

콜히친 처리에 의한 4배체 호밀 육성

황종진* · 김대욱* · 김철우** · 손범영* · 백성범* · 박형호* · 구자환* · 김정태* · 이진석* · 문중경* · 권영업* · 한옥규[†]

*국립식량과학원, 경기도 수원시 권선구 수인로 125

**국립식량과학원 바이오에너지작물센터, 전남 무안군 청계면 무안로 199

Production of Colchicine Induced Tetraploids in Rye (*Secale cereale* L.)

Jong-Jin Hwang*, Dea-Wook Kim*, Chul-Woo Kim**, Beum-Young Son*, Seong-Beum Baek*, Hyong-Ho Park*, Ja-Hwan Ku*, Jung-Tae Kim*, Jin-Seok Lee*, Jung-Kyung Moon*, Young-Up Kwon*, and Ouk-Kyu Han[†]

*National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 441-857, Korea

**Bioenergy Crop Research Center, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Muan 534-833, Korea

ABSTRACT This experiment was carried out to report some data such as survival rate, tetraploid production efficiency, and agronomic characteristics of offspring from the induced tetraploid by the colchicine treatment in rye. The colchicine was soaked with 0.05%, 12 hours in dark condition and at two growth stages (green seed and 2nd leaf stage) in diploid ryes. Flow cytometry (FC) was proved to be efficient and rapid tool for screening ploidy levels in rye, showing around 40 to 60 in DNA amount (DAPI) corresponding to diploid and 80 to 110 tetraploid. There were 18.5% of survival rate at green seed treatment and 78% at 2nd leaf stage in average of two rye cultivars, Gogu and Jogreen, but in reverse 50.9% and 1.1% in the ratio of tetraploid to total tillers among the plants survived, respectively, resulting in 9.42% of tetraploid production rate in green seed treatment and 0.86% at 2nd leaf stage, respectively. In green seed treatment, there were 33% of survival rate in Gogu, 4% in Jogreen in 1st year, but 56% in Gogu, 21% in Jogreen and 49% in Charmgreen, respectively. The rate of tetraploid to total spikes among survived was 53.7% in Gogu, 32.4% in Jogreen, and 50.9% in average in 1st year, and 64.1% in Gogu, 51.5% in Jogreen, 60% in Charmgreen, and 60.5% in average in 2nd year. In green seed treatment, tetraploid production rate (survival rate × tetraploid ratio × 100) was 17.7% in Gogu and 1.3% in Jogreen and 9.42% in average in 1st year, and 35.9% in Gogu, 10.8% in Jogreen, 29.4% in Charmgreen, and 25.4% in average of three diploid rye cultivars. By the colchicine

treatment with 0.05% for 12 hours in Gogu and Jogreen, 35 tetraploid plants were obtained and they produced 2,673 seeds with 148 spikes. There were 3.3-4.4 in the number of spikes per plant, 15.6-18.3 in grain number per spike, and 37.6 g in Gogu and 46.8 g in Jogreen in the 1,000-grain weight.

Keywords : rye, tetraploid, colchicine, induction, flow cytometry

호밀은 한해, 건조해, 염해, 산성토양 등의 불량 환경에 대한 적응성이 뛰어나서 추운지역인 러시아, 폴란드, 독일, 우크라이나 등 북유럽에서 주로 제빵과 사료용으로 생산·이용이 되며, 최근에는 에탄올이나 바이오메탄 생산을 위해 그 수요가 증가하고 있다(Bushuk, 2001; Geiger & Miedaner, 2009).

우리나라에서 호밀은 조사료용이나 녹비용으로 매년 5만 ha 정도가 재배되고 있으나, 종자는 대부분을 해외에 의존하여 매년 7~9천 톤을 도입하고 있다(MFAFF, 2010). 향후 호밀은 가축 사료용이나 친환경농업을 위한 녹비용으로 더욱 수요가 증가될 것으로 예상되며, 각종 기상재해로 인한 범세계적 작물의 작황 저조와 해외 각국의 식량주권주의로 인한 국내 수급 곤란에 대비하여 국내 환경에 적합한 출수나 성숙이 빠르고 수량이 많은 품종을 육성, 보급하여야 할 것이다.

국내에서의 호밀 품종 개발은 1984년 재래종을 수집하여

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-290-6757 (E-mail) okhan98@korea.kr

<Received 20 July, 2012; Revised 22 October, 2012; Accepted 22 October, 2012>

선발한 팔당호밀(Hwang *et al.*, 1985)이 최초이며, 그후 1980년대 후반까지 두루, 조춘, 춘추 등 도입종이 선발되었다(Hwang *et al.*, 1987 ; Ha *et al.*, 1989, 1990). 1990년 후반부터 최근까지는 집단선발방법에 의해 울호밀(Heo *et al.*, 1998), 곡우호밀, 이그린, 올그린(Heo *et al.*, 2004, 2009a, 2009b) 등 숙기가 빠르면서 수량이 많은 품종이 육성되었다. 또한 캐나다와 공동연구로 윈터그린(2002)이 육성되어 해외채종을 거쳐 국내에 보급되기도 하였다.

그러나 호밀 품종 육성은 국내 환경에 적응성이 높은 유망 육종소재의 한계성으로 인해 더 이상의 품종성능을 개선하는데 어려움이 있으며, 이를 극복하기 위한 육종 기술적 전환이 필요한 시기이다. 즉, 식물의 능력을 극대화시키기 위한 1대 잡종의 개발, 조숙성 인자 창성을 위한 돌연변이 육종, 다른 이종 속이나 과(family)로부터 유용인자를 도입하는 생명공학기법 뿐만 아니라 식물체의 거대화를 피하기 위한 배수성 육종(Geiger & Miedaner, 2009 ; Falke *et al.*, 2008) 등 여러 가지 방법을 채택할 필요가 있다.

식물에서 배수성 육종은 염색체의 집합인 게놈의 양적인 배가를 통해 얻어지는 배수체를 소재로 하여 새로운 유용형질의 출현이나 수량을 급진적으로 증대시키고자 하는 방법으로써, 레드클로버($X=7$), 알사이크 클로버($X=8$), 턴넵($X=10$), 시금치($X=6$), 상추($X=9$), 호밀 ($X=7$) 등에서 배수성 품종이 육성되었으며(Marie, 1955), 수박(Jaskani *et al.*, 2005), 바나나(Duren *et al.*, 1996) 등에서도 배수체가 얻어졌다. 호밀에서는 Dorsen(1936)이 'Rosen' 이라는 4배체를 생산한 이래 여러 연구자들에 의해 많은 우량 4배체 품종들이 동부 유럽에서 육성, 보급되었다.

