

작약 연작지토양 추출물이 작약 배양세포와 배양묘의 생육에 미치는 영향

박준홍¹ · 최성용¹ · 박소득¹ · 김태화² · 박 만² · 김장억^{2*}

¹경상북도농업기술원, ²경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부
(2010년 3월 2일 접수, 2010년 3월 23일 수리)

Effects of Continuously Cropped Soil Extracts on Cell Viability and Seedling Growth of Peony (*Paeonia lactiflora*)

Jun Hong Park¹, Seong Yong Choi¹, So Deuk Park¹, Tae Hwa Kim², Man Park² and Jang-Eok Kim^{2*} (¹Gyeongsangbuk-do Agricultural Research & Extension Services, Daegu 702-708, Korea and ²School of Division Applied Biosciences, College of Agricultural Life Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea)

This experiment was conducted to investigate the growth inhibition effects caused by continuous cropping soil in peony (*Paeonia lactiflora* Pallas). The effect of extracts from continuous cropping soil of peony was tested with bio-assay method using callus cells induced from peony filament tissues and seedlings derived from peony zygotic embryos. The cell viability and seedling growth were significantly inhibited by methanol extract in continuous cropping soil. Methanol extract from continuous cropping soil was successively fractionated with solvents such as *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol and water. The seedling growth was inhibited by ethyl acetate fraction obtained in methanol extract.

Key Words: Cell viability, Continuous cropping, *Paeonia lactiflora*, Seedling, Soil extract

서 론

국내에서 재배되고 있는 작약(*Paeonia lactiflora* Pallas)은 인삼, 당귀와 함께 가장 많이 사용되고 있는 약용작물 중의 하나로 생산과 소비면에서 중요시 되어 왔다. 우리나라의 작약 재배면적과 생산량은 1990년 882 ha, 3,361 M/T이었지만 2007년은 162 ha, 1,101 M/T으로 급격히 감소하였다(Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, 2008). 작약은 토심이 깊고 부식질이 많은 비옥한 사질양토의 배수가 잘되는 토질을 좋아하고 햇볕을 충분히 받는 곳에서 잘 자라는 작물로서, 토양과 기상조건, 시비법 등 재배기술이 까다로우 재배적지에서만 주로 재배되면서 동일지역에서 연작을 많이 하여 왔다. 작약은 재식 후 3-4년을 경과하여 수확되어 재배기간이 길기 때문에 병 발생이 많은 것으로 보고되어 있다(Park et al., 1996; Choo et al., 1995).

연작장해 원인에 대해서는 양분소모, 미생물, 독소, 병해,

선충, 토양 물리성의 악화 등이 보고되고 있으며(Blakley, 1966; Lee et al., 1987; Gries, 1943; Banyer, 1966; Griebel and Owens, 1972) 현재는 미생물설과 독소설이 중심이 되고 있다. 특히 식물체 또는 뿌리분비물 중에 독소물질의 존재나 그 성질 등을 구명하고 관련 물질을 분리 동정한 보고가 다수 있다(Datta and Sinha-Roy, 1974; Dhillon et al., 1982; Gulzar and Farrukh, 1979). 연작장해지 토양에서 식물독소의 생성은 작물잔체의 분해시 생성되는 2차 대사산물로서 terpenes, steroids, acetogenines, phenyl-propanes, alkaloids가 생성된다고 보고하고 있으며(Ray and Walter, 1976), 고추, 마늘, 배추의 연작제해지 토양에서는 benzoic acid, hydroquinone, *p*-hydroxybenzoic acid 및 vanillic acid가 식물독소로 작용하여 bio-assay에서 200 ppm 이상 일때는 줄기의 생장을 억제하고 생장점의 고사현상을 나타낸다고 하였다(Lee et al., 1987). 인삼 연작장해의 주된 원인은 *Cylindrocarpon destructans*에 의한 뿌리썩음병으로 이로 부터 분비되는 nectrolide라는 물질이 blackbutt 묘의 생육을 억제하고 시들음 증상과 묘의 뿌리를 흑색으로 변화시킨다고 보고하였다(Evans et al., 1967).

