

# *Chlorella*의 생리에 미치는 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid의 영향

蔡麟基·鄭英淑

(梨花女子大學校 文理大學 生物學科)

## Physiological Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) on *Chlorella ellipsoidea*

CHAI, In Ki, and Young Sook CHUNG

(Dept. of Biology, College of Liberal Arts and Sciences, Ewha Woman's University)

### ABSTRACT

Physiological effects of 2,4-D on the growth of *Chlorella ellipsoidea* were investigated culturing the algae in the MN4 media containing 0,  $10^{-4}$ M and  $4 \times 10^{-4}$  M 2,4-D. During 6 days culture of the algae, CO<sub>2</sub>-enriched air was bubbled in under 10 K lux of light at 25°C. At the given time intervals, samples of the culture were taken to analysis with respect to overall growth, photosynthesis, respiration and chemical composition. Results obtained from the experiment were as follows:

(1) The growth of *Chlorella* was increased at  $10^{-4}$ M and decreased at  $4 \times 10^{-4}$ M of 2,4-D concentrations.

(2) At  $10^{-4}$ M of 2,4-D concentration, the activity of photosynthesis enhanced relative to control, while at  $4 \times 10^{-4}$ M it was not changed. In both concentrations, however, the rate of respiration was down from the control.

(3) At  $10^{-4}$ M 2,4-D, the concentration of carbohydrate metabolites was not changed relative to control, while significant increase in the concentrations of proteins and nucleic acids was observed. On the other hand at  $4 \times 10^{-4}$ M of 2,4-D concentrations, all the metabolites including carbohydrates, proteins and nucleic acids were decreased.

(4) It is concluded that 2,4-D at  $10^{-4}$ M concentration accelerates the growth of *Chlorella* by promoting the activities of photosynthesis and biosynthesis of proteins and nucleic acids.

### 緒 論

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)는 그 製造法에 관한 Pokory(1941)의言及이 있는 이래 Zimmerman & Hitchcock(1942)에 의하여 처음으로 植物生長調節劑로서 사용되었고, Marth & Michell(1944), 그리고 Hammer & Tukey(1944) 등은 이것을 除草劑로서 사용하기 시작하였다. 그리하여 2,4-D가 農耕上の 省力劑로서 널리

普及되는 한편, 그것의 植物生理上에 미치는 影響이 生長(Frenkel & Raymond, 1973), 呼吸(Mitchell등, 1949), 光合性(Brown, 1946; Mitchell & Brown, 1946), 體物質(Rasmussen, 1947; Wort, 1949), 酵素(Wort, 1954) 및 分化(Gunckel등, 1972)등에 걸쳐서 널리 檢討되었다.

우리나라에서도 近年에와서 2,4-D의 除草劑로서의 使用이 增加추세에 있고, 漸次 벼 농사에까지도 波及되고 있어, 2,4-D의 淡

水藻類에 미치는 영향이 적지 않을 것으로 보아, 우선 *Chlorella*에 대한 2,4-D의 영향을 細胞生理學的 側面에서 調査하여 보았다.

이 研究는 東亞日報 科學振興獎勵金에 의하여 이루어졌음을 附記하여 둔다.

材料 및 方法

*Chlorella ellipsoidea*를 MN<sub>4</sub>배지(Tamiya 등, 1953)에 接種하여, 25°C, 10 Klux하에서 CO<sub>2</sub>(2~5%) 함유공기를 공급하면서 배양하되, 2,4-D의 농도는 O(control), 10<sup>-4</sup>(생장촉진 농도), 4×10<sup>-4</sup>(생장억제 농도) M이 되게 첨가하였다. 이것을 6일간 배양하면서 매일 *Chlorella*의 一定量을 採取하여 여러 가지 測定試料로 하였다.

*Chlorella*의 생장은 packed cell volume 으로, 呼吸과 光合成은 Warburg 검압계로 QO<sub>2</sub> 또는 QCO<sub>2</sub>를 측정하였다.

