

천연물 유래 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone의 살초특성과 작용기구

최정섭^{1*}, 김지연, 서보람, 고영관, 차미란, 김영섭, 류시용, 황인택

Herbicidal Properties of 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone and Their Possible Mode of Action

Jung-Sup Choi^{1*}, Ji-Yeon Kim, Bo-Ram Seo, Young-Kwan Ko
Mi-Ran Cha, Young-Sup Kim, Shi-Yong Ryu and In-Taek Hwang

ABSTRACT This study was conducted to assess the possibility of 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone (DHNQ) as an environmental friendly herbicide candidate. Foliar application of DHNQ showed excellent herbicidal effect to the 3 grasses and 5 broad-leaved weeds. Among them, *Digitaria sanguinalis* and *Solanum nigrum* were completely controlled by 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of DHNQ with main symptoms of desiccation or burndown within 24 hours. *Aeschynomene indica* was also sensitive to DHNQ treatment. All of the eight weed species were controlled by 90~100% at a concentration of 1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. However, soil application of DHNQ to *Digitaria sanguinalis* did not show any herbicidal symptoms. DHNQ strongly inhibited KAPAS activities *in vitro* and the IC_{50} was 4.4 μM . Cellular leakage from cucumber leaf squares treated with DHNQ increased depending on the concentrations increased from 6.25 to 100 μM 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 DHNQ. According to above results, DHNQ is a good natural herbicide candidate having a new target KAPAS, which is involved in biotin biosynthesis pathway, with environmental friendly.

Key words: 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone; environmental safer herbicide; 7-keto-8-aminopelargonic acid synthetase; rescue effect; 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

우수한 살초력과 저렴한 생산비용 때문에 전 세계적으로 유용하게 사용되어 왔던 유기합성 제초제는 triketones계 제초제 이후 새로운 작용점을 갖는 제초제 개발성고가 없는 상황이다(Prisbylla 등 1993; Schultz 등 1993). 또한 기존 제초제의 지속적인 사용에 따른 저항성 잡초의 출현과(Riches 등 1996) 생태계에 미칠 수 있는 잠재적인 영향 때문에 기 개발되어 사용되고 있는 제초제 중 독성이 있는 제초제의 재등록이 현실적으로 어렵게 되었다. 그리고 최근에는 중국과 인도, 브라질 등의 급속한 경제발전으로 인한 농약 수요가 증가하고 있고, 전 세계적으로 바이오매스 산업과 관련하여 농산물의 생산성 증대가 매우 중요한 현안문제로 부각되고 있다. 국지적인 이상 기후로 인한 생산량 감소에 따른 곡물가 상승 등과 같은 다양한 문제를 해결할 수 있는 적극적이고 효율적인 방안 중 하나가 저 독성의 유기합성 제초제이지만 친환경 농업에 대한 요구와 수요가 급증함에 따라 유기합성 제초제 개발도 현실적으로 쉽지 않은 상황이다.

이와 같은 문제를 해결하기 위한 수단으로 친환경적인 미래형 제초제 개발이 요구되고 있는데, 미래형 제초제는 농업 생산성을 저해하는 잡초만을 방제하는 단순한 개념이 아니라 환경 친화적이며 인축에 대한 안전성을 겸비하는 것으로 기술 난이도가 크면서 경제성을 갖는 친환경 신규 작용점 탐색과 독특한 화학구조를 갖는 후보물질 또는 천연소재의 발굴 및 확보가 매우 중요하다. 이러한 미래형 제초제 개발을 위해서는 인축과 관련이 없는 식물특이적인 신규 작용점이나 미생물이 생산하는 천연 유도 저항성 물질을 대상으로 기존의 모방적 기술을 탈피하는 새로운 개념의 창조적인 체계를 구축하여야 한다(Choi 등 2011).

유전체 기능 분석에 대한 연구를 통해 새로운 제초제 작용점 탐색이 시도되고 있는데(Wolfang 등 2004), 한국화학연구원에서는 비타민의 한 종류인 biotin H 생합성에 관련된 7-keto-8-aminopelargonic acid synthase (EC 2.3.1.47, KAPAS)를 제초제 신규 작용점으로 발굴·확보하였다(Hwang 등 2003). 이 KAPAS는 애기장대 유전자인 AtKAPAS이며, 본 유전자의 발현 억제체는 식물체에서 치사 표현형질을 제공하며 biotin 처리에 의해 표현형 회복이 유발되는 제초제 타겟 신규 작

용점이다. 신규 작용점 KAPAS를 대상으로 생리·생화학적인 방법을 통해 제초제 작용점으로서의 가능성과 식물체 내에서의 작용기작에 대해서도 보고한 바 있다(Choi 등 2007; Hwang 등 2010).

