

EMS처리에 의한 한란의 엽록소 결핍 돌연변이 식물체의 유도

이효연* · 정재성¹ · 이종석²

²순천대학교 농과대학, ¹순천대학교 자연과학대학, ²서울여자대학교 원예학과

Induction of Chlorophyll Deficient Mutant Plant of *Cymbidium kanran* by EMS Treatment

LEE, Hyo-Yeon* · JUNG, Jae-Sung¹ · LEE, Jong-Suk²

*College of Agriculture and ¹College of Natural Science, Suncheon National University, Suncheon, 504-742, Korea: and
²Dept. of Horticultural Science, Seoul, 137-774, Korea.*Corresponding author.

Chlorophyll mutants were produced by treating the rhizome of *Cymbidium kanran* with mutagen, EMS(ethyl methan sulfonate). The germination ratio of *Cymbidium kanran* seeds was 5.5 times higher when the seeds were treated with ultrasonic treatment for 20 minutes than untreated control. Fifty to sixty percent of the rhizomes became dark brown when they were cultured in a liquid growth medium containing 0.2% EMS for three weeks. When the dark-brown rhizomes were cultured in a solified MS medium, new rhizomes were developed from a part of the old ones. Chlorophyll mutant rhizomes were obtained from a meristem tissue by a subculturing the cuts of these new rhizomes for a year. Of the chlorophyll mutants, a zigzag-striped type of rhizome was dominant and light-yellow and albino ones were also produced. While the zigzag-striped type rhizomes were differentiated into green and striped plant, the light-yellow and the white rhizomes produced yellow-striped and albino plants respectively.

These results indicate that the EMS treatment on the rhizome is an effective means to induce a chlorophyll mutant. We believe that this method may be useful to produce variegated plants chlorophyll mutants from other orchids.

Key word: rhizome culture, variegated plants

최근 조직배양기술의 발달로 *Cymbidium*, *Cattleya*, *Dendrobium*속 등을 포함한 대부분의 양란은 생장점 배양이나 종자의 무균발아기술을 이용하여 대량생산이 가능하게 되었다. 또한 동양계 *Cymbidium*속 식물인 한란(Kim et al., 1979; Lee, 1989), 춘란(Lee and So, 1985; So and Lee, 1985), 건란 (Chung and Chun, 1983), 옥화란(Lee, 1988) 등의 식물도 양란류에 비해 증식속도가 늦고 분화력이 낮은 등의 문제점이 있으나 무균발아를 통한 근경배양법을 이용하여 대량생산이 가능하게 되었다. 양란의 경우 대부분 꽃이 크고 그 색깔도 화려하게 꽃을 개량하는 것이 육종의 주된 목표였다. 그러나 동양계 *Cymbidium*속 식물은 꽃이 작고 색깔이 화려하지 못하기 때문에 초형이나 잎무늬의 변화에 관상가치를 두어 왔다. 일본의 경우만 해도 자생난의 재배가 급속도로 대중화되어 다른 관상용 식물과 대등하게 화훼식물로서 자리를 잡아 왔다. 국내의 경우에 있어서도

최근 10여년 사이에 자생란에 대한 관심이 높아져 난의 수요가 급속히 늘어났고, 특히 춘란의 경우에는 잎이나 꽃에 chimera가 있는 변이종을 소유하려는 난 애호가들이 많아짐에 따라서 지나칠 정도로 고가로 거래되고 있는 것이 사실이다. 자연생태에서는 돌연변이 난이 유도될 확률은 낮기 때문에 희소가치로 인하여 가격이 높은 곳이 우리의 현실에서 당연한 일이라 생각하지 않을 수 없다. 최근들어서 변이종의 난을 채취하기 위하여 전국 각지의 난 자생지를 다니며 전문적으로 난을 채취한 결과 야산의 많은 식물들이 훼손되고 있으며 자생란의 생태가 급속도로 파괴되어 가고 있다.

본 연구는 조직배양기술을 이용하여 제주도에서 자생하고 있는 한란을 무균적으로 발아시켜 근경을 유도하고, 여기에 돌연변이 유발물질을 처리하여 색소변이 식물체를 유도하는데 그 목적을 두고 있다.

