

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

양경애, 홍경애, 이옥영
제주대학교 방사능이용연구소

PEG-mediated protoplast fusion between *Citrus sulcata* Takahashi and *Citrus sinensis*(L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel

Yang Kyung-Ae, Hong Kyung-Ae,
Lee Ok-Young

Applied Radioisotope Research Institute,
Cheju National University
Cheju 690-756, Republic of Korea

Abstract

PEG-mediated protoplast fusion between *Citrus sulcata* Takahashi and *Citrus sinensis*(L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel was demonstrated to establish the biotechnological breeding of Citrus. The optimum enzyme composition for protoplast isolation was 0.5 % cellulase, 0.5 % macerozyme and 0.1 % pectolyase for *Citrus sulcata* Takahashi(Sambogam) and 0.3 % cellulase, 0.3 % macerozyme and 0.1 % drieselase for *Citrus sinensis*(L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel(CCRN), giving the protoplast yield of $\sim 1 \times 10^6$ protoplast / ml. The best plant materials could be obtained from young matured leaves(1~2 months old) of Sambogam and 4 weeks old callus of CCRN. 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. One of the 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 embryo were grown under the light condition for greening.

Among 21 arbitrary primers, 6 primers(OPH-04 GGAAGTCGCC, OPM-13 AGCGTTCCTC, 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 confirmed by the RAPD technique that the obtained plantlets was fused with Sambogam and CCRN.

1. 서론

감귤의 품종개량을 위하여 종래에 많이 사용해왔던 방법으로는 교잡육종 또는 변이지 선발 등을 들 수 있다. 교잡육종은 형질의 특성을 파악하는 데 많은 시간이 소요되며 자연 돌연 변이질을 선발하는 방법도 우연한 기회에 의해서 발견되기 때문에 육종방법으로서는 적극적이지 못하며 선발 확율이 매우 낮다.

1970년초 담배의 원형질체 배양(Takebe et al., 1971)과 세포융합법에 의한 첫 중간 체세포잡종 창출의 성공(Carlson 등 1972)은 작물육종의 새로운 획을 긋는 전기가 되었다. 세포융합법은 교배가 힘든 식물의 종 또는 속간에도 체세포 잡종식물의 제조가 가능하므로 목표 유용 형질의 도입에 매우 효율적인 방법이다.

1980년대에 접어들어 영년생과수인 감귤의 원형질체 배양(Vardi, 1982)이 성공함에 따라 오렌지류감귤에 대한 원형질체의 융합이 시도되기 시작하여 속간교잡이 이루어질 수 없는 감귤류간의 융합도 성공하여 감귤육종의 신기술로 자리잡기 시작하였다(Ohgawara 등, 1991, Louzada 등 1993, Gmitter 등 1990, Grosser와 Ling 1993, Grosser 등 1991, 1992a, 1992b, 1994, 1996).

세포 융합에 의한 감귤육종의 세계적인 추세는 ① 질병저항성, 내한성, 조기수확 그리고 지역기후와 풍토에 적응을 잘하게 하는 대목의 육성, ② 좋은 유용 형질을 가지는 품종과의 융합을 통한 신품종 육성 등에 주안점을 두어 연구(Ohgawara 등, 1991, Louzada 등 1993, Gmitter 등 1990, Grosser와 Ling 1993, Grosser 등 1991, 1992a, 1992b, 1994, 1996)되어 지고

있는 바, 본도에 토착화된 재래 감귤류는 오랫동안 기후와 풍토에 적응하여 왔기 때문에 각종병해나 환경요인에 견디는 힘이 강하여 세포융합에 의한 감귤육종에 우수한 공여 유전자원으로 활용할 수 있다. 따라서, 삼보감, 청귤등은 내한성과 내병성이 강한 유전형질을 가진 재래감귤로써 이러한 형질을 외국에서 육종된 감귤류에 도입할 경우 본도의 재배환경에 더욱 잘 적용할 수 있고 감귤의 품질향상도 기대할 수 있다고 본다.

