

## Colchicine과 EMS 돌연변이 처리가 고추냉이 식물체의 단백질 Pattern에 미치는 영향

박 기인\*·은종선\*\*·최선영\*\*·권 성환\*\*·이 강수\*\*·소 상섭\*·윤 명자\*

### Effects of Colchicine and EMS Dropping to Apical Meristem on Induced Mutation and Plant Protein Pattern in *Wasabia japonica* Matsum

Kie - In. Park, \*, Jong - Seon Eun\*\*, Sun - Yong Choi\*\*, Sung - Whan Kwon\*\*, Kang - Soo Lee\*\*, Sang - Sup So\*, and Myung - Ja Youn\*

**ABSTRACT** : This study was investigated on the effects of colchicine and EMS . induced mutation, plant on the germination and polypeptide pattern and peroxidase activity monitored by two dimensional gel analysis in *Wasabia japonica* Matsum (wasabi). Germination rate of Muju was higher than that of Ulrung - Do and optimum concentration for germination was appeared 100 ppm GA<sub>3</sub> containing with 10 ppm BAP in these cultivars. Survived plants rate of Muju was higher than that of Ulrung - Do after colchicine and EMS treatment. Peroxidase activity and plant height were decreased by mutagen treatments, while increased in root and stem thickness. The number of protein spots and pattern showed difference between Muju and Ulrung - Do . The plants treated mutagen increased polypeptide spots, especially EMS treatment showed more different polypeptide pattern compared to control.

## 서 언

고추냉이는 반음지 식물로서 수목이 우거진 서늘한 기후를 좋아하며, 여름철에는 햇볕이 적게 들고 겨울철에는 햇볕이 잘 드는 곳에서 자생하는 십자화과 식물이다<sup>7,8)</sup>. 우리 나라에서는 울릉도 자생종도 있고 이러한 조건들을 충족시킬 수 있는 울릉도와 무주 지역에서 와사비의 재배가 시도되어

왔으나, 환경에 따라 생장이 민감하게 변화함으로써 인하여 발아 및 재배상에 여러 가지 문제점들이 발생되고 있다<sup>8)</sup>. 고추냉이는 실생 번식과 영양번식 모두 가능한데 실생 번식시 발아 저해성 종자이므로 발아율을 높이기 위하여 호르몬을 처리하거나 층적법을 통하여 휴면을 타파하고 있다<sup>5,9,10)</sup>. 박 (1996) 등<sup>5)</sup>과 中村 (1990)<sup>9)</sup>은 100 ppm의 GA<sub>3</sub> 또는 10 ppm의 BAP 처리시 발아율이 무처리구에 비하여 3배 이상의 효과가 있음을 보고하였다. 또한 재

\* 전북대학교 자연과학대학 생물과학 (Division of Biol. Sci. Chonbuk National University, Chonju 561 - 756, Korea)

\*\* 전북대학교 농과대학 생물자원과학부 (Division of Biol. Res. Sci. Chonbuk National University, Chonju 561 - 756, Korea)

본 논문은 1995년도 교육부 학술연구조성비 (농업과학분야)에 의하여 연구된 결과의 일부임.

( '97. 1. 3 접수 )

배상에 있어서 품종을 개량할 수 있다면 환경에 대한 반응과 병해에 대한 저항성 선발육종은 물론, 크기 및 식미까지도 획기적인 결과를 가져올 수 있다. Migueí과 Browse (1992)<sup>2)</sup>는 Arabidopsis에 EMS를 처리하여 불포화 지방산이 많이 함유된 식물체를 얻었으며 이는 내한성에도 강함을 나타냈다. 細木(1988) 등<sup>6)</sup>은 우량 형질의 특성을 유지하기 위하여 내서성 계통을 선발하는데 조직배양을 이용하였다. 이러한 유전적 변이를 이용하기 위하여 엽채류에서는 주로 영양기관 비대를 위한 배수성 육종법이 시도되고 있다<sup>7)</sup>.

