

유료용 유채 유식물의 조직내 효소의 발현 패턴

송용수¹ · 서동준¹ · 이복례² · 정우진^{1*}

¹전남대학교 응용생물공학부, ²전남대학교 동물자원학부

Expression Patterns of Enzymes in Different Tissues of Oil Seed Rape (*Brassica napus* L.) Seedling

Yong-Su Song¹, Dong-Jun Seo¹, Bok-Rye Lee², and Woo-Jin Jung^{1*}

¹Environment-Friendly Agriculture Research Center (EFARC), Division of Applied Bioscience and Biotechnology, Institute of Agricultural Science and Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

²Department of Animal Science, Institute of Agricultural Science and Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Received March 25, 2009; Accepted April 7, 2009

To investigate expression patterns of chitinase, β -1,3-glucanase and peroxidase involved in biological control of phytopathogens, three oil seed rapes (Capitol, Pollen and Saturnin) were used. Activities of the enzymes in old leaves were 9.7~11.8 unit/mg protein in chitinase, 11.1~17.3 unit/mg protein in β -1,3-glucanase and 0.6~1.7 unit/mg protein in peroxidase. Activities of the enzymes in roots were 39.2~49.0 unit/mg protein in chitinase, 49.9~62.0 unit/mg protein in β -1,3-glucanase and 2.4~3.8 unit/mg protein in peroxidase. Chitinase and β -1,3-glucanase activity were the highest level in Saturnin leaves and in Capitol roots while activities of those were the lowest level in Capitol leaves. Also, chitinase and β -1,3-glucanase and peroxidase activity were the lowest level in Saturnin roots. Active bands of chitinase isoform in leaves (73, 51, 40, 34, and 29 kDa) and in roots (100, 57, 34, and 29 kDa) tissues showed in the SDS-PAGE gel. Active bands of β -1,3-glucanase isoform in leaves and roots (75 and 55 kDa) tissues showed on the SDS-PAGE gel. Active staining of peroxidase showed the strongest level in leaves and roots of Pollen. Active bands of peroxidase isoform in leaves (122, 114, and 93 kDa) and in roots (135, 122, 114, and 93 kDa) tissues showed on the Native-PAGE gel. These results indicated that establishment of expression pattern of enzymes in rape tissues could play as an important role with respect to resistance of plant pathogens in rape.

Key words: *Brassica napus* L., chitinase, β -1,3-glucanase

서 론

최근 유채를 이용한 친환경 바이오에너지의 원료에 관한 연구가 대두되고 있다. 바이오디젤과 디젤연료의 혼합비율을 30:70으로 사용하거나 식물성 기름 단독의 연료로서 사용 가능성의 보고 되고 있다[Jang, 2002]. 또한, 겨울철에도 작물의 생육이 진행되는 점을 고려해볼 때 국내에서 재배의 가능성을 높일 수 있다. 유채의 주 용도는 기름을 이용하는 것인데 종자에는 40-45% 기름이 함유되어 있으며 기름의 지방산 조성도 품질개량이 된 품종과 품종개량이 되지 않은 품종으로 나뉜다[Jang, 2002]. 또한 부산물로 얻어지는 유채박은 가축사료와 유기질 비

료로 이용된다. 봄철, 가을철에는 단경기 채소용으로, 개화기의 밀원용 및 관상용, 축산에서의 청예용 등으로 쓰이고 있어 그 용도가 다양하게 사용된다. 또한 유채의 종실에는 단백질 함량이 21.6-24.5% 정도가 함유되어 있어 기름을 이용하고 남은 유채깻묵은 고단백의 가축사료로서 이용 가치가 매우 높다[Bang et al., 1990]. 단백질 제한 아미노산인 methionine이 풍부하게 함유되어 있다[Nocrashy et al., 1975]. 유채 Youngsan 품종의 경우 단백질을 추출하기 위하여 산업용 효소인 pronase를 사용하여 효소로 가수분해하기 위한 최적조건에 관한 연구가 보고된 바 있다[Kim et al., 1992]. 또한 유채 종자 내에는 배당체인 글루코시노레이트(glucosinolate)라고 하는 유독성분이 들어 있으며 이러한 성분 때문에 유채깻묵을 가축의 사료로 급여할 경우 감상선 장애를 일으켜 체중의 정지 및 가금류의 경우 산란율 등이 떨어지는 결과를 초래한 연구가 보고된 바 있다 [Josefsson, 1967; Daun, 1983]. 따라서 글루코시노레이트의 제거 방법에 관한 연구[Josefsson, 1971], 육종기술을 이용한 성분

*Corresponding author
Phone: +82-62-530-3960; Fax: +82-62-530-2129
E-mail: woojung@chonnam.ac.kr

억제 방법에 관한 연구가 수행 되었다[Kondra and Downey, 1970]. 그러나, 이러한 독성성분인 글루코시노레이트를 이용한 식물병 방제에 응용되고 있는데 선충의 분포를 감소시키는 효과가 있다는 연구결과도 보고된 바 있다[Zasada and Ferris, 2004]. 또한, 유채의 월동 후 재생에 있어 중요한 요인이 되는 월동기간 중의 식물체내 건물 및 영양소 축적 등의 생육 변화를 보고한 바 있다[Chung *et al.*, 1993]. 사료용 유채의 경우는 목초의 생육이 정지되고 품질이 저하되는 늦가을에 우수한 청초생산을 가능하게 하여 생초 공급기간을 늘리는 경우도 있다[Jo and Kim, 1988].

