

저온이 이탈리아 라이그라스의 품종별 ADH Isozyme 변이에 미치는 영향

이성규

The Effect of Low-temperature on Alcohol Dehydrogenase Isozyme Variations in Italian ryegrass Varieties

Sung Kyu Lee

Summary

This study was planned to identify the effect of low-temperature stress on Alcohol dehydrogenase(ADH) isozyme in sixteen varieties of Italian ryegrass using starch gel electrophoresis.

The specific electrophoretic zymograms of each variety were observed by ADH isozyme. The results were summarized as follows:

1. All tested varieties displayed two band zone by ADH and R.f values were 0.63 and 0.60, respectively.
2. There were four band type for ADH isozyme of 16 varieties classified with ADH isozyme dyeing intensity. According to dyeing intensity 7, 2, 1 and 6 varieties belong to banding type I, II, III and IV, respectively(Fig. 2-A, B).
3. The effect of short term low-temperature stress induces ADH gene expression in Italian ryegrass, which may reflect a fundamental shift in energy metabolism to ensure plant tissue survival during the low-temperature stress period.

I. 서 론

이탈리아라이그라스(*Lolium multiflorum* LAM.)는 서늘한 기후조건과 부식함량이 높은 배수가 잘 되는 砂質土壤에서 잘 자라는 一年生 또는 越年生인 북방형 벼과사료작물로서 耐乾性 耐暑性 耐寒性이 약하며(Miles and william, 1964) 특히 추운 冬節期를 거치는 지방에서는 월동이 되지않아 우리나라에서는 주로 중부 이남지방에서 답리작으로 많이 이용되고 있다(유 등, 1988).

최근에 농촌에서는 농업노동력의 급격한 감소로 天水畜이나 규모가 작은 논외 경작을 포기하여 유희농지가 증가하는 실정이지만 이를 효과적으로 이용할 대안이 마련되지 못하고 있으며 특히 강원도의 경우는 그 정도가 심하여 이의 시급한 대책이 요구되고 있다.

따라서 본 연구는 전기영동법을 이용하여 이탈리아 안라이그라스 품종을 대상으로 ADH Isozyme의 변이를 분석함으로써 강원도를 포함하는 중부이북지방에서 답리작으로 재배 할 수 있는 월동이 가능한 품종을 선발하는데 필요한 기초자료를 얻고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험시간

본 시험은 1994년 9월부터 1995년 4월까지 상지대학교 생명자원과학대학 동물영양자원학과 실험실에서 실시 되었다.

2. 供試品種

본 시험에 사용한 이탈리아라이그라스의 품종은 Table 1과 같다.

Table 1. Tested varieties and observed data of Italian ryegrass

Entry No.	Variety	Ploidy	Source*	Cold hardiness [#] (1-9)	Plant height [†] (1-9)	Yield index
1.	Barmulta	4X	NL	5	4	97
2.	Beef Builder	4X	USA	9	1	—
3.	Alifa	unknown	NL	8	4	80
4.	Bofur	4X	DK	6	4	104
5.	Butler	unknown	DK	6	5	100
6.	Bettina	2X	DK	5	4	103
7.	Barcolte	2X	NL	4	4	97
8.	Cervus	4X	Swiss	5	4	77
9.	Tosca	2X	NL	4	5	103
10.	Combita	2X	D	3	5	110
11.	Minaret	4X	NL	5	6	105
12.	Savanna	4X	NL	5	5	92
13.	Gordo	2X	NL	3	7	103
14.	Dalita	4X	DK	—	—	—
15.	Wase aoba	2X	J	8	4	60
16.	Elving	4X	DK	4	5	96

* USA : United States of America, NL : Netherland, D : Germany, DK : Denmark, J : Japan.

[#]1 : Very good, 9 : Very bad.

[†]1 : Short, 9 : Tall(Source; National Livestock Research Institute, 1994).

3. Isozyme의 분석

1) 효소의 추출

이탈리안라이그라스의 종자를 품종별로 구분하여 Petri dish에 여지를 깔고 증류수로 침적시킨 후 20℃ Incubator안에서 발아시켰다. 발아한 Seedling을 들로 나누어 한개는 20~25℃(고온)로, 다른 하나는 7~10℃(저온)에서 10일간 배양하여 시험에 사용하였다.

각 품종별 시료에서 10개체의 식물체를 선발하여 잎을 제거한 뿌리와 줄기를 막자 사발에 넣고 0.05% L-histidine액 1 ml를 가하여 마쇄한 시료를 eppendorf tube에 담아 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다.

