한작지(Korean J. Crop Sci.), 55(4): 327~332(2010)

대마 자주의 웅화 유도에 의한 자성종자 생산에 관한 연구

문윤호† · 구본철 · 최용환 · 안승현 · 박선태 · 차영록 · 안기홍 · 김중곤 · 서세정

농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터

Seed Production by Induction of Male Flowers on Female Plants of Hemp(*Cannabis sativa* L.)

Youn-Ho Moon†, Bon-Cheol Koo, Yoyng-Hwan Choi, Surn-Teh Bark, Seung-Hyun Ahn, Young-Lok Cha, Gi-Hong An, Jung-Kon Kim, and Sae-Jung Suh

Bioenergy Crop Research Center, National Institute of Crop Science, RDA, Muan, Chonnam 534-830, Korea

ABSTRACT This study was conducted to overcome the deliciousness by sex reversal in hemp plants. When female plants grown under long day length condition were transferred to short day length condition in 3th and 6th leaf stage, a few male flowers were formed and the gap of flowering days between sex reversed male and normal female flowers were around 10 days and 3 days, respectively. Although the flowering amounts were small, this short gaps of flowering days were enough for artificial pollination. When female plants grown under long day length condition were transferred to short day length condition just after treatment of silver nitrate in the vegetative stage, a great amount of male flower was formed and the gap of flowering days between sex reversed male and normal female flowers were only 1 to 3 days. The increased sex reversed male flowers and induced short gap of flowering days were adequate for natural wind pollination. When female seeds were cultivated, seed yield was 141 kg/10a, while it was 96 kg/10a when normal seeds cultivated.

Keywords : hemp, sex reversal, female seed

대마는 전통적인 섬유작물이지만 종실유에 함유된 γ-linolenic acid(GLA)가 아토피 피부염 등 여러 질병에 치료효과가 있어 선진국에서는 비누, 화장품 및 건강보조식품의 생산에 이용되고 있다(Pate & Robert, 1997; Rosenthal, 1994; Michael & Leson, 1994; Ernest and David, 2002). 또한 단위면적당 바이오매스 수량이 많고 줄기의 셀룰로오스 함량이 43~70%로 많아 2세대 바이오에탄올 원료작물로서도 유망하다(Piero & Gianpietro, 2003: Adriana & Rob, 2006).

대마는 자웅동주 품종도 있지만 기본적으로는 자웅이주 식물이고 집단 내에서 자주와 웅주는 보통 1:1의 비율로 존재하므로 재식주수의 50% 정도가 웅주로 종자가 맺히지 않아 채종량을 적게 하는 요인이 되고 있다(Robert, 1995).

대마의 성은 화분의 X, Y 성 염색체에 의해 결정되는데 웅주의 화분은 n=9+X인 자성 화분과 9+Y인 웅성화분으로 구성되어 자성화분으로 수정된 주두 식물체는 자주가 되고 웅성화분으로 수정된 주두 식물체는 웅주가 된다(Chailakhyan & Khrianin, 1980). 그러므로 체세포 성 염색체 조성이 XX인 자주의 성을 전환시켜 웅화를 발생시킨다면 그 화분은 모두 X 염색체만 있을 것이다. 이것을 일반 자주에 수정시켜 채종한 종자는 100% 자주만 출현하는 "자성종자"가 되어 육종 및 채종 효율을 크게 향상시킬 수 있다. 따라서 본 연구는 대마의 육종 및 채종상의 큰 장애인 "자웅이주성"을 극복할 수 있는 "자성종자" 생산기술을 개발하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료

시험에 사용된 재료는 네덜란드 CPRO(Center for Plant Breeding and Reproduction Research)에서 도입한 THC (Tetrahydrocannabinol) 함량이 적은 산업용 품종인 IH3를 사용하였다. IH3는 산업용 품종 중 경장과 섬유수량이 가장 크고 많으며 개화기가 우리나라 재래종과 비슷하여 실용적인 1대잡종 품종 육성에 유리할 것으로 기대되어 선택하였다.

