

遊離시간, 酵素處理 및 2,4-D 농도가 재래 유자(*Citrus junos*)의 캘러스由來 原形質體 遊離 및 培養에 미치는 영향

吳成都* · 金英淑
全北大學校 園藝學科

Effect of Incubation Time, Concentration of Enzyme, and 2,4-D on Isolation and Callus Formation of Protoplast from Callus of *Citrus junos*

OH, Sung Do* · KIM, Young Sook

Department of Horticulture, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea. *Corresponding author

The factors affecting the isolation and culture of the protoplast of embryogenic callus, derived from immature ovule in *Citrus junos*, were examined. An incubation time in enzyme solution of 16 hrs was preferable for protoplast isolation. Efficient protoplast yields were obtained from the treatment of equal concentration of 0.7 M BH3 to the enzyme solution containing 1.0% cellulase, 1.0% macerozyme and 0.2% pectolyase. Protoplast cultured in MT medium with 0.1 mg/L 2,4-D showed vigorous division and some of them formed callus. Induced callus was subcultured on solid MT medium but the callus showed very slow growth. The above results show the possibility to culture from protoplast fusion in *Citrus* genera.

key word: embryogenic callus, enzyme solution, protoplast isolation.

原形質體 融合에 의한 遺傳形質轉換은 異種屬間의 유전적 불화합성의 장벽을 극복할 수 있는 방법의 하나이며 인위적 배수성 육종은 동질 4배체만이 육성되나 원형질체 융합은 이질 4배체의 육성이 가능하며, 응성불임이나 부분적 암술불임계통은 양친으로부터 유전되고 있으므로 감귤의 경우는 무핵성 오렌지의 육종(Grosser et al., 1992)도 가능하다. 감귤류는 세포들이 全體形成能이 있기 때문에 세포배양에 의한 품종개발 연구가 많이 보고 되었는데(Grosser et al., 1988: 1994), 감귤류의 원형질체 배양에서 체세포배발생을 경유한 식물체 재분화(Ohgawara et al., 1985; Jumin and Nito, 1996)는 물론 *Citrus* 屬의 배발생 캘러스로부터 유리한 원형질체와 近緣屬의 엽육세포유래의 원형질체의 융합에 의한 잡종식물의 생산(Motomura et al., 1997)이 성공하여 많은 잡종개체를 육성하였으며 융합된 원형질체로부터 재분화된 식물체의 세포질잡종을 확인할 수 있는 isozyme분석(Grosser et al., 1996) 등이 보고된 바 있다. 대부분 이들 연구는 오렌지(*C. sinensis*), 탠저린(*C. reticulata*), 레몬(*C. limon*)등 으로서 우리나라와 같이 감귤 북한한계선에 있는

지역에서는 거의 재배하지 못하는 종류들이며, 原形質體 遊離 및 培養, 融合에 대한 反應이 감귤 종류에 따라서 큰 차이가 있다(Vardi and Galun, 1988; Vardi and Spiegel-Roy, 1988). 감귤 체세포잡종 육종에 있어서 필수적인 것은 양친 중 한쪽의 원형질이 중심배유래 배형성캘러스로부터 나오고 또한 원형질체 배양시 체세포배발생 및 식물체 분화가 쉽게 이루어져야 하는데 이 과정이 감귤종류에 따라서 크게 달라서 체세포잡종 육종에 제한이 된다는 것이다(Grosser and Gmitter, 1990b). 그러므로 우리나라에서 재배되고 있는 감귤류에 대한 원형질체 융합개체를 육성하기 위하여는 종류별로 原形質體 遊離條件 및 培養條件를 구명하고 이를 토대로 융합개체를 유도하는 과정이 필요하리라고 본다. 유자는 이미 葉肉原形質體를 유리하여 온주밀감과 霽氣的 融合에 의하여 체세포잡종을 유기하기도 하였다(Hidaka and Omura, 1992). 그러나 우리나라 재래유자를 공시하여 실험을 한 결과 원형질체 유리에 문제가 많았다. 본 연구에서는 우리나라에서 온주밀감 다음으로 재배면적이 많고 가공특성 등이 우량하나 개량해야 할 점이 많은 한국

재래 유자나무(*Citrus junos*)에 대하여 원형질체 분리 및 캘러스 분화에 미치는 여러 가지 조건을 구명하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

供試材料

재래유자(*Citrus junos*)의 未熟胚珠組織으로부터 유래된 캘러스를 MT(Murashige & Tucker, 1969)기본배지에 kinetin 10 mg/L와 자당을 50 g/L 첨가하고 pH는 5.8로 조정된 후 0.8%의 한천을 첨가한 배지에서 증식시켰다. 그 후 동일한 기본배지에 lactose 50 g/L를 첨가한 고체배지에 다시 계대 배양하여 유지시킨 배발생캘러스를 사용하였다.