2) Starch gel 지지매체의 제조

전기영동용 Starch를 gel buffer(Tris-Citric beffer pH 8.3)에 용해시켜 13% 용액을 만들고 이것을 충분히 가열한 후 진공펌프로 완전히 공기를 제거하였다. 공기를 제거한 Starch용액은 240 ml 용량의

Polyacryl 판에 부어서 식힌 후 Vinyl lap으로 싸서 하루 밤 동안 실온에서 숙성하였다.

3) Buffer system

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

Gel buffer(Tris-HCl buffer, pH 8.0, 0.2M)

Tris _____ 12.1 g

Water _____ 1,000 ml

adjust pH with HCl

Electrode buffer(Lithium-Borate buffer, pH 9.3)

Lithium hydroxide _____ 1.2 g

Boric acid _____ 11.89 g

H₂O _____ 1,000 ml

4) Electrophoresis

하루 밤 동안 숙성시킨 gel 판의 5 cm 위치에 origin line을 정하고 6 mm의 홈을 낸 다음 원심분리

한 시료의 상등액을 6mm×6mm 크기의 濾紙에 묻혀 흡에 삽입 하였다. Electrode buffer는 1,000 ml 용량을 두개의 acryl 용기에 같은 양으로 나누어 장치한 후 gel 판을 수평으로 올려 놓았다. Gel판의 origin쪽은 -전극을, 반대쪽은 +전극을 연결한 다음 최초의 전압은 250V로 시작하고 5분 후 300V로 승압하여 고정시켜 영동거리가 10 cm 될 때 까지 계속하였다.

5) Isozyme의 염색

전기영동이 끝난 starch gel은 3 mm 두께로 2등분하여 절단된 면을 다음의 염색액(Scandalios, 1969)으로 염색하였다.

Tris-HCl buffer	—————	100 ml
Distilled water	—————	260 ml
KCN(0.002M)	—————	4 ml
NAD(0.01M)	—————	4 ml
PMS(0.01M)	—————	4 ml
Ethanol(100%)	—————	2 ml
NBT	—————	50 mg

* Incubated at 37°C for approximately 30 min.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 저온처리

저온으로 처리하였을 때 이탈리아라이그라스의 품종별 ADH isozyme의 변이를 알아보기 위해 16개 품종을 7~10°C에서 10일간 배양한 시료를 사용하여 전기영동한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 시료로 사용한 전 품종의 band type은 두 개로 나타났다.

각 품종별 Isozyme의 band를 Fig. 1-A, B를 근거로 하여 염색강도를 비교하면 Fig. 2-A, B와 같이 4개의 Type으로 구분 되었다. 이 Type을 기준으로 하여 16개 품종의 ADH isozyme band를 분류하면 Type I에 속하는 것은 Tosca, Combita, Minaret, Savanne, Wase aoba, Elving, Dalita 등 7품종, Type II에 속하는 것은 Alifa, Gordo 등 2품종, Type III에 속하는 것은 Cervus 1품종, type IV에 속하는 것은 Barcolte, Beef Builder, Bofur, Butler, Bettina 등 6품종이었다.

Alcohol Dehydrogenase(알콜탈수소효소; EC 1.1.1.1)는 무기발효과정(Miemyk, 1990)에 관여하는 효소

로서 옥수수, 담배, 토마토, 알팔파 등 몇 종의 식물(Tanksley and Orton, 1983; Soltis and Soltis, 1989)에서 그 특징들이 잘 연구되었다.

본 시험에서 저온처리한 이탈리아라이그라스 ADH isozyme band의 품종간 변이는 없었으며, R.f 0.60과 R.f 0.63인 두개의 band가 나타났다. 식물의 종에 따라 ADH isozyme의 band수는 많은 차이가 있는데 Marshall 등(1974)은 狹葉, Lupin의 종자 ADH isozyme은 3개 band, Kut and Evans(1984)는 Nicotina屬의 여러 종에서 적은 것은 1개, 최고 5개의 band가 있으며 R.f는 0.42에서 0.68사이에 있음을 보고 한 바 있다.

ADH 효소의 활성화에 관한 연구에서 Wignarajah 등(1976)은 보리의 뿌리를 재료로 한 시험에서 산소가 3~13%로 부족할 때는 이 보다 산소가 훨씬 부족한 때 보다 효소의 활성이 크게 증가하였으며 Hanson and Brown(1984)은 보리의 Aleurone에서 산소가 10~20%일 때는 한 개의 band, 1~5%일 때는 2개 band가 나왔으나, 산소가 0%일 때는 3개의 band가 나왔다. 그리고 Root tip에서는 산소가 10~20%일 때 한 개의 band, 1~5%일 때는 band 2개 었으나 0%일 때는 band 가 나타나지 않았다고 하였다.