†Corresponding author: (Phone) +82-61-450-0145
(E-mail) yhmoon@korea.kr <Received September 28, 2010>

재배 및 자주 선발

모든 시험들은 대마를 폿트에 심어 수행하였는데 사용된 폿트는 직경 30 cm, 높이 40 cm와그너 폿트로 여기에 숙전토양 1톤과 요소, 용성인비, 염화가리를 각각 89, 75, 57 g(N-P_2O_5-K_2O = 10-4-8 kg/10a)을 잘 혼합하여 폿트에 채워 사용하였다. 폿트당 5립씩 파종하여 일장이 11시간 정도로 짧은 시기인 2월 20일에 유리온실 내에서 재배하였다. 자화 및 웅화 꽃봉오리가 형성되어 자주와 웅주의 판별이 가능하였을 때 폿트당 자주 1개체씩만 남기고 나머지 개체들을 제거하여 유리온실 외부로 이동시켜 14시간 이상의 장일조건 하에서 자주가 다시 영양생장을 하도록 유도하였다.

영양생장기 질산은 처리 시기별 웅화발생 조사

장일조건으로 인해 영양생장을 지속하고 있는 6월 15일, 6월 25일, 7월 5일, 7월 15일에 질산은 500 ppm 용액을 1 L들이 가정용 지압식 분무기로 용액이 식물체 전 부위에 고루 묻도록 3일 간격으로 3회씩 살포하였다. 처리한 식물체는 자연일장에 재배하여 일장이 짧아져 개화가 시작된 9월 상순에 식물체 정단부위의 웅화 개화량을 달관조사 하였는데 5% 이하, 5-10%, 10～20%, 20% 이상 등 4등급으로 나누어 각각을 극소(Ex-little), 소(Little), 중(Medium), 다(Much)로 하였다.

급격한 일장변화에 의한 자주의 웅화발생 조사

일장이 10시간 정도로 짧은 11월 21일에 30개 폿트에 대마 종자를 파종하여 이중 10개 폿트는 생식생장을 유도하기 위해 자연 단일조건에 재배하였고 20개 폿트는 영양생장이 지속되도록 250W 나트륨 전등을 이용한 16시간 일장의 장일조건에 재배하였다. 장일조건에 재배한 것 중 10 개 폿트는 3엽기에, 나머지 10 개 폿트는 6엽기에 10시간 일장의 단일조건에 재배하여 급격한 일장변화로 인한 자주의 성전환 개체 비율, 자화와 웅화의 개화기, 웅화의 개화량을 조사하였다.

질산은 및 단일 동시 처리 시기별 의한 자주 웅화발생 조사

질산은 및 단일 동시 처리는 시원화(primordia)가 형성되지 않아 영양생장기로 판단되는 7월 2일, 7월 12일, 그리고 시원화가 형성되어 생식생장기로 판단되는 7월 22일로 하였는데 각 처리 시작일의 일장은 각각 14시간 28분, 14시간 19분, 14시간 8분이었다. 단일처리 일장은 10시간 이었고 질산은 농도와 처리 횟수는 "영양생장기 질산은 처리 시기별 웅화발생 조사" 와 동일하게 하였다. 시험에 사용된 식물체 수는 각 시기별로 9개 이었고 대조로서 시기별로 9개를 질산은을 처리하지 않고 단일처리만 하였다.

대마의 생식생장 유도를 위한 단일처리 시설은 유리온실 내에 설치하였다. 즉 직경 15 mm 철제 파이프로 폭 2 m, 길이 7 m, 높이 2 m의 간이 차광틀을 만들고 차광재료로서 두께 0.05 mm 흑색비닐을 사용하였다. 단일처리는 수동식 권취기를 이용하여 흑색비닐 커튼을 오전 9시에 개방하고 오후 7시에 폐쇄하여 매일 10시간 일장이 유지되도록 하였다.

처리 30일 후 식물체 마디의 액아에서 화아가 형성되었을 무렵 가지의 액아 중 성이 전환되어 수꽃이 형성된 액아의 비율을 조사하였다.

