

## Colchicine과 EMS 처리에 의한 고추냉이의 변이체 유도

박기인\* · 윤명자\* · 권성환\*\* · 최선영\*\* · 이강수\*\*

### Effects of Colchicine and EMS on Induction of Variants in *Wasabia japonica* MATSUM

Kie In Park\*, Myung Ja Yoon\*, Sung Whan Kwon\*\*, Sun Yong Choi\*\* and Kang Soo Lee\*\*

**ABSTRACT** : This study was investigated to improve the rate of the seed germination of *Wasabia japonica* with GA<sub>3</sub> and BAP. The germination rate was 36% with 100ppm GA<sub>3</sub> only and 32% with 10ppm BAP only, while that was 65% with combination of 100ppm GA<sub>3</sub> and 10ppm BAP compared to that of 7.5% in control. This results show us that the most effect of germination rate was with 100ppm GA<sub>3</sub> and 10ppm BAP.

Mutagenesis was induced with mutagen, EMS and colchicine. Before the germination, the survival rate was 62% with 0.5% colchicine compared to that of 7% in control. After the germination, the 85% of developed seed was alive with treatment of 0.5% colchicine and 55% of those was alive with 0.06% EMS compared to that of 8% in control. We analyzed the karyotype and isozyme pattern of *Wasabia japonica* induced with colchicine and EMS. The tetraploid of *Wasabia japonica* was observed from *Wasabia japonica* treated with 0.5% colchicine, whereas it was not observed with 0.06% EMS. The peroxidase pattern of colchicine treated *Wasabia japonica* was different from nontreatment, but that of EMS treated *Wasabia japonica* was the same with normal one.

## 서 언

고추냉이 (*Wasabia japonica* Matsum)는 일본이 원산지로서 구주로부터 북해도에 이르는 지역에 넓게 분포된 다년생 초본류이다. 고추냉이는 근경과 전초에 독특한 매운 성분을 함유하고 있어 향신료로서 사용될 뿐 아니라 비타민 C의 산화억제작용,

베타 아밀라제 활성촉진, 식욕증진, 비타민 B1 합성증강, 항균성 등의 효과가 있어 건강식품으로도 각광을 받고 있으며, 국내에서도 생선 요리의 섭취에 따른 소비가 급증하고 있다. 그런데 국내에서는 고추냉이와는 근본적으로 다른 품종을 고추냉이의 대용품으로 식용하고 있다. 고추냉이는 생육적온이 8~20℃로서 여름에 시원하고 겨울에 따뜻한 해발 400~500m의 맑은 계곡에서 자라는 식물로 알

본 논문은 1994년도 교육부 학술연구조성비 (농업과학분야)에 의하여 연구된 결과 일부임.

\* 전북대학교 자연과학대학 생물학과 (Dept. of Biology, College of Natural Science, Chonbuk National University, Chonju 560 - 750, Korea).  
\*\* 전북대학교 농과대학 (College of Agriculture, Chonbuk National University, Chonju 560 - 750, Korea)

