

포플러類의 植物體와 미토콘드리아의 同位酵素 分析에 依한 몇 同位酵素의 細胞小器管的 位置^{1*}

柳長發² · 盧銀雲³ · 孫斗植⁴

Subcellular Location of Five Isozymes in *Populus* Species by Isozyme Analysis with Whole Plant and Mitochondria

Jang Bal Ryu, Eun Woon Noh, Doo Sik Son

要 約

포플러류의 植物體와 그 植物體에서 分離한 미토콘드리아를 同位酵素 分析하여, 각 同位酵素의 細胞內 位置를 糾明하였다. 分析한 同位酵素는 ADH, 6-PGD, MDH, PGI와 Diaphorase였다.

ADH는 細胞質에 있으며, 核內에 있는 한개의 遺傳子座에 依해 支配되는 것으로 나타났고, 6-PGD는 mitochondria에 있는 것으로 나타났다. MDH는 細胞質에 3개의 band, mitochondria에 4개의 band가 있는 것으로 나타났다. PGI는 細胞質에 3개의 band가 있는 듯하며, Diaphorase는 mitochondria에 1개의 band, 細胞質에 2개의 band가 있는 것으로 나타났다. 細胞質에 있는 두개의 band는 核內에 있는 1개의 遺傳子座에 있는 遺傳子에 依해 支配되는 것으로 판단되었다.

ABSTRACT

Subcellular location of five isozymes in *Populus* species was studied by isozyme analysis with plant and mitochondria. Isozymes analyzed were ADH, 6-PGD, MDH, PGI, and Diaphorase.

ADH seems to be cytosolic isozyme encoded with nuclear genes at one locus, while 6-PGD seems to be mitochondrial one. MDH showed three bands in cytosol and four other bands in mitochondria. Three cytosolic bands were showed for PGI. Diaphorase showed one mitochondrial band and two cytosolic bands which seemed to be encoded by nuclear genes at one locus.

Key words : Subcellular location, isozyme, mitochondria, *Populus* spp.

緒 論

同位酵素 分析은 林木의 遺傳 育種 研究에 널리 利用되고 있지만^{1,5,7,23)}, 수십만개의 遺傳子中 探知 可能한 同位酵素 수는 아직 50種 미만이다. 더우 기 樹種別로 보면 分析 可能한 同位酵素 수는 더

욱 줄어들며²³⁾, 同位酵素 分析 結果 나타난 모든 band의 遺傳的 解釋이 可能한 것도 아니다.

특히 倍數體의 存在와 細胞小器官(subcellular organelle)에 있는 遺傳子의 존재는 同位酵素 分析 結果의 遺傳的 解釋을 어렵게 하고 있다. 왜냐 하면 細胞小器官인 미토콘드리아(mitochondria)와 葉綠體(chloroplast: 植物에만 해당)에는

¹ 接受 1991年 1月 30日 Received on January 30, 1991.

² 大邱大學校 林學科 Dept. of Forestry, Taegu University, Taegu, Korea.

³ University of New Hampshire, USA.

⁴ 慶北大學校 林學科 Dept. of Forestry, Kyungpook National University, Taegu, Korea.

* 이 論文은 1988-1989年度 한국과학재단의 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

DNA가 있으며, 이들의 遺傳은 核內 染色體 上의 遺傳子의 遺傳, 소위 Mendel식 遺傳樣式과는 다르므로^{13, 15, 16, 17, 29)}, 細胞質遺傳이라고 불리며, 따라서 그 해석도 어려워지기 때문이다.

最近에 細胞小器官의 分離 技術이 開發되었으므로^{9, 11, 13)}, 분리된 細胞小器官別로 同位酵素를 分析하면, 각 同位酵素의 位置가 밝혀진다^{17, 29)}, 林木에 대한 이러한 細胞小器官의 分離 등 技術의 응용은 여러가지 이유로 지체되었다. 林木을 연구하는 대부분의 학자들에게 이런 일은 아직 다소 생소한 분야이며, 이런 技術을 가진 학자에게는 林木이 너무 크고 다루기 어려운 對象이기 때문일 것이다. 또한 林木에 있어서 問題點은 긴 生長期間과 높은 含量의 phenol성 物質 때문에, 순수한 mitochondria와 葉綠體의 分離가 어려웠기 때문이었다.

