

보리종자에서 α -Amylase 유도에 미치는 Dimethipin의 영향

全 芳 郁

(江陵大學校 生物學科)

Effect of Dimethipin on the α -Amylase Induction in Barley Seeds

Jun, Bang-Ook

(Department of Biology, Kangnung National University, Kangnung)

ABSTRACT

The effect of dimethipin, one of the synthesized plant growth regulators, on the gibberellic acid-induced α -amylase activity in the barley de-embryonated seed system was investigated in order to elucidate the possible action mechanism of dimethipin. Dimethipin markedly inhibited the increase of mRNA and protein content, and α -amylase activity induced by gibberellic acid. The inhibitory effects were gradually decreased as the time interval between gibberellic acid treatment and dimethipin addition was made larger. Dimethipin inhibited the increase of mRNA content when added within 18 h from gibberellic acid treatment; however, it inhibited the increase of soluble protein content and α -amylase activity even added after 18 h from the treatment. These results suggest the possibility that dimethipin inhibit both mRNA synthesis and α -amylase protein synthesis.

서 론

Dimethipin(2,3-dihydro-5,6-dimethyl-1,4-dithin-1,1,4,4-tetraoxide; 상품명 Harvade)은 기존의 합성 식물생장조절제들과는 그 구조가 현저하게 다른 새로운 타입의 식물생장조절제이다. Dimethipin은 대개의 식물에서 성숙과 자연적인 노화를 촉진시키며 낙엽을 유도한다(Ames *et al.*, 1982). 따라서 목화, 포도 및 천연고무나무 등의 고엽제(Costa and Intrieri, 1981), 감자 줄기의 건조제(Bohne, 1977; McIntire *et al.*, 1977; Bell *et al.*, 1974)와 해바라기 및 벼의 성숙 유도제로서 사용되어(Ames *et al.*, 1982) 수확의 효율을 제고시키거나 곡물 비용을 경감시켜주는 효과를 갖는다. 또한 dimethipin은 쌍자엽 및 단자엽의 잡초를 제거하는데 사용할 수 있으며(Bell *et al.*, 1975), 특히 감자의 경우는 파종 이전에 제초제로서 사용한다.

이상과 같이 dimethipin에 관한 연구는 주로 농업 분야에 국한되어 온 듯하다.

이에 비하면 dimethipin에 관한 생리적인 연구는 적은 편이다. 강낭콩의 경우에는 처리한 이층(abscission layer)의 cellulase 활성을 오히려 억제함이 보고되었고(Reid, 1976), ethylene 형성에도 관계하지 않았다(Reid and Marsh, 1976). 또한 dimethipin을 강낭콩에 처리하면 phenylalanine ammonia lyase와 nitrate reductase의 활성이 억제된다고 한다(Hoagland, 1984). 또한 노쇠와 관련된 효소인 peroxidase, superoxide dismutase 및 catalase 등의 활성이 조절된다는 것이 밝혀진 바 있다(Jun, 1990). 이와 같이 dimethipin 처리는 여러 효소의 활성에 영향을 줌으로써 식물생장 및 분화에 관여할 수 있다고 해석되고 있다. Dimethipin 처리시의 직접적인 영향으로는 단백질 합성이 억제됨이 알려졌다(Keng and Metzger, 1985). 그러나 Keng과 Metzger(1985)의 보고 이외에는 다른 식물을 재료로 해서는 단백질 합성의 억제 여부가 밝혀지지 않았으며, 더구나 단백질 합성을 조절하는 mRNA 합량 등 작용

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

양식의 구명에 관한 보고는 아직 없다. 국내에서도 최근 dimethipin에 대한 연구가 시작되고 있으나(Jun, 1987; Lee, 1987; Moon and Kwon, 1988; Lee, 1989; Jun, 1990), Moon과 Kwon(1988)이 막에 직접 작용한다는 결과를 보고했을 뿐 아직 기초적인 생리, 생화학적인 현상의 보고에 그치고 있는 실정이다.

