

기내수정에 의한 *Nicotiana tabacum*과 *N. repanda*의 잡종식물 육성

최상주*, 금완수, 정석훈, 정윤희, 조명조
한국인삼연초연구원
(1995년 12월 2일 접수)

Interspecific hybrid of *Nicotiana tabacum* and *N. repanda* by *in vitro* pollination and fertilization

S. J. CHOI*, W. S. KEUM, S. H. JUNG, Y. H. CHUNG, M. C. CHO
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute
(Received Dec. 2, 1995)

ABSTRACT : *Nicotiana repanda* has resistance to many important tobacco diseases but no tobacco cultivars are currently available that carry resistance genes derived from this species. Numerous attempts to hybridize *N. repanda* with commercial tobacco cultivars have been largely unsuccessful because of cross incompatibility or the uncovering of lethal genes. *In vitro* pollination of placenta attached ovules was useful in by passing prezygotic barriers for interspecific hybrid combination between *N. tabacum* cv. NC82 and *N. repanda*. Six days after *in vitro* pollination of *N. tabacum* cv. NC82 × *N. repanda*, enlarged ovules on placenta were removed and transferred into ovule culture medium of Nitsch and Nitsch (1969). Within 15 days of ovule culture, germination occurred. Most of the hybrid seedlings obtained had poor root system and finally died, while few of them had good root system and grew well.

Key words : *In vitro* pollination, Hybrid inviability, Interspecific hybridization, Tobacco

* 연락처자 : 440-600, 경기도 수원시 권선구 당수동 434번지, 한국인삼연초연구원, 수원시협장

* Corresponding Author : Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Suwon Experiment Station, 434 Dangsoo-Dong, Kwonsun-Ku, Suwon 440-600, Korea

현 재배종에 야생종이 갖고 있는 유용 유전인자의 도입은 종간 및 종내교배에 의해서 성공되어 실용화된 사례도 있지만 교잡불화합성, 염색체이상 및 잡종치사 등으로 실패하는 경우도 많이 알려지고 있어서 이러한 문제점을 타파하기 위하여 biotechnology 기법등이 이용되고 있다.

일반적으로 종간교배시 일어나고 있는 장애는 크게 두가지 즉 수정전 장애와 수정후 장애로 구분하고 있는데(Stebbins, 1950) 전자는 주두상에서 화분이 발아하지 않거나, 암술대에서 화분관의 신장이 정지되어 수정이 실패하는 경우(Hadley and Openshaw, 1980)이며 후자는 수정이 이루어진다고 하더라도 수일 이내에 배와 배유가 퇴화하여 발아력이 양호한 잡종종자를 얻을 수 없는 경우이다.

Nicotiana 속에 있어서도 종간교배시 조합에 따라 수정전후의 장애요인이 발생되어 기존 재배품종에 유용인자의 도입이 불가능한 조합이 많은 것으로 알려져 있다 (Pandey 1967, 1968). 따라서 수정전 장애를 타파하기 위하여 자방에 화분을 주입하는 방법과 기내에서 배양중인 태좌에 붙어있는 배주에 직접 화분을 떨어뜨려 수분시키는 방법(기내수분 및 수정) 그리고 sylvan pollination 등이 이용되고 있다. 그러나 수정이 된다 하더라도 그후 일어나는 장애요인들로 인하여 잡종식물을 얻을 수 없는 경우에는 이를 극복하기 위하여 잡종배주 배양법으로 잡종식물을 육성하고 있다.

본 연구에서 시험재료로 사용된 *Nicotiana repanda*는 *Nicotiana*속의 어느 종보다 많은 병과 층에 대하여 저항성을 갖고 있어서 육종가들에게 주요 관심이 대상이 되어왔다 (Pittarelli 등, 1975; Stavrely 등, 1973; Stavely, 1979). 현재까지 *N. repanda*의 주요 유용인자를 *N. tabacum*에 도입하기 위하여 종간교배, 배주배양, 세포융합, 방사선처리 (Shintaku 등, 1985; Suda 등, 1989; Pittarelli와 Stavely, 1975; Shintaku 등, 1988) 등 다양한 연구가 이루어져 왔지만 바람직한 잡종식물을 얻을 수 없어 최근에는 상기방법 이외에도 기내에서 수분 및 수정을 시켜 잡종식물을 육성하는 방법이 적용되고 있다.

