

## 분광분석을 이용한 막과산화작용 제초제의 신속한 검정법

권옥경 · 김진석\* · 조광연

한국화학연구소 농약활성연구팀

**요약 :** 본 연구에서는 세포막파괴형 제초활성물질을 보다 효율적으로 검정할 수 있는 방법을 확립하고자 시험하였으며 검정전략으로서는 막과산화에 의해 풍부히 형성되는 카보닐 및 알데히드류 화합물을 MBTH/ferric chloride로 발색시켜 96-well상태에서 검정하는 방법을 적용하였다. 검정과정상에 필요한 제반조건(식물재료, 광도, 광조사 시간, 발색을 위한 시약의 적정농도 및 반응시간 등)들을 최적화시킨 후 여러 가지 작용기작을 가지는 기존제초제들의 오이자엽 절편에 대한 반응을 조사하였다. 그 결과, PROTOX 저해제와 paraquat과 같이 신속히 세포막 파괴를 일으키는 기작을 가진 제초제에 양호한 반응을 보였다. 실제 온실에서의 제초활성이 각기 다르게 나타난 7가지 신규화합물을 대상으로, 온실에서의 제초활성과 본 검정법에서의 활성을 비교했을 때 매우 높은 상관성을 나타내었다. 본 검정법은 60  $\mu\text{L}$ 의 시험용액에 적경 4  $\mu\text{L}$ 의 오이자엽 절편 한 개만을 이용하므로 96-well microtitre plate에서 미량의 화합물을 동시에 대량으로 검정할 수 있다는 장점을 가지고 있으나, 발색을 위해 용액을 끓이는 과정이 필요하기 때문에 효율성을 제고하는데 한계성을 가졌다.(2000년 1월 26일 접수, 2000년 2월 23일 수리)

Key words : MBTH-assay, microtitre assay, membrane disrupting herbicides, screening.

### 서 론

신농약은 후보화합물 합성, 활성 검정, 안전성 평가, 대량 생산공정 단계를 거치면서 개발되는데 이 중 활성검정은 화합물의 용도와 가치를 탐색하는 단계로서 개발과정상 매우 중요할 뿐만 아니라 생물자체를 실험재료로 이용하기 때문에 속도제한 단계이기도 하다. 최근에 이르러 생물학 및 유전공학기술의 발달로 과거에는 접근하지 못했던 생물의 기능을 보다 정확히 규명할 수 있음에 따라 신규 작용점 발굴이 증가하게 되었고, 일시에 다수의 화합물을 합성하는 조합화학기술의 발달과 천연물연구의 활성화로 검정해야 할 시료수가 급증하게 되었다. 이는 활성검정분야에 새로운 도전이 되고 있는 바, 이를 극복하기 위한 기술로서 특정작용점에 대해 많은 화합물을 microplate상에서 일시에 검정하는 "고효율 대량검정법(High Throughput Screening)"이 1990년대 이후 새롭게 도입되고 있다(Anderson 등, 1994; Major, 1995; Porter와 Hill, 1995; Broach와 Thorner, 1996; Pallet, 1997; 김 등, 1998; Ridley 등, 1998). 고효율 대량검정법을 위해서는 뚜렷한 검정목표 설정, 실험의 초소형화(miniaturization), 고감도의 검정기술, 작업의 단순화 및 효율성 제고를 위한 자동화 등이 구비되어야 하는데 그 중에서 효소 및 조직 등의 시험재료를 용이하게 대량 확보할 수 있거나, 결과를 빠르게 분석하기 위한 새로운 기술의 활용이 무엇보다 중요하다. 아울러 동일한 실험방법을 사용한다 하더라도 작은 공간에서 수행할 수 있는 체제로 그 방법을 전환시키는 것도 매우 필요한 사항이다.

제초제의 경우 현재까지 약 15개 이상의 작용점이 알려져 있는데(Pallet, 1997; 김 등, 1999) 작용점이 서로 다르다 할지라도 식물세포내에 유해활성산소를 다량 발생시켜 최종적으로는 막과산화를 유기, 세포를 파괴시킴으로써 제초활성을 나타내는 화합물(peroxidizing herbicide)들이 다수 알려져 있다(Devine 등, 1993). 대표적인 작용점과 이에 속하는 화합물로는 첫째, photosystem I으로부터 전자를 탈취하여 활성산소를 발생시키는 paraquat(Babbs 등, 1989; Hiyama 등, 1993), 둘째, 염록소 생합성과정의 protoporphyrinogen oxidasePROTOX를 저해하여 protoporphyrin IX이라는 photosensitizer를 다량 축적시켜 광에 의해 활성산소를 발생시키는 acifluorfen, oxyfluorfen, oxadiazon, azafenidin 등(Kenyon 등, 1985; Sato 등, 1988; Becerril 와 Duke, 1989; Duke 등, 1989; Duke 등, 1991), 셋째로는 반응속도는 비교적 느리지만 photosystem II의 Qb site에 결합하여 전자전달을 차단함으로써 활성산소를 발생시켜 염록체를 파괴시키는 화합물로서 atrazine, diuron, bromoxynil 등이 있다(Barry 등, 1990; Fuerst와 Norman, 1991). 이들 중에서 특히 PROTOX 저해제는 10 g/ha 내외의 저농도에서도 활성을 가지며 속효성이다. 이들 화합물들은 제초스펙트럼이 넓어 주로 비선택적으로 사용되기도 하지만 벼, 밀, 보리 등의 작물에도 사용 가능한 화합물들이 다수 개발되고 있어 향후 이 분야의 연구는 더욱 진전될 것으로 기대된다. 따라서, 이러한 특성의 화합물들을 보다 대량으로 신속히 검정할 수 있는 방법의 확립은 매우 큰 의의를 가진다.