Dimethipin은 포유동물이나 어류에 대하여 비교적 비독성이며 동물체 내에서는 신속히 대사되고 배설되는 화합물이나 목화, 감자, 그리고 해바라기 등을 재료로 하여 연구한 바에 의하면 식물에서는 쉽게 대사되지 않는다고 한다. 또한 dimethipin은 통기가 원활치 못한 암처에서는 적어도 수년간 안정하다고 알려져 있는 화합물이며(Uniloyal chemical, unpublished). 따라서 파종 이전이나, 수확기에 살포하면 토양내에 잔류, 축적되게 된다. 이러한 dimethipin은 곡류나 채소의 발아 및 생장에 커다란 저해적 영향을 미치리라 예견된다. 특히 수확기가 끝난 후 바로 파종되는 가을보리의 경우 dimethipin은 발아 및 생장을 크게 억제한다(Jun, 1987; Jun, 1990; Lee, 1987; Lee, 1989).

보리의 호분층 조직은 균일한 세포로 되어 있고, 세포 분열이 일어나지 않으며, 세포내 대사계가 비교적 단순하다. 또한 gibberellic acid에 의해서 유도되는 α -amylase는 그 합성기작과 생리적인 시간대가 잘 알려져 있고 전체 가용성 단백질 중 대부분을 점유한다고 보고되어 있는 단백질이기 때문에 효과적인 생화학적 marker로서 사용될 수 있다(Bewley and Black, 1978; Ho, 1980).

따라서 본 연구자는 이에 착안하여 보리 무배부 종자 시스템을 사용하여 최근에 개발된 식물생장조절제로서, 그 구조가 기존의 생장조절제와는 현저히 다른 dimethipin이 보리 종자내의 α -amylase의 *de novo* 합성을 억제하는 작용양식을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

종자배양 및 효소 원액의 제조. 보리(*Hordeum vulgare* L. cv. Baedong) 종자를 반분하여 유배부를 제거한 후 무배부를 1% sodium hypochlorite 용액으로 15분간 소독한 뒤 무균 증류수로 충분히 씻어 내었다. 소독한 무배부 종자를 무균 증류수에 넣고 4°C의 암처에서 24시간 동안 침윤시켰다. 침윤이 끝난 무배부 종자 15립을 5 ml의 멸균된 배양액과 함께 25 ml의 삼각플라스크에 넣어 30°C의 암처에서 진탕배양하였다. 배양액으로는 CaCl_2 (20 mM), streptomycin sulfate (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 penicillin (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 1 mM Na-acetate 완충액(pH 4.8)을 사용하였으며, 배양액에 첨가되는 dimethipin과 GA_3 등은 함께 0.45 μm Millipore membrane으로 여과하였고 모든 조작은 무균하

에서 실시하였다.

일정시간의 배양이 끝나면, 배양액과 종자를 0.5 g의 석영사와 함께 2분간 막자사발에서 마쇄하고 이를 20,000×g에서 30분 동안 원심분리한 후 그 상정액을 효소 원액으로 하였다(Park and Kwon, 1981; Jun *et al.*, 1983).

Total amylase, α -amylase 활성 및 수용성 단백질 함량 측정. Total amylase 활성은 10배로 희석한 효소액 0.3 ml를 0.1% 전분용액과 함께 섞어서 30°C의 항온수조에서 1분간 반응시킨 후 3 ml의 KI-iodine 용액을 가하여 반응을 중지, 발색시키고, 그 흡광도를 620 nm에서 측정하였다. KI-iodine 용액은 KI 6 g과 iodine 0.6 g을 증류수 100 ml에 녹여서 만든 stock 용액 0.3 ml를 0.05 N HCl 100 ml에 첨가하여 사용하였다. α -Amylase 활성은 10배로 희석한 효소액 0.3 ml를 0.3 ml의 β -limit dextrin 용액과 함께 섞어서 30°C의 항온수조에서 1분간 반응시킨 후 3 ml의 KI-iodine 용액을 가하여 반응을 중지 발색시키고 그 흡광도를 525 nm에서 측정하였다. β -Limit dextrin은 1 mM Na-acetate 완충용액(pH 4.8) 100 ml에 500 g의 soluble starch를 끓여 녹인 후, 10 unit의 β -amylase를 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시킨 것이었다.

