Korean J. Plant Res. 28(5):656-664(2015)
http://dx.doi.org/10.7732/kjpr.2015.28.5.656

Print ISSN 1226-3591
Online ISSN 2287-8203

Original Research Article

염색체 배수화제를 이용한 4배체 수박품종 개발

오상아[1], 민광현[1], 최용수[1], 박상빈[2], 김영철[3], 조송미[1]*

[1]전남과학대학교 화훼원예과, [2]㈜아시아 종묘 생명육종연구소, [3]전남대학교 친환경농업연구소

Development of Tetraploid Watermelon Using Chromosome Doubling Reagent Treatments

Sang A Oh[1], Kwang Hyun Min[1], Yong Soo Choi[1], Sang Bin Park[2], Young Cheol Kim[3] and Song Mi Cho[1]*

[1]Department of Floriculture, Chonnam Techno University, Gokseong 57500, Korea
[2]Research & Development Center, Asiaseed. Co. ctd., Icheon 17414, Korea
[3]Institute of Enviromentally-Friendly Agriculture, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

Abstract - To produce high quality watermelon, three tetraploid watermelon breeding lines (‘SA03-1’, ‘SA06-1’ and ‘SB01-1’) were developed by treatment with different chromosome doubling reagents. To identify the optimal tetraploid inductive conditions, the three watermelon breeding lines were selected by counting the number of doubled chloroplasts in guard cells. Tetraploid induction rates differed depending on the genotypes and treatment with doubling reagents. However, the highest induction rate occurred with 1.0% colchicine (82.2%). These putative tetraploid lines were re-confirmed for ploidy using flow cytometric analysis and chromosome counting. The internode length of the tetraploid breeding lines was different when the leaf size was larger in all three tetraploid lines compared to their diploids. The fruit weight of the tetraploid fruits for ‘SA03-1’ and ‘SB01-1’ was lower than for their diploid, and the rind thickness and total sugar content (°Brix) of tetraploid SB01-1 were significantly different from those of its diploid. Tetraploid lines were sterile, yielded a lower number of seeds per fruit for ‘SA03-1’ (21), ‘SA06-1’ (62), and ‘SB01-1’ (34.7), and the seeds were larger and thicker than those of their diploids. These tetraploid breeding results will be useful for breeding new seedless watermelon cultivars.

Key words - *Citrullus lanatus*, Colchicine, 2,6-dinitroaniline, Polyploidy, Seedless

서 언

수박(*Citrullus lanatus* Thunb.)은 박과채소 중 하나로 전세계 채소 재배면적 17,534,940 ha중 3,810,535 ha로 21.7% 차지하며 토마토 다음으로 중요한 작물로 알려져 있다(Anonymous, 2012). 중국은 세계에서 수박 생산국 1위로 연간 700만톤의 수박을 생산하고 있으며 우리나라의 경우 세계에서 12위 생산국으로 연간 약 60만톤을 생산하고 있다(Anonymous, 2012). 국내 수박의 국제 경쟁력을 높이기 위해서는 수박의 품질개선, 비용절감 및 소비자의 기호도를 높여 생산성 증대 및 부가가치를 높여야 한다. 국제 경쟁력 제고를 위해 수박 품종 육성의 목표 중 하나로 씨없는 수박은 소비자들에게 씨가 있는 2배체 수박보다 당도가 높고 씨가 없어 선호되었고(Marr and Gast, 1991), 품질이 우수하고 수확량도 증대된다고 하였다(Henderson, 1977; Wall, 1960). 이러한 씨없는 수박 품종을 육성하는 방법으로 다양한 기술들이 알려져 있다. 그 중 풀멧 처리방식은 착과율은 좋으나 종피가 두껍고 기형과 발생율이 높은 단점이 있으며(Hayata *et al.*, 1995), 연질 X선 처리방식은 무처리구와 비교하여 열매의 형태적인 변화없이 당도가 다소 증가되는 경향이 있으나 흡수된 방사선에너지 양에 따라 씨앗 발생율이 높고(Sugiyama and Morishita, 2000) 고가의 장비가 소요되는 문제점을 가지고 있다.

또한 3배체 수박의 재배 시 기존 관행 수박재배기술에 비교하여 발아율이 낮아 종자생산성이 떨어지고 재배기술의 어려움이

*교신저자 : csmempal1@empas.com
Tel. +82-61-360-5261

ⓒ 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회지에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

내재되어 있어 지속적인 3배체 수박의 신품종 육성과 재배기술을 개발하는 연구가 필요하다(Kirhara, 1951; NeSmith and Duval, 2001). Colchicine과 같은 염색체 배가 화합물을 처리하여 4배체를 유기시키고 이를 2배체와 교배를 통해 3배체인 씨없는 수박을 육성하는 기술이 널리 알려져 있으나 4배체 유기효율과 임성율이 낮고 종자수가 적은 단점이 있다(Jaskani *et al.*, 2004; Suying *et al.*, 1995). 특히 colchicine 수용액 처리에 의한 4배체화 유도과정에서 다양한 체세포변이가 유발되고 2배체, 4배체 그리고 6배체까지 혼합된 배수체들이 동시에 발생하는 경우가 많아 선발기간 및 비용 측면에서 효율성이 낮다(Compton and Gray, 1994; Jaskani *et al.*, 2004). 또한, 기내 배양에 의한 4배체를 유기시키는 방법에 대한 연구보고가 알려져 있다(Compton *et al.*, 1996; Jaskani *et al.*, 1996; Veilleux and Johnson, 1998). 이러한 기내배양법은 기존 colchicine과 같은 화합물 처리 보다 체세포변이와 같은 비정상적인 식물체가 적게 형성되고, 종자생산량이 증대되기 때문에 효율적으로 우수한 4배체를 확보할 수 있다고 보고되어 있다(Compton *et al.*, 1996; Compton *et al.*, 2004). 그러나 수박 기내배양에 의해 4배체를 확보하기 위해서는 기본적으로 재분화가 이뤄져야 하는데 이는 계통이나 생장조절물질의 종류에 따라 달라지기 때문에 4배체 유기를 위한 재분화 조건이 확립되어야 가능하다(Cho *et al.*, 2014). 또한 기존의 기내배양에 의해 확보된 4배체들도 수정능력이 감소되는 부분은 여전히 해결되지 않았으며 다양한 품종으로 실용화 된 사례가 적고 또한 국내에서도 이러한 4배체 유기기술이 확립된 바가 없다. 이와 같이 기존의 보고된 방법으로 확보된 4배체들의 공통적인 문제점은 2배체에 비하여 특히 자가수분을 통하여 세대진전하는 과정에서 낮은 수정능력과 적은 종자량의 형성이다. 그리고 계통마다 colchicine 농도나 기내배양 조건들이 달라진다는 것이다. 따라서 다양한 육종계통에 대하여 4배체 유기조건을 구명하여 우수한 4배체를 육성시키는 것이 필요하다.

