식물조직배양학회지 제22권 제5호
Korean J. Plant Tissue Culture
Vol. 22, No. 5, 261~266 (1995)

屬間交雜 後 胚珠培養에 의한 柑橘類 新品種 育成

李 萬 相
원광대학교 농과대학 농학과

Breeding of New Varieties by Ovule Culture of Intergeneric Hybrid in the Aurantioideae

Lee, M. S.
Department of Agronomy, College of Agriculture, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk, 570-749

This study was carried out to develop new varieties which are dwarf and tolerant to winter cold in the Aurantioideae by intergeneric crossing. To do that, the reciprocal crosses of Hwanggeumyooza and trifoliate orange, yooza and trifoliate orange were done and in vitro immature ovule culture of their hybrid was carried out. The callus formation from immature ovule was good in order of Hwanggeumyooza, Hwanggeumyooza × trifoliate orange, yooza, and trifoliate orange and best at 1 to 3 mg/L NAA + 0.5 mg/L zeatin on MT medium. In vitro germination percentages of 20 week old hybrid of Hwanggeumyooza × trifoliate orange and trifoliate orange × Hwanggeumyooza were 41.3% and 37.7, respectively. The phenotype of hybrid (95%) of Hwanggeumyooza × trifoliate orange and that (100%) of trifoliate orange × Hwanggeumyooza were similar to that of trifoliate orange. After Hwanggeumyooza was pollinated by pollens of trifoliate orange, the pollen tubes grew on stigma after 3 h of pollination and entered into micropyle after about 24~28 h. One gamete in pollen was fused with polar nuclei after 2 days and other one fused with egg nucleus at 3 days after pollination. The fruit set percentage by intergeneric crossing was 14.0% in Hwanggeumyooza × trifoliate orange and 17.5% in trifoliate orange × Hwanggeumyooza. The fruit set percentages of Hwanggeumyooza and trifoliate orange were 34.2% and 39.5% by artificial self-fertilization, 34.2% and 39.5% by artificial cross fertilization, 3.1% and 1.4% by parthenocarpy, and 13.0% and 3.0% by natural fertilization, respectively. The somatic and gametic chromosome numbers of Hwanggeumyooza, yooza, and trifoliate orange were 2n = 18 and n = 9.

Key words: Aurantioideae, intergeneric hybrid, ovule culture, yooza

우리 나라 감귤류는 거의 모두 일본으로부터 도입된 것인데 원래 우리 나라 감귤 재배사는 百濟 文周王 2년(476년)에 감귤을 공물헌상했다는 高麗史의 기록으로 보아 이보다 훨씬 이전인 것으로 생각된다. 이 당시의 재배품종은 거의 제주 재래종으로 靑橘, 산귤, 동정귤, 柚子, 唐柚子, 紅橘 등 20여종에 이르렀으나(農業技術大系; 朴, 1976) 생식용으로는 맛이 없고 품질이 떨어져 지금은 유자, 당유자, 병귤 등 10여종만 몇 주씩 남아 있을 뿐이며 그 나무들의 樹齡이 120~350년이므로 언제 없어질지 모르는 상황에 처해있다(제주시험장 시험연구보고서, 1987-1988).

유자는 온주밀감에 비하여 향기가 높고, 비타민 C와 칼슘이 특히 과피에 많으며, 구연산의 함량도 높아 건강식품으로 알려져 있다. 이와 같이 향기와 영양 면에서 우수한 유자는 차, 식초용 이외에도 가공식품으로서의 개발가치가 높다. 우리 나라의 유자 재배면적은 약 1,400 ha인데 약 8,000 ton이 생산되고 있으며 樹高가 2.5~5 m(17 m도 있음)에 달하고 가시가 크고 많아서 작업하기가 곤란하다. 그러나 가시가 적은 왜성화된 유자나무를 만들어 밀식 재배하면 작업하기도 용이하고 단위면적당 생산량 증가와 생산비 절감으로 가격에 있어 국제경쟁력을 키울 수 있을 것이다.

본 시험은 耐寒性이 강하고, 향기가 많고, 多收性이면서 왜성인 新品種을 빠른 시일 내에 육성하기 위하여 가시가

적고, 矮性(1 m 이하), 多果性인 황금유자와 유자, 탱자 등 屬間 正逆交雜을 하여 얻은 胚珠를 여러 배지에 배양하였고 또한 육종의 기초적 연구로서 染色體數, 受精現象, 受精力, F1 종자의 발아 및 生育相도 조사하였다.

