韓草誌(J. Korean Grassl. Sci.) 11(4) : 199~202, 1991

콩과식물의 잎과 줄기의 Esterase Isozyme Banding Pattern에 관한 연구

李 性 圭

Esterase Isozyme Banding Pattern in Leaf and Stem of Legume Plants

Sung Kyu Lee

Summary

The esterase isozyme of several legume plants were separated and visualized by horizontal starch gel electrophoresis using enzyme-specific staining. Extracts used were prepared from fully expanded young leaf and stem of six legume species which were red clover(*Trifolium pratense* L.), ladino clover(*Trifolium repense* L.), wild white clover(*Trifolium repense* L.), alfalfa(*Medicago sativa* L.), mimosoides(*Cassia mimosoides var nomame Makino*), and amoena(*Vicia amoena Fisch*).

The number of band, Phenotype and staining intensity of esterase isozyme in leaf and stem varies depending on the plant species. However, there are little difference between leaf and stem esterase isozyme in same species except alfalfa. And in the leaf and stem of mimosoides and amoena showed not any esterase(Fig. 2).

Among the examined plants, the highest staining intensity and the rapidest migrating esterase isozyme was Est 1.

I. 서 론

효소 Isozyme은 주어진 基質에 작용하는 한 효소의 다양한 변형으로써 식물의 종과 품종은 물론 同一한 종이나 품종에 있어서도 각 조직에 따라 그 수와 모양이 하나에서 여러개로 나타나며(Macdonald와 Breubacker: 1975) seedling의 部位別(Edwards, 1976), 식물체의 생육단계별(Buschbeck와 Zelmer; 1979)로 많은 차이가 있다.

이와같은 효소 Isozyme의 차이는 식물의 계통발생, 유전자의 좌위등을 밝히고 품종의 개량이나 육종연구에 귀중한 기초자료가 되는 것으로 전분이나 Polyacrylamide gel의 支持媒體를 이용하는 생화학적 분석방법인 전기영동법이 널리 이용되고 있다.

전기영동법에 의한 효소 Isozyme의 수와 모양은 그 식물의 고유한 유전적 표현형으로서 그 식물의 특성의 하나라고 할 수 있으므로 효소 Isozyme의 분석은 그 식물의 유전적 특성을 찾아내는 가장 확실한 방법이 된다.

본 연구는 Ester의 가수분해를 촉매하는 Esterase의 Isozyme Pattern을 찾아내어 식물의 유전과 육종연구에 기초자료를 제공하기 위하여 몇가지 콩과 식물을 대상으로 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 供試材料

본 시험에서 供試된 식물은 Red clover(Trifolium pratense L.), Ladino clover(Trifolium repens L.), Wild white clover(Trifolium repens L.), Alfalfa(Medicago sativa L.), Mimosoides(Cassia mimosoides var. nomame Makino), 그리고 Amoena(Vicia amonea Fish.)의 6種이다.

尙志大學校 農科大學(College of Agriculture, Sangji University, Wonju, 220-130, Korea)

2. 方 法

(1) Esterase Isozyme의 추출

각 식물체의 윗 부분의 연한 잎과 줄기를 채취하여 막자사발로 마쇄하고 여기에 0.05% L-histidine용액을 5~7방울 섞어서 effendorf tube에 넣고 원심분리한 후 냉동보관하였다.

(2) Starch gel의 제조

용량 240ml의 Polyacryl판에 gas burner로 충분히 가열한 12% 전기영동용 Starch용액(Tris-Citric buffer, pH 8.3) 240ml를 부어 넣어 24시간 숙성하였다.

(3) Starch gel 전기영동용 buffer system

전기영동에 사용된 gel buffer는 Tris-Citric buffer (pH 8.3)로 Tris 6.2g, Citric acid 1.6g을 1000ml H_2O에 용해시켜 pH 8.3의 용액을 만들었다. Electrode buffer는 Litium-Borate buffer(pH 8.3)로 Litium hydroxide 1.2g, Boric acid(anhydrous) 11.89g을 1000ml H_2O에 용해하여 pH 8.3인 용액을 만들었다.

(4) 전기영동

Starch gel판에 Origin을 설정하여 6mm의 홈집을 내어 원심분리한 시료의 상층액을 6mm×6mm 크기의 여지로 묻혀서 삽입한 후 electrode buffer 용액을 담은 두 용기에 장치, Origin쪽은 −전극, 전개되는 방향은 +전극을 연결한 후 200V 전압으로 4시간 30분간 영동시켰다.

(5) Isozyme의 염색

4시간 30분간 전기영동한 Starch gel을 둘로 나누어 염색하였다. Esterase의 염색액은 α-Naphthyl acetate (1% aceton: water=1:1) 2ml, Fast Bule RRsalt 40 mg, Phosphate buffer(pH 4.3) 50ml, Phosphate buffer (pH 9.2) 10ml를 40ml H_2O에 혼합한 용액을 사용하였고 염색시간은 4시간 정도로 충분히 발색된 후 사진촬영하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 조직별 Esterase Isozyme의 banding pattern

본 시험에 공시한 콩과식물의 잎과 줄기에서 분리된 Esterase Isozyme의 banding pattern은 Fig. 1과 2에서 보는바와 같다.

