

*Nicotiana tabacum*과 *N. rustica* 체세포 잡종식물의 육성

최상주, 이승철*, 홍병희**

한국인삼연초연구원 수원시험장, 한국인삼연초연구원 대구시험장*, 고려대학교**

Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum* through protoplast fusion

S.J. Choi, S.C. Lee*, and B.H. Hong**

Suwon Experiment Station, Korea Ginseng & Tobacco Res. Insti.

Daegu Experiment Station, Korea Ginseng & Tobacco Res. Insti*.

Dept. of Agronomy, Korea University**

ABSTRACT : Mesophyll protoplasts derived from young leaves of *Nicotiana rustica* and *N. tabacum* cv Burley 21 were fused with the aid of polyethylene glycol(PEG). Cytological examination of protoplasts after PEG treatment revealed 12.8% heterokaryocytes. After 7 weeks culture, the hybrid calli showing greenish white with a compact appearance were selected in contrast to parental type calli tinged with white or green color. The somatic hybrid plants were verified by morphological, biochemical and cytological analysis. A heterosis effect for plant vigor and height was observed but the shape of leaves and flower characteristics were intermediate between *N. tabacum* and *N. rustica*. The isozyme banding patterns for peroxidase of somatic hybrid lines were compared with the parent species. A number of isozyme bands derived from both parental species were found in the hybrids. Somatic hybrid plants have been successfully backcrossed to the parental *N. tabacum*, particularly with somatic hybrid plants as female parents. These hybrid plants yielded small seeds, only few which were germinable.

서 론

지난 80여년간 주요작물의 개량은 대부분 동일종 내의 품종 또는 계통들간의 교잡육종으로 이루어져 왔으나 점차 이용할 수 있는 유전적 변이가 고갈되어 가고 있어¹⁾ 유전자원의 확대를 위하여 이, 종속간의 교잡이 많은 육종가들에 의해서 시도되었다²⁾. 그러나 이, 종속간 교잡에 있어서 교잡이 저해되는 원인은 여러가지가 있어서 이를 타파할 수 있는 방법이 사용되어지고 있는데 이중 세포융합은 이 종속간 교

잡불화합성을 타파하는 생물학적 기법으로 많이 이용되어지고 있다. 세포벽이 없는 세포인 원형질체는 세포간 융합에 의해 다핵세포가 될 수 있는 성질을 갖고 있는데, 세포융합에는 나출 원형질체간 스스로 융합이 일어나는 자발적 융합³⁾과 화학약품처리⁴⁾에 의한 인위적 융합으로 구분된다. 인위적 융합은 1909년 Kuster⁵⁾가 보고한 이후 1972년 Carlson 등이 세포융합 산물로 부터 잡종세포를 얻어냈지만 이 방법은 융합율이 대단히 낮은 것으로 알려져 있다. 그후 Keller와 Melchers⁶⁾는 담배 엽육 원형질체에서 high

pH-high Ca^{2+} 의 조건하에서 처리하면 세포융합이 일어난다고 보고한 이후로 PEG방법이 세포융합에 많이 사용되고 있다. 또한 이 방법은 인공교배가 불가능한 조합에도 이용되고 있는데 Melchers 등¹⁶⁾은 융합원형질체를 배양해서 최초로 속간잡종 식물을 얻는데 성공 하였다. Schieder²³⁾는 *Datura* 속간에서 Nagao¹⁸⁾ 및 Maliga 등¹⁵⁾도 교배가 불가능한 *Nicotiana* 속의 종간에 세포융합으로 잡종식물을 육성하였다. Carlson 등이 세포융합에 의한 종간잡종을 처음으로 육성한 이후 세포융합에 의한 체세포잡종은 여러 식물에서 육성되었다.^{4, 7)}

Belliard 등³⁾은 담배의 입성계통과 응성불입계통의 융합후대부터 입성계통에 가까운 응성불입개체를 얻을 수 있다고 하였는데 이 방법을 이용하여 *Cruciferae*속간 세포융합으로 응성불입계통이 육성되었으며²⁰⁾, 세포질 잡종이 *Nicotiana* 속에서도 육성되었다.¹³⁾

세포융합에 의해 육성된 체세포 잡종식물의 형질적 특성을 보면 그 변이가 인공교배에서 볼 수 없는 특성을 나타낸다고 한다. 그러나 인공교배가 불가능한 조합에서는 체세포 잡종의 다양한 변이는 품종 개량면에서 의의가 크다고 볼 수 있다. 따라서 본 연구는 종간교잡이 완전하지 못한 *Nicotiana rustica*와 *N. tabacum* 간에 나출된 원형질체를 융합하여 육성된 잡종식물의 특성을 구명코자 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료는 *Nicotiana tabacum*의 white gene을 가진 Burley 21과 유병이고 경과 엽의 색이 짙은 녹색을 지닌 *N. rustica*를 사용하였다.

