

## 철포백합의 기내 체세포 염색체 배수화를 위한 화학처리의 효과

정미영<sup>1</sup>, 정재동<sup>1</sup>, J. M. Van Tuyt<sup>2</sup>, 임기병<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 원예학과, <sup>2</sup>국제식물연구소, <sup>3</sup>농업생명공학연구원

### *In Vitro* Mitotic Chromosome Doubling by Chemical Treatments in *Lilium longiflorum*

Mi-Young Chung<sup>1</sup>, Jae-Dong Chung<sup>1</sup>, J.M. Van Tuyt<sup>2</sup>, Ki-Byung Lim<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticulture, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>2</sup>Business Unit Biodiversity and Breeding, Plant Research International, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, The Netherlands

<sup>3</sup>Genomics Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 441-707, Korea

**ABSTRACT** This study was carried out to develop an in vitro chromosome doubling systems for the breeding of tetraploid lily cultivar. Different concentration (ppm) and treatment time (hour) of colchicine, oryzalin and caffeine were compared for the efficiency of bulb regeneration and tetraploidization. The occurrence of tetraploid plants by colchicine was the highest in the concentration of 1,000 ppm for three hours. In oryzalin treatment, the best combination was at 30 ppm for three hours. However, the effects of oryzalin treatments were similar between 10 ppm and 30 ppm concentrations. The survival rate was dramatically reduced in a high concentration of caffeine, although some treatments had a higher tetraploid induction. As a consequence, reliable results for the tetraploid production were obtained in the treatments of 1,000 ppm colchicine, 3,000 ppm oryzalin both for three hours, and 9,000 ppm caffeine for nine hours.

**Key words:** Colchicine, caffeine, oryzalin, ploidy analysis, tetraploidization

## 서 론

백합은 세계적으로 5대 절화류에 속하며, 구근과 절화의 단가가 비싸기 때문에 고급 절화종으로 인식되어 있다. 백합의 원산지는 히말라야 지역으로서 중국, 한국, 대만 그리고 일본을 포함하는 아시아 지역과 북미지역에 분포하고 있으며, 현재 절화 재배용으로 주로 사용되고 있는 종은 모두 아시아 지역이 원산인 아시아틱계, 철포백합계 그리고 동양계 잡종이다.

염색체 배수화의 목적은 크게 두 가지로서 첫째, F<sub>1</sub> 중간잡종의 불임성을 극복하기 위하여 사용되며, 둘째, 꽃, 줄기 등의

기관의 크기를 증가시키는 배수체 육종에 있다. 또한 염색체 배수화 방법에는 크게 두 가지가 있는데, 첫째는 체세포 배수화이고, 둘째는 생식세포 배수화 방법이다. 체세포 배수화를 위해 colchicine이 가장 보편적으로 사용되어 왔으나 (Anderson et al. 1991; Chen and Goeden-Kallemeyn 1979; Griesbach 1981; Wan et al. 1989), colchicine은 발암물질로서 인체에 극히 해로운 뿐 아니라 많은 작물에서 비 정상적인 세포분열에 의한 불임, 비정상적 기관형성, chimera의 발생 등이 보고되고 있어서 (Wan et al. 1989), 이러한 단점을 보완할 수 있는 대체 물질로 제조제의 원료로 사용되고 있는 trifluralin, oryzalin, amiprofos-methyl (APM) 등이 일부 식물에 사용되기 시작하였으며, oryzalin은 많은 작물에서 colchicine에 비해 효과적인 것으로 보고되었다 (Chalak and Legave 1996; Ramulu et al.

\*Corresponding author Tel 031-299-1666 Fax 031-299-1662  
E-mail: kblim@rda.go.kr

1991; Wan et al. 1991). 최근에는 세포막 형성 억제제인 caffeine에 의한 체세포 염색체 배수화 가능성이 보고되었다 (Thomas et al. 1997).

