

신규 화합물 EK-5439의 선택성 및 protoporphyrinogen oxidase 저해활성

홍경식 · 황인택* · 김형래 · 전동주 · 이병희 · 송종환 · 조광연

한국화학연구원

요약 : 신규 제초제 후보화합물 3-Chloro-2-[4-chloro-2-fluoro-5-(5-methyl-3-phenyl-4,5-dihydroisoxazol-5-ylmethoxy)-phenyl]-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indazole(EK-5439)의 1년생 잡초방제효과와 요인별 벼에 대한 안전성을 조사하였다. EK-5439는 처리량 16~63 g ai/ha에서 피, 물달개비, 발뚝외풀, 마디꽃, 알방동사니, 여뀌바늘 등 1년생 잡초에 대하여 우수한 제초활성을 가지고 있었다. 또한 2엽기 이상의 이앙 벼에 대해서는 EK-5439를 2,000 g ai/ha로 처리하여도 약해를 발생하지 않았다. EK-5439의 최적 처리 시기는 썩레질 후 5일 이내로 판단되었고, 국내의 벼 품종(대진, 대안, 서진, 오대, 동진, 낙동, 화성, 추청, 일품, 서안, 화명, 오봉, 다산, 안다, 향미II, 태백)에 대해서 1,000 g ai/ha 까지는 안전한 것으로 나타났다. EK-5439의 PPO 저해활성은 oxadiargyl의 PPO 저해활성과 농도 의존적으로 일치하였다. 결과적으로 EK-5439에 의한 살초작용은 발아 후 유아부가 제초제 처리 층을 통과하면서 접촉되어 PPO 저해에 의한 chlorophyll 생합성이 억제되어 고사되는 것으로 설명할 수 있다. (2004년 6월 2일 접수, 2004년 6월 25일 수리)

Key word : annual weed, application window, rice herbicide, spectrum, transplanting.

서 론

환경친화형 신규 제초제의 개발을 위하여 여러 가지 방법들이 동원되고 있지만 새로운 작용기작 또는 기존의 유망한 작용기작을 지닌 다양한 구조의 화합물을 합성하는 것이 공통적인 내용 중의 하나이다(Abell 등, 1996; 황과 이, 2003; 황 등, 2001; 황 등, 2001). 그동안 다양한 작용기작을 가진 저해제들이 재배 작물의 종류에 따라 선택성 또는 비선택성 제초제로 개발되어 왔다(권 등, 1986; Lyga 등, 1991; Kearney와 Kaufman, 1988; 황 등, 1998; Hay, 1999; Yogo, 2000; Troyer, 2001; Kudsk와 Streibig, 2003). 특히 엽록체 기능저해제가 시장의 40~50%를 점유하며 선택성과 제초효과가 우수한 화합물이 많은데 이는 동물에 존재하지 않는 엽록체 기능 저해제가 환경 친화형이며 인체에 대한 독성이 없는 우수한 제초제가 될 확률이 높다는 것을 반증한다. 현재까지 보고된 제초제의 주요 작용점에는 protoporphyrinogen oxidase (PPO), acetolactate synthase (ALS), acetyl CoA carboxylase, 4-hydroxyphenylpyruvate

dioxygense, glutamine synthetase, enolpyruvyl shikimate-P-synthase, imidazole glycerol phosphate dehydratase 등이 있으며(Abell 등, 1996; 황과 이, 2003), 최근에는 엽록체기능 저해제 중 PPO 저해제나 ALS 저해제 같이 아주 적은 약량으로도 우수한 제초효과를 지닌 제초제들이 시장의 주류를 이루어 가는 추세이다. 이들 중에서 작용점 PPO 저해 제초제들은 1970년대부터 개발 사용되었고, 제초작용의 생화학적 발현경로가 밝혀진 1989년 이후에는 더욱 다양한 구조의 저해제들이 개발되거나 특히 출원되고 있다(Nagano 등, 1983; Jeon 등, 1999; Hirai, 1999; Jeon 등, 2001; Ryu 등, 2001; Hirai 등, 2002).

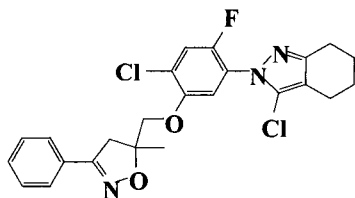
PPO저해제의 제 1세대에는 diphenyl ether계로서 bifenox과 chlomethoxyfen이 있으며, 제 2세대로는 acifluorfen, fomesafen, halosafen, lactofen 등이 있다. 이후에는 heterocycle 구조의 PPO저해제가 개발되었는데 oxadiazon, chlorphthalim, flumioxazin, azafenidin, oxadiargyl, pentoxazone, cinidon-ethyl 등을 이어서 sulfentrazone, carfentrazone-ethyl, fluzolate, pyraflufen-ethyl, profluzol 등이 개발되었다. 1995년 이후에는 각종 phthalimide계, thiadiazolidinone, thiadiazolinone, bicyclic pyrazole 등이 특

*연락처

허로 출원되고 있으며, 또다시 pyrazole, triazolinone, trifluoromethyluracil, pyridine, pyridone, pyridazine, 1,2,4-triazine, diheterocycle 유도체들이 연구되고 있다(Hirai, 1999; Hirai 등, 2002). 그러나 지금까지 개발된 PPO저해 제초제들 중에서 초기에 개발된 bifenox, oxadiazon, flumioxazin, oxadiargyl 등을 제외하고는 대부분이 경엽처리에 의한 제초활성을 나타내기 때문에 다양한 화합물들이 연구 개발되어도 벼농사용으로 사용하는데 제한되어 왔다(Duke 등, 1991; Hirai 등, 2002). 이들 중 oxadiazon은 국내에서 초기처리제로 사용되고 있지만 oxadiargyl은 벼에 대한 약해가 너무 심하여 현재까지는 제품화되지 못하고 있는 실정이다.

