

Lilium longiflorum x *L. x elegans* 의 子房培養에 의해
얻어진 雜種 F₁ 의 核型, 減數分裂 및 Isozyme 에 대한 研究

尹 義 洙 , 李 相 來*

日本進化生物學研究所 · 東洋資源植物研究所

**Study of Karyotype, Meiosis and Isozyme of hybrid
from cross *Lilium longiflorum* x *L. x elegans***

Eui Soo Yoon · Sang Rae Lee *

The Research Institute of Evolutionary Biology, Kamiyoga-2, Setagaya, Tokyo, 〒158

** Institue of Oriental Botanical Resources, Bukgajwa-dong 307-33, Seodaemun-ku,
Seoul, Korea*

Abstract

Hybrids which was made up by chromosome of *L. longiflorum* and *L. x elegans*, using root-tip individual which was obtained through ovary slice culture, and root-tip of these parents, with hoirugen staining, gimsa staining and Q-H staining in accordance with the location and the existence of secondary construction which was locating near short arm centromere of No. 1,2,6,9. In metaphase of meiosis of hybrid which was made up by univalent from 2 individuals to 10 individuals was observed, and nuclear plate which was having abnormal type's synthesis amounted to 91% of all cells which were observed. This result showed the fact that some obstacle arose annormal progress of the division after that time. 63% of the cells had micronucleus from 1 individual to 4 individuals in tetrad phase of meiosis division. The peroxidase and α - estelase zymogram phenotypes of parents and hybrids were determined using agarlose IEF gel. Crosses were performed between parents bearing dissimilar allelomorphs in orther to discern the genetic control of the resolved enzymes. Genetic variation of hybrids were detected at all but 2 plant progenies.

緒 言

百合은 種內交雜과 選拔에 의해 品種이 만들어져 왔다. 1810年頃 유럽 在來種의 madonna lily x *L.*

chalcedonicum 의 種間交雜에 의해 얻어진 雜種 *L. x testaceum* 을 시작으로, *L. x parkmanii* (*L. aurertum* x *L. speciosum*) 등이 注目되어져, 種間

交雜에 의한 새로운 交雜種이 多數 作出되어졌다. 最近에는 희귀하게 遠緣交雜에 의한, Black beauty (*L. speciosum* × *L. henryi*), Uki hikari (*L. longiflorum* × *L. aurertum*) 등이 만들어졌다. 그러나 遠緣交雜에는 여러가지 不親和性 現象이 있다. 그 理由는 1) 交雜後 花粉管의 花柱中途에서의 伸長停止, 2) 不受精, 3) 種子發育途上의 胚의 夭折等으로, 1)의 理由에 對하여는 花柱切斷援粉, 3)에 對하여는 子房培養의 應用에 의해 花粉管의 伸長停止와 中道夭折을 防止할 수 있게 되었다. (淺野·明道 1977, 尹 1986, 1988). 따라서 지금까지 交雜不親和 또는 交雜이 困難하였던 組合에 있어서도 再現性을 갖는 交雜苗를 얻었다. (林等 1986, 尹 1988a, 1988b). 本 研究에서는 花柱切斷援粉과 子房培養에 의해 얻어진 遠緣交雜種 가운데, *L. longiflorum* × *L. x elegans* F₁의 核型, 減數分裂 및 Isozyme의 type에 대해 調査하였다.

材料 및 方法

子房培養에 의해 發芽한 幼植物을 1/2 MS 培地에 繼代培養하여, 移植可能한 크기에 달한 苗를 barmikyulite에 옮겨 馴化後 溫室에서 栽培하여 開花에 到達시켰다. 根端細胞를 使用하여 染色體를 觀察하였다. 根端 1 cm를 採取하여, 0.05% colchicine 水溶液에 3時間 暗所 溫室에서 浸漬 前處理後, 酢酸 ethanol 液 1:3에서 固定하여, 70% alcohol 에 保存하였다. 觀察은 固定한 根端을 60°C 1N의 鹽酸에서 7分間 加水分解를 行하였다. 加水分解後 feulgen 反應에 의해 染色하여, 檢鏡하였다 (Emsweller 1944, Will 1970). 이 標本을 利用하여 Yoshida (1975) Quinacurine mustard and Hoechst 33258 double staining (Q-H 染色法)에 의해 染色하여 觀察한 후, 20% gimsa 液 (phosphate 緩衝液 pH 6.8)에서 染色하여 標本을 作製하였다.

