

연초(*Nicotiana tabacum* L.) 세포질 웅성불임 F₁과 *Nicotiana africana*의 종간 교배에 의한 반수체 식물의 특성

정윤화* · 김완수* · 조명조*

Characteristics of Haploid Plants Derived from Interspecific Cross between Cytoplasmic Male-sterile Tobacco F₁(*Nicotiana tabacum*) and *Nicotiana africana*

Yun Hwa Chung*, Wan Soo Keum* and Myung Cho Cho*

ABSTRACT : This study was conducted to investigate the utility and agronomic characteristics and use of cytoplasmic male-sterile (CMS) haploid plants derived from interspecific cross between (male-sterile NC82 × burley21) F₁ plant (*Nicotiana tabacum* L.) and *Nicotiana africana*. Abundant seeds of high germinability were obtained when *Nicotiana tabacum* (cytoplasmic male-sterile F₁ plants) is pollinated by *Nicotiana africana*. Most of seedlings died at the cotyledonary stage. The remaining seedlings are viable F₁ hybrids or maternal haploids that can be easily distinguished. Number of interspecific F₁ hybrids and maternal haploids per capsule obtained from the interspecific cross between cytoplasmic male-sterile tobacco F₁ plants and *N. africana* yielded 2.2 and 0.5 plants, respectively. Out of 149 CMS haploid plants obtained from interspecific cross, 102 plants showed green type while the others were yellow type for leaf and stem. This results agreed with the genetic ratios expected among haploid plants from the F₁ hybrids heterozygous for two recessive genes of yellow color of burley tobacco plant. Out of 83 CMS haploid plants inoculated with TMV, 48 plants showed resistant, while the others was susceptible. It agreed with the expected genetic ratios for a single dominant gene of TMV resistance. CMS haploid plant will be useful as a source material for breeding of CMS doubled haploid lines

Key words : Cytoplasmic male-sterile, Interspecific cross, *Nicotiana africana*, Maternal haploid.

많은 작물에 있어서 웅성불임은 F₁ 종자생산에 경제적이고 효과적으로 이용되고 있다. 연초는 자식성 작물로서 F₁ 종자를 생산하기 위해서는 제웅 조작과 인공교배가 필요하다. 제웅조작이 완전하지 못했을 경우에는 자식종자의 혼입으로 유전적으로 균일한 F₁ 종자를 얻을 수 없다. 그러므로,

대량의 균일한 종자를 얻기 위해서 웅성불임의 이용은 제웅에 소요되는 노력을 절감할 수 있고 자식으로 인한 종자 혼입을 막을 수 있다.

연초의 세포질 웅성불임은 East¹⁰⁾가 (*N. langsdorffii* × *N. sanderae*) × *N. sanderae*의 교잡에서 일부개체가 *N. langsdorffii*의 세포질에 의

* 한국인삼연초연구원 수원시험장(Suwon Exp. Sta., Korea Ginseng & Tobacco Res. Inst. P.O.Box 59, Suwon 440-600, Korea) <'95. 8. 3 接受>

한 웅성불임 개체가 나타난 것이 시초이며, 그 후 Clayton이 중간교배로 *N. tabacum*의 핵을 *N. denaeyi*와 *N. megalosiphon*의 세포질에 도입하여 웅성불임 *N. tabacum*이 육성되었다. 이러한 중간교배로 현재 10여종의 이종세포질에 의한 웅성불임 *N. tabacum*이 육성되었다^{3,6,2,4,6,8,17,20,22}).

웅성불임은 이종의 세포질과 핵내유전자의 상호작용에 의하여 나타나며²⁰ 핵내에 임성회복인자가 도입되지 않는한 세포질을 통하여 후대에 웅성불임은 계속 유지되어진다. 일단 중간교배으로 *N. tabacum*의 웅성불임이 육성되면 여교배에 의하여 *N. tabacum* 종내의 다른 품종에 세포질적 웅성불임계통이 쉽게 육성된다.

이들 웅성불임의 육성은 같은 종류내 여교배에 있어서는 여교배 회수가 많지 않아도 되나 종류가 다른 품종간의 여교배로 웅성불임 isogenic 계통을 육성할 때는 분리세대에서 여러번의 선발과 여교배를 해야 되기 때문에 많은 시간이 소요된다.

