

감귤 embryogenic callus 원형질체 배양에 의한 식물체 재분화

안현주^{1*}, 이동훈¹, 이지현¹, 최영훈¹, 강병철², 박효근³
¹난지농업연구소 감귤시험장, ²서울대학교, ³고추와육종

Plant regeneration from protoplasts-derived from embryogenic callus of *Citrus*

Hyun Joo An^{1*}, Dong Hoon Lee¹, Ji Hyun Lee¹, Young Hun Choi¹,
Byoung Cheorl Kang², and Hyo Guen Park³

¹Citrus Experiment Station, NISA, RDA, Jeju 697-943, Korea

²Dept. of Plant Science, CALS, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

³Pepper & Breeding Institute, Seoul National University, Suwon 441-853, Korea

ABSTRACT This study describes conditions for plant regeneration from protoplasts-derived from embryogenic callus of satsuma mandarin. Plants were generated via somatic embryogenesis. Protoplasts isolated directly from nucellar callus induced from immature ovule of satsuma mandarin cv. Okitsu (*Citrus unshiu* Marc.) were cultured in 0.6 M BH₃ medium. Cell division and plating efficiency were affected by protoplast culture method. The liquid over solid method was the most effective for formation of microcalli. Most of microcalli grew rapidly and transferred onto embryoid formation medium. Optimum embryoid formation medium was MT medium containing 1.5 g/L malt extract, 0.146 M sucrose and the medium for plantlet regeneration was MS medium containing 0.09 M sucrose, 1.0 mg/L GA₃. No differences were noticed in growth habits and leaf characters such as shape, thickness, and colour between protoplast-derived plants and nucellar seedlings. This plant regeneration system from protoplasts-derived from embryogenic callus provides an alternative way for producing new scion and rootstock cultivar from citrus species which can not be crossed.

서 론

감귤의 품종 육성은 지금까지 거의 대부분 교배육종과 가지돌연변이의 선발에 의하여 이루어져 왔다. 과수는 작물특성상 유전적으로 유전형질의 조성이 매우 잡다하고, 많은 경우에 교배불친화성이 존재하여 우량형질 교배친간의 교배가 어려울 뿐 만 아니라, 교배되어 종자가 형성되더라도 종자에서 꽃이 피어 과실이 결실하기까지 영양생장이 지속되는 유년성이 존재하기 때문에 세대진전에 10년 이상이 요

구되는 등 과수의 교배육종에는 오랜 육종기간과 많은 육종비용이 필요하다. 온주밀감은 배낭 및 화분의 임성이 매우 낮은 유전적 특성을 가지고 있어서 교배에 의한 신품종 육종이 매우 어려운 작물이다. 또한 수정배 퇴화 및 중심배 형성에 의한 다배성 (20여개)의 특성을 가지고 있어 수정배 실생을 얻기가 극히 어렵다 (Cameron and Frost 1968, Vardi and Spiegel-Roy 1978). 이러한 감귤의 특성으로 인해 교배육종에 의한 신품종 육성은 타과수 작물과 비교하여 육종기간과 노력이 2배 이상 소요된다.

이와 같이 재래 육종수단에 장애요인이 되어온 여러 가지 문제점들은 기내육종방법이 개발됨에 따라 점차적으로 해결되어 가고 있으며, 특히 감귤에 있어서는 새로운 대목용

*Corresponding author Tel 064-730-4151 Fax 064-733-9564
E-mail: hjan@rda.go.kr

품종 및 상품성을 지닌 품종의 육종에 원형질체 융합기술에 의한 체세포잡종체 생산 (somatic hybridization) 기술이 유용하게 사용되고 있다 (Grosser et al. 2000). 감귤은 엽을 포함한 대부분의 체세포조직에 식물체 재생능이 거의 없거나 아주 낮아서 캘러스배양에 의한 배형성과정을 통한 식물체 재생 체계가 아주 중요하다 (Grinblat 1972, Burger and Hackett 1981, Barlass and Skene 1982, Edriss and Burger 1984, Duran-Vila et al. 1989). 또한 원형질체 융합에서도 감귤의 엽육조직에서 분리한 원형질체 배양시 세포분열과 식물체의 재생이 전혀 이루어지고 있지 않기 때문에 캘러스 원형질체로부터의 배형성과정을 통해 식물체를 재분화시킬 수 있는 시스템의 확립은 주심조직으로부터 재생된 캘러스에서 분리한 원형질체들의 식물체 재분화능에 크게 좌우된다 (Guo and Grosser 2005).