식물의 배수성 육종에서 가장 중요한 것은 염색체가 배가된 배수체를 만드는 것이다. 배수체의 작성은 대부분 콜히친 처리로 이루어지며, 감수분열 시 방추사 기능을 무력화하여 염색체가 극도로 이동하는 것을 막음으로써 이루어진다. 콜히친 처리 방법은 처리농도, 처리시간, 또는 식물체의 부위나 생육단계 등에 따라 다르나 농도는 0.01~1%, 처리시간은 1~12시간 등 다양하며, 생육단계는 녹체 종자, 유식물체 등 어린 시기의 생장점 또는 뿌리 부위가 좋다고 알려져 있다(Scoldes *et al.*, 2001). 호밀에서는 Marie(1955)가 콜히친을 0.2%, Bremer & Bremer-Reinders(1954)가 0.2%에 2시간, 0.1%에 3시간동안 콜히친을 뿌리에 처리하여 염색체 배가에 성공하였다.

식물체에서 콜히친 처리에 의한 염색체의 배가 여부를 확인하는 방법은 처리 후 염색체 수를 직접 검정하는 방법이 흔히 사용되고 있다. 그러나 이 방법은 정확하다는 장점이 있으나 시간, 기술 및 노력이 많이 드는 단점이 있어 최근에

는 Flow cytometry(FC, 유세포분석기)를 이용하여 DNA의 양의 변화를 추정하는 방법이 많이 이용되고 있다(Ochatt, 2008 ; Ono & Hosaka, 2010). FC를 이용할 경우 감자에서는 95%의 확률로 배수체 확인이 가능하고(Ono & Hosaka, 2010), 수박에서도 4배체의 확인이 가능할 뿐만 아니라 엽면적, 엽록체 수, 공변세포 수, DNA 지수, 염색체 수 등으로 배수체를 확인하는 것에 비해 빠르고 편리함이 보고되었다(Jaskani *et al.*, 2005). Pfosser *et al.*(1995)도 FC 방법의 이용하여 밀의 이수체에서 작은 DNA 양도 식별할 수 있다고 하였다.

호밀에서 Kubalakoba *et al.*(2003)은 FC 방법으로 1R부터 7R까지의 전체 염색체를 DNA 양에 의해 식별하였으며, Lee *et al.*(2004)은 FC을 이용하여 밀, 트리티케일, 듀럼, 호밀에 대해 게놈 및 염색체 양을 조사하여 RR을 16.9pg이라고 하였다. Bashir *et al.*(1993)은 밀과 호밀의 잡종 계통에서 호밀 염색체의 DNA 양이 0.8 pg(3R)~1.4 pg(7R)이며, 이수체를 구분하는 빠르고 편리한 방법이라고 하였다.

본 연구의 궁극적인 목적은 국내 환경에서 생육특성과 수량성이 우수한 4배체 호밀 품종을 육성하는 것이며, 이를 위해서 2배체 호밀의 염색체를 배가하여 4배체를 작성하는 과정에서 몇 가지 기초자료를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시험재료

시험재료는 국내에서 육성한 곡우호밀, 조그린 및 참그린 등 3개의 호밀 품종을 이용하였다. 곡우호밀은 2004년에 육성되어 국내에서 가장 많이 재배되고 있으며, 각종 연구에서 표준품종으로 자주 이용된다. 조그린과 참그린은 각각 2009년과 2010년에 육성되었으며, 곡우호밀보다 출수기가 3~5일 빠른 조숙품종이다. 이들 3품종은 모두 동일한 모집단을 갖고 있으며, 집단선발에 의해 육성되었다.

콜히친 처리

배수체를 만들기 위한 콜히친 처리 방법에 관한 연구는 비교적 많다(Dermen, 1940 ; Marie, 1955 ; Turley & Unal, 2010). 본 시험에서 콜히친 처리는 식물체의 백체가 출현한 최아종자와 2엽기에 도달한 유식물체 등 2시기로 구분하여 실시하였다. 최아종자 처리는 1~2 mm 정도로 미리 최아시킨 호밀종자를 0.05% 콜히친 용액으로 상온의 암 상태에서 12시간 동안 침지하였다. 콜히친 처리가 끝난 호밀 종자는 흐르는 물에 5~6시간 충분히 세척한 후 포트에 이식하였다. 유식물체 처리는 발아 후 어린잎이 두 개 나온 2엽기

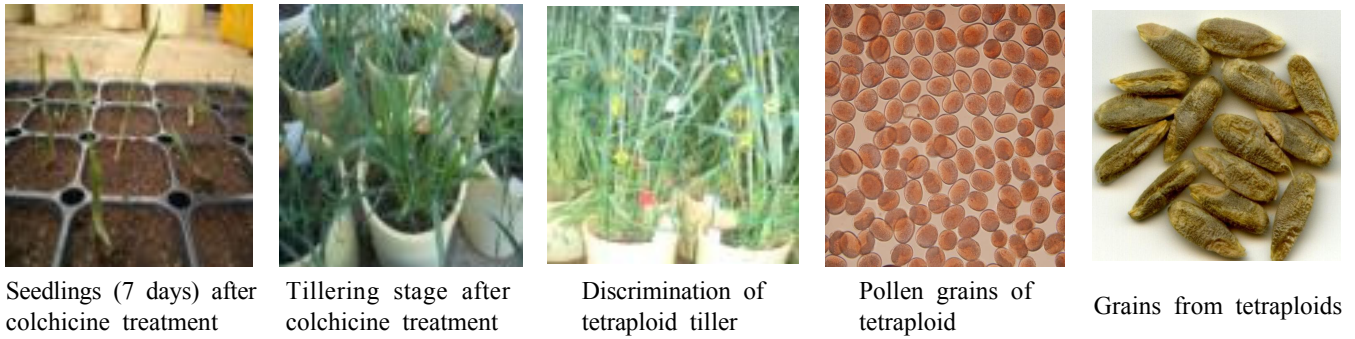


Fig. 1. Colchicine induced tetraploid plants, its pollen grains, and seeds.