체세포 배수화 방법은 중간 또는 속간교잡에서 야기되는 F<sub>1</sub> 잡종의 임성회복 뿐 아니라 표현형질 (예: 수세강건, 잎, 줄기, 꽃의 대형화) 에도 영향을 미친다. 따라서, 체세포 배수화에 의한 4 배체 백합은 대체로 초장은 다소 낮아지지만 꽃이 커지고, 잎은 짧아지지만 넓어지며 두꺼워 진다. 또한 줄기의 굵기가 비례해지는 이점이 있다 (Van Tuyl et al. 1992). 한편 생식세포 배수성은 생식세포의 형성과정 중 비 정상적인 세포분열로 인하여 자발적으로 생식세포 염색체가 배수화되는 것으로, 이들 배우자를 이용했을 때 F<sub>1</sub> 중간잡종의 불임을 효과적으로 극복할 수 있을 뿐 아니라 이중 염색체간 조환이 일어나 염색체 단편의 이입이 용이해 지는 이점이 있다. 반면, 생식세포 배가법은 중간잡종이 개화할 때까지 그 가능성을 알지 못하며, 수많은 개체들을 모두 개화할 때까지 유지해야 하는 단점이 있다 (Lim et al. 2001).

본 실험은 철포백합의 체세포 배수화에 사용되는 몇 가지 화학약제의 종류와 처리농도 및 시간을 규명하고, 그 효율성을 고찰하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

기내배양 (1/2MS 배지, sucrose 50 g/L, phytagel 4 g/L, pH 5.8)한 *L. longiflorum* 'Snow Queen'의 5×5 mm 크기의 인편을 사용하였다

### 화학약품의 처리 후 배양

기내 배양중인 인편을 분리한 뒤, 실험오차를 줄이기 위하여 크기가 비슷한 인편을 선발하여 사용하였다. 처리 당 30개의 인편을 3 반복으로 처리하여 그 평균 값을 표시하였다. 인위적인 체세포염색체 배수화를 위한 화학물질로는 colchicine, oryzalin, caffeine 3 종류를 사용하였으며, colchicine 1,000, 3,000, 9,000 ppm, oryzalin 10, 30, 90 ppm, caffeine 3,000, 9,000, 27,000 ppm의 농도로 각각 1, 3, 9 시간 처리하였다. 화학물질 중 caffeine은 수용성이므로 멸균수로, colchicine과 oryzalin은 dimethyl sulfoxide (DMSO) 용매제에 녹인 후 멸균수를 이용하여 적정 농도로 조제한 용액에 인편을 충분히 침지한 후 멸균수로 3~4회 행군 다음 멸균된 여과지로 물기를 제거하고 1/2MS 배지에 sucrose 50 g/L, phytagel 4 g/L를 첨가한 후 pH 5.8로 조정된 증식용 고체배지에 인편의 향배축 (adaxial)이 위로 향하도록 치상하여 25±1°C, 1,500 lux, 명과 암의 광주기를 16/8 시간으로 배양하였으며, 배양 60일 후 인

편의 생존율과 인편 당 자구 형성 수를 조사하였다.

### Ploidy level의 측정

Flow cytometer를 이용하여 DNA양을 측정하였으며, 배수화 정도를 알아보기 위해 각 처리구의 잎 또는 인편을 0.5 cm<sup>2</sup> 크기로 채취하여 400 μL extraction buffer (Partec HR-A)를 첨가한 뒤 가늘게 chopping하여 5분간 방치하여 핵 유리용 현탁 시료를 만들었다. 현탁용액을 30~50 μM nylon필터로 걸러 2 mL의 staining solution (Partec HR-B)을 첨가한 다음 상온에서 1분 정도 방치한 후 flowcytometer (Ploidy Analyser-II, Partec Co., Germany)로 분석하였다. Nuclei의 상대적인 DNA양의 측정은 고압의 HBO lamp (100W/2 lamp)가 있는 PA-II에서 측정하였다. 각 시료마다 1000~5000개의 핵이 10~30 nuclei/S 율로 분석하였으며 peak position과 변이의 상관관계는 DPAC (Partec) 프로그램으로 측정하였다. 상대적인 DNA양은 *Lilium*의 정점값을 *Al-stroemeria* 'Virginia'의 정점값으로 나누어 *Alstroemeria*의 DNA함량 (2C=52.0 pg)과 비교하여 계산하였다.

