RESEARCH ARTICLE https://doi.org/10.7235/HORT.20230020

Hydrangea arborescens 'Pink Annabelle'과 *H. paniculata* 'Polar Bear'의 종간 교배에서 수정 후 장벽 확인과 적정 배양 시기 구명

박성화[1,2] · 한태호[1,2*]

[1]전남대학교 원예학과, [2]전남대학교 IT-Bio 융합시스템공학부

Investigation of the Post-fertilization Barrier and Appropriate Culture Time During the Interspecific Hybridization of *Hydrangea arborescens* 'Pink Annabelle' and *H. paniculata* 'Polar Bear'

SeongHwa Bak[1,2] and Tae-Ho Han[1,2*]

[1]Department of Horticulture, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea
[2]Interdisciplinary Program in IT-Bio Convergence System, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

*Corresponding author: wageningen@hanmail.net

Received: May 9, 2022
Revised: October 4, 2022
Accepted: October 15, 2022

OPEN ACCESS

HORTICULTURAL SCIENCE and TECHNOLOGY
41(2):214-223, 2023
URL: http://www.hst-j.org

pISSN : 1226-8763
eISSN : 2465-8588

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright©2023 Korean Society for Horticultural Science.

본 연구는 농림수산식품부 수출전략기술개발사업 (과제번호: 315041-05)의 지원으로 수행되었음.

Abstract

Interspecific hybridization, referring to the transfer of various traits into another species, is an important method to expand diversity in flowering plants. It is very difficult to form seeds and obtain seedlings due to various factors. Post-fertilization barriers can be overcome by embryo rescue strategies in general. The purpose of this study is to establish a protocol to improv the success of the interspecific hybridization of hydrangeas by identifying seed abortion and optimal ovule stages in the presence of post-fertilization barriers. *Hydrangea arborescens* and *H. paniculata* were crossed, and ovaries and seeds were observed every week from three weeks after pollination (WAP). Ovules were cultured *in vitro* from 5 WAP. As a result, it appeared that the ovaries had matured normally. Embryos in the ovary started to form between 4 and 5 WAP and developed between 5 and 7 WAP. Forty five out of 2,905 cultured ovules germinated, indicating a very low germination rate of 1.6%. Early embryos from 5 to 7 WAP, the early stages of embryo formation and development, had a low germination rate and a long germination period (average of 23.3 days). The germination rate was relatively high and the period for germination (average 11.6 days) was relatively short in cultured ovules from 8 WAP. A sharp increase in the germination period (33 days) and ovule collapse were observed at 14 WAP. In conclusion, post-fertilization barriers appeared to occur between 13 and 14 WAP, and the optimal period for the culturing of ovules was between 8 and 12 WAP for interspecific hybridization (*H. arborescens* x *H. paniculata*).

Additional key words: cross-breeding, embryo degeneration, embryo development, ovule culture, postzygotic barrier

서 언

수국(*Hydrangea* L.)은 Hydrangeaceae과(family) Hydrangea속(genus)에 속하며, 낙엽성 관목으로 크고 화려한 색상의 꽃으로 절화뿐만 아니라 정원용 식물로도 그 인기가 대단하다(Bak et al., 2021b). 미국에서는 연간 관목판매의 13.5%인 약 1,000억원 규모의 시장성이 있으며(Owen et al., 2016), 국내에서는 절화 거래량 상위 8위로 연간 45만본 거래되고 분화 및 각종 조경용 시장에서도 인기가 많은 주요 화훼 작물이다(aT, 2021). 수국은 23종으로 분류되며 주요 원예 종으로는 *Hydrangea macrophylla*, *H. serrata*, *H. paniculata*, *H. arborescens*, *H. quercifolia*, *H. aspera, H. anomala*로 7종이 있다(Bak et al., 2021a). 그 중 가장 인기있는 종으로는 *H. macrophylla*와 *H. serrata*가 있지만 저온 저항성이 낮아 이를 향상시키고자 하는 육종적 노력이 지속되고 있다. 저온 저항성을 가진 주요 종으로는 *H. paniculata*와 *H. arborescens*가 있으며 최근에는 저온 저항성이 강하고 관상 기간이 길어 정원 식재에 자유로운 *H. paniculata*와 *H. arborescens, H. quercifolia*등의 인기가 증가하고 이에따라 품종 개발에 관심이 증가하고 있다.

*Hydrangea arborescens*의 원산지는 북아메리카이며 직립 또는 반직립으로 2 – 3m정도 자란다. 직선의 긴 줄기와 아주 커다란 연한 줄기의 완전화와 불완전화로 구성된 원형 화서를 가진 종으로 커다란 꽃받침이 발달된 불완전화가 흰색 또는 분홍색으로 5월 말부터 개화한다(Dirr, 1998). 한국의 온실에서 재배 시 한여름 고온으로 인해 분홍색으로 발현되지 않고 흰색으로 나타나는 경우가 종종 있다. 식물체는 기부에서 다수의 신초가 발생되고 당 해에 올라온 신초에서 꽃눈이 형성되기 때문에 이른 봄 서리 피해로 불량 개화나 꽃이 피지 못하는 일이 발생하지 않는다. 상대적으로 전정 시기에 제약을 받지 않는 특성으로 5월 첫 개화 후 전정을 통해 신초를 발생시켜 10월까지 개화를 유도하여 오랜 기간 관상할 수 있다. 수국 종들 중에서는 고온과 저온에 강한 편에 속하고 저온 저항성이 상당히 높은 편으로 USDA Zone 4(−34.4 ~ −28.9°C)에 속한다(Reed et al., 2001). 세포유전학적 연구는 적으나, 유전체 크기는 조사된 수국 종 중에 상대적으로 작은 편인 2.64 pg/2C이고 염색체 개수는 2n = 36 또는 38개로 조사되어진 바 있다(Kudo and Niimi, 1999; Cerbah et al., 2001; Jones and Reed, 2006). *Hydrangea arborescens*에 대한 유전학적 정보는 적지만 다른 종들과의 유전적 거리와 유사도를 바탕으로 계통발생학 연구를 통해 종간 교잡의 어려움을 극복하고 신품종 육성에 이용 가능한 임성이 있는 종간 교잡종(bridge plants)을 개발하기에 적합한 종으로 보고된 바 있는 잠재적 가치가 높은 종이다(Mendoza et al., 2013).

