

솔패랭이에서 화학돌연변이물질 처리에 따른 돌연변이 유기 및 변이 분석

이광희¹·임정대²·유창연^{2*}

Variations in Mutant Plants by chemical mutagen treatments of *Dianthus superbis* L.

Kwang Hoe Lee¹, Jung Dae Lim², and Chang Yeon Yu^{2*}

ABSTRACT : This study was conducted to determine the effects and optimum concentration of chemical mutagens, colchicine, EMS(ethyl methan sulfonate), MNU(1-methyl-3-1-nitrosoguanidinenitro), sodium azide(NaN_3) for induction of mutant plants. In order to induce the mutants of *Dianthus superbis* L, immature seed were pre-soaked in the water adding each mutagens and concentration of EMS, colchicine, MNU, and sodium azide(NaN_3). Comparison of morphological characteristic and seed germination in each mutant plants differed depending on mutagen sources and their concentrations.

When 0.2% EMS were treated on seed, germination decreased to 12% while untreated control was germinated 76.6% for twenty days. Treatments of colchicine appeared higher germination than other mutagen but not survived. The survival rate was extremely decreased in MNU treatment at 0.5mM and chlorophyll-mutant plantlets were obtained by sodium azide treatment at 0.2mM. Chlorophyll mutants were produced by pre-soaking the immature seed of *Dianthus superbis* L. with mutagen, sodium azide. The control plants appeared normal green leaf color, while mutant plant after mutagenic treatment of immature seed results in yellow-green stripes and albino in normal green leaf tissue.

RAPD was carried out to check the genetic modification of regenerated plants by mutagen treatments at 0.2mM sodium azide. Three polymorphic DNA fragments out of thirty-seven obtained by RAPDs were observed in regenerated plants using five decamer primers.

Key words : *Dianthus superbis* L., colchicine, EMS, MNU, NaN_3 , RAPD

¹ 상지대학교 생명자원과학대학 응용식물과학부 (Division of Applied Plant Sciences, Sangji University, Wonju, 220-702, Korea)

² 강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부 (Division of Applied Plant Science, College of Agriculture & Life Sciences, Kangwon National University, Chuchon 200-701, Korea)

* Corresponding author

< 2000. 9. 5 접수 >

緒 言

술패랭이 (*Dianthus superbus* L.)는 석죽과에 속하는 여러해살이풀로 생약명은 구맥이며 다른 이름은 대란(大蘭), 남천축초(南天竺草)이며 꽃은 취산화서로 피고 색은 분홍색 및 붉은 빛이 도는 옅은 보라색에 가까우며 향기가 좋아 개발 가능성이 높은 관상자원일 뿐 아니라 꽃과 열매가 달린 전체를 그늘에 말려 약용으로 사용하며 이뇨작용이 현저하고 담석과 감뇨증, 파혈과 습진 등에 유용하게 사용되어진다. 또한 진탕액은 혈압을 내려주는 효과가 인정되었고 신장염, 방광염, 요도염 등에 사용되고 눈이 충혈되면서 아픈 증상에 진요하게 쓰인다(한국민족문화 대백과 사전. 한국정신문화연구원, 1995). 우리 나라를 포함한 중국과 일본 등에 자생하며 유럽의 일부에서도 서식한다. 덩불 속이나 언덕 가, 암벽에 갈라진 틈에서 관찰되어진다.

*Dianthus*종에서 생장점 배양과 체세포 배생성을 통해 무병주 생산과 미세번식기술이 성공적으로 수행되었고(Miller et al., 1991; Radojevic et al., 1990) 술패랭이 (*Dianthus superbus* L.)의 원형질체로부터 식물체를 재분화 하는데 성공한 사례가 보고되었다(Kim & Lee, 1996). EtOAc 층에서의 항산화 활성 및 일부 균주에 대한 항미생물 활성, tubulin과의 반응성 등이 조사되었으나(Lim et al., 2000) 유용물질에 대한 분리 및 구조 등의 분석화학적인 연구가 미흡한 실정이다.

