

γ-선 및 화학돌연변이원 처리가 양치식물 전엽체의 기내배양에 미치는 영향

정진아, 이철희*

충북대학교 원예과학과 and 생물건강산업개발연구센터

Effects of γ-irradiation and Chemical Mutagenesis on *In vitro* Culture of Fern Prothallus

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 - Homogenized prothallus of 6 species (*Cyrtomium falcatum*, *Cyrtomium caryoptideum* var. *coreanum*, *Dryopteris varia*, *Asplenium incisum*, *Camptosorus sibiricus* and *Phyllitis scolopendrium*) were treated with gamma radiation or by chemical mutagenesis with EMS, NMU, NaN_3 and colchicine to assess their sensitivities for each treatments and also with the aim of inducing mutations. Generally, decrease of proliferation ratio was dose-dependent and time-dependent. Based on proliferation ratio, optimum dose of gamma irradiation was 5~10krad except in *D. varia* with 20krad. Optimum condition of EMS treatment was considered as 50mM for 3h and for NMU as 5~10mM for 1~3h. Optimum condition of NaN_3 treatment was considered as 0.5~1mM for 1~3h. For colchicine, there were significant differences between species as to the proliferation ratios of prothallus for each treatment.

Key words - γ-radiation, EMS, NMU, NaN_3 , Colchicine

서 언

면마과(Drypteridaceae)에 속하는 도깨비고비[*Cyrtomium falcatum*(L.) Presl], 참쇠고비[*Cyrtomium caryotideum* var. *coreanum* Nakai] 및 족제비사리[*Dryopteris varia*(L.) O. Kuntze]는 비교적 큰 양치식물로서 상록성이며 잎이 풍성하고 아름다워 화분용 또는 꽂꽂이 배경용 소재로 개발가치가 높다. 또한 꼬리고사리과(Aspleniaceae)에 속하는 꼬리고사리(*Asplenium incisum* Thunb.), 거미고사리(*Camptosorus sibiricus* Rupr.), 변산일엽[*Phyllitis scolopendrium*(L.) Newm.]은 바위정원(rockery)의 소재나 관엽식물로서 활용가치가 높은 종들이다(Jones, 1987).

최근 조직배양기술이 발전됨에 따라 식물조직에 물리적 또는 화학돌연변이원을 처리하는 과정에 조직배양기술이 도입되면서 생물학적 연구 및 농작물의 유전형질을 향상시키기 위한 식물육종 분야에서 중요한 도구로 대두되고 있다(Koh, 2000; Mandal *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003; Latado *et al.*, 2004). 이와 같이

돌연변이육종에 조직배양기술을 도입하면 원하는 형질 및 식물조직의 형태를 목적으로 맞게 선택하여 돌연변이원을 동일한 조건으로 처리할 수 있고(Lee *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2002; Wu and Mooney, 2002), 단일 변이세포로부터 완전한 식물체의 재생 및 번식이 가능하며(Rao *et al.*, 1997; Joseph *et al.*, 2004), 또한 화분배양을 통해 얻은 반수체를 대상으로 할 경우 육종기한을 단축시킬 수 있는 등의 장점이 있다(Jeong and Lee, 1997; Castillo *et al.*, 2001; Lotfi *et al.*, 2003).

γ-선은 식물조직 깊숙이 침투하여 유전자, 염색체 및 계놈 차원에서 다양한 형태의 돌연변이가 유발 가능하다는 장점이 있어, 많은 식물 종에서 종자, 꽃, 약(約), 화분입자, 단일세포, 식물체 등 다양한 재료들을 이용하여 활발한 연구가 진행되고 있다(van Harten, 1998; Arunyanart and Soonthronyata, 2002). 돌연변이육종에 많이 이용되는 화학돌연변이원에는 alkylating 물질에 속하는 ethylmethanesulfate(EMS), diethylsulphate(dES), ethyleneimine(EI) 및 nitroso 화합물과 또한 sodium azide(NaN_3)

*교신저자(E-mail) : leech@chungbuk.ac.kr

등이 있는데(van Harten, 1998), *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 식물 종에서 돌연변이 유기가 시도되었다. 그 연구결과에 따르면 식물의 종류 및 부위에 따라 적정 처리조건이 다른 것으로 여겨지며, 그러므로 종 또는 식물조직에 따라 이를 구명할 필요성이 요구된다. 특히 양치식물의 경우 돌연변이육종을 통한 신품종육성에 관한 연구는 매우 미진한 상태여서 그에 관한 기초자료조사 현저히 부족한 실정이다.

