



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



석사학위논문

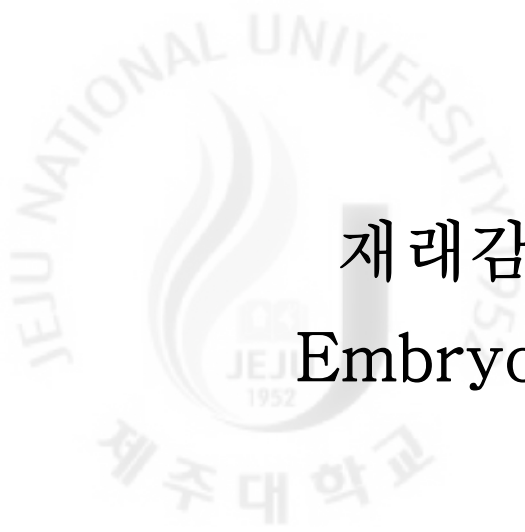
재래감귤 미성숙 배주 이용
Embryogenic Callus 유도 및
감귤 형질전환

제주대학교 대학원

생명공학과

이 비

2012년 02월



재래감귤 미성숙 배주 이용 Embryogenic Callus 유도 및 감귤 형질전환

지도교수 김 재 훈

이 비

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2012년 02월

Li Fei의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 대학원

2012년 02월

**Embryogenic callus induction from undeveloped
ovules of Jeju native citrus species and *Citrus
unshiu* Marc. transformation**

Li Fei

(Supervised by professor Jae Hoon Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
For the degree of Master of Biotechnology

February, 2012

This thesis has been examined and approved.

Chairperson of the supervising committee

Professor Key-Zung Riu, Ph.D., College of Applied Life Sciences, Jeju National University,
Korea

Professor Somi Kim. Cho, Ph.D., College of Applied Life Sciences, Jeju National University,
Korea

Professor Jae Hoon Kim, Ph.D., College of Applied Life Sciences, Jeju National University,
Korea

Department of Biotechnology

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목차

목차.....	i
그림 목록.....	iii
표 목록.....	v
초록.....	1
PART I. 재래감귤 미성숙 배주 이용 Embryogenic callus 유도	
1. 서론.....	3
2. 재료 및 방법.....	5
1) 식물 재료.....	5
2) 배양 배지.....	8
3) Embryo 유도.....	11
3. 결과.....	14
4. 고찰.....	18

PART II. 감귤 형질전환

1. 서론.....	19
2. 재료 및 방법.....	25
1) 식물 재료.....	25
2) 식물 형질전환 벡터의 제조.....	25
3) 형질전환.....	25
4) 형질전환체 검정.....	26
3. 결과.....	31
1) 형질전환체 선발 및 식물체 재분화.....	31
2) PCR법 이용한 형질전환 식물체의 확인.....	33
4. 고찰.....	34
부표.....	35
참고 문헌.....	40

그림 목록

Fig. 1. Classification of 12 kinds of Jeju native citrus species that is grown at Citrus Research Station, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Jeju. 7

Fig. 2. As experimental materials. 12

Fig. 3. Two months to cultivate native citrus undeveloped ovules. 15

Fig. 4. Three months to cultivate native citrus undeveloped ovules. 16

Fig. 5. Carotenoid biosynthesis pathway in plant. 22

Fig. 6. The isoprenoid biosynthetic pathway for Ggps. 23

Fig. 7. The biosynthetic pathway for ZDS. 24

Fig. 8. Callus(Miyagawa Wase) used in transgenic. 27

Fig. 9. Ggps and ZDS configuration of the transgenic vector. 28

Fig. 10. Ggps(geranylgeranyl diphosphate synthase) for *Citrus unshiu*. 29

Fig. 11. ZDS(zeta-carotene desaturase) for *Citrus unshiu*. 30

Fig. 12. Regeneration of *Citrus unshiu* embryogenic calluses after *Agrobacterium* mediated transformation. 32

Fig. 13. Shoot-tip *in vitro* grafting onto rootstock plants. 33

Fig. 14. Transgenic plants Ggps using PCR confirmed. 35

Fig. 15. Transgenic plants ZDS using PCR confirmed. 35

표 목 록

Table. 1. Classify of 12 kinds of Jeju native citrus species..... 6

Table. 2 Media conditions is MS I , MSII , MSIII..... 9

Table. 3. Media conditions is EME and 1/2 EME media..... 10

Table. 4. Experimental flowchart of embryogenic callus..... 13

Table. 5. Results of induced callus in 12 kinds of Jeju native citrus species.
..... 17

초록

PART I. Embryogenic callus induction from undeveloped ovules of Jeju native citrus species

There are 12 kinds of native citrus species in Jeju island. They have been well known for their physiological active substances. With increasing of the cultivation area for commercial citrus cultivars, the numbers of the Jeju native citrus species have lowered to an extremely dangerous level. Citrus callus can be applied widely to somatic hybridization, genetic transformation, and in vitro germplasm conservation. To obtain calluses, the undeveloped ovules of 12 different citrus species were cultured on 5 different media, respectively; MSI (MS, modified, with the addition of malt extract 500 mg/L and sucrose 50 g/L), MSII (MS, modified, with the addition of malt extract 500 mg/L, kinetin 1 mg/L and sucrose 50 g/L), MSIII (MS, modified, with the addition of malt extract 500 mg/L, 6-benzyladenine, 3 mg/L and sucrose 50 g/L), EME (MT, modified, with the addition of malt extract 500 mg/L and sucrose 50 g/L), 1/2 EME (half concentration of MT macronutrients, half concentration of BH3 macronutrients, malt extract 500 mg/L, glutamine 1.55 g/L and sucrose 50 g/L). The embryogenic calluses of *Citrus grandis* Osbeck and *Citrus platymamma* Hort . et Tanaka were obtained from media MSIII and MSII for two month culture, respectively. Embryogenic calluses were observed from surface of undeveloped ovules.

PART II. *Citrus unshiu* Marc. transformation

Carotenoids are a large family of isoprenoid compounds which provide attractive coloration to flowers and fruits, ranging from yellow, orange to deep red. High antioxidant activities also have effects on the prevention of heart disease and various cancers, offering useful functions for health. Ggps (geranylgeranyl diphosphate synthase) is known as a key enzyme for

carotenoid biosynthesis pathway and ZDS (ζ -carotene desaturase) is responsible for lycopene biosynthesis. To obtain transgenic citrus trees expressing Ggps and ZDS respectively, agrobacterium-mediated transformation was performed. After transformation by cocultivation *Citrus unshiu* callus and agrobacterium, transgenic plant candidates were selected with hygromycin selection medium, elongation medium and germination medium. Four Ggps gene transgenic target plants all confirmed and ten ZDS gene transgenic target plants eight confirmed by PCR (polymerase chain reaction).

제 1장. 미성숙 배주를 이용 Callus 유도

1. 서론

감귤류는 운향과 (*Rutaceae*), 감귤아과 (*Aurantinoideae*), 감귤군 (*Aurantinae*)에 속하는 식물 군으로서 현재 재배되고 있는 감귤은 분류상 감귤속 (*Citrus L.*), 금감속 (*Fortunella Swingle*), 탕자속 (*Poncirus RAF.*)의 3속이다. 감귤의 원산지는 아시아 대륙의 동남부와 그 주변부로 추정되고 있으며 약 2,000만년~3,000만년 전에 지구상에 최초의 감귤이 생성되었다고 추정되고 있다. 감귤류는 전 세계적으로 2,000여종이 넘는 유전자원이 있다고 보고되고 있으며 약 1,000여 품종이 재배되고 있다. 감귤은 국내 생산량의 대부분이 제주지역에서 생산되고 있으며, 생산총액은 연평균 6,000억원 규모이고, 생산량은 연간 60만 톤으로 생산총액과 생산량에서 국내 과수 생산량 1위를 차지하고 있는 중요한 작물로서 제주지역의 경제를 좌우하는 대표적인 산업이다. 1900년대 들어서면서 일본에서 미장온주가 도입된 이후 온주밀감 및 하귤, 이에감, 팔삭 등의 만감류가 도입되었으며, 최근 일본 육성 품종이 도입되고 있다. 그러나 1990년대 중반까지 도입된 품종 일부를 제외하고 현재는 거의 재배가 되고 있지 않다. 제주 재래감귤은 금감, 산귤, 청귤, 동정귤, 감자, 유감, 당유자, 홍귤, 유자, 당금귤, 석금귤, 편귤, 사두감, 주감, 광귤, 지각등 22개 품종이 재배되었다고 보고되어 있으나 (고정삼, 2007) 생식용으로는 맛이 없고 품질이 떨어져 차차 새로운 품종으로 개량되어 지금은 병귤, 당유자, 유자, 청귤, 동정귤, 홍귤, 진귤 등 12 가지 품종만이 보존되고 있다. 재래감귤은 내한성, 흑점병 및 창가병 (진귤은 제외)에 대한 저항성이 강하였고, 유자, 병귤, 청귤, 빈귤, 진귤 및 홍귤은 궤양병에 강하여 내한성 및 내병성 품종 육생의 재료로 이용할 수 있다 (김한용 1991).

감귤의 품종 육성은 대부분 교배육종과 가지 돌연변이 선발에 의하여 이루어져 왔으나, 과수는 작물특성상 유전적으로 유전형질의 조성이 매우 복잡하고 교배불친화성이 존재하여 우량형질 교배친간의 교배가 어렵다. 또한, 교배되어 종자가 맺히더라도 꽃이 피어 열매가 결실하기까지 약 10년 이상이 요구되는 등 과수의 교배육종에는 오랜 기간과 많은 비용이 필요하다 (안현주 외, 2008). 이와 같은 재래 육종

수단의 문제점을 해결하기 위해 기내육종방법이 적용되고 있다. 감귤류는 한 종자안에 접합자 유래의 정상배 이외에 배주 주심조직 유래의 부정배가 한 개부터 40개 정도까지 생기기도 한다. 기내 배양시에도 감귤속 식물에서는 배주 주심조직을 치상재로 하었을 때 배가 잘 발생하지만, 경엽이나 기타 영양기관의 조직을 배양했을 때에는 배가 잘 발생하지 않을 뿐만 아니라 식물체 재생능도 거의 없는 것으로 알려지고 있다 (Grinblat 1972, Burger and Hackett 1981, Barlass and Skene 1982, Edriss and Burger 1984, Duran-Vila et al. 1989). 따라서 재래감귤들에 대한 유전자원을 보존하고 특성을 파악하여 재래감귤의 이용 가능성을 높이며, 재래감귤의 배주를 이용하여 단기간내에 식물체로 재분화 가능성이 있는 embryogenic callus 세포 유도의 효과적인 방법을 개발하는 것이 목표이다.

Kochba 등 (1972)에 의해 Sweet orange의 미성숙 배주배양을 이용하여 embryogenic callus 세포를 유기시키는데 성공 한 이후 *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus paradisi*, *Citrus reticulata*, *Citrus limon*, *Citrus madurensis*와 같은 다배성이 많은 품종들에서 무균 주심배(Bitters et al.,1970; Navarro et al., 1979), 감귤류의 절제한 주심배 (Rangan et al.,1968), 불완전 배주 (Bitters et al.,1970), 수정이 되지 않은 배주 (Button and Bornman,1971), 미발달한 배주 (Starrantino and Russo, 1980), 과립낭 (Nito and Iwamasa, 1990)등을 이용하여 embryogenic callus 세포를 유도했다는 연구결과들이 보고되었다. 또한 원형질 분리기술(Vardi and Galun, 1989, Grosser and Gmitter, 1990 a and b, Gmitter et al., 1992)을 이용하여 생식기관((Kobayashi et al.,1990, Marin et al., 1993, Engelmann et al.,1994, Sakai et al., 1990 and 1991, Duran-Vila, 1995)으로부터 embryogenic callus 세포를 유기시킬 수 있다.

