천연물 제초제 개발을 위한 전식물체 수준의 경엽처리 검정법 확립

김재덕¹, 장현우, 서보람, 황현진, 최정섭, 김진석*

Establishment of Foliar Application Assays for Developing Natural Herbicides

Jae Deog Kim¹, Hyun Woo Jang, Bo-Ram Seo, Hyun Jin Hwang
Jung Sup Choi and Jin-Seog Kim*

ABSTRACT This study was carried out to establish an improved bioassay system, whole-plant bioassay which is more effective in developing natural herbicides for foliar treatment such as herbicidal essential oils. Two bioassay systems using four weed species (*Echinochloa crus-galli*, *Digitaria sanguinalis*, *Aeschynomene indica*, and *Abutilon theophrasti*), spraying method and spotting method, were established. Spraying method is applicable if the amount of test compounds is enough, while spotting method is useful for the small amount of test compounds. The initial application rate was desirable at 2,500~5,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Herbicidal activities were higher in the NOP treatment when compared to the Tween 20 treatment. To efficiently evaluate volatile compounds such as essential oils, if the compound-treated pots were incubated in dew chamber for about 10hrs, better results were obtained in the degree and stability of herbicidal responses. When the efficiency of bioassay systems established in this study was compared, the spraying method was minimized four times to the conventional method that has been used for screening of synthetic compounds in KRICT. On the other hand, in the spotting method, screening for development of a natural herbicides was possible even in level of 1/100 test volume and 1/200 amounts of test compound compared to the spraying method.

Key words: essential oil; foliar treatment; natural herbicide; spraying method; spotting method; whole-plant bioassay.

¹ 한국화학연구원 산업바이오화학연구센터, 305-600 대전광역시 유성구 신성로 19번지, 유성우체국 사서함 107(Chemical Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, Yuseong 305-600, Korea).

* 연락저자(Corresponding author) : Phone) +82-42-860-7026, Fax) +82-42-861-4913, E-mail) jskim@kRICT.re.kr

(Received April 28, 2010; Examined May 26, 2010; Accepted June 19, 2010)

서 언

미래 환경을 전망해 볼 때, 세계 인구 증가 및 산업 고도화에 따른 식량소비 증가, 경작지 감소, 불안정한 자연환경, 석유 자원을 대체할 수 있는 바이오매스 수요의 급격한 증가 등이 예상되며 이를 대비하기 위해서는 무엇보다 농작물 생산성이 향후 지속적으로 증진되어야 할 것이다. 한편 삶의 질 향상과 자연생태계 보호도 매우 중요하기 때문에 농작물 생산 증진 방안의 경우도 과거와는 다르게 추진되어야 하는 바, 환경오염 문제가 많은 화학물질의 사용을 제한하고, 보다 안전한 먹거리를 생산하기 위한 친환경 농법을 적극 개발하여 보급하려는 노력들이 이루어져야 할 것이다.

그 동안 농산물 생산성 향상을 위해 합성화학농약이 중요한 역할을 담당해 왔으나, 일부 유기 합성 농약은 여전히 인축 독성 및 환경오염의 문제를 가지고 있다. 이를 극복하기 위한 방안으로 미국, 일본 및 유럽 등 선진국에서는 합성농약의 생산 및 사용량을 제도적으로 규제하고 있다(김 2009). 아울러 유기합성 농약을 대체할 수 있는 생물농약의 개발을 적극 추진하고 있는 상황이다. 국내에서도 2001과 2005년에 생물농약 규정이 제정되고 확대 정립되면서 법적인 토대가 마련되었다(김 2009).

생물제초제(bioherbicide)는 ‘살아있는 미생물, 천연에서 유래된 추출물 등을 이용한 위해식물 방제제’로 정의할 수 있는데 세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물을 직접 이용하는 미생물제초제와 미생물이 분비하는 대사산물이나 천연화합물을 추출하여 이용하는 천연물 제초제로 구분될 수 있다. 그런데 미생물제초제는 좁은 살초스펙트럼과 효능발현의 불안정 등 때문에 실용화된 예는 많지 않고 DeVine(Kenney 1986), Collego(Te Beest 등 1992), Casst(Christy 등 1993) 등이 상품화되었거나 등록시험 중에 있는 수준이다. 한편, 천연물 제초제는 미생물 제초제에 비해 상대적으로 적용범위가 넓고 안정한 살초효과를 기대할 수 있어 매우 활발히 연구되고 있으며, bialaphos, pelargonic acid(nonanoic acid), 여러 가지의 식물정유(많이 알려진 종류로서는 pine oil, clove oil,

peppermint oil, lemongrass oil, citronella oil, eucalyptus oil, neem oil, oregano 및 basil, manuka oil 등이 있음), 기타 미생물/식물 추출물과 이의 분리성분 등이 알려져 있지만(김 등 2007; Bainard 등 2006; Dayan 등 2009; Douglas 등 2004; Evans 등 2009; Kato-Noguchi와 Ino 2003; Nimbal 등 1996; Rohlfen 2008; Singh 등 2005; Tworowski 2002; Vaughn와 Holser 2007; Young 2004), 농가의 요구 수준에는 부응하지 못하고 있는 실정이다.

