

Ethyl-methane-sulfonate(EMS) 처리에 의한 춘란 잎 돌연변이 품종의 개발

신윤호^{1†}, 송인자^{1,2†}, 강은정⁴, 배태웅², 선현진², 강시용⁴, 임평옥^{2,3}, 이효연^{1,2*}

¹제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부, ²제주대학교 아열대원예산업연구소, ³제주대학교 사범대학 과학교육과,
⁴한국원자력연구원 정읍 방사선과학연구소

Development of Leaf Mutant Cultivars of *Cymbidium goeringii* by Ethyl-methane-sulfonate (EMS) Treatment.

Yun-Ho Shin^{1†}, In-Ja Song^{1,2†}, Eun-Jung Kang⁴, Tae-Woong Bae², Hyeon-Jin Sun²,
Si-Young Kang⁴, Pyung-Ok Lim^{2,3} and Hyo-Yeon Lee^{1,2*}

¹Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

³Department of Science Education, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

⁴Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

[†]The first two authors contributed equally to this work

Abstract - This study was for developing leaf chlorophyll mutant cultivars of *Cymbidium goeringii* by ethyl-methane-sulfonate(EMS) treatment. Chlorophyll mutant rhizomes were easily produced by 0.2% EMS treatment in this genus. Among the mutants, they became dark brown about 50% of the rhizomes. When the dark-brown rhizomes were cultured in a solidified MS medium, new rhizomes were formed from part of the old ones. Chlorophyll mutant rhizomes were obtained from subcultured meristem tissues of newly-formed rhizomes. The rhizomes were cut and subcultured for a year and then became mutant plants. As the results, they produced 4 kinds of leaf mutant cultivars; zigzag-striped, comb-striped, net-striped, and dwarf types, indicating that the EMS treatment in the rhizome could produce versatile leaf chlorophyll regulating mutants. These results suggest that our method is useful for developing leaf mutant cultivars of this planta which they are estimated as higher commercial values.

Key words - EMS(ethyl-methane-sulfonate), Chlorophyll deficient, Mutant, Rhizome

서 언

춘란(Spring orchid; *Cymbidium goeringii*)은 동양란 중에서 화형 화색의 변화가 매우 다양하여 예로부터 많은 애호가들을 확보하고 있다. 특히 잎에 엽록소 변이가 있는 잎 변이종은 높은 관상적 가치를 가지고 있어 소비자들에 게 선호되고 있는 품종 중의 하나이다. 이러한 춘란은 잎 무늬에 따라 중투(속빛무늬), 호(속줄무늬), 호반(얼룩무늬), 서반(안개무늬), 사피(그물무늬), 복륜(갓줄무늬), 선반(끝살 무늬), 산반(빛살무늬) 등으로 나뉘며 꽃 색에 따라 황화, 홍

화, 자화, 적화, 백화, 주금화, 복색화 등으로 나뉜다(이, 2006). 지금까지 이러한 돌연변이 식물들은 주로 자연계에서 발견되어 난 애호가들에 의해 품종화되어 왔다. 그러나 자연상태에서 돌연변이 난이 유도될 확률은 매우 낮으며 동일한 유형이 동시에 반복적으로 발생하지 않기 때문에 그 희소성이 높아 고가로 거래되고 있다. 특히 잎 변이종의 경우 주로 분주에 의한 증식에 의존하고 있어 증식속도가 매우 느리며, 종자를 파종하면 후대가 모체와 동일하지 않고 분리되어 이형주가 생산될 가능성이 높다(Paek et al., 1992; Choi and Chung, 1993). 또한 잎 변이종은 재배 및 관리방법이 불량하면 1년에 신초의 발생이 이루어

*교신저자(E-mail) : hyoyeon@jejunu.ac.kr

지지 않아 대량증식에는 한계가 있다(Paek *et al.*, 1992). 그 밖에 최근 들어 변이종의 난을 채취하기 위하여 전북(정읍, 부안, 고창), 전남(영광, 함평, 장성) 등 전국 각지의 난자생지에서 불법 도채가 심하게 일어난 결과 자생란의 생태계가 급속도로 파괴되어 가고 있다(Lee *et al.*, 1998). 그러므로 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 인위적으로 잎 변이종을 유도하고 대량증식 시킬 수 있는 방법을 확립하여 수요자에게 공급 가능하도록 해야 한다. 본 연구에서는 무균적으로 발아시킨 춘란 근경에 화학 돌연변이원인 EMS(ethyl-methane-sulfonate)를 처리하여 잎 돌연변이 식물체를 유도함과 동시에 각 계통의 변이를 고정시키고 그러한 변이체를 대량 증식시키고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에서는 춘란(*Cymbidium goeringii*) 종자를 무균적으로 발아시켜서 얻은 근경을 이용하였다.

