최 종
연구보고서

δ-Aminolevulinic acid (ALA)의 작용기작 구명 및 생물농약 개발

Mode of Action of δ-Aminolevulinic acid (ALA) and Development of Biotic Pesticide

연 구 기 관

전 남 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "δ-Aminolevulinic acid (ALA)의 작용기작 구명 및 생물농약 개발" 과제 (세부과제 "ALA 작용기작 구명", "ALA를 이용한 생물농약 개발 연구")의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 10월 14일

주관연구기관명 : 전남대학교
총괄연구책임자 : 구 자 옥
연 구 원 : 국용인, 신지산, 국현
협동연구기관명 : 동신대학교
협동연구책임자 : 천상욱
연 구 원 : 김영민, 이진철

요 약 문

Ⅰ. 제 목

δ-Aminolevulinic acid (ALA)의 작용기작 구명 및 생물농약 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구목적

본 연구는 ALA의 작용기작 구명과 ALA를 이용한 생물농약을 개발하기 위하여 수행되었다. 첫 번째 연구목적은 광역학적인 효과로 식물체에 고사현상을 초래하는 ALA를 처리하여 적정 약량, 검정식물을 결정하고 생육단계별, 식물종간, 식물기관간에 선택활성 반응, 식물생리생화학적 반응 및 환경에 대한 안정성 여부를 확인하는데 있다. 두 번째 연구목적은 저농도에서는 생장촉진제 또는 재해 완충제로, 고농도에서는 제초제로의 개발 목적으로 단제는 물론, 기존의 제초제 및 다른 천연생리활성물질들과의 상호작용 연구를 통해 농약사용의 감량화 및 전천후 농약으로서의 이용성 증대와 농업환경과의 상호작용 및 stress 경감효과를 검토하여 실제로 논과 밭에 ALA를 사용 가능성을 증대하는데 있다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

ALA의 다목적 유용성: 현재 일본과 미국에서 생물 제초제/살충제(bio-herbicide/insecticide)및 광역학적 암 치료제(cancer drug for photodynamic therapy)로서 ALA의 농업 및 의학 분야에서의 관심이 커지면서 연구가 활발하게 진행 중이므로 국내에

서도 이에 대한 관심과 연구가 절실히 요구되고 있는 실정이다. 또한 농도에 따른 생장 촉진 및 억제제로서 다목적인 작물보호제로의 개발 가능성이 높다.

농약사용의 감량화: 유해생물의 농약에 대한 저항성 발생증가는 또한 새로운 농약의 출현을 요구하기에 충분하다. 대부분의 상품화된 화학물질은 천연화합물보다 상대적으로 환경적 반감기가 길며 높은 독성학적 특성을 갖는 할로겐화된 탄화수소들이다. 그래서 천연화합물을 이용한 농약탐색에 관심이 증가되고 있다. 우리의 농업 역시 인간, 환경과 식품에 안전성 확보를 위하여 농약 및 화학비료의 적정량 내지 감량 사용은 물론 저에너지 투입형의 지속적 농업으로 전환이 필요하다.

유기합성농약의 대체 또는 협력수단: 기존의 화학적 방법으로만 치중해 온 합성화학물질을 병해충 및 잡초 방제를 위한 생물농약이란 새로운 수단으로 대체 또는 협력 활용함으로써 인축에 안전하고 친환경적이며 지속적이고 경제적인 농업생산에 일조한다.

나. 경제・산업적 측면

환경친화적인 생물농약 및 효과적인 생산공정의 개발은 차세대 생물산업의 핵심분야: 21세기형 생물농약 개발은 국제경쟁력을 확보하고 과학기술선진국으로 도약해야 할 우리 나라의 현시점에서 매우 중요한 과제이다. 현재까지 전세계적으로 생물농약의 개발은 극히 미진한 상태이며, 특히 전세계 농약시장 제초제 중 미생물이 생산하는 생물제초제는 아직도 극히 미미할 뿐만 아니라 특히 상업화되는 비율이 거의 없는 형편이다.

제조 비용, 시간 및 노력이 화학합성농약에 비해 저렴: 상업적으로 유용한 농약을 발견하기 위해 선발되어야 하는 화합물의 수가 급속도로 증가와 함께 합성농약의 개발을 위한 비용, 시간 및 노력이 크게 투입되기 때문에 미생물 농약 등의 새로운 물질 탐색에 대한 전략 수립이 요청되고 있다.

기존의 화학적 방법을 통한 작물보호체계에 대체 또는 협력으로 합성농약의 원제수입에 대한 대외 의존도를 줄임: 현재의 농경지에서의 유해생물방제는 거의 대부분이 유기합성 화합물인 농약으로만 의존할 수밖에 없는 실정이어서, 합성농약 처리에 의한 방제부담은 절대적으로 막대하다고 볼 수 있다. 따라서 전적으로 원제수입에 의존하는 우리로서 그 부담을 줄이기 위해 미생물로부터 천연활성물질의 발견은 농업생태계에서 현재의 화학적, 기계적 및 재배적인 유해생물 방제법을 대체 또는 협력하는 새로운 작물보호전략으로 개발하고 이용이 필요하다.

ALA 자체가 갖는 다목적 유용성으로 인해 의약 등 타 분야에 대한 기초정보 제공이 가능: 광역학적인 암치료 효과, 광역학적인 살충 및 제초 효과 외에도 한발, 침관수 및 염해 등을 극복하는 재해 경감제 개발로 산업적 경제적 파급효과가 클 것으로 기대된다.

다. 사회·문화적 측면

생물농약 개발 요구: 국내외적으로 자연생태계 보존과 다양성이 강조되는 지구환경문제가 제기되고 있는 가운데, 화학물질로부터 자연 및 농업생태계에 있어서 오염 최소화를 위한 환경 친화적인 생물농약의 개발이 요구된다.

생물농약 개발은 생물농업의 핵심: 친환경농업, 합성농약의 대체수단, 안전 농산물생산, 새로운 자원의 산업화를 위한 생물농업의 핵심이다.

무공해 생분해성 천연 신농약: 좀 더 환경에 친화적이고 인축에 대해 안전하며, 선택적이고 효과적인 무공해 생분해성 천연 신농약 개발로 생태적으로 건전하고 환경적으로 안전하며 사회적으로 신뢰성을 갖는 유해생물 방제법과 작물보호체계를 확립할 수 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제1세부과제인 ALA 작용기작 구명연구에서는 광역학적인 효과로 식물체에 고사현상을 초래하는 ALA를 처리하여 적정 약량, 검정식물을 결정하고 생육단계별, 식물종간, 식물기관간에 선택활성 반응, 식물생리생화학적 반응 및 환경에 대한 안정성 여부를 확인하고자 하였다.

제2세부과제인 ALA를 이용한 생물농약 개발연구에서는 저농도에서 생장촉진제 또는 재해 완충제로, 고농도에서 제초제로의 개발 목적으로 단제는 물론, 기존의 제초제 및 다른 천연생리활성물질들과의 상호작용 연구를 통해 농약사용의 감량화 및 전천후 농약으로서의 이용성 증대와 농업환경과의 상호작용 및 stress 경감효과의 검토를 하여 ALA에 의한 생물농약 개발 가능성 여부를 알아보기 위하여 수행하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 다양한 식물종의 생장촉진과 억제에 관한 5-Aminolevulinic Acid의 효과

화학적 합성에 의해 생산된 ALA(합성ALA)와 *Bradyrhizobium japonicum*으로 부터 분리된 *heme*A 유전자를 과압해서 얻어낸 세포질 추출물인 Bio ALA을 보리 5품종, 밀 5품종, 벼 및 수종의 잡초종자를 사용하여 종자 침지, 경엽 처리 및 처리 시기에 따른 생물학적 활성을 비교한 결과는 다음과 같다.

보리 5 품종과 밀 5 품종의 ALA 종자 침지 처리 결과는 고농도 처리구에서 제초효과뿐만 아니라 저농도에서 생장 촉진 효과가 없었다. 그러나 벼에서는 5mM과 10 mM의 ALA 수용액에 종자 침지 처리에 의해 생육 억제 효과가 나타난 반면 저농도로 종자 침지 처리를 할 경우 생장 촉진 효과는 없었다. 강호쌀보리, 내한쌀보리, 송학보리, 새쌀보리, 대호쌀보리를 이용하여 저농도 0.05～1mM의 ALA 수용액을 경엽 처리했을 경우 생육은 무처리에 대비하여 각각 13～14%, 19～51%, 17～64%, 18～23% 및 22～38%가 촉진되었다.

한편 보리의 생육은 고농도 5~30mM의 ALA 수용액을 경엽 처리할 경우 생육 억제 효과가 컸다. ALA에 의한 생육 촉진 효과는 경엽처리가 종자 침지처리보다 더 좋았다. 1.5 엽기에 ALA를 경엽처리 할 경우 보리 생육이 19-51% 증가되었지만 종자 처리, 파종 후 3일째 처리, 3엽기 및 5엽기 처리에서는 생육 촉진 효과는 나타나지 않아 보리를 이용한 ALA 처리 효과는 처리 시기와 처리 농도가 크게 좌우했다. 단자엽 잡초가 쌍자엽 잡초보다 ALA 경엽 처리에 더 민감했으며, 쌍자엽 잡초 질경이(*Plantago asiatiaca* L.)가 ALA 처리에 가장 내성이 큰 반면 단자엽 잡초 강아지풀(*Setaria virids* L.)은 가장 민감했다. 본 연구를 통하여 보리, 밀, 벼 및 잡초에서 Bio ALA와 합성 ALA의 생물학적 차이는 없었다. 따라서 미생물에 의해 생산한 ALA(Bio ALA)은 작물생산에 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

2. 보리와 밀에 관한 5-Aminolevulinic Acid의 생장촉진과 제초작용 기작

5-Aminolevulnic acid(ALA)는 porphyrin 생합성 중간물질 또는 제초제로 알려져 있다. 본 연구에서는 ALA에 의한 식물의 생장촉진과 제초작용 기구를 구명하기 위하여 보리와 밀을 1.5엽기까지 생육시켜 저농도(0.05, 0.1 및 0.5 mM)와 고농도(5, 10 및 30 mM)의 ALA를 경엽에 처리하였다. 저농도의 ALA 처리에 의한 보리와 밀에서 지상부 생체중은 각각 12~26%와 3~9% 증가하였다. 반면에 고농도 ALA 처리에 의한 보리와 밀의 생체중은 각각 23~92%와 34~83% 억제되었다. 파종 후 5, 10, 15, 20 및 25일째 보리의 ALA 합성능력은 밀보다 훨씬 많았다. 따라서 ALA 저농도 처리에 의한 보리의 생장촉진 효과는 ALA 합성능력에 기인된다고 추측할 수 있었다. 5mM ALA를 보리와 밀의 경엽에 처리하고 암상태로 12시간 둔 후 광에 4, 8, 12 및 24시간 노출했을 때, 이들 식물체로부터 신속한 전해질 누출, 엽록소 함량 감소 및 지질과산화가 증대되었다. ALA 처리에 의한 보리의 제초작용은 밀과 유사하였다. Porphyrin 생합성의 중간물질인 protochlorophyllide, Mg-protoporphyrin Ⅸ 및 protoporphyrin Ⅸ (Proto Ⅸ)이 5mM ALA 처리에 의해 모두 축적되었으나 이중에 Proto Ⅸ 축적율이 가장 높았다. 이 축적률은 암상태에서 12시간 후에 보리는 23배 그리고 밀은 26배에 달했다. Proto Ⅸ 축적은 광 노출 후 4시간보다 암상태에 12시간 처리 후에 훨씬 많았다. 다른 porphyrin의 중간물질들의 축적률은 12시간 암상태와 4시간 광노출에서

적거나 변화가 적었다. 따라서 보리와 밀에 대한 ALA의 제초작용은 축적된 Proto Ⅸ의 광역학적인 작용에 의해 기인된다고 할 수 있다.

3. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 보리와 무의 생장반응과 피와 자귀풀의 제초 효과

다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 보리와 무의 생장촉진과 피와 자귀풀의 제초효과를 알아보고자 하였다. ALA 처리에 의한 보리의 생장촉진 효과는 보리 생육에 부적한 환경인 저온과 저광량 조건에서는 없었다. 그러나 포화수분 조건하에서 ALA를 처리시 보리의 지상부 생체중은 증가되었다. 다양한 환경조건하에서 ALA처리에 의한 무 생장량 반응은 보리에서 반응과 달리 저온(무처리 대비 50-60%)과 고온조건(50%), 고광조건(70-80%) 그리고 포화수분(70%) 같은 작물이 스트레스를 받을 수 있는 조건에서도 ALA 처리에 의한 지하부 생장량이 증가하는 경향을 보였다. 한편 온도조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 제초효과는 저온조건인 10℃조건에서보다 20℃나 30℃에서 높은 경향을 보였다. 또한 광량조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 제초효과는 저광량인 20㎛mol m^{-2} s^{-1}보다 상대적으로 고광량인 200과 400㎛mol m^{-2} s^{-1}에서 컸다. 담수조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 제초효과는 보통수분과 포화수분조건에 비해 다소 증가하였다. 10℃와 20℃ 조건하에서 ALA 처리에 의한 자귀풀 지상부 생체중의 억제정도는 30℃조건에서 보다 크게 나타났다. 광량조건하에서 5mM과 10mM ALA 처리에 의한 자귀풀의 지상부 생체중 억제정도도 저광인 20㎛mol m^{-2} s^{-1}보다 상대적으로 고광인 200과 400㎛mol m^{-2} s^{-1}에서 높았다. 담수조건하에서 ALA처리에 의한 자귀풀의 생체중 억제 효과는 보통수분조건과 포화수분조건에 비해 적었다. 이상의 결과로 볼 때, 보리와 무 생육에 부적한 일부 환경조건하에서도 ALA 처리에 의한 촉진효과 및 피와 자귀풀 같은 잡초종에 대한 제초효과가 확인되었다.

4. ALA 단제 및 다른 제초제와의 혼제에 의한 제초활성 연구

실험실내 Petri dish시험에서 온실 내 pot시험을 통해 ALA의 단제 및 타 약제와의 혼제에 대한 다양한 작물과 잡초종의 생물학적 반응이 검토되었다. 미생물에 의해 생산된 ALA(Bio-ALA)와 합성된 ALA(Synthetic-ALA)을 동일한 농도로 조제하여 벼, 알

팔파, 피 및 배추 종자에 처리한 결과 두 제형간의 차이는 인정되지 않았고 10^{-4}~10^{-3}M 사이의 농도에서 지하부의 생육과 엽록소의 함량이 억제됨이 관찰되었다. 처리방법별로 제초반응은 발생후처리를 한 결과 발생후처리에서 가장 높은 약제반응을 보였고 특히 뿌리침지처리에서 ALA가 상향이행됨을 증명하였다. 한편 약제반응을 증대시키기 위해 ALA를 2,2′-dipyridyl과의 혼합처리에서 배추와 피가 벼와 알팔파보다 높은 상승효과를 보였다.

ALA를 2~8mM에 대한 농도별 약제반응은 작물인 콩과 옥수수가 잡초인 한련초와 피보다 초장과 중량에 있어서 큰 변화 없이 높은 내성을 보였다. 한편 식물간에 광활성 제초반응의 차이를 알아보기 위해 chlorophyll 형성과정의 전구체인 tetrapyrrole 축적함량을 측정하여 비교한 결과 총 tetrapyrrole 함량에 있어서 피는 무처리에 비해 74배가 증가한 데 비해 옥수수와 콩은 각각 0.5와 2.8배로 피가 두 작물보다 많은 tetrapyrrole 축적량을 갖고 있는 것으로 나타났다. 그 중에서 Proto IX 피가 무처리에 비해 708배가 증가한데 비해 옥수수와 콩은 각각 0.5배와 7배로 증가하였다. 이 결과는 피는 두 작물에 비해 상대적으로 월등한 tetrapyrrole 축적량을 갖고 있어서 광 노출 후에 광활성 정도가 커서 제초활성이 높게 나타날 수 있음을 시사하고 있다. 피의 생육단계별로 ALA 2mM과 4mM 농도에 대한 반응은 묘령이 낮을수록 제초활성이 높게 나타나 다른 제초제와 유사한 결과를 보였다. ALA를 전착제 등 계면활성제와 혼합하여 처리한 것이 ALA 단일 처리의 경우보다도 높은 제초활성을 보였다. ALA와 기존제초제와의 혼합사용을 통한 상호작용을 검토하고자 재배 후 15일된 2.5~3엽기 벼와 피에 합성 ALA 0, 1, 2, 3, 4mM 농도와 oxyfluorfen 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}M로 조합된 용액을 엽면살포하여 처리한 후 16시간 동안 암치상한 후에 광노출시킨 결과 DPE계 모든 조합처리에서 다른 두 제초제보다 벼와 피의 생체중 및 엽록소 함량 반응에 있어서 더 높은 synergy 효과가 나타났다.

5. ALA의 농업환경 및 Stress와의 상호작용 연구

재배양식별 벼에 대한 ALA의 약해와 약효는 담수직파벼보다는 건답직파벼에서, 이앙벼보다는 직파벼에서, 20일이앙벼보다는 10일이앙벼에서 더 큰 것으로 나타났다. 한편 대조 약제 paraquat에 비해 작물 약해는 더 적었으나 약효는 다소 낮아 20mM이

상 처리농도에서만 높게 나타났다. ALA에 대한 벼의 약해와 피의 약효반응은 담수보다는 건답상태에서는 높게 나타났다. ALA의 처리 후 조건에 따른 약효의 차이는 처리 후 일정시간 암 치상한 것이 지속적으로 광에 노출시킨 것에 비해 약간 높은 효과를 나타내었고 처리농도가 증가함에 따라 생장이 감소되었다. ALA를 농도별로 처리한 배지에 나리의 인편배양에서 생육과 분화정도의 변화는 낮은 농도에서 10^{-8}, 10^{-6}, 10^{-5}M 처리에서 무처리에 비해 초장 및 생체중 등의 생육이 증가되었고 하나의 인편으로부터 재분화된 구와 잎 및 뿌리도 무처리에 비해 많았다. ALA 단제 및 살충제 파밤탄과의 상호 살충작용에 있어서 ALA 10배(10mM)에서 암치상기간이 없을 경우엔 3일째에 90%를 나타냈으며 16시간의 암치상 유지 후의 광 노출시에는 100%의 살충률을 나타내었다. 파밤탄과 ALA 10배액(10mM)를 혼합하여 시험한 결과 암치상을 한 경우 2일째부터 90% 이상의 살충률을 보였고 상승효과가 있었으나 암처리 하지 않은 경우에도 70%의 살충률만을 보였다. 점박이응애에 대해서는 파밤나방에 비해 높은 살충률을 나타냈다. 약효 지속성을 알아보기 위해 ALA의 토양혼합 처리 후 5일 간격으로 파종된 배추의 생육은 처리 직후(처리 후 0일 째) 파종된 배추는 지상부와 지하부 생육 및 엽록소 함량 모두 ALA의 농도 증가에 따라 급격히 생장이 감소되었으나 5일째 파종된 배추의 경우는 무처리에 비해 약간 감소되었으나 처리 후 10일째 이후의 파종에서는 ALA의 모든 처리 농도에서 무처리와 유사한 생육을 보여 ALA가 토양처리된 후 급격히 소실됨을 알 수 있었다. 토양 내 ALA의 잔류량 변화는 처리 직후에만 농도에 따라 그 함량이 변화하였고 5일 후에는 처리 농도에 따라 그 잔류량이 아주 적었고 10일째와 15일째 그리고 20일째에는 거의 잔류되어 있지 않았다. 따라서 ALA는 토양처리 직후 5일 이내에 토양에 흡착 또는 유실되 약효가 오래 지속되지 못한 것으로 나타났다. 포장적용시험에서 작물별 다소간의 차이는 있지만 약해 발생은 전 작물에서 발생되었다. 잡초종 간에도 뚜렷한 선택성이 없이 15mM 이상의 농도에서는 90%이상의 잡초방제 효과를 볼 수 있어서 비록 높은 살포량이 요구되지만 ALA는 비선택성 경엽처리제로서 비경지에 적용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다. ALA가 콩의 내염성에 미치는 영향을 검토한 결과 지상부 건물중의 변화는 초장의 경우보다도 NaCl 처리에 의한 감소가 처리농도가 증가할수록 뚜렷하게 타나났고 ALA의 처리에 의한 stress 경감 효과가 더 크게 나타나 NaCl 60과 90mM에서 ALA를

10^{-7}M 처리한 결과 각각 33과 45% 증가하였다. ALA처리에 따른 피의 형태 해부학적인 변화는 농도가 증가함에 따라 외부로부터 표피와 엽육세포의 수축으로 인해 엽신의 두께가 감소되었으며 세포의 수축 및 붕괴가 관찰되었다.

SUMMARY

1. Effects of 5-Aminolevulinic acids on arowth and inhibition of several plant

The purpose of this study is to investigate the positive or negative effects of 5-aminolevulinic acid (ALA) on the growth of several crops and weeds, by applying a seed soaking treatment, foliar treatment, and application timing, while comparing biological activity between ALA produced by chemical synthesis (Synthetic-ALA) and extracellularly-accumulated ALA by overexpressing the hemeAgene isolated from *Bradyrhizobium japonicum* (Bio-ALA). Seed soaking treatment of ALA in barley (five cultivars) and wheat (five cultivars) had not shown positive effects at lower concentrations, 0.05 to 0.5 mM as well as negative effects at higher concentrations, 1 to 30 mM. In rice, there also was no positive effect by seed soaking treatment of ALA at lower concentrations, although the rice became damaged by an application of 5 and 10 mM ALA. Growth in barley cultivars, Ganghossalbori, Naehanssalbori, Songhakbori, Saessalbori, and Daehossalbori were increased up to 14%, 19-51%, 17-64%, 18-23%,and 22-38% by ALA foliar application at lower concentrations, 0.05 to 0.5 mM, respectively. On the other hand, the growth in barley cultivars was inhibited by ALA foliar application at higher concentrations. Barley responded more positively to ALA foliar application than wheat and rice. The growth stimulation caused by ALA seed soaking treatment was less than by ALA foliar treatment. ALA treatment at the 1.5-leaf stage increased growth of barley by 19-58%, while pretreatment to seeds, post-emergence treatment at 3 days after seeding, 3-leaf stages, and 5-leaf stages had not shown positive effects. Thus, the positive effects of ALA on barley were dependent greatly upon the timing of application and its concentration. Monocots weeds were more sensitive to ALA foliar treatment than dicotyledonous weeds. A monocot weed, *Setaria viridis* L. was the most susceptible plant to ALA

while a dicotyledonous weed, *Plantago asiatica* L. was the most tolerant. No significant difference in biological activity between bio-ALA and synthetic ALA on barley, wheat, rice, and weed, *Ixeris dentate* tested was observed. Thus, ALA produced by microorganisms would be a potent substance to be used effectively in agricultural production.

2. Mechanism of promotive effect and herbicidal action of 5-Aminolevulinic acid on barley and wheat

The role of 5-aminolevulinic acid (ALA) as an intermediate of the biological tetrapyrrole synthesis or a herbicide is well documented. In the present report, to elucidate mechanism of promotive effects and herbicidal action of ALA, this compound was applied to 1.5 leaf stages of barley and wheat at lower (0.05, 0.1, and 0.5 mM) and higher (5, 10, and 30 mM) concentrations. Shoot fresh weight in barley and wheat was increased up to 12-26% and 3-9% by ALA at lower concentrations, respectively. On the other hand, the shoot fresh weight in barley and wheat were inhibited up to 23-92% and 34-83% by ALA at higher concentrations, respectively. The capacity for ALA synthesis was much higher in barley than in wheat at 5, 10, 15, 20, and 25 days after seeding. When the barley and wheat plants were applied on 5 mM of ALA solution in darkness for 12 hrs and then exposed to light, rapid electrolyte leakage, reduction of chlorophyll content, and increase of lipid peroxidation from the plants occurred. The herbicidal action in the barley was similar to those of wheat. Although porphyrin intermediate, protochlorophyllide, Mg-protoporphyrin Ⅸ, and protoporphyrin Ⅸ (Proto Ⅸ) were accumulated with 5 mM of ALA treatment, the ratio of accumulated of Proto Ⅸ was the greatest among the tested porphyrin intermediate. It reached more than 23 and 26-fold of control of barley and wheat after 12 hrs in darkness. The accumulation of Proto Ⅸ was much greater after the

12-hrs treatment in darkness than that after the 4-hrs treatment in light. The ratios of other porphyrins were small and changed little in both 12 hrs treatment in darkness and 4 hrs treatment in light. It is considered that phytotoxic action of ALA to barley and wheat is caused by the phytodynamic action of accumulated Proto Ⅸ.

3. Effect of ALA on growth promotion of barley and radish, and herbicidal action of barnyardgrass and Indian jointvetch under various environmental conditions

The purpose of this study is to investigate the effects of 5-aminolevulinic acid (ALA) on the growth promotion of barley and radish, and herbicidal effect of barnyardgrass and Indian jointvetch under various environmental conditions such as temperature, light intensity, and water levels. The effect of ALA on growth promotion of barley was not observed under adverse environment such as low temperature and low light intensity conditions. However, the effect of ALA on shoot fresh weight of barley was increased under saturated water condition. The root fresh weight of radish under low temperature, high temperature, high light intensity, and saturated water conditions was increased up to 50-60%, 50%, 70-80%, and 70% by ALA application at lower concentrations, 0.05 to 0.5 mM, respectively. On the other hand, the herbicidal effect of barnyardgrass by ALA application under different temperature conditions was higher in 20℃ and 30℃ conditions than in 10℃ condition. In addition, herbicidal effect of barnyardgrass by ALA application was higher in high light intensity, 200 and 400 μmol m^{-2} s^{-1} than in low light intensity, 20 μmol m^{-2} s^{-1}. The herbicidal effect of barnyardgrass by ALA application under flooded water condition was higher than in saturated water condition. The inhibitive level of shoot fresh weight of Indian jointvetch by ALA application under 10℃ and 20℃ conditions was higher than 30℃ condition. The

inhibitive level of shoot fresh weight of Indian jointvetch by ALA application at 5 mM and 10 mM under light intensity, 200 and 400 μmol m^{-2} s^{-1} was higher than in low light intensity, 20 μmol m^{-2} s^{-1}. The inhibitive level of shoot fresh weight of Indian jointvetch by ALA application under flooded water condition was lower than in normal water and saturated water conditions. Thus, the effect of ALA on growth promotion of crops, and herbicidal action of weeds under adverse environmental conditions was confirmed.

4. Herbicidal activity of single ALA and its mixture with other herbicides

Biological activity of δ-aminolevulinic acid (ALA), an intermediate for the biosynthesis of tetrapyrroles such as chlorophyll was examined to determine the variation in phytotoxic potential against different plant species as affected by different application methods and target plants through petri-dish and pot tests. No significant difference in herbicidal activity between mcrobiologically-produced ALA (Bio-ALA) and a synthetic ALA (Syn-ALA) was observed in a bioassay against rice, alfalfa, barnyardgrass and Chinese cabbage. Alfalfa showed the most tolerant response to ALA in both pre- and post-emergence application, and followed by rice. With post-emergence application, ALA at 2 to 4mM reduced shoot and root growths of Chinese cabbage and barnyard grass completely. Herbicidal effects of ALA were more enhanced in the treatment combined with 2,2-dipyridyl than single application in barnyard grass and Chinese cabbage. At 2 to 8 mM ALA, soybean and cornwas more tolerant to ALA than eclipta and barnyardgrass, showing higher plant height and fresh weight. By means of HPLC analysis, it demonstrated that ALA-treated corn and soybean (2.8 and 0.5 time(s) of control) accumulate more amounts of tetrapyrrole inthe dark than barnyardgrass (74 times of control), indicating less photodynamic acivity when light was exposed. The results showed that the accumulated tetrapyrroles act as potent photodynamic

sensitizers during the subsequent light period and results in the death of susceptible plants in a matter of hours. Younger plants were more susceptible responses to the ALA with increasing of concentration. than older plants, as like general phenomena of herbicides. To enhance the herbicidal activity of ALA, oxyfluorfen at low concentrations was mixed with ALA and the results showed that combined application of two compounds showed synergic effect that reduce fresh weight and chlorophyll content in rice and barnyardgrass. Several crops including alfalfa, soybean and corn showed higher tolerance to ALA than weed species, and that post-emergence application of ALA exhibited greatest photodynamic activity against tested plants. In conclusion, the joint utilization of δ-aminolevulinic acid and other activators, such as 2,2'-dipyridyl or other herbicide was needed for the development of ALA as a new herbicide and maximization of photodynamic activity.

5. Interactive effect of ALA herbicidal activity and agricultural environments and stresses

ALA (δ-Aminolevulinic acid) has received great attention as a new biodegradable pesticide that are inhibitory to weeds but are not harmful to crops, animals, and human, and as a prodrug for photodynamic diagnosis and therapy of cancer. In addition, ALA has been reported to promote the growth and yield of rice, corn, kidney bean, potato, garlic and *Vigna* species at low concentrations, and to improve salt tolerance of cotton seedlings. ALA was named as tetrapyrrole-dependent photodynamic herbicides (TDPH) that force green plants to accumulate undesirable amount of metabolic intermediates (protoporphyrin IX) of the chlorophyll and heme metabolic pathway in darkness, namely tetrapyrrole or as a laser herbicide that is photodynamic. With post-emergence application, ALA at 2~20 mM showed differential crop injury and weeding efficacy as affected by

different cropping patterns. Crop injury and weeding efficacy of ALA were greater in dry-seeding than water-seeding condition, direct seeding than transplanting, and 10 day-old seedling than 20 day-old seedlings, respectively. ALA foliar application against test plants with post-spray dark incubation (PSDIP) exhibited more herbicidal activity than without PSDIP. Early growth and differentiation of lily were stimulated at very low concentrations of ALA through scale culture *in vitro* compared to control. ALA above 10 mM and its mixture with a insecticide lufenuron showed 90% insecticidal effect on *Spodoptera exigua* (Hubner) as well as *Tetranychus urticae* Koch. To determine residual amount of ALA and its effect Chinese cabbage seeds were planted at 5-day interval and plant height, fresh weight and chlorophyll *A* content were measured. ALA-incorporated soil was collected and ALA dose was analyzed at same interval. The results showed that at 5 days after soil applicationALA was not detected, and no herbicidal effect on Chinese cabbage was observed. At 5 days ALA-incorporated soil did not affect growth and chlorophyll content of Chinese cabbage In field experiment, crop injuries of ALA at 5～20 mM against rice, barley, soybean and Korean lawn grass exhibited upto 30% even though degree of phytotoxicity differed depending on crop species. However, ALA above 25 mM showed excellent weeding efficacy above 90% at all fields. ALA improved salt tolerance of soybean; soybean seedling treated with 30～120 mM NaCl could grow in soil containing levels as high as 10^{-7}～10^{-4}M of ALA and stimulate up to 33～45%, because the presence of ALA may cause a reductionof Na+uptake. Major morphological responses of ALA-treated barnyardgrass leaf were reduction of leaf thickness due to destruction of mesophyll and epidermal cells following severe loss of turgidity and desiccation.

CONTENTS

Summary ····· 2
Contents ····· 22

Chapter 1. Outline of the report on development of research ····· 26
Section 1. Objectives and necessities of the development of research ····· 26
1. Objectives of research ····· 26
2. Necessities of the development of research ····· 26
1) Technical scope ····· 26
2) Economical scope ····· 27
3) Social scope ····· 28
Section 2. Scope of research ····· 29

Chapter 2. Statues of research in Korea and other countries ····· 30
Section 1. Recent research trend in Korea and other countries ····· 30
Section 2. Position of the outcome of the research at the present status of progress ····· 34

Chapter 3. Contents and products of the development of research ····· 37
Section 1. Effects of 5-Aminolevulinic acids on growth and inhibition of several plant ····· 37
1. Introduction ····· 37
2. Materials and methods ····· 39
1) Chemicals ····· 39
2) Seed soaking treatment with ALA ····· 39
3) Foliar treatment with ALA ····· 39
4) Effects of ALA application timing ····· 40

5) Effects of ALA on weed species ·····40
6) Comparison of biological activity between bio-ALA and synthetic-ALA ····41
3. Results and discussion ·····41
1) Seed soaking treatment with ALA ·····41
2) Foliar treatment with ALA ·····43
3) Effects of ALA application timing ·····46
4) Effects of ALA on weed species ·····48
5) Comparison of biological activity between bio-ALA and synthetic ALA ···50
4. Conclusion ·····52
Section 2. Mechanism of promotive effect and herbicidal action of 5-Aminolevulinic acid on barley and wheat ·····53
1. Introduction ·····53
2. Materials and methods ·····54
1) Plant materials ·····54
2) Growth response of wheat and barley by ALA application ·····54
3) ALA-synthesizing capacity by growth stage ·····54
4) Electrolyte leakage ·····55
5) Chlorophyll content ·····55
6) Lipid peroxidation ·····55
7) Accumulation of porphyrins ·····56
3. Results and discussion ·····56
1) Growth response of barley and wheat by ALA application and ALA-synthesizing capacity ·····56
2) Physiological response of barley and wheat by ALA application ·····58
3) Effect of ALA on porphyrins ·····60
4. Conclusion ·····63
Section 3. Effect of ALA on growth promotion of barley and radish, and herbicidal action of barnyardgrass and Indian jointvetch under

various environmental conditions ····64
1. Introduction ····64
2. Materials and methods ····65
1) Plant materials ····65
2) Growth response of barley and radish by ALA application under various environmental conditions ····65
3) Herbicidal effect of barnyardgrass and Indian jointvetch ALA application under various environmental conditions ····66
3. Results and discussion ····66
1) Promotive effect of barley by ALA application under various environmental conditions ····66
2) Promotive effect of radish by ALA application under various environmental conditions ····71
3) Herbicidal effect of barbyardgrass by ALA application under various environmental conditions ····75
4) Herbicidal effect of Indian jointvetch by ALA application under various environmental conditions ····79
4. Conclusion ····84
Section 4. Herbicidal activity of single ALA and its mixture with other herbicides ···· 85
1. Introduction ····85
2. Materials and methods ····87
1) Comparative effects of bio-ALA and synthetic-ALA ····87
2) Variation in herbicidal activity by different application methods ····87
3) Phytotoxicity and weeding efficacy on target plants ····87
4) Development of the optimized formulations with surfactant addition ····88
5) Combined effect of ALA and a DPE herbicide oxyfluorfen ····88
6) Combined effect of ALA and a Bipyridylium herbicide paraquat ····88

7) Combined effect of ALA and a SU herbicide nicosulfuron ·····88
3. Results and discussion ·····88
1) Comparative effects of bio-ALA and synthetic-ALA ·····88
2) Variation in herbicidal activity by different application methods ·····94
3) Phytotoxicity and weeding efficacy on target plants ·····99
4) Development of the optimized formulations with surfactant addition ·····105
5) Combined effect of ALA and a DPE herbicide oxyfluorfen ·····106
6) Combined effect of ALA and a Bipyridylium herbicide paraquat ·····107
7) Combined effect of ALA and a SU herbicide nicosulfuron ·····108
4. Conclusion ·····112
Section 5. Interactive effect of ALA herbicidal activity and agricultural environments and stresses ·····114
1. Introduction ·····114
2. Materials and methods ·····118
1) Interaction of ALA with cultivation environments ·····118
2) Interaction of ALA with other compounds ·····119
3) Persistence and residual effect of ALA in soil ·····120
4) Field experiments on performance of ALA ·····121
5) Effect of ALA on stress tolerance of crops ·····123
3. Results and discussion ·····124
1) Interaction of ALA with cultivation environments ·····124
2) Interaction of ALA with other compounds ·····130
3) Persistence and residual effect of ALA in soil ·····134
4) Field experiments on performance of ALA ·····138
5) Effect of ALA on stress tolerance of crops ·····146
4. Conclusion ·····152

Chapter 4. Achivements and contribution of the studies to the related fields ·····155
Section 1. Objectives of the research ·····155
Section 2. Yearly objectives of the research ·····157
Section 3. Standpoints of evaluation and accomplishment of the research ·····159

Chapter 5. Plans for the application of the research ·····160
Section 1. Necessities for further research ·····160
Section 2. Applications to other studies ·····160
Section 3. Research results ·····161

Chapter 6. References ·····162

목 차

요 약 문 ····2
목 차 ····22

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····26
제1절 연구개발의 목적 및 필요성 ····26
1. 연구목적 ····26
2. 연구필요성 ····26
가. 기술적 측면 ····26
나. 경제·산업적 측면 ····27
다. 사회·문화적 측면 ····28
제2절 연구개발 범위 ····29

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····30
제1절 국내외 연구동향 ····30
제2절 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 ····34

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····37

제1절 다양한 식물종의 생장촉진과 억제에 관한 5-Aminolevulinic Acid의 효과 ····37
1. 서론 ····37
2. 재료 및 방법 ····39
가. 사용약제 ····39
나. 종자 침지 처리 ····39
다. 경엽 처리 ····39

라. 처리 시기별 효과 ·····40
마. 잡초 종류별 ALA 처리효과 ·····40
바. Bio 및 합성 ALA의 활성 비교 ·····41
3. 결과 및 고찰 ·····41
가. 종자 침지 처리 효과 ·····41
나. 경엽 처리 효과 ·····43
다. 처리 시기별 효과 ·····46
라. 잡초 종류별 ALA 처리 효과 ·····48
마. Bio 및 합성 ALA의 활성비교 ·····50
4. 결과요약 ·····52
제2절 보리와 밀에 관한 5-Aminolevulinic Acid의 생장촉진과 제초작용 기작 ·····53
1. 서론 ·····53
2. 재료 및 방법 ·····54
가. 식물재료 ·····54
나. ALA 처리에 의한 밀과 보리의 생장반응 ·····54
다. 생육단계별 ALA 측정 ·····54
라. 세포내 전해물질의 누출 ·····55
마. 엽록소 파괴 ·····55
바. 지질과산화 작용 ·····55
사. Porphyrins 분석 ·····56
3. 결과 및 고찰 ·····56
가. ALA 처리에 의한 보리와 밀의 생장 반응 및 ALA 축적량 비교 ·····56
나. ALA 처리에 의한 보리와 밀의 생리적 반응 ·····58
다. Porphyrin에 관한 ALA 효과 ·····60
4. 결과요약 ·····63
제3절 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 보리와 무의 생장촉진과 피와
자귀풀의 제초 효과 ·····64
1. 서론 ·····64

2. 재료 및 방법 ·····65
가. 식물재료 ·····65
나. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 보리와 무의 생장반응 ·····65
다. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 피와 자귀풀 방제효과 ·····66
3. 결과 및 고찰 ·····66
가. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 보리의 생장촉진 효과 ·····66
나. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 무의 생장촉진 효과 ·····71
다. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 제초효과 ····· 75
라. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 자귀풀의 제초효과 ·····79
4. 결과요약 ·····84
제4절 ALA 단제 및 다른 제초제와의 혼제에 의한 제초활성 연구 ·····85
1. 서론 ·····85
2. 재료 및 방법 ·····87
가. 천연(Bio) 및 합성(Synthetic) ALA의 약효 발현의 특성 ·····87
나. ALA 처리방법별 약효시험 ·····87
다. 적용 식물의 약해 및 약효반응 연구 ·····87
라. 적정 제형 개발시험 ·····88
마. ALA+DPE계 제초제와의 상호작용 연구 ·····88
바. ALA+Bipyridylium계 제초제와의 상호작용 연구 ·····88
사. ALA+Sulfonylurea계 제초제와의 상호작용 연구 ·····88
3. 결과 및 고찰 ·····88
가. 천연(Bio) 및 합성(Synthetic) ALA의 약효 발현의 특성 ·····88
나. ALA 처리방법별 약효시험 ·····94
다. 적용 식물의 약해 및 약효반응 연구 ·····99
라. 적정 제형 개발시험 ·····105
마. ALA+DPE계 제초제와의 상호작용 연구 ·····106
바. ALA+Bipyridylium계 제초제와의 상호작용 연구 ·····107
사. ALA+Sulfonylurea계 제초제와의 상호작용 연구 ·····108

4. 결과요약 ·····112
제5절 ALA의 농업환경 및 Stress와의 상호작용 연구 ·····114
1. 서론 ·····114
2. 재료 및 방법 ·····118
가. 재배환경과의 상호작용 ·····118
나. 타화합물과의 상호작용 ·····119
다. 약효 지속성 연구 ·····120
라. ALA의 포장 적용시험 ·····121
마. ALA의 작물 stress 내성반응 연구 ·····123
3. 결과 및 고찰 ·····124
가. 재배환경과의 상호작용 ·····124
나. 타화합물과의 상호작용 ·····130
다. 약효 지속성 연구 ·····134
라. ALA의 포장 적용시험 ·····138
마. ALA의 작물 stress 내성반응 연구 ·····146
4. 결과요약 ·····152

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ·····155
제1절 연구개발 목표와 내용 ·····155
제2절 연차별 연구개발 목표와 내용 ·····157
제3절 연구평가의 착안점 및 달성도 ·····159

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ·····160
제1절 추가연구의 필요성 ·····160
제2절 활용계획 ·····160
제3절 본 연구과제를 통해 얻어진 연구실적 ·····161

제 6 장 참고문헌 ·····162

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구목적

본 연구는 ALA의 작용기작 구명과 ALA를 이용한 생물농약을 개발하기 위하여 수행되었다. 첫 번째 연구목적은 광역학적인 효과로 식물체에 고사현상을 초래하는 ALA를 처리하여 적정 약량, 검정식물을 결정하고 생육단계별, 식물종간, 식물기관간에 선택활성 반응, 식물생리생화학적 반응 및 환경에 대한 안정성 여부를 확인하는데 있다. 두 번째 연구목적은 저농도에서는 생장촉진제 또는 재해 완충제로, 고농도에서는 제초제로의 개발 목적으로 단제는 물론, 기존의 제초제 및 다른 천연생리활성물질들과의 상호작용 연구를 통해 농약사용의 감량화 및 전천후 농약으로서의 이용성 증대와 농업환경과의 상호작용 및 stress 경감효과를 검토하여 실지로 논과 밭에 ALA를 사용 가능성을 증대하는데 있다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

ALA의 다목적 유용성: 현재 일본, 미국에서 생물 제초제/살충제(bio-herbicide /insecticide), 광역학적 암 치료제(cancer drug for photodynamic therapy)로서 ALA의 농업 및 의학 분야에서의 관심이 커지면서 연구가 활발하게 진행 중이므로 국내에서도 이에 대한 관심과 연구가 절실히 요구되고 있는 실정이다. 또한 농도에 따른 생장 촉진 및 억제제로 다목적인 작물보호제로 개발 가능성이 높다.

농약사용의 감량화: 유해생물의 농약에 대한 저항성 발생증가는 또한 새로운 농약의 출현을 요구하기에 충분하다. 대부분의 상품화된 화학물질은 천연화합물보다 상대적

으로 환경적 반감기가 길며 높은 독성학적 특성을 갖는 할로겐화된 탄화수소들이다. 그래서 천연화합물을 이용한 농약탐색에 관심이 증가되고 있다. 우리의 농업 역시 인간, 환경과 식품에 안전성 확보를 위하여 농약 및 화학비료의 적정량 내지 감량 사용은 물론 저에너지 투입형의 지속적 농업으로 전환이 필요하다.

유기합성농약의 대체 또는 협력수단**:** 기존의 화학적 방법으로만 치중해 온 합성화학물질을 병해충 및 잡초 방제를 위한 생물농약이란 새로운 수단으로 대체 또는 협력 활용함으로써 인축에 안전하고 친환경적이며 지속적이고 경제적인 농업생산에 일조한다.

나. 경제・산업적 측면

환경친화적인 생물농약 및 효과적인 생산공정의 개발은 차세대 생물산업의 핵심분야: 21세기형 생물농약 개발은 국제경쟁력을 확보하고 과학기술선진국으로 도약해야 할 우리 나라의 현시점에서 매우 중요한 과제이다. 현재까지 전세계적으로 생물농약의 개발은 극히 미진한 상태이며, 특히 전세계 농약시장 제초제 중 미생물이 생산하는 생물제초제는 아직도 극히 미미할 뿐만 아니라 특히 상업화되는 비율이 거의 없는 형편이다.

제조 비용, 시간 및 노력이 화학합성농약에 비해 저렴: 상업적으로 유용한 농약을 발견하기 위해 선발되어야 하는 화합물의 수가 급속도로 증가와 함께 합성농약의 개발을 위한 비용, 시간 및 노력이 크게 투입되기 때문에 미생물 농약 등의 새로운 물질 탐색에 대한 전략 수립이 요청되고 있다.

기존의 화학적 방법을 통한 작물보호체계에 대체 또는 협력으로 합성농약의 원제수입에 대한 대외 의존도를 줄임: 현재의 농경지에서의 유해생물방제는 거의 대부분이 유기합성 화합물인 농약으로만 의존할 수밖에 없는 실정이어서, 합성농약 처리에 의한 방제부담은 절대적으로 막대하다고 볼 수 있다. 따라서 전적으로 원제수입에 의존하

는 우리로서 그 부담을 줄이기 위해 미생물로부터 천연활성물질의 발견은 농업생태계에서 현재의 화학적, 기계적, 및 재배적인 유해생물 방제법을 대체 또는 협력하는 새로운 작물보호전략으로 개발하고 이용이 필요하다.

ALA 자체가 갖는 다목적 유용성으로 인해 의약 등 타 분야에 대한 기초정보 제공이 가능: 광역학적인 암치료 효과, 광역학적인 살충 및 제초 효과 외에도 한발, 침관수, 및 염해 등을 극복하는 재해 경감제 개발로 산업적 경제적 파급효과가 클 것으로 기대된다.