계통에 따라 염색체 배화제나 기내배양 등을 통해 4배체 유기시키는 방법과 함께 중요한 것은 효과적으로 4배체를 판별하는 방법이다. 이러한 4배체의 배수성을 확인하는 다양한 판별법으로 현재 잎, 열매, 수꽃의 표현형을 확인하는 방법과 2배체 식물체와 비교하여 엽록체와 염색체수의 배수화 여부를 확인하는 방법 그리고 flow cytometry 분석법들이 알려져 있다(Compton *et al.*, 1996; Jaskani *et al.*, 2005).

본 연구에서는 국내·외 수박시장의 부가가치를 높이는 방안으로 칼라수박 계통의 씨없는 수박 품종을 육성하기 위한 4배체 유기 효율을 증대시키는 방법을 규명하고자 국내 시중에 아직 상업화 되지 않고 국외에 그 시장성이 증대되고 있는 과피가 황색이고 과육색이 황색이나 적색계통을 사용하였다. 특히 4배체 유기방법 중 colchicine과 2,6-dinitroaniline을 다양한 농도로 처리하여 효율적인 4배체 유기조건 및 종자생산성이 높은 4배체 품종을 육성하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

이배체 수박 육종라인 'A03', 'A06' 그리고 'B01'을 ㈜아시아종묘에서 분양받아 4배체 유기 실험을 수행하였다. 'A03' 계통의 경우 열매의 특성이 Stripe 타입에 원형이면서 녹색과피와 적색 과육을 지닌 평균 5 ㎏이며, 'A06' 계통의 경우 열매의 특성이 Stripe 타입에 타원형이면서 황색과피와 황색 과육을 지닌 평균 5 ㎏이고, 마지막으로 'B01' 계통의 경우 열매의 특성이 Jubilee 타입에 타원형이면서 황색과피와 오렌지색 과육을 지닌 평균 5 ㎏인 중과종이다(Table 1).

염색체배수화 처리

이배체 수박 육종라인 'A03', 'A06' 그리고 'B01'의 종자를 각각 200립씩 6~8시간 25℃ 온수에 침지시킨 후 증류수로 2~3회 세척 후 48시간 30℃ 배양기(VS-1203PF-LN, Visoin Scientific CO., LTD, Korea)에서 발아시킨 후 9 ㎝ 직경의 상업용 플라스틱 포트(갈색 8호, 영농사, Korea)에 심고 생장실로 옮겨 2주간 생장하였다. 각 라인들의 유묘 생장점 부위에 colchicine (Sigma-

Table 1. Morphological traits of three different color-type watermelon (*Citrullus lanatus*) breeding lines

Traits	Breeding lines		
	A03	A06	B01
Fruit shape	Circle	Oval	Oval
Color of pericarp	Green & stripe	Yellow & stripe	Green & jubilee
Color of flash	Red	Red	Yellow

Aldrich, MO, USA)은 0.5, 1.0, 1.5 그리고 2.0% 농도로 2, 6-dinitroaniline (Sigma-Aldrich, USA)은 10, 15, 30, 60 ㎎/L의 농도로 각각 lanolin (Sigma-Aldrich, USA)에 녹인 수용액을 멸균된 면봉으로 묻혀 처리하였다. 각 처리구별 개체수와 대조구로 lanolin을 사용하였고 종자는 각각 10개씩 사용하였다. Doubling reagent를 처리 후 차광막이 설치된 28 ± 2℃ 온실에서 2주간 생육시켰다.

공변세포 엽록체 수 조사

염색체 배수화제인 colchicine과 2,6-dinitroaniline이 처리된 유묘의 배수성 검정은 각 라인의 3~4번째 본엽이 형성되는 시기에 잎을 채취하여 forcep으로 잎 뒷면의 표피를 분리하였다. 분리된 표피는 0.5 ㎠ 크기로 잘라 slide glass 위에 놓고 증류수를 한방울 떨어뜨려 cover glass를 덮어 프레파라트를 제작하였다. 제작된 시료는 CCD digial camera (Fi1-U2, Nicon, Japan)이 장착된 10 × 40 배율의 광학현미경(Olympus, Germany) 하에서 관찰하였다. 각 잎 당 10개의 공변세포의 엽록체 수를 관찰하였으며 이를 통해 선발된 잠재적인 4배체 식물들은 ㈜아시아종묘의 비닐하우스에 이식하여 생장시켰다.

Flow cytometry 분석

엽록체 수 조사를 토대로 선발된 가능성 있는 4배체 식물의 배수성을 재확인하기 위하여 flow cytometer인 PA-1 (Partec, Germany) 장비와 FlowMAx® software (Partec®)를 이용하여 핵 DNA 함량 분석을 수행하였다. 선발된 3개 라인의 4배체 식물체의 5 개체의 잎 조직을 petri-dish 위에 놓고 2 ㎠로 절취한 후 Cystain UV precise P (Partec, Germany) kit 내 DAPI (excitation/emission wavelength:320-385/415-520)가 함유되어 있는 nucleous isolation buffer를 0.5 ㎖씩 떨어뜨려 칼로 여러 번 잘랐다(Galbraith *et al.*, 1983). 잘린 시료를 30 ㎛ nylon mesh (CellTrics®PARTEC, Germany)에 필터링한 후 동일한 kit 내에 들어있는 DNA staining 용액을 1 ㎖씩 첨가하여 핵 DNA 함량을 측정하였다. 2배체의 기준되는 peak를 비교하기 위하여 같은 계통의 대조구 식물을 각각 5 개체씩 조사하였다. 또한 표준이 되는 peak는 fluorescent intensity가 50 channel이 되도록 설정하였다.