따라서 본 연구도 *N. repanda*와 *N. tabacum*간의 종간교배시 발생하는 불화합성을 극복하기 위하여 기내수분 및 수정방법 과 배주배양법을 적용한 바

잡종식물을 얻었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시재료. 본 시험에는 *Nicotiana tabacum* L. cv. NC 82 ($2n=48$)와 *N. repanda* Willd ($2n=48$)을 공시재료로 사용하였다. 이들의 식물은 온실에서 파종하여 얻은 유묘를 1/2500 a Wagner pot에 심어 18-22-28℃로 유지되고 있는 인공기상실 내에서 육성하여 사용하였다. 두 종간의 상호교잡 및 배주배양에 의한 잡종식물 육성은 Reed 와 Collins(1978)의 방법에 준하였다.

기내수분 및 배주배양. 기내 수분을 위한 화분채집, 태좌배양 및 기내 수분등은 DeVerna와 Collins (1984) 방법에 준하였으며 기내에서 수분 6 일후 태좌상에서 수정되어 크게 발육된 잡종배주는 Reed 및 Collins(1978)와 동일한 방법으로 NN(Nitsch와 Nitsch, 1969) 배지에 치상하여 배양시켰다. 이때 배양조건은 28℃, 조도는 3 klux 1일 16 시간으로 하였으며, 발아 30 일후 유식물을 $1/4$ MS(Murashige 와 Skoog, 1962) 기본배지로 한 발근배지에 옮겨서 뿌리의 활력을 도모하였다. 그후 유식물체의 잎이 5-6매의 크기에 도달하였을 때 vermiculite가 담긴 pot에 이식하여 IAA 2mg/l 이 함유된 $1/4$ MS 배지를 영양원으로 하여 육성하였다.

결과 및 고찰

N. tabacum cv. NC 82에 *N. repanda*가 가지고 있는 유용인자중 TMV 저항성인자를 도입하기 위하여 상호교배하여 교잡화합성을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

N. tabacum cv. NC 82를 모본으로 하여 *N. repanda*와 인공교배할 때 교배한 모든 식은 교배후 3 일 이내에 모두 떨어져 결실된 식을 얻을 수 없었다. 이는 *N. repanda*의 화분이 *N. tabacum* cv. NC 82의 주두에서 발아율이 낮고 일부 발아된 화분도 발아후에 암술대를 통해 자방으로 이동하는 중 화분관 신장이 정지되어 수정이 이루어지지 않는 수정전 장애(Postzygotic barrier) 현상으로 보여진다

Table. 1 Results from *in situ* hybridization of *N. tabacum* cv. NC82 crossed with *N. repanda*

Cross combination	Total no. crosses	No. crosses setting seed	Hybrid seed germination
<i>N. tabacum</i> cv. NC82 x <i>N. repanda</i>	171	0	-
<i>N. repanda</i> x <i>N. tabacum</i> cv. NC82	125	18	No

(De Vema 등, 1987).

반면 *N. repanda*를 모본으로 하고 NC82를 화분친으로 하였을 경우 약 14% 정도 결실된 삭을 얻을 수 있었지만(Table 1) 이 종자들은 내용물이 충실치 못하여 발아력이 떨어져 잡종식물을 얻을 수 없었다. 이러한 현상은 교배후 수정은 이루어진다고 하더라도 유전적 부조화에 의해서 잡종배주 내의 배와 배유조직이 수일내에 붕괴되어 충실한 종자를 얻을수 없기 때문으로 보인다 (Reed 와 Collins 1978).

이에따라 잡종종자를 얻을수 있지만 발아력이 없는 *N. repanda* x *N. tabacum* cv. NC82 조합의 잡종배주를 교배 6 일후 8% sucrose가 함유된 NN 배지에 치상하여 배양하였지만 잡종식물은 얻을 수 없었다 (Table 2). 이는 일정한 영양원이 공급되더라도 배유조직이 유전적 부조화에 의해서 발육하지 못한 결과로 생각되어 진다 (Reed 와 Collins 1978).

