

온주밀감(*Citrus unshiu* Marc.  
var. *Okitsu*)과 오렌지(*Citrus*  
*sinensis* (L.) Osbeck)의 원형질체  
융합

Protoplast fusion between *Citrus*  
*unshiu* and *Citrus sinensis* (L.)  
Osbeck

홍경애, 송성준, 이옥영  
제주대학교 방사능이용연구소

Kyung-Ae Hong, Sung-Jun Song,  
Lee-Stadelmann Ok-Young

Cheju Applied Radioisotope Research Institute

ABSTRACT

By the development of plant molecular biology these days which has been accomplishing much an attempt to get mutants. However, there have been having many issues in lacking of recognition for transformants and the right of ownership of the gene. The breeding method of cell fusion without any problems can easily make new variety with an excellent character having plant itself.

The purpose of this study was therefore to carry out to get transformants having sweeter taste and the original character of *Citrus unshiu* itself using PEG method of cell fusion.

The yield of protoplasts per gram of leaf was  $7 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  /ml and callus cell was  $1 \times 10^6$  /ml.

The first protoplast division and formation of micro-calli were observed 7 to 9 days and 30 to 40 days after incubation, respectively. To induce embryo from these callus were inoculated solid medium containing 1.6% agarose and 5% sucrose.

Green somatic embryo and plantlet were appeared from 1 to 2 months after plating and

transferred to MT basal medium to stimulate rooting and shoot elongation. It was difficult to get normal plant directly through embryo of globular, heart and terpenoid state, and more effective method was directly to get plantlet from the globular embryo without heart and terpenoid state to control properly agar concentration.

서 론

근래 온주밀감의 생산목표는 다수확 생산 보다는 보다 더 부가가치가 높은 고품질의 과실을 생산하는 방향으로 변화하고 있다. 온주밀감의 재배방식에 있어서도 나무에 양분과 수분 스트레스에 의해 당도를 높이는 기술을 도입하는 방법을 이용하여 고품질 과실을 생산하는 것을 목적으로 품종이 갱신되어지고 있으나 이와같은 방법은 나무의 수세를 저하시키고 격년결과의 폭을 넓게하여 농가의 수입을 불안정하게 하는 요인이 되고 있다.

잡종 식물을 만드는 방법에는 여러 가지가 있는데 그중 원형질체 융합법은 단자엽과 쌍자엽 식물(Bang et al, 1991, Lee et al, 1991)에 관계없이 사용되어질 수 있고 교잡육종법으로는 불가능한 종속간 잡종도 창출할 수 있다. 따라서 그동안 PEG 및 dextran과 같은 화합물을 처리하여 여러 변이식물을 만드는 시도가 많이 이루어졌다(Proels et al. 1989, Weising et al. 1988, Vasil et al. 1974, Walden and Schell, 1990, Toriyama et al, 1988, Fromm et al, 1986). 최근에는 식물분자 생물학의 발달에 따라 이를 이용한 많은 방법으로 잡종식물을 만들려고 시도가 이루어지고 있으나 유전자 변형 식물에 대한 일반인들의 인식부족과 유전자 소유권등에 대한 문제점등이 대두 되어지고 있어 문제점이 되고 있다. 그러나 원형질체 융합을 통한 육종방법은 별다른 고가의 기자재없이 값싸게 식물체 자체에 내재하는 우수한 형질을 갖춘 새로운 품종을 만들 수 있는 장점이 있다.

따라서 본 연구에서는 위와같은 문제점을 해결하고 당도는 높으면서도 기존의 온주밀감의 특성을 가지는 잡종체를 만들고자 오렌지와 온주밀감간에 원형질체 융합을 시도하였다.

Table 1. The enzyme composition for protoplast isolation.

Compound	For callus cell		For mesophyll cell	
	Conc.	g/100ml	Conc.	g/50 ml
Mannitol	0.7M	12.8	0.7 M	12.8
CaCl <sub>2</sub>	24.5 mM	0.036	24.5 mM	0.036
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.92 mM	0.001	0.92 mM	0.001
MES	6.15 mM	0.012	6.15 mM	0.012
Cellulase Onozuka R-10	0.3%	0.3	1%	1.0
Macerase R-10	0.3%	0.3	-	
Driselase	0.1%	0.1	-	
Macerase R-10	-		1%	1.0
Pectolyase Y-23	-		0.2%	0.2
pH	5.8			

## 재료 및 방법

### 1. 식물재료

원형질체 융합을 위하여 사용한 2가지 공시재료 중 오렌지 캘러스는 미국 플로리다 감귤연구소에서 분양받은 것을 5주마다 EME 배지에서 계대배양하여 증식시킨 후 양호한 시료만을 선발하여 사용하였고, mesophyll 재료로 사용한 온주밀감은 서귀포 위미리 감귤 농장에서 채취한 감귤을 70% EtOH로 표면살균한 후 과실안에 있는 미숙종자만을 꺼내어 MT 기본 배지에 치상한 후 3개월 정도 배양하여 얻은 유묘를 사용하였다.

