

큰용담 (*Gentiana axillariflora* L.) 기내배양에서 화학돌연변이원 처리에 의한 돌연변이주 유기 및 RAPD 분석

임정대 · 김명조 · 유창연*
강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부

Induction and RAPD Analysis of Mutant Plants by Chemical Mutagens in *Gentiana axillariflora* Leveille

LIM, Jung Dae · KIM, Myong Jo · YU, Chang Yeon*
Division of Applied Plant Science, College of Agriculture & Life Sciences,
Kangwon National University, Chunchon, 200-701, Korea

ABSTRACT In order to induce the mutants of *Gentiana axillariflora* Leveille, nodes were cultured on Schenk and Hilderbrandt (SH) medium containing TDZ 2 mg/L, BAP 2mg/L, GA3 0.5 mg/L and 0.1 mg/L NAA and each mutagen of ethylmethanesulfate (EMS), colchicine, N-methyl-N-nitrosourea (MNU), and sodium azide (NaN₃) through filtration. Comparison of morphological characteristics and survival rate in each mutant plants differed depending on mutagen sources and their concentrations. When EMS were treated on nodes, the regenerated plants was thin and albino, regenerated shoots appeared 'erectoides type' and get twisted. The case of colchicine were treated on nodes, the survival rate was from 84% to 97% at all concentration after 30days but the rate of survival was decreased about 50% at 200 μM after 60days. The treatment of NaN₃ 200 μM was not survived. The survival rate was extremely decreased in MNU treatment at 500μM, according to concentrations two types of leaf characteristic were obtained. Type I of leaf characteristic was modified from oblanceolate to oboid at leaf shape and type II of leaf characteristic was modified from light green to dark violet at leaf color. RAPD analysis was carried out to check the genetic modification of regenerated plants by mutagen treatments. Three polymorphic DNA fragments out of thirty-seven obtained by RAPDs were observed in regenerated plants using 5 decamer primers.

Key words : Colchicine, EMS, *in vitro* mutagenesis, MNU, sodium azide

서 론

큰용담 (*Gentiana axillariflora* Leveille.)은 용담과에 속하는 속근성 다년초로서 우리나라 산야에 자생하며 꽃은 초여름부터 가을에 걸쳐서 피며 꽃색은 청자색으로 아름답게 피기 때문에 최근 절화용으로 이용되고 있다. 뿌리에는 건위 효

능이 있는 생약성분인 gentiopicoside를 함유하고 있어 한방에서 식욕부진이나 소화불량에 대한 내복약으로 처방되어 왔다. 용담은 생육지역에 따라 gentiopicoside 함량의 차이가 나타나는 것으로 보고되어 있으며 (Hayshi 1976; Yamada et al. 1991), 야생용담과 재배용담을 재료로 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 분석을 통해 지역과 계통에 따른 유전적 유사도를 분석한 결과가 보고 (Lee et al. 1996) 되어 있다. 또한 조직배양을 이용하여 기내유용변이주 유도에 관한 시험을 수행하고 얻어진 변이주로 gentiopicoside 함량을 비교하여 얻어진 결과가 보고되어 있다 (Seong et al.

1995).

돌연변이원을 처리하여 고등식물체에서 유용 변이체를 선 발하는 방법은 많은 연구자들에 의하여 사용되고 있으며 UV, X-ray, 감마선 등을 이용하는 것보다 변이체 유기의 효 율이 높은 화학돌연변이원을 사용하는 것이 Oehikers (1943) 에 의해 보고된 이래 많이 사용되고 있다. 또한 20세기에 들 어 기내배양기술의 급진전함에 따라 조직배양을 사용한 육종 이 유전적 향상과 관련하여 매우 유용하게 사용되고 있다. 기 내배양을 이용한 돌연변이육종의 장점은 돌연변이물질의 처 리와 선발물질의 분포가 균일하다는 점과 육종연한을 단축시 킬 수 있고, 한 개의 단일한 조직으로부터 전체식물체로 재분 화 할 수 있다는 것이다. 반면에 일반적으로 사용되는 배양방 법으로는 정상적인 식물체로 재분화 시키기가 어렵고, 전체식 물체와 배양되는 조직자체의 유전자가 종종 다른 양식으로 발현하고, 선발과정에서 변이주의 발현이 모두 유전적인 것에 기인하지 않는다는 단점이 있다 (Constantin 1984).

