

중이온 빔 조사에 의한 담배의 돌연변이 유도와 내염성 식물의 선발

배창휴¹ · Abe Tomoko¹ · 민경수² · 김동철³ · 정재성⁴ · 이춘환⁵ · 임용표⁶ · 이호연^{3*}
¹일본 이화학연구소, ²전남대학교 농과대학, ³순천대학교 농과대학, ⁴순천대학교 자연과학대학,
⁵부산대학교 자연과학대학, ⁶충남대학교 농과대학

Mutation Induction and Selection of Salt-tolerant Plants by Heavy-ion Beam Irradiation in Tobacco Proembryo

BAE, Chang-Hyu¹ · ABE, Tomoko¹ · MIN, Kyung-Soo² · KIM, Dong-Choul³
JUNG, Jae-Sung⁴ · LEE, Choon-Hwan⁵ · LIM, Yong-Pyo⁶ · LEE, Hyo-Yeon^{3*}

¹The Institute of Physical and Chemical Research, 351-01, Japan: ²College of Agriculture Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea: ³College of Agriculture Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea: ⁴College of Natural Sciences Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea: ⁵College of Natural Sciences Pusan National University, Pusan, 609-735, Korea: and ⁶College of Agriculture, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea. *corresponding author.

Tobacco proembryos were irradiated with 100 Gy of heavy-ion beams (¹⁴N, ²⁰Ne : 135 Mev/u) after 24 to 96 hours of pollination as a mutagen and screened M₁ generation for morphological mutants and salt-tolerant plants. Morphological and physiological characteristics of the salt-tolerant plants derived from the irradiated proembryo are discussed in this report. Mutants irradiated proembryos with the beams after pollination produced various kinds of morphological variation. A total of 17 salt-tolerant plants were selected from tobacco cultivar (BY-4) by treatment with ¹⁴N beam. Shapes of filament and pollen grain of most salt-tolerant plants were abnormal compared with non-irradiated wild type, and seeds weight and fertility obviously decreased. The germination rates of the several M₂ lines on the saline and the mannitol condition were higher than that of wild type.

Key words: *Nicotiana tabacum*, NaCl, morphological variation.

세계적으로 분포되어 있는 염해지역은 약 4백만 km²에 이르고 있고 이중 약 230만km²는 잠재적으로 작물을 생산할 수 있는 곳으로 추정되고 있다(Flowers et al., 1977: Greenway and Munns, 1980). 그러나 대부분의 작물은 염해에 약하기 때문에 일부의 식물을 제외하고는 작물의 재배가 불가능하다. 지금까지 대부분의 연구자들은 NaCl에 의해 발생하는 장애나 내염성 기작에 관하여 세포 및 기관의 수준에서 연구를 수행해 왔다. 특히 육종학적인 측면에서 내염성식물의 선발은 중생식물(glycophytes)로부터 내염성을 갖고 있는 품종을 선발하거나, 내염성을 지닌 야생종과 재배종 사이에 교배를 통하여 품종을 육성하여 왔다. 또한 조직배양을 이용하여 배양세포로부터 내염성 변이 세포가 선발되어 왔다(Binzel et al., 1988: Dvorak et al., 1988: Fooland

and Johnes, 1991: Kwon and Lee, 1966). 이러한 개체들의 내염성 기작으로는 외부의 높은 이온에 대응하여 이온을 액포내에 축적 하거나 또는 외적 삼투압변화에 따라서 세포내의 삼투압을 유지하기 위하여 특별한 화합물(compatible solutes: 적합용질)을 합성하는 방법이 식물의 적응기작으로 알려져 있다(Flowers et al., 1977: Binzel et al., 1985: Cheeseman, 1988). 내염성 식물을 포함한 환경 스트레스 저항성 개체의 기작을 규명하는데 있어서 저항성 돌연변이 식물체가 중요한 재료로서 이용되고 있다. 따라서 인위적 돌연변이체를 유도하여 내염성 기작을 해석하고 또한 품종개량에도 이러한 돌연변이 개체들을 이용하려고 하는 연구가 진행되고 있다. 예를 들어 화학돌연변이 유기물질인 EMS (ethyl methane sulphonate)를 종자와 배양세포에 처리