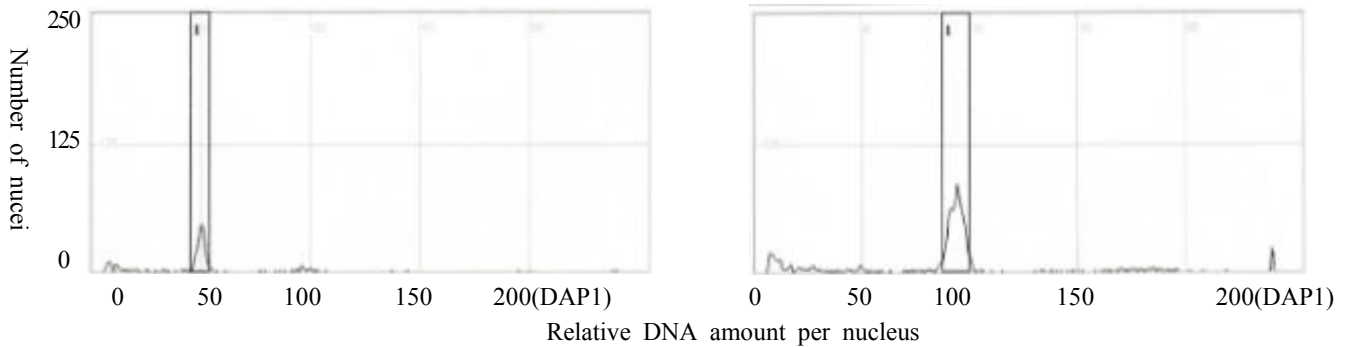


Fig. 2. Flow cytometric histograms of diploid and tetraploid of rye (*Secale cereale* L). Left: diploid rye cultivar Gogu with $2n=2X=14$, *RR*. Right: tetraploid rye cultivar Dooroo with $2n=4X=28$, *RRRR*. Gogu: 50, 52, 48, 48, Duroo: 98, 100, 91, 88.

에 뿌리 부위에 처리하였으며, 그 방법은 최아종자 처리에 서와 같이 하였다.

배수성 검정

콜히친 처리를 마친 최아종자와 유식물체는 15~20°C의 온실에서 생육시켰으며, 생존개체에 대해 배수성을 검정하였다. 배수성 검정은 Flow cytometry(CyFlow® Ploidy Analyzer, Partec, Germany)를 이용하였으며, 시료 준비는 다음과 같이 하였다. 분석 대상 줄기에서 잎을 채취하여 1 cm 정도 절단한 후 예리한 해부용 면도칼로 잘게 잘라 1회용 petri dish에서 0.5 mL nuclei extraction buffer를 첨가하여 현탁 시료를 만들었다. 이 현탁시료를 필터가 부착된 튜브에 걸러 2 mL staining buffer로 염색한 후 배수성 판정기로 검정 하였다.

배수성은 Flow cytometry(FC)에서 DNA 양(DAPI)의 중앙값이 40~60에 가까우면 2배체, 80~100에 가까우면 4 배체로 구분하였다. 배수성의 구분방법에서 분열경이 모두 4배체인 것은 tetraploid, 분열경이 모두 2배체인 것은 diploid, 2배체와 4배체가 혼재된 것은 mixoploid로 하였다. 그리고 동일한 줄기에서 2배체와 4배체가 혼재된 것은 우세한 쪽

으로 분류하였다.

4배체로 구분된 식물체 중 일부에 대해서는 다음과 같은 방법으로 염색체를 검정하였다. 근단 1 cm 정도를 채취하여 0.002M 8-hydroxyquinoline 용액에서 5~6시간 침지시킨 후 3 : 1(ethanol : acetic acid) 용액에 2시간 처리하여 고정시켰다. 다시 60°C 1N HCl 용액에서 1분간 연화시켰다. 연화된 근단 부위의 분열조직을 조심스럽게 채취하여 45% acetic acid로 현탁하고 1% aceto carmin으로 염색하여 검정하였다. 광학현미경의 배율은 100~200로 하였다.

배가체의 작물학적 특성 조사

콜히친에 의해 염색체가 배가된 식물체는 국립식량과학원 온실에서 1/5,000a 와그너 포트에 2개체씩 정식하여 2011년 2월 상순부터 자연 상태에서 6주간 춘화를 유도한 후 20/15°C(주/야)의 온실 조건에서 재배하였다. 이들 식물체에 대해 생육특성과 결실률 등을 조사하였다.

Fig. 1은 2배체 호밀 식물체에 콜히친을 처리하여 염색체 배가체를 작성하는 일련의 과정을 보여주는 것이다. 첫 번째 사진으로부터 1) 2배체 식물체에 콜히친을 처리한 후 7일 경과한 식물체, 2) 분열이 한창 진행 중인 식물체, 3) 배

수체를 구분하기 위해 표지를 한 모습, 4) 콜히친 처리에 의해 염색체가 배가된 4배체의 화분, 5) 4배체 식물체에서 얻은 종실의 사진이다.

결과 및 고찰

염색체 배가체의 확인

식물의 염색체 배가 여부는 대상재료에 콜히친 처리를 한 후 생존한 개체에 대해서 Flow cytometry(FC) 방법으로 확인하였다. 이 방법은 세포의 DNA 양을 측정함으로써 2배체나 4배체를 확인하는 방법이다(Ochatt, 2008; Ono & Hosaka, 2010). Fig. 2에서와 같이 배수성이 전혀 다른 대비 품종간의 DAPI를 비교한 바 2배체인 곡우호밀은 세포당 DNA 양(DAPI)이 48.3을 보였고, 4배체인 두루호밀은 96.5를 보였다.

곡우호밀에 콜히친을 처리한 후 생존한 개체들에 대해서 FC를 통한 DAPI를 측정치한 결과는 Table 1과 같다.

DAPI값은 주로 50 전후를 보이는 것과 90~100 중심의 값을 보이는 것으로 대별되는데, 전자는 염색체가 배가되지 않은 2배체, 후자는 염색체가 배가된 4배체로 판단되었다. 동일한 식물체 내에서도 2배체를 보이는 분얼경과 4배체를 보이는 분얼경을 갖는 식물체, 즉 mixoploid가 상당수 발견되었다. 또한 같은 분얼경 내에서도 2배체와 4배체가 혼재된 것도 발견되었는데, 이는 한 잎에서 4배체 세포와 2배체 세포가 함께 있는 경우로 판단되었다. 이를 기초로 하여 모든 분얼경이 4배체인 것은 4배체, 모든 분얼경이 2배체인 것은 2배체, 4배체와 2배체 줄기가 섞인 것은 mixoploid 식물체로 구분하였다.