우리나라에서 제초제와 관련된 생물농약연구는 주로 미생물제초제 개발을 중심으로 약간씩 진행되어 왔다. 최근 ‘다이클로버’의 개발, *Penicillium* sp., *P. tabacinum*, *E. nematosporus*, *E. monoceras*, *C. graminicola* 등의 활용연구가 일부 대학, 연구소 및 벤처기업 등에서(김 등 1996; 이 등 1994; 정 등 1990; 홍 등 2006) 이루어져 왔으나, 천연물 제초제와 관련된 연구는 아직 연구단계에 머무르고 있다(김 등 2001; 김 등 2003b; 김과 이 2007; 김과 장 2009; 우딘 로미즈 등 2009; 최 등 2008; 최 등 2009). 한편, 농업 현장에서는 효과발현이 불안정한 미생물 제초제보다는 효과가 보다 확실한 천연물 제초제의 요구도가 매우 높은 상태이기 때문에, 천연물 제초제 개발 연구가 보다 활발히 이루어져야 할 것이다. 천연물 제초제 개발이 보다 효과적으로 진행되기 위해서는 제초활성 생물검정 기술, 천연물로부터의 생리활성 물질의 분리 및 탐색 기술, 제제 기술, 소포장/포장시험 기술 등이 종합적으로 필요하다. 특히 생물검정기술은 가장 먼저 갖추어야 할 부문으로서 그 독창성, 효율성 및 재현성은 제품개발의 성패를 좌우한다. 천연물 성분은 다양하며 유효성분을 다량 확보하는데 상대적으로 높은 비용이 소요되기 때문에, 합성농약의 생물검정법과는 다른 접근 방법이 필요할 것이다.

현재 주로 개발 활용되고 있는 천연물 제초제로는 경엽처리 활성이 뚜렷한 식물정유 성분들이 대부분 차지하고 있다(Dayan 등 2009; Dudai 등 1999; Kobaisy 등 2001; Gauvrit와 Cabanne 1993; 최 등 2008; 최 등 2009). 따라서 본 연구는 식물정유의 활용과 개발을 포함한 천연물 제초제의 개발을 효과적

으로 추진하기 위하여 식물정유 성분의 제반 특성이 고려된 전식물체(whole-plant) 검정법을 확립하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

제조활성물질

모두 52종을 구입하여 실험에 사용하였다. Trans-anethrole, aminolevulinic acid(ALA), chrysophanic acid, carvacrol, cedarwood oil, cinnamon oil, clove oil, coconut oil, cotton seed oil, eugenol, geraniol, jojoba bean oil, levulinic acid, methyl(±)-jasmonate, pelargonic acid, quercetin, rotenone, safflower seed oil, sunflower seed oil, terpineol, thymol 등은 시그마알드리히 회사에서 구매하였고, bialaphos는 Meiji (明治)사에서 제공한 상품(루비액제, 유효성분 18%)을 사용하였다. 기타 식물정유 성분은 JIN-AH ENTERPRISE사로부터 구매하거나 최성환 박사가 제공한 시료를 사용하였다.

전식물체(whole-plant) 경엽살포 검정법

기본 실험방법

사각 플라스틱 포트(가로 9cm, 세로 9cm, 높이 6cm)에 사질양토의 발토양을 4cm 깊이로 채운 다음(표면적 64cm²), 돌피(*Echinochloa crus-galli*), 바랭이(*Digitaria sanguinalis*), 자귀풀(*Aeschynomene indica*) 및 어저귀(*Abutilon theophrasti*) 종자를 적정량 파종하였다. 파종된 포트는 온실에 두었으며 파종 후 10일 내외에 조제된 약제를 spray gun으로 포트당 3.5-4.0mL 처리하였다. 이 때 잡초의 생육단계는 자귀풀의 경우 제1복엽이 완전히 전개되어 약 50% 생장되었고, 피와 바랭이는 초엽이 완전 전개되었거나 제1본엽이 출현하여 생장하기 시작하는 단계였고, 어저귀는 자엽이 완전 전개된 후 제1본엽이 돌출되기 시작하는 상태였다. 약제조제는 수용성 시료의 경우 20% acetone(0.1% Tween 20 함유) 용매에 직접 녹여 조제하였고, 비수용성 시료의 경우는 acetone에 먼저 녹인 다음 계면활성제 Tween 20이 포함된 증류

수에 희석하여 조제하였는 바, 용매 및 계면활성제의 최종농도는 각각 50%, 0.1% 수준으로, 이는 잡초에 어떠한 약해도 유발하지 않았다. 제조활성검정은 약제 처리 후 5일 및 10일째에 0-100% 등급표 기준에 따라 달관조사하였다(0 : 효과 없음, 100 : 완전고사).