原形質體 遊離 및 培養

원형질체 유리는 0.6 g의 유자캘러스를 잘게 粉碎한 후 6 mL의 酵素溶液(Grosser and Gmitter, 1990a)을 처리하여 25°C로 조절된 reciprocal shaker에서 150 strokes/min로 일정 시간 암배양하였다. 그 후 40 µm 스텐레스체로 殘絲를 제거한 다음 500 rpm으로 5분간 遠心分離하였다. 원심분리 후 상징액을 제거하고 25% sucrose를 첨가한 CPW용액 [KH₂PO₄ 27.2 mg/L, KNO₃ 100 mg/L, CaCl₂ 150 mg/L, MgSO₄ 250 mg/L, Fe₂(SO₄)₃·6H₂O 2.5 mg/L, KI 0.16 mg/L, CuSO₄ 0.00025 mg/L, pH 5.8]을 넣어 잘 섞이게 한 다음 13% mannitol을 첨가한 CPW용액을 페스취 피펫으로 면을 따라 두 용액이 섞이지 않도록 살며시 첨가시켜 500 rpm으로 12분간 원심분리하였으며 두 용액 사이에 형성된 band부분의 원형질체를 회수하였다. 回收된 원형질체는 BH₃배지(Grosser and Gmitter, 1988)로 수세하여 EME배지(Grosser and Gmitter, 1988)에 암배양하였으며 1주일 간격으로 새로운 배지를 첨가시키면서 25°C ± 1°C의 성장상에서 암배양하였다.

原形質體 遊離 및 培養에 미치는 要因

캘러스로부터 원형질체 유리에 적당한 배양시간을 조사하기 위하여 BH₃, EME배지 및 酵素溶液(Grosser and Gmitter, 1988)을 사용하여 4, 9, 16 및 24시간 培養하여 遊離된 원형질체수를 조사하였고 건전한 원형질체유리에 적당한 효소농도를 조사하기 위하여 BH₃ 溶液과 酵素溶液을 3:1, 1:1, 1:3의 비율로 配合한 배지에 16시간 배양한 후 健全한 원형질체 유리수를 조사하였다. 유리된 원형질체로부터 캘러스형성에 효과적인 배지를 구명하기 위하여 MT기본배지에 2,4-D를 0.01~ 0.5 mg/L의 濃度로 배합하여 당을 30 g/L 넣은 배지를 첨가하여 2,4-D 농도에 따른 캘러스의 형성 양

상을 조사하였다.

Colony형성율은 한 시야에 보이는 전체 원형질체 수에 대한 cell colony형성수를 백분율로 계산하였으며 배양 4개월 후 육안으로 관찰이 가능한 캘러스형성을 조사하였다.

결과 및 고찰

유자의 胚發生 캘러스로부터 원형질체를 遊離시키는 데 적당한 시간을 조사하기 위하여 0.7M BH₃배지와 酵素溶液을 1:1의 비율로 첨가한 배지에 培養 후 유리된 원형질체수를 혈구계산기를 이용하여 조사한 결과(Figure 1), 4시간 처리부터 세포벽이 분해된 원형질체가 유리되기 시작하였으나 아직 세포벽분해가 덜 되어 세포벽조직이 서로 엉켜 있

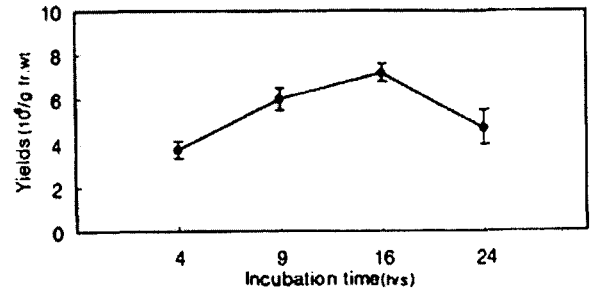


Figure 1. Effect of incubation time on the yields of protoplast from embryogenic callus of *Citrus junos*.

