

한국산 꽃무릇의 Allelopathy 효과 구명

박재현 · 이인중 · 신동현 · 김길웅

경북대학교 농학과

Investigation on Allelopathic potential of Korean *Lycoris radiata*.

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

Department of Agronomy, Kyungpook National University

Abstract

This study was conducted to investigate allelopathic potential from Korean *Lycoris radiata* HERB. Two different solvents such as MeOH and water were used for extraction from *Lycoris radiata* HERB. Both extract showed inhibitory effect on the germination of barnyardgrass and lettuce seeds, indicating that this species contained the biologically active substances. The inhibitory substance extracted from bulbs of this species was identified by GC-MS as lycorenan, a kind of alkaloid.

Key words : Allelopathic substances, *Lycoris radiata* HERB.

서 언

현대의 농업은 다수확을 목표로 과도한 시비 및 농약사용으로 생태계의 생물다양성을 파괴시키고 있다. 따라서 21C 농업은 지구환경보전측면의 환경친화적 지속가능한 농업을 영위하기 위한 안전한 재배기술의 필요성이 강조되고 있다. 이에 환경친화형 지속적 농업에 필요한 작물 보호를 위하여 allelopathic 물질을 이용한 생물학적 방제법의 활용이 80년대 후반부터 최근에 이르기까지 농학자들에 의해 제기되고 있다(Rice,

1987). Allelopathy는 미생물을 포함한 모든 식물체간의 생화학적 상호작용으로 자연생태계내에서 광범위하게 일어나고 있는 현상이며, 식물종의 밀도나 분포를 조정하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Rice, 1987 ; Dilday, 1994 ; Olofsdotter, 1994). 생태계 내에서 발생하는 allelopathy현상은 잡초와 잡초, 잡초와 작물, 작물과 작물, 수목류 및 미생물 사이에서 발생되고 있으며, 그 기작과 원인물질에 대해 여러 학자들에 의해 꾸준히 연구되고 있다. 잡초와 잡초 또는 잡초와 작물과의 상호작용에 대한 보고를 보면 바랭이, 머느리배

팝, 비름 등의 밭 잡초들의 수용 추출물 내에도 상추의 종자발아를 억제시키는 물질이 존재함이 밝혀진 바 있다(김 등, 1987; Harrison 등, 1986; Yamamoto 등, 1999).

이러한 allelopathy 현상을 일으키는 물질로는 phenolics, alkaloids, flavonoids, terpenoids, steroids, tannin, coumarins, purines, cyanogenic glycosides 및 glucosinolates 등이 알려져 있다(Rice 1987 ; Saggese 등 1985 ; Whittaker 등 1971 ; Wilson 등 1968).

우리나라의 산야에 자생하고 있는 *Lycoris* 속은 식물 분류학상 수선화과에 속하는 야생구근 식물로 일본, 중국, 대만, 인도차이나반도 등에 자생하는 동아시아 특산식물이다(안과 이 1983 ; 이, 1964). 우리나라에는 특산종인 백양꽃(*L. koreana*)을 비롯하여 꽃무릇(*L. radiata*), 상사화(*L. squa-migera*), 흰상사화(*L. albiflora*), 개상사화(*L. aurea*)등이 자생하는 것으로 알려져 있다. 이들 중 꽃무릇은 인경이 흑갈색 구형으로 8-9월에 잎이 없어진 환경에서 꽃이 개화하며 겨울에 농녹색의 잎을 관찰할 수 있으며 다음해 4-5월에 잎이 고사하는 특이한 식물이다(박 등, 1986).

