

보리 유식물 분리엽록체의 광합성 전자전달활성에 미치는 Dimethipin의 영향

이 준 상

상지대학교 생명과학과

Effects of Dimethipin on the Photosynthetic Electron Transport Activity of Isolated Barley Chloroplasts

Joon-Sang Lee

Department of Life Science, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract – Eight days grown barley seedlings were treated with dimethipin for 72 hours and then the content of chlorophyll and photosynthetic electron activities of isolated chloroplasts were investigated. At the treatment of 10^{-5} M dimethipin the content of chlorophyll was decreased to 33% at 72 hours. Seven days etiolated barley seedlings were exposed to the light while dimethipin was added. At the time of 48 hours' greening chlorophyll content was reduced to 43% at 10^{-4} M dimethipin and the chlorophyll *a/b* ratio was increased. In photosynthetic electron transport the activity of PSII+PSI was decreased to 10% at 48 hours and 25% at 72 hours at 10^{-4} M dimethipin. In the treatment of 10^{-4} M dimethipin the activity of PSII+PSI, except water splitting system was inhibited to 16% at 48 hours and 27% at 72 hours. The activity of PSII was inhibited to 8% at 24 hours, 13% at 48 hours and 18% at 72 hours at 10^{-4} M dimethipin. The activity of PSI was inhibited to 4% at 24 hours, 8% at 48 hours and 10% at 72 hours at 10^{-4} M dimethipin. In the times of greening of 7 days etiolated barley seedlings the activities of PSII+PSI were reduced to 5, 10, 10 and 11% at 6, 12, 24, and 48 hours, respectively, at 10^{-4} M dimethipin. On the other hand, the activity of PSII+PSI except water splitting system, was not inhibited at all incubated hours in 10^{-4} M dimethipin and there were no clear changes of the activities of PSII and PSI as compared to the control. Therefore, it could be concluded that dimethipin inhibited the photosynthetic electron activity by affecting the function of chloroplast rather than the synthesis of chloroplast and the inhibited function of chloroplast seems to come from the severe decrease of chlorophyll content.

Key words : isolated chloroplasts, electron transport, photosystem

서 론

우리가 말하고 움직이는 그 에너지의 근원은 태양에

너지이다. 우리 인간은 태양에너지를 우리가 활동하는데 사용하는 화학에너지로 고정할 수 없다. 그런 역할을 하는 것은 녹색식물의 엽록체이다. 엽록체는 매우 높은 효율을 가지고 태양에너지를 화학에너지로 고정하며 이 에너지를 이용하여 이산화탄소와 물을 결합시켜 포도당을 만든다. 광합성은 식물 생리의 가장 중심적인 반응으

* Corresponding author: Joon-Sang Lee, Tel. 033-730-0436, Fax. 033-730-0430, E-mail. jslee@mail.sangji.ac.kr

로 식물의 성장과 농작물의 수확량은 광합성 비율과 비례한다(Taiz and Zeiger 2002).

Dimethipin (2,3-dihydro-5,6-dimethyl-1,4-dithin-1,1,4,4-tetraoxide)은 수확기에 있는 벼, 해바라기의 수분함량을 감소시키고, 감자덩굴을 건조시킴으로서 수확시기를 앞당기게 하여 수확률을 증가시키는 화합물이다. Dimethipin은 벼와 해바라기의 성숙과 자연적인 노화를 촉진시키며 포도, 성숙한 과수 및 천연고무나무 등에서는 낙엽을 유도시키는데 사용되고 있다. 이와 같은 dimethipin의 생물학적 효과는 cellulase의 활성을 증가시켜 낙화와 낙엽을 유도하는 것과 관계가 있다고 보고되었다(Ames *et al.* 1982). Dimethipin과 비슷한 작용을 하는 호르몬으로 에틸렌이 있다. 에틸렌은 잎의 노화와 떨어져 현상을 유도하며(Morgan 1984; Zacarius and Reid 1990), 사과, 토마토 및 바나나 등의 과일 성숙과 연관이 있는 것으로 보고되었다(Burg and Burg 1965). 이러한 에틸렌의 생리적 효과는 옥신과 앱시스산과의 상호 연관 작용에 의해 일어나는 것으로 추측된다.