### 2. 효소액 조제 및 처리

원형질체를 분리하기 위한 효소용액은 Kobayashi (1985)와 Gasser(1990)의 조성을 오렌지 캘러스와 온주밀감의 mesophyll cell의 세포가 잘 분리되도록 조성을 변형시켜 사용하였다. 표 1의 조성으로 효소용액을 잘 혼합하여 녹인 뒤 0.2 $\mu$ m membrane filter로 여과하여 사용하였다.

효소액의 처리는 무균적으로 생육시킨 온주밀감의 유묘엽 4장을 멸균된 가위로 폭을 1mm 정도로 절단한 뒤 60 mm x 15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 침지시킨 후 27 $^{\circ}$ C를 유지하는 식물생육실에서 15시간 동안 25 rpm으로 진탕하면서 세포벽을 용해시켰다.

캘러스의 경우는 계대배양하여 4주 후 잘 생육된 캘러스만을 1 g 정도 선발하여 멸균된 스푼으로 으개

어 덩어리를 부순 후 캘러스가 잠길 정도의 캘러스 효소액에 침지시켜 mesophyll 시료와 같은 상태에서 배양시켰다.

### 3. 원형질체 분리

하룻밤 배양시킨 시료로부터 원형질체를 분리하기 위하여, 45  $\mu$ m의 체로 찌꺼기를 걸러낸 후 CPW washing 용액 5 ml를 가하여 현탁시켰다. 이 현탁액에 25% sucrose/13% mannitol 용액으로 농도 구배를 준 뒤 원심분리(Gasser, 1990)하여 두 용액 사이에 존재하는 원형질체만을 회수하여 새로운 원심분리관에 넣은 후 배양배지 용액으로 3번 세척한 후 원형질체의 수율을 조사하기 위하여 hemacytometer로 계측하였다.

### 4. 원형질체 융합 및 배양

원형질체 융합시 가장 적절한 원형질체 수율을 조사하여 밀도를 조정된 뒤 온주밀감의 mesophyll과 캘러스의 원형질체를 현탁하여 혼합하고 이중 100  $\mu$ l를 취하여 융합용기 가운데에 놓고 10분간 방치하여 세포들이 안정되도록 하였다. 여기에 PEG 융합용액 (PEG(MW. 1,450) 4g/10 ml, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.097 g/10 ml, Glucose 0.541 g/10 ml, pH 6.0) 100  $\mu$ l를 첨가하여 8분간 방치시킨 후 A:B=9:1(Solution A; Glucose 7.2 g/100 ml, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.97 g/100 ml, DMSO 10

ml/100 ml, pH 6.0, Solution B: Glycine 2.25 g/100 ml, pH10.5)로 혼합된 융합 촉진액 100  $\mu$ l를 가하여 12분이 경과하도록 하였다. 융합액을 세척하기 위하여 완전히 가장자리쪽으로 500  $\mu$ l의 배양액을 가한 후 5분이 경과되면 다시 세척액을 제거하고 융합액을 완전히 제거하기 위하여 이 과정을 2번 반복하였다. 융합된 원형질체를 배양하기 위하여 1 ml의 배양액 용액을 첨가하고 용기의 건조를 막기 위하여 용기 주변에 배양액 용액을 방울방울 가해 준 후 파라필름으로 밀봉하여 온도 37°C, 습도 60%를 유지하는 식물 생육상에 넣어 배양을 시작하였다(Grosser, 1990). 배양중에 3주가 경과되면 삼투압의 농도를 감소시키기 위하여 원형질체 배양액과 0.146M EME, 그리고 0.6M EME가 동량으로 혼합된 용액을 시료의 배양액에 따라 300 - 500  $\mu$ l 첨가하였다. 다시 2주 후 0.146 M EME와 원형질체 배양액이 동량으로 혼합된 용액을 첨가하면서 세포가 분열하여 callus가 생길 때까지 암배양하였다.