본 연구에서는 제주도 멸종 위기의 재래감귤들에 대한 유전자원을 보존하고 특성을 파악하여 재래감귤의 이용 가능성을 높이기 위해 12 품종의 재래감귤 미성숙 배주를 이용하여 embryogenic callus들을 식물생장조절물질의 종류와 첨가농도를 달리한 배지에서 유도하는 실험을 수행하였다. 식물생장조절물질로서는 사이토키닌에 포함되어 있는 BA (6-benzyladenine) 및 Kinetin (6-furfurlamino purine, kinetin)을 사용하였는데 이것은 같은 사이토키닌이지만 식물마다 작용하는 호르몬과 작용반응의 차이가 있기 때문이다. 그래서 본 연구에서는 12품종 재래감귤들 각각에 작용하는 호르몬 조건을 찾기 위해 BA와 Kinetin을 사용하여 실험을 수행하

였다.

2. 재료 및 방법

1) 식물 재료

Callus세포 유도를 위한 식물재료는 2011년 5월 제주도 서귀포 감귤시험장에서 재래감귤 12 품종의 체세포조직 (개화 되지 않은 꽃봉오리)을 채취하여 실험에 이용하였다 (Table 1, Fig. 1).

Table. 1. Classify of 12 kinds of Jeju native citrus species.

Scientific name	Common name	Korea name
<i>Citrus benikoji</i> Hort. ex. Tanaka	Kamja	감자
<i>Citrus grandis</i> Osbeck	Dangyooja	당유자
<i>Citrus erythrosa</i> Hort. et Tanaka	Dongjeongkyool	동정귤
<i>Citrus platymamma</i> Hort. et Tanaka	Byungkyool	병귤
<i>Citrus leiocarpa</i> Hort. ex. Tanaka	Binkyool	빈귤
<i>Citrus pseudogulgul</i> Hort. ex Tanaka	Sadookam	사두감
<i>Citrus junos</i> Sieb. et Tanaka	Yooja	유자
<i>Citrus aurantium</i> L	Jikak	지각
<i>Citrus sunki</i> Hort. ex Tanaka	Jinkyool	진귤
<i>Citrus nippokoreana</i> Tanaka	Cheongkyool	청귤
<i>Citrus tangerina</i> Hort. ex Tanaka	Pyunkyool	편귤
<i>Citrus tachibana</i> Tanaka	Hongkyool	홍귤

12 kinds of Jeju native citrus species this study as the material for Citrus Research Station, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Jeju.

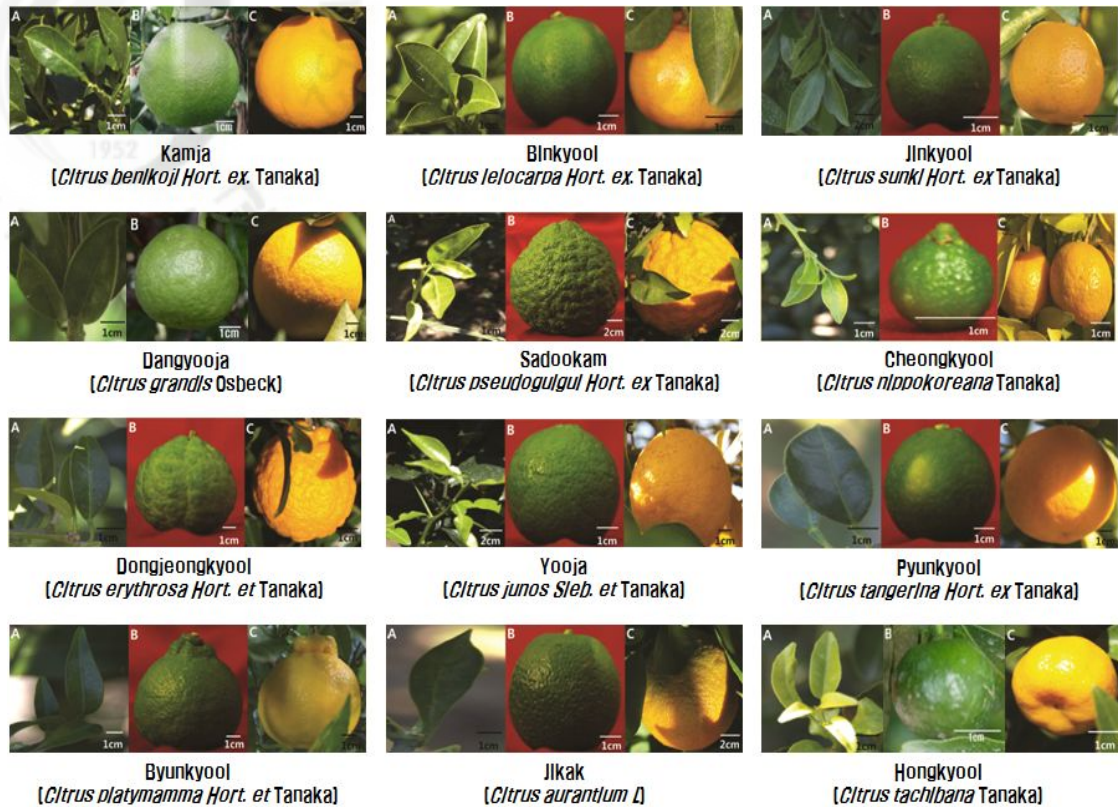


Fig. 1. Classification of 12 kinds of Jeju native citrus species that is grown at Citrus Research Station, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Jeju. (A) Leaf, (B) Immature fruit, (C) Mature fruit of each citrus species. Citrus species names were described that common names (above) and scientific names (under). Each bars = 1cm

2) 배양 배지

재래감귤 미성숙 배주로부터 callus 세포를 유도하기 위하여 지금까지 발표된 callus 세포유도와 관련된 논문들을 참고로 일차적인 기본조건을 찾았다. MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 탄소원으로 sucrose 5%, Malt extract 500 mg/L, pH 5.7-5.8, agar 0.8% 첨가된 MS I 고체배지와 MS I 고체배지에 식물 성장조절제로서 Kin (kinetin)과 BA (6-benzylamino purine) 첨가 후 변형시킨 MS II, MSIII 고체배지를 사용하였다 (Table 2) (Francesco *et al.*, 1998, A.El-Sawy *et al.*, 2006). 그리고 MT (Murashige and Tucker 1969) 기본배지에 탄소원으로

sucrose 5%, Malt extract 500 mg/L, pH 5.7-5.8, agar 0.8% 첨가된 EME 배지와 MT macronutrients를 기준 첨가량의 반만 사용한 1/2 EME 고체배지에 BH3 macronutrients와 L-Glutamine 첨가하여 callus를 유도하였다 (Table 3).

3) Embryo 유도

Callus 세포를 유도하기 위하여 개화되지 않은 꽃봉오리 (Fig. 2A)를 채집한 후 꽃잎을 제거한 자방 (Fig. 2B) 만을 얻은 후, clean bench로 이동하였다. 기외에서 얻은 식물조직은 오염 방지를 위해 항상 배양 전에 표면살균처리를 하였으며 (한지학, 2007) 이때 시료의 살균 방법은 다음과 같다. 70% 에탄올 적당량을 비커에 부은 후 꽃잎이 제거된 자방들을 담가서 5분 동안 침지한 후 2% sodium hypochloride에 담가서 15분 정도 처리 후 멸균된 3차 증류수로 3번 세척하였다. 그 후 절편 할 때 생기는 갈변을 방지하기 위하여 2.6 mM citric acid가 첨가된 멸균 3차 증류수로 20분간 표면 살균처리 하였다 (Francesco et al., 1998). 표면 살균처리된 자방들을 약 5분-10분 정도 dry 하였다. 현미경 상에서 메스를 이용하여 자방을 절편한 후 핀셋을 이용해서 미성숙 배주들을 callus세포 유도배지에 접종하였다 (Fig. 2C). 재래감귤 12품종의 배주를 다섯 개의 배양배지에 각 20개씩 접종하였으며 이 과정을 두 번 반복하였다. 접종 후 파라필름으로 페트리디쉬를 밀봉해서 실온 25°C±1 의 배양실에서 4 주간 암배양 하였다 (Table 4).

Table 2. Media conditions is MS I, MS II, and MSIII.

Contents	Culture media		
	MS I	MS II	MS III
MS basal salts	+	+	+
Vitamins	+	+	+
Sucrose(50 g/L)	+	+	+
Malt extract(500 mg/L)	+	+	+
BA(3 mg/L)	-	-	+
KIN(1 mg/L)	-	+	-

MS basal salts;

Macronutrients (CaCl₂ 6.64 g/L, KH₂PO₄ 3.40 g/L, KNO₃ 38 g/L, MgSO₄ 3.6 g/L, NH₄NO₃ 33 g/L).

Micronutrients (H₃BO₃ 0.62 g/L, MnSO₄•H₂O 1.68 g/L, ZnSO₄•7H₂O 0.86 g/L, KI 0.083 g/L, Na₂MoO₄•2H₂O 0.025 g/L, CuSO₄•5H₂O 0.025 g/L, CoCl₂•6H₂O 0.0025 g/L).

Iron (Na₂EDTA 7.45 g/L, FeSO₄•7H₂O 5.57 g/L).

KIN ; 6-furfurlamino purine (kinetin). BA ; 6-benzylamino purine.

Table 3. Media conditions is EME and 1/2 EME media.

Contents	Culture media	
	EME	1/2EME
MT basal salts	+	1/2
BH3 macronutrients	-	+
Sucrose(50 g/L)	+	+
Vitamins	+	+
Malt extract(500 mg/L)	+	+
Glutamine(1.55 g/L)	-	+

MT basal salts:

Macronutrients (NH_4NO_3 82.5 g/L, KNO_3 95 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 18.5 g/L, KH_2PO_4 7.5 g/L, K_2HPO_4 1 g/L).

Micronutrients (H_3BO_3 0.62 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.68 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.86 g/L, KI 0.083 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0025 g/L).

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 29.33g/L, Na_2EDTA 7.45 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.57 g/L.

MT; Murashige and Tucker basal medium.

BH3 Macronutrients (MgSO_4 37 g/L, KH_2PO_4 15 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, KCl 150 g/L).

1/2EME : Macronutrients and BH3 Macronutrients are half concentration of macronutrients.