자성종자 성비 및 종실 생산력 검정

자성종자의 성비 및 종실 생산력 검정은 급격한 일장변화가 자주의 웅화 발생에 미치는 영향 시험에서 채종한 자성종자와 웅주의 화분으로 수정된 일반종자를 사용하여 수행하였다. 성비는 자성종자에서 출현한 1,073개체와 일반종자에서 출현한 259개체의 성을 판별하여 조사하였고 재배법과 조사요령은 종실용 대마 표준재배법에 준하였다. 즉, 5월 상순경 포장에 질소, 인산, 칼리, 퇴비 각각 5, 4, 8, 1,000 kg/10a를 시용 후 경운 로터리 후 1 m 간격으로 두둑을 만들고 가로, 세로 각각 4, 5 m 크기로 시험구를 구획한 후 흑색비닐로 피복하여 50 cm 간격으로 4～5립씩 점파하였다. 포장 중앙 열에 수분수로서 재래종 일반종자(자웅혼합)를 파종하였다. 발아하여 20～30 cm정도 자랐을 때 생육상태가 충실한 1개체씩만 남기고 솎아주었다. 제초작업은 6월 중순 비닐로 피복된 두둑사이에 비 선택성 제초제를 살포하였고 7월 하순에 화총(flower cluster)이 형성되었을 때 추비로 질소를 5 kg/10a 시용하였다. 개화기는 전체 개체중의 50%가 개화된 시기를, 종실 등숙기는 전체 종실의 50%가 갈변한 시기로 하였다. 종실 등숙기에 시험구당 10개체씩 경장, 분지수, 분지장을 조사하였는데 경장은 지상부에서 정단까지의 길이, 분지수는 주경에서 나온 1차분지의 수, 분지장은 길이가 가장 긴 1차분지의 길이를 조사하여 10개체의 평균으로 하였다. 대마는 경장이 크고 분지수도 많아 종실수가 매우 많기 때문에 식물체 전체의 화방 및 종자수를 조사하기는 극히 어려워 본 시험에서는 상위 12절에서 나온 분지의 화방수와 종자수를 조사하여 화방당 종자수로 하였다. 생육특성을 조사한 후 예취하여 종자의 脫粒이 잘 되도록 양건하였으며 탈립된 종자를 정선하여 종실 수량을 조사하였다.

결과 및 고찰

영양생장기 질산은 처리시기별 웅화발생 양상

영양생장기에 질산은 처리시기에 따른 자주의 성 표현 양상은 Table 1과 같다. 처리 시기가 늦을수록 성전환 식물체의 비율이 증가하여 7월 15일 처리에서 92%가 성전환 되었으나 처리 시기 모두 웅화의 개화량이 적고 질산은을 처리하지 않은 자주의 개화기 보다 25~26일 늦어 자연적인 수정이 어려웠다.

급격한 일장변화에 의한 자주의 웅화발생 조사

16시간 일장의 장일조건에서 재배한 자주를 점진적으로 10시간 일장의 단일조건으로 변화시켰을 때 성 표현 양상은 Table 2와 같다. 전 생육기간 동안 자연 단일조건에서 재배한 경우의 성전환 식물체 비율은 5%이고 웅화 개화량도 극히 적었으며 자화와 개화기 차이가 24일이나 되어 자연적인 수정이 되지 않았다.

그러나 3엽기, 6엽기에 일장 조건을 장일에서 단일로 급격히 변화시킨 경우 웅화의 개화량은 적었지만 성전환 식물체의 비율이 각각 75%, 100%로 높고 자화와 개화기 차이가 각각 10일, 3일로 짧아져 인공수정으로 종자를 얻을 수 있었다.

상기 결과는 전 생육기간 단일조건에 재배하였을 때 90% 이상이 성전환 된다는 Schaffner(1928)의 연구결과와는 일치하지 않았고 장일조건에서 단일조건으로 변화시키면 자주에 웅화가 발생하여 종자를 얻을 수 있다는 Pete(2000)의 결과와 일치하였다. 그 이유는 Cheun(1989)의 연구결과와 같이 성 결정에 대한 식물생장조절물질의 반응이 3~4엽기에 가장 왕성하여 이 시기의 급격한 일장변화가 성전환을 유도하였기 때문인 것으로 생각된다.

