

Neutron 빔조사 담배 및 벼식물체의 특성

배창휴*, 채종서¹⁾, 김재홍¹⁾, 양태건¹⁾, 류재일, 이효연²⁾, 양덕춘³⁾

순천대학교 농업생명과학대학 식물생산과학부, ¹⁾한국 원자력의학원,

²⁾제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부, ³⁾경희대학교 한방재료가공센터

Characteristics of Tobacco and Rice Plants Irradiated with Neutron Beam

Chang-Hyu Bae*, Jong-Seo Chai¹⁾, Jae-Hong Kim¹⁾, Tae-Gun Yang¹⁾,
Jae-Il Lyu, Hyo-Yeon Lee²⁾ and Deok-Chun Yang³⁾

Division of Plant Production Sciences, College of Agriculture and Life Sciences,
Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea

¹⁾Cyclotron Application Lab., Korea Institute of Radiological & Medical Sciences (KIRAMS),
Seoul, 139-706, Korea

²⁾Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Cheju National University,
Jeju 690-756, Korea

³⁾College of Life Science & Center for Oriental Medicinal Materials and Processing,
Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

ABSTRACT

Effects of neutron beam irradiation on seed germination, growth and RAPD pattern of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv.; *N. plumbaginifolia*) and rice (*Oryza sativa* L. cv.) plants were estimated. Seed germination rate was not significantly changed by the neutron beam treatment in both tobacco and rice seeds. And there was no significant difference in growth of the plants by the neutron beam treatment. Interestingly, however, some of morphological changes, including leaf shape (about 36%), stem color and leaf color were observed in neutron beam treated tobacco plants. In addition, abnormal flower in petal was observed in the neutron beam treated plant. This results indicate that neutron beam is able to use as an effective mutagen in plant mutations. Scorable products from 20 primers were obtained by RAPD analysis in the leaves of the beam irradiated tobacco plants and most of the plants showed the similar band patterns.

Key words : Germination, neutron beam, *Nicotiana plumbaginifolia*, *Oryza sativa*, RAPD

*교신저자 : E-mail : chbae@sunchon.ac.kr

서언

새로운 유전자원을 개발하려는 노력의 일환으로 지금까지 X선, 감마선, 중성자선, 이온빔, 화학물질 등 다양한 돌연변이원을 이용하고 있다(Abe *et al.*, 2000; Bae *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1998; Hase *et al.*, 1999; Vazquez-Tello *et al.*, 1996; Wu and Yu, 2001; 배 등, 1998, 2000; 한 등, 1971). 원자핵은 양성자와 중성자(neutron)로 구성되어 있고 neutron은 전하를 띠고 있지 않다. 최근 양성자를 이용한 식물의 돌연변이유도가 이루어지고 있으며, 열중성자(thermal neutron)와 속중성자(fast neutron)를 이용한 식물연구가 이루어지고 있다(Li *et al.*, 2001; 권 등, 1973; 한 등, 1971). Neutron빔을 비롯한 이러한 돌연변이원을 식물체나 식물세포에 이용하면 많은 돌연변이 유전자원을 확보 할 수 있기 때문에 식물의 다양한 기능을 구명하는데에 유용하게 이용 될 수 있다(Bae *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 1999; Hase *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Li and Zhang, 2002; Tanaka *et al.*, 1997). Neutron빔 처리의 작물에 미치는 영향에 대한 연구에서 생육장애로 보이는 저장효과가 없다는 보고(Caldecott, 1968; Curtis *et al.*, 1958)가 있으나 저장효과가 있다는 보고도 있어(한 등, 1971) 새로운 유전자원개발을 위한 돌연변이 효과를 검토할 필요가 있다. 또한 속중성자(fast neutron) 빔의 식물유전체에 미치는 영향에 대한 분자생물학적 연구와 그 활용에 대하여 보고되고 있어(Li *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Li and Zhang, 2002) 이의 효용성이 주목받고 있다. 국내에서는 한 등(1971)이 속중성자를 이용하여 밀종자의 저장기간에 미치는 효과가 있음을 보고하였고, 권 등(1973)이 열중성자를 이용하여 대두에서 내개협성 유망계통을 선발한 바 있다. 그러나, 속중성자의 경우 외국의 시설을 주로 이용하였고(한 등, 1971), 국내시설을 이용한 예는

찾아보기 힘들다.