반수체육종법은 여러 작물에서 세대축진을 위하여 많이 이용되고 있으며 연초에 있어서 반수체 식물은 약배양³⁾, 화분배양¹⁸⁾ 및 중간교배⁵⁾에 의하여 얻을 수 있다. 그러나 약배양과 화분배양에 의한 반수체 식물의 육성은 임성인 개체에서만 가능하며 *N. africana*를 이용한 반수체 육성은 공시 식물체의 수술과 관계없이 반수체 식물을 육성할 수 있으므로 이 방법은 세포질 웅성불임 isogenic 계통의 조기 육성이 가능하다. 연초의 반수체세대에서 선발은 질적으로 유전되는 일부병해 저항성에 대해서 주로 이루어졌으나^{7,19)} 최근 Wither-spoon과 Wernsman²⁴⁾은 반수체 세대에서 수량, 엽수, 전알칼로이드 함량 및 초장 등의 형질이 이배체와 고도의 유의성이 인정되어 이들 형질은 반수체세대에서 선발이 가능하다고 하였다. 따라서 본 시험은 황색종 연초의 세포질적 웅성불임 NC82와 버어리종인 Burley21을 교배시켜 얻은 F₁ 식물체에 *N. africana*와의 중간 교배로 웅성불임 isogenic Burley 21을 조기에 육성하기 위하여 수행하였던 바 몇 가지 얻은 결과를 보고하고자 한다.

材料 및 方法

공시재료는 *Nicotiana debneyi*에서 유래된 세포질 웅성불임 NC82(BC₈), 버어리종인 Burley 21 그리고 *N. africana*를 사용하였다. 이들 공시재료 중 NC82는 우리나라 황색종 연초의 주품종으로 재배되는 품종이며 앞으로 황색종 F₁ 잡종자 생산을 위하여 교배모본으로 이용하기 위하여 웅성불임 NC82를 육성한 것이고, Burley 21은 우리나라 버어리종 산지의 주품종으로 이 품종의 특성은 잎과 줄기의 색이 Yellow이고 TMV에 저항성이며 *N. debneyi*에서 유래된 세포질 웅성불임성이 도입되지 않았다. 따라서 황색종 NC82의 성불임성을 Burley 21에 도입하기 위하여 이들 품종을 공시재료로 이용하였다. *N. africana*는 *N. tabacum*과 중간교배시 부분으로 사용되며 *N. tabacum*의 반수체를 육성하는 종으로 알려져 있다⁵⁾.

웅성불임 F₁을 육성하기 위하여 교배모본인 웅성불임 NC82와 Burley 21은 1994년 2월 20일 파종하여 4월 18일 개량 말칭 재배로 포장에 이식하였으며 인공교배는 6월 하순에 하였다. F₁식물의 육성은 교배된 종자를 7월 22일 파종하여 9월 20일 pot에 이식하였다. 세포질 웅성불임 반수체 식물을 육성하기 위하여 F₁식물의 개화기때 *N. africana*와 중간교배하였다. 중간교배하여 얻은 종자는 pot에 파종하여 파종 후 50일 경에 Burk 등의 방법⁵⁾에 의하여 반수체와 잡종식물을 판별하였다. 반수체 식물과 잡종식물체의 공변세포의 크기 및 공변세포내의 엽록체 수는 Kumashiro와 Hata¹⁴⁾의 방법에 의하여 조사하였고 반수체 식물의 染色體數의 檢鏡은 根端細胞를 採取, 0.004M hydroxyquinoline 용액에 4시간 전처리한 후 90% ethanol과 glacial acetic acid 3 : 1(v/v)액에 24~48시간 고정하고 물로 세척한 후 58℃의 1N HCl 용액에 8분간 가수분해한 다음 Schiff's 시약²³⁾ 및 acetocarmine으로 염색하여 검경하였다. 반수체 식물중 잎과 줄기의 색상이 green과 yellow인 것의 판별은 육안으로 하였으며 yellow인 반수체에 대한 담배모자이크 바이러스 검

정은 이병엽 1g당 완충용액 (phosphate buffer 0.01M, pH 7) 20ml의 비율로 막자사발에서 분쇄한 후 착즙한 액을 carborandum 도말법¹⁾으로 최대엽과 그 상위엽에 접종하여 저항성과 이병성을 판별하였다.

結果 및 考察

세포질 융성불임 NC82에 Burley 21을 교배시

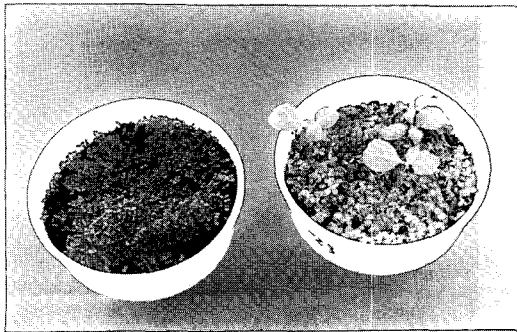


Fig. 1. Seedling at the 10days after seeding (left) and three weeks old seedling (right) after germination of seed obtained from interspecific cross of *N. tabacum* × *N. africana*.

