목초액이 기내 배양한 풍란(*Neofinetia falcata*)의 내생물질 함량 및 활성에 미치는 영향

지선옥* · 조동훈[1]

중부대학교 생명공학과, [1]경북대학교 원예학과

Received July 14, 2005 / Accepted August 22, 2005

Effect of Pyroligneous Liquor on the Content and Activitiy of Endogenous Substances of *Neofinetia falcata* Cultured *in vitro*. Sun Ok Jee* and Dong Hoon Cho[1]. *Department of Biotechnology, Joongbu University, Chungnam 312-702, Korea, [1]Department of Horticulture, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea* – This experiment was conducted to clarify the effect of pyroligneous liquor on endogenous substances that were GA (gibberelic acid)-like substances, starch, and protein of *Neofinetia falcata* cultured *in vitro*. When seedlings of *Neofinetia falcata* were treated with several concentrations (0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ml/L) of pyroligneous liquor, the growth of seedlings was enhanced in 1.0 ml/L pyroligneous liquor added media. The activity of GA-like substances was lower in the leaf, but higher in the and root than that of the control. The content of starch in 1.0 ml/L pyroligneous liquor was lower in the leaf, but higher in the root than that of the control. And the content of protein in 1.0 ml/L pyroligneous liquor was also lower in the leaf, but higher in the root than that of the control.

Key words – GA-like substances, *Neofinetia falcata*, protein, pyroligneous liquor, starch

풍란(*Neofinetia falcata*)은 기후가 온화하고 공중습도가 높은 남해 도서지방에서 자생하는 난으로 잎은 호생하며 좁은 피침형으로 총생하는 로젯트상의 단경성 난이다[24]. 흰색의 작은 꽃이 피고 거(距)가 길게 뻗어 있어 관상식물로써 인기가 대단히 높다. 특히 나무줄기나 바위에 착생하는 습성 때문에 재배 시 수태에 심기보다는 석부작이나 목부작을 하면 관상 가치를 한층 더 높일 수 있다. 풍란의 수요는 대단히 많지만 남획에 의해 자생지에서는 거의 멸종상태이기 때문에 지금까지 종자를 무균 파종하여 증식시킨 유묘가 공급되고 있으나 유묘의 생산에 비교적 많은 시간이 소요되며, 생산되는 묘의 품질 또한 기내 배양묘의 특성상 강건하지 못하여 기외 이식 시 고사율이 상당히 높다[6].

목초액은 식물의 세포 내에서 생성된 일종의 세포액으로 나무나 식물을 열분해 하면 세포액이 기체화되어 밖으로 나오게 되는데 이것을 냉각시켜 정치하면 연갈색의 투명한 액이 분리된다[21]. 일본에서는 농업 및 환경 정화분야에서 목초액의 활용성에 대한 연구가 수행되어 토양살균, 축산 분료의 탈취, 작물의 해충기피, 퇴비 발효촉진, 식물생장 및 뿌리 생육효과를 지니고 있음이 밝혀져 있다[8,20,22]. 목초액의 주요 성분은 물이 80~90%를 차지하며, 나머지는 주로 유기물인 산류와 페놀류로 구성된다[1,15]. 국내에서는 농업분야에 미량요소 복합비료로서 허가되어 비료 사용 목적 이외에도 농약의 보조재료, 토양살균, 가축사료 첨가제 등으로 활용되고 있으나 국내에서 제조된 목초액의 성분조성에 대해서는 잘 알려져 있지 않은 실정이다[9,12,16]. 국내 원예 분야에 적용 사례를 보면 Yoo와 Kang (2003)은 백합 '시베리아', '조지아' 품종의 인편삽 시 목초액의 처리가 자구형성 및 증식에 미치는 영향에 대하여 보고하였고, Jee (1998)는 백합 '히노모토' 품종의 기내 자구배양에서 목초액 처리가 자구의 비대에 미치는 영향에 대하여 보고하였다.

본 연구는 풍란 기내배양용 배지에 목초액을 농도별로 첨가하여 생장에 미치는 영향을 조사하고, 목초액 처리에 따른 풍란 식물체의 내생물질의 활성과 함량변화를 분석함으로써 목초액 처리가 풍란 내생물질의 소장에 미치는 영향을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양조건

기내 목초액 처리가 풍란 유묘의 생육 및 GA 유사물질의 활성, 전분 함량 및 단백질 함량에 미치는 영향을 조사하기 위해 초기 배양에서 사용된 식물재료는 엽수 3.0±0.5 장, 엽장 14.46±1.20 mm, 엽폭 2.20±0.21 mm, 근수 3.0±0.5개, 근경 0.86±0.06 mm, 근장 17.03±1.14 mm, 생체중 468.0±12.0 mg인 것을 사용하였다. 배양용기는 100 ml 삼각플라스크를 사용하였으며, 조제된 배지를 20 ml 씩 분주하였고, 각 플라스크 당 4 개체씩 치상하였으며, 처리 당 5반복으로 하였다.

