

천연 Naphthoquinone계 Juglone의 KAPAS 저해 및 제초활성 특성

최정섭^{1*}, 임희경, 서보람, 김진석, 최춘환, 김영섭, 류시용

Herbicidal Activity and KAPAS Inhibition of Juglone with Potential as Natural Herbicide

Jung-Sup Choi^{1*}, Hee-Kyung Lim, Bo-Ram Seo, Jin-Seog Kim
Chun-Whan Choi, Young-Sup Kim and Shi-Yong Ryu

ABSTRACT The potential of juglone a plant naphthoquinone as a natural herbicide on new target, 7-keto-8-amino pelargonic acid synthetase (KAPAS) in the early step of biotin biosynthesis pathway, was performed *in vitro* and *in vivo*. Juglone effectively inhibited KAPAS activities *in vitro* and the IC₅₀ was 9.5 μ M. Foliar application of juglone showed very good herbicidal activity to the eight-tested weed species. Among them, *Solanum nigrum* was completely controlled at a concentration of 250 μ g mL⁻¹ with main symptoms of desiccation or burndown. *Digitaria sanguinalis* and *Aeschynomene indica* were also sensitive to juglone treatment. All eight weed species were controlled by 90~100% at a concentration of 500 μ g mL⁻¹. However, soil application of juglone to *Digitaria sanguinalis* did not show any herbicidal symptoms. Cellular leakage from cucumber leaf squares treated with juglone increased depending on the concentrations increased from 6.25 to 100 μ M after 24 hours incubation with or without light. However, chlorophyll loss in cucumber leaf squares was negligible. Biotin supplements significantly rescued the inhibition of germination rate of *Arabidopsis thaliana* seeds previously inhibited by the juglone. Our results suggest that the juglone is a possible environmental friendly herbicide candidate with a new target KAPAS inhibiting activity.

Key words: biotin biosynthesis; environmental friendly herbicide; juglone; 7-keto-8-aminopelargonic acid synthetase; post-emergence treatment.

¹ 한국화학연구원 그린화학연구본부, 305-600 대전광역시 유성구 신성로 19번지, 유성우체국 사서함 107(Green Chemistry Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, Yuseong 305-600, Korea).

* 연락저자(Corresponding author) : Phone) +82-42-860-7431, Fax) +82-42-861-4913, E-mail) jschoi@kRICT.re.kr

(Received September 8, 2011; Revised September 20, 2011; Accepted September 23, 2011)

서 언

현대 농업에서 유기합성 제초제는 저렴한 비용과 높은 살초력을 확보할 수 있기 때문에 전 세계적으로 널리 사용되고 있지만, 대부분 합성 제초제는 환경이나 생태계에 대한 영향이 크지 않음에도 불구하고 많은 국가에서 그 사용을 엄격하게 제한하고 있다. 또한, 제초제의 장기 사용으로 인한 저항성잡초의 출현은 심각한 사회·경제적 문제로까지 인식되고 있다(Riches 등 1996). 그러나 저항성 문제를 해결할 수 있는 새로운 작용점을 갖는 제초제는 triketones계 제초제 개발 이후 10여년 이상 개발성과가 없는 실정이다(Prisbylla 등 1993; Schultz 등 1993). 따라서 새로운 구조의 신규 작용점을 갖는 합성 제초제에 대한 개발이 요구되고 있지만, 소득 향상과 삶의 질을 증시하는 풍토가 조성되면서 친환경 농업에 대한 관심이 높아지고 화학농약의 사용을 저감시키려는 각국의 강력한 규제 때문에 유기합성 제초제 개발 여건은 녹록하지 않은 것이 현실이다.

이러한 현실 타개를 위한 방안으로 천연물 유래의 제초활성 물질에 대한 관심과 연구가 다양하게 이루어지고 있는데, 동물이나 식물 또는 미생물과 광물 등에서도 탐색이 가능하지만 주로 토양 미생물(Satoh 등 1993; Duke 등 1996)과 다양한 종류의 식물(Rice 1984; Allan과 Fowler 1985; Putnam 1988)로부터 가장 활발하게 시도되고 있다. 토양 미생물 *Streptomyces hygroscopicus*의 2차 대사산물을 이용한 천연물 제초제 bialaphos의 작용기작은 글루타민 생합성 저해에 의한 암모니아 축적에 의한 독작용으로 알려져 있다(Bayer 등 1972; Tachibana 등 1986; Duke 등 1996; Lydon과 Duke 1999). 또한, *Streptomyces* 속에서 유래한 methoxyhygromycin(MHM)도 우수한 살초력을 갖는 대사산물로 알려져 있다(Lee 등 2003). 한편, 식물에서 유래한 C₉ 지방산인 pelargonic acid는 세포막의 지질 과산화작용에 의해 식물체가 고사되는데, 약효 발현속도가 매우 빠른 비선택성 경엽처리용 제초제로 개발되어 사용되고 있다(Fukuda 등 2004, Lederer 등 2004; Copping과 Duke 2007). Allelochemicals를 포함하는 다양한 종류의 essential oils도 광엽잡초 방제에 활용할 수 있는 가능성에 대한 검토가 이루어지고 있다(Lederer 등 2004).

