

비광요구형 디페닐에테르계 TOPE의 생리적  
작용에 관한 연구

김진석\* · 조광연\* · 변종영\*\*

Physiological Effects of TOPE, a Photo-independent  
Diphenylether, on Higher Plants

Kim, J.S.\*, K.Y. Cho\* and J.Y. Pyon\*\*

ABSTRACT

Several physiological responses were investigated in plants treated with TOPE as a preliminary step to know its action site. Unlike photo-dependent diphenylethers, herbicidal activity of TOPE appeared slowly and its typical symptoms were both burning of leaf blades and abnormal division of meristem in grasses. Similarly, both leakage of cell electrolytes and the curling of cotyledon margin were also shown in cucumber(*Cucumis sativus* L.). Biosynthesis of chlorophyll in etiolated cucumber cotyledon was not inhibited directly by treatment of TOPE at low light intensity( $5.5 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) and protoporphyrin IX was not also accumulated. The contents of phytoene, phytofluene and  $\beta$ -carotene were abnormally increased. Photosynthesis was inhibited only at high concentration. Mitochondrial respiration was inhibited at high concentration but rather increased significantly at  $10 \mu \text{M}$  of TOPE. However, respiration inhibitors did not alleviate the two symptoms of TOPE in cucumber cotyledon. In the same experiments, using inhibitors of protein or nucleic acid biosynthesis, only one of the two symptoms was alleviated by chloramphenicol and cycloheximide. In contrast, both symptoms were alleviated by actinomycin-D and hydroxyurea, suggesting that nucleic acid metabolism might be preferentially related to the mode of action of TOPE. DNA, RNA and protein contents were accumulated in both cucumber cotyledon and rice (*Oryza sativa* L.) roots treated with TOPE, and the DNA of them was increased at first. Thus, it is conjectured that TOPE increase nucleic acid metabolism directly or indirectly, and then disturb various metabolic pathways causing abnormal physiological and morphological effects followed by final death.

Key words: TOPE, mode of action, diphenylether herbicide, nucleic acid metabolism, physiological response.

\* 한국화학연구소, KRRICT, P.O.Box 107, Yuseong, Taejeon, Korea 305-606.

\*\* 충남대학교 농과대학, Dept. of Agronomy, Chungnam Nat'l Univ., Taejeon. Korea. 305-764

<1996. 3. 19 접수>

## 서 언

디페닐에테르계 화합물은 작용발현에 광을 요구하는 형과 요구하지 않는 형으로 나눌 수 있으며 전자는 A 환의 ortho, para 위치가 치환된 nitrofen, oxyfluorfen 등이, 후자는 meta 위치가 치환된 TOPE, DMNP 등이 이에 속한다.<sup>18)</sup>

광요구형 디페닐에테르계 화합물은 엽록소 생합성 과정상의 protoporphyrinogen oxidase를 저해하며<sup>13,21)</sup> 이로 인해 축적된 porphyrin은 광에 의해 여기되어 활성산소를 발생시키고 이들이 생체막을 파괴시킴으로써 제초활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다.<sup>1,11,15,16)</sup> 그러나 작용발현에 광을 요구하지 않는 디페닐에테르계 화합물의 작용기작은 상대적으로 거의 알려져 있지 않다. 본 연구는 TOPE가 어떻게 하여 제초활성을 나타내는지를 알아보기 위하여 식물 색소생합성, 호흡 및 광합성, 핵산대사 등 여러 가지의 식물생리작용에 미치는 영향을 조사하여 보았다. 그 결과 TOPE는 초기에 핵산대사에 영향을 미치며 이로 인해 나타나는 여러 생리과정의 교란에 의해 제초작용이 발현되는 것으로 생각되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험화합물

TOPE는 본 연구실에서 합성(a.i. 98%)하였으며 대조약제로서 oxyfluorfen(a.i. 70.3%), norflurazon(a.i. 80.3%), 2,4-D(Sigma), DCMU(Sigma) 등은 원제를 사용하였다. Methyl viologen(MV), protoporphyrin IX(PPIX), antimycin-A, oligomycin, 2,4-dichlorophenol(DCP), DNA, RNA, hydroxyurea 등은 Sigma사로부터 cycloheximide, chloramphenicol 등은 Aldrich사로부터 actinomycin-D는 Merk사로부터 구입하여 사용하였다.

### 2. 제초반응

사각꽃트(350cm<sup>2</sup>)에 사질양토의 흙을 담고 식용피(*Echinochloa crusgalli* var. *frumentacea* Wight.)

와 바랭이(*Digitaria sanguinalis* L.)를 파종한 다음 온실에서(낮 30-35°C / 밤 20-25°C) 14일간 생육시켰다. 4kg a.i./ha의 TOPE를 400 L/10a 수준으로 경엽처리하고 즉시 연속 암조건 또는 온실의 자연조건에 둔 다음 제초력 정도와 증상을 달관조사하였다. 화합물 용액내의 acetone 및 Tween-20 최종농도는 각각 50%, 0.1%였으며 본 농도에서의 약해는 전혀 관찰되지 않았다. 한편 오이(*Cucumis sativus* L.) 자엽에서 나타나는 증상을 파악하기 위해서는 25°C 암조건에서 자란 황화된 오이자엽을 약한 녹색광하에서 TOPE 용액 위에 치상한 후 암조건에 두면서 관찰하였다.

### 3. 엽록소 및 카로티노이드 생합성과정에 미치는 영향 조사

25°C 암조건에서 자란 황화된 오이자엽을 취하여 약한 녹색광 하에서 20, 200 μM TOPE 용액에 띄운 다음 14시간 암조건에 두었다. 이어 3.5 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> PAR의 광도하에 1일동안 녹화시키면서 시간별로 생체중을 측정하고 methanol로 엽록소를 추출하여 Lichtenthaler 방법<sup>14)</sup>으로 정량하였다.