재료 및 방법

종자

본 실험에 사용한 한란(*Cymbidium kanran*)은 종자를 무균으로 받아서켜서 얻은 근경을 이용하였다. 완전히 개화된 한란의 꽃을 1주당 1개씩 총 6개의 꽃에 자가수분 시켰다. 수분후 1개월 정도 경과된 후에 자방의 비대 정도를 살펴서 수정된 것만 남기고 그 외의 것은 제거하였다. 수분후 300 일 정도 경과된 뒤에 씨꼬투리가 황변되기 시작할 무렵에 채종하였다.

종자의 초음파 처리

채종된 씨꼬투리를 파라핀 필름으로 잘 싼 뒤 5°C에서 2주간 저온 처리하였다. 그 후 씨꼬투리를 2% sodiumhypochlorite용액에 30분간 담가서 표면 살균하였다. 무균상내에서 씨꼬투리내의 종자를 채취하여 효모추출액 1 g/L, peptone 3 g/L, LAA 0.5 mg/L, sourose 30 g/L을 포함한 MS(Murashige and Skoog, 1962)액체 배지에 담근 후 25°C의 암조건에서 24시간 천천히 교반하여면서 방치하였다. 수분이 흡수된 종자를 교반하면서 스포이드로 5 mL씩 채취하여 멸균된 시험관(직경 10 mM, 높이 7 cm)에 각각 넣었다. 시험관을 초음파 세척기 (Branson 3210)에 넣고 초음파를 0, 5, 10, 20, 40분간 처리한 후 상기와 동일한 조성의 배지 내에 gelite 0.2%, 활성탄 0.2%가 포함된 고형배지에 각 처리구 별로 종자를 파종하였다. 배양은 25°C, 3,000 Lux의 연속조명 조건에서 행하였으며, 실험은 5반복으로 실시하였다.

종자의 발아 및 근경의 증식

각 처리구로부터 유도된 근경이 약 5 cm 정도의 크기로 자랐을 때 근경증식용 배지에 계대배양하였다. 근경증식용 배지조성은 발아용 배지조성과 동일하나 MS배지의 무기이온 농도를 1/2로 줄이고 NAA 2.0 mg/L, kinetin 0.5 mg/L을 첨가하였다.

근경의 EMS처리

근경 증식용 고체배지에서 3개월간 배양하여 동일한 굵기로 균일하게 자란 근경을 골라서 길이 5 cm 크기로 잘라서 gelite와 활성탄이 첨가되지 않은 근경증식용 액체배지에서 2개월간 배양하였다. 근경의 배양은 250 mL 삼각플라스크에 배지를 50 mL씩 넣고 5 cm 길이로 자른 근경을 20개씩 치상한 후 100 rpm으로 진탕배양하였다. 배양중 phenol성 물질을 제거하기 위하여 3주간격으로 계대배양을 실시하되 기존의 배양액의 3/4을 새로운 배지로 갈아주었다. 액체배

지에서 2개월간 배양된 근경은 처음 치상된 근경(主根莖)으로부터 새로운 근경(側枝根莖)이 2-3 mm 크기로 자란 시기를 기준으로 다음 계대배양시기에 membrane 필터로 멸균된 EMS 0.2%의 농도가 되도록 배지에 첨가하고 3주간 배양하였다. EMS 0.2%의 농도를 설정한 것은 예비실험 결과 근경이 50%정도 갈변된 것을 확인하고 설정한 농도이다. EMS를 처리하는 기간동안은 암배양을 하였다. EMS를 첨가한 액체배지에서는 3주간 배양한 근경을 EMS가 첨가되지 않은 상기의 근경증식용 고체배지에 치상하여 1년간 계대배양하면서 근경의 변이상태를 관찰하였다. 배양은 25°C, 3,000 Lux의 명조건에서 행하였다.

근경으로부터의 식물체 유기

근경증식용 배지에서 계대배양되고 있는 근경 중에서 부분적으로 녹색의 색소가 결핍되어 흰색의 줄무늬가 나선형으로 들어 있거나 또는 전체적으로 색소가 결핍되어 있는 근경의 부위만을 골라 절단한 후 Hyponex배지에서 근경으로부터 식물체를 유도시켰다. Hyponex배지는 Hyponex 3 g/L, peptone 4 g/L, 효모추출액 1 g/L, 바나나 60 g/L, 감자점분 3.5g/L, myo-inositol 100 mg/L, Na₂-EDTA 40 mg/L, gelite 0.2%, pH 5.5로 조성된 고형배지를 사용하였다.

