

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000473-01

보안과제( ), 일반과제( ○ )

과제번호 107019-3

환경친화형 탄저/역병 방제용 신규 살균제 개발

Development of a new environmentally-sound fungicide  
to control anthracnose & late blight

친환경 살균제 개발 / 선도화합물의 최적화 유도체 합성

Development of environmentally-sound fungicide /  
Optimized compound synthesis from lead compound

(주)동부하이텍

농림수산식품자료실



0004985

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “환경친화형 탄저/역병 방제용 신규 살균제 개발”의 보고서로 제출합니다.

2010년 5월 31일

주관연구기관명 : (주)동부하이텍

주관/세부연구책임자 : 김 태 준

연 구 원 : 최 인 영

연 구 원 : 석 미 영

연 구 원 : 조 래 홍

연 구 원 : 엄 대 용

연 구 원 : 최 준 혁

연 구 원 : 문 기 준

연 구 원 : 손 명 건

협동연구기관명 : 순천향대학교

협동연구책임자 : 최 원 식

연 구 원 : 남 석 우

연 구 원 : 김 영 선

연 구 원 : 안 은 경

연 구 원 : 양 진 아

연 구 원 : 신 재 원

# 요 약 문

## I. 제 목

환경친화형 탄저/역병 방제용 신규 살균제 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목표는 천연(식물 또는 미생물)물질로부터 발굴된 선도화합물(novel scaffold)의 유도체 최적화 연구를 하여 친환경적인 탄저/역병 방제용 신규 살균제를 개발하는 것이다.

작물보호제의 세계 시장규모는 318억불(2006 Cropnosis)에 달하고, 국내의 경우 1조 161억 원('06 한국작물보호협회) 이르는 전체 정밀화학산업(7,200억불)의 4.4%를 차지하는 고부가가치 산업이다. '06년 기준 국내 작물보호제 원제의 98%(3,300억원)가 수입에 의존하고 있고 막대한 기술료 부담으로 국내기업들의 수익성이 선진국대비(미국 20%, 일본15%) 현저히 떨어지는 4-5%수준의 매우 열악한 사업구조를 지니고 있다.

1987년 물질특허제도의 도입에 따라 핵심원천기술의 경제적 중요성이 부각되었고 1993년 시장개방화 정책으로 인한 외국 원제회사들의 국내진출은 신물질 개발이 부진한 국내 작물보호제 산업의 경쟁을 더욱 가속화시킬 전망이다. 신규 작물보호제 개발은 연평균 매출 1억 불이상의 효과를 지니고 있고 20년간 지속적인 사업독점권확보가 가능하다. 따라서 기업매출의 수익구조개선 및 국가 무역수지개선 등의 경제적 효과뿐만이 아니라 신물질 개발국으로서 국가 위상을 높임으로써 국제산업경쟁에서 수평적 분업관계를 유지할 수 있게 하는 핵심 원천기술이다.

지금까지 개발된 작물보호제의 >99%은 모방적(Me-too) 유기합성방법에 의한 것이고, 같은 계열의 작물보호제를 지속적으로 오·남용하여 1) 유사한 작용기작을 지닌 물질의 반복투여에 따른 저항성 병·해충의 증가와 천적의 감소, 2) 인축에 대한 독성, 3) 잔류독성을 포함하는 환경 생태계의 파괴를 야기하였으며 시급히 해결해야 할 국제적 현안으로 부각되었다. 특히, 1992년 리우선언 협약에 이어 OECD 회원국들을 중심으로 유기합성 작물보호제의 원제생산량을 2013년까지 현 수준의 40%까지 감축하는 규제책이 마련되어 진행되고 있어 식량의 안정적 확보를 위한 기존의 작물보호제 대체제의 개발이 시급한 실정이다. 이러한 문제를 해결할 수 있는 수단으로 최근 생물농약연구가 활발히 진행되고 있으나 아직까지 그 생물적 효과가 저조하고, 방제효과의 변동 폭이 크며, 생태계 파괴 등의 문제를 여전히 내포하고 있어 유기합성 작물보호제의 현실적인 대체제로서의 역할을 하지 못하고 있는 실정이다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 선도화합물을 도출하고 유도체 최적화를 통하여 방제활성이 우수하며 인축에 안전한 환경친화적 신규 살균제 상업화 후보화합물을 얻고자 하였다.

- 천연물 유래 살균제 시장현황 및 개발동향 분석
- 새로운 천연물 유래 hit 및 선도화합물 pipe-line 확보
- SAR(Structure-Activity Relationship)연구
- 최적화 유도체 합성 및 방제활성 검정
- 후보화합물 선정
- 안전성(인축독성, 유전독성, 환경독성)평가
- 작용특성과약 및 작용기작 규명
- 제형 최적화 연구 및 포장시험
- 상업화 후보화합물 확보

#### IV. 연구개발결과

본 연구는 환경 친화적이고 인축에 안전한 탄저/역병 방제용 신규 살균제를 도출하여 상품화 하는데 그 목적을 두고 수행되었다.

당사가 보유하고 있는 식물 정유성분 유래 선도화합물(DBF12080)의 유도체 최적화 연구결과 DBF12080과 대조화합물(Tebuconazole)보다 방제활성이 우수한 화합물을 얻을 수 없었다. 그리고 DBF series의 방제활성부위 확인시험결과 분자구조중 식물정유성분에서 유래한 골격이 toxophore로서 부족함을 확인하였고, 진전단계 스크리닝(지효성, 접종농도별 시험 등) 결과 기존 탄저병 약제들보다 활성이 저조하여 상업화 후보화합물 골격으로 적합하지 않았다. 따라서 모핵 수준에서의 혁신적인 구조 변화없이 신규 살균제로 개발이 어렵다고 판단되어 탄저병 살균제 연구를 보류하고, 역병 살균제 연구에 집중하였다.

신규 역병 살균제 연구를 위하여 당사가 보유한 library 화합물(520개, DBM series)을 고추 역병에 대하여 *in vitro*, *in vivo* 시험을 통해 선도화합물 DBM1509를 도출하였다. 선도화합물을 다른 식물병원균(보리 흰가루병균(*Erysiphe graminis*), 오이 탄저병균(*Colletotrichum orbiculare*), 오이 잭빛곰팡이균(*Botrytis cinerea*), 벼 도열병균(*Magnaporthe grisea*), 벼 문고병균(*Rhizoctonia solani*))에 시험한 결과 특이적으로 역병에 대해서만 활성을 보였고, DBM1509는 Metalaxyl 교차저항성이 없으며 침투이행활성은 Metalaxyl보다는 낮고 Dimethomorph와는 비등한 수준이었다.

1, 2차년도에는 library 화합물에 대한 구조-활성분석을 기초로 하여 유도체 최적화 연구를 수행하였으며 방제활성, logP, EC50/EC90 및 합성공정 등을 고려하여 포장시험 화합물 DBM1766, DBA3486, DBA3570을 최종 선발하였다. 이 화합물들에 대하여 공정개발을 실시하여 포장시험 샘플을 확보하였고, 수화제로 제형을 최적화하였다. 포장시험은 고추 역병, 포도 노균병, 멜론 노균병에 대하여 실시하였으며, 그 중 DBM3570(2차년도)의 방제활성이 가장 우수하였으나, 대조약제(Dimethomorph) 대비 방제활성이 3/4 수준으로 미흡하였다. 포장시험 화합물들이 온실시험에서는 대조약제와 활성이 비등/우수하였으나 포장에서 저조한 결과를 보인 원인은 침투이행성 부족에 의한 것으로 사료되었다. 포장시험 화합물들의 기초독성시험 결과 급성경구독성은 2,000mg/kg 이상으로 안전하며, 송사리에 대한 어독성도 대체로 안전한 수준이었다.

3차년도에는 침투이행성과 어독성 개선을 위하여 최적화 유도체 92종을 합성하여 *in vitro*, *in vivo* 생물활성을 검정하였으며, 활성이 가장 우수한 DBA3645, DBA3646 2종을 선발하였다. 그러나 방제활성이 대조약제(Dimethomorph)와 비등하므로 후보화합물 도출을 위해선 추가 구조 최적화 연구가 요구된다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과

가. 기존의 상업화된 역병/노균병 살균제와 구조적 차별성이 있는 새로운 scaffold(diaryl thiazole)를 발굴하여 선도화합물을 도출하였다. 또한 구조 최적화 연구를 통하여 포장 시험을 실시한 결과 당사가 보유한 화합물들은 대조약제(Dimethomorph)와 비등한 활성을 나타내었다.

나. 특허출원

- 발명의 명칭: 농업용 살균제
- 출원번호: 제10-2008-0097107호
- 출원일: 2008. 10. 2

다. 논문게재

Choi, W. S., Nam, S. W., Ahn, E. K., Park, B. S., Lee, S. E., Kim, T. J., and Choi, I. Y., 2010. Synthesis and Fungicidal Activity of N-[4-(4-Fluoro)phenyl-2-piperidin-4-yl-thiazole-5-yl]pyrimidin-2-yl-N-phenylamines on *Phytophthora capsici*. Korea Society for Applied Biological Chemistry 53(2):206-214

라. 학회발표

Fungicidal Activity of DBM1509 on pepper late blight in Pepper Caused by *Phytophthora capsici*. (한국식물병리학회, 순천대학교, 2008년 4월 25일)

### 2. 연구성과 활용계획

최종 선별한 화합물 DBA3645, DBA3646는 진전단계 스크리닝 및 유도체 최적화를 진행하여 신규 살균제 개발의 기초자료로 활용하고, 그 연구성과를 특허 및 논문게재할 예정이다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of a new environmentally-sound fungicide to control anthracnose & pepper late blight

## II. Object and Significance of Research

The purpose of this research is based on development of a new environmentally-sound fungicide to control anthracnose or pepper late blight by optimizing novel scaffolds from the natural substance of plant and microorganism and finally commercialize it.

Global crop protection market is up to 31.8 billion dollar(2006 Cropnosis) and domestic one is up to 1,161 billion won(2006 Korea crop protection association). Crop protection is a high value-added industries sharing 4.4% of fine chemical industry in the world. The crop protection business in Korea is under weak and poor business situation because almost Korean pesticide manufacturing companies have depended above 98% of active ingredients for pesticide products on foreign global companies with paying massive royalty. So, the average profit margin of domestic pesticide manufacturing companies is 4-5% which is far lower than that of global companies reach to 15~20%.

In addition, substance patents introduced in 1987 has strengthened the industrial importance of core technology and it seems that the direct marketing in domestic market of global companies by market opening policy will intensify domestic market competition.

Statistically, the development of a new crop protection has brought a economic effect more than \$ 1 billion annually and business monopoly for 20 years to developer. Thus, the development of a new crop protection is a core competencies which can not only improve trade balance between two countries and revenue stream structure in corporation but also make horizontal relationship among countries by improvement of national status.

The most pesticides launched up to date more than 99% is developed by means of Me-Too approach, so some pesticides are very similar each other. Now a day, we have many problems with pesticide to solve due to pesticides misuse and abuse. Misuse and abuse of pesticides have cause many problems such as pesticide resistance, toxicity to human & animals, circumstance pollution etc. According to the Rio declaration in 1992, OECD countries agreed to reduce the product of pesticide to 40%, they has made related

legislation. Under these circumstances, new environmentally-sound fungicide development is urgently needed for steady food security. Recently bio-pesticides are intensively researched but its efficacy is lower than synthetic pesticides and fluctuates widely and it still has possibility to destruct ecosystems.

### III. Contents and Scope of Research

This research is carried out to develop a new environmentally-sound fungicide safe to human and animals by optimizing novel scaffolds from the natural substance.

- Trend analysis of development and market for fungicide derived from natural products
- Keep the pipe-line of new hit and lead compounds derived from natural products
- SAR (Structure-Activity Relationship) studies
- Structure optimization and efficacy estimation
- Selected candidate compounds
- Safety (human and animals toxicity, genetic toxicity, environmental toxicity)
- Study for material properties and mode of action
- Formulation optimizing studies and field trials
- Ensure the commercializing candidate compounds

### IV. Result

DBF12080 is a fungicide lead compound to control anthracnose disease derived from natural products. Despite of serial structure optimization of DBF12080, we didn't get compounds superior to Tebuconazole. We found that the structure derived from natural in DBF12080 is inadequate as a toxophore after various test. We determined that it is difficult to continue a study for anthracnose fungicide without innovative structural change and focused on study for pepper late blight fungicide.

Library compounds(520, DBM series) were tested *in vitro* & *in vivo* screening to find lead compound for pepper late blight fungicide. DBM1509 was finally selected as a lead compound. DBM1509 was tested to 6 major plant disease pathogens(*Erysiphe graminis*, *Colletotrichum orbiculare*, *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*)and showed specific antifungal activity only to pepper late blight.

In advanced screening test, we know that DBM1509 hasn't cross resistance to Metalaxyl, and has similar systemic activity level to Dimethomorph.

In 1st and 2nd research year, the structure optimization study for lead compound was mainly carried out based on structure-activity relationship analysis of library compounds.

As a result, DBM1766, DBA3486, DBA3570 were selected as a field trial candidate considering efficacy, logP, EC50/EC90, synthetic process. DBM1766, DBA3486 and DBA3570 was synthesized 50g a.i scale and tested formulation optimization for field trial. DBM1766, DBA3570 were tested to pepper pepper late blight, grape downy mildew, melon downy mildew. The efficacy of DBM3570 in field trial was superior to DBM1766 and DBA3486 but was lower than that of Dimethomorph. These three candidates showed similar efficacy to Dimethomorph *in vivo* test, but not in field trial. We assume the reason is low systemic activity of DBM3570. DBM1766, DBA3486, DBA3570 were examined to acute oral toxicity and fish toxicity. As a results, each lethal dose<sup>50</sup> (LD<sub>50</sub>) of acute oral toxicity was over 2,000mg/kg and fish toxicity lethal concentration was over 10ppm, these results not have any problem of toxicity.

To improve systemic activity of DBA series, 92 optimized compounds were synthesized and tested on pepper late blight *in vitro* and *in vivo*. DBA3645, DBA3646 were finally selected. But the antifungal activity of selected compounds is as much as that of Dimethomorph. So, structural optimization is more needed for DBA3645 and DBA3646 to develop new fungicide.

## V. The plans for practical application of results of research and development

### 1. Results of research and development

A. We found a new scaffold of oomycetes fungicides totally different from commercialized fungicides and identified the efficacy of compounds is similar to that of Dimethomorph.

#### B. Patent

- Title of Invention: Agricultural fungicide
- Application No.: 10-2008-0097107
- Filing Date: 2008. 10. 2

#### C. Articles publishment

Choi, W. S., Nam, S. W., Ahn, E. K., Park, B. S., Lee, S. E., Kim, T. J., and Choi, I. Y., 2010. Synthesis and Fungicidal Activity of N-[4-(4-Fluoro)phenyl-2-piperidin-4-yl-thiazole-5-yl]pyrimidin-2-yl-N-phenylamines on *Phytophthora capsici*. Korea Society for Applied Biological Chemistry 53(2):206-214

D. Conference

Fungicidal Activity of DBM1509 on pepper late blight in Pepper Caused by *Phytophthora capsici*. (Korean Society of Plant Pathology, Sunchun Univ., 2008. 4. 25.)

## 2. The plans for practical application of results

We have finally selected DBA3645 and DBA3646. We will continue advanced screening and structural optimization research and then apply for a patent or publish articles about the study achievements.

# CONTENTS

Chapter 1. Overview of research and development	
1.1. The object of research and development	14
1.2. The necessity of research and development	14
1.3. The Contents and Scope of research and development	15
Chapter 2. The current status of national and international research and development	
2.1. The current status of domestic research and development	16
2.2. The current status of international research and development	16
Chapter 3. Contents and results of research and development	
3.1. The research achievements in 2007-2008	
3.1.1. The research of new fungicide for anthracnose	18
3.1.1.1. Synthesis of new derivative	18
3.1.1.2. <i>in vivo</i> screening against cucumber anthracnose	20
3.1.1.3. Field trial of DBM12080	22
3.1.1.4. The toxophore test of DBF12080	23
3.1.1.5. Conclusion of plant essential oil research	23
3.2.1. The research of new fungicide for pepper late blight	
3.2.1.1. Synthesis of new derivative	24
3.2.1.2. Library compound <i>in vitro</i> screening against pepper late blight	25
3.2.1.3. <i>in vivo</i> screening against pepper late blight	31
3.2.1.4. fungicidal spectrum test of DBM1509	33
3.2.1.5. Systemic fungicidal activity test of DBM1509	34
3.2.1.6. Metalaxyl cross-resistance test of DBM1509	35
3.2. The research achievements in 2008-2009	
3.2.1. <i>in vivo</i> screening against pepper late blight	37
3.2.2. Selection of field trial candidate compound	43
3.2.3. Field trial of DBM1766, DBA3486 12.5% WP	44
3.2.4. Basic toxicity test	49
3.2.5. Synthesis of new derivative	50
3.3. The research achievements in 2009-2010	
3.3.1. <i>in vivo</i> screening against pepper late blight	51
3.3.2. Field trial of DBA3570 12.5% WP	54
3.3.3. Basic toxicity test	56
3.3.4. Synthesis of new derivative	58

Chapter 4. Degree of accomplishment of the objects & Contribution to the related research areas

- 4.1. Annual research contents and degree of accomplishment of the objects .....62
- 4.2. Contribution to the related research areas.....63

Chapter 5. The plans for practical application of results of research and development.....64

Chapter 6. Foreign information on science technologies collected during research project...65

Chapter 7. References.....67

# 목 차

제1장 연구개발과제의 개요	
제1절 연구개발의 목적	14
제2절 연구개발의 필요성	14
제3절 연구개발의 범위	15
제2장 국내외 기술개발 현황	
제1절 국내 관련기술 현황	16
제2절 외국 관련기술 현황	16
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	
제1절 1차년도 연구내용	
1. 탄저병 방제용 신규 살균제 개발	18
가. 신규 유도체 합성	18
나. 오이 탄저병 <i>in vivo</i> 스크리닝	20
다. DBF12080의 포장시험	22
라. DBF12080 방제활성부위 확인 시험	23
마. 식물정유성분 유래 신규 살균제 연구 결론	23
2. 역병 방제용 신규 살균제 개발	
가. 신규 유도체 합성	24
나. Library 화합물에 대한 고추 역병 <i>in vitro</i> 스크리닝	25
다. 고추 역병 <i>in vivo</i> 스크리닝	31
라. 선도화합물 DBM1509 방제스펙트럼 확인시험	33
마. 선도화합물 DBM1509 침투이행활성 시험	34
바. 선도화합물 DBM1509의 Metalaxyl 교차저항성 시험	35
제2절 2차년도 연구내용	
1. 고추 역병 <i>in vivo</i> 스크리닝	37
2. 포장시험화합물 제형 최적화	43
3. 선발화합물 포장시험	44
4. 기초독성시험	49
5. 신규 유도체 합성	50
제3절 3차년도 연구내용	
1. 고추 역병 스크리닝	51
2. 포장시험	54
3. 기초독성시험	56

4. 신규 유도체 합성.....	58
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	
제1절 연차별·세부과제별 연구개발의 내용 및 목표 달성도.....	62
제2절 관련분야 기여도.....	63
제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	
제1절 연구개발 성과.....	64
제2절 연구성과 활용계획.....	64
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	65
제7장 참고문헌.....	67

# 제1장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구개발의 목적

본 연구의 목표는 천연(식물 또는 미생물)물질로부터 발굴된 선도화합물(novel scaffold)의 유도체 최적화 연구를 통하여 친환경적인 탄저/역병 방제용 신규 살균제를 개발하는 것이다.