이에 따라 본 연구팀에서는 수도용 PPO저해 제초제를 개발하기 위하여 다양한 화합물을 합성하였고, bicyclic pyrazole 구조를 가지는 여러 가지의 2-(5-isoxazolinyl methoxyphenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indazole 유도체를 합성하여 제초활성을 조사하였는데 이들 중에서 3-Chloro-2-[4-chloro-2-fluoro-5-(3-phenyl-5-methyl-4,5-dihydroisoxazol-5-ylmethoxy)-phenyl]-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indazole(EK-5439, 그림 1)은 토양처리로 1년생 잡초에 대한 방제효과가 높고, 벼와 피에 대한 선택성이 매우 우수한 것을 발견하게 되었다.

그러나 Me-Too 방법에 의한 신규 제초제의 개발단계에서는 모핵 화합물의 유도체를 합성하면서 치환기의 종류와 위치에 따른 제초활성 양상을 분석하고, 유망 화합물에 대한 적용작물, 처리시기, 처리량, 처리방법 등의 최적화 작업을 통하여 후보물질을 선발하게 된다. 선발된 후보물질에 대해서는 선택성, 살초스펙트럼, 작용기작, 토양 중 행동 특성, 환경요인에 의한 약효 및 약해변동요인 등 보다 구체적으로 실용적 최적화작업을 하게 된다. 이러한 과정을 통하여 얻는 결과는 실제 포장시험과 실용



3-Chloro-2-[4-chloro-2-fluoro-5-(3-phenyl-5-methyl-4,5-dihydroisoxazol-5-ylmethoxy)-phenyl]-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indazole (EK-5439)

Fig. 1. Chemical structure of EK-5439 tested in this study.

화 과정에서의 성공 가능성을 높게 해준다.

본 논문에서는 이러한 일련의 과정 중 신규 합성화합물 EK-5439에 대하여 품종, 처리 시기와 이앙심도에 따른 약해 안전성 및 제초효과를 비교 조사하고, 작용점 PPO에 대한 저해활성 등을 조사하여 현재 사용되고 있는 oxadiazon과 oxadiargyl 두 가지 제초제를 비교물질로 하여 특성을 파악하고 새로운 제초제를 개발하는 최적화 과정의 일환으로 수행하였다.

재료 및 방법

제초 스펙트럼 조사

표면적 150 cm²의 플라스틱 포트에 곤죽 시킨 논토양을 담고, 1년생 잡초 종자(발아율 70% 이상)를 일정량씩 파종한 후 혼화시켰다. 대상으로 하였던 1년생 잡초는 모두 8종으로 피(*Echinochloa oryzicola*, ECHOR), 올챙이그랭이(*Scirpus juncooides*, SCPJU), 물달개비(*Monochoria vaginalis*, MOOVA), 발톱외풀(*Lindernia procumbens*, LIDPY), 마디꽃(*Rotala indica*, ROTIN), 사마귀풀(*Anilema keisak*, ANEKE), 알방동사니(*Cyperus difformis*, CYPDI), 여뀌바늘(*Ludwigia prostrata*, LUDPR) 등이었다. 각 포트는 3 cm 담수상태로 28-33°C (주간), 20-26°C (야간)의 온실에 두고 담수상태에서 제초제 용액을 점적 처리하였다. 제초제 용액은 합성 원제를 용매(아세톤)로 녹이고 tween-20을 0.1% 첨가시킨 증류수로 희석하여 처리 농도를 조정하였다. 제초제 처리 용액에 함유된 아세톤의 최종 농도는 50% 이었다. 제초효과는 제초제 처리 2주일 후 달관(0-100)으로 조사하였다.

이앙 벼의 묘령과 이앙심도에 따른 안전성 조사

이앙 벼의 묘령에 따른 안전성 조사는 동진벼를 육묘상자에서 생육시킨 후 2, 3, 4엽기의 모를 포트(표면적 150 cm²) 당 3본씩 2 cm 깊이로 이앙하였다. 3 cm 담수상태에서 이앙 2일 후 제초제를 처리하고 약제처리 4주 후 초장을 측정하여 무처리와 비교하였다. 이앙심도에 따른 안전성 조사는 육묘상자에서 생육시킨 2엽기의 모를 포트(표면적 150 cm²) 당 3본씩 1, 2, 3 cm 깊이로 이앙한 후 3 cm 담수상태에서 이앙 2일 후 제초제를 처리하고 4주 후 초장과 분얼 수를 조사하여 무처리와 비교하였다.

처리시기에 따른 피 방제효과 조사

표면적 150 cm²의 플라스틱 포트에 곤죽 시킨 논토양을

담고 강피 종자(발아율 70% 이상)를 파종한 후 혼화시켰다. 동일 포트에 육묘상자에서 재배한 2.5엽기의 유묘를 3본씩 3 cm 깊이로 이앙하였다. 3 cm 담수상태로 온실에서 재배하면서 이앙 후 0, 2, 5, 7일 후 제초제를 처리하였다. 실험은 3반복으로 수행하였고, 피 방제효과는 제초제 처리 2주일 후 달관(0-100)으로 조사하였다.

