

콩과식물의 Seedling Esterase Isozyme Banding Pattern에 관한 연구

李 性 圭

Esterase Isozyme Banding Pattern in Legume Seedlings

Sung Kyu Lee

Summary

Horizontal starch gel electrophoresis, follow by enzyme-specific staining, separate and visualize several legume esterase isozyme. Using extracts prepared from cotyledon, radicle and plumule of legume seedlings germinated 5 days. The results were as follows.

1. The number and staining intensity of esterase isozyme bands varies depending on the plant species, tissues and developmental stage.
2. Bands in the cotyledon of field bean seedling expressed 4 and 1 in radicle.
3. In soybean cultivars, cotyledon of Hwangkum-kong had 3 bands and 1 band in the examined tissues of Paldal-kong and Jangkyung-kong seedling.
4. The cotyledon and radicle of french bean seedling had 3 bands, respectively.
5. The highest esterase isozyme activity appears to be expressed in the cotyledon and radicle of french bean, as indicated by intensity of stain, with the Paldal-kong particulary active.

I. 緒 論

식물의 酵素는 種이나 品種 또는 葉, 莖, 根 및 種實 등의 조직에 따라 하나에서 數個의 同位酵素 즉 Isozyme을 갖고 있는 것으로 알려졌다. 이 효소 Isozyme은 starch gel이나 poly-acrylamide gel 전기영동법을 이용한 생화학적 분석방법으로 확인할 수 있어 식물의 유전연구는 물론 품종개량이나 육종연구에 가장 확실한 정보를 제공하고 있다.

Esterase는 Ester의 가수분해를 촉매하는 효소의 총칭으로 이 효소 역시 식물의 種이나 品種은 물론 同一種일지라도 각 조직에 따라 여러 종류의 Isozyme을 갖고 있는 것으로 알려졌다.

Macdonald and Brewbecker(1975)는 옥수수의 Esterase Isozyme은 Est 1, Est 2, …… Est 10으로 10개의 band를 확인하였고, Brown and Allard(1969)는 Est 12와 Est 16의 2개 band를 밝힌바 있다.

또한 Hvid and Nielson(1977)은 보리에는 적어도 10개의 Esterase Isozyme band가 존재하며, 보리의 조직이나 성장단계의 진행에 따라 그 종류와 수는 각각 다르게 나타남을 보고 하였다. 즉, Est 2는 보리의 뿌리에는 없고 plumule에서는 가장 활성이 높으며 Est 1과 Est 4는 뿌리와 plumule 모두에 들어있어 각 조직에 따라 많은 차이가 있다.

이와같이 Esterase Isozyme band의 차이가 있는 것은 그 식물의 유전자가 각각 다르다는 것을 의미하는 것으로써 식물의 유전이나 육종연구에 중요한 정보를 제공하는 것이라고 할 수 있다.

따라서 본 연구는 한국에 자생하는 야생콩과식물과 이미 개량되어 식용으로 이용되는 콩과식물에 존재하는 Esterase Isozyme의 banding pattern을 種 또는 組織別로 비교하여 이들 콩과식물을 飼料資原植物로 개발하는데 필요한 기초자료를 얻고자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試材料

본 시험에 供試된 식물은 돌콩(field bean-*Glycine soja* S. and Z.), 대두(soybean-*Glycine max* Merr.) 품종인 팔달(Paldalkong), 장경(Jangkyungkong), 황금(Hwangkumkong)과 덩굴상남콩(french bean-*Phaseolus vulgaris* L.)의 종자를 물에 침윤시킨후 5일간(70 시간) incubator에서 27°C로 발아시켜 얻은 seedling을 사용하였다.

2. 方法

(1) Isozyme의 추출

각 Seedling을 子葉, 幼葉, 幼根으로 구분하여 막자사발로 분쇄한후 0.05% L-histidine 용액 5~7방울을 섞어서 effendorf tube에 넣어 원심분리 하였으며 원심분리 한 시료는 5°C로 냉장보관 하였다.

(2) Starch gel 전기영동용 buffer system

전기영동용 gel buffer는 Tris-Citric Buffer(pH 8.3)로 Tris 6.2g, Citric acid 1.6g을 H₂O 1000ml에 용해시켰으며 Electrode Buffer는 Lithium-Borate Buffer(pH 8.3)로 Lithium hydroxide 1.2g, Boric acid(anhydrous) 11.89g을 H₂O 1000ml에 용해시켜 만들었다(Scandalios, 1969).

(3) Isozyme의 전기영동

Starch gel 판에 Origin을 정해 각 시료에 원심분리된 상층액을 여지로 묻혀서 삽입하고 electrode buffer용액을 담은 두 그릇에 걸쳐 놓는다. Origin 쪽은 (-)전극, 전개되는 방향으로 (+)전극을 연결하고 200V로 4시간 20분간 영동시켰다.

(4) Isozyme의 염색

영동이 끝난 gel판을 돌로 나누어 Scandalios(1969)의 염색법으로 염색하였다. 염색액은 증류수 40ml, L-Naphthyl acetate(acetone : Water=1 : 1의 1%) 2 ml, Fast Blue RR salt 40mg, phosphate buffer(pH 4.3) 50ml, phosphate buffer(pH 9.2) 10ml의 혼합액이다.

