

Triazole계 농약 Difenoconazole이 *Xenopus laevis*의 초기 배 발생에 미치는 독성 영향

이유화 · 윤춘식 · 이미주 · 황용기 · 정선우*

창원대학교 생물학과

(2011년 4월 7일 접수; 2011년 7월 11일 수정; 2011년 8월 17일 채택)

Toxic Effects of Triazole Fungicide Difenoconazole on the Early Development of African Clawed Frog, *Xenopus laevis*

You-Hwa Lee, Chun Sik Yoon, Mi-Ju Lee, Yong-Gi Hwang, Seon-Woo Cheong*

Department of Biology, Changwon National University, Changwon Kyungnam 641-773, Korea

(Manuscript received 7 April, 2011; revised 11 July, 2011; accepted 17 August, 2011)

Abstract

We investigated the toxic effects of difenoconazole on the development in the African clawed frog, *Xenopus laevis*. To test the toxic effects, frog embryo teratogenesis assays using *Xenopus* were performed. Embryos were exposed to various concentrations of difenoconazole (0-30 μ M). LC₁₀₀ for difenoconazole was 30 μ M, and the LC₅₀ determined by probit analysis was 27.19 μ M. Exposure to difenoconazole concentrations ≥ 5 μ M resulted in 10 different types of severe external malformation. Histological examinations revealed dysplasia of the eye, heart, liver, somatic muscle, and swelling of the pronephric ducts. The tissue-specific toxic effects were investigated with an animal cap assay. Blood cells were normally induced at a high frequency by mSCF and activin A. However, the induction of blood cells was strongly inhibited by the addition of difenoconazole. Electron micrographs of tested embryos showed the degeneration of somatic muscle and the shrinkage of microvilli on pronephric duct. The gene expression of cultivated animal cap explants was investigated by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). It revealed that the expression of the blood-specific marker(β -globin II) and muscle-specific marker (XMA) were more strongly inhibited than the neural-specific marker(XEn2) by the addition of difenoconazole.

Key Words : *Xenopus laevis*, Difenoconazole, Toxic effect

1. 서론

본 연구에서는 농약 중 살균의 목적으로 사용되고 있는 difenoconazole이 양서류인 *Xenopus laevis*의 초기 배 발생에 미치는 독성효과에 대하여 실험하였다.

Difenoconazole은 당근에 발병된 검은 잎마름병 방제를 위해 스위스의 Ciba-Geigy 회사에 의해 처음 개발 보고 되었으며 우리나라에는 1992년에 푸르젠이라는 상표명으로 등록되어 사용되고 있다. Triazole계 살균제인 difenoconazole은 균사의 침입과 생장을 억제하는데 우수한 특성을 보이며, 이미 발병된 경우에 치료효과가 크고, 생산량을 높이는 것으로 알려져 있다. 미국의 경우 difenoconazole의 식품 잔류허용기준은 우유, 달걀, 육류에서 0.05 mg/kg으로 설정되어

*Corresponding author : Seon-Woo Cheong, Department of Biology, Changwon National University, Changwon Kyungnam 641-773, Korea
Phone: +82-55-213-3454
E-mail: swcheong@changwon.ac.kr

있으나, 우리나라의 경우는 아직 잔류허용기준이 설정되어 있지 않은 실정이다. 2005년 농산물 안정성 조사 실적에서 부적합 검출 성분내역에 의하면 살균제 31개 성분 중 8위를 차지하는 주요 잔류화학물질에 해당한다. CAS number는 119446-68-3이고, 화학명은 cis, trans-3-Chloro-4-[4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazolo-1-ylmethyl)-1, 3-dioxolan-2-yl]phenyl 4-chlorophenyl ester이며, 분자식 $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$, 분자량은 406.29이다. 녹는점은 78.6 °C, 용해도는 물에 16 ml/L(25°C), 에탄올에는 330 g/L(20°C), 아세톤 610 g/L(20°C), 톨루엔 490 g/L(20°C), n-헥산 0.0034 mg/L(20°C), n-옥탄올 95 g/L(20°C)이며, 백색 또는 밝은 베이지색의 결정형 고체이다(Tomlin, 1994). 급성독성은 경구투여시 1,453 mg/kg(LD₅₀, rat), >2,150 mg/kg(LD₅₀, duck), 흡입시 >45 mg/m³/4hr, 피부는 >2,010 mg/kg(LD₅₀, rabbit)로 알려져 있다. 자극성 시험결과 토끼의 눈과 피부에 대해서는 비자극성이며 기니피그의 피부에 반응을 보이지 않았고 인간에 미치는 유해영향은 경구, 흡입, 피부의 경로로 노출되었을 때 받는 것으로 알려져 있다(Zarn 과 Brüscheweiler, 2003). 수생 및 생태독성은 오리(LD₅₀, 경구) >2,150 mg/kg, 메추라기(LC₅₀) >4,760ppm, 꿀벌(LC₅₀, 경구) 187 µg/bee, 물벼룩(EC₅₀) 0.8 mg/L/48hr, 무지개송어(LC₅₀) 0.8 mg/L/96hr, 지렁이(LC₅₀) > 610 mg/kg으로 나타났다. 식물에는 유입되어 두 가지의 활성대사를 이루는데 하나는 triazole에 의하여 triazolylalanine과 triazolylacetic acid로 변환 되는 것과 또 하나는 페닐링의 수산기에 의해 분해되는 것이다. 사양토, 식양토에서의 잔류반감기는 10.5일로 토양이나 수중에 유입되어 광분해 되어 제거된다.

이와 같이 difenoconazole의 독성효과에 대한 연구는 많은 생물에 대하여 이루어져 있으나, 양서류, 특히 대표적인 실험동물인 *Xenopus laevis*에 대한 실험은 이루어진 바 없어 본 연구에서는 difenoconazole이 *Xenopus laevis*의 초기 배 발생에 미치는 독성효과를 FETAX(Frog Embryo Teratogenesis assay-*Xenopus*) 방법(ASM, 1998)을 통하여 밝히고자 한다.

이를 위해서 본 연구에서는 첫째, difenoconazole 처리에 따른 *Xenopus* 배(embryo)의 기관별 이상과 농도별 생존율을 조사하였고, 이를 위한 독성실험은 국

제규격화와 객관화를 도모하기 위해 FETAX방법을 이용하였다. 둘째, difenoconazole이 가장 선택적으로 독성 효과를 나타내는 조직이나 기관을 찾아내어 조직 내 독성효과를 검증하기 위해 대조군과 실험군을 조직병리학적으로 비교하였다. 셋째, 본 연구의 결과 중 혈구 생성 저해효과를 확인하기 위하여 benzidine blood stain과 animal cap assay를 이용하였다. 배양조직내에 혈구의 유도를 위하여 *in vitro*에서 예정표피염으로부터 혈구를 유도하는 인자로 알려진 activin A와 mSCF (Ariizumi 와 Asashima, 1994; Miyanaga 등, 1999; Neildez-Nguyen 등, 2002)를 이용하였다. 그리고 difenoconazole의 세포내 독성효과를 전자현미경적 수준에서 밝히기 위해 정상배와 처리군 배의 미세구조를 투과전자현미경으로 비교하였다. 마지막으로 difenoconazole이 조직분화에 미치는 영향을 분자 수준에서 알아보기 위하여 cDNA 합성과 RT-PCR(reverse transcriptional poly chain reaction)을 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 독성평가

