

토끼풀(*Trifolium repens*) 추출액이 잔디(*Zoysia japonica*)의 발아와 생장에 미치는 알레로파시 효과

이지훈 · 김인택 · 이호준* · 김용욱*

창원대학교 자연과학대학 생물학과, 건국대학교 자연과학부 생명과학전공*

적 요: 본 연구는 토끼풀 추출액이 잔디의 발아와 생장에 미치는 allelopathy 효과를 살펴보기 위해 실시되었다. 토끼풀을 잎, 줄기, 뿌리, 꽃으로 나누어 추출한 후 실험한 잔디종자의 상대발아율은 꽃, 잎, 줄기, 뿌리의 순으로 억제되었고 75% 이상의 농도에서는 전 실험구에서 발아가 되지 않았다. 파종후 5일, 8일, 11일, 14일의 신장율과 생중량을 조사해본 결과 고농도로 갈수록 억제되었고 길이생장에 있어서 지상부보다 지하부의 생장을 더욱 저해하였으며 상대생중량은 뿌리, 줄기, 잎, 꽃의 순으로 나타났다. 토끼풀 추출액 중 phenolic compounds를 Gas chromatography에 의해 성분분석 한 결과 부위별로 차이가 있었으나 caffeic acid, p-hydroxybenzoic acid, ferulic acid, gallic acid, p-coumaric acid, vanillic acid, trans-cinnamic acid, 2,5-dihydroxybenzoic acid, syringic acid, 2-hydroxycinnamic acid, benzoic acid, salicylic acid, phloroglucinol, phenylacetic acid 등 14종류의 성분을 확인하였고, 이들 중 phloroglucinol, vanillic acid, 2-hydroxycinnamic acid, syringic acid를 제외한 10종류를 공통으로 함유하고 있는 것으로 분석되었다. 분석결과 동정된 14종류의 phenolic compounds에 의한 발아와 생장실험 결과 전체적으로 억제효과를 나타내었으며, 고농도로 갈수록 심화되었고 benzoic acid, salicylic acid, trans-cinnamic acid에서 매우 강한 억제효과를 나타내었다.

검색어: 알레로파시, Phenolic compounds, *Trifolium repens*, *Zoysia japonica*, 상대발아율, 상대신장율

서 론

Allelopathy 효과는 Molish(1937) 이후 Guenzi와 McCalla (1966), Wang 등 (1967), Chou와 Chen(1976), Reese(1979), 강과 강(1983), Thompson(1985), Hussain 등(1991)에 의해 여러 식물을 이용하여 계속적으로 연구되었으며, 최근 Newsome과 Noble (1986), Inderjit와 Dakshini(1990, 1992), Aber와 Melillo(1991), 이 등(1997)에 의해 귀화식물을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다.

토끼풀(*Trifolium repens* L.)은 유럽과 북아프리카가 원산지인 귀화식물로 1876년 우리나라 개항 이후 목초로 수입, 재배되어 현재는 전국 각지의 하천, 고수부지, 정원 등 일조조건이 좋은 곳에서 자라는 다년초이다. 이 토끼풀이 각종 운동장, 골프장은 물론 학교, 공원의 화단 및 정원의 조경용으로 많이 이용되고 있는 잔디(*Zoysia japonica* Steud.)밭에 침입하여 잔디의 생장을 저해하는 현상이 흔히 관찰된다.

본 연구는 토끼풀의 영향에 의한 잔디의 bioassay와 토끼풀에서 분비하는 phenolic compounds의 allelopathy 효과와의 연관 유무를 밝히기 위해 gas chromatography로 성분분석을 실시한 후 benzoic acid계와 cinnamic acid계의 14가지 시약을 선정하여 phenolic compounds에 의한 발아와 생장에 미치는 영향을 정량적으로 밝히고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

토끼풀을 본 실험의 공여체 식물로 선정하고 수용체 식물로 잔디를 택하여 종자의 발아, 생장실험과 그 allelochemicals를 조사하였다. 토끼풀은 1996년 6월 중순 경상남도 창원시 창원대학교내에서 채취하였고 잔디는 1997년 3월 발아 촉진 처리된 종자를 구입하여 사용하였다. Phenolic compounds의 영향을 확인하기 위한 실험재료로는 caffeic acid 등 14가지 시약을 사용하였다.