*Hydrangea paniculata*는 일본, 중국, 대만이 원산지로 알려져 있고 관목형으로 3 – 4.5m까지 자란다 (Lancaster and Wesley, 2008). 꽃은 원뿔형 화서에 완전화와 불완전화가 생기고 꽃받침이 비대한 불완전화가 외부에 관상용으로 보여진다. 꽃받침 색은 흰색으로 피고, 몇 품종은 시간이 지남에 따라 분홍빛으로 변하기도 한다(Reed and Rinehart, 2009). 보통 한여름부터 늦가을까지 개화하며 당해 발생된 신초에서 꽃이 피어 개화 기간 중 전정으로 더욱 오래 관상 할 수 있다. *Hydrnagea paniculata*는 USDA Zones 3(−40 ~ −34.4°C)에 속할 만큼 *Hydrangea* 종 중 저온저항성이 가장 강한 것으로 알려져 있으며 많은 경우 정원용으로 식재되어 왔으나 최근에는 절화용으로도 이용되고 있다(Leeson et al., 2004). 세포유전학적연구는 몇 차례 진행되어져 유전체 크기나 염색체 수 또는 분자 마커 개발 등이 이루어졌다. 유전체 크기는 조사되어진 종 중 가장 큰 7.00pg/2C로 알려져 있고(Cerbah et al., 2001; Zonneveld, 2004), 염색체는 n = 18과 n = 36으로 2배체(2n = 2x = 36)부터 6배체(2n = 6x = 108)까지 다양하게 조사된 바 있으나 일반적인 원예종은 4배체(2n = 4x = 72)로 보고되어졌다(Sax, 1931; Funamoto and Tanaka, 1988; Funamoto and Ogawa, 2002; Zonneveld, 2004; Van Laere et al., 2008; Reed and Rinehart, 2009). *Hydrangea paniculata*는 저온저항성이 가장 높은 종으로 가장 인기있는 *H. macrophylla*의 형질 개선에 많이 이용되는 주요 종이지만 형태학적으로 다양하지 못하여 다양성 확대가 필요한 종이다.

종간 교배는 화훼식물에서 다양성이 낮은 종들 및 다양한 형질들을 여러 종에 도입하는데 중요한 수단이다(Langton, 1987). 하지만 여러가지 요인에 의해 종자 형성 및 실생 획득은 매우 어렵다. 여러가지 요인에는 서로 다른 염색체 수, 유전체 크기, 수정 전 장벽(pre-fertilization barrier) 그리고 수정 후 장벽(post-fertilization barrier or postzygotic barrier)등이 있다. 그 중 수정 전 장벽은 종자 형성 자체가 되지 않는 것이고 수정 후 장벽은 종자는 형성되나 형성된 종자가 일정 단계 이상 발달하지 못하

거나 발달 중 퇴화하여 종자를 얻지 못해 실생 획득이 어렵다. 수정 전 장벽은 수정이 안되어 자방의 비대가 확인되지 않는 반면 수정을 통한 자방의 비대가 확인되면 수정 전 장벽이 아닌 것으로 본다(Cai et al., 2015).

수국에서는 몇 차례 종간 교잡이 시도되었고 종간 교배 후 자방의 비대가 확인됨에 따라 수정 후 장벽이 존재한다고 알려져 있다(Bak and Han, 2022). 또한 이것은 인위적인 방법에 의해 극복이 가능하며 그 방법으로는 자방 배양, 배 배양, 배주 배양 등이 있고 이것을 통한 종간 교잡체 획득 사례가 보고된 바 있다(Reed et al., 2001; Jones et al., 2006; Yoon et al., 2006; Kudo et al., 2008; Reed et al., 2008; Cai et al., 2015; Laojunta et al., 2019). 특히, Reed(2000)는 종간 교잡체 개발에 이용되는 자방 배양 기술에 집중하여 배지의 조성과 수분 후 경과 주수에 따른 배주 배양을 시행하였다. 배지는 Garmborg's B5, 2% sucrose 배지에서 가장 높은 발아율을 얻어 적정 배지로 선정하였다. 수분 후 주 수에 따른 열매 배양 결과로는 6주 전까지는 제대로 된 식물을 얻지 못했고 7주 이상부터는 박테리아 오염의 위험이 있으나 9 – 10주 사이의 배주를 배양하였을 때 추정 식물을 얻을 수 있었다. 피망에서는 종간 교잡 시 발생되는 수정 후 장벽에 따른 배주의 성숙 단계에 대한 정밀한 조사를 바탕으로 극복사례가 보고되었다(Yoon et al., 2006). 고추 종간 교잡에서도 수정 후 장벽을 확인하고 배아의 성숙 단계에 따른 비정상 발달 단계를 보고하였다(Kamvorn et al., 2014). 아기장대에서는 수정 후 종자 발달에 관여하는 유전자와 메커니즘을 밝혀 수정 후 장벽에 본질적으로 접근할 수 있는 연구 결과를 보고함으로 종간 교배 수정 후 장벽 극복에 새로운 접근을 제시하였다(Milutinovic et al., 2019).

