

# 배주배양 세포로부터 감귤 식물체의 획득 및 감귤 트리스테자 바이러스 무병주 검증

진성범<sup>1</sup> · 박재호<sup>1</sup> · 박석만<sup>1</sup> · 이동훈<sup>2\*</sup> · 윤수현<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤연구소, <sup>2</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원 기획조정과

## Production of *Citrus* Plants from Ovule Cell Culture and Verification of CTV - free Plants

Seong Beom Jin<sup>1</sup>, Jae Ho Park<sup>1</sup>, Suk Man Park<sup>1</sup>, Dong Hoon Lee<sup>2\*</sup>, and Su Hyun Yun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Citrus Research Institute, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Jeju 63607, Korea

<sup>2</sup>Planning and Coordination Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Wanju 55365, Korea

\*Corresponding author: [yunsh04@korea.kr](mailto:yunsh04@korea.kr)

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

### Abstract

This study was carried out to investigate a method for producing cultured virus - free ovules for breeding high - quality *Citrus* cultivars. Ovules from the immature fruits of three *Citrus* cultivars native to Jeju (Dongjeongkyool, Cheongkyool, and Jikak) and two cultivars of *Citrus unshiu* Marc. (Miyagawa wase and Haryejosaeng) that were thought to be infected with *Citrus tristeza virus* (CTV) were cultured on MS2 medium (Murashige - Skoog [MS] basal medium containing 500 mg·L<sup>-1</sup> malt extract, 50 g·L<sup>-1</sup> sucrose, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> kinetin, and 8 g·L<sup>-1</sup> agar). After four weeks of culture, 10, 21, 13, 5, and 7 somatic embryos and 2, 4, 2, 4, and 5 white callus cells (surrounding green somatic embryos) were obtained from Dongjeongkyool, Cheongkyool, Jikak, Miyagawa wase, and Haryejosaeng, respectively. After six weeks of culture, somatic embryos were obtained from cultured cells grown on MT basal medium supplemented with malt extract (500 mg·L<sup>-1</sup>), lactose (70 g·L<sup>-1</sup>), and agar (16 g·L<sup>-1</sup>). Over 60% of the somatic embryos from *Citrus* cultivars native to Jeju developed into normal plants on MS basal medium supplemented with malt extract (500 mg·L<sup>-1</sup>), sucrose (50 g·L<sup>-1</sup>), and agar (8 g·L<sup>-1</sup>) after 10 weeks of culture. Normal plants were regenerated from two *Citrus unshiu* Marc. cultivars on MT basal medium supplemented with sorbitol (1.0 M), galactose (1.0 M), GA<sub>3</sub> (1.0 mg·L<sup>-1</sup>), and Gelrite (3 g·L<sup>-1</sup>). The absence of virus in plants generated from cultured ovules was confirmed by RT - PCR and antigen - antibody reactions. Therefore, virus - free *Citrus* cells can be obtained for breeding high - quality citrus cultivars using the biotechnological technique evaluated in this study.

**Additional key words:** ctlv, *in vitro* shoot tip grafting, *Poncirus trifoliata* Raf., sdv, vascular system

 OPEN ACCESS



Hortic. Sci. Technol. 35(1):121-130, 2017  
<https://doi.org/10.12972/kjhst.20170013>

pISSN : 1226-8763  
 eISSN : 2465-8588

**Received:** May 13, 2016

**Revised:** September 7, 2016

**Accepted:** September 5, 2016

Copyright©2017 Korean Society for Horticultural Science.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution NonCommercial License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits unrestricted non- commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

본 연구는 농촌진흥청 PJ01027302사업의 지원에 의해 수행되었음.

## 서 언

제주도 감귤에 발생하는 주요 바이러스로는 점목이상병(CTLV, *Citrus tatter leaf virus*), 온주위축병(SDV, *Satuma dwarf virus*), 갈색줄무늬오갈병(CTV, *Citrus tristeza virus*) 3종이 알려져 있다(Kim et al., 1999). 이 3종의 바이러스는 감귤품종에 따라서 병증이 다르게 나타나며(Lee, 2004; Miyakawa, 1977) 감귤에 발병하는 주요 바이러스 중 진딧물 매개충으로 인해 감염되는 CTV(Roy et al., 2010)는 제주도 감귤품종에 널리 감염되어 있다(Kim et al., 1999). 또한 이 감귤 바이러스에 감염된 품종들은 수세약화, 수량감소, 과실의 품질저하 등 피해(Naz et al., 2007)를 가져오기 때문에 주요 품종의 무병주 보급을 위한 체계적 식물체 확보 방법이 필요하다.

감귤에서 무병주 식물체를 획득하기 위한 방법으로는 열처리 방법(Grant, 1957), 주심배 배양(Singh et al., 2006), 배주배양 방법(Feng et al., 1990; Navarro, 1984; Singh et al., 2005) 그리고 최근에는 기내 경정점목(Naz et al., 2007; Roistacher et al., 1976; Sharma et al., 2007; Singh et al., 2008)이 사용되고 있다. 열처리 방법은 식물의 생산량 감소와 성장발육에 영향을 주는 감귤류 엑소콜티스 바이로이드(CEVd, *Citrus exocortis viroid*) 그리고 형태학적으로 비정상적인 감귤을 만드는 감귤 스티번병(CSD, *Citrus stubborn disease*)을 제거하는데 어렵다(Naz et al., 2007). 반면에 바이러스가 전파되는 것보다 더 빨리 세포분열이 일어나 바이러스 프리일 가능성이 높은(Naz et al., 2007) 성장점 부위를 이용한 기내 경정점목 방법은 열처리 방법으로 제거하기 어려운 병원균을 모두 제거할 수 있기 때문에 감귤 무병주 획득 방법으로 사용되고 있다(Naz et al., 2007; Sharma et al., 2007; Singh et al., 2008). 그러나, 이 방법은 기내에서 작업하기가 어렵고 많은 무병주 식물체를 얻기는 쉽지 않다.

