

## EMS 處理에 의한 콩 根瘤着生 및 기타 形質의 突然變異 出現 樣相

李弘秭\* · 具滋煥\* · 李錫河\*\* · 金奭東\*\*

### Mutagenesis of Nodulation and Other Growth Characters with Ethyl Methanesulfonate in Soybean

Hong Suk Lee\* · Ja Whan Ku\* · Suk Ha Lee\*\* and Seok Dong Kim\*\*

**ABSTRACT** : The aims of the work were to examine the variability induced by EMS(ethyl methanesulfonate) mutagenesis of soybean plants, and to isolate mutants altered in nodulation and other growth characters. Seeds of two soybean cultivars, 'Hwanggeumkong' and 'Baegunkong' were treated with 30 and 50mM EMS(pH 7.0) for 6 hours and were planted directly in the field. Field emergency of M<sub>1</sub> seed was averaged to be 61.0%, and frequency of plants with chlorophyll-deficient sectors of the first trifoliolate is about 0.7%. Regardless of varieties and doses of EMS, M<sub>1</sub> plant injury at harvest was present in plant height, pod and seed number per plant when compared to those of original-type soybean plants. The M<sub>2</sub> variability of nodulation process induced by EMS treatment was found to be narrower than that of shoot dry weight. On the basis of the occurrence of chlorophyll-deficient plants, mutated cell frequency within M<sub>1</sub> seed ranged from 5.3% to 84.2%, suggesting that mutation frequency on the M<sub>1</sub> seed induced by EMS occurred partly and randomly regardless of varieties and doses of EMS. The putative mutant, which had more nodulation than original-type plant, was short in plant height. Sparse-nodulating soybean mutant was lower in leaf chlorophyll content and showed reduced growth.

**Key word** : Soybean, Mutagenesis, EMS, Nodulation

自然的 및 人爲的 突然變異들은 marker gene으로서, 그리고 品種改良을 위한 육종재료로서 널리 이용된다. 인위적 돌연변이 유발원으로서로는 주로 放射線과 化學劑가 이용되고 있으며, 이들의 돌연변이 誘起效果에 대한 비교연구가 많이 이루어져왔다<sup>1,6,9,11)</sup>.

식물체에 사용되어지는 돌연변이 유기체의 대부분

은 DNA와 반응하며, purine과 pyrimidine 염기 혹은 phosphate group에 alkyl group을 부착시킴으로써 변이를 誘發하는 것으로 밝혀졌다<sup>7)</sup>. Ethyl methanesulfonate(EMS), ethyleneimine(EI), nitrosomethyl urea(NMU) 등이 이에 속하며, 이 가운데 EMS는 두과작물의 화학적 돌연변이 유기체로 많이 이용되어 왔다.

이 논문은 1992년도 교유부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

\* 서울대학교 農科大學(Coll. of Agric. and Life Sci., Seoul Nat'l Univ., Suwon 441-744, Korea)

\*\* 作物試驗場(Crop Expt. Stn., RDA, Suwon 441-700, Korea)

〈93. 10. 25 接受〉

Filippetti와 de Pace(1986)에 의하면 *蠶豆*(*Vicia faba*)의 M<sub>1</sub> 및 M<sub>2</sub>세대에서 EMS 처리가 감마선 조사에 의한 것보다 돌연변이 유기율이 2~4배 높다고 하였으며<sup>6)</sup>, Constantin 등<sup>4)</sup>은 콩종자에 25mM부터 50mM농도의 EMS를 8시간 처리하는 것이 바람직하다고 하였다. 그러나 EMS의 처리농도 및 시간 뿐만 아니라 품종, 종자의 돌연변이 유발 전, 후처리 등에 따라 돌연변이 유기효과가 다르다고 보고되어<sup>15)</sup>, 實驗目的에 따라 최적 조건을 선택해야 할 것이다.