현재까지 막과산화형 제초제들의 제초활성을 측정하는 방법으로는 유묘에 약제를 처리하여 나타나는 증상을 달관

\*연락저자

조사하거나(조 등, 1995), 보다 단순하게 실내에서 측정할 경우 황화자엽의 녹화정도(김 등, 1990) 또는 잎절편을 시험용액에 띄운 후 세포질 누출정도를 전기전도계로 측정하는 방법(Vanstone과 Stobbe, 1977; Yanase 등, 1990; Duke와 Kenyon, 1993; 김 등, 1996; 권 등, 1999; Lee 와 Cho, 1996)이 이용되었다. 그러나, 이들 방법은 비교적 큰 용기(팟트, 페트리디ッシュ, 판병 등)를 이용함으로 공간을 많이 차지하고 시험용액도 최소한 7 mL 이상이 요구되며, 측정을 자동으로 하기가 어렵다는 단점을 가지고 있다. 따라서, 많은 화합물들을 효율적으로 검정하기 위한 새로운 방법으로서 Molin과 Khan(1995)은 배양용액으로 누출된 세포질을 발색시켜 분광분석함으로써 96-well 조건에서도 검정이 가능함을 제안하였다.

본 연구는 Molin과 Khan(1995)이 제안한 방법을 따라 검정할 경우 어느 작용기작을 가진 제초제 계열이 가장 잘 반응하는 지와 그 방법의 효율성을 검토하고, 아울러 실험과정의 최적조건을 구체적으로 설정하여 신규화합물에 대한 고효율대량검정법을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

오이종자(평강내병삼척오이, 동부한농)를 원예용 상토 5호가 채워진 풋트에 파종한 후, 낮/밤의 온도가 32/25°C인 14시간 광주기의 온실조건에서 6일간 재배하였다. 재배한 자엽으로부터 Cork borer를 이용하여 직경 4 mm의 절편(disc)을 얻고, 이를 3차 증류수로 씻은 후 시험재료로 사용하였다. 어저귀의 경우에는 위와 동일한 조건에서 재배하였고, 자엽 자체를 절편화하지 않은 상태로 사용하였다. 본엽을 대상으로 실험한 경우, 온실에서 12일동안 키운 오이와 어저귀의 본엽으로부터 직경 4 mm의 절편을 얻어 사용하였다.

### 공시화합물

기존 제초제로서는 acifluorfen, oxadiazon, oxyfluorfen, paraquat, atrazine, diuron, norflurazon, glyphosate의 원제를 공시하였고, 신규합성화합물로서는 한국화학연구소화학물질연구팀에서 합성한 KSC30811, KSC31669, KSC31673, KSC31675, KSC31676, KSC31679, KSC31681이(유 등, 1999) 이용되었다.

그 외에 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone(MBTH), ampicillin, FeCl<sub>3</sub>, phosphoric acid는 Aldrich 또는 Sigma사로부터 구입한 시약을 사용하였다.

### 시험용액 준비

공시화합물을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 후 (paraquat는 증류수에 녹임), 증류수에 회석하여 시험용액을 조제하였고 DMSO의 최종농도는 1%가 넘지 않도록 하였다. 시험용액에는 세균의 성장을 막기 위하여 50 mg/L의 ampicillin을 포함시켰으며, 이를 96-well microtitre plate

의 well당 60 μL씩 분주하였다.

### 식물재료 치상 및 배양

자엽절편을 well당 한 개씩 올려놓고 microtitre plate를 25°C의 200 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>의 광조건하에서 진탕배양하였다. 배양시간은 특별한 경우를 제외하고 8시간이었으며, 모든 처리는 4번복하였고, 각각의 실험은 조건에 따라 2회 이상 실시하였다.

### 세포질 누출정도의 분광분석

공시화합물의 영향으로 세포막이 파괴되면서 생성되거나 누출된 배양액내의 카보닐 및 알데히드류 화합물을 MBTH/FeCl<sub>3</sub>로 발색시켜 상대적인 양을 측정하였다(Paz 등, 1965; Molin과 Khan, 1995). 즉 배양이 끝난 후, microtitre plate내 배양액의 pH가 3~4가 되도록 0.36 mM phosphoric acid 용액을 12.5 μL 첨가하여 반응을 중지시켰다. 여기에 1%(w/v) MBTH 수용액 12.5 μL를 첨가하고, 끓는 물에서 3~5분간 반응시킨 후 얼음에서 냉각시켰다. 반응액에 0.2% FeCl<sub>3</sub> 용액 125 μL를 첨가하여 10분간 교반한 후 670 nm에서의 흡광도를 microplate reader(Labsystems Multiskan MS)로 측정하였다. 처리결과는 대조구와의 흡광도 차이로 구하였으며, formaldehyde를 이용하여 상대적 정량을 위한 표준곡선을 작성하였다.

### 온실에서의 제초활성 조사

Well plate에서의 분광분석을 통한 실험결과가 온실에서의 제초효과와 비슷한 경향을 나타내는지를 확인하기 위하여 신규 합성화합물 7종에 대해 비교, 조사하였다. 식물은 광엽 5초종과 화본과 5초종을 공시하였으며, 파종 후 10일이 경과한 유묘에 1 kg a.i./ha 수준으로 경엽처리하고 약 제처리 후 2주째에 제초활성을 달관평가하였다. 기타 실험방법은 한국화학연구소에서 시행하고 있는 제초제 온실스크리닝의 표준시험법을 따랐다(조 등, 1995).