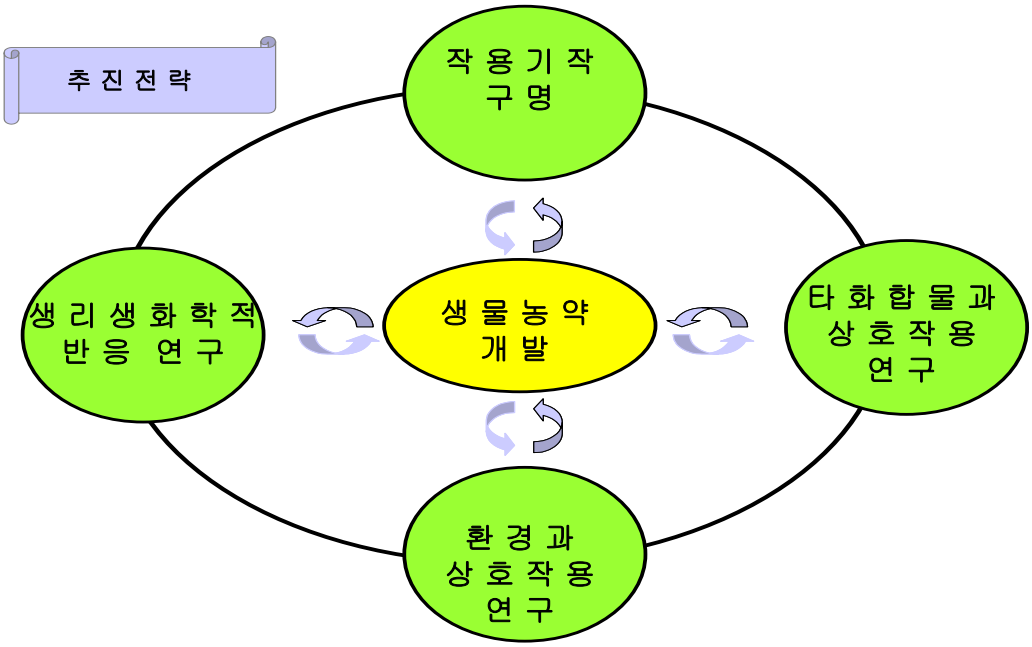
다. 사회·문화적 측면

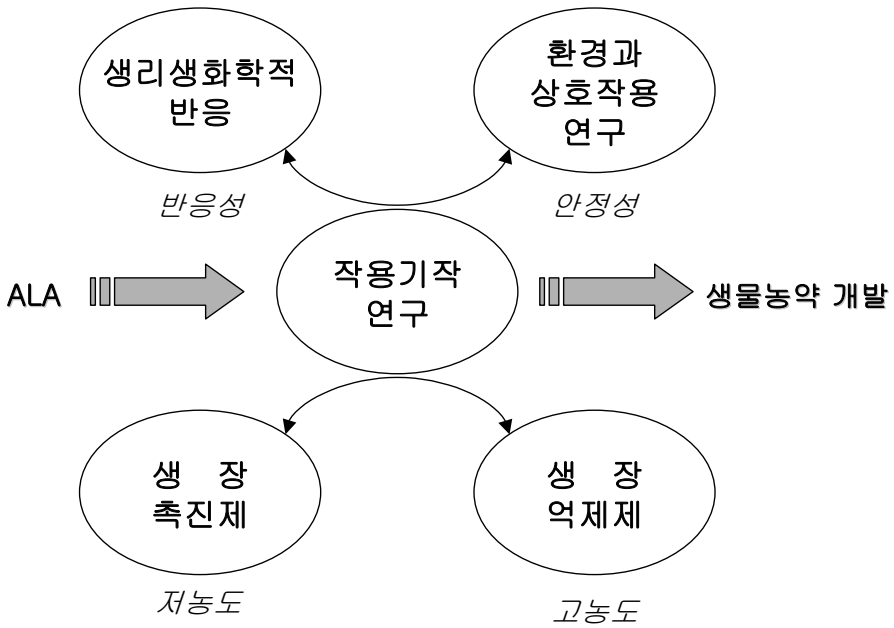
생물농약 개발 요구: 국내외적으로 자연생태계 보존과 다양성이 강조되는 지구환경문제가 제기되고 있는 가운데, 화학물질로부터 자연 및 농업생태계에 있어서 오염 최소화를 위한 환경 친화적인 생물농약의 개발이 요구된다.

생물농약 개발은 생물농업의 핵심: 친환경농업, 합성농약의 대체수단, 안전 농산물생산, 새로운 자원의 산업화를 위한 생물농업의 핵심이다.

무공해 생분해성 천연 신농약: 좀 더 환경에 친화적이고 인축에 대해 안전하며, 선택적이고 효과적인 무공해 생분해성 천연 신농약 개발로 생태적으로 건전하고 환경적으로 안전하며 사회적으로 신뢰성을 갖는 유해생물 방제법과 작물보호체계를 확립할 수 있다.

제2절 연구개발 범위


추 진 전 략
작 용 기 작 구 명
생 리 생 화 학 적 반 응 연 구
생 물 농 약 개 발
타 화 합 물 과 상 호 작 용 연 구
환 경 과 상 호 작 용 연 구


생리생화학적 반응
환경과 상호작용 연구
반응성
안정성
ALA
작용기작 연구
생물농약 개발
생 장 촉진제
생 장 억제제
저농도
고농도

제2장 국내외 기술 개발 현황

제1절 국내외 연구동향

1. ALA 생합성

화학적 합성과 미생물학적 합성: 5-Aminolevulinic acid(ALA)는 모든 유기체(동물, 식물, 미생물)가 거치는 테트라피롤 생합성(e.q., heme, chlorophyll, bacteriochlorophyll 및 vitamin B_{12}) (Fig. 1) 과정의 필수적인 전구체로서 탄소 5개의 지방족 화합물이다. ALA의 화학적 합성은 매우 많은 단계의 반응이 수반되지만 수율이 매우 낮은 반면 미생물을 이용한 ALA의 생합성은 단순한 생물반응 공정으로써 상업적 생산 가능성이 매우 큰 것으로 기대된다.

ALA 생합성 경로: C_4 및 C_5의 두 가지 경로가 있다. C_4 경로에 의한 ALA 생합성은 글리신과 숙신산(succinyl-CoA)의 축합 반응에 의해 이루어지는데 40,000-60,000 dalton의 이량체로 존재하는 ALA synthase(ALAS)에 의해 이루어진다. 그러나 ALA는 6개의 단량체로 구성된 ALA dehydratase(ALAD)에 의해 매우 빠르게 분해되기 때문에 ALA의 축적을 위해선 ALAD의 효과적인 저해가 필요하다(Fig. 2). 이와 같은 C4 경로에 의한 ALA합성은 동물, 곰팡이, 몇몇 영양생물(Chemotrophs)과 홍색 비유황 광합성 세균(purple non-sulfur photosynthetic bacteria)와 같은 미생물에서 관찰된다. 그러나, C_5 경로에서는 형질전환 과정을 통해 ALA가 생성되며 주로 식물, 조류, 대장균 등에서 발견되고 있으며, 이 경로는 글루탐산(glutamate)으로부터 글루타밀-tRNA 합성효소(glutamyl-tRNA synthetase), 글루타믹-tRNA 수소 이탈 효소(glutamic-tRNA dehydrogenase) 및 글루탐산-1-세미알데히드(glutamate-1-semialdehyde: GSA) 아미노기 전이효소(transaminase)에 의한 일련의 반응에 의해서 ALA로 전환된다. 분자 생물학적인 ALA 생합성 경로는 ALA 영양 요구 변이주(ALA auxotrophy)의 분리를 통하

여 밝혀졌는데, C_4 경로의 ALA 신타아제 유전자는 두 가지의 동위효소(isozyme) hemA 및 hemT가 존재하는 것으로 밝혀졌고, 반면에 C_5 경로는 hemA, hemL및 hemM유전자들에 의하여 구성되어 있다고 한다. 현재, ALA는 복잡한 유기 합성법을 이용하여 생산하고 있으나(참조: Beale S.I., et al., Phytochemistry,18:441(1979)), 생산단가가 높아 채산성이 없으므로 미생물의 발효를 이용한 ALA의 생산법 및 그 이용에 관한 연구들이 진행되고 있다(참조: Sasaki K., et al., J. Ferment.Technol., 65:511(1987); Sasaki K., et al., Biotechnol. Lett., 15:859(1993); Tanaka T., et al., Biotechnol. Lett.,13:589(1991); Janschen R., et al., FEMS Microb. Lett., 12:167(1981); Kipe-Not J.A. and Steven S.E., PlantPhysiol., 65:126(1980); Beale S.I., and Castelfranco P.A., Plant Physiol., 53:297(1974)).

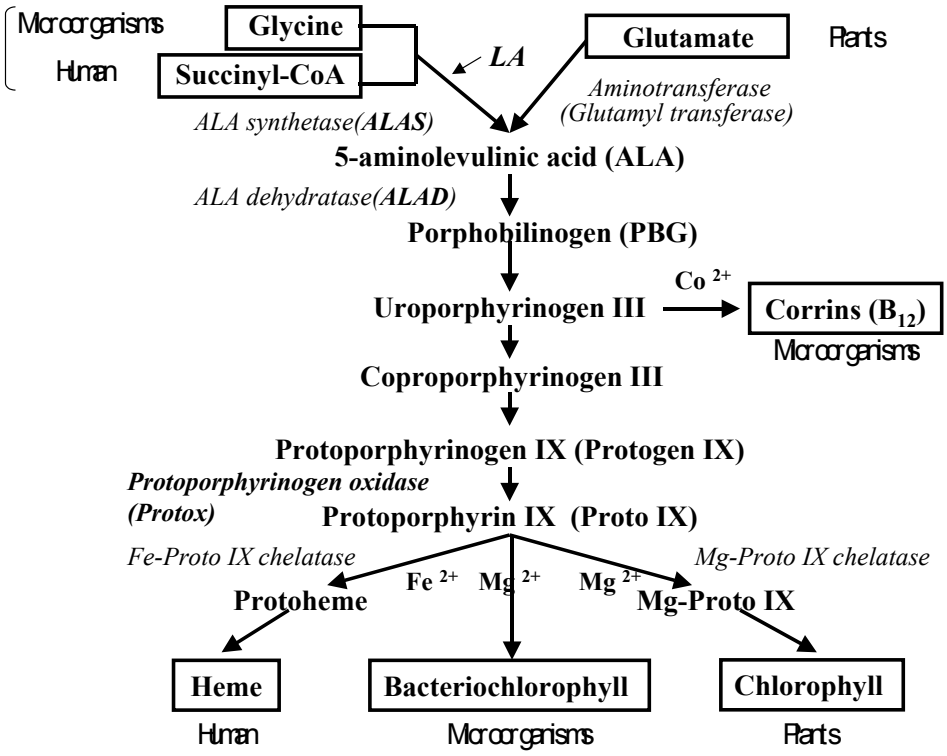


Fig. 1. Biosynthetic Pathway of Porphyrin

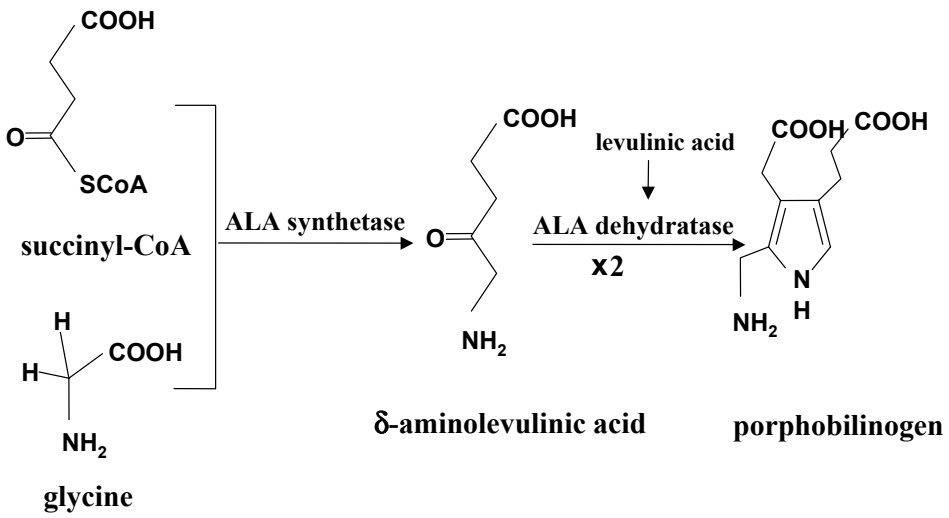


Fig. 2. Catalyzed reaction of ALA δ-aminolevulinic acid by ALAS and ALAD.

2. ALA의 이용

인체에 대한 안전성: ALA는 인체에 무해한 생분해성 제초제 및 살충제, 환경 친화적인 생물 농약 및 생장촉진제, 광역학적 암치료제(Grebenova 등, 1998)로서 관심을 끌고 있다. 인간을 포함한 생물체내 porphyrin 생합성의 전구체로서 천연 대사물질인 ALA는 인체, 가축 및 농작물에 무해함과 동시에 잡초와 유충만을 선택적으로 죽이는 생분해성 제초제/살충제로서 응용 가능성이 제시되고 있다.

의약부문: ALA는 의약부문에서 피부암 치료제 및 미생물 저항성 약품 등 생물활성 물질로 이미 상품화되어 사용되고 있어, FDA에서 승인된 악성종양치료용 광역학치료법 (PDT: Photodynamic theraphy)의 포토센시타이저 (Photosensitizer)로서 널리 이용되고 있다. 악성종양 부위에 ALA의 투여로 세포 내 포르피린(porphyrin), 특히 헴 생합성 경로의 최종 전구체인, protoporphyrin Ⅸ(Proto Ⅸ)의 농도가 급증되어 가시광선의 조사에 손상을 입혀 종양을 선태적으로 사멸시키는 것으로 밝혀졌다. 반면에, 정상

세포는 ALA의 흡수가 종양 세포에 비하여 낮고 또한 느린 성장속도로 인하여, 상대적으로 축적되는 Proto Ⅸ의 농도가 낮으므로, 빛의 조사로 인한 손상이 낮은 것으로 밝혀졌다.

환경 친화형의 생물농약: 대상식물에만 독성을 주며 인축에 무독하고 선택성이 탁월하고 생분해가 가능한 것이 필연적인 요구조건이 되어야 한다. ALA는 제초제 뿐만 아니라 낮은 농도에서 사용 될때는 식물광합성의 증진, 호흡저해 및 이산화탄소의 동화를 촉진시켜 생장을 촉진시킨다(Hua Z., et al, Cancer Research. 55:1723(1995); Matsumoto T.H., et al., Weed Research, 37:60(1992); Matsumoto T.H., et al., Resticide Biochemistry, 48:214(1994); Rebeiz N., et al, Photochem. Photobiol., 55: 431 (1995))고 보고되었다.

식물생장조절제, Stress 경감제로 이용 가능성: 낮은 농도에서 사용할 때 식물 광합성의 증진, 호흡의 저해 및 이산화탄소의 동화를 촉진시켜서 성장을 촉진시키는 효과가 있어(참조: Hua Z., et al., Cancer Research. 55:1723(1995); Matsumoto T.H., et al., Weed Research, 37:60(1992); Matsumoto T.H., et al., Pesticide Biochemistry, 48:214(1994); Rebeiz N., et al., Photochem. Photobiol., 55: 431(1995)), 볍씨를 1 내지 3 ppm의 ALA용액에 1 내지 48 시간 침지 후, 파종을 하였을 경우 초장, 무게 및 뿌리의 성장이 촉진되는 것으로 보고된 바 있고 NaCl에 대한 내성 발현에 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있어 작물 내재해성을 극복하는데 중요한 역할을 할 것으로 기대한다.

3. 식물에서 ALA의 제초기작

Tetrapyrrole 의존형 제초제: ALA는 TDPH(Tetrapyrrole-dependent photodynamic herbicide)형 제초제(REBEIZ,et al, 1984)로 분류된다.

암조건에서 녹색식물에 의한 흡수와 tetrapyrrole의 축적: 녹색식물에 처리되었을 때 엽

록소와 heme 대사경로 중 대사 중간체인 tetrapyrrole이 필요 이상으로 축적된다. 이 때 광민감성 화합물(photosensitizer, P)은 광산화효과(photoxidation effect)에 의해 빛에 노출되면 상당히 반응성이 높은 삼중상태(P^*)로 전환된다.

광 하에서 세포막의 지질과산화 작용: 생성된 P^*는 산소분자와 반응하여 일중항 상태의 산소($^1O_2$, singlet O_2)가 생성된다. 이 일중항 상태의 산소는 강력한 산화제로서 자유라디칼 연쇄반응(free radical chain reaction)에 의해 감수성 식물의 세포막에 존재하는 불포화지방산으로 구성된 인지질을 산화시켜 세포막을 파괴하여 1-4시간 내에 치명적이게 만든다. (참조: Rebeiz C.A., Montazer-Zouhoor A., Hopen H., and Wu S.M., Enzyme Microb. Technol., 6:390 (1984)).

백화현상을 유도하는 제초작용: 일련의 산화 반응이 일어나 감수성 식물 잎의 인지질을 파괴하여 팽압이 상실되고 백화되어 결국 고사되는 포토다이나믹 물질이다. Tetrapyrrole 의존형은 광역학적 제초제 군과 다른 광활성 제초제—예를 들면 Paraquat와 같은 제초제는 제초활성에 tetrapyrrole 대사에 의존하지 않는—들과 차별화 된다. (Fig. 3).

제2절 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

형질전환기법을 이용한 대량생산의 체계화: 앞으로 ALA 생합성 능력이 있는 박테리아로 알려져 있는 *Rhodobacter, Rhodospirillum, Rhodopseudomonas*등과 같은 광합성 홍색세균의 형태학적/생리학적 특성 및 미생물 성장과 ALA 생산성을 비교하여 최적 미생물을 선정하고 유전공학 기술을 이용한 ALA 생합성을 극대화할 수 있는 여러 연구가 진행되거나 가시적인 성과가 나오고 있음

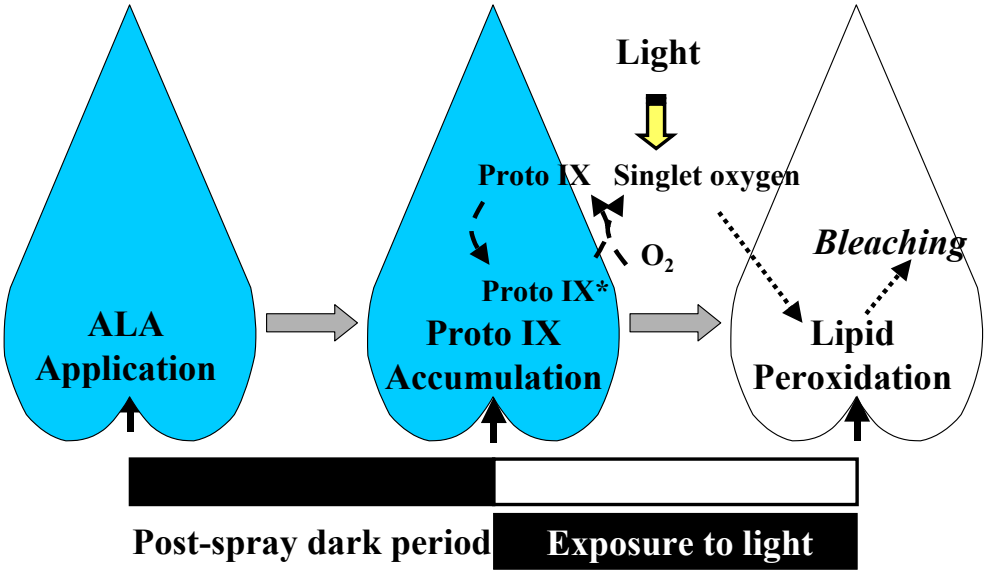


Fig. 3. Herbicidal mechanism of δ-Aminolevulinic acid. ALA forces green plants to accumulate undesirable amount of Proto IX of the chlorophyll and heme metabolic pathway in darkness. In the light, the accumulated tetrapyrroles (Proto IX) photosynthetize the formation of singlet oxygen which kills the treated plants by peroxidation of their cellular membranes as like DPE herbicides.

ALA의 다목적성 및 환경친화성으로 인한 이용성 증대: 의약 및 농업분야에서 환경친화적이며 부가가치가 높은 의약 또는 농약으로 생산하게 됨으로써 의약 및 농업부문 발전에 크게 기여

합성농약 감량사용에 기여: ALA를 단독 또는 혼합사용을 통한 화학적 및 인공 합성적인 농약에 대한 대체 또는 협력으로 기존의 농약 사용량을 줄일 수 있음

본 연구는 생물화학공학 산물과 작물보호학을 접목시키는 데 의의를 갖고 있으며 앞으로 ALA 이용의 저변화 확대를 위해 필수적인 기술이다. 지금까지 작물보호를 위해 화학적 수단위주의 병해충 잡초를 방제해 왔으나 환경오염의 최소화와 농약사용량 절감을 위해 미생물을 이용한 생물화학공학적인 방법으로 천연 생분해성 농약을 생산/개

발함으로써 기존의 농약을 대체하거나 혼용을 통해 새로운 21세기형 작물보호체계 확립을 위해 본 기술의 도입이 시급하며 생리활성 측면에서 무한한 잠재력을 갖는 ALA를 다른 농업생산활동에 적용하는 기술을 개발하여 그 이용을 증대시킬 필요성이 크다고 본다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 다양한 식물종의 생장촉진과 억제에 관한 5-Aminolevulinic Acid의 효과

1. 서론

최근 천연대사 물질인 5-Aminolevulinic acid(ALA)는 인체에 무해한 생분해성 제초제, 살충제, 친환경적인 생물 농약 및 식물 생장 촉진제, 내한성 및 내염성 증대, 광역학적인 암 치료제로서 관심을 끌고 있다.

ALA는 탄소 5개의 아미노산으로 인간을 포함한 생물체 내에 Chlorophyll과 heme 같은 tetraphyrrolle 생합성 과정의 필수적인 전구체이다(Avissar & Moberg, 1995; Granick & Sassa,1971).

ALA는 Chlorophyll 생합성 과정에서 최초의 속도 제한 단계이며(Beale,1990) 통상적으로 식물체내에는 50nmol · gFW^{-1} 이하의 매우 낮은 수준으로 ALA가 유지되고 있다(Chereskin & Castelfranco, 1982; Stobart & Ameen-Bukhari, 1984; Weinstein & Beale, 1985). ALA는 무, 강남콩, 보리, 감자, 마늘, 벼, 옥수수 같은 작물 등에서 저농도로 처리 할 경우 무처리구보다 10～60% 생육이 촉진되었다(Hotta *et al.*, 1997a; Roy *et al.*, 1998). 이러한 촉진 효과는 chlorophyll 함량 증가, 광합성 활성 증대 및 호흡 작용 억제를 통해 유발되었다(Hotta *et al.*, 1997a). 또한 ALA는 벼 유묘의 내한성((Hotta *et al.*, 1998)과 목화의 내염성을 증대시키는 것으로 보고되고 있다(Watanabe *et al.*, 2000).

그러나 비교적 높은 농도로 ALA를 처리한 경우 식물에서 제초 효과가 나타난다. 즉, ALA를 처리한 식물에서는 protoporphyrin, Mg-protoporphyrin 및 protochlorophyllide 같은 몇 가지 chlorophyll 중간물이 비정상적으로 높게 축적되어 진다(Castelfranco et al., 1974; Matsumoto *et al.*, 1994; Sundquvist, 1969). 과잉

축적된 tetrapyrrole 화합물은 일정기간 암조건에서 관리한 후 광조사를 실시하면 광산화 효과에 의해 산소와 반응하여 일중항 산소($^1O_2$)가 생성된다(Rebeiz *et al.*, 1984). 이 일중항 상태의 산소는 강력한 산화제로서 자유라디칼 연쇄반응에 의해 쌍자엽식물(주로 잡초)의 세포막에 존재하는 불포화 지방산으로 구성된 인지질을 산화시켜 식물의 세포막을 파괴하여 1~4시간내에 잡초를 치명적이게 만든다(Chakraborty & Tripathy, 1992). 이로 인하여 광역학적인 화합물은 많이 연구되고 있으며(Towers & Arnason, 1988), 실제 상업적으로 이용되고 있는(Duke *et al.*, 1991) diphenyl ether 같은 가능성 있는 제초제로 주목을 받아 왔다(Johnson *et al.*, 1978). ALA는 인간과 동물에 해가 없어 식물과 인체에 다방면으로 활용되고 있으나(Rebeiz et al., 1984; Schuitmaker *et al.*, 1996) 화학적으로 제조할 경우 매우 많은 단계의 반응(Beale *et al.*, 1979)이 수반되지만 수율이 낮고, 낮은 유용성과 경제성 때문에 상업적 거래에 널리 적용될 수 없는 많은 문제점을 안고 있다(Tschudy & Collins, 1959). Sasaki 등(1987)은 휘발성 지방산 배지를 사용하여 levulinic acid 첨가로 중성 pH에서 *Rhodobacter sphaeroides*에 의한 ALA의 세포질 추출물이 16mM까지 증가하는 것을 관찰하였다. 대장균에서 추출한 ALA synthase(합성효소)를 과압하여 추출하는 방법은 *Bradyhizobium japonicum*으로부터 *heme*A gene을 삽입하고 T7 promoter 아래서 추출하는 것에 의해 성공되었다(Choi *et al.*, 1999).

앞으로 광합성 홍색세균의 형태학적/생리학적 특성 및 미생물 성장과 ALA 생산성을 비교하여 최적 미생물을 선정하고 유전공학 기술을 이용한 ALA 생합성을 극대화할 수 있는 여러 연구가 진행되거나 가시적인 효과가 나오고 있어 의약 및 농업 분야에서 환경 친화적이며 부가가치가 높은 의약 또는 농약으로 생산하게 됨으로써 의약 및 농업부문 발전에 크게 기여할 것으로 기대될 뿐만 아니라, ALA를 단독 또는 혼합 사용을 통해서 화학적 및 인공 합성적인 농약에 대한 대체 또는 협력제로서 기존의 농약 사용량을 줄일 수 있으리라 기대된다.

따라서 본 연구는 생물화학공학 산물과 작물보호학을 접목시키는데 큰 의의를 갖고 있으며 앞으로 ALA 이용의 저변 확대를 위한 사전 준비 단계로서 생산 과정이 복잡하고 수율이 낮아 경제성이 떨어지는 기존의 합성 ALA를 대체할 Bio ALA의 제초제 또는 식물 생장 촉진제로서의 농업 부문 활용을 위해 다양한 식물종을

이용하여 종자 침지 처리, 경엽 처리, 처리 시기, 잡초 종류별 처리 효과 검증 및 Bio와 합성 ALA 사이의 생물학적 활성을 비교하였다.

2. 재료 및 방법

가. 사용 약제

화학적 합성에 의해 생산되는 ALA(합성 ALA)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에 의해 생산한 것을 사용하였고, Bio ALA는 *Bradyrhizobium japonicum*으로부터 분리된 *heme*A를 과압하여 만든(Choi *et al.*, 1999) 한국의 Environgen 회사에서 생산한 것을 사용하였다.

나. 종자 침지 처리

강호쌀보리, 내한쌀보리, 송학보리, 새쌀보리 및 대호쌀보리 5개 품종과 금강밀, 그루밀, 우리밀, 올밀 및 동해밀 5개 품종과 벼(동진벼) 종자를 사용하였는데, 벼 종자는 ALA 처리 전에 25℃의 물에 3일간 침종하여 사용하였다. 암실 조건하에서 25℃로 조절된 실험실에서 ALA 0.0001mM, 0.0005mM, 0.01mM, 0.05mM, 0.1mM, 0.5mM, 1mM, 5mM, 10mM 및 30mM의 다양한 수용액에 12시간 동안 침종한 뒤 증류수로 씻어 피트모스, 질석, 제오라이트가 섞인 시판용 원예상토 1호(흥농종묘사)가 충진된 200㎠의 포트에 파종하였다. 파종 후 하우스 온도 관리는 낮 25℃, 밤 15℃로 조절하였고, 10시간의 일조시간을 유지하여 일반 관리를 실시하였다. 처리 10일 후 식물체의 초장과 지상부의 생체중을 측정하여 무처리 생육량을 대비하여 각 처리구의 생육량을 백분율로 바꿔 SAS 프로그램(2000)을 이용하여 LSD(P=0.05) 분석을 하였다.

다. 경엽 처리

종자 침지 처리에서 사용한 보리와 밀 종자들을 원예상토 1호(흥농종묘사)가 충진된 200㎠ 포트에 파종하여 낮 25℃, 밤 15℃, 일조시간 10시간을 유지시킨 하우스에서 생육하여 파종 후 13일째(1.5엽기)에 ALA를 처리했다.

벼 종자는 25℃의 물에 4일 동안 담근 뒤 시판되는 부농상토(바이오메디아사)를 기계이앙 육묘 상자(60×30cm)에 2cm 두께로 채운 뒤 파종하여 낮 25℃, 밤 15℃, 일조시간 10시간을 유지시킨 하우스에서 생육하여 파종 8일 후 모를 200㎠ 포트에 1본씩 6주 이식하여 3cm 깊이로 물 관리를 실시하였다. 파종 13일째 (1.5엽기)에 계면활성제인 Tween 20(0.1%)이 포함된 0mM, 0.05mM, 0.1mM, 0.5mM, 1mM, 5mM, 10mM 및 30mM의 ALA수용액을 포트당 10ml씩 오후 8시에 스프레이로 경엽 처리하고 10시간 동안 암실에 두었다. 처리 10일 후에 식물의 초장과 지상부의 생체중을 측정했다. 자료는 종자처리 실험과 동일하게 분석하였다.

라. 처리 시기별 효과

ALA의 처리 시기별 효과는 내한쌀보리와 금강밀을 사용하였고, 생육 환경은 위의 실험과 동일하게 수행하였다. 계면활성제로 Tweeen 20(0.1%)를 혼합한 0.001mM, 0.005mM. 0.1mM, 0.05mM, 0.1mM, 1mM, 5mM 및 10mM의 ALA 수용액을 종자, 파종 3일 후, 1.5엽기, 3엽기 및 5엽기에 포트당 10ml씩 스프레이로 경엽 처리하였다. 다른 실험 과정들은 앞의 실험과 동일한 방법으로 실시하였다.

마. 잡초 종류별 ALA 처리 효과

단자엽 잡초로 강아지풀(*Setaria viridis* L.), 강피(*Echinochloa crus-galli* L. *var.oryzicola*), 물피(*Echinochloa crus-galli* L. *Beauv.*), 미국개기장(*Panicum dichotomiflorum* Michx.), 바랭이(*Digitaria ciliaris* Retz.)을 사용하였고 쌍자엽 잡초로 씀바귀(*Ixeris dentata* Thunb), 나도송이풀(*Phtheirospermum japonicum* Thunb), 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L.), 자귀풀(*Aeschynomene indica* L.), 취명아주(*Chenopodium glaucum* L.), 들깨풀(*Mosla punctulata* Gmel.), 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Miq.), 질경이(*Plantago asiatica* L.), 익모초(*Leonurus japonicus* Houtt.), 층층이꽃(*Clinopodium chinense* Benth.)을 사용하였다. 2엽기에 계면활성제로 Tween 20(0.1%)을 혼합한 ALA용액 0mM, 1mM, 3mM, 5mM, 10mM 및 30mM을 포트당 2ml씩 스프레이로 경엽 처리하였다. 처리 10일 후 식물을 지제부에서 절단한 후 지상부 생체중을 측정했다. 실험은 동일하게 2회 반복하였다. 자료는 무처리에 대비하여 백분율로 표시했다. 회귀분석은

SAS 프로그램(2000)을 사용하였고, GR_{50}값은 회귀방정식을 이용하여 계산하였다.

바. Bio 및 합성 ALA의 활성 비교

ALA 처리에 가장 생장 촉진 및 억제 반응이 잘 나타난 내한쌀보리, 금강밀, 동진벼 및 씀바귀(*Ixeris dentata* Thunb.)를 이용하여 Bio ALA와 합성 ALA 간의 생물학적 활성의 차이를 비교하였다. 3엽기의 보리, 밀, 벼와 2엽기의 씀바귀(*Ixeris dentata* Thunb.)를 이용하여 계면활성제로 Tween 20(0.1%)을 혼합한 Bio ALA와 합성 ALA 수용액을 각각 0mM, 0.05mM, 0.1mM, 0.5mM. 1mM, 5mM, 10mM 및 30mM을 스프레이로 경엽 처리하였다. 다른 실험과정은 앞의 실험과 동일한 방법으로 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 종자 침지 처리 효과

보리 5 품종과 밀 5 품종 및 벼 1 품종에 ALA 수용액을 종자 침지 처리하여 초장과 지상부의 생체중을 측정한 결과는 Table 1과 Table 2에서 보는 바와 같다.

ALA를 종자에 침지 처리하여 10일 후에 보리 5 품종의 초장과 지상부의 생체중은 크게 영향을 미치지 못했다. 밀의 4 품종에서도 초장과 지상부의 생체중은 증가하지 않았다. 그러나 올밀의 경우 0.001～10mM의 ALA를 처리한 결과 초장은 9～17% 증가하였으나, 지상부의 생체중은 증가하지 않았다. 벼의 경우에서도 저농도에서는 초장과 지상부 생체중이 증가하지 않았으나 상대적으로 고농도인 5mM와 10mM ALA의 종자 침지 처리에서는 초장과 지상부의 생체중이 ALA의 제초 특성으로 인하여 부분적으로 피해를 받았다. 이 실험 결과를 통하여 ALA를 종자에 침지 처리할 경우 고농도에서의 생육 억제 효과뿐만 아니라 저농도에서도 생육 촉진 효과가 없었다. 종자를 침지 처리하는 것은 경엽 처리보다 ALA에 충분히 반응하지 않는 것으로 생각된다.

Table 1. Effects of ALA on the plant height (% of untreated) of barley, wheat, and rice resulting from seed treatment. Parameters were recorded 10 days after application.

Cultivar	ALA concentration (mM)										
	0	0.001	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	LSD (0.05)
Barley											
Ganghossalbori	100^{b}	105^{ab}	107^{ab}	108^{ab}	106^{ab}	111^{a}	105^{ab}	111^{a}	111^{a}	110^{a}	9
Naehanssalbori	100^{a}	98^{ab}	98^{ab}	100^{a}	98^{ab}	97^{ab}	103^{a}	100^{a}	100^{a}	91^{b}	7
Songhakbori	100^{ab}	96^{ab}	91^{ab}	102^{a}	90^{ab}	97^{ab}	99^{ab}	97^{ab}	97^{ab}	96^{ab}	13
Saessalbori	100^{bc}	104^{b}	103^{bc}	101^{bc}	118^{a}	107^{ab}	107^{ab}	107^{ab}	107^{ab}	92^{c}	12
Daehossalbori	100^{bc}	103^{abc}	112^{a}	100^{bc}	104^{abc}	95^{c}	104^{abc}	109^{ab}	109^{ab}	100^{bc}	11
Wheat											
Geumgangmil	100^{ab}	105^{a}	96^{b}	88^{c}	104^{a}	105^{a}	99^{ab}	101^{ab}	101ab	104^{a}	7
Geurumil	100^{abcd}	91^{d}	96^{cd}	108^{a}	106^{ab}	100^{abc}	96^{cd}	99^{cd}	99cd	104^{abc}	8
Urimil	100^{a}	101^{a}	76^{b}	95^{ab}	102^{a}	103^{a}	98^{ab}	96^{ab}	96ab	94^{ab}	22
Olmil	100^{b}	112^{a}	109^{a}	117^{a}	110^{a}	109^{a}	108^{ab}	111^{a}	111a	114^{a}	9
Donghaemil	100^{abc}	99^{abc}	97^{abc}	105^{a}	102^{ab}	95^{bc}	95^{bc}	92^{c}	92c	93^{c}	8
Rice											
Dongjinbyeo	100^{a}	-	-	91^{a}	88^{ab}	92^{a}	92^{a}	88^{ab}	88^{ab}	58^{c}	20

Table 2. Effects of ALA on the shoot fresh weight (% of untreated) of barley, wheat, and rice resulting from seed treatment. Parameters were recorded 10 days after application.

Cultivar	ALA concentration (mM)										
	0	0.001	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	LSD (0.05)
Barley											
Ganghossalbori	100^{a}	91^{a}	91^{a}	85^{a}	93a	99^{a}	99^{a}	119^{a}	114^{a}	87^{a}	40
Naehanssalbori	100^{ab}	88^{b}	88^{b}	107^{ab}	107ab	87^{b}	99^{ab}	99^{ab}	120^{a}	92^{b}	26
Songhakbori	100^{bc}	115^{ab}	115^{ab}	110^{ab}	119ab	110^{ab}	100^{ab}	103^{ab}	103^{ab}	129^{a}	36
Saessalbori	100^{b}	122^{ab}	122^{ab}	110^{ab}	124ab	125^{ab}	144^{a}	123^{ab}	144^{a}	93^{b}	37
Daehossalbori	100^{a}	110^{a}	110^{a}	91^{a}	111a	98^{a}	98^{a}	87^{a}	111^{a}	90^{a}	38
Wheat											
Geumgangmil	100^{ab}	104^{ab}	104^{ab}	53^{d}	122^{a}	92^{bc}	70^{cd}	86^{bc}	97^{b}	105^{ab}	24
Geurumil	100^{bc}	105^{abc}	105^{abc}	133^{a}	119^{abc}	110^{abc}	105^{abc}	118^{abc}	114^{abc}	127^{ab}	31
Urimil	100^{abc}	110^{a}	110^{a}	96^{abc}	101^{abc}	108^{ab}	89^{bc}	98^{abc}	92^{abc}	87^{c}	19
Olmil	100^{bcde}	104^{abc}	104^{abc}	103^{abcd}	117^{ab}	84^{de}	110^{abc}	82^{e}	114^{ab}	93^{cde}	19
Donghaemil	100^{ab}	80^{bc}	80^{bc}	114^{a}	105^{ab}	99^{ab}	85^{bc}	83^{bc}	69^{c}	67^{c}	27
Rice											
Dongjinbyeo	100^{a}	-	-	69^{a}	76^{a}	85^{a}	78^{a}	99^{a}	32^{b}	12^{b}	32

나. 경엽 처리 효과

보리 5 품종, 밀 5 품종, 벼 1 품종을 이용하여 1.5엽기 때 ALA 수용액을 경엽 처리하여 초장을 측정한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다.

ALA를 0.05mM~1mM의 저농도로 처리한 보리의 내한쌀보리, 송학보리, 새쌀보리, 대호쌀보리에서의 초장은 무처리에 비교하여 각각 16~25%, 8~21%, 12~18% 및 18~31% 증가하였으나 강호쌀보리의 경우 영향을 받지 않았다. 가장 생장 촉진효과를

보인 내한쌀보리의 경우 초장은 지상부의 생체중 증가에 비해 ALA에 덜 민감하였다. 그러나 올밀을 제외한 밀 4 품종과 벼(동진벼)에서의 초장의 증가는 큰 영향을 받지 않았다.

Table 3. Effects of ALA on the plant height 9% of untreated) of barley, wheat, and rice resulting from foliar application at the 1.5-leaf stage. Parameters were recorded 10 days after application.

Cultivar	ALA concentration (mM)								
	0	0.05	0.1	0.5	1	5	10	30	LSD (0.05)
Barley									
Ganghossalbori	100^{ab}	110^{a}	110^{a}	102^{ab}	120^{a}	105^{a}	73^{bc}	67^{c}	30
Naehanssalbori	100^{c}	116^{b}	124^{a}b	125^{a}	117^{ab}	103^{c}	97^{c}	30^{d}	8
Songhakbori	100^{c}	108^{b}	113^{b}	121^{a}	111^{b}	108^{b}	89^{d}	62^{e}	7
Saessalbori	100^{b}	118^{a}	112^{a}	117^{a}	114^{a}	89^{c}	100^{b}	21^{d}	9
Daehossalbori	100^{d}	104^{d}	118^{bc}	124^{ab}	131^{a}	111^{cd}	76^{e}	10^{f}	11
Wheat									
Geumgangmil	100^{ab}	95^{ab}	107^{a}	108^{a}	107^{a}	99^{ab}	93^{b}	56^{c}	9
Geurumil	100^{ab}	103^{ab}	102^{ab}	103^{a}	104^{a}	95^{bc}	91^{c}	67^{d}	7
Urimil	100^{b}	102^{ab}	100^{b}	106^{ab}	114^{a}	85^{c}	73^{c}	44^{d}	13
Olmil	100^{c}	102^{ab}	110^{a}	110^{ab}	105^{b}	97^{c}	85^{d}	49^{e}	4
Donghaemil	100^{a}	109^{ab}	98^{ab}	103^{a}	98^{ab}	95^{ab}	91^{b}	75^{c}	8
Rice									
Dongjinbyeo	100^{a}	97^{ab}	101^{ab}	103^{a}	99^{ab}	87^{bc}	75^{c}	23^{d}	15

비록 ALA 경엽 처리가 초장의 억제에 미치는 영향이 품종마다 다를 지라도 시험된 품종 모두 10mM과 30mM의 ALA 처리는 식물체 초장을 감소시켰다. 특히 30mM이상 고농도로 처리할 때 대호쌀보리의 경우 90%의 생육 억제 효과가 있어 가장 크게 나타났고, 나머지 4개의 품종에서는 33～79%의 생육 억제 효과가 있었다.

그러나 밀에서는 우리밀이 56%의 생육 억제 효과가 나타나 가장 크게 나타났으며 나머지 4개 품종에서는 25～51%의 생육 억제 효과가 있었으며, 벼에서는 77%의 생육 억제 효과가 나타났다.

보리 5 품종, 밀 5 품종, 벼 1 품종을 이용하여 1.5엽기때 ALA 수용액을 경엽 처리하여 지상부의 생체중을 측정한 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다.

Table 4. Effects of ALA on the shoot fresh weight (% of untreated) of barley, wheat, and rice resulting from foliar application at the 1.5-leaf stage. Parameters were recorded 10 days after application.

Cultivar	ALA concentration (mM)								
	0	0.05	0.1	0.5	1	5	10	30	LSD (0.05)
Barley									
Ganghossalbori	100^{bc}	104^{abc}	114^{a}	91^{c}	113^{ab}	71^{d}	57^{e}	23^{f}	14
Naehanssalbori	100^{c}	119^{bc}	151^{a}	138^{ab}	121^{b}	55^{d}	57^{d}	11^{e}	21
Songhakbori	100^{d}	102^{cd}	117^{bc}	164^{a}	121^{b}	107^{bcd}	71^{e}	27^{f}	16
Saessalbori	100^{bc}	118^{ab}	119^{ab}	123^{a}	114^{ab}	72^{c}	59^{c}	8^{d}	20
Daehossalbori	100^{b}	122^{a}	128^{a}	138^{a}	130^{a}	68^{c}	50^{c}	9^{d}	18
Wheat									
Geumgangmil	100^{bc}	91^{c}	121a	98^{bc}	110^{ab}	68^{d}	64^{d}	40^{e}	18
Geurumil	100^{a}	100^{a}	96ab	97^{ab}	91^{ab}	67^{bc}	70^{abc}	48^{c}	31
Urimil	100^{b}	105^{b}	111b	116^{b}	169^{a}	66^{c}	64^{c}	17^{d}	17
Olmil	100^{b}	95^{b}	176a	106^{b}	126^{b}	95^{b}	38^{c}	32^{c}	44
Donghaemil	100^{b}	97^{b}	82cd	115^{a}	91^{bc}	76^{d}	57^{e}	38^{f}	12
Rice									
Dongjinbyeo	100^{cd}	107^{bc}	124^{ab}	128^{a}	107^{bc}	81^{de}	66^{e}	39^{f}	19

ALA를 0.05～1mM의 저농도로 처리할 경우 지상부의 생체중은 강호쌀보리, 내한쌀보리, 송학보리, 새쌀보리, 대호쌀보리에서 무처리에 대비 각각 13～14%,

19～51%, 17～64%, 14～23% 및 22～38% 증가하였으며 동해밀과 그루밀을 제외한 밀의 3개 품종에서도 지상부의 생체중은 미미하지만 증가하였고, 벼의 경우에도 7～28% 증가되었다.

ALA를 5mM, 10mM 및 30mM의 고농도로 처리할 경우 지상부의 생체중은 강호쌀보리, 내한쌀보리 송학보리, 새쌀보리, 대호쌀보리에서 무처리에 대비하여 각각 29～77%, 45～89%, 29～63%, 28～92% 및 32～91%의 생육 억제 효과가 나타났으며 밀의 경우 모든 품종과 벼에서 지상부의 생체중은 억제되었다.

ALA 처리로 인한 생장 촉진 효과는 초장보다 지상부의 생체중에서 더 크게 나타났다. 비록 ALA 처리 효과가 보리, 밀, 및 벼의 품종별, 식물체별, 농도별, 처리 방법에 따라 다르나 생장 촉진 효과를 볼 수 있었다. 이것은 ALA를 저농도로 처리한 옥수수, 강남콩 및 감자의 생장과 수량을 촉진시킨다는 보고(Tanaka et al., 1992; Hotta et al., 1997 a & b ; Roy & Vivekanandan, 1998)와 유사하였다. 몇 몇 작물 재배에서 이러한 생장 촉진 효과들은 식물체내에 광합성 증가와 호흡의 억제로 설명될 수 있었다.

