

柚子와 탱자의 屬間交雜後 胚珠培養에 의한 植物體 誘起

이만상* · 남궁승박
원광대학교 농학과

Plant Regeneration via in Vitro Culture of Ovule Obtained by Intergeneric Crossing Between *Citrus junos* Sieb. et Tanaka and *Poncirus trifoliata* Raf.

Man Sang LEE* and Seung Bak NAMKOONG

Department of Agronomy, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk, 570-749. *Corresponding author.

As a basic research for breeding new varieties, reciprocal intergeneric crosses between *C. junos* and *P. trifoliata* were made. F₁ hybrid production using *in vitro* ovule culture, gametogenesis, and fertilization phenomena were investigated. Frequency of fruit set resulting from crossing of *C. junos* and *P. trifoliata* was 16.6% while that of *P. trifoliata* and *C. junos* was 11.7%. Callus formation occurred well when ovules at the 6th week after pollination were cultured on MT (Murashige and Tucker) medium supplemented with zeatin 0.5 mg/L and NAA 1.0 or 3.0 mg/L. Immature ovules developed into mature embryos on the MT medium supplemented with 2,4-D 0.1 or 0.5 mg/L. The *in vitro* germination rates of 20-week-old ovules set by *C. junos* × *P. trifoliata* and *P. trifoliata* × *C. junos* were 54.5% and 48.6%, respectively. The emergence ratios of trifoliolate hybrids obtained by *C. junos* × *P. trifoliata* and *P. trifoliata* × *C. junos* were 56.7% and 100%, respectively. The chromosome number of *C. junos* and *P. trifoliata* was $n = 9$ or $2n = 18$, and the sizes of their pollen grain were 33.75 μ and 25.0 μ . The length and width of embryo sac in *C. junos* and *P. trifoliata* were 69.38~79.23 μ and 27.50~38.56 μ , and those of egg cells were 17.50~41.50 μ and 6.25~8.12 μ . The fertilization of *C. junos* and *P. trifoliata* terminated 72 h after pollination.

Key words: ovule culture

현재 食品 및 茶用으로 각광을 받고 있는 柚子나무는 키가 2.5~5 m에 달하고 남부지방에서만 재배되고 있다. 또한 재배관리가 불편하고 가시가 많아 수확하기가 어려울 뿐만 아니라 結實年齡이 10년 이상 되기 때문에 많은 인건비와 생산비가 소요되고 있다. 이러한 이유로 국내산 유자는 농산물 개방시 수입유자와의 가격 경쟁에서 떨어지므로 矮性化됨과 재배지 확대화를 위한 耐寒성이 강한 유자나무를 육성하여 재배함으로써 유자의 수량증대 및 생산비 절감으로 가격을 저렴하게 공급함으로써 柚子食品 개발에 기여하여 외화절약 및 국민보건 향상에도 큰 도움이 될 수 있다. 대부분 柑橘類는 자연상태에서 多胚(不定胚)種子로 알려져 있다(Kobayashi et al., 1978). 본 연구에서는 耐寒성이 강한 유자를 개발 육성하고자 유자와 탱자를 屬間交雜하여 생긴 미숙胚珠를 배양하였으며, 유기된 F₁植物들의 葉型을 조사

하였고, 雌雄配偶體의 부위별 크기, 受精力 및 染色體數를 조사하였다.

재료 및 방법

屬間交雜 및 胚珠培養

柚子 품종명은 고야인테 全南 莞島난지시험장 溫室 또는 圃場에 栽植된 것을, 탱자는 원광대학교 농과대학에 재식된 것을 이용하였다. 早期開花(유자는 온실 栽培株)한 花粉을 채취하여 4°C되는 데시케이터에 貯藏하였다가 이용하였다. 유자나 탱자는 開花 1日前에 人工除雄後 被袋하였다가 翌日 雌藥가 성숙하면 유자×탱자, 탱자×유자로 正逆交雜한

뒤 시기별로 (6, 10, 14, 15, 20주) 未熟果를 채취하여 75% 알코올에 1분간 表面殺菌한 다음 3% sodium hypochlorite 용액에 10분간 滅菌하고 滅菌水로 3~4회 水洗하여 이용하였다. 배지는 MT (Murashige and Tucker, 1969) 기본배지에 0.9% agar를 첨가하고 NAA, zeatin, 2,4-D를 여러 농도로 單獨處理하거나 NAA, 2,4-D에 zeatin을 혼합처리한 후 pH는 5.8로 조정하고 다음 121°C의 autoclave에서 12분간 멸균하였다. 人工授粉 후 3주부터 20주까지의 胚珠를 배지에 置床하여 胚發育 및 callus形成 정도를 조사하였다.