## 결과

### 식물재료 선발

MBTH를 이용한 막과산화작용 제초제의 검정을 위해 어떠한 식물재료를 사용하는 것이 적합한지를 검토하였다. 재배의 용이성과 생육의 균일성을 고려하여 오이와 어저귀를 선발한 후, 이를 대상으로 자엽과 본엽 중 어느 조직이 양호한 반응성을 나타내는지 acifluorfen을 공시하여 실험하였다. 그럼 1에 나타난 바와 같이, 어저귀보다는 오이가, 본엽보다는 자엽에서 반응성이 높았고 반복간의 변이는 오이에서 낮은 경향이었다. 반응성 이외의 요인을 검토해 볼 때, 어저귀 자엽을 사용할 경우, 절편을 만들지 않아도 된다는 장점은 있으나 조직이 약하여 다루기가 어려운 점이 있었고, 오이 본엽을 사용할 경우에는 재료를 다량 확보할 수 있으나 조직이 연약할 뿐만 아니라 잎에 텔이 있어서

배양중에 약제의 침투가 어려울 것으로 판단되었다.

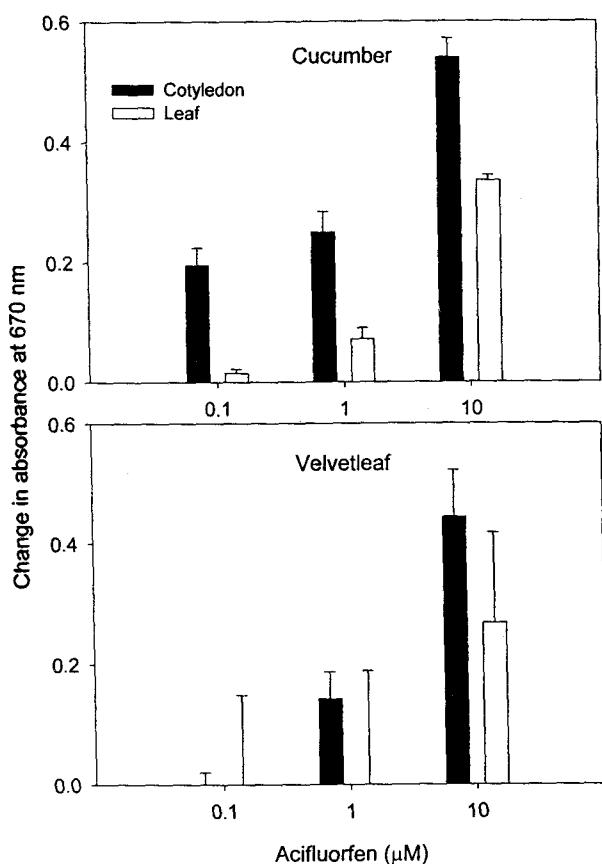


Fig. 1. Leakage of MBTH-positive products from cotyledon or leaf discs of cucumber and velvetleaf incubated in different concentration of acifluorfen. For experimental conditions, refer to Material and Method. The absorbance of coloured solution was determined at 670 nm. Vertical bars represent the mean values of 4 replications with standard errors.

Table 1. Effect of time of light irradiation on the leakage from cucumber cotyledon discs by different herbicides<sup>a)</sup>

Herbicides (1.0 $\mu$ M)	Light irradiation (hr)		
	8	24	48
----- Increased absorbance at 670 nm -----			
Acifluorfen	0.45±0.06	0.70±0.03	0.74±0.09
Oxadiazon	0.50±0.02	0.78±0.09	0.54±0.03
Oxyfluorfen	0.43±0.03	0.62±0.06	0.69±0.07
Paraquat	0.10±0.01	0.44±0.03	0.73±0.07
Atrazine	0.00±0.02	0.00±0.02	0.00±0.01
Diuron	0.00±0.01	0.00±0.02	0.00±0.01
Norflurazon	0.02±0.01	0.00±0.03	0.00±0.01
Glyphosate	0.01±0.02	0.02±0.00	0.02±0.01

<sup>a)</sup>The experiment was performed in the same conditions in Fig. 1, except illumination time. Values represent the mean values of 4 replications with standard errors.

따라서 절편화와 재료의 다양 확보에 다소 어려운 점이 있더라도 반응성이 뚜렷하고 반복간의 오차가 낮은 오이자엽을 사용하는 것이 가장 바람직할 것으로 판단되었기에 이후 실험에서는 모두 오이자엽 절편을 이용하였다.

#### 배양중의 광도와 광조사 시간

막과산화 제초제의 대부분은 암조건보다 명조건에서 보다 높은 활성을 나타내기 때문에 약제처리 후 배양중의 광도조건은 반응성과 시험기간 등에 영향을 미친다. 따라서 반응성만을 고려할 경우 가능한 한 높은 광도에서 실험하는 것이 타당하나 시설과 경비 등을 고려할 때 경제적으로 조절가능한 범위를 설정하는 것이 바람직할 것이다.