수국에서는 Reed(2000)의 보고 이외의 다른 수정 후 장벽 극복을 위한 배양 시기 차이에 대한 연구는 없었고 기 연구 내용에는 수분 후 종자의 퇴화의 진행 시점과 적정 배주 성숙 단계에 대한 구체적인 연구가 부족하다. 이에 본 연구를 통해 수국 종간 교잡 시(*H. arborescens* x *H. paniculata*)에 수정 후 장벽을 확인하고 발생 시점과 적정 배주 성숙 단계를 구명하여 수국의 교잡종 획득률 향상을 통한 유전적 다양성 확대의 기반을 마련하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료 및 교배

Hydrangea arborescens 'Pink Annabelle'과 *H. paniculata* 'Polar Bear'를 실험 재료로 사용하였다(Fig. 1). 식물은 전남대학교 내의 유리온실에서 재배하였으며, 개화 기간동안 5월부터 10월까지 65~75% 차광 하에 EC 1.5와 pH 5.5로 조절된 양액재배하였다. 모본으로 *H. arborescens* 'Pink Annabelle'을 사용하고 부본으로는 *H. paniculata* 'Polar Bear'의 꽃가루를 사용해 2019 – 2020년 6월부터 10월 사이에 교배를 진행하였다. *Hydrangea arborescens* 'Pink Annabelle'의 화서가 약7cm로 발달했을 때 불완전화를 제거하고 50 – 100개의 완전화만 남기고 나머지를 제거하여 화서를 성장시켰다. 완전화의 봉오리

Fig. 1. *Hydrangea arborescens* 'Pink Annabelle' used as the maternal plant and *H. paniculata* 'Polar bear' used as the pollen parent. Mophead type flower of *H. arborescens* 'Pink Annabelle' (A), leaf of *H. arborescens* 'Pink Annabelle' (B), con-head type flower of *H. paniculata* 'Polar bear' (C), and leaf of *H. paniculata* 'Polar bear' (D).

가 녹색에서 상아색으로 변하고 비대해지면 제웅을 하고 다른 꽃가루의 오염을 막기위해 유산지 봉투를 씌워 놓았다. *Hydrangea paniculata* 'Polar Bear' 의 당일 개화한 꽃가루를 수집하여 교배에 이용하였으며, 수집된 꽃가루는 4°C 저온 저장고에 저장 후 4 – 7일을 주기로 교체하였다. 제웅 후 1 – 2일이 지난 모본의 주두가 흰색으로 벌어지면 붓을 이용해 꽃가루를 주두에 충분히 묻힌 후 봉투를 씌웠다가 3 – 4일 지나 봉투를 제거하고 교배된 자방을 실험에 이용하였다.

자방 및 종자 관찰

2019년 교배 한 자방을 수분 후 3주부터 13주까지 매주 10개 수확하여 실체 현미경(Stemi2000-C, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하고 디지털 카메라(EOS 450D, Canon, Japan)로 촬영 후 iSolution Lite(IMT iSolution Lite, ver. 9.1, Canada)로 사진을 편집하였다. 관찰된 자방은 소독하지 않고 실체현미경 하에서 메스와 핀셋을 이용해 절단하고 배주를 적출하여 자방 당 적출된 종자의 수를 기록하고 MS 배지(Murashge and Skoog's medium)에 치상하여 종자 발달 확인에 사용하였다. 수분 후 3주부터 15주까지 매주 적출하여 치상 된 종자는 디지털 카메라(EOS 450D, Canon, Japan)를 이용해 촬영하고 iSolution Lite(IMT iSolution Lite, ver. 9.1, Canada)로 편집하였다.

배주 배양

2020년 교배 후 비대해진 자방은 수분 후 5주부터 14주까지 매주 수확하여 배주 배양에 사용하였다. 사용된 배주는 70% Ethyl alcohol에 1분 소독 후1% Sodium hypocloride에 Tween 20을 한 방울 첨가하여 멸균 작업대 내부에 두고 작업대의 UV 등(G30T8, SANKYO DENKI, Japan)을 이용하여 10분 자외선 하에서 소독한 다음 멸균수에 2회 수세하였다. 소독이 완료된 자방은 멸균 작업대 내부 실체현미경(Stemi-DV4, Carl Zeiss, Germany) 하에서 메스와 핀셋을 이용하여 배주를 적출하여 3% Sucrose가 첨가된1/2MS배지와 3% Sucrose가 첨가된 1/2Garmborg's B5배지에 치상하였다.

데이터 분석

Microsoft 365 Excel을 이용하여 데이터를 취합하고 분석하였다. 이미지 데이터는 iSolution Lite(IMT iSolution Lite, ver. 9.1, Canada)를 이용해 1차 편집하고 Imagej software(ImageJ 1.52a, National Institutes of Health, USA)를 이용하여 재편집하였다.

결과 및 고찰

자방 및 종자 발달

자방은 수분 후 2주부터 눈에 띄게 비대해져 수분 후 수정이 성공적으로 이루어짐을 확인하였다. 수정 후 장벽의 유무를 형태학적 변화로 알아보기 위해 3주부터 자방을 채취하여 관찰하였으나 3주부터 9주까지 초록색깔로 비대해진 자방은 큰 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2). 10주부터는 서서히 노란빛을 띄며 11주부터는 건조되어지는 자방이 관찰되었다(Fig. 2I). 그 이후 12 – 13주는 지속적 건조 단계로 큰 변화가 없어 이후 관찰이 무의미하였다.

수정 후 장벽의 확인과 시기 유추를 위한 수분 후 경과 주에 따른 종자의 형성과 발달 단계를 확인하였다. 수분 후 3 – 4주차의 종자는 형태가 확인되고 반투명 또는 우윳빛을 띄고 있었으나 배가 확인되지 않았다(Fig. 3A and 3B). 수분 후 5주의 종자는 내부에 백색의 배가 확인되었다(Fig. 3C). 배주 내부의 배는 수분 후6주부터 7주까지 비대해지며 발달하였고 수분 후 8주 이후 배는 수분 후 7주의 배와 크기가 비슷하였다. 이러한 배의 발달로 보아, 수분 후 6주부터는 새로운 배의 형성은 관찰되지 않고

기존 형성된 배의 발달 및 성숙과정이 관찰되어 수분 후7주에 배의 발달이 완료된 것으로 보인다. 이는 배의 형성 및 발달이 특정 시기에 이루어지고 특정 시기를 놓치면 더 이상 배가 발생되지 않는 것으로 보인다. 결과적으로 배주 내부의 배는 수분 후 4주에서 5주사이에 형성되고 배의 형성 이후부터 7주까지는 배의 발달기로 보인다. *Capsicum annuum*과 *C. baccatum*의 종간 교잡에서 수분 후 경과 일수에 따른 배의 발달을 관찰하여 Globular stage부터 Heart stage, Torpedo stage, Cotyledonary stage로 나누었다(Yoon et al., 2006). 수국 종자는 1mm가 되지 않기 때문에 배의 발달에 따른 내부의 형태를 명확하게 확인하기 어려워 단계 분리가 어려웠으나 수분 후 4주부터 7주 사이에 배 형성과 발달의 단계로 보임에 따라 이때 Globular stage부터

