

석사학위 논문

삼보감 (*Citrus sulcata* Takahashi)과
오렌지 (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck var
Cara Cara Red Navel)와의
원형질체 융합



제주대학교 대학원
농화학과

양 경 애

1999년 12월

삼보감 (*Citrus sulcata* Takahashi)과
오렌지 (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck var
Cara Cara Red Navel) 와의
원형질체 융합

지도교수 : 유 장 결

양 경 애

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함

1999년 12월

양경애의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 대학원

1999년 12월

Protoplast Fusion between
Citrus sulcata Takahashi and *Citrus sinensis* (L.)
Osbeck var. Cara Cara Red Navel

Kyung-Ae Yang

(Supervised by Professor Zang-Kual U.)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1999. 12

약 어

- 2,4-D : 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid ; $C_8H_6OCl_2$
BAP : N_6 -benzylaminopurine ; $C_{12}H_{11}N_5$
CCRN : *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel
CPW : Cell and Protoplast Washing
DMSO : Dimethylsulfoxide
DNA : Deoxyribonucleic acid
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
FDA : Fluorescein diacetate
GA₃ : Gibberellic acid; $C_{19}H_{22}O_8$
MES : (2-N-Morpholino) Ethane sulfonic acid
NAA : α -Naphthalene acetic acid; $C_{12}H_{10}O_2$
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEG : Polyethylene glycol
PVP : Polyvinylpyrrolidone
RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS : Sodium dodecyl Sulfate

목 차

< 표목차 >

< 그림목차 >

< Summary >

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 공 시 재 료	4
2. 원형질체 분리 및 융합	6
3. 원형질체 배양	11
4. 식물 재분화	11
5. Genomic DNA 추출과 RAPD를 통한 융합여부 분석	15
III. 결과 및 고찰	18
1. 식물 원형질체 수율	18
2. 원형질체 정제 및 융합 조건	22
3. 원형질체 배양	24
4. 식물 재분화	27
5. RAPD를 이용한 융합확인	30
IV. 요 약	35
< 참고 문헌 >	

표 목 차

- Table 1. The composition of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel callus subculture medium.
- Table 2. The composition of 1/4 MS medium for *Citrus sulcata* Takahashi seed germination.
- Table 3. The composition of the enzyme solution for protoplast isolation.
- Table 4. The composition of PEG solution for protoplast fusion.
- Table 5. The composition of CPW salts.
- Table 6. The composition of fusion-stimulating solution A and B.
- Table 7. The composition of protoplast washing and culture medium.
- Table 8. The composition of 0.146M EME medium for protoplast culture.
- Table 9. The composition of embryo enlargement medium.
- Table 10. The composition of embryo germination medium.
- Table 11. The composition of multi-adventitious shoot induction medium.
- Table 12. The composition of the root induction medium.
- Table 13. The effect of enzyme concentration on the protoplasts yield of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel callus.
- Table 14. The effect of enzyme concentration on the protoplast yield of *Citrus sulcata* Takahashi mesophyll cell.
- Table 15. The effect of PEG on protoplast fusion ratio.
- Table 16. The effect of protoplast density on cell development.
- Table 17. The primers used for RAPD of *Citrus sulcata* Takahashi and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel.

그림 차례

Figure 1. The samples used for protoplast fusion.

Figure 2. The change of protoplast yield depending on leaf age.

Figure 3. The change of protoplast yield depending on callus subculture period.

Figure 4. The relation between protoplast yield and enzyme treatment time.

Figure 5. The protoplasts of *Citrus sulcata* Takahashi and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel.

Figure 6. The protoplast fusion between *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel and *Citrus sulcata* Takahashi.

Figure 7. The process of protoplast development from naked protoplast to whole plant.

Figure 8. The primers selected for RAPD to confirm protoplast fusion between *Citrus sulcata* Takahashi and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel.

Figure 9. The specific band patterns of fused plant and non-fused plant, arrows indicating the DNA bands of the fused plant.

Summary

The purpose of this paper is to establish the method of protoplast fusion between 'Citrus sinensis (L.) Osbeck var Cara Cara Red Navel (CCRN)' and 'Citrus sulcata Takahashi (Sambogam)': CCRN has useful genetic characteristics but is not suitable to grow in Cheju due to the lack of cold tolerance. On the other hand, Sambogam is one of domestic varieties characterized by last harvest and strong uptake of nutrient. The enzyme composition for protoplast isolation, and the conditions of protoplast fusion and cultivation were investigated.

1. The optimum enzyme composition for protoplast isolation was 0.5% Cellulase, 0.5% Macerozyme and 0.1% Pectolyase for Sambogam, and 0.3% Cellulase, 0.3% Macerozyme and 0.1% Drieselase for CCRN, giving the protoplast yield of $\sim 1 \times 10^6$ protoplast/ml. The best plant materials could be obtained from young matured leave (1~2 months old) of Sambogam and 4-week old callus of CCRN.

2. The optimum protoplast density for fusion and culture was $6 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^5$ protoplast/ml. The same volume of protoplast sample and PEG brought about the best fusion.

3. One of the most important factors to get good plantlets was to cultivate the protoplast under the dark condition until embryo formation (6 weeks). If the protoplast were cultivated under the light condition then microcalli grew loosely and finally died not to

form embryo. The formed embryos were grown under the light condition for greening.

4. Among 21 arbitrary primers, 6 primers (OPH-04 GGAAGTCGCC, OPM-13 AGCGTTCACTC, OPN-07 CAGCCCAGAG, OPH-15 AATGGCGCAG, OPAT-04 TTGCCTCGCC, OPAT-13 CTGGTCCAAG) showing different PCR band pattern between Sambogam and CCRN were selected. Using the selected primers, it was conform by the RAPD technique that the obtained plantlet was fused with Sambogam and CCRN.



I. 서론

감귤은 세계적으로 중요한 과실수 중의 하나이다. 1998년 FAO의 통계에 의하면, 전세계의 감귤재배면적은 1,601,679 ha에 달하고, 우리 나라의 경우 제주도에 국한되어 있지만, 25,860 ha로 전세계 재배면적의 3.6%를 차지하고 있다. 제주도에 생산되는 감귤의 대부분은 국내에서 소비되고 있고, 최근 들어 미국, 일본, 러시아, 인도네시아, 홍콩, 사이판, 괌 등으로 수출되고 있는데, 전체 제주도 농업 조수익의 60% 정도를 차지하고 있다('98 농림통계연보). 농산물 시장 개방화 물결에 의해 수입량 역시 계속 증가하고 있어서 기존의 감귤 품질만으로는 경쟁력을 갖기 어려워지고 있다. 경쟁력을 갖추기 위해서는 수입되는 감귤류의 90%를 차지하면서 국내소비자들의 입맛에도 꽤 길들여진 오렌지의 특성을 포함하는 품종을 육성하는 것이 바람직하다. 하지만, 오렌지를 직접 도입하여 재배하기에는 생육 온도가 제주도 감귤보다 높아서 적합하지 않다. 이런 환경적응적인 측면의 극복은 오렌지와 제주도에 자라는 감귤간의 잡종을 만들어냄으로써 해결할 수 있다.

만감류 계통인 '삼보감'의 경우 내한성과 수세가 강하고 해거리가 적어서(한해룡 등, 1992), 제주도의 환경에서 생육하기 어려운 오렌지의 단점을 보완할 수 있는 품종이다. 따라서, 이 두 품종간의 우수성을 동시에 발현시킨다면, 제주도에 생육이 가능하면서도 오렌지 품종의 특성을 지닌 경제성을 갖춘 품종이 될 것이다.

잡종을 만드는 방법으로는 원형질체 융합법이 매우 유용하다. 이는 관행의 교잡육종법으로 불가능한 종속간의 잡종도 창출해 낼 수 있고, 신속하게 새 품종을 얻을 수 있는 장점도 있다.

이와 같은 실험이 가능하게 된 원형질체에 관한 연구는, 1882년 Klercer에 의해서 맨처음 이루어졌다. 그에 의해 원형질 막분리가 이루어진 사탕무 뿌리 세포로부터의 기계적인 방법으로 식물 원형질체가 최초로

분리되었던 것이다. 그러나 거기에서 얻을 수 있는 원형질체의 양이 대단히 적어서 별 진전을 가져오진 못했다. 이후, 1960년 Cocking에 의해서 기계적인 방법이 아닌 *Myrothecium*균 (fungus)에서 분리된 cellulase 효소처리를 통해 살아있는 원형질체를 아주 다량으로 분리할 수 있는 방법이 초본 식물 원형질체에 대하여 성공을 거둔 이래 오늘날까지 수많은 연구를 가능하게 했다. 원형질체 융합에 대한 보고는 1909년 Kuster에 의해서 물리적인 방법으로 이루어진 이래 뚜렷한 진척이 없다가 1970년에 Power가 질산나트륨을 융합물질로 사용하여 옥수수에서의 융합을 성공시킨데 이어, 1972년 Carlson 등에 의해 담배 종 *Nicotiana glauca*와 *Nicotiana langsdorffi* 간에서 이루어졌고, 1978년 Gosch와 Reinert에 의해서 *Atropa belladonna* cv. *Lutea Döll*과 *Petunia hybrida* cv. *Satellite*의 속간 잡종체가 출현하게 되었다. 감글의 원형질체로부터 새로운 식물까지의 재분화가 이루어진 것은 Vardi (1975, 1982)를 시작으로 하여 Vardi와 Galun (1982, 1988), Kobayashi (1988) 그리고 Grosser (1987, 1988, 1992, 1993, 1996), Louzada (1993) 등에 의해 현재까지도 활발하게 이루어지고 있으며, 감글세포질 잡종은 100종 이상에 이른다 (Grosser, 1990). 이외에도 Ohgawara와 Kobayashi 등 (1985, 1991), Hansan Basri Jumin과 Nobumasa Nito (1995, 1996)의 연구와 Kaniaki Sugawar (1995)의 연구들이 감글 속의 원형질체 융합을 통한 형질전환을 발전시켰다. 융합으로 얻은 식물체 잡종은 *Nicotiana*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Petunia*, *Daucus*, *Solanum*, *Brassica*, *Medicago* 등의 10여 속(屬)에 대해서 알려져 있는데 이 중 교목성으로는 감글류가 유일하다.