## 제2절 연구개발의 필요성

### 1. 기술의 경제적·산업적 중요성

작물보호제의 세계 시장규모는 318억불(2006 Cropnosis)에 달하고, 국내의 경우 1조 161억원('06 한국작물보호협회) 이르는 전체 정밀화학산업(7,200억불)의 4.4%를 차지하는 고부가가치 산업이다. '06년 기준 국내 작물보호제 원제의 98%(3,300억원)가 수입에 의존하고 있고 막대한 기술료 부담으로 인해 국내기업들의 수익성이 선진국대비(미국 20%, 일본15%) 현저히 떨어지는 4-5%수준으로 매우 열악한 사업구조를 지니고 있다. 1987년 물질특허제도의 도입에 따라 핵심원천기술의 경제적 중요성이 부각되었고 1993년 시장개방화 정책으로 인한 외국 원제회사들의 국내진출은 신물질 개발이 부진한 국내 작물보호제 산업의 경쟁을 더욱 가속화시킬 전망이다. 신규 작물보호제 개발은 연평균 매출 1억불이상의 효과를 지니고 있고 20년간 지속적인 사업독점권확보가 가능함에 따라 기업매출의 수익구조 및 국가 무역수지개선 등의 경제적 효과뿐만이 아니라 신물질 개발국으로서 위상제고에 따른 무한의 국제산업경쟁에서 수평적 분업관계를 유지할 수 있는 핵심원천기술이다.

### 2. 연구개발의 필요성

지금까지 개발된 작물보호제의 >99%은 모방적(Me-too) 유기합성방법에 의한 것으로 단순하고 반복적인 화학구조를 지닌 이들의 지속적인 오·남용은 1) 유사한 작용기작을 지닌 물질의 반복투여에 따른 저항성 병·해충의 증가와 천적의 감소, 2) 인축에 대한 독성, 3) 잔류독성을 포함하는 환경 생태계의 파괴를 야기하였으며 시급히 해결해야 할 국제적 현안으로 부각되었다. 특히, 1992년 리우선언 협약에 이어 OECD 회원국들을 중심으로 유기합성 작물보호제의 원제생산량을 2013년까지 현 수준의 40%까지 감축하는 규제책이 마련되어 진행되고 있어 식량의 안정적 확보를 위한 기존의 작물보호제 대체제의 개발이 시급한 실정이다. 이러한 문제를 해결할 수 있는 수단으로 최근 생물농약연구가 활발히 진행되고 있으나 아직까지 그 생물적 효과가 저조하고, 적용효과의 변동 폭이 크며, 생태계 파괴 등의 문제를 여전히 내포하고 있어 유기합성 작물보호제의 현실적인 대체제로서의 역할을 하지 못하고 있는 실정이다.

### 제3절 연구개발의 범위

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 연도 (2007- 2008)	친환경 살균제 개발	New scaffold 탐색계속	온실조건 <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> 활성검정 (1차 및 2차 스크리닝)계속 작용특성평가(스펙트럼, 약효/약해)
		포장시험 후보화합물 선발	온실조건 <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> 활성검정 (1차 및 2차 스크리닝)계속 작용특성평가(침투이행성, 치료효과)
		기초 독성평가	급성경구독성 실험, 어독성 실험
		기초 실용화 평가	소포장 시험(국내)
		특허출원	국내 특허 출원
	선도화합물의 최적화 유도체 합성	유도체 최적화 합성	후보물질 합성법 확립
		합성공정개선	소포장시험용 50g 규모샘플 합성법 확립
2차 연도 (2008- 2009)	친환경 살균제 개발	후보화합물 선발	상업화 후보물질 확보 및 유도체 합성
		기초 실용화 평가	기초 제형검토 및 소포장 시험 수행
		특허출원	후보물질의 신규성 및 진보성 확보 물질, 제조, 제형 및 용도특허 확보(국내/PCT)
		합성공정개선	소포장 시험용 샘플 제조 여부
	선도화합물의 최적화 유도체 합성	유도체 최적화 합성	후보물질 합성법 확립
		합성공정개선	소포장 시험용 50g 규모 샘플 합성
3차 연도 (2009- 2010)	친환경 살균제 개발	상업화 화합물 도출	상업화 후보화합물 확보
		안전성 자료 확보	유전독성/급성경구 경피/환경독성자료 확보
		사업화 제형 개발	최적제형 개발을 위한 물리성/이화학성 비교 검토자료 확보 여부
		특허출원	사업화 후보물질의 신규성 및 진보성 확보 물질, 제조, 제형 및 용도특허 확보
	선도화합물의 최적화 유도체 합성	유도체 최적화 합성	신규 합성화합물 합성법 확립
		대량 생산공정 확립	등록시험 규모의 생산공정 확립 여부

## 제2장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내 관련기술 현황

현재 살충제 1종(선봉, 정보화학), 제초제 2종(피안커와 flucetosulfuron, LG 생명과학), 살균제 1종(가디안, LG생명과학) 등 모두 4종이 개발되어 그 중에 3개 물질이 상품화 되었으며 신규물질(Bistrifluron과 Metamifop: (주)동부한농)을 포함한 6종이 등록 중이거나 상업화 단계에 있다.

국내 신규 작물보호제 개발은 이미 선진국에서 개발한 작물보호제의 구조를 변형하여 약효를 개선시키는 모방적(Me-Too) 접근이 주된 연구방법으로 전통적인 합성기술과 생리활성 스크리닝에 관한 기술은 선진국 수준에 이른 것으로 평가된다.

그러나 신규 작용점을 지닌 hit 또는 선도화합물 도출을 위한 미래핵심기술인 천연물로부터 유래한 생리활성물질을 탐색 및 발굴하여 산업적으로 응용하는 기반기술은 아직 미흡한 실정이다. 천연물로부터 분리, 정제, 구조 동정된 선도물질을 모핵으로 하는 작물보호제 연구는 아직까지 태동 단계로 최근 천연물을 이용한 활성 물질의 탐색 및 개발에 관한 연구가 일부 대학 및 정부출연연구소에서 이루어져 왔으나 산업적 응용을 위한 유기적인 체계 및 연구지원 미흡 등으로 산업화되지 못하고 있는 실정이다.

### 제2절 외국 관련기술 현황

천연물을 이용한 신규 작물보호제 연구를 살펴보면, 살충효과를 가지고 있는pyrethrin은 제충국에서 유래한 대표적인 terpenoid계 화합물로서 이를 선도물질로하여 allethrin이 개발되었으며, 그 후 살충활성이 개선된 bioresmethrin, fenvalerate등이 개발, 상업화되었다.

식물체로부터 분리된 아미노산계 화합물들인 tricholomic acid와 isotenic acid는 높은 살충효과가 확인되어 이를 선도화합물로 하여 isoxathion 살충제가 개발되었고physostigmine은 아프리카 식물에서 발견된 독성성분으로 carbamate 계열 살충제의 선도화합물이 되었다.

Strobilurin A로부터 유래한 strobilurin계 살균제는 조균류, 자낭균류, 담자균류, 불완전균류 등에 광범위한 활성을 보이며 현재 약 10여종의 살균제가 상품화 되었고단일 품목으로서 세계 살균제 시장의 21.7%(\$1,564m) 차지하는 상업적으로 가장 성공한 천연물 유래 작물보호제이다.(표1 참조)

표 1 . 천연물로부터 개발된 대표적인 작물보호제

분류	계열	유래(발견연도)	원제명(개발연도)
살균제	Strobilurin계	<i>Strobilurus tenacellus</i> (1977)	Azoxystrobin (Syngenta,1997) 외 6종
	Polyoxin계	<i>Streptomyces cacaoi</i> (1961)	Polyoxin B (Kumiai,1967) 외 1종
	농용 항생제	<i>Streptomyces hygroscopi</i> (1970)	validamycin (Takeda,1972) 외 3종
살충제	Pyrethroid계	제충국	Fenvalerate (BASF, 1976) 외 17종
	Carbamate계	서아프리카산 칼라발콩	Cartap (Sanonda, 1965) 외 22종
	Neonicotinoid계	담배속 식물엽	Imidacloprid (Bayer, 1991) 외 6종
	기타	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Abamectin (Syngenta, 1985) 외 3종

## 제3장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 1차년도 연구내용

#### 1. 탄저병 방제용 신규 살균제 개발

##### 가. 신규 유도체 합성

당사가 보유하고 있는 선도화합물(DBF12080)의 유도체 최적화 연구를 위하여 53종의 신규 화합물을 다음과 같이 합성하였다.

No	Code	Structure Name
1	DBF0001	4-isopropyl-3-methylphenyl-2,3,4,5-tetrafluorobenzoate
2	DBF0002	2-isopropyl-5-methylphenyl-2,3,4,5-tetrafluorobenzoate
3	DBF0003	4- <i>sec</i> -butylphenyl-2,3,4,5-tetrafluorobenzoate
4	DBF0004	2- <i>sec</i> -butylphenyl 2,3,4,5-tetrafluorobenzoate
5	DBF0005	4-isopropylphenyl 2,3,4,5-tetrafluorobenzamide
6	DBF0006	2-acetyl-4,6-diisopropylphenyl 2,3,4,5-tetrafluorobenzoate
7	DBF0007	4-allyl-2-methoxyphenyl 2,3,4,5-tetrafluorobenzoate
8	DBF0008	4- <i>tert</i> -butylphenyl 2,3,4,5-tetrafluorobenzoate
9	DBF0009	5-isopropyl-3-methylphenyl 2,3,4,5-tetrafluorobenzoate
10	DBF0010	4-isopropylphenyl 2,3,4,5-tetrafluorobenzoate
11	DBF0011	2-isopropylphenyl 2,3,4,5-tetrafluorobenzoate
12	DBF0012	4- <i>tert</i> -butylphenyl carbamate
13	DBF0013	4- <i>sec</i> -butylphenyl carbamate
14	DBF0014	3- <i>tert</i> -butylphenyl carbamate
15	DBF0015	2- <i>sec</i> -butylphenyl carbamate
16	DBF0016	4-(2-butenyl)-2-methoxyphenyl 2,3,4,5-tetrafluorobenzoate
17	DBF0017	5-isopropyl-2-methylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
18	DBF0018	2-isopropyl-5-methylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
19	DBF0019	5-isopropyl-3-methylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
20	DBF0020	4-isopropyl-3-methylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
21	DBF0021	4-isopropylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
22	DBF0022	2-isopropylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate

23	DBF0023	2- <i>sec</i> -butylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
24	DBF0024	4- <i>sec</i> -butylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
25	DBF0025	3- <i>tert</i> -butylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
26	DBF0026	4- <i>tert</i> -butylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
27	DBF0027	4-allyl-2-methoxyphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
28	DBF0028	4-(2-butenyl)-2-methoxyphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
29	DBF0029	4-isopropylphenyl 2,3,6-trifluorobenzamide
30	DBF0030	bis(2,3,6-trifluorophenyl) dicarbonate
31	DBF0031	Ethoxy 2,3,6-trifluorobenzene
32	DBF0032	2-allylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
33	DBF0033	2-allyl-6-methylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
34	DBF0034	4-pentylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
35	DBF0035	4- <i>tert</i> -pentylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
36	DBF0036	4-cyclopentylphenyl 2,3,6-trifluorobenzoate
37	DBF0037	Carvacrol
38	DBF0038	Thymol
39	DBF0039	5-isopropyl-3-methylphenol
40	DBF0040	4-isopropyl-3-methylphenol
41	DBF0041	4-isopropylphenol
42	DBF0042	2-isopropylphenol
43	DBF0043	2- <i>sec</i> -butylphenol
44	DBF0044	4- <i>sec</i> -butylphenol
45	DBF0045	3- <i>tert</i> -butylphenol
46	DBF0046	eugenol
47	DBF0047	isoeugenol
48	DBF0048	4-isopropyl aniline
49	DBF0049	2-allylphenol
50	DBF0050	2-allyl-6-methylphenol
51	DBF0051	4-pentylphenol
52	DBF0052	4- <i>tert</i> -pentylphenol
53	DBF0053	4-cyclopentylphenol

나. 오이 탄저병 *in vivo* 스크리닝

(1) 재료 및 방법

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 *Colletotichum orbiculare* 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 각 화합물을 acetone 10 ml에 녹인 후 Tween #20 250ppm 용액 90 ml와 혼합한 후 최종농도는 시험의 목적농도가 되도록 조정하였다. 합성물질의 예방효과에 대한 실험은 대상화합물을 경엽이 완전히 젖도록 고루 살포하고 24시간 동안 온실에서 풍건하였다. 접종원으로 사용된 오이 탄저병(*Colletotichum orbiculare*)은 PDA 배지에서 7일간 25°C로 배양한 후 분홍색의 포자를 붓으로 수거한 후 100 ppm tween 20 용액에  $10^5$  spores/ml의 농도로 병원균 접종액을 조제한 후 본엽 1엽의 작물체 경엽에 고루 살포하였다. 병원균 접종후 23°C Dew chamber로 이동하여 2일간 발병을 유도한다. 접종 5-7일후 경엽에 발생한 병반면적율을 조사하였고 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가를 구하여 약제의 효과를 비교하였다.

$$\text{방제가(\%)} = (1 - \text{처리구병반면적율} / \text{무처리구병반면적율}) \times 100$$

(2) *in vivo* 스크리닝

No.	Code Name	처리농도(PPM)	방제가(%)
1	DBF0001	100	0.0
2	DBF0002	100	0.0
3	DBF0003	100	0.0
4	DBF0004	100	0.0
5	DBF0005	100	25.9
6	DBF0006	100	0.0
7	DBF0007	100	18.5
8	DBF0008	100	40.7
9	DBF0009	100	18.5
10	DBF0010	100	14.8
11	DBF0011	100	40.7
12	DBF0012	100	0.0
13	DBF0013	100	0.0
14	DBF0014	100	7.4
15	DBF0015	100	0.0
16	DBF0016	100	11.1
17	DBF0017	100	51.7
18	DBF0018	100	75.9
19	DBF0019	100	75.9
20	DBF0020	100	72.4

21	DBF0021	100	58.6
22	DBF0022	100	79.3
23	DBF0023	100	72.4
24	DBF0024	100	68.6
25	DBF0025	100	42.9
26	DBF0026	100	37.1
27	DBF0027	100	8.6
28	DBF0028	100	22.9
29	DBF0029	100	71.4
30	DBF0030	100	0.0
31	DBF0031	100	86.2
32	DBF0032	100	60.0
33	DBF0033	100	68.6
34	DBF0034	100	20.0
35	DBF0035	100	48.6
36	DBF0036	100	51.4
37	DBF0037	100	27.6
38	DBF0038	100	48.3
39	DBF0039	100	0.0
40	DBF0040	100	0.0
41	DBF0041	100	0.0
42	DBF0042	100	0.0
43	DBF0043	100	0.0
44	DBF0044	100	0.0
45	DBF0045	100	0.0
46	DBF0046	100	0.0
47	DBF0047	100	0.0
48	DBF0048	100	0.0
49	DBF0049	100	0.0
50	DBF0050	100	0.0
51	DBF0051	100	0.0
52	DBF0052	100	0.0
53	DBF0053	100	0.0
54	Tebuconazole	20	95.9

---

(3) 결론

선행 수행과제의 최종 선발물질이었던 DBF12080보다 방제활성이 우수한 물질을 찾기 위해 53종의 물질을 추가 합성하였으나 오이 탄저병에 대해 DBF12080보다 *in vivo* 방제활성이 우수한 화합물이 없었다.