PPIX 축적효과를 보기 위해서는 위와 같이 처리하고 2시간동안 광조사(36 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> PAR)한 후, acetone:0.1 N NH<sub>4</sub>OH(9 : 1 v/v)로 추출하여 Duggan and Gassman 방법<sup>5)</sup>을 약간 변형시켜 형광 분광광도계(SFM 25, Kontron)로 정량하였다.

Carotenoid 성분을 조사하기 위해서는 황화된 오이자엽을 1 mM TOPE 용액에 치상 후 25°C 암조건에 1.5일동안 반응시킨 다음 methanol로 추출하여 이를 n-hexane으로 층분리하였다. n-hexane층에 함유된 phytoene(A<sub>287</sub>), phytofluene(A<sub>347</sub>), β-carotene(A<sub>453</sub>) 함량의 변화를 무처리와 비교하여 조사하였다.<sup>22)</sup>

### 4. TTC(triphenyltetrazolium chloride) 시험

황화된 오이자엽을 TOPE용액에 치상한 다음 25°C 암조건에 1일동안 두었다. 이를 0.1M potassium phosphate(pH 6.0)로 조제한 0.6% TTC

용액에 옮긴 후 동일조건하에 20시간 반응시켰다. 반응이 종료된 자엽을 증류수로 세척하고 일정량의 무게를 취한 후 발현된 색소를 55°C하에서 ethanol로 1시간 동안 추출하였다. Spectrophotometer(DU 65, Beckmann)를 이용하여 A<sub>520</sub>을 측정된 후 무처리구와 비교하였다.

## 5. 호흡활성 조사

미토콘드리아 분리: 황화된 콩(*Glycine max* L.) 하배측으로부터 Moreland방법<sup>20)</sup>으로 미토콘드리아를 추출하였다. 추출액(pH 7.0)에 콩 하배측을 갈아 여과지에 거른 후 4°C, 2,000g로 3분간 원심분리하여 얻은 상등액을 다시 10분간 14,500g로 원심분리하였다. Pellet을 소량의 세척액으로 분산시킨 후 10분간 14,500g로 원심분리하였으며 얻어진 pellet를 소량의 세척액으로 재분산시켜 미토콘드리아 용액으로 사용하였다. 추출액의 조성은 20 μM HEPES-NaOH buffer, 0.3M mannitol, 1mM EDTA-Na<sub>4</sub>, 0.3mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 이었으며, 세척액의 조성은 20 μM HEPES-NaOH buffer, 0.3M mannitol, 1mM EDTA-Na<sub>4</sub> 이었다.

호흡활성 측정: 반응조에 0.54M mannitol, 1 ml; 0.2M potassium phosphate buffer(pH 7.0), 0.2ml; 1M KCl, 0.02ml; 0.1M MgCl<sub>2</sub>, 0.01ml; 0.66M Na-malate, 0.1ml를 넣고 25°C가 되도록 기다렸다가 미토콘드리아 분산액(2.5mg protein/ml) 0.4ml를 넣고 총반응액량이 2.0ml가 되도록 증류수로 보충하였다. 약 2분후 22mM NADH 0.1ml, 0.1M ADP 22 μl를 넣어 반응을 개시시켰다. 2분 후에 용매에 녹인 시험약제를 20 μl 첨가하여 산소 소비정도를 산소전극(Rank Brothers, Bottisham Company)으로 측정하였다.

## 6. 광합성 전자전달 저해조사

엽록체 분리: 엽록체는 TOPE에 민감한 반응을 보였던 식용피로부터 추출하였다. 온실에서 3-4엽기까지 자란 식용피의 엽을 추출액(0.4M sucrose, 15mM NaCl, 20mM tricine-NaOH buffer, pH 8.0)에 마쇄시킨 후 4겹의 거즈에 거른 다음 2분 동안 1,000g로 원심분리하였다. 상등액

을 10분 동안 5,000g로 원심분리하여 얻은 pellet을 다시 추출액으로 분산시킨 다음, 2분 동안 300g로 원심분리시켜 덩어리진 것들을 제거한 후 이를 엽록체 용액으로 사용하였다. Ferricyanide 환원실험의 경우에는 추출액에 20 mM sodium ascorbate를 첨가하여 마쇄시킨 후, ascorbate가 없는 추출액으로 세척함으로써 sodium ascorbate를 제거하였다.

산소전극을 이용한 활성측정: 전자수용체로서 methyl viologen(MV)을 사용하였다. 반응조에 반응액(60mM NaCl, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM NH<sub>4</sub>Cl, 1mM NaN<sub>3</sub>, 12mM tricine-NaOH buffer, pH 8.0) 3ml를 넣고 엽록체 추출액을 200 μl(엽록소 7.4mg/ml) 가하였다. 이어 광을 조사하면서 여러 시기에 시험용액(3.2 μM DCMU, 9.6 μM TOPE, 3.2 μM MV)을 가하여 산소 소비정도를 산소전극으로 측정하였다.<sup>17)</sup>

Potassium ferricyanide를 이용한 측정: 반응액(0.2M tricin-NaOH(pH 8.0), 0.25ml; 50mM NaCl 1.0ml; 50mM MgCl<sub>2</sub> 0.5ml; 2mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 1.0ml; 증류수 1.7ml) 4.5ml에 엽록소 함량이 1.9 μg/ml인 엽록체 추출액 0.5ml를 첨가하고 이어 증류수 또는 시험용액을 넣은 다음, 광을 조사(2.75mMol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> PAR)하여 반응시켰다. 10분 후에 10% TCA를 1ml 첨가하여 반응을 종료시킨 후 10분간 2,000g로 원심분리하여 얻은 상등액을 가지고 A<sub>420</sub>에서 흡광도를 측정, 표준곡선을 통해 환원된 ferricyanide 농도를 구하였다.<sup>19)</sup>