따라서 이러한 문제점들을 해결하기 위한 방법으로 수정되지 않은 배주를 배양하는 방법이 사용되기도 한다. 수정되지 않은 배주는 바이러스에 감염되어 있지 않기 때문에 이를 배양하여 무병주인 감귤 식물체를 만드는데 이용되고 있다(Navarro, 1984; Shingh et al., 2005). 본 연구는 주요 감귤 품종들의 무병주 보급을 위한 체계적인 식물체 확보를 위하여 CTV에 감염된 온주밀감 품종과 재래감 품종의 배주로부터 캘러스 세포를 유도 하고, 선발된 체세포배 형성능 캘러스 세포로부터 재분화 식물체를 확보하였으며, 무병주임을 확인하기 위하여 RT-PCR과 항혈청 방법을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 캘러스 유도

제주도 재래감귤 3품종[동정귤(*Citrus erythrosa* Hort. et Tanaka), 청귤(*Citrus nippokoreana* Tanaka), 지각(*Citrus aurantium* L.)] 그리고 온주밀감 2품종[궁천조생(*Citrus unshiu* Miyawagawa wase), 하례조생(*Citrus unshiu* Marcow)]의 꽃은 5월에서 6월경 감귤시험장에서 채집하였다. 꽃 내부 자방 내의 수정되지 않은 배주는 현미경하에서 나출하여 실험에 사용하였다. 배지 구성에 따른 수정되지 않은 배주로부터 체세포배의 형성과 캘러스 유도 효과를 조사하기 위하여, 나출한 배주는 MS1[MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, sucrose 50g·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 8g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 배지], MS2(MS 기본배지에 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, sucrose 50g·L<sup>-1</sup>, kinetin 1.0mg·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 8g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 배지), MS3(MS 기본배지에 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, sucrose 50g·L<sup>-1</sup>, N6-benzyladenine(BA) 3.0mg·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 8g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 배지), EME[MT(Murashige and Tucker, 1969) 기본배지에 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, sucrose 50g·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 8g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 배지] (Grosser and Gmitter, 1990) 및 1 / 2 EME(1 / 2 MT macronutrients, 1 / 2 BH3 macronutrients, malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, glutamine 1.55g·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 8g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 배지)(Grosser and Gmitter, 1990) 총 5가지 배지 구성에 각각 50개씩 치상하여 광이 완전히 차단되지 않은 반암 조건하에서 4 - 6주간 배양하였다.

## 재분화능 체세포배 세포의 유도 및 재분화

캘러스 세포로부터 재분화능 체세포배를 유도하기 위하여, 수정되지 않은 배주로부터 유도된 캘러스 세포는 MT 기본배지에 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, Lactose 70g·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 16g·L<sup>-1</sup> 가 첨가된 체세포배 유도 배지(Jin et al., 2007)에 치상하여 4 - 6주간 명배양 하였다. 유도된 재분화능 체세포배로부터 식물체를 재분화 시키기 위하여, 재래감귤의 체세포배는 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, sucrose 50g·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 8g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 MS 기본배지에 에 옮기고 온주밀감 품종들의 체세포배는 sorbitol 1.0M, galactose 1.0M, GA<sub>3</sub> 1.0mg·L<sup>-1</sup> 그리고 gelrite 3g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 MT 기본배지에 약 10주간 명배양 하였다. 기내배양에서 싹과 뿌리가 형성된 감귤류들은 121°C에서 15분간 멸균 처리한 상토에 옮겨 심었다. 반면 뿌리가 형성되지 않는 감귤류들은 Jin et al.(2007)의 방법에 따라서 탱자(*Poncirus trifoliata* Raf.) 대목에 접목 하였다. 모든 식물체들은 25 ± 2°C, 45 μmol·m<sup>-2</sup>·sec<sup>-1</sup>, 16시간 광주기 조건하에서 순화시켰다.

## RT - PCR

바이러스 감염 여부를 확인 하기 위해 국립원예특작과학원 감귤시험장포장 노지내의 제주도 재래감귤로 3품종(동정귤, 청귤, 지각) 그리고 온주밀감 2품종(궁천조생, 하례조생)과 배주배양을 통하여 확보한 기내배양 식물체들의 잎을 RT - PCR 검정을 위한 시료로 사용하였다. RT - PCR를 위한 감귤류의 Total RNA는 FastPure™ RNA Kit(Takara, Bio Inc., Japan)를 사용하여 추출하였다. cDNA는 Topscript™ cDNA Synthesis kit(Enzymomics, Co., Daejeon, Korea)를 사용하여 합성하였다. RT - PCR검정을 위한 CTV 감염 여부 검증에 사용한 프라이머 set는 감귤 연구소 현재욱 박사님으로부터 제공받은 CTV - PoF / R, CTV - 32 / 52 그리고 CTV - CO - 1F / R를 사용하였고, cDNA 농도여부는 actin 유전자를 reference gene으로 한 primer(Actin F / R)을 사용하여 확인하였다(Table 1). PCR 반응액은 AccuPower PCR Premix(Bioneer, Corp., Daejeon, Korea)[250 μM dNTP, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0unit Taq DNA polymerase, 10mM Tris - HCl(pH 9.0), 40mM KCl]에 cDNA 25 - 50ng 그리고 0.5 μM의 프라이머를 첨가하여 20 μl로 조정하여 사용하였다. PCR 반응은 Takara PCR Thermal cycle(Takara, Bio Inc., Japan)에서 35cycle을 실시하였으며, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 55°C에서 30초, 그리고 extension을 72°C에서 30초간 수행하였다. 증폭된 PCR 생성물은 1.2% agarose gel에서 100V로 30분 동안 전기영동하여 나타나는 밴드로 확인하였다.

## 항원 항체 반응

감귤 품종들의 CTV 감염여부는 CTV immuneStrip test(Agdia, Inc., Elkhart, IN., USA)를 구매하여 항원 항체 반응으로 검정하였다. CTV 감염 여부를 확인하기 위해 국립원예특작과학원 감귤시험장포장 노지내의 제주도 재래감귤로 3품종(동정귤, 청귤, 지각) 그리고 온주밀감 2품종(궁천조생, 하례조생)과 배주배양을 통하여 확보한 기내배양 식물체들 5품종(동정귤, 청귤, 지각, 궁천조생, 하례조생)의 잎을 사용하였다.