하여 내염성 돌연변이체를 선발하였다(Nabors et al, 1980; Kishor and Reddy, 1986; Saleki et al, 1993). 최근 분자생물학의 급속한 진보에 따라서 식물기능에 관련된 유전자를 cloning하기 위하여 돌연변이 식물체의 유도의 중요성이 강조되고 있다. 과거에는 방사선인 X선 및 γ 선을 이용하여 돌연변이 개체를 유도하여 왔으나 수년 전부터 일본을 중심으로 에너지선 중 가장 큰 영향을 생체에 부여하는 중이온빔을 식물체에 조사함으로써 엽, 측아, 화기, 화색, 초형, 엽록소 등 식물체의 각 부위에 고빈도의 돌연변이가 유도될 수 있는 가능성을 보여 주었다(Bea et al, 1996). 그러나 중이온빔이 유전자의 결손 및 재조합에 어떠한 영향을 주는지는 거의 알려져 있지 않기 때문에 앞으로 보다 많은 연구가 진행되리라 생각한다.

본 연구는 방사선 육종법의 기초자료로써 활용하고자 담배를 이용하여 수분·수정직후의 원배(proembryo)에 중이온빔을 조사하여 NaCl 저항성 식물을 선발하고, 그 식물체의 형태 생리적 특성을 조사함과 동시에 NaCl 저항성 기작을 밝히는 식물재료로 이용하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 사용된 식물재료는 담배(*Nicotiana tabacum* L.) BY-4와 Xanthi의 2품종이며, 온실에서 약 3개월간 재배한 후 개화된 개체만을 이용하였다.

중이온 빔 처리

2품종의 담배를 수분 후 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96시간이 경과한 후에 ^{14}N , ^{20}Ne (135 Mev/u)빔을 100 Gy의 강도로 조사하였다. 중이온빔 조사에 사용된 링사이크로트론은 일본 이화학연구소의 시설을 이용하였다. 빔 조사된 각 식물체는 28°C-30°C의 유리온실에서 약 30일간 재배한 후에 각 처리구로부터 종자(M₁)를 채취하였다. 수확된 종자는 4°C의 냉장고에서 1주일간 저온처리를 한 후에 내염성 선발재료로 이용하였다.

내염성 식물체의 선발

내염성 식물체를 M₁세대의 종자로부터 직접 선발하기 위하여 2품종의 종자를 에탄올 70%용액에 30초간 담근 뒤 2% sodium hypochlorite 용액에 옮겨서 15분간 표면 살균하였다. 그리고 멸균수로 3회 세척한 후 BY-4는 2.0%, Xanthi는 2.5%의 NaCl이 포함된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 고형배지에 각 처리구별로 종자를 파종하였다. NaCl의 선발

농도를 위와 같이 설정한 것은 예비실험 결과 2품종에서 전혀 발아가 되지 않은 농도가 1.2%로 조사되었기 때문에 선발농도는 그 보다 약 2배정도 높은 농도를 기준으로 한 것이다. 각 처리구당 약 200립의 종자를 직경 9 cm 사레에 치상하였다. 배양은 30°C, 7500 lux의 명조건 하에서 4주간 행하였다.

내염성 식물체의 특성조사

NaCl이 포함된 MS배지에서 발아된 담배의 유식물체들을 선발하여 vermiculite와 perlite가 1 : 1의 비율로 혼합된 토양에 이식하여 상기의 유리온실에서 재배하면서 내염성 식물체의 특성을 조사하였다. 화분립의 충실도 및 화분의 형태는 3% 요오드용액에 염색하여 관찰하였고, 종실중은 자연 건조시킨 종자의 꼬투리를 제거하여 종자의 무게를 측정하였다.

M₂세대의 내염성 및 mannitol 농도에대한 저항성

M₁세대의 내염성 식물체들로부터 종자(M₂)를 채종하여 MS배지에 NaCl 0, 1.0, 2.0(%)의 농도가 되도록 조정 한 후 종자를 각각 치상하였고, mannitol에 대한 저항성 정도는 NaCl이 첨가되지 않는 MS배지에 mannitol을 0, 200, 400, 600, 800(mM)의 농도가 되도록 각각 첨가 한 후에 종자를 치상하였다. 종자의 소독, 치상방법, 배양조건 등은 상기의 내염성 식물체의 선발시와 동일하다.