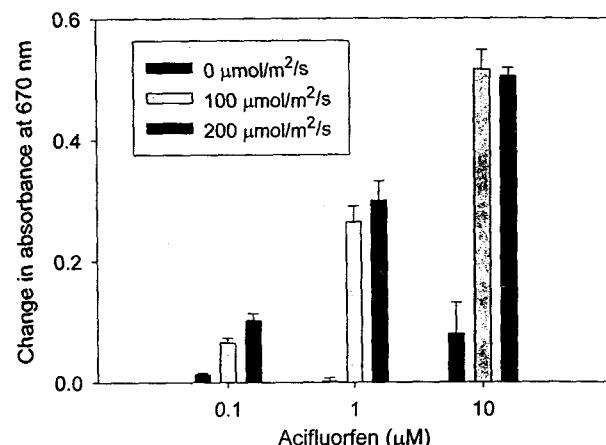


Fig. 2. Effect of light intensity on the leakage of MBTH-positive products from cucumber cotyledon discs. Vertical bars represent the mean values of 4 replications with standard errors.

본 실험에서는 100과 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 로 설정하여 acifluorfen을 처리한 후, 광도별 반응성을 검토해 보았다. 광을 8시간 동안 조사한 결과, 그림 2에서처럼

acifluorfen  $0.1 \mu\text{M}$ 의 경우 광도가 높을수록 높은 반응성을 보였고,  $1 \mu\text{M}$  이상에서는 두 광도간에 차이가 크지 않았다. 따라서 비교적 높은 농도로 시험할 경우에는  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 도 적당하겠으나 저농도의 경우에는  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 은 되어야 할 것으로 판단되었다.

한편  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 의 광도에서 실험할 경우 광조사 시간별 반응성을 측정한 결과, 처리약제의 농도에 따라 약간의 차이가 있지만 광조사 후 4시간째부터 반응성이 나타나기 시작하여 조사시간이 증가됨에 따라 높아졌다(그림 3).

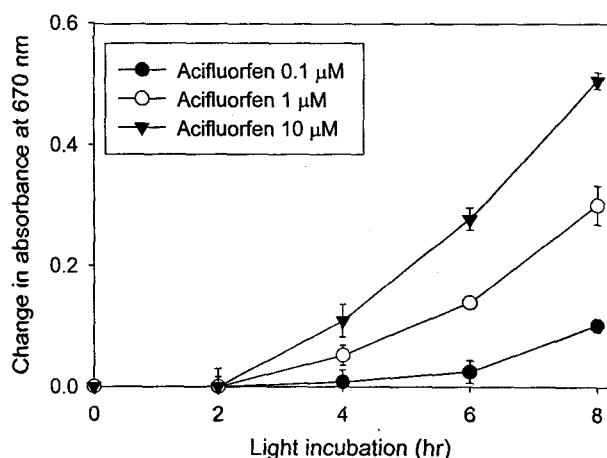


Fig. 3. Effect of light irradiation time on the leakage of MBTH-positive products from cucumber cotyledon discs incubated in different concentration of acifluorfen. Vertical bars represent the mean values of 4 replications with standard deviations.

보다 장시간 광조사를 할 경우, 약제에 따라 다르지만 24시간 또는 48시간까지 증가되는 경향을 보였다(표 1). 그러나, 본 검정의 목표가 빠른 시간 내에 검정을 완료하는 것이므로 실험의 전과정을 1~2일 단위로 종결할 수 있는,  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 의 광도조건에서 8시간 배양이 적합하다고 판단하였다.

Table 2. Effect of concentrations of MBTH and ferric chloride on the colorization of leakage from cucumber cotyledon discs treated with acifluorfen<sup>a)</sup>

MBTH (%)	Ferric chloride (%)	0.1	Acifluorfen ( $\mu\text{M}$ )		
			1	10	----- Increased absorbance at 670 nm -----
1.0	0.2	$0.24 \pm 0.02$	$0.38 \pm 0.03$	$0.48 \pm 0.01$	
2.0	0.2	$0.12 \pm 0.03$	$0.27 \pm 0.04$	$0.34 \pm 0.07$	
1.0	0.4	$0.17 \pm 0.02$	$0.41 \pm 0.05$	$0.48 \pm 0.03$	
2.0	0.4	$0.14 \pm 0.10$	$0.25 \pm 0.12$	$0.37 \pm 0.13$	

<sup>a)</sup>The experiment was performed in the same conditions in Fig. 1, except concentration of MBTH and ferric chloride. Values represent the mean values of 4 replications with standard errors.

### 발색 반응 조건

본 검정법은 세포막파괴로 인해 발생된 성분을 발색시켜 손쉽고 빠르게 분광분석을 하고자 하는 것이므로 무엇보다 적합한 발색조건을 확립하여야 한다. 이를 위해 먼저 발색시에 사용되는 MBTH와  $\text{FeCl}_3$ 용액의 농도에 따른 영향을 검토하였다. 농도의 설정은 Molin과 Khan(1995)에서 사용한 것을 기준으로 하되 각각의 성분에 대한 배량의 조합을 설정하여 발색정도가 증가되는지를 시험해 보았다.  $\text{FeCl}_3$ 의 농도를 고정한 상태에서 MBTH의 농도를 1%에서 2%로 높이면 오히려 발색정도가 떨어졌으나(표 2), MBTH를 고정한 상태에서는  $\text{FeCl}_3$ 의 농도를 두 배 증가시켜도 발색정도에 큰 차이가 없었다. 따라서, 발색에는 MBTH의 농도가 중요하게 작용하는 것으로 생각되며, MBTH 농도를 높여도 발색정도가 증가되지는 않았으며 Molin과 Khan(1995)이 사용한 방법에서처럼 1%를 사용하는 것이 가장 좋은 결과를 보여주었다.