국내에서도 식물 유래의 천연 제초활성 물질 탐색이 대학, 정부출연연구소, 국립농업기관, 벤처기업 등에서 진행하고 있으며, 국내 자생식물 또는 잡초에서 유래한 활성물질이 보고되어 있지만(Kim 등 2002; Kim 등 2003; Kim 등 2005; Jang 등 2010; Cho 등 2010; Hong 등 2011) 개발단계로의 진입은 아직 없는 상황이다.

최근에도 다양한 종류의 식물에서 기원하는 천연 제초활성 물질에 대한 탐색이 꾸준히 시도되고 있는데, Goncalves 등(2009)에 의하면 끈끈이주걱속(*Drosera*) *D. lusitanicum* 잎의 핵산 및 물 추출물에서 상추 종자의 발아억제 효과를 확인하였는데 triketones, benzoquinones, naphthoquinones 및 anthraquinones 등의 천연 유래 물질들은 hydroxyphenylpyruvate dioxygenase(HPPD)에 대한 억제효과를 갖는다고 하였다. 이 천연물질 중에서 juglone은 naphthoquinone 기본골격 5번 위치가 hydroxyl 그룹으로 치환된 형태로 이상적인 HPPD 저해제로서의 가능성을 갖는 기본 골격을 제공할 것으로 기대하고 있다(Meyer 등 2007).

한편으로는 새로운 작용점을 저해하는 새로운 제초제 개발에 대한 필요성이 농업인과 다국적 농약기업에서 지속적으로 요구하고 있는데, 일부 연구자들에 의해 유전자 수준에서의 새로운 제초제 작용점에 대한 탐색이 시도되고 있다(Wolfgang 등 2004). 이러한 탐색의 일환으로 한국화학연구원에서는 anti-sense 기법을 활용하여(Höfgen 1998) 신규 제초제 작용점 7-keto-8-aminopelargonic acid synthase(EC 2.3.1.47, KAPAS)를 발굴·확보하고 있다(Hwang 등 2003). 신규 제초제 작용점 KAPAS는 일부 미생물이나 식물에서만 존재하는 vitamin H(Biotin) 생합성 과정에 관여하는 효소로서 인축에 대한 안전성을 확보할 수 있기 때문에 이상적인 제초제 작용점이 될 수 있다. 발굴된 신규 제초제 작용점 KAPAS를 효과적으로 저해하는 triphenyltin acetate를 선발하여 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 생리·생화학적 방법을 통해 제초제로서의 가능성에 대해서도 보고한 바 있다(Hwang 등 2010).

최근 한국화학연구원에서는 다양한 종류의 식물에서 분리·동정한 528개의 천연 물질을 대상으로 *in vitro*에서의 KAPAS 저해활성을 평가하여 천연 naphthoquinone계 물질을 확보하였다. 본 연구에서는 천연 naphthoquinone계 물질 중에서 juglone을 대상으로 KAPAS에 대한 효소억제활성(IC₅₀)과 온실조건에

서의 토양 및 초기경엽처리, 전해물질 누출 정도와 엽록소 함량 감소 정도, biotin 첨가에 의한 회복효과 등의 생리·생화학적 탐색을 통해 천연물 제초제로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시험 물질

Juglone(5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone)은 black walnut (*Juglans nigra*)으로부터 구조 동정된 물질이며, 본 연구에서는 Sigma-Aldrich사로부터 구입하여 사용하였고, HPLC 분석을 통해 확인한 바 시험 물질의 순도는 90% 이상이였다.

KAPAS 저해활성

효소활성 저해는 KAPAS의 반응에 영향을 받아 생성되는 NADH의 A₃₄₀ 파장에서의 흡광도를 측정하였다(Ploux와 Marquet 1992; Webster 등 2000). 반응액은 각각의 plate well에 reaction buffer(10mM α -ketoglutarate, 25mM thiamin pyrophosphate, 10mM NAD⁺, 30mM MgCl₂, 20mM potassium phosphate buffer)100 μ L, α -ketoglutarate dehydrogenase 15 μ L, 1M L-alanine 5 μ L, 5mM pyridoxal 5-phosphate 50 μ L, pimeloyl-CoA 50 μ L, 원하는 최종 농도가 되도록 juglone 10 μ L씩을 혼합한 뒤 KAPAS(3 μ g μ L⁻¹) 20 μ L, D.W. 45 μ L를 첨가하여 최종량이 250 μ L이 되도록 준비하였다. 반응 온도 조건은 37 $^{\circ}$ C로 유지시켰으며 흡광도 측정은 1분 간격으로 60분 동안 microplate spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.

토양 및 경엽처리 효과

토양 및 경엽처리 효과 평가를 위해 polystyrene 컵에 원예용 상토를 충진하여 바랭이(*Digitaria sanguinalis*) 종자를 10~15립씩 치상하여 온실조건(30/20 \pm 5 $^{\circ}$ C, Light /Dark=14/10h)에서 토양 처리용은 1일, 경엽처리용은 9일 동안 생육시켰다. 약제 조제액(Acetone 60%, 0.1% Tween-20)으로 처리농도가 62.5, 125, 250 및 500 μ g mL⁻¹ 농도가 되도록 희석 조제 후 포트 당 5mL로 처리하여 7일(토양처리) 및 5일(경엽처리) 후에 외형적인 증상 및 약효를 약해 기준표에 의해 달관조사

(0~100)하였다. 초종확대 실험을 위해서는 원예용 상토를 충진 한 350cm² 사각 플라스틱 포트에 화분과 잡초 3종과 광엽 잡초 5종을 파종하여 동일한 온실조건에서 토양처리는 1일, 경엽처리는 12일 후에 동일한 방법으로 약제를 조제하여 포트 당 14mL로 처리하여 토양처리는 14일, 경엽처리는 7일 후에 달관조사하였다. 이때, 원예용 상토를 사용하는 경우에는 과습에 의한 활성발현의 이상을 초래할 경우를 회피하기 위하여 모든 토양처리에서는 원예용 복합비료가 첨가된 사질양토를 사용하였다.

