

電氣泳動法 (SDS-PAGE, PAGIF)에 의한 잔디 分類에 關한 研究

朴載福 · 金榮厚 · 李守永

서울市立大學校 文理科大學 環境園藝學科

Studies on the Identification of Turfgrass by Electrophoresis(SDS-PAGE, PAGIF)

Park, Jae-Bok · Young-Hoo Kim · Su-Young Lee

Dept. of Environmental Horticulture, Seoul City Univ.

SUMMARY

This experiment was executed to investigate the possibility of the application of taxonomic method through the isoelectric focusing with polyacrylamide gel and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with seeds in the identification of turfgrasses.

The sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis was used to investigate the pattern of seed proteins which were extracted from 18 cultivars of cool season turfgrass and 4 cultivars of warm season turfgrass. The isoelectric focusing with polyacrylamide gel was used to investigate the activity of the three isozymes of esterase, peroxidase and phosphoglucose isomerase which were extracted from 18 cultivars of cool season turfgrass and 4 cultivars of warm season turfgrass.

The results were summarized as follows.

1. The difference of the patterns of seed proteins was observed with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The identification of intra-genus was easily detected.
2. The three isozymes of esterase, peroxidase and phosphoglucose isomerase were investigated through isoelectric focusing with polyacrylamide gel. As a result, esterase was most effective among three isozymes in the identification of turfgrass cultivars.
3. In the past cultivar identification was primarily based on visual morphological characters, but there was a lot of difficulty. If we should use electrophoresis, we will be able to identify turfgrass cultivars more effectively.

電壓으로 實施하여 loading 部位의 여지를 除去하고 methyl-red 가 붉은선으로 나타나는 3時間동안 每 30분마다 50volt 씩을 높이며 實施했다. 이렇게 電壓을 준 것은 여러가지 方法으로 豫備實驗을 한 結果 band 形成이 가장 良好한 條件을 택한 데 있다.

Esterase, peroxidase and phosphoglucose isomerase 를 分析 對象의 同位酵素로 하였으며, esterase 同位酵素는 α -naphthyl acetate 를 氣質로 하여 fast blue RR salt 로 染色시켰으며, peroxidase 는 3-amino-9-ethylcarbazole, 1M Na-acetate buffer(pH 5.0), dimethyl formide, 0.01 M calcium chloride, H₂O₂으로 染色시켰고, phosphoglucose isomerase 는 fructose-6-phosphate, 0.5 M Tris-HCl buffer(pH 8.5), MgCl₂, NADP, glucose-6-phosphate dehydrogenase, NBT 및 PMS 로 染色시켰다.

그리고 Nei(1986)의 方法에 따라 染色되어 나타난 esterase 와 peroxidase 의 band 를 利用하여 各種屬과 品種間의 genetic distance 를 구하여 잔디의 種屬과 品種間의 類緣關係를 구하였다.

$$F = 2Mxy / (Mx + My) \times 100$$

Mx : Total number of bands in x

My : Total number of bands in y

Mxy : Number of shared bands

III. 結果 및 考察

供試된 잔디 22品種의 種子蛋白質과 esterase (EST), peroxidase(POX) 및 phosphoglucose isomerase(PGI)의 電氣泳動的인 特徵을 찾고, 種子 水準에서의 電氣泳動的인 特徵에 의한 分類方法으로서의 適用可能性을 調査하였다.

1. SDS-PAGE 에 의한 잔디 22品種의 electrophoretic banding patterns

供試된 잔디 22品種의 種子蛋白質에 있어서의 變異는 SDS-PAGE 에 의하여 調査되었고 그 結果는 Fig. 1과 Fig. 2와 같다.

이미 실행된 형태적 특성에 의한 잔디의 속간의 차

이가 SDS-PAGE 에 의해서도 band 의 量的特性에 의하여 調査, 확인되었다.

