

이탈리안 라이그라스의 품종별 Alcohol Dehydrogenase(ADH)와 Esterase의 Isozyme Banding Pattern에 관한 연구

이성규 · 박병훈*

Studies on the Alcohol Dehydrogenase(ADH) and Esterase Isozyme Banding Pattern of Italian Ryegrass Varieties

Sung Kyu Lee and Byung Hoon Park*

Summary

This study was planned to identify the variety of Italian ryegrass using electrophoresis. Thirty seven varieties of Italian ryegrass were tested by starch gel electrophoresis. The specific electrophoretic zymograms of each variety were observed by Alcohol dehydrogenase(ADH) and Esterase. The results were summarized as follows;

1. All varieties displayed two band zones by ADH and Rf values were 0.63 and 0.6 (Table 2, Fig. 2).
2. There were five band type for ADH isozyme of 37 varieties classified with isozyme banding pattern. According to the isozyme band type 7, 2, 6, 18 and 4 varieties belong to group, I, II, III, IV, and V, respectively (Table 2).
3. The varieties displayed single band zone for Esterase isozyme and Rf value was 1.00 (Table 2, Fig. 4).
4. According to banding type, Esterase isozyme of 37 varieties classified into 3 groups, 22, 8 and 7 varieties belong to group, I, II, and III, respectively (Table 2).

I. 緒 論

이탈리안 라이그라스(*Lolium multiflorum* LAM.)는 서늘한 氣候條件에서 잘 자라는 越年生 草種으로써 우리나라에서는 沓裏作으로 많이 재배되고 있다. 이 초종은 冬節期가 온화하고 습윤한 지방에서 排水가 좋고 腐蝕含量이 많은 토양에서 잘 자란다. 그러나 耐暑性과 耐寒性이 약하고(Miles & William, 1964) 특히 추운 冬節期 일때는 越冬이 되지 않아 우리나라에서는 주로 중부 이남지방에서만 안전 재배할 수 있다 (양 등 1988, 박 등 1989).

粗飼料가 부족한 우리의 축산현장에서 初期生育이 왕성하고 품질과 기호성이 우수한 이탈리안 라이그라스를 중부 이북지방까지 擴大栽培 하기 위해서는 이 지역에 적합한 품종을 선발하는 것이 중요하다.

본 연구는 이탈리안 라이그라스의 여러품종을 대상으로 ADH와 Esterase의 Isozyme Banding Pattern을

밝힘으로써 적지재배품종을 선택하는 기초자료를 얻고자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 공시 품종

본 시험에 동시된 품종은 Table 1과 같다.

2. Isozyme의 분석

1) 효소의 추출

이탈리안 라이그라스의 종자를 품종별로 48 시간 증류수에 침적한 후 10개의 종자를 막자사발에 넣고 0.05% L-histidine액 1ml를 가하여 마쇄하였다. 마쇄한 재료를 eppendorf tube에 담아 30분간 遠心分離하여 상등액을 얻었다.

Table 1. Tested varieties of italian ryegrass

Entry No.	Variety	Ploidy	Source*	Entry No.	Variety	Ploidy	Source
1.	Ace	4x	USA	21.	MA89	unknown	USA
2.	Alifa	unknown	NL	22.	Macho	4x	NL
3.	Atalja	2x	DK	23.	Metro	2x	NL
4.	Bambi	4x	DK	24.	Minamiwase	2x	J
5.	Barcolte	2x	NL	25.	Minaret	4x	NL
6.	Barmultra	4x	NL	26.	Moritz	2x	NL
7.	Bartissimo	2x	NL	27.	Ninak	4x	NL
8.	Beef builder	4x	USA	28.	Roberta	4x	DK
9.	Bettina	2x	DK	29.	Savanna	4x	NL
10.	Bofur	4x	DK	30.	Serenade	2x	NL
11.	Butler	unknown	DK	31.	Tachiwase	2x	J
12.	Cervus	4x	Swiss	32.	Tetra gold	4x	USA
13.	Combata	2x	D	33.	Tetrone	4x	NL
14.	Dalita	4x	DK	34.	Tosca	2x	NL
15.	Dama	unknown	Swiss	35.	Triangel	4x	NL
16.	Danergo	4x	DK	36.	Turgo	4x	DK
17.	Dilana	4x	D	37.	Wase aoba	2x	J
18.	EF Dasas 486	2x	DK				
19.	Elving	4x	DK				
20.	Gordo	2x	NL				

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

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 전분용액은 240ml 용량의 polyacryl판에 부어서 식힌 다음 vinyl lap으로 싸서 하루 밤 동안 숙성시켰다.