국내에서 원형질체의 배양과 융합연구는 일년생 작물과 화훼를 중심으로 수행되어 왔으며 감귤과 같은 영년생 과수에서도 시도되고 있으나 아직 뚜렷한 성과를 얻지 못하는 실정이다. 특히, 세포융합은 외국의 연구사례(Ohgawara 등, 1991, Louzada 등 1993, Gmitter 등 1990, Grosser와 Ling 1993, Grosser 등 1991, 1992a, 1992b, 1994, 1996)에서도 감귤 육종의 한가지 중요한 수단으로 활용되고 있음을 감안할 때 감귤의 원형질체의 배양과 융합에 대한 기초 연구는 반드시 필요하다.

PEG 원형질체 융합법은 PEG 자체 독성의 문제점을 지적하기도 하지만 특별한 고가의 장비가 필요없이 단순한 실험조작에 의해서 수행될 수 있고 성공률도 좋기 때문에 감귤의 세포융합에도 많이 사용하고 있다. 따라서, 본 연구의 목적은 PEG 원형질체 융합 기술을 이용하여 감귤의 신품종을 개발하는 데 있으며, 감귤류의 모델 식물을 선발하여 이의 원형질체 배양과 융합조건을 조사하여 체세포 잡종식물을 만들어 내고 이에 대한 형질특성을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 스위트오렌지 callus 배양

미국 CREC(Citrus Research and Education Center, University of Florida)에서 분양받은 스위트오렌지 cell line(CCRN)을 6주 간격으로 EME배지에서 계대 배양하여 실험 재료로 사용하였다.

2. 재래감귤 유묘 배양

삼보감 종자를 1% NaClO로 표면살균을 하고 1/2 MS 무기배지에서 발아시켜 1개월 정도키운 뒤 엽을 실험재료로 사용하였다.

3. 미발달 ovule의 조직배양과 식물체 재생

온주밀감에서 발달되지 않은 ovule을 적출하여 식물생장 조절물질이 없는 MT고체배지에 치상하여 embryo를 유도하였고 식물체를 재생시켰다.

4. 원형질체 분리

오렌지 callus 또는 세절한 삼보감 또는 온주밀감 잎에 효소 용액(cellulase RS, macerozyme R-10, pectolyase Y-23 또는 driselase, 0.6M mannitol, 25 μ M CaCl₂, 6 mM MES, 1.4 mM NaH₂PO₄)을 가하여 16시간 25°C에서 방치하고 45 μ m 나이론 채로 찌거기를 걸러 낸 후 원심분리(100 g, 10분)하여 효소액을 제거하였다. 원형질체 pellet은 25% sucrose를 함유하는 CPW 용액 5 ml로 재현탁시키고 13% mannitol을 함유하는 CPW 용액 2 ml를 상층에 조심스럽게 가하여 discontinuous mannitol-sucrose gradient를 준 뒤 원심분리(100g, 6분)하여 mannitol과 sucrose 경계층에 위치하여 있는 원형질체를 Pasteur pipette으로 회수하였다(Ohgawara 등, 1991, Louzada 등 1993, Gmitter 등 1990, Grosser와 Ling 1993, Grosser 등 1991, 1992a, 1992b, 1994, 1996).

5. 원형질체 융합

순수 분리한 오렌지 callus 원형질체와 삼보감 또는 온주밀감 mesophyll 원형질체를 같은 비율로 섞은 뒤 PEG용액(MW 6,000)을 가하여 8분동안 방치하였다(table 1). 그후 용리액(A:B=9:1)을 가하여 12분 동안 기다렸다가 BH3 배지를 가하여 PEG 용액을 세척하였다(Ohgawara 등, 1991, Louzada 등 1993, Gmitter 등 1990, Grosser와 Ling 1993, Grosser 등 1991, 1992a, 1992b, 1994, 1996).