벼 품종별 안전성조사

국내에서 재배되는 벼 16 품종(대진, 대안, 서진, 오대, 동진, 낙동, 화성, 추청, 일품, 서안, 화명, 오봉, 다산, 안다, 향미II, 태백)의 종자를 육묘상자에서 생육시킨 후 2.5엽기의 모를 포트(표면적 150 cm²) 당 10본씩 이앙하고 3 cm 담수상태에서 이앙 2일 후 제초제를 1,000 g ai/ha와 4,000 g ai/ha로 처리하고 온실에서 재배하였다. 제초제에 대한 품종별 약해는 2주 후 초장과 분얼 수를 조사하여 무처리와 비교하였다.

Prottox 저해활성 조사

Prottox 저해활성은 보리를 이용하여 조사하였다. 먼저 암 조건에서 7일 동안 재배한 보리 잎을 수확하여 마쇄한 후 etioplast를 Percoll을 이용한 농도별 원심분리를 통하여 Sherman 등(1991) 등의 방법에 준하여 분리시켰다. 분리된 etioplast는 50 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES, pH 7.8), 330 mM sucrose, 1 mM MgCl₂, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2.5 mM dithiothreitol(DTT), and 0.1%(w/v) bovine serum albumin(BSA)로 구성된 완충용액을 사용하여 단백

질 함량을 4 mg/ml으로 희석 조정하였다. 단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 하는 Bradford 법(1976)으로 측정하였다. 제초제는 아세톤으로 용해시켜 사용하였고, 동일한 양의 아세톤이 첨가된 것을 무처리로 하였다. 제초제 처리 후 Prottox의 활성은 Sherman 등(1991)의 방법으로 Kontron Instruments SFM 25를 이용하여 excitation 395 nm와 emission 622 nm에서 측정하였다. 반응액의 조성은 100 mM HEPES(pH 7.5), 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1% Tween 20과 약 2 mM Protogen IX으로 하였다. Protogen IX은 Jacobs and Jacobs의 방법(1982)에 준하여 Proto IX을 sodium amalgam으로 환원시켜 사용하였다.

결과 및 고찰

살초 스펙트럼

신규 제초제 후보화합물 3-Chloro-2-[4-chloro-2-fluoro-5-(5-methyl-3-phenyl-4,5-dihydroisoxazol-5-ylmethoxy)-phenyl]-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indazole(EK-5439)은 처리량 16~63 g ai/ha에서 피, 물달개비, 발뚝외풀, 마디꽃, 알방동사니, 여뀌바늘 등 1년생 잡초에 대하여 우수한 제초활성을 가지고 있었다(표 1). 그러나 사마귀풀에 대해서는 125 g ai/ha이상에서 방제가 가능하였고, 올챙이고랭이에 대해서는 250 g ai/ha에서도 방제하지 못하였다. 동일한 약량에서 기존의 제초제 oxadiazon과 방제효과를 비교하면 EK-5439가 우수한 것으로 나타났으나 다양한 포장 조건에서 확인되어야 할 것으로 사료 된다. 임 등(2003)에 따르면 우리나라 논에서 발생하는 잡초 종은 경작 방식

Table 1. Herbicidal efficacy of EK-5439 and oxadiazon to annual weed species 1 day after seeding under paddy condition

Chemicals	Rate (g a.i./ha)	Annual weed species ^{a)}							
		ECHOR	SCPJU	MOOVA	LIDPY	ROTIN	ANEKE	CYPDI	LUDPR
EK-5439	16	90	25	100	100	100	40	30	90
	31	100	30	100	100	100	70	100	100
	63	100	30	100	100	100	80	100	100
	125	100	55	100	100	100	100	100	100
	250	100	55	100	100	100	100	100	100
Oxadiazon	31	73	50	100	100	100	30	100	80
	63	98	50	100	100	100	45	100	90
	125	100	55	100	100	100	100	100	98
	250	100	80	100	100	100	100	100	100
	500	100	100	100	100	100	100	100	100

^{a)}ECHOR:*Echinochloa oryzicola*, SCPJU:*Scirpus juncoides*, MOOVA:*Monochoria vaginalis*, LIDPY:*Lindernia pyxidaria*, ROTIN:*Rotara indica*, ANEKE:*Aneilema keisak*, CYPDI:*Cyperus difformis*, LUDPR:*Ludwigia prostrata*.

에 따라 다르지만 공통적으로 우점하는 초종은 물달개비, 피, 발톱외풀, 여뀌바늘, 사마귀풀, 한련초 등이라고 하였는데 EK-5439를 처리할 경우 대부분의 1년생 우점잡초를 방제할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 우리나라에서는 초기방제용 제초제로 oxadiazon을 사용하고 있는데, EK-5439의 피에 대한 방제효과가 강하고 기타 잡초에 대해서도 방제효과가 우수한 것으로 보아 oxadiazon을 대체할 수 있는 유망한 제초제로 판단된다.