최근 재조합DNA 기술이 발달하여 이를 이용한 형질 전환이 성행하고 있는 하나 특허가 걸려 있는 유전자를 사용하면서 제기되는 문제점이나 유전자 획득의 어려움 등이 있다. 이에 비해 원형질체 융합법을 통한 육종은 식물체에 내재하는 좋은 형질을 갖는 새로운 품종을 생겨나게 하면서도 비교적 값싸게 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다. 뿐만 아니라 이제까지 재래교잡 육종에서 크게 벗어나지 못한 감글류에 대한 생명 공학적 기법을 이용한 육종 기술의 도입이라는데도 의의가 있다. 하지만, 원형질체 융합

은 원형질체로부터 완전한 식물체의 기능을 갖게 하는 데까지의 난점을 풀어야 하는 어려움이 있다. 따라서 오렌지와 삼보감의 원형질체 분리 조건과 원형질체 융합을 시작하여 완전한 식물체를 얻는 데까지의 조건을 단순화하고, 융합체를 찾기 위하여 Random Amplified Polymorphic DNA 기법을 감귤류에서 확립하는데 본 연구의 목적이 있다.



II. 재료 및 방법

1. 공 시 재 료

1) 오렌지 캘러스 (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel)

시료로 사용한 오렌지 캘러스는 미국 플로리다주에 있는 감귤연구소 (Citrus Research and Education Center, CREC) 에서 분양받은 CCRN 캘러스를 계대배양 배지 (Table 1)에 6주마다 계대배양하여 증식된 것 (Figure 1a) 을 사용했다.

Table 1. The composition of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel callus subculture medium.

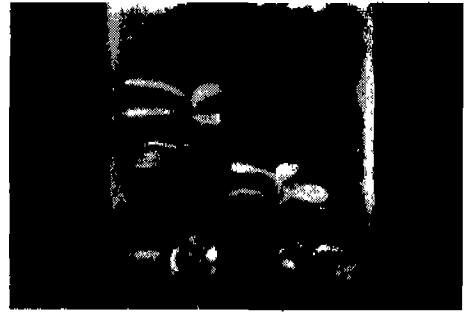
compound	g / liter	compound	g / liter
NH ₄ NO ₃	0.825	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.000025
KNO ₃	0.95	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.000025
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.185	Myo-inositol	0.1
KH ₂ PO ₄	0.075	Thiamine-HCl	0.01
K ₂ HPO ₄	0.01	Pyridoxine-HCl	0.01
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.185	Nicotinic acid	0.005
KH ₂ PO ₄	0.075	Glycine	0.002
K ₂ HPO ₄	0.01	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.44
KCl	0.75	Na ₂ EDTA	0.0745
H ₃ BO ₃	0.0062	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0557
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0168	Sucrose	50.0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0086	Malt extract	0.5
KI	0.00083	Agar	8.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00025	pH	5.8

2) 삼보감 (*Citrus sulcata* Takahashi) 의 유묘

제주도 감귤 시험장에서 재배되고 있는 삼보감의 종자를 채취하여 표면 살균한 뒤, 멸균수로 4~5회 세척하여 27 °C, 2,500 lux, 1/4 MS 배지 (Table 1) 에서 발아시키고 1 ~ 2 개월 배양하여 얻은 유묘엽 (Figure 1b)을 원형 질체 분리에 사용하였다.

Table 2. The composition of 1/4 MS medium for *Citrus sulcata* Takahashi seed germination.

compound	g / liter	compound	g / liter
NH ₄ NO ₃	0.0415	KI	0.0002075
KNO ₃	0.475	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0000625
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.0925	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0000625
KH ₂ PO ₄	0.0375	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0000625
K ₂ HPO ₄	0.005	Fe-EDTA Na·Fe·3H ₂ O	0.0422
H ₃ BO ₃	0.00015	Sucrose	10
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0042	Agar	6
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.00215	pH	5.8



a: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var.
Cara Cara Red Navel callus

b. *Citrus sulcata* Takahashi

Figure 1. The samples used for protoplast fusion.

2. 원형질체 분리 및 융합



1) 원형질체 분리용 효소액

원형질체를 분리하기 위한 효소용액은 CCRN의 경우에는 Kobayashi (1985)의 조성을 약간 수정한 것 (table 3)을 사용했고, 삼보감 엽에는 Grosser (1990)의 것을 수정보완 (table 3)했다. Table 3의 조성대로 혼합하여 잘 녹인 뒤, pH를 5.8로 맞추고, 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 사용하였다.

Table 3. The composition of the enzyme solution for protoplast isolation.

For CCRN callus		For Sambogam leaf	
compound	g / 100 ml	compound	g / 100 ml
Mannitol (0.7 M)	12.8	Mannitol (0.7 M)	12.8
CaCl ₂ (24.5 mM)	0.036	CaCl ₂ (24.5 mM)	0.036
NaH ₂ PO ₄ (0.92 mM)	0.001	NaH ₂ PO ₄ (0.92 mM)	0.001
M. E. S (6.15 mM)	0.012	M. E. S (6.15 mM)	0.012
0.3% Cellulase Onozuka R-10	0.3	1% Cellulase Onozuka R-10	1.0
0.3% Macerace R-10	0.3	0.2% Pectolyase Y-23	0.2
0.1% Driselase	0.1	1% Macerace R-10	1.0
pH	5.8	pH	5.8

2) 효소처리



삼보감의 경우, 무균 유도엽 3장을 멸균한 뒤 가위를 이용하여 잎맥을 제거하여 잎사귀를 가로 1mm 정도의 너비로 자르고, 3ml의 효소액 (Table 3)과 3ml의 배양배지 (Table 7)가 혼합된 용액을 60mm × 15mm 플라스틱 페트리디쉬에 침지시킨 후 진탕기 (Red Rocker, Hoefer Scientific instruments, U.S.A)를 이용하여 20~25 rpm으로 진탕시키면서 27℃에서 12~16 시간 세포벽을 용해시켰다.

캘러스의 경우는 계대 배양 후 4주가 경과된 것을 1g 정도 취하여, 멸균된 페트리디쉬에서 유리봉으로 살살 두드려 덩어리를 부순 뒤 table 3 조성의 효소액 6ml에 침지시킨 후 진탕기에서 20~25 rpm으로 진탕시키면서 27℃에서 12~16시간 세포벽을 용해시켰다.

3) 원형질체 분리와 정제

삼보감 엽육세포와 캘러스의 원형질체를 분리, 정제하기 위하여 효소액과 시료가 혼합된 용액을 체 ($45\ \mu\text{m}$ stainless steel, Sigma)로 걸러 원형질체와 분해가 덜된 찌꺼기를 분리했다. 체를 통과한 용액을 10 ml 원심분리관에 넣어 1000 rpm (Hanil MF 80, Korea)에서 10분간 원심분리하였고, 상등액을 버리고 남은 침전물에 CPW stock 1과 stock 2를 각각 1 ml씩 취하여 25 g의 sucrose을 넣고 100 ml로 채운 용액을 5 ml 가하여 현탁시켰다. 이 현탁액의 상층에 CPW stock 1과 stock 2를 각 1 ml씩을 넣고 13 g의 mannitol을 넣어 100 ml로 만든 용액 2 ml를 취하여 농도구배를 주고, 1000 rpm에서 6분간 원심분리했다 (Grosser, 1990). 엽육세포 시료와 캘러스 시료 모두에 대해서 같은 방법을 적용했다. 원심분리 후 CPW 13% mannitol과 CPW 25% sucrose층 사이에 존재하는 원형질체를 회수하여 새로운 원심분리관에 넣고 5 ml의 배양배지 (Table 7)를 넣어, 1000 rpm에서 10분 원심분리하는 방법으로 3회 세척했다. 세척 후, hemacytometer (Neubauer, Superior, Germany)를 이용하여 원형질체의 숫자를 측정함으로써 원형질체 수율이 가장 높은 조건을 찾았다. 생존력을 조사하기 위하여 FDA법 (Larkin, 1976)을 이용하였는데, 5 mg of fluorescein diacetate / 1 ml of acetone을 최종 농도가 0.01%가 되도록 한 뒤에 상온에서 5분 동안 방치한 후, 형광장치 부착된 도립 현미경 (Diaphot, Nikon, Japan) 하에서 검경하였다.