Table 2는 또 다른 2배체 대비품종인 조그린의 DAPI값을 측정한 결과로서, Table 1의 곡우호밀에서와 같이 DAPI값이 주로 50 전후를 보이는 것과 90~100 중심의 값을 보이는 것으로 대별되었다.

이와 같은 결과들은 FC 방법에 의해 4배체와 2배체 등의 식별이 가능하다는 Ochatt(2008)의 보고를 본 시험에서 적

Table 1. Colchicine treatment effect in the basis of relative DNA amount per nucleus by the Flow cytometry (FC) from the tillers of diploid rye cultivar ‘Gogu’ treated with 0.05% colchicine in the both green seed and 2nd leaf stage.

Plant no.	No. of tiller				Plant no.	No. of tiller			
	Total	4N	2N	(2N+4N)		Total	4N	2N	(2N+4N)
1	6	3	3	0	23	7	5	4	(2)
2	4	1	3	(1)	24	5	1	4	(1)
3	14	14	0	0	25	8	4	4	(3)
4	10	7	3	(2)	26	8	4	4	(3)
5	11	6	5	(1)	27	11	1	10	(1)
6	4	2	2	(1)	28	5	1	4	(1)
7	4	4	0	(2)	29	7	3	4	(5)
8	9	9	0	(4)	30	11	4	7	(3)
9	4	4	0	(1)	31	1	0	1	0
11	6	6	0	0	32	1	0	1	0
12	15	14	1	(3)	33	12	4	8	(2)
14	7	7	0	0	34	8	0	8	0
15	4	4	0	0	35	1	0	1	0
16	3	0	3	(2)	36	7	0	7	0
17	5	2	3	(3)	37	6	0	6	0
18	9	2	7	(4)	40	14	7	7	(3)
19	13	5	8	(1)	41	12	0	12	(2)
20	2	2	0	0	42	2	0	2	0
21	6	3	3	(2)	43	2	0	2	0
22	9	4	5	(1)	Sum	275	133	142	54
							(48.4%)	(51.6%)	

Note : Diploid check cultivar Gogu 50, 52, 48, 48, tetraploid check cultivar Duroo : 98, 100, 91, 88. The plant with DNA amount about 40 to 60 be assumed to be putative diploid (2N), 80 to 110 putative tetraploid (4N) in the table. (2N+4N) means diploid tiller with both more diploid and less tetraploid cell in the same leaf, or tetraploid tiller with both more tetraploid and less diploid cell in the same leaf. Plant number 1-35 treated in the green seed and 36-43 in the 2nd leaf growth stage.

용하는데 무리가 없는 것으로 사료되었다. 또한 Table 1과 Table 2에서의 결과는 본 시험에서 콜히친의 처리가 호밀의 염색체를 배가시키는데 효과가 있음을 말해 주었는데, 체세포 감수분열시 방추사 기능을 무력화하여 염색체가 극으로 이동하는 것을 막아 주는 과정에서 일어날 수 있는 자연적인 현상으로 사료되었다. Table 1과 Table 2의 결과는 염색체가 배가된 식물체를 분류하고 콜히친에 의한 배가효율을 산출하는 기초자료로 이용하였다.

FC에 의해 4배체로 분류된 식물체들을 대상으로 체세포 분열 중기에 직접 염색체를 검경하였는데, 그 결과는 Fig. 3과 같다. 그림에서 같이 2배체 표준품종 곡우호밀(A)이 14개, 4배체 표준품종 두루호밀(B)이 28개의 체세포 염색체를

보였다. 그리고 FC에 의해 4배체로 분류된 개체들은 각각 24개(C), 26개(D) 및 28개(E)의 체세포 염색체 수를 보였다. 이는 Bremer & Bremer-Reinders(1954)가 콜히친에 의해 배가된 4배체에서 체세포 염색체를 확인한바 28개가 가장 많았지만 27개에서 30개까지 분포하였다고 한 보고와 비슷하였지만, 본 시험에서는 24개와 26개를 갖는 개체도 확인되었다. 물론 Bremer & Bremer-Reinders(1954)가 보고한 대로 더 많은 개체에 대해 염색체를 확인한다면 25개나 27개, 또는 29개의 염색체를 갖는 개체들도 있을 것으로 사료되었다. 다만 본 시험에서 FC 분석에 의한 DNA 양(DAPI)과 염색체 수와의 관계를 정확하게 연관 짓지 못한 것으로 인해 결과를 해석하는데 다소의 어려움이 따르지만

Table 2. Colchicine treatment effect in the basis of relative DNA amount per nucleus by the Flow cytometry (FC) from the tillers of diploid rye cultivar 'Jogreen' treated with 0.05% colchicine in the both green seed and 2nd leaf stage.

Plant no.	No. of tiller				Plant no.	No. of tiller			
	Total	4N	2N	(2N+4N)		Total	4N	2N	(2N+4N)
1	15	3	12	(3)	13	3	0	3	0
2	12	6	6	(1)	14	3	0	3	0
3	7	3	4	(1)	15	5	0	5	0
4	3	0	3	0	16	1	0	1	0
5	2	0	2	2	17	4	0	4	(1)
6	3	0	3	(1)	18	3	0	3	0
7	2	0	2	(2)	19	1	0	1	(1)
8	4	0	4	(2)	20	3	0	3	(2)
9	4	0	4	0	21	3	0	3	(2)
11	5	4	1	(2)	Sum	88	16	72	22
12	5	0	5	(2)			(18.2%)	(81.8%)	

Note : Diploid check variety Gogu 50, 52, 48, 48, tetraploid check variety Duroo : 98, 100, 91, 88. The plant with DNA amount about 40 to 60 be assumed to be putative diploid(2N), 80 to 110 putative tetraploid (4N) in the table. (2N+4N) means diploid tiller with both more diploid and less tetraploid cell in the same leaf, or tetraploid tiller with both more tetraploid and less diploid cell in the same leaf. Plant number 1-4 treated in the green seed and 5-21 in the 2nd leaf growth stage.

