

탱자(*Poncirus trifoliata* RAFIN.)의 기내 재분화 및 조직학적 특성

박민희, 이현화, 장현규, 이숙영¹⁾, 김홍섭
조선대학교 생물학과, ¹⁾조선대학교 유전공학과

***In vitro* regeneration and the change of anatomical appearance in *Poncirus trifoliata* RAFIN.**

Min-Hee Park, Hyun-Hwa Lee, Hyun-Kyu Jang, Sook-Young Lee¹⁾ and Hong-Sub Kim

Department of Biological Science and ¹⁾Genetic Engineering, College of Natural Science,
Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

ABSTRACT

In this study, the induction regeneration of callus from immature embryo in trifoliata orange (*Poncirus trifoliata* RAFIN.) were accomplished. The embryogenic calli were induced from the immature embryo derived from seed when the calli were irradiated for 16hr at about 2,000 Lux in $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with 3% sucrose, and 44.4 μ M BA. Regeneration to whole plants was the most successful in MS medium containing 5.0 μ M BA. The yellowish callus was developed at 2 to 3 weeks of culture and the callus was changed from yellow to green at 5 to 6 weeks culture. *In vitro* regeneration was directly induced from embryogenic callus in MS medium containing 3% sucrose and 5.0 μ M BA. Multishoot was formed at 16 weeks culture. Moreover, when the root-formed plantlet was transplanted to soil, they grew to a whole plant. The compact cultured-cells were observed by light microscope after 4 weeks of cultivation and the embryogenic clumps were formed about the 5 weeks. At the same time, the neighboring cells were liquefied. In addition, differentiation of leaf and stem from the callus was observed after 12 weeks. The developed oil sacs and the profacial cambium of the immature leaf were observed after 18 weeks. Therefore, we can see the considerable changes of cell arrangements according to the developmental stages of calli from trifoliata orange.

Key words: Trifoliata(*Poncirus trifoliata* RAFIN.), Yellowish callus, Multishoot,
Embryogenic clumps, profacial cambium

서 론

본 연구에서 사용한 탱자 (*Poncirus trifoliata*

RAFIN.)는 분류학상으로 보면 운향과(云香科)에 속 한다. 탱자는 감귤속의 근연 식물체로서 내한력과 병충해에 대한 저항력이 강하기 때문에 주로 풀나무 와 접목시 대목으로 이용하며, 열매는 약용으로 쓰

이고 있다(Douce, 1985 ; Beatie, 1987). 텁자는 온난한 해양성 기후를 요구하므로 경남과 전남의 남해안 섬지방 일대에서 널리 분포되어 있다(한과권, 1991).

목본 식물의 경우 탈분화와 재분화가 어려울 뿐만 아니라(Lee and Park, 1989), 기내 배양 방법에 대한 정보가 일년생 초본류에 비하여 부족하다. 또한 대부분 배로부터 유래된 캘러스는 높은 재생력을 나타내지만, 성장한 식물체의 분화된 세포는 재생력이 없는 것으로 알려져 있어 (Reilly and Washer, 1977) 체세포배 발생에 대한 연구 결과는 미약하다. 자연 상태에서 삽목을 이용한 식물체의 재분화 방법을 다수의 임목에서 성공적으로 행하여져 왔지만, 작업 단계가 복잡하여 노동집약적이고, 생산 비용이 높으며, 줄기의 생산량이 적은 것이 문제점으로 드러났다(Denchev et al., 1992). 반면, 실험관내에서 체세포 배 발생법으로 배 형성을 유도할 경우 저렴한 비용으로 식물체의 생산을 대량화 할 수 있으며, 저장과 수송이 용이하다는 장점이 있다(Muralidharan et al., 1989). 한편 목본 식물의 체세포배 발생(somatic embryogenesis)은 활엽수에서는 레몬유칼리나무 (Muralidharan et al., 1989), 포플라 (Park and Son, 1988 ; Cheema, 1989), 사과나무 (Eichholtz et al., 1989), 뽕나무 (Oka and Ohyma., 1981), 커피나무 (Sharp et al., 1980) 등이 있으며, 침엽수는 스트로브 소나무 (Finer et al., 1989), 라디아타 소나무 (Reilly and Washer, 1977)등이 보고되었다. 그러나 조직배양을 통한 식물체의 재분화 연구는 주로 벼(Jung et al., 1993), 보리(Kao et al., 1991), 밀(Dayand Ellis, 1984), 옥수수 및 담배(Endo et al., 1988)를 포함한 여러 화본과 식물에서 많은 연구가 진행되었다. 그것은 식물 세포의 특성인 단세포에서 완전한 식물체를 유도할 수 있는 전형성능(totipotency)을 이용하여 유전 육종을 통한 품종개량에 쉽게 이용할 수 있기 때문이다. 또한 목본류의 약 배양을 통한 식물체 재분화(Kim et al., 1993)에 성공하였지만 약 배양과 소포자의 배양으로부터의 식물체 유도 효율은 극히 낮은 것으로 보고되었다(Kao et al., 1991 ; Yoon et al., 1993). 유채를 비롯한 쌍자엽 식물과(Swanson et al.,

1987), 보리와 밀과 같은 일부 단자엽 식물에서는 소포자로부터 배 발생을 통한 식물체의 재분화에 대한 배양조건도 어느 정도 확립되었다.

본 연구는 약용으로 널리 이용되고 있는 내한식물과 수지병에 대한 저항력이 강한 텁자나무의 조직배양 기법을 개발하고자 여러가지 조건을 달리하여 텁자의 미성숙 종자로부터 배를 분리하여 조직배양을 함으로써 식물체의 재분화 기법을 확립하고자 하였으며 더 나아가 이를 재분화 단계의 광학현미경적 구조를 관찰함으로써 조직학적 특성을 관찰하고자 하였다. 따라서 본 논문은 약용과 식용으로 널리 이용되어 경제적으로 그 가치가 충분히 인정되고 있는 유용한 경제 작물인 유자나무와 내한력과 수지병에 대한 저항력이 강한 텁자나무의 장점과 단점을 서로 보완함으로써 향후 보다 더 경제성 있는 과수원 예작물로써 유자를 품종개량하기 위한 기초실험의 일환으로 행해지게 되었다.

