

Weed & Turfgrass Science was renamed from both formerly Korean Journal of Weed Science from Volume 32 (3), 2012, and formerly Korean Journal of Turfgrass Science from Volume 25 (1), 2011 and Asian Journal of Turfgrass Science from Volume 26 (2), 2012 which were launched by The Korean Society of Weed Science and The Turfgrass Society of Korea founded in 1981 and 1987, respectively.

## 막과산화를 신속히 유발하는 제초제의 고효율 대량스크리닝을 위한 형광검정법

김진석\* · 권옥경

한국화학연구원 의약바이오연구본부 친환경신물질연구센터

### Fluorescence Assay for High Efficient Mass Screening of the Herbicides Inducing Rapid Membrane Peroxidation

Jin-Seog Kim\* and Ok Kyung Kwon

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

**ABSTRACT.** This study was conducted to establish a fluorescence assay system for high efficient mass screening of the herbicides causing rapid membrane peroxidation, based on the fact that peroxide in cellular leakage could be fluorometrically determined through the fluorescent compounds formed after reacting with homovanillic acid (HVA) and peroxidase (HRP). The assay procedure established in this study was as follows. Only single disc (4 mm diameter) excised from cucumber cotyledon is placed on the well containing test solution (200  $\mu$ L) with 96-well microplate. The plate is shaking-incubated for 8 h under light condition. Then after removing the cucumber disc, HVA and HRP are supplied in the medium buffer and incubated for 5 min at room temperature. Fluorescence values are determined at Ex 320 nm/Ex 425 nm. The higher fluorescence values are obtained in the treatment of chemical having higher herbicidal activity. Using this assay with 96-well microplates, a large number of herbicides inducing rapid membrane peroxidation seemed to be screened more efficiently than spectrophotometric microtiter assay reported previously.

**Key words:** Cell electrolyte leakage, Fluorescence assay, Herbicide inducing rapid membrane peroxidation, High throughput screening, Homovanillic acid

Received on October 15, 2015; Revised on November 9, 2015; Accepted on November 23, 2015

\*Corresponding author: Phone) +82-42-860-7026, Fax) +82-42-861-4913; E-mail) jskim@kricr.re.kr

© 2015 The Korean Society of Weed Science and The Turfgrass Society of Korea

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서 론

신농약은 후보화합물 확보, 활성검정, 적용성 평가실험, 안전성 평가, 대량생산공정 등의 개발단계를 거치면서 많은 시간과 투자가 소요되기 때문에 개발효율을 높이기 위한 여러 가지 신기술 개발은 지속적으로 요구된다(Duke, 2011; Serrano et al., 2015). 특히 활성검정 분야의 경우 조합화학기술의 발달, 천연물학 및 유전공학기술의 발달로 검정해야 할 시료수가 급증하고 있기 때문에 “고효율 대량 검정법(High Throughput Screening)”이 1990년대 이후 활

발히 도입되고 있다(Ridley et al., 1998; Kwon et al., 2000). 고효율 대량검정법이 가능하려면 실험의 초소형화, 고감도의 검출기술, 작업의 단순화 및 자동화 등이 구비되어 좁은 공간에서 매우 신속하게 검정할 수 있도록 검정체계를 만들거나 개선해야 한다.

제초제 중에는 식물세포내에 활성산소를 다량 발생시켜 최종적으로 막과산화를 유기, 세포를 파괴시킴으로써 제초 활성을 신속히 나타내는 화합물들이 다수 알려져 있으며, 이에 속하는 대표적인 화합물들로는 광합성전자전달과정의 제1광계로부터 전자를 탈취하여 활성산소를 발생시키

는 paraquat와 diquat (Babbs et al., 1989; Hiyama et al., 1993), 엽록소 생합성과정의 protoporphyrinogen oxidase (PPO)를 저해하여 protoporphyrin IX이라는 광증감제 (photosensitizer)를 다량 축적시켜 광에 의해 활성산소를 발생시키는 acifluorfen, oxyfluorfen, oxadiazon, azafenidin 등 (Kenyon et al., 1985; Becerril and Duke, 1989; Duke et al., 1989; Duke et al., 1991)이 있다. 이들 중에서 특히 PPO저해제는 헥타르당 10 g 정도의 저농도에서도 활성을 가지며 속효성이고 제초스펙트럼이 넓어 주로 비선택적으로 사용되기도 하지만 콩, 옥수수, 벼, 밀, 보리 등의 작물에도 선택성으로 사용가능한 화합물들이 다수 개발되어 2013년 기준 \$1,471 million의(전체 제초제의 5.6%) 세계시장을 차지하였다고 한다(Phillips McDougall, 2014). 그리고 현재도 많은 연구자들이 PPO저해제 개발에 관심을 갖고 연구개발하고 있으므로 이러한 특성의 화합물을 보다 대량으로 신속히 검정할 수 있는 방법의 확립은 큰 의의를 가진다. 현재 막과산화물 제초제들의 활성검정방법으로는 유묘에 약제를 처리하여 나타나는 증상을 달관조사하는 방법(Kim et al., 2005), 황화된 식물조직의 녹화 정도를 조사하거나(Kim et al., 1990), 약제처리된 식물조직으로부터 누출된 세포질 정도를 전기전도계로 측정하는 방법(Lee and Cho, 1996; Cho et al., 1997), 시험용액에 잎 절편을 띄운 다음 이로부터 누출된 세포질 성분을 발색시켜 분광분석법으로 측정하는 방법(Molin and Khan, 1995; Kwon et al., 2000)이 보고되고 있다.