미래형 제초제 개발을 위한 요건에서 신규 제초제 작용점 발굴과 함께 중요한 것이 친환경적인 후보물질 또는 천연소재의 발굴 및 확보일 것이다. 제초활성을 갖는 천연소재 탐색은 동·식물 또는 미생물과 광물에서도 가능하지만 토양 미생물(Satoh 등 1993; Duke 등 1996)과 약용식물과 자생식물 또는 정유식물 등 다양한 종류의 식물(Rice 1984; Allan과 Fowler 1985; Putnam 1988)로부터의 탐색이 가장 활발하다. 토양 미생물에서 발굴된 bialaphos는 *Streptomyces hygroscopicus*가 분비하는 2차 대사산물을 이용하는 것으로 글루타민 생합성 저해에 의한 암모니아 축적 결과에 따른 독작용에 의해 살초력이 발휘된다(Bayer 등 1972; Tachibana 등 1986; Duke 등 1996; Lydon과 Duke 1999). *Streptomyces* 속에서 유래한 methoxyhygromycin (MHM)도 천연소재의 제초활성 물질로서의 가능성이 보고되어 있다(Lee 등 2003).

한편, 식물에서 유래하는 천연 제초활성 물질에 대한 탐색도 활발하게 시도되고 있는데, 평지씨로부터 추출한 C₉ 지방산 pelargonic acid가 비선택성 경엽처리제로 개발되어 사용되고 있는데, 세포막 손상에 의한 지질과산화 작용으로 식물체가 고사되는 속효성 제초제이다(Fukuda 등 2004; Lederer 등 2004; Copping과 Duke 2007). 최근에도 식물 유래의 천연 제초활성 물질 탐색이 활발한데, Goncalves 등(2009)에 의하면 끈끈이주걱속(Drosera) *D. lusitanicum* 잎 추출물이 hydroxyphenylpyruvate dioxygenase(HPPD)를 억제하며, aphthoquinone의 기본골격이 치환된 형태의 물질들은 HPPD를 이상적으로 저해할 가능성을 주목하고 있다(Meyer 등 2007). 또한, cinnamon oil이나 clove oil과 같은 다양한 종류의 essential oils도 천연 제초제 소재로서의 가능성에 대한 검토가 활발하다(Tworkoski 2002; Lederer 등 2004; Bainard와 Isman 2006). 국내의 경우에도 삼주 근경(Kim 등 2002), 애기수영(Kim 등 2003), 수수(Uddin 등 2010), 목향(Cho 등 2010), 진노랑상사화 인경(Jang과 Kim 2010), 팔마로사 정유(Hong 등 2011) 등 국내 자생식물이나 잡초 또는 정유식물로부터의 천연 제초활성 물질 탐색이 꾸준히 시도

되고 있다.

최근 한국화학연구원에서는 528개의 식물 유래 천연물질을 확보하여 *in vitro*에서의 KAPAS 저해활성을 평가하였으며, KAPAS 저해활성이 우수한 6개의 천연 naphthoquinone계 물질을 확보하였다. 본 연구는 확보한 천연 naphthoquinone계 물질 중에서 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone(DHNQ)을 대상으로 KAPAS에 대한 농도반응 실험을 통해 50% 저해농도와 토양 및 초기경엽처리를 통해 작용특성을 확인하고, 전해물질 누출과 엽록소 함량 감소, biotin 첨가에 의한 회복효과 등의 생리·생화학적 방법을 통해 작용기작을 알아보고 천연물 제초제로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시험 물질

시험 물질 DHNQ는 Sigma-Aldrich사로부터 구입하였으며, HPLC 분석을 통한 시험 물질의 순도는 90% 이상이었다.