3) Buffer system

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

가. ADH isozyme

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

Tris..... 12.1g
Water..... 1,000ml

A just pH with HCl

Electrode buffer(Lithium-Borate buffer, pH 9.3)

Lithium hydroxide..... 1.2g
Boric acid..... 11.89g
H₂O 1,000ml

나. Esterase isozyme

Gel buffer(Tris-Citric buffer, pH 8.3)

Tris..... 6.2g
Citric acid..... 1.6g
H₂O 1,000ml

Electrode buffer는 ADH isozyme과 같음

4) 전기영동

하루 밤 동안 숙성시킨 starch gel 판의 5cm 위치에 origin line을 정하고 6mm의 홈을 낸 후 원심 분리 한 試料의 상등액을 6mm×6mm인 濾紙에 묻혀 홈에 삽입하였다. Electrode buffer는 1,000ml 용량을

두 개의 acryl 용기에 같은 양으로 나누어 양쪽으로 설치한 후 gel 판을 올려 놓았다. gel 판의 origin 쪽은 -전극을, 반대쪽은 +전극을 연결하고 최초의 전압은 300V로 시작하고 5분 후에 350V로 고정시켜 영동 거리가 10cm될 때까지 계속하였다.

5) Isozyme의 염색

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

가. ADH isozyme

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

* Incubated at 37°C for approximately 30min.

나. Esterase isozyme

a-Naphthyl acetate(1% acetone: water=1:1 용액)	2ml
Fast Blue RR Salt	40mg
Phosphate buffer(NaH ₂ PO ₄ , pH 4.3)	50mg
Phosphate buffer(NaH ₂ PO ₄ , pH 9.2)	10mg
H ₂ O	40ml

III. 結果 및 考察

1. ADH Isozyme의 품종별 Banding Pattern

37개 이탈리아인 라이그라스 품종의 ADH Isozyme Banding Pattern은 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 두 개의 band가 나타났는데 품종에 따른 banding Pattern의 변이는 band의 염색강도로 보아 5종으로 구별되었다(Fig. 2).

이탈리아인 라이그라스 37개 품종의 ADH isozyme banding pattern은 Fig. 1을 근거로 하여 band의 염색강도를 비교하면 Fig. 2와 같은 다섯가지 type으로 구분되었다. 이 Type을 기준으로 하여 37개 품종을 Group별로 분류하면 Group I에 속하는 것은 Combata, Elving, Gordo, Minaret, Savanna, Tosca, Wase Aoba 등 7품종, Group II에 속하는 것은 MA89, Macho 등

2품종, Group III에 속하는 것은 Ace, Cervus, Dama, Ninak, Serenade, Tachi Wase 등 6품종, Group IV에 속하는 것은 Alifa, Atajja, Barcolte, Barmultra, Baltissimo, Beef builder, Bettina, Bofur, Butler, Dama, Danergo, EF Dasas 486, Metro, Minami Wase, Tetra gold, Tetrone, Triangel, Turgo 등 18품종, Group V에 속하는 것은 Bambi, Dalita, Moritz, Roberta 등 4품종이었다.

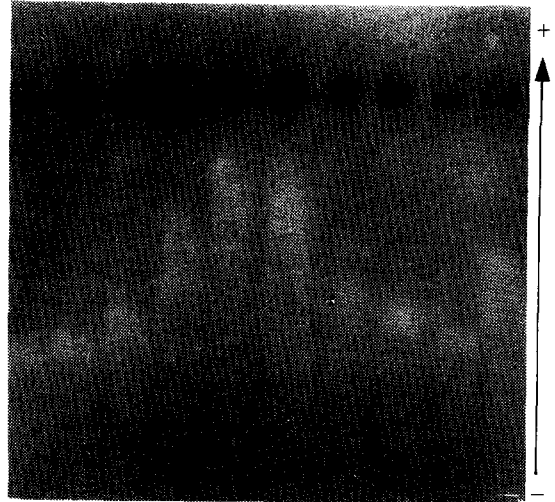


Fig. 1. Starch gel electrophoretic zymograms of ADH isozyme banding patterns in Italian ryegrass varieties.

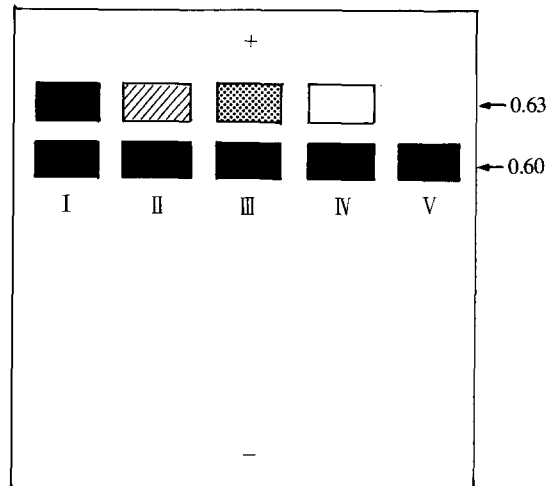


Fig. 2. Diagram showing ADH isozyme banding patterns of five types in Italian ryegrass varieties. I, II, III, IV, V indicate ADH isozyme banding type.

