

콜히친 침지처리에 의한 ‘망종화’의 4배체 식물유도

권수정, 조갑연¹, 김학현*

우송정보대학 플라워코디·조경과, ¹우송정보대학 식품영양조리계열

A Tetraploid Induction in *Hypericum patulum* Thunberg by Colchicine Soaking Treatment

Soo Jeong Kwon, Kab Yeon Cho¹ and Hag Hyun Kim*

Department of Flower Floral Plant Coordi & Landscape Architecture, Woosong College, Daejeon 300-715, Korea

¹Department of Food Nutrition and Cookery, Woosong College, Daejeon 300-715, Korea

Abstract - This study aimed to get the basic data on the breeding of good varieties in *Hypericum patulum* Thunberg. The optimum materials, concentration and soaking time were examined to identify the effective approach to induce tetraploid plant by colchicine treatment to cultivate the varieties. For the seed germination rate of seed by colchicine treatment, the higher colchicine concentration was and the longer soaking time was, the more the germination rate decreased. While individuals were germinated in 16 test groups except control group (no treatment group), all the plants were diploid and no tetraploid was induced. For the plant regeneration rate by colchicine treatment on the explant of *Hypericum patulum* Thunberg that was under in vitro culture, the higher the colchicine concentration increased, the less the regeneration rate. While total 147 individuals were regenerated in all treatment, when the explant was soaking treatment in more than 0.05% for over 6 hours, tetraploid could be obtained. In the soaking treatment of 0.05% for over 6 hours, tetraploid could be obtained. In particular, for the soaking treatment in 0.05% for 12 hours, 8 tetraploids were induced, which was about 47.1% of the number of plant regenerated. In accordance with the observation on doubling of DNA contents in leaf in order to identify polyploidy, the peak DNA content of G1 phase was 94.5 for diploid and 192.5 for tetraploid. It confirmed doubling of DNA content. Furthermore, the number of chloroplasts per guard cell depending on polyploid was around 10 in diploid and 17 to 19 in tetraploid, which were around 1.7 to 1.9 times as much as diploid.

Key words - DNA content, Explant, Flow cytometry, Number of chloroplasts, Soaking treatment

서 언

물레나물과에 속하는 ‘망종화(*Hypericum patulum*)’는 낙엽활목 소관엽으로 ‘금사매’라 불린다. 우리나라에서는 주로 정원수로 인기가 높아 널리 재배되고 있으나, 재배법이 극히 원시적이며 품종개량 및 재배법 개선을 위한 본격적인 연구는 거의 이루어지고 있지 않는 실정이다.

인위적인 4배체 식물의 유도는 일반적으로 콜히친(colchicine)의 농도, 처리시간 및 처리법 등을 달리하여 많이 이루어지고 있다. 콜히친은 식물의 체세포 분열과정에서 tubulin과 결합하여 방추사의 형성을 억제시키고, 세

포분열 중기단계에서 염색체의 양극이동과 microtubules의 형성을 방해함으로써, 염색체의 배수화를 유도하는 것으로 알려져 있다(Hadlaczky *et al.*, 1983).

4배체 식물은 일반적으로 기관 또는 줄기의 거대화가 생기며(Cockerham and Galletta, 1976; Lapins, 1975), 줄기는 굵고 길어지며 잎과 꽃 등도 커진다(Kim *et al.*, 2003a). 특히 배수화와 더불어 사탕수수에서는 당류, 토마토와 사과와 과실 중의 비타민 C, 담배 잎 내의 니코틴 등과 같은 2차적 대사물질의 성분함량의 변화 및 무 바이러스 저항성(Hahn, 1969), 뽕나무의 내동성(Park, 1994) 등의 특성이 향상되는 경우도 있다.

일반적으로 배수성을 식별하는 방법으로는 식물체의 특성(Hougas and Peloquin, 1957), ‘seed maker’ 또는

*교신저자(E-mail) : hkyushu@hanmail.net

'embryo maker' 등 표식유전자(Bingham, 1969; Hermsen and Verdenius, 1973), 기공세포(Borrino and Powell, 1987), 기공내 엽록체 수(Chaudhari and Barrow, 1975; Dudley, 1968; Bae *et al.*, 2001), 화분립(Bamberg and Hanneman, 1991)의 관찰 등이 있으나, 주로 가장 정확한 방법으로 알려진 엽록체 수 및 세포내 DNA의 양에 의한 분석방법이 이용되고 있다(Galbraith *et al.*, 1983; Miyoshi and Asakura, 1996; Sari *et al.*, 1999). 그러나 엽록체에 의한 방법은 실제로 이용하고자 할 때 약간의 기술적인 문제와 노력이 따르며, 많은 양의 재료를 검정할 수 없어 현재는 정확성과 많은 양의 재료를 분석할 수 있는 Flow cytometry를 이용하여 간단하게 DNA함량을 측정하여 배수성을 판정하고 있다.

