

할미 꽃 (*Pulsatilla koreana* NAKAI) 식물 절편체로부터 부정아 유도에 미치는 cytokinin의 영향 및 식물체 재 분화

염옥희^{1*} · 임광철¹ · 김원배² · 유동림² · 조소매¹

¹중국 산둥성 임기사범대학교 생명과학부

²농촌진흥청 작물과학연구원 고령지 농업연구센터

Effect of cytokinin on adventitious shoot formation and plant regeneration from explants of *Pulsatilla koreana* NAKAI

Lian, Yu Ji^{1*} · Lin, GuanZhe¹ · Yoo, Dong lim² · Kim, Won Bae² · Zhao, Xiao Mei¹

¹Linyi normal university, Tongda road Linyi City, shandong Province, China 276005

²Highland Agricultural Research Center of National Institute of Crop Science, RDA, Pyeongchang 232-955, Korea

Abstract Leaf and petiole explants of *Pulsatilla koreana* NAKAI were cultured on MS medium supplemented with various concentrations of zeatin, kinetin or BAP combined with 0.05 mg/L IAA. After 6 weeks of culture, effects of cytokinin on adventitious shoot formation from explants were investigated. The highest frequency of shoot formation was obtained when petiole explants were cultured on medium with 0.5 mg/L zeatin and 0.05 mg/L IAA. Regenerated shoot were transferred on to root induction medium. The best root formation was observed at 1/2 MS medium with 1.5 mg/L NAA. Rooted plantlets were transplanted to a mixture of perlite and soil (1:3), where they were successfully acclimatized.

서 론

할미 꽃 (*Pulsatilla koreana* Nakai)은 미나리아재비과에 속하는 다년초로서 한국 뿐만 아니라 중국, 일본 등지와 유럽 지역에도 약 30여종이 자생하고 있는데, 한국에는 가는 잎 할미 꽃 (*P. cernula*, 제주가 자생지로 엽 조직이 가늘고 끝이 뾰족함), 분홍 할미 꽃 (*P. davuraca*, 평북, 함경 자생으로 꽃이 분홍색임), 산 할미 꽃 (*P. nivalis*, 함북 자생으로 개화가 늦으며 암적자색으로 핏) 등이 분포 되어있다. 할미 꽃은 식물 전체에 triterpenoid와 같은 여러 약리성 물질을 함유하고 있어 解熱, 解毒 冷血, 止痢 작용을 하고 항균, 항아메바, 항암, 殺精子 등 효과가 있다고 하였다 (Huang et al. 1994, Song et al. 1999 Glebko et al. 2002). 현대 의학 연구 결과는 할미 꽃 추출물은 鎮靜 효과가 있고 암 세포 생장에 억제 효과가 있으며 (Ye et al., 1991), 라이보솜 활성 억제 단백질이 함유되어 있어 단백질 합성을 억제하고 단 클론장체, 호르몬, 성장인자들과 결합하여 목적 세포를 사살하기 때문에 암과 에이즈 치료에 효과적이라고 보

고하였다 (Tang et al. 1994).

뿐만 아니라 할미 꽃은 관상용 자생화훼로서 가치가 있어서 국내 외 시장 수요량이 증가되고 있다. 할미 꽃은 주로 종자로 번식하는 식물이지 만 종자 성숙이된 후 바로 파종하지 않으면 종자 활력을 잃는 문제점이 있고, 할미 꽃의 약리 성과 관상 가치가 사람들에게 알려지면서 무분별한 채집으로 유전 자원이 심각하게 파괴되고 있다. 아울러 할미 꽃을 이용한 식물 재분화 연구들이 이루어져 왔으나 (Lee and Oh 1993; Yoon 1996) 식물체 재분화 효율이 낮고 기내 발근이 저조하여 조직 배양을 이용한 식물체 대량 증식이 어려운 상태이며 아직까지 조직 배양을 이용한 할미 꽃 대규모 인공 재배가 이루어지지 않은 상태이다. 본 실험은 할미 꽃 식물 절편체로부터 고빈도 부정아 형성에 미치는 cytokinin의 영향과 재분화된 식물체의 기내 발근에 미치는 auxin과 배지 성분의 영향을 조사하여 할미 꽃 인공 재배와 대량 생산을 위한 기초 데이터를 제공하고자한다.

