

연초종간 상호교잡에 의한 Genetic Tumor의 유도 및 Teratoma Shoot의 특성

양덕춘* · 윤의수¹ · 최광태 · 이정명²

한국인삼연초연구원 유전생리부, ¹공주대학교 생물학과, ²경희대학교 원예학과

Formation of Genetic Tumor and Characteristics of Teratoma Shoot from Tobacco Interspecific Reciprocal Hybrids

YANG, Deok Chun* · YOON, Eui Soo¹ · CHOI, Kwang Tae · LEE, Jung Myung²

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea:

¹Department of Biology, Kongju National University, Kongju, Chung-Nam, 449-900, Korea: and

²Department of Horticulture, Kyung Hee University, Suwon, 302-735, Korea. *Corresponding author.

Reciprocal interspecific hybrids between *N. glauca*(2n=24) and *N. langsdorffii*(2n=18) were obtained by intercrossing. One hundred percent of F₁ seeds was produced from intercrossing of *N. glauca* × *N. langsdorffii*, whereas the frequency of F₁ hybrid seed formation from *N. langsdorffii* × *N. glauca* was very low. However, all the hybrid seeds were germinated well and then grown to normal plantlets. All the plants of F₁ hybrids have chromosome number of interspecific hybrids (2n=21). From observation of morphological characteristic, the structure of petiol, leaf, flower, and the morphology of pollen have characteristics of F₁ hybrid. Spontaneous tumors (genetic tumor) were formed from each F₁ hybrid; the genetic tumor arose at the reproductive phase when the maternal type of F₁ hybrid came from *N. glauca*, while the genetic tumor arose only after reproductive phase when the maternal type of F₁ hybrid came from *N. langsdorffii*. The genetic tumor actively proliferated on hormone-free medium and produced numerous teratoma shoots. In addition, normal leaf or stem explants of F₁ hybrid produced calli on hormone-free medium after 15 days of culture, the calli produced new numerous teratoma shoots after 30 days. The frequency of teratoma shoot formation from interspecific hybrid was higher in the *N. glauca* × *N. langsdorffii* than in the *N. langsdorffii* × *N. glauca*. Root development from the teratoma shoots was hardly obtained. Teratoma shoots without roots *in vitro* can form genetic tumor at the vegetative growth phase after tissue culture.

Key words: Chromosome, *in vitro* culture, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana langsdorffii*

식물체의 tumor(종양) 형성에 대해서는 이미 1800년대에 알려져 왔으며, 일반적으로 유전자의 변이와 비정상적인 유전자의 조절에 의해서 일어난다고 믿어왔다(Melchers, 1971). 1873년 Brassicaceae과에서 처음으로 종양조직에서 teratomas의 발견에 대한 보고가 있는 이후(Caspary, 1873), 1910년 Jensen에 의해서 *Brassica napus* × *B. rapa*의 종간 잡종에서 종양이 관찰되었다(Jensen, 1910). *Nicotiana*속에서는 1930년 Kostoff에 의해서 virus, bacteria, fungi 등의 외적인 요인에 관계없이 자발적인 종양이 형성되었음을 보고하였으며(Kostoff, 1930), 1965년 Kehr 등은 연초의 종간잡종에서 종양을 발견하고 이것을 Kostoff genetic tumor라고 부르게 되

었다(Kehr, 1965). Genetic tumor가 발견되면서 이에 대한 연구가 생리적, 그리고 유전적인 측면에서 많이 시도되었으며, 특히 *Nicotiana glauca* × *Nicotiana langsdorffii*의 종간잡종에서 유발된 tumor에 대한 연구가 활발히 진행되었다(Cheng and Smith, 1973). 또한 genetic tumor로부터 분화관계에 대한 연구와 더불어 *Agrobacterium spp*에 의하여 유도된 crown gall tumor와의 관계에 대한 연구도 활발히 수행되었다(Sharp and Gunckel, 1969). 그러나 상호교잡에 의한 종간잡종식물체의 유기와 종간잡종식물체에 대한 형태적 특성 등에 대한 연구는 아직 되어 있지 않으며 특히 *in vitro*에서 형성된 genetic tumor조직 및 일반 종간잡종체의 재분화에