Table 1. Primers used to detect *Citrus tristeza virus* (CTV).

Primer	Sequence (5' - 3')	Tm (°C)
Actin F	TCCACCATGTTCCCAGGTAT	60
Actin R	CATCTCTGTCTGCCACCTGA	62
CTV - Po F	GTGGCCAATAGGTCCGTAGA	62
CTV - Po R	CGGGTCTCAACCTAGCCATA	62
CTV - 52	CGAGGTATCATTCCTCGAGC	60
CTV - 32	CGCCATAACTCAAGTTGCG	60
CTV - CO - 1 - F	GTGGCCAATAGGTCCGTAGA	62
CTV - CO - 1 - R	CGGGTCTCAACCTAGCCATA	62

## 결과 및 고찰

### 미숙배주로부터 캘러스 세포 유도 및 증식

배지조성과 감귤의 유전자형(제주도 재래감귤 3품종(동정굴, 청굴, 지각) 그리고 온주밀감 2품종(궁천조생, 하례조생))에 따라서 감귤의 꽃 내부 자방 안쪽에 있는 수정되지 않은 배주로부터 체세포배와 그 주변에서 유도된 하얀색 같은 캘러스 세포의 유도효과를 배양 4주 후 조사한 결과 Table 2에서 보는 것처럼 비록 재래감귤 3품종 중 청굴은 1/2 EME배지, 지각은 MS1 배지조성에서 미숙 배주로부터 체세포배 형성개수가 각각 30, 18개로 다른 배지조성에 비하여 높은 효과를 얻었으나, 체세포배로부터 캘러스 유도 효과는 각각 6, 1개로 MS2 배지조성에 비하여 낮게 나타났다. MS2 배지조성에서 체세포배를 형성한 재래감귤(동정굴, 청굴, 지각)의 미숙배주 개수는 각각 10, 21, 13개이며, 온주밀감(궁천조생, 하례조생)은 각각 5, 7개를 얻었다. 그리고, 캘러스 세포를 유도하는 재래감귤의 체세포 배 개수는 각각 2, 4, 2개 그리고 온주밀감은 각각 4, 5개로써 체세포배 주변으로부터 얻었다(Table 2). 감귤은 유전자형과 배지조성에 따라서 체세포배 형성과 캘러스 세포 유도에 영향을 받는다고 하였다(El-sawy et al., 2005; Tomaz MI et al., 2001). 본 연구에서도 유전자형과 배지조성에 따라서 체세포배 형성 효과에 대한 차이점을 보였으나, 체세포배 주변으로부터 캘러스 세포의 유도 효과는 다른 배지 조성에 비하여 MS2 배지조건에서 동일하게 높게 관찰 되었다. 또한, Fig. 1에서 보는 것처럼 감귤의 유전자형은 먼저 배주로부터 녹색의 체세포배가 형성되고 그 주변에서 하얀색 같은 형태의 캘러스 세포가 유도 되는 것을 배양 4주 후 관찰 할 수 있는데, 이와 같은 결과는 온주밀감 수송과실 내의 미발달 된 배주로부터 캘러스 세포를 얻은 연구결과(Jin et al., 2007)와 Eureka lemon [*Citrus limon* (L.) Burm f. ('Eureka')]의 미성숙 과실 내 종자로부터 캘러스 세포를 얻은 연구결과(Gholami et al., 2013)와 유사하였다. 일반적으로 감귤품종들의 체세포배 형성능 캘러스 세포의 유도는 배주, 화분, juice vesicles, stigma 그리고 style조직으로부터 얻어지는데(Carmi, 2005), 본 연구에서도 마찬가지로 체세포배 형성능 캘러스 세포는 배주 조직으로부터 얻었다.

Table 2. Effect of medium composition on the formation of somatic embryos and callus cells in *Citrus* spp.

Genotype		Number of somatic embryos induced from ovules					Number of somatic embryos induced to form callus cells				
Common name	Scientific name	MS1 <sup>z</sup>	MS2 <sup>y</sup>	MS3 <sup>x</sup>	EME <sup>u</sup>	1/2 EME <sup>t</sup>	MS1	MS2	MS3	EME	1/2 EME
Dongjeongkyool	<i>C. erythrosa</i> Hort. et Tanaka	3	10	7	5	7	0	2	0	0	0
Cheongkyool	<i>C. nippokoreana</i> Tanaka	13	21	12	12	30	2	4	1	3	6
Jihak	<i>C. aurantium</i> L.	18	13	3	6	6	1	2	0	1	0
Miyagawa wase	<i>C. unshiu</i> Marc.	2	5	0	3	1	2	4	0	2	0
Haryejosaeng	<i>C. unshiu</i> Marc.	4	7	0	2	6	3	5	0	1	4

<sup>z</sup>MS basal medium containing 500mg·L<sup>-1</sup> malt extract, 50g·L<sup>-1</sup> sucrose, and 8g·L<sup>-1</sup> agar.

<sup>y</sup>MS basal medium containing 500mg·L<sup>-1</sup> malt extract, 50g·L<sup>-1</sup> sucrose, 1.0mg·L<sup>-1</sup> kinetin, and 8g·L<sup>-1</sup> agar.

<sup>x</sup>MS basal medium containing 500mg·L<sup>-1</sup> malt extract, 50g·L<sup>-1</sup> sucrose, 3.0mg·L<sup>-1</sup> N6-benzyladenine (BA), and 8g·L<sup>-1</sup> agar.

<sup>u</sup>EME (MT basal medium containing 500mg·L<sup>-1</sup> malt extract, 50g·L<sup>-1</sup> sucrose, and 8.0g·L<sup>-1</sup> agar).

<sup>t</sup>1/2 EME (1/2 MT macronutrients, 1/2 BH3 macronutrients, 500mg·L<sup>-1</sup> malt extract, 1.55g·L<sup>-1</sup> glutamine, and 8g·L<sup>-1</sup> agar)



Fig. 1. Induction of callus cells from unfertilized immature ovules from open flowers in *Citrus* spp. Vertical arrow indicates callus cells surrounding the somatic embryo induced from ovules.