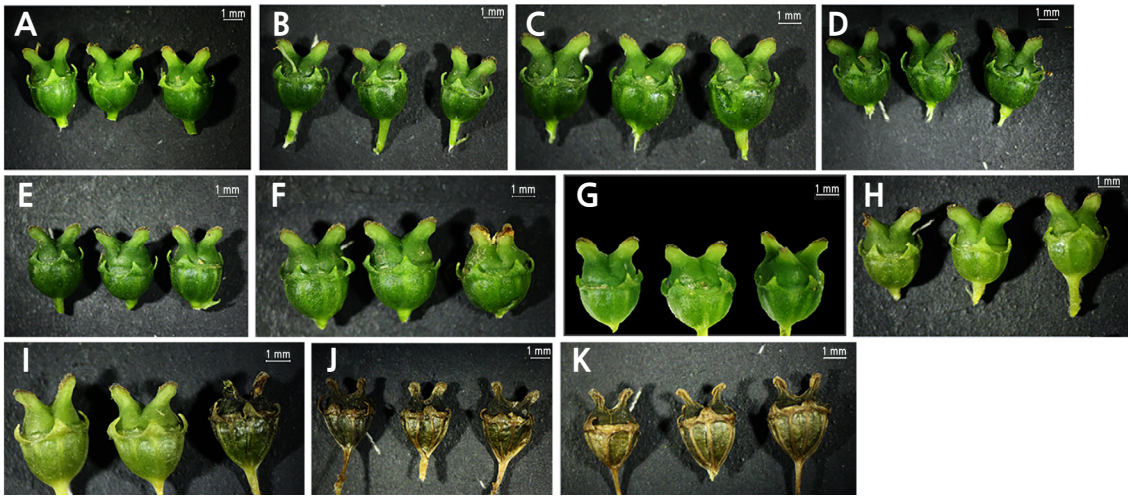

Fig. 2. Maturation of capsules in the hybrid (*H. arborescens* 'Pink Annabelle' x *H. paniculata* 'Polar bear'). Three weeks after pollination (A), four weeks after pollination (B), five weeks after pollination (C), six weeks after pollination (D), seven weeks after pollination (E), eight weeks after pollination (F), nine weeks after pollination (G), ten weeks after pollination (H), 11 weeks after pollination (I), 12 weeks after pollination (J), and 13 weeks after pollination (K).

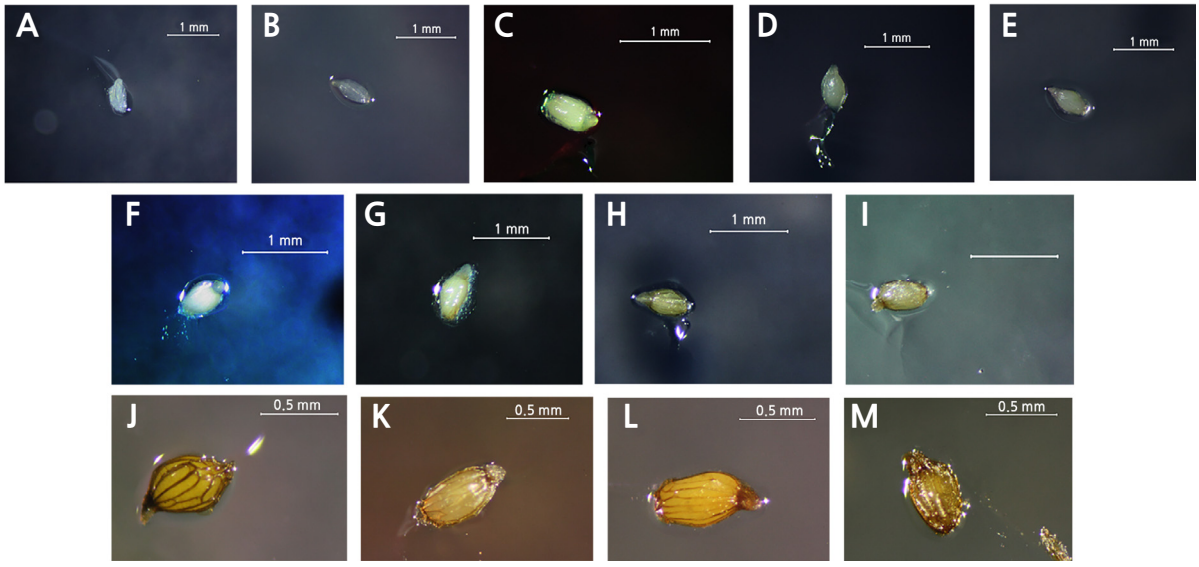

Fig. 3. Maturation of seeds in the hybrid (*H. arborescens* 'Pink Annabelle' x *H. paniculata* 'Polar bear); three weeks after pollination (A), four weeks after pollination (B), five weeks after pollination (C), six weeks after pollination (D), seven weeks after pollination (E), eight weeks after pollination (F), nine weeks after pollination (G), ten weeks after pollination (H), 11 weeks after pollination (I), 12 weeks after pollination (J), 13 weeks after pollination (K), 14 weeks after pollination (L), and 15 weeks after pollination (M).

Cotyledonary stage로 진행되는 것으로 보인다(Fig. 2). 또 Globular stage부터 Torpedo stage는 급격한 형태와 크기변화를 보이는데 본 연구의 배 발달에 비춰보면 수분 후 4 – 5주에 Globular stage가 시작되고 수분 후 5 – 6주에 Torpedo stage를 거치는 것으로 보인다(Fig. 2). Cotyledonary stage는 약간의 비대가 추가적으로 진행됨에 따라 본 연구에서는 수분 후6주에서 7주 사이에 배의 비대가 관찰되어 수분 후 6주부터 Cotyledonary stage로 확인된다.