대한 연구는 미비한 상태이다(Ichikawa and Syono, 1988). 따라서 본 실험은 많이 연구되어 있는 *Nicotiana glauca* × *Nicotiana langsdorffii*의 잡종체뿐만 아니라 *Nicotiana langsdorffii* × *Nicotiana glauca*의 중간잡종의 각종 형태적 특성 및 genetic tumor의 유도관계 그리고 조직배양시 재분화가능성과 식물호르몬에 대한 반응 등 생리적 특성등을 조사하였던 바 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

연초중간 잡종식물체의 유기 및 형태적 특성조사

연초 *Nicotiana glauca* (2N=24)와 *Nicotiana langsdorffii* (2N=18)의 종자를 파종하여 유기된 식물체의 중간잡종을 획득하기 위해서 interspecific reciprocal crossing에 의해서 F₁ 잡종종자를 획득하였다. 획득한 종자를 다시 파종하여 F₁ 잡종체의 염색체 수와 엽병의 존재여부, 잎의 형태 꽃잎의 형태와 색깔 및 크기, 화분의 색깔 등 형태적 특성을 조사하였다.

연초중간 잡종식물체의 염색체수 및 genetic tumor의 조사

연초중간잡종식물체의 근단부위 5mm를 절단하여 0.05% colchicine에 2시간 전처리하여 1:3 acetic alcohol에 1시간 처리한 후 60°C 1N HCl에서 12분간 가수분해하였다. 가수분해된 뿌리의 끝 1 mm를 carbolfuchsin에 30분간 염색하여 압착법으로 염색체를 관찰하였다. 한편 성숙한 잡종체식물체의 genetic tumor의 형성여부를 영양생장기와 생식생장기로 나누어 조사하였다. 또한 이미 genetic tumor를 형성하고 있는 잡종식물체로부터 인위적인 tumor를 유기하기 위해서 잡종식물체에 상처를 주고 genetic tumor의 형성여부를 조사하였다.

연초중간 잡종식물체의 조직배양 및 teratoma shoot의 특성

형성된 genetic tumor 및 일반조직부위에서 절취한 explant를 먼저 70% EtOH에서 3분간 침지후 2%(genetic tumor 조직) 및 1%(일반 잎조직) NaOCl에서 15분간 소독후 3회 멸균증류수로 세척하여 식물호르몬 무첨가 MS기본배지(MSO)에서 callus 및 teratoma shoot가 형성여부를 조사하였다. 또한 genetic tumor조직이 아닌 F₁ 중간잡종식물체의 잎과 줄기절편을 역시 동일한 방법으로 식물호르몬(24-D 0.5 mg/L)이 첨가된 MS배지에 접종하여 callus의 형성여부 및 형태적 특성을 genetic tumor와 연관하여 조사하였다. 잡

종체간의 teratoma shoot형성량을 조사하기 위해서는 식물호르몬이 첨가되지 않은 MS배지에 *N. langsdorffii* × *N. glauca*의 절편을 접종하여 teratoma shoot의 무게를 조사하였다.

