

# 야생 콩과식물의 Esterase Isozyme Banding Pattern에 관한 연구

이 성 규

## Esterase Isozyme Banding Pattern in Wild Legume Plants

Sung Kyu Lee

### Summary

Starch gel electrophoresis was used to examine the banding pattern of Esterase isozyme in the leaf, root-nodule and seedling of four wild legume species, *Trifolium repense*, *Glycine soja*, *Phaseolus nipponensis* and *Vigna vexillata*.

The number of band, enzyme activity and migrating rate of esterase isozyme varies depending on the species and tissues of legume plants. The isozyme banding pattern in the cotyledon and radicle of *T. repense* showed same pattern, however, the number of band were variable among the cotyledon of *G. soja*, *P. nipponensis* and *V. vexillata*, respectively.

Est-1 in the leaf of *G. soja*, *V. vexillata*, root-nodule of *G. soja* and seedling of *V. vexillata* expressed the highest enzyme activity.

The Est-1 showed the rapidest migrating rate among the isozymes.

### I. 서 론

전기영동에 의한 효소 Isozyme의 분리기술은 생물의 계통분류, 진화, 교배체계 등을 밝히는 유용한 방법으로 근래에는 농축산분야에서 품종선발과 개량에 필요한 유전적인 경제형질을 찾아내어 새로운 품종의 개량과 육종에 널리 이용하고 있다.

효소 Isozyme은 생물의 종이나 품종에 따라 특이한 banding pattern을 갖고 있을 뿐만 아니라 조직의 종류(Macdonald and Brewbacker, 1975)나 생육단계(Buschbeck and Zelmer, 1979)에 따라서 그 식물의 고유한 유전적 특징을 표현하는 다양한 변이를 나타내기 때문에 유전적 marker로 이용한다.

본 연구는 한국에 자생하는 야생 콩과식물을 대상으로 잎, 뿌리혹, seedling의 떡잎과 유근의 Esterase Isozyme Banding Pattern을 비교함으로써 야생 콩과식물을 사료작물로 개량 및 육종하는데 필요한 기초 자료를 얻고자 하였다.

### II. 재료 및 방법

#### 1. 재 료

본 시험에 사용된 재료는 한국에 자생하는 야생콩과식물로 white clover(*Trifolium repense* L.), 돌콩(*Glycine soja* S. and Z.), 새팥(*Phaseolus nipponensis* Ohwi), 들동부(*Vigna vexillata* var *tsusimensis* Matsumura) 등의 4종 이었다.

#### 2. 방 법

##### 1) 시료의 준비

잎은 충분히 자란 잎의 연한 부분을, 잎을 채취하는 같은 시기에 뿌리에 붙어있는 뿌리혹을 채취하여 증류수로 깨끗이 씻은 후 수분을 제거하였다. 종자는 18~20℃의 incubater 안에서 5일간(120시간) 발아시켜 얻은 seedling을 떡잎과 유근으로 나누었다. 이상의 각 재료는 각각 0.05% L-histidine를 5~7방울씩 섞어서 막자사발로 마쇄하여 eppendorf tube에 넣고 원심분리한 후 상등액을 사용하였다.

##### 2) Starch gel의 제조

전기영동용 starch를 Tris-Citric gel buffer (pH 8.3)에 용해시켜 13% 용액을 만들어 충분히 가열한 후 용량 240ml의 poly acryl판에 부어서 식혀 하루 밤 숙성하였다.

### 3) Buffer system

Buffer system은 Scandalios(1969)의 방법을 사용하였는데 gel buffer는 Tris-Citric buffer(pH 8.3)로

Tris	6.2g
Citric acid	1.6g
H <sub>2</sub> O	1000ml

Electrode buffer는 Lithium-Borate buffer (pH 8.3)로

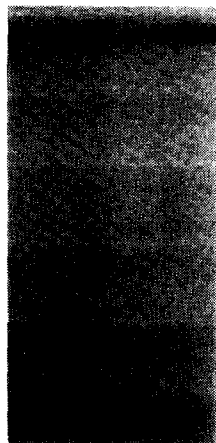
Lithium hydroxide	1.2g
Boric acid(anhydrous)	11.89g
H <sub>2</sub> O	1000ml

이었다.

### 4) 전기영동

Starch gel판에 origin을 설정하고 6mm 크기의 홈을 낸 후 원심분리한 시료의 상층액을 6mm × 6mm의 여지에 묻혀서 홈에 삽입하였다.

Electrode buffer는 두 개의 acryl 용기에 나누고, gel판의 origin쪽은 -전극을, 전개되는 방향은 +전극을 연결하고 350v 전압으로 영동거리가 10cm될 때까지 전개하였다.