Reed(2000)는 수국 종내 교배를 통해 수분 후 3 – 4주 된 종자는 반투명 종자로 수분 후 5 – 6주 된 종자는 불투명 종자로 구분하였다. 본 실험의 종간 교배를 통해 획득한 배주는 4주까지는 반투명 종자였고 5주부터는 불투명하게 내부의 배가 확인되어 Reed(2000)와 같은 결과를 얻었다. *Capsicum annuum*과 *C. baccatum*의 종간 교배의 사례와 애기장대의 수정 후 장벽과 종자 발달 기작 연구에서 돌연변이나 종간 교배의 종자의 발달은 일반 종자 발달보다 5일 또는 7일이 지연되었다고 보고하였으나(Kamvorn et al., 2014; Milutinovic et al., 2019), 수국에서는 지연되는 것을 확인할 수 없었다. 이는 1주일 단위의 조사로는 알 수 없는 1 – 6일 정도의 지연이 발생하였거나 교배에 사용된 두 종의 세포 유전학적 차이가 수정 후 분열에 어려움이 생기지 않을 정도였을 것으로 사료된다.

배주 배양

수분 후 5주부터 배가 확인됨에 따라 수분 후 5주부터 1주일 단위로 자방을 채취해 배양하였다(Table 1 and Fig. 3). 배양에는 불투명하고 하얀 배가 확인되는 배주만을 사용하였다. 총 336개의 자방을 실험에 사용하였고 자방에서 2,905개의 배주를 적출하여 치상하였다. 전체기간 45개 발아하였고 평균 발아율은 1.56%로 매우 저조하였다(Table 1). 종자 형성과 발달기로 추정되는 수분 후 5 – 6주는 489개중 5개가 발아하여 다른 수분 후 경과 주에 비교해 발아율(평균 1.1%)이 낮았다. 발아율 자체가 매우 낮기 때문에 어느 시기에 발아율이 높다고 결론내기는 조심스럽다. 하지만 배의 완전 발달기 이후인 수분 후 7주부터 12주까지 1,652개의 배주를 치상하여 35개가 발아하였고 평균 2.12% 발아율을 보였다. 특히, 수분 후 9주에는 3.14%, 10주에는 2.92%, 11주에는 2.01%로 2%가 넘는 발아율을 보였다. *H. macrophylla* x *H. paniculata*의 종간 교배에서는 수분 후3 – 4주 된 종자와 5 – 6주된 종자의 발아율은 5가지 교배 조합 중 4개의 조합에서 5 – 6주 된 종자의 발아율이 더 높았고, 1개의 조합에서 낮아졌는데 표준오차(SE) 범위 이내였다(Reed, 2000). Cai et al.(2015)은 *H. macrophylla* x *H. arborescens* 종간 교배 수분 후 60 – 65일(약 8 – 9주) 뒤에 195개의 자방을 배양하여 56개의 식물체를 얻었고 최종 14개의 식물을 획득하는데 성공하였다. *H. macrophylla* x *H. paniculata*의 종간 교배에서 수분 후 3 – 10주 사이의 배주를 배양하여 140개 이상의 식물체 획득하

Table 1. Number of capsules, seed, germinated seed, and the germination rate used for ovule culturing. According to the number of weeks after pollination (WAP)

Traits	Week after pollination											Total
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
No. capsules	36	31	29	27	23	64	22	31	21	36	16	336
No. seeds[z]	171	318	320	313	191	411	149	268	283	345	136	2,905
No. germinated seeds	2	3	6	4	6	12	3	4	0	3	2	45
Germination rate (%)	1.17	0.94	1.88	1.28	3.14	2.92	2.01	1.49	0	0.87	1.47	1.56
Day to germination[y]	31	23	16	10	9	11	14	14	13	33	30	

[z]No. Seed counts for the number of ovules including embryo among the seeds inside the ovary. Ovules at 3-4 weeks are not recorded as they do not show embryos.

[y]Days from embryo culture date to seed germination date according to the number of weeks after pollination. The days were counted based on the ovule culture created through interspecific cross breeding (*H. arborescens* 'Pink Annabelle x *H. paniculata* 'Polar Bear') in 2020. The count included the date of the first germinating plant among ovule cultures for each week (5-14 weeks). Table 1 presents the number of embryo cultures per week.

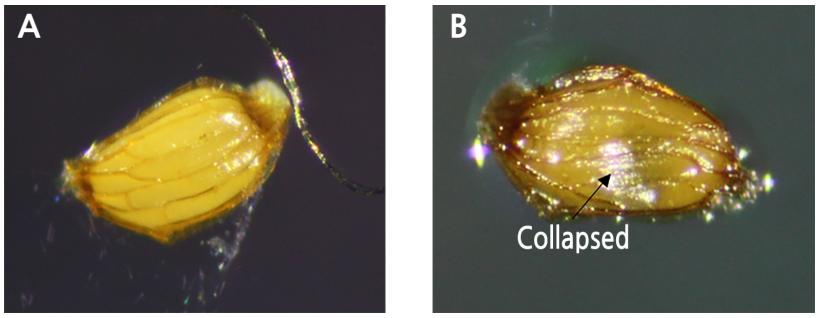

Fig. 4. Ovule degeneration in the seeds of *H. arborescens* 'Pink Annabelle' x *H. paniculata* 'Polar Bear': a normal seed (A), and the collapsed seed (B).