본 研究는 試驗官에서 植物을 길러냄으로써 phenol성 物質의 生産을 最小化하면서, 兩親과 次代를 알고 있는 포플러의 器官別 同位酵素 分析을 통해, 林木의 同位酵素 研究의 새로운 方法을 찾으려는 目的으로 試圖되었다.

材料 및 方法

본 研究에는 은백양(*Populus alba*) 2클론, 수원사시(*P. glandulosa*) 1클론 및 그들의 F₁ 雜種인 현사시(*P. alba* × *P. glandulosa*) 3클론이 使用되었다. 은백양은 옛 京畿 林業試驗場(안양) 위치의 2본을 사용하였고, 수원사시는 서울大學校 農科大學(水原) 醫務室 앞의 것이 사용되었다. 현사시는 64-6-44(안양 은백양과 서울대 농대 의무실 앞의 수원사시 사이의 F₁)과 장성8(근원은 알수 없으나 1979-1980년에 選拔한 현사시)이 資料로 사용되었다.

은백양은 外國에서 導入된 樹種으로 암나무뿐이며, 수원사시는 水原의 農村振興廳 뒤 여기산에 여러본이 있으나, 그간의 研究 結果 여기산의 수원사시와 서울대 농대 의무실 앞의 수원사시는 모두 동일한 클론으로 알려졌고²⁶⁾, 아마 現存하는 몇나무에 불과한 수원사시는 모두 同一한 클론으로 推定되는바, 實驗材料로는 한나무로 制限시켰다. 현사시는 人工交雜種으로 오래전부터 全國에 栽植되고 있으나, 兩親의 記錄이 남아있는 경우는

64-6-44와 같이 林木育種研究所에서 保存하고 있는 몇클론 뿐이다. 위의 樹木中 兩親으로 쓰인 나무는 樹齡이 30년이 넘었으므로, 앞으로 언제 伐採될지 모르기 때문에, 본 實驗은 클론을 保存하는 의미에서도 뜻이 있다고 생각된다.

87년 6월 위의 모든 樹木에서 當年生 가지를 採取하여 組織培養을 하였다. 材料消毒 및 培養은 Noh¹⁹⁾의 方法을 따랐다. 試驗官에서 植物이 4cm 정도 자랐을 때 클론별로 일부는 植物體 전체로, 일부는 mitochondria를 抽出하여 同位酵素를 分析하였다. 電氣泳動은 Clayton과 Tretiak¹⁴⁾과, Ryu²²⁾의 方法으로 하였고, O'Malley 등¹⁹⁾의 方法으로 染色시켰다.

Mitochondria의 抽出은 Mutschler와 Bush¹³⁾의 方法을 다소 변경시켜 사용하였다. 細胞內의 starch 축적을 소모시키기 위하여 충분히 자란 植物體가 들어있는 試驗官을 暗室로 옮겨 4-5일간 방치시켰다. 그후 植物體를 끄낸후 mortar와 pestle로 粉碎시켰다. 이때 사용된 buffer는 4종류로 다음과 같으며, 모두 pH 7.5로 고정시켜 사용하였다.

Buffer A : 0.4M sucrose

0.05M Tris

5mM EDTA

0.1% BSA

4mM-mercaptoethanol(autoclave 후 첨가)

Buffer B : 0.4M sucrose

0.05M Tris

10mM MgCl₂

Buffer C : 0.6M sucrose

0.05M Tris

20mM EDTA

Buffer D : 50mM Tris

20mM EDTA

Mitochondria의 抽出 過程은 다음과 같다.

1. Buffer A를 첨가하여 mortar과 pestle을 이용하여 粉碎한다.
2. 이것을 4겹의 가제(cheese cloth)로 거른후 다시 2겹의 miracloth로 거른다.
3. 1,000g로 10분간 遠心分離한다.
4. 찌꺼기(pellet)를 버리고 上層液을 새 튜브에 옮겨, 다시 15,900에서 10분간 遠心分離한다.