## 7. 전해질 누출 측정시험

Antimycin-A의 6종의 화합물 각각에 또는 TOPE와 혼합처리된 용액에 황화된 오이자엽 5쌍을 치상하여 25°C 암조건에 4일 둔 다음 전해질 누출정도를 전기전도도계(AOC-10, DKK Co.)로 조사하였다.<sup>24)</sup>

## 8. 단백질 및 핵산함량 변화 조사

오이자엽 또는 벼(*Oryza sativa* L. cv. Dongjin) 유근에 TOPE를 처리한 후 시간별로 시료를 취하여 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5)

로 마쇄, 원심분리한 후 상등액을 가지고 Bradford 방법<sup>2)</sup>으로 단백질을 정량하였다. 핵산분석은 침전된 잔사를 이용하였으며 Chen 방법<sup>3)</sup>을 약간 변형시켜 핵산을 추출하여 RNA는 orcinol 반응으로, DNA는 diphenylamine 반응으로 각각 정량하였다.<sup>9)</sup>

### 9. 엽병 굴곡실험

상면 30cm<sup>2</sup> 포트에 멸균된 발토양을 충전하고 어저귀(*Abutilon avicennae* Gaertn)를 파종한다. 다음 위에서 언급한 온실조건에 7일간 성장시켰다. 이때는 제1본엽이 출현하려고 하는 시기였다. 자엽부위에 2,4-D와 TOPE 0.45mM 용액을 살포하고 동일한 온실조건에 1일간 둔 다음 자엽병 굴곡정도를 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 명, 암조건에 따른 제조활성 및 그의 증상

TOPE의 명, 암간 제조활성을 비교하기 위하여 바랭이와 피의 경엽에 TOPE를 처리한 후 시간별 제조활성을 평가한 결과는 그림 1과 같았다. 처리후 1일째에는 암조건의 경우 10% 내외의 방제가를 보이나 명조건의 경우는 약 60% 정도로써 명, 암간 활성차이가 있었다. 4일째에는 암조건의 경우 피 65%, 바랭이 40%, 명조건의 경우 각각 70%, 60%의 방제가를 보여 암조건에서도 활성을 보이면서 명, 암간 활성차이는 1일째보다 적었다. 따라서 TOPE는 광요구형 디페닐에테르와는 달리 암조건에서도 활성이 발현되었으나 그 속도는 명조건보다는 완만한 경향이였다. 암조건에서 작용이 완만하게 발현되었던 것은 무처리에서의 생장이 명조건보다는 암조건에서 매우 낮았던 것으로 보아 식물체 자체의 성장력과 약제에 대한 흡수력 등이 암조건에서 둔화되었기 때문으로 생각된다.

이들의 제조증상을 살펴보면 광요구형 디페닐에테르계 제조제 처리시 보다는 완만하였으나 처리후 1-2일 사이에 특히 화분과 잡초에서 엽신부의 일부가 변색, 괴사되는 증상을 보였

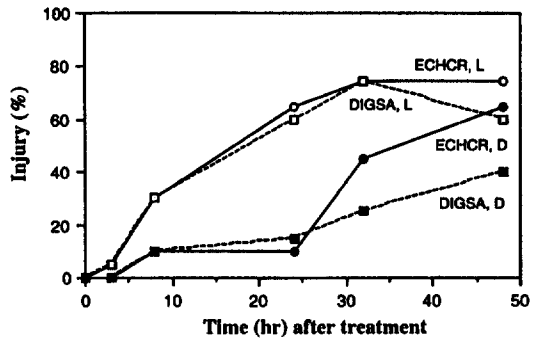


Fig. 1. Herbicidal activity of TOPE against to barnyardgrass(ECHCR) and large crabgrass(DIGSA) in light or dark. TOPE was foliar-treated at 4kg a.i./ha 9 days after seeding in greenhouse, and then immediately incubated in continuous dark(D) or light(natural day, L).

고, 처리후 2주째에는 성장중지 및 분얼부에서의 형태이상 즉 줄기 및 뿌리가 팽대된 모습을 보였다. 한편 오이자엽에 TOPE를 처리하여 암조건에 두었을 경우 자엽주변부의 분열이상(curling)과 더불어 전해질 누출이 야기되어 광요구형 디페닐에테르계 약제와는 다른 증상을 보였다. 이상의 결과를 볼 때 TOPE는 암조건에서도 활성이 발현되며, 뚜렷한 제조증상으로는 세포분열이상과 막파괴로 인한 엽신부 고사를 들 수 있었다.

### 2. 엽록소 및 카로티노이드 생합성과정에 미치는 영향

엽신부의 고사가 광요구형 디페닐에테르계 제조제 처리에서처럼 일차적으로 엽록소 생합성에 이상을 초래시켜 작용하는지를 알아보고자 엽록소의 광산화가 억제되는 저광도하에서 녹화(greening)에 미치는 영향을 실험하였다. 엽록소생합성과정의 protoporphyrinogen IX oxidase (PROTOX)를 저해하는 것으로 알려진 oxyfluorfen<sup>13,21)</sup> 처리의 경우 광조사 2시간째에 엽록소 함량이 이미 40% 억제되었으나 TOPE 처리의 경우는 20 $\mu$ M 처리에서 광조사후 11.5시간까지, 200 $\mu$ M 처리에서는 8시간까지 감소경향이 없다가 그 이후에서부터 감소되는 경향이였다. 그리고 이러한 엽록소 함량의 감소는 자엽주

변부가 이상생장되면서 생체중이 증가되기 시작하는 시기와 일치하였다(그림 2). 이와 같은 결과로 볼 때 TOPE에 의한 색소함량 감소는 직접적인 것이 아니라 간접적인 효과이며, 엽록소 생합성 과정의 저해가 체조작용의 일차적인 원인은 아닌 것으로 생각된다. 실제 PPIX 축적여부를 조사한 경우에서도 oxyfluorfen을