따라서 본 연구에서는 온주밀감의 주심조직 유래 캘러스로부터 분리한 원형질체의 배양을 통해 정상적인 배형성 과정에서부터 식물체 재생까지의 체계 확립을 위하여 배양 원형질체로부터 미소괴 (microcalli) 형성율을 높이기 위한 배양 방법, 배유기 배지 및 신초 재분화 배지를 조사하였다.

재료 및 방법

원형질체 분리 및 배양

우리나라의 대표적인 온주밀감인 흥진조생 (*Citrus unshiu* Marc.)과 길전네블오렌지 (*C. sinensis* Osbeck)의 어린 미성숙 배주조직을 배양하여 주심조직으로부터 유기시킨 캘러스를 사용하여 원형질체를 분리하였다. 캘러스는 5% sucrose와 500 mg/L malt extract가 첨가된 Murashige & Tucker 배지 (1969)에서 2~3주 간격으로 계대배양을 하여 식물체 재분화능을 유지시켰다. 캘러스원형질체의 분리과정은 Grosser et al. (1990)의 방법을 약간 변형한 방법으로 이루어졌다. 캘러스를 조직배양시 사용하는 칼로 잘게 자른후 효소용액 (1% cellulase RS + 0.5% macerozyme R10 + 0.5% driselase + 24.5 mM CaCl₂ + 6.15 mM MES + 0.92 mM NaH₂PO₄ + 0.7 M mannitol)과 0.7 M BH₃ 배지를 1:3의 비율로 혼합한 용액에 배양 (29°C, 50 rpm)하였다. 12~16시간 배양후 나일론 체 (45 μ m)를 사용하여 배양액을 여과하고, 모아진 용액은 원심분리 (100×g, 10분)하여 상정액을 제거하였다. 남아있는 pellet에 25% sucrose가 첨가된 CPW 배지를 5 mL 첨가하여 pellet과 잘 섞이게 피펫팅하고, 그 위에다 13% mannitol이 첨가된 CPW 배지를 층이 생기도록 2 mL 첨가하였다. 준비

된 이 용액을 다시 원심분리 (100×g, 10분)하면 농도구배에 의해 25% sucrose 용액과 13% mannitol 용액 사이에 원형질체들만이 모인 층이 생기게 된다. 원형질체 층을 조심스럽게 분리하여 새로운 원심분리용 튜브에 옮기고 10 mL의 새로운 배지를 첨가한 후 원심분리하는 방법으로 원형질체를 정제하였다. Hemocytometer를 이용하여 정제된 원형질체를 5 × 10⁵ cells/mL로 원형질체 수를 조절하고, 0.6 M BH₃ 배지 (Grosser and Gmitter 1990)를 첨가하였다.

미소괴 형성에 효과적인 배양방법

원형질체를 배양하는 기본 배양방법으로는 주로 액체배양법이 사용되고 있으나 원형질체 배양방법이 세포분열율과 plating efficiency에 미치는 영향을 살펴보기 위해 고체배양, 액체배양, solid over solid 배양, liquid over solid 배양법을 비교해 보았다. 액체배양법은 분리한 원형질체의 농도를 5 × 10⁵ cells/mL로 조절한 후 0.6 M BH₃ 액체배지에 현탁하여 페트리디쉬 (60 × 15 mm)에 배양하였다. 고체배양은 0.6 M BH₃ 배지에 0.2% agarose를 첨가한 후 agarose가 적당히 식었을때 농도를 조절해 놓은 원형질체를 배지에 섞어 페트리디쉬에 분주하여 배양하였고, liquid over solid 배양법은 0.1% gelrite를 첨가한 0.6 M BH₃ 고체배지위에 원형질체 현탁액을 spread하여 배양하였다. Solid over solid 배양법은 0.1% gelrite 0.6 M BH₃ 고체배지위에 0.2% agarose에 원형질체를 섞은 것을 spread하여 배양하였다.