재료 및 방법

2-1. 재료

한국의 남해안 전남 완도지방(고금면 상정리)에 분포되어 있는 텁자(*Poncirus trifoliata* RAFIN.)를 사용하였다. 열매는 봄가지(3월)에 착생하여 개화일로부터 30일 된 미숙열매와 10월 하순의 성숙 열매를 사용하였다.

2-2. 텁자의 조직배양

2-2-1. 배분리 배양

실험에 사용할 미숙 열매와 성숙열매를 무균대에서 살균수를 이용하여 세척한 후 멸균된 해부용칼과 펀셋을 이용하여 4등분한 다음 종자를 분리하였다. 분리한 종자는 곧 바로 종자의 종피를 제거하고 70%(V/V) Ethanol에 10분, 5% Sodium hypochloride 용액에 15분간 표면 살균한 후 이것을 멸균수로 3회 수세한 다음, 멸균된 종자로부터 배를 분리해 무균적으로 해부용칼을 이용하여 배를 2-3mm로 자른 후 멸균후 절단면이 캘러스 유기 배지에 접하도록 치상하여 배양하였다.

2-2-2. 캘러스 유기와 식물체의 재분화

1) 배발생 캘러스에 미치는 Sucrose, BA 및 배양재료의 부위에 따른 효과

캘러스 유도배지로써 $\frac{1}{2}$ MS(Murashige and Skoog)에 sucrose의 농도를 각각 1, 3, 6, 9%로 첨가한 배지를 처리구로 하여 sucrose 농도의 변화가 배발생 캘러스에 미치는 효과를 조사하였고, BA(6-benzylaminopurin)의 효과는 동일한 $\frac{1}{2}$ MS 배지에 1, 20, 44.39 M의 BA를 첨가하여 각각의 배발생 캘러스의 발생 상태를 조사하였다. 유자와 텅자의 미숙 열매와 성숙 열매로부터 캘러스 유도를 위해 각각 과피, 배, 배유와 잎을 절취하여 캘러스 유도 배지에 치상함으로써 각 배양재료 부위별 캘러스의 유기정도를 확인하였다. 모든 배지는 121°C, 1.5 기압하에서 15분간 고압증기 멸균한 후 사용하였다.

2) 광주기와 온도변화에 따른 캘러스의 유기

배발생 캘러스의 광주기에 따른 유기정도를 알아보기 위해 형광등을 광원으로하여 2,000 lx로 1일당 4, 8, 12, 16, 20, 24 h의 광주기로 실험 하였으며 이와 함께 24~28°C까지 온도의 변화를 주어 배양함으로써 1°C 상승함에 따른 캘러스 유기정도를 관찰하였다.

3) 식물체의 재분화유도

Organogenesis를 위해 캘러스유도 배지에서 형성된 캘러스를 3% sucrose와 0.8% agarose가 첨가된 MS배지에 치상하였다. 유도된 캘러스는 embryogenic clumps가 포함되도록 절단하여 2주 간격으로 계대 배양하였다. 재분화의 유도는 26°C, 습도 50%, 조도 2,000 lx의 형광하에서 16h의 광주기와 8h의 암주기로 배양하였으며 계속적인 계대 배양을 통해 30주 후에는 5cm정도로 생장한 소식물체를 관찰하였고 이를 배지에서 분리하여 화분에 이식하였다.

2-3. 텅자의 조직학적 관찰

2-3-1. 광학 현미경적 방법

실험에 사용될 각 텅자 시료들은 채취 즉시 이들 각각을 1~2mm 두께로 자르고 4% FAA, 0.5% glutaraldehyde용액에 고정한 후, 알코올로 탈수한다

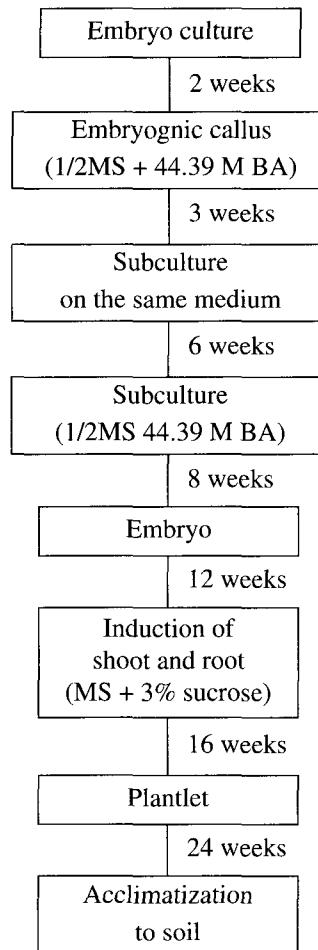


Fig 1. Protocol for plant regeneration from embryo in *Poncirus trifoliata* RAFIN.

음 epon으로 포매하였다.

포매된 시료는 rotary microtome(LKB)으로 8-15 μm의 연속 절편을 제작하여 toluene blue로 염색한 후 광학 현미경(Olympus × 400)으로 각 단계별 조직의 변화를 관찰하였다.

결과

3-1. 텅자의 캘러스 유도 및 재분화 과정

캘러스 유도를 위하여 미성숙과 성숙의 잎, 줄기, 열매의 과피 그리고 배유와 배등의 여러 조직을 절단하여 각각 동일한 조건에서 여러 방법으로 배양하

Table 1. Effects of BA on callus induction.

		BA(M)		
Explants		1	20	44.39
IMMATURE	Leaf	+	++	+++
	Pericarp	-	-	+
	Embryo	++	+++	++++
	Endosperm	+	+	++
MATURE	Leaf	-	+	++
	Pericarp	-	-	-
	Embryo	+	++	+++
	Endosperm	-	-	+

Degree of callus induction :

: - ; none, + ; rare, ++ ; moderate,
++ + ; good, ++ + + ; excellent

였다. 각 배양 재료 및 부위에 따른 캘러스 유도 정도는 $44.4 \mu\text{M}$ BA가 첨가된 $\frac{1}{2}$ MS 배지에서 미성숙 종자의 배조직으로부터 가장 양호하게 유기되었으며 성숙열매의 과피에서는 캘러스 유기가 일어나지 않았다(Table 1).