제초활성 평가

살초력 평가를 위해 polystyrene 컵에 원예용 상토를 충전하여 바랭이(*Digitalia sanguinalis*) 종자를 10~15립씩 파종하여 복토 후 온실 조건(30/20±5°C, Light/Dark=14/10h)에서 1일(토양처리) 또는 9일(경엽처리) 동안 생육시켰다. 최종 처리농도가 62.5, 125, 250 및 500µg mL⁻¹ 농도가 되도록 약제 조제액(Acetone 60%, 0.1% Tween-20)으로 희석 조제하여 포트 당 5mL로 처리하여 온실에서 관리하여 토양처리는 7일 후, 경엽처리는 5일 후에 달관조사(0~100)하였다. 8종의 화분과 및 광엽잡초에 대한 활성 평가를 위해서는 원예용 상토를 충전한 350cm² 사각 플라스틱 포트에 각 종자를 적당량 파종하여 복토 후 동일한 온실조건에서 관리하여 토양처리는 파종 1일, 경엽처리는 12일 후에 동일한 방법으로 약제를 조제하여 포트 당 14mL로 처리하여 토양처리는 14일, 경엽처리는 7일 후에 달관조사하였다. 이때, 토양처리에서는 원예용 상토를 사용할 경우에 과습에 의한 활성발현의 이상이 초래될 가능성을 배제하기 위하여 원예용 복합비료가 첨가된 사질양토를 사용하였다.

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)100µL, α-ketoglutarate dehydrogenase 15µL, 1M L-alanine 5µL, 5mM pyridoxal 5-phosphate 50µL, pimeloyl-CoA 50µL, 원하는 최종 농도가 되도록 DHNQ 10µL씩을 혼합한 뒤 KAPAS(3µg µL⁻¹) 20µL, D.W. 45µL를 첨가하여 최종량이 250µL이 되도록 준비하였다. 반응 온도 조건은 37°C로 유지시켰으며 흡광도 측정은 1분 간격으로 60분 동안 microplate spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.

엽록소 함량 측정

온실에서 11일 동안 생육시킨 오이(백미 백다다기) 자엽을 직경 10mm cork borer를 이용하여 엽절편을 만들어 7mL의 1% sucrose와 1mM 1-(N-morpholino)ethanesul fonic acid(pH 6.5)가 담겨져 있는 직경 6cm polystyrene Petri dish에 15개씩 옮긴 후, 원하는 농도가 되도록 아세톤으로 용해시켜 처리하였고, 무처리구의 경우에는 동일한 양의 아세톤을 처리하였다. 최종 처리농도는 100, 50, 25, 12.5, 6.25µM로 하여 25°C, 120µmol m⁻²sec⁻¹로 24시간 동안 광을 조사한 후, Hiscox와 Israelstam(1979)의 방법으로 엽록소 함량을 측정하였다. 광 조사 후 엽절편을 배양액과 분리하여 여과지로 흡습시켜 시험관에 넣고 10mL의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 넣어 교반한 다음, 암조건으로 실온에 24시간 동안 두었다가 흡광분광분석기(Beckman, UV-52)를 이용하여 다음의 계산식을 이용하여 총 엽록소 함량을 측정하였다.

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

전해물질 누출 측정

엽록소 함량 측정과 동일한 방법으로 엽절편을 준비하여 DHNQ를 처리하였다. 약제 처리 후 25°C 생육상에서 120µmol m⁻²sec⁻¹의 광을 24시간 조사한 후

전도도계(Denki Kagaku Kenki Co., Ltd., Musashino, Japan)를 이용하여 전해물질 누출 정도를 측정하였다(Kenyon 등 1985). 한편, 암조건에서의 전해물질 누출은 광상태와 동일한 조건으로 처리하여 24시간 동안 암상태로 두었다.

측정방법은 각 처리구에 따라 최초의 전도도 값이 다르므로 24시간 후의 전도도 변화를 수치로 나타내며, 처리구와 무처리구에서의 전도도 차이를 DHNQ에 의한 전도도의 변화로 표시하였다.

Biotin 처리에 의한 회복 효과

아세톤을 이용하여 1, 0.1, 0.05, 0.025, 0mM 농도가 되도록 DHNQ를 용해시켜 55mm 여과지(Advantech No. 2)를 깐 Petri dish에 1mL씩 처리하였다. 후드 내에서 아세톤을 완전히 건조시킨 Petri dish에 biotin을 1, 0.5, 0.25, 0mM 농도가 되도록 증류수로 희석조제하여 각각 1mL씩을 넣고 애기장대 종자를 30립씩 치상하여 밀봉한 후 25℃, 14/10h(Light/Dark) 조건의 생육상에서 7일 후에 발아율을 조사하였다.

결과 및 고찰

경엽처리 효과

528개의 식물 유래 천연물질을 대상으로 *in vitro*에서 KAPAS 저해활성을 평가하여 우수한 저해활성을 보이는 6개 물질을 확보하였는데, 이 중에서 naphthoquinone 계열 DHNQ의 제초활성을 바랭이와 8종의 잡초 종을 대상으로 평가하였다.