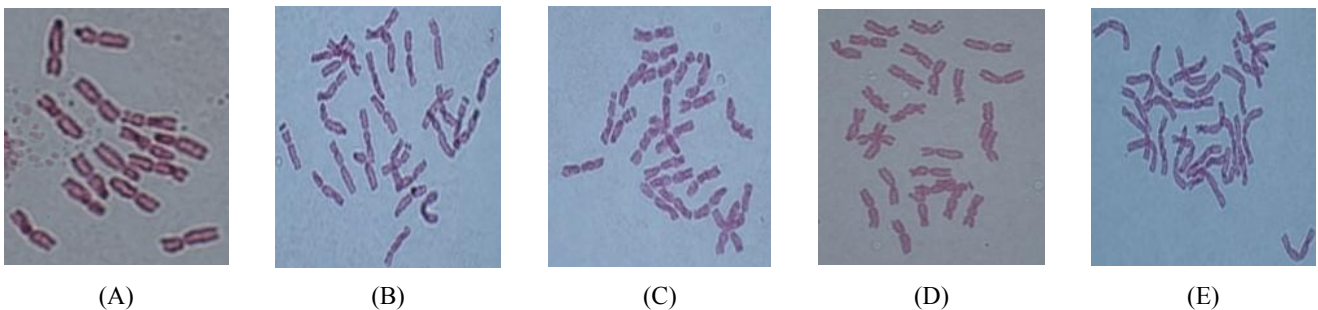


Fig. 3. Metaphase chromosomes in the root tips of the rye seeds from the colchicine induced tetraploid individuals. (A) The diploid check cultivar 'Gogu' with $2n=2X=14$, (B) The tetraploid check cultivar 'Dooroo' with $2n=4X=28$ and (C), (D), and (E), the colchicine induced individual with 24, 26, and 28 chromosomes, respectively.

최근 감자(Ono & Hosaka, 2010), 수박(Jaskani *et al.*, 2005), 호밀(Kubalakoba *et al.*, 2003) 등 다양한 작물에서 FC에 의해 DNA의 양(DAPI)을 추정하는 방법이 이용되고 있으므로 본 시험의 결과도 FC에 의한 배수체를 구분하는 것은 큰 무리가 없는 것으로 판단되었다.

본 연구에서 콜히친 처리에 의해 유기된 염색체 배가 개체 중에서 28개 이외의 염색체를 갖는 개체들은 후대에 임실률이 낮거나 불임이 될 수 있는 개체라고 추정되었으며, 이들을 품종이나 유전자원으로 활용하기 위해서는 각 개체에 대한 면밀한 세포학적 관찰과 이에 따른 육종학적 접근이 필요하다고 판단되었다.

품종별, 처리시기별 콜히친의 염색체 배가 효율

품종 및 식물체의 생육단계를 고려한 처리시기별 콜히친의 배가효율은 Table 3에서와 같다. 곡우호밀은 최아종자 상태에서 100개의 종자를 처리하였는데 이 중 33개체가 생존하였으며, 생존한 개체 중에서 8개체는 모든 분얼경이 4배체, 21개체는 2배체와 4배체의 혼재된 mixoploid, 그리고 4개체는 모두 2배체로 나타났다. 이삭 단위로 볼 때는 총 244개 중 131개 이삭이 4배체로 나타나 생존한 식물체의 이삭 중에서 53.7%가 4배체였으며, 이는 100개의 종자를 배가시켰을 때 17.7%의 배가효율을 보여 주었다.

콜히친을 식물체의 2엽기에 처리할 경우에는 100식물체 중에서 78개의 식물체가 생존하여 생존율이 최아종자에 처리했을 때보다 높았으나 모두 2배체로 나타나 배가의 효율은 기대할 수 없었다. 다만 Table 1에서와 같이 일부 분얼경에서 mixoploid가 발견되었으나 모두 2배체로 분류되었

다. 따라서 곡우호밀에서의 배가효율은 유식물체, 즉 2엽기 처리에서보다는 최아종자에 처리하는 것이 월등히 높았다.

한편 조그린의 경우는 100립의 최아종자 처리에서 4개 식물체만이 생존했고, 그중에서 4배체는 없었으며, 2배체와 4배체의 분얼경이 혼재된 mixoploid가 3개, 2배체가 1개로 나타났다. 이들 4개 식물체에서 얻은 37개 이삭 중에서 12개의 이삭이 4배체로 나타나 32.4%의 4배체 배가효율을 보였다. 이는 처리한 식물체 중에서 1.3%의 배가효율을 의미한다. 2엽기에 처리했을 때에는 100개체 중에서 78개체가 생존했으나 4배체는 없었고, mixoploid 1개, 2배체가 77개로 나타났으며, 배가가 된 4배체 이삭은 단지 1개뿐이었다. 역시 조그린에서도 콜히친을 식물체가 2엽기에 처리했을 때보다 최아종자에 처리했을 때의 배가효율이 높았다.

본 실험에서 곡우호밀은 유기된 4배체 이삭이 131개였으나 조그린은 13개로 배가 효율의 품종간 차이가 있었다. 또한 처리시기에 따른 차이가 컸는데, 최아종자 처리는 두 품종 평균 9.42%의 배가효율을 보였으나 2엽기 처리에서는 0.86%의 배가효율을 보여 콜히친의 처리시기에 따라 11배의 차이를 보였다.

이상과 같이 Table 3에서 보여주는 결과는 Marie(1954)가 레드클로버($X=7$), 알사이크 클로버($X=8$), 턴넵($X=10$), 시금치($X=6$), 상추($X=9$), 호밀 ($X=7$) 등에서 배수성 품종을 육성했고, 수박(Jaskani *et al.*, 2005), 헤어리베치(Tulay & Unal, 2010), 바나나(Duren *et al.*, 1996) 등에서도 배수체가 얻어졌다는 보고 등으로 볼 때 본 시험에서 나온 결과는 향후 호밀에서 배수성 품종을 육성하는데 도움이 될 수 있는 긍정적인 결과로 판단되었다. 또 배수체 작성 효율에서 4배

Table 3. Number of survival, tetraploid, diploid, and mixoploid plants obtained by the 0.05% colchicine treatment at two growing stages of two diploid rye cultivars in 2011.