반면에 dimethipin은 단백질 합성을 억제하며, dimethipin에 의한 단백질 합성 억제는 생리 현상과 밀접하게 관련된 것으로 보고되었다(Keng and Metzger 1984). 또한 Hoagland (1984)는 강낭콩 배양액에 dimethipin을 처리하였을 때 자엽에서 nitrate reductase (NR) 활성은 변화가 없었으나 뿌리에서 크게 억제되었다고 발표하였으며, 이런 결과는 뿌리 내에 높은 dimethipin의 농도 때문인 것으로 추측하였다. 이와 같이 dimethipin 처리는 phenylalanine ammonia lyase, NR 및 여러 가수분해 효소에 영향을 줌으로써 식물생장에 관여할 수 있다(Hoagland 1984).

이상과 같이 dimethipin에 대한 연구는 주로 농업분야에 국한된 듯 하여 본 연구는 분리 엽록체의 광합성 전자전달활성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

크기가 일정한 보리(*Hordeum vulgare* L.CV. Mooan) 종자를 선별한 후 1% NaCl 용액에 15분간 담그어 표면 살균하고, 증류수로 충분히 씻은 후 3일간 암소에서 발아시켰으며, 이를 가아제를 깐 플라스틱 용기(12×12×11 cm)에 파종하여 수경 재배하였다. 배양 용액은 Hoagland (Sigma, U.K.) 용액을 사용하였으며, 14시간의 명기와 10시간의 암기, 25°C의 온도와 100 μmole E m⁻² s⁻¹ (metal halides lamp)의 광도에서 재배하였다.

2. 엽록소 함량 측정과 엽록체 분리

엽록소 함량과 엽록소 *alb* 비율의 측정은 Holden (1965)의 방법을 기초로 하였다. 엽록체 분리는 Lee *et al.* (1983)의 방법을 기초로 하였다. 보리 유식물 제 1엽 4g을 30 mL의 50 mM Tricine-KOH 완충용액(pH 7.9, 10 mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin, 0.33 M sorbitol)에 넣은 후 Waring blender로 10초간 고속에서 homogenization 한 후 6겹의 거즈로 여과시킨 용액을 200×g로 3분간 원심 분리하여 침전물을 버리고 상등액을 취하여 다시 1,300×g로 10분간 원심 분리하였다. 이 중 상등액을 버리고 침전물을 전자전달 활성 측정을 위해 50mM HEPES 완충용액(pH 7.6, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM MgCl₂ 및 0.33 M sorbitol 포함)에 적당량 희석시켜 분리 엽록체 시료로 사용하였다.

3. 광화학반응계 활성 측정

분리 엽록체의 전자전달 활성은 Lee *et al.* (1983)의 방법을 기초로 하여 반응액 내의 O₂ 변화량으로 측정하였다. Photosystem II (PSII)+Photosystem I (PSI)의 활성은 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM MgCl₂ 및 uncoupler로서 5 mM NH₄Cl을 포함하는 50 mM HEPES-KOH 완충용액(pH 7.6)에 엽록체 현탁액을 넣고 0.5 mM FeCy 및 0.1 mM DCPIP를 첨가한 후 발생하는 산소의 양을 측정하였다. Water splitting system을 제외한 PSII+PSI은 PSII+PSI 활성 측정시 사용하는 동일한 용액에 엽록체 현탁액을 넣고, H₂O의 광분해를 억제하는 50 mM NH₂OH, pseudocyclic electron transport 억제제로서 200 μM NaN₃ 그리고 전자 수용체로서 100 μM MV (methyl viologen)를 첨가하고 소비되는 산소의 양을 측정하였다. PSI 활성 측정은 100 mM NaCl, 2 mM EDTA와 2 mM MgCl₂를 포함하는 50 mM HEPES-KOH 완충용액(pH 7.6)에 PSII 활성억제제로서 10 μM DCMU와 100 μM NaN₃, 전자수용체로 50 μM MV, 전자공여체로는 0.3 mM DCPIP를 넣은 뒤 엽록소 현탁액을 넣고 10 mM ascorbate를 첨가하였을 때 소비되는 산소의 양을 측정하였다. PSII 활성은 PSII+PSI 활성 측정과 동일한 용액에 엽록체를 넣고, 전자수용체로 p-PD와 0.5 mM FeCy를 첨가한 후 O₂ 방출량으로 측정하였다. 빛은 500 W Projector lamp로 TE-2 청색광 filter (Olympus)를 사용하여 600 μmole E m⁻²s⁻¹의 백색광을 조사하면서 25°C에서 Clark type electrode (Hansatech, U.K.)로 O₂ 변화량을 측정하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 dimethipin이 엽록소 함량에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 8일간 생장한 보리 유식물에 72시간 동안 dimethipin을 처리하면 10^{-6} M에서는 엽록소 함량에 큰 변화가 없었으나, 10^{-5} M부터는 농도의 증가에 따라 엽록소 함량이 급격히 감소하였다. 10^{-3} M dimethipin을 72시간 처리한 경우 엽록소 함량이 33% 감소하였다 (Fig. 1). 그러나 엽록소 *alb* 비율에는 영향이 없었다 (data not shown). 이에 비해 7일간 암소에서 생장시킨 후 dimethipin을 처리한 보리 유식물은 녹화 48시간에 10^{-4} M에서 대조구에 비해 43% 엽록소 함량이 감소하였으며, 엽록소 *alb* 비율이 증가하였다. 정상적인 잎의 엽록소 *alb* 비율은 일반적으로 2.5~3.5이다 (Oh and Lee 1996; Lee 2002). 본 실험에서 엽록소 *alb* 범위는 3~4 사이에서 측정되었다 (Fig. 2).

