

## 기내에서 화학돌연변이원 처리에 의한 참쇠고비의 변이주 유기 및 RAPD 분석

정진아, 이철희\*

충북대학교 원예과학과 and 생물건강산업개발연구센터

### Induction of Variants of *Cyrtomium caryoptideum* var. *coreanum* Nakai by Chemical Mutagenesis *In vitro* and RAPD Analysis

Jin-A Jeong and Cheol Hee Lee\*

Dept. of Horticultural Science and Research Center for Bioresource and Health,  
Chungbuk National University Cheongju, 361-763, Korea

**Abstract** - With the aim of inducing mutation in fern *Cyrtomium caryoptideum* var. *coreanum*, rhizome segments of *In vitro*-grown cultures were treated with chemical mutagens such as EMS, NMU and colchicine. Based on regeneration ratios, sensitivities for each treatments were assessed and also optimum treatment condition of each mutagens was explored. Optimum concentration for EMS treatment was considered to be 20 to 50mM and for NMU 5 to 10mM. NMU was found to be more effective in inducing chlorophyll and morphological variations than EMS. The RAPD were performed to check the genetic modification of phenotypical variants. As a result, polymorphic DNA band patterns between wild type and variants were observed by two 10-mer primers.

**Key words** - EMS, NMU, Colchicine, RAPD

## 서 언

참쇠고비(*Cyrtomium caryoptideum* var. *coreanum*)는 면마과(Dropteridaceae)에 속하는 양치식물로서 낮처럼 굽은 잎 모양이 독특하고 아름다워 관상가치가 높은 종으로, 형태적으로는 도깨비고비(*Cyrtomium falcatum*)와 유사하나 15~30cm의 크기로 상대적으로 왜소한 편이다(Jones, 1987). 우리나라에서는 제주도 남부 해안의 바위틈에 자생하며, 그 밖에 일본, 중국, 인도 남부, 하와이 등지에 분포하고 있는 것으로 알려져 있다(Pak, 1961).

영양변식을 이용한 돌연변이육종은 일단 변이체가 분리되면 그것을 고정할 필요 없이 번식시킬 수 있다는 점에서 유성변식에 의한 것보다 유리하다고 할 수 있다(Doo et al., 2001). 하지만 기외 조건에서 전통적인 영양번식법을 이용할 경우에는 발생된 변이를 증식시키는 것이 용이하지 않기 때문에 꽃이나 줄기 또는 잎 등에서 일부분이 변이되어 형성된 키메라 형질을 분리하거나 보존하는 것이 쉽지 않다. 그러므로 돌연변이육종에 조직배양기술을 도입하여 절편 내의 변이세포로부터 부정아를 유도한 후 키메라형질에서

완전한 변이식물체를 분리하여 고정하고자 하는 연구들이 활발히 진행되고 있는데, *Sinningia speciosa*(Paek과 Han, 1988), *Oryza sativa* cv. Dongjinbyeo(Lee et al., 1993), *Gentiana scabra*(Seong et al., 1995), *Cymbidium kanran*(Lee et al., 1998), *Gentiana axillariflora*(Lim et al., 2000), *Arabidopsis thaliana*(Gaj, 2002), 벼(Lee et al., 2002), *Gossypium hirsutum*(Herring et al., 2002), *Glycine max*(Hofmann et al., 2004), *Dendranthema grandiflora*(Latado et al., 2004)와 같이 다양한 기내배양식물들에서 변이주 육성연구가 시도되었다. 그러나 양치식물의 경우 돌연변이육종을 이용한 변이주의 육성연구는 매우 미진한 상태여서 그에 관한 기초자료조차 현저히 부족한 실정이다.

기내에서 변이주의 선발 시 그 수행능력은 효과적인 재생법 및 안정적인 영양번식체계의 확립과 더불어 적절한 선발제(selective agent)의 사용에 의하여 향상될 수 있다. 그 밖에 조직배양물의 생화학적, 분자적 및 생리적 연구를 통해서 내성이 있는 개체를 선발할 수 있는 방법이 제시되고 있다(Piqueras et al., 1996; Gueta-Dahan et al., 1997; Avsian-Kretchmer et al., 1999). 최근에는 단백질

\*교신저자(E-mail) : leech@chungbuk.ac.kr

(동위효소 및 다른 단백질 마커)을 이용한 분자적 마커와 함께 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism(AFLP), Simple Sequence Repeats(SSR) 등 DNA 마커가 기내배양 및 돌연변이원 처리에 의하여 유기된 변이주의 유전적 다양성을 검출하기 위한 효율적인 방법으로 대두되고 있다(Predieri, 2001). 특히 RAPD 분석법은 방법이 간편하고 경제적이어서 형태변이, 계통변이 혹은 비정상적인 생장을 보이는 체세포 변이체나 돌연변이체 등에서 유전적 변이를 분석하는 작업에 많이 이용되고 있다.