배양에 사용된 배지는 hyponex 3 g/L와 peptone 2 g/L를 혼합한 배지에 생장조절물질로는 NAA 0.5 mg/L와 kinetin 1.0 mg/L를 첨가하였고, sucrose 30 g/L, plant agar 7 g/L를 첨가하여 pH는 5.2로 조절하였다.

목초액 처리는 위와 같은 조성의 기본 배양 배지에 목초액(거성 바이오, 한국) 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ml/L의 농도로 각각 처리하였다.

배양환경은 온도 25±1℃, 광도 2,000 lux, 광주기 명 16, 암

*Corresponding author
Tel : +82-41-750-6713, Fax : +82-41-750-6380
E-mail : sojee@joongbu.ac.kr

8시간으로 각각 처리하였으며, 생육조사 및 내생물질 활성 및 함량 분석은 초기배양으로부터 16주 후 실시하였다.

GA 유사물질 활성 검정

GA 유사물질의 활성검정을 위하여 목초액 처리배지에서 16주 배양된 유묘의 지상부 및 지하부를 각각 10 g씩 채취해서 Badr 등(1971)의 방법에 의하여 분리 · 추출하였다. 각 분획별로 paper chromatography (Toyo No. 51)를 실시하였으며 각각의 분획을 상온에서 여과지에 loading한 후 밀폐된 용기에 넣어 25℃, 암상태에서 5시간 전개{전개용매 ; iso-propanol : ammonia water (28%) : water = 10 : 1 : 1(v/v)}하였다. GA 유사물질의 활성검정을 위한 생물검정은 벼 '短銀坊主'를 30℃에서 3일간 최아시킨 종자를 관병에 Rf치 별로, 각각 잘게 자른 여과지를 넣은 다음, 멸균수 5 ml를 넣고 여기에 최아된 종자를 넣은 후 25℃에서 14일 동안 생육시킨 후 제 2 엽초의 길이를 조사하여 상대 생장률을 환산하였다.

전분 함량분석

전분 함량분석을 위해서 Phenol-sulfuric법[4]을 이용하였다. 풍란의 지상부 및 지하부를 각각 10 g씩 채취하여 균질분쇄기를 이용하여 80% MeOH 100 ml 와 함께 분쇄한 후 48시간 동안 진탕(50 rpm)하였다. 진탕 후 여과지(Toyo No. 1)를 통해 1차 여과를 하였고, 여과액을 다시 원심분리(3,000 rpm, 10분)시켜 그 상등액을 취하여 Sep-Pak cartridge와 membrane filter (0.2 μm)를 이용하여 여과시키고, 시험관(1.5 cm×15 cm)당 시료용액 1 ml와 5% phenol용액 1 ml를 첨가하여 혼합한 후, 끝을 자른 피펫으로 가수분해와 환원당 탈수를 시키기 위해 무수 H_2SO_4 5 ml를 직접 시험관의 액면에 가하고, vortex mixer로 잘 혼합하여, 실온에 20~30분간 방치하였다. 당 표준용액의 조제는 glucose를 95℃에서 8시간 건조시켜 수분을 제거한 후 1 mg/ml의 glucose를 포함하는 용액을 조제 후 이 용액을 25, 50, 75, 100 μg/ml의 용액을 만들어 시료와 동일한 방법으로 조작하였다. 모든 조작이 완료된 후 UV-VIS spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu)를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 당 표준용액의 흡광도를 이용하여 탄수화물 함량 표준곡선을 작성하여 시료 중의 전분함량으로 환산하였다.