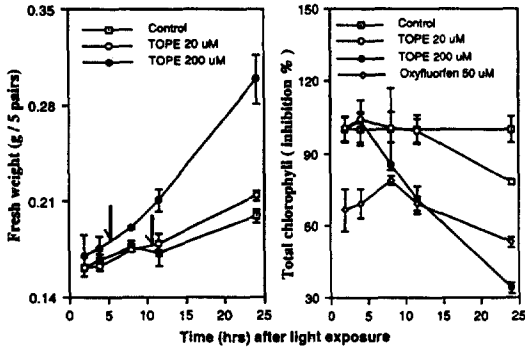


Fig. 2. Effect of TOPE on the chlorophyll biosynthesis of the etiolated cucumber cotyledons at dim light(5.5  $\mu$ E m<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup> PAR). Vertical bars represent standard deviations. ← : initiation of cotyledon margin curling.

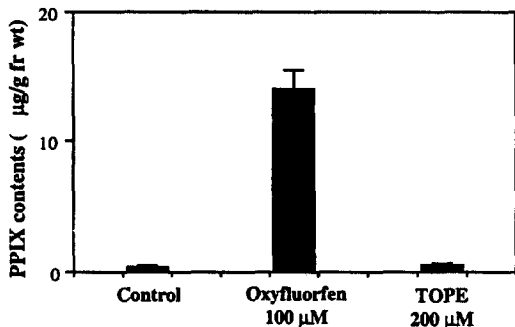


Fig. 3. Effect of TOPE on the protoporphyrin IX contents of cucumber cotyledons. Vertical bars represent standard deviation.

처리한 오이자엽에서는 현저히 증가되었으나 TOPE 처리구는 거의 영향이 없었다(그림 3). 따라서 엽신부의 고사는 광요구형 디페닐에테르와는 다른 과정을 통해서 나타나는 것으로 판단된다. Endo 등<sup>7)</sup>은 2,2'-dipyridyl과 혼합처리할 경우 Mg-PPIX methyl ester가 축적되었다고 하였다. 그러나 이러한 증가는 후술되는 바와 같이 TOPE 처리에 의한 초기의 대사촉진과 관련이 있는 것으로 추정된다.

TOPE가 카로티노이드생합성을 저해하는지의 여부를 조사하였다. 왜냐하면 카로티노이드생성이 저해될 경우 활성산소 소거능력의 저하로 인해 막과산화가 초래되어 엽신부가 고사될 수도 있기 때문이다. 생합성 저해여부를 확인하기 위해서는 광산화가 일어나지 않을 정도의 낮은 광도 또는 암조건에서 실험이 수행되어야 하는 바 본 연구에서는 오이자엽에 TOPE를 처리한 후 암조건에 두었다. 처리후 1.5일째에 조사하여 보았을 때 무처리구에 비해 phytoene은 2.6배, phytofluene은 2.8배,  $\beta$ -carotene은 1.1배가 증가되어 저해보다는 오히려 전과정이 촉진되는 경향을 보였다. 이는 phytoene 및 phytofluene을 축적시키면서  $\beta$ -carotene을 감소시키는 norflurazon과는<sup>25)</sup> 다른 양상을 보여 카로티노이드생합성 저해제는 아닌 것으로 생각되었다(표 1).

## 2. 호흡 및 광합성 전자전달과정에 미치는 영향

호흡 및 광합성과정을 작용점으로 하는 제초제들은 이차적인 영향으로 세포막을 파괴시켜 세포질을 누출시킬 수도 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>6)</sup> 본 연구에서 관찰되었던 엽신부 고사가 이와같은 현상과 관련이 있는지를 알

Table 1. Changes of phytoene, phytofluene and  $\beta$ -carotene content in cucumber cotyledons treated with TOPE.

Herbicides	Phytoene	Phytofluene	$\beta$ -Carotene
	..... % of control .....		
Norflurazon 0.05 mM	127.0	100.0	64.5
TOPE 1.0 mM	225.9	277.8	109.7

Carotenoids were extracted with absolute methanol and then separated with n-hexane after saponification.

아보고자 호흡 및 광합성 과정에 미치는 영향을 조사하였다.

먼저 TOPE 처리된 오이지엽에서의 탈수소효소 활성을 TTC 실험으로 조사하여 보았을 때 그 활성이 50  $\mu$ M TOPE 처리에서 30%, 1mM 처리에서 54% 증가되었기 때문에 이를 확인하기 위하여 미토콘드리아에서의 호흡에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 100  $\mu$ M 처리시에는 15% 억제되었으나 10  $\mu$ M 처리시는 산소 소비율이 오히려 2.13배 증가되었다(표 2). 이들의 결과를 볼 때 TOPE는 적정농도 범위에서 호흡활성을 억제하기 보다는 촉진하는 것으로 여겨졌다. 그런데 TOPE가 호흡활성촉진과 직접적으로 관련이 있다면 전실험에서 관

찰되었던 여러 증상들 특히 전해질 누출의 효과가 호흡저해제 처리에 의하여 상쇄되어야 할 것이다. Cytochrome b의 작용을 저해하는 antimycin-A<sup>23)</sup> 및 호흡과정의 탈공역제인 DCP는 TOPE의 효과를 전혀 상쇄시키지 못했으며, 막결합형 ATPase 복합체를 저해하는 것으로 알려진 oligomycin<sup>23)</sup> 처리에서는 오히려 상승효과(synergistic effect)를 보였다(표 3). 이러한 상승효과가 어떠한 과정으로 나타나는지에 대해서는 아직 알 수 없다. 이상의 실험결과로 볼 때 호흡활성의 증감이 TOPE의 일차적 작용은 아닌 것으로 생각된다.

