

할미꽃 정단 분열조직 배양을 통한 효율적 미세번식

고정애^{1*}, 김현순²

¹전북대학교 농업생명과학대학 생물자원과학부, 농업과학기술연구소, ²농촌진흥청 작물과학원

Effective Micropropagation of *Pulsatilla cernua* var. *koreana* through Apical Meristem Culture

Jeong Ae Ko^{1*} and Hyun Soon Kim²

¹Faculty of Biological Resources Science, College of Agriculture, Chonbuk National University, Institute of Agricultural Science & Technology, Chonbuk National University, JeonJu 561-756, Rep. of Korea

²National Institute of Crop Science, Rural Development Administration 151 Suinro, Seodun-Dong, Gwonseon-Gu Suwon 441-857, Rep. of Korea

Abstract - In order to investigate the effect of plant growth regulators on effective *in vitro* micropropagation, apical meristems of *Pulsatilla cernua* var. *koreana* were cultured on Murashige and Skoog's (MS) medium with 2,4-D, NAA, TDZ and BA. Media containing 2,4-D and kinetin, 2,4-D and TDZ, NAA and TDZ were not effective on callus induction. However, embryogenic or organogenic callus was obtained on media containing NAA and BA. Especially, on MS medium with 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA was optimal for a high frequency (62%) of shoot or shoot bud obtained from callus. Callus proliferation, shoot multiplication and elongation were significantly increased by adding 10% coconut water on MS media with 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA. Repeated subculturing of *in vitro* grown shoots resulted in propagation rate of 12.9 shoots per explant every 30 days. Root formation from the adventitious shoots was not easily achieved. However, roots were only produced through callus on MS medium with 2.0 mg/L NAA alone or 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA. These roots were used materials for callus and shoot production repetitively.

Key words - Optimal medium, Coconut water, NAA, BA

서 언

할미꽃(*Pulsatilla koreana*)은 미나리아재비과에 속하는 다년생 식물로 지상부 꽃은 아름다워 조경, 분식 등에 이용하고 뿌리는 hederagenin glucoside 화합물인 사포닌이 풍부해서 한방에서는 진통, 지혈, 소염, 건위, 익혈, 풍상, 산기, 수렴, 이질, 지사, 신경통 등에 약재로 사용할 뿐만 아니라 뿌리의 살충효과를 이용하여 구충제로도 이용하는 등 용도가 다양한 식물이다(Ye et al., 1995). 할미꽃은 동아시아와 유럽지역에 약 30여종이 자생하고 있으며 우리나라에는 가는 잎 할미꽃(*P. cernua*), 분홍할미꽃(*P. davuraca*), 산할미꽃(*P. nivalis*) 등이 분포하고 있는데 최근에는 개량종

품종들이 수입되어 재배되고 있다.

우리나라 전국 양지바른 산야지에 널리 분포되어 있었던 할미꽃은 최근 산업화에 의해 개발과 환경오염에 의해 자생면적이 축소되어 깊은 산속이나 일부 화원에서 구입하여야 관찰할 수 있는 실정이다. 할미꽃의 고유 특성을 유지하고 절화로서 이용 가능한 개화수명의 연장, 다양한 화색의 신품종 육성 등이 요구되고 있으며, 그렇기 위해서는 현재 보유하고 있는 할미꽃 유전자원의 대량증식이 절실히 요구된다. 할미꽃은 종자 또는 분주에 의해 번식되고 있으나 할미꽃 종자는 방임상태에서 수명이 6주 정도로 짧은 단명종자로서 추파를 위한 적절한 저장방법 등이 구명되어야 하고 파종 및 분주에 의해 개화주가 되기까지는 2-3년의 기간이 소요된다고 한다(Sang et al., 1993; Sang et al., 1996). 이런 점들을 보완하기 위해 보다 체계적인 급속 다