다. 처리 시기별 효과

ALA 처리의 적당한 시기를 규명하기 위해 내한쌀보리와 금강밀을 사용하여 실험하였다. 보리의 경우 ALA의 다양한 수용액을 종자 침지 처리, 파종 3일 후 경엽 처리, 1.5엽기, 3엽기 및 5엽기 등 5가지 생육 단계별로 경엽 처리하였으며, 밀의 경우 종자 침지 처리, 1.5엽기, 3엽기에 처리하였으며 그 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다.

1.5엽기에 0.01～1mM의 저농도로 ALA를 처리한 보리의 초장은 16～25% 증가되었지만 종자 침지 처리, 파종 3일 후 경엽처리, 3엽기 및 5엽기 때 처리한 보리의 초장은 무처리에 대비하여 생육 촉진 효과가 나타나지 않았다.

한편 1.5엽기에 처리한 보리 지상부의 생체중은 Table 6에서 보는 바와 같이 무처리에 대비하여 19～51% 증가하였다. 다른 생육기에 처리한 경우 초장을 비롯하여 지상부의 생체중 증가는 나타나지 않았다.

Table 5. Effects of ALA application timing on the plant height (% of untreated) of barley and wheat. Parameters were recorded 10 days after application.

Cultivar	Application timing	ALA concentration (mM)									
		0	0.001	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10
Barley (Naehanssalbori)	Seed	100^{a}	98^{ab}	98^{ab}	100^{a}	98^{ab}	97^{ab}	103^{a}	100^{a}	97^{ab}	91^{b}
	3 DAS	100^{a}	-	-	-	100^{a}	92^{a}	99^{a}	97^{a}	-	-
	1.5-leaf	100^{c}	-	-	-	116^{b}	124^{ab}	125^{a}	117^{ab}	103^{c}	97^{c}
	3-leaf	100^{a}	-	-	-	107^{a}	102^{a}	104^{a}	98^{a}	84^{b}	72^{c}
	5-leaf	100^{a}	-	-	-	103^{a}	102^{a}	99^{a}	98^{a}	-	-
Wheat (Geumgangmil)	Seed	100^{ab}	105a	96b	88c	104^{a}	105^{a}	99^{ab}	101^{ab}	103^{ab}	104^{a}
	1.5-leaf	100^{ab}	-	-	-	103^{ab}	107^{a}	108^{a}	107^{a}	99^{ab}	93^{b}
	3-leaf	100^{a}	-	-	-	96^{b}	94^{b}	93^{b}	83^{b}	82^{b}	66^{c}

a) DAS, days after seeding

Table 6. Effects of ALA application timing on the shoot fresh weight (% of untreated) of barley and wheat. Parameters were recorded 10 days after application.

Cultivar	Application timing	ALA concentration (mM)									
		0	0.001	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10
Barley (Naehanssalbori)	Seed	100^{ab}	88^{b}	103^{ab}	107^{ab}	107^{ab}	87^{b}	99^{ab}	99^{ab}	120^{a}	92^{b}
	3 DAS	100^{a}	-	-	-	88^{b}	92^{b}	82^{b}	86^{b}	-	-
	1.5-leaf	100^{c}	-	-	-	119^{bc}	151^{a}	138^{ab}	121^{b}	55^{d}	57^{d}
	3-leaf	100^{a}	-	-	-	101^{a}	107^{a}	109^{a}	98^{a}	78^{b}	49^{c}
	5-leaf	100^{b}	-	-	-	108^{a}	106^{a}	110^{a}	111^{a}	-	-
Wheat (Geumgangmil)	Seed	100^{ab}	104^{a}	72^{cd}	53^{d}	122^{a}	92^{bc}	70^{cd}	86^{bc}	97^{b}	105^{a}
	1.5-leaf	100^{bc}	-	-	-	91^{c}	121^{a}	98^{bc}	110^{ab}	68^{d}	64^{d}
	3-leaf	100^{a}	-	-	-	98^{a}	109^{a}	99^{a}	90^{a}	78^{b}	45^{c}

a) DAS, days after seeding

또한, 밀 1.5엽기 때 경엽처리에서도 초장과 생체중의 촉진 효과를 나타냈지만, 종자 처리와 3엽기 때 처리는 생장 촉진 효과가 없었다. 따라서 보리와 밀의 생장 촉진 효과는 처리 시기와 농도에 따라 크게 좌우됨을 알 수 있었다.

라. 잡초 종류별 ALA 처리 효과

ALA가 매우 훌륭한 생장 촉진제임과 동시에 높은 농도에서 사용될 때 제초 성질을 가진다(Tanaca *et al,* 1992). 잡초 종류별 ALA의 효과를 알아보기 위하여 다양한 농도의 ALA 수용액을 경엽에 처리하였다(Table 7과 Photo 1).

Table 7. Effect of ALA on GR_{50} of monocotyledons and dicotyledons weeds resulting from foliar application at the 2-leaf stage. Parameter was recorded 10 days after application. GR_{50} values were the ALA concentrations that reduce shoot fresh weight by 50%.

Weeds		Equation	R^2	GR_{50} (mM)
Monocotyledons weeds	*Setaria viridis* L.	Y= 99.4/{1+(X/1.68)1.003}	0.95	1.6
	Echinochloa crus-galli (L.) var. *oryzicola*	Y= 109.5/{1+(X/4.3)5.46}	0.92	4.4
	Echinochloa crus-galli (L.) Beauv.	Y= 101.6/{1+(X/1.74)1.92}	0.96	1.7
	Panicum dichotomiflorum Michx.	Y= 100.7/{1+(X/4.01)1.22}	0.96	4
	Digitaria ciliaris (Retz.)	Y= 97.7/{1+(X/2.82)5.88}	0.99	2.8
Dicotyledons weeds	*Ixeris dentata* (Thunb.)	Y= 106/{1+(X/3.8)4.99}	0.98	3.9
	Phtheirospermum japonicum (Thunb.)	Y= 105.7/{1+(X/4.04)1.85}	0.98	4.3
	Xanthium strumarium L.	Y= 97.4/{1+(X/9.25)2.25}	0.99	8.9
	Aeschynomene indica L.	Y= 98.7/{1+(X/11.87)1.75}	0.92	11.7
	Chenopodium glaucum L.	Y= 135/{1+(X/6.02)3.03}	0.87	7.1
	Mosla punctulata (Gmel.)	Y= 114.7/{1+(X/9.5)4.1}	0.95	10.1
	Achyranthes japonica (Miq.)	Y= 95.7/{1+(X/12.6)0.9}	0.91	11.3
	Plantago asiatica L.	Y= 109.3/{1+(X/16.6)2.5}	0.93	17.7
	Leonurus japonicus Houtt.	Y= 90.1/{1+(X/17.96)3.96}	0.92	16.9
	Clinopodium chinense (Benth.)	Y= 108/{1+(X/12.8)2.7}	0.95	13.4

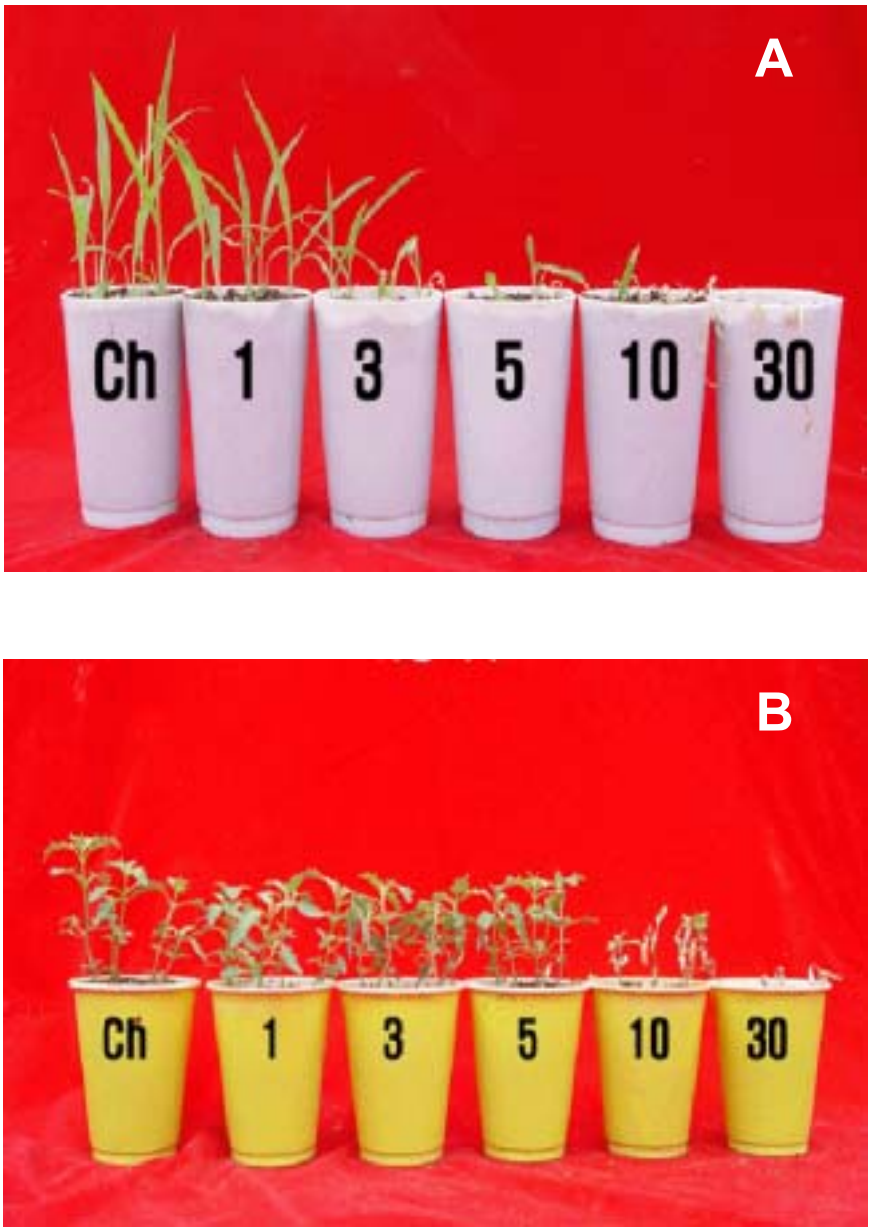


Photo 1. Effect of ALA on monocotyledons weed, *Digitaria ciliaris* (Retz.)(A) and dicotyledons weed, *Chenopodium glaucum* L.(B) resulting from foliar application at the 2-leaf stage.

GR_{50}에 기초하여 단자엽 잡초들은 씀바귀(*Ixerise dentata* Thunb)와 나도송이풀(*Phtheirospermum japonicum* Thunb)를 제외한 쌍떡잎 잡초들보다 ALA에 더 민감했다. 단자엽 잡초인 강아지풀(*Setaria viridis* L.)은 GR_{50}가 1.6mM으로 가장 민감한 식물인 반면, 쌍자엽 잡초인 질경이(*Plantago asiatica* L.)는 GR_{50}가 17.7mM로 가장 내성을 보였다.

그러나 취명아주, 겨자, 털비름, 쇠비름 등의 쌍떡잎 잡초들은 tetrapyrrole에 유도된 광역학적인 손상에 매우 민감한 반면 옥수수, 밀, 귀리, 보리 같은 단자엽 식물들은 ALA의 경엽 처리에 의한 생장 저해를 받지 않았다. 게다가 쌍자엽 식물들은 콩처럼 생장이 빠른 것은 경엽에 처리하면 영향을 받지 않거나 강남콩, 콩, 목화에서 관찰된 것처럼 피해를 받더라도 새로운 건강한 잎이 출현하여 손상으로부터 완전히 회복되었다(Rebeiz *et al.*, 1984).

한편 보리, 밀, 벼의 유묘기에 ALA를 경엽 처리할 경우 잡초 보다 영향을 덜 받았다. 고농도에서 ALA의 생화학적 작용은 ALA가 protochlorophyllide, proto-porphyrin, 변형된 Mg-protoporphyrin, 그리고 광학적 손상을 일으키는 일중항 산소($^1O_2$)의 생성을 위해 감광제로 작용하는 tetrapyrrole 같은 porphyrin 중간체들이 증가됨을 암시한다. 그래서 식물종 사이의 선택성은 tetrapyrrole을 축적하는 능력과 다양한 식물종에서의 tetrapyrrole 대사에 근거한다(Rebeiz *et al,* 1988).

마. Bio 및 합성 ALA의 활성 비교

ALA는 저농도로 처리하면 생장 조절 물질로서, 고농도로 처리하면 미생물에 의해 분해되는 새로운 제초제로서 주목을 받는다. 또 ALA는 작물, 동물, 인간에 해가 없고 암의 광학적 진단과 치료를 위한 기존 약의 효과를 향상시키기 위한 약물로 사용되고 있다(Schuimaker *et al.,* 1999).

그러나 ALA는 보통 복잡한 공정을 거쳐 화학적으로 합성되기 때문에 매우 고가이므로 값싼 미생물을 이용한 ALA 생물학적 생산 방법이 제안되고 있다.

이 연구에서는 *Bradyrhizobium japonicum*으로부터 분리된 *heme*A 유전자를 과압하여 축적된 ALA 30mM을 사용했다. 보리, 밀, 벼와 잡초인 씀바귀(*Ixeris dentata)*를 이용하여 Bio ALA와 합성 ALA의 생물학적 활성의 차이를 실험하였으나 중요한

차이는 없었다(Table 8과 Table 9).

Table 8. Effects of bio (B)- and synthetic (S)-ALA on plant height (% of untreated) of barley, wheat, rice and weeds, *Ixeris dentata*. Barley, wheat, and rice at three leaf stages and weed, Ixeris dentata at two leaf stages, were applied bio- and synthetic ALA. Parameters were recorded 10 days after application.

Cultivar	ALA	ALA concentration (mM)								LSD (0.05)
		0	0.05	0.1	0.5	1	5	10	30	
Barley	S	100	107	102	104	98	84	72	53	ns
(Naehanssalbori)	B	100	109	104	100	98	93	87	50	
Wheat	S	100	96	94	93	83	82	66	42	ns
(Geumgangmil)	B	100	102	99	98	94	89	82	51	
Rice	S	100	91	88	83	83	79	75	51	ns
(Dongjinbyeo)	B	100	93	95	98	92	86	78	60	
Weed	S	-	-	-	-	-	-	-	-	
(*Ixeris dentata*)	B									

Table 9. Effects of bio (B)- and synthetic (S)-ALA on shoot fresh weight (% of untreated) barley, wheat, rice and weeds, *Ixeris dentata*. Barley, wheat, and rice at three leaf stages and weed, Ixeris dentata at two leaf stages, were applied bio- and synthetic ALA. Parameters were recorded 10 days after application.

Cultivar	ALA	ALA concentration (mM)								LSD (0.05)
		0	0.05	0.1	0.5	1	5	10	30	
Barley	S	100	101	107	109	98	78	49	18	ns
(Naehanssalbori)	B	100	107	106	85	83	84	74	23	
Wheat	S	100	98	109	99	90	78	55	17	ns
(Geumgangmil)	B	100	94	93	98	81	84	66	23	
Rice	S	100	114	85	101	84	64	44	13	ns
(Dongjinbyeo)	B	100	102	100	97	87	53	40	29	
Weed	S	100	-	97	106	88	30	12	0	ns
(*Ixeris dentata*)	B	100	-	93	89	86	38	15	0	

따라서 미생물에 의해 생산된 ALA를 농작물에 생장 촉진과 농작물 재배시 발생하는 잡초를 방제할 수 있는 제초제로 사용하여도 될 것으로 사료되었다.

4. 결과요약

화학적 합성에 의해 생산된 ALA(합성ALA)와 *Bradyrhizobium japonicum*으로 부터 분리된 *heme*A 유전자를 과압해서 얻어낸 세포질 추출물인 Bio ALA을 보리 5품종, 밀 5품종, 벼 및 수종의 잡초종자를 사용하여 종자 침지, 경엽 처리 및 처리 시기에 따른 생물학적 활성을 비교한 결과는 다음과 같다. 보리 5 품종과 밀 5 품종의 ALA 종자 침지 처리 결과는 고농도 처리구에서 제초 효과뿐만 아니라 저농도에서 생장 촉진 효과가 없었다. 그러나 벼에서는 5mM과 10 mM의 ALA 수용액에 종자 침지 처리에 의해 생육 억제 효과가 나타난 반면 저농도로 종자 침지 처리를 할 경우 생장 촉진 효과는 없었다. 강호쌀보리, 내한쌀보리, 송학보리, 새쌀보리, 대호쌀보리를 이용하여 저농도 0.05～1mM의 ALA 수용액을 경엽 처리했을 경우 생육은 무처리에 대비하여 각각 13～14%, 19～51%, 17～64%, 18～23% 및 22～38%가 촉진되었다. 한편 보리의 생육은 고농도 5～30mM의 ALA 수용액을 경엽 처리할 경우 생육 억제 효과가 컸다. ALA에 의한 생육 촉진 효과는 경엽처리가 종자 침지 처리보다 더 좋았다. 1.5 엽기에 ALA를 경엽 처리 할 경우 보리 생육이 19～51% 증가 되었지만 종자 처리, 파종 후 3일째 처리, 3엽기 및 5엽기 처리에서는 생육 촉진 효과가 나타나지 않아 보리를 이용한 ALA 처리 효과는 처리 시기와 처리 농도가 크게 좌우했다. 단자엽 잡초가 쌍자엽 잡초보다 ALA 경엽 처리에 더 민감했으며, 쌍자엽 잡초 질경이(*Plantago asiatiaca* L.)가 ALA 처리에 가장 내성이 큰 반면 단자엽 잡초 강아지풀(*Setaria virids* L.)은 가장 민감했다. 본 연구를 통하여 보리, 밀, 벼 및 잡초에서 Bio ALA와 합성 ALA의 생물학적 차이는 없었다. 따라서 미생물에 의해 생산한 ALA(Bio ALA)은 작물생산에 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

제2절 보리와 밀에 관한 5-Aminolevulinic Acid의 생장촉진과 제초작용 기작

1. 서론

5-Aminolevulinic acid(ALA)는 탄소 5개의 아미노산으로 인간을 포함한 생물체 내에 chlorophyll 및 heme과 같은 tetraphyrrole 생합성 과정의 필수적인 전구체이다(Avissar와 Moberg 1995; Beale 1990; Granick와 Sassa 1971). 이러한 ALA는 인체에 무해한 생분해성 제초제, 살충제, 친환경적인 생물농약 및 식물 생장 촉진제, 광역학적인 암 치료제로서 관심을 끌고 있다(Rebeiz 등 1988).

ALA는 통상적으로 식물체내에 50nmol · gFW^{-1} 이하의 매우 낮은 수준이 함유되어 있다(Chereskin와 Castelfranco 1982; Weinstein와 Beale 1985). ALA를 외생적으로 저농도로 처리할 경우, 무, 강남콩, 보리, 감자, 마늘, 벼, 옥수수 같은 작물 등에서 무처리구보다 10～60% 생육이 촉진되었다(Hotta 등 1997b). 이러한 촉진 효과는 chlorophyll 함량 증가, 광합성 활성 증대 및 호흡 작용 억제를 통해 기인되는 것으로 보고되었다(Hotta 등 1997a). 또한 ALA는 생장촉진이외에도 벼 유묘의 내한성(Hotta 등 1998)과 목화의 내염성을 증대시키는 것으로 보고되고 있다(Watanabe 등 2000).

그러나 비교적 높은 농도로 ALA를 식물체에 처리한 경우에는 제초 효과가 나타난다(Rebeiz 등 1984). 즉, ALA를 처리한 식물에서는 protoporphyrin(Proto Ⅸ), Mg-protoporphyrin(Mg-Proto Ⅸ) 및 protochlorophyllide(PChlide) 같은 몇 가지 chlorophyll 생성과정의 중간물질이 비정상적으로 높게 축적되어 진다(Castelfranco 등 1974; Matsumoto 등 1994; Sundquvist 1969). 이렇게 과잉 축적된 tetrapyrrole 화합물은 일정기간 암조건에 둔 후 광을 조사하면 광산화 효과에 의해 산소와 반응하여 일중항 산소($^1O_2$)가 생성된다(Rebeiz 등 1984). 이 일중항 상태의 산소는 강력한 산화제로서 자유라디칼 연쇄반응에 의해 식물의 세포막에 존재하는 불포화 지방산으로 구성된 인지질을 산화시켜 식물의 세포막을 파괴하여 결국 식물을 죽게 만든다(Chakraborty와 Tripathy 1992). ALA의 약해 증상은 protoporphyrinogen oxidase(Protox) 저해형 제초제인 oxyfluorfen과 유사하게 나타난다. 이들 제초제의

작용기작은 Proto Ⅸ 축적과 관련되어 있다고 보고되었다(Becerril와 Duke 1989, Duke 등 1991; Jacobs 등 1996; Lee 등 1992). Proto Ⅸ 축적은 Protox 저해에 의해 기인된다고 할 수 있다(Matringe 등 1989; Witkowski 등 1989). 그러나 ALA를 식물체에 처리한 경우 어떻게 제초작용이 발생하는지에 대한 연구는 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구의 목적은 밀과 보리를 대상으로 ALA 처리시 이들 식물의 생장 및 생리적 반응을 조사하였고, ALA 처리시 나타난 제초 작용기구와 porphyrin 대사의 중간체의 축적정도와의 관련성을 조사하는데 있다.

2. 재료 및 방법

가. 식물재료

전보(Kuk 등 2003)에 사용한 보리와 밀 각각 5개 품종 중에서 ALA 저농도와 고농도 처리에 의해 가장 생장 촉진과 저해 효과가 뚜렷한 각각 1개 품종을 선발하였다. 보리는 새쌀보리를, 밀은 우리밀을 선발하였다. 이들 종자는 원예용상토(Bio 상토)가 충진된 200cm^2 포트에 파종하여 23/15℃(주/야)의 온도조건과 14시간의 일장조건으로 조절된 생장상에서 생육시켰다. 이때 생장상의 광량은 250㎛ol m^{-2} s^{-1}이었다.

나. ALA 처리에 의한 밀과 보리의 생장반응

밀과 보리를 파종한 후 13일째(1.5엽)에 계면활성제인 Tween-20(0.1%)이 포함된 0, 0.05, 0.1, 0.5, 5, 10, 30mM의 ALA 수용액을 밀과 보리 경엽에 충분히 묻도록 포트당 10ml씩 처리하였다. 처리 후 10시간 동안 암실에 둔 후 14시간 일장조건으로 5일간 생육시켜 지상부 생체중을 조사하여 ALA 저농도 처리에 의한 생장촉진과 고농도 처리에 의한 생장저해 정도를 조사하였다.

다. 생육단계별 ALA 측정

보리와 밀을 파종하고 5, 10, 15, 20 및 25일째에 각각의 제1엽을 수확하여 4mm 크기로 절편을 만들고, 40mM levulinic acid를 함유한 20mM phosphate buffer(pH 6.9)

5ml가 들어있는 petri dish에 절편의 0.15g을 넣어 23℃의 생장상에 6시간 광상태(250 μmol m^{-2} s^{-1})에서 배양하였다. 이렇게 배양한 식물체를 20mM phosphate buffer(pH 6.9) 1ml에 넣어 마쇄하고 10,000g로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 얻은 상징액 0.5ml에 ethyl acetoacetate를 0.1ml 넣어 95℃의 water bath에서 10분간 배양하였다. 이렇게 배양한 액을 10분간 ice위에서 식힌 후 Ehrlichs 시약(Lermontova와 Grimm 2000)을 0.6ml 넣어 교반한 후 spectrophotometer를 이용하여 553nm에서 흡광도를 측정하였다. ALA정량은 표준 ALA 농도에 의해 얻어진 직선회귀에 의해 계산하였다.

라. 세포내 전해물질의 누출

위의 생장상 조건에서 생육시킨 1.5엽기 밀과 보리를 수확하여 1엽만 대상으로 cork borer를 이용하여 엽절편(4mm 직경)을 만들고 각 0.15g씩을 5ml의 1% sucrose/1mM 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid buffer(pH 6.5)가 담겨져 있는 petri dish(6cm 직경)에 옮긴 후 ALA의 최종농도가 5mM되도록 하였다. ALA을 처리한 엽절편을 23℃의 생장상에서 12시간 암배양한 다음 250μmol m^{-2} s^{-1}의 광에 4, 8, 12, 24시간 조사하여 전기전도계(Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, USA)를 이용하여 전해물질의 누출 정도를 측정하였다. 전해물질의 누출 정도는 무처리구를 측정하여 처리구에서 그 값을 빼주어 실제 ALA 처리에 의해서 누출되는 양으로 표시하였다.

마. 엽록소 파괴

ALA을 처리한 1.5엽기 보리와 밀에 계면활성제인 Tween-20(0.1%)이 포함된 5mM ALA를 처리하고 12시간 동안 암배양한 후 250μmol m^{-2} s^{-1}의 광에 4, 8, 12, 24시간 동안 조사한 제1엽을 0.5g씩 채취하여 Hiscox와 Israelstam(1979)의 방법을 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다.

바. 지질과산화작용

처리는 엽록소 함량 측정시와 동일하게 하였다. 지질과산화작용은 thiobarbituric

acid(TBA) 방법(Slater 1984)을 이용하여 malondialdehyde(MDA)의 생성량을 측정하였다.

사. Porphyrins 분석

1.5엽이 전개된 보리와 밀에 ALA를 처리하고 위의 세포내 전해물질의 누출 시험과 동일하게 암상태에서 12시간 배양한 후 밀과 보리의 1엽을 각각 0.3g 채취하여 1mL의 methanol : acetone : 0.1N NaOH (9 : 10 : 1, v/v)로 추출한 후 10,000g에서 10분간 원심분리하여 상징액을 취하고 그 상징액을 나일론 필터(0.2㎛ pore size)로 거른 후 사용전까지 -70℃의 냉동고에 보관해 두었다. ALA에 의해 축적되는 Proto Ⅸ, Mg-Proto Ⅸ 및 PChlide의 양은 HPLC를 이용하여 측정하였고, 그 밖의 HPLC 분석조건 등은 Lermontova와 Grimm(2000)의 방법에 준하여 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. ALA 처리에 의한 보리와 밀의 생장 반응 및 ALA 축적량 비교

보리와 밀을 1.5엽기까지 생육시켜 ALA를 처리한 후 5일째에 지상부 생체중을 조사하였다(Fig. 1). ALA를 저농도인 0.05, 0.1, 0.5mM로 처리했을 경우, 보리는 무처리에 대비하여 생체중이 각각 12, 26 및 26% 증가하였으나, 밀의 경우는 각각 9, 3 및 4% 증가하였다.

이처럼 밀보다는 보리에서 ALA 처리 효과가 좋았는데, ALA 처리 효과는 종간은 물론이고 같은 종내에서도 생육단계별로 다른 반응을 보인다고 하였다(Hotta 등 1997b; Kuk 등 2003). ALA 저농도 처리와 달리 고농도인 5, 10 및 30mM로 처리시 보리와 밀의 생체중은 각각 23-92%와 34-83% 억제되었고 이들 두 종간의 생육저해 정도에도 큰 차이가 없었다. ALA 처리에 의한 약해 증상은 diphenyl ether계인 oxyfluorfen과 유사하게 처리 후 초기에 황화현상을 보이다가 결국 고사하였다.

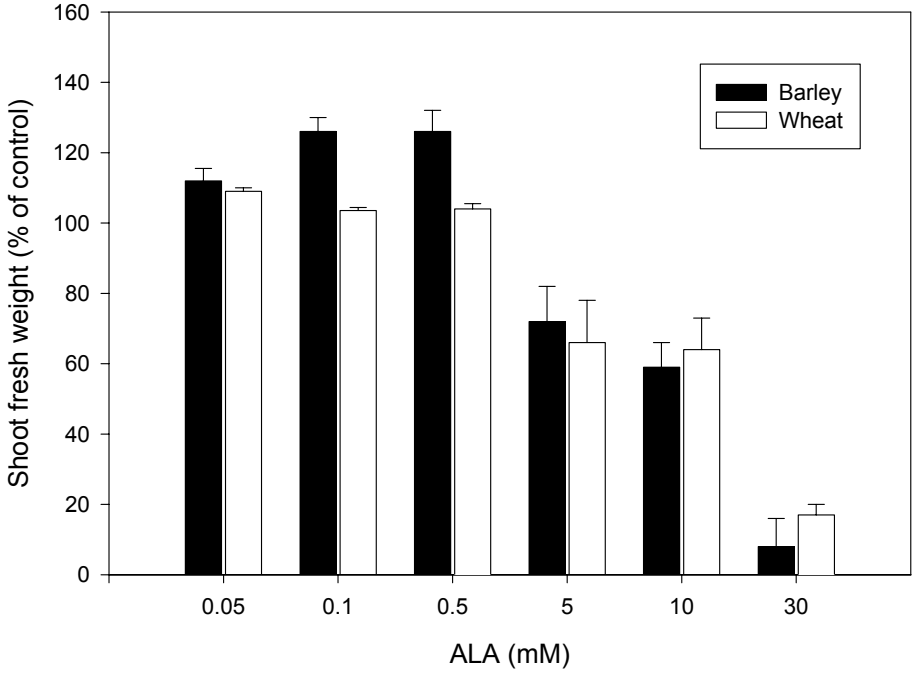


Fig. 1. Effects of ALA on the shoot fresh weight of barley and wheat resulting from foliar application at the 1.5-leaf stage. Shoot fresh weight was measured 5 days after application.

ALA 처리에 의한 보리와 밀의 초기 생육촉진 효과와 내생적인 ALA 함량과의 관계를 알아보기 위하여 파종 후 5일 간격으로 25일까지 ALA 함량을 조사하였다(Fig 2). ALA량은 보리와 밀 모두 파종 후 5일째에 많았으나 파종 후 10, 15, 20 및 25일로 시간이 경과할수록 ALA량은 줄어들었다. 그러나 ALA량은 보리가 밀보다 파종 후 5, 10, 15, 20 및 25일에 각각 1.6, 4.5, 4.2, 15.8 및 6.4배 많았다. 본 연구에서 보리와 밀의 ALA 처리 시기는 1.5엽기로 이때는 파종 후 약 15일 경에 해당한다. 파종 후 15일경에 ALA량만 보더라도 보리가 밀보다 4.2배 많았다. 따라서 ALA처리에 의한 보리가 밀보다 초기 생장량이 좋았던 것은 보리 자체가 ALA량을 많이 함유하고 있기 때문으로 생각된다. 또한 ALA 처리에 의한 식물체의 chlorophyll 함량 증가, 광합성

활성 증대 및 호흡 작용이 억제(Hotta 등 1997a)되어 보리가 밀보다 초기생육이 좋았을 것으로 생각할 수 있다.

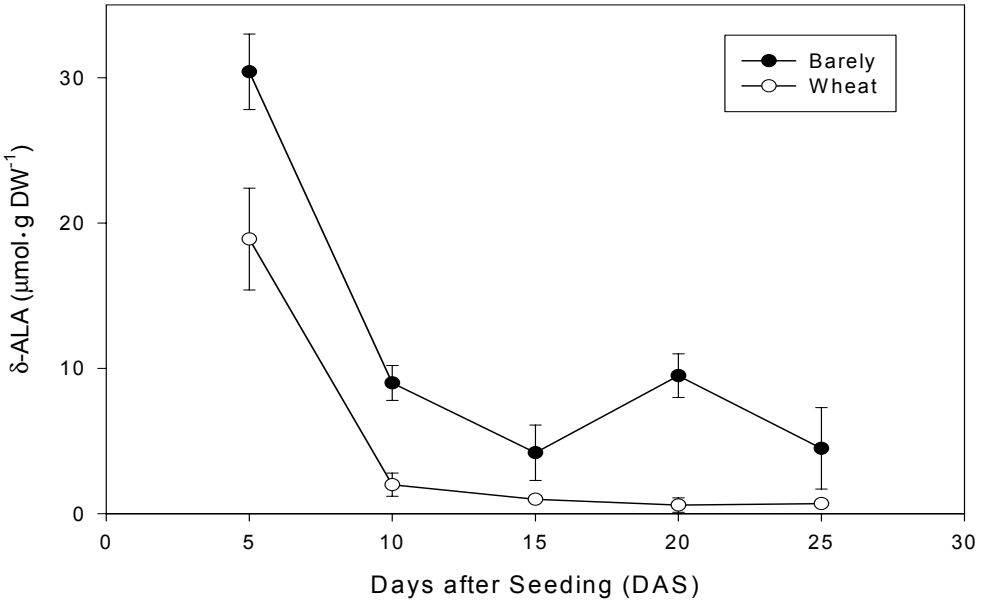


Fig 2. ALA-synthesizing capacity in leaves of barley and wheat.

나. ALA 처리에 의한 보리와 밀의 생리적 반응

보리와 밀을 암상태에서 12시간 동안 ALA와 함께 배양하고 광에 4, 8, 12, 24시간 노출했을 때 식물체로부터 전해질 누출이 빠르게 증가하였다(Fig. 3A). 밀과 보리의 전해질 누출은 lag time 없이 광에 노출 후 12시간까지 급격히 증가하였다. 그러나 생장량 반응에서 밀과 보리간에 차이가 없었던 것처럼 전해질 누출에도 차이가 없었다. 12시간 암상태에서 배양하는 동안에는 전해질 누출은 없었다(자료 미제시). 이러한 결과로 볼 때 막의 피해는 광에 노출 후부터 시작됨을 의미한다. 또한 엽록소 함량 감소도 ALA 처리 후에 관찰되었다(Fig. 3B). 보리와 밀 모두 광에 노출 후 시간이 경과할수록 엽록소 함량은 계속 감소하였으나 두 종간에는 차이가 없었다. 두 종 모두 광에 노출 후 12시간째에 엽록소 함량은 무처리에 대비하여 약 50%정도 감소하였다. 무

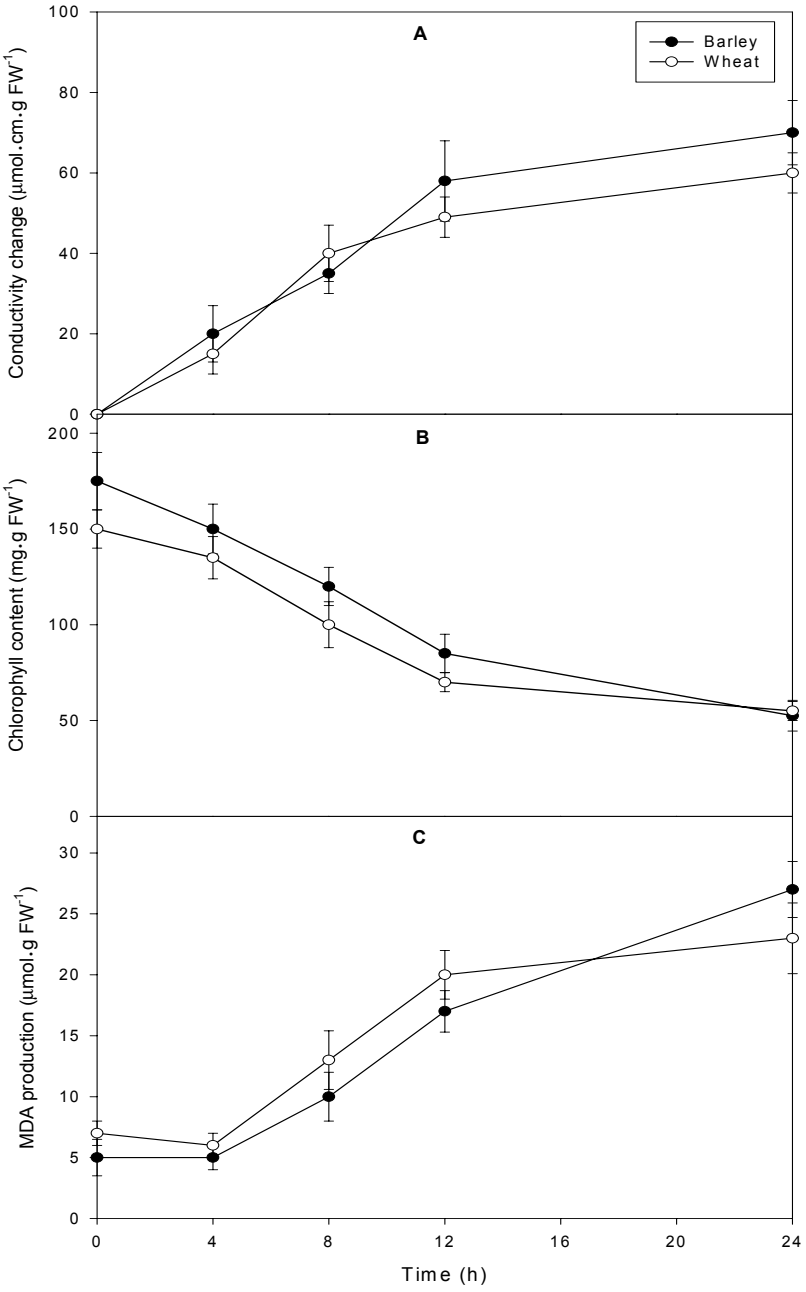


Fig 3. Electrolyte leakage (A), chlorophyll content (B), and lipid peroxidation (C) from ALA-treated barley and wheat. Plants were applied in 5 mM ALA and kept in darkness for 12 hrs. Thereafter, the seedlings were exposed to light.

처리의 보리와 밀에서는 엽록소 함량 감소가 없었기 때문에 ALA 처리에 의해 발생된 황화현상은 엽록소 파괴에 의해 기인되는 것으로 생각되었다.

한편, ALA의 처리에 의하여 나타나는 막의 지질과산화작용의 지표로서 MDA 생성량을 조사한 결과(Fig. 3C), 전해물질의 누출이나 엽록소 파괴의 경우에서와 마찬가지로 광에 노출 후 시간이 경과될수록 MDA 발생량이 증가하였으나, 보리와 밀은 차이가 없었다. 밀의 경우 MDA 발생량은 광노출 후 12시간까지 급격히 증가 하였으나, 보리의 경우는 광노출 후 24시간까지 급격히 증가하였다.

이상의 결과로 볼 때, ALA의 고농도 처리는 보리와 밀에 생장저해를 가져왔고, 이러한 생장저해는 전해물질의 누출, 엽록소 함량 감소 및 지질과산화 증가에 기인되는 것으로 추측할 수 있다. 그러나 diphenyl ether계인 oxyfluorfen에 대해 밀은 보리보다 상대적으로 내성으로 알려져 있다(Choi 등 1999). 이 연구에서 밀이 보리보다 상대적으로 내성이었던 것은 전해질 누출 감소, 엽록소 함량 감소, 지질과산화 증가를 비롯하여 Proto Ⅸ의 축적이 적었고 Protox 활성 저해도 적었다고 하였다. 그러나 본 연구에서 ALA 처리에 의한 보리와 밀은 내성차이가 없었던 것으로 보아 ALA 처리와 oxyfluorfen처리에 의한 제초작용 기구는 동일하지 않을 것으로 사료되었다.

다. Porphyrin에 관한 ALA 효과

ALA 제초효과와 porphyrin 중간체의 축적 정도와의 관련성을 알아보기 위하여 ALA 처리 후 12시간 암배양하고 porphyrin 축적량을 조사하였다(Table 1). 보리와 밀에 ALA 처리했을 때 가장 많이 PChilide이 축적되었다. 또한 PChilide 양은 무처리 상태에서도 Proto Ⅸ과 Mg-Proto Ⅸ 보다 수십 배 많았다. 비록 PChilide가 처리 또는 무처리 상태에서 가장 많이 축적되었더라도 암상태에서 12시간 배양 후 PChilide의 축적률은 보리에서 2.5배, 그리고 밀에서 3.1배이었고, Mg-PChilide의 축적량은 보리와 밀에서 각각 1.4배와 2.1배로 적었다. 그러나 Proto Ⅸ는 무처리 상태에서 축적량은 가장 적었으나 ALA 처리에 의해 기인한 축적량은 보리에서는 23배, 그리고 밀에서 26배의 차이를 보였다. 보리와 밀은 종 자체가 다르기 때문에 무처리 상태에서도 축적량은 달랐으나 처리에 기인한 porphyrin 축적률은 보리와 밀간에 큰 차이가 없었다.

Table 1. Accumulation of porphyrins in 5mM ALA-treated barley and wheat. Plants were kept in darkness for 12 hrs after ALA treatment.

Porphyrins	Barley			Wheat		
	Control	ALA	Ratio[a)]	Control	ALA	Ratio
	--- content (nmol · g FW^{-1}) ---					
PChlide	11.8	29.5	2.5	30.4	94.3	3.1
Mg-Protox IX	0.69	1.00	1.4	7.7	16.9	2.1
Proto IX	0.45	10.4	23.1	1.9	49.9	26.0

[a)] Ratio of each porphyrin content in ALA-treated plants to that in control.

ALA를 처리하여 12시간 암배양하고 4시간 광에 노출한 후에 porphyrin 축적량을 조사하였다(Table 2). 광 노출 후 porphyrin은 무처리 상태의 보리와 밀에서는 크게 감소하지 않았다. 그러나 ALA를 처리한 보리와 밀에서는 축적된 PChilide와 Proto Ⅸ가 크게 감소하였고, Mg-PChilide도 감소하였으나 PChilide와 Proto Ⅸ보다는 적게 감소하였다. 광노출 후 4시간째 PChilide의 축적률은 보리에서 1배 그리고 밀에서 1.2배를 보였고, Mg-PChilide의 축적량은 보리와 밀에서 각각 1.5배와 1.6배이었다. 그러나 Proto Ⅸ는 암상태에서 12시간 배양한 것보다는 적었으나 ALA 처리에 의해 기인

Table 2. Accumulation of porphyrins in 5mM ALA-treated barley and wheat. Plants were kept in darkness for 12 hrs after ALA treatment and then exposed for 4 hrs to light.

Porphyrins	Barley			Wheat		
	Control	ALA	Ratio[a)]	Control	ALA	Ratio
	--- content (nmol · g FW^{-1}) ---					
PChlide	9.7	10.1	1.0	29.1	35.2	1.2
Mg-Protox IX	0.41	0.62	1.5	6.5	10.3	1.6
Proto IX	0.50	3.3	6.6	2.2	16.9	7.6

[a)] Ratio of each porphyrin content in ALA-treated plants to that in control.

한 광노출 후 4시간째에 축적률은 보리에서 6.6배 그리고 밀에서 7.6배를 보였다.

ALA 처리에 의한 제초작용 기구에 관해 연구되고 있다. Rebeiz 등(1984)은 최초로 ALA를 제초제로 잠재성이 있음을 보고하였다. 그들은 ALA를 처리한 식물체는 PChilide, Proto Ⅸ 및 Mg-PChilide와 같은 porphyrin 중간물질이 비정상으로 높게 축적된다고 하였다(Rebeiz 등 1984; Rebeiz 등 1988). Chakrabothy와 Tripathy(1992)는 일중항 산소의 소거제는 광계 Ⅱ(photosystem Ⅱ)에 의해 기인한 피해로부터 보호될 수 있다고 보고 하였다. 또한 그들은 축적된 PChilide의 광역학적인 작용에 의해 발생한 활성산소종은 막 지질의 빠른 과산화와 관련될 수 있다고 제안하였다. 그래서 본 연구에서는 보리와 밀을 대상으로 하여 ALA를 처리한 후 나타나는 제초작용과 porphyrin 중간물질들과 관련되어 있는지를 조사하였는데, 암상태에서 축적된 Proto Ⅸ이 보리와 밀에 대한 ALA 제초작용에 가장 관련되어 있는 porphyrin 생합성 경로의 중간물질이라고 결론을 내릴 수 있다. Mayasich 등(1990)도 ALA를 처리한 오이 자엽에서 많은 양의 PChilide이 16시간 암배양 동안 축적된다고 보고하였다. 그러나 그들 실험에서는 5mM ALA 처리 후에 Proto Ⅸ의 축적은 없었다고 하였다. 그러나 보리와 밀은 Proto Ⅸ이 쉽게 축적되었고, 이것이 ALA 처리에 의한 제초작용과 관련될 수 있을 것이다.

Oxyfluorfen, oxadiazon과 같은 Protox 저해형 제초제는 이들 제초제가 처리된 식물체에서 많은 양의 Proto Ⅸ이 축적된다고 알려져 있다(Becerril와 Duke 1989, Duke 등 1991; Jacobs 등 1996; Lee 등 1992). 이것은 Proto Ⅸ이 광역학적인 제초제의 작용에 중요한 역할을 하는 tetrapyrrole이라는 것을 의미한다. 이러한 Proto Ⅸ의 축적은 Protox 저해에 의해 기인된다.

Protox 저해형 제초제의 작용기작은 색소체의 외막에 있는 Protox의 저해로 인해 이 효소의 기질인 Protogen Ⅸ이 색소체 바깥으로 이동 후 원형질막에 존재하는 제초제에 내성인 Protox 유사효소의 활성에 의해 Proto Ⅸ으로 산화되며 광조건하에서 원형질막에 축적된 Proto Ⅸ로부터 일중항 산소가 발생되어 원형질막이 파괴되는 것으로 알려져 있다(Lee와 Duke 1994). ALA가 엽록소나 heme 생합성의 전구체이므로 본 연구에서 보인 Proto Ⅸ의 축적은 Protox 저해에 의해 기인되지 않을 것이다. 그러나 세포질에 축적된 Proto Ⅸ량은 ALA를 처리한 보리와 밀에서 증가하였다. 더욱이

이러한 세포질의 Proto Ⅸ은 PChilide보다 식물을 고사하는데 훨씬 더 toxic할 것이다 (Lee 등1993). 또한 이들 연구는 보리와 밀에서 축적된 Proto Ⅸ이 ALA의 제초작용과 주로 관련되어 있음을 지지하는 것이다.