구입된 제조활성물질의 제조효과 조사

경엽살포 검정법의 타당성과 초기처리 유효농도를 파악하기 위하여 ALA를 포함한 52종의 천연제조활성물질을 위의 기본 실험방법에 준하여 각 농도별로 조제한 후, spray gun을 사용하여 포트당 4mL를 경엽처리하였다. 약제처리된 포트는 온실에 바로 옮겨 관리하였으며, 약제처리 5일 후에 달관조사를 통해 제조활성을 평가하였다.

효과적인 전착제 선발시험

천연물체조제의 살초력을 효과적으로 증진시킬 수 있는 전착제를 선발하기 위하여, 전 실험에서 제조활성이 우수한 8개의 식물정유를 선발하고, 각 약제를 5가지 전착제[Tween-20, Reitron, N-Octyl pyridone(NOP), Siluett 및 채종유]로 조제하여 경엽에 살포한 다음 제조활성 증진 여부를 검토하였다. 채종유(SE)는 soybean oil 0.9g+emulsifier 0.1g으로 구성되었고, 계면활성제의 최종 농도는 채종유의 경우에는 0.2%이었고 나머지는 모두 0.1%였으며, 용매인 acetone의 최종농도는 10% 였다. 기타는 위에 기술한 경엽살포 검정법에 준하여 실시하였다.

습도처리 효과

Carvacrol, cinnamon oil, citronella, clove oil, eugenol, geraniol, oregano, thymol 등 8종의 식물정유가 처리된 포트를 과습조건의 밀폐 아크릴 상자에 10시간 동안 둔 다음 온실에 옮겨 살초력의 발현정도를 조사하였다. 과습 조건에 두지 않고 직접 온실에 옮긴 포트를 대조구로 설정하여 비교하였다.

전식물체(whole-plant) 생장점 점적처리법

검정식물체 육성을 위해 육묘용 포트인 12×24 (Well) 트레이[(주) 범농, 정읍]에 원예용 상토를 담

고 돌피, 바랭이, 자귀풀, 어저귀를 파종하여 최종적으로 well당 한 개체로 관리하였다. ALA의 7종의 천연물을 선별하여 여러 농도의 시험용액을 제조하였으며 약제 조제시 acetone 및 Tween 20 최종 농도는 각각 20%, 0.1%였다. 약제처리는 파종 후 1주일 지난 어린 묘에 피펫을 이용하여 실시하였으며 각 식물의 생장점부위에 10 μ L씩 점적처리하였다. 그 후 약제처리된 포트를 과습상태의 밀폐 아크릴 상자에 10시간 둔 다음 꺼내어 온실로 옮겨 생육시켰다. 제초활성 검정은 약제처리 후 5일째에 0-100% 등급표 기준에 따라 달관조사하였다(0 : 효과 없음, 100 : 완전고사).

결과 및 고찰

전식물체(whole-plant) 경엽살포 검정법

천연물 제초제를 실용화시키기 위해서는 실내검정보다는 실외검정에서 효능이 빠르게 확인되어야 한다. 실내검정은 검정대상 식물의 조직절편을 가지고 엽록소 파괴, 세포질 누출, 조직 괴사정도 등을 조사

하는 것으로서(김 등 1990; 권 등 2000; 김 등 2003a; 김 등 2006; Tworkoski 2002) 간편하고 소량의 시료로도 약제의 활성 정도를 알 수 있다는 장점이 있으나, 실용화와 관련된 정보를 얻기에는 부족한 점이 많다. 따라서 실용화를 목적으로 할 경우에는 가능한한 전식물체(whole-plant)를 이용하는 것이 바람직하다. 또한 천연물 제초제는 충분한 양의 시료를 확보하기 어려울 수도 있으므로, 가능한 한 소량으로도 효능을 검정할 수 있는 시스템의 확보가 필요하다. 본 연구에서는 합성화합물을 대상으로 온실조건에서 제초활성을 검정했던 기존 시스템(김 등 2005)을 축소화시켜 개선하는 방향으로 실험을 진행하였다. 그 결과, 합성화합물 검정시에 적용해 왔던 350cm² 표면적을 가진 포트에서(김 등 2005) 8 cm² 표면적을 가진 포트로 대체하여도 약효 평가에는 아무런 문제가 없었으며, 약제 소요량을 1/4 정도로 줄일 수 있었다(그림 1). 이 때의 검정초종은 온실조건에서의 년중 실험이 가능하고 발아력이 좋아 취급하기 용이한 잡초종으로서 광엽 2초종(자귀풀, 어저귀), 화본과 잡초 2종(돌피, 바랭이)을 사용토록 하였다

Fig. 1. Foliar application bioassay as a whole-plant test for screening of natural post-emergence herbicides.

