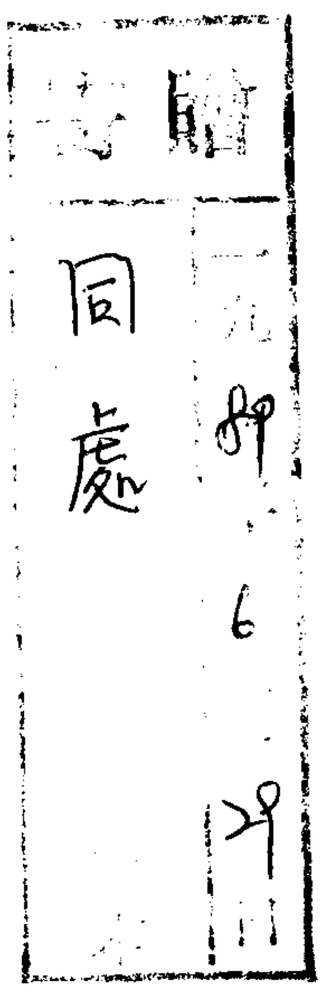
GOVP1198900286

호박 幼胚培養에 의한 種間雜種 獲得技術開發

Development of Embryo Rescue Technique for Obtaining Interspecific Hybrids between *Cucurbita pepo* and *C. moschata*

研 究 機 關

農村振興廳 園藝試驗場



科 學 技 術 處

提　出　文

科學技術處長官　貴下

本　報告書를 “호박　幼胚培養에　의한　種間雜種獲得技術開發”　課題의　最終報告書로　提出합니다.(1次年度)

1989. 6. 20.

主管研究機關名：農村振興廳　園藝試驗場
研究責任者：李　洙　聖
研　究　員：嚴　榮　鉉
金　昞　東
洪　珪　鉉
金　韋　憲
吳　奉　純
金　康　旭

여 백

要　約　文

I. 題　　目

호박　幼胚培養에　의한　種間雜種　獲得技術開發

II. 研究開發의　目的　및　重要性

東洋種　호박(*Cucutbita　moschata*)은　맛과　外觀은　좋으나　덩굴性이고 生産性이　낮으며　低温伸張性이　弱하여　低温期에　栽培가　어렵다. 그러나　페포種(*C.　pepo*)中　쥬키니　系統은　非덩굴性이며　低温伸張性이　良好하고　多着果性이어서　겨울　및　봄의　施設栽培에　주로　利用되고　있다. 이들　兩種間의 長點을　지닌　品種이　育成되면　良質의　풋호박이　周年供給될　수　있고　單位面積當　生産性이　높아　農家所得에도　크게　寄與할　것이다. 本　試驗은　호박品種　育成을　위한　基礎研究로서　東洋種과　페포種의　種間雜種幼胚를　培養하여 植物體를　얻는　技術을　開發하고자　遂行되었다. 지금까지　胚培養이　成功한 例는　주로　成熟胚培養인데　胚가　成熟하기　前에　많이　退化하여　有用한　遺傳因子가　消失되었을　可能性이　높을　뿐　아니라　植物體　獲得率도　극히　낮으므로　未熟胚에서　植物體를　얻을　必要가　있다. 이　技術이　이루어지게　되면 他殖性　植物의　種間交雜의　基礎資料로써도　그　意義가　큰　것으로　생각된다.

III. 研究開發의　內容　및　範圍

東洋種(*C.　moschata*)　2系統과　페포種(*C.　pepo*)　1系統을　使用하여　種間에

4組合의 人工交配를 實施하여 胚珠培養을 하였다. 基本培地는 MS와 B_5를 使用하여 sucrose 0, 5, 35g/ℓ와 agar 8g/ℓ를 添加한 固體培地를 썼다. 生長調整劑는 3種을 處理했으며 培養溫度는 23±2℃와 27±2℃의 2가지 處理에 형광등 光源의 16時間 日長 狀態에서 培養하였다. 胚珠 切斷의 效果를 究明하기 위해서는 授粉後 20日된 未熟胚珠를 利用하였으며, 組合別로 胚의 退化 狀態를 알아보기 위하여 授粉後 5日 간격으로 各 組合別 胚珠를 置床하여 發芽率을 調査하였다.

IV. 研究開發結果 및 活用에 對한 建議

호박 幼胚培養에 의한 種間雜種 獲得技術開發에 관한 研究의 主要結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 種間交配時 着果率과 種子內 胚發達狀態는 *C. pepo*를 母本으로 했을 때 훨씬 좋았다. 그러나 모든 組合에서 正常種子는 거의 없는 것으로 보아 相當量의 胚가 자라는 途中에 退化돼 버린 것으로 判斷된다.

2. 適正 培養條件을 위한 試驗에서 培養溫度는 27℃가 23℃에 비하여 좋았으며, 基本培地는 MS 培地가 B_5보다 效果的이었고 1/2 MS가 기본MS보다 多少 좋았다. Sucrose는 35g 添加할 때 多少 效果的이었고 生長調整劑 添加는 別 效果가 없었다.

3. 置床 胚珠의 切斷試驗에서 無切斷時에는 전혀 發芽를 하지 않았으나 切斷時에는 發芽를 잘 하였다. 잘라내버린 部位가 클수록 發芽率도 높고 發芽速度도 빨랐으나 1/2크기만 돼도 發芽率은 1/4크기에 크게 뒤지지 않았다. 따라서 이 切斷胚珠培養을 利用하면 未熟胚에서도 쉽게 交雜植物體를

얻을 수 있음을 알 수 있었다.