이상의 연구들에서 살펴본 바와 같이 농업적 이용면에서 가치가 매우 높은 사료용 유채의 식물체내 단백질의 발현 패턴에 대한 연구 결과가 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 식물병의 생물학적 방제에 응용할 수 있는 식물체 조직내 단백질의 활성을 조사하기 위하여 사료용 유채 3품종(Capitol, Pollen 및 Saturnin)의 서로 다른 부위별에서 얻어진 효소 활성 및 활성염색의 패턴을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

식물재료. 본 실험에 사용된 오일용 유채(*Brassica napus* L.) 3 품종은 Capitol, Pollen, Saturnin이다. 유채종자는 주야온도(25/15)와 상대습도(60~80%)를 유지하는 온실에서 자랐고 2주 후 멸균토양:펄라이트:상토(Sterilized soil:pearlite:bed soil)가 4:3:1의 비율로 혼합된 포트에 정식하여 하루에 1회, 1/2 Johnson 영양용액[Johnson, 1957] 을 100 mL씩 관주하였다. 정식 18주 후 작물의 영양생장에 품종 당 3그루씩 생육이 양호한 것을 선별하여 지상부를 3부분(Old, middle, young leaves)과 지하부를 2부분(주근; Tap roots, 지근; lateral roots)로 구분하여 분리한 후 -80°C에서 냉동보관 하였다.

단백질 추출. 냉동보관 중인 지상부와 지하부 생초 시료를 0.5 g씩 막자사발에 넣고 소량의 액체질소를 붓고 시료를 분쇄 하였다. 시료의 단백질을 추출하기 위해 100 mM potassium phosphate($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) buffer(2 mM ethylenediamine tetraacetic acid+1% polyvinylpyrrolidone+1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.0) 1 mL를 넣어 균질화 시킨 후 4°C에서 10,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 하였다[Jung *et al.*, 2004]. 원심분리 후 상등액을 취하고 Bradford[1976] 방법으로 단백질 함량을 측정하였다.

Chitinase 활성 및 활성염색. Chitinase(EC 3. 2. 1. 14) 활성 측정은[Lingappa and Lockwood, 1962] 3 유채 품종의 조직 부위별(잎; Old, middle, young, 뿌리; Tap, lateral)로 추출된 시료 20 μL 을 사용하였다. 기질은 0.5% colloidal chitin[Berger and Reynolds, 1958] 500 μL , 50 mM sodium acetate 완충용액 480 μL 을 혼합하여 항온수조 내에서 37°C에서 1시간 동안 배양하고 1 N NaOH용액 200 μL 으로 반응을 정지시켰다. 반응 용액을 10,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 500 μL 의 상등액에 1 mL의 Schales' 시약(0.5 M Sodium carbonate +1.5 M Potassium ferricyanide)을 가하여 15분간 증탕하고, 분광광도계(HITACHI, U-2001, Japan)를 사용하여 420 nm로 흡광도

를 측정하였다. SDS-PAGE를 Laemmli[1970] 방법에 따라 Bio-Rad Mini-PROTEAN(80×73×1.5 mm)에 12%(w/v) 폴리아크릴아마이드 분리겔을 사용하고 0.12% Coomassie brilliant blue R-250으로 착색하였다. Chitinase 활성염색은 Trudel과 Asselin[1989] 방법에 따라 12%(w/v) 폴리아크릴아마이드 분리겔에 0.01% glycol chitin 기질을 이용하였다. SDS-PAGE 후 1%(v/v) Triton X-100이 포함된 100 mM sodium acetate(pH 5.0) 완충용액을 37°C에서 24시간 배양하고, 0.01% Calcofluor white M2R(Sigma F3543)이 포함된 500 mM Tris-HCl(pH 8.9) 용액에 착색하였다. UV transilluminator(DAIHAN Sci. co., WGD-30, Korea)를 사용하여 활성염색을 조사하였다.

β -1,3-Glucanase 활성 및 활성염색. β -1,3-glucanase(EC 3. 2. 1. 6) 활성은[Yedia *et al.*, 2000] 추출물 20 μL 에 1% laminarin(Sigma L9634) 25 μL 와 50 mM sodium acetate(pH 5.0) 완충용액 455 μL 를 혼합하여 항온수조 37°C에서 1시간 배양 후 3-amino-5-nitrosalicylic acid(DNS) 시약 1.5 mL을 가하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. SDS-PAGE는 10%(w/v) 폴리아크릴아마이드 분리겔에 chitinase와 동일한 방법을 사용하였다. β -1,3-glucanase 활성은 Trudel과 Asselin[1998] 방법에 따라 10%(w/v) 폴리아크릴아마이드 분리겔에 0.2% laminarin(Sigma L9634)을 기질로 사용하였다. SDS-PAGE 후 겔은 10 mM CaCl_2 이 포함된 20 mM 2-(N-morpholino) ethansulfonic acid (MES) 완충용액(pH 6.0)에 30분간 배양하고 1 N NaOH가 포함된 0.15% triphenyltetrazolium chloride 용액으로 10분간 중탕하였으며, 고정 용액(3% Glycerol+40% Methanol+10% Acetic acid)에 탈색 시킨 후 조사하였다.