한편 발색에 소요되는 시간과 발색이 완료된 이후의 변화여부는 조사시기와 방법에 중요한 영향을 미치며 바람직한 조건은 발색반응이 종결된 이후 오랫동안 그 상태로 유지되는 것일 것이다. 반응시간별 흡광도 변화를 조사한 결과, 반응개시 후 10분까지는 흡광도가 급격히 증가하였고 이후 50분까지는 매우 완만하게 증가하면서 발색이 종결되었다. 발색반응이 종결된 이후 적어도 4시간까지는 흡광도 변화가 거의 없었다(그림 4). 따라서 본 발색반응은 비교적 안정적이므로 조사시기를 폭넓게 선택할 수 있지만 빠른 검정을 위해서는 발색시간을 10분으로 하는 것이 좋을 것으로 생각되었다.

### Formaldehyde의 농도별 반응

본 실험조건의 타당성을 검증해 보고, 결과의 정량화를 위해서는 어느 한 표준물질을 대상으로 반응정도를 조사해 두어야 할 것이다. 이를 위해서 분자구조에 카보닐기를 가지고 있는 formaldehyde에 대한 본 실험조건에서의 농도와 흡광도간 비례여부를 검정하였다. 그 결과  $0.4 \sim 200 \mu\text{M}$ 까지 거의 정량반응을 보였다( $y = 0.0089x + 0.0092, r^2 = 0.9978$ )(그림 5).

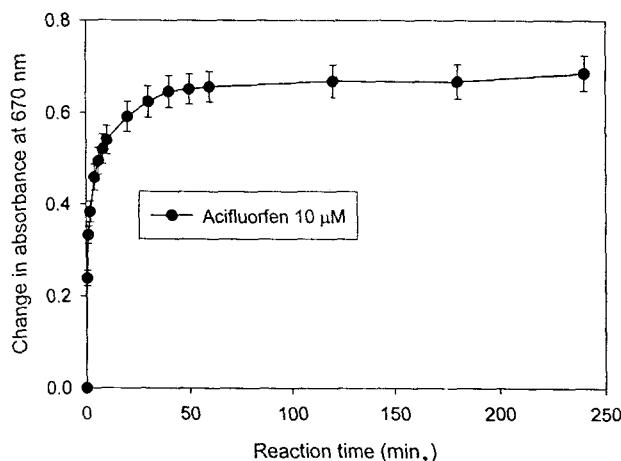


Fig. 4. The change of optical density during reaction of leakage from cucumber cotyledon discs with MBTH and ferric chloride. Vertical bars represent the mean values of 4 replications with standard deviations.

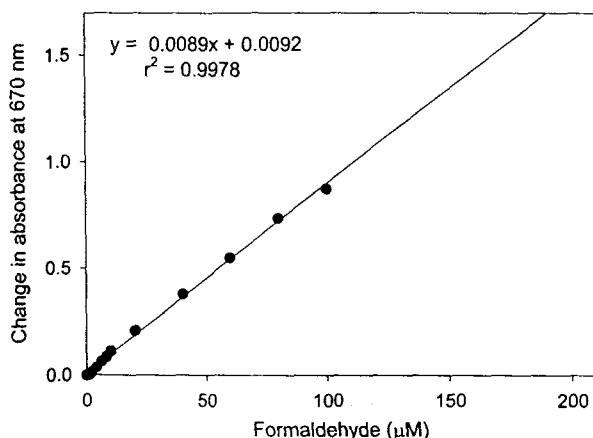


Fig. 5. Linearity of MBTH assay dependent on formaldehyde concentration.

#### 공시화합물들에 대한 반응특성

신규화합물을 스크리닝할 때 초기 농도를 어느 수준으로 결정하는 것이 실용적으로 의미가 있으며, 이 방법을 적용하였을 때 어느 유형의 제초제가 가장 유용하게 검정될 수 있는지를 아는 것은 본 검정법의 명확한 목적과 활용을 위해서 매우 필요한 사항이다. 이를 위해서 여러 가지 작용점을 가진 기존제초제와 신규합성화합물에 대해 검정해 보았다. 본 시험에 공시한 기존제초제들은 1) PROTOX를 저해하는 acifluorfen, oxadiazon, oxyfluorfen(Kenyon 등, 1985; Becerril과 Duke, 1989; Duke 등, 1989; Duke 등, 1991), 2) photosystem I을 작용점으로 하는 paraquat (Babbs 등, 1989; Hiyama 등, 1993), 3) photosystem II의 Qb site에 결합되어 전자전달을 차단하는 atrazine과 diuron(Barry 등, 1990; Fuerst 와 Norman, 1991), 4) phytoene desaturase를 저해하여 카로티노이드 생합성을 저해하는 norflurazon(Sandmann 등, 1989), 5) EPSP synthase를 저해하는 glyphosate(Siehl, 1997) 등이다. 이들의 농도 반응성을 검토한 결과, PROTOX 저해제만 0.1  $\mu$ M에서 반응성을 보인 반면 기타 약제는 활성이 없다가 1  $\mu$ M 농도에서는 paraquat가 추가적으로 반응성이 나타나기 시작하였고, 10  $\mu$ M에서는 1  $\mu$ M에서와 같은 경향이었다(표 3). 한편 광조사 시간을 더 연장하였을 때 나머지 화합물 처리에서도 반응성이 나타나는지를 알아보기 위하여 8시간에서 48시간까지 광을 조사한 결과, 조명시간을 늘인다고해서 기타 약제로부터 반응성이 새롭게 나타나지는 않았다(표 1). 한편 PROTOX 저해제로 추정되는 여러 구조의 신규합성화합물을 온실조건에서 시험하여 표 4에서와 같이 제초활성이 강한 것과 활성이 매우 낮은 것을 선별한 후 이를 가지고 *in vitro*활성을 조사, 비교해 보았다.