다. DBF12080의 포장시험

(1) 재료 및 방법

DBF 12080를 10% EC로 각각 제제하여 압출식 25L 동력분무기를 이용하여 접종 1일 전을 기준으로 500 ppm, 250 ppm의 농도로 각각 3회 경엽처리하였다. 탄저병의 접종원은 상습발병포장의 발병양상이 양호하여 인공접종하지 않고 자연발병시켰다. 고추는 “부자” 품종을 정식하였고 난괴법의 3반복으로 포장설계를 하여 시험하였다. 조사결과시 각 처리구의 방제효과 산출은 시험구내의 전체 과실에 대한 이병과수인 이병과율로 구하였다. 각 약제의 방제효과는 각 처리구의 이병과율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가를 구하여 약제의 효과를 비교하였다. 각 산출식은 다음과 같다.

$$\text{이병과율(\%)} = (\text{처리구 발병과수} / \text{처리구 전체과수}) \times 100$$

$$\text{방제가(\%)} = (\text{무처리 이병과율} - \text{처리구 이병과율}) / \text{무처리구 이병과율} \times 100$$

(2) 포장시험결과

No.	시험약제	처리농도 (ppm)	평균 이병과율(%)	방제가(%) (DMRT, p=0.05)	
1	Untreated	-	12.2	-	d
2	Blank formulation	-	10.5	13.8	cd
3	DBF12080	500	9.5	22.2	bc
4	DBF12080	250	11.3	7.4	cd
5	Trifloxystrobin WG(대조)	125	2.5	79.7	a
6	Dithianon WP(대조)	750	3.5	71.7	ab
7	Tebuconazole EC(대조)	125	5.6	54.6	ab

(3) 결론

DBF12080의 포장활성은 500ppm의 고농도에서도 다른 대조약제들에 비해 현저히 낮은 방제활성을 보였다.

라. DBF12080 방제활성부위 확인 시험

(1) 재료 및 방법

*in vivo* 스크리닝 시험법과 동일

(2) 시험결과

No	시험약제	농도(ppm)	방제가(%)
1	Untreated	-	-
2	DBF12080	100	69
3	DBF0030	100	34
4	DBF0031	100	69
5	2,3,6-Trifluorobenzoic acid	100	79
6	2,3,6-Trifluorobenzoyl chloride	100	31
7	Benzoic acid	100	71
8	Ethyl benzoate	100	66
9	Tebuconazole(대조)	20	99
10	Tebuconazole(대조)	10	89
11	Tebuconazole(대조)	5	71

(3) 결론

방제활성부위 확인 시험결과 DBM12080이 오이 탄저병에 대해 보이는 방제활성은 thymol 자체가 아닌 치환기들에 의한 활성으로 판단되었다. 2,3,6-trifluorobenzoyl chloride, benzoic acid 또는 ethyl benzoate는 식물정유성분이 없는 화합물로 50%이상 방제활성을 보였으며, 식물정유성분은 고농도에서 방제활성을 보이거나 저농도에서는 그 활성을 상실하는 것으로 확인되었다.

마. 식물정유성분 유래 신규 살균제 연구 결론

당사가 보유하고 있는 DBF12080의 유도체 최적화 연구결과 DBF12080과 대조화합물(Tebuconazole)보다 방제활성이 우수한 화합물은 없었다. 그리고 DBF series의 방제활성부위 확인시험결과 분자구조중 식물정유성분에서 유래한 골격이 toxophore로서 부족함을 확인하여 모핵 수준에서의 혁신적인 구조적 변화없이 신규 살균제로 개발이 어렵다고 판단하였다.

## 2. 역병 방제용 신규 살균제 개발

### 가. 신규 유도체 합성

당사가 보유한 library 화합물 520개(DBM series)와 신규 화합물 80개(DBA series)를 합성하였다.

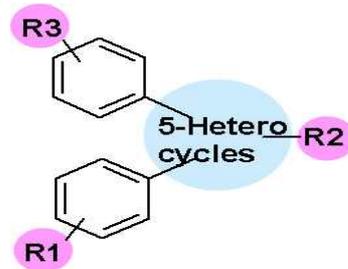


그림 1. 모핵의 구조

#### (1) 대조화합물 합성: 10개

DBA-3356, DBA-3357, DBA-3358, DBA-3359, DBA-3360, DBA-3361, DBA-3362, DBA-3363, DBA-3364, DBA-3365

#### (2) 선도화합물(DBM-1509) 최적화 유도체 합성: 29개

DBA-3366, DBA-3367, DBA-3368, DBA-3369, DBA-3370, DBA-3371, DBA-3372, DBA-3373, DBA-3374, DBA-3434, DBA-3435, DBA-3453, DBA-3454, DBA-3455, DBA-3456, DBA-3457, DBA-3458, DBA-3459, DBA-3460, DBA-3461, DBA-3462, DBA-3463, DBA-3464, DBA-3465, DBA-3466, DBA-3480, DBA-3481, DBA-3482, DBA-3483

#### (3) 선도화합물(DBM-1285) 최적화 유도체 합성: 41개

##### (가) R2 part 최적화 유도체: 6개

DBA-3436, DBA-3437, DBA-3438, DBA-3439, DBA-3440, DBA-3441

##### (나) R3 part 최적화 유도체: 35개

DBA-3442, DBA-3443, DBA-3444, DBA-3445, DBA-3446, DBA-3447, DBA-3448, DBA-3449, DBA-3450, DBA-3451, DBA-3452, DBA-3467, DBA-3468, DBA-3469, DBA-3470, DBA-3471, DBA-3472, DBA-3484, DBA-3485, DBA-3486, DBA-3487, DBA-3488, DBA-3489, DBA-3490, DBA-3491, DBA-3492, DBA-3493, DBA-3494, DBA-3495, DBA-3496, DBA-3497, DBA-3498, DBA-3499, DBA-3500, DBA-3501

나. Library 화합물에 대한 고추 역병 *in vitro* 스크리닝

(1) 재료 및 방법

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 *Phytophthora capsici* 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 활성평가를 하고자하는 합성물질 5mg을 acetone 1ml에 용해시켜 5000ppm이 되도록 제조한 후 이 용액을 지름 6mm인 paper disc(Avantec) 3개에 각각 15 $\mu$ l씩 점적한 뒤 1시간 동안 clean-bench에서 풍건시켰다. 합성물질이 담긴 paper disc를 PDA(Difco) 배지에 중앙을 기준으로 12시, 4시, 8시 방향으로 각각 2.5cm 떨어진 지점에 치상한 후 V-8배지(V-8 juice 200ml, CaCO<sub>3</sub> 4.5g, agar 20g, D.W 800ml)에서 7일간 배양한 균주를 중앙에 치상하여 20°C incubator에서 4-5일 배양한 뒤 형성된 저지원의 최소반경(mm)을 측정하였다(Paper Disc Method).

(2) 시험결과

시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)
DBM1257	0.0	DBM1278	0.0	DBM1300	6.0
DBM1258	0.0	DBM1279	6.0	DBM1301	0.3
DBM1259	1.0	DBM1280	5.3	DBM1302	5.0
DBM1260	0.0	DBM1281	0.0	DBM1303	0.7
DBM1261	0.0	DBM1282	-	DBM1304	3.3
DBM1262	0.0	DBM1283	-	DBM1305	0.0
DBM1263	0.7	DBM1284	1.3	DBM1306	0.0
DBM1264	0.0	DBM1285	18.0	DBM1307	0.0
DBM1265	0.0	DBM1286	-	DBM1308	3.0
DBM1266	1.3	DBM1287	0.0	DBM1309	0.0
DBM1267	0.0	DBM1289	0.0	DBM1310	10.0
DBM1268	0.0	DBM1290	0.0	DBM1311	15.3
DBM1269	3.0	DBM1291	0.0	DBM1312	0.0
DBM1270	0.0	DBM1292	0.0	DBM1313	0.0
DBM1271	0.0	DBM1293	0.0	DBM1314	0.0
DBM1272	0.0	DBM1294	0.0	DBM1315	0.0
DBM1273	0.0	DBM1295	0.0	DBM1316	0.0
DBM1274	0.0	DBM1296	0.0	DBM1317	0.0
DBM1275	0.0	DBM1297	0.0	DBM1318	0.0
DBM1276	4.7	DBM1298	0.0	DBM1319	0.0
DBM1277	0.7	DBM1299	0.0	DBM1320	0.0
DBM1321	0.0	DBM1362	0.0	DBM1403	0.0
DBM1322	0.0	DBM1363	0.0	DBM1404	0.0
DBM1323	0.0	DBM1364	11.0	DBM1405	13.3
DBM1324	0.0	DBM1365	8.3	DBM1406	2.3

시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)
DBM1325	0.0	DBM1366	0.7	DBM1407	0.7
DBM1326	0.0	DBM1367	-	DBM1408	4.3
DBM1327	0.0	DBM1368	6.0	DBM1409	14.3
DBM1328	0.0	DBM1369	6.3	DBM1410	5.0
DBM1329	0.0	DBM1370	3.7	DBM1411	0.3
DBM1330	0.0	DBM1371	0.0	DBM1412	5.0
DBM1331	14	DBM1372	0.0	DBM1413	-
DBM1332	1.3	DBM1373	0.0	DBM1414	0.0
DBM1333	0.0	DBM1374	-	DBM1415	8.7
DBM1334	0.0	DBM1375	0.0	DBM1416	2.3
DBM1335	14	DBM1376	0.0	DBM1417	0.0
DBM1336	14.7	DBM1377	0.7	DBM1418	0.0
DBM1337	5.3	DBM1378	0.0	DBM1419	14.3
DBM1338	4.7	DBM1379	0.0	DBM1420	10.0
DBM1339	0.0	DBM1380	0.0	DBM1421	2.3
DBM1340	0.0	DBM1381	0.0	DBM1422	12.7
DBM1341	0.0	DBM1382	0.0	DBM1423	0.0
DBM1342	0.0	DBM1383	0.0	DBM1424	0.0
DBM1343	0.0	DBM1384	0.0	DBM1425	0.0
DBM1344	0.0	DBM1385	0.0	DBM1426	0.0
DBM1345	2.3	DBM1386	0.0	DBM1427	9.0
DBM1346	0.0	DBM1387	0.0	DBM1428	3.7
DBM1347	11.3	DBM1388	0.0	DBM1429	0.0
DBM1348	1.7	DBM1389	0.0	DBM1430	10.3
DBM1349	12	DBM1390	0.0	DBM1431	0.0
DBM1350	1.7	DBM1391	-	DBM1432	0.0
DBM1351	15	DBM1392	0.0	DBM1433	2.3
DBM1352	7.7	DBM1393	0.0	DBM1434	0.0
DBM1353	12	DBM1394	0.0	DBM1435	0.0
DBM1354	0.0	DBM1395	16.0	DBM1436	0.0
DBM1355	0.0	DBM1396	14.7	DBM1437	12.7
DBM1356	0.0	DBM1397	8.0	DBM1438	9.7
DBM1357	13.0	DBM1398	8.3	DBM1439	2.3
DBM1358	6.0	DBM1399	16.7	DBM1440	11.0
DBM1359	12.0	DBM1400	16.7	DBM1441	15.3
DBM1360	0.0	DBM1401	13.0	DBM1442	14.0
DBM1361	0.0	DBM1402	12.0	DBM1443	9.3
DBM1444	13.0	DBM1485	0.0	DBM1526	0.0
DBM1445	0.0	DBM1486	0.0	DBM1527	-
DBM1446	0.0	DBM1487	0.0	DBM1528	0.0

시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)
DBM1447	0.0	DBM1488	6.3	DBM1529	0.0
DBM1448	0.0	DBM1489	7.7	DBM1530	-
DBM1449	0.0	DBM1490	3.0	DBM1531	3.3
DBM1450	0.0	DBM1491	7.3	DBM1532	-
DBM1451	0.0	DBM1492	16.0	DBM1533	-
DBM1452	0.0	DBM1493	15.3	DBM1534	0.0
DBM1453	0.0	DBM1494	13.0	DBM1535	0.0
DBM1454	0.0	DBM1495	1.3	DBM1536	0.0
DBM1455	0.0	DBM1496	4.3	DBM1537	0.0
DBM1456	0.0	DBM1497	15.3	DBM1538	0.0
DBM1457	0.0	DBM1498	0.0	DBM1539	0.0
DBM1458	0.0	DBM1499	0.0	DBM1540	10.0
DBM1459	0.0	DBM1500	0.0	DBM1541	9.7
DBM1460	0.0	DBM1501	0.0	DBM1542	3.3
DBM1461	0.0	DBM1502	0.0	DBM1543	1.0
DBM1462	0.0	DBM1503	0.0	DBM1544	10.7
DBM1463	0.0	DBM1504	13.0	DBM1545	12.0
DBM1464	0.0	DBM1505	3.3	DBM1546	6.0
DBM1465	0.0	DBM1506	14.0	DBM1547	2.0
DBM1466	15.0	DBM1507	8.3	DBM1548	0.3
DBM1467	9.7	DBM1508	0.0	DBM1549	0.0
DBM1468	2.0	DBM1509	8.0	DBM1550	0.0
DBM1469	3.0	DBM1510	0.0	DBM1551	0.0
DBM1470	15.0	DBM1511	0.0	DBM1552	0.0
DBM1471	2.7	DBM1512	0.0	DBM1553	0.0
DBM1472	1.3	DBM1513	0.0	DBM1554	0.0
DBM1473	1.0	DBM1514	0.0	DBM1555	0.0
DBM1474	0.0	DBM1515	0.0	DBM1556	0.0
DBM1475	0.0	DBM1516	0.0	DBM1557	0.0
DBM1476	2.7	DBM1517	0.0	DBM1558	0.0
DBM1477	1.3	DBM1518	0.0	DBM1559	0.0
DBM1478	0.0	DBM1519	3.7	DBM1560	0.0
DBM1479	1.0	DBM1520	11.7	DBM1561	0.0
DBM1480	9.3	DBM1521	11.3	DBM1562	0.0
DBM1481	13.3	DBM1522	-	DBM1563	0.7
DBM1482	10.3	DBM1523	12.7	DBM1564	0.0
DBM1483	8.0	DBM1524	-	DBM1565	0.0
DBM1484	0.0	DBM1525	-	DBM1566	0.0
DBM1567	0.0	DBM1608	0.0	DBM1649	10.7
DBM1568	0.0	DBM1609	0.7	DBM1650	2.0
DBM1569	0.0	DBM1610	0.0	DBM1651	6.0

시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)
DBM1570	7.0	DBM1611	0.0	DBM1652	12.0
DBM1571	3.0	DBM1612	0.0	DBM1653	13.0
DBM1572	1.0	DBM1613	0.0	DBM1654	6.0
DBM1573	0.7	DBM1614	0.0	DBM1655	8.0
DBM1574	0.3	DBM1615	0.0	DBM1656	0.0
DBM1575	0.3	DBM1616	10.3	DBM1657	0.0
DBM1576	1.0	DBM1617	4.7	DBM1658	0.0
DBM1577	1.0	DBM1618	1.3	DBM1659	0.0
DBM1578	0.0	DBM1619	1.0	DBM1660	0.0
DBM1578	0.0	DBM1620	8.3	DBM1661	0.0
DBM1579	4.3	DBM1621	9.3	DBM1662	16.0
DBM1580	0.0	DBM1622	1.0	DBM1663	13.7
DBM1581	0.0	DBM1623	1.3	DBM1664	8.3
DBM1582	0.0	DBM1624	0.0	DBM1665	5.3
DBM1583	-	DBM1625	0.0	DBM1666	16.3
DBM1584	13.3	DBM1626	8.3	DBM1667	14.3
DBM1585	9.0	DBM1627	0.7	DBM1668	10.3
DBM1586	4.7	DBM1628	0.0	DBM1669	8.3
DBM1588	0.0	DBM1629	0.0	DBM1670	0.3
DBM1589	0.0	DBM1630	10.0	DBM1671	0.0
DBM1590	0.0	DBM1631	11.0	DBM1672	0.0
DBM1591	-	DBM1632	5.7	DBM1673	0.0
DBM1592	10.3	DBM1633	-	DBM1674	0.0
DBM1593	-	DBM1634	0.0	DBM1675	0.0
DBM1594	-	DBM1635	0.0	DBM1676	0.0
DBM1595	0.0	DBM1636	0.0	DBM1677	0.0
DBM1596	0.0	DBM1637	0.0	DBM1678	0.0
DBM1597	0.0	DBM1638	9.0	DBM1679	0.0
DBM1598	0.0	DBM1639	6.0	DBM1680	0.0
DBM1599	0.0	DBM1640	2.0	DBM1681	0.0
DBM1600	0.0	DBM1641	8.3	DBM1682	0.0
DBM1601	0.0	DBM1642	0.0	DBM1683	0.0
DBM1602	0.0	DBM1643	0.0	DBM1684	1.0
DBM1603	0.0	DBM1644	0.7	DBM1685	0.0
DBM1604	0.0	DBM1645	0.0	DBM1686	0.0
DBM1605	0.0	DBM1646	0.0	DBM1687	0.0
DBM1606	0.0	DBM1647	0.0	DBM1688	0.0
DBM1607	0.0	DBM1648	11.0	DBM1689	0.0
DBM1690	0.0	DBM1731	1.0	DBM1772	0.0
DBM1691	14.0	DBM1732	0.0	DBM1773	0.0
DBM1692	4.7	DBM1733	0.0	DBM1774	14.3