Ryegrass 屬(lane 1-4)과 fescue 屬(lane 5-10) 間에는 66,200~42,700 dalton 部位에서 差異를 보였다. 즉 ryegrass 와 tall fescue(lane 7-10) 間에는 band 數에 있어서 差異를 보였으며 ryegrass 와 chewings fescue(lane 5-6) 間에는 band 數는 같으나 band 의 位置에서 差異를 나타냈다(Fig. 1).

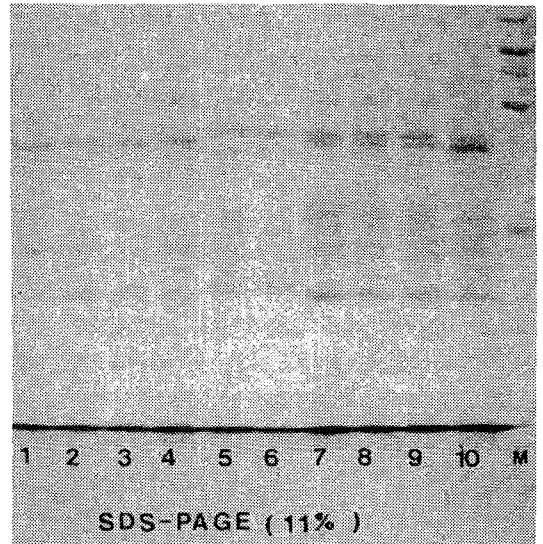


Fig. 1. Banding patterns of SDS-PAGE of proteins extracted from seeds of 10 cultivars of turfgrass.

M: Molecular weight standards, from top: 200,000; 116,250; 97,400; 66,200; 42,700 dalton

Fescue 屬(lane 11)과 bentgrass 屬(lane 12-16)의 相異性은 fescue 屬은 66,200-42,700 dalton 部位에서 그 特徵的인 band 를 보이나 bentgrass 屬은 97,400-66,200 dalton 部位에서 그 特性을 확인할 수 있었다. 즉 97,400-66,200 dalton 에서 band 의 有無에 의하여 fescue 屬과 bentgrass 屬을 구별할 수 있었다. Bentgrass 와 kentucky bluegrass(lane 17)와의 相異性은

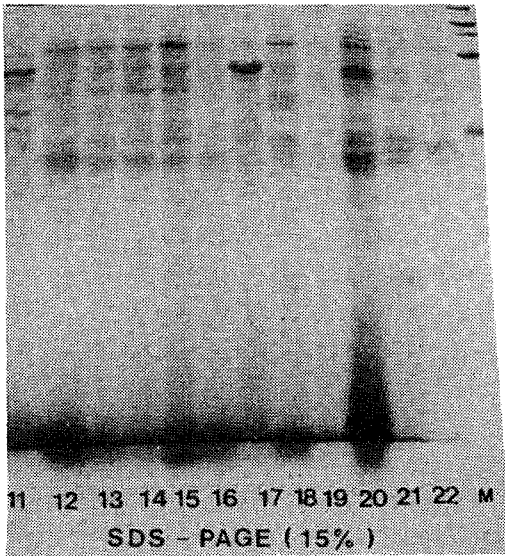


Fig. 2. Banding patterns of SDS-PAGE of proteins extracted from seeds of 12 cultivars of turfgrass.

M: Molecular weight standards, from top: 200,000; 116,250; 97,400; 66,200; 42,700 dalton

kentucky bluegrass가 66,200 dalton 部位에서 높은 密度의 band를 보이나 連續的이지는 못한다. 반해 bentgrass는 66,200 dalton 部位에서 連續的인 banding pattern을 나타낸다(Fig. 2). 이것은 bentgrass가 bluegrass 보다 明確하고 連續的인 banding pattern을 보였다는 Wilkinson 등(1972)의 報告와 一致하였다.

SDS-PAGE에 의한 種間 및 品種間의 差異 또한 band의 量的 및 質的 特性에 의해 調査, 확인할 수 있었다. Perennial ryegrass (lane 1-3)와 Italian ryegrass(lane 4) 間에는 42,700 dalton 部位의 band의 有無에 의하여 差異를 나타냈으며, perennial ryegrass var. pennant(lane 2)는 66,200-45,000 dalton 部位에서 3개의 band를 나타냈다는 Ferguson 등(1986)의 報告와는 다르게 本實驗에서는 이 部位에서 1개의 band를 보였다.