특히 꽃무릇의 인경에는 alkaloid 계통의 lycorineine $C_{16}H_{17}D_4N$ (총 alkaloid 함량 0.013-0.132%, lycorine 함량 0.005-0.028%), lycoramine, $C_{18}H_{23}O_4N$, lycoranine (ϕ -homelycorine) $C_{17}H_{23}O_3N$, tazettine, $C_{18}H_{21}O_5N$, homolycorine $C_{18}H_{21}O_4N$, base IX $C_{16}H_{19}O_3N$, lycoremine $C_{17}H_{21}O_3N$, lycoranoline $C_{18}H_{23}O_3N$, ϕ -lycorine $C_{16}H_{19}O_4N$ 및 lycoranolidine $C_{17}H_{21}O_3N$ 등 10종의 염기가 알려져 있으며, 한방에서는 진해 거담제 및 구토제로 사용하고 있는 것으로 알려져 있다(안, 1983). 또한 꽃무릇은 논둑의 식생 보호차원에서 잡초관리가능성이 검토되고 있으며 최근 일본에서는 생리활성물질의 탐색 연구가 진행되고 있다 (Fujii, 1999).

꽃무릇은 꽃이 아름다워 관상용이나 alkaloid를

제거하면 식용, 호분용으로 쓸 수 있는 장점과 함께 환경 보호적인 차원에서 allelopathy 물질의 함유로 잡초의 발아 및 생육억제 효과도 있는 것으로 밝혀지고 있다. 따라서 다양한 이용성을 지닌 꽃무릇의 천연생리활성물질을 탐색하여 환경친화적 잡초방제기술의 개발과 함께 그 효용성을 증대시키는데 필요한 기초자료를 제공하고 자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 꽃무릇의 생리활성 검정

1.1 꽃무릇 추출액의 생리활성 조사

경북대 포장에서 재배한 한국 재래종 꽃무릇의 지상부 및 구근을 2000년 1월에 채취하여 추출재료로 사용하였다. 각각 종의 꽃무릇을 지상부 5g, 구근 5g을 측정하고 액체질소를 가하여 시료를 분쇄하였다. 추출용매로는 MeOH와 증류수를 이용하여 48h 동안 shaking 하였다. 이를 여과지에 걸러낸 후 농도를 1%, 5%, 10%로 조절하여 사용하였다.

생물검정방법으로는 여과지 Whatman no. 2를 깔 petridish (87×15 mm)에 돌피(*Echinochloa crus-galli* var. *praticola*)를 10립씩 치상하고 각 농도별 추출액 8ml 씩을 주입하였다. 각 처리는 3반복으로 $25 \pm 5^\circ C$ 로 유지되는 항온실(2000 lux)에서 24h 정상태로 하여 치상 후 10일째 발아율을 조사하였다.

1.2 꽃무릇 추출액의 상추 생물 검정

꽃무릇 추출액의 상추생물검정은 Duke(1986)가 제시한 생물 검정방법을 이용하였다. 여기에 사용된 검정종자로는 발아력이 높고 균일한 상추를 이용하였다. 꽃무릇은 1999년 12월에 지상

부 및 구근을 채취하여 추출하였으며, 추출액의 농도는 1%, 5%, 10%로 하였다.

먼저 여과지를 칸 petridish(87×15mm)에 검정 용액 8ml를 첨가한 후 상추종자 30립씩 각 처리 당 3반복으로 치상하였다. 다음으로 암상태에서 24h 배양한 종자의 발아율을 조사하고 다시 백색광을 15분간 조사한 후 암상태에서 48h 배양하였다. 마지막으로 상추의 발아율과 뿌리 및 배축의 생장을 측정하고 백색광을 48h 조사한 후 자엽내 chlorophyll 함량은 Porra (1989)의 방법에 의해 측정하였다.

