

RESEARCH ARTICLE

# Loreclezole의 여러 가지 미세조류 및 식물종들에 대한 생육억제활성

김진석<sup>1\*</sup> · 김보관<sup>1</sup> · 황윤경<sup>1</sup> · 최지혜<sup>1</sup> · 이병석<sup>2</sup> · 이일영<sup>1</sup>

<sup>1</sup>한국화학연구원 의약바이오연구본부 친환경신물질연구센터, <sup>2</sup>안전성평가연구소 생활안전독성연구부

## Growth Inhibition Effects of Loreclezole on the Various Microalgae and Plant Species

Jin-Seog Kim<sup>1\*</sup>, Bo Gwan Kim<sup>1</sup>, Yun Gyeong Hwang<sup>1</sup>, Ji Hye Choi<sup>1</sup>, Byoung-Seok Lee<sup>2</sup>, and Ill Young Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Center for Eco-Friendly New Materials, Bio & Drug Discovery Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 34114, Korea

<sup>2</sup>Department of Advanced Toxicology Research, Korea Institute of Toxicology, Daejeon 34114, Korea

### Abstract

This study was conducted to investigate the biological activities of loreclezole on the various microalgae and plant species. Loreclezole roughly showed a broad algicidal spectrum with a active rate of 2.0-35  $\mu\text{M}$ . Among the tested green algae, there was sensitive response in the order of *Scenedesmus* spp. > *Raphidocelis subcapitata* > *Chlorella sorokiniana* > *C. vulgaris* (KCTC) > *C. vulgaris* (FBCC). In the tested cyanobacteria (blue-green algae), *Microcystis aeruginosa* exhibited higher response to loreclezole than that of *Dolichospermum circinale*. In the case of Lemnaceae (duckweeds), *Lemna paucicostata* showed higher herbicidal activity ( $\text{IC}_{50}$ =10.5  $\mu\text{M}$ ) to loreclezole than that of *Spirodella polyrhiza* (SPIPO). Loreclezole seemed to have a novel action mechanism different with the those of commercial herbicides when it was gathered through symptoms of SPIPO treated with loreclezole. In the mixture experiment to evaluate a chemical interaction in SPIPO control, loreclezole showed a mild synergistic effect with bentazon, photosynthesis inhibitor. In herbicidal activities against the various weeds at a foliar application, loreclezole primarily induced burning symptoms (leaf desiccation, discoloration and necrosis), had about 50% control at the rate of 1.0 kg ha<sup>-1</sup> and a short efficacy duration within about 5 days. Taken together, our results suggested that loreclezole had a potential as an algicide in water ecological system, but an optimization of chemical structure was likely to be required for the use of herbicide.

**Keywords:** Algicide, Growth inhibition, Lemnaceae (duckweed), Loreclezole, Synergistic interaction



### OPEN ACCESS

**\*Corresponding Author:**

Tel) +82-42-860-7026  
Fax) +82-42-861-4913  
E-mail) jskim@kRICT.re.kr

**Received:** July 21, 2021

**Revised:** September 14, 2021

**Accepted:** September 23, 2021

© 2021 The Korean Society of Weed Science and The Turfgrass Society of Korea



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서 언

인간의 산업활동과정 중에서 생물의 화학조절은 필수적으로 요구되는 기술분야이며 인구증가와 산업발달에 따라 보다 안전한 먹거리 생산, 쾌적한 삶의 공간 확보, 자연환경보전 등에 대한 관심이 높아짐에 따라 고도의 생물조절 정밀 기술을 필요로 할 뿐만아니라 관련 기술개발 지표도 매우 엄격해지고 있다. 따라서 제초제의 경우도 인축독성, 비표적 생물에 대한 안전성, 환경내 잔류기간 문제, 저항성 발현문제 등을 극복하고자 새로운 작용기작 또는 신규구조의 화합물 개발이 지속적으로 수행되어야 한다(Kim et al., 2020). 한편 산업활동 유형의 새로운 변화에 따라 이에 적합한 화합물 개발도 새롭게 요구되고 있다. 예를 들면, 식물공장 및 지능형 스마트팜을 통한 안전한 먹거리의 년중생산이 확대되고 있고, 도시에서의 녹지확보 뿐만아니라 가정 및 사무공간에서의 식물재배(도시농업)가 보다 활성화 되고 있다. 그런데 이와 같은 장소에서는 영양분이 집중적으로 사용되고 있는 상황이기 때문에 햇빛 하에서 미세조류 또는 이끼가 의도치 않게 발생하여 여러 가지 문제를 일으킬 수 있다. 따라서 기존에 사용되고있는 화학물질들에 비해 보다 안전하면서 효율적인 제어관리가 가능한 새로운 대체제가 요구되고 있는 상황이다.

신물질 개발에 있어서 1,2,4-triazole 구조를 기본골격으로 가진 화합물들은 항경련(anticonvulsant), 항균(antimicrobial), 진통효과(analgesic), 항산화(antioxidant), 항염증(anti-inflammatory), 살충활성(insecticidal), 제초활성(herbicidal), 살균활성(fungicidal) 등 여러 가지 다양한 생물활성을 나타내고 있어 많은 연구가 진행중이다(Aouad et al., 2015). 그 중의 한 화합물인 loreclezole은 GBAB<sub>A</sub> ( $\gamma$ -aminobutyric acid) 수용체와 결합하여 수용체 단백질의 Cl<sup>-</sup> 흐름을 조절하는 allosteric modulator 역할을 해서 진정제 및 항경련제 효과를 나타내는 물질로(Fernandez et al., 2012; Green et al., 1996; Wingrove et al., 1994) 임상 2단계까지 연구가 진행된 사례가 있고(Lee et al., 2019), 최근 loreclezole 및 이의 유도체는 곤충 유충호르몬의 agonist 또는 antagonist로 작용하여 곤충성장조절제(insect growth regulator)로서의 약리기전을 가지는 살충제 조성물 특히 흰줄 숲모기(*Aedes albopictus*) 방제에 효과적인 물질로도 보고되었다(Ko et al., 2018; Lee et al., 2020). 그러나 미세조류를 포함한 식물들에 대한 효능에 대해서는 구체적 연구사례가 보고되어 있지 않았었는데, 본 저자들의 예비실험에서 loreclezole 처리가 상당한 살조활성을 보였기에 이의 살조제로서의 활용 가능성 검토가 필요하다고 여겨졌다.

