

Butachlor가 귀리의 細胞分裂 및 蛋白質 合成에 미치는 影響

權景煥 · 金栽喆

Effects of Butachlor on the Cell Division and Protein Synthesis on Oat(*Avena sativa* L.)

Kwon, S.W. and Kim, J.C.

ABSTRACT

The effects of varying concentrations and durations of butachlor (N-(butoxymethyl)-2-chloro-2,6-diethylacetanilide) treatment on oat (*Avena sativa* L.) root cell division and protein synthesis were studied.

The highest concentration ($1 \times 10^{-3} M$) of butachlor caused the significant inhibition of cell division after 18hrs treatment. After 18hrs treatment, 59% and 82% inhibition of cell division occurred at $1 \times 10^{-4} M$ and $1 \times 10^{-3} M$, respectively, while 9% inhibition of cell division did at $1 \times 10^{-6} M$ concentration at the same exposure period. To investigate protein synthesis, the oats were treated for 18 and 24hrs with concentrations ranging from $1 \times 10^{-6} M$ to $1 \times 10^{-3} M$ butachlor. After 18hrs, butachlor treatment of oat with $1 \times 10^{-4} M$ inhibited 23% protein synthesis, and butachlor treatment with $1 \times 10^{-4} M$ caused 34% inhibition after 24hrs.

With SDS-PAGE of proteins extracted from oat root tips, butachlor usually inhibited the 16, 18, 30, 43 and 43.5 kD polypeptide, and proteins of root tips are made up of subunits below 100 kD polypeptide.

緒 言

除草劑 N-(butoxymethyl)-2-chloro-2,6-diethylacetanilide (butachlor)는 美國 Monsanto社가 開發한 amide 系統의 選擇性 除草劑로서 發芽이전이나 幼苗期에 處理함으로써 一年生 花本科雜草, 廣葉雜草와 水生雜草 防劑에 優秀한 效果를 나타내어 粟의 主産地인 아시아 地域에서 많이 이용되고 있으며, 특히 韓國에서는 70年代 導入된 이래 84年 한해동안 55% 이상의 가장 많은 消費를 보이고 있는데 이러한 理由는 植物體의 줄기나 뿌리에 빨리 敷水되어 效力發生이 빠르고 水稻作에 安全하며 低廉한 價格으로 購入할 수 있으므로 生産費를 줄일 수 있기 때문이다.¹⁾

정상적인 細胞에서는 DNA複製, 細胞分裂 및 細胞伸長에 蛋白質 合成이 기본적으로 要求되는데 alachlor, chlorsulfuron, metolachlor 그리고 propachlor 등 amide 系統의 除草劑는 細胞分裂, 蛋白質 合成, 細胞伸長 및 ATP生成中 어느 한 代謝에

자극을 주어서 植物의 生長을 抑制시키는 것으로 알려져 있다.^{1,4)} Duke 등²⁾은 propachlor가 귀리, 옥수수, 강낭콩의 根生長을 抑制한 것은 auxin誘起 및 細胞分裂의 抑制로 인한 結果라 하였으며, 특히 propachlor의 一次的 作用은 amino-acyl-t-RNA로부터 단백질 合成을 妨害하기 때문에 生長이 抑制된다고 하였다. 植物生長 抑制劑인 butachlor는 細胞分裂, 細胞伸長 및 ATP合成 抑制에 관한 報告는 있었지만 蛋白質 合成에 있어서는 어느 蛋白質을 抑制시키는지 報告되지 않았다.

따라서 本 研究은 butachlor의 機作을 究明하기 위하여 butachlor의 作用에 敏感한 귀리(*Avena sativa* L.)를 擇하여 細胞分裂 및 蛋白質 合成 抑制를 調査하였으며 특히 本 除草劑가 蛋白質 合成中 어느 蛋白質을 抑制시키는지를 調査하였다.

