

돌콩, 돌동부, 화이트 클로버의 조직별 Esterase Isozyme 변이에 관한 연구

이성규

Esterase Isozyme Variation in the Tissues of *Glycine soja* S. and Z., *Vigna vexillata* var. *tsusimensis* Matsumura, and *Trifolium repens* L. in Korea

Sung Kyu Lee

Summary

The esterase isozyme in tissue of wild legume plants were separated by horizontal starch gel electrophoresis. Extracts used in this study were prepared from fully expanded young leaf, cotyledon and radicle of seedling and root-nodule of *Glycine soja*, *Vigna vexillata* var. *tsusimensis* and *Trifolium repens*. The results are as follows;

1. Each tissue examined had a characteristic banding pattern. Number of bands in each species, *G. soja*, *V. vexillata*, and *T. repens*, were 14, 8 and 11 bands, respectively. And difference in esterase isozyme bands were greater from tissue to tissue than difference between habitat.
2. Est-1, Est-2, Est-3 and Est-4 in *G. soja*, Est-1 in *V. vexillata* and Est-1 and Est-2 in *T. repens* showed strong enzyme activity than other enzyme.
3. Esterase isozyme variation in *G. soja* and *T. repens* showed more variety than *V. vexillata*. This is resulted from many genotypic differences within species.
4. The main enzyme among the esterase isozyme were Est-1, Est-2, Est-3 and Est-4.

I. 緒 論

우리나라에 分布되고 있는 야생 콩과식물은 種이 다양하고 사료가치도 우수하여 일찌기 가축의 조사료로 이용되어 왔음에도 불구하고 개량을 위한 연구는 거의 없다. 그러나 粗飼料 생산이 절대 부족한 우리나라 축산의 입장에서는 우리환경에 맞는 조사료자원을 개발하고 개량하는 것이 대단히 중요한 과제로 대두되고 있다.

조사료자원이 될 수 있는 식물은 우선 생산성이 높고 지역성이 넓으며 가축의 기호성과 영양성분의 질이 우수한 것이 바람직하다. 우리 주변에서 흔히 볼 수 있는 돌콩(허, 1978), 돌동부, white clover는 대표적인 야생 콩과식물로 지역성이 넓고 기호성과

영양성분도 우수한 식물로 알려졌다.

야생식물을 이용목적에 적합하게 개량한다는 것은 오랜 기간이 소요되는 어려운 일이지만 식물이 갖고 있는 유전적 특성인 유전형질과 환경적응성(생태형)을 알면 보다 용이하게 개량을 할 수 있다.

최근의 전기영동에 의한 단백질, 효소 및 DNA의 분리기술 등은 생물의 유전적 특성을 찾아내는데 효과적이어서 가축이나 농작물의 품종개량에 획기적인 기여를 하고 있다(Scandalios, 1969). 특히 식물분야에서는 효소 Isozyme이 종의 유전형질을 나타내는 marker가 될 수 있음에 착안하여 경제형질의 규명에 이용하고 있다.

경제형질의 marker가 될 수 있는 효소 Isozyme을 구명하기 위해서는 먼저 각 식물의 종이 갖는

고유한 효소 Isozyme의 pattern을 밝혀야 한다. 그런데 효소 Isozyme은 주어진 기질에 작용하는 한 효소의 다양한 변형이기 때문에 식물의 종과 변종은 물론 동일한 종일지라도 생육단계(Buschbeck and Zelmer, 1979), seedling의 부위별(Edwards, 1976; Lee, 1991), 조직의 종류(Macdonald and Breubaiker, 1975; Lee, 1991; Lee, 1992), 배유(Schwartz, 1960)에 따라 많은 변이를 나타낸다.

따라서 본 연구는 야생 콩과식물종 조사료자원으로 유망한 돌콩, 돌동부, white clover를 재료로 하이 조직에 따른 Esterase Isozyme의 변이를 밝힘으로써 경제형질을 나타내는 marker를 찾아내는 기초 자료를 얻고자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試材料

본 시험에 공시된 재료는 1992년 7월 10일 상지대 학교 주변에 자생하는 돌콩(*Glycine soja* S. and Z.), 돌동부(*Vigna vexillata* var. *tsusimensis* Matsu-mura), white clover (*Trifolium repens* L.)의 3종이었다.