따라서 본 연구에서는 loreclezole을 대상으로 식물생육 저해활성의 종(species)간 스펙트럼과 제초특징을 알아보고, 필요에 따라 이의 개선 방향을 탐색해 보고자 생물활성과 관련한 몇가지 기초연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 시험생물

공시된 생물종은 총 19종으로서 고등식물 10종, 하등식물 2종, 녹조류 5종, 남조류 2종이었다(Table 1). 고등식물의 경우 자체 수집하여 휴면타파된 종자를 사용하였으며, 개구리밥과 좁개구리밥은 일정 조건의 생육실(온도 25°C, 광주기 14시간, 광도 20-40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  조건)에서 1x mDM 배지에(Kim and Kim, 2020) 계대배양중인 것을, 미세조류는 동일 생육실에서 BG11 배지(pH 7.1)를 사용하여 계대배양중인 것을 사용하였다.

### 공시화합물

두종류의 화합물을 시험에 사용하였으며 loreclezole (1-[(Z)-2-Chloro-2-(2,4-dichlorophenyl)ethenyl]-1,2,4-triazole)은 자체 합성한 화합물(순도 99%)을, bentazon은 Sigma-Aldrich사(Saint Louis, USA)에서 구입한 원제(analytical standard)를 공시하였다.

**Table 1.** Test plants used in this study.

Groups	Abbreviation	Scientific names (한글명)	Sources <sup>z</sup>
Green algae	Cv	<i>Chlorella vulgaris</i>	FBCC
	Cv	<i>Chlorella vulgaris</i>	KCTC
	Cs	<i>Chlorella sorokiniana</i>	KCTC
	Rs	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	KTR
	Sc	<i>Scenedesmus</i> spp.	KCTC
Blue-green algae	Dc	<i>Dolichospermum circinale</i> = <i>Anabaena circinalis</i>	FBCC
	Ma	<i>Microcystis aeruginosa</i>	FBCC
Lower plants	LEMPA	<i>Lemna paucicostata</i> (좁개구리밥)	KRICT
	SPIPO	<i>Spirodella polyrhiza</i> (개구리밥)	KRICT
Higher plants	ABUTH	<i>Abutilon theophrasti</i> (어저귀)	KRICT
	AESIN	<i>Aeschynomene indica</i> (자귀풀)	KRICT
	ALOMY	<i>Alopecurus myosuroides</i> (블랙그래스)	KRICT
	CALJA	<i>Calystegia japonica</i> (메꽃)	KRICT
	DIGCI	<i>Digitaria ciliaris</i> (바랭이)	KRICT
	ECHCG	<i>Echinochloa crus-galli</i> (돌피)	KRICT
	PANDI	<i>Panicum dichotomiflorum</i> (미국개기장)	KRICT
	SOLNI	<i>Solanum nigrum</i> (까마중)	KRICT
	SORBI	<i>Sorghum bicolor</i> (수수)	KRICT
XANSI	<i>Xanthium strumarium</i> (도꼬마리)	KRICT	

<sup>z</sup> FBCC: Freshwater Bioresources Culture Collection (담수생물자원은행); KCTC: Korean Collection for Type Cultures (생물자원센터); KTR: Korea Testing & Research Institute (한국융합화학시험연구원); KRICT: Korea Research Institute of Chemical Technology (한국화학연구원).

### 살조활성(algicidal activity) 평가

기본적으로 살조활성 평가는 유리관병(직경 3.5 cm, 높이 7.0 cm, 부피 60 mL)에 20-25 mL의 배양액을 가지고 3반복으로 실시하였으며 시험기간 동안 시험용액을 교체해주지 않는 지수식(static)으로 실험하였다. 사전 준비한 BG11 멸균배지(pH 7.0-8.0)에 계대배양중인 미세조류를 접종하여 종마다 다르지만 대략 배지 1 mL당 2.5-10만 cell 범위의 미세조류를 포함하는 배양액을 준비한 후 이를 유리관병에 20-25 mL씩 분주하였다. DMSO (dimethyl sulfoxide; 0.5% Tween 20 함유)를 이용하여 사전에 용해해 둔 여러 농도의 loreclezole 화합물 stock을 20 mL 배양액에 40 µL씩 분주하였으며 모든 작업은 무균실에서 실시하였다. 이때 DMSO와 Tween 20의 최종농도는 각각 0.1%, 5 ppm이었다. 약제처리된 관병을 tray에 담아 생육실 형광등 조건에 두어(25°C 항온, 14 hr 명조, 45-55 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) 5-10일 동안 배양하였고, 매일 3회 이상 손으로 흔들어 주었다. 배양이 종료되었을 때, 먼저 생육저해정도를 0-100% 등급표를 이용하여 달관조사한 다음(0: 무방제, 100: 100% 방제), 그 후 UV/VIS spectrophotometer (DU800, Beckman Coulter, Brea, USA)를 이용하여 *in vivo* chlorophyll 흡광도(A680-A780 nm)를 조사하였다. 각 화합물의 미세조류에 대한 생육저해 활성은 무처리구에 대한 억제정도(inhibition %)로 환산하여 나타내었으며, 처리 화합물의 50% 생육억제활성농도(IC<sub>50</sub>) 또는 90% 생육억제활성 농도(IC<sub>90</sub>)는 통계프로그램인 PRISM (GraphPad Software, GraphPad, San Diego, USA)을 사용하여 구하였다.

## 좁개구리밥과 개구리밥에 대한 제초활성 평가

기본 배양액(1x mDM)에 여러 농도의 시험용액을 조제한 다음, 90 mL 투명 플라스틱 소주컵에 20 mL (SPIPO) 또는 30 mL (LEMPA) 씩 분주하였다. 그 후 식물생육실에서 계대배양중인 3.9-4.1 엽상체(frond) 생육단계의 좁개구리밥 (LEMPA) 5개체를, 또는 2.2-2.4 엽상체(frond) 생육단계의 개구리밥(SPIPO) 2개체를 골라 각각의 시험용액에 접종하였다. 접종된 용기를 직사각형 반투명 플라스틱 박스에 담고 바닥에 일정량 수분을 공급한 다음 증발을 억제하기 위해 투명필름으로 위를 덮은 후, 생육실(25°C 항온, 14 hr 명조건, 형광등 45-55  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )에 옮겨 5-6일간 배양하였다. 화합물의 활성을 평가하기 위해서는 먼저 배양 종료후의 생육상태와 제반 증상을 달관조사하였다. 그 후 엽상체 개수를 조사한 후 성장한 개체 모두를 수집하여 수분 흡착이 용이한 soft paper에 놓고 물기를 완전 제거한 후 생체중을 측정하였다. 생체중 측정이 완료된 시료는 10 mL methanol이 담긴 falcon tube에 침지시켜 1일 동안 실온 암조건에서 색소를 추출한 후 UV/VIS spectrophotometer (DU800, Beckman Coulter, Brea, USA)를 이용하여 470, 652.4, 665.2 nm에서의 흡광도 값을 측정한 후, Lichtenthaler (1987) 방법에 의해 광합성색소를 정량하였다. 색소가 추출된 잔여시료(residues)는 별도로 수집하여 90°C에 1일 이상 건조시킨 다음 이의 건물중을 조사하였다. 공시 화합물의 생육억제활성은 기본적으로 무처리구에 대한 상대 비율(%)로 나타내었으며 처리 화합물의 50% 생육억제활성농도(IC<sub>50</sub>) 또는 90% 생육억제활성 농도(IC<sub>90</sub>)는 통계프로그램인 PRISM (GraphPad Software, GraphPad, San Diego, USA)을 사용하여 구하였다.