콩에 있어서 EMS 돌연변이 유기에 의하여 많은 변이체가 創出되었다. 뿌리에 根瘤가 形成되지 않는 변이체 뿐만아니라<sup>12)</sup> 超多根瘤着生 변이체가 선발되었으며<sup>2,3)</sup>, 이들은 根瘤着生 메카니즘구명에 유용한 遺傳資源으로 그 가치가 크다<sup>10)</sup>. 유묘기의 엽중 窒酸態窒素 還元酵素가 결핍된 변이체도 콩<sup>14)</sup>과 완두<sup>5)</sup>에서 이미 얻어졌다. 콩은 토양, 시비, 그리고 뿌리후에 의한 空中窒素固定 등의 相互作用에 의해 질소공급이 결정되기 때문에<sup>10)</sup>, 위와 같은 변이체들은 고정된 공중질소와 뿌리에서 흡수된 질소 이용의 상대적 효율성을 밝히는 좋은 재료가 될 것이다. 그밖에 콩의 품질을 떨어뜨리는 요인이 되는 linolenic acid함량이 낮은 계통도 선발되어<sup>17)</sup> 품질개선을 위한 새로운 자원확보의 觀點에서 鼓舞的인 현상이라고 할 수 있다.

본 실험은 우리나라 주요 콩 獎勵品種인 황금콩과 백운콩을 공시하여 EMS 30mM과 50mM 두 수준으로 종자를 처리하므로써 돌연변이를 유기시켜 그 효과와 변이정도를 살펴보고, M<sub>2</sub>세대에서 다량 근류착생 및 기타 돌연변이 계통을 選拔하고자 실시하였다.

## 材料 및 方法

공시 품종은 황금콩과 백운콩으로, 종자를 정선하여 EMS 처리 전에 16시간 증류수에 침종하였다. 수분이 충분히 흡수된 종자는 pH7.0으로 조절된 30mM과 50mM EMS에 각각 종자 1粒當 1ml 수준으로 6시간 실온에서 처리하였으며, 浸種 및 處理期間 중에는 電氣氣泡發生機를 이용하여 지속

적으로 酸素를 공급하였다. 처리가 끝난 종자는 흐르는 물에서 10시간 동안 세척한 후 토양수분이 충분한 포장에 즉시 播種하였으며, 재식밀도는 60×30cm, 1주 1본식으로 하였다.

파종후 처리수준에 따른 圃場出現率과 제1본엽에 葉綠素가 결핍된 개체들의 발생율을 조사하였으며, 수확기에는 경장, 개체당 협수 및 종실수를 조사하였고, 각 개체별로 종자를 수확하였다.

근류착생 이상 돌연변이체 선발을 위해서는 모래로 채워진 사각 플라스틱 포트(60×35×15cm)에 수확개체별로 系統化하여, 계통당 M<sub>2</sub>종자를 10~15粒씩 파종하였으며, 다음날 콩근류균 接種劑 Nitragin(LipaTech, Inc., Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.)을 撒布하였다. 양액은 근류착생 돌연변이체 선발이 용이하도록 질산태 질소함량을 5mM의 높은 수준으로 조절하여 일주일에 포트당 400ml씩 1회 공급하였고, 근류착생 및 기타 돌연변이 출현 양상은 5~7주 재배후에 식물체의 뿌리후 형성을 가시적으로 판별하였으며 선발된 개체는 Wagner포트에 移植해서 개체를 유지하였다. 한편 포장에서도 품종 및 EMS 처리 농도에 따라 각각 M<sub>2</sub>종자 100여 계통을 재식밀도 60×15cm, 1주 1본식으로 공시하여, 변이체를 선발하였으며 선발된 변이체는 꼬리표를 부착하여 구별하였다.