단백질함량 분석

식물체 내 단백질 함량을 조사하기 위해 Lowry 등(1951)의 방법에 의해 분석을 실시하였다. 전분 함량 분석의 방법과 같이 시료를 준비하여 시험관(1.5 cm×15 cm)에 시료용액 0.1 ml와 단백질 표준용액(bovine serum albumin standard)에 2 N NaOH를 0.1 ml씩을 각각 첨가하고 100℃에서 10분간 가수분해 후 상온에서 용액이 완전히 식을 때까지 방치하였다가 혼합시약(2% Na_2CO_3 : 1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 2% sodium potassium tartrate = 100 : 1 : 1)을 1 ml씩 첨가한 후 실온에서 10분간 방치하고 folin 시약 0.1 ml를 첨가 후 vortex mixer로 잘 혼합하여 실온에서 30분간 방치하였다. 이 시료를 30분 후 UV-VIS spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu)를 이용해 550 nm에서 흡광도(Optical Density; OD)를 측정하였고, 단백질 표준용액의 흡광도로 단백질 함량 표준곡선을 작성하여 각각의 처리별 단백질 함량을 조사하였다.

결과 및 고찰

생육 및 내생 GA 유사물질의 활성

기내 목초액 처리가 풍란 유묘의 생육에 미치는 영향(Fig. 1)은 목초액을 처리하지 않았던 대조구에 비하여 목초액 1.0 ml/L 처리에서 엽수, 엽장, 엽폭, 근수, 근직경 등에서 생장이 양호하였다.

GA 유사물질의 활성(Fig. 2)에 대한 분석은 생육조사에서 생육 상태가 가장 저조하였던 대조구와 생육 상태가 가장 양호하였던 목초액 1.0 ml/L 처리만을 대상으로 실시하였다.

잎에서의 GA 유사물질 활성은 목초액을 처리하지 않은 대조구에서 목초액 1.0 ml/L를 처리했을 때 보다 활성이 상당히 높았으며, 뿌리에서는 목초액 1.0 ml/L를 처리했을 때 대조구보다 GA활성이 매우 높았다. Cho (2000)는 나도풍란(*Sedirea japonica*) 유묘의 기내 배양에서 식물생장억제제인 uniconazole, ancymidol, paclobutrazol을 몇 가지 농도로 처리했을 때 각각의 생장억제제 저농도 처리에서 잎은 GA 활성이 비교적 높았고, 중간농도 및 고농도 처리에서는 활성이 낮아짐을 확인하였다고 하였으며, 뿌리에서는 처리 농도에 관계없이 대조구에 비하여 GA활성이 높았다고 하였고, Park (2000)과 Chung 등(2005)은 나도풍란 유묘의 조직배양에서 생장억제제 처리에 의한 내생 GA 유사물질 활성을 검정한 결과, Cho (2000)와 유사한 결과를 얻었으며, Park (2000)은 춘란(*Cymbidium goeringii*)에 생장억제제인 uniconazole을 엽면살포했을 때 저농도에서 잎의 생장이 촉진되면서 GA 유사

Fig. 1. Effect of pyroligneous liquor on growth of *Neofinetia falcata* cultured *in vitro*.