본 연구는 기내배양중인 참쇠고비의 포자체에서 근경을 취하여 EMS, NMU 등의 화학돌연변이원과 colchicine을 처리한 후 포자체 재생물을 조사함으로써 적정 처리조건을 구명하고, 표현형 변이에 근거한 변이주를 선별하여 빠른 육종기간 안에 순수한 돌연변이주를 얻을 수 있는 방법을 개발하기 위한 목적으로 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 돌연변이원 처리

기내배양중인 참쇠고비의 어린 식물체에서 근경부위를 취하여 곱게 다진 후 처리조건 당 500mg 씩 준비하였다. EMS, NMU는 필터멸균하여 EMS는 0, 10, 20, 50 및 100mM의 농도로, NMU는 0, 1, 2, 5, 및 10mM의 농도로 준비하여 각각에서 근경을 3시간 동안 침지처리 하였다. 필터멸균한 colchicine은 0, 0.01, 0.05, 0.1 및 0.5%의 농도로 조절하여 근경을 침지한 후 2일 동안 진탕배양(100rpm) 하였다. 돌연변이원을 처리한 근경조직은 멸균수로 3회 세척하고, 100mg씩 나누어 처리구 당 5반복으로 kinetin 5 $\mu$  M + IBA 5 $\mu$  M이 혼용 처리된 1/2MS배지(sucrose 1%, 활성탄 0.1%, agar 0.8%, pH 5.8)에 치상한 후 12주간 배양하였다. 이후 동일배지에 계대하여 12주간 더 배양한 후 각각의 처리구에서 재생된 식물체의 수를 조사하였고, 육안으로 표현형을 관찰하여 잎의 모양 및 색소가 변이된 식물체를 선별한 후 새로운 배지에 치상하여 배양하였다.

### DNA 추출

야생종 및 변이주의 계통 DNA를 추출하기 위하여 0.3g의 엽조직을 액체질소를 이용하여 곱게 마쇄한 후, 65 $^{\circ}$ C로 미리 가온시킨 1ml의 CTAB buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.0; 1.4M NaCl; 20mM EDTA; 2% CTAB; 1% PVP; 1%  $\beta$ -mercaptoethanol; 0.5% sodium bisulfite)를 첨가하여 65 $^{\circ}$ C 항온수조에서 1시간 동안 반응시켰다. 1배양의 chloroform:isoamylalcohol(24:1)을 첨가하여 추출과정을 거치고, 원심분리(12,000rpm, 10분)한 상등액에 isopropanol을 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 DNA를 침전시켰

다. 원심분리하여 얻은 pellet을 차가운 70% ethanol로 세척한 후 자연건조하고, 0.1 $\times$ TE 용액(pH 8.0)에 녹인 후 5 $\mu$ l RNase A(10mgmL<sup>-1</sup>)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시켰다. 동일량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)을 첨가하여 추출과정을 거치고, 다시 한번 chloroform:isoamylalcohol(24:1)의 추출과정을 실시하였다. 원심분리한 상등액에 isopropanol을 첨가하고 -20 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 DNA를 침전시켰다. 원심분리하여 얻은 DNA pellet을 70% ethanol로 세척하고 자연건조한 후에 0.1 $\times$ TE 용액에 녹여 사용하였다. DNA의 양은  $\lambda$  DNA(Promega, 미국)와 함께 0.8% agarose gel(in 1 $\times$ TAE buffer)에서 전기영동하여 확인하였다(Lim *et al.*, 1997; Ong *et al.*, 1998b).