재료 및 방법

식물 재료

*Corresponding author Tel 0086-539-206-0232 Fax 0086-539-206-0235
E-mail: lyj1964@hanmail.net

실험 재료는 한국농촌진흥청 작물과학연구원 고령지 농업연구 센터내 하우스에서 재배되고 있는 할미 꽃을 이용하였다. 엽조직과 엽병을 채취하여 흐르는 물에서 2~4 시간 수세 한 다음 1% sodium hypochlorite 용액 에서 20 min 표면 살균 하였다. 표면 살균 후 멸균수로 4~5회 세척 하였으며 세척 후 식물 재료를 멸균된 여과지에 올려 표면의 물기를 깨끗이 제거하였다. 살균 된 엽조직과 엽병은 0.5 cm × 0.5 cm 크기로 잘라 MS (Murashige & Skoog 1962)에 0.8% agar, 3% sucrose 배지를 기본으로 한 부정아 유도 배지에 치상하였다. 배양 조건은 30~40 μmol m⁻² s⁻¹ 16 h 일장과 25°C 온도 조건하 에서 부정아 발생을 유도시켰다. 배양 6주 후 식물체의 부정아 형성 비율을 조사하였으며 획득된 shooting은 발근 배지에 옮겨 발근을 유도시켰다.

식물체의 부정아 유도

식물 절편체로 부터 고 빈도의 부정아 발생을 유도시키기 위하여 본 실험에서는 MS 기본 배지에 0.5~3 mg/L BAP, zeatin, kinetin 과 0.05 mg/L IAA를 각각 조합하여 첨가하였다. 실험은 세 번 반복 으로 수행 되었으며 매 반복 실험에 사용된 절편체 수는 처리 당 60개이며 절편체는 모두 세 개의 petridish에 나누어 치상 하였다.

식물체의 기내 증식

식물체의 기내 유지를 위하여 부정아는 여러 개 작은 덩어리로 잘라 0.5 mg/L의 BAP와 0.5 mg/L NAA가 첨가 된 배지에서 치상하고 2~3주 간격으로 계대 배양을 하였다.

재 분화 식물체의 기내 발근

할미 꽃의 기내 발근을 위하여 MS배지에 IAA, IBA, NAA등을 고농도, 저농도 별로 처리하였으 며, MS배지의 성분을 1/2, 1/4, 1/8 로 줄인 배지에 NAA, IAA와 IBA를 각각 같은 농도로 첨가하여 발근 유도시켰다.

사이토키닌 처리가 식물체의 부정아 유도에 미치는 영향

부정아 유도하기 위하여 배지에 cytokinin 첨가하여 식물체를 배양 한 결과 배양 2주후 식물체 절편체에서 같지 않는 정도로 녹색 혹은 연녹색의 캘러스가 형성되기 시작하였으며 형성된 캘러스에서 부정아가 형성되었다. 부정아 형성은 식물체 부위 별로 서로 달랐으며 일반적으로 엽병에서 부정아 형성 빈도가 엽조직보다 높았다. 뿐만 아니라, 다른 종류의 cytokinin이 부정아 형성에 미치는 영향도 같지 않았다 (Table 1).

Zeatin과 IAA조합 처리 중 엽 조직에서 zeatin 0.5 mg/L농도 처리에서 79%의 절편체 에서 부정아가 형성 되었으며 엽병에서는 농도에 별 차이가 없이 82.5~100%로 아주 높은 비율로 부정아가 형성되었다.

엽병 절편체의 캘러스부터 부정아가 형성되는 과정에서 갈변 현상이 나타나지 않았으나 엽조직 절편체는 배양 과정에서 갈색으로 변하면서 캘러스가 형성되었고 나중에 부정아도 형성 되었다. 부정아 형성빈도는 엽병에서 엽조직보다 높았다 (Fig. 1A, 1a).

Kinetin과 IAA조합에서는 kinetin 2 mg/L농도에서 엽조직은 68%

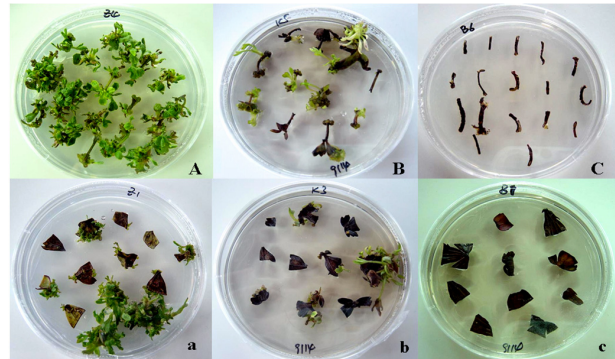


Figure 1. Leaf and petiole explant of *P.koreana* were cultured on MS medium supplemented with various concentrations of cytokinin and auxin. A, B, C: Adventitious shoots were formed from explants of petiole on shoot induction medium, which contained 2.0 mg/L Zeatin, 2.5 mg/L Kinetin and 3.0 mg/L BAP combined with 0.05 mg/L IAA, respectively. a, b, c : Adventitious shoots were formed from explant of leaves on shoot induction medium, which contained 0.5 mg/L Zeatin, 1.5 mg/L Kinetin and 0.5 mg/L BAP combined with 0.05 mg/L IAA, respectively