엽록소 함량 측정

온실에서 11일 동안 생육시킨 오이(백미 백다다기) 잎을 직경 10mm cork borer를 이용하여 엽절편을 만들어 7mL의 1% sucrose와 1mM 1-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(pH 6.5)가 담겨져 있는 직경 6cm polystyrene Petri dish에 15개씩 옮긴 후, juglone을 원하는 농도가 되도록 아세톤으로 용해하여 처리하였고, 무처리구의 경우에는 동일한 양의 아세톤을 처리하였다. 최종 처리농도는 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ M로 하여 25 $^{\circ}$ C, 120 μ mol m²sec⁻¹로 24시간 동안 광을 조사한 후, Hiscox와 Israelstam(1979)의 방법을 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다. 광 조사 후 Petri dish에 있는 엽절편을 배양액과 분리하여 여과지로 흡수시켜 시험관에 넣고 10mL의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 넣은 다음, 암조건으로 실온에 24시간 동안 두었다. 이때 엽절편의 엽록소는 완전히 추출되었으며, 흡광분광분석기(Beckman, UV-52)를 이용하여 645nm와 663nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 엽록소의 양은 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{Chlorophyll(mg/L)} = (20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}) \times \text{dilution factor}$$

전해물질 누출 측정

엽록소의 함량을 측정할 때와 동일한 방법으로 약제를 처리하였다. 약제 처리 후 25 $^{\circ}$ C 생육상에서 120 μ mol m²sec⁻¹ 광을 24시간 조사한 후 전도도계(Denki Kagaku Kenki Co., Ltd., Musashino, Japan)를 이용하여 전해물질의 누출 정도를 측정하였다(Kenyon 등 1985). 한편, 암조건에서의 전해물질 누출은 광상태와

동일한 조건으로 처리하여 24시간 동안 암조건으로 처리하였다.

측정방법은 약제 처리농도에 따라 최초의 전도도 값이 다르므로 24시간 후의 전도도의 변화를 수치로 나타내며, 처리구와 무처리구에서의 전도도 차이를 약제에 의한 전도도의 증가로 표시하였다.

Biotin 처리에 의한 발아회복 효과

Juglone을 아세톤으로 0, 0.025, 0.05, 0.1, 1mM 농도가 되도록 용해시켜 55mm 여과지(Advantech No. 2)를 깐 Petri dish에 1ml씩 처리한 후, 후드 내에서 아세톤을 완전히 건조시켰다. 건조시킨 Petri dish에 biotin을 0, 0.25, 0.5, 1mM 농도가 되도록 증류수로 희석조제하여 각각 1ml씩을 넣고 애기장대 종자를 30립씩 치상하였다. 처리한 Petri dish를 25°C, 14/10h(Light/Dark) 조건의 생육상에서 7일 후에 발아율을 조사하였다.

결과 및 고찰

KAPAS 저해활성

식물 유래 528개의 천연 물질을 대상으로 *in vitro*에서 단일 농도에서의 KAPAS 저해활성을 평가하였을 때, 강력한 저해활성을 보이는 6개 물질을 선별하였다(자료 미제시). 이 중에서 naphthoquinone 계열의 juglone에 대하여 KAPAS 농도반응을 평가하였을 때 농도의존적인 반응을 나타내었으며, 50% 저해농도는 9.5µM 수준이었다(그림 1). Webster 등(2000)은 식물에서의 biotin은 carboxylase와 transcarboxylase 반응에서 필수요소이며, Ploux와 Marquat(1992)에 의하면 KAPAS는 미생물과 식물에서 biotin 생합성의 첫 번째 경로에 관여하는 효소로서 이 경로가 저해되면 살균제 또는 제초제로서의 가능성이 있을 것이라고 하였으며, Ashkenazi 등(2005)은 KAPAS에 의해 생합성 되는 KAPA 유사체들은 제초제로서의 가능성이 있다고 하였다. 또한, Hwang 등(2010)은 triphenyltin acetate에 대한 *in vitro*에서의 KAPAS 저해활성을 평가하였을 때 100µM 농도에서 완전한 저해활성을 보였고, 온실 조건에서 애기장대(*A. thaliana*) 또는 10종의 화분과 및 광엽 잡초에서 우수한 살초력을 나타낸다고 보고한 바 있다. 따라서 KAPAS에 대한 juglone의 강력한 저