Peroxidase 활성 및 활성염색. Peroxidase(POD; EC 1. 11. 1. 7) 활성은 Chance와 Maehly[1955] 방법으로 측정하였다. 추출물 100 μL 에 200 mM guaiacol 50 μL 와 10 mM phosphate 완충용액(pH 7.0) 2.8 mL를 혼합하고 1분 동안 470 nm로 흡광도를 측정하였으며, 이때 56 mM H_2O_2 20 μL 를 cuvette에 넣어 줌으로써 반응은 시작된다. Native-PAGE는 Omstein과 Davis[1964] 방법으로 chitinase와 동일한 장치를 사용하였으며, 10%(w/v) 폴리아크릴아마이드 분리겔에 0.12% Coomassie brilliant blue R-250으로 착색하였다. Peroxidase 활성염색은 Caruso[1999] 등의 방법으로 0.46%(v/v) guaiacol과 13 mM H_2O_2 가 포함된 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 6.8)에 PAGE를 실시한 10%(w/v) 폴리아크릴아마이드 분리겔을 배양하여 활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

단백질 함량. 사료용 유채 3품종(Capitol, Pollen, Saturnin)의 서로 다른 조직별 총단백질 함량의 분포를 Table 1에 나타내었다. 잎의 경우 총단백질 함량은 young leaf에서 가장 높은 분포를 나타내었다. 특히, Capitol의 young leaf 경우 생초 g당 16.62 mg으로 다른 2품종보다 더 높게 나타났다. 또한 Capitol의 총단백질의 잎 조직별 비율은 old:middle:young leaf에서 12:27:61로 나타났다. 뿌리의 경우 총단백질 함량은 주근이 지근보다 높은 분포를 보였고, 주근의 총단백질 함량은 Saturnin,

Table 1. Distribution of total protein content in different tissues leaves and roots of three oil seed rapes in early vegetable stage

Plant parts		Total protein (mg/g FW)		
		Capital	Pollen	Saturnin
Leaves	Old	3.27±0.14	3.59±0.16	3.21±0.71
	Middle	7.28±0.40	6.05±0.72	6.32±0.44
	Young	16.62±1.00	12.67±0.45	12.27±0.86
Roots	Tap	4.78±0.50	3.93±0.04	5.08±0.05
	Lateral	1.11±0.26	1.04±0.19	1.18±0.17
Whole plant	L+R	33.06±2.30	27.28±1.56	28.06±2.23

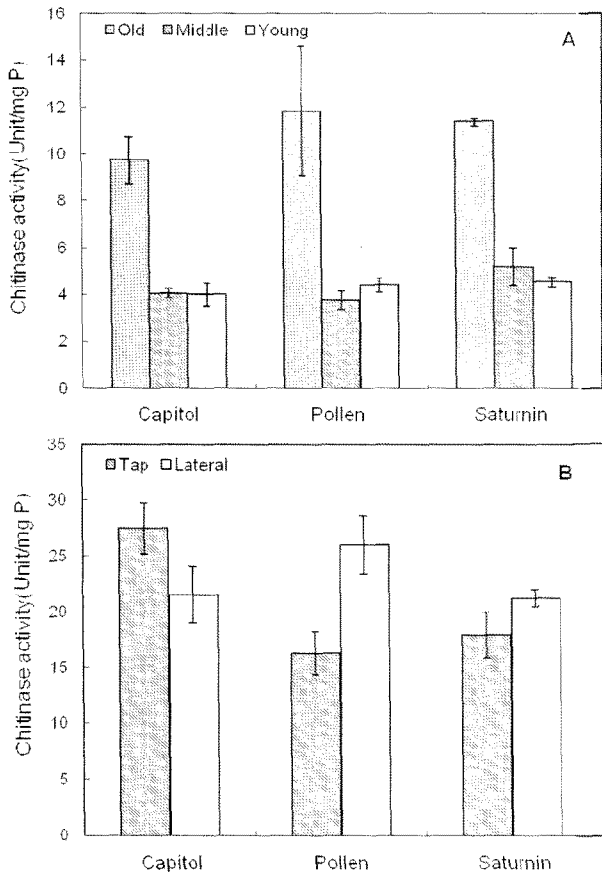


Fig. 1. Pattern of chitinase activity in different tissues of three oil seed rapes (Capitol, Pollen and Saturnin) seedling. Leaves (A) and roots (B).

Capitol, Pollen 순으로 나타났다. 특히, Saturnin의 주근의 경우 총단백질 함량이 생초 g당 5.08 mg였고, 총단백질 함량의 뿌리 조직별 비율은 81:19(주근:지근)였다. 유채종자 유전자원의 총 단백질 함량은 15.3-36.2%의 변이폭을 보였고, 평균 총단백질 함량이 23.2%로 조사되었다[Bang *et al.*, 1990]. 본 연구에서는 유채 지상부 잎에서 총단백질 함량이 생초 g당 27.17 mg으로 약 2.72%로 90% 수분함량을 고려해볼 때 약 24.5%의 단백질 함량을 보였다.