Table 1. Herbicidal activities of 52 natural chemicals by foliar application in a greenhouse condition.

Chemicals	Application ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Chemicals	Application ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	5,000	2,500	1,250	625		5,000	2,500	1,250	625
----- Injury % -----					----- Injury % -----				
1,4-Cineole	0	0	0	0	Lemon grass	0	0	0	0
Anise oil	5	0	0	0	Levulinic acid	91	72	16	0
Basil	27	0	0	0	Linseed oil	0	0	0	0
Bisabolene	2	0	0	0	Marjoram	0	0	0	0
Camphor	0	0	0	0	Methy-jasmonate	91	51	15	5
Castor	0	0	0	0	Neem oil	21	2	0	0
Caryophyllene oxide	72	45	15	2	Oregano	100	38	25	0
Carvacrol	100	86	31	7	Peanut oil	0	0	0	0
Cedarwood oil	15	5	0	0	Pelargonic acid	100	92	43	11
Chrysophanic acid	100	95	74	50	Pennyriyal	0	0	0	0
Coconut oil	0	0	0	0	Peppermint oil	23	0	0	0
Cotton seed oil	0	0	0	0	Pine oil	20	2	0	0
Cinnamon oil	90	37	2	0	Quercetin	0	0	0	0
Clove oil	80	20	2	0	Rosemary oil	2	0	0	0
Eucalyptus GLB	0	0	0	0	Rotenone	27	5	0	0
Eucalyptus GROD	32	0	0	0	Safflower seed oil	0	0	0	0
Eugenol	70	35	12	5	Sunflower oil	5	0	0	0
Fennel	15	0	0	0	Tarragon	30	2	0	0
Geraniol	79	26	0	0	Teatree	0	0	0	0
Geranium	47	27	0	0	Terpineol	40	5	2	0
Grape fruit	5	0	0	0	Thyme oil	5	0	0	0
Jobba bean oil	0	0	0	0	Thymol	100	47	27	20
Juniper berry	0	0	0	0	Trans-anethole	32	12	0	0
Lavender	0	0	0	0	Turpentine oil	0	0	0	0
Lemon	0	0	0	0	Wintergreen oil	7	0	0	0

Chemicals	Application ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Chemicals	Application ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	1,000	500	250	125		50	25	12	6
----- Injury % -----					----- Injury % -----				
Aminolevulinic acid	78	66	32	7	Bialaphos	95	85	75	56

공시된 제초활성물질의 살초효과

검정법의 타당성과 초기처리 유효농도를 파악하기 위하여 ALA를 포함한 52종의 천연 살초활성물질의 약효를 조사하였다. 그 결과(표 1, 그림 2), bialaphos는 $50\mu\text{g mL}^{-1}$ 에서 잡초 4초종에 대해 평균 95%, ALA의 경우에는 $1,000\mu\text{g mL}^{-1}$ 에서 78% 살초활성을 보였으며, pelargonic acid, carvacrol, clove oil, thymol을 포함한 10개 시료에서는 $5,000\mu\text{g mL}^{-1}$ 에서 75-100%의 살초활성을 나타냈다. 따라서 천연물 제초제 생물검정의 초기설정 농도는 $5,000\mu\text{g mL}^{-1}$

이하로 하되 $2,500\mu\text{g mL}^{-1}$ 내외가 바람직할 것으로 생각되었다. 그런데 현재 상품으로 출시된 성분들의 대부분은 $2,000\mu\text{g mL}^{-1}$ 이하에서도 활성을 보이기 때문에 실용화 수준의 보다 강한 활성을 가진 화합물을 선별하려면 $2,000\mu\text{g mL}^{-1}$ 를 초기설정 농도로 해도 무방할 것 같았다.

효과적인 전착제 선별시험

천연물 제초제 생물검정 시 살초력을 효과적으로 발현시킬 수 있는 계면활성제가 있다면 검정 과정에

Fig. 2. Herbicidal activities of some natural chemicals at foliar application to 4 weed species in a greenhouse condition.