2. 꽃무릇의 생리활성물질 동정

2.1 TLC를 통한 생리물질 검정

꽃무릇의 구근 45g에 액체질소를 첨가하여 막자사발에서 마쇄한 후 95% EtOH에 7일동안 암 조건에서 보관 추출하였다. 이 추출액을 여과한 후 점액물질이 생성될 때까지 45℃에서 감압농축하여 점성이 강한 응고물을 얻었다. 이를 2%의 황산에 용해시킨 후 ether (150ml)에 3번 추출하여 지방층을 분리시키고, ammonia를 이용하여 산도를 pH 8-9로 조정한 후 CHCl₃ (150ml)에 3회 추출하였다. CHCl₃층과 수용층을 분리하여 수용층 (fraction A), CHCl₃층(fraction B)으로 각각 명명하였다. 활성이 있는 fraction B를 감압, 농축하여 획득한 농축시료를 0.5mm TLC (Thin layer chromatography) plate를 Merck상에서 전개용매 (CHCl₃ : MeOH, 50 : 50)로 전개시킨 다음 formaldehyde 1ml를 H₂SO₄ 10ml에 녹인 Marquis 시약을 사용하여 발색시켰다.

2.2 꽃무릇의 생리활성물질 동정

Fraction B를 PLC (preparative layer chromatography) plate (Silica gel 60 F₂₅₄, 20×20cm Merck) 상에서 전개용매(CHCl₃ : MeOH, 50 : 50)로 전개시킨 다음 발색되었던 부위 Rf value 0.49-0.52를 분취하

여 MeOH로 녹인 후 질소 gas로 날린 후 petridish에 증류수 10 ml을 넣고 25±5℃ 2000lux의 광도가 유지되는 항온실에서 상추를 생육시킨 후 초장과 근장을 조사하였다. 남은 분취물 1/2은 MeOH로 녹인 후 여과지(Gelman Sciences Membrane filter, 13mm, 0.45µm)로 걸러 GC-MS의 분석시료로 사용하였다. 처리된 시료는 표 1과 같은 조건하에서 분석하였다(Takagi 등, 1968; Fujii 1999).

Table 1. The operating conditions of GC-MS for *Lycoris radiata* HERB.

Items	Conditions
Model	HP.6890 GC& 5973MS
Column	30m.0.25mm(i.d.)HP-1capillary
Flow rate	Carrier(N ₂): 1.0 ml/min
Injection port temperature	230 °C
Ion source temperature	180 °C
Temperature program	240°C(5min)→280°C(5min)
Ionizing energy	70 eV
Mode	EI Positive

결과 및 고찰

1. 꽃무릇의 생리활성 검정

1.1 추출용매에 따른 생리활성 차이 검정

MeOH와 수용추출하여 얻은 추출물을 피의 생육에 미치는 영향을 구멍코자 농도별로 처리한 후 신초와 뿌리의 생육상태를 조사한 결과 두 용매 모두 5%와 10%농도에서는 전혀 발아하지 않았고, 저농도인 1%에서는 발아는 되었으나 뿌리생육이 매우 저조하여 억제효과가 있는 것으로 나타났다(표 2). 또한 경엽이나 구근 추출물에서 비슷한 양상의 억제율이 나타남을 알 수 있었다(표 2).

MeOH과 수용액을 추출용매로 하여 조사한 결과 두 용매간에 억제율이 유사하게 나타나서 용

매간에는 차이가 없어서 억제물질이 물에 용출되는 것으로 사료된다.

Table 2. Growth response of barnyardgrass affected by MeOH and water extract from bulb and leave of *Lycoris radiata* HERB.

Solvent	Part of <i>Lycoris radiata</i>	Bulb				Leave			
	Conc. of extract (%)	0	1	5	10	0	1	5	10
MeOH	Root(mm)	63.0	0.4	0	0	63.0	0.4	0	0
	Shoot(mm)	21.0	12.4	0	0	21.0	7.9	0	0
H ₂ O	Root(mm)	50.5	0.03	0	0	50.5	0	0	0
	Shoot(mm)	16.4	10.3	0	0	16.4	6.3	0	0

¹⁾ Average of 3 repli. (10 seeds per repli.), % root and shoot determined at 10 days after incubation, maintaining 25±5°C and 2000lux.