배유기 배지

유기된 미소괴로부터 배형성과정을 거쳐 자엽형의 배를 유기시키기에 적당한 배지를 선발하고자 ① EME 배지 : MT macro, MT micro, MT vitamin, 0.5 g/L malt extract, 0.146 M sucrose, ② 1500 EME : MT macro, MT micro, MT vitamin, 1.5 g/L malt extract, 0.146 M sucrose 와 ③ MT + gal/sor/GA₃ : MT basic medium, MT vitamin, 0.1 M galactose, 0.1 M sorbitol, 1.0 mg/L GA₃ 배지를 비교하였다. 각각의 배지에는 0.3% gelrite가 첨가되었고, 배양후 생성된 자엽형 배의 수를 조사하였다.

신초 재분화 배지

생성된 자엽형 배로부터 배발아를 유도하여 신초를 재분

화시킬 수 있는 적정배지 선별시험을 수행하였다. 시험에 사용된 배지조성은 ① SI-1 : MS basic medium, MS vitamin, 3% sucrose, ② SI-2 : MS basic medium, MS vitamin, 3% sucrose, 1.0 mg/L GA₃와 ③ SI-3(B⁺) : MT macro, MT micro, MT vitamin, 20 mL coconut water, 14.6 mg/L coumarin, 0.02 mg/L NAA, 2.5% sucrose 배지이다. 각각의 배지에 자엽형 배를 배양하여 발근과 함께 정상적으로 분화된 신초의 수를 조사하였다.

결과 및 고찰

오렌지 (*Citrus sinensis*)와 탕자 (*Poncirus trifoliata*), 오렌지와 grapefruit (*C. paradisi*), 오렌지와 감귤 근연속인 *Severinia disticha* 간 감귤 이종속간의 원형질체 융합에 의한 체세포 잡종체들이 생산되어오고 있다 (Ohgawara et al. 1985, Guo et al. 2000, Grosser et al. 1988). 이들 융합조합은 기본적으로 신초 재분화능이 높은 오렌지의 캘러스를 사용하여 배형성 과정을 거쳐 이루어졌다. 오렌지의 경우 미성숙 배주의 주심조직으로부터 재분화능이 높은 배형성 캘러스를 성공적으로 유기하기가 쉬우나 온주밀감의 경우 여러 연구자들이 미성숙 배주의 주심조직으로부터 캘러스를 유기하는 데 실패를 하였다 (Ling et al. 1990, Kunitake et al. 1991). 원형질체 분리에 있어서도 대부분의 연구 결과에서 보면 분리된

원형질체들의 많은 파열과 세포벽의 불완전한 분해로 인해 캘러스 배양물에서 직접 원형질체를 분리하지 못하고 현탁 배양물이나 당조성을 조절한 배지에서 전처리를 한 후 원형질체를 분리하여 배양하였다 (Ling et al. 1989). 그러나 본 연구에서는 온주밀감 홍진조생의 미성숙 배주배양에 의해 주심조직으로부터 재분화능이 아주 높은 배형성 캘러스 (Figure 1A)를 유기시킬 수 있었으며, 5% sucrose 와 500 mg/L malt extract 가 첨가된 MT 배지에서 2~3주 간격으로 계대배양한 캘러스로부터 직접 원형질체 (Figure 1B)를 분리하여 배양할 수 있었다.

미소괴 형성에 효과적인 배양방법

배양 7~10 일 후 첫 세포분열 (Figure 1C)이 관찰되었으며, 20~30일 후에는 30~40개 정도의 세포들이 덩어리져 형성된 미소괴 (Figure 1D)가 생성되었다. 미소괴 생성을 향상 위해 배양방법에 따른 세포분열율을 비교해 본 결과 (Table 1, Figure 2), 오렌지와 홍진조생 모두 기본 배양법으로 사용되고 있는 액체배양의 경우 보다는 고체배지위에서 액체배양을 하는 것이 세포분열율이 더 높음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 감자의 원형질체 현탁액을 고체배지 위에 배양하는 liquid over solid 배양방법 사용시 가장 높은 세포분열율을 얻은 결과(Ahn et al. 2001)와 일치함을 알 수 있었다.

