

저온·담수토양에서 벼종자 β -아밀라제 유전자 발현과 호분층 인접 배유의 전분분해 양상

윤병성*† · 강원희*

*강원대학교 농업생명과학대학

Expression of β -amylase Gene and Degradation of Starch Granules of Germinating Rice Seed under Low Temperature and Submerged Soil Condition

Byeong Sung Yoon*† and Won Hee Kang*

*College of Agricultural and Life Science, Kangwon National University, Chunchon, 200-701, Korea

ABSTRACT : This study was conducted to determine β -amylase gene expression and degradation of starch granules in the endosperm near scutellar epithelium of rice cultivars under the submerged soil at hypoxia 18°C, which is practically important condition for farmers in temperate regions. In case of cv. Janghyangdo, accumulation of β -amylase mRNA was detected in the aleurone layer on the ninth day after seeding. However that of cv. Suwon 287 and Norin 6 were not detected in the aleurone layer in submerged soil(hypoxia) at 18°C. β -amylase of cv. Janghyangdo was synthesized *de novo* in aleurone cells not in the scutellar epithelium. Degradation of starch granules in the endosperm near scutellar epithelium of c.v. Janghyangdo and Ginbozu, which have a strong β -amylase activity, was greater than that of cv. Suwon 287 and Norin 6 with no β -amylase activity in submerged soil(hypoxia) at 18°C. This result may indicate that β -amylase gene expression and degradation of starch granules of germinating rice seed are related to the emergence of rice under the submerged soil condition at low temperature.

Keywords : β -amylase, gene expression, starch granules, submerged soil, rice germination.

배유에 축적된 전분은 우선 α -아밀라제에 의해 가용화 되고, 이 가용성 전분은 R-효소, β -아밀라제와의 공동작용에 의해 말토스 단위까지 분해되며, 또한 글루코스가 되어 배조직에 이동 자당의 형태로 출아에 이용된다(Yamaguchi, 1993; Yamaguchi, 1995). 상온·대기중의 산소농도조건에서는 종자의 전분을 분해하는데 충분한 양의 효소군이 발현한다고 생각되어 진다(Nandi *et al.*, 1995). 또한 상온 발아 조건하에서는, 발아 종자 중에 강한 활성을 나타내는 β -아밀라제는 α -아밀라

제와 달리 生전분을 분해하지 못하므로, 종자 전분 분해계에 있어서 보조적인 역할을 담당한다고 생각된다(Guglielminetti *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996).

한편, 온대 북한계 지대의 수도직과 재배 조건의 하나인 저온·담수토양 조건에서 벼 출아성의 품종간 차이를 검토한 결과 아밀라제에 의한 전분 분해과정과 출아와의 관계를 명백히 해야할 필요가 있음이 시사되었다(Akita *et al.*, 1998; Yoon *et al.*, 2002). 따라서, 저온·담수토양 조건하에서 벼 종자 출아시 아밀라제 활성 및 유전자 발현의 유무가 실제 전분분해에 미치는 영향을 확인하기 위하여 자이모그램을 이용해 아밀라제 분자種에 대해서 해석한 결과, α -아밀라제 활성은 실험한 모든 조건하에서 발현했지만, 저온·저산소조건(담수토양)에서도 β -아밀라제 활성이 검출되는 품종群(I), 상온·통상의 산소농도에서는 β -아밀라제 활성이 검출되지만, 저온·저산소조건(담수토양)에서는 검출되지 않는 품종群(II), 실험한 모든 조건하에서 β -아밀라제 활성이 검출되지 않는 품종群(III)의 3개로 나누어졌다(Yoon *et al.*, 1998; Yoon & Akita, 2001; Yoon *et al.*, 2001). 또한 胚가 크고 출아가 좋은 품종과 배가 큰데도 출아가 나쁜 품종을 선택하여 β -아밀라제 활성과의 관련성을 검토한 결과 18°C의 담수토양 조건에서의 출아는 β -아밀라제 발현 유무와 연동하는 결과를 얻었다(Yoon & Akita 2001; Yoon *et al.*, 2001). 이러한 저온·저산소 조건에서의 발아의 경우에는 α -아밀라제 활성의 발현이 억제되기 때문에 α -아밀라제 단독으로 충분한 양의 전분분해활성이 유지되지 않는다고 생각되어지고, 이때에 β -아밀라제 활성의 유무는 보조적이 아니고 중요한 인자가 되고 있다고 추측되어졌다(Yoon *et al.*, 1998; Yoon & Akita 2001; Yoon *et al.*, 2001). 그러나 저온·담수토양조건에 있어서 출아성에 관계하는 β -아밀라제의 역할을 체계적으로 해석한 결과는 거의 없다. 따라서 금후 온대 수도작에 있어서의 발아의 조건에 가까운 저온·담수토양조건에서의 출아에 깊게 관련된다고 생각되어지