## Loreclezole과 bentazon의 개구리밥에 대한 제초활성 상호작용성 평가

Loreclezole과 bentazon의 활성농도를 사전에 조사한 후, 이들의 범주 내에서 여러 농도조합의 혼합물을 조제한 다음, 개구리밥(SPIPO)을 접종하여 위에 기술한 개구리밥 제초활성 평가방법과 동일한 조건에서 5-6일간 배양하면서 광합성 전자전달 저해활성과 생육저해 효과를 조사하였다. 광합성 전자전달 흐름은 처리후 2일, 6일째에 FluoPen (FP110/D, Photon Systems Instrument, Drásov, Czech Republic)을 이용하여 엽록소 형광분석을 통해 quantum yield (Qy) 값을 통해 조사하였다. 두 화합물간의 제초활성의 상호작용성은 콜비 방법(Colby, 1967)으로 아래 수식에 따라 평가하였다. 만일 혼합 처리에 의해 나타난 실제의 방제가(실측치, observed value)가 기대치(expected value) 보다 클 경우는 상승작용, 같을 경우는 상가작용, 작을 경우는 길항작용이 있는 것으로 나타내었다.

$$E=(X+Y)-XY/100 \quad (1)$$

여기서 E는 기대치, X는 화합물 A의 p 농도에서의 억제%, Y는 화합물 B의 q 농도에서의 억제%를 나타낸다

## 여러 가지 잡초종에 대한 경엽처리 제초활성 조사

공시 잡초종자(광엽 5종, 화본과 5종)를 혼합배양상토가 담긴 350 cm<sup>2</sup>의 사각포트에 파종하고 15일간 온실에서 키운 다음, 한국화학연구원에서 수행하는 제초활성검정 온실시험방법(Choi et al., 2017; Kim et al., 2005)에 따라 약제를 조제하고 경엽처리한 후 4일째에 제초활성정도를 평가하였다.

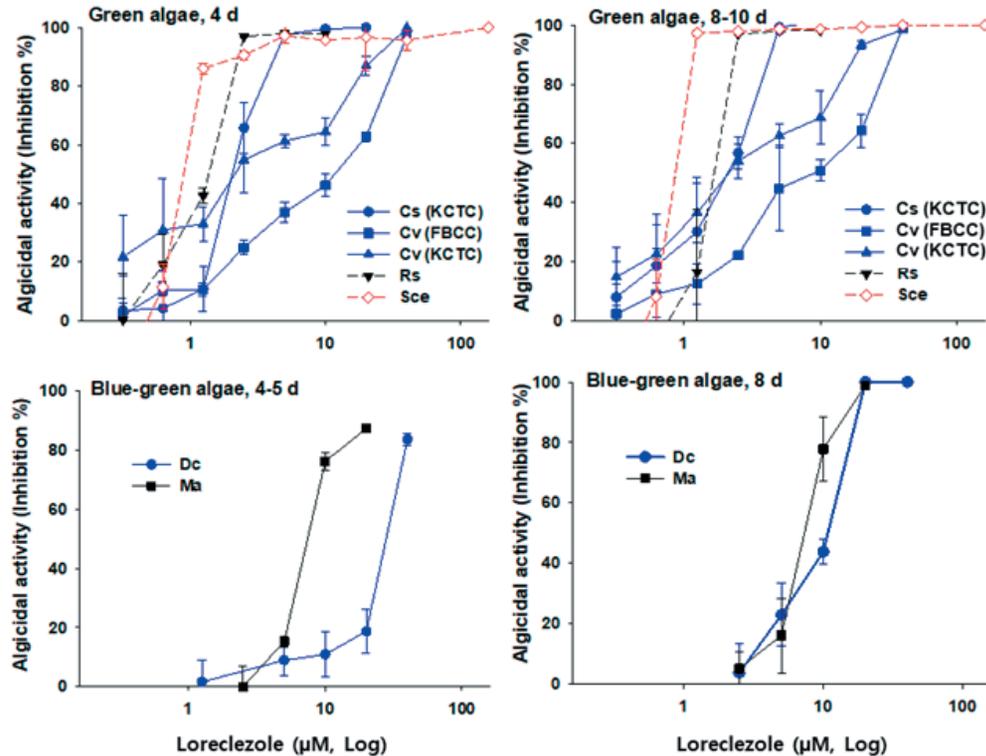
## 결과 및 고찰

### Loreclezole의 여러가지 미세조류에 대한 살조활성 효과

녹조류에 대한 loreclezole 활성의 경우, *Scenedesmus* spp. (Sce)>*Raphidocelis subcapitata* (Rs)>*Chlorella sorokiniana* (Cs)>*C. vulgaris* (KCTC) [Cv (KCTC)]>*C. vulgaris* (FBCC) [Cv (FBCC)] 순으로 보다 높은 살조활성을 나타내어 Sce는 2  $\mu\text{M}$  이하에서 거의 100% 방제된 반면, Cv (FBCC)는 35  $\mu\text{M}$  수준에서 90% 방제되는 특징을 나타내어 미세조류 종간에 15배 정도의 선택성 차이를 보였다(Fig. 1). 남조류의 경우, *Microcystis aeruginosa* (Ma)가 *Dolichospermum circinale* (Dc)보다

loreclezole에 대한 반응이 민감하여 처리후 4일째의  $IC_{50}$ 이 각각 7.6, 27.6  $\mu\text{M}$ 였다. 그러나 처리후 8-10일째에는 두 종간의 반응차이가 경감되는 경향이였다(Fig. 1).