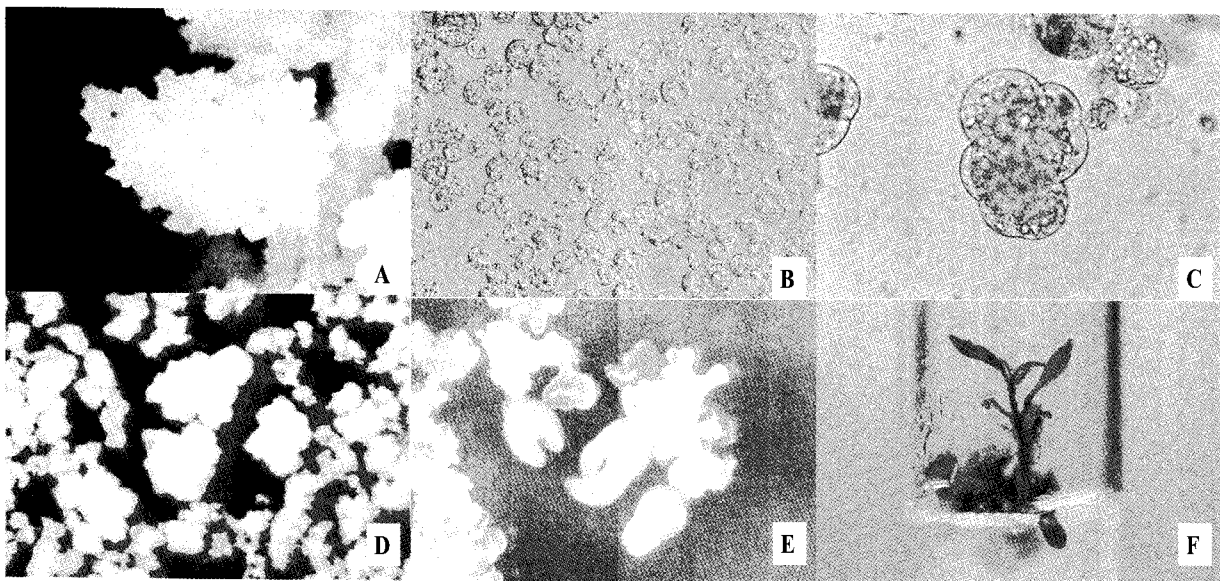


Figure 1. Plant regeneration from callus protoplasts of 'Okitsu' satsuma mandarin. A: Embryogenic callus, B: Protoplasts-derived from callus, C: Cell division of cultured protoplast, D: Microcalli formation, E: Embryoids formation, F: Plantlet derived from protoplast

원형질체 배양방법은 세포분열과 캘러스 형성에 중요한 영향을 미치는데, 액체배양의 경우에는 삼투조절제에 원형질체가 민감하게 반응하므로 원형질체의 분열정도와 미소피의 생성정도에 따라 점차적으로 삼투조절제의 농도를 낮추어 주어야 한다. 생성된 미소피는 배양 1달 후부터는 급속하게 성장 속도가 빨라지고 nodular calli로 발육하면서 점점 배형성 캘러스 원래의 형태를 보이기 시작하였다.

배유기 배지

Nodular calli의 형태로 성장한 캘러스로부터 배를 유기시키기 위한 적정 배지 선발 시험을 수행하였다. MT macro, MT micro, MT vitamin, 0.5 g/L malt extract, 0.146 M sucrose (EME), MT macro, MT micro, MT vitamin, 1.5 g/L malt extract, 0.146 M sucrose (1500 EME), MT basic medium, MT vitamin, 0.1 M galactose, 0.1 M sorbitol, 1.0 mg/L GA₃ (MT + gal/sor/GA₃) 3가지 배지에 원형질체로부터 재생된 캘러스를 각 배지별로 1g 씩 배양해 본 결과 홍진조생의 경우 1500

Table 1. Effect of culture method on the cell division in protoplast culture of 'Okitsu' satsuma mandarin and 'Yoshida' navel orange