4. 成熟度別로 즉 授粉後 5日 간격으로 胚珠培養을 했을 때 *C. pepo*가 母親인 組合에서는 授粉後 10日된 胚에서 40% 以上까지 發芽되었으나 相反交配組合에서는 發芽가 거의 되지 않았다. 授粉後 10日부터는 胚 發芽率이 점차 떨어지는 것으로 보아 *C. pepo*×*C. moschata* 雜種胚 10日 以後부터는 退化가 많이 일어나는 것으로 推定된다.

5. 이 切斷胚珠를 利用한 未熟胚培養은 植物體 獲得率이나 作業의 難易度面에서 볼 때 상당히 效率的이기 때문에 種間交雜育種의 基礎資料로 活用될 것이다.

여 백

SUMMARY

Cucurbita moschata is good in fruit quality, but not suitable for the plastic-film house cultivation because of its vine growth habit. On the other hand, Zucchini squashes of *C. pepo* have bush growth habit and good growth ability under low temperature condition. Therefore, many studies have been done for obtaining hybrids between the above 2 species. However, complete bush type cultivar with good fruit quality like *C. moschata* has not come out yet. The embryo cultures of interspecific hybrids have been done with the embryos excised from more than 30 day-old seeds. The method has made the rate of gain very low and made the subsequent breeding works difficult.

This study was carried out as a basic step for the breeding of bush type squash with good quality. *In vitro* culture using immature embryos was attempted to prevent the loss of useful genes and to acquire the hybrids safely in interspecific crosses. Two cultivars of *C. moschata* 'Seoulmadi' and 'Puthobag', and one of *C. pepo* 'Ford Zucchini were crossed to be 4 combinations including reciprocal crosses. The basal medium for half-cut ovule culture consisted of MS or B_5 inorganic salts supplemented by 0, 5, or 35 g/ℓ sucrose. Five combinations of 3 growth regulators were added also. Cultures were incubated at 23± 2℃ or 27± 2℃ under a 16 hour photoperiod of 2,000 lux inflorescent light. The cutting effect of ovules also was investigated.

Results are summarized as follows :

1. As the female parent for the interspecific cross, *C. pepo* was much better than *C. moschata* in fruit set and embryo development. But, only a few normal seeds were produced in all combinations. Many embryos might have aborted during the growth of seeds.

2. For optimum culture condition, 27℃ was better than 23℃ in embryo germination. The basal medium containing half strength MS salts supplemented by 35 g/ℓ sucrose was best. The germination was not significantly influenced by the addition of growth regulators.

3. While the embryos of intact ovules did not germinate at all, those of cutted ovules did well. The 1/4 sized ovules after cut showed the highest rate and speed in germination of embryos. However, the 1/2 sized ones were not much backward in germination rate compared to the smaller ones. The half-cut ovule culture proved to be a useful method for easy obtaining of hybrid plants from immature embryos.

4. In the experiment of ovule cultures by different fruit ages, the 10 day-old embryos showed more than 40% germination in the crosses with *C. pepo* as the female parent. In the reciprocal cross combinations, however, no germination was observed except for one embryo. As time progressed from 10 days after pollination, the percentages of embryo germination decreased gradually. Therefore, the hybrid embryos were thought to abort rapidly from 10 days after pollination.

5. In the view of hybrid obtaining and *in vitro* culture work, the embryo rescue method by half-cut ovule culture might be useful for the breeding of interspecific hybridization.

CONTENTS

Chapter I. Introduction ····· 13

Chapter II. Materials and Methods ····· 16

Chapter III. Results and Discussion ····· 18

1. Fruit set and embryo development in mature stage in interspecific crosses ····· 18
2. Optimum condition for culture ····· 18
   (1) Effect of temperature ····· 18
   (2) Effects of basal media and growth regulators ····· 21
   (3) Effect of the size of cutted ovules plated ····· 24
3. Result of ovule culture in different fruit ages ····· 27

Literature Cited ····· 31

여 백

目　　次

第1章　緒　　論 ……13

第2章　材料　및　方法 ……16

第3章　結果　및　考察 ……18

1. 種間交配時　着果率　및　完熟果内
胚發達狀態 ……18

2. 適正　培養條件　究明 ……18

가. 培養　温度의　影響 ……18

나. 培地의　影響 ……21

다. 胚珠　切斷處理의　效果 ……24

3. 果實의　成熟度別　胚珠培養　結果 ……27

引用文献 ……31

여 백

第1章 緒 論

Cucurbito 屬에는 全世界的으로 약 27種이 있으며(Whitaker, 1974) 그 中 栽培種으로 많이 利用되고 있는 것은 *moschata*(東洋種), *pepo*(페포種), *maxima*(西洋種)의 3種이다.

韓國에서 호박은 重要한 副食菜蔬로서 주로 露地栽培를 위한 青·熟果兼用인 東洋種 호박(*C. moschata*)이 많았으나, 最近에는 施設栽培의 增加로 풋호박 專用인 pepo種의 Zucchini系統 品種이 늘어나고 있다. 이는 果實의 品質이 좋은 東洋種 호박에는 非덩굴性 品種이 없는데 反해 페포種의 쥬키니品種은 비덩굴성이면서 低温伸張性이 좋아 施設栽培用으로 適合한 特性을 지녔기 때문이다. 따라서 非덩굴性이면서 東洋種 호박의 品質을 갖는 品種이 理想的인 施設栽培用으로 생각된다. 金과徐(1976)는 *C. pepo*×*C. moschata*의 種間交雜을 利用한 品種育成을 했지만 아직 完全한 비덩굴성 품종은 못 만들었다.