材料 및 方法

실험1. Butachlor가 細胞分裂에 미치는 影響

1) 湖南 作物試驗場에서 保存育種하고 있는 귀

리(*Avena sativa* L.)를 2日間 發芽시킨 다음, 根端 1cm 정도를 채취하여 Carnoy 溶液에 固定한 後, 냉장 보관하였다. 보관된 試料를 蒸溜水로 3~4回 水洗한 後 1N HCl로 60°C에서 15分間 加水分解시키고, 다시 蒸溜水로 水洗한 後, Schiff's reagent로 暗條件下에서 30分間 염색시켰다. 이를 蒸溜水로 3~4回 水洗한 後 균일하게 마쇄시키기 위하여 5% pectinase (pH 4.0) 溶液에 12時子 浸漬한 다음, 根端 2mm 정도를 切斷하여 slide glass에 올려놓고 45% 氷초산 1~2 방울을 添加하여 cover glass를 덮고 으개었다. 試料를 400 배율의 현미경 하에서 관찰한 1,000개의 세포중 분열하고 있는 세포수를 각각 分열 단계별로 하여 調査하였다.

실험2. 蛋白質 測定

A) Lowry法을 이용한 測定: 각각 농도별로 처리된 root tip을 150개당 cold 상태의 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 in 0.25M sucrose & 0.001 M MgCl₂ 용액 1ml를 tissue grinder에 넣고 4°C에서 완전 마쇄한 다음 이것을 10,000 × g에서 20分間 遠心分離하여 상등액을 Lowry⁷⁾ 방법에 의하여 測定하였다. 이때 처리구당 3 반복으로 하여 실시하였고 bovine serum albumin을 standard로 이용하여 정량하였다.

B) ¹⁴C-leucin을 이용한 蛋白質 測定: 총 반응액 100 μl 안에 試料 40 μl, 0.025 M Tris-HCl, pH 7.5 및 ¹⁴C-leucin 50 μCi를 加하여 25°C에서 1時間 反應後 millipore apparatus에 filter disc(2.5cm GF/C)를 깔고 20% TCA로 filtration하였으며 다시 insoluble residues를 水洗하기 위하여 5ml 10% TCA로 filtration하였다. 그後 filter disc를 完全히 말린다음 10ml cocktail solution(PPO, POPOP, Toluene, Triton X-100)를 넣고 liquid scintillation system을 利用하여 각각 10分씩 counting하였다.

실험3. 전기영동

Stacking gel은 4%, resolving gel은 12%로 하여 sample buffer와 1:1로 混合한 後 끓는 물에 1分間 放置한 다음, 각각 40 μl씩 well에 loading하였다. 또한 電流는 stacking gel을 통과할 때 까지는 10mA를 維持하고 resolving gel에서는 30mA로 높여서 약 10cm 가량 移動할 때까지 電流

를 통해 주었다. 염색은 0.1% coomassie blue-R-250으로 하였으며, 脫色은 1次와 2次로 나누어 back ground를 完全히 脫色시켰다. 이때 분자량 추정은 mark protein의 相對移動도를 對數値로 환산하여 결정했다(Fig.2).

結果 및 考察

1. 細胞分裂에 미치는 影響

植物體에서 吸水 및 代謝作用을 매우 빠르게 일으키고 있는 butachlor의 效果는 Table 1에서 보는 바와 같이 10⁻⁶ M은 28.2%, 10⁻⁴ M에서는 59%의 抑制를 보였으며 10⁻³ M 濃度에서는 82%로 현저하게 細胞分裂을 抑制하였다.