본 실험에서는 발아율을 높이기 위하여 무주산과 울릉도 와사비간에 GA<sub>3</sub>와 BAP 처리에 따른 발아율을 조사하고, 발아후 mutant를 얻기 위해서 EMS와 colchicine을 처리하였다. 특히 colchicine 처리시 배수체가 유도되면 일반적으로 영양기관이 비대되기 때문에 와사비의 근경 비대에도 큰 효과를 얻을 수 있다는 가정 하에서 colchicine과 EMS를 처리하여 형태적 변화를 관찰하였으며, 또한 이때 발현되는 단백질 양상의 변화와 peroxidase 활성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 호르몬 처리후 발아율 조사

전북 무주군 농촌 지도소와 경북 울릉도 농촌 지도소에서 분양받은 고추냉이 종자를 GA<sub>3</sub>와 BAP에 각각 3시간동안 침지한 다음, petri-dish에 5장의 filter paper를 깔고 5 ml의 증류수를 첨가하여 30립씩 3반복으로 치상하였다. 치상 10일후 발아율을 조사하였는데 유근이 2 mm이상 신장한 것은 발아한 것으로 간주하여 백분율로 환산하였다<sup>5,11)</sup>.

### 2. 배수체 유도

배양토에 고추냉이 종자를 파종하여 18℃에서 발아시킨 후, 약 3 cm 정도 발아된 묘의 생장점 부위에 colchicine과 EMS를 처리하였다. 처리후 박(1996) 등<sup>5)</sup>과 같은 방법으로 생존율을 조사하였다.

### 3. 배수체의 Peroxidase활성 측정

Peroxidase 활성은 mutagen이 처리된 식물체를

0.02 M sodium acetate, pH 5.0에 마쇄하여 15분 동안 17,000 g로 원심분리하였다. 상등액을 효소 원으로 하여 전체반응액 1ml내에 1.8 mM benzidine과 0.9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 기질을 첨가한 다음, 효소 추출액 0.01 ml를 넣고 2분간 반응시켜 610 nm의 흡광도를 unit로 표시하였다<sup>1)</sup>.

### 4. 단백질 Pattern의 비교.

1) 시료준비 : Mutagen이 처리된 식물체의 엽조직을 1g씩 채취하여 SDS-buffer (4% SDS, 2% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 2mM PMSF in Tris-HCl, pH 6.8)에 마쇄한 후, 80℃에서 3분간 반응하였다. 그후 원심분리하여 일정량의 상등액을 취한 후 4배의 아세톤 용액 (-20℃)과 혼합하여 20분간 반응하여 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질을 다시 80% 아세톤을 이용하여 20분간 반응시킨 후 원심분리하여 침전물질을 N<sub>2</sub> 가스에 말린 다음, 전기영동용 시료로 사용하였다.

2) 전기영동 : 등전점 전기영동은 tube gel (1.5 mm x 12cm)을 이용하여 O'Farrell 방법으로 실시하였다. Ampholine은 pH 3-10과 pH 5-8을 사용하였으며, 음극 탱크에는 0.1 M NaOH, 양극은 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 채운 후 1시간 prerun한 후, 17 시간 동안 450V, 마지막 1시간은 800V로 영동하였다<sup>8)</sup>. Gel을 꺼낸 후, 20분간 equilibrium하여 SDS-전기영동 gel 위에 놓은 다음 agarose로 봉합했다. SDS 전기영동은 10% acrylamide 사용하여 Laemmli와 같은 방법으로 약 5시간 동안 전개하였다<sup>3)</sup>. Silver staining법으로 염색하여 나타난 단백질 spots을 Mac computer scanner에 scanning한 후, 부위별로 나누어 spot을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

고추냉이는 발아 저해성 종자이므로 발아율을 높이기 위하여 여러가지 식물호르몬을 처리하여 발아율을 높이고 있다<sup>7,9,11)</sup>. 휴면타파는 GA와 ABA의 상호 작용에 의하여 결정되며 BAP는 세포분열을 촉진시키기 때문에 일반적으로 GA 또는 BAP의 농도를 높여 발아를 촉진시키고 있다. 이전에朴(1996) 등<sup>5)</sup>에 의하여 보고된 바에 의하면 무주산 와사비에 100 ppm GA<sub>3</sub> 단독 처리 또는 10 ppm

BAP 단독 처리시 무처리구에 비하여 4배 이상의 발아 효과를 보였다. 또한 GA<sub>3</sub> 농도를 100 ppm으로 고정 한 후 BAP 농도를 10, 50, 100, 150 ppm으로 변화시켜 혼합 처리한 결과 GA<sub>3</sub> 100+BAP 10 ppm 처리구에서 8배 이상의 발아 효과를 보임으로써 최적의 농도로 나타났으며 BAP 50 ppm 이상의 농도에서는 오히려 억제되는 현상을 보였다. 본 실험에서 무처리구에서 무주산과 울릉도산의 발아율은 각각 8%와 6%, GA<sub>3</sub> 100+BAP 10 ppm 처리구에서는 65%와 53%로 무주산이 약간 높은 경향을 보이고 있다(그림. 1).