따라서 본 실험은 작약 연작지 토양 추출물과 용매분획물

*연락처:

Tel: +82-53-950-5720 Fax: +82-53-953-7233

E-mail: jekim@knu.ac.kr

이 작약 배양세포의 세포활력과 작약 배양묘의 생육에 미치는 영향을 조사함으로써 작약 연작 장애의 피해정도를 조사하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 추출

시험에 사용된 토양시료는 초작 및 연작 재배지 3년생 포장의 토양을 각각 5월 하순에 채취하여 음건 후 2 mm체를 통과한 시료를 사용하였다. 각각의 음건한 토양시료 300 g에 물과 메탄올을 가하고 상온에서 24 h 추출한 후 여과지(Whatman No. 3)로 여과하였고 메탄올 추출물은 메탄올이 남지 않도록 40°C에서 감압농축하고 증류수 300 mL로 현탁시킨 후 생물검정용 시료로 사용하였다.

용매극성별 활성을 검정하기 위하여 건조한 토양 20 kg에 95% 메탄올 60 L를 가하여 상온에서 24 h 침지하여 추출한 후 여과지로 여과하여 40°C에서 감압농축하였다. 위의 추출조작을 2회 반복 실시하여 메탄올 추출물 11.1 g을 얻었다. 메탄올 추출물 11 g을 물 1 L에 현탁시켜 분액여두를 이용하여 극성별로 *n*-hexane층(2.0 g), ethyl acetate층(2.8 g), *n*-butanol층(0.7 g) 및 물 층(4.8 g)을 얻어 실험에 사용하였다. 각 분획물별 처리농도는 200 µg/mL로 처리하였고, 실험은 3반복으로 수행하였다.

Ethyl acetate 분획물로부터 연작장애 물질의 분리

작약 연작지 토양 메탄올 추출물을 분배추출하여 얻은 ethyl acetate 분획물을 실리카겔(Merck, 7734)과 혼합하여 유발에서 미세한 분말로 조제한 후 실리카겔이 충전된 유리 칼럼(직경 5 cm) 상부에 올려놓고 칼럼크로마토그래피(용매, CHCl₃:MeOH=10:1→5:1→2:1→1:1) 방법으로 분리를 실시하여 EF(ethyl acetate fraction)-1, 2, 3, 4의 총 4개의 분획을 얻었다.

토양추출액의 세포활력 억제효과 검정

작약 토양 추출물이 작약의 세포배양에 미치는 영향을 조사하기 위하여, Chung et al.(1995)의 방법에 따라 작약 배양세포를 증식하였다. 즉, 작약 재배포장에서 지름이 2 cm 정도의 화퇴(花蕾)를 채취하여 4°C에서 20일간 전처리 후 70%(v/v)의 에탄올에 1분간 소독후 멸균수로 세척한 화퇴의 꽃잎과 암술을 제거하고 수술의 약(葯)부분을 제외한 화사(花絲) 조직만을 절취하여 2,4-D가 0.5 mg/L 첨가된 MS 배지(Murashige and Skoog, 1962)에 치상한 후 26°C가 유지되는 항온실에서 60일간 암상태에 배양하여 캘러스를 얻었다. 이 캘러스를 2,4-D가 0.5 mg/L 첨가된 MS배지에서 분당 70회의 진탕배양기에서 2주간 순화시킨 후 100 mesh의 체를 통과한 세포를 신선배지에서 다시 1주일간 배양하였으며, 증식된 세포를 실험재료로 사용하였다.