金 등⁸⁾은 10⁻³ M butachlor를 6시간 處理時 35%, 12時間 處理時 54%의 抑制를 보였으며, 本實驗에서는 18時間 處理時 細胞分裂이 18.4%를 보임으로써 butachlor는 濃度가 증가할수록 細胞分裂 抑制效果도 증가하며 同一濃度에서는 處理時間이 경과함에 따라 抑制效果도 증가하였다. 또한 M期中 分裂細胞가 전기, 중기, 후기, 말기로 進行됨에 따라 細胞分裂이 減少되었고 同一 stage에서는 高濃度일수록 細胞分裂 抑制效果가 增加하였다. 또한 分裂細胞 中에서 metaphase의 arrest나 polynucleus 같은 染色體 異常이 전혀 發見되지 않았던 것으로 보아 間期中 어느 phase에 作用하여 細胞分裂이 抑制되는 것으로 생각된다.

金 등⁸⁾은 chlorsulfuron, alachlor, metochlor 등은 細胞週期中 間期에 作用하여 細胞分裂이 抑制되며 haloxyfop과 CGA-82725는 G₂ 期에서 蛋白質 合成을 방해함으로써 細胞分裂을 抑制한다고 하였고 butachlor도 줄기와 뿌리에 敏感하게 作用하여 細胞分裂과 細胞伸長이 抑制되는 것을 보였다. 本實驗에서도 butachlor는 分裂週期中 蛋白質 活性이 높은 G₁, S 또는 G₂ 期의 어느 한 時期에 影響을 줌으로써 細胞分裂이 抑制된 것으로 思料된다.

2. 蛋白質 合成에 관한 研究

植物은 계속적인 DNA, RNA, 蛋白質 合成 그리고 ATP 생성으로 인하여 細胞分裂 및 細胞伸長이 이루어지고 있다.^{10,11)} 그러나 이들 중 어느 한가지라도 부족하면 植物의 生長이 抑制된다. Table 2에서 보는 바와 같이 蛋白質 抑制 效果는 18時間

Table 1. Frequency of mitotic stages in Oat root tips treated with Butachlor for 18 hours^a

Treatment	Total No. of dividing cells (% of control)	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telopase
Control	100a	28.3a	23.0	9.0a	8.7a
1x10 ⁻⁶ M	90.7a	27.3±3.9a	20.3±8.4a	8.0±2.7a	10.0±4.0a
1x10 ⁻⁵ M	71.8b	21.0±4.4b	15.0±8.3b	7.0±2.6a	9.0±3.5a
1x10 ⁻⁴ M	41.0c	14.0±8.8c	8.0±7.2c	1.0±0.7b	6.7±3.9b
1x10 ⁻³ M	18.4b	6.0±2.5d	3.0±6.5d	1.3±1.4b	3.0±3.8b

All frequencies are arithmetic means of values from 1,000 cells per roots.

Standard errors are given as ± values

^a In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test

Table 2. Effect of Butachlor on protein synthesis in Oat root tips

Concentration	18 hrs.		24 hrs.	
	Amount of protein (ug/ml)	% control	Amount of protein (ug/ml)	% control
Control	1,204a		1,284a	
1x10 ⁻⁶ M Butachlor	1,175a	97.6	1,185a	92.2
1x10 ⁻⁵ M Butachlor	1,115a	92.6	1,120a	87.3
1x10 ⁻⁴ M Butachlor	928ab	77.1	844b	65.7
1x10 ⁻³ M Butachlor	793b	65.9	701b	54.6

In a column, means followed by common letter are not significantly different at the % level by Duncan's multiple range test

Table 3. Effects of butachlor on protein synthesis as measured by ¹⁴C-leucine incorporation after 18 hours.

Treatment	¹⁴ C-leucine incorporation	
	cpm A/K	% control
control	2,998	100
1x10 ⁻⁴ M butachlor	2,110	71

처리시 10⁻³ M은 34.1%, 10⁻⁴ M은 22.9%의抑制를 보이고 있으며 24시간 처리시는 10⁻³ M에서 45.4%, 10⁻⁴ M에서는 34.3%로서 18시간에 비하여 抑制效果가 增加되었다.

동위원소를 이용하여 10⁻⁴ M butachlor와 control區의 ¹⁴C-leucin을 측정한 결과 그 抑制效果는 Lowry法으로 측정한 것과 거의 같은 수준으로 나타났다(Table 3).