*교신저자(E-mail) : kjam@chonbuk.ac.kr

량증식에 대한 새로운 번식방법의 개발이 시급한 실정이다. 할미꽃 유전자원에 대한 보존 및 할미꽃에 함유되어 있는 다양한 생리활성 물질에 대한 관심이 고조되고 있어 최근 할미꽃에 대한 연구는 할미꽃 속 식물 5종의 핵형 분석 (Lee et al., 2004)과 할미꽃 캘러스 생장과 식물체의 재분화에 미치는 polyvinylpyrrolidone의 효과(Yoon, 1996), 할미꽃 기내발근에 관한 식물생장조절제의 영향(Yoon et al., 2006)과 할미꽃 약배양에 의한 화분배 형성에 대한 연구(Ko and Kim, 2006) 및 할미꽃 캘러스와 부정근 절편에 의한 식물체 재분화(Jung et al., 2007)에 대한 보고가 있을 뿐 효율적 대량생산을 위한 정단 분열조직배양에 관한 연구는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구는 할미꽃 유전자원 유지 및 확보를 위해 정단분열조직을 배양함으로 효율적 기내번식체계를 확립코자 실시 되었다.

재료 및 방법

식물재료

전북 무주지역에 자생하고 있는 할미꽃을 분양 받아 화분에 옮겨 본 대학 온실에서 재배 관리하였으며 순화 1주일 후부터 정단분열조직을 배양재료로 이용하였다.

정단분열조직 배양

엽원기를 3-4매 붙여 채취된 정단분열조직을 70% 에탄올에 30초간 침지하고 7% calcium hypochlorite 수용액에 10분간 소독과 멸균수로 4-5회 수세한 다음 현미경 하에서 정단분열조직과 1-2매 엽원기를 붙여 절취한 후 배양 배지에 치상하였으며 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 와 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 16/8h 광주기로 조절된 성장상에서 배양하였다.

배지

MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 식물생장조절물질을 첨가하지 않거나, 2,4-D와 kinetin, NAA와 BA, NAA와 TDZ를 동일수준(0.5-2.0 mg/L)으로 처리하여 캘러스 및 shoot를 유도하였고, 캘러스 및 식물체 재분화에 효과적이었던 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 배지에 10% 및 20% coconut water를 첨가하여 정단 분열조직 유래 형성된 캘러스 및 shoot 형성에 미치는 coconut water 효과를 조사하였다.

조사방법

치상후 10일 간격으로 정단분열조직 유래 캘러스와 shoot를 육안으로 관찰하였고 배양 90-120일경에는 캘러스로부터 shoot 재분화 수를 조사하였다. 한편, 분화된 shoot에서 뿌리분화를 유도하기 위해 MS 배지에 2,4-D, NAA 및 IBA를 농도별(0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L) 단용 또는 BA와 혼용처리한 후 뿌리 분화에 미치는 성장조절물질 효과를 조사 하였다.

조직학적 분석

배양 30, 60, 90일 후 정단분열조직 유래 캘러스를 2개씩 선발하여 tert-Butyl Alcohol에 고정, 상법에 따라 파라핀으로 포매한 후 shoot 분화현상을 현미경 하에서 검정하였다.

결과 및 고찰

캘러스 유도 및 shoot 분화에 미치는 식물생장조절물질의 효과

엽원기를 1-2매 부착한 할미꽃의 정단 분열조직을 MS 배지에 2,4-D와 kinetin, 2,4-D와 TDZ, NAA와 BA, NAA와 TDZ를 각각 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 수준으로 혼용 처리한 후 90일간 배양한 결과는 Fig. 1과 같다.