4) 융합과정

세척 후, hemacytometer (Neubauer, Superior, Germany)를 이용하여 원형질체의 숫자를 측정하고, 원형질체의 밀도를 $5 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^5$ protoplast / ml 정도로 융합에 알맞게 조정하였다. 밀도를 조정한 삼보감과 캘러스의 원형질체 현탁액을 혼합하고 100 μl 를 취하여 페트리디쉬의 가운데에 놓고 10분간 기다려 세포들이 안정되도록 한다. 안정된 원형질체에

100 μ l의 PEG 용합 용액 (Table 4)을 첨가하여 8분간 방치시킨 후 A 용액과 B 용액 (Table 6)이 각각 9:1로 섞인 용합 촉진액을 50 μ l씩 두 번 가하여 12분 경과시키고 이 혼합용액 주변에 배양배지용액 500 μ l를 가하여 5분간 방치하였다 (Grosser 등, 1990). 5분 경과 후, 첨가했던 세척배지 분량만큼 (500 μ l)을 빼내고 새로운 세척배지를 다시 500 μ l 넣고 10분 방치시키는데, 이 과정을 두 번 더 반복하고 최종적으로 1ml의 배양배지용액을 첨가했다. 건조를 막기 위하여 페트리디쉬벽 주변에 8방울 정도의 배양배지용액을 넣고 파라필름으로 밀봉하여 27 $^{\circ}$ C, 60% 습도에서 암배양했다 (Grosser 등, 1990).

Table 4. The composition of PEG solution for protoplast fusion.

compound	g / 10 ml
PEG (MW. 1,450)	4.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.097
Glucose	0.541
pH	6.0

Table 5. The composition of CPW salts.

stock 1

compound	g / 100ml
KH_2PO_4	0.2720
KNO_3	1.0000
MgSO_4	2.5000
KI	0.0016
CuSO_4	0.000025
pH	5.8

stock 2

CaCl_2	1.5
pH	5.8

Table 6. The composition of fusion-stimulating solution A and B

solution A

compound	g / 100ml
Glucose	7.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.97
DMSO	10
pH	6.0

solution B

Glycine	2.25
pH	10.5

3. 원형질체 배양

융합된 원형질체가 담긴 페트리디쉬를 식물생육상 (Model VS-#DM, Vision Scientific Co.Ltd, Korea)에 넣어 27℃, 60% 습도를 유지시켜주면서 배양했다. 배양하는 도중에, 삼투압 농도를 줄여주기 위하여 3주가 경과한 후 원형질체 배양배지와 0.146 M EME 그리고 0.6 M EME가 동량의 체적비로 혼합된 용액을 300 ~ 500 μ l 첨가하였다. 다시 2주가 경과했을 때에는 0.146 M EME 배지와 원형질체 배양배지가 동량의 체적비로 섞인 배지를 첨가하고 2주마다 이 배지를 계속 첨가해주면서 노란 구상배가 형성될 때까지 암배양했다.

4. 식물 재분화

원형질체 배양과정에서 노란 구상배를 형성한 것들은 한천이 첨가된 고체 EME 배지 (Table 8)에 옮겨준 뒤에 광배양하고, EME 배지에서 배가 더욱 성장하여 직경이 5mm를 넘긴 것은 배를 비대시키는 배지 (Table 9)에 옮겨서 배를 성장시켰다. 배 비대배지에서 자란 배를 식물체로 유도시키기 위하여 coumarin과 NAA가 첨가된 germination 배지 (Table 10)에 옮겨주었고, germination 배지에서 재분화를 시작한 개체에 대해서는 multi-shoot을 유도하기 위하여 2,4-D와 6-BAP가 첨가된 multi-adventitious 배지 (Table 11)에 옮겨주었다. 이 배지에서 multi-shoot이 생긴 개체에 대해서는 뿌리를 유도시키기 위하여 NAA가 첨가된 뿌리 유도배지 (Table 12)에 옮겨주었다.

Table 7. The composition of protoplast washing and culture medium.

compound	g / liter	compound	g / liter
MgSO ₄	0.37	Riboflavin	0.001
KH ₂ PO ₄	0.15	Biotin	0.0001
K ₂ HPO ₄	0.02	Retinol	0.0001
KCl	1.5	Cholecalciferol	0.0001
H ₃ BO ₃	0.0062	Vitamin B ₁₂	0.0002
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0168	KI	0.0075
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0086	Fructose	0.025
KI	0.00083	Ribose	0.025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00025	Xylose	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.000025	Mannose	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.000025	Rhamose	0.025
Myo-inositol	0.01	Cellobiose	0.025
Thiamine-HCl	0.001	Galactose	0.025
Pyridoxine-HCl	0.001	Mannitol	0.025
Nicotinic acid	0.005	Sodium pyruvate	0.02
Glycine	0.002	Citric acid	0.04
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.44	Malic acid	0.04
Na ₂ EDTA	0.0745	Fumaric acid	0.04
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0557	Coconut water	20 ml
Calcium pantothenate	0.005	Mannitol	81.99
Ascorbic acid	0.001	Glutamin	3.1
Choline chloride	0.005	Sucrose	51.35
p-aminobenzoic acid	0.0001	Casein Enzyme Hydrolysate	0.25
Folic acid	0.002	Malt extract	1.0
pH	5.8		

Table 8. The composition of 0.146 M EME medium for protoplast culture

compound	g / liter	compound	g / liter
NH ₄ NO ₃	1.65	Myo-inositol	0.1
KNO ₃	1.9	Thiamine-HCl	0.01
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.37	Pyridoxine-HCl	0.01
KH ₂ PO ₄	0.15	Nicotinic acid	0.005
K ₂ HPO ₄	0.02	Glycine	0.002
H ₃ BO ₃	0.0062	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.44
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0168	Na ₂ EDTA	0.03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0086	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.028
KI	0.00083	Sucrose	50.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00025	Malt extract	0.5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.000025	Agar	8.0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.000025	pH	5.8

Table 9. The composition of embryo enlargement medium.

compound	g / liter	compound	g / liter
NH ₄ NO ₃	1.65	Myo-inositol	0.1
KNO ₃	1.9	Thiamine-HCl	0.01
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.37	Pyridoxine-HCl	0.001
KH ₂ PO ₄	0.15	Nicotinic acid	0.005
K ₂ HPO ₄	0.02	Glycine	0.002
H ₃ BO ₃	0.0062	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.44
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0168	Na ₂ EDTA	0.03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0086	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.028
KI	0.00083	Sucrose	50.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00025	Malt extract	1.5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.000025	Agar	8.0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.000025	pH	5.8

Table 10. The composition of embryo germination medium.

compound	g / liter	compound	g / liter
NH ₄ NO ₃	1.65	Thiamine-HCl	0.01
KNO ₃	1.9	Pyridoxine-HCl	0.01
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.37	Nicotinic acid	0.005
KH ₂ PO ₄	0.15	Glycine	0.002
K ₂ HPO ₄	0.02	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.43995
H ₃ BO ₃	0.0062	Na ₂ EDTA	0.03725
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.068	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.02785
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0086	Coconut water	20 ml
KI	0.00083	Sucrose	25.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00025	Coumarin	0.0146
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.000025	NAA	0.0002
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.000025	GA ₃	0.01
Myo-inositol	0.1	Agar	8.0
pH	5.8		



Table 11. The composition of multi-adventitious shoot induction medium

compound	g / liter	compound	g / liter
NH ₄ NO ₃	1.485	Thiamine-HCl	0.009
KNO ₃	1.71	Pyridoxine-HCl	0.009
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.33	Nicotinic acid	0.0045
KH ₂ PO ₄	0.135	Glycine	0.0018
K ₂ HPO ₄	0.018	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.43995
H ₃ BO ₃	0.0059	Na ₂ EDTA	0.03725
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0612	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.02785
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0077	Coconut water	20 ml
KI	0.00077	Sucrose	25.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00023	Malt extract	1.5 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.000023	2,4-D	10.08 µg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.000023	6-BAP	0.003
Myo-inositol	0.09	Agar	8.0
pH	5.8		

Table 12. The composition of the root induction medium.

compound	g / liter	compound	g / liter
NH ₄ NO ₃	1.65	Myo-inositol	0.1
KNO ₃	1.9	Thiamine-HCl	0.01
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.37	Pyridoxine-HCl	0.01
KH ₂ PO ₄	0.15	Nicotinic acid	0.005
K ₂ HPO ₄	0.02	Glycine	0.002
H ₃ BO ₃	0.0062	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.43995
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.068	Na ₂ EDTA	0.03725
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0086	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.02785
KI	0.00083	Sucrose	25.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00025	NAA	0.02011
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.000025	Activated charcoal	0.5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.000025	Agar	8.0
pH	5.8		



5. Genomic DNA 추출과 RAPD를 통한 융합 여부 분석

1) DNA 추출

삼보감의 잎사귀를 1.5 ml micro-tube에 넣고 5 μ l의 1% (V/V) 2-mercaptoethanol을 첨가하여 잘 빻아준 뒤 300 μ l의 extraction buffer (250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, 200 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 넣어 가끔씩 가벼운 충격을 주면서 상온에서 한 시간 동안 방치하였다. 이 튜브에 PVP (soluble PVP, Sigma MW 10,000)를 최종 농도가 6%가 되도록 첨가했고, 이 부피의 반에 해당하는 7.5 M ammonium acetate를 첨가하여 얼음 속에서 30 분 동안 방치한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 10,000 \times g로 10 분간 원심분리하였다(Brushless D.C Motor centrifuge VS-15000 CF, Vision Scientific Co. Ltd,