2. 試驗方法

1) 효소의 추출

충분히 성숙한 식물에서 잎과 뿌리혹을 채취하여 증류수로 깨끗이 세척한 후 물기를 완전히 제거하고 막자사발에 넣은 후 0.05% L-histidine액 5~7방울을 첨가하여 마쇄하였다. 마쇄한 재료를 eppendorf tube에 담아 30분간 원심분리 한 후 상등액을 얻었다.

2) Starch gel 지지매체의 제조

전기영동용 starch를 Gel buffer(Tris-Citric buffer pH 8.3)에 용해시켜 13% 용액을 만들고 이것을 충분히 가열한 후 진공펌프로 공기를 완전히 제거하였다. 공기를 제거한 진분용액은 240ml 용량의 polyacryl 판에 부어서 식힌 후 vinyl lap으로 싸서 하루 밤 동안 숙성하였다.

3) Buffer system

본 시험에 사용한 buffer system은 Scandalios (1969)의 방법으로 다음과 같다.

Gel buffer(Tris-Citric buffer, pH 8.3)

Tris ----- 6.2 g
Citric acid ----- 1.6 g
H₂O ----- 1,000 ml
Electrode buffert(Lithium-Borate buffer, pH 9.3)
Lithium hydroxide ----- 1.2 g
Boric acid ----- 11.89 g
H₂O ----- 1,000 ml

4) 전기영동

하루 밤 숙성시킨 starch gel판의 5cm 위치에 origin line을 선징하고 6mm의 홈을 낸 후 원심분리 한 시료의 상등액을 6mm×6mm인 이지에 분혀 홈에 삽입하였다. Electrode buffer는 1,000ml 용량을 두 개의 acryl 용기에 같은 양으로 나누어 양쪽으로 설치한 후 gel판을 걸쳐 놓았다. gel판의 origin쪽은 -전극을, 반대쪽은 +전극을 연결하고 최초의 전압은 300v로 시작하였으며 5분 후 350v로 고정시켜 영동 거리가 10cm될 때 까지 계속하였다.

5) Isozyme의 염색

진개가 끝난 gel을 3mm 두께로 2등분하여 절단된 밑을 염색하였다. Esterase Isozyme의 염색은 Scandalios (1969)의 방법을 이용하였으며 염색액은 다음과 같다.

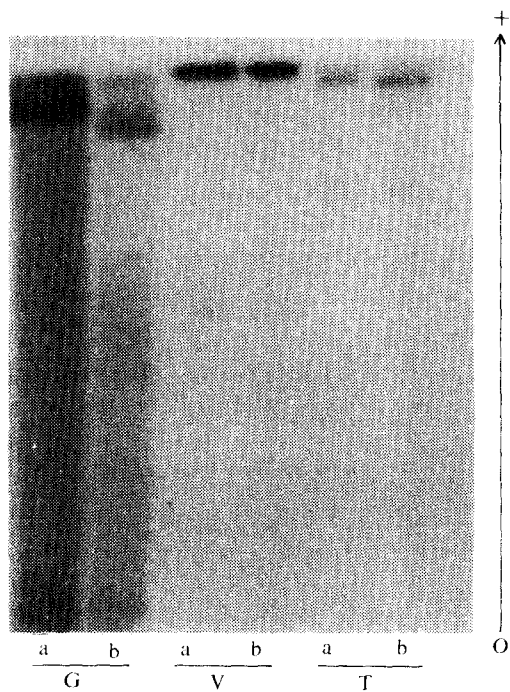
a-Naphthyl acetate(1% acetone: water - 1:1 용액) ----- 2 ml
Fast Blue RR Salt ----- 40 mg
Phosphate buffer(pH 4.3) ----- 50 ml
Phosphate buffer(pH 9.2) ----- 10 ml
H₂O ----- 40 ml