결과 및 고찰

연초중간 잡종식물체의 유기 및 형태적 특성조사

연초 *N. glauca*(Figure 1-A)와 *N. langsdorffii*(Figure 1-B)의 중간잡종의 종자를 획득하기 위해서 상호교잡을 하였던 바, *N. glauca* × *N. langsdorffii* 교잡에서는 거의 100%의 F₁ 잡종종자를 획득할 수 있었으나(Figure 1-C), *N. langsdorffii* × *N. glauca* 교잡에서는 종자결실이 극히 불량하여 1% 미만에서만 종자를 획득할 수 있었다. 그러나 2종류의 중간잡종 종자를 모두 토양에 파종하였을 때 받아들인 매우 양호하였으며 정상식물체로 성장하였으나 *N. glauca* × *N. langsdorffii* 잡종체(Figure 1-D)보다는 *N. langsdorffii* × *N. glauca* 잡종체(Figure 1-E)의 생장이 더 양호한 편이었다. 잎의 형태적 특성을 보면 *N. glauca* 모본의 경우 엽병이 있고(Figure 1-F), *N. langsdorffii*는 엽병을 갖고 있지 않으나(Figure 1-G) 중간 잡종체에서는 *N. langsdorffii*와 같이 모두 엽병을 갖고 있지 않았다(Figure 1-H, I). 그러나 *N. langsdorffii*처럼 확실하게 엽병이 없는 것이 표시가 나지 않고 엽병을 가지고 있는 *N. glauca*와의 중간 형태를 나타내고 있었으며, *N. glauca* × *N. langsdorffii* 잡종체는(Figure 1-H) *N. glauca*와 더 유사하였으며 *N. langsdorffii* × *N. glauca* 잡종체는(Figure 1-I) *N. langsdorffii*와 더 유사한 경향을 보여 엽병의 경우 모본에 의해서 영향을 받은 것으로 사료되었다. 또한 잎의 전체적 형태는 비교적 *N. glauca* 보다 *N. langsdorffii*와 더 유사하였으며, 표면의 거칠음 정도도 *N. langsdorffii*와 더 유사하였다. 중간잡종의 triconm의 경우에는 *N. langsdorffii*와 더 유사하였으나 밀도가 중간 잡종체가 모본인 *N. langsdorffii*보다 낮아 이것 역시 2종류 모본의 중간 형태를 나타내고 있었다. 줄기와 엽병사이에 *N. glauca*의 경우 보라색을 띄고 있으나(Figure 1-J), *N. langsdorffii* 경우에는 전혀 색깔이 없는 반면(Figure 1-K), *N. glauca* × *N. langsdorffii* 잡종체에서는 보라색이 관찰되었으며 줄기를 연해서 많은 보라색이 나타났으나(Figure 1-L), *N. langsdorffii* × *N. glauca* 잡종체에서는 줄기와 엽병사이에만 연한 보라색을 관찰할 수 있었다(Figure 1-M).

중간잡종체는 모두 정상적으로 개화가 가능하였으며 줄기에서 화경이 뻗어나는 각도를 보면 *N. glauca* × *N. langsdorffii* 잡종체는 60°로(Figure 2-A) *N. langsdorffii* × *N. glauca* 잡종체 40°보다(Figure 2-B) 더 곧게 뻗어나는 경향을 보였으며 꽃잎의 색깔은 *N. glauca*의 경우 노랑색이고