Cultivar	Growth stage treated	No. of seed treated	No. of survival plant				Tetraploid/ total tiller	Tetraploid production efficiency (%)
			Total	Tetraploid	Mixoploid ¹⁾	Diploid		
Gogu	Green seed	100	33	8	21	4	131/244 (53.7)	17.7
	2nd leaf stage	100	78	0	0	78	0/42 (0)	0
	Sum	200	111 (55.5) ²⁾	8 (4)	21 (10.5)	82 (41)	131/286 (46.0)	25.5
Jogreen	Green seed	100	4	0	3	1	12/37 (32.4)	1.30
	2nd leaf stage	100	78	0	1	77	1/53 (1.9)	1.48
	Sum	200	82 (41)	0 (0)	4 (2)	78 (39)	13/90 (14.4)	5.90
	Green seed	200	37 (18.5)	8 (4)	24 (12)	5 (2.5)	143/281 (50.9)	9.42
	2nd leaf stage	200	156 (78)	0 (0)	1 (0.5)	155 (77.5)	1/95 (1.1)	0.86
	Total	400	193 (48.3)	8 (2)	25 (6.25)	160 (40.0)	144/376 (38.3)	18.5

¹⁾Mixoploids : Plants with diploid and tetraploid tillers in the same plant. ²⁾() stand for percentage.

체 출현율은 곡우호밀에서 25.5%(생존율 55.5% × 4배체 유기율 46%), 조그린에서 5.9%(41% × 14.4%), 두 품종 평균은 18.5%(48.3% × 30.2%) 등으로 상당히 높았다. 특히 최아종자 처리에서는 품종별로 볼 때 4배체 작성효율은 곡우호밀 17.7%(생존율 33% × 4배체 유기율 53.7%), 조그린 1.3% (4% × 32.4%), 두 품종 평균으로 9.42%(18.5% × 50.9%)를 보였다. 이는 국내에서 배수체 품종을 육성한 다른 작물, 즉 뽕(Sung *et al.*, 2004, 2007), 도라지(Kim *et al.*, 2005), 꽃창포(Koh *et al.*, 2001), 포도(Hong *et al.*, 1999), 심비디움(Kim *et al.*, 1998), 자란(Yun *et al.*, 2004), 수박(Koh *et al.*, 2002) 등과 함께 호밀에서도 배수체 품종을 육성할 수 있는 실용성을 시사하였다. 다만 본 시험에서 농도(0.05%), 처리지속기간(12시간) 및 처리시기는 최아종자에 처리한 결과로써 그 효율이 비교적 양호하게 나타났다. 이는 Marie (1954)가 호밀에서 0.2%, Bremer & Bremer-Reinders(1954)가 콜히친을 0.2%로 2시간, 0.1%로 3시간 동안 뿌리에 처리하여 염색체 배가에 성공하였다는 보고와는 다소 차이는 있으나 재료와 처리 방법이 상이한 때문으로 해석되며, 배가효율이 양호하게 나온 점에서는 오히려 진일보한 한 결과로 볼 수 있었다.

이와 같은 결과는 Table 4에서와 같이 차년도에 실시하였을 때도 비슷한 경향으로 나타났다. 곡우호밀, 조그린, 참그린을 대상으로 최아종자에 대해 콜히친 0.05%를 처리하였을 때 생존 개체수는 3개 품종 평균 42%를 보였고, 4배체

의 비율은 곡우호밀이 25%, 조그린 8%, 참그린 19%로 평균 17.3%를 보여 앞선 시험 결과 보다 높았다. 4배체 분얼경의 비율도 곡우호밀 64.1%, 조그린 51.5%, 참그린 60.0%로 품종간 차이가 있을 뿐만 아니라 세 품종 평균 60.5%를 보여 높은 경향이었다. 전체 처리 개체수를 고려한 배가효율에 있어서도 곡우호밀 35.9%, 조그린 10.8%, 참그린 29.4%, 세 품종 평균 25.4%로 전년(Table 3)도 보다 월등히 높았다.

이상과 같은 결과는 Bremer & Bremer-Reinders(1954)가 총 270개체를 콜히친 처리하여 배수체 작성 효율과 그 후대의 세포유전학적 양상을 본 바 167개체의 4배체를 얻었는데 이 중에서 114개체는 완전 4배체, 53개체는 2배체와 4배체의 혼합체였고, 이 후대에서 총 4,125 개체의 4배체를 얻었다고 보고한 내용과 유사하였다. 따라서 본 시험에서 얻어진 4배체들에 대해 후대에서의 배수성과 세포유전학적인 양상에 대해 면밀한 조사가 수행될 경우 상기 결과와 그 상이점을 다시 검토할 수 있을 것으로 보이며, 배수체 품종을 육성하는데도 기여할 수 있을 것으로 판단되었다.

염색체 배가체의 작물 특성

염색체가 배가되어 4배체로 분류된 호밀 개체를 1/5,000a와그너 포트에 2개체씩 정식하여 실외의 자연 상태에서 6주간에 걸쳐 춘화처리한 후 주/야 20/15°C의 온실에서 재배한 식물체의 특성은 Table 5와 같다. 곡우호밀에 콜히친을

Table 4. Number of survival, tetraploid, diploid, and mixoploid plants obtained by the 0.05% colchicine treatment at green seed stage of three diploid rye cultivars in 2012.

Cultivar	No. of seeds treated	No. of survival plant				Tetraploid/total tiller	Tetraploid production efficiency (%)
		Total	Tetraploid	Mixoploid ¹⁾	Diploid		
Gogu	100	56	25	22	9	116/181 (64.1)	35.9
Jogreen	100	21	8	11	2	34/66 (51.5)	10.8
Charmgreen	100	49	19	26	4	78/130 (60.0)	29.4
Sum	300	126 (42)	52 (17.3)	59 (19.7)	15 (5)	228/377 (60.5)	25.4

¹⁾Mixoploids : Plants with diploid and tetraploid tillers in the same plant. ²⁾() stand for percentage.

Table 5. Number of plants, spikes per plant, number of grains per spike, and 1,000-grain weight of colchicine induced tetraploid in rye.

Diploid cultivars treated	Tetraploid plant induced	No. of tetraploid spike	Spikes per plant	No. of total grains	Grains per spike	1,000-grain weight (g)
Gogu	31	135	4.4	2,470	18.3	37.6
Jogreen	4	13	3.3	203	15.6	46.8
Sum	35	148	-	2,673	-	-

Table 6. Frequency in spikes per plant of colchicine induced tetraploid in rye.

