

*Nicotiana*屬에 있어서 Tetrazolium Oxidase Isozyme의  
電氣泳動的 變異에 관한 研究

韓 昶 烈 · 孫 清 烈 · 金 英 眞  
(韓國原子力研究所)

Studies on the Electrophoretic Variation in Tetrazolium  
Oxidase Isozyme of *Nicotiana* Species

Harn, Changyawl, Cheong Yeol Sohn, and Yurg Jin Kim  
(Radiation Breeding Lab. and Radiation Biology Lab., Korea Atomic Energy  
Research Institute, Seoul)

ABSTRACT

Four kinds of *Nicotiana* species and five varieties belonging to *N. tabacum* were used as materials for electrophoretic analysis of the tetrazolium oxidase isozyme to examine the taxonomic affinity among them based on the biochemical property. All the five varieties of *N. tabacum* showed same isozyme bands despite the fact that these varieties had notably varied characteristics including morphological traits. The band patterns were more or less different among the four species. Although *N. rustica* and *N. tabacum* were of the same genome group of AABB, their isozyme bands showed considerable difference. *N. sylvestris*, genome A donor of *Nicotiana* species, was found to be markedly different from *N. tabacum* in band pattern, including the absence of system 2 in *N. sylvestris*.

縮 論

近來에 이르러 生物의 分類나 類緣關係等을 究明함에 있어 生物體組織에 含有되어 있는 蛋白質의 電氣泳動과 酵素染色方法(Markert and Möller, 1959)을 많이 利用하고 있다. 이러한 生化學的인 方法을 利用한 生物의 系統學的인 研究나 遺傳學的인 研究, 또는 進化學的인 研究는 植物에서 보다는 動物에서 더 많이 이루어지고 있다(Whittaker and West, 1932; Maxwell and Baker, 1963; Sherman and Jackson, 1963; Nadler and Hughes, 1966; Evans, 1971). 植物에 있어서는 옥수수속 esterase, alcohol dehydrogenase, leucine aminopeptidase 등에 관한 研究와(Schwartz, 1962, 1964, 1965, 1971; Scandalios, 1967; Beckman

et al., 1964), 水稻에 있어서의 peroxidase를 利用한 類緣關係研究(Chu, 1967; Shahi et al., 1969), 그리고 담배에 있어서의 esterase, peroxidase, leucine aminopeptidase 등에 관한 研究報告가 있고(Bhatia et al., 1967), 이외에도 大麥, 小麥, 시금치, 감자등에 對한 isozyme의 研究報告가 있으며(Shannon, 1968), 植物의 系統學이나 遺傳關係研究에 isozyme을 利用한 研究도 漸次 活潑해 가고 있다.

한편 細胞遺傳學의 方法에 依한 genome 分析은 異種屬近緣植物間의 類緣關係를 究明함에 正確하고도 科學的인 方法의 하나로 오랫동안 利用되어 왔으나 이 方法은 長時日을 要한다든가 또는 異種屬間에 交雜이 이루어져야 한다든가하는 制約條件으로 因하여 모든 植物에 適用하기는 곤란하다. 이런 缺點은 生化學的

Table 1. *Nicotiana* species used for the studies of electrophoretic variation of tetrazolium oxidase isozyme

Species	Genomes	Varietal names	Remarks
<i>N. sylvestris</i>	AA	—	—
<i>N. glutinosa</i>	CC	—	—
<i>N. tabacum</i>	AA BB	Hicks	Cultivated in Korea
<i>N. tabacum</i>	AA BB	Burley 21	Introduced from Japan
<i>N. tabacum</i>	AA BB	Byolcho	Korean native variety
<i>N. tabacum</i>	AA BB	Xanthi	Introduced from Turkey
<i>N. tabacum</i>	AA BB	Samsun	Introduced from Turkey
<i>N. rustica</i>	AA BB	—	—

방법을 이용한 isozyme을 비교함으로써補充할 수 있다고 본다.

*Nicotiana*屬은 genome分析에 의해 그類緣關係가明白히 밝혀진 植物中의 하나이다. 本 研究에서는 細胞遺傳學的인 方法으로 밝혀진 genome關係上的 類緣關係가 isozyme을 이용한 生化學的 方法으로는 相互 어떠한 關係가 있는지를 밝히기 爲한 것이며 *N. tabacum*에 屬하는 品種들중 特性이 大端히 다른 5品種과 *N. sylvestris*, *N. glutinosa*, *N. rustica*等 3種을 選擇하여 生化學的인 方法으로 tetrazolium oxidase isozyme을 比較研究하였다.

### 材料 및 方法

本 實驗에 使用한 材料는 專賣廳 素砂煙草 試驗場에서 분양받았으며 이들의 種名, 品種名, genome構成等은 Table 1과 같다.

