식물학회지 제33권 제1호
Korean J. Bot. 33(1) : 25-30

Dimethipin이 절단한 보리 제1엽의 노쇠에 미치는 영향

全 芳 郁
(江陵大學 生物學科)

Effects of Dimethipin on the Senescence of Excised Barley First Leaves

Jun, Bang-Ook

(*Department of Biology, Kangreung National University*)

ABSTRACT

Effects of dimethipin on the senescence of excised barley first leaves were investigated. Dimethipin markedly inhibited chlorophyll and protein loss and reduced peroxidase activity relevant to senescence phenomena in the excised leaves. Dimethipin decreased hydrogen peroxide content, later malondialdehyde content, and increased the activities of superoxide dismutase and catalase. The antisenescence effects of dimethipin may result from the stabilization of membrane structure through inhibiting the peroxidation of unsaturated lipid and the accumulation of free radicals during senescence.

緖 論

최근에 개발된 식물생장조절제인 dimethipin(2,3-dihydro-5,6-dimethyl-1,4-dithin-1,1,4,4-tetraoxide ; 상품명 Harvade)은 기존의 식물생장조절제들과는 현저하게 다른 구조를 가지고 있는데 농업적으로 고엽제, 건조제 및 성숙 유도제로서 사용되어 수확의 효율을 제고시켜 주거나 곡물 생산에 따르는 비용을 경감시켜 주는 효과를 갖는다. Dimethipin은 감자에서 미성숙한 덩굴의 노쇠를 촉진하므로써 덩굴을 건조시키며(Bell *et al.*, 1971), 해바라기와 벼의 경우에는 자연적인 노쇠과정을 촉진시켜 수확시에 종자내 수분함량을 낮추어준다(Ames *et al.*, 1982). 이러한 작용을 나타내는 dimethipin이 어떠한 방식으로 노쇠를 촉진하는가에 대한 생리, 생화학적인 보고는 아직 없으나 아마도 ethylene 합성을 통해서 노쇠를 촉진하는 것 같지는 않다(Reid and Marsh, 1976).

반면에, dimethipin은 절단한 귀리잎에서 엽록소의 소실을 억제하였고(Metzger and Keng, 1984), 노쇠 중인 보리잎의 엽록소 함량과 엽록소 a/b의 비율을 대조구보다 높게 유지시켰다(Jun, 1987). 따라서 엽록소의 함량만을 노쇠의 기준으로 사용할 때 dimethipin은 적어도 일부 식물에서는 노쇠를 촉진한다기보다 오히려 억제한다고 사료된다. 그러나 엽록소 함량이 노쇠의 대표적인 지표이기는 하지만(Thimann, 1980), dimethipin이 노쇠를 실제로 억제시킨다는 다른 증거는 아직 없다.

이와 같이 노쇠에 대한 dimethipin의 효과는 서로 상반되게 보고되고 있으며 그 작용기작에 대한 연구도 시급한 실정이다. 최근 Moon과 Kwon(1988)은 dimethipin이 막에 직접 작용한다는 결과를 보고한 바 있다.

본 연구는 보리의 제1엽을 절단하여 노쇠과정을 인위적으로 유도한 후 dimethipin을 처리하여 노쇠과정의 생리, 생화학적인 현상에 관련된 지표들에 미치는 효과를 조사하고, 그 결과를 세포막 수준에서 구명하고자 하였다.

본 연구의 일부는 1988~1990년도 과학재단 기초연구비(883-0408-005-2) 지원으로 이루어진 것임.

材料 및 方法

실험재료 및 처리조건. 본 연구에 사용된 보리 (*Hordeum vulgare* L.)는 농촌진흥청 작물시험장에서 분양 받은 백동 품종(cv. Baecdong)으로 저온(4℃)에 저장하면서 이를 재료로 사용하였다. 종자를 1% sodium hypochlorite 용액으로 15분간 표면살균한 후 증류수로 충분히 씻어 여과지 1장이 들어있는 petri dish(ϕ 9 cm)에 넣고 하룻 동안 발아시켰다. 발아상태가 양호한 종자를 선별하여 가아제 브릿지(11.0×11.0×1.5 cm)에 36개씩 심은 다음 증류수를 100 ml씩 넣은 플라스틱 용기(12.0×12.0×11.0 cm)에서 배양하였다. 배양조건은 25℃, 7,000 lux, 16 : 8로 하였다(Jun, 1987). 배양 6일째에 잎은 선단부로부터 6 cm를 잘라내어 증류수 혹은 dimethipin 용액이 20 ml 들어있는 petri dish(ϕ 9 cm)에 20개씩 띄우고 25℃에서 암처리하였다.

