

## NaOCl 처리에 의한 한라천마(*Gastrodia verrucosa* Blume)와 애기천마(*Hetaeria sikokiana* Tuyama)의 기내발아

배기화 · 고명석 · 최선아 · 이학봉 · 김남영 · 송재모 · 송관필

### *In vitro* germination of *Gastrodia verrucosa* Blume and *Hetaeria sikokiana* Tuyama treated by NaOCl

Kee-Hwa Bae · Myoung Suk Ko · Sun A Choi · Hak Bong Lee · Nam Young Kim · Jae Mo Song · Gwanpil Song

Received: 6 July 2012 / Accepted: 23 July 2012  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** An optimization *in vitro* seed germination was established by using triphenol tetrazolium chloride (TTC) test, which has been known as two rare orchids (*Gastrodia verrucosa* Blume and *Hetaeria sikokiana* Tuyama) in Jeju island. We have established proper NaOCl treatment for *in vitro* germination of *G. verrucosa* and *H. sikokiana* through TTC test. In the case of *H. sikokiana*, seed viability through TTC test was high with 95% in control. However, NaOCl

1% treatment for 30 minutes showed the highest embryo swelling rate to seed viability. Likewise, swelling formation of embryos, diameter of embryos, protocorm formation and diameter of protocorms of *G. verrucosa* was 87%, 59  $\mu$ m, 91% and 138  $\mu$ m through NaOCl 1% treatment for 30 minutes. This result will be applied on the basic information for improving *in vitro* seed germination rate of *G. verrucosa* and *H. sikokiana*.

K.-H. Bae  
(재)홍천메디칼허브연구소  
(Hongcheon Institute of Medicinal Herb, 101 Yeonbong-ri,  
Hongcheon-eup, Hongcheon, Gangwon, 250-930, Korea)

M. S. Ko · S. A. Choi  
(재)제주테크노파크  
(Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark,  
Seogwipo, 699-943, Korea)

H. B. Lee  
강원대학교  
(Department of Forest Resources, College of Forest and  
Environmental Sciences, Kangwon National University,  
Chunchon 200-701, Korea)

N. Y. Kim  
국립수목원  
(Department of Horticulture and Education, Korea National  
Arboretum, Pocheon, Gyeonggi 487-821, Korea)

J. M. Song  
강원도자연환경연구사업소  
(Nature Environment Research Office of Gangwon Province,  
Hongcheon, Gangwon, 250-884, Korea)

G. Song (✉)  
(주)제주환경자원연구소  
(Jeju Environment Research Institute, Rm 603, BI Center, Jeju  
Tourism College, Jeju 690-791, Korea)  
e-mail: gwanpill@hanmail.net

**Keywords** rare plants, Orchidaceae, seed viability, swelled embryo

#### 서론

제주도는 우리나라에서 식물다양성이 가장 풍부한 곳으로 알려져 있다. 제주도의 식물 수는 167과 770속 1,819종, 121변종, 50품종으로 총 1,990분류군으로 정리된바 있다(Kim et al. 2006). 이중 제주특산종은 77종으로 분류되는데, 이는 국내 472분류군의 약 16%를 차지하는 비중이다(Kim 2006). 이처럼 제주도에 특산종이 많이 분포하는 이유는 육지와 격리된 섬이라는 환경과 독특한 아열대성 기후 때문인 것으로 보여 진다.

한라천마(*Gastrodia verrucosa* Blume)와 애기천마(*Hetaeria sikokiana* Tuyama)는 재배, 생산되는 천마(*Gastrodia elata* Blume)와는 다른 종이다. 하지만 한라천마의 경우 보통 천마와 같은 천마속(*Galeola* genus)이고, 애기천마는 천마와 다른 애기천마속(*Hetaeria* genus)으로 분류되고 있다(Lee 2007). 애기천마의 뿌리는 괴근이 아닌 가근으로 발달하고, 한라천마는 우리나라에서는 제주도에에서만 자라

지만 애기천마는 부산광역시 백양산 인근에도 서식한다는 보고가 있다(Lee 2007). 이 두 종은 천마와 마찬가지로 고등식물이지만 잎과 뿌리가 없어서 탄소동화능력이 없는 퇴화된 다년생 난과식물(Orchidaceae)이다. 난과식물, 특히 지생란(Terrestrial orchid)의 경우 공생균(Symbiotic fungal)과의 공생을 통해 생육하는데 천마는 담자균류인 뽕나무버섯속균(*Amillaria* spp.)과 공생적으로 생육한다고 보고가 된 바 있지만(Kusano 1911), 한라천마나 애기천마 역시 이와 비슷한 공생균과 관계가 있을 것으로 예상할 뿐 관련된 연구결과는 전무하다.