결과 및 고찰

Table 1 The effect of zeatin treatment on adventitious shoot formation from leaf and petiole explants of *P.koreana*

Concentration (mg/L)		Leaf	Petiole
Zeatin	IAA	Shoot regeneration Frequency (%)	Shoot regeneration Frequency (%)
Control		0 ^a	0 ^a
0.5		79.0±4.0 ^{bc}	100±0.0 ^b
1.0		53.9±13.4 ^{bc}	100±0.0 ^b
1.5	0.05	56.9±4.4 ^{bc}	98.0±1.5 ^b
2.0		21.1±1.6 ^c	100±0.0 ^b
2.5		38.1±11.4 ^{bc}	92.5±8.5 ^b
3.0		53.9±24.7 ^{bc}	82.5±9.1 ^b

Table 2 The effect of kinetin treatment on adventitious shoot formation from leaf and petiole explants of *P. koreana*

Concentration (mg/L)		Leaf	Petiole
Kinetin	IAA	Shoot regeneration Frequency (%)	Shoot regeneration Frequency (%)
Control		0 ^a	0 ^a
0.5		29.3±1.0 ^b	80.0±14.1 ^b
1.0		32.5±5.5 ^b	65.2±2.2 ^b
1.5	0.05	58.8±1.8 ^b	77.3±19.3 ^b
2.0		68.0±6.6 ^b	76.7±9.4 ^b
2.5		20.9±5.9 ^b	66.6±9.3 ^b
3.0		27.5±10.6 ^b	81.8±6.9 ^b

20 replicates were used for each treatment. Data were collected after 6 weeks of culture. Each datum indicates the mean value and standard deviation. ^{abc}Different superscript in the column means significant difference ($P < 0.01$).

절편체에서 부정아가 형성되었으며 엽병에서는 zeatin 처리시와 마찬가지로 농도에 별 큰 차이가 없이 65.2~81.8% 높은 효율의 부정아가 형성되었다 (Table 2). kinetin IAA 조합에서는 엽병과 엽조직 절편체 모두가 갈색으로 변하면서 캘러스가 형성되고 부정아가 유도되는 현상이 관찰되었다. 이 처리에서도 zeatin IAA 조합과 마찬가지로 엽 병에서 부정아 형성 빈도가 엽조직보다 높았다. 캘러스와 부정아 형성이 zeatin 처리보다 왕성하지 못하였다 (Fig. 1B, 1b).

BAP와 IAA 처리에서 엽 병 절편체는 배양 과정에서 점차 갈변되었으며 부분적으로 하얗고 부서지기 쉬운 캘러스가 형성되었으나 부정아는 형성 되지 않고 나중에 고사 되는 현상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1C). 엽 조직에서는 캘러스가 형성되지 않았으며 부정아도 형성되지 않고 점차 갈변된 후 고사하였다 (Fig. 1c).

세 가지 처리 결과를 종합하면 가장 높은 빈도의 부정아는 zeatin과 IAA 조합 처리에서 나타났으며, 일찍 zeatin과 옥신의 조합 처리가 할미 꽃의 캘러스 유도, 식물체 재분화에 효과적이라고 보고된 바가 있다 (Lee and Oh 1993). Kinetin과 IAA 조합에서도 비교적 높은 빈도로 부정아가 유도되었다. 그러나 BAP와 IAA 조합에서는 엽병과 엽조직 절편에서는 부정아가 유도되지 않았으며 절편체가 갈변 되다가 나중에 고사되었다.

이상의 결과에서 할미 꽃 조직 배양에 의한 대량 증식을 위하여 MS 배지에 Zeatin과 IAA를 조합하여 첨가하는 것이 가장 효과적이긴 하지만 zeatin 가격이 높다는 것을 감안한다면 인공 재배를 위한 할미 꽃 조직 배양 묘의 대량 생산을 위하여 1~3 mg/L의 kinetin과 0.05 mg/L의 IAA을 조합하여 사용하는 것이 실제 응용에서 경제적인 것으로 사료된다.