바랭이에 대한 경엽처리에서 DHNQ 125, 250, 500, 1,000µg mL⁻¹ 농도에서의 살초력은 각각 60, 70, 95 및 100%이었다(표 1). 살초력을 나타내는 주된 증상은 고사(burndown)이었고, 일부 바랭이 앞에서는 지제부 부근에 괴사(necrosis)도 관찰되었다. DHNQ 처리 후 짧은 시간 내에 외형적인 살초증상이 발현되어 약효발현 속도가 빠른 속효성의 특성을 보였지만, 250µg mL⁻¹ 이하 농도에서는 처리 5일이 지나면서 재생되었다(그림 1). DHNQ는 경엽처리 활성은 우수하였지만, 토양 처리 효과는 전혀 없었다(그림 2).

DHNQ의 화분과잡초 3종과 광엽잡초 5종을 대상으로 실시한 경엽처리에서 2,000µg mL⁻¹ 농도에서는 살

Table 1. Effect of foliar application of DHNQ on *Digitaria sanguinalis*.

Conc. (µg mL ⁻¹)	Herbicidal efficacy (%)
1,000	100 ¹⁾
500	95
250	70
125	60

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

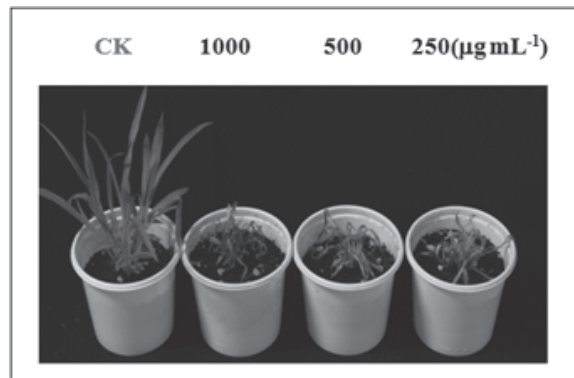


Fig. 1. Herbicidal efficacy of foliar application of DHNQ on *Digitaria sanguinalis*. Photo was taken 5 days after application.

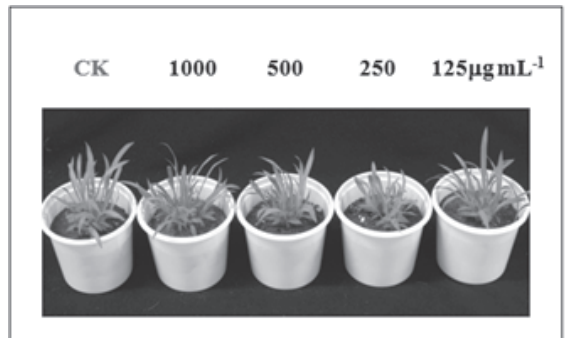


Fig. 2. Herbicidal efficacy of soil application of DHNQ on *Digitaria sanguinalis*. Photo was taken 7 days after application.

초력이 100%이었으며, 1,000µg mL⁻¹ 농도에서의 방제 효과는 90% 이상이었고, 500µg mL⁻¹ 농도에서는 70~100%이었다(표 2, 그림 3). 잡초 종간의 감수성 차이는 없었으며 약제처리 후 짧은 시간 내에 살초 증상이 나타나는데, 완전하게 억제되지 않은 개체에서는 약제처리 5일이 지나면서 재생되었다. 8종의 잡초에 대한

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

Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	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	90	100	100	100	100	100	100
500	70	90	100	100	95	70	90	100
250	50	60	100	100	95	40	70	40

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*.

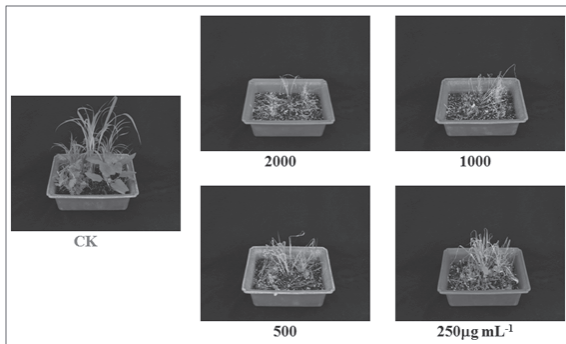


Fig. 3. Herbicidal efficacy of postemergence treatment of DHNQ on several weeds in a greenhouse condition. Photos were taken 7 days after application.