결과 및 고찰

내염성 식물의 선발

수분 후 배에 중이온 빔을 조사하여 수확한 BY-4와 Xanthi품종의 담배 종자(M₁)를 NaCl이 포함된 MS배지에 치상하여 4주동안 배양한 후 조사한 결과는 Table 1과 같다. Xanthi 품종의 경우 중이온 빔의 종류 또는 조사시기에 관계없이 NaCl 2%가 포함된 배지에서 생존된 유묘도 없고, 종자의 발아도 관찰되지 않았다. 또한 BY-4 품종의 경우에도 ^{20}Ne 빔이 조사된 처리구에서는 NaCl 저항성 개체를 관찰할 수 없었다. 그러나 ^{14}N 빔이 조사된 처리구에서는 NaCl 2.5%의 농도에서 저항성 유묘를 17개체 선발할 수 있었다. 특히 수분 후 60-72시간대의 처리구에서 2.03%로 가장 높게 나타났으며, 그 다음은 수분 후 24-36시간대에서 1.05%로 나타났다. 이러한 결과를 살펴보면 담배의 내염성 돌연변이체 유발은 담배의 품종과 중이온 빔의 종류에 따라 각각 다른 반응을 보이는 것으로 나타났다. 또한 수분·수정 직후의 배발생단계 초기에 빔을 조사함으로써 내염성

Table 1. Effect of heavy-ion beams on seed germination of *N. tabacum* L. under salt conditions.

Cultivar	Ion	Stage ^(a)	No. of Seed ^(b)	No. of seedlings	Frequency of seedlings(%)
Xanthi	¹¹ N	control	413	0	0
		36-48	277	0	0
		60-72	30	0	0
		84-96	367	0	0
		total	674	0	0
³⁰ Ne		36-48	1169	0	0
		48-60	1151	0	0
		72-84	104	0	0
		total	2424	0	0
BY-4	¹¹ N	control	723	0	0
		24-36	875	9	1.05
		48-60	682	0	0
		60-72	246	5	2.03
		84-96	1634	3	0.18
total	3447	17	0.49		
³⁰ N		36-48	1181	0	0
		48-60	3158	0	0
		72-84	153	0	0
		total	4944	0	0

(a)Irradiation time(hrs) of the beams after pollination

(b)M1 seeds of *Xanthi* and BY-4 were placed on MSmedium containing 20% and 25% respectively and they were incubated for 4 weeks.

돌연변이 식물체 이외에도 왜성, 세엽, 측아다발성식물체 등의 형태적 돌연변이 식물체가 높은 빈도로 관찰되었다(data 미제시). 그러나 어떠한 기작에 의해 변이가 발생되었는지는 아직까지 불분명하기 때문에 추후 세포생물학 및 분자생물학적 관점에서 보다 많은 연구가 뒷받침되어야 한다고 생각한다.

내염성 식물체의 형태 및 생리적 특성조사

M1 세대의 NaCl 저항성 담배로 선발된 17개통 (S201~S2017)의 BY-4품종을 온실에서 재배하면서 생육시기별로 형태 및 생리적 특성을 조사하였다. 영양생장기에 있어서는 담배의 잎과 줄기의 형태가 대조구의 식물체와 비교하여 특이한 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 생식생장기의 화기의 형태에 있어서는 많은 형태적 차이가 관찰되었다. 예를 들어 꽃의 형태가 S202 계통의 경우에는 대조구에 비교하여 꽃잎이 밀집형으로 착생되었으며(Figure 1-A), S203, S205, S206의 3계통은 암술과 수술의 길이가 대조구와 비교하여 차이를 보여 주었다(Table 2). 특히 S203과 S206계통은 암술 또는 수술이 단축되는 단예화 현상을 보여 주었다(Figure 1-B). 이러한 현상은 M2세대에서도 관찰되었다. 또한 화분립의 충실도는 S203계통의 경우 대조구에 비하여 약 50%정도로 가장 낮게 나타났으며, 그 외의 계통에서도