Table 1은 분리 엽록체의 광합성적 전자전달 활성에 미치는 dimethipin의 영향을 살펴본 것이다. 8일간 생장

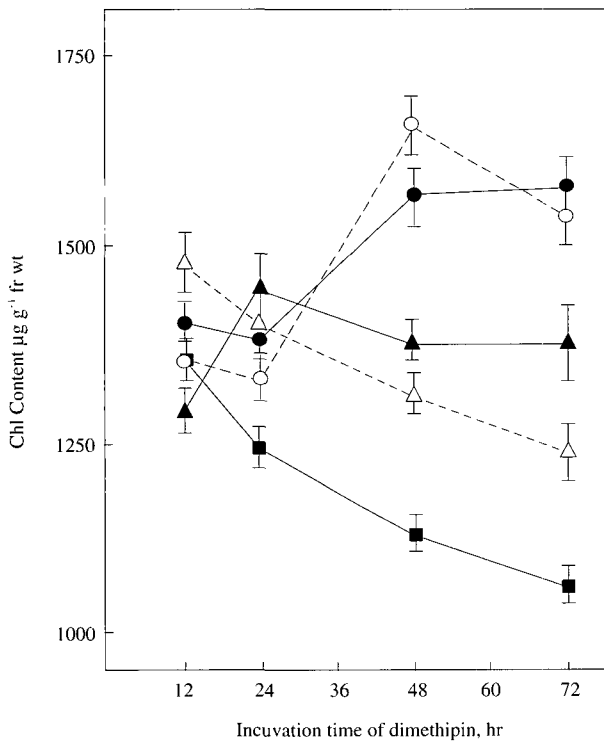


Fig. 1. Chlorophyll content at the treatment time of dimethipin in barley seedlings grown under the normal conditions for 8 days. Each result is the mean (\pm s.e.m) of three replicate experiments. Closed circles, control; open circles, 10^{-6} M; closed triangles, 10^{-5} M; open triangles, 10^{-4} ; closed rectangles, 10^{-3} M dimethipin.

한 보리 유식물에 72시간 동안 dimethipin을 처리하면서 24시간 간격으로 분리엽록체를 이용하여 PSII+PSI, PSII와 PSI를 측정하였다. PSII+PSI 활성은 두 가지 방법으로 측정하였다. 첫 번째는 전체적인 전자전달시스템의 측정으로 PSII+PSI 활성이며, 다른 하나는 전자전달계의 첫 번째 단계인 water splitting system을 제외한