한편 Pearson等(1951)은 *C. moschata*가 가진 耐虫性과 *C. maxima*가 가지고 있는 香味를 兼備한 F_1에서 그의 不稔性을 回復케하는 方法으로 複2倍體(2n=28)를 만들어 高稔性, 耐虫性 및 香味性을 겸비한 몇 系統을 選拔하였다고 한다. Louisiana農試에서는 *C. pepo*와 *C. moschata*의 Cushaw 品種을 交雜하여 Longfellow라고 하는 新品種을 만들었는데 이 品種은 生産力과 適應性에 있어서 兩親보다 우수하며 貯藏力도 강하고 年2回 栽培도 가능했다고 한다(香川, 1957). Whitaker (1962)는 *C. lundelliana*×*C. maxima*의 F_1을 自殖시켜 그 F_2 集團에서 원하는 個體를 選拔하여 우량한 *C. maxima*의 品種을 戻交雜시켜나가면 바람직한 품종을 육성할 수 있음을 提示하였다.

Denna와 Munger(1962)는 *C. maxima*와 *C. pepo*에 있어서 bush type의

major gene은 allelism 관계에 있다고 하였으며, 또한 *C. pepo*의 種內에서 bush gene이 生育初期에는 vine gene에 대하여 거의 우성이고 生育後期에는 不完全優性임을 제시하였다. 嚴과 洪(1987)도 韓國에서의 *C. pepo*種內 덩굴性 遺傳을 조사한 바 비덩굴성은 한 雙의 對立遺傳子로 部分優性이며 生育이 進展됨에 따라 우성정도는 낮아진다고 하였다. Kwack과 Fujieda(1988)는 *C. pepo*×*C. moschata*의 種間交雜後代에서의 生育特性을 조사하여 *C. moschata* 型의 叢生系 育成은 가능해 보인다고 하였다.

遠緣間 交雜에 있어서 embryo rescue는 幼胚가 退化하기 前에 器內에서 人工培養하여 植物體를 얻는 데 몇개 作物에서는 일반적으로 쓰여지고 있다. 특히 十字花科에서는 新植物 創成의 見地에서 배추와 무우 間의 屬間交雜種 育成을 胚珠培養을 통하여 成功한 바 있고(Lee와 Yoon, 1987), 벼에 있어서도 野生種이 갖는 有用形質을 導入시키기 위하여 種間交雜時 未熟種子를 置床하여 種間雜種을 養成한 바 있다(楊等, 1988).

호박에 있어서는 東洋種(*C. moschata*)과 西洋種(*C. maxima*)間의 交雜은 쉽게 이루어지므로 수박 等 박科 菜蔬의 台木用으로 이 두 種間의 F_1品種인 新土佐가 日本과 韓國에서 이미 開發, 利用되고 있다. 그러나 pepo種은 東洋種이나 西洋種과 交雜이 잘 안된다. 따라서 이들 간의 人工交雜種을 쉽게 얻는 方法을 圖謀하여(Hayase, 1950；1956；1957；1960；1963；Kwack과 Fujieda, 1985) 種間交雜種 獲得의 可能性을 보여 주었으나, 특별히 *C. moschata*와 *C. pepo* 間의 交雜에 있어서는 種子獲得이 쉽지 않음을 지적하고 있다. 따라서 *C. moschata*와 *C. pepo*間의 胚培養이 오래 전부터 試圖되었으며(Wall, 1954；金과 徐, 1976；Kwack과 Fujieda, 1987), 最近에는 胚培養이 野生種에서의 有用因子導入을 위한 手段으로도 많이 利用되고 있다.

Nakajima(1962)는 호박 *C. moschata*種에서의 胚 發育과 胚乳와의 관계를

나타냈는데, 授粉 5日頃에 胚는 heart stage에 이르고 수분 10일경에는 胚의 전체 길이가 4mm 정도 되는데 그 중 胚軸과 幼根部는 2mm로서 약 半만 차지한다. 그 이후에 幼根部는 별로 生長하지 않고 子葉部만 生長하는데 授粉 20日경에는 8mm, 30日 後에는 12mm까지 되어 완전한 길이에 도달하게 되며, 그 이후에는 子葉에 養分이 축적되어 두께가 두꺼워지며 胚乳는 없어져간다. Kwack과 Fujieda(1987)는 種間交雜時에 種子內 胚와 胚乳의 길이를 調査하여 交雜種의 胚가 自殖種子들에 비하여 늦게 生長하며 크기도 작다는 것을 報告하였다.

*C. pepo*와 *C. moschata*의 種間交雜種 育成은 전부 交配後 30日 以上된 胚로부터 얻어진 것이므로 그 獲得率이 매우 낮았으며, 이러한 既存 成熟胚 培養法으로서는 잡종을 安全하게 얻기 어렵다. 따라서 本 實驗은 호박 非덩굴性 優良品種育成을 위한 첫 段階로 交雜植物體를 안전하게 획득하고자 雜種胚가 退化하기 前에 어린 胚珠를 利用하는 培養方法을 試圖하였다.

第2章 材料 및 方法

1. 供試材料

本 試驗場에서 保有하고 있는 資源 中 가장 優秀하다고 생각되는 세 系統을 사용했다. 東洋種(*C. moschata*)으로서 장방형 果形인 서울마디호박과 球形인 풋호박 系統을, 페포種(*C. pepo*)으로서 Ford Zucchini 系統을 사용했다.

2. 實驗方法

가. 交配

胚培養 材料를 얻기 위하여 호박을 하우스栽培하였는데 1988年 2月15日에 播種하여 3月16日 定植했으며 5月初부터 *C. pepo*×*C. moschata*의 相反交配를 포함한 4組合의 人工交配를 實施하였다. 交配는 아침 9時 以前에 하였다. 自然狀態에서의 着果率과 種子內 胚發達狀態調査를 위한 露地栽培는 3月30日 播種하여 4月27日 定植하였으며 6月初부터 人工交配하여 交配後 40日 以上된 完熟果로만 調査했으며 營養狀態를 考慮하여 포기當 2果씩만 열리도록 했다.

