

## 리기다소나무의 잎 추출액이 무우 종자의 발芽에 미치는 Allelopathy 效果

金溶玉 · 金善昊 · 李浩俊 · 殷茂永\*  
建國大學校 生物學科 · 農業技術研究所\*

### Allelopathic Effects of Leaf Extract of *Pinus rigida* Mill. on the Seeds Germination of *Raphanus sativus* var. *hortensis* for. *acanthiformis* Makino

Kim, Young-Ok, Seon-Ho Kim, Ho-Joon Lee and Moo-Young Eun\*  
Dept. of Biology, Kon-Kuk Univ. and Agricultural Sciences Institute\*

#### ABSTRACT

Toxic effect of water extract from leaves of *Pinus rigida* and some phenolic compounds on the seeds germination of *Raphanus sativus* var. *hortensis* for. *acanthiformis* Makino has been studied.

There was little difference of germination percentage among the pH value of leaf extract (pH3~9). The germination percentage decreased drastically with increased concentration level of leaf extract at about 60 percent.

Seeds germination of *Raphanus sativus* var. *hortensis* for. *acanthiformis* Makino inhibited severely by caffeic acid, ferulic acid and p-coumaric acid at  $10^{-3}$  M, but the germination percentage was higher than that of the control group in vanillic acid.

In electrophoresis, there was no differences at earlier seedling stage of protein band between allelochemical treated and non-treated group, but in late stage, two protein band near 58kd and 27kd did not appeared in the toxic affected group. In case of caffeic acid treatment, two protein band near 58kd and 27kd did not found at late stage too.

#### 緒 言

Allelochemical은 植物相互間에 타감작용을 일으키는 化學物質로 種子の 發芽와 幼根의 成長, 光合成 및 細胞分裂을 抑制하며 植物群落의 形成과 遷移, 作物의 生産등에 生理·生態學的으로 重要하게 作用한다(Kaputska and Rice, 1976 ; Einhellig and Rasmussen, 1973 ; Lee and Monsi, 1963 ; Muller, 1970, 1974 ; Olmisted and Rice, 1970 ; Tinnin and Muller, 1971).

Allelochemical은 대부분이 phenolic compound, volatile substance, tannin, terpenoid등이며(Chou and Chen, 1976 ; Chou and Waller, 1980 ; 吉, 1983, 1988 ; Einhellig and Rasmussen, 1973 ; Lodhi, 1976 ; Rasmussen and Einhellig, 1979), 다른 植物의 發芽와 成長을 抑制하는 作用외에도 呼吸과 細胞膜透過性, 단백질合成, 酸素活性을 抑制하여 營養物質의 移動장애를 일으킨다(Del Moral, 1972 ; Dieterman *et al.*, 1964). Phenolic compound중 ferulic acid, caffeic acid는 nitrification을 방해하고(Rice and Pancholy, 1974), ferulic acid는 yeast와 잔디에서 단백질合成을 저지하며(Van Sumere *et al.*, 1971), 단백질의  $^{14}\text{C}$ 와 phenylalanine의 incorporation을 抑制하는 것으로 알려져있다(Putnam, 1983).

發芽進行過程중 種子內의 저장단백질은 호분층(aleurone layer)에서 生成된 단백질 加水分解酵素인 protease,  $\alpha$ -amylase, lipase등에 의해 아미노산으로 加水分解되지만 胚에서는 새로운 단백질이 다시 合成되기 때문에 단백질含量이 증가되며(Jones and Armstrong, 1971), 밀, 보리, lentil등 種子の 發芽過程중의 단백질 含量變化가 調査되어 있다(Evans and Bhatt, 1977 ; Khan *et al.*, 1973 ; Gaspak *et al.*, 1973). 本 研究에서는 리기다소나무의 잎 抽出液이 發芽에 미치는 影響과 發芽過程 중의 生理的變化 즉 種子內의 단백질 패턴 變化와 연결시켜 調査 究명한 allelopathy效果에 대하여 보고하고자 한다.