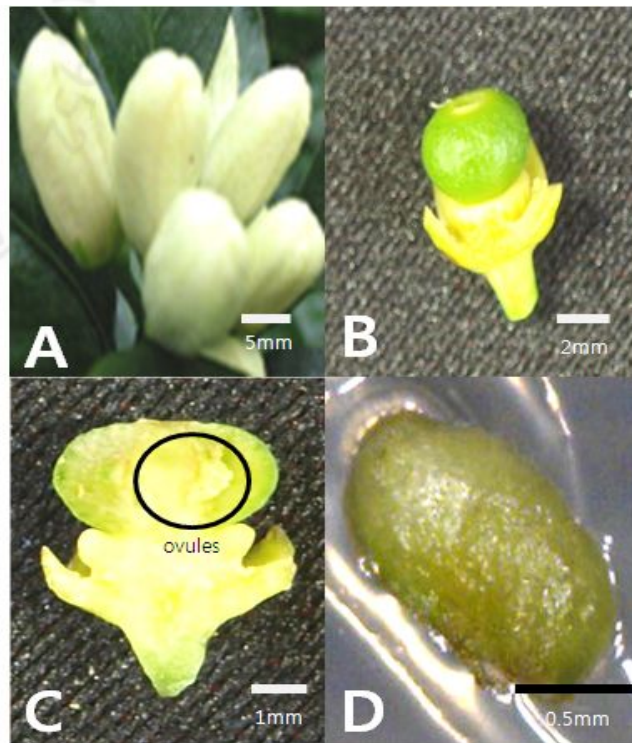
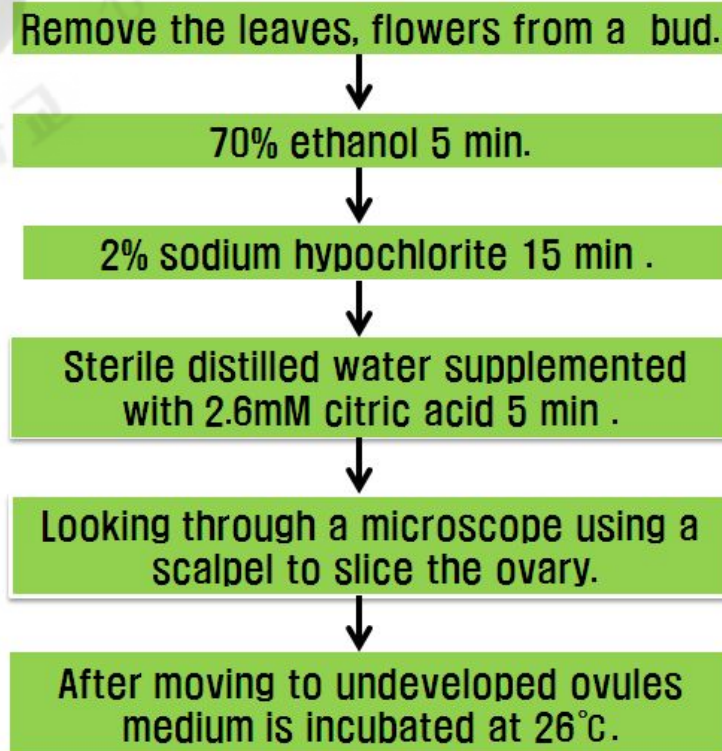


Fig. 2. As experimental materials. (A) Flowers are not blooming. (B) Ovary
(C) Sectioning of ovary. (D) Ovules after 2 months cultured.

Table 4. Experimental flowchart of embryogenic callus.



3. 결과

재래감귤 12품종의 미숙배주로부터 embryogenic callus세포를 유도하였다. 미성숙 배주들을 5가지의 배지에서 2달 정도 배양 후 embryogenic callus세포, 비정상적인 callus세포, 그리고 embryo의 형태 생성을 관찰 하였다. 가장 먼저 MSⅢ 배지에서 배양한 당유자와 MSⅡ 배지에서 배양한 병굴에서 embryogenic callus 세포의 가운 embryogenic callus세포가 유도된 것을 확인 하였다 (Fig. 3). 그리고 배양 3달 후 다양한 품종의 재래감귤 배주에서 embryogenic callus 세포를 얻을 수 있었다 (F 4). 배지종류에 따른 callus 유도 결과를 보면 감자, 당유자, 병굴 그리고 홍굴은 한 가지 배지에서만 embryogenic callus가 유도되었다 (Table. 5) . 감자는 1/2 EME 배지에서 유도되었고, 당유자는 MSⅢ, 병굴은 MSⅡ, 마지막으로 홍굴은 EME 배지에서 유도되는 것을 확인 하였다. 지각은 MS I, EME 배지에서 유도되었고 진굴은 MS I, MSⅡ, MSⅢ 배지에서 embryogenic callus가 유도되는 것을 확인 하였다. 청굴은 본 연구에서 사용한 5가지의 배지 모두에서 embryogenic callus가 유도되는 것을 확인하였다. 동정굴, 빈굴, 유자, 편굴등은 본 연구에서 사용한 배지에서 embryogenic callus가 유도되지는 않았지만 그 외 비정상적인 callus, 그리고 embryo의 생성등을 관찰 하였다. 그러나 사두감의 경우 본 연구에서 사용한 5가지의 배지에서 단 하나의 callus나 embryo도 얻을 수 없었던 것으로 보아 사두감은 이번과 다른 조건의 배지를 이용하여 캘러스를 유도할 필요가 있는 것으로 확인 되었다.

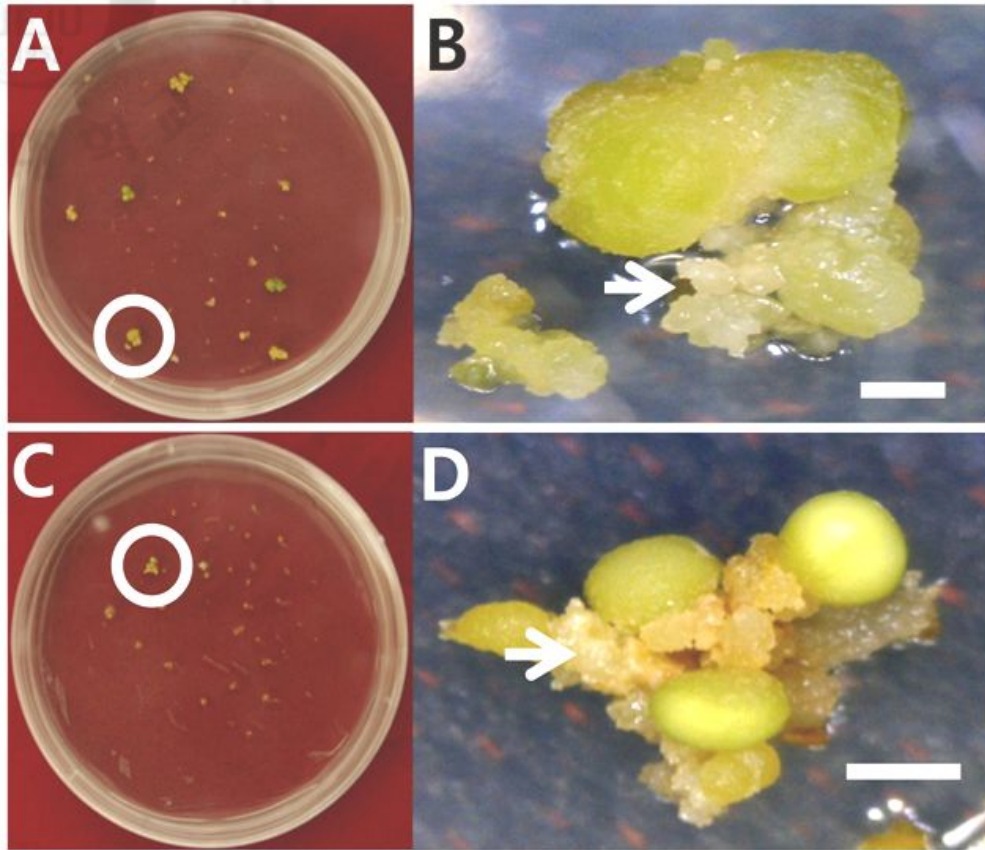


Fig. 3. Two months to cultivate native citrus undeveloped ovules. (A) Cultured in the MSIII medium to produce callus of undeveloped ovules were *Citrus grandis* Osbeck. (B) Larger picture in white circle of A. (C) Cultured in the MSII medium to produce callus of undeveloped ovules were *Citrus platymamma* Hort. et Tanaka. (D) Larger picture in white circle of C. White arrows were showed callus derived from embryo. Bar = 0.1 mm

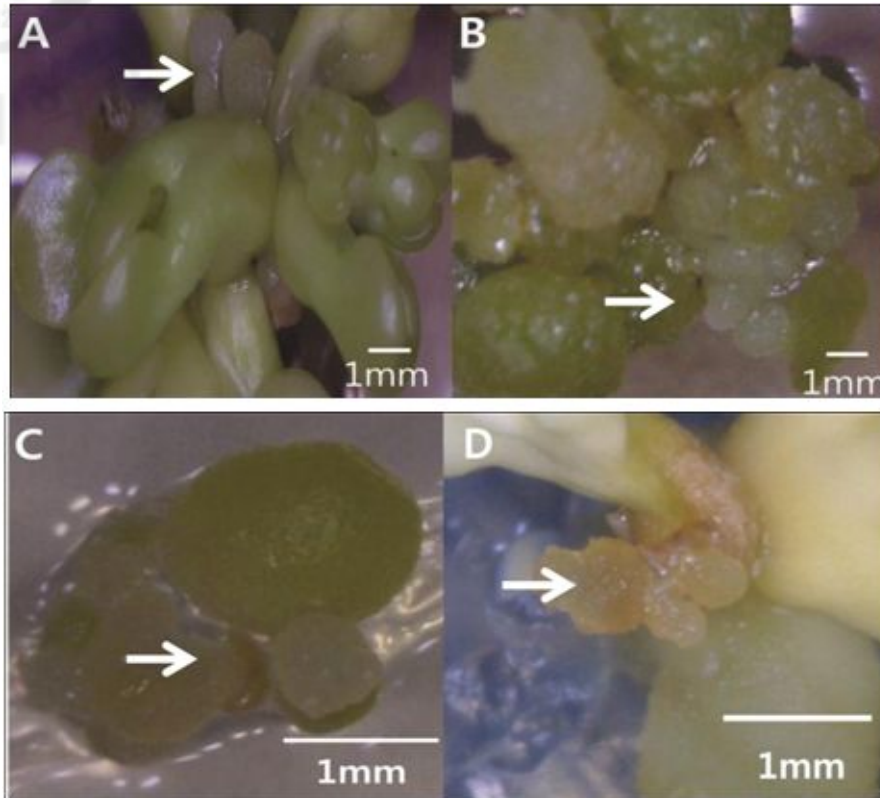


Fig. 4. Three months to cultivate native citrus undeveloped ovules.
 (A) Cultured in the MS I medium to produce callus of undeveloped ovules were *Citrus nippokoreana* Tanaka. (B) Cultured in the MSII medium to produce callus of undeveloped ovules were *Citrus aurantium* L. White arrows were showed callus derived from embryo.

Table 5. Results of induced callus in 12 kinds of Jeju native citrus species.