작약 배양세포의 활력 검정은 TTC(2,3,5-triphenyl tetrazolium) 염색법(Towill and Masur, 1975)으로 측정하였다. 작약 배양세포에 토양 추출물을 처리하고 25°C, 암상태에서 24 h 동안 진탕배양후 배양세포에서 생성되는 formazan을 TTC 용액으로 염색하고, 95% ethanol로 색소를 추출하여 485 nm에서 흡광도를 측정하여 무처리와 비교하였다. 무처리 세포의 흡광도를 100%, 완전히 죽은 세포의 흡광도를 0%로 하여 활력의 억제 정도를 계산하였고, 실험은 3반복으로 수행하였다.

작약 배양묘에 대한 추출물의 생육억제효과 검정

작약 연작지토양 추출물이 작약 배양묘의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 초작지와 연작지토양 추출액을 MS 배지에 200 µg/mL 농도로 첨가하고, 3%(w/v)의 sucrose와 0.3 mg/L의 GA₃를 첨가한 후 pH는 5.8이 되도록 조절하여 121°C의 고온 고압멸균기로 살균하였다. 무균상에서 지름 9 cm의 페트리디쉬에 20 mL씩 배지를 분주하였으며, 배지 응고제로 0.2%(w/v)의 gelrite를 멸균전에 첨가하였다.

작약의 생숙종자를 채취하여 종피를 제거하고 16 h정도 증류수에 침적 후 70%(v/v) 에탄올에 30초, 1% NaOCl에 10분간 흔들어 소독하고 멸균수로 4-5회 세척하였다. 무균상에서 소독된 종자로부터 배유부분을 제거한 후 배(embryo)를 토양 추출물이 첨가된 배지에 치상한 후 26°C에서 16/8 h의 일장조건에서 30일간 배양후 배의 생육정도를 조사하였고 실험은 3반복으로 수행하였다.

HPLC 분석

작약 연작지 토양에서 분리한 EF-3은 HPLC(Alliance, Waters, USA)로 분석하였다. 컬럼은 silica(4.6×150 mm, 5 µm), 이동상은 CH₂Cl₂:MeOH=20:1(v:v), 유속은 1 mL/min., 검출기는 PDA(2996, Waters, USA)로 240 nm에서 분석하였고, UV spectrum은 HPLC 분석후 PDA 검출기를 이용하여 spectrum을 확인하였다.

통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SAS program(V.9.13, SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 Duncan의 다중검정에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

작약 연작지토양 추출물의 세포활력

작약 토양의 물과 메탄올 추출물이 작약 배양세포의 활력에 미치는 영향은 Table 1과 같다. 토양시료 300 g을 증류수 300 mL로 추출한 추출물을 작약 배양세포에 처리하였을 때 세포활력은 초작지 토양 물추출물 처리가 98.1%, 연작지 토양 물추출물은 89.0%이었으며, 초작지 토양 메탄올 추출물

Table 1. Effect of Water and MeOH extracts from soils on the cell viability of *Paeonia lactiflora*

Treatment	Cell viability (% of control)	
	Water extract	MeOH extract
First cropping	98.1±6.3	95.2±2.1
Continuous cropping	89.0±6.6	76.7±3.1

Viability of control cell was considered as 100%.

Table 2. Effect of each solvent fractions from MeOH extract of continuous cropping soil on the cell viability of *Paeonia lactiflora* cultured cells

Fraction	Cell viability (% of control)
Hexane	86.7±3.9
EtOAc	73.9±8.1
BuOH	82.8±8.2
Water	92.8±4.7

Soil fractions was treated 200 µg/ml. Viability of control cell was considered as 100%; control, treated with D.W.

처리가 95.2%인데 비해 연작지 토양 메탄올 추출물은 76.7%로, 초작지 토양 추출물에 비해 연작지 토양 추출물에서, 물 추출물에 비해 메탄올 추출물에서 뚜렷한 작약 배양세포 억제효과를 나타내었다.