완전히 개화한 춘란의 꽃을 자가수분 시켜 얻은 씨 꼬투리를 5°C에서 2주간 저온 처리한 후 2% sodium hypochlorite 용액에서 30분간 표면 살균하였다. 그 후 1차 표면 살균된 춘란 씨꼬투리를 70% 알코올에 침지시켜 알코올램프의 화염으로 표면을 1회 소독한 후 무균상 안에서 배양하였다. 춘란 종자를 효모추출액(yeast extract) 1 g/L, peptone 3 g/L, NAA 0.5 mg/L, sucrose 30 g/L가 포함된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 액체 배지에 배양한 후 25°C 암조건에서 24시간 교반하였다. 배지가 흡수된 종자를 5 mL 씩 멸균된 시험관에 넣고 발아를 촉진시키기 위하여 초음파 처리(Branson 3210 : 20분)하였다. 초음파 처리된 춘란 종자는 gelrite 0.2%, 활성탄 0.2%를 포함한 효모 추출액 고체배지에 파종하여 25°C, 3000 Lux의 연속 광 조건 하에서 발아시켰다. 춘란 종자로부터 유도된 근경은 약 5 cm 정도로 자랐을 때 NAA 2.0 mg/L, Kinetin 0.5 mg/L가 포함된 1/2 MS 고체배지에 계대배양하였다.

춘란 근경의 EMS 처리

근경 증식용 고체배지에서 3개월간 자란 근경 중 굵기가 균일한 근경을 골라 근경 증식용 액체 배지(1/2 MS, NAA 2.0 mg/L, Kinetin 0.5 mg/L)에서 2개월간 배양하였다. 근경은 5 cm 길이로 절단하여 삼각플라스크에 20개씩 치

상한 후 100 rpm으로 진탕 배양 하였다. 배양 중 phenol 성 물질로 인한 식물의 고사를 막기 위하여 3주 간격으로 계대배양하였다. 2개월간 배양된 근경 중 측면으로부터 새로운 근경이 2-3 mm 정도 자랐을 때 membrane filter (0.2 μm)로 멸균된 EMS(ethyl-methane-sulfonate)를 최종농도 0.2%가 되도록 첨가하여 3주간 암배양 하였다. EMS가 처리된 춘란 근경은 근경증식용 고체배지(1/2 MS, NAA 2.0 mg/L, Kinetin 0.5 mg/L, gelrite 0.2%, 활성탄 0.2%)에 치상하여 3주 간격으로 16회 계대배양하며 근경의 변이 상태를 관찰하였다.

잎 돌연변이 식물체의 유도

계대배양되고 있는 근경 중 부분적으로 녹색의 색소가 결핍되어 있거나 전체적으로 색소가 결핍되어 있는 근경 부위만을 골라 절단 한 후 Hyponex 배지 [Hyponex 3 g/L, peptone 4 g/L, 효모추출액(yeast extract) 1 g/L, 바나나 60 g/L, 감자전분 3.5 g/L, myo-inositol 100 mg/L, Na₂-EDTA 40 mg/L, gelrite 0.2%, pH 5.5]에 치상하여 식물체를 유도하였다.

잎 돌연변이 식물체의 외형적 관찰

잎 돌연변이 식물체의 외형적 관찰은 근경선발이 5년 이상 경과된 후 각각의 잎 돌연변이 특성이 나타나는 시점부터 관찰하였다. 잎 돌연변이 식물체는 Hyponex 배지에 근경을 치상한 후 약 6주 후에 첫 번째 축이 형성되었으며 약 7주 후에는 두 번째 축이 형성되기 시작하였다. 외형적 관찰은 근경배양 9주 후 첫 번째 축이 3 cm로 성장한 시점부터 24주 후 8 cm정도 자란 시점까지 관찰하였다. 또한 잎 돌연변이 식물체 중 단엽종은 근경 배양 9주 후에는 약 3 cm로 성장이 완전히 정지 되었으나 24주 후까지 지속적으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

색소변이 근경의 선발

춘란의 색소변이 근경을 선발하기 위해 EMS가 첨가된 근경증식배지에서 3주간 배양한 결과 50% 이상의 근경이 갈변되었다. 갈변되지 않은 주근경의 경우에도 측지근경은 형성되지 않았다(Fig. 1A). EMS 처리된 근경은 근경 증식용 고체배지에 치상하여 1개월 후 관찰하였다. 그 결과 갈