킨 F₁ 식물체와 *N. africana*와의 중간교배에 의한 maternal haploid의 육성은 중간교배한 식의 종자를 pot에 파종하면 10여일 경에는 사진 1(왼쪽)같이 발아가 거의 완료가 되고 시간이 경과함에 따라 사진 1(오른쪽)과 같이 점차 자엽의 생장이 중지되고 치사하는 개체와 정상적으로 성장하는 개체로 구분된다. 정상적으로 성장한 개체중에는 중간잡종과 maternal haploid가 혼재해 있으며 이들의 판별은 염색체 수의 검경(사진 2)으로 중간잡종(2n=47)과 maternal haploid(n=24)로 구별된다. 또한 중간잡종과 maternal haploid의 공변세포의 크기, 공변세포내의 엽록체수 및 gland의 크기를 조사한 결과는 사진 2-2 및 2-3과 같다. Maternal haploid는 중간잡종에 비하여 공변세포의 크기는 작은 편이었고, 엽록체수는 적었으며 gland는 크게 나타났다. 그 외에도 maternal haploid는 non-undulate margin, graininess, pucker 등의 형태적 특성을 가지고 있어 중간잡종과 구별이 가능하였다.

표 1은 융성불임 F₁과 *N. africana*와 중간교배에 의한 융성불임 반수체 식물의 출현빈도를 조사한 결과이다. 한 식당 생존개체수는 2.77주였고 그 중 반수체 식물은 0.5주로 나타났다. 중간교배에 의한 식당 반수체 출현빈도는 0~8주로 매우 큰 변이를 나타내고 대부분의 생육 조건 및 품종

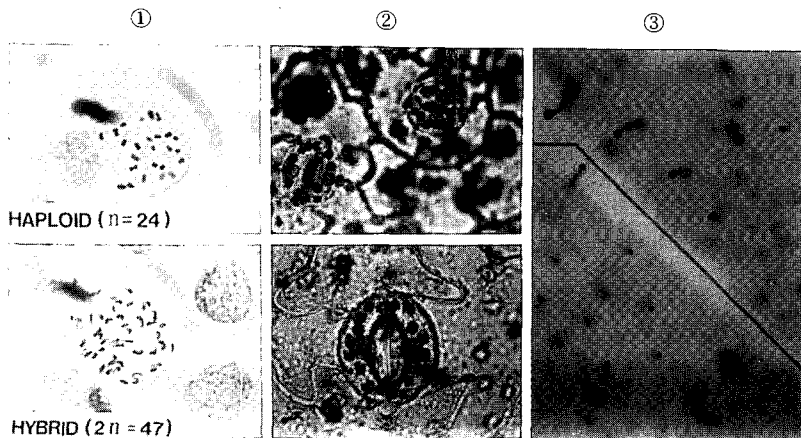


Fig. 2. Chromosome number, stomata size, chloroplast number in the guard cell and glandular length *N. tabacum* × *N. africana* of trichome of interspecific hybrid and haploid derived from interspecific cross of *N. tabacum* × *N. africana*.

에 따른 차이도 인정된다고 하였다²⁴⁾. 표 2는 응성 불임 반수체 식물중 잎과 줄기의 색상이 green과 yellow를 나타내는 반수체를 조사하여 분리비를 나타낸 결과이다. 149주의 응성불임 반수체 중 green색이 108주 yellow색이 41주로 나타났으며 분리비는 χ^2 검정결과 3 : 1로 나타났다. 표 3은 yellow(버어리종 타입) 색을 띤 응성불임 반수체 식물에 대한 담배모자이크바이러스의 저항성과 이병성의 분리비를 조사한 결과이며 저항성과 이병성의 분리비가 1 : 1로 나타났다.

버어리종의 yellow 색상은 두 개의 열성인자에 의하여 지배되고^{11,21)} *Nicotiana glutinosa*에서 유래된 담배모자이크바이러스는 단순 우성인자에 의하여 지배된다고 하였다¹²⁾. n개의 독립유전자에 대해 2배체 육종법과 반수체 육종법에 있어서 분리집단에서 homo 유전자형을 얻을 수 있는 확률은 다르며 2배체 육종의 경우 F_2 세대에서의 확률은 $(1/4)^n$ 인데 비하여 반수체 육종에서는 $(1/2)^n$ 이다¹⁶⁾. 따라서 본 실험 결과에서 버어리종의 Yellow 타입과 *N. glutinosa*에서 유래된 담배모

자이크바이러스는 전술한 분리식에 잘 일치하게 나타났다.