### 材料 및 方法

#### 리기다소나무의 水溶液抽出

리기다소나무의 신선한 잎 200 g에 물 1,000 ml를 넣어 80°C에서 48時間동안 진탕 抽出한 다음, 15,000 rpm에서 30分間 원심분리한 후(centrifugation T-1045, Kontron Co.) 그 상층액을 4°C냉장고에 보관하면서 본 實驗에 使用하였다.

#### 發芽와 生長實驗

균일한 크기의 무우 種子를 골라 페트리접시(直徑 90 mm)당 50粒씩을 播種하여 incubator(25°C)에 넣어 時間別로 發芽率을 調査하였다. pH別 發芽率은 HCl 및 NaOH를 利用하여 抽出液의 pH를 3~9범위로 調整하였고 播種 6日後에 最終發芽率을 調査比較하였다. 또한 抽出液의 濃度를 각각 100%, 75%, 50%, 25%, 12%, 6%, 3%로 희석하여 抽出液희석으로 인한 發芽抑制정도를 發芽率로 比較하였다.

#### Phenolic compound의 影響

리기다소나무잎에 들어있는 allelochemical로 알려진(吉, 1988) caffeic acid등 7種類의 藥品을  $10^{-3}\text{M}$ 의 濃度로 調節하여 發芽實驗을 實施하였다.

#### 抽出液處理에 따른 發芽過程別 단백질比較

리기다소나무잎의 抽出液을 60%로 희석시켜 두겹의 여과지를 충분히 적셔주면서 무우 種子 40粒을 페트리접시에 播種하여 發芽狀態를 관찰하였다. 이 발아실험은 5回 반복하여 실시하였다. 播種後 2日동안은 6時間간격으로 發芽過程중인 種子를 30粒씩 무작위로 試料를 採取하였으며, 播種 2日後부터는 12時間 간격으로 3日동안 총 120時間 採取하여 -50°C에 냉동保管하였다.

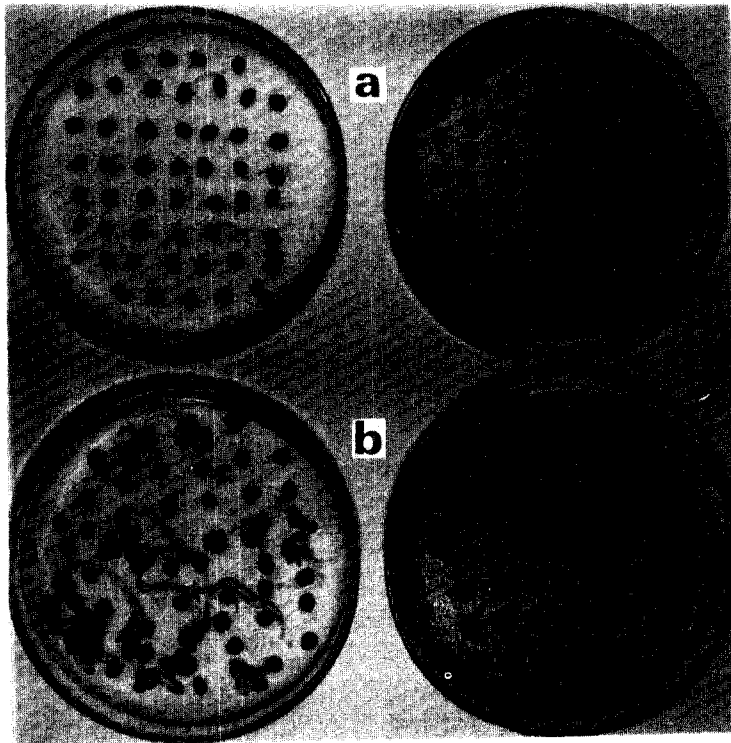
단백질抽出은 保管한 試料에 액체질소를 넣어서 마쇄한 後 증류수 3 ml를 첨가하고 10,000 rpm에서 15分間 원심분리한 다음 상등액을 이용하였다. 다음에는 試料用 buffer (2% SDS, 5% mercapto ethanol, 10% glycerol : pH 6.8)와 1 : 1로 혼합하여 수조에서 끓는 물에 5分間 熱處理한 다음 냉동실에 保管하면서 전기영동試料로 利用하였다.