T G P V

T: *T. repense*, G: *G. soja*, P: *P. nipponensis*, V: *V. vexillata*, O: Origin

### 5) Isozyme의 염색

전개된 거리가 10cm 되었을 때 전원을 제거하고 starch gel을 acryl판에서 떼어낸 후 세로로 둘로 나누어 절단된 면을 염색하였다. esterase의 염색은 Scandalios (1969) 방법을 사용하였는데 염색액은 a-Naphthyl acetate (1% acetone: water = 1:1) 2ml, Fast Blue RR salt 40mg, Phosphate buffer (pH 4.3) 50ml, Phosphate buffer (pH 9.2) 10ml를 40ml H<sub>2</sub>O에 혼합한 용액으로 4시간 이상 충분히 발색하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. Esterase Isozyme의 Banding Pattern

#### 1) 잎

white clover, 돌콩, 새팥, 돌동부의 잎에서 분리된 esterase isozyme의 banding pattern은 Fig. 1과 같다.

Fig. 1은 분리된 전체 band를 origin에서 가장 빠르게 이동한 band의 순서로 번호를 정한 것으로 white clover, 돌콩, 새팥의 잎은 Est-1을 각각 1개씩 보이고 있다. 그러나 돌동부의 잎은 Est-1 이 외에 minor band인 Est-3과 Est-6을 더 갖고 있었다. Lee(1991b)에 의하면 red clover는 Est-1과 Est-2의 2개, ladino

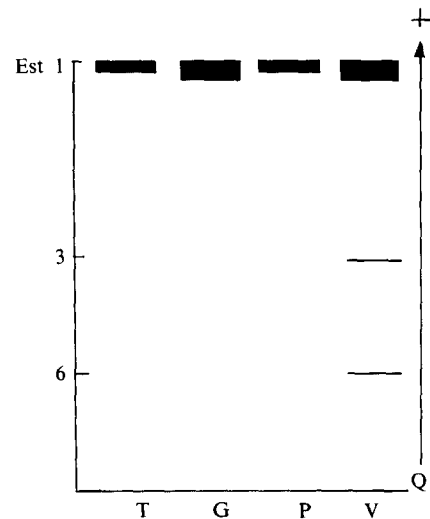


Fig. 1. Starch gel electrophoretic zymograms(a) and diagrams(b) of leaf esterase isozyme banding pattern.

clover는 Est-1과 Est-2 두개와 minor band Est-7 한개, white clover는 Est-1과 minor band Est-3, Est-5, Est-6, Est-7의 4개, alfalfa는 Est-1과 minor band Est-8 한개씩을 갖고 있다고 하였는데, 본 시험에 사용된 시료와는 많은 차이가 있다.

Wu et al. (1984)은 Kentucky bluegrass 품종의 seedling과 잎에서 그리고 Kahler and Allard(1970)는 Barley 품종의 뿌리와 plumule에서 esterase isozyme의 banding pattern이 각각 차이가 있음을 보고한 바 있는데 이것은 식물의 종이나 품종이 다르거나 또는 종이 같더라도 조직의 종류에 따라 생화학 반응을 촉매하는 효소의 종류도 다르다는 것을 의미한다.

그리고 white clover의 잎에서 Lee(1991)의 보고와는 달리 Est-1 한개만 분리된 것은 본 시험에 사용된 white clover의 계통이 다르기 때문에 나타난 차이가 아닌가 생각된다.

## 2) 뿌리혹

뿌리혹의 Esterase Isozyme은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 White clover, 돌콩, 돌동부는 각각 한개의 Est-1이 있으나 새팍의 뿌리혹에서는 band가 나타나지 않았다.

콩과식물의 뿌리혹은 잎이나 줄기의 세포와는

달리 뿌리혹 bacteria에 의해 만들어진 특수한 조직으로써 뿌리세포의 효소를 지배하는 동일한 유전자를 갖고 있다. 그러므로 뿌리혹의 esterase isozyme은 다른 조직과 마찬가지로 효소 isozyme연구에 이용될 수 있을 것이다.