*Xenopus laevis*는 미국에서 수입(Nasco Co. USA)하여 22±2 °C 수조에서 사육·유지하였고, 3년 이상 성적으로 성숙된 암수개체에 HCG(human chorionic gonadotropin, sigma)를 주사하여 수정란을 얻은 후 젤리층을 제거하고 후기 포배기의 배(st. 9)를 실험에 이용하였다(ASM, 1998). 배의 발생단계는 Nieuwkoop 과 Faber를 따랐다(Nieuwkoop 와 Faber, 1956). FETAX 실험을 하기 위하여, 멸균된 3% agar plate 위에서 stage 9의 배를 선별 한 후 무작위로 25개를 선택하여 10 ml FETAX 배양액이 들어있는 직경 60 mm 유리제 페트리디시에 배양하였으며, 이를 대조군으로 하였다. Difenoconazole은 아세톤에 용해시켜 사용하였으며 아세톤 0.06%(v/v)를 용매대조군 농도로 하였다. 전체 치사농도(LC₁₀₀)를 찾기 위한 실험용액의 농도는 2.03(5), 4.06(10), 6.09(15), 8.12(20), 10.15(25), 12.18(30) mg/L(µM)로 하였고, 반수치사농도(LC₅₀)를 찾기 위한 실험용액의 농도는 ASTM의 지침에 따라 LC₁₅와 LC₉₅ 사이에서 1µM 간격으로 세분하여 25, 26, 27, 28, 29 µM으로 하였다. 각 농도에서 세 번 반복하여 실험하였으며, 각각 세 번의 실험은 다른 암수

쌍으로부터 얻은 배를 사용하였다. 배의 선택은 FETAX의 표준지침을 이용하였다(ASTM, 1998). 대조군과 실험군은 96시간동안 24 ± 0.5 °C에서 배양하였다. pH는 7.2~7.4 범위로 하였고 배양액은 매일 교환하였으며, 치사한 배는 매일 제거하였다. 생존한 배는 ethylene glycol monophenyl ether(0.05%)로 마취시켰으며, 실험이 끝난 후 3% 중성포르말린으로 고정하였다. 배의 생존률과 기형률을 대조군의 값과 비교하였다. 배의 체장은 해부현미경하에서 micrometer로 측정하였으며, 외형적 기형 또한 해부현미경(Zeiss)으로 관찰하였다.

2.2. 조직학적 연구

조직학적 관찰을 위하여 FETAX 실험을 마친 배를 대조군과 실험군의 각 농도별로 10개체씩 사용하였다. 표본은 Bouin's solution에서 6시간 동안 실온에서 고정하였다. 이후 ethanol로 탈수하고, xylene으로 투명화 하였다. Paraffin(Paraplast Plus, Sigma)으로 포매하여 microtome으로 8 μ m 두께로 절편 한 후 Xylene으로 paraffin을 제거하고 ethanol로 탈수한 후 hematoxylin-eosin 염색을 행하였다.

2.3. Benzidine blood stain

Difenoconazole의 독성이 혈구의 발생저해를 유발하는지 밝히기 위해서 앞의 FETAX 실험법으로 배양한 배의 대조군, 15 μ M 그리고 25 μ M 농도의 실험군과 동물극 분리배양법으로 배양한 조직의 대조군, 그리고 모든 실험군을 대상으로 benzidine blood stain을 행하였다. 배양과정을 거친 후 고정을 하지 않은 살아 있는 배나 조직을 benzidine(Sigma) 용액으로 5분간 처리한 후 반응이 나타날 때까지 과산화수소를 첨가해 주고 실온(22 °C)에서 10-15분간 유지하면서 발색을 관찰하였고, 사진촬영 하였다. 촬영 후에는 아세트산으로 과산화물을 세척하고 메탄올로 고정하였다(Orkin 등, 1975).

2.4. Animal cap assay

동물극 분리 배양법은 중배엽 유도 실험방법과 동일하게 행하였으며(Slack, 1991), 모든 과정을 멸균상태에서 행하였다. 멸균된 3% agar plate 위에서 stage 9의 배만을 선별하여 핀셋(watch maker's tweezers)

으로 난막을 제거하고 전기분해한 텅스텐 니들로 동물극을 분리한 후, 0.1% bovine serum albumin(BSA; Sigma)이 포함된 Steinberg's solution(SS; 60 mM NaCl, 0.67 mM KCl, 0.34 mM Ca(NO₃)₂, 0.83 mM MgSO₄·H₂O, 5 mM Tris-HCl)으로 정상배가 stage 43에 도달할 때까지 배양하여 이를 대조군으로 하였다. activin A 단독처리군에서 동물극 분리편은 0.5 ng/ml activin A(in SS with 0.1% BSA)에 노출시켰다. Difenoconazole 처리군에서 동물극 분리편은 difenoconazole의 sublethal 농도인 25 μ M(in control solution)에서 노출시켰다. 혈구 유도 및 difenoconazole에 의한 혈구발생 저해를 확인하기 위하여 mSCF(stem cell factor frog-mouse, Sigma)처리군은 30 ng/ml, 복합처리군에서는 30 ng/ml mSCF 와 0.5 ng/ml activin A의 복합처리액, 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A 및 difenoconazole 25 μ M의 복합처리액에 각각 노출시켰다. 동물극 분리편은 정상배가 stage 43에 도달할 때까지 20 °C에서 72시간 배양하였다.

2.5. 투과전자현미경적 연구(Transmission Electron Microscopy)

투과전자현미경적 관찰을 위해 대조군과 difenoconazole을 처리, 배양한 배를 0.1 M 인산완충액, 2.5% glutaraldehyde 용액, 2% paraformaldehyde 용액과 3차 증류수를 이용하여 2~4시간 전고정하고 0.1M 인산완충액으로 세척하였다. 후고정은 0.1 M 인산완충액으로 완충시킨 1% 오스뮴 산으로 4°C에서 1시간 동안 고정하였으며, 고정된 시료는 0.5% uranyl acetate로 염색하였다. 시료를 ethanol과 propylene oxide로 탈수한 후, epon-araldite에 포매 하였다. 포매한 시료를 초박절편기(LDK NOVA)에서 다이아몬드 나이프(Diatome)를 이용하여 0.08 μ m 두께로 절편한 후 2% uranyl acetate 용액과 lead citrate 용액으로 각각 염색하여(Reynold, 1963) 투과전자현미경(Jeol 1200 EX2)으로 조영하였다. *Xenopus laevis* 배에 대한 전자현미경 관찰 결과의 분석은 Tardin에 따랐다(Tardin, 1972).

2.6. RT-PCR assay

Total RNA는 각 농도 조합별로 배양된 50개씩의 동물극 분리편으로부터 RNase Mini Kit(Qiagen)를

이용해 추출하였으며, EF-1 α , muscle actin, β globin II, XEn-2 등의 Primer로(Hemmati-Brivanlou 와 Melton, 1994) RT-PCR(Perkin-Elmer Gene Amp PCR system 2400)을 하여 증폭된 DNA를 전기영동 후 밴드를 확인하였다.