材料 및 方法

種屬間交雜 및 胚培養

황금유자(왜성), 유자, 탱자 등을 早期開花(황금유자와 유자는 온실재배)한 화분과 노지재배에서 適期開花한 화분을 채취하여 4°C desiccator에 저장하였다가 개화 1일전 인공제웅 후 被袋하고 翌日 황금유자, 유자, 탱자를 正逆 種屬間交雜하였다. 授粉 후 2-15주까지 주별로 미숙과를 채취하여 75% 알코올에 1분간 Table면 살균한 다음 3% sodium hypochlorite 수용액에 10분간 멸균하고 멸균수로 3-4회 수세하였다. 배지는 MS 및 MT 기본배지에 농도별로 단독처리 및 2,4-D, Zeatin 등을 혼합처리한 후 멸균전 pH를 5.8로 조절하여 121의 autoclave에서 12분간 멸균하고 미숙배주를 치상하여 callus 형성 또는 胚發芽 等을 주마다 조사하였다.

屬間交雜에 의한 受精

受精에 대한 기초로서 황금유자, 유자, 탱자의 염색체 수를 조사하고 受精現象과 受精力을 조사하였는데 생식세포 염색체 수는 개화 15일전경부터 화뢰를 채취하여 Carnoy 液에 고정 후 iron aceto-carmine으로 염색하였고 체세포 염색체 수는 종자를 발근시켜 근단 1~2 cm를 0.002 mol 8-oxyquinoline으로 2~3시간 전처리 한 다음 Carnoy 液에 고정하고 hydrolysis하여 aceto carmine으로 염색하였으며 수정현상은 인공수분 후 시간별로 고정 후 paraffin 包埋한 것을 12~15 μ으로 連續切片을 만들어 Heidenhain's iron-alum hematoxylin으로 염색하여 검경하였다. 또 受精力은 인공수분 후 주별로 과실의 비대과정을 측정하여 조사하였다. F1 종자의 발아 및 생장과 특성 등도 조사하였다.

結果 및 考察

屬間交雜 및 胚培養

黃金柚子와 탱자, 柚子와 탱자의 正逆 屬間交雜에서 얻어진 未熟胚珠를 授粉 후 2~15 주까지 採取하여 MS개량배지와 MT배지에 培養하였던 바 5주 이내의 胚珠培養은 성적이 좋지 않았고, 6주 후부터 MT배지에 호르몬 조성을 달리하여 배양하였던 바 캘러스형성은 Table 1, 2와 같은데 授粉 후 8주까지는 대체로 불량하였다. 黃金柚子에 탱자를 授粉 후 9주에서 캘러스형성은 2,4-D 0.1~1.0 mg/L에서 양호하였는데 탱자보다는 黃金柚子가, 黃金柚子보다는 F1(黃金柚子×탱자)이 더욱 양호하였다. 柚子에 탱자를 수분 후 9주에서 캘러스형성은 zeatin 0.01~3.0 mg/L, NAA 0.5 + zeatin 0.5, 1.0 mg/L, NAA 1.0 + zeatin 0.5 mg/L, NAA 3.0 + zeatin 0.5 mg/L에서 양호하였는데 柚子 〉 F1(柚子×탱자) 〉 탱자 順이였다.

Table 1. Effect of 2,4-D in Murashige and Tucker's medium on callus induction from immature ovule of Hwanggeumyooza, trifoliate orange, and F1 (Hwanggeumyooza × trifoliate orange).[a]

After pollination (week)	2,4-D (mg/L)	Hwanggeum yooza	trifoliate orange	Hwanggeum yooza × trifoliate orange
6	0.0	+	+	+
	0.1	++	+	+
	0.5	++	++	++
	1.0	++	+	++
	2.0	+	+	+
9	0.0	+	+	+
	0.1	+++	++	+++
	0.5	+++	+++	++++
	1.0	++	++	+++
	2.0	+	+	+
11	0.0	++	+	++
	0.1	+++	++	++
	0.5	++++	+++	+++
	1.0	+++	+++	++++
	2.0	+++	++	++
15	0.0	+	-	+
	0.1	++	+	++
	0.5	++	++	+++
	1.0	+++	++	+++
	2.0	+	+	++
15b	0.0	-(0)	-(0)	(0)
	0.1	-(0)	-(0)	(0)
	0.5	-(0)	-(0)	+(0)
	1.0	-(0)	-(0)	++
	2.0	-(0)	-(0)	+

[a]Callus formation (radius); - : none, +: ~1mm, ++: 1~3 mm, +++: 3~5 mm, ++++: above 5 mm.
[b]After taking out ovule and sterile, (0): plantlet from ovule.