Table 2. Staining density of ADH and Esterase isozyme in Italian ryegrass varieties

Entry No.	Variety	ADH		Esterase
		Rf 0.60	Rf 0.63	Rf 1.00
1	Ace	++	+	+++
2	Alifa	++	-	+++
3	Atajja	++	-	+
4	Bambi	+	0	+++
5	Barcolte	++	-	++
6	Barmultra	++	-	+++
7	Bartissimo	++	-	+
8	Beef Builder	++	-	+++
9	Bettina	++	-	+
10	Bofur	++	-	+++
11	Butler	++	-	++
12	Cervus	++	+	++
13	Combita	++	++	++
14	Dalita	+	0	+++
15	Dama	++	+	+++
16	Danergo	++	-	+++
17	Dilana	++	-	+++
18	EF Dasas 486	++	-	+++
19	Elving	++	++	+++
20	Gordo	++	++	+++
21	MA89	+++	++	+++
22	Macho	+++	++	++
23	Metro	++	-	+
24	Minami wase	++	-	+
25	Minaret	++	++	+++
26	Moritz	+	0	+++
27	Ninak	++	+	+++
28	Roberta	+	0	++
29	Savanna	++	++	++
30	Serenade	++	+	++
31	Tachi Wase	++	+	+++
32	Tetra gold	++	-	+++
33	Tetrone	++	-	+++
34	Tosca	++	++	+++
35	Triangel	++	-	+++
36	Turgo	++	-	+
37	Wase Aoba	++	++	+

Note: 0, +, ++, +++: Staining density.

MARSHALL 등(1974)에 의하면 狹葉 Lupins의 종자 ADH isozyme은 이동속도에 따라 3개의 band zone으로 보고하였는데 본 시험에서 이탈리아인 라이그라스 품종은 band zone이 두 개로써 Lupin과는 달리 band zone 수가 하나 적었다. 그러나 염색 강도로 본 band의 차이점은 band zone II가 band I 보다 짙게 나타났는데 MARSHALL 등이 Lupin의 band zone II의 염색강도(효소활성도)가 가장 높았다고 한 보고와는 일치하였다.

이탈리안 라이그라스 37개 품종의 ADH isozyme의 Rf value는 band zone I은 0.60, band zone II는 0.63으로 품종에 따른 차이는 없었다. Kut and Evans (1984)는 Nicotina종의 종자 ADH isozyme은 Rf value가 0.42에서 0.68사이에 있음을 보고 하였는데 본 시험의 결과와 별 차이가 없는 것으로 보아 ADH isozyme의 Rf value는 대개 이 범위 안에 있는 것으로 생각된다.

2. Esterase isozyme의 품종별 banding pattern

이탈리안 라이그라스 37개 품종의 Esterase isozyme banding pattern을 염색강도에 따라 비교하면 Table 2와 같으며 이를 기준으로 Fig. 4와 같이 3개 type으로 구별할 수 있었다. 각 Type에 따라 37개 품종을 Group별로 나누면 Group I에 속하는 것은 Ace, Alifa, Bambi, Barnultra, Beef Builder, Bofur, Dalita, Dama, Danergo, Dilana, EF Dasas 486, Elving, Gordo, MA89, Minaret, Moritz, Ninak, Tachi Wase, Tetrone, Tetro gold, Tosca, Triangel 등 22품종, Group II에 속하는 것은 Barcolte, Butler, Cervus, Combita, Macho, Roberta, Savanna, Serenade 등 8품종, Group III에 속하는 것은 Atalja, Bartissimo, Bettina, Metro, Minami Wase, Turgo, Wase Aoba 등 7품종이었다.

Esterase isozyme의 Rf value는 1.00으로 한 개의 band만 나타났는데 Oat(*Avena barbata*)에서는 7개의 band(Marshall and Allard, 1969), *A. fatua*는 5개의 band(Clegg and Allard, 1973), Barley seed에서는 적어도 10개의 esterase isozyme band(Hvid and Nielson, 1977), 돌콩, 돌동부, White clover의 잎과 뿌리혹은 각각 8개의 band(이, 1992)가 있다고 한 보고와는 많은 차이를 발견할 수 있었다.

이처럼 esterase isozyme의 band 수에서 많은 차이가 나는 것은 種이나 品種, 식물의 기관별 변이에 따른

것으로 그 식물 자체의 고유한 특성이라고 할 수 있다. 그러나 본 시험에서 한 개의 band가 나타난 것은 miner band의 출현이 안 되었기 때문으로 생각된다.