### PCR 반응

사용된 모든 시약은 Promega(Madison, 미국)의 제품이었으며, 60개의 ten-mer oligonucleotide primers(A, B, U Kits, Operon Technologies, Alameda, Calif.)를 RAPD 분석에 사용하였다. RAPD 반응물(25 $\mu$ l)에는 magnesium-free reaction buffer(50mM KCl; 10mM Tris-HCl, pH 9; 1% Triton X-100)에 20~50ng의 DNA, 200 $\mu$  M dNTP, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1 $\mu$  M primer, 그리고 1 U Taq DNA polymerase가 포함되었다. PCR 증폭은 Gene Amp PCR System 9600(Perkin-Elmer Cetus, 미국)을 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 DNA를 변성시킨 후, 60 cycle(94 $^{\circ}$ C에서 30초, 35 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분)를 반응시켰으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 1회 증폭반응을 실행하였다. PCR 생성물은 2% agarose gel(in 1 $\times$ TAE buffer)에서 전기영동한 후에 ethidium-bromide로 염색하여 UV 상에서 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### EMS 처리 효과

참쇠고비의 근경조직은 20mM에서 무처리구 대비 56%에 해당하는 식물체 재생물을 보였으며, 50mM에서는 45%, 100mM에서는 30%로 감소하였다(Table 1). 재생된 식물체들의 표현형 변이를 조사한 결과, 20mM에서 2.8%, 50mM에서는 8.2%, 그리고 100mM에서 3.8%의 식물체에서 잎 모양의 변이가 관찰되었다. 그러므로 식물체 재생률과 표현형 변이의 출현빈도수에 근거할 때, 참쇠고비의 근경에서 EMS의 적정 처리농도는 20~50mM인 것으로 생각되었다.

*Glycine max* cv. Iroquois의 체세포배는 EMS 1~3mM으로 4시간 동안 처리하였고(Hofmann *et al.*, 2004), 국화(*Dendranthema grandiflora*)의 미성숙 소화경(pedicel)은 0.77%에서 1시간 45분(Latado *et al.*, 2004), 기내배양중인 글록시니아(*Sinningia speciosa*)의 싹초는 0.001%의 농도에서 12시간(Pack and Han,

1988), 한란(*Cymbidium kanran*)의 근경은 0.2%에서 3주간(Lee *et al.*, 1998)의 처리가 각각 이용된 것으로 보고되었다. 이들을 고려할 때 양치식물의 근경은 한란의 근경처럼 다른 식물조직에 비하여 EMS에 비교적 강한 내성을 지니는 것으로 생각되었다. 그 밖에 처리방법에 따라서 배지에 EMS를 첨가하여 30~60일간 상대적으로 오랜 시일동안 처리할 경우에는 10~500 $\mu$  M의 낮은 농도가 이용되기도 하였다(Lim *et al.*, 2000).

EMS는 한란(*Cymbidium kanran*; Lee *et al.*, 1998)이나 국화(*Dendranthema grandiflora*; Latado *et al.*, 2004), 큰용담(*Gentiana axillariflora*; Lim *et al.*, 2000) 등에서 보고된 것처럼 고등식물에서 색소체의 색소형성을 감소시키거나 반문식물체를 유도하는 등 색소체 관련 DNA에 돌연변이를 일으키는 데 효과적인 것으로 알려져 있다(Farooqui *et al.*, 1997). 그러나 본 실험에서 참쇠고비는 잎의 모양이나 식물체의 형태가 변이된 식물체만 출현하였을 뿐 색소변이 식물체는 나타나지 않았다.

**NMU 처리 효과**

참쇠고비의 근경절편에 NMU를 농도별로 처리한 후 배양한 결과, 10mM의 농도에서 재생된 식물체 수는 무처리구 대비 67%로 감소되었다. 0~5mM의 처리구에서는 대조구와 유의차를 보이지 않았다(Table 2). 재생된 식물체의 표현형 변이를 조사한 결과, 2mM에서 3.3%, 5mM에서 4.9%, 그리고 10mM에서 8.3%의 식물체에서 엽색 변이가 나타났고, 2mM에서 3.3%, 5mM에서 2.4% 그리고 10mM에서 6.3%의 식물체에서 잎의 모양 또는 식물체의 형태변이가 관찰되었다. 이러한 실험결과를 고려할 때, NMU 처리의 적정조건은

5~10mM에서 3시간인 것으로 생각되었다.

기내배양종인 베고니아(*Begonia x hiemalis*)는 잎 절편을 2~10 mM의 NMU로 1시간동안 처리하였고(Bouman and De Klerk, 2001), *Capiscum annuum*의 자엽은 5mM에서 1시간 30분 동안 처리하였다고 하였다(Rao *et al.*, 1997). 또한 기내배양종인 용담(*Gentiana scabra*)에서 정아와 액아는 1~4mM에서 2시간의 처리가 이용된 반면, 종자는 24시간의 처리가 이용되었다고 하였다(Seong *et al.*, 1995).