## 結果 및 考察

돌연변이 유기율은 유기체의 종류, 처리농도 및 조건 뿐만 아니라 품종등에 의하여 다양하게 영향을 받는다<sup>15)</sup>. 표1은 EMS 처리 농도에 따른 황금콩과 백운콩 M<sub>1</sub>식물체의 圃場出現 및 葉綠素缺乏 개체 출현율을 나타내고 있다. M<sub>1</sub>종자의 포장출현율은 백운콩이 63~64%로서 황금콩의 58%보다 비교적 높았으나, EMS 처리 농도수준에 의한 차이는 없었다. 엽록소 결핍 개체 출현율을 살펴보면, 백운콩의 경우 50mM EMS 농도에서 0.8%를 나타내어 30mM의 0.4%보다 높은 경향이었으나, 황금콩에서는 EMS 처리 농도에 따른 차이가 없었다. 전체적으로는 포장출현율이 61.0%, 엽록소 결핍 개체 발생율이 0.7%로 나타나 다른 실험 보고<sup>14)</sup>

Table 1. Effect of EMS treatment on M<sub>1</sub> soybean seedling characters in the field

Genotypes	Dose (mM)	Emergence (%)	Plants with* sectors(%)
Hwanggeumkong	30	58.2	0.9
	50	57.7	0.8
Baegunkong	30	63.1	0.4
	50	64.0	0.8
Mean		61.0	0.7

\* Sectors defined as a chlorophyll-deficient region of the first trifoliolate.

와 비교하여 본 연구에서는 EMS 처리에 의해 M<sub>1</sub> 개체들의 藥害가 비교적 낮았다.

화학적 돌연변이 유기자 처리에 의한 M<sub>1</sub> 세대의 약해정도는 표1에서와 같이 포장출현을 뿐만 아니라, 幼苗期의 경장, 실내발아후의 뿌리생육, 개체당 협수 및 립수에 의하여 量的으로도 판별될 수 있다<sup>7)</sup>. 그림1은 수확시 M<sub>1</sub> 개체들의 EMS 처리농도 및 품종에 따른 경장, 개체당 협수 및 립수의 분포를 나타내고 있다. 일반적으로 M<sub>1</sub> 개체들의 경장은 두 품종 모두 非處理個體에 비하여 감소되는