식물의 용액추출 및 제조

채취한 토끼풀을 잎, 줄기, 뿌리, 꽃의 부위별로 약 1cm정도로 잘라 증류수 1000 ml당 각각 200 g씩 정량하여 넣은 후 건조기에서 80°C로 24시간 처리하여 여과하고 원심분리기(Centrifuge T-124, Kontron Co.)를 사용하여 12,000 rpm에서 30분간 원심 분리한 후 그 상층액을 모아 4°C에서 냉장 보관하였다. pH에 따라 발아 및 생장의 차이가 나타난다는 Gil(1988)의 보고에 따라 대조구로 쓰인 증류수의 pH와 동일하게 6.75로 맞춘 후 추출액의 농도를 각각 100%, 75%, 50%, 25%, 10%, 5%로 희석하였다.

추출액에 의한 발아 및 생장 실험

Cleanbench(JS-SCB-1300 Johnsam Co.)에서 균일한 Petri

dish에 filter paper (Whatman No 1002)를 2장씩 깔고 균일한 잔디종자를 50립씩 파종한 후 30°C의 성장실에 넣어 각 농도별로 24시간 간격으로 14일간의 상대발아율(Relative germination ratio : RGR)을 조사하였고, 파종후 5일째, 8일째, 11일째, 14일째 되는 날 지상부와 지하부로 나누어 mm단위로 길이의 성장정도를 측정하였으며, 전체의 생중량을 mg단위로 측정하여 상대신장율(Relative elongation ratio : RER)과 상대생중량율(Relative fresh weight ratio : RWR)을 조사하였다.

토끼풀 추출액에 함유되어 있는 Phenolic compounds의 분석

Phenolic compounds의 분석을 위해 gas chromatography를 사용하였다. 표준물질로는 phenolic compounds로 잘 알려진 benzoic acid, caffeic acid, p-hydroxybenzoic acid, 2,5-dihydroxybenzoic acid, ferulic acid, gallic acid, salicylic acid, phloroglucinol, p-coumaric acid, vanillic acid, phenylacetic acid, syringic acid, trans-cinnamic acid, 2-hydroxycinnamic acid 14종류를 정제하여 이용하였고, Flame Ionization Detector(FID)가 부착된 gas chromatograph(DS 6200, Donam Systems Inc.)로 DB-5(5% Phenyl-1~95% methyl 30m×0.25 μm) fused silica capillary column을 사용하였다. Carrier gas는 nitrogen, flow rate는 1.0 ml/min, 시료주입부와 검출기의 온도는 각각 300°C와 320°C로 유지시켰다. Column온도는 110°C에서 3.0°C/min의 rate로 260°C까지 사용하였고 260°C에서 10.0°C/min의 rate로 290°C까지 올린 후 290°C에서 5분간 유지시켰다.

Phenolic compounds에 의한 발아 및 성장실험

분석시 표준물질로 사용한 phenolic compounds 14종을 김 등(1990), 길(1988)의 방법을 토대로 수차례의 예비실험한 결과 적절한 농도로 확인된 1 mM, 3 mM, 5 mM, 7 mM로 각각 조절하여 추출액에 의한 발아 및 성장실험과 동일한 방법으로 실험하였다.

본 실험에서의 발아의 기준은 종피가 파열되었을 때를 발아로 간주하여 그 수를 산정하였으며, 1997년 3월 31일부터 1997년 7월 23일까지 각각 4회씩 반복하여 실시하였다.

결과 및 고찰

토끼풀 추출액을 이용한 Bioassay

토끼풀 추출액에 의한 잔디종자의 RGR은(Table 1) 농도별로 차이가 있으나 전체적으로 꽃, 잎, 줄기, 뿌리의 순서로 억제되었고, 75%이상의 농도에서는 전 실험구에서 발아되지 않았다. 특히 뿌리추출액의 경우는 고농도인 50%에서도 3.94%의 RGR을 나타내어 억제효과를 일으키는 물질이 같은 종내에서도 부위별로 차이가 있음을 알 수 있었다.