본 연구는 유전자원개발을 위한 돌연변이원 검토를 목적으로 원자력의학원 사이크로트론(KIRAMS)에서 유래한 neutron빔이 식물체에 미치는 영향을 조사하고자 빔조사에 따른 식물의 발아율, 성장, 발육특성과 유전자 변화를 관찰하였고, 최종적으로는 유전자원개발을 위한 기초자료를 얻고자 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 neutron 빔 처리

공시재료는 담배와 벼 품종(또는 계통)을 사용하였다. *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4 품종, anthF1(BY-4 유래) 계통과 야생담배인 *Nicotiana plumbaginifolia* 품종으로 성숙한 건조종자를 수확하여 neutron빔 처리용 재료로 사용하였다. Neutron빔 처리는 성숙한 담배종자에 빔을 0, 90, 180, 270, 360, 450, 540 Gy 선량으로 각각 조사하였고, 한국원자력의학원의 조사시설(KIRAMS, 35 MeV/n, 30 μ A, 서울)을 이용하여 실시하였다. 시료의 조건으로 담배종자 무게는 한 종자 당 0.2mg, 크기는 직경 0.42 mm였다. 또한 벼(*Oryza sativa* L. cv.)는 동진1호, 남평, 일미의 3품종으로 건조종자에 상기와 같은 시설의 neutron빔을 0, 90, 180, 270, 360, 450, 540Gy 선량으로 각각 조사하였다. 시료의 조건으로 벼의 한 종자 당 무게는 27 mg, 크기는 7 mm×3 mm×2.5 mm(세로×가로×두께)였다.

발아 및 성장조사

Neutron빔을 조사한 후 담배종자의 발아율과 포트에서 재배한 식물체의 성장과 발육을 관찰하였다. 발아율은 페트리접시에 여과지를 3매간 다음 종자를 치상하여 매일 아침 10시를 기준으로하여 2주간 조사하였다. 생장은 발아후 19주째부터 조사하였다. 벼의 발아율은 페트리

접시에 여과지를 3매 간 다음 종자를 치상한 후 매일 아침 10시를 기준으로하여 2주간 조사하였다. 벼의 초기생장은 pot에 식물체를 이식한 후 경시적으로 관찰하였다.

계놈 DNA 추출

PCR 분석에 적합한 DNA를 추출하기 위하여 상기와 같이 neutron빔을 조사한 담배종자를 발아시켜 5~6주째의 유묘기 담배 4~5엽에서 0.1g을 채취하여 액체질소로 분쇄하고 Poresbski *et al.*, (1997)의 CTAB 방법을 기본으로 하여 추출하였다.

RAPD 분석

Williams *et al.*, (1990)의 방법을 기본으로 하여 Operon사의 10-mer의 random oligonucleotide primer 총 34개(A, B, C kit 중)를 사용하여 분석에 이용하였다. PCR조건은 GeneAmp[®] PCR system 2700을 이용하여 94℃에서 150초간 초기 변성시킨 후 94℃에서 30초, 40℃에서 30초, 72℃에서 1분을 1회로 하여 총 35회 반복시킨 후 반응을 종료하였다. 증폭된 단편은 1.5% agarose gel에 loading 후 Ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator 상에서 확인하였다.

결과 및 고찰

담배종자의 발아 및 초기생장에 미치는 neutron빔 조사의 영향

Nicotiana tabacum L. cv. BY-4 품종, anthF1(BY-4 유래) 계통, *N. plumbaginifolia* 품종의 성숙종자에 neutron빔을 조사하여 발아양상과 생장을 조사하였다.