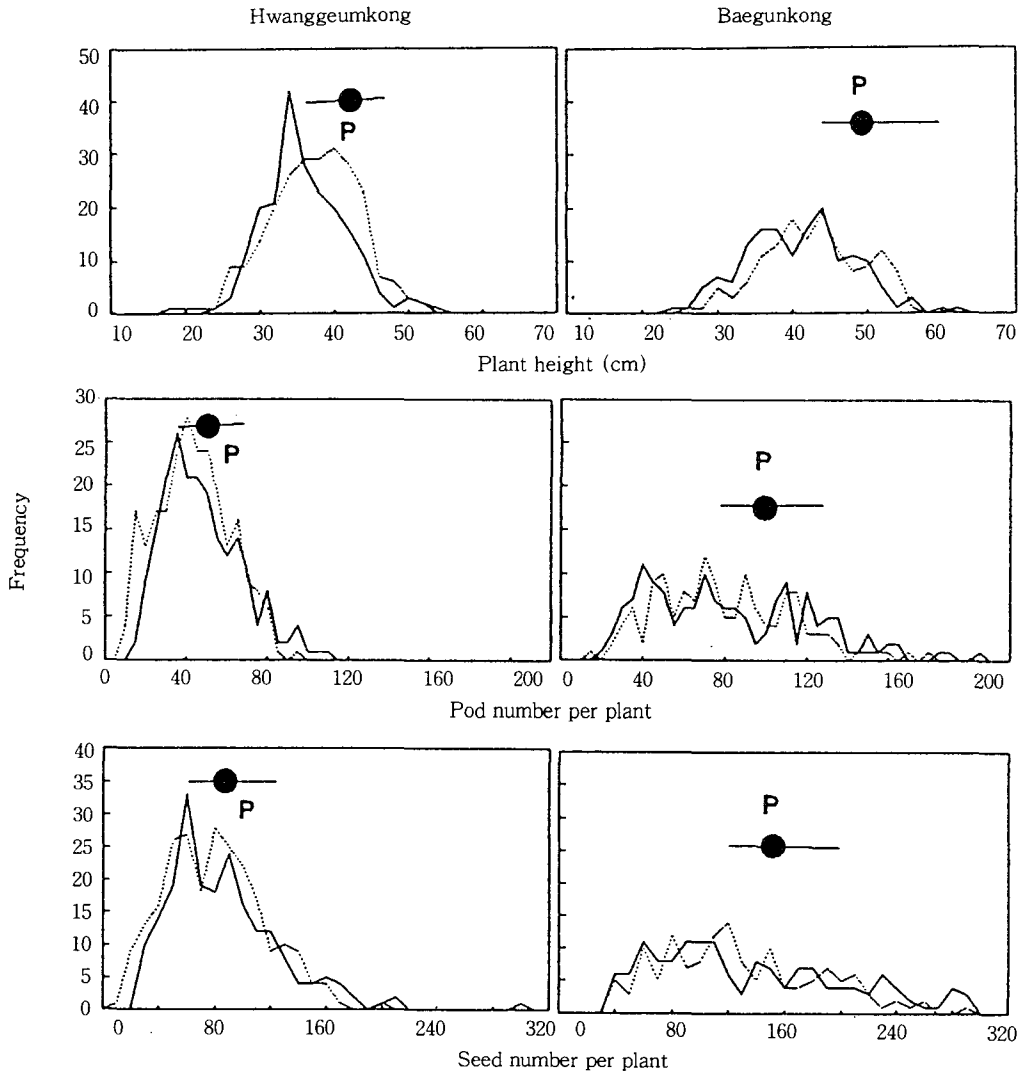


Fig. 1. Frequency distribution for agronomic characters of M<sub>1</sub> plants, as affected by EMS concentration (Solid and dot lines represent 30mM and 50mM EMS, respectively)

경향이었으며, 개체당 협수 및 립수에 있어서도 같은 양상을 나타내고 있어 EMS 처리에 의하여 M<sub>1</sub> 개체들의 생육은 저해되었으나, EMS 처리농도에 따른 분포양상의 차이는 크지 않았다.

M<sub>1</sub>을 個體別로 수확, 系統化하여 이듬해 M<sub>2</sub> 종자를 황금콩은 45계통, 백운콩은 30계통을 각각 계통당 10粒씩 모래로 채워진 사각 포트에 파종, 근류균을 접종하고 4주가 경과한 후에 무처리개체들과 비교하여 근류착생 및 뿌리와 지상부의 건물중에 있어서의 변이체 發生頻度率을 조사하여 나타낸 것이 표2이다. 무처리개체들의 평균치에서  $\pm 3\sigma$  범위에서 벗어나는 개체를 변이체로 간주하였는데, 근류착생수에 있어서 황금콩의 변이체는 없었으나, 백운콩의 경우에는 근류착생이 적은 개체 발생빈도가 0.9%, 높은 개체들이 6.2%로 비교적 높았다. 地上部 乾物重에 있어서의 변이개체비율은 황금콩 및 백운콩의 경우 각각 14.2 및 12.4%로 그 발생빈도가 다른 形質에 비하여 높았다. 따라서 M<sub>2</sub> 개체들의 근류착생변이체 선발은 다른 형질변이체 선발보다 용이하지 않다는 것을 알 수 있다.

한편 포장에서 계통화하여 재배된 M<sub>2</sub> 식물체의 엽록소결핍 개체발생 및 돌연변이 유기율을 살펴보면 표3과 같다. 백운콩은 30mM보다는 50mM EMS 수준에서 엽록소결핍 개체발생율이 높았으며, 전체적으로는 공시된 496계통들 가운데 11계통이 葉綠素缺乏 개체출현을 나타내어 평균 2.2%의 엽록소 결핍 突然變異가 유기되었다. 일반적으로 알려진 엽록소 함량이 잎의 전반에 걸쳐서 낮은 변이체 뿐만 아니라, 엽맥 부근은 엽록소가 잘 발달된 반면 엽맥사이에는 엽록소가 결핍된 변이체와

既存에 보고되어 있는 albino 遲延變異體(遺傳子記號 : y19)<sup>16)</sup>와 유사한 변이체들이 발생되었다. 그러나 같은 계통내에서의 이와 같이 다양한 엽록소 결핍 특성의 변이체간 차이는 없었다.