Korea). 상등액을 새 튜브에 옮겨서, 같은 부피에 해당하는 isopropanol을 가하고 -20°C 에 30분간 두면서 DNA를 침전시킨 후, 원심분리(10분, $10,000 \times g$, 4°C)하여 상등액을 제거하고, 진공 상태에서 건조시켰다. 건조된 DNA를 $500 \mu\text{l}$ 의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)으로 잘 현탁시켜서, $2 \mu\text{l}$ RNase (1 mg/ml)를 첨가하여 37°C 에서 15분간 방치하고, 식물색소체와 RNase를 제거하기 위하여 같은 부피의 Chloroform-isoamyl alcohol (24:1)을 첨가하여 거꾸로 뒤집기를 반복하여 잘 섞은 뒤 원심분리하고 (10분, $10,000 \times g$, 4°C). 상등액을 새로운 튜브에 옮겨서 같은 과정을 반복한 뒤 상등액에 같은 부피의 isopropanol을 첨가하여 -20°C 에서 10분 동안 방치하였다. 이를 재원심분리 (10분, $10,000 \times g$, 4°C)하고 DNA pellet을 80% ethanol 1 ml로 세척한 후 진공 하에서 건조시켰다. 건조 후의 DNA는 일단 $30 \mu\text{l}$ 의 TE buffer에 녹여서 DNA 흡광도를 측정하고, RAPD에 사용되는 DNA 양 ($15 \text{ ng} / 25 \mu\text{l}$)을 고려하여 $2 \mu\text{l}$ 를 취하였을 때 15 ng이 되도록 TE buffer로 다시 희석하였다. 그리고 4°C 에서 저장하였다.



2) RAPD

Operon사에서 제작한 임의로 21개의 primer를 선정해서 삼보감 DNA와 CCRN DNA에 대해서 PCR을 수행하여, 두 식물종에 특이적 band pattern을 갖는 primer를 6개 선발하였는데 이중에서 primer OPH-04 (GGAAGTCACC)와 OPAT-04 (TTGCCTCGCC)만을 사용하여 RAPD를 수행했다. 즉, $500 \mu\text{l}$ micro tube에 추출한 DNA 15 ng, $10 \times$ buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40, pH 8.8 at 25°C) $2.5 \mu\text{l}$, 25 mM MgCl_2 $2 \mu\text{l}$, 1.5 unit에 해당하는 Taq polymerase, dNTP 혼합물 $2 \mu\text{l}$, $5 \mu\text{M}$ primer $2 \mu\text{l}$ 를 취하여 총 $25 \mu\text{l}$ 가 되게 하였다. 이 반응용액을 92°C 에서 1분 반응시킨 뒤, 92°C 1분, 36°C 1분, 72°C 에서 2분을 각각 36회 반복하고, 72°C 에서 10분 방치한 후 그리고 20°C 로 냉각시켰다 (Macado 등 1996). PCR

반응으로부터 얻은 산물 9 μ l와 6 \times loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25 % Ficoll (type 400 ; Pharmacia in water)) 2 μ l를 TAE Buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA)에서 0.5 μ g /ml ethidium bromide를 첨가하여 만든 1.4% agarose gel의 well에 loading하고 TAE buffer를 채운 전기영동 용기에서 전기영동하여 UV광 하에서 개체간의 다형성을 살펴보았다.



III. 결과 및 고찰

1. 식물 원형질체 수율

1) 시료의 연령에 따른 영향

삼보감 엽세포 (*Citrus sulcata* Takahashi)의 경우 기내에서 종자발아시켜 얻은 유묘엽를 사용하였는데 너무 어린잎보다는 1~2개월 정도의 잎이 완전히 전개한 것 (young matured leaf)을 이용했을 때가 수율이 좋았다 (Fig 2).

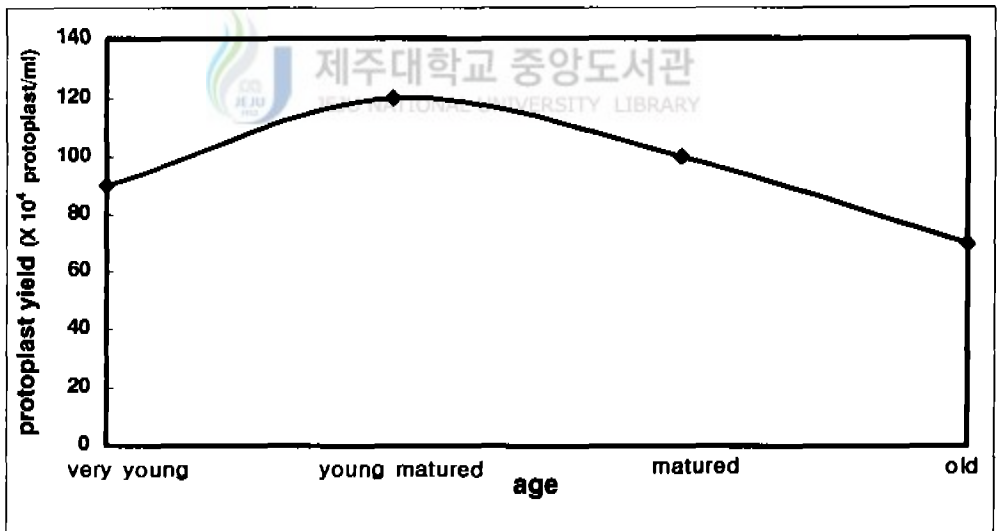


Figure 2. The change of protoplasts yield depending on leaf age.

일반적으로 고체배지에서 배양한 캘러스 조직은 세포생장률이 낮고, 캘러스를 구성하고 있는 세포의 생리적 상태나 연령이 다양하기 때문에 원형질체 분리용 조직으로는 적합하지 못한 경우가 많아(김 등, 1996) 액체 현탁 배양한 시료를 사용하는 것이 좋다고 하였는데(Ohgawara 등, 1985; Hirofumi 등 1976; 김 등, 1996), 본 실험에서 사용한 오렌지 캘러스 시료의 경우는 고체배지에서 배양한 캘러스 조직을 사용하여도 원형질체의 수율이 높고, 배와 기관형성까지도 잘 진행되었다. 단지, 액체 배양한 캘러스의 경우 배양 후 2주가 지났을 때 원형질체 분리 수율이 가장 좋다고 한 보고(Grosser, 1990)와는 달리 고체배지에서 배양한 경우에는 배양 후 4주가 지난 것을 사용했을 때가 수율이 가장 좋았다.

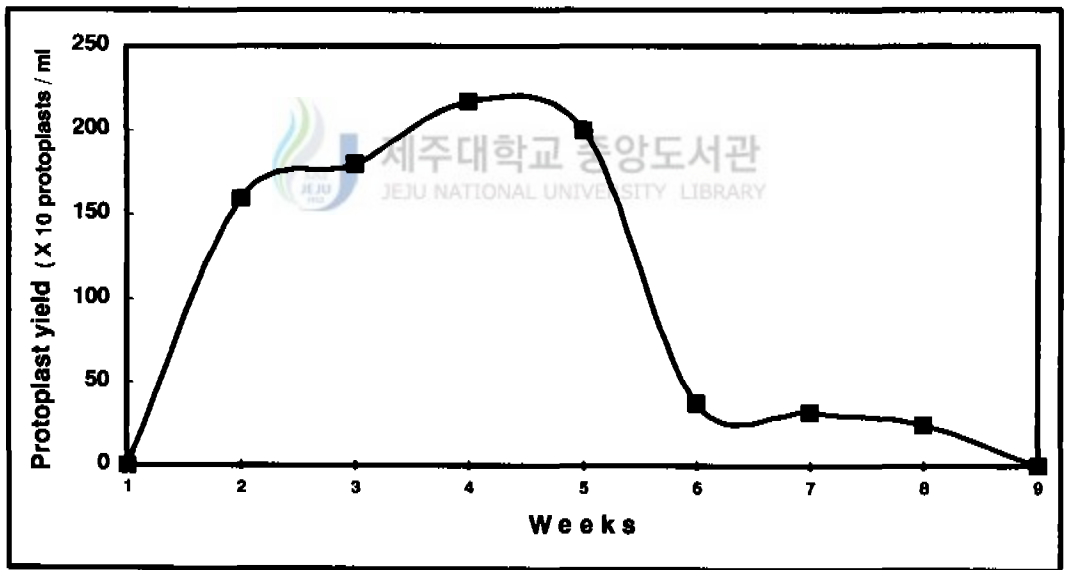


Figure 3. The change of protoplasts yield depending on callus subculture period.

2) 효소처리조건이 원형질체 수율에 미치는 영향

원형질체의 분리정도는 사용하는 시료의 상태와 효소의 농도 그리고 효소에 노출시킨 시간에 큰 영향을 받기 때문에 (Collin등, 1998a) 효소의 농도와 시간을 조절하여야 한다. 본 실험에서는 비교적 낮은 농도의 효소를 사용해서 14~16 시간 정도 처리할 때 좋은 수율을 얻었고, 16시간 이상에서는 현저하게 수율이 낮아졌다. 효소의 사용에서 어느 것 하나만 사용해도 원형질체 분리가 가능 하지만 여러 효소를 적당한 농도로 혼합하여 사용하는 것이 훨씬 효율적이기 때문에 여러 효소를 사용하여 수율을 높이도록 하였다. 삼보감 엽육세포와 CCRN 캘러스에서 가장 높은 수율을 보이는 것은 Table 13과 Table 14에서 회색배경으로 표시한 조성과 같았다.