수정전 장애요인으로 기인되는 교잡불화합성은 기내수분법으로 극복하고 있는데 Niimi (1970,

Table 2. *In vitro* culture of fertilized ovules of *N. repanda* x *N. tabacum* cv. NC82

Days after pollination	No. placenta cultured	No. plants obtained
6	15	0

* Basic medium was NN containing 8% sucrose

1976)가 *Pentunia hybrida* 종을 "암술대 수정"(Stylar pollination) 방법으로 잡종유식물을 얻은 바 있다. 따라서 *N. tabacum* cv. NC82 x *N. repanda* 조합에서 나타나는 교잡불화합성도 기내수분법으로 타파하기 위하여 온실에서 재배종인 NC82의 꽃을 개화 1 일전 채취하여 무균실내에서 자방의 표피조직을 제거한 태좌를 MS 배지상에 치상하였다. 그 후 태좌 위에 *N. repanda* 의 화분을 살포하여 6 일후 수정 여부를 관찰하여보면 수정이 이루어진 배주는 크게 발육된 모양을 나타내어 미수정 배주와 육안으로 구별이 가능하였다 (Fig. 1).

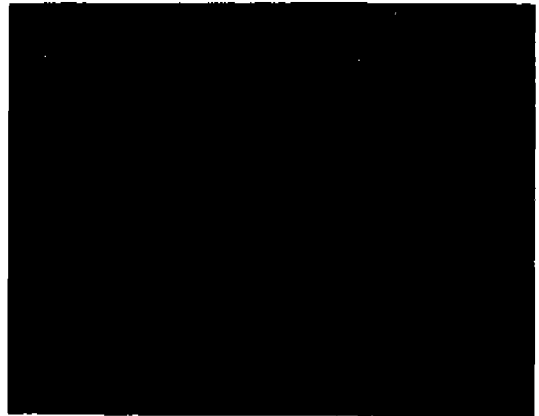


Fig. 1. Enlarged ovules on placenta 6 days after *in vitro* pollination.

이 잡종배주들은 새로운 배지에 옮겨 치상하지 않을 경우 시간이 경과 될 수록 위축 현상을 관찰할 수 있었는데 이는 배주내의 배유가 붕괴됨으로 인한 현상으로 보였다. 따라서 이들을 MS배지에서 NN배지로 옮겨 치상하였던 바 배양 일수가 경과됨에 따라 배주의 색상이 갈색으로 변화 되면서 종자의 형태로 진전되었는데 배양 15 일 후부터는 종피가 터지면서 발아가 시작되었다 (Fig. 2). Table 3에서 보는 바와같이 배양한 총 태좌중 잡종식물을 얻을 수 있는 태좌는 27%로 나타났으며, 치상된 총 잡종배주중 발아된 잡종배주는 5.3% 였다. 이 결과는 *Nicotiana* 속의 타 교배조합의 결과에 비해서 낮았는데 이는 유전적 부조화에 의한 결과로 보인다 (Reed 와 Collins 1978).

Table. 3 Production of hybrid plants of *N. tabacum* cv. NC82 x *N. repanda* via *in vitro* pollination and ovule culture

Total no. placenta cultures (A)	No. enlarged ovules transferred to NN media	Total no. plants produced	No. placenta cultures which responded (Produced hybrids) (B)	% (B/A)
137	3827	204	37	27.0



Fig. 2. Seedlings germinating from enlarged ovules transferred to media NN 6 days after pollination.



Fig. 3. Healthy seedling transferred to a rooting medium 60 days after pollination.

그후 이 잡종식물들은 시간이 경과됨에 따라 치사관련 유전인자에 의해서 뿌리가 흑색으로 변화되면서 점차 고사되는 현상을 보였으므로 생육정체가 시작되기전 즉 유식물체의 엽수가 4-5매의 크기에 달하였을때 뿌리배지로 옮겨 뿌리활력을 도모하였다 (Fig. 3).

그러나 뿌리배지에서 배양중 일정기간이 지나면 잡종치사 유전인자에 의해서 고사되는 현상을 관찰할 수 있었서 (Fig. 3) 뿌리배지에서 뿌리가 왕성히 출현하였을 때 즉 기내수정후 60일이 경과 (Fig. 4)되어 식물체의 엽수가 12-13매에 달하였을때 pot에 이식하여 1/4MS 기본배지에 IAA를 1당 2mg 첨가한 병배양액을 영양원으로 하였다. 일반적으로 exogenous IAA는 중간교배로 육성된 잡종식물이 생육중 잡종치사를 극복하는데 큰 효과가 있는 것으로

Days after pollination	Parental flowers ↓ Hand pollination	Medium MS(1962)
6	Fertilized ovules ↓ Ovules culture	NN(1969)
30	Seedlings ↓ Subculture	1/4 MS
60	Plants bearing 5 to 6 leaves ↓ Potting	1/4 MS + IAA

Fig. 4. Scheme of hybrid production between *N. tabacum* cv. NC82 and *N. repanda*