식물체가 물속에 잠겼을 때, 산소의 공급이 적거나 부족할 때(Newman and Van Tai, 1991) 또는 온대식물이 얼지 않을 정도의 저온에 며칠간 노출되었을 때 등 추위에 견디는 능력을 갖게 되는데(Jarillo et al., 1993), 이것은 식물이 에너지대사과정에 부적합한 환경이 되면 이를 감지한 해당 유전자의 빠른 출현으로 ADH mRNA를 유도하여 ADH Enzyme을 생산하기 때문으로 파악하고 있다(Guy et al., 1985; Gilmour et al., 1988).

결국 식물은 산소의 공급 양이나 저온 또는 얼 정도의 낮은 온도 등의 환경에서 ADH isozyme을 생산하여 Acetaldehyde를 ethanol로 환원하는 대사과정을 거쳐 에너지를 공급함으로써 생존을 지속하는 것으로 이해되지만(Torres et al., 1977), 이와 같은 제한조건이 장기간 지속된다면 ethanol의 축적이 독성이 되어 결국은 죽게 될 것이다. 그러므로 이탈리아라이그라스가 추운 겨울 동안을 견뎌 내고 월동을 하기 위해서는 Acetaldehyde에서 ethanol로 분해를 계속할 수 있는 조건이 되어야 가능할 것이며 이 점이 앞으로의 연구과제가 될 것이라 생각된다.