전반적으로 약제처리 직후에는 활성발현이 잘 관찰되지 않았지만 4일째에는 살조활성이 대부분 발현되었고 8-10일째에는 억제활성이 유지되거나 오히려 약간씩 증가된 활성을 나타내었다(Fig. 1; Table 2). 특히 Sce, Ma, Dc (구 *Anabaena*)의 경우에는 약제처리후 4일째보다 8-10일째 활성이 보다 뚜렷이 높게 나타났다(Table 2). 따라서 loreclezole은 라디칼(radical)을 발생시켜 세포를 즉시 사멸시키는 유형의 속효성 화합물은 아닌 것 같으며, 화합물에 대한 반응에 있어서 종간 차이를 보이기는 하나 전체적으로 광범위 살조활성을 나타내는 그룹에 속하는 것으로 여겨졌다.

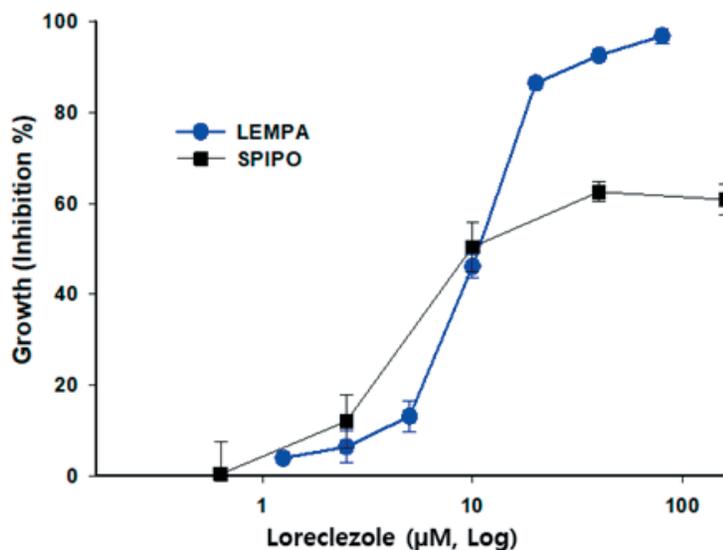


**Fig. 1.** Algicidal activities of loreclezole on the various microalgae according to the increase of incubation time after chemical treatment. Abbreviation of microalgae species used in this experiment was designated in Table 1.

살조활성을 나타내는 화합물로서는 무기광물(Cu, Ag 등), 유기합성 화합물, 천연물 기원의 화합물 등 여러 가지 성분들이 보고되고 있지만 나름대로 장·단점이 있어서 보다 효능이 우수하면서 인축 및 생태환경에 상대적으로 안전한 화합물의 꾸준한 개발이 요구되고 있다. 국내의 경우, 2020 작물보호제 사용지침서에 수록된 농업용 유기합성화합물 살조제(논조류[이끼])는 총 15가지 품목이 있으며, 이들 중 전문 방제용 단제로서는 quinclamine과 dimethametryn 만이 고시되어 있다. 한편 하천, 호소, 연안지역 등의 환경분야 미세조류에 사용하기 위한 살조제로서 최근 GreenTD (Cho et al., 2021; Lee et al., 2018), naphthoquinone 유도체(Joo et al., 2016; 2017a; 2017b; 2020), 왕겨초액 혼합물(Kim and Kim, 2018)의 사용 가능성 사례가 보고되고 있는 상황이지만 모두 loreclezole과는 다른 화학구조를 가지는 화합물들이다.

## 좀개구리밥과 개구리밥에 대한 제초활성 평가

개구리밥과 식물의 경우, loreclezole 처리에 대해 LEMPA가 SPIPO보다 민감하여 처리후 5일째 IC<sub>50</sub> 농도가 각각 10.45, 15.6  $\mu$ M 이었다. 전반적으로 볼 때, 미세조류에서보다는 약간 높은 처리농도에서 방제되는 특징을 보이는 경향이였다 (Fig. 2; Table 2).



**Fig. 2.** Effects of loreclezole on the growth inhibition of *Lemna paucicostata* (LEMPA) and *Spirodella polyrhiza* (SPIPO) at 5 d after treatment.

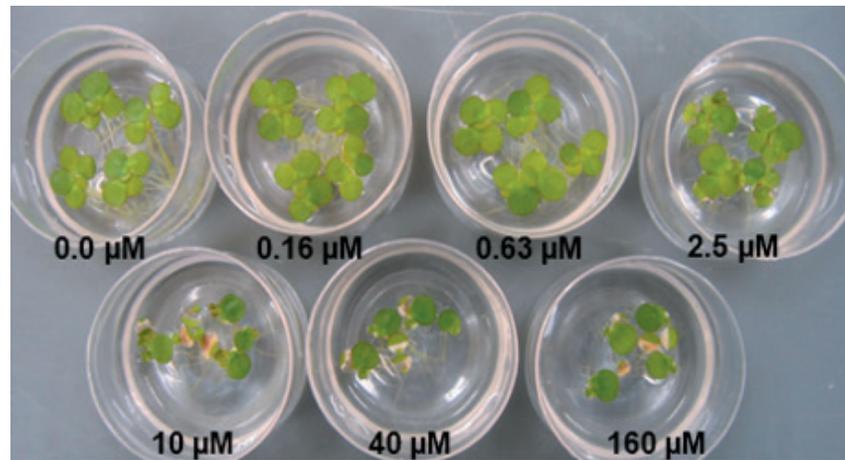
**Table 2.** Concentrations of loreclezole inducing a 50% or 90% growth inhibition of the various microalgae and duckweeds.