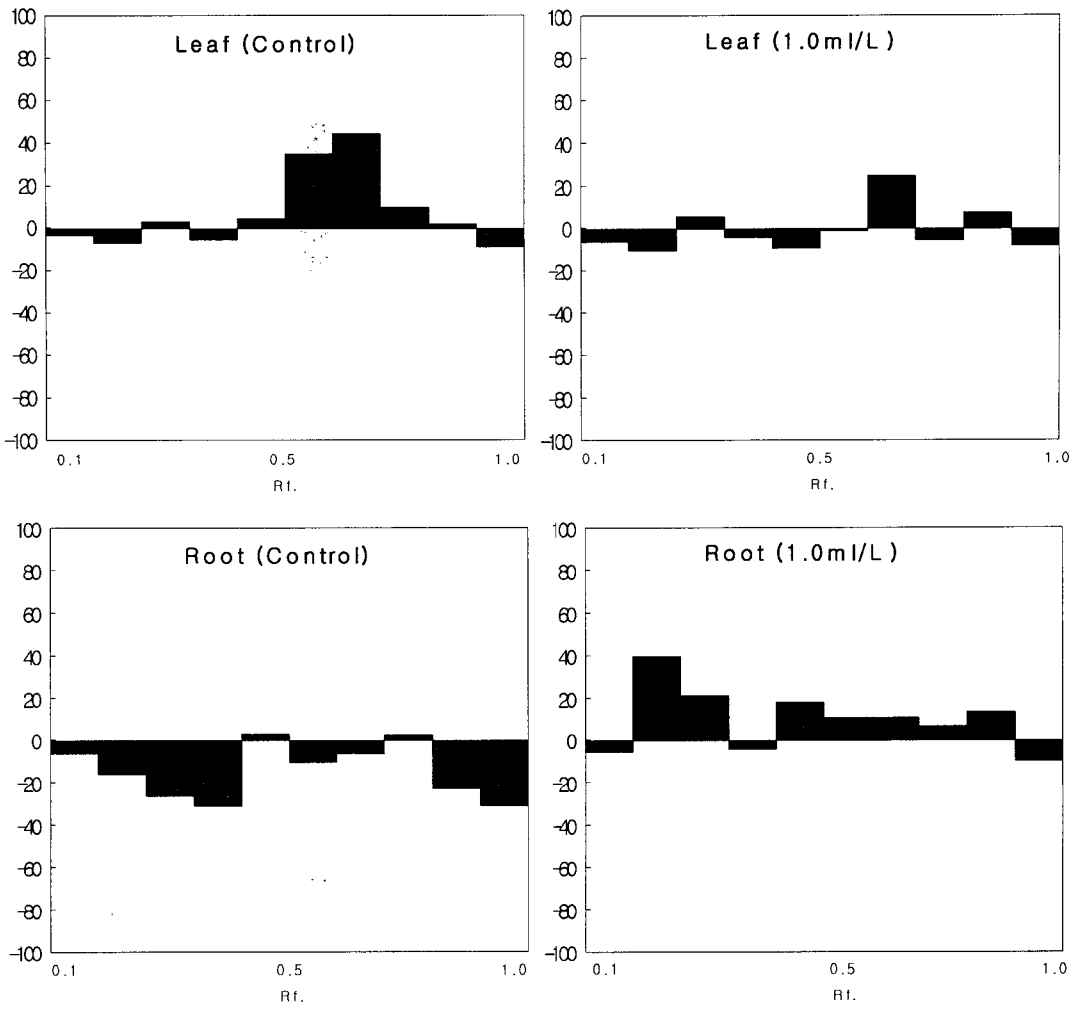

Fig. 2. Effect of pyroligneous liquor on activity of endogenous GA-like substances of *Neofinetia falcata* cultured *in vitro*.

물질 활성도 높았다고 하였으나 고농도 처리에서는 대조구에 비하여 활성이 상당히 낮았다고 하였으며, 뿌리에서의 활성은 처리 농도에 관계없이 대조구보다 높았다고 하였다. 본 연구는 목초액을 배지에 첨가하여 풍란의 GA 유사물질 활성을 조사한 것이나 생장억제제를 이용한 연구와 결과의 경향이 유사하여 풍란 유묘의 조직배양 시 목초액 처리가 생장억제제 처리와 같은 내생 GA 활성의 변화를 발생시킨 것으로 생각되었다. 목초액을 식물의 생육 향상 목적으로 사용한 예는 전무한 상황이며, 그러므로 이는 적용 식물에 따른 생장 및 GA 유사물질의 활성에 차이가 있을 것으로 판단되어 차후 다른 종류의 식물에 적용하는 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각되었다.

전분 및 단백질 함량 분석

기내 목초액 처리가 풍란 유묘의 전분 및 단백질 함량에 미치는 영향(Fig. 3)을 보면, 전분 함량은 잎에서는 대조구가 목초액 1.0 ml/L 처리에 비해 다소 높게 나타났으나, 뿌리에서는 목초액 처리구가 대조구에 비해 상당히 높은 함량을 나타내었다.

단백질 함량도 목초액 1.0 ml/L 처리가 대조구에 비하여 잎에서는 다소 낮았으나, 뿌리에서는 다소 높은 경향을 나타내었다.

식물생장억제제 paclobutrazol 처리가 사과나무 부위별 전분축적 양상에 관한 연구[3]에서 paclobutrazol 처리는 과실에, 무처리구는 잎에 보다 많은 전분을 함유하였다고 하였으며, uniconazole 처리에 의한 춘란의 광합성 산물인 당의 부위별 함량은 화기, 위구경, 엽신, 엽초의 순으로 화기와 위구경의 당 함량이 다른 기관에 비해 월등히 많았다는 보고[17,18] 등으로 미루어 보아 지상부와 지하부의 전분함량은 지상부의 경우 생장억제제 처리가 전분함량을 감소시키는 경향을 나타내었으며, 지하부의 경우는 이와 반대로 처리구가 무처리구에 비하여 함량이 높아서 식물생장억제제의 처리에 의해 전분 축적이 촉진되는 것을 알 수 있었는데 본 연구에서 목초액을 1.0 ml/L 처리했을 때 생장억제제를 처리한 경우와 유사한 전분함량을 나타내어 생장억제제의 처리에 의해 나타나는 식물체의 영향과 유사하여 목초액이 풍란