2.7. 통계학적 분석

LC₅₀을 결정하기 위하여 SPSS Software(version 14.0)를 사용하여 probit analysis를 행하였다. 그리고 difenoconazole을 처리한 실험군의 성장이 대조군에 비하여 유의미하게 저해되었는지 평가하기 위하여 SPSS중 student t-test의 독립표본 검증법을 사용하여 95% 신뢰한계에서 측정하였다.

3. 결과

3.1. 독성평가

Difenoconazole 농도별로 *Xenopus laevis* 후기낭배기의 배(st. 9)를 150개체씩 사용하여 96시간 처리한 결과 대조군과 아세톤 0.06%(v/v)군에서 모든 배(embryos)가 st.46의 정상 유생으로 발생하였다. Difenoconazole에 노출된 실험군에서는 수종(edema)과 척색 이상을



Fig. 1. Tadpoles of *Xenopus laevis* exposed to difenoconazole at the blastula stage. Control tadpole(bottom) and test tadpoles(others).Control and acetone-treated embryos developed into normal tadpoles but difenoconazole-treated embryos exhibited dose-dependent abnormalities. (A) Control embryo of *Xenopus laevis*. (B) Acetone control embryo, (C-E) Difenoconazole-treated embryos (10 μ M, 20 μ M, 25 μ M). Bar:1 mm.

포함한 10종류의 다양한 발생학적 기형이 관찰 되었으며, difenoconazole의 농도가 증가 할수록 기형발생률 역시 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 1).

FETAX 배양액에 처리한 대조군과 용매 대조군의 생존비율은 실험된 개체수의 100%로 나타났다. Difenoconazole 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M 그리고 25 μ M의 농도에 노출된 배의 생존률은 각각 실험 개체수의 100%, 98.67%, 98.67%, 89.33% 그리고 52%로 독성물질의 농도가 높아짐에 따라 생존률이 낮아지며, 30 μ M 이상의 고농도에서는 모든 배가 치사하였다(Fig. 2).

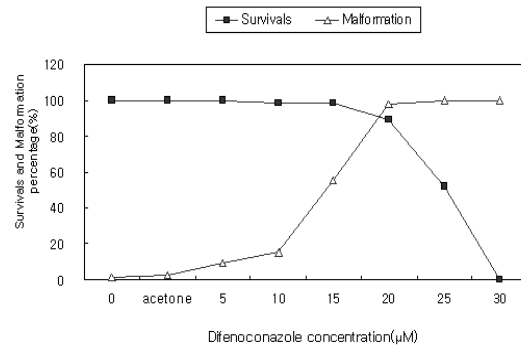


Fig. 2. The percentage of survivals and malformations in *Xenopus laevis*. Blastula embryos were exposed to difenoconazole for 96 hr at 24 \pm 0.5 $^{\circ}$ C. Rates of lethality and malformation increased with increasing the concentration of difenoconazole.

생존한 배의 기형비율은 대조군에서는 실험 개체수의 1.33%였고, 용매 대조군에서는 2.67%로 모두 ASTM E 1439-98에서 제시하는 기준이하로 나타났다. 15 μ M, 20 μ M의 difenoconazole 처리군에서 생존한 배의 기형비율은 각각 55.33%, 98%로 증가하였고, 25 μ M 이상에서는 100%로 나타났다(Fig. 2). 그리고 반수치사 농도(LC₅₀)를 구하기 위한 실험군인 25 μ M, 26 μ M, 27 μ M, 28 μ M, 그리고 29 μ M 농도에 노출된 배의 생존율은 각각 85.33%, 79.33%, 49.33%, 35.33%, 그리고 23.33%로, 27 μ M 정도에서 LC₅₀을 구할 수 있었다. 위의 결과를 SPSS의 probit analysis로 검증한 결과 LC₅₀은 27.19 μ M로 나타나 본 실험에서 나타난 결과와 유사하였다.

대조군과 실험군에서 생존한 모든 배의 외형적 기형을 연구한 결과 수종을 포함하여 10가지의 기형이 나타났다. 수포(blisters)는 피부와 수종 표면에서 비특이적으로 나타났으며 정상적인 배에서 눈(eye)은 머리의 측면에 위치하지만 difenoconazole 처리된 배의 눈은 구심성의 안배를 보여주고, 20 μM 이상의 농도부터 뚜렷한 발생이상이 관찰되었으며, 눈의 두부 중앙으로 쓸림은 뇌간이 좁아지는 개체에서 더 심하게 나타났으며 농도가 증가 할수록 뇌간의 좁아짐이 증가하였다. 코 부분의 함몰, 눈의 헤르니아와 수종 발생으로 인한 안면(face) 이상은 25 μM 에서 76%로 나타났다. Difenoconazole의 처리에 의해 가장 뚜렷하고 심한 이상은 척색(notocord)에서 나타났으며 10 μM 에서 실험 개체수의 15.33%에서 나타나기 시작하여, 농도가 증가할수록 크게 증가하였다. 수종(edema)은 눈, 얼굴, 그리고 복부에서 나타났으며, 농도가 증가할수록 수종의 기형률이 증가하였다. st.46의 정상배의 장(gut)은 밀집하고 잘 회전하고 있지만 실험군의 장은 짧고 느슨하며, 형성 장애를 보였으며 고농도에 노출된 배에서는 yolk cell들이 멍쳐있는 경우가 많아 장의 발달이 확인 되지 않았다. 소화관 이상과 눈의 이상을 비롯한 안면기형 및 척색 이상이 고농도의 difenoconazole 처리 시, 심각한 발달 이상을 보였고, 대조군의 심장은 활발히 뛰고 혈액이 잘 돌고 있었으나 처리군에서의 심장은 크기가 많이 줄어들고 심장의 일부만 박동을 하여 심근의 이상을 보이는 개체들이 많았다. 발육저해(stunted)는 difenoconazole 10 μM 처리 시, 0.67%로 나타나기 시작하여 25 μM 에서 36.67%로 나타났다(Fig. 3).

Difenoconazole에 의한 성장저해 영향을 확인하고, 정상배와 처리배의 체장사이의 유의성을 검증하기 위하여 student's t-test의 독립표본 검증을 행하였다. 대조군의 평균 체장 $\pm\text{SD}$ 는 8.97 ± 0.63 mm이었고 아세톤 처리군의 평균 체장은 8.90 ± 0.75 mm($t= 0.73$)으로 유의미한 변화를 나타내지 않았고, 5 μM difenoconazole이 처리된 군에서는 8.83 ± 0.64 mm($t= 1.54$, $p<0.05$)로 평균 체장이 감소하여 유의한 변화를 나타내었다. 그리고 10 μM , 15 μM , 20 μM , 그리고 25 μM 으로 농도가 증가함에 따라 각각의 평균 체장도 8.23 ± 0.70 mm($t= 7.80$, $p<0.001$), 7.54 ± 0.61 mm($t= 16.3$, $p<0.001$),