4. 결과요약

5-Aminolevulnic acid(ALA)는 porphyrin 생합성 중간물질 또는 제초제로 알려져 있다. 본 연구에서는 ALA에 의한 식물의 생장촉진과 제초작용 기구를 구명하기 위하여 보리와 밀을 1.5엽기까지 생육시켜 저농도(0.05, 0.1 및 0.5 mM)와 고농도(5, 10 및 30 mM)의 ALA를 경엽에 처리하였다. 저농도의 ALA 처리에 의한 보리와 밀에서 지상부 생체중은 각각 12～26%와 3～9% 증가하였다. 반면에 고농도 ALA 처리에 의한 보리와 밀의 생체중은 각각 23～92%와 34～83% 억제되었다. 파종 후 5, 10, 15, 20 및 25일째 보리의 ALA 합성능력은 밀보다 훨씬 많았다. 따라서 ALA 저농도 처리에 의한 보리의 생장촉진 효과는 ALA 합성능력에 기인된다고 추측할 수 있었다. 5mM ALA를 보리와 밀의 경엽에 처리하고 암상태로 12시간 둔 후 광에 4, 8, 12 및 24시간 노출했을 때, 이들 식물체로부터 신속한 전해질 누출, 엽록소 함량 감소 및 지질과산화가 증대되었다. ALA 처리에 의한 보리의 제초작용은 밀과 유사하였다. Porphyrin 생합성의 중간물질인 protochlorophyllide, Mg-protoporphyrin Ⅸ 및 protoporphyrin Ⅸ (Proto Ⅸ)이 5mM ALA 처리에 의해 모두 축적되었으나 이중에 Proto Ⅸ 축적률이 가장 높았다. 이 축적률은 암상태에서 12시간 후에 보리는 23배 그리고 밀은 26배에 달했다. Proto Ⅸ 축적은 광 노출 후 4시간보다 암상태에 12시간 처리 후에 훨씬 많았다. 다른 porphyrin의 중간물질들의 축적률은 12시간 암상태와 4시간 광노출에서 적거나 변화가 적었다. 따라서 보리와 밀에 대한 ALA의 제초작용은 축적된 Proto Ⅸ의 광역학적인 작용에 의해 기인된다고 할 수 있다.

제3절 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 보리와 무의 생장촉진과 피와 자귀풀의 제초 효과

1. 서 언

5-Aminolevulinic acid(ALA)는 chlorophyll 및 heme을 포함하는 모든 porphyrin 화합물의 필수적인 전구체이다(Avissar와 Moberg 1995; Beale 1990; Granick와 Sassa 1971). 최근에 외생적 ALA의 몇 몇 생리적 효과가 식물의 생장과 발달을 조절한다는 보고되고 있다. 즉, ALA를 외생적으로 저농도로 처리할 경우, 무, 강낭콩, 보리, 감자, 마늘, 벼, 옥수수 같은 작물 등에서 무처리구보다 10～60% 생육이 촉진되었다(Hotta 등 1997b). 이러한 촉진 효과는 chlorophyll 함량 증가, 광합성 활성 증대 및 호흡 작용 억제를 통해 기인되는 것으로 보고되었다(Hotta 등 1997a). 또한 ALA는 생장촉진 이외에도 벼 유묘의 내한성(Hotta 등 1998)과 목화의 내염성을 증대시키는 것으로 보고되고 있다(Watanabe 등 2000).

그러나 비교적 높은 농도(5mM)로 ALA를 식물체에 처리한 경우에는 제초 효과가 나타난다(Rebeiz 등 1984). 그래서 ALA를 새로운 비독성 외생적 물질로서 작물생산에 폭넓게 사용될 잠재성을 가지고 있다고 제안하였다(Wang 등 2003). ALA를 처리한 식물에서는 protoporphyrin(Proto Ⅸ), Mg-protoporphyrin(Mg-Proto Ⅸ) 및 protochlorophyllide(PChlide) 같은 몇 가지 chlorophyll 생성과정의 중간물질이 비정상적으로 높게 축적되어 진다(Castelfranco 등 1974; Matsumoto 등 1994; Sundquvist 1969). 이렇게 과잉 축적된 tetrapyrrole 화합물은 일정기간 암조건에 둔 후 광을 조사하면 광산화 효과에 의해 산소와 반응하여 일중항 산소($^1O_2$)가 생성된다(Rebeiz 등 1984). 이 일중항 상태의 산소는 강력한 산화제로서 자유라디칼 연쇄반응에 의해 식물의 세포막에 존재하는 불포화 지방산으로 구성된 인지질을 산화시켜 식물의 세포막을 파괴하여 결국 식물을 죽게 만든다(Chakraborty와 Tripathy 1992). 이와 같이 ALA는 저농도로 사용한 경우 작물의 생장을 촉진하는

효과가 있는 반면 고농도로 사용한 경우에는 제초효과가 있음이 확인되었다. 그러나 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 식물에 관한 생장촉진과 제초효과에 관한 연구는 아직까지 보고되지 않고 있다. 따라서 본 연구는 온도, 광량 및 수분 처리를 달리한 조건에서 ALA의 처리에 의한 생장촉진과 제초효과가 어떻게 변화하는지를 알아보고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 식물재료

전보(Kuk 등 2003)에 사용한 보리 5개 품종 중에서 ALA 처리에 의해 가장 생장촉진효과가 뚜렷한 새쌀보리를 본 연구에 사용하였다. 무는 조생알타리무와 속성대형봄무중에서 생장촉진 효과가 더 뚜렷한 속성대형봄무을 본 실험에 사용하였다. 이들 종자는 원예용상토(Bio 상토)가 충진된 200cm^2 포트에 파종하여 23/15℃(주/야)의 온도조건과 14시간의 일장조건으로 조절된 온실에서 생육시켰다. 또한 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 제초효과를 알아보기 위하여 화본과 잡초인 피와 광엽잡초인 자귀풀을 사용하였다.

나. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 보리와 무의 생장반응

앞의 연구의 ALA 처리에 의한 보리의 엽령별 효과실험에서 1.5엽기 처리시 가장 효과가 뚜렷하였다. 그래서 보리를 파종한 후 1.5엽기(파종 후 13일)까지 생육시켜 다양한 환경조건하에서 ALA를 처리하고 보리의 생장반응을 조사하였다. 환경조건 중에 온도처리 실험은 보리에 계면활성제인 Tween-20(0.1%)이 포함된 0, 0.05, 0.1 및 0.5mM의 ALA 수용액을 경엽에 충분히 묻도록 포트 당 10ml씩 처리하였다. 처리 후 20℃에 4시간 동안 ALA 흡수를 위해 암실에 두었다. 그 후 10℃, 20℃ 및 30℃로 조절된 생장상에 둔 후 10일째에 초장과 지상부 생체중을 조사하였다. 이때 광량은 200 μmol m^{-2} s^{-1}이었다. 광량실험도 위의 온도처리 실험과 동일하게 수행하였으나, 광량은 20, 200 및 400μmol m^{-2} s^{-1} 수준으로 하였다. 이때 생장상의 온도는 20℃이었다. 수분

처리에 관한 실험도 위의 온도와 광량실험과 동일하나, 수분처리는 보통처리(control), 포화처리(100%)와 침수처리(보리 식물체가 50% 침수)로 처리하였다. 이 때 생장상의 온도는 20℃로 하였고, 광량은 200μmol m^{-2} s^{-1} 이었다. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 무 생장량 반응에 관한 실험도 보리 실험과 동일하게 수행하였으나 단, 무는 3엽기까지 생육시켜 사용하였다. 조사항목은 초장, 지상부 및 지하부 생체중을 조사하였다. 이들 실험은 5반복으로 동일한 실험을 2회 이상 실시하였다.

다. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 피와 자귀풀 방제 효과

위의 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 보리 생장량 변화 실험처럼 강피와 자귀풀을 1.5엽기까지 생육시켜 온도, 광량 및 수분조건하에서 강피와 자귀풀 방제정도를 알아보았다. ALA 처리는 1, 3, 5, 10 및 30mM로 처리하였다. 다른 실험과정들은 위의 실험과 동일한 방법으로 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 보리의 생장촉진 효과

ALA를 저농도로 작물에 처리한 경우 일부 작물에서 생장촉진 효과가 확인되었다(Hotta 등 1997b). 그리고 본 연구에서도 ALA 처리에 의한 보리의 생장이 20% 정도로 증가됨을 확인하였다. 이들 증가가 다양한 환경조건에서 지속되는지 여부를 확인하고자 다양한 온도, 광량 및 수분조건하에서 보리에 ALA를 처리한 후 10일째에 보리의 초장과 지상부 생체중을 조사하였다(Figs. 1, 2, 3). 다양한 온도조건하에서 ALA 처리에 의한 보리 초장은 대조 처리구(control)인 20℃에서 0.5mM ALA 처리가 무처리(0mM)에 비해 유의적인 차이가 인정되었을 뿐, 그 밖의 ALA 농도 처리에서는 유의적인 차이가 없었다(Fig. 1). 또한, 10℃와 30℃ 조건하에서는 ALA의 어느 처리농도에서도 유의적인 차이를 볼 수 없었다. 온도조건하에서 ALA 처리에 의한 보리의 생체중은 20℃ 조건하에서는 무처리에 비해 0.05, 0.1, 0.5 mM 처리에서 약 20% 이상 증가하였다. 그러나 10℃ 조건하에서는 무처리에 비해 ALA 어느 처리농도에서도 유

의적인 차이를 볼 수 없었다. 30℃ 조건에서는 무처리에 비해 단지 0.05mM ALA 처리에서 효과가 인정되었을 뿐 그 밖의 농도에서는 차이가 없었다. 따라서 보리 생육에 적합한 20℃ 조건하에서만 초장과 지상부 생체중에서 ALA 효과가 인정되었을 뿐 보리 생육 적온보다 낮거나 높은 온도조건하에서는 ALA 효과를 볼 수 없었다. 그리고 ALA 효과는 초장에 비해 지상부 생체중에서 더 크게 나타났다.

광량조건하에서 ALA 처리에 의한 보리의 초장은 20과 200μmol m^{-2} s^{-1} 조건하에서 무처리에 비해 ALA 처리효과가 인정되지 않았으나 400μmol m^{-2} s^{-1} 조건하에서 0.5mM ALA 처리에서 10% 정도 초장이 증가하였다 (Fig. 2). 광량조건하에서 ALA 처리에 의한 지상부 생체중은 200μmol m^{-2} s^{-1} 조건하에서 무처리에 비해 0.05mM 이상 처리에서 20% 정도 증가하여 ALA 효과가 인정되었다. 그러나 저광량인 20μmol m^{-2} s^{-1} 조건에서 ALA 처리에 의한 ALA 효과는 인정되지 않았다. 또한 고광량조건인 400μmol m^{-2} s^{-1} 조건하에서는 무처리에 비해 ALA 0.5mM 처리에서만 지상부 생체중이 증가하였다. 온도 조건 실험에서와 유사하게 광량조건 실험에서도 작물 생장에 불리한 환경조건 즉, 저광량 조건에서 ALA처리에 의한 보리의 생장촉진 효과는 없었다.

수분조건하에서 ALA처리에 의한 보리의 초장과 지상부 생체중 변화는 Fig. 3과 같았다. 관행적으로 재배한 보통수분 조건하에서는 0.1과 0.5mM ALA 처리에서 다소 초장이 증가하였으나, 포화조건이나 침수조건에서는 ALA 처리 효과가 인정되지 않았다. 또한 관행적으로 재배한 보통수분 조건하에서 ALA 처리에 의한 지상부 생체중은 0.05mM 이상의 ALA 처리 농도에서 효과가 인정되었다. 포화상태 조건하에서는 단지 0.1mM ALA 처리에서만 ALA 효과가 인정되었고, 침수조건하에서는 ALA 처리 효과가 인정되지 않았다. 결론적으로 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 보리의 생장촉진 효과는 보리 생육에 부적한 환경조건에서는 ALA 효과가 없었다. 그러나 포화조건하에서 ALA를 처리시 보리의 지상부 생체중이 증가됨을 확인하였다. 포화조건 중에서 다소 ALA 효과가 인정되었던 것은 다른 환경조건에 비해 보리 생육에 상대적으로 스트레스가 적어서 ALA 효과가 있었던 것으로 사료된다. 따라서 보리의 생육에 부적한 환경조건하에서 ALA를 처리한 경우 ALA 효과가 없음을 확인할 수 있었다.

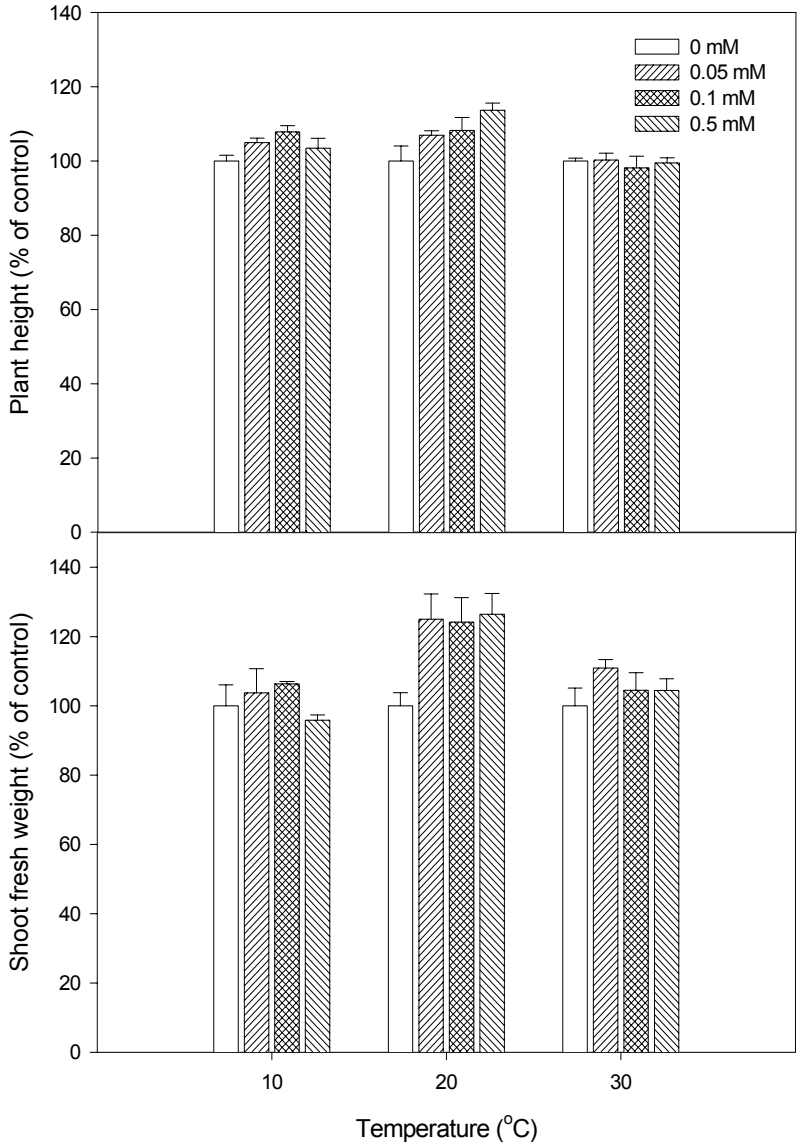


Fig. 1. The effect of ALA on growth of barley under different temperature conditions.

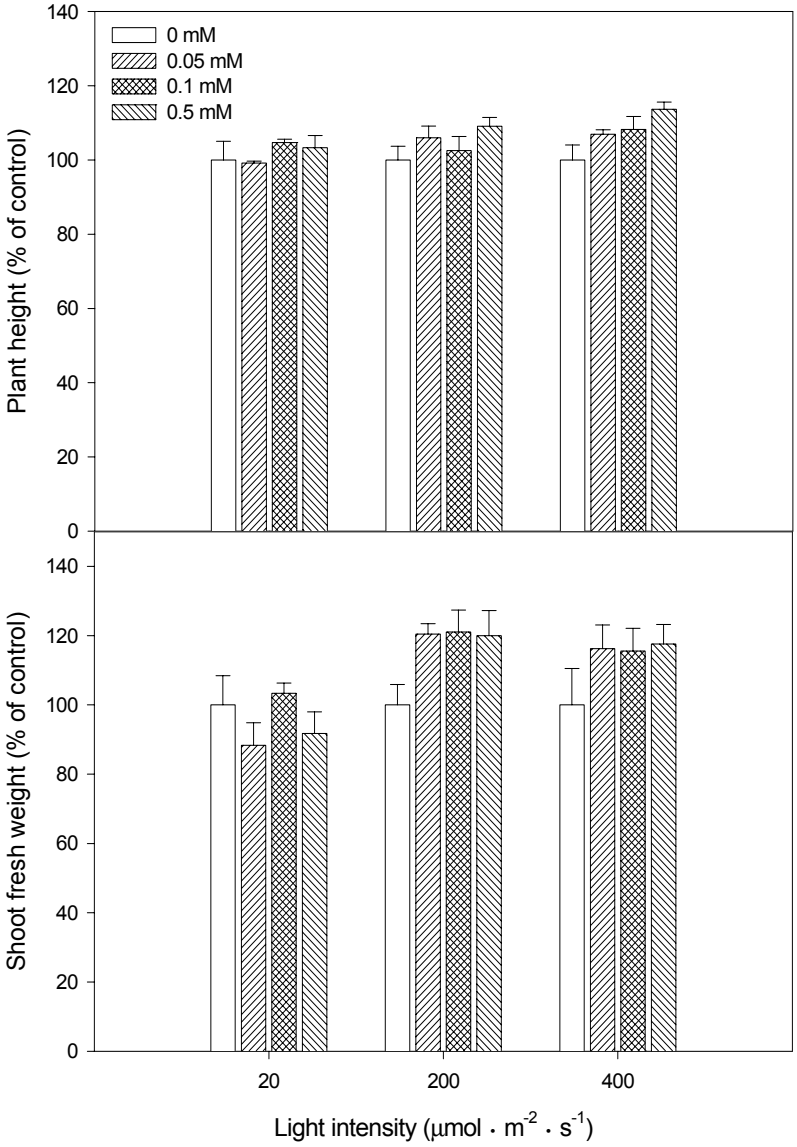


Fig. 2. The effect of ALA on growth of barley under different light intensity conditions.

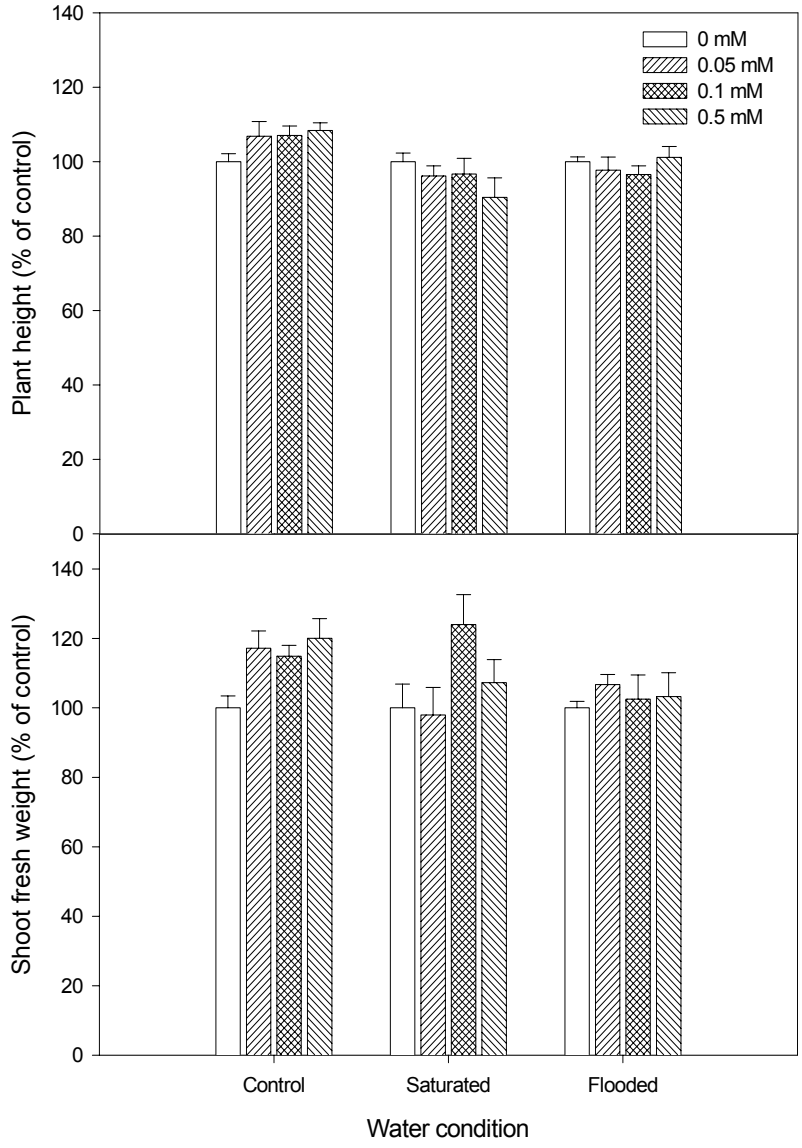


Fig. 3. The effect of ALA on growth of barley under different water conditions.

나. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 무의 생장촉진 효과

다양한 온도, 광량 및 수분조건하에서 무에 대한 ALA 효과를 알아보기 위하여 ALA를 처리한 후 10일째에 무의 초장, 지상부 생체중 및 지하부 생체중을 조사하였다(Fig. 4, 5, 6). 다양한 온도조건하에서 ALA 처리에 의한 무의 초장, 지상부 및 지하부 생체중 변화는 표 4와 같다. 20℃ 조건하에서 0.1mM과 0.5mM ALA 처리에서 초장에 대한 효과가 인정되었고, 10℃ 조건에서도 0.5mM ALA 처리에서 다소 초장이 증가하였다. 그러나 30℃ 조건하에서는 ALA 처리에 의한 초장의 증가 효과를 볼 수 없었다. 온도조건하에서 ALA 처리에 의한 지상부 생체중은 초장의 결과와 다소 다르게 10℃ 조건하에서는 ALA 효과가 없었고 20℃와 30℃ 조건하에서 0.1mM과 0.5mM ALA 처리에 의해 15-30% 지상부 생체중이 증가하였다. 온도조건하에서 ALA 처리에 의한 지하부 생체중은 초장과 지상부 생체중과 다르게 ALA 효과가 크게 나타났다. 즉, 10℃ 조건하에서는 0.1mM과 0.5mM ALA 처리에 의한 지하부 생체중은 50-60% 증가하였다. 20℃ 조건하에서도 0.1mM과 0.5mM ALA 처리에 의해 지하부 생체중이 50% 이상 증가하였으나, 30℃ 조건하에서는 단지 0.5mM ALA 처리 농도에서만 지하부 생체중이 50% 증가하였다. 온도조건하에서 ALA 처리에 의한 생장량 효과는 초장과 지상부 생체중에서 보다 지하부 생체중에서 크게 나타났다.

다양한 광량조건하에서 ALA 처리에 의한 초장, 지상부 및 지하부 생체중에 미치는 영향 중에 초장의 경우는 200과 400μmol m^{-2} s^{-1} 조건하에서 0.1mM ALA 처리에 의해서만 무처리에 비해 초장의 유의적인 증가가 있었다(Fig. 5). 그러나 저광량인 20μmol m^{-2} s^{-1}조건에서는 0.5mM ALA 처리에서만 무처리에 비해 유의적인 증가를 보였다. 다양한 광량조건하에서 ALA 처리에 의한 지상부 생체중은 저광량인 20μmol m^{-2} s^{-1}조건에서는 차이가 없었으나, 200과 400μmol m^{-2} s^{-1}조건하에서 지상부 생체중은 무처리에 비해 0.1mM과 0.5mM ALA 처리에서 30-50% 증가하였다. 그러나 ALA 두 처리 농도간에는 유의적인 차이를 볼 수 없었다. 한편 광량조건하에서 ALA 처리에 의한 지하부 생체중 변화에서도 지상부 생체중과 같이 저광량인 20μmol m^{-2} s^{-1}조건하에서 ALA 처리 효과는 인정되지 않았다. 200과 400μmol m^{-2} s^{-1} 조건하에서 ALA 두 처리농도에 의한 지하부 생체중은 각각 무처리에 비해 70~90%와 70~180% 증가하였다. 광량조건하에서도 온도조건 실험과 유사하게 ALA 처리 효과는 지상부 생체중에 비해

지하부 생체중에서 훨씬 큰 경향을 보였다.

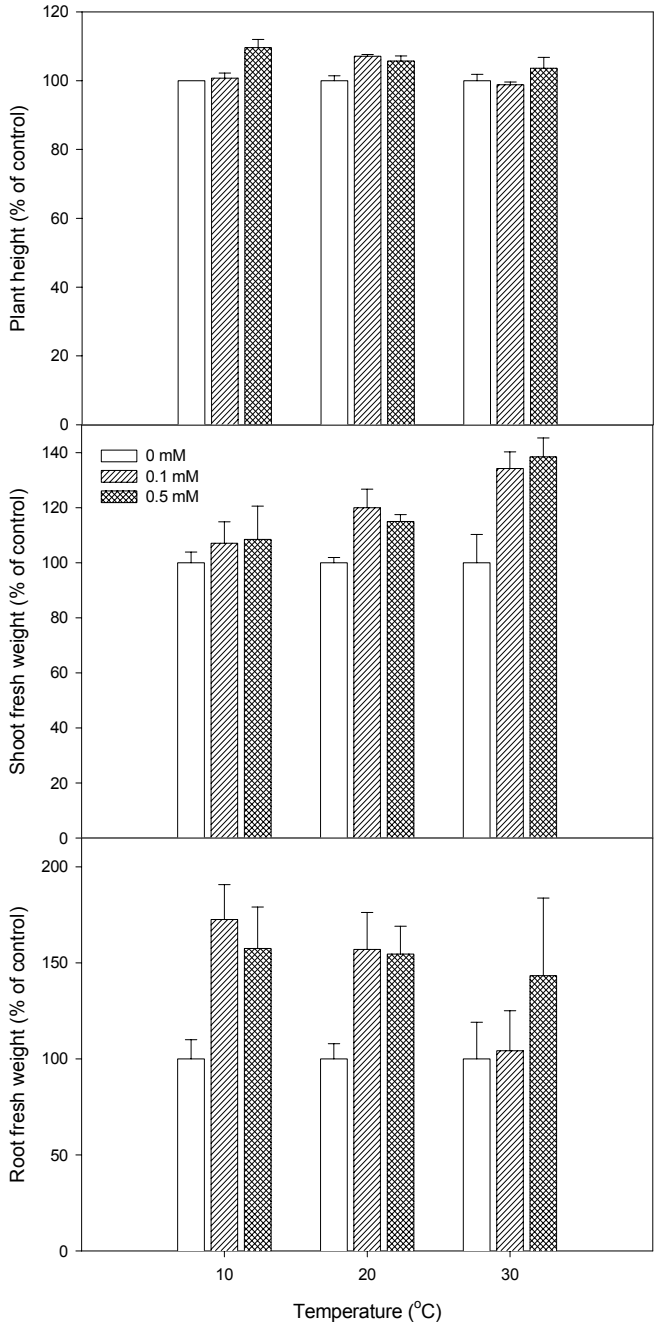


Fig. 4. The effect of ALA on growth of radish under different temperature conditions.

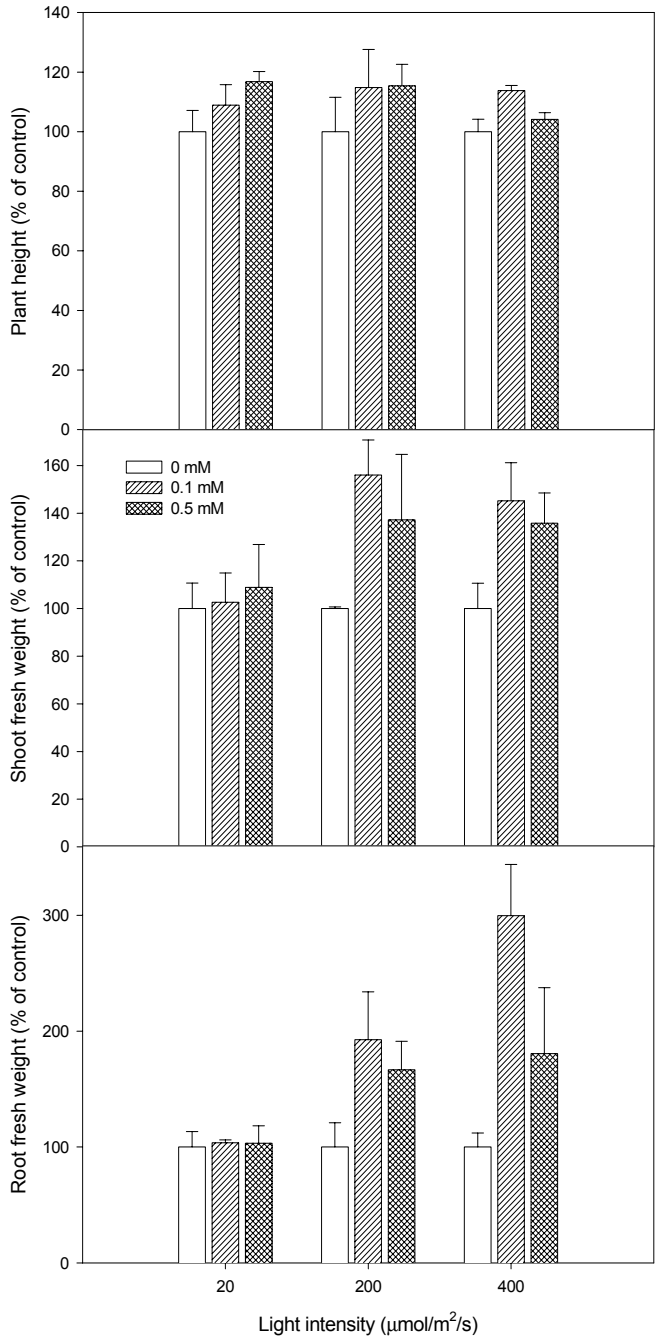


Fig. 5. The effect of ALA on growth of radish under different light intensity conditions.

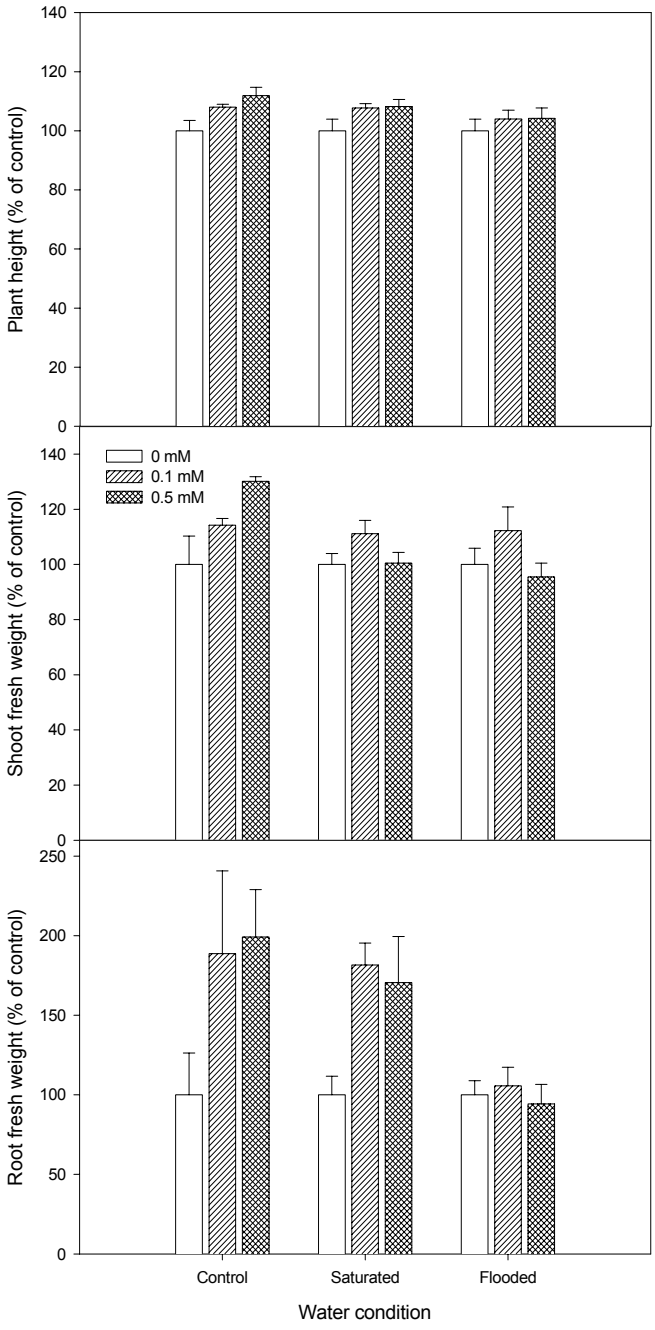


Fig. 6. The effect of ALA on growth of radish under different water conditions.

다양한 수분조건하에서 ALA 처리에 의한 무 생장량 변화는 Fig. 6과 같다. 보통수분조건하에서는 ALA 처리에 의한 초장이 증가하였으나, 포화조건과 침수조건하에서는 ALA 처리에 의한 초장의 효과는 관찰되지 않았다. 그러나 수분조건하에서 ALA 처리에 의한 지상부 생장량의 변화는 관찰되었다. 즉, 보통수분조건하에서 0.5mM ALA 처리에 의해 약 30% 증가하였다. 포화조건하에서는 0.1mM ALA 처리에 의해서 무처리에 비해 지상부 생체중이 유의적으로 증가하였고, 침수조건하에서는 ALA 처리에 의한 지상부 생장량에는 차이가 없었다. 앞의 광량의 실험과 유사하게 수분조건하에서 ALA 처리에 의한 지하부 생장량에 관한 효과는 초장과 지상부 생체중보다 더 좋았다. 즉, 보통 수분조건하에서 ALA 처리에 의한 지하부 생장량은 무처리에 비해 약 80% 증가하였다. 그리고 포화조건하에서 ALA 처리에 의한 지하부 생장량도 무처리에 비해 약 70% 정도 증가하였으나 ALA 처리농도간에는 유의적인 차이가 없었다. 그러나 침수조건하에서는 ALA 처리에 의한 지상부 생장량에는 영향을 미치지 못했다.

다양한 환경조건하에서 ALA처리에 의한 무 생장량 반응은 보리에서 반응과 달리 저온과 고온조건, 고광조건 그리고 포화수분 같은 작물이 스트레스를 받을 수 있는 조건에서도 ALA 처리에 의한 지하부 생장량이 증가하는 경향을 보였다.

다. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 제초효과

ALA를 식물체에 고농도로 사용할 경우 제초효과가 나타났다는 보고가 있다(Rebeiz 등 1984). 본 연구에서도 ALA 1, 3, 5, 10, 30mM 처리에서 피와 자귀풀에 제초효과가 나타났다. 따라서 이러한 제초효과 차이가 환경요인에 따라 달라지는지 확인하고자 하였다.

온도조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 초장에 관한 억제 정도는 10℃ 조건하에서보다 20℃와 30℃ 조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 제초효과가 컸음을 알 수 있었다(Fig. 7). 20℃와 30℃ 조건 간에 ALA 제초효과는 유사하나 20℃ 조건하에서 10mM과 30mM ALA 고농도 처리에서 30℃ 조건하에서보다 ALA 제초효과가 좋았다. 온도조건하에서 ALA 처리에 의한 지상부 생체중에 관한 억제 정도에서도 초장의 결과와 유사하게 저온조건인 10℃에서 20℃나 30℃에 비해 ALA 처리에 의한 억제효과는 떨

어졌다. 그러나 20℃와 30℃간에 제초효과는 큰 차이가 없었다. 그러나 온도조건하에서 피의 제초효과는 ALA 처리농도가 증가할수록 증가하였다.

광량조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 초장 억제정도는 저광량인 20μmol m^{-2} s^{-1}보다 상대적으로 고광량인 200과 400μmol m^{-2} s^{-1}에서 컸다. 그러나 200과 400μmol m^{-2} s^{-1} 조건 간에 ALA 처리에 의한 피의 억제 정도는 유사하였다. 광량조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 지상부 생체중 억제정도는 초장의 결과와 유사한 경향을 보였으나 ALA처리에 의한 생체중 억제효과가 더 뚜렷하였다. 또한 광량조건하에서도 ALA 처리농도가 증가할수록 피의 억제 효과는 증가하였다. ALA와 작용기작이 유사한 Prtotox 저해형 제초제인 oxyfluorfen도 광이 있는 조건에서 제초효과가 높다고 보고되었다(Rebeiz 등 1984). 저광량조건에서 ALA를 처리한 경우에 제초효과가 낮게 나타나는 것도 ALA가 제초작용하는데 최소한 광이 필요하는 것으로 사료된다.

수분조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 초장과 지상부 생체중 억제정도는 Fig. 9와 같다. 보통수분과 포화수분 조건하에서 ALA 처리에 의한 초장의 억제 정도는 유사하였으나, 담수조건에서는 ALA 처리에 의한 피의 초장억제 정도가 보통수분과 포화수분조건에 비해 다소 증가하였다. ALA 처리에 의한 피의 생체중은 초장의 결과 유사하게 보통수분조건과 포화수분 조건간에 차이가 없었고 담수수분조건에서 보통수분조건과 포화수분 조건에 비해 ALA 처리에 의한 피의 생체중 억제정도가 다소 컸다. 그러나 수분조건하에서 ALA처리에 의한 생체중의 억제가 초장보다 크게 나타났다. 그리고 ALA 처리농도가 증가할수록 제초효과는 증가하였다. 이처럼 포화수분과 담수조건간에 ALA 효과 차이가 적었던 것은 피가 물에서 잘 자라기 때문에 앞의 저온과 저광량인 조건처럼 피의 생육에 스트레스 요인으로 작용하지 않았기 때문으로 사료된다.

결론적으로 온도조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 제초효과는 저온조건인 10℃에서 20℃나 30℃에 비해 떨어진 경향을 보였다. 또한 광량조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 제초효과는 저광량인 20μmol m^{-2} s^{-1}보다 상대적으로 고광량인 200과 400μmol m^{-2} s^{-1}에서 컸다. 담수조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 제초효과 정도는 보통수분과 포화수분조건에 비해 다소 증가하였다.

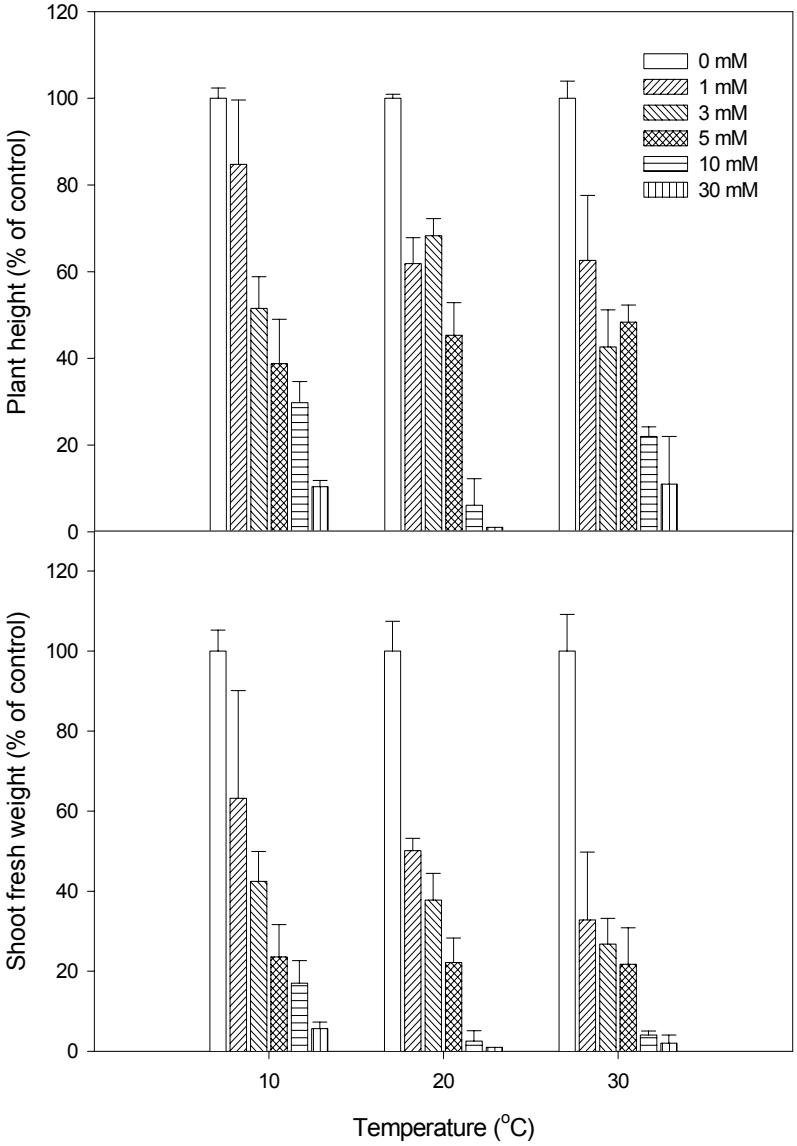


Fig. 7. The effect of ALA on growth of barnyardgrass under different temperature conditions.

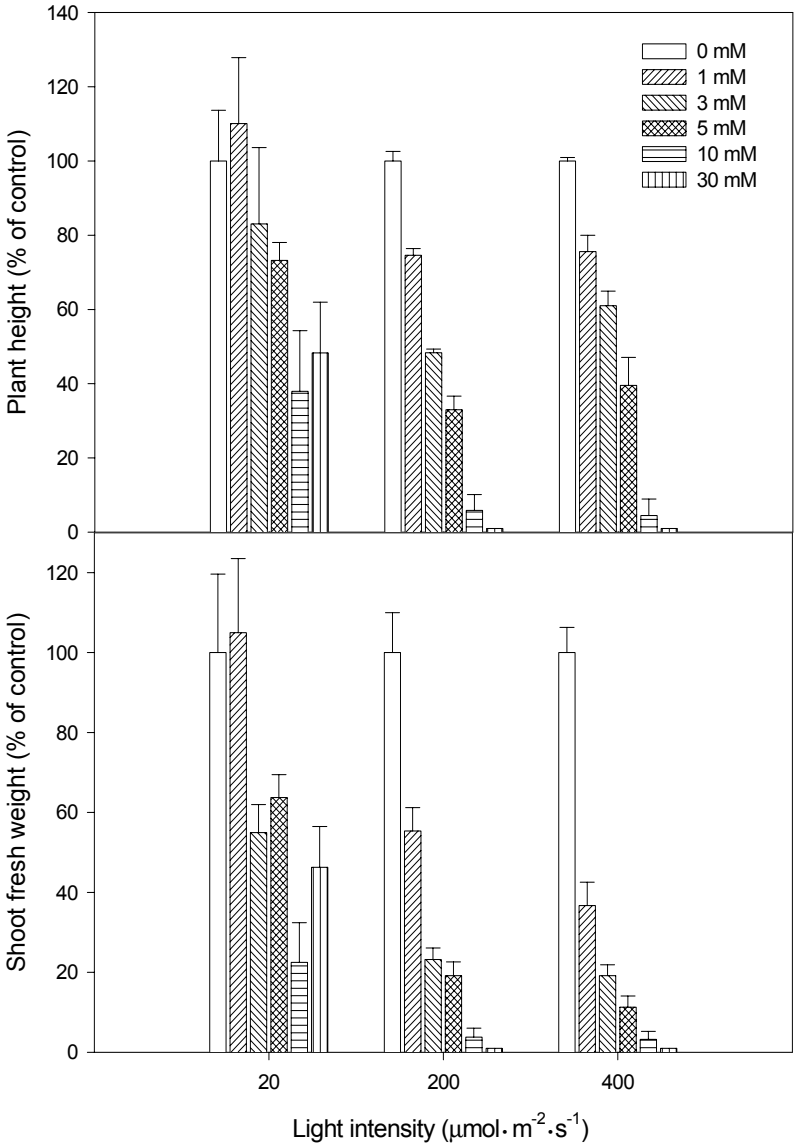


Fig. 8. The effect of ALA on growth of barnyardgrass under different light intensity conditions.