뿐만 아니라 탱자는 탈분화가 잘 이루어지지 않아 캘러스 유기가 잘 이루어지지 않고 배양한 조직들이 성장을 계속하는 경우가 많았으므로 캘러스 유도에 의한 조직 배양 실험이 어려웠다(Fig. 2). 그러나 캘러스 유도가 시작된 조직의 경우에는 유자보다 2~3주 정도 빠른 배양 2~3주경부터 담황색의 캘러스가 빠르고 왕성하게 유도되기 시작하였다(Fig. 3).

또한 3% sucrose가 첨가된 배지에서 하루에 26°C에서 2,000 lx로 16 h이상 광배양할 때 캘러스가 가장 왕성하게 유도되었다(Table 2, 3).

Table 2. Effects of concentration of sucrose on callus induction.

Hormone	Concentration(%)	Callus induction
Sucrose	1	+
	3	++ + +
	6	++ +
	9	+

Degree of callus induction : + ; rare, ++ ; moderate,
++ + ; good, ++ + + ; excellent

Table 3. Effects of illumination time temperature in 1/2 MS medium supplemented with 3% sucrose and 44.39 M BA on callus induction.

Time (hour/day)	Temperature(°C)				
	24	25	26	27	28
8	+	+	++	+	+
12	+	++	+++	++	++
16	++	+++	++++	+++	+++
20	+	++	+++	+++	+
24	+	+	++	+	+

Degree of callus induction : - ; none, + ; rare,
++ ; moderate, ++ + ; good, ++ + + ; excellent

발생 초기에는 유자와 같이 담황색의 캘러스였다가 배양 5~6주에는 녹색으로 서서히 변하기 시작하였는데 주로 탱자가 유자에 비해서 녹색을 띄게되었다(Fig. 4). 배양 8주경 부터는 단단한 녹색 조직으로 변하면서 배발생 캘러스와 비배발생 캘러스로 발달하기 시작하였다(Fig. 5). 녹색 캘러스는 주로 녹색과 담황색이 공존한 캘러스로 존재하는데 탱자의 경우에는 대부분의 캘러스 전체가 녹색으로 변한 단단한 조직으로 존재하였으며 일부만 녹색과 담황색이 공존한 캘러스로 존재하였다(Fig. 6).

따라서 $44.4 \mu\text{M}$ BA가 첨가된 $\frac{1}{2}$ MS 배지에서 배양한 결과 배발생 캘러스의 비배발생 캘러스의 발생 빈도는 20%와 80%로 비배발생 캘러스의 발생 빈도가 훨씬 높았으나 재분화율에 있어서는 배발생 캘러스가 83%로 더 높다는 것을 알 수 있었다(Table 4).

배양 8주경에는 일반적으로 두 가지 형태의 캘러스로 변하였는데, 가장 많은 빈도로 나타난 첫번째 유형은 한쪽면은 크고 작은 둥근 구형의 돌기들이 발생하였으며 다른 쪽면은 녹색의 다소 유통불통한

Table 4. Callus formation and regeneration from embryogenic callus and nonembryogenic callus.

Callus	Frequency(%)	
	Formation of callus	Plant regeneration
Embryogenic callus	6/30(20%)	5/6(83%)
Nonembryogenic callus	24/30(80%)	2/24(8.3%)

Table 5. Effects of various concentration of hormone supplemented on MS medium for regeneration.

Basal medium	Hormone		Regeneration
	BA	NAA	
MS	1μM	-	+
	1μM	-	++++
	5μM	5μM	++

Degree of callus induction : - ; none, + ; rare, ++ ; moderate, +++ ; good, +++; excellent

비배발생 캘러스였다(Fig. 7). 두번쩨 유형은 녹색과 담황색이 공존하고 있는 표면에 구형의 돌기들이 형성된 캘러스로 배양 10주경 부터 shoot가 형성되나 완전한 식물체로 재분화가 이루어지지 않고 퇴화된 것을 관찰하였다(Fig. 8). 배양 12주 후에 단단한 배발생 캘러스를 식별하여 배발생 돌기가 포함되도록 하여 2-3개로 절단, 분리한 다음 5 μM BA가 첨가된 재분화 배지에 치상(置床)하였는데 배양 13주경부터 구형의 하얀색 배발생돌기로 부터 shoot가 형성되기 시작하였다(Fig. 9, Table 5).

배양 14주경에는 이들 shoot로부터 다분화가 이루어져 왕성하게 잎과 줄기가 분화됨으로서 유자보다 더 생명력이 강인하고 왕성하다는 것을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 shooting후 계대배양하기 전부터 주근이 튼튼하게 발달하면서 측근이 발달하기 시작하였으며 줄기에서는 왕성하게 튼튼한 측지가 발달하므로 전강한 식물체로 발달되었다(Fig. 10). 다음 2주 간격으로 기본 MS배지에 두번 계대배양한 후 5cm정도 자란 24주경에 화분에 옮겨 심어 유자의 재분화 식물체에서와 동일하게 처리하였는데, 이식 초기에는 간접광하에 식물체를 방치하였으며 1주일 후에는 6~8h 노출시켰고, 3주일 후부터는 26°C, 습도 50%, 그리고 조도 2,000 lx하에서 배양하였다. 화분에 이식후 계속하여 측지와 근모의 발달이 왕성하게 이루어졌다(Fig. 11).

3-2. 탱자 캘러스 발달양상의 광학현미경적 구조

탱자는 배양 3주경부터 캘러스 유도가 시작되었는데 5주된 캘러스가 8주된 유자 캘러스만큼 증식이

되었으며 일반적으로 2~3주 정도 빠르게 분화되었다(Fig. 12). 계속적으로 육안으로 변화를 확인할 수 있는 단계에서 절편을 제작하여 관찰하였는데 캘러스 발달이 왕성하여 세포들이 빠르게 분화됨으로서 주로 1주일 간격으로 절편을 제작하였다. 캘러스 유도 초기의 배 조직 세포들은 가장자리에서부터 내부 쪽으로 서서히 세포가 조밀하게 분화되어 가므로서 진하게 염색되었다(Fig. 13).

배양 7주된 캘러스에서 유조직의 형성층 세포들이 분화되어 안쪽으로 세포벽이 조금씩 비후되기 시작하여 외부의 형성층 세포보다 더 진하며 장방형으로 발달되어 지는 목부와 사부 유조직을 관찰하였다 (Fig. 14).