DHNQ의 토양처리에서는 살초력이 전혀 없었다(자료 미제시).

통상 천연물 유래의 제초활성 물질은 주로 접촉형이며 살초력을 나타내는 주된 증상은 약제처리 초기에 줄기나 잎에 burndown 증상을 보이고, 약효지속성이 아주 짧거나 없기 때문에 완전하게 억제되지 않은 경우에는 재생되는 특징을 보인다(Copping과 Duke 2007). 또한, 작물 선택성과 잡초 중간에서의 뚜렷한 살초력 차이도 없는 것으로 알려져 있는데, 천연물 제초제인 bialaphos의 경우에 작물에 대한 선택성이 없거나 아주 미약하기 때문에 주로 비경작지나 작물 수확 후에 사용한다(Lydon과 Duke 1999). 천연에서 유래하는 제초활성 물질은 토양처리 효과는 극히 미약하거나 없는 것으로 알려져 있으며, 실제 적용하고자 하는 경우에도 처리량이 아주 높아야 가능하기 때문에(Quarles 1999) 실용성은 없는 것으로 판단된다. DHNQ는 경엽처리 활성은 강하지만(표 1, 표 2), 토양

처리에서의 살초력은 전혀 없는 살초특성을 보이기 때문에(그림 2) 비선택성의 경엽처리용 제초제로의 가능성 검토가 이루어져야 할 것으로 판단하였다.

KAPAS 저해활성

DHNQ에 대한 *in vitro*에서의 KAPAS 농도반응 평가에서 고도의 상관관계를 나타내며 농도의존적인 반응을 보였으며, 50% 저해농도는 $4.4\mu\text{M}$ 이었다(그림 4). 식물에서의 biotin은 carboxylase와 transcarboxylase 반응에서 필수 cofactor이며(Webster 등 2000), KAPAS는 일부 미생물과 식물에서 biotin 생합성의 첫 번째 경로에 관여하는 효소이기 때문에 이 경로를 저해시키는 물질은 살균제나 제초제로서의 가능성이 있을 것이라고 하였다(Ploux와 Marquat 1992). 또한, KAPA 유사체들은 식물체를 고사시키는 활성을 가질 수 있기 때문에 제초제로서의 가능성이 있다고 하였으며(Ashkenazi 등 2005), 또한, Hwang 등(2010)은 *in vitro*에서의 KAPAS 저해활성을 나타내는 triphenyltin acetate을 온실조건에서 처리하였을 때 애기장대(*A. thaliana*)와 10여 종의 잡초 종에 대하여 우수한 살초력을 나타낸다고 하였다. Abell(1996)과 Pillmoor 등(1995)은 신규 작용점으로서의 구비 조건으로 선발된 물질이 대상 작용점을 저해한다면 60-80%의 살초력이면 가능할 것이라고 하였으며, KAPAS를 효과적으로 저해하는($\text{IC}_{50}=19.85\mu\text{M}$) triphenyltin acetate를 온실조건에서 경엽처리했을 때 강력한 살초력을 보인다고 하였다(Hwang 등 2010). 따라서 KAPAS에 대한 강력한 저해활성과 온실조건에서의 살초력과의 상관관계로부터 DHNQ는 천연물 제초제로서의 가능성을

시사하고 있다고 판단하였다.

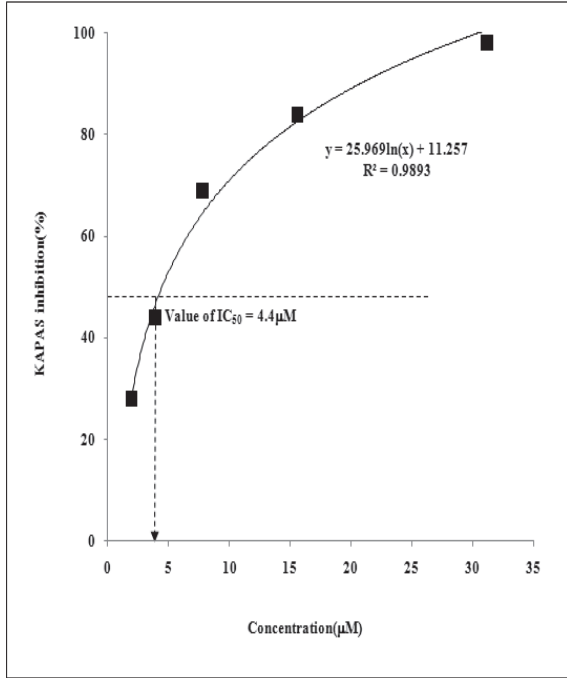


Fig. 4. KAPAS inhibition treated with DHNQ on *in vitro* assay. Vertical bars are standard deviations of the means. In some cases the vertical bar is obscured by the datum symbol.