본 연구는 기내배양중인 6종의 양치식물 전엽체에 돌연변이원을 처리한 후 포자체를 유도하여 빠른 육종기간 안에 순수한 돌연변이주를 얻기 위한 방법을 개발하기 위한 목적으로, γ -선을 비롯하여 EMS, NMU, NaN_3 등의 화학돌연변이원 그리고 colchicine의 적정 처리조건을 탐색하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

양치식물의 전엽체는 포자를 MS 기본배지(sucrose 1%, agar 0.8%, pH 5.8)에 무균배양하여 얻었으며, 이를 한두 달 간격으로 동일배지에 계대배양하여 증식시켰다.

방사선 처리실험에서 각각의 전엽체는 메스로 곱게 다진 후 300mg씩 10ml의 MS배지(sucrose 1%, agar 0.8%, pH 5.8)가 담긴 시험관(150×25mm)에 처리구 당 3반복으로 치상하였다. γ -선(^{60}Co)의 처리선량을 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 및 30krad 등 9구간으로 구분하여 전엽체를 치상한 시험관에 24시간동안 조사하였다. 방사선을 처리한 전엽체는 8주 동안 배양한 후, 동일한 배지에 1회 계대하여 4주간 더 배양하고 전엽체의 생체중을 조사하였다. 화학돌연변이원 처리 실험에서 각각의 전엽체는 메스로 곱게 다진 후 처리구 당 600mg 씩 나누어 준비하였다. 화학돌연변이원 EMS, NMU, NaN_3 는 필터멸균하여 EMS는 0, 10, 20, 50, 100mM의 농도로, NMU는 0, 0.5, 1, 5, 10mM의 농도로, NaN_3 는 0, 0.1, 0.5, 1, 5mM의 농도로 준비한 후 각각에서 균질화한 전엽체를 1, 3, 6시간 동안 침지처리 하였다. Colchicine 용액은 필터멸균하여 0, 0.01, 0.05, 0.1 및 0.5%의 농도로 준비한 후 균질화한 전엽체를 각각 600mg 씩 1, 2, 4일 동안 침지처리 하였다. 화학돌연변이원을 처리한 전엽체는 멸균수로 3회 헹구고 배양병 당 200mg씩 처리구 당 3반복으로 나누어 치상한 후 계대없이 12주간 기내배양하였고 생체중을 조사하였다.

배양온도는 $25\pm1^\circ\text{C}$ 였으며, 형광등을 이용하여 $40\mu\text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

로 16시간 조명하였다. 생체중을 조사한 전엽체는 곱게 다져서 상토가 담긴 화분에 이식하여 포자체를 유도하였다.

결과 및 고찰

γ -선 처리 효과

본 실험에서 돌연변이원 처리의 적정조건은 전엽체에 γ -선 및 화학돌연변이원을 처리하여 12주 동안 기내배양한 후 전엽체 증식률이 무처리구 대비 70%를 나타내는 처리구를 임의로 정하였다. 이때 무처리구 대비 70%의 증식률이란 돌연변이원을 처리하는 과정에서 전엽체의 30%가 손상되었다는 것을 의미하는 것은 아니며, 정확한 수치로 환산할 수는 없지만 그보다 더 많은 양의 전엽체가 약해를 입은 결과로 추정된다.

6종의 전엽체에 γ -선의 처리선량을 0~30krad로 달리하여 조사한 후 12주 동안 배양한 결과는 Fig. 1과 같았다. 도깨비고비와 참쇠고비의 전엽체는 15krad 이상에서는 생존하지 못하고 모든 조직이 고사하였다. 이들의 적정 처리선량은 5krad였는데, 이때 도깨비고비는 무처리구 대비 71.3%, 참쇠고비는 70.6%의 증식률을 보였다. 10krad에서 도깨비고비와 참쇠고비의 전엽체는 증식률이 급감하여 각각 대조구의 39.0%와 38.4%에 그쳤다. 족제비고사리의 전엽체는 15krad 및 20krad가 적절한 처리선량으로 생각되었는데, 각각 무처리구의 75.8% 및 73.8%에 해당하는 증식률을 보였다. 처리선량이 높아짐에 따라 족제비고사리의 증식률은 점차 감소되었으며, 최고 선량인 30krad에서는 대부분의 전엽체 조직이 생존하지 못하고 고사하였다. 꼬리고사리와 거미고사리의 전엽체는 10krad가 적정 처리선량으로 조사되었다. 이 처리구에서 꼬리고사리는 무처리구 대비 69.0%의 증식률을 보였고, 거미고사리는 87.5%의 증식률을 보였다. 꼬리고사리에서 전엽체 증식률은 처리선량에 따라 점진적으로 감소되어 25~30krad에서도 대조구의 22.4~29.7%에 해당하는 증식률을 보인 반면, 거미고사리는 15krad에서 증식률이 무처리구의 54.1%로 급감하였고 25krad 이상에서는 대부분 조직이 생존하지 못하고 갈변 고사하였다. 변신일엽의 전엽체는 10krad에서 무처리구 대비 83.8%의 증식률을 보여 적정 처리조건에 가장 근사하였다. 반면 15krad에서는 증식률이 14.1%로 급감하여 10krad 근처가 생존에 있어 한계점인 것으로 생각되었다.