Chromosome counting 분석

선발된 4배체 식물의 염색체 수를 조사하기 위해 각 라인들의 종자를 5립씩 상기 방법과 동일하게 온탕 침지 후 25℃ 배양기 내에서 발아를 유도하였다. 염색체 관찰방법은 Haskell and Paterson (1962)를 약간 변형하여 이용하였다. 발아 유도 1~2일 후 유근이 0.5~1 ㎝ 길이로 자라났을 때 오전 8~9시경에 근단을 채취하여 3차 멸균수에 담가 4℃에 24시간 동안 저온처리하였다. 이후 glacial acetic aicd (Merch, Germany)과 ethanol (Merch, Germany)이 1 : 3 (v/v)로 혼합된 고정액에 넣어 고정시킨 다음 멸균수로 근단을 세척하였다. 세척된 근단을 60℃로 가열된 1N HCl 용액을 1 ㎖씩 넣어 약 3~5분간 반응시킨 뒤 멸균수로 다시 세척하였다. 이후 근단은 90 ㎜ petridish (SPL, Korea)에 옮겨 Feulgen (Japan) 염색 시약을 1~2방울 떨어뜨려 뿌리끝을 염색하였다. 두 시간 이후 염색이 잘된 뿌리 끝부분을 해부침을 이용해 절단한 뒤 1% aceto-carmine (DAEJUNG, Korea) 용액을 한방울 떨어뜨려 압착법을 이용하여 프레파라트를 제작하였다.

형태적 특징 조사

2배체와 4배체 식물의 절간은 각 라인당 10 개체씩 15~17 마디를 digital caliper (PDIC-301, China)를 이용하여 측정하였으며, 잎의 길이와 너비는 수정 후 착과된 부위를 기준으로 3~5번째 잎을 이용하여 조사하였다. 4배체 열매의 특징은 각 라인에서 5 개체씩 과중, 과피두께, 당도를 2배체와 비교하여 측정하였다. 또한 2배체와 4배체 종자의 형태적인 차이는 종자 크기, 두께, 그리고 열매당 종자량을 조사하였다. 과피두께와 종자의 크기 및 두께 조사는 상기 digital caliper를 이용하였으며 당도는 당도계(Master-M, ATAGO, Japan)를 이용하여 측정하였다.

통계분석

본 연구의 각 시험에 완전임의배치 3반복으로 수행하였으며, 통계분석은 SPSS (SPSS Inc. version 12.0, USA)을 이용하였고, 배수성 검정은 던컨의 다중범위검정(Duncan's multiple range test)을 실시하였고, 엽록체수와 표현형 조사는 t-검정법(Student's t-test)을 실시하여 95%, 99% 수준에 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

배수화제 처리에 의한 수박 4배체 유기

4배체를 유도하는 화합물들이 다양하게 알려져 있으며 이는 식물에 따라 그 종류와 농도 및 처리방법이 달라지기 때문에

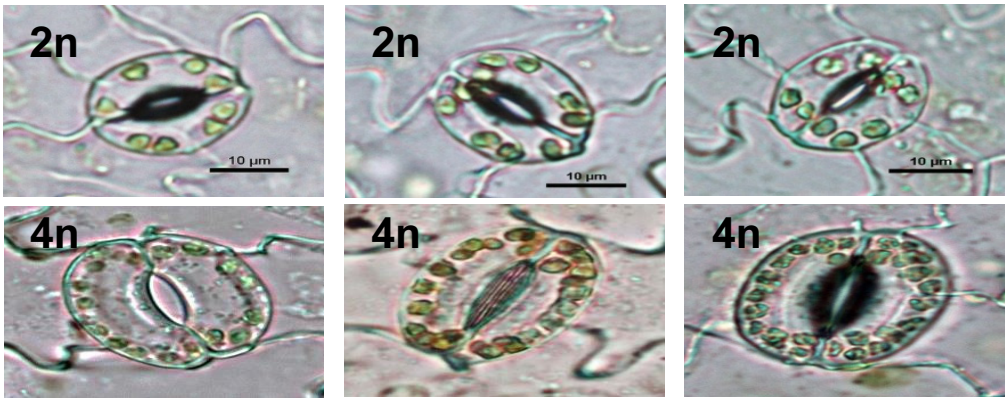

Fig. 1. Number of chloroplast in stomata guard cell from three diploid (2n=2X) and tetraploid (4n=4X) breeding linses leaf peels of wateremelon' SA03-1'(A), 'SA06-1'(B) and 'SB01-1'(C). These tetraploid plants derived from colchicine or 2,6-dinitroaniline treated leaf segment and diploid plants derived from the control treatment without these chemicals.Number of chloroplasts per guard cell pairs examined (30 pairs per each breeding lines). Size bar = 10 ㎛.