Common name	MS I			MS II			MS III			EME			1/2 EME		
	Normal callus derived from embryo	Abnormal callus derived from ovule	Embryo	Normal callus derived from embryo	Abnormal callus derived from ovule	Embryo	Normal callus derived from embryo	Abnormal callus derived from ovule	Embryo	Normal callus derived from embryo	Abnormal callus derived from ovule	Embryo	Normal callus derived from embryo	Abnormal callus derived from ovule	Embryo
Kamja	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	7
Dangyooja	0	0	2	0	0	1	5	0	10	0	0	5	0	0	11
Dongjeongkyool	0	0	2	0	10	0	0	7	0	0	0	6	0	0	7
Byungkyool	0	0	3	1	0	9	0	0	0	0	3	1	0	0	2
Binkyool	0	0	4	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0	0	12
Sadookam	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yooja	0	0	5	0	1	9	0	0	16	0	0	2	0	0	1
Jikak	2	0	21	0	0	13	0	0	3	1	0	7	0	0	6
Jinkyool	1	0	3	1	0	6	1	3	12	0	0	4	0	3	6
Cheongkyool	2	6	13	4	17	20	1	3	11	3	0	12	6	0	31
Pyunkyool	0	0	3	0	0	7	0	0	12	0	0	0	0	0	0
Hongkyool	0	1	5	0	0	5	0	0	17	3	4	8	0	0	20

- Embryogenic callus.
- 비정상 Callus(Embryogenic callus가 아님).
- 일반 Embryo.

4. 고찰

본 연구에서는 제주도 멸종 위기의 재래감귤들에 대한 유전자원을 보존하고 특성을 파악하여 재래감귤의 이용 가능성을 높이기 위해 12 품종의 재래감귤 미성숙 배주를 이용하여 식물생장조절물질의 종류와 첨가농도를 달리한 다섯 개의 배지에서 embryogenic callus 세포유도에 관한 실험을 수행하였다.

BA 및 KIN은 같은 사이토키닌 호르몬은 식물마다 작용하는 기능이 다르기 때문에 본 실험에서 이용한 12 품종 재래감귤들 각각에 작용하는 최적의 호르몬 조건을 찾기 위해 BA 및 KIN을 사용하였다. Francesco *et al.*, (1998)의 연구에서 네이블 오렌지 그룹 중 서로 다른 11 품종의 미성숙 과실 배주의 배양에 BA가 첨가된 MS배지가 제일 좋은 조건임을 알 수 있었고. A.El-Sawy *et al.*, (2006)도 같은 배지 조건에서 서로 다른 11 품종의 감귤류 미성숙 배주의 배양결과 BA가 첨가된 MS배지는 33.7%로 31.7%의 기본 MS배지 그리고 17.9%의 KIN 첨가된 MS배지들 보다 높은 배양효율을 보여주었다. 재래감귤 미성숙 배주를 이용하여 embryogenic callus 세포를 유도한 본 연구의 경우 BA는 당유자, 진귤, 청귤에서 그리고 KIN의 경우 병귤, 진귤, 청귤에서 callus 세포유도 효율이 좋았다.

본 연구를 통해 재래감귤 12 품종 중 7품종 (당유자, 병귤, 청귤, 감자, 지각, 진귤, 홍귤)의 미숙 배주로부터 embryogenic callus 세포를 유도하였다. 특히 청귤은 본 연구에서 이용한 다섯 가지의 모든 배지에서 embryogenic callus 세포가 유도되는 것을 확인하였다. 이러한 연구결과는 신품종 감귤 생산 연구 뿐 아니라 멸종위기에 놓인 재래감귤에 대한 중요한 유전자원으로서 그리고 callus를 이용한 기능성 물질의 대량 생산에 따른 고부가가치 산업화에 활용이 가능하다고 생각되어진다.

제 2장. 감귤 형질전환

1. 서론

감귤 형질전환에 관한 연구는 미국, 스페인, 브라질을 중심으로 시작 되었으며 90년대 후반부터 일본, 중국, 한국에서도 연구를 수행하기 시작했다.

감귤류에 함유된 식물성분으로서 시네후린, 플라보노이드, 리모노이드, 카로티노이드 등의 다양한 화합물들이 알려져 있으나 현재까지도 식물화학적으로 검토가 되지 않은 성분들이 많이 남아있다. 카로티노이드(carotenoid)는 현재 600여종 이상이 알려져 있을 만큼 자연계에 널리 분포하는 대표적인 천연색소로써 붉은색과 주황색 야채나 과실에 많이 함유되어 있다 (Hirschberg, 2001, DellaPenna and Pogson, 2006, Zhu *et al.*, 2002). 감귤류에 다량 존재하는 카로티노이드 물질은 β -carotene 과 β -cryptoxanthin이 있으며 특히 β -carotene은 체내에서 비타민 A로 전환이 되기 때문에 프로비타민 A로 불리고 영양적으로 중요한 성분이다 (Clinton, 1998, Sandmann, 2001, Fraser and Bramley, 2004). β -cryptoxanthin은 감귤류 중에서도 온주밀감에 많이 함유되어 있으며 피부암, 대장암 억제에 효과가 큰 것으로 보고되어 있다 (Kim *et al.*, 2001). 또한 카로티노이드는 암세포 괴사 활성화와 심장병 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Matsumura *et al.*, 1997). 또 다른 대표적인 카로티노이드 물질인 lycopene은 주로 붉은색 야채나 과실에 다량으로 포함된 물질로 체내에서 독립적으로 자유 라디칼 (free radical) 제거제, 즉 항산화제의 역할을 수행하며 체내에서 비타민 A로 전환될 수 있는 α -carotene, β -carotene, γ -carotene 그리고 cryptoxanthin등의 카로티노이드에 비해 높은 항산화능을 가지고 있는 것으로 보고되었다 (Di Mascio *et al.*, 1989, Nguyen *et al.*, 1999). 최근에는 lycopene이 전립선암, 피부암, 유방암, 그리고 식도암, 췌장암, 구강암 등과 같은 소화기 관련 암 등의 함암효과와 동맥경화와 같은 심혈관계 질환의 예방, 그리고 노화방지에 효과가 있음이 알려져 이에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Edward, 1999, Rao *et al.*, 1999). 형질전환은 특정 유전자를 세포 내로 도입하고, 이들 세포를 선택적으로 성장시키고 재분화시키는 과정으로 구분할 수 있다. 특정 유전자를 세포 내로 도입하는 방법에는 Agrobacterium을 이용하는 간접적인 도입과 유전자 총 또는 전기충격 등을 이용하는 직접도입 방식으로 구분할 수 있다. 그런데, Agrobacterium

을 이용하는 방법은 유전자의 삽입이 안정적이고 비용이 저렴하며 간편하다는 장점을 가지고 있어 널리 이용되고 있다. *Agrobacterium*을 이용한 유전자 전이에는 기주와의 상호작용(Janssen and Gardner, 1993), 균 배양 및 접종 조건, 식물체의 genotype, 식물체 배양조건, acetosyringone의 농도 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 그리고 재분화는 형질전환체를 획득하기 위한 필수적인 단계이다. 감귤의 경우, 카로티노이드 성분과 함량을 분석한 연구 및 카로티노이드 생합성 관련 유전자를 감귤로부터 분리한 연구 결과도 보고된 바 있다. 이러한 carotenoid 생합성 경로(Fig. 5)의 중간단계에 작용하는 Ggps (geranylgeranyl diphosphate synthase)와 lycopene의 생합성을 담당하는 ZDS (ζ -carotene desaturase)의 유전자 발현이 carotenoid의 축적과 밀접하게 관련되어 있을 것으로 생각되어진다.

Ggps (geranylgeranyl diphosphate synthase)는 다양한 생물에서 다양한 역할들을 담당하고 있다. Ggps를 Isoprenyl diphosphate(IPP) 효소는 Phytoten 생합성의 처음 전구체인 C₄₀카로티노이드를 두 개의 C₂₀ geranylgeranyl diphosphate(GGPP) 기질로 분리된다. 하나의 GGPP(Ggps) 효소는 IPP와 DMAPP로부터 GGPP의 생합성을 촉진한다(Fig 6). 약 5가지의 Ggps 유전자들이 *Arabidopsis*의 다른 조직에서 발현되는 것을 확인되었으나, 얼마나 많이 카로티노이드 생합성에 관련되어 있는지는 알려져 있지 않다(Okada et al., 2000).

ζ -carotene desaturase (ZDS)는 lycopene에 뉴 로스포렌 (neurosporene:카로티노이드 합성 중간체)에 ζ -carotene의 전환을 촉진시키는 작용을 한다 (Fig. 7) (Albrecht *et al.*, 1995).

본 연구에서는 이러한 Ggps와 ZDS 유전자의 분리와 형질전환 식물체 제작을 통해 높은 항산화 효과를 나타내는 기능성 물질인 카로티노이드의 함량이 증가된 감귤 식물체를 제작하는 것을 목적으로 수행되었다.

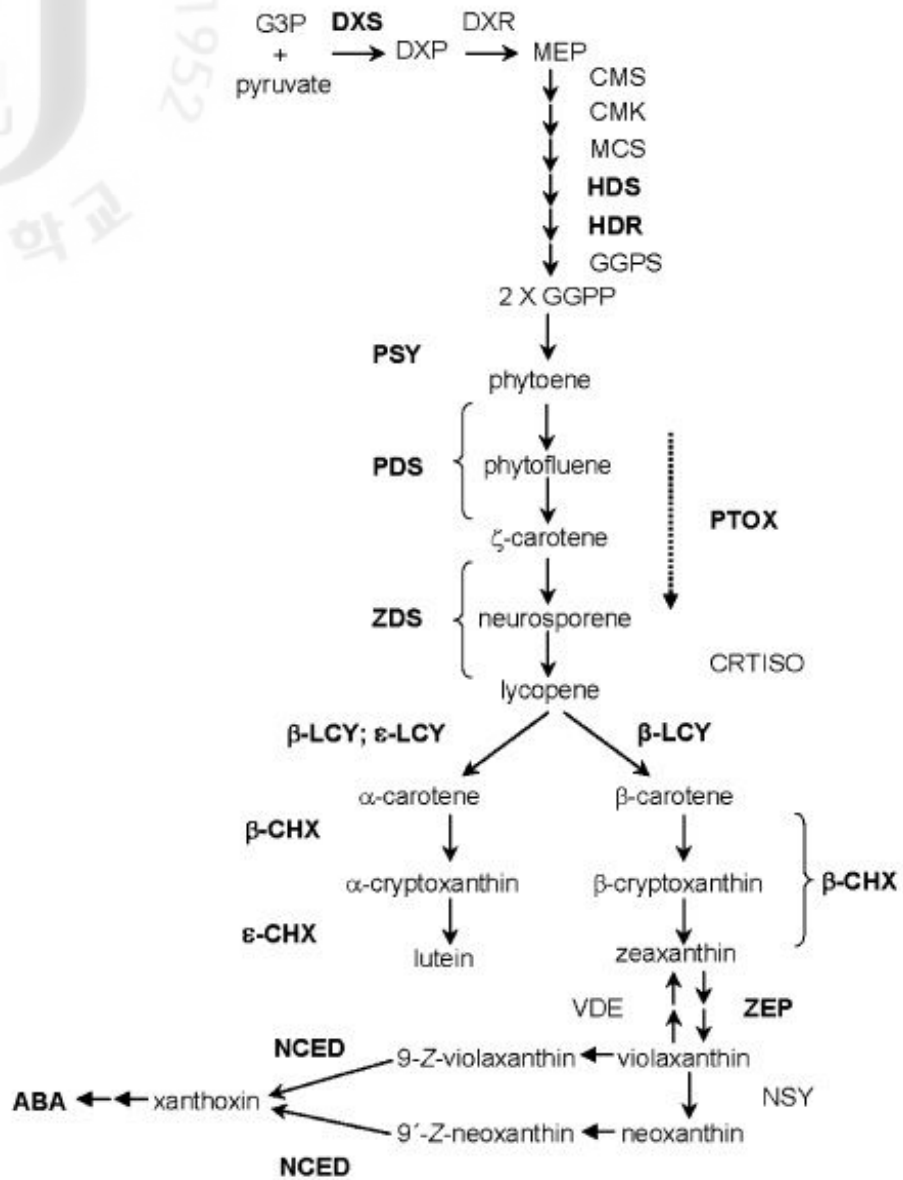


Fig. 5. Carotenoid biosynthesis pathway in plant.