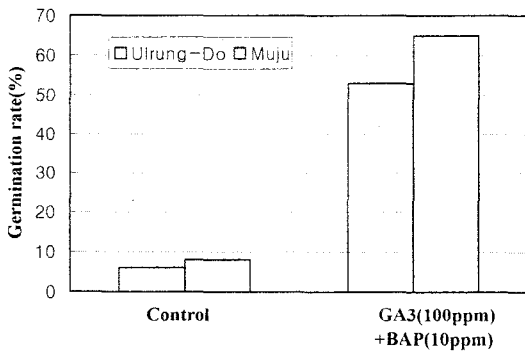


Fig. 1. Effects of combination of 10 ppm BAP and 100 ppm GA<sub>3</sub> on the germination of *Wasabia japonica* seeds.

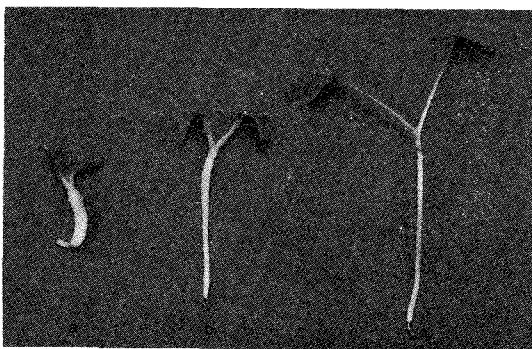


Fig. 2. Comparison of growth phenotype between control(c), EMS(a) and colchicine(b) treatment. The plants were 7 day old after treatment.

무주산에 colchicine 과 EMS를 처리하여 나타난 식물체는 그림 2에서 보는 바와 같이 초장은 작지만 뿌리와 줄기가 비대됨을 볼 수 있었으며, 특히 EMS 처리는 초장이 현저하게 억제되어 나타났다. Mutagen 처리후 생존율도 무주산이 울릉도산에 비하여 전처리구에서 높게 나타났는데, 전 보고<sup>5)</sup>에서도 colchicine 0.5% 처리시 와사비의 염색체가 배가되었으며, EMS 0.06% 농도에서 mutant을 얻었다. 표 1에서 보는 바와 같이 0.5% colchicine 처리시 무주산의 생존율은 86%를 보인 반면, 울릉도산은 73%, 또한 0.06% EMS 처리구에서는 각각 55%와 45%의 생존율을 보였으며 mutagen의 농도가 증가될수록 생존율은 감소하였다.

Table 1. Percent of survived plants by colchicine and EMS treatment after germination in wasabi varieties of Ulrung - Do and Muju.

Mutagen	Concentration (%)	Percent of survived plants	
		Ulrung - Do	Muju
Colchicine	0	85	91
	0.5	73	86
	1.0	49	60
EMS	0	85	91
	0.06	45	55
	0.12	35	38

Table 2. Effect of colchicine and EMS dropping apical meristem on peroxidase activity in wasabi varieties of Ulrung - Do and Muju.

Treatments	Ulrung - Do		Muju	
	Unit	% of control	Unit	% of control
Control	0.65		0.56	32.1
0.5% colchicine	0.23	35.4	0.18	0.46
0.06% EMS	0.53	81.5	0.46	82.1

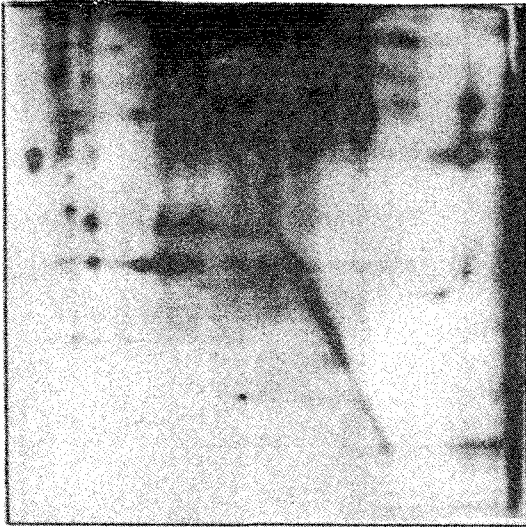


Fig. 3 - A. Two dimensional separation of whole proteins from colchicine treated plants of Muju (wasabi). The gel was stained with silver nitrate.