Diploid cultivars treated	Total tetraploid plant	No. of spikes per plant				
		1~3	4~6	7~9	14	Other
Gogu	31 (100)	12 (38.7) ¹⁾	12 (38.7)	4 (12.9)	2 (6.5)	1 (3.2)
Jogreen	4 (100)	2 (50)	1 (25)	0	0	1 (25)
Sum	35 (100)	14 (40)	13 (37.1)	4 (11.4)	2 (5.7)	2 (5.7)

¹⁾() stand for percentage.

처리하여 4배체로 배가된 31개체의 평균 주당 이삭수가 4.4 개로써, 일반 2배체 호밀보다 다소 적은 경향을 보였다. 수 당 립수는 곡우호밀에서 유래한 4배체가 135이삭에서 2,470립(평균 18.3립), 조그린에서 유래한 4배체가 13개 이삭에서 203립(평균 203립)을 수확하여 일반적인 2배체 품종보다 다소 적은 경향이였다. 천립중은 곡우호밀에서 유래한 4배체가 37.6 g, 조그린에서 유래한 4배체가 46.8 g을 보여 2배체보다 월등히 무겁게 나타났다.

본 시험에서 배가체의 식물체당 이삭수가 적은 것은 시험 재료가 콜히친을 처리한 당대에서 나타나는 생육 불안 현상 때문으로 사료되었다. 또한 수당 립수도 15.6~18.3개로 다소 적었는데, 이는 4배체에서 감수분열의 부조화로 불임이 증가하며, 7세대에서도 7.4%의 이수체가 발생하지만 세대가 진전됨에 따라 점차 감소한다는 Bremer & Bremer-Reinders(1954)의 보고 등으로 해석할 수 있었다. 그리고 2배체 호밀에 비해 천립중이 무거운 것은 4배체에서 천립중이 증가한다는 Wexelsen *et al.*,(1961)의 보고와 온실조건에서 비교적 장기간 동안 등숙했다는 점도 그 원인으로 이해할 수 있었다.

Table 6은 식물체당 이삭수의 발생 양상을 구체적으로 보기 위해 빈도로 나타내었다. 곡우호밀에서 유래한 4배체의 경우 1~3개와 4~6개의 이삭을 갖는 식물체가 각각 12개체로 38.7%였고, 7~9개를 갖는 것은 4개체로 12.9%를 차지하였으며, 2개(6.5%)의 식물체는 14개의 이삭을 보유하여 일반 2배체와 비슷한 양상을 보인 개체도 있었다. 조그린은 1~3개를 갖는 것이 2개체로 절반을 차지하였고, 4~6개를 갖는 식물체가 한 개체 있었으며, 대체로 분열도 적은 편으로 나타났다.

요 약

이 연구는 수량이 많은 4배체 호밀 품종을 육성하기 위한 일환으로 기존의 2배체 호밀에 0.05% 농도의 콜히친을 처리하여 염색체가 배가된 4배체 식물체를 만드는 과정에서

배수체 작성효율, 처리시기, 4배체의 작물학적 특성 등 몇 가지 기초자료를 얻었다.

1. Flow cytometry(FC) 방법으로 호밀에서 배수성 여부를 구분하였는데, 2배체는 DNA 양(DAP1)이 50 전후, 4배체는 80~110 범위이었다.
2. 처리시기에 따른 2배체 호밀의 콜히친 처리후 생존율은 최아종자 처리가 18.5%, 2엽기 처리가 78%로 나타났지만, 생존한 개체 중에서 4배체 배가비율은 각각 50.9%, 1.1%로써, 처리시기별 총 4배체 작성효율은 최아종자 처리(9.42%)가 2엽기 처리(0.86%)보다 월등히 높았다.
3. 최아종자에 콜히친 처리 시 처리종자의 생존율은 1차년도에 평균 18.5%(곡우호밀 33%, 조그린 4%), 2년차에 평균 42%(곡우호밀 56%, 조그린 21%, 참그린 49%)를 보였다. 생존한 개체들 중에서 4배체 비율은 1년차에 평균 50.9%(곡우호밀 53.7%, 조그린 32.4%), 2년차에 평균 60.5%(곡우호밀 64.1%, 조그린 51.5%, 참그린 60%)를 보였다.
4. 최아종자 처리 시 4배체 작성 효율(생존율×4배체 유기율)은 1차년도에 곡우호밀 17.7%, 조그린 1.3%, 2차년도에 곡우호밀 35.9%, 조그린 10.8%, 참그린 29.4%로 품종간 차이를 보였다.
5. 2배체 호밀에 콜히친 0.05%를 12시간 처리하여 35개의 4배체 식물체에서 148개 이삭과 2,673립의 종자를 얻었다. 식물체당 이삭수는 곡우호밀 4.4개, 조그린 3.3개, 수당 립수는 곡우호밀 18.3개, 조그린 15.6개, 천립중은 곡우호밀 37.6g, 조그린 46.8g 이었으며, 14개 이삭을 갖는 식물체도 2개나 되었다.

인용문헌

Bashir, A., J. A. Auger, and A. Lane Rayburn. 1993. Flow cytometric DNA analysis of wheat-rye addition lines. *Cytometry* 14 : 843-847.