그리고 효소처리 시간은 Figure 4에서와 같이 12~16시간

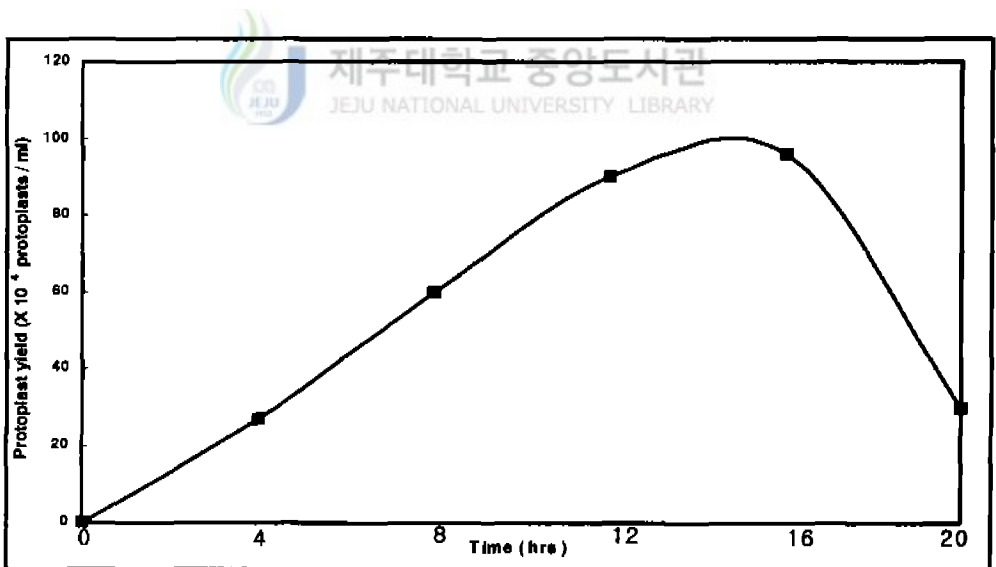


Figure 4. The relation between protoplast yield and enzyme treatment time.

Table 13. The effect of enzyme concentration on the protoplasts yield of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel callus

Enzyme concentration (%)			protoplast yield (protoplasts / ml)
Cellulase	Macerozyme	Drieselase	
0.3	0.3	0.1	$\sim 1 \times 10^6$
0.5	0.5	0.1	$\sim 2 \times 10^4$
1.0	1.0	0.2	$\sim 1 \times 10^4$

Table 14. The effect of enzyme concentration on the protoplast yield of *Citrus sulcata* Takahashi mesophyll cell.

Enzyme concentration (%)			protoplasts yield (protoplasts / ml)
Cellulase	Macerozyme	Pectolyase	
0.5	0.5	0.1	$\sim 1 \times 10^6$
1.0	1.0	0.2	$\sim 2 \times 10^4$

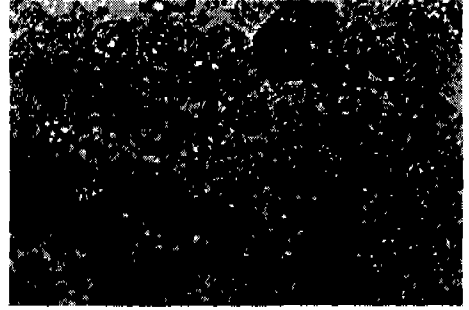
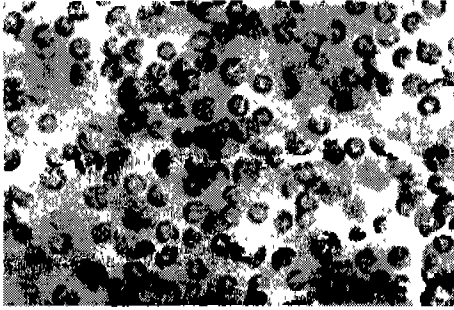


Figure 5. The protoplasts of *Citrus sulcata* Takahashi (left) and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel (right)

2. 원형질체 정제 및 융합 조건

1) 원형질체 정제 및 융합 조건

원형질체 배양시 남아 있는 찌꺼기나 파괴된 원형질체 및 아세포(亞細胞) 찌꺼기 등이 혼입되면 세포막의 재생과 세포분열을 저해하기 때문에 배양 전에 원형질체만 순수하게 분리하는 게 중요한데(김 등, 1996), 배양 배지로 3회 세척했을 때 찌꺼기가 적은 순수한 상태의 원형질체를 관찰할 수 있었다.

2) 융합 과정

융합 방법에는 전기적 방법과 화학적 방법이 있고, 화학적 방법에는 또 NaNO_3 , PVA, gelatin, rabbit immune sera, high pH/ Ca^{++} , polyvinyl alcohol sodium nitrate, phytolectins, pronase E, dextran sulfate, seawater와 lysolethicin (James 등, 1987) 등을 이용한 방법이 있다. 본 연구에서는 여러 융합 방법 중에서 값싸고 조작성이 쉬운 장점이 있는

calcium을 포함하는 PEG방법을 사용하였다. PEG는 근접한 세포들의 지질이 풍부한 plasma membrane에서 표면 단백질을 확산시키며, 막을 불안정하게 하고, 그 결과 근접한 세포간의 지질들이 뭉치게 하고, 막의 성분들을 재편성하는 두 가지의 역할을 한다 (Akhong 등, 1975). 이런 PEG의 효과를 적절히 이용하기 위해서는 원형질체의 밀도를 조절하는 것이 필요했고, 밀도는 1×10^5 전후로 하였으며, 시료와 PEG 그리고 용합을 도와주는 (A+B) 용액의 분량을 1:1:1 (v:v:v)로 했을 때가 용합되는 정도가 가장 좋았다. 이때 용합률은 약 10% 정도였는데, PEG를 사용하면 약 10% 내외의 용합률을 관찰하였다 (Kao 등, 1974)는 것과 일치하였다. PEG의 양이 시료량의 반 이었을 때는 용합율이 낮았고, PEG의 양이 시료량의 두 배였을 때는 세포들이 과다하게 뭉쳤다. Menezel (1981) 등의 실험에서도 PEG는 적정량일 때 좋은 용합유도물질이 되지만, 과다하면 오히려 나쁘고, 저장해서 쓰는 것은 별로 좋지 않으므로 용합 전에 만들어 사용하는 것이 좋다고 하였다 (Grosser, 1991).

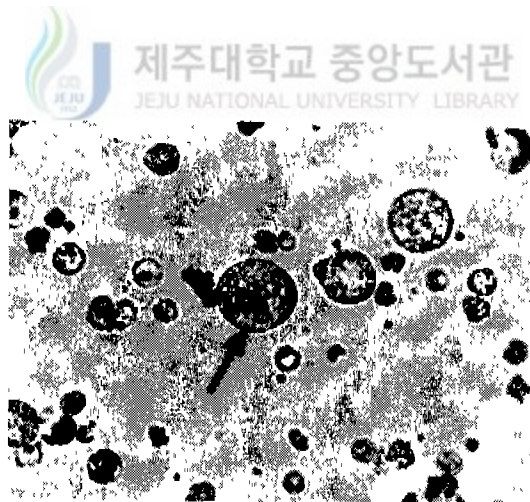


Figure 6. The protoplast fusion between *Citrus sinensis*(L.)Osbeck var. Cara Cara Red Navel and *Citrus sulcata* Takahashi

Table 15. The effect of PEG on protoplast fusion ratio.

PEG : Protoplasts	Degree of protoplast fusion
0.25 : 1	no fusion
0.5 : 1	less fusion
1 : 1	optimum fusion
2 : 1	over fusion

3. 원형질체 배양

원형질체는 세포벽을 갖고 있지 않으므로 배양액의 오스몰 농도를 적절히 맞춰주어야 세포활성을 유지하면서 성장하게 된다. 원형질체 주변 용액의 농도가 너무 높을 경우에는 세포의 물이 밖으로 빠져나가면서 핵 속에 있는 DNA가 응축하거나, 단백질 합성이 저조하게 되고 반대로, 대표적인 영향이고, 너무 낮을 경우에는 세포에 물이 들어감으로써 터지게 된다. 원형질체를 유지할 수 있는 오스몰 농도는 0.3 ~ 0.70smole 이며, 본 실험에서도 0.4 ~ 0.70smole에서 생육이 잘 되었다. 그 이하나 이상의 오스몰 농도에서는 세포 발달이 없었다. 세포 분열이나 콜로니의 형성에는 최소의 세포 밀도가 있는데 (Constabel 등, 1984; Kobayashi 등, 1985; Vardi 등, 1987), 그 범위가 식물마다 다르지만, $10^4 \sim 10^8$ cells/ml 정도이다. 본 실험의 경우는 6×10^4 protoplasts/ml에서 1.5×10^5 protoplasts/ml가 가장 좋았다. 세포의 밀도가 높으면 초기에 분열이 잘 되는 것처럼 보이나 시간이 지나면서 그 숫자가 줄어드는 경향이 있었다. 따라서 높은 밀도와 빠른 세포분열이 꼭 바람직한 것은 아니었다. 그리고 세포 밀도가 너무 낮은 경우는 분열이 일어나는 것부터 늦기 시작해서 정상적인 발육이 되지 않았다. 실험결과에 의하면 재분화까지 이루어지기 위해서는 6×10^4 protoplasts/ml에서 1.5×10^5 protoplasts/ml가 가장 좋았다. 그리고 단일 세포를 배양했을 경우, 세포분열이 일어나나 세포들이 덩어리지는 현상을

볼 수 없었고, 적어도 7 또는 10 개의 세포들이 모여야 세포가 분열하여 덩어리지는 현상을 볼 수 있었다. 밀도가 너무 낮은 경우는 단일 세포로 떨어져 있는 경우가 많아 성장이 늦었을 것으로 사료된다.