이들 두 종과는 달리 천마(*G. elata*)는 한국, 중국, 일본 등에서 고가에 거래되는 전통약재로 땅속덩이줄기를 오래전부터 고혈압, 경기, 두통, 현기증의 치료용 약재로 이용되어 왔다(Huang 1985; Chang and But 1986). 국내에서도 천마의 식품학적 연구가 20여 년 전부터 활발히 이루어져 왔고, 최근에는 천마관련 제품들도 다양한 형태로 출시되고 있다. 하지만 특산식물인 한라천마와 애기천마는 특수한 서식환경으로 인해 식품학적 연구는 물론 어떠한 연구도 이루어지지 못하고 있다.

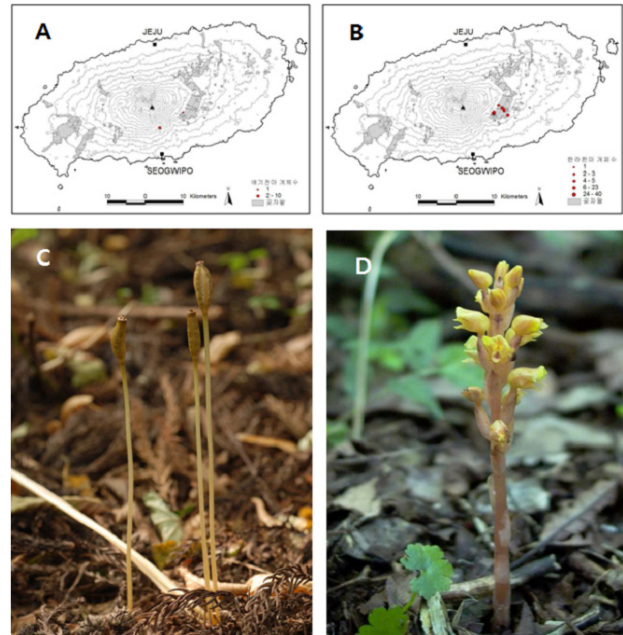
한편, 천마속 식물의 증식은 천마가 상품적 가치가 우수하기 때문에 1995년 농촌진흥청에서 뽕나무버섯균인 천마1호를 보급하며 대량생산이 가능해졌지만 무성번식에 품종 퇴화 문제를 해결할 수는 없었다. 이러한 문제점 해결 방법으로 기내 종자배양법이 제시되는데 차아염소산나트륨(Sodium hyperchloride: NaOCl)은 *Cypripedium*속 기내 종자 발아개선에 중요한 요인으로 작용한다는 본 연구자의 보고가 있었다(Bae et al. 2009; Bae et al. 2010; Bae et al. 2011).

따라서 본 연구에서는 발아개선택제로 여겨지는 NaOCl의 처리를 통해 특산식물로 분류되는 한라천마와 애기천마의 기내종자발아법을 확립하는데 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 기내배양조건

본 연구에 사용된 한라천마(*G. verrucosa*)의 꼬투리(Fig. 1C)는 2010년 7월에 이승약 오름(Fig. 1A)에서 2립, 애기천마(*H. sikokiana*)의 꼬투리(Fig. 1D)는 2010년 9월에 서귀포시 남원읍 한남지역(Fig. 1B)에서 2립, 총 4립을 채집하였다. 채집된 식물재료는 표면을 깨끗이 씻고 건조기를 이용하여 물기를 제거한 다음 실리카겔이 포함된 보관병에 담아 4°C 냉장고에서 3개월간 저온처리를 하였다. 한라천마와 애기천마 종자의 기내배양은 온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 광주기 16/8시간, 광도  $46 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 배양실에서 실시하였다. 실험에 사용한 모든 배지와 기구는  $121^\circ\text{C}$ , 1.5기압으로



**Fig. 1** Map of collected area (A: *G. verrucosa*, B: *H. sikokiana*), C: *G. verrucosa* flowers, D: *H. sikokiana* fruits

20분간 고온·고압 멸균하여 페트리디쉬에 30 mL씩 배지를 분주하여 실험에 사용하였다.