減數分裂은 蕾의 크기가 1.5 ~ 2.5 mm의 것을 0.3 mm 段階에 의해 3個씩 취하여, 그속의 葯에서 發達中の 花粉을 취하여, acetocarmine으로 染色 觀察하였다.

電氣泳動法은 平板薄層 agarose 等 電點電氣泳動法 (Sarvis 등 1979)에 準據하였다. 電極液은 +極側에 phosphoric acid 0.85%를 包含한 30% sucros 液을, -極側에 1% ethylenediamin을 使用하였다. 酵素는 Peroxidase (Endo, T 1972)와 α -Estelase (Kahler, A.L and Allard, R.W 1970)를 檢出하였다.

結 果

圖 1과 2에서 보듯이, feulgen 染色, gimsa 染色 및 Q-H 染色法에 의한 *L. longiflorum*은 第 3, 6, 9番 對立染色體에 二次狹窄이 있고, *L. x elegans*는 第 1, 2, 3 및 6番에 二次狹窄이 있는것이 確認되었다. 거기에 對하여 *L. longiflorum* × *L. x elegans*의 F₁에서는 第 1染色體의 一本은 短腕動原體 附近에 二次狹窄을 가지고 있어 *L. x elegans* 由來의 染色體이고, 다른 一本은 同位置에 二次狹窄을 가지고 있지 않는 染色體로써 *L. longiflorum* 由來인 것이 분명하였다. 또한 第二染色體는 短腕中央部에 二次狹窄을 갖는 *L. x elegans* 由來의 染色體와 同位置에 二次狹窄을 갖지 않는 *L. longiflorum* 由來의 染色體로 되어 있는 것이 識別되었다. 또한, 第 6 染色體의 一本은 短腕動原體 附近에 二次狹窄을 가지고 있는 *L. x elegans* 由來의 染色體와 다른 一本은 長腕 2/3 附近에 二次狹窄을 가지고 있는 *L. longiflorum* 由來의 染色體인 것이 確認되었다. 또한, 第 9 染色體의 一本은 短腕動原體 附近에 二次狹窄이 없고, 다른 一本은 가지고 있어, 各各 *L. x elegans* 와 *L. longiflorum* 由來의 染色體인 것이 確認되었다. 또한, 染色體를 觀察한 全個體에서 染色體數의 異常은 보이지 않았다. 花粉의 成熟分裂 第一分裂 中期에 二價染色體의 接合이 觀察되어진 核板은 9% 程度로, 나머지는 11_{II}+2_I, 10_{II}+4_I, 9_{II}+6_I 및 7_{II}+10_I였다 (表 1). 染色體 斷片 (supernumerary chromosome fragments: SCF_s)은 第一分裂의 中期에서 보여지기 시작하여 第二分裂의 末期에는 全觀察 細胞의 90%에서 보여졌다. 그중에서 SCF_s와 染色體 bridge가 함께 보여진 細胞는 12%, SCF_s만이 보여진 것은 78%였다. SCF_s를 포함하고 있는 細胞中에서 2個의 斷片을 가지고 있는 것이 가장 많았다. 染色體橋는 第一分裂의 後期에서 부터 보여져, 第二分裂의 中期에는 約 45%의 細胞에서 染色體橋가 觀察되었다. 染色體橋만을 가지고 있는 細胞는 얼마되지 않고, 大部分의 細胞는 染色體橋와 함께 SCF_s를 갖는 細胞였다. 또한 染色體橋를 하나만 갖는 細胞가 가장 많고, 4個의 染色體橋를 갖는 細胞도 보여졌다 (表 2). 圖 3은 *L. longiflorum* × *L. x elegans*의 雜種의 成熟分裂 過程을 나타냈다. 4分子期에는 4個의 核 以外에, 1 ~ 4個의 小核을 가지고 있는 細胞가 63%나 보였다. (表 3).