5. 上層液을 버리고 바닥의 pellet을 buffer B로 resuspend 시킨 다음 1,000g로 다시 10분간 원심분리 한다.
6. Pellet을 버리고 上層液을 buffer C가 반쯤 차 있는 튜브에 조금씩 떨어뜨려 올려 놓는다 (Buffer C와 B의 濃度差 때문에 두 溶液은 섞이지 않는다).
7. 이것을 12,000g에서 20분간 원심분리 한다.
8. 上層液을 버리고 pellet을 buffer C로 resuspend 시킨다.
9. 15,000g로 10분간 遠心分離한다.
10. 상층액을 버리고 pellet을 buffer D로 resuspend 시킨다. Buffer D는 3ml 이내로 이용하고 Eppendorf 튜브에 mitochondria suspension을 1ml씩 담은 후 -80°C에 보존하며 實驗에 사용한다.

結果 및 考察

1. ADH isozyme

Alcohol dehydrogenase(ADH) isozyme의 경우 植物體에서는 band가 나타나고, mitochondria에서는 나타나지 않았다(Fig. 1). 植物體로 分析하였을 때 은백양에서는 上端의 먼저 移動하는 band만 나타나고, 수원사시에서는 下端의 느리게 移動하는 band만 나타난 반면, 그들간의 F₁ 雜種 3클론에서는 모두 上下 두 band가 나타나 典型的인 Mendel식 遺傳樣式을 보였다. 따라서 ADH의 遺傳子座는 核內的 染色體上에 있고, 이 酵素는 미토콘드리아에 있지않고 細胞質에 있는 것으로 판단된다.

이 同位酵素의 遺傳은 본 樹種들에서 著者들에

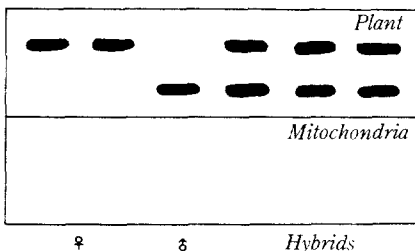


Fig. 1. Alcohol dehydrogenase(ADH) isozyme pattern in *Populus alba*(♀), *P. glandulosa*(♂) and their hybrids.

의하여 보고되었는데²⁶⁾, 그때는 雜種에서 모두 3개씩의 band가 나타났으나, 이번은 두개씩만 나타났다. 아마 實驗方法의 미세한 차이에 의한 것으로 推定되나, 雜種에서 band가 두개씩 나타나면 單量體(monomer)로 解析되고, 3개씩 나타나면 二量體(dimer)로 解析되니까, 이 酵素의 構造를 밝히기 위해서는 더욱 세밀한 實驗이 요구된다.

2. 6-PGD isozyme

6-phosphoglucose dehydrogenase(6-PGD)의 경우, 樹種에 관계없이 植物體에서도 mitochondria에서도 同一 위치에 하나의 band만 관찰되었으므로 (Fig. 2), 이 酵素는 mitochondria에 位置한 것으로 판단된다.

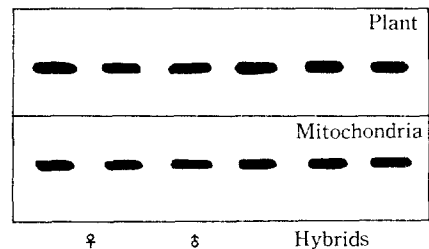


Fig. 2. 6-phosphoglucose dehydrogenase(6-PGD) isozyme pattern in *Populus alba*(♀), *P. glandulosa*(♂) and their hybrids.

*Populus tremuloides*에서는 이 同位酵素에서 두개의 遺傳子座가 보고되었으며¹⁰⁾, 하나의 遺傳子座에서는 變異가 없었고, 다른 하나의 遺傳子座에서는 두개의 allele이 있다고 보고되었다. 이 樹種에서 變異가 없는 그 band와, *Pinus strobus*에서 이 同位酵素에서 變異가 없던 band도²²⁾ mitochondria에 位置한 것일 가능성이 있다고 보여진다.