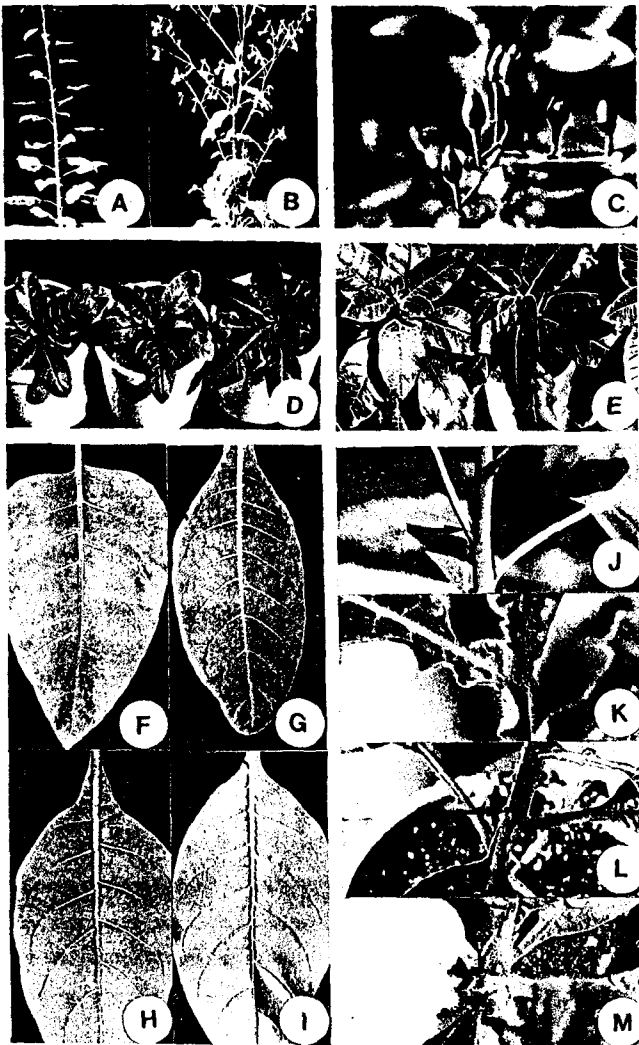


Figure 1. Phenotype of hybrid plants derived from *N. glauca*(A) and *N. langsdorffii*(B). C: hybrid seeds developed of *N. glauca* × *N. langsdorffii*. D, E: hybrid plants of *N. glauca* × *N. langsdorffii*(D) and *N. langsdorffii* × *N. glauca*(E), phenotype of leaf derived from *N. glauca*(J), *N. langsdorffii*(D), *N. glauca* × *N. langsdorffii*(E) and *N. langsdorffii* × *N. glauca*. Color between stem and branch of *N. glauca*(J), *N. langsdorffii*(K), *N. glauca* × *N. langsdorffii*(L) and *N. langsdorffii* × *N. glauca*(M).

(Figure 2-C-G) *N. langsdorffii*는 연두색을 띄고 있으나 (Figure 2-C-L), 중간잡종체에서는 모두 연한 연두색을 띄고 있었고(Figure 2-C-F1), 꽃잎의 크기, 암술대 및 수술의 길이 그리고 씨방은 모두 중간을 나타내었다(Figure 2-C, D, E, F). 화분의 색깔은 *N. glauca*는 노랑색이고(Figure 2-G), *N. langsdorffii*는 청색인데(Figure 2-H) 반해 중간잡종체에서는 모두 연한청색을 띄고 있었으며(Figure 2-I, J), 화분의 발달과정은 *N. glauca*는 처음 미색에서 바로 노랑색으로 변하였고(Figure 2-G), *N. langsdorffii*는 미색에서 밤색으로 되었다가 청색이 되었는데(Figure 2-H) 중간잡종체에서는 미색에서 밤색으로 되었다가 연한청색을 나타내고 있었다