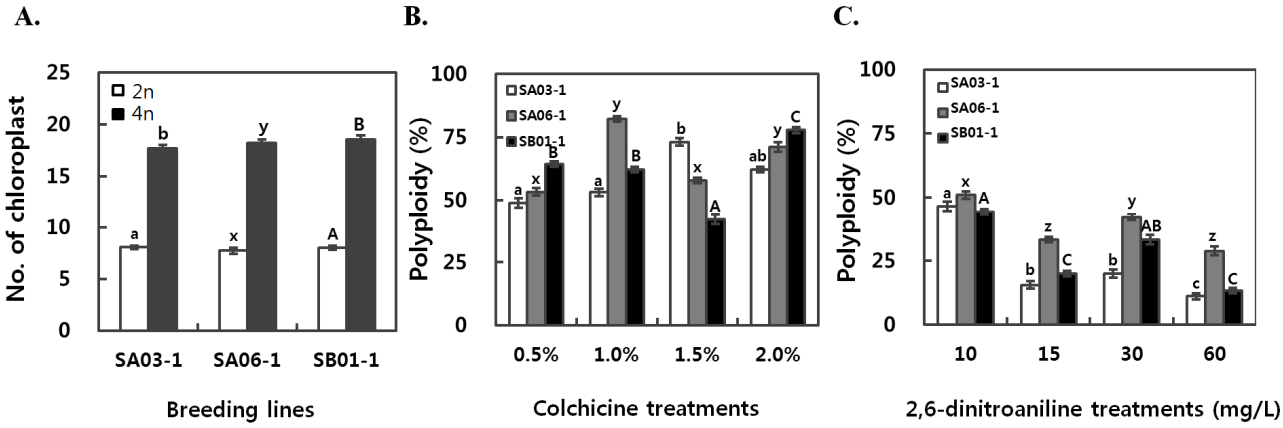

Fig. 2. Number of chloroplast diploid (2n=2X) and their putative tetraploid (4n=4X), (A) and percent polyploids induced by treatments of colchicine (B) and 2,6-dinitroaniline (2,6-D) (C) solution into growing apex of three watermelon breeding lines SA03-1, SA06-1 and SB01-1. Data are from three independent experiments and are represented as means and standard errors. Different letters for each breeding line have significantly different ($P < 0.05$) levels of chloroplast based on Duncan's multiple range test.

(Hansen and Andersen, 1996) 품종에 따라 그 조건을 확립할 필요가 있다. 또한 기존에 다양한 식물종에서 공변세포의 엽록체 수를 조사하는 것은 배수성을 확인하는 데 유용한 방법으로 알려져있다(Compton *et al.*, 1996; Jaskani *et al.*, 2004; Koh, 2002). 본 연구에서는 3가지 전혀 다른 수박육종라인('A03', 'A06' 그리고 'B01')에 대하여 염색체 배화제인 colchicine과 2,6-dinitroaniline (2,6-D)을 농도별로 처리하여 라인별 최적의 4배체가 유기되는 조건을 확립하고자 1차적으로 엽록체가 배수화 되어있는 잠재적인 4배체 육종라인('SA03-1', 'SA06-1' 그리고 'SB01-1')들을 확보하였다(Fig. 1 and 2). Colchicine 처리의 경우 모든 라인의 1개 공변세포 내 엽록체수는 2배체 7.6~8.1개인 반면, 4배체 17.7~18.8개로 확인되었고, 2,6-D 처리의 경우 2배체 7.8~8.3개이고, 4배체는 18.6~19.3개로 확인되었다(Fig. 1 and 2A). 엽록체 배수화율은 colchicine과 2,6-D의 농도별, 라인별, 그리고 배수화제 종류별로 다른 비율로 나타났다(Fig. 2B and 2C).

배수화율이 가장 낮은 colchicine 농도는 'SA03-1' 라인의 경우 0.5%에서 48.9%로 나타났으며, 'SA06-1'과 'SB01-1' 라인의 경우 1.5%에서 53.2%와 53.2%로 나타났고, 반대로 가장 높은 배수화율은 'SA03-1'과 'SB01-1' 라인의 경우 colchicine 2.0%에서 62.2%와 77.8%로, 'SA06-1' 라인의 경우 1.0%에서 82.2%로 가장 높게 나타났다(Fig. 2B). 2,6-D의 경우 colchicine

처리보다 배수화율이 상대적으로 낮게 나타났는데, SA03-1과 SB01-1 라인의 경우 10 ㎎/L에서 46.6%와 43.0%로 각각 가장 높게 나타났고, SA06-1 라인의 경우 10, 30 ㎎/L에서 동일하게 48.8%에서 가장 높게 확인되었다(Fig. 2C). 특히 colchicine의 경우 수박 염색체 배수화제로 처리할 경우 처리부위 주변이 경화되어 신초발육이 지연되기도 하며(Jaskani *et al.*, 1996; Suying *et al.*, 1995) 품종에 따라 내성을 나타낸다는 연구도 알려져 있다(Jaskani *et al.*, 2004). 본 연구의 3가지 라인들에 대한 colchicine의 반응은 무처리구에 비해 2 ~ 3주간 지연되는 현상이 관찰되었고 이후 회복되어 정상 생육상태를 보이지만 열매 수확기 까지는 평균 1개월 정도 지연됨을 알 수 있었다(결과 미제시). 2,6-D는 제초제의 일종으로 다양한 식물 종에서 배수화제로 이용되고 있으나(Hansen and Andersen, 1996), colchicine과 같은 약해는 나타나지 않았다. 그리고 배수화제 처리 방식을 상기와 같이 실시하면 기존에 알려진 방법, 즉 colchicine 수용액을 생장점부위에 여러 번 떨어뜨리는 방법으로 처리할 경우 콜히친 저농도(0.2%)에서 엽록체 배수화율은 83.1%까지 나타나지만 0.6%로 농도가 증가될수록 65% 이하로 배수화율이 낮아지는 결과(Jaskani *et al.*, 2005)의 방법보다 더 효과적인 결과가 나타남을 확인하였다.

이와 같이 식물c의 배수성을 확인하는 방법으로 엽록체 수를 조사하는 것은 식물에 따라 또는 계통에 따라 달라질 수 있으며 수박의 경우 2배체 9.7개, 4배체 17.8개로 보고되어 있고(Compton *et al.*, 1999), 국내 무등산 수박 품종에 대해서는 2배체 12개, 4배체 22.8개로 알려져 있다(Koh, 2002). 그러나 이와 같이 염색체 배화제 처리 후 공변세포의 엽록체수를 보면 그 수가 8개에서 15개까지 다양하게 확인되어 판별에 혼란을 준다는 보고가 있는데(Koh, 2002), 이는 잎 조직내에서는 mixoploid 발생이 잘되기 때문이라고 하였다. 본 연구에서 mixploid로 의심되는 개체를 강선발을 거쳐 제외시키는 방법을 적용하였으나 여전히 chimeric 식물체 존재 가능성이 높아 flow cytometer 분석기법과 같은 좀 더 정확한 재선발이 필요할 것으로 사료된다.