### 5. 재분화

세포분열을 거쳐 생성된 callus로부터 embryo를 형성시키기 위하여 EME 고체배지에서 4주마다 계대배양하면서 callus를 증식시킨 다음 1.6% agarose와 5% sucrose가 첨가된 EME 고체배지에서 배양한 후 유묘를 얻어 MT 배지에 치상하여 식물체로 유도시켰다.

## 결과 및 고찰

### 1. 효소처리 조건 및 원형질체 수율

원형질체 분리조건은 시료의 생리적 상태나 효소처리 조건에 따라 좌우되기 때문에(Collin 등, 1998a) 효소 처리 조건은 활성이 양호한 원형질체를 얻기 위하여 아주 중요한 사항이다. 온주밀감 열세포의 경우는 어린 잎보다는 과중 후 2-3개월 정도 경과한 잎이 수율이 높았는데 표 1에서의 조성으로 처리했을 때  $7 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  정도이었고 켈러스의 경우는  $1 \times 10^6$  이었다. 이것을 원형질체 융합을 위하여  $1 \times 10^5$  으로 희석하여 사용하였다.

오렌지 켈러스의 경우는 시료의 생리적 상태에 따라 원형질체의 수율과 활성이 많이 달랐는데 켈러스

의 경우는 계대배양하여 가장 활성적으로 생장할때의 시료를 사용하는 것이 중요하였는데 4주 정도의 시료가 원형질체의 수율과 활성이 가장 좋았다.

### 2. 원형질체 융합

융합법에는 전기적 방법과 화학적인 방법이 있는데 별다른 기기가 필요없고 값이 싸고 조작하기가 쉬운 장점이 있는 PEG 방법을 많이 사용하고 있다. PEG는 막을 불안정하게 만들어 주변 세포들간의 지질들이 서로 뚫리게 하여 붙게 하는 역할을 하는데(Ahkong, 1975) 이때 원형질체의 밀도를 잘 조절하는 것이 중요하다. 원형질체 밀도는  $1 \times 10^5$ 이 가장 좋았으며 시료와 PEG 용액, 그리고 융합촉진액의 비율을 1:1:1 (v/v/v)로 했을 때 융합율이 12% 내외로 좋았고, 이는 Kao 등(1974)의 결과와 일치하였다(그림 1).

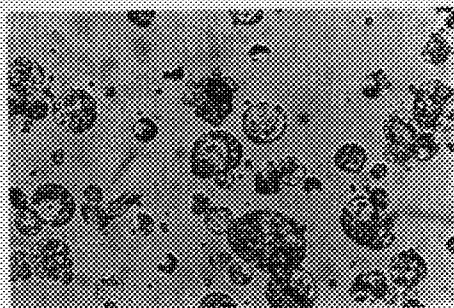


Fig. 1. The protoplast fusion between *Citrus unshiu* Marc. Var. Okitsu and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var Cara Cara Red Navel.

### 3. 원형질체 배양

원형질체를 배양하기 위해서는 배양액의 오스몰 농도를 적절히 맞춰 주어야 세포가 터지거나 오므라들지 않고 잘 생장할 수 있다. 배양액의 농도가 너무 높으면 세포벽이 밖으로 빠져 나가 원형질체가 오므라드는 현상이 발생하고 반대로 주위의 농도가 너무 낮으면 세포에 물이 들어감으로써 세포가 터지게 된다. 따라서 적절한 오스몰 농도를 유지하는 것은 원형질체 배양에서 가장 유념하여야 할 사항으로 본 연구에서는 0.4 - 0.7 Osmole 농도에서 세포 분열이 잘 되었다. 배양 후 3일 정도가 지나면 세포벽이 형성되는 것을 관찰할 수 있었고 7-9일 정도에서 세포가 분열되었고, 3-4주가 지났을 때 micro-calli가 형성되었으며 그 후 고체 EME 배지에 옮겨 callus로 성장시켰다(그림 2, 3).

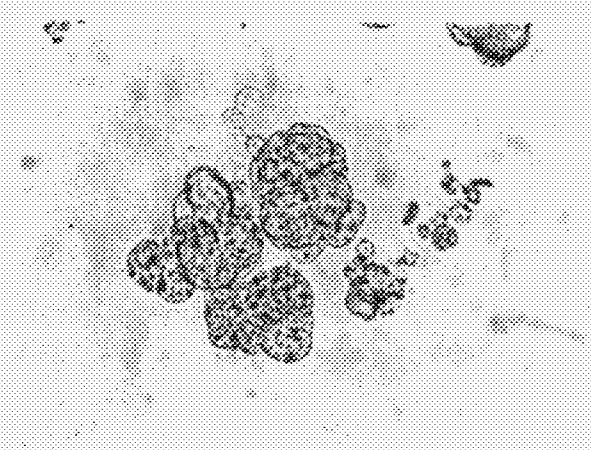


Fig. 2. The stage microcalli formation.