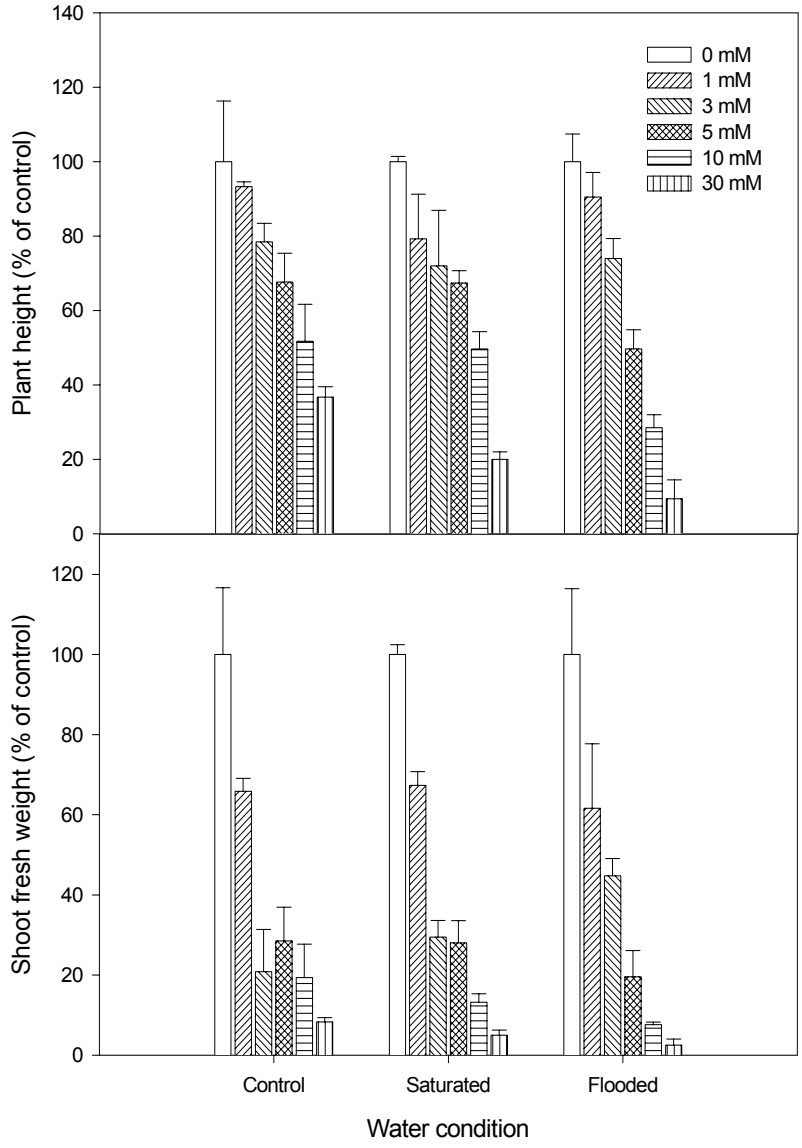


Fig. 9. The effect of ALA on growth of barnyardgrass under different water conditions.

라. 다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 자귀풀의 제초효과

3수준의 온도조건하에서 ALA 처리에 의한 자귀풀의 제초효과를 조사하였다(Fig. 10). 저온 조건인 10℃하에서 ALA 처리에 의한 초장의 억제정도는 ALA 처리농도가

증가하더라도 크게 감소되지 않았다. 그러나 20℃와 30℃ 조건하에서는 ALA 처리에 의한 초장의 억제정도가 10℃ 조건하에서 크게 나타났다. 또한 20℃ 조건하에서 일부 ALA 처리농도에 의한 초장의 억제정도는 30℃ 조건하에서 크게 나타났다. ALA 처리에 의한 초장의 억제정도와 다르게 지상부 생체중 억제정도는 10℃와 20℃ 조건간에 유사한 경향을 보였고, 10℃와 20℃ 조건하에서 ALA 처리에 의한 지상부 생체중 억제정도가 30℃조건에서 보다 크게 나타났다. 이와 같은 결과는 피의 결과와 상반된 경향으로 나타났다. 온도조건과 관계없이 30mM ALA 고농도 처리에서는 자귀풀은 거의 고사되었다. 또한 ALA 처리농도가 증가할수록 자귀풀의 제초효과는 증가하였다. 온도조건하에서 ALA 처리에 의한 제초효과는 초장에서 보다 지상부 생체중에서 높았다.

광량조건하에서 ALA 처리에 의한 자귀풀의 초장과 지상부 생체중 억제정도는 Fig. 11과 같다. 3수준의 광량조건에서 1mM과 3mM ALA 처리에 의한 초장의 억제정도는 유사하였으나, 5mM과 10mM ALA 처리에서는 저광량인 20μmol m^{-2} s^{-1}조건에서 ALA 처리에 의한 초장 억제정도보다는 200과 400μmol m^{-2} s^{-1}조건에서 훨씬 크게 나타났다. 그러나 3수준의 광량조건에서 모두 30mM ALA 처리에서는 자귀풀이 거의 고사되었다. 광량조건하에서 5mM과 10mM ALA 처리에 의한 지상부 생체중 억제정도도 저광인 20μmol m^{-2} s^{-1}보다 상대적으로 고광인 200과 400μmol m^{-2} s^{-1}에서 높았다. 200과 400μmol m^{-2} s^{-1}간에 제초효과는 일부 ALA 처리농도에서 차이가 있었으나 전반적으로 차이가 없었다. 온도조건 실험과 유사하게 ALA 처리에 의한 초장 억제정도보다는 지상부 생체중 억제정도가 크게 나타났다.

수분조건하에서 ALA 처리에 의한 자귀풀의 제초효과는 표 12와 같다. ALA 처리에 의한 자귀풀 초장의 억제 정도는 보통수분조건과 포화수분조건에 비해 담수조건에서 다소 떨어지는 경향을 보였다. 마찬가지로, 담수조건하에서 보통수분조건과 포화수분조건에 비해 상대적으로 ALA 처리에 의한 자귀풀 지상부 생체중의 억제정도가 감소하였다. 이러한 결과는 자귀풀이 담수조건에 비해 다습한 조건에 잘 생육되기 때문에 담수조건에서 ALA가 작용하는데 부적합했을 것으로 생각된다.

이상의 결과로 볼 때, 환경조건이 다른 경우에 ALA 처리에 의한 피와 자귀풀의 제초효과도 다른 것으로 확인되었다.

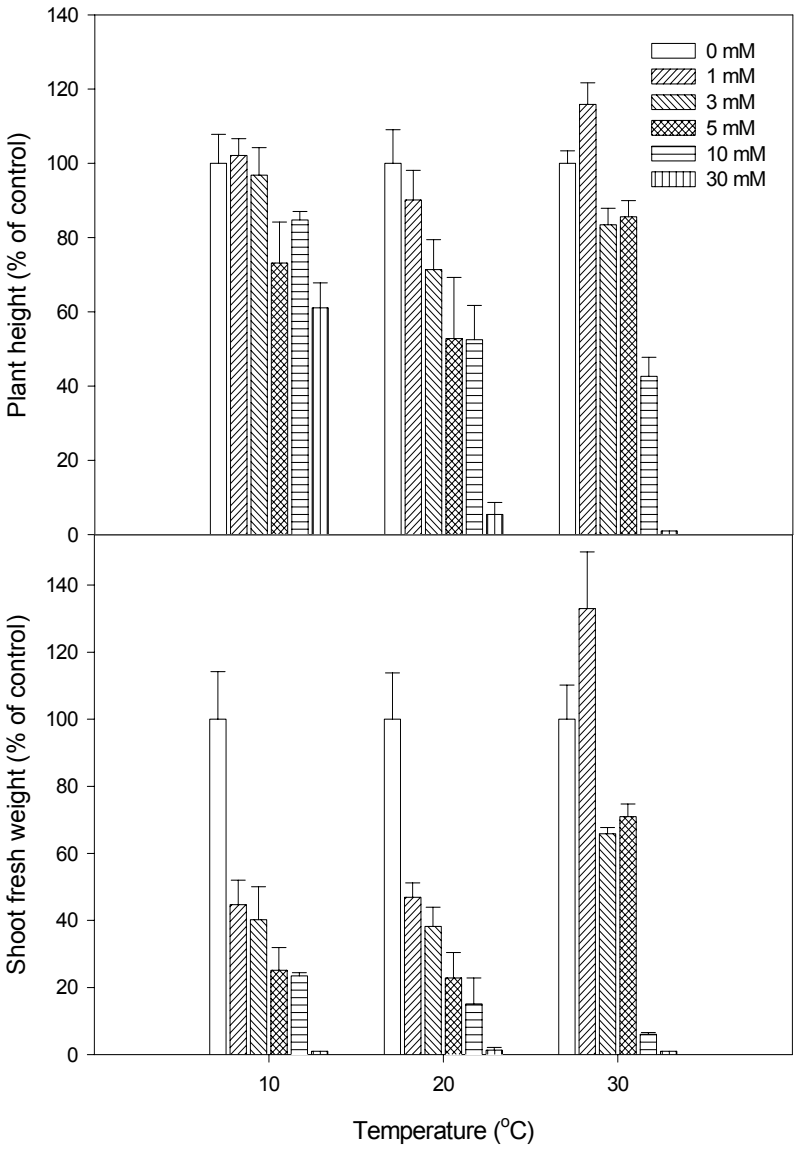


Fig. 10. The effect of ALA on growth of Indian jointvetch under different temperature conditions.

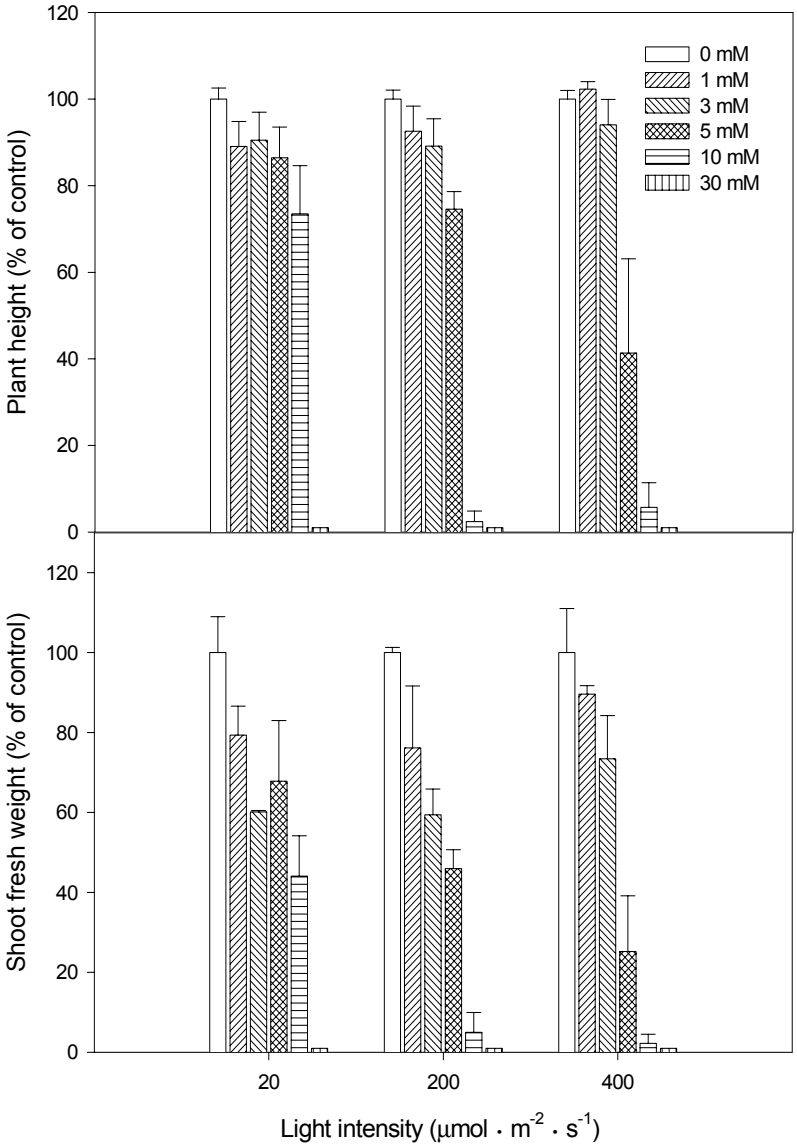


Fig. 11. The effect of ALA on growth of Indian jointvetch under different light intensity conditions.

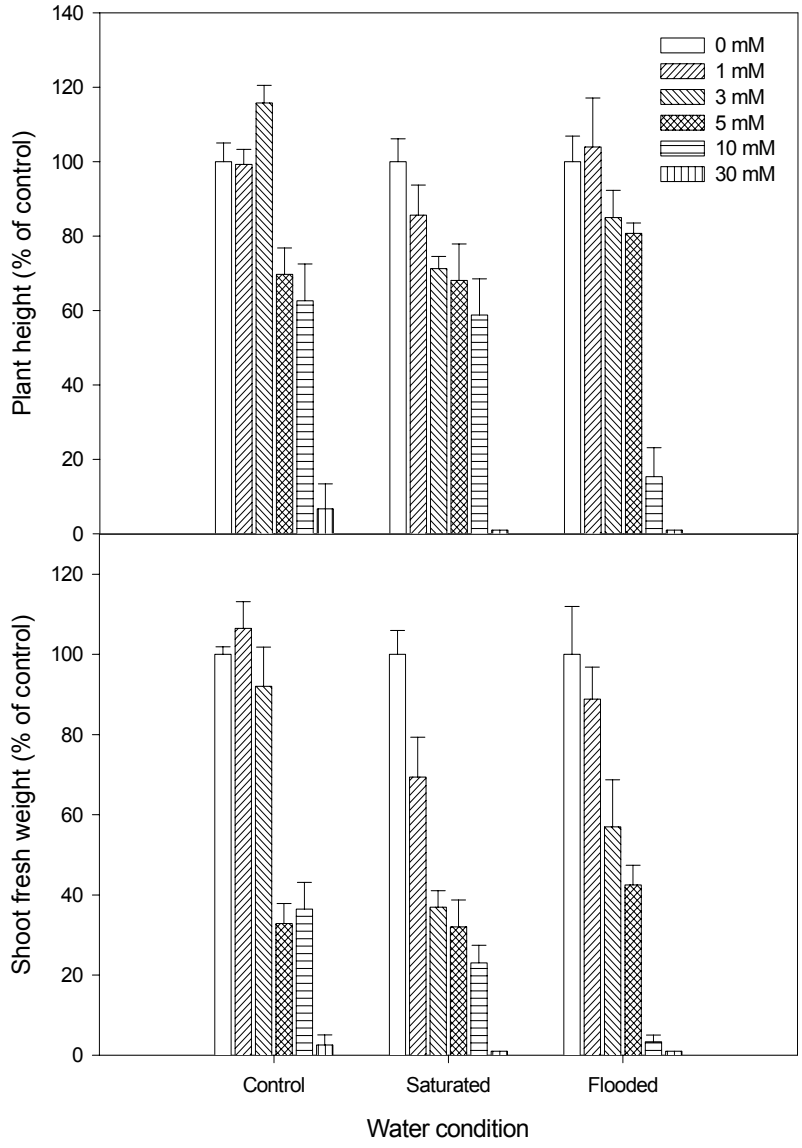


Fig. 12. The effect of ALA on growth of Indian jointvetch under different water conditions.

4. 결과요약

다양한 환경조건하에서 ALA 처리에 의한 보리와 무의 생장촉진과 피와 자귀풀의 제초효과를 알아보고자 하였다. ALA 처리에 의한 보리의 생장촉진 효과는 보리 생육에 부적한 환경인 저온과 저광량 조건에서는 없었다. 그러나 포화수분 조건하에서 ALA를 처리시 보리의 지상부 생체중은 증가되었다. 다양한 환경조건하에서 ALA처리에 의한 무 생장량 반응은 보리에서 반응과 달리 저온(무처리 대비 50-60%)과 고온조건(50%), 고광조건(70-80%) 그리고 포화수분(70%) 같은 작물이 스트레스를 받을 수 있는 조건에서도 ALA 처리에 의한 지하부 생장량이 증가하는 경향을 보였다. 한편 온도조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 제초효과는 저온조건인 10℃조건에서보다 20℃나 30℃에서 높은 경향을 보였다. 또한 광량조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 제초효과는 저광량인 20μmol m^{-2} s^{-1}보다 상대적으로 고광량인 200과 400μmol m^{-2} s^{-1}에서 컸다. 담수조건하에서 ALA 처리에 의한 피의 제초효과는 보통수분과 포화수분조건에 비해 다소 증가하였다. 10℃와 20℃ 조건하에서 ALA 처리에 의한 자귀풀 지상부 생체중의 억제정도는 30℃조건에서 보다 크게 나타났다. 광량조건하에서 5mM과 10mM ALA 처리에 의한 지상부 생체중 억제정도도 저광인 20μmol m^{-2} s^{-1}보다 상대적으로 고광인 200과 400μmol m^{-2} s^{-1}에서 높았다. 담수조건하에서 ALA처리에 의한 자귀풀 생체중의 억제 효과는 보통수분조건과 포화수분조건에 비해 적었다. 이상의 결과로 볼 때, 보리와 무 생육에 부적한 일부 환경조건하에서도 ALA 처리에 의한 촉진효과와 피와 자귀풀 같은 잡초종에 대한 제초효과가 확인되었다.

제4절 ALA 단제 및 다른 제초제와의 혼제에 의한 생물농약 개발연구

1. 서론

기존의 화학적 방법으로만 치중해 온 합성화학물질을 병해충 및 잡초 방제를 위한 생물농약이란 새로운 수단으로 대체 또는 협력 활용함으로써 인축에 안전하고 친환경적이며 지속적이고 경제적인 농업생산에 일조 할 수 있을 것으로 본다. 상업적으로 유용한 농약을 발견하기 위해 선발되는 화합물의 수가 급속도로 증가하고 있지만 합성농약의 개발을 위한 비용, 시간 및 노력이 크게 투입되기 때문에 미생물 농약 등의 새로운 물질 탐색에 대한 전략수립이 요청되고 있다. 현재의 농경지에서의 유해생물 방제는 거의 대부분이 유기합성 화합물인 농약으로만 의존할 수밖에 없는 실정이어서, 합성농약 처리에 의한 방제부담은 절대적으로 막대하다고 볼 수 있다. 따라서 전적으로 원제수입에 의존하는 우리로서 그 부담을 줄이기 위해 미생물로부터 천연활성물질의 발견은 농업생태계에서 현재의 화학적, 기계적, 및 재배적인 유해생물 방제법을 대체 또는 협력하는 새로운 작물보호전략으로 개발하고 이용하는 것이 필요하다고 본다.

ALA의 인공적인 화학적 합성은 매우 많은 단계의 반응이 수반되고 수율이 상대적으로 낮은 반면 광합성 미생물을 이용한 ALA의 생합성은 매우 단순한 생물반응 공정이어서(Beal 등 1979; Chen 등 1981; 이 1997; Nishikawa 1999; Sasaki 등 1990) 앞으로 상업적 생산 가능성이 클 것으로 기대된다. *Rhodobacter, Rhodospirillum, Rhodopseudomonas* 등과 같은 광합성 홍색세균에 의한 ALA 생합성에 관한 많은 연구(Chen 등 1981; Hagemann 등 1995; Germeroth 등 1993; Oelze 1983; Sasaki 등 1990)가 진행되고 있으며 ALA에 의한 생분해성 농약개발 등의 농업적 이용은 미진한 실정이므로 이에 대한 연구는 필수적이라 생각된다. 현재 일본, 미국에서 광역학적 암 치료제 (Hua 등 1995; Mariet 등 1996; Schuitmaker 등 1999) 및 생물제초제/살충제 (Hotta 등 1997a; Matsumoto 등 1994; Rebeiz 1984; Tanaka 등 1992)로서 ALA의 의

학 및 농업분야에서의 관심이 커지면서 연구가 활발하게 진행 중이다.

현재, ALA는 복잡한 유기합성법을 이용하여 생산하고 있으나(Beale 등 1979), 생산단가가 높아 채산성이 없으므로 미생물의 발효를 이용한 ALA의 생산법 및 그 이용에 관한 연구들이 진행되고 있다(Sasaki 등 1987; Sasaki 등 1993; Kipe-Nolt과 Steven 1980; Beale과 Castelfranco 1974). 기본적인 이론적 배경은 그림 2에 제시한 것과 같은 방법으로 정상적인 또는 형질전환된 미생물의 생장과정에서 미생물학적으로 생산이 되고 있다.

ALA의 축적은 ALA합성효소 C_4경로의 (ALA synthase; ALAS) 유전자가 *E. coli*에서 과발현되었을 때 이루어진다. Succinate, pyridoxal phosphate, CoA와 ATP의 첨가로 재조합된 *E. coli* 추출물에서 22 mM 까지의 ALA 생산이 이루어졌다 (Mariet 등 1996). 한편 Choi 등 (1999)은 *Bradyrhizobium japonicum* 균주로부터 hemA 유전자을 통해 ALA합성효소 (ALA synthase; ALAS)를 과발현하는 *E. coli*에 의한 ALA의 세포외 축적과 생산을 성공시켰다. 그들은 pH 7에서 glycine 30 mM과 succinate 90 mM을 배지에 첨가하여 발효조에서 15 mM 농도의 ALA를 생산하였고 levulinic acid (LA)를 첨가하여 20 mM까지에 이르러서 기존의 정상적인 균주 2 - 3 mM 농도보다 10배이상의 생산증대를 보이고 있다. 또한 그 이전 Sasaki 등 (1993)은 중성 pH와 휘발용 지방산 배지에서 LA 첨가로 인해 *Rhodobacter spheroides* 균주를 통해 16 mM 농도 수준의 ALA를 생산한 바 있었다.

TDPH (tetrapyrrole-dependent photodynamic herbicide)형 제초제(Rebeiz 등 1984)로 명명되는 ALA는 녹색식물에 처리하였을 때 엽록소와 heme 대사경로 중 대사중간체인 tetrapyrrole을 필요 이상으로 축적시키는 화합물로 알려지고 있다. 광 하에서 축적된 tetrapyrrole은 그들의 세포막의 산화에 의해 처리된 식물을 고사시키는 일중항 산소의 형성에 광감성(photosensitize)이 부여되어 이루어진다. TDPH는 보통 식물과 동물 세포 내의 모든 tetrapyrrole의 전구체인 5탄소 아미노산이며, 여기에 몇몇 화학물질 중 하나가 조절자로서 혼합사용되면 ALA와 조절자가 동시에 반응하여 조절자는 양적 및 질적으로 tetrapyrrole 축적의 양상을 조절하는 반면 그 ALA 아미노산은 tetrapyrrole 축적에 있어서 골격으로서 역할을 한다. 따라서 Tetrapyrrole 의존형이란 의미는 광활성 제초제 군과 다른 paraquat와 같은 제초제—제초활성에 tetrapyrrole

대사에 의존하지 않는—와는 차별화 된다. ALA는 태양광선에 의해서 강력한 산화물질인 클리드(pchlide)가 형성되고, 이 물질에 의한 일련의 산화반응이 일어나 감수성 식물 잎의 인지질을 파괴하여 고사시키는 포토다이나믹 물질이다. 그러므로, ALA는 사람, 동물 및 농작물 등에는 피해를 주지 않으면서 잡초를 선택적으로 고사시키는 환경친화성의 제초제로 활용될 수 있는 것이다(Rebeiz 등 1984).

2. 재료 및 방법

검정식물의 종자는 육묘용 상토에서 파종 및 발아시켜서 유묘는 Hoagland 용액으로 정기적으로 관수시켰다. 온실에서 자연 일장하에서 실시하되 할로겐 등으로 매일 14시간 동안 조사함으로써 보광시켜준다. 약 28℃의 온실조건 하에서 재배하였다. 본 연구에서 사용된 검정 식물종으로는 벼, 콩, 옥수수, 피, 알팔파, 배추, 한련초였다. 공시되는 화학물질로는 (주) 엔바이로젠으로부터 제공받은 천연(Bio) ALA 및 합성(Synthetic) δ-aminolevulinic acid(ALA), 2,2′-dipyridyl(DPY), oxyfluorfen(고올), nicosulfuron(원호프), paraquat(그라목손)이 사용되었다.

가. 천연(Bio) 및 합성(Synthetic) ALA의 약효 발현의 특성

천연 및 합성 ALA를 공시하여 두 제형간에 약효 발현의 특성 차이를 구명하고 광(암: 0 lux, 광: 60,000 lux) 및 온도(고온: 24℃, 저온 2℃)조건에 따른 천연 및 합성 ALA를 Petri-dish의 알팔파에 1과 2mM로 처리하며 약효의 지속성을 검토하였다.

나. ALA 처리방법별 약효시험

ALA 0.1μM - 10 mM 농도에서 실험실과 온실 조건에서 실용화를 위해 생육단계별 반응을 처리방법을 달리하여 침지, 발생전, 뿌리침지처리, 발생후처리 및 2,2′-dipyridyl(DPY)와의 합제 처리 방법으로 ALA의 활성을 검토한다.

다. 적용 식물의 약해 및 약효반응 연구

ALA 처리 농도를 1-10mM를 기준으로 주요 작물, 벼, 콩, 옥수수에 대한 약해와 잡초로서 피와 한련초에 대한 약효 반응을 검토하여 공시 검정식물을 선발하고 대표적으로 콩, 옥수수 및 피를 상대로 8mM의 ALA를 처리한 후16시간 암치상 상태에서 채취하여 tetrapyrrole의 축적함량을 비교 분석하였다.

라. 적정 제형 개발시험

온실 내 조건에서 순수한 ALA 경우와 계면활성제 등의 첨가한 경우를 비교하는 방법으로 예비제형을 개발 및 검정하여 최대의 활성효과를 발현시킨다.

마. ALA+DPE계 제초제와의 상호작용 연구

ALA와 가장 유사한 작용특성을 갖는 DPE계 대표적인 제초제 oxyfluorfen과 조합처리 함으로써 그들의 상호작용을 검토하며, 암치상기간과 광노출의 영향을 받지 않는 조합을 정한다.

바. ALA+Bipyridylium계 제초제와의 상호작용 연구

광활성이지만 작용기작이 다른 Bipyridylium계 제초제 paraquat와 조합처리함으로써 그들의 상호작용을 검토한다.

사. ALA+Sulfonylurea계 제초제와의 상호작용 연구

현재 가장 널리 사용되고 있는 Sulfonylurea계 제초제 nicosulfuron과 조합 처리함으로써 협력적인 그들의 상호작용을 검토한다.

3. 결과 및 고찰

가. 천연(Bio) 및 합성(Synthetic) ALA의 약효 발현의 특성

1) 천연(Bio) 및 합성(Synthetic) ALA의 약효 비교

미생물에 의해 생산된 ALA와 합성된 시판용 ALA 간의 동일한 농도 조건에서 발

아전 처리를 한 결과 알팔파(그림 1), 피(그림 2), 배추(그림 3), 벼(그림 4)에 대한 제초활성은 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 한편 지상부 및 지하부 생장에 유의적인 억제효과를 보이는 농도는 10^{-4}(0.1)에서 10^{-3}M(1mM)까지의 농도범위를 나타냈다.

Fig. 1. Comparison in phytotoxic effects of Bio- and Synthetic-ALA on shoot and root length of alfalfa 6 days after seeding on filter paper wetted with different ALA concentrations.

Fig. 2. Comparison in phytotoxic effects of Bio- and Synthetic-ALA on shoot and root length of barnyard grass 6 days after seeding on filter paper wetted with different ALA concentrations.

Fig. 3. Comparison in phytotoxic effects of Bio- and Synthetic-ALA on shoot and root length of Chinese cabbage 6 days after seeding on filter paper wetted with different ALA concentrations.

Fig. 4. Comparison in phytotoxic effects of Bio- and Synthetic-ALA on shoot and root length of rice 6 days after seeding on filter paper wetted with different ALA concentrations.

특히 피의 지하부 생장에 있어서 10^{-4}(0.1)에서 10^{-3}M(1mM)까지의 농도범위에서 억제 효과가 뚜렷하게 나타났다. 배추는 10^{-3}M(1mM)의 농도에서 자엽에 황화 및 백화현상이 뚜렷하게 나타났고 Chlorophyll a 의 함량(그림 5)에 있어서 유의적인 감소를 보였다.

Fig. 5. Comparison in photodynamic effects of Bio- and Synthetic-ALA on chlorophyll a content of Chinese cabbage 6 days after seeding on filter paper wetted with different ALA concentrations.

2) 천연(Bio) 및 합성(Synthetic) ALA의 지속성

ALA의 약효 발현의 특성과 지속성 시험에서는 Bio 및 합성 ALA가 1과 2 mM로 처리된 Petri-dish를 50일간 동안 고온조건에서 광 및 암조건에 치상한 후 처리 및 치상 후 5, 10, 15, 25, 35, 및 50 일 째에 알팔파에 대해 bioassay를 실시한 결과 제초활성의 변화는 인정되지 않았다 (그림 6).

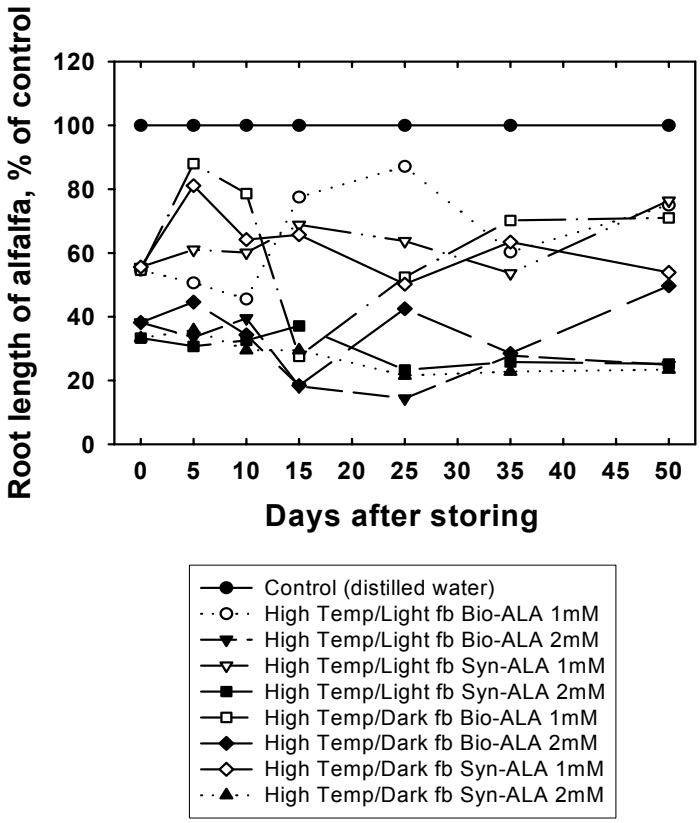


Fig. 6. Change in herbicidal activities of Bio- and Synthetic-ALA on root length of alfalfa as affected by storage time. Bioassay was conducted every 6 days after seeding on filter paper treated with different ALA concentrations.

나. ALA 처리방법별 약효시험

1) 종자침지처리

합성 ALA가 2, 4, 6, 및 8 mM 농도로 벼, 피, 알팔파, 및 배추 종자를 8시간 동안 침지한 후 세척한 후 증류수가 젖어 있는 Petri-dish에 파종한 결과 20% 내외의 억제 효과가 나타났다(그림 7).

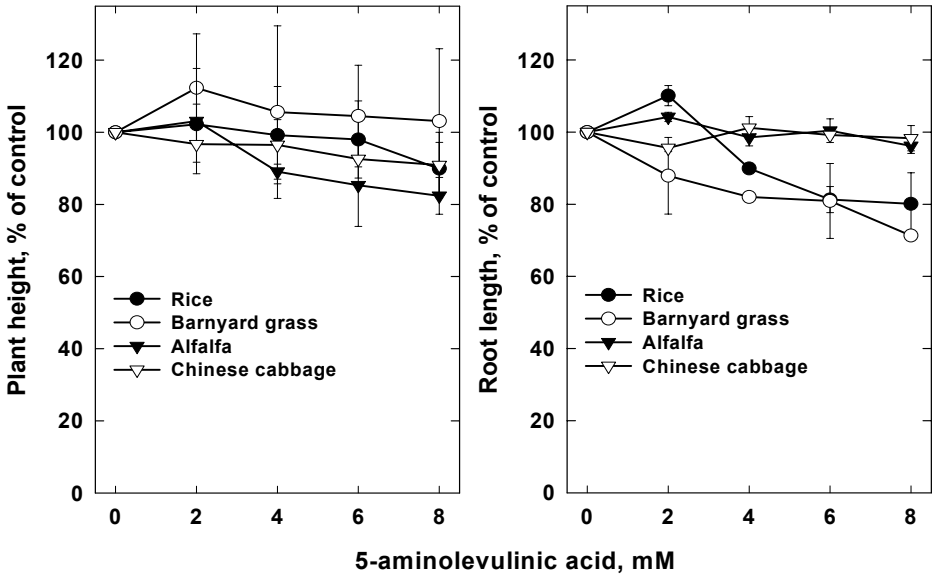


Fig. 7. Effects of pre-seed treatment by soaking in ALA solution for 8 hours on plant height and root length of rice, barnyard grass, alfalfa, and Chinese cabbage 6 days after seeding on filter paper wetted with distilled water.

2) 발생전처리

합성 ALA가 0.5, 1, 1.5, 및 mM 농도가 처리된 Petri-dish에 증루수에 12시간 동안 침지한 벼, 피, 알팔파, 및 배추 종자를 파종한 결과 배추, 피, 벼, 및 알팔파 순으로 ALA에 대한 제초활성 반응이 높게 나타났고 특히 알팔파는 가장 내성이 높은 식물로 나타났고 배추는 0.5mM에서부터 황화 및 백화현상이 유발되어 괴사되었으며 피는 1mM 농도부터 유의적으로 지상부 및 지하부 생육이 억제되었다 (그림 8).

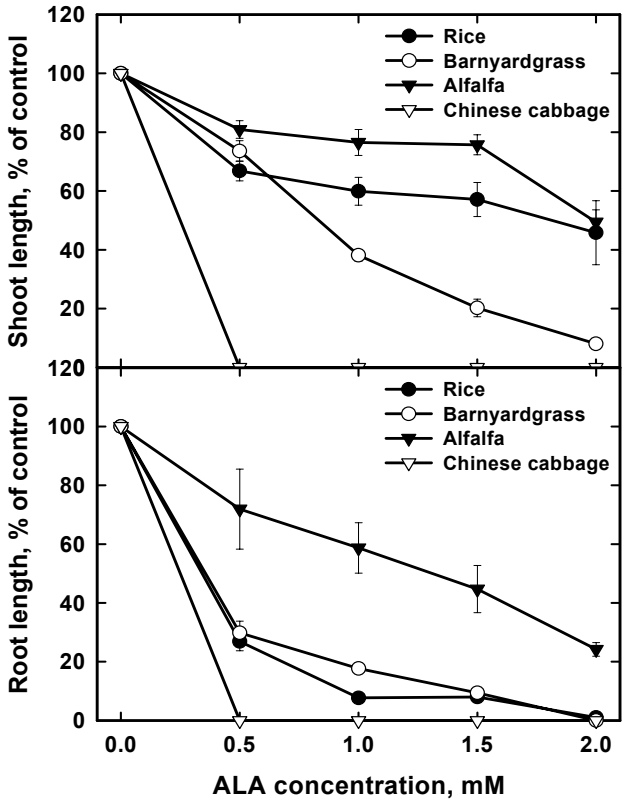


Fig. 8. Effects of pre-emergence application of ALA on shoot and root length of rice, barnyard grass, alfalfa, and Chinese cabbage 6 days after placing on filter paper wetted with different ALA concentrations.

3) 광조건 유무에 따른 15일묘 뿌리 침지처리 효과

재배 후 15일된 벼와 피를 굴취하여 합성 ALA가 1, 2, 3, 4 및 6 mM 농도로 조제된 용액에 뿌리를 침지하여 처리한 후 16시간동안 암상태에서 처리한 후 광노출을 시킨 경우(DL)와 처리 후 연속 광에 노출시킨 경우(L), 암조건에 계속적으로 치상할 경우(D)를 비교한 결과 DL의 경우는 농도에 비례하여 활성을 보였고 연속 암조건(D)에서는 DL보다 다소 약제 활성이 저하되는 경향이었으나 연속광(L)의 경우는 1과2 mM에서 100%의 억제효과를 나타냈다 (그림 9).

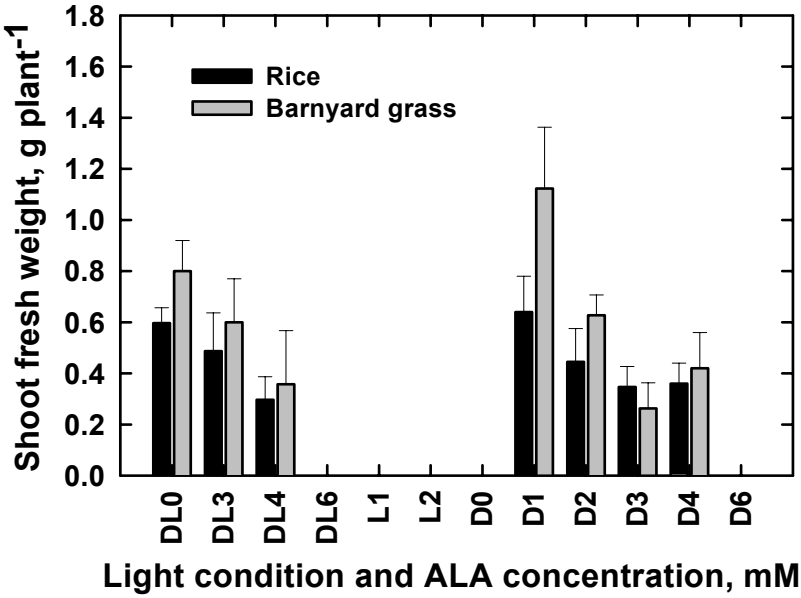


Fig. 9. Effects of root soaking application of ALA on shoot fresh weight of rice and barnyard grass under different light conditions. DL: Dark period for 16 hrs followed by light exposure, L: continous light exposure, and D: Continuous darkness, after soaking application.

4) 발생후처리

재배 후 15일된 벼, 피, 알팔파, 및 배추 유묘에 합성 ALA가 2, 4, 6 및 8 mM 농도로 조제된 용액을 엽면 살포하여 처리한 후 16시간 동안 암상태에서 치상한 후 광노출을 시킨 결과 지상부 및 지하부 신장은 모두 배추는 2mM에서부터 피는 4mM에서부터 100% 생장이 억제 되었고 벼와 배추는 비교적 내성반응을 보였다 (그림 10).

한편 검정식물의 지상부 및 지하부 생체중도 유사한 반응을 보였다 (그림 11).

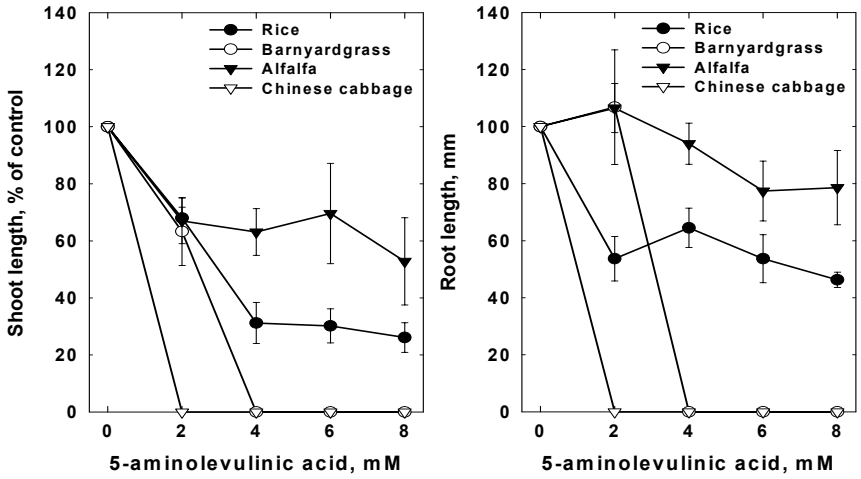


Fig. 10. Effect of post-emergence application of ALA on shoot and root lengths of rice, barnyard grass, alfalfa, and Chinese cabbage 6 days after application. The plants were grown in horticultural pots filled with silt-loam soil under greenhouse.

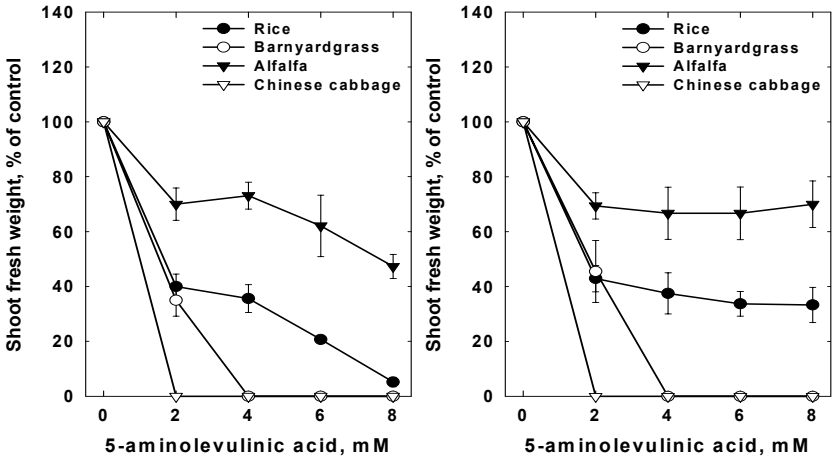


Fig. 11. Effect of post-emergence application of ALA on shoot and root fresh weight of rice, barnyard grass, alfalfa, and Chinese cabbage 6 days after application. The plants were grown in horticultural pots with silt-loam soil under greenhouse.

5) 2,2′-dipyridyl (DPY)와의 합제처리

재배 후 15일된 벼, 피, 알팔파, 및 배추 유묘에 합성 ALA가 0, 1, 2mM 농도로 DPY가 0, 1, 2mM로 조합된 용액을 엽면살포하여 처리한 후 16시간 동안 암치상한 후에 광노출한 결과 알팔파와 벼보다는 배추와 피에서 ALA와 DPY의 synergy 효과가 나타났다 (그림12).

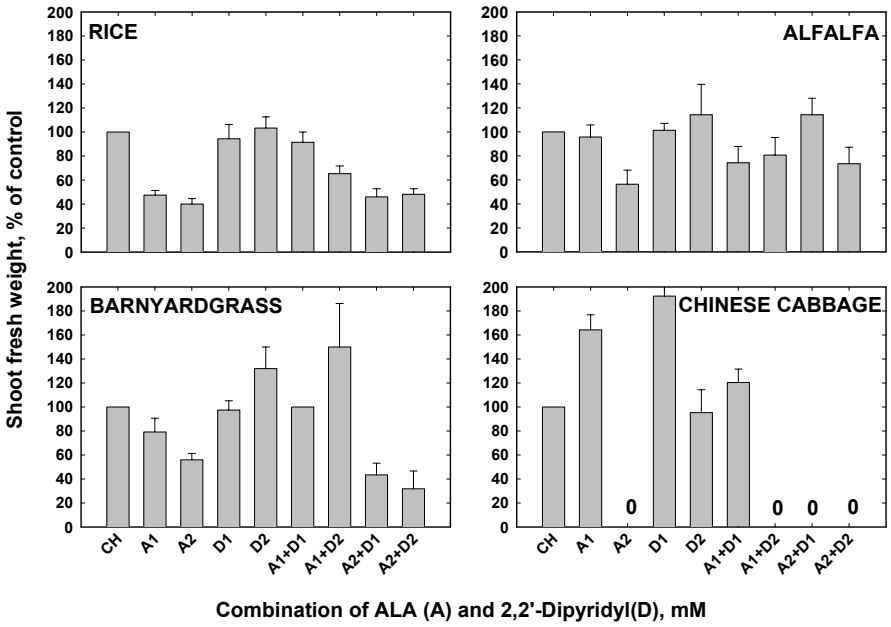


Fig. 12. Effect of combined application of 5-aminolevulinic acid and 2, 2'-dipyridyl on fresh shoot weight of rice, barnyard grass, alfalfa, and Chinese cabbage 6 days after application. The plants were grown in horticultural pots filled with silt-loam soil under greenhouse.

다. 적용식물의 약해 및 약효반응 연구

1) 생육단계별 약효반응

제 1, 2, 3, 4, 5엽기로 재배 된 피(그림 13)와 배추(그림 14)에 Bio 및 합성 ALA를 2mM 농도로 처리한 후 16시간 동안 암조건에 치상한 후에 광 노출시킨 결과 피는 3, 4엽기에서는 무처리에 비해 억제되는 반면 1,2 엽기와 5엽기에서는 오히려 증가하는 경향을 보인 반면, 배추는 엽기가 증가할수록 억제정도가 저하되는 일반적인 현상을 보였다.

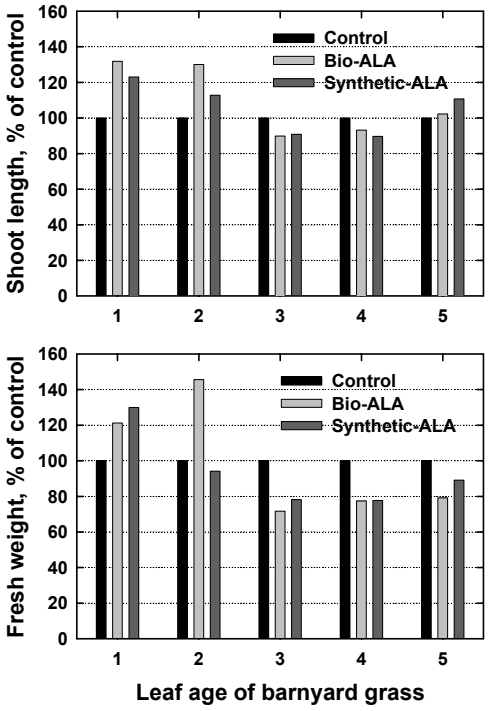


Fig. 13. Effects of Bio- and Synthetic-ALA on shoot length and fresh weight of barnyard grass as affected by different leaf stages.

