

돌연변이 처리된 M₂ 유묘에 대한 Isozyme을 이용한 돌연변이율 검정

구본철¹, M. Kucharska²
¹ 작물시험장 맥류과, ² Silesian대학교

Test of mutation rate using isozyme on M₂ seedling treated by mutagen in barley
Bon-Cheol Koo¹, M. Kucharska²
¹ Wheat and barley division, Crop experiment station, RDA
² Genetic department, Silesian University, Poland

1. 실험목적

돌연변이를 유기할 경우 실제 돌연변이가 처리식물체에 얼마나 유전적 효과를 주었는가에 대한 분석이 필요하다. 특히 목표형질에 미친 영향을 알고자할 때는 그 형질과 관련있는 marker를 찾게되고 그 marker를 통한 선발이 이루어지면 효과적일 것이다. 본시험은 그 기초단계로 돌연변이체 처리가 된 M₂ 유묘에 대한 돌연변이율을 Isozyme을 이용, 분석하였다.

2. 재료 및 방법

가) 공시품종 : 2조 춘파 품종인 Dema(폴랜드산), 사천 6호

나) 돌연변이체 처리 : 1.5NaN₂ + 0.75MNH
0.75MNH + 0.75MNH
0.5MNH + 0.5MNH

돌연변이체 처리 방법 : ① 건조종자를 8시간동안 침지 ② 제 1 돌연변이체를 3시간 처리하고 세척 ③ 5시간의 무처리 기간 ④ 제 2 돌연변이체를 처리한 후 포장에 심어 재배

isozyme분석을 위해 7-8엽기의 M₂유묘를 사용하였으며 각 이삭당 최소 5개의 유묘를 임의적으로 선택하여 잎을 절반 가량 잘라 추출시약과 혼합한 후 잘 부쇄 isozyme의 추출을 한다. 두꺼운 여과지(0.2-0.5mm)를 추출액에 담귀 충분히 흡수시킨 후 앞 추출액이 흡수된 여과지 절편은 horizontal starch gel에 옮겨져 전기영동을 하였다. 2-3시간의 전기영동후(gel상에서 8cm정도의 진행후) 냉장고에 10-20분 저장하여 gel을 냉각시킨다. 3개의 isozyme system을 관찰하기위해 gel을 3부분으로 절단하여 각각 3개의 염색시약에 20-30분 담가 25℃ 항온기에 처리한다. 충분히 염색시킨 후 염색시약을 버리고 세척 후 고정시약을 부어 gel내의 isozyme을 고정시킨다. 이 염색시약으로 분석할 수 있는 isozyme은 esterase 1, 2, 3와 Glutamate Oxalo Acetate 1, 2, 3 과 Leucine Aminopeptidase 1, 2 이다.

3. 결과 및 고찰

가. 세 가지 돌연변이체로 처리된 M₂ 식물체에 대한 돌연변이율조사를 실시하였는데 염색체에 대한 돌연변이율은 폴랜드 품종인 Dema에서는 3.3%였고 사천 6호에서는 1.8%로 나타났다.

나. Esterase에 대한 돌연변이율은 Dema에서 3.5%로 사천 6호의 0%보다 높았으며 GOT와 LAP에서는 두 품종간 차이가 없었음.

다. 세 가지 isozyme중 대개의 돌연변이체가 Esterase에 관계된 유전자좌에서 발생하였으며(75%차지) 나머지에서 돌연변이율은 극히 미미하였음.