엽록소 함량 측정. 잎 생체량 1 g 당 50 ml의 80% acetone으로 추출한 후 663 nm와 645 nm에서의 흡광도를 측정하여 Harborne(1973)의 식에 의하여 계산함으로써 엽록소 함량을 결정하였다.

단백질 함량 측정. 잎 생체량 1 g 당 70 mM 인산완충용액(pH 8.0)을 사용하여 마쇄한 후에 12,000×g에서 30분간 원심분리하였다. 상등액 1 ml를 취해 1 ml의 10% trichloroacetic acid 용액으로 침전시킨 후에 4℃에서 24시간 정치한 다음 12,000×g에서 30분간 원심분리한 후 Lowry *et al.* (1951)의 방법에 의하여 정량하였다.

Malondialdehyde 함량 측정. Heath and Parker (1968)의 방법에 따라 malondialdehyde의 함량을 측정하였다. 생체량 1 g의 잎당 4 ml의 0.1% trichloroacetic acid 용액을 넣고 마쇄한 후 12,000×g에서 30분간 원심분리하였다. 상층액 1 ml를 취해 4 ml의 20% trichloroacetic acid 용액(0.5% thiotarbituric acid 포함)과 혼합한 후 95℃에서 30분간 정치한 다음 급속히 냉각시켰다. 12,000×g에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 취해 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. Malondialdehyde의 양은 몰 흡광계수인 155 $mM^{-1}cm^{-1}$을 사용하여 계산하였다.

과산화수소 함량 측정. 보리 제1엽내의 과산화수소 함량은 Bernt와 Bergmeyer(1974)의 방법을 기초로 하여 측정하였다. 생체량 1 g의 잎을 0.1 M 인산완충용액(pH 6.8) 4 ml에 마쇄한 후 12,000×g로 20분간 원심분리하였다. 상층액 중 0.5 ml를 취하여 peroxide 시약(83 mM phosphate, 0.005% o-dianisidine, 40 μg/ml peroxidase 포함) 2.5 ml와 잘 섞은 다음 30℃에서 10분간 반응시킨 후 1N perchloric acid 0.5 ml를 가하고 원심분리(12,000×g, 10분)하여 얻은 상층액의 흡광도를 436 nm에서 구하였다. 이 때의 흡광도를 과산화수소 표준곡선과 대조하여 잎내의 과산화수소 함량을 결정하였다.

효소용액의 제조 및 효소활성 측정. 생체량 1 g의 보리잎당 5 ml의 70 mM 인산완충용액(pH 8.0)을 가하여 마쇄한 후 12,000×g에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 취해 이를 효소용액으로 사용하였으며 모든 과정은 0-4℃에서 실시하였다.

Peroxidase의 활성을 3 ml의 cuvette에 2.9 ml의 0.1 M acetate 완충용액(pH 5.2)과 효소용액 50 μl을 혼합한 다음 기질용액(0.03% 과산화수소 용액) 50 μl를 첨가하고 430 nm에서의 흡광도 증가로서 측정하였다.

Superoxide dismutase 활성은 Giannapolitis and Ries (1977)의 방법 및 Dhinsa *et al.* (1981)의 방법을 수정하여 실시하였으며, nitroblue tetrazolium의 광환원을 저지하는 효과로서 측정하였다. 2 ml의 반응혼합액(50 mM 인산완충용액 pH 7.8, 13 mM methionine, 75 μM nitroblue tetrazolium, 0.1 mM EDTA, 2 μM riboflavin, 0-50 μl 효소용액)을 시험관에 넣고 20 w 형광등 6개로 만든 조명기구 40 cm 전방에 위치시켰다. 8분 동안 광처리한 후 560 nm에서의 흡광도를 측정하고, 반응을 50% 억제시키는 효소용액량을 구해 1 unit로 하여 효소활성을 산출하였다. Catalase의 활성 측정은 Chance와 Maehly(1955)의 방법을 따랐다. 3 ml의 cuvette에 2.9 ml의 50 mM 인산완충용액(pH 7.0)과 효소용액 50 μl를 혼합한 다음 50 μl의 기질용액(0.3% 과산화수소 용액)을 첨가하여 반응을 시켰다. 효소의 활성은 240 nm에서의 흡광도 감소를 측정한 다음 과산화수소의 몰흡광계수 0.44×$10^{-2}M^{-1}cm^{-1}$로부터 과산화수소의 분해량을 산출하였다.