작약 연작지 토양의 메탄올 추출물 처리가 배양세포 활력의 감소정도가 가장 심한 것으로 나타나 메탄올 추출물의 용매극성별로 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, 물층으로 분배추출하여 얻은 분획물 처리에 따른 작약배양세포의 활력에 미치는 영향은 Table 2와 같다. 작약 배양세포의 세포활력은 ethyl acetate 분획물 처리가 73.9%로 가장 억제되었으며 그 다음으로 *n*-butanol 82.8%, *n*-hexane 86.7%, 물 분획물 92.8% 순으로 억제되었다. Park et al.(1999)은 식물체 추출물이 상추 종자의 발아 및 생장에 미치는 영향에서 물 추출물보다 에탄올 추출물에서 억제효과가 크며, 생장억제에 관련된 물질은 phenol성 물질, 유기산 등으로 보고하였는데(Lee et al., 1987), 본 실험에서도 연작장해에 관련된 물질이 메탄올, ethyl acetate 등의 유기용매에 보다 쉽게 용해되기 때문에 작약 배양세포의 활력에 영향을 미친 것으로 추측된다.

작약 연작지 토양추출물의 배양묘 생육억제효과

작약 초작지 토양추출물에 비해 연작지 토양추출물에서 배양세포 활력억제 효과를 나타내어 연작지 토양추출물 처리에 따른 작약 배양묘의 생육억제효과를 증강하였다(Table 3). 배양묘의 뿌리길이와 직경은 대조구가 각각 16.4 mm, 2.0 mm에 비해 연작지 토양 물추출물 13.8 mm, 1.6 mm, 연작지 토양 메탄올추출물 8.6 mm, 1.3 mm 이었으며 생근층에서도 대조구가 10주당 1.4 g에 비해 물추출물이 1.2 g, 메탄올추출물이 0.7 g으로 토양 물추출물에 비해 메탄올 추출물에서 생육저해효과를 나타내었다.

작약 연작지 토양의 메탄올 추출물로부터 용매극성별로 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, 물층으로 분배추출하여 얻은 분획물을 작약 배양묘에 처리하였을 때 생육은 Table 4에서와 같다. *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, 물 분획물 모두 작약 배양묘의 생육을 억제시켰으나 ethyl acetate 분획물에서 억제효과가 가장 크게 나타났다. 배양묘의 뿌리 길이와 직경은 대조구가 각각 16.4 mm, 2.0 mm에 비해 ethyl acetate 분획물이 4.6 mm, 1.7 mm이었고 생근층에서도 대조구가 10주당 1.4 g에 비해 ethyl acetate 분획물 0.3 g이었다. 인삼 6년근 토양의 chloroform 분획물이인삼 배양세포의 활력을 억제시켰다는 보고(Lee et al., 1989)하였는데 작약 연작장해에 관여하는 물질은 중간 극성의 ethyl acetate 층에 분포하는 것으로 판단된다.

위 용매분획물중 작약 배양세포와 작약 배양묘의 생육억제효과를 나타낸 ethyl acetate 분획물을 silica gel 칼럼크로마토그래피 방법으로 분리한 4개의 분리물을 작약 배양묘에 처리하여 활성을 검정한 결과는 Table 5과 같다. Ethylacetate 층의 4개의 분리물 모두 대조구에 비해 생육억제효과를 나타내었으며 특히 연작지 토양 EF(ethyl acetate fraction)-3번 분리물은 생육억제효과가 가장 크게 나타났다. 그러나 ethyl acetate 층 4개의 분리물의 작약 배양묘 생육억제효과는 분리전 ethyl acetate 분획물 보다 더 억제되는 농축효과는 나타나지 않았다. 이는 어떤 한가지 물질이 작약 배양묘의 생육을 억제하는 것이 아니라 여러가지 성분들의 복합적인 작용으로 생육억제현상이 나타난 것으로 추측된다.