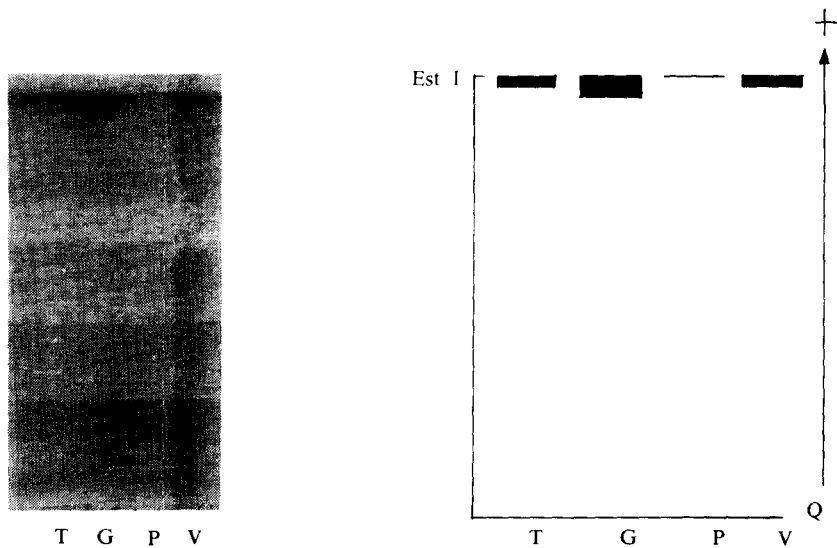
본 시험에서 뿌리혹의 esterase isozyme band가 잎에서와 같이 Est-1 한개씩 나타나 잎과 같은 pattern을 보이고 있으나 새팍의 뿌리혹에서는 Est-1이 나타나지 않았다.

Fottrell(1968)과 Ferrer-Monge(1973)는 대두의 뿌리혹과 떡잎에서는 -극에서 3개의 band가 분리되었으나 +극에서는 뿌리혹에서 5개의 band가 분리되었다고 하였는데 본 시험의 결과와는 많은 차이가 있었다. 이것은 식물의 생육기간에 따라 뿌리혹의 esterase zymogram이 변하고(Fottrell, 1968), 시험에 사용한 식물의 종이 각각 다르기 때문으로 생각된다.

## 3) Seedling의 떡잎

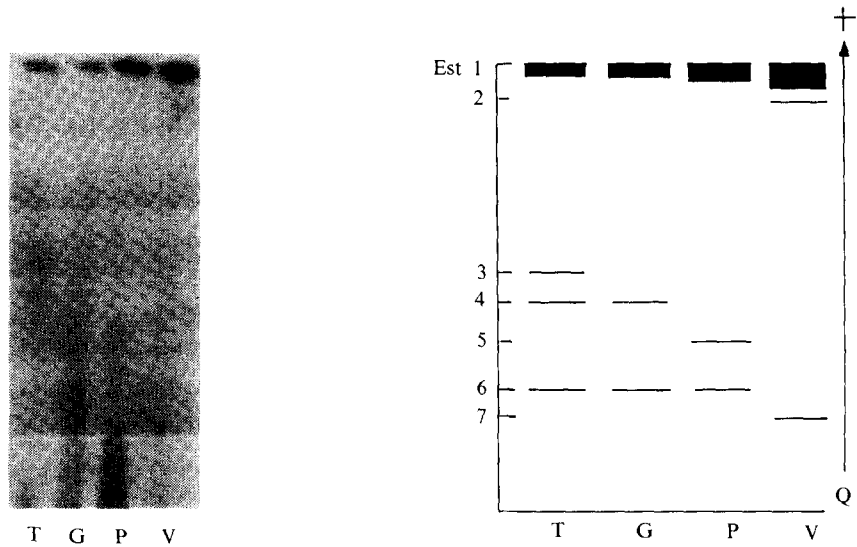
시료의 종자를 5일간 incubater(18~20℃)안에서 발아시켜 얻은 seedling의 떡잎에서 분리한 esterase isozyme의 banding pattern은 Fig. 3과 같다.

떡잎의 esterase isozyme banding pattern은 잎과 뿌리혹의 경우와는 달리 다양하게 나타났다. white



T: *T. repense*, G: *G. soja*, P: *P. nipponensis*, V: *V. vexillata*, O: Origin

Fig. 2. Starch gel electrophoretic zymograms(a) and diagrams(b) of root-nodule esterase isozyme banding pattern in legume plant.



T: *T. repense*, G: *G. soja*, P: *P. nipponensis*, V: *V. vexillata*, O: Origin

Fig. 3. Starch gel electrophoretic zymograms(a) and diagrams(b) of esterase isozyme banding pattern in cotyledon of legume seedling.