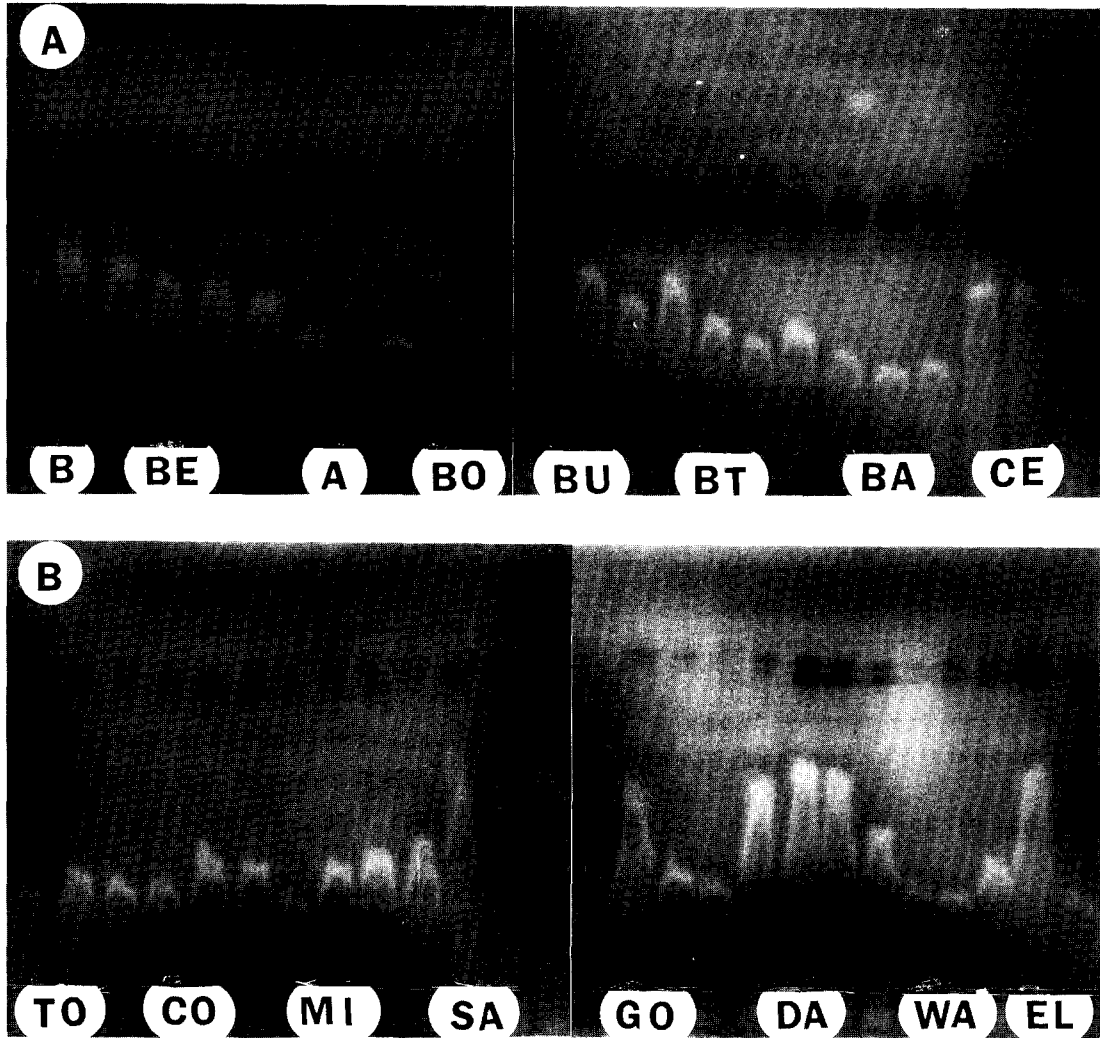


Fig. 1-A, B. Starch gel electrophoretic zymograms of ADH isozyme banding variation in Italian ryegrass varieties.

B: Barmulta, BE: Beef Builder, A: Alifa, BO: Bofür, BU: Butler, BT: Bettina, BA: Barcolte, CE: Cervus, TO: Tosca, CO: Combita, MI: Minaret, SA: Savanna, GO: Gordo, DA: Dalita, WA: Wase aoba, EL: Elving.

2. 추위에 강한 이탈리아라이그라스의 선발

Table 1. 에 제시된 품종중 내한성이 3 또는 4에 해당되는 품종은 Barcolte, Combita, Elving, Gordo, Tosca로 비교적 추위에 강한 것으로 보고되었다(국립 축산기술연구소, 1994). 그러나 본 시험에서 ADH isozyme의 band는 공시된 전 품종에서 같은 pattern을 보이고 있으며 특별히 내한성과 상관관계는 발견할 수 없었다. 이것은 식물체가 일정기간 동안 저온에

노출되면 ADH를 유도하는 gene이 활성화되어 무기 발효를 수행하는 ADH enzyme을 생산하게 함으로서 (Christie et al., 1991) 저온에 견디는데 필요한 기본 에너지를 공급하는 것으로 이해된다. 따라서 본 시험에 사용한 이탈리아라이그라스는 품종에 상관없이 어느 정도의 내한성은 있지만 장기간의 저온에서는 생존할 수 없는 것으로 볼 수 있다.

ADH isozyme의 염색강도로 본 band의 차이점은

Dalita, Elving, Barcolte, Bettina, Butler, Cervus 등에서, 그리고 R.f 0.60이 R.f 0.63 보다 강하게 나타났는데 이것은 효소의 활성도의 차이에서 비롯되는 것으로 생각되며 Marshall 등(1974)이 Lupin의 ADH isozyme 에서 밝힌 바와 같은 결과였다.

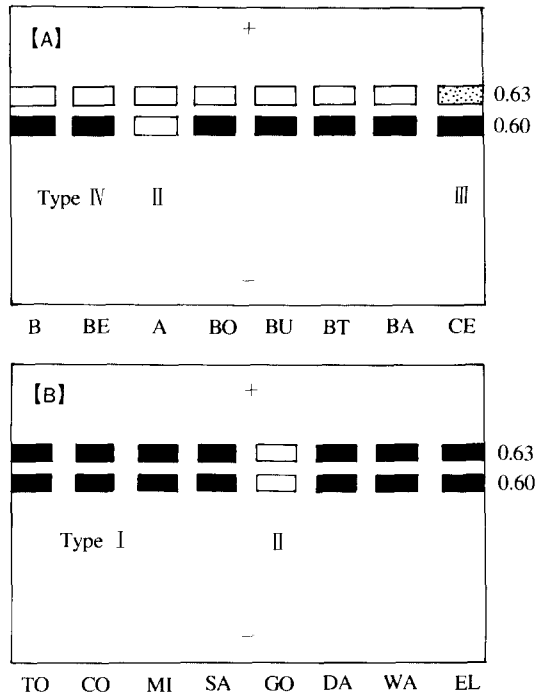


Fig. 2-A, B. Diagram showing ADH isozyme banding types in Italian ryegrass varieties. I, II, III, IV indicate ADH isozyme banding type.

3. 고온처리

이탈리안라이그라스 품종은 고온(20~25℃)에서 처리하여 ADH isozyme을 전기영동한 결과 전 품종에서 Isozyme band가 나오지 않았다. 이와같은 결과는 저온일 때와는 달리 온도가 이 식물의 생장에 적합한 조건이므로 ADH Enzyme의 생성이 되지 않은 것으로 생각된다.