Chitinase 활성. 다음은 유료용 유채 3품종(Capitol, Pollen, Saturnin)의 서로 다른 조직별 병발생관련 단백질인 chitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase 활성의 분포를 조사하였다. Chitinase 활성의 경우 뿌리가 잎보다도 더 높은 활성의 분포를 나타내었

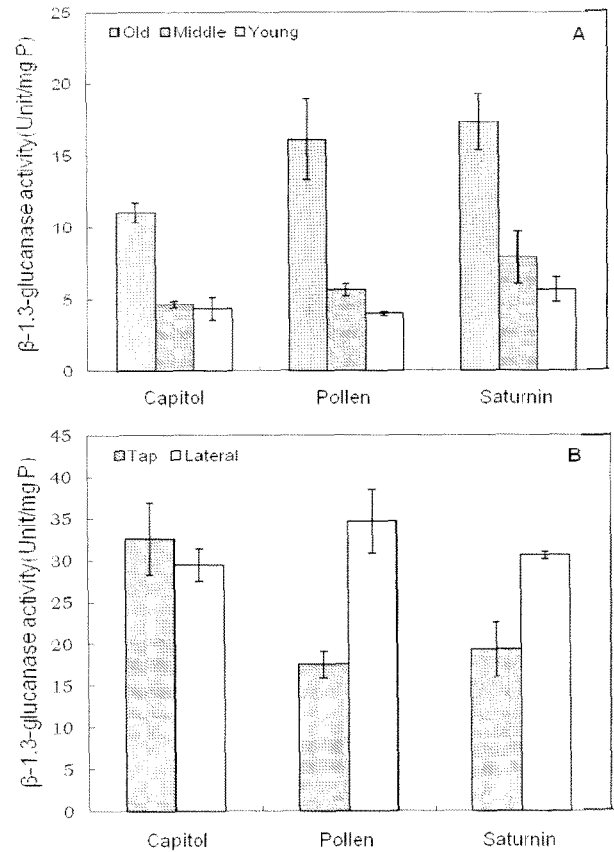


Fig. 2. Pattern of β -1,3-glucanase activity in different tissues of three oil seed rapes (Capitol, Pollen and Saturnin) seedling. Leaves (A) and roots (B).

다(Fig. 1). 잎의 경우 Capitol, Pollen, Saturnin의 chitinase 활성은 old leaf에서 각각 단백질 mg당 9.7, 11.8, 11.4 unit으로 높게 나타났고, middle leaf과 young leaf은 유사한 경향을 보였다(Fig. 1A). 특히, Pollen과 Saturnin의 경우 Capitol보다 약간 높은 chitinase 활성 분포를 보였다. Saturnin의 경우 chitinase 활성의 비율은 old:middle:young leaf에서 53.9:24.6:21.5로 나타났다. 뿌리의 경우 chitinase 활성부위는 Capitol은 주근에서 Pollen과 Saturnin은 지근에서 높게 나타났다(Fig. 1B). Capitol의 주근과 지근의 chitinase 활성은 각각 단백질 mg당 27.5와 21.3 unit으로 나타났다. 총 chitinase 활성(주근+지근)의 경우 Capitol의 경우가 가장 높았고, 주근:지근의 비율은 56:44였다.

β -1,3-Glucanase 활성. 다음은 유료용 유채 3품종의 서로 다른 조직별 β -1,3-glucanase 활성의 분포를 조사하였다(Fig. 2). β -1,3-glucanase 활성의 경우 뿌리가 잎보다도 더 높은 활성의 분포를 나타내었다. 잎의 경우 Capitol, Pollen, Saturnin의 β -1,3-glucanase 활성은 old leaf에서 각각 단백질 mg당 11.1, 16.1, 17.3 unit으로 높게 나타났고, 다음으로 middle leaf, young leaf 순으로 나타났다(Fig. 2A). 특히, Saturnin의 경우가 Capitol과 Pollen보다 높은 β -1,3-glucanase 활성 분포를 보였다. 또한 Saturnin의 경우 β -1,3-glucanase 활성의 비율은 old:middle:young leaf에서 56.1:25.6:18.3으로 나타났다. 뿌리의 경우 β -1,3-glucanase 활성부위는 Capitol은 주근에서 Pollen과