시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)
DBM1693	2.7	DBM1734	0.0	DBM1775	12.7
DBM1694	1.3	DBM1735	0.0	DBM1776	6.3
DBM1695	15.0	DBM1736	0.0	DBM1777	10.0
DBM1696	10.7	DBM1737	0.0	-	-
DBM1697	4.0	DBM1738	0.7	-	-
DBM1698	2.7	DBM1739	0.0	-	-
DBM1699	1.3	DBM1740	0.0	-	-
DBM1700	0.0	DBM1741	0.0	-	-
DBM1701	4.3	DBM1742	0.0	-	-
DBM1702	1.0	DBM1743	0.0	-	-
DBM1703	0.0	DBM1744	0.0	-	-
DBM1704	0.0	DBM1745	1.0	-	-
DBM1705	14.7	DBM1746	0.0	-	-
DBM1706	15.0	DBM1747	0.0	-	-
DBM1707	11.7	DBM1748	0.0	-	-
DBM1708	10.3	DBM1749	0.0	-	-
DBM1709	0.0	DBM1750	0.0	-	-
DBM1710	0.0	DBM1751	0.0	-	-
DBM1711	0.0	DBM1752	14.3	-	-
DBM1712	0.0	DBM1753	7.7	-	-
DBM1713	13.3	DBM1754	1.0	-	-
DBM1714	13.0	DBM1755	1.0	-	-
DBM1715	0.0	DBM1756	13.7	-	-
DBM1716	10.0	DBM1757	10.7	-	-
DBM1717	0.0	DBM1758	3.7	-	-
DBM1718	0.0	DBM1759	3.7	-	-
DBM1719	0.7	DBM1760	0.7	-	-
DBM1720	0.0	DBM1761	0.0	-	-
DBM1721	0.0	DBM1762	7.0	-	-
DBM1722	0.0	DBM1763	2.0	-	-
DBM1723	17.0	DBM1764	0.0	-	-
DBM1724	13.7	DBM1765	0.0	-	-
DBM1725	6.7	DBM1766	15.0	-	-
DBM1726	8.3	DBM1767	14.7	-	-
DBM1727	17.3	DBM1768	10.0	-	-
DBM1728	16.0	DBM1769	12.0	-	-
DBM1729	11.3	DBM1770	0.0	-	-
DBM1730	10.7	DBM1771	0.0	-	-

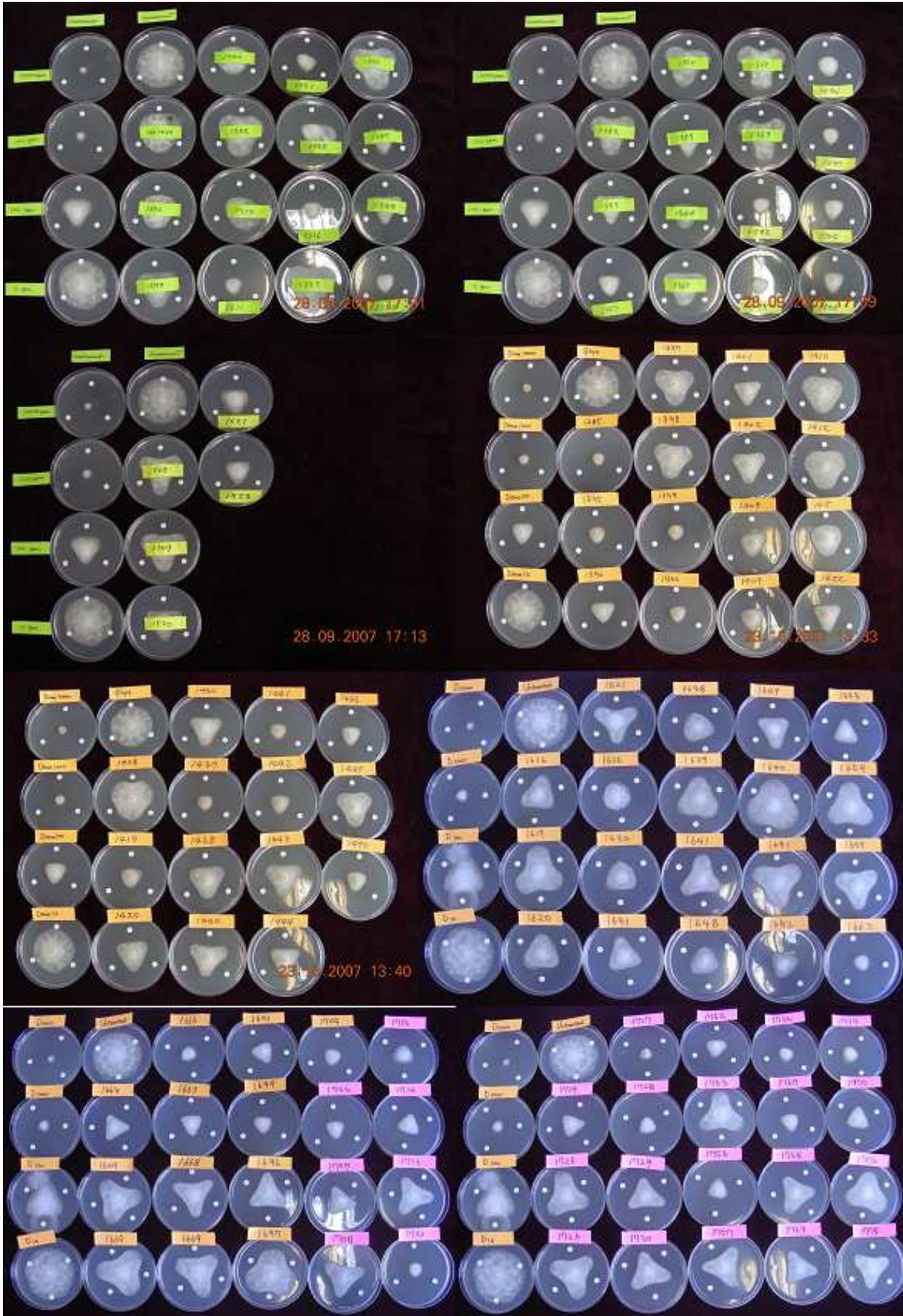


그림 2. 고추역병에 대한 DBM series의 5000ppm paper disc method *in vitro* 시험결과

### (3) 결론

소량의 화합물을 이용하여 대상병해에 대한 방제활성 유무를 판단할 수 있는 paper disc method를 이용하여 고추 역병의 대조약제로 사용한 Dimethomorph의 100ppm 보다 큰 저지원을 형성한 108개 화합물 1차 선발하였고, 선발된 화합물의 대한 단일농도에서의 *in vivo* 활성 확인이 필요하다고 판단되었다.

## 다. 고추 역병 *in vivo* 스크리닝

### (1) 재료 및 방법

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 *Phytophthora capsici* 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 각 화합물을 acetone 10 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 90 ml와 혼합한 후 시험물질의 최종농도는 30ppm이 되도록 조정하였다. 합성물질의 예방효과에 대한 실험은 대상화합물을 경엽이 완전히 젖도록 골고루 살포하고 24시간 동안 온실에서 풍건하여 실시하였다. 접종원으로 사용된 고추 역병(*P. capsici*)은 V-8배지(V-8 juice 200ml, CaCO<sub>3</sub> 4.5g, agar 20g, D.W 800ml)에서 7일간 배양한 균주의 기중균사를 제거한 후 24시간이 경과하면 표면에 다량의 유주자낭이 형성시킨 후 붓으로 유주자낭을 수거하여 100ppm tween 20 용액에 10<sup>4</sup> sporangia/ml의 농도로 병원균 접종액을 조제한 후 4℃로 1시간 유지하여 유주자낭에서 유주자의 유출을 최대한 유도하였다. 본엽 6-8엽의 고추 경엽에 골고루 살포하였다. 병원균 접종후 23℃ dew chamber로 이동하여 2일간 발병을 유도시켰다. 방제효과의 산출은 접종 2-4일후 경엽에 발생한 병반면적율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가를 구하여 약제의 효과를 비교하였다.

### (2) 시험결과

시험약제	방제가(%)	시험약제	방제가(%)
DBM1285	100.0	DBM1347	100.0
DBM1310	80.0	DBM1351	100.0
DBM1311	100.0	DBM1353	80.8
DBM1331	83.3	DBM1357	100.0
DBM1335	26.7	DBM1359	100.0
DBM1335	26.7	DBM1364	100.0
DBM1336	0.0	DBM1365	93.3
DBM1337	0.0	DBM1395	100.0
DBM1396	100.0	DBM1621	0.0
DBM1397	0.0	DBM1626	86.7
DBM1398	63.3	DBM1630	100.0
DBM1399	100.0	DBM1631	65.4
DBM1400	100.0	DBM1638	96.7

시험약제	방제가(%)	시험약제	방제가(%)
DBM1401	94.2	DBM1641	76.7
DBM1402	100.0	DBM1648	100.0
DBM1405	70.0	DBM1649	96.7
DBM1409	30.8	DBM1652	100.0
DBM1412	57.7	DBM1653	76.9
DBM1415	73.1	DBM1662	100.0
DBM1419	100.0	DBM1663	73.3
DBM1420	100.0	DBM1664	20.0
DBM1422	53.8	DBM1666	98.1
DBM1427	70.0	DBM1667	100.0
DBM1430	10.0	DBM1668	73.1
DBM1437	100.0	DBM1669	73.1
DBM1438	86.7	DBM1691	90.0
DBM1440	53.3	DBM1695	69.2
DBM1441	100.0	DBM1696	0.0
DBM1442	100.0	DBM1705	100.0
DBM1443	98.1	DBM1706	100.0
DBM1444	92.3	DBM1707	100.0
DBM1466	96.7	DBM1708	53.8
DBM1467	26.7	DBM1713	100.0
DBM1470	76.7	DBM1714	80.0
DBM1480	96.7	DBM1716	53.3
DBM1481	100.0	DBM1723	100.0
DBM1482	78.8	DBM1724	93.3
DBM1492	86.7	DBM1726	66.7
DBM1493	98.1	DBM1727	100.0
DBM1494	73.3	DBM1728	100.0
DBM1497	100.0	DBM1729	80.8
DBM1504	73.3	DBM1730	80.8
DBM1506	83.3	DBM1752	83.3
DBM1507	13.3	DBM1756	65.4
DBM1509	100.0	DBM1757	0.0

시험약제	방제가(%)	시험약제	방제가(%)
DBM1521	63.3	DBM1766	100.0
DBM1521	63.3	DBM1767	100.0
DBM1523	83.3	DBM1768	76.9
DBM1540	80.0	DBM1774	93.3
DBM1541	66.7	DBM1775	100.9
DBM1544	61.5	DBM1777	66.7
DBM1545	86.5	-	-
DBM1574	7.7	-	-
DBM1584	61.5	-	-
DBM1585	76.9	-	-
DBM1592	63.3	-	-
DBM1616	73.3	-	-

### (3) 결론

30ppm *in vivo* 시험에서 고추 역병에 대해 95%이상의 방제효과를 보이는 화합물 42종을 최종 선발하였고, 일련의 *in vitro*, *in vivo* 시험을 통해 재현성있게 우수한 방제활성을 보인 DBM1509를 선도화합물로 도출하였다.

### 라. 선도화합물 DBM1509 방제스펙트럼 확인시험

#### (1) 재료 및 방법

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 고추 역병균(*Phytophthora capsici*), 오이 탄저병균(*Colletotrichum orbiculare*), 오이 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 벼 문고병균(*Rhizoctonia solani*) 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 활성평가를 하고자하는 합성물질 5mg을 Acetone 1ml에 용해시켜 5000ppm이 되도록 제조한 후 이 용액을 지름 6mm인 paper disc(Avantec) 3개에 각각 15 $\mu$ l씩 점적한 뒤 1시간동안 clean-bench에서 풍건시켰다. 합성물질이 담긴 paper disc를 PDA(Difco) 배지에 중앙을 기준으로 12시, 4시, 8시 방향으로 각각 2.5cm 떨어진 지점에 치상한 후 PDA배지에서 7일간 배양한 균주를 중앙에 치상하여 고추 역병균, 오이 탄저병균, 오이 잿빛곰팡이병균은 20 $^{\circ}$ C incubator에서, 벼 문고병원균은 28 $^{\circ}$ C incubator에서 각각 배양하여 무처리구의 균사직경이 5cm이상 자랐을때 형성된 저지원의 최소반경(mm)을 측정하였다(Paper Disc Method). 보리 흰가루병은 2005년 한국화학연구원에서 분양받은 *Erysiphe graminis* f. sp. hordei 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 이 균은 활물기생균이므로 온실에서 보리 유묘로 계대배양 하면서 균주를 유지하였다. 각 화합물을 acetone 10 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 90 ml와 혼합한 후 최종농도는 100 ppm이 되도록 조정하였다.

합성물질의 예방효과에 대한 실험은 대상화합물을 경엽이 완전히 젖도록 고루 살포하고 24시간 동안 온실에서 풍건하였다. 접종원으로 사용된 보리 흰가루병원균은 10 일간 육묘된 1엽기의 보리에 계대한 뒤 7 일 뒤 형성된 분생포자를 직접 약제처리된 보리 유묘에 털어(dusting) 접종하였다. 병원균 접종후 온실로 이동하여 10-12 일간 발병을 유도하였다. 접종 후 1엽에 발생한 병반면적율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가를 구하여 약제의 효과를 비교하였다

(2) 시험결과

No.	시험약제	처리농도 (PPM)	<i>P. capsici</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>C. orbiculare</i>	<i>R. solani</i>	<i>E. graminis</i>
			4 DAT	4 DAT	14 DAT	4 DAT	13 DAT
			저지환(mm)				방제가(%)
1	Untreated	-	-	-	-	-	-
2	DBM1509	5000	7.0	0.0	0.0	0.0	19.0
3	Dimethomorph	1000	17.0	-	-	-	-
4	Dimethomorph	100	11.0	-	-	-	-
5	Dimethomorph	10	1.3	-	-	-	-
6	Fludioxonil	1000	-	20.3	-	-	-
7	Fludioxonil	100	-	20.0	-	-	-
8	Fludioxonil	10	-	14.7	-	-	-
9	Tebuconazole	1000	-	-	5.7	-	-
10	Tebuconazole	100	-	-	0.3	-	-
11	Tebuconazole	10	-	-	0.0	-	-
12	Pencycuron	1000	-	-	-	15.0	-
13	Pencycuron	100	-	-	-	10.3	-
14	Pencycuron	10	-	-	-	0.0	-
15	Azoxystrobin	50	-	-	-	-	71.4

(3) 결론

DBM1509는 다른 식물병원균(보리 흰가루병원균(*Erysiphe graminis*), 오이 탄저병원균(*Colletotrichum orbiculare*), 오이 잣빛곰팡이균(*Botrytis cinerea*), 벼 도열병원균(*Magnaporthe grisea*), 벼 문고병원균(*Rhizoctonia solani*))에 시험한 결과 특이적으로 역병에 대해서만 활성을 보였다.

마. 선도화합물 DBM1509 침투이행활성 시험

(1) 재료 및 방법

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 *Phytophthora capsici* 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 각 화합물을 acetone 10ml에 녹인 후 Tween 20 250ppm 용액 90ml와 혼합한 뒤 최종농도는 시험목적 농도가 되도록 조정하였다. 합성물질의 침투이행활성에 대한 실험은 상기의 제조된 용액을 고추 유묘의 하단에 20ml씩 분주한 후 광조건 하의 온실에 두었다. 접종원으로 사용된 고추 역병은 V-8배지(V-8 juice 200ml, CaCO<sub>3</sub>

4.5g, agar 20g, D.W 800ml)에서 7일간 배양한 균주의 기중균사를 제거한 후 24시간이 경과하면 표면에 다량의 유주자낭이 형성시킨 후 붓으로 유주자낭을 수거하여 100ppm tween 20 용액에  $10^4$  sporangia/ml의 농도로 병원균 접종액을 조제한 후 본엽 6-8엽의 작물체 잎에 고루 살포하였다. 병원균 접종후 23℃ dew chamber로 이동하여 2일간 발병을 유도시켰다. 방제효과의 산출은 접종 2-4일후 경엽에 발생한 병반면적율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가를 구하여 약제의 효과를 비교하였다.

(2) 시험결과

No.	시험약제	처리농도 (PPM)	방제가(%)
1	Untreated	-	-
2	DBM1509	200	46.1
3	DBM1509	100	30.3
4	DBM1509	50	7.9
5	Metalaxyl	200	100.0
6	Metalaxyl	100	100.0
7	Metalaxyl	50	100.0
8	Ethaboxam	200	100.0
9	Ethaboxam	100	100.0
10	Ethaboxam	50	96.6
11	Dimethomorph	200	100.0
12	Dimethomorph	100	70.8
13	Dimethomorph	50	52.8

(3) 결론

DBM1509의 침투이행활성은 개발된 역병약제들과 비교시 유의적으로 낮은 침투이행성을 확인할 수 있었다. Metalaxyl은 저항성 균주의 출현이 문제가 되었음에도 불구하고 뛰어난 침투이행활성으로 국내 및 세계에서 단일 역병 전문약제로 가장 높은 시장 점유율을 갖고 있는 약제임을 감안할 때, DBM1509의 침투이행활성을 증가시킬 수 있는 방법에 관한 연구가 필요할 것이라 판단되었다.