그러나 이들 기존의 검정기술은 많은 화합물을 다루는데는 효율적 측면에서 모두 제한적인 요인을 가지고 있다. 따라서 막과산화물 제초제의 고효율 대량검정법을 개발하기 위해서는 다음과 같은 조건이 구비되어야 하는 바, 1) 막과산화물 제초제에 특이적인 반응을 보이는 검정법이어야 하고, 2) 작은공간, 낮은 시험용액 부피에서 검정할 수 있어야 하며, 3) 작업과정이 짧고 단순하여 필요한 경우 자동화가 가능해야 하고, 4) 검정에 소요되는 비용이 가능한 한 낮아야 한다. 이들의 구비조건을 충족시키려면 96-well microplate에서 검정하되, 분광분석법 중 발색을 위한 끓이는 과정을 다른 간편한 방법으로 대체하는 것이 필요하다. 이러한 기술적인 과제를 해결하기 위한 방법중의 하나로서 활성검정을 분광분석 대신에 형광분석을 적용하고자 한다. 그 이론적 배경은 제초제에 의해 세포막이 과산화되면 많은 량의 과산화수소가 발생하여 세포질과 함께 시험용액으로 일부 누출될 것이며, 이를 형광분석하면 보다 높은 감도에서 손쉽게 활성을 조사할 수 있을 것이기 때문이다. 따라서 본 연구는 형광분석법의 가능성을 여러 측면에서 검정하여 보다 효율적인 막과산화물 제초제의 신규 검정법을 개발하기 위해 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

오이종자(평강내병성삼척오이, 동부한농)를 원예용 상토 5호가 채워진 포트에 파종한 후, 낮/밤의 온도가 32/25°C인 14시간 광주기의 온실조건에서 6일간 키웠다. 완전 전개된 자엽으로부터 cork borer를 이용하여 직경 4 mm의 절편(disc)을 얻고 이를 3차 증류수로 씻은 후 시험재료로 사용하였다.

### 공시화합물

기존제초제 acifluorfen, oxadiazon, oxyfluorfen, paraquat, atrazine, diuron, norflurazon, glyphosate의 원제를 사용하였으며, 한국화학연구원 유기합성팀에서 합성한 신규합성화합물 KSC30811, KSC31669, KSC31673, KSC31675, KSC31676, KSC31679, KSC31681등을(Ryu et al., 2001) 이용하였다. 그 외에 ampicillin, homovanillic acid (HVA), horseradish peroxidase (HRP), 과산화수소는 Sigma Aldrich 사로부터 구입한 시약을 사용하였다.

### 시험용액 준비

공시화합물을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 (paraquat는 증류수에 녹임) 증류수에 희석하여 여러 농도로 준비하였고 DMSO의 최종농도는 1%가 넘지 않도록 하였다. 시험용액에는 세균의 성장을 막기 위하여 50 ppm의 ampicillin을 첨가하였다. 이를 96-well microplate의 well당 200 µl씩 분주하거나, 직경 5 cm 페트리디쉬에 7 mL 분주하여 실험하였다.

### 식물재료의 치상 및 배양

96-well microplate의 경우 준비된 오이자엽절편을 well당 1개씩 올려놓고, 이를 25±5°C 항온기의 광조건(200 µmolm<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) 하에서 회전진탕기로 흔들어주면서 배양하였다. 한편 직경 5 cm 페트리디쉬의 경우엔 자엽절편 40개를 띄워 배양하였다. 배양시간은 특별한 경우를 제외하고 8시간이었으며, 모든 처리는 4반복 하였다.

### 세포질 누출정도의 형광분석

배양액내 과산화수소를 분석하기 위해서는 사전에 보고된 방법(Baggiolini et al., 1986)을 적용하였다. HVA 자체는 형광물질이 아니지만 과산화수소와 HRP가 존재하면 이들과 반응하여 형광을 발산하는 물질(2,2'-dihydroxy-3,3'-dimethoxybiphenyl-5,5'-diacetic acid)로 전환된다(Guilbault et al., 1968). 따라서 배양이 종료되면 절편을 꺼내고 배양액에 45 mM의 HVA 20 µl와 HRP 희석액 (0.5 mg mL<sup>-1</sup>)

10  $\mu$ l를 첨가한 후 실온상태에서 5분간 두었다 그 후 마이 크로펄판용 형광검출기(Fluoroskan Ascent FL, Labsystems, USA)를 이용하여 여기광 320 nm, 발산광 425 nm에서 형광도를 측정하였으며 데이터는 대조구와의 차이를 구하여 상대적인 형광변화량으로 표시하였다. 한편 형광스펙트럼은 fluorescence spectrophotometer (SFM-25, Kontron Instruments, Switzerland)를 이용하여 조사하였다.

