Journal of Radiation Industry 6 (2) : 189~197 (2012)

감마선 및 화학적 돌연변이원 처리가 스테비아 (*Stevia rebaudiana* Bert.)의 종자 발아 및 초기 생장에 미치는 영향

윤태영* · 김이엽 · 김영호 · 최진수 · 현경섭 · 성윤희
조한직 · 김동섭[1] · 강시용[1] · 고정애[2]

한국스테비아(주) 연구소, [1]한국원자력연구원 첨단방사선연구소,
[2]전북대학교 농업생명과학대학 원예학과

Effects of Gamma-ray and Chemical Mutagens on the Germination and Seedling Growth in *Stevia rebaudiana* Bert.

Tai-Young Yoon*, Ee-Youb Kim, Young-Ho Kim, Gin-Su Choi, Kyung-Sup Hyun, Yoon-Hee Seong, Han-Jig Jo, Dong Sub Kim[1], Si-Yong Kang[1] and Jeong-Ae Ko[2]

Korea Stevia Research Institute, [1]Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute
[2]Department of Horticultural Science, Chonbuk National University

Abstract - This study was carried out to develop the improved useful mutants for yield or composition of stevia plants using the gamma ray or chemical mutagens treatments. The seeds of stevia 'Suwon No. 11' were irradiated up to 400 Gy of gamma ray. Chemical mutagens were treated on the seeds of the 'Suwon No. 11' using 0.07% colchicine, 10 mM sodium azide, or 10 mM NMU for various durations. The germination rate, and shoot and root growth of seedling were estimated at 30 days after gamma ray irradiation or chemical mutagen treatment, and the plant height, the number of branches, and leaf length and width were examined at 3 months after mutagenesis treatments. In the case of gamma ray treatments, the germination rate and early-stage growth were decreased as the increase of radiation dose, and the 50% lethal dose was found to be 200 Gy. the plant height was decreased as the increase of radiation dose, while the number of branches per plant and leaf length were increased. Leaf shape was modified to the relatively longer one compared to the control, which was identified more apparently at the treatments of higher than 150 Gy. In the treatment of chemical mutagens, the rate of germination and survival were decreased as the increase of incubation time. The 50% lethal dose for germination rate were identified as the conditions of the 15 hours incubation in 0.07% colchicine, the 4 hrs in 10 mM sodium azide, and the 2 hrs in 10 mM NMU, in the three chemical mutagens treatments. Chemical mutagens had no influence on shoot growth, while root growth was increased, especially as the incubation time was extended. The highest root growth occurred in the NMU treatment at 6 hrs incubation time. The plant height was decreased as the increase of incubation time in the chemical mutagens treatments. Among the chemical mutagens, NMU was the most effective to induce the mutants with long-shaped or the least lobed leaves.

Key words : Gamma-ray, Chemical mutagens, Mutation, LD_{50}, Stevia plant

* Corresponding author: Tai-Young Yoon, Tel. +82-63-538-3704,
Fax. +82-63-534-0222, E-mail. jforall@hanmail.net

서 론

스테비아 (*Stevia rebaudiana* Bert.)는 국화과의 다년생 초본식물로 남미 파라과이가 원산지로서 주로 작은 하천이나 습지대 주변에서 자생한다 (Katayama *et al.* 1976; Hanson and De Oliveira 1993). 스테비아 추출물은 남미의 부족들에 의해 수 백 년 동안 감미료와 전통의약품으로 사용되어 왔다 (Kinghorn and Soejarto 2002). 특히 stevioside는 스테비아에 함유된 배당체로서 설탕보다 250~300배의 감미를 갖는 저칼로리의 고감미 성분이다. 감미성분인 steviol glycoside은 스테비아속 154종 중 *Stevia rebaudiana* Bert.만이 steviol glycoside를 생산하는 유일한 식물인데, 주로 잎에 함유되어 있다 (Soejarto *et al.* 1983; Nishiyama *et al.* 1992; Chalapathi and Thimmegowda 1997).

최근 당뇨병과 비만이 증가하고 있어 설탕을 대체할 천연감미료에 관심이 집중되고 있다. 스테비아에서 추출한 stevioside가 감미료, 당뇨 및 비만 치료제 등에 설탕 대체 첨가제로 수요가 급속히 증가하고 있으며, 여러 가지 염장채소, 건어물, 장류, 음료, 사탕, 껌, 요구르트, 아이스크림, 치약 및 구강청결제 등에도 이용되고 있다 (Soejarto *et al.* 1983).

우리나라에는 스테비아가 1973년에 도입되어 일부 지역에서 재배가 시도되었고, 스테비아 품종개량 연구는 농촌진흥청에서 1975년 시작되어 1979년도에 '수원 2호', 1982년에 '수원 11호'가 육성된 바 있다 (Lee *et al.* 1979, 1982). 현재 국내에서 재배되고 있는 스테비아 품종은 수확량, 품질, 감미성분, 일장반응 등 개량해야 할 점이 많다.

'수원 11호'는 일본과 중국에서 재배하고 있는 품종들과 비교해 보면 초장과 잎이 커서 수확량은 많지만 설탕과 유사한 감미도를 갖는 rebaudioside A의 함량이 낮아 경쟁력이 떨어진다. 그리고 수형은 반 직립성이고 수확 전까지 하엽이 고사하는 현상이 많이 나타나 수확과 작업의 효율이 떨어진다. '수원 11호'는 잎과 줄기를 이용하여 비료와 사료로 사용하기에는 적합하지만 rebaudioside A의 함량이 적어 잎을 이용하는 차와 감미료로는 적합하지 않으며, 종자의 결실률이 낮고 고정화 되기 어려운 종자번식의 단점을 보완하기 위한 품종개량 연구가 필요하다. 그러나, 스테비아는 전형적인 타가수정 식물이며 꽃의 크기가 작아 교배육종이 어렵고 육종기간도 장기간 소요되는 단점이 있다. 하지만 돌연변이 육종기술은 교배육종이 어려운 식물에도 적용이 가능하며 기존 품종의 단점형질을 개량하는 데 뛰어난 장점을 가지고 있다 (Schum and Preil 1998). 특히 영양번식 작물에서는 체세포변이에 의해 일단 변이체가 선발되면 영양체로 유전형질이 고정된 개체를 대량으로 번식시킬 수 있어 단기간에 품종개량이 가능하다.