성장실험 결과 부위별로 신장은 계속적으로 이루어졌지만 최종일로 갈수록 지상부보다 지하부 즉 뿌리에 더 많은 영향을 주었고(Table 2), 고농도일수록 길이신장에 더 많은 억제효과가 있었는데 이는 길(1993)의 측백나무에 들어있는 생장억제물질 실험결과와 동일하였다. 또한 고농도로 갈수록 RWR도 심하

Table 1. Effects of extracts of *T. repens* on the RGR of *Z. japonica* at 14days

Parts	Concentration of extract					
	5%	10%	25%	50%	75%	100%
Leaf	59.60±31.95	25.25± 5.20	10.21± 7.58	.	.	.
Stem	65.48±15.36	50.52±10.05	11.43±11.92	0.76±1.31	.	.
Root	55.23±24.70	69.96±17.81	44.01±27.28	3.94±4.14	.	.
Flower	19.25±17.80	9.27± 5.05	4.65± 4.51	.	.	.

※ Values are expressed as mean±standard deviation of 4 replications.

Table 2. Effects of extracts of *T. repens* on the RER of *Z. japonica* at 14days

Parts		Concentration of extract					
		5%	10%	25%	50%	75%	100%
Leaf	shoot	55.80±35.12	38.68±19.48	8.11± 5.86	.	.	.
	root	13.19± 7.53	9.94± 3.57	2.68± 1.39	.	.	.
Stem	shoot	74.80±19.52	61.40±38.23	18.55±26.09	2.08± 3.61	.	.
	root	31.02± 8.67	21.82±14.05	7.81±12.82	0.83± 1.44	.	.
Root	shoot	74.33±31.25	77.94±15.13	52.95±32.19	2.21± 2.72	.	.
	root	32.40±16.97	33.47±23.03	9.61± 6.11	0.58± 0.60	.	.
Flower	shoot	27.64±27.43	22.05±17.73	1.92± 2.04	.	.	.
	root	7.93± 5.43	7.55± 5.38	0.34± 0.23	.	.	.

※ Values are expressed as mean±standard deviation of 4 replications.

Table 3. Effects of extracts of *T. repens* on the RWR of *Z. japonica* at 14days

Parts	Concentration of extract					
	5%	10%	25%	50%	75%	100%
Leaf	51.75±17.32	40.83± 8.20	13.36± 5.21	.	.	.
Stem	58.60±19.89	43.55±14.23	15.71±15.75	1.47± 2.55	.	.
Root	54.78±19.27	64.67±21.05	51.76±19.76	7.94± 8.46	.	.
Flower	28.36±24.49	21.46±13.87	5.51± 4.18	.	.	.

※ Values are expressed as mean±standard deviation of 4 replications.

게 억제되었는데(Table 3), 특히 꽃추출액을 처리한 잔디의 RWR은 잎, 줄기, 뿌리추출액의 1/2이하로 가장 억제효과가 강하게 나타났다.

Phenolic compounds의 성분분석

길(1988), 윤과 길(1989), 김과 이(1996) 등이 동정했던 caffeic acid를 비롯한 14가지 phenolic compounds를 본 실험의 표준 물질들로 선정한 후 토끼풀을 부위별로 나누어 GC로 분석한 결과 부위별로 양은 다르지만 14가지의 phenolic compounds 중 phloroglucinol, syringic acid, vanillic acid 그리고 2-hydroxycinnamic acid를 제외한 10종류를 공통적으로 함유하고 있는 것으로 분석되었다. 이것은 윤과 길(1989)이 속에 들어있는 화학물질의 독성효과에서의 보고와 11종류가 일치하는 결과였다.

