸균한 후 무균실에서 petridish에 분주하였다. 살균된 엽병과 잎은 5 mm로 절단하여 치상하였고 15일 간격으로 계대 배양하였다. 배양조건은 27~55 mol photons · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> 16시간의 일장과 25°C의 온도 조건 하에서 캘러스를 유기시켰다.

## 2. Shoot의 유도과 성장

1.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BA를 조합처리한 배지에서 얻어진 캘러스를 이용하여 Yoon (1996)에 의해 선행된 연구를 토대로 선택한 2.0 mg/L PVP와 1.0 mg/L BA를 조합 처리한 MS (3% sucrose) 배지에 치상하고 15일 간격으로 계대 배양하였다. 유도된 shoot를 1/2 MS (3% sucrose) 배지에서 약 10일간 성장시켰다.

## 3. 뿌리의 유도

유도된 shoot로부터 뿌리를 유도하기 위해서 크게 3가지 방법으로 시도하였다. 첫 번째로는 2.0 mg/L PVP와 1.0 mg/L BA를 혼합처리한 shoot유도배지에서 유도된 shoot를 바로 IBA, IAA, NAA를 각각 1.0 mg/L, 3.0 mg/L, 5.0 mg/L의 농도 별, 종류별로 달리 처리한 발근유도배지 (1.5% sucrose)에 치상하였고, 두 번째로는 1/2 MS배지에서 성장시킨 shoot를 발근유도배지에 치상하였고 세 번째로는 1/2 MS배지에서 성장시킨 shoot를 발근유도배지의 호르몬 처리기간을 1일, 3일, 5일로 달리 한 후 1/3 MS (1.5% sucrose) 배지에서 배양하였다.

## 4. 토양 순화처리

1/3 MS의 재분화체를 염류와 설탕의 농도를 1/5 MS

(1.5% sucrose), 1/10 MS (0.7% sucrose), 1/10 MS (0% sucrose) 배지로 순차적으로 낮추어 기내배양 한 후 피트모스와 펄라이트를 3 : 2의 비율로 혼합한 인공토양에 순화처리 하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 캘러스의 유기

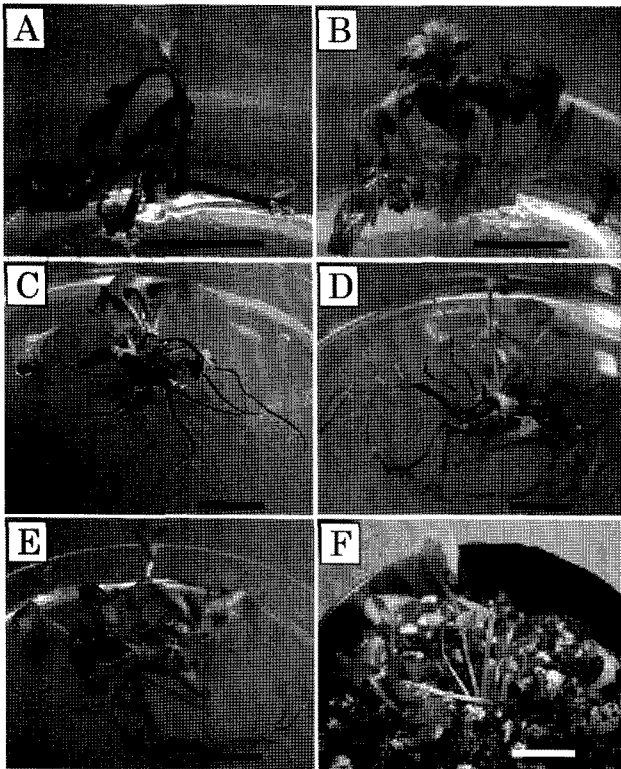
종자의 발아는 약 30%로 비교적 낮은 발아율을 보였고, 캘러스 유기에의 경우 1.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BA를 혼합 처리한 0.3% gelite 배지에서 유식물의 자엽에서 87%, 배측에서 91%, 뿌리에서 79%, 엽병과 잎으로부터는 86%의 캘러스 유도율을 보였다 (Fig. 1A). Yoon (1996)은 엽병의 경우 2.0 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA를 조합처리한 배지에서 88.1%, 잎으로부터의 캘러스 유기에 대하여는 1.0 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA를 조합처리한 배지에서 89.6%로 높게 나타났다고 보고하였다.