*Chlorella*의 체물질함량은 試料를 M/500 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 3회 씻은 후 Schmit-Thannhauser(1945)의 방법에 따라 여러 fraction 으로 나누어 아래와 같이 定量하였다.

RNA 및 DNA량은 RNA 및 DNA fraction의 일부를 취하여 spectrophotometer 로 260mμ에서 OD<sub>1</sub>를 측정하였고 protein (alkali-labile,alkali-stable)량은 RNA fraction과 그 殘渣를 취하여 micro-kjeldahl flask 내에서 5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 加水分解한 후 Troll & Cannan(1953)의 방법에 따라 ninhydrin으로 呈色시켜 570mμ에서 OD를 측정하였다.

탄수화물량은 anthrone method(Scott & Melvin, 1953)에 의하여 가수 분해된 PCA-soluble, EtOH-ether soluble 및 alkali insoluble fraction을 anthrone으로 呈色시켜

625mμ에서 OD를 측정하였다.

結果 및 考察

1. *Chlorella*의 生長에 미치는 2,4-D의 영향  
*Chlorella*의 生長에 미치는 2,4-D의 영향은 2,4-D의 각종농도에 따른 여러 차례의 실험결과, 그 生長촉진농도와 억제농도를 구분지을 수 있었는데 生長의 촉진과 억제의 농도限界가 매우 銳利하였다. Table 2와 Fig. 1에서 보는 바와 같이 2,4-D의 10<sup>-4</sup>M에서 生長촉진이, 그리고 4×10<sup>-4</sup>M에서 生長억제가 있었는데 배양 제2일째 까지는 어느 농도에서나 약간의 生長억제의 경향을 보이다가 제3일째 부터 촉진과 억제의 구분이 확연하여져서 그후 배양 제6일까지 대체

Table 1. Fractionation of various compounds in *Chlorella* cells (by Schmidt-Thannhauser method).

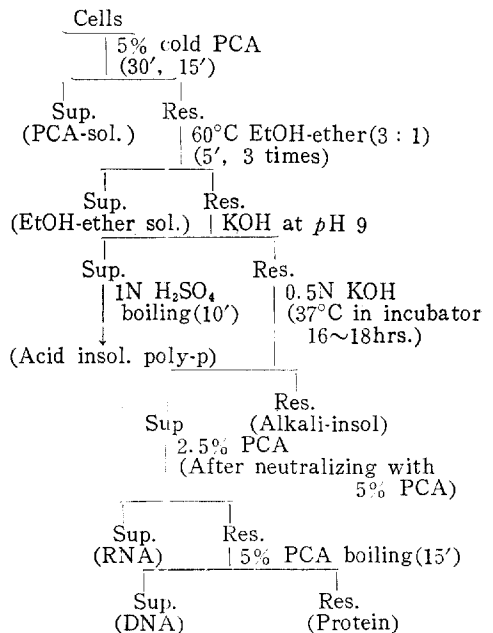


Table 2. Effects of 2,4-D on the growth of *Chlorella* (ml/L. medium)

Conc. of 2,4-D	Day of culture							
	0	1	2	3	4	5	6	
Control	0.11	0.43	1.50	2.48	3.32	4.14	5.24	
10 <sup>-4</sup> M	0.11	0.48	1.30	2.72	3.94	5.24	6.32	
4×10 <sup>-4</sup> M	0.11	0.35	0.35	1.86	1.55	3.10	4.30	

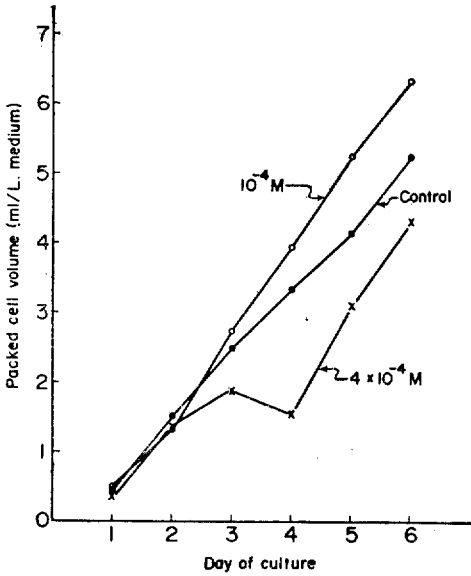


Fig. 1. Growth of *Chlorella* treated with 2,4-D( $10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-4}$ M) during the culture.