Culture method	Cell division (%)	
	'Okitsu'	'Yoshida'
Liquid culture	18.8	23.4
Solid culture	19.0	19.3
Liquid over solid cul.	22.6	24.9
Solid over solid cul.	5.6	22.1

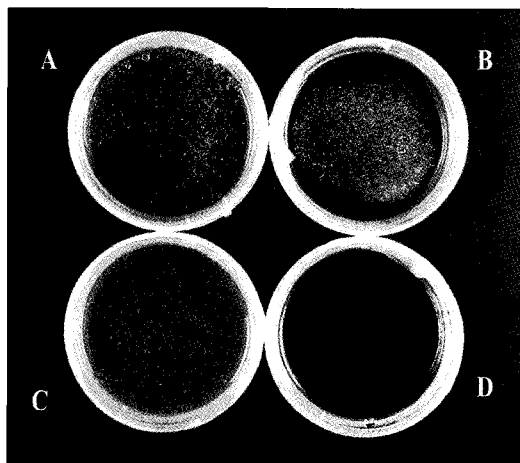


Figure 2. Microcalli formation from protoplast of 'Okitsu' satsuma mandarin by different culture method. A: Liquid culture, B: Liquid over solid culture, C: Solid culture, D: Solid over solid culture

EME 배지에서 197개로 가장 많은 자엽형 배를 얻을 수 있었으나 길전네블오렌지의 경우는 MT + gal/sor/GA₃ 배지에서 많은 자엽형 배를 얻을 수 있었다 (Table 2). 오렌지를 비롯하여 대부분의 감귤류에 있어서 배형성 캘러스로부터의 배형성은 배유기 배지에 첨가하는 sucrose를 galactose, lactose, raffinose, maltose, glycerol 등의 당으로 바꾸어 주어야만 정상적인 배형성 과정이 이루어진다는 보고가 있다 (Button 1978, Kochba et al. 1982, Ben-Hayyim et al. 1983). 온주밀감에 있어서도 품종에 따라 배유기에 적합한 당의 종류는 달랐으며 배유기에 있어서 당의 역할이 중요함을 알 수 있는데 (Kunitake et al. 1991), 본 연구에서는 malt extract의 효과에 의해서도 정상적인 형태의 자엽형 배를 유기시킬 수 있다는 결과를 얻었다.

신초 재분화 배지

유기된 자엽형 배를 신초 재분화 배지로 옮긴 후 20~30일부터 어린 신초들이 재분화되기 시작하였다. 적정 신초 재분화배지 선발에서는 홍진조생과 길전네블오렌지 모두 SI-2 배지에서 가장 많은 신초가 재생되었다 (Table 3). SI-2

Table 2. Effect of culture medium on embryoid formation from 'Okitsu' satsuma mandarin and 'Yoshida' navel orange protoplasts

Culture medium ^x	No. of cotyledonary embryo	
	'Okitsu'	'Yoshida'
EME	114	105
1500 EME	197	40
MT + gal/sor/GA ₃	115	130

^x EME : MT basic medium, 0.5 g/L malt extract, 0.146 M sucrose
 1500 EME : MT basic medium, 1.5 g/L malt extract, 0.146 M sucrose
 MT + gal/sor/GA₃ : MT basic medium, 0.1 M galactose, 0.1 M sorbitol, 1.0 mg/L GA₃

Table 3. Effect of medium on shoot regeneration from cotyledonary embryo derived from protoplast of 'Okitsu' satsuma mandarin and 'Yoshida' navel orange

Shoot Induction medium ^y	Shoot regeneration frequency (%)	
	'Okitsu'	'Yoshida'
SI-1	48.9(44/90) ^x	0(0/23)
SI-2	100(74/74)	92.8(271/292)
SI-3	67.8(61/90)	60.0(12/20)

^x No. of regenerated shoots × 100/No. of cotyledonary embryo
^y SI-1 : MS basic medium, 3% sucrose,
 SI-2 : MS basic medium, 3% sucrose, 1.0 mg/L GA₃
 SI-3 : MT basic medium, 2.5% sucrose 20 mL coconut water, 14.6 mg/L coumarin, 0.02 mg/L NAA,