질산은 및 단일 동시 처리 시기별 의한 자주의 웅화발생 조사

질산은 및 단일 동시처리 시기별 자주의 웅화 발생 양상은 Table 3과 같다. 시원화가 형성되지 않아 영양생장기로 판단되는 7월 2일과 7월 12일에 처리한 개체들은 성전환 액아 비율이 각각 63.2%, 61.9%로 높았고 무처리 자주와 개화기 차이가 각각 1일 3일로 짧아서 자연적인 풍매로 수정이 가능하였다. 그러나 시원화가 형성되어 생식생장기로 판단되는 7월 22일에 처리한 개체들은 성전환 액아의 비율이 4.4%로 낮고 무처리 자주보다 개화기가 16일 늦어 자연적인 풍매로 수정이 불가능하였다.

절위별 성전환 액아 비율은 Fig. 1와 같다. 7월 2일과 7월 12일에 처리한 개체들은 상위 제 1절에서 성전환 액아의 비

Table 1. Sex expression of female hemp as influenced by treating times of silver nitrate solution in vegetative stage.

Treating dates	RMFP(%)	DFF[z](A)	DMF[y](B)	B-A(No. of days)	QMF[w]
June 15	75	Aug. 8	Sep. 3	26	Ex-little
June 25	83	Aug. 8	Sep. 2	25	Little
July 5	87	Aug. 8	Sep. 2	25	Little
July 15	92	Aug. 8	Sep. 2	26	Little

[z]RMFP : Ratio of male flowering plants, [y]DFF : Date of female flowering,
[x]DMF : Date of male flowering, [w]QMF : Quantity of male flowering

Table 2. Sex expression of female hemp as influenced by changing environment from long day to short day length.

Treatment	RMFP[z] (%)	DFF[y] (A)	DMF[x] (B)	B-A (No. of days)	QMF[w]	Possibility of pollination
Cultivated under short day length	5	Dec. 6	Dec. 30	24	Ex-little	Impossible
Changed in 3 leaves stage	75	Jan. 5	Jan. 15	10	Little	Possible
Changed in 6 leaves stage	100	Jan. 30	Feb. 2	3	Little	Possible

[z]RMFP : Ratio of male flowering plants, [y]DFF : Date of female flowering,
[x]DMF : Date of male flowering, [w]QMF : Quantity of male flowering

Table 3. Sex expression of female hemp as influenced by both treating date of silver nitrate and short day length simultaneously.

Treating date	NDL[z] at treating date(hours)	SL[y] (cm)	Flowering date		B-A (No. of days)	QMF[x]	RSRAB[w] (%)
			Female(A)	Male(B)			
July 2	14.28	79	July. 22	July 23	1	Much	63.2
July 12	14.19	82	Aug. 1	Aug. 4	3	Much	61.9
July 22	14.08	83	Aug. 5	Aug. 21	16	Medium	4.4
[v]Non-treatment	-	84	Aug. 13	-	-	-	0

[z]NDL : Natural day length, [y]SL : Stem length, [x]QMF : Quantity of male flowering, [w]RSRAB : Ratio of sex reversed axillary buds, [v]Non-treatment : Cultivation in condition of natural day length

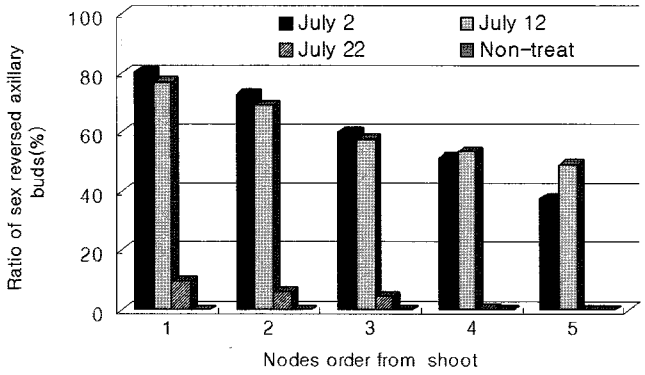

Fig. 1. The ratio of sex reversed axillary buds according to the node order.