로 알려져 있는데(Suda 등, 1990) 본 시험에 있어서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

결 론

*Nicotiana repanda*의 내병충성 유전인자를 연초 재배품종으로 도입은 많은 연구가 수행되어 왔지만 교잡 불친화성과 잡종치사로 인하여 잡종식물 육성은 매우 어려운 것으로 알려져 있다. 그러나 기내배양과 배주배양법은 *N. tabacum* cv. NC82 와 *N. repanda*의 종간교배시 발생하는 stilar barrier와 잡종치사(hybrid inviability)을 극복하는데 매우 유효하였다. 기내에서 *N. tabacum* cv. NC82의 태좌에 *N. repanda* 화분을 수분시킨 6일후 비대 성장한 배주를 Nitsch와 Nitsch(1969) 배지상에 배양한 바 15 일 후 부터 발아가 시작되었다. 대부분의 잡종식물들은 시간이 경과될수록 근의 활력이 불량하여 치사되었지만 그 중 소수의 식물체만 뿌리의 활력이 높아져 정상식물체를 육성할 수 있었다.

참 고 문 헌

- DeVerna, J. W., Myers, J.R, Collins G.B.(1987) By passing prefertilization barriers to hybridization *Nicotiana* using *in vitro* pollination and fertilization. *Theor. Appl. Genet.* 73 : 665 - 671
- Hadley, H.H., Openshaw S.J. (1980) Interspecific and intergeneric hybridization. In : *Hybridization of crop plants*. Fehr W.R, HADLEY H.H. (eds) Am. Soc. Agron. Crop Sci., Madison Wis., p.261 - 272
- Murashige, T., Skoog, F.(1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15 : 473 - 497
- Niimi, Y.(1970) *In vitro* fertilization in the self-incompatible plant, *Petunia hybrida*. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 39 : 346 - 352
- Niimi, Y.(1976) Effect of "stilar pollination" on *in vitro* seed setting of *Pentunia hybrida*. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 45 : 168 - 172
- Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science*. 163 : 85 - 87
- Pandey, K.K.(1967) Origin of genetic variability : combination of peroxidase isozymes determine multiple allelism of the S-gene. *Nature* 213 : 669
- Pandey, K.K.(1968) Colchicine-induced changes in the self incompatibility behavior of *Nicotiana*. *Genetica* 389 : 257 - 271
- Pittarelli, G.W., and Burk, G. L. (1973) *Nicotiana repanda* as a potential source for disease resistance in *N. tabacum*. *J. Hered.* 64 : 265 - 271
- Pittarelli, G.W., Stavely, J.R. (1975) Direct hybridization of *Nicotiana repanda* × *N. tabacum*. *J. Hered.* 66 : 281 - 284
- Reed, S.M., Collins, G.B. (1978) Interspecific hybrids in *Nicotiana* through *in vitro* culture of fertilized ovules. *J. Hered.* 69 : 311 - 315
- Stavely, J.R., Pittarelli, G W., Burk, L. G.(1973) *Nicotiana repanda* as a potential source for disease in *N. tabacum*. *J. Hered.* 64 : 265 - 271
- Stavely, J.R.(1979) Disease resistance. In : *Nicotiana : procedures for experimental use*. Durbin, R.D. (ed) USDA Tech. Bull. 1556, p. 87 - 110
- Stebbins, G.L. Jr. (1950) *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York.
- Shintaku, Y. Yamamoto, K, Nakajima, T.(1985) Overcoming hybrid inviability in interspecific cross between *Nicotiana repanda* Willd. and *N. tabacum* L. *Jpn. J. Breed.* 35 : 76 - 79
- Shintaku, Y., Yamamoto, K., Nakajima, T.(1988) Interspecific hybridization between *Nicotiana repanda* Willd. and *N. tabacum* L. through the pollen irradiation technique and the egg cell irradiation technique. *Theor. Appl. Genet.* 76 : 293 - 298
- Suda, M., Marubashi, W., Onozawa, T.(1989) Increase in fertility through "stilar pollination" and production of interspecific hybrid between *Nicotiana tabacum* L. and *N. repanda* Willd. *Jpn. J. Breed.* 39 [Suppl.2] : 84 - 85
- Suda, M., Marubashi, W.(1990) Effects of culture temperatures and IAA on the growth of hybrid seedlings of *Nicotiana repanda* Willd. × *N. tabacum* L. *Jpn. J. Breed.* 40 [Suppl.1] : 58 - 59