배양 9주경에는 배발생 캘러스의 표피세포에서 전자밀도가 높은 밀집된 세포들이 더욱 조밀하게 밀집되면서 밖으로 용기되어 나오는 현상을 관찰하였는데 이러한 현상을 shoot라 하며 내부의 세포들은 액포가 크게 포함되어 있어 다소 밝게 염색되었다 (Fig. 15).

배양 10주된 배발생 캘러스의 배발생 돌기들로부터 shooting이 시작되었는데 이때 발생한 묘조의 구조는 조직이 대체로 단순하게 발달되어 있었다. 이는 1~2층의 균일한 평판상의 표피세포로 덮여 있고 묘조의 정단 부위에 정유(精油)를 함유하고 있는 발달된 유낭이 다수 관찰되었고 후각상유조직 세포들이 산재해 있었다. 또한 표피세포에는 기공이 소수 발달되었으며 유낭이 표피조직과 하부유조직에 분포되었는데 이들 조직세포 내에서 많은 엽록체들이 관찰되었다(Fig. 16). 한편 shooting이 시작되고 있는 캘러스 조직에서 액포화된 유조직 세포들 사이에 발달된 유낭이 관찰되었으며 이를 액포화된 유낭 상피조직이 싸고 있는 것을 관찰하였다(Fig. 17).

고찰

본 실험에서 유자와 탱자의 미성숙 열매의 과피, 배, 배유 그리고 어린잎과 성숙열매의 과피, 배, 배유 그리고 성숙잎을 조직배양 재료로 사용하였다. 그런데 그 중 미성숙 배의 조직으로부터 캘러스 유기가

가장 양호했으며 이로 부터 유기된 배발생 캘러스로부터 재분화가 잘 이루어졌다(Table 1, 4). 이는 목본류에서는 대부분 배조직의 절편에서 유래된 캘러스가 높은 재생력을 나타내지만 Reilly and Washer (1977)의 보고에서 처럼 완전히 분화된 조직으로부터 유도한 캘러스는 재분화력이 현저히 떨어졌다. 또한 성숙도가 다른 여러 종류의 절편으로부터 배발생 캘러스 및 체세포배의 유도는 재료 식물의 성숙도가 어릴수록 체세포 배의 유도가 잘 이루어졌는데 이러한 경우는 *Gossypium hirsutum*에서도 같은 현상으로 나타났다(Trolider and Goodin, 1988). 따라서 기내 재분화 실험에서는 어느 부위의 어떤 조직의 절편을 선택하느냐가 중요한 관건으로 여겨진다.

캘러스 배양을 통한 식물체의 재분화에 대해서는 많은 보고가 있어 왔으나(Grayner et al., 1980) 목본식물은 재분화율이 낮고 수종에 따라 재분화가 용이하지 않아 초본류에 비해 연구가 미비한 실정이다(Reilly and Washer, 1977). 본 실험에서 사용한 텅자의 경우에도 캘러스 유기에서 비배발생 캘러스 유기가 80% 정도로 재분화율이 상당히 저조하였다(Fig. 4, 5, 6, 7, 8). 특히 텅자의 경우에는 탈분화가 어려워 캘러스 유기가 잘 안되었다(Fig. 4). 따라서 목본식물의 경우 재분화와 탈분화가 어려울 뿐만 아니라 기내 배양 방법이 일년생 초본류에 비하여 많이 부족하다(Lee and Park, 1989).

배양한 배의 절편으로부터 배발생 캘러스의 유도는 $44.4 \mu\text{M}$ BA와 3% Sucrose를 함유한 MS배지에 치상했을때, 텅자는 3주경에 26°C 광배양(ca, 2,000 lx, 16/8h)함으로써 캘러스가 가장 양호하게 유기되었다(Table 2, 3, 5) (Fig. 3, 9).

Gui et al.(1991)등이 파종 후 6주 경과된 유식물의 잎과 절편으로부터 배발생 캘러스의 유도는 1.0 mg/L 2, 4-D 단독 또는 0.5 mg/L ABC 조합 처리시에 이루어졌으며 특히 ABC 처리시에 더욱 양호하였다. 그리고 cytokinin 조합시에는 이루어지지 않았다고 하였지만 cytokinin 처리시 본 실험에서는 성공적으로 캘러스가 유도되었다. 특히, 감귤류에서의 캘러스 유도 실험은 광배양시 더욱 잘된다는 보고와 같이 본 실험에서도 2,000 lx로 조사하였을 때 더 빨리 캘

러스를 유도할 수 있었다.

텅자의 캘러스는 발생초기에는 담황색이지만 점점 녹색으로 변하게 되고 표면에 구형의 목질화된 돌기(embryoid)들이 생겨나는 배발생 캘러스(embryogenic callus; E-callus)와 그렇지 않은 비배발생 캘러스(non-embryogenic callus ; NE-callus)가 발생하는데 나중에 배발생캘러스에서 식물체가 재분화되었다(Fig. 7, 8, 9).

Nabors et al.(1983)은 화본과 식물(禾本科植物)의 캘러스 계대배양에서 식물체 재분화 능력이 낮아지는 것은 배발생 캘러스와 비배발생 캘러스의 구성비에 있다고 하고 배발생 캘러스의 경우는 계대배양을 하여도 재분화능력(再分化能力)이 비교적 장기간 지속된다고 하였는데 이는 본 실험 결과 배발생 캘러스에서의 재분화율은 효율적으로 유지되는 것을 볼 수 있었다.