Group	Test materials		Days after treatment	Herbicidal activities <sup>z</sup>	
	Abbr.	Species		IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>90</sub> ( $\mu$ M)
Green algae	Cv	<i>Chlorella vulgaris</i> (FBCC)	4	12.0	38.0
			8	10.0	35.0
	Cv	<i>Chlorella vulgaris</i> (KCTC)	4	2.3	25.0
			8	2.3	19.0
	Cs	<i>Chlorella sorokiniana</i> (KCTC)	4	2.1	4.0
			8	2.2	4.5
Blue-green algae	Rs	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	4	1.3	2.4
			10	1.6	2.1
	Sce	<i>Scenedesmus</i> spp.	4	0.9	2.4
			10	0.8	1.1
Lower plants	Dc	<i>Dolichospermum circinale</i> ( <i>Anabaenacircinalis</i> )	4	27.6	46.5
			8	19.2	38.0
	Ma	<i>Microcystis aeruginosa</i>	4-5	7.6	>20.0
Lower plants	LEMPA	<i>Lemna paucicostata</i>	5	10.5	25.6
	SPIPO	<i>Spirodella polyrhiza</i>	5	15.8	206.7

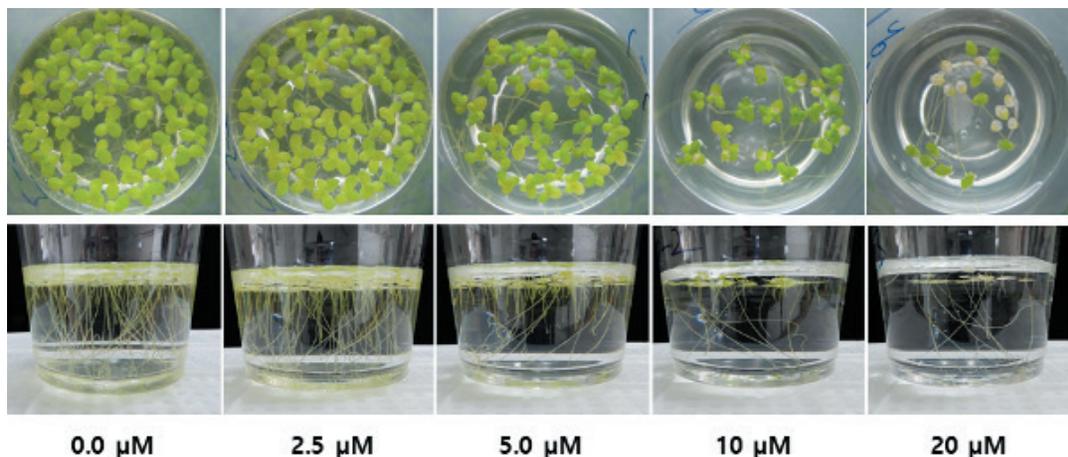
FBCC: Freshwater Bioresources Culture Collection; KCTC: Korean Collection for Type Cultures.

<sup>z</sup> IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M): Concentration ( $\mu$ M) inducing 50% growth inhibition of test species; IC<sub>90</sub> ( $\mu$ M): Concentration ( $\mu$ M) inducing 90% growth inhibition of test species.

포유류에서 loreclezole은 GBABA ( $\gamma$ -Aminobutyric acid) 수용체와 결합하여 수용체 단백질의 Cl<sup>-</sup> 흐름을 조절하는 allosteric modulator 역할을 한다고 알려져 있지만(Fernandez et al., 2012; Green et al., 1996; Wingrove et al., 1994), 식물의 경우에는 작용기작이 구명되어있지 않다. 본 연구에서는 loreclezole의 작용유형이 기존의 화합물과 차별되는지를 우선 알아보기 위하여 LEMPA와 SPIPO에서의 증상발현을 면밀히 조사해 보았다. SPIPO에 대한 제초증상을 살펴 볼 경우, 처리후 1일째 10  $\mu$ M 이상의 농도부터 엽상체의 신속한 해체 분리, 분열조직 및 어린 조직에서의 세포와해(침윤증상, 탈색), 적갈색 색소의 축적이 관찰되었고 이후 시간이 경과함에 따라 엽상체의 괴사가 어린 조직을 중심으로 진전되고 아울러 성장억제도 동반되었다(Fig. 3). 한편 LEMPA에 대한 제초증상에 있어서도 약제처리 5시간 이후 10  $\mu$ M 이상에서 엽상체의 신속한 해체 분리가 일어났으며 분열조직 및 어린 조직에서의 탈색과 세포괴사가 일어났다. 약제처리 2일째에 10  $\mu$ M에서 신규 엽상체의 소형화와 기형생장이 관찰되고 처리후 5일째에는 엽상체 일부에서의 엽록소 파괴가 뚜렷하여 백색/회색을 나타내는 조직의 비율이 보다 높아졌다(Fig. 4). 이들의 결과를 종합해 볼 때, 초기증상 발현에 있어서는 대체적으로 cellulose biosynthesis inhibitor에 가까운 증상을 나타내었지만 궁극적으로 다른 양상을 보였고, 작용점이 알려진 기존의 상업용 제초제와도 다른 유형의 증상을 나타내었다. 이는 loreclezole이 새로운 제초작용점을 가질 수 있음을 시사해 주며 보다 명확한 결과를 얻기 위해서는 추후 연구가 필요할 것 같다.