였고 오래 성숙한 자방일수록 잡종의 활력이 높았다(Reed, 2000). 본 연구에서도 수분 후 3–6주 된 종자에서 식물체를 얻을 수 있었지만 캘러스로 분화하던지 토양으로 옮기기 전 조직배양 배지상에서 고사하였다. 따라서 더 성숙한 종자 일수록 발아율이 더 높고 식물체 획득률이 높아지는 것으로 보인다(Table 1). 하지만Reed(2000)는 종간 교배 수분 후 7–8주 된 종자를 배양했으나 오염(핑크박테리아)이 심하여 실험에서 배제하였으나, 본 연구에서는 수분 후 14주까지 배양하였고 오염은 극히 드물었다. 자방 소독시에 자외선을 동시 처리하여 오염율을 낮출 수 있었을 것으로 사료된다. 하지만, 소독 후 치상하지 않고 3일 이상 보관한다면 심하게 곰팡이 오염이 발생되고 재소독을 통해서도 해결할 수 없기 때문에 자방을 소독한 후 1–2일 내에 적출하여 치상하는 것이 필요하다.

배주의 퇴화시기 및 적정 배양 시기를 확인하기 위해 수분 후 경과 주수에 따라 최초 발아하기까지 소요일수를 기록하였다(Table 1). 형태적으로 수분 후 5주부터 7주까지는 배의 형성과 발달 시기로, 이 시기에 배주 배양에 사용된 배주는 미성숙 배 상태로 이후 시기에 비하여 발아가 약 12일 늦었다. 배의 완전 발달 이후인 수분 후 7주 이후 배주를 배양한 결과, 대체로 9–14일 사이에 최초 발아가 확인되었다. 하지만 수분 후 14주 된 배주는 발아 소요 일이 34일로 2배 이상 발아가 늦어지는 것을 확인하였다. 이는 수분 후 14주 배주에서 함몰 발생이 다수 관찰됨에 따라 종자의 퇴화 진행으로 보인다(Fig. 4). 이러한 이유로 수분 후 14주차 배주 배양에서 최초 발아 소요 일수가 증가하는 것으로 보인다. *Alstroemeria* 종간 교잡에서 배주의 발달은 조직학적으로 관찰되었고 그 결과 배유와 배의 발달 침체와 함몰을 기반으로 배주의 퇴화를 결정하였다(Buitendijk et al., 1995). 수국에서는 조직학적으로 정확한 확인은 하지 못했지만 수분 후 14주된 종자의 발아 소요 일수 증가와 종자의 함몰을 육안으로 관찰하였다. 결과적으로 *H. arborescens* x *H. paniculata* 종간 교배 시 수정 후 장벽으로 인한 종자의 퇴화는 수분 후 13–14주 사이에 발생하는 것으로 확인되었다.

발아 과정 후 생장상태

종간 교배 수분 후 5–7주 된 종자를 배양 한 결과 대부분의 종자는 발아하지 않았고 발아를 하더라도 캘러스가 되는 경우가 많거나, 비정상 발아하였다(Fig. 5). 종자가 정상적으로 떡잎전개가 완료된 상태만 발아 개수로 측정하였으나(Table 1), 캘러스 분화하는 경우가 정상 발아 수만큼 확인되었다(Fig. 5A). 유근은 발생되나 이후 떡잎 전개가 되지 않는 비정상 발아하는 경우도 관찰되었다(Fig. 5B). 드문 경우 발아를 하더라도 토양으로 옮겼을 때 고사하였으며 수분 후 전체 기간 중 현재까지 토양에 활착하여 1년이상 생육한 식물은 없었다(자료 미제시). 수국 종간 교잡 배주 배양 후 대부분의 식물체는 Cotyledonary Stage에서 고사하였다고 보고되었고(Reed et al., 2001), 본 연구의 Fig. 5C 원안의 식물은 떡잎까지 전개된 Cotyledonary Stage에 고사된 것으로 이전 보고와 동일한 결과를 확인하였다. 본엽 전개 이후까지 생육한 식물체가 확인되었지만 본엽 전개 이후 생장이 매우 느리다가 고사하거나(Fig. 5D), 떡잎과 본엽이 비정상적인 형태로 생육하다가 조직 배양상에서 고사하였고(Fig. 5E) 정상적인 떡잎과 본엽을 갖고 정상 생육을 하다가 더 이상 생육하지 못하고 서서히 고사하였다(Fig. 5F). 이는 두 교배