바. 선도화합물 DBM1509의 metalaxyl 교차저항성 시험

(1) 재료 및 방법

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 metalaxyl 감수성 *Phytophthora capsici* 균주와 2006년 고령지농업기술연구소에서 분양받은 metalaxyl 저항성 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 활성평가할 합성물질을 DMSO 4ml에 용해시킨 후 400ml PDA 배지에 목적농도에 맞게 균기전 첨가하여 petri dish에 분주하였다. PDA배지에서 7일간 배양

한 균층의 말단을 cork-borer를 이용하여 직경 6mm의 원형절편을 만들어 약제가 혼합된 배지의 중앙에 치상한 후 20℃ incubator에서 무처리구의 균사직경이 8cm 이상 배양되었을 때 평균 균사직경을 조사하였다. 방제효과와 저항성 지수는 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{방제가(\%)} = \frac{\{(\text{무처리구 균사직경}-6) - (\text{처리구 균사직경}-6)\}}{(\text{무처리구 균사직경}-6)} \times 100$$

$$\text{저항성 지수식} = \frac{\text{저항성 균주의 EC}_{50}}{\text{감수성 균주 EC}_{50}}$$

(2) 시험결과

물질명	Metalaxyl 저항성 고추역병		Metalaxyl 감수성 고추역병		저항성 지수	
	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>
DBM1509	0.663	2.890	0.093	0.813	7.1	3.6
Metalaxyl	1.381	149.634	0.125	3.172	11.0	47.2
Ethaboxam	0.880	5.196	0.115	1.861	7.7	2.8
Dimethomorph	351.199	6790.422	0.158	1.535	2220.0	4423.7

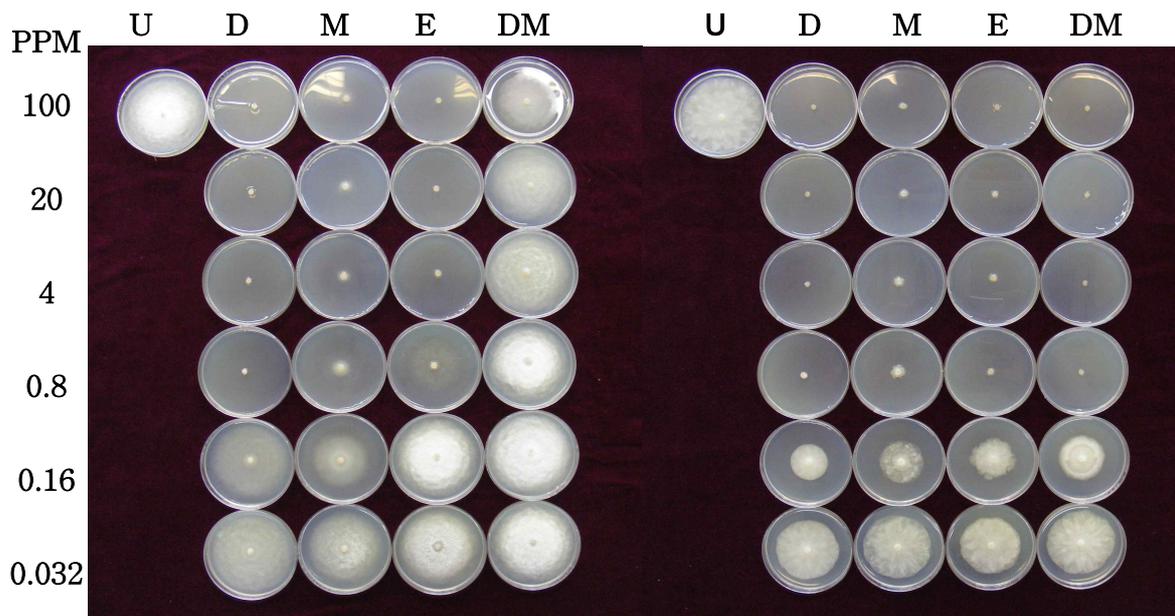


그림 3. Metalaxyl 교차저항성 확인시험결과(좌: metalaxyl 저항성 *P. capsici*, 우: metalaxyl 감수성 *P. capsici*, U: 무처리, D: DBM1509, M: Metalaxyl, E: Ethaboxam, DM: Dimethomorph)

### (3) 결론

저항성 균주에 대한 기준은 연구자마다 상이하나 Metalaxyl에 대한 저항성 검정의 경우 *in vitro* EC50값의 경우 1ppm을 기준으로 1ppm 이상이면 저항성 균주, 그 미만이면 감수성 또는 중도저항성으로 분류한다. 강원도 고령지농업연구소로부터 분양 받은 Metalaxyl 저항성 균주는 *in vitro* EC50값이 1ppm 이상이며, 감수성 균주의 EC50값과의 차이가 10배 이상인 Metalaxyl 저항성 균주임을 시험을 통해 확인하였다. 저항성 유무를 판별하기 위해서는 전 지역의 다양한 균주를 대상으로 시험해야 하지만 국내에서 역병 약제를 많이 사용하는 지역 중 한 곳인 강원도의 균주를 대표균주로 사용하였다. DBM1509는 최신 역병 전문약제인 Ethaboxam과 비등한 저항성 지수를 보임에 따라 Metalaxyl과의 교차저항성은 없는 것으로 판단되었다. Dimethomorph의 저항성은 아직 학계에 보고된 바는 없으나, 이 시험결과에 비추어 볼 때 국내 포장에서의 저항성 발현 가능성이 크다.

## 제2절 2차년도 연구내용

### 1. 고추 역병 *in vivo* 스크리닝

#### 가. 1차년도 합성 유도체의 다중농도 스크리닝

1차년도 합성한 80개 화합물(DBA3356~3374, DBA3434~DBA3472, DBA3480~3501)에 대하여 1차 스크리닝(*in vitro*)후 선발된 화합물을 2차 스크리닝(*in vivo*) 30ppm 단일농도 시험에서 95% 이상의 방제활성을 보인 8종 화합물을 선발하였다.

#### (1) 재료 및 방법

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 *P. capsici* 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 선발된 포장시험 후보물질들을 각각 acetone 10 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 90 ml와 혼합한 후 최종농도가 한 물질당 30, 15, 7.5 ppm이 되도록 조정하였다. 합성물질의 예방효과에 대한 실험은 대상화합물을 경엽이 완전히 젖도록 골고루 살포하고 24시간 동안 온실에서 풍건하여 실시하였다. 접종원으로 사용된 고추 역병(*P. capsici*)은 V-8배지(V-8 juice 200ml, CaCO<sub>3</sub> 4.5g, agar 20g, D.W 800ml)에서 7일간 배양한 균주의 기중균사를 제거한 후 24시간이 경과하면 표면에 다량의 유주자낭이 형성시킨 후 붓으로 유주자낭을 수거하여 100ppm tween 20 용액에 10<sup>4</sup> sporangia/ml의 농도로 병원균 접종액을 조제한 후 4℃로 1시간 유지하여 유주자낭에서 유주자의 유출을 최대한 유도하였다. 본엽 6-8엽의 고추 경엽에 골고루 살포하였다. 병원균 접종후 23℃ dew chamber로 이동하여 2일간 발병을 유도시켰다. 방제효과의 산출은 접종 6일후 경엽에 발생한 병반면적율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가를 구하여 약제의 효과를 비교하였다. 유의성 검정은 0.05 수준에서 Duncan's new multiple range test 로 검정하였으며, EC50, EC90값 산출은 ARM (7.2 Ver, Gylling Data Management)

프로그램을 이용하여 산출하였다.

$$\text{방제가} = (\text{무처리구 병반면적} - \text{처리구 병반면적}) / \text{무처리구 병반면적} \times 100$$

(2) 시험결과

시험약제	처리농도 (ppm)	방제가 (%)	EC50	EC90	Dimethomorph 대비 활성비교
DBA3460	30	100	3.23	7.73	우수
	15	100			
	7.5	88.9			
DBA3461	30	94.4	1.69	15.13	비등
	15	92.2			
	7.5	79.6			
DBA3463	30	98.1	4.16	17.68	비등
	15	83.3			
	7.5	72.2			
DBA3484	30	96.3	4.90	20.23	비등
	15	81.5			
	7.5	66.7			
DBA3486	30	100	5.07	11.03	비등
	15	96.3			
	7.5	74.1			
DBA3491	30	88.9	8.02	33.00	열등
	15	70.4			
	7.5	48.1			
DBA3492	30	40.7	41.88	461.72	열등
	15	33.3			
	7.5	0			
DBA3495	30	0	-	-	열등
	15	0			
	7.5	0			

(3) 결론

시험결과 *in vivo* EC50, EC90값을 기준으로 Dimethomorph와 비등하거나 우수하다고 판단되는 물질 5종(DBA3460, DBA3461, DBA3463, DBA3484, DBA3486)을 선발하였다.

나. 1차년도 Library에서 선발된 화합물의 다중농도 스크리닝

(1) 재료 및 방법

상기 *in vivo* 다중농도 스크리닝법 참조

(2) 시험결과

시험약제	처리농도 (ppm)	방제가 (%)	EC50	EC90	Dimethomorph 대비 활성비교
DBM1285	30	100	4.86	12.98	비등
	15	92			
	7.5	72			
DBM1311	30	98	4.85	25.90	열등
	15	72			
	7.5	68			
DBM1347	30	100	4.27	23.45	열등
	15	80			
	7.5	68			
DBM1359	30	84	4.76	53.18	열등
	15	72			
	7.5	60			
DBM1396	30	100	5.55	18.04	비등
	15	84			
	7.5	64			
DBM1400	30	96	2.86	21.66	열등
	15	80			
	7.5	76			
DBM1480	30	80	7.20	69.52	열등
	15	64			
	7.5	52			
DBM1481	30	96	7.21	27.04	열등
	15	68			
	7.5	56			
DBM1493	30	98	6.89	19.49	비등
	15	80			
	7.5	56			
DBM1630	30	92	3.72	24.07	열등
	15	84			
	7.5	68			
DBM1706	30	88	3.98	34.00	열등
	15	80			
	7.5	64			

시험약제	처리농도 (ppm)	방제가 (%)	EC50	EC90	Dimethomorph 대비 활성비교
DBM1713	30	100	1.69	12.59	비등
	15	90			
	7.5	84			
DBM1727	30	100	1.43	54.37	열등
	15	76			
	7.5	74			
DBM1351	30	92	7.66	30.80	열등
	15	68			
	7.5	52			
DBM1357	30	96	15.09	26.88	열등
	15	44			
	7.5	8			
DBM1395	30	100	3.81	9.08	우수
	15	98			
	7.5	84			
DBM1399	30	100	4.78	10.01	열등
	15	98			
	7.5	78			
DBM1402	30	52	29.16	60.21	열등
	15	12			
	7.5	0			
DBM1419	30	86	9.99	41.25	열등
	15	60			
	7.5	42			
DBM1437	30	92	5.12	33.54	열등
	15	70			
	7.5	64			
DBM1442	30	94	7.08	29.16	비등
	15	68			
	7.5	56			
DBM1443	30	96	7.42	29.68	비등
	15	64			
	7.5	56			
DBM1466	30	80	11.29	49.58	열등
	15	60			
	7.5	36			
DBM1497	30	92	5.70	27.92	비등
	15	76			
	7.5	60			
DBM1509	30	99.6	6.55	12.07	비등
	15	98			
	7.5	60			

시험약제	처리농도 (ppm)	방제가 (%)	EC50	EC90	Dimethomorph 대비 활성비교
DBM1638	30	88	8.91	34.32	열등
	15	68			
	7.5	44			
DBM1648	30	94	13.13	33.35	열등
	15	44			
	7.5	28			
DBM1649	30	94	11.61	21.59	비등
	15	84			
	7.5	12			
DBM1652	30	88	4.82	31.05	열등
	15	82			
	7.5	60			
DBM1662	30	92	8.68	27.45	비등
	15	72			
	7.5	44			
DBM1666	30	86	6.97	38.90	열등
	15	72			
	7.5	52			
DBM1667	30	100	4.04	55.36	열등
	15	70			
	7.5	64			
DBM1723	30	94	6.92	21.48	비등
	15	84			
	7.5	52			
DBM1767	30	100	0.45	2.56	우수
	15	100			
	7.5	98			
Dimethomorph (대조)	30	100	5.07	24.87	-
	15	78			
	7.5	64			

(3) 결론

시험결과 *in vivo* EC50, EC90값을 기준으로 Dimethomorph와 비등하거나 우수하다고 판단되는 물질 13종 (DBM1285, 1396, 1493, 1713, 1442, 1443, 1497, 1649, 1662, 1723, 1395, 1399, 1767)을 선발하였다.

다. 포장시험화합물 최종선발시험을 위한 다중농도 시험(강스크리닝 조건)

(1) 재료 및 방법

상기 *in vivo* 다중농도 스크리닝법과 동일하며 접종원의 농도를 기존의  $10^4$  sporangia/ml 에서 10배 증가시킨  $10^5$  sporangia/ml 농도로 접종하여 시험을 실시하였다.

(2) 시험결과

시험약제	처리농도 (ppm)	방제가 (%)	EC50	EC90	EC50/EC90	logP
DBM1767	30	63.9	24.45	64.80	0.17	2.73
	15	19.4				
	7.5	8.3				
DBA3460	30	52.8	31.40	198.63	0.41	3.15
	15	22.2				
	7.5	19.4				
DBM1395	30	44.4	38.11	143.51	0.42	3.03
	15	11.1				
	7.5	8.3				
DBM1766	30	94.4	9.86	23.38	0.33	2.31
	15	75.0				
	7.5	33.3				
DBM1399	30	50.0	33.15	159.61	0.47	3.24
	15	19.4				
	7.5	13.9				
DBA3486	30	95.3	6.77	22.66	0.45	3.24
	15	77.8				
	7.5	55.6				
DBM1509 (내부대조)	30	66.7	17.19	97.90	0.17	3.15
	15	44.4				
	7.5	27.8				
Dimethomorph (대조)	30	88.6	11.91	32.12	0.37	2.63 (E) 2.73 (Z)
	15	61.1				
	7.5	27.8				
Mandipropamid (대조)	30	100.0	3.95	10.34	0.38	3.2
	15	95.8				
	7.5	80.6				

(3) 결론

Dimethomorph 30ppm에서 88% 정도의 방제가가 나올 정도의 강스크리닝 조건이었으며, 이 조건하에서도 DBM1766과 DBA3486의 방제활성이 Dimethomorph보다 우수하였다. 강스크리닝 조건하에서도 활성의 큰 산포를 보이지 않은 DBM1766과 DBA3486을 포장시험 물질로 최종 선발하였다.

2. 포장시험화합물 제형 최적화

가. 포장 후보물질 DBM1766, DBA3486 12.5% WP에 대한 최적 부제 선발시험

포장시험 후보물질은 약효평가가 용이한 수화제(WP) 제형으로 결정하였으며, 포장시험 농도와 희석배수를 감안하여 12.5%로 제제를 결정였고 약효 증진을 위해 18종의 전착제에 대한 선발시험을 수행하였다.

(1) 재료 및 방법

상기 *in vivo* 스크리닝법과 동일

(2) 시험결과

시험약제	처리농도 (ppm)	방제가 (%)	시험약제	처리농도 (ppm)	방제가 (%)
DBM1285	15	63.3	DBM1285	15	53.3
SOF70	250		EHE100	250	
DBM1285	15	63.3	DBM1285	15	66.7
QTO	250		OP6	250	
DBM1285	15	73.3	DBM1285	15	76.7
NK-PP620	250		LAM7	250	
DBM1285	15	60.0	DBM1285	15	70.0
RPE8020	250		LPE238	250	
DBM1285	15	80.0	DBM1285	15	70.0
TDE-7	250		LPE222	250	
DBM1285	15	83.3	DBM1285	15	60.0
LE-9	250		FS-25	250	
DBM1285	15	83.3	DBM1285	15	66.7
PLE5	250		Surfynol 2502	250	
DBM1285	15	80.0	DBM1285	15	80.0
CE-12	250		SM3420P-1	250	
DBM1285	15	76.7	DBM1285	15	76.7
Tween 20	250		CET10L TN-1	250	
DBM1285	15	70.0			

(3) 결론

18종 부제는 0~13%의 활성증진효과를 보였으며 그 중 LE-9, PLE5가 유의적으로 가장 우수한 증진효과를 나타내었다. LE-9와 PLE5중 용해도가 상대적으로 우수한 PLE5를 최적용매로 선발하였다.