3. MDH isozyme

Malate dehydrogenase (MDH)의 경우는 植物體로 分析하였을 때는 모두 7개씩의 band를 보였고, mitochondria로 分析하였을 때는 band 1, 2, 3, 7번의 4개씩의 band를 보였으므로(Fig. 3), 이 同位酵素는 細胞質에도 있고, 미토콘드리아에도 있는 것으로 보인다.

MDH는 植物體에서 細胞質과 미토콘드리아에

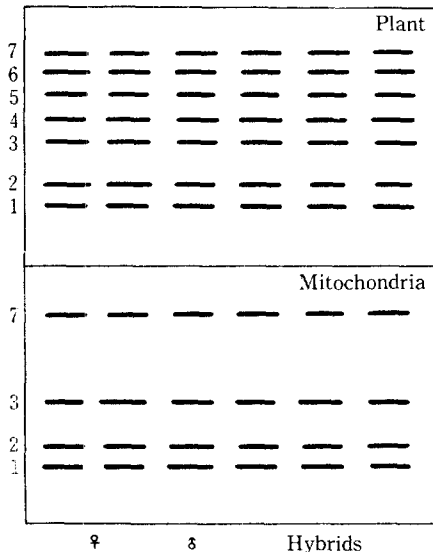


Fig. 3. Malate dehydrogenase(MDH) isozyme pattern in *Populus alba*(♀), *P. glandulosa*(♂) and their hybrids.

있다고 이미 보고되었으며^{17,28)}, 同位酵素 分析 결과의 band 形態도 복잡하다²⁴⁾, 그러나 본 實驗에서처럼 band를 位置別로 나눌 수 있으면 遺傳樣式도 지금까지보다는 훨씬 쉽게 밝힐 수 있을 것이다. 본 實驗에서는 양친과 雜種에서 전혀 變異를 보이지 않았으므로 遺傳樣式的 추정은 불가능하였다.

4. PGI isozyme

Phosphoglucose isomerase(PGI)의 경우, 植物體에서는 樹種別 差異없이 3개씩의 band가 나타

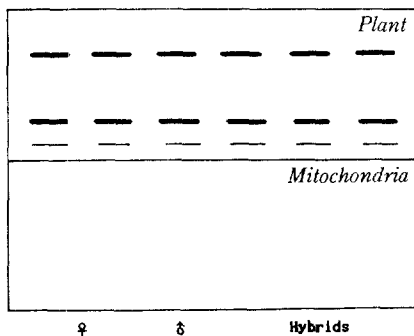


Fig. 4. Phosphoglucose isomerase isozyme pattern in *Populus alba*(♀), *P. glandulosa*(♂) and their hybrids.

났으며, mitochondria에서는 band가 전혀 나타나지 않았다(Fig. 4). 따라서 PGI는 ADH와 같이 mitochondria에는 없고 細胞質에 있는 것으로 판단된다.

PGI는 *Populus tremuloides*에서 두개의 遺傳子座로 보고되었으며¹⁰⁾, 이 酵素는 몇 植物에서 葉綠體에 있는 것으로 밝혀졌다^{9,29)}. 본 實驗에서는 葉綠體를 따로 分離하지 않았으므로, 細胞質에 있는지 葉綠體에 있는지 확인할 수 없었다.

5. Dia isozyme

Diaphorase의 경우 *Populus alba*와 *P. glandulosa*에서 각각 두개씩의 band가 나타났으나, 하나는 위치가 같고 다른 하나는 달랐으며, 이들 사이의 雜種인 현사시 3클론에서는 모두 3개씩의 band가 나타났다(Fig. 5). Mitochondria의 경우 모든 樹種에서 下端의 느리게 이동하는 band가 관찰되었기 때문에, 이 band는 mitochondria에 있는 酵素로 판단된다. 그러므로 植物體 전체의 band에서 이 band를 제외하면, 남은 두 band의 모양과 解析은 앞서의 ADH경우와 같아진다.