또한 최근 식물의 유전자 분석에 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 이용한 RAPD분석이 많이 사용되고 있으며 이 것은 염기서열에 대한 정보 없이도 DNA의 다형 현상을 조 사할 수 있으며 (McGarvey and Karper 1991) 인위적으로 제 조한 random-primer를 이용한 DNA 다형현상의 분석은 유 전적 marker를 쉽게 탐색할 수 있는 장점이 있어 (Williams et al. 1990) 돌연변이원의 처리를 통해 얻은 재분화 식물체의 유전적 특성을 확인하는 데에도 유용하게 이용되고 있다.

따라서 본 연구는 기내배양을 통해 화학돌연변이원을 처리 하여 변이체를 유기하고 선발하는데 있어서 최적 돌연변이원 의 종류와 농도를 구명하고 RAPD 분석을 통해 유기된 돌연 변이체에 대한 분자유전학적인 변이를 조사하기 위하여 실시 하였다.

재료 및 방법

기내배양에 의한 돌연변이 식물체 유기

본 실험에서 사용한 재료는 기내에서 형성된 multiple shoot의 줄기마디 (0.5 cm) 부분을 사용하였다 (Lim and Yu, 2000). 배지는 Schenk and Hilderbrandt (SH)배지를 기본으 로 사용하였으며 thidiazuron (TDZ) 2 mg/L, BAP 2 mg/L, GA₃ 0.5 mg/L과 0.1 mg/L의 NAA를 조합처리 하였으며 돌 연변이원으로는 ethylmethanesulfate (EMS) colchicine, N-methyl-N-nitrosourea (MNU), sodium azide (NaN₃)를 각각 10, 30, 50, 80, 100, 200, 500 μM의 농도로 멸균여과 하여 배 지에 첨가하였다. 배양은 23°C, 16시간 광조건에 30~60일 동 안 배양하고 생존률과 성장비율 및 형태적 특성을 비교하였 다.

유도된 변이체의 RAPD 분석

돌연변이원을 처리한 배지에서 재분화한 식물체의 유전적 변이성 여부를 조사하기 위하여 돌연변이물질이 처리된 배지 에서 재분화 식물체를 각각의 농도에 따라 선발하였고 돌연 변이물질이 처리된 배지에서 재분화된 식물체와 모식물체의 잎조직에서 DNA를 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) 방법으로 추출하였고, DNA의 유무를 결정하기 위 하여 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.

최적의 증폭조건은 5 ng template DNA, 2.5 μM의 primer 4 μL (Operon, Ameda, CA, USA), 1.25 mM의 dNTP 4 μL, 10×buffer 2.5 μL (with MgCl₂), 2.5U Taq polymerase 0.5 μ L (Biotool)를 포함하는 반응액 25 μL를 사용하였으며 pre-denature 94°C 5분, denaturation 94°C 1분, annealing 35°C 1 분, extension 72°C 2분 (45cycle); post-elongation 72°C 10 분으로 정하였다. Primer screen 작업을 실시하여 그 중 band 가 형성되지 않은 것과 다형성 band가 형성된 primer를 제외 시키고 5개의 primer (OPA-01 : CAGGCCCTTC, OPA-02 : TGCCGAGCTG, OPA-08 : GTGACGTAGG, OPA-09 : TGCGCCCTTC, OPA-14 : TCTGTGCTGG)를 선정하여 변이성을 관찰하였다. 각 각의 실험은 2반복으로 실시하였고 major band와 minor band가 형성되었고 그 중 재현성의 문 제가 되거나 기내배양에 의한 변이의 경우를 제외시킨 후 변 이성 여부를 조사하였다. 기내배양에 의한 변이band의 제외 는 돌연변이원을 처리한 배지에서 재분화된 식물체의 RAPD 의 pattern과 기내배양된 식물체를 무작위적으로 선택하여 수 행한 RAPD pattern을 비교하여 제외하였다.

결과 및 고찰

기내배양에 의한 돌연변이 식물체 유기

본 연구에서 사용된 배지는 SH배지에 TDZ 2 mg/L, BAP 2 mg/L, GA₃ 0.5 mg/L과 0.1 mg/L의 NAA를 조합하여 사 용하였는데 이것은 저자들에 의하여 보고 (Lim and Yu 2000) 된 바 있는 큰용담의 multiple shoot를 유기 하였던 배 지를 일부 변형하여 사용한 것이고 이것은 보통의 경우 배양 에서의 치상조직의 재분화와 조직의 지속적인 성장을 위하여 배지에 성장호르몬을 첨가하는 것이며 특히 높은 농도로 처 리하게되면 유전적인 불안정성을 유발시킬 수 있고 자연발생 적인 변이도 유발할 수 있을 뿐 만 아니라 보통의 배양방법 으로는 정상적인 식물체를 육성할 수 없었기 때문이다.