방사선의 처리효과는 여러 가지 환경요인과 생물학적 인자에 따라서 달라지며 같은 종이라 할지라도 품종과 계통 및 영양과 생리적 조건에 따라서 다른 것으로 알려져 있는데, 벼의 종자(Kim, 1998)나 나물콩의 종자(Shim et al., 1996)는 30krad, 들깨종자(Lee et al., 1996)나 콩(*Phaseolus vulgaris*)은 10~20krad가 적절한 처리조건으로 보고되었다. 한편 구기자나무(*Lycium chinense*)의 종자는 3~6krad로 비교적 낮은 선량이 이용되었다(Lee

등, 1997). 이들 종자에 비하여 기내배양중인 감(*Diospyros kaki*)의 신초(Koh, 2000)나 토란(*Colocasia esculenta*)의 신초(Malamug 등, 1994)는 1~2krad, 감자의 줄기는 3krad(Kim 등, 1996), 야콘의 관아(crown bud)는 4krad(Doo et al., 2001), 그리고 assava의 체세포배는 5krad(Joseph et al., 2004) 등 상대적으로 낮은 선량이 이용되었는데, 연(lotus)의 소식물체는 LD₅₀이 2krad로 조사되었고 3krad 이상에서는 식물체가 유리화(vitrification)되거나 백화(chlorosis)되는 등 비정상적인 형태형성을 보였다고 하였다.

본 실험에서 도깨비고비, 참쇠고비 및 변산일엽의 전엽체는 15krad 이상에서는 거의 생존하지 못하고 괴사하였으며, 적정 처리선량은 5~10krad 수준이었다. 한편 족제비고사리와 꼬리고사리는 비교적 높은 선량에서도 전엽체의 생장이 관찰되었고, 적정 처리선량은 10~20krad로 나타났다. 즉 양치식물의 전엽체는 전반적으로 식물종자에 비해서는 γ -선 처리에 내성이 약한 것으로 여겨지며, 반면 기내배양중인 신초나 줄기마디, 캘러스 및 삽목묘 등의

식물조직보다는 높은 것으로 생각되었다.

EMS 처리 효과

실험된 모든 종에서 EMS는 처리농도가 높을수록 그리고 처리기간이 길수록 전엽체의 증식을 확연하게 감소시켰으며(Fig. 2), 100mM의 농도나 3시간 이상의 처리 시에는 EMS액에 침지하는 동안에 전엽체가 갈변되었다. 도깨비고비에서 EMS의 적정 처리조건은 20mM에서 1시간(70.1%) 또는 50mM에서 1시간(67.2%)으로 조사되었고, 6시간의 처리나 100mM의 처리는 생체중을 현저히 감소시켰다. 참쇠고비는 50mM에서 3시간 처리(68.5%)가 적절하였으며, 족제비고사리 또한 50mM에서 3시간의 처리(70.8%)가 적절한 것으로 조사되었다. 꼬리고사리의 적정 처리조건은 50mM에서 3시간(73.9%) 또는 6시간(69.7%)이었으며, 거미고사리는 50mM에서 3시간(73.0%) 및 100mM에서 1시간(69.5%)으로 나타났다. 변산일엽은 20mM에서 6시간(71.3%) 및 50mM에서 6시간 처리(70.3%)가 적절한 조건으로 조사되었다.

Table 1. Effect of γ -ray treatments on proliferation of fern prothalli *In vitro*

γ -ray		Relative proliferation of prothalli to non-mutagenized (%)					
Absorbed dose (krad)	<i>C. falcatum</i>	<i>C. caryoptideum</i>	<i>D. varia</i>	<i>A. incisum</i>	<i>C. sibiricus</i>	<i>P. scolopendrium</i>	
0	100.0 a ^z	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	
1	91.4 ab	95.3 a	90.5 a	86.4 b	102.5 a	90.8 ab	
2	82.3 bc	81.1 b	84.2 a	76.0 bc	101.5 a	91.8 ab	
5	71.3 c	70.6 b	91.9 a	75.7 bc	100.1 a	94.8 a	
10	39.0 d	38.4 c	88.3 a	69.0 c	87.5 b	83.8 b	
15	0.0 e	0.0 d	78.0 a	65.0 c	54.1 c	14.1 c	
20	0.0 e	0.0 d	73.8 a	48.0 d	15.5 d	0.0 d	
25	0.0 e	0.0 d	38.1 b	29.7 e	3.9 e	0.0 d	
30	0.0 e	0.0 d	13.7 b	22.4 e	0.0 e	0.0 d	

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test, P<0.05.