Table 1. The effect of dimethipin on the chlorophyll loss in excised barley leaves incubated at 25 °C in the dark for 3 days

Diemthipin Concentration (M)	Chlorophyll Content (μg/g fr. wt.)	Inhibition of Chlorophyll loss (%)
0 day control	965.8	—
0	555.4	0
10^{-6}	594.1	9.4
10^{-5}	595.3	9.7
10^{-4}	723.0	40.8
10^{-3}	680.7	30.5

結果 및 考察

절단한 보리 제1엽에 dimethipin을 암처(25℃)에서 3일간 처리한 후 엽록소 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. Dimethipin의 농도가 증가할수록 절단한 보리잎의 노쇠에 따른 엽록소의 소실은 억제되어 10^{-4} M에서 40.8%로 최고의 억제율을 나타내었다. 그러나 시간경과에 따른 엽록소의 분해는 비례적으로 진행됨을 알 수 있었다 (Fig. 1). 이는 절단한 귀리잎에서 dimethipin이 엽록소의

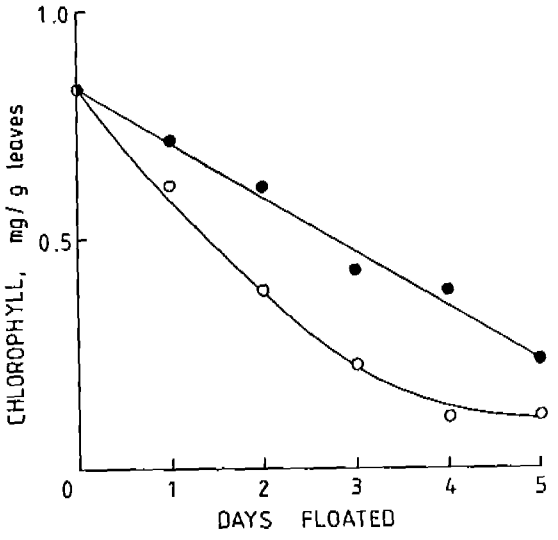

Fig. 1. Effect of dimethipin on the chlorophyll loss in excised barley first leaves during senescence. ○,control; ●,dimethipin (10^{-4}M).

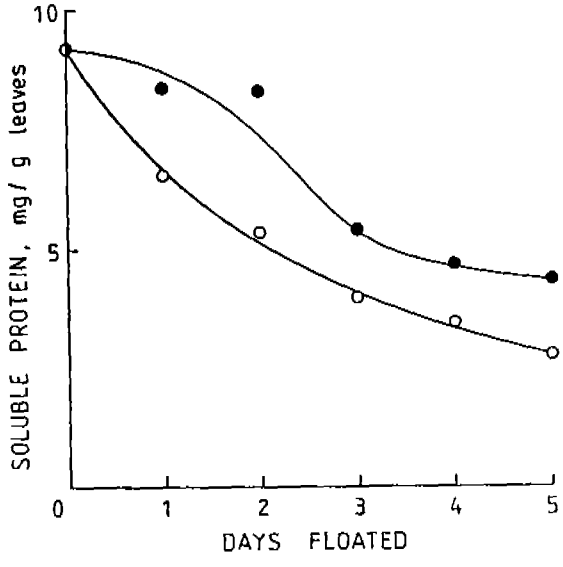

Fig. 2. Effect of dimethipin on the soluble protein loss in excised barley first leaves during senescence. ○,control; ●,dimethipin (10^{-4}M).

소실을 억제한다는 Metzger와 Keng(1984)의 결과와 일치한다고 할 수 있다.