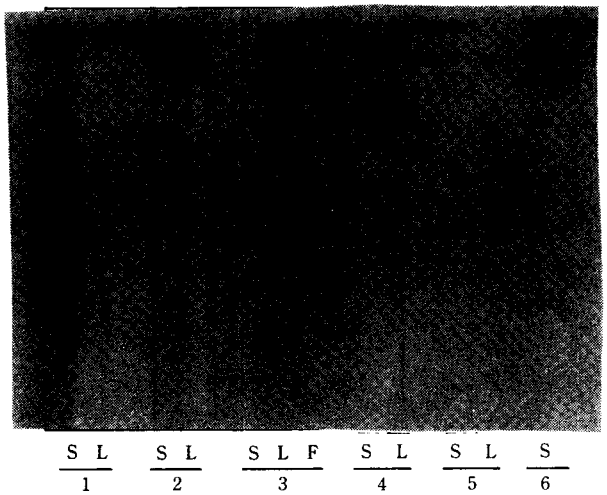

Fig. 1. Starch gel electrophoretic zymograms of leaf and stem esterase isozyme bnanding pattern in legumes.
1: red clover, 2: ladino clover, 3: white clover, 4: alfalfa, 5: mimosoides, 6: amoena, S: stem, L: leaf, F: flower

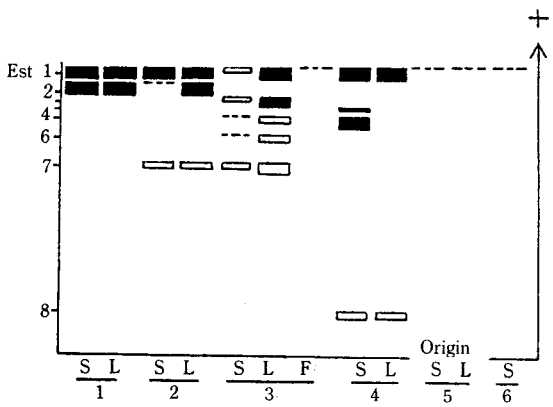

Fig. 2. Diagrams of zymogram expressed for stem and leaf esterase isozyme banding pattern in legume plants.
1: red clover, 2: ladino clover, 3: white clover, 4: alfalfa, 5: mimosoides, 6: amoena, S: stem, L: leaf, F: flower

Fig. 2에서 Esterase Isozyme의 banding pattern은 種은 물론 同一種이라도 잎과 줄기에 따라 차이가 있음을 알 수 있다. Fig. 1을 도식화 한것이 Fig. 2로 Origin에서 가장 빠르게 이동한 band를 Est 1번으로 하여 번호를 정하였다. 여기에서 red clover는 잎과 줄기 모두 Est 1과 2가 같았다.

이와는 달리 ladino clover의 줄기는 Est 1과 minor band인 Est 2, Est 7의 3개, 잎에서는 Est 1과 Est 2 그리고 minor band인 Est 7의 세개로 band 수는 같았으나 Est 2의 모양에서 차이가 있었다.

White clover의 줄기는 Est 1, Est 3, Est 5, Est 6, Est 7의 5개 모두 minor band였으며, 잎에서는 Est 1를 제외한 Est 3, Est 5, Est 6, Est 7이 minor band로 나타났다. 그러나 잎과 줄기의 band 수와 위치는 동일하였다. alfalfa의 줄기는 Est 1, Est 4, Est 5의 3개와 minor band로 Est 8이, 잎에서는 Est 1과 minor band인 Est 8이 있고 Est 4와 Est 5가 없으며 잎과 줄기 모두 Est 8의 출현이 특이하였다. 그러나 white clover의 꽃, 차풀의 잎과 줄기, 갈키나물의 줄기에서는 band가 전혀 나타나지 않았는데 이것은 esterase가 이들 식물에 있어서는 유전적열성으로 작용하기 때문이 아닌가 생각된다.

Wu et al.(1984)은 Kentucky bluegrass 품종의 seedling과 잎에서 그리고 Kahler and Allford(1970)은 Barley 품종의 root나 plumule에서 esterase isozyme banding pattern이 각기 다르게 나타남을 보고 한 바 있는데 이러한 사실들은 한 種의 식물에서 품종의 선발이나 유전적 규명을 위하여 잎, 줄기, 뿌리, 종자, 꽃, 또는 seedling의 각 부위별 Isozyme의 banding pattern을 marker로 이용하는 것이 바람직한 방법이 될 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다.

2. Esterass Isozyme의 활성도

효소의 활성도를 band의 염색강도와 크기로 비교하면 Fig. 1에서 나타난 바와같이 red clover, ladino clover, white clover, alfalfa에서 Est 1이 가장 강하게 표현되었다. Macdonald and Brewbaker(1975)는 옥수수의 胚盤에서 Est 5, Est 6, Est 8과 Est 9번이 활성도가 가장 높게 나타났다고 하였는데 본 시험에서도 조직에 존재하는 Esterase Isozyme에 따라 활성도가 큰 차이를 보이고 있어 효소 Isozyme의 활성도가 식물의 종별, 품종별, 조직의 발육 단계별 특성을 나타내는 하나의 marker가 될 수 있다고 생각된다.