본 연구는 자생식물의 우량원예품종 육성방법의 하나로 콜히친 처리에 의한 '망종화'의 효율적인 4배체 식물의 유도법을 위한 기초적 자료를 얻은 목적으로 적정식물체 부위, 적정농도 및 침지시간 등에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

종자 및 기내 배양체의 콜히친 침지처리

2009년 채종한 '망종화'의 종자 및 기내 무균파종 후, 생장시킨 식물체의 절을 포함한 줄기 절편체를 공시재료로 하였다. 종자처리는 여과지 2매를 깐 직경 9 cm의 페트리 접시에 0, 0.01, 0.05, 0.1 및 0.5%의 콜히친 수용액을 20 ml씩 넣은 후, 50립의 종자를 침지처리 하였으며, 콜히친 처리 후 발아촉진을 위하여 5°C의 저온 조건하에서 1, 3, 6 및 12 시간 동안 두었다. 각 처리는 3반복으로 하였다. 침지처리 후, 각 종자를 멸균수로 3~4회 씻은 다음, 버미큐라이트와 피트모스를 1:1(v/v)의 비율로 혼합한 배양토에 파종하여 25°C의 항온실에서 최하시켰다. 자엽이 출현했을 때 발아조사를 하였으며, 본엽이 6매 이상 출현했을 때 엽을 채취하여 배수성의 유무를 확인하였다. 또한 줄기 절편체는 10 ml의 비이커에 0.01, 0.05 및 0.1%의 콜히친 수용액을 40 ml씩 넣은 후, '망종화'의 절을 포함하여 약 1 cm의 길이로 잘라 각각 1 시간, 6 시간, 12 시간 침지처리 하였다. 침지처리 후, 각 절편체를 멸균수로 3~4회 씻은 다음, MS배지에 각각 5개씩 치상하였으며 각 처리는 9반복으로 하였다. 배양조건은 25±1°C, 40 μmol·m⁻²·s⁻¹의 광도로 16시간 조명하였다.

Cytometry를 이용한 DNA 함량 분석

DNA함량의 차에 따른 배수체 판정을 위하여 각 처리구의 종자에서 발아되어 생장시킨 식물체의 잎과 절편체에서 재생된 식물체의 잎을 약 0.5×0.5 cm의 크기로 자른 후, HR-A액(Patec사, Germany)을 첨가한 다음, 조직을 으깨어 DNA를 추출하였다. 이 용액에 HR-B액(Patec사, Germany)을 첨가하여 염색한 다음, Flow cytometry (Patec PA-1, Germany)를 이용하여 DNA 함량의 배가 여부를 확인하였으며, 이 결과로 배수성을 판정하였다.

공변세포 내 엽록체 수 조사

식물체의 중간부위에 채취한 잎의 이면을 분리하여 이면 표피를 오려낸 후, iodine-potassium 용액[1% iodine (w/v), 2% potassium iodide(w/v)]에 2~3시간 침지하여 염색된 이면표피를 이용하여 공변세포내의 엽록체를 검정하였다. 공변세포내의 엽록체 수는 반복당 3개체의 잎에서 30개의 세포를 조사한 후, 평균을 산출하였다.

결과 및 고찰

콜히친의 종자침지처리 농도 및 시간이 '망종화'의 발아와 배수체 유도에 미치는 영향은 Table 1과 같다. 종자의 발아율은 콜히친 농도가 높을수록 또한 침지시간이 길수록 저하되는 경향이였다. 특히, 12시간 침지처리의 경우, 0.05% 이상의 농도구에서 발아율이 0.7~5.3%의 범위로 현저히 억제되는 것으로 나타났다. 무처리구를 제외한 16개의 처리구에서 총 453개체가 발아되었으나 모두 2배체로 4배체는 유도되지 않았다. 또한 엽록체의 배가작용이 있는 것으로 알려져 있는 oryzalin 처리도 동시에 행하였으나 4배체를 얻을 수 없었다(자료 미제시). 터덕의 경우, 4배체의 획득을 위하여 콜히친 0.05% 농도의 6시간 침지처리가 적당하다(Kim, 1999; Kim *et al.*, 2003b)고 하였으나 본 실험의 결과에서는 모든 처리구에서 4배체가 유도되지 않았으며, 식물의 종에 따라 그 농도 및 침지시간의 정도에 큰 차이가 있을 것으로 생각되었다.