전기영동은 Laemmli(1970)의 SDS-PAGE에 따랐으며 gel의 濃度は 12%로 하여 15 mA, 常溫에서 5~7時間 동안 行하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.12% Coomassie Brilliant Blue R-250 溶液에서 2時間 이상 染色시키고, 탈색용액 (acetic acid : methanol : water = 1 : 5 : 4 v/v/v)에 넣어 단백질이외의 부분을 탈색시킨 後 단백질 전기영동상을 比較 검토하였다.

### 結果 및 考察

#### 發芽와 生長

리키다소나무의 잎 抽出液에 의한 무우種子의 發芽는 Fig. 1에서와 같이 抑制되었으나 播種後 2일째 (Fig. 1a)보다는 播種 4일後 (Fig. 1b)에 抑制效果가 더 크게 나타났다. 이 結



**Fig. 1.** Toxic effect of water extract from leaves of *Pinus rigida* on the seeds germination and seedling growth of *Raphanus sativus* var. *hortensis* for. *acanthiformis* Makino; on the left, control without extract. on the right, with leaf extract.

(a) 2 days after sowing (b) 6 days after sowing.

果는 쇠비름抽出液이 무우 幼根에 대하여 95%의 抑制를 보인 반면 發芽에 있어서는 22%의 抑制를 나타냈다는 張(1988)의 報告와 곰솔抽出液에 의한 發芽實驗에서 發芽率보다 幼苗의 乾重量에서 심한 抑制現象이 나타났다는 吉(1983)의 報告와 一致한다.

抽出液의 pH에 따른 發芽抑制效果를 실험한 結果는 Fig. 2와 같다. pH 5에서 비교적 發芽率이 높은 것으로 나타났으나 전반적으로 發芽率이 10~25%程度를 나타내므로써 抽出液의 pH에 따른 發芽抑制效果는 큰 差異는 거의 없는 것으로 나타났다.

抽出液의 濃度에 따른 發芽抑制效果는 (Fig. 3), 抽出液 原液(100%)일때 最終發芽率이 30%였으나, 抽出液의 희석濃도 25%까지 發芽率이 거의 직선적으로 상승했으며 그 이상의 희석濃度에서는 對照區보다는 저조하지만 비교적 높은 發芽率을 나타내었다. 여기에서 發芽率이 약 50%정도의 抑制效果를 나타낸 抽出液 희석濃度는 약 60%임을 알수있어 위의 實驗은 抽出液을 60%로 희석하여 實施하였다.

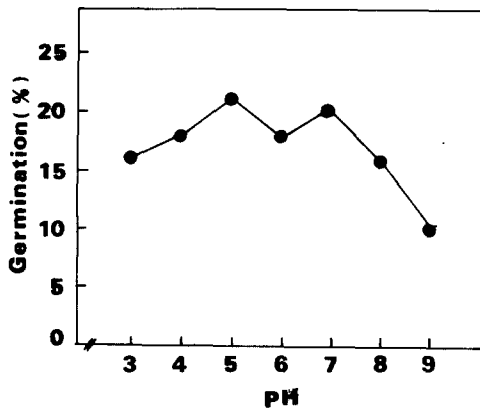


Fig. 2. Germination percentage of *Raphanus sativus* seeds in different pH of leaf extract.

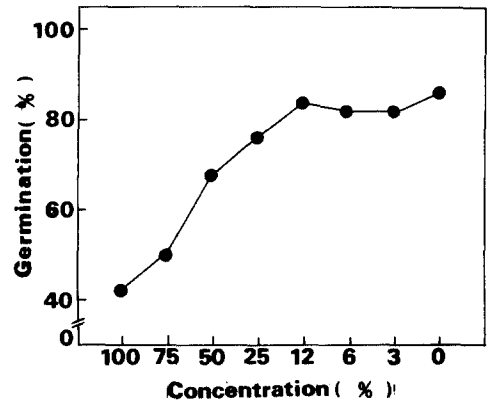


Fig. 3. Germination percentage of *Raphanus sativus* seeds in different concentration of leaf extract.