Flow cytometry 분석

각 육종라인별로 2배체 식물(2X)로부터 추출된 nuceli는 G1/G2 phase에 channel 100으로 확인되었고, 4배체 식물(4X)의 경우 G1 peak가 200인 값을 보여주었다(Fig. 3). Flow cytometry 분석에 따른 channel 기준 값은 시험자에 따라 달리 정할 수 있는데 2배체를 channel 50인 값으로 지정하면 4배체의 경우 100으로 제시하기도 한다(Jaskani *et al.*, 2005). 만약에 mixoploid라면 peak 값이 channel 50과 100값 (2X + 4X)으로 보이거나 channel 50, 100, 150 (2X + 4X > 6X)으로 나타나는 경우도 있다고 하였다. 이러한 flow cytometer 분석 시 mixoploid의 발생율은 수박의 경우 colchicine에 노출정도가 길어질수록 많이 발생된다고 하였으며 이에 따라 정확한 4배체 확보율이 낮아질 수 있다고 하였다. 따라서 flow cytometer 분석에 따른 4배체 선발 효율은 앞서 엽록체 수 판별효율과 일치하지 않으며 진정한 4배체는 4~6%로 확인된다고 하였다(Jaskani *et al.*, 2004; Jaskani *et al.*, 2005). 그러나 잎의 모양과 꽃의 형태적인 차이로 선발 후 이 분석법을 적용하면 4배체를 확보율을 50%까지 높일 수 있다고 하였다(van Duren *et al.*, 1996). 또한 엽록체 수와 flow cytometer 분석을 통한 DNA 함량은 서로 상관관계가 있고

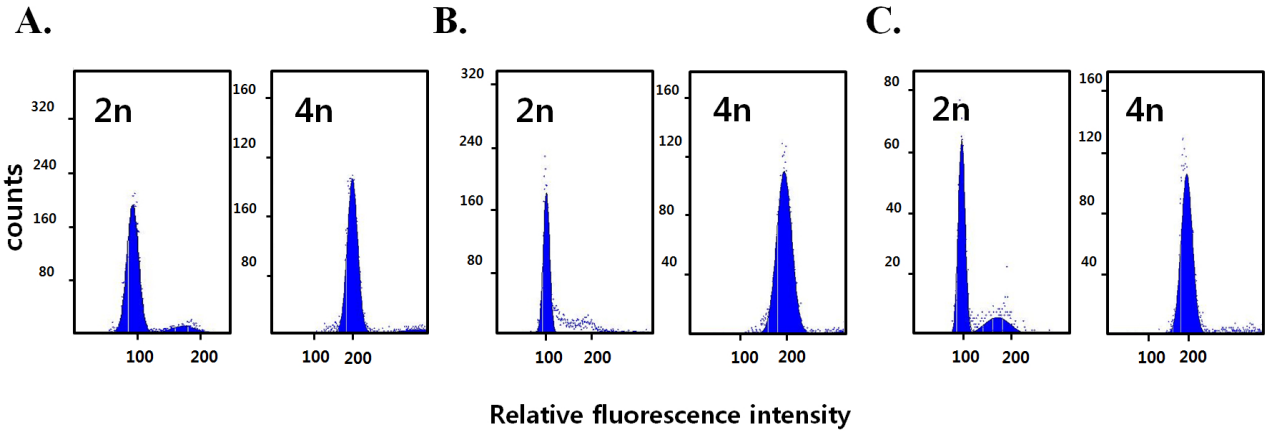

Fig. 3. Flow cytometric analyses of a diploid (2n=2X) and their tetraploid (4n=4X) in three watermelon breeding lines 'SA03-1' (A), 'SA06-1' (B), and 'SB01-1' (C), respectively. These tetraploid plants derived from colchicine or 2,6-dinitroaniline treated leaf segment and diploid plants derived from the control treatment without these chemicals.

(Jaskani *et al.*, 2005), 특히 수박의 경우 DNA 함량분석이 타 식물에 비해 배수성 확인방법이 정확성이 높은 것으로 알려져 있다. 이는 염색체 배수화제 처리 직후 엽록체 수 조사는 분열단계에 있는 세포의 분포가 많기 때문에 chimera로 될 가능성이 높고 엽록체 수 조사와 표현형적인 선발과정을 거쳐 세대진전으로 고정시킨 후 DNA 함량분석을 통해 진정한 4배체를 확보하는 게 중요할 것으로 판단된다.

Chromosome counting 분석

Flow cytometer 분석을 통해 확보된 각 육종라인 4배체('SA03-1', 'SA06-1' 그리고 'SB01-1) 식물로부터 근단세포의 염색체수를 조사하여 이들의 배수성 여부를 확인하였다(Fig. 4). 이들 육종라인들의 2배체 식물은 2n=2X=22개의 염색체 수를 나타내었고, 이에 대응하는 4배체 식물은 2n=4X=44개로 확인됨을 알 수 있었다. 이들 근단세포를 이용한 염색체의 관찰은 식물의 유사분열 단계를 조사하는 유용한 방법으로써 염색체 수를 조사하는 기술은 작물에 따라 관찰이 용이한 것도 있고 정교한 장비나 기술력이 갖추어져야 하는 문제점이 있지만 수박 작물의 경우 엽록체 수와 flow cytometer 분석과 함께 배수성을 진단하는 중요한 도구로 알려져 있다(Sari *et al.*, 1999). 그러나 수박 염색체가 작아 근단세포에서의 관찰이 쉽지 않고 특히 잎과 같이 분화된 조직처럼 분열이 끝난 세포는 배수성를 측정하기 어려운 점이 있기 때문에 기공의 크기나 밀도 그리고 화분의 크기를 조사하거나 flow cytometer 분석기술 등이 이용되고 있다(Jaskani *et al.*, 2005).

형태적 특징 조사

배수화된 식물의 형태적인 특징은 앞서 확보된 3가지 육종라인 4배체('SA03-1', 'SA06-1' 그리고 'SB01-1')들의 영양기관으로서 절간, 잎의 길이 및 두께 (Table 2)와 생식기관으로 열매와 종자의 특성(Table 3, Fig. 5 and Table 4)을 이들의 2배체와 비교하여 조사하였다. 첫번째 절간의 길이는 육종라인에 따라 다른 양상을 보였는데 2배체와 4배체 절간의 길이는 'SA03-1' 라인의 경우 각각 62.7 ± 1.27 ㎜이고, 60.8 ± 1.25 ㎜로 차이가 없었고, 다른 2개 라인의 경우 각각 'SA06-1'은 61.0 ± 0.95 ㎜이고, 68.0 ± 1.01 ㎜이며 'SB01-1'은 74.3 ± 0.79 ㎜와 63.4 ± 0.77 ㎜로 유의성 있는 차이를 보여주었다.