원형질체의 나출은 온실에서 파종후 65일된 식물의 엽을 채취하여 Nagao¹⁸⁾와 같은 방법으로 원형질체를 나출 하였으며 원형질체 융합은 *N. tabacum*과 *N. rustica*의 원형질체를 동일한 양으로 혼합하여 그 밀도가 1×10^5 cells/ml 일때 6cm plastic 사래에 0.2ml씩 6방울을 적하하여 5분간 방치한 후 PEG액 [33% (W/V) PEG 1540, 10.5mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 및 0.7mM KH_2PO_4 , pH 5.9]을 원형질체 주변부에 적하하였다. 10분 후에 10배량의 세척액 I [0.1M glycine - NaOH buffer, 10mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.4M glucose, pH 10.6]을 첨가하여 20분간 방치한 후 세척액 II [240mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.4M glucose]로 5회 세척한 다음 이어서 NT 배양액¹⁹⁾으로 3회 세척하였으며 그 후 현미경으로 융

합된 세포를 조사하였다.

융합세포 배양과 식물체의 재분화는 융합처리된 원형질체를 NT 액체 배지¹⁹⁾에서 배양하였으며 배양조건은 온도 25°C, 16시간 조명하에서 배양초기에는 47 ft-c에서 그 후는 186 ft-c에서 배양하였다. Colony의 크기가 1-2mm가 되었을 때 mannitol이 첨가되지 않고 sucrose 농도가 30g/l인 NT의 교체 배지에 배양하여 colony가 0.5-1.0cm 자랐을 때 NAA (1.0mg/l)와 BA(2.0mg/l), IAA(4.5mg/l)와 Kinetin (2.0mg/l)이 함유된 MS배지¹⁷⁾에 치상하여 경엽을 분화시켰다. 경엽이 분화된 식물은 IAA(1.0 ppm)와 Kinetin(0.3 ppm)이 함유된 MS배지에서 발근시켰다. 잡종식물의 형태적 특성은 개화기때 조사하였으며 화분의 활성도는 aceto-carminie 염색법⁵⁾으로 검경하여 조사하였다.

Peroxidase 동위효소의 형태는 Sheen과 Calvert²⁴⁾의 방법에 따라 7% acrylamide gel에 tube당 15ml의 시료를 넣었으며 0.1M Tris - Aminomethane - Borate(pH 8.9)를 사용하여 5mA/tube로 3시간 동안 전기영동을 시켰다. Gel의 염색은 benzidine 용액 (benzidine 1g, acetic acid 9ml, 증류수 40ml) 10ml에 0.9% H_2O_2 10ml와 증류수 40ml를 혼합한 용액에서 3분간 발색반응을 일으켰다. Band가 나타난 gel은 5% acetic acid에 세척한 후 5% acetic acid액에 보관하면서 사진을 촬영하였다.

결과 및 고찰

식물세포의 원형질체를 이용한 세포융합법은 교잡 불가능한 식물간에 잡종을 육성⁷⁾할 수 있을뿐 아니라 동시에 세포질 잡종을 육성할 수 있는 점도 큰 특징의 하나이다¹³⁾. 따라서 본 시험에 있어서도 교잡불화합성 조합인 *N. tabacum* cv. Burley 21과 *N. rustica*의 엽육 원형질체를 세포융합으로 불화합성을 타파하고자 PEG와 high pH/high Ca^{2+} 방법으로 처리한 결과는 표 1과 같다. *N. tabacum* cv. Burley 21과 *N. rustica*간의 세포융합은 현미경하에서 조사하였는데 *N. tabacum* cv. Burley 21의 원형질체와 *N. rustica*의 원형질체 두개만 융합된 [그림 1 - (A)] 융합율은 12.8%를 나타냈다. *N. rustica*의 원형질체와 *N. tabacum* cv. Burley 21의 원형질체는 그 크기나 엽육체의 차이에 의해서 구별이 가능한 종으로 융합세포와도 구별이 가능하였다.

