

Ⅲ. 벼 교잡종의 Allelopathy 효과 구명

이재현 · 신동현 · 이인중 · 김길웅

경북대학교 농학과

Ⅲ. Investigation on Allelopathic Effect from Various Crosses of Rice Cultivars

Jae-Hyun LEE · Dong-Hyun SHIN · In-Jung LEE · Kil-Ung KIM

Department of Agronomy, Kyungpook National University

Abstract

This study was conducted to investigate allelopathic potential of various crosses of rice cultivars using their inhibitory effect on barnyardgrass growth under field conditions, and to determine PAL activity and phenolic compounds involved in phenylpropanoid pathway from selected crosses of rice cultivars. Under field conditions, Kouketsumochi, Woo co chin yu possessed higher allelopathic potential inhibiting over 90% of barnyardgrass growth. Crosses of Kouketsumochi/Woo co chin yu, Dongjinbeyo/Kouketsumochi, Dongjinbeyo/Woo co chin yu showed over 80% inhibitory effects on barnyardgrass growth. The highest PAL activity, 63.46 μ kats/kg proteins was detected in Kouketsumochi which is the most important enzyme in phenylpropanoid pathway and also higher PAL activity in crosses with Kouketsumochi. Content of cinnamate was 2.64 μ g/g f.w. in Kouketsumochi which was 2 to 5 times higher than other rice cultivars tested, indicating that higher PAL activity resulted in more cinnamate. The similar trends in cinnamate content and PAL activity were observed in crosses of rice cultivars with Kouketsumochi.

Key words : Allelopathy, Corsses of rice cultivars, PAL activity, Phenolic compounds, Phenylpropanoid pathway

서 언

식물간의 상호작용 중에는 영양분, 광, 수분등에 대한 경쟁 이외에 화학물질을 매개로 하여 동종이나 이종 식물의 발아 및 생육을 억제 또

는 촉진하는 allelopathy란 현상이 있음은 오래 전부터 알려져 왔다^{1,2,3}.

Molish 는 미생물을 포함한 모든 식물체간의 생화학적 상호작용을 최초로 'allelopathy'라 했으며¹, 그 후 Rice⁴)는 allelopathy를 '한 식물체가 분

비하는 화학물질이 다른 식물체에 직·간접적으로 미치는 효과'로 정의하였으며 '이 작용은 억제 및 촉진효과도 포함한다'고 했다.

일반적으로 allelochemical로 알려진 화합물들은 식물 대사물질 중 이차 생성물질인 phenolic compounds, coumarins, alkaloids, terpenoids, toxic gases, flavonoids, quinones류 등의 화합물로서 한 식물체로부터 분비되어 다른 식물의 발아, 성장, 호흡, 광합성, 영양분의 흡수, 호르몬의 합성 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다^{5,6,7,8,9}. 특히 지금까지 allelochemicals 가운데 phenolic compounds의 연구가 가장 많이 되어있다. 작물에서 그 작물의 교잡종들이 나타나는 allelopathy 효과에 관한 연구는 거의 없다.

그러나 Panchuk과 Prutenskaya¹⁰, 그리고 Grodzinsky와 Panchuk¹¹은 wheat grass(*Agropyron glaucum*)와 밀(*Triticum aestivum*)의 교잡종에서 allelochemicals의 유전적 전이에 관하여 연구하였다. 그들은 wheat grass 잔류물의 수용추출액이 무의 종자발아와 큰다닥냉이(*Lepidium sativum*)의 뿌리 성장에 미치는 효과면에서 밀 잔류물의 추출액보다 더 억제시키는 것을 발견하였다. 제 1대 교잡종은 주로 wheat grass의 특성을 나타내면서 상당히 높은 억제 활성을 보였고, 그 외 교잡종들은 중간 정도의 억제효과를 나타내었다. 밀의 특성을 더 많이 보유한 교잡종일수록 allelopathy 활성도는 더 낮았고, 밀과 wheat grass 모두에서 억제물질들이 동정되었는데 wheat grass의 특성을 주로 지닌 제 1대 교잡종은 wheat grass가 가진 억제물질들을 더 많이 가지고 있었으며, 밀의 특성을 가장 많이 가진 교잡종에서는 밀에서 발견되는 억제물질만 존재하는 것으로 나타나 억제물질이 유전하고 있음을 입증하였다¹¹.