#### Phenolic compound別 發芽抑制效果

리기다소나무에서 분비되는 allelochemical로 알려진 14種의 化合物(吉, 1988)중 caffeic acid와 7種의 化學藥品을 利用하여 濃度  $10^{-3}M$ 에서 發芽實驗을 실시한 結果는 Fig. 4와 같이 caffeic acid 處理區에서 가장 發芽가 抑制되었다. 또한 p-coumaric acid 및 ferulic acid 處理時도 發芽가 심하게 抑制되었으나, p-hydroxybenzoic acid, gallic acid 및 cinnamic acid 處理區는 對照區와 거의 비슷한 發芽率을 나타냈으며, vanillic acid 處理區는 對照區보다 오히려 發芽率이 증가하였다. Patterson(1981)이 p-coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid등이 강낭콩의 發芽, 乾重量, 光合成을 가장 심하게 抑制했다고 報告한 바와 같이 本 實驗에서도 위의 세가지 phenolic compound가 가장 抑制效果가 높았다. 그러나 파의 發芽實驗에서 gallic acid가 가장 抑制效果가 크다고 한 吉(1983)의 報告와 本 實驗의 結果와는 差異가 있으며 이는 植物의 種에 따른 抑制效果의 差異로 思料된다. 가장 抑制效果가 높았던 caffeic acid는 一般的으로 nitrification을 방

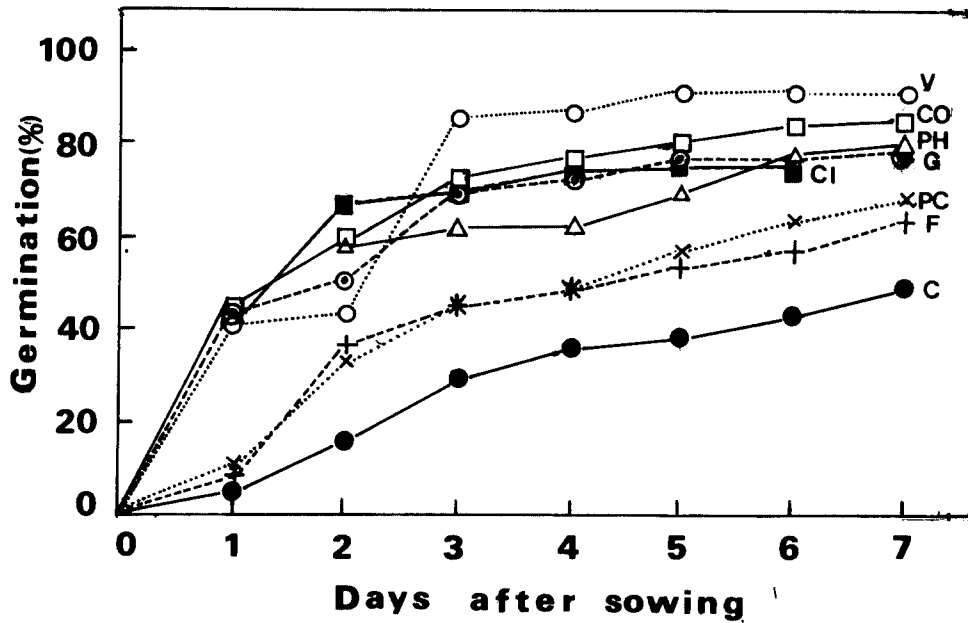


Fig. 4. Effect of phenolic compound on the seeds germination of *Raphanus sativus*. V: vanillic acid, CO: control, PH: p-hydroxybenzoic acid G: gallic acid, CI: cinnamic acid, PC: p-coumaric acid, f: ferulic acid, C: caffeic acid.