한편 광합성 전자전달 과정에 직접적인 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 엽록체를 이용한 산소 소모정도를 조사한 실험결과는 그림 4와 같다. 전자수용체로 MV를 공급해 주면 그림 4의 C와 같이 급격히 산소가 소모되는데 여기에 DCMU를 공급하면 즉시 저해되었다(D). 그러나 TOPE를 투여하면 DCMU처럼 전자전달을 즉시 저해하지는 못하였지만 전체적인 기능을 쉽게 상실시켜 MV 단독 공급시보다 산소소모의 중지가 보다 이른 시기에 보였다(E). 한편 MV 대신에 TOPE를 먼저 공급

**Table 2.** Effect of oxyfluorfen and TOPE on the O<sub>2</sub> consumption rate of mitochondria from soybean hypocotyl.

Herbicides	Concentration ( $\mu$ M)	O <sub>2</sub> consumption rate (nmoles O <sub>2</sub> /mg protein/min)
TOPE	0	16.52 (100.0%)
	0.1	16.96 (102.7%)
	1	19.01 (115.1%)
	10	35.12 (212.6%)
	100	9.15 (55.4%)

**Table 3.** Mixture effects of respiration inhibitors and TOPE on the electrolyte leakage of cucumber cotyledon under the dark condition.

Compounds	Concentration	TOPE	
		0 $\mu$ M	200 $\mu$ M
..... electrolyte leakage ( $\mu$ S/cm) .....			
Antimycin A	0 $\mu$ M	7.7 $\pm$ 1.17	14.3 $\pm$ 24.25
	1	9.2 $\pm$ 0.77	137.7 $\pm$ 3.21
	10	14.9 $\pm$ 1.32	151.0 $\pm$ 32.42
	100	17.5 $\pm$ 2.12	140.0 $\pm$ 24.52
DCP	0mM	14.1 $\pm$ 3.32	145.0 $\pm$ 17.09
	0.02	14.9 $\pm$ 3.17	127.3 $\pm$ 11.02
	0.2	11.9 $\pm$ 0.12	124.3 $\pm$ 12.34
	2.0	482.0 $\pm$ 37.00	444.3 $\pm$ 48.00
Oligomycin	0 ppm	5.2 $\pm$ 0.25	152.0 $\pm$ 12.17
	0.1	6.4 $\pm$ 0.36	211.3 $\pm$ 12.50
	1.0	12.2 $\pm$ 1.50	261.3 $\pm$ 4.04
	10.0	21.9 $\pm$ 3.18	447.3 $\pm$ 11.72
	100.0	22.6 $\pm$ 3.51	544.7 $\pm$ 19.43

Data represent the means of three replicates  $\pm$  standard deviations

할 경우 MV와 같이 산소소모가 무처리보다 증가되는 경향이나 그 정도는 미약하였다(B, F). 이와 반대로 TOPE를 처리한 후 MV를 투여했을 경우 MV의 전자수용체로서의 기능이 여전히 발현되었으나(F) MV를 단독으로 처리했을 때(C) 보다 산소소모가 빨리 중단되는 경향이었다. 한편 ferricyanide 환원정도를 통한 전자전달 저해실험의 경우, DCMU는 저농도에서 급격히 저해하는 특징을 보였으나 TOPE는 보다 높은 농도에서 저해경향이 있을 뿐 저농도에서는 영향이 없었다(그림 5). 이들 두 실험의 결과들을 볼 때 TOPE는 고농도에서 광합성을 저해하며 미약하지만 라디칼을 발생시키

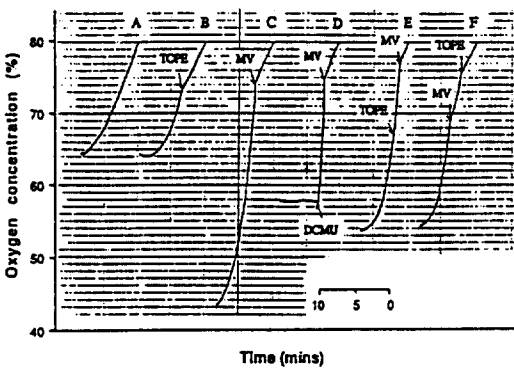


Fig. 4. Effect of TOPE on the whole chain electron transport in isolated barnyardgrass chloroplast, measured by oxygen electrode. Concentration of TOPE, MV, and DCMU was  $9.6 \mu\text{M}$ ,  $3.2 \mu\text{M}$ , and  $3.2 \mu\text{M}$ , respectively.

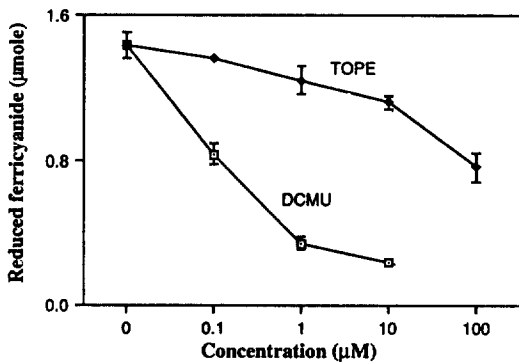


Fig. 5. Effect of TOPE and DCMU on noncyclic basal electron transport of the chloroplast from barnyardgrass. Vertical bars represent standard deviations.

는 것으로 보여진다. 그러나 제초효과 발현에는 크게 기여하지는 않는 것 같다. 왜냐하면 위와 같은 작용은 광이 존재할 때 주로 나타나므로 암조건에서 활성이 발현되었던 원인에 대해서는 충분히 설명되지 못할 뿐만 아니고 식물체에 TOPE를 처리했을 때 나타나는 형태 이상과 대사과정의 증가경향과는 직접적인 관련이 없을 것으로 판단되기 때문이다. 따라서 광합성과 과정 역시 일차적인 작용점은 아닌 것으로 생각된다.