†Corresponding author: (phone) +82-33-250-6410 (E-mail) 65yoon@netian.com <Received May 29, 2002>

는 β-아밀라제 유전자 발현과 발현 양상이 실제로 호분층 인접 부분의 전분분해에 영향을 미쳤는지 현미화학적으로 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

자이모그램 실험에서(Yoon & Akita 2001; Yoon *et al.*, 2001) 저온·담수토양조건에서도 β-아밀라제의 활성을 나타내는 長香稻, 저온·담수토양조건에서는 β-아밀라제의 활성을 나타내지 않는 수원 287호, 시험한 모든 조건하에서 β-아밀라제의 활성을 나타내지 않는 農林(Norin) 6호를 사용해 휴면타파(50°C에서 7일간)와 종자소독(베노람 수화제)을 한 후 8°C의 인큐베타에서 5일간 침지 한 후 18°C의 담수토양구(직경 약 7 cm 컵에 토양을 3 cm 충전하고, 그 위에 종자를 10립씩 파종, 두께 1 cm의 복토를 한 후, 깊이 1 cm의 담수)를 설정하여 9일째 샘플링 하였다.

β-아밀라제 유전자의 발현

샘플링 한 종자를 4°C의 FAA(5% 포르말린, 5% 빙초산, 45% 에탄올)에 3일간 고정 후, t-부틸알코올 시리즈로 탈수한 후, 파라플라스트로 包埋했다. 마이크로톰으로 두께 10 μm로 절편을 한 후 백타 본드로 코팅한 슬라이드그래스에 붙여 β-아밀라제의 유전자 발현의 유무를 *in situ* hybridization에 의해 조사했다. β-아밀라제 mRNA을 지오키시게닌 표식 프로브를 이용한 Kouchi & Hata(1993)과 Yoon *et al.*(2001) 방법에 의해 검출하였다(Fig. 1).

배유에서의 전분분해 양상

β-아밀라제의 활성, 유전자 발현의 유무가 저온 담수토양중에서의 벼 종자의 출아에 대해 실제로 전분 분해에 영향을 미쳤는가를 확인하기 위해 자이모그램 실험에서 저온·담수토양조건에서도 β-아밀라제의 활성을 나타내는 長香稻, 銀坊主(Ginbozu), Fortana I-133과 저온 담수 토양조건에서 β-아밀라제의 활성을 나타내지 않는 수원 287호, 시험한 모든 조건하에서 β-아밀라제의 활성을 나타내지 않는 고시히카리(Koshihikari) 및 農林(Norin) 6호를 사용해(Yoon 1997; Yoon & Akita 2001), 건조 종자 및 18°C의 담수토양 조건에서 9일간 처리한 종자를 4°C의 FAA에서 5일간 고정한 후 Fig. 2의 순서에 따라 PAS 반응에 의한 호분층 인접 부분의 전분분해 양상을 현미화학적으로 검토하였다.