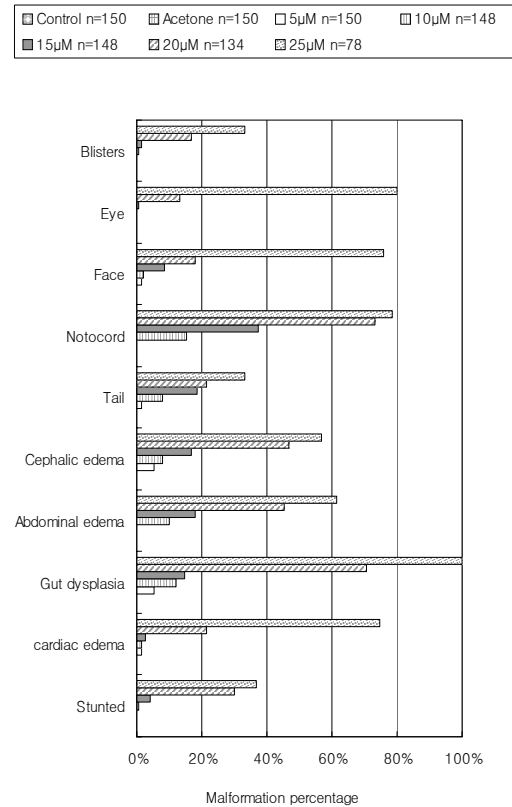


Fig. 3. Various external malformations were observed in tadpoles exposed to 5–25 μM difenoconazole. Edema, gut dysplasia and abnormal notocord were induced by 20 μM or higher concentrations of difenoconazole. All malformations were observed very frequently at the concentrations of 20 μM of difenoconazole or higher.

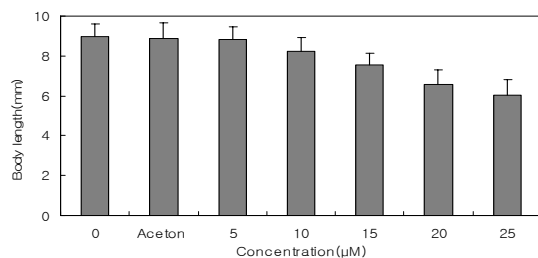


Fig. 4. Body lengths of control and difenoconazole-treated embryos. The reduction of length was significant in 10 μM or higher concentration of difenoconazole ($P<0.01$ and error bars show 95.0%).

6.60±0.74 mm($t= 24.83, p<0.001$), 그리고 6.05±0.79 mm($t= 28.99, p<0.001$)등으로 점차 감소하며 대조군과 비교 하였을 때 매우 유의미한 변화를 나타내었다 (Fig. 4).

3.2. 조직학적 연구

Difenoconazole 처리된 실험군에서 눈, 심장, 간, 신장(전신관), 근육, 체절, 그리고 소화관 등에서 다양한 조직학적 기형이 관찰되었다(Fig. 5). 정상배의 눈은 렌즈, 유리체방, 망막층이 잘 발달되었고 안배는 머리 측면에 위치하였다(Fig. 5-A). 한편 정상배의 눈과 비교하였을 때 difenoconazole이 처리된 배에서 유리체방의 결핍에 의한 헤르니아와 광수용 세포(photoreceptor cell)의 분리현상, 즉 망막분리가 관찰되었고, 구전정상피층이 뇌쪽으로 함몰되어 나타났(Fig. 5-B). 정

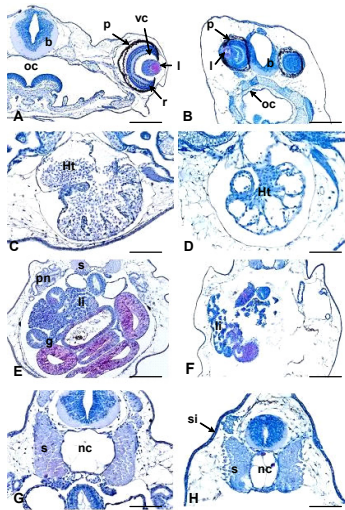


Fig. 5. Comparative histology showing malformations in *Xenopus laevis* embryos to 25 μ M difenoconazole for 96 h; (A-B) tadpoles sectioned at the level of the eye, (A) control, (B) difenoconazole treated; (C-D) tadpoles sectioned at the level of the heart, (C) control, (D) difenoconazole treated; (E-F) tadpoles sectioned at the level of the liver, somites, pronephros, (E) control, (F) difenoconazole treated; (b: brain, g: gut, Ht: heart, l: lens, li: liver, nc: notochord, oc: oral cavity, p: pigment epithelium, pn: pronephros, r: retina, s: somatic muscle, si: swollen integument, vc: vetrous chamber; bar = 100 μ m).

상배의 심장은 1심방 2심실로 심장 내에 다수의 적혈구가 분포하지만(Fig. 5-C), difenoconazole 처리군의 심장은 심근발육 부전으로 크기가 매우 감소하여 있고, 심장내의 적혈구 수도 극히 낮은 밀도를 보였다(Fig. 5-D). 정상배의 소화계에서 간은 세포가 일정하게 분포되어 있고, 세포사이에 모세혈관이 분포하며, 식도, 간, 장 등으로 복잡한 구조로 나타났으며 간삭(hepatic cords)들은 서로 줄을 이루고 서로 밀착되어 규칙적으로 배열되어 있다(Fig. 5-E). 반면 difenoconazole 처리배의 간은 정상 간보다 단순한 구조를 보이며 간삭이 산재되어 있으며 혈관의 분포도 드물게 나타났고 간이 심장 쪽에 침투하여 기관사이가 구분되지 않으며 간삭이 망상을 이루어 밀도가 높지 않았다 (Fig. 5-F). 또한 정상배의 전신관에서는 전형적인 특징인 세포내 공포가 나타나고 고리모양을 이루고 있으나(Fig. 5-E) 실험배의 전신관은 단세포층이 팽대되고 느슨한 구조를 가지고 있었다(Fig. 5-F). 정상배에서 척색은 조밀하고 치밀하게 조직되어 서로 밀착되어 있으나(Fig. 5-G) difenoconazole 처리배의 척색은 구부러져있고 느슨하며, 근조직은 치밀하지 않고 비어있는 곳이 자주 관찰되는 근육발달이상이 나타났(Fig. 5-H).

3.3. Benzidine blood stain & Animal cap assay

Difenoconazole의 독성이 혈구의 분화를 저해하였으며, 이러한 결과를 확인하기 위하여 배(embryo)와 동물극 분리편을 대상으로 benzidine blood stain을 행하였고, 동물극 분리편의 경우 조직학적 연구방법을 통해 분석하였다(Fig. 6).

*In vivo*에서 FETAX 배양액에서 배양한 대조군의 정상배에서는 심장과 대동맥궁에서 benzidine 반응을 보이는 혈구가 관찰되었다(Fig. 6-A). 그러나 15 μ M 농도로 처리한 실험군의 심장부위에서는 대조군에 비해서 benzidine 반응이 약하게 나타났고 오히려 심장의 부위에서 출혈로 추정되는 푸른 색 반응을 확인하였다(Fig. 6-B). 그리고 25 μ M 실험군에서는 심장과 전신관부근에서 benzidine 반응이 관찰되지 않았으며 대동맥궁 형성이 정상적으로 이루어지지 않은 것을 알 수 있었다(Fig. 6-C).