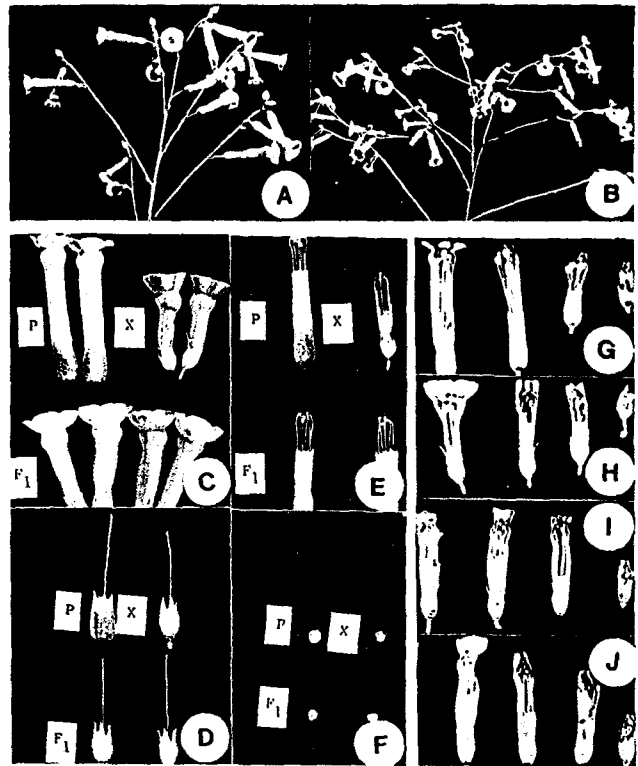


Figure 2. Aspects of peduncle stretched from main stem of *N. glauca* × *N. langsdorffii*(A) and *N. langsdorffii* × *N. glauca*(B), color of petal(C), size of filament(D) and ovary of hybrids, development of anther in *N. glauca*(G), *N. langsdorffii*(H), *N. glauca* × *N. langsdorffii*(I) and *N. langsdorffii* × *N. glauca*(J).

(Figure 2-I, J).

연초중간 잡종식물체의 염색체수 및 genetic tumor

연초중간잡종식물체의 근단부위의 염색체 수를 조사한 결과 *N. glauca* × *N. langsdorffii* 잡종식물체(Figure 3-A) 및 *N. langsdorffii* × *N. glauca*(Figure 3-B) 잡종식물체 공히 $2n=21$ 개로서 *N. glauca* $2n=24$ 개와 *N. langsdorffii*를 $2n=18$ 개의 중간 염색체 수를 가지고 있어 중간잡종임을 확인할 수 있었다. 또한 중간잡종식물체는 spontaneous tumor인 genetic tumor가 형성되었으며 *N. glauca* × *N. langsdorffii* 잡종체는 영양생장기부터 형성되었고 크기가 매우 클 뿐더러 지상부에서도 많은 tumor가 형성되었으나(Figure 3-C), *N. langsdorffii* × *N. glauca* 잡종체에서는 생식생장이후에만 형성되었고 tumor의 크기도 작았을 뿐더러 지상부에서는 거의 형성되지 않았다(Figure 3-D). 그러나 genetic tumor가 형성된 잡종체에서도 임의로 상처를 주어도 전혀 genetic tumor가 형성되지 않았다(Figure 3-E, F). *N. glauca* × *N. langsdorffii*의 잡종체에서 genetic tumor의 형성에 대해서는 이미 많은 보고가 있으며(Kostoff, 1930, 1943; Brieger and Forster, 1942), 정상적인 재배조건하에서 genetic tumor의 형