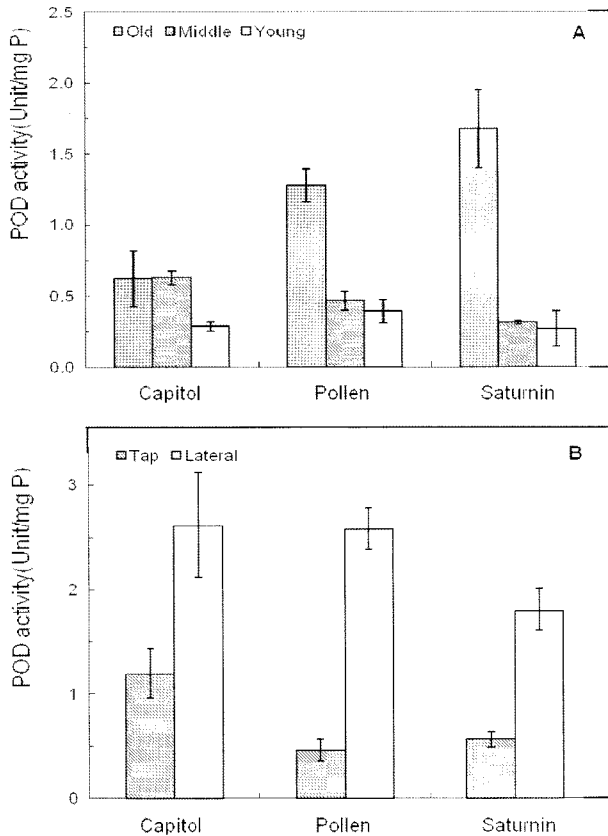


Fig. 3. Pattern of peroxidase (POD) activity in different tissues of three oil seed rapeseed (Capitol, Pollen and Saturnin) seedling. Leaves (A) and roots (B).

Saturnin은 지근에서 높게 나타났었다(Fig. 2B). Capitol의 주근과 지근의 β -1,3-glucanase 활성은 각각 단백질 mg당 32.6과 29.4 unit으로 나타났었다. 총 β -1,3-glucanase 활성(주근+지근)의 경우 Capitol의 경우가 가장 높았고, 주근:지근의 비율은 53:47이었다.

Peroxidase 활성. 다음은 유효용 유채 3품종의 서로 다른 조직별 peroxidase 활성의 분포를 조사하였다(Fig. 3). Peroxidase 활성의 경우 뿌리가 잎보다도 더 높은 활성의 분포를 나타내었다. 잎의 경우 Capitol의 peroxidase 활성은 old와 middle leaf에서 높게 나타났고, Pollen, Saturnin은 old leaf에서 각각 단백질 mg당 1.28과 1.67 unit으로 높게 나타났고, 다음으로 middle leaf, young leaf 순으로 나타났었다(Fig. 3A). 특히, Saturnin의 경우는 Capitol과 Pollen보다 높은 peroxidase 활성 분포를 보였다. 또한 Saturnin 경우 peroxidase 활성의 비율은 old:middle:young leaf에서 74:14:12로 나타났었다. 뿌리의 경우 peroxidase 활성부위는 Capitol, Pollen, Saturnin은 지근에서 높게 나타났었다(Fig. 2B). Capitol의 주근과 지근의 peroxidase 활성은 각각 단백질 mg당 1.2과 2.6 unit으로 나타났었다. 총 peroxidase 활성(주근+지근)의 경우 Capitol의 경우가 가장 높았고, 주근:지근의 비율은 31:69였다. 이상의 결과는 유효용 유채 3품종 모두에서 지상부와 지하부 각 조직별의 병발생관련 단백질인 chitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase 활성 패턴이 유사한 결과를 보임을 확인할 수 있었다.

Chitinase 활성염색. 전기영동 후 유효용 유채 3품종의 서로

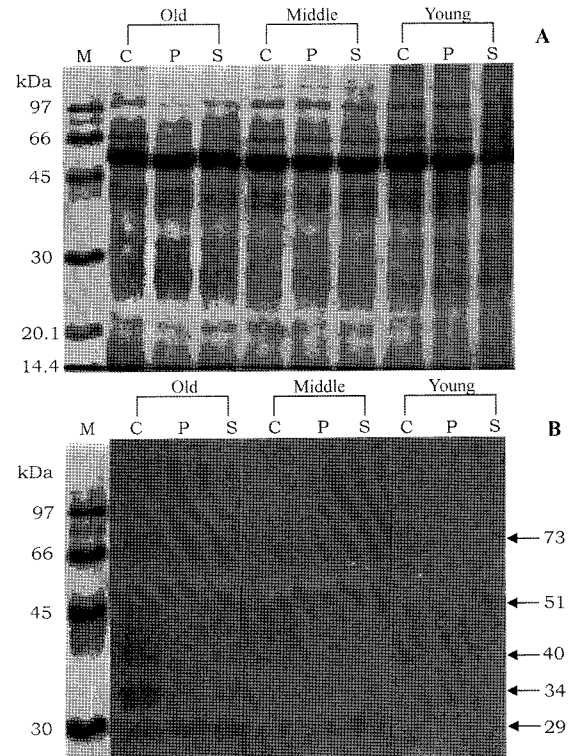


Fig. 4. SDS-PAGE 15% (w/v) gels with Coomassie Brilliant Blue R-250 (A), Chitinase activity staining of leaves. In SDS-PAGE 12% (w/v) gels (1.0 mm thick) a glycol chitin used as substrate and calcofluor white M2R used for resolution of dark band (B). Protein marks (M), Capitol (C), Pollen (P) and Saturnin (S).

다른 조직별 chitinase 활성염색을 조사하였다. 유채 잎에서의 chitinase 활성염색의 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 유채 잎에서의 단백질의 분포 패턴을 Coomassie blue 염색 후 조사하였다(Fig. 4A). Chitinase의 동위효소는 약 73, 51, 40, 34, 29 kDa의 분자량을 보였다(Fig. 4B). 전반적으로 3품종 유채의 old leaf에서 chitinase 활성염색이 강하게 나타났고, 특히 Capitol의 old leaf에서 가장 강하게 나타났었다. 따라서 병발생관 단백질의 한 종류인 chitinase의 동위효소가 young leaves에서는 매우 약하게 나타남으로써 병에 대한 저항성이 매우 약하다는 것을 알 수 있었다.