## 결과 및 고찰

철포백합의 인위적인 체세포 염색체 배수화에 의한 임성회복에 필요한 기초자료를 얻기 위하여 colchicine, oryzalin과 caffeine을 농도 및 시간별로 *L. longiflorum* 'Snow Queen'의 인편조직에 처리했을 때 배수체 획득에 미치는 이들 물질의 영향을 보면 Table 1, 2, 3 및 Figure 1과 같다. Colchicine의 경

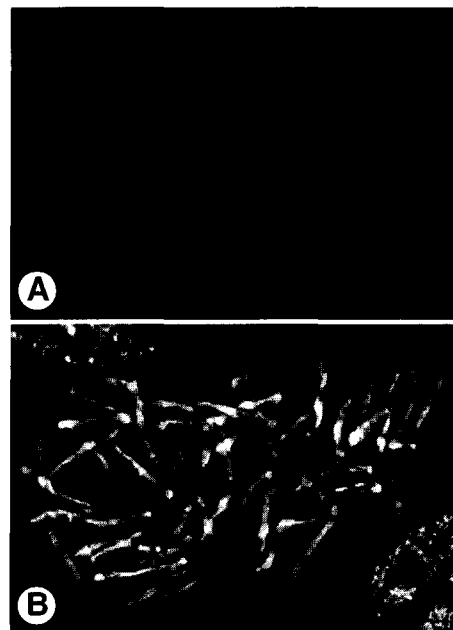


Figure 1. Somatic chromosome preparation of diploid (2x=24) and tetraploid (4x=48) of *L. longiflorum* 'Snow Queen'.

우 (Table 1), 1,000 ppm의 농도로 처리했을 때 절편의 생존율은 100%였으며, 절편 당 자구 형성수는 처리시간이 길어짐에 따라 감소하는 경향이었고 4배체 출현빈도는 3시간 처리 시 80%로 가장 높았다. 한편 8배체의 출현빈도는 1시간 처리 시 30%에 달하였고, 9시간 처리시 10%로 낮아졌다. 3,000 ppm의 농도로 처리 했을 때는 생존율은 100%였으나 절편 당 자구 형성수는 0.7개로써 낮았으나 4배체의 출현빈도는 처리시간이 길어짐에 따라 높은 경향이였으며 혼수체 (mixoploid)의 출현빈도는 1시간과 3시간 처리 시 30% 전후였다. 9,000 ppm

의 농도로 처리했을 때 절편은 모두 생존하였으나 절편 당 자구 형성수는 급격히 감소하여 0.1개에 불과하였고 9시간 처리는 자구를 전혀 얻을 수 없었다. 한편 4배체 출현빈도는 1시간 처리시 100%였으나 관찰 가능한 자구수가 제한되어 신뢰도에 영향을 주었다. 이상의 결과를 볼 때 1,000 ppm의 농도로 3 시간 처리했을 때 4배체 획득개체가 가장 높았다.

Oryzalin의 경우 (Table 2), 10 ppm의 농도로 처리했을 때 생존율은 100%로 양호하였으며 절편체당 자구수도 1.8~1.9개로써 많은 편이었다. 4배체 획득율은 전반적으로 높은 편으

**Table 1.** Effect of *in vitro* colchicine treatment on mitotic chromosomal polyploidization in bulbscale of *L. longiflorum* 'Snow Queen'.

Concentration (ppm)	Treatment (hrs)	Survival (%)	No. of bulblets formation/scale	Ploidy level (%)				Efficiency <sup>a</sup>
				2x	4x	8x	Mixo	
1,000	1	100	1.9	10.0	40.0	30.0	20.0	7.6
	3	100	1.4	0.0	80.0	0.0	20.0	11.2
	9	100	1.1	10.0	30.0	10.0	50.0	3.3
3,000	1	100	0.7	0.0	66.7	0.0	33.3	4.7
	3	100	0.7	0.0	70.0	0.0	30.0	4.9
	9	100	0.7	0.0	100.0	0.0	0.0	7.0
9,000	1	100	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
	3	100	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	9	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

<sup>a</sup>Efficiency = Survival rate × No. of bulblet foranction per scale × % of tetraploidy / 1000

**Table 2.** Effect of *in vitro* oryzalin treatment on mitotic chromosomal polyploidization from bulbscale of *L. longiflorum* 'Snow Queen'.