식물체들은 여러 가지 자연적인 환경에 존재하는 스트레스에 노출될 우려가 있으며 이러한 요인들에 의하여 유전학적인 변이와 함께 생체 내부는 생화학적인 변화가 유도될 수 있다. 이러한 점을 고려하여 인위적인 돌연변이원 처리에 의해 많은 유용변이주들이 선발

되고 있으며 신품종으로서 육종되어지고 있다. 돌연변이 물질 처리는 식물체로부터 anthocyanin, chlorophyll 등의 일부 색소적 변이를 일으키며 이러 색소적 변이는 생합성적 과정에 있어서 flavonoid 등의 저분자의 2차 대사산물을 빠르게 합성하고 축적할 수 있는 것으로 알려져 있다. 돌연변이원을 처리하여 고등식물체에서 유용 변이체를 선발하는 방법은 많은 연구자들에 의하여 사용되어지고 있으며 UV, X-ray, 감마선 등을 이용하는 것보다 변이체 유기의 효율이 높은 화학돌연변이원을 사용하는 것이 Oehlkers (1943)에 의해 보고된 이래 많이 사용되어지고 있다. 화학돌연변이 유기원에는 EMS(ethyl methane sulfonate), MNU(1-methyl-3-1-nitrosoguanidinenitro), sodium azide(NaN_3), DES(diethyl sulfate), DEB(diepoxybutane) 등이 있으며 sodium azide와 같은 경우는 수용성이고 매우 안정화 되어있으며 낮은 pH하에서 효과적일 뿐 아니라 염색체 변형과 염기의 삭제의 비율이 매우 높은 화합물이다.

따라서 본 연구는 유용 약용식물인 술패랭이를 대상으로 하여 화학돌연변이원을 처리하여 유용 변이체를 유기하고 선발하는데 있어서 최적의 돌연변이원의 종류와 농도를 구명하고 RAPD 분석을 통해 유기된 돌연변이체에 대한 분자유전학적인 변이를 조사하기 위하여 실시하였다.

材料 및 方法

1. 술패랭이의 돌연변이 식물체 유기

본 실험에 사용한 술패랭이 종자를 페트리 디시에 filter paper를 깔고 그 위에 각 농도별 돌연변이 물질을 처리한 후 한 처리구 당 30~40립 씩을 치상하였다. petridish에 랩으로 씌

뒤에 몇 개의 구멍을 주고 20℃에서 발아시켰다. 처리된 돌연변이원으로는 EMS, colchicine, MNU, sodium azide를 증류수로 희석하여 EMS, colchicine는 각각 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 0.5%로 처리하였으며, MNU와 sodium azide는 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2mM의 농도로 처리하였다. 치상 후 5, 10, 15, 20일에 각각 발아율을 조사하였으며 1.5cm 정도 자랐을 때 상토에 구역 당 3개씩을 옮겨 심었다. 상토에 이식한지 3개월 후에 외형적 특성을 조사하였다.

2. 유도된 변이체의 RAPD 분석

Sodium azide처리에 의해 유도된 엽록소 결핍 돌연변이체에서 잎의 색에 있어서 차이가 나는 각 부분의 유전적 변이성 여부를 조사하기 위하여 엽록소 결핍 돌연변이체의 각 부분(무처리 식물체와 같은 녹색을 나타내는 부분: ●, 잎에 흰색 또는 노란색의 줄무늬가 있는 부분: ⊙, 백화된 부분: ○)와 무처리 식물체(⊙)를 채취하여 RAPD 분석 재료로 사용하였다(그림 3). 돌연변이가 처리된 종자에서 발아한 식물체와 무처리 식물체의 잎조직에서 DNA를 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) 방법으로 추출하였고, DNA의 유무를 결정하기 위하여 0.8% agarose gel 하에서 전기영동하여 관찰하였으며 농도를 구명하기 위해 Hitach U-2001 spectrophotometer를 이용하였다. PCR 기법을 이용하여 DNA를 증폭하여 1.5% agarose gel 하에서 전기영동하여 관찰하였다. Random Primer는 N8001에서부터 N8020까지(10mer, Bioneer), 20개의 primer를 사용하였으며 최적의 증폭조건은 10 ng template DNA, 20 pmol의 primer 1 μ l, 1.25mM의 dNTP 3.2 μ l, 10 \times buffer 2.0 μ l (with MgCl₂), 2.5U Taq polymerase 0.5 μ l (Biotool)를