III. 結果 및 考察

1. 生育地別 Esterase Isozyme의 변이

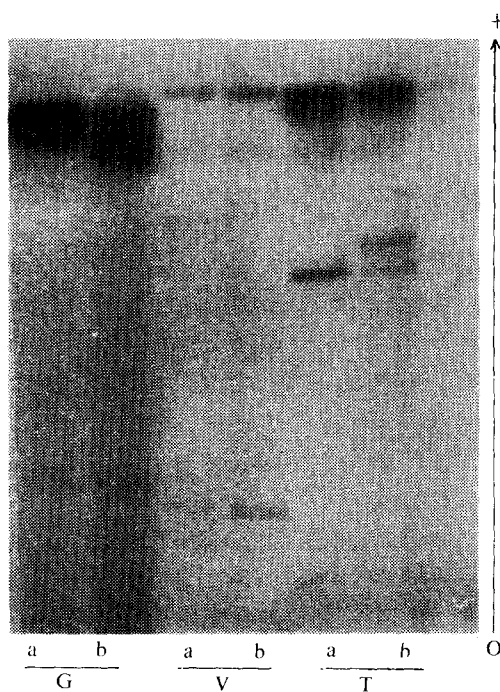
생육지가 다른 세 장소에서 채취한 돌콩, 돌동부, white clover의 잎과 뿌리혹에서 분리한 Esterase Isozyme의 banding pattern은 Fig. 1, 2에, 그리고 Gel에 나타난 Esterase Isozyme의 band를 Rf(rate of flow)로 비교하면 Table 1과 2와 같이 세 종의 식물은 많은 변이를 보이고 있다.

돌콩의 잎은 가장 빠른 Rf 1.00에서 가장 느린 Rf 0.28에 이르기까지 8개의 변이를 갖고 있는데 그 중 Rf 0.98, 0.55, 0.28은 동일한 위치에 있었다.



G : *G. soja* V : *V. vexillata*
 T : *T. repens* O : Origin
 a,b: sample from different plant

Fig. 1. Starch gel electrophoretic zymograms of leaf esterase isozyme banding patterns in legume plants



G : *G. soja* V : *V. vexillata*
 T : *T. repens* O : Origin
 a,b: sample from different plant

Fig. 2. Starch gel electrophoretic zymograms of root-nodule esterase isozyme banding patterns in legume plants

Table 1. Rf value of the esterase isozyme in leaf of legume plants

<i>Glycine soja</i>			<i>Vigna vexillata</i>			<i>Trifolium repens</i>		
a	b	c	a	b	c	a	b	c
—	—	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.98	0.98	—	—	—	—	0.98	0.98	—
0.95	—	—	—	—	—	—	—	—
—	0.90	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	0.78
—	—	—	0.58	0.58	—	—	—	0.73
—	—	—	—	—	—	—	—	0.64
—	—	—	—	—	0.55	—	—	—
0.55	0.55	—	—	—	—	—	—	—
—	0.44	—	—	—	—	—	—	—
0.30	—	—	—	—	—	—	—	—
0.28	0.28	—	0.28	0.28	—	—	—	—
—	—	—	—	—	0.25	—	—	—

a,b,c: Sample from different site.

Table 2. Rf value of the esterase isozyme in root-nodule of legume plants

<i>Glycine soja</i>			<i>Vigna vexillata</i>			<i>Trifolium repens</i>		
a	b	c	a	b	c	a	b	c
-	-	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.98	-	-	-	-	-	0.98	-	-
-	0.96	-	-	-	-	-	-	-
0.95	-	-	-	-	-	-	-	-
-	0.93	-	-	-	-	-	-	-
-	0.90	-	-	0.90	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	0.71	-
-	-	-	-	-	-	0.67	0.67	-
0.30	-	-	-	-	-	-	-	-
0.28	0.28	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	0.21	0.21	-	-	-	-

a,b,c: Sample from different site.