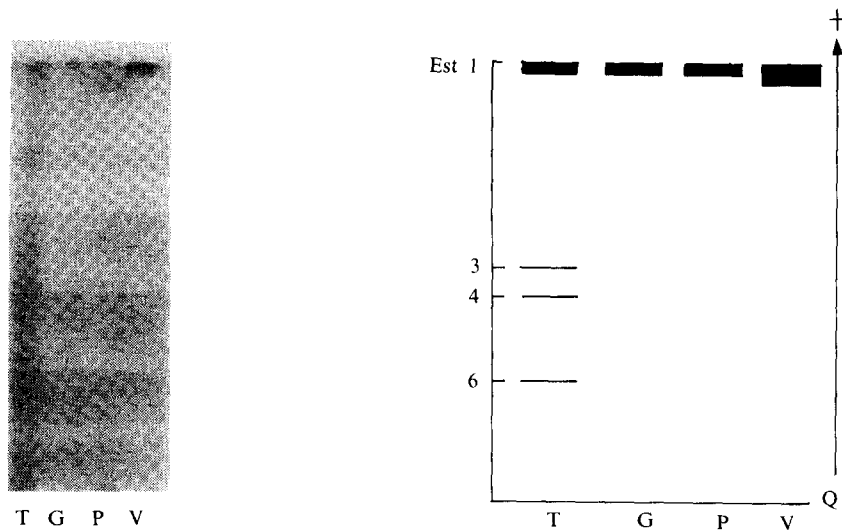
clover는 Est-1 한개와 minor band(Est-3, Est-4, Est-6) 3개, 돌콩은 Est-1 한개와 minor band(Est-4, Est-6) 2개, 새팥은 Est-1 한개와 minor band(Est-5, Est-6) 2개, 돌동부는 Est-1 한개와 minor band(Est-2, Est-7) 2개가 분리되었다.

李(1991a)는 덩굴강남콩, 팥달콩, 장경콩, 황금콩,

돌콩의 유근에서 Est-1은 공통으로 한개씩, minor band는 각각 2, 0, 0, 2, 3개가 분리되었다고 하였는데 돌콩은 본 시험의 결과와 같았다.

#### 4) Seedling의 유근

유근에서 분리된 esterase isozyme의 banding



T: *T. repense*, G: *G. soja*, P: *P. nipponensis*, V: *V. vexillata*, O: Origin

Fig. 4. Starch gel electrophoretic zymograms(a) and diagrams(b) of esterase isozyme banding pattern in radicle of legume seedling.

pattern 은 Fig. 4에서 보는 바와 같다.

유근의 esterase isozyme banding pattern은 white clover에서 Est-1 한개와 minor band Est-3, Est-4, Est-6 3개가 분리되었으나 돌콩, 새팍, 돌동부는 각각 Est-1 한개씩만 분리되었다. 이것은 강남콩의 유근에서 Est-1 한개와 minor band 2개가 분리된 것을 제외하면 팔달콩, 장경콩, 황금콩, 돌콩에서 Est-1이 각각 한개씩 분리되었다고 한 Lee(1991a)의 결과와 같았다.

이와같이 같은 종 또는 같은 품종의 식물이라도 각 조직이 갖고 있는 esterase isozyme의 banding pattern에는 많은 변이가 있는데 이것은 각 조직의 생화학반응을 촉매하는 효소의 생산을 조절하는

유전자가 다르기 때문에 식물의 계통을 분리하거나 형질의 유전 여부를 확인하는 중요한 marker가 되리라고 생각된다.

## 2. Esterase Isozyme의 활성도

효소의 활성도를 Esterase isozyme band의 염색강도에 따라 비교하면 Table 1과 같다.

먼저 효소 isozyme의 활성도를 각 조직의 Est-1으로 비교하면 Table 1에서 보는 바와같이 잎에서는 돌콩과 돌동부, 뿌리혹에서는 돌콩, seedling의 떡잎과 유근에서는 돌동부가 가장 높게 나타났다. 그리고 white clover와 돌콩에서는 잎과 뿌리혹이 떡잎과 유근보다 높았고, 새팍에서는 떡잎이, 돌동부에서는

Table 1. Enzyme activity of esterase in tissues of legume plant.

Species	Leaf	Root-nodule	Cotyledon	Radicle
<i>Trifolium repense</i>	++	++	+	+
<i>Glycine soja</i>	+++	+++	+	+
<i>Phaseolus nipponensis</i>	+	0	++	+
<i>Vigna vexillata</i>	+++	++	+++	+++

+++ : high, ++ : middle, + : low.

Table 2. Migrating rate of esterase isozyme in tissues of legume plants.