Peroxidase의 泳動像은 pH 4 ~ 9의 範圍에서 檢出되었다 (圖 4, 6)

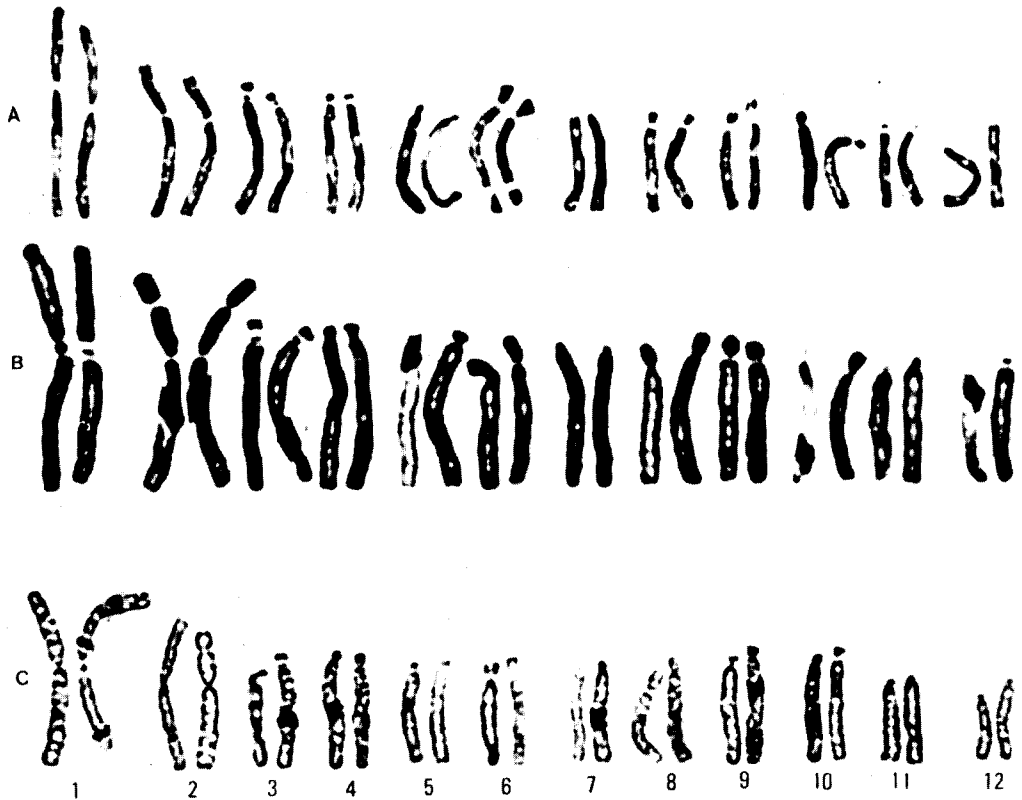


Fig.1. Metaphase chromosome in root-tips cells of the interspecific hybrids and their parents
 A; the karyotapes of *L. longiflorum* by feulgen staining.
 B; the karyotapes of *L. x elegans* by feulgen staining.
 C; the karyotypes of *L. longiflorum* x *L. x elegans* by feurigen staining.