Chewings fescue의 구별은 容易하였고 같은 tall fescue 中에서는 tall fescue var. fawn(lane 9)은 42,700 dalton 部位의 2개의 band로서 tall fescue var. crown(lane 7)은 97,400 dalton 部位의 band가 없다는 것으로 다른 tall fescue와 구별되는 identification marker가 되었다(Fig. 1).

Colonial bentgrass인 highland(lane 12)와 creeping bentgrass인 Seaside, Penneagle과 Pencross(lane 13, 14, 15)의 差異는 200,000-116,250 dalton과 66,200-42,700 dalton 部位에서 나타났다. Pencross(lane 15)는 같은 creeping bentgrass인 Seaside와 Penneagle과는 對照的으로 66,200 dalton 部位에서 特徵을 나타냈다. 이것은 creeping bentgrass 들은 51,000-66,000과 35,000-45,000 dalton 部位에서 差異가 있었다는 Clark 등(1989)의 報告와 一致했다. 그러나 Redtop(lane 16)은 뚜렷한 band pattern을 보이지 않았다. Weeping love grass (lane 20)은 높은 密度의 band가 連續的으로 나타났으며 bermudagrass는 42,000 dalton 部位의 band가 特徵的이었다. 그리고 *Zoysia japonica*는 66,200-42,700 dalton 部位에서 band를 보였으나 明確하고 特徵的인 band pattern을 보이지 않았다(Fig. 2).

2. PAGIF에 의한 잔디 22品種의 electrophoretic patterns

供試된 잔디 22品種에 대하여 esterase, peroxidase와 phosphoglucose isomerase 同位酵素 水準에서의 變異를 調査하였다.

1). Esterase에 있어서 잔디 22品種間의 相異性 pH 3~10에서의 供試된 잔디 22品種의 esterase banding pattern의 結果는 Fig. 3과 4와 같다.

供試된 22品種에 있어서 esterase band는 39개가 나타났으며 각 品種은 다른 band patterns를 보였다. Perennial ryegrass는 20), 28), 30)과 39)번 band가 共通的으로 나타났으며 Morene은 Pleno와 Pennant와는 다르게 36)번 band 하나를 더 나타냄으로써 상이성을 보였다. Chewings fescue와 tall fescue 間의 相異性은 높은 pH 쪽의

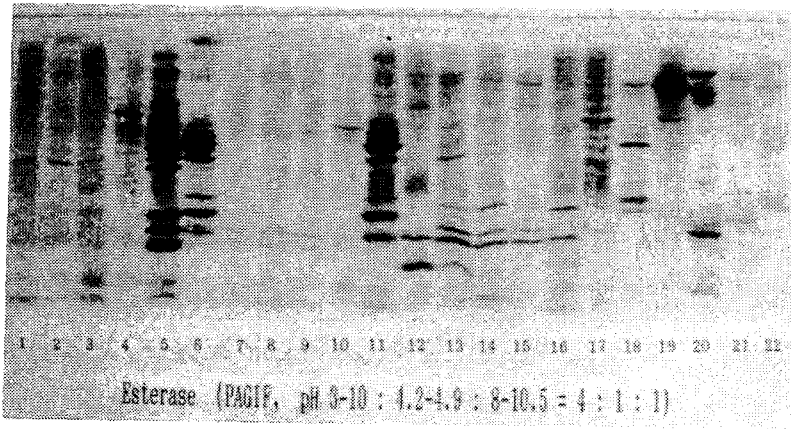


Fig. 3. Zymogram of esterase banding patterns of 22 turfgrass cultivars in seed.
(PAGIF, pH 3~10 : 4.2~4.9 : 8~10.5=4 : 1 : 1)