배양을 시작해서 배가 형성될 때까지 광조절이 아주 중요하였는데, 배양 3일 후부터 광배양을 시작한 것들은 micro-calli까지 성장하였으나 그 이후 진전이 없었고, 반면에 배가 생길 때까지 암배양한 것은 전체의 분화과정을 거쳐 식물체가 되었다. 배양 후 3일 정도가 지나면 세포벽을 합성하였고, 7~10일이 지났을 때 세포분열을 관찰할 수 있었다. 약 2~3주가 지났을 때 육안으로 관찰이 가능한 micro-calli를 형성하기 시작하여 그 숫자가 서서히 증가하였다. micro-calli는 조밀해지고 비대해지면서 노란색의 구형배를 형성하고 서서히 녹색으로 변하였고, 심장형배, 어뢰형 배를 거쳐서 재분화를 시작하였다 (Figure 7). 심장형배로 발달되지 않을 것들은 보통 초기배 형성 이후 갈색이 되었다. 이때 갈색이 되는 것도 자라거나 세포 분열하여 양이 증가하기도 하였지만, 최종 녹색의 배를 형성하지 못해서 식물체로 발달하는 데는 문제가 있었다. 이는 Kobayashi (1985) 등도 언급한 바 있다. 삼투압 조건을 낮춰주기 위하여 배지를 첨가할 때도 첨가하는 양과 생육간에 상관관계가 있었는데, 100 ~ 200 μl 정도로 첨가했을 때는 생육이 좋지 않았고, 300 ~ 800 μl 를 첨가했을 때는 생육이 양호했다. 그리고 1000 ~ 1500 μl 를 첨가했을 때도 역시 생육이 좋지 않았다. 이는 첨가하는 배지의 양이 세포의 최종 밀도를 낮추고 높이는 효과 때문이라고 생각된다.

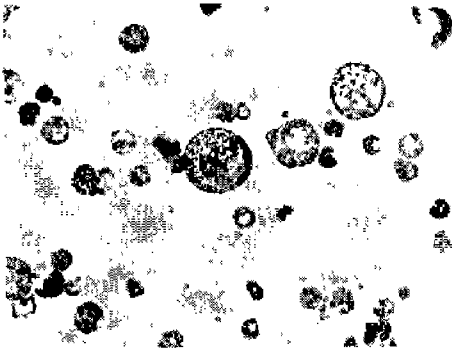
Table 16. The effect of protoplast density on cell development.

Cell density (protoplasts / ml)	cellula development (weekly)					
	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th
0.6×10^4		Poor start of cell division	No cell division	No more growth		
1×10^4						
2×10^4	Cell wall formation with no division	Good start of cell division	Poor cell growth		No growth	
6×10^4			Good cell growth		Embryo formation with greening	
1×10^5						
1.5×10^5						
3×10^5			Only embryo formation without greening			
6×10^5						

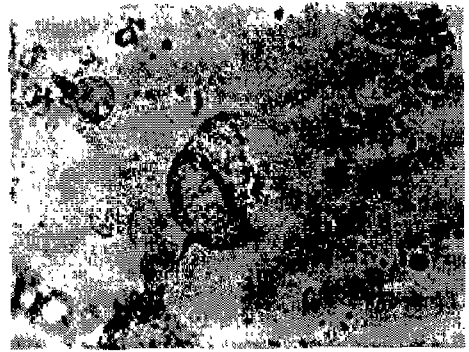
4. 식물재분화

식물의 체세포로부터 분리된 원형질체는 배양으로부터 식물체가 얻어지는 과정에서 세포, 구형배, 심장형배, 어뢰형 배까지는 접합자 (zygote)에서 얻어지는 원형질체와 다를 바 없으나, 그 후의 과정에서 seed의 과정을 거치는 접합자와는 달리 곧 식물체로 분화가 이루어진다 (Collins 등, 1998b).

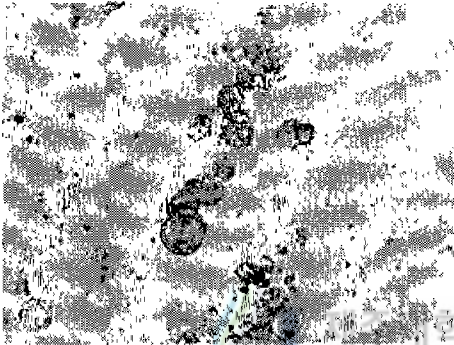
분리 후 암배양 기간이 배의 형성에 아주 중요한 영향을 미쳤는데, 3일간의 암배양을 하고난 후 광배양 조건에서 배양을 한 것들은 작은 세포 덩어리를 만들기는 하였으나 조밀하지 않고 느슨한 형태로 형성되었다가 생육이 더 일어나지 않았다. 또한 노란 배가 형성될 때까지 암배양을 한 것에서는 조밀한 세포덩어리를 잘 형성하고, 이후 광배양 조건에서 배양을 했을 때 녹색의 배를 형성하면서 다음 단계로 진행되어 개체로 발달하였다. 녹색의 구형배를 형성한 다음에 약 5mm의 크기가 되었을 때, 비대배지에 옮겨주면 배가 신장하면서 심장형배, 어뢰형배 단계를 거쳐 식물체로서의 분화능을 가지게 되었다. Coumarin, GA₃와 NAA 등의 성장조절제가 들어간 배지에 식물체를 옮겨주면 germination이 이루어지는데, 이 배지에서 germination이 일어난 후에는 곧 shooting 배지에 옮겨주는 것이 좋다. 왜냐하면 어린 조직에 대해서 지나치게 신장효과를 보이는 (金 등, 1998) GA₃의 영향을 덜 받을 수 있게 하기 때문이다. 그리고, 높은 GA₃의 영향하에서의 shoot 돌이 많고, 약하고 그리고 잘 죽는 현상을 나타냈는데, Gmitter 등 (1990)도 이와 비슷한 현상을 보고한 바 있다.



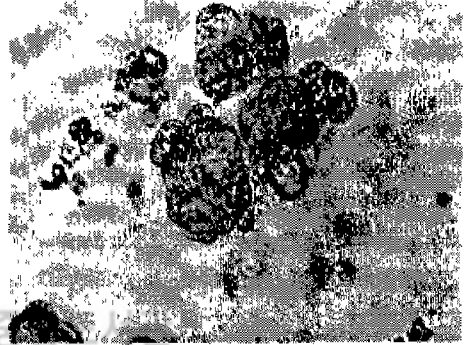
Protoplast stage



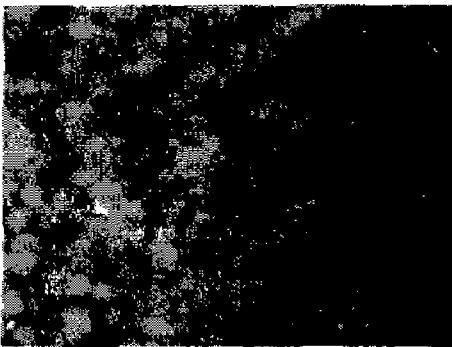
Cell division



Multi-division of cell



Microcalli formation



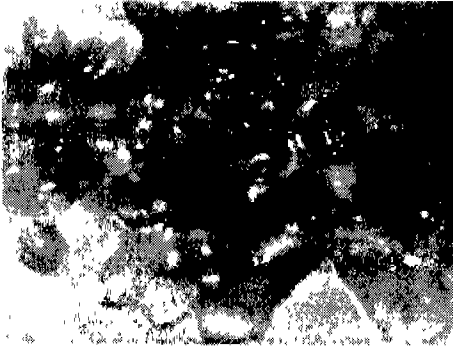
Yellow/green globular embryo



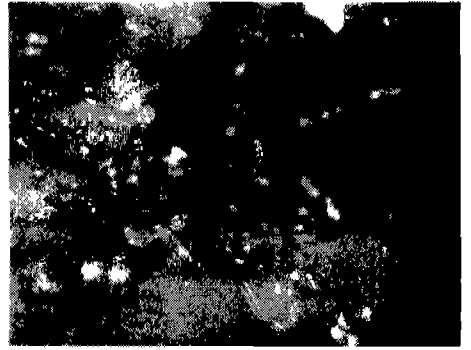
Green globular embryo

Figure 7. The process of protoplast development from naked protoplast to plant

(to be continued)