재 분화 식물체의 기내 증식

재 분화 배지에서 유도된 부정아를 메스로 잘라 호르몬이 첨가되지 않은 배지에 치상하여 정상적인 생장을 유도한 후 기내 발근 유도시켰다. 그러나 실험 과정에서 할미 꽃은 다른 식물체의 조직 배양과 달리 부정아로부터 생장된 식물체가 작은 식물체로 잘라서 호르몬이 첨가되지 않은 배지에 치상 되었을 때 처음에는 식물체의 생장이 양호하다가 나중에 생장이 억제 되면서 갈변, 고사

되는 현상이 관찰되었으며, 그 중 잘려진 식물체에 캘러스 모양의 덩어리가 함께 붙어 있거나 혹은 여러개 식물체가 덩어리져 있을 때 식물체의 생장이 양호하였으며 갈변되지도 않는 현상이 관찰되었다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 실험에서는 MS 배지에 BAP와 NAA 농도별로 조합한 배지에 식물체를 여러 덩어리로 잘라 치상하거나 한 개의 식물체는 기부의 캘러스 모양의 조직과 함께 배지에 치상하였다. 실험 결과 0.5 mg/L의 BAP와 0.5 mg/L NAA가 첨가된 배지에서 식물체의 생장이 가장 양호하였으며, 식물체 기부에 캘러스 모양의 덩어리가 부착되지 않은 식물체도 배양 과정에서 캘러스가 형성되었고, 형성된 캘러스에서 지속적으로 shooting이 되어 증식 효과도 아주 좋았다. 할미 꽃의 이와 같은 특성에 대하여 Zhang (2004) 등은 할미 꽃 줄기가 뿌리형 줄기식물 (Song et al. 1999)이기 때문인 것으로 해석하였으며, 부정아 기부의 캘러스 모양의 조직 덩어리는 가능하게 뿌리형 줄기의 역할을 하고, 할미 꽃의 무성 번식 기관으로서 조직 배양 과정에서 부정아와 뿌리 분화와 생장에 유리하다고 하였다 (Zhang, et al. 2004).

재 분화 식물체의 기내 발근.

기내 발근 유도를 위하여 MS 배지에 IAA, IBA, NAA 등을 낮은 0.1~0.5 mg/L 농도 별로 처리 한 결과 IAA, IBA와 NAA에서는 기내 발근이 전혀 유도되지 않았으며 높은 농도 처리에서 (1~3 mg/L) 첨가된 배지에서는 캘러스가 비대해 지고 뿌리 유도율이 아주 저조하였다. 하여 할미 꽃의 효과적인 기내 발근 유도 체계를 확립하기 위하여 MS 배지 분을 1/2, 1/4, 1/8 낮추고 이에 각각 0.2, 0.4, 0.8, 1.5, 3.0 mg/L NAA 첨가하여 발근을 유도 시켰다.

실험 결과 1/2 MS 배지에 1.5 mg/L과 3 mg/L NAA 첨가된 배지에서 발근이 가장 좋았다. NAA 0.2 mg/L 농도에서는 뿌리는 거의 유도 되지 않았고 (Fig. 2B), 0.4 mg/L 농도에서 발근이 저조하였으며, 0.8 mg/L 농도에서 발근이 비교적 양호하였고 (Fig. 2C), 1.5 mg/L의 농도에서 발근이 가장 좋았다 (Fig. 2 D). NAA 3 mg/L 농도 처리에서는 굵고 튼튼한 뿌리들이 유도되긴 하였지만 줄기 생장은 도리어 억제되었다 (Fig. 2F).

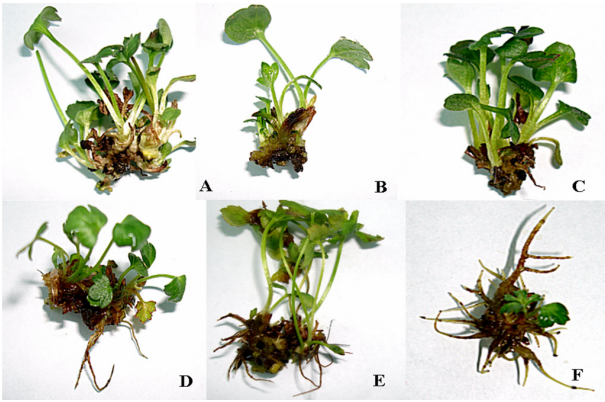


Figure 2. Root formation from regenerated of *P. koreana* shoots in the presence of different concentrations of NAA. A: 0 mg/L; B: 0.2 mg/L; C: 0.4 mg/L; D: 0.8 mg/L; E: 1.5 mg/L; F: 3.0 mg/L