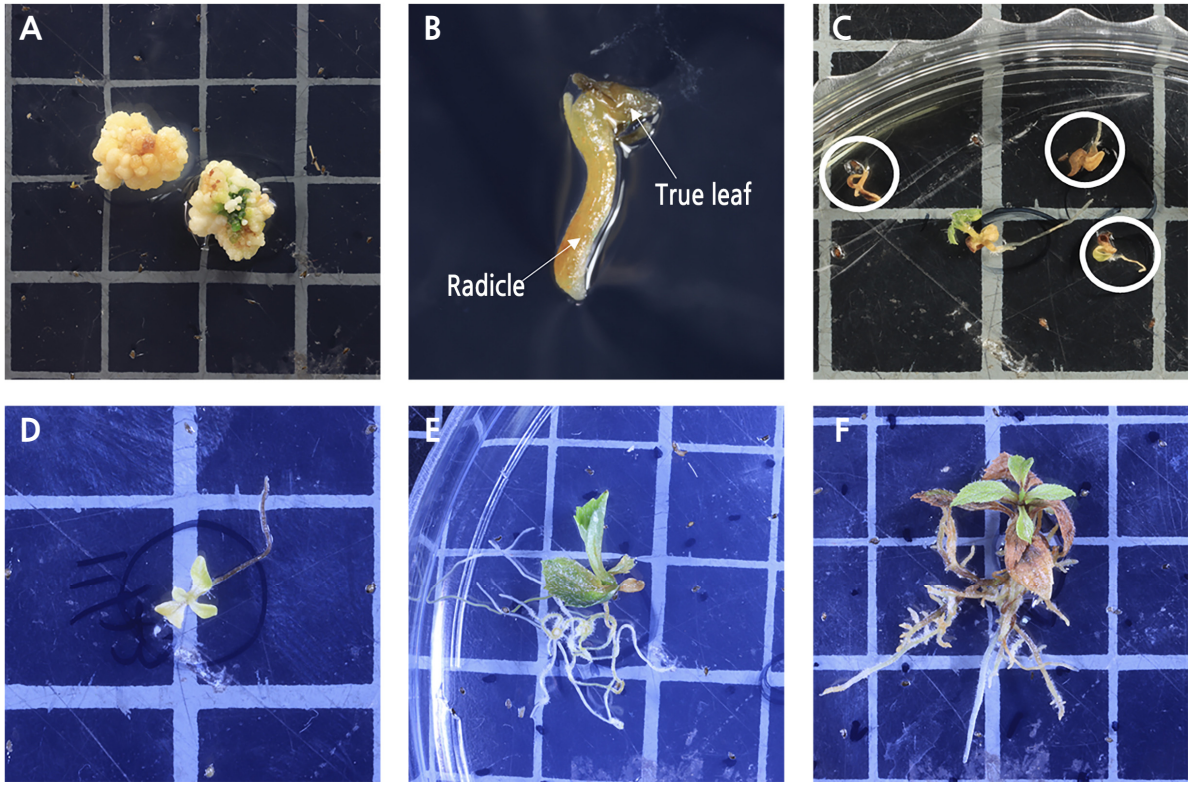

Fig. 5. Three types of seed germination and various types of plant death during interspecies hybridization. Callus (A), a type that died after the radicle was formed before the development of the cotyledon (B), plants that died in the cotyledon stage (C), plant with true leaf development from normal germination (D), plant with abnormal true leaf and epicotyl development from normal germination (E), and a plant that died during growth after normal germination (F).

종 사이의 유전학적 및 세포학적 불친화성으로 인한 결과로 보인다. 현재까지 수분 후 11 – 13주 사이의 배주에서 발아한 식물체가 조직배양 상에서 상당한 생육정도를 보여주었고 조직배양 상 생육과 토양 순화 과정 중에 있다(자료 미제시). 일반적인 경우에 종간 교잡은 교배 친화성이 낮아 생존율 및 임성의 감소가 관찰되어진다. 이러한 현상 속에서 발생된 식물체를 대상으로 후성유전학적인 잡종 강세의 이해와 이를 바탕으로 한 교배 전략 수립을 위해서는 향후 수분 후 경과주수 및 교배 시기에 따라 획득된 식물을 분리하여 생육을 관찰하고 획득 식물의 혼종성을 확인하는 연구가 필요 할 것이다.

이것을 종합해보았을 때, *H. arborescens* 'Pink Annabelle' x *H. paniculata* 'Polar Bear'의 종간 교잡 수분 후14주 종자에서 최초 발아 소요 일수 증가와 종자 함몰이 관찰되어 13 – 14주 사이에 퇴화가 일어나는 것으로 보이며, 종자 발달, 발아율 그리고 최초 발아 소요 일수를 토대로 8 – 13주 사이에 배주 배양을 시행하는 것이 적절할 것으로 보인다. 결과적으로, 교배 기간의 온도와 습도 차이에 따른 배주의 성숙 속도는 1 – 2주 정도 차이가 발생할 것으로 생각되어 수국 종간 교배(*H. arborescens* 'Pink Annabelle' x *H. paniculata* 'Polar Bear')의 적정 배주 배양 시기는 수분 후 9 – 12주로 교배 후 2 – 3개월 사이에 배주 배양을 시행하는 것이 적절 할 것이다.

초 록

종간 교배는 화훼식물에서 다양한 형질들을 여러 종에 도입하여 다양성을 확대하는데 중요한 수단이다. 여러가지 요인에 의해 종자 형성 및 실생 획득은 매우 어렵지만 그 중 수정 후 장벽은 배주 배양을 통해 극복 가능하다. 본 연구는 수국 종간 교잡

시(*H. arborescens* x *H. paniculata*)에 수정 후 장벽을 확인하고 퇴화 시점과 적정 배주 성숙 단계를 구명하여 수국의 교잡종 획득률 향상을 통한 유전적 다양성 확대의 기반을 마련하고자 한다. *H. arborescens* x *H. paniculata*를 교배하였고, 수분 후 3주부터 1주일 단위로 자방과 종자를 관찰하였다. 수분 후 5주부터 배주 배양을 시행하였다. 그 결과 자방은 자연스러운 자방의 성숙 단계로 관찰되었다. 배주는 수분 후 4 – 5주 사이에 배가 형성되고 수분 후 5 – 7주에 발달하고 발달이 완료되는 것으로 확인되었다. 배주 배양 전체 2,905개중 45개 발아하였고 평균 발아율은 1.6%로 매우 낮았다. 수분 후 5 – 7주는 배의 형성과 발달기로 상대적으로 낮은 발아율과 발아 소요 일이 길었다. 수분 후 8주부터는 상대적으로 높은 발아율과 발아 소요 일(평균 11.6일)이 짧았다. 하지만 수분 후 14주에 급격한 발아 소요 일(33일) 증가가 확인되었고 수분 후 14주 배주에서 종자의 함몰이 확인됨에 따라 수분 후 13 – 14주 사이에 퇴화가 시작되는 것으로 확인되었다. 결론적으로, *H. arborescens* x *H. paniculata*의 종간 교배시 수정 후 장벽으로 인한 종자 퇴화는 13 – 14주에 발생되며, 적정 배주 배양 시기는 8 – 12주이다.

