

*Drosophila*에서 인삼 및 단삼 추출물이 MNNG의 돌연변이원성에 미치는 영향

최영현* · 정해영* · 유미애** · 이원호

부산대학교 생물학과, *약학과, **분자생물학과

(Received February 4, 1994)

Effects of Ginseng and *Salvia miltiorrhiza* Extracts on the Mutagenicity of MNNG in *Drosophila*

Yung-Hyun Choi*, Hae-Young Chung*, Mi-Ae Yoo** and Won-Ho Lee

Dept. of Biology, *Dept. of Pharmacy, **Dept. of Molecular Biology, Pusan

National University, Pusan, 609-735, Korea

Abstract—Using germinal and somatic cell mutation assaying systems of *Drosophila melanogaster*, effects of Ginseng and *Salvia miltiorrhiza* extracts on the *in vivo* mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) were investigated. For these purpose, the attached-X method and the *mwh/flr* spot test system which are an X-linked lethal mutation and a somatic chromosome mutation assaying system, respectively, were used. In the induction of X-linked lethal mutations during the spermatogenesis, MNNG showed more actions in the sperm and spermatid stages, in which Ginseng and *Salvia miltiorrhiza* extracts had remarkable inhibitory effects than other stages. Ginseng and *Salvia miltiorrhiza* extracts reduced the mutagenicity by MNNG in the *mwh/flr* system, which reveal that they can inhibit gene mutation, deletion and mitotic chromosomal recombination. These results seem to suggest that Ginseng and *Salvia miltiorrhiza* extracts may exert their inhibitory effects to *in vivo* mutagenic and/or carcinogenic properties of DNA-damaging agents.

Keywords □ Ginseng and *Salvia miltiorrhiza* extracts, mutagenicity, MNNG, *Drosophila*.

인간에 있어서 암의 유발은 주로 각종 화학물질과 방사선 등의 환경요인에 의한 경우가 대부분인 것으로 알려져 있다.¹⁾ 암의 생성기구에 대해서는 아직도 완전히 밝혀지지 않고 있으나, 이미 개발되어진 다양한 돌연변이원검출계들에 의해 발암물질의 대부분이 돌연변이를 유발하며, 암생성의 초기단계는 체세포돌연변이에 의한 것이라는 설은 많은 연구들에 의해 지지되어지고 있다.²⁻⁶⁾ 따라서 합암제개발에 있어 돌연변이원 검출계들을 이용한 변이유발 억제가능성의 검색이 선행단계라 할 수 있다. 현재 가장 널리 사용되고 있는 발암물질의 prescreening계로는 원핵생물인 *Salmonella*균을 사용한 Ames 검사법^{2,7)}이지만, 인

간을 포함한 고등동물의 세포에는 그 구조나 생화학적 성질 특히 변이유발물질에 대한 대사활성화 및 핵산상해의 성질들이 원핵생물과는 다른 점이 많을 뿐만 아니라, 생식세포계통의 변이라든지 염색체 이상과 같은 고차원의 변이를 검출할 수 없는 점을 고려할 때, *Salmonella*/mammalian microsome 검사법과 같은 *in vitro* 변이원검출 결과만으로 사람에게의 영향을 평가할 수는 없다. 아울러 많은 시간과 경비가 소요되는 포유류검출계의 문제점을 보완하는 관점에서 종래의 생식세포계를 이용하는 방법 이외에, 최근 단기 *in vivo* 검출계의 개발로서 포유동물 대사효소계의 약 80% 이상을 가지는⁸⁾ *Drosophila*를 이용한 몇가지 검출계들이 개발되어져⁹⁻¹¹⁾ 그 적용성이 여러 연구자들에 의해 수행되어지고 있다.¹²⁻¹⁴⁾