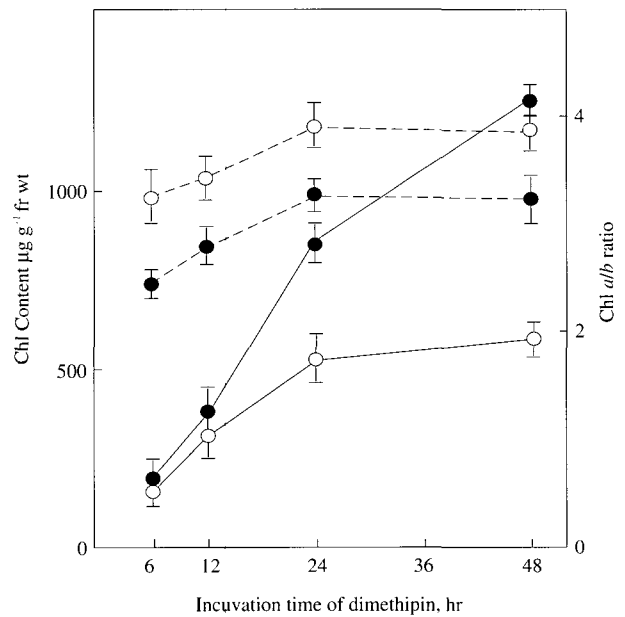


Fig. 2. Effects of dimethipin on chlorophyll content (a solid line) and chl *alb* ratio (dashed line) according to the time of greening in etiolated barley seedlings grown for 7 days. Each result is the mean (\pm s.e.m) of three replicate experiments. Closed circles, control; open circles, 10^{-4} M.

Table 1. Electron transport activities of chloroplasts after treatment of dimethipin in barley seedlings grown for 8 days. The activities were measured as O_2 evolution (PSII+PSI and PSII) and uptake (PSII+PSI, except for the water splitting system and PSI). Each result is the mean (\pm s.e.m) of three replicate experiments and the unit of the concentration of O_2 is $\mu\text{mol mg}^{-1}$ chl. hr^{-1} . PSII+PSI* indicates PSII+PSI except for the water splitting system

Treatment time, hours	Dimethipin (Mole)	Photosynthetic Electron Transport Activities			
		PSII+PSI	PSII+PSI*	PSII	PSI
24	Control	108 \pm 8.9	43 \pm 4.1	116 \pm 10.5	273 \pm 9.3
	10^{-5}	106 \pm 6.8	43 \pm 2.9	112 \pm 8.3	271 \pm 5.9
	10^{-4}	101 \pm 5.7	41 \pm 5.5	107 \pm 7.4	262 \pm 3.6
48	Control	113 \pm 10.2	38 \pm 4.9	114 \pm 7.4	291 \pm 0.5
	10^{-5}	111 \pm 9.2	35 \pm 5.0	108 \pm 6.1	282 \pm 7.5
	10^{-4}	102 \pm 8.7	32 \pm 2.0	99 \pm 4.9	269 \pm 1.0
72	Control	114 \pm 10.2	41 \pm 7.0	114 \pm 12.4	313 \pm 2.5
	10^{-5}	105 \pm 10.7	35 \pm 6.0	105 \pm 13.3	304 \pm 4.0
	10^{-4}	87 \pm 10.3	30 \pm 9.0	93 \pm 13.9	281 \pm 1.5

PSII+PSI 활성이다. 이런 분리적인 PSII+PSI 활성 측정은 dimethipin이 전자전달계의 어느 단계에서 작용하는지를 추측하는 데 도움이 된다. 10^{-6} M의 dimethipin 처리는 엽록소 함량 변화에 큰 변화를 주지 않았으나 dimethipin 10^{-5} 과 10^{-4} M은 뚜렷하게 엽록소 함량을 감소시켜 전자전달은 dimethipin 10^{-5} 과 10^{-4} M을 사용하여 측정하였다(Fig. 1). 24시간의 dimethipin 처리는 PSII+PSI 활성에 거의 영향을 미치지 않았다. 10^{-4} M dimethipin 처리는 48시간 배양시 10% 그리고 72시간에는 25%의 PSII+PSI 활성을 억제하였다(Table 1). 10^{-5} M dimethipin을 48시간 처리할 경우 PSII+PSI 활성을 억제하지 않았으나, 72시간에서는 10% 억제하였다. Water splitting system을 제외한 PSII+PSI 활성은 water splitting system을 포함한 PSII+PSI 활성과 dimethipin에 대해 비슷한 반응 양상을 보여주었으나, 그 억제 정도는 증가하였다. 즉 24시간의 dimethipin 처리는 water splitting system을 제외한 PSII+PSI 활성에 거의 영향을 미치지 않았으나, 48시간 처리할 경우 10^{-5} M에서 8% 그리고 72시간에서는 15% 억제되었다. 10^{-4} M dimethipin을 48시간 처리할 경우 16% 그리고 72시간에는 27% 억제되었다. 따라서 dimethipin은 PSII+PSI 활성을 억제하며, 전자전달계의 첫 번째 단계인 water splitting system 또한 억제한다고 볼 수 있다. 그러나 water splitting system을 제외한 PSII+PSI 활성이 더 억제된 것으로 보아 dimethipin은 water splitting system 보다는 그 다음 단계의 전자전달계에 더 크게 작용하는 것으로 사료된다. PSII 활성은 10^{-5} M dimethipin을 24시간 처리할 경우 3%, 48시간에서는 5% 그리고 72시간에서는 8% 억제되었다. 10^{-4} M dimethipin을 24시간 처리할 경우 PSII 활성은 8%, 48시간에서는 13% 그리고 72시간에서는 18% 억제되었다. PSI 활성은 10^{-5} M dimethipin을 24시간 처리할 경우에는 변화가 없었으나, 48시간과 72시간에서는 3% 억제되었다. 따라서 10^{-5} M dimethipin은 72시간까지 PSI 활성을 억제하지 않았음을 알 수 있다. 10^{-4} M dimethipin을 24시간 처리할 경우 PSI 활성은 4%, 48시간에서는 8% 그리고 72시간에서는 10% 억제되었다.