**Fig. 3.** Herbicidal activities and its symptoms at 5 d after loreclezole treatment against *Spirodella polyrhiza*.

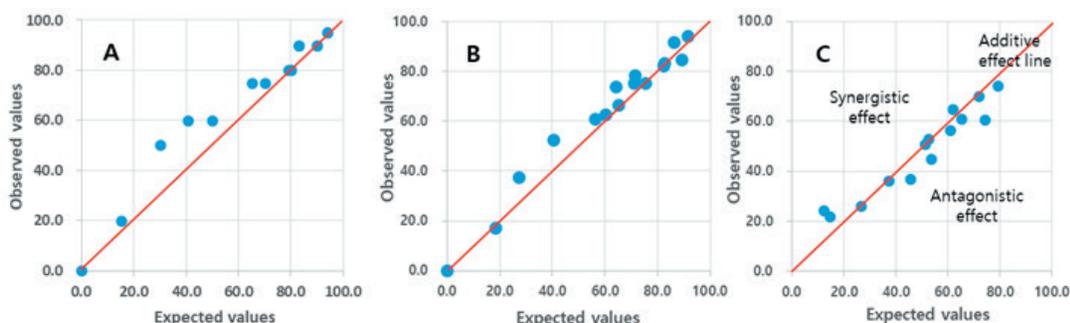


**Fig. 4.** Herbicidal activities and its symptoms at 5 d after loreclezole treatment against *Lemna paucicostata*.

## Loreclezole과 bentazon의 개구리밥에 대한 제초활성 상호작용성 평가

Loreclezole의 활용성을 높이는 방법의 하나로서 다른 약제와의 혼합조성물 처리를 생각해 볼 수 있다. 본 연구에서는 광합성저해제로 알려진 bentazon과의 상호작용성을 SPIPO에서 평가해 보고자 실험하였다. 먼저 여러 조합의 조성물을 SPIPO에 처리한 다음 처리후 5일째의 생육정도를 육안으로 조사해 본 결과는 Table 3에서와 같았으며, 콜비방법을 통한 상호작용성을 조사한 결과는 Fig. 5와 같았다. Loreclezole 2.5  $\mu$ M+bentazon 2.5  $\mu$ M, loreclezole 2.5  $\mu$ M+bentazon 10  $\mu$ M, loreclezole 0.63  $\mu$ M+bentazon 40  $\mu$ M 처리구에서는 각각의 단일처리구에 비해 높은 제초활성을 나타내어 상승적 작용을 보였다(Table 3; Fig. 5A). 기타는 독립적 작용을 나타내는 경향이었다(Fig. 5). 이를 보다 구체적으로 분석하기 위해 건물중과 엽록소 함량을 지표로 하여 검토해 보았다. 건물중의 경우, 전반적으로 약한 상승작용을 나타내었으며 가장 효과가 뚜렷한 처리농도 조합은 loreclezole 2.5  $\mu$ M+bentazon 2.5  $\mu$ M와 loreclezole 2.5  $\mu$ M+bentazon 10  $\mu$ M,이었다(Table 4; Fig. 5B). 엽록소 함량의 경우에는, 평균적으로 상가작용을 나타내었지만 여러 농도조합에서 미약한 길항작용성을 나타내는 경향이었다(Table 5; Fig. 5C). 이들 결과는 loreclezole에 의해 SPIPO와 LEMPA에서 일어난 색소탈색은 일차적인 작용에 의해서 나타나는 것이 아닐 수 있음을 시사해 준다.

이에 대해 좀더 면밀한 조사를 위해 광계2의 광합성 전자전달 저해효과에 대한 상호작용성을 검토해 보았다. Bentazon의 일차작용점이 광계2 저해에 있기 때문에 loreclezole이 이와 밀접한 관련이 있다면 약제처리 초기에 상가작용성 이상의 결과가 나타날 것으로 예상된다. 이에 대해 조사한 결과는 Table 6에서와 같았다. 혼합처리후 2일째 조사한 바에 의하면 bentazon에 의한  $Q_y$  감소가 loreclezole에 의해 전혀 영향을 받지 않았다. 처리후 5일째에는 bentazon에 의한  $Q_y$  감소가 loreclezole에 의해 약간 감소되는 경향이 있었지만 그다지 뚜렷하지는 않았다. 그러나 loreclezole 고농도(40  $\mu$ M)에서는 bentazon의  $Q_y$ 를 현저히 감소시켰는데 이는 광계2에 대한 직접적인 영향때문이라기 보다는 주변조직의 붕괴에 따른 엽록체 파괴로 인해 간접적으로 나타난 효과일 것으로 판단된다. 이들의 결과를 종합해 볼 때, bentazon과 혼합처리된 loreclezole은 제초활성에 있어서 전반적으로 미약한 상승작용성을 나타내었지만 이들의 상호작용성 원인은 광계2와 직접적인 관계는 없는 것으로 판단된다.



**Fig. 5.** Interaction of loreclezole + bentazon mixtures on the growth inhibition of *Spirodella polyrhiza*. A: Visual injury %, B: Dry weight ( $\text{mg dish}^{-1}$ ), C: Total chlorophyll contents ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Table 3.** Interaction of loreclezole+bentazon mixtures on the growth inhibition (visual injury %) of *Spirodella polyrhiza*.

Loreclezole ( $\mu\text{M}$ )	Bentazon ( $\mu\text{M}$ )				
	0	2.5	10	40	160
0	0	0	15	50	70
0.6	0	0	20	60	75
2.5	30	50	60	75	80
10	80	80	90	90	95
40	80	80	90	90	95

**Table 4.** Interaction of loreclezole + bentazon mixtures on the growth inhibition (dry weight [mg dish<sup>-1</sup>], % of control) of *Spirodella polyrhiza*.

Loreclezole ( $\mu\text{M}$ )	Bentazon ( $\mu\text{M}$ )				
	0	2.5	10	40	160
0	100.0 $\pm$ 12.7 <sup>z</sup>	101.5 $\pm$ 14.9	81.8 $\pm$ 7.4	39.9 $\pm$ 3.9	24.6 $\pm$ 2.3
0.63	100.5 $\pm$ 3.0	107.4 $\pm$ 10.1	82.8 $\pm$ 6.8	37.4 $\pm$ 3.1	24.6 $\pm$ 3.1
2.5	72.9 $\pm$ 12.3	62.6 $\pm$ 4.8	47.3 $\pm$ 6.8	24.6 $\pm$ 2.3	17.7 $\pm$ 1.5
10	43.8 $\pm$ 3.4	38.9 $\pm$ 3.1	26.1 $\pm$ 0.9	16.7 $\pm$ 3.4	15.3 $\pm$ 1.7
40	35.0 $\pm$ 5.6	33.5 $\pm$ 0.9	21.7 $\pm$ 0.9	8.4 $\pm$ 0.9	5.9 $\pm$ 0.0

<sup>z</sup>Data represent the average $\pm$ standard deviation of three replicates.

**Table 5.** Interaction of loreclezole+bentazon mixtures on the growth inhibition (total chlorophyll contents [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ], % of control) of *Spirodella polyrhiza*.

Loreclezole ( $\mu\text{M}$ )	Bentazon ( $\mu\text{M}$ )				
	0	2.5	10	40	160
0	100.0 $\pm$ 7.9 <sup>z</sup>	104.0 $\pm$ 11.5	101.4 $\pm$ 7.2	74.6 $\pm$ 4.5	55.4 $\pm$ 6.5
0.63	98.5 $\pm$ 4.4	106.2 $\pm$ 6.4	103.2 $\pm$ 2.2	74.0 $\pm$ 3.6	62.9 $\pm$ 7.7
2.5	84.3 $\pm$ 2.7	75.8 $\pm$ 4.1	78.1 $\pm$ 7.2	63.9 $\pm$ 1.6	55.0 $\pm$ 2.8
10	46.9 $\pm$ 0.9	49.1 $\pm$ 4.0	46.9 $\pm$ 3.3	38.8 $\pm$ 5.1	39.4 $\pm$ 2.8
40	37.7 $\pm$ 6.5	43.6 $\pm$ 2.9	35.2 $\pm$ 1.4	30.1 $\pm$ 1.5	25.9 $\pm$ 1.9

<sup>z</sup>Data represent the average $\pm$ standard deviation of three replicates.

**Table 6.** Quantum yield (Qy) values at 2 d and 6 d after loreclezole+bentazon mixture treatment against *Spirodella polyrhiza*.