**온실에서의 제초활성 조사**

신규 합성화합물의 온실에서의 제초활성 정도는 사전에 보고된 방법에(Kwon et al., 2000; Kim et al., 2005) 준하여 조사하였다. 즉 공시식물로서 광엽초종(까마중, 자귀풀, 어저귀, 도꼬마리, 매꽃)과 화본과 초종(수수, 피, 개밀, 바랭이, 미국 개기장)을 사용하였으며 파종후 10일된 유묘에 1 kg ha<sup>-1</sup> 수준으로 경엽처리하고 처리후 2주째에 제초활성을 달관평가한 후 전체 초종에 대한 평균 방제가를 구하였다.

**결 과**

**과산화수소의 농도와 배양액 부피에 따른 표준반응과 형광산물의 안정성**

고효율 대량검정을 위해서는 향후 자동화과정의 도입을 고려하여 기본적으로 96-well plate를 이용하는 것이 바람직하다. 본 연구에서 적용하고자 했던 분석법의 타당성을 검증하고 기본 검정조건을 설정하고자 표준물질인 과산화수소와의 반응성을 확인하였다. 반응액의 부피를 50~200  $\mu$ l로 하고 각 부피에서의 과산화수소 농도를 5  $\mu$ M부터 20  $\mu$ M까지 달리한 다음 상대적인 형광변화량을 조사한 결과 주어진 부피내에서의 과산화수소 농도별 반응은 직선적이었고 반응용액의 부피가 클수록 형광값이 높게 나타나는 경향이였다(Fig. 1A). 이어 반응이 종료된 후 형광값의 변화를 추적해 본 결과, 10분까지는 거의 변동이 없었으므로 (Fig. 1B) 반응에 의해 형성된 형광물질은 비교적 안정한 것으로 사료되었다.

**검정식을 재료로서 오이자엽 절편을 이용할 때의 배양액 적정 부피**

여러 농도로 조제된 oxadiazon 용액을 96-well 마다 50  $\mu$ l 또는 200  $\mu$ l 넣고 절편 1개씩을 띄운 후 광조건하에서 배양한 다음, 절편으로부터 누출된 세포질이 포함된 배양용액을 형광발색시켰다. 그 결과 50  $\mu$ l 부피에서는 제초제 농도에 의존하여 형광값이 낮게 증가하는 반면, 200  $\mu$ l에서는 농도에 의존하여 형광값이 크게 증가하였으며(Table 1) 전체적으로 50  $\mu$ l에서보다 형광값이 높게 나타났다. 따라서 본 검정에서는 뚜렷한 반응성을 얻기 위하여 용액의 부

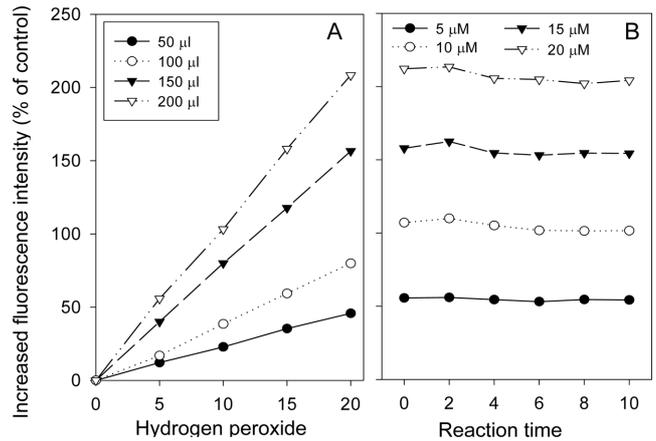


Fig. 1. The change of fluorescence values according to reaction volume and time at 5 min reaction (A) and after reaction stop (B) in peroxide-peroxidase-homovanillic acid reaction system.

Table 1. Effect of application rate and volume of oxadiazon on the change of fluorescence value (peroxide determination using homovanillic acid).

Oxadiazon ( $\mu$ M)	Relative values of fluorescence	
	50 $\mu$ L medium	200 $\mu$ L medium
0.1	0.47	0.44
1	0.65	0.87
10	0.72	2.47

피를 가능한 한 증가시키는 것이 좋은 것으로 판단되었으며 well의 수용능력을 고려하여 200  $\mu$ l 내외가 적당하였다.