나. 胚培養

未成熟種子의 경우 胚의 摘出作業이 어렵고 또한 物理的인 損傷이 많으므로 그 對處方案으로 無菌狀態에서 胚의 生長點이 손상되지 않는 範位內에서 胚珠를 切斷하여 培養하는 處理를 試圖하였다.

基本培地는 MS와 B_5를 使用하여 sucrose 0, 5, 35g/ℓ와 agar 8g/ℓ를

添加한 固體培地를 썼다. 生長調整劑로는 NAA, Kinetin, 2,4－D의 3種을 5가지 組合으로 처리하였다. 培養温度는 23±2℃와 27±2℃의 2가지로 처리했으며 형광등 光源의 약 2,000 lux 光度와 16時間 日長狀態에서 培養하였다.

胚珠 切斷의 效果를 究明하기 위하여 *C. pepo*×*C. moschata*의 授粉後 20日된 未熟胚珠를 利用하여 잘라내고 남은 胚珠의 크기에 따라 1/4, 1/2, 3/4과 자르지 않은 原型 그대로의 4가지 處理로 各 處理當 45개씩의 胚珠를 置床하였다.

또한 組合別로 胚의 退化狀態를 알아보기 위하여 授粉後 5日 間隔으로 30日까지의 各 組合別 胚珠를 置床하고 그 胚의 發芽率을 調査하였다. 그때 모든 胚珠는 1/2크기로 切斷하여 NAA와 Kinetin이 各各 0.1㎎/ℓ씩 첨가된 1/2 MS 培地에 置床하고 27±2℃ 狀態에서 배양하였다.

發芽한 植物體는 本葉이 나올 때에 生長調整劑가 없는 培地에 옮겨서 繼代培養하였으며 본엽 3～4枚 됐을 때에 flask에서 꺼내어 vermiculite와 perlite가 7：3으로 섞인 12㎝ 盆에 심어 15～20日間 馴化시킨 후 비닐하우스 안에 옮겨 심었다.

第3章 結果 및 考察

1. 種間交配時 着果率 및 完熟果內 胚發達狀態

露地栽培에서 人工交配시킨 후 調査한 着果率과 種子內 胚의 發達狀態는 表1에 나타난 바와 같다. '서울마디' 나 '풋호박', 즉 東洋種을 母本으로 했을 때보다 페포種인 'Zucchini'를 모본으로 했을 때 着果率은 훨씬 높았으며 胚의 發達狀態도 多少 좋았다. 東洋種을 母本으로 했을 때 着果된 果實은 모두 正常種皮를 갖춘 種子를 갖고 있었지만 페포種을 母本으로 했을 때는 착과된 과실중 半 以上이 種子를 갖고 있지 않았는데, 이는 쥬키니 품종의 높은 單爲結果性(嚴과洪, 1989)에 基因하는 것으로 생각된다. 이러한 單爲結果를 감안하더라도 쥬키니 품종을 母本으로 했을 때 着果率이 현저히 높고 胚發達狀態가 多少 좋아서 이 두 種間의 交配에서는 相反效果(reciprocal effect)가 있다는 것을 알 수 있었다. 어느 組合을 막론하고 胚의 길이가 12㎜ 이상 되는 正常種子는 거의 없었으며 種子 內에는 胚가 많이 退化되어 버렸는데 서울마디호박이 모본인 경우 87.2%以上, 풋호박이 모본인 경우 45.8%以上 胚가 없었다. 이는 相當量의 胚가 자라는 도중에 퇴화돼 버린 것으로 判斷된다.

2. 適正 培養條件 究明

가. 培養溫度의 影響

組織培養室의 恒溫室에 들어있는 대부분의 作物들은 25℃ 또는 그 以下에서 배양되고 있는데, 本 實驗에 供試된 호박 胚의 培養에 있어서는 호박 種子發芽에 高溫이 좋은 점을 考慮하여 다소 높은 온도인 27±2℃의

Table 1. Fruit set and embryo development in mature stage in interspecific crosses between *C. pepo* and *C. moschata*.

Cross combination	No. of pollinated flowers	Fruits developed		Fruits with seeds[1]		No. of seeds per fruit with seeds	Frequency distribution of seeds (%)							
							Embryo length (mm)							
		No.	%	No.	%		0[2]	~2	~4	~6	~8	~10	~12	>12
Zucchini/ Seoulmadi	58	52	89.7	26	50.0	108	87.2	1.2	7.1	1.5	0.6	0.3	0.4	1.7
Seoulmadi /Zucchini	49	7	14.3	7	100	59	93.6	0.5	3.6	1.5	0.2	0.2	0	0.4
Zucchini/ Puthobag	59	46	80.0	18	39.1	131	52.5	0	1.9	13.6	22.8	7.4	1.8	0
Puthobag /Zucchini	44	5	11.4	5	100	149	45.8	0	0.2	16.7	15.0	22.2	0	0

1) Ones with apparently normal seed coat.

2) No embryo.

Table 2. Effect of temperature on germination of 20 day-old embryos in the half-cut ovule culture in the crosses between *C. pepo* and *C. moschata*[1)]

Cross combination	23±2℃			27±2℃		
	No. of ovules plated	Germination		No. of ovules plated	Germination	
		No.	%		No.	%
Zucchini/ Seoulmadi	143	7	4.9	143	43	30.1
Zucchini/ Puthobag	93	14	15.1	93	21	22.6
Total	236	21	8.9	236	64	27.1

1) Medium : MS+Sucrose 35g/ℓ+NAA 0.1mg/ℓ+Kinetin 0.1mg/ℓ.