이는 96-well에서의 결과가 실제 온실에서의 경엽처리효과를 어느 정도 대변할 수 있는지를 알아보기 위해서이다. 그 결과, 온실경엽처리에서 10초종(수수, 피, 개밀, 바랭이, 미국개기장, 까마중, 자귀풀, 어저귀, 도꼬마리, 베꽃)에 대한 평균 방제율이 90% 이상이었던 KSC31673과 KSC31675

Table 3. Leakage of MBTH-positive products from cucumber cotyledon discs by different herbicides

Herbicides	Concentration ( $\mu$ M)		
	0.1	1.0	10
----- Increased absorbance at 670 nm -----			
Acifluorfen	0.27 ± 0.06	0.45 ± 0.06	0.46 ± 0.02
Oxadiazone	0.17 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.53 ± 0.03
Oxyfluorfen	0.26 ± 0.01	0.43 ± 0.03	0.49 ± 0.01
Paraquat	0.01 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.02
Atrazine	0.02 ± 0.04	0.00 ± 0.02	0.00 ± 0.02
Diuron	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01
Norflurazon	0.00 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Glyphosate	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.02	0.04 ± 0.01

Values represent the mean values of 4 replications with standard errors.

Table 4. Herbicidal activity of newly synthesized compounds against various weeds<sup>a)</sup> in the greenhouse<sup>b)</sup>

Chemicals	S O R B I	E C H C G	A G R S M	D I G S A	P A N D I	S O L N I	A E S I N	A B U T H	X A N S I	C A G E H	Mean control (%)
KSC 30811	20	20	0	30	70	80	0	100	40	95	45.5
KSC 31669	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0
KSC 31673	60	100	80	100	100	100	100	100	95	100	93.5
KSC 31675	40	80	80	100	100	100	100	100	100	100	90.0
KSC 31676	30	0	20	0	0	0	0	100	70	100	32.0
KSC 31679	30	0	20	0	100	100	100	100	95	100	64.5
KSC 31681	35	0	20	30	40	100	100	100	100	100	62.5

<sup>a)</sup>SORBI : *Sorghum bicolor*, ECHCG : *Echinochloa crus-galli*, AGRSM : *Agropyron smithii*, DIGSA : *Digitaria sanguinalis*, PANDI : *Panicum dichotomiflorum*, CAGHE : *Calystegia japonica*, XANSI : *Xanthium strumarium*, ABUTH : *Abutilon avicinnae*, AESIN : *Aeschynomene indica*, SOLNI : *Solanum nigrum*

<sup>b)</sup>The test chemicals were treated on 12 day-old-seedlings at 1 kg a.i./ha. Herbicidal activity was visually determined at 14 days after application with 0~100% scale system (0=no effect, 100=completely killed).

는 MBTH를 이용한 검정법의 0.1  $\mu\text{M}$ 에서 0.5이상 평균 방제율이 60~65% 정도였던 KSC31679과 KSC31681은 0.35내외, 평균방제율이 30~50% 정도였던 KSC31676과 KSC30811은 0.1이하의 흡광도를 보였고, 제초활성이 없었던 KSC31669는 전혀 반응을 나타내지 않아 두 검정조건에서의 결과가 아주 일치하는 경향을 보여주었다. 그 경향은 1  $\mu\text{M}$ 에서도 같았다(표 5).

이상의 기준제초제와 신규합성화합물을 가지고 수행한 여러 가지 시험들의 결과를 볼 때, 본 방법은 PROTOX 저해제 및 광계 I의 전자를 탈취하는 제초제 등을 검정하는데 특이성을 가지는 것으로 판단되었으며 초기의 기준농도는 1~10  $\mu\text{M}$ 이 적당할 것으로 생각되었다. 즉, 미지의 물질이 1~10  $\mu\text{M}$  농도에서 활성이 보이면 이는 실용적인 수준에 도달하는 막과산화제초제로서의 가능성이 있다고 여겨진다.

## 고 칠

고효율대량검정법의 기본적인 취지는 많은 수의 화합물을 신속하게 검정함으로써 초기단계에서 후보화합물의 선발효율을 높이는데 있기 때문에 결과의 정밀성보다는 검정 효율의 극대화에 중요한 의미를 부여한다. 막과산화작용 제초제들은 식물체의 세포를 파괴하여 외부에 세포질을 누출시키며(Devine 등, 1993) 이러한 누출을 검정지표로서 이용하여 왔는데 지금까지 가장 보편적으로 사용되어 온 검정법은 세포질 누출정도를 전기전도도로 조사하는 것이었다(Duke와 Kenyon, 1993; 김 등, 1996; 권 등, 1999; Lee 와 Cho, 1996; Vanstone과 Stobbe, 1977; Yanase 등, 1990). 그러나, 이 방법은 시험용액이 최소한 7 mL 이상 요구되며 잎절편 수도 20개 이상 소요되므로 비교적 큰 용기(풋트, 페트리디ッシュ, 관병 등)를 이용하게 되어 공간을 많

Table 5. Effect of different concentrations of newly synthesized chemicals on the leakage of MBTH-positive products from cucumber cotyledon discs