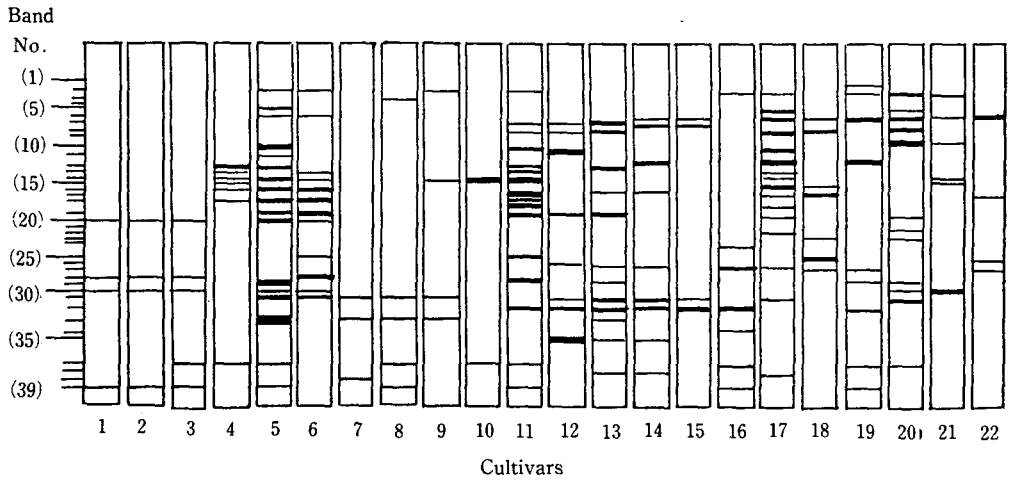


Fig. 4. Diagram of esterase banding patterns of 22 turfgrass cultivars in seed.
(PAGIF, pH 3~10 : 4.2~4.9 : 8~10.5=4 : 1 : 1)

band의 有無와 明確性의 程度로써 쉽게 구별할 수 있었다.

Chewings fescue와 chewings fescue var. cascade는 10), 11), 12), 33), 36), 39)번 band들에 의해 區別이 되었다. Tall fescue는 2), 3), 38)번 band에 의해 4개 品種을 구별할 수 있었다. Bentgrass 속은 32)번 band를 共通의으로 갖

고 있었으며, creeping bentgrass인 Penncross는 6), 7), 31), 32)번 band에 의해 다른 bentgrass와 상이성을 보였다.

Kentucky bluegrass는 높은 pH에서 부터 낮은 pH까지 고른 band pattern을 보여 주었다. 暖地型 잔디인 rose grass, weeping love grass, bermudagrass와 zoysiagrass는 6)번 band를 共

通的으로 갖고 있었다. 특히 rose grass는 6)번 band 부근에서의 높은 밀도에 의해 그 구분이 가능하였다.

2) Peroxidase와 phosphoglucose isomerase에 있어서 잔디 22品種의 相異性

pH 3-10에서의 供試된 잔디 22品種의 peroxidase와 phosphoglucose isomerase banding pattern 結果는 Fig. 5와 6 및 7과 같다.

Peroxidase에 대하여 供試된 잔디 22品種은 21

개의 band를 나타냈다. Esterase에 의해 區別이 안 되었던 perennial ryegrass의 Pleno와 Pennant는 1), 4)번의 peroxidase band의 有無에 의해 두 品種間의 比較가 可能하였다. 7개의 esterase band를 보여 주었던 Italian ryegrass는 peroxidase에서는 12), 21)번의 두 band만을 보였다. Fescue 屬에 있어서 chewings fescue와 chewings fescue var. cascade는 2)번 band에 의해 tall fescue는 13), 14), 20)번 band들에 의해