용담으로부터 유용돌연변이주를 얻고자 돌연변이 유발원으

로 널리 이용되고 있는 EMS, colchicine, MNU, sodium azide 용액을 농도별로 배지에 처리하여 기내의 줄기마디 조직을 배양한 결과는 table 1과 같다. 30일 배양 후 생존률은 EMS와 sodium azide를 처리한 경우 농도가 높아질수록 생존률이 저하되었으나 colchicine의 경우 전 농도에서 84~97%의 높은 생존률을 보였다. MNU의 경우 10 μ M에서 200 μ M까지는 89~97%의 높은 생존률을 보이다가 500 μ M이상에서는 18.2%로 급격한 감소를 보였다.

형성된 shoot의 길이를 비교하여 보면 30일 경과 후 sodium azide, MNU를 처리한 경우에는 약 1.0 cm 내외인

반면 colchicine의 경우 0.5 cm 내외로 저조한 길이 생장을 보였다 (자료 미제시). 배양 60일의 경우에는 EMS의 경우 농도가 높아질수록 생존율은 반비례적으로 저하되었지만 500 μ M인 경우에 30일과 동일한 수준을 보였다. Colchicine 처리 시 30일 배양 시에 농도별로 생존률에 차이가 없던 것이 60일이 경과하면서 농도에 따라 차이를 보였다. 이것은 용담에 colchicine을 처리할 때에는 60일 이상 배양하여야 번이체를 선발하는데 효과적이라는 것을 나타낸다. Sodium azide를 처리한 경우 60일 배양 시 전반적으로 30~50%의 균일한 생존률을 보였다 (Table 1).

Table 1. Effect of mutagens on *in vitro* node culture of *Gentiana axillaryflora* Leveille.

Treatment concentration (μ M)	No. of lateral bud cultured	30 days		60 days		Plant growth ^a
		No. of shoots survived	(%)	No. of shoots survived	(%)	
Control	44	43	98.1	43	98	+++
EMS	10	40	87.5	15	37.5	
	30	43	88.4	16	37.2	
	50	53	73.6	13	24.2	
	80	38	65.8	11	28.9	++
	100	45	46.7	11	24.4	
	200	44	61.4	22	50.0	
	500	29	11	37.9	11	37.9
Colchicine	10	43	95.3	35	81.4	
	30	41	92.7	30	73.2	
	50	39	89.7	23	59.0	
	80	45	93.3	24	53.3	+
	100	50	84.0	21	42.0	
	200	46	87.0	25	54.3	
	500	33	32	96.9	7	21.2
MNU	10	42	97.6	41	97.6	
	30	36	95.0	34	95.0	
	50	33	97.0	32	97.0	
	80	46	93.5	43	93.5	+++
	100	42	95.2	40	95.2	
	200	49	89.8	44	89.8	
	500	44	8	18.2	4	13.0
NaN ₃	10	51	97.0	18	35.3	
	30	55	81.9	30	54.5	
	50	40	60.0	22	55.0	
	80	29	82.8	16	55.2	+++
	100	47	36.2	8	16.7	
	200	40	40.0	12	30.0	
	500	45	20	44.5	17	37.8