또한 difenoconazole에 의하여 혈구의 분화가 저해된다는 사실을 *in vitro*에서 확인하기 위하여 행한 동

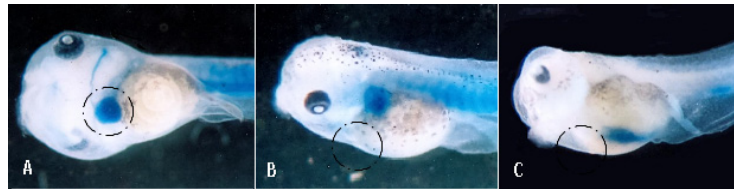


Fig. 6. Benzidine blood stained tadpoles of *Xenopus laevis* exposed to difenoconazole and control at the blastula stage. (A) Control tadpole (left) and test tadpoles(others). Control embryos developed into normal tadpoles with intact heart and blood. (B and C) But test embryos exhibits dose-dependent decrease of blood in heart. (A) Control embryos showed heart that stained with benzidine (blue color) in both atrium and ventricle, (B) 15 μ M difenoconazole-exposed, (C) 25 μ M difenoconazole-exposed.

물극 분리 배양 실험(Fig. 7)에서 0.1% BSA가 포함된 Steinberg's 생리식염수에 배양된 대조군 동물극 분리편은 비정형표피조직만 분화시켰으며 benzidine blood stain에 반응하지 않았다(Fig. 7-A). 양서류 *in vitro* 실험에서 혈구를 유도하는 효과가 있는 것으로 알려진 mSCF를 단독으로 처리하였을 때도 혈구가 유도되는지를 확인하기 위하여 30 ng/ml mSCF를 단독으로 처리하였으며 그 결과 역시 대조군과 유사하게 비정형표피조직만이 분화하였다(Fig. 7-B). 그리고 difenoconazole을 15 μ M 농도로 단독처리 했을 때 외관상 대조군과 비슷하였고 역시 benzidine blood stain에 반응하지 않았다(Fig. 7-C). 강력한 증배엽 유도인자인 activin A는 0.5 ng/ml의 농도에서 동물극 분리편을 배양했을 때 혈구양세포가 주로 유도되는 것으로 보고되었는데 (Ariizumi 등, 1991) 0.5 ng/ml의 농도로 단독 처리한 결과 benzidine blood stain에 20개 중 1개만 반응하여 낮은 비율의 혈구분화를 보여주었다(Fig. 7-D). Activin A와 mSCF를 복합처리하면 양서류 조직 배양 시, 혈구 분화가 효과적으로 일어난다는 보고(Miyanaga 등, 1998)에 따라 본 연구에서 30 ng/ml mSCF, 0.5 ng/ml activin A를 복합 처리하여 배양하였다. 그 결과 benzidine blood stain에 반응을 보인 분리편은 20개 중 8개로 실험군의 40%로 나타났다(Fig. 7-E). 최종적으로 activin A 및 mSCF에 의한 혈구유도 효과를 difenoconazole이 얼마나 강하게 저해 할 수 있는지를 *in vitro* 에서 확인하기 위하여 30 ng/ml mSCF, 0.5 ng/ml activin A, 25 μ M difenoconazole의 세 가지 물질을 혼합한 배양액에 동물극 분리편을 배양하였다. 그 결과 activin A의 효과로 인하여 분리편의 조직분

화는 나타났지만 mSCF와 activin A의 복합 효과인 혈구의 발생빈도는 10%로 저조하였고 그 배양조직들도 benzidine blood stain에 대하여 약하게 반응하였다(Fig. 7-F). 이러한 결과를 통해 difenoconazole은 *in vitro*에서 적혈구 유도를 저해한다는 사실을 알 수 있었다.

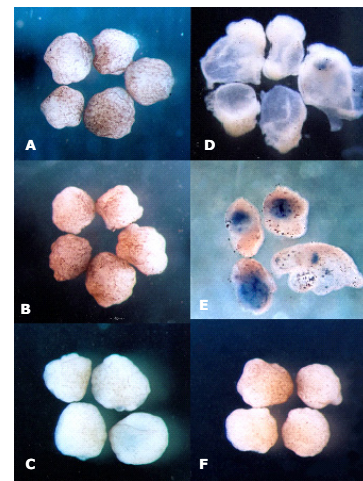


Fig. 7. Benzidine treated animal cap explants of *Xenopus laevis* (A) Control, (B) single dose of 30 ng/ml of mSCF, (C) single dose of 25 μ M difenoconazole, (D) explant treated with 0.5 ng/ml of activin A swelled but showed benzidine reaction in only one explant, (E) 40% of explant incubated in the mixture of 30 ng/ml mSCF and 0.5 ng/ml activin A showed distinct benzidine reaction in their inner space, (F) the addition of 25 μ M difenoconazole to the mixture of 30 ng/ml mSCF, 0.5 ng/ml activin A showed strong inhibition of inducing erythrocytes in explants.

Benzidine blood stain 결과를 재확인하기 위하여 반응을 마친 분리편들을 재고정하여 절편한 결과(Fig. 8), 대조군에서는 비정상표피조직만이 확인되었다(Fig. 8-A). 25 μM difenoconazole 단독 처리군에서도 역시 비정상표피조직만이 분화되었으나 대조군과는 달리 비정상표피조직 사이사이에 작은 공극이 관찰되고 eosin에 대한 염색반응이 약하여 대조군과는 차이가 있었다(Fig. 8-B). 30 ng/ml mSCF 단독 처리군에서는 대조군과 유사한 결과를 보여주었으며 비정상표피조직만 분화하였다(Fig. 8-C). 0.5 ng/ml activin A 단독 처리군에서는 약간의 중배엽성 간엽조직이 분화하면서

서 가운데 빈 공간이 형성이 되었으며 여기에 약간의 혈구세포가 나타난 분리편이 있었다(Fig. 8-D). 그리고 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A 복합 처리군에서도 역시 약간의 중배엽성 간엽조직이 분화하면서 가운데 빈 공간이 형성되었으며 여기에는 mSCF의 작용으로 blood cell이 관찰되었다(Fig. 8-E). 그러나 30 ng/ml mSCF, 0.5 ng/ml activin A, 25 μM Difenoconazole 복합 처리군에서는 단층의 표피세포로 둘러싸인 분리편에 근육조직과 신경조직이 드물게 나타나며 빈 공간에서는 blood cell이 관찰되지 않았다(Fig. 8-F). 이로써 difenoconazole이 *Xenopus laevis* 배의 혈구분화에 강한 저해제로 작용한다는 것을 알 수 있었다.