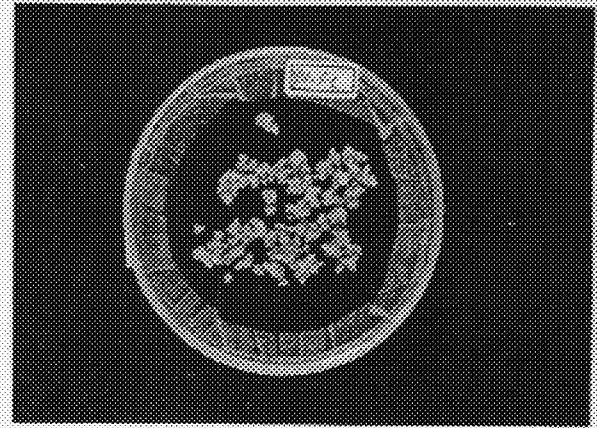


Fig. 4. The stage of greenish embryo.

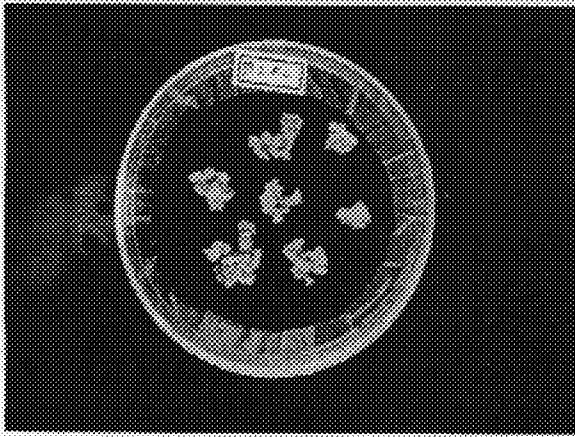


Fig. 3. Callus formed from microcalli

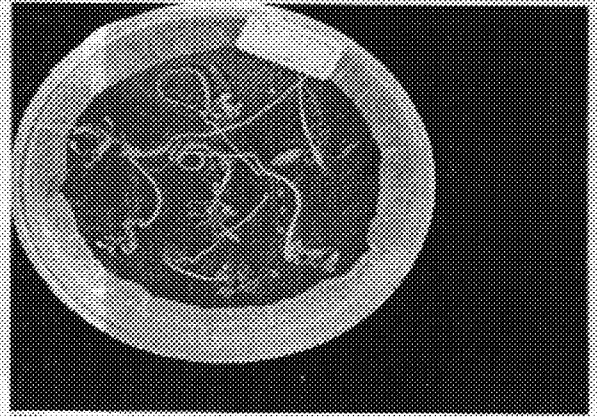


Fig. 5. The shooting obtained from embryo.

#### 4. 식물체 재분화

개대배양하여 증식시킨 캘러스로부터 embryo를 유도시키기 위하여 1.6% agarose와 5% sucrose를 함유하는 EME 배지에 지상하였다. 최상 1-2달 후 구상형의 embryo(그림 4)를 거쳐 생성되는 조그만 유묘를 얻을 수 있었는데(그림 5) 이것을 MT 기본 배지에 옮긴 결과 shooting된 식물체를 얻을 수 있었다(그림 6). 본 연구결과 micro-calli로부터 식물체로의 발달 과정은 구상형의 배를 거치고 다시 심장형의 배, 그리고 어뢰형을 거쳐 식물체로의 성장 과정은 정상적인 식물체를 얻기가 힘들었고 캘러스 상태에서 agarose 농도를 높게하여 구상형의 배를 거치면서 직접 유묘를 획득하는 방법이 더 효과적이었다. 이 방법은 배로부터 식물체까지의 성장과정에서 어떤 호르몬의 첨가 없이도 가능하였는데 이들 식물체를 가지고 RAPD를 수행하여 용합을 확인하려고 한다.



Fig. 6. The whole plant formed from naked protoplast.