지금까지 밀 등의 교잡조에 의한 allelopathy 효과 검정 실험은 많이 이루어져 왔으나, 벼 교잡종

의 allelopathy 효과에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 allelopathic potential을 지닌 것으로 보고된 벼들의 교잡종을 대상으로 실내와 포장에서 생물검정을 통하여 allelochemicals이 다음세대로 이동이 된다는 것을 확인하고, 생물검정 결과 선발된 교잡종을 이용하여 지금까지 allelochemicals로 가장 많은 연구가 되어온 phenolic compounds를 조사하여 phenolic compounds와 allelochemicals의 관계를 살펴보고, phenolic compounds 생합성 경로인 phenylpropanoid pathway의 첫단계인 PAL(phenylalanine ammonia-lyase)의 활성을 측정하고 PAL에 의해 유도되는 cinnamate, ρ -coumaric acid, benzoic acid 등을 조사하여 이러한 phenolic compounds가 벼 allelopathy 효과를 일으키는 allelochemicals 중의 하나로서 중요한 역할을 함을 구명하여 궁극적인 목적인 allelopathic rice 품종 육성에 필요한 기초 자료를 제공하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 벼 교잡종들의 수용추출액이 피의 생장에 미치는 영향구명

공시품종 : 김 등¹²에 의해 allelopathy 효과가 검정된 Kouketsumochi와 Woo co chin yu, allelopathy 효과가 적다고 보고된 재배품종의 Dongjinbyeo, 그리고 이들을 양친으로 교잡한 Kouketsumochi/Woo co chin yu, Dongjinbeyo/Kouketsumochi, Dongjinbeyo/Woo co chin yu의 F₁을 사용하였다.

생물검정 : 경북대학교 실험포장에서 1999년 6월에 공시품종을 파종하여 파종 후 생육 50일째에 식물체의 지상부 10g을 수확한 뒤 액체질소와 막자사발을 이용하여 마쇄한 후 증류수 100ml를 첨가하여 24시간 동안 실온(24℃)하에서

24시간 동안 수용추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 추출액(10%)을 생물검정 용액으로 사용하였다. 돌피(*Echinochloa crus-galli* var. *praticola*) 10립이 치상된 여과지를 간 직경 9cm의 사래에 추출용액 10ml를 넣고 26°C 2000 lux의 항온실에서 10일간 생육시킨 후 돌피의 초장, 근장 및 생육 상태를 조사하였다.

2. 벼 교잡종에서 phenylpropanoid pathway에 관여하는 효소 활성 측정과 phenolic compounds의 함량 조사

Phenylalanine ammonia-lyase(PAL)활성 검정: 생물검정에서 피에 대한 억제율이 높게 나타난 Kouketsumochi, Woo co chin yu와 억제율이 낮은 Dongjinbyeo, 그리고 이들 품종 간의 교잡종인 Kouketsumochi/Woo co chin yu, Kouketsumochi/Dongjinbyeo, Woo co chin yu/Dongjinbyeo을 1999년 8월 20일에 파종하여 온도(낮 12시간 : 30°C, 밤 12시간 : 22°C), 광(10,000lux), 습도(70%)가 조절되는 생장상에서 생육시킨 후 30일째 수확하여 실험에 사용하였다. 생체시료 0.5g을 액체질소와 막자사발을 이용해 마쇄한 후 2mM의 mercaptoethanol이 포함된 sodium borate buffer(pH 8.8)를 첨가하여 추출하고, 4분 동안 15,000rpm으로 원심분리한 조추출액에 30 μM의 L-phenylalanine과 300 μM의 sodium borate가 포함된 반응액(pH 8.8)을 첨가한 후 40°C가 유지되는 배양기에서 1시간 동안 반응시킨 다음 6M HCl로 반응을 중지시켰다. PAL 효소 활성은 290nm에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. PAL 효소의 활성은 생체 중 1g이 1분 동안 생산한 cinnamic acid를 μkats/kg protein으로 나타내었다.