Bicyclic pyrazole 구조를 가지는 여러 가지의 화합물 중에서 cyclic imide 그룹은 여러 가지 형태의 헤테로고리 화합물로 변화되어도 활성이 유지되므로 신규제초제 개발을 위하여 이 부분의 변환에 중점을 두는 경우가 가장 많은 편이다(Lyga 등 1991; Hirai 등, 2002). 현재까지 개발된 것들을 살펴보면, 고전적인 오각형 cyclic imide type으로부터 시작하여(S-23121, Pentoxazone, Flumioxazin 등), carbonyl기가 없는 오각형 혹은 육각형의 헤테로고리 화합물들(S-275 등)이 알려져 있으며, 심지어는 aniline의 아민기 대신 pyrazole 유도체의 3위치 탄소에 직접 연결된 화합물(ET-751 등)도 상용화되어 있다(Hirai 등, 2002). 이 제초제들은 PPO저해제 들이 갖고 있는 여러 가지의 특징들을 가지고 있는데, 그것들은 다음과 같다. 1) 살초작용을 위해서는 빛이 필요하다. 2) 약해의 증상이 매우 빨리 나타난다(약제 살포 후 수 시간 내에 살초 증상을 볼 수 있다). 3) 주로 post-emergence 타입이다(최근에는 pre-emergence 타입도 발견되고 있다). 4) 약제에 대한 식물의 저항성이 생기지 않는다. 5) 토양 미생물에 의한 분해가 빨라서 윤작에 문제가 없으며

환경오염의 문제도 거의 없다. 특히 이 제초제의 가장 큰 장점은 단위 ha당 약제의 사용량이 ALS 저해제인 sulfonylurea계 제초제와 더불어 가장 적다. 또한 sulfonylurea계 제초제의 약효발현이 보통 일주일 이상인데 비하여 이 제초제들은 불과 수 시간 내에 살초 효과를 눈으로 확인할 수 있는 장점도 있다.

이앙 벼의 묘령과 이앙심도에 따른 안전성

이앙재배에서는 벼와 잡초의 생육 차이에 따른 감수성 차이를 이용하여 제초제에 의한 선택적 잡초방제를 하고 있다. 따라서 제초제에 의한 약해발생은 벼의 묘령이 증가될수록 안전성이 높아진다. 육묘상자에서 재배한 2, 3, 4엽기의 모를 이앙하고 제초제를 처리한 결과(표 2) 2엽기 이상의 모에 대해서는 EK-5439를 2,000 g ai/ha로 처리하여도 약해를 발생하지 않았다. 피를 포함한 1년생 잡초를 방제하는 데 필요한 처리농도가 16~63 g ai/ha이었던 살초스펙트럼 조사결과를 감안하면 선택성의 폭이 30배 이상으로 벼에 대한 안전성은 매우 높은 것으로 나타났다. EK-5439 처리에서 무처리보다 생장이 증가된 것처럼 보이지만 이는 통계적으로 유의차를 인정할 수 없었다. 또한 동일 조건에서 비교할 경우 이앙벼에 대한 안전성은 EK-5439이 oxadiazon보다 우수한 것으로 나타났다.

벼에 대한 안전성은 이앙 벼의 묘령뿐만 아니라 이앙심도에 의해서도 변화될 수 있다(한 등, 1990a; b; 김, 1992). 따라서 2 엽기의 모를 1, 2, 3 cm의 깊이로 이앙하고 2일 후 제초제를 처리하여 4주 후 초장과 분얼 수를 조사하였다(표 3). EK-5439를 처리한 이앙 벼의 초장은 처리량이 증가하거나 이앙심도가 낮을수록 감소하는 경향이였다.

Table 2. Response of rice leaf stages according to EK-5439 and oxadiazon under rice transplanting

Chemical	Rate (g a.i./ha)	Plant height (% of control) ^{a)}		
		2 ^{b)}	3	4
EK-5439	125	105	102	102
	250	100	101	104
	500	106	102	100
	1,000	102	97	105
	2,000	97	97	102
Oxadiazon	125	99	98	104
	250	97	96	100
	500	100	95	96
	1,000	91	88	87
	2,000	72	82	70

^{a)}Plant height evaluated at 4 weeks after application.

^{b)}Leaf stages of rice seedlings.

Table 3. Growth of rice to EK-5439 and oxadiazon 2 days after transplanting

Chemical	Rate (g a.i./ha)	Plant height(% of control) ^{a)}			Tiller number(% of control)		
		1 ^{b)}	2	3	1 ^{a)}	2	3
EK-5439	125	100.3	102.3	101.6	89.6	101.7	112.8
	250	98.7	101.2	100.3	91.5	101.7	101.5
	500	93.4	98.4	101.7	87.2	99.1	101.7
	1,000	88.8	96.9	102.5	83.5	103.9	102.5
	2,000	89.0	97.3	97.7	91.5	101.8	100.7
Oxadiazon	125	93.9	95.2	99.3	85.4	96.1	99.2
	250	79.9	89.4	97.3	85.4	101.6	101.4
	500	62.5	88.8	99.7	81.1	98.7	100.5
	1,000	49.1	72.8	91.3	87.2	93.9	95.2
	2,000	31.6	57.4	74.4	54.9	75.8	85.0

^{a)}Plant height and tiller number evaluated 4 weeks after treatment.

^{b)}Transplanting depth(cm).

즉, 1 cm 이앙심도와 2,000 g ai/ha 처리 구에서의 초장 억제효과가 가장 크게 나타났지만 억제율은 10% 내외이었다. 분얼 수에 대한 영향도 초장 억제효과와 같이 처리량이 증가하면서 이앙심도가 낮을 때 억제율이 높게 나타났지만 10% 내외이었다. 한편, oxadiazon의 경우에는 EK-5439에 비하여 초장과 분얼 수의 감소 폭이 크게 나타났다. Oxadiazon을 과다하게 2,000 g ai/ha로 처리할 때 3 cm 이앙심도에서는 30%이내의 초장 억제율과 15% 정도의 분얼 수 감소를 보였지만, 1 cm 이앙심도에서는 70% 정도의 초장 억제율과 45% 정도의 분얼 수 감소를 나타내었다. 1,000 g ai/ha 처리에서도 초장 억제율이 50% 정도 이었고, 250 g ai/ha 처리에서도 20% 정도의 초장 억제율을 나타내었다.