發生學 및 染色體數

유자와 탕자의 雌雄配偶體形成 및 受精現象을 이해하기 위하여 開花 20일전부터 화퇴를 花齡別로 채취하였다. 人工授粉 후 時間別로 채취하여 Carnoy액에 固定한 다음 paraffin에 包埋한 것을 12~15 μ의 두께로 連續切片을 만들어 Heidenhain's hematoxylin으로 염색하였고, 세포분열 과정에 있는 염색체는 iron-aceto carmine으로 염색하여 檢鏡하였다.

결과 및 고찰

屬間交雜 및 胚珠培養

유자와 탕자의 正逆屬間交雜한 후 결과율은 년도별로 차이는 있지만 유자×탕자는 16.6%이었고, 탕자×유자는 11.7%이었다(Table 1). 人工受精後 3주까지는 落花率이 심하였다.

屬間交雜 후 3주부터 未熟胚珠를 培養하였지만 5주 이내의 未熟胚珠에서는 callus형성이나 胚發育이 불량하였지만, 수분 후 6주된 배주를 배양했을 때 callus형성 정도는 식물생장조절물질의 종류의 농도에 의해서 크게 영향을 받았다(Table 2). 그 중에서도 NAA 1.0 mg/L에 Zeatin 0.5 mg/L, NAA 3.0 mg/L에 Zeatin 0.5 mg/L을 혼용처리한 MT배지에서 캘러스 유기율이 높았다. 그러나 미숙배가 성숙배로 胚發育은 관찰되지 않았다.

반면에 MT기본배지에 2,4-D를 농도별 단독처리할 경우 2,4-D 0.1 또는 0.5 mg/L을 첨가한 배지에서는 인공수분 후 6주의 배주에서도 식물체가 유기되었으며 14주의 배주부터는 양호한 편이었고(Table 3), 캘러스 형성은 6주와 10주에서 좋았다.

Citrus속 식물에 있어서 배배양에는 BAP 0.5 mg/L에 IBA 0.5 mg/L를 혼합처리한 배지에서(Sabharwal, 1963), IAA 0.1~0.25 mg/L을 첨가한 MT배지에서(Ohta and Furusato, 1957) 식물체 분화가 양호한 바 있다.

인공수분 20주 후에 胚珠培養한 것은 14~15주의 것

Table 1. The fruit set percentage of *C. junos* and *P. trifoliata* by intergeneric crosses.

Year	Cross combination	No. of flowers pollinated	No. of fruits set	Fruit set percentage
1994	<i>C. junos</i> × <i>P. trifoliata</i>	10	2	20.0
	<i>P. trifoliata</i> × <i>C. junos</i>	49	12	24.5
1993	<i>C. junos</i> × <i>P. trifoliata</i>	146	11	7.5
	<i>P. trifoliata</i> × <i>C. junos</i>	84	6	7.1
1992	<i>C. junos</i> × <i>P. trifoliata</i>	476	92	19.3
	<i>P. trifoliata</i> × <i>C. junos</i>	210	22	10.5
Total	<i>C. junos</i> × <i>P. trifoliata</i>	632	105	16.6
	<i>P. trifoliata</i> × <i>C. junos</i>	343	40	11.7

Table 2. The effects of plant growth regulators on the frequency of callus formation when 6-week-old-ovules derived from intergeneric crosses were cultured.