잎의 길이와 두께는 3가지 육종라인 모두에서 2배체 비교하

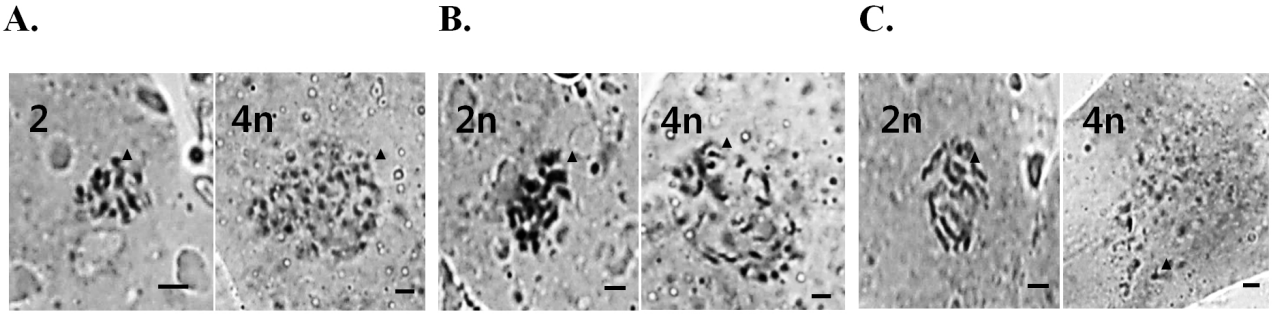

Fig. 4. Chromosome counts analyses of a diploid (2n=2X=22) and their tetraploid (2n=4X=44) in three watermelon breeding lines 'SA03-1' (A), 'SA06-1' (B), and 'SB01-1' (C), respectively. These tetraploid plants derived from colchicine or 2,6-dinitroaniline treated root tip cell and diploid plants derived from the control treatment without these chemicals. Arrow indicates stained chromosome of the root tip cells. Size bar = 2 ㎛.

Table 2. Comparison of vegetative traits in three diploid and tetraploid watermelon breeding lines[x,y]

Lines	Internode length (㎜)		Leaf length (㎝)		Leaf width (㎝)	
	2n	4n	2n	4n	2n	4n
SA03-1	62.7 ± 1.27*	60.8 ± 1.25	17.0 ± 0.27**	19.6 ± 027	20.4 ± 0.31	26.6 ± 0.35**
SA06-1	61.0 ± 0.95	68.0 ± 1.01**	15.7 ± 0.37	17.8 ± 0.38**	16.2 ± 0.41	22.7 ± 0.47**
SB01-1	74.3 ± 0.79**	63.4 ± 0.77	16.8 ± 0.70	19.1 ± 0.31*	17.2 ± 0.84	23.4 ± 0.41**

[y]Data are from three independent experiments and are represented as means and standard errors.
[x]The symbols indicate significance of the difference between two mean values at the $p < 0.05$ level(*), and $p < 0.01$ level (**) at tested by two-sample *t*-test.

Table 3. Comparison of fruit traits in three diploid and tetraploid watermelon breeding lines[x·y]

Lines	Weight (㎏)		Rind thickness (㎜)		°Brix	
	2n	4n	2n	4n	2n	4n
SA03-1	8.0 ± 0.23**	5.4 ± 0.42	7.9 ± 0.23	12.3 ± 0.71**	11.1 ± 0.87	12.0 ± 0.32
SA06-1	3.4 ± 0.68	2.6 ± 0.36	9.0 ± 0.90	9.9 ± 0.90	8.70 ± 0.33	10.7 ± 0.42**
SB01-1	5.1 ± 0.32	3.7 ± 0.22**	8.3 ± 0.29	12.6 ± 0.42**	11.9 ± 0.20	11.8 ± 0.29

[y]Data are from three independent experiments and are represented as means and standard errors.
[x]The symbols indicate significance of the difference between two mean values at the $p < 0.05$ level(*), and $p < 0.01$ level (**) at tested by two-sample *t*-test.

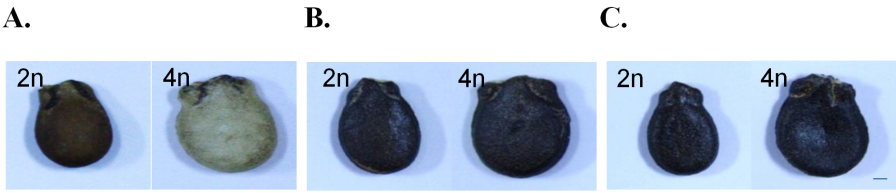

Fig. 5. Comparison of diploid (2n=2X) and tetraploid (4n=4X) seed trait in three watermelon breeding lines 'SA03-1' (A), SA06-1' (B), and 'SB01-1' (C). These tetraploid plants derived from colchicine or 2,6-dinitroaniline treated and diploid plants derived from the control treatment without these chemicals. Size bar = 2 ㎜.

Table 4. Comparison of seed traits in three diploid and tetraploid watermelon breeding lines[x·y]

Lines	No. of seeds		Length (㎜)		Width (㎜)		Thickness (㎜)	
	2n	4n	2n	4n	2n	4n	2n	4n
SA03-1	250 ± 1.92**	21 ± 0.87	7.3 ± 0.18	7.8 ± 0.12**	4.2 ± 0.16	5.5 ± 0.10**	1.6 ± 0.14	2.4 ± 0.08**
SA06-1	155 ± 1.30**	62 ± 2.46	7.3 ± 0.14	8.6 ± 0.28**	5.0 ± 0.19	5.9 ± 0.24**	1.9 ± 0.12	2.3 ± 0.18**
SB01-1	300 ± 2.24**	34 ± 0.39	8.2 ± 0.04	8.7 ± 0.19**	4.9 ± 0.23	6.4 ± 0.40**	2.0 ± 0.11	2.4 ± 0.08**
Mean	235 ± 2.68	39 ± 1.56	7.6 ± 0.22	8.4 ± 0.13	4.6 ± 0.20	5.6 ± 0.19	1.8 ± 0.08	2.3 ± 0.06

[y]Data are from three independent experiments and are represented as means and standard errors.
[x]** indicate significance of the difference between two mean values at the $p = 0.01$ level, at tested by two-sample *t*-test.