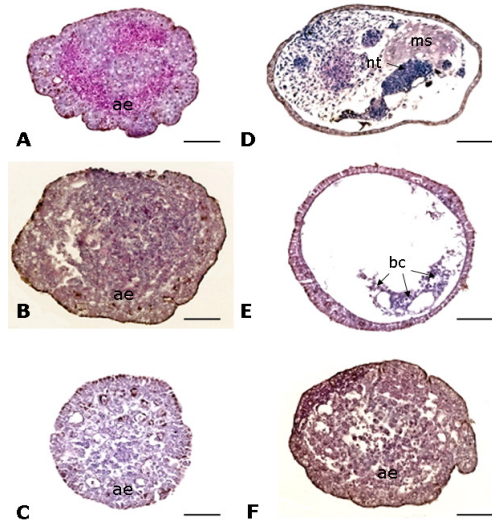


Fig. 8. The histological verification on the induction or inhibition erythrocytes in animal cap explants of *Xenopus laevis*. (A) Only atypical epithelium was observed in control explants, (B) explants exposed to 25 μM difenoconazole also exhibited only atypical epithelium, (C) explants exposed to 30 ng/ml of mSCF showed only atypical epithelium, (D) mesenchyme and atypical epithelium were induced but blood cell was hardly differentiated by a single dose of 0.5 ng/ml activin A, (E) explants incubated in the mixture of 30 ng/ml mSCF and 0.5 ng/ml activin A showed mesenchyme and blood cells, (F) in explants incubated in the mixture of 30 ng/ml mSCF, 0.5 ng/ml activin A and 25 μM difenoconazole, erythrocytes were hardly developed (ae: atypical epithelium, bc: blood cell, nt: neural tissue; ms: muscle; bar=100 μm).

3.4. 미세형태학적 연구

25 μM difenoconazole에서 72시간 동안 배양된 배와 대조군의 미세구조를 투과전자현미경으로 관찰하였다. Difenoconazole의 근육발생 저해효과를 확인하기 위하여 *Xenopus* 배의 체절 옆 등쪽 근육을 관찰하여 보았을 때 대조군의 정상배에서는 근원섬유요소들이 규칙적으로 배열되어 있고 Z 라인이 뚜렷하며 치밀한 구성을 보여주었다(Fig. 9-A). 그에 비해 difenoconazole 처리군에서는 Z 라인의 부분적 붕괴와 근원섬유요소의 결실이 자주 관찰되고 군데군데 비어 있는 것이 특징으로 나타났으나 미토콘드리아의 붕괴는 관찰되지 않았다(Fig. 9-B).

원신관(protonephros) 은 세뇨관의 원기이며 올챙이시기에 나타나는 배설기관이다. 대조군에서 원신관의 환상구조를 관찰하였을 때 내강을 향하여 미세융모(microvilli; mv)가 밀집하여 분비와 수송기능을 담당하고 있으며 섬모(cilia)가 관찰된다(Fig. 9-C). 대조군과 비교하여 처리군에서는 내강 쪽을 향한 미세융모와 섬모가 구부러져 있고 길이도 짧아지며 불규칙적인 것이 관찰되었다. 또한 파괴된 세포부속물들 처리하는 것으로 알려져 있으며 파괴되는 세포에서 대표적으로 나타나는 거대용해소체(multivesicular body; mb)가 자주 관찰되었는데 이는 difenoconazole의 처리에 의해 세포붕괴가 일어났다는 것을 의미한다(Fig. 9-D).

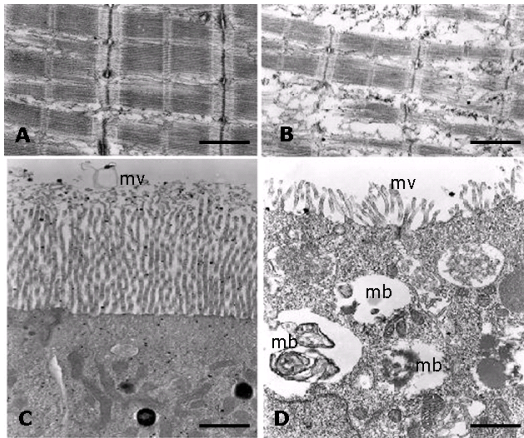


Fig. 9. Electron micrographs of the incubated explants. (A, C) Control animal cap explants, (B, D) test explants exposed to 25 μ M of difenoconazole. The difenoconazole-exposed explants exhibited muscle degeneration and the shrinkage of microvilli on pronephric duct. (mb: multivesicular body; mv: micro villi; bar = 1 μ m).

3.5. RT-PCR assay에 의한 mRNA 발현량 조사

activin A와 mSCF에 의한 특정 조직유도와 difenoconazole에 의해 저해된 조직의 유전자 발현을 확인하기 위해 mRNA 발현량조사를 하였다. 이를 위해 total RNA를 대조군과 difenoconazole 처리군에서 추출하여 cDNA를 합성하기 위해 RT-PCR을 행하였다. 혈액 특이적 유전자인 β -globin II와 근육 특이적 유전자인 XMA(*Xenopus-laevis* muscle actin), 신경 조직 특이적 유전자 및 중뇌, 후뇌 경계 특이적 유전자인 XEn2에 대하여(Hemmati-Brivanlou 등, 1991) 두 비교 그룹간의 유전자 발현을 비교하였다(Fig. 10). 대조군과 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A 복합 처리군 그리고 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A에 25 μ M difenoconazole 복합 처리군의 mRNA 발현량을 비교해 보았다. EF-1 α (*Xenopus laevis* elongation factor 1alpha enhancer-promoter)는 유전자 수준에서 변화가 없기 때문에 동일한 mRNA 양의 표시자로 사용하였다. β -globin II는 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A 복합 처리된 분리편에서 높게 나타났으나 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A에 25 μ M difenoconazole 복합 처리군에서는 낮은 발현량을 보

였다. 따라서 difenoconazole이 혈액의 분화를 저해하는 것으로 보인다. XMA는 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A 복합 처리된 분리편에서 높게 나타났으나 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A에 25 μ M difenoconazole 복합 처리군에서는 비교적 낮은 발현량을 보였다. 이로써 근육의 발현량은 difenoconazole의 첨가에 의해 저해된다는 것을 알 수 있었다. 또한 XEn2 유전자는 대조군에서는 발현하지 않았으나, 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A 복합 처리된 분리편과 30 ng/ml mSCF와 0.5 ng/ml activin A에 25 μ M difenoconazole 복합 처리군에서 비슷한 양의 발현을 보였다. 이 결과로 difenoconazole이 혈액과 근육의 분화는 저해하지만 신경조직분화에는 강한 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다.

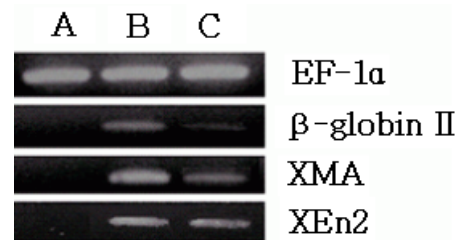


Fig. 10. Gene expression by RT-PCR of incubated animal cap explants (presumptive ectoderm). Expressions of mRNA were compared. Control showed highly expressed EF-1 α and unexpressed β -globin II, XMA and XEn2(lane A). In combined dose of 30 ng/ml mSCF with 0.5 ng/ml activin A, and EF-1 α , β -globin II, XMA and XEn2 showed strong expression(lanes B). In combined dose of 30 ng/ml mSCF and 0.5 ng/ml activin A of 25 μ M difenoconazole, EF-1 α expressed strongly, but and β -globin II and XMA showed weak expression (lanes C).