려져있다(李安 1995). 고추냉이의 연구는 주로 일본에서 이루어지고 있으며, 우리나라에서는 작물 시험장과 전북 농촌진흥원에서 수 년전부터 연구되어 왔으나 휴면타파 및 번식 등 아직도 재배방법 체계가 미흡한 실정이다. 고추냉이는 주로 분주 및 실생법으로 증식되고 있으며, 영양번식 방법으로 virus에 감염되기 쉬운 단점을 가지고 있다. 따라서 실생번식이 권장되고 있으나, 고추냉이는 발아 저해성 종자이므로 발아 및 재배관리에 문제점이 많아 일본등에서는 다량으로 발아시킬 수 있는 방법이 연구되고 있다. 다량 발아의 방법으로써 일반적으로 GA<sub>3</sub>로 휴면을 타파하여 파종하거나 총적법을 통하여 휴면을 타파하고 있다. 中村(1990) 등은 GA<sub>3</sub>가 발아에 미치는 영향, BAP나 thiourea에 의한 휴면타파, 발아 적온범위등, 발아에 대한 최적상태를 연구하였다. 細木(1986) 등은 부정아의 발생을 촉진시켜서 다량번식을 꾀하고 있으며, 경조직 및 화경조직에서 맹아를 신장시켜 분할법으로 증식시켰다. 또한 이들은 실생번식에서 나올 수 있는 유망형질인 내서성 계통의 선발에 조직배양을 응용하기도 하였다. 하지만 고추냉이의 우량 품종은 대부분 일대 교잡종이므로 관행의 종자번식으로는 교잡종의 우량 특성을 유지할 수 없는 실정이다. 따라서 고추냉이 품종 개량을 통하여 우량형질을 확보하여 까다로운 재배 조건에서도 생육이 잘될 수 있는 다수확 품종의 육성이 요구된다. 본 실험에서는 돌연변이체를 유도하기 위하여 고추냉이 종자에 colchicine과 EMS를 각각 처리하였으며, 이때 유도된 식물체의 염색체와 hydrogen peroxidase의 isozyme pattern 및 확인된 변이주의 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

고추냉이의 종자는 전라북도 농촌진흥원 무주군 농촌지도소와 경상북도 농촌진흥원 울릉도 농촌지도소에서 분양 받아 이용하였다.

### 1. 종자발아에 있어 식물 생장 조절물질의 영향

종자를 GA 및 BAP 0, 10, 50, 100, 150ppm용액에 3시간 침지한 다음, petri dish에 3장의 filter

paper를 깔고 petri dish당 5 ml의 증류수를 첨가하여 30립씩 3반복으로 치상하였다.

발아 조사는 치상 후 매일 실시하여 농도별 발아율을 계산 하였는데, 유근이 2mm이상 신장한 것을 발아한 것으로 간주하였다. 발아율은 공식 종자수에 대한 발아 종자의 백분율로 계산하였다.

### 2. Mutagen 처리에 의한 품종개량

개갑 직후의 고추냉이 종자를 사용하였으며, mutagen으로는 colchicine과 ethyl ester methane sulfate(EMS)를 증류수에 희석 하여 다양한 농도로 처리하였다. Col. 은 0.02, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0%로, EMS는 0.06, 0.12, 0.3, 1.2, 12%로 각각 처리 하였다.

#### 1) 발아 전 처리

petri dish에 filter paper를 깔고 그 위에 각 농도별 mutagen을 처리한 후, 한처리구 당 30립씩 치상하였다. 랩으로 싼 뒤에 몇 개의 구멍을 주고 18℃에서 발아시켰다. 발아 5일 후, 1.5 cm 정도로 발아되었을 때 혼합토(버미큘라이트 : 영양토 = 1 : 1)에 구역당 9개씩 옮겨 심었다.

#### 2) 발아 후 처리

버미큘라이트와 영양토를 1 : 1로 혼합하여 개갑 직후에 고추냉이 종자를 파종하였다. 18℃에서 충분한 수분을 공급하여 발아시켰으며, 3cm 정도 자랐을때 생장점(apical meristem) 부위에 mutagen(colchicine, EMS)을 처리하였다.

#### 3) 염색체 조사

각 mutagen을 처리한 후 자란 식물체의 줄기 및 뿌리의 정단분열조직을 각각 채취한 다음, 0.05% colchicine에 침적시켜 암 상태의 실온에서 3시간 동안 처리하였다. 증류수로 3~4회 세척하여 acetic acid : alcohol(1 : 3)에 1시간 고정하고, 70% ethanol에 넣어 4℃에 냉장 보관하였다. 고정된 재료는 증류수로 수세하여 60℃ 1N HCl에 10분간 가수 분해한 후 증류수와 45% acetic acid로 세척하였다. 세척 후 corbal fuchsin 염색액에 약 30~40분 동안 염색하여 압착, 검경하였다.