추가 주요어 : 교배 육종, 배 퇴화, 배 발달, 배주 배양, 접합 후 장벽

Literature Cited

Bak SH, Han TH (2022) Development of an interspecific hybrid between *Hydrangea arborescens* 'Magical Pinkerbell' and *H. quercifolia* JNHQ01. Hortic Sci Technol 40:338-347

Bak SH, Jung HJ, Lim JM, Lee JS, Han, TH (2021b) The New Domestic Hydrangea macrophylla Cultivar 'Moonlight'. Hortic Sci Technol 39:832-837. doi:10.7235/HORT.20210073

Bak SW, Lim JM, Han TH (2021a) Inheritance of Hydrangea Inflorescence and Leaf Shape between Various Cross Combinations. Flower Res J 29:247-255. doi:10.11623/frj.2021.29.4.05

Buitendijk JH, Pinsonneaux N, Van Donk AC, Ramanna MS, Van Lammeren AAM (1995) Embryo rescue by half-ovule culture for the production of interspecific hybrids in *Alstroemeria*. Sci Hortic 64:65-75. doi:10.1016/0304-4238(95)00827-2

Cai M, Wang K, Luo L, Pan HT, Zhang QX, Yang YY (2015) Production of interspecific hybrids between *Hydrangea macrophylla* and *Hydrangea arborescens* via ovary culture. HortScience 50:1765-1769. doi:10.21273/HORTSCI.50.12.1765

Cerbah M, Mortreau E, Brown S, Siljak-Yakovlev S, Bertrand H, Lambert C (2001) Genome size variation and species relationships in the genus Hydrangea. Theor Appl Genet 103:45-51. doi:10.1007/s001220000529

Dirr MA (1998) Manual of woody landscape plants. Their identification, ornamental characteristics, culture, propagation and uses. Stipes Publ CO, Champaign, Illinois USA, p 554

Funamoto T, Ogawa M (2002) A cytogeographical study in *Hydrangea paniculata* Sieb.(Saxifragaceae sl) in Japan. Chromosome Sci 6:73-82

Funamoto T, Tanaka R (1988) Karyomorphological studies in some taxa of *Hydrangea* from Japan. La Kromosomo, 49:1583-1594

Jones KD, Reed SM (2006) Production and Verification of *Hydrangea arborescens* 'Dardom'× *H. involucrata* Hybrids. HortScience 41:564-566. doi:10.21273/HORTSCI.41.3.564

Jones KD, Reed SM, Rinehart TA (2006) Wide crosses in the Hydrangeaceae: *Dichroa febrifuga*× *Hydrangea macrophylla*. In Proc Southern Nursery Assn Res Conf 51:577-579

Kamvorn W, Techawongstien S, Techawongstien S, Theerakulpisut P (2014) Compatibility of inter-specific crosses between *Capsicum chinense Jacq*. and *Capsicum baccatum L*. at different fertilization stages. Sci Hortic 179:9-15. doi:10.1016/j.scienta.2014.09.003

Korea Agro-Fisheries & Food Trade Corporation (aT) (2020) Total transaction information by item. Accessed August 2021, https://flower.at.or.kr/hab04/hab04.do

Kudo N, Matsui T, Okada T (2008) A novel interspecific hybrid plant between *Hydrangea scandens* ssp. *chinensis* and *H. macrophylla* via ovule culture. Plant Biotech 25:529-533 doi:10.5511/plantbiotechnology.25.529

Kudo N, Niimi Y (1999) Production of Interspecific Hybrids between *Hydrangea macrophylla* f. hortensia (Lam.) Rehd. and *H. arborescens* L. J Jpn Soc Hortic Sci 68:428-439. doi:10.2503/jjshs.68.428

Lancaster N, Wesley W (2008) *Hydrangea paniculata*. RHS Plant Trials Bulletin, London, UK, 2:2-15

Langton FA (1987) Breeding for improved ornamental plants. Improving vegetatively propagated crops. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 159-180

Laojunta T, Narumi-Kawasaki T, Takamura T, Fukai S, (2019) A new interspecific hybrid of Torenia obtained through ovule culture. Hortic Environ Biotechnol 60:443-452. doi:10.1007/s13580-019-00136-6

Leeson T, Bale S, Jones RT, Dunwell W, McNiel R (2004) Extended vase life for cut stems of *Hydrangea paniculata*. In Proc Southern Nursery Res Conf 49:624-626

Mendoza CG, Wanke S, Goetghebeur P, Samain MS (2013) Facilitating wide hybridization in *Hydrangea sl* cultivars: a phylogenetic and

marker-assisted breeding approach. Mol Breed 32:233-239. doi:10.1007/s11032-012-9822-8

Milutinovic M, Lindsey III BE, Wijeratne A, Hernandez JM, Grotewold N, Fernández V, Brkljacic J (2019) Arabidopsis EMSY-like (EML) histone readers are necessary for post-fertilization seed development, but prevent fertilization-independent seed formation. Plant Science 285:99-109 doi:10.1016/j.plantsci.2019.04.007

Owen JS, Fulcher A, LeBude A, Chappell M (2016) Hydrangea production: Cultivar selection and general practices to consider when propagating and growing hydrangea. UT Ext doi:10.13140/RG.2.2.18534.01608

Reed SM (2000) Development of an in ovolo embryo culture procedure for Hydrangea. J Environ Hortic 18:34-39. doi:10.24266/0738-2898-18.1.34

Reed SM, Jones KD, Rinehart TA (2008) Production and characterization of intergeneric hybrids between Dichroa febrifuga and *Hydrangea macrophylla*. J Am Soc Hortic Sci 133:84-91. doi:10.21273/JASHS.133.1.84

Reed SM, Riedel GL, Pooler MR (2001) Verification and establishment of *Hydrangea macrophylla* 'Kardinal' x *H. paniculata* 'Brussels Lace' interspecific hybrids. J Environ Hortic 19:85-88 doi:10.24266/0738-2898-19.2.85

Reed SM, Rinehart TA (2009) Simple-sequence repeat marker analysis of genetic relationships within *Hydrangea paniculata*. HortScience 44:27-31. doi:10.21273/HORTSCI.44.1.27

Sax K (1931) Chromosome numbers in the ligneous Saxifragaceae. J Arnold Arbor 12:198-206. doi:10.5962/p.324566

Van Laere K, Van Huylenbroeck J, Van Bockstaele E (2008) Karyotype analysis and physical mapping of 45S rRNA genes in Hydrangea species by fluorescence *in situ* hybridization. Plant Breed 127:301-307. doi:10.1111/j.1439-0523.2007.01456.x

Yoon JB, Yang DC, Do JW, Park HG (2006) Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. Breed Sci 56:31-38. doi:10.1270/jsbbs.56.31

Zonneveld BJM (2004) Genome size in Hydrangea. Encyclopedia of hydrangeas. Timber Press. Oregon, Portland, pp 245-251