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

동양에서 인삼(Panax ginseng)은 민간과 한방에서 오랫동안 귀중한 한약제로 인식되어 왔으며 인삼성분의 효능에 관해서는 주로 생리, 생화학 및 생약학적 측면에서 많은 연구가 진행되어져 왔다. 인삼의 여러가지 성분들은 핵산의 생합성이나 단백질과 지질의 생합성촉진을 통하여 주로 여러가지 스트레스에 관한 비특이적인 저항성을 강화시키고 생체를 정상기능으로 유지하려는 작용을 지니는데, 인삼의 식이에 의한 수명의 연장효과라든지,¹⁵⁾ 인삼 ether 추출물의 항산화기능,¹⁶⁾ 암세포의 성장 및 암발생의 억제,^{17,18)} 돌연변이유발의 억제,¹⁶⁾ 배양세포에서 돌연변이원에 의한 DNA와 염색체 이상의 억제 및 회복과정의 영향^{19,20)} 등 여러 측면에서 그 실질적인 자료들이 보고되어지고 있다. 한편으로 단삼(Salvia miltorrhiza)은 중국을 비롯한 동양권에서 임상적으로 혈액응고를 방지하고 혈액순환을 촉진시켜 혈전현상을 억제시키는 생약으로서 혈액순환계 질환, 월경불순, 협심증, 불면증 등에 널리 응용되고 있으며,²¹⁾ 단삼의 지용성성분으로서 cryptotashinone, tanshinone IIA 등이 협심증에 유효하다고 보고되고 있고,²²⁾ 수용성성분으로서 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid는 관상동맥 혈류량증가 작용이 있다고 알려져 있다.²³⁾ 또한 최근에 수용성 물질로서 magnesium lithospermate B가 단리되어 강력한 신장기능 항진작용²⁴⁾ 및 항산화작용이 보고²⁵⁾ 되고 있고, 지용성물질로서 dihydrotanshinone I, tanshinone I, methylentanshinone, cryptotanshinone도 강력한 항산화작용을 나타낸다고 보고되고 있다.²⁵⁾

본 연구에서는 인삼 및 단삼추출물이 nitroso 화합물의 일종인 돌연변이원 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)에 의한 *Drosophila melanogaster*의 생식세포 및 체세포 돌연변이유발에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 생식세포 돌연변이유발에 미치는 영향을 알아보기 위해서는 attached-X법을 사용하였으며, 체세포 돌연변이유발에는 *mwh/flr* 검출계에 준하였다. 전자는 반성치사 돌연변이유발을, 후자는 체세포 염색체 돌연변이를 검정할 수 있는 검출계이다.^{10,11,26)}

재료 및 방법

인삼 및 단삼성분의 추출 및 처리—인삼추출물은

한국 금산산의 5년근 인삼 근경을 분말로 한 다음 실온에서 증류수로 추출하여 사용하였다. 단삼추출물은 중국 사천산의 단삼을 1시간 동안 열탕으로 추출 후 동결건조하여 사용하였다. MNNG(Sigma) 및 인삼과 단삼추출물의 단일처리는 모두 증류수에 희석하여 사용하였으며, 대조군은 동일량의 증류수만을 사용하였다. MNNG와 인삼 및 MNNG와 단삼추출물과의 복합처리를 위해서는 두 추출물의 희석액에 MNNG를 적정량 녹여서 사용하였다.

Drosophila stocks—Attached-X법을 위해서는 *D. melanogaster*의 표준종인 Oregon-R(OR)과 attached-X 염색체를 가지는 계통(*ywmf & yf*: =)을 사용하였으며, *mwh/flr* 검출계를 위해서는 표지유전자로서 *mwh*(multiple wing hairs) 유전자를 homo로 가지는 *y; mwh jv* 계통과 *flr*(flare hairs)를 가지는 *y; Dp(1:3) sc¹⁴, flr TM1, Me* 계통을 각각 사용하였다.

생식세포 돌연변이유발에의 영향—Attached-X법을 이용한 반성치사 돌연변이유발의 영향을 조사하기 위해서 수컷 OR에 Lewis와 Bacher²⁷⁾의 방법에 준하여 MNNG, 인삼 및 단삼추출물 희석액의 단독 또는 MNNG와의 혼합액을 24시간 동안 경구투여하여 *Drosophila*의 표준배지가 든 vial에서 *ywmf & yf*: = 계통 유래의 미교배 암컷(*yw*: =)과 교배(각 처리 농도당 암수 25 : 25의 비율)후 매 48시간 마다 새로운 *yf*: = 암컷을 교체공급하면서 10일째까지의 연속 vial들을 얻었다. 연속 vial들은 Sankaranarayan과 Sobel²⁸⁾의 분류기준에 의거 생식세포형성의 4단계로 나누어 그 영향을 비교하였다.