결과 및 고찰

저온·담수토양조건하에서 β-아밀라제의 유전자 발현

18°C의 저온·담수토양조건하에서도 자이모그램하에서 β-

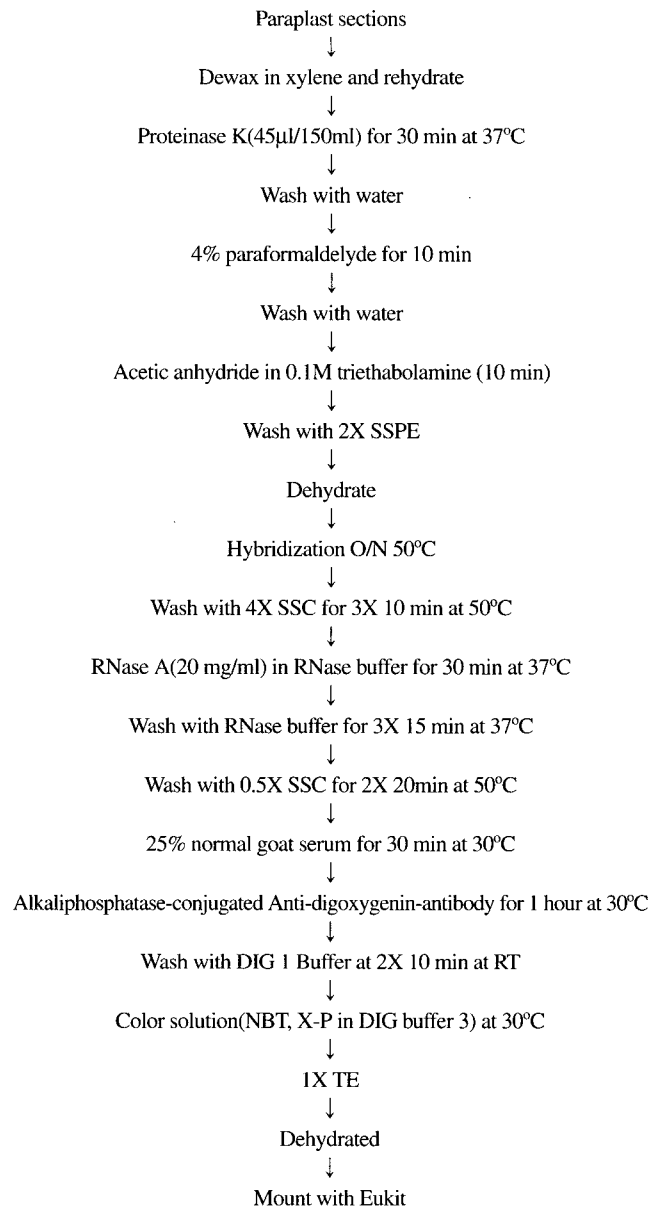


Fig. 1. Flowchart of *in situ* hybridization experiment.

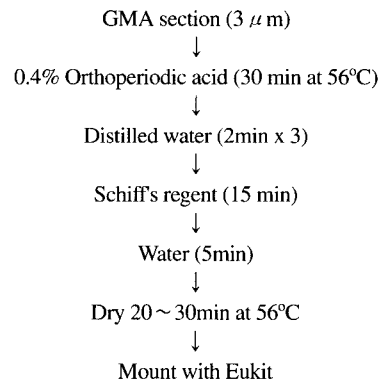


Fig. 2. Flowchart of PAS reaction.

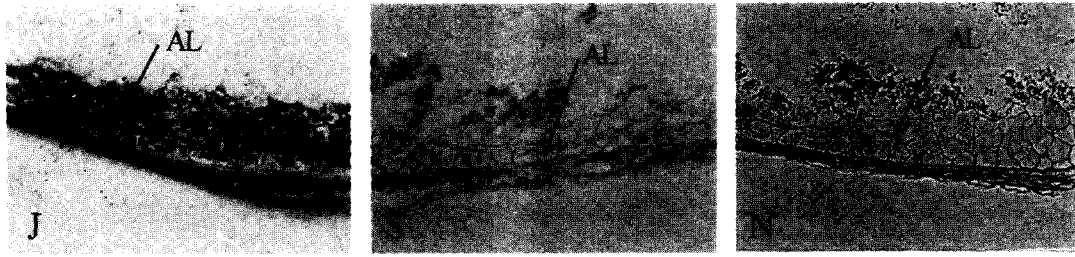


Fig. 3. Histological localization of β -amylase mRNA in the aleurone layer of three rice cultivars treated 9 days under the submerged soil condition at 18°C (antisense probe). *in situ* hybridization was carried out on 10 μ m thick section. Abbreviations, al:aleurone layer; J: Janghyangdo; S: Suwon 287; N: Norin 6.