Phenolic compounds를 이용한 Bioassay

분석실험에서 동정된 14종류의 phenolic compounds를 각각 1 mM, 3 mM, 5 mM 그리고 7 mM 농도로 조절한 뒤 잔디종자 50립에 처리하여 14일간의 발아를 살펴본 결과 각 compound별

RGR은 Table 4와 같다. 1mM에서는 syringic acid, phloroglucinol, gallic acid 그리고 vanillic acid는 RGR이 95%이상을 나타내었으며, 2,5 di-hydroxybenzoic acid와 phenylacetic acid는 억제의 정도가 강하게 나타났고 benzoic acid, trans-cinnamic acid 그리고 salicylic acid는 거의 발아되지 않을 정도의 아주 강한 억제를 나타내었으며, 농도가 진할수록 발아를 더욱 억제하였다.

p-coumaric acid와 2-hydroxycinnamic acid인 경우 1 mM에서는 수용체식물에서 높은 RGR을 나타내었으나 3 mM부터는 매우 강하게 억제되어 5 mM부터는 전혀 발아가 되지 않았다. 최고농도인 7 mM처리구에서는 caffeic acid에서 35.53%로 고농도에서의 RGR이 가장 높게 나타났으며, ferulic acid는 5 mM에서도 RGR이 65.83%를 나타내었다. 종합하면 gallic acid, caffeic acid 그리고 ferulic acid는 억제율이 낮았고 benzoic acid, trans-cinnamic acid 그리고 salicylic acid는 억제율이 매우 높았다.

길이생장실험 결과는 caffeic acid 1mM이 억제효과가 가장 적게 나타났으며(Table 5), caffeic acid, p-hydroxybenzoic acid, ferulic acid는 1 mM에서 지상부보다 지하부의 길이가 적은 저해효과를 나타내었다. 즉 신장율이 높은 처리구는 지하부의 억

Table 4. Effects of phenolic compounds on the RGR of *Z. japonica* at 14days

Compounds	Concentration			
	1mM	3mM	5mM	7mM
Caffeic acid	87.68±21.97	61.95±16.53	42.66±24.72	35.53±17.78
p-Hydroxybenzoic acid	88.85±18.57	27.51±17.70	1.73± 2.99	.
Benzoic acid	0.86± 1.49	.	.	.
2,5di-Hydroxybenzoic acid	32.56±13.43	.	.	.
Ferulic acid	86.57±14.14	76.66±42.69	65.83±27.32	19.38±15.76
Gallic acid	95.86± 8.26	48.28±10.25	26.71± 8.59	15.96±10.98
Salicylic acid
Phloroglucinol	99.80±25.57	41.53±19.82	12.48± 7.52	5.83±10.10
p-Coumaric acid	94.46±25.47	6.73± 4.88	.	.
Vanillic acid	98.50±12.92	39.02± 8.54	10.01± 4.10	.
Phenylacetic acid	22.52±13.02	1.67± 2.89	.	.
Syringic acid	99.95± 3.99	41.58±11.68	14.87± 9.18	6.59±6.02
trans-Cinnamic acid
2-HydroxyCinnamic acid	68.57±34.84	0.86± 1.49	.	.

※ Values are expressed as mean±standard deviation of 4 replications.

Table 5. Effects of phenolic compounds on the RER of *Z. japonica* at 14days

Compounds	Part	Concentration			
		1mM	3mM	5mM	7mM
Caffeic acid	shoot	135.57±28.34	63.74±39.47	42.87±38.95	30.14±16.77
	root	60.82±35.93	0.96± 0.53	0.66± 0.49	0.73± 0.42
p-Hydroxybenzoic acid	shoot	112.38±28.99	21.11± 6.93	2.86± 4.95	.
	root	48.13±28.96	0.54± 0.56	0.01± 0.02	.
Benzoic acid	shoot	0.60± 0.70	.	.	.
	root	0.03± 0.03	.	.	.
2,5di-Hydroxybenzoic acid	shoot	36.59±17.58	.	.	.
	root	0.83± 0.64	.	.	.
Ferulic acid	shoot	91.24±20.57	89.05±33.83	82.28±25.66	10.50± 9.94
	root	43.93±12.30	1.02± 0.51	1.05± 0.89	0.23± 0.04
Gallic acid	shoot	124.79±30.59	59.29±25.78	21.36±14.32	3.24± 2.69
	root	28.24±14.25	2.05± 1.78	0.87± 0.60	0.12± 0.11
Salicylic acid	shoot
	root
Phloroglucinol	shoot	119.49±36.78	12.70± 2.57	4.44± 5.54	4.79± 8.29
	root	25.60±10.50	1.04± 0.44	0.43± 0.37	0.12± 0.20
p-Coumaric acid	shoot	74.74±18.69	4.88± 6.30	.	.
	root	1.88± 0.65	0.41± 0.49	.	.
Vanillic acid	shoot	74.87±45.65	24.00±21.63	8.76± 5.33	.
	root	5.64± 8.04	3.05± 4.05	0.29± 0.30	.
Phenylacetic acid	shoot	34.37±19.84	4.26± 7.37	.	.
	root	0.85± 0.74	0.13± 0.22	.	.
Syringic acid	shoot	122.47±24.39	38.58±12.75	21.34±12.69	32.18±52.89
	root	13.35±11.65	0.72± 0.42	0.51± 0.53	0.12± 0.15
trans-Cinnamic acid	shoot
	root
2-HydroxyCinnamic acid	shoot	53.34±42.67	.	.	.
	root	2.47± 1.89	.	.	.