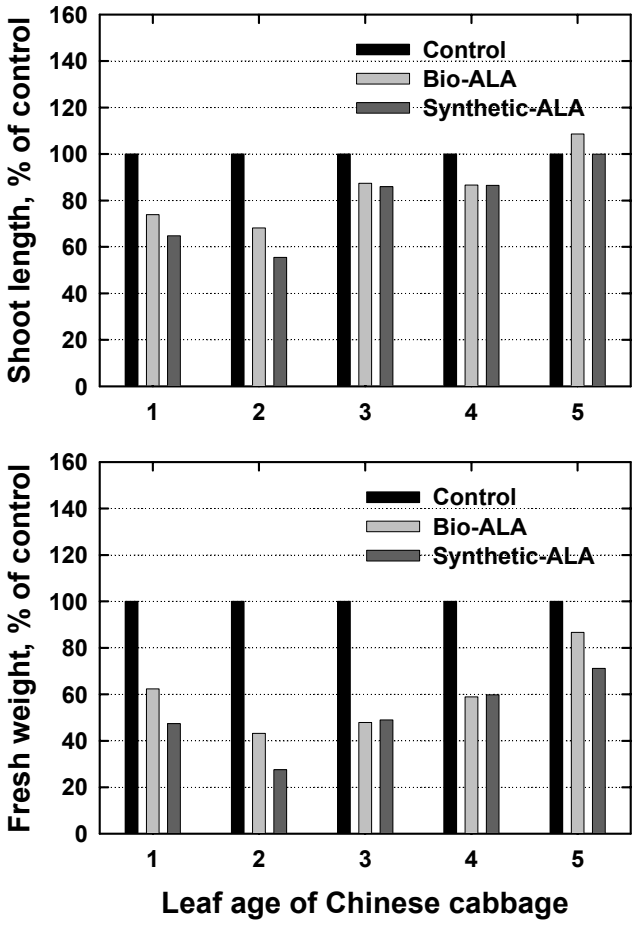


Fig. 14. Effects of Bio- and Synthetic-ALA on shoot length and fresh weight of Chinese cabbage as affected by different leaf stages.

2) 농도별 약제 반응

재배 후 10일된 콩, 옥수수, 피, 및 한련초 유묘에 BIO 및 합성 ALA가 2, 4, 6 및 8 mM 농도로 조제된 용액에 surfavtant 0.1%를 첨가하여 엽면살포하여 처리한 후 16시간 동안 암상태에서 치상한 후 광노출을 시킨 결과 초장의 경우 피에서만 농도가 증

가할수록 유의적인 감소가 있을 뿐 두 작물 종은 거의 반응을 보이지 않았고 한련초는 상당한 내성반응을 나타냈다 (그림15, 16).

3) Tetrapyrrole 축적함량의 차이

전체적으로 잡초 피는 작물 콩과 옥수수에 비해 tetrapyrrole 축적량이 유의적으로 더 많은 것으로 나타났다. 총 tetrapyrrole 함량의 경우 피는 무처리에 비해 74배가 증

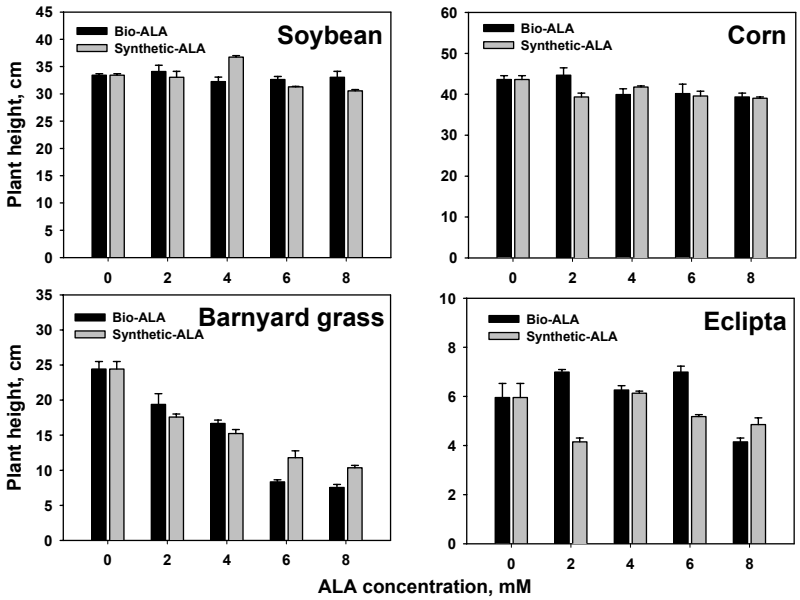


Fig. 15. Effects of ALA-foliar application of two types on plant height of soybean, corn, barnyard grass and eclipta as affected by different ALA concentrations.

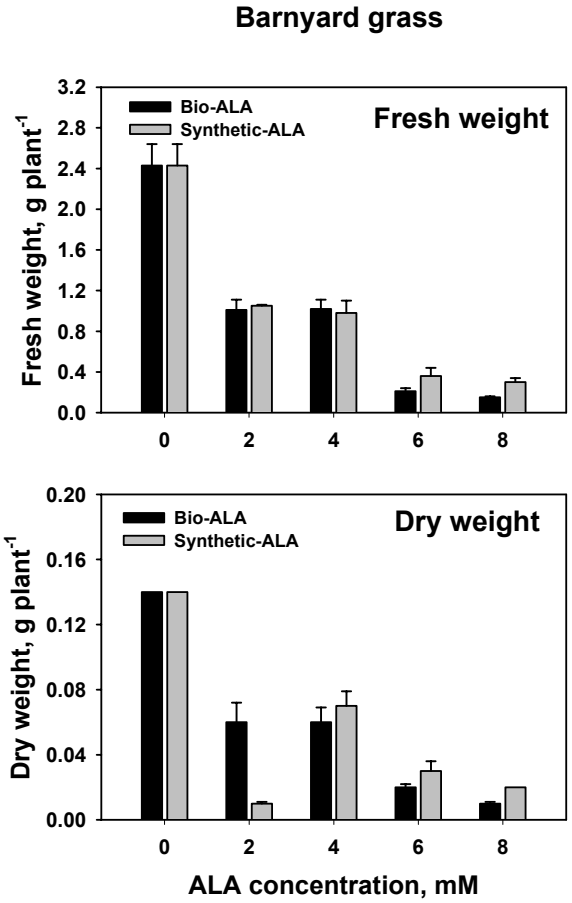


Fig. 16. Effects of ALA-foliar application of two types on fresh and dry weight of barnyard grass as affected by different ALA concentrations.

가한 데 비해 옥수수와 콩은 각각 0.5와 2.8배로 피가 두 작물보다 많은 tetrapyrrole 축적량을 갖고 있는 것으로 나타났다. 그 중에서 Proto IX 피가 무처리에 비해 708배가 증가한데 비해 옥수수와 콩은 각각 0.5배와 7배로 증가하였다. 이 결과는 피는 두 작물에 비해 상대적으로 월등한 tetrapyrrole 축적량을 갖고 있어서 광 노출 후에 광활성 정도가 커서 제초활성이 높게 나타날 수 있음을 시사하고 있다. 두 작물 중에서도 콩은 옥수수보다 상대적으로 많은 양의 tetrapyrrole을 축적하고 있는 것으로 나타났다 (표 1).

Table 1. Contents of tetrapyrroles, as intermediates of chlorophyll biosynthesis, in barnyardgrass, corn, and soybean 16 hours after foliar application at 8 mM ALA.

Plant	ALA Conc.	Tetrapyrrole content, nmol g^{-1} fresh wt.			
		Proto IX	Proto IX-ME	Pchlide	Total
Barnyardgrass	0 mM	0.337±0.065 (100)	0.313±0.042 (100)	0.859±0.314 (100)	3.368±0.964 (100)
	8 mM	238.5±62.2 (70,772)	0.437±0.041 (140)	10.95±1.28 (1,275)	249.9±46.5 (7,420)
Corn	0 mM	0.903±0.448 (100)	0.520±0.061 (100)	0.480±0.091 (100)	1.903±0.165 (100)
	8 mM	1.379±0.237 (153)	0.552±0.021 (106)	0.929±0.017 (194)	2.860±0.760 (150)
Soybean	0 mM	0.370±0.115 (100)	0.930±0.026 (100)	1.509±0.416 (100)	2.809±0.816 (100)
	8 mM	2.578±0.704 (697)	0.954±0.065 (103)	4.393±0.065 (291)	7.925±1.134 (282)

Values are mean±SE of three replications.

4) 검정식물별 약제 반응

재배 후 10일, 20일, 30일된 피에 BIO 및 합성 ALA가 2 및 4 mM 농도로 조제된 용액에 surfavtant 0.1%를 첨가하여 엽면살포하여 처리한 후 16시간 동안 암상태에서 치상한 후 광노출을 시킨 결과 피의 생체중 반응에 있어서 10일묘는 농도가 증가할수록 유의적인 감소가 있었고 20일묘와 30일묘는 2mM 농도처리에서 오히려 촉진되었고 4mM에서는 다소 억제되는 반응을 보여 일반 제초제처럼 ALA를 처리시 피를 기준으로 2-3엽기에 처리하는 것이 적정한 시기라 사료되었다 (그림 17).

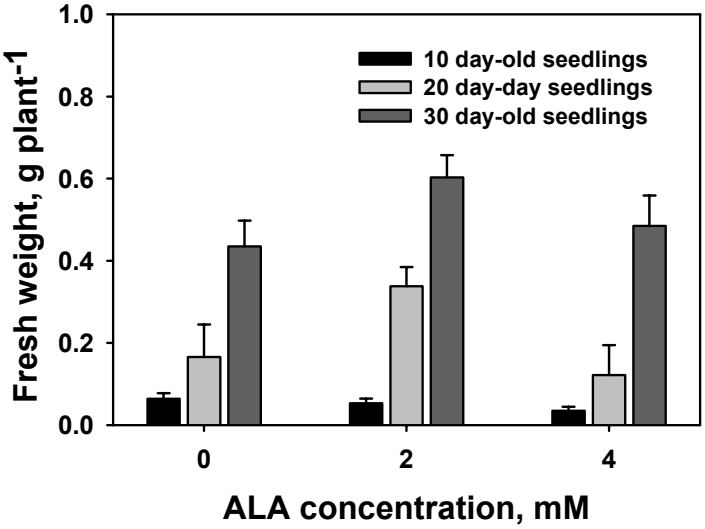


Fig. 17. Effects of ALA-foliar application on fresh weight of barnyard grass as affected by different growth stages.

라. 적정 제형 개발시험

1) ALA 경우와 계면활성제 첨가처리

재배 후 10일된 피에 ALA가 2, 4, 6 및 8 mM 농도로 조제된 용액에 surfavtant Tween 80을 0.1%로 첨가하여 엽면살포하여 처리한 후 16시간 동안 암상태에서 치상한 후 광노출을 시켜거 surfactant를 처리하지 않는 것과 비교한 결과 유의적으로 큰 차이를 나타내지 않았다 (그림 18).

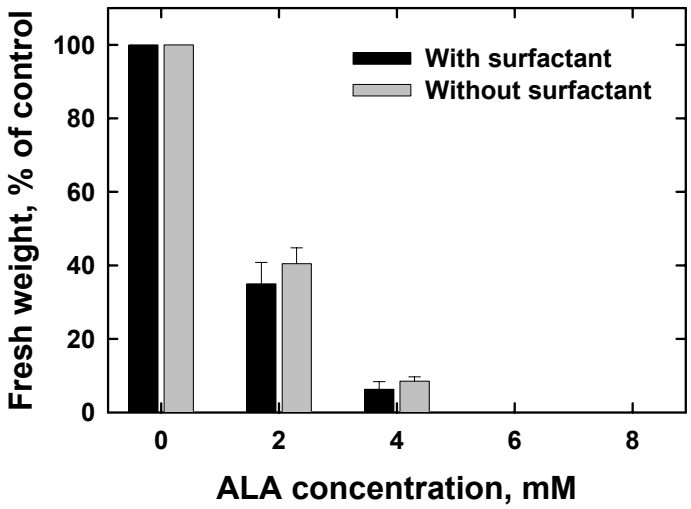


Fig. 18. Comparison in phytotoxic effects of ALA-foliar application with or without surfactant on fresh weight of barnyard grass as affected by different ALA concentrations.

마. ALA+DPE계 제초제와의 상호작용 연구

1) 제초제 oxyfluorfen과 조합처리로 그들의 상호작용 검토

재배 후 15일된 2.5 -3엽기 벼와 피에 합성 ALA 0, 1, 2, 3, 4mM 농도와 oxyfluorfen이 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}M로 조합된 용액을 엽면살포하여 처리한 후 16시간 동안 암치상한 후에 광노출시킨 결과 모든 조합처리에서 벼와 피의 생체중 반응에 있어서 synergy 효과가 상당히 나타났다(그림 19).

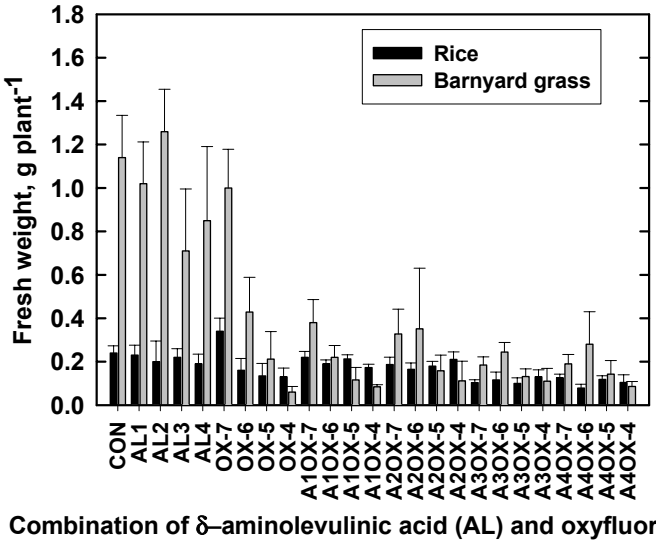


Fig. 19. Effects of combined ALA-foliar application of ALA and oxyfluorfen on fresh weight of rice and barnyard grass as affected by different ALA concentrations.

바. ALA+Bipyridylium계 제초제와의 상호작용 연구

1) 제초제 paraquat와 조합처리로 그들의 상호작용을 검토

재배 후 15일된 2.5 -3엽기 배추와 피에 합성 ALA 0, 1, 2, 3, 4mM 농도와 paraquat이 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-3}M로 조합된 용액을 엽면살포하여 처리한 후 16시간 동안 암치상하여 광노출시킨 결과 모든 조합처리에서 배추와 피의 생체중 반응에 있어서 고농도의 조합에서 경미한 synergy 효과가 나타났다 (그림 20).

한편 chlorophyll a 함량에 있어서 반응 역시 생체중과 유사한 경향으로 나타났다 (그림 21).

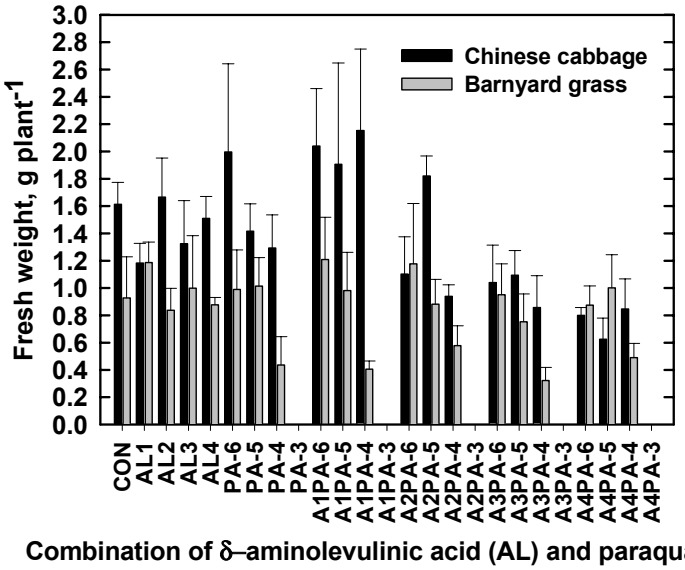


Fig. 20. Effects of combined ALA-foliar application of ALA and paraquat on fresh weight of Chinese cabbage and barnyard grass as affected by different ALA concentrations.

사. ALA+Sulfonylurea계 제초제와의 상호작용 연구

1) 제초제 nicosulfuron과 조합처리로 그들의 상호작용을 검토

재배 후 15일된 2.5 - 3엽기 피에 합성 ALA 0, 1, 2, 3, 4mM 농도와 nicosulfuron 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}M로 조합된 용액을 엽면살포하여 처리한 후 16시간 동안 암치상하여 광노출시켜서 피의 생체중 반응에 있어서 상호작용 효과를 검토한 결과 공시 조합농도에서 생체중에서는 뚜렷한 상호작용은 관찰되지 않았으나 건물중과 엽록소 함량에서는 일부조합에서 상호작용이 나타났다 (그림 22-24).

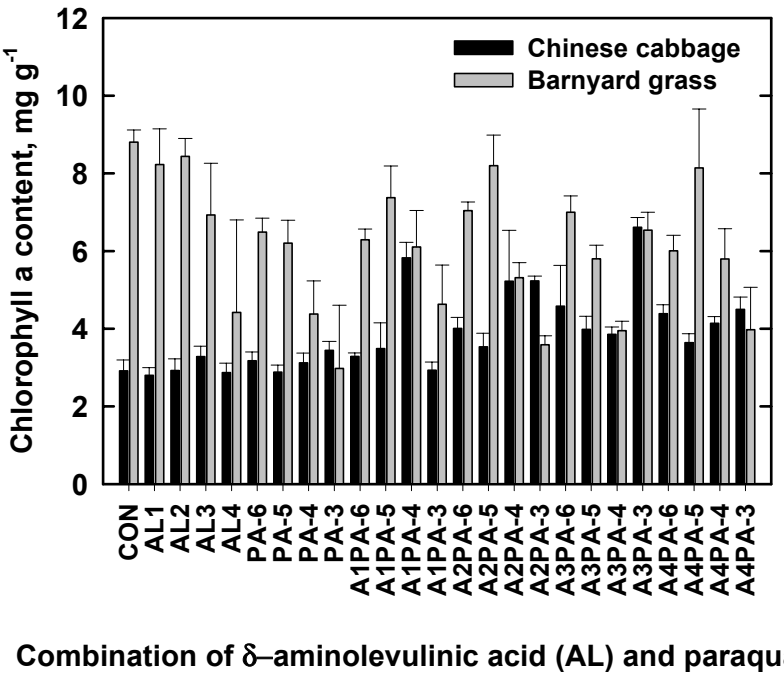


Fig. 21. Effects of combined ALA-foliar application of ALA and paraquat on chlorophyll a content of Chinese cabbage and barnyard grass as affected by different ALA concentrations.

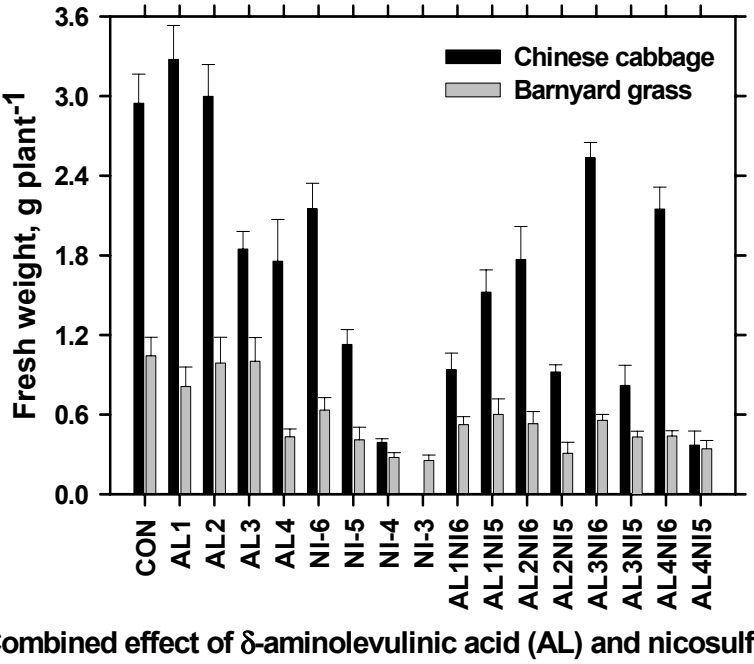


Fig. 22. Effects of combined ALA-foliar application of ALA and nicosulfuron on fresh weight of Chinese cabbage and barnyard grass as affected by different ALA concentrations.

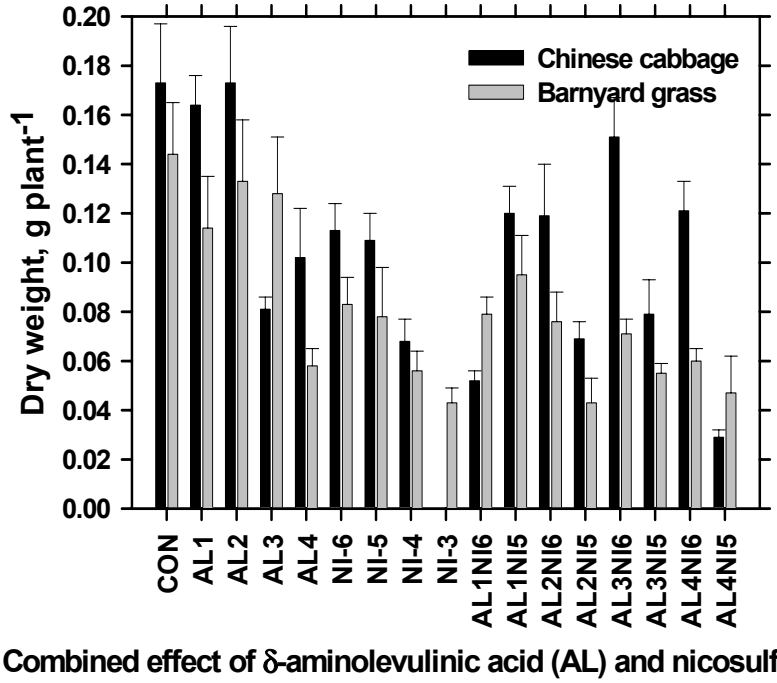


Fig. 23. Effects of combined ALA-foliar application of ALA and nicosulfuron on dry weight of Chinese cabbage and barnyard grass as affected by different ALA concentrations.

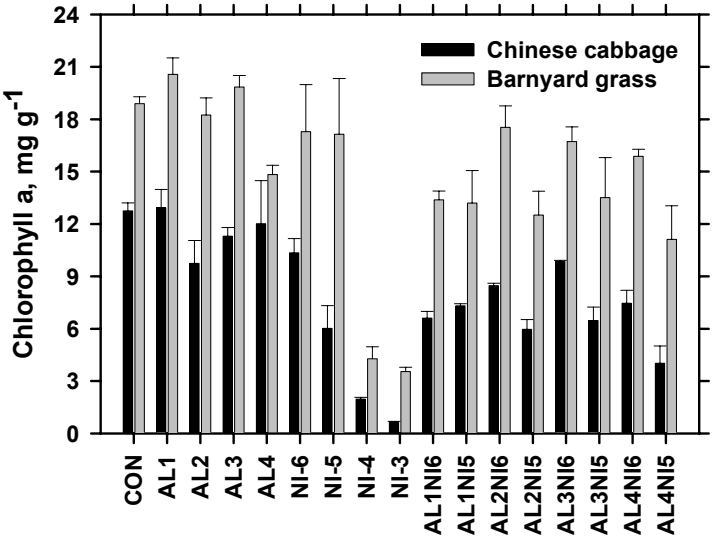


Fig. 24. Effects of combined ALA-foliar application of ALA and nicosulfuron on chlorophyll a content of Chinese cabbage and barnyard grass as affected by different ALA concentrations.

4. 결과요약

실험실내 Petri dish시험에서 온실 내 pot시험을 통해 ALA의 단제 및 타 약제와의 혼제에 대한 다양한 작물과 잡초종의 생물학적 반응이 검토되었다.

미생물에 의해 생산된 ALA(Bio-ALA)와 합성된 ALA(Synthetic-ALA)을 동일한 농도로조제하여 벼, 알팔파, 피 및 배추 종자에 처리한 결과 두 제형간의 차이는 인정되지 않았고 10^{-4} - 10^{-3}M 사이의 농도에서 지상부보다는 지하부의 생육이 더 억제되었

고 엽록소의 함량이 억제됨이 관찰되었다. Petri dish에 ALA 두 제형을 각각 1과 2mM로 처리하여 처리 후 50일 째까지 광과 암조건에 치상/보관하여 5일 또는 10일 간격으로 알팔파를 파종한 결과 제초활성에 있어서 큰 변화를 보이지는 않았다.

작물의 생육단계별로 제초반응을 보기 위해 종자침지, 발생전처리, 뿌리침지처리, 발생후처리를 한 결과 발생후처리에서 가장 높은 약제반응을 보였고 특히 뿌리침지처리에서 ALA가 상향이행됨을 증명하였다. 한편 약제반응을 증대시키기 위해 ALA를 2,2'-dipyridyl과의 혼합처리에서 배추와 피에서 벼와 알팔파에서보다 높은 상승효과를 보였다.

식물의 엽령간의 약제반응은 피는 엽령이 높을수록, 배추는 낮을수록 높은 제초활성을 보여 식물간의 선택성이 있음을 보여주었다.

ALA를 2-8mM에 대한 농도별 약제반응은 작물인 콩과 옥수수가 잡초인 한련초와 피보다 초장과 중량에 있어서 큰 변화 없이 높은 내성을 보였다. 한편 식물간에 광활성 제초반응의 차이를 알아보기 위해 chlorophyll 형성과정의 전구체인 tetrapyrrole 축적함량을 측정하여 비교한 결과 총 tetrapyrrole 함량에 있어서 피는 무처리에 비해 74배가 증가한 데 비해 옥수수와 콩은 각각 0.5와 2.8배로 피가 두 작물보다 많은 tetrapyrrole 축적량을 갖고 있는 것으로 나타났다. 그 중에서 Proto IX 피가 무처리에 비해 708배가 증가한데 비해 옥수수와 콩은 각각 0.5배와 7배로 증가하였다. 이 결과는 피는 두 작물에 비해 상대적으로 월등한 tetrapyrrole 축적량을 갖고 있어서 광 노출 후에 광활성 정도가 커서 제초활성이 높게 나타날 수 있음을 시사하고 있다.

피의 생육단계별로 ALA 2mM과 4mM 농도에 대한 반응은 묘령이 낮을수록 제초활성이 높게 나타나 다른 제초제와 유사한 결과를 보였다. ALA를 전착제 등 계면활성제와 혼합하여 처리한 것이 ALA 단일 처리의 경우보다도 높은 제초활성을 보였다.

ALA와 기존제초제와의 혼합사용을 통한 상호작용을 검토하고자 DPE계, Bipyridylium계, 및 Sulfonylurea계 제초제를 1종씩 선택하여 재배 후 15일된 2.5 -3엽기 벼와 피에 합성 ALA 0, 1, 2, 3, 4mM 농도와 oxyfluorfen이 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}M로 조합된 용액을 엽면살포하여 처리한 후 16시간 동안 암치상한 후에 광노출시킨 결과 DPE계 모든 조합처리에서 다른 두 제초제보다 벼와 피의 생체중 및 엽록소 함량 반응에 있어서 더 높은 synergy 효과가 나타났다.

제5절 ALA의 농업환경 및 Stress와의 상호작용 연구

1. 서언

델타아미노레브린산(ALA)는 인간, 동식물 및 미생물의 체내에서 각 엽록소, heme, bacteriochlorophyll 및 vitamin B_{12} 유사물질과 같은 tetrapyrrole 생합성 과정의 중간 대사물질로서 알려져 있다. 최근 ALA는 인축과 작물에 유해하지 않으면서도 잡초에 대해 억제작용을 발휘하는 생분해성 농약뿐만 아니라 암에 대해 광활성 치료약물로서 많은 관심을 받고 있다. 또한 매우 낮은 농도에서는 여러 작물들의 생육과 수량을 촉진시키며 면화와 같은 작물의 내염성을 증진시킨 것으로 보고되고 있다. ALA는 보통 복잡한 공정을 통해 화학적으로 합성되기 때문에 값비싼 비용이 소용된다. 따라서 저렴한 비용이 소요되는 미생물을 이용한 생물학적 생산이 제안되어져 왔었다. 미생물 또는 인축에 있어서 ALA는 보통 glycine과 succinate로부터 ALA합성효소 (ALAS)에 의해 생합성 된다. 그러나 ALA dehydratase(ALAD)는 ALA 두 분자가 porphobilinogen(PBG)로 축합하는 것을 촉매한다. 미생물학적 생산에서 ALA의 축적을 증대시키기 위해 tetrapyrrole 생합성 경로에서 ALAD의 경쟁적인 억제제인 levulinic acid(LA)를 배지에 첨가해야만 한다. ALA는 tetrapyrrole 의존형 광활성제초제(TDPH)로 명명되었는데 ALA를 처리하면 녹색식물의 엽록소(Chl)와 heme 대사경로의 중간대사물질인 tetrapyrrole이 필요 이상의 양으로 축적하게 되는데 광 조건 하에서 이 축적된 tetrapyrrole은 DPE계 제초제처럼 일중항 산소를 형성시켜 식물체의 세포막을 과산화 시킴으로써 식물체를 고사시킨다. ALA를 새로운 제초제로 개발하기 위해서 암 조건(처리후 암치상기간)에서 처리된 식물체를 다량의 tetrapyrrole의 생합성과 축적을 유도하기 위하여 2,2'-dipyridyl과 같은 엽록소 생합성을 위한 활성제 와의 혼합사용을 시도하고 있다. 후속되는 광노출 기간동안에 축적된 tetrapyrrole은 강력한 광활성제로서 작용하여 감수성 식물을 수 시간 내에 고사시키게 된다.

광활성 효과를 발현시키기 위해 살포후 암치상기간(PSDIP)이 필요하다고 밝혀졌다 (Rebeiz 1984). ALA가 처리되면 축적된 tetrapyrrole은 광 노출로 광역학적인 제초효

과의 발현에 필수적인 것이기 때문에 PSDIP가 필수적인가에 대한 궁금증을 갖는 것은 당연하다. 이 기간은 광분해로부터 tetrapyrrole을 보호하며 그들이 암상태에서 축적이 가능토록 하기 위해 필요하다고 본다. 한 실험에서도 암치상기간이 수반되는 처리식물은 암치상기간이 없는 식물에 비해 약 3배 더 광역학적인 피해를 나타냈다 (Rerbeiz, 1984).

Tetrapyrrole 축적과 광역학적 피해와의 상관 관계는 일반적으로 유의적이었다. 가장 좋은 상관관계는 Pchlide 축적과 광역학적인 피해에서 관찰되었다. 한편 MP(E) 및 Proto축적과 광역학적인 피해간의 유의적인 상관관계는 그들의 농도가 어떤 한계농도 이상에서만 나타났다. 총 tetrapyrrole 축적과 광역학적 피해간의 전체적인 상관이 우수할 지라도 그것은 광역학적인 피해를 유도하는데 있어서 여러 가지 tetrapyrrole의 상대적인 장점이 아직 엄밀하게 조사되지 않았다. 예를 들면 광역학적인 피해를 일으키는 것이 Pchlide, MP(E) 및 Proto pools의 MV, DV 또는 MV + DV 둘 다인지는 아직 알려져 있지 않다. 다른 보고 (Belanger 등 1982)에서 보여 준 바 Pchlide와 MP(E)의 MV와 DV의 유의적인 양이 ALA + DPY 처리 식물에서 축적되었다. 더구나, 대사되는 tetrapyrrole의 광에 대해 불안정성을 고려하면 광역학적 피해는 본질적으로 축적된 tetrapyrrole에 의해 야기되는지 또는 그들의 일시적인 파괴물질에 의해 일으키는지는 정확히 알려지지 않고 있다. 예를 들면 일광에 노출되는 동안 ALA + DPY에 의해 유도된 Pchlide와 MP(E) pools가 경시적으로 소실되는 것을 알 수 있다. 온실에서 광노출 후 8시간 째에 MP(E) 함량이 단순히 일시적인 증가 후에 MP(E)와 Pchlide pools의 76과 93%가 각각 소실되었는데 아마도 광 분해의 결과로 생각된다. ALA에 의해 유도된 Pchlide는 파괴되고 온실에서 높은 광 강도 하에서 Chlorophyll로 전환되지 않는 것으로 잘 알려져 있다. 이는 일광에 8시간 노출하는 동안에 ALA + DPY가 처리된 식물체에 의한 유의적인 순수 Chl 합성의 결핍 때문인 것으로 증명되었다 (Rebeiz 1984).

처리된 ALA의 단지 매우 낮은 비율이 tetrapyrrole로 전환되기 때문에 식물조직의 tetrapyrrole 생합성 능력을 증대시킬 수 있는 어떤 화학물질들은 그 목표를 달성할 수 있을 것으로 기대된다. 2,2′-dipyridyl이 바로 그러한 일에 있어서 제 1의 후보물질이다. 이런 결론은 두 가지 주요한 고려에서 근거한 것인데; a) 2,2'-dipyridyl은 상대

적으로 값이 싸고 쉽게 이용할 수 있는 물질이고, b) 이 화학물질은 식물체 조직에서 tetrapyrrole의 생합성과 축적을 증대시킨다고 증명되었기 때문이다(Duggan과 Gassman 1974).

TDPH 처리에 대한 가장 두드러진 반응은 살포된 그대로의 신선한 식물체가 광에 노출되기 전의 수 시간 동안에 암상태로 치상되었을 때 정상적으로 관찰되었다. 암조건에서 처리된 식물체는 다량의 tetrapyrrole을 축적하여 광 하에서 광역학적 반응이 매우 급속히 일어난다. 광역학적 약해 증상은 광 조사 후 최초 20분 이내에 뚜렷하게 나타내며 고광도 조건에서는 약 60분 후에 본질적으로 비가역적인 반응이 일어난다. 초기증상은 접촉되는 녹색 잎이 분리된 백화 반점들이 급속히 나타난다. 이러한 백화는 잎의 위조로 인해 팽압이 심하게 소실되기 때문에 일어나는 현상들이다. 24시간 이내에 녹색식물 조직은 갈변되어 죽은 조직으로 고사한다. 어린 지하발아 식물(hypogenous plants)에서 심한 백화와 하배축의 탈수가 일어나고 경엽이 건조되는 동안 하배축이 붕괴되어 고사된다. 포장조건 하에서 그 반응 속도는 약간 더 느린 편이어서 청명한 날에 위에서 언급한 증상은 약 2시간 이내에 뚜렷해지며 다음 24시간 동안 진전이 계속된다. 광이 첨가되어 어떤 수준으로까지의 tetrapyrrole의 축적은 광역학적 약해 발현에 있어서 필수적이기 때문에 효과적인 TDPH 처리를 위해 살포후 암치상기간(PSDIP)이 필수적인가 하는 의문이 제기되었다. Rebeiz 등 (1984)에 의해 보고된 예비실험에서 그것은 사실임에 분명하다고 지적하였다. 그러나 더 많은 실험연구에서 ALA와 조절제 2,2'-dipyridyl(DPY)의 조합처리로 살포후암치상기간이 없이 광에 노출된 식물체에서 낮은 광역학적 약해는 그 자체의 tetrapyrrole 축적보다는 목포지점에 유효성분의 진입에 더 밀접한 연관이 있음을 보여 주었다. 예를 들어 적절한 제형으로 PSDIP없이 캔터키 블루그라스 잔디밭에서 광엽잡초 방제가 가능하였다(Rebeiz 1987b; Rebeiz 등 1988b). 10가지 잡초종에 ALA와 포장시험을 목적으로 조제된 용매를 이용하여 4개의 TDPH 조절자 중 하나가 처리되었다 (Rebeiz 등 1988a). 몇 가지 처리가 PSDIP에 관여한데 비해 다른 것들은 관여하지 않았다. PSDIP에 따른 유묘는 암조건에서 많은 량의 tetrapyrrole이 축적되었다. PSDIP에 치상 되지 않은 식물은 광 하에서 낮은 tetrapyrrole 함량을 보여줬다. 그러나 모든 실질적인 목적에서 PSDIP를 거치지 않은 잡초의 광역학적 약해는 PSDIP를 거친 잡초만큼 본질적으로 좋

은 것으로 나타났다.

정상적인 식물 유묘에서 TDPH의 이행에 관한 검토가 이루어졌다. 아마도 목부를 통한 상향이행(acropetal)은 뿌리가 ALA와 조절제의 용액으로 관주되었을 때 유묘의 생장부분에서 암상태의 tetrapyrrole 축적에 의해 탐지되었다. 뿌리로부터 오이 유묘의 자엽으로 ALA와 조절제의 이행은 매우 광범위한 것으로 나타났는데 하배축과 자엽에서 tetrapyrrole의 다량으로 축적되고, 뿌리로부터 Proto의 이행에 의해 생긴 자엽에서 tetrapyrrole의 축적은 일어나지 않는 것으로 보고되고 있다. 실제로 Proto는 매우 급속하게 membrane결합이 일어나기 때문에 이행하기 어려울 것이다 (Smith와 Rebeiz 1979). 절단되거나 정상적인 뿌리와는 대조적으로 자엽은 Proto 대신에 주로 Pchlide를 축적한다는 사실에 주목할 가치가 있다. 이상의 연구는 vermiculite에서 재배된 유묘생장 반응을 통해 수행되었다. 유사한 시험이 토양에서 재배된 유묘로 수행되었는데 확실치 않는 결과가 관찰된 것으로 보아 뿌리 system에 대해 ALA와 조절제의 이용성에 미치는 토양환경의 영향은 무시할 수 없다고 본다. 한편 체관을 통한 하향이행(basipetal)은 오이 자엽이 ALA와 1,10-phenanthroline으로 살포될 때 하배축과 뿌리에서 tetrapyrrole의 축적이 탐지되었다. Tetrapyrrole, 주로 Pchlide 축적이 자엽에서 관찰되었으나 뿌리에서는 어느 것도 관찰되지 않았다. 바꿔 말해 이것은 TDPH의 하향이행은 제한적인 영역이었으며 지하발아 유묘에서 하배축을 경유해 이행되지 않았음을 의미한다.

TDPH 선택성의 분자학적 근거로서 원래 광역학적 제초제는 그들의 작용기작에 있어서 비선택적인 것으로 추정되어졌다. 환경이 조절된 실험실과 포장시험조건에서 더 많은 연구에서 검토한 결과 여러 가지 ALA+modulators의 조합처리로 유의적인 정도의 광역학적 제초활성의 선택성을 지적하였다. 이 선택성은 1) 여러 식물체 조직간의 tetrapyrrole의 축적 능력의 차이, 2) 다양한 tetrapyrrole의 축적에 대한 식물체의 greening group의 감수성에 있어서 차이, 3) 광역학 제초제 modulators에 대한 다양한 greening 그룹의 반응 차이 (Rebeiz 등 1988b)에서 기원되는 것으로 나타났다.

Tetrapyrrole 대사는 TDPH처리에 의해 다양한 식물체 조직에서 동등하게 영향을 받지 않는 것은 분명하다. 이런 상황은 줄기, 잎 및 자엽은 ALA+DPY의 처리에 대해 다른 감수성을 보여 준 녹색콩 유묘에서 나타났다. 매우 적은 량의 tetrapyrrole 축적

을 보인 줄기 (Rebeiz 등 1984)와 자엽(Rebeiz 등 1988a)은 처리에 대해 내성을 보인 반면 tetrapyrrole이 축적된 잎은 광역학적인 약해 반응에 있어서 매우 감수적인 반응을 보였다.

2. 재료 및 방법

가. 재배환경과의 상호작용

수도작에서 재배법(직파 또는 이식), 담수조건의 차이 및 암치상기간의 유무 등에 따른 재배환경에 따른 ALA의 제초효과의 차이를 구명하고자 다음과 같은 연구가 온실 내에서 폿트시험으로 수행되었다.

1) 재배양식별 ALA의 약해 및 약효시험

재배방식별로 벼와 피에 대한 ALA의 약효 및 약해를 검토하고자 벼(품종: 동진1호)를 건답(건종자) 및 담수(최아종자)에 직파한 것과 15일과 25일간 재배된 묘를 각각 와그너 pot에 5주씩 파종 및 이앙하고 동시에 각 pot에 침종된 피를 20립씩 파종하였다. 파종 및 이앙 후 10일째에 ALA 0, 5, 10, 15, 20mM과 paraquat 1mM 농도로 엽면살포한 후 처리 후 5일째에 달관평가와 처리 후 20일째에 벼와 피의 초장 및 생체중을 각각 조사하였다.

2) 담수 정도에 따른 ALA의 약해 및 약효시험

담수정도에 따른 작물과 잡초에 대한 ALA의 약효 및 약해의 차이를 검토하기 위해 벼와 피를 각각 원예용 pot에 파종하였다. 파종 후 15일된 상태에서 건답조건과 담수조건(1cm 깊이)하에 방치한 후 ALA 0, 5, 10mM 농도로 엽면 분무살포하여 각각의 초장과 생체중을 조사하였다.

3) 처리 후 암조건 치상 유무에 따른 ALA의 약해 및 약효시험

ALA 약효의 효율성을 증가시킬 수 있는 방법을 검토하기 위해 약제처리 후 광조건 또는 암조건에 치상하여 약효 발현의 차이를 검토하고자 다음과 같은 시험이 수행되었다. 파종 후 15일된 2.5~3엽기 배추에 ALA 0, 2, 4, 6, 8mM 농도와 paraquat 1mM을 엽면살포한 후 각각 암상태에 보관후 광에 노출한 것과 광에 지속 노출한 것간의 ALA 효과를 비교하였다.

4) 나팔나리의 기내배양에서 초기생육 효과

조직배양에서 ALA의 이용 가능성을 검토하기 위해 0, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 및 10^{-3}M 농도로 혼합된 MS 기본배지에 비슷한 크기로 분리된 나팔나리(cv. 조지아) 인편을 치상한 후 배양실에서 40일간 배양한 후 각 인편에서 분화된 새로운 구수와 초장 및 근장, 엽수, 근수 등을 조사하였다. 조직배양에서 ALA의 이용 가능성을 검토하기 위해 0, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}M 농도로 혼합된 MS 기본배지에 비슷한 크기로 분리된 나팔나리(cv. 조지아) 인편을 치상한 후 배양실에서 40일간 배양한 후 각 인편에서 분화된 새로운 구수와 초장 및 근장, 엽수, 근수 등을 조사하였다.

나. 타화합물과의 상호작용

살충제와 미량원소 등의 화합물과 조합처리를 통해 그들의 상호작용을 검토한다.

1) ALA 단제 및 살충제 파밤탄과의 상호 살충작용 연구

ALA의 살충제로서의 가능성을 검토하기 위해 파밤나방과 점박이응애를 대상으로 ALA의 단제 처리와 기존 살충제와의 혼합처리의 효과를 시험하였다. 파밤나방 유충 2~3령충을 30마리를 Petri dish에 각각 담고 인공사료를 넣어준 후 ala와 파밤탄을 각각 농도별로 희석하여 스프레이 처리하였다. 한쪽은 처리 후에 16시간 암상태에 보관 후 광에 노출하여 조사하였다. 상승효과를 알아보기 위해 파밤탄을 1,000배, 2,000배, 4,000배로 하고 ALA는 10배를 각각 혼합하여 살충효과를 알아보았다. 약효는 처리후

1일, 2일, 3일째까지 조사하였으며 3반복 시험하였다. 생사 판별은 파밤나방이 움직이 없거나 유충체가 말라가고 있는 개체를 죽은 것으로 간주하였다. 점박이응애 약제 독성 시험 방법으로 leaf disk법을 사용하였고 암컷성충의 살비효과는 강낭콩을 2 X 2cm로 잘라 물에 적신 탈지면이 깔린 샤레에 놓고 그 위에 점박이응애 암컷 성충을 30마리씩 접종한 후 30분정도 정착시킨 다음 약제 농도별로 25cm거리에서 hand spray로 5초 동안 spray한 후 음건시켰다. 처리한 샤레는 상온에 보관하면서 1일, 2일, 3일 후에 살비율을 조사하였다. ALA의 활성을 높이기 위해 처리직 후 16시간동안 암처리하고 이후 광이 있는 사육실에 옮겨 놓았다. 생사판별은 해부현미경하에서 붓끝으로 충체를 접촉하여 몸길이정도를 이동하지 못한 개체를 죽은 것으로 간주하였다.

2) ALA와 미량원소의 상호작용

ALA와 미량원소와의 상호작용을 검토하고자 생체 내에서 ALA의 축적과 관계가 있는 붕소를 함께 처리하여 ALA와의 상호작용 효과를 시험하였다. 파종 후 15일된 2.5~3엽기 배추에 ALA 0, 2, 4, 6, 8mM 농도와 붕소를 5, 10ppm 등의 농도로 조합처리하여 배추의 생장을 조사하였다.

다. 약효 지속성 연구

실험실 및 온실조건에서 약효 지속성을 검토하기 위해 처리 후 경시적인 ALA의 토양 내의 소실 및 식물체내 잔류량과 그 효과를 HPLC의 분석 등에 의해 검토한다.

1) 생육반응 및 엽록소 함량의 변화

ALA를 제초제나 생장촉진제로서 농업에의 적용시 토양 중에서 그 약효의 지속성 정도를 검토하기 위해 토양혼화처리 후 경시적으로 토양내 ALA의 잔류량 측정과 작물의 생육반응을 조사하였다. 원예용 상토 400g에 0, 4, 8, 그리고 12mM 농도의 ALA 용액 400㎖를 잘 혼합한 후 tray에 충진하였다. ALA 혼합 직후와 5, 10, 15일 후 각

각 배추 종자를 파종하여 10일 후 지상부와 지하부 생육 및 엽록소 함량을 측정하였다. 엽록소(Chlorophyll) 함량은 임의표본추출 잎 0.1g을 5㎖ 95% 에탄올에 0.5㎜로 절편하여 80℃에서 20분 추출 후 얼음에 보관하고, spectrophotometer를 이용하여 470㎚, 648㎚, 664㎚에서 흡광도를 측정하여 아래의 방법(Method in enzymology, 1987)에 의해 산출하였다.