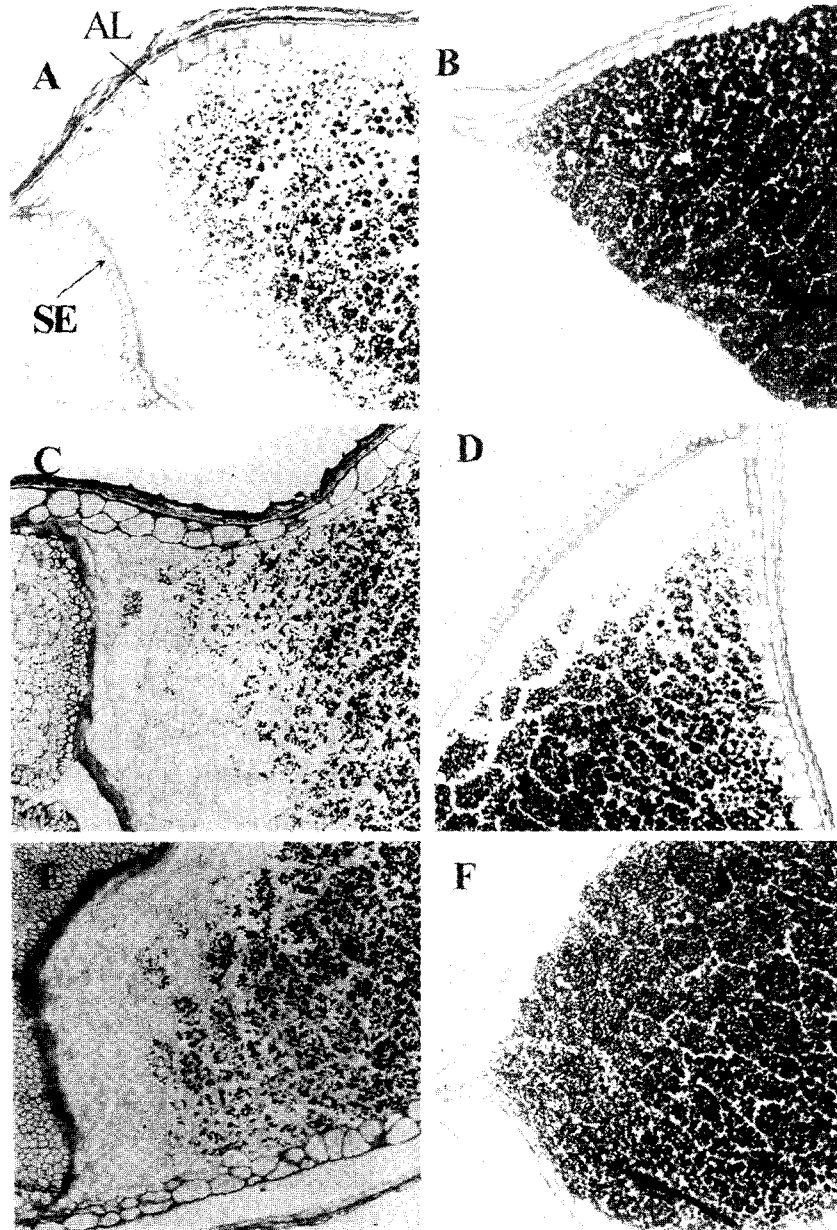


Fig. 4. Degradation of starch granules in the endosperm near scutellar epithelium of 6 rice cultivars, Janghyangdo(A), Fortana I-133(C), Ginbozu(E), Suwon 287(B), Koshihikari(D) and Norin 6(F) treated 9 days under the submerged soil condition at 18°C. Abbreviations; al:aleurone layer; se:scutellar epithelium.

아밀라제의 활성이 보였던 장향도 품종(Yoon & Akita 2001; Yoon *et al.*, 2001)에 대해 β -아밀라제의 유전자의 발현 유무를 처리 9일째에 조사한 결과 유전자의 발현이 보였으나, 저온·담수토양조건하에서는 자이모그램하에서 β -아밀라제의 활성이 보이지 않았던 수원 287호에서는 *in situ* hybridization에 의해서도 β -아밀라제 유전자의 발현이 보이지 않았다(Fig. 3). 시험한 모든 조건하에서 β -아밀라제의 활성이 보이지 않았던 農林(Norin) 6호도 β -아밀라제의 유전자 발현이 보이지 않았다(Fig. 3). 이 결과는 전기 영동법에 의한 활성 측정의 결과(Yoon *et al.*, 2001)와 일치했다. 이것은 아밀라제 활성이 유전자의 전사 레벨의 조절 가능성을 시사한다(Yoon *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 1996). 한편 배반상피세포에서의 β -아밀라제 유전자의 발현은 보이지 않았다(Yoon, 1997; Yoon & Cho; 2001).