HPLC를 이용한 phenolic compounds 검정 : Phenolic compounds의 함량 분석을 위하여 Smith-Becker 등¹³⁾의 방법에 따라 벼 생체 0.5g을 액체질소와 막자사발을 이용해 마쇄한 후 10ml의

100% MeOH로 24시간 동안 추출하고 그 추출액을 5분 동안 10,000rpm으로 원심분리하여 상등액을 취하여 새로운 tube로 옮겼다. 상등액을 40°C에서 감압농축하여 MeOH을 제거하고, 농축된 잔사가 포함된 플라스크에 증류수 10ml를 첨가하여 5분 동안 흔들어 용해시켰다. 그후 두번의 hexane분획(물층에 hexane 10ml 첨가 후 5분 동안 흔듦) 후 hexane층은 버리고 수용층을 새로운 tube에 수집하고 ethyl acetate를 첨가하여 6시간 동안 흔들어 주었다. 수집된 ethyl acetate 분획은 40°C에서 감압농축 하였다. 농축된 잔사에 1ml의 MeOH를 첨가하여 녹였다. 처리된 시료는 표 1과 같은 HPLC 조건하에서 분석하였다.

Table 1. The operating conditions of HPLC for phenolic compounds analysis.

Items	Conditions
Column	CLC-ODS(M)
Mobile phase	A Water(0.075% trifluoroacetic acid)
	B Acetonitrile
Wavelength	280 nm
Sample injection volume	20 μl

결과 및 고찰

1. 벼 교잡종들의 수용추출액이 피의 생장에 미치는 영향구명

양친에서는 Kouketsumochi, Woo co chin yu가 90.2%, 98.4%로써 높은 피 뿌리 생장 억제율을 보였다(표 2). 그러나 Dongjinbyeo의 경우는 72.5%로서 피 뿌리 생장 억제율이 상기의 두품종보다 작았다. 교잡종에서의 억제율은 Kouketsumochi/Woo co chin yu가 95.2%, Dongjinbyeo/Kouketsumochi가 89.2%, Dongjinbyeo/Woo co chin yu가 97.3%로서

역시 높은 피 뿌리 생장 억제율을 보였다.

피에 대한 신초 생장 억제 정도는 Dongjinbyeo의 경우 수용추출액에 의한 피의 신초 생장 억제 효과는 나타나지 않으나, Kouketsumochi에서 59.5%, Woo co chin yu에서 71.5%의 억제율을 보여 품종에 따라 다양한 억제율을 나타내었다. 또한, 비교적 높은 생장 억제 효과를 나타낸 Kouketsumochi와 Woo co chin yu의 교잡종에서도 39~70% 범위의 억제율을 보여서 벼에서 allelopathy 현상을 나타내는 allelochemical이 양친으로부터 교잡종으로 유전된다는 가능성을 시사하고 있다. 이는 Panchuk과 Prutenskaya¹⁰⁾ 그리고 Grodzinsky와 Panchuk¹¹⁾이 wheat grass(*Agropyron glaucum*)와 밀(*Triticum aestivum*)의 교잡종에서 allelochemicals의 유전실험에서 교잡종의 억제율은 높은 억제율을 보이는 양친(wheat grass)의 특성을 많이 갖고 있는 교잡종에서 높게 나타났다는 연구보고와 유사한 결과를 보였다.

Table 2. Effect of water extract from various crosses of rice cultivars grown for 50 days under the field conditions on the growth of barnyardgrass.

Accession	Inhibition rate	
	shoot	root
	-% control ¹⁾	
Kouketsumochi	59.5	90.2
Woo co chin yu	71.5	98.4
Dongjinbyeo	15.4	72.5
Kouketsumochi/Woo co chin yu	70.4	95.2
Dongjinbyeo/Kouketsumochi	39.4	89.2
Dongjinbyeo/Woo co chin yu	61.4	97.3

¹⁾ Average of 3 replications determined at 50 days after plating

2. 벼 교잡종에서 phenylpropanoid pathway에 관여하는 효소 활성 측정과 phenolic compounds의 함량 조사

생물검정에서 생육억제 정도가 높게 나타난

Kouketsumochi, Woo co chin yu와 낮게 나타난 Dongjinbyeo를 모본으로 하여 그 교잡종들 간의 phenolic compounds 생합성에 관여하는 PAL 활성을 측정된 결과는 표 3과 같다.

