

유자(*Citrus junos* SIEB.)의 발생단계에 따른 미세구조적 특성

박민희, 이숙영¹⁾, 정현숙¹⁾, 이상래²⁾, 김홍섭

조선대학교 생물학과¹⁾, 유전공학과²⁾, 동양자원식물연구소

Ultrastructural Characteristics of Developmental Stages During *in vitro* Regeneration in *Citrus junos* SIEB.

Min Hee PARK¹⁾, Sook Young LEE¹⁾, Hyun Sook CHEONG¹⁾, Sang Rae LEE²⁾, and Hong Sub KIM

Department of Biology, ¹⁾Department of Genetic Engineering, Chosun University, Kwang-ju, 501-759; and ²⁾Institute of Oriental Botanical Resources, Seoul 120-130, Korea

Abstract

In this study, the callus was induced and regenerated from the immature embryo and ultrastructural characteristics of developmental stages in *Citrus junos* SIEB. were investigated. The yellowish callus was induced by 5 to 6 weeks of culture of citrus. In proliferating callus after 6 weeks of culture, large vacuole was formed by fusion between adjacent small ones. In the non-embryogenic callus cultured for 12weeks, re-differentiated cells of callus showed the large nucleus with globular nucleus and amyloplast with large size of starches. In the embryogenic callus cultured for 14-16 weeks, the active exocytosis occurred in cells, secretory vesicles appeared on cell membrane and small particles from cytoplasm were released to intercellular space. In the embryogenic callus cultured for 24 weeks, a spherical type of chloroplast bounded on cytoplasm by double membrane and typical grana was dispersed equally among matrix. In the normal plantlet after 26 weeks of culture, a lot of vessels and companion cells appeared in the leaf cell of plantlet. In the normal plantlet after 30 weeks of culture, the immature leaf showed many small companion cells, sieve tubes and central vacuole. Also, the secondary vacuole protruded into the central vacuole and elongated chloroplasts near plasma membrane. In the matured plant habituated on the soil, palisada tissue composed of orderly arranged cells contained the nucleus in the center of the cell and large vacuoles on either side of the nucleus.

Key words : *Citrus Junos* SIEB Non-embryogenic Callus Embryogenic callus.

緒 言

유자(*Citrus junos* SIEB.)는 운향과 감귤속 후생감귤아속에 속하며 후생감귤아속 중에서도 오래된 과수이다. 현재 남해안 섬지방 일대에서 경제성 작물로 재배가 급격히 증가하고 있는 감귤속의 재배는 다습하고 연평균 기온이 12-15℃ 가량되는 지방이 적절하며 비교적 세포액이 높고 조기의 동사점이 -9℃ 정도로서 활엽상록수로는 내한성이 강한 식물이다. 겨울철에 유자나무의 잎이 많이 떨어지게 되면 화아

분화 상태가 나빠지게 되므로 다음해에는 유자의 수확은 거의 할 수 없게 된다.

유자는 상록소교목 과수로서 유목때에는 새순 발생이 년3회가 되지만 성목에 가까울수록 연간 새순 발생량과 회수는 점점 줄어들며 노목에 가까울수록 극히 짧게 나오며 봄신장 한번에 그치게 된다.

새 잎은 전년 잎보다 광합성이 왕성하다. 유자의 잎은 평균수명이 16-20개월 정도가 대표적으로 많고 3년이상 되는 것도 많다. 유자의 잎은 11-12월에 걸쳐 묵은 잎이 황변하여 낙엽된다. 맛있는 유자는 섬

이나 해안 지방에서 생산되는 것이 많다. 이것은 바다나 들담에서 산란광을 많이 받아 광합성을 활발히 하기 때문이다. 산란광은 해면상 조직의 광합성을 활발히 한다.(김 등, 1991).

본 실험에 사용한 *Citrus junos* SIEB.는 동남아시아가 그 원산지이며 국내에서 재배된지는 오래되었으나 큰 발전없이 근래에 이르렀다가 열매의 독특하고 뛰어난 향기와 다량의 당분 그리고 비타민, 미네랄 성분 등의 영양적 가치가 인식되면서 종래의 관상용에서 벗어나 식품으로서 다양한 용도와 약용으로 개발되었다. 일반 작물의 재배보다 경제성이 높은 과수작물인 감귤은 제주도가 중심재배지이며, 유자는 독특한 성장습성 때문에 경남과 전남의 남해안 섬지방 일대에서 재배가 급격히 증가되고 있다. *Citrus* 속은 잎의 표면이 큐틴질과 납질로 피복되어 있는 목본식물로서 2배체, 3배체, 4배체로 3종류가 있으나 대부분의 경우 염색체가 9개인 2배체이다. 후생감귤아속에 속하는 유자(*Citrus junos* SIEB.)는 꽃이 단생 또는 총생이며 화서는 이루지 않는다. 화사는 합착성이 강하고 꽃가루 주머니는 짧은편이며 외피와 심피는 잘 분리되고 종자는 난형으로써 배는 녹색이거나 유색이다. 유자의 경우 수세가 강하고 직립성이며 특히 내한성이 강하고 구형 또는 단구형으로 과육은 신맛이 강하고 종자는 비교적 적게 들어 있으며 백색다배체이다.(한동, 1991).