Neutron빔 조사 후 2주째 발아율을 관찰한 결과, Table 1에서와 같이 발아율은 계통에 따라 다소 다르게 나타났다. 이 중 2계통은 neutron빔 조사에 따라 약간 발아율이 감소하

였으나 BY-4계통에서는 neutron빔 조사로 발아율이 약간 감소하거나 오히려 증가하였다. 이 결과는 다른 빔조사실험에서 유사선량을 조사한 결과보다는 발아억제효과가 매우 낮은 결과이다. 또한 대조구 보다 발아율이 높게 나타난 것은 감마선이나 이온빔 등에서 저선량의 빔이 발아를 촉진한다는 보고가 있어(Hase *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1997; Wu and Yu, 2001) 본 실험에서 neutron빔이 발아를 촉진할 정도의 낮은 선량효과를 나타내었다는 해석도 가능하다. 발아시와 평균발아일수는 처리종 모두 차이가 없이 비슷하게 나타났다. 따라서 중성자의 담배종자의 발아에 미치는 영향은 낮게 나타났다.

N. plumbaginifolia 품종에서 발아 후 19주째부터 유식물체의 생장을 조사하였다. 19주째, 22주째 그리고 26주 후의 생육특성을 보면 수치상으로 초장과 최대엽장 및 엽수는 약간 차이를 나타냈으나 통계적으로 유의적인 차는 인정되지 않았다(Table 2). 이와는 다르게 neutron빔을 조사한 식물체에서는 형태적 변화를 나타내었다. 360Gy 이상 선량을 조사한 경우 식물체의 앞에서 빔의 손상을 받은 개체가 관찰되었고(Fig 1, Right), 총 200개체 중 71개체가 앞에서 형태 이상을 나타내었다. 또한 neutron빔 조사로 발아율과 생장에는 큰 피해를 미치지 않는 것으로 나타났으나 줄기색 변이체(Fig 2, Center), 화형변이체(Fig 2, Right), 엽색이 진하게 되는 변이체를 유도하였다. 줄기색이 진한 보라색을 띄는 현상은 조사된 빔에 대한 내성작용으로 다른 돌연변이원에서도 일반적으로 보고되는 표현형 변이현상이다. 이와 같은 결과는 효율적인 변이체 선발로 제시되고 있는 중위치사량 정도의 조사선량 뿐만 아니라 기타의 생리적형질이나 표현형 형질의 유도에 효율적인 선량을 구분하여 적정조사선량을 설정해야 한다는 것을 시사한다. 따라서 식물체에 미치는 neutron빔 조사의 영향을 최종적으로 파악하기 위해서는 발아율과 당대에서의 생장뿐만 아니라 후대(M2)에서 분리되는 형태변이에 대한

Table 1. Germination rate (%) of seeds of tobacco plants in 2 weeks from neutron beam irradiation

Neutron		N. plumb ¹⁾		BY-4 ²⁾		anthF ₁ ³⁾	
Dose (Gy)	No. of seeds ⁴⁾	No. of germ ⁵⁾	Germ (%) ⁶⁾	No. of germ	Germ (%)	No. of germ	Germ (%)
Cont	50	45	90%	33	76%	41	82%
90	50	44	88%	36	72%	40	80%
180	50	43	86%	40	80%	46	92%
270	50	46	92%	38	76%	48	96%
360	50	42	84%	36	72%	44	88%
450	50	41	82%	38	76%	38	76%
540	50	42	84%	37	74%	39	78%

¹⁾*Nicotiana plumbaginifolia*, ²⁾*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4, ³⁾A line derived from BY-4, ⁴⁾No. of seeds that neutron treated, ⁵⁾No. of seeds that germinated, ⁶⁾Percentage (%) of germinated seeds.