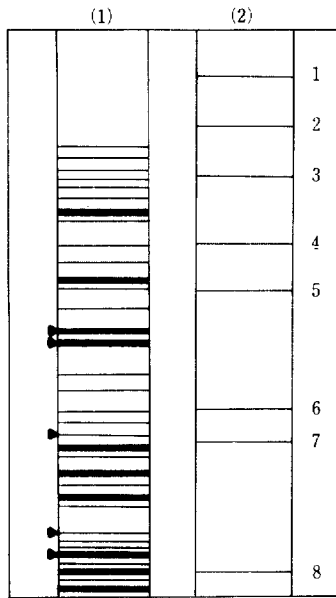
Propachlor는 오이 뿌리에서 蛋白質合成을 抑制시키고 귀리의 coleoptile의 伸長을 抑制하였으며 soybean hypocotyl section時 蛋白質合成 및 RNA合成을 抑制하였다. 또한 propachlor는 蛋白質合成中 aminoacyl-t-RNA로부터 polypeptide chain으로 合成을 방해함으로써 植物生長이 抑制된다.^{8,9}

本實驗에서 蛋白質抑制效果는 butachlor의 濃度가 높을수록 增加하였으며 同一濃度에서는 時間이 경과됨에 따라 蛋白質抑制效果도 增加되었다. 이것은 細胞分裂에서와 마찬가지로 一定時間에 處理濃度가 높아짐에 따라 抑制效果도 增加함으로써 蛋白質合成과 細胞分裂은 相關係數가 0.98로 서로 정(+)의 相關關係로 나타났다.

이상의 結果로 butachlor는 蛋白質合成을 抑制시킴으로써 細胞分裂이 抑制되었으며 또한 細胞分裂抑制로 인하여 植物의 生長이 抑制되는 것으로 思料된다.

3. 電氣泳動

電氣泳動上에서 S.D.S(sodium dodecyl sulfate)를 蛋白質溶液에 處理하면 蛋白質分子는 subunit로 解離되어 蛋白質本래의 電下와는 關係없이 subunit分子量과 일정한 關係를 갖고 많은 band로 分離되어 나타난 反面, S.D.S를 添加하지 않은 電氣泳動상에서는 4개의 major band만 나타났다. 또한 12% SDS-PAGE상에서 귀리의 root tip은 分子量 100,000 이하의 subunit로 構成되어 있으며 control區의 band는 10개의 major band와



▲ : The site of the responses of butachlor in oat root tips.

Fig. 1. SDS-PAGE of protein extracted from oat root tips.

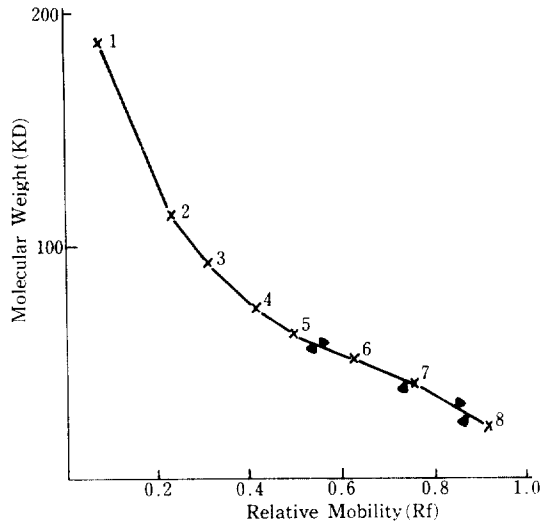
lane 1 : root tips protein
lane 2 : mark protein

약 24개의 minor band로 나타냈다(Fig. 1). 그러나 同一 植物에서 butachlor 處理區는 無處理區에 比較하여 전체적으로 蛋白質 含量이 감소하였기 때문에 前者의 band는 얇고 後者는 짙었으나 전혀 다른 뚜렷한 band의 差異는 나타내지 않았다. 따라서 處理區와 無處理區의 band density 差異를 比較한 結果 butachlor 는 특히 分子量 16, 18, 30, 43 그리고 43.5 KD의 蛋白質을 抑制하는 것으로 推定된다(Fig. 2). 本 研究에 대해서는 좀더 정확히 究明하기 위하여 pH별, 分子量別로 同位原素를 利用한 2-Dimensional Autoradiographic Electrophoresis 방법으로 調査할 豫定이다.

