

최 중
연구보고서

식충식물의 항균물질 탐색 및
그를 이용한 식물병방제 보조자재 개발
Investigations on the antifungal substances of
carnivorous plants and development of an agent
for plant disease control

충 북 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식중식물의 항균물질 탐색 및 그를 이용한 식물병방제 보조
자재 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 충북대학교

총괄연구책임자 : 차 병 진

협동연구기관명 : 대전대학교

협동연구책임자 : 신 광 수

협동연구기관명 : (주)원바이오

협동연구책임자 : 최 수 영

요 약 문

I. 제 목

식충식물의 항균물질 탐색 및 그를 이용한 식물병방제 보조자재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

식충식물들의 추출물로부터 주요 작물 병원균에 항균력을 보이는 물질을 선별하여 동정하고 작용기작을 밝히며, 식충식물의 대량배양법을 개선하고 기내 배양법을 확립함으로써 식충식물 추출물을 이용하여 주요 작물 병을 환경친화적으로 방제할 수 있는 생물적 방제제를 개발하는 것이 본 연구의 목표다.

III. 연구개발 내용 및 범위

식충식물 추출물의 식물병원균 항균력 및 기주식물 저항성 유도능력을 검정하기 위하여 네펜데스, 끈끈이주걱, 파리지옥 등 다양한 식충식물의 조추출물을 이용하여 주요 병원균에 대한 항균력 및 식물 저항성 유도능력과, 이들을 식물에 처리하였을 때 식물생육에 미치는 여러 가지 영향을 확인하였으며, 식충식물 추출물이 가장 높은 방제효과를 낼 수 있는 처리방법을 탐색하였다.

식물병원균광이와 세균에 항균성인 물질을 분리 동정하고 기작을 연구하기 위하여 항균성을 보이는 식충식물 조추출물로부터 항균활성 물질 및 저항성 유도물질이 plumbagin을 순화하고 동정하였으며, 항균활성 및 저항성 유도물질의 대량분리법을 탐색하여 생물적 방제제의 개발에 필요한 자료들을 제공하였다.

식충식물의 대량생산법을 개선하고 병방제자재를 개발하기 위하여 항균성 물질을 생산하는 식충식물들의 재배 최적조건을 개선하는 한편, 새로운 식충식물 자원도 탐색하였다. 항균성을 보이는 식충식물의 재배방법 및 재배조건들을 달리 하며 항균성의 변화여부를 검정함으로써 항균물질 생산 최적조건을 찾아내고, 대량배양법을 확립하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

2건의 특허를 등록하고 SCI급 국제학회지에 2편의 논문을 발표하였다.

SUMMARY

To investigate the antifungal activity for phytopathogenic fungi and the ability to induce the resistance of plants to diseases, candidate substances were extracted crudely from several carnivorous plants including *Nepenthes* spp., *Dionaea* spp., *Pinguicula* spp. and *Drosera* spp. Those activity and their effects on the growth of plants were examined both in the greenhouse and the laboratory. In addition, the application methods to result the best control efficacy was investigated, too. Among the carnivorous plants, *Nepenthes* spp. showed the strongest antifungal activity. From the crude sap of *Nepenthes ventricosa* x *maxima*, a certain antifungal substance was purified and identified by using GC–mass and HPLC. The substance was a 'plumbagin' which was usually isolated from *Plumbago* spp. Plumbagin is already known as an antifungal substance for human use. However, little work was done on the application of this substance to agriculture. During the research, one of the characteristics of plumbagin, volatility, caused some problems in the application of it to the plants. This limitation should be solved prior to develop biocontrol agent with plubagin. Many species of carnivorous plants including *Nepenthes* spp. and *Drosera* spp. regenerated well in tissue culture systems. Almost all parts of the plant could be regenerated if the environment condition such as a medium, nutrient, and light are suitable for them. In the growth test, stems and roots showed different responses to the environment conditions in tissue culture systems. The plantlets from tissue culture systems adapted quite well to the soil–culture system.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	1
I. Objective of the research	1
II. Importance of the research	1
III. Scope of the research & development	2
Chapter 2. Current status of domestic and foreign technology	4
I. Current status and issue of domestic technology	4
II. Current status and issue of foreign technology	5
Chapter 3. Results of the research	6
I. Antifungal activity and the ability of carnivorous plant extracts on phytopathogenic fungi and inducing host resistance	6
1. Carnivorous plants and phytopathogenic fungi	6
2. Crude extraction of carnivorous plant sap	8
3. Antifungal activity of crude sap of carnivorous plants	9
4. Antifungal activity of crude sap of carnivorous plants on <i>Rhizoctonia</i> spp.	18
5. Antifungal activity of crude sap of carnivorous plants on <i>Fusarium oxysporum</i>	20
6. Ability of carnivorous plants crude sap to induce resistance on host plants	22
7. Effect of purified plumbagin on phytopathogen and plant diseases	23
II. Isolation and identification of carnivorous plants extracts antagonistic to plant pathogens	30
1. Extraction of antifungal crude sap from carnivorous plants	30
2. Antifungal activity assay of crude extracts	31
3. Purification of antifungal substances of carnivorous plants	32
4. Identification of antifungal substances	34
5. Antifungal activity assay for major plant pathogens	36
6. Selection of antifungal substances and carnivorous plants	

which produce the substances	37
III. Establishment of mass-production system for carnivorous plants and the development of biocontrol materials	38
1. Investigaion of cultural conditions for carnivorous plants	38
2. Optimum cultural conditions for carnivorous plants	50
3. Collection and culture of new carnivorous plant germplasms	55
4. In vitro culture of carnivorous plants	58
5. Outdoor culture of tissue-cultured carnivorous plants	78
Chapter 4. Achievement of objective and the effect on related field	79
1. Analyses of overall achievement of objective and the effect on technology development of related fields	79
2. Achievement of research development goal	80
3. Published papers	81
4. Registration of the patents	83
Chapter 5. Application of research development results	85
Chapter 6. Collected informations on foreign sciences and technologies	86
Chapter 7. References	87

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1절 연구개발의 목적	1
제 2절 연구개발의 필요성	1
1. 기술적 측면	1
2. 경제·산업적 측면	2
3. 사회·문화적 측면	2
제 3절 연구개발의 범위	2
1. 식충식물 추출물의 식물병원균 항균력 및 기주식물 저항성 유도능력 검정	2
2. 식물병원균광이와 세균에 항균성 물질의 분리 동정 및 항균 기작 연구	3
3. 식충식물의 대량생산법 개선 및 병방제자재 개발	3
제 2 장 국내외 기술개발 현황	4
제 1절 국내 기술현황과 문제점	4
제 2절 국외 기술현황과 문제점	5
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	6
제 1절: 식충식물 추출물의 식물병원균 항균력 및 기주식물 저항성 유도능력 검정	6
1. 식충식물과 주요 식물병원균	6
2. 식충식물의 조즙액 추출	8
3. 식충식물 조즙액의 항균력 (<i>in vitro</i> 시험)	9
4. 모잘록병균에 대한 식충식물 추출물의 항균력	18
5. 오이 덩굴쪄김병균에 대한 식충식물 추출물의 항균력	20
6. 식충식물 추출물의 저항성 유도능력 검정	22
7. 정제한 plumbagin이 식충병원균 및 병발생에 미치는 영향	23
가. <i>In vitro</i> 역가검정 및 MIC 측정	23
나. Plumbagin의 <i>in vivo</i> 치료효과 검정	24

다. Plumbagin의 <i>in vivo</i> 저항성 유도효과 검정	28
제 2절: 식물병원균에 항균성인 식충식물 추출물의 분리 동정 및 항균기작 연구	30
1. 식충식물 유래 항균활성물질 조추출액 제조	30
2. 조추출물의 항균력 검정	31
3. 식충식물 유래 항균물질의 순화	32
4. 항균물질의 동정	34
5. 주요 식물병원균에 대한 항균활성 검정	36
6. 타 항균물질 생산 식충식물 및 항균물질 탐색	37
제 3절: 식충식물의 대량생산법 개선 및 병 방제자재 개발	38
1. 식충식물별 재배조건 탐색	38
가. 파리지옥 <i>Dionaea</i> spp.	38
나. 끈끈이주걱 <i>Drosera</i> spp.	44
다. <i>Sarracenia rubra</i>	49
2. 식충식물별 최적 재배조건 탐색	50
가. 파리지옥 <i>Dionaea muscipula</i>	50
나. 끈끈이주걱 <i>Drosera filiformis</i>	52
다. <i>Sarracenia purpurea</i> 'red tube'	52
라. <i>Sarracenia purpurea</i>	53
마. <i>Brochinia reducta</i>	54
바. <i>Darlingtonia californica</i>	54
3. 새로운 식충식물 유전자원 확보 및 재배	55
가. 끈끈이주걱 <i>Drosera</i> 속 식물 (30 분류군)	55
나. 벌레잡이제비꽃 <i>Pinguicula</i> 속 식물 (7 분류군)	56
다. 파리지옥 <i>Dionaea</i> 속 식물 (21 분류군)	56
라. 네펜데스 <i>Nepenthes</i> 속 식물 (10 분류군)	57
마. 그 외 유망 식충식물들 (29 분류군)	57
4. 식충식물별 기내 대량번식법	58

가. <i>Darlingtonia californica</i>	58
나. <i>Heliophora minor</i>	64
다. 벌레잡이제비꽃 <i>Pinguicula moranensis</i>	69
5. 식충식물별 기내식물의 기외 이식	78
가. <i>Heliophora minor</i>	78
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	79
1. 전반적인 목표 달성도 분석 및 관련 분야 기술발전예의 기여도	79
2. 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도	80
3. 학회지 발표 논문	81
4. 특허 등록	83
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	85
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	86
제 7 장 참고문헌	87

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

식중식물들의 추출물로부터 주요 작물 병원균에 항균력을 보이는 물질을 선별하여 동정하고 작용기작을 밝히며, 식중식물의 대량배양법을 개선하고 기내 배양법을 확립함으로써 식중식물 추출물을 이용하여 주요 작물 병을 환경친화적으로 방제할 수 있는 생물적 방제제를 개발하는 것이 본 연구의 목표다.

제 2절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

유전적 특성이 비슷한 식물의 대량재배는 반드시 병의 대발생으로 이어지기 때문에 식물병리학에서는 가급적이면 피해야 하는 것으로 규정하고 있는 재배법이다. 그러나 수확에 대한 우려와 농작업의 편리성 등으로 인하여 실제 농업에 종사하는 농민들이 선택하는 품종은 작물별로 정해져 있는 까닭에 전국적으로 봐도 어떤 품종이든지 재배되는 품종은 불과 몇에 지나지 않는다. 따라서, 이들 작물에 병이 대량으로 발생할 가능성은 매우 높은 현실이다. 실제로 작물 재배지에서 수많은 병해충이 발생하고 있으며, 현재 이러한 문제를 해결하기 위하여 거의 전적으로 합성 살균제 사용에 의존하고 있다.

그러나 합성살균제의 과다사용은 환경생태계에 악영향을 미치고 농가의 경제적 부담을 가중시킬 뿐만 아니라, 저항성 균주의 출현을 조장하여 기존 살균제의 효과를 떨어뜨리고 있으며, 그에 따라 병 방제가 더욱 어려워지고 있으므로 새로운 방제방법 또는 수단에 대한 요구는 날로 커지고 있다. 특히 요즈음에 빠른 속도로 그 면적이 확대되고 있는 무농약 재배 및 유기농업에 있어서는 기존의 합성농약을 대체할 수 있는 물질 또는 수단의 개발이 절실한 실정이다.

따라서, 천연 자재로부터 병 방제용 물질을 개발하고 그것을 추출하여 사용할 수 있다면 환경에 대한 부담이 거의 없고, 특히 저항성균주 출현가능성을 낮추어 고품질 청정 농산물 생산에 큰 도움을 줄 수 있을 것이다.

2. 경제·산업적 측면

현대 농업에서는 작물을 안정적으로 생산하기 위하여 화학적 방제에 많은 비용을 지출하고 있으며, 그 결과 유기합성 살균제의 사용량은 꾸준히 늘고 있다. 그러나 합성살균제의 사용 대신에 환경친화적인 천연 병방제자재를 개발하여 사용한다면 유기합성 살균제의 사용량을 대폭 줄일 수 있으므로 청정 작물 생산은 물론 외화 절약에도 큰 기여를 할 수 있다.

현재 우리나라의 생물적 방제제 연구 및 생산기술은 선진국과 비교하여 큰 차이를 보이고 있지 않으므로 이 분야에 대하여 집중적으로 연구하고 개발한다면 생물적 방제제 산업을 국제적으로 이끌어 갈 토대를 마련할 수도 있을 것으로 기대한다.

식층식물의 경우, 항암성이나 항충성, 동물병원성 곰팡이 및 세균에 대한 항균성 등에 대한 연구는 다소 이루어졌으나 식층식물로부터 식물 병방제제를 개발하는 것은 아직까지 보고 된 바 없으므로 본 연구를 수행함에 따라서 우리나라가 그 분야 연구를 선도할 수 있는 가능성도 있다.

3. 사회·문화적 측면

국민소득 향상과 환경에 대한 관심의 증가에 따라 소비자들은 깨끗하고 안전한 먹을거리에 대한 욕구가 날로 증가하고 있다. 현재 우리나라를 비롯한 세계 각국에서 주요 경제작물의 안정된 생산을 위하여 엄청난 양의 유기합성 살균제를 사용하고 있는데, 그 결과 환경에 다양한 부작용이 나타나고 있는가 하면, 특히 농산물에 대한 소비자들의 불신이 날로 커가고만 있다.

이러한 상황에서 만약 천연물로부터 식물병방제제를 개발하여 병을 방제할 수 있다면 그것은 환경친화적으로서 고품질 청정 농산물을 찾는 소비자들을 끌어당기는 매력적인 요소가 될 것이다.

제 3절 연구개발의 범위

1. 식층식물 추출물의 식물병원균 항균력 및 기주식물 저항성 유도능력 검정

다양한 식층식물들의 조추출물을 이용하여 주요 병원균에 대한 항균력 및 식물 저항성 유도능력을 검정하며, 이들을 식물에 처리하였을 때 식물생육 및

여러 가지 토양 특성에 미치는 영향을 확인한다. 또, 식충식물 추출물이 가장 높은 방제효과를 낼 수 있는 처리방법을 탐색한다.

2. 식물병원곰팡이와 세균에 항균성 물질의 분리 동정 및 항균 기작 연구

항균성을 보이는 식충식물 조추출물로부터 항균활성 물질 및 저항성 유도물질을 순화하고 동정하며 작용기작을 알아낸다. 또한, 항균활성 및 저항성 유도물질의 대량분리법을 탐색하여 생물적 방제제의 개발에 필요한 자료들을 제공한다.

3. 식충식물의 대량생산법 개선 및 병방제자재 개발

항균성 물질을 생산하는 식충식물들의 재배 최적조건을 개선하는 한편, 새로운 식충식물자원도 탐색한다. 항균성이 인정된 식충식물의 재배방법 및 재배조건들을 달리하며 항균성의 변화여부를 검정함으로써 항균물질 생산 최적조건을 찾아내고, 대량배양법을 확립한다. 마지막으로, 항균물질의 추출법을 확립하며, 추출물의 보존성 향상연구 등을 통하여 생물적 방제제의 시제품을 생산하고 효과를 검정한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내 기술현황과 문제점

식물 병에 대한 생물적 방제에 대한 연구는 상당히 오래 전에 시작 되었으나 생물적 방제제의 개발이 본격적으로 연구되기 시작한 것은 환경에 대한 스트레스와 인축에 대한 안정성 등이 관심을 끌기 시작한 약 30년 전의 일이다. 국내에서는 이 보다 약간 늦어 1980년대 후반부터 생물적 방제에 대한 연구가 태동하기 시작하여 1990년대에 들어오면서 활발하게 진행되었다. 그 결과 병 방제용으로 특허등록 되어 있는 미생물 균주의 수는 수 천 종에 이르고 있다. 초기에는 농촌진흥청 농업과학기술원과 대학교 등을 중심으로 연구가 진행되었으나, 최근에는 그린바이오텍(주), (주)휴살림 등 여러 벤처기업이 생물적 방제의 연구와 실용화에 참여하고 있다. 생명공학연구소 생물소재센터, 동부한농(주) 등에서도 생물농약에 많은 관심을 가지고 개발 또는 생산 중에 있다. 대학은 현재 거의 모든 곳에서 연구한다고 할 수 있을 정도로 생물적 방제는 이제 매우 중요한 분야가 되었다.

국가적으로는 2001년에 이미 생물농약등록 기준이 마련되어 생물농약의 연구 개발 및 실용화에 박차를 가하는 계기가 되었으며, 친환경농업육성법을 필두로 관련 규정들은 생물농약의 중요성을 더욱 확실하게 인식시키는 지렛대가 되고 있다.

현재 우리나라에서 생산되는 미생물제는 수백 종에 이르며, 이를 생산하는 회사도 수 십 군데 이상인 것으로 추산되고 있다. 하지만, 거의 대부분은 생물농약으로 정식 등록되지 않은 것들이며, 그 효과에 대한 검증이 정확하게 이루어진 바도 없어, 앞으로 이들에 대한 정비가 필요한 상황이다.

다행이도 2004년에 들어서 천연물을 주성분으로 한 생물농약의 기준이 마련되어 앞으로 이 분야의 연구 개발이 활성화 될 것으로 기대를 모으고 있다. 그러나 본 연구의 결과와 직접적으로 관련이 있는 천연물을 주성분으로 한 제품들은 생화학농약으로 분류되고 있으며, 이 분야에 대한 개발 연구는 미생물살균제에 대한 연구 및 개발에 비하여 상대적으로 적은 편이다. 그 이유는 생화학농약의 경우에 미생물농약에 비하여 등록에 소요되는 비용이 더 크며, 연구 개발도 더 어렵기 때문이다.

유기농업과 무농약재배가 활성화 되면서 지금도 실제로 많은 농가가 식물을 원료로 한 영양액을 자체제조하여 사용하고 있으며, 일부는 병해충 방제효과를 주장하고 있다. 따라서, 이 분야에 대하여 좀 더 폭넓게 연구한다면 식물을 이용하여 병방제용 유용자재를 개발해 낼 수 있는 가능성은 아직도 많다고 할 수 있다.

본 연구에서는 식충식물인 네펜데스로부터 몇 가지 식물병원균에 길항력을 보이는 물질인 plumbagin을 분리하여 SCI급 우수 학회지들에 결과를 발표하였으며 두 건의 특허를 등록하는 성과를 올렸다. 또한 plumbagin을 생산하는 네펜데스를 대량생산할 수 있는 기반을 마련하였으며, 이들을 제형화하고 실제 병방제 효과를 검증하였다.

제 2절 국외 기술현황과 문제점

식물병의 생물적 방제에 대해서는 지금까지 세계적으로 많은 연구가 이루어져 왔으나 대부분 길항미생물을 이용한 것이었다. 천연물을 이용한 방제제 개발연구도 많은 수행되어 왔으며, 일부에서는 좋은 결과를 얻기도 하였다. 그러나 식충식물로부터 식물병원균 억제물질을 탐색하는 연구는 거의 없었다.

현재까지 알려진 식충식물의 효능은 항암성, 항충성, 그리고 항균성 등이나, 이 모든 것이 주로 사람의 병을 대상으로 연구가 진행되고 있다. 이는 식충식물이 예로부터 세계 여러 곳에서 사람의 병을 다스리는 민간처방으로 사용되어 왔기 때문이다.

식물로부터 유용성분을 탐색하고 분리해 내는 기술은 오래 전부터 사용되어 왔으므로 현재 상당 수준에 올라가 있다. 또한, 이 물질의 정제와 동정 기술도 매우 발전되어 있다. 하지만, 이러한 부분의 기술수준은 우리나라도 충분히 경쟁할 수 있을 정도의 능력을 갖추고 있다.

식충식물을 이용한 식물병 방제에 대한 연구는 선진외국도 우리나라와 마찬가지로 이제 시작단계이므로 선진외국과 충분히 어깨를 견줄만한 수준이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절: 식충식물 추출물의 식물병원균 항균력 및 기주식물 저항성 유도능력 검정

1. 식충식물과 주요 식물병원균

식충식물 추출물의 항균효과를 검정하기 위하여 현재까지 우리나라에 알려져 있는 2과 6속 14종 중에서 우선 일반적으로 많이 알려져 있는 끈끈이주걱 (*Drosera rotundifolia*)과 벌레잡이제비꽃(*Pinguicula vulgaris* var. *macroceras.*), 그리고 도입종으로서 시판되고 있는 파리지옥(*Dionaea* sp.)과 네펜테스(*Nepenthes ventricosa* x *maxima*) (이상 그림 1, 표 1)의 식물체 또는 신선한 조직을 제2협동과제 기관인 원바이오(주)의 식충식물원과 충북대학교 원예과학과 야생화실험실(교수 이철희)로부터 분양 받아 사용하였다.



끈끈이주걱
Drosera rotundifolia



벌레잡이제비꽃
Pinguicula vulgaris var. *macroceras*



파리지옥
Dionaea sp.



네펜테스
Nepenthes ventricosa x *maxima*

그림 1. 본 실험에서 주로 사용한 식충식물.

Table 1. 본 연구에 사용한 식충식물

일반명과 속명	종 명	출 처
끈끈이주걱 <i>Drosera</i>	<i>adelae</i>	야생화연구실
	<i>aliciae</i>	야생화연구실
	<i>binata</i>	야생화연구실
	<i>capensis</i>	야생화연구실
	<i>filiformis</i>	(주)원바이오, 야생화연구실
	<i>nidiformis</i>	야생화연구실
	<i>rotundifolia</i>	야생화연구실
	<i>tokaiensis</i>	야생화연구실
파리지옥 <i>Dionaea</i>	<i>muscipula-Red</i>	(주)원바이오, 야생화연구실
	<i>muscipula</i>	야생화연구실
네펜테스 <i>Nepenthes</i>	<i>ventricosa</i>	(주)원바이오, 야생화연구실
벌레잡이제비꽃 <i>Pinguicula</i>	<i>ehlersae</i>	(주)원바이오, 야생화연구실
- <i>Brocchinia</i>	sp.	야생화연구실
- <i>Darlingtonia</i>	<i>californica</i>	야생화연구실

식충식물은 온실에서 재배하며 필요할 때마다 적당량을 채취하여 사용하였으며, 양이 충분치 않아서 조직으로 받은 식충식물은 초저온급속냉동(-70℃)하여 보관하며 필요할 때마다 적당량을 꺼내어 마쇄한 후 다음과 같은 방법으로 물질을 분리하여 사용하였다. 그러나 식충식물 중 *Darlingtonia*는 시험 초기에 양이 부족하여 충분한 시험을 하지 못하였다.

식충식물 추출물의 항균성을 검정할 대상 병원균으로는 본 실험실에서 분리하여 보관하고 있는 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum*)과 고추 역병균(*Phytophthora* spp.), 여러 식물의 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 밤나무 줄기마름병균(*Cryphonectria parasitica*) 등 4종과 농촌진흥청 한국농업미생물 지원센터(KACC)에서 분양받은 각종 식물의 모잘록병균(*Rhizoctonia solani* AG-1), 사과나무 점무늬낙엽병균(*Alternaria alternata*), 오이 덩굴쪼김병균

(*Fusarium oxysporum* f. sp. *oxysporum*), 벼 잎집마름병균(*Bipolaris oryzae*) 등 모두 8종을 사용하였다(표 2). 병원균들은 모두 사면배지법과 증류수보관법으로 보관균주를 만들어 유지 보존하고 있으며 필요할 때마다 일부를 배양하여 각각의 기주식물에 접종하여 활성을 되찾게 한 다음 다시 분리하고 배양한 균주를 사용하였다.

Table 2. 본 연구에 사용한 병원균

학명	기주	병명	출처
<i>Colletotrichum dematium</i>	고추	탄저병	충북대 식물학과
<i>Phytophthora capsici</i>	고추	역병	충북대 식물학과
<i>Botrytis cinerea</i>	토마토	챗빛곰팡이병	충북대 식물학과
<i>Cryphonectria parasitica</i>	밤나무	줄기마름병	충북대 식물학과
<i>Phytophthora nicotianae</i>	토마토	역병	KACC
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	오이	덩굴썩김병	KACC
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1	유묘	모잘록병	KACC
<i>Pyricularia grisea</i>	벼	도열병	KACC

2. 식충식물의 조즙액 추출

한편 식충식물은 끈끈이주걱(*Drosera*), 벌레잡이제비꽃(*Pinguicula*), 파리지옥(*Dionaea*), 네펜데스(*Nepenthes*) 등 식충식물의 식물체 전체(잎, 줄기, 뿌리)를 30g씩 채취하여 methanol 500 ml를 첨가하고 homogenizer로 갈아서 24시간 동안 교반한 후 여과지를 깔은 깔때기를 통과시키는 방법으로 여과하였다. 여과액은 40℃에서 감압농축기(rotary evaporator)로 농축한 후 dimethylsulfonate (DMSO) 8 ml를 넣어 충분히 씻어내고 그 추출액을 유리병에 담아 실온에 보관하며 사용하였다. 이 때 즙액 중 일부는 그대로 사용하며, 일부는 고압멸균(autoclave)하여 사용하고, 또 다른 일부는 세균여과기(membrane filter, pore size 0.22 um)로 여과하여 사용하였다.

3. 식충식물 조즙액의 항균력 (*in vitro* 시험)

확보한 식물병원균팡이들은 모두 일반적인 감자한천배지(potato dextrose agar medium: PDA)에서 잘 자라는 것들이었으므로 이들을 PDA에 키우며 추출물의 항균력을 검정하였다. 우선 앞에서 설명한 바와 같이 추출한 추출액을 1000ppm이 되도록 첨가하여 PDA를 조제하고 그 위에 지름 5 mm cork borer로 채취한 각 병원균 균사절편을 올려놓고 25℃ 항온기에서 배양하며 균총의 형성과 크기를 조사하였다.