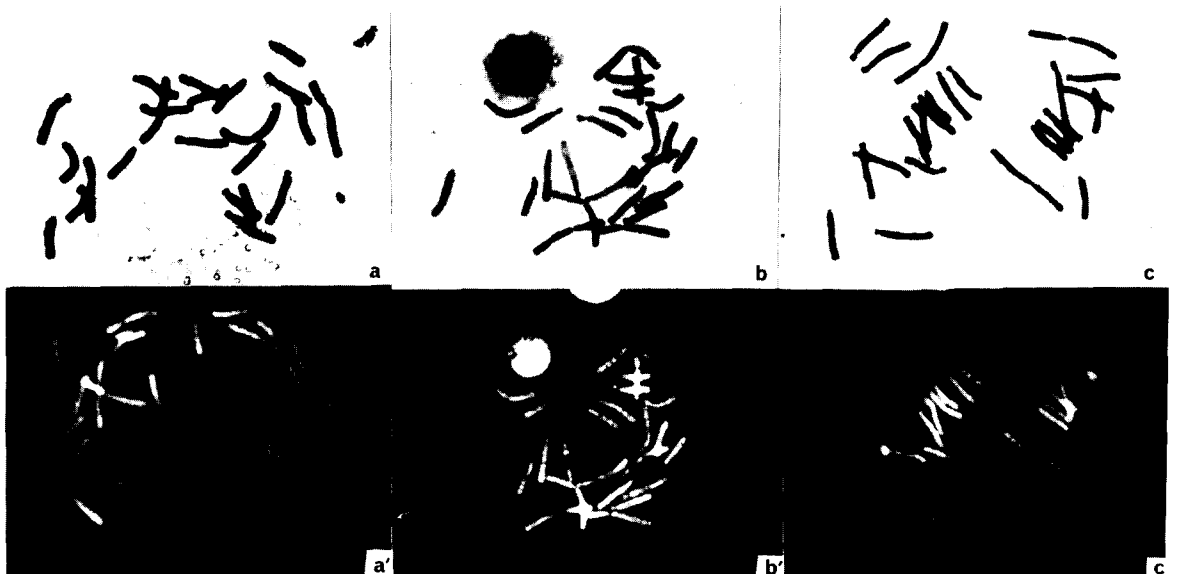


Fig.2. Metaphase chromosome in root-tip cells of the interspecific hybrids and their parents by Gimsa and Quinacurine mustard and Hoechst 33258 double staining.
 a,a'; *L. longiflorum* b,b'; hybrid of *L. longiflorum* x *L. x elegans* c,c'; *L. x elegans*

Table.1. Frequencies of univalent chromosome at M1 of PMC*

	No. of univalent chromosomes						Total
	0	2	4	6	8	10	
Observed No.	36	84	144	108	25	3	400
Average frequency	9	21	36	27	63	0.7	100

*: Georgia × Kakutanohikari

Table.2. Frequency of supernumerary chromosome fragments(SCF_s) and bridge chromosome at meiosis.

	first division			second division		
	metaphase	anaphase	telophase	metaphase	anaphase	telophase
Normal(non-SCF _s and bridge)						
observed number	300	3	154	32	114	36
frequency (%)	77.50	3	38.50	64	28.50	9.0
SCF _s only						
observed number	100	55	142	8	111	313
frequency (%)	22.5	55	35.50	16	27.75	78.25
Bridge only						
observed number		1	3	6	10	2
frequency (%)		1	0.75	12	2.50	0.50
SCF _s and bridge						
observed number		41	101	4	165	49
frequency (%)		41	25.25	8	41.25	12.25
Total	400	100	400	50	400	400

Table.3. Number of micronuclei per monad at tetrad phase of the *L. longiflorum* 'Georgia' × *L. x elegans* 'Kakutanohikari' F₁ hybrid.

	No. of micronuclei					Total
	0	1	2	3	8	
Observed No.	148	152	68	24	8	400
Average frequency	37	38	17	6	2	100

L. longiflorum (Georgia)의 泳動像은 1,2,8, 13,14番의 band가 檢出되었으나, 그중 1個體에서 3,4番의 band가 보였다. *L. x elegans* (Kakutanohikari)의 泳動像은 4,6,11,13番의 band가 檢出되었고, 그중 1個體에서 3番의 band가 보였다. 또한 *L. x elegans* (Kiyotsukou)는 全個體에서 3, 4,12,14番 band가 檢出되었다. *L. longiflorum* × *L. x elegans*의 F₁은 兩親의 全 band가 모두 檢出되었다.

α - Esterase의 泳動像은 *L. longiflorum* (Ge-

orgia) × *L. x elegans* (Asahikari)의 F₁ 20個體와 그들의 兩親을 比較하였다(圖 5,7). *L. longiflorum* 1,2,3,4,5,6,10,13,15,16番 band, *L. x elegans*는 7,8,9,14,15,16番 band가 檢出되었다. *L. longiflorum* × *L. x elegans*의 F₁은 20個體中 18番과 19番 個體를 除外하고는 全部가 약간씩 다른 type을 나타내었다. 그러나 *L. longiflorum*의 1,2,3,6,10番 band와 *L. x elegans*의 8,9番 band가 거의 全個體에서 檢出되었다.

