

유자의 성숙종자 배양 및 종자유래 배발생 현탁배양으로부터 체세포배발생을 통한 유자의 식물체 재생

민성란 · 최명석¹ · 정원중 · 유장렬*
한국생명공학연구원 식물세포공학연구실
¹경상대학교 산림과학부

Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Mature Seed Cultures and Seed-Derived Embryogenic Suspension Cultures of Yuzu

MIN, Sung-Ran · CHOI, Myung-Suk¹ · JEONG, Won-Joong · LIU, Jang-Ryol*
Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and
Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-333, Korea
¹Division of Forest Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT Off-white, friable embryogenic calluses were formed on the internal integument of mature seeds of yuzu (*Citrus junos*) cultured on Murashige and Skoog's basal medium at a frequency of 1.2%. Embryogenic calluses were proliferated when cultured on medium with 1 mg/L 2,4-D. Upon transfer to medium with 0.1 mg/L kinetin, embryogenic calluses produced numerous somatic embryos. Embryogenic suspension cultures were established by placing embryogenic calluses into liquid medium with 1 mg/L 2,4-D. When plated onto medium with 0.5 mg/L ABA, embryogenic cells developed into somatic embryos at a high frequency, and then regenerated into plantlets. Plantlets were successfully transplanted to potting soil and grown in a greenhouse.

Key words : *Citrus junos*, rutaceae, somatic embryo

서 론

Polyembryo는 한 개의 종자 내에 존재하는 여러 개의 배를 일컫는다 (Maheswari 1950). 이러한 polyembryo는 첫 번째 접합자 분열 전후에 형성되지만 배의 발달이 진행되면서 퇴화하기도 한다 (Bacchi 1943). 따라서 polyembryo가 나타나는 종은 *Citrus*, *Magnifera* 등을 제외하고는 매우 드물다. 귤 (*Citrus*)속의 많은 종들은 자연상태에서 주심 (nucellus)조직으로부터 polyembryo를 형성한다 (Bacchi 1943). 귤속에 속

한 종들의 체세포배발생에 대한 연구는 대부분 주심조직이나 미숙배주를 분리하여 사용하였으나 (Maheswari and Ranganswamy 1958; Ling and Iwamasa 1997), 성숙배를 배양하여 체세포배발생과 기관발생을 통한 식물체 재분화도 이루어졌다 (Beloualy 1991). 이밖에 주심이나 배주가 아닌 다른 조직으로부터 캘러스를 거치지 않고 직접 체세포배를 유도한 바도 있으며 (Litz et al, 1985), 레몬 (*C. limon*)과 자몽 (*C. paradisi* Macf.) 잎의 원형질체로부터 식물체를 재분화하였고 (Tusa et al, 1990; Ohgawara et al, 1989), *C. reticulata*와 *Citropsis gabunensis*의 원형질체에 전기적 융합을 통해 체세포 잡종을 만들기도 하였다 (Ling and Iwamasa 1989).

유자나무 (*C. junos*)는 크기가 4~5 m에 달하는 인도와 중

*Corresponding author Tel 042-860-4430

E-mail jrlu@kribb.re.kr

국원산의 상록 소교목으로서 열매에 좋은 향기가 있으며 열매를 약용 및 음료로 이용하는 중요한 과수이다. 우리나라에서는 제주도와 전남의 일부지역에서 재배되고 있다. 유자의 조직배양은 수분 전후의 미숙배주 배양을 통한 체세포배발생 (Song et al. 1990)과 접합배로부터 기관분화를 통한 식물체 재분화 (Park et al. 1995), 유자와 탱자의 교배과실의 미숙배주 배양에 의한 접합자 잡종개체의 특성을 조사하기도 하였다 (Oh and Song 1996). 우리는 예비실험에서 유자 성숙배의 자엽 절편을 여러 농도의 2,4-D를 첨가한 배지에 배양하였으나 배발생캘러스를 얻을 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 유자의 성숙종자를 배양하여 종자내피에서 형성된 배발생 캘러스로부터 체세포배를 생산하거나 현탁배양계를 통하여 대량의 체세포배를 생산할 수 있도록 함으로써 유자의 유용유전 자원을 기내 보존하고 급속 증식시킬 수 있는 시스템을 확립코자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

전남 진도지역에서 재배된 5~7년생 유자나무 (*Citrus junos* Siebold ex Tanaka)의 완숙된 열매 (11월 채취)로부터 종자를 분리하여 70% 에탄올에 30초, 20% 상업용 표백제 (유한락스: 유효염소 함유량: 4%) 용액에 15분간 표면 살균한 후 멸균증류수로 4~5회 수세하여 재료로 사용하였다.