Table 1. PEG fusion solution

PEG solution	A solution	B solution
40 % PEG (MW6,000)	0.4M glucose	0.3 M Glycine
0.3M sucrose	66 mM CaCl ₂	
66 mM CaCl ₂	10% dimethylsulfoxide	
pH 6	pH 6	pH 10.5

6. 원형질체의 배양 및 체세포 배분화

융합된 원형질체는 BH₃, EME 또는 이들의 일정비를 혼합한 배지에서 단계적으로 osmoticum조건을 낮추면서 배양을 실시하여 체세포배분화를 유도하였다 (Ohgawara 등, 1991, Louzada등 1993, Gmitter등 1990, Grosser와Ling 1993, Grosser등 1991, 1992a, 1992b, 1994, 1996).

7. 식물체 재분화

유도된 구상배는 고체 EME배지에서 옮겨 배양하였으며, 직경 5 mm가 넘는 배는 1.5 g/l malt extract 가 첨가된 EME배지에서 배 비대를 유도하였다. 그후 15 mg/l coumarin과 2 mg/l NAA가 공급된 B+배지 (germination)에서 재분화시킨 뒤, 10 µg/L 2, 4-D와 3 mg/l 6-BAP가 첨가된 DBA3배지로 옮겨 주어 adventitious shoot를 유기시켰다. 지상부가 재분화 식물은 2 mg/L NAA와 0.5 g/l activated charcoal 사용된 RMAN 고체배지에 치상하여 뿌리를 유도하였다 (Grosser등 1991, 1992a, 1992b, 1994, 1996).

8. RAPD에 의한 융합체 선발

융합식물체의 잎, 삼보감 잎의 조각 또는 callus을 1.5 ml micro-tube에 넣고 Kim 등(1997)의 방법의 기초로 분리하였다. RAPD을 위해 사용된 random primer는 operon사의 것을 사용하였다. 21개종의 primer중 두 식물종에 특이적인 band pattern을 갖는 primer을 6개 선발하였고 이중에서 primer OPH-04(GGAAGTCACC)와 OPAT-04(TTGCCTCGCC)을 가지고 RAPD를 수행하였다. 즉, 500 µl micro tube에 주형 DNA 15 ng, 10 x buffer(100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40, pH 8.8) 2.5 µl, 25 mM MgCl₂ 2 µl, Taq polymerase 1.5 unit, dNTP mixture 2 µl, 5 µM primer 2 µl를 섞어 최종 25 µl가 되게 만든 후 PCR에 걸었다. PCR의 운행조건은 다음과 같다(Macado 등, 1996).

- 92°C 1 min 1 cycle
- 92°C 1 min → 36°C 1 min → 72°C 2 min 36 cycle
- 72°C 10 min → 4°C 냉각

PCR반응산물은 1.4 % agarose gel에 running 시켜

DNA band를 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 삼보감 mesophyll 원형질체와 오렌지 캘러스 원형질체 융합

1-1. 원형질체 분리 조건

식물의 세포를 둘러싸고 있는 세포벽의 조성은 식물마다 조금씩 다르기 때문에 세포벽을 파괴하고 이로부터 원형질체를 분리하기 위해서는 적당한 효소, 농도 그리고 시간 선택이 필수적이며 특히, 엽육세포와 캘러스간에도 분리조건이 다를수 있다. 또한, 일반적으로 감귤류의 원형질체 분리를 위한 효소 조성등이 알려져 있으나 Grosser등(1991,1992a,1992b, 1994, 1996)이 시도했던 방법대로 할 경우에 분리가 잘 되지 않았고 또한, 가능한 처리하는 효소의 양을 최소화시키는 것이 세포의 손상을 최소화시켜 그 활성을 유지시킬 수 있기 때문에 table 2와 3과 같이 오렌지 세포와 삼보감로부터 원형질체 분리를 위한 효소 조성과 농도를 조사하였다.