Fig. 3 - B. Two dimensional separation of whole proteins from colchicine untreated plants of Muju (wasabi). The gel was stained with silver nitrate.

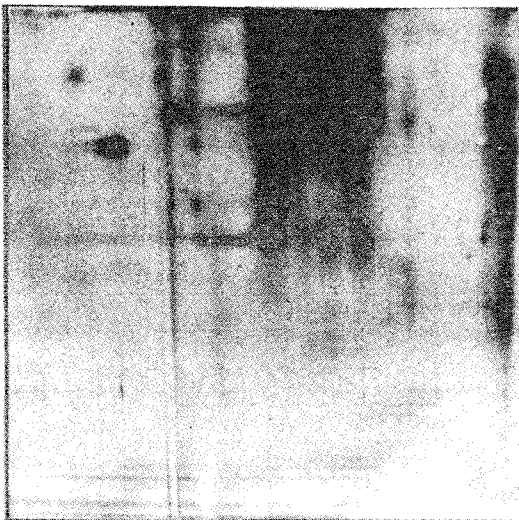


Fig. 3 - C. Two dimensional separation of whole proteins from EMS untreated plants of Ulrung - Do (wasabi). The gel was stained with silver nitrate.



Fig. 3 - D. Two dimensional separation of whole proteins from EMS treated plants of Muju (wasabi). The gel was stained with silver nitrate.

과산화효소 활성은 울릉도산이 무주산에 비하여 높았으며, mutagen을 처리시 활성이 억제되는 경향을 보였다. 무주산은 0.5% colchicine 처리시 무처리구에 비하여 70.0%, 0.06% EMS 처리는 17.5%의 활성이 억제되었으며, 울릉도산은 0.5% col-

chicine에서 77.9%, 0.06% EMS에서 18.5%활성이 억제되었다. 일반적으로 식물체가 스트레스를 받으면 과산화효소의 활성이 높아지나 colchicine과 EMS 처리는 과산화효소의 활성이 감소된 것으로 보아 이와는 다른 기작이 작용한 것으로 추정된다.

Table 3. Changes of wasabi root polypeptides separated by two-dimensional SDS-PAGE. The data given were obtained from Figure 2.

Cultivar	pH range	Mol. wt. range (kD)	No. of polypeptide
Muju	below 5	above 90	9
		below 90	14
	5.0-7.0	above 90	undetectable
		below 90	18
	above 7.0	above 90	9
below 90	12		
Total spots <sup>2</sup>			62
Ulrunng Do	below 5	above 90	9
		below 90	14
	5.0-7.0	above 90	undetectable
		below 90	18
	above 7.0	above 90	9
below 90	9		
Total spots			59
Muju (colchicine)	below 5	above 90	11
		below 90	23
	5.0-7.0	above 90	undetectable
		below 90	28
	above 7.0	above 90	9
below 90	12		
Total spots			83
Muju (EMS)	below 5	above 90	15
		below 90	24
	5.0-7.0	above 90	15
		below 90	14
	above 7.0	above 90	5
below 90	8		
Total spots			66