Table 2. Effect of EMS treatments on proliferation of fern prothalli *In vitro*

EMS		Relative proliferation of prothalli to non-mutagenized (%)					
Conc. (mM)	Treatment duration (h)	<i>C. falcatum</i>	<i>C. caryoptideum</i>	<i>D. varia</i>	<i>A. incisum</i>	<i>C. sibiricus</i>	<i>P. scolopendrium</i>
0	1	100.0 a ^z	100.0 ab	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
10	1	91.1 ab	96.9 ab	98.0 a	104.0 a	96.7 ab	84.4 bc
	3	75.3 bc	78.9 a-d	90.0 ab	101.7 a	92.6 ab	86.0 a-c
	6	54.0 cd	78.6 a-d	82.5 a-c	79.0 b-e	93.1 ab	76.2 b-d
20	1	70.1 bc	101.9 a	95.5 a	90.7 ab	98.8 a	85.8 a-c
	3	57.6 cd	92.4 a-c	92.0 ab	98.1 a	89.6 a-c	77.4 b-d
	6	54.3 cd	60.7 de	83.3 a-c	82.4 b-d	77.6 b-d	71.3 cd
50	1	67.2 bc	91.0 a-c	82.7 a-c	88.2 a-c	84.1 a-d	87.7 ab
	3	52.0 c-e	68.5 c-e	70.8 b-d	73.9 c-e	73.0 c-e	73.5 b-d
	6	38.8 de	25.2 f	56.2 d	69.7 de	56.8 e	70.3 cd
100	1	55.1 cd	73.6 b-e	71.7 b-d	74.7 c-e	69.5 de	79.7 b-d
	3	29.0 e	51.5 e	61.7 cd	66.1 e	39.2 f	67.6 d
	6	4.9 f	24.1 f	11.5 e	35.7 f	27.0 f	39.0 e

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test, P<0.05.

벼(*Oryza sativa* cv. Dongjinbyeo)의 캘러스는 0.25% 또는 0.5%의 EMS로 6시간 동안 처리하였을 때 비교적 높은 생존율을 보인 반면, 0.75%에서는 34.9%, 1.0%에서는 8.8%로 생존율이 급감하였다(Lee et al., 1993). 그리고 *Capsicum annuum*의 종자와 절편은 0.1%에서 24시간(Rao et al., 1997), 기내배양 중인 용담(*Gentiana scabra*)에서 정아 및 액아는 50~200mM에서 2시간, 종자는 동일농도에서 24시간의 처리가 이용되었다(Seong et al., 1995).

이처럼 EMS 처리의 적정수준은 기내배양중인 식물체의 절편 및 캘러스의 경우 종자에 비하여 상대적으로 처리농도가 낮거나 또는 처리기간이 짧은 것이 일반적이며, 양치식물의 전엽체에서 적정 처리조건은 기내배양중인 다른 식물체의 절편 및 캘러스와 유사한 수준인 것으로 판단되었다.

NMU 처리 효과

6종의 전엽체는 NMU 처리에서 위하여 다소 다른 생장반응을 보였다(Fig. 3). 도깨비고비는 5mM에서 3시간의 처리(59.7%)와 10mM에서 1시간의 처리(59.3%)가 적정조건에 가장 근사하였다. 참쇠고비는 5mM에서 1시간의 처리(77.1%) 또는 10mM에서 1시간의 처리(73.2%)가 적정한 조건으로 생각되었다. 족제비고사리는 10mM에서 6시간의 처리(68.8%)가 적정 처리조건이었으며, 그 밖의 다른 처리구에서는 증식률이 80.9% 이상으로 양호하였다. 이는 NMU에 대한 족제비고사리의 내성이 강하기 때문이라기보다는 다른 종에 비해 전엽체의 증식속도가 매우 빠른 특성을 지니고 있기 때문인 것으로 추정된다. 꼬리고사리는 5mM에서 3시간의 처리(71.3%)와 6시간의 처리(72.7%)가 적절한 조건으로 조사되었고, 거미고사리는 10mM에서 3시간(68.5%), 변산일엽은 1mM에서 6시

간(69.6%) 처리가 적절한 조건으로 생각되었다.