Dimethipin은 보리 제1엽의 노쇠에 따른 수용성 단백질의 함량 감소를 억제하였는데(Fig. 2), 특히 절단 후 2일까지는 절단시 단백질 함량을 91.4%로 유지하여 결과적으로 이 기간 동안 57.6%로 감소한 대조구와의 차이가 뚜

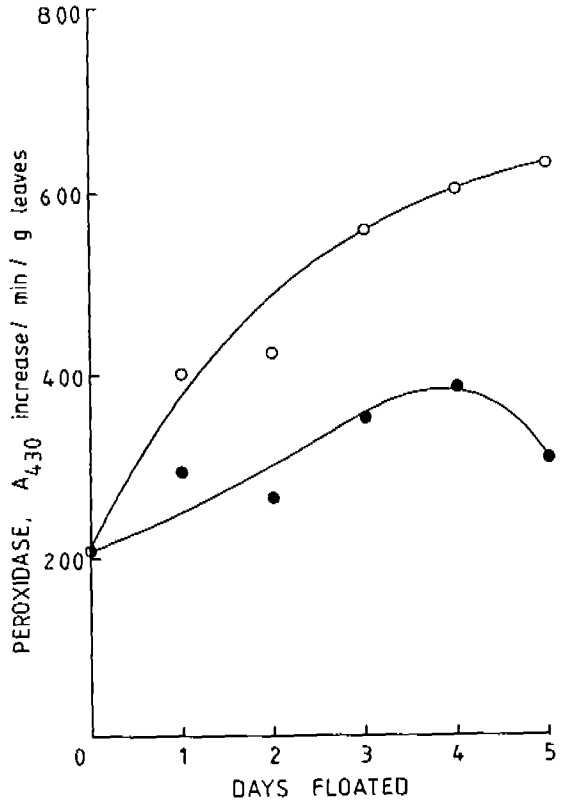

Fig. 3. Effect of dimethipin on the peroxidase activity in excised barley first leaves during senescence. ○,control; ●,dimethipin (10^{-4}M).

렷했으나 이후 급격하게 그 함량이 감소하였고 3-5일째에는 각각 일정한 수준을 유지하였다. 식물체의 노쇠현상을 나타내는 대표적인 척도로 엽록소와 단백질 함량의 감소를 들 수 있는 바(Thimann, 1980), dimethipin이 상기한 바와 같이 이들 함량의 감소를 억제하였다는 사실은 dimethipin이 인위적으로 노쇠현상을 유도한(Thomas and Stoddart, 1980; Hurkman, 1979) 절단한 보리잎에서 노쇠과정을 지연시킨다는 뚜렷한 증거가 될 수 있다.

노쇠과정에 있는 대조구의 보리 제1엽에서는 peroxidase의 활성이 계속 증가하여 5일째에는 절단시의 3배에 도달한데 반하여 dimethipin 처리구에서는 4일째에 1.8배에 달했다가 5일째에 1.5배로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). Peroxidase는 노쇠가 일어날 때 활성이 증가하는 효소로서 노쇠현상의 지표가 된다고 알려져 있는데(Thomas and Stoddart, 1980), 본 실험에서도 정치기간 중 그 활성이 계속 증가하여 노쇠현상의 특징을 보이고 있다. 특히 대조구에 비하여 처리구의 peroxidase 활성이 낮은 것은 엽록소 및 단백질 함량 감소를 억제하는 사실과 부합하는 결과이며, 이는 dimethipin이 절단한 보리 제1엽의 노쇠를 억제한다는 또다른 증거라고 할 수 있다.

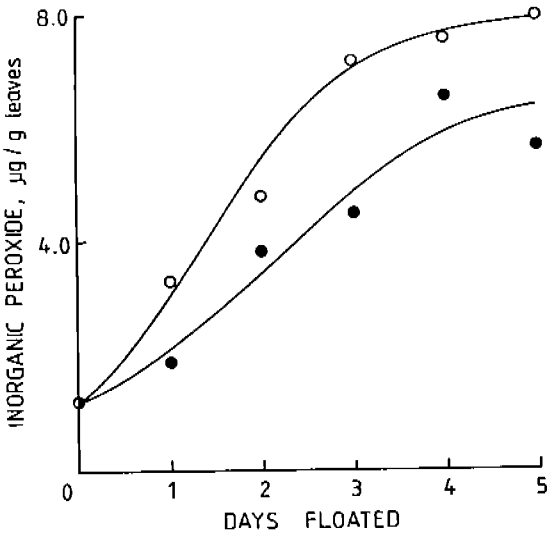

Fig. 4. Effect of dimethipin on the inorganic peroxide content in excised barley first leaves during senescence. ○,control; ●,dimethipin (10^{-4}M).