로 같은 경향을 지속하였다. 그리고  $4 \times 10^{-4}$  M 이상 농도에서는 배양 제1일에 완전히 사멸하였다.

Yamaguchi & Crafts(1958)는 2,4-D의 常用농도( $1m^2$ 당 1350g)에서는 토양미생물에 별 영향이 없으나, 이 농도를 넘을 때에는 好氣性미생물은 生長阻害를 받고 嫌氣性인 것은 오히려 生長촉진이 된다고 하였다. 그리고 Aberg(1974)는 oat의 幼葉鞘의 生長이 2,4-D에 의하여 촉진됨을 보았고 Rubery & Sheldrake(1974)는 2,4-D에 의한 生長촉진은 2,4-D가 IAA의 擴散移動을 막아 그 蓄積을 초래하기 때문이라고 하였다.

2. *Chlorella*의 광합성과 호흡에 미치는 2,4-D의 영향

2,4-D의 광합성에 미치는 영향은 Table 3에서 보는 바와 같이 *Chlorella*의 生長촉진 농도에서는 촉진적이었고 억제농도에서는 이렇다할 변동을 주지 못하였다. Klingman(1951)은 2,4-D가 除草가능농도( $1m^2$  1350g)에서 광합성을 억제함을 보고하였는

데, 그러한 농도이하의 저농도에서는 광합성에 촉진적으로 작용한다는 것을 알 수 있었다.

이것은 비슷한 식물생장조절물질인 IAA의 生長촉진 농도가 광합성을 촉진한다(Feierabend, 1970)는 사실과도 일치한다.

Table 3. Effects of 2,4-D on the photosynthetic activity of *Chlorella*.

Conc. of 2,4-D	Control	$10^{-4}$ M	$4 \times 10^{-4}$ M
QO <sub>2</sub>	16.82	18.24	16.83

Table 4. Effects of 2,4-D on the respiratory activity of *Chlorella*.

Conc. of 2,4-D	Respiration	Endogenous QO <sub>2</sub>	Glucose QO <sub>2</sub>
	Control		1.11
$10^{-4}$ M		3.57	10.65
$4 \times 10^{-4}$ M		4.68	12.87

한편 2,4-D는 *Chlorella*의 呼吸을 촉진하였는데 (Table 4) 生長억제농도에서는 그것이 더욱 현저하였다. 이것은 IAA의 경우 (Frech & Beevers, 1953; van Hove, 1968)에서와 마찬가지로 2,4-D가 呼吸을 양진시켜 체물질소모를 극대화시키므로써 植物生長을 억제한다는 일반적 견해의 일면을 뒷받침하는 것으로 생각된다.

3. *Chlorella* 세포의 탄수화물함량에 미치는 2,4-D의 영향

2,4-D에 의한 *Chlorella* 세포의 탄수화물함량의 변화는 Table 5와 Fig. 2에서와 같이 生長촉진농도에서는 control에 비하여 별 차이를 찾아볼 수 없으나, 生長억제농도에서는 얼마간의 감소를 나타내고 있다. 이것은 生長촉진농도에서 호흡의 촉진으로 감소된 탄수화물을 광합성의 촉진으로 보상하였고, 生長억제농도에서는 호흡촉진의 정도가 높았을 뿐만 아니라, 광합성마저 별로 촉진됨이 없었기 때문인 것으로 보여진다.

Table 5. Yield of carbohydrates from each fractions of *Chlorella* cells treated with 2,4-D.