1.2 꽃무릇 추출액이 상추의 생육에 미치는 영향

검정식물로 사용할 수 있는 것은 식물체로서 그 중요성이 인정된 것이어야 하고, 종자를 얻기 쉽고 발아력이 우수한 식물이어야 한다. 일반적으로 상추는 발아력이 높고 균일하여 발아억제, 신장억제, 광합성 억제 등을 측정하는데 이용되고 있다. 표 3은 Duke (1986)가 제시한 방법에 따라 상추 생육조사를 한 결과를 나타내고 있다. 발아율은 대조구에서 1차 40%, 2차 95%였으나 꽃무릇의 인경 추출물에서는 추출액 농도 1%에서 1차, 2차 조사시 상추종자의 발아율이 각각 2%, 50%였으나, 5% 및 10%농도에서는 1, 2차 모두 발아가 되지 않았다. 반면에 잎의 추출물에서는 추출액 농도 1%에서 1, 2차 조사시 7%와 86%, 5%에서 0%와 36%, 10%에서 1, 2차 조사시 0%와 3%등으로 나타나 인경 추출액이 잎 추출액보다 발아억제 시키는 것으로 나타났다. 상추의 생육에 미치는 영향으로는 무처리외의 경우 상

추의 근장이 28.4mm, 배축 13.8mm 인데 비하여 인경 추출물 1%에서는 배축의 길이는 3mm로 86%억제, 근장은 4mm로 78%억제되었다. 5% 및 10%에서는 상추종자가 전혀 발아가 되지 않았다. 반면 잎 추출액은 1%에서 근장 6.6mm로 77%억제되었고, 배축의 길이가 11.5mm로 17%억제되어 인경 추출물보다 억제 정도가 훨씬 작았다. 잎 추출물의 5% 및 10%농도에서 초장이나 배축의 길이가 3-5 mm범위내외로 조사되어 무처리외에 비하여 크게 억제되었음을 알 수 있다(표 3).

상추의 chlorophyll 함량은 인경 추출액 1%에서 chlorophyll a가 1.9 mg/m², chlorophyll b는 1.7 mg/m²인 반면, 잎 추출액은 1%에서 chlorophyll a가 4.6 mg/m², chlorophyll b는 3.3 mg/m²로서 인경 추출액에서 상추의 chlorophyll 함량이 낮았다. 이는 인경 추출액이 잎 추출액보다 chlorophyll 함량에 끼친 억제현상이 다소 높은 것으로 나타났다. 추출액의 농도가 높아짐에 따라 상추의 chlorophyll 함량 역시 감소하는 경향이었으며, 잎 추출액 10%에서는 생장발육이 미미하여 chlorophyll 측정이 불가능하였다(표 3).

Table 3. Effect of water extracts from bulbs and leaves of *Lycoris radiata* on the germination and growth of lettuce seedlings.

Solvent	Part of <i>Lycoris radiata</i>	Bulb				Leave			
	Conc. of extract (%)	0	1	5	10	0	1	5	10
Germination	1st test(%)	40 ¹⁾	2	0	0	40	7	0	0
	2nd test(%)	95	50	0	0	95	86	36	3
Length	Root(mm)	28.4	4	0	0	28.4	6.6	3	3
	Hypocotyl(mm)	13.8	3	0	0	13.8	11.5	5	4
Chlorophyll	chlorophyll a	5.2 ²⁾	1.9	0	0	5.2	4.6	0.8	0
	chlorophyll b	1.4	1.7	0	0	1.4	3.3	0.2	0
	total	6.6	3.6	0	0	6.6	7.9	1.0	0

¹⁾ Average of 3 replication.

²⁾ Chlorophyll : mg/m²

이상의 결과를 종합해 볼 때 꽃무릇의 추출물질은 상추의 신장억제 및 광합성억제에 영향을 미치는 물질을 함유하고 있는 것으로 나타났으며 꽃무릇의 잎 추출물보다 인경 추출물에서 억제율이 높은 것으로 나타났다.