체세포 돌연변이유발에의 영향—체세포 염색체 돌연변이유발을 위한 *mwh/flr*법은 wing-hair spot 검출계로서 교배양식에 준하여^{10,11)} *mwh* 계통의 미교배 암컷과 *flr* 계통의 수컷을 교배시켜 이형접합체 유충(*mwh +/+ flr*)을 얻었다. 여기서 얻어진 3령기 유충들(72±4 hr)에 8시간 동안 MNNG와 인삼 및 단삼추출물의 단일 혹은 혼합액을 각각 8시간 섭식시킨 후 우화한 성체의 날개를 영구표본 작성하여 돌연변이유발의 정도를 조사하였다. 만약 유충의 날개 원기세포에서 돌연변이가 일어났다면 우화후 성충의 날개에는 염색체 돌연변이의 종류에 따른 다양한 spot을 가지게 될 것이다.^{10,11)} *Drosophila*의 사육을 위해서는 corn meal-agar 표준배지를 이용하였으며 이상의 모든 실험은 25°C 항온사육실에서 실시하였다

결과 및 고찰

암세포는 체세포돌연변이에 의한 정상세포들에서 생겨날 수 있다는 Boveri의 암에 있어서의 체세포 돌연변이설(the somatic mutation theory of cancer)²⁸은 최근 많은 연구자들에 의해 다시 지지를 받고 있으며, 돌연변이를 억제할 수 있는 물질이 암을 억제할 수도 있음을 의미한다. 그러나 인삼의 여러가지 구성성분이 돌연변이의 유발이나 암의 발생 과정을 억제할 수 있다는 선행보고들의 대부분이 *in vitro* 조건하에서의 결과들^{16,18,20}이었다. 그리고 단삼의 영향에 관한 것은 단삼에서 분리된 przewaquinone A가 mouse sarcoma 180 세포증식을 억제한다는 것²²과, 최근 단삼의 항산화작용에 대하여 보고되어²⁵ 있을 뿐 항돌연변이에 작용에 대해서는 보고되어진 바는 없다.

본 연구에서는 *Drosophila*의 *in vivo* 조건하에서 MNNG에 의한 돌연변이유발에 미치는 인삼 및 단삼의 영향을 생식세포 및 체세포의 수준에서 조사하였다. 먼저 Table I은 정자형성 전 단계에서의 효과를 보여주는 것으로서, attached-X법에 의하여 전체 자손에 대한 수컷의 상대적인 출현도가 낮음은 X 염색체상의 치사돌연변이가 많이 유발되었음을 의미한다. 인삼과 단삼의 단독처리는 대조군과 거의 유사한 성비를 보여주고 있으며, MNNG 단독처리보다 인삼 또는 단삼과의 혼합처리는 다소 치사돌연변이유발을 억제하는 것으로 나타났다.

이 결과를 생식세포형성 연속 4단계의 비교²⁸를 위하여 대조군(♀ : ♂ = a : b)과 MNNG 단독 또는 혼합처리군(♀ : ♂ = c : d)에서 나타난 결과를 근거로 대조군에 대한 상대적 치사돌연변이 유도량, index (1-ad/bc)를 구하여 Fig. 1에 나타내었다. 이러한 index는 치사의 효과가 전혀없는 경우에는 0이 될 것

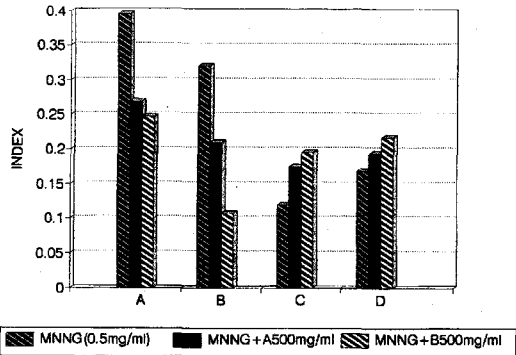


Fig. 1—Effects Ginseng and *Salvia miltiorrhiza* extracts on changes of the index in the male germ cells of OR exposed to MNNG(A; sperm, B; spermatid, C; spermatocyte, D; spermatogonia).

이며, 수컷의 출현이 없는 경우, 즉 완전 치사돌연변이를 유도한 경우의 index는 1이 될 것이다. 따라서 index의 값이 큰 정도는 돌연변이원성이 상대적으로 강하다는 것을 의미한다.