黃金柚子나 屬間交雜(黃金柚子 × 탱자)의 授粉 후 15주 胚珠를 培養한 것에서는 캘러스형성과 胚發芽는 저조했으나 배주를 물에 씻은 후 치상하면 發芽는 현저하게 좋았다 (Figure 1A, B). 이는 배주 주위에 있는 물질이 발아를 억제한다고 사료된다.

種屬間交雜種의 胚 發芽試驗은 MT + 2,4-D 0.1~0.5 mg/L에서 실시한 결과는 Table 3과 같다. 黃金柚子 × 탱자(屬間交雜)의 F1 種子는 3년간 150粒 中 62粒이 발아하여

Table 2. Effect of plant growth regulators in Murashige and Tucker's medium on callus induction from immature ovule of yooza, trifoliate orange, and F1 (yooza × trifoliate orange).[a]

Plant regulator (mg/L)	*Citrus junos*	*Poncirus trifoliata*	*Citrus junos* × *Poncirus trifoliata*
NAA 0.01	++	+	+
0.1	+++	+	+
1.0	++(0)	+	+
3.0	++	+	+
Zeatin 0.01	++	+	+
0.1	+++	+	+
1.0	+++	+	++
3.0	+++	+	++
NAA 0.5 + Zeatin 0.5	+++	+	++
NAA 0.5 + Zeatin 1.0	+++	++	++
NAA 1.0 + Zeatin 0.5	++++	++	++
NAA 1.0 + Zeatin 1.0	++	+	+
NAA 3.0 + Zeatin 0.5	++++(0)	++	++
NAA 3.0 + Zeatin 1.0	++	+	+
2,4-D 0.5 + Zeatin 0.5	+	+	+
2,4-D 0.5 + Zeatin 1.0	+	++	++
2,4-D 0.5	+(0)	+	+(0)
2,4-D 1.0	+(0)	++	+

[a]Callus formation ; +: 10~20%, ++: 21~30%, +++: 31~40%, ++++: above 41%, (0): Plantlet formation from ovule.

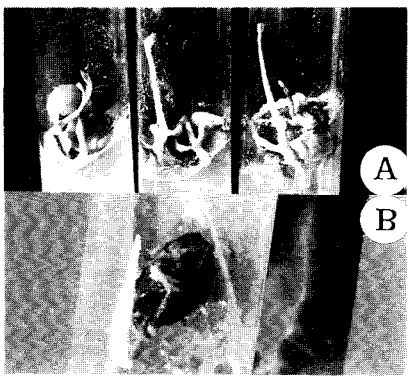


Figure 1. A, B. Embryo culture of hybrid of Hwanggeumyooza × trifoliate orange

41.3%, 탱자 × 黃金柚子(屬間交雜)의 F1 種子는 106粒 中 40粒이 발아하여 37.7%의 발아율로 兩親種子를 매장하였다가 파종상에 播種한 발아율(黃金柚子 65.8%, 탱자 66.7%)보다는 낮았지만 屬間交雜種子의 器內에서의 발아율은 잘 되는 편이었다.

屬間交雜 黃金柚子 × 탱자의 F1 植物 20個體 中 19個, 탱자 × 黃金柚子의 F1 식물 16個體 모두는 形態, 樹型이나 잎의 三葉型 모두가 탱자를 닮았는데(Figure 2) 黃金柚子 × 탱자로 屬間交雜한 組合 20個體 中 1個體만 黃金柚子를 닮았다. 그리고 三葉型 탱자와 같은 個體中에는 대부분이 탱자葉과 같이 三葉型이지만 中央葉이 크거나 二葉型 들이 간혹 섞이어 출현한다. 이와 같은 보고는 Cameron 등(1968)이 감귤과 탱자를 屬間 體細胞融合 후 雜種에서 三葉이 대부분 출현하여 탱자를 닮았다고 하였으며 또한 4배체(2n = 4× = 36)이였다고 하였다. Grossor 등(1988, 1994)은 오렌지와 탱자를 原形質體 融合으로 屬間 雜種植物을 誘導했고, F1의 분리에서 탱자와 같은 三葉型이 많이 출현하였다고 하였다.