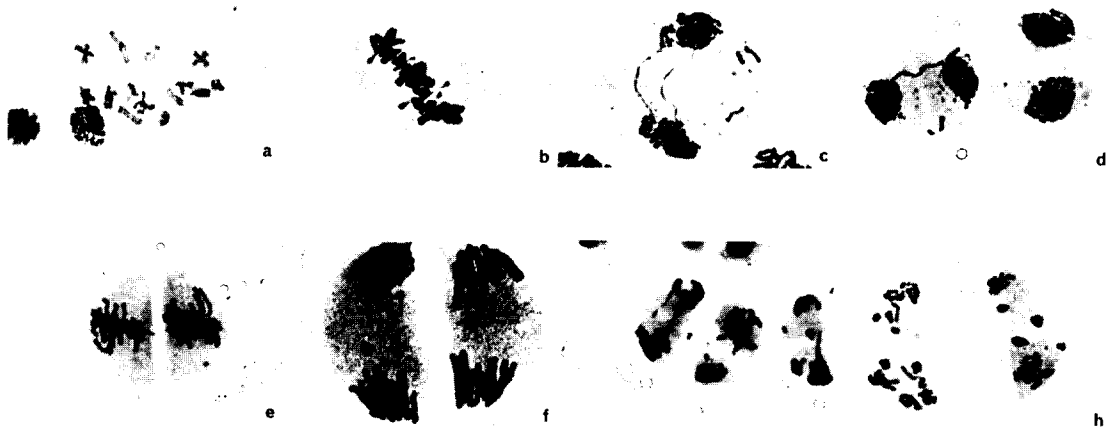


Fig 3. Abnormal meiotic division of interspecific hybrid. a:interkinesis b:first metaphase c:first anaphase d:interkinesis e;second metaphase f:second anaphase g:second telophase h:micronucleus and tetrad phase

考 察

百合屬의 野生種의 體細胞 染色體는 *L. lanciflorum* ($2n = 36$)을 除外하고는, 基本的으로 全部 $2n = 24$ 의 2倍體 (Stewart 1974)로, 種內 및 種間에 보여지는 差異는 單純히 二次狹窄의 位置變化로 區分하였다 (Ogihara 1966). 따라서, 이 二次狹窄의 位置變化를 利用하여, 交雜의 成否, 起原不明의 品種의 兩親의 決定이 行하여져 왔다 (Emsweller 等 1944, KumaZawa 等 1946). 本 研究에서도 이 方法에 의해 雜種의 核型을 調査한 結果, 모든 雜種의 核型은 兩親으로부터 一組合씩 由來한 染色體에 의해 되어 있고, 染色體의 異常 또는 形態異常은 보여지지 않았다. 또한, Q-H 染色에 의해 *L. x elegans*의 種內에서도 Akenishiki와 Kakutanohari의 banding pattern의 差가 보여졌다. *L. x elegans*의 品種은 多元交雜일 뿐 아니라, 數回의 逆交配가 行하여지고 있는 園藝雜種이기 때문에, 同一種이면서도 品種에 따라 遺傳的인 特性이 달라졌다고 생각되어진다.

Brock(1954)와 Darby(1965)에 의하면 花粉稔性의 低下는 減數分裂時의 染色體의 異常 (genome 相同性의 低下)에 의한다고 報告하였다. 本 研究에서도 成熟分裂의 第一分裂 中期의 核板에서 接合의 異常이 91%나 보여졌다. 또한 1值染色體가 10個인 細胞도 觀察된 것은, 雜種의 12對立染色體中 적어도 5對

立染色體의 接合이 貧弱한 것으로 생각되어진다.

또한, 染色體橋가 4個까지 보여진 것은 적어도 4對立染色體에서 逆位, 이어서 交差가 일어나, 이 原因에 의해 染色體橋와 SCF가 나타났다고 생각되어진다. 또한 이것이 原因이 되어 4分子期에는 觀察한 細胞의 64%에서 小核이 나타났다고 생각되어진다. 이것은 적어도 形成되어진 花粉의 64%는 不稔性이라고 생각할 수 있다. 實際로 雜種의 花粉稔성은 거의 0에 가까웠다. 그 理由는, 正常으로 보여지는 4分子도 成熟分裂의 過程에서 染色體 (遺傳子)의 分布가 均一하게 이루어지지 않았기 때문에, 不稔性으로 되었다고 보여진다. 이러한 結果는 雜種의 兩親種의 genome을 構成하는 染色體間에는 一應의 장애가 있음과 아울러, 모든 染色體가 接合하고 있는 것으로 보아, *L. longiflorum*와 *L. x elegans*의 모든 染色體는 接合이 可能하고, 또한 5對立染色體는 接合이 매우 貧弱하며, 4對立染色體에서 逆位와 交差가 일어나기 쉬운 程度의 分化를 하고 있는 것으로 考察되어진다.