전기영동 후 유채 뿌리에서의 chitinase 활성염색의 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 유채 잎에서의 단백질의 분포 패턴을 Coomassie blue 염색 후 조사하였다(Fig. 5A). Chitinase의 동위효소는 약 100, 57, 34, 29 kDa의 분자량을 보였다(Fig. 5B). Chitinase 활성을 가진 동위효소가 주근보다는 지근에서 약한 더 강하게 나타났었다. 주근에서는 약 29와 34 kDa의 강한 활성을 가진 동위효소와 약 100 kDa의 약한 활성을 가진 동위효소가 보였다. 반면 지근에서는 약 29와 34 kDa의 강한 활성을 가진 동위효소가 보였고 약 57과 100 kDa의 약한 활성을 가진 동위효소가 보였다. 특히, Pollen의 잎에서는 약 57 kDa의 chitinase의 활성을 가진 동위효소가 나타나지 않았다. 식물의 곰팡이균에 대한 저항성 반응으로 병발생관련 단백질(PR-proteins)의 밀접한 관련성이 잘 보고 되어왔다[Ignatius *et al.*, 1994; Kragh *et al.*, 1993]. 식물에서 노균병을 일으키는

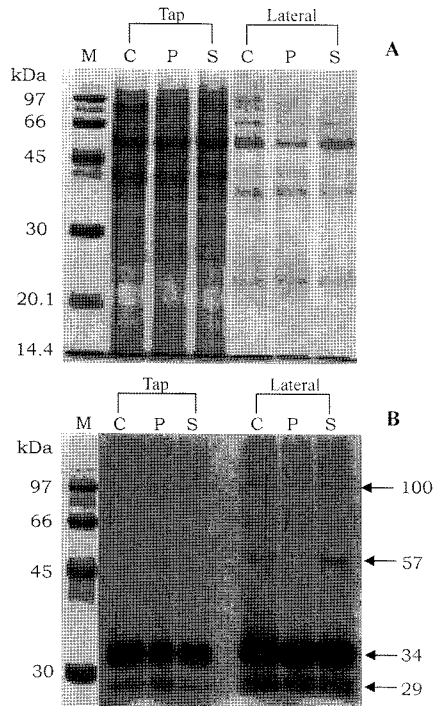


Fig. 5. SDS-PAGE 15% (w/v) gels (1.5 mm thick) with Coomassie Brilliant Blue R-250 (A), Chitinase activity staining of roots. In SDS-PAGE 12% (w/v) gels (1.0 mm thick) a glycol chitin used as substrate and calcofluor white M2R used for resolution of dark band (B). Protein marks (M), Capitol (C), Pollen (P) and Saturnin (S).

*Peronospora parasitica*와 저항성 유도화합물로 알려진 acibenzolar-S-methyl(ASM)물질을 동시에 처리 했을 때 *Brassica oleracea* 조직내 PR-proteins인 chitinase와 β -1,3-glucanase 활성이 더욱 뚜렷히 유도됨이 보고되었다[Ziadi *et al.*, 2001].

β -1,3-Glucanase 활성염색. 전기영동 후 3품종 유채 잎과 뿌리에서의 β -1,3-glucanase 활성염색을 조사하였다. 유채 잎에서의 단백질의 분포 패턴을 coomassie blue 염색 후 β -1,3-glucanase 활성을 조사한 결과 모든 유채 품종에서 전반적으로 약하게 나타났다(data not shown). 잎의 경우 약 75 kDa이 약간 강하게 나타났고, 약 55 kDa의 β -1,3-glucanase 동위효소 활성이 약하게 보였다. 뿌리의 경우 주근과 지근에서 모두 약 75 kDa이 약간 보였고 약 55 kDa에서 약간 강한 활성을 보였다. 식물체의 병발생관련 단백질의 유도에 관한 다양한 연구 결과들이 보고 되고 있다. Pearl millet 유식물에서는 20.5 kDa의 β -1,3-glucanase과 노균병을 일으키는 *Sclerospora graminicola* 처리시 30 kDa의 β -1,3-glucanase의 동위효소가 더욱 강하게 발현됨이 보고 되었다[Kini *et al.*, 2000].