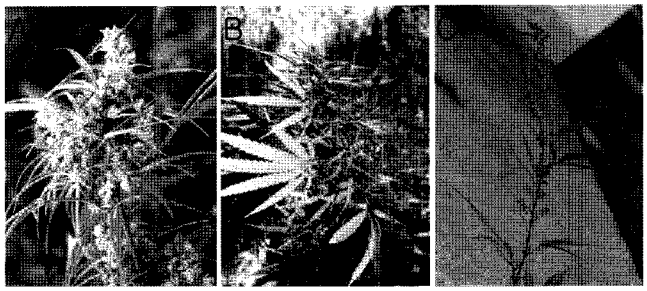

Fig. 2. Sex reversed male flowers and normal flowers(female and male flowers).
A : Sex reversed male flowers, B : Female flowers, C : Male flowers

율이 각각 80.5%, 77.0%로 가장 높고 하위절일수록 낮아져 5절에서는 각각 33.7%, 49.2%로 식물체 상부의 성전환 액아비율이 높았다. 그러나 7월 22일에 처리한 개체들은 이미 생식생장기에 접어든 이후 이므로 상위 제 1절에서도 성전환 액아의 비율이 9.7%로 낮았고 무처리 개체에서는 성이 전환된 액아가 없었다.

성전환 웅화와 무처리 자화의 모습은 Fig. 2과 같다. 웅주는 개화기 중에도 절간신장이 계속되어 꽃이 느슨하게 발생하지만 성이 전환된 자주는 절간생장이 멈춰서 절간장이 짧아 웅화가 빽빽하게 발생하였다.

Hennik *et al.*(1991)에 따르면 Y 염색체에 꽃을 느슨하게 발생하게 하는 유전자 'I'와 X 염색체에 빽빽하게 발생하게 하는 유전자 'i' 가 있어 웅주의 개화습성 유전자형이 'Ii'로 꽃이 느슨하게 발생하지만 자주는 'ii'로 빽빽하게 발생한다. 따라서 본 시험에서는 질산은 및 단일처리로 꽃의 성은 전환되었지만 절간장의 신장은 이루어지지 않은 것으로 보인다. 이는 웅주와는 달리 자주는 GA 생성이 많지 않아서 절간생장이 이루어지지 않는다는 Cheun(1989)의 보고와 일치하는 것으로 질산은 및 단일처리가 자주의 GA 생성량을 변화시키지 못한 것으로 생각된다.

대마는 장일조건에서 영양생장을 하고 일장이 짧아지면 생식생장기로 접어들어 꽃눈이 형성되는데 이때 자주는 내생 ethylene 생성량이 많아 자화가 형성되고 웅주는 그 양이 적어 웅화가 형성된다고 한다(Beyers *et al.*, 1972). 이때 자주에 코발트 또는 은 이온을 처리하여 내생 ethylene 생성을 억제하면 웅화가 형성된다(Mohan & Sett, 1982). 그러나 질산은 처리 시 자주와 웅주의 판별이 가능할 정도로 생식생장이 진전된 후 은 이온을 처리하면 이미 생성된 ethylene의 영향을 받아 웅화의 발생시기가 늦어지고 발생량도 적어(Mohan & Sett, 1982) 자연적인 풍매에 의한 자성종자 생산은 어렵다고 생각된다. 대마 자주에 웅화를 발생시켜 실용적으로 자성종자를 생산하려면 웅화의 발생량이 많고 개화기를 자화와 일치시켜야 할 것이다.

상기와 같은 웅화의 다량 발생 및 자화와의 개화기 일치를 통하여 자연적인 풍매로 수분이 가능하도록 하려면 영양생장기에 은 이온을 처리하여 단일조건에서 생식생장을 유도함으로서 식물체의 내생 ethylene 발생을 억제시켜 성전환 웅화의 개화기를 자주의 개화기와 일치시켜야 할 것으로 생각된다.

Table 4. Sex ratio and seed yield of female and normal seeds.