Table 3. PAL activity of various crosses of rice cultivars.

	Inhibition rate		Activites of PAL
	shoot	root	
	-%control ¹⁾		-μkats/kg proteins-
Kouketsumochi	59.5	90.2	63.46
Woo co chin yu	71.5	98.4	46.54
Dongjinbyeo	15.4	72.5	54.38
Kouketsumochi/Woo co chin yu	70.4	95.2	58.05
Dongjinbyeo/Kouketsumochi	39.4	89.2	57.42
Dongjinbyeo/Woo co chin yu	61.4	97.3	50.53

¹⁾ Average of two replications, and determined at 50 days after planting

Kouketsumochi의 경우 PAL 활성이 protein 1kg당 63.46 μkats로 가장 높게 나타났고, Kouketsumochi와의 교잡종에서 역시 PAL 활성이 높게 나타났다. 그리고 피 생육억제율과 비교해 보면 역시 억제율이 높은 품종들간의 교잡종에서 PAL 활성이 높게 나타났다. 이는 김 등¹⁴⁾의 Kouketsumochi, Woo co chin yu에서 phenolic compounds의 생합성에 관련된 PAL, BA2H, CA4H의 효소의 활성이 높게 나타났다고 보고한 결과와 유사하였다.

본 실험에서 PAL에 의해 유도되는 phenolic compounds의 함량을 표 4에 나타내었다. PAL에 의해 가장 많은 영향을 받는 cinnamate 함량의 경우 PAL 활성 결과와 마찬가지로 Kouketsumochi에서 생체중 1g 당 2.64 μg 으로서 다른 품종과 비교했을 때 2배~5배 이상 높은 것으로 나타났다. 또한 Kouketsumochi를 포함한 교잡종에서도 타 교잡종보다 높은 수치를 나타냈다. p-coumaric acid

의 경우에도 cinnamate 함량과 비슷한 경향을 보였다. 그러나 4-hydroxybenzoic acid는 Kouketsumochi를 제외한 대부분의 품종에서 검출이 되지 않았다.

Table 4. Phenolic compounds of various crosses of rice cultivars.

Accessions	Inhibition rate		Phenolic compounds		
	shoot	root	cinnamate	<i>p</i> -coumaric acid	4-hydroxybenzoic acid
	-%control ¹⁾		----- μ g F.W.-----		
Kouketsumochi	59.5	90.2	2.64	1.74	1.35
Woo co chin yu	71.5	98.4	1.38	1.47	- ²⁾
Dongjinbyeo	15.4	72.5	0.52	1.51	-
Kouketsumochi/ Woo co chin yu	70.4	95.2	1.44	1.69	-
Dongjinbyeo/ Kouketsumochi	39.4	89.2	1.38	1.04	-
Dongjinbyeo/ Woo co chin yu	61.4	97.3	0.56	1.28	-

¹⁾ Average of two replications, and determined at 50 days

²⁾ - : not detected

이상의 결과를 요약하면 phenolic compounds 생합성에 관여하는 효소의 활성이 높게 나타나는 벼품종을 양친으로 한 교잡종들에서도 역시 높은 효소 활성을 보였고, 이 효소의 작용으로 생성된 phenolic compounds의 함량 또한 이와 유사한 경향을 나타내었다. 이는 phenolic compounds가 벼에서 allelopathy 효과를 나타내는 allelochemicals 가운데 하나라는 사실을 시사한다. 그러나 이 부분에 대한 타 관련 효소들의 활성이나 타 관련 화합물질이 더 많이 구명하여야 명확한 설명이 가능하리라 믿는다.

적 요

본 연구는 allelopathic potential을 지닌 벼의 교

잡종을 포장에서 재배하여 그 식물체의 잎을 생물검정에 이용하여 allelopathy 효과 유무를 검정하고, 생물검정으로 선발된 교잡종을 대상으로 phenolic compounds를 조사하여 allelochemical로서의 기능성을 확인하고 나아가 phenolic compounds 생합성에 관여하는 효소의 활성 측정과 이 효소의 작용에 의해 유도되는 phenolic compounds를 구명한 결과는 다음과 같다.