- Bremer, G. and D. E. Bremer-Reinders. 1954. Breeding tetraploid rye in the Netherlands. I. Methods and cytological investigations. *Euphytica* 3 : 49-63.
- Bushuk, W. 2001. Rye : Production, chemistry and technology, 2nd ed., Amer. Assoc. Cereal Chem., MN, USA.
- Dermen, H. 1940. Colchicine polyploidy and technique. *Botanic. rev.* 6(11) : 599-635.
- Dorsen, E. 1936. Induced polyploidy in wheat and rye. *J. Hered.* 27 : 155-160.
- Duren, M., R. Morpurgo, J. Dolezel, and R. Afza. 1996. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by in vitro techniques. *Euphytica* 88 : 25-34.
- Falke, K. C., Z. Susic, B. Hackauf, and B. Korzun. 2008. Establishment of introgression libraries in hybrid rye (*Secale cereal* L.) from an Iranian primitive accession as a new tool for rye breeding and genomics. *Theor. Appl. Genet.* 117(4) : 641-652.
- Geiger, H. H. and T. Miedaner. 2009. Cereals, rye breeding, M. J. Carena (ed.), Springer, ND, USA. pp. 157-181.
- Ha, Y. W., J. J. Hwang, B. R. Sung, S. Y. Lee, K. B. Youn, J. H. Park, N. H. Song, and H. S. Hur. 1989. A new high forage yielding and early rye variety 'Chochunhomil'. *Res. Rept. RDA (U & I)* 31(2) : 51-55.
- Ha, Y. W., J. J. Hwang, M. E. Park, H. S. Song, C. S. Park, Y. S. Kim, and B. R. Sung. 1990. A new high forage yielding rye variety 'Chunchuhomil'. *Res. Rept. RDA (U & I)* 32(3) : 7-12.
- Heo, H. Y., H. H. Park, J. J. Hwang, H. S. Kim, O. K. Han, T. I. Park, J. H. Seo, D. W. Kim, S. Y. Kim, S. J. Kim, and K. H. Park. 2009a. A new early-heading and high-yielding forage rye variety, 'Olgreen'. *Kor. J. Breed. Sci.* 41(4) : 625-629.
- Heo, H. Y., H. H. Park, J. J. Hwang, H. S. Kim, O. K. Han, T. I. Park, J. H. Seo, D. W. Kim, S. Y. Kim, S. J. Kim, and K. H. Park. 2009b. A new early-heading and high forage yielding rye variety 'Egreen'. *Korean J. Breed. Sci.* 41(4) : 620-624.
- Heo, H. Y., H. H. Park, Y. U. Kwon, J. G. Kim, J. H. Nam, S. J. Kim, and J. K. Lee. 2004. A new high yielding rye variety 'Gogu'. *Treat. Crop Sci.* 6 : 59-66.
- Heo, H. Y., K. G. Park, J. J. Hwang, H. S. Song, J. H. Nam, H. H. Park, Y. W. Ha, Y. C. Lim, J. I. Ju, and M. W. Park. 1998. Early heading and high forage yielding new rye variety 'Olhomil'. *RDA J. Crop Sci(II)* 40(2) : 88-91.
- Hong, S. Y., Y. S. Lee, S. D. Kim, and T. S. Kim. 1999. Diploid production of grape using colchicine. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 17(5) : 178.
- Hwang, J. J., K. B. Youn, N. H. Song, C. S. Park, Y. S. Kim, and B. R. Sung. 1987. A new high yielding forage rye variety 'Doorohomil'. *Res. Rept. RDA (Crop)* 29(1) : 193-197.
- Hwang, J. J., W. S. Ahn, K. B. Youn, B. R. Sung, J. H. Lee, W. J. Lee, C. H. Cho, Y. S. Kim, C. S. Park, K. Y. Chung, and B. Y. Kim. 1985. An early and high forage yielding rye variety 'Paldanghomil' as soiling crops. *Res. Rept. RDA (Crop)* 27(2) : 156-160.
- Jaskani, N. J., S. W. Kwon, and D. H. Kin. 2005. Flow cytometry of DNA contents of colchicine treated watermelon as a ploidy screening method at M1 stage. *Pak. J. Bot.* 37(3) : 685-696.
- Kim I. H., J. S. Park, H. H. Kim, J. S. Yun, C. H. Lee, and C. H. Lee. 2005. Breeding of tetraploid in platycodon grandiflorum (Jacq.) A. DC. by colchicine treatment. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 23(1) : 13.
- Kim, M. S., J. Y. Won, Y. R. Lee, J. Y. Kim, B. H. Kim, and J. S. Eun. 1998. Induction of polyploid of in vitro symbidium by colchicine treatment. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 16(1) : 189.
- Koh, G. C. 2002. Tetraploid production of moodeungsan watermelon. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 43(6) : 671-676.
- Koh, J. C., C. K. Sang, I. K. Youn, E. J. Lee, and J. M. Lee. 2001. Effect of colchicine treatment for polyploidy induction of *Iris ensata*. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 19(2) : 91.
- Kubalakoba, M., M. Valarik, J. Bartos, J. Vrana, J. Cihalikova, M. Molnar-Lang, and J. Dolezel. 2003. Analysis and sorting of rye (*Secale cereale* L.) chromosomes using flow cytometry. *Genome* 46 : 893-905.
- Lee, J. H., Y. Ma, T. Wako, L. C. Li, K. Y. Kim, S. W. Park, S. Uchiyama, and K. Fukui. 2004. Flow karyotypes and chromosomal DNA contents of genus *Triticum* species and rye (*Secale cereale*). *Chrom. Res.* 12 : 93-102.
- Marie, B. 1955. Production of polyploids by colchicine. *Euphytica* 4 : 76-82.
- MFAFF. 2010. Food statistical yearbook. Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Seoul, Korea.
- Ochatt, S. 2008. Flow cytometry in plant breeding. *Cytometry Part A.* 73A, pp. 581-598.
- Ono, S. and K. Hosaka. 2010. Efficient chromosome number estimation using flow cytometry in the backcross of *Solanum demissum* (2n=6X=72) to *S. tuberosum* (2n=4X=48). *Amer. J. Potato Res.* 87(6) : 553-556.
- Pfossen, M., A. Amon, T. Lelley, and E. Heberle-Bors. 1995. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry* 21 : 387-393.
- Scoles, G. J., J. P. Gustafson, and J. G. McLeod. 2001. Genetic and breeding. *in Rye : Production, chemistry and technology* (2nd eds), V. Walter (ed.), Amer. Assoc. Cereal Chem., MN., USA. pp. 9-32.
- Sung, G. B., H. B. Kim, I. P. Hong, S. H. Nam, and I. M. Chung. 2007. Characteristics of new breed mulberry cultivar 'Daesungppong' (*Morus Lhou* (Ser.) Koidz.) for mulberry fruit production. *Kor. J. Seric. Sci.* 49(2) : 56-59.

- Sung, G. B., H. W. Nam, H. B. Kim, I. P. Hong, and S. U. Lee. 2004. Breeding of good quality leaves high yielding mulberry cultivar 'Suilppong' (*Morus alba* L.). Kor. J. Seric. Sci. 46(1) : 12-17.
- Tulay, E. and M. Unal. 2010. Production of colchicine induced tetraploids in *Vicia villosa* roth. Caryologia 63(3) : 292-303.
- Wexelsen, H., J. Aastveit, and M. Brogado. 1961. Some data on selection of tetraploid rye. Euphytica 10 : 244-256.
- Yun, J. S., E. Y. Hong, I. H. Kim, S. K. Shin, T. Yun, C. H. Lee, T. S. Kim, and K. Y. Paek. 2004. Breeding of new tetraploid *Bletilla striata* Reiehb. fil., 'Chungbuk Jaran'. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 22(4) : 495-498.