Incubation	Bentazon ( $\mu\text{M}$ )	Loreclezole ( $\mu\text{M}$ )	Qy values	Relative (%)
2 d	0	0	0.790 $\pm$ 0.00	100.0 $\pm$ 0.0
		10	0.793 $\pm$ 0.01	100.4 $\pm$ 0.7
		40	0.780 $\pm$ 0.02	98.7 $\pm$ 2.2
	10	0	0.257 $\pm$ 0.01	32.5 $\pm$ 1.3
		10	0.375 $\pm$ 0.05	47.5 $\pm$ 6.7
		40	0.325 $\pm$ 0.08	41.1 $\pm$ 10.1
	20	0	0.175 $\pm$ 0.03	22.2 $\pm$ 3.6
		10	0.187 $\pm$ 0.02	23.6 $\pm$ 3.1
		40	0.175 $\pm$ 0.03	22.2 $\pm$ 3.3
6 d	0	0	0.777 $\pm$ 0.01	100.0 $\pm$ 1.3
		10	0.778 $\pm$ 0.01	100.2 $\pm$ 1.5
		40	0.692 $\pm$ 0.08	89.0 $\pm$ 10.1
	10	0	0.287 $\pm$ 0.05	36.9 $\pm$ 5.9
		10	0.248 $\pm$ 0.11	32.0 $\pm$ 14.2
		40	0.078 $\pm$ 0.02	10.1 $\pm$ 2.8

지금까지의 loreclezole 합제연구는 마우스를 대상으로 기존 항간질제(antiepileptic drugs) 화합물(carbamazepine, valproate, phenobarbital, phenytoin)들과 혼합했을 때 상승 또는 상가적 활성을 보였다는 사례만 보고되어 있고(Luszczki et al., 2006), loreclezole과 동일한 구조는 아니지만 1,2,4-triazole 구조를 가진 halogenoalkyl-, alkenyl- 및 alkynyl-azoles 유도체는 몇 가지 광합성 저해 제초제들과 상승적인 작용성을 보였다는 결과만 보고되었다(Kraatz et al., 1988). 따라서 현재 매우 제한적인 연구만 시도된 상태이기 때문에 여러 생물에 대해 다양한 구조 화합물들과의 loreclezole 합제연구는 향후 새로운 결과들을 보여줄 것으로 여겨진다.

### 여러 가지 잡초종에 대한 경엽처리 제초활성 조사

Loreclezole의 여러 잡초들에 대한 온실조건에서의 경엽처리효과를 조사해 보았다. 약제를 1.1 kg ha<sup>-1</sup> 수준에서 경엽 처리했을 때, 처리후 4일째 제초활성을 보면 Table 7에서 보는 바와 같이 어저귀, 까마중, 메꽃은 90% 이상의 제초활성을 블랙그래스와 도꼬마리는 10% 미만, 나머지는 40-60%의 제초활성을 보여 상업용 제초제들에 비해 그다지 높은 활성을 보이지는 않았다. 처리후 비교적 빠른 시간에(2-3일 이내) 잎이 신속히 탈색 괴사하는 burning effect 증상을 나타내면서 잡초가 고사하였다(Fig. 6). 이후 약효가 더 증가됨이 없이 10일 이상이 경과되면 오히려 회복하는 모습을 보였다. 전반적으로 볼 때, 잡초방제제로서의 loreclezole은 제초활성 잠재력이 부족한 편이고 약효지속시간도 짧기 때문에 이의 실용화를 위해서는 유도체 합성을 통한 상당한 개선이 필요한 것으로 여겨졌다.

**Table 7.** Herbicidal activities of loreclezole on the various weeds at a foliar application under the green house condition.

Chemicals	Rate (kg ha <sup>-1</sup> )	Weed species		Herbicidal activity/sy mptoms <sup>z</sup>
		Abbr.	Names	
Loreclezole	1.1	ABUTH	<i>Abutilon theophrasti</i> (어저귀)	90 CIE
		AESIN	<i>Aeschynome ne indica</i> (자귀풀)	50 CI
		ALOMY	<i>Alopecurus myosuroides</i> (블랙그래스)	10 C
		CALJA	<i>Calystegia japonica</i> (메꽃)	90 CIE
		DIGCI	<i>Digitaria ciliaris</i> (바랭이)	40 C
		ECHCG	<i>Echinochlo a crus-galli</i> (돌피)	60 CI
		PANDI	<i>Panicum dichotomifl orum</i> (미국개기장)	50 C
		SOLNI	<i>Solanum nigrum</i> (까마중)	100 C
		SORBI	<i>Sorghum bicolor</i> (수수)	40 C
		XANSI	<i>Xanthium strumarium</i> (도꼬마리)	0

<sup>z</sup> Visual injury %, C, I, and E represent dessication (necrosis), chlorosis (discoloration), and abnormal growth, respectively.



**Fig. 6.** Herbicidal symptoms of loreclezole against the various weeds at 2 d (A) and 4 d (B) after a foliar treatment (1.1 kg ha<sup>-1</sup>) under the green house condition.

## 요약

본 연구에서는 1,2,4-triazole계 화합물인 loreclezole의 여러 가지 미세조류 및 식물종들에 대한 생육저해활성을 조사하였다. 미세조류에 대한 loreclezole 활성의 경우, 종마다 약간씩 다르지만 2-35  $\mu\text{M}$  범위에서 비교적 광범위한 살조활성을 나타내었다. 녹조류 중 *Scenedesmus* spp.>*Raphidocelis subcapitata*>*Chlorella sorokiniana*>*C. vulgaris* (KCTC)>*C. vulgaris* (FBCC) 순으로 민감한 반응을, 남조류(시아노박테리아)의 경우엔 *Microcystis aeruginosa*가 *Dolichospermum circinale*보다 loreclezole에 대한 반응이 민감한 경향을 보였다. 개구리밥과 식물의 경우, loreclezole 처리에 대해 *Lemna paucicostata*가 *Spirodella polyrhiza* (SPIPO)보다 민감하여 처리후 5일째  $\text{IC}_{50}$  농도가 10.5  $\mu\text{M}$  이었다. SPIPO에 대한 제초증상발현을 통해서 볼 때, 지금까지 알려진 상업용제초제와는 다른 제초작용기작을 가지는 것으로 보였으며 loreclezole은 광합성저해제인 bentazon과 SPIPO에 대한 제초활성에 있어서 미약한 상승작용을 나타내었다. 여러 잡초들에 대한 경엽처리 제초활성의 경우, burning symptoms이 주로 관찰되었으며 1.0 kg ha<sup>-1</sup>에서 평균적으로 50% 내외의 저해활성을 나타내었고 약효 지속시간도 5일 이내로서 짧은 경향을 보였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, loreclezole은 수생태계에서의 살조제로서 사용가능한 잠재력을 보였으나 잡초방제를 위한 제초제로 활용하기 위해서는 상당한 개선이 필요할 것으로 여겨졌다.