Diaphorase는 *Populus trichocarpa*에서 하나의 遺傳子座에 두개의 allele이 있는 것으로 보고되었으며³⁰⁾, 소나무에서는 두개의 遺傳子座에 각각 4개와 2개의 allele이 있는 것으로 보고되었다¹⁴⁾.

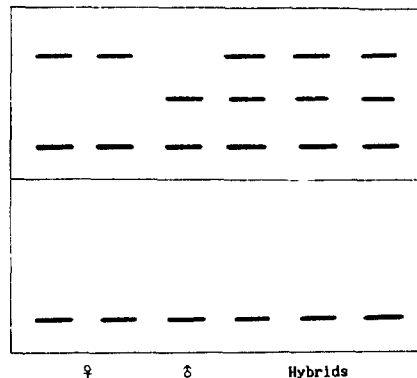


Fig. 5. Diaphorase isozyme pattern in *Populus alba*(♀), *P. glandulosa*(♂) and their hybrids.

이상 다섯 종류의 同位酵素의 細胞小器官의 位置를 밝혔다. 이렇게 位置가 밝혀지면 앞으로의 同位酵素의 研究에 도움이 될 것이며, 지금까지 遺傳的 解析이 어려웠던 복잡한 band도 解析이 훨씬 쉬워질 것이다.

Mitochondria에 있는 酵素라고 하여 mitochondria에 있는 遺傳子에 依해 만들어지는 것은 아니다⁷⁾. Mitochondria와 chloroplast에 있는 遺傳子에 依한 同位酵素의 研究는 아직 없는 듯하다^(7,29), 그러나 兩 細胞小器官의 DNA를 分離하여 制限酵素로 절단하여서 이들 DNA의 遺傳 細胞質 遺傳을 밝힌 論文은 다소있다^{15,16,17,29)}.

本 著者들도 mitochondria와 chloroplast의 DNA 分離와 制限酵素에 依한 절단, 이들간의 비교를 시도하였다. 그러나 本 實驗에서는 兩親의 수도 적고, 그 兩親의 遺傳의 變異가 거의 없었으며, 次代의 수도 적어 細胞質 遺傳을 論하기는 무리였다. 그러나 本 研究로 앞으로의 同位酵素 研究와 細胞質 遺傳 研究에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

引 用 文 獻

1. Adams, W.T. 1979. Applying isozyme analysis in tree-breeding programs. Proc. Isozymes of North American forest trees and forest insects. 60-64. July 27, Berkeley, California, USA.
2. Cheliak, W.M. and B.P. Dancik. 1982. Genetic diversity of natural populations of a clone-forming tree *Populus tremuloides*. Can. J. Genet. Cytol. 24 : 611-616.
3. Cheliak, W.M. and J.A. Pitel. 1984. Electrophoretic identification of clones in trembling aspen. Can. J. For. Res. 14 : 740-743.
4. Clayton, J.W. and D.N. Tretiak. 1972. Aminocitrate buffer for pH control in starch gel electrophoresis. J. Fish. Res. Board. Can. 29 : 1169-1172.
5. Conkle, M.T. and W.T. Adams. 1977. Use of isozyme techniques in forest genetics research. Proc. Northeastern Forest Tree Imp. Conf. 25 : 219-226.
6. Falkenhagen, E.R. 1985. Isozyme studies in provenance research of forest trees. Theor. Appl. Genet. 69 : 335-347.
7. Feret P.P. 1979. Isozymes for tree improvement. Proc. Northeastern Forest Tree Imp. Conf. 26 : 102-120.