Bouman과 De Klerk(2001)은 기내배양중인 베고나야(*Begonia ×hiemalis*)의 잎 절편에 0.2~10mM의 NMU를 처리한 결과, 처리농도가 높아질수록 재생에 오랜 시간이 걸렸다고 하였다. 또한 *Capscicum annuum*에서 자엽은 5mM에서 1시간 30분, 종자는 동일농도에서 24시간의 처리가 이용되었는데(Rao et al., 1997), 용담(*Gentiana scabra*) 역시 정아와 액아는 1~4mM에서 2시간, 종자는 동일농도에서 24시간 처리하여 돌연변이를 유도하였다고 하였다(Seong et al., 1995).

이처럼 NMU 또한 EMS와 마찬가지로 기내배양중인 절편이나 정아 및 자엽 등은 종자에 비하여 낮은 농도 또는 짧은 침지시간의 이용이 보편적이며, 본 실험에서 양치식물의 전엽체는 종에 따라 다소 차이가 있었지만 5~10mM의 농도에서 1~3시간의 처리가 적절한 것으로 생각되었다.

NaN₃ 처리 효과

실험된 모든 종의 전엽체는 5mM의 농도에서 3시간 이상 NaN₃를 처리한 경우 생존하지 못하고 갈변 고사하였다(Fig. 4). 도깨비고비의 전엽체는 0.1mM에서 6시간(75.5%), 0.5mM에서 3시간(76.5%) 및 1mM에서 1시간의 처리(74.6%) 등이 적절한 처리조건으로 생각되었다. 참쇠고비는 0.1mM에서 6시간(71.7%) 또는 0.5mM에서 3시간의 처리(62.6%)가 적절하였으며, 족제비고사리는 1mM에서 6시간(76.6%)의 처리가 적정 처리조건에 가장 근사하였다. 꼬리고사리는 0.1mM에서 3시간(77.4%) 및 6시간 처리(72.1%)와 1mM에서 1시간의 처리(66.4%)가 적절하였고, 거미고사리의 전엽체는 0.1mM에서 6시간의 처리(65.2%)와 1mM에서 1시간의 처리(74.2%)가 적절한 것으로 조사되었다. 그리고 변산일

Table 3. Effect of NMU treatments on proliferation of fern prothalli *In vitro*

Conc. (mM)	Treatment duration (h)	Relative proliferation of prothalli to non-mutagenized (%)					
		<i>C. falcatum</i>	<i>C. caryoptideum</i>	<i>D. varia</i>	<i>A. incisum</i>	<i>C. sibiricus</i>	<i>P. scolopendrium</i>
0.5	1	100.0 a ^z	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
	3	88.4 a	92.5 ab	96.7 ab	96.1 ab	94.7 ab	95.8 ab
	6	90.7 a	75.7 bc	98.7 a	84.6 a-c	98.9 a	89.5 a-c
	1	74.9 ab	77.7 bc	88.7 ab	88.3 ab	78.4 a-c	76.2 b-e
1	1	89.8 a	77.5 bc	93.2 ab	82.6 a-d	91.7 ab	89.4 a-c
	3	93.6 a	79.2 bc	95.6 ab	78.9 a-d	84.4 a-c	78.0 a-d
	6	76.4 ab	64.2 c	84.8 ab	78.9 a-d	79.5 a-c	69.6 c-e
5	1	89.0 a	77.1 bc	93.5 ab	78.8 a-d	78.8 a-c	79.6 a-d
	3	59.7 bc	57.3 c	91.5 ab	71.3 b-d	73.7 a-d	58.6 d-f
	6	54.1 bc	59.4 c	82.4 bc	72.7 b-d	61.4 cd	59.8 d-f
10	1	59.3 bc	73.2 bc	88.2 ab	76.8 a-d	77.1 a-d	64.7 d-f
	3	52.8 bc	59.5 c	80.9 bc	60.9 cd	68.5 b-d	52.8 e-f
	6	45.3 c	55.9 c	68.8 c	58.0 d	51.5 d	43.9 f

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test, P<0.05.

엽은 0.1mM에서 6시간(76.4%) 또는 0.5mM에서 1시간의 처리(75.9%)가 적절한 처리조건으로 생각되었다.

EMS의 경우 처리 시 약해를 입은 조직이 금방 갈변되는 경향을 보이는 데 반해, NaN_3 는 처리 시 또는 직후에는 녹색을 띠며 생존해 있던 전엽체들이 배양기간이 지나면서 서서히 갈변 고사하는 경향을 보였다. 이는 NaN_3 가 돌연변이 유발원이자 광합성의 산소 생성반응에서 전자전달을 저해하는 물질이기 때문에 잔류한 NaN_3 에 의하여 전엽체조직이 약해를 입은 탓으로 생각되었다(Mano *et al.*, 1993; Zhang and Lee, 1997).