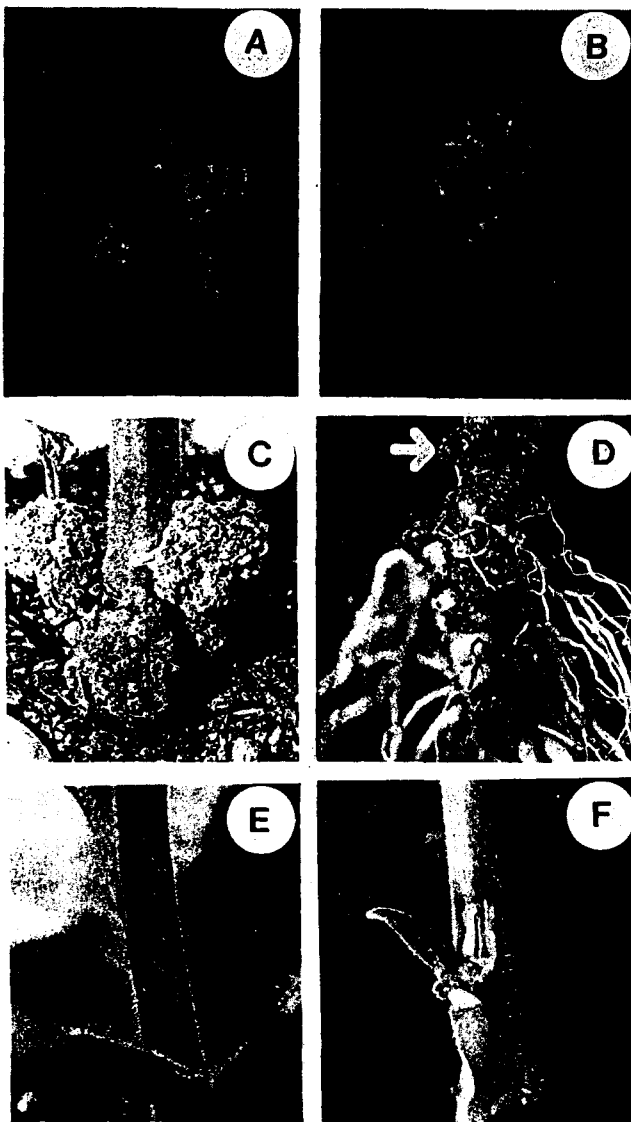


Figure 3. No. of chromosome(2n=21) of *N. glauca* × *N. langsdorffii*(A), *N. langsdorffii* × *N. glauca*(B), and spontaneous formation of genetic tumors in *N. glauca* × *N. langsdorffii*(C), *N. langsdorffii* × *N. glauca*(D). However, hybrid plants don't have any genetic tumor 15days(E) and 60(F) days after wounding.

성은 영양생장기 말기에 형성되고 가끔 개화나 착과에 저해요인이 된다고 하였으나, 본 실험에서는 상호교잡에 의해서 유도된 종간잡종에서 genetic tumor의 형성시기는 다소 차이가 있었는데 *N. glauca*를 모본으로 할 경우에는 역시 영양생장기 말기 및 생식생장기때부터 genetic tumor가 형성되었으나 *N. langsdorffii*를 모본으로 할 경우에는 genetic tumor의 형성이 늦어 주로 생식생장기 이후에 형성되었다. 또한 이런 tumor로 인한 개화의 억제나 착과에는 전혀 영향을 보이지 않았다.

연초종간 잡종식물체의 조직배양 및 teratoma shoot의 특성

형성된 genetic tumor를 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않은 MSO 기본배지에 접종했을 때 callus가 왕성히 생겨나면서 수많은 teratoma shoot가 형성되었는데 이런 shoot는 전혀 뿌리를 형성하지 못했다(Figure 4-A). 그러나 식물호르몬이 (2,4-D 0.5 mg/L) 첨가된 배지에서는 teratoma shoot가 나오지 못하고 정상조직과 같이 처음에는 callus가 형성되었으나(Figure 4-B) 계속 배양하였을 때 녹색을 띄면서 전혀 식물체의 형태를 갖추지 못한 teratoma shoot가 형성되었다. 더욱이 genetic tumor조직이 아닌 F1 종간잡종식물체의 잎과 줄기절편을 역시 동일한 방법으로 MSO배지에 접종하였을 때에도 15일경부터 callus가 왕성히 형성되었으며(Figure 4-C), 30일경부터는 역시 teratoma shoot가 왕성히 형성되었다. 또한 식물호르몬이 첨가되지 않은 배지에서 형성된 teratoma shoot중에서는 간혹 정상식물체와 같이 생장하는 개체를 발견할 수가 있었는데 이런 개체도 역시 뿌리를 가지고 있지 못하였으며 조직의 밑부분에서부터 새로운 tumor조직이 형성되었다.