유자는 경제성 작물로서 재배가 급격히 증가하고는 있으나 체계적인 연구가 이루어 지지 않았으며 다만 재배 방법과 병충해에 강한 것과 약간의 형태적인 측면에서 연구가 이루어진 실정이다.(김, 한, 등, 1991).

특히, 감귤속에 대한 특성적인 연구는 국내외적으로 형태, 분류, 생리학적 특성 및 2차 산물, 특히 flavonone glucoside의 합성과 축적 메카니즘에 관하여 이루어 졌을 뿐 여러측면에서 앞으로 많은 연구가 행해져야 할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 향후유자의 분자생물학적 연구를 수행하기 위한 기초 단계로서 유자잎의 발생단계별 미세구조적 특성과 소기관들의 유연관계를 관찰하였다.

材料 및 方法

식물재료 및 배분리배양

본 실험에 사용한 유자(*Citrus junos* SIEB.)는 전남 완도군 고금면 상정리에 분포되어 있는 것으로 봄가지(3월)에 착생하여 개화일로부터 30일된 미숙열매와 10월하순의 성숙열매를 사용하였으며 봄가지와 여름가지의 잎중 조직이 유연한 어린잎만을 육안으로 식별하여 채취하고 실험재료로 사용하였다.(Fig. 1,2).

실험에 사용할 미숙 열매와 성숙열매를 무균대에서 살균수를 이용하여 세척한 후 멸균된 해부용 칼과 핀셋을 이용하여 4등분한 다음 종자를 분리하였다. 분리한 종자는 곧바로 종자의 종피를 제거하고 70% (V/V)에탄올에 10분, 5% NaOCl용액에 15분간 표면을 살균한 후 이것을 멸균수로 3회 수세한 다음, 멸균된 종자로부터 배를 분리해 무균적으로 해부용칼을 이용하여 배를 2-3mm로 절취한 후 캘러스유도 배지에 치상하였다.

캘러스 유도

캘러스 유도배지로서 1/2 MS(Murashige and Skoog, 1962) 배지에 6% sucrose, 44, 39 μ M BA를 첨가하여 배발생 캘러스를 유도하였다. 실험재료로는 미성숙배를 사용하였으며 모든 배지는 121 $^{\circ}$ C, 1.5기압에서 15분간 고압증기 멸균한 후 사용하였다. 또한 배양조건은 26 $^{\circ}$ C에서 형광등을 광원으로 하여 2,000 lx 에서 16h 동안의 광주기와 8시간의 암주기로 배양하였다.

식물체의 재분화유도

Organogenesis를 위해 캘러스유도 배지에서 형성된 캘러스를 3% sucrose와 0.8% agarose가 첨가된 MS배지에 치상하였다.유도된 캘러스는 2주 간격으로 embryogenic clumps가 포함되도록 절단하여 계대 배양 하였다.

재분화의 유도는 26 $^{\circ}$ C, 습도 50%, 조도 2,000 lx 형광하에서 16시간의 광주기와 8시간의 암주기로 배양하였으며 지속적인 계대배양을 통해 30주 후에는 5cm정도로 성장한 소식물체를 관찰하였고 이를 배지

에서 분리하여 화분에 이식 하였다.

전자현미경적 관찰

해부현미경하의 전 고정액(4% paraform aldehyde-5% glutaraldehyde in phosphate buffer, pH 6.8)내에서 추출한 실험재료를 동일한 고정액으로 4℃에서 2시간 전 고정하였다.