따라서, 본 연구에서는 다수성이면서 stevioside 및 rebaudioside A 고함유의 특성을 지닌 스테비아 계통을 육성하고자 스테비아 종자에 감마선 및 화학적 돌연변이원을 처리하여 M_1세대의 발아율, 생존율 및 유묘생육 등 돌연변이원에 대한 감수성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 공시재료는 한국스테비아 (주)에서 재배하고 있는 스테비아 품종 '수원 11호'로서 2007년에 수확한 건조종자를 이용하였다.

2. 방사선 조사

스테비아 종자에 대한 감마선 조사는 한국원자력연구원 정읍 첨단방사선연구소의 저준위 감마선 조사시설 (^{60}Co gamma-irradiator, 150 TBq of capacity; ACEL, Canada)을 이용하였다. 본 실험은 50, 100, 150, 200, 300 및 400 Gy의 선량으로 24시간 동안 조사하였다.

3. 화학적 돌연변이원 처리

화학적 돌연변이원이 스테비아의 발아율 및 초기 생육에 미치는 효과를 조사하기 위해 스테비아 종자에 농도와 처리시간을 달리하여 처리하였다. 처리된 돌연변이원으로는 colchicine, sodium azide (NaN_3), NMU (N-nitroso-N-methylurea)를 사용하였으며, 1차적으로 적정농도를 선정하기 위하여 colchicine은 0.05%와 0.1%의 농도로, sodium azide는 10 mM과 20 mM의 농도로, NMU는 5 mM과 10 mM의 농도로 조정한 후 5시간과 10시간 동안 침지처리를 하였다.

Colchicine은 소량의 알코올에 녹인 후 pH 6.0, 온도 20±1°C로 처리하였다. Sodium azide는 0.1 M phosphate buffer, pH 3.0, 온도 20±1°C에 처리하였다. 그리고 NMU는 pH 6.0, 온도 20±1°C에서 처리하였다. 2번째 실험은 첫 번째 실험에서 선정된 colchicine 0.07%, sodium azide 10 mM, NMU 10 mM 농도조건에서 처리시간을 달리하여 처리하였다. 스테비아 종자 처리시간은 colchicine 용액에 5, 10, 15시간 동안, sodium azide 및 NMU 용액에 각각 2, 4, 6시간 동안 침지처리하였다. 변이원을 처리한 종자는

멸균수로 5회 수세하여 발아상에 치상하였다.

4. 발아율 및 초기 생육조사

본 실험은 각각 돌연변이원을 처리한 종자 및 무처리 종자를 petri-dish에 filter paper를 깔고 수분을 흡수시킨 후 100립씩 3반복으로 치상하여 온도 25±1°C, 상대습도 70~80%, 명암 16/8시간 조건으로 생장상에서 발아시켰다. 처리에 따른 초기 생육의 차이를 조사하고자 25공 트레이에 파종 30일 후 생존율, 신초길이, 뿌리길이 등을 조사하였다.

파종 3개월 후에 각각 돌연변이원에 따라 초장, 분지수, 엽장, 엽폭 등 생육조사를 하였으며, 무작위로 200개체씩 선발하여 외형적인 잎의 형태 및 잎 가장자리의 거치를 조사하여 변이성 여부를 확인하였다.

초장은 각 개체별로 지재부에서 주경의 끝까지를 측정하였으며, 잎은 둥근 형(round), 긴 형(long), 아주 긴 형(extra long)으로 구분하여 조사하였고 잎 가장자리의 거치는 완만한 모양(moderate), 강한 모양(strong), 아주 강한 모양(extra strong)으로 구분하여 조사하였다(Fig. 1).

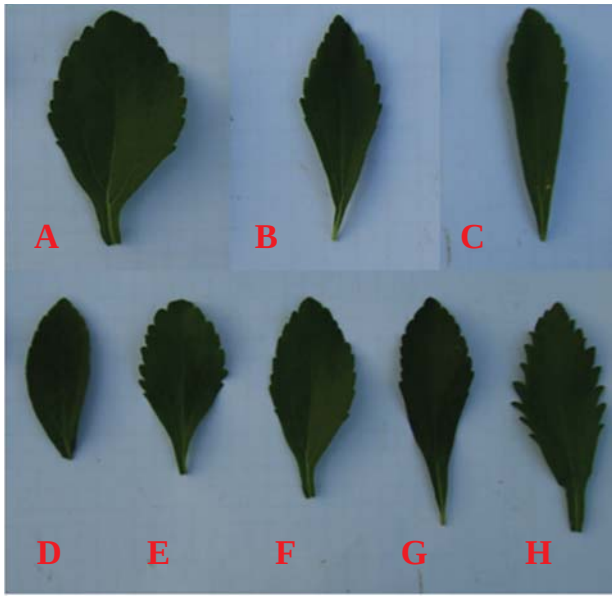

Fig. 1. Characteristics of leaves in M_1 generation induced by treatment of gamma ray and chemical mutagens on the stevia seeds. Leaf shape: A) round type, B) long type, C) extra long type. Lobation: D) moderate, E)~G) strong, H) extra strong.

결과 및 논의

1. 감마선 조사구의 감수성

스테비아 종자는 자가 불화합성으로 인한 불임성 종자가 많으므로 종자성숙도에 따라 발아율의 차이가 크다. 원품종인 '수원 11호'의 종자도 종자성숙도에 따라 발아율이 30~60% 정도이며, 완숙된 종자라도 60~70% 이상 발아하기가 어렵다(Lee *et al.* 1982). 본 실험에서는 종자를 선별하여 처리하지 않았기 때문에 무처리구의 경우 약 35% 정도로 낮았다.

스테비아 종자에 50~400 Gy의 감마선을 조사한 결과, 발아율이 50 Gy는 33.3%, 300 Gy에서는 14.3%, 400 Gy에서는 4.7%로 대조구에 비해 선량이 증가할수록 낮게 나타났다(Fig. 2). 대조구와 비교하여 반치사선량인 LD_{50}은 200 Gy 정도로 판단되었다.