배양배지 및 배양조건

기본배지는 100 mg/L myo-inositol, 0.4 mg/L thiamine · HCl, 3% sucrose 및 0.4% Phytigel (Sigma)을 첨가한 MS (Murashige and Skoog 1962) (MSBM)로 조제하였다. 배지는 87×15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 25 mL씩 분주하여 사용하였다. 각 처리구는 페트리디쉬당 9개의 종자를 치상하여 10반복으로 구성하였다. 특별한 언급이 없는 한 모든 배양은 25°C 암소에서 행하였다. 또한 고체배지라 함은 0.4% Phytigel을 첨가하여 제조한 배지를, 액체배지라 함은 Phytigel을 첨가하지 않은 배지를 일컫는다.

종자발아, 배발생 캘러스 증식, 현탁배양

종자발아는 MSBM에서 행하였다. 종자 유래 배발생 캘러스는 1 mg/L 2,4-D를 첨가한 MS 고체배지 (MS1D)에서 4주간격으로 계대배양하였다. 현탁배양은 50 mL의 MS1D 액체배지를 담은 250 mL 삼각플라스크에 약 1 g의 계대배양된 배발생캘러스를 넣은 후 이를 gyratory shaker (100 rpm) 위에 놓고 1주일 간격으로 계대배양하였다. 현탁배양된 세포

로부터 체세포배를 유도하기 위하여 직경 약 1 mm 크기의 세포괴를 스테인레스체 (Sigma)로 걸러 MSBM 액체배지 혹은 MS배지에 0.5 mg/L ABA를 첨가한 액체배지 (MS0.5A)를 담은 삼각플라스크에 넣었다. 이 삼각플라스크를 gyratory shaker (60 rpm) 위에 놓고 1~2주 배양하면서 체세포배의 발달여부를 관찰하였다.

식물체 재생

현탁배양된 세포괴로부터 발달된 체세포배로부터 식물체를 유도하기 위하여 MSBM 혹은 MS배지에 0.1 mg/L kinetin을 첨가한 고체배지 (MS0.1K)에 체세포배를 치상한 후 2,000 lx (cool-white fluorescent lamps)하에서 16시간 일장조건으로 배양하였다. 재생된 식물체는 vermi culite:peatmoss가 1:1로 섞인 토양으로 옮겨서 생육상 (27°C 낮/22°C 밤, 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ cool-white fluorescent lamps, 광주기 16시간)에서 유지된 후 온실에서 육성되었다.

결과 및 고찰

배발생캘러스의 형성, 계대배양, 식물체로의 재생

MS 기본배지에 치상한 종자는 배양 1주일 후부터 외종피가 벌어지기 시작하여 다양한 발달상태에 있는 polyembryo가 5~15개씩 형성되었으며 일부 상대적으로 더 발달된 배는 발아중이거나 식물체로 발달하였다 (Figure 1A, B). Polyembryo로부터 발아된 배는 배양 2주 후에 자엽과 유근을 가진 2 cm 크기의 유식물체로 발달하였고 유식물체의 형태는 배축이 길며 자엽을 비롯한 잎의 크기가 작고 두꺼우며 직근을 가졌다 (Figure 1B). 한편, MS 기본배지에 치상된 종자 중 극히 일부의 종자 (1.2%) 내피에서는 회고 부서지기 쉬운 캘러스가 형성되었는데 (Figure 1C) 이들 캘러스는 성장조절제가 함유되지 않은 배지에서 완전한 체세포배로 발달하였으므로 배발생캘러스임을 확인할 수 있었다. 이들 배발생 캘러스는 MS1D 고체배지에서 증식되었다 (Figure 1D). 이들 캘러스의 일부를 MS 기본배지로 옮겨서 체세포배로의 발달을 유도하였는데 대부분의 캘러스 표면으로부터 구상배 (globular embryo)가 발생하여 어뢰형 및 자엽기의 배로 발달하였다 (Figure 1E). 어뢰형과 자엽기의 체세포배를 MSBM 혹은 MS0.1K 배지에 치상하였을 때 MSBM보다는 MS0.1K 배지에서 뿌리의 발생이 효과적이었다 (Figure 1F). 5~7 cm로 자란 이들 유식물체는 90%이상 순화되어 토양으로 옮겨졌으며 온실에서 육성되었다 (Figure 1G).