추출물의 항균효과는 처리 후 3일째와 6일째에 조사하였는데, 시간이 지나면서 추출물의 항균효과는 뚜렷하게 구분되었다(그림 2). 즉, 시간이 경과하면서 식충식물 추출물 처리구는 무처리구에 비하여 균총의 크기가 확실히 작았다. 그러나 파리지옥(*Dionaea*)과 끈끈이주걱(*Drosera*)은 벼 잎집무늬마름병원균(*Bipolaris oryzae*)에 대해서만 어느 정도 효과를 보였을 뿐, 나머지에 대해서는 뚜렷한 억제효과를 보이지 않았다. 반면에 네펜데스(*Nepenthes*)와 벌레잡이 제비꽃(*Pinguicula*)은 시험에 사용한 균 중 고추 역병균, 고추 탄저병균, 오이 덩굴쪄짐병원균, 잿빛곰팡이병원균 등에 대하여 뚜렷한 억제효과를 보이고 있었다. (그림 2). 이들 병원균에 대해서는 처리 후 3일째나 6일째나 균총의 크기에 별 차이가 없으며, 3일째에는 무처리구를 비롯하여 다른 처리구들과 큰 차이가 없으나 6일째에는 확실한 차이를 보이는 것으로 미루어 병원균의 생육억제력이 늦게 나타나는 것으로 보인다.

이상의 연구에서 식충식물의 종류와 병원균의 종류에 따라서 억제효과가 다르게 나온다는 사실이 확인되었으므로, 병원균 생육억제력이 더 뛰어난 식충식물을 선별하기 위하여 식충식물의 종류를 더 확대하여 다음 실험을 진행하였다. 대상 식충식물은 *Drosera* spp. 8종(*D. adaelae*, *D. aliciae*, *D. binata*, *D. apensis*, *D. filliformis*, *D. nidiformis*, *D. rotundifolia*, *D. tokaiensis*)과 *Dinaea* spp. 2종(*D. muscipula*-Red, *D. muscipula*)과 *Brocchinia* sp., *Nepenthes ventricosa*, *Darlingtonia californica*, *Pinguicula ehlersae* 등 모두 14종이었으며, 추출액 추출방법 및 항균력 검정을 위한 추출물 처리방법은 앞에서 설명한 것과 동일하였다. PDA 배지에 첨가한 추출물의 농도는 배지 당 1,000 ppm이었으며, PDA 위에 지름 5 mm의 병원균 균사조각을 접종하고 3일과 5일째에 균총의 크기를 조사하여 균생장 억제력을 조사하였다.

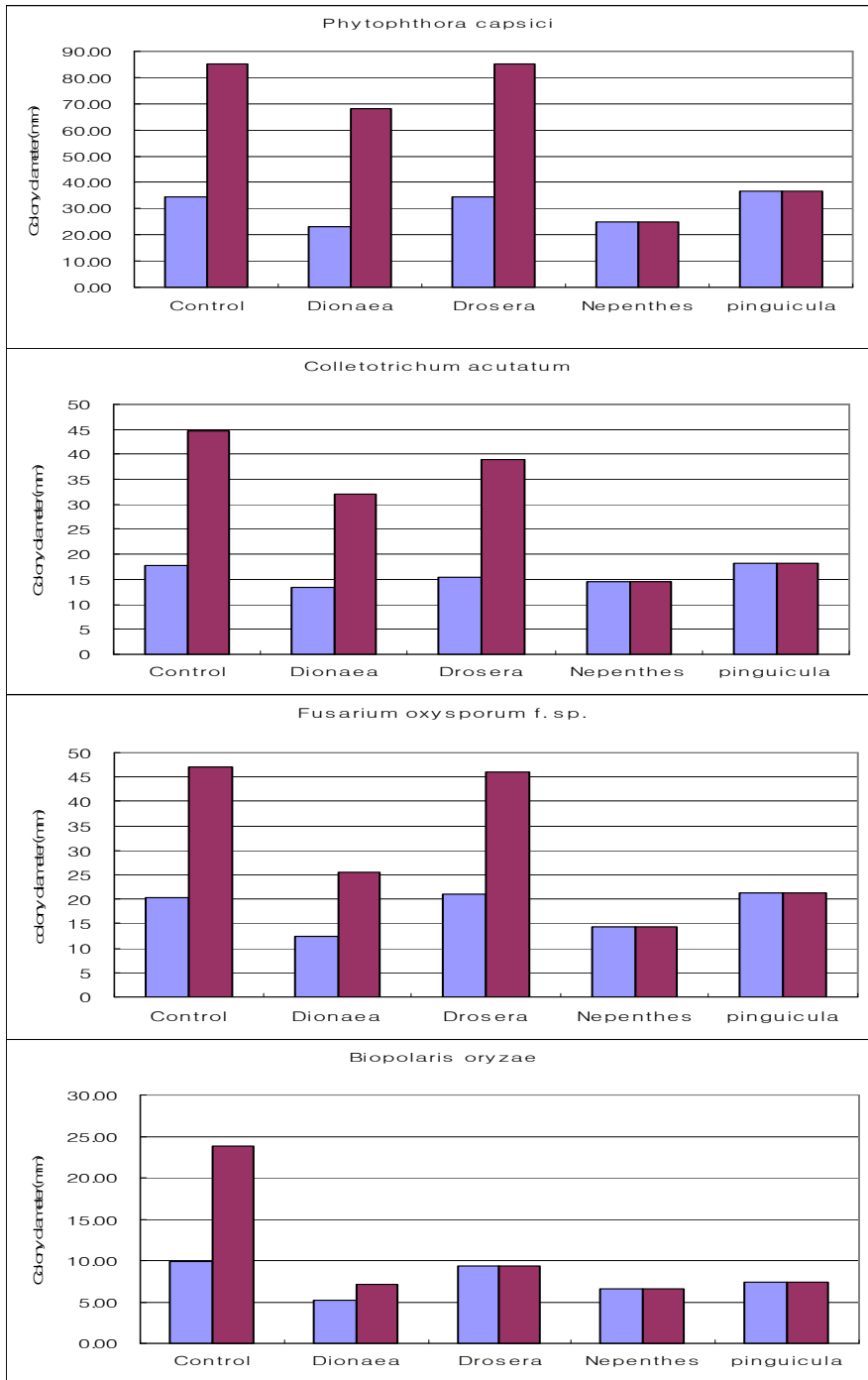


그림 2. 식충식물 추출물의 식물병원균 성장 억제효과(3일째, 6일째).

그러나 아쉽게도 본 실험에서 검정한 대부분의 식충식물들이 별다른 항균력을 보이지 않았다. 일부 식충식물 추출물이 특정 병원균에 대하여 항균력을 보이기는 하였으나 그 경우에도 항균력이 그리 크지는 않았다. 대부분의 경우 처음부터 차이가 없거나, 또는 초기에는 차이를 보인다고 하여도 처리 후 5일이 지나면 대조구와 비교하여 아무런 차이를 보이지 않았다. 하지만, 이들과는 달리 일부 파리지옥 DM-11 (*Dionaea muscipula-Red*)과 DM-15 (*D. muscipula*), 그리고 네펜데스 N-9 (*Nepenthes ventricosa*) 등 세 품종은 *Colletotrichum dematium*을 제외한 대부분의 식물병원균에 대하여 상당한 정도의 균사생장억제력을 보이고 있어 생물적 방제제로의 개발 가능성을 보여주고 있었다(그림 3).

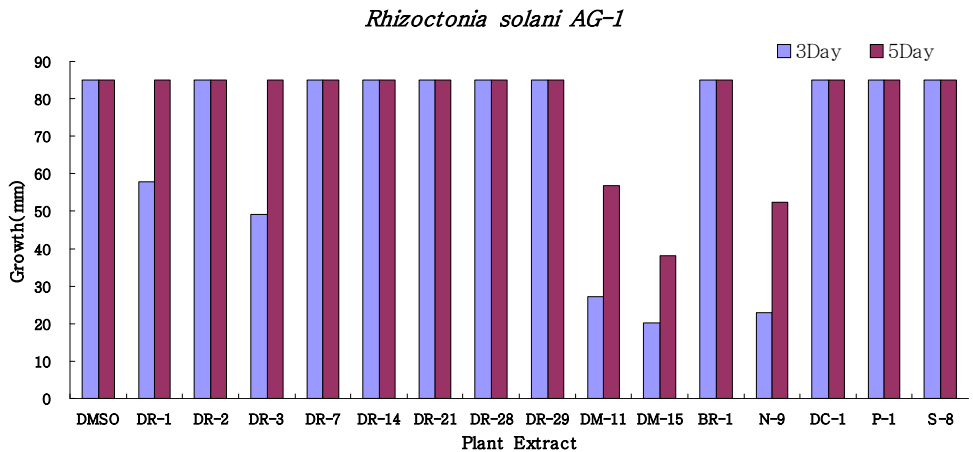
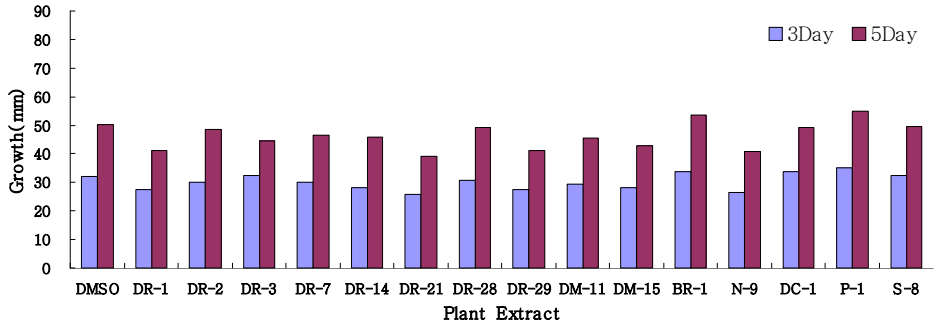
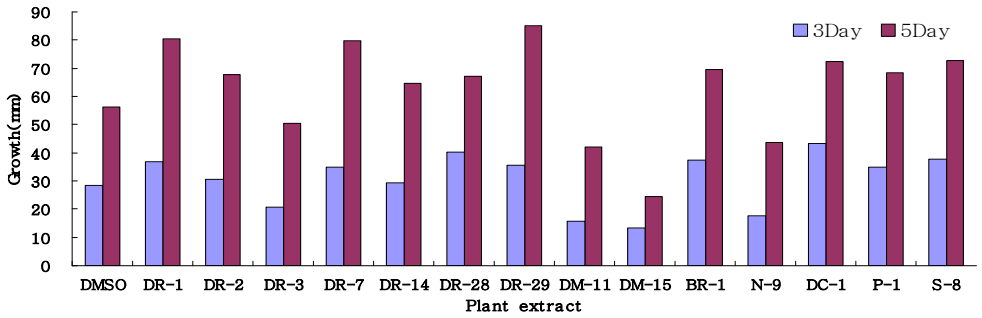


그림 3. 식충식물 추출물이 식물병원균의 생장에 미치는 효과. DMSO (DMSO 단독처리 대조구), DR-1 (*Drosera adelae*), DR-2 (*D. aliciae*), DR-3 (*D. binata*) DR-7 (*D. capensis*), DR-14 (*D. filliformis*), DR-21 (*D. nidiformis*), DR-28 (*D. rotundifolia*), DR-29 (*D. tokaiensis*), DM-11 (*Dionaea muscipula-Red*), DM-15 (*D. muscipula*), BR-1 (*Brocchinia* sp.), N-9 (*Nepenthes ventricosa*), DC-1 (*Darlingtonia californica*), P-1 (*Pinguicula ehlersae*), S-8 (*Sarracenia leucophylla*).

Colletotrichum dematium



Botrytis cinerea



Phytophthora nicotianae

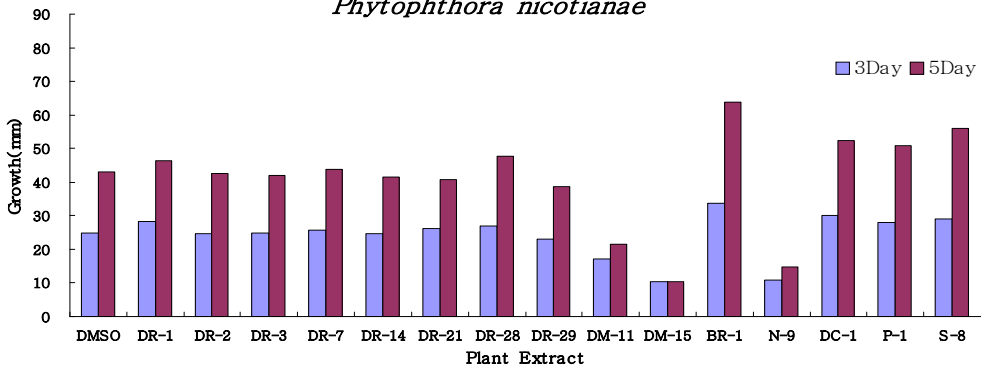
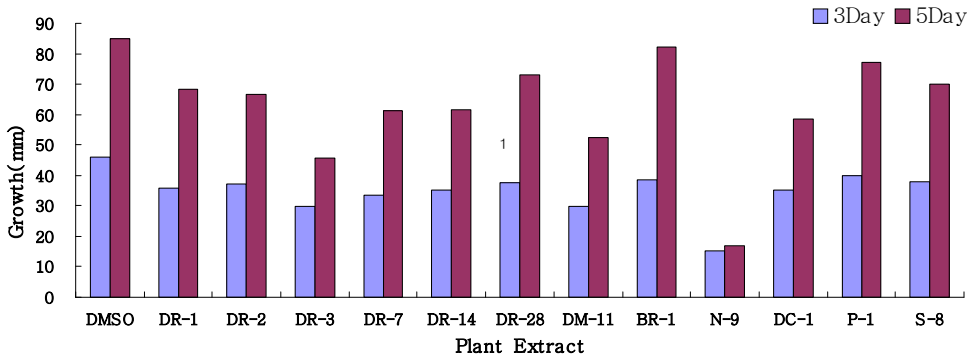


그림 3(계속). 식충식물 추출물이 식물병원균의 생장에 미치는 효과. DMSO (DMSO 단독처리 대조구), DR-1 (*Drosera adalae*), DR-2 (*D. aliciae*), DR-3 (*D. binata*) DR-7 (*D. capensis*), DR-14 (*D. filliformis*), DR-21 (*D. nidiformis*), DR-28 (*D. rotundifolia*), DR-29 (*D. tokaiensis*), DM-11 (*Dionaea muscipula-Red*), DM-15 (*D. muscipula*), BR-1 (*Brocchinia* sp.), N-9 (*Nepenthes ventricosa*), DC-1 (*Darlingtonia californica*), P-1 (*Pinguicula ehlersae*), S-8 (*Sarracenia leucophylla*).

Phytophthora capsici



Fusarium oxysporum f. sp. niveum

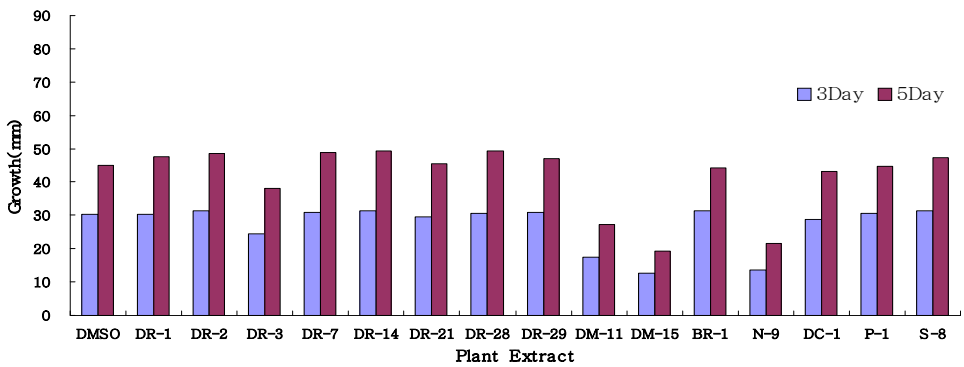


그림 3(계속). 식충식물 추출물이 식물병원균의 생장에 미치는 효과. DMSO (DMSO 단독처리 대조구), DR-1 (*Drosera adela*), DR-2 (*D. aliciae*), DR-3 (*D. binata*), DR-7 (*D. capensis*), DR-14 (*D. filliformis*), DR-21 (*D. nidiformis*), DR-28 (*D. rotundifolia*), DR-29 (*D. tokaiensis*), DM-11 (*Dionaea muscipula-Red*), DM-15 (*D. muscipula*), BR-1 (*Brocchinia* sp.), N-9 (*Nepenthes ventricosa*), DC-1 (*Darlingtonia californica*), P-1 (*Pinguicula ehlersae*), S-8 (*Sarracenia leucophylla*).

추출물의 균사생육억제효과가 어느 정도 지속되는 지를 알아보기 위하여 벼도열병균에 대해서는 처리 후 10일까지 조사하였다. 그 결과 효과를 보이는 균주들은 처리 10일 후까지도 병원균의 균사생육을 억제하고 있는 것이 확인되

었다(그림 4).

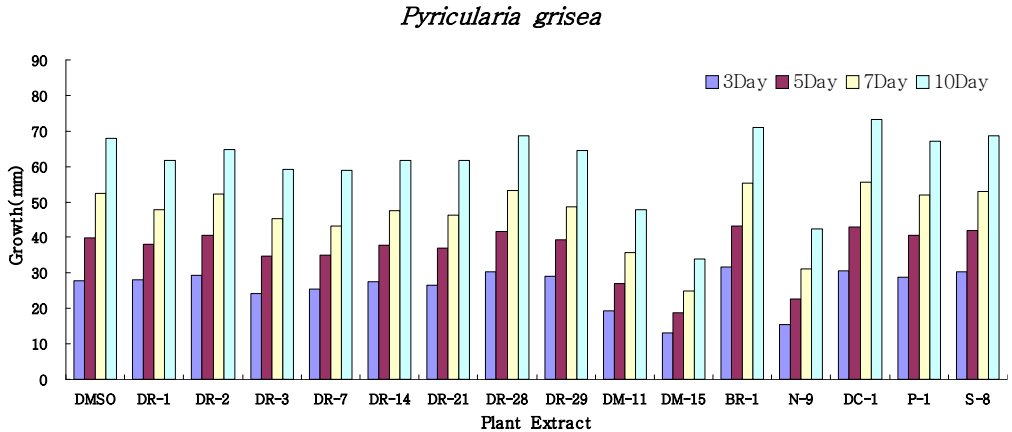


그림 4. 식충식물 추출물이 식물병원균 *Pyricularia oryzae*의 생장에 미치는 효과. DMSO (DMSO 단독처리 대조구), DR-1 (*Drosera adelae*), DR-2 (*D. aliciae*), DR-3 (*D. binata*) DR-7 (*D. capensis*), DR-14 (*D. filliformis*), DR-21 (*D. nidiformis*), DR-28 (*D. rotundifolia*), DR-29 (*D. tokaiensis*), DM-11 (*Dionaea muscipula-Red*), DM-15 (*D. muscipula*), BR-1 (*Brocchinia* sp.), N-9 (*Nepenthes ventricosa*), DC-1 (*Darlingtonia californica*), P-1 (*Pinguicula ehlersae*), S-8 (*Sarracenia leucophylla*).

위 실험에서 병원균 생장억제효과를 보이고 있는 DM-11과 DM-15, N-9, 그리고 다른 연구에서 좋은 효과를 보였던 N-1(*Nepenthes ventricosa*와 *N. maxima*의 교잡종) 등 4 종의 식충식물을 선발하였으며, 병원균으로는 식충식물의 추출물에 의해 생육이 억제되는 현상을 보였던 *Rhizoctonia solani* AG-1, *Phytophthora capsici*, *P. nicotianae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *nivem*, *Botrytis cinerea* 등 5종을 선발하여 다음 시험을 수행하였다.

선발된 N-1, N-9, DM-11, DM-15의 MeOH 추출액을 원액으로 간주하고 그 농도가 10,000 ppm이 되도록 PDA에 첨가하여 배지를 조제한 뒤, 추출물 첨가배지의 한 가운데에 지름 5 mm의 균사조각을 접종하고 25°C 항온기에서 배양하며 24시간 간격으로 7일 동안 균총의 성장 정도를 조사하였다. 그 결과

네펜테스 추출물(N-1, N-9)이 *R. solani*와 *F. o. f. sp. niveum*에 대하여 좋은 효과를 나타내었(그림 5). 반면에 파리지옥 추출물(DM-11과 DM-15)은 원액을 사용하였을 때보다 억제효과가 많이 감소하였으며, 특히 모든 추출물이 *B. cinerea*에 대해서는 초기에는 어느 정도의 억제효과를 보였으나 배양 7일째에는 대조구와 비교하여 차이가 나지 않았다. 즉, *B. cinerea*는 초기생장은 억제되었으나 곧 식충식물 추출물의 항균효과를 극복하는 것으로 나타났다.

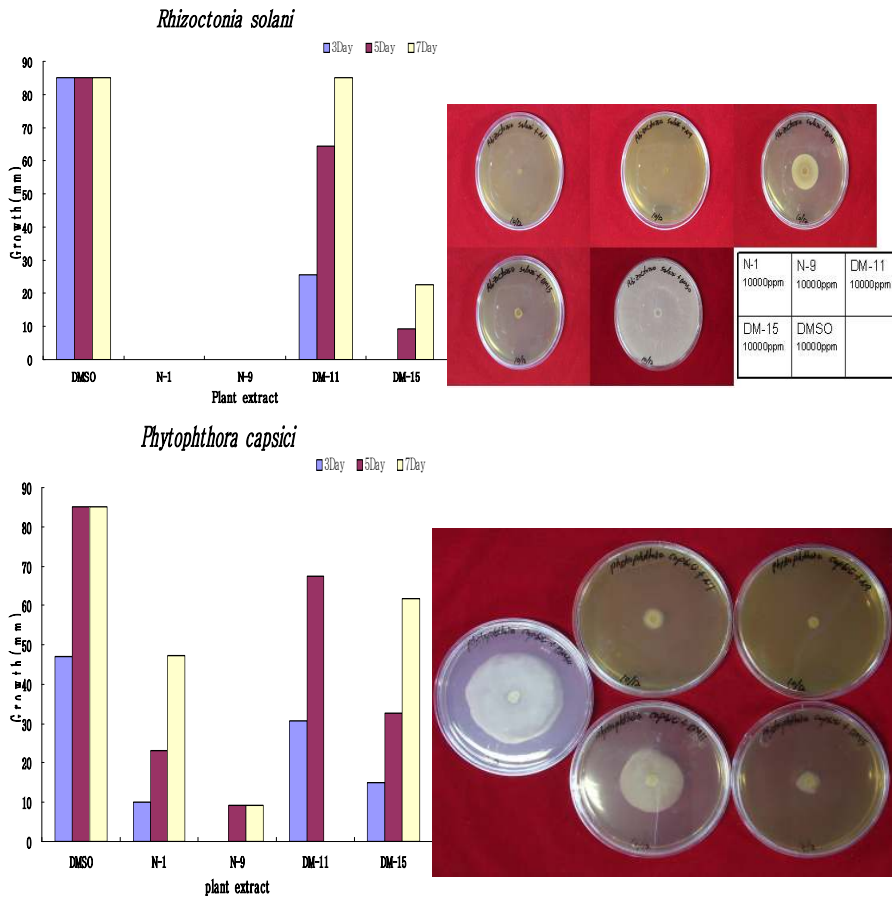


그림 5. 네펜테스와 파리지옥 추출물(10,000 ppm)에 의한 병원균의 생육억제 효과. DMSO (DMSO 처리대조구), DM-11 (*Dionaea muscipula*-Red), DM-15 (*D. muscipula*), N-1 (*Nepenthes ventricosa x maxima*), N-9 (*N. ventricosa*).

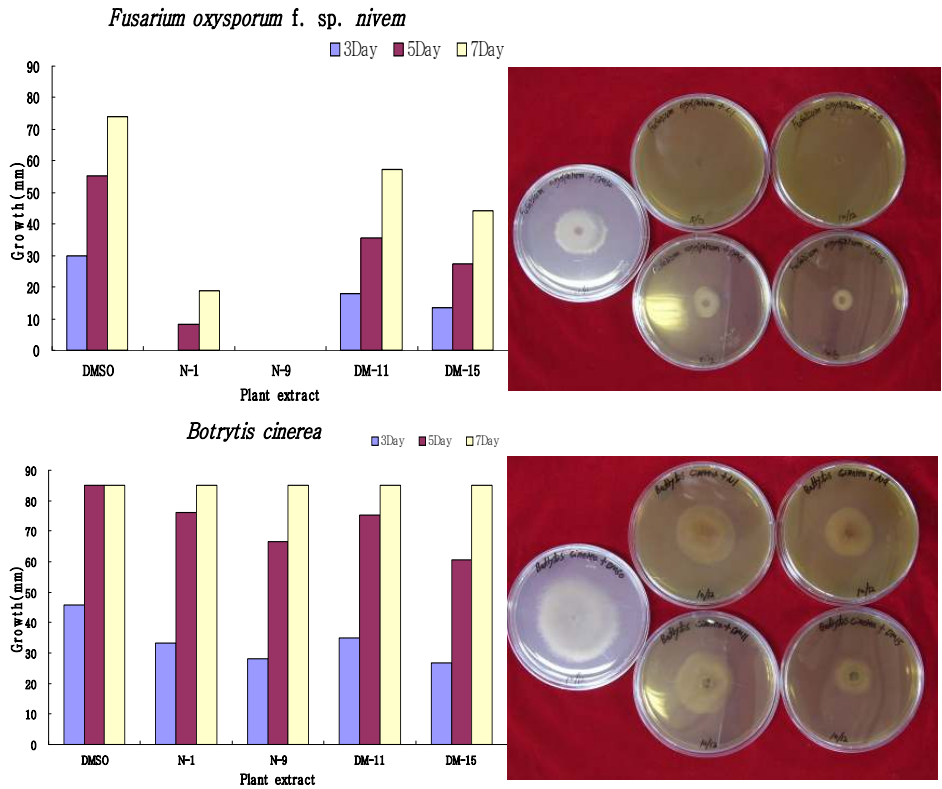


그림 5(계속). 네펜테스와 파리지옥 추출물(10,000 ppm)에 의한 네 가지 병원균의 생육억제효과. DMSO (DMSO 처리대조구), DM-11 (*Dionaea muscipula-Red*), DM-15 (*Dionaea muscipula*), N-1 (*Nepenthes ventricosa x maxima*), N-9 (*Nepenthes ventricosa*).