### 3. 단백질 및 핵산대사 과정에 미치는 영향

TOPE처리에 의해 나타나는 엽신부 고사와 오이자엽의 세포질 누출은 광요구형 디페닐에테르계 제초제처리에서처럼 신속히 나타나지 않았고, 또한 그 현상이 분열부 이상과 병행되어 나타나며, 지금까지의 실험결과에서처럼 색소, 호흡, 광합성과 과정 등과는 직접적인 관련이 없었기 때문에 다른 가능성 즉 단백질 또는 핵산대사에 미치는 영향을 조사하여 보았다. 먼저 TOPE처리에 의해 나타나는 분열이상과 전해질 누출효과가 저해제 처리에 의해 상쇄되는지 여부를 조사함으로써 그 대사과정과의 관련성을 검토하였다. 진핵세포 80S ribosome의 단백질 생합성을 저해하는 것으로 알려진 cycloheximide<sup>4)</sup>와 원핵세포 또는 미토콘드리아 70S ribosome의 단백질 생합성을 저해하는 것으로 알려진 chloramphenicol<sup>4)</sup>을 TOPE와 처리하여 전해질 누출을 조사지표로 하여 상호작용을 실험하였을 때 전자는 상가적 효과를, 후자는 경감적 효과를 보였다(그림 6). 더불어 cycloheximide는 오이자엽 주위의 분열이상을 경감시켰으나 chloramphenicol은 경감시키지 못하였다. Cycloheximide와 chloramphenicol 상호간의 작용에 있어서도 cycloheximide의 전해질 누출 촉진이 chloramphenicol에 의하여 억제되는 경향이므로(그림 7), TOPE가 cycloheximide와 비슷한 생리작용을 가진다고 볼 수 있겠으나 cycloheximide 단독처리에 의해서는 TOPE에서 보이는 분열부 이상이 없었으므로 정확히 같다고는 할 수 없었다. 그리하여 DNA의 G≡

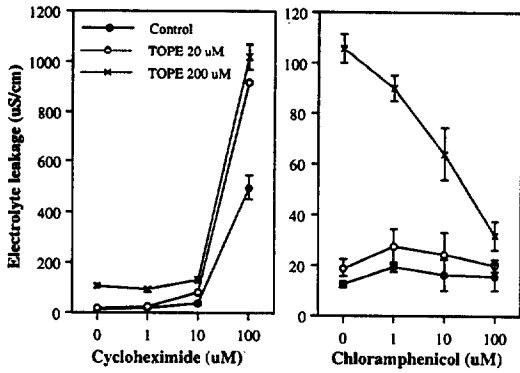


Fig. 6. Effects of cycloheximide and chloramphenicol added to TOPE on the electrolyte leakage of cucumber cotyledon in darkness. Vertical bars represent standard deviations.

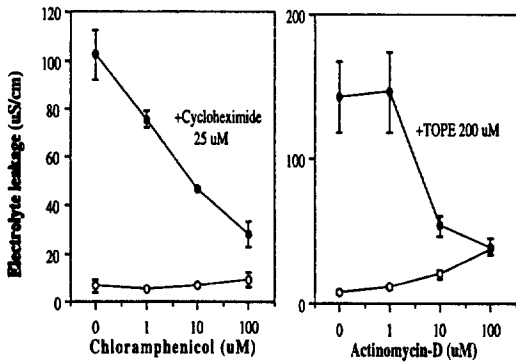


Fig. 7. Effects of cycloheximide and TOPE added to chloramphenicol and actinomycin-D on the electrolyte leakage of cucumber cotyledons in darkness. Vertical bars represent standard deviations.

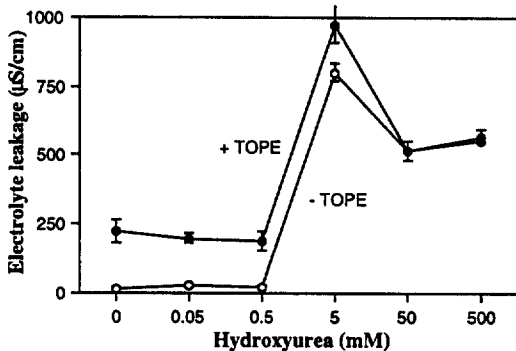


Fig. 8. Effects of TOPE(200 µM) and hydroxyurea on the electrolyte leakage of etiolated cucumber cotyledons in darkness. Vertical bars represent standard deviations.

C 염기쌍에 phenoxazone ring system이 끼어들어 DNA 주형에 이상을 초래시켜 RNA 신장을 저해하는 것으로 알려진 actinomycin-D<sup>4,23)</sup>와 ribonucleotide에서 deoxyribonucleotide로의 과정을 저해하여 DNA 합성을 억제하는 hydroxyurea<sup>8)</sup>와의 상호작용을 실험한 결과 전해질 누출과 분열이상이 모두 경감되었다(그림 7, 8). 이는 TOPE의 작용이 핵산대사와 깊게 관련이 있음을 시사해 주었다.