배지내 첨가한 식물생장조절물질의 종류와 관계없이 모든 치상한 절편은 배양 1주일 후부터 팽대와 캘러스를 형성하기 시작하였으나 배양 3주 경부터 팽대된 절편 및 증식된 캘러스는 배지내 첨가된 식물생장조절물질의 종류에 따라 육안으로 구별이 가능한 상태로 변화하였다. 즉 배지내 2,4-D와 kinetin, 2,4-D와 TDZ 처리구에서는 처리농도에 관계없이 황색, 또는 회색빛을 띤 흰색의 점액성 캘러스가 형성되었으며 0.5 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L kinetin 혼용처리구에서는 총치상체의 10%에서 점액성 캘러스가 형성되어 2,4-D와 kinetin 처리에서는 가장 양호한 반응을 보였다. 한편, 2,4-D와 TDZ 혼용처리 시 치상한 절편에서 캘러스 형성은 10% 이하의 수준으로 발생되었으며 특히 2,4-D와 kinetin 그리고 2,4-D와 TDZ가 각각 2.0 mg/L 씩 혼용처리된 곳에서 치상한 절편은 2-3% 수준으로 반응을 보여 본 실험에 사용된 식물생장조절제로서 부적합하였다. 그러나 0.5-1.0 mg/L 농도 수준에서 NAA와 TDZ를 혼용처리 하여 18-32% 정도 캘러스가 형성되었으나 2.0 mg/L

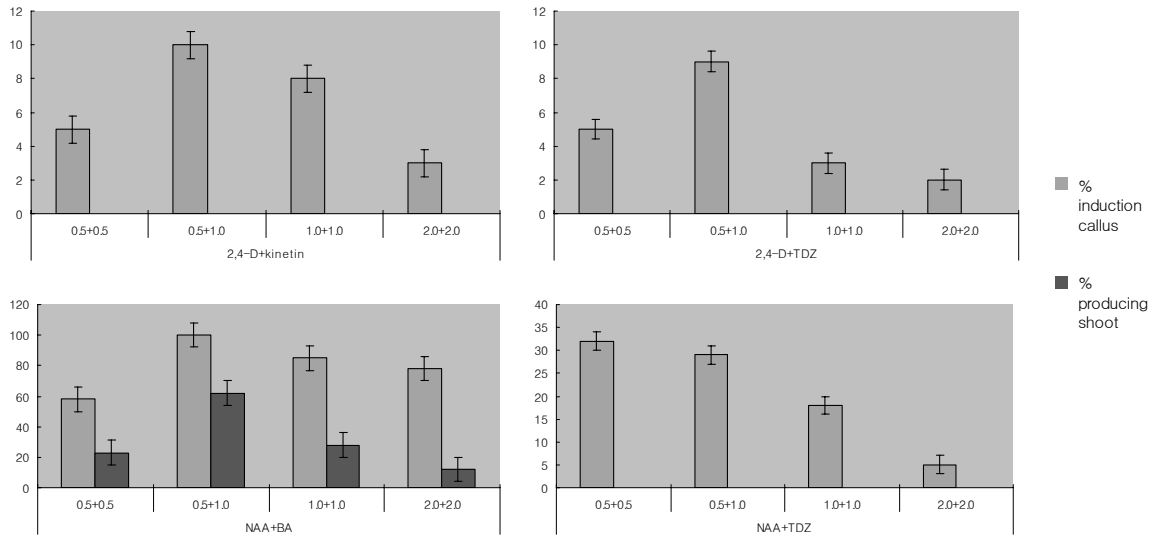


Fig. 1. Effect of plant growth regulators on callus induction and shoot production on MS media with 2,4-D+kinetin, 2,4-D+TDZ, NAA+BA and NAA+TDZ in apical meristem culture of *Pulsatilla cernua* var. *koreana* after 90 days of culture.

NAA와 2.0 mg/L TDZ에서는 5% 정도로 캘러스 형성이 급감하였다.