**HVA의 적정농도조건**

HVA 처리농도에 따른 형광발산 정도의 차이를 알아보고자 배양액에 여러 농도의 과산화수소를 첨가한 것과 여러 농도의 oxadiazon 용액에 띄운 절편으로부터 누출된 세포질 용액을 가지고 시험해 본 결과(Table 2), 45 mM HVA (45 HVA) 또는 22.5 mM HVA (22.5 HVA)와 1 mg mL<sup>-1</sup> HRP (1 HRP) 또는 0.5 mg mL<sup>-1</sup> HRP (0.5 HRP) 를 각각의 조합으로 처리했을 때 본 실험조건에서는 초기 투입한 HVA의 농도와 크게 상관없이 비슷한 형광값을 보였다. 이는 분석될 과산화수소의 농도와 충분히 반응할 정도의 기질량이 공급되기 때문으로 여겨졌다.

**여러 가지 제초제들에 대한 광조사 시간별 반응특성**

신규화합물을 스크리닝 할 때 초기 농도를 어느 수준으로 설정하며, 검정 방법을 적용하였을 때 어느 유형의 제초제가 가장 잘 검정될 수 있는지를 아는 것은 매우 중요하다. 이를 알아보기 위해서 작용점이 서로 다른 여러 가지 기존 제초제를 가지고 검정해 보았다. 본 시험에 공시한 기존 제초제들은 1) PPO를 저해하는 acifluorfen,

**Table 2.** Effect of concentration of homovanillic acid (HVA) and horseradish peroxidase (HRP) on the change of fluorescence value (peroxide determination using HVA).

Chemicals	Conc. (μM)	Relative values of fluorescence			
		45 HVA/1 HRP <sup>z</sup>	45 HVA/0.5 HRP	22.5 HVA/1 HRP	22.5 HVA/0.5 HRP
Hydrogen peroxide <sup>x</sup>	5	1.21	1.50	1.34	1.47
	10	2.30	2.42	2.60	2.72
	15	3.36	3.41	3.89	4.09
	20	4.55	4.36	5.10	5.45
Oxadiazon <sup>y</sup>	0.1	0.02	0.07	0.22	0.18
	1.0	0.81	0.79	1.17	1.18
	10.0	1.50	1.79	2.16	2.18

<sup>x</sup>Oxadiazon and cucumber leaf disc were not added in culture medium. Reaction was conducted after adding peroxide in the medium buffer.

<sup>y</sup>Oxadiazon and cucumber leaf disc were added in culture medium. After 8h culture, reaction was conducted according to the given method.

<sup>z</sup>45 HVA/1 HRP: 20 mL of 45 mM HVA and 10 mL of HRP (1 mg mL<sup>-1</sup>) were added in 0.2 mL medium buffer for reaction.

**Table 3.** Effect of light incubation time in various herbicide solutions on the change of fluorescence value (peroxide determination using homovanillic acid).

Herbicides (1.0 mM)	Light incubation (hr)		
	8	24	48
Acifluorfen	1.01±0.12 <sup>z</sup>	3.01±0.44	5.38±0.37
Oxadiazon	0.72±0.06	3.59±0.19	10.24±1.09
Oxyfluorfen	0.35±0.28	3.73±0.11	7.31±1.45
Paraquat	1.88±0.76	4.38±0.42	12.40±1.20
Atrazine	0.07±0.10	0.00±0.06	0.29±0.23
Diuron	0.00±0.23	0.00±0.20	0.11±0.13
Norflurazon	0.00±0.19	0.03±0.22	0.00±0.16
Glyphosate	0.00±0.17	0.16±0.17	0.09±0.04

<sup>z</sup>Fluorescent values were determined at Ex 320 nm/Ex 425 nm after reaction. Data represent the means of 4 replications with standard errors.

oxadiazon, oxyfluorfen, 2) 제 1 광계를 작용점으로 하는 paraquat, 3) 제 2 광계의 전자전달을 차단하는 atrazine과 diuron, 4) phytoene desaturase를 저해하여 카로티노이드 생합성을 저해하는 norflurazon 5) 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) synthase를 저해하는 glyphosate 등이다 (HRAC, 2014; Kim et al., 1999). 공시약제들의 농도는 1.0 μM로 하였다. 그 결과, PPO저해제와 paraquat에서만 반응성이 양호하게 나타났다(Table 3). 광조사 시간을 48시간 까지 더욱 길게 하였을 경우, 8시간 명배양에서 반응성을 가진 4개 화합물에서는 배양시간이 길수록 형광값도 높아 졌지만 기타 약제의 경우는 명배양 시간을 늘려도 반응성이 증가하지는 않았다(Table 3).

**신규 합성화합물의 온실제조활성과 형광분석법 결과의 관련성**

96-well microplate assay에서의 결과가 실제 온실에서의 경엽처리효과를 어느 정도 나타내는지 파악하기 위해 증 상면에서 PPO저해제로 추정되는 여러 구조의 신규 합성 화합물을(Ryu et al., 2001) 온실조건에서 시험하여 Table 4

**Table 4.** Activity comparison of newly synthesized compounds between at foliar treatment in the greenhouse and at this fluorescent assay system.