전해물질 누출에 미치는 영향

DHNQ를 처리했을 때 엽절편으로부터의 전해물질 누출은 광·암 조건에 관계없이 농도 의존적으로 증가되었다. 광조건에서 DHNQ 처리 24시간 후에 6,25, 12,5, 25, 50 및 100µM 농도에서의 전해물질 누출 정도는 각각 57, 80, 124, 142 및 191µmhos/cm이었다(그림 5A). 암 조건에서도 동일한 농도에서의 전해물질 누출은 각각 56, 74, 87, 146 및 208µmhos/cm로(그림 5B) 광조건과 암조건에서의 차이는 거의 없었다. 그러나 무처리구에서 누출된 전해물질 총량은 약 683µmhos/cm이었는데 DHNQ 100µM 농도에서의 광 조건과 암 조건에서 누출된 전해물질 총량은 각각 191 및 208µmhos/cm로 누출된 전해물질 총량은 상대적으로 적었다.

엽록소 함량 감소에 미치는 영향

DHNQ은 광·암 조건에 관계없이 엽록소 함량 감소는 거의 없었다(그림 6). DHNQ를 처리했을 때 엽록소 함량 감소는 광 조건에서는 50과 100µM 농도에서 각각 3.5 및 7%이었고, 암 조건에서는 처리한 전 농도 범위에서 엽록소 함량 감소는 전혀 없었다. 이상의 결과에 의하면 DHNQ는 광·암 조건에 관계없이 엽록소 함량의 감소가 거의 없었기 때문에 살초력 발현은

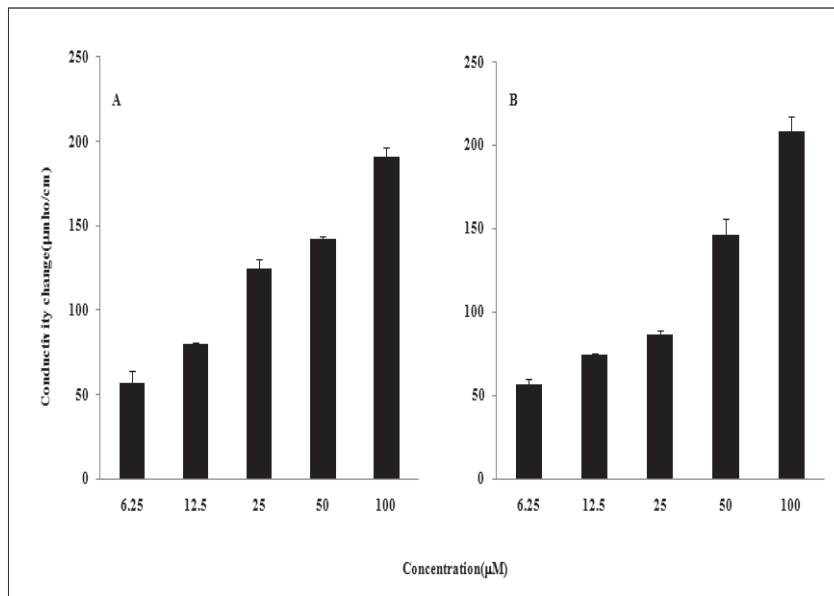


Fig. 5. Effect of DHNQ on ellular leakage from cucumber leaf squares of (A) with and (B) without light condition. Vertical bars are standard deviations of the means.