도움이 될 것이다. 본 실험에서는 일반적으로 사용되어 온 Tween 20보다 우수한 효과가 있는 계면활성제를 파악하기 위하여 실시되었다. 그 결과, clove oil과 eugenol에서는 NOP가, cinnamon oil에서는 Siluet과

NOP가, carvacrol에서는 Reitron이, thymol에서는 Tween-20과 Reitron, NOP 및 SE 첨가시에 60% 이상의 살초활성을 나타내었다(그림 3). 식물정유 8가지의 잡초 4초종에 대한 살초활성을 공시된 5가지 전

Table 2. Effect of different adjuvants on the herbicidal activities of clove oil at post-emergence treatment.

Adjuvants	Clove oil (μ g mL ⁻¹)	Weed species ¹⁾							
		AESINI		ECHOR		ABUTH		DIGSA	
		5D ²⁾	10D	5D	10D	5D	10D	5D	10D
----- Injury % -----									
0.1% Tween 20	5,000	100	100	100	100	40	60	100	90
	2,500	10	0	60	50	10	0	90	90
	1,250	0	0	0	0	0	0	20	10
0.1% Siluet	5,000	30	20	90	80	0	0	100	100
	2,500	10	0	30	20	0	0	100	100
	1,250	0	0	0	0	0	0	15	0
0.1% Reitron	5,000	95	90	100	100	35	20	100	90
	2,500	10	0	70	60	0	0	90	80
	1,250	0	0	0	0	0	0	15	0
0.1% NOP	5,000	100	100	100	100	35	20	100	100
	2,500	50	50	100	100	20	0	100	100
	1,250	60	50	30	20	10	0	100	100
	625	40	30	30	20	0	0	70	60
	313	30	10	20	0	0	0	60	30
0.2% SE	5,000	100	100	100	100	60	30	100	90
	2,500	0	0	20	0	10	10	80	40
	1,250	0	0	0	0	0	0	10	0

¹⁾ AESINI : *Aeschynomene indica*, ECHOR : *Echinochloa crus-galli*, ABUTH : *Abutilon theophrasti*, DIGSA : *Digitaria sanguinalis*.

²⁾ 5D and 10D : at 5 day and 10 day after herbicide treatment.

Fig. 3. Effect of different adjuvants on the herbicidal activities of some natural chemicals at post-emergence treatment ($2,500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Herbicidal activity was designated as average value of injury % to four weeds.

착제별로 평균해 볼 때 Tween-20, Reitron, Siluette, NOP, SE에서 각각 40%, 40%, 36%, 70% 및 42%로 NOP 첨가시에 활성이 상대적으로 높게 나타났다. 보다 구체적으로, clove oil을 가지고 각 계면활성제의 효과를 검정하였을 때, 모든 처리농도에서 NOP는 다른 전착제들 보다 살초활성을 더 증가시키는 경향이 있었다(표 2).

습도처리 효과

식물정유의 살초활성은 오래전부터 보고되어 왔으며(Dayan 등 2009; Dudai 등 1999; Gauvrit와 Cabanne 1993; Tworkoski 2002) 유기농법에서 잡초 방제를 위하여 사용될 수 있다. 이들은 대부분 비선택적 접촉형 살초활성을 보이며 잡초제거 효과가 일시

적인데, 그의 주된 이유는 식물정유가 상대적으로 휘발성이 높기 때문일 것으로 예상된다(Dayan 등 2009). 본 연구에서도 식물정유를 가지고 실험했을 때, 활성 결과가 실험시마다 다르게 나타남을 경험하였으며 이는 식물정유의 휘발성 때문이라고 여겨졌다. 따라서 식물정유의 살초활성 검정시에는 살초효과 발현의 균일성 유지를 위한 방안이 강구될 필요성이 있었다.

본 연구에서는 약제가 경엽으로 흡수되는 동안에 휘발을 낮추기 위해 식물체를 고습도 조건에 일정기간동안 두는 방안을 검토하였다. 8종의 식물정유를 $2,500\mu\text{g mL}^{-1}$ 농도로 처리한 다음, 잡초 4초종에 대한 평균 방제활성을 조사한 결과, 약제처리 후 과습조건에 10시간 둔 시험구는 약 60% 활성을 나타낸 반면,

Fig. 4. Effect of incubation in dew chamber on the herbicidal activity of different essential oils at post-emergence treatment ($2,500 \mu\text{g mL}^{-1}$). The treated pots were incubated for 10 hr in dew chamber. Herbicidal activity was designated as average value of injury % to four weeds.

Table 3. Effect of incubation in dew chamber on the herbicidal activity of eugenol at post-emergence treatment.