※ Values are expressed as mean±standard deviation of 4 replications.

제력도 저하되었으며 신장율이 낮은 처리구일수록 역으로 지하부의 억제력도 비례적으로 강해짐을 알 수 있었다.

생중량은 benzoic acid, salicylic acid 그리고 trans -cinnamic acid 처리구에서 강하게 억제되었으며 대체적으로 고농도로 갈수록 억제되었고 시간이 지날수록 RWR도 낮아졌다(Table 6).

이상의 결과에서 귀화식물인 토끼풀은 benzoic acid 등의 phenolic compounds를 분비함으로써 잔디의 종자발아 및 생장에 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었으며, 이는 phenolic compounds가 종자의 발아와 유근의 생장을 억제하는 등 여러 가지 생리대사에 영향을 미친다. 김과 이(1996)의 보고와 일치하였다.

인용문헌

- 강경홍, 강영선. 1983. Cinnamic acid계 물질이 *Pisum sativum* L.의 절편생장과 분화 및 탈분화현상에 미치는 영향. 식물조직배양학회지 10(2): 71-78.
- 길봉섭. 1988. 리기다소나무의 Allelopathy 효과. 한국생태학회지 11(2): 65-76.
- 길봉섭. 1993. 측백나무에 들어있는 생장억제물질의 작용. 한국생태학회지 16(2): 181-190.

Table 6. Effects of phenolic compounds on the RWR of *Z. japonica* at 14days

Compounds	Concentration			
	1mM	3mM	5mM	7mM
Caffeic acid	84.12± 15.49	47.73± 9.38	39.21±12.93	42.55±3.25
p-Hydroxybenzoic acid	75.17± 12.13	17.69±12.99	2.63± 4.56	.
Benzoic acid	8.46± 11.81	.	.	.
2,5di-Hydroxybenzoic acid	26.10± 18.24	.	.	.
Ferulic acid	101.01± 24.26	56.09±15.52	58.09±12.34	18.35±13.83
Gallic acid	87.49± 31.91	56.36± 1.89	37.76±6.05	17.07±9.94
Salicylic acid
Phloroglucinol	93.74± 37.56	35.51±8.44	18.05±12.14	1.27±2.20
p-Coumaric acid	69.20± 17.20	13.15±9.59	.	.
Vanillic acid	75.69± 6.51	49.10±8.56	10.26±6.96	.
Phenylacetic acid	31.29± 18.81	3.85±6.66	.	.
Syringic acid	66.91± 16.77	43.42±11.09	20.91±9.93	1.39±2.41
trans-Cinnamic acid
2-HydroxyCinnamic acid	61.29± 27.88	.	.	.

* Values are expressed as mean±standard deviation of 4 replications.

김용옥, 김선호, 이호준, 연무영. 1990. 리기다소나무 잎추출액이 무종자의 발아에 미치는 Allelopathy 효과. 한국생태학회지 13 (2): 75-82.

김용옥, 이호준. 1996. 수종식물의 페놀화합물 분석과 효과. 한국생태학회지 19(4): 329-340.

윤경원, 김봉섭. 1989. 쑥(*Artemisia princeps* var. *orientalis*)에 들어있는 화학물질이 다른 식물에 미치는 독성효과. 한국생태학회지 12(3): 161-170.