### Sodium hyperchloride(NaOCl)처리에 따른 종자활력검증

NaOCl처리 농도, 시간에 따라 한라천마와 애기천마의 종자활력을 검증하기 위해 1% triphenol tetrazolium chloride (TTC) 용액을 제조하여 사용하였다. 한라천마와 애기천마의 종자를 꼬투리에서 꺼내 시간별, 농도별로 NaOCl을 처리한 후 멸균수로 3회 세척하여 TTC용액에 각각 1,000개 이상을 침지하여  $20^\circ\text{C}$  암조건에서 48시간 반응하고 이후 증류수로 5회 세척하였다. TTC용액으로 붉게 염색이 되는 부위는 조직이 살아있는 부위이고 염색이 되지 않는 부위는 죽은 조직으로 확인할 수 있다(van Waes and Deberg 1986). 따라서 NaOCl처리 농도, 시간에 따라 한라천마와 애기천마의 종자활력을 확인하기 위해 세척 후 실체현미경을 이용하여 한라천마와 애기천마 종자의 붉은 염색부위를 조사하였다.

### Sodium hyperchloride(NaOCl)처리에 따른 배비대 및 발아

NaOCl의 처리시간과 농도가 한라천마와 애기천마의 종자발아에 미치는 영향을 알아보기 위해 한라천마와 애기천마의 꼬투리를 70% 에탄올에 1회 30초간 표면 살균한 후 멸균된 증류수로 3회 수세하였다. 꼬투리를 열개하여 종자를 수확한 다음 1~4% NaOCl을 0~60분간 처리하였다. NaOCl이 처리된 종자는 멸균수로 5회 수세하여 NaOCl

을 완전히 제거하여 배양하였다. 배양은 Phytomax orchid maintenance(P6668, Sigma, USA)배지에 sucrose가 20 g/L, pH 5.2, gerlite 3.0 g/L를 첨가한 배지위에 치상하여 암배양 한 다음 6주후에 배비대(embryo swelling)율과 12주후에 발아(germination)율을 조사하였다.

통계분석

모든 데이터는 means ± standard deviation으로 표시하였다. 변이들의 집단간 차이를 알아보기 위해서 one-way ANOVA를 실시하였고, 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple range test로 사후검증을 하였다. 통계적 유의성은 P < 0.05로 설정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Sodium hyperchloride(NaOCl)처리에 따른 한라천마 및 애기천마 종자활력

NaOCl은 일반적으로 표백 및 살균제로 사용하고, 식물조직배양에서는 외부조직의 무균 배양 시 무균적 기내도입을 위해 주로 사용되는 화학물질이다. 이러한 용도 외에 멸종위기 난과 식물인 광릉요강꽃(*Cypripedium japonicum* Thunb.), 털복주머니란(*C. guttatum* Sw.), 복주머니란(*C. macranthum* Sw.)의 연구결과에 따르면 이들 종의 기내 종자배양시 NaOCl처리는 초기 배의 발달과 프로토크롬으로 발달을 촉진한다는 결과가 보고된 바 있고, 배지의 경우 POM배지는 MS배지보다 2배 높은 배비대와 종자발아율을 보였다고 보고하였다(Bae et al. 2009; Bae et al. 2010; Bae et al. 2011).