따라서 여러 가지 식충식물 추출물 중 *R. solani*와 *F. o. niveum*, *P. capsici*, *P. nicotianae* 등에 대해 10,000 ppm에서도 좋은 효과를 보였던 네펜테스(N-9)을 농도별로 처리하여 억제효과를 조사하였다. 앞서서와 같은 방법으로 PDA 배지에 네펜테스 추출물을 첨가하고 병원균을 접종하여 배양한 결과, 5,000 ppm (200배 희석)과 2,500 ppm (400배 희석)에서는 초기 억제력이 우수하였으나 배양 5일 쯤에는 모두 균총이 PDA plate 전체를 채우는 등 효과 지속기간이 매우 짧은 것으로 나타났다(그림 6). 이는 아마도 이러한 항균력의 주성분인 plumbagin의 휘발성이 매우 높기 때문인 것으로 추측할 수 있다.

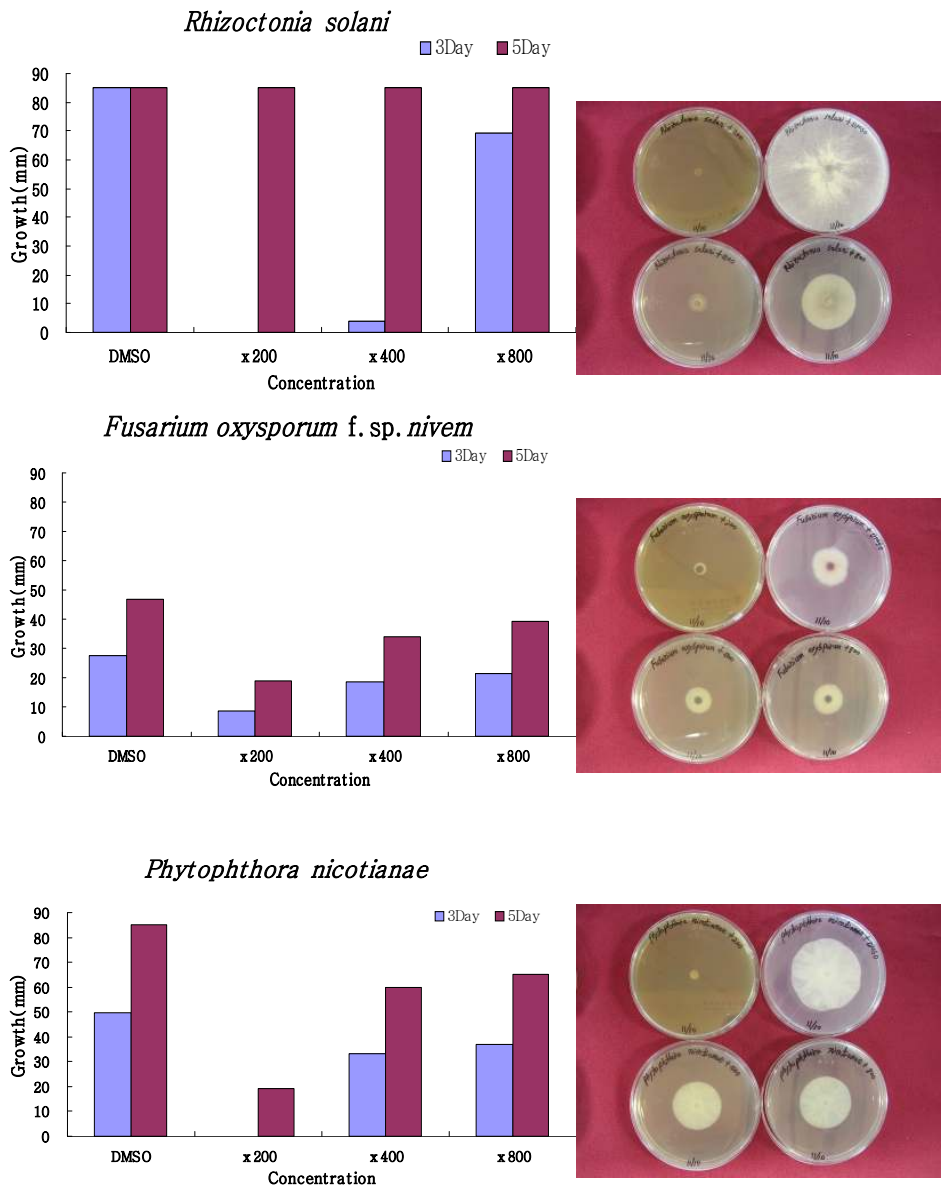


그림 6. N-9 (*Nepenthes ventricosa*) 추출물 희석액이 네 가지 병원균의 생육에 미치는 영향. DMSO (DMSO 처리대조구).

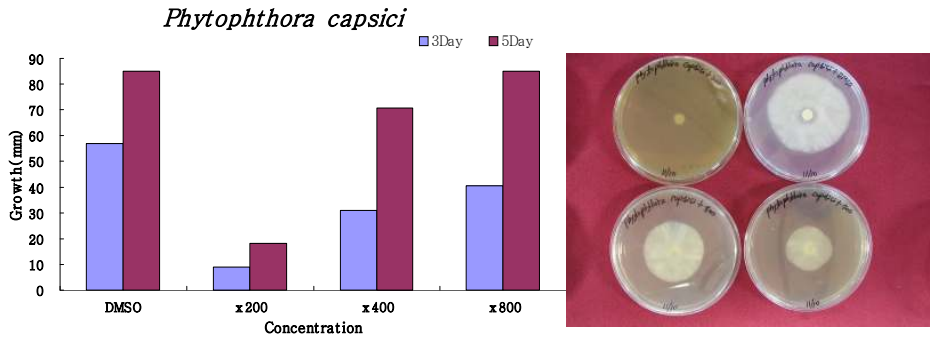


그림 6(계속). N-9 (*Nepenthes ventricosa*) 추출물 희석액이 네 가지 병원균의 생육에 미치는 영향. DMSO (DMSO 처리대조구).

4. 모잘록병균에 대한 식충식물 추출물의 항균력

균주 *Rhizoctonia solani* AG-1에 대한 항균성 검정에 사용된 배지는 petri dish에 분기 전에 네펜데스 추출물을 250, 500, 1,000, 2,000 ppm씩 첨가하여 각각 제조하였다. 공시균주는 앞에서 설명한대로 지름 5 mm cork borer로 균사선단부를 떼어내어 네펜데스 추출물로 적정한 배지에 접종한 다음 앞에서와 같은 조건으로 배양하고 colony diameter를 측정하여 성장정도를 확인했다. 대조구로는 DMSO 2,000 ppm 넣은 배지를 사용하였다.

그 결과 네펜데스 추출물은 250 ppm부터 균사생육억제력을 보이는 것으로 나타났다. 균사생육은 네펜데스 추출물의 첨가량에 따라서 비례적으로 억제되었으며, 1,000 ppm 이상에서는 모잘록병균의 균사생육이 거의 이루어지지 않을 정도로 크게 억제하는 것으로 나타났다(그림 7).

하지만 시간이 지나면서 모잘록병균 균사가 다시 활력을 회복하는 현상을 보여, 접종 8일 후에는 높은 농도의 네펜데스 추출물에서도 모잘록병균의 균사가 잘 자라는 현상을 보였다(그림 8). 본 실험을 수행할 당시에는 그 원인을 확실히 알 수 없어서 궁금증만 더하였다.

그러나 그 뒤의 연구에서 추출물 중 항균활성을 보이는 물질은 plumbagin이며, plumbagin의 특성 중 하나가 휘발성이라는 것이 밝혀진 후에는 이 물질의 휘발성 때문에 시간이 지나면서 억제효과가 떨어지는 것으로 판단하게 되었으며, 이는 식충식물 추출물의 실제 적용을 제한하고 있는 걸림돌이 되고 있다.

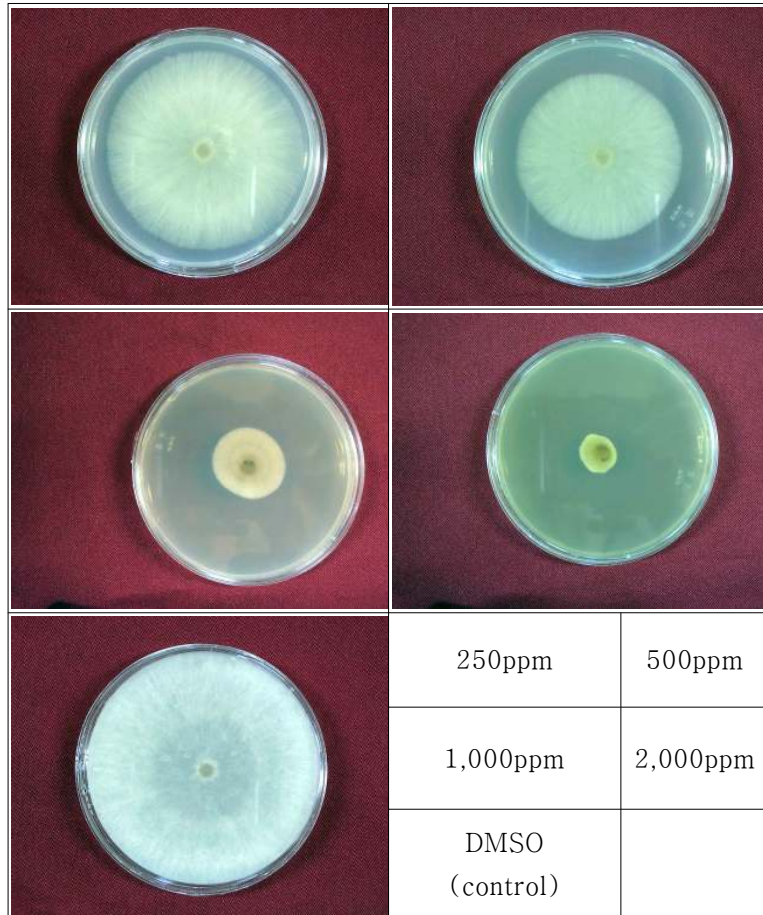


그림 7. *Nepenthes* sp. 추출물에 의한 *Rhizoctonia solani*의 균사생육 억제.

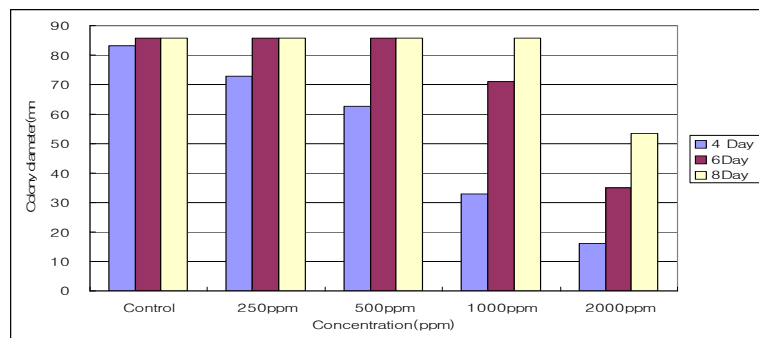


그림 8. *Rhizoctonia solani* 균사생육에 대한 네펜데스 추출물 농도의 영향

*R. solani*를 이용하여 파리지옥 추출물인 DM-11과 DM-15 희석액의 효과도 검정하였으나 원액에서만 효과를 보일 뿐 나머지 100배, 200배, 400배 희석액은 DMSO 처리 대조구나 무처리 대조구와 전혀 차이를 보이지 않았다(그림 9). 이 실험에서 원액처리구에서의 균총 성장을 보면 추출물을 넣은 방향 뿐 아니라 모든 방향에서 다 생육이 저지되는 현상을 관찰할 수 있었는데, 이 역시 주성분이 휘발성을 가지고 있을 가능성이 높음을 보여주는 것이라 생각할 수 있다.

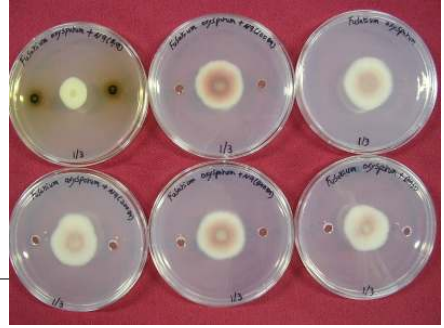
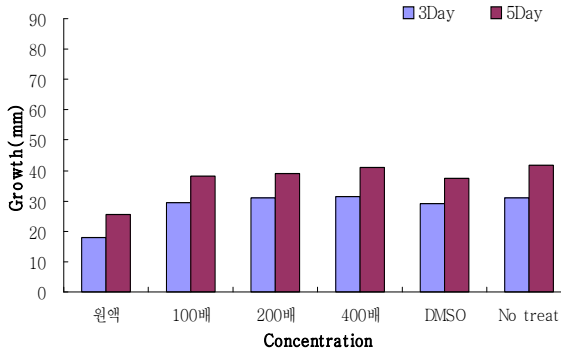


그림 9. *Dionaea* spp. (DM-11) 추출물 희석액이 *Rhizoctonia solani* 균총생육에 미치는 영향.

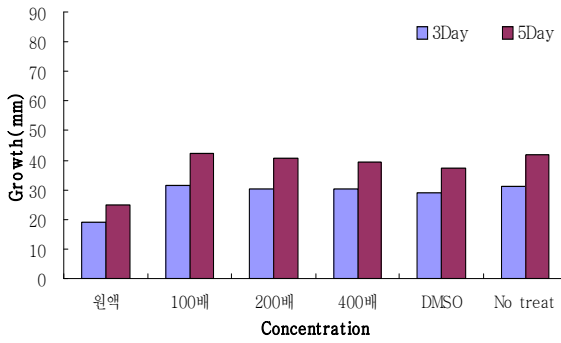
5. 오이 덩굴쪼김병균에 대한 식충식물 추출물의 항균력

오이류에 덩굴쪼김병을 일으키는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*에 대한 군사생육억제력 검정에서도 식충식물 추출물은 원액에서만 대조구에 비하여 50% 정도의 억제력을 보였을 뿐 100배 이상의 희석액에서는 대조구와 별다른 차이를 보이지 않아(그림 10), 원액을 제외하고는 뚜렷한 억제효과가 없는 것으로 판단되었다.

Fusarium oxysporum f. sp. *nivem* (N-9)



Fusarium oxysporum f. sp. *nivem* (DM-11)



Fusarium oxysporum f. sp. *nivem* (DM-15)

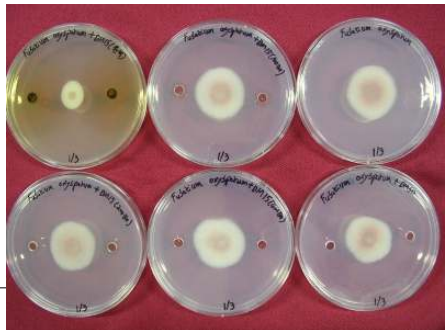
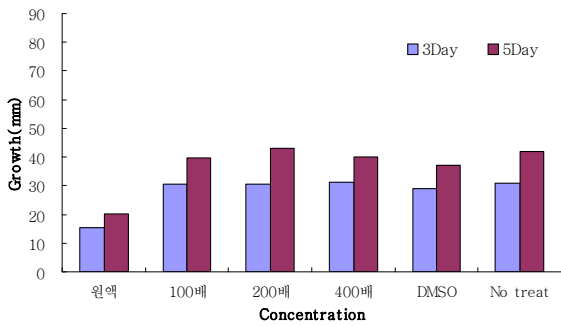


그림 10. *Nepenthes* sp. (N-9)와 *Dionaea* spp. (DM-11, DM-15) 추출물 희석액이 *Fusarium oxysporum* f. sp. *nivem*의 균총생육에 미치는 영향. 사진은 접종 후 3일째임.

6. 식충식물 추출물의 저항성 유도능력 검증

In vitro 시험에서 여러 가지 병원균에 대하여 비교적 좋은 항균력을 보여주었던 네펜데스(N-9)와 파리지옥(DM-11, DM-15) 추출물을 고추에 처리하여 고추 흰가루병에 대한 저항성 유도능력을 조사하였다.

N-9, DM-11, DM-15의 추출물을 각각 200배로 희석하여 고추 유묘에 1주일 간격으로 3회, 충분량을 엽면살포하였다. 1회 처리가 끝난 뒤 흰가루병에 심하게 감염된 고추를 처리구 사이사이에 놓아 흰가루병이 자연적으로 감염되도록 유도하였다. 각 처리는 5반복으로 수행하였으며, 대조구에는 추출물 수확에 사용한 DMSO를 200배로 희석한 용액을 엽면살포하였다. 병 발생정도는 3회 처리가 끝난 후 일주일 뒤에 조사하였다.

하지만, 병발생조사 결과 식충식물의 추출물은 고추에서 흰가루병에 대해 뚜렷한 저항성 유도능력을 보이지 않았다. 세 종류의 추출물 모두 DMSO 처리 대조구와 비교하여 병 방제가 10% 정도로서 아주 미약한 효과만을 보였다(그림 11. 12). 주성분인 plumbagin의 휘발성이 강한 특성을 고려할 때 엽면살포라는 처리방법이 주성분의 효과를 매우 떨어뜨렸을 것으로 추정하며, 휘발성을 고려하여 토양 관주 처리 등의 효과를 알아보기 위한 시험을 진행하고 있다.

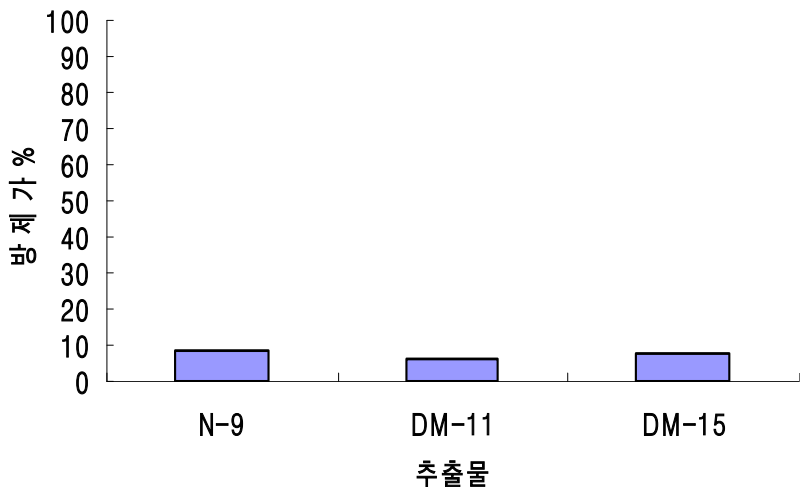


그림 11. 네펜데스(N-9)와 파리지옥(DM-11, DM-15) 추출물 엽면살포에 의한 고추 흰가루병 방제효과.

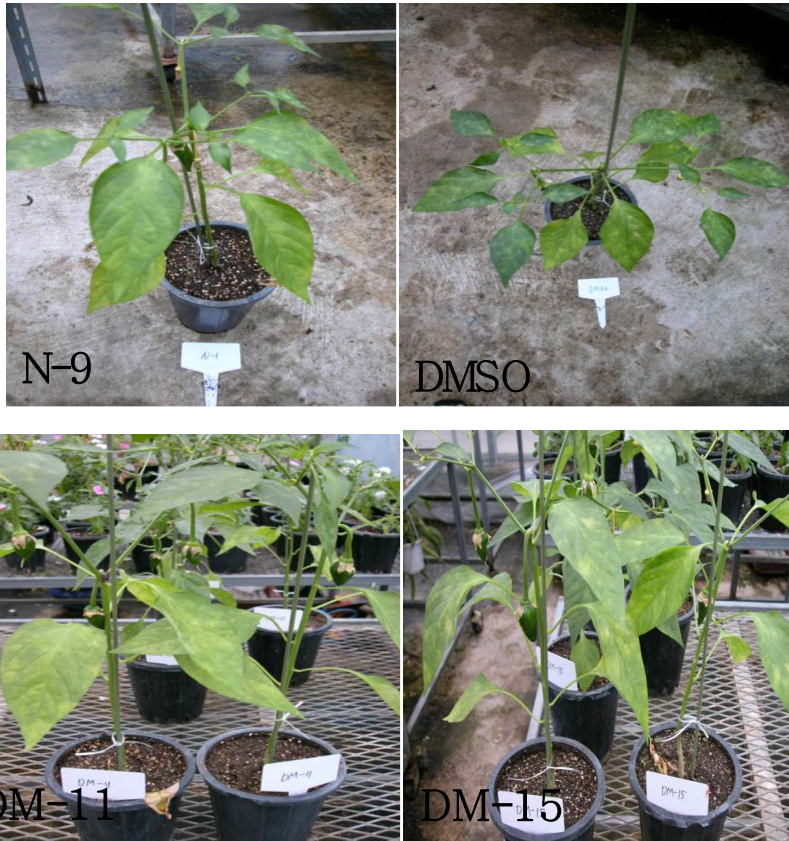


그림 12. 네펜테스(N-9)와 파리지옥(DM-11, DM-15) 추출물을 엽면살포한 고추에서의 흰가루병 발생.

7. 정제한 plumbagin이 식충병원균 및 병발생에 미치는 영향

가. *In vitro* 역가검정 및 MIC 측정

대부분의 연구에서 사용한 식충식물 추출물은 활성을 보이는 물질뿐만 아니라 여러 가지 물질들이 혼합되어 있으므로 주성분의 함량은 상대적으로 낮으며, 분리주에 따라서 변이가 심하고, 또 혼합되어 있는 성분들 간의 간섭작용이 나타날 수도 있다. 따라서, 주성분 자체의 영향을 검정하기 위하여 협동연구기관인 대전대학교에서 순수분리 정제한 plumbagin을 제공받아 식물병원균과 병발생에 미치는 영향을 조사하였다. Plumbagin은 식충식물이 항균성을 보이는 주성분으로 알려져 있다.

우선 소정 농도의 plumbagin을 첨가한 PDA 배지를 제조하여 고추 역병균 *Phytophthora capsici*의 균사를 접종하고 성장률을 관찰하였다.

그 결과 아래 그림 11과 같이 plumbagin의 농도가 15 ppm 이상이 되면 접종 후 닷새가 지나도록 고추 역병균의 균사생장이 전혀 이루어지지 않음을 알 수 있었다.

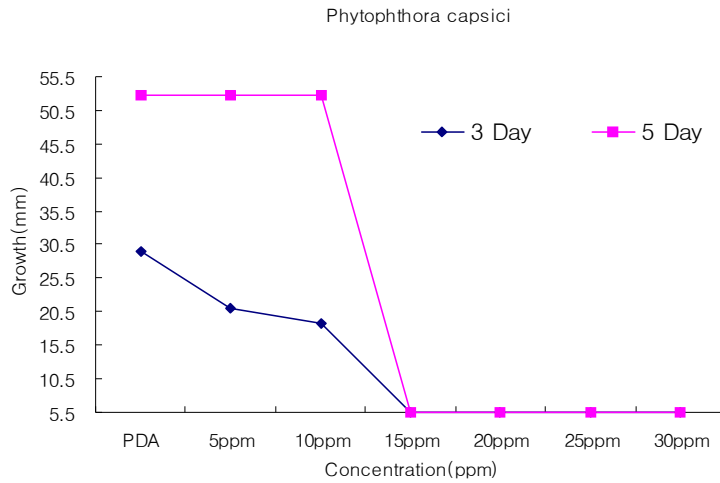


그림 11. 정제한 plumbagin을 첨가한 배지에서의 고추 역병균 성장.

10 ppm에서는 plumbagin을 첨가하지 않은 배지에서와 같은 수준으로 자라는 것을 볼 때 *P. capsici*에 대한 plumbagin의 MIC는 10 ppm과 15 ppm 사이에 있는 것으로 보였다. 따라서 그 범위에서 1 ppm 간격으로 조절하여 균사 생육을 관찰하여 본 결과 그림 12와 같이 MIC가 11 ppm으로 나타났다.

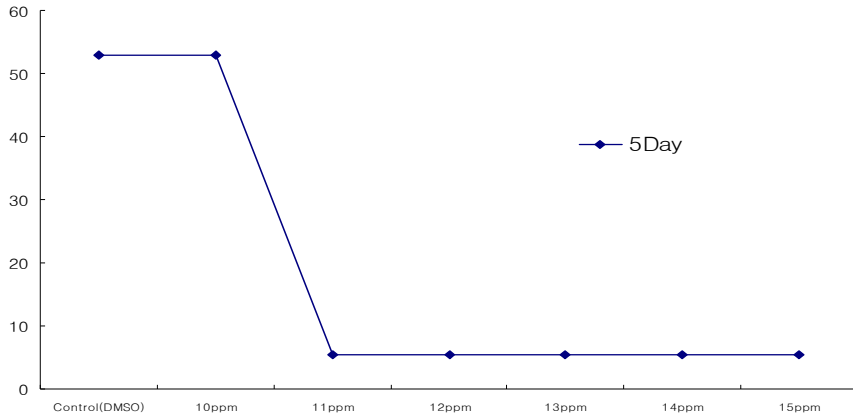


그림 12. 정제된 plumbagin의 고추 역병균에 대한 MIC 검정.

나. Plumbagin의 *in vivo* 치료효과 검정

1) 고추 역병

이와 같은 결과를 토대로 *in vivo* 상태에서 *P. capsici*에 대한 plumbagin의 활성을 검정하였다. 고추 역병에 대한 치료효과를 보기 위해서 온실 내에서 재배하고 있는 고추 유묘(5엽기)에 역병균 *P. capsici*의 유주포자낭懸탁액(2.3×10^5 sporangia/ml)을 먼저 접종한 후 병징이 나타나기 시작할 때부터 plumbagin 희석액을 7일 간격으로 2번 처리 하였다. 처리구는 no treatment control, DMSO (2%) control, 5.5 ppm, 11 ppm, 22 ppm plumbagin 이었으며, 성적 조사는 마지막 처리로부터 7일 간격으로 3회 실시하였다.

Plumbagin의 효과에 대한 *in vivo* 검정에서는 *in vitro* 검정과는 매우 다른 결과가 나타났다. Plumbagin의 처리는 초기에는 어느 정도의 방제효과를 보이는 듯하였으나 시간이 지남에 따라서 대조구와 같이 감염률이 증가하였으며, 조사 마지막 날에는 시험구의 모든 고추 유묘가 감염되어 있어(그림 13, 14), *in vitro* 실험에서 plumbagin이 보여주었던 항균력은 포장상태에서는 찾아보기 어려웠다.