따라서 TOPE를 처리하였을 때 식물체내의 핵산 및 단백질함량이 어떻게 변화되는지를 오이자엽과 벼 유근을 이용하여 조사하여 보았다. 오이자엽에 TOPE를 처리한 경우 처리후 1일째에는 DNA만 18% 증가하였고 3일째에는 DNA와 RNA가 각각 27%, 20% 증가되어 DNA가 먼저 증가됨을 알 수 있었다(그림 9). 이러한 경향은 TOPE에 민감한 반응을 보였던 벼 근에서도 확인이 되었다. 즉 TOPE를 처리할 경우 10 µM에서 벼 근의 신장이 거의 정지되면서 팽대되는데 이를 취하여 단백질 및 핵산을 분석하여 본 결과, 처리후 6시간째에 DNA 및 RNA가 각각 46%, 7.8% 증가되어 DNA 축적이 가장 높았으며 이후 24시간째에는 DNA, RNA, 단백질 모두 각각 33.2%, 67.2%, 14.9% 증가되었다(그림 10). TOPE에 의해 핵산함량이

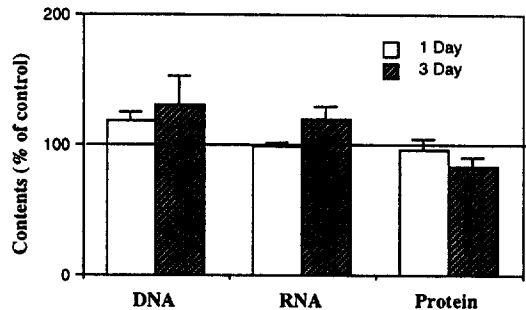


Fig. 9. Effect of TOPE on the DNA, RNA and protein contents per fresh weight in cucumber cotyledons under dark incubation. Vertical bars represent standard deviations. DNA, RNA and protein content per g fresh weight of the untreated control was 377.6 µg, 8.7mg and 81.9mg at 1 day after dark incubation, and 880.3 µg, 7.6mg and 75.7mg at 3 days after dark incubation, respectively.



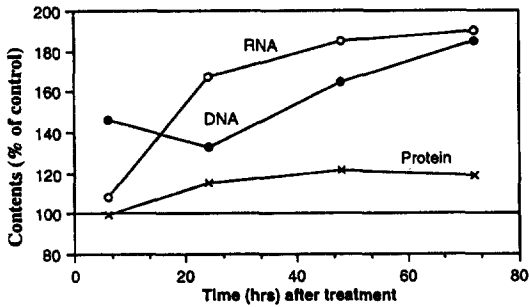


Fig. 10. Changes of DNA, RNA and protein contents per fresh weight in rice roots treated with  $10\mu\text{M}$  TOPE. DNA of the untreated control was 67.2, 88.1, 75.5 and  $64.8\mu\text{g}$  per g fresh weight at 6, 24, 48, 72 hr after treatment, respectively. RNA of the untreated control was 54.6, 43.7, 39.1 and  $41.3\text{mg}$  per g fresh weight at 6, 24, 48, 72 hr after treatment, respectively. Protein of the untreated control was 5.5, 5.5, 4.6 and  $4.1\text{mg}$  per g fresh weight at 6, 24, 48, 72 hr after treatment, respectively.

증가되고 있다는 것은 쿠리선단의 acetocarmine 염색시 TOPE 처리구에서 조기에 진하게 염색되었던 것으로 보아도 확인될 수 있었다(결과 제시 생략).

한편 분열이상, 호흡증가, 핵산함량의 증가와 같은 현상은 2,4-D 처리시에도 보이는 생리 현상이므로<sup>10,12)</sup> TOPE가 2,4-D와 동일한 작용점을 가지는 지를 조사하였다. 만일 동일한 작용점을 가진다면 똑같은 반응이 관찰되어야 할 것이다. 2,4-D의 생리적 반응의 하나로서 엽병굴곡현상이 있는데 이를 기준으로 조사하여 보았을 때 TOPE는 2,4-D와 달리 엽병굴곡은 일어나지 않았다. 따라서 제조작용에 있어서 TOPE는 2,4-D와는 다른 작용기구를 가지는 것으로 판단된다(그림 11).

이상의 실험결과들 즉 전해질 누출과 분열이상 증상중에서 cycloheximide와 chloramphenicol은 어느 한 증상만 저해하지만 actinomycin-D나 hydroxyurea는 두 증상 모두 저해하며, 핵산중 DNA 함량의 증가속도가 RNA 보다 빠르다는 결과를 종합하여 볼 때 TOPE가 처리되면 비정상적인 핵산대사 촉진으로 인해 제반 생

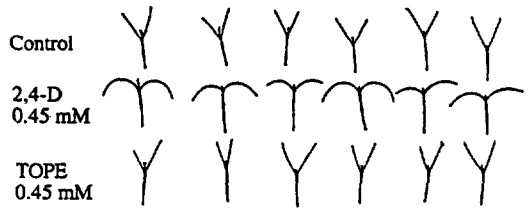


Fig. 11. Effect of 2,4-D and TOPE on the cotyledonary petiole curvature response of velvetleaf.

리작용이 교란되고 이어 엽신부의 고사와 분열이상 등의 제조활성이 발현되는 것으로 생각된다. 그런데 DNA의 증가가 TOPE의 직접적인 작용인지 아니면 어떤 다른 인자의 조절에 의한 간접적인 효과인지는 더욱 검토가 이루어져야 할 것이다.

## 적 요

비광요구형 디페닐에테르계 화합물인 TOPE의 제조작용 생리를 알기 위하여 온실에서 제조특성을 비롯한 식물색소대사, 전자전달계, 단백질 및 핵산대사 등에 미치는 TOPE의 영향을 조사하였다. 작용발현 속도가 광요구형 디페닐에테르계보다는 늦지만 엽신부의 고사와 동시에 생육저해 및 성장점에서의 분열이상이 관찰되었으며 절취된 오이자엽에 처리될 경우 전해질 누출과 더불어 엽주변부의 심한 분열이상이 초래되었다. 그러나 2,4-D와 같은 오옥신 활성은 아니었다. 저광도에서의 엽록소형성 저해정도는 관찰되지 않았으며 oxyfluorfen과는 달리 protoporphyrin IX의 축적도 유기되지 않았으나, 카로티노이드 성분은 모두 비정상적으로 증가되었다. 탈수소효소의 활성 또는 미토콘드리아에서의 호흡활성은 일정농도에서 증가되는 경향을 보이나 호흡저해제들은 TOPE에 의한 전해질 누출을 경감시키지 못하였다. 한편 광합성 전자전달 저해는 고농도에서만 관찰되었다. 오이의 전해질 누출과 분열이상을 지표로 한 TOPE와의 상호작용 실험에서 전해질 누출에 대하여 cycloheximide는 상승적으로, chloramphenicol, actinomycin-D, hydroxyurea는 길

항적으로 작용하였고, cycloheximide, actinomycin-D, hydroxyurea 등은 자엽의 이상분열을 경감시켰다. 이는 TOPE가 핵산대사에 관여됨을 시사해 주는 것으로써 오이자엽 및 벼 근에 TOPE를 처리했을 때 RNA 및 단백질보다 DNA의 증가가 보다 빠른 시기에 일어났다. 따라서 TOPE가 처리되면 비정상적인 핵산대사 촉진으로 인해 제반 생리작용이 교란되고 이어 엽신부의 고사와 분열이상 등의 제초활성이 발현되는 것으로 생각된다.