### 3. 선발화합물 포장시험

#### 가. 고추 역병 포장시험

(1) 재료 및 시험법

최종 포장시험 후보물질로 선발된 DBM1766과 DBA3486을 12.5% WP로 제제한 후 250 ppm, 125 ppm의 농도로 희석하여 압출식 25L 동력분무기(MaruYama)로 장마직전부터 10일 간격 4회 경엽처리 하였다. 역병 감수성 품종인 부자품종의 고추를 정식하였고 난과법 3반복으로 포장설계하여 시험하였다. 시험포장은 경기도 화성시 정남면에 위치한 동부농업기술연구소의 인공접종이 필요없는 상습발병포장이나 시험대상병해가 토양성 병해인 고추 역병(*P. capsici*)임을 감안하여 약제처리전 1회 고추 지체부에 25L 동력분무기를 이용하여 1x10<sup>4</sup> sporangia/ml 농도로 인공접종하였다. 결과조사는 최종약제 살포 10일 후 실시하였으며 전체주수에 대한 이병주수의 비율인 이병주율을 조사하여 방제가를 산출하였다.

$$\text{방제가(\%)} = (\text{무처리 이병주율} - \text{처리구 이병주율}) / \text{무처리구 이병주율} \times 100$$

(2) 시험결과

시험약제	함량 (%)	희석 배수	PPM	이병주율 (%)	방제가 (%)
Untreated	-	-	-	93.9	-
DBM 1766 WP	12.5	500배	250	55.3	41.1
DBM 1766 WP	12.5	1,000배	125	72.0	23.3
DBA 3486 WP	12.5	500배	250	76.0	19.0
DBA 3486 WP	12.5	1,000배	125	73.0	22.2
Azoxystrobin SC (대조)	20	2,000배	100	45.1	51.9
Mandipropamid SC (대조)	21.8	2,000배	109	8.2	91.3
Dimethomorph WP (대조)	25	1,000배	250	37.8	59.8
Cyazofamid SC (대조)	10	1,500배	67	9.6	89.8

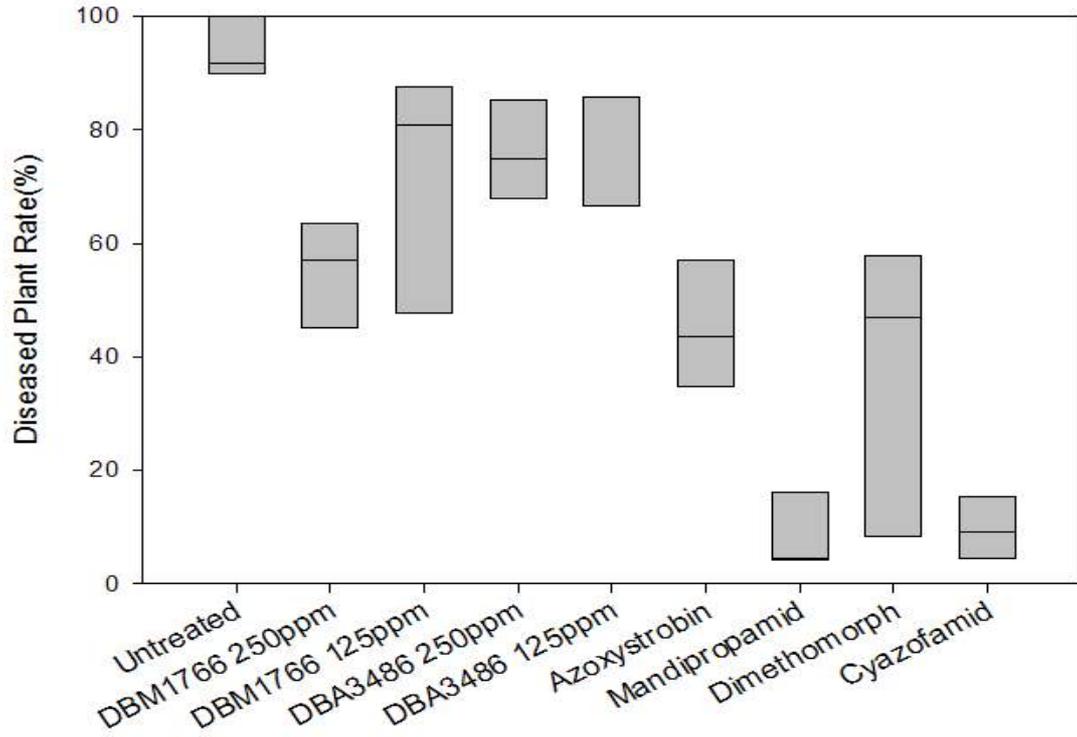


그림 4. 고추 역병에 대한 후보물질의 포장시험 결과 Box-plot



그림 5. DBM1766, DBA3486 고추 역병 포장시험 결과  
(A: 무처리, B: DBM1766 250ppm, C: DBA3486 250ppm, D: Cyazofamid 67ppm)

(3) 결론

무처리 이병주율이 93.9%로 포장의 발병상황이 매우 양호하였다. DBM1766이 DBA3486보다 포장에서의 활성이 우수한 것으로 판단되나, DBM1766도 Dimethomrph 활성의 3/4 수준으로 대조물질보다는 방제활성이 낮았다.

나. 포도 노균병 포장시험

(1) 재료 및 시험법

최종 포장시험 후보물질로 선발된 DBM1766과 DBA3486을 12.5% WP로 제제한 후 250 ppm, 125 ppm의 농도로 희석하여 압출식 25L 동력분무기(MaruYama)로 발병초부터 10일 간격 3회 경엽처리 하였다. 경기도 안성에 위치한 포도 생산단지내의 노균병 감수성 품종인 거봉 포장에서 난괴법 3반복으로 설계하여 시험하였다. 결과조사는 최종약제 살포 10일 후 실시하였으며 방제효과의 산출은 전체 엽수에 대한 발병엽수의 비율인 이병엽율로 방제가를 산출하였다.

$$\text{방제가(\%)} = (\text{무처리 이병엽율} - \text{처리구 이병엽율}) / \text{무처리구 이병엽율} \times 100$$

(2) 시험결과

시험약제	함량 (%)	희석 배수	PPM	이병엽율 (%)	방제가 (%)
Untreated	-	-	-	21.3	-
DBA1766 WP	12.5	500배	250	8.1	62.1
DBA1766 WP	12.5	1,000배	125	11.8	44.5
DBM3486 WP	12.5	500배	250	11.9	44.0
DBM3486 WP	12.5	1,000배	125	13.3	37.4
Cyazofamid SC(대조)	10	2,000배	50	3.7	82.6

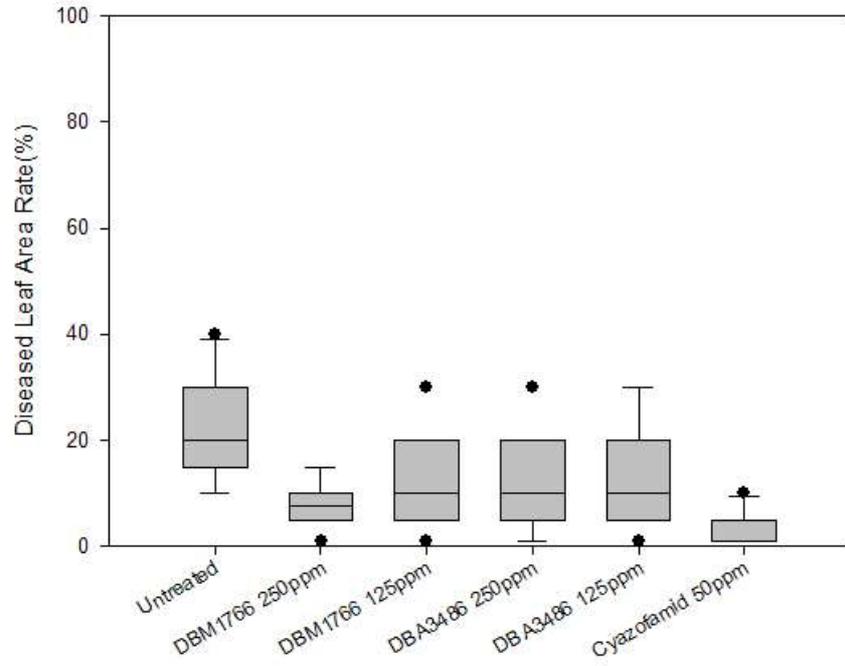


그림 6. 포도 노균병 포장시험 결과 Box Plot



그림 7. DBM1766, DBA3486 포도 노균병 포장시험 결과  
(A: 무처리, B: DBM1766 250ppm, C: DBA3486 250ppm, D: Cyazofamid 50ppm)

(3) 결론

무처리 이병엽율이 21.3%로 방제활성 평가에 충분하였다. DBM1766의 활성이 DBA3486보다 우수하였으며 DBM1766 250ppm에서 62.1%의 방제활성을 나타내었다. 이는 대조 Cyazopamid 10 SC 활성의 3/4 수준이었다.

다. 메론 노균병 포장시험

(1) 재료 및 시험법

최종 포장시험 후보물질로 선발된 DBM1766과 DBA3486을 12.5% WP로 제제한 후 250 ppm, 125 ppm의 농도로 희석하여 압출식 25L 동력분무기(MaruYama)로 발병초부터 10일 간격 3회 경엽처리 하였다. 시험포장은 대전 동부기술원에 있는 대형온실의 상습발병포장을 이용하였으며 난괴법 3반복으로 설계하여 시험하였다. 결과조사는 최종약제 살포 10일 후 실시하였으며 방제가는 병반면적율을 조사한 후 발병도로 환산하여 산출하였다.

$$\text{방제가}(\%) = (\text{무처리구 발병도} - \text{처리구 발병도}) / \text{무처리구 발병도} \times 100$$

(2) 시험결과

시험약제	함량 (%)	희석 배수	PPM	발병도 (%)	방제가 (%)
Untreated	-	-	-	10.7	-
DBM1766	12.5	500	250	3.7	65.63
DBM1766	12.5	1,000	125	5.0	53.13
DBA3486	12.5	500	250	5.7	46.88
DBA3486	12.5	1,000	125	7.0	34.38
Dimethomorph WP(대조)	25	1,000	250	3.0	71.88
Azoxystrobin SC(대조)	20	2,000	100	4.3	59.38
Mandipropamid SC(대조)	21.8	2,000	109	1.0	90.63
Cyazofamid SC(대조)	10	2,000	50	0.7	93.75

(3) 결론

메론 노균병 시험의 최소요구 발병도 15%로 시험포장의 발병상황은 무처리 발병도가 10.7%로 충분하지는 않았다. DBA3486보다는 DBM1766의 활성이 더 높았으며 DBM1766 250ppm에서 65.6%로 Dimethomorph활성의 4/5 수준의 방제 활성을 나타내었다. 낮은 발병도로 DBA3486과 DBM1766처리구의 반복간 오차가 심한 편이었으나 대조물질인 Mandipropamid와 Cyazofamid 처리구에서는 반복간 오차가 적었으며 방제가도 90%이상으로 우수하게 나타났다.

## 4. 기초독성시험

### 가. 급성경구독성시험

#### (1) 재료 및 시험법

입수한 실험동물(ICR mice, 4 주령, 암컷)을 1주일간 순화시킨 후 5주령시 건강한 개체를 선발, 분리하였다. 2마리를 1개 군으로 하여 꼬리에 일련번호를 표시하고 투여개시 3시간 전부터 시험물질을 투여후 2시간 동안 먹이를 주지 않았다. 시험물질은 Corn Oil을 용매로 사용하여 막자사발에 충분히 갈아 현탁시켜 사용하였다. 마우스용 경구투여주사침을 이용하여 체중측정치를 기준으로 소정의 시험물질 조제액량을 산출한 후 경구투여경로를 이용, 위내에 1회 한하여 강제투여하였다. 처리당일은 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 다음날부터는 1일 1회 일반중독증상 및 치사개체를 7일간 관찰하였다.

#### (2) 시험결과

DBM1766 2,000 mg/Kg 1회 투여시 치사개체 없었음

Globally Harmonized Classification System의 Category 5에 해당

※GHS Category 5 : 반수치사량이 2,000~5,000 mg/Kg으로 음독시 유해할 가능성이 있는 물질, Category 중 가장 안전한 등급의 물질임.

DBA3486 2,000 mg/kg 1회 투여시 1일차에 모두 폐사하여, 2차로 300mg/kg 1회투여시 치사개체 없었음

Globally Harmonized Classification System의 Category 4에 해당

※GHS Category 4 : 반수치사량이 300~2,000 mg/Kg으로 음독시 유해한 물질임.

#### (3) 결론

두 물질 모두 GHS Category 4 이상에 해당하는 저독성 물질로 나타났으며 DBM1766가 DBA3486에 비해 상대적으로 안전했다.

### 나. 어독성 시험

#### (1) 재료 및 시험법

시험에 필요한 3~5cm의 잉어(*Cyprinus carpio*)를 시험 4일전부터 독성시험에 사용할 물과 같은 수질의 물에 순화시켰다. 순화기간동안 에어펌프로 공기를 계속 공급해 주었으며 먹이는 시험시작 24시간 전까지 1일 1회 공급하였다. 광조사는 14시간으로 하되, 수온은 사육적온범위인 21~25℃를 유지하였다. 시험농도는 10ppm의 1개 농도를 설정하였으며 시험어 수는 각 군당 10마리씩 사용하였다. 시험물질 0.1020g을 칭량한 후 1ml의 acetone에 잘 녹인 후 10L의 시험용수에 직접 처리후 교반하였다. 약제처리후 3시간, 6시간, 24시간 간격으로 96시간까지 관찰하였다. 형태이상, 유영이상, 출혈 등의 중독증상과 치사개체수를 관찰하였다.

(2) 시험결과

시험약제	농도 (mg/L)	시험 생물수 (마리)	치사수(마리)					치사율(%)	
			6h	24h	48h	72h	96h	48h	96h
음성대조구	0	10	0	0	0	0	0	0	0
DBM1766 Tech	10	10	0	0	0	3	5	0	50
DBA3486 Tech	10	10	10	10	10	10	10	100	100

(3) 결론

DBM1766이 DBA3486에 비해 상대적으로 안전한 물질로 판단되며 LC50이 약 10ppm임

5. 신규 유도체 합성

2차년도 포장시험결과 대조약제보다 낮은 방제활성을 나타내었다. 온실시험에서는 대조약제와 활성이 비등/우수하였으나 포장에서 저조한 결과를 보인 원인이 침투이행성 부족에 의한 것으로 사료되어 침투이행성을 증진시키고자 유도체를 합성하였다.

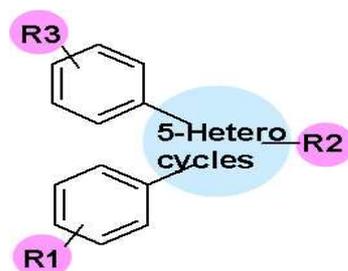


그림 8. 모핵의 구조

가. R1 part 최적화 유도체(34종)

DBA3526, DBA3527, DBA3528, DBA3529, DBA3530, DBA3531, DBA3532, DBA3533, DBA3534, DBA3535, DBA3536, DBA3537, DBA3538, DBA3539, DBA3540, DBA3541, DBA3542, DBA3543, DBA3555, DBA3556, DBA3557, DBA3558, DBA3559, DBA3570, DBA3571, DBA3572, DBA3573, DBA3574, DBA3575, DBA3576, DBA3577, DBA3578, DBA3579, DBA3580

나. R3 part 최적화 유도체(5종)

DBA3560, DBA3561, DBA3562, DBA3563, DBA3564

다. R2 + R3 part 최적화 유도체(23종)

DBA3565, DBA3566, DBA3567, DBA3568, DBA3569, DBA3581, DBA3582, DBA3583, DBA3584, DBA3585, DBA3586, DBA3587, DBA3588, DBA3589, DBA3590, DBA3591, DBA3592, DBA3593, DBA3594, DBA3595, DBA3596, DBA3597, DBA3598

### 제3절 3차년도 연구내용

#### 1. 고추 역병 스크리닝

가. 2차년도 합성 유도체의 *in vitro* 스크리닝

##### (1) 재료 및 방법

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 *Phytophthora capsici* 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 활성평가를 하고자하는 합성물질 5mg을 acetone 1ml에 용해시켜 5000ppm이 되도록 제조한 후 이 용액을 지름 6mm인 paper disc(Avantec) 3개에 각각 15 $\mu$ l씩 점적한 뒤 1시간동안 clean-bench에서 풍건시켰다. 합성물질이 담긴 paper disc를 PDA(Difco) 배지에 증양을 기준으로 12시, 4시, 8시 방향으로 각각 2.5cm 떨어진 지점에 치상한 후 V-8배지(V-8 juice 200ml, CaCO<sub>3</sub> 4.5g, agar 20g, D.W 800ml)에서 7일간 배양한 균주를 증양에 치상하여 20 $^{\circ}$ C incubator에서 4-5일 배양한 뒤 형성된 저지원의 최소반경(mm)을 측정하였다(Paper Disc Method).

##### (2) 시험결과

시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)
DBA3526	0.0	DBA3541	2.0	DBA3567	0.0
DBA3527	0.0	DBA3542	3.0	DBA3568	0.0
DBA3528	0.0	DBA3543	1.7	DBA3569	0.0
DBA3529	0.0	DBA3555	2.0	DBA3570	12.3
DBA3530	0.0	DBA3556	2.0	DBA3571	0.0
DBA3531	0.0	DBA3557	0.3	DBA3572	0.0
DBA3532	0.0	DBA3558	3.3	DBA3573	0.3
DBA3533	0.0	DBA3559	3.0	DBA3574	0.0
DBA3534	0.0	DBA3560	0.0	DBA3575	17.0
DBA3535	0.0	DBA3561	0.0	DBA3576	11.0
DBA3536	0.0	DBA3562	0.0	DBA3577	3.0
DBA3537	0.0	DBA3563	0.0	DBA3578	0.0
DBA3538	0.0	DBA3564	0.0	DBA3579	7.3
DBA3539	0.0	DBA3565	0.0	DBA3580	13.7
DBA3540	0.7	DBA3566	0.0	DBA3581	1.0
DBA3582	15.0	DBA3588	0.0	DBA3594	0.0
DBA3583	14.7	DBA3589	0.0	DBA3595	0.3
DBA3584	0.7	DBA3590	0.0	DBA3596	0.7
DBA3585	0.7	DBA3591	4.3	DBA3597	0.0
DBA3586	0.7	DBA3592	0.0	DBA3598	0.0
DBA3587	0.7	DBA3593	0.0		

(3) 결론

시험결과 저지환 10mm 이상을 형성시켜 활성이 우수하다고 판단되는 물질 6종 (DBA3570, DBA3575, DBA3576, DBA3580, DBA3582, DBA3583)을 선발하였다.