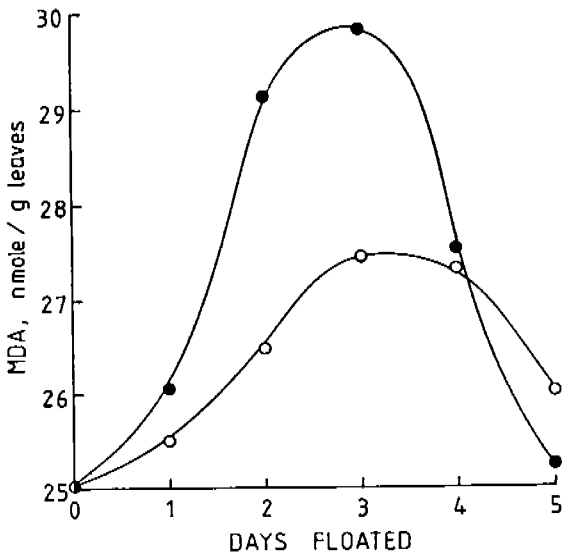

Fig. 5. Effect of dimethipin on the malondialdehyde (MDA) content in excised barley first leaves during senescence. ○, control; ●,dimethipin (10^{-4}M).

노쇠 중인 보리 제1엽의 과산화수소 함량을 조사한 결과 (Fig. 4), 대조구와 dimethipin 처리구 공히 처리일수에 따라 그 함량이 증가하여 절단 당시에 비해 5일째에, 대조구에서는 6.7배, 처리구에서는 4.6배의 증가를 보였다. 또한 대조구에 비하여 처리구의 함량이 항상 적게 나타났다. 노쇠 중 일어나는 현상 중 가장 중요한 것 중의 하나가 산화

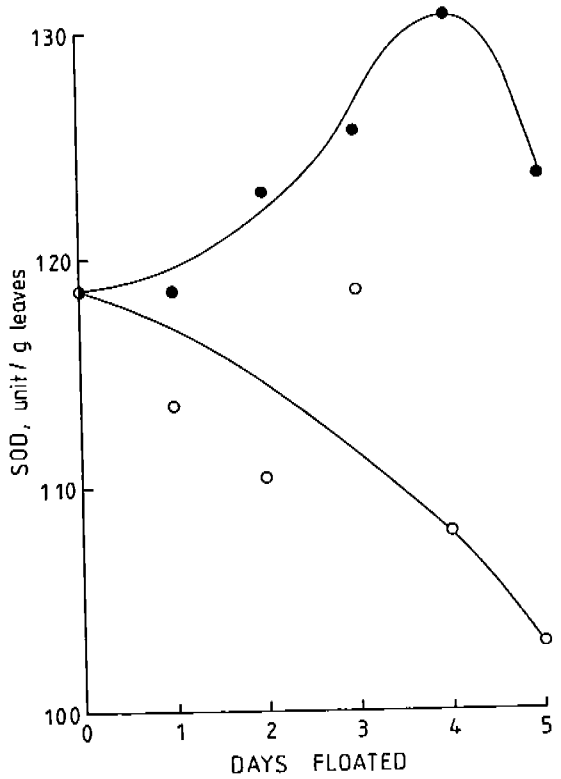

Fig. 6. Effect of dimethipin on the superoxide dismutase (SOD) activity in excised barley leaves during senescence. ○, control; ●,dimethipin (10^{-4}M).

에 따른 막의 파괴라고 할 수 있는데 이는 대사의 불균형으로 인하여 조직내에 축적된 과산화수소에 의하여 주로 이루어진다고 보고되고 있다(Brennan and Frenkel, 1977).