[Berta Alquezar *et al*, *Phytochemistry* 69 (2008) 1997–2007]

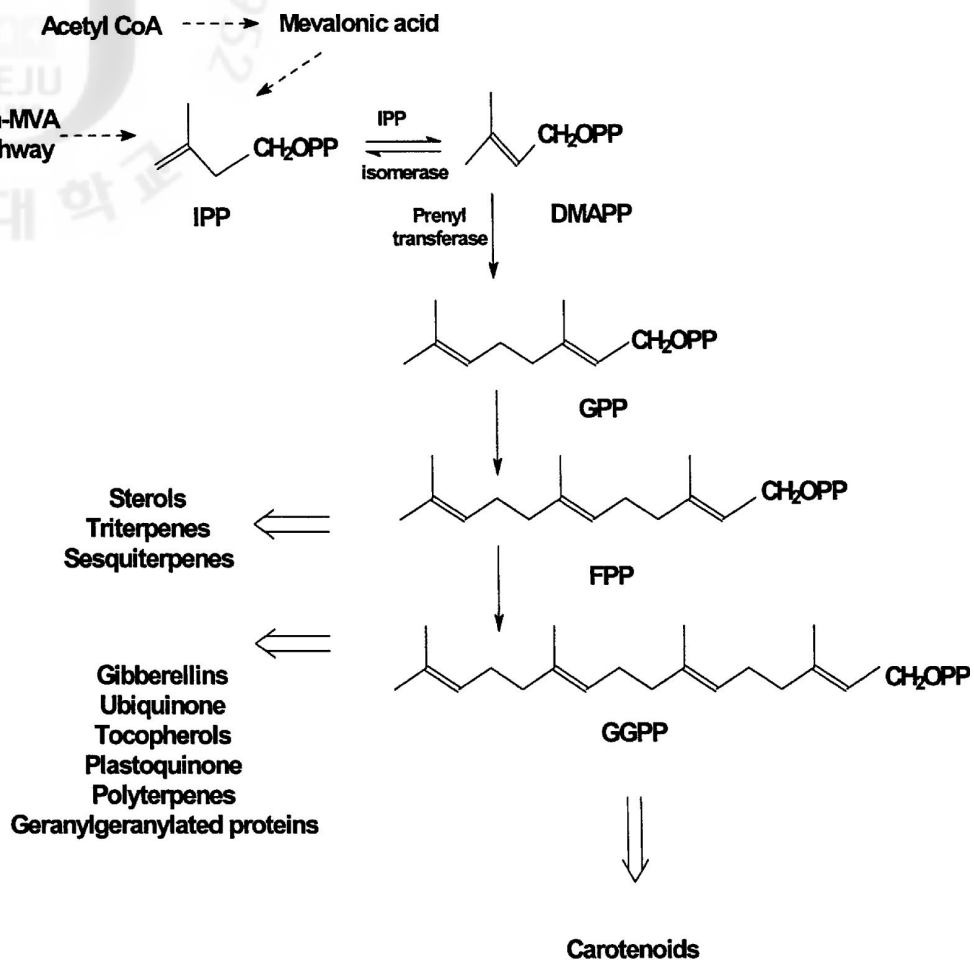


Fig.6. The isoprenoid biosynthetic pathway for Ggps.

[Peter M. Bramley. (2002). Journal of Experimental Botany. 53 No. 377]

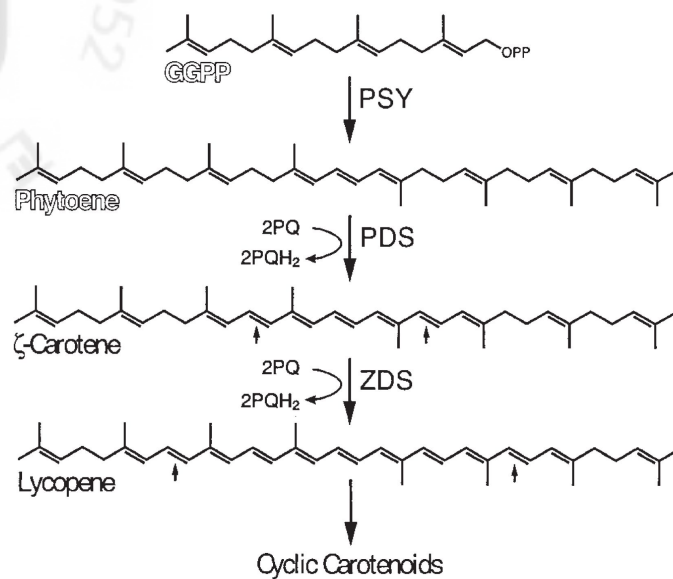


Fig.7. The biosynthetic pathway for ZDS.

[Sarah S. McCarthy *et al.*, (2004). *Genetics* 168: 1249–1257.]

2. 재료 및 방법

1) 식물 재료

본 연구에 사용된 callus는 단백질 공학 실험실에서 제작 및 계대배양을 통해 유지되어 온 궁천조생의 미숙과실 유래 callus 를 사용하였다 (Fig. 8).

2) 식물 형질전환 벡터의 제조

감귤 형질전환체의 유도효율이 높다고 알려진 hygromycin 내성마커를 가진 벡터를 제작하기 위해 pCAMBIA-1300을 기본벡터로 사용하였다. pBI121의 35S promoter와 Nos terminator를 pCAMBIA-1300의 MCS 사이트에 (*HindIII*와 *EcoRI*) 도입 하였다. 카로티노이드 생합성 기작에 관여하는 Ggps와 ZDS 유전자는 35S promoter와 Nos terminator 사이에 (*BamHI*과 *XhoI*) 삽입한 후 이 벡터를 감귤 callus의 형질전환에 사용하였다.

3) 형질전환

형질전환은 아그로박테리움법 (*Agrobacterium*-mediation)을 이용하여 수행하였다. *Agrobacterium tumefaciens*의 strain은 binary vector pCAMBIA 1300을 포함하고 있는 EHA105를 이용하였다. 이 벡터의 내부에는 선발표지로서 hygromycin 저항성 유전자과 목적 유전자로 온주밀감(*Citrus unshiu*)의 과실로부터 클로닝한 *BamHI*과 *SalI/XhoI* enzyme site가 첨가된 Ggps 또는 ZDS의 유전자(Kim, 2000)를 포함하고 있다 (Fig. 9). 형질전환을 위한 균의 배양은 먼저 *Agrobacterium* EHA105의 균체를 10 mg/L-1 kanamycin + 50 mg/L-1 rifampicin의 항생제를 첨가한 고체 YEB 배지(5.0 g/L-1 peptone + 1.0 g/L-1 yeast extract + 5 g/L-1 sucrose + 0.5 g/L-1 MgSO₄)에 도말하고 28°C에서 배양하여 단일 균체들을 형성시켰다. 이들 단일 균체 중의 하나를 액체 YEB 배지에 접종하여 28°C, 180 rpm 조건에서 OD_{600nm} 0.6이 될 때까지 배양하였다. 배양한 균을 6,000×g에서 10분간 원심분리 한 후, 액체 재분화 배지(pH 5.2)(MT 기본배지 + 100 μM acetosyrigone)에 OD₆₀₀ 0.6로 희석하였다.

균 접종은 배양된 캘러스를 균 현탁액에 담가 28°C, 150 rpm에서 20분간 공

동 배양하였다. 접종 후 감염된 캘러스는 여액을 제거한 후 공동 배양 고체 배지에서 5일간 25℃ 암 상태를 유지하면서 공동배양을 수행하였다. 공동배양 배지는 MT 기본배지(pH 5.2)에 100 µM acetosyrigone을 첨가하고 0.25% gelrite로 고형화한 것을 이용하였다 (Fraser *et al.*, 2002). 공동배양 후 캘러스는 hygromycin이 첨가된 1차 선발 배지로 옮기고 광 조건에서 2주 동안 배양하였다. 2주 후 선발체는 배지를 교체하고 광 조건에서 4주간 더 배양하였다. 4주 후 3차 선발배지에 옮긴 후 4주 이상 배양하여 embryogenic callus를 확보 하였다. callus들은 elongation 배지 (MT기본배지 + gelrite 0.2% + galactose 1802 mg/L + sorbitol 1822 mg/L + adenine 07 mg/L pH 5.7-5.8)에서 식물체로의 분화를 유도하였다. 약 4주 후 germination 배지 (MT기본배지 + sucrose 25% + gelrite 0.2% + coconut oil 20 ml/L coumarin 10 ml/L + NAA 20 ml/L + GA3 10 ml/L)로 옮겨 배양하여 뿌리를 유도하였다. 재분화된 식물체는 항생제가 없는 신초증식배지 (MT 배지)에 배양하여 식물체를 선발하고, 이를 형질전환체 검정에 이용하였다 (Jin, 2005. Md. Adnan Al Bachchu, 2011).

4) 형질전환 식물체 검정

형질전환체 검정은 polymerase chain reaction (PCR) 분석을 수행하였다. PCR 분석을 위한 식물체의 DNA 추출은 CTAB 방법을 이용하여 DNA를 분리하였다. 유전자 증폭을 위한 primers로는 hygromycin 유전자에 대하여 5'-CTTCTACACAGCCATCGGTCCAGA-3'과 5'-GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTC-3'을, Ggps 유전자에 대하여 5'-ATTGAAGGATCCATGTTAATTTATCGTGGAC-TTTCT-3'과 5'-CAATGTGAGGAGCTCGTCGACTTATTTATTTCTTGT-GATGAC-3'을, 그리고 ZDS 유전자에 대하여 5'-GGGATTGCTAGCATGGGT-TCTTCAGTTCTGTTTCCT-3'과 5'-AACAGACTCGAGTCACACAAGACT-TAGTTCATCGTT-3'을 사용하였다. PCR 반응은 hygromycin의 경우, 94℃에서 5분간 DNA를 denaturation시킨 후, 94℃ 1분간 denaturation, 58℃ 1분간 annealing, 72℃ 1분간 extension의 35회 반복 과정을 거친 다음, 72℃에서 10분 동안 extension시킨 후 4℃에서 안정화되도록 하였다. Ggps의 경우, 94℃에서 5분간 DNA를 denaturation 시킨 후, 94℃ 1분간 denaturation, 35℃ 1분간

annealing, 72°C 1분간 extension의 35회 반복 과정을 거친 다음, 72°C에서 10분 동안 extension시킨 후 4°C에서 안정화되도록 하였다. ZDS는 94°C 에서 5분간 DNA를 denaturation시킨 후, 94°C 1분간 denaturation, 50°C 1분간 annealing, 72°C 2분간 extension의 35회 반복 과정을 거친 다음, 72°C에서 10분 동안 extension시킨 후 4°C에서 안정화되도록 하였다. 증폭한 DNA 단편은 1% agarose gel 상에서 전기영동 하여 EtBr로 염색 후 illuminator 상에서 ultraviolet를 조사하여 관찰하였다.