Species	Tissue	Est 1	Est 2	Est 3	Est 4	Est 5	Est 6	Est 7
<i>T. repense</i>	leaf	1.00						
	root-nodule	1.00						
	cotyledon	1.00		0.55	0.45		0.25	
	radicle	1.00		0.55	0.45		0.25	
<i>G. soja</i>	leaf	1.00						
	root-nodule	1.00						
	cotyledon	1.00			0.45		0.25	
	radicle	1.00						
<i>P. nipponensis</i>	leaf	1.00						
	root-nodule	0						
	cotyledon	1.00				0.30	0.25	
	radicle	1.00						
<i>V. vexillata</i>	leaf	1.00		0.55			0.25	
	root-nodule	1.00						
	cotyledon	1.00	0.90					0.15
	radicle	1.00						

잎과 떡잎 그리고 유근에서 높았다.

Esterase Isozyme 중에서 Est-1만 효소의 활성도가 높게 나타났는데 Rick(1983)도 토마도에서 Est-1의 활성이 가장 높다고 하였다. 이와같은 사실은 Esterase isozyme 중에서 Est-1이 핵심 기능을 하는 효소로써 각 조직의 생명활동을 나타내는 marker 가 될 수 있을 것이다.

### 3. Esterase Isozyme의 이동속도

전기영동에 의한 단백질이나 효소를 분리할 때는 전하, 분자의 크기 또는 모양에 따라 이동속도가 다르기 때문에 이를 가지고 물질의 종류를 구분하는 근거로 한다. 본 시험에 사용한 시료의 각 종에 따른 조직별 Esterase isozyme의 이동거리를 Rf값(rate of flow)으로 계산하여 비교하면 Table 2와 같다.

Table 2에서 종이나 조직에 관계없이 Est-1은 모두 Rf-1.00으로 가장 빨랐으며 Est-2, Est-3, Est-4, Est-5, Est-6, Est-7은 각각 0.90, 0.55, 0.45, 0.35, 0.30, 0.25, 0.15이었다.

## IV. 적 요

Starch gel 전기영동법으로 야생 콩과식물인 white clover, 돌콩, 새팠, 돌동부의 잎, 뿌리혹, seedling의 떡잎, 유근에서 esterase isozyme의 banding pattern, 활성도, 이동속도를 비교하였다.

Esterase isozyme의 banding pattern, 활성도, 이동속도는 콩과식물의 종과 조직에 따라 차이가 있었는데 white clover의 떡잎과 유근의 banding pattern 이 같은 것을 제외하고 돌콩, 새팠, 돌동부의 떡잎은 각각 3, 3, 3개를, 유근은 각각 1개씩의 band로 분리 되었으나 band의 위치와 이동속도는 다르게 나타났다.

Esterase isozyme의 효소 활성도는 Est-1이 종이나 조직에 관계없이 높았으나 잎에서는 돌콩과 돌동부, 뿌리혹에서는 white clover, 돌콩, 돌동부가, 잎에서는 새팠과 돌동부가, 유근에서는 돌동부가 높았다.

Esterase isozyme의 이동속도는 종이나 조직의

차이없이 Est-1이 가장 빨랐다.

## V. 인용문헌

1. Buschbecker, R., and I. Zelmer. 1979. Veränderungen von protein und Isozyme-Muster in Winter-roggen-Koryopsen während der Reifung. Wiss Z Pad Hoch Schule "Liselotte Hermann" Gestrow, DDR 1:59-79.
2. Ferrer-Monge, J.A. 1974. Esterase isozyme pattern in *Glycine max* exposed to gamma radiation. Can. J. Bot. 52:273.
3. Fottrell, P.F. 1968. Esterase isozymes from legume root nodule. Phytochem. 7:23-29.
4. Kahler, A.L., and Allard, R.W. 1970. Genetics of isozyme variants in barley, 1. Esterase. Crop Sci. 10:444-448.
5. 이성규. 1991a. 콩과식물의 Seedling Isozyme Banding Pattern에 관한 연구. 한초지. 11(3): 158-161.
6. \_\_\_\_\_. 1991b. 콩과식물의 잎과 줄기의 Esterase Isozyme Banding Pattern에 관한 연구. 한초지. 11(4):199-202.
7. Macdonald, T., and J.L. Brewbacker. 1975. Isozyme Polymorphism in Flowering Plant. V. The isoesterase of Maize tissue and substrate specificities and chemical inhibitors. Hawaii Agri. Expt. Stn. Tech. Bull. 89:24.
8. Rick, C.M. 1983. Tomato. In Isozyme in Plant Genetics and Breeding, Part B., S. P. Tanksley and T.J. Orton, Eds, p. 147-165, Elsevier Sci. Publishers, Amsterdam.
9. Scandalios, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: Review, Biochemical Genetics, 3:37-79.
10. Wu, Lim, Ali Harivandi, J.A. Harding and W.B. Davis. 1984. Identification of Kentucky bluegrass cultivars with esterase and Phosphoglucumutase isozyme markers. Crop Sci. 24:763-768.