Peroxidase 활성염색. 전기영동 후 3품종 유채 잎과 뿌리에서의 peroxidase 활성염색을 조사한 결과 Fig. 6에 나타내었다. 유채 잎에서의 단백질의 분포 패턴을 coomassie blue 염색 후 조사하였다(Fig. 6A). Chitinase와 마찬가지로 peroxidase 활성도 old leaves에서 가장 강하게 나타났다(Fig. 6B). 특히, Pollen의 경우가 old leaves에서 가장 강하게 나타났다. 유채 뿌리의 경우, 주근과 지근에서 약 135, 122, 114, 93 kDa의 활성을 가진 동위효소가 나타났고, 그 중에 약 93 kDa의 동위효소가 가장

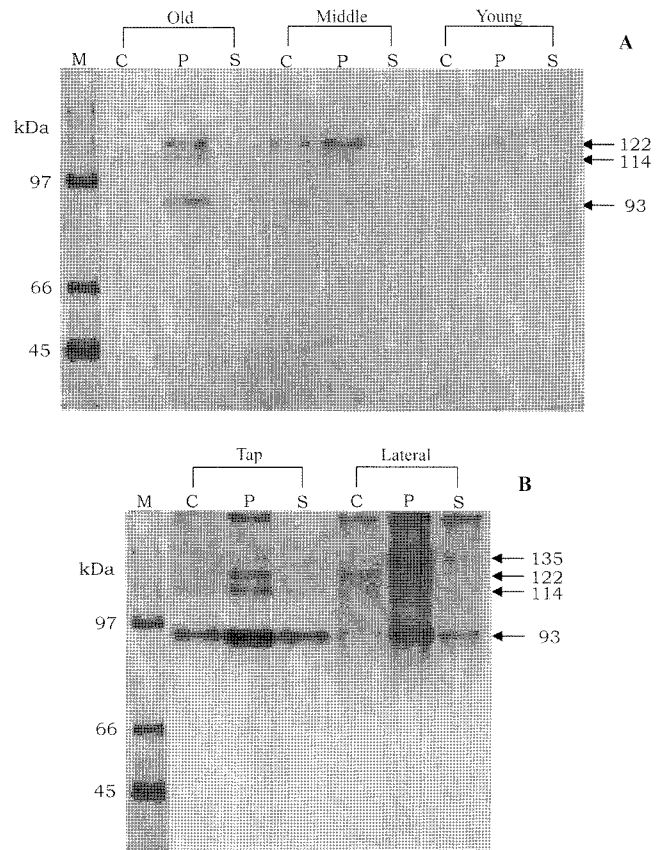


Fig. 6. Active bands of peroxidase isoform in Rape tissues [Leaves (A) and Roots (B)] were showed on the Native-PAGE gel with 0.46% guaiacol and H_2O_2 solution. Protein marks (M), Capitol (C), Pollen (P) and Saturnin (S).

강하게 나타났다. Pepper 식물에서 대조구는 약 53 kDa의 peroxidase가 발현되었고, 역병을 일으키는 *Phytophthora capsici* 를 처리구는 약 45 kDa의 peroxidase의 동위효소가 새롭게 발현됨이 보고되었다[Jung *et al.*, 2004]. Wheat 종자의 발아시 *Fusarium culmorum*을 감염 시켰을 때 종자내 2개의 염기성 β -1,3-glucanase(PR2) 동위효소와 3개의 염기성 chitinase(PR3) 동위효소 및 peroxidase(PR9) 동위효소가 유도 됨이 확인되었다[Caruso *et al.*, 1999]. 본 시험에서 유채의 잎과 뿌리 조직내 효소활성을 나타내는 동위효소들은 polypeptide chain을 가진 것인지 아니면 개별 소단위의 동위효소인지에 대한 방안으로 유채의 종자를 Native-PAGE상에서 동위효소 발현패턴을 조사하였다. 그 결과 일부 개별 소단위의 동위효소도 있는 것으로 보여졌지만 구체적인 비교, 분석은 효소의 정제과정을 거쳐야 더욱 정확히 밝혀질 것으로 사료된다.

이상의 결과로 살펴볼 때, 유채 조직내 생물학적 방제와 관련된 효소의 발현 패턴을 정확하게 확립함으로써 앞으로 유채 재배 동안 다양한 식물병에 노출되었을 때 유도될 수 있는 저항성 관련 단백질의 발현 패턴의 변화에 대한 기초적 자료를 마련하는데 도움이 될 것으로 사료된다. 추후 이와 관련하여 유채 조직내 병발생관련 효소의 분리/정제 등 활발한 연구가 진행될 것으로 기대된다.

초 록

식물병의 생물학적 방제에 관련한 chitinase, β -1,3-glucanase, peroxidase의 발현 패턴을 살펴보기 위하여 3 품종(Capitol, Pollen 및 Saturnin)의 유로용 유채를 조사하였다. 유채 old leaf에서 병발생관련 단백질의 활성 중에서 chitinase의 경우 단백질 mg당 9.7~11.8 unit, β -1,3-glucanase의 경우 단백질 mg당 11.1~17.3 unit, peroxidase의 경우 단백질 mg당 0.6~1.7 unit를 나타내었다. 유채 뿌리내 효소의 활성 중에서 chitinase의 경우 단백질 mg당 39.2~49.0 unit, β -1,3-glucanase의 경우 단백질 mg당 49.9~62.0 unit, peroxidase의 경우 단백질 mg당 2.4~3.8 unit를 나타내었다. Chitinase와 β -1,3-glucanase 활성은 Saturnin 잎과 Capitol 뿌리내에서 가장 높았고, 반면 Capitol 잎에서 가장 낮은 수준을 보였다. 또한, chitinase, β -1,3-glucanase 및 peroxidase 활성은 Saturnin 뿌리내에서 가장 낮은 수준을 보였다. Chitinase 동위효소가 잎(73, 51, 40, 34, 29 kDa)과 뿌리(100, 57 34, 29 kDa)의 SDS-PAGE 겔 상에서 보였다. β -1,3-glucanase 동위효소가 잎과 뿌리(75, 55 kDa)의 SDS-PAGE 겔 상에서 보였다. Peroxidase 활성염색은 Pollen의 잎과 뿌리내에서 가장 강하게 나타났다. Peroxidase 동위효소는 잎(122, 114, 93 kDa)과 뿌리(135, 122, 114, 93 kDa)의 Native-PAGE 겔 상에서 보였다. 이상의 결과로 볼 때 유채 조직내 효소 발현 패턴의 확립은 유채 생육기간 동안 식물병에 대한 저항성과 관련하여 중요한 자료가 될 것으로 사료된다.