전 고정이 끝난 시료를 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8)로 20분씩 3회 세척하고 그 후 고정액(1% osmium tetroxide in phosphate buffer, pH 6.8)에 2시간 동안 후고정하고 동일한 buffer로 세척하여 alcohol로 탈수 한후 propylene oxide로 치환하여 epon-araldite suppr's low viscosity medium에 포매하였다. 일부시료는 6.5% glutaraldehyde에 단일 포매 하였다. 포매된 시료를 LKB/V형 ultramicro-tome으로 1 μ m의 절편을 제작하여 methylene blue basic fuchsin으로 염색하여 관찰 대상부위를 확인한 다음 동일한 부위에서 은색 절편을 취하여 UAA(curanylacetate) 및 lead citrate로 이중 염색한 후 투과전자현미경(JEM 100 CX-11, 100KV)으로 관찰하였다. (Forde *et al.*, 1978, 1980; Fisher *et al.*, 1979; Fontarnau., 1982; Greenberg., 1984).

結果 및 考察

배양 6주 후부터 3% sucrose 배지로부터 배지에 접하고 있는 절단면에서 연한 노란색의 캘러스가 발생하기 시작하였다.(Fig. 1A). 이것은 절단면이 넓을수록 더 빠르고 양호하게 유기 되었다.

따라서 조직학적 변화양상과 상호유연관계를 확인하기 위하여 실험의 각 단계별 재료를 1mm의 절편으로 제작하여 전자현미경으로 관찰하였다.

식물세포의 캘러스 배양으로부터 식물체의 재분화는 생리적, 형태적 과정 뿐만아니라 육종 프로그램에 있어서 매우 유용한 것으로 알려져 있다.(Calson, 1975). 그러므로 전자현미경적, 세포조직학적 구조관찰은 매우 의미 있는 일이라 사료된다. 유자의 캘러스는 담황색으로 조직이 부드럽기 때문에 캘러스 발생초기의 단계를 관찰하기가 쉽지 않았다. 그러므로

캘러스 발생초기보다 조금 더 자란 배양 6주 정도에 겨우 관찰할 수 있었는데 다양한 크기의 크고 작은 액포들이 융합하는 현상을 관찰할 수 있었으며 다수의 미토콘드리아와 녹말과 osmophilic granule을 함유하고 있는 엽록체들을 관찰할 수 있었다. 또한 이들 사이에서 미소체들과 지질과립들이 관찰되었으며 세포벽이 아주 얇게 발달되어 있는것을 관찰하였다.(Fig 1B,C).

배양 12주경에는 담황색의 캘러스 표면에 많은 작은 돌기들이 발달되어 있으므로 표면이 거칠게 보였는데 이와 같이 캘러스들은 나중에 배발생 캘러스(embryogenic callus)로 발달하게 된다.(Fig. 2A)

이와 같이 배발생 캘러스는 44.39 μ M BA가 첨가된 캘러스 유도배지에서 미성숙 배조직으로 부터 유도되었는데 이러한 결과는 성숙도가 다른 여러종류의 절편으로 부터 배발생 캘러스 및 체세포 배의 유도가 잘 이뤄진다고 보고한 Toliner와 Gookin(1988)의 결과와도 일치하였다.

이시기의 세포에서는 큰핵속에 포함되어 있는 구형의 핵인과 다수의 커다란 녹말로 가득찬 전분형성체들을 관찰할 수 있었다.(Fig. 2B).

따라서 배발생 캘러스에서는 일반적으로 재분화 직전에 엽록체에 녹말이 가득 채워 지는것을 알 수 있었다.

전구 색소체내의 결정체는 Park등 (1984)에 의해 연구되었으며, 특히 Newcamb(1967)은 결정체 자체가 항상 막경계를 갖는다고 하였다.

또한 Thomson등 *Citrus junos* 잎 속의 색소체는 분비작용과 관련이 없다고 하였으나 Ameluexen 등 (1967), Fahn등(1974)은 세포 소기관내의 색소체가 분비 물질합성 장소로서 작용한다고 주장하였다.

배양 14주된 배발생 캘러스는 구형의 밝은색 돌기가 잘 발달된 shoot가 형성되기 직전의 단계로서 분열 전에 길쭉하게 변했던 세포들이 변형되면서 구형에 가까운 모양으로 변화되어 가는 모습을 볼 수가 있었다.(Fig. 3A, B). 일부 세포에서는 구형의 커다란 핵인을 함유하고 있는 특히 다른 소기관 보다 더 큰 핵을 관찰하였으며 배발생 돌기 조직의 작은 세포들은 중심 액포에 작은 액포들이 융합되면서 서서히 액포화되어 주변세포로 밀려나는 것을 볼 수 있었