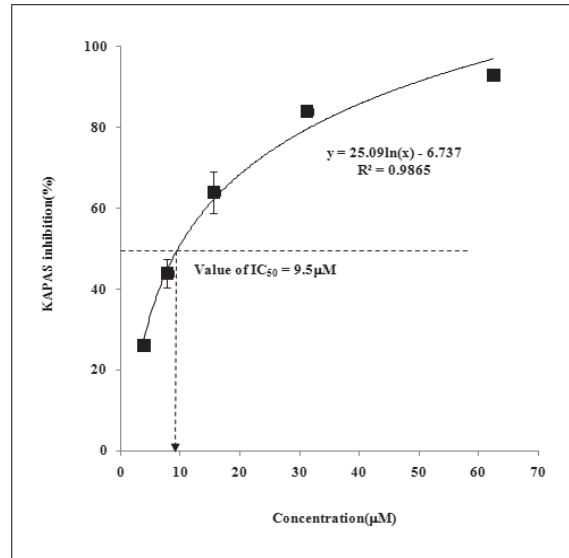


Fig. 1. KAPAS inhibition treated with juglone *in vitro* assay. Vertical bars are standard deviations of the means. In some cases the vertical bar is obscured by the datum symbol.

해활성은 천연 제초제로서의 특징을 가질 수 있는 결과라는 것을 시사하고 있다고 판단하였다.

토양 및 경엽처리 효과

바랭이에 대한 juglone 경엽처리 시 125, 250, 500 및 1,000µg mL⁻¹ 농도에서의 살초력은 각각 70, 95, 100 및 100%이었다(표 1). Juglone 처리 시 나타나는 주된 증상은 고사(burndown)이었으며, 약제처리 수 시간 내에 증상이 발현되어 약효발현 속도가 매우 빠른 특징을 보이고 있었다(그림 2). 그러나 완전한 방제가 되지 않았던 125µg mL⁻¹ 이하 농도에서는 약제처리 5일 이후에 재생되었다. 한편, 토양처리에서는 전혀 활성이 나타나지 않았다(그림 3).

Table 1. Effect of foliar application of juglone on *Digitaria sanguinalis* in a greenhouse condition.

Conc. (µg mL ⁻¹)	Herbicidal efficacy (%)
1,000	100 ¹⁾
500	100
250	95
125	70

¹⁾Visual injury was determined at 3 days after application with a scale of 0 (no injury) to 100 (complete death).

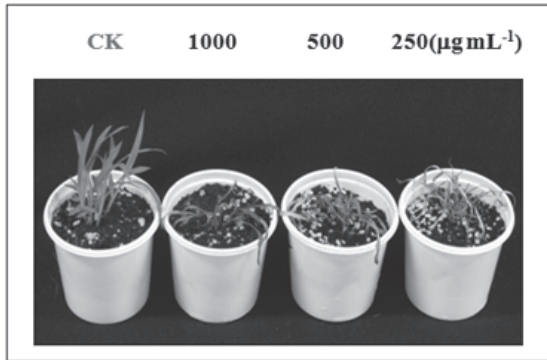


Fig. 2. Herbicidal efficacy of foliar application of juglone on *Digitaria sanguinalis* in a greenhouse condition. Photo was taken 5 days after application.

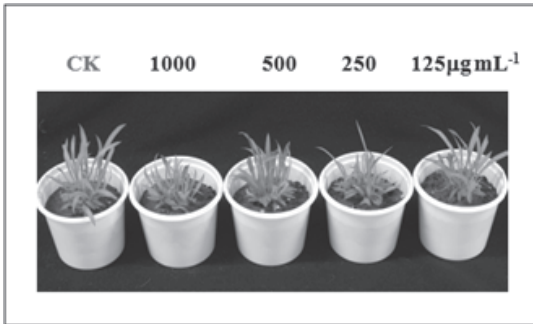


Fig. 3. Herbicidal efficacy of soil application of juglone on *Digitaria sanguinalis*. Photo was taken 7 days after application.

초종확대 실험에서 juglone 1,000 및 2,000µg mL⁻¹ 농도에서 경엽처리 시 8종의 시험대상 초종을 완전하게 방제하였으며, 500µg mL⁻¹ 농도에서도 95% 이상의 살초력을 나타내었다(표 2, 그림 4). 화분과 잡초와 광엽 잡초 간의 감수성 차이는 없었으며, 약제처리 후 24

시간 내에 살초증상이 발현되었다. 토양처리에서는 juglone의 활성은 전혀 없었다(자료 미제시).

Abell(1996)과 Pillmoor 등(1995)은 신규 작용점으로서의 구비 조건으로 선발된 물질이 대상 작용점을 저해한다면 60-80%의 살초력을 나타내는 경우에 가능할 것이라고 제안하였으며, Hwang 등(2010)은 신규 제초제 작용점 KAPAS를 효과적으로 저해하는(IC₅₀=19.85 µM) triphenyltin acetate를 온실조건에서 경엽처리했을 때 애기장대(*A. thaliana*)에서는 125g ha⁻¹ 이상의 농도에서 90% 이상의 살초력을 나타내었고, 500g ha⁻¹ 이상에서는 도꼬마리를 포함한 광엽잡초에 대해서 우수한 살초력을 나타낸다고 보고한 바 있다. 이러한 관점에서 고려해 보면 naphthoquinone계 juglone은 신규 제초제 작용점 KAPAS를 효과적으로 저해하며 경엽처리 효과가 매우 우수하기 때문에 비선택성 경엽처리용 제초제로서의 가능성이 매우 높다고 판단하였다. 일반적으로 천연 제초활성 물질은 주로 접촉형, 비선택적 효과를 나타내는데, 약제처리 후 초기에 줄기나 잎에 burndown 증상을 보이며, 잔류효과가 없기 때문에 일정 시간이 경과하면 재생되는 특징을 갖는다(Copping과 Duke 2007). 천연물 유래 제초제인 bialaphos와 glufosinate는 작물에 대한 선택성이 없거나 아주 미약하기 때문에 주로 비경작지나 작물 수확 후에 사용된다(Lydon과 Duke 1999). 한편, juglone의 토양처리효과는 전혀 없었는데(그림 3), 통상 천연 제초활성 물질의 토양처리 효과는 거의 없는 것으로 알려져 있다. Quarles(1999)의 보고에 의하면 토양처리용 제초제로서의 가능성을 검토하기 위해 천연에서 유래한 'Maize gluten meal'을 처리하는 경우에 2톤 ha⁻¹ 이상을 사용