<sup>2</sup> Total spots were counted without undetectable area the gel

배수체가 유도된 농도에서 식물체를 채취하여 발현되는 단백질의 양상을 2차원적 전기영동을 이용하여 나타난 것은 그림 A-D에서 보는바와 같다. 처음 염색은 comassie blue R-250으로 실시하였으나 spot이 거의 나타나지 않았기 때문에 glutaraldehyde로 30분간 고정 후, silver nitrate를 이용하여 염색하였다. Rany와 Bretteville (1987)<sup>4)</sup>은 일반적인 comassie blue R-250 염색 방법보다 silver nitrate 방법이 20-200배 더 민감하게 단백질을 감지할 수 있는 것으로 보고했다. pH 5.0-7.0 사이에 있는 고분자인 90 kD 이상에서 많은 band가 나타났으나 식별이 불가능하였고 그 부위를 제외한 polypeptide spots는 mutagen이 처리되지 않은 무주산 고추냉이에서 약 62개, 울릉도산은 59개의 polypeptide spots가 나타났으나, 무주산과 울릉도 자생종은 거의 비슷한 protein pattern을 가지고 있었다(그림 3-B와 C). 고추냉이의 원산지는 주로 일본으로 알려져 있으며 우리나라에서도 울릉도에 자생 고추냉이를 발견하였으나 1920년 일본인에 의해 도입되었다가 해방과 더불어 자연 상태로 방치되어 군락을 이루게 되었다는 설이 유력시되고 있다<sup>7)</sup>. 본 실험에서도 울릉도산이 일본에서 도입하여 무주에서 재배되고 있는 것과 거의 같은 단백질 양상을 보이고 있는 것으로 보아 일본 유입설의 가능성을 제시해 주고 있다. 특히 알칼리성을 띤 90 kD이하의 저분자 단백질이 달라진 것은 환경의 변화에 발현된 것으로 추정된다. 일반적으로 식물체는 노화되면서 고분자의 단백질은 감소되고, 저분자의 단백질이 증가되는 것으로 알려져 있다<sup>12)</sup>. 그러나 콜히친과 EMS를 처리한 고추냉이는 mutagen이 처리되지 않은 것과 상당히 다른 polypeptide를 형성하고 있는데(그림 3-A와 D), colchicine 처리시 83개, EMS 처리시 66개의 polypeptide spots으로 mutagen 처리시 protein polypeptide가 증가되는 현상을 보였다. Colchicine은 방추사 형성을 억제하여 배수체를 유도하고, EMS는 guanine 염기에 thymine을 결합시킴으로써 mutation을 일으킨다. EMS 처리는 무처리구나 colchicine 처리구와 비교할 때 단백질 pattern과 spot의 수적인 면에 있어서 현저한 차이를 보인 것으로 보아 와사비에 있어서 EMS가 col-

chicine에 비하여 더욱 강한 mutagen이라 생각되며, 앞으로 변이체의 생장에 따른 수확량과 품질의 비교가 조사될 부분으로 남아 있다.

## 적 요

고추냉이의 배수체를 유도하기 위하여 EMS와 colchicine을 처리하였을 때 변화되는 단백질과 과산화효소 활성은 다음과 같이 나타났다.

발아율은 무주산이 울릉도산 보다 높았으며, GA3 100 ppm+ EMS 10 ppm 혼용처리시 무처리구에 비하여 모두 6배 이상 증가되었다. Mutagen 처리후 생존율도 울릉도산 보다 무주산에서 더 높게 나타났으며, 과산화효소 활성과 와사비의 초장은 감소되어 나타난 반면, 줄기와 뿌리는 비대되는 경향을 보였다. 무주산과 울릉도산의 단백질 양상이 비슷하고, mutagen을 처리했을 때 polypeptide spot 수가 증가되었으나 단백질 pattern은 다르게 나타났고, 특히 EMS 처리는 무처리구에 비하여 현저하게 다른 양상을 보였다.

## 인 용 문 헌

1. Kwon, S. W. and J. C. Kim. 1995. Role of polyamines in the retardation of chinese cabbage leaf senescence. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 36(3) : 317-322.
2. Miquel, M. and J. Browse. 1992. Arabidopsis mutant deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 267 : 1502-1509.
3. O Farrell, P. H. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 : 4007-4021.
4. Remy, R. and F. A. Bretteville. 1987. Two-dimensional electrophoresis in the analysis and preparation of cell organelle polypeptides. *Methods in Enzymology* 148 : 623-632.
5. 박 기인, 윤 명자, 권 성환, 최 선영, 이 강수. 1996. Colchicine과 EMS처리에 의한 고추냉이의 변이체유도. *약용작물학회지* 4(1) : 12-18.

6. 細木高志. 1988. 고추냉이 조직 배양묘의 증식. 농지원 63(5) : 83-84.
7. 이 성우, 안병옥. 1995. 고추냉이(와사비) 재배법 - 일본의 고추냉이 재배법과 국내 연구 결과 소개. 사단법인 농진회.
8. 이 태호. 1993. 향신 작물 고추냉이의 특성과 재배 기술. 연구와 지도 34(2) : 50-55.
9. 中村俊一郎. 1990. 와사비 종자의 발아에 관한 연구. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 59(3) : 573-578.
10. 中村俊一郎. 1990. 와사비 종자의 배양에 관한 연구. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 59(3) : 579-587.
11. 최 선영, 이강수. 1994. 식물생장 조절 물질이 고추냉이의 발아와 유근 생장에 미치는 영향. 한국약물학회지 3(2) : 111-115.
12. Salisbury, F. B. and C. W. Ross. 1989. Plant Physiology (3rd edition). Wadsworth Publishing Company.