Kao 등¹⁰⁾도 융합제인 PEG를 세척할 때 high pH

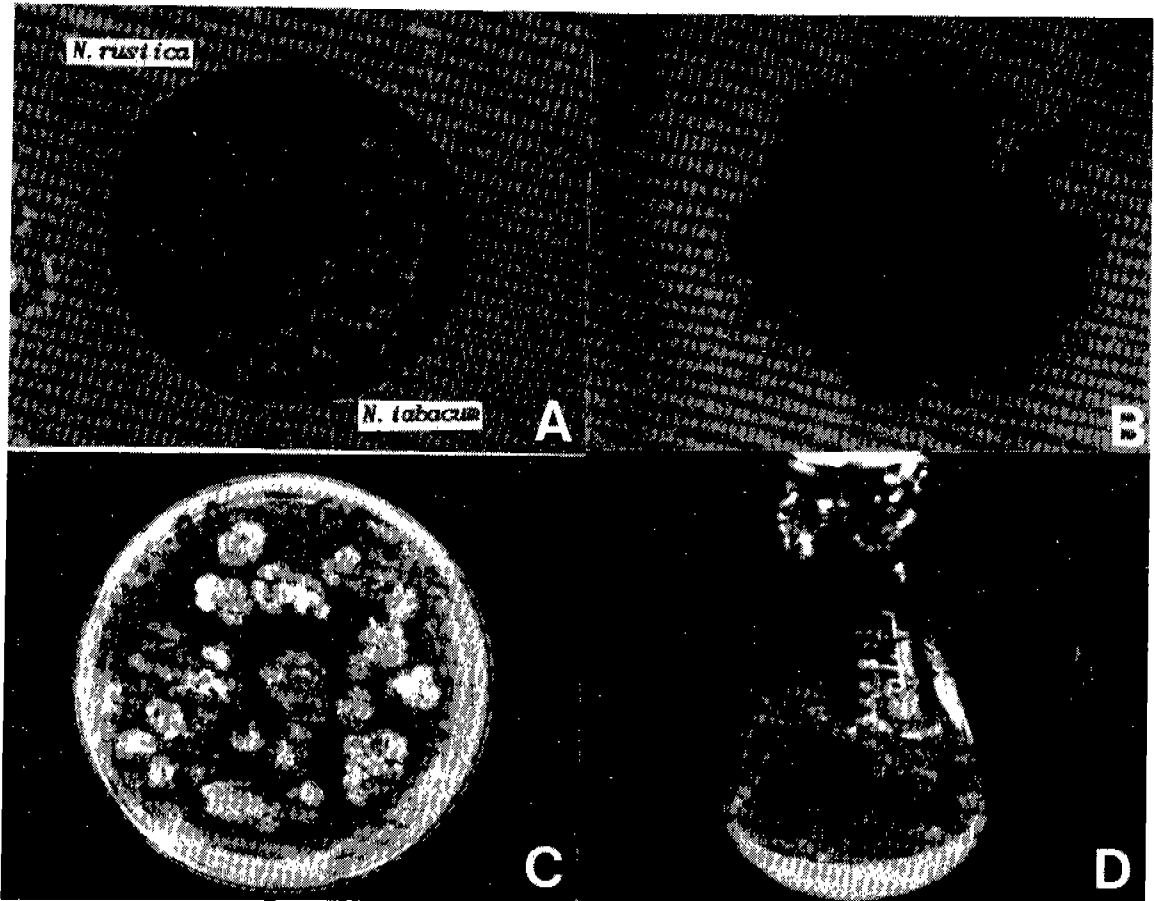


Fig. 1. Callus formation and redifferentiation of the fused cells derived from *N. tabacum* cv. Burley 21 and *N. rustica*
 (A) A fused protoplast
 (B) Callus formation 4 weeks after culturing
 (C) Colony formation 9 weeks after culturing
 (D) Shoot regeneration from the colonies

/high Ca^{2+} 액을 사용하면 융합율을 더 높일 수 있다고 하였는데 본 시험의 결과도 일치되는 경향을 보여 주었다. 세포융합시 PEG와 high pH/high Ca^{2+} 방법은 여러 연구자들의 보고⁷⁾에도 잘 나타나 있으며 가장 많이 이용되어 지고 있다.