Chemicals	Concentration ( $\mu\text{M}$ )		
	0.1	1.0	10
----- Increased absorbance at 670 nm -----			
KSC 30811	0.07±0.04	0.12±0.03	0.31±0.02
KSC 31669	0.00±0.01	0.00±0.02	0.00±0.02
KSC 31673	0.51±0.04	0.62±0.09	0.67±0.07
KSC 31675	0.50±0.03	0.51±0.04	0.69±0.04
KSC 31676	0.10±0.04	0.26±0.02	0.47±0.04
KSC 31679	0.36±0.04	0.46±0.05	0.62±0.05
KSC 31681	0.33±0.05	0.34±0.05	0.40±0.01
Acifluorfen	0.29±0.03	0.45±0.02	0.51±0.01

Values represent the mean values of 4 replications with standard errors.

이 차지하고, 측정의 경우에도 각 처리구마다 하나씩 하게 되므로 시간이 많이 소요되는 단점을 가지고 있다. 본 실험에서는 96-well 상에서 누출된 세포질용액을 발색시킨 후 분광분석으로 측정하는 방법을 설정하여 그 적용성을 검증해 본 결과, PROTOX 저해제 및 photosystem I의 전자탈취제와 같이 식물의 막과산화작용을 직접적으로 유도하는 제초제의 검정에 유효하였다. 아울러 MBTH를 이용한 분석법의 효율성을 기준 전기전도도법과 비교해 보면 시험용액과 검정 화합물 소요량은 거의 100배 이상 줄일 수 있었으며, 처리당 자엽절편 소요개수도 20~40개로부터 1개로 줄일 수 있고 따라서 절편준비시간도 20배 정도 단축할 수 있었으며, microplate reader로 결과를 측정하기 때문에 측정시간도 거의 80배 정도 단축시킬 수 있었다. 종합적으로 볼 때 한사람이 하루에 검정할 수 있는 약제의 수는 약 400개 정도가 가능할 것으로 판단되었으며 약제조제 및 기타 과정을 자동화시킨다면 그 효율성은 더욱 높아질 것으로 여겨진다.

그러나, MBTH를 이용한 고효율대량검정법에는 몇 가지 고려되어야 할 점이 있었다. 첫째, MBTH/FeCl<sub>3</sub>는 카보닐 및 알데히드류 화합물과 반응하여 발색됨으로(Paz 등, 1965) 이러한 구조를 함유한 화합물을 가지고 검정을 할 경우 처리효과와는 관계없이 바탕색(background color) 자체가 높아질 수 있기 때문에 검정계획을 세울 때 화합물만 들어있는 시험구를 설정해서 그 값을 빼주어야 하는 번거러움이 있다. 그러나 세포질 누출로 인한 흡광도 변화값이 상대적으로 크기 때문에 단순히 활성유무만을 알고자 할 경우에는 크게 고려하지 않아도 무방할 것이다. 둘째, 본 방법의 작업과정 중에는 끓이고 식히는 과정이 있기 때문에 전체적인 검정소요시간이 길어지고 또한 작업의 전과정을 자동화시키기가 어려워 검정의 효율성을 높이는 데는 제한이 있다. 셋째, 발색정도를 흡광도로 나타내기 때문에 화합물의 용해도가 낮거나 처리농도가 높아 상대적으로 탁도가 높은 조건에서는 활성유무를 정확히 분별하기가 어렵다. 따라서 효율성을 보다 현저히 높이려면 이상의 단점을 보완할 수 있는 새로운 방법이 개발되어야 할 것이다.

## 인용문헌

- Anderson, M. P., C. N. Bensch and J. F. Stritzke (1994) A rapid microtitre plate assay for determining sensitivity to photosystem II herbicides. *Weed Sci.* 42:517~522.
- Babbs C. F., J. A. Pham and R. C. Coolbaugh (1989) Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol.* 90:1267~1270.
- Barry P., A. J. Young and G. Britton (1990) Photodestruction of pigments in higher plants by herbicide action. I. The effect of DCMU(diuron) on isolated chloroplasts. *J. Exp. Bot.* 41:123~129.
- Becerril J. M. and S. O. Duke (1989) Protoporphyrin IX content correlates with activity of photobleaching herbicides. *Plant Physiol.* 90:1175~1181.
- Broach J. R. and J. Thorner (1996) High-throughput screening for drug discovery. *Nature.* 384. Supp. 7:14~16.
- Devine M., S. O. Duke and C. Fedtke (1993) Oxygen toxicity and herbicidal action. In *Physiology of Herbicide Action.* pp.115~140. PTR Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Duke S. O., J. Lydon and R. N. Paul (1989) Oxadiazon activity is similar to that of p-nitrodiphenyl ether herbicides. *Weed Sci.* 37:152~160.
- Duke S. O., J. Lydon, J. M. Becerril, T. D. Sherman, L. P. Lehnen, Jr., and H. Matsumoto (1991) Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* 39:465~473.
- Duke S. O. and W. H. Kenyon (1993) Peroxidizing activity determined by cellular leakage, In *Target Assays for Modern Herbicides and Related Phytotoxic Compounds*(eds. by P. Boger and G. Sandmann). pp.61~66. Lewis, Boca Raton.
- Fuerst E. P. and M. A. Norman (1991) Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Sci.* 39:458~464.
- Hiyama T., A. Ohinata and S. Kobayashi (1993) Paraquat(methyl viologen) : Its interference with primary photochemical reactions. *Z. Naturforsch.* 48c:374~378.
- Kenyon W. H., S. O. Duke and K. C. Vaughn (1985) Sequence of effects of acifluorfen on physiological and ultrastructural parameters in cucumber cotyledon discs. *Pestic. Biochem. Physiol.* 24:240~250.
- Lee H. J. and K. Y. Cho (1996) Light-dependent cellular leakage from cucumber cotyledon discs treated with δ-aminolevulinic acid, oxyfluorfen, and rose bengal. *Journal of Photoscience.* 3(1):1~7.
- Major J. S. (1995) Current screening practices in the pharmaceutical industry. Proc. of Brighton Crop Protection Conference - Weeds. pp.89~96.
- Molin W. T. and R. A. Khan (1995) Microbioassays to determine the activity of membrane disrupter herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 53:172~179.
- Pallett K. E. (1997) Herbicide target sites, recent trends and new challenges. Proc. of Brighton Crop Protection Conference-Weeds. pp.575~578.
- Paz M. A., O. Blumenfeld, M. Rojkind, E. Henson, C. Furfine, and P. M. Gallop (1965) Determination of carbonyl compounds with N-methyl benzothiazoline