위의 결과를 비교 분석하면 할미 꽃 기내 발근 유도에서 적합한 NAA 농도 처리도 중요하지만 배지 성분 중 염류의 영향도 아주 중요한 역할을 한 것으로 사료된다. 1/2 MS배지에서 기내 발근 효율이 가장 높은 것은 배지 조성중의 질소의 농도가 감소가 뿌리 형성과 신장에 작용을 하였을 것으로 사료되며, 1/4 MS 1/8 MS 배지에서 발근 효율이 낮은 것은 질소의 농도가 감소되기는 하였지만 배지 내의 인의 농도도 따라서 감소되었기 때문인 것으로 사료된다. Maene와 Debergh (1985)는 기내 식물 발근 단계에 배지의 염류 농도가 낮으면 발근이 촉진된다고 보고하였으며, Bucio (2005) 등은 *Arabidopsis* 뿌리 발육 실험에서 배지 내 질소 농도의 감소 혹은 인 농도의 증가가 모두 뿌리의 발육과 신장을 촉진시킨다고 하였다. 아울러 할미 꽃 뿌리 발근 유도를 위하여 배지의 대량 원소 중 질소와 인의 농도를 조절하여 가장 효과적인 할미 꽃의 발근 조건을 밝히는 것이 아주 중요하다.

적 요

본 실험에서는 할미 꽃의 엽병과 엽조직을 재료로 하여 부정아 형성에 미치는 cytokinin 영향을 조사하였다. 절편체는 0.5~3.0 mg/L의 zeatin, BAP, Kinetin을 0.05 mg/L의 IAA와 조합 한 부정아 유도 배지에 치상하여 부정아를 유도시켰다. 배양 42일 후, 엽병을 MS 기본배지에 0.5 mg/L의 zeatin과 0.5 mg/L의 NAA를 첨가한 배지에서 배양하였을 때 부정아 유도 효과가 가장 좋았으며, kinetin이 첨가된 배지에서 부정아 유도 효과도 양호하였다. 유도된 부정아는 여러 덩어리로 잘라 MS배지에 0.5 mg/L BAP와 0.5 mg/L NAA를

첨가한 배지에서 증식시켰으며 배양 7~10후, 식물체는 기내 발근 배지에 옮겨 졌다. 기내 발근은 1/2 MS배지에 1.5 mg/L NAA가 첨가된 배지에서 가장 좋았으며 발근된 식물체는 포트에 옮겨 순화시켰다.

사 사

본 연구는 한국 농촌진흥청 고령지 농업연구센터 기관 프로젝트 연구비 지원으로 수행 되었으며 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

- Bucio, J.L, Cruz-Ramirez, A, Perez-Torres, A, Ramirez-Pimentel, J.G, Sanchez-Calderon, L. and Herrera-Esrella, L, (2005) Root Architecture. In: Turnbull, C.G.N, (eds), Plant Architecture and its Manipulation (Annual Plant Reviews). CRC Press. p200
- Glebko, L.I, Krasovskaj, N.P, Strigina, K.P, Ulanova, KP, Denisenko V.A, and Dmitrenok P.S. (2002) Triterpene glycoside from *pulsatilla chinensis*. Russ.Chem. Bull., Int.Ed. 51:1945-1950
- Huang TK, You QD, Shi YM (1994) Hand book of the composition and Pharmacology of common Chinese drug. China Medical Science and Technology Press. p743
- Maene L, Debergh P (1985) Liquid medium addition to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vitro. Plant Cell Tis.Organ Cult. 5:23-33
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-497
- Lee MS, Oh KH (1993) Histological studies on in vitro propagation of *pulsatilla koreana* Nakai. Kor.J.Med. Crop Sci.1:137-157
- Song LR, Hu R, Zhang GZ (1999) Chinese Materia Medica. Shanghai science technology press. Vol (7) p293
- Tang GY, Zhang CM, Wu HJ (1994) Isolation, Purification and Determination of the Constituents of a Toxic Protein from Plant Amenone. Chinese Journal of Chromatography. 16:414-416
- Ye WC, Ji NN, Zhao SX, Liu JH, Ye T, McKevey M. A and Stevenson, P (1996) Triterpenoids from *Pulsatilla chinensis*. Phytochemistry. 42:799-802
- Yoon ES (1996) Effect of polyvinylpyoolidone on callus growth and plant regeneration of *pulsatilla koreana*. Kor.J.Plant Tiss. Cult. 23:349-354
- Zhang ZX, Ding WQ, Tang Y, Shi WJ, Ye WC (2004) Study on tissue of pasque flower. China Journal of Chinese Material Medica. 29:215-218

(접수일자 2009년 6월 4일, 수리일자 2009년 6월 23일)