단백질 함량의 측정을 위해서는 먼저 trichloroacetic acid로 단백질을 침전시킨 후 Lowry 등(1951)의 방법을 사용하여 침전된 단백질을 정량하였으며, 이 때 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하였다(Jun and Kwon, 1986).

mRNA 추출 및 함량 측정. mRNA의 추출과 함량 측정은 Leaver와 Ingle(1971)의 방법 및 Slater(1984)의 방법을 기본으로 하였다. 영하 20°C에서 동결시킨 배양 무배부 종자 270립에 1 g의 석영사를 넣고 15 ml의 추출용 완충용액(10 mM Tris-HCl, 1% SDS, 5 mM MgCl_2 포함)과 0.5 ml의 RNAse 억제제인 diethyl pyrocarbonate를 가한 후 미리 냉각시킨 막자사발에서 마쇄하였다. 파스퇴르 피펫을 사용하여 50 ml 원심분리관에 옮기고 여기에 페놀용액(phenol : H_2O : 8-hydroxy-quinoline : m-cresol = 50 : 10 : 0.05 : 7(v/v/w/v)) 15 ml를 가하고 5분간 강하게 진탕시켰다. 그 후 12,000×g로 30분간 원심분리하여 얻은 상정액에 단백질 추출용액(isoamyl alcohol : chloroform : phenol = 1 : 24 : 15(v/v/v)) 15 ml를 가하고 1-2분간 진탕한 후 다시 12,000×g로 30분간 원심분리하였다. 상정액의 용적의 두배에 해당하는 냉각시킨 95% ethyl alcohol(0.2 N sodium acetate 포함)을 넣고 진탕한 후 영하 20°C에서 하룻밤 동안 정치하였다. 이것을 다시 12,000×g로 원심분리하여 얻은 침전물에 냉각된 95% ethyl alcohol 10 ml를 가하고 12,000×g로 원심분리한 후 얻어진 침전물을 건조시켰다. 이 침전물에 증류수 10 ml를 넣고 진탕하여 녹인 후 ethyl ether 10 ml를 더 넣고 2분 후 층이 형성되었을 때 파스퇴르

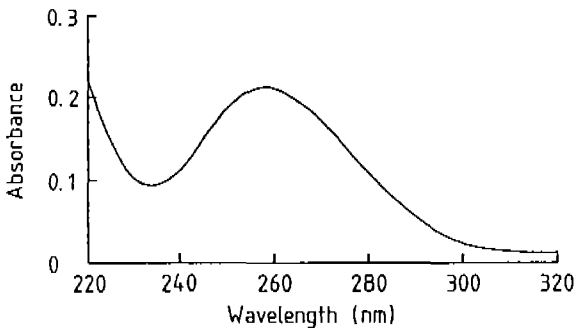


Fig. 1. UV-absorption spectra of RNA purified from de-embryonated barely seeds.

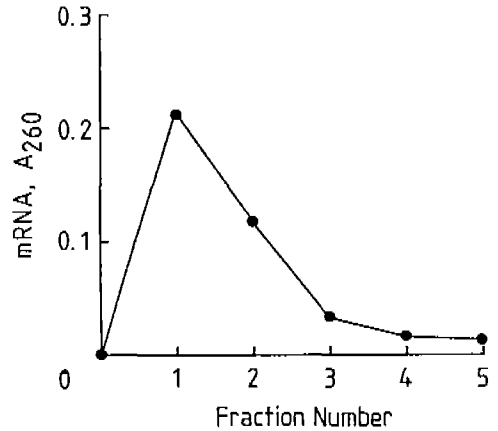


Fig. 2. Elution profile of mRNA on the oligo (dT)-cellulose column (0.5×5 cm). The fraction size was 2 ml.

피펫을 이용하여 ether와 phenol을 제거한 후 또 한번 이 단계를 반복하여 phenol을 완전히 제거하였다. 이 액의 용적의 두배에 해당하는 냉각시킨 95% ethyl alcohol(0.2 N sodium acetate 포함)을 넣고 진탕한 후 영하 20℃에서 하룻밤 동안 정착한 다음 이것을 다시 12,000×g로 원심 분리하여 얻어진 침전물에 냉각시킨 95% ethyl alcohol 10 ml를 가하고 12,000×g로 원심분리한 후 얻어진 침전물을 건조시켰다. 이 침전물에 10 mM Tris 완충용액(pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% SDS 포함) 20 ml를 넣고 진탕하여 녹인 후 12,000×g로 30분간 원심분리하여 상층액을 얻은 다음 자외선 분광광도계를 사용하여 220-320 nm까지 주사하였다(Fig. 1). 그 결과 A_{260}/A_{280} 이 1.9 이상 이었고 A_{310} 이 0.05 미만인 것을 보아 RNA가 성공적으로 분리된 것을 확인할 수 있었다. 총 RNA 함량은 260 nm에서의 흡광도로부터, 흡광도가 1이면 시료 중에 50 μ mg/ml의 RNA가 있는 것으로 간주, 계산하였다.