#### 적 요

최근 식물분자 생물학의 발달에 따라 이를 이용하여 많은 잡종식물들을 만들려는 시도가 이루어지고

있으나 유전자 변형 식물에 대한 인식부족과 유전자 소유권등에 관한 문제점들이 대두되고 있는 실정이다. 그러나 원형질체 융합법을 이용한 육종방법은 그러한 문제점의 소지가 전혀 없이 손쉽게 식물체 자체에 내재하는 우수한 형질을 갖는 새로운 품종을 만들 수 있어 온주밀감(*Citrus unshiu* Marc. var. Okitsu)과 오렌지(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)의 원형질체 융합을 시도하여 당도는 높으면서도 기존의 온주밀감의 특성을 갖는 잡종체를 만들고자 하였다.

원형질체 수율은 온주밀감 엽세포의 경우는 어린 잎보다는 과종 후 2~3개월 정도 경과한 때가 수율이  $7 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  으로 가장 높았고, 오렌지 캘러스의 경우는 시료의 생리적 상태에 따라 많이 달랐는데 계대배양하여 4주정도일때가  $1 \times 10^6$ 으로 가장 좋았다. 원형질체 배양은 오스몰 농도를 0.4 ~ 0.7 Osmol를 적절히 유지하면서 배양했을 때 7 ~ 9일 정도에서 세포가 처음 분열하였고, 3 ~ 4주가 지났을 때 micro-calli가 형성되었으며 이것을 고체 배지로 옮겨 callus로 성장시켰다. 이 캘러스로부터 embryo를 유기시키기 위하여 1.6% agarose와 5% sucrose를 함유하는 고체배지에 치상하였다. 치상 1~2달 후 구상형의 embryo를 거쳐 생성되는 조그만 유묘를 얻을 수 있었고 이것을 MT 기본배지에 옮겨 shooting을 유기시켰다. 본 연구결과 micro-calli로부터 식물체로의 발달과정은 구상형의 배를 거치고 다시 심장형의 배, 그리고 어뢰형을 거쳐 식물체로의 성장 과정은 정상적인 식물체를 얻기가 힘들었고 캘러스 상태에서 agarose 농도를 높게하여 구상형의 배를 거치면서 직접 유묘를 획득하는 것이 더 효과적이었다.

### 참 고 문 헌

- Ahkong, Q. F., D. Fisher, W. Tampion and J. A. Lucy. 1975. Mechanisms of cell fusion, Nature(Lond.) 235:194-195.
- Bang, J. W., S. W. Park, S. G. Paik and Y. J. Kim, 1991. Transformation of tobacco(*Nicotiana Tabacum*) by Ti-plasmid vector system. Proc. Mol. & Genet. 6:193-194.
- Collins, H. A. and S. Edwards. 1988. Plant Cell Culture, BIOS scientific publishers. pp 46, pp 91.
- Fromm, M. E., L. P. Jaylor and V. Wallbot. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporator. Nature 319.
- Grosser, J. W., G. A. Moore and F. G. Gmitter Jr. 1990. Interspecific somatic hybrid plants from the fusion of 'key' lime(*Citrus aurantifolia*) with 'valencia' sweet orange(*Citrus sinensis*) protoplasts. Plant Breeding Abstracts 60(4):424.
- Kao, K. N. and M. R. Michayluk. 1974. A method for high-frequency spectrum fusion of plant protoplasts, Planta(Berl.) 115, 355-367.
- Kobayashi Shozo, Isami and Hirofumi Uchimiya. 1985. Conditions for high frequency embryogenesis from orange(*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. Plant Cell Tissue Organ Culture 4:249-259.
- Lee, Y. B., E. G. Lee and K. S. Choi. 1991. Genetic transformation of Brassica oleraceae by Agrobacterium tumefaciens. Proc. Mol. Biol. & Genet. 6:195-198.
- Proels, M., J. Schell and H. H. Steninbiss. 1989. Critical evaluation of electromediated gene transfer and transient expression in plant cells. Elctroporation and electrofusion in Cell Biology. 367-375.
- Toriyama, K, H. Kanzaki, S, Toki and T, Abe. 1989. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. Bio/Technology. 16: 1072-1074.
- Vasil, V., and I. K. Vasil. 1974. Regeneration of tobacco and petunia plants from protoplasts and culture of corn protoplasts. In vitro. 10:83-96.
- Weising, K., J. Schell and G. Kahl. 1988. Foreign genes in plants : Transfer, structure, expression and applications. Ann. Rev. Genet. 22:421-477.
- Walden, R. and J. Schell. 1990. Techniques in plant molecular biology-progress and problems. Eur. Biochem. 192:563-576.