## 인용문헌

1. Becerril, J.M. and S. O. Duke. 1989. Protoporphyrin IX content correlates with activity of photobleaching herbicides. *Plant Physiol.* 90: 1175-1181.
2. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
3. Chen, L.G., C.M. Switzer, and R.A. Fletcher. 1972. Nucleic acid and protein changes induced by auxin-like herbicides. *Weed Sci.* 20(1): 53-55
4. Dawson, R.M.C., D.C. Elliott, W.H. Elliott, and K.M. Jones. 1986. *Data for biochemical research*(3rd ed.). Clarendon Press, Oxford.
5. Duggan, J. and M.L. Gassman. 1974. Induction of porphyrin synthesis in etiolated bean leaves by chelators of iron. *Plant Physiol.* 53 : 206-215.
6. Duke, S.O. and W.H. Kenyon. 1992. Peroxidizing activity determined by cellular leakage. pp.61-66. *In* Boger, P. and G. Sandmann(ed.) *Target Assays for Modern Herbicides and Related Phytotoxic Compounds*. Lewis Publishers.
7. Endo, Y., T. Soeda, T. Uchida, T. Goto, and N. Umetsu. 1990. HPLC profiles of porphyrins in cucumber treated with diphenyl ether herbicides. *J. Pesticide Sci.* 15: 31-37.
8. Frankfurt, O.S. 1991. Inhibition of DNA repair and the enhancement of cytotoxicity of alkylating agents. *Int. J. Cancer* 48(6): 916-928.
9. Gruenhagen, R.D. and D.E. Moreland. 1977. Protein and nucleic acid synthesis in excised plant tissues. pp.114-155. *In* Truelove B.(ed.) *Research Methods in Weed Science*(2rd ed.), Southern Weed Science Society.
10. Humphreys, T.E. and W.M. Dugger Jr. 1957. The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the respiration of etiolated pea seedlings. *Plant Physiol.* 32: 530-536.
11. Jacobs, J.M. and N.J. Jacobs. 1993. Porphyrin accumulation and export by isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) plastids: effect of diphenyl ether herbicides. *Plant Physiol.* 101: 1181-1188.
12. Key, J.L. and J.B. Hanson. 1961. Some effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on soluble nucleotides and nucleic acid on soybean seedlings. *Plant Physiol.* 36: 145-152.
13. Lee, H.J., M.V. Duke, and S.O. Duke. 1993. Cellular localization of protoporphyrinogen-oxidizing activities of etiolated barley(*Hordeum vulgare* L.) leaves: Relationship to mechanism of action of protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Plant Physiol.* 102: 881-889.
14. Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic bio-membranes. *Methods in Enzymol.* 148: 350-382.
15. Matringe, M. and R. Scalla. 1988. Effects of acifluorfen-methyl on cucumber cotyledons: Protoporphyrin accumulation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 32: 164-172.
16. Matringe, M., D. Clair, and R. Scalla. 1990. Effects of peroxidizing herbicides on proto-

- porphyrin IX levels in nonchlorophyllous soybean cell culture. *Pestic. Biochem. Physiol.* 36: 300-307.
17. Matsumoto, H. and K. Ishizuka. 1982. Effects of simetryne on the photochemical reactions of isolated chloroplasts of rice and barnyard-grass plants. *Weed Research(Japan)* 27: 91-97.
  18. Matsunaka, S.. 1969. Acceptor of light energy in photoactivation of diphenyl ether herbicides. *J. Agr. Food Chem.* 17(2): 171-175.
  19. Moreland, D.E.. 1986. Measurements of reactions mediated by isolated chloroplasts. pp.309-323. *In* Camper N. D.(ed.), *Research Methods in Weed Science(3rd ed.)*. Southern Weed Science Society.
  20. Moreland, D.E. and W.P. Novitzky. 1986. Measurements of reactions mediated by isolated chloroplasts. pp.291-308. *In* Camper N. D.(ed.), *Research Methods in Weed Science (3rd ed.)*. Southern Weed Science Society.
  21. Nicolaus, B., J.N. Johansen and P. Boger. 1995. Binding affinities of peroxidizing herbicides to protoporphyrinogen oxidase from corn. *Pestic. Biochem. Physiol.* 51: 20-29.
  22. Ridley, S.M. and J. Ridlet. 1979. Interaction of chloroplasts with inhibitors - Location of carotenoid synthesis and inhibition during chloroplast development. *Plant Physiol.* 63: 392-398.
  23. 寺田弘, 條原康雄. 1986. 農薬の タ-ゲツトとしてのエネルギー-獲得係 - エネルギー-生産のしくみとその 沮害劑 - *日本農薬學會誌.* 11: 641-651.
  24. Vanstone, D.E. and E.H. Stobbe. 1977. Electrolyte conductivity - a rapid measure of herbicidal injury. *Weed Sci.* 25: 352-354.
  25. Wilkinson, R.E. 1985. Carotenogenic inhibition by norflurazon in wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.* 23: 370-377.