기내배양 중인 '망종화'의 절의 절편체를 이용한 배수체의 유도와 식물체 재생에 미치는 콜히친의 침지처리 농도 및 시간의 농도는 Table 2와 같다. 식물체 재생율은 침지시간에 따른 일정한 경향은 볼 수 없었으나, 농도가 높아짐에 따라 재생율은 낮아지는 것으로 나타났다. 모든 처리구

Table 1. Effect of seed soaking treatment in colchicine on the seed germination and chromosome doubling in *Hypericum patulum* Thunberg

Conc.(%)	Soaking time(hrs)	No. of seeds treated	No. of seeds germinated	% of germination	No. of tetraploids
Control		150	95	63.3a ^z	-
0.01		150	62	41.3b	-
0.05	1	150	53	35.3bc	-
0.1	1	150	43	28.7bcd	-
0.5	1	150	21	14.0efg	-
0.01		150	54	36.0bc	-
0.05	3	150	38	25.3cde	-
0.1	3	150	24	16.0def	-
0.5	3	150	12	8.0fg	-
0.01		150	53	35.3bc	-
0.05	6	150	17	11.3fg	-
0.1	6	150	11	7.3fg	-
0.5	6	150	11	7.3fg	-
0.01		150	38	25.3cde	-
0.05	12	150	8	5.3fg	-
0.1	12	150	7	4.7fg	-
0.5	12	150	1	0.7g	-

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test (p=0.05).

Table 2. Effect of colchicine soaking concentration and its soaking time for *Hypericum patulum* Thunberg. on chromosome doubling of *in vitro* explants and plant regeneration

Conc.(%)	Soaking time(hrs)	No. of explants treated	No. of explants regenerated	% of regeneration	No. of tetraploids
0.01		45	18	40.0b ^z	0
0.05	1	45	18	40.0b	0
0.1	1	45	15	33.3bcd	0
0.01		45	14	31.3bcd	0
0.05	6	45	16	35.6bcd	4
0.1	6	45	13	28.9cd	1
0.01		45	24	53.3a	1
0.05	12	45	17	37.8bc	8
0.1	12	45	12	26.7d	2

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test (p=0.05).

에서 총 147개체의 식물체가 재생되었으며, 0.05% 농도 이상으로 6시간 이상 침지처리 하였을 때 4배체 식물을 얻을 수 있었다. 특히, 0.05% 12시간 침지 처리한 경우, 8개체의 4배체 식물이 유도되어 식물체 재생수 대비 약 47.1%의 높은 획득율을 보였다. 그러나 콜히친의 농도에 관계없이 1시간 침지처리한 경우 4배체의 식물은 유도되지 않았다.

콜히친 처리 후 재생된 식물의 특징을 비교해 본 결과, 2배체 식물은 엽육조직이 얇고 엽모양이 긴편으로 잎이 아래로 말려 들어가는 특성을 보였으나, 4배체 식물은 2배체에 비해 짧은 엽형태를 보였고, 엽육조직도 두꺼운 것을 볼 수 있었다. 또한 엽색도 2배체에 비해 4배체의 식물에서 더욱 진한 녹색을 보였다(Fig. 1).

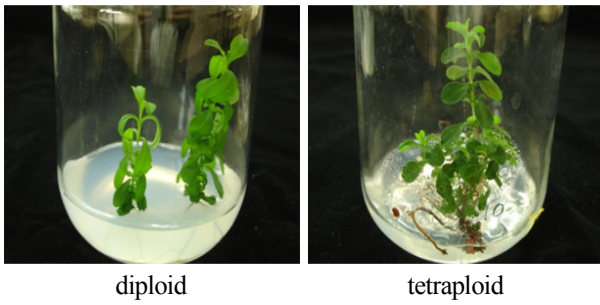


Fig. 1. Comparison of morphologic characteristics in diploid and tetraploid of *Hypericum patulum* Thunberg cultured *in vitro*.