감마선 조사가 유묘생육에 미치는 영향을 조사하였던 결과, 발아 5일 후에 자엽이 전개되었고 각각의 처리구에서 대조구와 거의 비슷하게 출현하였다. 그리고 200 Gy 이상 처리구는 발아 후 본엽이 전개되지 못했고 자엽과 배축이 황화되어 고사하는 현상이 나타났다. 30일 후의 생존율은 조사선량이 증가할수록 낮게 나타났으며, 200 Gy에서 생존율이 16.5%로 현저히 떨어지는 경향을 보였다(Table 1). 50 Gy에서는 대조구와 비교해 보면 지

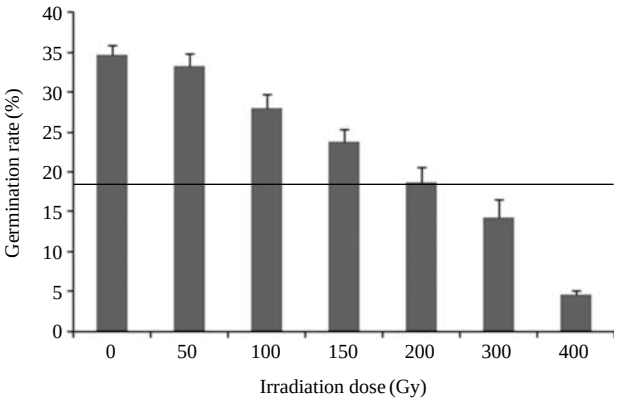

Fig. 2. Germination rate of stevia seeds according to the gamma ray dose at 10 days after irradiation.

상부와 지하부의 생육정도가 유사하게 나타났다. 감마선의 선량이 증가할수록 생존율, 신초 및 뿌리의 생육이 떨어지는 경향을 보였다. 그리고 300 Gy 조사구에서는 평균 신초길이가 1.8 cm로 대조구의 신초길이 3.5 cm와 비교해 보면 생육이 현저히 떨어졌다. 뿌리의 생육은 150 Gy 이상 처리구에서 대조구와 유의적으로 감소하였으며, 신초의 생육도 100 Gy 이상 처리구에서 대조구와 유의적으로 감소하였다. 이와 같이 감마선 조사는 스테비아 초기 생육에서 뿌리보다 신초 신장에 더 큰 영향을 주는 것으로 나타났는데, 잔디의 경우와도 유사한 경

Table 1. Survival rate, shoot and root length of seedlings in *Stevia rebaudiana* Bert. at 30 days after gamma irradiation

Dose-(Gy)	Survival rate (%)	Shoot length (cm)	Root length (cm)
0	33.8a[z]	3.5a	5.8a
50	33.0a	3.3ab	5.6ab
100	27.5b	3.2b	5.6ab
150	22.7c	2.9bc	5.1b
200	16.5d	2.5c	4.2c
300	11.6d	1.8d	3.9c

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, p=0.05.

Table 2. Plant height, branch number per plant, and leaf length and width in *Stevia rebaudiana* Bert. at 3 months after gamma irradiation

Dose-(Gy)	Plant height (cm)	No. of branches per plant	Leaf size (cm)	
			Length	Width
0	132.4a[z]	11.5bc	5.8b	2.8a
50	131.2a	10.7c	5.9b	2.6ab
100	128.5ab	11.8b	6.1ab	2.5b
150	122.7b	13.1a	6.7a	2.4b
200	116.4c	12.6ab	6.6a	2.3b
300	109.2d	12.4ab	6.2ab	2.4b

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, p=0.05

향을 보였다(Lee *et al.* 2008).

파종 3개월 후 생육조사를 한 결과(Table 2), 감마선 조사선량이 증가할수록 초장은 감소하여 150 Gy 이상 처리구에서는 대조구와 유의적인 차이를 보였다. 개체당 분지수의 경우 선량이 150 Gy까지는 증가하다가 그 이상의 선량에서는 감소하였다. 대조구와 비교해 보면 감마선 선량이 증가할수록 엽장은 증가하였으며 150 Gy 이상 처리구에서 유의적인 차이를 보였다. 또한 조사선량이 증가할수록 엽폭은 감소하였으며 100 Gy 이상 처리구에서 유의적인 차이를 보였다. 방사선에 대한 감수성은 품종차이, 시료의 수분 함량이나 생육단계 등 여러 가지 조건에 따라서 다르다고 보고되어 있다(Kwon and Won 1978). 감마선 감수성에 관한 연구보고에서 국화과 식물인 털머위 종자의 LD_{50}은 25 Gy (Park *et al.* 2008), 국화 기내식물체의 LD_{50}은 40 Gy (Goo *et al.* 2003), 자주초롱꽃 종자의 LD_{50}은 75 Gy (Choi *et al.* 2006), 층꽃나무 종자의 LD_{50}은 100 Gy (Park *et al.* 2010), 술패랭이꽃 종자의 LD_{50}은 150 Gy (Park *et al.* 2010) 및 홍화 종자의 LD_{50}은 200 Gy (Shin *et al.* 2005) 등으로 보고되었다. 또한 잔디류 종자의 LD_{50}은 100～500 Gy로 품종에 따라 다양하며 (Lee *et al.* 2008), 수도 종자의 LD_{50}은 품종에 따라 다소 차이는 있지만 200～300 Gy로 나타났다. 이와 같이 식물의 종이나 품종에 따라 방사선 감수성에 차이가 나

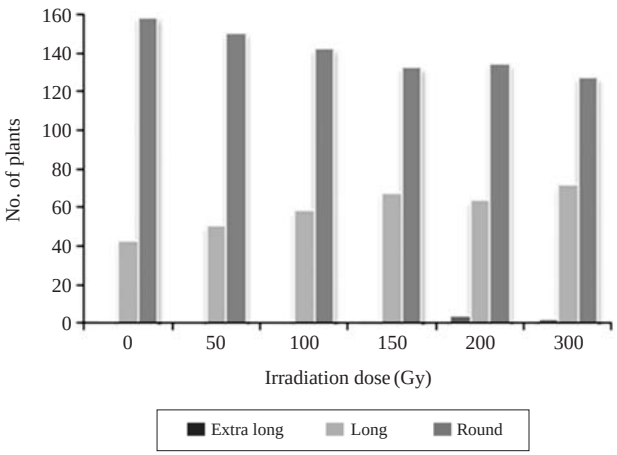

Fig. 3. The effects of gamma ray treatment on leaf shape of stevia at 3 months after irradiation.