NMU는 *Helianthus annuus*(Triboush *et al.*, 1999)나 용담(Seong *et al.*, 1995), *Capiscum annuum*(Rao *et al.*, 1997), 큰용담(Lim *et al.*, 2000) 등에서 보고된 바와 같이 고등식물에서 엽록체 유전자에 변이를 발생시키는 빈도수가 높은 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 용담의 경우 초장이 작은 위축형 변이주가 출현하였고(Seong *et al.*, 1995), 큰용담에서는 잎의 형태가 변형된 식물체가 관찰되었다고 하였다(Lim *et al.*, 2000). 본 실험에서 참쇠고비 또한 NMU 처리에 의하여 잎의 형태가 변이된 식물체와 색소변이 식물체가 모두 출현하였다. 그러므로 NMU는 고등식물에서와 마찬가지로 양치식물에서도 식물체의 형태 및 색소 변이주를 얻는데 효과적인 돌연변이원으로 생각되었다.

**Colchicine 처리 효과**

Colchicine 처리의 적정조건을 알아보기 위하여, 참쇠고비의 근경조직을 0, 0.05, 0.01, 0.1 및 0.5%의 농도로 2일간 침지처리한 후 재생된 식물체의 수와 표현형 변이를 조사하였다. 근경에서 재생된 식물체의 수는 0.5%에서 무처리구 대비 86%로 감소되었으나

Table 1. Plant regeneration from homogenized rhizome segments treated with EMS in *C. caryoptideum* var. *coreanum*

EMS (mM)	Mean no. of plants regenerated/culture bottle	Total no. of plants regenerated	No. of phenotypical variation	
			Leaf color (%)	Leaf shape (%)
0	21.5 a <sup>2</sup>	43	0 (0)	0 (0)
10	15.3 ab	46	0 (0)	0 (0)
20	12.0 bc	36	0 (0)	1 (2.8)
50	9.8 bc	49	0 (0)	4 (8.2)
100	6.5 c	26	0 (0)	1 (3.8)

<sup>2</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P<0.05.

Table 2. Plant regeneration from homogenized rhizome segments treated with NMU in *C. caryoptideum* var. *coreanum*

NMU (mM)	Mean no. of plants regenerated/culture bottle	Total no. of plants regenerated	No. of phenotypical variation	
			Leaf color (%)	Leaf shape (%)
0	18.0 a <sup>2</sup>	36	0 (0)	0 (0)
1	15.5 ab	31	0 (0)	0 (0)
2	15.0 ab	30	1 (3.3)	1 (3.3)
5	13.7 ab	41	2 (4.9)	1 (2.4)
10	12.0 b	48	4 (8.3)	3 (6.3)

<sup>2</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, P<0.05.

유의차는 없었다. 재생된 식물체의 형태변이를 조사한 결과, 0.05%에서 3.6%, 0.1%에서 3.2%의 식물체에서 잎의 모양 또는 식물체의 형태가 변이된 것으로 나타났다(Table 3). 그러나 형태변이 식물체의 ploidy level을 분석한 결과, 염색체 수의 배수화는 확인되지 않았다(data not shown). 그러므로 본 실험에서 식물체의 재생률 및 변이주의 출현빈도수에 근거하여 colchicine 처리의 적정 조건을 선별하기는 어려웠다.

기내배양상태의 mulberry(*Morus alba*)는 정아를 0.05~0.2%의 농도로 1일간 처리한 결과, 0.1%에서 4배체 유도가 가장 효과적이었다고 하였다(Chakraborti 등, 1998). 반면 *Brachiaria brizantha*의 기저부(basal segment) 절편은 0.01%에서 2일간 처리가 적절하였고(Pinheiro et al., 2000), *Alocasia micholitziana*에서 신초 tip은 0.01%에서 24시간 처리가 4배체 유도에 가장 효율적이었다고 하였다(Thao et al., 2003).

이러한 결과들을 고려할 때, 기내배양상태의 식물체에서 신초 및 절편은 보편적으로 0.01~0.1%의 colchicine에서 1~2일의 처리가 배

수성 식물체 유도에 효과적인 것으로 여겨지며, 그보다 처리농도가 높아지면 식물체의 생육이 불량하거나 카메라의 유기 빈도수가 높아지는 것으로 여겨진다.