Compounds	Herbicidal activity (mean control %) at foliar treatment <sup>y</sup>	Fluorescence values at this assay <sup>z</sup>
KSC 30811	45.5	1.13±0.18
KSC 31669	0.0	0.15±0.12
KSC 31673	93.5	2.60±0.26
KSC 31675	90.0	2.08±0.42
KSC 31676	32.0	0.91±0.18
KSC 31679	64.5	1.39±0.18
KSC 31681	62.5	0.97±0.14

<sup>y</sup>The material and methods were explained in the referenced article (Kwon et al., 2000). Herbicidal activities were designated as the mean control values of herbicides against 10 weed species with 0 ~ 100% scale system (0 = no effect, 100 = completely killed).

<sup>z</sup>Fluorescent values were determined at Ex 320 nm/Ex 425 nm after reaction. Data represent the means of 4 replications with standard errors.

에서와 같이 제조활성이 강한 것과 활성이 매우 낮은 것을 선별한 다음 이를 가지고 본 연구의 형광분석법을 실시한 후 활성 결과를 상호간 비교하였다. 그 결과 온실경엽처리 에서 10초중에 대한 평균 방제율이 90% 이상이었던 KSC31673 과 KSC31675는 본 시험의 형광분석법에서 2.0 이상의 형 광값을 보였고, 평균방제율이 50-65% 정도였던 KSC31679, KSC30811, KSC31681은 각각 1.4, 1.1, 0.97 정도의 형광값, 평균 방제율이 32%였던 KSC31676은 0.91 정도의 형광값, 제조활성이 없었던 KSC31669는 0.1 이하의 매우 약한 반 응을 나타내 두 검정조건에서의 결과가 유사한 경향을 나 타냈다(Table 4). 그 중 활성이 뛰어난 4가지 약제들의 처 리 농도별 활성을 보면 Table 5에서처럼 약제에 따라 그 정 도가 다르기는 하나 농도가 증가함에 따라 형광값도 증가 하는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 볼 때, 본 방법은 PPO저해제 및 제 1광계

의 전자를 탈취하는 제초제 등을 검정하는데 효과적이며 초기의 실험 기준농도는 1.0 µM가 적당할 것으로 사료되었다.

**HVA의 배양액내 첨가 유무에 따른 형광반응차이**

고효율 대량검정법에서는 다루어야 화합물 수가 매우 많기 때문에 화합물당 소요경비는 낮더라도 전체적으로 합산하면 매우 높은 경비가 든다. 따라서 가능한 한 저렴하며 단순한 작업과정일수록 더욱 효과적일 것이므로 본 실험에서도 그 가능성을 검토하기 위하여 형광발색의 기질인 HVA 처리 유무에 따른 반응차이를 조사하였다.

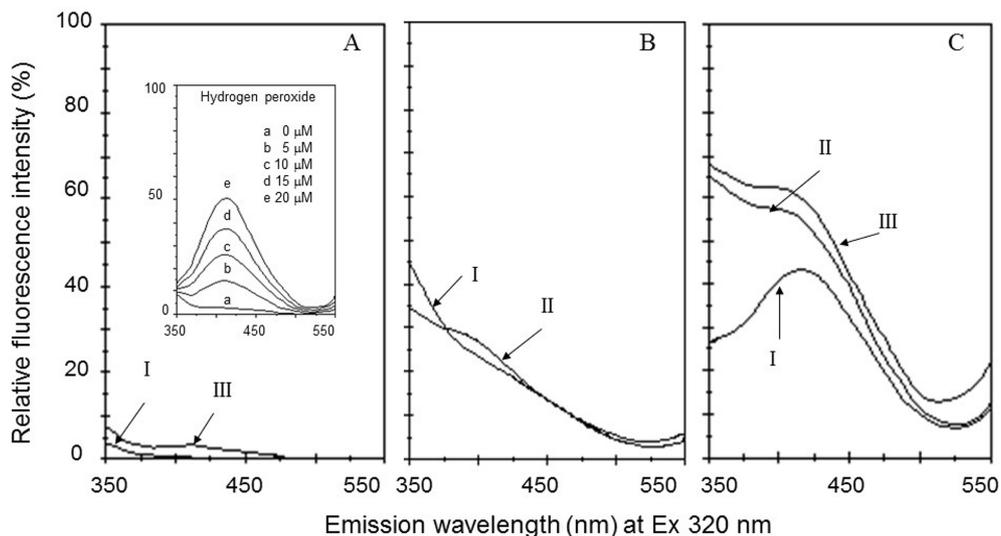
직경 5 cm의 페트리디쉬에 증류수 또는 oxadiazon 1.0 µM 용액을 분주하고 오이자엽 절편을 40개 띄워 광배양한 배양액을 가지고 HVA, HRP, 과산화수소 처리 유무에 따른 형광스펙트럼을 조사하였다. 그 결과, 약제처리없이 자엽