IV. 적 요

이탈리안라이그라스 16개 품종을 시료로 하여 저

온이 ADH isozyme의 변이에 미치는 영향을 알아보기 위하여 전분지지매체를 이용하는 전기영동방법으로 실시해 본 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 저온(7~10℃)에 처리한 품종의 ADH isozyme band는 전 품종에서 R.f 0.60과 0.63의 두개가 나왔으며 고온(20~25℃)에서 처리한 것은 전혀 Band가 나타나지 않았다.

2. ADH isozyme을 염색 강도에 따라 분류하면 본 시험에 사용한 이탈리안라이그라스 품종은 4개의 Type으로 분류가 되었는데 Type I에 속하는 것은 Tosca, Combita, Minaret, Savanna, Wase aoba, Elving, Dalita, Type II에 속하는 것은 Alifa, Gordo, Type III에 속하는 것은 Cervus, Type IV에 속하는 것은 Barmultra, Beef Builder, Bofur, Butler, Bettina, Barcolte 이었다.

3. 저온처리한 품종에서는 ADH isozyme band가 전부 나왔는데 이것은 저온 Stress가 ADH 효소생산을 유도하는 ADH gene을 활성화하여 식물조직이 생존하는데 필요한 기본적인 대사에너지를 공급하기 위한 것이라고 생각된다.

V. 인용 문헌

- Christie, P.J., M. Hahn and V. Walbot. 1991. Low-temperature accumulation of alcohol dehydrogenase mRNA and Protein activity in Maize and Rice seedlings. *Plant Physiol.* 95:699-706.
- Gilmour, S.J., R.K. Halela and M.F. Thomashow. 1988. Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 87:745-750.
- Guy, G.L., K.L. Niemi and R. Brambi. 1985. Altered gene expression during cold acclimation of Spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:3673-3677.
- Hanson, A.D. and A.H.D. Brown. 1984. Three alcohol dehydrogenase genes in wild and cultivated barley; Characterization of the products of variant alleles. *Biochemical Genetics* 22, Nos. 5(6):495-515.
- Jarillo, J.A., A. Leyva, J. Salinas and J.M. Martinez-Zapater. 1993. Low temperature induces the acclimation of alcohol dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, A chilling-tolerant plant. *Plant*

- Physiology, 1993. 101:833-837.
6. Kut, S.A. and D.A. Evans. 1983. ADH isozymes in seed of Nicotina species and somatic hybrids. The j. of Heredity. 75:215-219.
 7. 이성규. 1994. 이탈리아안라이그라스이 품종별 ADH와 Esterase isozyme banding pattern에 관한 연구. 한초지. 14(2):82-87.
 8. Marshall, D.R., P. Broue and R.N. Oran. 1974. Genetic control of alcohol dehydrogenase isozymes in narrow leafed Lupins. J. of Heredity. 65:198-203.
 9. Miernyk, J.A. 1990. Glycolysis, the oxidative pentose phosphate pathway and anarobic respiration. In Dennis, D.P. and Turpin, D.H.(eds), Plant Physiology Biochemistry and Molecular Biology, Congman Scientific and Technical, John Wiley and Sons New York.
 10. Miles, D.G. and I.G. Williams. 1964. Winter hardiness in pasture varieties. Rep. Welch Pl. Breed Station. 1964. 70-1.
 11. Newman, K.D. and T.T. Vantai. 1991. Developmental regulation and organ specific expression of soybean alcohol dehydrogenase, Crop Sci. 31:1253-1259.
 12. Annual Report. 1994.
 13. Scandalios, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants, A. review Biochemical Genetics, 3:37-79.
 14. Soltis, D.E. and P.S. Soltis. 1989. Isozymes in Plant Biology, Advances in Plant Science Series, Vol 4. Dioscorides Press, Portland, OR.
 15. Tanksley, S.D. and T.J. Orton. 1983. Eds, Isozymes in Plant Genetic and Breeding, Part B, Elsevier Sci, Pub., Amsterdam.
 16. Torres, A.M. U. Diedenhofen and I.M. Johnstone. 1977. the early allele of alcohol dehydrogenase in Sunflower populations, Thw. J. of Heredity, 68:11-16.
 17. Wignarajah, K., H. Greenway and C.D. John. 1976. Effects of waterlogging on growth and activity of alcohol dehydrogenase in barley and rice. New Phytology 77:585-592.
 18. 유종원, 강정훈, 한홍전, 김용배, 박병훈. 1988. 화본과 목초의 종속간 잡종 Hybrid ryegrass와 Festulolium의 생육특성, 한초지, 8(2):123-127.