는 것은 염색체의 크기, DNA 함량, 손상된 DNA 분자의 회복능력, 생성된 과산화수소를 제거하는 효소의 활성, 수분 함량에 의해서 달라진다고 알려져 있다(Oh *et al.* 2003). 방사선 조사선량은 LD_{50}을 기준으로 하여 추정할 수 있으며, 일반적으로 실생번식 식물에서는 LD_{50} 또는 LD_{80}의 선량을 적용하지만 영양번식 식물에서는 $LD_{30\sim40}$을 기준으로 한다는 보고도 있다(Kim and Lee 1998; Doo *et al.* 2001). 돌연변이 육종의 궁극적 목적인 양질, 내병성, 다수성 품종을 육성하기 위해서는 LD_{50}보다는 약한 선량에서 목적한 유용돌연변이 형질의 유기가 더 잘 일어나고, 발아 후 생존율과 생육상태를 고려한다면 $LD_{30\sim40}$의 약한 선량을 조사하는 것이 선발효율을 높여 준다는 이론이다(Doo *et al.* 2001).

술패랭이꽃 종자에 감마선을 조사한 결과, 엽장은 90 Gy에서 대조구보다 길었으며 엽폭은 150 Gy에서 짧아졌다고 보고되고 있다. 그리고 층꽃나무 종자에 감마선을 조사한 결과, 선량이 증가할수록 엽장은 감소하였으며 엽폭은 증가하였다는 연구결과가 있다(Park *et al.* 2010). 이와 같은 연구결과를 보면 감마선 선량 및 품종에 따라 엽형은 다양한 변이가 일어났으며, 스테비아 엽형에 대한 변이양상은 술패랭이꽃의 변이 양상과 유사하다고 할 수 있다.

파종 3개월 후에 조사한 대조구의 잎은 둥근 형이며 잎 가장자리의 거치는 대부분 강한 모양이었다(Fig. 3). 감마선 조사구의 엽형을 대조구와 비교해 보면 고선량으로 갈수록 둥근 형은 감소하였으며 긴 형이 증가하는 경향을 보였다. 그리고 150 Gy 이상 처리구에서 아주 긴 형의 잎 변이체가 처음 나타났으며, 200 Gy에서 3개체로 가장 많이 나타났다. 이처럼 스테비아는 감마선 조사구

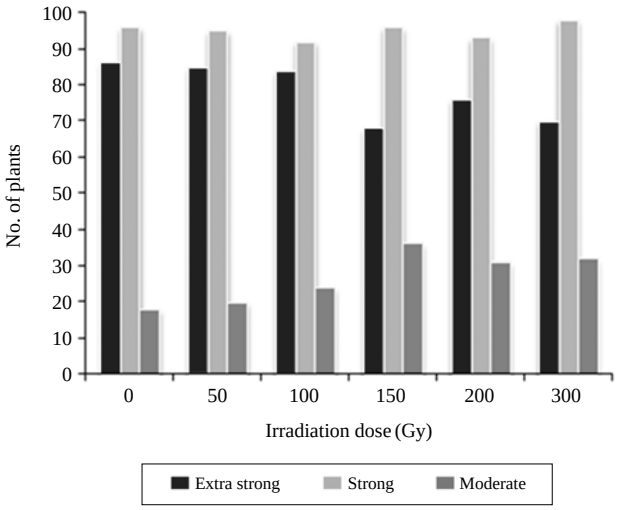

Fig. 4. The effects of gamma ray treatment on leaf lobation of stevia at 3 months after irradiation.

에서 초장이나 엽폭이 작은 경향을 보였는데, 이는 감마선이 생장점을 죽이거나 생장점 부근에 있는 분열조직의 활동을 억제한다는 보고와 관련이 있을 것으로 사료된다 (Sachs and Hackett 1972). 옥잠화 종자에 감마선을 조사한 결과를 보면 엽장은 선량별 유의적인 차이가 없었고 엽폭은 15 Gy 이상 처리구부터 대조구와 유의적인 차이를 보였다 (Park *et al.* 2008). 반면에 털머위 종자에 처리한 결과를 보면 엽장은 25 Gy에서 유의적인 차이를 보였고 엽폭은 선량별 유의적인 차이가 없었다. 이러한 연구결과 중 긴 형의 엽형 변이가 유기된 옥잠화의 경우가 스테비아와 유사하였다.

감마선 조사선량에 따른 잎 가장자리의 거치는 엽형과 상관관계를 가지고 있었는데 둥근 형으로 갈수록 거치는 강한 모양을 나타냈으며, 아주 긴 형으로 갈수록 완만한 모양을 나타냈다 (Fig. 4). 고선량 조사구에서는 대조구보다 완만한 모양이 증가하였다. 150 Gy에서 완만한 모양은 36개체로 가장 많이 나타났다. 반면 아주 강한 모양은 68개체로 가장 적게 나타났다.

2. 화학적 돌연변이원 처리구의 감수성

돌연변이 유발원으로 널리 이용되고 있는 colchicine, sodium azide 및 NMU를 적정농도와 처리시간을 선정하기 위하여 선행실험을 실시하였다 (Table 3). 돌연변이원, 농도 및 처리시간 등에 따라 스테비아 종자발아율은 각각 다르지만 대조구의 LD_{50}인 18.9%를 기준으로 농도와 처리시간을 선정하였다. 선행실험을 토대로 본 실험은 돌연변이원에 따라 한 가지 농도에 처리시간을 세부적으로 구분하여 처리하였다.