β -아밀라제의 활성유무와 배유에서의 전분분해 양상

18°C의 저온·담수토양조건에서도 출아하고, β -아밀라제의 활성을 나타내는 長香稻, 銀坊主(Ginbozu), Fortana I-133(Yoon & Akita 2001)의 출아 9일째의 배반상피세포와 배반상피세포에 인접한 호분층 부위의 배유 전분립을 Fig. 4에 나타냈다.

저온·담수토양조건에서 β -아밀라제의 활성을 나타내지 않는 수원 287호, 시험한 모든 조건하에서 β -아밀라제의 활성을 나타내지 않는 고시히카리(Koshihikari) 및 農林(Norin) 6호의 9일째의 배반상피세포와 배반상피세포에 인접한 호분층 부위의 배유 전분립을 Fig. 4에 나타냈다.

위에서 보는 바와 같이 β -아밀라제 활성의 유무에 의해 배반세포에 인접한 배유부분의 전분분해량에 변화를 보여 β -아밀라제 활성이 높은 長香稻와 Fortana I-133가 저온·담수토양조건에서 β -아밀라제 활성을 나타내지 않는 수원 287호 보다 배반상피세포 및 배반상피세포에 인접한 호분층 근접 배유부분의 전분립 감소가 컸다. 또 α -아밀라제 활성의 자이모그램 결과는 거의 같은데 β -아밀라제의 활성을 나타내는(Yoon, 1987) 銀坊主(Ginbozu), Fortana I-133와 활성이 없는 農林(Norin) 6호, 고시히카리(Koshihikari)를 비교한 결과 銀坊主(Ginbozu), Fortana I-133 쪽이 활성이 없는 農林(Norin) 6호, 고시히카리(Koshihikari) 보다 배반상피세포 및 배반상피세포에 인접한 호분층 근접 배유부분의 전분립 감소가 컸다.

β -아밀라제의 동태에 대해서는 작물종에 따라 다른 결과가 얻어지고 있는데, 보리 및 밀의 β -아밀라제는 발육중의 종자에서 합성되어 배유중에 축적된다(Hara *et al.*, 1986; Shewry *et al.*, 1988; Daussant *et al.*, 1994). 이것에 대해 벼에서는 발아시에 배반 상피세포(Okamoto & Akazawa; 1980) 혹은 호분층(Wang *et al.*, 1996)에서 *de novo* 합성된다고 하는 보고는 있지만, 이들 실험은 효소 항체법에 의한 결과로 그 발현에 대한 유전자 레벨에서의 해석은 거의 행해지지 않았다. 그런데 분자 생물학적 수법에 의한 이번 결과는 Okamoto와

Akazawa(1980)의 결과와는 달리 벼 종자의 β -아밀라제 유전자는 배반상피세포에서는 발현되지 않고, 호분층에서 *de novo* 합성된다는 Wang 등(1996)의 결과와 일치했다.

이상의 결과로부터, 18°C의 저온·담수토양조건하에서 벼 종자의 출아에 β -아밀라제 유전자의 발현과 전분 분해의 연관 가능성을 확인하였다.

적 요

온대 수도작에 있어서 발아시의 조건에 가까운 저온·담수토양조건에서의 출아에 관련된다고 생각되어지는 β -아밀라제 유전자 발현과 발현 양상이 실제로 호분층 인접 부분의 전분 분해에 영향을 미치는지 *in situ* hybridization과 현미화학적 방법으로 검토하였다.

1. 18°C의 저온·담수토양조건하에서 출아했던 장향도 품종은 호분층에서 β -아밀라제 유전자의 발현이 보였다.

2. 18°C의 저온·담수토양조건하에서 출아하지 못했던 수원 287호는 β -아밀라제 유전자의 발현이 보이지 않았다.

3. β -아밀라제 활성의 유무에 의해 배반세포에 인접한 배유부분의 전분분해량에 변화를 보여 β -아밀라제 활성이 높은 長香稻, 銀坊主(Ginbozu), Fortana I-133가 18°C의 저온·담수토양조건하에서는 β -아밀라제 활성을 나타내지 않는 수원 287호와 시험한 모든 조건하에서 β -아밀라제의 활성이 보이지 않았던 農林(Norin) 6호, 고시히카리(Koshihikari) 보다 배반상피세포 및 배반상피세포에 인접한 호분층 근접 배유부분의 전분립 감소가 컸다.