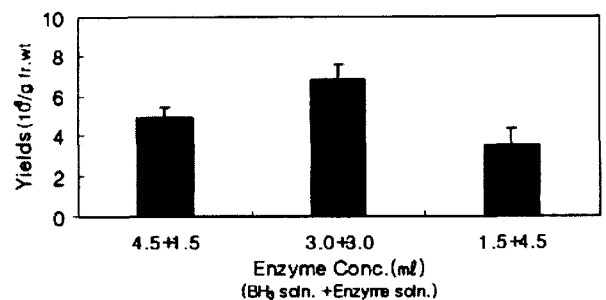


Figure 2. Effect of enzyme solution concentration for isolation of protoplast from embryogenic callus of *Citrus junos*.

Table 1. Effect of 2,4-D concentration on colony and callus formation from protoplast culture of *Citrus junos*

MT + 2,4-D(mg/L)	No. of observed petridish	Frequency of colony(%)	Callus formation
0.01	9	1.5	-
0.05	8	3.6	+
0.1	10	22.2	++
0.5	8	16.0	+

-, non response: +, slight: ++, moderate.

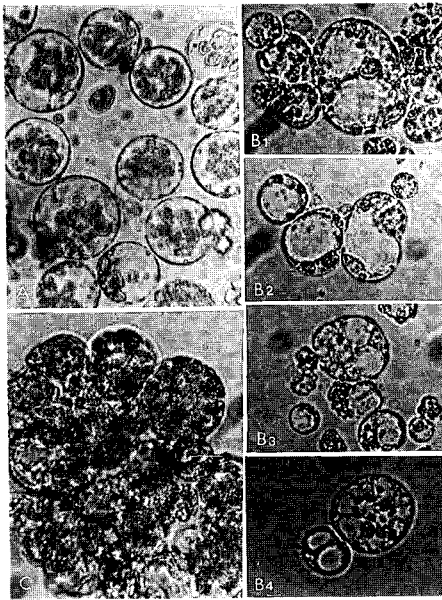


Figure 3. Protoplast culture from embryogenic callus of *Citrus junos*
 A: Freshly isolated protoplasts from embryogenic callus culture of *Citrus junos*
 B: Division of cells originated from protoplasts
 1. First division of cell 2. Elongated cell 3. Second division of cell
 4. More advanced stage of cell division
 C: Colony formation from protoplast culture

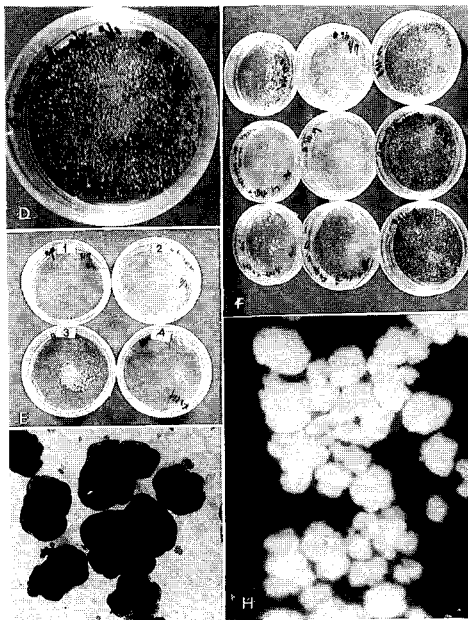


Figure 3. D: Callus formation from protoplast culture on MT medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D
 E: Effect of concentration of 2,4-D on protoplast culture: 1. 0.01 mg/L 2. 0.05 mg/L 3. 0.1 mg/L 4. 0.5 mg/L
 F: Calli formed from protoplast culture
 G: More advanced callus just before transplanting on agar medium
 H: Callus subcultured on solid medium after 5 months in suspension culture