Fraction	Day of culture	Amount ( $\mu\text{M}$ )		
		Control	2,4-D( $10^{-4}\text{M}$ )	2,4-D( $4 \times 10^{-4}\text{M}$ )
PCA-sol.	0	3.20	3.20	3.20
	2	4.65	3.54	3.57
	4	17.47	21.76	10.62
	6	49.56	38.20	24.42
EtOH-ether sol.	0	4.26	4.26	4.26
	2	6.41	4.81	6.41
	4	16.71	22.95	17.80
	6	29.46	59.62	29.62
Alkali insol.	0	1.59	1.59	1.59
	2	5.89	6.28	3.72
	4	11.52	8.32	10.96
	6	71.89	44.77	53.13
Total	0	9.05	9.05	9.05
	2	16.95	14.63	13.70
	4	45.70	53.03	39.38
	6	141.91	142.59	107.17

#### 4. *Chlorella* 세포의 아미노산과 단백질함량에 미치는 2,4-D의 영향.

우선 PCA-soluble fraction에 주로 함유되어 있는 아미노산은 2,4-D에 의하여 약간의 증가를 보여주었다(Table 6, Fig. 3). 즉 배양 제2일째까지는 control과 별 차이가 없었다가 제4일부터는 2,4-D 처리구가 약간의 아미노산함량증가를 보였다.

한편 단백질은 그 전체함량에 있어서 성장속진농도( $10^{-4}\text{M}$ )에 있어서는 제6일에 와서 control보다 약간의 증량이 있었고 억제농도( $4 \times 10^{-4}\text{M}$ )에서는 처음부터 control이하의 수준이었다. Chatterji(1971)는 *Cyanoopsis tetragonoloba*의 種子를 2,4-D로 처리하였을때 그 芽生의 free amino acid는 增加하고 단백질 結合아미노산은 減少된다고 하였고, Fahmy(1974)는 kenaf의 2,4-D처리에서 全量의 增加가 있었다고 하였다. Key & Hanson(1961)등에 의하면 원래 auxin類는 단백질 합성을 촉진하는 것으로 되어 있는데, Ingle등(1965)은 이것을

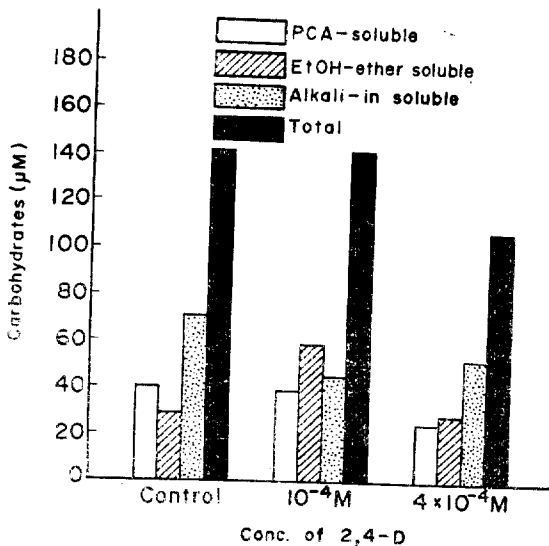


Fig. 2. Yield of carbohydrates from *Chlorella* cells treated with 2,4-D after 6 days culture.

Table 6. Changes in the yields of amino acid and protein from *Chlorella* cells treated with 2,4-D.

Fraction	Day of culture	Amount( $\mu\text{M}$ )		
		Control	2,4-D( $10^{-4}\text{M}$ )	2,4-D( $4 \times 10^{-4}\text{M}$ )
PCA-sol(amino acid)	0	12.49	12.49	12.49
	2	15.85	18.46	9.06
	4	25.68	60.52	44.03
	6	115.07	114.39	103.98
Alkali-abile	0	2.29	2.29	2.29
	2	19.71	17.23	11.40
	4	47.27	48.50	16.97
	6	100.44	131.46	63.65
Protein	0	29.60	29.60	26.60
	2	138.13	121.87	87.15
	4	275.14	252.65	108.87
	6	310.13	350.00	189.70
Total	0	31.89	31.89	31.89
	2	157.84	139.10	98.55
	4	322.41	301.15	125.84
	6	410.57	471.46	253.35