해하고 (Rice and Pancholy, 1974) IAA metabolism에 관계하며 (Leopold and Plummer, 1961; Zenk and Muller, 1963), chlorogenic acid, tannic acid와 함께 무우種子發芽를 抑制한다고 報告되고 있다 (Lodhi, 1979 a, b). 한편 對照區보다도 發芽率이 높았던 vanillic acid가 있음에도 리기다소나무 抽出液이 무우種子의 發芽를 현저하게 抑制한 것은 抑制物質들의 相助的作用에 의한 抑制效果로 思料되며, *Rumex crispus*의 allelochemical이 相助的으로 影響을 미친다는 Einhellig와 Rasmussen (1973)의 報告와 一致하고 있다.

抽出液處理에 따른 단백질 比較

抽出液處理에 따른 幼苗生長時期別 단백질合成의 差異를 SDS-PAGE에 의하여 比較한 結果는 Fig. 5와 같다.

播種 2日後에는 단백질 밴드의 差異가 거의 없었으나 播種 4日後에는 단백질 밴드의 형태가 크게 差異가 있었다. Fig. 5에서 ←로 표시된 것은 추출액에 의하여 合成이 크게 抑制된 단백질의 밴드를 나타내고 있으며, 특히 分子量 58kd 및 27kd의 단백질이 抽出液에 의하여 가장 合成이 抑制되는 것으로 나타났다. 이 結果는 allelochemical이 種子發芽率보다는 乾重量에 심한 抑制現象을 나타낸다는 報告와 같이 (吉, 1983, 張, 1988), 抽出液이 幼根의 生長을 抑制함으로써 전체적인 단백질合成을 감소시켰음을 나타내고 있다. 또한 caffeic acid를 처리한 C에서는 播種 4日後의 抽出液處理區의 단백질패턴과 거의 유사한 結果를 나타내는데 두 밴드의 단백질合成이 크게 抑制된 것으로보아 리기다소나무 抽出液에 caffeic acid와 같은 抑制物質이 함유되어 있다는 것을 알 수 있었다.

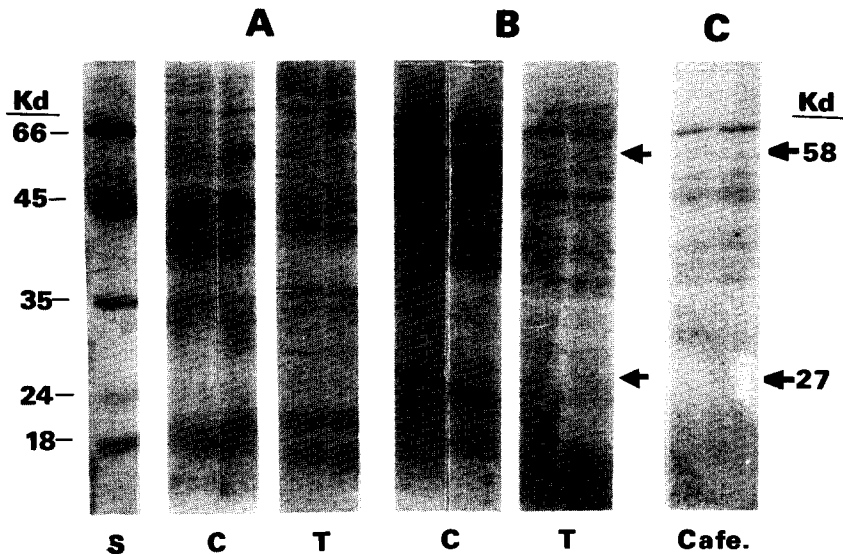


Fig. 5. Change of electrophoretic patterns of seed protein of *Raphanus sativus* on seeds germination with allelochemicals. A: 2 days after sowing, B: 4 days after sowing, C: treated with caffeic acid, S: standard. C: control, T: treatment, Cafe: caffeic acid.