EMS 처리에 의하여 엽록소 결핍 개체들이 출현한 M<sub>2</sub> 계통들의 정상 개체와 변이체의 분리비는 표4에서 보는 바와 같이 품종 및 EMS농도에 관계없이 다양한 分離樣相을 나타내고 있다. 지금까지 콩 遺傳學 雜誌(Soybean Genetics Newsletter)에 등록된 엽록소 결핍에 관여하는 핵내 유전자는 19종으로, 이들 모두 單純劣性으로 유전한다고 하였다.<sup>13)</sup> 만약 변이체들이 단순열성으로 유전하고, EMS 처리에 의하여 M<sub>1</sub> 종자의 모든 細胞에 돌연변이가 일어났을 경우에는 M<sub>2</sub> 세대에서 정상인 개체와 엽록소결핍 개체가 3:1로 분리되어야 하지만,  $\chi^2$  檢定 결과에 의하면 MD9와 MD69계통을 제외하고는 그 외의 변이체 모두가 理論値와 일치하지 않았다. 따라서 M<sub>1</sub> 종자세포의 일부만이 돌연변이가 일어나 chimera현상을 나타내고 있음을 시사하고 있다. 엽록소결핍이 단순열성으로 지배된다는 假定아래, 分離比를 이용하여 M<sub>1</sub> 종자내의 유전적 조성을 推定한 결과에 의하면 MB88계통은 M<sub>1</sub> 종자세포의 5.3%가 돌연변이가 유기된 이형접합체로, 나머지 94.7%는 정상적인 단순우성인자의 동형접합체로 구성되어 있고, MD69계통은 M<sub>1</sub> 종자의 84.2%가 돌연변이가 유기되어 품종 및 EMS 처리 농도에 따른 일정한 경향이 없었다. 이는 EMS 처리시 M<sub>1</sub> 종자에 유기된 돌연변이 세포 구성비율은 濃度에 관계없이 임의적으로 일어나고 있음을 나타내고 있으며, 추후 M<sub>3</sub> 세대에서 좀 더

Table 2. Percentage of morphological variants in M<sub>2</sub> soybean plants mutagenized with EMS

Characters	Genotypes					
	Hwanggeumkong			Baegunkong		
	Small*	Large*	Total	Small	Large	Total
Nodule number	0	0	0	0.9	6.2	7.1
Nodule dry weight	3.1	2.9	6.0	0	4.4	4.4
Root dry weight	2.7	0.4	3.1	0.4	12.6	13.0
Shoot dry weight	11.1	3.1	14.2	6.0	6.4	12.4

\* The small and large represent smaller than  $\bar{P} - 3\sigma$  and larger than  $\bar{P} + 3\sigma$ , respectively.

Table 3. Frequency of chlorophyll-deficient mutant in M<sub>2</sub> plants mutagenized with EMS

Genotype	Dose (mM)	No. of M <sub>2</sub> lines tested	No. of M <sub>2</sub> lines mutated	Mutation frequency (%)
Hwanggeumkong	30	100	2	2.0
	50	100	3	3.0
Baegunkong	30	100	1	1.0
	50	96	5	5.2
Total		496	11	2.2

Table 4. Segregation of M<sub>2</sub> chlorophyll-deficient mutants and their mutated cell frequency within M<sub>1</sub> seed

Genotype	Dose (mM)	M <sub>2</sub> line	Observed			X <sup>2</sup> (3:1)	P	Mutated cell frequency(%)
			Normal	Mutant	Total			
Hwanggeumkong	30	MA1	57	4	61	11.07	< 0.005	26.2
		MA85	57	1	58	16.76	< 0.005	6.9
	50	MB62	47	4	51	8.01	< 0.005	31.4
		MB88	74	1	75	22.40	< 0.005	5.3
		MB98	77	2	79	21.27	< 0.005	10.1
Baegunkong	30	MC11	49	2	51	12.09	< 0.005	15.7
		MD9	29	5	34	1.92	0.25~0.10	58.8
	50	MD69	30	8	38	0.32	0.75~0.50	84.2
		MD75	60	6	66	8.91	< 0.005	36.4
		MD78	77	4	81	17.39	< 0.005	19.8
		MD92	69	3	72	16.67	< 0.005	16.7