4. 고찰

본 연구에서는 농약류의 내분비교란물질이 생태계 내에서 양서류의 생존과 생활사에 미치게 될 잠재적인 영향을 예측하기 위해, 사용처와 사용빈도에 비해 생물체에 대한 연구결과가 빈약한 difenoconazole을 이용하여 *Xenopus laevis*의 초기 배 발생에 미치는 독성효과를 실험하였고, 그 결과 영향을 받는 다양한 기

관과 조직을 확인하였다.

Xenopus laevis 의 배를 difenoconazole에 노출하였을 때, 농도가 증가할수록 기형발생률은 증가하였고, 기형발생은 비교적 낮은 농도에서부터 비 특이적으로 나타났으며, 25 μ M difenoconazole 처리군에서 100%의 기형이 관찰되었다. 초기 배를 difenoconazole에 노출하였을 때 수종과 수포와 같은 10개 형태의 외부형태 기형이 발생하였다. 특히 외관상 눈에 띄게 높은 빈도로 관찰된 수종의 발생과 뇌간이 좁아지는 것과 심장의 비정상적인 발생들은 이미 보고된 바 있는 fenitrothion(Elliott-Feeley E 와 Armstrong, 1981-1982)과 ZZ-Aphox(Pilar 등, 1993)의 독성실험 결과와 유사하였다. 또한 소화관의 회전 이상과 탈색, 눈의 형태적·조직적 이상, 피부의 수포 등도 관찰되었는데 이러한 영향 역시 이미 보고된 바 있는 벤지딘과 그 부산물인 카벤다짐과 BIC(n-butyl isocyanate)의 독성효과와 유사하였다(Yoon 등, 2003; 2008).

정상배의 체장과 difenoconazole 처리군의 체장사이에 유의미한 차이가 있는가를 확인하기 위하여 행한 student's t-test의 독립표본 검증결과 처리군 10 μ M 농도 이상에서 평균 몸길이가 감소하여 유의미한 변화를 나타내기 시작하였고 15, 20, 그리고 25 μ M으로 농도가 증가함에 따라 각각의 평균 몸길어도 점차로 감소하여 대조군과 비교하였을 때 매우 유의미한 변화를 나타내었다. Carbaryl (Bridges, 2000; Shin 등, 2009)에 대한 연구에서도 평균 신장 감소를 보여주는 결과가 있었으며, 이러한 평균 신장의 감소는 모든 독성실험에서 가장 현저한 독성평가 기준으로서, 본 연구에서 difenoconazole은 *Xenopus laevis*에 심각한 성장저해를 유발하는 독성물질로 판명되었다.

Difenoconazole에 의해 독성을 나타내는 조직과 기관을 탐색하기 위해 행한 조직학적 연구에서 대조군과 비교하였을 때 농도 20 μ M 이상 처리군에서 눈, 심장, 간, 전신관, 체절(근육), 이자 그리고 소화관 등에서 다양한 조직학적 기형이 관찰되었다. 눈은 유리체방의 결핍에 의한 헤르니아가 나타나고 광수용 세포(photoreceptor cell)가 망막으로부터 분리되는 현상이 관찰되었고, 구전정 상피층이 뇌 쪽으로 함몰되어 나타났다. 이러한 효과는 니켈 클로라이드(nickel chloride)를 *Xenopus laevis*의 배형성에 투여하였을 때 소안구,

탈색, 망막의 헤르니아, 홍채결손 등 눈의 기형발생을 일으킨다는 보고와 유사하다(Hauptman 등, 1993). 한편, 완전한 형태를 갖추고 다수의 적혈구가 분포하고 있는 대조군과 비교했을 때 처리군에서는 심장 내의 적혈구가 감소하는 것이 관찰되었고, 심장 근육의 손상을 보였는데 이는 chlorpyrifos가 *Xenopus laevis*에 나타내는 독성효과와 비슷하였다(Colombo 등, 2005). 한편, 외부 형태적인 기형 발생에서 유사한 영향을 나타내었던 페니트로티온(Elliott-Feeley 와 Armstrong, 1981-1982)은 교감신경에 영향을 끼치는 것으로 보고되었는데, 본 실험에서는 중추신경계의 형성에 대한 특별한 영향은 조직학적 관찰 수준에서는 관찰되지 않았다.

본 연구에서는 또한, difenoconazole의 독성효과에 의해 혈구의 분화가 저해된다는 결과를 얻었고 이를 증명하기 위하여 *in vivo*에서 FETAX 실험법에 따라 배양한 배와, 중배엽 유도 실험방법에 따라 배양한 동물극 분리편을 대상으로 benzidine blood stain을 행하였다. 모든 단독 처리군에서는 benzidine blood stain에 반응하는 것을 관찰할 수 없었다. 이로써 비록 mSCF와 activinA가 각각 혈구 유도 효과가 있는 것으로 알려진 물질이지만 단독 처리되었을 경우에는 혈구 유도능력이 극히 저하되는 것을 알 수 있었다. 이 두 물질을 복합 처리하여 배양한 결과 20개 분리편 중 8개가 반응하여 40%의 분리편이 benzidine blood stain에 반응하는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 혈구의 유도를 확인한 앞의 두 물질과 difenoconazole을 복합 처리한 결과 benzidine blood stain에 20개 중 1개만의 분리편이 반응하여 혈구의 발생빈도가 현저히 저하되었으며, 이를 통해서 difenoconazole이 적혈구의 분화를 저해한다는 것을 증명할 수 있었다.

Difenoconazole의 기관발생 저해효과를 전자현미경적 수준에서 확인한 결과, 대조군과 달리 처리군의 체절 옆 등쪽 근육에서 Z 라인의 부분적 붕괴와 근원섬유요소의 결실이 자주 관찰되었으나 미토콘드리아의 붕괴는 관찰되지 않았다. 이것은 미토콘드리아를 붕괴하는 타 독성물질과 달리 difenoconazole은 미토콘드리아에 영향을 주지 않는다는 것을 시사한다. 처리군의 원신관은 내강 쪽을 향한 미세융모와 섬모가 구부러져 있고 길기도 짧아지며 불규칙적인 것이 관

찰되었다. 또한 세포파괴와 밀접한 관계가 있는 거대 용해소체가 자주 관찰되었는데 이는 독성물질에 의해 세포가 붕괴되고 있음을 나타낸다.