잡종체간의 teratoma shoot형성량을 조사하기 위해서 식물호르몬이 첨가되지 않은 MSO배지에 *N. langsdorffii* × *N. glauca*의 절편을 접종하였던 바 *N. glauca*를 모본으로 한 잡종체가 7.2g의 teratoma shoot가 형성된 반면 *N. langsdorffii*를 모본으로 한 잡종체는 5.6g으로 *N. glauca*를 모본으로 한 잡종체의 절편에서 더 많은 teratoma shoot가 형성되었다. 일반적으로 genetic tumor조직은 기내 조직배양시

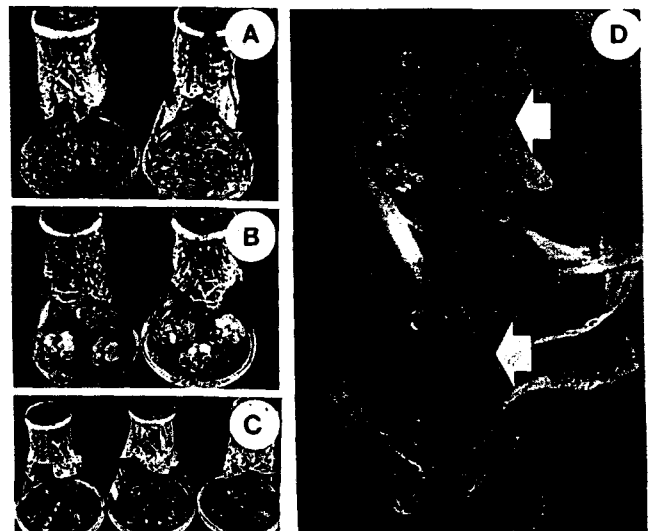


Figure 4. Teratoma shoot formation from spontaneous genetic tumor(A) and hybrid stem and leaf(C) by *in vitro* culture on the media without phytohormone(A) and 2,4-D 0.5mg/l(B). Teratoma shoot(D) derived genetic tumor of hybrids formed new secondary tumors(arrows).

Table 1. Fresh weights of tobacco hybrid teratoma shoot derived from spontaneous genetic tumor on the phytohormone free media *in vitro* culture

| Hybrids | Fresh weight (g/flask) |
|---|------------------------|
| <i>N. glauca</i> × <i>N. langsdorffii</i> | 7.2 ± 0.21 |
| <i>N. langsdorffii</i> × <i>N. glauca</i> | 5.6 ± 0.12 |

식물호르몬 무첨가배지에서 생장이 왕성히 되는데 이것은 필요한 식물호르몬을 자체내에서 다량 합성할 수 있기 때문이며 (Cheng, 1972), 식물체에서 genetic tumor의 형성은 이런 식물호르몬의 증가 때문에 일어나는 현상으로 보고하였다 (Bayer, 1977). 특히 *N. glauca* × *N. langsdorffii* 잡종식물체에서 tumor의 크기와 발현 부위는 auxin의 함량에 차이에 따라 달라진다고 하였으며, auxin의 함량이 정상조직에 비해 월등히 많고 auxin 전구물질인 tryptophan으로부터 매우 빠르게 IAA로 변환시킨다고 하였다 (Kehr and Smith, 1954). 본 실험에도 *N. glauca* × *N. langsdorffii* 뿐만 아니라 *N. langsdorffii* × *N. glauca*에서도 같은 현상을 보였으나 모본을 어느 식물체로 하느냐에 따라 tumor의 형성시기와 크기에 차이가 났다. 특히 tumor의 형성시기에 있어 일반관행재배에서는 영양생장기 후기에만 *N. glauca* × *N. langsdorffii*에서 형성되었고 *N. langsdorffii* × *N. glauca*에서는 개화 이후인 생식생장기 이후에만 tumor가 형성되었으나 기내배양에서는 잡종식물체가 영양생장기 초기에 있었음에도 불구하고 모본을 어느것으로 하더라도 모두 genetic tumor가 형성되어 자연상태에서 재배된 식물체와는 다른 양상을 보였다.