+:poor, ++:moderate +++:good

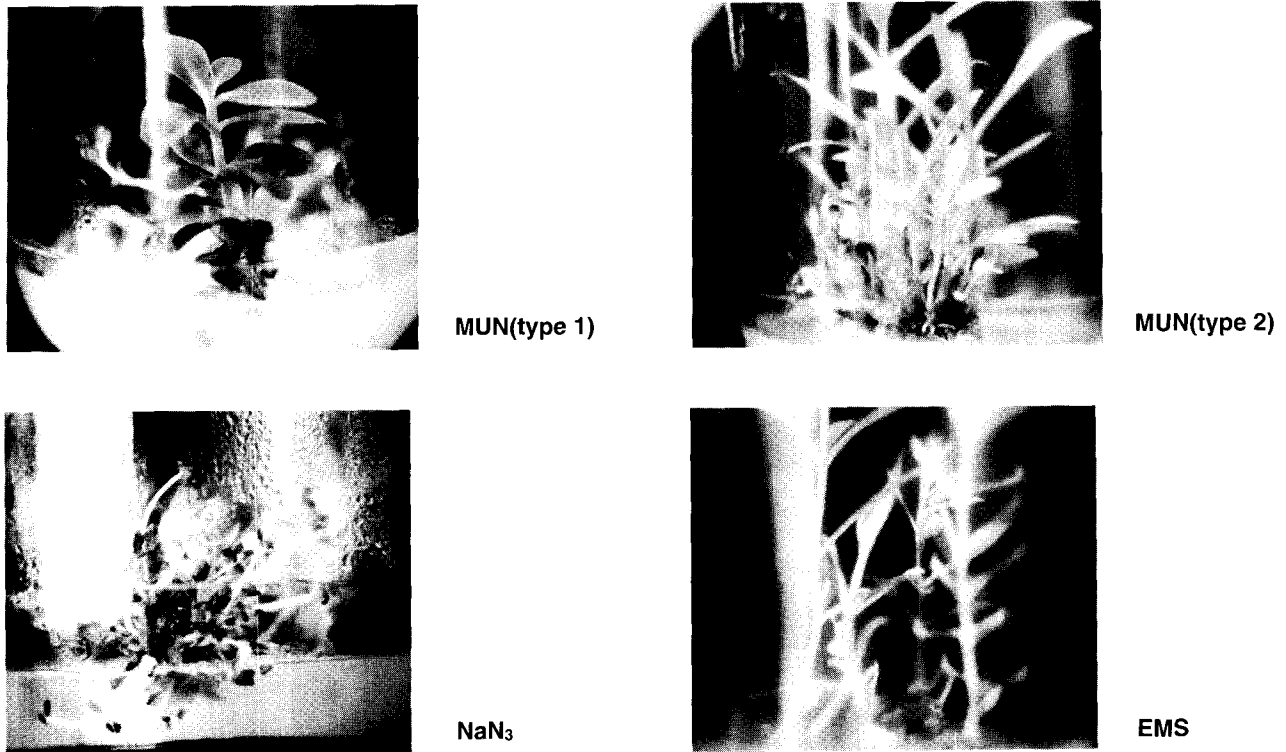


Figure 1. Mutant plants in *Gentiana axillaryflora* Leveille.

유기된 옹담 돌연변이체의 특성

배양 60일 후 관찰된 돌연변이원의 처리에 대한 식물체의 표현형은 잎에 있어서 얼룩의 형성과 백화현상, 잎의 협소화 그리고 성장저해 등으로 나타났다. 본 실험에서는 albino의 출현을 정확히 측정하기는 어려웠으며 EMS의 처리 경우 얼룩이 형성되고 줄기가 꼬여있으며 잎이 가늘고 엽선이 길며 전체적으로 '곧추서는 형'이 나타나 보리에 EMS를 처리한 경우에 chlorophyll mutant 뿐만 아니라 형태적 특성이 erectoides-type으로 나타났다는 보고 (Ehrenberg et al. 1961)와 유사한 결과를 보였으며 EMS처리가 돌연변이원 중 가장 백화현상이 심하게 나타났다.

Colchicine처리에서 나타나는 현상은 생장이 저해되고 식물체가 고사하는 특성을 보였으며 전체 297개의 치상 조직으로부터 단 2개의 조직이 식물체로 재분화 하였는데 형태적인 특성은 뿌리가 비대해지고 그 속이 비어 있는 특성을 나타내었다.

MNU의 처리에서는 무처리 식물체 잎 형태가 도피침형에서 주걱형이나 도란형으로 변형된 것이 나타났으며 줄기가 비후하고 엽육이 두꺼운 형태의 모양이 나타났다. 또한 또다른 표현형으로 잎이 협소하고 길며 탈색되고 진보라색의 얼룩이 형성된 것이 많이 나타났다.

Sodium azide 처리에서는 전반적으로 초장이 아주 작고 다수의 분지수를 가지게 되는 위축형의 변이주가 관찰되었다.

돌연변이원 처리에 따른 식물체의 외형상 특징 중 엽록소가 결핍된 albino는 식물의 돌연변이 유기시 빈번하게 발생하는데 이는 식물체 genome 상에 엽록소 결핍 표현형에 관련된 유전자가 변화하였기 때문일 것으로 사료된다 (Figure 1).