### 2. 캘러스의 증식과 shoot의 유도

2.0 mg/L PVP와 1.0 mg/L BA의 혼합배지에서 초록빛을 띠는 캘러스로부터 shoot가 왕성하게 유도되었다 (Fig. 1B, C). 15일마다 계대를 해주지 않고 방치하면 갈변되었고 shoot의 유도율도 낮아졌다. 란의 조직배양에 있어 PVP를 처리함으로써 갈변화가 낮아지고 엽 수와 근 수가 증가하였고 (Sung *et al.*, 1995), 양란의 일종인 *Phalaenopsis*의 엽편배양 배지에 PVP를 처리하면 prorocom-like body (PLB) 형성률이 현저히 높아짐과 마찬가지로 할미꽃에서도 PVP가 캘러스의 형성에 상당한 효과가 있음이 선행 연구에 의해 밝혀졌다 (Yoon, 1996).

### 3. 발근유도

발근유도의 첫 번째 실험으로 유도된 shoot를 바로 발근유도 배지에 치상하였을 때, 뿌리는 유도되나 shoot가 고사하거나 뿌리도 나오지 않고 shoot도 고사하였다 (Fig. 2A). 이와



**Fig. 2.** Plant shoot regeneration of *Pulsatilla koreana*. A, Induced shoot directly transferred onto rooting medium containing 3.0 mg/L NAA; B, The shoot proliferated on 1/2 MS medium for 10 days; C, The proliferated shoot transferred onto rooting medium containing 3.0 mg/L NAA; D, The proliferated shoot treated with MS medium supplemented with 3.0 mg/L IBA for 3 days, then transferred to 1/3 MS medium; E, The proliferated shoot treated with MS medium supplemented with 3.0 mg/L NAA for 3 days, then transferred to 1/3 MS medium; F, Regeneration plantlet potted in soil. Bar; 1 cm.

같은 결과는 너무 작은 shoot에 대한 호르몬의 높은 농도가 영향을 끼친 것으로 사료된다. 따라서 이와 같은 단점을 보완하고자 shoot를 바로 호르몬이 처리된 발근배지에 치상하지 않고 1/2 MS배지에서 약 10일간 성장시켰다 (Fig. 2B). 뿌리 유도를 위한 두 번째 실험으로 1/2 MS에서 약 10일간 shoot를 성장시킨 후 호르몬이 처리된 발근배지로 치상하였다. 그 결과 성장시킨 shoot로부터 비교적 높은 발근율이 보이나 발근되는 기간은 1달 이상으로 오래 걸렸으며 shoot는 고사되지는 않았으나 상태가 빈약하였다 (Fig. 2C). 따라서 뿌리의 유도와 정상적인 shoot의 생육의 최적조건을 탐색하기 위하여, 세 번째로 호르몬의 영향을 받는 시간을 단축시켜 주었다. 즉, 1/2 MS에서 성장시킨 shoot를 호르몬이 처리된 발근배지에서 1일, 3일, 5일간 나누어 배양 후 1/3 MS배지로 옮겨 치상하였다. 호르몬의 처리기간을 단축해 본 결과 3일간 호르몬을 처리하였을 경우에는 15일 정도로 뿌리의 유도기간이 크게 단축되고 shoot의 상태도 양호하였다. IBA의 1일간 처리에서는 모