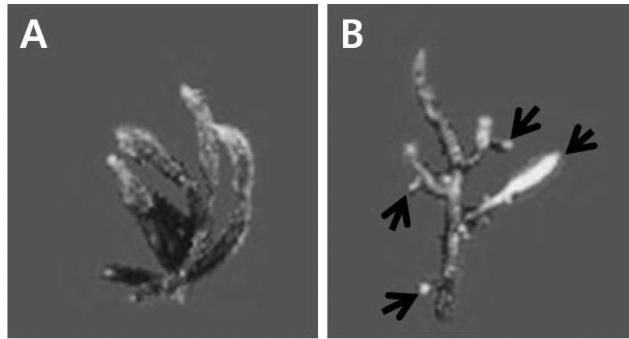


Fig. 1. The growth of EMS-treated rhizome. A: The rhizome was cultured in liquid growth medium containing 0.2% EMS for 3 weeks. B: The rhizome transferred to a solid growth medium without EMS and cultured for 2 months. Arrows: new rhizomes developed from dark brown one.

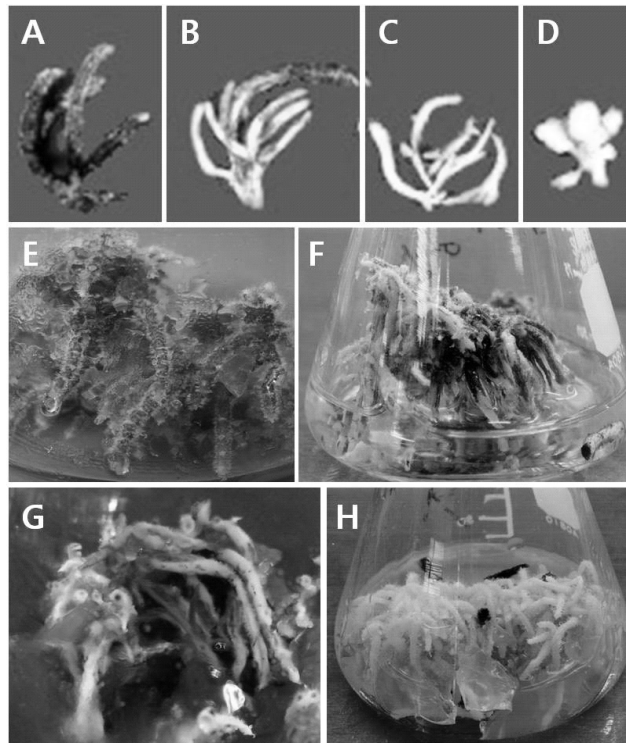


Fig. 2. Chlorophyll-deficient rhizome obtained from subcultured rhizome after EMS treatment. A, E: green rhizome. B, F: zigzag-striped rhizome. C, G: light yellow rhizome. D, H: white rhizome.

변된 근경의 일부 조직으로부터 새로운 측지근경의 생장이 관찰되기 시작하였다(Fig. 1B). 3주 간격으로 1년 이상 계대배양을 지속한 결과 EMS가 처리되지 않은 대조구의 경우 chlorophyll 변이가 관찰되지 않았으며, EMS 처리구에서는 녹색의 바탕에 나선형의 흰줄 또는 노란 줄무늬가 있는 근경과 근경 전체가 전반적으로 밝은 노란색을 띠는 근경, 흰색을 띠는 근경이 관찰되었다(Fig. 2). 유도된 색소 변이 근경은 비슷한 유형에 따라 분류하여 한 개의 배양병

에 5개씩 치상하였다. 변이 근경의 계대배양은 3개월 간격으로 수행되고 있으며 15년이 경과된 지금도 비슷한 유형을 유지하고 있다. 이러한 결과는 기존 한란을 이용하여 엽록소 결핍 돌연변이를 유도한 결과와 일치하며 이는 EMS 처리가 근경의 분열세포에 영향을 주어 변이가 발생된 것으로 생각된다(Lee *et al.*, 1998). 일반적으로 돌연변이 식물체를 유도하기 위해서는 물리적 돌연변이원인 X선, α 선, β 선, 중이온 beam(Wang *et al.*, 1988; Ling *et al.*, 1991;