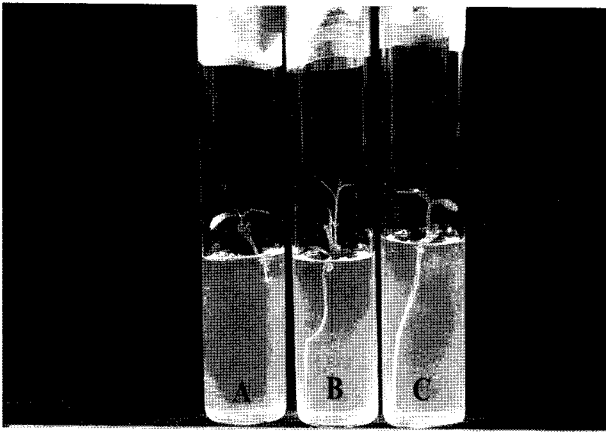


Figure 3. Plant regeneration from cotyledonary embryo derived from protoplast of 'Okitsu' satsuma mandarin. A: SI-1 medium, B: SI-2 medium, C: SI-3 medium

배지에서 재분화된 대부분의 싹들은 건강한 뿌리와 함께 정상적인 생육을 보였으나, 지상부가 약간 황화 현상을 보이고 싹 줄기가 가늘며 약한 싹들이 재분화되는 경우도 있었다 (Figure 3). 조직 내 옥옥신과 사이토키닌 간의 농도 또는 비율이 기관분화에 적합할 때에 지베렐린을 첨가하면 대부분의 식물에서 기관형성이 억제되나 기관의 생장은 촉진된다 (金奎元 등 1987). 그러나, 감귤과 같이 내생 옥옥신의 함량이 높은 경우 지베렐린의 첨가로 인하여 정상적인 싹과 발근형성이 촉진됨과 동시에 생장이 촉진되어 연약한 싹이 재분화되는 것으로 생각되어진다. 따라서, 이러한 싹은 싹이 정상적으로 재분화되는 즉시 생육배지로 옮겨주어 건강한 식물체로 생육할 수 있게 해 주어야 한다.

원형질체 배양 후 배양기 및 싹 재분화과정을 거쳐 재분화된 싹들은 순화과정을 거쳐 온실에서 육묘중에 있으며 (Figure 4), 원형질체 배양에 의해 재분화된 싹들의 생장상이나 엽형태 (모양, 색깔, 두께)에 있어서 실험재료로 사용한 원 홍진조생과 길전네블오렌지와 비교하였을 때 전혀 차이가 없음을 알 수 있었다.

본 연구의 결과에 따라 온주밀감 원형질체를 이용한 식물체 재생체계가 확립되었으므로 감귤 이중속간의 원형질체 융합에 의한 우수한 형질을 도입된 체세포잡종체 생산 뿐만 아니라 감귤 근연속과의 융합에 의해 우량 대목용 품종 육종의 수단으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

적 요

감귤에 있어서 원형질체 융합에 의한 체세포잡종체 생산



Figure 4. Plant regenerated from protoplast-derived from embryogenic callus of 'Okitsu' satsuma mandarin. The plant was cultivated for 3 months in the greenhouse.

을 위해서는 우선 캘러스 원형질체로부터의 식물체 재분화가 가능하여야 하기 때문에 온주밀감의 캘러스 원형질체로부터 배형성과정을 통한 식물체 재분화에 관한 실험을 수행하였다. 홍진조생의 어린 미성숙 배주의 주심조직으로부터 유기된 배형성 캘러스를 사용하여 건강한 원형질체를 분리하고 0.6 M BH₃ 배지를 배양배지로 사용하여 배양방법에 따른 plating efficiency를 비교해 본 결과 liquid over solid 배양시 원형질체로부터의 미소괴 형성율이 더 높음을 알 수 있었으며, 적정 배형성 배지 선발에서는 1500 mg/L malt extract 첨가 배지에서 배형성율이 높았다. 자연형 배로부터의 싹유기를 위한 배지비교에서는 1.0 mg/L GA₃ 첨가배지에서 발근과 함께 정상적으로 재분화된 싹을 얻을 수 있었다. 원형질체 배양으로부터 재분화된 식물체들은 순화과정을 거쳐 온실 육묘중에 있으며, 생장상이나 형태적인 특성에 있어서 모본 식물체와 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 본 실험으로 얻어진 원형질체 배양에 의한 식물체 재분화 체계를 바탕으로 이중속간 감귤의 원형질체 융합 기술을 이용하여 교배육종이 불가능한 품종들로부터 우수한 형질을 지닌 감귤 품종 및 대목용 품종 생산에 활용하고자 한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국제공동연구사업(과제번호 : 200712 A01032067)의 일환으로 수행되었다.