Table 3. The effects of concentration and time chemical mutagens treatment on germination rate of stevia seeds at 10 days after mutagens treatment

Treatment	Mutagen concentration	time	No. of seeds tested	Germination rate (%)
Control			300	37.8±4.5[z]
Colchicine	0.05%	5 hr	300	33.6±6.4
		10 hr	300	27.2±7.5
	0.1%	5 hr	300	18.2±5.8
		10 hr	300	11.7±6.8
Sodium azide	10 mM	5 hr	300	12.8±4.8
		10 hr	300	5.4±2.4
	20 mM	5 hr	300	3.8±1.5
		10 hr	300	0.0±0.0
NMU	5 mM	5 hr	300	28.5±6.2
		10 hr	300	21.2±5.8
	10 mM	5 hr	300	10.4±3.4
		10 hr	300	5.8±2.5

[z]Mean±SE

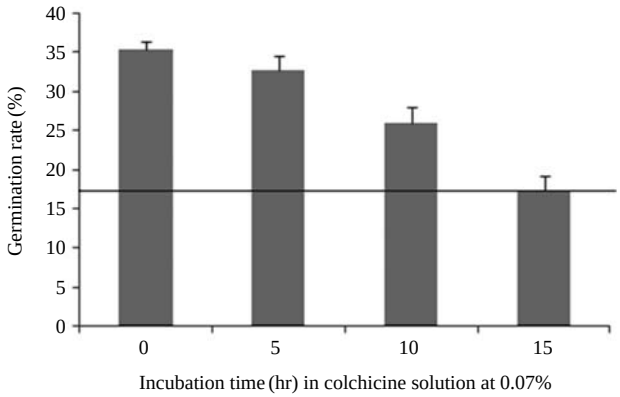

Fig. 5. Germination rate of stevia seeds according to the incubation time in 0.07% colchicine solution.

Colchicine 0.07%에서 5, 10, 15시간을 침지처리한 결과, 5시간 처리구의 발아율은 대조구의 발아율인 35.3%보다 약간 낮은 32.7%이었지만 10시간 처리구는 26.0%로 현저한 차이가 나타났다 (Fig. 5). 그리고 15시간 처리구는 17.3%로 대조구와 비교할 때 LD_{50} 수준으로 판단된다.

Jin *et al.* (2003)은 땅나리 종자에 colchicine을 처리할 때 치사량 (LD_{50})을 감안하여 0.2%에서 4일 또는 0.5%에서 2일 처리하는 것이 변이가 잘 일어나는 조건임을 밝혔다. 그리고 Koh *et al.* (2001)은 꽃창포의 배수성 유기를 위한 colchicine 처리 시 농도에 따른 생존율을 조사한 결과 생존율과 배수성 유기가 용이한 농도는 0.05~0.1%로 보고하였다. 이는 스테비아 종자의 적정 처리농도와 유사한 수준인 것으로 판단된다.

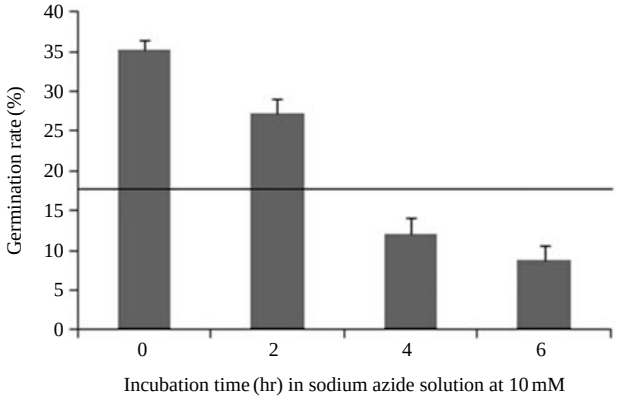

Fig. 6. Germination rate of stevia seeds according to the incubation time in 10 mM sodium azide solution.

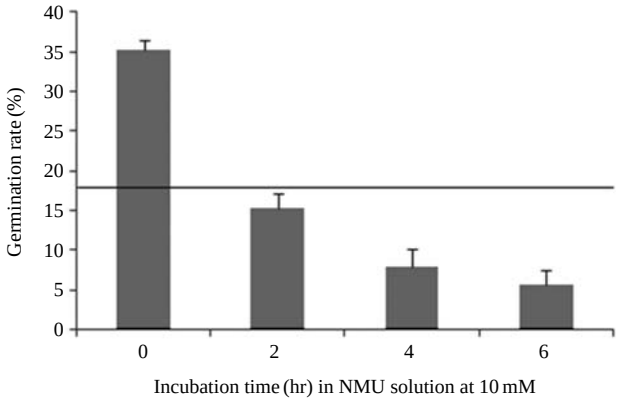

Fig. 7. Germination rate of stevia seeds according to the incubation time in 10 mM NMU solution.

Sodium azide 10 mM에서 2, 4, 6시간을 침지 처리한 결과, 2시간 처리구의 발아율은 27.3%로 나타났으며, 4시간 처리구의 발아율은 12%로 대조구와 비교할 때 LD_{70}으로 판단되었다 (Fig. 6). 그리고 6시간 처리구에서는 발아율이 8.7%로 현저히 감소하였다. Sodium azide에 대한 스테비아 종자의 LD_{50}은 10 mM에서 3시간 처리로 판단된다.

Sodium azide를 보리의 꽃가루에 처리한 경우 0.1～1 mM에서 6시간, 소포자는 0.01～0.1 mM에서 1시간 처리가 이용되었다 (Castillo *et al.* 2001). 그리고 술패랭이 종자에 처리한 경우 0.1 mM에서 급격한 발아율 저하를 보였고 0.2 mM의 경우 약 20%의 발아율을 보였으며, 그 이상의 농도에서는 전혀 발아가 이루어지지 않았다 (Lee *et al.* 2000). Arenaz and Nilan (1981)은 sodium azide의 농도가 비록 낮아도 4시간 이상 처리하면 식물체가 대부분 고사되었다고 보고하였다. 이와 같은 연구보고는 스테비아 종자의 처리조건과 현격한 차이를 나타냈다. 따라서 다른 식물에 비해 스테비아 종자의 감수성이 다소 낮은 수준으로 판단된다.

Table 4. The effects of colchicine, sodium azide and NMU treatments on survival rate, shoot and root length of stevia seedlings at 30 days after mutagens treatment

Treatment	Mutagen time	Survival rate (%)	Shoot length (cm)	Root length (cm)
Control		33.2a[z]	3.2b	5.6c
Colchicine 0.07%	5 hr	30.5ab	3.3ab	5.8c
	10 hr	23.4b	3.5a	6.2b
	15 hr	14.8c	3.2b	5.6cd
Sodium azide 10 mM	2 hr	25.3b	3.2b	5.7c
	4 hr	11.2cd	3.4a	6.1bc
	6 hr	8.5cd	3.3ab	6.8b
NMU 10 mM	2 hr	13.0c	3.2b	8.9ab
	4 hr	7.4cd	3.3ab	9.1a
	6 hr	4.2d	3.5a	9.5a

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, p=0.05.