그러나 NAA와 BA 모든 처리구에서는 배양 초기부터 담녹색 및 담황색의 팽대한 치상 절편에서 단단하고 부스러지기 쉬운 배발생적 캘러스가 형성되었고 이어서 shoot가 분화되어 본 실험 중 할미꽃 정단유래 캘러스 유도에 적합하였다. 특히 0.5, 1.0 및 2.0 mg/L 씩 각각 NAA와 BA를 혼용처리 하였을 경우(Fig. 1), 대체적으로 초기 캘러스 형성이나 shoot 분화에 별로 차이가 없었으나 배양기간이 경과함에 따라 캘러스에 변화가 일어나기 시작하였는데 0.5 mg/L 및 2.0 mg/L BA 처리구에서 일부 캘러스는 배양 35일 경부터 활력이 없는 갈색 캘러스로 변하여 증식이 감소되었고 동일배지에 30일 간격으로 2회 계대배양 하였을 때는 치상한 절편의 23% 및 12%만이 생존할 수 있었다. 그러나 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼용처리구에서 치상체는 변함없이 캘러스를 증식시켜 배양 30일경에는 치상한 절편 당 담녹색을 띤 왕성한 캘러스로 증식되었으며(Photo. 1A). 30일 간격으로 callus를 동일배지에 계대배양한 결과 배양 60일 경에는 증식된 캘러스에서 단단한 돌기 및 shoot 원기가 형성되기 시작하였고(Photo. 1B), 이들 돌기는 배양 90일경에는 치상한 절편의 62%가 육안으로도 구분되는 shoot 또는 shoot bud로 분화되었다(Photo. 1C).

돌기성 캘러스에서 부스러지기 쉬웠던 캘러스 가운데 극히 일부에서는 구형 및 심장형을 띤 체세포성 배가 분리된

상태로 관찰되기도 하였으나 대부분 캘러스는 단단한 덩어리 형태에서 shoot나 shoot bud가 형성되었는데 캘러스 덩이의 표피에서 핵이 뚜렷하고 세포가 밀집된 돌기가 형성되고 이들 돌기는 계속적으로 분열하여 표피쪽으로 이동되어 표피의 원형이 파괴되지 않은 상태로 shoot를 형성하거나(Photo. 1D), 표피 직하의 세포에서 직접 계속적으로 분열하여 shoot bud를 형성하는(Photo. 1E) 두가지 경로를 관찰 할 수 있었다.

이와같이 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼용 처리구에서는 정단 분열조직으로부터 다량의 캘러스를 획득할 수 있었고 뒤이어 형성되는 녹색점 등에 의해 shoot 또는 shoot bud로 이어져 식물체 재분화 체계의 가장 기본적인 단계에 필수적인 식물생장조절물질로 생각되었다.

캘러스 증식, shoot 성장에 미치는 coconut water 효과

캘러스 증식 및 shoot 성장에 미치는 coconut water의 효과를 조사하기 위해 할미꽃 정단 분열조직유래 캘러스 형성에 효과적이었던 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA가 혼용처리된 MS 배지에 10%, 20% coconut water를 첨가하였다(Fig. 2).

초기 배양 30일 경 캘러스 분화율을 조사한 결과 coconut water 첨가시 대조구(25%)에 비해 캘러스 분화가 양호하였는데 10%, 20% coconut water를 배지에 첨가한 경우 캘러스 분화율은 각각 65%, 50%로서 세처리 중 10% coconut

water가 캘러스분화에 가장 효과적이었다.

또한, 배양 30일부터 60일 사이에 형성된 캘러스 양을 비교하였을 때 대조구는 치상체 당 180-200 mg 정도였으나 10%-20% coconut water 첨가구에서는 절편 당 평균 400-500 mg 정도로 증식되었으며, 특히 10% coconut water 첨가구에서 형성된 캘러스가 거둬지는 계대배양에도 활력을 유지하여 증식효과가 있었다. Coconut water가 첨가되지 않은 대조구에서 개체 당 평균 5.2개의 shoot bud를 분리할 수 있었고, 10% coconut water 첨가시 평균 12.9개 (Photo. 2B), 20% coconut water 첨가는 7.2개로 10% coconut water는 절편 당 부정 신초 증식에 탁월한 효과가 있었다. 또한 10% coconut water 첨가 시 shoot 길이가 대조구에 비해 0.5-1.0 cm 정도 신장되어 기내 생육이 왕성하였다(Photo. 2A). Coconut water 첨가로 캘러스로부터 multiple shoot 및 shoot bud 분화가 현저하게 빨랐

으며 배양 60일 경에는 shoot 길이가 0.5-1.0 cm 크기로 신장되어 기내생장이 왕성하여 10% coconut water는 할미꽃 배양시 식물체 증식에 효과적인 첨가물질로 생각되었다.