Isozyme type에 있어서 *L. longiflorum* (Georgia)와 *L. x elegans* (Asahikari, Kiyotsukou, Starlingstar, Kakutanohikari)는 品種에 따라 比較的 均一한 遺傳子의 組合을 갖는 Homo로 보여진다. 특히 *L. x elegans*의 경우는 品種에 따라서 Isozyme type가 다른 點은 核型에서 品種에 따라 Q-H banding pattern에 差가 보여진 點과 一致하였다.

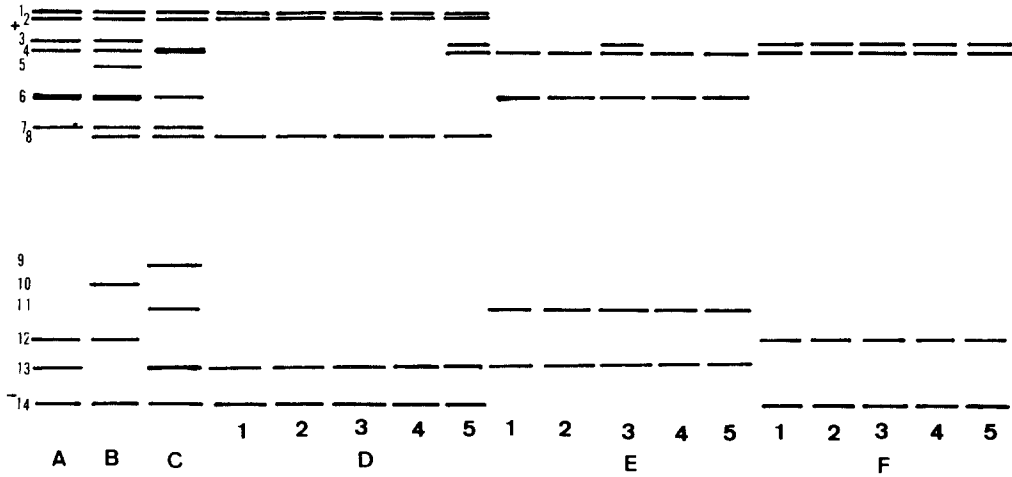


Fig 4. Electrophoretic patterns of lap in *Lilium*. A: *L. longiflorum* × *L. x elegans* (Kiyotsukou), B: *L. longiflorum* × *L. x elegans* (Starlingstar), C: *L. longiflorum* × *L. x elegans* (Kakutanohikari), D: *L. longiflorum*, E: *L. x elegans* (Kakutanohikari), F: *L. x elegans* (Starlingstar).

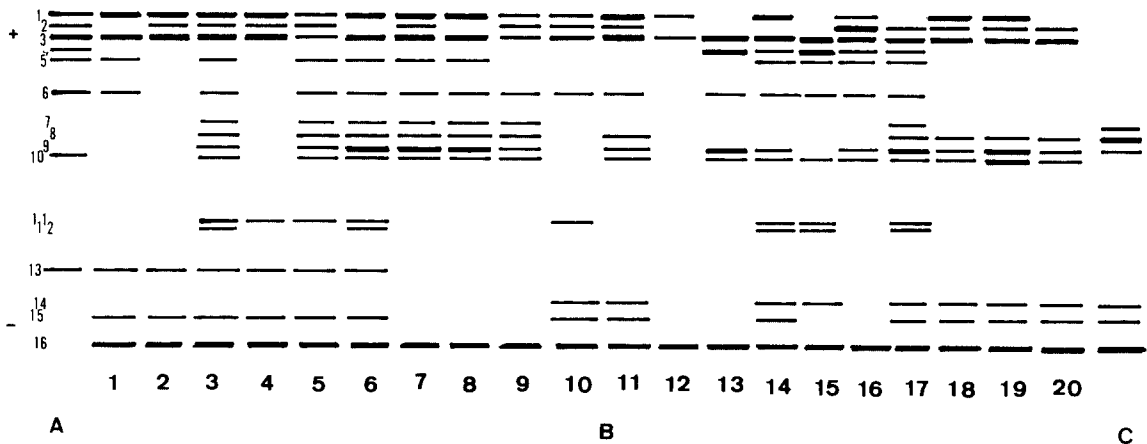


Fig 5. Electrophoretic patterns of α -esterase in *Lilium*. A: *L. longiflorum* B: *L. longiflorum* × *L. x elegans* (Asahikari), C: *L. x elegans* (Asahikari).