Ozawa와 Komamine(1989)는 벼의 미숙배(未熟胚) 유래의 캘러스 혼탁배양에서 부정배 발생(不定胚發生)과 식물체 재분화에는 배지와 생장조절제의 조성, 캘러스의 크기와 배양밀도, 새로운 배지의 추가 등이 중요한 영향을 미친다고 하였다. 텅자는 온도, 빛 그리고 호르몬의 종류나 양에 대해서 적응력이 좋았으며 배양 3주경부터 왕성하게 캘러스가 유기되며 재분화율과 속도도 빠르고 화분에 이식한 후에도 잘 자랐다(Fig. 10, 11). 그러나 텅자는 비교적 탈분화율이 낮았으며 조직 자체에서 바로 재분화되는 경우도 있었다(Fig. 2). 따라서 조직배양은 배양식물의 종, 치상조직의 종류와 그의 생리적 성질이 기내에서 탈분화 및 재분화를 유도하는데 가장 중요한 요인이 되며 체세포배(somatic embryo)가 식물조직 편 자체에서 직접 생겨나던지 캘러스 세포에서 생겨나던지 간에 그 세포가 먼저 배발생의 잠재력을 가지고 있어야 한다(Hacius, 1978). 이렇게 된 세포는 배지 조성분이나 배양 조건 여하에 따라 배로 발달하기도 하고 억제되기도 하며 배발생 캘러스 유기에 있어 식물 종마다 배지의 조성이 달라지므로 적합한 배지의 조합을 실험을 통해 규명되어야 한다고 사료된다. 본 연구에서 텅자가 Lee and Park(1989)이 보고한 바와 같이 탈분화율이 낮아 결과적으로 부정배로

로부터 식물체 분화는 식물 생장조절 물질이 들어 있지 않은 배지에서 정상적인 식물체의 분화가 가장 많았으며 $44.4 \mu\text{M}$ BA와 3% sucrose가 함유된 배지에서 광배양(ca, 2,000 lx, 16/8h)시에 양호한 편이었다. 이러한 결과는 미성숙 접합자 배를 저농도의 cytokinin에 노출시켰을 때 체세포 배가 형성되었다는 Petrova and Williams(1986), Maheswaran and williams(1986)의 결과와 $5 \mu\text{M}$ 2.4-D와 kinetin이 들어 있는 배지에서 유도된 캘러스를 $1 \mu\text{M}$ 로 2.4-D의 농도를 낮춘 배지로 옮겼을 때 체세포 배가 형성되었다는 Lang and Kohlenbachg(1978)의 결과와는 약간 차이가 있었다.

탱자는 녹색의 배발생 캘러스상의 구형의 배발생 돌기로부터 multiple shoot가 발생하는 경우가 있었는데(Fig. 8, 9), 이러한 현상을 Vasil and Vasil(1982)은 조기 발아하는 배발생 돌기가 2.4-D에 의해 정아 우열현상(頂芽優烈現象)이 상실되어 원래의 shoot 분열조직에 많은 분열조직이 발생하기 때문이라고 해석하였다.

한편, 탱자의 배발생 캘러스에 발생하는 배발생 돌기들의 발달과정을 해부학적으로 관찰하기 위하여 구형의 어린 배발생 돌기가 발생한 배발생 캘러스를 $10 \mu\text{m}$ 두께로 절단한 후, 광학현미경으로 관찰하였다. 그 결과 배발생 캘러스의 하부세포층에서는 진하게 염색이 되는 구형의 전배발생돌기(pro-embryoid)가 주위의 크고 액포화된 세포에 둘러싸여 발달하고 있었는데, 이러한 전배발생 돌기들은 핵이 뚜렷하고, 세포질이 풍부하여 진하게 염색이 되는 특징을 나타내었다(Fig. 15, 17). 이는 Kang *et al.*(1988)의 벼의 체세포 배 발생에 관한 실험 보고에서와 일치되는 결과를 보였다.

탱자의 유낭은 표피세포 하(下)층에서 액포화된 유낭표피 세포에 의하여 형성되었으며 유낭 내부에 접해있는 액포화된 세포가 파괴되면서 파생적인 방법에 의하여 유낭이 발달하는 것을 알 수 있었는데(Fig. 16, 17), 정(1994)이 일부 식물에서 초기에 세포 간극이 이생적으로 발생한 후 유낭을 이루는 액포화된 유낭 표피 세포가 파괴되는 것으로 추론하였으며 본 연구와 같은 현상으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 탱자의 미성숙배로부터 캘러스 유도와 재분화에 관하여 연구하였다.

탱자 배발생 캘러스들은 3% sucrose와 $44.4 \mu\text{M}$ BA로 처리된 $\frac{1}{2}$ MS배지에서 광조사(2,000 lx, 16h)시에 미성숙종자의 배로부터 유도되었으며 식물체 재분화는 MS배지에 $5.0 \mu\text{M}$ BA를 첨가하였을 때 가장 양호하였다.

탱자는 배양 2~3주경에 담황색의 캘러스가 유도되었으며 배양 5~6주경부터는 딱딱한 녹색의 캘러스로 변하였다. 기내 재분화는 3% sucrose와 $5.0 \mu\text{M}$ BA가 첨가된 MS배지에서 배발생 캘러스로부터 직접 유도되었다. 또한 배양 12주 후에 Multishoot가 재분화되었으며, 배양 16주 후에 뿌리가 형성되었다. 또한 뿌리가 형성된 식물체들은 토양으로 옮겨져 완전한 식물체로 잘 자랐다.

광학 현미경 관찰시 탱자에서는 배양 4주경에 하얀색의 조밀한 배양된 세포들이 나타났다. 배양 6주경부터는 세포들이 신장되면서 배발생 돌기가 나타났으며 주변의 세포들은 액포화 되었다. 또한 배양 12주경에는 미성숙 잎에서 발달된 유낭과 전형성충을 관찰하였다.

사사

본 연구 결과는 조선대학교 교내연구비 지원(1997)에 의해 수행된 것으로 이에 감사 드립니다.

인용문헌

- Beattie,D.S.,and K.Sen. 1987. Synthesis of mitochondrial protein, mitochondrial DNA. IRL Press. pp.283-307.
Cheema,G.S. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension and tissue cultures of mature himalayan poplar(*Populus ciliata*). *Plant Cell Reports*. Vol.8, pp.124-127.