는 모습이 많았다. 배양시간을 점점 더 늘렸을 때 원형질체 유리수는 증가하여 16시간 처리에서 비교적 건전한 원형질체가 가장 많이 유리되었다(Figure 3A). 그러나 24시간 배양한 것은 건전한 원형질체보다는 파괴된 원형질체가 많아서 적당한 배양시간은 16시간인 것으로 생각되었다. 감귤류의 원형질체 유리를 위한 효소처리시간은 연구자에 따라서 다르고 종류에 따라서 다르다. Grosser와 Gmitter(1988)는 감귤류는 유리시간을 6-16시간 사이로 하는 것이 좋다고 하였는데 유자는 16시간 처리가 가장 양호한 것으로 나타났다. 그 이상의 시간은 오히려 원형질체가 파괴된 것이 많아져서 더욱 불량하였다. 원형질체가 유리되도록 서로 연결되어 있는 세포간 조직을 분해시키기 위하여 분해효소를 첨가해야 하는데 이 때 연구자들(Sim et al., 1988; Vardi and Galuin, 1988; Ling et al., 1989)에 따라서 효소조성이 다르다. 본 연구에서는 Grosser와 Gmitter(1988)의 방법을 택하여 효소를 조성하였다.

적당량의 효소량을 조사하기 위하여 0.7M BH₃용액과 효소용액을 3:1, 1:1, 1:3의 비율로 혼합하여 16시간 배양하여 유리된 원형질체수를 조사한 결과(Figure 2), 3 mL씩 同量으로 혼합처리하였을 때가 비교적 건전한 원형질체가 많이 유리되었으며 1.5 mL의 BH₃ 용액과 4.5 mL의 효소용액을 혼합한 배지에서는 건전한 원형질체수가 감소하였다.

원형질체 회수율을 높이는 요인은 모식물체의 생육조건 및 재배환경, 삼투조절제의 종류 및 농도, 효소용액내 첨가물, 효소용액의 酸度, 溫度, 遊離時間 등 여러 가지가 있으며 특히 효소처리하기 전의 전처리가 回收率에 좋은 효과를 나타내는 것으로 보고된 바 포도에서는 전처리로서 저온의 암처리가 원형질체 회수율에 좋은 효과를 보였다고 하였으며(Hyung et al., 1992), 토마토에서는 4°C에서 12-14시간 低溫處理가 無處理보다 원형질체 회수율에 효과적이라고 하였다(Chung et al., 1986). 따라서 유자의 경우에도 원형질체를 유리할 때 암처리나 저온처리 등 전처리를 고려해야 할 것으로 생각되었다.

EME배지로 배양을 시작한 원형질체로부터 캘러스형성에 적당한 성장조절제의 농도를 조사하기 위하여 MT기본배지에 2,4-D를 0.01-0.5 mg/L의 농도로 첨가한 배지를 1주일 간격으로 조금씩 첨가하여 4개월간 배양 후 캘러스 형성을 조사하였다(Table 1).

배양을 시작한 원형질체는 별 반응이 없이 유리당시의 모습을 띤 것이 많았으나 일부의 원형질체는 培養 5-7일경부터 細胞分裂이 일어나기 시작하여 1차 細胞分裂한 모습이 관찰되었으며(Figure 3B1) 신장한 형태의 원형질체도 보였다(Figure 3B2). 이들은 배양기일이 경과함에 따라 2차 分裂이 진행되어 4細胞性的의 모습(Figure 3B3)과 더 진전된 多細胞의 형태(Figure 3B4)를 띤 경우도 관찰되었으며 배양 3개월 정도에는 세포분열이 더 진전된 cell colony의 형태(Figure 3C)가 많이 관찰되었고 배양기간이 지남에 따라 細胞分裂

이 進行되어 cell colony 형태가 더욱 진전된 캘러스가 형성됨을 관찰할 수 있었다(Figure 3D). Schamouti orange(*Citrus sinensis*) (Vardi et al., 1975)에서 원형질의 밀도는 10^6 이나 8×10^4 cell/mL일 때 colony 발생이 가장 양호하였다고 하였는데 유자는 plating 상에서 7.2×10^6 cell/g.fr.wt일 때 가장 양호하였다. 배양 4개월 후 배지에 첨가한 2,4-D의 농도별로 colony 형성율과 캘러스 형성 정도를 관찰한 결과(Figure 3E) 2,4-D 0.1 mg/L를 첨가한 배지에서 가장 많은 캘러스가 형성되었으며 2,4-D의 농도간에 조금씩 차이가 있었지만 캘러스가 형성된 것들은 육안으로 식별이 가능한 것들로 캘러스 생육이 양호한 상태이었다(Figure 3F). 이들을 대부분 독립현미경으로 관찰했을 때도 대부분의 캘러스가 비교적 조밀한 모양으로 양호한 상태임을 확인할 수 있었다(Figure 3G).