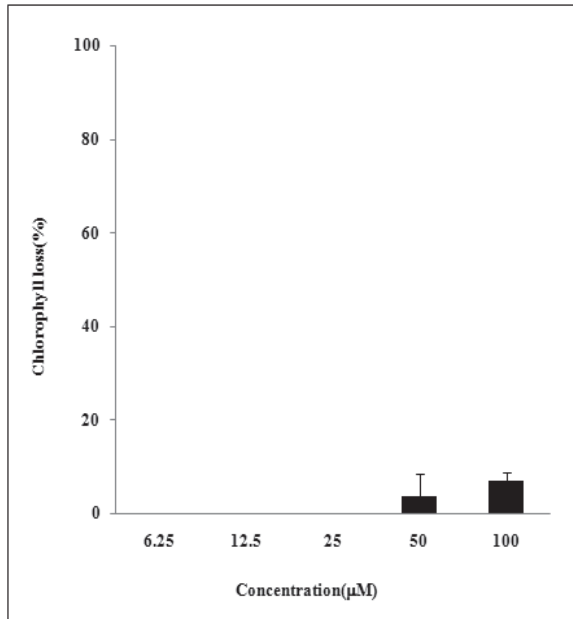


Fig. 6. Effect of DHNQ on chlorophyll contents from cucumber leaf squares of with light condition. Vertical bars are standard deviations of the means.

광의 유·무와는 관련이 없을 것으로 판단되며, 광 조건에 관계없이 전해물질 누출이 일어나기 때문에 KAPAS 저해 이후 biotin의 생합성이 억제되고 궁극적으로 세포막 손상에 의해 식물체가 고사될 것으로 판단하였다. 경엽처리용 제초제로 개발되어 사용되고 있는 식물 유래의 C₉ 지방산 pelargonic acid(Fukuda 등 2004)의 살초력은 세포막 손상에 의한 지질 과산화작용이라고 하였다(Fukuda 등 2004; Lederer 등 2004; Copping와 Duke 2007). 그러나 DHNQ에 대한 *in vitro*에서의 KAPAS 저해활성에서 50% 저해농도는 4.4µM로 우수하였지만(그림 4), 누출된 전해물질의 총량은 상대적으로 낮았다(그림 5). 일반적으로 *in vitro* assay에서의 효소 저해활성 정도는 식물 죽음과의 상관관계가 있는 것으로 해석하지만, 제초제 작용점 저해와 잡초 고사와의 상관성은 아직 명확하지 않고(Hwang 등 2010) 제초제 작용점 대상 효소의 완전한 억제가 식물 고사에 반드시 필요한 것인지는 불명하다고 하였다(Abell 1996). 따라서 DHNQ는 대상 작용점에 대해서는 강력한 저해활성을 보였지만, 식물체 내로의 제한된 흡수 등을 포함한 다양한 장애 요인에 의해 살초력이 감소되는 것으로 판단하였다. 향후 식물체 내로의 확산성이나 침투성을 증가시킬 수 있는 제형개발을 통

하여 살초력을 높일 수 있는 기술 개발을 필요로 한다고 하겠다.

Biotin 처리에 의한 발아 회복효과

DHNQ를 처리하였을 때 억제되었던 애기장대 종자의 발아율은 biotin 공급에 의해 발아율이 크게 증가되었다(표 3). 0.1mM 농도로 DHNQ를 처리했을 때 23.3%이었던 종자발아율은 0.25, 0.5 및 1mM의 농도의 biotin을 공급하면 각각 43.3, 66.3 및 70.0%로 증가되었다. 또한, 30.0%이었던 juglone 0.05mM에서의 발아율이 biotin 공급하면 각각 50.0, 66.7, 73.3%로 뚜렷하게 증가되었다. 이때, DHNQ 1mM 농도에서는 biotin 공급에 의해서도 발아율은 회복되지 않았다. KAPAS가 결핍된 식물체에 biotin, dethiobiotin(DTB), 7,8-diaminopelargonic acid(DAPA)과 같은 biotin 생합성 과정의 intermediates를 처리하면 식물 생육의 뚜렷한 회복현상이 있다고 하였다(Meinke 1985; Patton 등 1998; Alban 등 2000). 본 실험을 통해서 DHNQ는 강력한 KAPAS 저해활성이 있음을 확인하였는 바(그림 4), KAPAS 저해 결과 궁극적으로 biotin 생합성이 이루어지지 않는 것으로 추측하였다. DHNQ 처리에 의해 억제되었던 종자 발아율이 biotin 공급에 의해 뚜렷하게 증가되었기 때문에(표 3), DHNQ는 신규 제조제 작용점 KAPAS 저해 화합물로 판단하였다. Hwang 등 (2010)에 의하면 *in vitro* assay를 통해 KAPAS 저해활성을 확인한 triphenyltin acetate을 biotin을 처리하여 애기장대 종자의 발아율과 식물체에 처리하여 회복여부를 평가하였을 때 모두 뚜렷한 회복효과가 있다고 하였다. 본 실험에서 확인한 DHNQ의 KAPAS 저해활

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

DHNQ (mM)	Biotin(mM)			
	0	0.25	0.5	1
0	100 ¹⁾	96.7	100	96.7
0.025	40.0	53.3	63.3	80.0
0.05	30.0	50.0	66.7	73.3
0.1	23.3	43.3	63.3	70.0
1	0	0	0	0

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

성과 biotin 공급에 의한 종자 발아율 회복현상에 대한 뚜렷한 상관관계 분석을 위해 애기장대 식물체를 대상으로 수행할 예정이다.