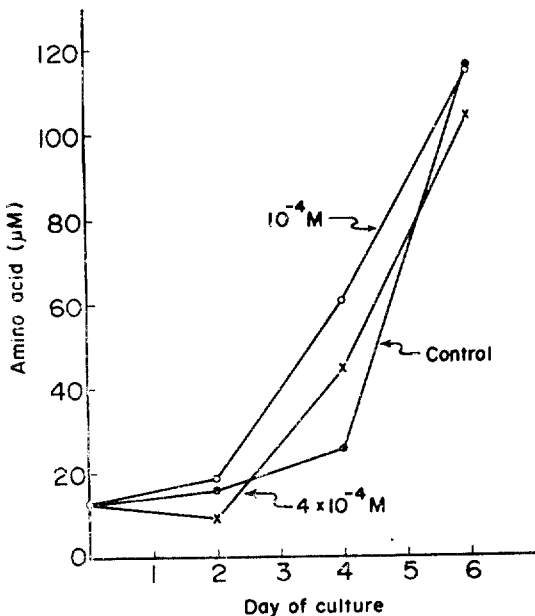


Fig. 3. Yield of amino acid from *Chlorella* cells treated with 2,4-D during the culture.

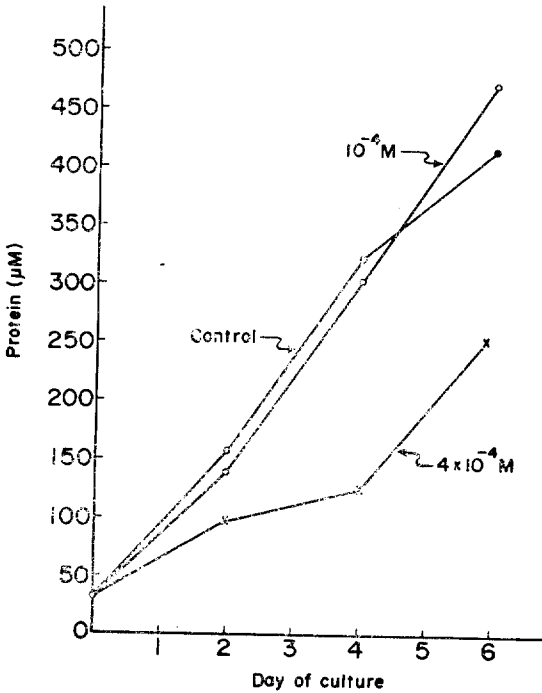
5. *Chlorella* 세포의 핵산(RNA,DNA) 함량에 미치는 2,4-D의 영향

핵산 가운데서 RNA함량에 대한 2,4-D의 영향은 Table 7과 Fig. 5에서 보는 바와같이 성장촉진농도에서는 control 보다 RNA 함량의 증가가 있었고 성장억제농도에서는 처음에는 증가하다가 제4일 이후부터는 감소되었다. 그리고 DNA함량의 증감에 있어서도 RNA의 경우와 거의 같은 경향을 나타내고 있다(Table 7, Fig. 6). Chkanikov 등(1970)은 pea의 胚軸에서의  $P^{32}$ 에 nucleotide phosphate에로의 進入이 2,4-D( $5 \times 10^{-3}\text{M}$ )에 의하여 阻害된다고 하였는데 *Chlorella*의 성장억제농도( $4 \times 10^{-4}\text{M}$ )에서의 RNA나 DNA의 함량감소의 일면을 암시하여 주는것 같다. Ingle등(1965)은 auxin에 의한 식물체의 성장촉진은 핵산의 증가에 따른 단백질합성의 촉진때문이라고 해석하였는데 2,4-D의 경우에도 이러한 추정이 成立될 수 있을것 같다.