Table 2. Growth characters of neutron beam irradiated *Nicotiana plumbaginifolia*

Neutron Dose (Gy)	Leaf length (mm)			Leaf width (mm)			Leaf number			Height (mm)	
	19w ¹⁾	22w	26w	19w	22w	26w	19w	22w	26w	22w	26w
	Mean			Mean			Mean			Mean	
Cont	94 ^a	181 ^a	228 ^a	49 ^a	89 ^a	102 ^a	6.3 ^a	9.0 ^a	12.7 ^a	123 ^a	246 ^a
90	105 ^a	185 ^a	218 ^a	48 ^a	96 ^a	106 ^a	6.3 ^a	8.0 ^a	12.3 ^a	128 ^a	232 ^a
180	92 ^a	167 ^a	227 ^a	43 ^a	88 ^a	103 ^a	6.0 ^a	9.3 ^a	14.0 ^a	132 ^a	208 ^a
360	90 ^a	153 ^a	210 ^a	43 ^a	80 ^a	99 ^a	6.3 ^a	9.0 ^a	12.0 ^a	131 ^a	224 ^a
540	107 ^a	176 ^a	205 ^a	52 ^a	87 ^a	98 ^a	7.0 ^a	8.7 ^a	13.3 ^a	126 ^a	228 ^a

¹⁾Weeks after beam irradiation. ²⁾Mean separation within column by Duncan's multiple range test, 5% level of significance.

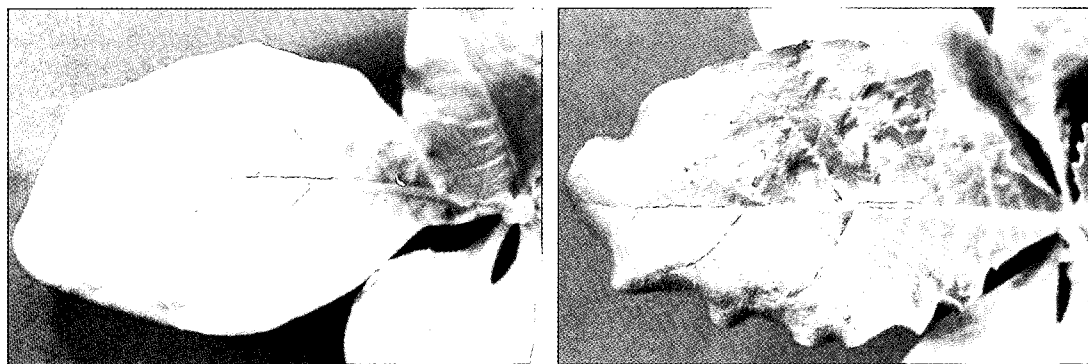


Fig. 1. Effect of neutron on tobacco plant (*Nicotiana plumbaginifolia*) leaf shape (Left; control plant, Right; neutron irradiation). Out of 200 plants, 71 plants showed changed leaf-surface by neutron beam irradiation.

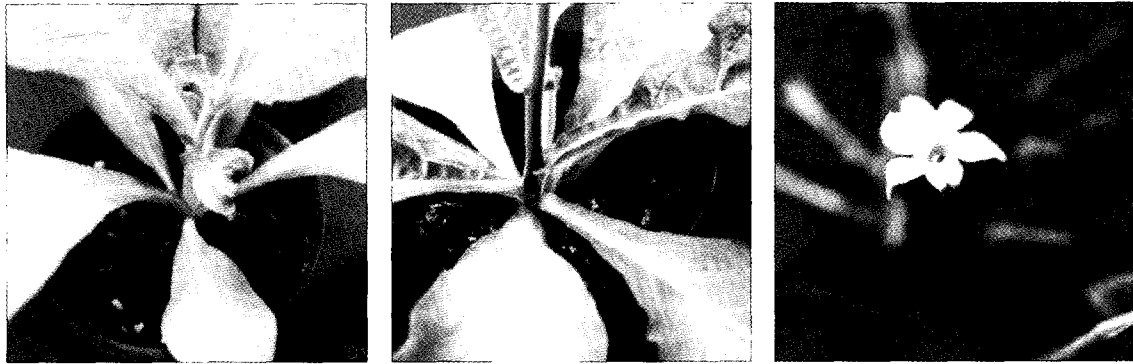


Fig. 2. Effect of neutron on tobacco plant (*Nicotiana plumbaginifolia*) stem (Left; control plant and Middle; neutron irradiation) and flower shape (Right; flower with changed petal).

조사를 포함한 포괄적인 검토가 필요할 것으로 본다. 한편 본 실험결과 발아수준에서 중위치사량 결정을 위하여 보다 고선량에서 빔조사가 필요한 것으로 제시되었다.