감귤류의 원형질체 배양을 위한 EME배지는 식물생장조절물질을 함유하고 있지 않다. 그러나 유자 조직배양에서는 캘러스 발생에 2,4-D의 첨가 효과가 컸으므로(Oh et al., 1991) 캘러스 발생을 위하여 2,4-D를 첨가하였다. 본 실험의 결과도 0.1 mg/L의 2,4-D를 첨가한 배지에서 캘러스형성이 가장 양호한 것으로 보아서 원형질체의 세포분열 및 발달에 2,4-D가 상조적인 역할을 한 것으로 생각된다. 그러나 원형질체 배양에서 캘러스 발생을 위한 배지에 식물생장조절물질의 첨가는 이론이 많다. 무첨가의 경우(Grosser and Gmitter, 1988; Vardi and Galun, 1988; Ling et al., 1989; Kuchuk et al., 1998)와 첨가하는 경우(Gmitter et al., 1990; Jumin and Nito, 1996; Benmoussa et al., 1997)가 있는데 첨가할 때는 auxin류나 cytokinin류가 효과적 이었는데 본 연구에서는 2,4-D첨가로 효과를 얻었다.懸濁培養에 의해 형성된 캘러스 중 비교적 조밀한 모양의 캘러스를 2,4-D가 첨가된 고체배지로 이식하여 관찰한 결과 캘러스 표면이 광택이 있고 상태가 양호하여 배발생캘러스로 진전될 가능성이 있는 것처럼 보였으나 주시조직이나 기타 다른 치상체 유래의 캘러스보다 培養反應이 느린 편이어서 캘러스생장이 더딘 양상을 보이고 있다.

Motomura 등(1997)은 감귤류와 近緣屬間的 雜種植物을 얻기 위한 원형질체 융합에 의한 신조형성은 種間에 차이가 있어서 반응이 다양하게 나타났으며 정상적인 잡종식물을 획득하기가 어려움을 보고하였는데 본 실험의 경우 캘러스로부터 식물체 분화가 어려운 것으로 보아 품종간의 차이가 있는 것으로 여겨지며 더 구체적인 원인 구명이 있어야 할 것으로 생각되었다.

한편 원형질체 융합을 위하여 포장에서 栽培하고 있는 다른 品種의 유자잎을 채취하여 원형질체 유리를 시도하였으나 잎조직이 革質의 양상을 띠고 있어서 원형질체 유리에 많은 어려움이 있었다. 그러나 生育이 왕성한 어린 잎은 다소 원형질체를 遊離하기가 쉬운 편이고 기내에서 배양한 식물체의 新梢는 비교적 원형질체 유리가 잘 되었는데 캘

러스유래의 원형질체 수와 비교하면 적은 양이었으나 탱자나 감귤 x 탱자에서도 잎원형질체(Grosser and Chandler, 1987)를 유리시킨 연구 결과들이 있으므로 본 실험에서 구명된 適定한 遊離條件으로 실험하면 배발생캘러스유래의 원형질체와 엽육세포유래의 原形質體間的 融合에 의한 培養도 가능할 것으로 생각되었다.

적 요

未熟胚珠組織 由來의 배발생캘러스를 이용하여 原形質體의 遊離 및 培養에 미치는 要因을 조사하였다. 배발생캘러스로부터 원형질체를 유리시키는데 적당한 배양시간은 16시간이었고, 건전한 원형질체를 유리하는데 적당한 酵素溶液의 농도는 0.7M BH₃ 용액과 cellulase 1.0%, macerozyme 1.0%, pectolyase 0.2%가 혼합된 효소용액을 동량으로 조합하였을 때가 가장 효과적이었다.

유리된 원형질체는 MT기본배지에 0.1 mg/L 2,4-D를 첨가한 培地로 培養하면 캘러스 형성이 양호하였다. 誘導된 캘러스는 고체배지에 繼代培養하고 있으나 生育이 微弱한 상태이다.

본 실험결과 배발생캘러스유래의 원형질체와 葉肉細胞 由來의 原形質體 融合에 의한 培養도 가능할 것으로 생각되었다.

사사 - 본 논문은 韓國科學財團支援(KOSEF 931-0600-014-2)에 의하여 수행된 연구결과의 일부임.