- Day,A.,and T.H.N.Ellis. 1984. Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen : Possible basis for material inheritance of chloroplasts. *Cell*. Vol.39, pp.359-368.
- Denchev,P.D., Kuklin, A.I., and Scragg, R.L. 1992. Somatic embryo production in bioreactors. *J. Biotechnol.* Vol.26, pp. 99-109.
- Douce,R.O. 1985. Mitochondria in higher plant : Structure, function, and biogenesis. *Academic Press*. pp.1-327.
- Eichholz, D.A., H.A.Robitaille and P.M.Hasegawa. 1989. Adventive embryony in apple. *Hort Science*. Vol. 14, pp. 699-700.
- Endo,T., T.Komiya, M.Mino, K.Nakanishi, S.Fujita, and Y.Yamada. 1988. Genetic diversity among s originating from a single somatic hybrid cell of *Duboisia hopwoodii* + *Nicotiana tabacum*. *Theor Appl Genet*. Vol.76, pp.641-646.
- Finer,J.J., Kriebel, H.B., and Becwar, M.R. 1989. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Reports*. Vol.8, pp.203-206.
- Gayner, F.A., O.P. Jones, R. Watkins and M.E. Hopgood. 1980. Regeneration of plants from callus. Rep E Malling Res Stn for 1979, pp.187-188.
- Gui, Y., Z.Guo, S.Ke and R.M. Skirvin. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acanthopapax Senticosus*. *Plant Cell Reports*. Vol.9, pp.514-516.
- Hacius, B. 1979. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology*. Vol.28, pp.74-81.
- Jung, B.G., J.C.Ahn, K.M.Ko, Y.J. Kim, S.J.H. wang, and B.H. wang. 1993. Plant regeneration from protoplasts isolated through embryogenic cell suspension culture in rice. *Korean J. Bot.* Vol.36, No.3, pp.21 -218.
- Kang K.H., K.H. Kim and T.Y. Chung. 1988. Studies on somatic embryogenesis in rice. *Korean J. Plant Culture*. Vol.13, NO. 2: 149-159.
- Kao, K.N., M.Saleem, S.Abrams, M.Pedras, D.Horn, and C.Mallard. 1991. Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. *Plant Cell Reports*. Vol.9, pp.595-601.
- Kim, Y.S., J.S.Jeon, and K.W.Lee. 1993. Plant regeneration from rice microspore cultures. *Korean J.Bot.* Vol.36, No.2, pp.183-192.
- Lang, H., and Kohlenbach, H.W. 1978. Development of isolated leaf parenchyma cells. In an alfermann, E reinhard, eds, production of natural compounds by cell culture methods. Gesellschaft f r strahlenund umweltforschung mbh. *Munchen*, pp.247-282.
- Lee, S.G., and Park, Y.G. 1989. Plant regeneration from cambium callus of *Ailanthus altissima* Swingle. *J. Kor. Food. Soc.* Vol.78, pp412-418.
- Maheswaran, G., and Williams, E.G. 1986. Direct secondary somatic embryogenesis from immature somatic embryos of *Trifolium repens* cltured *in vivo*. *Amm.Botony*. Vol.57, pp.107-117.
- Muralidhram, EM, Gupta, P.K., and Mascarenhas, A.F. 1989. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of eucalyptus buds and its modification by high concentration of benzyladenine in leaf tissue of mulberry (*Morus alba*). *CAN J. Bot.* Vol.59, pp.68-74.
- Nabors, M.W., J.W. Heyser, T.A. Dykes and K.J. DeMott. 1983. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta*. Vol.157, pp.385-391.
- Oka, S.K., and Ohyama, K. 1981. *In vitro* initiation of adventitious buds and its modification by high concentration of benzyladenine in leaf tissue of mulberry (*Morus alba*). *Can J Bot.* Vol.59, pp.68-74.
- Ozawa, K. and A. Komamine. 1989. Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet*. Vol.77, pp.205-211.
- Park, Y.G., and Son, S.H. 1988. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis from puctured leaf of *Populus nigra* X.P. *maximowiczii*. *Plant cell tissue*

- and organ culture*. Vol.15, pp.95-105.
- Petrova, A. and E.G.Williams. 1986. Zygotic embryo cloning in oil seed rape (*Brassica napus L.*). *Plant Sci.* Vol.47, pp.195-198.
- Reilly, K. and J.Washer. 1977. Vegetative propagation of radiata pine by tissue. *NZJ For Sci.* Vol.7, pp.199-206.
- Sharp, W.R., Sundahl, M.R., Caldas, L.S., and Maraffa, L.S. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hortic Rev.* Vol.2, pp.268-310.
- Swanson, E.B., M.P. Coumans, S.C. Wu, T.L. Barsby and W.D. Beversdorf. 1987. Efficient isolation of microspores and the production of microspore-derived embryos from *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.*
- Trolinder, N.L. and J.R. Goodin. 1988. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*) 1. Effects of source of explant and hormone regime. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol.12, pp.31-42.
- Vasil, V. and I.K. Vasil. 1982. The ontogeny of somatic embryos of *pennisetum ammericanum* (L) K : Schum I. In cultured immature embryos. *Bot. Gaz.* (Chicago) 143 : 454-465.
- Yoon, S.J., S.H. Sohn, and K.W. Lee. 1993. Morphology and protein pattern during microspore-derived embryogenesis of *Brassica napus*. *Korean J.Bot.* Vol.36, No.4; pp.399-406.
- 鄭濬. 1994. *식물형태학*. 서울특별시, 형설출판사.
- 한해룡, 권오균. 1991. *감귤원예신서*, 2nd ed. 서울특별시, 선진문화사.

(접수일: 1999.4.1)

(수리일: 1999.6.10)