Table 2. Effect of postemergence treatment of juglone on several weeds in a greenhouse condition.

Conc. (µg mL ⁻¹)	Herbicidal efficacy (%) ¹⁾							
	SORBI ²⁾	ECHCG	DIGSA	SOLNI	AESIN	ABUTH	XANSI	CAGEH
2,000	100	100	100	100	100	100	100	100
1,000	100	100	100	100	100	100	100	100
500	95	95	100	100	95	100	100	100
250	70	60	95	100	90	20	80	20

¹⁾Herbicidal activity was determined 7 days after treatment by visual injury.

²⁾SORBI : *Sorghum bicolor*, ECHCG : *Echinochloa crus-galli*, DIGSA : *Digitaria sanguinalis*, SOLNI : *Solanum nigrum*, AESIN : *Aeschynomene indica*, ABUTH : *Abutilon avicennae*, XANSI : *Xanthium strumarium*, CAGEH : *Calystegia japonica*.

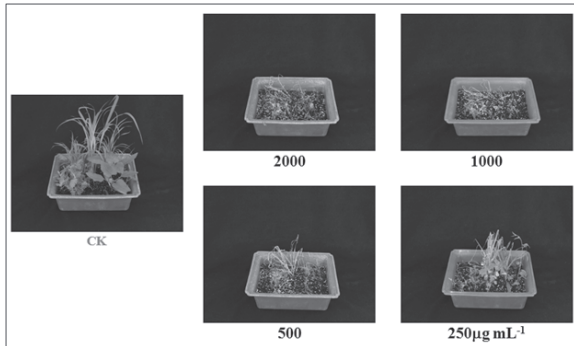


Fig. 4. Herbicidal efficacy of postemergence treatment of juglone on several weeds in a greenhouse condition. Photos were taken 7 days after application.

해야 하기 때문에 현실적으로는 적용하기 어려울 것으로 판단된다. 따라서 juglone 역시 온실조건에서 토양처리 효과가 없기 때문에 실용적인 면에서도 토양처리로 적용하기는 어려울 것으로 판단된다.

전해물질 누출에 미치는 영향

Juglone을 처리한 오이 잎으로부터의 전해물질 누출은 광 또는 암조건에 관계없이 농도 의존적으로 증가되었다. 광조건에서 juglone 처리 24시간 후 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 μM 농도에서의 전해물질 누출 정도는 각각 58, 83, 153, 222 및 293 μmhos/cm이었다(그림 5A). 또한, 암 조건에서도 동일한 농도에서의 전해물질 누출 정도가 각각 57, 75, 87, 210 및 322 μmhos/cm

로서(그림 5B) 광 조건과 암 조건에서의 차이가 거의 없이 전해물질 누출이 일어났다.

엽록소 함량에 미치는 영향

엽록소 함량 감소는 광 조건에서 50과 100 μM 농도에서 각각 24.1 및 25.4%로 경미한 수준이었고, 25 μM 이하 농도에서는 엽록소 함량 감소가 거의 없었다(그림 6). 한편, 암조건에서는 엽록소 함량 감소가 전혀 일어나지 않았다(자료 미제시). 따라서 juglone은 암조건에서의 엽록소 함량에는 영향을 미치지 않고, 광 조건에서도 경미한 정도의 영향이기 때문에 광조건과의 관련성은 없을 것으로 판단되며, 광조건에 관계없이 전해물질 누출이 일어나기 때문에 KAPAS 저해 이후 biotin의 생합성이 억제되고 궁극적으로 세포막 손상에 의해 식물체가 고사될 가능성이 있을 것으로 판단하였다. 식물 유래의 C₉ 지방산 pelargonic acid가 경엽처리용 제초제로 개발되어 사용되고 있는데(Fukuda 등 2004), 세포막 손상에 의한 지질 과산화작용에 의해 식물체가 고사된다고 하였다(Fukuda 등 2004; Lederer 등 2004; Copping와 Duke 2007). 이러한 관점에서 juglone 처리에 의한 식물체의 고사 기작과 관련하여 세포막 파괴 등 다양한 방향으로의 접근이 필요할 것으로 판단되며, 추후 연구를 계획 중에 있다.