포함하는 반응액 20 μ l로 하였으며 PCR 조건은 pre-denature 94℃ 5분; denaturation 94℃ 1분, annealing 35℃ 1분, extension 72℃ 2분(45cycle); post-elongation 72℃ 10분으로 정하였다.

Primer screen 작업을 실시하여 그 중 band가 형성되지 않은 것과 다형성 band가 형성된 primer를 제외시키고 5개의 primer를 선정하여 변이성을 관찰하였다. 각각의 실험은 2반복으로 실시하였고 재현성의 문제가 되는 부분을 제외시킨 후 변이성 여부를 조사하였다.

結果 및 考察

1. 돌연변이 식물체 유기

술패랭이의 유용돌연변이주를 얻고자 돌연변이 유발원으로 널리 이용되고 있는 EMS, colchicine, MNU, sodium azide 용액을 농도별로 petridish에 분주하고 종자를 치상한 후 발아 test를 수행한 결과는 다음과 같다(표 1, 2).

EMS를 처리한 경우 0.02%처리에서는 control과 매우 유사한 발아율을 보였으며 0.05%에서는 20%내외로 급격한 발아저해를 보였다가 0.2%이상의 농도가 되면 완전히 발아가 저해되었다. Colchicine의 경우 치상한지 5일 후에는 농도가 높을수록 발아가 저해되었지만 15일 후에는 0.1%처리에서 control과 매우 유사한 발아율을 보였다.

Sodium azide의 경우 0.1mM에서 급격한 발아율 저하를 보이며 0.2mM의 경우 20일에 약 20%의 발아율을 보였으며 그 이상의 농도에서는 전혀 발아가 이루어지지 않았다. 술패랭이에서 sodium azide는 매우 toxic한 돌연변이원으로 사료된다. MNU의 경우 0.2mM의 처리부터 발아저해를 보여 1mM이상이 되면 발아하지 않았다.

Table 1. Germination percent of *Dianthus superbis* by mutagens, EMS and colchicine treatments on petridish

Treatment concentration (%)	No. of seed tested	No. of seeds germinated (%)				
		days				
		5	10	15	20	
Control	30	14 (46.7)	20 (66.7)	22 (73.3)	23 (76.6)	
EMS	0.02	32	16 (50.0)	20 (62.5)	22 (68.8)	22 (68.8)
	0.05	31	6 (19.4)	9 (29.0)	9 (29.0)	9 (29.0)
	0.1	33	1 (3.0)	3 (11.0)	4 (12.0)	4 (12.0)
	0.2	35	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	0.5	31	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Colchicine	0.02	34	4 (11.8)	20 (58.8)	23 (67.7)	23 (67.7)
	0.05	31	4 (12.9)	19 (61.3)	20 (64.5)	20 (64.5)
	0.1	30	3 (10.0)	11 (36.7)	22 (73.3)	23 (76.7)
	0.2	35	2 (5.7)	9 (25.7)	16 (45.7)	16 (45.7)
	0.5	35	0 (0.0)	3 (8.5)	7 (20.0)	8 (22.8)

Table 2. Germination percent of *Dianthus superbis* by mutagens, MNU and sodium azide on petridish