**주요어:** 개구리밥과, 살조활성, 상승적 상호작용, 제초활성, Loreclezole

## Acknowledgement

This research was supported by a grant of Institute-Based R&D through the Korea Research Institute of Chemical Technology (Project No. IP21-06).

## Authors Information

Jin-Seog Kim, <https://orcid.org/0000-0002-9939-522X>

Bo Gwan Kim, <https://orcid.org/0000-0002-0031-9033>

Yun Gyeong Hwang, <https://orcid.org/0000-0003-1183-1152>

Ji Hye Choi, <https://orcid.org/0000-0002-5851-5248>

Byoung-Seok Lee, <https://orcid.org/0000-0003-4215-6495>

Ill Young Lee, <https://orcid.org/0000-0002-0788-430X>

## References

- Aouad, M.R., Messali, M., Rezki, N., Ali, A.A. and Lesimple, A. 2015. Synthesis and characterization of some novel 1,2,4-triazoles, 1,3,4-thiadiazoles and Schiff bases incorporating imidazole moiety as potential antimicrobial agents. *Acta Pharm.* 65:117-132.
- Cho, I.K., Seol, J.U., Rahman, M.M., Lee, D.G., Son, H., et al. 2021. Laboratory studies of the algaecide GreenTD: Stability, algaecidal activity and reduction of microcystin production. *Appl. Biol. Chem.* 64:22.
- Choi, J.S., Kim, Y.S., Kim, J.D., Kim, H.J., Ko, Y-K., et al. 2017. Herbicidal characteristics of soil bacteria *Actinomyces* G-0299 to southern crabgrass. *Weed Turf. Sci.* 6(3):212-221. (In Korean).

- Colby, S.R. 1967. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. *Weeds* 15:20-22.
- Fernandez, S.P., Karim, N., Mewett, K.N., Chebib, M., Johnston, G.A.R., et al. 2012. Flavan-3-ol esters: New agents for exploring modulatory sites on GABA<sub>A</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.* 165(4):965-977.
- Green, A.R., Misra, A., Murray, T.K., Snape, M.F. and Cross, A.J. 1996. A behavioral and neurochemical study in rats of the pharmacology of loreclezole, a novel allosteric modulator of the GABA<sub>A</sub> receptor. *Neuropharmacol.* 35(9/10):1243-1250.
- Joo, J.H., Cho, H. and Han, M.S. 2016. Novel algicidal substance (naphthoquinone group) from bio-derived synthetic materials against harmful cyanobacteria, *Microcystis* and *Dolichospermum*. *Ecol. Resil. Infrastruct.* 3(1):22-34. (In Korean)
- Joo, J.H., Park, B.S., Kim, S.H. and Han, M.S. 2020. A case study of biologically derived algicidal substances (naphthoquinone derivative) for mitigate of *Stephanodiscus* and it's ecological changing monitoring. *Ecol. Resil. Infrastruct.* 7(1):72-81. (In Korean)
- Joo, J.H., Park, C.S., Choi, H.J., Lee, H.W. and Han, M.S. 2017b. A field application feasibility of biologically derived substances (naphthoquinone derivate: NQ 2-0) for the mitigation of harmful cyanobacterial blooms. *Ecol. Resil. Infrastruct.* 4(3):130-141. (In Korean)
- Joo, J.H., Wang, P., Park, B.S., Byun, J.H., Choi, H.J., et al. 2017a. Improvement of cyanobacterial-killing biologically derived substances (BDSs) using an ecologically safe and cost-effective naphthoquinone derivative. *Ecotox. Environ. Safe.* 141:188-198.
- Kim, B.G. and Kim. J.S. 2018. Development of new composition containing chaff vinegar (carbonized solution of rice hull) as active ingredient for controlling harmful algae and moss. *Weed Turf. Sci.* 7(4):365-378. (In Korean)
- Kim, B.G. and Kim. J.S. 2020. Germination and growth characteristics of giant duckweed (*Spirodela polyrhiza*) turion. *Weed Turf. Sci.* 9(2):107-117. (In Korean)
- Kim, J.S., Kim, B.G., Lee, I.Y. and Lim, H.N. 2020. Simple screening of cellulose biosynthesis inhibitors through response patterns of seedling of specific seeds. *Weed Turf. Sci.* 9(4):331-343. (In Korean)
- Kim, J.S., Lee, B.H., Oh, K.H. and Song, J.E. 2005. Interaction of glufosinate-ammonium and oxyfluorfen for herbicidal activity. *Kor. J. Weed Sci.* 25(3):171-178. (In Korean)
- Ko, Y.G., Je, Y.H., Lee, I.Y., Kim, U.J., Choi, J.Y., et al. 2018. Pesticide composition with (1-halovinyl) benzene compound. *Repub. Korean Patent.* KR 10-1898182 B1.
- Kraatz, U., Behrenz, W. and Fedtke, C. 1988. Halogenoalkyl-, alkenyl- and alkinyl-azoles. *United States Patent.* US 4783474.
- Lee, I.Y., Hwang, Y.K., Lim, H.N., Ko, Y.K., Kim, J.S., et al. 2019. Study of HTS based new skeleton as insecticides. 2019 Annual Meeting on The Korean Society of Pesticide Science. p. 35-44.
- Lee, I.Y., Lim, H.N., Hwang, Y.G. and Je, Y.H. 2020. Insecticide composition, insecticide product containing same insecticide composition, and method for eradicating pest. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo,* KR 2020143148 A.
- Lee, M., Shin, J., Kim, J.H., Lim, Y.K., Cho, H., et al. 2018. Selective algicidal effects of a newly developed GreenTD against red tide harmful alga. *Korean J. Environ. Biol.* 36(3):359-369.

- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymol.* 148:350-382.
- Luszczki, J., Ratnaraj, N., Patsalos, P.N. and Czuczwar, S.J. 2006. Isobolographic analysis of interactions between loreclezole and conventional antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock-induced seizure model. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 373(2):169-181.
- Wingrove, P.B., Wafford, K.A., Bain, C. and Whiting, P.J. 1994. The modulatory action of loreclezole at the gamma-aminobutyric acid type A receptor is determined by a single amino acid in the beta 2 and beta 3 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(10):4569-4573.