本實驗에서 caffeic acid와 더불어 큰 抑制를 일으킨 ferulic acid가 發芽抑制劑로써 yeast와 잔디에서 아미노산의 전달을 抑制하여 단백질 合成이 방해를 받는다는 報告가있다(Van Sumere *et al.*, 1971). 또한 ferulic acid와 coumaric acid는  $^{14}C$ 과 phenylalanine의 incorporation을 抑制하므로써 단백질 合成을 抑制하고(Putnam, 1983), tannic acid는 一般적으로 단백질과 peroxidase, catalase, amylase 등의 효소억제제로 잘 알려져 있고(Corcoran *et al.*, 1972), peroxidase는 ethylene 生成과 IAA 및 phenol류를 산화하는 機能으로 植物의 分化 내지는 生育에 직접적인 관계가 있다는 報告와 같이(Yoo and Kim, 1988), allelopathy 現象의 生理的 代謝를 좀더 깊이 研究하기 위해서는 관련 酵素의 活性에 미치는 影響에 관하여 더욱 調査하여야 할 것으로 본다.

### 摘 要

리기다소나무(*Pinus rigida* Mill.)의 잎 抽出液에 의해 무우 種子 發芽가 抑制되는 allelopathy 現象을 究明하기 위하여 抽出液의 pH와 濃도에 따른 發芽率, 각 phenolic compound別 發芽抑制效果 및 抽出液에 의한 發芽後 初期生長別 단백질 전기영동상을 調査하였다.

抽出液의 發芽抑制效果는 pH 3~9에서는 pH에 따라 거의 차이가 없었다. 또한 抽出液의 濃도는 희석할수록 직선적으로 抑制效果가 감소하였으며 50%의 發芽抑制力을 보이는 抽出液의 희석 濃도는 60%일 때였다.

각각의 phenolic compound에 따른 發芽抑制效果는  $10^{-3}M$  濃度에서 caffeic acid, ferulic acid, p-coumaric acid가 가장 심하였으나 vanillic acid는 抑制效果가 없이 오히려

對照區보다 發芽率이 높게 나타났다.

抽出液處理에 따른 發芽後 初期生長中 단백질전기영동상을 對照區와 비교하면 初期에는 對照區와 밴드상에 차이가 없었으나 後期の 58kd 및 27kd의 두개의 뚜렷한 단백질 밴드가 抽出液에 의하여 단백질합성이 크게 抑制되었다. 또한 抽出液의 전기영동상과 caffeic acid를 처리한 단백질 전기영동상이 거의 비슷한 양상을 보였다.