절편만을 띄운 배양액 즉 형광발색전의 스펙트럼을 보면 미지의 물질이 어느정도 누출되어 기본선이 높아지기는 하나 여기광 320 nm/발산광 425 nm에서의 피크는 거의 나타나지 않았으며 여기에 HVA와 HRP를 첨가하여도 형광발산정도가 증가되지 않았다(Fig. 2B). 그러나 oxadiazon 1.0 µM 용액 위에 오이자엽을 띄운 후 8시간 광조사 한 다음 배양액의 형광발산 정도를 측정된 결과, 약제 무처리에서와는 달리 여기광 320 nm/발산광 425 nm에서 피크를 보이는 어떤 형광물질이 존재하였다(Fig. 2C-I). 여기에 HVA와 HRP를 첨가하였을 때 반응이 약간 더 높아졌고(Fig. 2C-II), 과산화수소 20 µM을 추가로 첨가하면 반응이 더욱 증가되는 경향이였다(Fig. 2C-III). 이는 막과산화와 더불어 특이적인 형광반응이 세포내에서 일어나 배양액으로 누출되며 HVA +HRP와 반응할 수 있는 물질인 과산화수소도 배양액에 포함되어 있다는 것을 시사한다. 실제로 증류수에 과산화수소 20 µM을 첨가하면 증가분 만큼의 반응이 추가되는 것은 이를 증명하는 결과이다(Fig. 2A, Fig. 2C). 아울러 약제 처리된 오이자엽으로부터 누출된 물질을 가지고 분석한 형광스펙트럼의 패턴은 과산화수소+HVA+HRP로 형광반응시켰을 때 보여준 스펙트럼 패턴과 거의 동일한 경향을 보였다(Fig. 2A). 이는 형광반응을 위한 발색시약의 첨가 없이도 제초활성의 대략적인 측정이 가능함을 의미하기 때문에 낮은 경비로 대량의 약제를 고효율로 검정할 수 있음을 시사한다. 그러나 보다 뚜렷한 반응결과를 얻기 위해서는 HVA와 HRP를 첨가하여 반응시킨 후 분석하는 것이 바람직한 것으로 사료되었다.

**Table 5.** Effect of various herbicide solutions on the change of fluorescence value (peroxide determination using homovanillic acid).

Compounds	Relative values of fluorescence		
	0.1 µM	1.0 µM	10 µM
KSC 30811	0.22±0.18 <sup>z</sup>	1.13±0.18	1.56±0.23
KSC 31673	0.92±0.14	2.60±0.26	2.70±0.17
KSC 31676	0.61±0.16	0.91±0.17	1.61±0.31
KSC 31679	0.75±0.22	1.39±0.19	1.93±0.23

<sup>z</sup>Fluorescent values were determined at Ex 320 nm/Ex 425 nm after reaction. Data represent the means of 4 replications with standard errors.



**Fig. 2.** Effect of various treatments on the relative fluorescence intensity and spectrum change in peroxide-peroxidase (HRP)-homovanillic acid (HVA) reaction system. A: Oxadiazon and cucumber leaf disc were not added in culture medium (Diagram in the box shows the change of fluorescence spectrum dependent on peroxide concentration); B: Oxadiazon herbicide was added in culture medium, but cucumber leaf disc were not placed; C: Oxadiazon (1.0 µM) and cucumber leaf disc were added in culture medium; I: Before reaction with HVA+HRP; II: After reaction with HVA+HRP; III: After supplement of peroxide (20 µM) additionally at the reaction with HVA+HRP.

## 고찰

현재 막과산화형 제초제들의 활성을 측정하는 방법으로는 대략 네 가지가 알려져 있으며 이들의 특성을 보면 다음과 같다. 첫째, 유묘에 약제를 처리하여 나타나는 증상을 달관조사하는 방법이다(Kim et al., 2005). 주로 온실 또는 식물생육실에서 실험하며 종자로부터 나온 어린 식물체에 약제를 처리하여 활성을 관찰한다. 따라서 많은 공간이 필요하고 약제처리를 위한 시설과 최소 10 mL 이상의 시험용액이 필요하다. 막과산화형 제초제에만 특이적으로 반응하는 것은 아니며 결과를 기계적으로 조사하기가 곤란하다. 둘째, 암조건에서 키운 오이 또는 보리 등의 황화된 조직을 화합물 용액위에 치상하고 이를 광조건에 두면서 녹화되는 정도를 관찰한다(Kim et al., 1990). 보통 직경 5 cm의 페트리디쉬를 이용하기 때문에 1 mL 이상의 용액이 필요하고 작업을 녹색 안전광 하에서 실시하여야 하며 정량적인 결과치를 얻기 위해서는 색소를 추출해야 하는 번거로움이 있다. 막과산화형 제초제에만 특이적으로 반응하는 것은 아니다. 셋째, 오이자엽과 같은 조직으로부터 얻은 절편을 시험용액에 띄운 다음 누출된 세포질 성분을 전기전도계로 측정한다(Lee and Cho, 1996; Cho et al., 1997). 가장 흔하게 이용하는 방법으로서 비교적 큰 용기(페트리디쉬, 관병 등)를 이용함으로써 공간을 많이 차지하고 시험용액도 최소한 7 mL 이상이 요구되며 측정을 자동으로 하기가 어렵다는 단점을 가지고 있다. 시험용액 위에 조직을 놓아두는 시간이 1일 정도로 짧으면 막과산화형 제초제에 특이적인 반응을 보이지만 그 이상 두면 다른 유형의 제초제에 대해서도 반응을 나타낸다. 넷째, 시험용액에 잎 절편을 띄운 다음 이로부터 누출된 세포질 성분을 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine (MBTH)와 FeCl<sub>3</sub>로 발색시켜 분광분석법으로 측정하는 방법이다(Molin and Khan, 1995; Kwon et al., 2000). 이는 위의 세가지 다른 방법과는 달리 막과산화형 제초제에 비교적 특이적인 반응을 보인다. 기본적으로 직경 4 mm의 절편 한 개와 60 µL의 반응액, 소량의 발색시약만 있으면 검정가능하므로 96-well microplate를 이용할 수 있다. 따라서 전기전도도를 측정하는 것보다는 효율성이 증가될 수 있으나, 발색반응에 끔이는 과정이 있기 때문에 보다 복잡한 작업과정이 소요된다(Kwon et al., 2000).