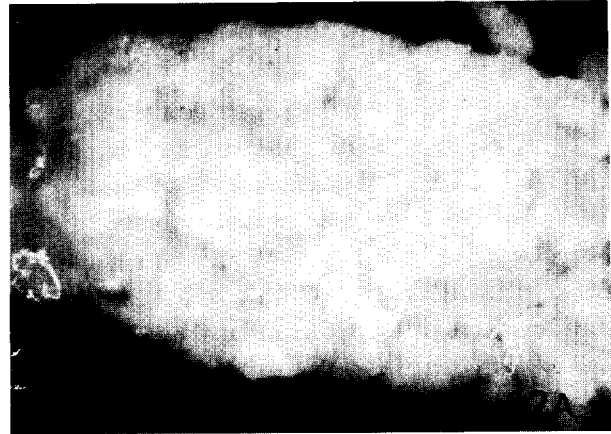
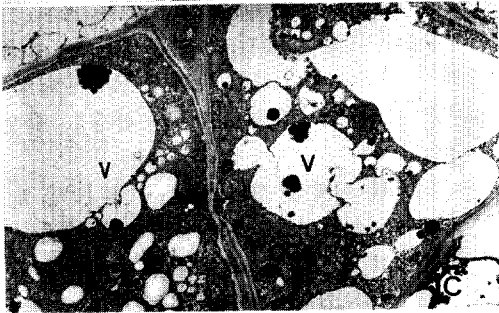
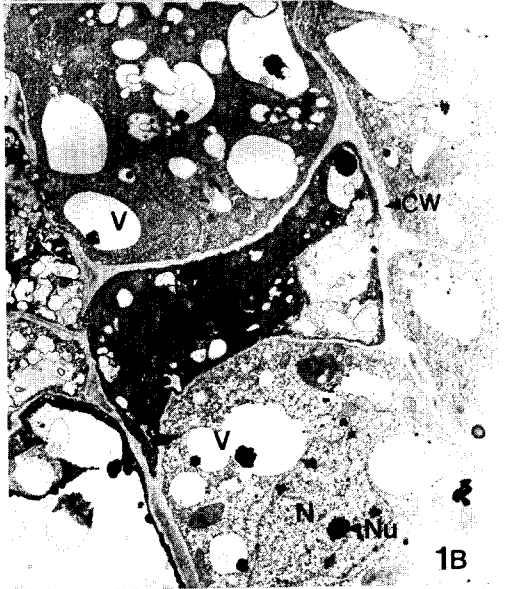


Fig. 1 Early stage of embryo callus for 6 weeks culture.
 A: Proliferating callus (arrow) after 6 weeks of culture on 1/2MS medium supplemented with $44.39\mu\text{M}$ BA. $\times 35$.
 B: Cell showed thin cell wall(W), lipid droplets(Ld), chloroplast(C) with osmophilic granules(OG), starches(S) and a lot of small vacuoles(V) with electron-dense deposits. $\times 4,500$.
 C: Large vacuole is forming by fusion between adjacent small ones. $\times 3,500$

Fig. 2 Non-embryogenic callus for 12 weeks culture.
 A: Non-embryogenic callus for 12 weeks culture. $\times 35$.
 B: Re-differentiated cells of callus showing large nucleus(N) with globular nucleolus(Nu) and amyloplast(A) large size of starches. $\times 7,000$.

다.(Fig. 3C,D). 따라서 이들액포화된 세포들은 분열중이거나 분열하려고 하는 세포에 영양물질을 제공하는 것으로 생각되며 분열 세포들은 길쭉하게 변형되는 양상으로 특이적인 분열을 하였다. 그리고 이들 세포중에는 활발한 exocytosis가 발생하므로써 세포벽 주변에서 많은 분비체들(secretory vesicles)이 나타났으며 이중막으로 둘러싸인 핵 주변에 소포체가 인접해 있을 뿐만아니라 이로부터 다수의 작은 운반체들이 형성되었고 작은 입자들이 세포간극으로 빠져나가는 것을 관찰할 수 있었다.(Fig. 3D).

배양 16주경의 켈러스에서는 지름이 5mm정도로 가장 밝고 잘 발달된 구형의 배발생돌기(embryogenic clump)로 부터 shoot가 형성되었다.(Fig. 4A).

여기에서는 커다란 중심 액포와 다소 발달된 그라나와 다수의 osmophillic granule들을 가지고 있는 커다란 엽록체와 불규칙적인 크리스테를 가지고 있는 활발하게 활동중인 구형에 가까운 미토콘드리아가 관찰되었으며 원형질막 주변에서는 발달된 다수의 디티오솜들이 밀집하게 분포되어 있는 것으로 보아 재분화가 활발하게 일어나고 있음을 알수가 있었다.(Fig. 4B).