Concentration (ppm)	Treatment (hrs)	Survival (%)	No. of bulblets formation/scale	Ploidy level (%)				Efficiency <sup>a</sup>
				2x	4x	8x	Mixo	
10	1	100	1.8	0.0	54.2	18.2	27.3	9.8
	3	100	1.9	20.0	40.0	10.0	30.0	7.6
	9	100	1.8	30.0	40.0	10.0	20.0	7.2
30	1	100	1.5	50.0	20.0	20.0	10.0	3.0
	3	100	2.0	25.0	50.0	0.0	25.0	10.0
	9	100	1.7	60.0	0.0	0.0	40.0	0.0
90	1	100	1.8	40.0	40.0	0.0	20.0	7.2
	3	100	2.0	78.0	30.0	0.0	0.0	6.0
	9	100	1.4	50.0	25.0	0.0	25.0	3.5

<sup>a</sup>see foot note of Table 1.

**Table 3.** Effect of *in vitro* caffeine treatment on mitotic chromosomal polyploidization in bulbscale of *L. longiflorum* 'Snow Queen'.

Concentration (ppm)	Treatment (hrs)	Survival (%)	No. of bulblets formation/scale	Polyploid level (%)				Efficiency <sup>a</sup>
				2x	4x	8x	Mixo	
3,000	1	100	1.8	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	3	100	1.6	70.0	30.0	0.0	0.0	4.8
	9	90	1.4	80.0	20.0	0.0	0.0	2.5
9,000	1	100	1.8	36.4	54.5	9.1	0.0	9.8
	3	100	1.9	30.0	50.0	20.0	0.0	9.5
	9	81	1.6	10.0	90.0	0.0	0.0	11.7
27,000	1	90	1.5	30.0	70.0	0.0	0.0	9.4
	3	67	0.3	50.0	0.0	0.0	50.0	0.0
	9	14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

<sup>a</sup>see foot note of Table 1.

로 1시간 처리 시 54.2%로 가장 높았다. 한편 혼수체의 출현 빈도는 20~30% 수준이었고 10~18%의 8배체 출현빈도를 나타내었다. 30 ppm 처리시 절편체의 생존율은 처리시간에 관계없이 100%였으며, 3시간 처리시 2.0개의 절편체당 자구 형성수를 나타내었다. 4배체의 출현빈도는 3시간 처리 시 50%로 가장 높았고 8배체 출현빈도는 1시간 처리 시 20%에 달하였으며 혼수체의 출현빈도는 처리시간이 경과함에 따라 증가하여 9시간 처리 시 40%에 달하였다. 90 ppm 처리 시 생존율 역시 저 농도와 차이가 없이 100%에 달하였고 절편체당 자구 수는 비교적 많아 3시간 처리 시 2.0개로서 가장 많았다. 한편 4배체 출현빈도는 1시간 처리 시 40.0%로 높았으나 처리시간이 길어짐에 따라 감소하였으며 혼수체 출현빈도는 20~25%로 높았다. 이상의 결과 30 ppm의 농도로 3시간 처리했을 때 4 배체 획득효율이 10.0으로 가장 높았다.