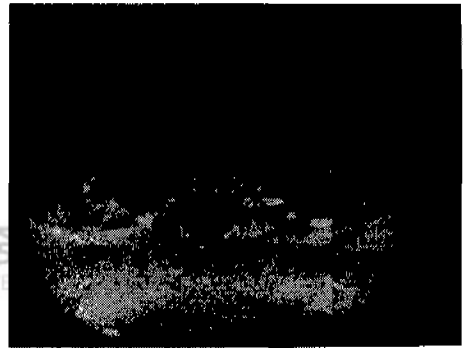
Heart shape embryo



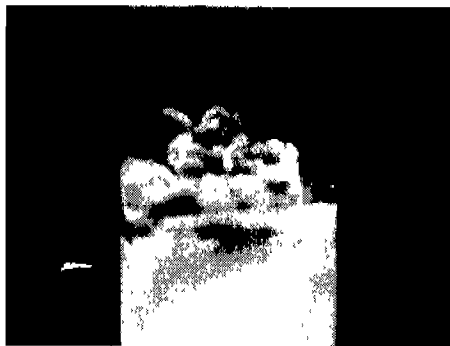
Torpedo shape embryo



Embryo germination



Adventitious shoot formation



Embryo rooting

5. RAPD를 이용한 융합확인

융합된 개체들을 선발하는 방법은 여러 가지가 있겠지만, 본 실험에서는 원형질체를 융합 시킨 다음 융합된 것과 융합되지 않은 것을 모두 식물체로 키운 후, RAPD 방법을 이용하여 DNA의 다형성을 살펴봄으로써 융합여부를 조사했다. RAPD법에서는 임의의 primer를 사용하여 유전자를 증폭시킬 때, 염기서열이 조금만 달라도 개체간의 차이를 PCR 산물로 부터 알 수 있다. 따라서 원형질체 융합 후 소량의 시료로 짧은 배양기간 내에 융합을 확인하기에 적당한 방법이다 (Kang, 1993; Rick 등, 1994). RFLP가 DNA의 다형성을 보여줄 수 없고, 조작이 까다로우면서, 시간과 돈이 많이 드는 southern blotting을 해야하는 것과는 달리 RAPD가 조작이 쉽고 경제적인 면이 있다 (William 등, 1990; Kang 등, 1993; Weeden 등, 1992; Rick 1994). 특히, 재배기간이나 식물의 크기 등으로 해서 융합여부를 확인하기에 어려움이 있는 영년생 과수의 경우에 더욱 적합한 방법이다.

Genomic DNA의 추출은 Kim 등 (1997)의 방법을 토대로 하였는데, 이 방법으로 비교적 순도가 높은 DNA를 얻을 수 있었다. 순도가 높은 DNA의 경우 OD 260 / OD 280의 값이 1.8 정도인데 1.7 정도의 비교적 순수한 DNA를 얻을 수 있었다. Weeden 등 (1992)은 재현성 있는 RAPD결과를 얻기 위하여 주형 DNA의 순도가 결정적인 영향을 미친다고 하였으며, 본 실험에서도 그런 경향을 확인할 수 있었다. 순도가 좋지 않은 경우는 전기영동 후 밴드가 아주 희미하였고, 순도가 높은 DNA에서 밴드가 선명하게 나왔으며, 순도가 낮은 경우 전기 영동 후 밴드가 나오지 않는 경향이 있었다.

주형 DNA의 양과 RAPD와의 관계에서 DNA의 양이 증가할수록 밴드의 양상에는 관계가 없으나 두께에는 상관성이 있다고 보고된 바 있다 (Sugawara, 1995). 한편 DNA의 양이 너무 적었을 경우에는 희미해서 안 보이지만, 과량의 DNA를 사용한 경우 일부 밴드가 너무 두꺼워 다른 밴드를 안보이게 하였다고 했다 (Frank 등, 1996). 본 실험에서는 밴드의 패턴을 보는 것을 목적으로 하였는데 15 ng DNA의 사용이 적정량이었다.

RAPD를 수행하기 위해서는 primer의 선정이 중요한데 융합의 여부를 확인시켜줄 primer를 결정하기 위하여 Operon 제품 10-mer 짜리 21개의 random primer를 삼보감과 오렌지 캡러스에 각각 테스트한 결과 두 시료간에 차이를 나타내게 하는 6개의 primer를 찾을 수 있었다(Table 18). 그러나, 특이적 밴드양상을 나타내게 하는 6개의 primer를 다 사용하지 않고 2~3개의 primer 사용만으로도 융합여부를 식별하는 것이 가능하여서, 가장 확실한 차이를 보여주는 OPAT-04와 OPH-04를 주로 사용하였다. 형태학적 차이를 보아 융합체를 찾아내는 것은 과수 작물에서는 긴 시간을 요하는 일이므로 RAPD를 수행하여 1차적으로 융합체를 찾는 것은 시간과 경비를 줄이는 것이어서 권장할 만한 방법이라고 생각한다.



Table 17. The primer test for RAPD of *Citrus sulcata* Takahashi and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel. Only the primers in gray background were used for RAPD.

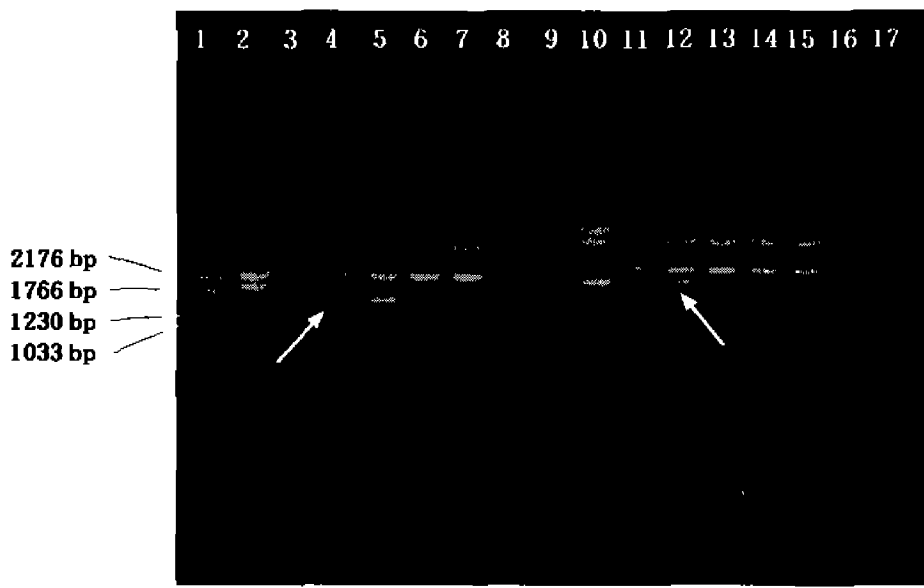
Primer	5' to 3'
primers inducing specific bands	
OPH-04	GGAAGTCGCC
OPAT-04	TTGCCTCGCC
OPM-13	AGCGTCACTC
OPN-07	CAGCCCAGAG
OPH-15	AATGGCGCAG
OPAT-13	CTGGTGGGAAG
primers inducing non-specific band	
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPAT-14	GTGCCGCACT
OPI-11	ACATGCCGTG
OPJ-09	TGAGCCTCAC
OPJ-10	AAGCCCGAGG
OPK-04	CCGCCCAAAC
OPM-04	GGCGGTTGTC
OPM-06	CTGGGCAACT
OPM-13	AGCGTCACTC
OPN-07	CAGCCCAGAG
OPN-14	TCGTGCGGGT
OPN-20	GGTGCTCCGT
OPQ-10	TGTGCCCGAA
OPQ-11	TCTCCGCAAC
OPQ-14	GGACGCTTCA
OPW-17	GTCCTGGGTT
primers not amplified	
OPB-09	TGGGGGACTC

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



1. OPAT-04 reacted with Sambogam DNA
2. OPAT-04 reacted with CCRN DNA
3. OPAT-13 reacted with Sambogam DNA
4. OPAT-13 reacted with CCRN DNA
5. OPH-04 reacted with Sambogam DNA
6. OPH-04 reacted with CCRN DNA
7. OPH-15 reacted with Sambogam DNA
8. OPH-15 reacted with CCRN DNA
9. OPN-13 reacted with Sambogam DNA
10. OPN-13 reacted with CCRN DNA
11. OPN-07 reacted with Sambogam DNA
12. OPN-07 reacted with CCRN DNA

Figure 8. The primers selected for RAPD to confirm the protoplast fusion between *Citrus sulcata* Takahashi and *Citru sinensis* (L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel.



1. Marker (DNA molecular-weight maker VI, Boehringer)
2. Sambogam DNA with primer OPAT-04
3. CCRN DNA with primer OPAT-04
4. Fused plant DNA with primer OPAT-04
- 5-9. Non-fused plant DNA with primer OPAT-04
10. Sambogam DNA with primer OPH-04
11. CCRN DNA with primer OPH-04
12. Fused plant DNA with primer OPH-04
- 13-17. Non-fused plant DNA with primer OPH-04

Figure 9. The specific band patterns of fused plant and non-fused plant, the white arrows indicating the DNA bands of the fused plant.

V. 요약

본 연구는 유전적으로 이용 가치가 있지만 제주도의 환경조건에서는 생육이 어려운 오렌지를 생육이 가능하도록 형질 전환시키는 기초연구로서, 오렌지 캘러스와 재래 감귤인 삼보감의 엽에서 원형질체를 분리하는 조건과 융합 및 배양조건을 확립하고 RAPD 방법을 이용하여 융합체를 확인하였다.