^a MT + plant growth regulator(mg/L)	<i>C. junos</i>	<i>P. trifoliata</i>	<i>C. junos</i> × <i>P. trifoliata</i>
regulator(mg.√/L)			
NAA 0.01	+b	+	+
0.1	+	+	+
1.0	+	++	++
3.0	+	+	+
Zeatin 0.01	+	+	+
0.5	++	+	++
1.0	+	+	+++
3.0	+	+	+
NAA 0.5 + Zeatin 0.5	++	++	++
NAA 0.5 + Zeatin 1.0	++	++	+
NAA 1.0 + Zeatin 0.5	+++	++	+++
NAA 1.0 + Zeatin 1.0	++	++	+
NAA 3.0 + Zeatin 0.5	+++	+	+++
NAA 3.0 + Zeatin 1.0	++	+	+
2,4-D 0.5 + Zeatin 0.5	+	+	+
2,4-D 0.5 + Zeatin 1.0	+	++	+
2,4-D 1.0 + Zeatin 0.5	+	+	+
2,4-D 1.0 + Zeatin 1.0	+	+	+

^aMurashige and Tucker's medium.

b+: 10~20%, ++: 21~30%, +++: 31~40% of callus formation.

(Table 3)과는 달리 식물체 유기율이 높았다(Table 4). 유자×탕자로 屬間交雜한 과실 종자의 발아율은 54.5%이었고, 탕자×유자의 것은 48.6%이었다. 유자나 탕자 종자는 각각 68.0%, 75.0%가 발아하였다.

유자나 탕자의 人工自家 또는 他家受精率을 보면 유자의 自家受精은 15.0%이고 他家受精은 16.0%인데 비하여 탕자의 自家受精은 20.7%, 他家受精은 26.3%로 탕자가 모두 높았다(Table 5).

屬間交雜時 유자를 母本으로 한 유자×탕자의 과실 크기는 授粉 후 6주부터 20주까지 빠른 속도로 자라다가 점차 느리게 발육하였고, 수확시 유자×탕자의 크기는 52.9 mm

Table 3. The callus formation from immature ovule as influenced by various levels of 2,4-D and times after pollination.

After pollination(week)	MT + 2,4-D (mg/L)	<i>C. junos</i>	<i>P. trifoliata</i>	<i>C. junos</i> × <i>P. trifoliata</i>
6	0.0	+++	+	+
	0.1	++++	++	+++ (0) ^c
	0.5	++++	+++	++
	1.0	++	++	++
	2.0	+	++	+
10	0.0	+(0)	+	+
	0.1	++	++	++
	0.5	+++	+++	+++ (0)
	1.0	++	++	++
	2.0	+++	++	++
14	0.0	+(0)	+	+(0)
	0.1	++(0)	++(0)	++(0)
	0.5	++	++(0)	++(0)
	1.0	++	++	++
	2.0	++	+	++
15 ^b	0.0	(0)	(0)	(0)
	0.1	(0)	(0)	(0)
	0.5	(0)	(0)	+(0)
	1.0	(0)	+	++
	2.0	+	+	+

^aCallus formation (radius); +: ~1 mm, ++: 1~3 mm, +++: 3~5 mm, ++++: above 5 mm.

^bAfter removing flesh around ovule.

^c(0): Plantlets from embryo.

Table 4. Germination percentage of intergeneric hybrids of *C. junos* and *P. trifoliata* on medium^a.

Cross combination	No. of seed	No. of seed germinated	Germination (%)
<i>C. junos</i> × <i>P. trifoliata</i>	66	36	54.5
<i>P. trifoliata</i> × <i>C. junos</i>	70	34	48.6
<i>C. junos</i>	100	68	68.0
<i>P. trifoliata</i>	100	75	75.0

^aMT + 2,4-D 0.1 mg/L.

였지만, 탱자×유자는 34.0 mm 였다(Table 6). 수확시 果幅은 유자×탱자는 59.6 mm, 탱자×유자는 35.6 mm 였다. 이상의 결과로 보아 유자와 탱자의 正逆屬間交雜은 비교적 용이하고 식물체 유기도 잘 되었다. 교배 果實들의 크기는 母本 과실의 크기와 비슷하였다.