세포 소기관들의 증가현상은 세포가 매우 활성화 되었음을 나타내며 이러한 활성화는 앞으로 이루어질 원형질체의 세포벽 형성 및 세포분열을 준비하기 위한 것으로 보인다.(Robenek and Peveling, 1977).

배양 24주경에는 shoot로 부터 제일엽이 분화되는 것을 관찰하였다.(Fig. 5A). 이들 잎세포에서는 특히 그라나가 잘 발달된 엽록체에 크고 작은 다수의 osmophillic granule들이 고루 분포되어 있었으며 이들 발달된 엽록체 주변에는 구형의 작은 미소체와 구형의 크리스테가 발달된 활성중인 미토콘드리아들이 관찰되었다.(Fig. 5B, C).

배양 26주 경에는 호르몬이 첨가되지 않은 MS배지에서 근단분열조직이 발달되는 것을 관찰하였다.(Fig. 6A). 이들 미성숙 잎세포들은 크고 작은 구형으로 이들사이에 반세포들이 분포되어 있었으며 일부에서는 도관이 발달되어 있는 것을 볼 수 있었다. (Fig. 6B).

배양 30주후 화분에 이식한 식물체의 미성숙 잎에서는 많은 작은 반세포와 사관 그리고 중심 액포들이 보였다.(Fig. 7A, B). 특히 특이한 점은 작은 제2차

액포가 중심액포속으로 끼여 들어 갔으며 원형질막 주변에서는 녹말을 함유하고 있는 길쭉하게 신장된 엽록체들이 관찰되었다(Fig. 7C).

토양에 이식하여 성숙하게 자란 잎의 조직에서는 세포들이 균일한 책상조직을 이루고 있었으며, 세포의 중앙 부위에는 핵인을 가지고 있는 커다란 핵이 위치하고 있으며 이들 핵 양쪽에는 비교적 큰 액포가 분포되어 있는 것을 관찰하였다(Fig. 7D).

摘 要

본 연구에서는 유자의 미성숙 배로부터 켈러스 유도와 재분화 및 발생단계별 미세구조적 특성에 관하여 연구하였다.

유자에서는 배양 5-6주 경에 담황색의 켈러스가 유도되었으며, 배양 6주경의 켈러스 세포에서는 인접하고 있는 작은 액포들이 융합하여 큰 액포를 형성하는 융합현상을 관찰하였다.

배양 12주 경에는 배발생 켈러스의 미분화 세포에서 특이하게 구형의 핵인을 가지고 있는 큰핵과 녹말로 가득차 있는 녹말체를 다수 관찰하였다.

배양 14-16주 경의 배발생 켈러스 세포에서는 활발하게 exocytosis가 일어나므로써 다수의분배체들이 세포벽쪽에서 관찰되었으며 세포질로부터 작은 입자들이 세포 간극으로 빠져나가는 것을 볼수 있었다. 또한 배양 24주경의 배발생 켈러스에서는 발달된 커다란 구형의 엽록체들이 이중막으로 세포질과 경계되어 있었으며 기질중에 일정하게 전형적인 그라나가 분포되어 있었다.

배양 26주경의 어린 정상 식물체의 미성숙잎에서는 다수의 도관과 반세포들이 관찰되었다.

배양 30주경의 정상식물체의 미성숙잎에는 다수의 작은 반세포들과 사관 그리고 중심액포들이 나타났으며 또한 작은 제2차 액포들이 커다란 중심 액포 속으로 끼어들어가는 현상을 볼 수 있었으며 원형질막 근처에는 신장된 엽록체들이 분포되어 있었다.

감사의 글

본 연구는 1994년도 조선대학교 교내 학술연구비 지원(CRF-94-050)에 의하여 수행된 것으로 이에 감사를 드립니다.