사진 3, 4는 중간교배에 의한 세포질 응성불임 반수체식물의 화기 형태(그림 3)에 있어서 세포질 응성불임 반수체는 정상반수체에 비하여 수술이 없는 것이외는 비슷하였고 이들 두 반수체 화기는 2배체 화기에 비해서 작았다. 그림 4는 버어리종의 정상 반수체와 세포질 응성불임 반수체 식물을 나타낸 것이다. 사진에서 보는 바와 같이 초장 엽수 및 엽형이 매우 유사하였다. 연초 반수체 육종에 있어서 질적으로 유전되는 병해 저항성과 양적형질인 수량, 엽수 및 초장 등의 형질은 이배체와 고도의 유의성이 인정되어 이들 형질은 반수체 세대에서 선발이 가능하다고 하였다²⁴⁾. 따라서 사진 4에 나타난 세포질 응성불임반수체는 정상 반수체와 엽수, 초장 및 초형이 유사하여 이러한 반수체 식물을 선발하여 조직배양¹³⁾ 및 화지 colchicine 처리법에 의하여 염색체를 배가함으로써 2배체 육종법에 비하여 조기에 응성불임 계통을 육성할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 1. The production of interspecific hybrids and cytoplasmic male-sterile haploids from interspecific cross between (CMS NC82×Burley21) F_1 and *N. africana*

Capsules seeded	No. of survived seedling			% haploids among survived seedling
	Total	Hybrids	Haploids	
 plant per capsule			
120	2.7	2.2	0.5	18.5

Table 2. Segregation of green and yellow type for haploid plants derived from interspecific cross of (CMS NC82×Burley21) F_1 × *N. africana*

No. of applied haploid plant	No. of haploid plant		Chi-square value
	Green type	Yellow type	
149	102	47	3.403

$\chi^2(0.05)=3.84$

Table 3. Tobacco Mosaic Virus(TMV) response of yellow type haploid plants derived from interspecific cross of (CMS NC82×Burley21) F_1 × *N. africana*

No. of applied haploid plants	No. of haploid plant		Chi-square value
	Resistant	Susceptible	
83	48	35	2.036

$\chi^2(0.05)=3.84$

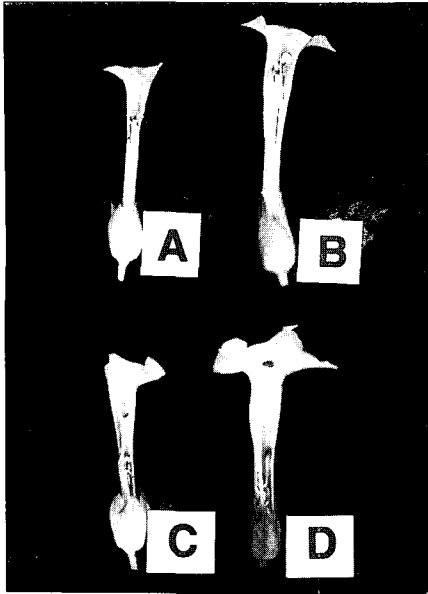


Fig. 3. Flowers of normal and male sterile tobacco.

A; Normal haploid B; Normal diploid
C; Male sterile haploid
D; Male sterile diploid



Fig. 4. Normal(right) and cytoplasmic male sterile haploid(left) plant derived from interspecific cross.

* Normal haploid was produced from the interspecific cross of Burley 21 × *N. africana*

** Cytoplasmic male sterile haploid was produced from interspecific cross of (CMS NC82 × Burley 21)F₁ × *N. africana*

摘要

연초(*N. tabacum* L.)의 세포질 응성불임 F₁ 식물체와 *N. africana*의 종간교배에 의한 응성불임 반수체식물의 육성 및 특성을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. (CMS NC82 × Burley 21) F₁과 *N. africana*의 종간교배에 의한 세포질 응성불임 반수체 식물의 출현빈도는 식당 0.5주로 나타났다.
2. 종간교배으로 얻은 응성불임 반수체식물 중 잎과 줄기의 색이 green(황색종)과 yellow(버어리종)의 분리비는 3 : 1로 나타났다.
3. 반수체 식물 중 잎과 줄기의 색이 yellow(버어리종 type)인 개체에 TMV저항성을 검정한 결과 저항성과 이병성의 비는 1 : 1로 나타났다.
4. (CMS MC82 × Burley 21)F₁과 *N. africana*의 종간교배으로 세포질 응성불임 isogenic Burley 21 반수체 식물의 육성이 가능하였고 이 반수체 식물의 염색체를 배가함으로써 여교배육종법에 비하여 조기에 세포질 응성불임 Burley 21을 육성할 수 있을 것으로 생각된다.