유자와 탱자의 正逆交雜으로 얻어진 F1의 30개체 중 父本인 탱자를 닮은 樹型 또는 三葉型이 17개체이고, 13개체는 母本인 유자와 비슷하였고(Figure 1, BD), 반면 탱자×유자의 F1 28개체는 전부가 樹型, 三葉型 모두 탱자를 닮았다(Figure 2). 유자와 탱자의 屬間交雜에서도 황금유자와 탱자를 속간교잡할 때 정역교잡 후 F1잡종개체의 모두 樹型, 三

Table 5. The fruit set percentage of *C. junos* and *P. trifoliata* by self- and cross-pollination ('94).

Pollination	Species	No. of flowers pollinated	No. of fruits set	Fruit set percentage
Self	<i>C. junos</i>	100	15	15.0
	<i>P. trifoliata</i>	29	6	20.7
Cross	<i>C. junos</i>	100	16	16.0
	<i>P. trifoliata</i>	38	10	26.3

Table 6. The growth of fruits set by intergeneric crosses between *C. junos* and *P. trifoliata* ('94).

After pollination (weeks)	Fruit height (mm)				Fruit width (mm)			
	<i>C. junos</i>	<i>P. trifoliata</i>	<i>C. junos</i> × <i>P. trifoliata</i>	<i>P. trifoliata</i> × <i>C. junos</i>	<i>C. junos</i>	<i>P. trifoliata</i>	<i>C. junos</i> × <i>P. trifoliata</i>	<i>P. trifoliata</i> × <i>C. junos</i>
6	23.8	18.5	14.1	17.0	24.5	20.8	19.8	19.5
11	38.9	23.6	26.9	20.6	41.5	25.3	31.8	23.6
15	46.8	27.2	33.8	25.2	46.5	28.9	46.7	27.4
20	54.7	30.7	50.9	27.8	56.7	32.8	54.2	30.1
25	58.8	33.9	51.8	30.5	66.9	35.8	61.6	33.4
At harvest	57.0	36.5	52.9	34.0	71.6	38.1	59.6	35.6

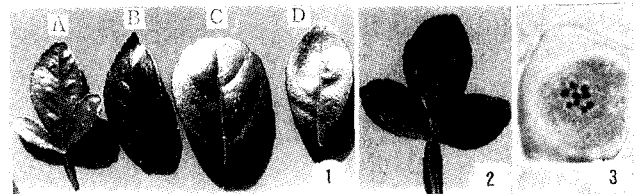


Figure 1. Various types of leaves in F1 hybrids of *C. junos* × *P. trifoliata*.

Figure 2. Trifoliate leaf morphology in F1 hybrids of *P. trifoliata* × *C. junos*.

Figure 3. Meiotic metaphase (n=9) of *C. junos* at 15th day before flowering (× 2,000).

葉型이 출현한 것(Lee, 1995)과 같이 모든 형질에 있어서 탱자가 優性이었다. 오렌지와 탱자의 細胞雜種(Ohgawara et al., 1985; Grosser et al., 1988), 밀감과 탱자의 細胞雜種(Grosser et al., 1994)에서 탱자가 優性으로 나타난 것과 동일하다. 본 실험에서는 유자×탱자의 F1식물 중 일부가 유자를 닮은 개체가 출현한 것은 교잡이 되었는지 不定胚가 자라서 생겨난 것인지는 成木으로 성장시켜도 알 수 있을 것이다.

감귤류는 다배성이 많기 때문에 교잡육종에 있어 교잡실생 초기판별이 중요한데 탱자 화분친을 사용하여 F1식물 중 三葉型 출현(Cameron and Frost, 1968)과 동위효소(Iglesias et al., 1974; 문두길, 1987)를 이용하는 경우들이 있다.

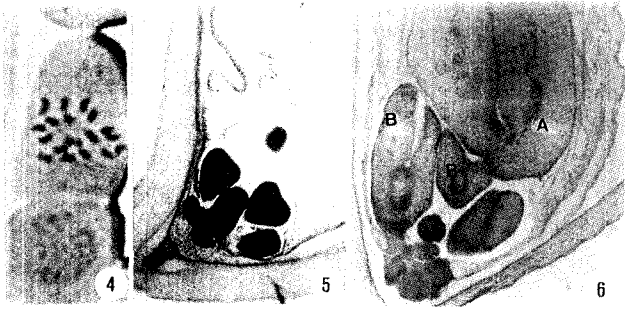


Figure 4. Mitotic metaphase ($2n=18$) of *C. junos* ($\times 2,000$).