種子는 溫室에서 2個月間 재배한 후 可及的 높은 濃度의 蛋白質을 얻기 爲하여 材料採取 2~3日前부터 水分供給을 중단 植物體內의 水分含量을 最大限으로 줄인 다음 잎과 뿌리를 取하여 實驗에 使用하였다.

採取한 잎이나 뿌리는 mortar에서 잘 분쇄한 다음 다시 glass grinder를 利用하여 低溫狀態에서 다쇄한 후 遠心分離機에 옮겨 0°C에서 13,000g로 30分間 沈沈하여 상등액만을 取하여 電氣泳動試料로 하거나 또는 -50°C에 보관하였다가 實驗에 使用하였다.

電氣泳動은 horizontal starch-gel electrophoresis法을 利用하였고(Selander *et al.*, 1971) starch는 Electrostarch, Lot 682(Otto Hiller, Madison, Wisconsin)을 12.5%의 濃度로 使用하였다. Buffer system은 Tris Versene Borate (pH 8.0)의 continuous buffer system을 利用하였으며 electrode buffer의 組成은 0.5

M Tris-0.02M EDTA-0.65M boric acid이었고, gel buffer는 electrode buffer를 脫이은 水 1:9로 희석하였다. 泳動은 5°C, 200V 條件에서 3時間 行한 후 0.1 mm 두께로 slice하여 tetrazolium oxidase 檢出을 爲한 染色을 하였으며 染色液의 組成은 0.5M phosphate buffer(pH 7.0) 5ml, H<sub>2</sub>O 40ml, NBT 2ml, PMS 0.5ml, NAD 3ml로 하여 37°C에서 6~10時間 染色하였고 검은 끈색바탕에 흰부분이 確實히 보일때 固定液(acetic acid: methanol: water=1:5:5)으로 固定하여 觀察하였다.

### 結果 및 考察

Fig. 1에서 보는 바와같이 *Nicotiana*屬에서 5個의 tetrazolium oxidase isozyme system이 觀察되었으며, 이중 4個의 system은 陽極으로, 그리고 1個의 system은 陰極으로 移動하였다. 陽極으로 移動한 4個의 system중 가장 많이 移動한 것을 system 1으로 하고 移動距離에 따라 system 2, 3, 4로 表示하였다.

System 1에서는 *N. glutinosa*와 *N. rustica*만이 서로 同一種의 isozyme을 가지고 있었고 그외는 isozyme을 가지고 있지 않았다. 따라서 tetrazolium oxidase의 system 1으로 본다면 實驗에 使用한 *Nicotiana*屬의 植物을 2群으로 區分할 수가 있다. 한편 genome分析上으로 본다면 3群으로 區分할 수 있고 種으로서는 4種類로 되어 있다. System 2에 있어서는 *N. sylvestris*만이 system 2型을 갖고 있지 않았으며 나머지는 全部 同一한 種의 isozyme을 가지고 있었다. 그러므로 system 2에 있어서는 *N. sylvestris*와 나머지 의 種類를 2群으로 區分할 수 있다. System 3에 있어서는 이 system을 갖지 않은 *N. glutinosa*와 *N. rustica* 그리고 서로 同一한 種의 system 3을 갖는 *N. tabacum* 品種



摘 要

*Nicotiana*屬內의 異種 및 異 genome 植物들, 또 *N. tabacum*種에 屬하는 形態, 產地, 其他에 있어서 큰 差가 있는 5個品種들을 材料로 해서 tetrazolium oxidase isozyme의 電氣泳動의 變異에 依한 類緣關係를 調査해 보았다.

*N. tabacum*種內의 5品種間에는 isozyme band의 差가 없었고, *N. sylvestris*, *N. glutinosa*, *N. rustica* 및 *N. tabacum*의 4種間에는 畚畚 程度의 差가 있지만 band상의 差가 뚜렷하였다. *N. rustica*는 genome上으로는 *N. tabacum*과 같은 AA BB이지만 큰 差가 있었고 genome A의 起源種인 *N. sylvestris*는 isozyme上으로는 *N. tabacum*과는 system 5란 감고 그 외에는 전혀 다르고 이 種은 *N. tabacum* 보다는 *N. rustica*에 좀 더 가까운 種이었다.

參 考 文 獻

Beckman, L., J. G. Scandalios, and J. L. Brewbaker. 1964. Genetics of leucine aminopeptidase isozymes in maize. *Genetics* 50 : 899-904.

Bhatia, C. R., M. Buiatti, and H. H. Smith. 1967. Electrophoretic variation in proteins and enzymes of the tumor-forming hybrid *Nicotiana glauca* × *N. langsdorffii* and its parent species. *Amer. J. Bot.* 54(10) : 1237-1241.

Chu, Y. E. 1967. Variations in peroxidase isozymes of *Oryza perennis* and *O. sativa*. *Japan. J. Genetics* 42(4) : 233-244.

Evans, A. A. F. 1971. Taxonomic value of gel electrophoresis of proteins from mycophagous and plant-parasitic nematodes. *Int. J. Biochem.* 2 : 72-79.