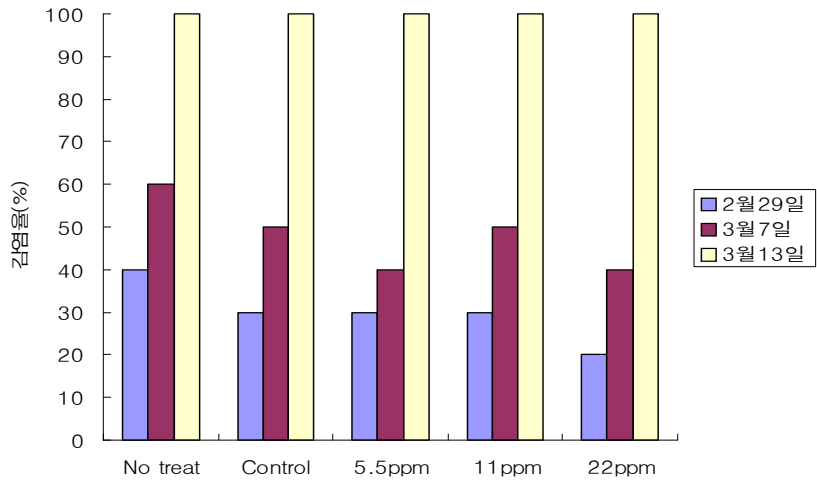


그림 13. Plumbagin을 처리한 고추의 역병균 감염률.



그림 14. Plumbagin을 처리한 고추에 발생한 역병 증상.

2) 오이 흰가루병

고추 역병균 뿐만 아니라 오이 흰가루병균에 대해서도 *in vivo* 상태에서 plumbagin의 활성을 검정하였다. 오이 역시 온실 내에서 재배하고 있는 5엽기에 이른 식물체를 사용하였으며, 흰가루병은 포자현탁액의 분무접종이 쉽지 않기 때문에 감염된 오이 식물체를 시험에 사용할 식물의 사이사이에 놓아두는

방법으로 자연 발병을 유도하였다. Plumbagin은 병징이 나타나기 시작할 때부터 소정 농도로 희석하여 7일 간격으로 3회 처리하였다. 처리구는 no treatment control, DMSO (1%) control, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm plumbagin 이었으며, 성적 조사는 마지막 처리로부터 7일 간격으로 3회 실시하였다.

상대적으로 높은 농도의 plumbagin을 처리하였기 때문인지는 확실치 않지만 오이에서는 고추에서와 달리 plumbagin의 효과가 눈에 띄었다. 10 ppm의 plumbagin을 처리하였을 때는 약 50% 정도의 방제가를 보였으며, 50 ppm과 100 ppm에서는 흰가루병이 전혀 발생하지 않았다(그림 15, 16). DMSO만을 처리한 오이에서는 약 3% 수준의 방제가를 보였으므로, 본 실험에서 얻은 방제가는 순수하게 plumbagin의 효과라고 할 수 있다.

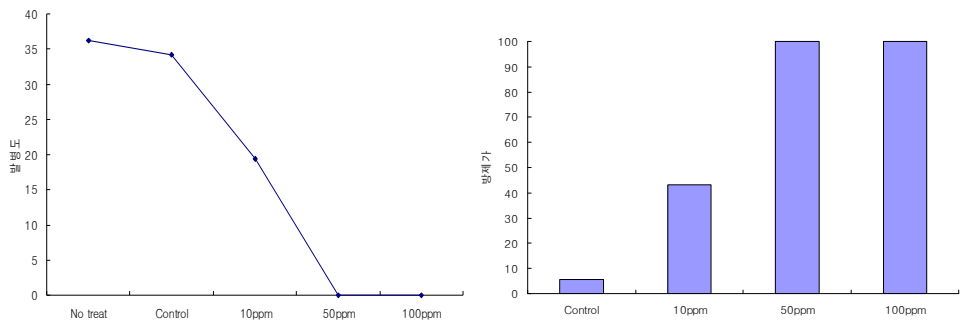


그림 15. Plumbagin 처리에 따른 오이 흰가루병의 발병도 및 방제가.



그림 16. 오이 흰가루병의 발생과 plumbagin 효과 검정 시험.

그러나, 50 ppm과 100 ppm에서는 잎이 타는 약해 증상을 보였으므로(그림 17) 병 방제용으로 사용하기는 어려울 것으로 본다. 약해 역시 다른 처리구에

서는 나타나지 않고 오로지 이 두 처리구에서만 발생하였으므로 전적으로 plumbagin에 의한 것으로 보는 것이 타당하다.



그림 17. Plumbagin을 처리한 오이 잎에 나타난 약해.

다. Plumbagin의 *in vivo* 저항성 유도효과 검증

1) 고추 역병

식물체에 plumbagin을 처리하였을 때 식물병원균에 대한 저항성이 유도되는지 확인하기 위하여 4-5엽기의 고추 유묘에 plumbagin을 7일 간격으로 2회 처리한 후 고추 역병균 *Phytophthora capsici*의 포자낭懸탁액(2.3×10^5 sporangia/ml)을 접종 하였다. 처리구는 no treatment control, DMSO(2%) control, 5.5 ppm, 11 ppm, 22 ppm plumbagin 이었다.

Plumbagin 5.5 ppm 처리구에서는 약 65%의 방제가를 보였으며, 11 ppm 이상에서는 발병이 전혀 없어서 100%의 방제가를 보였다(그림 18). 그러나 11 ppm 이상에서는 잎사귀 끝이 타고 말리는 약해 증상이 나타났는데(그림 19), 무처리 대조구를 제외하고는 다른 모든 처리구에서도 약해가 발생하였으므로 약해는 plumbagin의 영향이라기보다는 DMSO의 영향으로 보는 것이 더 타당하였다. 따라서 실제로 적용하려면 DMSO가 아닌 다른 용매로 plumbagin을 용해시켜야 할 것으로 생각한다. 한편, 2% DMSO 처리구에서도 5.5 ppm plumbagin 처리구에서와 같이 약 65%의 방제가를 보이고 있으므로 이 방제가

는 plumbagin의 효과라기보다는 DMSO의 효과로 보는 것이 더 타당할 것이다. 결국 plumbagin은 11 ppm 이하에서는 별다른 저항성 유도효과를 보이지 못한 반면 11 ppm 이상에서는 확실한 저항성 유도효과를 보이기는 하였으나 약해의 발생이 문제였다.

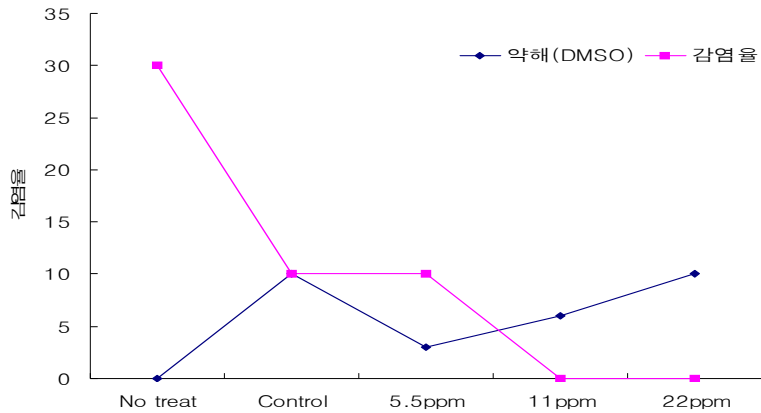


그림 18. Plumbagin을 처리한 고추에서의 역병과 약해 발생률.



그림 19. Plumbagin을 처리한 고추에 나타난 약해 증상.

식물체에 나타나는 약해를 방지하기 위하여 plumbagin을 DMSO가 아닌

EtOH로 녹여서 고추에 처리하여 보았다. 다른 모든 처리는 앞의 실험과 같았으나 다만 2% DMSO control 대신에 1% EtOH를 처리하였다. 그 결과 약해는 나타나지 않아 안심하고 사용할 수 있었으나 대신에 방제가가 매우 떨어져서 DMSO를 사용하였을 때는 100%의 방제가를 보였던 plumbagin 11 ppm에서도 방제가가 30% 정도에 머무는 것이 문제였다(그림 20).

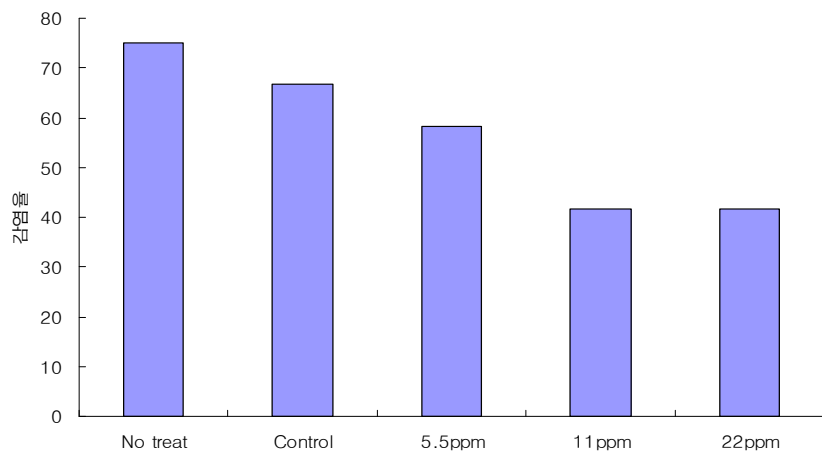


그림 20. EtOH를 용매로 사용한 plumbagin의 고추 역병 방제효과.

제 2절: 식물병원균에 항균성인 식충식물 추출물의 분리 동정 및 항균기작 연구

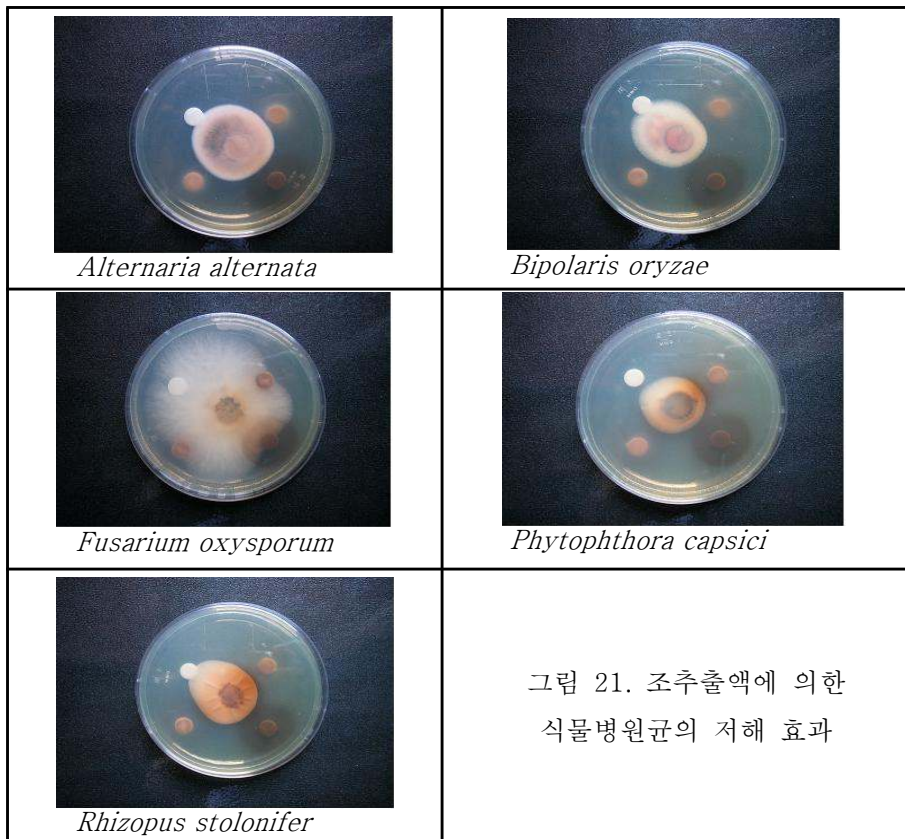
1. 식충식물 유래 항균활성물질 조추출액 제조

앞에서 말한 항균성 검정에 사용한 주요 식물병원균 및 식충식물인 네펜데스와 파리지옥을 대상으로 잎, 줄기, 포충낭 부위별로 구분하여 항균성을 조사

하였다. 준비된 시료의 중량을 측정하고 오븐에서 24시간 건조시켜 건중량을 측정하였다. 총 중량대비 건중량은 약 20%였다. 시료에 메탄올을 처리한 후 믹서로 갈아 상온에서 24시간 방치한 후, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올의 순서로 추출하여 조추출액을 만들었다.

2. 조추출물의 항균력 검정

식물 병원균 *Alternaria alternata*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* 및 *Rhizopus stolonifer*을 PDA 배지에 배양한 후, 식충 식물의 조추출액을 첨가하여 성장저해능을 관찰하였다. 그림 21에서 볼 수 있듯이 조추출액이 상당히 희석된 상태임에도 불구하고 헥산(hexane)으로 추출한 조추출액이 실험한 모든 병원균에 대해 저해 효과를 나타내었다(그림 21).



효과가 있는 헥산 추출액을 대상으로 하여 thin layer chromatography (TLC)를 시행하여 물질을 분리한 후 각 부분에 대한 항균력 시험을 실시하고, 항균력이 있는 물질을 HPLC의 방법으로 확인하였다. HPLC에 사용한 컬럼은 Shim-pack CLC-ODS(M) (4.6x250 mm)이었으며, 용매는 80% methanol에 0.1% trifluoroacetic acid였으며, 254 nm의 파장에서 측정하였다. 이러한 조건을 주었을 때 항균물질은 약 7분 정도에서 용출되었다(그림 22).

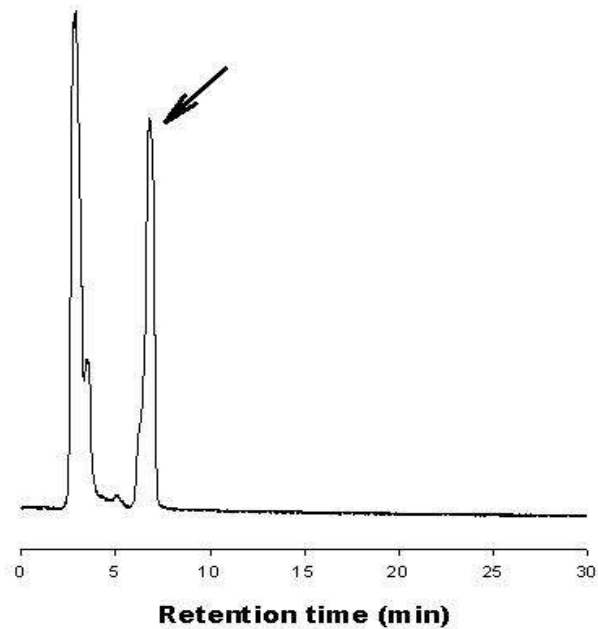


그림 22. HPLC에 의한 항균활성 물질의 확인.

3. 식충식물 유래 항균물질의 순화

식충식물의 일종인 *Nepenthes ventricosa x maxima*의 잎을 모아 동결건조한 후 메탄올을 가하여 12시간 동안 추출하였다. 메탄올 추출물에 헥산을 가하

여 향균물질을 추출하고 TLC의 방법으로 대상 물질의 분리방법을 조사하였다. 이 결과를 바탕으로 하여 hexane:ethylacetate (2:1, v/v)를 용매로 하여 용출시킨 후 TLC로 확인하였다. 향균활성 물질의 순화는 silica gel column chromatography의 방법을 사용하였다.

순화된 물질의 구조를 추정하고자 UV-Visible spectroscopy의 방법과 FTIR을 사용하여 작용기를 추정하였다. 순화된 물질은 오렌지색 결정이었으며, 수율은 0.51 %였다. UV-Visible 스펙트럼에서 보는 바와 같이 280 nm와 400 nm에서 peak을 보여 벤젠고리와 퀴논그룹을 지니고 있는 것으로 나타났다 (그림 23). FTIR 분석결과 1,640, 1,610 및 750 cm^{-1} 에서 특징적인 peak을 보였다 (그림 24).

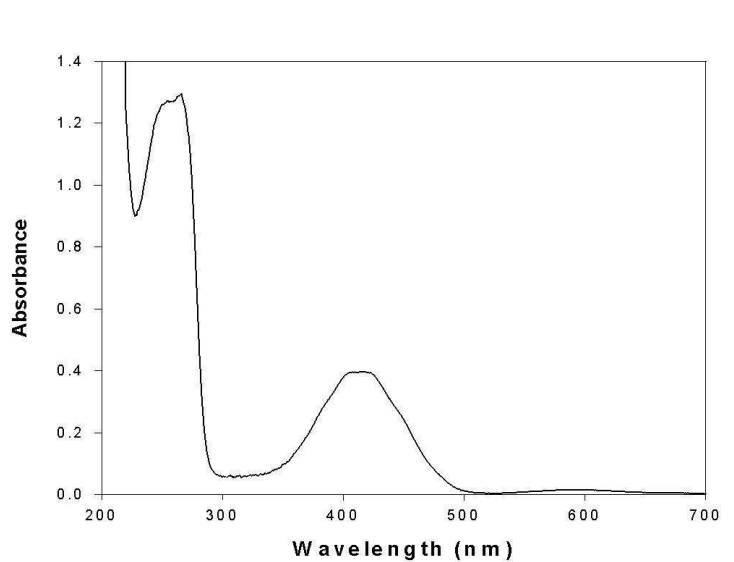


그림 23. 순화된 향균활성 물질의 UV-Visible 스펙트럼

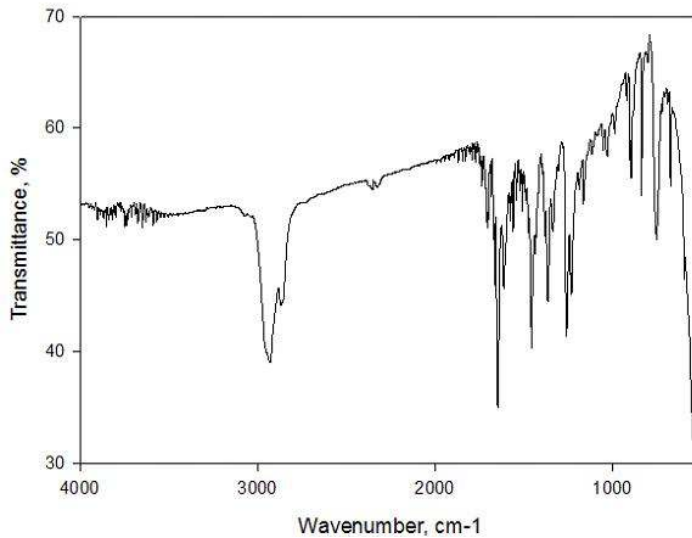


그림 24. 향균물질의 FTIR 스펙트럼

4. 향균물질의 동정

순화된 향균물질의 화학적 구조를 규명하고자 GC/MS와 ^1H NMR 분광분석을 시행하였다. GC/MS 분석결과, 향균 물질은 12.32 min에서 1개의 peak으로 나타나 향균물질의 순화가 효율적으로 이루어졌음을 알 수 있었다(그림 25). MS 스펙트럼의 분석결과 향균물질의 분자량은 188이었으며, fragmentation pattern은 EIMS m/z (intensity, %); 188 (100), 173 (26), 160 (27), 131 (44), 120 (30), 92 (39) 및 63 (43) 이었다(그림 26). ^1H NMR 분광분석결과 향균물질은 naphthoquinone 계열의 화합물임을 알 수 있었고, 각 peak의 동정은 다음과 같다. ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm); 2.18 (s, 3H), 6.79 (d, 1H), 7.25 (m, 1H), 7.60 (m, 2H), 11.96 (s, 1H) (그림 27). GC/MS와 ^1H NMR 분광분석 결과를 종합하여 순화된 향균물질을 동정한 결과 향균물질은 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone 즉, plumbagin이었다(그림 28).

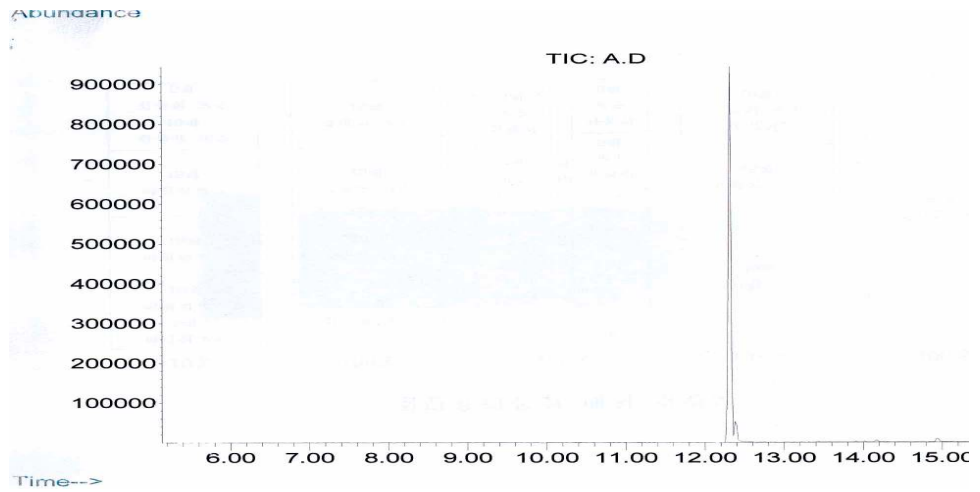


그림 25. 정제된 항균성 물질의 GC chromatogram.

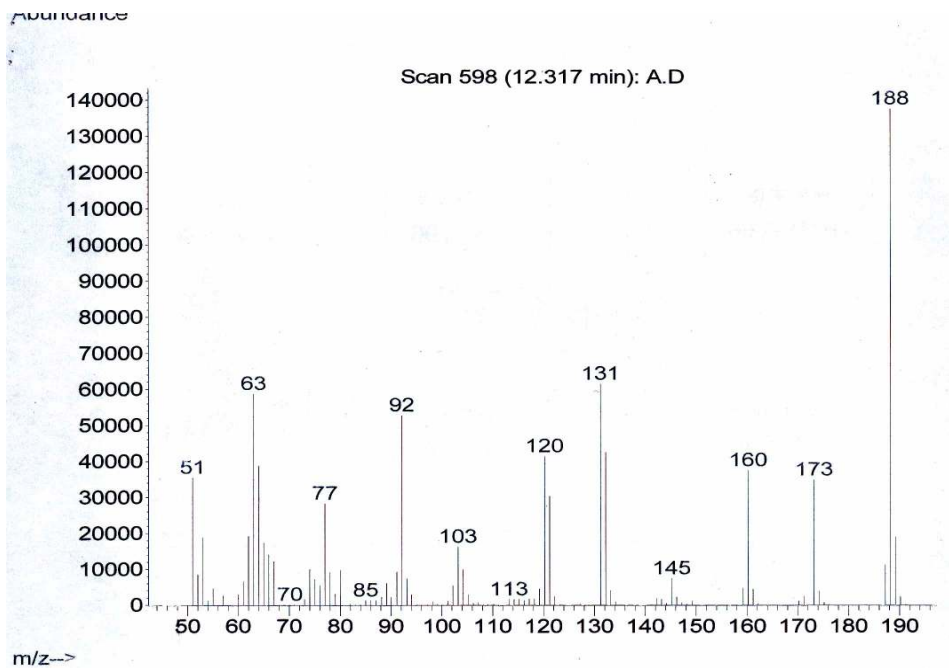


그림 26. 정제된 항균성 물질의 Mass spectrum.

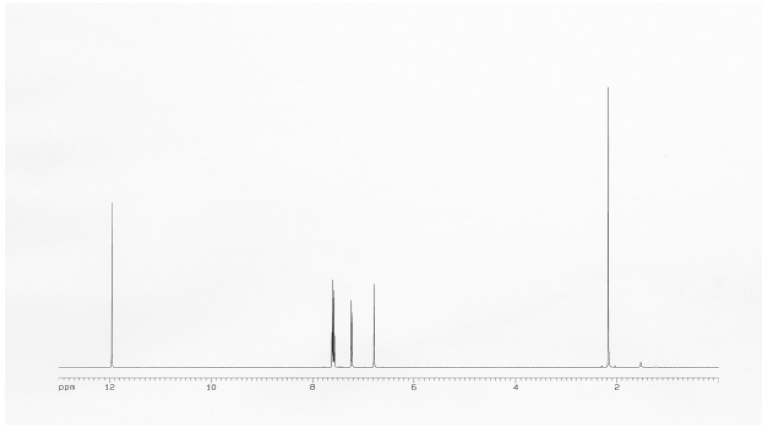


그림 27. 정제된 항균성 물질의 ^1H NMR spectrum.

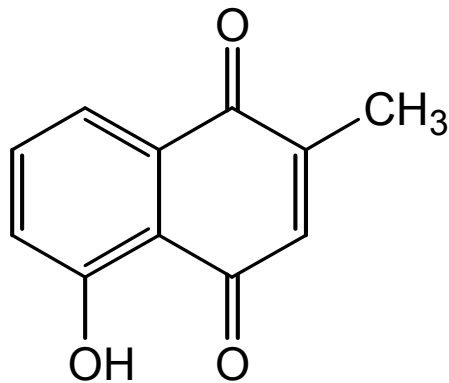


그림 28. 정제된 항균성 물질의 화학구조 동정.

5. 주요 식물병원균에 대한 항균활성 검정

순화된 항균물질의 항균력을 검정하기 위하여 주요 식물병원균인 *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* 및 *Sclerotinia sclerotiorum*을 대상으로 최저 저해 농도를 결정하였다. 순화된 항균물질인 plumbagin은 난균문에 속하는 *P. capsici*, 접합균문의 *R. stolonifer*

var. *stolonifer*와 불완전균문의 *A. alternata*, *A. niger*, *B. oryzae*, *F. oxysporum*, *R. solani* 및 *S. sclerotiorum* 등 실험한 모든 식물병원균에 대하여 우수한 항균활성을 보였다 (표 3). 특히, *R. solani*에 대하여 매우 높은 항균 효과를 보여 MIC 값이 $4.8 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ 이었다.