유도된 세포들은 MT 기본배지에 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, sucrose 50g·L<sup>-1</sup>, adenine 34mg·L<sup>-1</sup>, GA<sub>3</sub> 1.0mg·L<sup>-1</sup> 그리고 gelrite 2g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 배지로 옮겨 압조건 하에서 2주간격으로 12주간 계대배양함으로써 캘러스 세포로만 증식 및 유지 시킬 수 있었다. 결과적으로, 수정되지 않은 배주로부터 캘러스 세포를 유도하고 증식시키는데 소요된 시간은 총 16주 걸렸다.

### 체세포배 형성능 세포의 선발 및 식물체 재분화

캘러스 세포로부터 체세포배 형성능 세포만을 선발하기 위하여, 증식된 캘러스 세포들은 MT 기본배지에 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, lactose 70g·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 16g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 고체배지에 배양하였고, 그린 색깔의 체세포배를 형성하는 세포는 배양 6주 후 얻었다(Fig. 2). 캘러스 세포로부터 체세포배의 형성은 세포의 스트레스를 주는 물질로 탄수화물의 종류와 농도 그리고 agar 농도가 주요한 요인으로 작용하는데(Carmi, 2005; Gholami et al., 2013; Jin et al., 2007), 본 연구에서는 세포의 스트레스 작용으로써 lactose 70g·L<sup>-1</sup>와 건조 스트레스 작용으로써 agar 16g·L<sup>-1</sup>을 이용하여 캘러스 세포로부터 체세포배를 얻었다. Jin et al. (2007)에 따르면 온주밀감의 캘러스 세포로부터 체세포배를 얻는데 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, Lactose 70g·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 14g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 MT 기본배지가 효과적이라고 하였으나, 본 연구에서는 체세포배 형성에 있어서 무기물 조성(MS, MT 기본배지)에 따른 차이점은 없었고, 단지 agar 농도를 높여 주었을 때 배 형성시기가 약 1주 정도 단축되었다(자료 미제시). 비록, 주변 세포들이 건조되면서 갈변되어 죽어버리는 문제점은 있지만 빠른 시일 내에 계대배양을 해줌으로써 이와 같은 문제점은 해결 할 수 있었다. 위 결과로 세포의 스트레스를 주는 물질로써 고농도 agar의 사용은 체세포배 형성 시기를 단축하는데 주요하게 작용한다는 것을 알 수 있었다. 또한, 체세포배 형성능 캘러스 세포만을 얻기 위하여, 체세포배 형성능 캘러스 세포는 체세포배 형성 주변 캘러스 세포들을 MT 기본배지에 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, sucrose 50g·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 8g·L<sup>-1</sup>가 첨

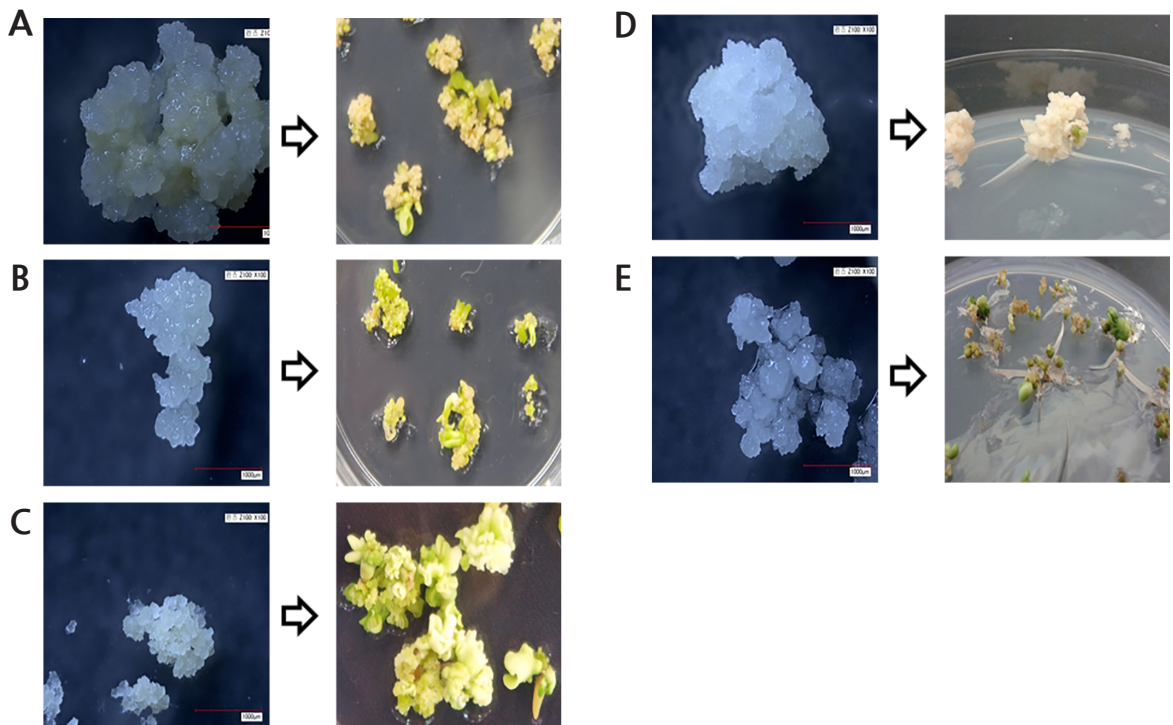


Fig. 2. Induction of somatic embryo from callus cells in *Citrus* spp.: 'Dongjeongkyool' (A); 'Cheongkyool' (B); 'Jikak'(C); 'Miywagawa Wase.' (D); 'Haryejosaeung' (E).

가된 고체배지로 옮겨 4주 간격으로 동일한 배지상에 계대배양하여 얻었다.

체세포배로부터 유식물체의 유도함에 있어서 재래감귤 3품종(동정굴, 청굴, 지각)은 MS 기본배지에 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, sucrose 50g·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 8g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 배지에 옮겨 10주간 명배양 하여 얻어진 정상적인 식물체는 순화과정을 통하여 약 60% 이상의 유식물체를 얻었다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 네블오렌지 품종의 체세포배로부터 유식물체를 얻은 연구결과(Carmi et al., 1998)와 유사하였다.