Fig. 1의 각 brood는 정자(A), 정세포(B), 정모세포(C) 및 정원세포(D)의 연속적인 단계를 의미한다. 결과에서 알 수 있듯이 MNNG는 전자형성 단계상 정자와 정세포에 비교적 큰 치사영향이 있음을 알 수 있고 이는 Choi와 Lee²⁹의 결과와 잘 일치되며, 동일 alkylating agent군들의 결과와도 유사하다.³⁰ 인삼과 단삼을 MNNG와 동시에 투여했을 경우에 연속 brood중 특히 돌연변이유발이 가장 높은 정자와 정세포 단계에 높은 회복능을 보여 생식세포계에서의 항돌연변이 효과가 뚜렷함을 알 수 있다.

Table II와 III은 *mwh/flr*검출계에 의한 체세포 염색체 돌연변이유발 정도의 결과로서, samll single spot는 유충시기때 날개 원기세포중에 생긴 결실 또는 불분리현상에 의한 것이며, *mwh*와 *flr*좌위 사이의 염

Table I—Effects of Ginseng and *Salvia miltiorrhiza* extracts on sex-ratio of progenies from the crosses between attached-X females(yf: =) and MNNG treated OR males

Chemicals	Total flies counted(♀, ♂)	Sex ratio(♂/♀ + ♂)
Control	4,251(1,995/2,256)	0.531
A 500 mg/ml	1,551(729/ 822)	0.530
B 500 mg/ml	1,833(860/ 973)	0.531
MNNG(0.5 mg/ml)	4,735(2,580/2,155)	0.455
MNNG + A 500 mg/ml	2,915(1,568/1,347)	0.462
MNNG + B 500 mg/ml	3,757(1,999/1,758)	0.468

A; Gineseng extract, B; *Salvia miltiorrhiza* extract

Table II—Frequencies of somatic chromosome mutations in the *Drosophila* wing spot test system(*mwh*+/+*flr*) after 3rd instar(72±4 hr) larval treatment with MNNG, Gineseng and *Salvia miltiorrhiza* extracts

Treatment (mg/ml)	Wings with spots(No.) ^a	Small single spots		Large single spots		Twin spots		Total no. of wing scored
		Wings with spots	No. of spots	Wings with spots	No. of spots	Wings with spots	No. of spots	
Control	25.58(22)	23.26(20)	25.58(22)	1.16(1)	1.16(1)	0.00(0)	0.00(0)	86
MNNG(0.5)	44.44(20)	31.11(14)	42.22(19)	11.11(5)	15.56(7)	6.67(3)	6.67(3)	45
MNNG(1.0)	47.62(30)	38.09(24)	42.86(27)	9.52(6)	12.70(8)	4.76(3)	4.76(3)	63
A(250)	22.50(18)	18.75(15)	20.00(16)	3.75(3)	3.75(3)	0.00(0)	0.00(0)	80
A(500)	25.00(19)	23.18(18)	26.32(20)	2.63(2)	2.63(2)	0.00(0)	0.00(0)	76
B(250)	28.00(35)	25.60(32)	29.60(37)	1.60(2)	1.60(2)	0.01(1)	0.01(1)	125
B(500)	24.53(13)	20.75(11)	22.63(12)	1.89(1)	1.89(1)	0.00(0)	0.00(0)	53

A; Gineseng extract, B; *Salvia miltiorrhiza* extract
 a: Number of wings possessing at least one spot

Table III—Effects of Gineseng and *Salvia miltiorrhiza* extracts on the mutagenicity induced by MNNG in the *Drosophila* wing spot system(*mwh*+/+*flr*)

Treatment	Wings with spots(No.) ^a	Small single spots		Large single spots		Twin spots		Total no. of wing scored
		Wings with spots	No. of spots	Wings with spots	No. of spots	Wings with spots	No. of spots	
MNNG 0.5								
+250(A)	59.32(35)	27.12(16)	35.59(21)	20.34(12)	20.34(12)	3.39(2)	3.39(2)	59
+500(A)	46.67(42)	30.00(27)	35.56(32)	11.11(10)	11.11(10)	0.00(0)	0.00(0)	90
MNNG 1.0								
+500(A)	42.50(17)	22.50(9)	30.00(12)	7.50(3)	7.50(3)	2.50(1)	2.50(1)	40
MNNG 0.5								
+250(B)	35.48(33)	24.73(23)	29.03(27)	7.53(7)	7.53(7)	3.23(3)	3.23(3)	83
+500(B)	47.54(29)	37.70(23)	42.62(26)	9.89(7)	9.89(7)	4.23(3)	4.23(3)	61
MNNG 1.0								
+250(B)	29.25(31)	23.58(25)	27.36(29)	5.66(6)	5.66(6)	0.00(0)	0.00(0)	106
+500(B)	32.86(23)	21.43(15)	27.14(19)	7.14(5)	7.14(5)	4.29(3)	4.29(3)	70