NMU 10 mM에서 2, 4, 6시간을 침지처리한 결과, 2시간 처리구의 발아율은 15.3%로 대조구와 비교할 때 LD_{60}으로 판단된다. 발아율은 4시간 처리구에서 현저히 감소하여 8%로 나타났으며, 6시간 처리구는 5.7%로 화학 돌연변이원 중 가장 낮게 나타났다 (Fig. 7).

Jeong and Lee (2006a)는 양치식물의 전엽체에 NMU 처리에 대한 적정조건을 보면 도깨비고비에서는 5 mM에서 3시간 처리와 10 mM에서 1시간 처리가 적당하였으며, 참쇠고비와 족제비고사리는 5～10 mM에서 3시간 처리가 적당하다고 한다. 술패랭이 종자에 처리한 경우 적정농도는 0.1～0.2 mM이었고, 2 mM에서는 발아하지 않았다 (Lee *et al.* 2000). 스테비아 종자에 대한 적정조건은 5 mM에서 6시간 처리와 10 mM에서 1～2시간 처리가 적정조건으로 조사되었는데, 이는 양치식물의 전엽체와 유사한 수준이었다.

스테비아의 종자에 colchicine, sodium azide 및 NMU 처리가 초기 유묘생육에 미치는 영향을 조사하였던 결과, 발아 5일 후부터 자엽이 전개하였으며, 각각의 돌연변이원 처리구가 대조구보다 1～2일 정도 늦게 자엽이 전개하였다. 그리고 처리구에 따라 발아 후 자엽과 배축이 황화하면서 고사하는 현상이 나타났으며, 처리구별 생존율은 발아율보다 약간 낮게 나타났다.

Colchicine 처리구는 대조구와 비교해 보면 신초와 뿌리의 생육에 별로 차이가 없었으나, 생존율은 10시간 이상 처리구에서 유의적으로 감소하였다 (Table 4). Sodium azide 처리구에서는 신초생육은 대조구와 유사한 반면 처리시간이 길수록 뿌리생육이 증가하였다 (Table 4). NMU 처리구에서는 처리시간이 길수록 신초와 뿌리의

Table 5. The effects of colchicine, sodium azide and NMU treatment on plant height, branch number per plant and leaf length and width of stevia at 3 months after mutagens treatment

Chemical mutagens		Plant height (cm)	No. of branches per plant	Leaf (cm)	
				Length	Width
Control		132.8±11.5[z]	12.1±5.2	5.8±0.3	2.9±0.2
Colchicine 0.07%	5 hr	132.6±14.3	12.2±5.6	5.9±0.4	3.0±0.2
	10 hr	131.4±18.2	11.9±6.4	6.2±0.4	3.1±0.2
	15 hr	130.6±23.8	11.7±8.1	6.1±0.5	3.1±0.3
Sodium azide 10 mM	2 hr	130.5±13.4	12.6±9.2	5.8±0.4	2.8±0.3
	4 hr	127.5±15.6	12.8±10.5	6.0±0.5	2.7±0.3
	6 hr	126.2±18.9	13.5±6.8	6.1±0.6	2.7±0.3
NMU 10 mM	2 hr	129.7±13.7	12.9±7.5	6.1±0.6	2.7±0.2
	4 hr	128.5±15.5	13.6±11.6	6.2±0.7	2.6±0.4
	6 hr	125.6±17.6	14.2±12.8	6.0±0.6	2.6±0.4

[z]Mean±SE

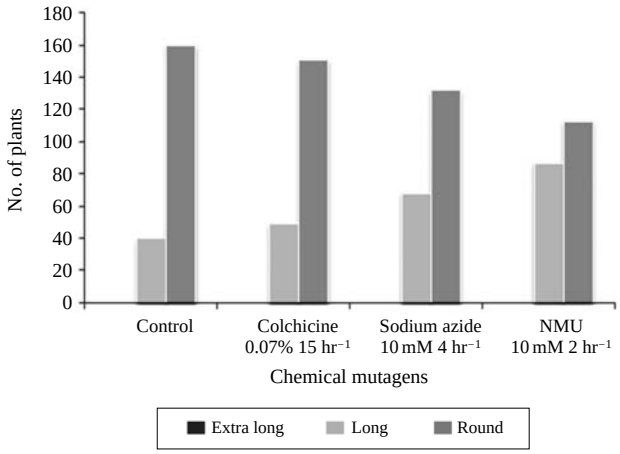

Fig. 8. The effects of chemical mutagens treatment on leaf shape of stevia at 3 months after sowing.

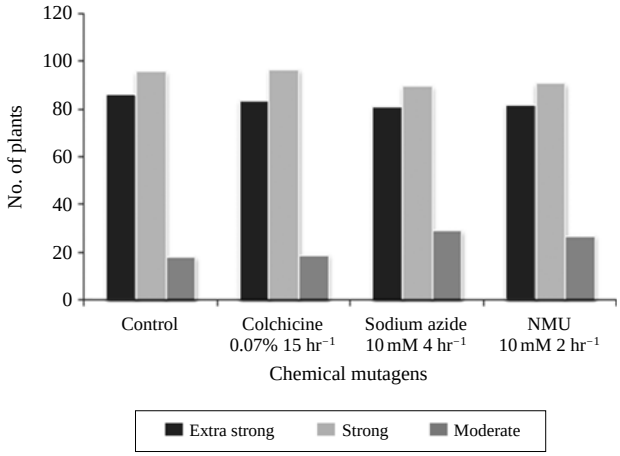

Fig. 9. The effects of chemical mutagens treatment on leaf lobation of stevia at 3 months after sowing.