결과 및 고찰

종자의 처리효과

각 시험관당 5 mL의 액체배지내의 한란 종자는 약 500-600개 정도가 포함되어 있었다. 이러한 종자를 발아배지에 치상한 결과는 Figure 1에서 나타난 바와 같이 초음파 무처

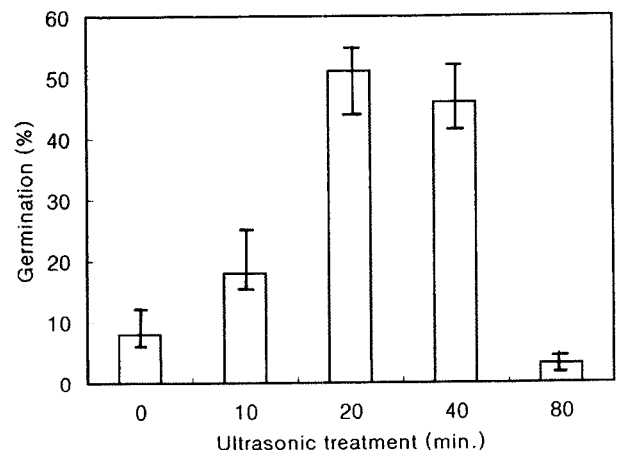


Figure 1. The effect of ultrasonic treatment on seed germination of *Cymbidium kanran*. The seeds were sown in seed germination medium after ultrasonic treatment and cultured for 180 days.

리구에서는 $8.6 \pm 5\%$ 의 발아율을 나타낸 것에 비하여 20분간 초음파를 처리한 것은 $50 \pm 10\%$ 의 발아율을 나타내어 약 5.5배가 증가된 결과를 보여주었다. 그러나 80분간 초음파 처리된 종자의 경우에는 2%미만의 발아율을 나타냈다. 이러한 결과는 20-40분 정도의 시간 내의 초음파 처리가 종자에 물리적 자극을 줌으로써 종자의 발아율을 높인 것으로 생각되나 80분간의 장시간 처리는 지나친 물리적 자극으로 종자의 배에 손상을 주어서 발아율이 감소된 것으로 사료된다. 지금까지 동양난의 경우 자연상태에서는 발아가 힘든 것으로 알려져 왔다. 이러한 현상을 종자내의 발아억제물질의 존재, 종피내의 수분, 용질, 산소의 투과부족, 난균과의 공생 등이 주된 원인으로 알려져 왔으나 이러한 이유에 대해서도 구체적으로 확실한 증거는 없다. 지금까지 초음파를 이용하여 종자의 발아율을 높인 식물로는 해바라기(Tudor and Ioana, 1973), 목화(Mukahamedkhanov and Shermukhamedov, 1971), 소나무(Weinberger and Burton, 1981), 새우난초(Miyoshi and Mii, 1988) 등이 알려져 있다. 그러나 이러한 식물 종자들이 초음파 처리에 대하여 어떠한 기작에 의해 발아에 영향을 주었는지 분명히 밝혀져 있지 않다. 단지 새우난초의 경우 배가 종피의 두꺼운 층에 싸여 있기 때문에 수분 및 양분이 배에 충분히 전달되지 못하기 때문에 발아력이 감소하는 것으로 알려져 있고 초음파 처리가 종피의 기계적 장애를 제거하여 발아를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Miyoshi and Mii, 1988). 한란의 경우에 있어서도 새우난초와 비슷한 원인으로 발아력에 영향을 주는 것으로 사료되나 추후 보다 많은 검토가 필요하다고 생각된다.

근경의 EMS처리 효과

EMS가 첨가된 근경증식배지에서 3주간 배양된 근경은 50-60%의 근경이 갈변되었으며 갈변되지 않은 주근경의 경우에도 측지근경의 생장은 정지된 상태로 있었다(Figure 2-A). 갈변된 근경을 포함하여 EMS처리된 모든 근경을 근경증식용 고체배지에 치상하여 관찰한 결과 갈변되지 않은 근경에 비해 1개월 정도 늦었지만 갈변된 근경의 일부 조직에서부터 측지 근경의 분열세포조직의 생장이 시작되었다(Figure 2-B). 계대배양을 1년정도 계속한 결과 갈변된 근경에서 성장된 측지근경이 갈변되지 않은 측지근경에 비해서 외관적으로 관찰해 볼 때 chlorophyll변이가 약 3-4배 정도 더 많이 발생하였다. EMS가 처리되지 않은 근경의 경우에는 상기와 같은 chlorophyll변이는 관찰되지 않았다. 외관적 chlorophyll변이의 형태는 녹색의 바탕에 나선형의 흰줄 또는 노란 줄무늬가 있는 것이 가장 많이 관찰되었고, 근경의 색깔 자체가 전반적으로 엷은 노란색 또는 흰색의 것이 관찰되었다(Figure 3). 이상의 결과는 EMS의 처리가 근경의 분열세포에 영향을 주어 변이가 발생된 것으로 생각된다. 또한 EMS의 영향을 강하게 받아서 근경이 갈변된 개체로