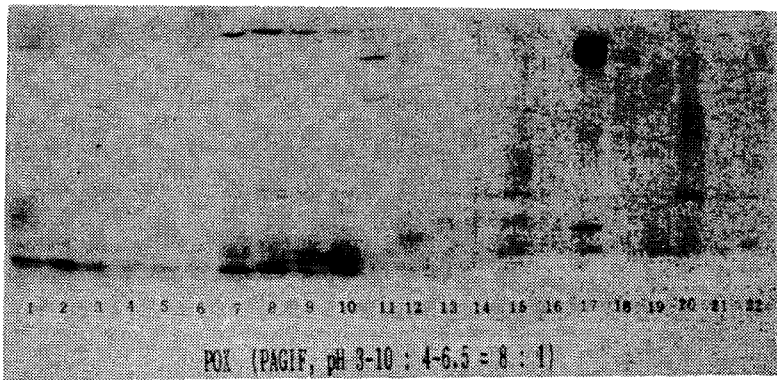


Fig. 5. Zymogram of peroxidase banding patterns of 22 cultivars in seed (PAGIF, pH 3-10 : 4-6.5=8 : 1)

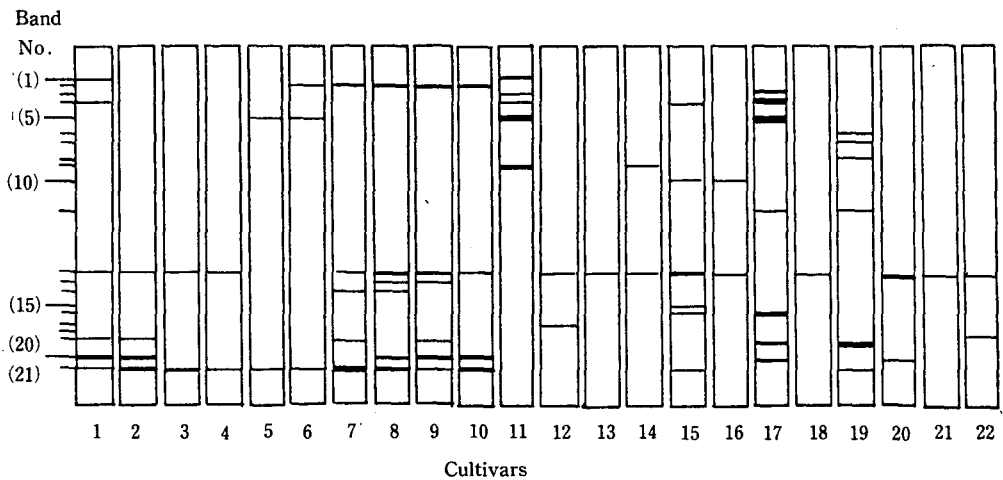


Fig. 6. Diagram of peroxidase banding patterns of 22 cultivars in seed (PAGIF, pH 3-10 : 4-6.5=8 : 1)

Table 2. Esterase and peroxidase isomerase bands observed in each turfgrass cultivar.

No.	Cultivar	Esterase bands	Peroxidase bands
1	Perennial ryegrass var. pleno	(20) (28) (30) (39)	(1) (4) (12) (19) (20) (21)
2	Perennial ryegrass var. pen- nant	(20) (28) (30) (39)	(12) (19) (20) (21)
3	Perennial ryegrass var. morene	(20) (28) (30) (36) (39)	(12) (21)
4	Italian ryegrass	(12) (13) (14) (15) (16) (18) (36)	(12) (21)
5	Chewings fescue var. cascade	(2) (5) (6) (10) (11) (12) (14) (16) (18) (19) (20) (29) (30) (31) (33) (36) (39)	(5) (21)
6	Chewings fescue	(2) (6) (13) (14) (16) (18) (19) (20) (25) (28) (30) (31)	(2) (5) (21)
7	Tall fescue var. crown	(31) (33) (38)	(2) (12) (14) (19) (21)
8	Tall fescue var. falcon	(3) (31) (33) (36) (39)	(2) (12) (13) (14) (20) (21)
9	Tall fescue var. fawn	(2) (14) (31) (33)	(2) (12) (13) (19) (20) (21)
10	Tall fescue var. KY31	(14) (36)	(2) (12) (20) (21)
11	Red fescue var. echo	(2) (7) (8) (10) (12) (13) (14) (16) (17) (18) (19) (25) (28) (32) (36) (39)	(1) (3) (4) (5) (9)
12	Bentgrass var. highland	(7) (8) (10) (19) (26) (31) (32) (35)	(12) (17)
13	Bentgrass var. seaside	(7) (8) (12) (16) (19) (27) (28) (31) (32) (33) (35) (37)	(12)
14	Bentgrass var. penneagle	(6) (7) (11) (16) (27) (31) (32) (35) (37)	(9) (12)
15	Bentgrass var. penncross	(6) (7) (31) (32)	(4) (10) (12) (15) (16) (21)
16	Redtop	(2) (24) (27) (32) (34) (36) (39)	(10) (12)
17	Kentucky bluegrass var. sobra	(2) (5) (6) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (16) (18) (19) (21) (26) (31) (37)	(3) (4) (5) (11) (16) (19) (20)
18	Alkali grass	(6) (7) (14) (16) (22) (25) (27)	(12)
19	Rose grass	(1) (2) (6) (11) (27) (28) (32) (36) (39)	(6) (7) (8) (11) (19) (21)
20	Weeping love grass	(2) (5) (6) (7) (8) (9) (19) (21) (22) (28) (29) (31) (37)	(12) (20)
21	Bermuda grass	(2) (6) (9) (13) (14) (29)	(12)
22	<i>Zoysia japonica</i>	(6) (16) (25) (27)	(12) (18)