A; Ginseng extract, B; *Salvia miltiorrhiza* extract
 a: Number(percent) of wings possessing at least one spot

색체 재조환이나 *mwh* 좌우에 유전자 돌연변이가 일어나면 large single spot으로 나타나고, twin spot은 *flr* 좌우와 동원체 사이의 염색체재조환에 의한 것이다.^{10,11)} 대조군과 인삼 및 단삼처리군에 비하여 MNNG의 처리군에서 samll single spot은 2배 내외의 증가를 보였으며, large single spot과 twin spot의 유발에서도 양성반응을 보였다.

다음은 MNNG와 인삼 및 단삼과의 복합처리에 의한 결과로, Table III에서 알수 있듯이 전체 변이 유발 spot을 가진 개체의 비율이 MNNG단독처리에 비하여 다소 감소하였음을 알 수 있다. 먼저 인삼의 경우, 염색체상의 결실이나 불분리현상에 의한 samll

single spot 유발빈도가 MNNG 1.0 mg/ml 단독처리군에 비하여 10% 이상 감소하였으며, 염색체의 재조환이나 유전자 돌연변이에 의한 large single spot와 twin spot의 빈도 역시 다소 감소된 추세였다. 단삼과의 복합처리에 의해서도 조사된 3가지 변이 spot이 MNNG 단독처리군보다 다소 감소된 추세였다.

In vivo 조건하에서의 생식세포계에서 뿐만 아니라 체세포계에서의 돌연변이 억제효과는 본 연구에서 조사된 인삼 및 단삼추출물이 MNNG에 의해 유발된 DNA 및 염색체상해의 회복과정에 영향을 주었음을 의미하며, 결국 DNA 상해 요인에 의한 돌연변이 및 암유발과정에 저해적인 효과를 나타낼 수 있음을 간

접적으로 시사하는 것으로 사료된다.