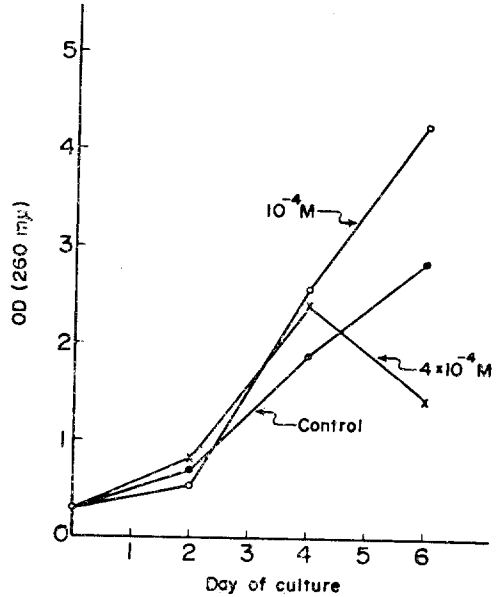
RNA합성의 촉진과 관련지어서 해석하고 있다.

**Table 7.** UV-absorbances of RNA and DNA fraction of *Chlorella* cells treated with 2,4-D.

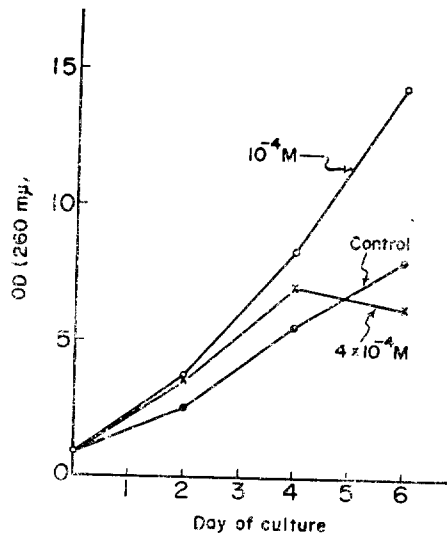
Fraction	Day of culture.	UV-absorbance(260 $\mu$ m)		
		Control	2,4-D ( $10^{-4}$ M)	2,4-D ( $4 \times 10^{-4}$ M)
RNA	0	0.93	0.93	0.93
	2	2.53	3.73	3.55
	4	5.56	8.04	7.18
	6	8.02	14.40	6.29
DNA	0	0.31	0.31	0.31
	2	0.70	0.53	0.82
	4	1.88	2.58	2.41
	6	2.85	4.25	1.42



**Fig. 4.** Yield of total protein from *Chlorella* cells treated with 2,4-D during the culture.



**Fig. 5.** Absorbances of DNA of *Chlorella* cells treated with 2,4-D during the culture.



**Fig. 6.** Absorbances of RNA of *Chlorella* cells treated with 2,4-D during the culture.

以上の 실험결과와 고찰을 요약하여 보건 데 2,4-D의 *Chlorella*에 미치는 영향은 생장 촉진 농도( $10^{-4}$ M)에서는 광합성과 호흡의 촉진, 탄수화물량의 별무증감, 단백질 및 핵산의 증가, 그리고 생장 억제 농도( $4 \times 10^{-4}$ M)에서는 광합성의 별무영향, 호흡의 촉진,

탄수화물, 단백질 및 핵산의 감소등을 초래 하였다. 따라서 2,4-D에 의한 *Chlorella*의 생장과 억제는 핵산량의 증감에 따른 단백질 합성의 성패에 연유되는 것으로 짐작된다.

## 摘 要

*Chlorella*의 생리에 미치는 2,4-D의 영향은 그 농도에 따라 차이가 있었는데 그 결과는 아래와 같았다.

- 1) *Chlorella*의 생장은 2,4-D의  $10^{-4}$ M농도에서 촉진되었고  $4 \times 10^{-4}$ M에서 억제되었다.
- 2) 호흡은 생장촉진농도와 억제농도에서 모두 촉진되었고, 광합성은 생장촉진농도에서 촉진되었고, 억제농도에서는 control과 별차이가 없었다.
- 3) 대사물질중, 생장촉진농도에서 단백질, 핵산등은 증가되었는데, 탄수화물은 control에 비하여 별증상이 없었다. 그리고 억제농도에서는, 탄수화물, 단백질 및 핵산이 모두 감소되었다.
- 4) 결국 2,4-D에 의한 *Chlorella*의 생장촉진과 억제는 핵산과 그에 따른 단백질의 증감에 기인하는 것으로 짐작된다.