인용문헌

- Benmoussa M, Mukhopadhyay S, Desjardins Y (1997) Factors influencing regeneration from protoplasts of *Asparagus densiflorus* cv. Sprengeri. *Plant Cell Reports* 17:123-128
- Chung JD, Lee MH, Chun CK (1986) Isolation and culture of protoplast of ornamental tomato (*Lycopersicon esculentum* x *L. pimpinellifolium* cv. Tiny Tim). *J Kor Soc Hort Sci* 27:289-303
- Gmitter Jr FG, Ling XB, Deng XX (1990) Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli in vitro. *Theor Appl Genet* 80:785-790
- Grosser JW, Chandler JL (1987) Aseptic isolation of leaf protoplasts from *Citrus*, *Poncirus*, *Citrus* x *Poncirus* hybrids and *Severinia* for use in somatic hybridization experiments. *Sci Hort* 31:253-257
- Grosser JW, Gmitter Jr FG (1988) Protoplast fusion and *Citrus* improvement. *Plant Breed Rev* 8:339-374
- Grosser JW, Gmitter Jr FG (1990a) Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. *HortScience* 25:147-151
- Grosser JW, Gmitter Jr FG (1990b) Wide hybridization of *Citrus* via

- protoplast fusion: Progress, strategies, and limitations. Hort Biotech : 31-41
- Grosser JW, Gmitter Jr FG, Chandler JL.** (1988) Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. Theor Appl Genet 75:397-401
- Grosser JW, Gmitter Jr FG, Loudaza ES, Chandler JL** (1992) Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless *Citrus* development. HortScience 27:1125-1127
- Grosser JW, Gmitter Jr FG, Tusa N, Reforgiato Recupero G, Cucinotta P** (1996) Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from *Citrus* leaf protoplasts following somatic fusion. Plant Cell Reports 15:672-676
- Grosser JW, Louzada ES, Gmitter Jr FG, Chandler JL** (1994) Somatic hybridization of complementary *citrus* rootstocks: five new hybrids. HortScience 29:812-813
- Hidaka T, Omura M** (1992) Regeneration of somatic hybrid plants obtained by electrical fusion between satsuma mandarine(*Citrus Unshiu*) and rough lemon(*C. jambhiri*) or yuzu(*C. junos*). Japan J Breed 42:79-89
- Hyung NI, Kang SK, Lee CH** (1992) Protoplast isolation and culture of grapes cv. 'Camernet sauvignon' (*Vitis vinifera* L.) and 'Niagara' (*Vitis labrusca* L.) Korean J Plant Tissue Culture 19:227-231
- Jumin HB, Nito N** (1996) Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of Uganda cherry orange(*Citropsis schwenfurtherii*). Plant Cell Reports 15:754-757
- Kuchuk N, Herrman RG, Koop HU** (1988) Plant regeneration from leaf protoplasts of evening primrose(*Oenothera hookeri*). Plant Cell Reports 17:601-604
- Ling JT, Nito N, Iwamasa M** (1989) Plant regeneration from protoplasts of Calamondin (*Citrus madrensis* Lour.). Sci Hort 40:325-333
- Motomura T, Hidaka T, Akihawa T, Tatagi S, Berhow M, Moriguchi T, Omura M** (1997) Protoplast fusion for production of hybrid plants between Citrus and its related genera. J Japan Soc Hort Sci 65:685-692
- Murashige T, Tucker DPH** (1969) Growth factor requirements of *citrus* tissue culture. In HD Champman, eds, Proc 1st International Citrus Symposium, Vol 3. Riverside, University of California, USA, pp 1155-1161
- Oh SD, Song WS, Kim JS, Park EH** (1991) *In vitro* micropropagation of yooza(*Citrus junos* Sieb et Tanaka). I. Plant regeneration from callus induced from shoot tips. J Kor Soc Hort Sci 32:87-96
- Ohgawara T, Kobayashi S, Ohgawara E, Ishii S** (1985) Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. Theor Appl Genet 71:1-4
- Sim GE, Loh CS, Goh CJ** (1988) Direct embryogenesis from protoplasts of *Citrus mitis* Blanco. Plant Cell Reports 7:418-420
- Vardi A, Galun E** (1988) Recent advances in protoplast culture of horticultural crops: Citrus. Sci Hort 37:217-230
- Vardi A, Spiegel-Roy P, Galun E** (1975) *Citrus* cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. Plant Science Letters 4:231-236
- Vardi A, Spiegel-Roy P** (1982) Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: Variability in methodological requirements among cultivars and species. Theor Appl Genet 62:171-176

(1998년 7월 16일 접수)