## 引 用 文 獻

- Chou, C.H and C.S. Chen. 1976. Leaching metabolites in the vegetation of northern Taiwan. II. Allelopathic potential of some vegetation in northern Taiwan. Mem. Vol. Presid. Ching K.S. pp. 365-383.
- Chou, C.H. and G.R. Waller. 1980. Isolation and identification by mass spectrometry of phytotoxins in *Coffea arabica*. Bot. Bull. Acad. Sin.(Taipei) 2:25-34.
- Corcoran, M. R., T.A. Geissman and B. O. Phinney. 1972. Tannins as gibberellin antagonists. Plant Physiol. 49:323-330.
- Del Moral, R. 1972. On the variability of chlorogenic acid concentration. Oecologia 9:289-300.
- Dieterman, L. J., C. Y. Lin, L. M. Robrbaugh and S. H. Weder . 1964. Accumulation of ayapin and scopolin sunflower plants treated with 2,4-dichlorophenoxy acetic acid. Arch. Biochem. Biophys. 106: 275-279.
- Einhellig, F.A. and J.A. Rasmussen. 1973. Allelopathic effects of *Rumex crispus* on *Amaranthus retroflexus* grain sorghum and field corn. Amer. Mid. Nat. 90:79-86.
- Evans, L.E. and G.M. Bhatt. 1977. Influence of seed size protein content and cultivar on early seedling vigor in wheat. Can. J. Plant Sci. 57:929-935.
- Gaspak, T., A.A. Khan and D. Fries. 1973. Hormonal control of isoperoxidase in lentil embryonic axis. Plant Physiol. 51:146-149.
- 張炳春. 1988. 밭 주요 優占 雜草의 allelopathy에 關한 研究. 全北大學校大學院 碩士學位論文, 41 pp.
- Jones, R.L. and J.E. Armstrong. 1971. Evidence for osmotic regulation of hydrolytic enzyme production in germinating barley seeds. Plant Physiol. 48:137-142.
- Kapustka, L.A. and E.L. Rice. 1976. Acetylene reduction ( $N_2$ -fixation) in soil and old field succession in central Oklahoma. Soil Biol. Biochem. 8:497-553.
- Khan, A. A., R. Verbeek, E.C. Waters, Jr. and H.A. Van Onckele. 1973. Embryoless wheat grain: A natural system for the study of gibberellin-induced enzyme formation. Plant Physiol. 51: 641-645.
- 吉奉燮. 1983. 植物의 發芽와 成長에 미치는 곰솔의 allelopathy 效果. 圓光大學校論文集 17 : 73-89.
- 吉奉燮. 1988. 리기다소나무의 allelopathy 效果. 韓生態誌 11 : 65-76.
- Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lee, I. K. and M. Monsi. 1963. Ecological studies on *Pinus densiflora* forest. I. Effect of plant substances on the florestic composition of the undergrowth. Bot. Mag.(Tokyo) 76: 400-413.
- Leopold, A.C. and T.H. Plummer. 1961. Auxin-phenol complexes. Plant Physiol. 36:389-392.
- Lodhi, M.A.K. 1976. Role of allelopathy as expressed by dominating trees in a low land forest in controlling the productivity and pattern of herbaceous growth. Amer. J. Bot. 63:1-8.
- Lodhi, M.A.K. 1979a. Allelopathic potential of *Salsola kali* L. and its possible role in rapid disappearance of weedy stage during revegetation. J. Chem. Ecol. 5:429-437.
- Lodhi, M.A.K. 1979b. Germination and decreased growth of *Kochia scoparia* in relation to its autoallelopathy. Can. J. Bot. 57: 1083-1088.

- Muller, C.H. 1970. The role of allelopathy in the evolution of vegetation. Biochemical coevolution. Oregon State Univ. Press, Corvallis. pp. 13-31.
- Muller, C.H. 1974. Allelopathy in the environment complex, hand book of vegetation science, Part VI: Vegetation and Environment, Dr. W. Junk B.V. Publishers. The Hague. pp. 73-85.
- Olmsted, C.E. III. and E. L. Rice. 1970. Relative effects of known plant inhibitors or species from two stages of oldfield succession. Southwestern Nat. 15:165-173.
- Patterson, D.T. 1981. Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological responses of soybean (*Glycine max*). Weed Sci. 29:53-59.
- Putnam, A.R. 1983. Allelopathic chemicals, nature's herbicides in action. special report. pp. 34-45.
- Rasmussen, J.A. and F.A. Einhelling. 1979. Allelopathic effects of leaf extracts of *Ambrosia trifida* (Compositae). Southwestern Nat. 4:637-644.
- Rice, E.L. and S.K. Panchoy. 1974. Inhibition of nitrification by climax ecosystems. III. Inhibitors other than tannins. Am. J. Bot. 61:1095-1103.
- Tinnin, R. and C.H. Muller. 1971. The allelopathic potential of *Avena fatua*; Influence on herb distribution. Bull. Torrey Bot. Club 98:243-250.
- Van. Sumere, C. F., J. Cottenie, J. De Greef and J. Kint. 1971. Biochemical studies in relation to the possible germination regulatory role of naturally occurring coumarin and phenolics. Recent Adv. Phytochem 4: 165-221.
- Yoo, W.I. and S. S. Kim. 1988. Purification and characterization of an anionic isoperoxidase from korean-radish root. Korean Biochem. J. 21:207-213.
- Zenk, M. and G. Muller. 1963. In vivo destruction of exogenously applied indol-3-acetic acid as influenced by naturally occurring phenolic acids. Nature 200: 761-763.

(1990年 4月 12日 接受)