Table 1. Frequency and description of M2 seedlings from which were found

Variety	Dose	Locus	Allozyme	No. of Phenotype(segregation)				Note
				of Plant Mutagen	types	seedling induced analysed homo	hetero	
Dema	1.5NaN3 +0.75MNH	1 Est 4	fast	5	0	1	4	
		2 Est 1	fast	5	1	0	4	
		3 Est 5	slow	13	2	7	3	harvest
		GOT 3	null	12	1	0	11	2)
		Est 4	null	12	1	0	11	
		4 LAP 2	null	5	1 ^o	0	4	
		5 Est 5	slow	5	1 ^{oo}	0	4	harvest
	0.75MNH +0.75MNH	6 Est 4	slow	5	1	0	4	
		Est 5	slow					
		7 Est 5	slow	5	1	0	4	
	0.5MNH +0.5MNH	8 Est 5	slow	5	1	0	4	green-
9 Est 5		fast	5	1	0	4	green-	
10 LAP 2		slow	5	1	0	4	green-	
11 Est 2		null	5	3	0	2	green-	
Sacheon 6	0.5MNH +0.5MNH	12 GOT 1	null	5	1	0	4	green-
		GOT 2	null	5	1	0	4	house
		GOT 3	null	5	1	0	4	

^o Albino

^{oo} One more mutant was found in rest of spikes in this plant

Greenhouse : Plants which I found some mutant were grown in green house

- 1)harvested:got 2seeds. After repeating electrophoresis No mutant were found
- 2)harvested:got 9seeds(3 and 6seeds from two plants)from rest of seedling from the same spike that didn't analyse with electrophoresis. No mutant were found
- 3)harvested :got 7seeds(2,3 and 2 from three plants)from rest of seedling from the same spike that didn't analyse with electrophoresis. No mutant were found

Table 2. The number of plants and Chlorophyll mutants in two varieties.

Variety	Treat- ment	total No. of No.			Chlorophyll mutant			Mutation rate		
		plant	spike	of M2	Albino	Xan-	Viri-	Total	spike plant	
		analy-	seed-	sed-	tha	dis	Total	(%)	(%)	
		sed	ling	ling						
Dema	1.5NaN3+0.75MNH	80	108	864	21	2	6	29 (11)	10.2	3.3
	0.75MNH+0.75MNH	84	86	344	9	3	2	14 (5)	5.8	4.0
	0.5MNH +0.5 MNH	100	110	440	9	0	2	11 (9)	8.2	2.6
	Total	264	304	1648	39	5	10	54 (25)	8.1	3.3
sacheon 6	1.5NaN3+0.75MNH	7	7	35	0	0	0	0 (0)	0.0	0.0
	0.75MNH+0.75MNH	94	94	376	2	3	2	7 (5)	5.3	1.9
	0.5MNH +0.5 MNH	80	80	400	6	6	2	14 (5)	6.3	3.5
	Total	181	181	811	8	9	4	21 (10)	3.9	1.8

Table 3. The mutation rate according to the different dose of mutagens

Variety	Treatment	Total No. of Plant spike analysed	No. of M2 Seedling analysed	Iso- zyme loci	No. of Mutant	Mutation rate			
						(%)	seedling (%)		
Dema	1.5NaN3 +0.75MNH	80	108	864	EST	13(4)	5.0	0.7	
					GOT	0	0.0	0.0	
					LAP	1	1.3	0.1	
	0.75MNH +0.75MNH	84	86	344	EST	2	2.4	0.6	
					GOT	0	0.0	0.0	
					LAP	0	0.0	0.0	
	0.5MNH +0.5MNH	100	110	440	EST	5(3)	3.0	0.7	
					GOT	0	0.0	0.0	
					LAP	2(1)	1.0	0.2	
	Total	264	304	1648		23(11)	2.2	0.3	
	sa- cheon 6	1.5NaN3 +0.75MNH	7	7	35	EST	0	0.0	0.0
						GOT	0	0.0	0.0
LAP						0	0.0	0.0	
0.75MNH +0.75MNH		94	94	376	EST	0	0.0	0.0	
					GOT	0	0.0	0.0	
					LAP	0	0.0	0.0	
0.5MNH +0.5MNH		80	80	320	EST	0	0.0	0.0	
					GOT	3(1)	1.3	0.9	
					LAP	0	0.0	0.0	
Total		181	181	731		3(1)	0.1	0.1	