Table 3. In vitro germination percentage of intergeneric hybrid of Hwanggeumyooza (HY) and trifoliate orange (TO) by reciprocal cross.

Year	Cross combination	No. of seed	No. of seed germinated	germination percentage
1993	HY × TO	70	29	41.4
1994	HY × TO	80	33	41.3
	TO × HY	50	18	36.0
1995	TO × HY	56	22	39.3
Total	HY × TO	150	62	41.3
	TO × HY	106	40	37.3
	HY[a]	120	79	65.8
	TO[a]	132	88	66.7

[a]Field test after burying underground.

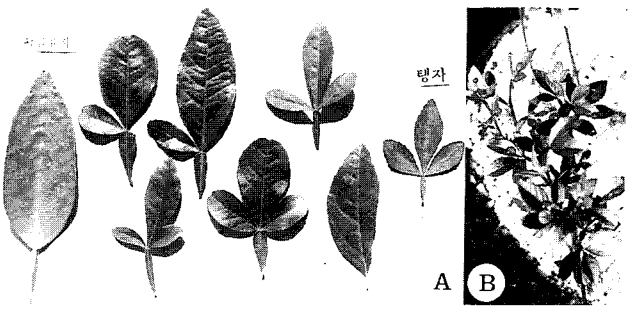


Figure 2. A: F1(Hwanggeumyooza × trifoliate orange); B: F1(trifoliate orange × Hwanggeumyooza).

F1식물들의 전체적인 優劣의 關係는 성장시켜 結果한 다음에 알 수 있겠지만 기존 硏究報告[1]와 本 實驗結果로 보아서 黃金柚子와 탱자의 屬間交雜 F1의 樹型, 葉型은 탱자가 優性임을 알 수 있다. 黃金柚子를 닮은 1個體는 不定胚(多胚)의 유래에서 출현하였는지는 結果 후 알 수 있겠다. 왜냐하면 柚子 不定胚는 43%, 탱자는 21.2%, 黃金柚子는 0.6%로 나타났기 때문이다.

屬間交雜에 의한 受精

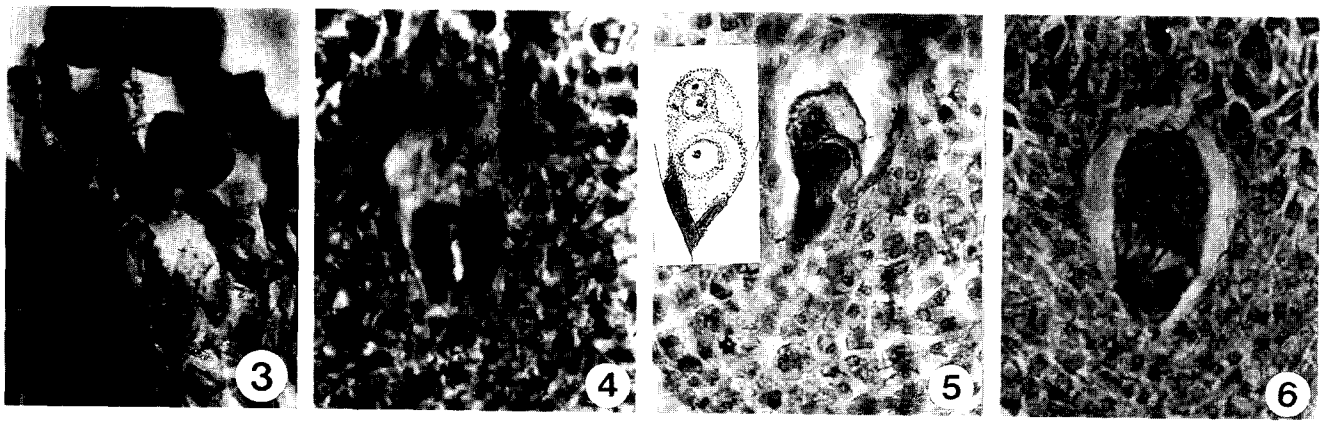


Figure 3. Growing pollen tube Trifoliate orange on stigma of Hwanggeumyooza at 4 hours after pollination.
Figure 4. Entering of pollen tube into synergid at 3 h after pollination.
Figure 5. Entering of sperm nucleus into polar nuclei at 48 h after pollination.
Figure 6. Entering of sperm nucleus into egg cell at 3 days after pollination.