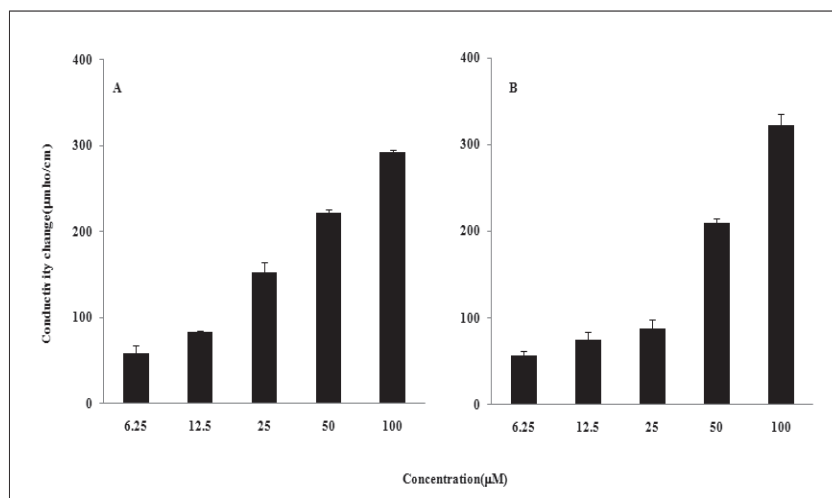


Fig. 5. Effect of juglone on cellular leakage from cucumber leaf squares of (A) with and (B) without light condition. Vertical bars are standard deviations of the means.

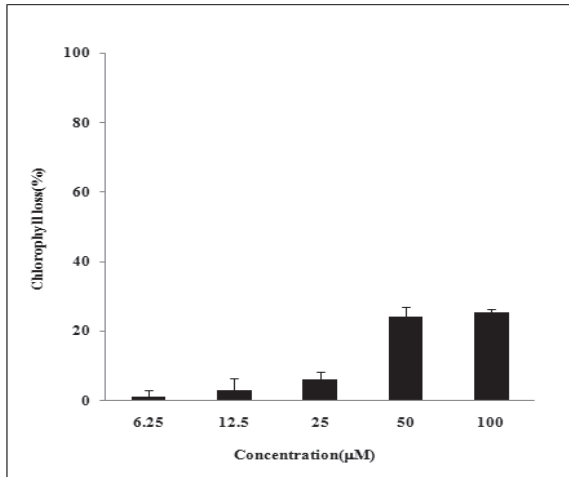


Fig. 6. Effect of juglone on chlorophyll contents from cucumber leaf squares of with light condition. Vertical bars are standard deviations of the means.

Biotin 처리에 의한 발아회복 효과

Juglone 처리에 의해 억제되었던 애기장대 종자의 발아율이 biotin을 공급해 주면 농도의존적으로 뚜렷하게 회복되었다(표 3). Juglone 0.1mM에서의 애기장대 종자 발아율은 20.0%이었는데, biotin을 0.25, 0.5 및 1mM의 농도로 공급해 주면 발아율이 각각 46.7, 66.7 및 86.7%로 증가되었다. 또한, 26.7%이었던 juglone 0.05mM에서의 발아율이 동일한 농도의 biotin 공급 시 각각 50.0, 66.7, 83.3%로 뚜렷한 회복효과가 나타났다. 그러나 juglone 1mM 농도에서는 biotin을 공급하더라도 발아율이 회복되지 않았다. KAPAS가 결핍된 식물체에 *E. coli bioA gene coding DAPAS*를 유전자 조작을 통해 삽입하거나 biotin, dethiobiotin(DTB), 7,8-diaminopelargonic acid(DAPA)를 처리하면 억제되었던 식물 생육이 회복된다고 하였다(Meinke 1985; Patton 등 1998; Alban 등 2000). 본 실험에서도 juglone은 강력한 KAPAS 저해활성을 보였고(그림 1), 그 결과 biotin 생합성 과정에서의 DAPA, DTB 등의 intermediates의 합성이 이루어지지 않고 궁극적으로는 biotin 생합성이 이루어지지 않는 것으로 추측할 수 있었다. 이때, 외부에서 biotin을 공급해 주면 juglone 처리에 의해 억제되었던 종자 발아력이 뚜렷하게 회복되는 점을 고려할 때(표 3), juglone은 신규 제초제 작용점 KAPAS를 저해하는 화합물이라고 판단하였다. Triphenyltin acetate 처리에 의해 억제되었던 애기장대 종자 발아율이 biotin 공급에 의해 회복되었

Table 3. Reversal effect of *Arabidopsis thaliana* seed germination with biotin supplement.

Juglone (mM)	Biotin (mM)			
	0	0.25	0.5	1
0	100 ¹⁾	100	100	96.7
0.025	36.6	56.7	63.3	83.3
0.05	26.7	50.0	66.7	83.3
0.1	20.0	46.7	66.7	86.7
1	0	0	0	0

¹⁾Germination rate of *A. thaliana* seed at 7 days after application.

고, 이러한 현상은 애기장대 식물체에서도 발견되는 바(Hwang 등 2010), 향후 애기장대 식물체를 대상으로 하는 회복효과 여부를 평가할 예정이다.

이상의 결과에 의하면 naphthoquinone계 juglone은 biotin 생합성에 관여하는 신규 제초제 작용점 KAPAS를 효과적으로 저해하는 친환경적인 천연물 제초제로서의 가능성을 확인하였으며, 향후 포장시험 및 독성 평가, 살초기작에 관한 연구 등 개발 가능성과 관련된 연구를 진행할 예정이다.