Treatment method	Eugenol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Weed species ¹⁾							
		AESINI		ECHOR		ABUTH		DIGSA	
		5D ²⁾	10D	5D	10D	5D	10D	5D	10D
----- Injury % -----									
No incubation in dew chamber	5,000	85	100	100	100	50	40	100	100
	2,500	15	15	10	20	0	0	70	50
	1,250	0	0	0	0	0	0	15	0
Incubation in dew chamber	5,000	100	100	100	100	100	100	100	100
	2,500	0	0	75	80	30	0	100	100
	1,250	0	0	0	0	0	0	30	30

¹⁾ AESINI : *Aeschynomene indica*, ECHOR : *Echinochloa crus-galli*, ABUTH : *Abutilon theophrasti*, DIGSA : *Digitaria sanguinalis*.

²⁾ 5D and 10D : at 5 day and 10 day after herbicide treatment.

과습조건에 두지 않았던 대조구에서는 약 40%의 살초 활성을 보여 과습상태의 보관이 제초활성을 높임과 동시에 상대적으로 균일한 제초효과를 나타내었으며 처리 화합물별로 볼 때, eugenol, carvacrol, citronella 및 oregano 처리시에 그 효과가 보다 뚜렷한 것으로 나타났다(그림 4). 이를 더욱 확인하기 위하여 eugenol 농도를 달리 살포한 다음 동일한 실험을 수행한 결과, 약제처리 후 과습조건에 두었을 때에 살초효과가 보다 증진되어 나타났다(표 3). Scarfato 등(2007)은 식물정유의 휘발성을 줄이기 위해 microencapsulation을 검토한 바 있으나, 생물검정 단계에서는 검정시료를 microencapsulation시켜서 실험하기는 어렵기 때문에, 상기와 같은 방법을 적용하는 것이 바람직 할 것으로 생각되었다.

전식물체(whole-plant) 생장점 점적처리법

천연물 유래 활성물질은 많은 양을 확보하기 어려운 경우가 많기 때문에 미량으로도 초기 활성 검정을 할 수 있다면 매우 바람직할 것이다. 경엽처리 활성을 평가하기 위하여 지금까지 적용해 온 대부분의 방법은 조직절편을 이용하여 실내에서 소규모로 검정하는 것이었다. 그러나 이 방법은 조직의 절편화 및 약제제 등에서 세밀한 주의가 필요하고, 전식물체가 아닌 절편을 이용하기 때문에 보다 현실적인 조건의

검정이라고 보기 어렵다. 따라서 이를 보완하기 위해서는 식물의 생장점 부위에 점적 처리하는 방법이 효과적일 것으로 사료되어 실험하였다. 그 결과, 각 초종의 생장점 부위에 약제를 처리했을 때는 경엽살포 검정법에서보다 높은 활성을 나타내었는데, clove oil의 경우 5,000, 2,500, 1,250 및 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 농도로 경엽살포처리시 평균 제초활성이 각각 80, 20, 2, 0%인 반면, 점적처리시에는 평균 제초활성이 각각 100, 85, 48, 20%였다(표 4). 이는 점적처리시 경엽살포 검정법 처리농도의 1/2 수준에서도 같은 효과를 얻을 수 있음을 의미한다. 효율성 측면에서 위의 생장점 부위 점적처리법을 전식물체 경엽살포 검정법과 비교해 보았을 때 상대적인 처리용량(4초종을 10 μL 씩 처리시)은 1/100, 성분량은 1/200 정도로 줄일 수 있었다(표 5).

이상의 실험결과들로부터 천연물 유래 제초제 개발을 위한 생물검정을 수행할 때에는 초기 처리농도를 2,500~5,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 내외로 하여 적절한 계면활성제를 첨가하고 경엽살포 또는 생장점 점적처리를 한 후, 이를 과습 상태에 약 10시간 둔 다음 온실에 옮겨 두면, 제초활성 발현이 증진됨은 물론 균일성을 확보할 수 있어 천연물 제초제 선발과 실용화에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 확보한 천연물 성분이 미량일 경우에도 점적처리법을 통해

Table 4. Herbicidal effect of foliar application and spot treatment in post-emergence.

Chemicals	Foliar application ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				Spot treatment ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	5,000	2,500	1,250	625	5,000	2,500	1,250	625
----- Injury %, average of four weeds -----								
Carvacrol	100	86	31	7	100	100	52.5	30
Caryophyllene	72	45	15	2	82.5	60	15	5
Clove oil	80	20	2	0	100	85	47.5	20
Eugenol	70	35	12	5	100	97.5	85	25
Oregano	100	38	25	0	100	95	50	30
Pelargonic acid	100	92	43	11	100	97.5	85	25
Thymol	100	47	27	20	100	97.5	80	25

Chemicals	1,000	500	250	125	1,000	500	250	125
----- Injury %, average of four weeds -----								
ALA	78	66	32	7	100	92.5	82.5	27.5

전식물체(whole-plant) 수준에서의 활성 정도를 평가하는 것이 효과적인 것으로 사료되었다.