반면, 온주밀감 2품종(궁천조생, 하례조생)의 체세포배로부터 식물체의 유도는 재래굴 품종들과는 달리 식물생장 호르몬으로써 GA<sub>3</sub>와 탄수화물원으로써 sorbitol 과 galactose를 사용한 sorbitol 1.0M, galactose 1.0M, GA<sub>3</sub> 1.0mg·L<sup>-1</sup> 그리고 gelrite 3g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 MT기본배지에서 정상적인 유식물체를 얻었다(Fig. 4). 선행연구에서(Jin et al., 2007) 온주밀감(궁천조생) 성숙과실 내 미숙종자의 캘러스 세포로부터 유도된 체세포배는 정상적인 식물체를 직접적으로 유도하는데 쉽지가 않았다. 따라서, 이들 체세포배는 GA<sub>3</sub>가 첨가된 배지 상에서 비 정상적인 식물체로 형성된 후 GA<sub>3</sub>가 첨가되지 않은 배지상에 옮겨 정상적인 식물체로 유도하는 방법을 사용해야만 하였다. 그러나, 이 두 온주밀감 품종은 뿌리가 형성되지 않았다. 선행연구에 따르면 온주밀감 품종은 다른 감귤 품종들과는 달리 뿌리가 잘 형성되지 않는 유전자형을 갖고 있는 품종이기 때문에 탱자대목에 접목시키는 방법을 통하여 증식시켰다고 하였다(Jin et al., 2007). 본 연구에서도 동일한 방법으로 정상적인 식물체를 증식시킬 수 있었다.

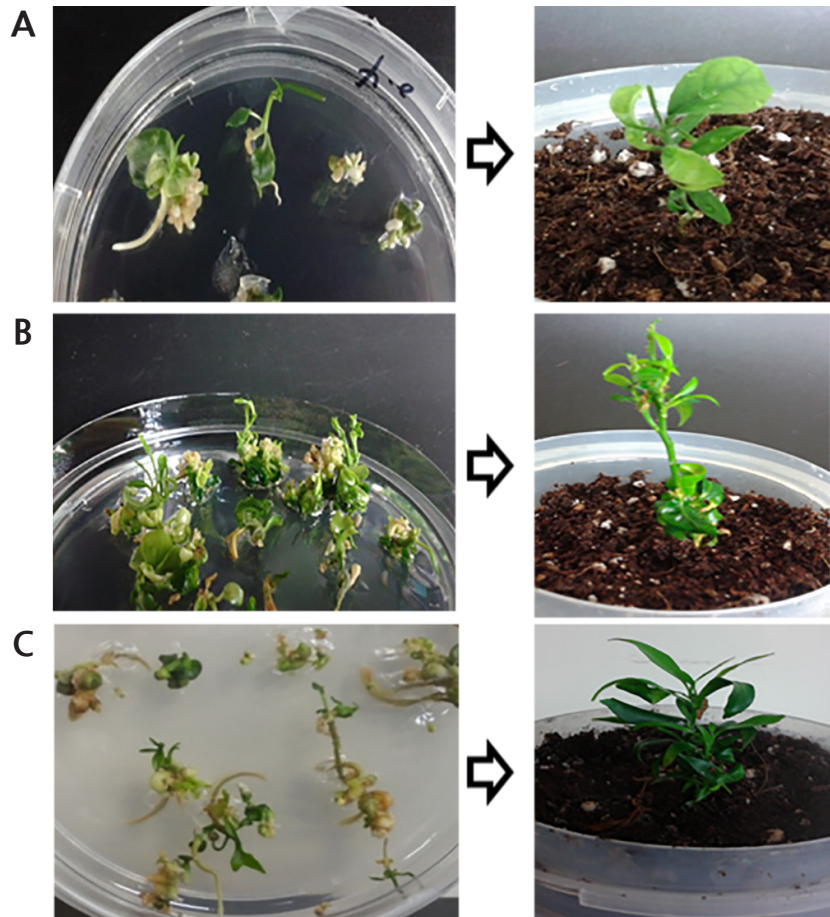


Fig. 3. Induction of normal plants from somatic embryos of *Citrus* cultivars native to Jeju: Induction of plants from 'Dongjeongkyool' somatic embryos and acclimatization (A); induction of plants from 'Cheongkyool' somatic embryos and acclimatization (B); induction of plants from 'Jikak' somatic embryos and acclimatization (C).