2. 꽃무릇의 생리활성물질 동정

2.1 TLC를 통한 생리활성물질 검정

꽃무릇의 인경으로부터 생리활성물질을 탐색하고자 전처리 과정을 거쳐 TLC 검정결과로 물질의 유무를 검정하였다. Fraction A, B에서 활성이 나타난 fraction B를 UV-254nm에서 검침한 결과 Rf수치 0.49-0.52에서 spot의 활성이 있었다. 이러한 fraction B를 Marquis 시약을 이용한 발색에서 노란-적자색의 반점이 나타나, 이 물질의 동정결과 alkaloid 계통임을 추정할 수 있었다(그림 1).

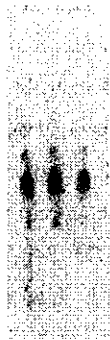


Fig. 1. TLC pattern of Korean *Lycoris radiata* HERB

2.2 꽃무릇의 생리활성물질 동정

활성이 발견된 fraction B를 PLC 한 후 이를 분취하여 상추를 가지고 생육시킨 결과 그림 2와 같이 상추의 생장에 억제효과가 있음이 나타났다. Fraction B를 GC-MS로 peak를 조사한 결과 25분대에서 peak가 나타났다.

이 물질을 GC-MS library로 조사한 결과 lycorenan으로 추정되었다(그림 3). 안 (1983)은 꽃무릇의 인경에는 alkaloid, lycorenine, lycorine 등의 물질이 함유되어 있음을 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서 구명된 lycorenan도 안(1983)이 보고한 물질과 유사물질인 것으로 사료된다.

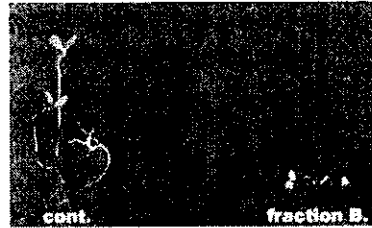


Fig. 2. Effect of activated fraction B on the growth of lettuce.

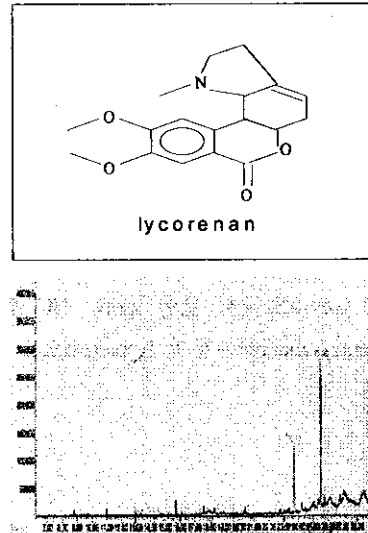


Fig. 3. Chemical structure of allelochemical (lycorenan) and its gas chromatogram of Koeran *Lycoris radiata* HERB.

최근 Fujii (1999)등은 일본 꽃무릇에서 lycorine과 crinine을 밝혀낸 바 있으며, 이것은 15ppm에서 상추생육을 완전히 억제한다고 보고하였다.

반면 본 연구에서는 한국재래 꽃무릇에서 lycorenan이라는 물질이 검출되었으며 이 물질 또한 상추의 생물검정을 통해 억제효과가 있음이 검증되었다(그림 3). 따라서 꽃무릇이 함유하고 있는 lycorenan도 allelopathy 효과를 나타내는 생리활성물질의 일종이라는 사실을 추정할 수 있었다. 또한 이와 관련한 여러 lycoris alkaloid 계통의 물질에 대한 연구가 지속되어야 다양하고 명확한 생리활성물질이 구명될 것으로 사료된다.