결 론

*Drosophila*의 생식세포 및 체세포 돌연변이검출제를 이용하여 MNNG에 의한 *in vivo* 돌연변이원성에 미치는 인삼 및 단삼추출물의 영향을 조사하였다. 이를 위해 사용된 attached-X법과 *mwh/flr* 검출제는 각각 반성치사 돌연변이 및 체세포 염색체 돌연변이 검출제이다. MNNG는 정자형성단계상 정자와 정세포단계에서 가장 많은 치사돌연변이를 유발하였으며, 두 단계에서 인삼과 단삼추출물의 변이유발 억제효과가 뚜렷하였다. *mwh/flr* 검출제에서도 MNNG에 의한 유전자 돌연변이, 결실, 염색체 재조합 등의 유발에 다소 억제 효과가 있었다. 이러한 결과는 본 실험에 사용된 인삼과 단삼의 추출물이 DNA 상해요인에 의한 돌연변이 및 암 유발과정에서 저해적인 효과를 나타낼 수 있음을 간접적으로 시사하는 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) Wynder, E. L. and Gori, G. E.: Contribution of environmental to cancer incidence: A epidemiologic exercise. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 825 (1977).
- 2) McCann, J., Choi, E., Yamazaki, E. and Ames, B. N.: Detection of carcinogens as mutagens in *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* **72**, 5135 (1975).
- 3) Auerbach, C.(1976) "Mutation Research". Chapman and Hall, London, pp. 464 (1976).
- 4) Ames, B. N.: Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* **201**, 587 (1979).
- 5) Sugimura, T.: Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily food. *Cancer* **49**, 1970 (1981).
- 6) Ames, B. N., Gold, L. S., Sawyer, C. B. and Havender, W.: Carinogenic potency, in "Environmental Mutagens and Carcinogens", Alan R. Liss Inc., New York, p.663 (1982).
- 7) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mut. Res.* **31**, 347 (1975).
- 8) Hallstrom, I., Magnusson, J. and Ramel, C. *Mut. Res.* **92**, 161 (1982).
- 9) Rasmuson, B., Svahlin, H., Rasmuson, A., Montell, I. and Olofsson, H.: The use of a mutationally unstable X-chromosome in *Drosophila melanogaster* for mutagenicity testing. *Mut. Res.* **54**, 33 (1978).
- 10) Graf, U., Juon, H., Katz, A. J., Frei, H. F. and Wurgler, F. E.: A pilot study on a new *Drosophila* test. *Mut. Res.* **120**, 233 (1983).
- 11) Graf, U., Wurgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H. J., Juon, H., Hall, C. B. and Kale, P. G.: Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutag.* **6**, 153 (1984).
- 12) Yoo, M. A., Ryo, H., Todo, T. and Kondo, S.: Mutagenic potency of heterocyclic amines in the *Drosophila* wing spot test and its correlation to carcinogenic potency. *Jpn. J. Cancer Res.* **76**, 468 (1985).
- 13) Alonso, M. A., and Graf, U.: Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Mutagenesis* **4**, 105 (1989).
- 14) Graf, U., Frei, H. J., Kagi, A., Katz, A. J., and Wurgler, F. E.: Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mut. Res.* **222**, 359 (1989).
- 15) Brekhman, I. I. (1970): 藥用人蔘. 人蔘文獻特輔 **4**, 69.
- 16) Chung, K. C., Kang, G. M. and Nam, K. S.: Influence of ginseng ether extracts and selenium on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene mutagenicity. *Kor. Biochem. J.* **19**, 193 (1986).
- 17) Oura, H., Hiai, S. and Nakashima, K.: 朝鮮人蔘有效成分(Prostisol)의 生化學的, 實驗 醫學的 研究. *Chem. Pharm. Bull.* **19**, 453 (1971).
- 18) Hwang, W. I.: A study on the cytotoxic activity of extract panax root againer some cancer cells. *Kor. J. Biochem.* **8**, 1 (1976).
- 19) Kim, C. M., and Park, H. S.: Effects of radioprotective ginseng protein on MMS induced sister chromatid exchange and chromosome aberrations. *Kor. Biochem. J.* **21**, 525 (1988).
- 20) Lee, J. S., Lee, H. H., Park, K. H. and Park, S. D.: Effects of saponin on DNA strand breaks and replication inhibition induced by S-15-activated benzo(a)pyrene and 3-methylcholanthrene in Chinese hamster ovary cells. *Environ. Mutag. Carcin.*

- 10, 127 (1990).
- 21) Tang, W. and Eisenbrand, G.: "Chinese drugs of plant origin". Springer-Verlag, New York, p.891 (1992).
- 22) 陳維洲: 丹參의 藥理. 藥學學報 **19**, 876 (1984).
- 23) Koo, A.: Microvascular techniques for *in vivo* assay of vasoactive agents from Chinese medicinal herbs, in "Chinese medicinal materials research", World Sci. Publ. Co., Singapore, p.559 (1985).
- 24) Yokozawa, T., Chung, H. Y., Oura, H., Nonaka, G. and Nishioka, I.: Isolation of active component having uremia-preventive effect from *Salviae miltorrhizae* radix extract. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 316 (1988).
- 25) 백기주, 김기현, 김규원, 정해영: Magnesium lithospermate B의 항산화작용 기전에 관한 연구, 제 42회 대한약학회 학술대회 요지집, 대한약학회 (1993).
- 26) Goodenough, U.: "Genetics", Saunders College Pub., p.194 (1984).
- 27) Lewis, E. B. and Bacher, F.: Method of feeding ethyl methanesulfonate(EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila Infor. Serv.* **43**, 193 (1968).
- 28) Sankaranarayan, K., and Sobels, F. H.: "The Genetics and Biology of *Drosophila*", Vol. 1C, Academic Press, p.1089 (1976).
- 29) Choi, Y. H. and Lee, W. H.: Toxic and mutagenic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and ethidium bromide in *Drosophila melanogaster*. *J. Science, Pusan Nat. Univ.* **47**, 211 (1989).
- 30) Ikebuchi, M. and Teranish, Y.: Storage effects on sex-chromosome losses induced by triethylene melamine(TEM) and ethyl methansulfonate(EMS) in *Drosophila melanogaster*. *Jpn. J. Genet.* **56**, 145 (1981).