處理를 해 본 결과(表2) Zucchini/서울마디 組合에서는 低溫에서 4.9%의 發芽率을 보인데 비하여 高溫에서는 훨씬 높은 30.1%를 나타냈다. 또 Zucchini/풋호박 組合에서도 高溫에서 다소 높은 결과를 나타냈다. *C. pepo*×*C. moschata*의 胚培養에 있어서 Wall(1954)은 21~23℃에서 하였고 Kwack과 Fujieda(1987)는 25℃에서 했는데 本 實驗에서는 그러한 25℃ 以下의 低溫에서보다는 27℃ 정도의 高溫에서 훨씬 좋은 결과가 나온다는 것을 알 수 있었다.

나. 培地의 影響

基本培地에 있어서는 表3에서 볼 수 있는 바와 같이 授粉後 10~15日된 어린 胚나 20~25日된 비교적 성숙한 胚에서 모두 B_5보다는 MS培地가 效果的인 것을 알 수 있었다. B_5培地는 十字花科 植物의 幼胚珠培養에서 效果的이었기 때문에 (Lee 等, 1989) 供試한 것인데 호박의 幼胚珠培養에서는 效果가 적었다. MS培地에서 無機鹽類의 量이 基本量인 것과 1/2量인 것을 比較할 때 (表4) 1/2量 處理에서 다소 發芽率이 좋은 것 같았다. 그러나 基本量 MS培地일지라도 Kwack과 Fujieda(1987)의 실험에서 보였다는 albino現象은 나타나지 않았다. Sucrose의 濃度에 따른 發芽 差異를 보면 幼胚(10~15日胚)에는 높은 濃度(35g/ℓ)가 效果的이었으며 成熟胚(20~25日胚)에 있어서는 sucrose을 첨가한 處理區 사이에서는 서로 차이가 없었으나 無處理에 비해서는 效果的이었다. 이는 일반적으로 幼胚때의 胚乳일수록 滲透壓이 높은 것으로 알려져 있으므로 (Nakajima, 1962 ; Raghavan, 1977) 이를 調節하는데 있어서 본 실험의 처리농도간에 差異가 나타난 것으로 생각된다.

生長調整劑의 添加는 表5에 나타난 바와 같이 별다른 差異를 나타내지 않았다. Nakajima(1962)가 報告한 바에 따르면 호박의 어린 胚의 生長에

Table 3. Effect of basal media on germination of immature embryos in the half-cut ovule culture in the crosses of *C. pepo* 'Zucchini' × *C. moschata* 'Seoulmadi'.

Medium	10~15 day-old embryos			20~25 day-old embryos		
	No. of ovules plated	Germination		No. of ovules plated	Germination	
		No.	%		No.	%
MS	97	46	47.4	230	60	26.1
B_5	43	4	9.3	69	9	13.0

Table 4. Effects of MS inorganic salts and sucrose concentrations on the germination of embryos in the half-cut ovule culture in the crosses of *C. pepo* 'Zucchini' × *C. moschata* 'Seoulmadi'.

Treatment	10~15 day-old embryos			20~25 day-old embryos		
	No. of ovules	Germination		No. of ovules	Germination	
		No.	%		No.	%
Levels of MS salts						
1/2	60	29	48.3	90	28	31.1
1	60	23	38.3	90	24	26.7
Sucrose concentration						
0 g/ℓ	27	12	44.4	50	11	22.0
5	35	16	45.7	90	25	27.8
35	35	18	51.4	90	24	26.7

Table 5. Effect of growth regulators added to the basal medium[1] on germination of embryos in the crosses between *C. pepo* and *C. moschata*.

Growth regulator regime			Fruit age and cross combination			
			10 days		20 days	
NAA	Kinetin	2,4−D	Z/S	Z/P	Z/S	Z/P[2]
mg/ℓ	mg/ℓ	mg/ℓ	%	%	%	%
0	0	0	50.0	33.3	33.3	30.9
0.1	0.1	0	42.9	58.3	31.0	28.6
0.1	0	0.1	33.3	41.7	35.7	33.3
0	0.1	0.1	40.5	58.3	33.3	28.6
0.1	1.0	0	35.7	50.0	−	−
No. of ovules plated per treatment			42	12	42	42

1) Basal medium : MS+Sucrose 35g/ℓ+Agar 8g/ℓ

2) Cultivar names : Z(Zucchini), S(Seoulmadi), P(Puthobag)

있어서는 IAA와 Kinetin이 必要하다고 했는데 본 실험에서는 供試된 生長調整劑의 효과를 전혀 찾을 수 없었다.

다. 胚珠 切斷 處理의 效果

切斷胚珠의 크기 別로 처리했을 때 置床後 9日에 가장 작은 1/4크기의 胚珠에서 45個 中 5개가 發芽했으며 20日째까지 半 以上이 발아하여 總 66.7%의 發芽率을 보였다(表6). 한편 1/2크기의 배주에 있어서는 發芽速度가 느려서 置床 20日後에야 半 以上이 발아하였으며 44日까지에 총 62.2%가 발아하여 발아율에 있어서는 1/4크기와 거의 비슷하였다. 그러나 3/4크기에 있어서는 發芽率이 현저하게 낮아서 35.6% 밖에 안 되었으며, 자르지 않은 穩全胚珠에서는 전혀 발아를 하지 않았다(사진1). 結果的으로 잘라내버린 部位가 클수록 發芽率도 높고 發芽速度도 빨랐지만 1/2크기만 돼도 발아율은 1/4크기에 크게 뒤지지 않는 것을 알 수 있었다. 그런데 이 胚珠切斷實驗의 結果에서는 대체로 발아율이 상당히 높게 나타났는데, 이는 특별히 잘 成熟된 胚珠들을 골라서 置床하였기 때문에 그 成功率이 다른 實驗結果에서보다 높았던 것으로 생각된다.