표 3. *Nepenthes ventricosa* x *maxima*의 잎에서 분리정제된 plumbagin의 최소억제농도(minimal inhibition concentration (MIC))

Fungus	KACC No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Alternaria alternata</i>	40019	27.0 ± 5.2
<i>Aspergillus niger</i>	41858	13.5 ± 0.3
<i>Bipolaris oryzae</i>	41025	9.7 ± 0.4
<i>Fusarium oxysporum</i>	40053	21.1 ± 5.0
<i>Phytophthora capsici</i>	40157	56.6 ± 5.3
<i>Rhizoctonia solani</i>	40136	4.8 ± 0.1
<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	41364	16.6 ± 2.8
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	40457	12.1 ± 0.2

6. 타 항균물질 생산 식충식물 및 항균물질 탐색

제2 협동연구과제 연구진이 보유하고 있는 여러 가지 식충식물을 대상으로 하여 동결건조한 후 메탄올을 가하여 12시간 동안 추출하였다. 메탄올 추출물을 여과지에 적신 후 식물병원균과 함께 배양한 결과, 파리지옥 (*Dionaea muscipula*)의 메탄올 추출액에서 항균물질 존재 가능성이 나타났다 (그림 29). 그림 29에서 보는 바와 같이 파리지옥의 추출액은 병원균의 균사생장을 저해하지는 못하였으나 병원균의 포자 형성을 억제하는 효과가 나타났다. 하지만 이미 항균력을 검정하였던 다른 물질들과 비교하여 항균효과는 매우 미약한 것으로 보이므로 그 이상의 작업은 진행하지 않았다.



그림 29. 식물병원균의 생장에 미치는 *Dionaea muscipula* 메탄올 추출액의 효과. (left: *Alternaria alternata*, right: *Fusarium oxysporum*).

제 3절: 식층식물의 대량생산법 개선 및 병 방제자재 개발

1. 식층식물별 재배조건 탐색

가. 파리지옥 *Dionaea* spp.

1) *Dionaea muscipula*

- 연구재료: 엽병,
- 생장조절물질 종류 및 농도(기본배지: MS):
 - kinetin, BA 1, 2, 5, 10 μ M + NAA, IAA 0.5, 1, 2 μ M
 - 기본배지: 변형 Parliman(BA 1 μ M + NAA 1 μ M, sucrose 3%, pH 5.5)
 - 1/4MS, 1/2MS, Parliman배지, 활성탄(0, 1, 2%), 암처리 기간(0, 2, 4주)
 - 각 실험에 고체배지(agar 0.6%)와 액체배지를 각각 활용
 - 배지별 공통처리 : kinetin 5 μ M + IAA 1 μ M, ascorbic acid 200mg·L⁻¹, sucrose 3%, pH 5.5

연구결과

12주 배양 후에 조사하였는데 전반적으로 BA 1 μ M에서 식물체의 재생율이 높았다(표 4). BA 1 μ M + NAA 1 μ M 혼용처리구에서 26.5개로 가장 많은 식물체가 재생되었으며, Kinetin은 BA에 비해 재생율이 낮은 경향을 보였다(표 5-7).

식물체의 재생과 발근은 고체배지에서 가장 왕성하였으나, 재생된 식물체의 생육은 액체배지에서 활발하였다. 배지 종류 중 Parliman배지에서 식물체 형성이 가장 양호하였으며, 다음이 1/4MS, 1/2MS 순이었다. 식물체의 재생에 미치는 빛의 영향은 배지의 종류에 따라 약간의 차이는 있었으나, 전반적으로 4주까지는 암처리 기간이 길어질수록 식물체 재생이 촉진되는 경향을 보였다. 배지에 첨가하는 활성탄은 농도가 높을수록 전반적으로 식물체 재생과 생육이 활발하였다(표 8-13).

따라서 식물체의 재생에 가장 적합한 처리는 활성탄 2%를 첨가한 Parliman 고체배지이며, 여기에 파리지옥의 잎자루 상부 절편을 접종하고, 4주간 암처리 후에 명배양하는 것이며, 이러한 배양에서는 잎 조직 절편 당 약 34개가 재생될 것으로 기대할 수 있다.

표 4. MS 배지에 자라는 *Dionaea muscipula* 잎자루의 재생에 미치는 BA와 NAA의 영향

Growth regulators (μ M)	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
BA 1 + NAA 0.5	240.6 \pm 30.6	18.6 \pm 2.2	0.6 \pm 0.1	3.6 \pm 0.5	0.5 \pm 0.1
1.0	284.3 \pm 18.5	26.5 \pm 3.5	0.4 \pm 0.1	4.0 \pm 0.7	0.6 \pm 0.1
2.0	237.1 \pm 18.2	21.3 \pm 2.1	0.5 \pm 0.1	8.0 \pm 0.7	0.5 \pm 0.1
BA 2 + NAA 0.5	250.2 \pm 35.4	12.0 \pm 1.1	0.3 \pm 0.0	2.8 \pm 0.6	0.4 \pm 0.0
1.0	245.0 \pm 39.5	15.0 \pm 2.4	0.4 \pm 0.1	4.0 \pm 0.6	0.4 \pm 0.1
2.0	212.9 \pm 37.9	13.0 \pm 2.1	0.2 \pm 0.0	4.1 \pm 0.4	0.5 \pm 0.0
BA 5 + NAA 0.5	150.0 \pm 15.3	7.0 \pm 2.7	0.2 \pm 0.0	2.3 \pm 0.3	0.3 \pm 0.1
1.0	193.3 \pm 12.0	11.3 \pm 1.5	0.3 \pm 0.1	2.5 \pm 0.3	0.4 \pm 0.0
2.0	101.8 \pm 17.5	9.0 \pm 1.6	0.2 \pm 0.0	2.0 \pm 0.4	0.3 \pm 0.1
BA 10 + NAA 0.5	142.6 \pm 21.7	8.4 \pm 1.7	0.2 \pm 0.0	2.4 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1
1.0	162.4 \pm 7.1	6.0 \pm 1.8	0.1 \pm 0.0	2.3 \pm 0.5	0.4 \pm 0.0
2.0	98.3 \pm 10.8	6.0 \pm 1.0	0.1 \pm 0.0	2.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1

표 5. MS 배지에 자라는 *Dionaea muscipula* 잎자루의 재생에 미치는 BA와 IAA의 영향

Growth regulators (μM)	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)	
BA 1 + IAA	0.5	275.6 \pm 2.9	4.8 \pm 0.3	0.9 \pm 0.0	10.0 \pm 0.6	0.5 \pm 0.1
	1.0	390.8 \pm 79.7	23.0 \pm 0.6	1.2 \pm 0.1	14.0 \pm 0.6	0.5 \pm 0.0
	2.0	220.1 \pm 68.1	22.3 \pm 3.5	1.3 \pm 0.5	37.5 \pm 6.5	0.7 \pm 0.6
BA 2 + IAA	0.5	340.2 \pm 71.7	5.0 \pm 1.2	0.5 \pm 0.1	12.0 \pm 1.7	0.3 \pm 0.0
	1.0	283.3 \pm 71.5	19.0 \pm 0.6	0.4 \pm 0.0	10.0 \pm 1.0	0.3 \pm 0.1
	2.0	180.8 \pm 34.2	10.3 \pm 2.1	0.6 \pm 0.2	11.0 \pm 1.0	0.4 \pm 0.1
BA 5 + IAA	0.5	160.2 \pm 27.0	9.8 \pm 1.6	0.6 \pm 0.1	11.0 \pm 1.5	0.4 \pm 0.1
	1.0	280.6 \pm 70.0	19.0 \pm 1.2	0.2 \pm 0.1	9.0 \pm 3.1	0.3 \pm 0.1
	2.0	190.2 \pm 51.1	5.2 \pm 0.4	0.3 \pm 0.0	9.0 \pm 1.0	0.4 \pm 0.1
BA 10 + IAA	0.5	130.8 \pm 60.0	4.5 \pm 1.5	0.4 \pm 0.0	10.3 \pm 1.5	0.3 \pm 0.0
	1.0	98.4 \pm 18.6	8.3 \pm 1.9	0.3 \pm 0.0	5.0 \pm 1.2	0.2 \pm 0.0
	2.0	105.2 \pm 35.0	6.0 \pm 2.2	0.1 \pm 0.0	4.0 \pm 0.6	0.2 \pm 0.1

표 6. MS 배지에 자라는 *Dionaea muscipula* 잎자루의 재생에 미치는 kinetin과 NAA의 영향

Growth regulator (μM)	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)	
Kinetin 1 + NAA	0.5	80.2 \pm 10.7	9.6 \pm 1.3	0.8 \pm 0.1	7.5 \pm 2.2	0.6 \pm 0.1
	1.0	50.6 \pm 5.8	6.3 \pm 0.3	0.4 \pm 0.1	7.7 \pm 0.9	0.5 \pm 0.1
	2.0	55.0 \pm 25.0	5.0 \pm 0.8	0.2 \pm 0.1	8.0 \pm 3.0	0.8 \pm 0.2
Kinetin 2 + NAA	0.5	85.6 \pm 20.4	8.5 \pm 2.0	1.2 \pm 0.2	8.5 \pm 6.5	0.6 \pm 0.5
	1.0	130.2 \pm 8.9	11.4 \pm 2.7	0.8 \pm 0.1	9.8 \pm 3.0	0.5 \pm 0.1
	2.0	80.8 \pm 26.5	9.7 \pm 3.2	0.6 \pm 0.3	17.0 \pm 2.8	0.9 \pm 0.1
Kinetin 5 + NAA	0.5	82.4 \pm 40.4	14.6 \pm 2.9	0.9 \pm 0.3	8.5 \pm 2.9	0.7 \pm 0.1
	1.0	150.4 \pm 20.0	13.0 \pm 1.0	0.8 \pm 0.6	15.0 \pm 1.0	1.2 \pm 0.0
	2.0	51.2 \pm 20.0	5.0 \pm 1.0	0.3 \pm 0.2	7.0 \pm 2.0	0.7 \pm 0.2
Kinetin 10 + NAA	0.5	48.6 \pm 11.8	8.3 \pm 1.5	0.6 \pm 0.1	7.5 \pm 0.8	0.6 \pm 0.1
	1.0	70.2 \pm 20.8	9.0 \pm 2.1	0.4 \pm 0.1	9.7 \pm 1.5	0.7 \pm 0.1
	2.0	31.6 \pm 20.0	6.5 \pm 1.5	0.3 \pm 0.1	8.0 \pm 3.0	0.6 \pm 0.2

표 7. MS 배지에 자라는 *Dionaea muscipula* 잎자루의 재생에 미치는 kinetin과 IAA의 영향

Growth regulator (μM)	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
Kinetin 1 + IAA 0.5	115.2± 25.0	12.0± 1.2	0.8± 0.1	8.0± 7.0	0.5± 0.2
	180.2± 30.0	17.5± 1.5	0.8± 0.0	11.0± 1.0	0.4± 0.0
	150.8± 60.0	7.5± 3.5	1.0± 0.3	29.0± 4.0	0.6± 0.0
Kinetin 2 + IAA 0.5	160.6± 20.0	14.0± 1.0	0.7± 0.1	8.0± 3.0	0.4± 0.1
	230.4± 50.0	20.5± 2.5	0.6± 0.2	9.0± 6.0	0.5± 0.3
	170.6± 80.0	12.5± 4.5	0.7± 0.0	8.0± 4.0	0.6± 0.0
Kinetin 5 + IAA 0.5	187.2± 36.5	21.0± 3.0	0.6± 0.2	7.0± 1.0	0.4± 0.2
	183.2± 82.5	22.5± 2.5	0.3± 0.1	5.5± 1.5	0.4± 0.2
	152.8± 52.0	12.0± 4.0	0.3± 0.2	10.0± 4.0	0.5± 0.2
Kinetin 10 + IAA 0.5	160.6± 90.0	18.5± 2.5	1.0± 0.3	7.0± 5.0	0.4± 0.2
	181.5± 60.0	15.5± 4.5	0.5± 0.1	10.0± 6.0	0.6± 0.1
	70.2± 30.0	10.5± 4.5	0.4± 0.1	10.0± 3.0	0.6± 0.2

표 8. 1/4 MS 배지에 자라는 *Dionaea muscipula* 잎자루의 재생에 미치는 암처리와 활성탄의 영향

Period of dark treatment (weeks)	Activated charcoal (%)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	0	0.91	17.2	1.53	23.0	0.9
	1	1.60	25.4	2.76	31.6	1.4
	2	1.46	14.8	3.49	22.3	1.2
2	0	0.89	15.7	1.68	21.9	1.2
	1	1.30	15.0	2.53	21.8	1.3
	2	1.32	18.9	2.62	25.1	1.2
4	0	1.07	11.8	1.74	17.9	2.2
	1	0.82	20.8	2.44	22.6	1.2
	2	0.88	14.4	2.31	21.8	1.5

표 9. 1/2 MS 배지에 자라는 *Dionaea muscipula* 잎자루의 재생에 미치는 암처리와 활성탄의 영향

Period of dark treatment (weeks)	Activated charcoal (%)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	0	1.40	16.1	2.0	22.3	1.2
	1	2.14	19.2	3.0	25.2	1.8
	2	2.04	16.8	3.7	25.5	1.9
2	0	1.42	10.3	2.5	18.4	2.0
	1	1.32	19.1	2.7	27.0	1.6
	2	1.40	17.3	3.5	27.0	1.6
4	0	1.26	10.6	2.3	19.2	2.0
	1	1.29	18.6	2.5	26.7	1.6
	2	1.25	20.8	2.7	27.0	1.8

표 10. 1/4 Parliman 배지에 자라는 *Dionaea muscipula* 잎자루의 재생에 미치는 암처리와 활성탄의 영향

Period of dark treatment (weeks)	Activated charcoal (%)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	0	1.65	18.7	2.2	28.5	1.3
	1	2.01	23.1	3.4	33.3	1.7
	2	1.85	20.8	3.5	32.2	1.5
2	0	1.61	19.0	2.3	28.8	1.6
	1	1.87	24.7	3.6	35.0	1.7
	2	1.83	31.2	2.8	36.1	1.5
4	0	1.60	21.7	2.1	34.8	2.0
	1	1.29	30.7	2.5	37.4	1.9
	2	1.65	33.8	2.8	46.8	2.1

표 11. 1/4 MS 액배지에 자라는 *Dionaea muscipula* 잎자루의 재생에 미치는 암처리와 활성탄의 영향

Period of dark treatment (weeks)	Activated charcoal (%)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	0	0.67	4.4	2.1	6.8	0.5
	1	0.12	2.6	0.8	2.5	0.3
	2	0.83	4.7	4.5	4.7	0.4
2	0	0.96	5.3	2.3	6.1	1.5
	1	1.02	8.9	3.8	7.5	0.7
	2	0.81	5.6	3.2	4.2	0.1
4	0	0.68	10.3	2.5	10.1	0.6
	1	1.23	6.8	4.0	8.5	0.3
	2	1.18	9.5	3.9	8.0	0.2

표 12. 1/2 MS 액배지에 자라는 *Dionaea muscipula* 잎자루의 재생에 미치는 암처리와 활성탄의 영향

Period of dark treatment (weeks)	Activated charcoal (%)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	0	0.80	6.6	2.5	9.4	0.5
	1	0.41	4.7	2.4	2.4	0.3
	2	0.58	4.0	3.6	2.9	0.3
2	0	1.15	6.4	2.3	8.8	1.1
	1	1.12	5.4	4.0	7.5	1.1
	2	1.50	8.1	5.0	12.5	1.1
4	0	1.10	6.5	2.5	16.5	0.7
	1	0.99	5.1	3.6	8.0	0.9
	2	0.92	7.2	3.0	7.6	0.5

표 13. Parliman 액배지에 자라는 *Dionaea muscipula* 잎사루의 재생에 미치는 암처리와 활성탄의 영향

Period of dark treatment (weeks)	Activated charcoal (%)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	0	1.55	5.3	3.5	11.8	0.4
	1	0.81	3.0	3.6	2.7	0.6
	2	1.16	7.3	4.3	5.7	1.0
2	0	0.79	2.9	3.7	4.6	0.7
	1	1.83	8.1	5.2	10.1	1.5
	2	1.56	8.4	6.0	7.5	0.8
4	0	1.03	6.6	3.0	15.1	1.1
	1	1.29	6.8	4.4	9.3	1.4
	2	1.58	9.9	4.9	10.7	0.8

나. 끈끈이주걱 *Drosera* spp.

1) *Drosera intermedia*

■ 연구재료: 잎 절편

■ 처리내용:

배지 종류(1/8, 1/4, 1/2, 1, 2MS), 총질소 농도(7.5, 15, 30, 60, 120mM)

Sucrose(0, 1, 2, 3, 4, 5%), 활성탄(0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%)

agar(0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0%), 배지 pH별(4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0)

□ 기본배지: MS(kinetin 0.05 μ M, IAA 0.005 μ M, sucrose 3%, pH 5.5, agar 0.7%)

■ 조사내용 및 방법: 8주 배양 후 생체중, 신초수·길이, 뿌리수·길이 조사

연구결과

배지의 종류로는 1/4 MS배지를 사용하였을 때 끈끈이주걱 잎 절편체당 5.9개로 가장 많은 식물체가 재생되었으나, 식물체의 생장은 농도가 높을수록 양호하였다(표 14). 뿌리도 1/4 MS에서 10.3개로 가장 많이 형성되었으며 생육도

가장 양호하였다. 즉, 배지의 종류로는 1/4 MS배지가 가장 적당한 것으로 나타났다(표 14). **총 질소**는 1/2배 (30 mM) 첨가구에서 식물체가 가장 많이 재생되기는 하였으나 다른 구와 큰 차이 없었으며, 뿌리는 1/4배 (15 mM) 첨가 배지에서 8.2개가 형성되어 가장 왕성한 생육을 보였다(표 15). 반면에 2배를 첨가한 처리구에서는 모두 고사하여 총질소농도 2배는 매우 높은 것으로 나타났다. **Sucrose 농도**는 4% 첨가구에서 가장 많은 식물체가 재생되었고(4.8개/절편체), 뿌리는 3% 첨가구에서 8.9개로 가장 많이 형성되었다(표 16). **활성탄**은 배지에 0.05%를 첨가하였을 때 재생되는 식물체 수가 가장 많았으나(6.5개/절편체), 뿌리는 오히려 무첨가구(12.1개)가 다른 첨가구에 비해 많이 형성되었다(표 17). **Agar의 농도**와 식물체 재생율은 반비례하여 액체배지(0%)에서 가장 많은 식물체가 재생되고 생육도 왕성하였으나, 뿌리의 경우에는 생육이 다소 떨어지는 경향이였다(표 18). **배지의 pH**는 4.5에서 최고로 재생되었으나 pH가 높아질수록 식물체 재생률은 감소하였다(표 19).

표 14. *Drosera intermedia* 잎 조각의 재생에 미치는 배양배지의 영향

Media	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
1/8 MS	238.2± 23.6	5.2± 0.8	0.6± 0.1	7.3± 1.1	2.8± 0.5
1/4 MS	259.0± 26.0	5.9± 1.6	0.8± 0.1	10.3± 1.5	3.0± 0.5
1/2 MS	238.8± 18.9	4.8± 0.9	0.8± 0.1	7.8± 1.1	2.6± 0.4
MS	237.6± 32.6	3.9± 0.5	0.9± 0.1	5.9± 1.1	2.4± 0.2
2 MS	7.8± 0.5	0 ^x	-	0	-

표 15. *Drosera intermedia* 잎 조각의 재생에 미치는 총질소 농도의 영향

Total nitrogen concentration	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
×1/8 of MS	165.0± 25.0	3.7± 0.9	0.8± 0.0	8.0± 1.0	2.4± 0.7
×1/4 of MS	354.6± 37.5	4.0± 0.5	1.0± 0.2	8.2± 0.9	4.3± 0.3
×1/2 of MS	354.3± 45.5	4.2± 0.8	0.9± 0.2	5.6± 2.3	1.3± 0.2
×1 of MS	96.2± 5.0	4.0± 1.5	0.5± 0.1	3.5± 0.5	0.9± 0.2
×2 of MS	9.8± 0.3	0 ^x	-	0	-

표 16. *Drosera intermedia* 잎 조각의 재생에 미치는 sucrose의 영향

Sucrose (%)	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	68.5± 8.5	2.2± 0.2	0.9± 0.1	3.0± 0.6	1.1± 0.1
1	293.8± 42.1	3.0± 0.3	1.3± 0.0	5.5± 0.8	2.8± 0.2
2	392.7± 37.7	3.7± 0.4	1.3± 0.2	8.3± 1.3	2.9± 0.4
3	374.8± 65.2	3.6± 0.4	1.0± 0.1	8.9± 1.1	2.7± 0.2
4	426.4± 21.0	4.8± 0.6	1.1± 0.1	7.2± 0.9	2.8± 0.2
5	270.0± 47.2	3.5± 1.0	0.7± 0.1	1.5± 0.2	1.5± 0.2

표 17. *Drosera intermedia* 잎 조각의 재생에 미치는 활성탄의 영향

Activated charcoal (%)	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	442.7± 52.5	4.3± 0.6	1.2± 0.1	12.1± 1.5	2.2± 0.2
0.01	420.1± 62.1	4.6± 0.3	1.1± 0.1	8.1± 1.0	3.6± 0.3
0.02	412.4± 61.3	6.3± 0.9	1.2± 0.3	8.1± 0.9	3.0± 0.4
0.05	538.6± 43.8	6.5± 0.7	1.2± 0.1	8.7± 0.9	3.7± 0.3
0.1	327.7± 29.7	4.3± 0.6	1.0± 0.1	6.4± 1.2	3.0± 0.5

표 18. *Drosera intermedia* 잎 조각의 재생에 미치는 배지의 영향

Agar (%)	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	437.0± 70.8	5.5± 0.7	1.2± 0.1	10.5± 1.5	1.9± 0.4
0.2	508.9± 81.6	4.9± 0.5	1.4± 0.1	10.0± 1.3	2.6± 0.3
0.4	419.4± 62.8	4.2± 0.6	1.1± 0.1	9.2± 1.9	2.5± 0.2
0.6	342.7± 57.5	4.2± 0.8	1.0± 0.1	8.2± 1.1	2.8± 0.2
0.8	321.9± 42.5	3.8± 0.5	1.0± 0.1	9.3± 1.0	2.5± 0.1
1.0	187.2± 27.4	3.4± 0.6	0.9± 0.1	5.3± 0.7	2.3± 0.3

표 19. *Drosera intermedia* 잎 조각의 재생에 미치는 배지 pH의 영향

pH	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
4.0	1812.0± 71.7	9.5± 0.9	2.0± 0.2	13.4± 0.7	2.6± 0.0
4.5	1910.0± 46.6	10.1± 0.5	2.4± 0.0	19.3± 1.1	2.7± 0.1
5.0	1647.8± 20.4	9.2± 0.2	2.3± 0.1	14.2± 0.9	2.5± 0.1
5.5	1674.0± 57.2	9.2± 0.9	2.3± 0.0	14.0± 1.5	2.4± 0.2
6.0	1366.7± 97.8	8.8± 0.4	2.4± 0.0	12.5± 0.4	2.5± 0.1

2) *Drosera rotundifolia*

■ 연구재료: 잎 절편

■ 처리내용 및 방법

총질소 농도(7.5, 15, 30, 60, 120mM), sucrose 농도(0, 1, 2, 3, 4, 5%)

활성탄농도(0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1%), agar 농도(0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0%)

□ 기본배지 : 1/2MS배지 (sucrose 3%, pH 5.5, agar 0.6%)

■ 조사내용 및 방법: 생체중, 신초수·길이, 뿌리수·길이 조사

연구결과

총질소는 1/4~1/2배 (15~30mM)를 첨가한 배지에서 식물체의 재생이 양호하였고 생육은 가장 낮은 농도인 1/8배(7.5mM)를 첨가한 배지에서 가장 좋았으나 다른 처리구에 비해 노화가 빨리 진행되는 것을 관찰할 수 있었다(표 20). 2배(120mM)를 첨가한 구에서는 모두 고사하였다. **Sucrose**는 1% 첨가구에서 절편체당 5.1개의 식물체가 형성되어 가장 높은 형성률을 보였으나 식물체의 생육 및 뿌리의 발달은 오히려 무첨가구에서 더 왕성하였다(표 21). **활성탄**은 0.01% 첨가하였을 때 절편체당 5.6개로 가장 많은 식물체가 재생되었고, 농도가 높아질수록 식물체 재생이 감소하는 경향을 보였다(표 22). 뿌리도 0.01%에서 3.7개가 형성되어 가장 좋은 결과를 보였다. 배지에 **agar**를 첨가하지 않은 무첨가구에서 식물체 및 뿌리의 발달이 가장 왕성하였고, agar를 첨가하는 경우 농도가 높아질수록 식물체와 뿌리의 형성이 감소하였다(표 23).