이상의 결과 저온·담수토양조건하에서 벼 종자의 출아에 β -아밀라제 유전자의 발현과 전분 분해의 연관 가능성을 확인하였다.

사 사

Author is grateful to Akita S(former professor of Tokyo University), Nemoto K(assistant professor of Tokyo University) and Yamaguchi J(professor of Hokkaido University) for providing valuable discussion and encouragement during this experiment.

인용문헌

- Akita, S., B. S. Yoon, and N. Kabaki. 1998. Relationship between seedling emergence rate and embryo weight of rice under low-temperature and submerged soil condition. *Jpn. J. Crop Sci.* 67 : 318-322.
- Daussant, J., J. Sadowski, and P. Ziegler. 1994. Cereal β -amylases : Diversity of the β -amylase isozyme status within cereals. *J. Plant Physiol.* 143 : 585-590.
- Guglielminetti, L., J. Yamaguchi, P. Perata, and A. Alpi. 1995. Amyolytic activities in cereal seeds under aerobic and anaerobic condi-

- tions. *Plant Physiol.* 109 : 1069-1076.
- Hara, N., M. Nishimura, and J. Daussant. 1986. Conversion of free β -amylase to bound β -amylase on starch granules in the barley endosperm during desiccation phase of seed development. *Protoplasma.* 134 : 149-153.
- Kouchi, H., and S. Hata. 1993. Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen. Genet.* 238 : 106-119.
- Nandi, S. D. G., and S. Sen-Mandi. 1995. β -amylase activity as an index for germination potential in rice. *Ann. Bot.* 75 : 463-467.
- Okamoto, K., and T. Akazawa. 1980. Enzymatic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. 9. De novo synthesis of β -amylase. *Plant Physiol.* 65 : 81-84.
- Saitho, T., S. Itoh, S. Hatano, and J. Yanaguchi. 1996. Analysis of structure and regulatory expression of β -amylase gene in rice. *Japan J. Breed* 46(extra 2) : 30.
- Shewry, P. R., S. Parmar, B. Buxton, M. D. Gale, C. J. Liu, J. Hejgaard, and M. Kreis. 1988. Multiple molecular forms of β -amylase in seeds and vegetative tissues of barley. *Planta.* 176 : 127-134.
- Wang, S. M., W.L. Lue, K. Eimert, and J. Chen. 1996. Phytohormone regulated β -amylase gene expression in rice. *Plant Mol. Biol.* 31 : 975-982.
- Yamaguchi, J. 1993. Starch degradation system. *Plant Cell Tech* 5(3) : 184-192.
- Yamaguchi, J. 1995. Bioscience of seed. 5. Starch synthesis and degradation of seed. Gakukai press center. Tokyo. pp.87-93.
- Yoon, B. S. 1997. Ecological study on the regulation mechanism of seedling emergence in direct seeding cultivation of rice. Ph. D. Thesis of graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo.
- Yoon, B. S., K. Nemoto, J. Yamaguchi, S. Akita, E. H. Kim, and N. S. Kim. 1999. Differential amyloytic activity among rice cultivars in germinating under prevailing direct seedling condition in temperate regions. *Annual meeting Abstracts. Crop Sci.* 74-75. Salt Lake City, Utah.
- Yoon, B.S., N.S. Kim, and S. Akita.. 2001. The expression patterns of α - and β -amylase genes in germinating rice seeds under low temperature and hypoxia condition. *Korean J. Genetics* 23(4) : 333-339.
- Yoon, B. S., and S. Akita. 2001. Seedling emergence and β -amylase activity of rice cultivars under low temperature and submerged soil condition. *Korean J. Breed.* 33(3) : 162-166.
- Yoon, B. S., and D. H. Cho. 2001. Time and spatial change of amylase gene expression in germinating rice seed under the low temperature and submerged soil condition. *Korean J. Crop Sci* 46(suppl 1) : 120-121.
- Yoon, B. S., D. H. Cho, and N. S. Kim. 2002. Relationship between embryo weight and emergence rate of rice cultivars under low temperature and submerged soil condition. *Korean J. Breed.* 34(1) : 1-9.