## 引 用 文 獻

1. Aberg, B., 1974. Plant growth regulator. XXXII. *Swed. J. Agric. Res.* 4, 71—85.
2. Brown, J.W., 1946. *Bot. Gaz.* 107, 332—343.
3. Chatterji, U.N., 1971. Influence of phenoxycetic acids on the amino acid composition of perminating seeds of *Cyamopsis tetragonoloba*. *Biochem. physiol. Pflanz.*(BPP) 162, 466—469.
4. Chkanikov, D.I., O.D. Mikityuk, A.M. Makeev, and Y.M. Mirenkov, 1970. Additional data on disruption of phosphorylation processes by 2,4-D. *Fieiol. Rast.* 17, 757—764.
5. Fahmy, R., 1974. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the organic compounds assimilated in the kenaf leaves. *Egypt. J. Physiol. Sci.* 1, 55—61.
6. Feierabend, J., 1970. Characterization of cytokinin action on enzyme formation during the development of the photosynthetic apparatus in rye seedlings. Enzymes of the reductive and oxidative in pentose phosphate cycles. *Planta* 94, 1—15.
7. French, R.C., and H. Beevers, 1953. Respiratory and growth responses induced by growth regulators and allied compounds. *Am. J. Bot.* 40, 666—672.
8. Frenkel, C., and R. Dyck, 1973. Auxin inhibition of ripening in Bartlett pears. *Plant Physiol.* 51, 6—9.
9. Gundkel, J.E., W.R. Sharp, B.W. Williams, W.C. West, and W.O. Drinkwater, 1972. Root and shoot initiation in sweet potato explants as related to polarity and nutrient media. *Bot. Gaz.* 133, 254—262.
10. Hamner, C.L., and H.B. Tukey, 1944. *Botan. Gaz.* 106, 232—245.
11. Ingle, J., J.I. Key, and R.E. Holm, 1965. Demonstration and characterization of a DNA like RNA in excised plant tissue. *J. Mol. Biol.* 11, 730—737.
12. Key, J.L., and J.B. Hanson, 1961. Some effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on soluble nucleotides and of soybean seedlings. *Plant Physiol.* 36, 145—151.
13. Klingman, G.C., and G.H. Ahlgren, 1951. *Botan. Gaz.* 113(2), 119—134.
14. Mitchell, J.W., and J.W. Brown, 1946. *Botan. Gaz.* 107, 120—129.
15. Pokorny, R., 1941. *Am. J. Chem. Soc.* 63, 1968.
16. Rasmussen, L.W., 1947. *Plant Physiol.* 22, 292—377.
17. Rubery, P.H., and A.R. Sheldrake, 1974. Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 118, 101—121.
18. Schmidt, G., and S.J. Thannhauser, 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissues. *J. Biol. Chem.* 161, 83—89.
19. Scott, T.A., and E.H. Melvin, 1953. Methods in carbohydrate analysis. *Anal. Chem.* 25, 150.
20. Tamiya, H., K. Shibata, T. Sasa, T. Iw-

- amura, and Y. Morimura, 1953. Effect of diurnally intermittent illumination on the growth and some cellular characteristics of *Chlorella*. *Carnegie Inst. Wash. Publ.* No. 600, 76-81.
21. Troll, W., and R.K. Cannan, 1953. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino acid and imino acids. *J. Biol. Chem.* **200**, 803-911.
22. van Hove, C., 1968. The influence of auxin on growth and glycolysis-Krebs cycle pathway as affected by malonic acid, monoiodo acetic acid and sodium fluoride. *Z. Pflanzen Physiol.* **58**, 395-401.
23. Wort, D.J., 1954. *Weeds* **3**(2), 131-135.
24. Yamaguchi, S., and A.S. Crafts, 1958. *Hilgardia*. **28**(6), 161-191.
25. Zimmerman, P.W., and A.E. Hitchcock, 1942. *Contribs. Boyce Thompson Inst.* **12**, 321-343.