### 선발된 변이주의 특성

기내환경에서 포자체의 어린잎은 생리적인 요인에 의하여 형태변이가 발생할 가능성이 있기 때문에, 기내선발 시 5~10개 이상의 엽상체가 출현한 후에도 동일한 형질이 계속 유지되는지를 관찰한 후 변이주를 선발하였다. 최종적으로 선발된 변이주는 EMS 처리구에서 4개, NMU 처리구에서 12개였다(Table 4; Fig. 1). EMS 처리구에서 선발된 변이주는 모두 형태변이로 우편(finnate)의 모양이나 엽상체의 모양에 변이가 발생한 식물체들과 엽맥이 야생종보다 촘촘하고 많게 변이된 식물체였다. NMU 처리구에서 선발된 12개 중에서 5개의 식물체는 엽색이 변이된 것이었고, 7개는 엽상체의 형태가 변이된 것이었다. 엽색변이 식물체로는 황색식물체와 반문식물체가 선발되었는데, 반문식물체에서 엽색의 변이는 매우 불규칙했고 새로운 엽상체가 출현할 때마다 엽색변이의 정도가 점점 감소되는 경향을 보였다. NMU 처리구에서 선발된 형태변이 식물

Table 3. Plant regeneration from homogenized rhizome segments treated with colchicine in *C. caryoptideum* var. *coreanum*

Colchicine (%)	Mean no. of plants regenerated/culture bottle	Total no. of plants regenerated	No. of phenotypical variation	
			Leaf color (%)	Leaf shape (%)
0	19.7 a <sup>2</sup>	59	0 (0)	0 (0)
0.01	23.5 a	47	0 (0)	0 (0)
0.05	14.0 a	28	0 (0)	1 (3.6)
0.1	15.5 a	31	0 (0)	1 (3.2)
0.5	17.0 a	34	0 (0)	0 (0)

<sup>2</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test,  $P < 0.05$ .

Table 4. Morphological characteristics of variants obtained from various mutagen treatments in *C. caryoptideum* var. *coreanum*

Variant line	Mutagen treatment condition			Characteristics
	Mutagen	Con. (mM)	Treatment time (hrs)	
CcarE20-1	EMS	20	3	Yellow plant
CcarE20-2	"	"	"	Narrow, toothed finnate
CcarE50-1	"	50	"	Round finnate, numerous frond
CcarE20-2	"	"	"	Fine, numerous vein of finnate
CcarM2-1	NMU	2	"	Broad and round finnate
CcarM2-2	"	"	"	Broad, toothed finnate
CcarM2-3	"	"	"	Variogated frond
CcarM5-1	"	5	"	Narrow and long finnate
CcarM5-2	"	"	"	Narrow and long finnate
CcarM5-3	"	"	"	Narrow, toothed finnate
CcarM5-4	"	"	"	Numerous frond
CcarM5-5	"	"	"	Narrow finnate
CcarM5-6	"	"	"	Variogated frond
CcarM10-1	"	10	"	Yellow plant
CcarM10-2	"	"	"	Variogated frond
CcarM10-3	"	"	"	Variogated frond

체에는 우편이 야생종에 비하여 등근 개체, 가늘고 좁은 개체, 또는 우편 돌레에 톱니 모양이 뚜렷해진 변이주 등이 있었으며, 야생종보다 분지수가 많은 것도 선발되었다.

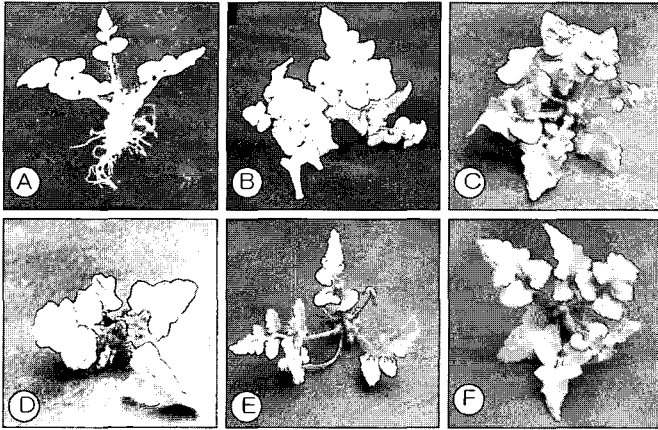


Fig. 1. Morphological variants of *C. caryotidium* var. *coreanum* regenerated from rhizome segment treated with mutagen *In vitro*. (A) Wild type, (B) *CcarM10-3'*, (C) *CcarM5-6*, (D) *CcarM10-1*, (E) *CcarM5-5*, (F) *CcarM5-4*.