Figure 5. Adventive embryos.

Figure 6. Normal embryo (A) and adventive embryos (B).

發生學 및 染色體數

減數分裂期에 生殖細胞 染色體數를 보면 유자와 탕자가 모두 $n=9$ 였고(Figure 3), 體細胞 染色體數는 $2n=18$ 이었다(Figure 4). 유자, 탕자, 황금유자, 밀감의 염색체수가 같고 種屬間交雜이 잘되며 그들의 F₁교잡종들이 結果, 結實이 잘 된다면 이들은 genome이 같다고 사료된다.

유자, 탕자, 황금유자의 雌雄配偶體의 발생 및 발육은 정상적인데(이만상 등, 1993), 성숙된 뒤 雌雄配偶體의 部位別 크기(Table 7)를 보면, 胚囊의 크기는 유자가 79.23 μ 탕자가 69.38 μ 이었고, 卵細胞의 길이와 폭은 유자가 41.50, 8.12 μ 이고, 탕자는 20.50, 6.25 μ 이었다. 極核細胞 길이와 폭은 유자가 18.23, 15.30 μ , 탕자는 13.50, 12.50 μ 였다. 성숙한 花粉의 크기는 유자가 33.75 μ 이고 탕자는 25.0 μ 이었다. 성숙배낭의 모든 부위별과 화분에 있어 유자가 탕자보다 큰 것은 유자 \times 탕자의 結果率이 탕자 \times 유자의 것보다 높은 것을 암시해 준다. 작은 화분이 큰 배낭으로 이동이 큰 화분이 작은 배낭으로의 이동보다 물리적으로 용이한 점은 교잡의 친화력에 관여할 수 있으리라 사료된다.

유자의 受精은 授粉後 3시간이면 柱頭上에서 花粉管이 발아하기 시작하여 授粉 후 48시간이면 極核과 精核이 受精하고, 授粉 후 72시간이면 卵細胞와 精核이 受精이 되고, 이때 不定胚도(Figure 5) 발육하는데 유자는 43.0%, 탕자는 21.2%의 多胚가 발생되기도 했다(이만상 등, 1993). 그러나 雌雄이 受精하여 생긴 正常胚(Figure 6A)와 여러 개의 不定胚(Figure 6B)들도 동시에 形成하는 경우도 있다.

속간교잡 F₁종자가 兩親인 유자나 탕자 종자의 발아율보다 저조하고 발아도 균일하지 못하였다(Table 4). 유자나 탕자가 自家受精보다는 他家受精率이 높았고(Table 5), 속간교잡의 잡종종자에는 受精胚와 不定胚가 형성됨을(Figure 5-6) 알 수 있다. 유자 \times 탕자를 교잡한 F₁ 잡종식물체 30개체 중 43.3%가 母本인 유자를 담은 것은 受精胚 유래의 식물체 아니라 不定胚 유래의 식물체로 추정된다. 柑橘類는 黃金柚자와 탕자의 正逆交雜에서와 같이(Lee, 1995) 유자와 탕

Table 7. The size (μ) of mature gametophytic parts of *C. junos* and *P. trifoliata*.

Gametophytic part	<i>C. junos</i>	<i>P. trifoliata</i>
Embryo sac ^a	79.23	69.38
Embryo sac ^b	38.56	27.50
Egg cell ^a	41.50	20.50
Egg cell ^b	8.12	6.25
Egg nucleus	6.32	4.23
Nucleolus in egg nucleus	3.70	3.50
Polar nucleus cell ^a	18.23	13.50
Polar nucleus cell ^b	15.30	12.50
Polar nucleus	6.00	5.25
Nucleolus in polar nucleus	4.35	3.25
Synergid ^a	12.00	10.00
Synergid ^b	7.00	4.00
Synergid nucleus	5.00	5.00
Nucleolus in synergid nucleus	3.75	3.75
Pollen	33.75	25.00

^alength; ^bwidth.