#### 4) Isozyme의 분석

채취된 재료를 중성세제와 수돗물로 씻은 다음 증류수로 행구고 나서 filter paper로 물기를 닦아내고, buffer 와 함께 재료를 갈아 생성되는 즙액을 filter paper에 묻혀 0.7% agarose gel 상에 흡착, 4°C에서 수평식 전기 영동을 실시하였다.

hydrogen peroxidase를 위한 염색은 0.5 g의 benzidin을 초산(5ml)에 완전히 녹인 후 120ml의 증류수와 혼합하여 9% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣어서 전기영동이 끝난 gel에 부어 hydrogen peroxidase를 발색시켰다(문두길 1986).

### 결과 및 고찰

#### 1. 종자발아에 있어 식물 성장 호르몬의 영향

종자발아에 있어서 식물 성장 호르몬은 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 GA에 의한 종자의 휴면 타파(Hsiao 1970 : Bannerjee and Padforth, 1967)와 BAP로 인한 세포분열촉진은 종자 내에 있는 유근의 신장에 영향을 주어, 종피를 뚫고 발근이 빠르게 이루어진다. 종자 발아에 미치는 GA<sub>3</sub>와 BAP를 처리 하여 고추냉이의 발아율을 조사한 결과는 다음과 같다.

##### a) GA<sub>3</sub> 단독 처리시의 영향

GA<sub>3</sub>가 고추냉이 종자발아에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 0, 10, 50, 100, 150 (ppm) 농도로 각각 처리하여 조사한 결과, 무처리에서는 7.5%, GA<sub>3</sub> 10ppm에서 5%, 50ppm에서 12%, 100ppm에서 36%, 150ppm에서 6%의 발아율을 보였다(Fig. 1). 본 실험으로 GA<sub>3</sub>의 적정농도는 100ppm임을 알 수 있었다. 하지만 100ppm이상의 고농도에서는 오히려 발아가 억제되는 현상을 보였다. 이러한 결과로 볼 때 고추냉이의 종자 휴면 타파와 유근 및 유경의 성장에는 GA<sub>3</sub> 100ppm에서 가장 효과적인 것으로 나타났다.

##### b) BAP 단독 처리시의 영향

BAP와 고추냉이 종자발아와의 관계를 알아보기 위해서 GA<sub>3</sub>와 동일한 농도로 처리하여 조사한 결과, 무처리에서 7%, BAP 10ppm에서 32%,

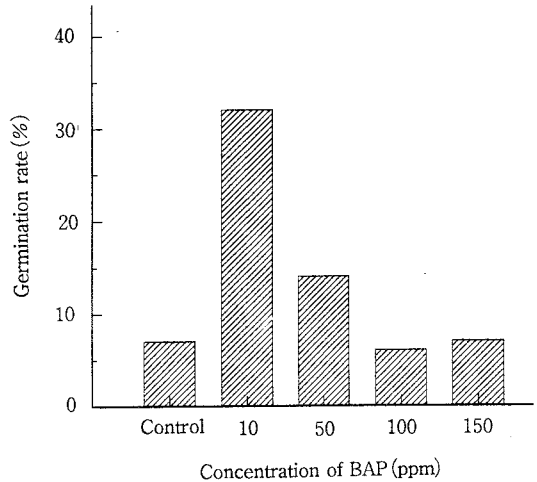


Fig. 1. Effects of GA<sub>3</sub> on the germination of *Wasabia japonica* seeds.

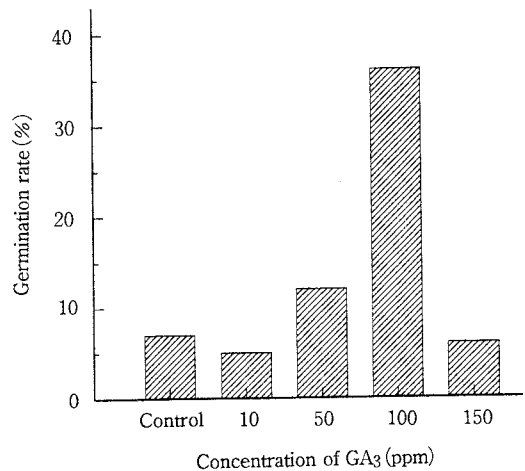


Fig. 2. Effects of BAP on the germination of *Wasabia japonica* seeds.