10 mM Tris 완충용액(pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% SDS 포함) 20 ml로 미리 평형시킨 oligo-(dT)-cellulose column(0.5×5 cm)에 상기 RNA 분획을 얹고 다시 동일한 완충용액으로 수차례 씻어낸 다음 elution 용액(10 mM Tris 완충용액(pH 7.5), 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% SDS 포함)을 흘려 분획하였다(Fig. 2). 이 때 분획속도는 0.2 ml/min, 분획량은 2 ml/140 drops 이었다. 각 분획의 mRNA 함량도 260 nm에서의 흡광도로 계산하였다(Mundy *et al.*, 1985).

결과 및 고찰

Gibberellic acid(GA₃)에 의하여 유도되는, 무배부종자내 α -amylase 활성화에 미치는 dimethipin의 억제 효과를 알아 보기 위하여 dimethipin을 농도별로 처리한 결과 10⁻⁶ M의 dimethipin은 α -amylase 활성을 거의 억제하지 않았으나, 10⁻⁵ M은 20%, 10⁻⁴ M은 80%, 10⁻³ M은 95% 억제하였다.

따라서 본 실험에서는 dimethipin의 확실한 효과를 보기 위하여 10⁻³ M을 사용하였다(미발표 결과).

Gibberellic acid를 처리한 후 시간간격을 두고 dimethipin을 처리한 결과 시간 간격이 커질수록 mRNA의 함량 증가를 억제하는 정도는 작아졌으며, 특히 12시간 이후에 처리한 경우는 함량증가를 억제하지 못했다(Table 1). 이로 미루어보아 본 실험의 경우, 보리 무배부 종자에 GA₃를 처리한 경우에 전사는 12시간 이전에 종결되는 것으로 사료된다. 또 12시간 이전에 처리한 dimethipin은 mRNA 함량증가를 상당히 억제했는데, 이로 미루어보아 dimethipin은 보리의 무배부에 gibberellic acid를 처리할 때 일어나는 mRNA의 합성(Ho and Varner, 1974)을 억제하였음을 알 수 있다.

Dimethipin이 어떤 경로를 통하여 amylase 활성을 억제하는가를 일부 살펴보기 위하여 GA₃ 처리 후, dimethipin이 시간간격을 두고 처리되었을 때의 total amylase 및 α -amylase 활성과 단백질 함량에 미치는 영향을 조사하였

Table 1. Effect of dimethipin addition time after GA₃ treatment on the increase of mRNA content in barley half seed

Treatment	mRNA	Ratio of relative increase(%)
None	1.06	0
GA ₃ only	2.96	100
GA ₃ +Dimethipin (0 hr)	0.80	-13.6
GA ₃ +Dimethipin (6 hr)	1.23	8.9
GA ₃ +Dimethipin (12 hr)	1.86	42.1
GA ₃ +Dimethipin (18 hr)	3.41	123.7

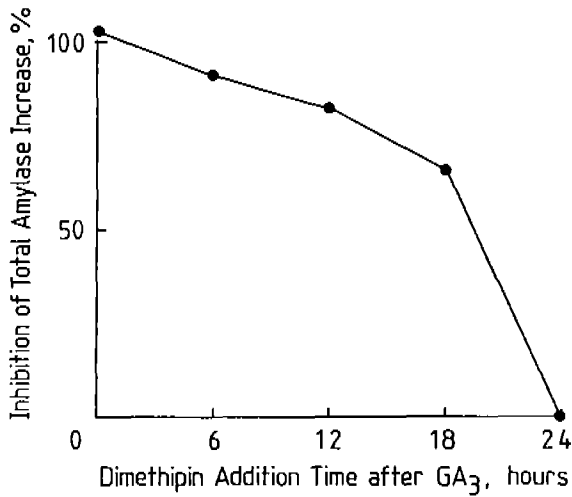


Fig. 3. The effect of dimethipin addition time after GA₃ treatment on the increase of total amylase activity.