<sup>2</sup>Refer to Table 4.

**RAPD 분석**

RAPD 분석에 사용된 변이주 *CcarE20-1*은 황색을 띠는 식물체였으며, *CcarE50-2*는 엽맥이 많고 촘촘한 식물체였다. *CcarM5-2*는 우편이 좁고 길게 변형되었으며, *CcarM10-3y*는 반분식물체인 *CcarM10-3*의 근경으로부터 M<sub>1</sub>V<sub>2</sub> 세대에서 재생된 황색식물체였다. 이들 변이주와 야생종의 게놈 DNA를 추출하여 RAPD 분석을 실시한 결과, OPA03(AGTCAGCCAC), OPA13(CAGCACCCAC), OPB06(TGCTCTGCC), OPB10(CTG CTGGGAC), OPB12(CCTTGACGCA), OPU01(ACGGACGTCA), OPU05(TTGGGGGCOCT), OPU13(GGCTGGFITCC) 등 8개의 primer에서 분석가능한 DNA 밴드를 얻을 수 있었다. 그 중에서 OPB06과 OPU01 primer에서 야생종과 일부 변이주 사이에 다형성 DNA 밴드 패턴을 보인 반면, OPA03을 비롯한 나머지 primer들은 동일한 밴드 패턴을 나타냈다(Fig. 2). OPB06 primer의 경우 *CcarE50-2*와 *CcarM10-3y*에서 야생종과 달리 DNA 밴드가 증폭되지 않았고, OPU01 primer는 *CcarM5-2*에서 야생종과 다른 두 개의 DNA 밴드가 나타났는데, 그 크기는 각각 700bp 및 500bp 정도였다. 이러한 결과를 볼 때, RAPD 분석법은 양치식물에서 기내선발한 변이주의 유전적 변이 여부를 검정할 수 있는 유효한 방법 중 하나로 생각되었다.

하지만 그 밖에 다수의 형태변이주에서 RAPD 분석법을 이용하여 유전적 변이를 검출하는데 실패하였다(data not shown). 이는

선발된 변이주의 형태변이가 생리적인 요인에 기인하였기 때문일 수도 있으나, 또한 게놈 DNA의 거대한 pool에서 발생한 임의의 유전적 변이를 탐색하는 데 있어 RAPD 분석법만으로는 효율적이지 못하기 때문인 것으로 여겨진다. 앞선 보고에 의하면 *Asparagus officinalis*(Raimondi *et al.*, 2001), *Picea glauca*(De Verno *et al.*, 1999), 고구마(*Ipomoea batatas*: Lee *et al.*, 2003), 구기자나무(*Lycium chinense*: Lee *et al.*, 1997), *Oryza sativa*(Kim, 2003), 황금알 얼룩개나리(*Forsythia koreana*: Shim *et al.*, 1994) 등의 경우 RAPD 분석에 의하여 체세포 변이 및 아조변이 등을 유전적으로 확인할 수 있었으나, 베고니아(*Begonia × hiemalis*, Bouman and De Klerk, 2001), 가문비나무(Fourre *et al.*, 1997)의 연구에서는 표현형 및 게놈상의 변이가 분명하였음에도 불구하고 RAPD 밴드 상에 다형성이 검출되지 않았다고 하였다. 그러므로 선발된 변이주의 유전적 변이를 보다 효율적으로 검정하기 위해서는 게놈분석을 비롯하여 AFLP, SSR, RFLP 등 여러 분석법을 병행해야 할 것으로 생각되었다(Coulibaly *et al.*, 2003; Devarumath *et al.*, 2002; Nakajima *et al.*, 1998; Ude *et al.*, 2003).

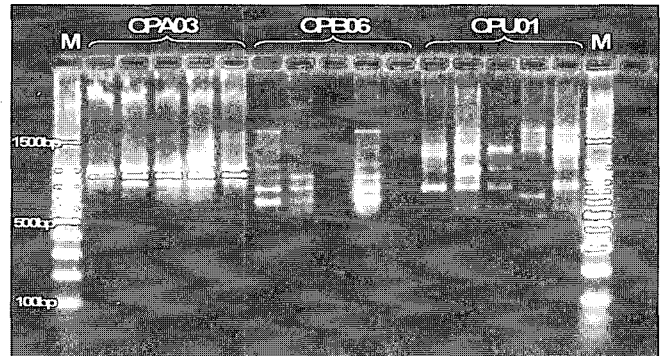


Fig. 2. RAPD bands in wild type and variants line of *C. caryotidium* var. *coreanum* using primer OPA03 (AGTCAGCCAC), OPB06 (TGCTCTGCC) and OPU01 (ACGGACGTCA). Lane: 1, 6, 11, wild type; 2, 7, 12, *CcarE20-1*<sup>2</sup>; 3, 8, 13, *CcarE50-2*; 4, 9, 14, *CcarM5-2*; 5, 10, 15, *CcarM10-3y*; M, the size standard (100bp DNA ladder, Promega). <sup>2</sup>Refer to Table 4.