III. 結果 및 考察

1. Seedling Esterase Isozyme의 banding pattern

본 시험에 사용된 콩과식물의 Seedling에서 분리된 조직별 Esterase Isozyme의 banding pattern은 Fig. 1과 같다.

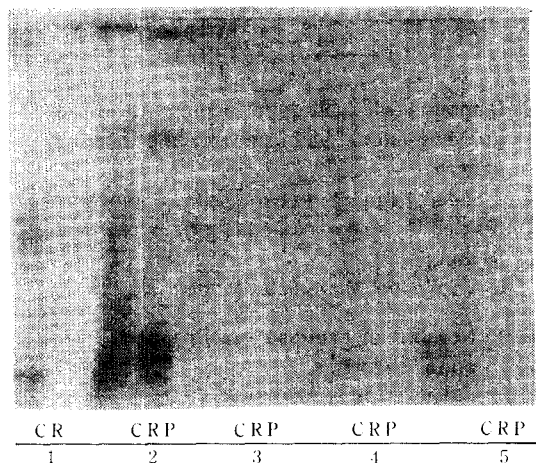


Fig. 1. Starch gel electrophoretic zymograms of legume seedling esterase isozyme banding pattern

1 : field bean 2 : french bean 3 : soybean (Paldal) 4 : soybean(Jangkyung) 5 : soybean (Hwangkum)

C : cotyledon, R : radicle, P : plumule.

그림에서 염색이 짙게 된 부분과 희미한 부분, 모양이 넓은 부분과 좁은 부분으로 구분되는 모든것을 전체 Isozyme수로 보면 Seedling의 子葉, 幼根, 幼葉에 따라 차이가 있음을 알 수 있다.

이 그림을 명백히 하기위해 도식화하면 Fig. 2와 같이 되는데, 여기에서 子葉은 돌콩 4개, 덩굴상남콩 3개, 대두의 품종에서 팔달 1개, 장경 1개, 황금 3개로 나타났다. 幼根은 덩굴상남콩 3개를 제외하고는 모두 1개의 band를 갖고 있다.

그러나 幼葉에서는 팔달, 장경, 황금에서만 조사되었는데 각각 1개의 band가 있을 뿐이다.

이와같이 식물의 조직에 따라 band의 수가 다르게 나타나는 것은 옥수수에서도 마찬가지로 Macdonald and Brewbecker(1975)에 의하면 Est 8과 Est 9는 옥수수의 모든 조직에 존재하지만 Est 10은 미성숙 胚

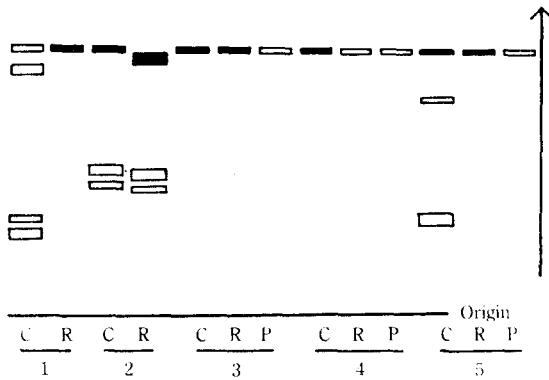


Fig. 2. Diagrams of zymogram expressed for legume seedling esterase isozyme banding pattern

1 : field bean 2 : french bean 3 : soybean (Paldal) 4 : soybean(Jangkyung) 5 : soybean (Hwangkum)
C : cotyledon, R : radicle, P : plumule.

Table 1. Numbur of esterase isozyme band in legume seedlings.

Common name	No. of bands		
	C	R	P
Field bean	4	1	—
French bean	3	3	—
Soybean cultivar			
Paldal	1	1	1
Jangkyung	1	1	1
Hwangkum	3	1	1

C : cotyledon R : radicle P : plumule

Table 2. Migrating distance in cm of esterase isozyme band in legume seedling.

Field bean		French bean		Soybean(Paldal)			Soybean(Jangkyung)			Soybean(Hwangkum)		
C	R	C	R	C	R	P	C	R	P	C	R	P
6.7	6.7	6.7		6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7
			6.6									
6.4												
		4.8										5.9
			4.7									
		4.5										
			4.3									
3.2												3.2
2.7												

C : cotyledon R : radicle P : plumule

위에에서만 존재하며 Est 4는 幼根에서만 존재한다고 하였다.

또한 본 시험에서 대두의 세 품종중 유독 황금콩의 子葉에서만 3개의 band가 나타나고 나머지는 모두 1개의 band만 존재하는 것은 품종간 유전자의 특성을 표현해 주는 중요한 표지가 될 것으로 생각된다.

Seedling Esterase Isozyme의 band수는 Table 1과 같이 들콩의 子葉에서 4개로 가장 많았는데 이 band의 수는 옥수수, 밀, 보리의 band수 보다는 훨씬 적은 수로써 種과 식물조직의 차이에서 비록되는 특징이라고 할 수 있다.