50ppm에서 14%, 100ppm에서 6%, 150ppm에서 7%의 발아율을 보임으로써 BAP의 적정 농도는 10ppm임을 알 수 있었다(Fig. 2). 위와 같은 결과로 볼 때 GA<sub>3</sub> 100ppm 과 BAP 10ppm에서 고추냉이 종자발아에 가장 효과적인 것으로 나타났다. 그리고 휴면 타파에 영향을 주는 GA<sub>3</sub>와 세포 분열과세

포 신장에 영향을 주는 BAP처리는 모두가 고추냉이의 발아에 효과적인 것으로 생각되었다.

c) GA<sub>3</sub>와 BAP 조합 처리시의 영향

위의 GA<sub>3</sub>와 BAP 단독처리시의 영향을 조사한 결과, GA<sub>3</sub> 처리시 적정 농도를 100ppm으로 얻었기에 GA<sub>3</sub> 100ppm과 BAP의 농도를 다양하게 조합처리 (GA<sub>3</sub> 100ppm+BAP 10ppm, GA<sub>3</sub> 100ppm+BAP 50ppm, GA<sub>3</sub> 100ppm+BAP 100ppm, GA<sub>3</sub> 100ppm+BAP 150ppm) 하여 고추냉이 종자의 발아율을 조사한 결과, 무처리 8%, GA<sub>3</sub> 100ppm+BAP 10ppm 처리시 65%, GA<sub>3</sub> 100ppm+BAP 50ppm 처리시 32%, GA<sub>3</sub> 100ppm+BAP 100ppm 처리시 14%, GA<sub>3</sub> 100ppm+BAP 150ppm 처리시 12%의 발아율을 보였다 (Fig. 3). 이와 같이 GA<sub>3</sub>와 BAP를 조합처리 하였을 때 GA<sub>3</sub>, BAP 단독처리시 보다는 높은 발아율을 보였다. 따라서 위의 두 가지 호르몬의 다양한 농도에서 발아율을 조사한 결과 고추냉이 종자 발아에는 GA<sub>3</sub> 100ppm+BAP 10ppm이 가장 효과적으로 나타났다. 일반적으로 종자의 휴면을 타파 하여 발아율을 높이는 데는 GA<sub>3</sub> 및 GA<sub>3</sub>와 BAP조합의 효과가 많이 연구되어왔다. 본 실험에서는 발아에 미치는 GA<sub>3</sub>와 BAP의 효과는 이미 보고된 *崔와李 (1994)*의 결과와 유사한 경향으로 나타났다.

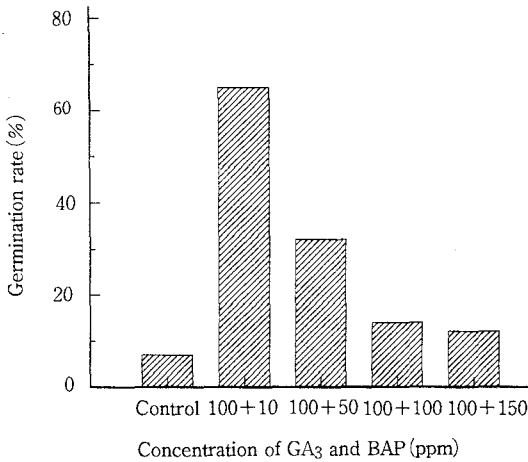


Fig. 3. Effects of combination of GA<sub>3</sub> and BAP on the germination of *Wasabia japonica* seeds.