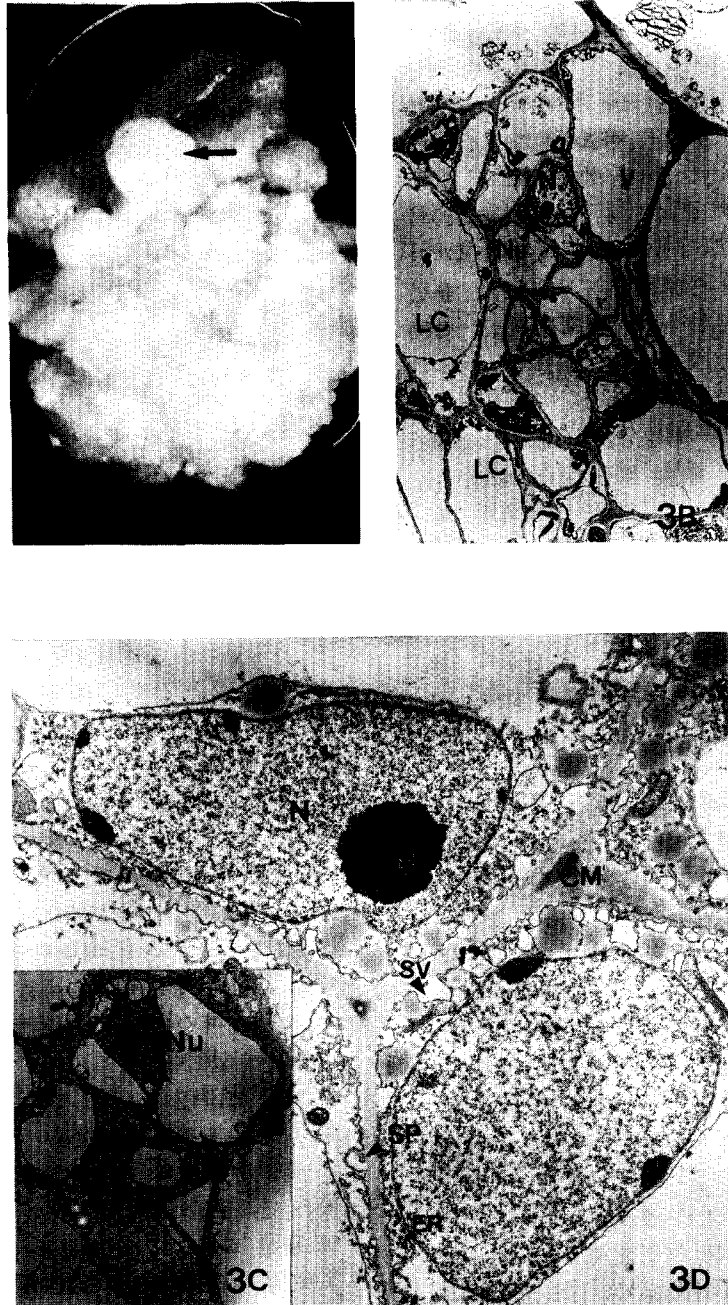


Fig. 3 Embryonic callus for 14 weeks culture.

A: Globular-clumped embryo (arrow) in embryonic callus. Arrow indicate callus be to differentiate. $\times 35$.

B: Many of small cells and enlarged of liquified cells(LC) surrounding it. $\times 3,500$.

C: The cells possess prominent nucleus with large globular nucleolus. $\times 3,500$.

D: Active exocytosis occurs in cells and secretory vesicles(SV) appear on the cell membrane(CM).

Endoplasmic reticulum(ER) is adjacent to nucleus and a lot of small vesicles is formed it. Small particles(SP) from cytoplasm is released to intercellular space(IS). $\times 7,000$.

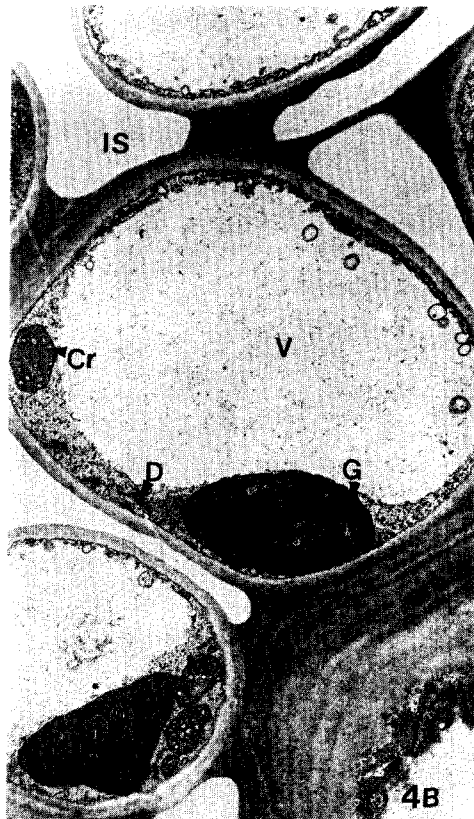
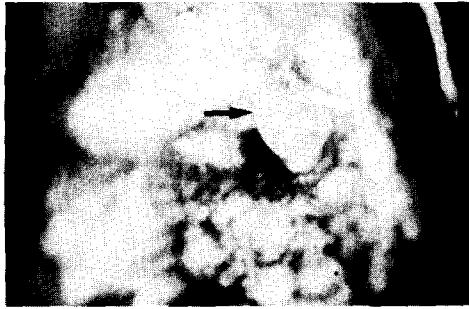


Fig. 4. The shoot induced from embryogenic callus after 16 weeks.