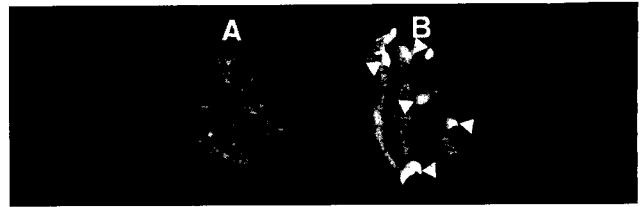


Figure 2. The growth of EMS-treated rhizome. The rhizome were cultured in liquid growth medium containing 0.2% EMS for 3 weeks (A), and then transferred to a solid growth medium without EMS and cultured for 2 months (B). Arrows: new rhizomes developed from dark brown one.

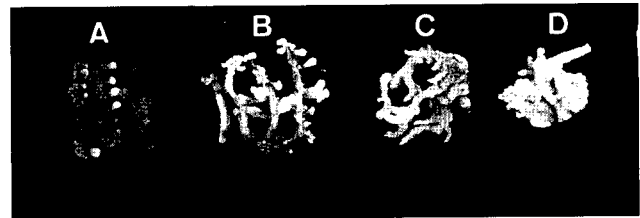


Figure 3. Chlorophyll-deficient rhizome obtained from subcultured rhizome after EMS treatment. A: normal rhizome. B: zigzag-striped rhizome. C: light yellow rhizome. D: white rhizome.

부터 변이의 발생이 높게 나타난 것은 갈변되어 근경이 고사하지 않은 범위 내에서 EMS를 처리하는 것이 변이의 발생을 증가시킬 수 있는 것으로 생각된다. 나선형의 줄무늬 변이를 나타내는 근경의 경우에는 그 부위만을 절단하여 근경을 증식시켰을 경우 측지 근경이 증식되는 과정에서 무늬가 소멸되거나 또는 더 깊어지는 현상이 관찰되었으며 이것은 유전적으로 고정되지 않아서 균일성을 갖는 무늬가 근경의 색깔이 변화된 것은 계대배양 3년이 경과된 현재에도 동일한 색으로 유지되므로 유전적으로 고정된 것으로 사료된다.

변이 근경으로부터 식물체 유기

외형적으로 근경에 무늬가 있는 부위를 절단하여 식물체 분화 배지에 치상한 결과는 Table 1과 같다. EMS처리를 하지 않은 종자로부터 발아된 근경의 경우에는 식물체분화배지에서 모두 녹색의 잎을 가진 식물체가 분화되었다. 그러나 나선형의 줄무늬를 가진 근경이 증식하면서 식물체가 유도되었을 경우에는 정상적인 한란 잎을 가진 녹색 식물체로 분화되는 경우가 71.6%로 가장 많았으며 잎에 흰색 또는 노랑색의 줄무늬가 들어있는 식물체는 26.6%가 분화되었고 백화된 식물체(albino type)도 1.6%가 출현되었다. 전반적으로 엷은 노랑색의 근경으로부터 유도된 식물체는 짙은 노랑색 줄무늬를 갖는 식물체로 분화하였고, 흰색의

Table 1. Frequency of chlorophyll-deficient mutants from EMS-treated rhizome. The plants were observed 3 months after culture on shoot induction medium.