한라천마(*G. verrucosa*)와 애기천마(*H. sikokiana*)의 종자 발아에 적정 NaOCl 처리농도와 시간을 알아보기 위해 종자활력테스트를 수행한 결과는 Figure. 2와 같다. 한라천

마 종자를 NaOCl이 2% 또는 4%에 15분 이상 처리하면 종자생존율은 40% 미만으로 급감함을 확인하였고(Fig. 2A), 애기천마 역시 비슷한 결과를 보였다(Fig. 2B). NaOCl 무처리구 한라천마 종자는 96%이상(Fig. 2A), 애기천마 역시 96%이상(Fig. 2B) 생존하였지만 배의 비대와 발아는 전혀 일어나지 않음을 확인하였다(Table 1, Table 2). 한라천마 종자발아 시 적정 NaOCl 처리농도와 시간은 1%에서 30분 미만 처리할 경우인데 이는 생존율 90%, 배비대율 87%, 배비대율 대비 프로토크롬 형성율 91%의 높은 상관관계를 나타냈다(Table 2). 한편, 애기천마의 경우는 NaOCl 2% 또는 4%처리를 할 때 15분을 기점으로 급격하게 생존율이 감소되는 결과를 보였고(Fig. 2B), 2%에서 30분 이상 처리를 하면 붉은색의 염색부위가 관찰이 되지 않았다(Fig. 3D-E). 배비대율도 NaOCl 1%에서 30분간 처리했을 때 77%의 높은 성적을 보였지만(Table 1) 이후 발아는 3개월이 지나도 관찰되지 않았다. 한라천마의 배비대와 종자발아의 결과는 본 연구자가 수행한 광릉요강꽃, 털복주머니란, 복주머니란의 기내 종자발아시 NaOCl 처리는 배의 비대와 종자발아를 개선시키는 역할을 한다는 결과와 비슷한 결과를 보였다(Bae et al. 2009; Bae et al. 2010 Bae et al. 2011). 또한 Choi 등(1992)은 한국춘란의 종자를 관찰한 결과 미분화된 배는 주피가 변화한 종피에 싸여있음을 확인하였고, Bae 등(2010)은 NaOCl 처리가 복주머니란 종자의 종피를 파괴하여 발아율을 개선한다는 결과를 보고하였다.

Sodium hyperchloride(NaOCl)처리에 따른 배비대 및 종자 발아

NaOCl의 처리시간 및 농도에 따른 애기천마 배의 비대율과 발아율을 확인하기 위해 실험을 수행 한 결과 NaOCl의 처리시간은 30분, 처리농도는 1%로 조절하였을 때 배의 비대율이 77%로 가장 높았지만 발아는 이루어지지 않았다(Table 1). 한라천마의 경우 NaOCl 처리 시간별, 농

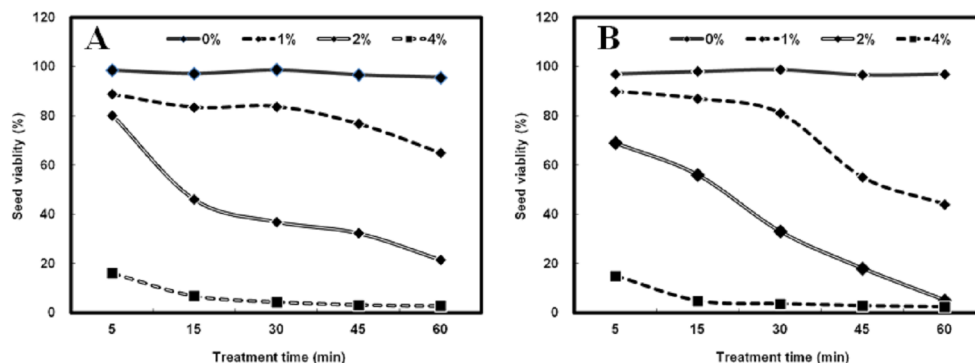


Fig. 2 Effects of NaOCl treated time and concentrations on seed viability of embryo from seed of *G. verrucosa* and *H. sikokian*. A: *G. verrucosa* mature seeds, B: *H. sikokian* mature seeds

**Table 1** Effect of treatment time and concentration of NaOCl on swelling formation and diameter of swelled embryo from seed of *H. sikokiana* after 12 weeks of culture on POM medium supplemented with sucrose 20 g/L and gerlite 3.0 g/L