A: Shoot tip (arrow) induced from embryogenic callus. $\times 35$.

B: The globular cell contains central vacuoles (V), large chloroplast (C) with osmophilic granules (OG), grana (G) and active mitochondria (M) with irregular cristae (Cr) and intercellular space (IS) is developed between cell and cell.

Dictyosomes (D) exist at the peripheral cytoplasm. $\times 7,000$.

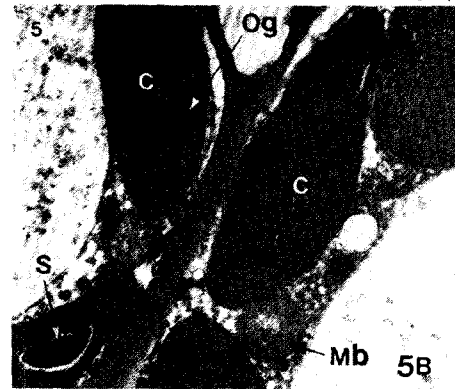


Fig. 5 The leaf and the stem induced from shoot tip for 24 weeks culture.

A: The differentiation of leaf and stem from shoot tip. Arrow indicate leaf primordia. $\times 35$.

B: A lot of developed chloroplast contain osmophilic granule (OG), starch (S) and grana (G).

C: A spherical type of chloroplast bounded on cytoplasm by double membrane and typical grana is dispersed equally among matrix.

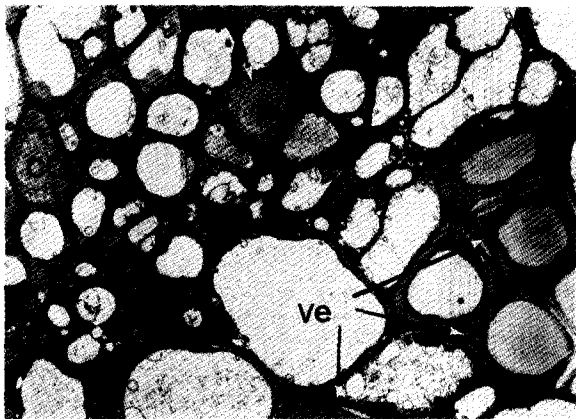
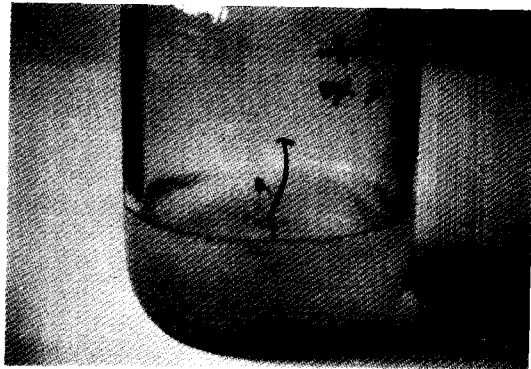


Fig. 6. Normal plantlet after 26 weeks culture.
 A: Plantlet in hormone-free medium for 26 weeks culture. $\times 1/2$.
 B: A lot of vessels and companion cell is appeared in the leaf cell of plantlet. $\times 4,500$.

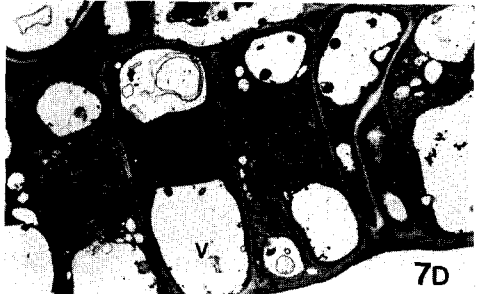
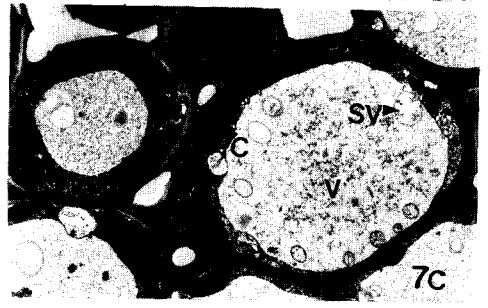
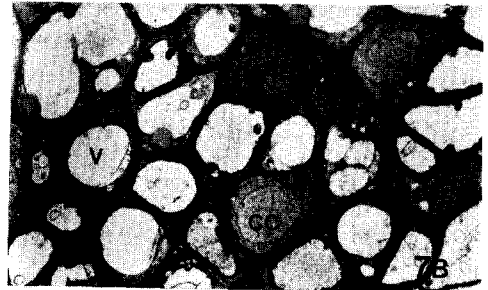