벼종자의 발아 및 초기생장에 미치는 neutron 빔 조사의 영향

벼의 성숙종자를 90, 180, 270, 360, 450, 540 Gy 선량으로 동진1호, 남평, 일미의 3품종에 neutron빔을 조사하여 발아와 초기생장을 검토비교하였다.

Table 3에서와 같이 발아율은 품종간에 약간의 차이는 나타났으나 동진1호의 경우 선량이 증가함에 따라 대조구에 비해 10% 정도 낮게

나타난 반면, 일미벼는 발아율에 있어 큰 감소는 없었다. 남평벼에서는 대조구 보다 발아가 높게 나타났다. 결과적으로 neutron빔 조사에 의하여 벼종자의 발아율은 크게 영향받지 않았다. 다만 남평벼에서 발아율이 대조구보다 높았던 것은 neutron빔이 종자발아를 촉진시키는데 대해서는 보다 검토가 필요하지만 타조사원에서 저선량조사가 종자발아를 촉진시킨다는 보고(Hase *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1997; Wu and Yu, 2001)도 있어 종자발아촉진 효과의 가능성도 고려될 수 있다. 발아일수는 일미벼에서 2일, 남평과 동진 1호는 각각 3일과 4일로 나타났고 동진1호의 경우에 가장 길게 나타났다.

Table 3. Germination rate(%) of rice seeds with hull in 2 weeks from neutron beam irradiation

Neutron		Dongjin-1		Nampyongbeyo		Ilmibeyo	
Dose (Gy)	No. of seeds ¹⁾	No. of germ ²⁾	Germ (%) ³⁾	No. of germ	Germ (%)	No. of germ	Germ (%)
Cont	50	46	92%	42	84%	48	96%
90	50	42	94%	47	94%	56	93%
180	50	46	92%	45	90%	46	92%
270	50	47	94%	46	92%	48	96%
360	50	38	86%	48	96%	46	92%
450	50	44	88%	46	92%	43	86%
540	50	41	82%	45	90%	47	94%

¹⁾No. of seeds that neutron treated, ²⁾No. of seeds that germinated, ³⁾Percentage (%) of germinated seeds.

과피를 제거한 뒤 neutron빔을 조사한 벼의 경우, 3품종 모두 발아율이 대조구와 비슷하거나 오히려 높게 나타났다. 이와 같은 결과를 통해 벼종자에 대한 neutron빔의 영향은 매우 약하게 나타났고, 따라서 추후 보다 높은 선량의 조사가 필요함을 알 수 있었다. 발아 후 초기생장에 있어도 중성자 조사구와 무조사구 간에 가시적인 차이는 관찰되지 않았다(자료 미제시). 이와같이 중성자 빔조사의 벼종자의 발아와 초기생장에 대한 가시적 효과는 나타나지 않았으므로 후대(M2)에서 분리되는 형태변이와 기타변이에 대한 관찰이 이뤄져야 할 것으로 보인다.

유전자 손상에 미치는 neutron빔 조사의 영향

피조사체의 유전자 손상의 기초자료를 얻기 위하여 담배식물체(*N. plumbaginifolia*) 24개체를 대상으로 총 34개의 primer를 사용하여 (Operon 사 primer kit) USA RAPD분석한 결과, 20개의 primer에서 성공적으로 DNA 증폭이 이루어졌다. 총 104개의 DNA밴드가 증폭되었고 primer 당 평균 5.2개의 밴드가 출현하

였다. 또한 증폭된 DNA 산물의 크기는 320 bp에서 3,000 bp 사이였다. 그러나 선량 및 개체 특이적인 DNA밴드는 나타나지 않았다(Fig 3). 추후 더 많은 primer의 선발에 따른 추가 실험이 필요하며, 이를 통하여 neutron빔 조사 특이적인 DNA 단편을 찾고 유전자 클로닝에 의한 특이 DNA단편에 대한 동정이 이루어져야 할 것으로 본다.