Caffeine의 경우 (Table 3), 생존율은 처리농도와 시간의 경과에 따라 뚜렷한 차이를 보였는데, 특히 27,000 ppm 처리구에서는 시간의 경과에 따라 급격한 생존율의 저하를 가져왔다. 27,000 ppm 처리구에서는 생존율 뿐 아니라 절편당 자구 재생율도 현저히 저하되어 3시간 이상 처리할 경우 자구의 재생에 치명적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 따라서, 27,000 ppm의 농도는 처리 시간을 단축한다 하여도 자구 재분화에 크게 악영향을 주기 때문에 부적합하고, 3,000~9,000 ppm 처리구에서는 처리시간이 경과 하더라도 생존율 및 자구 재분화율에 그다지 영향을 미치지 않는 것으로 보아 9,000 ppm 정도의 농도에서 9시간 처리하였을 때 4배체 획득효율이 11.7로써 가장 적합하였다. Flowcytometry를 이용하여 배수체들을 조사하여 얻어진 2배체와 4배체들로부터 근단세포 염색체 수를 조사 해 본 결과 Figure 1에서 보는 바와 같이 2배체는  $2x=24$  였고, 4x=48 개의 염색체 수를 확인 할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 colchicine 1,000 ppm으로 3시간, oryzalin 30 ppm으로 3시간 처리, caffeine 9,000 ppm으로 9시간 처리 시 4배체 출현빈도가 가장 높은 편이었다. 한편 실제적인 응용에 있어 colchicine의 경우 인체에 유해하며 약해가 우려되고 독성이 강한 단점이 있으며 (Takamura et al. 2002; Van Tuyl et al. 1992), caffeine의 경우 생존율 및 인편당 자구수가 농도에 따라 급격히 감소되며 처리시간이 긴 단점이 있으며 (Table 3), oryzalin의 경우 인편당 자구형성을 및 4배체 출현빈도가 높을 뿐 아니라 재현성이 인정되었다.

백합에 있어 인위적 체세포 염색체의 배수화는 Emsweller (1947)에 의해 중간감종의 임성회복을 위해 처음 colchicine이 사용되어졌으며 colchicine의 단점을 보완하기 위해 oryzalin을 이용한 연구는 Van Tuyl 등 (1992)에 의해 이루어졌으나 구체적인 처리시간이나 농도에 관한 비교 결과는 빈약한 실정이다. 본 실험 (Table 1, 2, 3)에 있어서 효과적인 염색체 배수화를 위해 *L. longiflorum*의 대표적인 품종인 'Snow Queen'을 이용하여 colchicine, oryzalin, caffeine을 다양한 농도와 시간별로 처리한 결과로서 colchicine의 경우 처리시간과 처리

농도에 따라 백합 인편의 생존율에는 영향을 미치지 않았으며 비록 고농도에서 4배체 획득율이 높았으나 고농도, 장시간 처리시 인편당 자구 형성율은 급격히 낮아 효율성이 낮은 것으로 나타났다. 동양란 (제주한란)을 포함한 많은 작물에서 colchicine 처리시 처리농도와 처리시간을 증가시킬수록 생존율과 분화율 뿐만 아니라 배수체 형성율이 낮아지는 것으로 보고되어 (Chalak and Legave 1996; Han et al. 1999; Hansen and Anderson 1996; Väinölä 2000), 본 실험결과와 일치함을 보여주고 있으나 cocoyam의 경우는 colchicine의 처리농도가 배수체형성에 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있는데 (Tambong et al. 1998), 이와 같은 결과는 각 작물의 colchicine에 대한 감응정도의 차이에 의한 것으로 판단된다. Colchicine은 식물체뿐만 아니라 발암물질로서 인체에도 크게 해로우며 많은 작물에서 불임, 비정상적인 성장과 형태, 염색체 상실 및 재배열 (chromosome losses or rearrangement), 유전자 돌연변이 (gene mutation) 등이 보고되었는데 (Luckett 1989; Wan et al. 1989), 본 실험에서도 다른 작물에서 보고된 예와 마찬가지로 기형, 이상성장현상 등이 나타나 나리의 염색체 배수화를 위한 colchicine의 고농도 처리는 부적합할 것으로 판단되었다. 따라서 colchicine 처리를 통한 염색체 배수화를 위해서는 작물별, 처리부위별 적정농도와 처리시간의 규명이 필수적일 것으로 생각된다. 비록 작물의 종에 따라 colchicine이 oryzalin에 비해 효과적으로 작용하거나 (Hassawi and Geroge 1991) 또는 colchicine과 oryzalin 모두 처리 후 부정적인 효과에 대한 예도 찾아볼 수 있으나 (Wan et al. 1991), 대부분 많은 작물들에서 oryzalin이 colchicine보다 배수체 유도에 효과적이며 식물체에 toxicity가 적은 것으로 보고되었다 (Chalak and Legave 1996; Ramulu et al. 1991; Wan et al. 1991). 이러한 측면에서 oryzalin의 경우 colchicine에 비해 4배체 획득율은 낮지만 1/100의 저 농도에서도 인편으로부터 자구 형성율이 높고 사용 약량에 대한 변이 폭이 넓으며 기형이나 식물체 이상이 적을 뿐만 아니라 비용면에서 저렴하므로 실질적인 면에서 colchicine보다 우수한 것으로 여겨진다. 한편 caffeine을 이용한 작물의 염색체 배수화는 Thomas 등 (1997)에 의해 wheat에 처음 시도되었으며 본 실험에서 철포백합의 경우, 9,000ppm, 9시간 처리에서 4배체 형성율이 높았다. 본 실험의 결과 일단 형성된 자구는 4배체가 될 확률이 높고 혼수체는 적게 발생한 반면 처리농도와 처리시간에 따른 4배체 형성율은 colchicine에 비해 편차가 심한 특징을 갖는데 이는 Thomas 등 (1996)의 결과와 일치함을 보여주었다. 이러한 이유는 colchicine과 같은 제초제 계통은 생육과정 중 발육 초기 단계를 포함한 광범위한 발달단계에서 배수화가 일어나지만 caffeine의 경우 발육단계의 특정시점 (유수형성기부터 sporogenesis 직전)의 mitotic cycle에서 배수화가 주로 일어나기 때문이며 일단 처리를 받은 세포는 colchicine에 비해 mixoploid율은 낮고 배수체율은 높게 나타나는 것이라고 하였다. Caffeine은 실용적인 면에서 colchicine 등 다른 약제에