여 4배체에서 더 증가하였다. 잎의 길이의 경우 2배체와 4배체 각각에서 'SA06-'1의 경우 17.0 ± 0.27 ㎜와 19.6 ± 0.27 ㎜이며, 'SA06-1'의 경우 15.7 ± 0.37 ㎜와 17.8 ± 0.38 ㎜이고, 'SB01-1'의 경우 16.8 ± 0.70 ㎜와 19.1 ± 0.31 ㎜로 나타나 모두 유의성 있는 차이를 보여주었다. 잎의 너비 또한 2배체와 4배체에서 각각 'SA03-1'의 경우 20.4 ± 0.31 ㎜와 26.6 ± 0.35 ㎜이고, 'SA06-1'의 경우 16.2 ± 0.41 ㎜와 22.7 ± 0.47 ㎜이며, 'SB01-1'의 경우 17.2 ± 0.84 ㎜와 23.4 ± 0.41 ㎜로 모두 유의성 있는 차이를 보여주었다. 이와 같은 결과는 4배체 식물에서 이들의 2배체보다 잎의 길이가 증가되는 결과(Berdahl & Ries, 1997)와 일치하였다. Colchicine과 같은 염색체 배수화제를 처리하면 2배체 식물과 비교하여 식물체 생육이 느려지거나 엽색이 짙어지고, 절간과 잎의 크기가 커지거나 두터워지는 등 영양기관의 형태적인 변화가 나타난다는 결과와 일치됨을 알수 있었다(Berdahl and Ries, 1997; Jaskani *et al*, 2005; Ye *et al.*, 2010).

육종라인의 4배체의 열매의 특성을 조사한 결과 모두 2배체보다 과중은 감소하였고 과피와 당도는 라인에 따라 차이를 보였다(Table 3). 과피 두께는 'SA03-1' 라인의 경우 2배체와 4배체에서 각각 8.0 ± 0.23 ㎏과 5.40 ± 0.42 ㎏으로 유의성 있는 차이를 나타낸 반면,' SA06-1'과 'SB01-1' 라인의 경우는 차이가 없었다. 당도의 경우는 'SA06-1' 라인을 제외하고 나머지 2개 라인에서는 2배체와 크게 차이가 없었다. 이와 같은 4배체의 과중의 감소는 2배체보다 4배체에서 더 작은 열매가 생산되는 경향이 있다는 연구보고(Henderson, 1977)와 일치하였다.

각 라인들의 4배체 종자 생산량을 조사해보면 'SA03-1',

'SA06-1' 그리고 'SB01-1' 육종라인들 각각 21 ± 0.87개, 62 ± 2.46개 그리고 34.7 ± 0.39개로 확보되었다(Table 4). 이는 기존의 개발된 4배체 품종들이 대부분 수정능력이 감소되는 경향이 있고(Lower and Johnson, 1969) 열매당 10개 이하 종자가 만들어진다는 보고(Compton *et al.*, 2004)에 비하면 종자생산성이 2배에서 최대 6배까지 향상된 것을 알 수 있었다. 종자의 크기는 'SA06-1' 라인의 종자 너비를 제외하고 종자의 길이나 너비 그리고 두께 모두 2배체에 비하여 4배체에서 유의하게 증가되었다. 이와 같은 결과는 4배체 종자가 2배체에 비하여 크기가 키지고 두터워진다는 연구 보고(Kihara, 1951)와 일치됨을 알 수 있었다.

본 연구에서 3가지 다른 수박 육종라인을 이용하여 염색체 배수화제로서 colchicine과 2,6-dinitroaniline를 처리하여 최적 4배체를 유기조건을 검토하였을 때 배수화제 종류별, 농도별, 육종라인에 따라 차이가 있음을 밝혔다. 이는 육종라인별 유전적인 특성이 4배체 유기조건에 영향을 미치는 것으로 추정된다. 또한 4배체 선별방법으로 공변세포의 엽록체 수를 조사하는 것은 방법상 용이하지만 잎 표피세포에 국한되어 관찰되는 것이고 세대 진전과정에서 배수성의 성질이 상실되는 경우가 많기 때문에 1차적인 선별방법으로만 적합하고 flow cytometer 분석과 염색체 수를 조사를 통해 4배체를 재확인하는 과정을 반드시 거쳐야 됨을 확인하였다. 확보된 4배체 식물의 영양번식기관의 다양한 형태적 변화도 2배체와 4배체를 구별하는 중요한 판별기준이 될 수 있으나 육종가의 다년간의 노하우가 필요할 것으로 사료된다. 또한 본 연구를 통해 확보된 4배체 종자는 평균 39개로 기존의 colchicine 처리에 의해 확보된 4배체 종자들 중 열매당 종자수가 10개 이하인 경우(Compton *et al.*, 2004)보다는 약 2배에서 6배정도 증가되었고, 유전자형과 처리방법에 차이가 있지만 평균 37.9개 확보된 경우(Jaskani *et al.*, 2005)와 유사하다. 그러나 후자의 경우 열매당 2배체 종자수확량 기준(2배체 평균 종자수 323.5개 대비 4배체 종자확보율 37.9개)에 따르면 4배체 종자확보량이 11.7%인 반면 본 연구의 경우 2배체 종자수확량 기준(2배체 평균 종자수 235개 대비 4배체 종자확보율 39개) 대비 4배체 종자확보량이 16.6%로 다소 향상되는 결과가 제시되었음을 알 수 있다(Table 4). 따라서 이와 같이 개발된 4배체 종자와 그 개발 과정들은 향후 국내 종자회사들의 씨없는 수박 품종 육성의 유용한 자원과 도구로서 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 앞으로 이들 4배체들의 종자의 형태적인 변형과 관련하여 낮은 발아율을 향상시키는 기술적인 방법과 종자 수확량을 더 증대시키기 위한 꽃가루의 형태적인 변화나 발아율의 역학 관계 등에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