적요

재배종담배(*Nicotiana tabacum* L. cv.), 야생종담배(*N. plumbaginifolia*)와 벼종자(*Oryza sativa* L. cv.)에 neutron빔을 각각 조사(irradiation)하여 발아, 식물체의 성장과 DNA의 변이에 미치는 영향을 검토하였다. 담배종자와 벼종자에 90, 180, 270, 360, 450, 540 Gy까지 조사로 발아율은 크게 감소하지 않았고, 성장에 있어 유의적인 차이는 없었다. 그러나 담배식물체에서 총 200개체 중 71개체(약

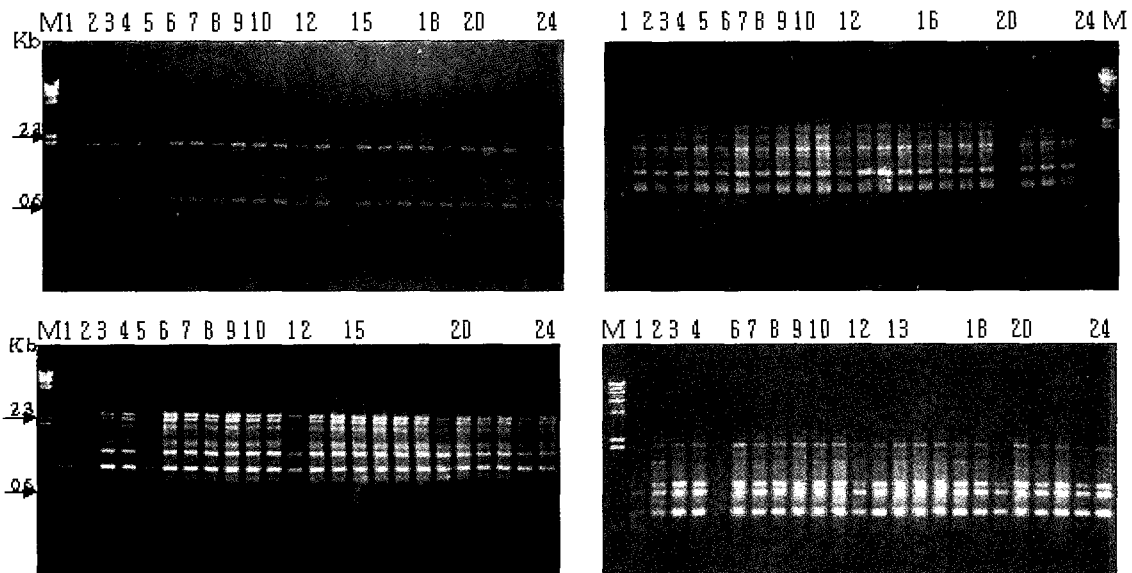


Fig. 3. RAPD profiles of neutron beam irradiated *Nicotiana plumbaginifolia*. Twenty four tobacco plants were amplified using primer #OPA-02 (Left-upper), #OPA-03 (Right-upper), #OPB-07 (Left-lower) and #OPC-01 (Right-lower), and separated on 1.2% agarose gel.

36%)가 잎에서 형태 이상을 나타내었다. 또한 줄기색 변이체, 엽색변이체, 화형변이체를 유도하였다. 이 결과는 neutron빔이 유용한 돌연변이원으로서 가능성이 있음을 시사해 준다. Neutron빔을 조사한 후 생장한 담배식물체의 잎에 대하여 총 34개의 primer를 이용하여 RAPD 분석한 결과, 20개의 primer에서 총 104개의 DNA 단편이 증폭되었고, 중성자 빔 조사처리구에서만 출현하는 DNA 단편은 나타나지 않았다.

사사

본 연구는 2003년도 과학기술부 원자력연구개발사업의 연구비지원 (M2C00000705)에 의해 수행된 결과의 일부임.