1. 효소용액에 의해서 식물세포로부터 원형질체를 분리하기 위해서는 삼보감의 경우 0.5% Cellulase, 0.5% Macerozyme, 0.1% Pectolyase, 오렌지의 경우는 0.3% Cellulase, 0.3% Macerozyme, 0.1% Drieselase를 사용했을 때 약 1×10^6 protoplast / ml의 높은 원형질체수율을 보여주었고, 분리에 사용한 시료는 삼보감의 경우 엽이 들기 시작하여 약 1개월이 경과한 것과 그리고 오렌지 캘러스의 경우는 계대배양 후 4주가 경과한 것에서 가장 좋은 수율을 보여 주었다.

2. 원형질체 융합이나 배양 과정에서 원형질체의 밀도가 중요한 인자로 작용하였는데, 적정 밀도는 $5 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^5$ protoplast / ml였고, 원형질체 시료와 융합유도 물질인 PEG 그리고 융합을 도와주는 용리액의 양을 각각 1:1:1의 부피로 첨가하였을 때가 좋은 융합상태를 보여주었다.

3. 융합 후, 원형질체 배양 과정에서 광이 중요한 인자로 작용하였는데, 약 3일의 암배양을 하고 광배양을 한 것은 microcalli를 형성하긴 하였으나 형태가 느슨하고 조밀한 배를 형성하지 못하여 이후 성장이 불량했다. 하지만 배가 형성될 때까지 암배양을 한 것은 식물체로 분화가 가능한 배를 형성하였다. 일단 배를 형성한 다음에는 광조건으로 옮겨줘야 녹색배를 형성하면서 계속 성장하였다.

4. RAPD 방법으로 융합체를 선별하기 위해서 21개의 primer를 조사하여 오렌지와 삼보감 간에 특이적인 밴드 패턴을 나타내는 6 개의 primer를 찾았고 이를 이용하여 삼보감과 오렌지의 유전자를 모두 포함하는 융합체를 찾으므로써 융합을 확인할 수 있었다.



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.

Cocking, E. C. 1960. A method for the isolation of plant protoplast and vacuole, *Nature (Lond.)*. 187:962-963

Cocking, E. C. 1972. Plant Cell Protoplasts-isolation and Development, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23:29-50.

Collins, H. A., and S. Edwards. 1998. *Plant Cell Culture*, BIOS Scientific Publishers. p. 46, p. 91.

Constabel, F. 1984. Fusion of Protoplasts by Polyethylene Glycol (PEG). *Cell Culture and Somatic Cell of Plants*, Vol. 1. 414-422.

Frank A., Buffone and Don R. La Bonte, 1996. Random Amplified Polymorphic DNA Markers in Sweetpotato Infected with *Fusarium Lateritium*. *HortiScience* 31(7):1215-1216.

Gmitter, F. G. Jr., X. B. Ling and X. X. Deng. 1990. Induction of triploid citrus plants from endosperm calli in vitro. *Theor Apple Genet.* 80:785-790.

Grosser J. W., F. G. Gmitter Jr., and J. I. Chandler. 1988. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species:

Citrus sinensis and *Severinia desticha*. Theor Apple Genet. 75:397-401.

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*) protoplast. Plant Breeding Abstracts 60(4):424

Grosser J. W., F. G. Gmitter Jr., N. Tusa, G. Reforgiato Recupero and P. Cucinotta. 1996. Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from citrus leaf protoplasts following somatic fusion. Plant Cell Reports 15:672-676.

Grosser. J. W., F. A. A. Mourazo, F. G. Gmitter Jr., E. S. Louzada., J. Jiang., K. Baergea., A. Quiros., C. Cabasson., J. L. Schell., J. L. Chandler. 1996. Allotetraploid hybrid between *citrus* and seven related general produced by somatic hybridization. Theor Apple Genet 92:577-582.

Hasan Basri Jumin and Nobumasa Nito. 1995. Embryogenic protoplasts cultures of orange jessamine (*Murraya paniculata*) and their regeneration into plants flowering in vitro. Plant Cell Tissue and Organ Culture 41:277- 279.

Hasan Basri jumin and Nobumasa Nito. 1996. Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of six plant species related to *Citrus*. Plant Cell Report 15: 332-336.

Hirofumi Uchimiya and Toshio Murashige., 1976. Influence of the Nutrient Medium on the Recovery of Dividing Cells from Tobacco Protoplasts. *Plant Physiol* 57:424-429.

Kang Fu Yu, Allen Van Deynze, and K. Peter Pauls. 1993. Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. 287-301.

Kao, K. N., and M. R. Michayluk, 1974. A method for High-frequency Spectrum Fusion of Plant Protoplasts, *Planta (Berl.)* 115, 355-367.

Kim, C. S., C. H. Lee, J. S. Shin, Y. S. Chung, and N. I. Hyung. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research*, 25(5): 1085-1086.

Kobayashi Shozo, Isami Ikeda and Hirofumi Uchimiya. 1985. Conditions for high frequency embryogenesis from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4:249-259.

Kobyashi S., T. Ohgawara, E. Ohgawara, and I. Oiyama S. Ishii. 1988. A somatic hybrid plant obtained by protoplast fusion between navel orange (*Citrus sinensis*) and satsuma mandarin (*C. unshiu*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 14:63-69.

Kuniaki Sugawara and Atsushi Oowada. 1995. Identification of Citrus Chimeras by RAPD Markers, *Hort Science* 30(6):1276-1278.

Larkin P. J. 1976. Purification and Viability Determinations of Plant Protoplasts. *Planta (Berl.)* 128:213-216.

Louzada, E. S., J. W. Grosser, and F. G. Gmitter Jr. 1993. Intergeneric somatic hybridization of sexually incompatible parents: *Citrus sinensis* and *Atalantia ceylanica*. *Plant Cell Reports* 12:687-690.

Machado, M. A., H. D. Coletta Filho, M. L. P. N. Targon and J. Pompeu Jr. 1996. Genetic relationship of mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. 92: 321-326.

Menezel C., Kiss Z, Maliga P. 1981. Streptomycin resistant and sensitive hybrids of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana knightiana* correlation of resistance with *N. tabacum* plastids. *Theor appl genet* 59:191-195.

Ohgawara, T., S. Kobayashi, E. Ohgawara, H. Uchimiya and S. Ishii., 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theor Appl Genet* 71:1-4.

Ohgawara, T., S. Kobayashi, S. Ishii, K. Yoshinaga and I. Oiyama. 1991. Fertile fruit trees obtained by somatic hybridization: navel orange (*Citrus sinensis*) and *Troyer citrange* (*C. sinensis* × *Poncirus trifoliata*). *Theor Apple Genet* 81:141-143.

Power, J. B., S. E. Cumins, and E. C Cocking. 1970. Fusion of isolated protoplasts, *Nature (Lond)* 225:1016-1018.

Rick V. Kesseli, Ilan Paran and Richard W. Michelmore. 1994. Analysis of a Detailed Genetic Linkage Map of *Lactuca sativa* (Lettuce) Constr-

ucted From RFLP and RAPD Markers. Genetic Society of America 136:1435-1446.

Sugawara, K., A. Oowada, T. Moriguchi and M. Omura. 1995. Identification of Citrus chimeras by RAPD markers. Hort. Scie. 30(6):1276-1278.

Vardi A., Spiegel-Roy P., Galun E., 1975. *Citrus* cell culture : isolation of protoplasts, plating efficiencies, effect of mutagens and regeneration of embryos. Plant Scie Lett 4:231-236.

Vardi and P. Spiegel-Roy. 1982. Plant Regeneration from *Citrus* Protoplasts : Variability in Methodological Requirements Among Cultivars and Species. Theor Appl Genet. 62:171-176.

Vardi, A., A. Breiman and E. Galun. 1987. Citrus cybrids : production by donor-recipient protoplast-fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. Theor Appl Genet 75 : 51-58.

Vardi, A, P. Arzee-Gonen, A. Frydman-shani, S. Bleichman, and E. Galun. 1989. Protoplast-fusion-mediated transfer of organelles from micro-citrus into Citrus and regeneration of novel alloplasmic trees. Theor Appl Genet. 78:741-747.

Weeden, N. F., G. M. Timmerman, M. Hemmat, B. E. Kneen, and M. A. Lodhi 1992. Identification and reliability of RAPD markers. In : Applications of RAPD technology to plant breeding. pp. 12-17. Joint plant breeding symposia series. Minnesota.

Williams J. G. K., Anne R. kubelik, Kenneth J. Livak, J. Antoni Rafalski and Scott V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as 0 markers. Nucleic Acids Research 10(22):6531-6535.

韓海龍 · 權五均, 1997, 柑橘園藝新書, 先進文化社., p.108

金奎元 외 4인. 1996. 植物組織培養 · 技術, 鄉文社, pp.88-107, 264-290.



감사의 말

본 논문이 완성되기까지 지난 2년 동안 아낌없는 지도와 격려를 하여 주신 유장걸 교수님께 감사를 드리고, 심사를 맡아주신 류기중 교수님과, 자연대학 화학과 이선주 교수님, 그리고 학과의 강순선, 고정삼, 현해남, 김찬식 교수님께 감사를 드립니다. 그리고 실험의 전반을 지도해 주신 송성준 박사님께도 깊은 감사를 드립니다. 이하 선배님과 후배, 대학원 동기들과 조교선생님들께도 고마움을 전합니다.