Table 4. The fruit set percentage of HwanggeumYooza (HY) and trifoliate orange (TO) by intergeneric crossing.

Year	Cross combination	No. of flowers pollinated	No. of fruits set	Fruit set percentage
1994	HY × TO	95	20	21.1
	TO × HY	60	12	20.0
1993	HY × TO	392	48	12.2
	TO × HY	43	6	14.0
Total	HY × TO	487	68	14.0
	TO × HY	103	18	17.5

Table 5. The fruit set percentage of Hwanggeumyooza (HY) and trifoliate orange (TO) by self- and cross-pollination ('94).

Pollination	Species	No. of flowers pollinated	No. of fruits set	Fruit set percentage
Self	HY	22	10	45.4
	TO	29	8	27.6
Cross	HY	38	13	34.2
	TO	38	15	39.5
None	HY	64	2	3.1
	TO	70	1	1.4

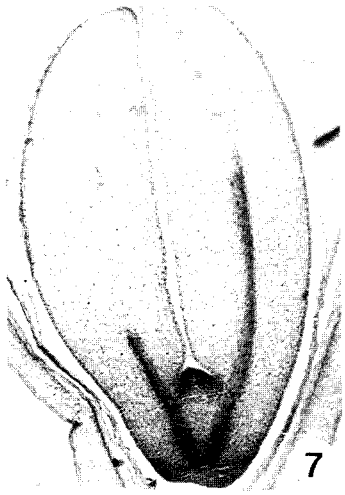
黃金柚子 × 탱자를 人工交雜하여 시간별로 채취하여 受精現象을 조사하였더니 授粉 후 3시간이면 花粉은 柱頭上에서 발아 시작하여 10시간 후면 花柱 上部(Figure 3)를 통과하며, 授粉 후 24~28시간이 되면 珠孔에 進入시작하고 38~40시간이 되면 花粉管은 珠孔內에 進入하여 媒助細胞를 뚫고 들어간다(Figure 4). 授粉 후 48시간이 되면 極核에 精核이 進入(Figure 5)하는데 이때 2개의 極核은 融合하기 시작한다. 授粉 후 3일이 되면 卵細胞에 精核이 進入하여 受精(Figure 6)이 되는데 多胚가 관찰되는 것도 있다. 授粉 후 4일이 되면 受精卵은 分裂하기 시작하고 7일이 되면 수십개의 세포로 된 原胚가 형성된다. 黃金柚子를 自家受精하여 受精되는 시간은 黃金柚子에 탱자를 屬間交雜한 경우의 시간과 비슷하지만 前者가 약간 빠르다.

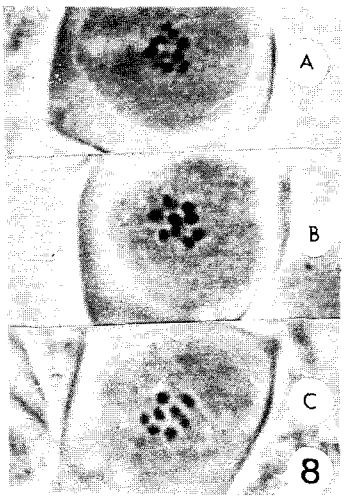
黃金柚子와 탱자의 正逆交雜을 2년간 하여 屬間 結實率을 보면 Table 4에서 보는 바와 같이 黃金柚子 × 탱자는 487花 中 48花가 結果되어 14.0%이였고, 탱자 × 黃金柚子는 103 花 中 18花가 結果되어 17.5%이였는데 해에 따라 母樹의 健康狀態, 着果數에 따라 차가 있다.