기계이앙의 경우 농촌 일손이 부족하고 경비를 절약하기 위하여 어린모를 이앙하는 추세로 변화되고 있다. 이러한 영농방식에서는 어린모에 안전한 제초제의 개발 및 보급이 선행되어야 할 것이다(김, 1992). 또한 기계이앙 시 정지작업이 불균일할 경우 천식되거나 뜯 모가 많이 발생할 수 있는데, 이들에 대해서도 안전한 초기 제초제의 필요성은 부연 설명할 필요가 없을 것이다. 그 동안 기계이앙 벼에 대한 약해발생 요인으로는 품종, 묘령, 식부심, 수심, 누수량, 토성, 작부 시기는 물론 경험이나 기술, 장비에 의해서도 다르게 나타날 수 있다고 보고 되었다(한 등, 1990a; 한 등, 1990b). 현재 사용되고 있는 제초제들은 25-45일 동안 육묘한 중묘 또는 성묘를 대상으로 하여 안전성이 입증된 것들로서, 주로 이앙 묘와 잡초 간의 생육단계차이를 이용하여 선택 살초활성을 발현하는 것

들이 대부분이다. 그러나 어린모를 이앙하거나, 이앙 후 초기에 사용할 경우에는 벼에 대한 안전성 확보가 더욱 중요한 구비조건이다. 따라서 EK-5439는 기존에 사용되고 있는 초기처리 제초제보다 1년생 잡초에 대한 방제효과가 우수할 뿐만 아니라, 어린모에 대한 안전성도 높은 것으로 나타났기 때문에 이앙 벼에 대한 신규 초기처리 제초제로 개발하는데 큰 장점을 가지고 있다.

처리시기에 따른 피 방제효과 조사

제초제 처리 시 대상으로 하는 이앙 벼의 묘령에 따라 약해가 발생할 수 있으며, 또한 대상으로 하는 잡초 방제효과도 변동된다. 이앙 벼에 대해 안전하면서 잡초방제효과가 우수한 최적 처리시기를 파악한다는 것은 제초제 처리에 의한 잡초방제 효율을 증진시킬 수 있는 중요한 요인이 된다. 피를 파종하고 2.5엽기의 벼 육묘를 이앙한 후 3 cm 담수상태에서 0, 2, 5, 7일 후 제초제를 처리하여 생육 시기별 피 방제효과를 조사한 결과(그림 2) 5일 후 처리까지는 16 g ai/ha 처리에서도 97% 이상의 방제효과를 보였지만 7일 후 처리에서는 1,000 g ai/ha 처리에서도 90%의 방제효과를 보였다. 즉, 토양처리의 경우 EK-5439를 처리하여 피를 방제하기 위해서는 씨레질 후 5일 이내에 처리하여야 효과적인 잡초 방제효과를 기대할 수 있을 것이다. 제초제는 처리시기에 따라 초기, 중기, 후기제초제로 구분하게 되는데, EK-5439의 처리 적기는 씨레질 동시 처리 또는 이앙 후 초기처리 제초제로서의 특징을 가지고 있었다. 따라서 트랙터 또는 이앙기에 제초제 처리 장치를 부착하여 제초제 처리작업을 동시에 수행하게

Table 4. Response of several rice cultivars to EK-5439 and oxadiazon

Rice cultivar	Plant height(% of control)				Tiller number(% of control)			
	EK-5439 (g a.i./ha)		Oxadiazon (g a.i./ha)		EK-5439 (g a.i./ha)		Oxadiazon (g a.i./ha)	
	4,000	1,000	4,000	1,000	4,000	1,000	4,000	1,000
Daejin	93	89	51	62	42	65	32	39
Daean	83	84	54	72	80	86	43	74
Seojin	93	91	66	77	55	82	45	76
Odae	81	86	53	79	67	83	33	57
Dongjin	85	83	64	84	97	97	48	90
Nakdong	83	87	64	81	91	91	52	67
Hwasong	88	85	67	85	65	90	32	65
Choochong	79	83	61	80	63	78	31	69
Ilpoom	89	93	61	85	67	77	30	61
Seoan	84	90	67	84	71	58	32	58
Hwamyung	83	82	73	81	74	82	44	74
Obong	82	86	71	84	79	79	43	64
Dasan	80	87	63	77	90	83	43	77
Anda	79	86	62	83	67	77	57	73
Hyangmi II	84	87	80	93	74	82	50	82
Taebaek	93	93	91	94	57	77	43	50
Average	84.9	87.0	65.5	81.3	71.2	80.4	41.1	67.3
SD	4.9	3.4	10.0	7.5	14.2	9.4	8.5	12.6
(LSD)	(bc)	(ab)	(d)	(c)	(b)	(a)	(c)	(b)

된다면 농업인구의 감소와 노령화를 극복하기 위한 기계화나 생력화 방안으로 바람직 할 것으로 생각되었다.

벼 품종별 안전성

제초제를 처리할 경우 여러 가지 요인에 의해서 약해가 발생할 수 있는데, 이들 중에는 품종에 따른 약해발생요인을 지적할 수 있다. 즉, 동일한 조건과 약량에서도 품종에 따라 약해 정도가 다르게 나타날 수 있다. 따라서 국내에서 재배하는 16가지 품종에 대한 EK-5439의 안전성을 약해발생 범위의 처리농도에서 조사하였다(표 4).