Table 5. Nodulation and growth characters of M<sub>2</sub> mutants and their wild-type soybean plants at R<sub>6</sub> stage

Genotypes	Nodule number	Chlorophyll* content	Plant height (cm)	Pod number
Hwanggeumkong	17 b**	49 a	65 a	38 a
MA48	27 a	54 a	47 b	34 a
MB88	12 b	28 b	28 c	8 b
MB97	12 b	33 b	32 c	12 b
Baegunkong	14 a	48 a	83 a	48 a
MD69	0 b	28 c	28 c	11 b
MD75	8 a	32 b	47 b	27 b

\* Measured with SPAD501, Minolta Camera Co., LTD., Japan.

\*\* Means on the same column and within the same wild-type soybean genotype are significantly different at P=0.05 based on an LSD.

검토해 볼 가치가 있으리라 생각된다.

파종 4주 후 M<sub>2</sub> 개체에서 근류착생 및 기타 생육 이상 개체들을 선발한 다음, 포트에 이식하여 R<sub>6</sub>단계에서 변이체들의 지상부 생육특성을 조사한 결과는 표5에서 보는 바와 같다. 일반적으로 근류가 다량으로 착생되는 계통은 지하부의 근류형성 및 질소고정을 위하여 지상부에서 생성된 광합성물질을 많이 필요로 하여 지상부 생육이 阻害된다고 한다<sup>11)</sup>. 선발된 MA48계통은 무처리 황금콩보다 근류착생이 많았으며, 경장의 크기는 작은 반면 개체당 협수는 거의 차이가 없어서, 이와 같은 특성들

이 후대에도 전달되는 경우에는 생물학적 窒素固定能力 向上과 窒素施肥 輕減 측면에서 유망할 것으로 생각된다. 한편 근류착생이 비교적 적은 MB88, MB97 및 MD75계통들은 잎의 엽록소 함량이 낮았으며 경장이 작았고 개체당 착협수도 적었다. 특히 불량한 생육을 보인 MD69계통은 표5에서 보는 바와 같이 파종 4주후에는 근류착생이 전혀 안 되었으나 생육후기에는 극히 미미한 근류가 착생되었다. 이와 같이 선발된 변이체들은 그 유전성 여부를 판정함과 동시에 既存의 콩 유전자원과 비교하여 새로운 資源의 確保 觀點에서 좀 더 검토되어야 할 것이다.

## 摘 要

황금콩과 백운콩에 30mM 및 50mM EMS를 각각 종자 1립당 1ml 수준으로 실온에서 6시간 처리하여 얻은 M<sub>1</sub> 종자를 播種한 다음, 圃場出現率 및 M<sub>1</sub>개체들의 형태적 특성의 분포 양상을 검토하고, M<sub>2</sub> 세대에서 근류착생 및 기타 突然變異 출현 양상을 조사한 결과를 要約하면 다음과 같다.

1. M<sub>1</sub> 종자의 포장출현율은 백운콩이 황금콩보다 비교적 높았으나 EMS 농도 처리간 차이는 없었으며, 葉綠素 缺乏 個體 發生率은 평균 0.7% 였다.
2. 수확시 M<sub>1</sub> 개체들의 경장, 개체당 협수 및 립수

- 는 無處理個體에 比하여 減少되는 傾向이었으며, EMS 처리 농도간 분포차이는 크지 않았다.
3. M<sub>2</sub> 세대에서 엽록소 결핍 개체 출현율에 의하여 판별된 突然變異 유기율은 평균 2.2%이었으며, 돌연변이가 유기된 M<sub>1</sub> 종자는 chimera 현상을 나타내었으며 돌연변이 細胞의 비율은 5.3~84.2%로 나타났다.
  4. EMS 처리에 의하여 根瘤着生在 많은 MA48계통과 근류착생이 거의 안되는 MD69계통을 선발하였는데 MA48계통은 葉綠素含量이 많았고 MD69 계통은 엽록소 결핍현상을 나타내었다.