Table 2. Effect of enzyme concentration on the protoplast yield of *Citrus sinensis*(L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel callus.

Enzyme concentration(%)			Protoplast yield (protoplasts/g fresh weight)
Cellulase	Macerozyme	Drieselase	
0.3	0.3	0.1	~ 1 x 10 ⁶
0.5	0.5	0.1	~ 2 x 10 ⁴
1.0	1.0	0.2	~ 1 x 10 ⁴

Table 3. Effect of enzyme concentration on the protoplast yield of *Citrus sulcata* Takahashi mesophyll cell.

Enzyme concentration(%)			Protoplast yield (protoplasts/g fresh weight)
Cellulase	Macerozyme	Pectolyase	
0.5	0.5	0.1	~ 1 x 10 ⁶
1.0	1.0	0.2	~ 2 x 10 ⁴

오렌지 캘러스로부터의 원형질체의 분리정도는 효소의 농도와 조성 그리고 incubation 시간에 의해 크게 영향을 받았다. 일반적으로 효소의 농도가 높을수록 짧은 시간에 원형질체를 분리할 수 있는 장점이 있었으나 나출 수율이 높지 않았던 것을 감안한다면 효소농도를 낮게 하여 incubation 시간을 12-14 시간 정도하는 것이 그 수율을 높이고 값이 비싼 효소의 사용량을 절약할 수 있었다. 또한, FDA법으로 테스트된 원형질체의 활성은 95% 이상 유지되어 본 실험에 영향을 주지 않았다. 특히, Drieselase는 Pectolyase Y-23보다 오렌지 캘러스 원형질체의 수율을 증진시키는 데, 더 효과적이었다.

한편, 삼보감 엽육 조직으로부터의 원형질체 분리에는 일반적으로 감귤류에 잘 사용하는 효소가 잘 적용되었다. 캘러스의 경우와 마찬가지로 효소의 농도가 높을 때에는 원형질체가 비교적 일찍 즉, 6시간 이내에 잘 분리되고 있기는 하였으나 그 효소의 농도를 1/2로 낮추고 overnight incubation을 시킬 때 수율이 좋았다. 따라서, recipient 식물체인 오렌지 캘러스 원형질체의 나출 최적조건이 12 - 14 시간 정도임을 감안할 때 삼보감 엽육세포로부터의 원형질체의 나출을 위한 효소 농도는 cellulase 0.5 %, macerozyme 0.5% 그리고 pectolyase Y-23 0.1% 가 적당하였고 incubation 시간은 오렌지 캘러스와 같은 조건인 12 - 14 시간 정도가 적절하였다.

2. 원형질체융합 조건

비록 PEG 원형질체 융합법이 잘 확립되어 있기는 하지만 각 연구자의 연구여건과 환경에 따라 다소 차이가 날 수 있기 때문에 원형질체의 융합 조건 특히, PEG와 원형질체의 첨가 비율에 대해서 조사하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 원형질체 현탁액의 부피가 PEG용액의 부피보다 많을 때에는 융합되지 않거나 그 율이 낮았고 이와 반대인 경우는 2개 이상의 원형질체 융합이 많이 발생하였다. 그러나 PEG와 원형질체 비율이 같은 양으로 첨가 했을 때 17%내외의 가장 높은 융합율을 보였고 이는 다른 연구자들의 융합결과와 비슷하였다. 또한, 융합하는 원형질체의 밀도도 융합율에 영향을 미치는 데, 삼보감 엽육세포와 오렌지 캘러스 원형질체의 융합인 경우 $1 \times 10^5/ml$ - $5 \times 10^5/ml$ 일 때 융합율이 좋았고 이 밀도 이상일 때에

는 2개이상의 원형질체 융합이 많이 발생하였다.