위 결과로부터 dimethipin에 의한 PSII+PSI 활성 억제는 각각 PSII와 PSI의 억제를 더한 값과 유사하며, dimethipin이 PSII에 더 민감하게 반응한 것으로 사료된다.

Table 2는 7일간 암소에서 자라 황백화된 보리 유식물을 녹화시간에 따라 dimethipin의 효과를 살펴본 것으로, dimethipin이 엽록체 합성 과정과 엽록체의 활성에 미치는 영향을 추측할 수 있다. 녹화과정에서 dimethipin을 6, 12, 24와 48시간 처리할 경우 PSII+PSI 활성은 각

Table 2. Effects of dimethipin on the electron transport activities of chloroplasts greening in etiolated barley seedlings grown for 7 days. The activities were measured as O_2 evolution (PSII+PSI and PSII) and uptake (PSII+PSI except water splitting system and PSI). Each result is the mean (\pm s.e.m) of three replicate experiments and the unit of the concentration of O_2 is $\mu\text{mol mg}^{-1}$ chl. hr^{-1} . PSII+PSI* indicates PSII+PSI except water splitting system

Treatment hours	Dimethipin (Mole)	Photosynthetic Electron Transport Activities			
		PSII+PSI	PSII+PSI*	PSII	PSI
6	Control	38	40 \pm 2.0	31 \pm 2.5	90 \pm 2.0
	10^{-4}	36 \pm 1.0	40 \pm 2.5	31 \pm 0.5	92 \pm 2.0
12	Control	62 \pm 3.5	83 \pm 2.5	38 \pm 2.7	143 \pm 5.0
	10^{-4}	56 \pm 6.0	81 \pm 6.0	38 \pm 2.7	140 \pm 5.0
24	Control	100 \pm 1.5	119 \pm 0.5	53 \pm 3.5	255 \pm 5.0
	10^{-4}	90 \pm 0.5	118 \pm 1.0	51 \pm 4.2	248 \pm 7.5
48	Control	133 \pm 2.0	126 \pm 1.5	65 \pm 6.5	278 \pm 6.1
	10^{-4}	118 \pm 7.0	124 \pm 1.5	63 \pm 6.5	267 \pm 19.0

각 5, 10, 10 그리고 11% 억제되었다. 반면에 Water splitting system을 제외한 PSII+PSI 활성은 모든 처리시간에서 그 효과가 없었다. 또한 PSII와 PSI의 활성도 대조구와 큰 차이가 없었다. 따라서 녹화 전의 dimethipin 처리는 엽록소 함량에 커다란 감소를 초래하나, 엽록체의 기능에는 매우 미약하게 작용하는 것으로 사료된다.

이와 같이 dimethipin에 의한 PSII+PSI 활성 억제는 각각 PSII와 PSI의 억제를 더한 값과 유사하며, dimethipin이 PSII에 더 민감하게 반응한 것으로 사료된다. 또한 dimethipin에 의해 야기된 광합성적 전자전달활성의 억제는 엽록체 합성과정에서의 영향보다는 엽록체의 기능에 영향을 주는 것으로 사료되며, 이러한 엽록체 기능의 감소는 dimethipin에 의해 야기되는 30~40%의 엽록소 함량감소에 의한 것으로 볼 수 있다.