Rhizome	No. of rhizome transferred to plant induction medium.(ea)	No. of plants observed (ea)	No. of plants produced		
			Green plants (%)	Striped plants (%)	Albino plants (%)
Normal rhizome	40	95	95 (100)	0 (0)	0 (0)
Zigzag stripe rhizome	40	120	86 (71.6)	32 (26.6)	2 (1.6)
Light yellow rhizome	30	78	0 (0)	78 (100)	0 (0)
White rhizome	30	65	0 (0)	0 (0)	100 (100)

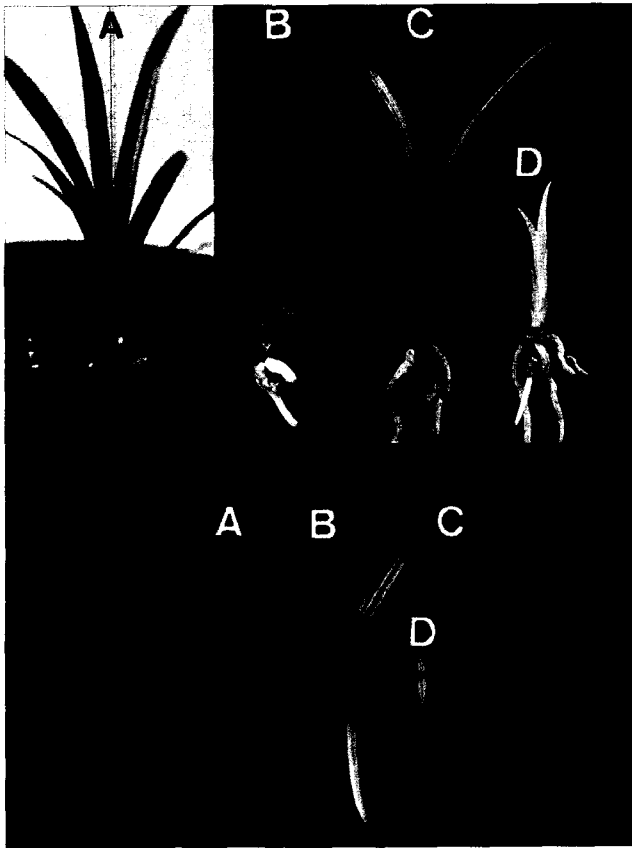


Figure 3. Chlorophyll-deficient mutant plants induced from rhizome. A: green plant, B, C: striped plants, D: albino plant. Each plants was induced from normal(A), zigzag(B), light yellow(C), and white(D) rhizomes, respectively.

근경으로부터 유도된 식물체의 경우에는 모두 백화된 식물체로 분화되었다(Figure 4). 이러한 결과는 나선형 근경의 색소변이를 제외하고는 근경의 엽록소 변이가 식물체로 분

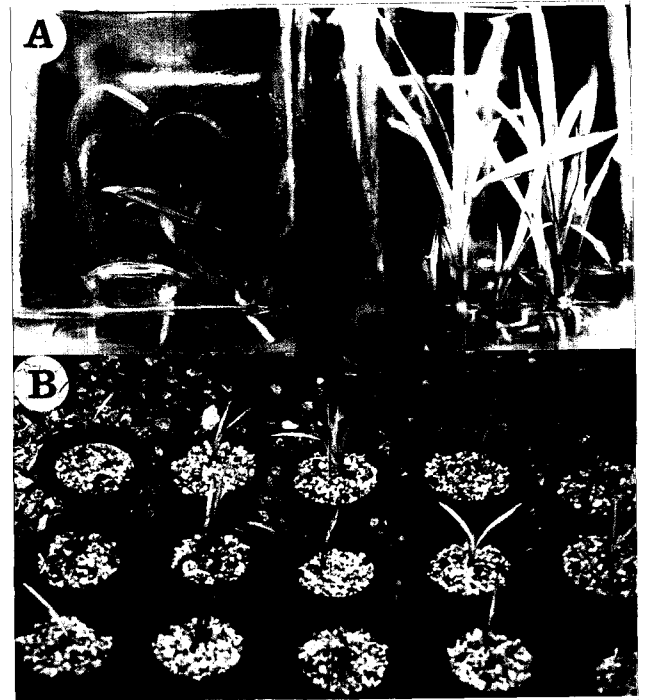


Figure 5. Chlorophyll-deficient mutants grown on plant regeneration medium and pot. A: mutants of *Cymbidium kanran* cultured in vitro. B: mutants of *Cymbidium kanran* cultivated on pots for 6 months.

화되었을 경우에도 그 변이 형질이 지속된다는 사실을 보여준 것이다. 그러나 나선형 근경의 색소변이는 근경의 증식배지에서도 설명하듯이 색소변이에 관련된 유전인자가 고정되지 않아서 식물체로 분화하는 과정에서 색소 관련 유전인자가 분리되어 나타나는 현상이라고 생각한다. Figure 5-A는 재분화배지내에서 변이종 한란이 식물체로 분화된 모습을 나타낸 것이고 Figure 5-B는 변이종 난들이 화분에서 재배되고 있는 과정을 보여준 것이다.