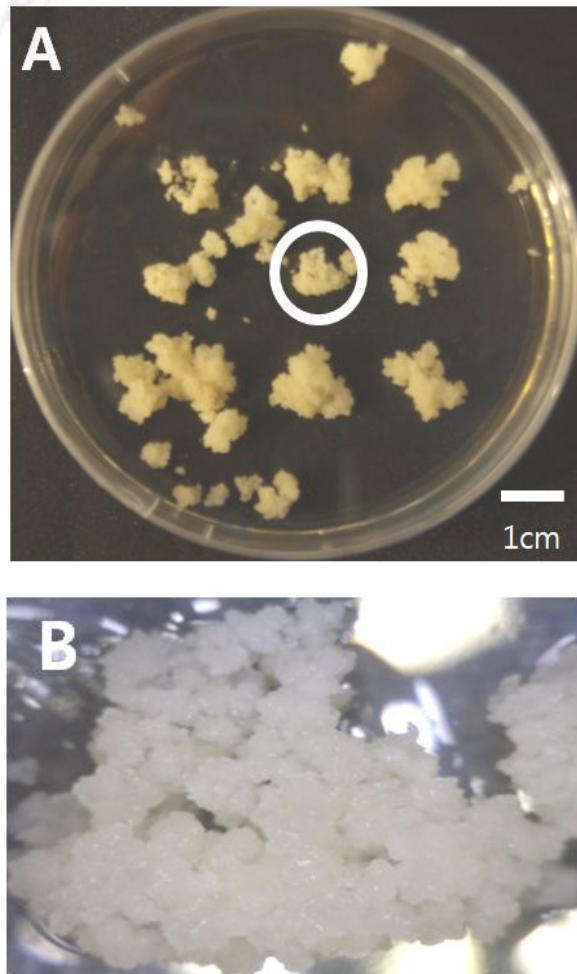


Fig. 8. Callus (Miyagawa Wase) used in transgenic.

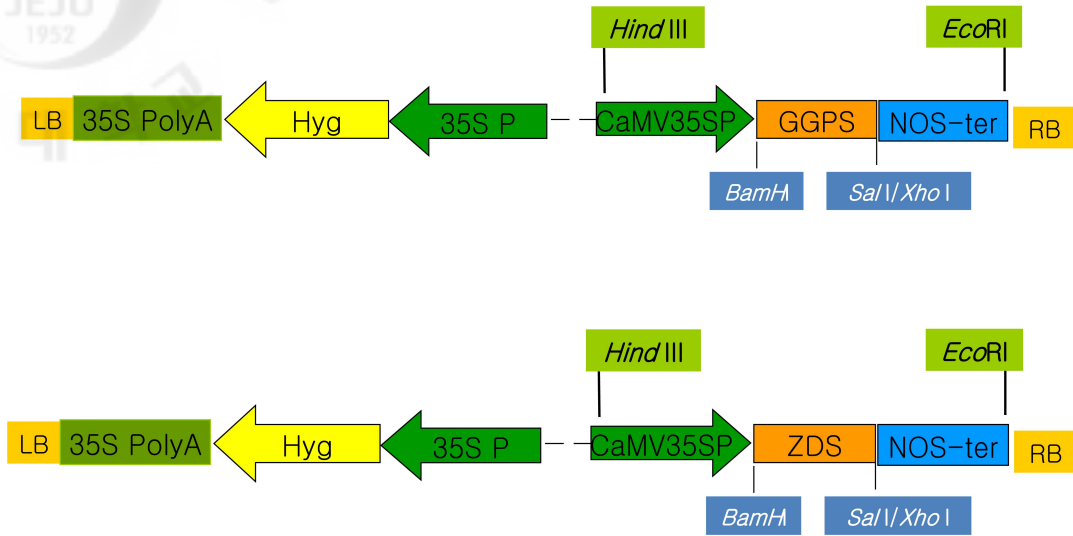


Fig. 9. Ggps and ZDS configuration of the transgenic vector.

ggatccatgt taatttatcg tggactttct cggatttcta gaatctcgaa aaagactcog tttggccgcc
 gttggcttcc ctctcaccgg cttctctocg gtgcttcaca ctctgctgct gctgctgcgg cggactcttc
 tgtgaaggtt ttgggttgca gagaagctta ttcattggagt ttgcctgcct tgcattggaat tagacatcaa
 attcatcacc agagcagctc cgtaattgag gatactgatt cccaggagca gctcgacca ttttctcttg
 ttgctgatga actgtcaata cttgctaaaa gtttgcgctc catggtagtt gctgagggtgc ctaagcttgc
 ctgagctgct gactatttct ttaaaatggg gttggaagga aagaggttcc gtcccacggt tttattgctg
 atggcgacag ctctgaatgt tcgagtacct gaacctctac atgatggagt agaagatgct ttggcgactg
 aactacgtac aaggcaacaa tgtatagctg agattacaga gatgatccat gtagcaagcc ttcttcatga
 tgatgtcttg gatgatgcag ataccaggcg tggatttggg tcattgaatt ttgtgatggg caataagtta
 gctgtattag cgggcgattt tcttctttcc cgtgcttttg ttgccottgc ctctttgaaa aacacagagg
 ttgtgacggt actggcaacc gttgtagagc atcttgttac tgggtgaaacc atgcaaatga caacatcacc
 tgaccaacgt ttagcatgg attattatat gcaaaaaaca tactacaaga ccgcatcatt aatctcaaac
 agctgcaagg caattgccct tcttgctgga caaacagccg aagtggcaat attagctttt gattatggaa
 agaactctggg tctggcatat caattaatcg acgatgttct cgatttccact ggacacatcag cctctcttgg
 aaagggttct ttatctgaca tccagcatgg aatcataaca gctccaatat tgtttgccat ggaagagttc
 cctcagttac gcacagtagt tgagcaaggc ttcgaggatt cctcaaatgt tgatatagcc cttgagtacc
 ttgggaagag tcgagggata caaaagacaa gagaactggc cgtgaagcat gctaactctg ctgcagctgc
 gattgattct ctacctgaaa acaatgatga ggatgttaga aagtcaaggc gtgcactttt agatctcact
 catagagtca tcacaagaaa taaataagtc **gac**

Fig. 10. Ggps (geranylgeranyl diphosphate synthase) for *Citrus unshiu*.



ggatccatgg gttcttcagt tctgtttcct gcaacttcag tcactgggtg tagttggctc cgggttcaag
agaagtgtcg aagattctgt gtacgggctt cttggacgc taatgtttct gatatgagtg ttaatgcacc
ccagggttg ttccaccag aaccagaaca ttatagagga ccaaagctga aagtggctat tattggagct
gggcttgcgg gcatgtcaac ggcagtggaa ttgttggatc aaggccacga ggtggatata tatgagtcaa
ggtcttttat tggtggtaaa gtgggttcat ttgtcgataa acgtggaaac catattgaaa tgggcctgca
cgttttcttt ggatgctaca ataatctgtt ccgattgatg aaaaaggctg gtgcggacaa aaatttactt
gtgaaggatc atactcatac atttgtaaat cagggtgggtg aaattgggtg acttgatttc cggttcccaa
ttggagctcc gttacatggg attcgcgcac ttttgtcgac aaatcagctt aagacttatg ataaagcaag
aaatgctctt gctcttgctc tgagtctgtg tgtaaaggca cttgttatcc tgatggagcc ttgaaggaca
tacgagattt ggatagtata agcttctctg attggttttt gtccaagggt ggtacacaga cgagtattca
aagaatgtgg gatcctgttg cctatgccct tgggtttatt gatttgata acatcagtcg tcgttztatg
cttactatat ttgcaactgtt tgcgactaag actgaggctt ccctattgcg gatgctcaag ggttctccag
atgtttattt gaggggccc ataagaaaat atatcacaga taaagggggc aggttccatc ttaggtgggg
atgcagagag atactttatg ataaagctgc taatgcggaa acatatgtca aaggacttgc catgtctaag
gccactgaca agaaggttgt gcaagctgat gcatatgttg cagcatgtga tgtccctgga attaaaagat
tgcttccctc atcatggagg gaaatgaaat tttcaacaa ttttatgcg ctagtggag ttctgttgt
cacagtgcag cttagataca atggttgggt tactgagttg caagacctag aocggtaag gcaattgagg
cgagctctgg gttagataa ccttttgtat actocagatg cagatttctc ttgctttgca gatctagcac
tcacttcacc agaagactac tacagagaag ggcaaggttc attactocaa tgtgttttga cgcctggcga
tccttacatg cccttaccac atgatgaaat cataaggaga gtggcaaagc aggttttagc tctatttcca
tcatccaag gtttagaagt tatttggctg tctgttgtca aaatcgggca atctttgtac cgtgagggac
ctggtaaaga ccccttcaga cctgatcaaa agacacctgt gaagaacttc ttcccttctg gctcatatac
aaaacaggat tacatagata gtatggaagg agcaactttg tctggtagac aagcctcagc ctacatatgc
aatgccgggg aagaattagt agcactgagg aagcagcttg ctgcctttga atctcaagaa caaatggaag
ctccaactac tactaacgat gaactaagtc ttgtgtgaag **tcgac**

Fig. 11. ZDS (zeta-carotene desaturase) for *Citrus unshiu*.

3. 결과

1) 형질전환체 선발 및 식물체 재분화

아그로박테리움을 이용하여 형질전환 시킨 callus들은 3번의 hygromycin 첨가배지에서 선발과정을 거쳐 선발된 callus (Fig. 12A)를 elongation 배지에서 식물체로 분화 시킨 후 (Fig. 12B), germination 배지에서 식물체를 유도 하였다 (Fig. 12C). 최종적으로 식물체 재분화에 성공한 궁천은주는 기내 배양하였고 (Fig. 12D). 현재 Ggps 및 ZDS 형질전환된 식물체들은 탱자 대목에 기내 접목 하였다 (Fig. 13).