EK-5439를 4,000 g ai/ha로 처리하였을 경우와 1,000 g ai/ha로 처리하였을 경우 모두 16개 벼 품종의 초장 억제율은 10% 내외 이었고 가장 감수성이 큰 품종은 추청벼와 안다벼로 4,000 g ai/ha 처리시 각각 21%, 22%로 나타났지만 1,000 g ai/ha에서는 10% 내외 이었다. 그러나 분얼수에 미치는 영향은 비교적 크게 나타나 4,000 g ai/ha로 처리할 경우 대진벼, 서진벼, 오대벼, 화성벼, 추청벼, 일품벼, 안다벼, 태백벼에 대해서는 30~50%의 분얼수 감소를 초래하였다. 1,000 g ai/ha 처리에서도 대진벼과 서안벼에 대해서는 30~40%의 분얼수 감소를 보였고, 추청벼, 일품벼, 안다벼, 태백벼 등에 대해서도 20% 내외의 분얼

수 감소를 초래하였다. 이러한 분얼수 감소는 최종 수확에 영향을 미칠 것으로 판단되지만 EK-5439는 100 g ai/ha 내외의 처리에서도 1년생 잡초를 방제하기 때문에 과다하게 4,000 g ai/ha를 처리하였고, 수확량에 직접적으로 영향을 미치는 유효 분얼수를 고려할 때 EK-5439는 국내에서 재배하고 있는 16개 품종에 대해서 안전성은 보장된다고 할 수 있다.

Oxadiazon 역시 과다한 4,000 g ai/ha로 처리하는 동일 조건에서 비교할 경우 태백벼과 향미벼 II를 제외한 모든 품종의 초장 감소율은 40~50% 이었고, 분얼수 감소율은 모든 품종에 대하여 50~70%로 나타났다. 1,000 g ai/ha를 처리하였을 때에도 대진벼과 대안벼에 대해서는 30% 내외의 초장 감소율을 초래하였고, 동진벼와 향미벼 II를 제외한 모든 품종의 분얼수 감소율이 20~60%로 나타났다. 따라서 16개 품종에 대한 안전성은 실제로 사용되고 있는 제초제 oxadiazon보다 EK-5439가 높다고 할 수 있다.

Protoporphyrinogen Oxidase(PPO) 저해활성

EK-5439는 구조상으로 볼 때 bicyclic pyrazole 유도체로 PPO를 저해하는 cyclic imide계 화합물이며 살초 증상에 서로 동질성을 가지고 있기 때문에 작용점이 PPO에 있을

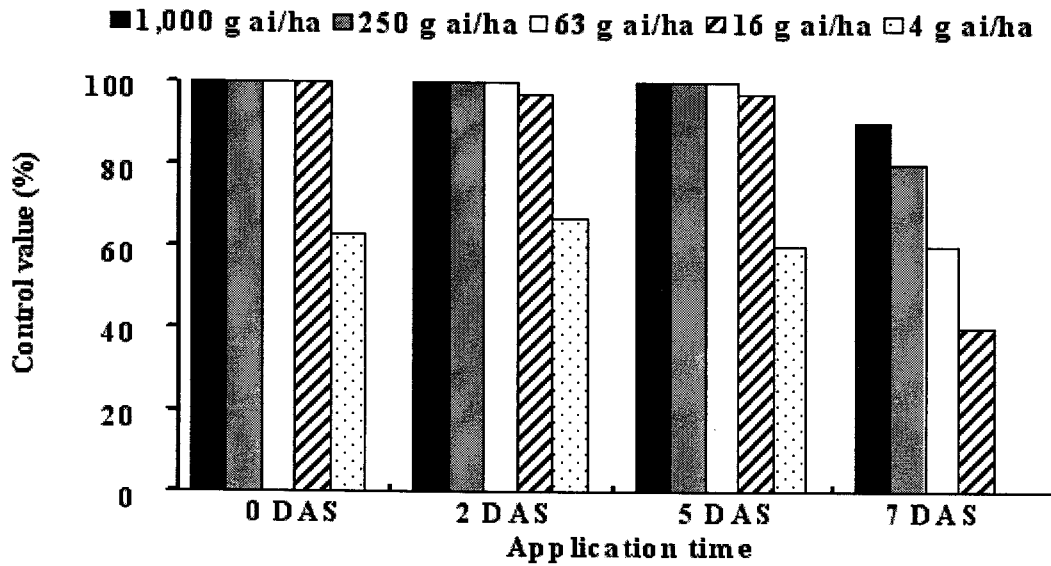


Fig. 2. Effects of application time on the control value of EK-5439 to barnyardgrass. DAS : days after seeding of barnyardgrass. Control value was evaluated at 41 days after application by visual injury (0~100)

것으로 예측할 수 있다. 따라서 대표적인 PPO 저해 제초제인 oxadiargyl를 표준물질로 하여 보리로부터 추출한 PPO에 대한 저해활성을 조사하였다(그림 3).