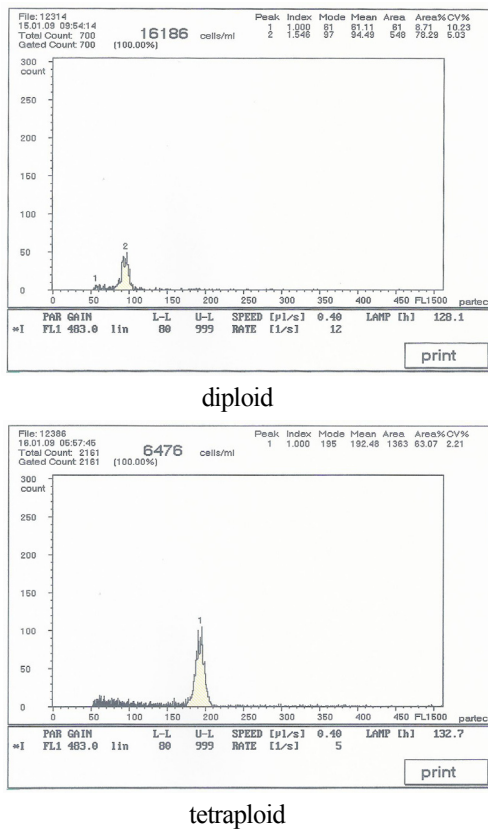


Fig. 2. Comparison of DNA contents in diploid and tetraploid of *Hypericum patulum* Thunberg Flow histograms showing DNA measurements of nuclei from leaves.

이상의 결과에서 콜히친의 종자처리의 경우 4배체 획득율은 없었던 반면, 기내배양에서 얻었던 배양체의 처리는 5.4%의 높은 획득율로 4배체를 유도할 수 있었다(Table 2). 이는 '흰꽃풀'의 4배체 유도에 있어 콜히친의 종자처리에 비해 기내배양에서 얻은 절편체의 침지처리가 약 9.6배

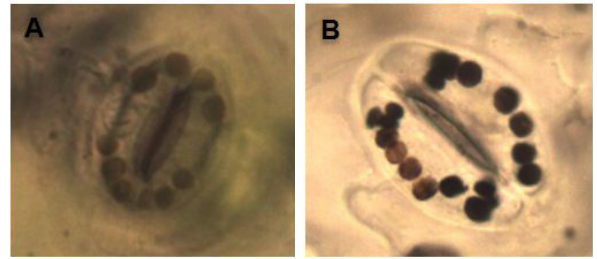


Fig. 3. Comparison between the number of chloroplasts per guard cell in diploid(A) and tetraploid(B) of *Hypericum patulum* Thunberg. ($\times 100$)

정도 높은 4배체의 획득율을 가져온다(Kwon *et al.*, 2009)는 보고와 유사한 결과였다.

배수성 판별을 위하여 flow cytometry를 이용, GAIN 값을 483으로 고정시킨 후, 잎의 DNA 함량의 배가유무를 확인한 결과, G₁ phase의 DNA 함량 peak는 2배체에서 94.5, 4배체는 192.5로, DNA 함량이 배가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 배수성에 따른 공변세포 당 엽록체의 수를 조사한 결과, 2배체가 약 10개였던 것에 비해 4배체는 17~19개로 2배체에 비해 약 1.7~1.9배 정도 많은 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 이 같은 결과는 감자의 배수성에 따른 공변세포 내의 엽록체 수에서 반수체가 12.2개, 3배체 18.4개 및 4배체 20.2개로 배수성이 증가됨에 따라 유의하게 증가하며(Cho *et al.*, 1994), 담배(Bae *et al.*, 2001) 및 흰꽃풀(Kwon *et al.*, 2012)에 있어서도 배수성이 증가함에 따라 공변세포 내의 엽록체 수도 증가한다는 결과와 매우 유사한 경향이였다.

이상의 결과로부터 콜히친을 종자에 직접 처리하는 것보다 세포분열이 왕성한 기내배양의 절편체에 처리하는 것이 더 효과적임을 알 수 있었으며, 4배체 식물체의 효율적인 획득을 위한 하나의 방법으로 이용될 수 있을 것으로 판단되었다.

적 요

'망종화'에서 콜히친 처리에 의한 효율적인 4배체 식물을 유도하고자 적정 식물체 부위, 적정농도 및 침지시간을 검토하였다. 종자의 발아율은 콜히친의 농도가 높을수록 또한 침지시간이 길수록 저하되었다. 대조구를 제외한 16개의 처리구에서 총 453개체가 발아된 반면 4배체는 유도되지 않았다. 기내 배양 중인 줄기 절편체의 식물체 재생율은 콜히친 처리농도 0.01%에서 최고를 나타내다가 0.1%

농도 이상으로 높아질수록 낮았다. 적정식물체 부위는 줄기 절편체로 나타났다. 4배체 식물체는 콜히친을 0.05% 이상으로 6시간 침지처리 하였을 때 얻을 수 있었고, 특히 0.05%, 12시간 침지처리에서 식물체의 재생수 대비 약 42%의 높은 획득율을 보였다. Flowcytometry에 의해 DNA함량의 배가여부를 확인한 결과, G₁ phase의 DNA 함량 peak가 2배체에서 94.5, 4배체는 192.5로, DNA가 배가됨을 확인할 수 있었다. 또한 공변세포 당 엽록체 수는 2배체가 약 10개인 것에 비해 4배체는 17~19개로 2배체보다 약 1.7~1.9배 정도 많았다.