Treatment concentration (%)	No. of seed tested	No. of seeds germinated (%)				
		days				
		5	10	15	20	
Control	30	14 (46.7)	20 (66.7)	22 (73.3)	23 (76.6)	
MNU	0.1	45	21 (46.7)	27 (60)	29 (64.5)	31 (68.9)
	0.2	35	12 (34.3)	13 (37.1)	13 (37.1)	13 (37.1)
	0.5	31	1 (3.2)	3 (9.7)	3 (9.7)	3 (9.7)
	1	42	1 (2.4)	1 (2.4)	1 (2.4)	1 (2.4)
	2	34	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
NaN ₃	0.1	44	1 (2.2)	12 (27.3)	18 (41)	21 (47.7)
	0.2	35	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.9)	7 (20.6)
	0.5	31	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	1	42	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	2	34	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

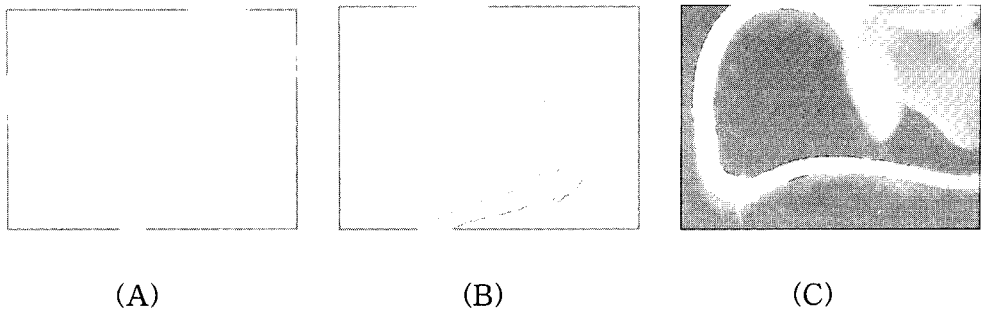


Fig. 1. The germination of mutagen-treated seed. The seed germinated on petridish containing 0. 1% EMS(A), 0. 5mM MNU(B), and 0. 2mM NaN₃(C)

발아한 슬패랭이 종자의 형태를 비교하여 보면 EMS처리 시에 발아된 배축이 나선형으로 한번 꼬여서 신장하며 자엽은 연노랑색을 나타내었다. Colchicine처리에서는 자엽과 배축의 중간부분은 정상식물체와 유사하게 자라났지만 뿌리의 말단부가 비후하여 끝 쪽에서부터 갈변하는 것이 관찰되었다. MNU처리 시에는 뿌리가 매우 길게 신장하고 두껍게 나타났으며 sodium azide처리 시에는 뿌리만 신장하고 자엽은 연노랑색을 띄면서 펼쳐지지 않은 반면 같은 기간에 다른 돌연변이원 보다 빠르게 첫 번째 잎이 출현하였다(그림 1).

2. 형태적 특성 조사

토양에 이식한 3개월 후에 형태적 특성을 비교하면 전반적으로 모든 돌연변이원들을 0. 2mM이상으로 처리하면 식물체는 갈변 고사하였으며 colchicine의 경우에는 모든 농도에서 정상식물체로 자라나지 않았다. 형태적인 특징은 MNU처리 시 분지수가 작았으며 MNU처리나 EMS처리 시에 초장이나 엽장, 분지수 등은 control 식물체와 유사하게 나타났고 sodium azide처리 시에는 초장과 엽장이 control 식물체보다 짧은 형태를 나타내었으며 이러한 것은 슬패랭이에 sodium azide를 처리하여 유도된 돌연변이체를 통해 왜성종으

로서 육종할 수 있음을 시사한다(그림 2). 또한 sodium azide(NaN₃) 0. 1mM 처리한 종자로부터 자란 식물체 중에서 잎이 색깔발현에 있어서 키메라인 식물체가 형성되었다(그림 3). 외관적인 chlorophyll 변이의 형태는 엽의 주맥을 중심으로 하여 절반은 녹색이고 나머지 절반은 연노랑색을 띄고 있고 돌연변이주의 중심으로 갈수록 연노랑색의 부분은 짙어