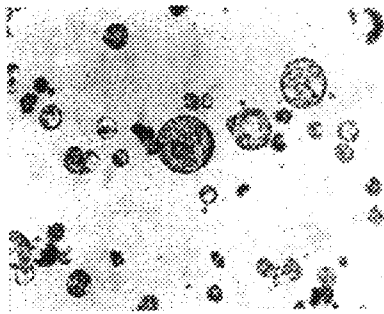
Table 4. Effect of PEG solution/ protoplast suspension ratio on fusion.

PEG solution/Protoplast suspension Ratio	Degree of protoplast fusion
0.25 : 1	No fusion
0.5 : 1	Less fusion
1 : 1	Optimum fusion
2 : 1	Over fusion

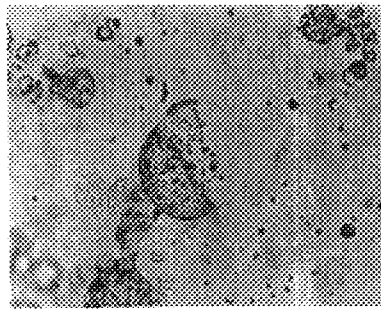
3. 원형질체 배양 및 체세포 배분화

융합된 원형질체는 Grossor등(1991, 1992a, 1992b, 1994, 1996)이 사용한 0.6 M BH₃ 액체배지에서 배양되었다. 일반적으로 오렌지 캘러스 원형질체는 배양 3 일째부터 세포벽이 합성되고 있음을 Calcofluor white 방법으로 확인할 수 있었고 약 1주일 후에는 대부분의 원형질체들이 세포벽을 합성하였을 뿐만 아니라 세포분열도 활발히 일어나기 시작하였다. 배양 2-3 주 후에는 0.6 M BH₃ - 0.146 M regular EME - 0.6M EME(1:1:1) 배지를 가하여 삼투압을 조건을 감소시켰는데, 배양 3주후에는 원형에 가까운 micro-calli가 관찰되기 시작하였다. 앞서 배양 단계에서 명배양과 암배양은 형성되는 calli 형태에 영향을 주는 것으로 사료되었다. 암배양과는 달리 명배양은 세포분열이 일어나기는 하지만 원형의 compact한 micro-calli가 아니고 부정형의 느슨한 형태의 calli가 형성되어 일정기간 분열하다가 멈춰버렸다. 따라서 감귤류의 원형질체는 암조건에서 배양되어야 할 것으로 사료된다.

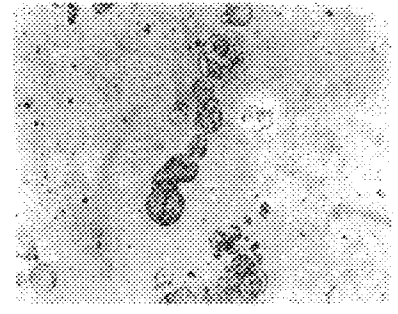
한편, 약 5주후에는 calli 생육정도에 따라서 선별적으로 첨가되는 배지의 조성이 달라야 하는 데 왕성한 경우에는 0.146M EME와 0.6 M BH₃배지를 2:1로 섞은 것을 가하여 embryo를 얻었고 육안으로 직경 0.5 - 1 mm 정도 크기의 globular embryo가 형성되었을 때 고체 EME 배지에 옮겨 3주후에는 육안으로 식별이 가능한 heart 모양의 embryo를 얻었다. 그런데, 생육이 왕성하지 않은 것도 0.6 M BH₃ - 0.146 M regular EME - 0.6M EME (1:1:1) 배지를 가하여 calli 생육을 왕성하게 한 뒤 globular embryo를 유도하여 heart 모양의 embryo를 얻었다.