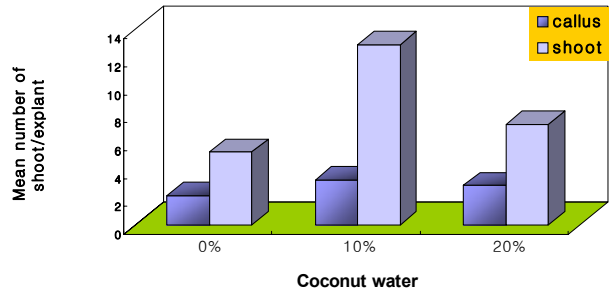


Fig. 2. Effect of 10% and 20% of coconut water on callus induction and shoot differentiation in apical meristem culture of *Pulsatilla cernua* var. *koreana* on MS medium with 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA after 60 days of subculture.

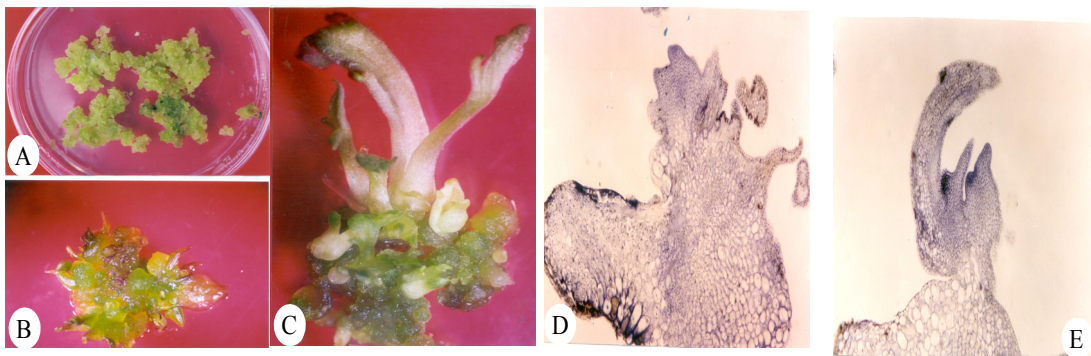


Photo. 1. Callus induction, shoot and shoot bud formation from apical meristem culture of *Pulsatilla cernua* var. *koreana*. Greenish, compact and embryogenic callus formation (A), shoot primordia (B) and shoot bud regeneration (C) on MS medium with 0.5 mg/L NAA plus 1.0 mg/L BA after 30 to 60 days of culture. Longitudinal section of apical meristem derived callus showing shoot and shoot bud in the subepidermal cells (D and E).