든 뿌리의 유도가 관찰되지 않았고, 5일간의 처리에서는 3.0 mg/L의 농도에서만 일부 발근이 관찰되었으며, 3일간 처리하였을 때 3.0 mg/L와 5.0 mg/L의 농도에서 모두 발근이 보였다 (Fig. 2D). IAA를 처리한 경우에는 1일과 5일간의 모든 농도별 처리에서 뿌리의 유도가 관찰되지 않았고 3일간 처리에서 모두 뿌리가 유도되었다. NAA를 처리한 결과 1일간의 호르몬 처리에서 뿌리 유도가 보이지 않았고, 5일간의 처리에서는 일부에서 발근이 관찰되었으며 3일처리에서는 모두 발근이 되었다. 특히 3.0 mg/L의 농도에서 가장 빠른 발근이 보였으며 뿌리가 굵고 튼튼하였다 (Fig. 2E). 일차적으로 뿌리의 유도시기에는 오옥신의 요구도가 낮은 것이 유리한 것으로 보고되었다 (Gaspar *et al.*, 1977). 따라서 본 실험에서 긴 시간동안 높은 농도의 오옥신의 처리는 발근을 억제시키는 것으로 사료된다. 또한, 발근단계에서 배지의 염류농도가 낮으면 발근을 촉진시킨다 (Maene & Debergh, 1985). *Spathiphyllum*의 실험에서는 1/2 MS 염류농도에서 발근이 촉진되었으나, 2배 MS 염류농도에서는 뿌리수가 현저하게 감소하여 발근이 억제되었다 (Han *et al.*, 2001). 따라서, 본 연구에서 호르몬을 3일간 처리 후 1/3 MS배지로 치상함으로써 배지내의 염류농도를 낮추어 발근이 촉진되는 것으로 사료된다.

지금까지의 결과를 종합적으로 정리하면 성장된 shoot를 발근배지로 바로 치상하였을 경우 발근율은 좋았으나 shoot의 생존율은 양호하지 못하였기 때문에 호르몬의 처리기간을 달리 하였는데 3일을 처리하였을 때만 모든 농도에서 뿌리의 유도가 관찰되었으며 특히 3 mg/L IBA와 NAA의 처리에서 높은 뿌리 유도율을 보였고 shoot가 양호한 상태의 재분화체를 얻을 수 있었다. 각 호르몬에 3일간 처리하고 1/3 MS로 치상한 후 30일째의 재분화체에서 유도된 뿌리의 특성을 조사한 결과, 3.0 mg/L IBA를 처리한 경우에 뿌리의 길이는  $7.42 \pm 0.11$  cm로 가장 길었고, 3.0 mg/L NAA에서는 뿌리가 굵고 튼튼하며 발근이 가장 빨리 관찰되었으며 뿌리의 개수는  $28 \pm 7.0$ 개로 가장 많은 수가 관찰되었다 (Table 1). 뿌리의 개수가 많이 유도되지 않은 것은 할미꽃의 뿌리가 수염뿌리가 아니고 원뿌리이기 때문인 것으로 생각된다.

#### 4. 순화처리

1/3 MS (1.5% sucrose)에서 얻은 재분화체를 1/5 MS (1.5% sucrose)로 옮겨 배양 후 1/5 MS (0.7% sucrose)에서 배양하고 마지막으로 1/10 MS (0% sucrose)에서 각각 10일 배양 후 피트모스와 펄라이트를 3:2로 섞은 인공토양에 순화처리하였다 (Fig. 2F).

결론적으로 할미꽃의 발근에 있어서 최적조건은 1/2 MS배지에서 유도된 shoot를 약 10일가량 성장시켜 3.0 mg/L NAA와 3.0 mg/L IBA으로 3일간 처리한 후 1/3 MS배지로 옮겨 배양함으로써 가장 효과적인 재분화체를 얻을 수 있었다.

**Table 1.** Effect of root formation after treatment of auxins for 3 days from the proliferated shoot of *Pulsatilla koreana*.