Manwell, C. and C. M. A. Baker. 1953. A sibling species of sea cucumber discovered by starch-gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.* 10 : 37-53.

Markert, C. L. and F. Möller. 1959. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenic and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. U.S.* 45 : 753-763.

Nadler, C. F. and C. E. Hughes. 1966. Serum proteins electrophoresis in the taxonomy of some species of the ground squirrel subgenus *Spermophilus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 18 : 639-651.

Scandalios, J. G. 1967. Genetic control of alcohol dehydrogenase isozymes in maize. *Biochem. Gen.* 1 : 1-8.

Schwartz, D. 1962. Genetic studies on mutant enzymes in maize. III. Control of gene action in the synthesis of pH 7.5 esterase. *Genetics* 47 : 1609-1615.

\_\_\_\_\_. 1964. Genetic studies on mutant enzymes in maize. V. *In vitro* interconversion of allelic isozymes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 52 : 222-226.

\_\_\_\_\_, and T. Endo. 1966. Alcohol dehydrogenase polymorphism in maize—simple and compound loci. *Genetics* 53 : 709-715.

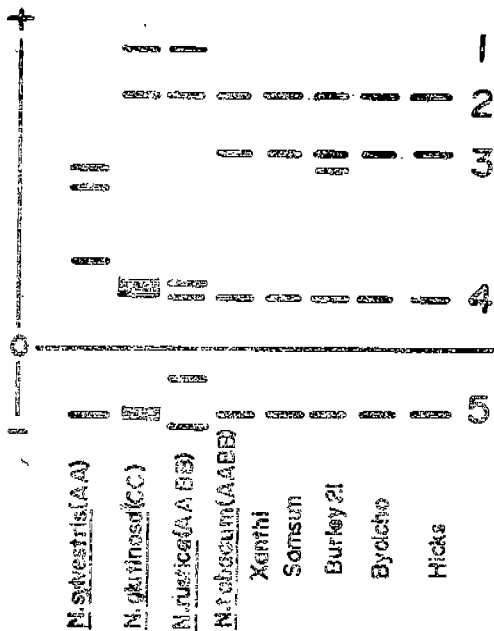


Fig. 2. Diagrammatic representation of the tetrazolium oxidase isozyme patterns showing the differences among the intra- or interspecies of *Nicotiana* genus.

여 isozyme型을 比較하였다면 더욱 興味있는 結果를 얻었으리라 生覺된다. Fig. 2는 同種內, 異種間, genome 構成等이 다름에 따른 isozyme의 型을 比較하기 爲하여 Fig. 1을 토대로 하여 排列한 것이다.

*Nicotiana*屬에 있어서의 isozyme型을 밝히기 爲하여 tetrazolium oxidase 外에도 esterase, general protein, alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, glutamate-oxalate transaminase, lactate dehydrogenase 등의 酵素檢출을 시도하였으나 esterase와 general protein에서만이 酵素活性을 보여 주었고 나머지에 있어서는 그 活性을 볼 수가 없었다. 活性을 가지고 있었던 esterase와 general protein에 있어서도 그 活性度가 너무 낮아 isozyme의 型을 比較할 수는 없었다. Esterase는 옥수수를 비롯한 여러 植物에서 存在가 確認되었으며, malate dehydrogenase는 담배를 비롯한 數種의 植物에서도 檢出된 바있고, lactate dehydrogenase는 콩과식물에서 研究된 바도 있어 (Shannon, 1968), *Nicotiana*屬에 있어서도 이러한 酵素들의 檢출이 可能할 것으로 期待하였는데 豫想과는 달랐다.

- \_\_\_\_\_. 1971. Subunit interaction of a temperature-sensitive alcohol dehydrogenase mutant in maize. *ibid.* 67 : 515—519.
- Selander, R. K., M. H. Smith, S. Y. Yang; W. E. Johnson, and J. B. Gentry. 1971. Appendix in IV. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). Studies in genetics VI. *Univ. Texas Publ.* 7103, Feb.
- Shahi, B. B., Y. E. Chu, and H. I. Oka. 1969. Analysis of genes controlling peroxidase isozymes in *Oryza sativa* and *O. perennis*. *Japan. J. Genetics* 44(5) : 321—328.
- Shannon, L. M. 1968. Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 19 : 187—210.
- Sherman, I. W. and G. J. Jackson. 1963. Zymograms of parasitic nematodes, *Neoplectana giaseri* and *N. car-pocapsae*, grown axenically. *J. Parasit.* 49 : 392—397.
- Thomas, H. and D. I. H. Jones. 1968. Electrophoretic studies of proteins in *Avena* in relation to genome homology. *Nature* 220 : 825—826.
- Whittaker, J. R. and A. S. West. 1962. A starch-gel electrophoretic study of insect hemolymph proteins. *Can. J. Zool.* 40 : 655—671.
- (1975. 12. 16. 접수)