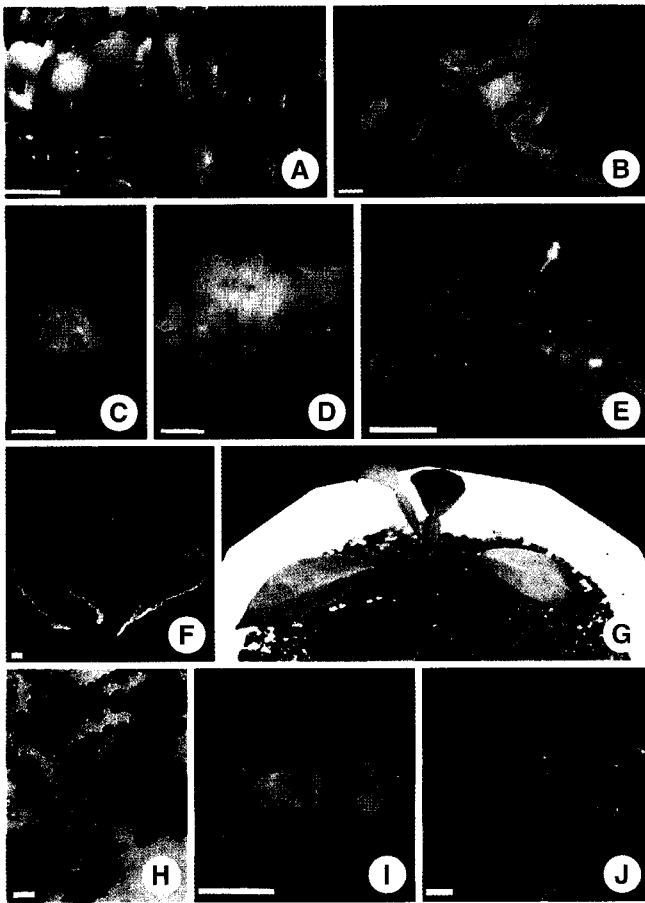


Figure 1. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *C. junos*. A, Polyembryos developed in one seed; B, Germination of mature seed; C, Embryogenic callus formed on the internal integument of seed; D, Subcultured off-white, friable embryogenic calluses; E, Numerous somatic embryos developed from embryogenic calluses; F, Plantlets regenerated from somatic embryos; G, Regenerant transplanted to potting soil; H, Embryogenic cell suspension cultures established from subcultured embryogenic calluses; I, Somatic embryos developed from cell suspension cultures; J, Plantlets regenerated from cell suspension cultures via somatic embryogenesis. Scale bars: 2 mm (A, B, C, D, E, F, I, and J) and 600 μ m (H).

배발생 현탁배양계 확립 및 이용범위

MS1D 고체배지에서 증식한 배발생 캘러스는 현탁배양하였을 때 미세한 세포괴로 유지되었으나 (Figure 1H), 계대배양 시기를 늦추면 현탁배양중에도 일부 체세포배가 형성되기도 하였다. 확립된 현탁배양세포로부터 체세포배 발생을 위해 MS 기본 액체배지에 배양하였을 때 배양 1주부터 체세포배 발생이 관찰되었는데, 특히 MS0.5A 배지에서 발달된 체세포배는 자엽의 수나 모양이 전형적 (typical)이었으며 날개로 분리하기가 용이하였다 (Figure 1I). 액체배지에서 형성된 체세포배는 MSBM 또는 MS0.1K 고체배지에서 체세포배발생을 거쳐 정상적인 식물체로 재생하였다 (Figure 1J).

종자의 내피에서 형성된 희고 부서지기 쉬운 캘러스는 생

장조절제가 첨가되지 않은 곳에서 완전한 체세포배로 발달하므로 배발생 캘러스로 입증되었지만 이의 기원은 주심조직 유래의 아주 어린 상태의 polyembryo가 내종피에 붙어서 캘러스화한 것으로 추정된다. 이러한 현상은 주심조직을 생장조절제가 첨가되지 않은 배지에 치상하였을 때 배발생의 초기 단계의 특징으로 캘러스의 초기 증식이 이루어지고 이어서 배 발달이 일어난다는 보고 (Rangaswamy 1958)가 이를 뒷받침 해준다. 이들 캘러스는 MS1D 배지에서 배양하였을 때 초기에는 적응하지 못하고 일부 갈변되었으나 계대배양이 지속됨에 따라 적응하여 성장 속도가 빨라졌다. 미숙배주를 사용한 Song 등 (1990)의 실험재료와는 달리 본 연구에서는 성숙종자 내피에서 발견된 배발생 캘러스로부터 식물체 재분화를 유도하였다. 또한 Park 등 (1995)이 확립한 유자의 식물체 재분화 시스템은 토양순화 단계까지 약 30주가 소요된다고 했으나 본 연구에서 확립한 체세포배발생 시스템은 15주 정도로 생육기간을 훨씬 단축할 수 있었다. 그러나 본 연구를 위한 예비실험에서 유자 성숙배의 자엽 절편을 여러 농도의 2,4-D를 첨가한 배지에서 배양하였을 때 배발생캘러스를 얻을 수 없었다. 종자 한 개에서 형성되는 polyembryo 수에는 한계가 있기 때문에 본 연구에서 확립한 체세포배발생 시스템을 이용하여 체세포배를 대량생산하는 편이 훨씬 많은 수의 개체를 얻을 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서 확립된 체세포배발생에 의한 유자의 식물체 재생 시스템은 유자의 유용한 유전자원 (germplasm and elite plants)의 기내 보존과 급속 증식의 수단으로 활용될 수 있을 것이며, 향후 *Agrobacterium*과의 공동배양 혹은 particle bombardment에 의한 유자의 형질전환에도 이용될 수 있을 것이다.