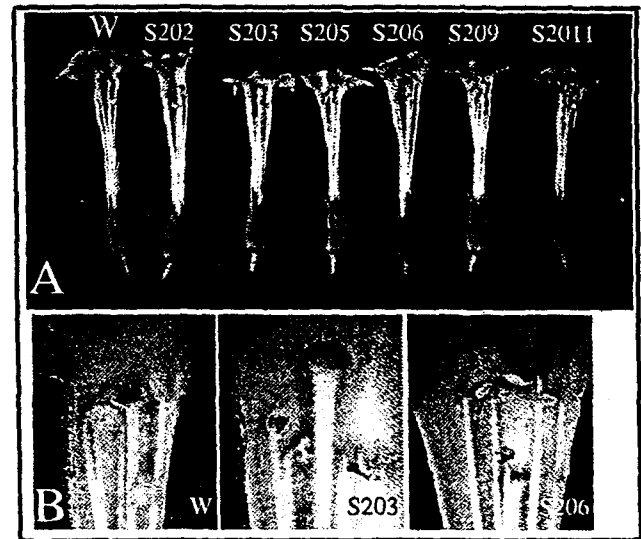


Figure 1. Morphological changes in M1 generation of salt-tolerant tobacco.

A: Changes of length of styles and filaments (W: wild type, S202, S203, S205, S206, S209, S2011: Salt-tolerant plants of M1 generation). B: Detail profiles of style length in wild type and salt-tolerant plants.

Table 2. Morphological and physiological characteristics of salt-tolerant plants (BY-4) induced by heavy-ion beams (¹¹N) irradiation.

Strain	Style (mm)	Morphological changes of flowers Filament (mm)	Normal-pollen grain (%)	No. of flowering internode	Seed weight of M1 (mg/fruit)
Cont.	40	40	10	33	194
S201	40	40	89.3	22	78
S202	40	40	96.9	28	16
S203	37	33	82.1	28	11
S204	40	39	88.7	29	79
S205	38	35	95.5	24	118
S206	35	41	75.7	25	104
S207	40	39	78.9	19	87
S208	40	40	91.1	28	151
S209	40	37	90.1	25	134
S2010	40	42	89.4	29	136
S2011	40	39	89.9	27	100
S2012	40	40	95.2	29	123
S2013	38	39	93.0	35	147
S2014	40	40	94.8	35	162
S2015	40	40	96.3	35	150
S2016	39	39	97.5	33	181
S2017	39	39	86.4	28	164

10-20% 정도 불완전 화분립이 많이 관찰되었다. 따라서 M2 세대의 종자의 경우 꼬투리당 종자의 수도 감소하였고, 종실중도 낮았다. 특히 S202, S203, S204, S207계통은 종실중이 대조구 식물에 비하여 10% 미만으로 관찰되었다. 줄기당 꽃의 수도 4계통을 제외하고는 대부분 적게 착생되었다. 이

상의 결과와 같이 NaCl 저항성 담배로 선발된 식물체의 대부분의 계통에서 화기의 이상, 불임 등의 특징을 보이고 있는 것에 관해서는 아직까지 정확히 설명할 수는 없으나 배 발생 단계의 중이온빔 처리가 다양한 부위의 유전자 결손에 기인하는 것으로 생각된다.

M2 식물체의 내염성 및 mannitol 저항성 검증

M1세대의 17계통의 내염성 식물체들로부터 각각 종자를 채종하여 M2세대의 NaCl 저항성 유무를 관찰한 결과는 Figure 2와 같다. 대조구의 경우 NaCl 1.0%농도에서 약 5%의 발아율을 보여주었고, 2.0%에서는 종자의 발아가 전혀 관찰되지 않았다. 또한 M1세대에서 NaCl저항성 식물체로 선발된 S204, S206, S208, S209, S2013, S2014, S2015, S2016, S2017의 9계통의 경우에도 M2세대에서 대조구와 동일하게 NaCl에 대하여 저항성을 보이지 않았다. 그러나 S201, S202, S203, S205, S207, S2010, S2011, S2012의 M2세대의 종자의 경