Chl. A = $13.16\times A_{664} - 5.19\times A_{648}$

Chl. B = $27.43\times A_{648} - 8.12\times A_{664}$

Carotenoid = $(1000\times A_{470} - 2.14\times$Chl. A $- 97.64\times$Chl. B$)/209$

2) 토양 중 ALA 잔류량 분석

토양내 ALA 함량은 Papenbrock et al. (1999)의 방법을 약간 변형하여, 건조된 토양 시료 0.3㎎에 인산완충액 5㎖과 ethylacetoacetate 1㎖를 가한 후 충분하게 교반희석하면서 열 중탕에서 10분간 반응시킨 후 냉각하여 15,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액 1㎖에 수정된 Ehrlich's 반응액 1㎖를 가하여 20분간 방치한 후 분광광도계 553nm에서 흡광도를 측정하였고 보정곡선을 이용하여 ALA 농도를 결정하였다.

라. ALA의 포장 적용시험

실제 포장살포로 각 입지별, 즉 경작지에서 적정 처리량을 정하고 잡초방제 효과와 작물에 대한 생육 및 약해를 검토한다. 일반 작물과 잡초에 대한 ALA의 제초제 및 생육촉진제로서의 가능성을 검토하기 위해 논과 밭의 그리고 여름과 겨울의 대표적인 작물과 잡초인 벼와 피 그리고 보리와 둑새풀에 대해 생육시기에 따라 그리고 ALA를 농도별로 처리하여 약효 및 약해를 조사하였다.

1) 수도작지에서 ALA의 약해 및 약효

파종 후 15, 25, 35일 된 벼와 피에 각각 0, 5, 10, 15, 그리고 20mM 농도의 ALA를

처리하였고 초장 및 생체중을 조사하였고 대표적 제초제인 paraquat 1mM 농도의 용액을 분무 처리한 후 비교 조사하였다.

2) 보리밭에서 ALA의 약해 및 약효

파종 후 15일(1-2엽기)된 보리에 각각 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 그리고 20mM 농도의 ALA 용액을 분무 처리한 후 초장 및 생체중, 건물중 그리고 엽록소 함량을 조사하였다. 그리고 파종 후 25일(3-4엽기)된 보리와 둑새풀에 각각 0, 4, 8, 12, 16, 그리고 20mM 농도의 ALA 용액을 분무 처리한 후 초장 및 생체중, 건물중 그리고 엽록소 함량을 조사하였다. 또한 ALA 1×10^{-8}, 5×10^{-8}, 1×10^{-7}, 5×10^{-7}, 1×10^{-6}, 5×10^{-8}, 1×10^{-5}, 5×10^{-5}, 1×10^{-4}M 등의 낮은 농도 처리에 의한 생장촉진효과를 조사하였다.

3) 전작지에서 ALA의 약해 및 약효

콩은 파종 후 30일 째 (바랭이 초장, 20 cm 내외) ALA를 0, 5, 10, 15, and 20mM 농도로 paraquat를 1 mM 농도로 처리하여 처리 후 5일 째와 10일 째에 콩의 약해를 달관평가하고 초장과 생체중을 측정하였고 0.25 m^2내의 발생 초종별 개체수와 생체중을 측정하였다. 주요한 우점초종은 바랭이, 강아지풀, 쇠비름, 여뀌, 망초 순이었다.

4) 잔디밭에서 ALA의 약해 및 약효

한국 들잔디가 10-15cm 크기로 자라고 있을 때 ALA를 0, 5, 10, 15, and 20mM 농도로 paraquat를 1 mM 농도로 콩과 같은 방법으로 처리하였고 발생된 잡초종으로는 바랭이, 여뀌, 개비름, 괭이밥, 닭의장풀이었다.

5) 비경지에서 ALA의 약해 및 약효

비경지에서 발생된 초종은 바랭이, 선피막이, 닭의장풀, 쑥, 강아지풀 순으로 우점되어 있었고 콩과 같은 방법으로 처리하였고 처리 후 20일 째 잡초방제효과를 검토하였다.

마. ALA의 작물 stress 내성반응 연구

1) ALA가 콩의 내염성에 미치는 영향

δ-Aminolevulinic acid (ALA)의 저농도에서 생장촉진제 또는 재해 완충제의 농업이용 가능성을 검토하기 위해 염 stress를 받은 대표적인 밭작물과 논작물인 콩과 벼에 대하여 ALA의 stress 경감 및 회복에 대한 효과를 검토하였다. 콩은 파종 후 10일된 콩을 0, 30, 60, 90, and 120mM 농도의 NaCl 용액에 10일간 침지하여 Stress를 유발한 후 깨끗한 물로 제염하고 ALA를 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 그리고 10^{-4}M 농도의 용액에 침지 처리하여 콩의 지상부와 지하부의 생육을 조사하였다.

2) ALA가 벼의 내염성에 미치는 영향

벼는 출현 후 10일된 유묘를 0, 30, 60, 90, and 120mM 농도의 NaCl 용액에 10일간 침지하여 Stress를 유발한 후 깨끗한 물로 제염하고 ALA를 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 그리고 10^{-4}M 농도의 용액에 침지 처리하여 벼의 지상부와 지하부의 생육을 조사하였다.

3) ALA가 침관수해 경감에 미치는 영향

파종 후 15일된 2.5~3엽기 배추를 0(미침수), 3(배추 초장의 절반깊이까지 침수), 8cm(완전침수) 깊이로 각각 24시간과 72시간 동안 침수시켜 stress를 유발하였다. 침관수 stress가 유발된 배추에 ALA 0, 10^{-7} 그리고 10^{-6}M 농도로 엽면살포한 후 생체중 및 건물중량을 측정하여 stress 경감 및 회복 효과를 조사하였다.

4) ALA에 대한 잡초 종 피의 해부학적 반응 연구

검경하고자 하는 식물체 부위를 5-8mm 길이로 절취한 후 FAA(Formalin: Glacial acetic acid: Ethyl Alcohol: Water=15:10:35:45)용액에 24시간 이상동안 침지/고정하여 30, 50, 70, 90, 및 100 % EtOH용액의 과정에서 1시간씩 탈수시킨다. 그 후 샘플은 EtOH:Xylene을 3:1, 1:1, 및 1:3 비율로 혼합된 용액, 100% Xylene에 각각 2시간씩 투명화시킨 후 60℃ Oven에서 Xylene:Paraplast=1:1 비율의 용액에 24시간 침투시키고 60℃ Oven에서 Paraplast에 72시간 이상 동안 침투시킨다. 이미 만들어진 종이박스에

식물체 절편을 넣고 Paraplast를 Embedding한다. 이 작업은 Hot plate 위에서 하는 것이 안전하다. 특히 section 방향이 cross와 longitudinal에 따라서 잘 매몰시켰다. Embedding된 조직은 적당히(5mm x 5mm x 10mm)크기로 trimming하고 Paraplast paper cake를 정사각형 목재(2x2x2cm)에 부착, 고정하여 Steel knife(blade)가 고정된 Rotary microtome에 6-8㎛ 두께로 절단하고 그 절편들을 40 ℃ Water bath에 잘 펴지도록 띄워 Egg-albumine (White part of egg : glycerin=1:1)가 접착되어 있는 slideglass 위 Mounting하여 Dryer에 25℃ 온도에서 24시간 이상 건조시킨다. 건조된 조직은 Xylene 단일용액, EtOH:Xylene의 혼합액 1:3, 1:1, 3:1에 1시간씩 paraplast를 녹이는 과정(dewaxing)과 탈수과정을 거친다.100% EtOH단일용액에 5분간 침지/탈수한 후 0.5% Fast green 95% 알콜용액에 15-20초간 염색한 후 100% EtOH 용액 I과 II에서 5분씩 탈수시키고 다시 EtOH:Xylene의 혼합용액에 각각 3:1, 1:1, 1:3용액에 각각 5분씩 탈수한다. 그 후 Xylene용액에서 1시간 dewaxing again 한 후 건져낸 slideglass가 마르기 전에 이미 조제된 접착제(canadabalsam: xylene=1:1)를 한 방울 떨어뜨려 올림 cover glass를 mounting한 후 가볍게 부착한 후 완전 고착할 때까지 25℃에 건조한 후 x50, x100, x400 배율의 현미경하에서 엽신의 두께와 형태적 조직의 변화를 검경한다.

3. 결과 및 고찰

가. 재배환경과의 상호작용

1) 재배양식별 ALA의 약해 및 약효시험

벼에 대한 ALA의 약해는 담수직파벼보다는 건답직파벼에서, 이앙벼보다는 직파벼에서, 20일이앙벼보다는 10일이앙벼에서 더 큰 것으로 나타났다. 피에 대한 ALA의 약효는 역시 담수직파조건보다는 건답직파조건에서, 이앙조건보다는 직파조건에서, 20일이앙조건보다는 10일이앙조건에서 더 크게 나타났다. 한편 대조 약제 paraquat에 비해 작물 약해는 더 적었으나 약효는 다소 낮아 20mM이상 처리농도에서만 높게 나타

났다 (표 1).

한편 ALA에 대한 벼와 피의 생육반응에서 초장과 생체중은 피보다는 벼가, 담수직파보다는 건답직파에서, 이앙조건보다는 직파조건에서, 20일이앙벼보다는 10일이앙벼에서 더 크게 감소되었다 (표 2, 3). 담수상태에서 ALA처리에 따른 직파와 이앙벼의 초장은 10%내외의 감소가 있는 반면 건답조건의 직파벼는 15mM에서 69% 초장감소를 보였고 20mM에서는 100% 초장이 억제되었다. 피의 초장에 대한 효과는 담수조건의 이앙조건에서 20mM 농도에서 61-64% 억제되었으나 담수와 건딥조건에서는 각각 27과 38% 억제되어 이앙조건에서 방제효과 높게 나타났다. 한편 paraquat 1mM 처리에서는 전 재배양식에서 100%의 약해와 약효를 보였다.

Table 1. Effect of ALA on rice injury and weeding efficacy against barnyardgrass based on visual rating under different cropping conditions*.

Treatment	Direct seeding		Transplanting	
	Dry	Wet	10 day-seedling	20 day-seedling
		Rice injury		
ALA 0 mM	0.0	0.0	0.0	0.0
5 mM	2.3	0.5	0.0	0.0
10 mM	3.5	1.3	1.5	0.5
15 mM	5.3	3.0	2.3	2.0
20 mM	8.0	3.5	3.5	3.0
Paraquat 1 mM	9.0	9.0	0.0	0.0
		Weeding efficacy against barnyardgrass		
ALA 0 mM	0.0	0.0	0.0	0.0
5 mM	1.3	2.0	2.3	3.3
10 mM	2.5	3.0	3.0	3.5
15 mM	5.0	3.5	3.3	3.3
20 mM	7.7	4.5	4.5	4.0
Paraquat 1 mM	9.0	9.0	9.0	9.0

* Visual rating was conducted 5 days after application and made using a 0-9 scale, where represents no control of barnyardgrass or no rice injury.

Table 2. Effect of ALA on plant height (cm) of rice and barnyardgrass under different cropping conditions at 20 days after application.

Treatment	Direct seeding		Transplanting	
	Dry	Wet	10 day-seedling	20 day-seedling
		Rice		
ALA 0 mM	64.7(100)	55.3(100)	76.9(100)	81.1(100)
5 mM	62.2(96)	57.7(104)	80.2(104)	86.6(107)
10 mM	37.8(58)	56.9(103)	69.7(91)	75.8(94)
15 mM	20.1(31)	43.8(79)	70.0(91)	72.2(89)
20 mM	0.0(0)	52.0(94)	68.6(89)	75.4(93)
Paraquat 1 mM	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)
		Barnyardgrass		
ALA 0 mM	61.8(100)	66.2(100)	40.9(100)	39.4(100)
5 mM	57.9(94)	76.1(115)	30.8(75)	29.5(75)
10 mM	48.7(79)	56.5(85)	23.2(57)	30.9(78)
15 mM	38.2(62)	48.4(73)	21.2(52)	17.5(44)
20 mM	0.0(0)	47.2(71)	16.1(39)	14.0(36)
Paraquat 1 mM	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)

Table 3. Effect of ALA on fresh weight (g/plant) of rice and barnyardgrass under different cropping conditions at 20 days after application.

Treatment	Direct seeding		Transplanting	
	Dry	Wet	10 day-seedling	20 day-seedling
		Rice		
ALA 0 mM	2.5(100)	2.4(100)	9.7(100)	19.3(100)
5 mM	1.7(68)	2.4(100)	9.4(97)	16.8(87)
10 mM	0.7(28)	1.7(71)	7.9(81)	16.3(85)
15 mM	0.3(12)	1.6(67)	7.2(74)	13.3(69)
20 mM	0.0(0)	1.4(58)	5.6(58)	11.0(57)
Paraquat 1 mM	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)
		Barnyardgrass		
ALA 0 mM	5.3(100)	6.5(100)	1.9(100)	1.8(100)
5 mM	3.5(66)	6.3(97)	1.7(90)	1.6(89)
10 mM	2.2(42)	5.7(88)	1.5(79)	1.7(94)
15 mM	1.6(30)	3.7(57)	0.9(47)	0.8(44)
20 mM	0.7(13)	2.6(40)	0.7(37)	0.4(22)
Paraquat 1 mM	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)	0.0(0)

ALA에 대한 벼와 피의 생체중은 역시 초장과 유사한 경향의 반응을 보였다. ALA 20mM 농도에서 담수상태의 직파와 이앙벼의 생체중이 42-43% 감소되는 반면 건답직파벼는 100%억제를 보였다. 피는 20mM ALA에 대해 이앙조건에서 63-78%, 담수직파조건에서 60%가 각각 억제된 반면 건답 직파조건에서 87% 억제되어 높은 방제효과를 보였다.

2) 담수 정도에 따른 ALA의 약해 및 약효시험

ALA에 대한 벼의 약해와 피의 약효반응은 담수상태에서는 낮게 나타났다 (그림 1). 즉 ALA가 처리된 벼의 초장 및 생체중은 건답보다는 담수상태에서 높게 나타나 낮은 약해를 나타낸 반면 벼에 대한 약효는 역시 건답조건에서 피의 초장 및 생체중의 억제가 더 높게 나타나 ALA 역시 일반 제초제와 같이 약효발현을 위해 배수를 한 후 건답상태에서 살포하는 것이 바람직 할 것으로 본다.

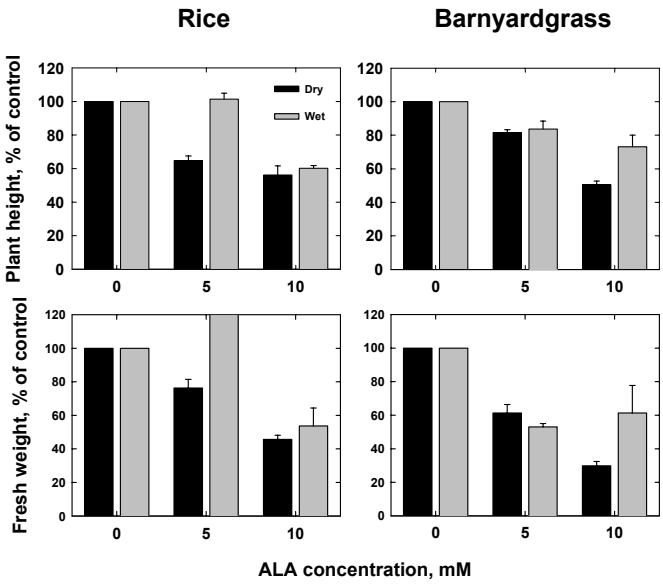


Fig 1. Effect of flooding depth on rice injury and weeding efficacy against barnyardgrass by ALA treatment.

3) 처리 후 암조건 치상 유무에 따른 ALA의 약해 및 약효시험

ALA의 처리 후 조건에 따른 약효의 차이는 처리 후 일정시간 암 치상한 것이 지속적으로 광에 노출시킨 것에 비해 약간 높은 효과를 나타내었고 처리농도가 증가함에 따라 생장이 감소되었다 (표 4-5).

Table 4. Effect of a post-spray dark incubation period (PSDIP) on the subsequent occurrence of photodynamic damage against Chinese cabbage.

Treatment (mM)	Plant height (cm)		Fresh weight (g/plant)		Leaf number (No./plant)	
	D/L	L/L	D/L	L/L	D/L	L/L
ALA 0	11.7	11.7	2.5	2.5	4.9	4.9
ALA 2	12.5	12.8	3.3	3.1	5.3	4.9
ALA 4	12.8	11.7	2.8	2.4	4.6	4.5
ALA 6	11.1	10.6	2.0	2.1	3.8	3.5
ALA 8	9.3	10.3	1.5	1.7	2.8	3.4
Paraquat 1	3.6	4.7	0.3	0.6	0.7	0.7

* ALA was foliar applied with (D/L : Dark/Light) or without (L/L : Light/Light) post-spray dark incubation period.

Table 5. Effect of a post-spray dark incubation period (PSDIP) on the subsequent occurrence of photodynamic damage against eclipta.

Treatment (ALA, mM)	Plant height (cm)		Fresh weight (g/plant)		Chlorophyll a (mg/g)	
	D/L*	L/L	D/L	L/L	D/L	L/L
0	14.8	14.8	0.7	0.7	4.4	4.4
4	15.3	20.4	0.6	0.9	3.9	4.0
6	15.1	19.7	0.6	0.9	3.9	3.9
8	10.9	13.6	0.2	0.2	3.5	5.2
10	6.6	8.8	0.1	0.2	7.4	6.2

* ALA was foliar applied with (D/L : Dark/Light) or without (L/L : Light/Light) post-spray dark incubation period.

광활성 효과를 발현시키기 위해 살포후 암치상기간(PSDIP)이 필요하다고 밝혀졌다 (Rebeiz 1984). ALA가 처리되면 축적된 tetrapyrrole은 광 노출로 광역학적인 제초효과의 발현에 필수적인 것이기 때문에 PSDIP가 필수적인가에 대한 궁금증을 갖는 것은 당연하다. 따라서 이 기간은 광분해로부터 tetrapyrrole을 보호하며 그들이 암상태에서 축적이 가능토록 하기 위해 필요하다고 본다.

4) 나팔나리의 기내배양에서 초기생육 효과

ALA를 농도별로 처리한 배지내 나리의 생육 (표 6)과 재분화(표 7) 정도의 변화는 10^{-8}, 10^{-6}, 10^{-5}M 처리에서 무처리에 비해 초장 및 생체중 등의 생육이 증가되었고 하나의 인편으로부터 재분화된 구와 잎 및 뿌리도 무처리에 비해 많았다. 이러한 결과로 보아 조직배양에서 ALA가 낮은 농도에서 특히 초기 생육 분화시기에는 생육촉진 효과가 인정되어 생장조절제로서 이용될 수 있는 가능성이 있다고 사료된다.

Table 6. Effect of ALA on early seedling growth of lily (cv. Georgia) 40 days after *in vitro* scale culture.

Treatment	Plant height (cm)	Root length (cm)	Fresh weight (mg/plant)
0 M	3.3 (100)*	1.5 (100)	54.8 (100)
10^{-8}M	3.8 (114)	1.7 (117)	82.3 (150)
10^{-7}M	3.6 (107)	1.7 (117)	80.4 (147)
10^{-6}M	3.3 (99)	1.4 (98)	57.6 (105)
10^{-5}M	2.7 (80)	1.5 (100)	54.3 (99)
10^{-4}M	2.6 (78)	1.3 (88)	33.9 (62)
10^{-3}M	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)

* ( ) : % of control (0 M)

Table 7. Effect of ALA on number of leaf, root and bulb of lily (cv. Georgia) 40 days after *in vitro* scale culture.

Treatment	Bulb number	Leaf number	Root number
0 M	2.9 (100)*	2.9 (100)	4.2 (100)
10^{-8}M	3.5 (121)	2.5 (86)	4.4 (105)
10^{-7}M	3.4 (117)	9.7 (334)	11.3 (269)
10^{-6}M	3.1 (107)	4.8 (166)	8.9 (212)
10^{-5}M	2.9 (100)	4.8 (166)	9.6 (229)
10^{-4}M	2.6 (90)	4.4 (152)	7.3 (174)
10^{-3}M	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)

* ( ) : % of control (0 M)

나. 타화합물과의 상호작용

1) ALA 단제 및 살충제 파밤탄과의 상호 살충작용 연구

파밤탄은 파밤나방에 높은 살충율을 나타내지 못하여 3일째에 70%의 살충율을 나타냈으며(표 8), ALA는 10배액(10mM)의 고농도에서 파밤탄 100배액보다 높은 살충효과를 나타낼 수 있었다. ALA 10배에서 암치상기간이 없을 경우엔 3일째에 90%를 나타냈으며 16시간의 암치상 유지 후의 광 노출시에는 100%의 살충율을 나타내었다(표 9). 파밤탄과 ALA 10배액(10mM)를 혼합하여 시험한 결과 암치상을 한 경우 2일째부터 90% 이상의 살충률을 보였고 상승효과가 있었으나 암처리 하지 않은 경우에도 70%의 살충률만을 보였다(표 10). 점박이응애에 대해서는 파밤나방에 비해 높은 살충율을 보였으며(그림 2), 점박이응애에 ALA 10배 처리는 암처리를 여부에 관계없이 높은 살비율을 나타내어 2일째에 100%였으며, 50배 이후에서는 암처리 조건에서 약간 더 높은 살비율을 나타내었다 (표 11).

Table 8. Insecticidal effect of lufenuron on *Spodoptera exigua*.

Lufenuron, folds	Insecticidal activity (%)		
	1 DAA	2 DAA	3 DAA
x 1,000	31.1±2.9	42.2±2.9	70.0±3.8
x 2,000	16.7±1.9	28.9±1.1	40.0±3.3
x 4,000	3.3±3.3	7.8±2.9	21.1±1.1

Table 9. Insecticidal effect of ALA on *Spodoptera exigua*.

Light	ALA (folds)	Insecticidal activity (%)		
		1 DAA*	2 DAA	3 DAA
L/L	10배	26.7±1.92	55.6±7.29	90.0±5.09
	50배	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
	100배	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
D/L	10배	33.3±1.92	77.8±2.94	100.0±0.00
	50배	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
	100배	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00

Table 10. Combined insecticidal effect of lufenuron(LU) and ALA on *Spodoptera exigua*.

Light	Treatment (ALA+LUF, folds)	Insecticidal activity(%)		
		1 DAA*	2 DAA	3 DAA
L/L	10+1,000	28.9±1.11	71.1±2.22	97.8±1.11
	10+2,000	6.7±3.33	33.3±3.33	46.7±6.67
	10+4,000	10.0±5.77	10.0±5.77	23.3±3.33
D/L	10+1,000	44.4±2.94	92.2±2.94	100.0±0.00
	10+2,000	23.3±3.33	35.6±2.94	53.3±1.92
	10+4,000	3.3±3.33	10.0±5.77	33.3±6.67

* DAA: day(s) after soil-application

Table 11. Insecticidal effect of ALA on *Tetranychus urticae*

Light	ALA (folds)	Insecticidal activity(%)		
		1 DAA*	2 DAA	3 DAA
L/L	x 10	97.8±2.22	100.0±0.00	100.0±0.00
	x 50	31.1±4.44	61.1±2.94	68.9±2.22
	x 100	8.9±2.22	22.2±5.88	23.3±5.09
	x 200	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
D/L	x 10	92.2±4.01	100.0±0.00	100.0±0.00
	x 50	35.6±2.22	62.2±4.84	85.6±4.01
	x 100	16.7±1.92	27.8±1.11	38.9±2.94
	x 200	1.1±1.11	4.4±2.22	4.4±2.22

* DAA: day(s) after soil-application

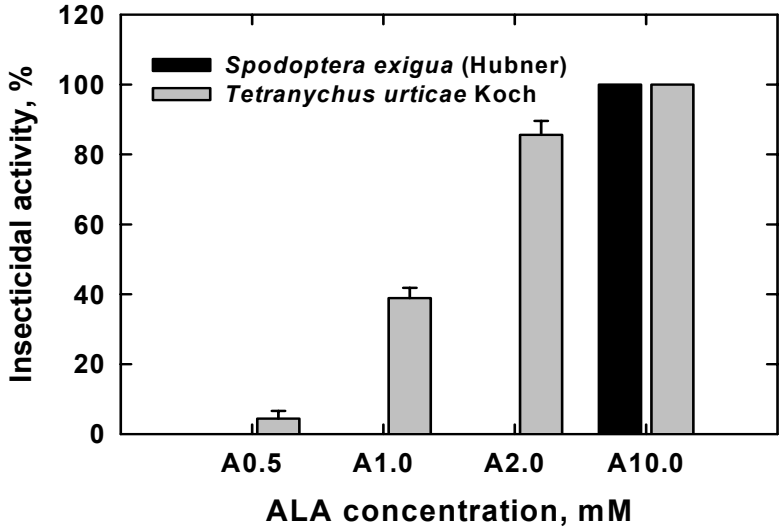


Fig. 2. Comparative insecticidal effect of ALA on *Spodoptera exigua* (Hubner) and *Tetranychus urticae* Koch.

Rebeiz 등 (1988b)은 ALA 30 mM 이상에서 유충에 처리했을 때 90%이상의 살충율을 보였음을 보고하였다. 비록 고농도의 처리가 요구되나 다른 합성농약과의 상호작용의 연구를 통해 농약사용량의 감량화에 기여할 것으로 본다. 또한 ALA를 이용한 살충효과는 특정 대사단계에 관여하여 효력을 나타내는 기존의 살충제와는 다른 작용기작을 갖고 있으므로 환경 친화 살충제로서의 활용이 가능하다.

2) ALA와 미량원소의 상호작용

붕소와의 혼합처리에서는 ALA를 단처리 한 것과 비교해 초장은 거의 차이가 나지 않았으나 생체중은 ALA 단제 4mM과 6mM 농도 처리에서 2.8g과 2.0g인 반면 ALA 4mM에 붕소를 5와 10ppm 혼합처리한 것에서는 약 각각 1.8g과 1.3g으로 감소되어 ALA 6mM 처리효과 보다 크게 나타났고 ALA 단제로 약 2배의 농도(8mM) 처리와 비슷한 효과를 나타냈다(표 12).

Table 12. Combined effect of ALA and boron on seedling growth of Chinese cabbage.

Treatment		Plant height	Fresh weight	Leaf number
ALA (mM)	B (ppm)	(cm)	(g/plant)	(No./plant)
0	0	11.7	2.464	4.9
2	0	12.5	3.258	5.3
4	0	12.8	2.808	4.6
6	0	11.1	2.025	3.8
8	0	9.3	1.457	2.8
0	5	12.2	2.705	4.5
0	10	13.5	3.271	5.0
0	15	12.9	3.126	4.8
0	20	11.7	3.072	4.9
2	5	13.1	3.293	4.9
2	10	13.7	3.931	5.5
4	5	11.3	1.794	3.5
4	10	10.0	1.341	3.0

낮은 농도에서 ALA는 붕소와의 혼합사용은 오히려 생육이 증가하는 경향을 보여 무기광물과의 혼합사용은 약해경감과 작물 생육촉진에 기여할 것으로 기대된다.

다. 약효 지속성 연구

1) 생육반응 및 엽록소 함량의 변화

ALA의 토양혼합 처리 후 5일 간격으로 파종된 배추의 생육은 그림 3, 4, 5에서 보는 바와 같이 처리 직후(처리 후 0일 째) 파종된 배추는 지상부와 지하부 생육 모두 ALA의 농도 증가에 따라 급격히 생장이 감소되었다. 그러나 5일째 파종된 배추의 경우는 무처리에 비해 약간 감소되었으나 처리 후 0일 째와 달리 일정하지 않았고 뿌리의 4mM 처리에서는 무처리에 비해 오히려 생장이 증가되는 경향이었다. 처리 후 10일째 이후의 파종에서는 ALA의 모든 처리 농도에서 무처리와 유사한 생육을 보여 ALA가 토양 처리된 후 급격히 소실됨을 알 수 있었다.

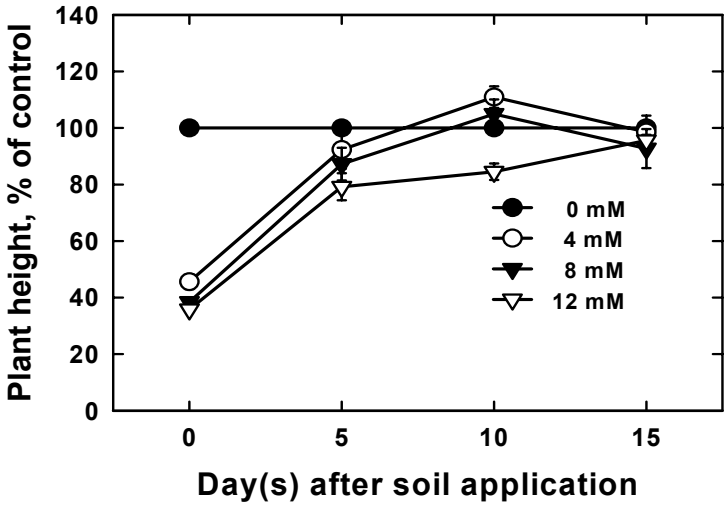


Fig. 3. Change in herbicide-residual effect of ALA in soil on plant height of Chinese cabbage as affected by different application concentrations.

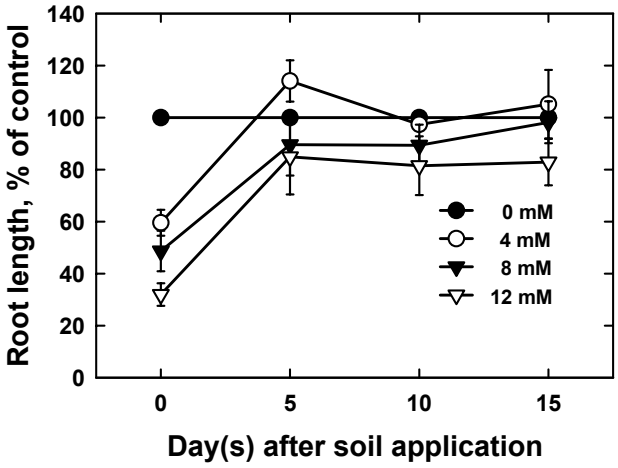


Fig 4. Change in herbicide-residual effect of ALA on root length of Chinese cabbage as affected by different application concentrations.

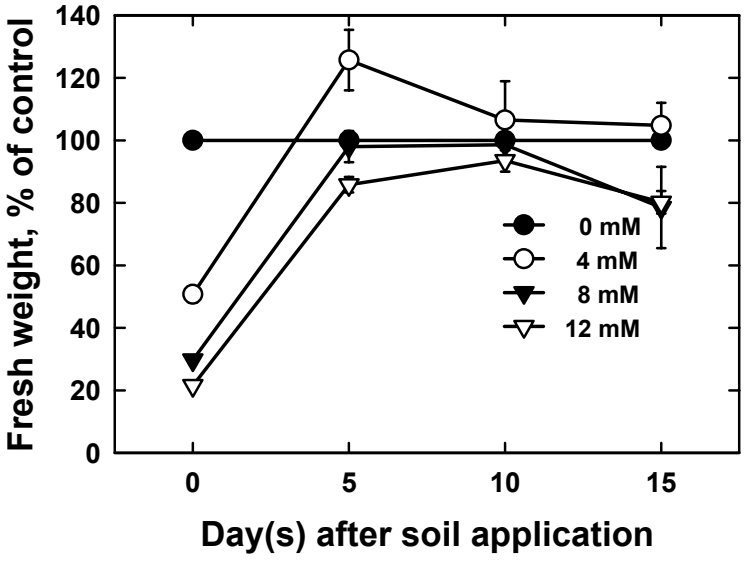


Fig. 5. Change in herbicide residual effect of ALA on fresh weight of Chinese cabbage as affected by different application concentrations.

따라서 ALA를 토양처리 할 경우에는 제초제 paraquat 처럼 처리 직후에 토양에 흡착, 용탈, 생분해될 가능성을 갖고 있기 때문에 토양처리보다는 직접 경엽에 살포하는 경엽처리 되는 후기 발생후 경엽처리제로 개발할 필요가 있을 것으로 본다.

Chlorophyll와 carotenoid의 함량 변화는 (그림 6, 표 13) 처리 후 0일째 파종에서는 무처리에 비해 ALA의 농도가 증가함에 따라 함량이 급격히 감소되었고 5일째 파종에서도 ALA의 농도 증가에 따라 함량이 감소되었고 그 감소 폭도 적었다. 그러나 10일째 이후에는 ALA의 처리 농도에 관계없이 chlorophyll과 carotenoid의 변화가 거의 없었다.

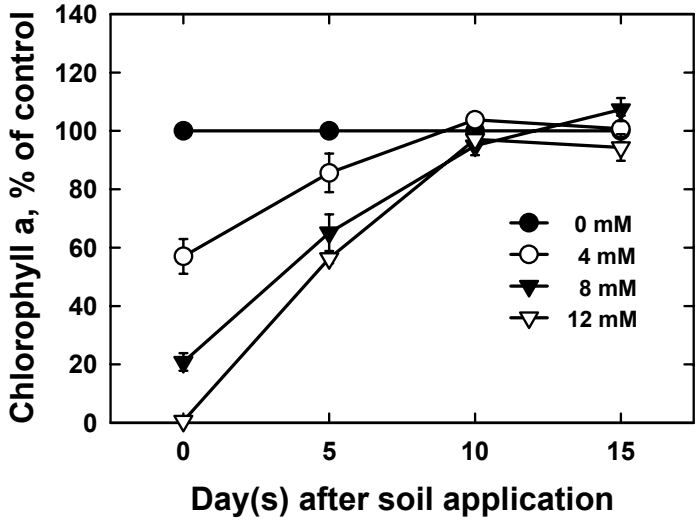


Fig. 6. Change in herbicide-residual effect of ALA on chlorophyll *A* content of Chinese cabbage as affected by different application concentrations.

Table 13. Change in herbicidal effect of ALA on pigments of Chinese cabbage as affected by different application concentrations.

DAA*	Chlorophyll a				Chlorophyll b				Carotenoid			
	0	4mM	8mM	12mM	0	4mM	8mM	12mM	0	4mM	8mM	12mM
0	100	57	21	1	100	58	21	5	100	50	19	0
5	100	85	65	56	100	83	61	38	100	91	86	63
10	100	104	95	97	100	101	99	103	100	103	82	89
15	100	101	107	94	100	97	112	96	100	104	110	99

* DAA: day(s) after soil-application

2) 토양 중 ALA 잔류량 분석

토양내 ALA 함량은 Papenbrock et al. (1999)의 방법을 약간 변형하여, 건조된 토양 시료 0.3㎎에 인산완충액 5㎖과 ethylacetoacetate 1㎖를 가한 후 충분하게 교반희석하면서 열 중탕에서 10분간 반응시킨 후 냉각하여 15,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액 1㎖에 수정된 Ehrlich's 반응액 1㎖를 가하여 20분간 방치한 후 분광광도계 553nm에서 흡광도를 측정하였고 보정곡선을 이용하여 ALA 농도를 결정한 결과 토양 내 ALA의 잔류량 변화는 (그림 7) 처리 직후에만 농도에 따라 그 함량이 변화하였고 5일 후에는 처리 농도에 따라 그 잔류량이 아주 적었고, 10일째와 15일째 그리고 20일째에는 거의 잔류되어 있지 않았다. 따라서 ALA는 토양처리 직후 5일 이내에 토양에 흡착 또는 유실되어 약효가 오래 지속되지 못한 것으로 나타났다.

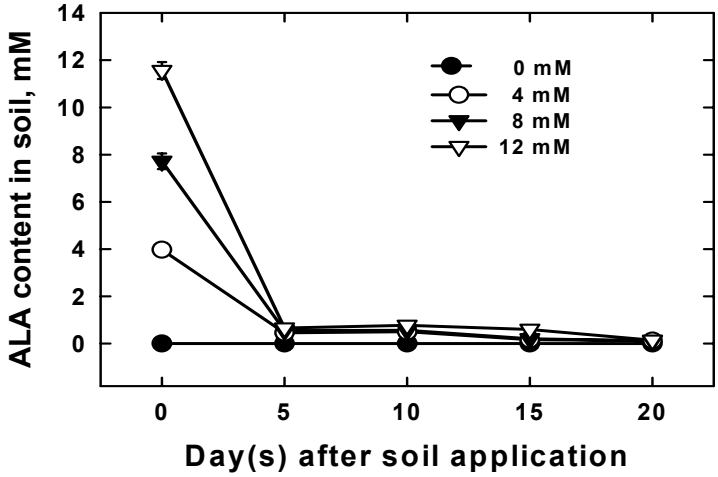


Fig. 7. Change in ALA contents in soil as affected by different application concentrations.

라. ALA의 포장 적용시험

1) 수도작지에서 ALA의 약해 및 약효

벼와 피의 엽령기별 ALA의 처리 효과를 그림 8, 9, 10에서 보는바와 같이 벼의 경우는 1-2엽기(15일) 묘령에 처리한 것에 비해 5-6엽기(35일) 묘령에 처리한 것이 ALA의 처리 농도가 증가할수록 무처리에 비해 생장이 크게 감소되었다. 반면 피의 경우는 벼와는 반대로 15일 묘령에 ALA를 처리한 것이 3-4엽기(25일) 묘령이나 35일 묘령에 처리한 것에 비해 ALA 농도 증가에 따른 초장 및 생체중의 감소폭이 크게 나타나 어릴수록 ALA의 효과가 크게 나타남을 볼 수 있었다. 이는 생장속도가 빠른 묘령이 어릴 때에 ALA에 대한 반응이 크고 벼와 피간의 선택성이 나타날 수 있음을 시사하고 있다. 반면 묘령이 늦을수록 벼와 피간의 선택성이 없어지는 것으로 보아 1-2엽기 초기방제를 하는 것이 바람직 하는 것으로 나타났다.

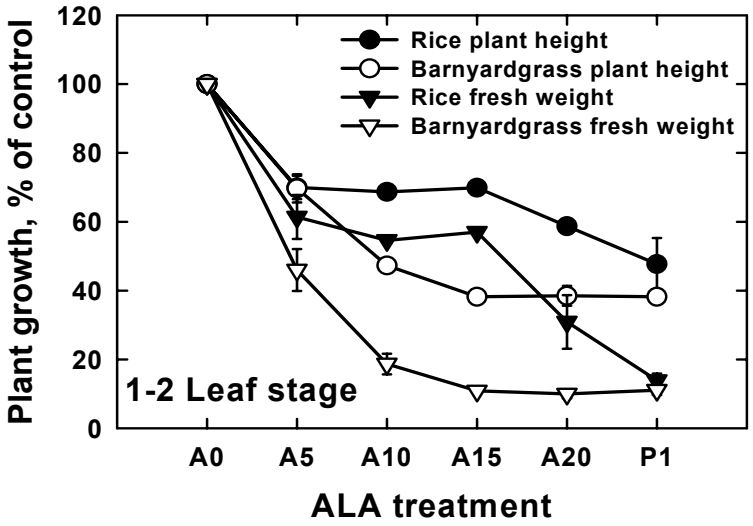


Fig. 8. Effects of ALA on plant height and shoot fresh weight of rice and barnyardgrass at 1-2 leaf stage (15 days after seeding).

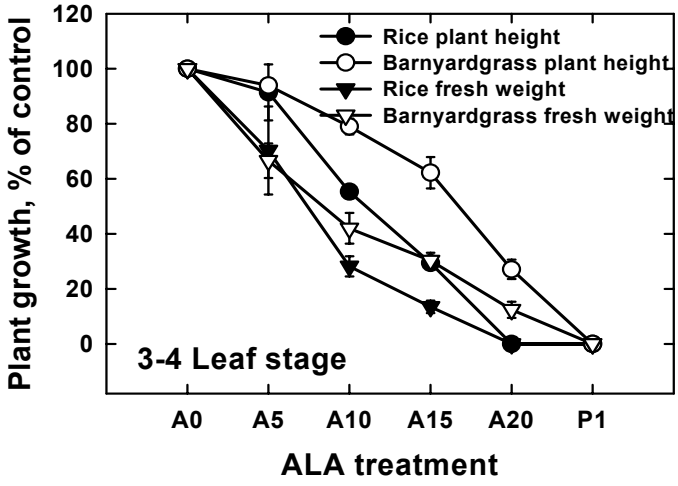


Fig. 9. Effects of ALA on plant height and shoot fresh weight of rice and barnyardgrass at 3-4 leaf stage (25 days after seeding).

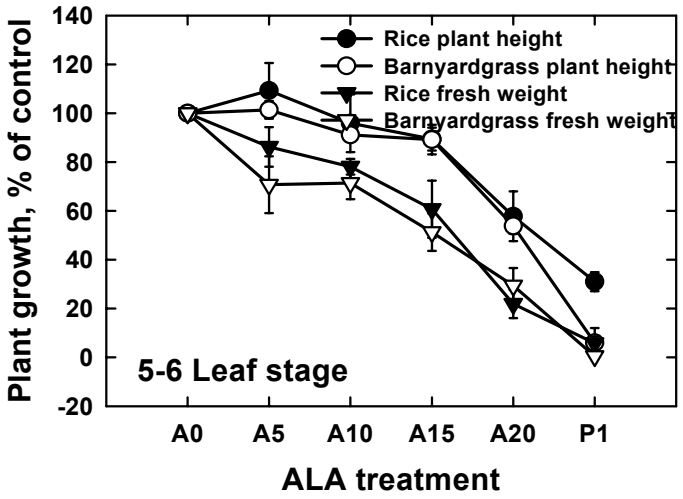


Fig. 10. Effects of ALA on plant height and shoot fresh weight of rice and barnyardgrass at 5-6 leaf stage (35 days after seeding).

2) 보리밭에서 ALA의 약해 및 약효

대표적인 겨울 작물과 잡초인 보리와 둑새풀에 대한 ALA의 농도별 처리 효과를 표 3-3, 3-4, 3-5에서 보면 보리는 다른 여름 작물에 비해 ALA에 대해 강력한 내성을 나타내었다. 초장의 경우 8mM의 고농도에서도 무처리(16.5cm)에 비해 감소폭이 적었고 14mM 이상의 농도에서 50% 이하로 감소되었다. 생체중도 6mM 이하의 농도에서는 무처리와 거의 같았고 10mM의 농도에서도 무처리에 비해 약 72% 이상의 생육이 유지되었다(표 14, 15, 16).

또한 엽령기 별로 보면생육초기보다 4엽기에서는 20mM의 고농도의 ALA 처리에서조차 생체중이 무처리의 약 60% 정도의 생육을 유지하여 ALA에 대해 강한 내성을 나타내었다. 반면 둑새풀은 보리에 비해 ALA의 처리 농도의 증가에 따라 생장의 감소폭이 크게 나타났다(그림 11).

Table 14. Effect of ALA on early seedling growth and chlorophyll content of barley at 1-2 leaf stage.

Treatment	Plant height (cm)	FWT. (g/plant)	DWT. (mg/plant)	Chlorophyll (mg/g)		Carotenoid (mg/g)
				a	b	
Control	16.5	0.379	35.6	25.5	9.7	7.6
2mM	18.4	0.429	40.0	24.6	8.5	7.5
4mM	15.7	0.421	39.7	23.6	7.6	7.2
6mM	16.1	0.350	34.2	20.9	6.8	6.2
8mM	15.5	0.266	24.2	18.1	5.6	5.6
10mM	13.9	0.274	24.2	19.4	6.0	5.9
12mM	10.9	0.186	17.2	13.0	4.0	4.1
14mM	8.9	0.118	9.4	10.4	3.2	3.3
16mM	7.5	0.089	7.5	9.8	3.0	3.0
18mM	6.5	0.068	6.2	8.0	2.8	2.5
20mM	4.7	0.063	5.8	6.1	3.9	1.3

Table 15. Effect of ALA on early seedling growth and chlorophyll content of barley at 3-4 leaf stage.

Treatment	Plant height (cm)	FWT (g/plant)	DWT (mg/plant)	Chlorophyll (mg/g)		Carotenoid (mg/g)
				a	b	
Control	26.7	0.483	72.2	17.6	6.0	5.5
4mM	28.7	0.440	62.0	17.1	5.9	5.4
8mM	28.5	0.374	52.4	16.5	5.3	5.1
12mM	29.7	0.319	44.7	15.2	5.0	5.0
16mM	28.1	0.351	50.7	17.5	5.5	5.7
20mM	23.8	0.298	45.6	12.2	3.8	3.8

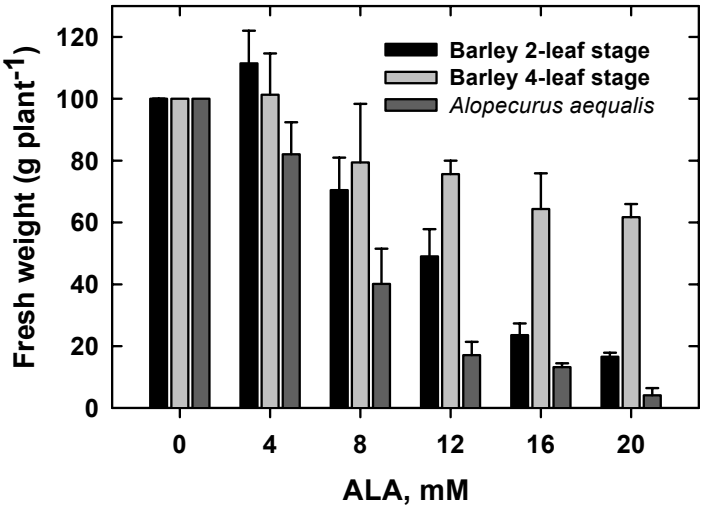


Fig. 11. Effect of ALA on seedling fresh weight of barley at 2- and 4-leaf stage and water foxtail at 4-leaf stage.