既存의 호박 胚培養 報告들에서는 交配後 30日 以上된 成熟胚를 摘出하여 成功한 例가 있을 뿐인데, 本 實驗에서는 未熟胚일지라도 胚乳가 많이 除去된 胚珠를 置床함으로써 쉽게 交雜植物體를 얻을 수 있었다.

다만 胚에서 發芽한 植物體 中 50% 以上이 繼代培養과 馴化과정 中 異狀發育으로 죽어버려서 앞으로 그 對策이 강구되어져야 할 것으로 생각된다. Nakajima(1962)에 따르면 호박 胚珠 中의 胚乳은 授粉後 10~20日쯤에 가장 많아지고 그 후 점점 消失되어 30~40日쯤에 완전히 없어지는데 雜種의 경우 (*C. maxima*×*C. moschata*)는 늦게까지 胚乳가 消失되지 않아서 그

Table 6. Effect of the size of cutted ovules on germination of 20 day-old embryos in the cross between *C. pepo* and *C. moschata.*[1]

Days after plating	No. of embryos germinating[2]			
	Size of ovules plated			
	1/4	1/2	3/4	Whole(No cut)
9	5	0	0	0
10－12	14	3	0	0
12－20	4	7	1	0
21－30	6	14	11	0
31－44	1	4	4	0
Total	30	28	16	0
Percentage(%)	66.7	62.2	35.6	0

1) Medium : MS+Sucrose 35g/ℓ+NAA 0.1mg/ℓ+Kinetin 0.1mg/ℓ.

2) In each treatment 45 ovules were cultured.

Photo. 1. Effect of half-cutted ovules on the germination of embryos in ovule culture.

Left : intact ovule showing no germination.

Right : halved ovule showing shoot formation.

중의 細胞分裂促進物質이 胚와 子葉의 異狀發育을 가져온다고 하였다. 본 실험에서도 주로 子葉 部位에서 細胞分裂過多로 因한 callus 形成이 이루어져 異狀發育하는 경우가 많이 생기는 것 같았다.

切斷處理에 있어서 잘라낸 部位의 크기에 따라 胚의 發芽率 및 速度의 差異가 顯著한 것으로 보아 幼胚의 生育을 抑制하는 원인은 胚乳나 種皮의 化學物質에 의한 것으로 생각된다. 호박 胚乳 中 auxin과 細胞分裂促進물질 (Nakajima, 1962), 사과 種皮 物質(ABA)의 休眠 誘起(Balboa-Zavala와 Dennis, 1977) 및 器內培養時 種皮除去에 의한 發芽 및 不定芽形成(Kouider 等, 1985)等이 이를 뒷받침하고 있으며, 일반적으로 種子의 休眠과 發芽生

理面에서 볼 때에도 대부분 種皮에 문제가 있는 것으로 알려져 있다(Mayer와 Poljakoff-Mayber, 1975). 또한 blackberry 및 raspberry의 胚培養에서도 본 실험과 같은 方式으로 半을 잘라낸 種子를 배양했을 때 가장 效率이 높았는데 그 理由도 胚乳 中에 있는 發芽抑制物質 때문인 것으로 알려져 있다(Ke 等, 1985). 호박의 未熟種子에서도 胚乳 및 種皮에 있는 物質의 種類와 變化에 관하여 앞으로 자세히 究明되어져야 할 것이다.

胚珠 切斷에 의한 호박 種間交雜種의 有胚로부터의 植物體 獲得은 育種效率面에서 볼 때 상당히 進步된 技術로 생각된다. Blackberry 및 raspberry의 育種에 있어서는 半을 잘라낸 種子를 이용하여 交雜植物體를 획득하는 器內培養體系로 世代進展時間까지 단축시킬 수 있어 種間交雜育種에 상당히 효율적인 방법으로 認識되고 있다(Ke 等, 1985). 또 벼의 種間交雜에 있어서도 embryo rescue를 위한 胚培養에서 未熟種子로부터의 分離培養보다 未熟種子를 직접 배양하는 방법이 더 效率的임을 立證하여 利用하고 있다(楊 等, 1988). 호박의 切斷胚珠培養技法을 이용하면 種間交雜時 胚의 退化로 後代를 얻기 힘든 경우에도 未熟種子를 배양함으로써 多量의 F_1植物體을 얻을 수 있을 뿐만 아니라 그 置床方法이 아주 간단하여 種間交雜育種을 效率的으로 遂行할 수 있을 것으로 생각된다.

3. 果實의 成熟度別 胚珠培養 結果

27±2℃의 상태에서 胚의 成熟度別로 胚珠培養을 한 結果는 表7과 같다. 授粉後 5日 간격으로 胚珠를 置床하였는데, 수분후 15일 이하의 과실에서 나온 胚珠는 크기가 작아서 1/2로 자를 수 밖에 없기 때문에 全 胚珠의 切斷 處理를 1/2크기로 하였다. Pepo種인 'Zucchini'가 母親인 組合에서는 授粉後 10日된 胚에서 40% 以上까지 발아되었으나 相反交配組合에서는 發

Table 7. Effect of fruit age on embryo germination in the half-cut ovule culture[1] in interspecific crosses of *Cucurbita*.

Cross combination	Germination (%)					
	Fruit age (days after pollination)					
	5	10	15	20	25	30
Zucchini/ Seoulmadi	2(3/136)[2]	46(32/69)	37(71/194)	25(104/415)	29(40/138)	2(1/60)
Seoulmadi /Zucchini	0(0/160)	1(1/152)	0(0/ 87)	0(0/111)	0(0/ 66)	0(0/20)
Zucchini/ Puthobag	–	41(28/69)	–	31(85/272)	19(35/186)	25(15/60)
Puthobag /Zucchini	0(1/164)	0(0/261)	0(0/207)	0(0/129)	0(0/ 60)	0(0/54)

1) Medium : 1/2 MS + Sucrose 35g/ℓ + NAA 0.1mg/ℓ + Kinetin 0.1mg/ℓ.