고품질 수박을 생산하기 위하여 서로 다른 염색체 배수화제를 처리하여 3가지 4배체 육종라인('SA03-1', 'SA06-1' and 'SB01-1')을 개발하였다. 최적의 4배체 유기조건들을 조사하기 위하여, 3가지 육종라인들의 4배체는 공변세포의 배수화된 엽록체 수를 조사하는 것으로 선발하였다. 4배체 유기율은 배수화제의 종류와 유전자형에 따라 다르게 나타났다. 가장 높은 4배체 유기율은 colchicine 1.0%에서 82.2%로 가장 높게 나타났다. 이들 잠재적인 4배체 라인들의 배수성은 flow cytometer와 염색체 수 분석을 이용하여 재확인하였다. 확보된 4배체 육종라인들의 절간은 그들 2배체와 비교하여 4배체와 유사하거나 짧게 나타난 반면, 잎의 크기는 4배체에서 더 크게 나타났다. 과중은 'SA03-1', 'SB01-1' 라인에서는 다소 감소하였고, 과피 두께와 당도는 'SB01-1'라인에서만 2배체와 차이를 보여주었다. 4배체 육종라인은 수정능력을 가지고 있었고 종자는 열매마다 'SA03-1' (21개), 'SA06-1' (62개), 'SB01-1' (34.7개)로 수확되었으며, 4배체 종자는 그들의 2배체보다 더 크고 두터웠다. 이러한 4배체 품종 육성 결과는 씨없는 수박의 신품종 육성을 위해 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원(IPET)의 GSP사업단 사업의 지원에 의해 수행되었음.

References

Anonymous (2012). "Annula world statistics", (weblink: http://stat.fao.org).

Berdahl, J.D and R.E. Ries. 1997. Development and vigor of diploid and tetraploid Russian wild rye seedling. J. Range Management 50:80-84.

Cho, S.M., S.A. Oh, Y.S. Choi and S.B. Park. 2014. Effect of plant growth regulators on regeneration from the cotyledon explants in watermelon (*Citrullus lanatus* (thumb.) Matsum. & Nakai). Korean J. Plant Res. 27(1):51-59 (in Korean).

Compton, M.E and D.J. Gray. 1994. Adventitious shoot

organogenesis and plant regeneration from cotyledon of tetraploid watermelon. HortScience 29:211-213.

Compton, M.E., D.J. Gray and G.W. Elmstrom. 1996. Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured *in vitro*. Euphytica 87:165-172.

Compton, M.E., N. Barnett and D.J. Gray. 1999. Use of fluorescein diacetate (FDA) to determine ploidy of *in vitro* watermelon shoots. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 58:199-203.

Compton, M.E., D.J. Gray and V.P. Gaba. 2004. Use of tissue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 77:231-243.

Galbraith, D.W., K.R. Harkins, J.R. Maddox, N.M. Ayres, D.P. Sharma and E. Firoozabady. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science 220:1049-1051.

Hansen, N.J.P. and S.B. Andersen. 1996. *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in Brassica napus microspore culture. Euphytica 88:159-164.

Haskell, G. and E. B. Paterson. 1962. The Phase Contrast Microscope in Plant Cytology. Genetica 33:52-58.

Hayata, Y., Y. Niimi and N. Iwasaki. 1995. Synthetic Cytokinin-1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea (CPPU)-promotes fruit set and induces parthenocarpy in watermelon. J. Am. Soc. Hort. Sci. 120:997-1000.

Henderson, W.R. 1977. Effect of cultivar, polyploidy and reciprocal hybridization on characters important in breeding triploid seedless watermelon hybrids. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 102:293-297.

Jaskani, M.J., I.A. Khan and S. Husnain. 1996. Morphological description of citrus colchiploid. Proc. Intl. Soc. Citriculture 1:130-132.

Jaskani, M.J., S.W. Kwon, G.C. Koh, Y.C. Huh and B.R. Ko. 2004. Induction and characterization of tetraploid watermelon. J. Korean Soc. Hort. Sci. 45:60-65.

Jaskani, M.J., S.W. Khan and D.H. Kim. 2005. Flow cytometry of DNA contents of colchicines treated watermelon as a ploidy screening method at M1 stage. Pak.J. Bot. 37:685-696.

Kihara, H. 1951. Triploid watermelons. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 58:217-230.

Koh, G.C. 2002. Tetraploid production of Moodeungsan watermelon. J. Korean Soc. Hort. Sci. 43: 671-676 (in Korean).

Lower, R.L. and K.W. Johnson. 1969. Observations on sterility of induced autotetraploid watermelons. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 94:367-369.

Marr, C.W. and K.L.B. Gast. 1991. Reaction by consumers in a "famers" market to price for seedless watermelon and ratings of eating quality. Hort. Technol. 1:105-106.

NeSmith, D.S. and J.R. Duval. 2001. Fruit set of triploid watermelons as a function of distance from a diploid pollinizer. HortSceince 36(1):60-61.

Sari, N., K. Abak and M. Pitrat. 1999. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. And Nakai. Sci. Hortic. 82:265-277.

Sugiyama, K. and M. Morishita 2000. Production of seedless watermelon using soft-X-irradated pollen. Scientia Hort. 84:255-264.

Suying, T., H. Xiuqiang, L. Jiwei and L. Wenge. 1995. Raising the frequency of inducing tetraploid watermelon by treating colchicine. Acta Hort. 402:18-22.

van Duren, M., R. Morpurg, J. Dolezel and R. Afza. 1996. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. Euphytica 88:25-34.

Velleux, R.E. and A.A.T. Johnson. 1998. Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization: *In* Plant Breeding Reviews, Janick, J. (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York (USA). pp. 229-267.

Wall, J.R. 1960. Use of marker genes in producing triploid watermelon. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 76:577-581.

Ye, Y.M., J. Tong, X.P. Shi, W. Yuan and G.R. Li. 2010. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of carpe myrtle (*Lagerstromemia indica* L.). Sci. Hortic. 124:95-101.

(Received 11 August 2015 ; Revised 22 October 2015 ; Accepted 23 October 2015)