2. Mutagen 처리에 의한 돌연변이체 유도

일반적인 고추냉이 육종법은 순계분리법, 집단선발법, 교잡육종법, 배수체 육종법이 있으며, 본 실험에서는 배수체 육종법으로 염색체의 배수체를 유도하여 이때 생기는 유전적 변이를 이용하는 것이다. 따라서 고추냉이의 품종을 개량하고 우량형질을 확보하여 재배를 용이하게 하고, 까다로운 재배조건들을 해결할 수 있는 다수확 품종을 육성하기 위하여 colchicine과 EMS의 mutagen을 발아전과 발아 후 고추냉이 종자에 농도 별로 처리하여 염색체 변이를 조사하였다.

a) 발아 전 돌연변이원 처리

돌연변이를 유도하기 위하여 고추냉이 종자를 petri dish 상에 colchicine과 EMS를 여러 농도로 처리한 결과, colchicine의 경우 무처리에서는 83%의 높은 생존율을 나타내었으며 0.02%의 낮은 농도에서 30% 정도의 생존율을 보이는 반면에 0.5%에서 가장 높은 62%의 생존율을 보였다 (Table 1). 하지만 2.0%의 높은 농도 처리에서는 생존하지 못

Table 1. Germination percent of *Wasabia japonica* by colchicine and EMS treatments on petri dish.

Mutagen	Concentration (%)	No. tested seeds	No. germinated seeds	Percent germination (%)
colchicine	0.00	30개	25	83
	0.02		9	30
	0.1		10	32
	0.2		5	16
	0.5		19	62
	1.0		16	56
	2.0		0	0
EMS	0.00	30개	25	83
	0.06		11	36
	0.12		10	32
	0.3		0	0
	1.2		0	0
	12		0	0

하였다. 또한 EMS를 처리한 실험군에서는 0.06% 처리시 36%의 생존율을 보였으며, 0.3% 이상 처리시 는 전혀 생존하지 못한 것으로 보아, EMS 처리는 고추냉이 종자에 치명적인 돌연변이원이라 생각되었다.

b) 발아 후 돌연변이원 처리

고추냉이를 발아시켜 3cm 정도 자란 후, 생장점 부위에 colchicine, EMS를 여러 농도로 처리하여 식물체 생존에 미치는 영향은 Table 2에서 보는바와 같다. colchicine의 경우 무처리에서는 91%의 생존율을 나타내었으며 전체적으로 60~80%의 생존율을 보였고, 특히 0.5% 처리시 86%의 높은 생존율을 나타냈다. 또한 EMS 처리는 무처리에서는 91%를 나타내었으며 전반적으로는 낮은 생존율을 보였는데, 0.06%인 경우만이 55%의 비교적 높은 생존율을 보였다. 발아 전과 발아 후 colchicine과 EMS 처리에 따른 생존율은 모두 colchicine 처리가 EMS보다 높았다. 또한 처리농도에 있어서도 colchicine의 경우 0.5%가 발아 전과 발아 후 가장 높은 생존율을 보였으며, EMS는 0.06% 처리에서 가장 높은 생존율을 보였다. Mutagen처리에 따른 식물체의 염색체에 미치는 영향을 알아보기 위하여 colchicine 0.5%, EMS 0.06% 처리로 얻어진 식물체의 핵형을 조사하고 isozyme pattern을 분석하였다.

Table 2. Percent of survived plants by colchicine and EMS treatments on seedling stage in *Wasabia japonica* seeds.

Mutagen	Concentration (%)	No. tested plants	No. survived plants	Percent survived plants
colchicine	3.0	45개	26	62
	1.0		27	60
	0.5		39	86
	0.15		32	70
	0		41	91
EMS	0.6	45개	13	29
	0.3		11	24
	0.12		17	38
	0.06		25	55
	0		41	91