융합제를 처리할 경우 30분간 처리시에 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었으며 처리시간이 짧으면 집합 현상만 보이고 융합율은 낮은 경향이였다. 또한 처리 시간을 장시간 하면 다수의 원형질체의 융합빈도가 높게 되어 거대한 세포출현을 관찰할 수 있었다. 따라서 2종을 융합할 경우에 나출한 원형질체는 건전한

원형질체를 사용하여야 하며 융합제 처리농도와 처리시간이 융합세포의 효율에 큰 영향을 미치는 것으로 보였다.

융합처리후 융합된 원형질체들은 NT 액체 배지에 접종하면 융합안된 원형질체와 동일하게 세포벽이 재생되어 접종 5일후 부터는 1차 세포분열이 시작되었다. 그 후 세포분열이 계속 이루어져 colony가 증식 [그림 1-(B)]되었는데 이를 더욱 촉진시키기 위하여 새로운 NT 배지를 샐레에 주입시켰으며 배양후 6일째에는 미세한 colony를 NT 고체 배지에 접종시켜 증식시켰다.

Table 1. Frequency of heterokaryocyte formation (or rate of fusion) of *N. rustica*+*N.tabacum* cv. Burley 21.

Total protoplasts	Heterokaryocytes	Homokaryocytes
156	20(12.8)	8(5.1)

() : Percentage to total.

융합세포선발은 융합세포가 직경 4-8mm 크기의 colony로 증식되었을때 [그림 1-(C)] 선발하였는데 융합되지 않은 callus는 잡종 callus와 구별이 가능하였다. 즉 *N. tabacum*의 callus는 중앙부가 황갈색이며 주변부가 백색을 띤 단단한 callus이었고 *N. rustica*는 농록색의 연한 callus의 모양을 보였다. 그러나 잡종 callus는 양종의 callus 형질을 갖는 녹색의 약간 단단한 모양의 callus 였다.

본 시험에 있어서는 공시재료의 특수성으로 비추어 특정배지상에서 callus의 색상과 분화능력에 의해 선발을 행하였다. Callus로 부터 식물체 재분화는 *N. tabacum* cv. Burley 21를 한천 배지상에 접종하면 왕성한 경엽분화 현상을 볼 수 있었지만 *N. rustica*는 타종과 달리 callus의 재분화 능력은 어려운 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 이들이 융합된 잡종 callus는 일정한 식물호르몬이 조성된 배지에서만 재분화 능력을 볼 수 있는데 일반적으로 잡종세포의 callus로 부터 재분화되는 식물체 [그림 1-(D)]는 *N. rustica*와 동일하게 줄기색이 연한 녹색을 띠고 있어서 타종의 유식물과 형태적인 식별이 가능하였다.

잡종식물의 근분화 능력에 있어서도 *N. rustica*가 *N. tabacum*에 비하여 잘 분화되지 않는 특성을 갖고 있으며^{6, 17)}, Nagao¹⁸⁾는 RM 1964 배지(1/2무기염류)에 IAA 0.02%를 첨가하여 근을 분화시켰다고 하였지만

유식물을 이 배지에서 근 분화시켰을때 고사하는 현상을 관찰할 수 있었다. 따라서 8-11매에 도달한 유식물을 근 분화배지에서 분화시켰을 때 그 피해를 감소시킬 수 있었다. 종속간 융합세포로부터 육성된 잡종 유식물의 근분화는 조합별로 차이는 있지만 어려운 것으로 알려져 있으며^{1, 15, 16, 25)} 근분화가 이루어지지 않은 조합의 잡종식물은 교배친에 삼목하여 성공한 바있다^{16, 25)}.

따라서 본 시험에 있어서도 잡종 유식물의 근분화는 식물호르몬을 달리한 배지상에서 시험한 바 IAA (2.0mg/l)와 BA(0.5mg/l)가 조성된 MS 고체 배지에서 근분화를 이룰 수 있었다.