Table 16. Effect of ALA on early growth of barley as affected by different concentrations.

Treatment	Fresh weight (g/plant)	Dry weight (mg/plant)	Treatment	Fresh weight (g/plant)	Dry weight (mg/plant)
Control	0.462	39.0	0 mM	0.462	39.0
1×10^{-8}M	0.392	33.7	2 mM	0.337	27.7
5×10^{-8}M	0.438	41.3	4 mM	0.317	25.7
1×10^{-7}M	0.356	31.7	6 mM	0.305	23.3
5×10^{-7}M	0.425	33.0	8 mM	0.318	27.0
1×10^{-6}M	0.403	29.3	10 mM	0.281	23.0
5×10^{-6}M	0.383	29.7	12 mM	0.303	28.0
1×10^{-5}M	0.318	26.3	14 mM	0.277	26.3
5×10^{-5}M	0.349	30.3	16 mM	0.221	19.3
1×10^{-4}M	0.335	31.7	18 mM	0.230	21.7

3) 전작지에서 ALA의 약해 및 약효

가) 콩에 대한 약해 반응

Table 17. Effect of ALA on visual crop injury and plant growth of soybean seedlings.

Treatment (mM)	Crop injury (visual)		Plant growth	
	5 DAA*	10 DAA	Plant height	Fresh weight
			cm	g plant^{-1}
ALA 0	0.0	0.0	33.4	10.8
5	0.3	0.5	36.7	11.3
10	1.3	1.3	35.2	10.5
15	1.6	1.5	33.5	10.6
20	2.3	2.0	31.5	9.8
Paraquat 1	9.0	9.0	0.0	0.0

* DAA: days after application.

나) 약효반응

Table 18. Effect of ALA on the number of individuals and fresh weight of weed species at 20 days after application.

Trt. (mM)	바랭이		강아지풀		쇠비름		여뀌		망초		Total		Weeding Efficacy	
	NO*	FW	NO	FW	NO	FW	NO	FW	NO	FW	NO	FW	NO	FW
ALA 0	34.3	74.6	5.2	2.6	1.3	11.2	1.0	1.7	1.5	21.5	43.3	112	0.0	0.0
5	16.2	12.5	1.2	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	7.3	18.7	21.3	56.8	81.0
10	7.5	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.5	8.3	82.6	92.6
15	3.5	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	3.8	91.9	96.6
20	1.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.4	97.0	99.6
PAR 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100	100

*NO: number of individuals per 0.25 m^2, FW: fresh weight of each weed species.

4) 잔디밭에서 ALA의 약해 및 약효

가) 잔디에 대한 약해반응

Table 19. Effect of ALA on visual crop injury and plant growth of Korean lawn grass.

Treatment (mM)	Crop injury (visual)		Plant growth	
	5 DAA*	10 DAA	Plant height	Fresh weight
			cm	g plant^{-1}
ALA 0	0.0	0.0	15.3	0.6
5	0.5	1.0	15.0	0.5
10	1.5	2.0	13.5	0.4
15	3.0	3.5	13.1	0.3
20	4.5	5.5	12.5	0.2
Paraquat 1	9.0	9.0	0.0	0.0

* DAA: days after application.

나) 약효반응

Table 20. Effect of ALA on the number of individuals and fresh weight of weed species at 20 days after application.

Trt. (mM)	바랭이		여뀌		개비름		괭이밥		닭의장풀		Total		Weeding Efficacy	
	NO	FW	NO	FW	NO	FW	NO	FW	NO	FW	NO	FW	NO	FW
ALA 0	25.3	19.5	2.3	18.4	2.3	19.9	5.3	5.0	1.0	4.2	36.2	85.4	0.0	0.0
5	12.0	10.3	1.0	5.4	1.0	7.2	3.0	5.9	0.0	0.0	17.0	28.8	53.0	66.3
10	3.3	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	2.7	0.0	0.0	3.3	9.1	90.9	89.3
15	2.7	2.4	0.0	0.0	1.0	0.9	1.0	0.3	0.0	0.0	2.7	2.4	92.5	97.2
20	1.0	0.2	0.0	0.0	1.0	0.4	1.0	0.2	0.0	0.0	1.0	0.2	97.2	99.8
PAR 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100	100

* NO: number of individuals per 0.25 m^2, FW: fresh weight of each weed species.

5) 비경지에서 ALA의 약효반응

가) 약효

Table 21. Effect of ALA on the number of individuals and fresh weight of weed species at 20 days after application.

Trt. (mM)	바랭이		선피막이		닭의장풀		쑥		강아지풀		Total		Weeding Efficacy	
	NO	FW	NO	FW	NO	FW	NO	FW	NO	FW	NO	FW	NO	FW
ALA 0	17.1	46.6	5.0	7.8	1.0	7.7	4.3	15.7	6.3	21.4	33.7	99.2	0.0	0.0
5	7.0	12.2	1.0	0.2	1.0	4.7	1.1	2.0	2.0	5.1	13.1	24.2	61.1	75.6
10	5.3	8.2	1.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.3	8.2	81.3	91.7
15	2.0	4.5	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3	4.6	93.2	95.4
20	1.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.7	97.0	98.3
PAR 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100	100

콩은 파종 후 30일 째 (바랭이 초장, 20 cm 내외) ALA를 0, 5, 10, 15, and 20mM 농도로 paraquat를 1 mM 농도로 처리하여 처리 후 5일째와 10일째에 콩의 약해를 달관평가하고 초장과 생체중을 측정하였고 0.25 m^2내의 발생 초종별 개체수와 생체중을 측정하였다. 콩은 처리 후 5일째와 10일째에 20mM처리에서 20%내외의 약해가 발생하였고 무처리에 비해 생육에 있어서 큰 차이가 없어 타작물에 비해 내성이 큰 것으로 판단되었으며 한편 대조구로 paraquat을 처리한 콩의 생육은 완전 고사되었다. 주요한 우점초종은 바랭이, 강아지풀, 쇠비름, 여뀌, 망초 순이었다. 처리 후 20일 째 측정한 잡초방제효과는 15mM 이상에서 총 개체수와 생체중에 있어서 각각 92와 97%의 방제율을 보였다(표 17, 18).

한국 들잔디가 10-15cm 크기로 자라고 있을 때 ALA를 0, 5, 10, 15, and 20mM 농도로 paraquat를 1 mM 농도로 콩과 같은 방법으로 처리한 결과 처리 후 20일째 5mM에서 10% 정도 약해를 보였고 농도가 증가할수록 20%에서 55%로 약해가 증가하였다. 대조구로 처리된 paraquat는 잔디의 생육은 완전 억제되었다. 발생된 잡초종으로는 바랭이, 여뀌, 개비름, 괭이밥, 닭의장풀으로서 처리 후 20일째 측정한 잡초방제효과는 15mM 이상에서 총 개체수와 생체중에 있어서 각각 93와 97%의 높은 방제율을 보였다(표 19, 20).

비경지에서 발생된 초종은 바랭이, 선피막이, 닭의장풀, 쑥, 강아지풀 순으로 우점되어 있었고 처리 후 20일째 잡초방제효과는 역시 15mM 이상에서 총 개체수와 생체중에 있어서 각각 93와 95%의 높은 방제율을 보였다(표 21).

이상의 결과로 볼 때 포장적용시험에서 작물별 다소간의 차이는 있지만 약해 발생은 전 작물에서 발생되었다. 잡초종 간에도 뚜렷한 선택성이 없이 15mM 이상의 농도에서는 90%이상의 잡초방제 효과를 볼 수 있어서 비록 높은 살포량이 요구되지만 ALA는 비선택성 경엽처리제로서 비경지에 적용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

마. ALA의 작물 stress 내성반응 연구

1) ALA가 콩의 내염성에 미치는 영향

NaCl과 ALA 처리에 의한 콩의 지상부 생육은 표 22와 23에서 보는 바와 같이 처리 농도 증가에 의해 일정한 경향을 보이지 않았다.

초장의 경우 ALA를 처리하지 않은 NaCl 30과 60mM의 저농도에서는 무처리에 비해 오히려 초장이 약간 증가하였으나 90mM 이상의 농도에서는 NaCl stress가 나타났다. NaCl stress 유발 후 ALA를 농도별로 처리한 결과도 무처리와 같이 NaCl 처리에 의한 감소의 영향이 ALA의 처리에 의한 효과 보다 크게 나타나 ALA의 stress 경감이나 회복의 효과를 볼 수 없었으나 ALA 10^{-7}M처리에서는 10-15%의 증가를 보였다(표 22).

지상부 건물중의 변화는 초장의 경우보다도 NaCl 처리에 의한 감소가 처리농도가 증가할수록 뚜렷하게 타나났고 ALA의 처리에 의한 stress 경감 효과가 더 크게 나타나 NaCl 60과 90mM에서 ALA를 10^{-7}M 처리한 결과 각각 33과 45% 증가를 보였다 (표 23).

Table 22. The effect of ALA on plant height of NaCl-treated soybean seedlings.

Treatment	Plant height (cm)				
	0	30mM	60mM	90mM	120mM
0	45.1(100)	51.7(100)	45.5(100)	41.3(100)	34.9(100)
10^{-7}M	52.8(117)	49.8(96)	50.4(111)	45.4(110)	40.5(116)
10^{-6}M	50.8(113)	48.3(93)	49.1(108)	38.6(93)	35.9(103)
10^{-5}M	47.9(106)	49.4(96)	48.3(106)	40.2(97)	31.6(91)
10^{-4}M	46.5(103)	48.1(93)	46.4(102)	39.8(96)	31.3(90)

Table 23. The effect of ALA on shoot dry weight of NaCl-treated soybean seedlings.

Treatment	Shoot dry weight (g/plant)				
	0	30mM	60mM	90mM	120mM
0	0.910l(100)	0.610(100)	0.401(100)	0.273(100)	0.210(100)
10^{-7}M	0.827(91)	0.722(118)	0.533(133)	0.397(145)	0.212(101)
10^{-6}M	0.770(85)	0.637(104)	0.490(122)	0.279(102)	0.202(96)
10^{-5}M	0.741(81)	0.664(109)	0.482(120)	0.261(96)	0.177(84)
10^{-4}M	0.589(65)	0.576(94)	0.401(100)	0.244(89)	0.154(73)

NaCl stress에 직접 노출되는 콩 뿌리의 길이(표 24)는 30과 60mM의 저농도의 NaCl 처리에서는 무처리와 거의 같은 생장을 보였고 90mM 이상의 고농도에서 생장이 감소되었다. ALA 처리에 의한 효과는 10^{-7}M의 처리에서 NaCl 처리에 의한 감소

가 무처리에 비해 적었고 90mM 처리는 60mM 처리와 근장이 거의 같았다. 그러나 ALA의 다른 농도에서는 처리 효과의 일정한 경향이 나타나지 않았다.

건물중의 변화(표 25)는 NaCl 처리농도의 증가에 따라 크게 감소되었다. 그러나 ALA의 처리에 의한 stress 경감효과는 30mM 처리에서만 무처리에 비해 건물중의 감소가 적어 효과를 볼 수 있었고 그 외의 처리 농도에서도 무처리에 비해서는 감소폭이 약간 적었으나 ALA의 처리에 의한 NaCl stress를 완전 회복할 수는 없었다.

Table 24. The effect of ALA on root length of NaCl-treated soybean seedlings.

Treatment	Root length (cm)				
	0	30mM	60mM	90mM	120mM
0	14.9(100)	14.9(100)	14.3(100)	12.5(100)	10.8(100)
10^{-7}M	15.9(107)	16.2(109)	15.1(106)	13.6(109)	11.6(107)
10^{-6}M	15.4(103)	15.2(102)	13.4(94)	12.8(102)	11.0(102)
10^{-5}M	14.9(100)	14.9(100)	14.4(101)	11.0(88)	9.8(91)
10^{-4}M	14.4(97)	14.5(97)	14.4(101)	11.8(94)	10.0(93)

Table 25. The effect of ALA on root dry weight of NaCl-treated soybean seedlings.

Treatment	Root dry weight (mg/plant)				
	0	30mM	60mM	90mM	120mM
0	130.0(100)	100.0(100)	77.0(100)	33.7(100)	25.3(100)
10^{-7}M	132.9(102)	114.1(114)	86.2(112)	66.6(197)	37.4(148)
10^{-6}M	128.7(99)	104.2(104)	75.2(98)	40.7(121)	30.9(122)
10^{-5}M	108.9(84)	109.5(110)	58.7(76)	44.8(133)	28.3(112)
10^{-4}M	108.7(84)	86.3(86)	61.0(79)	37.4(111)	27.9(110)

나) ALA가 벼의 내염성에 미치는 영향

출현 후 10일된 벼 유묘를 NaCl Stress 유발한 후 ALA를 농도별로 침지 처리하여 벼의 지상부와 지하부의 생육을 조사한 결과 초장의 변화 (표 26)는 무처리에 비해 NaCl 농도가 증가할수록 초장이 감소하였고 ALA 처리의 모든 농도에서도 무처리와 같이 NaCl stress에 대한 경감효과와 회복효과는 나타나지 않았다.

Table 26. The effect of ALA on plant height of NaCl-treated rice seedlings.

Treatment	Plant height (cm)				
	0	30mM	60mM	90mM	120mM
0	54.7(100)	48.0(100)	50.9(100)	45.9(100)	38.5(100)
10^{-7}M	58.4(107)	55.1(115)	53.6(105)	49.7(108)	41.1(107)
10^{-6}M	56.2(103)	52.7(110)	49.9(98)	47.9(104)	39.4(102)
10^{-5}M	56.5(103)	48.9(102)	50.5(99)	47.7(104)	35.8(93)
10^{-4}M	55.7(102)	47.1(98)	47.0(100)	47.7(104)	35.6(92)

지상부 건물중의 경우(표 27)는 NaCl 처리에 의한 감소폭이 초장보다 크게 나타났고 초장에서와 같이 ALA의 효과는 나타나지 않았다.

Table 27. The effect of ALA on shoot dry weight of NaCl-treated rice seedlings.

Treatment	Shoot dry weight (g/plant)				
	0	30mM	60mM	90mM	120mM
0	0.485(100)	0.398(100)	0.359(100)	0.305(100)	0.181(100)
10^{-7}M	0.552(118)	0.376(94)	0.334(93)	0.321(105)	0.202(112)
10^{-6}M	0.573(114)	0.319(80)	0.320(89)	0.278(91)	0.178(98)
10^{-5}M	0.533(109)	0.364(91)	0.323(90)	0.302(99)	0.124(69)
10^{-4}M	0.439(91)	0.395(99)	0.275(77)	0.289(95)	0.139(77)

지하부 생육의 변화는 (표 28) 무처리의 경우 NaCl 농도의 증가에 따라 건물중이 크게 감소되었다. ALA의 처리에서도 NaCl stress에 의한 감소를 약간 완화시켰으나 그 폭은 크지 않아 본 실험에서는 NaCl stress에 대한 ALA의 stress 경감효과나 회복효과를 볼 수 없었다.

Table 28. The effect of ALA on root dry weight of NaCl-treated rice seedlings.

Treatment	Root dry weight (mg/plant)				
	0	30mM	60mM	90mM	120mM
0	202.6(100)	155.2(100)	111.3(100)	102.4(100)	53.9(100)
10^{-7}M	158.2(78)	112.1(72)	94.2(85)	99.2(97)	62.3(116)
10^{-6}M	156.5(77)	113.1(73)	87.9(79)	93.1(91)	32.3(60)
10^{-5}M	125.0(62)	92.1(59)	73.5(66)	80.1(78)	45.4(84)
10^{-4}M	155.2(77)	83.1(54)	76.0(68)	86.9(85)	42.0(78)

다) ALA가 침관수해 경감에 미치는 영향

파종 후 15일된 2.5~3엽기 배추를 0(미침수), 3(배추 초장의 절반깊이까지 침수), 8cm(완전침수) 깊이로 각각 24시간과 72시간 동안 침수시켜 stress를 유발하였다. 침관수 stress가 유발된 배추에 ALA 0, 10^{-7} 그리고 10^{-6}M 농도로 엽면살포한 후 생체중 및 건물중량을 측정하여 stress 경감 및 회복 효과를 조사한 결과 3cm 깊이에서 72시간 침수시에 ALA 10^{-7}M과 10^{-6}M을 처리한 결과 배추 생체중에 의한 생육이 무처리에 비해 82와 39% 회복되었다(표 29).

Table 29. Effect of ALA on fresh weight of Chinese cabbage injury as affected by different depths and duration of water logging.

ALA treatment	0 cm		3 cm		6 cm	
	24 hrs	72 hrs	24 hrs	72 hrs	24 hrs	72 hrs
	g plant^{-1}					
0 M	0.53 (100)	0.53 (100)	0.61 (100)	0.37 (100)	0.60 (100)	0.22 (100)
10^{-7}M	0.58 (120)	0.58 (109)	0.45 (74)	0.62 (182)	0.57 (99)	0.20 (87)
10^{-6}M	0.54 (102)	0.54 (116)	0.41 (68)	0.51 (139)	0.42 (73)	0.19 (86)

4) ALA에 대한 잡초 종 피의 해부학적 반응 연구

ALA처리에 따른 피의 해부학적인 변화는 농도가 증가함에 따라 뚜렷한 반응을 보였다. 외부로부터 표피세포와 엽육세포의 수축으로 인해 엽신의 두께가 유의적으로 감소되었으며 세포의 수축현상 및 파괴가 관찰되었다(그림 12).

엽신의 두께는 ALA 8mM 처리에서 무처리에 비해 70%가 감소되었으며 이는 대부분이 엽신의 대부분을 형성하는 엽육세포의 파괴(대조구의 79% 감소)에 기인하는 것으로 해석된다. 이는 해면조직으로 된 엽육세포의 미세구조에 있어서 경시적인 변화에 관한 연구를 수행한 Motazer-Zouhoor(1988)의 결과와 유사한 현상으로서 초기증상은 접촉되는 녹색 잎에 백화 반점들이 급속히 나타나면서 잎의 위조로 인해 팽압이 심하게 소실되며 이에 감수성 녹색식물 조직은 갈변되어 죽은 조직으로 고사한다. 이

는 세포질 안에서 액포막의 투과성 차이의 소실, 액포즙액의 삼출 및 가수분해효소 증가 등의 초기증상에 이어서 엽록체 막의 파괴가 뚜렷하게 나타났음을 의미한다.

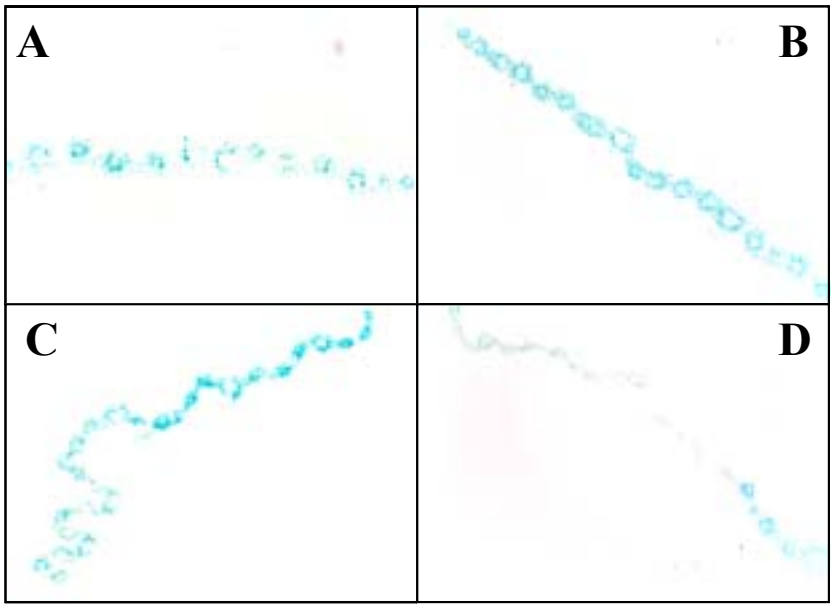


Fig 12. Transverse section of ALA-treated barnyardgrass leaves 72 hours after foliar application as affected by different concentrations, control (A), 4 (B), 6 (C), and 8mM (D). Magnification was X100.

Table 30. Effects of ALA on leaf morpholgy of barnyardgrass.

ALA (mM)	Cell thickness (㎛)		
	Epidermal cell	Mesophyll cell	Total
0	19.4±3.9(100)	108.1±26.3(100)	127.5±23.4(100)
2	17.8±0.9(92)	70.9±9.7 (66)	88.7±8.8 (70)
4	17.7±0.7(91)	51.5±9.7 (48)	69.2±3.9 (54)
6	16.8±1.5(87)	37.2±10.2(34)	54.0±1.5 (42)
8	15.8±0.9(81)	22.4±8.4 (21)	38.2±3.4 (30)

4. 결과요약

ALA가 주변의 농업환경과 타화합물과 반응, 주요한 환경스트레스와의 상호작용을 검토하고자 기내배양시험, 온실의 pot시험 및 포장(작물포장과 비경지 등) 실증시험을 통해 ALA가 미치는 수종의 작물과 잡초종의 생육반응 시험이 수행되었다.

재배양식별 벼에 대한 ALA의 약해는 담수직파벼보다는 건답직파벼에서, 이앙벼보다는 직파벼에서, 20일이앙벼보다는 10일이앙벼에서 더 큰 것으로 나타났다. 피에 대한 ALA의 약효는 역시 담수직파조건보다는 건답직파조건에서, 이앙조건보다는 직파조건에서, 20일이앙조건보다는 10일이앙조건에서 더 크게 나타났다. 한편 대조 약제 paraquat에 비해 작물 약해는 더 적었으나 약효는 다소 낮아 20mM이상 처리농도에서만 높게 나타났다. ALA에 대한 벼의 약해와 피의 약효반응은 담수보다는 건답상태에서는 높게 나타났다. ALA의 처리 후 조건에 따른 약효의 차이는 처리 후 일정시간 암 치상한 것이 지속적으로 광에 노출시킨 것에 비해 약간 높은 효과를 나타내었고 처리농도가 증가함에 따라 생장이 감소되었다

ALA를 농도별로 처리한 배지 내 나리의 생육 과 분화정도의 변화는 10^{-8}, 10^{-6}, 10^{-5}M 처리에서 무처리에 비해 초장 및 생체중 등의 생육이 증가되었고 하나의 인편으로부터 재분화된 구와 잎 및 뿌리도 무처리에 비해 많았다. 이러한 결과로 보아 조직배양에서 ALA가 낮은 농도에서 특히 초기 생육 분화시기에는 생육촉진효과가 인정되어 생장조절제로서 이용될 수 있는 가능성이 있다고 사료된다.

ALA 단제 및 살충제 파밤탄과의 상호 살충작용에 있어서 ALA 10배(10mM)에서 암치상기간이 없을 경우엔 3일째에 90%를 나타냈으며 16시간의 암치상 유지 후의 광노출시에는 100%의 살충률을 나타내었다. 파밤탄과 ALA 10배액(10mM)를 혼합하여 시험한 결과 암치상을 한 경우 2일째부터 90% 이상의 살충률을 보였고 상승효과가 있었으나 암처리 하지 않은 경우에도 70%의 살충률만을 보였다. 점박이응애에 대해서는 파밤나방에 비해 높은 살충률을 나타냈다

약효 지속성을 알아보기 위해 ALA의 토양혼합 처리 후 5일 간격으로 파종된 배추의 생육은 처리 직후(처리 후 0일 째) 파종된 배추는 지상부와 지하부 생육 및 엽록소 함량 모두 ALA의 농도 증가에 따라 급격히 생장이 감소되었다. 그러나 5일째 파종된

배추의 경우는 무처리에 비해 약간 감소되었으나 처리 후 10일째 이후의 파종에서는 ALA의 모든 처리 농도에서 무처리와 유사한 생육을 보여 ALA가 토양 처리된 후 급격히 소실됨을 알 수 있었다. 토양 내 ALA의 잔류량 변화는 처리 직후에만 농도에 따라 그 함량이 변화하였고 5일 후에는 처리 농도에 따라 그 잔류량이 아주 적었고 10일째와 15일째 그리고 20일째에는 거의 잔류되어 있지 않았다. 따라서 ALA는 토양 처리 직후 5일 이내에 토양에 흡착 또는 유실되 약효가 오래 지속되지 못한 것으로 나타났다.

벼와 피의 엽령기별 ALA의 처리 효과를 벼의 경우는 1-2엽기(15일) 묘령에 처리한 것에 비해 5-6엽기(35일) 묘령에 처리한 것이 ALA의 처리 농도가 증가할수록 무처리에 비해 생장이 크게 감소되었다. 반면 피의 경우는 벼와는 반대로 15일 묘령에 ALA를 처리한 것이 3-4엽기(25일) 묘령이나 35일 묘령에 처리한 것에 비해 ALA 농도 증가에 따른 초장 및 생체중의 감소폭이 크게 나타나 어릴수록 ALA의 효과가 크게 나타남을 볼 수 있었다.

대표적인 겨울 작물과 잡초인 보리와 둑새풀에 대한 ALA의 농도별 처리 효과는 다른 여름 작물에 비해 ALA에 대해 강력한 내성을 나타내었다. 엽령기 별로 보면생육초기보다 4엽기에서는 20mM의 고농도의 ALA 처리에서조차 생체중이 무처리의 약 60% 정도의 생육을 유지하여 ALA에 대해 강한 내성을 나타내었다. 반면 둑새풀은 보리에 비해 ALA의 처리 농도의 증가에 따라 생장의 감소폭이 크게 나타났다.

파종 후 30일째 (바랭이 초장, 20 cm 내외) 콩은 처리 후 5일째와 10일째에 20mM 처리에서 20%내외의 약해가 발생하였고 무처리에 비해 생육에 있어서 큰 차이가 없어 타작물에 비해 내성이 큰 것으로 판단되었으며 처리 후 20일째 측정한 잡초방제효과는 15mM 이상에서 총 개체수와 생체중에 있어서 각각 92와 97%의 방제율을 보였다.

한국 들잔디가 10-15cm 크기로 자라고 있을 때 ALA를 0, 5, 10, 15, and 20mM 농도로 paraquat를 1 mM 농도로 처리한 결과 처리 후 20일 째 5mM에서 10% 정도 약해를 보였고 농도가 증가할수록 20%에서 55%로 약해가 증가하였다. 대조구로 처리된 paraquat는 잔디의 생육은 완전 억제되었다. 처리 후 20일 째 측정한 잡초방제효과는 15mM 이상에서 총 개체수와 생체중에 있어서 각각 93와 97%의 높은 방제율을 보였

다.

비경지에서 처리 후 20일 째 잡초방제효과는 역시 15mM 이상에서 총 개체수와 생체중에 있어서 각각 93와 95%의 높은 방제율을 보였다. 이상의 결과로 볼 때 포장적용시험에서 작물별 다소간의 차이는 있지만 약해 발생은 전 작물에서 발생되었다. 잡초종 간에도 뚜렷한 선택성이 없이 15mM 이상의 농도에서는 90%이상의 잡초방제 효과를 볼 수 있어서 비록 높은 살포량이 요구되지만 ALA는 비선택성 경엽처리제로서 비경지에 적용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

ALA가 콩의 내염성에 미치는 영향을 검토한 결과 지상부 건물중의 변화는 초장의 경우보다도 NaCl 처리에 의한 감소가 처리농도가 증가할수록 뚜렷하게 타나났고 ALA의 처리에 의한 stress 경감 효과가 더 크게 나타나 NaCl 60과 90mM에서 ALA를 10^{-7}M 처리한 결과 각각 33과 45% 증가한 반면 벼의 지상부와 지하부의 생육은 무처리에 비해 NaCl 농도가 증가할수록 생장이 감소하였고 ALA 처리의 모든 농도에서도 무처리와 같이 NaCl stress에 대한 경감효과와 회복효과는 나타나지 않았다.

ALA처리에 따른 피의 형태 해부학적인 변화는 농도가 증가함에 따라 외부로부터 표피와 엽육세포의 수축으로 인해 엽신의 두께가 감소되었으며 세포의 수축 및 붕괴가 관찰되었다.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표와 내용

제1세부과제: ALA의 작용기작 구명

광역학적인 효과로 식물체에 고사현상을 초래하는 ALA를 처리하여 적정 약량, 검정 식물을 결정하고 생육단계별, 식물종간, 식물기관간에 선택활성 반응, 식물생리생화학적 반응 및 환경에 대한 안정성 여부를 확인하고자 하였다.

1) 식물의 생육반응

(1) 약량별 반응

(2) 식물체 부위별 선택활성 반응

(3) 식물체 초종별 선택활성 반응

2) 식물생리생화학적 반응

(1) 엽록소 함량 및 형광

(2) 광합성 측정

(3) 전해물질과 지질과산화작용

(4) Proto IX의 축적

3) 식물반응의 환경과의 상호작용 및 안정성 연구

(1) 온도조건에 따른 변이

(2) 광조건에 따른 변이

(3) 수분조건에 따른 변이

제2세부과제: ALA를 이용한 생물농약 개발 연구

저농도에서는 생장촉진제 또는 재해 완충제로, 고농도에서는 제초제로의 개발 목적으로 단제는 물론, 기존의 제초제 및 다른 천연생리활성물질들과의 상호작용 연구를 통해 농약사용의 감량화 및 전천후 농약으로서의 이용성 증대와 농업환경과의 상호작용 및 stress 경감효과의 검토를 본 과제의 목표로 삼았다.

1) ALA 단제에 의한 생물농약 개발연구

(1) 식물 생육단계별 적용시험

(2) 적용 작물 및 잡초 대상 연구

(3) 적정 제형 개발 연구

2) ALA와 타 제초제와의 상호작용 연구

(1) DPE계 제초제 : 대체성

(2) Bipyridylium계 제초제 : 대체성

(3) Sulfonylurea계 제초제 : 협력성

3) ALA와 농업환경과의 상호작용 연구

(1) 재배적 환경과의 상호작용

(2) 타 화합물(타농약, 비료, 생리활성물질 등)과의 상호작용

(3) 약효 지속성 연구

(4) 포장 적용시험 연구 (생장촉진 및 억제 효과)

4) ALA의 Stress 내성반응 연구

(1) 내염성 연구

(2) 한발 Stress 내성 연구

(3) 수분 stress 내성 연구

제2절 연차별 연구개발 목표와 내용

제1차 년도

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002 - 2003)	(1) ALA에 대한 식물의 생육반응	- 약량별 식물의 생육반응 - 식물체 부위별 선택활성 반응 - 식물체 초종별 선택활성 반응
	(2) 식물생리학적 반응	- 엽록소 함량 및 형광 - 광합성 측정
	(3) ALA 단제에 의한 생물농약 개발연구	- 식물 생육단계별 적용시험 - 적용 작물 및 잡초 대상 연구 - 적정 제형 개발 연구
	(4) ALA와 타제초제와의 상호작용 연구	- DPE계 제초제 : 대체성 - Bipyridylium계 제초제 : 대체성 - Sulfonylurea계 제초제 : 협력성

제2차 년도

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2003 - 2004)	(1) 식물생리 생화학적 반응	- 전해물질과 지질과산화작용 - Proto IX의 축적
	(2) 식물반응의 환경과의 상호작용 및 안정성 연구	- 온도조건에 따른 변이 - 광조건에 따른 변이 - 수분조건에 따른 변이
	(3) ALA와 농업환경과의 상호작용 연구	- 재배적 환경과의 상호작용 - 타 화합물(타농약, 생리활성물질 등)과의 상호작용 - 약효 지속성 연구 - 포장 적용시험 연구
	(4) ALA의 Stress 내성반응 연구	- 내염성 연구 - 한발 Stress 내성 연구 - 수분 Stress 내성 연구

제3절 연구평가의 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척도(점수)
1차년도 (**2003년**)	○ ALA에 대한 생육반응과 선택활성은? ○ ALA에 대한 생리학적 제초반응은? ○ 식물의 생육단계별 제초효과와 적정제형은? ○ 타제초제와 상호작용 여부?	100% 100% 100% 100%
2차년도 (**2004년**)	○ ALA에 대한 생화학적 제초반응은? ○ ALA의 환경에 따른 안정성 여부? ○ 농업환경과 상호작용은? ○ ALA에 의한 작물 Stress 경감여부?	100% 100% 100% 100%
최종평가	○ ALA의 생리화학적 작용기작은 규명되어졌나? ○ ALA로 생물농약 개발은 가능한가?	100% 100%

제5장 연구개발결과의 활용계획

제1절 추가연구의 필요성

21세기형 생물농약 개발은 국제경쟁력을 확보하고 과학기술선진국으로 도약해야 할 우리나라의 현시점에서 매우 중요한 과제이다. 현재까지 전세계적으로 생물농약의 개발은 극히 미진한 상태이며, 특히 전세계 농약시장 제초제 중 미생물이 생산하는 생물제초제는 아직도 극히 미미할 뿐만 아니라 특히 상업화되는 비율이 거의 없는 형편이다. 따라서 전적으로 유기제초제의 원제수입에 의존하는 우리로서 그 부담을 줄이기 위해 미생물로부터 천연활성물질의 발견은 농업생태계에서 현재의 화학적, 기계적, 및 재배적인 유해생물 방제법을 대체 또는 협력하는 새로운 작물보호전략으로 개발하고 이용이 필요하다. 그래서 미생물로부터 ALA를 대량생산하는 system을 개발하여 여러 가지 다기능을 가진 환경 친화적인 생물농약의 개발이 요구된다.

제2절 활용계획

가. 다른 농약, 미생물 살균제 및 살충제 개발에 기초자료 제공
나. 대체 농약개발로 잡초방제기술의 특허화 및 산업계에 기술이전
다. 골프장, 잔디밭 등 농약오염의 최소화를 요하는 Niche시장 공략
라. 저농도에서 작물 생장촉진 또는 억제제로 개발
마. 염해 등 작물재해 경감제로 개발

제3절 본 연구과제를 통해 얻어진 연구실적

1) 임경섭. 2003. 다양한 식물종의 생장촉진과 억제에 관한 5-Aminolevulinic Acid의 효과. 전남대학교 석사학위논문. p 37.

2) Yong In Kuk, Gyeong Seob Lim, Sang Uk Chon, Tay Eak Hwang, and Ja Ock Guh. 2003. Effect of 5-Aminolevulinic acid on growth and inhibition of various plant species. Korean J. of Crop Science. 48(2): 127-133.

3) Yong In Kuk. 2003. 보리와 밀에 관한 5-Aminolevulinic acid의 생장촉진과 제초작용기작. 한국잡초학회지. 23(3): 285-293.

4) Chon Sang-Uk. 2003. Herbicidal Activity of δ-aminolevulinic Acid on Several Plants as Affected by Application Methods. Korean J. Crop Sci. 48(1):50-55.

5) 천상욱, 국용인, 구자옥. 2004. Tetrapyrrole 의존형 광활성 제초제 δ-Aminolevulinic Acid의 미생물학적 생산 및 제초기작. 한국잡초학회지. 24(3): 161-172.

제6장 참고문헌

Askira, Y. B. Rubin, and H.D. Rabinowitch. 1991. Differential response to the herbicidal activity of 5-aminolevulinic acid in plants with high and low SOD activity. Free Rad. Res. Comms. 12-13 : 837-843.

Avissar, Y.J. and P. A. Moberg. 1995. The common origins of the pigments of life-early steps of chlorophyll biosynthesis. Photosynth. *Res*. 44 : 221-242.

Beale, S.I. 1990. Biosynthesis of the tetrapyrrole pigment precursor, δ-aminolevulinic acid, from glutamate. Plant Physiol. 93 : 1273-1279.

Beale, S.I., M.H. Gold, and S. Graninie, 1979. "Chemical synthesis of 4, 5-dioxovaleric acid and its nonenzymatic transamination to 5-aminolevulinic acid," Phytochemistry. 18 : 441-444.

Becerril, J. M. and S. O. Duke. 1989. Protoporhyrin Ⅸ content correlates with activity of photobleaching herbicides. Plant Physiol. 90 : 1175-1181.

Bingshan, L., Y. Hotta, Q. Yinglan, Z. Jinsong, T. Tanaka, Y. Takeuchi, and M. Konnai. 1998. Effects of 5-aminilevulinic acid on the growth and ripening of wheat. J. Pesticide Sci. 23 : 300-303.

Castelfranco, P. A., P. M. Rich, and S. I. Beale. 1974. The abolition of the lag phase in greening cucumber cothyledons by exogenous δ-aminolevulinic acid. Plant Physiol. 53 : 615-618.

Chakraborty, N., and B. C. Tripathy. 1992. Involvement of singlet oxygen in 5-aminolevulinic acid induced photodynamic damage of cucumber chloroplast. Plant Physiol. 98 : 7-11.

Chereskin, B.M. and P.A. Castelfranco. 1982. Effects of iron and oxygen on chlorophyll biosynthesis. 2. Observations on the biosynthetic pathway in isolated etiochloroplasts. Plant Physiol. 69 : 112-116.

Choi, C., B.S. Hong, H.C. Sung, H.S. Lee, and J.H. Kim. 1999. Optimization of

extracellular 5-aminolevulinic acid production from *Escherichia coli* transformed with ALA synthase gene for *Bradyrhizobium japonicum*. Biotech. Letters. 21 : 551-554.

Choi, J. S., H. J. Lee, I. T. Hwang, J. Y. Pyon, and K. Y. Cho. 1999. Differential susceptibilities of wheat and barley to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. Pesticide Biochem. Physiol. 65 : 62-72.

Duke, S. O., J. Lydon, J. M. Becerril, T.D. Sherman, L. P. Lehnen, and H. Matsumoto. 1991. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. Weed Sci. 39 : 465-473.

Eiji. N, Kuniaki. T, Noboru. N, Kiyoshi. T. and Keitaro W. 2001. Effect of 5-Aminolevulinic Acid (ALA) on Photosynthetic Rate, Hydrogen Peroxide Content, Antioxidant Level and Active Oxygen-Scavenging Enzymes in Spinach (*Spinacia oleracea* L.), J. Japan. Soc. Hort. Sci. 70(3) : 346-352.

Granick, J. and S. Sassa. 1971. δ-Aminolevulinic acid synthetase and the control of heme and chlorophyll synthesis. In: Vogel, H.J. (ed.): Metabolic Regulation. Vol. V. pp. 77-141. Academic Press. New York.

Hiscox, J. D. and G. F. Israelstam. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Canada J. Bot. 57 : 1332-1334.

Hotta, Y., K. Watanabe, T. Tanaka, Y. Takeuchi, and M. Konnai. 1997c. Effects of 5-aminilevulinic acid on growth of plant seedling. J. Pesticide Sci. 22 : 102-107.

Hotta, Y., T. Tanaka, H. Takaoka, Y. Takeuchi, and M. Konnai. 1997a. New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: the increase of photosynthesis, chlorophyll content, and plant growth. Biosci. Biotech. Biochem. 61 : 2025-2028.

Hotta, Y., T. Tanaka, H. Takaoka, Y. Takeuchi, and M. Konnai. 1997b. Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops. *Plant Growth Regulation* 22 : 109-114.

Hotta, Y., T. Tanaka, L. Bingshan, Y. Takeuchi, and M. Konnai. 1998. Improvement

of cold resistance in rice seedlings by 5-aminolevulinic acid. J. pesticide Sci. 23 : 29-33.

Jacobs, J. M., N. J. Jacobs and S. O. Duke. 1996. Protoporphyrinogen destruction by plant extracts and correlation with tolerance to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. Pestic. Biochem. Physiol. 55 : 77-83.

Johnson, W. O., G. E. Kollman, C. Swithenbank, R. Y. Yih. 1978. RH-6201 (blazer): A new broad spectrum herbicide for postemergence use in soybeans. J. Agric. Food. Chem. 26 : 285-286.

Kuk Y. I., G. S. Lim, S. U. Chon, T. E. Hwang, and J. O. Guh. 2003. Effects of 5-aminolevulinic acid on growth and inhibition of various plant species. Korean J. of Crop Sci. 48: 127-133.

Lee, H. J. and S. O. Duke. 1994. Protoporphyrinogen Ⅸ-oxidizing activities involved in the mode of action of peroxidizing herbicides. J. Agric. Food Chem. 42 : 2610-2618.

Lee, H. J., M. V. Duke, and S. K. Duke. 1993. Cellular localization of protoporphyrin-oxidizing activities of etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. Relationship to mechanism of action of protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. Plant Physiol. 102: 881-889.

Lee, J. J., H. Matsumoto, and K. Ishizuka. 1992. Light involvement in oxyfluorfen-induced protoporphyrin Ⅸ accumulation in several species of intact plants. Pestic. Biochem. Physiol. 44 : 119-125.

Lermontova, I. and B. Grimm. 2000. Overexpression of plastidic protoporphyrinogen Ⅸ oxidase leads to resistance to the diphenyl-ether herbicide acifluorfen. Plant Physiol. 122 : 75-83.

Matringe, M., J.M. Camadro, P. Labbe and R. Scalla. 1989. Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target of diphenyl ether herbicides. Biochem. J. 260 : 231-235.

Matsumoto, H., Y. Tanida, and K. Ishizuka. 1994. Porphyrin intermediate involved

in herbicidal action of δ-aminolevulinic acid on duckweed. Pestic. Biochem. Physiol. 48 : 214-221.

Mayasich, J. M., U. B. Nandihalli, R. A. Liebl, and C. A. Rebeiz. 1990. The primarly mode of action of acifluorfen-Na in intact seedling is not via tetrapyrrole accumulation during the first dark period following treatment. Pestic. Biochem. Physiol. 36: 259-265.

Mishra, S. N., and H. S. Srivastava. 1983. Stimulation of nitrate reductase activity by delta aminolevulinic acid in excised maize leaves. Experientia. 39 : 1118-1120.

Rebeiz, C. A., A. Montazer-Zouhoor, H. J. Jopen, and S. M. Wu. 1984. Photodynamic herbicides: Concept and phenomenology. Enzyme Microb. Technol. 6 : 390-401.

Rebeiz, C. A., A. Montazer-Zouhoor, H. J. Jopen, and S. M. Wu. 1984. Photodynamic herbicides: Concept and phenomenology. Enzyme Microb. Technol. 6 : 390-401.

Rebeiz, C. A., A. Motazer-Zouhoor, J. M. Mayasich, B. C. Tripathy, S. M. Wu, and C. C. Bebiz. 1988. Photodynamic herbicides. Recent developments and molecular basis of selectivity. Crit. Rev. Plant Sci. 6 : 385-486.

Roy, C. B., and M. Vivekanandan. 1998. Role of aminolevulinic acid in improving biomass production in *Vigna catjung*, *V. mungo*, and *V. radiata*. Biologia plantarum 41 : 211-215.

SAS (Statistical Analysis System). 2000. SAS/STAT users guide. Version 7. Cary, NC: Statistical Analysis Systems Institute. Electronic Version.

Sasaki, K., S. Ikeda, Y. Nishizawa, and M. Hayashi. 1987. Production of δ-aminolevulinic acid from photosynthetic bacteria. J. Ferment. Technol. 65 : 511-515.

Schuimaker, J. J., P. Baas, L. M. van Leengoed, F.W. van der Meulen, W. M. Star, N. van Zandwijk. 1999. Photodynamic therapy: a promising new modality for

treatment of cancer. J. Photochem. Photobiol. 34 : 3-12.

Slater, T. F. 1984. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. Methods Enzymol. 105 : 283-293.

Sundquvist, C. 1969. Transformation of protochlorophyllide, formed from exogenous δ-aminolevulinic acid in continuous light and flashlight. Physiol. Plant 22 : 147-156.

Sundquvist, C. 1969. Transformation of protochlorophyllide, formed from exogenous δ-aminolevulinic acid in continuous light and flashlight. Physiol. Plant 22 : 147-156.

Tanaka, T., K. Takahashi, Y. Hotta, and Y. Takeuchi. 1992. 5-aminolevulinic acid as plant growth stimulator. Eur. Pat. App. EP 541-776.

Towers, G. H. N., and J. P. Arnason. 1988. Photodynamic herbicides. Weed Technol. 2 : 545-549.

Tschudy, D. P., and A. Collins. 1959. Malonic ester synthesis of 5-aminolevulinic acid. The reaction of N-3-bromoacetonylphthalimide with malonic ester. J. Org. Chem. 24 : 556-557.

Watanable, K., T. Tanaka, Y. Hotta, H. Kuramochi, and Y. Takeuchi. 2000. Improving salt tolerance of cotton seedlings with 5-aminolevulinic acid. Plant Growth Regulation 32 : 99-103.

Weinstein, J. D. and S. I. Beale. 1985. Enzymatic conversion of glutamate to δ -aminolevulinic acid in soluble extracts of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. Arch Biochem Biophys. 239 : 454-464.

Witkowski, D.A. and B.P. Halling. 1989. Inhibition of plant protoporphyrinogen oxidase by the herbicide acifluorfen-methyl. Plant Physiol. 90 : 1239-1242.

김형석, 2000, Rhodopseudomonas sphaeroides에서의 Polyhydroxyalkanoates와 5-Aminolevulinic Acid의 생합성, 충남대학교 석사 학위 논문.

민나영, 2001, Rhodobacter sphaeroides를 이용한 5-Aminolevulinic Acid 생산, 전남대학교 석사 학위 논문.

이희재, 1996, “Porpyrin 합성 저해 제초제의 작용 기작”, 원예학 세계, 1(2):30-33.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

δ-Aminolevulinic acid (ALA)의 작용기작 구명 및 생물농약 개발

농림부