黃金柚子와 탱자의 自家, 他家 人工授粉한 뒤 被袋하였다가 結果率을 보면 Table 5에서 보는 바와 같이 自家授粉花數 중 黃金柚子는 22花 中 10花가 결과하여 45.4%이였고, 탱자는 29花 中 8花가 결과하여 27.6%이였으며, 他家授粉花數 중 黃金柚子는 38花 中 13花가 결과하여 34.2%, 탱자는 38花 中 15花가 결과하여 39.5%이였다. 그리고 人工除雄 후 授粉하지 않고 被袋한 것은 黃金柚子가 64花 中 2花가 結果하여 3.1%가, 탱자는 70花 中 1花가 결과되어 1.4%의 單爲結果되었다.

染色體 數

黃金柚子, 柚子, 탱자 모두 開花 13~14일 전경이 되면 減數分裂 中期(Fig. 7)가 되는데 모두 n=9이지만 染色體가 극히 작아 조사하기 어려웠다. 著者가 조사한 溫州밀감, 귤 등의 柑橘類도 生殖細胞의 染色體數는 모두 n=9이였다. 根端





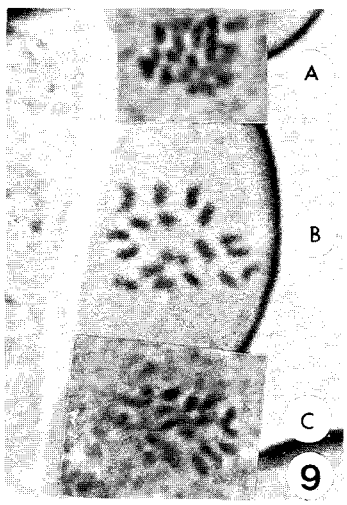


Figure 7. Mature embryo at 20 days after pollination.
Figure 8. Meiotic metaphase (n = 9) of yooza (A), HwanggeumYooza (B), and Trifoliate orange (C) at about 15 days before flowering.
Figure 9. Mitotic metaphase (2n = 18) of yooza (A), Hwanggeumyooza (B), and Trifoliate orange (C).

細胞(種子根)에서 調査한 體細胞 染色體數(Figure 9)는 3식물 모두 2n = 18이었지만 體細胞染色體 역시 작아서 세기가 매우 어렵다. 이상의 결과로 보아 黃金柚子와 탱자는 屬間交雜(自然狀態에서 結果는 5%이내)도 비교적 잘되고, 交雜種 F1 種子도 發芽가 잘 되며, 染色體數도 같기 때문에 앞으로 交雜種 F1 植物의 減數分裂도 正常的이고 結果도 잘 된다면 genome이 같다고 생각된다.

적 요

柑橘類 屬間交雜에 의하여 矮性化되고 耐寒性이 강한 新品種 개발에 대한 연구로서 黃金柚子와 탱자, 柚子와 탱자의 正逆交雜 및 雜種種子의 未熟胚珠 培養을 하였던 바 그 결과는 다음과 같다. 未熟胚珠의 callus형성은 탱자 < 柚子 < 黃金柚子 × 탱자 < 黃金柚子 순서로 양호했는데, NAA 1~3 mg/L + zeatin 0.5 mg/L 처리구에서 제일 좋았다. 黃金柚子와 탱자의 正逆屬間交雜 20주 후 器內에서의 發芽率은 黃金柚子 × 탱자의 잡종이 41.3%, 탱자 × 黃金柚子의 잡종에서는 37.7%를 보였다. 黃金柚子 × 탱자의 F1 잡종 95%와 탱자 × 黃金柚子의 F1 잡종 100%는 탱자를 닮았다. 黃金柚子 × 탱자의 授粉 후 3시간이면 花粉은 柱頭上에서 발아하고, 24~28시간이면 花粉管이 珠孔에 進入하며, 2일이면 極核과 受精하며, 3일이면 卵細胞와 受精한다. 屬間交雜의 結果率은 黃金柚子 × 탱자가 14.0%, 탱자 × 黃金柚子가 17.5%이었다. 黃金柚子와 탱자의 人工自家受精 結果率은 각각 45.4%, 27.6%이었으며 人工 他家受精 結果率은 34.2%, 39.5%이었고, 單爲結果率은 3.1%, 1.4%이었다. 또한 자연상태에서의 結果率은 각각 13.0%, 3.0% 이었다. 黃金柚子, 柚子, 탱자의 體細胞와 生殖細胞 染色體數는 모두 2n = 18, n = 9이었다.