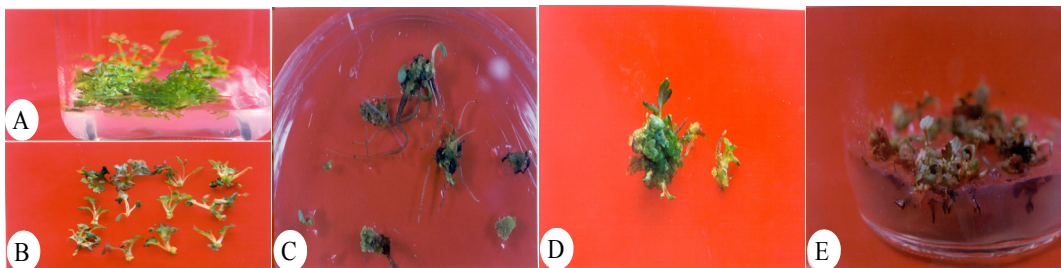


Photo. 2. Effect of coconut water and auxins on shoot multiplication and root formation through apical meristem culture of *Pulsatilla cernua* var. *koreana*. MS medium with 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA adding 10% coconut water was more effective than 20% coconut water *in vitro* multiplication and shoot elongation (A), and ten or twelve shoot buds were separated from one explant (B). Roots were only produced through the callus on MS medium with 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA (C) or 2.0 mg/L NAA alone (D) after 180 days of culture. *In vitro* roots initiated repetitively producing callus, shoot bud and regenerated plantlets on MS medium with 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA (D and E).

뿌리분화에 미치는 식물생장조절물질의 효과

기내에서 형성된 할미꽃 shoot를 2,4-D, NAA 및 IBA를 각각 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 및 5.0 mg/L 단용 처리하거나 켈러스 유도에 효과적이었던 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼용처리된 MS배지에 180일간 계대배양한 후 뿌리 분화를 조사하였다. 할미꽃의 shoot를 2,4-D, NAA 및 IBA 단용 배지에 계대배양 한 결과 shoot로부터 직접 뿌리는 분화되지 않았고 초기 배양에서와 같이 2,4-D 처리구에서는 담황색 점액성 켈러스가, NAA 및 IBA 처리구에서는 희고 단단하면서 부스러지기 쉬운 켈러스가 형성된 후 켈러스를 통해 뿌리가 분화되었다. 배양 90일이 경과되었을 때 각 처리별로 가늘고 흰 뿌리가 극히 미미한 정도로 발생하기도 하였으나 각 처리별 3.0 mg/L 이상 고농도 배지에서는 shoot로부터 켈러스 증식은 물론 계대 배양된 shoot도 갈변, 고사하여 뿌리 분화에 부적합하였다. 2.0 mg/L NAA 처리구에서는 담황색의 켈러스를 통해 담갈색의 굵은 뿌리가 다수 발생되어 본 실험의 오옥신 단용처리 가운데 가장 효과적이었다. 그러나 할미꽃 켈러스 유도 및 shoot 분화에 효과적이었던 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼용처리 배지에 지속적으로 계대배양 하였던 식물체 가운데 배양 180일이 경과되었을 때 전체 식물체의 20-23%가 켈러스를 통해 희고 굵은 뿌리가 형성되어 켈러스유도 및 shoot 분화에 적합하였던 배지가 뿌리 분화에도 가장 효과적이었다(Photo. 2C). 이들 뿌리에서 켈러스와 shoot가 반복적으로 형성되기도 하였으며(Photo. 2D) 30일 마다 계대배양을 통해 다량의 식물체를 획득할 수 있었다(Photo. 2E).

고 찰

동일 식물일지라도 치상 절편의 부위에 따라 켈러스 형성에 요구되는 식물생장조절물질의 종류와 농도는 다르다. 즉, 할미꽃 잎과 엽병에 의해 켈러스 형성에 효과적인 식물생장조절물질은 1.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BA 혼용처리임이 보고되었고(Yoon, 1996) 여기서 얻어진 켈러스에 2.0 mg/L PVP 및 1.0 mg/L BA를 첨가하므로 켈러스의 갈변화를 방지할 뿐더러 왕성한 shoot를 얻을 수 있었다고 한다(Yoon et al., 2006). 그러나 할미꽃 약 유래 화분배 형성이나(Ko and Kim, 2006) 본 실험 절편인 정단 분열조직은 2,4-D와 kinetin, 2,4-D와 TDZ, NAA와 BA 그리고 NAA와 TDZ를 혼용처리한 배지에 치상한 결과 NAA와