引用文獻

1. Agrios, G. N. 1978. Plant pathology, 2nd ed. pp. 567-569, Academic press, New York, U. S. A.
2. Berbec, J. 1974. A cytoplasmic male sterile mutation form of *Nicotiana tabacum* L. Z. Pflanzenzuchtg. 73:204-216.
3. Bourgin, J. P., and J. P. Nitsch. 1967. Obtention de *Nicotiana* haploides a partir d'etamines cultivees *in vitro*. Ann. Veg., 9:377-382.
4. Burk, L. G. 1960. Male-sterile folwer anomalies in interspecific tobacco hybrids. J. Hered. 51:27-31.
5. _____, K. U. Gerstel, and E. A. Wernsman, 1979. Maternal haploids of

- Nicotiana tabacum* L. from seed. Science, 206:585.
6. _____, and T. J. Mann. 1970. Onset, prevention, and restoration of male-sterile folwer anomalies in tobacco. J. Hered. 61:143-146.
 7. Campbell, K. G. and E. A. Wernsman. 1994. Selection among haploid sporophytes for resistance to Black Shank in tobacco. Crop. Sci. 34:662-667.
 8. Chaplin, J. F. and Z. T. Ford. 1965. Agronomic and chemical characteristics of male-sterile flue-cured tobacco as influenced by cytoplasm of different *Nicotiana* species. Crop Sci. 5:436-438.
 9. Clayton, E. E. 1950. Male-sterile tobacco. J. Hered. 41:171-175.
 10. East, E. M. 1932. Studies on self-sterility. IV. The behavior of crosses between self-sterile and self-fertile plants. Genetics, 17:175-202.
 11. Henika, F. S. 1932. The inheritance of white burley character in tobacco. J. Agr. Res. 44:177-193.
 12. Holmes, F. O. 1939. Inheritance of resistance to tobacco mosaic disease in tobacco. Phytopathology 28:553-561.
 13. Kasperbauer, M. J., and G. B. Collins. 1972. Reconstitution of diploids from leaf tissue of anther-derived haploids in tobacco. Crop Sci. 12:98-101.
 14. Kumashiro Takashi and Takahisa Hata. 1979. Studies on the haploid method of breeding by anther culture in tobacco VIII. Selection of doubled haploids by chloroplast number in a pair of guard cell. Iwata Exp. Sta. Report 11:73-81.
 15. Nakamura, A., T. Yamada, N. Kadotani, R. Itagaki, and M. Oka . 1974. Studies on the haploid method of breeding in tobacco. SABRAO J. 6(2) 107-131.
 16. Nei, M. 1963. The efficiency of haploid method of plant breeding. Heredity 18:95-100.
 17. Nikova, V. and D. Cikov. 1976. Comparative in vestigations on flower morphogenesis in various tobacco sources of cytoplasmic male sterility. Genet. Sel. 9:3 62-365. (Tob. Abs. 22:146).
 18. Nitsch, J. P., and C. Nitsch . 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163:85-87.
 19. Rufty, R. C., E. A. Wernsman, and G. V. Gooding, Jr. 1986. Evaluation of tobacco haploids and doubled haploids for resistance to tobacco mosaic virus, *Meloidogyne incognita* and *Pseudomonas syringae* pv tabaci using detached leaves. Phytopathology 77:60-62.
 20. Smith, H. H. 1968. Recent cytogenetic studies in the genus *Nicotiana*. Advances in Genetics 14:1-54.
 21. Steins, B. J. and T. J. Mann. 1960. Diploidization in *Nicotiana tabacum*. A studay of the Yellow burley characters. J. Hered. 51:222-227.
 22. Ternovskii, M. F., M. E. Moiseeva, and A. P. Grebennin. 1975. Experimentally produced new type of cytoplasmic male sterility in interspecies *Nicotiana* hybrids. Sov. Genet. (Enlg. Transl. Genetika) 9:693-702. (Tob. Abs. 20:955).
 23. Thorpe, T. A. 1981. Plant tissue culture. Academic Press, Inc. pp. 249.
 24. Wernsman, E. A., and B. W. Smeeton. 1984. Factors affecting maternal haploid frequencies in *Nicotiana tabacum* L. 8th International Tobacco Scientific Congress, Vienna, Austria.
 25. Witherspoon, W. D., Jr. and E. A. Wernsman. 1989. Feasibility of selection for quantitatuil traits among haploid tobacco sporophytes. Crop Sci. 29:125-129.