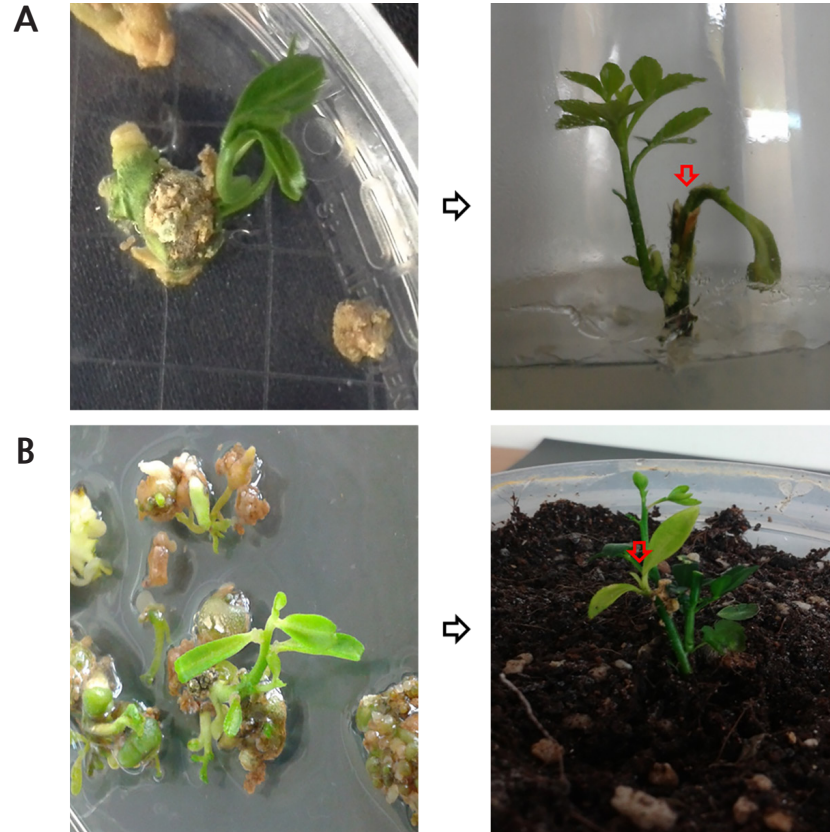


Fig. 4. Induction of normal plants from *Citrus unshiu* Marc. somatic embryos: Induction of shoots from somatic embryos of *C. unshiu* Marc. ('Miyagawawa wase') and *in vitro* micrografting with *Poncirus trifoliata* Raf. (A); induction of shoots from somatic embryos of *C. unshiu* Marc. ('Haryejesaeng') and *in vivo* grafting with *Poncirus trifoliata* Raf. (B). Vertical arrows indicate shoots.

이들 제주도 재래감귤 3품종을 비롯한 온주밀감 2품종은 미숙 배주배양 세포로부터 유식물체를 유도하기 까지 걸린 기간은 약 9개월 소요되었다. 위 결과로부터 얻어진 유식물체들은 바이러스 감염여부 검증의 재료로 사용하였고, 이들 감귤 품종들에 대하여 확립된 조직배양 시스템은 우량 감귤품종 육성을 위한 재료 확보에 이용할 수 있으리라 기대된다.

#### RT - PCR를 이용한 바이러스 감염여부 검증

노지 제주도 재래감귤 3품종과 온주밀감 2품종의 잎과 감귤 5품종의 미숙배주 배양을 통하여 얻어진 유식물체 5품종에 대한 CTV 바이러스 감염여부는 CTV 유전자의 특정 서열부분을 디자인 한 프라이머 set (Table 1)들을 이용하여 RT - PCR로 검증하였다.

CTV 유전자의 특정 서열부분을 디자인 한 CTV - 32 / 52 프라이머 set를 이용하여 RT - PCR한 결과 노지내의 감귤 5품종 중 제주도 재래감귤 청귤을 제외한 나머지 품종들은 모두 약 800bp의 positive control과 같은 위치에 공통적으로 증폭된 산물이 확인되어 CTV에 감염되어 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 5A). 또한, CTV - Co - 1F / R 그리고 CTV - PoF / R set를 이용하여 RT - PCR 검정을 수행한 결과 노지 감귤 5품종들은 모두 약 500bp의 positive control과 같은 위치에 공통적으로 증폭된 산물이 확인되어 CTV에 감염되어 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 5B, C). 비록 제주도 재래감귤 청귤 품종은 CTV - 32 / 52 프라이머 set를 사용하여 RT - PCR로 검출되지 않았지만 다른 CTV 유전자의 특정 서열부분을 디자인 한 두 프라이머로는 검출된 점으로 보아 제주도 재래감귤 청귤 또한 CTV에 감염되어 있음을 알 수 있었다. 반면 CTV에 감염된 감귤의 미숙배주 배양



을 통하여 얻어진 유식물체 5품종들은 positive control과 같은 위치에 증폭된 산물이 확인되지 않아 이들 유식물체는 CTV에 감염되지 않은 무병주임을 알 수 있었다(Fig. 5). 바이러스는 유관속(vascular system)을 통하여 식물체 내부로 침입하는데, 배주는 유관속으로 연결되어 있지 않기 때문에(Button and Kochba, 1977) 배주 배양을 통하여 얻어진 유식물체는 무병주였다는 연구결과와 동일 하였다(EI - Sawy et al., 2005).

### 항원 항체 반응을 이용한 CTV 감염 여부 검증

노지 감귤 5품종의 잎과 수정되지 않은 배주 배양을 통하여 얻어진 유식물체 5품종에 대한 CTV 감염 여부를 항원 항체 반응을 통하여 검증하였다. 노지 감귤 5품종의 모든 잎들은 CTV 항원 항체 반응을 보였지만(Fig. 6A), 수정되지 않은 배주 배양을 통하여 얻어진 5품종의 유식물체들은 모두 CTV 항원 항체 반응을 보이지 않았다(Fig. 6B).

이 결과로 비록 배양에 이용된 모본 감귤 식물체들이 CTV에 감염되었으나, 배주배양을 통하여 얻어진 유식물체들은 무병주라는 것을 알 수 있었다(EI - Sawy et al., 2005). 따라서, 수정되지 않은 배주 배양으로부터 얻어진 감귤 유식물체와 캘러스 세포는 생명공학기법을 적용하기 위한 재료로 이용 할 수 있고, 감귤품종의 무병주 식물체 획득을 위한 유용한 방법으로 활용 될 수 있을 것으로 기대된다.