2) No. of embryos germinating/No. of ovules plated.

芽가 거의 되지 않았다.

胚珠 속의 胚를 관찰한 결과 東洋種이 母本인 組合들에서는 胚가 heart stage까지만 자라고 그 以上은 자라지 못했다. 따라서 胚의 退化가 pepo種이 母本일때에 비하여 훨씬 먼저 일어나기 때문에 發芽가 거의 되지 않아서 本 結果와 같은 相反交雜效果가 일어난 것으로 推定된다. 胚의 退化가 일찍 일어나게 되는 原因과 heart stage 以前의 상태에서 發芽시킬 수 있는 方法은 앞으로 밝혀져야 할 것이다.

페포種을 모본으로 했을 때는 heart stage 以後까지 자라다가 退化되어 갔는데 培養結果에서 볼 때 授粉後 5日된 胚의 發芽는 역시 어려웠다. 수분후 10일부터는 胚發芽率이 점차 떨어지고 있는 것으로 보아 *C. pepo*×*C. moschata*의 雜種胚는 10日 以後부터 退化가 많이 일어나는 것으로 推定되었다.

*C. moschata*와 *C. pepo*의 交雜時에는 成熟胚培養(Wall, 1954 ; 金과 徐, 1976)이나 本 試驗의 未熟胚培養에서나 *C. pepo*를 母本으로 했을 때 交雜植物體를 얻기 쉬웠다. 植物體 獲得率이나 作業의 難易度面에서 볼 때 未熟胚培養이 훨씬 效率的인 方法이기 때문에 種間交雜時 本 試驗의 結果를 利用하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

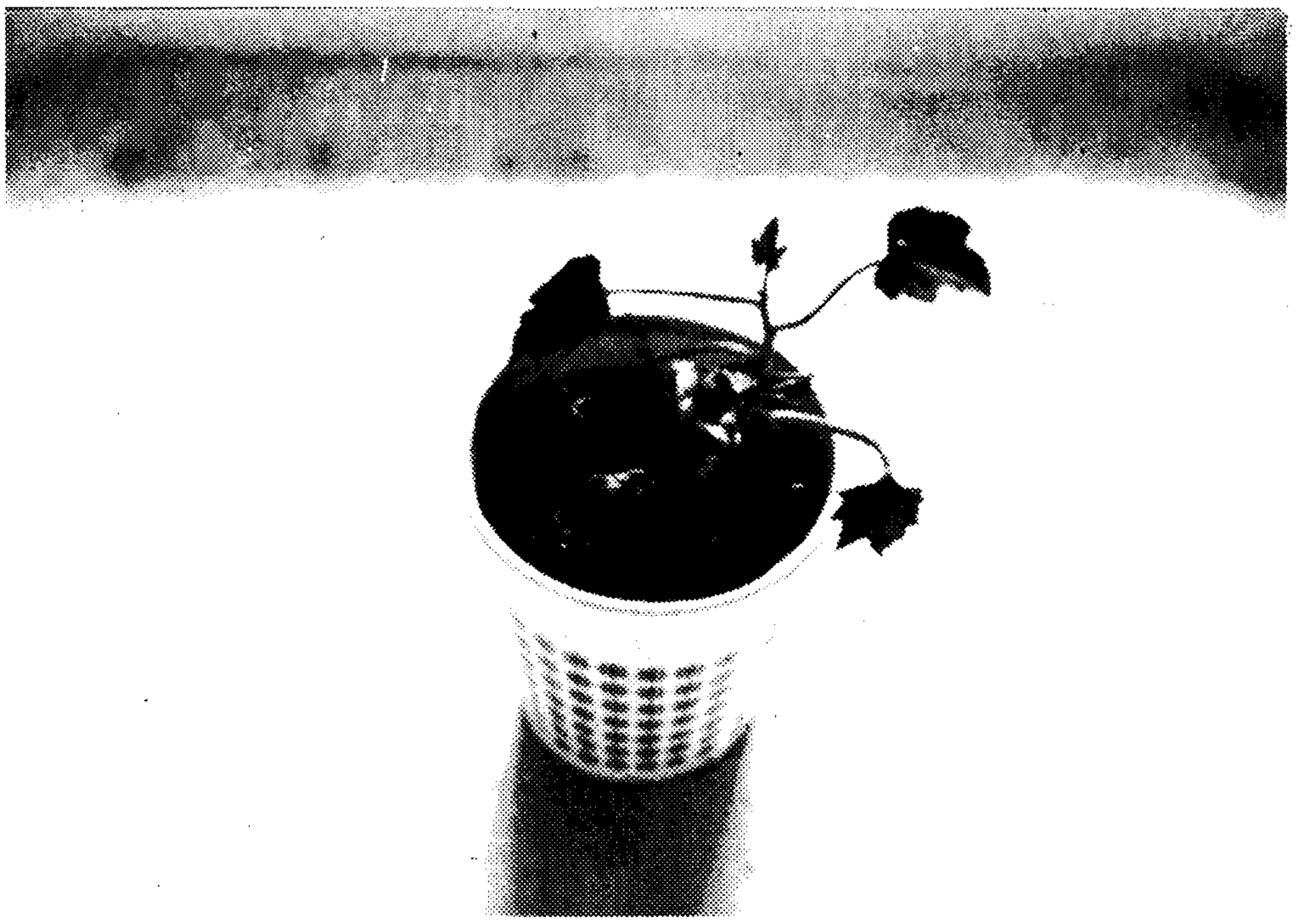


Photo. 2. A plant derived from half-cut ovule culture of *C. pepo*×*C. moshata*.