우에는 NaCl 1.0%의 농도에서 40-70%의 발아율을 보여주었고, 특히 S203, S2010, S2011의 3계통은 NaCl 2.0%의 농도에서도 약 5-10%정도의 발아가 관찰되었다. 이상의 결과를 살펴보면 일부의 계통을 제외하고는 M1세대에서 선발된 NaCl 저항성 형질이 M2세대에도 유전된다는 것을 확인하였다. NaCl 저항성 형질이 이온의 축척 이외에 삼투압의 조절에 기인하는 것인가를 조사하기 위하여 NaCl 2.0%의 농도에 대하여 저항성을 갖고 있는 M2세대의 3계통을 골라서 mannitol이 포함된 배지에 종자를 파종하여 종자의 발아율을 조사하였다(Figure 3). 그 결과 mannitol 400mM의 농도에서 S203, S2010, S2011은 대조구에 비교하여 높은 발아율을 보였으며, S2011은 mannitol 800mM의 농도에서도 종자의 발아가 관찰되었다. 이러한 결과는 담배의 NaCl 저항성 형질의 원인이 세포내의 이온 축척과 삼투압의 조절능력에 기인하는 것으로 생각된다. 내염성 식물의 내염성 기작을 알기 위해서는 먼저 염에 의한 식물세포의 장애를 규명해야 하는데 지금까지 염에 의한 장애는 1차효과 2차효과로 나누어 설명되고 있다. 1차효과는 직접적 장애와 간접적 장애로 구분되는데 직접적 장애의 경우에는 세포막의 투과성 또는 물질 운반계의 변화로 인하여 이온이 외부로 방출되는 세포막에 대한 장애이고 간접적 장애는 단백질 및 효소 대사제의 이상으로 발생하는 장애이다. 2차효과는 영양결핍에 의한 장애와 삼투압에 의한 장애로 알려졌다. 그러므로 내염성 세포의 경우에는 단일 유전자 돌연변이에 의해 발생할 수는 없고 복수의 유전자 돌연변이에 의해 발생할 수 있는 것으로 생각된다. 본 연구에서 선발된 S203, S2010, S2011의 3계통은 NaCl과 mannitol에 대하여 저항성을 갖고 있지만 구체적으로 어떠한 원인에 의해 저항성 형질이 발현되는 것인가에 대해서는 앞으로 보다 많은 연구 검토가 필요하다고 생각된다.

이상의 연구 결과를 종합하면 담배의 수분·수정시기의 배에 중이온 빔을 조사하여 다양한 돌연변이 종자를 유도할 수 있었으며, 그러한 변이 종자로부터 NaCl 저항성 식물체를 비교적 쉽게 선발할 수 있었다. 또한 일부 계통의 담배에서는 NaCl 저항성 형질이 M2세대에도 지속되었으며, mannitol에 대해서도 저항성을 나타내었다. 앞으로 NaCl 저항성 형질이 안정된 식물체를 육성하여 프롤린 등의 삼투 조절 물질을 검토하고 이와 관련된 유전자 및 유전분석을 통하여 내염성 기작을 해석하고자한다.

적 요

중이온 빔을 이용한 방사선 돌연변이의 기초자료를 얻고자 담배의 수분·수정 직후의 원배에 100 Gy의 중이온빔을 조사하여 M1세대의 종자를 얻었다. NaCl 2.0과 25%를 포함

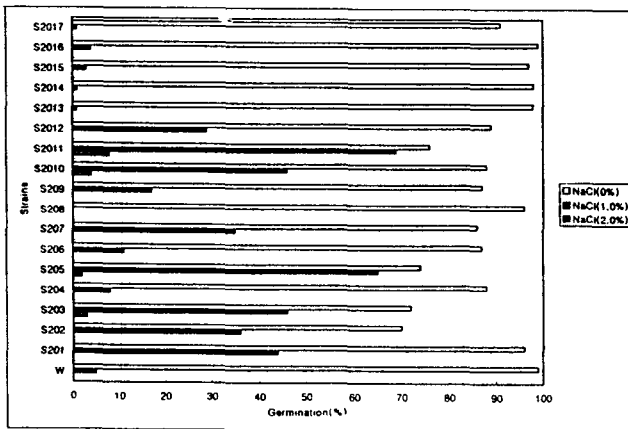


Figure 2. Germination pattern of wild type and salt-tolerant lines on various concentrations of NaCl. Percentage of germination was calculated from the number of seedlings within 2 weeks.