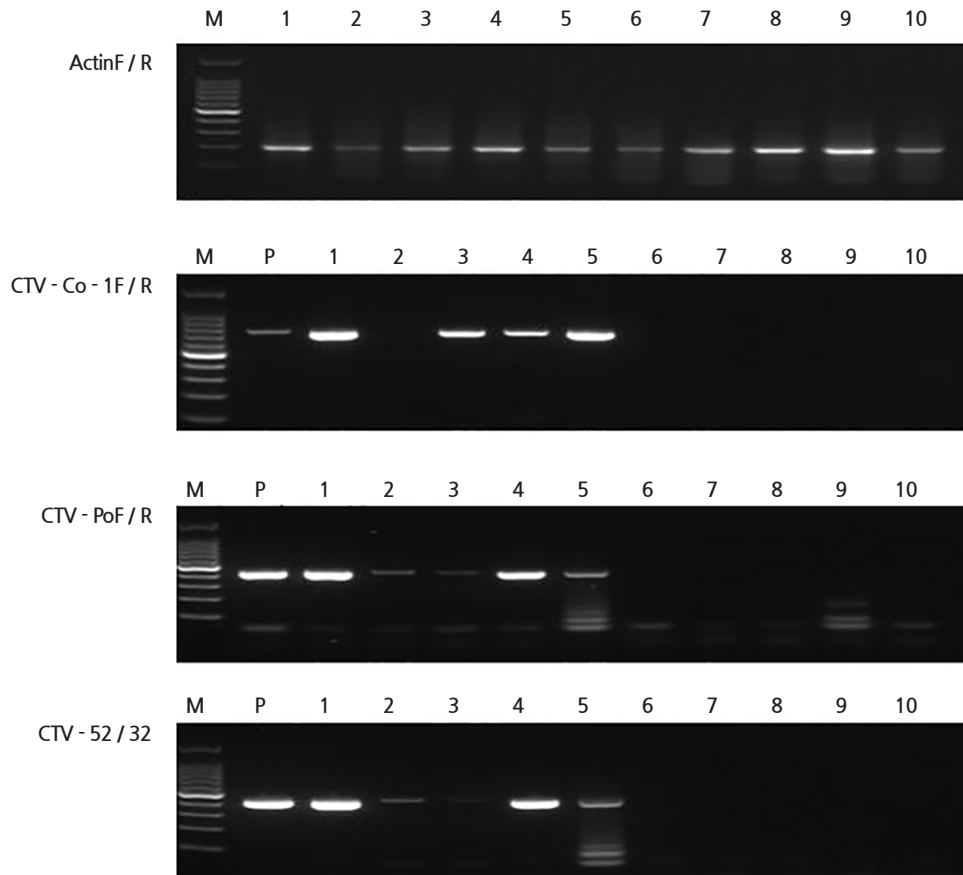


Fig. 5. Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) from citrus cultivars (*Citrus* spp.) obtained *in vivo* (ground leaves from the *Citrus* cultivars) and *in vitro* (leaves of seedlings obtained from nucellar embryogenic callus cells) using RT - PCR. Lane M, 100 bp marker; 1, 'Miyagawa wase'; 2, 'Cheongkyool'; 3, 'Jikak'; 4, 'Haryejaesaeng'; 5, 'Dongjeongkyool'; 6, 'Miyagawa Wase.'; 7, 'Cheongkyool'; 8, 'Jikak'; 9, 'Haryejaesaeng'; 10, 'Dongjeongkyool'; P, positive CTV control, Cultivars in lane 1 to 5 were produced *in vivo*, and those in lane 6 to 10 were produced *in vitro*.



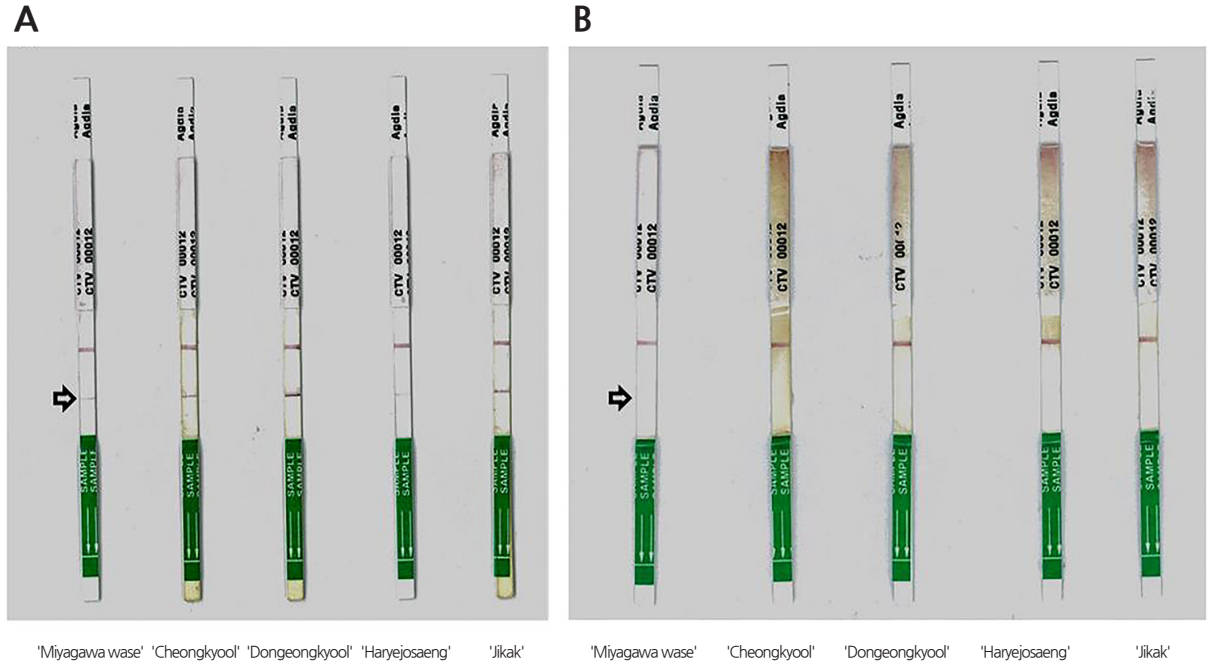


Fig. 6. Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) from citrus cultivars (*Citrus* spp.) obtained *in vivo* and *in vitro* using the CTV immuneStrip test: ground leaves of *Citrus* cultivars (A); leaves of seedlings obtained from nucellar embryogenic callus cells (B). Horizontal arrows indicate the positive (+) control line for the detection of *Citrus tristeza virus*.