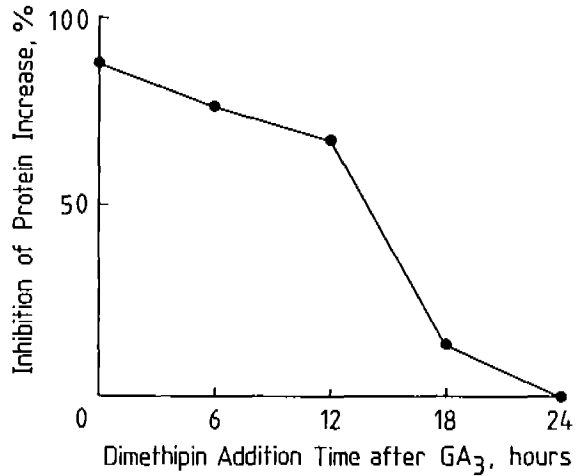


Fig. 5. The effect of dimethipin addition time after GA₃ treatment on the increase of soluble protein content.

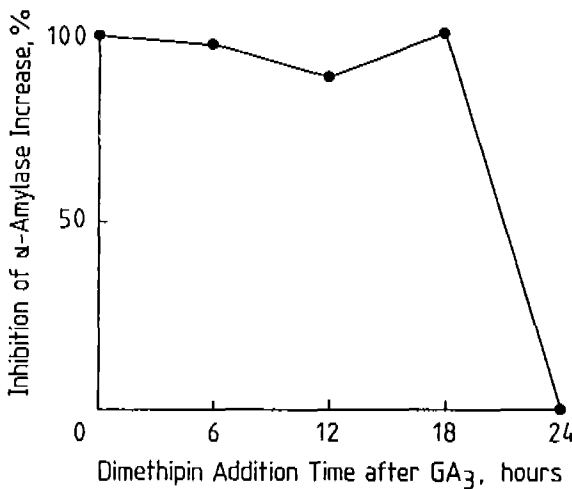


Fig. 4. The effect of dimethipin addition time after GA₃ treatment on the increase of α-amylase activity.

다. GA₃와 동시에 첨가한 dimethipin은 total amylase 활성 증가를 완전히 억제하였으나 GA₃ 처리 후 시간 간격이 커질수록 억제 정도가 감소하였다(Fig. 3). GA₃ 처리와 동시에 dimethipin을 처리하였을 때, 이와 같이 효소 활성이 완전히 억제되는 것으로 미루어보아 dimethipin은 α-amylase의 de novo 합성만 억제하는 것이 아니라 β-amylase의 활성화도 억제하는 것으로 보인다(Jun *et al.*, 1983).

α-Amylase의 경우, GA₃를 처리한 시간간격과 거의 상관없이 dimethipin은 α-amylase의 활성증가를 완전히 억제하였다(Fig. 4). α-Amylase mRNA의 합성이 종료되는 18

시간 이후(Jun *et al.*, 1983)에도 이처럼 α-amylase의 활성증가가 억제된다는 결과는 dimethipin이 α-amylase mRNA의 합성과정 뿐만 아니라 해독과정에도 영향을 미친다는 사실을 시사해준다.

Dimethipin의 시간별 처리가 전체 가용성단백질의 함량에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 5), dimethipin은 GA₃에 의한 수용성 단백질의 함량증가를 억제하였으나(Metzger and Keng, 1984), total amylase 및 α-amylase의 경우보다는 억제 정도가 더욱 심해진 것으로 사료된다(Jun *et al.*, 1983).

결론적으로 dimethipin은 보리 무배부종자 시스템에서 GA₃에 의한 mRNA 함량증가와 단백질 함량증가를 공히 억제하여 total amylase 활성 및 α-amylase 활성을 억제한다고 할 수 있다.

적 요

합성 식물생장조절제인 dimethipin의 작용기작을 밝히 고자 보리 무배부 종자 시스템에서 gibberellic acid(GA₃)에 의해 유도되는 α-amylase 활성에 미치는 dimethipin의 영향을 조사하였다. Dimethipin은 mRNA와 단백질 함량 및 GA₃에 의해 유도되는 α-amylase 활성을 뚜렷하게 억제하였다. 그러나 억제효과는 GA₃ 처리 후 dimethipin 첨가시간 간격이 커질수록 점점 감소하였다. Dimethipin을 GA₃ 처리 후 18시간 이내에 첨가하였을 때 mRNA 함량증가를 억제하였다. 그러나 GA₃ 처리 18시간 경과 후에 첨가하였을 경우에도 수용성 단백질 함량 및 α-amylase 활성 증가를 억제하였다. 이러한 결과로 미루어보아 dimethipin은