Time of NaOCl (min)	NaOCl concentration (%)	Embryo stage	
		Swelling formation (%)	Diameter of swelled embryo ( $\mu\text{m}$ )
0	0	0	0
	1	0	0
	2	0	0
	4	0	0
	0	0	0
15	1	55 $\pm$ 4.4*d	22 $\pm$ 1.8e
	2	68 $\pm$ 5.3b	28 $\pm$ 2.2b
	4	66 $\pm$ 4.6c	27 $\pm$ 3.8bc
	0	0	0
30	1	77 $\pm$ 4.8a	33 $\pm$ 2.9a
	2	66 $\pm$ 8.7c	27 $\pm$ 3.6bc
	4	64 $\pm$ 6.6	28 $\pm$ 4.8bc
	0	0	0
45	1	68 $\pm$ 5.6b	29 $\pm$ 4.8b
	2	33 $\pm$ 6.3e	27 $\pm$ 5.6bc
	4	25 $\pm$ 3.8f	28 $\pm$ 2.9b
	0	0	0
60	1	12 $\pm$ 2.9g	25 $\pm$ 6.3d
	2	0	0
	4	0	0

\*Data are the means  $\pm$  SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncun's multiple range test at  $P < 0.05$ .

**Table 2** Effect of treatment time and concentration of NaOCl on swelling and protocorm formation from seed of *G. verrucosa* after 12 weeks of culture on POM medium supplemented with sucrose 20 g/L and gerlite 3.0 g/L

Time of NaOCl (min)	NaOCl concentration (%)	Embryo stage		Protocorm stage	
		Swelling formation (%)	Diameter of swelled embryo ( $\mu\text{m}$ )	Protocorm formation (%)	Diameter of protocorm ( $\mu\text{m}$ )
0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
15	1	58 $\pm$ 3.5*f	44 $\pm$ 6.9c	78 $\pm$ 3.7g	122 $\pm$ 11.9*d
	2	72 $\pm$ 3.6b	38 $\pm$ 8.9e	77 $\pm$ 5.8h	118 $\pm$ 18.9ef
	4	64 $\pm$ 6.3cd	52 $\pm$ 6.9b	82 $\pm$ 3.9f	106 $\pm$ 9.9g
	0	0	0	0	0
30	1	87 $\pm$ 8.8a	59 $\pm$ 8.9a	91 $\pm$ 5.6a	138 $\pm$ 17.8a
	2	61 $\pm$ 7.2e	44 $\pm$ 7.6c	88 $\pm$ 6.3b	135 $\pm$ 19.3b
	4	58 $\pm$ 5.9f	41 $\pm$ 6.3d	82 $\pm$ 7.2de	128 $\pm$ 15.3c
	0	0	0	0	0
45	1	67 $\pm$ 7.2c	36 $\pm$ 3.3f	83 $\pm$ 5.4d	119 $\pm$ 13.3ef
	2	54 $\pm$ 8.4g	44 $\pm$ 6.9c	87 $\pm$ 6.3bc	123 $\pm$ 16.7d
	4	48 $\pm$ 2.3h	38 $\pm$ 6.7e	78 $\pm$ 8.9g	118 $\pm$ 15.9ef
	0	0	0	0	0
60	1	22 $\pm$ 1.9h	32 $\pm$ 8.9g	79 $\pm$ 2.8g	119 $\pm$ 17.8ef
	2	0	0	0	0
	4	0	0	0	0

\*Data are the means  $\pm$  SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncun's multiple range test at  $P < 0.05$ .