N. tabacum cv. Burley 21과 *N. rustica*의 세포융합에 의해 육성된 잡종식물의 특성은 표 2와 같다. 융합세포의 callus로 부터 분화된 식물은 정상외의 형태를 나타낸 잡종식물이었고 생육도 매우 왕성하였으며 잡종강세를 나타낸 초장은 *N. rustica*나 *N. tabacum* cv. Burley 21에 비하여 컸으나 [그림 5] 기형인 잡종식물은 전반적으로 생육이 지연되는 경향을 보였다. 지상엽수는 양종의 중간형태를 나타냈지만 엽병은 *N. rustica*와 같이 유병종으로 긴편이었고 [그림 3] 화기의 형태는 양종의 중간 형태를 나타냈으며 [그림 2] 화색은 양종의 중간색이었으나 엽색은 *N. rustica*와 같이 농록색이었다. 형태적으로 정상적인 형태를 보인 잡종식물은 화분의 활성이 비교적 높았고 일부 결실된 종자의 발아율도 양호하였으나 잡종식물의 종자크기는 *N. tabacum* cv. Burley 21보다는 크고 *N. rustica*와 유사하였다.

잡종식물의 초장이 잡종강세를 나타낸 것은 타연구자^{6, 18)}의 보고와 일치하는 경향이었으며, 기타 형태적 특성에 있어서도 잡종식물이 양종의 중간적 특성을 갖고 있는 것도 타 연구자의 보고와 일치하는 경향이었다^{9, 15, 16)}. 대부분 잡종식물은 중간 형태의

Table 2. Comparison of morphological characteristics of *N. rustica*+*N.tabacum* somatic hybrid plants with the two parental species.

Plant	Plant height (cm)	No. of leaves per plant	Corolla		Sepal Length (cm)	Pollen viability (%)
			Length (cm)	Width (cm)		
<i>N. rustica</i>	84	15.0	1.8	1.8	1.1	96
<i>N. tabacum</i>	109	26.2	5.0	2.6	1.9	98
<i>N. rustica</i> + <i>N.tabacum</i> (somatic hybrids)	122	17.8	3.7	2.4	1.7	34