비해 가격이 저렴하고 사용이 간편한 장점을 가지고 있으나 처리농도와 처리시간에 따라 인편의 생존율과 자구 형성에 있어서 편차가 심한 것으로 나타나 caffeine의 기작에 대한 다양한 연구와 작물별 처리시점, 처리방법 등의 개선을 통해 앞으로 대체물질로서 이용가능성에 대한 검토가 더 필요할 것으로 생각된다. 백합 인편에서 부정자구 (adventive bulbs) 발생은 단세포에서 기원되지 않기 때문에 혼수체가 출현하는 것으로 여겨지며 다른 한편으로 약제 처리시 세포의 다른 발달 단계에 따라 야기될 수 있는 것으로 추측된다. 이러한 혼수체의 발생은 colchicine 또는 oryzalin을 이용한 다양한 작물 즉, 거베라 (Tosca et al. 1995), maize (Wan et al. 1991), day lily (Chen and Goeden-Kallemeyen 1979)의 배수체 유도과정에서 찾아 볼 수 있으며, 성장과정에서 다양한 변화를 일으키는 것으로 보고되었는데 2배체 *Rhododendron* 경우 chimeric 또는 2배체로 (Väinölä 2000), 혼수체 melon은 2배체로 (Adelberg et al. 1993) 전환되는 반면 혼수체 백합의 경우 ploidy level이 우세한 방향으로 (Van Tuyl et al. 1992), 혼수체 *Haplopappus*의 경우 4배체로 (Fujishige et al. 1996) 전환되는 것으로 알려져 있다. 따라서 혼수체의 경우 성장과정에서 ploidy level의 반복검정이 바람직할 것으로 여겨진다.

본 실험의 결과를 종합해 볼 때, colchicine, oryzalin 및 caffeine 공히 배수성 육종에 사용될 수 있으며, 그 효율성과 식물에 대한 toxicity를 고려할 때 oryzalin 또는 caffeine 사용이 더욱 바람직 할 것으로 판단된다.

## 적 요

본 연구에서는 백합의 배수성 육종 체계를 확립하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 인위적 체세포 염색체 배수화 방법에 대한 실험을 수행하였다. 체세포 배수화를 위한 in vitro 처리의 경우 4배체 뿐 아니라 혼수체의 비율이 처리에 따라 높게 나타나는 경우도 있으며, 무엇보다 4배체 획득율을 기준으로 그 효율성 조사해 본 결과 colchicine의 경우 1,000 ppm 농도에서 3시간 처리 (효율성=11.2%), oryzalin의 경우 30 ppm에서 3시간 처리 (효율성=10.0%), caffeine의 경우 9,000 ppm에서 9시간 처리 (효율성=11.7%)가 가장 양호하였다. 처리에 따른 4배체 획득 효율성은 다소 차이가 있을 수 있으나 인체에 대한 유해성, 혼수체 빈도 및 식물체에 대한 toxicity 등을 고려 할 때 oryzalin 또는 caffeine 사용이 바람직할 것으로 판단된다.