그림에 나타난 것처럼 EK-5439의 PPO 저해활성은 oxadiargyl의 PPO 저해활성과 농도 의존적으로 일치하였다. PPO를 저해하는 제초제는 주로 diphenyl ether

(DPE)계와 cyclic imide (CYI)계 화합물로서 약 30년 전부터 상품화되어 사용되어 왔으나, 그것들의 제초작용의 생화학적 발현경로는 1989년에 이르러서야 밝혀졌다(Hirai 등, 2002). 이 제초제들의 특징은 살초작용에 빛이 필요하며 bleaching 현상이 나타난다고 알려져 왔다(Duke 등, 1991; Hirai, 1999; Hirai 등, 2002). 이

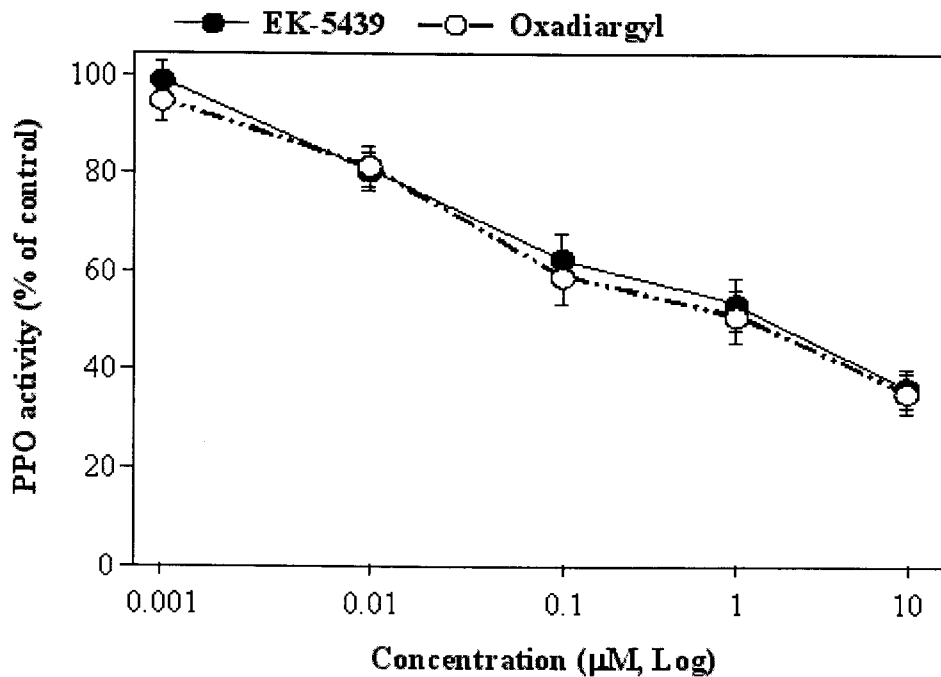


Fig. 3. The inhibition of EK-5439 and oxadiargyl to protoporphyrinogen oxidase(PPO) activity extracted from barley. Error bars are standard error of the mean.

러한 현상과 더불어 살초작용 발현 기구에 대해서도 카로티노이드 생합성 저해, 광합성 및 호흡전자전달계의 저해, 클로로필 합성 저해, membrane의 광산화 파괴 등의 여러 가지 작용기구가 제안되어 왔다. 그러나 최근의 연구 결과에 따르면 대부분의 DPE계와 CYI계 제초제들은 클로로필생합성 과정에 관여하는 PPO를 저해하여 plasma membrane을 파괴하는 것으로 알려져 PPO저해제로 분류되게 되었다(1991; Hirai, 1999; Hirai 등, 2002). 살초작용 메카니즘은 식물체 내에서 glutamate로부터 엽록소 생합성 경로 중의 protoporphyrinogen IX에서 다음 단계인 protoporphyrin IX(Proto-IX)으로 진행되는 것을 저해하는 것으로 알려져 있다. 즉, PPO 저해제는 바로 이 효소를 저해하여 비정상적인 경로로 빛에 민감한 tetrapyrrole류인 Proto-IX가 과량 축적되고, 이것은 빛과 산소의 존재 하에서 활성산소(singlet oxygen)를 발생하여 membrane lipid를 파괴하여 식물을 죽게 한다. 이러한 작용기작 때문에 PPO 저해제는 엽록소생합성 저해 및 파괴로 인한 bleaching 현상이 나타나며, 살초활성을 위해서는 빛이 필요하다는 사실이 밝혀졌다(Duke 등, 1991; Hirai, 1999; Hirai 등, 2002). 결과적으로 EK-5439에 의한 살초작용은 발아 후 유아부가 제초제 처리 층을 통과하면서 접촉되어 PPO 저해에 의한 chlorophyll 생합성이 억제되어 고사되는 것으로 설명할 수 있다. 그러나 이양 벼의 경우에는 엽초 부위가 처리층에 노출되지만 생장점이 보호되어 있고, 엽초 부위는 잎보다 chlorophyll 생합성이 왕성하게 이루어지지 않기 때문에 생장에 미치는 영향이 적을 수 있다. 이러한 원인에 의해서 이양 벼와 피 간의 선택성이 발현되는 것으로 유추할 수 있다.