Seeds	No. of examined plants	Flowering date	Sex ratio(%)		SL[z] (cm)	No. of branch	Branch length (cm)	Seed yield (kg/10a)
			Female	Male				
Female seeds	1,073	Aug. 12	100	0	321	37	181	141
Normal seeds	259	Aug. 12	49	51	330	38	184	96

[z]SL : Stem length

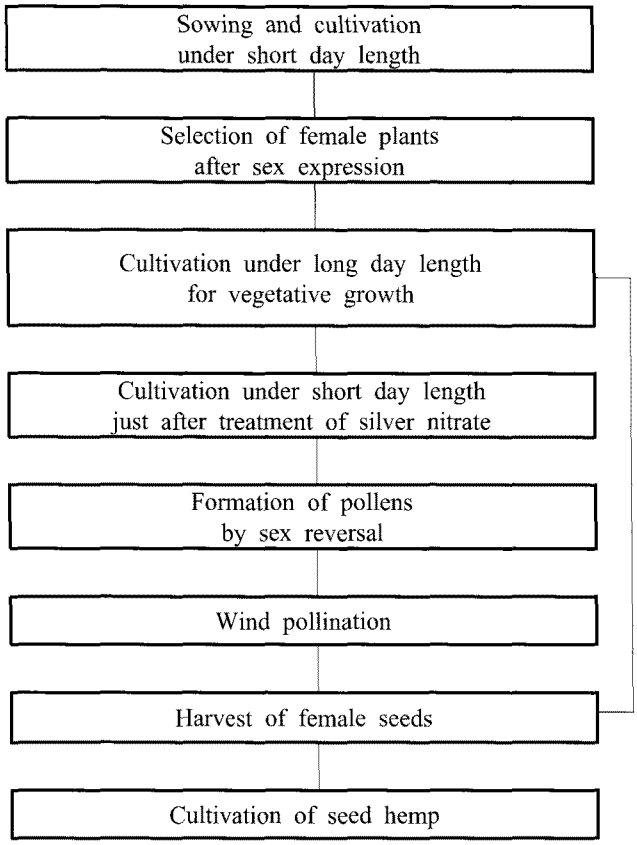

Fig. 3. Production procedures of female seeds of hemp.

자성종자 성비 및 종실 생산력 검정

자성종자와 일반종자의 성비 및 종실생산력을 검정한 결과는 Table 4와 같다. 일반종자는 자주의 비율이 49%로 자주와 웅주의 성비가 1 : 1에 근접하였기 때문에 종실수량이 96 kg/10a였으나 자성종자는 자주비율이 100%로서 종실수량이 141 kg/10a로 일반종자에 비해 47% 많았다.

본 시험에서 얻어진 결과로 실용적인 자성종자 생산 과정을 요약하면 Fig. 3과 같다. 일반종자(자웅 혼합종자)를 파종하여 단일조건에서 생식생장을 유도한 후 웅주를 제거하고 자주를 선발하여 다시 장일조건에서 영양생장을 유도한다. 영양생장기에 질산은을 처리한 직후 단일조건에서 생식생장을 유도하면 성이 전환되어 자주에서 웅화가 발생하여 자성화분이 형성된다. 이 자성화분을 자화에 수정시키면 후대에 100% 자주만 나오는 자성종자가 생산되는데 이 자성종자는 종실용 대마 재배 및 1대잡종 채종용으로 사용한다.

생산된 자성종자는 후대에 100% 자주만 나오는 것이 확실하므로 이것을 이용하여 자성종자 생산 과정상에서 단일조건에 의한 성 판별 및 자주선발 과정을 생략하고 곧바로 장일조건에 파종 재배하여 자성종자 생산과정을 이어갈 수 있다.

대마는 자웅이주식물로 개화 전에 모본 품종의 성을 판별하여 웅주를 제거한다면 1대잡종 채종이 쉬울 것으로 보일 수 있다. 그러나 대마는 경장이 보통 2m 이상이고 정단부에서부터 꽃눈이 형성되기 때문에 정단부의 꽃눈으로 성을 판별하여 모본 품종의 웅주를 제거하는 것은 어렵다. 자성종자를 모본 품종으로 이용한다면 웅주를 제거할 필요 없이 쉽게 1대잡종을 채종 할 수 있어 품종 육성이 크게 도움이 될 것으로 판단된다.