NaN_3 는 보리에서 가장 효과적인 돌연변이원 중 하나로 알려져 있는데, 약은 0.1~1mM에서 6시간, 소포자는 0.01~0.1mM에서 1시간의 처리가 이용되었고(Castillo *et al.*, 2001), 종자(*Hordeum vulgare*)에 NMU 1mM을 1시간 동안 처리하여 색소변이 식물체를 얻었다는 보고가 있었다(Doring *et al.*, 1999). Seong *et al.*(1995)에 의하면 기내배양중인 용담(*Gentiana scabra*)의 정아와 액아는 1~3mM에서 2시간, 종자는 동일농도에서 24시간 동안 처리하여 배양한 결과, 정아와 액아는 1mM 이상의 농도에서 생육이 크게 저해된 반면 종자는 모든 처리구에서 대조구와 유사한 발아율 및 생존율을 보였다고 하였다.

본 실험에서 양치식물의 전엽체는 대부분 NaN_3 0.5~1mM에서 1~3시간 처리가 적정조건으로 조사되었는데, 이는 소포자 보다는 처리농도가 높거나 처리기간이 긴 편이지만 다른 식물조직이나 약과는 유사한 수준이었다.

Colchicine 처리 효과

양치식물의 전엽체는 종에 따라서 colchicine 처리에 의하여 생장반응에 다소 차이를 보였는데, 전반적으로 처리농도보다는 처리

기간에 민감한 반응을 나타냈다(Fig. 5). 도깨비고비에서 적정 처리조건은 0.1%에서 2일(70.3%)이었으며, 각 농도에서 4일의 처리는 전엽체 증식률을 무처리구 대비 19.7~55.1%로 크게 감소시켰다. 참쇠고비의 전엽체는 0.5%에서 2일의 처리가 적절하였으며, 각 농도에서 4일의 처리 시 전엽체 증식률은 무처리구 대비 30.9~54.2%로 감소되었다. 죽제비고사리의 전엽체는 0.05%에서 2일의 처리(77.4%) 또는 0.1%에서 2일의 처리(78.6%)가 적절한 조건으로 조사되었으며, 4일간의 처리 시에는 무처리구의 57.9~65.3%로 증식률이 감소되었다. 꼬리고사리와 거미고사리는 0.5%에서 4일간 처리했을 경우를 제외하고 그 외의 처리구에서는 전엽체 증식률이 무처리구와 큰 차이를 보이지 않았다. Colchicine 0.5%에서 4일간 처리한 경우 꼬리고사리는 전엽체 증식률이 무처리구 대비 73.0%였으며, 거미고사리는 80.6%였다. 변산일엽은 0.5%에서 2일(73.5%)의 처리가 적절하였으며, 4일의 처리에서는 무처리구의 30.5~48.3%로 증식률이 감소하였다.

기내배양중인 복숭아(*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui)의 신초를 0.01 및 0.1%의 colchicine에서 1~8일간 처리한 결과, 0.01%의 농도에서 1~4일간의 처리조건에서 50~65%의 생존율을 보인 반면, 그 외의 처리구에서는 모든 식물조직이 괴사하였다고 하였다(Katota와 Niimi, 2002). 또한 *Buddleia globosa*의 마디절편에 0.01~0.1%의 농도로 1~3일 동안 처리한 결과, 0.1%에서 3일 처리 시 가장 많은 4배체가 유도되었고(Rose *et al.*, 2000), 감귤류인 'Umatilla'의 배발생 캘러스는 0.05%의 처리구에서 배수성 식물체가 가장 많이 유도되었다고 하였다(Wu와 Mooney, 2002).

이와 같이 식물의 종이나 조직에 따라 colchicine 처리의 적정조건에는 다소 차이가 있어 보이며, 그러나 보편적으로 높은 농도보다는 0.01~0.1%의 농도에서 1~4일간의 처리가 4배체 식물 유도에

Table 4. Effect of NaN_3 treatments on proliferation of fern prothalli *In vitro*