8. Feret, P.P. and F. Bergmann. 1976. Gel electrophoresis of proteins and enzymes. In : Modern Methods in Forest Genetics(ed. Miksche JP). Springer : 49-77.
9. Gottlieb, L.D. and N.F. Weeden. 1981. Correlation between subcellular location and phosphoglucose isomerase variability. Evol. 35 : 1019-1022.
10. Hyun, J.O. 1984. Inheritance of isozyme in root tips of trembling aspen (*Populus tremuloides* M.). J. Korean For. Soc. 64 : 20-25.
11. Lumaret, R. 1986. Doubled duplication of the structural gene for cytosolic phosphoglucose isomerase in the *Dactylis glomerata* L. polyploid complex. Mol. Biol. Evol. 3 : 499-521.
12. Mitton, J.B., Y.B. Linhart, K.B. Sturgeon, and J.L. Hamrick. 1979. Allozyme polymorphism detected in mature needle tissue of ponderosa pine. J. Hered. 70 : 86-89.
13. Mutschler, M.A. and C.N. Bush. 1987. Mitochondrial plasmids in related cultivars of crookneck and stable and unstable butternut squash. Theor. Appl. Genet. 75 : 211-216.
14. Na'iem, M., Y. Tsumura, K. Uchida, T. Nakamura, S. Shimizu, and K. Ohba. 1989. Inheritance of isozyme variants of megagametophyte in Japanese red pine. J. Jpn. For. Soc. 71 : 425-434.
15. Neale, D.B., K.A. Marshall, and R.R. Sederoff. 1989. Chloroplast and mitochondrial DNA are paternally inherited in *Sequoia sempervirens*. D. Don Endl. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 86 : 9347-9349.
16. Neale, D.B. and R.R. Sederoff. 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. Theor. Appl. Genet. 77 : 212-216.
17. Newton, K.J. 1983. Genetics of mitochondrial isozymes. In : Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Tanksley SD and TJ Orton (ed.) Elsevier Science publishers, B. V. Amsterdam. pp : 157-174.
18. Noh, E.W. 1987. Tissue culture and genetic transformation of forest trees. MS thesis, Uni-

- versity of New Hampshire, USA. 143pp.
19. O'Malley, D.M., N.C. Wheeler, and R.P. Guries. 1980. A manual for starch gel electrophoresis. Staff paper series 2. College of Agri. and Life Sci., Univ. of Wisconsin, USA. 16pp.
 20. Park, Y.G. 1977. Genetic studies in natural populations of *Pinus densiflora*. Res. Rep. Inst. For. Genet. Korea, 13 : 7-80.
 21. Rajora, O.P. and L. Zsuffa. 1986. Sporophytic and gametophytic gene expression in *Populus deltoides* Marsh., *P. nigra* L. and *P. maximowiczii* Henry. Can. J. Genet. Cytol. 28 : 476-482.
 22. Ryu, J.B. 1982. Genetic structure of *Pinus strobus* L. based on foliar isozymes from 27 provenances. Ph. D. thesis, Univ. New Hampshire, USA. 133pp.
 23. Ryu, J.B. 1988. Tree isozyme studies in Korea. J. Agr. Sci. Taegu Univ. 2 : 19-33.
 24. Ryu, J.B and C.S. Na. 1987. Allozyme analysis of five isozymes in megagametophytes of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). J. Natural Sci. Taegu Univ. 4 : 171-176.
 25. Scandalios, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants : a review. Biochemical Genetics, 3 : 37-79.
 26. Son, D.S. and S.H. Joo. 1985. Inheritance of four isozymes (GOT, ACP, MDH, and ADH) in *Populus alba* x *P. glandulosa* F1 hybrids. J. of Korean For. Soc. 71 : 90-98.
 27. Strauss, S.H. and W.J. Libby. 1987. Allozyme heterosis in radiata pine is poorly explained by overdominance. Am. Nat. 130 : 879-890.
 28. Ting, I.P., I. Fuhr, R. Curry, and W.C. Zochsche. 1975. Malate dehydrogenase isozymes in plants : preparation, properties, and biological significance. In : Isozymes II. Physiological Function (ed. CL Markert). 369-384.
 29. Weeden, N.F. 1983. Plastid isozymes. In : Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. Tanksley SD and TJ Orton (ed.) Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam. pp : 139-156.
 30. Weber, J.C. and R.F. Stettler. 1981. Isozyme variation among ten populations of *Populus trichocarpa* Torr. et Gray in the Pacific Northwest. Silvae Genetica 3 : 82-87.