요 약

식물 유래 naphthoquinone계 juglone의 신규 제초제 작용점 KAPAS에 대한 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 활성 평가를 통해 천연물 유래 제초제로서의 기능을 검토하였다. Juglone은 농도의존적인 반응으로 KAPAS를 효과적으로 저해하였으며, 50% 저해농도는 9.5µM이었다. 바랭이(*Digitaria sanguinalis*)에 대한 경엽처리에서 juglone 125, 250, 500 및 1,000µg mL⁻¹ 농도에서의 활성 정도는 각각 70, 95, 100 및 100%이었다. 또한, 8종의 화분과 및 광엽잡초에 대한 juglone 2,000 및 1,000 µg mL⁻¹ 농도에서의 살초력은 완전하였으며(100%), 500µg mL⁻¹에서도 90~100%이었다. Juglone을 처리했을 때 나타나는 주요 증상은 고사(desiccation) 또는 화염상(burndown)이었다. Juglone 처리에 의한 전해물질 누출은 광조건에 관계없이 농도의존적으로 일어났으나, 엽록소 함량 감소 정도는 광조건에서도 경미한 수준이었으며, 암 조건에서는 전혀 일어나지 않았다. Juglone에 의해 억제되었던 애기장대 종자의 발아율은

biotin 공급에 의해 뚜렷하게 회복되었다. 이상의 실험에 결과에 의하면 천연 naphthoquinone계 juglone은 신규 제초제 작용점 KAPAS를 효과적으로 저해하는 친환경적인 천연물 유래 제초제로서의 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 15개 어젠다과제 “화학농약 대체기술”의 연구비(과제번호 PJ0068201002) 지원에 의해 수행되었음.

인용 문헌

- Abell, L. M. 1996. Biochemical approaches to herbicide discovery : advances in enzyme target identification and inhibitor design. *Weed Sci.* 44:734-742.
- Alban, C., D. Job and R. Dource. 2000. Biotin metabolism in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:17-47.
- Allan, E. J., and M. W. Fowler. 1985. Biologically active plant secondary metabolites perspectives for the future. *Chemistry and Industry.* pp. 408-410.
- Ashkenazi, T., A. Widberg, A. Nudleman, V. Wittenbach and D. Flint. 2005. Inhibitors of biotin biosynthesis as potential herbicides : Part 2, *Pestci. Manag. Sci.* 61(10):1024-1033.
- Bayer, E., K. H. Gugel, K. Hagele, H. Hagenmaier, S. Jessipow, W. A. Konig and H. Zahner. 1972. Stoffwechselfproduct von Mikroorganismen 98. Mitteilung(1) Phosphinothricin und phosphinothryl-alanyl-alanin. *Helvetica Chimica Acta.* 55:224-239.
- Cho, K. M., X. H. An, J. K. Chon, H. S. Kim and J. C. Chun. 2010. Foliage contact herbicidal activity of dehydrocostus lactone derived from *Saussurea lappa*. *Korean J. Weed Sci.* 30(4):421-428.
- Copping, L., and S. O. Duke. 2007. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Sci.* 63:524-554.
- Duke, S. O., H. K. Abbas, T. Amagasa and T. Tanaka. 1996. Phytotoxins of microbial origin with potential for use as herbicides, in Copping. LG (ed.), *Crop Protection Agents from Nature : Natural Production and Analogues. Critical Reviews on Applied Chemistry, Vol. 35.* Society for Chemical Industries, Cambridge, UK. pp. 82-113.
- Fukuda, M., Y. Tsujino, T. Fujimori, K. Wakabayashi and P. Böger. 2004. Phytotoxicity activity of middle-chain fatty acids I : effect on cell constituents. *Pestci. Biochem. Physiol.* 80:143-150.
- Goncalves, S., M. Ferraz and A. Romano. 2009. Phytotoxic properties of *Drosophyllum lusitanicum* leaf extracts and its main compound plumbagin. *Sci. Hortic.* 122:96-101.
- Hiscox, J. D., and G. F. Israelstam. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissues without maceration. *Can. J. Bot.* 57:1332-1334.
- Höfgen. R. 1998. Antisense gene expression as a tool for evaluating molecular herbicide targets. *Extended summaries-8th International Congress of Pesticide Chemistry, 175-177.*
- Hong, S. Y., J. S. Choi and S. M. Kim. 2011. Herbicidal activity of essential oil from Palmarosa(*Cymbopogon martini*). *Korean J. Weed Sci.* 31(1):96-102.
- Hwang, I. T., D. H. Lee, J. S. Choi, Y. K. Min, T. J. Kim, J. H. Ko, T. H. Kim, Y. S. Park, K. Y. Cho and S. W. Lee. 2003. Novel polypeptide having function of 7-keto-8-aminopelargonic acid synthase of plant and method for inducing growth inhibition and lethality by suppressing expression of the polypeptide. Patent No. PCT/KR2003/001301.
- Hwang, I. T., J. S. Choi, H. Y. Song, S. J. Cho, H. K. Lim, N. J. Park and D. H. Lee. 2010. Validation of 7-keto-8-aminopelargonic acid synthase as a potential herbicide target with lead compound triphenyltin acetate. *Pestci. Biochem. Physiol.* 97: 24-31.
- Jang, H. W. B. R. Seo, H. J. Hwang, J. D. Kim, J. S. Kim, S. M. Kim, J. C. Chun and J. S. Choi. 2010. Herbicidal activity of natural product chrysophanic