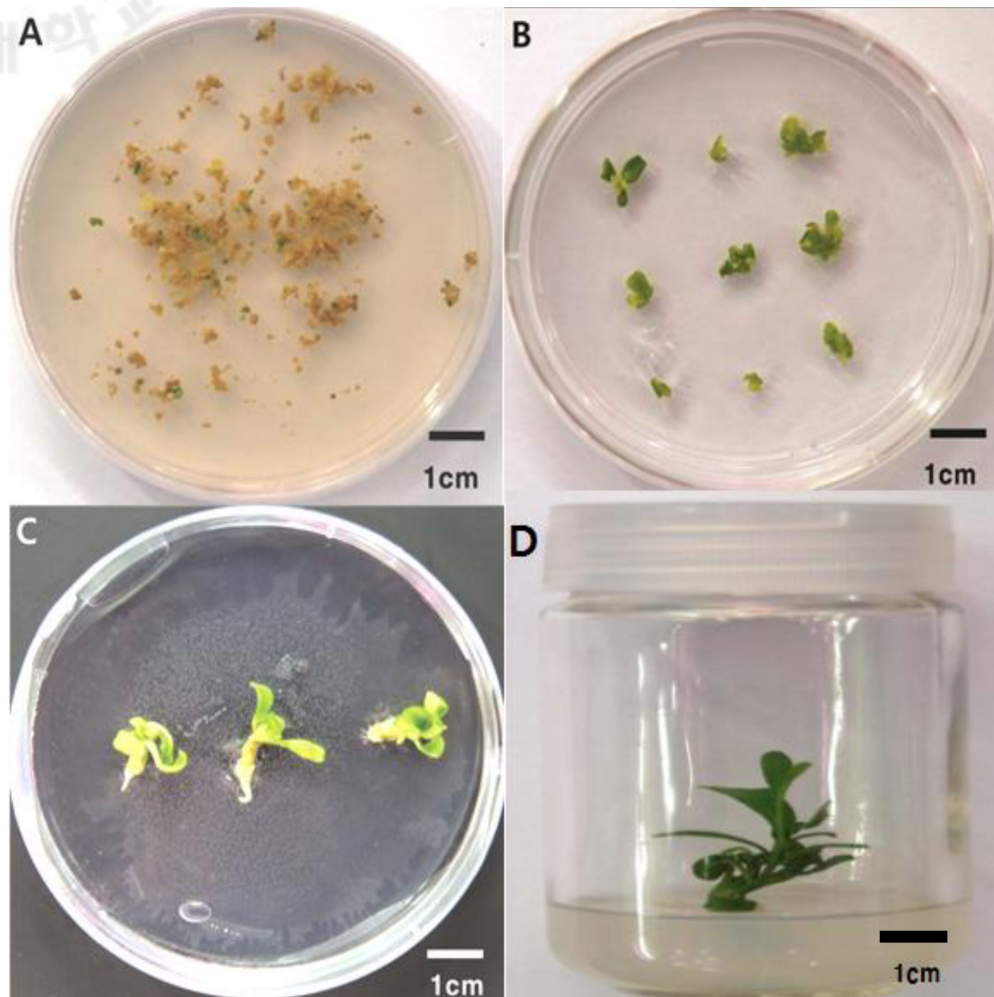


Fig. 12. Regeneration of *Citrus unshiu* embryonic calluses after *Agrobacterium* mediated transformation.

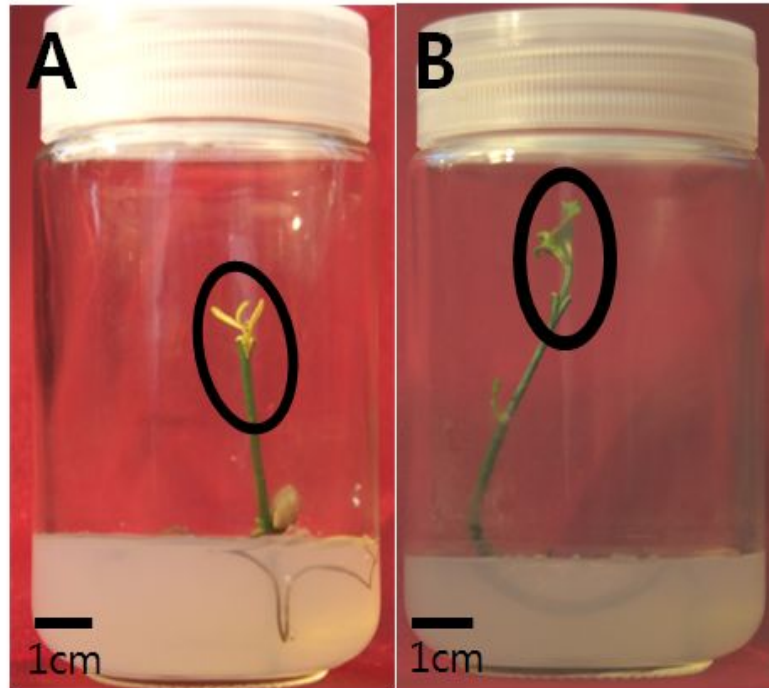


Fig. 13. Shoot-tip *in vitro* grafting onto rootstock plants.

2) 형질전환 식물체의 확인

형질전환 후 성공적으로 재분화된 식물체들의 잎에서 게놈 DNA를 추출한 후 PCR 방법을 이용하여 Ggps 및 ZDS 형질전환 유무를 확인하였다. 형질전환하지 않은 감귤의 잎에서 추출한 게놈 DNA를 negative control로 하고 각 유전자가 삽입되어 있는 plasmid DNA를 positive control로 사용하였다.

Ggps 경우는 유전자 특이적인 primer를 사용하여 35℃의 PCR 조건에서 Ggps/EHA105를 접종시킨 처리구에서 재분화된 4개체는 Ggps 유전자에 해당하는 1300bp의 DNA 단편이 증폭되었다. 추가로 hygromycin 특이적 primer 4개체도 800bp의 DNA 단편이 증폭되었다 (Fig. 14).

ZDS 특이적 primer를 사용한 형질전환 식물체에서는 ZDS/EHA105를 접종시킨 처리구에서 재분화된 10개체 중 8개체는 1700bp의 DNA 단편이 증폭되었으나 hygromycin 특이적 primer를 사용한 PCR에서는 재분화된 10개체 중 9개체 800bp의 DNA 단편이 증폭되었다 (Fig. 15). 그림 15번의 8번 형질전환 예상 식물 같은 경우는 형질전환이 되지 않은 것으로 생각이 되어 진다.

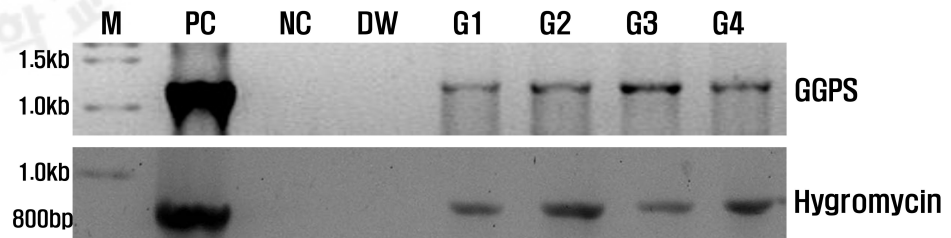


Fig.14. Transgenic plants Ggps using PCR confirmed.

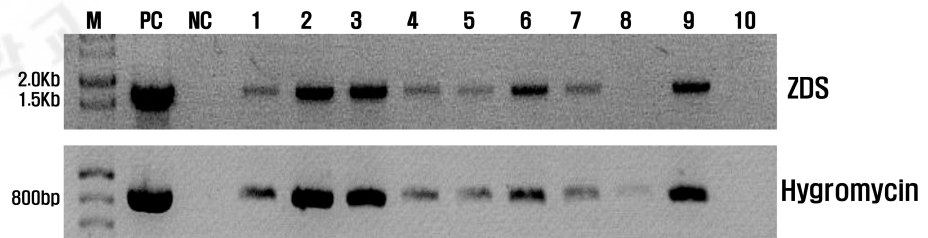


Fig.15. Transgenic plants ZDS using PCR confirmed.

4. 고찰

감귤작물은 기내에서 배양시 측근이나 세근은 발달되지 않는 반면에 굵은 주근 한 개만이 자라나오는 특성을 가지고 있어 재분화 된 감귤 식물체는 토양으로 이식을 하게 되면 생존율이 저하된다. 따라서 감귤 형질전환 식물체를 획득하기 위해서는 먼저 기내에서 배양중인 탱자 묘목이나 상토에 배양되고 있는 탱자 묘목에 접목을 시키고 순화 단계를 거친 후 온실로 이식하여 배양해야한다.

본 연구에서는 암 예방 등의 생리활성이 보고되어 있는 카로티노이드 함량이 증가된 감귤을 개발하기 위한 연구를 수행 하였다. 이를 위해 카로티노이드 생합성에 관여하는 주요 유전자들 (Ggps와 ZDS)을 감귤로부터 분리하여 확보하였다.

식물 형질전환에는 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105를 사용하였다. 형질전환된 식물체는 PCR 방법으로 확인하였다. 형질전환 후 성공적으로 재분화된 식물체들의 잎으로부터 게놈 DNA를 추출한 후 각 유전자의 특이적 primer와 PCR법을 이용하여 Ggps 및 ZDS 형질전환 유무를 확인한 결과 4개체의 Ggps 형질전환 식물체와 8개체의 ZDS 형질전환 식물체를 확보 할 수 있었다. 계속해서 형질전환된 식물체에서 카로티노이드 함량이 증가 유무 도 이 유전자의 종류 및 유전자는 생합성 경로에서 무슨 역할을 하고 있는지 연구하여 현재 보다 더 많은 좋은 지식을 얻어야 한다. 이어서 새로운 지식들이 이용하여 고 기능성의 신품종 감귤 생산과 감귤 육종 또는 감귤 종묘산업 분야에 유용한 연구자료로 활용이 가능하다고 판단된다.

참고자료

Citrus transformation stock solution and media composition

1. *Agrobacterium* strain culture medium composition: YEP medium (Liquid)

Components	g/L
Beef extract	5
Yeast extract	1
Peptone or Tryptone	5
Sucrose	5
MgSO ₄	0.5

Autoclave at 121°C for 15 minutes.



2. Acetosyrigone medium:[Co-culture medium (Liquid and solid)]

Components	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄ (monobasic)	150
K ₂ HPO ₄ (dibasic)	20
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.8
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
KI(Potassium Iodite)	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85
CaCl ₂ ·2H ₂ O	439.95
Myo inositol	100
Thiamine HCL (hydrochloride)	10
Pyridoxine HCL (hydrochloride)	10
Nicotinic acid	5
Glycine	2
Malt extract	500
Sucrose	50000
Gelrite	2000
pH	5.2

Autoclave at 121°C 15 minutes. 100 µM Acetosyrigone were used after autoclave when temperature below 50°C.



3. Preparation of different selection medium

Components	First selection mg/L	Second selection mg/L	Third selection mg/L
NH ₄ NO ₃	825	1650	1650
KNO ₃	950	1900	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	370
KH ₂ PO ₄ (monobasic)	150	150	150
K ₂ HPO ₄ (dibasic)	20	20	20
KCl	750	-	-
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2
MnSO ₄ .H ₂ O	16.8	16.8	16.8
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6	8.6
KI(Potassium Iodite)	0.83	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.025
Na ₂ EDTA	37.25	37.25	37.25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	27.85	27.85
CaCl ₂ .2H ₂ O	439.95	439.95	439.95
Myo inositol	100	100	100
Thiamine HCL(hydrochloride)	10	10	10
Pyridoxine HCL(hydrochloride)	10	10	10
Nicotinic acid	5	5	5
Glycine	2	2	2
Malt extract	500	500	500
lactose	-	70000	70000
glutamine	1550	-	-

Sucrose	50000	-	-
Agar	-	1200	1600
hygromycin	15	20	25
cefotaxime	250	250	250

Autoclave at 121°C 15 minutes. hygromycin and cefotaxime were used after autoclave when temperature below 50°C.

4. Preparation of embryo elongation medium

Components	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄ (monobasic)	150
K ₂ HPO ₄ (dibasic)	20
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.8
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
KI(Potassium Iodite)	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85
CaCl ₂ ·2H ₂ O	439.95
Myo inositol	100
Thiamine HCL(hydrochloride)	10
Pyridoxine HCL(hydrochloride)	10
Nicotinic acid	5
Glycine	2
sorbiol	1822 (0.1M)
galactose	1802 (0.1M)
Adenine	0.7
Gelrite	2000

pH

5.7-5.8

Autoclave at 121°C 15 minutes.