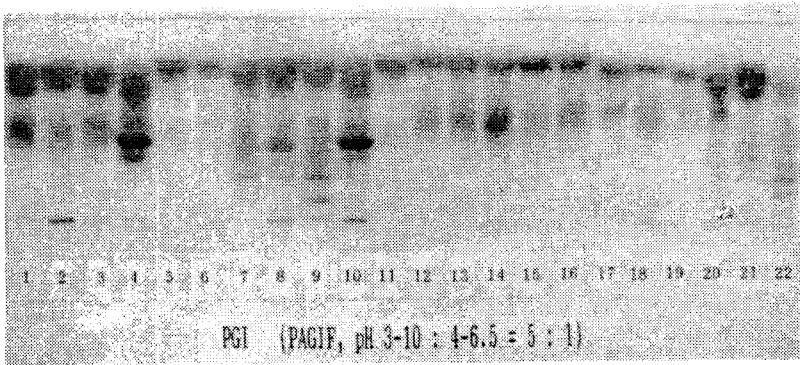


Fig. 7. Zymogram of phosphoglucose isomerase of 22 turfgrass cultivars in seed (PAGIF, pH 3-10 : 4-6.5=5 : 1)

구별되었다.

Bentgrass 屬은 12)번 band를 共通적으로 나타냈으며, kentucky bluegrass 15品種에서 2~4개의 band를 보였다. Wehner 등 (1976)의 報告와는 다르게 本 實驗에서는 8개의 band를 보여 結果의 차이를 보였다. Esterase와 마찬가지로 peroxidase에 대해서 kentucky bluegrass는 연속적인 banding pattern을 나타냈다.

Phosphoglucose isomerase 同位酵素에 있어서는 전체적으로는 뚜렷한 band pattern을 나타내지는 않았으나 屬間의 구별은 가능하였다. 특히 zoysiagrass의 경우는 다른 종 또는 품종과의 구별이 가능하였다(Fig. 7).

3) Esterase와 peroxidase band들에 의한 類緣關係 調査

電氣泳動에 의해 esterase와 peroxidase band를 基礎로 하여 genetic distance를 F값에 의하여 구하였고 그 結果를 Table 3에 나타내었다.

Ryegrass 屬에서는 perennial ryegrass var. pleno와 pennant가 그 類緣程度가 90.0으로 제일 높았고 fescue 屬에서는 chewings fescue var. cascade와 chewings fescue 사이에 71.3의 값으로 비교적 높은 類緣關係를 보였다.