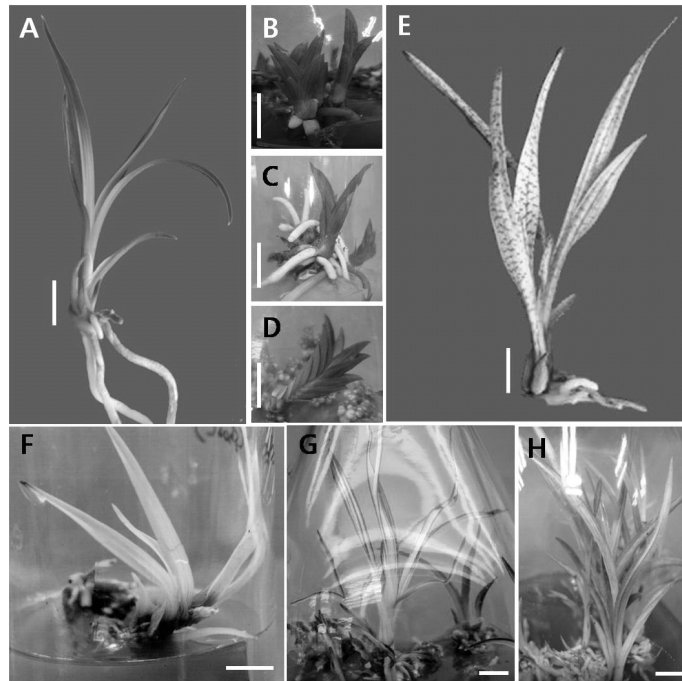


Fig. 3. Leaf mutant and normal plant induced from rhizome. A: green plant. B-D: dwarf plant. E: net-striped plant. F: albino plant, G: zigzag-striped plant. H: comb-striped plant (bar : 1 cm).

Abe *et al.*, 1997; Bae *et al.*, 2000; Naito *et al.*, 2005), Neutron(Bae *et al.*, 2005a), Proton(Bae *et al.*, 2005b) 과 화학적 돌연변이원인 EMS(Ethyl-methane-sulfonate), EO(Ethylene oxide), NMC(Nitro methylurea)가 주로 이용되고 있다(Adamska and Maluszynski, 1983; Lee *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2005; Hohmann *et al.*, 2005). 그러나 어떠한 경우에도 효과적인 돌연변이 식물체를 생산해 내기 위해서는 반치사량(LD₅₀)이 매우 중요하다. 본 연구에서도 예비실험결과 얻어진 반치사량을 토대로 근경이 고사하지 않는 범위(EMS 0.2%) 내에서 EMS를 처리하였으며, 이는 변이의 발생을 증가시킬 수 있는 중요한 요인이라고 생각된다.

변이 근경으로부터 식물체 유도

잎 돌연변이 식물체의 유도를 위해 근경에 외형적으로 무늬가 있는 부위만을 절단하여 식물체 재분화 배지에 치상한 후 3개월 간격으로 계대배양하였다. 초기에는 근경 변이만을 골라내어 배양하였으나 근경 배양이 5년 이상 경과되었을 때부터는 산반, 사피, 중투 등 잎 변이 형태별로 분류하여 배양하기 시작하였다(Fig. 3E-H). 그 결과 EMS를 처리하지 않은 근경은 식물체 재분화 배지에서 모두 녹색

잎을 가진 식물체로 분화된 반면(Fig. 3A, 4A) EMS 처리된 근경 중 흰색의 근경으로부터 유도된 식물체는 모두 백화된 식물체로 분화되었다(Fig. 3F). 전반적으로 밝은 노랑색의 무늬가 들어가 있는 근경으로부터 유도된 식물체는 잎 전체에 빛살처럼 가느다란 선이 부분적으로 들어가 있는 산반 식물체로 분화하였으며(Fig. 3H) 연한 노란색에 짙은 녹색을 띠는 근경으로부터 유도된 식물체는 잎의 가장자리에 짙은 녹색을 띠는 중투 형태의 식물체로 분화하였다(Fig. 3G, 4B). 또한 EMS를 처리하지 않은 근경과 같이 전체적으로 짙은 녹색을 띠는 근경으로부터 유도된 식물체는 사피 형태의 식물체로 분화하였다(Fig. 3E, 4C). 그 밖에 배양 중 엽록소 결핍 근경뿐만 아니라 굵고 짧은 형태의 근경이 형성되었으며, 이러한 근경을 배양하여 식물체를 유도해 본 결과 키가 왜소해진 단엽종과 파인애플형의 단엽종 식물체로 분화하였다(Fig. 3B-D). 이상의 결과는 근경의 엽록소 변이가 식물체로 분화되었을 경우에도 그 변이 형질이 지속된다는 사실을 보여준 것이며 이러한 변이 형태는 자연계에서 일어나는 변이와 유사한 형태의 표현형 변이가 일어난 것으로 사료된다. 또한 사피와 같이 대조구와 비교하여 근경에는 외형적 변화가 없으나 잎 변이가 일어난 것은 엽색체 내 변이라고 생각되며, 중투, 산반