인 용 문 헌

Cameron JW, Frost HB (1968) Genetics, breeding, and nucellar embryony. *In* W Rewther, LD Batchelor, and HJ Webber (eds). The *Citrus* Industry, revised ed, Vol II. Univ Calif Div Agri Sci, Berkley, Calif, pp 325-381

Chaturvedi HC, Mitra GC (1974) Clonal propagation of citrus from somatic callus cultures. HortScience **9**: 118-120

Chaturvedi HC, Mitra GC (1975) A shift in morphogenetic pattern in *Citrus* callus tissue during prolonged culture. Ann Bot **39**: 683-687

제주시험장 시험연구보고서 (1987-1988) 제주시험장

Esen A, Soost RK (1974) Polyphenol oxidase-catalyzed browning of young shoot extracts of *Citrus* taxa. J Am Soc Hort Sci **99**: 484-489

Esen A, Soost RK (1974) Inheritance of browning of young shoot extracts of *Citrus*. J Hered **65**: 97-100

Esen A, Geraci G, Soost RK (1975) Inheritance of coagulation of young shoot homogenates in the *Citrus*. J Hered **66**: 233-236

Esen A, Soost RK (1976) Peroxidase polymorphism in *Citrus*. J Hered **67**: 199-203

Grinblat U (1972) Differentiation of *Citrus* stem in vitro. J Am Soc Hort Sci **97**: 599-603

Handa T, Ishizawa Y, Oogaki C (1986) Phylogenetic study of fraction 1 protein in the genus *Citrus* and its close related genera. Jap J Genet **61**: 15-24

Grosser JW, Gmitter Jr FG, Chandler JL (1988) Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus* sinensis cv. Hamlin and Poncirus trifoliata cv Flying Dragon. Plant Cell Reports **7**: 5-8

Grosser JW, Louzada ES, Gmitter Jr FG, Chandler JL (1994) Somatic hybridization of complementary *Citrus* rootstocks: five new hybrids. HortScience **29**: 812-813

Iglesias L, Lima H, Simon JP (1974) Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. J Hered **65**: 81-84

Kato Y (1980) Studies on juice vesicles isolated from mature and immature *Citrus* fruit. 1. Callus induction and cell differentiation in *Citrus* hassaku hort. ex Tanaka. J Japan Soc **49**: 36-40

Kesterson JW, Pieringer AP, Edwards GJ, Hendrickson R (1964) Application of gas-liquid chromatography to the *Citrus* leaf oils for the identification of kinds of *Citrus*. Proc Am Hort Sci **84**: 199-203

Kobayashi S, Ikeda I, Nakatani M (1979) Studies on the nucellar embryogenesis in *Citrus*. II. Formation of the primordium cell of the nucellar embryo in the ovule of the flower bud, and its meristemic activity. J Japan Soc Hort Sci **48**: 179-185

이만상, 이중호, 박공열, 진성계 (1992) 種屬間交雜에 의한 柚子나무 矮性化에 關한 硏究(I). 농진청특정과제 요약집 : 143-144

이만상, 이중호, 권태오, 진성계, 박공열, 박문영 (1993) 種屬間交雜에 의한 柚子나무 矮性化에 關한 硏究(II). 농진청특정과제 제 2년차 완결보고서: 1-98

Mitra GC, Chaturvedi HC (1972) Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of in vitro-grown emasculated flower buds of *Citrus* spp. Bull. Torrey Bot, Club **99**: 184-189

Moore GA (1985)Factors Affecting in vitro embryogenesis from undeveloped ovules of mature *Citrus* fruit. J Am Soc Hort Sci **110**: 66-70

문두길 (1987) 제주 재래 감귤의 동위효소 분석과 교잡실생의 조기 식별방법에 관한 연구. 서울대학교 박사학위논문

Navarro L, Ortiz JM, Juarez J (1985) Aberrant *Citrus* plants obtained by somatic embryogenesis on nucelli cultured in vitro. HortScience **20**: 214-215

農業技術大系. 果樹編 7(特産果樹) ゆず 栽培の基礎. 農山漁村 文化協會: 1-6

朴用厚 (1976) 濟州島誌. 白昧社: 110-113

申瑾澈 (1972) 濟州柑橘의 史的 考察. 農村振興聽

宋沅燮 (1988) 柚子의 器內不定胚發生에 關한 硏究. 圓光大學校 大學院 博士學位論文

(1995년 6월 1일 접수)