생육이 대조구에 비해 증가하는 경향을 보였는데 신초 생육은 6시간 처리구에서 유의적인 차이를 보였다(Table 4). 뿌리생육은 NMU 처리구에서 4 cm 정도 길게 신장하여 대조구에 비해 월등히 좋았으며, colchicine, sodium azide 처리에 비해서도 좋은 경향이었다. Lee *et al.* (2000)에 의하면 화학적 돌연변이원을 술패랭이 종자에 처리한 결과, NMU 처리시에는 뿌리가 매우 길고 굵어졌으며 sodium azide 처리 시에는 뿌리만 신장하고 자엽은 연노랑색을 띄면서 펼쳐지지 않았다고 보고하였다. 이것은 본 연구의 스테비아 종자에 NMU 처리 시의 뿌리생육에 미치는 영향과 유사한 결과라고 할 수 있다.

화학적 돌연변이원 처리 종자를 파종하여 3개월 후에 생육특성을 조사하였다(Table 5). 스테비아 종자에 colchicine을 처리하면 처리시간이 길수록 엽장과 엽폭은 대조구보다 약간 증가하는 양상을 보였지만 초장과 개체 당 분지수는 약간 감소하였다. 그리고 처리시간이 길수록 개체간의 표준오차가 커지는 양상을 보였다. Suh *et al.* (2005)에 의하면 자생 중나리에 colchicine을 처리하면 초장, 엽수, 엽폭은 작아지는 반면 엽장은 대조구보다 더 길어졌다고 보고하였는데, 이는 본 연구결과와 유사한 경향을 보였다.

Sodium azide 처리구에서는 처리시간이 길수록 초장이 작아지고 개체 당 분지수는 증가하였으나, 엽장과 엽폭은 약간씩 감소하였다. Lee *et al.* (2000)은 술패랭이 종자에 sodium azide 처리 시 초장과 엽장이 짧은 형태를 나타내었으며 유도된 돌연변이체를 통해 왜성종과 엽색 변이체를 선발할 수 있음을 밝혔는데, 스테비아의 경우도 이런 변이체의 선발이 가능할 것으로 보인다.

NMU 처리구에서는 sodium azide 처리 시와 유사하며, 대조구와 비교하여 초장은 3 cm 이상 감소하는 반면 개체 당 분지수는 증가하였다. 그리고 엽장이 크고 엽폭이 작은 잎모양이 눈에 띄게 보였으며, 엽형 변이체가 다른 처리보다 가장 많이 나타났다. 용담의 경우 NMU 처리에 의하여 초장이 작은 위축형의 변이주가 출현하였고 (Seong *et al.* 1995), 큰 용담에서는 잎의 형태가 도침형에서 주걱형 또는 도란형으로 변형된 식물체가 유기되었다는 보고가 있다(Lim *et al.* 2000). 스테비아 종자에 대한 변이양상의 결과는 이 연구결과와 유사하였으며, sodium azide와 NMU를 처리한 경우 초형 및 엽형 변이주를 유기하는데 효과적임을 확인할 수 있었다.

화학 돌연변이원에 따른 엽형을 비교해 보면 colchicine 처리구에서는 큰 변화가 없었으며, sodium azide 처리구는 긴 형이 대조구보다 28개체 많이 나타났다(Fig. 8).

그리고 NMU 처리구에서는 긴 형이 87개체로 가장 많이 나타났다. 대조구는 둥근 형에 가깝고 잎 가장자리의 거치는 강한 모양이 약 50%, 아주 강한 모양은 약 40%, 나머지 10%는 완만한 모양이었다. 잎 가장자리의 거치를 대조구와 비교해 보면 colchicine 처리구에서는 유사한 경향을 보였다. Sodium azide와 NMU 처리구에서는 완만한 모양의 개체가 증가하는 경향이었다(Fig. 9).

Jeong and Lee (2006b)는 기내 참쇠고비의 근경에 NMU 처리 시 선발된 형태변이 식물체에는 우편이 대조구에 비하여 둥근 개체, 가늘고 좁은 개체, 또는 우편 둘레에 톱니 모양이 뚜렷해진 변이주 등이 선발되었다고 보고하였다. 스테비아의 엽형과 식물체의 형태가 변이된 결과는 이 연구결과와 유사한 경향이라고 볼 수 있다.

결 론

본 연구에서는 돌연변이에 의한 품종개량의 일환으로 스테비아 '수원 11호'의 종자에 감마선 및 화학적 돌연변이원의 처리조건을 달리하여 발아율 및 초기생장에 미치는 영향을 검토하고 적정 처리조건을 밝히고자 하였다. 스테비아 건조종자에 감마선을 0～300 Gy 수준으로 처리한 결과 감마선 선량이 증가할수록 발아율 및 초기생육 정도는 감소하였다. 감마선 조사에 의한 스테비아 종자의 LD_{50}은 200 Gy 정도이었으나, M_1세대 생존율 및 변이 발생율을 고려하면 150 Gy 정도가 적정 조사선량으로 판단되었다. 그리고 감마선 처리 3개월 후 생육을 조사한 결과 감마선 선량이 증가할수록 초장은 감소하는 반면 개체 당 분지수는 증가하는 것으로 나타났다. 또한 선량이 증가할수록 엽장은 증가하였지만 엽폭은 감소하여 긴 형의 잎모양 개체가 증가하였다. 화학적 돌연변이원인 0.07% colchicine, 10 mM sodium azide, 10 mM NMU 등을 시간별로 처리한 결과, 처리시간이 증가할수록 발아율 및 생존율이 감소하였다. LD_{50}은 각각 0.07% colchicine에서는 15시간, 10 mM sodium azide에서는 3시간, 10 mM NMU의 경우는 1시간 등으로 판단되었다. 화학돌연변이원 처리에 따른 초기생육은 신초 신장의 경우 유의적인 차이를 보이지 않았다. 뿌리 신장은 처리시간이 길어질수록 증가하였는데, 돌연변이원 중 NMU 6시간 처리구가 뿌리생육이 가장 좋게 나타났다. 그리고 파종하여 3개월 후에 돌연변이원에 따른 생육을 조사한 결과 초장은 처리시간이 증가할수록 감소하였다. Colchicine 처리구에서 개체 당 분지수는 감소하는 반면, 엽장과 엽폭은 증가하였다. Sodium azide와 NMU 처리구에서 개체 당 분지수는 증가하였으며, 엽장은 약간 증가하면서 엽폭은 감소하였다. 그리고 엽형은 대조구의 경우 둥근형에 가까운 모양인 반면 sodium azide와 NMU 처리구에서는 긴 모양의 잎이 다수 관찰되었다.