mRNA 합성과 α -amylase 단백질 합성을 공히 억제하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Ames, R.B., A.R. Blem, J.M. Pryzbyl, 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 potato herbicide and vine desiccant. *Proc. Northcentral Weed Control Conf.* **19**: 69-70.
- Bell, A.R., R.B. Ames, R.W. Neidermyer and A.D. Brewer. 1975. UNI-N252, a new harvest aid chemical and herbicide. *Proc. Northcentral Weed Control Conf.* **29**: 183.
- Bewley, J.B. and M. Black. 1978. Physiology and Biochemistry of Seeds. I. Development, Germination and Growth. Springer Verlag, New York. pp. 245-263.
- Bohne, P. 1977. Harvade (UNI-252): A new harvest aid chemical for potatoes. *Proc. Plant Growth Reg. Working Group* **4**: 172.
- Costa, G. and C. Intrieri. 1981. Pre-harvest defoliation on grapes induced by growth regulators. *Acta Horticult.* **120**: 238.
- Ho, T.D. 1979. Hormonal control of enzyme formation in barley aleurone layers. In, *Plant Molecular Biology*, I. Rubenstein (ed.). Academic Press, New York. pp. 217-240.
- Ho, T.D. and J.E. Varner. 1974. Hormonal control of messenger ribonucleic acid metabolism in barley aleurone layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 4783-4786.
- Hoagland, R.E. 1984. Dimethipin (2,3-dihydro-5,6-dimethyl-1,4-dithin-1,1,4,4-tetraoxide) effects on soybean seedling growth and metabolism. *Plant Cell Physiol.* **25**: 397-405.
- 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**: 57-66.
- Jun, B.O. 1990. Effects of dimethipin on the senescence of excised barley first leaves. *Korean J. Bot.* **33**: 25-30.
- Jun, B.O. and Y.M. Kwon. 1986. Isolation and characterization of α -amylase from barley half seed treated with canavanine. *Kor. Biochem. J.* **19**: 179-186.
- Jun, B.O., S.C. Koh and Y.M. Kwon. 1983. Canavanine effects on the amylase activity and protein content in barley half seed. *Korean J. Bot.* **26**: 173-180.
- Keng, J. and J.D. Metzger. 1985. Modification of dimethipin action by light. *Plant Physiol.* **77** (Suppl.): 152.
- Leaver, C.J. and J. Ingle. 1971. The molecular integrity of chloroplast ribosomal ribonucleic acid. *Biochem. J.* **123**: 235-243.
- Lee, B.S. 1989. Physiological effect of dimethipin on the growth of barley seedlings. Ph.D. Thesis. Seoul National University, Seoul.
- Lee, J.S. 1987. Effects of dimethipin on the growth of barley seedlings and the electron transport activity of isolated barley chloroplasts. M.S. Thesis. Seoul National University, Seoul.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- McIntire, S., B. Lambert and A.D. Brewer. 1977. Harvade (UNI-N252), a new harvest aid chemical for cotton. *Proc. Plant Growth Reg. Working Group* **4**: 202.
- 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.
- Moon, B.Y. and Y.M. Kwon. 1988. Effects of dimethipin on the osmotic ground value and passive permeability of onion epidermal cells. *Korean J. Bot.* **31**: 113-119.
- Mundy, J.A., A. Brandt and G.B. Fincher. 1985. Messenger RNAs from the scutellum and aleurone of germinating barley encode (1-3, 1-4)- β -D-glucanase, α -amylase and carboxypeptidase. *Plant Physiol.* **79**: 869-871.
- Park, I.H. and Y.M. Kwon. 1981. Effect of L-canavanine on the GA₃ induced amylase activity in barley half seeds. *Kor. Biochem. J.* **15**: 261-268.
- Reid, P.D. 1976. Effect of UBI-N252 on abscission and cellular activity in *Phaseolus vulgaris*. *Proc. Northeastern Weed Sci.* **30**: 147-151.
- 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.
- Slater, R.J. 1984. The extraction of total RNA by the detergent and phenol method. In, *Methods in Molecular Biology*. Vol. II. Nucleic Acid. J.M. Walker (ed.), Humana Press, New Jersey. pp. 101-108.

(Received May 17, 1991)