표 20. *Drosera rotundifolia* 잎 조각의 재생에 미치는 총질소의 영향

Total nitrogen concentration	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
×1/8 of MS	29.5± 7.1	3.3± 0.5	0.9± 0.1	4.7± 0.9	0.7± 0.1
×1/4 of MS	38.8± 3.5	4.1± 0.7	0.8± 0.1	6.1± 0.3	0.7± 0.1
×1/2 of MS	41.7± 3.5	4.0± 0.5	0.8± 0.1	3.7± 0.8	0.5± 0.1
×1 of MS	15.0± 1.2	3.0± 0.3	0.4± 0.0	1.7± 0.3	0.1± 0.0
×2 of MS	6.3± 0.9	0 ^x	—	0	—

표 21. *Drosera rotundifolia* 잎 조각의 재생에 미치는 sucrose의 영향

Sucrose (%)	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	31.6± 1.4	3.0± 0.7	0.8± 0.1	3.8± 0.6	0.6± 0.0
1	32.8± 6.5	5.1± 0.3	0.6± 0.0	2.7± 0.3	0.4± 0.0
2	31.2± 4.1	3.8± 0.6	0.5± 0.1	1.7± 0.7	0.2± 0.1
3	18.7± 5.7	3.2± 0.9	0.5± 0.0	1.8± 0.8	0.3± 0.1
4	7.3± 0.6	2.8± 0.5	0.3± 0.0	2.0± 0.0	0.1± 0.0
5	7.3± 1.2	3.0± 0.0	0.3± 0.1	0	-

표 22. *Drosera rotundifolia* 잎 조각의 재생에 미치는 활성탄의 영향

Activated charcoal (%)	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	33.3± 4.7	3.7± 0.6	0.5± 0.1	2.3± 0.6	0.3± 0.1
0.01	36.9± 6.5	5.6± 0.1	0.5± 0.1	3.7± 0.4	0.3± 0.1
0.02	44.1± 5.5	5.0± 0.6	0.4± 0.1	3.0± 0.6	0.5± 0.2
0.05	31.2± 3.5	3.9± 0.5	0.5± 0.1	3.3± 0.3	0.3± 0.0
0.1	32.3± 7.3	3.7± 0.5	0.6± 0.1	3.3± 0.6	0.4± 0.1

표 23. *Drosera rotundifolia* 잎 조각의 재생에 미치는 agar의 영향

Agar (%)	Total fresh wt. (mg)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	206.2± 23.6	6.5± 0.8	1.1± 0.1	5.0± 1.4	0.6± 0.1
0.2	114.5± 24.0	6.2± 0.4	0.9± 0.1	4.7± 0.7	0.6± 0.1
0.4	57.8± 5.7	4.4± 0.2	0.7± 0.1	4.7± 0.4	0.6± 0.1
0.6	53.4± 5.4	4.3± 0.4	0.6± 0.1	3.8± 0.7	0.5± 0.0
0.8	32.3± 7.5	3.8± 0.5	0.4± 0.1	3.3± 0.2	0.3± 0.0
1.0	11.9± 1.3	3.6± 0.6	0.4± 0.0	2.9± 0.3	0.2± 0.0

다. *Sarracenia rubra*

- 연구재료: 유식물체
- 처리내용 및 방법 (처리수 : test tube 5반복)
 - * 성장 조절제 종류: kinetin + NAA & kinetin + IAA
 - 농도: 0, 1, 2, 5, 10 μ M(Kinetin), 0.1, 2 μ M(NAA, IAA)
 - * 기본배지 : 1/2MS, sucrose 3%, agar 0.6, pH 5.5
- 조사: 8주 배양 후 생체중, shoot 수와 길이, 엽장, 뿌리 수와 길이 조사

연구결과

전반적으로 kinetin을 NAA와 혼용한 구에서 IAA와 혼용한 구에 비해 식물체의 형성이 양호하였다. 특히 **Kinetin 5 μ M과 NAA 2 μ M**을 혼용첨가한 처리구에서 집중한 어린 유묘당 5.8개의 가장 많은 식물체가 형성되었다. **Kinetin과 IAA**를 혼용하였을 때는 전반적으로 식물체의 증식율이 극히 저조한 경향을 보였다. Kinetin 2 μ M과 IAA 2 μ M을 혼용첨가한 처리구에서 집중한 어린 유묘 당 1.4개의 식물체가 형성되었다(표 24-25).

표 24. 1/2MS 배지에서 *Sarracenia rubra* 줄기증식에 대한 kinetin과 NAA 영향

	Growth regulators (μ M)		Fresh weight (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)
	kinetin	NAA						
0	0	0	0.25d	1.6bc	2.6bcd	19.6bcde	2.0f	4.2ab
		1	1.25ab	2.8abc	3.5abcd	13.4cdef	20.4abc	2.8bcde
		2	0.39cd	1.2c	1.8d	6.0f	9.6def	0.8fg
1	0	0	0.44cd	3.8abc	3.3abcd	34.2a	2.0f	4.4a
		1	1.23ab	3.8abc	4.6ab	21.4bcd	22.0ab	3.6abc
		2	0.96abc	1.8bc	4.1abcd	10def	28.4a	2.2cdef
2	0	0	0.32d	4.6ab	3.2abcd	28.6ab	1.4f	3.5abc
		1	1.42a	3.4abc	4.2abcd	22.4bc	16.0bcd	4.2ab
		2	0.66bcd	2.4bc	2.2cd	7.6ef	6.2ef	1.1fg
5	0	0	0.41cd	3.2abc	3.6abcd	16.8cdef	0.6f	1.6efg
		1	1.16ab	3.6abc	4.1abcd	19.6bcde	12.6cde	3.1abcd
		2	1.18ab	5.8a	4.8ab	23.2bc	11.6de	1.8defg
10	0	0	0.35cd	2.4bc	4.3ab	16.6cdef	0.2f	0.3g
		1	0.55cd	2.8abc	5.3a	15.2cdef	1.8f	0.5g
		2	0.72bcd	2.8abc	3.1abcd	12.2cdef	1.6f	0.2g

표 25. 1/2MS 배지에서 *Sarracenia rubra* 줄기증식에 대한 kinetin과 IAA 영향

Growth regulators (μM)		Fresh weight (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of leaves	No. of roots	Root length (cm)
kinetin	IAA						
0	0	0.7abc	1.0b	4.0a	21.6ab	4.6ab	5.8a
	1	0.8a	1.0b	4.6a	15.8bc	6.2a	5.5ab
	2	0.4cd	1.0b	2.4a	20.2ab	3.4bc	2.3efg
1	0	0.7ab	1.0b	4.3a	32.6a	4.6ab	5.1abc
	1	0.3cd	1.0b	2.9a	23.8ab	2.6bcd	2.5defg
	2	0.3cd	1.0b	3.7a	21.2ab	3.6bc	3.2cdef
2	0	0.5abcd	1.0b	3.7a	21.2ab	3.4bc	4.4abcd
	1	0.6abc	1.0b	3.5a	30.4a	4.2abc	2.5defg
	2	0.5abcd	1.4a	3.6a	20.8ab	3.6bc	2.8def
5	0	0.4bcd	1.0b	3.5a	13.6bc	1.2cd	3.7bcde
	1	0.2d	1.0b	2.7a	16.6c	2.2bcd	1.5fg
	2	0.2d	1.0b	2.8a	6.0c	0.6d	0.7g
10	0	0.4cd	1.0b	2.9a	11.4bc	0.6d	0.7g
	1	0.2d	1.0b	3.5a	11.8bc	0.4d	0.6g
	2	0.4bcd	1.0b	4.0a	11.8bc	2.0bcd	1.3fg

2. 식충식물별 최적 재배조건 탐색

본 실험에서는 각 식물 모두 기내에서 배양된 식물체를 연구재료로 사용하였으며 배양토의 처리는 각각의 표에 나와 있고 저면관수하였다. 각 처리의 효과는 각 식물체를 12주간 배양 후 생존율, 생체중, 신초수, 초장, 초폭, 근수, 근장을 조사하여 평가하였다.

가. 파리지옥 *Dionaea muscipula*

순화재배용토에 관계없이 100% 활착률을 보였으나, 생체중 및 신초 수를 고려할 때 상토 단용에서 결과가 가장 좋았다(표 26-27).

표 26. *Dionaea muscipula*의 생육조사에 사용된 배지의 종류

Code No.	Medium code	Medium composition
1	S	Compost
2	P-A	Peatmoss-Acadian
3	P-A:Pe=4:1	Peatmoss-Acadian: Perlite=4:1
4	P-A:Pe=3:1	Peatmoss-Acadian: Perlite=3:1
5	P-A:Pe=2:1	Peatmoss-Acadian: Perlite=2:1
6	P-A:Pe=1:1	Peatmoss-Acadian: Perlite=1:1
7	P-S	Peatmoss-Sunshine
8	P-S:Pe=4:1	Peatmoss-Sunshine: Perlite=4:1
9	P-S:Pe=3:1	Peatmoss-Sunshine: Perlite=3:1
10	P-S:Pe=2:1	Peatmoss-Sunshine: Perlite=2:1
11	P-S:Pe=1:1	Peatmoss-Sunshine: Perlite=1:1

표 27. *Dionea musipula*의 형태적 특성에 미치는 배지의 영향

Medium code ²	Survival rate (%)	Fresh weight (g)	No. of shoots	plant height (cm)	Plant width (cm)	No. of roots	Root length (cm)
S	100	0.20ab	2.63a	1.38bc	2.99abcd	2.75ab	2.78ab
P-A	100	0.26ab	1.88abc	1.20cde	3.28abcd	2.75ab	3.65a
P-A:Pe=4:1	100	0.22ab	2.50a b	1.05de	2.65cd	2.50ab	3.00ab
P-A:Pe=3:1	100	0.32a	1.63abc	1.65a	3.71ab	1.88b	3.83a
P-A:Pe=2:1	100	0.19ab	1.38bc	1.40abc	2.44d	1.75b	1.98b
P-A:Pe=1:1	100	0.26ab	2.25abc	1.26cde	2.71bcd	1.88b	3.89a
P-S	100	0.27ab	2.75abc	1.31bcd	3.68ab	3.38a	2.10b
P-S:Pe=4:1	100	0.24ab	2.00abc	1.24cde	3.83a	2.63ab	2.73ab
P-S:Pe=3:1	100	0.18b	1.25c	1.00e	3.48abc	2.50ab	2.03b
P-S:Pe=2:1	100	0.16ab	1.38b	1.19cde	3.86a	2.38ab	3.05ab
P-S:Pe=1:1	100	0.22ab	1.88abc	1.58ab	3.15abcd	2.75ab	3.08ab

나. 끈끈이주걱 *Drosera filiformis*

재배용토의 종류에 관계없이 생육이 양호하였고, peatmoss와 perlite를 4:1로 하였을 때 근장이 가장 양호하였다(표 28).

표 28. *Drosera filiformis*의 형태적 특성에 미치는 배지의 영향

Medium code ^z	Survival rate (%)	Fresh weight (g)	No. of shoots	plant height (cm)	Plant width (cm)	No. of roots	Root length (cm)
S	100	0.43ab	1.80a	1.18a	1.16a	9.40a	3.88bcd
P-A	100	0.43ab	3.80a	1.24a	0.94a	10.60a	3.42bcd
P-A:Pe=4:1	100	0.76ab	2.80a	1.12a	0.76a	8.60a	5.70a
P-A:Pe=3:1	80	0.83ab	1.75a	0.95a	0.73a	9.75a	4.58bcd
P-A:Pe=2:1	80	1.10a	3.75a	2.23a	0.83a	10.75a	4.85ab
P-A:Pe=1:1	100	0.44ab	1.80a	0.70a	0.56a	10.00a	2.60de
P-S	100	0.58ab	2.60a	2.31a	2.06a	5.60a	3.06cde
P-S:Pe=4:1	100	0.24b	1.00a	1.84a	1.16a	8.20a	1.62e
P-S:Pe=3:1	100	0.29ab	2.20a	0.66a	0.86a	6.20a	2.56de
P-S:Pe=2:1	100	0.57ab	2.40a	1.60a	1.46a	10.40a	2.30de
P-S:Pe=1:1	80	0.44ab	4.00a	0.58a	0.63a	11.00a	2.85de

다. *Sarracenia purpurea* 'red tube'

순화재배용토의 영향은 크지 않았으나 상토 단용에서 가장 양호하였다(표 29).

표 29. *Sarracenia purpurea*'red tube'의 형태적 특성에 미치는 배지의 영향

Medium code ^z	Survival rate (%)	Fresh weight (g)	No. of shoots	plant height (cm)	Plant width (cm)	No. of roots	Root length (cm)
S	100	0.15abc	1.50a	5.44a	4.21ab	5.13a	3.00a
P-A	87.5	0.21a	1.43a	4.67abc	4.21ab	4.29ab	2.46ab
P-A:Pe=4:1	75	0.15abc	1.33a	3.92cd	3.33abc	3.50abc	2.38ab
P-A:Pe=3:1	75	0.13abc	1.33a	3.88cd	3.70abc	3.50abc	2.12abc
P-A:Pe=2:1	100	0.18ab	1.75a	5.30ab	3.94ab	4.00ab	2.93a
P-A:Pe=1:1	87.5	0.14abc	1.86a	5.19ab	4.53a	2.71bc	3.20a
P-S	100	0.11bc	1.25a	4.14bcd	3.85ab	3.50abc	2.43ab
P-S:Pe=4:1	100	0.07c	1.38a	3.31d	2.54c	3.13bc	1.15c
P-S:Pe=3:1	75	0.13abc	1.33a	4.60abc	3.33abc	3.50abc	1.58bc
P-S:Pe=2:1	37.5	0.08c	1.67a	3.30d	3.00bc	2.00c	1.33c
P-S:Pe=1:1	75	0.06c	1.50a	4.67abc	4.22ab	2.00c	2.40ab

라. *Sarracenia purpurea*

순화재배용토에 크게 영향을 받지 않았으나, peatmoss 단용구(SunshineTM)에서 결과가 가장 양호하였다(표 30).

표 30. *Sarracenia purpurea*의 형태적 특성에 미치는 배지의 영향

Medium code ^z	Survival rate (%)	Fresh weight (g)	No. of shoots	plant height (cm)	Plant width (cm)	No. of roots	Root length (cm)
S	100	0.13ab	1.50b	3.40ab	4.08a	3.17ab	2.05ab
P-A	83.3	0.05cd	1.20b	3.58a	1.66c	1.40c	0.82bc
P-A:Pe=4:1	100	0.09bcd	2.00ab	3.67a	2.82abc	2.00abc	1.12bc
P-A:Pe=3:1	66.6	0.03d	1.00b	2.85ab	2.75abc	2.25abc	2.05ab
P-A:Pe=2:1	100	0.08bcd	1.67b	3.23ab	2.67bc	1.83bc	0.60c
P-A:Pe=1:1	100	0.09bcd	1.17b	3.22ab	2.45bc	2.67abc	1.20bc
P-S	66.6	0.17a	3.00a	2.85ab	3.18ab	3.25ab	0.68c
P-S:Pe=4:1	83.3	0.12bcd	1.40b	3.20ab	3.36ab	3.40a	1.58abc
P-S:Pe=3:1	100	0.08bcd	1.33b	2.65b	2.38bc	1.83bc	2.02ab
P-S:Pe=2:1	100	0.09bcd	1.17b	3.03ab	2.35bc	2.33abc	2.52a
P-S:Pe=1:1	83.3	0.07bcd	1.80ab	2.84ab	2.22bc	1.80bc	0.88bc

마. *Brochinia reducta*

순화재배용토에 관계없이 생존율이 높았지만, 생체중, 신초수 및 초장을 고려할 때 상토 단용에서 결과가 가장 양호하였다(표 31).

표 31. *Brochinia reducta*의 형태적 특성에 미치는 배지의 영향

Medium code ^z	Survival rate (%)	Fresh weight (g)	No. of shoots	plant height (cm)	Plant width (cm)	No. of roots	Root length (cm)
S	100	2.45a	1.40a	7.34a	11.56a	5.60a	7.7ab
P-A	100	1.66a	1.00a	6.08abc	8.76a	6.20a	4.70ab
P-A:Pe=4:1	100	1.63a	1.20a	6.28abc	8.58a	8.20a	6.02ab
P-A:Pe=3:1	80	1.90a	1.25a	6.08abc	9.23a	6.75ab	5.58ab
P-A:Pe=2:1	100	2.05a	2.00a	6.10abc	10.80a	8.20a	8.22ab
P-A:Pe=1:1	100	2.13a	1.80a	6.42abc	10.10a	6.20ab	8.84a
P-S	100	1.65a	1.20a	5.60bc	7.84a	5.00b	4.18b
P-S:Pe=4:1	80	1.70a	1.00a	5.55c	10.85a	4.25b	5.25ab
P-S:Pe=3:1	100	2.46a	1.00a	6.74abc	10.32a	4.80b	6.44ab
P-S:Pe=2:1	100	1.69a	1.80a	7.20ab	8.62a	4.40b	4.74ab
P-S:Pe=1:1	60	1.42a	1.00a	5.33c	11.00a	6.67ab	5.85ab

바. *Darlingtonia californica*

순화, 재배용토에 관계없이 활착률이 양호하여 어떤 배지에서나 잘 자라는 편이었다(표 32).

표 32. *Darlingtonia californica*의 형태적 특징에 미치는 배지의 영향

Medium code ^z	Survival rate (%)	Fresh weight (g)	No. of shoots	plant height (cm)	Plant width (cm)	No. of roots	Root length (cm)
S	100	0.21a	1.60a	2.30a	3.84ab	4.20a	2.94ab
P-A	100	0.22a	3.20a	1.70bc	3.60ab	4.20a	2.52ab
P-A:Pe=4:1	100	0.18a	2.40a	1.66bc	4.10ab	4.40a	2.38b
P-A:Pe=3:1	100	0.26a	2.40a	2.06ab	3.60ab	5.80a	2.62ab
P-A:Pe=2:1	100	0.29a	2.00a	1.82abc	4.20a	3.60a	3.72a
P-A:Pe=1:1	100	0.25a	1.80a	1.70bc	3.46ab	4.40a	3.28ab
P-S	80	0.28a	2.25a	1.38c	4.23a	4.00a	2.95ab
P-S:Pe=4:1	60	0.18a	2.33a	1.93ab	3.50ab	5.00a	2.43b
P-S:Pe=3:1	100	0.25a	2.33a	1.92ab	3.74ab	5.80a	3.06ab
P-S:Pe=2:1	80	0.24a	2.50a	1.85abc	3.60ab	4.25a	3.15ab
P-S:Pe=1:1	100	0.20a	2.80a	2.00ab	3.26b	5.20a	3.08ab

3. 새로운 식충식물 유전자원 확보 및 재배

가. 끈끈이주걱 *Drosera* 속 식물 (30 분류군)

학 명	비 고	학 명	비 고
<i>D. adela</i>	★	<i>D. intermedia</i> type	○
<i>D. aliciae</i>	★	<i>D. intermedia</i> 'Giant'	○
<i>D. binata</i>	●	<i>D. lanata</i>	●
<i>D. burmanni</i>	★	<i>D. nidiformis</i>	●
<i>D. capensis</i>	★	<i>D. occidentalis</i> 'pink flower'	●
<i>D. capensis</i> '60cm tall'	★	<i>D. occidentalis</i> 'white flower'	●
<i>D. capensis</i> 'Alba'	★	<i>D. pauciflora</i>	★
<i>D. capensis</i> 'Narrow'	★	<i>D. petiolaris</i> 'All Red'	●
<i>D. capensis</i> 'All Red'	★	<i>D. pygmar</i>	★
<i>D. capensis</i> 'Typical'	★	<i>D. regia</i>	★
<i>D. cristiflora</i>	★	<i>D. rotundifolia</i>	○
<i>D. dilatato-petiolaris</i>	●	<i>D. tokaiensis</i>	●
<i>D. esmelderdae</i>	○	<i>D. trinervia</i>	●
<i>D. filiformis</i>	★	<i>D. whittakerii</i>	●
<i>D. indica</i>	○	<i>D. intermedia</i>	○

★ 가치 매우 높음 ● 가치 높음 ○ 가치 있음

나. 벌레잡이제비꽃 *Pinguicula* 속 식물 (7 분류군)

학 명	비 고	학 명	비 고
<i>P. ehlersae</i>	★	<i>P. moranensis</i>	★
<i>P. esseriana</i>	★	<i>P. primuliflora</i>	★
<i>P. grandiflora</i>	●	<i>P. vulgaris</i>	●
<i>P. ionantha</i>	★		

★ 가치 매우 높음 ● 가치 높음 ○ 가치 있음

다. 파리지옥 *Dionaea* 속 식물 (21 분류군)

학 명	비고	학 명	비고
<i>D. muscipula</i>	★	<i>D. muscipula</i> 'Vigorous'	★
<i>D. muscipula</i> B	●	<i>D. muscipula</i> 'Fast'	★
<i>D. muscipula</i> 'Big Traps'	★	<i>D. muscipula</i> 'Fine Tooth * Red'	★
<i>D. muscipula</i> 'Big Vigorous'	★	<i>D. muscipula</i> 'Low Giant'	★
<i>D. muscipula</i> 'Burbanks Best'	★	<i>D. muscipula</i> 'Paradisial'	★
<i>D. muscipula</i> C	●	<i>D. muscipula</i> 'Red'	★
<i>D. muscipula</i> Cross Teeth	★	<i>D. muscipula</i> 'Red-purple'	★
<i>D. muscipula</i> D	●	<i>D. muscipula</i> 'Saw Tooth'	★
<i>D. muscipula</i> 'Dutch'	★	<i>D. muscipula</i> 'Sharks Teeth'	★
<i>D. muscipula</i> E	●	<i>D. muscipula</i> 'Typical'	★
<i>D. muscipula</i> 'Fang'	★		

★ 가치 매우 높음 ● 가치 높음 ○ 가치 있음

라. 네펜데스 *Nepenthes* 속 식물 (10 분류군)

학 명	비 고	학 명	비 고
<i>N. alata</i> var. <i>biflora</i>	★	<i>N. rafflesiana</i>	★
<i>N. 'Allardii'</i>	●	<i>N. sanguinea</i>	★
<i>N. khasiana</i>	★	<i>N. truncata</i>	★
<i>N. madagascariensis</i>	★	<i>N. ventricosa</i>	★
<i>N. maxima</i>	★	<i>N. vieillardii</i>	★

★ 가치 매우 높음 ● 가치 높음 ○ 가치 있음

마. 그 외 유망 식충식물들 (29 분류군)

속 명	학 명	비고	학 명	비고
<i>Brocchinia</i>	<i>B. reducta</i>	★		
<i>Byblis</i>	<i>B. filifolia</i>	★	<i>B. liniflora</i>	★
	<i>B. filifolia</i> 'Giant'	★		
<i>Cephalotus</i>	<i>C. follicularis</i>	★		
<i>Darlingtonia</i>	<i>D. californica</i>	★		
<i>Genlisea</i>	<i>G. violacea</i>	★	<i>G. violacea</i> 'Serra da Caraca'	★
<i>Heliamphora</i>	<i>H. minor</i>	★	<i>H. nutans</i>	★
<i>Ibicella</i>	<i>I. lutea</i>	★		
<i>Sarracenia</i>	<i>S. flava</i>	★	<i>S. minor</i>	★
	<i>S. flava</i> Generic	★	<i>S. rubra</i>	★
	<i>S. flava gestreeped</i>	★	<i>S. flava</i> ssp.	★
	<i>S. willisii</i> × <i>leucophylla</i>	●	<i>grupelii</i> 'Milton Florida'	
	<i>S. rubra</i> ssp.	★	<i>S. rubra</i> ssp. <i>werryii</i>	★
	<i>S. gulfensis</i> 'Stocky'	★	<i>S. psittacina</i>	★
	<i>S. flava</i> 'Copperlid'	★	<i>S. purpurea</i>	★
	<i>S. leccoplvio</i>	★	<i>S. purpurea</i> ssp. <i>purpurea</i>	★
	<i>S. leucophylla</i>	★	<i>S. surprise</i>	★
<i>S. leucophylla</i> f. Red Tube	★			
<i>Utricularis</i>	<i>U. bifida</i>	●		

★ 가치 매우 높음 ● 가치 높음 ○ 가치 있음

4. 식충식물별 기내 대량번식법

가. *Darlingtonia californica*

1) pH농도별 실험

① 연구재료 : *Darlingtonia californica*의 유식물

② 처리내용 및 방법

* pH : 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0

* 기본배지 : 기본 1/2, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.5, BA $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

* 5반복, 마요네즈병(4개)

③ 조사내용 및 방법

* 배양기간 : 12주

* 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이

④ 연구결과

배지의 pH를 4.0~6.0으로 조절하여 실험한 결과, 신초의 증식 및 생육은 전반적으로 모든 처리구에서 차이를 보이지 않았다. pH 6.0에서 증식과 생육이 불량하였으며 정상적이지 않은 신초를 형성하여 높은 pH는 *D. californica*의 배양에 좋지 않은 것으로 보인다. 4.0~5.5 정도는 신초에 큰 영향이 없는 것으로 보인다(표 33, 그림 30).

표 33. *D. californica*의 생육과 분화에 미치는 pH의 영향^z.

pH	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
4.0	0.99b ^y	13.9ab	1.69a	0	—
4.5	0.93a	18.9a	1.56a	0	—
5.0	0.68a	16.4ab	1.26b	0	—
5.5	0.63a	19.0a	1.52a	0	—
6.0	0.50b	12.6b	0.99c	0	—

^zCultured on 1/2MS medium containing $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA.

^yMeans separation within columns DMRT, $p=0.05$.



그림 30. 다양한 pH의 1/2MS 배지에서 자란 *D. californica*의 성장 반응.

2) 온도별 실험

① 연구재료 : *Darlingtonia californica*의 유식물

② 처리내용 및 방법 : 5반복, 마요네즈병(4개)

* 온도 : 15, 20, 25, 30°C

* 기본배지 : 기본 1/2, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.5, BA 2mg·L⁻¹

③ 조사내용 및 방법

* 배양기간 : 12주

* 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이

④ 연구결과

*D. californica*의 최적 배양온도를 알아보기 위하여 15~30°C로 배양한 결과, 신초의 증식은 20, 25°C에서 각각 21.4개와 19.0개로 다른 온도에 비해 매우 활발하였으며, 신초의 생육 역시 1.58, 1.52cm로 양호한 결과를 보였다(표 34, 그림 31).

표 34. *D. californica*의 생육과 분화에 미치는 온도의 영향^z.

Temperature (°C)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
15	0.30b ^y	5.7b	1.33b	0	—
20	0.59a	21.4a	1.58a	0	—
25	0.63a	19.0a	1.52ab	0	—
30	0.15b	6.7b	1.03c	0	—

^zCultured on 1/2MS medium containing 2 mg·L⁻¹ BA.

^yMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.



그림 31. 다양한 온도에서 배양된 *D. californica*의 성장반응.

3) 암배양 실험

① 연구재료 : *Darlingtonia californica*의 유식물

② 처리내용 및 방법 : 5반복, 마요네즈병(4개)

* 암전처리 기간 : 0, 1, 2, 4주

* 기본배지 : 기본 1/2, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.5, BA $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

③ 조사내용 및 방법

* 배양기간 : 12주

* 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이

④ 연구결과

배양초기의 암처리가 신초의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0~4주간 암배양 후 명배양하였다. 그 결과, 1~2주의 암처리가 신초의 증식을 촉진하여 각각 24.0, 22.0개로 우수하였다. 그러나 4주간 암배양한 경우처럼 암배양 기간이 길수록 신초의 증식 및 생육이 불량해지는 결과를 보였다(표 35, 그림 32).

표 35. *D. californica*의 생육과 분화에 미치는 암처리의 영향^z.