사 사

이 논문은 농림수산식품부 생명산업기술개발사업에 의한 연구비 지원을 통하여 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Arenaz P and Nilan RA. 1981. Effect of sodium azide on sister-chromatid exchanges in human lymphocytes and Chinese hamster cell. *Mutation Research* **88**:217-221.

Castillo AM, Cistue L, Valles MP, Sanz JM, Romagosa I and Molina-Cano JL. 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.

Chalapathi MV and Thimmegowda S. 1997. Natural non-caloric sweetener stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): A future crop of India. *Crop Res. Hisar.* **14**(2):347-350.

Choi NH, Kim GH, Kim ZH, Song HS and Jeong BR. 2006. Morphological characteristics of *Campanula punctata* Lam. var. *rubriflora* Mak. as affected by doses of γ-ray radiation. *Flower Res. J.* **14**(2):116-120.

Doo HS, Kang CS and Ryu JH. 2001. Induced mutation by gamma-ray irradiation on crown bud of yacon (*Polymnia sonchifolia* Poeppig & Endlicher). *Korean J. Breed.* **33**(1): 1-6.

Goo DH, Yae BW, Song HS, Park IS, Han BH and Yu HJ. 2003. Color change in chrysanthemum flower by gamma ray irradiation. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **44**(6):1006-1009.

Hanson JR and De Oliveira BH. 1993. Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. *Nat. Prod. Rep.* **10**:301-309.

Jeong JA and Lee CH. 2006a. Effects of γ-irradiation and chemical mutagenesis on *In vitro* culture of fern prothallus. *Korean J. Plant Res.* **19**(2):348-354.

Jeong JA and Lee CH. 2006b. Induction of variants *Cyrtomium caryoptideum* var. *coreanum* Nakai by chemical mutagenesis *In vitro* and RAPD analysis. *Korean J. Plant Res.* **19**(2): 374-380.

Jin YH, You JH, Jang HW, Cho HW and Lee CH. 2003. Investigation of optimal concentration and treatment period of colchicine for mutation breeding of *Lilium* spp. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **21**(Suppl. II):112.

Katayama O, Sumida T, Hayashi H and Mitsuhashi H. 1976.

The practical application of stevia and research and development data (English translation). ISU Company, Japan pp. 747.

Kim JS and Lee YB. 1998. Ionizing radiation hormesis in crops. *Kor. J. Environ. Agri.* **17**(1):76-85.

Kinghorn AD and Soejarto DD. 2002. Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. *Pure. Appl. Chem.* **74**(7):1169-1179.

Koh JC, Sang CK, Youn IK, Lee EJ and Lee JM. 2001. Effect of colchicine treatment for polyploidy induction of *Iris ensata*. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **19**(Suppl. II):91.

Kwon SH and Won JL. 1978. Recommendable dose of X- and gamma-ray for mutation breeding. *Korean J. Breed.* **10**(2): 127-132.

Lee HJ, Lee GJ, Kim DS, Kim JB, Ku JH and Kang SY. 2008. Determination of the optimum dose range for a mutation induction of turfgrasses by a gamma-ray. *Kor. Turfgrass Sci.* **22**(1):25-34.

Lee JI, Kang KH, Park HW and Kim JH. 1979. High-yielding stevia variety "Suweon 2". *Res. Rept. ORD* **21**:167-169.

Lee JI, Kang KH, Park HW and Kim JH. 1982. New high rebaudioside-A stevia variety "Suweon 11". *Res. Rept. ORD.* **24**: 186-188.

Lee KH, Lim JD and Yu CY. 2000. Variations in mutant plants by chemical mutagen treatments of *Dianthus superbus* L. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **8**(4):334-341.

Lim JD, Kim MJ and Yu CY. 2000. Induction and RAPD analysis of mutant plants by chemical mutagens in *Gentiana axillariflora* Leveille. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* **27**:89-94.

Nishiyama P, Alvarez M and Vieira LGE. 1992. Quantitative analysis of stevioside in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Sci. Food Agri.* **59**(3):277-281.

Oh BK, Hong KA, Song SJ, U ZK, Lee SJ and Lee YI. 2003. Gamma radiation sensitivity and quantitative characters in M1 generation of *Heteropappus hispidus* (Thunb.). *Korean J. Environ. Agri.* **22**(4):294-299.

Park JO, Cho HS, Park MY, Jo YS, Kang SY, Kwack SN and Heo BG. 2008. Effect of gamma ray irradiation on seed germination, growth and variant induction in *Hosta plantaginea* and *Farfugium japonicum*. *Flower Res. J.* **16**(2):128-133.

Park JO, Jeong BJ, Park MY, Kang SY, Kwack SN, Park YJ and Heo BG. 2010. Effect on the germination growth and variation induction in gamma rays irradiated seeds of lilac pink and nursery spiraea. *Korean J. Plant Res.* **23**(1):19-24.

Sachs RM and Hackett WP. 1972. Chemical inhibition of plant height. *Hort. Sci.* **2**:440-447.

Schum A and Preil W. 1998. Induced mutations in ornamental plants. Somaclonal variation and induced mutation in crop improvement. p. 332-366. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands.

Seong NS, Park CH, Kim KS, Lee ST and Chang YH. 1995. *In vitro* variant induction and its content of gentiopicroside of *Gentiana scabra* Bunge. *Kor. J. Med. Crop* **3**:40-44.

Shin JY, Lim HS, Kim JS, Han SK and Eun JS. 2005. Effects of gamma ray on the radiosensitivity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J. Honam Soc. Hort. Sci.* **3**:93-99.

Soejarto DD, Compadre CM, Medon JP, Kamath SK and Kinhorn AD. 1983. Potential sweetening agents of plant origin II. Field search for sweet-tasting Stevia species. *Econ. Bot.* **37**:71-79.

Suh JT, Cho KS, Yang MH and Hong SY. 2005. Characteristics of mutant by colchicine treatment of wild *Lilium leichtlinii* seed native to Korea. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **23**(4):430-432.

Manuscript Received: April 2, 2012
Revised: April 16, 2012
Revision Accepted: May 27, 2012