c) 핵형 조사

고추냉이의 체세포 핵에는 28개의 염색체가 있다 ( $2n=28$ ). 그 염색체상에는 고추냉이의 각각의 형질을 표현하는 유전자가 배열되어있어 고추냉이의 품질을 지배하고 있다. colchicine과 EMS처리 후 성장한 식물체의 염색체를 분석한 결과, 정상적인 고추냉이의 핵형은 Fig. 4에서와 같이  $2n=28$ 개의 염색체를 보이는 반면, colchicine을 생장점에 처리하여 성장한 식물체에서는 다수의 4배체 핵형을 볼 수 있었다. 이러한 colchicine 처리의 배수체 유도는 1981년 (靜岡縣 立富士西高)의 後勝이 자엽의 생장점에 0.4% colchicine을 처리하여 4배체의 고추냉이를 만든 것을 보고하였고, 1993년 경북 농촌진흥원에서 0.01~0.2%의 colchicine용액을 처리한 개체에서 배수체가 유도됨을 보고한 바 있다.

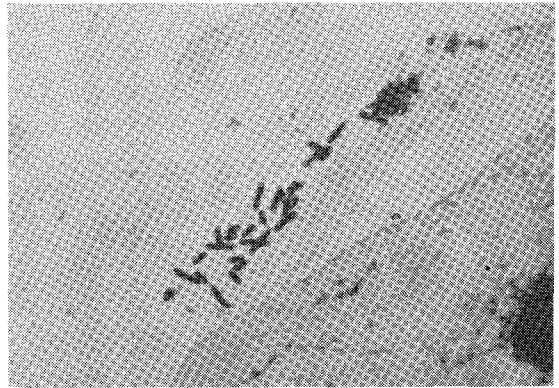


Fig. 4. Karyotype of normal *Wasabia japonica*.

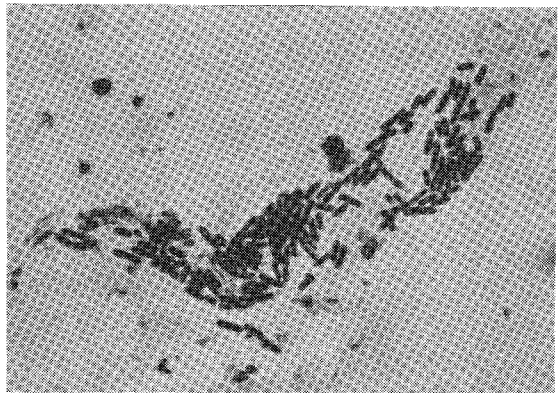


Fig. 5. Karyotype of tetraploidy mutant of *Wasabia japonica* treated with colchicine.

앞서 보고된 실험에서 사용한 colchicine 농도와 본 실험에서 사용한 colchicine 농도에서는, 본 실험에서 사용한 농도가 약간 높은 차이점이 있으나, 앞선 연구에서 colchicine 처리로 배수체가 생성된 결과와 유사하다고 생각되었다. 또한 EMS를 처리한 식물체에서 배수체가 발견되지 않음은 EMS 처리에 의한 돌연변이체가 핵형의 숫자적인 변화가 아닌 구조적 변화를 유발하기 때문으로 생각되었다. 교잡 육종법으로 염색체를 배가하여, 이때 생기는 유전적 변이를 이용하는 배수성 육종법에서 볼때 식물의 염색체가 배수가 되면 영양기관이 비대 되는데, 고추냉이는 영양기관을 이용하는 작물이기 때문에 배수체의 작출은 근경의 비대 촉진에 상당한 효과가 있을 것으로 추정되었다.

#### d) Isozyme pattern

Parfitt등(1985)은 여러 작물에서 특정한 효소의 분석은 유전의 표지로 이용할 수 있다고 보고하였다. 또한 많은 학자들이 isozyme pattern을 분석하여 그 결과에 따라 식물을 분류하기도 하였다 (Crawford, 1983). 본 연구에서는 colchicine 또는



Fig. 6. Isozyme pattern of hydrogen peroxidase of *Wasabia japonica* on 0.7% agarose gel electrophoresis.