그러나 同一品種에 있어서는 園藝品種임에도 불구하고 遺傳的 特性이 거의 均一함이 確認되었다. 그러나 圖 5에서 보듯이 同一한 兩親으로부터 作出되어진 種間雜種에 있어서는 얻어진 20個體中, 거의 大部分의 個體의 band type가 다른 點으로 보아 種間雜種에 있

어서 相當한 遺傳子의 變異가 있었다고 보여진다. 그러나, 百合의 경우는 그 繁殖이 거의 球根에 의해 이루어지고 있는 點을 생각할 때, 多樣한 變異를 간단히 作出할 수 있다고 하는 點에서 子房培養이 百合育種의 手段으로 매우 有益하다고 생각되어진다.

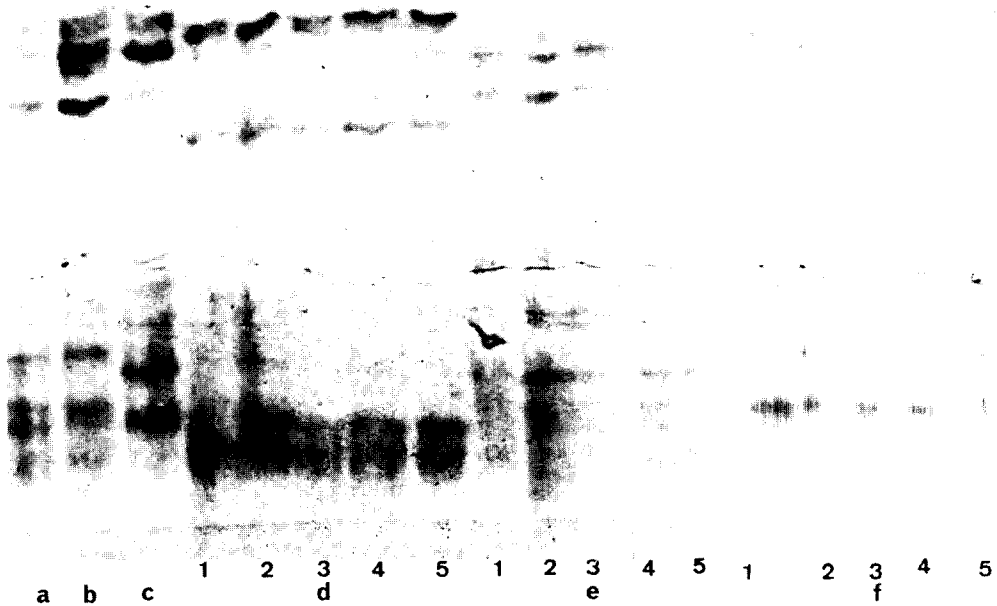


Fig 6. Electrophoretic mobilities of lap on agarose gel agamid lizards, *Lilium*. a: *L. longiflorum* × *L. x elegans* (Kiyotsukou), b: *L. longiflorum* × *L. elegans* (Starlingstar), c: *L. longiflorum* × *L. x elegans* (Kakutanohikari). d: *L. longiflorum*, e: *L. x elegans* (Kakutanohikari), e: *L. x elegans* (Starlingstar).