2. Esterase Isozyme의 활성화도

효소의 활성화도는 Isozyme의 염색강도에 따라 비교하는데 본 시험에 이용된 콩과식물의 Esterase Isozyme의 활성화도는 Fig. 1에서 보는바와 같다. 즉 덩굴 상남콩의 子葉과 幼根에서는 모두 짙게 나타났으며 관남콩에서는 다른 대두품종보다 비교적 활성화도가 큰 것으로 보인다. 또 조직별로는 사용된 종별 Seedling에 관계없이 子葉의 활성화도가 크고 다음이 幼根이며 幼葉은 아주 낮았다.

Macdonald and Brewbecker(1975)에 의하면 옥수수는 특히 胚盤(Scutellum)에서 Est 5, Est 6, Est 8와 Est 9의 활성이 높으며 Tomato(Rick, 1983)에서는 Est 1의 활성화도가 가장 높은 것으로 보고되었다. 그러나 염색에 소요되는 시간에 따라 염색의 강도가 차이가 있으므로 활성화도 판정에는 신중을 기해야 하며 이와같은 판정에 근거하여 얻은 식물의 종별, 조직별,

성장단계별의 차이점은 식물의 계통발생, 유전형질, 환경적응성과 같은 종의 특성을 구별하는데 marker가 되리라고 생각된다.

3. Esterase Isozyme의 이동속도

단백질이나 효소의 전기영동은 電荷나 분자의 크기 또는 모양에 따라 이동속도가 결정됨으로 이동속도는 Isozyme의 분별에 중요한 요인이 된다.

본 시험에 사용된 Seedling의 Isozyme band는 이동속도에 따라 분리된 것으로 각 종 및 조직별 Isozyme의 이동속도는 Table 2와 같다.

가장 속도가 빠른것은 6.7cm로 덩굴강남콩의 幼根을 제외하면 같은 결과를 나타내었다. 반대로 속도가 가장 느린 것은 돌콩의 子葉으로 2.7cm에 머물렀다.

Jaacka(1983)에 의하면 밀에서는 子葉에서 추출한 Est A의 이동속도가 4.3cm로 가장 빠르며(polyacrylamide gel로 영동) Est C는 2.6cm로 가장 느리게 나타났다. 이것은 Isozyme 분자의 크기나 모양의 차이에 따라 이동속도가 다르게 나타나는 것으로 보이며, 본 시험에서 식물의 종에 따라 이동속도가 다른 Esterase Isozyme이 존재하는 것은 이들 식물의 유전자가 갖는 특징으로써 種間 또는 品種間 특징을 보여 주는 것이라고 생각된다.

IV. 摘 要

콩과식물을 5일간 발아시켜 얻은 seedling을 子葉, 幼根 및 幼葉으로 나누어 Starch gel 전기영동법으로 Esterase Isozyme을 분리하고 염색하여 얻은 band의 수와 활성도는 다음과 같다.

1. Isozyme의 band수와 활성도는 식물의 종, 조직, 성장단계에 따라 차이가 있었다.
2. 돌콩의 子葉에서는 4개, 幼根에서는 1개의 band가 있어 조직에 따라 차이가 있었다.
3. 대두의 품종간 band수는 황금콩에서 子葉만이 3개의 band가 있었으며, 팔달콩, 장경콩의 子葉, 幼根, 幼葉은 각각 1개의 band를 갖고 있어 차이가 없었다.
4. 덩굴강남콩에서는 子葉, 幼根의 band수가 3개로

같았다.

5. Esterase Isozyme의 활성도는 염색정도에 따라 비교하면 덩굴강남콩의 子葉과 幼根에서 가장 높았고, 팔달콩에서 비교적 높게 나타났다.

V. 引用文獻

1. Brown, A. H. D. and Alland, R. W. 1969. Further isozyme differences among the inbred parents of a reciprocal recurrent selection population of maize. *Crop Sci.* 9: 643-644.
2. Buschbeck, R. and Zelmer, I. 1979. Veränderungen von protein-und Isozyme-Muster in Winterroggen-Karyopsen während der Reifung. *Wiss Z Pad Hoch Schule "Liselotte Hermann" Gestrow, DDR* 1: 59-79.
3. Hvid, S. and Nielson, G. 1977. Esterase isozyme variants in barley. *Hereditas.* 87: 155-162.
4. Jaaska, V. 1975. Evolutionary variation of enzymes and phylogenetic relationships in the genus, *Secale L.*, *Esti NSV TA Toimet, Biologia.* 24(3): 181-198(In Russian).
5. _____. 1983. *Secale and Triticale*. In *Isozyme in Plant Genetics and Breeding, Part B.* S. P. Tanksley and T. J. Orton, Eds, p. 79-101, Elsevier Sci. Publishers, Amsterdam.
6. Macdonald, T. and Brewbecker, J. L. 1975. Isozyme polymorphism in flowering plant. V. The isoesterase of maize: Tissue and substrate specificities and responses to chemical inhibitors. *Hawaii Agri. Expt. Stn, Tech. Bull.* 89: p. 24.
7. 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.
8. Scandalios, J. G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: Review, *Biochemical Genetics.* 3: 37-79.