3. Esterase Isozyme의 이동속도

Table 1. Migrating distance of the esterase isozyme in leaf and stem of legumes(cm).

Red clover		Ladino Clover		White clover			Alfalfa		Mimosodes		Amoena
S	L	S	L	S	L	F	S	L	S	L	S
7.3 (1.00)	7.3 (1.00)	7.3 (1.00)	7.3 (1.00)	7.3 (1.00)	7.3 (1.00)	−	7.3 (1.00)	7.3 (1.00)	−	−	−
6.9 (0.95)	6.9 (0.95)		6.9 (0.95)								
			6.4 (0.88)	6.4 (0.88)							
							6.2 (0.85)				
					5.7 (0.78)		5.7 (0.78)				
					5.3 (0.73)						
		4.7 (0.64)	4.7 (0.64)	4.7 (0.64)	4.7 (0.64)						
							1.2 (0.16)	1.2 (0.16)			

S; stem, L; leaf, F; flower, ( ); Rf-vale

전기영동에 의한 단백질이나 효소의 분리는 전하, 분자의 크기 또는 구조에 따라 이동속도가 다르기 때문에 Isozyme의 분별에 중요한 기준이 된다. 표 1은 본 시험에 공시된 콩과식물의 部位別 Esterase Isozyme의 이동거리와 이를 Rf(Rate of flow)로 환산한 것인데 각 조직의 Rf는 Est 1이 1.00으로 가장 빠른 속도를 나타냈고 Est 2는 0.95, Est 3은 0.88, Est 4는 0.85, Est 5는 0.78, Est 6은 0.73, Est 7은 0.64, Est 8은 0.16으로 나타났는데 李(1991)의 콩과식물의 seedling에서 돌콩의 Est 1은 1.00, Est 2는 0.95, Est 3은 0.88로 본 시험의 Est 1, 2, 3과 같았다.

Jaaska(1983)에 의하면 밀의 초엽에서 분리한 Est A의 이동속도가 4.3cm로 가장 빠르며 Est C는 2.6 cm로 가장 느리게 이동된다고 하였는데 이처럼 Isozyme의 이동속도가 다른것은 조직내의 Esterase Isozyme의 다양성을 나타내는 것으로써 콩과식물의 Esterase Isozyme의 Rf는 주로 Est 1, Est 2, Est 3에 관련된 유전적 특성을 고찰하는 것이 효과적일 것으로 생각된다.

Ⅳ. 적 요

Red clover, ladino clover, white clover, alfalfa, 차풀 그리고 갈키나물등 6種의 콩과식물에서 잎과 줄기의 Esterase Isozyme를 추출하여 starch gel 전기영동법으로 분리한 후 염색하여 種間 차이점을 고찰하였다.

供試된 식물의 Esterase Isozyme의 band수, 염색강도, 이동속도는 種間에 차이가 있었다. 그러나 同一種에 있어서는 alfalfa를 제외하고는 잎과 줄기사이에 band의 數는 차이가 없었으며 차풀과 갈키나물에서는 전혀 나타나지 않았다.(Fig. 2).

Esterase Isozyme의 염색강도와 이동속도는 Est 1이 가장 강하고 빨랐다.

Ⅴ. 引用文獻

1. Buschbeck, R. and Zelmer, I. 1979. Veränderungen von protein und Isozymer-Muster in Winterrogen-Karyopsin während der Reifung, Wiss Z. Pad Hoch Schule "Liselotte Hermann" Gestrow, DDR 1: 59-79.
2. Edwards, K. J. R. 1976. Natural selection and biochemical properties of polymorphic esterase in barley. In H, Gaul(ed, Barley Genetics III. Thiemig, Muchen, 23-39.
3. Jaaska, V. 1975. Evolutionary variation of enzymes and phylogenetic relationships in the genus, Secale I Es ti NSV TA Toimet, Biologia 24(3): 181-198(In Russian).
4. Kahler, A. L., and R. W. Allard. 1970. Genetics of isozyme variants in barley. I. Esterase, Crop sci. 10: 444-448.
5. Macdonald, T. and Brewbacker, J. L. 1975. Isozyme polymorphism in flowering plant. V. The isoesterase of maize: Tissue and substrate specificities and responses to chemical inhibitors. Hwaii Agri. Expt. Stn. Tech. Bull. 89: 24pp.
6. Scandalios, J. G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: Review, Biochemical Genetics. 3: 37-79.
7. Wu, Lin, Ali Harivandi, J. A. Harding and W. B. Davis. 1984. Identfication of Kentucky bluegrass cultivars with esterase and phosphoglucomutase isozyme markers. Crop Sci. 24: 763-768.
8. 李性圭. 1991. 콩과식물의 Seedling Esterase Isozyme Banding Pattern에 관한 연구. 한초지 11(3): 158-161.