## 인용문헌

Adelberg JW, Rhodes BB, Skorupska HT (1993) Generating tetraploid melons in tissue culture. *Acta Hort* 336: 373-380

Anderson JA, Mousset-Declas G, Williams EG, Taylor NL (1991b) An in vitro chromosome doubling method for clovers (*Trifolium ssp.*). *Genome* 34: 1-5

Chalak L, Legave JM (1996) Oryzalin combined with adventitious regeneration for an efficient chromosome doubling of trihaploid kiwifruit. *Plant Cell Rep* 16: 67-100

Chen CH, Goeden-Kallemeyn YC (1979) In vitro induction of tetraploid plant from colchicine-treated diploid daylily callus. *Euphytica* 28: 705-709

Ermsweller SL (1947) The utilization of induced polyploidy in Easter lily breeding. *J Amer Soc Hort Sci* 49: 379-384

Fujishige I, Tanaka R, Taniguchi K (1996) Efficient isolation of non-chimeric tetraploids artificially induced in a stable culture of *Haplopappus gracili*. *Theor Appl Genet* 92: 157-162

Griesbach BA (1981) Colchicine-induced polyploidy in *Phalaenopsis* orchids. *Plant Cell, Tiss Org Cult* 1: 103-107

Han DS, Niimi Y, Nakano M (1999) Production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived haploid calli in the Asiatic hybrid lily 'Connecticut King'. *J Japan Soc Hort Sci* 68(5): 979-983

Hansen NJP, Anderson SB (1996) In vitro chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. *Euphytica* 88: 159-164

Hassawi DS, Geroge HL (1991) Antimitotic Agents: Effects on double haploid production in wheat. *Crop Sci* 31: 723-726

Lim KB, Ramanna MS, De Jong JH, Jacobsen E, Van Tuyl JM (2001) Indeterminate meiotic restitution (IMR): a novel type of meiotic nuclear restitution mechanism detected in interspecific lily hybrids by GISH. *Theor Appl Genet* 103: 219-230

Luckett D (1989) Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. *Euphytica* 42: 177-182

Ramulu SK, Verhoeven HA, Dojkhuis P (1991) Mitotic blocking, micronucleation and chromosome doubling by Oryzalin, Amiprofos-methyl, and colchicine in potato. *Protoplasma* 160: 65-71

Takamura T, Lim KB, Van Tuyl JM (2002) Effect of a new compound on the mitotic polyploidization of *Lilium longiflorum* and Oriental hybrids lilies. *Acta Hort* 572: 37-42

Tambong JT, Sapra VT, Garton S (1998) In vitro induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets. *Euphytica* 104: 191-197.

Thomas J, Chen Q, Howes N (1997) Chromosome doubling of haploids of common wheat with caffeine. *Genome* 40: 552-558

Tosca A, Pandolfi R, Citterio S, Fasoil A, Sgorbati S (1995) Determination by flow cytometry of the chromosome doubling capacity of colchicine and oryzalin in gynogenetic haploid of *Gerbera* *Plant Cell Rep* 14: 455-458

Väinölä A (2000) Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica* 112: 239-244

Van Tuyl JM, Meijer B, van Diën MP (1992) The use of oryzalin as an

alternative for colchicine in vitro chromosome doubling of *Lilium*  
an Nerine. Acta Hortic 325: 625-630

Wan Y, Duncan DR, Rayburn AL, Petolino JE, Widholm JM (1991)  
The use of antimicrotubule herbicides for the production of  
doubled haploid plants from anther-derived maize callus. Theor

Appl Genet 81: 205-211

Wan Y, Petolino JF, Widholm JM (1989) Efficient production of  
doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-  
derived maize callus. Theor Appl Genet 77: 889-892

(접수일자 2003년 11월 28일, 수리일자 2003년 12월 18일)