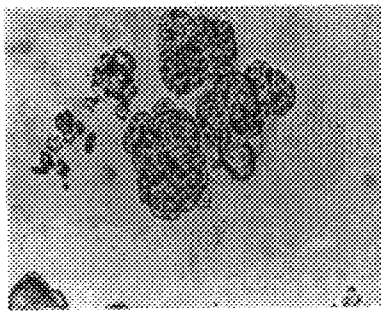
Protoplast stage



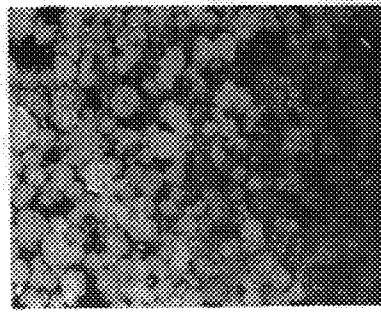
Cell division



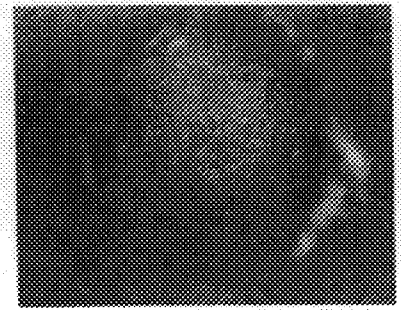
Multi-division of cell



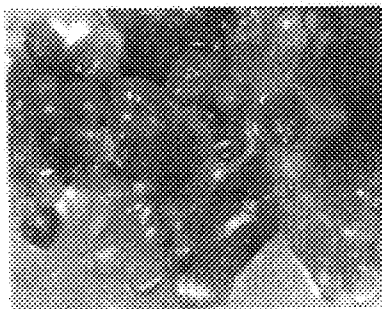
Microcalli formation



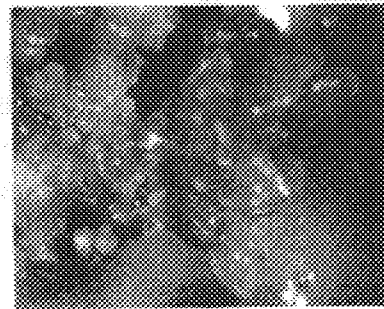
Yellow/green globular embryo



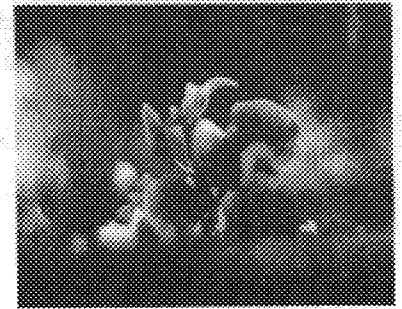
Green globular embryo



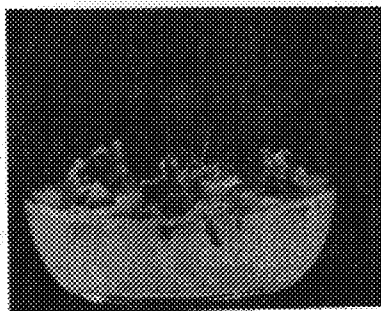
Heart shape embryo



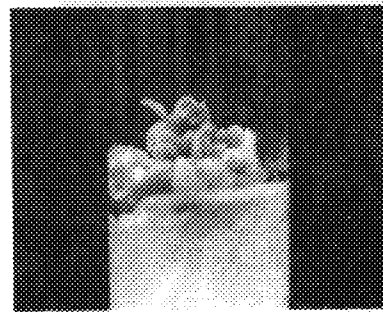
Torpedo shape embryo



Embryo germination



Adventitious shoot formation



Embryo rooting

Figure 1. Somatic embryogenesis of fused protoplasts and their plantlet formation.