적 요

8일간 성장한 보리 유식물에 72시간 동안 dimethipin을 처리하면서 엽록소 함량의 변화와 광합성적 전자전달 활성을 측정하였다. 10^{-3} M dimethipin을 72시간 처리한 경우 엽록소 함량이 33% 감소하였다. 이에 비해 7일간 암소에서 성장시킨 후 dimethipin을 처리한 보리 유식물은 녹화 48시간에 10^{-4} M에서 대조구에 비해 43% 엽록소 함량이 감소하였으며, 엽록소 *alb* 비율이 증가하였다. 24시간의 dimethipin 처리는 PSII+PSI 활성에 거의 영향을 미치지 않았다. 10^{-4} M dimethipin 처리는 48시간 배양시 10% 그리고 72시간에는 25%의 PSII+PSI 활성

을 억제하였다. Water splitting system을 제외한 PSII+PSI 활성은 10^{-4} M dimethipin을 48시간 처리할 경우 16% 그리고 72시간에는 27% 억제되었다. 10^{-4} M dimethipin을 24시간 처리할 경우 PSII 활성은 8%, 48시간에서는 13% 그리고 72시간에서는 18% 억제되었다. 10^{-4} M dimethipin을 24시간 처리할 경우 PSI 활성은 4%, 48시간에서는 8% 그리고 72시간에서는 10% 억제되었다.

7일간 암소에서 자란 황백화된 보리 유식물을 녹화시간 6, 12, 24와 48시간에 dimethipin을 처리할 경우 PSII+PSI 활성은 5, 10, 10 그리고 11% 억제되었다. 반면에 water splitting system을 제외한 PSII+PSI 활성은 모든 처리시간에서 그 효과가 없었다. 또한 PSII와 PSI의 활성도 대조구와 큰 차이가 없었다.

이와 같이 dimethipin에 의해 야기된 광합성적 전자전달활성의 억제는 엽록체 합성과정에서의 영향보다는 엽록체의 기능에 영향을 주는 것으로 사료되며, 이러한 엽록체 기능의 감소는 dimethipin에 의해 야기되는 30~40%의 엽록소 함량감소에 의한 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Ames RB, AR Blem, JM Pryzbyl, AW Walz and D Jaction. 1982. Dimethipin: A unique plant maturity regulator for rice and sunflower. Proc. Crop Protection Conf. 2:563-568.
- Burg SP and EA Burg. 1965. Relationship between ethylene production in apples. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 45:335-344.
- Holden M. 1965. Chlorophylls. pp. 461-488. In Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments (Goodwin TW eds.). Academic press, New York.
- Hoagland RE. 1984. Dimethipin effects on soybean seedings growth and metabolism. Plant Cell Physiol. 25(3):397-405.
- Keng JP and JD Metzger. 1984. Modification of dimethipin action by light. Plant Growth Regul. 3:141-156.
- Lee CB, YN Hong, YD Cho, SH Lee and YM Kwon. 1983. Development of electron transport and photophosphorylation in greening barley seedings. Korean Biochemical J. 16(1):61-71.
- Lee JS. 2002. Cd^{2+} 에 의한 닭의장풀의 생리적 독성에 salicylic acid가 미치는 영향. 환경생물. 20(1):73-77.
- Morgan PW. 1984. Is ethylene the natural regulator of abscission? pp. 231-140. In Ethylene: Biochemical, Physiological and Applied Aspects (Fuchs Y and E Chaluitz eds). Martinus Nijhoff. Hague.
- Oh MH and CH Lee. 1996. Disassembly of chlorophyll-protein complex in *Arabidopsis thaliana* during dark-induced foliar senescence. J Plant Biology 39(4):301-304.
- Taiz L and E Zeiger. 2003. Plant physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Co. California USA.
- Zacarius L and MS Reid. 1990. Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. Physiol. Plant. 80:549-554.

Manuscript Received: September 7, 2004

Revision Accepted: November 11, 2004

Responsible Editorial Member: Joo-Hwan Kim
(Daejeon Univ.)