인용문헌

- Abell L. M. (1996) Biochemical approaches to herbicide discovery: advances in enzyme target identification and inhibitor design. *Weed Sci.* 44:734~742.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248~53.
- 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: 465~70.
- Hay, James V. (1999) Herbicide discovery in the 21st century - a look into the crystal ball. *Special Publication - Royal Society of Chemistry, 233(Pesticide Chemistry and Bioscience):55~65.*
- Hirai K. (1999) Structural evolution and synthesis of diphenyl ethers, cyclic imides and related compounds. pp.15~71, *In Peroxidising herbicides* (ed. Böger, P. and Wakanayashi, K.), Springer, Berlin.
- Hirai K., A. Uchida and R. Ohno (2002) Major synthetic routes for modern herbicide classes and agrochemical characteristics. pp. 255~278, *In Herbicide classes in development* (ed. Böger, P. and Wakanayashi, K.), Springer, Berlin.
- Jacobs N.J. and J. M. Jacobs (1982) Assay for enzymatic protoporphyrinogen oxidation, a late step in heme biosynthesis. *Enzyme* 28:206~211.
- Jeon D.J., Y. M. Kim, J. Y. Park, H. R. Kim, J. H. Song, J-S Kim, and E. K. Ryu (2001) Synthesis and Herbicidal Properties of 2-(5-Isoxazolinemethoxyphenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-Indazole and Their Related Derivatives, *The Korean J. Pestic. Sci.* 5(3):54~57.
- Jeon, D.J., J. N. Lee, H. R. Kim, J. H. Song, I. T. Hwang and E. K. Ryu (1999) Synthesis of new pyrazoles and their herbicidal effects. *Korean J. Pestic. Sci.* 3(1): 96~101.
- Kearney P.C. and D.D. Kaufman. (1988) *Herbicides. Chemistry, degradation, and mode of action.* 403p. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kudsk, P., J. C. Streibig (2003) Herbicides - a two-edged sword. *Weed Research*, 43(2):90~102.
- Lyga J.W., R. M. Patera, G. Theodoridis, B. P. Halling, F. W. Hotzman, and M. J. Plummer (1991) Synthesis and quantitative structure-activity relationships of herbicidal N-(2-fluoro-5-methoxyphenyl)-3,4,5,6-tetrahydrophthalimides, *J. Agric Food Chem.* 39:1667~1673.
- Nagano E., I. Takemoto, M. Fukushima, R. Yoshida, and H. Matsumoto (1983) Herbicidal 2-substituted phenyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indazoles, GB 2127410A.
- Ryu E. K., D. J. Jeon, J. H. Song, H. R. Kim, J. N. Lee, K. M. Kim, K. Y. Cho (2001) Herbicidal 2-(5-Isoxazolinemethoxyphenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-Indazole and Their Related Derivatives. *Korean Pat.* 0289470.
- Sherman T.D., J. M. Becerril, H. Matsumoto, M. V. Duke, J.

- M. Jacobs, N. J. Jacobs, and S. O. Duke (1991) Physiological basis for differential sensitivities of plant species to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Plant Physiol.* 97:280~290.
- Troyer, James R. (2001) In the beginning: the multiple discoveries of the first hormone herbicides. *Weed Science*, 49(2):290~297.
- Yogo, Yasuhiro. (2000) Challenge to discovery of novel action site of herbicides. *Nippon Noyaku Gakkaishi*, 25(3):276~280.
- 권용웅, 조광연, 소창호, 이강휘, 조용섭 (1986) 제초제 연구동향과 신규 제초제 개발전망. *한국잡초학회지* 6(1):138~148.
- 김길웅 (1992) 제초제 약해발생 양상과 경감대책. *한국잡초학회지* 12(3):261~270.
- 임일빈, 강종국, 김선, 나승용, 경은선 (2003) 벼 재배 유형별 잡초발생 빈도. *한국잡초학회지* 23(2):112~122.
- 한성욱, 구자욱, 천상욱 (1990a) 재배조건의 차이가 수도 어린모의 제초제 약해발생에 미치는 영향. I. 유망제초제 선발. *한국잡초학회지* 10(4):255~260.
- 한성욱, 구자욱, 천상욱 (1990b) 재배조건의 차이가 수도 어린모의 제초제 약해발생에 미치는 영향. II. 배유유무, 이앙심도, 처리시기에 따른 약해반응. *한국잡초학회지* 10(4):261~268.
- 황인택, 이동희, 최정섭, 김태준, 김범태, 박유신, 조광연 (2001) 식물치사관련 유전자를 이용하는 신규 제초제 작용점 탐색 및 조절물질 개발. *한국농약과학회지*, 5(3):1~11.
- 황인택, 이동희 (2003) 식물생존 필수효소 유전자활용 신규 제초제 작용점 탐색. *한국잡초학회지* 23(3):179~189.
- 황인택, 최정섭, 박상희, 이관휘, 이병희, 홍경식, 조광연 (2001) 식물특정효소저해제의 생물활성 조사에 의한 신규 제초제 작용점 탐색. *한국농약과학회지* 5(1):36~45.
- 황인택, 최정섭, 홍경식, 유주현, 김진석, 조광연 (1998) Benzenesulfonylurea계 화합물 KSC-13906의 약해 발생요인 및 경감방법. *한국잡초학회지* 18(3):225~236.

Inhibition of protoporphyrinogen oxidase activity and selectivity of new compound EK-5439

K. S. Hong, I. T. Hwang*, H. R. Kim, D. J. Jeon, B. H. Lee, J. H. Song, and K. Y. Cho (Korea Research Institute of Chemical Technology, Yusong, Taejon 305-606, Korea)

Abstract : 3-Chloro-2-[4-chloro-2-fluoro-5-(5-methyl-3-phenyl-4,5-dihydroisoxazol-5-ylmethoxy)-phenyl]-4,5,6,7-tetrahydro-2H-indazole(EK-5439) demonstrated rice selectivity and herbicidal activity on annual weeds, such as *Echinochloa oryzicola*, *Monochoria vaginalis*, *Lindernia pyxidaria*, *Rotala indica*, *Aneilema keisak*, *Cyperus difformis*, and *Ludwigia prostrata* at doses of 16-63 g a.i./ha. However, the application window was limited from pre-emergence to 5 days after transplanting. The control efficacy of EK-5439 on barnyardgrass was 4 times higher than that of oxadiazon. EK-5439 was excellently safe to the 16 different transplanted rice cultivars treated 2 days after transplanting. These compounds have the mechanism of action on the chlorophyll biosynthesis like protoporphyrinogen IX oxidase inhibitors.

*Corresponding author(Fax : +82-42-860-7447, E-mail : ithwang@kriict.re.kr)