Difenoconazole이 혈구분화를 저해한다는 조직학적 결과를 증명하기 위하여 유전자 발현결과를 추가적 증거로 제시하였다. 이들 동물극 분리편은 difenoconazole 과 mSCF, activin A를 복합 처리한 농도에서 배양하였으며, 혈구 특이적 분자인 β -globin II의 발현량의 감소가 관찰되었고, 근육 특이적인 분자인 muscle actin의 발현량도 감소하는 것을 보여주었다. 반면 신경조직인 특이적 분자인 XEn2의 발현은 별 감소를 보이지 않았다. 이는 difenoconazole이 혈구를 저해한다는 조직학적 결과와 동일하였으나 근육이 생각보다 많은 감소를 RT-PCR 결과에서 보였는데 이는 광학현미경 조직상에서는 보이지 않았지만 전자현미경을 통한 미세형태학적 연구에서 정상적인 근육에 비해서 Z 라인의 부분적 붕괴와 근원 섬유요소의 결실 등이 나타나는 결과를 볼 때 근육의 저해가 내부적으로는 상당히 진행되고 있는 결과로 사료된다. 특히 difenoconazole을 처리 시, 혈액, 근육과 같은 기관에 많은 영향을 미치는 것으로 볼 때, 중배엽성 기원의 기관을 특이적으로 저해하는 것 같다. *Xenopus laevis* 초기 배에 다른 조직보다 혈구의 분화에 악영향을 미치는 difenoconazole은 급성독성은 아니지만, 순환계에 심각한 결함을 유도할 수 있고, 이로 인한 자연환경에서 양서류의 개체 수 감소는 불가피할 것으로 사료된다. 따라서 농업 목적으로 이용한 여러 가지 농약류 내 분비교란물질은 농장에 인접한 담수 서식지에 유입되어 양서류의 초기 배 발생에 직접적인 악영향을 끼칠 수 있으며, 농업지역에서 양서류의 기형발생과 농약 사용 사이의 상호관계에 관하여 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

5. 결론

본 연구에서는 *Xenopus laevis*의 초기 발생에 미치는 difenoconazole의 독성효과를 연구하였다. 독성 효과의 실험은 *Xenopus* 개구리의 배를 이용한 FETAX assay방법에 따라 행하였다. 초기 배는 다양한 농도의 difenoconazole(0-30 μ M)에 노출시켰으며 그 결과

difenoconazole에 대한 LC₁₀₀은 30 μ M이었고, 반수치 사농도인 LC₅₀은 probit analysis를 통해 27.19 μ M로 나타났다. Difenoconazole 5 μ M 이상의 농도에 노출된 배에서 소화관 이상을 포함한 10가지의 다양한 종류의 외부형태 기형이 관찰되었다. 조직학적인 연구에서 눈, 심장, 간, 장, 체질성 근육의 형성부전과 전신관의 팽대가 관찰되었다. 조직 특이적 독성연구를 위해 동물극 분리배양법을 행한 mSCF와 activin A의 복합처리에 의해 일반적으로 혈구세포의 분화가 유도되지만 difenoconazole에 의해 강력한 저해를 받는다는 것을 알 수 있었다. 전자현미경을 통한 미세형태학적 관찰에서는 근육발생 저해효과가 관찰되었다. 또한 내강 쪽을 향한 미세용모와 섬모가 구부러져 있고 길어도 짧아지며 불규칙적인 것이 관찰되었고 세포파괴와 관련되어 있는 거대용해소체가 발견되었다. 동물극 분리 배양법을 통한 조직 특이적 독성연구를 뒷받침하기 위하여 RT-PCR을 행하였다. Difenoconazole 첨가에 의해 혈구 특이 유전자인 β -globin II와 근육 조직 특이 유전자인 muscle actin은 신경조직 특이 유전자인 XEn2보다 더 강하게 저해되는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2009-2010년도 창원대학교 교내공모과제 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고 문헌

- Ariizumi, T., Asashima, M., 1994, *In vitro* control of the embryonic form of *Xenopus laevis* by activin A: Time and dose-dependent inducing properties of activin-treated ectoderm, *Dev. Growth Differ*, 36, 499-507.
- Ariizumi, T., Sawamura, K., Uchiyama, H., Asashima, M., 1991, Dose and time-dependent mesoderm induction and outgrowth formation by activin A in *Xenopus laevis*, *Int. J. Dev. Biol.*, 35(4), 407-414.
- ASTM(American Society for Testing and Materials), 1998, Standard guide for conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX), Philadelphia, ASTM, 1439-1498.

- Bridges, C. M., 2000, Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard Frog (*Rana sphenoccephala*), Arch. Environ. Contam. Toxicol., 39(1), 90-96.
- Colombo, A., Orsi, F., Bonfanti, P., 2005, Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholin-esterase activity and affects muscular integrity in *Xenopus laevis* larvae, Chemosphere, 61(11), 1665-1671.
- Elliott-Feeley, E., Armstrong, J. B., 1981-1982, Effects of fenitrothion and carbaryl on *Xenopus laevis* development, Toxicology, 22(4), 319-335.
- Hauptman, O., Albert, D. M., Plowman, M. C., Hopfer, S. M., Sunderman, F. W. Jr., 1993, Ocular malformation of *Xenopus laevis* exposed to Nickel during embryogenesis, Ann. Clin. Lab. Sci., 23(6), 397-406.
- Hemmati-Brivanlou, A., Melton, D. A., 1994, Inhibition of activin receptor signaling promoted neurulization in *Xenopus*, Cell, 77(2), 273-281.
- Miyayama, Y., Shiurba, R., Asashima, M., 1999, Blood cell induction in *Xenopus* animal cap explants, effects of fibroblast growth factor, bone morphogenetic proteins, and activin, Dev. Genes Evol., 209(2), 69-76.
- Neildez-Nguyen, T. M., Wajcman, H., Marden, M. C., Bensidhoum, M., Moncollin, V., Giarratana, M. C., Kobari, L., Thierry, D., Douay, L., 2002, Human erythroid cells produced *ex vivo* at large scale differentiate into red blood cells *in vivo*. Nat. Biotechnol., 20(5), 467-72.
- Nieuwkoop, P. D., Faber, J., 1956, Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin), North-Holland Publishing, Amsterdam, 243.
- Orkin, S. H., Harosi, F. L., Leder, P., 1975, Differentiation of erythroleukemic cells and their somatic hybrids, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72(1), 98-102.
- Pilar, H. M., Paz, H. M., Alvarez, R., 1993, The carbamate insecticide ZZ-Aphox induced structural changes of gills, liver, gall-bladder, heart, and notochord of *Rana perezi* tadpoles, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 25(2), 184-191.
- Reynold, E. S., 1963, The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, J. Cell Biol., 17, 208-212.
- Shin, S. H., Lee, M. J., Lee, Y. H., Cheong, S. W., Yoon, C. S., 2009, The toxic effects of a pesticide carbaryl on the development of african clawed frog, *Xenopus laevis*, J. Environ. Sci., 18(11), 1247-1259.
- Slack, J. M. W., 1991, The nature of the mesoderm-inducing signal in *Xenopus*, a transfilter induction study, Development, 113(2), 661-669.
- Tardin, D., 1972, Ultrastructural features of neural induction in *Xenopus laevis*, J. Anat., 111(1), 1-28.
- Tomlin, C. D. S., 1994, The Pesticide Manual, 10th ed., British Crop Protection, UK, 228-230.
- Yoon, C. S., Jin, J. H., Park, J. H., Yeo, C. Y., Kim, S. J., Hwang, Y. G., Hong, S. J., Cheong, S. W., 2008, Toxic effects of carbendazim and n-butyl isocyanate, metabolites of the fungicide benomyl, on early development in the African clawed frog, *Xenopus laevis*, Environ. Toxicol., 23(1), 131-144.
- Yoon, C. S., Jin, J. H., Park, J. H., Youn, H. J., Cheong, S. W., 2003, The fungicide benomyl inhibits differentiation of neural tissue in the *Xenopus* embryo and animal cap explants, Environ. Toxicol., 18(5), 327-337.
- Zam, J. A., Brüscheiler, B. J., Schlatter, J. R., 2003, Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase, Environ. Health Perspect, 111, 255-262.