### 引用文獻

1. Carroll, B. J. and P. M. Gresshoff. 1986. Isolation and initial characterization of constitutive nitrate reductase-deficient mutants NR328 and NR345 of soybean(*Glycine max*). Plant Physiol. 81:572-576.
2. Carroll, B. J., D. L. McNeil and P. M. Gresshoff. 1985. Isolation and properties of soybean[*Glycine max*(L.) Merr.] mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4162-4166.
3. Carroll, B. J., D. L. McNeil and P. M. Gresshoff. 1985. A supernodulation and nitrate-tolerant symbiotic(nts) soybean mutant. Plant Physiol. 78:34-40.
4. Constantin, M. J., W. D. Klobe and L. N. Skold. 1976. Effects of physical and chemical mutagens on survival, growth and seed yield of soybeans. Crop Sci. 16:49-52.
5. Feenstra, W. J. and E. Jacobsen. 1980. Isolation of a nitrate reductase deficient mutants of *Pisum sativum* by means of selection for chlorate resistance. Theor. Appl. Genet. 58:39-42.
6. Filippetti, A. and C. De Pace. 1986. Improvement of seed yield in *Vicia faba* L. by using experimental mutagenesis. II. Comparison of gamma-radiation and ethyl-methane-sulphonate(EMS) in production of morphological mutants. Euphytica 35:49-59.
7. Gaul, H. 1977. Mutagen effects in the first generation after seed treatment. I. Plant injury and lethality. p. 87-91. In C. N. Welsch(ed.) Manual on mutation breeding. IAEA, Vienna.
8. Gremaud, M. F. and J. E. Harper. 1989. Selection and initial characterization of partially nitrate tolerant nodulation mutants of soybean. Plant Physiol. 89:169-173.
9. 權臣漢, 任建燾, 孫清烈, 殷種旋. 1964. 突然變異 誘起에 依한 大豆品種改良研究. I. 大豆에 對한 EMS, EI 및 감마線 處理 效果比較. 韓作誌 7:139-144.
10. 李錫河, 李弘秭. 1992. 超多 根瘤着生 突然變異體 콩의 뿌리혹 形成 및 初期生育. 韓作誌 37:16-21.
11. 任建燾, 權臣漢, 孫清烈, 殷種旋. 1969. 人爲突然變異 利用에 依한 小麥 品種改良. I. 小麥에 對한 감마線과 EMS의 處理效果. 韓育誌 1(1):21-28.
12. Mathews, A., B. J. Carroll and P. M. Gresshoff. 1987. Characterization of non-nodulation mutants of soybean[*Glycine max*(L.) Merr.] : *Bradyrhizobium* effects and absence of root hair curling. J. Plant Physiol. 131:349-361.
13. Palmer, R. G. and T. C. Kilen. 1987. Qualitative genetics and cytogenetics. p. 135-209. In J. R. Wilcox(ed.) Soybeans : improvement, production and uses. ASA, Inc., CSSA Inc., SSSA. Inc. , Madison, Wisconsin, U. S. A.
14. Ryan, S. A., R. S. Nelson and J. E. Harper. 1983. Soybean mutants lacking constitutive nitrate reductase activity. II.

- Nitrogen assimilation, chlorate resistance and inheritance. *Plant Physiol.* 72:510-514.
15. Ryan, S. A., R. S. Nelson and J. E. Harper. 1983. Mutagenesis of soybean. *Soybean Genet. Newsl.* 10:29-32.
16. Soybean Genetics Committee. 1978. New gene symbols. *Soybean Genet. Newsl.* 5:13.
17. Wilcox, J. R. and J. F. Cavins. 1985. Inheritance of low linolenic acid content of the seed oil of a mutant in *Glycine max.* *Theor. Appl. Genet.* 71:74-78.