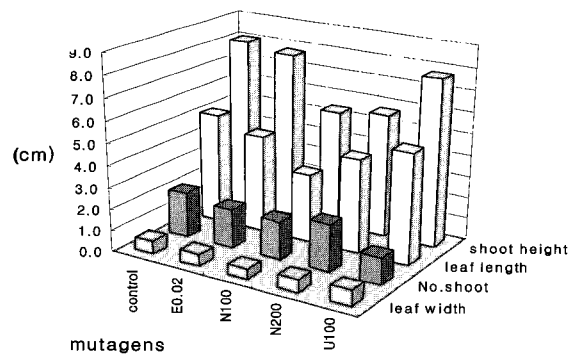


Fig. 2. Morphological characteristics of mutants in *Dianthus superbus* L. (Control : Non-treated mutagen, E 0.02 : treatment of EMS 0. 02%, N100 : treatment of NaN₃ 0. 1mM, N200 : treatment of NaN₃ 0. 2mM, U100 : treatment of MNU 0. 1mM)

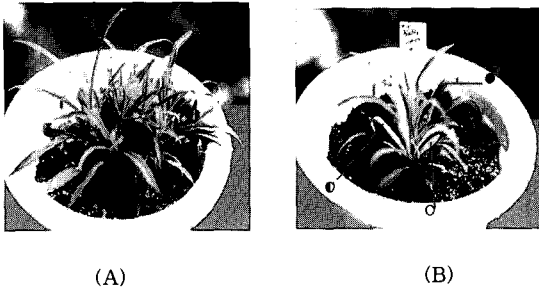


Fig. 3. Chlorophyll-deficient mutant grown on plant regeneration pot. Control plant(A) and mutant plant of *Dianthus superbis* L. cultivated on pots for three months.

지는 결과를 나타냈다. 이 키메라의 발현은 Kleinhofs 등 (1984)의 보고에서 azide의 처리에 의해 유도되어진 엽록소 변이 식물체의 외관적 특징이 백색이나 노란색 줄무늬로 관찰된다는 것과 일치하였으며 EMS처리에 의해 한란에서 엽록소 결핍 돌연변이 식물체를 유도하였다는 보고 (Lee et al., 1998)와 유사하였다. 이는 식물체의 게놈상에 엽록소 결핍 표현형에 관련된 유전자가 많기 때문일 것이라고 사료된다.

3. RAPD에 의한 변이 분석

Sodium azide처리에 의해 유도된 엽록소 결핍 돌연변이에서 잎의 색깔의 차이에 따른 RAPD분석을 수행한 결과 20개의 random primer 중 N8002(CAGGCCCTTC), N8006(AGCCAGCGAA), N8010(CTGAGACGGA), N8014(TGGATTGGTC)의 4개의 primer에서 총 12개의 변이 band가 나타났으며 엽록소 결핍 변이에 관계된 band의 수는 2개(N8002-600bp, n8010-1100bp)로 나타났다. N8002에서는 무처리 식물체(⊙)에서는 관찰되지 않는 약 450 bp에서 1개의 변이band가 무처리 식

물체와 같은 녹색을 나타내는 부분(●), 잎에 흰색 또는 노란색의 줄무늬가 있는 부분(⊙) 백화된 부분(○)모두에서 관찰되었으며 이러한 것은 N8006에서는 4개의 변이band로, N8014에서는 3개의 변이band로 나타났다. N8006에서 약 850 bp에서의 무처리 식물체와 같은 녹색을 나타내는 부분(●)에서는 band가 관찰되는 반면 잎에 흰색 또는 노란색의 줄무늬가 있는 부분(⊙) 백화된 부분(○)에서는 band가 관찰되지 않는 것으로 보아 이러한 band가 잎의 녹색발현에 관여하는 유전자