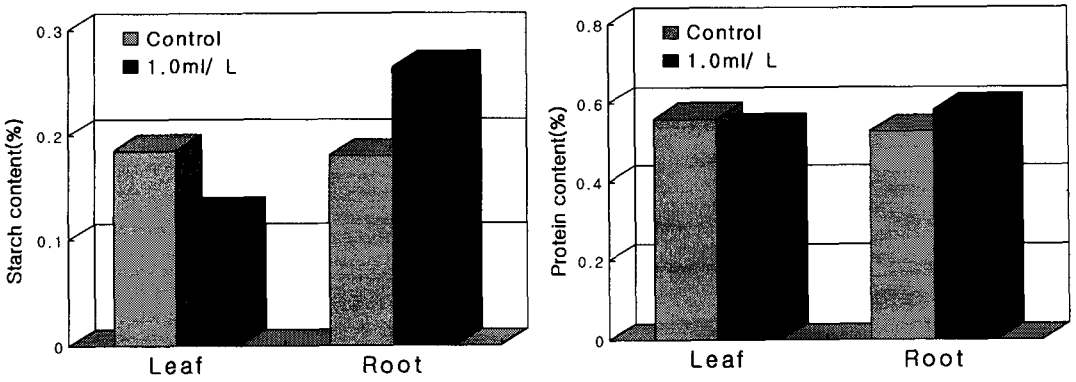

Fig. 3. Effect of pyroligneous liquor on starch and protein content of *Neofinetia falcata* cultured *in vitro*.

의 전분함량에 생장억제제와 유사한 영향을 미치는 것으로 생각되었다.

또한 단백질 함량에 있어서 Lee (1987)는 생장억제제인 paclobutrazol 처리가 땅콩의 품종에 따라서 다소 차이는 있었으나 조생 및 중생종 품종에서 엽면 살포에 의해 열매라고 할 수 있는 땅콩의 단백질 함량이 대조구에 비하여 높았다고 하였으며, Kim과 Suzuki (1989)도 *Zinnia elegans*에 식물생장억제제인 uniconazole 처리가 식물체 내 효소활성 변화에 미치는 영향을 알아보기 위한 단백질 함량조사에서 줄기에서의 단백질 함량은 낮았으나, 뿌리의 단백질 함량은 증가하였다고 하였는데, 이는 생장억제제 처리가 저장기관인 열매와 뿌리에 단백질의 함량을 증가시킨 것으로 생각되었다. 이는 목초액을 처리한 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었는데, 현재 친환경 농업을 위해 살충, 살균제 및 비료의 역할을 하고 있는 목초액이 본 연구에서는 생장억제제를 처리한 경우와 같이 생장, GA 유사물질 활성, 전분함량 및 단백질 함량에도 영향을 미친 것으로 보아 목초액이 풍란 유묘의 조직배양에 있어서 생장억제제를 처리했을 때와 유사한 결과를 나타내어 건전한 유묘의 생산을 위한 생장억제제 처리를 대치함으로써 인위적 화학물질인 생장조절제에 의해 발생할 수 있는 환경적, 보건적 문제를 차단함은 물론, 건전한 유묘의 생산에도 큰 도움이 될 것으로 생각되었다.

결 론

본 연구는 목초액의 배지 내 첨가가 풍란유묘의 내생 GA 유사물질의 활성, 전분 함량 및 단백질 함량에 미치는 영향을 구명하기 위하여 실시되었다.

풍란 유묘 배양에서 배지에 목초액을 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ml/L 각각 처리했을 때 1.0 ml/L에서 생육 상태가 가장 양호하였으며, GA 유사물질의 활성이 잎에서는 대조구가 상당히 높았고, 뿌리에서는 목초액 1.0 ml/L 첨가배지에서 높았다.

전분 함량은 목초액 처리를 하지 않은 대조구에 비하여 생육이 가장 양호하였던 1.0 ml/L 처리에서 잎은 낮았으나, 뿌리는 높았다.

단백질 함량 역시 생육이 가장 양호하였던 1.0 ml/L 처리에서 잎에서는 대조구보다 낮았으나, 뿌리에서는 높았다.