MNU를 기내에 돌연변이 처리한 경우에는 2가지 type의 돌연변이 형태가 나타났다. Type I은 잎이 도란형으로 나타나는 것이고 type II는 잎이 협소하여지고 백화현상을 일으키는 것이다. MNU의 농도에 따라 이러한 2가지 type의 빈도는 각기 다르게 나타나는데 type I의 경우 50 μM 까지 농도가 높아질수록 출현빈도가 낮아지다가 80 μM 에서는 가장 높게 나타났으며 그 이상의 농도에서는 출현하지 않았다 (Figure 2).

유기된 돌연변이체의 RAPD에 의한 변이분석

RAPD에 의한 돌연변이체의 확인에서 25개의 primer 중 5개의 primer가 선발되었으며 2개의 primer (MNU-OPA1, NaN_3 -OPA9)에서 돌연변이 계통간에 한 개 이상의 DNA 변이가 발견되었으며 돌연변이원의 농도는 가장 높은 500 μM 에서 변이 band가 관찰되었다 (Figure 3).

기내 배양된 식물체의 RAPD 분석 결과 band가 형성되지 않거나 다형성 band와 기내 배양에 의한 변이의 경우를 제외하고 전체 25개의 primer에서 37개의 RAPD marker bands가 관찰되었고 모식물체에는 없고 돌연변이계통에서 새로 형

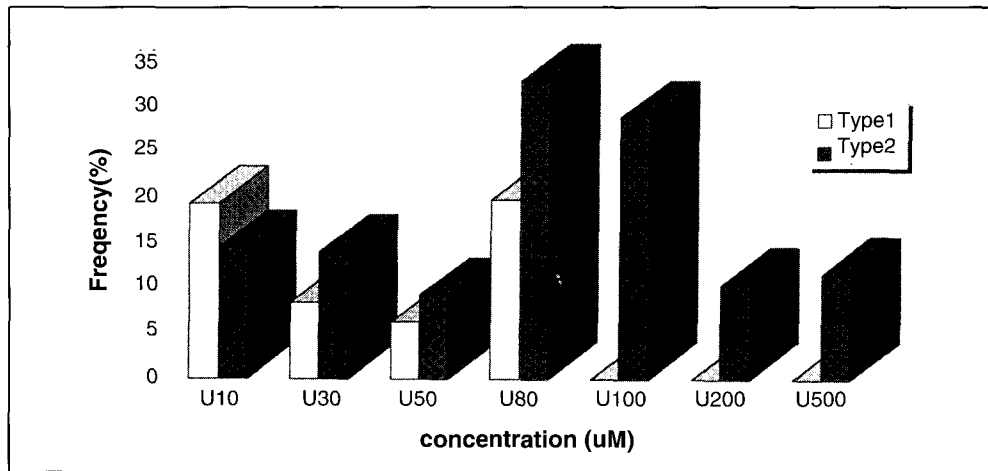


Figure 2. Frequency of mutant plant types by MNU treatments in *Gentiana axillaryflora* Leveille.

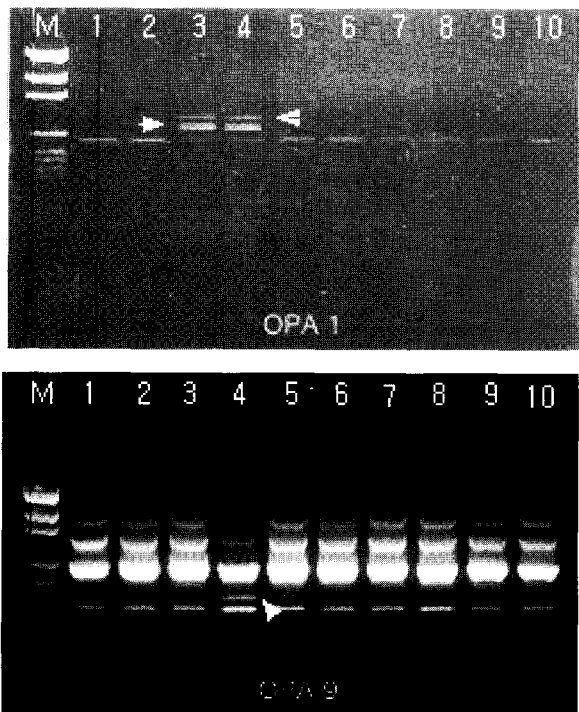


Figure 3. Ethidium bromide-stained agarose gel of amplified sequences from a RAPD reaction directed by random primers using DNA extracted from mutagen-treated regenerants of *Gentiana axillaryflora* L. Three novel bands are indicated by arrows. (left panel: OPA1-primer; right panel: OPA9-primer; M-marker DNA; lane1-3: 500 μ M; 4-6: 100 μ M; 7-9: 50 μ M; 10-control).