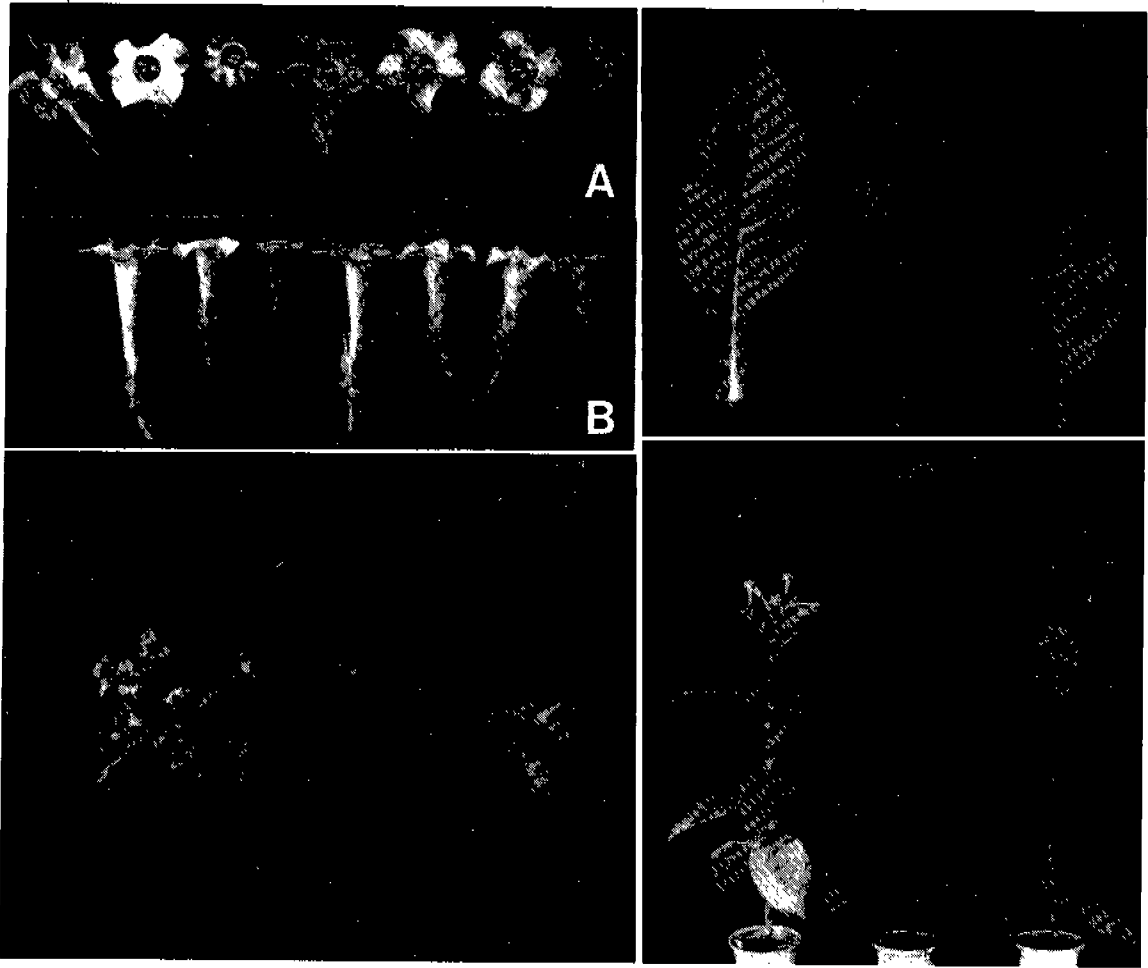


Fig. 2. (A) and (B). Comparison of flowers of somatic hybrids and those of sexual hybrids derived from the combination of *N. rustica* and *N. tabacum*.

From left to right : *N. tabacum*, sexual hybrids, *N. rustica*, *N. tabacum*, somatic hybrid, somatic hybrid, *N. rustica*.

Fig. 3. Somatic hybrid exhibiting morphologically different leaves *N. tabacum*(left), *N.rustica*(right), somatic hybrid(centre)

Fig. 4. Self-fertilized seeds attained in part from the somatic hybrid line.

Fig. 5. Height comparison of somatic hybrid with the parental species, *N. tabacum*(left), Somatic hybrid (centre), *N. rustica*(right)

Table 3. Fertility and seed germination in backcross generations of somatic hybrid (*N. rustica*+*N.tabacum*) with *N. tabacum*

Cross combination	Total no. crosses	No. capsule setting seed	Percent of capsule setting seed	Germination
			(%)	(%)
<i>(N. rustica</i> + <i>N. tabacum</i>) F_2 × <i>N. tabacum</i>	121	115	95.0	17.0
<i>N. rustica</i> + <i>(N. rustica</i> + <i>N. tabacum</i>) F_2	134	121	90.3	0

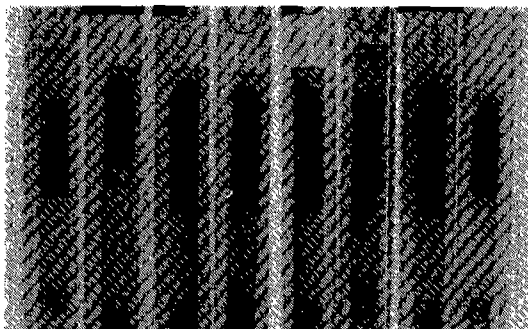


Fig. 6. Peroxidase isoenzymes in leaf extracts of hybrids and parental plants. Samples were run from *N. tabacum*(1), *N. rustica*(2) and the somatic hybrids(3-8).

특성을 갖고 있으나 그 범위가 광범위한 것으로 알려져 있는데 이와 같은 형태적 변이성은 성적 불화합성인 원연간 식물에서 더욱 현저하다고 한다²⁾.

잡종식물의 peroxidase isozyme pattern을 조사한 결과는 그림 6과 같다. 융합된 세포로부터 재분화된 잡종식물의 band는 양종과 같이 상하위 2 group으로 나타났고 band의 수에 있어서는 하위부에 나타는 band의 수는 양종과 같게 나타났으나 상위부에 나타난 band는 양종의 band가 합하여진 수를 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 볼때 peroxidase isozyme pattern은 잡종식물의 판별에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 고찰되었다.