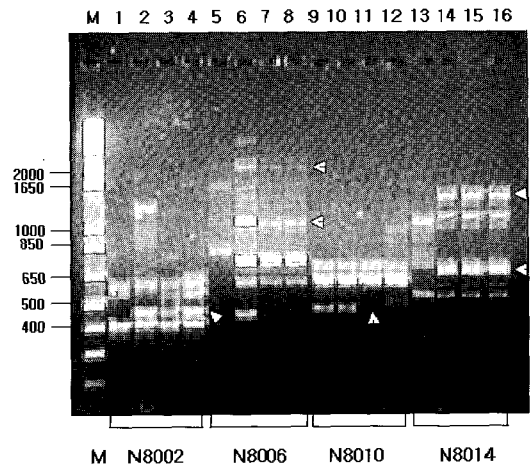


Fig. 4. RAPD profile of *Dianthus superbis* L. by random primers using DNA extracted from chlorophyll deficient mutant. (lane M is size marker ; lane 1, 5, 9, 13(⊙) : PCR amplification of normal plant ; lane 2, 6, 10, 14(●) : PCR amplification of green leaf ; lane 3, 7, 11, 15(⊙) : PCR amplification of yellow-green stripes leaf ; lane 4, 8, 12, 16(○) : PCR amplification of albino leaf on chlorophyll deficient mutant.

locus 라는 것을 알 수 있었다. 이러한 것은 N8010의 450 bp에서도 확인되었다.

이러한 것은 Conger와 Carabia가 1977년에 옥수수를 대상으로 한 EMS와 azide의 돌연변이체 형성의 비교실험에서 이러한 키메라의 형성이 잎 색깔의 녹색발현에 관여하는 Yg-2 gene의 열성발현에 의한 것이라고 보고한 것처럼 돌연변이체에서 나온 색깔이 다른 잎의 RAPD band의 변이성을 검정함으로써 대상 식물체에서 잎의 색에 관여하는 유전자 자리를 관찰할 수 있었다. 이러한 RAPD marker를 이용하면 돌연변이 후대에서 변이를 탐색하는데 매우 유용한 수단이 될 것으로 사료된다.

차후에 색소변이의 양상과 2차 대사물질의 변화와의 상관관계를 구명하여야 할 것이며 돌연변이체의 F2 세대에서 유전분석, 돌연변이체와 야생종의 교배에서 분리비 등이 조사를 통해서 이러한 돌연변이체가 유전적으로 고정되어져 있는지의 여부를 확인하여야 할 것이며 이러한 방법은 구맥에서 뿐만 아니라 *Dianthus caryophyllus* L. 나 *Dianthus sinensis* L. 등의 다른 석죽과 식물과 유용한 약용식물에도 적용되어질 수 있으며 유망한 식물자원이로서의 가치를 높여줄 것이라 생각된다.

摘 要

솔페랭이에서 식물체의 개발가치를 증대시키기 위하여 화학돌연변이원을 처리하여 변이체를 유기하고 RAPD 분석을 통해 유기된 돌연변이체에 대한 분자유전학적인 변이를 조사한 실험결과는 다음과 같다.

1. 솔페랭이의 종자를 이용하여 변이 식물체를 유도하는 방법으로 화학 돌연변이원인 sodium azide를 사용하는 것이 효과적이라는 것을 알 수 있었으며 적정농도는 0.2mM 정도

이고 그 이상의 농도에서는 발아하지 않아 솔페랭이에서 sodium azide (NaN_3)는 매우 toxic한 돌연변이원으로 추정할 수 있었다.

2. Sodium azide (NaN_3) 처리시에는 자엽이 펼쳐지지 않았고 생장에 있어서도 초장과 엽장이 control 식물체보다 짧은 형태를 나타내었다. Sodium azide (NaN_3) 0.1mM 처리한 종자로부터 자란 식물체 중에서 잎이 색깔발현에 있어서 키메라인 식물체가 형성되었다.