이상의 결과에 의하면 naphthoquinone계 DHNQ는 biotin 생합성에 관여하는 신규 제초제 작용점 KAPAS를 효과적으로 저해하는 친환경적인 천연물 제초제로서의 가능성을 확보할 수 있었고, 향후 식물체 내로의 흡수 또는 침투성을 증가시킬 수 있는 제형개발을 통해 살초력을 증가시킬 수 있는 연구를 진행할 예정이다.

요 약

본 실험은 식물에서 유래한 천연 naphthoquinone계 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone(DHNQ)의 온실조건에서의 제초활성 정도를 평가하고 효소활성 저해를 포함한 생리·생화학적인 규명을 통해 살초특성을 알아보고자 수행하였다. 온실조건에서 바랭이(*Digitaria sanguinalis*)에 대한 경엽처리에서 DHNQ 125, 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 농도에서의 활성정도는 각각 60, 70, 95 및 100%이었다. 돌피를 포함한 화본과 잡초 3종과 까마중을 포함한 5종의 광엽 잡초에 대한 살초활성 평가에서 2,000 및 1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 농도에서는 완전방제되었고, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 수준에서는 70~100%이었다. 주요 증상은 화염상(burndown)이었고, 약제 처리 24시간 이내에 활성이 나타나 속효성이지만 완전하게 방제되지 않은 개체에서는 처리 5일 이후에 재생되었다. DHNQ를 처리했을 때 KAPAS를 농도의존적으로 저해하였으며, 50% 저해농도는 4.4 μM 이었다. 엽절편으로부터의 전해물질 누출은 광·암 조건에 관계없이 농도 의존적으로 증가되었으나 누출된 총량은 상대적으로 적었다. DHNQ은 광·암 조건에 관계없이 엽록소 함량 감소는 거의 일어나지 않았다. 한편, DHNQ에 의해 억제되었던 애기장대 종자 발아율은 biotin을 공급해 줌으로서 크게 증가되었다. 이상의 실험에 결과에 의하면 천연 naphthoquinone계 DHNQ는 식물체 내로의 흡수 또는 침투성을 증가시킬 수 있는 제형개발을 통해 살초력을 증가시킬 수 있는 방안이 강구된다면 신규 제초제 작용점으로 발굴한 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.

인 용 문 헌

- 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.
- Bainard, L. D., and M. B. Isman. 2006. Phytotoxicity of clove oil and its primary constituent eugenol and the role of leaf epicuticular wax in the susceptibility to these essential oils. *Weed Sci.* 54:833-837.
- Bayer, E., K. H. Gugel, K. Hagele, H. Hagenmaier, S. Jessipow, W. A. Konig and H. Zahner. 1972. Stoffwechselproduct 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.
- Choi, J. S., H. Y. Song, S. J. Cho, M. S. Park, N. J. Park, D. H. Lee, H. G. Hahn and I. T. Hwang. 2007. Mechanism action of KAPAS inhibitor on

- new herbicidal target site. Korean J. Weed Sci. 30(Sub. 2):39-40.
- Choi, J. S., C. M. Ryu, B. S. Han, D. H. Lee and I. T. Hwang. 2011. Biochemical crop protecting agents for LOHAS. Korean Industrial Chemistry News 24(4):29-40.
- 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.
- 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. J., and K. W. Kim. 2010. Isolation of herbicidal compound from bulbs of *Lycoris chinensis* var. *sinuolata*. Korean J. Weed Sci. 30(4):437-444.
- 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.
- 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-benzoylcyclo hexane-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.
- Tworokski, T. 2002. Herbicide effects of essential oils. *Weed Sci.* 50:425-431.
- Uddin, M. R., O. J. Won and J. Y. Pyon. 2010. Herbicidal effects and crop selectivity of sorgoleone, a sorghum root exudate under greenhouse and field conditions. *Korean J. Weed Sci.* 30(4):412-420.
- 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.