나. 포장시험화합물 선발을 위한 다중농도 시험(강스크리닝 조건)

(1) 재료 및 방법

2004년 농업과학기술원에서 분양받은 *P. capsici* 균주를 계대배양하며 접종원으로 사용하였다. 선발된 포장시험 후보물질들을 각각 acetone 10 ml에 녹인 후 Tween 20 250 ppm 용액 90 ml와 혼합한 후 최종농도가 한 물질당 30, 15, 7.5 ppm이 되도록 조정하였다. 합성물질의 예방효과에 대한 실험은 대상화합물을 경엽이 완전히 젖도록 골고루 살포하고 24시간 동안 온실에서 풍건하여 실시하였다. 접종원으로 사용된 고추 역병(*P. capsici*)은 V-8배지(V-8 juice 200ml, CaCO<sub>3</sub> 4.5g, agar 20g, D.W 800ml)에서 7일간 배양한 균주의 기중균사를 제거한 후 24시간이 경과하면 표면에 다량의 유주자낭이 형성시킨 후 붓으로 유주자낭을 수거하여 100ppm tween 20 용액에 10<sup>5</sup> sporangia/ml의 농도로 병원균 접종액을 조제한 후 4℃로 1시간 유지하여 유주자낭에서 유주자의 유출을 최대한 유도하였다. 본엽 6-8엽의 고추 경엽에 골고루 살포하였다. 병원균 접종후 23℃ dew chamber로 이동하여 2일간 발병을 유도시켰다. 방제효과의 산출은 접종 6일후 경엽에 발생한 병반면적율을 조사하여 약제를 처리하지 않은 무처리구에 대한 방제가를 구하여 약제의 효과를 비교하였다. 유의성 검정은 0.05 수준에서 Duncan's new multiple range test 로 검정하였으며, EC50, EC90값 산출은 ARM (7.2 Ver, Gylling Data Management) 프로그램을 이용하여 산출하였다.

방제가=(무처리구 병반면적율-처리구 병반면적율)/무처리구 병반면적율 x 100

(2) 시험결과

시험약제	처리농도 (ppm)	방제가 (%)	EC50	EC90	Dimethomorph 대비 활성비교
Untreated	-	-	-	-	-
DBA3570	120	100.0	1.74	10.89	비등
	60	100.0			
	30	100.0			
	15	90.9			
	7.5	86.4			
DBA3575	120	100.0	58.34	79.93	열등
	60	54.5			
	30	0.0			
	15	0.0			
	7.5	0.0			
DBA3576	120	100.0	2.02	16.84	열등
	60	100.0			
	30	93.2			
	15	88.6			
	7.5	79.5			
DBA3580	120	100.0	2.02	98.35	열등
	60	86.4			
	30	75.0			
	15	84.1			
	7.5	63.6			
DBA3582	120	100.0	1.62	31.51	열등
	60	95.5			
	30	86.4			
	15	81.8			
	7.5	77.3			
DBA3583	120	100.0	9.85	26.49	열등
	60	97.7			
	30	90.9			
	15	86.4			
	7.5	27.3			
Dimethomorph	120	100.0	1.06	7.15	-
	60	100.0			
	30	100.0			
	15	95.5			
	7.5	90.9			

(3) 결론

시험결과 *in vivo* EC50, EC90 값을 기준으로 Dimethomorph와 비등하거나 우수하다고 판단되는 물질 1종(DBA3570)을 선발하였다.

## 2. 포장시험

### 가. 고추 역병 포장시험

#### (1) 재료 및 시험법

최종 포장시험 후보물질로 선발된 DBA3570을 12.5% WP로 제제한 후 250 ppm, 125 ppm의 농도로 희석하여 압출식 25L 동력분무기(MaruYama)로 장마직전부터 10일 간격 4회 경엽처리 하였다. 역병 감수성 품종인 부자품종의 고추를 정식하였고 난괴법 3반복으로 포장설계하여 시험하였다. 시험포장은 경기도 화성시 정남면에 위치한 동부농업기술연구소의 인공접종이 필요없는 상습발병포장이나 시험대상병해가 토양성 병해인 고추 역병 (*P. capsici*)임을 감안하여 약제처리전 1회 고추 지체부에 25L 동력분무기를 이용하여  $1 \times 10^4$  sporangia/ml 농도로 인공접종하였다. 결과조사는 최종약제 살포 10일 후 실시하였으며 전체주수에 대한 이병주수의 비율인 이병주율을 조사하여 방제가를 산출하였다.

$$\text{방제가(\%)} = (\text{무처리 이병주율} - \text{처리구 이병주율}) / \text{무처리구 이병주율} \times 100$$

#### (2) 시험결과

시험약제	함량 (%)	희석 배수	PPM	이병주율 (%)	방제가 (%)
Untreated	-	-	-	50.5	-
DBA 3570 WP	12.5	500배	250	18.5	63.4
DBA 3570 WP	12.5	1,000배	125	28.0	44.6
Azoxystrobin SC (대조)	20	2,000배	100	7.5.0	85.1
Mandipropamid SC (대조)	21.8	2,000배	109	3.5	93.1
Dimethomorph WP (대조)	25	1,000배	250	5.0	90.1
Cyazofamid SC (대조)	10	1,500배	67	2.5	95.0

#### (3) 결론

무처리 이병주율이 50.5%로 포장의 발병상황이 예년에 비해 다소 낮았다. DBA3570의 방제활성은 250ppm에서 63.4%, 125ppm에서 44.6%로 조사되었으며, 250ppm 처리시 활성을 대조약제와 비교하면 대조약제 활성의 2/3~4/5 수준으로 대조물질보다는 방제활성이 낮았다.

### 나. 포도 노균병 포장시험

#### (1) 재료 및 시험법

최종 포장시험 후보물질로 선발된 DBA3570을 12.5% WP로 제제한 후 250 ppm, 125 ppm의 농도로 희석하여 압출식 25L 동력분무기(MaruYama)로 발병초부터 10일 간격 3회 경엽처리 하였다. 경기도 안성에 위치한 포도 생산단지내의 노균병 감수성 품종인 거봉 포장에서 난괴법 3반복으로 설계하여 시험하였다. 결과조사는 최종약제 살포 10일 후

실시하였으며 방제효과의 산출은 전체 엽수에 대한 발병엽수의 비율인 이병엽율로 방제가를 산출하였다.

$$\text{방제가(\%)} = (\text{무처리 이병엽율} - \text{처리구 이병엽율}) / \text{무처리구 이병엽율} \times 100$$

## (2) 시험결과

시험약제	함량 (%)	희석배수	PPM	이병엽율 (%)	방제가 (%)
Untreated	-	-	-	11.0	-
DBA3570 WP	12.5	500배	250	3.5	68.3
DBA3570 WP	12.5	1,000배	125	7.5	31.2
Dimethomorph WP(대조)	25	1,000배	250	0.5	95.7
Cyazofamid SC(대조)	10	2,000배	50	0.3	97.0



그림 9. DBA3570 포도 노균병 포장시험 결과  
(A: 무처리, B: DBA3570 250ppm, C: DBA3570 125ppm, D: Cyazofamid 50ppm)

## (3) 결론

무처리 이병엽율이 11.0%로 예년보다 발병율이 낮았고, 무처리 최소발병율인 15%보다도 낮아 방제활성 평가에 병발생이 충분하지는 않았다. DBA3570은 250ppm에서 68.3%, 125ppm에서 31.2%의 방제활성을 나타내었으며 이는 대조 Cyazopamid 10 SC 활성의 약 3/4 수준이었다.

### 3. 기초독성시험

#### 가. 급성경구독성시험

##### (1) 재료 및 시험법

입수한 실험동물(ICR mice, 4 주령, 암컷)을 1주일간 순화시킨 후 5주령시 건강한 개체를 선발, 분리하였다. 2마리를 1개 군으로 하여 꼬리에 일련번호를 표시하고 투여개시 3시간 전부터 시험물질을 투여후 2시간 동안 먹이를 주지 않았다. 시험물질은 Corn Oil을 용매로 사용하여 막자사발에 충분히 갈아 현탁시켜 사용하였다. 마우스용 경구투여주사침을 이용하여 체중측정치를 기준으로 소정의 시험물질 조제액량을 산출한 후 경구투여경로를 이용, 위내에 1회 한하여 강제투여하였다. 처리당일은 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 다음날부터는 1일 1회 일반중독증상 및 치사개체를 7일간 관찰하였다.

##### (2) 시험결과

마우스를 이용하여 DBA3570를 2,000mg/kg 용량으로 급성경구 단회 투여하였다. 치사수가 없어서 OECD 가이드라인에 근거하여 2차적으로 2,000mg/kg 투여용량으로 반복실험을 실시하여야 했지만, 치사수가 전혀 관찰되지 않는 점으로 보아 마우스를 이용한 DBA3570의 급성경구는 OECD TG 423(2001) 근거에 의한 Globally Harmonized Classification system 으로 분류시 Category 5 (>2,000 ~ 5,000mg/kg b.w) 로 예상된다.

##### (3) 결론

GHS Category 5는 반수치사량이 2,000~5,000 mg/Kg으로 음독시 유해할 가능성이 있는 물질이며 Category 중 가장 안전한 등급으로 DBA3570의 급성경구독성은 낮은 것으로 판단된다.

#### 나. 어독성 시험

##### (1) 재료 및 시험법

본 시험은 DBA3570의 송사리(*Oryzias latipes*)에 대한 급성독성 경향을 파악하고자 실시하였다. DBA3570 (순도 95% , Lot no. NTM10003)을 각각 0.0053, 0.0211, 0.1053 g 칭량하여 1ml 의 DMF에 녹여 working stock을 조제하였다. 조제한 working stock을 10 L 시험용수에 넣고 충분히 혼합하여 0.5, 2.0, 10.0 mg/L 의 시험용액을 준비하였다. 시험용액 조제 시 최고농도인 10.0 mg/L 군은 시험물질의 석출이 관찰되어 시험을 진행하지 않았다. 시험생물은 음성대조군과, 시험군에 각각 7마리씩 사용하였다.

(2) 시험결과

시험농도 (mg/L)	3 hr		48 hr		96 hr	
	치사수 (치사수 /노출수)	이상 증상	누적 치사수 (치사수 /노출수)	이상 증상	누적치사수 (치사수 /노출수)	이상 증상
Control	0 / 7	NOR <sup>a</sup>	0 / 7	NOR	0 / 7	NOR
0.5	0 / 7	NOR	1 / 7	SUR <sup>b</sup> 1 LOE <sup>c</sup> 1	7 / 7	NA
2.0	0 / 7	NOR	7 / 7	NA <sup>d</sup>	7 / 7	NA

<sup>a</sup> NOR : Normal

<sup>b</sup> SUR : Fish mainly at the surface

<sup>c</sup> LOE : Loss of equilibrium.

<sup>d</sup> NA : Not available

(3) 결론

시험결과, DBA3570의 48시간 및 96시간 반수치사농도(LC50)는 0.5 mg/L이하일 것으로 추정된다.

#### 4. 신규 유도체 합성

##### 가. 신규 유도체 합성

3차년도 포장시험결과 대조약제보다 낮은 방제활성과 어독성이 관찰되었다. 따라서 방제활성을 높이고 어독성을 감소시키고자 유도체를 합성하였다.

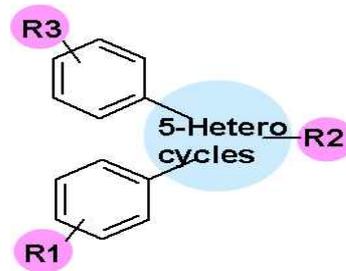


그림 10. 모핵의 구조

##### (1) R2 + R3 part 최적화 유도체(92종)

DBA3599, DBA3600, DBA3601, DBA3602, DBA3603, DBA3604, DBA3605, DBA3606,  
DBA3607, DBA3608, DBA3609, DBA3610, DBA3611, DBA3612, DBA3613, DBA3614,  
DBA3615, DBA3616, DBA3617, DBA3618, DBA3619, DBA3620, DBA3621, DBA3622,  
DBA3623, DBA3624, DBA3625, DBA3626, DBA3627, DBA3628, DBA3629, DBA3630,  
DBA3631, DBA3632, DBA3633, DBA3634, DBA3635, DBA3636, DBA3637, DBA3638,  
DBA3639, DBA3640, DBA3641, DBA3642, DBA3643, DBA3644, DBA3645, DBA3646,  
DBA3647, DBA3648, DBA3649, DBA3650, DBA3651, DBA3652, DBA3653, DBA3654,  
DBA3655, DBA3656, DBA3657, DBA3658, DBA3659, DBA3660, DBA3661, DBA3662,  
DBA3663, DBA3664, DBA3665, DBA3666, DBA3667, DBA3668, DBA3669, DBA3670,  
DBA3671, DBA3672, DBA3673, DBA3674, DBA3675, DBA3676, DBA3677, DBA3678,  
DBA3679, DBA3680, DBA3681, DBA3682, DBA3683, DBA3684, DBA3685, DBA3686,  
DBA3687, DBA3688, DBA3689, DBA3690

나. 고추 역병 *in vitro* 스크리닝

(1) 재료 및 방법

상기 고추 역병 *in vitro* 스크리닝 방법과 동일하게 실시함

(2) 시험결과

시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)	시험약제	저지원 최소반경 (mm)
DBA3599	1.3	DBA3633	0.0	DBA3668	0.0
DBA3600	1.3	DBA3634	5.0	DBA3669	5.3
DBA3601	0.0	DBA3635	12.0	DBA3670	4.7
DBA3602	8.8	DBA3636	0.0	DBA3671	10.3
DBA3603	9.0	DBA3637	1.0	DBA3672	12.3
DBA3604	0.0	DBA3638	0.0	DBA3673	0.0
DBA3605	9.0	DBA3639	0.3	DBA3674	0.0
DBA3606	12.3	DBA3640	0.0	DBA3675	9.0
DBA3607	0.0	DBA3641	1.0	DBA3676	0.0
DBA3608	9.0	DBA3642	8.0	DBA3677	6.7
DBA3609	9.0	DBA3643	0.7	DBA3678	0.0
DBA3610	2.7	DBA3644	0.0	DBA3679	10.0
DBA3611	0.0	DBA3645	15.7	DBA3680	0.0
DBA3612	0.0	DBA3646	10.3	DBA3681	3.7
DBA3613	0.0	DBA3647	0.0	DBA3682	1.2
DBA3614	0.0	DBA3648	0.7	DBA3683	2.0
DBA3615	0.3	DBA3649	0.0	DBA3684	0.0
DBA3616	0.0	DBA3650	0.0	DBA3685	0.67
DBA3617	0.0	DBA3652	0.3	DBA3686	1.67
DBA3618	0.0	DBA3653	15.0	DBA3687	0.0
DBA3619	0.0	DBA3654	0.0	DBA3688	0.0
DBA3620	0.3	DBA3655	0.7	DBA3689	2.7
DBA3621	0.3	DBA3656	0.7	DBA3690	0.0
DBA3622	0.0	DBA3657	0.0	-	-
DBA3623	5.7	DBA3658	0.0	-	-
DBA3624	0.0	DBA3659	0.0	-	-
DBA3625	0.0	DBA3660	0.0	-	-
DBA3626	3.3	DBA3661	0.0	-	-
DBA3627	0.0	DBA3662	0.0	-	-
DBA3628	3.0	DBA3663	0.0	-	-
DBA3629	0.0	DBA3664	0.0	-	-
DBA3630	0.7	DBA3665	2.7	-	-
DBA3631	7.7	DBA3666	0.0	-	-
DBA3632	0.3	DBA3667	0.0	-	-

(3) 결론

시험결과 저지환 10mm 이상을 형성시켜 활성이 우수하다고 판단되는 물질 6종 (DBA3635, DBA3645, DBA3646, DBA3653, DBA3671, DBA3672)을 선발하였다.

다. 포장시험화합물 선발을 위한 다중농도 시험(강스크리닝 조건)

(1) 재료 및 방법

상기 고추 역병 *in vivo* 스크리닝 방법과 동일하게 실시함

(2) 시험결과

시험약제	처리농도 (ppm)	방제가 (%)	EC50	EC90	Dimethomorph 대비 활성비교
Untreated	-	-	-	-	-
DBM3635	30	83.3			
	15	66.7	10.87	38.18	열등
	7.5	33.3			
DBM3645	30	98.1			
	15	96.3	5.25	13.45	우수
	7.5	66.7			
DBM3646	30	100			
	15	98.1	4.57	9.75	우수
	7.5	79.6			
DBM3653	30	98.1			
	15	74.1	6.54	22.60	비등
	7.5	59.3			
DBA3570	30	100			
	15	92.6	3.47	11.84	우수
	7.5	79.6			
DBM3671	30	40.7			
	15	3.7	33.58	60.95	열등
	7.5	0			
DBM3672	30	44.4			
	15	0	31.99	54.49	열등
	7.5	0			
Dimethomorph	30	98.1			
	15	81.5	9.40	18.78	-
	7.5	33.3			

(3) 결론

시험결과 *in vivo* EC50, EC90값을 기준으로 Dimethomorph와 비등하거나 우수하다고 판단되는 물질 2종(DBA3645, DBA3646)을 선발하였다.