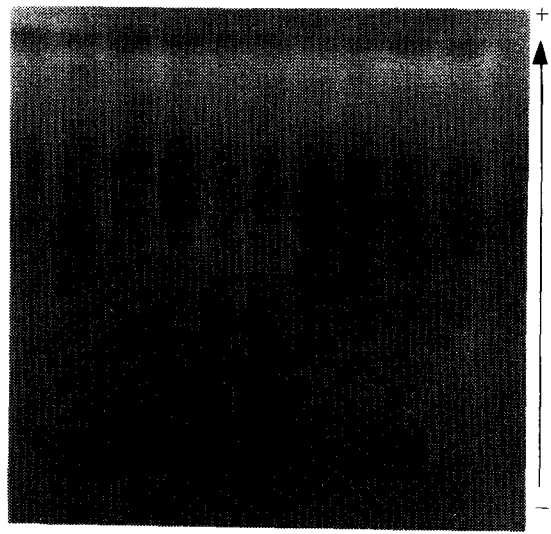


Fig. 3. Starch gel electrophoretic zymogram of esterase isozyme banding patterns in Italian ryegrass varieties.

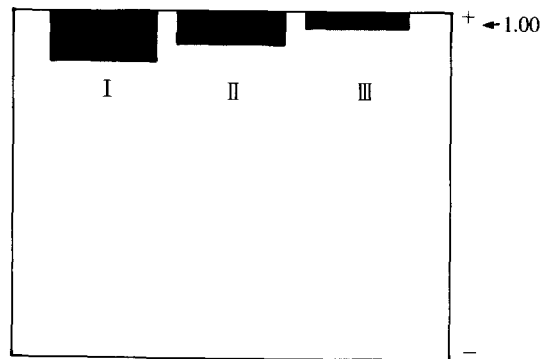


Fig. 4. Diagrams of zymogram expressed for esterase isozyme banding patterns in Italian ryegrass varieties. I, II, III indicate isozyme banding type.

IV. 摘 要

이탈리안 라이그라스 37개 품종을 대상으로 ADH와 Esterase의 Isozyme을 Starch gel 전기영동법을 이용하여 분리한 후 염색하여 품종간 band의 차이점을 비

교하였다.

1. ADH isozyme은 Rf 0.60과 0.63 두 개의 band zone으로 나타났으며 Rf 0.60이 main band이었다.

2. ADH isozyme의 banding pattern은 5개의 type으로 구별이 되었는데 type I은 7개 품종, type II는 2개 품종, type III은 6개 품종, type IV은 18개 품종, type V는 4개 품종이었다.

3. Esterase isozyme은 Rf 1.00으로 한 개의 band만 나타났다.

4. Esterase isozyme의 banding pattern은 3개 type으로 구별되었는데 type I은 22품종, type II는 8품종, type III은 7개 품종이었다.

5. ADH와 Esterase isozyme의 banding pattern으로 본 이탈리아인 라이그라스의 품종별 차이는 없으나 염색 강도에 따라 일부 품종의 변이를 구분할 수 있었다.

V. 引用文獻

1. Clegg, M.T. and R.W. Allard. 1973. The genetics of eletrophoretic variants in Avena. II. The esterase E1, E2, E4, E5, E6 and anodal peroxide APX4 loci in A. fatua. J. of Hered, 64:3-4.
2. Hvid, S. and Nielson, G. 1977. Esterase isozyme variants in barley. Hereditas, 87:155-162.
3. 이성규. 1992. 돌콩, 돌동부, 화이트클로버의 조직별 Esterase isozyme 변이에 관한 연구. 한초지. 12(4):253-259.
4. Marshall, D.R., and R.W. Allard. 1969. The genetics of electrophoretic variants in Avena. I. The esterase E4, E9, E10, Phosphatase P5 and anodal peroxidase APX5 loci in A. barbata. J. of Hered. 69:17-19.
5. Marshall, D.R., P. Broue and R.N. Oram. 1974. Genetic control of alcohol dehydrogenase isozymes in narrow leafed Lupins. The J. of Hered. 65:198-203.
6. Miles, D.G. and I.G. Williams. 1964. Winter hardness in pasture varieties. Rep. Welsch Pl. Breed Sta. pp. 70-1.
7. 박병훈, 김명환. 1989. 禾本科牧草의 種屬間 雜種에 관한 연구. I. 交雜 胚 日齡에 따른 Callus 형성과 식물체 재분화. 한초지. 9(2):62-67.
8. Scandalios, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. A review. Biochemical genetics. 3:37-79.
9. Stephanie, A. Kut. and D. A. Evans. 1984. ADH isozymes in seed of Nicotina species and somatic hybrids. The J. of Heredity, 75:215-219.
10. 柳鐘遠, 姜正勳, 韓興傳, 金雄培, 朴炳勳. 1988. 禾本科牧草의 種屬間 雜種 hybrid ryegrass와 Festulolium의 생육특성. 한초지. 8(2):123-127.