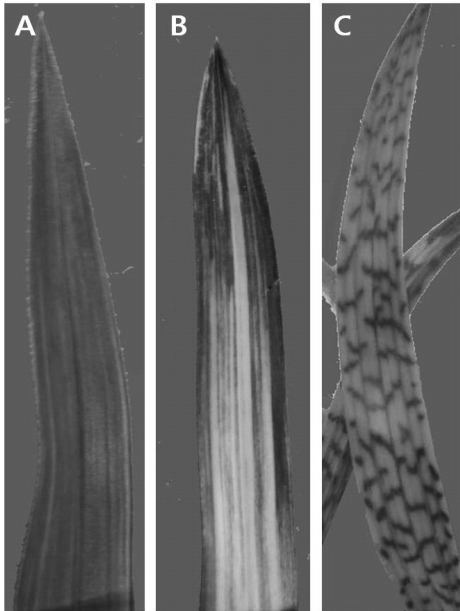


Fig. 4. Leaf mutant and normal plant induced rhizome. A: green plant. B: zigzag-striped plant. C: net-striped plant.

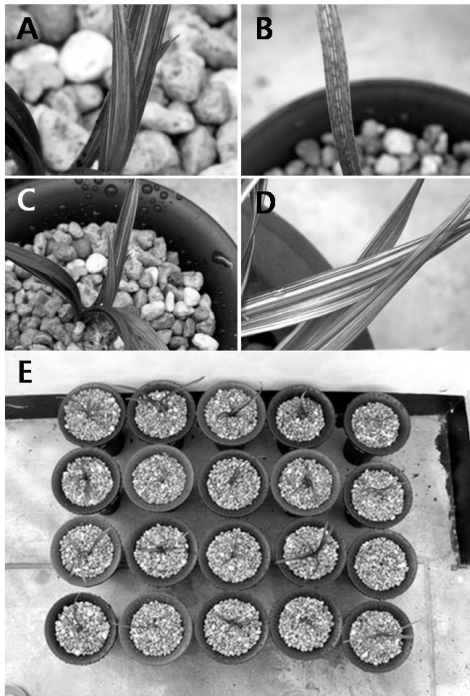


Fig. 5. Leaf mutant and normal plant grown on pot. A: green plant. B: net-striped plant. C-D: zigzag-striped plant. E: mutants of *Cymbidium goeringii* cultivated on pots for 6 months.

은 색소체 변이에 의해 발생된 것으로 추정하고 있다. 동양난 *Cymbidium* 계통인 한란에서도 돌연변이원인 EMS를 처리

하여 색소변이 식물체를 유도한 연구가 보고 되어 있으나 이러한 잎 변이를 일으키는 원인에 대해서는 명확하게 밝혀져 있지 않다(Lee *et al.*, 1998). 현재 춘란 잎 돌연변이 식물체를 이용하여 잎 변이를 일으키는 원인에 대해 규명하고자 분자생물학적 연구를 수행하고 있다. 또한 산반, 중투, 사피, 단엽종 등은 각 변이체별로 근경을 분류하여 3개월 간격으로 계대배양 하였으며 6개월 후에는 완전한 식물체로 성장하여 순화 시켰다(Fig. 5). 이상의 결과 춘란 잎 돌연변이 식물체를 유도하는 방법으로 근경의 EMS(ethyl-methane-sulfonate) 처리가 효과적인 것으로 확인되었으며, 본 연구에서 확립된 돌연변이 식물체의 유도 및 증식법은 근경으로 증식이 가능한 동양란 *Cymbidium*계통 난들의 다양한 잎 변이 식물체 육성에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