형성된 band의 수는 MNU에서 2개 NaN₃에서 1개로 전부 3개 (8.1%)의 변이 band가 나타났다.

선발하기에 최적의 농도는 200 μ M이며 농도가 높아질수록 생존률이 저하되었으며 줄기는 가늘고 나선형으로 꼬이고 백화현상이 가장 심하였다. Colchicine의 경우 30일까지는 전 농도에서 84~97%의 높은 생존률을 보였으나 60일 이후에는 농도에 따라 생존률의 차이가 보였다 변이체가 단간이며 왜소하였다. MNU의 경우 10 μ M에서 200 μ M까지는 89~97%의 높은 생존률을 보이다가 500 μ M이상에서는 18.2%로 급격한 감소를 보였으며 변이체의 잎의 형태가 도피침형에서 주걱형과 도란형으로 변형된 것과 잎의 청색에서 진보라색으로 변형된 2가지 type의 변이체가 형성되었다. Sodium azide를 처리한 경우 적정농도는 80 μ M였고 60일 배양 시 전반적으로 30~50%의 균일한 생존률을 보였고 초장이 아주 작고 다분얼성 변이체를 형성하였다. 형성된 shoot의 길이를 비교하여 보면 sodium azide, MNU의 경우에는 약 1.0 cm 내외인 반면 colchicine의 경우 0.5 cm 내외로 저조한 길이 생장을 보였다. RAPD에 의한 돌연변이체의 확인에서 농도가 가장 높은 500 μ M에서 변이 band가 관찰되었으며 돌연변이계통에서 새로 형성된 band의 수는 MNU에서 2개 NaN₃에서 1개로 전부 3개 (8.1%)의 변이 band가 나타났다.

사사 - 본 논문은 과학기술부 생명공학기술개발사업 연구비 (Grant No. BT-5-1-01) 지원으로 수행되었으며 감사를 표한다

인용문헌

Constantin MJ (1984) Potential of *in vitro* mutation breeding for the improvement of vegetatively propagated crop plants. In *Induced Mutation for Crop Improvement in Latin America* (Proceedings FAO/IAEA Regional Seminar, Lima, Peru, 1982). IAEA-

적 요

큰용담의 기내배양에서 EMS를 처리한 경우 돌연변이체를

- TECDOC 305, pp.59-78 Vienna: IAEA
- Ehrenberg L, Gustafsson A, Lundqvist U** (1961) Viale mutants induced in barely by ionizing radiation and chemical mutagen. *Hereditas* **47**: 243-282
- Hayshi T** (1976) Studies on crude drugs originated from Gentianaceous plants. I. Determination of gentiopicroside, the bitter principle of *Gentiana radix* and *Gentiana scabra* Radix. *Yakugaku Zasshi* **96**: 356-361
- Kimball JW** (1983) *Biology*. Ed 5. Addison Wesley Press. Massachusetts. pp 362-365
- Lee HK, Lee MK, Moon CS, Bang JW** (1996) Analysis genetic similarity of *Gentiana scabra* var. *bungeri* by randomly amplified polymorphic DNA. *Kor J Med Crop Sci* **4(3)**: 224-497
- Lim JD, Yu CY** (2000) Multiple shoot formation of *in vitro* culture of *Gentiana axillariflora* Leveille. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **8(1)**: 41-48.
- McGarvey P, Kaper JM** (1991) A simple and rapid method for screening transgenic plant using the PVR. *Biotechniques* **11** : 428-432
- Oehlkers F** (1943) Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Eünwirkung von Chemikalien. *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre* **81** : 313-341
- Seong NS, Park CH, Kim KS, Lee ST, Chang YH** (1995) *In vitro* variant induction and its content of gentiopicroside of *Gentiana scabra* Bunge. *Kor J Med Crop Sci* **3(1)**: 129-136
- Williams JGK, Kublelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV** (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc Acids Res* **18**: 6531-6535
- Yamada Y, Shoyama Y, Nishioka I, Kodha H, Namera A, Okamoto T** (1991) Clonal micropropagation of *Gentiana scabra* var *buergeri* Maxim and examination of the homogeneity concerning the gentiopicroside content. *Chem Pharm Bull* **39**: 204-206

(접수일자 2000년 1월 14일)