연작지 토양 EF-3 분리물의 HPLC chromatogram과 UV spectrum은 Fig. 1과 같이 HPLC상에서는 단일 peak를 나타내었고, UV spectrum에서는 240.4 nm에서 최대 흡수파장을 나타내는 물질이었다.

본 연구의 결과로 작약 연작지 토양의 MeOH 추출물과

Table 3. Effect of extracts from continuous cropping soil on the growth of seedlings derived from zygotic embryos of peony seeds

Extract solvent	Root length (mm)	Root diameter (mm)	Fresh weight (g/10 plants)
Water	13.8b*	1.6b	1.2ab
MeOH	8.6c	1.3c	0.7b
Control	16.4a	2.0a	1.4a

* Means by the same letter within a column are not significantly different at 0.05 probability level according the Duncan's multiple range test.

Table 4. Effect of fractions from MeOH extract of continuous cropping soil on the growth of seedlings derived from zygotic embryos of peony seeds

Fraction	Root length (mm)	Root diameter (mm)	Fresh weight (g/10 plant)
Hexane	8.8b*	1.4b	0.5c
Ethyl acetate	4.6c	1.7a	0.3c
Butanol	9.6b	1.8a	0.8b
Water	9.1b	1.9a	0.9b
Control	16.4a	2.0a	1.4a

Soil fractions was treated 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$; control, treated with D.W.

* Means by the same letter within a column are not significantly different at 0.05 probability level according the Duncan's multiple range test.

Table 5. Effect of fractions from ethylacetate fraction on the growth of seedlings derived from zygotic embryos of peony seeds

Fraction	Root length (mm)	Root diameter (mm)	Fresh weight (g/10 plant)
EF-1	12.5b*	1.7a	0.86ab
EF-2	10.0bc	1.6a	0.78b
EF-3	7.2c	1.5a	0.42c
EF-4	16.4a	1.8a	0.95ab
Control	17.3a	1.9a	1.09a

Soil fractions was treated 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$; control, treated with D.W.

* Means by the same letter within a column are not significantly different at 0.05 probability level according the Duncan's multiple range test.

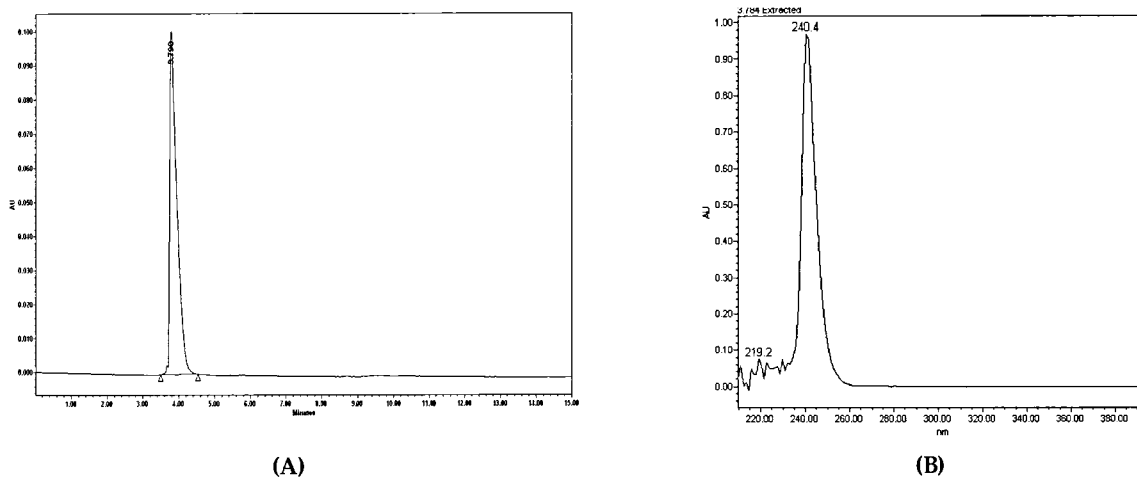


Fig. 1. HPLC chromatogram(A) and UV spectrum(B) of EF-3 isolated from continuous cropping soil. HPLC conditions ; silica(4.6 \times 150 mm, 5 μm) column, solvent CH_2Cl_2 :MeOH =20:1(v/v) for 15 min. ; flow rate, 1 ml ; UV detection at 240 nm.