자의 正逆交雜이 11.7~16.6%로 비교적 잘 되었고, 이들의 염색체수도 동일하였다. 屬間交雜으로 얻어진 F₁ 잡종식물체가 앞으로 減數分裂이 정상적이고, 結果와 結實이 된다면 이들 속간들의 genome은 같다고 추정할 수 있을 것이다.

적 요

屬間交雜에 의한 新品種 育成을 위한 기초 연구로서 柚자와 탕자를 正逆交雜한 후 胚珠培養하였고, 雌雄配偶體 形成 및 受精現象을 조사하였다. 속간교잡의 結果率은 유자 \times 탕자가 16.6%, 탕자 \times 유자는 11.7%이었다. 授粉後 6주된 胚珠를 MT 기본배지에 Zeatin 0.5 mg/L에 NAA 1 또는 3.0 mg/L에 배양했을 때 callus 形成율이 높았지만, 14~15주된 胚珠를 2,4-D 0.1 mg/L 또는 0.5 mg/L이 첨가된 배지에 배양했을 때는 식물체 유기가 잘 되었다. 20주된 胚珠培養時 발아율은 유자 \times 탕자의 경우 54.5%, 탕자 \times 유자는 48.6%이었다. F₁식물의 三葉型 出現率은 유자 \times 탕자는 56.7%, 탕자 \times 유자는 100%이었다. 유자와 탕자의 染色體數는 모두 $n=9$ ($2n=18$)이었고 花粉粒의 크기는 각각 33.75 μ , 25.0 μ 이었다. 유자와 탕자 胚囊의 길이와 폭은 69.38~79.23 μ , 27.50~38.56 μ , 卵細胞의 길이와 폭은 17.50~41.50 μ , 6.25~8.12 μ 이었다. 授粉後 72시간이면 受精이 끝났다.

인용 문헌

- Cameron JW, Frost HB (1968) Genetics, breeding, and nucellar embryony. In Rewther W, Batchelor LD, Webber HJ(eds.). The citrus industry (revised ed.) Univ Calif Div Agri Sci, Berkley, Calif Vol II. 325-381

- Grosser JW, Gmitter Jr. FG, Chandler JL (1988) Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. *Plant Cell Reports* 7: 5-8
- Grosser JW, Louzada ES, Gmitter Jr. FG, Chandler JL (1994) Somatic hybridization of complementary Citrus rootstocks: Five new hybrids. *HortScience* 29: 812-813
- Iglesias L, Lima H, Simon JP (1974) Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedlings in Citrus. *J Hered* 65: 81-84
- Kobayashi S, Ikeda I, Nakatani M (1979) Studies on the nucellar embryogenesis in Citrus. II. Formation of the primordium cell of the nucellar embryo in the ovule of the flower bud, and its meristemic activity. *J Japan Soc Hort Sci* 48: 179-185
- 이만상, 이중호, 권태오, 진성계, 박공열, 박문영 (1993) 種屬間交雜에 의한 柚子나무 矮性화에 關한 研究(II). 농진청특정과제 제2년차 완결보고서 1-98
- Lee MS (1995) Breeding of new varieties by interspecific and intergeneric crossing in the Aurantioideae I. Ovule culture of intergeneric hybrid. *Korean J Plant Tissue Culture* 23 (in press)
- 문두길 (1987) 제주 재래 감귤의 동위효소 분석과 교잡실생의 조기 식별방법에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문
- Murashige T, Tucker DPH (1969) Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. In Chapman HD, ed, Proc 1st Int Citrus Symp 3. Univ of Calif, Riverside Calif, pp 1151-1161
- Ohgawara T, Kobayashi S, Ohgawara E, Uchimiya H, Ishii S (1985) Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*
- Ohta Y, Furusato K (1957) Embryo culture in *Citrus*. *Rep Kihard Inst Biol Res* 8: 49-54
- Sabharwal PS (1963) *In vitro* culture of nucelli and embryos of *Citrus aurantifolia* Swingle. In Maheshwari P, ed, plant embryology. A Symp C S I R, New Delhi, India, pp 239-243

(1995년 10월 1일 접수)