요 약

본 연구는 식물정유의 활용과 개발을 포함한 천연물 제초제의 개발을 효과적으로 추진하기 위한 방안으로서 식물정유 성분의 특성이 고려된 개선된 전식물체(whole-plant) 검정법을 확립하기 위해 수행되었다. 잡초 4초종을(피, 바랭이, 자귀풀, 어저귀) 이 이용하는 전식물체 경엽살포 검정법은 검정 화합물 량

이 충분할 경우, 전식물체 생장점 점적처리법은 검정 화합물이 미량일 때 추천할 수 있는 방법으로 판단되었다. 각 식물정유 처리시 초기 처리농도는 2,500~5,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 수준이 필요하였으며 계면활성제는 Tween 20 보다 NOP를 첨가하였을 경우에 보다 높은 살초활성을 나타내었다. 식물정유와 같이 휘발성이 있는 천연물의 활성을 평가하기 위해서는 약제를 처리한 후 과습 상태에 일정시간 두면 제초활성 발현이 증진되었다. 또한 전식물체 생장점 점적처리법은 경엽살포 검정법에 비해 약 1/100의 약제처리량(부피), 약 1/200의 성분량(무게)에서도 살초효과의 검정이 가능하였다.

Table 5. Efficiency of several methods as a whole-plant assay for natural herbicide development.

Items	Conventional method ¹⁾	Method I (Foliar application)	Method II (Spot treatment)
Treatment surface area	350cm ²	64cm ²	Spot
IC90($\mu\text{g mL}^{-1}$)	5,000	5,000	2,500
Rating time (Days after treatment)	5~14	5~14	2~14
Weed species	Broad leaf 5 Grass 5	Broad leaf 2 Grass 2	Broad leaf 2 Grass 2
Application volume required for assay	14mL	4mL	40 μL
Amounts of compounds required for assay	140mg	40mg	200 μg

¹⁾ Greenhouse test for screening of synthetic herbicidal compounds which was established in KRICT.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 “신바이오 작물보호제”의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- 권옥경, 김진석, 조광연. 2000. 분광분석을 이용한 막과산화작용 제초제의 신속한 검정법. 농약과학회지 4(1):11-18.
- 김건우, 이동구. 2007. 살초 및 살균활성물질 함유 국내 자원식물의 탐색. 한국잡초학회지 27(3):285-295.
- 김건우, 장호진. 2009. 국내 자생식물의 살초활성. 한국잡초학회지 29(3):194-203.
- 김성문, 허수정, 김진석, 허장현. 2001. 천연물기원 살초활성물질. 한국잡초학회지 21(3):199-212.
- 김진석, 김태준, 홍경식, 황인택, 조광연. 1990. 식물색소 관여형 화합물의 생물검정법으로서 Greening Assay. 한국잡초학회지 10(3):214-220.
- 김진석, 이병희, 김소희, 민석기, 최정섭. 2006. Glyphosate에 대한 옥수수 반응의 개선된 검정 방법. 식물생명공학회지 33(1):57-63.
- 김진석, 이병희, 오판훈, 송재은. 2005. Glufosinate-ammonium과 oxyfluorfen의 제초활성 상호작용. 한국잡초학회지 25(3):171-178.
- 김진석, 이병희, 이정애, 오판훈, 조광연. 2003a. 백화옥수수 잎절편을 이용한 안토시아닌 생합성 조절제 탐색용 신규 검정법 확립. 식물생명공학회지 30(2):207-214.
- 김진철. 2009. 생물농약의 연구개발 동향. Bio인스페셜Zine 2009년 10호. 생명공학정책연구센터 전문가리포트.
- 김관경, 박동진, 최순용, 김창진. 1996. 토끼풀(*Trifolium repens* L.)에 제초활성을 나타내는 *Penicillium* sp.의 탐색. 한국농화학회지 39:455-459.
- 김희연, 최해진, 유용만, 허수정, 임상현, 김진석, 김성문. 2003b. 식물기원 제초활성물질. 한국잡초학회지 23(3):190-212.
- 우던 로미즈, 김용경, 박상언, 변종영. 2009. 수수뿌리에서 분리된 *sorgoleone*의 제초활성 및 수수 품종간 함량 차이. 한국잡초학회지 29(3):229-236.
- 이수관, 김재철, 홍연규. 1994. 논잡초 올방개 방제용 에피코코소라스 (*Epicoccosorus*) YCSJ-112 균주와 이 균주의 포자 대량 생산방법 및 올방개의 방제방법. 대한민국특허 94-24055.
- 정영륜, 김병섭, 김홍태, 조광연. 1990. 논피(*Echinochloa crus-galli*) 잎마름병을 일으키는 병원균 *Exserohilum* sp.의 분리 및 동정. 한국식물병리학회지 6:429-433.
- 최성환, 구홍모, 안재영, 남진선, 김형환, 천인규, 이증주. 2008. 식물정유의 단독 및 혼합처리가 발잡초와 작물에 미치는 영향. 한국잡초학회지 28(1):61-68.
- 최성환, 안재영, 박기웅, 이증주. 2009. 식물정유가 직파벼와 피의 초기생장에 미치는 영향. 한국잡초학회지 29(4):318-322.
- 홍연규, 김정남, 이본춘, 황재복, 송석보, 박성태, 전민구, 김인섭. 2006. 곰팡이 유래 미생물제초제 스크레로티니아속균 BWC98-105균주의 클로버 방제효과. 한국잡초학회지 26(4):353-361.
- Bainard, L. D., M. B. Isman and M. K. Upadhyaya. 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 Science 54(6):833-837.
- Christy, A. L., K. A. Herbst, S. J. Kostka, J. P. Mullen and P. S. Carlson. 1993. Synergizing weed biocontrol agents with chemical herbicides. In : *Pest Control with Enhanced Environmental Safety*, ed. by S. O. Duke, J. J. Menn and J. R. Plimmer, pp. 87-100. Amer. Chem. Soc.
- Dayan, F. E., C. L. Cantrell and S. O. Duke. 2009. Natural products in crop protection. Bioorganic & Medicinal Chemistry 17:4022-4034.
- Douglas, M. H., J. W. van Klink, B. M. Smallfield, N. B. Perry, R. E. Anderson, P. Johnstone and