**적 요**

양치식물인 참쇠고비에서 인위적인 돌연변이를 유기하기 위하여, 기내배양한 근경조직에 EMS, NMU 등의 화학돌연변이원과 colchicine을 처리하였다. 식물체 재생물을 근거할 때, EMS의 적정 처리농도는 20~50mM이었으며, NMU는 5~10mM인 것으로 확인되었다. 또한 참쇠고비에서 엽의 색소 및 형태적 변이를 유도하는 데 있어 NMU가 EMS 보다 효과적인 것으로 확인되었다. 표현형 변이 식물체의 유전적 변이를 분석하기 위하여 RAPD를 수행한

결과, 두 개의 10-mer primer에서 야생종과 변이주 사이에 다형성 DNA 밴드 패턴이 나타났다.

## 사 사

본 연구는 산업자원부한국산업기술평가원지원의 지역협력연구센터인 충북대학교 생물건강산업개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

## 인용문헌

- Avisian-Krechmer, O., Y. Eshdat, Y. Gueta-Dahan and G. Ben-Hayyim. 1999. Regulation of stress-induced phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in *Citrus*. *Planta* 209: 469-477.
- Bouman, H. and G.-J. De Klerk. 2001. Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regeneration under various condition. Comparison of three assays. *Theor. Appl. Genet.* 102: 111-117.
- Chakraborti, S.P., K. Vijayan, B.N. Roy and S.M.H. Qadri. 1998. *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Cell Rep.* 17: 799-803.
- Coulibaly, L., B. Revol, M. Noirot, V. Poncet, M. Lorieux, C. Carasco-Lacombe, J. Minier, M. Dufour and P. Hamon. 2003. AFLP and SSR polymorphism in a coffee interspecific backcross progeny [(*C. heterocalyx* × *C. canephora*) × *C. canephora*]. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1148-1155.
- Devarumath, R.D., S. Nandy, V. Rani, S. Marimuthu, N. Muraleedharan and S.N. Raina. 2002. RAPD, ISSR, RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type). *Plant Cell Rep.* 21: 166-173.
- DeVerno, L.L., Y.S. Park, J.M. Bonga and J.M. Barrett. 1999. Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss.). *Plant Cell Rep.* 18: 948-953.
- Doo, H.S., C.S. Kang and J.H. Ryu. 2001. Induction mutation by gamma-ray irradiation on crown bud of yacon (*Polymnia sonchifolia* Poeppig and Endlicher). *Kor. J. Breed.* 33: 1-6.
- Farooqui, M.A., A.V. Rao, T. Jayasree and A. Sadanandam. 1997. Induction of atrazine resistance and somatic embryogenesis in *Solanum melongena*. *Theor. Appl. Genet.* 95: 702-705.
- Fourre, J.-L., P. Berger, L. Niquet and P. Andre. 1997. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: Morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theor. Appl. Genet.* 94: 159-169.
- Gaj, M.D. 2002. Stimulation of somatic embryo formation by mutagens and darkness in culture of immature zygotic embryos of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 37: 93-98.
- Gueta-Dahan, Y., Z. Yaniv, A. Zilinskas and G. Ben-Hayyim. 1997. Salt and oxidative stress: Similar and specific responses and their relation to salts tolerance in *Citrus*. *Planta* 203: 460-467.
- Herring, A., D.L. Auld, M.D. Ethridge, E.F. Hequet and E. Bechere. 2002. Inheritance of fiber quality and lint yield in a chemically mutated population of cotton. *Euphytica* 136: 333-339.
- Hofmann, N.E., R. Raja, R.L. Nelson and S.S. Korban. 2004. Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers. *Biological Plantarum* 48: 173-177.
- Jones, D.L. 1987. Encyclopedia of ferns. Timber press, Portland.
- Latado, R.R., A.H. Adames and A.T. Neto. 2004. *In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethylmethane sulphonate (EMS) in immature floral pedicels. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77: 103-106.
- Lee, B.C., T.S. Kwak, J.S. Park and K.W. Yu. 1997. Variation of agronomic characters and RAPD in induced boxthorn (*Lycium chinense*) mutants. *Kor. J. Breed.* 29: 453-460.
- Lee, H.Y. and J.S. Jung and J.S. Lee. 1998. Induction of chlorophyll deficient mutant plant of *Cymbidium kanran* by EMS treatment. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 25: 183-187.
- Lee, I.S., D.S. Kim, C.P. Hong, S.Y. Kang, H.S. Song, S.J. Lee, Y.P. Lim and Y.I. Lee. 2003. Selection and characterization of S- aminoethyl-L-cysteine resistant from gamma-ray irradiated embryogenic callus in sweet potato. *J. Plant Biotechnology* 5: 233-238.
- Lee, J.H. and S.Y. Lee. 2002. Selection of stable mutants from cultured rice anthers treated with ethyl methane sulfonic acid. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 71: 165-171.
- Lee, S.Y., J.K. Lee, T.H. Noh, H.J. Kang and S.Y. Lee. 1993. Variation of major characters in plants regenerated from rice