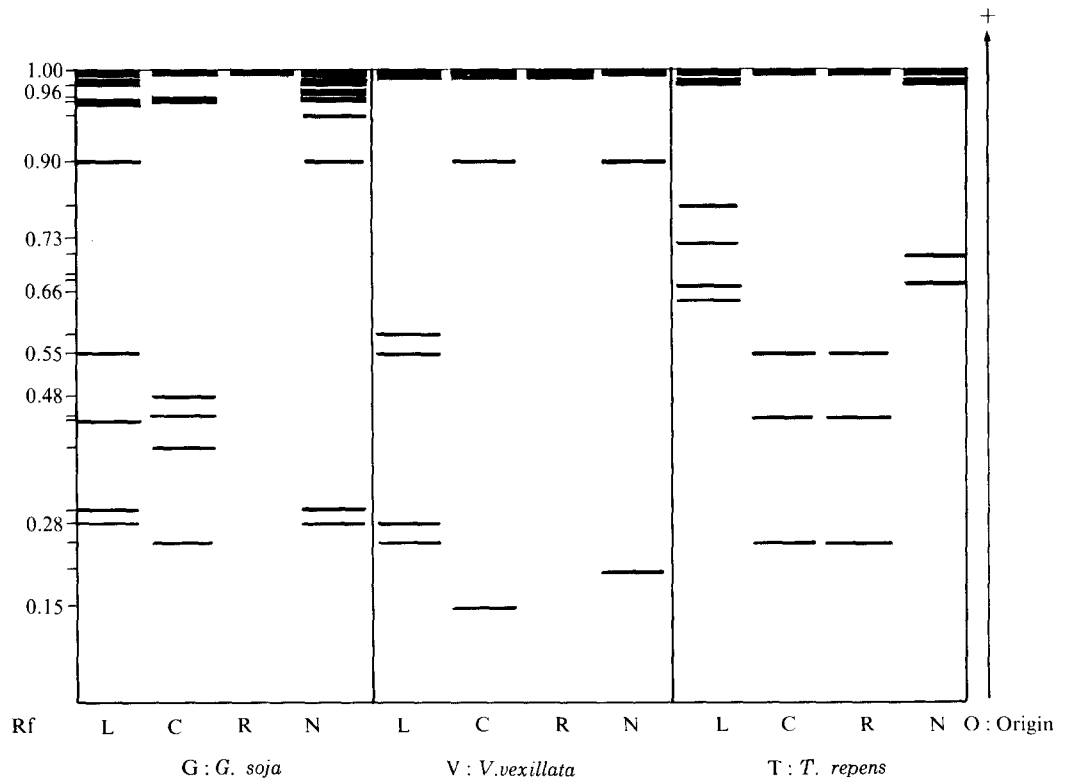


Fig. 3. Diagram showing esterase isozyme patterns in different tissues of legume plants. L: leaf, C: cotyledon of seedling, R: radicle of seedling, N: root-nodule, Rf: rate of flow.

이에 비해 돌콩의 뿌리혹은 Rf 1.00에서 0.28까지 8개의 변이를 보이고 있으나 이들 중 Rf 0.28만 동일한 위치를 차지하였다. 돌콩의 Esterase Isozyme중 염색강도가 높은 것은 잎에서는 Rf 1.00, 0.98, 0.96 이었고, 뿌리혹에서는 Rf 1.00, 0.98, 0.95 이었다.

돌동부에 있어서는 잎은 Rf 1.00에서 Rf 0.25까지 5개, 뿌리혹에서는 Rf 1.00에서 Rf 0.21까지 3개의 변이를 나타냈다. 이 중 생육지가 다른 두곳의 돌동부 잎에서 분리된 효소의 변이 세 개가 Rf 1.00, 0.58, 0.28로 동일한 위치를 차지하고 있는데 이것은 생육지는 다르더라도 種의 변이가 없기 때문이라고 생각된다. 돌동부의 Esterase Isozyme중 염색강도가

가장 높은 것은 Rf 1.00 한개 뿐이었다.

White clover의 잎은 Rf 1.00에서 Rf 0.64까지 5개의 변이를, 뿌리혹에서는 Rf 1.00에서 Rf 0.67까지 4개의 변이를 보이고 있다. 이 중에서 잎의 경우 두 곳의 식물의 잎은 효소의 변이가 같았다. 그러나 뿌리혹의 효소는 다르게 나타났는데 이것은 종이 같아도 공생하는 뿌리혹균의 종류가 다른데서 기인한 것으로 사료된다. white clover의 Esterase Isozyme중 염색강도가 가장 높은 것은 Rf 1.00, 0.98의 두개 이었다.