체세포잡종 식물은 *N. tabacum*을 부분으로 하여 여교배 [표 3]했을때 잡종식물을 얻을 수 있었으며 *N. tabacum*을 모본으로 여교배했을 때에는 체세포율은 90.3%였으나 발아는 전혀 되지 않았다. 따라서 목적인 형질을 야생종으로부터 도입된 잡종식물의 임실율을 증가시키기 위해서는 *N. tabacum*을 부분으로 하여 계속 여교배 해야할 것으로 보인다.

결 론

N. tabacum cv. Burley 21과 *N. rustica*의 엽육세포에서 나출된 원형질체를 PEG로 융합처리하여 얻은 잡종식물의 특성은 다음과 같다.

두종간의 융합율은 12.8%로 나타났으며, 잡종식물은 양친에 비하여 초세가 매우 왕성하였고 꽃의 형태 및 화색은 양친의 중간형을 보였다. 체세포 잡종 엽조직의 peroxidase isozyme pattern은 양친의 pattern 특성을 함께 나타내고 있었다. 잡종식물과 *N.*

*tabacum*간의 여교배에 있어서는 *N. tabacum*을 화분친으로 이용할 경우에만 소량의 종자를 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. Bates, G.W., Theor. Appl. Genet. 80 : 481 - 487 (1990)
2. Banks, M.S., and P.K. Evans. Plant Sci. Lett. 7 : 409 - 416(1976)
3. Belliard, G., G. Pelletier, F. Vedel, and F. Quetier. Mol. Gen. Genet. 165 : 231 - 238 (1978)
4. Bui, P.T., A.E. Jennis, S.M. Schneider, and M.E. Daub. Phytopathology 82 : 1305 - 1310(1992)
5. Collins, G.B. U.S.D.A. Techn. Bull. No. 1586 p. 20(1979)
6. Douglas, G.C., L.R. Wetter, W.A. Keller, and G. Setterfield. Can. J. Bot. 59 : 208 - 219 (1981)
7. Gleba, Y.Y., and K.M. Sytnik. Protoplast fusion and parasexual hybridization of higher plants. Springer - Verlag Berlin Heidelberg New York, Tokyo. pp. 36 - 62(1984)
8. Hadley, H.H., and S.J. Openshaw. Am. Soc. of Auto Madison. pp. 133 - 159(1980)
9. Kanta, K., and P. Maheshwari. Phytomorphol. 13 : 215 - 229(1963a)
10. Kao, K.N., F. Constabel, M.R. Michayluk, and O.L. Gamborg. Planta. 120 : 215 - 227(1974)
11. Kao, K.N., and M.R. Michayluk. Planta. 115 : 335 - 367 (1974)
12. Keller, W.A., and G. Melchers. Z. Pflanzenphysiol. 28C : 737 - 741 (1973)
13. Kumashiro, T., and T. Kubo. Japan. J. Breed. 36 : 39 - 48(1986)
14. Kuster, E. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 27 : 589 - 598 (1909)
15. Maliga, P., Z.R. Kiss, A.H. Nagy, and G. Lazar. Mol. Gen. Genet. 163 : 145 - 151 (1978)
16. Melchers, G., M.D. Sacristan, and A.A. Holder. Carlsberg Res. Commun. 43 : 203 - 218 (1978)
17. Murashige, T., and F. Skoog. Physiol. Plant. 15 : 473 - 497 (1962)
18. Nagao, T. Jpn. J. Crop. Sci. 47 : 491 - 498(1978)

19. Nagata, T., and I. Takebe. *Planta*. 99 : 12 - 20 (1971)
20. Pelletier, G., C. Primard, F. Vedel, P. Chetrit, R. Remy, P. Rousselle, and M. Renard. *Mol. Gen. Genet.* 191 : 244 - 250(1983)
21. Sanchez - Monge, E., and F. Garcia - Olmedo. Proc. of the 8th congress of EUCARPIA, Madrid. pp. 407(1978)
22. Schieder, O. *Mol. Gen. Genet.* 149 : 251 - 254 (1976)
23. Schieder, O. *Mol. Gen. Genet.* 162 : 113 - 119 (1978a)
24. Sheen, S.T., and Calvert, J. *Plant. Physiol.* 44 : 199 - 204(1969)
25. Smith, H.H., K.N. Kao, and N.C. Combatti. *J. Hered.* 67 : 123 - 128(1976)