참 고 문 헌

1. Alen, R., E. Kuoppala and P. Oesch. 1996. Formation of the main degradation compound groups from wood and its components during pyrolysis. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **36**, 137-148.
2. Badr, S.A., G.C. Martin and H.T. Hartmann. 1971. A modified method for extraction and identification of abscisic acid and gibberellin-like substances from the olive(*Olea europaea*). *Physiol. Plant* **24**, 191-198
3. Byun, J.K., S.Y. Wang and G.L. Steffens. 1984. Controlling Plant Growth via The Gibberellin Biosynthesis System; II. Carbohydrates Alterations by GA3 and Paclobutrazol in Apple Seedlings, Horticulture Abstracts **2**, 68-69
4. Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy. 1986. Carbohydrate analysis. A Practical Approach JRI. Press, oxford and washington D.C.
5. Cho, D.H. 2000. Effect of plant growth retardants on growth and change of endogenous substances in *Aerides japonicum*. MS thesis, Kyungpook national university, Daegu
6. Chung, J.D., S.H. Harm, S.O. Jee, M.Y. Chung, T.M. Khin and C.K. Kim. 2004. The multiple propagation of mericlones from shoot tip culture of *Neofinetia falcata*. *J. Kor. Flower Res. Soc.* **12**, 101-106.
7. Chung, M.Y., J.D. Chung, D.H. Cho, H.Y. Kim, M.S. Cho and C.K. Kim. 2005. Effect of growth retardants on the growth of *Sedirea japonica* in vitro. J. *Kor. Flower Res. Soc.* **13**, 44-50.
8. Guillen, M.D. and M.L. Ibargoitia. 1998. New components with potential antioxidant and organoleptic properties, detected for the first time in liquid smoke flavoring preparations. *J. Agric Food Chem.* **46**, 1276-1285.
9. Jang, C.S. and H.D. Seok. 2001. Policy directions for the general use of charcoal and wood tar in agriculture and livestock. *J. Res. Forest and economy* **9**, 28-37.

10. Jee, S.O. 1999. Effect of culture substrate and wood vinegar solution on bulblet increment of *Lilium longiflorum*. *J. Joongbu Univ.* **12**, 375-382.
11. Kim, H.Y. and Y. Suzuki. 1989. Changes in assimilated 13C distribution and soluble acid invertase activity of *Zinnia elegance* induced by uniconazole an inhibitor of gibberellin biosynthesis. *Plant physiol.* **90**, 316-321
12. Kim, Y.H., S.K. Kim, K.S. Kim and Y.H. Lee. 2001. Compounds identification of commercial wood vinegar liquors. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **44**, 262-268.
13. Lee, H.S. 1987. Effects of a growth retardant Paclobutrazol on the oil, protein content and fatty acid composition of peanut (*Archis hypogea* L.). *KJWS* **9**, 250-261
14. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough., A.l. Farr. and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
15. Maga, J.A. and Z. Chen. 1985. Pyrazine composition of wood smoke as influenced by wood source and smoke generation variables. *J. Flavour Fragr.* **1**, 37-42.
16. Mun, S.P. and C.S. Ku. 2002. Analysis of volatile compounds in bamboo and wood crude vinegars by the Solid-Phase Microextraction (SPME) method. Mokchae Konghak **30**, 80-86.
17. Paek, K. Y., H. Y. Kim., T. J. Kim., S. K. Park., K. C. Son and J. H. Suh. 1995. From beginning to management of *Cymbidium* culture. The nongmin press. Seoul
18. Park, J. S. 2000. Studies on habitat environment and flowering physiology of *Cymbidium goeringii*. PhD thesis, Kyungpook national university, Daegu
19. Park, Y. K. 2000. Effect of plant growth retardants on the growth of *Aerides japonicum* and *Bletilla striata* cultured in vitro. MS thesis, Kyungpook national university, Daegu
20. Sugiura, G. 1972. In Mokuzai Kokyo Handbook. Forestry and Forest Res. Inst. Maruzen, Tokyo. p. 930.
21. Toth, L. and K. Potthast. 1984. Chemical aspects of the smoking of meat and meat products. Adv. Food Res. **29**, 87-158.
22. Yatagi, M., G. Unrinin and G. Sugiura. 1986. By-products of wood carbonization. Tar from mangrove, sugi ogalite, wheat straw and chishima-sasa. Mokuzai Gakkaishi **32**, 467-471.
23. Yoo, Y.K. and S.W. Kang. 2003. Effects of wood charcoal and pyroligneous acid on the growth and formation of bulblet in lily. *Kor. L. Hort. Sci. Technol.* **21**, 80-81.
24. Yoon, P.S. 1989. The pictorial book of Korean horticultural plant. Jisik press. Seoul. p. 703-704.