3. EMS를 처리한 경우 0.05%에서 급격히 발아저하를 보였으며 발아시 배축이 나선형으로 한번 꼬여서 신장하였고 Colchicine의 경우 모든 농도에서 발아율은 양호하였지만 정상식물체로 자라나지 못했고 뿌리의 말단부가 비후하여 끝 쪽에서부터 갈변하는 것이 관찰되었다. MNU처리 시에는 뿌리가 매우 길게 신장하고 두껍게 나타났으며 MNU의 경우 0.2mM의 처리부터 발아저해를 보여 1mM이상이 되면 발아하지 않았다.

4. Sodium azide 처리에 의해 유도된 엽록소 결핍 돌연변이에서 잎의 색깔의 차이에 따른 RAPD 분석을 수행한 결과 4개의 primer에서 총 12개의 변이 band가 나타났으며 엽록소 결핍 변이에 관계된 band의 수도는 2개로 나타나 DNA 수준에서 변이가 확인 되었다.

5. 변이 band 중 무처리 식물체와 같은 녹색을 나타내는 부분에서는 band가 관찰되는 반면 잎에 흰색 또는 노란색의 줄무늬가 있는 부분과 백화된 부분에서는 band가 관찰되지 않거나 이러한 엽록소 변이가 형태적으로 나타나는 부분에서 새롭게 형성되는 band를 확인함으로써 이러한 band가 잎의 녹색발현에 관여하는 유전자 좌라는 것을 알 수 있었다.

LITERATURE CITED

Baird E., S. Cooper-Bland, R. Wangh, M. De

- Maine and W. Powell 1992. Mol. Gen. Genet. 233 : 469-475.
- Conger B. V. and J. V. Carabia. 1977. Mutagenic effectiveness and efficiency of sodium azide versus ethyl-methane-sulfonate in maize : induction of somatic mutation at the Yg 2 locus by treatment of seeds differing in metabolite state and cell population. Mutation Research 46 : 285-295.
- Kim J. C. and E. A. Lee. 1996. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Dianthus superbus* L. Plant Cell Reports 16 : 18-21.
- Kleinhofs A., A. L. Hodgon, W. M. Owais and R. A. Nilan. 1984. Effectiveness and safety of sodium azide mutagenesis. In Induced Mutations for Crop Improvement in Latin America (Proceedings Regional FAO/IAEA Seminar, Lima, Peru, 1982), IAEA-TECDOC 305. pp. 53-58.
- Lee H. Y., J. J. Sung and J. S. Lee. 1998. Induction of chlorophyll Deficient mutant plant of *Cymbidium kanran* by EMS treatment. Korea J. Plant Tissue Culture 25(3) : 183-187.
- Lim J. D., K. Heo, S. A. Huang and C. Y. Yu 2000. Induction of Mutant Plant by Mutagen Treatments and RAPD analysis of *Dianthus superbus* L. Korean J. Medicinal Crop Sci. 8 : supplement 1 : 32-33.
- McGarvey P. and J. M. Kaper 1991. A simple and rapid method for screening transgenic plant nusing the PVR. Biotechniques 11 : 428-432.
- Miller R. M., V. Kaul, J. F. Hutchinson and D. Richard . 1991. Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) from axillary bud explants. Ann. Bot. 67 : 35-42.
- Murray H. G. and W. F. Thomson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acid Res. 8 : 4321-4352.
- Nakano M. and M. Mii. 1992. Protoplast culture and plant regeneration of several species in the genus *Dianthus* Plant Cell Report 11 : 225-228.
- Nakano M. and M. Mii. 1993. Somatic hybridization between *Dianthus chinensis* and *D. barbatus* through protoplast fusion. Theor. Appl. Genet. 89 : 509-513.
- Radojevic L., D. Nevena and J. Petrovic. 1990. In vitro culture techniques for carnation breeding. Acta. Hort. 280 : 163-167.
- Taylor B. and A. Powell. 1982. Isolation of plant DNA and RNA. Focus. 4 : 4-6.
- Williams J. G. .K., A. R. Kublelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers Nuc. Acids. Res. 18 : 6531-6535.
- 한국민족문화 대백과 사전. 한국정신문화연구원, 1995