이상에서 기술된 바와 같이 기존의 검정기술은 많은 화합물을 보다 효율적으로 검정하고자 할 때 모두 제한적인 요인들을 가지고 있기 때문에 개선이 필요하였다. 본 연구에서는 이를 극복하기 위한 방법중의 하나로서 활성검정을 분광분석 대신에 형광분석을 실시하면 보다 효율적으로 막과산화형 제초제 검정이 가능함을 확인하였다. 의약분

야에선 HVA를 이용해 과산화수소를 분석해 진단 또는 활성검정에 이용한 사례들이 보고되었지만(Baggiolini et al., 1986), 제초제 스크리닝으로의 활용은 본 연구가 처음인 것으로 여겨진다. 본 방법의 효율성을 기존 전기전도도법(Lee and Cho, 1996; Cho et al., 1997)과 비교해 보면, 시험용액은 35배, 검정 화합물 소요량은 거의 350배 정도 줄일 수 있었으며, 처리당 작업절편 소요갯수도 20-40개로부터 1개로 줄일 수 있고, microplate용 분석기로 결과를 측정하기 때문에 측정시간도 거의 80배 정도 단축시킬 수 있었다. 종합적으로 볼 때 한사람이 수동으로 하루에 검정할 수 있는 약제의 수는 약 600개 정도가 가능할 것으로 판단되었으며, 작업과정을 자동화시킨다면 그 효율성은 더욱 높아질 것으로 여겨진다. 아울러 분광분석법(Kwon et al., 2000)과 비교해 보면 시험용액이 3.3배 더 소요되나 검정 화합물량을 3배 줄일 수 있고 반응시간도 2.5배 정도 단축되어 전체적으로 볼 때 검정효율성이 약 2배 정도 증가될 것으로 여겨졌다. 특히 본 형광분석법은 분광분석법에서의 끔이고 식히는 과정이 없기 때문에 전체적인 검정단계와 소요시간이 단축될 뿐만 아니라 작업의 전과정을 자동화시키기가 용이하여 검정의 효율성을 현저히 높일 수 있다. 또한 흡광도 대신 형광을 이용하기 때문에 감도가 높고 용액의 탁도에도 크게 영향받지 않을 수 있으며, 필요한 경우 HVA와 HRP를 넣지 않고서도 배양액내의 형광정도를 통해서 활성 유무를 조사할 수도 있어 화합물 개당 검정비용을 더욱 절감시킬 수 있는 장점을 가진다. 따라서 본 형광검정법은 미량의 화합물 시료로 많은 화합물을 짧은 시간내에 스크리닝 할 수 있기 때문에 막과산화형 제초제의 개발 초기단계에서 새로운 리드화합물을 탐색하는데 그 기여도가 높을 것으로 판단된다.

## 요약

본 연구는 식물세포막을 파괴시켜 제초활성을 나타내게 하는 화합물(막과산화형 제초제)을 미지의 많은 화합물로부터 신속하게 탐색하기 위한 새로운 검정법을 확립하기 위하여 실시되었으며, 확립한 전체적인 검정과정은 다음과 같다. 96-well microplate에 시험용액 200 µL 넣고 여기에 오이자엽으로부터 적출한 직경 4 mm의 절편 1개씩을 띄운다. 항온실의 광조건 하에서 회전진탕기로 조금씩 흔들 어주면서 8시간 배양한 후 절편을 제거한 다음, 배양액에 HVA와 HRP를 첨가하여 반응시킨 후 마이크로평판용 형광검출기를 이용하여 형광도(Ex 320 nm, Em 425 nm)를 측정한다. 형광변화량이 높을수록 제초활성이 높은 것으로 판단한다. 본 방법은 96-well microplate에서 작업을 수행할 수 있고 형광검출 기술을 이용함으로써 검정과정과 작업

을 간편하게 하여 검정효율을 기존보다 현저히 높인 것이 특징이다. 아울러 활성검정을 추출된 효소가 아닌 잎 절편 수준에서 수행하기 때문에 보다 실용화에 근접한 정량적 데이터를 얻을 수 있는 장점을 가진다.