이를 실험적으로 검증하기 위하여 지질의 과산화의 중간 산물로서 지질의 산화 정도를 알 수 있는 척도가 되는 malondialdehyde (Heath and Packer, 1968)의 함량을 측정하였던 바 (Fig. 5), 대조구와 처리구에서 3일째까지 1.1 및 1.2배로 증가하다가 그 이후 감소하는 추세를 보였다. Dimethipin 처리구의 경우, 대조구에 비하여 3일째까지는 높았으나 5일째에는 malondialdehyde의 함량이 다소 낮아졌다. 이로 미루어 보아 dimethipin은 노쇠 초기보다는 4일 이후에야 막의 불포화지방의 과산화 과정을 조절하는 것으로 사료되나, 보리 제1엽의 노쇠와 malondialdehyde 함량과의 상관관계는 추후의 실험을 통해서 구명하여야 할 것이다.

Superoxide dismutase의 활성은 대조구에서는 노쇠일수에 따라 감소하여 절단 후 5일째에 절단 당시의 87%로 낮아졌으나, dimethipin 처리구에서는 활성이 절단 후 증가하는 추세를 보여 4일째에는 110%에 달했으며 5일째에는 다시 104%로 낮아졌다 (Fig. 6).

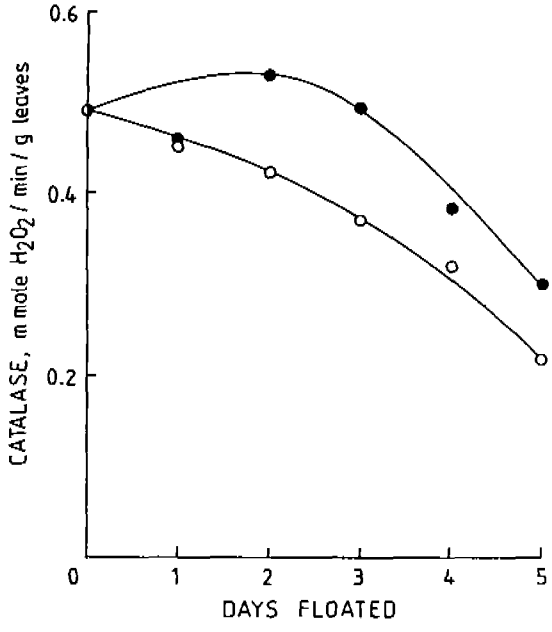

Fig. 7. Effect of dimethipin on the catalase activity in excised barley first leaves during senescence. ○, control; ●, dimethipin (10^{-4}M).

노쇠 중인 보리 제1엽의 catalase 활성을 조사한 결과 대조구에서는 활성이 계속 감소하여 5일째에는 절단시의 45%에 불과하였으나, dimethipin 처리구에서는 이틀째 활성이 절단시의 108%로 증가하였다가 이후 감소하는 추세를 보여 5일째에는 61%에 달하였다. 또한 대조구에 비하여 처리구의 활성이 약 25% 정도 높게 나타났다(Fig. 7). Superoxide dismutase와 catalase는 노쇠시 막 불포화지방의 과산화를 유발하는 free radical(Mishra *et al.*, 1971 ; Leshem *et al.*, 1981) 중 대표적인 종류인 superoxide radical과 과산화수소를 각각 분해함으로써 지질의 과산화 정도를 조절한다고 알려져 있는데(Fridovich, 1975), 노쇠 중인 보리 제1엽에서 대조구에 비하여 dimethipin 처리구에서 이들 효소의 활성이 높다는 사실은 dimethipin 처리구에서는 freeradical의 축적이 억제되어 막지질의 산화에 따른 노쇠가 억제된다는 가설을 지지한다고 할 수 있다.

이들 실험결과를 종합하여 볼 때, 엽록소 및 단백질 함량의 변화와 peroxidase 활성실험에서 dimethipin은 절단한 보리 제1엽의 노쇠를 억제하는 것으로 나타났고, 이에 따른 과산화수소의 생성과 malondialdehyde의 후기생성을 억제하였으며, 또한 생성되는 free radical을 제거하는 superoxide dismutase와 catalase 활성이 대조구보다 dimethipin 처리구에서 높은 점으로 미루어 보아, dimethipin은 막을 구성하는 불포화지방의 과산화와 관련한 효소활성의 조절 및 막 과산화 중간산물의 함량 조절을 통하여 막구조의 유지에 기여하므로써 절단한 보리 제1엽의 노쇠를 억제할 가능성이 있다.