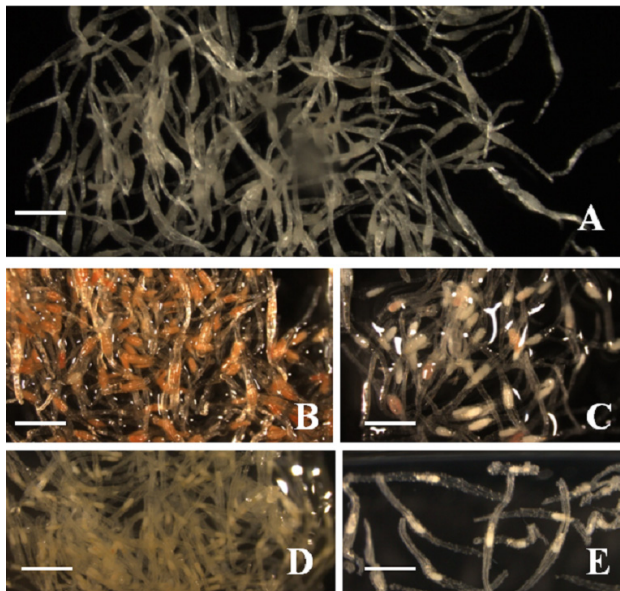
도별 실험을 통해 확인한 결과 Table 2와 같다. 애기천마와 마찬가지로 NaOCl 30분, 1% 처리시 99%의 배비대율과 비대율대비 발아율이 91%로 가장 높은 결과를 보였다. 이러한 결과는 난과 식물인 광릉요강꽃의 기내 배비대를 통한 종자발아율을 높이고자 하는 결과와 일치하며, NaOCl 처리를 통한 털복주머니란의 성숙종자의 기내 발아율 증가에 관한 연구와도 비슷한 결과를 보이는 것이다(Bae et al. 2009). 난과 식물은 아니지만 단자엽식물인 *Iris sanguinea*에서 종자의 발아 억제 물질을 타파하여 발아율을 높이고자 NaOCl 0, 1, 3, 5, 10%로 10분간 침지

한 것을 파종해 발아율을 조사한바 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다(Lee et al. 2002). 한편, 애기천마의 종자는 유백색으로 종자의 길이는 0.2 mm정도로 조사되었고(Fig. 3A), 고농도의 NaOCl(2% 이상)을 30분 이상 처리하게 되면 종자가 내부까지 완전히 흰색으로 탈색되는 것을 확인 하였다(Fig. 3E). 한라천마의 경우 NaOCl 1%에서 30분간 처리를 하면 Figure. 4B에서 보는 바와 같이 노란색을 띠는 배들이 관찰되고 이들은 2주 후 Figure. 4D에서 보는 바와 같이 부풀어 오르고 10주 후 노란색의 발아체들을 확인할 수 있었다(Fig. 4E).

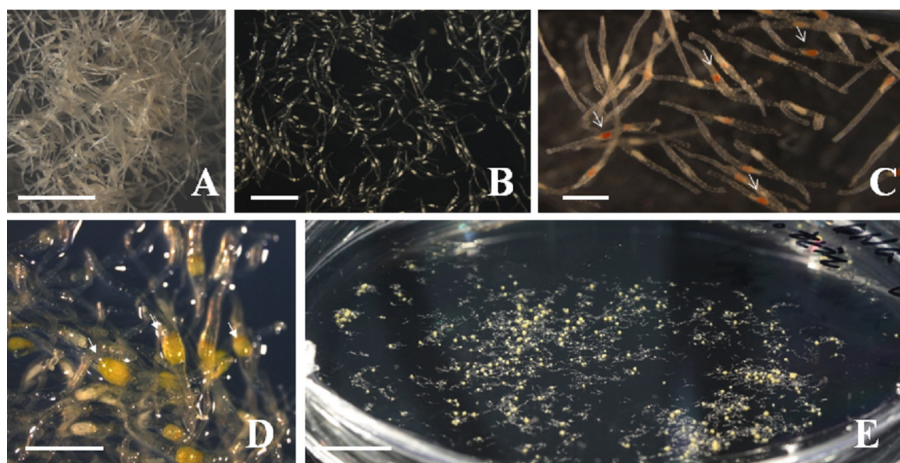
천마속은 난과인데 반해 식품학적 가치가 우수하여 식품학적 연구와 관련하여 다양한 연구결과들이 보고되고 있는데 애기천마와 한라천마는 국내외적으로 어떠한 연구도 진행된 바 없다. 따라서, 본 연구는 한라천마와 애기천마의 기내 배배양을 통한 증식 시 초기 발아에 미치는 NaOCl의 농도를 종자활력을 검증해 가며 연구를 수행한데 가치가 있다고 사려 된다. 이러한 연구결과는 향후 이들 종의 증식에 중요한 기초자료로 활용될 것으로 사료된다.