1. 포장상태에서 피를 대상으로 생물검정을 실시한 결과 양친으로는 Kouketsumochi, Woo co chin yu에서 공통적으로 90% 이상의 높은 피뿌리 성장 억제율을 보였고, 교잡종에서는 Kouketsumochi/Woo co chin yu, Dongjinbyeo/Kouketsumochi, Dongjinbyeo/Woo co chin yu 조합에서 80% 이상의 높은 억제율을 나타냈다.
2. Kouketsumochi의 PAL 활성은 protein 1kg당 63.46 μ kats로 타 공시품종보다 높았다. 또한 Kouketsumochi와의 교잡종도 타교잡종보다 높은 것으로 나타났다.
3. Kouketsumochi의 cinnamate 함량은 생체중 1g당 2.64 μ g으로서 다른품종이나 교잡종보다 2~5배 높았고, Kouketsumochi와의 교잡종도 타교잡종보다 높았다.

참고문헌

1. Rice, E. L. 1984. Allelopathy. Academic Press. Inc. New York. pp. 2-4
2. Young, C. C. and D. P. Bartholomew. 1981. Allelopathy in a grass-legume association: I. Effects of *Hemarthria altissima* (Poir.) Stapf. and Hubb. root residues on the growth of *Desmodium intortum* (Mill.) Urb. and *Hemarthria altissima* in a tropical soil. Crop Sci. 21 : 770-774.

3. Young, C. C. and T. C. Chou. 1985. Auto-intoxication in residues of *Asparagus officinalis* L. *Plant and Soil*. 85 : 385-393.
4. Rice, E. L. 1987. Allelopathy: An overview. *Am. Chem. Soc.* pp. 8-22.
5. Shafer, W. E. and S. A. Garrison. 1986. Allelopathic effects of soil incorporated asparagus roots on lettuce, tomato, and asparagus seedling emergence. *Hort. Science*. 21(1) : 82-84.
6. Rice, E. L. 1979. Allelopathy-an update. *The Bot. Rev.* 45 : 15-109.
7. Swain, T. 1977. Secondary compounds as protective agents. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28 : 479-501.
8. Demos, E. K., M. Woolwine, R. H. Wilson and C. McMillan. 1975. The effect of ten phenolic compounds on hypocotyl growth and mitochondrial metabolism of mung bean. *Am. J. Bot.* 62(1) : 97-102.
9. Williams, R. D. and R. E. Hoagland. 1982. The effect of naturally occurring phenolic compounds on seed germination. *Weed Sci.* 30 : 206-212.
10. Panchuk, M. A. and N. I. Prutenskaya. 1973. On the problem of the presence of allelopathic properties in wheat-wheat grass hybrids and their initial forms. *In "Physiological- Biochemical Basis of Plant Interactions in Phytocenoses"*(A. M. Grodzinsky, ed.). *Naukova Dumka, Kiev.*(In Russian, English summary) Vol. 4 : 44-47.
11. Grodzinsky, A. M. and M. A. Panchuk. 1974. Allelopathic properties of crop residues of wheat-wheat grass hybrids. *In "Physiological- Biochemical Basis of Plant Interactions in Phytocenoses"*(A. M. Grodzinsky, ed.). *Naukova Dumka, Kiev.*(In Russian, English summary) Vol. 5 : 51-55.
12. Kim, K. U., D. H. Shin, I. J. Lee, H. Y. Kim, J. H. Kim, and K. W. Kim. 1999. Study on rice allelopathy, II. Factors affecting allelopathic potential of rice. *Kor. J. Weed Sci.* 19(2) : 10-16.
13. Jennifer, S. B., M. Eric, J. H. Elisabeth, L. M. Sharon, J. S. James and T. K. Noel. 1998. Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiol.* 116 : 231-238.
14. 김길웅, 신동현, 이인중, 김학윤, 신혜정. 1998. 벼의 allelopathic potential 검정(II). 벼 allelopathic potential에 관련된 효소의 활성 검정. *한국잡초학회지 발표요지* 18(1) : 85-87.