적 요

본 연구는 돌연변이원인 EMS(ethyl-methane-sulfonate)를 이용하여 춘란 잎 돌연변이 품종을 개발하고자 수행되었다. 조직배양기술을 이용하여 발아시킨 춘란 근경에 0.2%의 EMS를 처리함으로써 엽록소 결핍 돌연변이 근경을 유도하였다. EMS 처리시 50%이상의 춘란 근경이 갈변되었으며, 갈변된 근경을 근경증식용 고체배지에 배양하였을 때 갈변된 근경의 일부 조직으로부터 새로운 측지근경의 생장이 관찰되었다. 이러한 근경조직을 절단하여 1년간 계대배양하던 중 관찰된 색소변이 근경을 식물체로 재분화시킨 결과 중투, 사피, 산반, 단엽종 등 다양한 잎 돌연변이 식물체들로 분화하였다. 이러한 결과들로부터 EMS 처리에 의해 잎 돌연변이 식물체들이 효과적으로 유도되었음을 확인할 수 있었다. 또한 본 연구결과에서 얻어진 춘란 잎 돌연변이 식물체를 대량 증식시킬 수 있는 배양체계도 확립되어있다. 그러므로 본 연구에서 개발한 잎 돌연변이 춘란은 향후 산업적으로 이용이 가능할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 2007 0301034033), 농림수산 식품부 농림기술개발사업, 2010년도 정부의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원 사업으로 수행된 연구임(과제번호: 2010-0029630).

인용문헌

- Abe, T., C.H. Bae, T. Matsuyama and S. Yoshida. 1997. Hormone mutants obtained by heavy-ion beam irradiation. Am. Soc. Plant Physiol. S-787.
- Adamska, E. and M. Maluszynski. 1983. The stimulation of growth in shoots of *Nicotiana rustica* and *Nicotiana tabacum* after N-nitroso-N-methyl urea treatment. Acta. Biol. 11: 175-185.
- Bae, C.H., T. Abe, N. Nagata, N. Nobuhisa, T. Matsuyama, T. Nakano and S. Yoshida. 2000. Characterization of a periclinal chimera variegated tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Plant Sci. 151:93-101.
- Bae, C.H., J.S. Chai, J.H. Kim, T.G. Yang, J.I. Lyu, H.Y. Lee and D.C. Yang. 2005a. Characteristics of tobacco and rice plants irradiated with neutron beam. Kor. J. Plant Res. 18(3):359-366 (in Korean).
- Bae, C.H., J.I. Lyu, G. Sarantuya, J.S. Chai, J.H. Kim, T.G. Yang, M.Y. Lee and D.C. Yang. 2005b. Effects of proton beam irradiation on germination and growth of tobacco and rice plants. Kor. J. Plant Res. 18(3):462-469 (in Korean).
- Choi, S.O. and J.D. Chung. 1993. Factors influencing rhizome formation from shoot tip culture of temperate *Cymbidium* Species. Kor. J. Plant Tissue Cult. 20:247-254 (in Korean).
- Hohmann, U., G. Jacobs and C. Jung. 2005. An EMS mutagenesis protocol for sugar beet and isolation of non-bolting mutants. Plant Breed. 124:317-321.
- 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 Tissue Culture 25:183-187 (in Korean).
- Ling, D.X., D.J. Luckett and N.L. Darvey. 1991. Low-dose gamma irradiation promotes wheat anther culture response. Aust. J. Bot. 39:467-474.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plantarum 15:473-497.
- Naito, K., M. Kusaba, N. Shikazono, T. Takano, A. Tanaka, T. Tanisaka and M. Nishimura. 2005. Transmissible and nontransmissible mutations induced by irradiating *Arabidopsis thaliana* pollen with γ -rays and carbon ions. Genetics 169: 881-889.
- Paek, K.Y., Y.T. Lee, G.B. Shim and J.U. Kim. 1992. Effects of mineral levels on organogenesis in rhizome cultures of temperate *Cymbidiums in vitro*. Kor. J. Plant Tissue Culture 19:141-150 (in Korean).
- Wang, A.S., D.S.K. Cheng, J.B. Milcic and T.C. Yang. 1988. Effect of X-ray irradiation on maize inbred line B73 tissue cultures and regenerated plants. Crop Sci. 28: 358-362.
- Wu, J.L., C. Wu, C. Lei, M. Baraoidan, A. Bordeos, M.R. Madamba, M. Ramos-Pamplona, R. Mauleon, A. Portugal, V.J. Ulat, R. Bruskiwich, G. Wang, J. Leach, G. Khush and H. Leung. 2005. Chemical and irradiation induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics. Plant Mol. Biol. 59:85-97.
- Lee, JS. 2006. Orchid in Korea. Hyangmoon Publishing Co., Seoul, Korea. p. 28-30 (in Korean).

(접수일 2010.11.4; 수락일 2010.12.23)