5. Preparation of embryo Germination medium

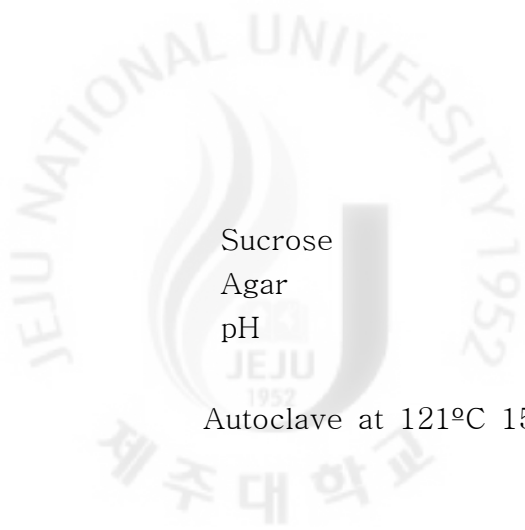
Components	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄ (monobasic)	150
K ₂ HPO ₄ (dibasic)	20
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.8
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
KI(Potassium Iodite)	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85
CaCl ₂ ·2H ₂ O	439.95
Myo inositol	100
Thiamine HCL(hydrochloride)	10
Pyridoxine HCL(hydrochloride)	10
Nicotinic acid	5
Glycine	2
Coumarin	0.0146
NAA	0.02

Sucrose	3000
Gelrite	2000
Coconutwater	20 ml
GA3	1
pH	5.7-5.8

Autoclave at 121°C 15 minutes.

6. Preparation of MT medium (to make normal plants)

Components	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄ (monobasic)	150
K ₂ HPO ₄ (dibasic)	20
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.8
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
KI(Potassium Iodite)	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85
CaCl ₂ ·2H ₂ O	439.95
Myo inositol	100
Thiamine HCL(hydrochloride)	10
Pyridoxine HCL(hydrochloride)	10
Nicotinic acid	5
Glycine	2



Sucrose	30000
Agar	8000
pH	5.7-5.8

Autoclave at 121°C 15 minutes.

참고 문헌

- (1) 고정삼. 제주감귤. (2007). 제주문화. 45.
- (2) 김한용. 제주도 연구 (8) 제주 재래 감귤의 분류와 유용물질. (1991). 제주도 연구회. 59~99.
- (3) 안현주, 이동훈, 이지현, 최영훈, 강병철, 박효근. (2008). 감귤 embryogenic callus 원형질체 배양에 의한 식물체 재분화.
- (4) Grinblat U. (1972). Differentiation of citrus stem in vitro. Journal of the American Society for Horticultural Science. 97(5): 599-603.
- (5) Burger DW, Hackett WP. (1981). Regeneration of buds and roots from several citrus tissues. Proc Int Soc Citriculture 1: 161-163.
- (6) Barlass M, Skene KGM. (1982). In vitro plantlet formation from Citrus species and hybrids. Scientia Horticulturae 17: 333-341.
- (7) Edriss MH, Burger DW. (1984). In vitro propagation of Troyer citrange from epicotyl segments. Scientia Horticulturae 23: 159-162.

- (8) Duran-Vila N, Ortega V, Navarro L. (1989). Morphogenesis and tissue cultures of three citrus species. *Plant Cell Tiss Org Cult* 16: 123-133.
- (9) Kochba J, Spiegel-Roy P, Saad S. (1972). Adventive plants from ovules and nucelli in citrus. *planta* 106: 237-245.
- (10) Bitters, W.P., Murashige, T., Rangan, T.S. and Nauer, E. (1970). Investigations on established virus-free plants through tissue culture. *Calif. Citrus Nursery Soc.* 9:27-30.
- (11) Navarro L., Juarez, J., Ballester, J.F., Pina, J.A. and Ortega, C. (1979). Obtaining nucellar virus-free plants of different citrus cultivars of the navel group by means of ovule culture *in vitro*. *Anales del Instituto Nacional de investigaciones Agrarias, protección vegetal.* No. 12, 95-113. [Hort. Abst. 51(1): 779].
- (12) Rangan, T.S., Murashige, T. and Bitters, W.P. (1968). *In vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic citrus. *HortScience* 3(4): 226-227.
- (13) Button, J. and Bornman, C. H. (1971). Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington navel orange *in vitro*. *J. S. Afr. Bot.* 37: 127-134.
- (14) Starrantino, A. and Russo, F. (1980). Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruits of polyembryonic citrus cultivars. *HortScience* 15(3): 296-297.
- (15) Nito, N. and Iwamasa, M. (1990). *In vitro* plantlet formation from juice vesicle callus of Satsuma (*Citrus unshiu* Mare.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 20(2): 137-140.
- (16) Kobayashi, S., Sakai, A. and Oiyama, I. (1990). Cryopreservation in

liquid nitrogen of cultured navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) nucellar cells and subsequent plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23:15-20.

(17) Marin, M.L., Gogorcena, Y., Ortiz, J. and Duran-Vila, N. (1993). Recovery of whole plants of sweet orange from somatic embryos subjected to freezing thawing treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34:740-746.

(18) Engelmann, F., Dambier, D. and Ollitrault, P. (1994). Cryopreservation of embryogenic cell suspensions and calluses of *Citrus* using a simplified freezing process. *Cryo-Letters* 15:53-58.

(19) Sakai, A., Kobayashi, S. and Oiyam, I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9:30-33.

(20) Sakai, A., Kobayashi, S. and Oiyam, I. (1991). Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C. *Plant Physiol.* 137:465-470.

(21) J. Navas-Castillo, E Moreno, N. Duran-Vila. (1995). Citrus psorosis, ringspot, cristicortis and concave gum pathogens maintained in callus culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40: 133-137.

(22) Vardi, A. and Galun, E. (1989). Isolation and culture of *Citrus* protoplasts. In *Biotechnology in agriculture and forestry*. (Bajaj, Y.P.S., Ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 8:147-159.

(23) Grosser, J.W. and Gmitter, Jr. F.G. (1990a). Protoplast fusion and *Citrus* improvement. *Plant Breed. Rev.* 8:339-374.

(24) Grosser, J.W. and Gmitter, Jr. F.G. (1990b). Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. *Hort. Sci.* 25:147-151.

- (25) Gmitter, F.G., Grosser, J. W. and Moore, G. A. (1992). Citrus. In: Biotechnology of perennial crops, (Hammerschlag, F.A. and R.E. Lits, Eds). CAB International, Wallingford, UK, 335-369.
- (26) Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-479.
- (27) Francesco Carimi, Maria Concetta Tortorici, Fabio De Pasquale & Francesco Giulio Crescimanno. (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules and stigma/style explants of sweet orange navel group [*Citrus sinensis*(L.) Osb.], *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 54; 183-189.
- (28) A.El-Sawy, A. Gomaa, A. Reda, N. Danial. (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules of citrus, *Arab J. Biotech.*, 9, (1). 189-202.
- (29) Murashige T, Tucker DPH (1969) Growth factor requirements of citrus tissue culture. *Proc 1st Int Citrus Symp* 3: 1155-1161.
- (30) 한지학 외 76인 공저. 식물 형질전환. (2007). 정문각. 19.
- (31) Francesco AM, Gold BA. (1998). *International Organizational Behavior*, Prentice Hall.
- (32) Hirschberg, J., (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 210-218.
- (33) DellaPenna, D., Pogson, B.J., (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 57, 711-738.
- (34) Zhu, J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 247-273.

- (35) Clinton, S.K., (1998). Chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr. Rev.* 56, 35-51.
- (36) Sandmann, G., (2001). Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 4-12.
- (37) Fraser, P.D., Bramley, P.M., (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progr. Lipid Res.* 43, 228-265.
- (38) Kim, I.J., K.C. Ko, C.S. Kim, and W.I. Chung. (2001a). Isolation and characterization of cDNAs encoding β -carotene hydroxylase in *Citrus*. *Plant Science* 161 : 1005-1010.
- (39) Kim, I.J., K.C. Ko, C.S. Kim, and W.I. Chung. (2001b). Isolation and expression patterns of a cDNA encoding phytoene synthase in *Citrus*. *Plant Physiol.* 158 : 795-800.
- (40) Matsumura, K., Chiba, A., Yamada, H., Fukuta-Ohi, H., Fujita, S., Endo, T., Kobata, A., Anderson, L. V. B., Kanazawa, I., Campbell, K. P. *et al.* (1997). A role of dystroglycan in schwannoma cell adhesion to laminin. *J. Biol. Chem.* 272, 13904-13910.
- (41) DiMascio, P., Kaiser, S. and Sies, S. (1989). Lycopene as the most effective biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274:532-538.
- (41) Nguyen, H.T., and Walker, E. (1999). *First course in fuzzy logic*, Boca Raton: Chapman & Hall/CRC Press, second edition.
- (42) Edward, G. (1999). Tomato, tomato-based products, lycopene and cancer: review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 317-331.
- (43) Rao, A.V., Agarwal, S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutr. Res.* 19: 305-323.

- (44) Janssen BJ, Gardner RC. (1993). The use of transient GUS expression to develop an *Agrobacterium*-mediated gene transfer system for kiwifruit. *Plant Cell Rep.* 13:28-31.
- (45) Sitthithaworn, W., Kojima, N., Viroonchatapan, E., Suh, D. Y., Iwanami, N., Hayashi, T., Noji, M., Saito, K., Niwa, Y. and Sankawa, U. (2001). Geranylgeranyl diphosphate synthase from *Scoparia dulcis* and *Croton sublyratus*. Plastid localization and conversion to farnesyl diphosphate synthase by mutagenesis. *Chem. Pharm. Bull.* 49(2):197-202.
- (46) Wang, K. and Ohnuma, S. I. (1999). Chain-length determination mechanism of isoprenyl diphosphate synthases and implications for molecular evolution. *Trends Biochem. Sci.* 24(11):445-451.
- (47) Dogbo, O. and Camara, B. (1987). Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta.* 920:140-148.
- (48) Kuntz, M., Romer, s., Surie, C., Hugueney, P., Weil, J. H., *et al.* (1992). Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. *Plant J.* 2:25-34.
- (49) Albrecht, M, Klein, A, Hugueney, P, Sandmann, G, Kuntz, M, (1995). Molecular cloning and functional expression in *E.coli* of a novel plant enzyme mediating ζ -carotene desaturation. *FEBS.* 372:199-202.
- (50) Berta Alquezar, Maria J. Rodrigo, Lorenzo Zacarias. (2008). Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. *Phytochemistry* 69: 1997-2007.

- (51) Peter M. Bramley. (2002). Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 53, No. 377.
- (52) Sarah S. McCarthy, Marilyn C. Kobayashi and Krishna K. Niyogi. (2004). White Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Are Defective in Phytoene Synthase Genetics 168: 1249-1257.
- (53) Kim YS, Lee JH, Yoon GM, Cho HS, Park S-W, Suh MC, Choi D, Ha HJ, Liu JR, Pai HS. (2000). CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase in tobacco. *Plant Physiol* 123: 905-915.
- (54) Fraser PD, Romer S, Shipton CA, Mills PB, Kiano JW, Misawa N, Drake RG, Schuch W, Bramley PM. (2002). Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1092-1097.
- (55) Seong-Beom Jin. Treatise. (2005). Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated Transformation in "Miyagawa Wase" Satsuma Mandarin.
- (56) Md. Adnan Al Bachchu. Treatise(2010). Functional expression of miraculin, a taste modifying protein, in *Citrus unshiu* Marc. and characterization of three novel citrus ERF genes.