- acid. Korean J. Weed Sci. 30(2):143-152.
- Kenyon, W. H., S. O. Duke and K. C. Vaughn. 1985. Sequence of effects of acifluorfen on physiological and ultrastructural parameters in cucumber cotyledon discs. *Pestci. Biochem. Physiol.* 24:240-250.
- Kim, K. W., J. G. Shin and J. S. Kim. 2002. Isolation and identification of plant growth retardants from *Atractylodes japonica* rhizome. Korean J. Weed Sci. 22(4):385-391.
- Kim, H. Y., H. J. Choi, D. S. Kim, S. J. Heo and Songmun Kim. 2003. Isolation of new herbicidal compound chrysophanic acid from red sorrel (*Rumex acetosella* L.). Korean J. Weed Sci. 23(4): 301-309.
- Kim, K. W., J. K. Baek and J. S. Kim. 2005. Isolation of herbicidal compounds from the fruit of *Zanthoxylum schinifolium* S. et. Z. Korean J. Weed Sci. 25(3):194-201.
- Lee, H. B., C. J. Kim, J. S. Kim, K. S. Hong and K. Y. Cho. 2003. A bleaching herbicidal activity of methoxyhygromycin (MHM) produced by an actinomycetes strain *Streptomyces* sp. 8E- 12. Letters in Applied Microbiol. 36:387-391.
- Lederer, B., T. Fujimori, Y. Tsujino, K. Wakabayashi and P. Böger. 2004. Phytotoxicity activity of middle-chain fatty acids II : peroxidation and membrane effects. *Pestci. Biochem. Physiol.* 80:151-156.
- Lydon, J., and S. O. Duke. 1999. Inhibition of glutamine synthesis. In : Singh BK (ed.), *Plant Amino Acids : Biochemistry and Biotechnology*. Marcel Dekker, New York, pp. 445-464.
- Meinke, D. W. 1985. Embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana* : analysis of mutants with a wide range of lethal phases. *Theor. Appl. Genet.* 72:543-552.
- Meyer, J. J. M., F. Van der Kooy and A. Joubert. 2007. Identification of plumbagin epoxide as a germination inhibitory compound through a rapid bioassay on TLC. *S. Afr. J. Bot.* 73:654-656.
- Patton, D. A., A. L. Schetter, K. H. Franzmann, K. Nelson, E. R. Ward and D. W. Meinke. 1998. An embryo-defective mutant of *Arabidopsis* disrupted in the final step of biotin synthesis. *Plant Physiol.* 116:935-946.
- Pillmoor, J. B., S. D. Lindell, G. G. Briggs and K. Wright. 1995. The influences of molecular mechanisms of action on herbicide design. In : N. N. Ragsdale, P. C. Kearney, J. R. Plimmer (Eds). *Processing of the Eighth of the English International Congress of Pesticide Chemistry*, America Chemical Society, Washington, DC, pp. 292-303.
- Ploux, O., and A. Marquet. 1992. The 8-amino-7-oxopelargonate synthase from *Bacillus sphaericus*. Purification and preliminary characterization of the cloned enzyme overproduced in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 283:327-331.
- Prisbylla, M. P., B. C. Onisko, J. M. Shribbs, D. O. Adams, Y. Liu, M. K. Ellis, T. R. Hawkes and L. C. Mutter. 1993. The novel mechanism of action of the herbicidal triketones. *Proc. Brighton Crop Prot. Conf.-Weeds* 2:731-738.
- Putnam, A. R. 1988. Allelochemicals from plant as herbicides. *Weed Tech.* 2:510-518.
- Quarles, W. 1999. Non-toxic weed control in the lawn and garden. *Common Sense Pest Cont. Quarter Summer*. pp. 4-14.
- Rice, E. L. 1984. *Allelopathy*. 2nd ed. Academic Press, Orlando, Florida, pp. 266-291.
- Riches, C. R., J. C. Casely, B. E. Valverde and V. M. Down. 1996. Resistance of *Echinochloa colona* to ACCase inhibiting herbicides. *Proc. International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides*. EWRS, Cordoba, Spain. pp. 14-16.
- Satoh, A., T. Murakami, H. Takebe, S. Imai and H. Seto. 1993. Industrial development of bialaphos, a herbicide from metabolites of *Streptomyces hygroscopicus* SF 1293. *Actinomyceteologica* 7:128-132.
- Schultz, A., O. Art, P. Beyer and H. Kleing. 1993. SC-0051, a 2-benzoylcyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEBS Lett.* 316:162-16637.
- Tachibana, T., T. Watanabe, Y. Sekizawa and T.

- Takematsu. 1986. Inhibition of glutamine synthetase and quantitative changes of free amino acids in shoots of bialaphos treated Japanese barnyard millet. *Journal of Pesticide Sci.* 11:27-31.
- Webster, S. P., D. Alexeev, D. J. Campopiano, R. M. Watt, M. Alexeeva, L. Sawyer and R. L. Baxter. 2000. Mechanism of 8-amino-7-oxononanoate synthase : spectroscopic, kinetic, and crystallographic studies. *Biochemistry* 39:516-528.
- Wolfgang, L., F. Börnke, A. Reindl, T. Ehrhardt, M. Stitt and U. Sonnewald. 2004. Target-based discovery of novel herbicides. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(2): 219-225.