인용문헌

- Abe, T., C.H. Bae, T. Ozaki, J.M. Wang and S. Yoshida. 2000. Stress-tolerant mutants induced by heavy-ion beams. *Gamma Field Symposia* 39:45-56.
- Bae, C.H., T. Abe, T. Matsuyama, N. Fukunish, N. Nagata, T. Nakano, Y. Kaneko, K. Miyoshi, H. Matsushima and S. Yoshida. 2001. Regulation of chloroplast gene expression is affected in *ali*, a novel tobacco albino mutant. *Annals of Botany* 88:545-553.
- Bae, C.H., T. Abe, N. Nagata, N. Fukunish, T. Matsuyama, T. Nakano and S. Yoshida. 2000. Characterization of a periclinal chimera variegated tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Science* 151:93-101.
- Caldecott, R.S. 1968. Post-irradiation modification of injury in barley its basic and applied significance. 2nd U.N. Inter. Conf. Peaceful Uses of Atomic Energy 27: 260-269.
- Chen, Y., B. Jiang, Y. Chen, X. Ding, X. Liu, C. Chen, X. Guo and G. Yin. 1998. Formation of plasmid DNA strand breaks induced by low-energy ion beam: induction of nuclear stopping effects. *Radiat. Environ. Biophys.* 37:101-106.
- Choi, K.S., J.G. In, S.Y. Kang, C.H. Bae and H.Y. Lee. 1999. Effect of UV radiation on early growth of Korean rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Kor. J. Crop Science* 44(3): 298-303.
- Curtis, H.J., N. Delihias, R.S. Caldecott and C.F. Konzak. 1958. Modification of radiation damage in dormant seeds by storage. *Rad. Research* 8:526-534.
- Hase, Y., K. Shimono, M. Inoue, A. Tanaka and H. Watanabe. 1999. Biological effects of ion beams in *Nicotiana tabacum* L. *Radiat. Environ. Biophys.* 38:111-115.
- Li, X. and M. Lassner and Y. Zheng. 2002. Deletegene: a fast neutron deletion mutagenesis-based gene knockout system for plants. *Comp. Funct. Genom.* 3:158-160.
- Li, X., Y. Song, K. Century, S. Straight, P. Ronald, X. Dong, M. Lassner and Y. Zheng. 2001. A fast neutron deletion mutagenesis-based reverse genetics system for plants. *Plant J.* 27(3):235-242.
- Li, X., Y. Zheng. 2002. Reverse genetics by fast neutron mutagenesis in higher plants. *Funct. Integr. Genomics* 2:254-258.
- Poresbski, S.L., G. Bailey and R.B. Baum. 1997. Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12:8-15.
- Tanaka, A., N. Shikazono, Y. Yokota, H. Watanabe and S. Tano. 1997. Effects of heavy ions on the germination and survival of *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Radiat. Biol.* 72:121-127.
- Vazquez-Tello, A., T. Uozumi, M. Hidaka, Y. Kobayashi and H. Watanabe. 1996. Effect of $^{12}\text{C}+5$ ion beam irradiation on cell viability and plant

- regeneration in callus, protoplasts and cell suspensions of *Lavatera thuringiaca*. Plant Cell Rep. 16:46-49.
- Willams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.
- Wu, L. and Z. Yu. 2001. Radiobiological effects of a low-energy ion beam on wheat. Radiat. Environ. Biophys. 40:53-57.
- 권신한, 임건혁, 김재기. 열중성자에 의한 대두의 내개협성 품종육성. 1973. 한국육종학회지. 5(2): 65-68.
- 배창휴, Tomoko. Abe , 김동철, 이영일, 정재성, 민경수, 이효연. 2000. 중이온 beam 조사가 담배의 약과 캘러스 및 종자에 미치는 영향. 한국식물조직배양학회지. 27:109-115.
- 배창휴, T, Abe, 민경수, 김동철, 정재성, 이춘환, 임용표, 이효연. 1998. 중이온 beam 조사에 의한 돌연변이 유도과 내염성 식물의 선발. 한국 식물조직배양학회지 25(2):89-94.
- 한창렬, 김지문, 김영상. 1971. 감마선과 속중성자를 조사한 밀종자의 저장기간과 저장온도가 발아후 유묘생장에 미치는 영향. 한국작물학회지. 10: 73-77.
- (접수일 2005. 2. 10)
(수락일 2005. 6. 07)