## 초 록

본 실험은 우량 감귤품종 육성을 위한 바이러스 프리인 배주배양 세포의 재료 공급을 목적으로 실시하였다. 감귤 트리스테자 바이러스(CTV)에 감염된 것으로 추정되는 제주도 재래감귤 3품종(동정귤, 청귤, 지각) 그리고 온주밀감 2품종(궁천조생, 하례조생)의 미숙과실 내 수정되지 않은 배주를 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, sucrose 50g·L<sup>-1</sup>, kinetin 1.0mg·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 8g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 MS2 배지에 치상하여 4주 후 각각 10, 21, 13, 5, 7개의 체세포 배를 얻었고, 체세포배 주변에서 white 캘러스 세포의 유도는 각각 2, 4, 2, 4, 5개를 얻었다. 얻어진 캘러스 세포로부터 체세포배의 유도는 MT 기본배지에 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, lactose 70g·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 16g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 배지로 옮겨 6주 후 재분화능 체세포배를 얻었다. 재래감귤의 재분화능 체세포배는 MS 기본배지에 malt extract 500mg·L<sup>-1</sup>, sucrose 50g·L<sup>-1</sup> 그리고 agar 8g·L<sup>-1</sup>이 첨가된 배지로 옮겨 약 10주 후 약 60% 이상의 정상적인 유식물체를 얻었다. 반면 온주밀감 2품종은 MT 기본배지에 sorbitol 1.0M, galactose 1.0M, GA<sub>3</sub> 1.0mg·L<sup>-1</sup> 그리고 gelrite 3g·L<sup>-1</sup>가 첨가된 배지에서 정상적인 유식물체를 얻었다. 배주배양 세포로부터 유도된 식물체들의 무병주 여부는 RT-PCR과 혈청학적 진단법을 이용하여 무병주임을 확인하였다. 본 연구결과는 생명공학기법에 바이러스 프리인 감귤 세포를 이용함으로써 우량 감귤 품종을 육성할 수 있을 것으로 기대된다.

**추가주요어:** 접목이상병, 기내 경정접목, 탕자, 온주위축병, 유관속

## Literature Cited

Button J, Kochba J (1977) Tissue culture in the Citrus industry. In: Reinert J & Bajaj YPS (Eds), Applied and Fundamental Aspects of PCTOC Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, pp 70-92

- Carmi F (2005) Somatic embryogenesis protocol: *Citrus*. S.M. Jain and P.K. Gupta (eds.), Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Netherlands, pp 321-343. [https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3\\_26](https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_26)
- Carimi F, Tortorici MC, Pasquale FD, Crescimanno FG (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules and stigma/style explants of sweet orange navel group [*Citrus sinensis* (L.) Osb.]. PCTOC 54:183-189. <https://doi.org/10.1023/A:1006113731428>
- El-Sawy A, Gomaa A, Reda A, Danial N (2005) Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules of citrus. Arab J Biotech 9:189-202
- Feng G, Chen JZ, Chen SC (1990) Production of virus-free nucellar plantlets from unfertilized ovules of *citrus* in vitro. Acta Bot Sin 32:505-509
- Gholami AA, Alavi SV, Majd A, Fallahian F (2013) Plant regeneration through direct and indirect somatic embryogenesis from immature seeds of citrus. Eur J Exp Biol 3:307-310
- Grant TJ (1957) Heat treatment for obtaining sources of virus-free citrus budwood. Florida State Hort Soc 176:51-53
- Grosser JW, Gmitter FG (1990) Protoplast fusion and citrus improvement. Plant Breeding Reviews 8:339-374. <https://doi.org/10.1002/9781118061053.ch10>
- Jin SB, Song KJ, Riu KZ (2007) Several factors affecting embryogenetic culture maintenance and shoot regeneration in 'Miyagawqa Wase' satsuma mandarin (*Citrus unshiu*). Hortic Environ Biotechnol 48:167-170
- Kim DH, Oh DC, Hyun CW (1999) Incidence of three major citrus viruses in Cheju island. Plant Dis Agric 5:34-40
- Lee SY (2004) Viral diseases of Woody plants in Korea. Journal of Forest Science 20:1-10
- Miyakawa T (1977) Distribution of bud and union disorder disease with citrus virus. Ann Phytopathol Soc Jpn 31:395-398
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-479. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murashige T, Tucker DPH (1969) Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proc 1<sup>st</sup> Intl Citrus Symp 3:1156-1161
- Navarro L (1984) Citrus tissue culture. In: Micropropagation of selected root crops, palms, citrus and ornamental plants (plant protection and production, Paper 59). FAO, Rome, pp 113-154
- Naz Ali A, Jaskani MJ, Abbas H, Qasim A (2007) In vitro studies on micrografting technique in two cultivars of citrus to produce virus free plants. Pak J Bot 39:1773-1778
- Roistacher CN, Navarro L, Murashige T (1976) Recovery of citrus selections free of several viruses, exocortis viroid, and *Spiroplasma citri* by shoot-tip grafting in vitro. Proc 7th Conf IOCV 186-193
- Roy A, Ananthkrishnan G, Hartung JS, Brlansky RH (2010) Development and application of a multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction assay for screening a global collection of *Citrus tristeza virus* isolates. Phytopathology 100:1077-1088. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-10-0102>
- Sharm, S, Singh B, Rani G, Zaidi AA, Hallan V, Nagpal A, Virk GS (2007) Production of Indian citrus ringspot virus free plants of kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting. J Central Eur Agric 8:1-8
- Singh, B, Sharma S, Rani G, Zaidi AA, Hallan V, Nagpal A, Virk GS (2005) In vitro production of Indian *Citrus* ringspot virus-free plants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour X *C. deliciosa* Tenora) by ovule culture. J Plant Biotechnol. 7:1-7
- Singh B, Sharma S, Rani G, Zaidi AA, Hallan V, Nagpal A, Virk GS (2006) In vitro production of Indian *citrus* ringspot virus-free plants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour X *C. deliciosa* Tenora) by nucellus culture. Plant Pathol J. 5:274-282. <https://doi.org/10.3923/ppj.2006.274.282>
- Singh B, Sharma S, Rani G, Hallan V, Zaidi AA, Virk GS, Nagpal A (2008) In vitro micrografting for production of Indian *citrus ringspot virus* (ICRSV) - free plants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour X *C. deliciosa* Tenora). Plant Biotechnol Rep 2:137-143. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0055-6>
- Tomaz ML, Januzzi-Mendes BM, Mourão-Filho FDA, Dem trio CGB, Jansakul N, Martinelli- Rodriguez AP (2001) Somatic embryogenesis in *Citrus* SPP.: Carbohydrate stimulation and histodifferentiation. In Vitro Cell Dev Biol - Plant 37:446-452. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0078-y>