인용문헌

- Bae, C.H., Y.H. Lee, D.C. Yang, K.S. Min, H.I. Kim and H.Y. Lee. 2001. Changes of chloroplast number per guard cell pairs of leaves by ploidy level in *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4. Korean J. Plant Tissue Cult. 28(4):179-184 (in Korean).
- Bamberg, J.B. and R.E. Hanneman Jr. 1991. Rapid ploidy screening of tuber bearing *Solanum* (potato) species through pollen diameter measurement. Am. Potato J. 68:279-285.
- Bingham, E.T. 1969. Haploids from cultivated alfalfa *Medicago sativa* L. Nature 221:865-866.
- Borrino, E.M. and W. Powell. 1987. Stomatal guard cell length as an indicator of ploidy in microspore derived plants of barley. Genome 30:158-160.
- Chaudhari, H.K. and J.R. Barrow. 1975. Identification of cotton haploids by stomatal chloroplast-count technique. Crop Sci. 15:760-763.
- Cho, H.M., H.Y. Kim and I.G. Mok. 1994. Stomatal cell characters as an indicator for haploid identification from progeny plants derived by 4x×2x interspecific crosses in potatoes. Korean J. Breed 26(1):66-73 (in Korean).
- Cockerham, L.E. and G.J. Galletta. 1976. A survey of pollen characteristics in certain *Vaccinium* species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 101:671-676.
- Dudley, J.W. 1968. Number of chloroplasts in guard cells of inbred lines of tetraploid and diploid sugarbeets. Agron. J. 50(3):169-170.
- Galbraith, D.W., K.R. Harkins, J.M. Maddox, N.M. Ayres, D.P. Sharma and E. Firoozabady. 1983. A rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science 220:1049-1051.
- Hadlaczy, G., G. Bistray, T. Parznovszky and D. Dudits. 1983. Mass isolation of plant chromosomes and nuclei. Planta 157:278-385.
- Hahn, S.J. 1969. Studies on the tetraploid radish (*Raphanum sativus* L.) induced by colchicine. On the resistance the virus diseases. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 5:48-56 (in Korean).
- Hermesen, J.G.TH., and J. Verdenius. 1973. Selection from *Solanum tuberosum* group 'Phureja' of genotypes combining high-frequency haploid induction with homozygosity for embryo-spot. Euphytica 22:244-259.
- Hougas, R.W. and S.J. Peloquin. 1957. A haploid plant of the potato variety 'Katahdin'. Nature 180:1209-1210.
- Kim, H.H. 1999. Studies on establishment of cultivation system and breeding of *Codonopsis lanceolata* (Sieb. et Zucc.) Trautv. PhD Diss., Kyushu Univ. (in Japanese).
- Kim, I.H., H.H. Kim, E.Y. Hong, J.S. Yun, T. Yun, J.K. Hwang and C.H. Lee. 2003a. Breeding of tetraploid in *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. by colchicine treatment. Korean J. Plant Res. 6(3):188-194.
- _____. 2003b. Breeding of tetraploid in *Codonopsis lanceolata* (Sieb. et Zucc.) Trautvetter by colchicine treatment. Korean J. Plant Res. 6(3):227-232.
- Kwon, S.J., J.H. Park, S.H. Woo and H.H. Kim. 2012. The effective approach to induce tetraploid plant of *Prunella vulgaris* for. *albiflora* by colchicine soaking treatment. Korean J. Plant Res. 43 (Abstr.).
- Kwon, S.J., U.D. Shin, I.H. Kim and H.H. Kim. 2009. Tetraploid induction in *Prunella vulgaris* for. *albiflora* by colchicine soaking treatment. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 27 (Suppl. I):151 (in Korean).
- Lapins, K.O. 1975. Polyploidy and mutations induced in apricot by colchicine treatment. Can. J. Genet. Cytol. 17:591-599.
- Miyoshi, K. and N. Asakura. 1996. Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gevera jamesonii*). Plant Cell Rep. 16:1-5.
- Park, K.J. 1994. Cold-hardiness and tetraploid induced by colchicine treatment in mulberry seedlings (*Morus alba* L. Yongchonppong/Kaeryanppong). Korean J. Seric. Sci. 36(1): 1-7 (in Korean).
- Sari, N., K. Abak and M. Pitrat. 1999. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai. Sci. Hort. 82:265-277.

(Received 2 January 2013 ; Revised 9 March 2013 ; Accepted 10 April 2013)