**주요어:** 세포질 누출, 막과산화형 제초제, 형광분석법, 고 효율 대량검정, 호모바닐릭산

## References

- Babbs, C.F., Pham, J.A. and Coolbaugh, R.C. 1989. Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol.* 90:1267-1270.
- Baggiolini, M., Ruch, W. and Cooper, P.H. 1986. Measurement of hydrogen peroxide production by phagocytes using homovanillic acid and horseradish peroxidase. *Methods Enzymol.* 132:395-400.
- Becerril, J.M. and Duke, S.O. 1989. Protoporphyrin IX content correlates with activity of photobleaching herbicides. *Plant Physiol.* 90:1175-1181.
- Cho, K.Y., Kim, J.S. and Hong, K.S. 1997. Physiological action characteristics of *m*-substituted diphenylethers, TOPE and KC6361. *J. Weed Sci. Tech.* 42(4):307-317.
- Duke, S.O., Lydon, J. and Paul, R.N. 1989. Oxadiazon activity is similar to that of *p*-nitrodiphenyl ether herbicides. *Weed Sci.* 37:152-160.
- Duke, S.O., Lydon, J., Becerril, J.M., Sherman, T.D., Lehnen Jr, L.P., et al. 1991. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* 39:465-473.
- Duke, S.O. 2011. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? *Pest Manag. Sci.* 68:505-512.
- Guilbault, G.C., Brignac Jr, P. and Zimmer, M. 1968. Homovanillic acid as a fluorometric substrate for oxidative enzymes. Analytical applications of the peroxidase, glucose oxidase, and xanthine oxidase systems. *Anal. Chem.* 49(1):190-196.
- Hiyama, T., Ohinata, A. and Kobayashi, S. 1993. Paraquat (methyl viologen) : Its interference with primary photochemical reactions. *Z. Naturforsch.* 48c:374-378.
- HRAC (Herbicide Resistance Action Commetee). 2014. Classification of herbicides according to site of action. [http://www.hracglobal.com/education/classification of herbicide site of action. aspx](http://www.hracglobal.com/education/classification%20of%20herbicide%20site%20of%20action.aspx). (Accessed Sept. 26, 2015).
- Kenyon, W.H., Duke, S.O. and Vaughn, K.C. 1985. Sequence of effects of acifluorfen on physiological and ultrastructural parameters in cucumber cotyledon discs. *Pestic. Biochem. Physiol.* 24:240-250.
- Kim, J.S., Kim, T.J., Hong, K.S., Hwang, I.T. and Cho, K.Y. 1990. A bioassay for chemicals affecting plant pigment biosynthesis: Greening assay. *Kor. J. Weed Sci.* 10(3):214-220. (In Korean)
- Kim, J.S., Kim, T.J., Kim, S.M. and Cho, K.Y. 1999. Herbicide mode of action - Recent advances. *Kor. J. Weed Sci.* 19(4):261-287. (In Korean)
- Kim, J.S., Lee, B.H., Oh, K.H. and Song, J.E. 2005. Interaction of glufosinate-ammonium and oxyfluorfen for herbicidal activity. *Kor. J. Weed Sci.* 25(3):171-178. (In Korean)
- Kwon, O.K., Kim, J.S. and Cho, K.Y. 2000. Spectrophotometric microtitre assay for rapid screening of membrane-disrupting herbicides. *Kor. J. Pest. Sci.* 4(1):11-18. (In Korean)
- Lee, H.J. and Cho, K.Y. 1996. Light-dependent cellular leakage from cucumber cotyledon discs treated with  $\delta$ -aminolevulinic acid, oxyfluorfen, and rose Bengal. *J. Photosci.* 3(1):1-7.
- Molin, W.T. and Khan, R.A. 1995. Microbioassays to determine the activity of membrane disrupter herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 53:172-179.
- Phillips McDougall. 2014. AgriService. Products section - 2013 market, Vineyard Business Centre, Midlothian, United Kingdom.
- Ridley, S.M., Elliott, A.C., Yeung, M. and Youle, D. 1998. High-throughput screening as a tool for agrochemical discovery : Automated synthesis, compound input, assay design and process management. *Pestic. Sci.* 54:327-337.
- Ryu, E.K., Kim, H.L., Song, J.H., Jeon, D.J., Kim, K.M., et al. 2001. Herbicidal N-(5-isoxazolinemethoxyphenyl)-3,4,5,6-tetrahydrophthalimide derivatives. Patent No. KR 2001-0028478 A. (In Korean)
- Serrano, M., Kombrink, E. and Meesters, C. 2015. Considerations for designing chemical screening strategies in plant biology. *Front. Plant Sci.* 6:131. doi: 10.3389/fpls.2015.00131.