Concentration of plant hormones (mg/L)	Number of root	Length of root (cm)
IBA	3	7.5 ± 1.5
	5	5 ± 3.0
NAA	3	28 ± 7.0
	5	7 ± 2.0
IAA	3	1
	5	0

**적 요**

식물생장조절제의 종류와 농도를 모색하여 할미꽃의 발근 최적 조건을 조사하여 정상적인 재분화체를 획득하고자 하였다. 지금까지의 선행연구를 토대로 최적조건에서 shoot를 유도시킨 후 발근 유도 성장조절제에 바로 옮기면 shoot가 너무 작아 재분화체가 성장하지 못하고 고사되었다. 1/2 MS에서 키운 shoot를 3.0 mg/L NAA를 첨가한 배지에서 3일간 생장시킨 후, 1/3 MS로 옮겨 치상 한 경우, 약 10일 전후에 뿌리의 유도가 관찰되었다. 이렇게 뿌리가 유도된 재분화체는 염의 농도와 설탕의 농도를 동시에 순차적으로 낮추어 순화처리되었다.

**사 사**

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

**LITERATURE CITED**

**Choi HJ, Kim HY, Hur JH, Heo SJ, Kim DS, Kim SM** (2003) Isolation of New Herbicidal Compound Anemonin from *Pulsatilla koreana* Nakai. Kor. J. Weed Sci. 23(4):310-317.  
**Gaspar TD, Smith D, Thorepe TA** (1977) Arguments supplementaires en faveur d'une variation inverse du niveau auxinique endogene au cours des deuxpremueres mpnasesae la rmzogenese.

C. R. Acadsci. 285:327-330.  
**Han BH, Yae BW, Yu HJ, Shin JS** (2001) *In vitro* propagation of *Spathiphyllum floribundum* cv. Cupid. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 28(4):185-188.  
**Jim ML, Nam DW, Ahn JC, Hwang B** (2006) Micropropagation of *Hypericum erectum* by axillary bud culture. Kor. J. Med. Crop Sci 14(1):23-26.  
**Kim HY, Kim JS, Kim SM** (2004) Herbicidal action mechanism of catechol from red sorrel (*Rumex acetosella*). Kor. J. Weed Sci. 24(2):129-137.  
**Kim KS, Hwang SJ, Oyo BS, Kim SM** (2005) Adventitious bud induction and plant regeneration from cotyledon explants of *Camellia japonica* L.. Kor. J. Med. Crop Sci 13(3):105-108.  
**Kim SM, Heo SJ, Yong SH, Kim JS, Hur JH** (2001) Natural compounds as leads for novel herbicides. Kor. J. Weed Sci. 21:199-212.  
**Kim Y, Kim SB, You YJ, Ahn BZ** (2002) Deoxypodophyllotoxin; the cytotoxic and antiangiogenic component from *Pulsatilla koreana*. Planta Med. 68(3):271-274.  
**Lee HH, Ma SJ, Moon JH, Park KH** (1998) Isolation and Characterization of 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic Acid and 3,4-Dihydroxycinnamic Acid with Antimicrobial Activity from Root of *Pulsatilla koreana*. Agri. Chem. and Biotech. 41(2): 191-196.  
**Lee MS, Oh KH** (1993) Histological studies on *in vitro* propagation of *Pulsatilla koreana* Nakai. Kor. J. Med. Crop Sci 1:137-157.  
**Maene L, Debergh P** (1985) Liquid medium addition to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vitro*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 5:23-33.  
**Sang CK, Kim EH, Kim HY** (1993) Germination and life span of *Pulsatilla cernua* var. *koreana* Seeds. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 34(3):207-212.  
**Yoon ES** (1996) Effect of Polyvinylpyrrolidone on callus growth and plant regeneration of *Pulsatilla koreana*. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 23(6):349-354.  
**박근형, 문제학, 마승진** (2001) 백두옹으로부터 분리한 신규 천연 항균물질 및 그의 분리방법. 대한민국특허. 2001-0090122.  
**손영석** (2002a) 약이 되는 물질을 함유한 간장. 대한민국특허. 2002-0004595.  
**손영석** (2002b) 약이 되는 물질을 함유한 레토르식품. 대한민국특허. 2002-0004718.  
**조의환, 정순간, 박시경, 오갑진, 배춘일, 김현태, 김현중, 방사룡** (1998) 당뇨병 치료제 조성물. 대한민국특허. 1998-077618.  
**태경환** (1998) 한국의 식물. 생명공학연구소. p. 202-203.