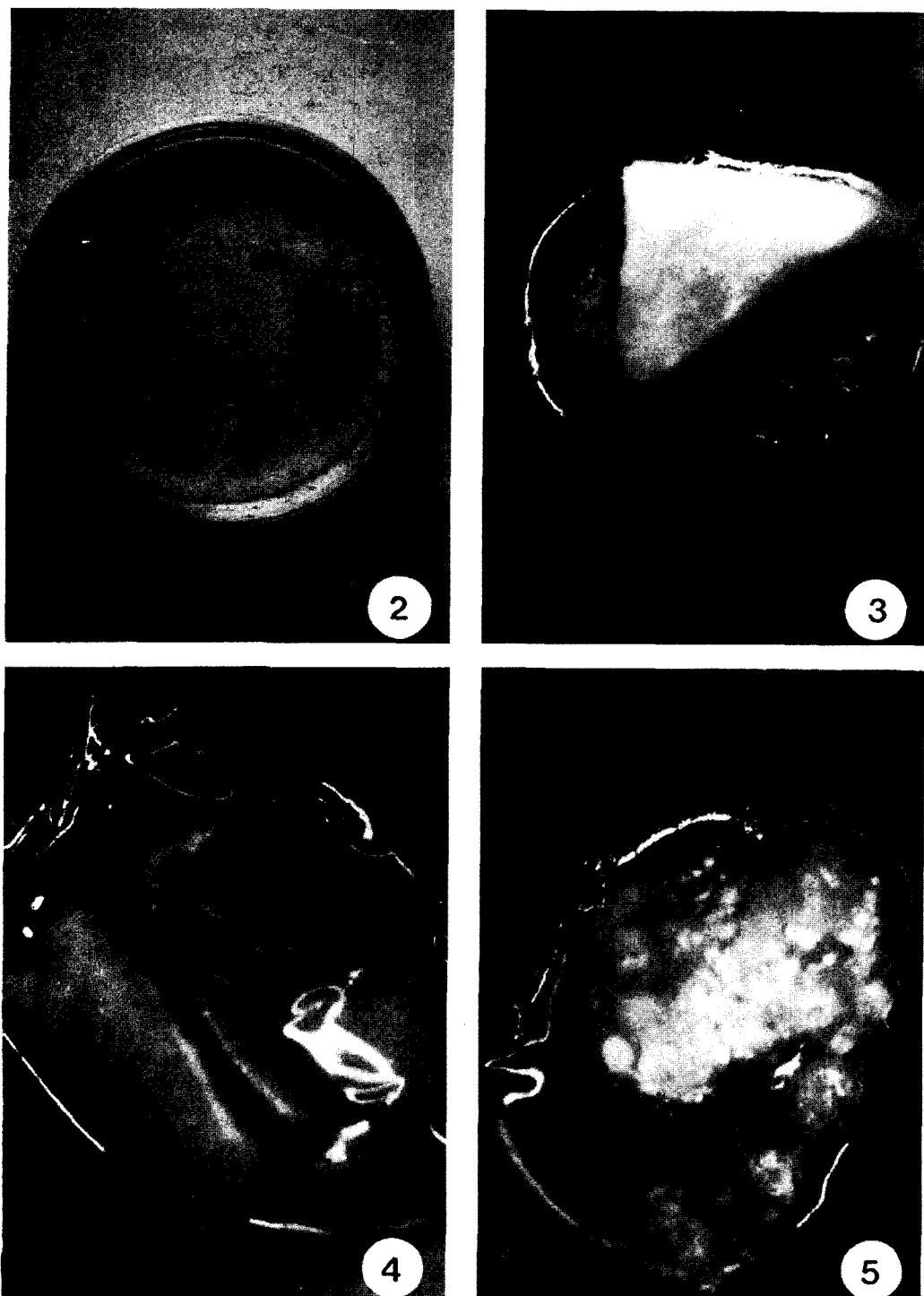


Fig. 2-11. Various developmental stages during induction of callus in *Poncirus trifoliata* RAFIN.

Fig. 2. Embryogenic callus on $\frac{1}{2}$ MS solid medium supplemented with $44.4 \mu\text{M}$ BA. $\times \frac{1}{2}$.

Fig. 3. Early stage of yellow colored embryo callus (arrows) induced on the callus induction medium for 3 weeks culture. $\times 35$.

Fig. 4, 5. Early stages of green callus converted from yellow callus for 6 weeks culture. $\times 35$.



Fig. 6. Yellow and green callus for 10 weeks culture. $\times 40$.

Fig. 7. Embryogenic callus contained with globular-shaped embryo (embryogenic clumps) for 9 weeks culture. $\times 40$

Fig. 8. Multiple shoot tips are differentiated from embryogenic callus for 12 weeks culture. $\times 40$.

Fig. 9. Multiple shoot formation from embryogenic callus for 16 weeks culture. $\times 40$.