적 요

연초 *N. glauca* (2n=24)와 *N. langsdorffii* (2n=18)의 중간상 교잡에 의하여 중간잡종을 획득하였다. *N. glauca* × *N. langsdorffii* 교잡에서는 100%의 F₁ 종자를 획득할 수 있었으나, *N. langsdorffii* × *N. glauca* 교잡에서는 종자결실이 극히 불량하였다. 그러나 종자 발아율은 모두 양호하였으며, 정상 식물체로 성장하였다. F₁ 식물체의 chromosome수를 조사한 결과 모두 2n=21개로 중간잡종임이 확인되었으며, 엽병의 존재여부 및 형태, 잎의 형태, 꽃잎의 형태와 색깔 및 크기, 화분의 색깔 등의 형태적 특성을 조사한 결과 모두 중간잡종임을 재차 확인할 수 있었다. F₁ 잡종식물체에서는 spontaneous tumor인 genetic tumor가 형성되었으며, *N. glauca*을 모본으로 한 교잡체에서는 생식생장기부터 형성되었고, *N. langsdorffii*을 모본으로 한 잡종체에서는 생식생장기 이후에만 형성되었다. 특히 genetic tumor 조직을 기내에서 식물호르몬 무첨가배지에서 배양할 경우 생장이 매우

왕성하였으며 많은 teratoma shoot를 형성하였다. 또한 genetic tumor 조직이 아닌 일반 F₁ 식물체의 잎과 줄기절편도 식물호르몬 무첨가 배지에 접종되었을 때에도 15일경부터 callus가 왕성히 형성되었으며, 30일경부터는 수많은 teratoma shoot가 형성되었다. 식물호르몬 무첨가배지에서 잡종체의 teratoma shoot형성은 *N. langsdorffii* × *N. glauca*보다 *N. glauca* × *N. langsdorffii*가 더 양호한 경향을 보였다. Teratoma shoot 중에서는 뿌리는 가지고 있지 않지만 지상부가 정상적으로 자란 shoot를 절취하여 다시 조직배양할 경우에는 영양생장기에 배양잡종식물체에서 많은 genetic tumor가 형성되었다.

인용 문헌

- Bayer MH (1977) Phytohormone und pflanzliche tumorigenese. Beitr Biol Pflanz 53: 1-54
- Brieger FG and Forster R (1942) Tumores em certos hibridos do genero *Nicotiana*. Bragantia 2: 259-274
- Caspary R (1873) Eine Wruke (*Brassica napus* L.) mit laubsp ossen auf knolligem wurzelausschlag. Schr Phys-Oekonom Ges Konigsb 14: 109-112
- Cheng TY (1972) Induction of indoleacetic acid and synthesis in tobacco pith explants. Plant Physiol 50: 723-727
- Cheng TY and Smith HH (1973) The influence of genomes on autonomous growth of pith cultures of *Nicotiana glauca*-*langsdorffii* hybrids. Planta 113: 29-34
- Ichikawa T and Syono Kunihiko (1988) Tumorization-redifferentiation system of tobacco genetic tumor. Plant Cell Physiol 29: 1373-1378
- Jensen CO (1910) Von echten Geschwulsten bei Pflanzen. Conf Int Etude Cancer. 2nd, pp. 243-254
- Kehr AE (1965) The growth and development of spontaneous plant tumors. Encycl Plant Physiol 15: 184-196
- Kehr AE and Smith HH (1954) Genetic tumors in *Nicotiana* hybrids. Brookhaven Symp Biol 6: 55-76
- Kostoff D (1930) Tumors and other malformations on certain *Nicotiana* hybrids. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd 81: 244-280
- Kostoff D (1943) Cytogenetics of the genus *Nicotiana*, State Printing House. Sofia, Bulgaria.
- Melchers G (1971) Transformation or habituation to autotrophy and tumor growth and recovery. Colloqu Internat CNRS 193: 229-234
- Sharp WR and Gunckel JE (1969) Physiological comparisons of pith callus with crown gall and genetic tumors of *Nicotiana glauca*, *N. Langsdorffii* and *N. glauca*-*langsdorffii* grown *in vitro*. II. Nutritional physiology. Plant Physiol 44: 1073-1079