## 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제1절 연차별 · 세부과제별 연구개발의 내용 및 목표 달성도

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2007- 2008)	친환경 살균제 개발	New scaffold 탐색계속	100	온실조건 <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> 활성검정 실시(1차 및 2차 스크리닝) 작용특성평가(스펙트럼, 약효/약해)
		포장시험 후보화합물 선발	100	다중농도 <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> 활성검정 DBM1766, DBA3486 선발
		기초 독성평가	100	급성경구독성시험, 어독성시험
		기초 실용화 평가	100	고추 역병, 포도 노균병, 멜론 노균병 포장시험 실시함
		특허출원	100	국내 특허 출원
	선도화합물 의 최적화 유도체 합성	유도체 최적화 합성	100	최적화 유도체 합성법 확립 및 유도체 합성
		합성공정개선	100	포장시험화합물 합성법 확립 및 샘플 50g 제조
2차 연도 (2008- 2009)	친환경 살균제 개발	후보화합물 선발	100	유도체 합성 및 포장시험화합물 확보 DBA3570 선발
		기초 실용화 평가	100	수화제 제형 확립 고추 역병, 포도 노균병 포장시험 실시
		특허출원	100	물질/제조/제형/용도 특허확보(국내)
		합성공정개선	100	포장시험화합물 합성법 확립 및 샘플 100g 제조
	선도화합물 의 최적화 유도체 합성	유도체 최적화 합성	100	최적화 유도체 합성법 확립 및 유도체 합성
		합성공정개선	100	유도체 합성법 확립
3차 연도 (2009- 2010)	친환경 살균제 개발	상업화 후보화합물 도출	100	후보화합물 2종(DBA3645, DAB3646) 확보
		안전성 자료 확보	100	급성경구독성시험, 어독성시험
		사업화 제형 개발	100	최적제형 개발을 위한 물리성/이화학성 시험 WP 제형 등
		특허출원	80	물질/제조/제형/용도 특허확보 예정
	선도화합물 의 최적화 유도체 합성	유도체 최적화 합성	100	신규 합성화합물 합성법 확립
		대량 생산공정 확립	100	대량 생산공정 확립

## 제2절 관련분야 기여도

신규 작물보호제는 개발성공시 특허출원 후 20년간 독점적 권리를 행사할 수 있으므로 경제적으로 부가가치가 큰 연구분야이다. 그러나 신규 작물보호제 개발에 성공하기 위해서는 다양한 기반기술과 막대한 비용 및 기간이 요구되므로 현재 개발된 대부분의 작물보호제는 글로벌 작물보호제 기업에 의해 주도적으로 이루어지고 있는 현실이다.

이런 상황에서 당사는 신규 역병/노균병 방제용 살균제 개발을 위하여 연구를 수행을 하였다. 선진사의 선행연구를 그대로 모방하지 않고 자체 library로부터 선도화합물을 발굴하여 유도체 최적화 연구를 진행하였고, 역병/노균병 방제활성검정시스템 확립 및 강화를 하였으며, 구조-활성분석(SAR) 시스템을 구축하여 신물질개발 기반기술의 능력을 향상시켰고 또한 산학협동연구를 통하여 신물질 개발연구인력 양성에 기여하였다. 본 과제를 수행하면서 축적된 신물질 개발 기반기술과 경험은 지속적인 신물질 창출과 신제품 개발에 적극 활용될 것이다.

## 제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제1절 연구개발 성과

가. 기존의 상업화된 역병/노균병 살균제와 구조적 차별성이 있는 새로운 scaffold를 발굴하여 선도화합물을 도출하였다. 또한 구조 최적화 연구를 통하여 포장시험을 실시한 결과 당사가 보유한 골격은 상업화 가능성이 있음을 확인하였다.

나. 특허출원

- (1) 발명의 명칭: 농업용 살균제
- (2) 출원번호: 제10-2008-0097107호
- (3) 출원일: 2008. 10. 2

다. 논문게재

Choi, W. S., Nam, S. W., Ahn, E. K., Park, B. S., Lee, S. E., Kim, T. J., and Choi, I. Y., 2010. Synthesis and Fungicidal Activity of N-[4-(4-Fluoro)phenyl-2-piperidin-4-yl-thiazole-5-yl]pyrimidin-2-yl-N-phenylamines on *Phytophthora capsici*. Korea Society for Applied Biological Chemistry 53(2):206-214

라. 학회발표

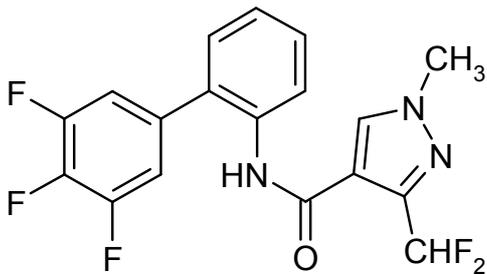
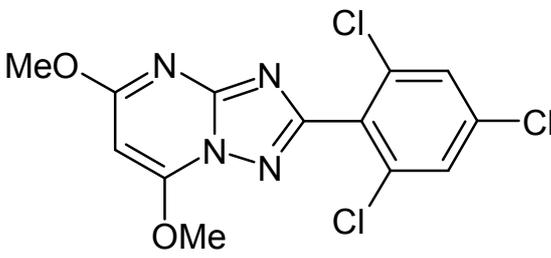
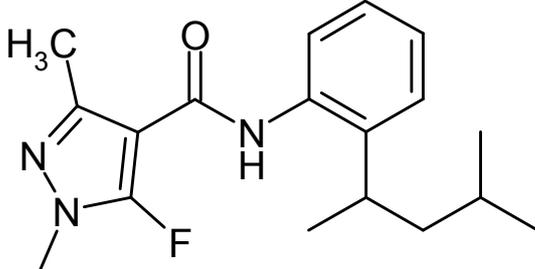
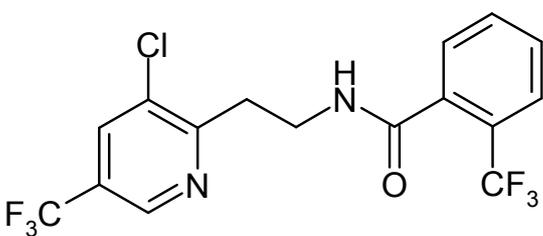
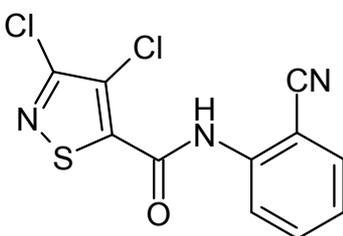
- (1) Fungicidal Activity of DBM1509 on pepper late blight in Pepper Caused by *Phytophthora capsici*. (한국식물병리학회, 순천대학교, 2008년 4월 25일)

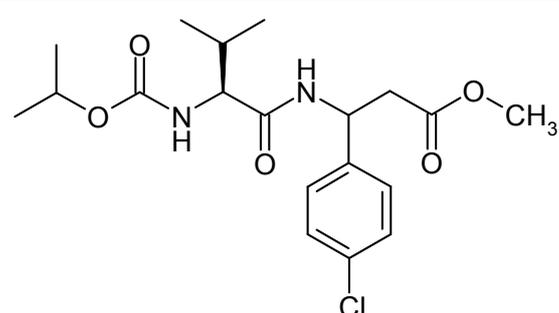
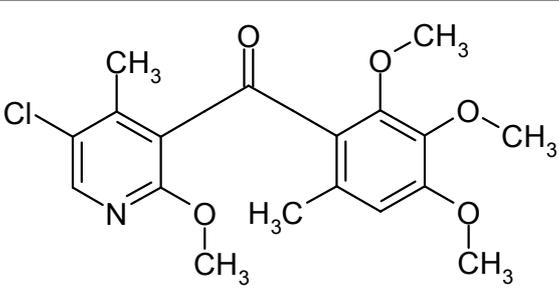
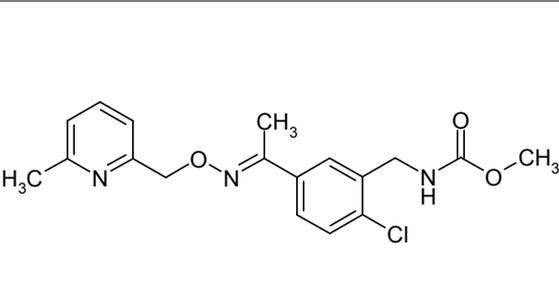
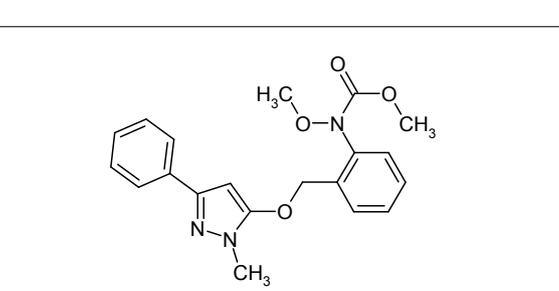
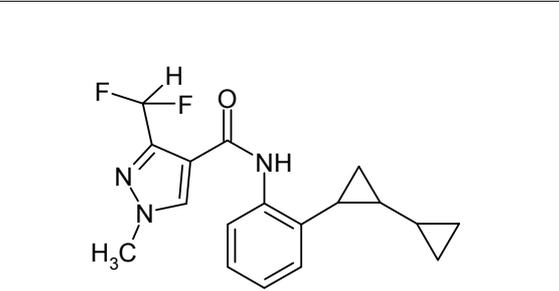
### 제2절 연구성과 활용계획

최종 선발한 화합물 DBA3645, DBA3646는 진전단계 스크리닝 및 유도체 최적화를 진행하여 신규 살균제 개발의 기초자료로 활용하고, 그 연구성과를 특허 및 논문게재할 예정이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 최근 개발중인 신규 살균제 개발 동향

No	구조	화합물명	비고
1		Fluxapyroxad	-BASF社 개발중 -흰가루병 방제용 살균제 -Pyrazole anilide 계열
2		BAF-045	-BASF社 개발중 -잣빛곰팡이병, 썩음병 방제용 살균제 -Triazolopyrimidine 계열
3		Penflufen BYF 14182	-Bayer社 개발중 -종자처리용 광범위 살균제 -Pyrazole carboxamide 계열
4		Fluopyram AE C656948	-Bayer社 개발중 -잣빛곰팡이병, 흰가루병, 균핵병 방제용 살균제 -Pyridine ethylbenzamide 계열
5		Isotianil BCF-051 BYF 1047	-Bayer社 개발중 -벼도열병 방제용 살균제 -Thiazole carboxamide 계열

No	구조	화합물명	비고
6		Valifenalate IR 5885 JAVA F	-Isagro-Ricerca社 개발중 -역병, 노균병 방제용 살균제 -Valinamide carbamate 계열
7		Pyriofenone IKF-309	-Ishihara Sangyo社 개발중 -흰가루병 방제용 살균제 -Pyridyl phenyl ketone 계열
8		Pyribencarb KUF-1204 KIF-7767	-Kumiai社 개발중 -흰가루병, 잣빛곰팡이병 방제용 살균제 -Benzylcarbamate 계열
9		Pyrametostrobin SYP-4155	-SYRICI社 개발중 -흰가루병, 노균병 방제용 살균제 -Strobilurin 계열
10		Sedaxane SYN 524 NOA 524	-Syngenta社 개발중 -감부기병, 잎집무늬마름병 방제용 종자처리제 -Pyrazole carboxamide 계열

## 제 7 장   참고문헌

- Chang, S.H., Kwack, M.S., Kim, Y.S., Lee, J.Y., Kim, K.D., 2001. A rapid radicle assay for pre스크리닝 antagonistic bacteria against *Phytophthora capsici* on pepper. Mycobiology 29, 218-223.
- Chang, S.H., Lee, J.Y., Kim, K.D. and Hwang, B.K. 2000. 스크리닝 for *in vitro* antifungal activity of soil bacteria against plant pathogens. Mycobiology 28, 190-192.
- Cohen, Y., Coffey, M.D., 1986. Systemic fungicides and the control of oomycetes. Annual Review of Phytopathology 24, 311-338.
- Dupler, M. and Baker, R. 1984. Survival of *Pseudomonas putida*, a biological control agent, in soil. Phytopathology, 74, 195-200.
- E. C. Tjamos, G. C. Papavizas, and R. J. Cook, eds. Pleum Press, NY. Ristaino, J.B., Johnston, S.A., 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora blight* on bell pepper. Plant Disease 83, 1080-1089.
- Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annual Review of Phytopathology 26,75-91.
- Georgakopoulos, D.G., Fiddaman, P., Leifert, C., Malathrakis, N.E., 2002. Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. Journal of Applied Microbiology 92, 1078-1086.
- Hausbeck, M.K., Lamour, K.H., 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. Plant Disease 88, 1292-1303.
- Heungens, K., Parke, J.L., 2001. Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. Phytopathology 91, 383-391.
- Ho, S.H., Ma, Y. and Huang, Y. (1997) Anethole, a potential insecticide from *Illicium verum* Hook f., against two stored product insects. Int. Pest Control. 39:50-51.

- Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescences* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69, 480-482.
- Huang, Y., Chen, S.X. and Ho, S.H. (2000) Bioactivities of methyl allyl disulfide and diallyl trisulfide from essential oil of garlic to two species of stored-product pests, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum*(Coleoptera: Tenebrionidae). *J.Econ.Entomol.* 93:537-543.
- Hummelbrunner, L.A. and M.B. Isman (2001) Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*(Lep., Noctuidae). *J.Agric. Food Chem.*49, 715-720.
- Hwang, B.K., Kim, C.H., 1995. pepper late blight of pepper and its control in Korea. *Plant Disease* 79, 221-227.
- Hynes, R. K., and Boyetchko, S. M. 2006. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 845-849.
- In C. R. A. Godfrey., *Agrochemicals from natural products*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Gu, Y.-H., Mazzola, M.,2001. Impact of carbon starvation on stress resistance,
- Isman MB (2000) *Plant essential oils for pest and disease management*. *Crop Protection* 19 : 603-608.
- Jensen, P. R., and Fenical, W. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria : Ecological perspectives. *Annual Review of Microbiology* 62, 249-253.
- Jiang, Z.-Q., Guo, Y.-H., Li, S-M., Qi, H.-Y., Guo, J.-H., 2006. Evaluation of biocontrol efficacy of different *Bacillus* preparations and field application methods against pepper late blight of bell pepper. *Biological Control* 36, 216-223.
- Kim, B. S., Lee, J. Y., and Hwang, B. K. 2000. *in vivo* control efficacy and *in vitro* antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. *Pest Management Science*. 56: 1029-1035.

- Kim, H.S., Sang, M.K., Jeun, Y.-C. Hwang, B.K., Kim, K.D., 2008. Sequential selection and efficacy of antagonistic rhizobacteria for controlling pepper late blight of pepper. *Crop Protection* 27, 436-443.
- Kim, K.D., Nemeč, S., Musson, G., 1997. Control of *Phytophthora* root and crown rot of bell pepper with composts and soil amendments in the greenhouse. *Applied Soil Ecology* 5, 169-179.
- Kim, Y.J., Hwang, B.K., Park, K.W., 1989. Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Disease* 73, 745-747.
- Lee, S-E., B-H. Lee, W.-S. Choi, B.-S. Park, J.-G. Kim and B.C. Campbell (2001) Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae*(L.). *Pest Management Sci.* 57,548-553.
- Matheron, M.E., Porchas, M., 2000. Impact of azoxystrobin, dimethomorph, fluazinam, fosetyl-Al, and metalaxyl on growth, sporulation, and zoospore cyst germination of three *Phytophthora* spp. *Plant Disease* 84, 454-458.
- Monaghan, R. L., and Tkacz, J. S. 1990. Bioactive microbial products : Focus upon mechanism of action. *Annual Review of Microbiology* 44, 271-301.
- Rice, P.J., Coats, J.R.(1994) Insecticidal properties of monoterpenoid derivatives to the house fly (Diptera: Muscidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pestic. Sci.* 41, 195-202.
- Ryu, C.-M., Farag, M.A., Hu, C.-H., Reddy, M.S., Wei, H.-X., Parém, P.W., Kloepper, J.W., 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 4927-4932.
- Ryu, C.-M., Kim, J., Choi, O., Kim, S.H., Park, C.S., 2006. Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. *Biological Control* 39, 282-289.

- Sang, M.K., Chiang, M.H., Yi, E.S., Park, K.W., and Kim, K.D., 2006. Biocontrol of Korean ginseng root rot caused by *Phytophthora cactorum* using antagonistic bacterial strains ISE13 and KJ1R5. The Plant Pathology Journal 22, 103-106.
- Sang, M.K., Oh, J.Y., Kim, K.D., 2007. Root-dipping application of antagonistic rhizobacteria for the control of pepper late blight of pepper under field conditions. The Plant Pathology Journal 23, 109-112.
- Shen, S.-S., Piao, F.-Z., Lee, B.-W., Park, C.-S., 2007. Characterization of antibiotic substance produced by *Serratia plymuthica* A21-4 and the biological control activity against pepper late blight. The Plant Pathology Journal 23, 180-186.
- Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., 2003. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root-infecting fungi in tomato. Journal of Phytopathology 151, 215-222.
- Stanghellini, M.E., Kim, D.H. Rasmussen, S.L. and Rorabaugh, P.A. 1996. Control of root rot of peppers caused by *Phytophthora capsici* with nonionic surfactant. Plant Disease 80, 1113-1116.
- Weller, D. M. 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology 26, 379-407.
- Williams, G. E. and Asher, M. J. C. 1996. Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar-beet seedlings. Crop Protection 15, 479-48.
- Williams, L.E., Schmitthenner, A.F., 1960. Effect of growing crops and crop residues on soil fungi and seedling blights. Phytopathology 50, 22-25.
- Wilson, C.L., Solar, J.M., El Ghaouth, A., Wisniewski, M.E. (1997) Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Disease 81, 204-210.