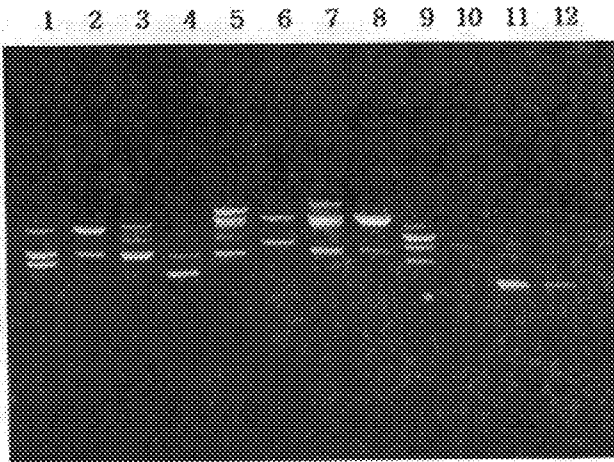
Embryo를 신장시키기 위해서는 malt extract 1500 mg 정도 첨가하는 EME 배지가 좋았고 그 후 신장된 embryo는 coumarin등이 함유된 B+배지에서 shoot가 형성되었고 또한, 뿌리가 형성되는 경우도 있었다. 그후 adventitious shoot수를 증가시키기 위해서는 DBA3 배지가 필요하였고 뿌리를 유도하기 위해서는RMAN 배지가 요구되었다(figure 1).

3-1-3. RAPD에 의한 융합 여부 분석

융합된 식물체를 선발방법에는 뿌리의 선단 염색체의 수, 잎모양 또는 DNA 다형성을 알아보는 RAPD 등이 있다. 이 중 배양단계에서 장정적인 융합체를 선발할 때에는 제일 신속하고 간편한 방법은 RAPD방법이므로 이를 이용하여 삼보감과 오렌지과의 융합된

식물체를 선발하였다. RAPD를 수행하기 위해서는 primer 선정이 중요한데 융합의 여부를 확인시켜줄 primer를 선정하기 위하여 operon 제품의 10 mer의 21개 random primer를 삼보감과 오렌지 callus에 테스트한 결과 두시료간에 차이를 나타내는 6개의 primer를 선발할 수 있었다(Table 5). 그러나, 두 식물간에 매우 확실하게 특징적인 DNA 다형성을 보이는 2개의 primer인 OPAT-04와 OPH-04를 사용하여 융합체 식물체를 선발할 수 있었다(Figure 2, 3).

따라서, 형태학적인 차이를 가지고 융합체를 찾아내는 것은 파수작물에서는 긴시간을 요하는 일이므로 RAPD를 수행하여 1차적으로 융합체를 찾는 것은 시간을 최대한 단축시킬 수 있어 권장할 만한 방법이라고 사료된다.

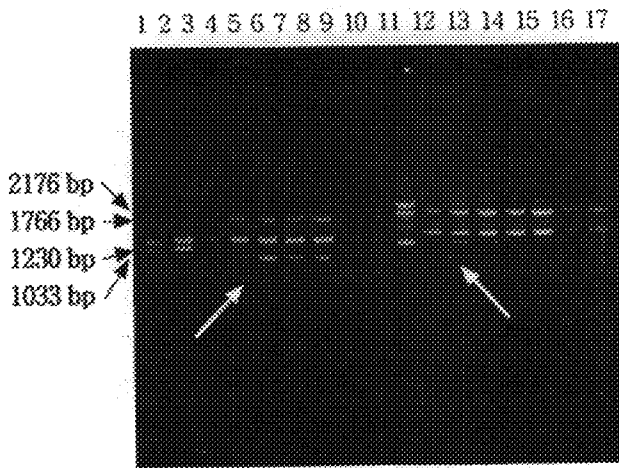


1. OPAT-04 reacted with Sambogam DNA
2. OPAT-04 reacted with CCRN DNA
3. OPAT-13 reacted with Sambogam DNA
4. OPAT-13 reacted with CCRN DNA
5. OPH-04 reacted with Sambogam DNA
6. OPH-04 reacted with CCRN DNA
7. OPH-15 reacted with Sambogam DNA
8. OPH-15 reacted with CCRN DNA
9. OPN-13 reacted with Sambogam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

Figure 2. The primers selected for RAPD to confirm the protoplasts fusion between *Citrus sulcata* Takahashi(Sambogam) and *Citrus sinensis*(L.) Osbeck var. Cara Cara Red Navel(CCRN).