BA 혼용조합이 다른 조합에 비해 켈러스 발생 속도 및 식물체로의 분화에 현저한 차이를 보였고 각기 처리한 조합에서 생장조절물질의 농도가 2.0 mg/L 이상 수준으로 높아지면 발생된 켈러스는 쉽게 갈변되었으며 생존율이 급격히 떨어졌다. 특히 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 처리배지에서는 배발생적 또는 기관분화성 켈러스 형성과 식물체 재분화에 가장 효과적인 반응을 나타내 정단 분열조직배양에 첫 단계에 필수적인 생장조절제로 생각된다. 또한 할미꽃의 조직배양에서 절편체의 부위에 따라 형성된 켈러스는 공통적으로 페놀성 물질이 배출되기 때문에 적당한 기간을 두고 계대 배양을 해 주어야 켈러스가 생존할 수 있었다. 이런 번거로움을 줄이기 위해 배지 내 형성된 켈러스를 2.0 mg/L PVP와 1.0 mg/L BA를 혼용 처리하여 페놀성 물질의 제거 효과를 가져왔다고 하였는데(Yoon et al., 2006) 본 실험에서는 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼용처리 배지에 coconut water를 0, 10% 및 20% 첨가하여 켈러스의 증식력과 분화된 식물체의 신장 등 생육을 조사한 결과 무처리에서 발생된 켈러스(25%)에 비해 10%, 20% coconut water를 첨가하였을 때 각각 65%, 50%의 켈러스 발생율을 나타내 탁월한 효과가 인정되었으며 또한 켈러스에서 식물체 분화에도 영향을 미쳐 20% coconut water 처리는 무처리구에서 치상체 당 평균 5.2개의 shoot가 분화된 것과 비교한 결과 1.4배 이상 증수 효과가 있었고 10% coconut water 처리 시에는 치상체 당 평균 12.9개 shoot가 분화되어 거의 2.5배의 증수효과가 인정되었다. 한편, 켈러스를 30일간 의 배양기간을 두고 계대배양하므로 페놀성 물질이 배지내에 잠재할 수 있어 켈러스 증식이나 shoot 분화에 영향을 주었는데 coconut water를 처리하므로 켈러스 증식력이 빨라 무처리구에 비해 계대배양 기간이 대폭 단축됨으로써 배지내 페놀성 물질이 잔존할 수 없도록 하는 효과를 가져올 뿐만 아니라 shoot 또는 shoot bud의 신장에도 탁월한 효과가 있어 배지내 coconut water 첨가는 유용한 첨가제로 생각된다.

최근 할미꽃 기내발근에 미치는 식물생장조절물질의 효과를 조사한 결과 1/2MS 배지에서 키운 shoot를 3.0 mg/L NAsA 첨가 배지에서 3일간 생장시킨 후 1/3MS 배지로 옮겨 치상한 경우 10일 전후에서 뿌리 유도를 관찰하였다고 하였다(Yoon et al., 2006). 그러나 본 실험에서 분리된 shoot에서 직접 뿌리가 분화되지는 않았으며 켈러스를 통해서만 뿌리가 분화되었는데 2,4-D, IBA 및 NAA 단용 처리

시 2.0 mg/L NAA가 뿌리분화에 적합하였으나 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA와 혼용처리시 형성된 캘러스에서 배양 130여일이 경과된 후 굵고 담갈색의 뿌리가 다수 분화되어 가장 효과적이었다. 이들 shoot와 뿌리가 동시에 분화된 개체를 동일배지에 배양함으로써 multiple shoot와 더불어 다량의 뿌리를 획득할 수 있었다.