- R. T. Weavers. 2004. Essential oils from New Zealand manuka : triketone and other chemotypes of *Leptospermum scoparium*. *Phytochemistry* 65(9):1255-1264.
- Dudai, N., A. Poljakoff-Mayber, A. M. Mayer, E. Putievsky and H. R. Lerner. 1999. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *J. Chem. Ecol.* 25:1079-089.
- Evans, G. J., R. R. Bellinder and M. C. Goffinet. 2009. Herbicidal effect of vinegar and a clove oil product on redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Weed Tech.* 23(2):292-299.
- Gauvrit, C., and F. Cabanne. 1993. Oils for weed control : uses and mode of action. *Pestic. Sci.* 37:147-53.
- Kato-Noguchi, H., and T. Ino. 2003. Rice seedlings release momilactone B into the environment. *Phytochemistry* 63:551-554.
- Kenney, D. S. 1986. DeVine -The way it was developed- an industrialist's views. *Weed Sci.* 34:15-16 (suppl.1).
- Kobaisy, M., M. R. Tellez, C. L. Webber, F. E. Dayan, K. K. Schrader and D. E. Wedge. 2001. Phytotoxic and fungitoxic activities of the essential oil of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves and its composition. *J. Agric. Food Chem.* 49(8):3768-3771.
- Nimbal, C. I., J. F. Pedersen, C. N. Yerkes, L. A. Weston and S. C. Weller. 1996. Phytotoxicity and distribution of sorgoleone in grain sorghum germplasm. *J. Agric. Food Chem.* 44(5):1343-1347.
- Rohlfesen, W. G. 2008. Method and formulation for eliminating moss with oregano oil. U.S. 2008125321, U.S. 2006-604081.
- Scarfato, P., E. Avallone, P. Lannelli, V. De Feo and D. Acierno. 2007. Synthesis and characterization of polyurea microcapsules containing essential oils with antigerminative activity. *J. Appl. Polym. Sci.* 105:3568-3577.
- Singh, H. P., D. R. Batish, N. Setia and R. R. Kohli. 2005. Herbicidal activity of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* against *Parthenium hysterophorus*. *Ann. Appl. Biol.* 146(1):89-94.
- Te Beest, D. O., X. B. Yang and C. R. Ciser. 1992. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Ann. Rev. Phythpathol.* 30: 637-657.
- Tworowski, T. 2002. Herbicide effects of essential oils. *Weed Sci.* 50:425-431.
- Vaughn, S. F., and R. A. Holser. 2007. Evaluation of biodiesels from several oilseed sources as environmental friendly contact herbicides. *Industrial Crops and Products* 26(1):63-68.
- Young, S. L. 2004. Natural product herbicides for control of annual vegetation along roadsides. *Weed Technol.* 18(3):580-587.