摘 要

植物生長 抑制劑인 butachlor 의 作用機構를 究明하기 위하여 本 除草劑가 生長基本要素인 細胞分裂 및 蛋白質 合成 抑制에 미치는 影響은 다음과 같다.

1. Butachlor 의 細胞分裂 抑制 效果는 18時間 處理後 10^{-6} M은 9.3%, 10^{-5} M은 28.2%의 抑制를 보였으며, 특히 10^{-3} M 濃度에서는 81.6%의



Mark Protein

1. 2-macroglobulin(MW : 180, 000)
2. B-galactosidase(MW : 116, 000)
3. fructose-6-p-kinase(MW : 84, 000)
4. pyruvate kinase(MW : 58, 000)
5. fumarase(MW : 48, 500)
6. lactic dehydrogenase(MW : 36, 500)
7. triosephosphate isomerase(MW : 26, 600)
8. lysozyme(MW : 14, 000)

Fig. 2. Comparison of molecular weight of 8 different polypeptide chains in the molecularweight range from 14,000 to 180,000 with their electrophoretic mobility on SDS gel.

현저한 抑制를 보임으로서 本 除草劑는 濃度가 높아질수록 細胞分裂 抑制效果도 增加하였다.

2. 蛋白質 抑制 效果는 18時間 處理後 10^{-4} M 濃度에서 22.9%, 10^{-3} M은 34.1%의 抑制效果를 보였다. 또한 24時間 處理時 10^{-4} M은 34.3%로 18時間 處理後의 10^{-3} M과 거의 같은 抑制效果를 보이고 있다. 이와같이 butachlor 는 濃度와 處理時間이 길어짐에 따라서 蛋白質 抑制效果의 增加를 보였다.

3. Butachlor 處理는 전체적인 蛋白質 合成을 抑制하였고 특히 분자량 16, 18, 30, 43 그리고 43.5 KD의 蛋白質을 抑制하는 것으로 나타났으며 귀리 (*Avena sativa* L.)의 root tip은 100,000 이하의 polypeptide subunit 의 단백질로 構成되었다.

引用文獻

1. Ashton, F.M.; Crafts, A.S. "Mode of Action of Herbicide"; Wiley: New York, 1973: 69-99.
2. Duke, W.B., F.W. Slife, J.B. Hanson and H.S. Butler. 1975. An investigation on the mechanism of action of propachlor. Weed Sci. 23: 142-147.
3. Kang, J.I., S.I. Oh, J.S. Choi and C.Y. Kang. 1985. A study of supply demand of pesticide. K.R.E.I. 144pp.
4. Kim, J.C. 1986. A study of Mode of action of Fluazifopbutyl. K.J.W.S. 6(2): 168-173.
5. Kim, J.C. and I.T. Hwang. Effects of Butachlor on cell division and cell enlargement in Oat (*Avena sativa* L.). Korean J. Bot. 29(3): 167-173. (1986).
6. Kim, J.C. and L.E. Bendixen. 1987. Effects of haloxyfop and CGA 82725 on cell cycle and cell division of oat root tips. Weed Sci. 35: 769-774.
7. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin reagent. J. Biochem. 193: 265-275.
8. P.L. Webster and J. Van't Hof. DNA synthesis and mitosis in meristems: Requirement for RNA and protein synthesis. Amer. J. Bot. 57(2): 130-139. 1970.
9. Saul Zalik and B.L. Jones. Protein Biosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol. (1973). 24: 47-68.