**적 요**

본 실험은 TTC테스트를 통해 난과식물인 한라천마(*G. verrucosa* Blume)와 애기천마(*H. sikokiana*)의 종자기내배양시 NaOCl의 적정 처리시간과 농도조건을 확립한 결과이다. TTC테스트를 통한 종자활력은 애기천마의 경우 무처리구에서 95%이상 높았지만 배비대율, 비대배 직경과의 상관관계를 분석해보면 1%에서 30분간 처리 할 경우 종자활력대비 배비대율 77%, 배직경 33 μm로 가장 높게 나타났다. 한라천마 역시 종자활력, 배비대율, 배직경



**Fig. 3** Seed viability test of embryo from seed of *H. sikokiana*. A: Seeds of *H. sikokiana*, B: Treated 1% NaOCl 5 min, C: Treated 1% NaOCl 30 min, D: Treated 1% NaOCl 45 min, E: Treated 1% NaOCl 60 min. Scale bars, 20 μm



**Fig. 4** Germination of mature seed from *G. verrucosa*. A: control (after 8 weeks of culture), B: 1% NaOCl treated 5 min, C: Seed viability test of embryo from seed of *G. verrucosa*. D: Germinated embryos from swelled embryos cultured POM medium after 12 weeks. E: Development of germinated embryos of *G. verrucosa*. Arrows were survival seed in 1% NaOCl (30 min). Scale bars, 20 μm

비대, 프로토크롬 형성, 프로토크롬직경 비대의 상관관계를 분석하면 1% NaOCl을 30분간 처리할 경우 최종적으로 종자활력대비 배비대율 87%, 배직경 59  $\mu\text{m}$ , 프로토크롬의 형성율이 91%, 프로토크롬 직경 138  $\mu\text{m}$ 로 다른 처리구에 비해 높게 나타났다. 이상의 결과는 국내외적으로 연구된 바 없는 애기천마와 한라천마의 종자 기내배양 시 발아율을 개선하기 위한 중요한 기초자료로 활용될 것이고 더 나아가 자생 생물소재를 활용한 연구의 소재확보의 가능성을 제시하는 결과이다.

## 사 사

본 연구는 환경부 차세대환경기술개발사업(project no. 052-091-075)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Bae KH, Choi YE (2011) Factors affecting fruit bearing in natural habitat and *in vitro* culture of zygotic embryos of *Cypripedium japonicum*. Prog Ornament Plant 11:146-152
- Bae KH, Kim CH, Sun BY, Choi YE (2010) Structural changes of seed coats and stimulation of *in vitro* germination of fully mature seeds of *Cypripedium macranthos* Swartz by NaOCl pretreatment. Prog. Ornament. Plant 10:107-113
- Bae KH, Kwon HK, Choi YE (2009) *In vitro* germination and plantlet conversion from the culture of fully mature seeds of *Cypripedium guttatum* Swartz. Prog. Ornament. Plant 9:160-165
- Chang HM, But AD (1986) Pharmacology and Application of Chinese Materia Medica, Vol I World Scientific Singapore pp 185
- Choi SO, Chung JD, Chang MW (1992) A scanning electron microscopic observation from seed germination to seedlings stage of *Cymbidium goeringii* Reichench. Kor J Soc Hort Sci 33:190-195
- Huang ZL (1985) Pharmacology studies and clinical applications of *Gastrodia elata* Bl. Journal of Modern Development Traditional Media 5:251-254
- Kim CS, Kang YJ, Song G, Moon MO (2006) The vascular plants in Mt. Hanlla. Jeju pp 59-141
- Kim JW, Park YM, Lee EJ, Jae JG, Choi KR (2006) A primer of conservation biology (3rd ed.). Sinauer Associates Inc and World Science Publishing Co
- Kusano S (1911) *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. J Agric Coll Tokyo 4:1-66
- Lee EJ, Koh JC (2002) Improvement of seed germination in native *Iris sanguinea* donn ex horn. Kor J Hort Sci Technol 20: 345-351
- Lee JS (2007) Taxonomy of Orchideae and distribution of Orchidaceae in Korea. PhD thesis, Inha University, Incheon
- van Waes JM, Debergh PC (1986) *In vitro* germination of some Western European orchids. Physiol Plant 67:253-261