Table 5. 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.

Primers showing specific bands	
Primer	5' to 3'
OPH-04	GGAAGTCGCC
OPM-13	AGCCTCACTC
OPN-07	CAGCCAGAG
OPH-15	AATGGCCAG
OPAT-04	TTCCTCGCC
OPAT-13	CTGGTGAAG
Primers showing non-specific bands	
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPAT-14	GTGCCGCACT
OPI-11	ACATGCCGTG
OPJ-09	TGAGCCTCAC
OPI-10	AAGCCCGAGG
OPK-04	CCGCCAAAC
OPM-04	GGGGTTGTC
OPM-06	CTGGGCAACT
OPM-13	AGCCTCACTC
OPN-07	CAGCCAGAG
OPN-14	TCGTCCGGT
OPN-20	GGTCTCCGT
OPQ-10	TGTCCCGAA
OPQ-11	TCTCCCAAC
OPQ-14	GGACGCTTCA
OPW-17	GTCTGGGTT
Primers not amplified	
OPB-09	TGGGGACTC



1. DNA marker(DNA molecular-weight marker 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 OPN-13

Figure 3. The specific band patterns of fused plant and non-fused plant. The white arrows indicating the DNA bands of the fused plant.

참 고 문 헌

- Carlson, P. S., Smith, H. H., and Dearing, R. D. (1972) Parasexual interspecific plant hybridization. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2292-2294
- Louzada, E. S., J. W. Grosser, and G. Gmitter, Jr.(1993) Intergeneric somatic hybridization of sexually incompatible parents: *Citrus sinensis* and *Atalantia ceylanica*. Plant Cell Reports 12:687-690
- Gmitter, F. G., Jr., X. B. Ling and X. X. Deng(1990) Introduction of triploid Citrus plants from endosperm calli in vitro. Theor Appl Genet 80:785-790
- Grosser, J. W., J. L. Chandler, and E. S. Louzada (1991) The effect of growth regulators on the rooting of stem cuttings of citrus related genera and intergeneric somatic hybrids. Proc. Fla. State Hort. Soc. 104:188-191.
- Grosser, J. W., Frederick G, Gmitter, Jr., E. S. Louzada, and J. L. Chandler (1990) Production of Somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development. HortScience 27(10): 1125-1127.
- Grosser, J. W., Frederick G, Gmitter, JR., E. S. Louzada, and J. L. Chandler (1992) Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development. Hortscience 27(10): 1125-1127
- Grosser, J. W. and J. L. Chandler (1993) In-vitro micropropagation of seedless 'COHEN' Citrange. Proc. Fla. State Hort. Soc. 106:57-60.
- Grosser, J. W., Eliezer S. Louzada, Frederick G. Gmitter, Jr. and J.L. Chandler (1994) Somatic hybridization of complementary citrus rootstocks : Five new hybrids. Hortscience 29(7):812-813
- Grosser, J. W., Frederick G, Gmitter, JR., W. S. Castle and J. L. Chandler (1994) Production and evaluation of citrus somatic hybrid rootstocks: Progress report. Proc. Fla. State Hort. Soc. 108: 140-143.
- Grosser, J. W., F. A. A. Mourao-Fo , F. G. Gmitter Jr, E. X. Louzada, J. Jiang , K. Baergem, A. Quiros C. Cabasson, J. L. Schell, J. L. Chandler (1996) Allotetraploid hybrids between citrus and seven related genera produced by somatic hybridization. Theor Appl Genet 92:577-582
- 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 protoplasts following somatic fusion. Plant Cell Reports 15:672-676
- 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.

- 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.
- 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 Appl Genet 81:141-143
- Takebe, L., Labib, G., and Melchers, G. (1971) Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissen. 58:318-320