摘 要

Dimethipin이 절단한 보리 제1엽의 노쇠에 미치는 영향을 조사하였다. 절단한 잎에서 dimethipin은 노쇠현상과 관련된 엽록소 및 단백질의 소실을 억제하였고 peroxidase 활성을 감소시켰다. 또한 dimethipin은 과산화수소 함량과 후기 malondialdehyde 함량을 감소시켰으며 superoxide dismutase 및 catalase 활성을 증가시켰다. Dimethipne의 이러한 노쇠억제효과는 노쇠시 발생하는 불포화지방의 과산화 및 free radical의 축적을 억제하여 막 구조를 안정화시킨 결과로 사료된다.

參 考 文 獻

Ames, R.B., A.R. Blem, J.M. Pryzbylek, A.W. Walz and D. Jackson. 1982. Dimethipin: A unique plant maturity regulator for rice and sunflower, *Proc. 1982 British Crop Protection Conf.* **2:** 563-568.

Bell, A.R., R.B. Ames, R.W. Neidermyer and A.D. Brewer. 1974. 2, 3-dihydro-5, 6-dimethyl-1,4-dithin-1,1,4,4-tetraoxide: A new protato herbicide and vine desiccant. *Proc. Northcentral Weed Control Conf.* **19:** 69-70.

Bernt, E. and H.U. Bergmeyer. 1974. Inorganic peroxides. *In,* Method of enzymatic analysis, H.U. Bergmeyer (ed.). Vol. 4. Academic Press, New York, pp. 2246-2248.

Brennan, T. and C. Frenkel. 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol.* **59:** 411-416.

Chance, B. and A.C. Maehly. 1955. Assays of catalase and peroxidase. *In,* Methods in Enzymology, S.P. Colowick and S.P. Kaplan (eds.) Vol. 2, Academic Press. New York, pp. 764-769.

Deinsa, R.S., P.P. Dhinsa and T.A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* **32:** 93-101.

Fridovich, I. 1975. Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochm.* **44:** 147-159.

Giannopolities, C.N. and S.K. Ries. 1977. Superoxide dismutase. *Plant Physiol.* **59:** 304-314.

Harborne, J.B. 1973. Phytochemical Methods. Chapman and Hall. London, pp. 204-208.

Heath, R.L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of

fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **125:** 189-198.

Hurkman, W.J. 1979. Ultrastructural changes of chloroplasts in attached and detached, aging primary wheat leaves. *Amer. J. Bot.* **61:** 64-70.

Jun, B.O. 1987. Effects of dimethipin on the chlorophyll content and chlorophyll-protein complexes in barley first leaves. *Proc. Nat. Sci. Res. Inst. KANU.* **3**(2): 57-66.

Leshem, Y., J. Wurzburger, S. Grossman and A. Frimer 1981. Cytokinin interaction with free radical metabolism and senescence: Effects on endogenous lipoxygenase and purine oxidation. *Physiol. Plant.* **53:** 9-12.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Photein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193:** 265-275.

Metzger, J.D. and J. Keng. 1984. Effects of dimethipin, a defoliant and desiccant, on stomatal behavior and protein synthesis. *J. Plant Growth Regul.* **3:** 141-156.

Mishra, S.D., I.C. Dare, B.B. Singh and B.K. Gaur. 1971. Electron spin resonance study of developing and aging betel leaves. *Proc. Indian Acad. Sci.* **74:** 102-105.

Moon, B.Y. and Y.M. Kwon. 1988. Effects of dimethipin on the osmatic ground value and passive permeability of onion epidermal cells. *Kor. J. Bot.* **31:** 113-119.

Reid, P.D. and H.V. Marsh. 1976. Effect of a new defoliant (UBI-N252) on abscission and cellulase activity in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 57(Suppl.), 99.

Thimann, K.V. 1980. The senescence of leaves. *In,* Senescence in Plants, CRC Press, Florida, pp. 85-116.

Thomas, H. and J.L. Stoddart. 1980. Leaf senescence. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31:** 83-111.

(1989. 12. 29 接受)