NaN_3		Relative proliferation of prothalli to non-mutagenized (%)					
Conc. (mM)	Treatment duration (h)	<i>C. falcatum</i>	<i>C. caryopterium</i>	<i>D. varia</i>	<i>A. incisum</i>	<i>C. sibiricus</i>	<i>P. scolopendrium</i>
0	1	100.0 a ^z	100.0 a	100.0 ab	100.0 a	100.0 a	100.0 a
	1	95.2 a	86.4 ab	97.5 a-c	96.3 a	81.1 ab	93.7 ab
	3	88.7 ab	76.1 b-d	101.9 a	77.4 b	78.9 ab	83.0 bc
	6	75.5 bc	71.7 b-d	99.7 ab	72.1 b	65.2 bc	76.4 cd
0.5	1	97.3 a	80.7 a-c	101.9 a	99.6 a	80.8 ab	75.9 cd
	3	76.5 bc	62.6 cd	84.1 cd	59.6 b-d	58.7 bc	62.7 de
	6	44.4 de	24.7 fg	86.5 b-d	62.6 b-d	58.2 bc	44.7 fg
	1	74.6 bc	56.9 de	101.1 a	66.4 bc	74.2 bc	58.6 ef
1	3	66.2 c	36.3 ef	82.0 d	40.6 e	51.3 c	29.9 g
	6	34.9 ef	11.5 gh	76.6 d	37.7 e	53.4 c	11.1 h
	1	59.5 cd	36.2 ef	97.8 a-c	53.1 c-e	51.8 c	7.9 h
	3	23.8 f	9.4 gh	18.4 e	46.0 de	29.0 d	3.9 h
5	6	0.7 g	0.0 h	0.0 f	2.8 f	3.8 e	0.0 h

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test, P<0.05.

효과적인 것으로 여겨진다. 본 실험에서 양치식물의 전엽체는 증식률에 근거할 때 0.05~0.5%에서 2일의 처리가 적절한 것으로 생각되며, 그러므로 다른 식물조직보다 colchicine에 비교적 강한 내성을 지니고 있는 것으로 여겨진다. 그러나 양치식물에서 배수성 식물체 유도에 효과적인 처리조건을 구하기 위해서는 이후 연구가 더 보충되어야 할 것으로 생각되었다.

적  요

6 종(도깨비고비, 참쇠고비, 족제비고사리, 꼬리고사리, 거미고사리 및 변산일엽)의 양치식물에서 돌연변이원 처리에 따른 영향을 구하고 인위적인 돌연변이를 유도하기 위하여, 균질화한 전엽체에 감마선 및 EMS, NMU, NaN₃등의 화학돌연변이원과 colchicine을 처리하였다. 전엽체 증식률은 전반적으로 처리동도 및 처리시간에 비례하여 감소되는 경향을 보였다. 전엽체의 증식률에 근거할 때, 감마선 처리의 최적 조건은 족제비고사리의 경우 20krad였으며, 그 나머지 종은 5~10krad 수준이었다. EMS의 적정 처리조건은 50mM에서 3시간이었으며, NMU는 5~10mM에서 1~3시간 수준이었다. 그리고 NaN₃ 처리의 적정조건은 0.5~1mM에서 1~3시간이었으며, colchicine의 경우 각각의 처리조건에서 전엽체 증식률은 종에 따라 다소 차이를 보였다.

사  사

본 연구는 산업자원부·한국산업기술평가원지원의 지역협력연구센터인 충북대학교 생물건강산업개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

인용문헌

- Arunyanart S. and S. Soontronyatara. 2002. Mutation induction by γ and X-ray irradiation in tissue cultured lotus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 70: 119-122.
- 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.
- Castillo, A.M., L. Cistue, M.P. Valles, J.M. Sanz, I. Romagosa and J.L. Molina-Cano. 2001. Efficient production of androgenic doubled-haploid mutants in barley by the application of sodium azide to anther and microspore culture. *Plant Cell Rep.* 20: 105-111.
- 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.
- Dorling, H.-P., J. Lin, H. Uhring and F. Salamini. 1999. Clonal analysis of the barley (*Hordeum vulgare* L.) leaf using periclinal chlorophyll chimeras. *Planta* 207: 335-342.
- 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.
- 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.

Table 5. Effect of colchicine treatments on proliferation of fern prothalli *In vitro*

Conc. (%)	Treatment du- ration (day)	Relative proliferation of prothalli to non-mutagenized (%)					
		<i>C. falcatum</i>	<i>C. caryoptideum</i>	<i>D. varia</i>	<i>A. incisum</i>	<i>C. sibiricus</i>	<i>P. scolopen- drium</i>
0.01	1	100.0 a ^z	100.0 a	100.0 a	100.0 ab	100.0 a	100.0 a
	1	98.4 a	95.2 a	97.8 a	97.6 a-c	97.7 ab	99.5 a
	2	102.9 a	86.4 ab	81.6 b	99.4 ab	95.2 ab	93.9 ab
	4	55.1 cd	49.7 cd	65.2 cd	99.5 ab	94.7 ab	46.3 c
0.05	1	97.2 b	99.4 a	103.4 a	98.6 a-c	96.4 ab	105.1 a
	2	101.5 a	84.6 ab	77.4 bc	100.8 a	90.3 ab	88.5 ab
	4	38.9 de	54.2 cd	60.5 d	81.4 cd	93.0 ab	48.3 c
	1	98.2 a	96.9 ab	102.6 a	96.1 a-c	97.6 ab	101.3 a
0.1	2	70.3 bc	92.4 ab	78.6 b	98.4 a-c	101.5 a	90.7 ab
	4	27.8 ef	30.9 d	65.3 cd	82.9 b-d	86.2 ab	44.4 c
	1	78.8 b	89.2 ab	100.9 a	92.9 a-c	98.8 ab	96.5 a
	2	72.3 bc	66.2 bc	80.4 b	95.9 a-c	90.5 ab	73.5 b
0.5	4	19.7 f	41.5 cd	57.9 d	73.0 d	80.6 b	30.5 c

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test, P<0.05.

- Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers. Biological Plantarum 48: 173-177.
- Jeong, H.W. and S.S. Lee. 1997. Influence of NMU on embryo induction and plant development of microspore culture in Broccoli. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38: 379-383.
- Jones, D.L. 1987. Encyclopedia of ferns. Timer press, Portland.
- Joseph, R., H.H. Yeoh and C.S. Loh. 2004. Induced mutation in cassava using somatic embryos and the identification of mutant plants with altered starch yield and composition. Plant Cell Rep. 23: 91-98.
- Kadota, M. and Y. Niimi. 2002. *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. *Hosui*). Plant Cell Rep. 21: 282-286.
- Kim, J.S., I.C. Shin, J.S. Oh, Y.J. Paek and Y.H. Lee. 1996. Reaction of late blight (*Phytophthora infestans*) and RAPD polymorphism induced from *In vitro* culture of nodal stem by γ -ray irradiation. Kor. J. Breed. 28: 323-331.
- Kim, J.S., I.C. Shin, Y.S. Lee, J.K. Kim and H.S. Song. 1998. Effects of gamma ray on the seedling grown of rice varieties. Kor. J. Breed. 30: 227-231.
- Koh, G.C. 2000. Induction of mutation by irradiation of γ -ray on *In vitro* shoots of Perisimmon. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 27: 143-148.
- 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., 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, 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.
- Lee, S.W. and Z.H. Kim. 2003. Genetic relationship analysis of melons (*Cucumis melo*) germplasm by RAPD method. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 44: 307-313.
- Lee, Y.I., J.S. Kim, I.C. Shin and K.K. Kang. 1996. Selection from γ -ray-induced leaf mutation in *Perilla frutescens*. Kor. J. Breed. 28: 75-79.
- Lim, J.D., M.J. Kim and C.Y. Yu. 2000. Induction and RAPD analysis of mutant plants by chemical mutagens in *Gentiana axillarisflora* Leveille. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 27: 89-94.
- Malamug, J.J.F., S. Yazawa and T. Asahira. 1994. Morphological variants induced from shoot tips of taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] treated with gamma radiation. Sci. Hort. 58: 105-113.
- Mandal, A.K.A., D. Chakrabarty and S.K. Datta. 2000. Application of *In vitro* techniques in mutation breeding of chrysanthemum. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 60: 33-38.
- Mano, J., K. Kawamoto, G.C. Dismukes and K. Asada. 1993. Inhibition of the catalase reaction of photosystem II by anion. Photosyn. Res. 38: 433-440.
- Lotifi, M., A.R. Alan, M.J. Henning and M.M. Jahn. 2003. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. Plant Cell Rep. 21: 1121-1128.
- Paek, K.Y. and K.R. Han. 1988. Micropropagation of gloxinia (*Sinningia speciosa*) from hypocotyl and cotyledon segments and treatment of EMS and colchicine on regenerated shoot tips. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 29: 126-135.
- Rao A.V., M.A. Farooqui and A. Sadanandam. 1997. Induction of lincomycin and streptomycin resistance by nitroso-methylurea and ethylmethanesulphonate in *Capsicum annuum* L. Plant Cell Rep. 16: 865-868.
- Rose, J.B., J. Kubba and K.R. Tobutt. 2000. Induction of tetraploidy in *Buddleia globosa*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 63: 121-125.
- 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 gentiopicroside of *Gentiana scabra* Bunge. Kor. J. Med. Crop 3: 40-44.
- Shim, K.M., H.S. Song, S.H. Kim, H.I. Rhee and N.S. Kim. 1996. Variation of several agronomic and biochemical traits in γ -ray induced mutant soybeans. Kor. J. Breed. 28: 298-296.
- van Harten, A.M. 1998. Plant breeding. Theory and practical applications. Cambridge University press, New York.
- Wu, J.H. and P. Mooney. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from *In vitro* citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 70: 99-104.
- Zhang, D.H. and Y.K. Lee. 1997. Enhanced accumulation of secondary carotenoids in a mutant of the green alga, *Chlorococcum* sp. J. Appl. Phycol. 9: 459-463.

(접수일 2006.3.10 ; 수락일 2006.4.16)