또한 형성된 뿌리는 배지면에 접한 부위에서 반복적인 배양 절편의 역할을 하여 캘러스를 형성하거나 직접적으로 shoot가 형성되기도 하여 지속적인 배양단계를 형성하기도 하였는데 이는 할미꽃의 잎 절편 또는 엽병을 배양하였을 때에도 배지내 첨가된 식물생장조절제에 따라 캘러스 및 부정아 및 부정근이 형성되었으며 부정근의 절편에 의해 shoot가 고빈도로 출현하였다는 보고(Jung et al., 2007)와 동일한 결과로 할미꽃의 배양부위 및 식물생장조절제의 종류와 농도에 차이는 있으나 형성되는 캘러스 및 기관분화성은 동일한 것으로 추측되며 본 실험에서 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼용첨가는 할미꽃 정단 분열조직으로부터 캘러스 형성뿐만 아니라 shoot와 뿌리 분화에도 탁월한 효과가 있는 식물생장조절제라고 생각된다. 또한 할미꽃의 기내 뿌리분화는 다른 식물에 비해 용이하지 않아 복잡한 계대배양 과정을 통해서 이루어지고 있음이 윤 등(2006)에 의한 보고에서도 알 수 있었다. 따라서 완전한 식물체를 생산하기 위해 기내 뿌리분화에 대한 적합한 배지 및 식물생장조절물질에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

적 요

할미꽃의 정단 분열조직배양에 의한 기내 효율적 미세번식에 미치는 식물생장조절물질의 효과를 조사하기 위해 2,4-D, NAA, kinetin, TDZ와 BA를 혼용처리한 MS 배지에 정단분열조직을 배양하였다. 배지내 2,4-D와 kinetin, 2,4-D와 TDZ, NAA와 TDZ 혼용처리하는 캘러스 유도에 효과적이지 못하였으나 NAA와 BA가 혼용 처리되었을 때 배발생적 또는 기관분화성 캘러스가 유도되었다. 특히 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼용처리된 MS 배지에서는 캘러스로부터 고빈도로(62%) 신초가 형성되어 캘러스 유도 및 신초형성에 적합하였다.

적합배지에 10% coconut water를 첨가하여 30일마다 계대배양 하므로 캘러스 증식률, 신초 분화율 및 신초 신장이 현저히 증가되었는데, 그 결과 절편체 당 평균 12.9개의 shoot bud를 분리할 수 있었다. 할미꽃 기내 유도된 식물체에서 뿌리는 쉽게 분화되지 못하였으나 2.0 mg/L NAA 단용 또는 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼용처리된 MS 배지에서 캘러스를 통해서만 분화되었다. 이들 뿌리는 동일 배지에서 캘러스유도 및 식물체 분화를 반복적으로 실시하는 시원체가 되기도 하였다

인용문헌

- Jung, S.J., J.H. Jeong, E.S. Yoon and Y.E. Choi. 2007. Plant regeneration from callus and adventitious root segments of *Pulsatilla koreana* Nakai. J. Plant Biotechnol 34(2):153-159
- Ko, J.A. and H.S. Kim. 2006. Microspore-derived embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Pusatilla cernua* var. koreana. Kor. J.Hort. Sci. Technol 24(2):290-295
- Lee, W.K., H.W. Choi and J.W. Bang. 2004. Karyotype analysis of five species of genus *Pusatilla*. Korean J. Medicinal Crop Sci.12(6)490-493
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Physiol Plant 15:473-497
- Sang, C.K., E.H. Kim and H.Y. Kim. 1993. Germination and life span of *Pusatilla cernua* var. koreana seeds. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 23(6):349-354
- Sang, C.K., B.J. Choi and J.C. Koh. 1996. Effect of storage humidity and temperature on seed germination of pasque flower(*Pusatilla cernua* var. koreana). J. Kor. Soc. Hort. Sci. 37(3):447-450
- Ye, W.C., B.X. Ou., N.N. Ji., S.X. Zaho., T. Ye., M.A. Mckervey and P. Stevenson. 1995. Patensin, a saponin from *Pulsatilla patens* var. multifida. Phytochemistry39:937-939
- Yoon, E.S. 1996. Effect of polyvinylpyrrolidone on callus growth and plant regeneration of *Pulsatilla koreana*. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 23(6):349-354.
- Yoon, E.S., H.K. Kwon and Y.Y. Cho. 2006. Effects of plant growth regulation on adventitious root formation of *Pulsatilla koreana* Nakai. Korean J. Medicinal Crop Sci. 14(4); 225-228.

(접수일 2008.7.25; 수락일 2008.9.4)