적 요

대마의 육종 및 채종상의 큰 장애인 "자웅이주성"을 극복할 수 있는 "자성종자" 생산기술을 개발하기 위해 수행한 일련의 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 전 생육기간 자연 단일조건에 재배한 개체들은 질산은을 처리하더라도 성전환 식물체 비율이 5%이고 웅화의 발생정도가 극히 적었으며 자화보다 24일 늦게 개화하여 수정이 되지 않았다.
2. 재배환경을 3엽기, 6엽기에 장일에서 단일조건으로 급격하게 변화시킨 자주는 웅화의 개화량은 적었지만 성전환 개체 비율이 각각 75%, 100%로 높고 자화와 개화기 차이가 각각 10일, 3일로 비슷한 시기에 개화하여 인공수정이 가능하였다.
3. 영양생장기로 판단되는 7월 2일과 7월 12일에 질산은과 단일을 동시에 처리한 개체들은 모두 성이 전환되

어 성전환 액아 비율이 각각 63.2%, 61.9%로 높았고 무처리 자주와 동일한 시기에 개화하여 자연적인 풍매로 수정되었다. 또한 상위 제 1절에서 성전환 액아의 비율이 각각 80.5%, 77.0%로 가장 높아 풍매에 유리하도록 바람이 잘 통하는 식물체 상부에서 성전환 액아의 비율이 높았다.

4. 생식생장기로 판단되는 7월 22일에 처리한 개체들은 성전환 액아의 비율이 4.4%로 낮고 자화보다 16일 늦게 개화하여 수정되지 않았다.
5. 일반종자는 자주 비율이 49%로 성비가 1:1에 근접하기 때문에 종실수량이 96 kg/10a였으나 자성종자는 자주 비율이 100%로서 종실수량이 141 kg/10a로 일반종자에 비해 47% 증수되었다.

인용문헌

Adriana, M. I. & B. D. Rob. 2006. Biomass and multi-product crops for agricultural and energy production-an AGE analysis. Energy Economics 28: 308~325.

Beyers, R.E., L.R. Baker and H.M. Sell. 1972. Ethylene a natural regulator of sex expression of *Cucumis melo* L. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 69: 717-720.

Chailakhyan, M. Kh. and V.N. Khrianin. 1980. Sexuality in plants and its hormonal regulation. The University of Chicago Press. pp. 1-58, 108-118.

Cheun, J. Y. 1989. Male or female expression of hemp and its hormonal regulation. Research of agricultural science of Sunchun National University 3: 83-108.

Ernest, S. and M. David. 2002. Hemp: "A new crop with uses for north America" in Janick J. and A. Whipkey(editor): "*Trends in new crops and new uses*". ASHS press, Alexandria. pp. 284-296.

Hennink, S., E.P.M. de Meijer and H.M.G. van der Werf. 1991. "Fiber hemp in the Ukraine, 1991" in Rosenthal, Ed (editor): *Hemp Today*; Quick American Archives, Oakland, California, USA.

Michael, K. and G. Leson. 1994. Hemp research and market development in Germany. J. of International hemp association. 1(2): pp. 52-56.

Mohan, R.H.Y. and R. Sett. 1982. Sex reversal in female plants of *Cannabis sativa* L. by treatment of silver thiosulfate anionic complex. Theor. Appl. Genet. 62: 369-375.

Pate, D.W. and C.C. Robert. 1997. Genetic future of hemp. J. of International hemp association. 4(1): 32-36.

Pete, B.. 2000. Feminized seeds. Cannabis culture magazine. http://www.cannabisculture.com/articles/1332.html.

Piero, V. & V. Gianpietro. 2003. Analysis of energy comparison for crops in European agricultural systems. Biomass and Bioenergy 25: 235-255.

Robert, C.C.. 1995. "*Marihuana botany*". Ronin Publishing, Inc. Califonia, USA. pp. 1-10.

Rosenthal, Ed.. 1994. Hemp today. Published by Quick American Archives, Oakland, California, USA. pp. 243-247.

Schaffner, J. H. 1928. Further experiments in repeated rejuvenation in hemp and their bearing on general problems. American Journal of Botany. 15 (1): 77-85.