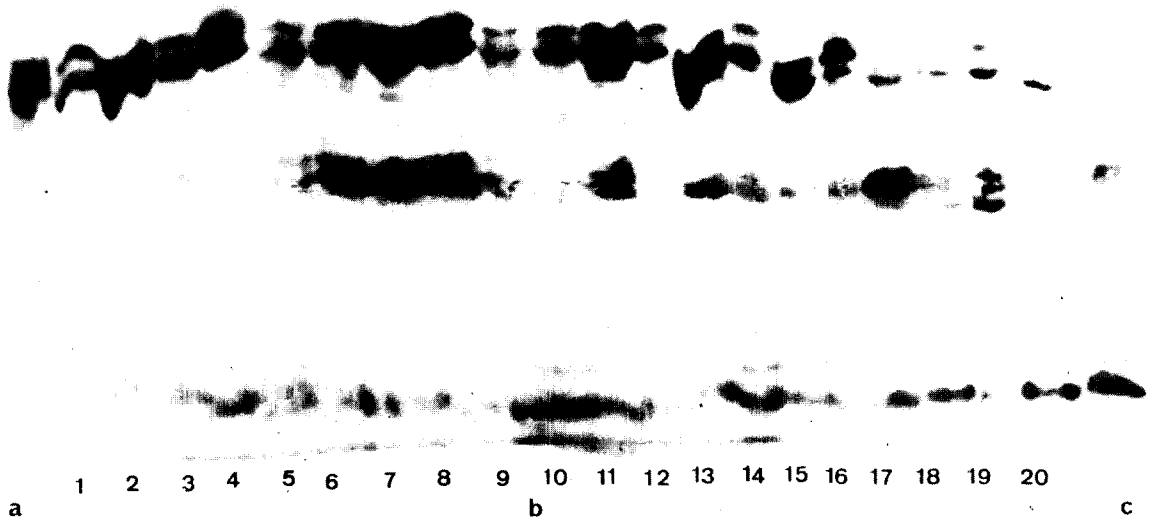


Fig 7. Electrophoretic mobilities of α -esterase on agarose gel for agamid lizards, *Lilium*. a: *L. longiflorum* b: *L. longiflorum* × *L. x elegans* (Asahikari), c: *L. x elegans* (Asahikari).

引用文献

- 浅野義人・明道 博, 1977. ユリの遠縁種間交雑に関する研究(第一報) 花柱切断授粉法による交配. 園学雑. 46:59 ~ 65.
- BROCK, R.D 1954. Spontaneous chromosome breakage in *Lilium* endosperm. Ann. Botan. 18:7 ~ 14.
- DARBY, G.W 1965. *Lilium* hybrid 'Black Beauty'. Lily Yb., R.H.S. 28:118
- EMSWELLER, S.L and M.B. STEWART 1944. The origin of *Lilium testaceum*. Jour. Heredity. 35:301 ~ 308.
- ENDO, T 1972. Application of the nadi` reaction to rice-peroxidase isozyme stain. Bot. Mag. Tokyo. 85:147 ~ 151.
- 態沢・木村 1946. ユリ属の染色体研究(第一報) 生物 1:73 ~ 84.
- HAYASHI, M., K.KANO, Y., SERIZAWA and E.YOON 1986. Ovary slice culture of *Lilium formasanum* Wallace. Japan. J. Breed. 36:304 ~ 308.
- OGIHARA, R. 1966. Intraspecies variation of karyotype in natural population of *Lilium japonicum* the izu peninsula. La karomosomo. 66:2135 ~ 2144.
- SARVIS, C.A., M.O BRIEN and N.ZAMCHEK 1979. Direct tissue isoelectric focusing in agarose. J. Immunol. Methods 29:97 ~ 100
- STEWART, R.N 1947. The morphology of somatic chromosome in *Lilium*. Amer. J. Bot. 34:9 ~ 26.
- WILL, A.B 1970. Verification of new lily species hybrids by chromosome examination lily Yb. R.H.S. 33:174 ~ 177.
- YOSHIDA, M.C., T.IKEUCHI and M.SASAKI 1975. Defferental staining of parental chromosome in interspecific cell hybrid with a combind quinacrine and 33258 Hoechst technique. Proc. Japan Acad. 51:184 ~ 187.
- YOON, E and H.HAYASHI 1988. *In vivo* and *in vitro* development of interspecific hybrid ovules of *Lilium longiflorum* x *L. x elegans* in ovary slice culture, plant cell, tissue and organ culture. 1988-071.
- YOON, E., E.HAYASHI and Y.SERIZAWA 1988. Development of embryos of *Lilium* interspecific hybrids in ovary slice culture. Plant cell, tissue and organ culture. 1988-072.