이상의 결과에서 볼 때 돌콩, 돌동부, white clover는 모두 Rf 1.00, 0.98, 0.96, 0.95 4개의 활성이 높은 효소와 활성이 약한 여러 개의 효소 변이를 보이고

Table 3. Variation of the esterase isozyme in tissues of legume plants

Isozyme number	<i>Glycine soja</i>				<i>Vigna vexillata</i>				<i>Trifolium repens</i>			
	L	C	R	N	L	C	R	N	L	C	R	N
1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2	0.98	-	-	0.98	-	-	-	-	0.98	-	-	0.98
3	-	-	-	0.96	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0.95	0.95	-	0.95	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	0.93	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0.90	-	-	0.90	-	0.90	-	0.90	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	0.78	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	0.73	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.71
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.67
11	-	-	-	-	-	-	-	-	0.66	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	0.64	-	-	-
13	-	-	-	-	0.58	-	-	-	-	-	-	-
14	0.55	-	-	-	0.55	-	-	-	-	0.55	0.55	-
15	-	0.48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	0.45	-	-	-	-	-	-	-	0.45	0.45	-
17	0.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	0.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	0.30	-	-	0.30	-	-	-	-	-	-	-	-
20	0.28	-	-	0.28	0.28	-	-	-	-	-	-	-
21	-	0.25	-	-	0.25	-	-	-	-	0.25	0.25	-
22	-	-	-	-	-	-	-	0.21	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	0.15	-	-	-	-	-	-

L: fully expanded young leaf C: cotyledon of seedling R: radicle of seedling N: root-nodule

있는데 전기영동에 의한 효소의 변이는 그 수가 대단히 많으며 이것은 동일한 생물체에 적어도 1 분자의 효소 보다는 많은 효소가 존재한다는 것을 나타내는 것이라고 할 수 있다(Shaw, 1965).

2. 식물체의 조직에 따른 Esterase Isozyme의 변이

돌콩, 돌동부, white clover의 잎, seedling의 떡잎과 유근, 뿌리혹의 효소를 분리하여 조직에 따른 변이를 diagram과 Rf 값으로 비교한 결과는 Fig. 3과 Table 3에서 보는 바와 같다.

1) 돌 콩

돌콩의 잎, seedling, 뿌리혹의 효소는 본 시험과 Nishii(1991a, 1991b, 1992)의 보고를 종합하여 Rf 값으로 정리하면 총 14개의 변이를 보이고 있으며 그 중 잎은 8개, 떡잎은 6개, 유근은 1개, 뿌리혹은 8개로 조직에 따라 많은 차이가 있음을 나타내고 있다.

여러개의 변이중 4개 조직에 공통으로 존재하는 것은 Rf 1.00 한 개 뿐이며 잎과 뿌리혹에서는 Rf 1.00, 0.98, 0.95, 0.90, 0.30, 0.28가 공통으로 존재함으로써 대단히 유사함을 보였다. 효소 isozyme중 염색강도로 보아 효소 활성이 가장 높게 나타난 것은 1, 2, 3, 4번이며 나머지는 모두 minor band로 이(1991a, 1991b, 1992)의 보고와 같았다.

2) 돌동부

돌동부의 잎, seedling, 뿌리혹의 효소는 모두 8개의 변이를 나타내고 있는데 돌콩과는 달리 비교적 단순하였다. 4개 조직에서 공통으로 존재하는 효소는 Rf 1.00 한개 뿐이고 seedling의 떡잎과 뿌리혹의 Rf 0.90이 공통이었다. 염색강도로 본 효소의 활성도는 1번이 가장 높았고 나머지는 모두 약하게 나타났는데 이(1992)의 보고와 같았다.