- cells treated with ethylmethane sulfonic acid. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 20: 307-314.
- Lim, J.D., M.J. Kim and C.Y. Yu. 2000. Induction and RAPD analysis of mutant plants by chemical mutagens in *Gentiana axillariflora* Leveille. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 27: 89-94.
- Lim, S.H., L.K.C. Looi, B.L. Ong and Y.C. Wee. 1997. A method of DNA isolation from epiphytic CAM ferns for use in random amplified polymorphic DNA analysis. Biologia Plantarum 39: 637-639.
- Nakajima, Y., K. Oeda and T. Yamamoto. 1998. Characterization of genetic diversity of nuclear and mitochondrial genomes in *Daucus* varieties by RAPD and AFLP. Plant Cell Rep. 17: 848-853.
- Ong, B.L., S.H. Lim and K.C. Looi. 1998b. Morphological and molecular variations in the epiphytic CAM fern *Pyrrhosia piloselloides*. Biologia Plantarum 41: 281-285.
- Paek, K.Y. and K.R. Han. 1988. Micropropagation of gloxinia (*Simningia speciosa*) from hypocotyl and cotyledon segments and treatment of EMS and colchicine on regenerated shoot tips. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 29: 126-135.
- Pak, M.K. 1961. Flora of Korean Pteridophyta. Kyohakdosoo Co., Seoul.
- Pinheiro, A.A., M.T. Pozzobon, C.V. de Valle, M.I.O. Pentead and V.T.C. Carneiro. 2000. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. Plant Cell Rep. 19: 274-278.
- Piqueras, A., J.A. Hernandez, E. Olmos, E. Hellin and F. Selvilla. 1996. Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 45: 53-60.
- Predieri, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 64: 185-210.
- Raimondi, J.P., R.W. Masuelli and E.L. Camadro. 2001. Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses. Sci. Hort. 90: 19-29.
- Rao A.V., M.A. Farooqui and A. Sadanandam. 1997. Induction of lincomycine and streptomycin resistance by nitrosomethylurea and ethylmethanesulphonate in *Capsicum annuum* L. Plant Cell Rep. 16: 865-868.
- Seong, N.S., C.H. Park, K.S. Kim, S.T. Lee and Y.H. Chang. 1995. *In vitro* variant induction and its content of gentiopicoside of *Gentiana scabra* Bunge. Kor. J. Med. Crop 3: 40-44.
- Shim, K.K., Y.M. Ha and S.K. Lee. 1994. A study on the new yellow variegated cultivar of Korean Forsythia. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 35: 270-278.
- Thao, N.T., P.K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki and H. Okubo. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 72: 19-25.
- Triboush, S.O., N.G. Danienko, I.I. Ulticheva and O.G. Davydenko. 1999. Location of induced mutation and reversion in the chloroplast genome of *Helianthus annuus*. Plant Growth Reg. 27: 75-81.
- Ude, G., M. Pillay, E. Ogundiwin and A. Tenkouano. 2003. Genetic diversity in an African plantain core collection using AFLP and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 107: 248-255.
- Xu, M.L., A.E. Melchinger, X.C. Xia and T. Lubberstedt. 1999. High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR and AFLP markers. Mol. Gen. Genet. 261: 574-581.

(접수일 2006.3.11 ; 수락일 2006.4.17)