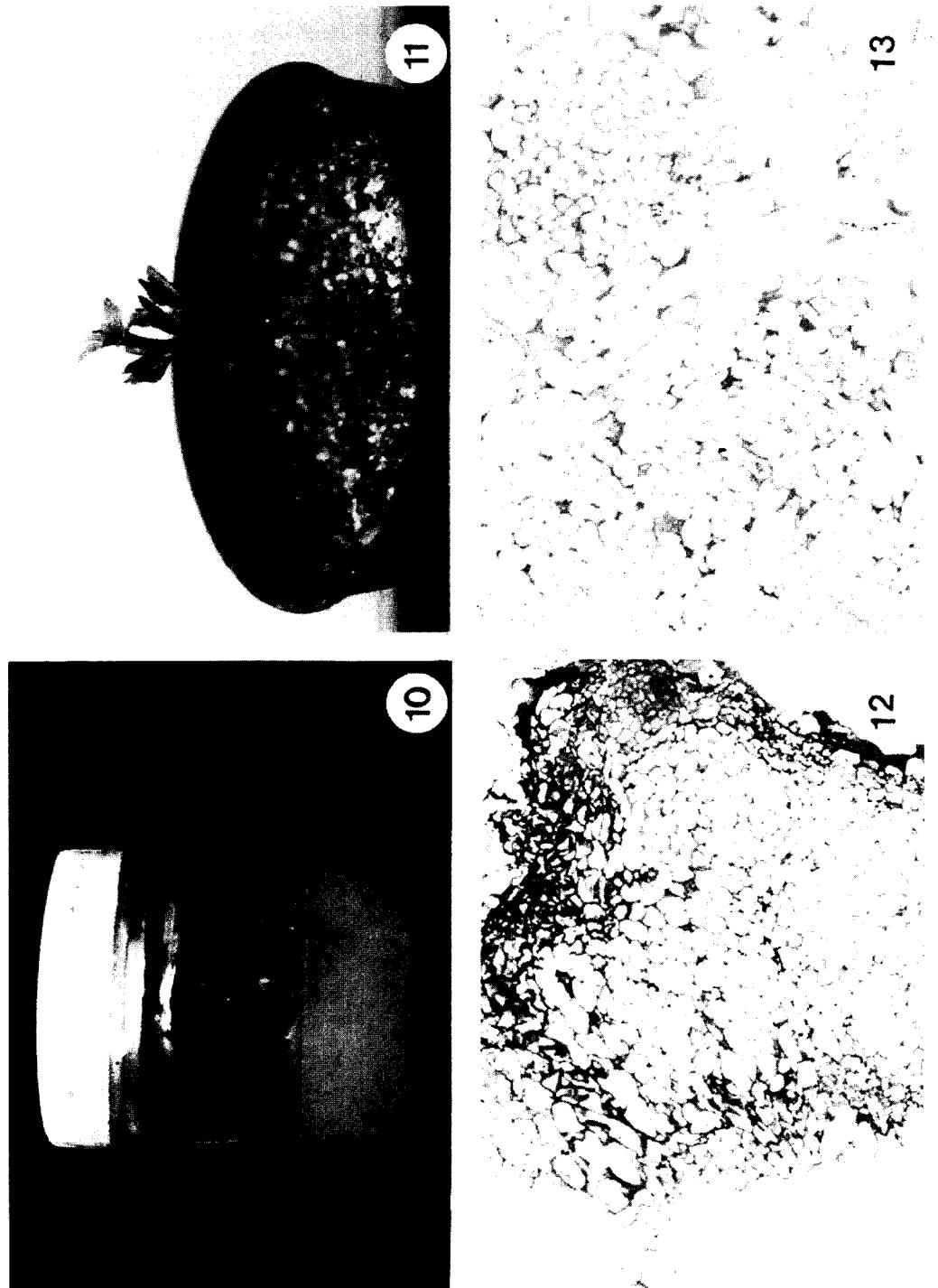


Fig. 10. Normal plantlet cultured in hormone-free MS medium for 20 weeks culture. $\times \frac{1}{2}$.

Fig. 11. Plant habituated on the pot in the outdoor condition. $\times \frac{1}{2}$.

Fig. 12-17. Light micrographs showing various developmental stages of callus in *Poncirus trifoliata* RAFIN.

Fig. 12. Early stage of callus for 3 weeks culture. $\times 400$.

Fig. 13. The early stage of embryoid development according to changes of cell arrangement in callus for 7 weeks culture. $\times 400$.

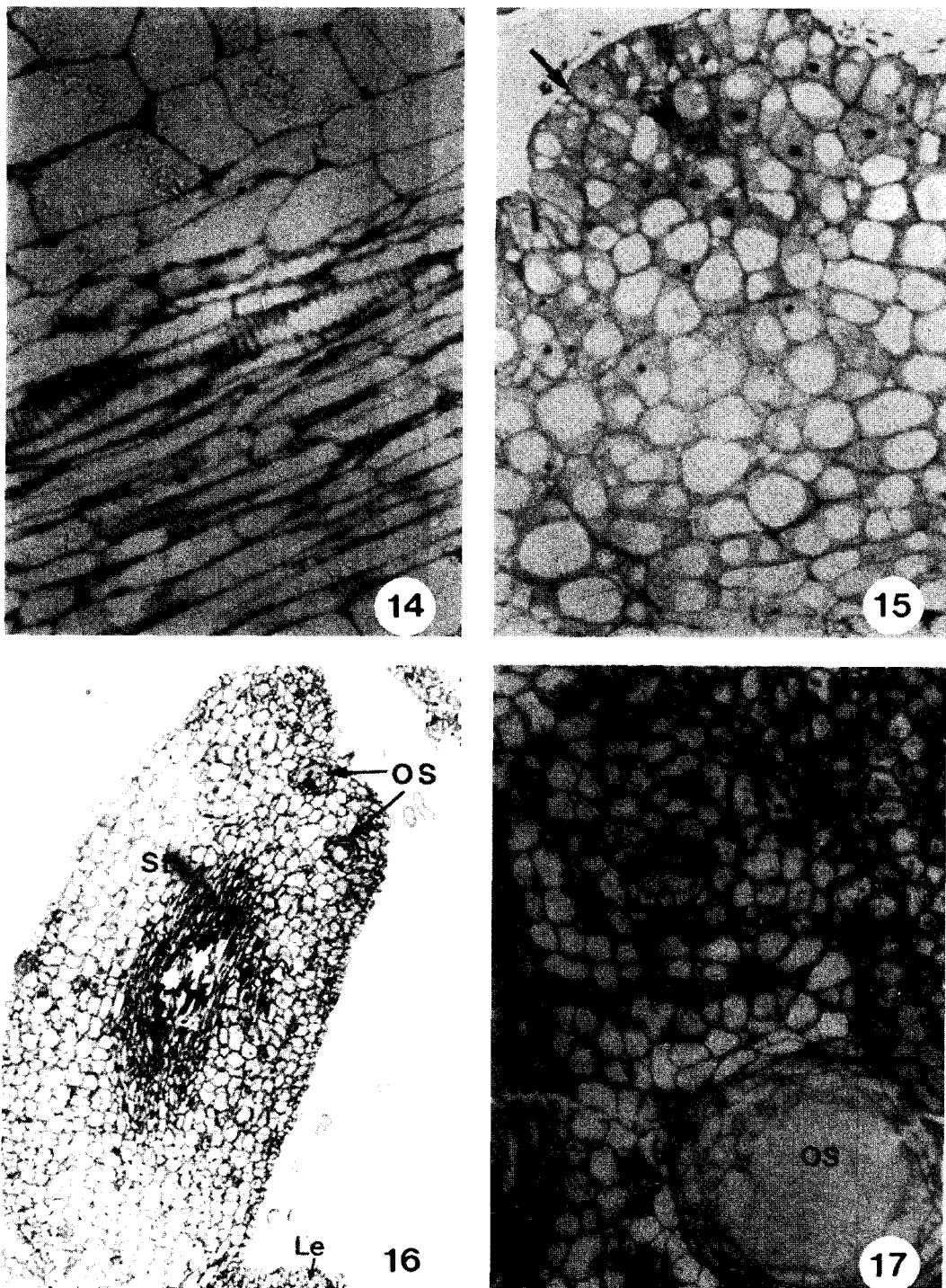


Fig. 14. The early developmental stage of meristematic tissue of callus for 7 weeks culture. $\times 400$.

Fig. 15. The early developmental stage of shooting appearance (arrow) from embryogenic callus for 9 weeks culture $\times 400$.

Fig. 16. The early appearance of the leaf and the stem according to differentiated initiation from shoot tip in embryogenic callus for 10 weeks culture. $\times 400$.

Fig. 17. The developmental structure of oil sac in the immatured leaf for 16 weeks culture. $\times 1,000$.