3) white clover

White clover의 잎, seedling, 뿌리혹의 효소 변이는 모두 11개이었다. 잎과 뿌리혹에서 Rf 1.00과 0.98이 공통이었고 떡잎과 유근의 효소는 같았다. 염색강도에 따른 효소의 활성도는 Rf 1.00, 0.98가 가장 높았으며 나머지는 약하게 나타났는데 이것은 이(1992)의 보고와 일치하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 식물의 효소를 전기영동하면 많은 변이를 분리할 수 있다는 Shaw(1965)의 보고와 같이 본 시험의 결과도 식물의 종이나

조직에 따라 효소의 변이 즉 isozyme이 아주 다양함을 알 수 있다. 또한 효소의 전기영동에 의한 분리는 효소 단백질의 차이에서 비롯되는 것으로 볼 때 효소 생산에 관여하는 DNA의 정보가 다르다는 것을 알 수 있다.

따라서 Rf나 염색강도에 의한 효소의 변이는 그 식물의 고유한 유전적 특성이라고 할 수 있으며 이를 기초로 하여 환경이나 교잡에 따른 종의 변이를 파악하고 경제형질을 찾아내는 데 아주 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

그리고 본 시험에서 돌콩과 white clover는 돌동부에 비해 효소의 변이가 다양함을 보이고 있는데 이것은 생육지의 범위가 넓은데서 기인하는 환경적응의 결과로 종의 변이가 많음을 의미한다. 또한 돌콩에 있어서 잎과 뿌리혹의 효소변이가 다양하더라도 공통의 효소가 많은 것은 속수인 돌콩의 잎과 공생하는 뿌리혹 박테리아와 관련된 것으로서 돌콩에 공생하는 뿌리혹 박테리아도 다양한 변이체가 있음을 나타낸 것이라 사료된다.

IV. 摘 要

우리나라에 널리 分布하는 야생콩과식물인 돌콩, 돌동부, white clover를 조식료자원식물로 개발하는데 필요한 기초자료를 얻기 위하여 starch gel 전기영동법으로 식물의 각 組織에서 Esterase Isozyme을 분리하여 비교한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 돌콩, 돌동부, white clover의 생육지, 잎, seedling의 떡잎과 유근, 뿌리혹에 따른 Esterase Isozyme 변이는 각각 14, 8, 11개를 갖고 있으며 동일한 종이라도 생육지보다는 조직이 다를 때 효소의 변이가 다양하게 나타났다.

2. Esterase Isozyme의 효소 활성도는 돌콩은 1, 2, 3, 4번까지, 돌동부는 1번, white clover는 1, 2번에서 높았으며 나머지 효소는 활성이 약하게 나타났다.

3. 동일한 種이 생육지를 달리 하였을 때 효소의 다양한 변이를 나타내는 것은 遺傳形質의 차이가 많음을 의미하는 것으로 본 시험에서는 돌콩과 white clover가 종 사이의 많은 변이를 보였다.

4. 돌콩, 돌동부, white clover의 Esterase Isozyme 중 주효소로 작용하는 효소는 1, 2, 3, 4번이었다.

V. 引用文獻

1. Buschbeck, R. and I. Zelmer. 1979. Veränderungen von protein und Isozyme- Muster in Winterrogen-Karyopsen Während der Reifung. Wiss Z Pad Hoch Shule "Liselotte Hermann" Gestro, 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, Munchen, 23-39.
3. Macdonald, T. and J.L. Brewbaker. 1975. Isozyme polymorphism in flowering plant. V. The Isoesterase of Maize tissue and substrate specificities and chemical inhibitors. Hawai Agri. Expt. Stn. Tech. Bull. 89:24.
4. 이성규. 1991a. 콩과식물의 Seedling Esterase Isozyme Banding Pattern에 관한 연구. 한초지. 11(3):158-161.
5. 이성규. 1991b. 콩과식물의 잎과 줄기의 Esterase Isozyme Banding Pattern에 관한 연구. 한초지. 11(4):199-202.
6. 이성규. 1992. 야생 콩과식물의 Esterase Isozyme Banding Pattern에 관한 연구. 한초지. 12(1):71-76.
7. Scandalios, J.G. 1969. Genetic control of Multiple molecular forms of enzymes in plants. A review, Biochemical Genetics. 3:37-79.
8. Shaw, C.R. 1965. Electrophoretic variations in enzymes. Science. 149:936.
9. 허삼남. 1978. 야생대두의 생리생태에 관한 연구. 제2보 돌콩(*Glycine soja*)의 생육특성. 한초지. 1(1):29-33.