이상의 결과를 종합해 보면 한란의 근경을 이용하여 색소변이 식물체를 유도하는 방법으로 배양중인 근경에 EMS 처리가 효과가 있는 것으로 확인되었다. 이러한 방법을 근경으로 증식이 가능한 동양란 *Cymbidium*계통에 적용하면 색소변이식물체의 육성이 가능하며, 화훼품종으로써의 가치를 높여줄 것으로 생각된다.

적 요

한란(*Cymbidium kanran*)의 근경에 돌연변이 물질인 EMS를 처리하여 엽록소변이 식물체를 유도하였다. 한란 종자를 받아서서 근경을 유도할 때 종자에 40분간 초음파 처리한 것이 무처리구에 비하여 발아율이 5.5배 정도 높았다. EMS 0.2%를 포함한 근경증식용 액체배지에서 3주간

배양하였을 경우에 50-60%정도의 근경이 갈변되었다. 갈변된 근경을 근경증식용 고체배지에서 배양하였을 경우에 근경조직의 일부분으로부터 새로운 근경의 증식의 관찰되었고, 이러한 근경조직을 절단하여 1년간 계단배양하던중에 분열조직의 일부분에서 색소변이 근경이 관찰되었다. 색소변이 근경은 나선형의 줄무늬가 가장 많았고, 그 외 엷은 노란색과 흰색의 근경이 분리되었다. 나선형의 근경에서 유도된 식물체는 잎에 무늬가 전혀 없는 녹색의 식물체 또는 줄무늬가 들어 있는 식물체가 유도되었다. 그러나 엷은 노란색 근경에서 유도된 식물체는 노란색 줄무늬가 있는 식물체로, 흰색 근경으로부터 유도된 식물체는 백화된 식물체로만 분화하였다.

이상의 결과 한란근경을 이용한 색소변이식물체의 유도에 있어서 배양중인 근경에 EMS처리가 효과적인 것을 보여주었다. 이러한 방법을 다른 식물에 적용하면 색소변이 식물체를 개발할 수 있으리라 생각된다.

사사-본 논문은 1996년 농림수산부 첨단농업 기술개발사업 (295170-5)의 연구결과의 일부이다.

인용문헌

- Choi SO, Chung JD (1993) Factors influencing rhizome formation from shoot tip culture of temperate *Cymbidium* Species. Korean J Plant Tissue Culture 20: 247-254
- Chung JD, Chun Ck (1983) Asymbiotic germination of *Cymbidium ensifolium*. J Kor Soc Hort Sci;24: 236-242
- Kim YJ, Lee Js, Yeam DY, Roh SM (1979) Exploitation of native orchid plants and their propagation for the floricultural crops. J Kor Soc Hort Sci 20:94-105
- Lee JS (1988) Effect NAA, BA and temperature alternating on growth and shoot differentiation of *Cymbidium niveo-marginatum* Makino(Oriental *Cymbidium*) rhizome in vitro. Cheju Nat'I Univ J 27:21-27
- Lee JS (1989) Effective medium for rhizome culture of *Cymbidium kanran* in vitro. J Kor Soc Hort Sci 30:303-310
- Lee JS, So Is (1985) Effect of NAA and BA on dark culture of *Cymbidium virescens* rhizome in vitro. Subtrop Agric Cheju Nat Univ 2:133-139
- Miyoshi K, Mii M (1987) Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture. Scientia Horticulturae 35:127-130
- Mukhamedkhanov O, Shermukhamedov K (1971) Effect of ultrasound on development and yield of cotton cv. 108-F. Nauchn Tr Tashk Skh Inst 22:45-71
- Murashing T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497
- So IS, Lee JS (1985) Asymbiotic germination and mass propagation of *Cymbidium virescens* using tissue culture technique. J Kor Soc Hort Sci 26:375-380
- Tudor M, Ioanna I (1973) The effect of treatment of sunflower with ultrasound shown during plant development. An Univ Craiova Stiint Agric 4:143-157
- Weinberger P, Burton C(1981) The effect of sonication on the growth of some tree seeds. Can J For Res 11:840-844

(1998년 2월 7일)