Period of dark treatment (weeks)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	0.63a ^y	19.0ab	1.52a	0	—
1	0.61a	24.0a	1.49a	0	—
2	0.56ab	22.0ab	1.47a	0	—
4	0.41b	16.8b	1.04b	0	—

^zCultured on 1/2MS medium containing $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA.

^yMeans separation within columns Duncan's multiple range test, $p=0.05$.



그림 32. 다양한 암처리 기간에 따른 *D. californica*의 성장반응.

4) 발근유도 실험

① 연구재료 : *Darlingtonia californica*의 유식물

② 처리내용 및 방법 : 5반복, 마요네즈병(4개)

* IBA: 배지에 첨가 -0, 1, 2, 5, 10 mg·L⁻¹

용액에 침지 후 배지 치상 - 100, 200, 300, 500 mg·L⁻¹/ 3, 6, 12hr

* 기본배지 : 기본 1/2배지, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.5

③ 조사내용 및 방법

* 배양기간 : 12주

* 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이

④ 연구결과

발근촉진제 IBA를 1/2MS배지에 첨가하여 *D. californica*의 유식물체를 기내 배양한 결과, 신초의 증식 및 성장, 뿌리의 발달 모두 IBA를 첨가하지 않은 처리에서 가장 우수한 결과를 보였다. 뿌리의 증식은 무첨가하였을 때 6.4개로 IBA 10mg·L⁻¹ 첨가구보다 약 5배 정도 많이 발생하였으며, 2mg·L⁻¹ 첨가구에서 4.9개로 양호하였다(표 36, 그림 33). 뿌리의 길이생장은 2mg·L⁻¹의 첨가구에서 양호하였으나 다른 처리구와 유의차가 없었다.

또한 IBA의 농도별로 *D. californica*의 유식물체 침지시간을 달리하여 처리한 후 1/2MS배지에 기내배양 한 결과, 신초의 증식은 무첨가하였을 때 16.5개로 가장 많이 발생하였으나 IBA의 처리구에서는 농도가 낮고 침지 시간이 짧을수록 왕성하여 100mg·L⁻¹에서 3시간 침지시 13.3개로 양호한 결과를 보였다. 발근의 경우 IBA 100mg·L⁻¹ 농도구에서 전반적으로 발근 및 길이생장이 양호한 경향을 보여 IBA 100mg·L⁻¹에서 3시간 침지하였을 때 발근 및 길이가 각각 12.9개

와 1.48cm로 무첨가구의 6.4개와 0.73cm에 비해 약 2배정도 증가되는 결과를 보였다. 그러나 IBA의 처리는 농도가 높아질수록, 침지시간이 길어질수록 신초의 증식 및 성장, 발근이 억제되는 경향을 보여 500mg·L⁻¹농도에서 12시간 침지 처리에서는 모든 식물체가 고사하였다(표 37, 그림 34).

표 36. *D. californica*의 줄기와 뿌리 형성에 미치는 IBA의 영향^z.

IBA (mg·L ⁻¹)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	0.89a ^z	16.5a	2.05a	6.4a	0.73a
1	0.53b	10.9b	1.55b	4.5ab	0.75a
2	0.43b	8.2b	1.57b	4.9a	0.87a
5	0.15c	4.3c	1.45bc	2.0bc	0.67a
10	0.07c	3.0c	1.24c	1.7c	0.77a

^zMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.



그림 33. 1/2MS 배지에서 다양한 IBA 농도에 대한 *D. Californica*의 성장반응.

표 37. *D. californica*의 줄기 및 뿌리 형성에 대한 IBA 침지효과^z

IBA (mg·L ⁻¹)	Soaking time (hrs.)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
Control		0.89a ^z	16.5a	2.05ab	6.4bcd	0.73a
100	3	0.79ab	13.3ab	2.27a	12.9a	1.48a
	6	0.55abc	10.5abc	1.93abc	8.4abc	1.21a
	12	0.52bc	9.7bcd	1.59bcd	8.9a b	1.35a
200	3	0.71ab	10.7abc	1.88abc	5.8bcd	1.15a
	6	0.33cd	5.9cde	1.61bcd	4.3bcd	0.90a
	12	0.12d	1.5e	1.50cd	4.5bcd	0.95a
300	3	0.53bc	9.0bcd	1.60bcd	6.4bcd	1.11a
	6	0.15d	3.8de	1.60bcd	2.2d	0.60a
	12	0.10d	2.5e	1.20d	3.0cd	0.60a
500	3	0.27cd	5.9cde	1.46cd	4.2bcd	0.68a
	6	0.17d	5.0cde	1.30d	1.0d	0.60a
	12			Dead		

^zMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.

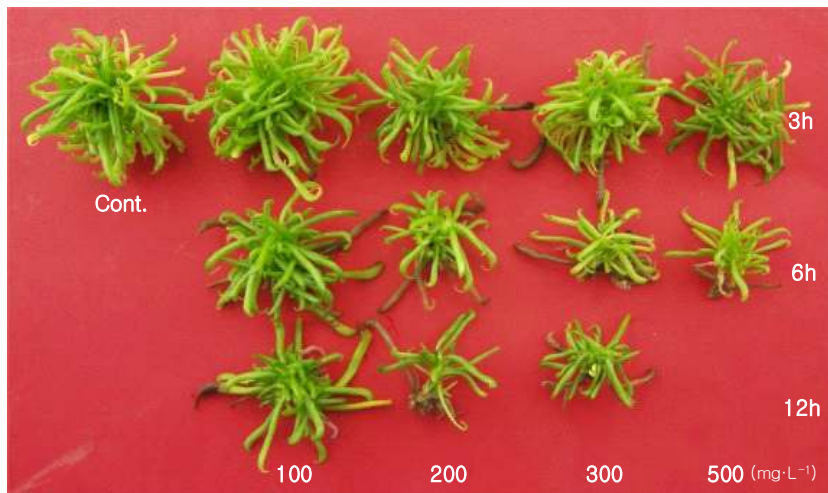


그림 34. 다양한 IBA 침지처리에 따른 *D. californica*의 성장반응.

나. *Heliophora minor*

1) pH농도별 실험

① 연구재료 : *H. minor*의 유식물

② 처리내용 및 방법 : 5반복, 마요네즈병(4개)

* pH: 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0

* 기본배지 : 기본 1/2배지, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.5,
 생장조절제(BA1mg·L⁻¹, NAA 2mg·L⁻¹)

③ 조사내용 및 방법

* 배양기간 : 12주

* 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이

④ 연구결과

식물체 재생에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 배지의 pH를 4.0~6.0으로 조절한 결과, 신초의 증식은 pH 5.0일 때 14.9개로 양호하였으며, 뿌리는 pH 5.5에서 12.0개로 양호하였다(표 28, 그림 35).

표 38. *H. minor*의 생육과 분화에 미치는 pH의 영향^z.

pH	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
4.0	1.01a ^y	13.3ab	3.52a	9.9ab	0.53b
4.5	1.04a	11.7b	3.23bc	7.8b	0.65ab
5.0	1.01a	14.9a	2.97c	8.9b	0.74ab
5.5	1.06a	12.1ab	3.28ab	12.0a	0.66ab
6.0	0.80b	13.4ab	2.99c	9.4ab	0.75a

^zCultured on 1/2MS medium containing 1 mg·L⁻¹ BA and 2 mg·L⁻¹ NAA.

^yMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.



그림 35. 1/2 MS 배지에서 다양한 pH에 대한 *H. minor*의 성장반응.

2) 온도별 실험

① 연구재료 : *H. minor*의 유식물

② 처리내용 및 방법 : 5반복, 마요네즈병(4개)

* 온도 : 15, 20, 25, 30°C

* 기본배지 : 기본 1/2배지, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.5,
생장조절제(BA1mg·L⁻¹, NAA 2mg·L⁻¹)

③ 조사내용 및 방법

* 배양기간 : 12주

* 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이

④ 연구결과

배양온도를 15~30°C로 달리하여 배양한 결과, 신초의 형성은 25°C에서 12.1개로 가장 활발하였으며, 30°C에서도 11.1개로 양호한 결과를 보였다. 신초의 길이생장 및 뿌리의 발달 역시 25°C에서 가장 우수하였다(표 39, 그림 36).

표 39. *H. minor*의 생육과 발달에 미치는 온도의 영향^z

Temperature (°C)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
15	0.18d ^y	3.4c	1.80d	0	-
20	0.65b	7.0b	2.89b	9.7a	0.40b
25	1.06a	12.1a	3.28a	12.0a	0.66a
30	0.36c	11.1a	2.27c	2.0b	0.60ab

^zCultured on 1/2MS medium containing 1 mg·L⁻¹ BA and 2 mg·L⁻¹ NAA.

^yMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.



그림 36. 다양한 온도에 대한 *H. minor*의 성장 반응.

3) 암배양 실험

- ① 연구재료 : *H. minor*의 유식물
- ② 처리내용 및 방법 : 5반복, 마요네즈병(4개)
 - * 암처리 기간 : 0, 1, 2, 4주
 - * 기본배지 : 기본 1/2배지, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.5, 생장조절제(BA1mg·L⁻¹, NAA 2mg·L⁻¹)
- ③ 조사내용 및 방법
 - * 배양기간 : 12주
 - * 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이
- ④ 연구결과

0, 1, 2, 4주간 25°C의 조건에서 암배양 후 명배양한 결과, 2주간 암배양 후 명배양하였을 때 신초 재생이 13.0개로 양호하였지만 다른 처리구와 유의차는 인정되지 않았다(표 40, 그림 37).

표 40. *H. minor*의 생육과 분화에 미치는 암처리의 영향^z.

Period of dark treatment (week)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	1.06a ^y	12.1a	3.28a	12.0ab	0.66ab
1	0.80b	12.6a	3.39a	7.6b	0.71a
2	0.95ab	13.0a	3.37a	13.5a	0.63ab
4	0.81b	10.6a	2.67b	8.5b	0.47b

^zCultured on 1/2MS medium containing 1 mg·L⁻¹BA and 2 mg·L⁻¹NAA.

^yMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.

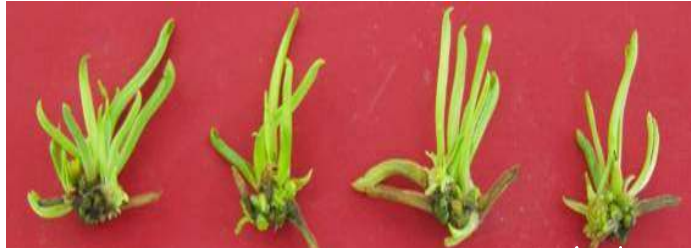


그림 37. 다양한 암처리 기간에 따른 *H. minor*의 성장 반응.

4) 발근유도 실험

① 연구재료 : *H. minor*의 유식물

② 처리내용 및 방법 : 5반복, 마요네즈병(4개)

* IBA: 배지에 첨가 -0, 1, 2, 5, 10 mg·L⁻¹

용액 침지 후 배지 치상 - 100, 200, 300, 500 mg·L⁻¹ / 3, 6, 12hr

* 기본배지 : 기본 1/2배지, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.5

③ 조사내용 및 방법

* 배양기간 : 12주

* 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이

④ 연구결과

H. minor 유식물체의 기내배양시 IBA를 0~10mg·L⁻¹의 농도로 1/2MS배지에 첨가한 결과, 신초의 증식은 IBA의 농도가 높아질수록 증가하여 2~10mg·L⁻¹의 농도에서 18.1~19.3개로 양호한 결과를 보였으며, 신초의 생장은 5~10mg·L⁻¹에서 양호하였다(표 41, 그림 38). 발근은 2~5mg·L⁻¹의 농도에서 22.6~22.4개로 무첨가구의 3.8개에 비해 7배 정도 증가하였으며, 뿌리의 생장은 2mg·L⁻¹의 농도에서 가장 길게 자랐다.

고농도의 IBA(100~500mg·L⁻¹)에 유식물체를 시간별로 침지한 결과, 신초의 증식은 300mg·L⁻¹에서 12시간 침지하였을 때 18.6개로 활발하였다. 500mg·L⁻¹의 농도에서는 12시간 침지시 신초의 형성은 17.3개 양호하였으며, 뿌리의 증식 역시 38.5개로 무첨가구의 3.8개에 비하여 10배 이상 증가하였다. 뿌리의 생장은 300mg·L⁻¹의 농도에서 6시간 침지하였을 때 가장 좋았지만 500mg·L⁻¹의 농도에서 6~12시간 침지하였을 경우에도 양호한 결과를 보였다(표 42, 그림 39).

표 41. *H. minor*의 줄기와 뿌리 형성에 미치는 IBA의 영향^z.

IBA(mg·L ⁻¹)	Fresh wt.(g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	0.70c ^z	12.6c	2.16c	3.8c	0.78bc
1	0.92ab	15.3bc	2.37bc	14.6b	0.96ab
2	1.08a	19.3a	2.52b	22.6a	1.19a
5	0.99ab	18.5ab	2.75a	22.4a	0.92ab
10	0.86bc	18.1ab	2.79a	20.7ab	0.52c

^zMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.



그림 38. 1/2 MS 배지에서 다양한 IBA 농도에 대한 *H. minor*의 성장반응.

표 42. *H. minor*의 줄기와 뿌리 형성에 미치는 IBA 침지처리의 영향^z.

IBA (mg·L ⁻¹)	Soaking time (hrs.)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
Control		0.73c ^z	12.6c	2.16b	3.8h	0.78e
100	3	1.02ab	14.8bc	2.52a	9.1gh	1.30cd
	6	1.23a	16.8ab	2.53a	13.8efg	2.07a
	12	1.07ab	16.9ab	2.38ab	20.9e	0.99de
200	3	0.97b	16.6ab	2.50a	12.8fg	1.16cde
	6	1.09ab	17.1ab	2.51a	18.4def	1.94ab
	12	1.14ab	17.8ab	2.51a	28.8bc	1.19cde
300	3	1.09ab	15.4abc	2.44a	19.1de	1.56bc
	6	1.11ab	14.4bc	2.50a	19.5de	2.23a
	12	1.00b	18.6a	2.31ab	30.8b	1.09de
500	3	1.15ab	15.7abc	2.42a	24.4cd	1.30cd
	6	1.08ab	15.2abc	2.41a	29.0bc	2.01a
	12	1.18ab	17.3ab	2.53a	38.5a	1.96ab

^zMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.

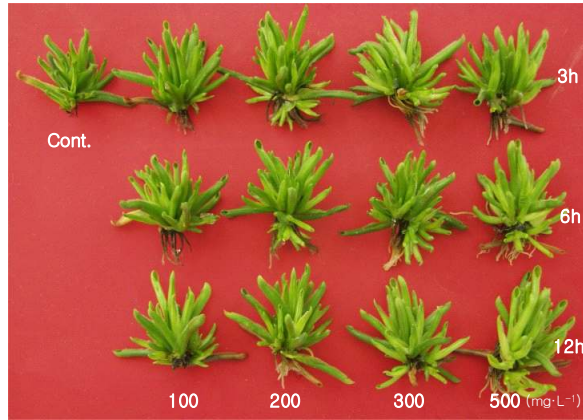


그림 39. 다양한 IBA 침지처리에 대한 *H. minor*의 성장반응.

다. 벌레잡이제비꽃 *Pinguicula moranensis*

1) 성장조절제

① 연구재료 : *Pinguicula moranensis*의 leaf (1× 1cm)

② 처리내용 및 방법 : 5반복, 마요네즈병(4개)

* 성장조절제의 종류 및 농도 : BA, Kinetin + NAA, IAA (4조합)

- Kin, BA : 1, 2, 5mg·L⁻¹ - NAA, IAA: 0, 0.5, 1.0, 2.0mg·L⁻¹

* 기본배지 : 1/2MS, sucrose 3%, agar 0.8, pH 5.5

③ 조사내용 및 방법

* 배양기간 : 60일

* 조사항목 : 생체중, shoot 수 shoot 길이, root 수, root 길이

④ 연구결과

Kinetin과 IAA를 혼용으로 첨가한 배지에서 식물체의 재생이 가장 왕성하게 나타났으나 kinetin을 단용으로 처리하였을 때는 농도에 관계없이 신초의 증식이 저조하였다. Kinetin과 IAA를 각각 1 mg·L⁻¹씩 혼용 처리구에서 94.3개로 가장 많은 신초를 형성하였다(그림 40, 표 43-46).

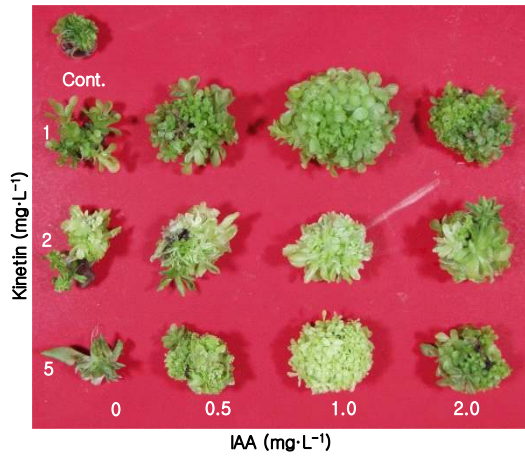


그림 40. 1/2 MS 배지에서 다양한 kinetin과 IAA 농도에 대한 *P. moranensis*의 성장반응.

표 43. 1/2 MS 배지에서 *P. moranensis* 잎의 성장과 분화에 미치는 kinetin과 NAA의 영향

Growth regulators (mg·L ⁻¹)		Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
Kinetin	NAA					
Control		0.57bcd ^z	6.8f	1.36a	14.1de	1.42ab
1	0	0.26d	4.8f	0.95bc	11.9de	1.23a-d
	0.5	1.62a	51.4bc	1.08b	48.9a	0.93de
	1.0	0.86b	29.6cde	1.01bc	35.7abc	0.98cde
	2.0	0.80bc	31.3cde	0.86cd	38.8ab	0.74e
2	0	0.34cd	6.4f	0.94bc	11.7de	1.31abc
	0.5	0.94b	31.6cde	0.73de	22.9cd	0.85e
	1.0	0.83b	39.2cd	0.74de	11.3de	0.74e
	2.0	0.85b	27.1def	0.89bcd	26.4bcd	0.94de
5	0	0.58bcd	12.9ef	0.74de	10.8de	1.55a
	0.5	1.54a	79.7a	0.61e	21.8cd	1.10b-e
	1.0	1.49a	52.3bc	0.82cd	5.2e	0.88de
	2.0	1.55a	67.9ab	0.61e	15.0de	0.78e

^zMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.

표 44. 1/2 MS 배지에서 *P. moranensis* 잎의 생장과 분화에 미치는 BA와 NAA의 영향

Growth regulators (mg·L ⁻¹)		Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
BA	NAA					
	Control	0.57d ^z	6.8c	1.38a	14.1a	1.42a
1	0	0.57d	6.3c	1.00b	7.0abc	1.50a
	0.5	1.01bc	40.4ab	0.88bcd	9.9abc	0.82bc
	1.0	0.98c	45.9a	0.85b-e	7.8abc	0.72bc
	2.0	1.00bc	38.5ab	0.72def	10.4ab	0.70bc
2	0	0.36d	8.6c	0.72def	1.7bc	0.83bc
	0.5	1.40a	42.6ab	0.91bc	8.8abc	0.73bc
	1.0	1.37a	38.5ab	0.75c-f	8.9abc	0.74bc
	2.0	1.02bc	29.7b	0.87bcd	13.8a	0.71bc
5	0	0.48d	17.0c	0.59f	1.5c	1.05b
	0.5	1.19abc	42.9ab	0.78cde	4.3bc	0.53c
	1.0	1.34ab	42.6ab	0.69ef	4.8bc	0.55c
	2.0	1.08abc	42.6ab	0.74def	10.0abc	0.72bc

^zMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.

표 45. 1/2 MS 배지에서 *P. moranensis* 잎의 생장과 분화에 미치는 kinetin과 IAA의 영향

Growth regulators (mg·L ⁻¹)		Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
Kinetin	IAA					
	Control	0.28e ^z	17.0ef	0.77b	6.7f	0.80d
1	0	0.65de	15.8ef	1.19b	19.1def	1.31ab
	0.5	1.95abc	42.6cde	1.23b	48.5bc	1.24abc
	1.0	2.37a	94.3a	1.41b	72.5a	1.49a
	2.0	2.25ab	74.8ab	1.35b	63.9ab	0.99bcd
2	0	1.04cde	15.6ef	0.87b	16.4def	0.89cd
	0.5	1.60a-d	39.8de	2.29a	26.4de	1.09bcd
	1.0	1.48a-d	36.9def	0.83b	10.9ef	1.25abc
	2.0	2.29a	39.9de	0.83b	24.8def	1.02bcd
5	0	0.64de	8.9f	0.87b	9.0ef	1.03bcd
	0.5	1.28bcd	40.2de	1.45b	14.4def	1.11a-d
	1.0	1.56a-d	69.8abc	0.88b	19.8def	1.30ab
	2.0	1.86abc	64.7cde	1.04b	32.7cd	1.27abc

^zMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.

표 46. 1/2 MS 배지에서 *P. moranensis* 잎의 생장과 분화에 미치는 BA와 IAA의 영향

Growth regulators (mg·L ⁻¹)		Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
BA	IAA					
Control		0.28d ^z	17.0fg	0.77def	6.7abc	0.80abc
1	0	0.79c	20.7efg	0.86cde	2.3d	0.56c
	0.5	1.40ab	45.9bcd	0.97bc	7.0bcd	0.78abc
	1.0	1.68a	42.8bcd	1.14a	9.0abc	0.82abc
	2.0	1.29ab	50.9abc	1.06ab	14.1a	1.02a
2	0	1.02bc	12.1g	0.89cd	3.6cd	0.64bc
	0.5	1.44ab	35.4cde	1.04ab	9.7abc	1.11a
	1.0	1.51ab	38.5cd	1.08ab	9.8abc	1.05a
	2.0	1.66a	48.2bcd	1.11ab	13.0ab	0.85abc
5	0	1.01bc	31.3def	0.70ef	0	—
	0.5	1.42ab	65.4a	0.70ef	4.3cd	0.84abc
	1.0	1.33ab	59.8ab	0.69f	5.4cd	0.99ab
	2.0	1.62a	48.3bcd	0.77def	6.0cd	0.82abc

^zMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.

2) 배지구성물질의 영향

가) 배지종류별

- ① 연구재료 : *Pinguicula moranensis*의 leaf (1× 1cm)
- ② 처리내용 및 방법 : 5반복, 마요네즈병(4개)
 - * MS, 1/2MS, 1/4MS, parliman배지
 - * 기본배지 : 기본 1/2배지, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.5,
생장조절제(IAA 1mg·L⁻¹, Kin 1mg·L⁻¹)
- ③ 조사내용 및 방법
 - * 배양기간 : 12주
 - * 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이
- ④ 연구결과

배지종류를 1/4MS~1MS, Parliman배지로 달리하여 배양한 결과, 배지에 첨가

한 무기물질의 양이 증가할수록 식물체의 재생은 증가하여 1MS배지에서 21.9개로 가장 우수하였다(표 47, 그림 41).

표 47. *P. moranensis* 잎의 성장과 분화에 미치는 배지의 영향^z.

Medium	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
1/4MS	0.50c ^y	13.5b	1.09c	17.6a	1.24a
1/2MS	3.08a	16.1b	1.79a	15.7a	1.05ab
1MS	2.15b	21.9a	1.44b	10.6a	0.79b
Parliman	0.32c	5.2c	1.05c	15.7a	1.31a

^zCultured on 1/2MS medium containing 1 mg·L⁻¹ kinetin and 1 mg·L⁻¹ IAA.

^yMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.



그림 41. 다양한 배지에 대한 *P. moranensis*의 성장 반응.

나) Agar 농도별 실험

① 연구재료 : *Pinguicula moranensis*의 leaf (1× 1cm)

② 처리내용 및 방법 : 5반복, 마요네즈병(4개)

*agar : 0, 0.6, 0.8, 1%

* 기본배지 : 기본 1/2배지, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.5,
 생장조절제(IAA 1mg·L⁻¹, Kin 1mg·L⁻¹)

③ 조사내용 및 방법

* 배양기간 : 12주

* 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이

④ 연구결과

Agar를 첨가하지 않은 액체배지에서는 모두 고사하여 *P. moranensis*의 배양에는 적합하지 않았으며, 식물체의 재생은 agar 첨가구에서 양호하였다. 0.8%에서 15.7개로 많이 형성하였으며, 식물의 성장 및 생육도 우수하였다. 뿌리의 증식은 0.6%에서 19.9개로 높았지만 다른 처리구와 유의차는 없었다(표 48, 그림 42).

표 48. *P. moranensis* 잎의 성장과 분화에 미치는 agar의 영향^z.

Agar (%)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0			Dead		
0.6	0.93b ^y	13.4b	1.20b	19.9a	1.48a
0.8	3.08a	15.7a	1.79a	15.9a	1.05b
1.0	0.78b	12.9b	1.04b	18.5a	1.35ab

^zCultured on 1/2MS medium containing 1 mg·L⁻¹ kinetin and 1 mg·L⁻¹ IAA.

^yMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.



그림 42. 1/2 MS 배지에서 다양한 agar 농도에 따른 *P. moranensis*의 성장반응.

다) 활성탄 농도별 실험

- ① 연구재료 : *Pinguicula moranensis*의 leaf (1× 1cm)
- ② 처리내용 및 방법 : 5반복, 마요네즈병(4개)
 - * 활성탄 : 0, 0.5, 1, 2%
 - * 기본배지 : 기본 1/2배지, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.5, 성장조절제(IAA 1mg·L⁻¹, Kin 1mg·L⁻¹)
- ③ 조사내용 및 방법
 - * 배양기간 : 12주
 - * 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이
- ④ 연구결과

활성탄을 첨가하지 않은 처리에서 첨가구에 비해 식물체의 증식 및 생장이 매우 왕성하였다. 무첨가구에서 발생한 싹의 수는 16.1개로 매우 많았으며, 뿌리 역시 15.7개로 매우 양호하였다(표 49, 그림 43).

표 49. *P. moranensis* 잎의 성장과 분화에 미치는 활성탄의 영향^z.

Activated charcoal (%)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	3.08a ^y	16.1a	1.79a	15.7a	1.05a
0.5	0.34b	5.9b	1.17b	14.1a	1.01a
1.0	0.33b	1.3b	1.05b	10.4a	1.06a
2.0	0.37b	4.4b	1.18b	13.6a	1.34a

^zCultured on 1/2MS medium containing 1 mg·L⁻¹ kinetin and 1 mg·L⁻¹ IAA.

^yMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.



그림 43. 1/2 MS 배지에서 다양한 활성탄농도에 대한 *P. moranensis* 성장반응.

라) Sucrose 농도별 실험

- ① 연구재료 : *Pinguicula moranensis*의 leaf (1× 1cm)
- ② 처리내용 및 방법 : 5반복, 마요네즈병(4개)
 - * sucrose : 0, 1, 2, 3, 4, 5%
 - * 기본배지 : 기본 1/2배지, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.5, 성장조절제(IAA 1mg·L⁻¹, Kin 1mg·L⁻¹)
- ③ 조사내용 및 방법
 - * 배양기간 : 12주
 - * 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이
- ④ 연구결과

Sucrose의 첨가량이 많을수록 신초 재생은 증가하여 5%를 처리하였을 때 35.8개로 가장 왕성하였으나, 생장은 3% 처리에서 양호하였다(표 50, 그림 44).

표 50. *P. moranensis* 잎의 성장과 분화에 미치는 sucrose의 영향^z.

Sucrose (%)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
0	0.17b ^y	2.4c	1.38b	8.9c	1.52ab
1	0.43b	4.7c	1.45b	14.5bc	1.65a
2	0.61b	10.7bc	1.46b	25.0b	1.81a
3	3.08a	16.1bc	1.79a	15.7bc	1.05c
4	0.64b	23.5ab	1.15bc	41.2a	1.63a
5	0.67b	35.8a	0.90c	42.4a	1.21bc

^zCultured on 1/2MS medium containing 1 mg·L⁻¹ kinetin and 1 mg·L⁻¹ IAA.

^yMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.



그림 44. Sucrose에 대한 *P. moranensis*의 성장반응.

마) 총질소 실험

- ① 연구재료 : *Pinguicula moranensis*의 leaf (1× 1cm)
- ② 처리내용 및 방법 : 5반복, 마요네즈병(4개)
 - * 15, 30, 60mM
 - * 기본배지 : 기본 1/2배지, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.5, 성장조절제(IAA 1mg·L⁻¹, Kin 1mg·L⁻¹)
- ③ 조사내용 및 방법
 - * 배양기간 : 12주
 - * 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이
- ④ 연구결과

배지의 총 질소함량을 15~60mM로 달리하여 배양한 결과, 신초는 60mM에서 60.5개로 가장 많이 형성되어 다른 농도에 비해 식물체의 재생이 3배정도 증가하였다. 뿌리의 형성은 모든 처리구가 19.4~19.5개로 양호하였으나 처리구간 큰 차이를 보이지 않았다. 반면, 뿌리의 생장은 1/2배로 처리한 30mM에서 양호하였다 (표 51, 그림 45).

표 50. *P. moranensis* 잎의 성장과 분화에 미치는 전질소농도의 영향^z.

Total nitrogen concentration (mM)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Shoot length (cm)	No. of roots	Root length (cm)
15	0.70b ^y	24.6b	0.90b	19.5a	1.11ab
30	0.66b	20.4b	1.09a	19.4a	1.52a
60	2.14a	65.0a	1.01ab	19.4a	0.75b

^zCultured on 1/2MS medium containing 1 mg·L⁻¹ kinetin and 1 mg·L⁻¹ IAA.

^yMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.



그림 45. 전질소농도에 대한 *P. moranensis* 성장반응.

5. 식충식물별 기내식물의 기외 이식

가. *Heliamphora minor*

1) 기외순화시 발근촉진제가 미치는 영향

- ① 연구재료 : 기내배양한 *Heliamphora minor*의 유식물
- ② 처리내용 및 방법 : 5개체, 5반복
 - * IBA : 용액에 침지 후 배양토에 이식
 - 0, 100, 200, 300, 500 mg·L⁻¹ / 3, 6, 12시간
 - * 기본토양 : 식충식물용 무비 원예상토(상토박사)
- ③ 조사내용 및 방법
 - * 배양기간 : 10주
 - * 조사항목 : 생체중, Shoot 수 & 길이, Root 수 & 길이
- ④ 연구결과

IBA의 농도별 침지시간을 달리하여 기외 이식 후 발근에 미치는 영향을 알아본 결과, 생존율은 무처리구에서 70%로 가장 양호하였다(표 51).

표 51. *In vivo*에서 IBA 침지처리가 *H. minor*의 성장과 분화에 미치는 영향

IBA mg·L ⁻¹	Soaking time (hrs.)	Survival rate (%)	Fresh wt. (g)	No. of shoots	Plant height (cm)	Plant width (cm)	No. of roots	Root length (cm)
Control		70	0.10a ^z	1.0a	2.09bcd	1.39efg	3.3a	0.21ab
100	3	50	0.09a	1.0a	2.11bc	1.44c-g	2.1bcd	0.28ab
	6	40	0.07a	1.0a	2.00cde	1.48b-f	2.3bcd	0.33a
	12	25	0.08a	1.0a	1.88ef	1.38fg	2.0de	0.20ab
200	3	50	0.11a	1.0a	2.35a	1.63bc	2.9ab	0.18b
	6	30	0.09a	1.0a	2.35a	1.83a	2.2bcd	0.24ab
	12	15	0.10a	1.0a	1.97def	1.43d-g	2.0cd	0.20ab
300	3	30	0.11a	1.0a	2.15b	1.60bcd	2.5bc	0.20ab
	6	15	0.09a	1.0a	2.02bcd	1.62bcd	2.2bcd	0.20ab
	12	20	0.11a	1.0a	1.96def	1.64b	2.0cd	0.17b
500	3	15	0.10a	1.0a	2.07bcd	1.57b-e	1.7d	0.15b
	6	15	0.07a	1.0a	1.83f	1.31fg	2.0cd	0.20ab
	12	15	0.07a	1.0a	1.83f	1.27g	1.0e	0.15b

^zMeans separation within columns Duncan's multiple range test, p=0.05.

IBA의 처리에서는 $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 와 $200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 농도에서 3시간 침지시 각각 50%의 생존율을 보였으며, 나머지 처리구에서는 50%에도 미치지 못하는 생존율을 보여 농도가 낮을수록, 침지 시간이 짧을수록 생존율이 양호한 것을 관찰할 수 있었다. 식물의 초장 및 초폭의 생장은 $200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 농도에서 3~6시간 동안 침지하였을 때 가장 양호하였다. 발근은 무처리구에서 3.3개로 IBA를 처리한 것보다 높았다. IBA 처리에서 발근은 농도에 상관없이 침지 시간이 짧을수록 양호하였다. 반면, 뿌리의 생장은 $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 3~6시간 침지하였을 때 양호하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 전반적인 목표 달성도 분석 및 관련 분야 기술발전예의 기여도

- 본 과제를 수행하면서 처음 예상과는 달리 활성물질의 효과가 안정적이지 않으며, 대개의 경우 병 방제효과도 크지 않아 당초 예상대로 연구를 수행하여 가기가 힘들었다.
- 활성물질의 효과가 불안정하였던 이유를 밝힌 결과 활성물질로 확인된 plumbagin은 휘발성이 있는 물질로서 분리 중에 잘 날아가기 때문이었다. 따라서, 알코올이나 DMSO 등 유기용매로 추출하여 사용하였는데, 실제 식물체에 처리하였을 때도 휘발 등으로 인하여 결과가 불안정하였던 것으로 판단하고 있다.
- 이러한 특성이 식충식물 추출물의 사용을 제한하는 요인이 되어, 그 다음 단계 연구를 진행하는데 있어서 어려움을 주었고, 결과적으로 식충식물 추출액의 보존성을 향상하기 위한 첨가제 선발과 식물병 방제제 시제품 제조 등이 원래 계획대로 진행되지 않았다.
- 그러나, 물질의 분리 및 기술권 확보 등에 있어서는 기대 이상의 성과를 얻어 특허 2건의 등록을 마칠 수 있었다 (4월 15일자로 등록접수 되어 아직 정식 특허증은 받지 못했으므로, 첨부한 2건의 특허결정서를 참조하기 바람).
- 또한, 식충식물로부터의 물질 분리와 식물병원균에 대한 길항작용을 정리하여 SCI급의 우수 학회지에 2건의 논문을 발표하였다 (Fitoterapia(2007) 78:585-586, The Plant Pathology Journal (2007) 23:113-115, 첨부자료 참조).
- 이러한 연구 결과는 천연물질의 추출과 동정 및 천연물질을 이용한 식물병 방제 연구 등에 있어서 유용한 선행자료가 될 것으로 기대한다.

2. 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착안사항	척도	수행도
1차년도(2005)	○ 식층식물 대량확보	15	15
	○ 항균 및 저항성 유도능력 검정	20	20
	○ 주요 작물 배양세포 확보	10	10
	○ 항균물질 조추출	15	15
	○ 항균활성 및 저항성유도 물질의 순화	10	10
	○ 식층식물 재배 최적조건 탐색	15	15
	○ 새로운 식층식물 유전자원 확보	15	15
	2차년도(2006)	○ 항균 및 저항성 유도능력 검정	20
○ 조즙액이 작물생육에 미치는 영향		10	10
○ 항균활성 및 저항성유도 물질의 순화		10	10
○ 항균, 저항성유도 물질의 동정		15	15
○ 추출물 처리시 기주의 변화		5	5
○ 식층식물 대량 기내배양법		20	20
○ 배양에 따른 유용물질 생산성		20	20
3차년도(2007)		○ 조즙액 처리와 미생물상	10
	○ 처리시기와 방법에 따른 항균효과	10	10
	○ 추출물 처리시 병원체와 기주의 변화	10	10
	○ 항균, 저항성유도물질 최적 분리법	10	10
	○ 대량 조추출법 확립	10	10
	○ 즙액 보존성 향상을 위한 첨가제 등 선발	10	5
	○ 병방제 시제품 제조	30	0
	최종평가	○ 식층식물의 항균 및 저항성유도능력 검정	20
○ 식층식물 즙액 처리조건 규명		15	15
○ 항균, 저항성유도물질의 동정		15	15
○ 항균, 저항성유도물질의 기작		15	15
○ 식층식물 대량배양		15	15
○ 즙액 보존성 향상 및 방제 시제품 제조		20	0

3. 학회지 발표 논문

가. Fitoterapia (SCIE)



Fitoterapia 78 (2007) 585–586

FITOTERAPIA

www.elsevier.com/locate/fitote

Short report

Suppression of phytopathogenic fungi by hexane extract of *Nepenthes ventricosa* x *maxima* leaf

Kwang-Soo Shin^{a,*}, Samkeun Lee^b, Byeong Jin Cha^c

^a Department of Microbiology, Daejeon University, Daejeon 300-716, Republic of Korea

^b Department of Chemistry, Daejeon University, Daejeon 300-716, Republic of Korea

^c School of Environmental Biology and Horticulture, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

Received 19 June 2006; accepted 13 March 2007

Available online 24 May 2007

Abstract

The hexane extract of *Nepenthes ventricosa* x *maxima* leaf exhibited antifungal activity against *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* and *Sclerotinia sclerotiorum*.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Nepenthes ventricosa* x *maxima*; Antifungal activity; *Rhizoctonia solani*

1. Plant

Nepenthes ventricosa x *maxima* (Nepenthaceae), leaves obtained from the culture of this species. A voucher specimen has been deposited in the Carnivorous Plants Herbarium of Chungbuk National University, Cheongju, Republic of Korea.

Table 1
Antifungal activity (MIC, µg/ml) of *N. ventricosa* x *maxima* leaf hexane extract

Fungi	Hexane extract	Bifonazole
<i>Alternaria alternata</i>	43.7	5.6
<i>Aspergillus niger</i>	20.2	7.6
<i>Bipolaris oryzae</i>	21.4	8.9
<i>Fusarium oxysporum</i>	22.5	10.8
<i>Phytophthora capsici</i>	18.6	7.1
<i>Rhizoctonia solani</i>	7.2	33.3
<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	19.7	8.5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	26.5	16.0

* Corresponding author. Tel.: +82 42 280 2439; fax: +82 42 280 2608.
E-mail address: shinks@dju.ac.kr (K.-S. Shin).

Note

Antifungal Activity of Plumbagin Purified from Leaves of *Nepenthes ventricosa* x *maxima* against Phytopathogenic Fungi

Kwang-Soo Shin¹, Samkeun Lee² and Byeongjin Cha^{3,*}

¹Department of Microbiology and ²Department of Chemistry, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

³Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Received on January 16, 2007; Accepted on May 23, 2007)

A kind of naphthoquinone, plumbagin was purified and identified from the leaves of *Nepenthes ventricosa* x *maxima* through solvent extraction, silica gel column chromatography, and recrystallization. The yield (0.51%) was higher than that of the root of *Plumbago scandens* (0.26%), *P. capensis* (0.15%), and *N. thorelii* (0.092%). It exhibited antifungal activity against all plant pathogenic fungi tested, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* and *Sclerotinia sclerotiorum*. The minimum inhibitory concentration values ranged from about 4.8 to 56.6 µg/ml against the above eight fungi and *R. solani* was the most sensitive.

Keywords : *Nepenthes ventricosa* x *maxima*, antifungal activity, plumbagin

Phytochemicals may be an alternative to currently used fungicides to control plant pathogenic fungi, because they constitute less environmental risk and mammalian toxicity (Cho et al., 2006; Hwang et al., 2005; Lee and Lee, 2005; Lee et al., 2005). Quinones occurring in higher plants have a good to moderate antifungal activity against phytopathogenic fungi (Lee and Lee, 2005; Meazza et al., 2003). Phenols and guaiacols extracted from wood vinegar of *Cryptomeria japonica* have a strong antifungal activity against four plant pathogenic fungi (Hwang et al., 2005).

Nepenthes are carnivorous plants using their specialized leaves as passive pitfalls and trap arthropods (Juniper et al., 1989). Phytochemically, naphthoquinones are characteristic of *Nepenthes* and are chemotaxonomic markers within the *Nepenthelae*. Several naphthoquinones have been isolated and identified from the roots of *N. rafflesiana* (Cannon et al., 1980), *N. thorelii* (Likhitwitayawuid et al., 1998), *N. gracilis* (Aung et al., 2002), and *N. insignis* (Rischer et al., 2002). A kind of naphthoquinone, plumbagin has insect antifeedant (Kubo et al., 1980), cardiotoxic (Itoigawa et al.,

1991), anticancer (Parimara and Sachdanandam, 1993), antimicrobial (Didry et al., 1994), and antimalaria activities (Likhitwitayawuid et al., 1998). However, no detail study has described yet on the antifungal activity of plumbagin against plant pathogenic fungi. The present paper reports on the inhibition of eight plant pathogenic fungi by plumbagin isolated from the leaves of *N. ventricosa* x *maxima* hybrid.

HPLC was performed with Shimadzu LC 10 AD pump, SPD 10 A UV-VIS detector, and the column used was Shim-pack CLC-ODS (M) (4.6 x 250 mm) with a detection wavelength of 254 nm. The mobile phase was methanol and water (80:20, v/v) with 0.1% trifluoroacetic acid at a flow rate of 1.0 ml/min. EIMS was measured using a HP 5890 GC/MS spectrometer using HP5-MS column. Injector temperature was 270°C, and column temperature was 70°C for 1 min at the beginning and then raised to 120°C at rate 12°C/min and hold 1 min, 200°C at rate 15°C/min and hold 1 min, and 300°C at rate 20°C/min and hold 15 min. ¹H NMR spectroscopy was performed using a Bruker AC-300 at 300 MHz using CDCl₃ as solvent.

The lyophilized leaves of plant (100 g) was ground and extracted with methanol overnight at room temperature. The methanol extract was re-extracted with hexane. The extract was subjected to flash chromatography on silica gel using a hexane and ethyl acetate (2:1, v/v) solvent system and detection of antifungal compound was achieved by bioassay. After collection of active fractions, further purification was performed by recrystallization with hexane, yielding 0.51 g of orange crystalline solid.

The plant pathogenic fungi were acquired from the Korean Agricultural Culture Collection (KACC). The antifungal activity of the active compound which was resolve in methanol was tested by the modified method of Daouk et al. (1995) using potato dextrose broth. The minimum inhibitory concentration (MIC) was the lowest concentration of plumbagin that completely inhibited growth of the fungi and the antifungal testing was performed in triplicate.

The presence of plumbagin in methanol extract of the leaves of *N. ventricosa* x *maxima* was estimated by HPLC with a retention time of 6.75 min. The peak area was calculated by comparing with an authentic sample of

*Corresponding author.

Phone) +82-43-261-2557, FAX) +82-43-271-4414
E-mail) bjcha@cbnu.ac.kr

4. 특허 등록

가. 플럼바긴을 포함하는 식물병 치료용 조성물

발송번호: 9-5-2008-001813883
발송일자: 2008.01.15

수신 서울 관악구 봉천7동 1627-10 옥산빌딩 4
층(제니스국제특허법률사무소)
윤여강

151-818

YOUR INVENTION PARTNER

특 허 청 특허결정서

출원인명	명	칭	신광수 (출원인코드: 420030324395)
출원주소	주	소	대전광역시 유성구 신성동 삼성한울아파트 101동 1101호
대리인명	명	칭	윤여강
대리인주소	주	소	서울 관악구 봉천7동 1627-10 옥산빌딩 4층(제니스국제특허법률사무소)
발명자성명	성	명	신광수
발명자주소	주	소	대전시 유성구 신성동 삼성한울아파트 101동 1101호
발명자성명	성	명	차병진
발명자주소	주	소	대전시 유성구 도룡동 397-4 쌍용빌라 8동 102호
발명자성명	성	명	이상근
발명자주소	주	소	대전시 서구 둔산동 1423번지 크레온 1404호
출원번호	번	호	10-2007-0110091
발명명칭	의	칭	플럼바긴을 포함하는 식물병 치료용 조성물
청구항	구	항	1

이 출원은 특허법 제66조의 규정에 의하여 특허결정합니다.
(특허법 제87조의 규정에 따라 특허권은 특허료를 납부하여 설정등록함으로써 발생하게 됩니다.) 끝.

[보통출원을 인정함]

원출원번호 : 10-2006-0113637 원출원일자 : 2006.11.17

[참고문헌]

1, US 06340468 A

나. 네펜데스 벤트리코사에서 플럼바긴 생산방법

발송번호: 9-5-2008-011494159
 발송일자: 2008.02.29

수신 서울 관악구 불천7동 1627-10 옥산빌딩 4
 층(제니스국제특허법률사무소)
 윤여강

151-818

YOUR INVENTION PARTNER

특 허 청
 특허결정서

출원인명	칭	신광수 (출원인코드: 420030324395)
주 소		대전광역시 유성구 신성동 삼성한울아파트 101동 1101호
대리인명	칭	윤여강 외 2명
주 소		서울 관악구 불천7동 1627-10 옥산빌딩 4층(제니스국제특허법률사무소)
발명자성명	명	신광수
주 소		대전시 유성구 신성동 삼성한울아파트 101동 1101호
발명자성명	명	차병진
주 소		대전시 유성구 도룡동 397-4 쌍용빌라 8동 102호
발명자성명	명	이상근
주 소		대전시 서구 둔산동 1423번지 크레온 1404호
출원번호	호	10-2006-0113637
발명의명칭	칭	네펜데스 벤트리코사에서 플럼바긴 생산방법
청 구	항	2

이 출원은 특허법 제66조의 규정에 의하여 특허결정합니다.
 (특허법 제87조의 규정에 따라 특허권은 특허료를 납부하여 실정등록함으로써 발생하게 됩니다.) 끝.

[참고문헌]

1. Biomed. Paper 149,2005, "Simultaneous determination of 1,4-narhtoquinone, lawsone, juglone and plumbagin by liquid chromatography with uv detection"
2. Current Sci.,2003, "Antimalarial agents from plant sources"
3. Elec.J.Bio.,2002, "Plumbagin production by root cultures of Plumbago roosa"

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 연구 수행 중에 계획 단계에서는 예상치 못했던 문제가 발생하여 연구 진척도가 뒤쳐진 만큼, 그 부분에 대한 문제를 해결하기 위해서는 추후에 보충 연구가 필요할 것으로 판단한다.
- 본 연구의 결과를 기업화하기 위해서는 그러한 문제들을 먼저 해결하여야 할 것이다.
- 하지만, 보충 연구와 기업화 이전에, 수의학 분야 등 특허를 등록한 본 연구의 결과물을 적용할 수 있는 타 분야가 있는지 검색하는 것도 의미 있을 것으로 생각한다.
- 한편으로는, 아직까지 발표하지 못한 내용을 정리하여 SCI급 학회지에 발표할 예정이다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 활발히 자라는 대장균에 O₂- radical의 유입 유출을 증가시키는 redox cycling quinone인 plumbagin을 처리하면 대장균에 돌연변이가 일어나고 죽기도 한다. Plumbagin의 독성은 막에 피해를 주지는 않으며, DNA 보수 반응이 일어남을 암시하는 것이다. J Bacteriol. 1985 December; 164(3): 1309-1316.
- Plumbagin (2-methoxy-5-hydroxy-1,4-naphthoquinone)은 다양한 약리활성을 가지고 있는 천연 naphthoquinone이다. 즉, 항말라리아성, 항미생물성, 강장성 등을 가지고 있다. 현재 plumbagin의 최대 생산처는 *Plumbago* spp. (*Plumbago europea*, *P. rosea*, *P. zeylanica*)의 뿌리이다. 그러나 이 식물들은 매우 늦게 자라므로 plumbagin을 추출할 수 있을 정도로 자라는데는 많은 시간이 걸린다. 따라서, 다른 생산원을 찾는 것이 바람직하다. 예를 들면 선행연구에서 *Plumbago zeylanica*, *Drosophyllum lusitanicum*, *Drosera natalensis*, *D. capensis*, 그리고 *Drosera gigantea* 등이 plumbagin의 생산기주로 밝혀진 바 있다. *Plumbago rosea*도 이렇나 목적을 위하여 이용될 수 있을 것이다. Electronic Journal of Biotechnology. 2002. 5(3).
- *Diospyros crassiflora* 줄기로부터 methanol/dichloromethane (1:1)로 추출한 plumbagin을 12종의 yeast와 사상균(*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Geotrichum candidum*, *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp.)에 대하여 항균성을 검정하였다. 곰팡이의 생장은 plumbagin에 의하여 억제되었으며, 추출물의 저지대는 12 to 18 mm, plumbagin의 저지대는 21 to 35 mm였다. 추출물의 MIC는 12.5 to 25 mg/mL, plumbagin의 MIC는 0.78-3.12 mg/mL 이었다. 따라서, *Diospyros crassiflora* 줄기 수피로부터 추출한 추출물은 진균성 감염을 치료하는데 사용할 수 있을 것이다. 표준 항진균제로 사용되는 ketoconazole과 비교할 때 plumbagin은 사용할 수 있는 가능성을 보여준다. Phytotherapy Research 2007. 21:671-674.

제 7 장 참고문헌

- 김창진, 유익동, 이인경, 윤봉식. 1991. 과채류 병해방제용 유용항생물질 탐색에 관한 연구(I), 과학기술처 연구보고서. Pp. 1-66.
- 문병주, 정후섭, 박현철. 1995. 딸기 시들음병균에 대한 *Trichoderma*속 균의 항균 작용에 관한 연구. V. 중복기생균 *Trichoderma harzianum*에 대한 딸기 시들음병의 생물학적 방제. 한국식물병리학회지. 11(4): 298-303.
- 임태현, 이정목, 장태현, 차병진. 2000. 복숭아 미이라과로부터 분리한 방선균의 항균활성 및 동정. 한국산업미생물학회지 28:161-166.
- 조광연. 1998. 살균제의 현황 및 전망. *Proceedings of International Symposium on Recent Technology of Chemical Control of Plant Diseases*. Pp. 120-142.
- 최용철, 이재국, 배영석. 1992. 고추역병방제용 항균미생물 AC-1 균주의 농가생산 방법. 농업과학논문집. 36(2C.P) : 337-342.
- Campbell, R. 1989. *Biological Control of Microbial Plant Pathogens*, Pp.41-64. Cambridge Press, Cambridge.
- Choi, Y. C. 1994. Control of Fungal Diseases with Antagonistic Bacteria, *Bacillus* sp. AC-1, *Proceedings of International Symposium on Biological Control of Plant Diseases*. 50-61.
- de Paiva, S. R., Figueiredo, M. R., Aragao, T. V., and Kaplan, M. A. C. 2003. Antimicrobial activity in vitro of Plumbagin isolated from *Plumbago* species. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98:959-961.
- Dzoyem, J. P., J. G. Tangmouo, D. Lontsi, F. X. Etoa, and P. J. Lohoue. 2007. *In Vitro* antifungal activity of extract and plumbagin from the stem bark of *Diospyros crassiflora* Hiern (Ebenaceae). *Phytotherapy Research* 2007. 21:671-674.
- Fravel, D. R., Marois, J. J., Lumdsen, R. D., and Connic, Jr. W. J. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay mixture.

Phytopathol. 75:774–777.

- Fravel, D. R., Connick, W. J. J., and Lewis, J. A. 1996. Formulation of microorganism to control plant diseases. In: *Formation of Microbial Biopesticides, Beneficial Microorganisms and Nematodes*(H. D. Burges, ed.). Chapman and Hall, London.
- Komaraiah, P. et al. (2003) Influence of hormones and selection of stable cell lines of *Plumbago rosea* fro accumulation of plumbagin. *J. Plant Biotechnol.* 5:181–185.
- Panichayupakaranant, P. et al. (2002) Plumbagin production by root cultures of *Plumbago rosea*. *Electron. J. Biotechnol.* 5:228–232.
- Pusey, P. L. 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organism as biofungicides. *Pesticide Science.* 27:133–140.
- Selma R. de P. et al. (2003) Antimicrobial activity in vitro plumbagin isolated from *Plumbago* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98:959–961.
- Thomashow, L. S. and Weller, D. W. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* Pp. 2–79. in biological control of *Gaeumannomyces var. tritici*. *J. Bactriol.* 170: 3499–3508.
- Tokunaga, T., Dohmura, A., Takada, N., and Ueda, M. 2004. Cytotoxic antifeedant from *Dionaea muscipula* Ellis: a defensive mechanism of carnivorous plants against predators. *Bull.*

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.