이호준, 김용옥, 장남기. 1997. 수종식물의 분비물질이 종자발아와 균류생장에 미치는 알레로파시 효과. 한국생태학회지 20(3): 181-189.

Aber, J.D. and J.M. Melillo. 1991. Terrestrial Ecosystem. Saunder College Pub. pp. 315-316.

Chou, C.H. and C.S. Chen. 1976. Leaching metabolites in the vegetation of northern Taiwan. II Allelopathic potential of some vegetation of northern Taiwan. Mem. Vol. Presid. Ching K.S. pp. 365-383.

Guenzi, W.D. and T.M. McCalla. 1966. Phytotoxic substances extracted from soil. Soil Sci. Soc. Amer. 30: 214-216.

Hussain, F., I. Ilahi and B.S. Kil. 1991. Allelopathic effects of walnut plants (*Juglans regia* L.) on four crop species. Korean J. Bot. 34(2): 93-100.

Inderjit, K.M. and M. Dakshini. 1990. The nature of interference potential of *Pluched lanceolata* (DC) Clarke C.B. (Asteraceae). Plant and Soil 122: 298-302.

Inderjit, K.M. and M. Dakshini. 1992. Interference potential of *Pluched lanceolata* (Asteraceae): Growth and physiological responses of asparagus bean, *Vigna unguiculata* var. *sesquipedalis*. Am. J. Botany 79(9): 979-981.

Molish, H. 1937. Der Einfluss einer Pflanze auf die Andere: Allelopathie. Fischer Jena. 20p.

Newsome, A.E. and I.R. Noble. 1986. Ecological and physiological characteristics of invading species, In R.H. Groves and J.J. Burdon (eds.), Ecology of Biological Invasions. Cambridge Univ. Press. pp. 1-33.

Reese, J. C. 1979. Interactions of allelochemicals with nutrients in herbivore food, in Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites. Academic Press. New York, pp. 309-330.

Thompson, A. C. 1985. The chemistry of allelopathy: Biochemical interactions among plants. ACS Symp. Ser. 268, Amer. Chem. Soc. Washington. DC.

Wang, T.S.C., T. Yang and T. Chuang. 1967. Soil phenolic acids as plant growth inhibitors. Soil Sci. 103: 239-246.

(1999년 12월 6일 접수; 2001년 4월 19일 채택)

Allelopathic Effects of Extracts of *Trifolium repens* on the Seed Germination and Seedling Growth of *Zoysia japonica*

Lee, Ji-Hoon, In-Taek Kim[†], Ho-Joon Lee* and Yong-Ok Kim*

Department of Biology, Changwon National University

*Department of Biological Science, Division of Natural Science, Konkuk University**

ABSTRACT : The allelopathic effects of aqueous extracts from *Trifolium repens* were studied. Aqueous extracts of leaves, stems, roots and flowers of *T. repens* strongly inhibited the seed germination and seedling growth of *Zoysia japonica*. In general, the higher concentration of the extracts showed the more great inhibition effect. The phenolic compounds extracted from *T. repens* were analysed and identified using gas chromatography. 14 phenolic compounds were isolated from the leaves, stems, roots and flowers: caffeic acid, p-hydroxy benzoic acid, ferulic acid, gallic acid, p-coumaric acid, vanillic acid, trans-cinnamic acid, 2,5 dihydroxy benzoic acid, syringic acid, 2-hydroxy cinnamic acid, benzoic acid, salicylic acid, phloroglucinol and phenylacetic acid. The seed germination and relative growth ratio of *Z. japonica* by 14 phenolic compounds were inhibited in whole treatment. Stronger growth inhibitor were benzoic acid, salicylic acid and trans-cinnamic acid. From these results it is suggested that the phenolic compounds from *T. repens* seemed to be responsible for the allelopathic potential.

Key words : Allelopathy, Phenolic compound, Relative elongation ratio, Relative germination ratio, *Trifolium repens*, *Zoysia japonica*.

[†] Author for correspondence; Phone: 82-55-279-7440, e-mail: itkim@sarim.changwon.ac.kr