Fig. 7. Plant habitated on the pot after 30 weeks.
 A: A whole plant transplanted to pot for acclimatization. $\times 3,500$.
 B: Immatured leaf showing many, small companion cells and sieve tube, central vacuole. $\times 3,000$.
 C: An secondary vacuole(SV) protruded into the central vacuole and elongated chloroplasts near plasma membrane. $\times 4,000$.
 D: Palisada tissue composed of orderly arranged cells contained the nucleus in the center of the cell and large vacuoles on either side of the nucleus. $\times 3,500$.

參考文獻

- Aelunxen, F. and H. Arbeiter. Untersuchungen an den spritzdrüsen von *Pistia stratiotes* L. Z. Pflanzenphysiol. Vol. 58. pp.49-69. 1967.
- Armstrong, C.L., C.E.Green. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of S-proline. *Plante* 164:207-214. 1985.
- Calson, P.S. Crop improvement through techniques of plant cell and tissue cultures S.Bioscience Vol. 25, pp.747-749. 1975.
- Fahn, A., I.Shomer and I.Ben-Gera. Occurrence and structure cuticular wax on juice vesicles of *Citrus* fruits *Ann Bot.* Vol.3 pp.868-872. 1974.
- Fisher, H.W. and R.C. Willian. Electron microtron microscopic visualization of nucleic acids and of their complexes with proteins, *Ann. Rev. Biochem.* 48:649, 1979.
- Forde, B.G., R.J.C Oliver and C.J.Leaver. Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasm in maize, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3841-3845, 1978.
- Fontarnau Agustin and Jose Hernandez-Yage. Characterization of mitochondrial DNA in citrus, *Plant Physiol.* 70:1678-1682, 1982.
- Forde, B.G., R.J.C. Oliver and C.J. Leaver. Variation in mitochondrial translation products associated with male-sterile cytoplasm in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 418-422, 1980
- Greeberg. B.M., W. Gruissem, and R.B. Halick. Accurate processing and pseudouridylation of chloroplast transfer RNA in a chloroplast transcription system, *Plant Mol. Biol.* 3: 97-109, 1984.
- John., J.F. 1987. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high sucrose containing medium, *Plant Cell Rep.* 6: 372-374.
- Kim, K.M., and J. Button. 1974. The stimulation of embryogenesis and plant regeneration from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.). Variety Taebaegbyeon. *Lorea J Plant Tissue Culture.* Vol. 18, pp. 7-15.
- Kobayashi, S., A.Sakai, and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation in Liquid Nitrogen of Cultured Navel Orange (*Citrus sinensis* Osb.) Nucellar cells and subsequent plant regeneration. *Plant Cell.* 23: 15-20.
- Kochba, J., and J.Button. 1974. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. *Z. Pflanzenphysiol.* 73: 415-421.
- Lupotto, E. 1983. Propagation of embryogenic culture of *Medicago sativa* L. *Z.Pflanzenphysiol.* 111 : 95-104.
- May, R.A., and R.N.Trigiano. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *J.amer.soc.Hortsc.* 116 : 366-371.
- Oh, S.D., and W.S.Song. 1993. Plant regeneration of Chinese Jujube (*Zizyphus jujube* Miller) through somatic embryogenesis. *Korean J. Plant Tissue Culture.* 20(4):205-21.
- Parks, T.D., W.G. Dougherty, C.S. Levings 3 and D.H. Timothy. 1984. Identification of two methionine transfer RNA genes in the maize mitochondrial genome. *Plant Physiol.* 76 : 1079-1082.
- Trolinder, N.L. and Goodin. 1988. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*) L. effects of source of explant and hormone regime. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* Vol. 12, pp.31-42.

Yeo, U.D., and K.H.Kim. 1991 Effects of auxins and illumination on growth and nicotine production of calluses induced from *Nicotiana glauca* leaf explants. *Korean J.Plant Tissue Culture*. 18(3):163-169.

한혜룡, 권오균. 1991. 감귤원예신서, 2nd ed.
서울특별시, 선진문화사.

한혜룡, 권오균. 1993. 감귤원예신서.

(접수일:1995년 10월 25일)