EMS를 처리하여 성장한 식물체의 isozyme pattern을 비교 분석하였다. 정상적인 식물체와 colchicine 또는 EMS를 처리한 식물체의 hydrogen peroxidase pattern을 분석하여 본 결과, 정상 대조군과 EMS를 처리한 식물체의 isozyme pattern은 같은 양상으로 3개의 bands를 보이나, colchicine를 처리한 식물체는 두 실험군과는 다르게 하나의 band만이 나타났다(Fig. 6). 이 결과로 볼때 돌연변이 유발원으로 많이 이용되는 colchicine은 배수체를 유발하였고, 배수성의 돌연변이체는 정상 식물체와는 다른 hydrogen peroxidase pattern을 보였다. 본 실험의 결과로는 colchicine 처리로 인한 염색체의 배수체 형성과 hydrogen peroxidase pattern의 변화에 대한 어떤 정확한 관계를 결론적으로 알 수는 없으나, 앞으로 여러 유전적인 특성을 조사하면 이에 대한 보다 확실한 관계를 알 수 있을 것으로 생각되었다.

## 적 요

*Wasabia japonica* 종자의 성장조절물질에 의한 발아율 돌연변이 유도, 유도체의 핵형 분석과 isozyme pattern을 조사한 결과는 다음과 같다.

1) 고추냉이의 종자 발아는  $GA_3$  100ppm 처리 시 36%, BAP 10ppm 처리 시 32%,  $GA_3$  100ppm + BAP 10ppm 조합 처리 시 65%의 높은 발아율을 나타냈다.

2) colchicine과 EMS처리로 인한 돌연변이 유도에 따른 생존율은 발아전 처리의 경우 colchicine 0.5%일때 62% 생존율을 보이며, 발아 후 처리는 colchicine 0.5% 일때 85%, EMS 0.06% 일때 55%의 생존율을 보였다.

3) colchicine 과 EMS처리로 유도된 식물체의 핵형 분석은 colchicine 0.5%처리로 유도된 식물체에서 다수의 4배체를 관찰할 수 있었으며, EMS 0.06% 처리의 유도체에서는 정상 배수체 만이 관찰되었다.

4) 돌연변이원으로 유도된 식물체의 peroxidase pattern은 colchicine 처리 식물체가 정상체와 다른 양상(1 band)을 보이는 반면, EMS 처리 식물체는 정상체와 같은 양상(3 band)을 보였다.

## 인용문헌

1. 中村俊一郎 1985. 와사비 종자의 배양에 관한 연구. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 59 (3) : 579 - 587.
2. 中村俊一郎 1990. 와사비 종자의 발아에 관한 연구. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 59 (3) : 573 - 577.
3. 최선영, 이강수 1994. 식물 성장 조절물질이 고추냉이의 발아와 유근생장에 미치는 영향. K. J. Medical Crop Sci. 3(2) : 111 - 115.
4. Kochba, J., S. Lvee, P. Spoegel-Roy 1977. Differences in peroxidase activity and isozyme in embryogenic and nonembryogenic shamouti orange ovular callus lines. Plant & Cell Physiol. 18 : 463 - 467.
5. Van t Hof, J. C. J. Kovacs 1980. The principle control point hypothesis. Ad. Exp. Med. Biol. 15 - 32.
6. Crawford, D. J. 1983. Phylogenic and systematic inferences from electrophoretic studies. 257 - 287.
7. 李盛雨, 安炳玉 1995. 고추냉이(와사비) 재배법 - 일본의 고추냉이 재배법과 국내 연구 결과 소개 - 사단법인 농진회.
8. 細木高志. et. al. 1988. 고추냉이 조직배양묘의 증식. 농지원 63(5) : 83 - 84.
9. 文斗吉 1986. 제주 재래 감귤의 동위원소 분석과 교잡 실생의 조기 식별에 관한 연구. 서울대학교 박사 학위 논문 27 - 31.
10. 李奉鎬 1993. 향신 작물 고추냉이의 특성과 재배기술. 연구와 지도 34(2) : 50 - 55.