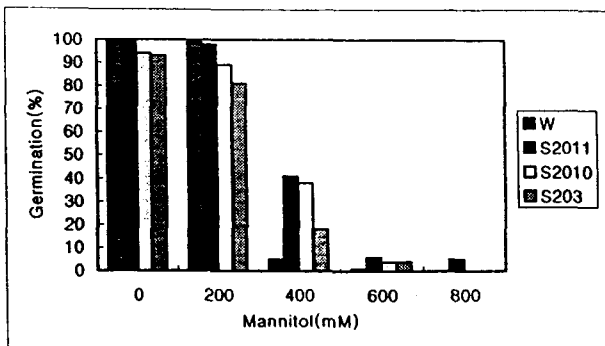


Figure 3. Germination pattern of wild type and salt-tolerant lines on various concentrations of mannitol. Percentage of germination was calculated from the number of seedlings within 2 weeks.

된 MS배지에 M₁ 세대의 종자를 파종하여 17개통의 NaCl 저항성 식물체를 선발하였다. 저항성 식물체는 BY-4품종에 14N빔을 조사한 처리구에서만 관찰되었다. M₁ 세대의 저항성 식물체의 경우 영양생장기간 중에는 외형적 변이가 관찰되지 않았으나 생식생장기의 화기에 있어서는 다양한 변이가 관찰되었다. 특히 암술 수술의 길이의 변화, 꽃잎의 변화, 불완전 화분립, 줄기당 꽃의 착생수 감소 등의 변이가 발생하였다. M₁ 세대에서 17개의 NaCl저항성 계통 중에서 8계통은 M₂ 세대에도 저항성형질이 발현되었고, 또한 M₂ 세대의 3계통은 Mannitol이 포함된 배지에서 저항성을 보여 주었다.

시사-본 논문은 교육부 기초과학 육성연구비의 지원에 의해 수행된 것임(BSRI-96-44(8)).

인용문헌

- Bea CH, Abe T, Yoshida S (1996) Characteristics of salt-tolerant plants induced by heavy-ion beams irradiation. In the 31th annual meeting of the society for the chemical regulation of plants. Chemical Regulation of Plants 31: 218
- Binzel ML, Hasegawa PM, Handa AK, Berssan RA (1985) Adaptation of tobacco cell to NaCl. Plant Physiol 79: 118-125
- Binzel ML, Hess FD, Berssan RA, Hasegawa PM (1988) Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. Plant Physiol 86: 607-614
- Cheeseman JM (1988) Mechanisms of salinity tolerance in plants. Plant Physiol 87: 547-550
- Dvorak J, Edge M, Ross K (1988) On the evolution of the adaption of *Lophopyrum elongatum* to growth in saline environments. Proc Natl Acad Sci 85: 3805-3809
- Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR (1977) The mechanism of salt tolerance in halophytes. Ann Rev Plant Physiol 28: 89-121
- Fooland MR, Johnes RA (1991) Genetic analysis of salt tolerance during germination in *Lycopersicon*. Theor Appl Genet 81: 321-326
- Greenway H, Munns R (1980) Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. Ann Rev Plant Physiol 31: 149-190
- Kishor Kavi PB, Reddy GH (1986) Improvement of rice for tolerance to salt and drought through tissue culture. Oryza 23: 102-108
- Kwon TO, Lee SY (1996) Selection of salt-tolerant calli and variation of salt tolerance in regenerants of rice. Korean J Plant Tissue Culture 23: 117-122
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 477-497
- Nabors MW, Gibbs SE, Bemstein CS, Meis ME (1980) NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. Z Pflanzenphysiol 97: 13-17
- Saleki R, Young PG, Lefebvre DD (1993) Mutants of *Arabidopsis thaliana* capable of germination under saline conditions. Plant Physiol 101: 839-845

(1997년 12월 11일 접수)