적 요

유자의 성숙종자를 MS 기본배지에 치상하여 종자의 내피에서 주심조직 유래의 희고 부서지기 쉬운 배발생캘러스가 1.2%의 빈도로 형성되었다. 이 캘러스는 1 mg/L 2,4-D를 첨가한 MS배지에서 증식되었다. 증식된 캘러스를 0.1 mg/L kinetin을 첨가한 MS 배지에 옮겼을 때 많은 수의 체세포배가 형성되었다. 배발생캘러스를 1 mg/L 2,4-D를 첨가한 액체배지에 넣어 배발생 현탁배양계를 확립하였다. 배양된 현탁배양세포를 0.5 mg/L ABA를 첨가한 고체배지에 평판하였을 때 높은 빈도로 체세포배로 발달하였으며 MS 기본배지 혹은 1 mg/L kinetin 첨가배지에서 소식물체로 발달하였다. 소식물체는 성공적으로 토양으로 옮겨서 온실에서 육성되었다.

사사 - 본 연구는 농진청의 BioGreen 21 및 한국과학재단 지정 식물대사연구센터의 과제로 지원되었음.

인용문헌

- Bacchi O** (1943) Cytological observation in *Citrus*. III. Megasporogenesis, fertilization, and polyembryony. *Bot Gaz* **105**:221-225
- Beloualy N** (1991) Plant regeneration from callus culture of three *Citrus* root stocks. *Plant Cell Tiss Org Cult* **24**:29-34
- Ling JT, Iwamasa M** (1989) Somatic hybridization between *Citrus reticulata* and *Citropsis gabunensis* through electrofusion. *Plant Cell Rep* **13**:493-497
- Ling JT, Iwamasa M** (1997) Plant regeneration from embryogenic calli of six *Citrus* related genera. *Plant Cell Tiss Org Cult* **49**:145-148
- Litz RE, Moore GA, Srinivasan C** (1985) *In vitro* system for propagation and improvement of tropical fruits and palm. *Hort Rev* **7**:157-200
- Maheswari P** (1950) An introduction to the embryology of angiosperms, McGrawHill Book Co, Inc, New York
- Maheswari P, Ranganswamy NS** (1958) Polyembryony and *in vitro* culture of *Citrus* and *Mangifera*. *Ind J Hort* **15**:275-286
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:478-497
- Oh SD, Song WS** (1996) Characteristics of hybrid plants obtained by zygotic embryogenesis from immature ovule crossed between korean native *Citrus junos* and *Poncirus trifoliata*. *J Kor Soc Hort Sci* **37**:428-434
- Ohgawara T, Kobayashi S, Ishii S, Yoshinaga K, Oiyama I** (1989) Somatic hybridization in *Citrus*: navel orange (*C. sinensis* Osb.) and grape fruit (*C. paradisi* Macf.). *Theor Appl Genet* **78**:609-612
- Park MH, Chung HH, Lee SY, Kim HS** (1995) Plant regeneration from zygotic embryo-derived callus in *Citrus junos* SIEB. *Korean J Plant Tissue Culture* **22**:189-194
- Rangaswamy NS** (1958) Culture of nucellar tissue of *Citrus in vitro*. *Experientia* **14**:11-112.
- Song WS, Kim CS, Eun JS, Park EH, Yoo SO** (1990) Studies on the somatic embryogenesis in yooza (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka). *Korean J Plant Tissue Culture* **17**:255-265
- Tusa N, Grosser JW, Gunitter FG** (1990) Plant regeneration of 'Valencia' sweet orange, 'Femminello' lemon, and the interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. *J Amer Soc Hort Sci* **115**:1043-1046

(접수일자 2002년 6월 20일)