Key words: 베타-1,3-글루칸아제, 유채, 키틴아제, 퍼옥시데이제

감사의 글

이 논문은 2007년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음에 감사 드립니다.

참고문헌

- Bang JK, Lee JI, Chung DH, and Kim KJ (1990) Varietal difference of seed protein content and amino acid composition in rapeseed. *Kor J Crop Sci* **35**, 464-475.
- Berger LR and Reynolds DM (1958) The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **29**, 522-534.
- Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Caruso C, Chilosi G, Caporale C, Leonardi L, Bertini L, Magro P, and Buonocore V (1999) Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Sci* **140**, 107-120.
- Chance B and Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Method Enzymol* **2**, 764-775.
- Chung WJ, Kim BH, and Kim TH (1993) Evolution of carbon and nitrogen concentrations in the leaves as related to dry matter and crude protein accumulation of forage rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). *Kor Grassl Sci* **13**, 58-65.
- Daun JK (1983) Glucosinolates in canola and rapeseed their importance, composition and analysis. *Can Grain Commission* 1-6.
- Ignatius SMJ, Chopra RK, and Muthukrishnam S (1994) Effects of fungal infection and wounding on the expression of chitinases and β -1,3-glucanases in near-isogenic lines of barley. *Physiol Plant* **90**, 584-592.
- Jang YS (2002) Prospect and situation of quality improvement in oilseed rape. *Kor J Crop Sci* **47**, 175-185.
- Jo MH and Kim DA (1988) Effects of nitrogen fertilization levels and some additives on the chemical composition and silage quality of forage rape (*Brassica napus* Subsp. *oleifera*) I. Effect of harvesting dates and N fertilization levels on the yield and quality of forage rape. *Kor Grassl Sci* **8**, 33-39.
- Johnson CM (1957) Comparative chlorine requirements of different plant species. *Plant Soil* **8**, 337-353.
- Josefsson E (1967) Distribution of thioglucosides in different parts of *Brassica* plants. *Phytochemistry* **6**, 1617-1627.
- Josefsson E (1971) Studies of the biochemical background to differences in glucosinolate content in *Brassica napus* L. I. Glucosinolate content in relation to general chemical composition. *Physiol Plant* **24**, 150-159.
- Jung WJ, Jin YL, Kim YC, Kim KY, Park RD, and Kim TH (2004) Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. *Biol Control* **30**, 645-652.
- Kim CH, Kim HS, Jung YH, and Kang YJ (1992). The hydrolysis conditions of rapeseed protein by pronase. *J Korean Soc Food Nutr* **21**, 513-518.
- Kini KR, Vasanthi NS, Umesh-Kumar S, and Shetty HS (2000) Purification and properties of a major isoform of β -1,3-glucanase from pearl millet seedlings. *Plant Sci* **150**, 139-145.
- Kondra ZP and Downey RK (1970) Glucosinolate content of rapeseed (*Brassica napus* L. and *B. campestris* L.) meal as influenced by pod position on the plant. *Crop Sci* **10**, 54-56.
- Kragh KM, Jacobsen S, Mikkelsen JD, and Nielsen KA (1993) Tissue specificity and induction of class I, II and III chitinases in barley (*Hordeum bulgare*). *Physiol Plant* **89**, 490-498.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-683.
- Lingappa Y, and Lockwood JL (1962) Chitin media for selective isolation and culture of Actinomycetes. *Phytopathology* **52**, 317-323.
- Nocrashy AS, Kiewitt M, Mangold HK, and Mukhejee KD (1975) Nutritive value of rapeseed meals and rapeseed protein isolate. *Nutr Metab* **19**, 145.
- Ornstein L and Davis BJ (1964) Disc electrophoresis- I Background and theory. *New York Academy of Sci* **121**, 321-349.
- Trudel J and Asselin A (1989) Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **178**, 362-366.
- Trudel J and Asselin A (1998) Detection of enzymes active on

- various α -1,3-glucans after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 1788-1792.
- Yedidia I, Benhamou N, Kapulnik Y, and Chet I (2000) Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the Mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol Biochem* **38**, 863-873.
- Zasada IA and Ferris H (2004) Nematode suppression with brassicaceous amendments: application based upon glucosinolate profiles. *Soil Biol Biochem* **36**, 1017-1024.
- Ziadi S, Barbedette S, Godard JF, Monot C, Le Corre D and Silu  D (2001). Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*)-downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. *Plant Pathol* **50**, 579-586.