Fescue 屬은 bentgrass 屬보다 ryegrass 屬에 더 가까웠으며, bentgrass 屬의 경우 colonial

bentgrass인 Highland는 creeping bentgrass중 Seaside와 63.3의 값으로 가장 가까운 것으로 나타났다. Alkali grass는 ryegrass와 fescue 屬보다 bentgrass 屬과 더 가까운 것으로, kentucky bluegrass는 fescue와 bentgrass 屬보다 ryegrass 屬에 더 가까운 것으로 나타났다. 이것은 esterase와 peroxidase 두가지 酵素를 對象으로 하여 나온 結果이므로 이외에 調査對象을 넓힌다면 좀더 正確한 類緣關係를 보일 것이다.

이상과 같이 形態의인 特性에 의한 잔디 品種 區別의 方法외에 電氣泳動的인 方法을 잔디品種 區分에 병행한다면 좀더 正確한 品種區分이 可能할 것이라 思慮된다.

IV. 摘 要

本 研究는 電氣泳動法을 잔디의 品種區別에 利用하고자 種子로서 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis와 폴리아크릴 아마이드 젤 等電點電氣泳動에 의한 分類方法에의 適用可能性을 調査하기 위하여 遂行되었다.

寒地型 잔디 18品種과 暖地型 잔디 4品種에 대한 種子蛋白質의 pattern을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis로, 그리고

Table 3. Similarity matrix of F value was calculated by esterase and peroxidase bands.
(POX + EST)/2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1	90.0	69.4	25.0	26.8	29.9	27.3	36.1	33.4	30.0	28.2	12.5	20.5	12.5	25.0	21.6	23.1	14.3	32.1	30.9	14.3	12.5		
2		77.8	33.3	30.9	33.0	33.3	41.1	40.0	37.5	10.0	16.7	26.3	16.7	20.0	25.8	18.2	20.0	35.4	39.2	20.0	16.7		
3			58.3	43.2	37.6	28.6	45.0	25.0	47.6	14.3	25.0	39.2	25.0	25.0	41.7	0	33.3	33.9	30.6	33.3	25.0		
4				45.8	41.1	28.6	33.3	34.1	55.6	26.1	25.0	43.9	31.3	25.0	32.1	14.7	47.6	31.3	25.0	48.7	34.1		
5					71.3	24.3	26.5	31.5	27.2	41.6	12.0	17.2	15.4	22.0	12.5	43.5	12.5	31.7	16.7	17.3	9.5		
6						31.7	28.1	41.0	35.7	41.1	10.0	16.7	14.3	23.6	5.3	27.6	21.0	25.4	20.0	22.2	18.8		
7							61.4	64.9	33.3	0	23.4	30.0	22.6	32.5	14.3	13.3	16.7	18.2	20.5	16.7	14.3		
8								63.9	54.3	9.5	20.2	26.1	19.6	27.8	29.2	12.2	14.3	22.6	30.6	14.3	12.5		
9									56.9	10.0	20.8	25.8	20.2	29.2	21.6	29.7	23.4	24.4	24.3	34.3	12.5		
10										11.1	16.7	20.0	16.7	10.0	27.8	14.4	31.1	19.1	33.3	32.5	16.7		
11											20.8	25.0	26.3	14.1	17.4	52.3	17.4	20.0	17.2	13.6	10.0		
12												63.3	48.5	37.5	31.7	20.0	40.0	5.9	57.3	33.3	25.0		
13													66.7	33.0	43.9	20.7	65.8	14.3	41.0	50.0	45.8		
14														43.3	37.5	19.2	58.3	17.6	57.3	40.0	48.1		
15															34.1	24.9	32.5	23.7	38.6	24.3	25.0		
16																4.2	40.5	31.3	30.1	41.0	34.1		
17																	13.6	15.4	41.1	17.4	9.5		
18																		12.5	48.3	63.3	69.7		
19																			13.6	13.3	15.4		
20																				49.1	31.3		
21																						43.3	
22																							43.3

esterase, peroxidase, phosphoglucose isomerase 세가지 酵素의 同位酵素活性을 폴리아크릴 아마이드 젤 等電點電氣泳動을 利用하여 檢定한 結果는 다음과 같다.