인용문헌

- Ahn YK, Kim HY, Yoon JY, Park HG (2001) Plant regeneration from leaf protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.). J Kor Soc Hort Sci 42(4): 415-419
- Barlass M, Skene KGM (1982) In vitro plantlet formation from Citrus species and hybrids. Scientia Horticulturae 17: 333-341
- Ben-Hayyim G, Neumann H (1983) Stimulatory effect of glycerol on growth and somatic embryogenesis in *Citrus* callus cultures. Z Pflanzenphysiol 110: 331-337
- Burger DW, Hackett WP (1981) Regeneration of buds and roots from several citrus tissues. Proc Int Soc Citriculture 1: 161-163
- Button J (1978) The effect of some carbohydrates on the growth and organization of *Citrus* ovular callus. Z Pflanzenphysiol 88: 61-68
- Cameron JW, Frost HB (1968) Genetic breeding and nucellar embryony. In: The *Citrus* Industry Univ. of California, Berkeley, pp 325-370
- Duran-Vila N, Ortega V, Navarro L (1989) Morphogenesis and tissue cultures of three *Citrus* species. Plant Cell Tiss Org Cult 16: 123-133
- Edriss MH, Burger DW (1984) In vitro propagation of Troyer citrange from epicotyl segments. Scientia Horticulturae 23: 159-162
- Grosser JW, Gmitter FG, Chandler JL (1988) Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. Theor Appl Genet 75: 397-401
- Grosser JW, Gmitter FG (1990) Protoplast fusion and citrus improvement. Plant Breed Rev 8: 339-374
- Grosser JW, Chandler JL (2000) Somatic hybridization of high yield, cold-hardy and disease resistant parents for citrus rootstock improvement. J Hort Sci & Biotechnol 75(6): 641-644
- Guo WW, Deng XX, Yi HL (2000) Somatic hybrids between navel orange (*Citrus sinensis*) and grapefruit (*C. paradisi*) for seedless triploid breeding. Euphytica 116: 281-285
- Guo WW, Grosser JW (2005) Somatic hybrid vigor in *Citrus*: Direct evidence from protoplast fusion of an embryogenic callus line with a transgenic mesophyll parent expressing the GFP gene. Plant Sci 168: 1541-1545
- 金奎元, 白基燁, 鄭根植, 鄭載東, 崔光泰 (1987) 植物組織培養技術. 鄉文社. 서울. pp 48-69
- Kochba J, Spiegel-Roy P, Neumann H, Saad S (1982) Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of *Citrus* cultivars. Z Pflanzenphysiol 105: 359-368
- Kunitake H, Kagami H, Mii M (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Scientia Horticulturae 47: 27-33
- Ling JT, Nito N, Iwamasa M (1989) Plant regeneration from protoplasts of Calamondin (*Citrus madurensis* Lour). Scientia Horticulturae 40: 325-333
- Ling JT, Nito N, Iwamasa M, Kunitake H (1990) Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic callus of Satsuma. HortScience 25: 970-972
- Murashige T, Tucker DPH (1969) Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proc 1st Int Citrus Symp 3: 1155-1161
- Ohgawara T, Kobayashi S, Ohgawara E, Uchimiya H, Ishii S (1985) Somatic hybrid obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. Theor Appl Genet 71: 1-4
- Vardi A, Spiegel-Roy P (1978) Citrus breeding, taxonomy and the species problems. Proc Int Soc Citriculture 3: 51-57

(접수일자 2008년 2월 13일, 수리일자 2008년 3월 17일)