- hydrazone. *Arch. Biochem. Biophys.* 109:548~559.
- Porter N. and D. Hill (1995) Technological developments in high throughput screening. *Proc. of Brighton Crop Protection Conference - Weeds.* 289~308.
- Ridley S. M., A. C. Elliott, M. Yeung and D. Youle (1998) High-throughput screening as a tool for agrochemical discovery : Automated synthesis, compound input, assay design and process management. *Pestic. Sci.* 54:327~337.
- Sandmann G., H. Linden and P. Boger (1989) Enzyme-kinetic studies on the interaction of norflurazon with phytoene desaturase. *Z. Naturforsch.* 44c:787~790.
- Sato R., E. Nagano, H. Oshio, and K. Kamoshita (1988) Activities of the N-phenylimide S-23142 in carotenoid deficient seedlings of rice and cucumber. *Pestic. Biochem. Physiol.* 31:213~220.
- Siehl D. L. (1997) Inhibitors of EPSP synthase, glutamine synthetase and histidine synthesis. *Rev. Toxicol. (Amsterdam).* 1(3,4):37-67.
- Vanstone D. E. and E. H. Stobbe (1977) Electrolytic conductivity: A rapid measure of herbicide injury. *Weed Sci.* 25:352~354.
- Yanase D., A. Andoh, and N. A. Yasudomi (1990) A new simple bioassay to evaluate photosynthetic electrontransport inhibition utilizing paraquat phytotoxicity, *Pestic. Biochem. Physiol.* 38:92~98.
- 권혜경, 권석윤, 이행순, 윤의수, 김진석, 조광연, 곽상수 (1999) 다양한 제초제에 대한 담배 photomixotrophic 배양세포의 반응. *한국조직배양학회지* 26(3):183~187.
- 김성수 외 10 (1998) 로봇활용 화합물합성 및 대량약효검색 연구. *기관고유사업연구보고서(한국화학연구소).*
- 김진석, 김태준, 홍경식, 황인택, 조광연 (1990) 식물색소 관여형 화합물의 생물검정법으로서 Greening Assay. *한국잡초학회지* 10(3):214~220.
- 김진석, 김태준, 김성문, 조광연 (1999) 제초제 작용기작 연구의 최근 동향과 그 활용. *한국잡초학회지* 19(4):인쇄중.
- 김진석, 조광연, 변종영 (1996) 비광요구형 디페닐에테르계 TOPE의 생리적 작용에 관한 연구. *한국잡초학회지* 16(2):160~170.
- 유응걸, 김형래, 송종환, 전동주, 김경만, 이정노, 홍경식. (1999) 제초활성을 갖는 N-(5-isoxazolelinemethoxyphenyl)-3,4,5,6-tetrahydrophthalimide derivatives. 출원번호 99-040742. 한국.
- 조광연 외 42 (1995) 농약스크리닝(III). 특정연구개발사업 보고서(한국화학연구소).

---

#### Spectrophotometric microtitre assay for rapid screening of membrane-disrupting herbicides

Ok Kyung Kwon, Jin-Seog. Kim\* and Kwang Yun Cho(*Screening Research Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, Yusung, Taejon, 305-600, Korea*)

**Abstract :** This study was conducted to establish an efficient screening method of membrane-disrupting herbicides, based on the result that membrane leakage leading to evolution of carbonyl compounds and aldehydes could be colorimetrically assessed by formation of stable chromophores with MBTH and ferric chloride. Assay conditions including plant material, light intensity, irradiation time, concentrations of reagents for colorization, and reaction time were optimized, and activities of different types of known herbicides were investigated with cucumber cotyledon discs. That result indicated that this assay was sensitive to membrane-disrupting herbicides, such as protoporphyrinogen oxidase inhibitors (acifluorfen, oxyfluorfen, oxadiazon) and an electron interceptor from photosystem I(paraquat). With seven compounds newly synthesized, highly positive correlation was observed between herbicidal activities measured by greenhouse bioassay and MBTH method. Because only a single disc(4 mm diameter) from cucumber cotyledon in 60  $\mu$ L of incubation solution was required to assay, a large number of herbicides could be tested simultaneously using 96-well microtitre plates. But the assay efficiency is not likely to significantly increase because of the boiling step during the reaction.

---

\*Corresponding author (FAX : +82-42-861-4913, E-mail : jskim@pado.krict.re.kr)