1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 에 의한 잔디의 種子 蛋白質의 pattern 은 差異가 있었고 屬間의 區別은 쉽게 發見할 수 있었다.
2. 폴리아크릴 아마이드 젤 等電點電氣泳動에 의해서 esterase, peroxidase, phosphoglucose isomerase 등 3가지 同位酵素를 調査했다. 그 結果 잔디의 品種區別에 있어서 esterase 가 3가지 酵素中 가장 效果의이었다.
3. 過去에 可視的인 形態의 特性에 根據하여 品種區別을 해왔으나 여기에는 많은 어려움이 있었다. 따라서 電氣泳動法을 分類에 應用한다면 더욱 더 效果的인 잔디 品種區別을 할 수 있을 것이다.

V. 參考文獻

1. Clack, K. W., A. Hussan, K. Bamford and W. Bushuk. 1989. Identification of cultivars of *Agrostis* species by polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins. Proceedings of the 6th International Turfgrass Research Conference. Japanese Society of Turfgrass Science. pp. 121-125.
2. Ferguson, J.M. and D.F. Grabe. 1986. Identification of cultivars of perennial ryegrass by SDS-PAGE of seed proteins. CROP SCIENCE. Vol. 26. pp. 170-176.
3. Hames, B.D. and D. Rickwood. 1981. Gel electrophoresis of proteins: A practical Approach. IRLPRESS. pp. 157-185.
4. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227.: 680-685.
5. Lin Wu, A.H. Harivandi, J.A. Harding and W.B. Davis. 1984. Identification of kentucky bluegrass cultivars with esterase and phosphoglucomutase isoenzyme marks. CROP SCIENCE Vol. 24. pp. 763-768.
6. Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics, Columbia University Press.
7. Osterman, L.A. 1984. Methods of protein and nucleic acid research. Springer-Verlag. pp. 30-101.
8. Payne, R.C. and T. J. Koszykowski. 1983. Electrophoretic differences among field grown plants and cultivars of perennial ryegrass. Assoc. Off. Seed Anal. Newsl. 57: 90-93.
9. Sakai, K. I. and Y. Miyazaki. 1972. Genetic studies in natural populations of forest trees, II) Family analysis: A new method for quantit active genetic studies. SI vae Genetica. 21: 149-154.
10. Scandalios, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plant. Biochem. Genet. 3: 37-79.
11. Scandalios, J.G. 1975. Isoenzymes in development and differentiation. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 225-258.
12. Tanksley, S.D. and C.M. Rick. 1980. Isozymic gene likagemap of tomato: Applications in genetics and breeding. Theo. Appl. Genet. 57: 161-170.
13. Tiselius, A. 1937. Electrophoresis of serum globulin. II. Electrophoretic analysis of normal and immune sera. Biochem. J. 31: 1464-1477.
14. Villamil, C.B., R.W. Duell, D.E. Fairbrothers and J. Sadowski. 1982. Isoelectric focusing of esterase for fine fescue identification, CROP SCIENCE

- Vol. 22. pp. 786-793.
15. Walker, J. M. 1984. Methods in molecular biology Vol. I) Proteins, Humana. pp. 41-56.
 16. Wehner, D.J., J.M. Duich and T.L. Watschke. 1976. Separation of kentucky bluegrass cultivars using peroxidase isozyme banding patterns. CROP SCIENCE Vol. 16. pp. 475-480.
 17. Wilkinson, J.F. and J.B. Beard. 1972. Electrophoretic identification of *Agrostis palustris* and *Poa pratensis* cultivars. CROP SCIENCE Vol. 12. pp. 833-834.
 18. 김기선. 1988. 잔디의 種類, 잔디研究. 제1권 제1호 pp. 42.
 19. 염도익, J.J. Murray and G.R. Bauchan. 1987. 同位酵素分析에 의한 Zoysiagrass의 分類. 韓國園藝學會 論文發表要旨. 5(1): 130-131.
 20. 은무영. 1988. 分析用 폴리아크릴 아마이드 겔 등電點電氣泳動. 植物遺傳工學 Workshop. 農業技術研究所. pp. 7-33.