이로부터 분리한 ethylacetate 분획물이 배양세포의 세포활력을 억제하고 배양묘의 생육을 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 TTC염색법과 배양묘 생육정도를 측정함으로써 연작지 토양에 작약을 식재할 경우 연작장애정도를 추정할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

- Banyer, H.J., 1966. Cereal root diseases and their control. Part III *Agric. South. Aust.*, 415-417.
- Blakley, E.R., 1966. Gas chromatography of phenolic acid, *Anal. Biochem.* 15, 350-354.
- Choo, Y.D., Kim J.C., Whang W.B., Park S.D., 1995. Effect of intercropping system on the population on nematodes, *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 3(2), 116-119.
- Chung, J.D., Harn, J.S., Sohn, J.K., 1995. Somatic embryogenesis from filament-derived callus of *Paeonia lactiflora* Pall., *Korean J. Plant Tissue Culture* 22(1), 47-51.
- Datta, S.C., Sinha-Roy, S.P., 1974. Allelopathy and inhibitors, *Sci. and Cul.* 40, 47-59.
- Dhillon, M.S., Mulla, M.S., Hwang, Y.S., 1982. Allelochemicals produced by the hydrophate myriophyllum spicatum affecting mosquitoes and midges, *J. Chem.* 8, 517-528.
- Evans, G., Cartwright, J.B., White, N.H., 1967. The production of a phytotoxin, nectrolide, by some root-surface isolates of *Cylindrocarpon radicolica*, Wr., *Plant and Soil* 26(2), 253-260.
- Gries, G.A., 1943. The effect of plant decomposition products on root diseases, *Phytopath.* 33, 1111-1112.
- Griebel, G.E., Owens L.D., 1972. Nature of the transient activation of soil microorganisms by ethanol or acetaldehyde, *Soil Biol. Biochem.* 4, 1-8.
- Gulzar, A.D., Farrukh. H., 1979. Allelopathic effects of *dichanthium annulatum* (FORSK) stapf on some cultivated plants, *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 22, 194-197.
- Lee, J.C., Kim, H.J., Oh, S.H., 1989. Review of studies on ginseng replanting problems, *Korean J. Crop Sci.* 34(2), 115-120.
- Lee, S.K., Suh, J.S., Kim, Y.S., Park, J.K., 1987. Studies on phytotoxin in intensively cultivated upland crops, *Korean J. Soil Sci. Fert.* 20(1), 63-67.
- Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, 2008. Guide book of industrial crop production, pp. 18-311.
- Murashige and Skoog, 1962. A revised media for rapid growth and bioassays with tabacoo tissue culture, *Physiol Plant* 15, 473-497.
- Park, K.M., Lee, M.K., Hwang, S.J., Kim, H.Y., Lee, I.J., Shin, D.H., Kim, K.U., 1999. Effect of water and ethanol extracts from various plants on the germination and growth of lettuce seeds, *Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl. Univ.* 17, 1-6.
- Park, S.D., Kim, K.J., You, O.J., Kim, S.J., Kim, J.C., Shin, J.H., 1996. Incidence of major diseases on *Paeonia lactiflora* Pallas, *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 4(3), 236-240.
- Ray, M., Walter, H., 1976. The extraction of soil phytotoxins using a natural EDTA solution, *Soil Sci.* 124(4), 205-210.
- Towill, L.E., Masur, P., 1975. Studies on reduction of 2,3,5-TTC as a viability assay for plant tissue, *Can. J. Bot.* 53, 1097-1102.