적 요

1. 꽃무릇으로부터 용매를 다르게 하여 잎과 인경의 MeOH와 수용추출물을 bioassay 한 결과, 농도가 5% 및 10%로 증가하였을 때는 전혀 발아되지 않았으며, 1%에서는 근장이 크게 억제되었다. 용매간의 추출효과에는 차이가 없었으나, 상추의 생장에서는 인경추출액이 잎추출액보다 억제효과가 다소 높은 것으로 보였다.
2. 꽃무릇의 인경을 추출하여 UV를 조사하였을 때 Rf 0.49-0.52에서 보인 spot는 GC-MS에 의해 lycoris alkaloid계통의 lycorenan으로 동정되었다.

참고문헌

1. Duke, S. O. 1986. Naturally occurring chemical as herbicides. Reviews of Weed Sci. Vol. 2: 16-44.
2. Dilday, R. H., J. Lin and W. Yan. 1994. Identification of allelopathy in the USDA-ARS rice germplasm collection, Australian J.

Exp. Agric. 34: 907-910.

3. Fujii, Y., Z. Iqbal, S. Hiradate, N. Nakajima, M. Takahashi and G. R. Waller. 1999. Isolation of lycorine and crinine from *Lycoris radiata* and their role as allelochemicals. In Program and Abstracts of 2nd World Congress on Allelopathy held at Lakehead University, Canada from August 8-13, 1999. p. 91.
4. Harrison Jr., H. F. and J. K. Peterson. 1986. Allelopathic effects of sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) on yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*) and alfalfa (*Medicago sativa*). Weed Sci. 34: 623-627.
5. Olofsdotter, M., A. Olesen, S. B. Anderson and J. C. Streibig. 1994. Acomaparison of herbicide bioassays in cell culture and whole plants. Weed Research 34(6):387-394.
6. Porra R. J., Thompson W. A. and Kieidemann P. E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients as simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975: 348-394
7. Rice. E. L. 1987. Allelopathy: An overview. Amer. Chem. Soc., pp.8-22
8. Saggese, E. J., T. A. Foglia. G. Leather, M. P. Thompson, D. D. Bills, and P. D. Hoagland. 1985. Fractionation of allelochemicals from oilseed sunflowers and jerusalem artichokes. Amer. Chem. Soc. pp. 99-112.
9. Takagi, S., T. Katagi. and K. Takebayashi. 1968. Gas liquid chromatography of alkaloids. II. Quantitative analysis of alkaloids of *Lycoris radiata* herb. Chem. Pharm. Bull(Tokyo). 16(6):

- 1121-1123.
10. Whittaker, R. E. and P. P. Feeny. 1971. Allelochemics : chemical interactions between species. *Science* 171:757-770.
 11. Wilson, R. E. and E. L. Rice. 1968. Allelopathy as expressed by *Helianthus annuus* and its role in old-field succession. *Bull. Torrey Bot. Club* 95:432-448.
 12. Yamamoto T., K. Yokotani, S. Kosemura., S. Yamamura. K. Yamada., and K. Hasegawa. 1999. Allelopathic substance exuded from a serious weed, germinating barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.) roots. *J. Plant Growth Regul.* 18: 65-67.
 13. 金吉雄, 禹宣旭, 白鏡煥. 1987. 발 雜草로부터 生理活性物質 探索. *Research Bulletin of Agri. Science and Technology (Kyungpook Nat'l. Univ.)* 4:13-22.
 14. 安鶴洙, 李春寧. 1983. 韓國植物圖鑑 范學社. pp. 316-317.
 15. 李徽載. 1964. 韓國植物圖鑑. 花卉 I. 三和出版社. pp. 61-62.
 16. 安柱澤. 1983. 韓國資源植物. 韓國資源植物研究所. pp. 1264-1265
 17. 박윤점, 박인현, 이만상, 김진수, 유성오. 1986. 야생식산(*L. radiata*)에 관한 연구 I. 형태, 생태 및 발생학적 특성. *한국원예학회지* 27(4):359-365.