Photo. 3. Field-grown interspecific F_1 hybrid plant derived from the half-cut ovule culture.

引　用　文　獻

1. Balboa-Zavala, O. and F. G. Dennis, Jr. 1977. Abscisic acid and apple seed dormancy. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102 : 633－637.
2. Denna, D. W. and H. M. Munger. 1963. Morphology of the bush and vine habits and the allelism of the bush genes in *Cucurbita maxima* and *C. pepo* squash. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 82 : 370－377.
3. Hayase, H. 1950. Cucurbita-crosses. I. The pollen tube growth in interspecific crosse. Jap. Jour. Genet. 25 : 181－190.(In Japanese)
4. _____. 1956. Cucurbita-crosses. Ⅷ. On the reciprocal interspecific hybrids between *C. maxima* and *C. moschata*. Res. Bull. Hokkaido Natl. Agric. Sta. 70 : 15－29.(In Japanese)
5. _____. 1957. Cucurbita-crosses. Ⅺ. Cytogenetical studies on *C. Maxima*×*C. pepo* F_1 hybrids. Res. Bull. Hokkaido Natl. Agric. Sta. 72 : 48－58.(In Japanese)
6. _____. 1960. Physiological studies on the pollination of the genus *Cucurbita*, with special reference to the fertilizing power of pollen and anther dihiscence. Hokkaido Natl. Agric. Exp. Sta. Rept. 54.
7. _____. 1963. Cucurbita crosses. XV. Flower pollination at 4 a.m. in the production of *C. pepo*×*C. moschata* F_1 hybrids. Jap. J. Breed. 13 : 76－82.
8. 香川冬夫. 1957. 種屬間交雜による作物育種學.

9. Ke, S., R. M. Skirvin, K. D. McPheeters, A. G. Otterbacher, and G. Galletta. 1985. In vitro germination and growth of *Rubus* seeds and embryos. HortScience 20 : 1047－1049.
10. Kim, B. H. and Y. G. Seo. 1976. Studies on the interspecific hybrids of *Cucurbita* species. II. Breeding process and characteristics of Bulam Sacheol Aehobag. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 17 : 38－46.(In Korean)
11. Kouider, M., S. S. Korban, R. M. Skirvin, and H. Joung. 1985. The relationship of apple embryos and their cotyledons to maturity, dormancy, and the potential to form shoots *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110 : 93－96.
12. Kwack, S. N. and K. Fujieda. 1985. Pollen tube growth and embryo development in interspecific crosses of *Cucurbita*. J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 30 : 1－8.
13. _____. 1987. Seed abortion and techniques for obtaining hybrids in interspecific crosses of *Cucurbita*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 55 : 455－460.
14. _____. 1988. Growth habit in populations of an interspecific cross *Cucurbita pepo*×*C. moschata*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 29 : 9－12.
15. Lee, S. S. and Y. J. Yoon. 1987. Anther culture of ×*Brassicoraphanus*. Cruciferae Newsl. 12 : 68－69.
16. _____, H. H. Shin, Y. J. Yoon and H. D. Kim. 1989. Obtaining intergeneric hybrid between *Brassica campestris* and *Raphanus sativus*

by means of ovule culture and anther culture of derived F_1 plants.(In preparing)

17. Mayer, A. M. and A. Poljakoff-Mayber. 1975. Dormancy, germination inhibition and stimulation. In : Germination of Seeds. Pergamon Press.

18. Nakajima, T. 1962. Physiological studies of seed development, especially embryonic growth and endosperm development. Bull. Univ. Osaka. Pref., Ser. B 13 : 13－48.

19. Om, Y. H. and K. H. Hong. 1989. Evaluation of parthenocarpic fruit set in Zucchini squash. Res. Rept. RDA(H) 31 : (In the press, In Korean)

20. _____, D. G. Oh, and K. H. Hong. 1987. Inheritance of vining and lateral branching on main stem in *Cucurbita pepo* L. Korean J. Breed. 19 : 382－385.(In Korean)

21. Pearson, O. H., R. Hopp, and G. W. Bohn. 1951. Notes on species crosses in *Cucurbita*. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 57 : 310－322.

22. Raghavan, V. 1977. Applied aspects of embryo culture. In: J. Reinert and Y. S. P. Bajaj (eds.). Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Springer-Verlag Berlin Heidelberg N. Y. pp.375－397.

23. Wall J. R. 1954. Interspecific hybrids of *Cucurbita* obtained by embryo culture. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 63 : 427－430.

24. Washek, R. L. and H. M. Munger. 1983. Hybridization of *Cucurbita pepo* with disease resistant *Cucurbita* species. Cucurbit Genetics Coop. Rept. 6 : 92－93.

25. Whitaker, T. W. 1962. An interspecific cross in *Cucurbita* : *C. ludeliana* Bailey×*C. maxima* Duchesne. Euphytica 11 : 273－281.

26. _____. 1974. Cucurbita. In: R.C. King (ed.). Handbook of Genetics 2. Plenum Press, New York. pp.135－144.

27. Yang, S. J., B. G. Oh, J. C. Koh, and G. S. Chung. 1988. The application of tissue culture for interspecific hybrids in rice. I. Development of interspecific F_1 hybrids through embryo rescue. Kor. J. Plant Tissue Culture 15 : 33－38.(In Korean)

注　　意

1. 이 報告書는 科學技術處에서 施行한 特定研究開發 事業의 研究報告書이다

2. 이 研究開發 內容을 對外的으로 發表할 때에는 반드시 科學技術處에서 施行한 特定研究開發 事業의 研究結果임을 밝혀야 한다.