



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](#)

博士學位論文

不知火 珠心胚 由來 新品種 開發 및
遺傳體 特性

濟州大學校 大學院

農化學科

田 京 龍

2018年 8月



不知火 珠心胚 由來 新品種 開發 및 遺傳體 特性

指導教授 柳 基 中

田 京 龍

이 論文을 農學 博士學位 論文으로 提出함

2018年 6月

田京龍의 農學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校 大學院 農化學科

2018年 6月

Development and Genomic Characterization
of New Citrus Variety Derived from
'Shiranui' Nucellar Embryos

Gyeong-Lyong Jeon
(Supervised by professor Key-Zung Riu)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Doctor of Philosophy

2018. 6

Department of Agricultural Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

목 차	i
Summary	iii
List of Tables	v
List of Figures	vii
서 언	1
연구사	3
제1장 부지화 주심배 배양체로부터 우수 계통 선발 및 특성	10
1.1 서 론	10
1.2 재료 및 방법	12
1.2.1 부지화 미성숙종자 유래 계통 선발	12
1.2.2 부지화 유래 선발 계통의 형태적 특성 조사	12
1.2.3 부지화 유래 선발 계통의 유리당 및 유기산 분석	12
1.3 결과 및 고찰	14
1.3.1 부지화 미성숙종자 배양체 유래 계통 선발	14
1.3.2 부지화 미성숙종자 배양체 유래 계통의 맛 특성	20
1.3.3 부지화 미성숙종자 배양체 유래 계통의 형태 특성	27
제2장 부지화 주심배 배양체 선발 계통의 유전체 특성	30
2.1 서 론	30
2.2 재료 및 방법	32
2.2.1 NGS 분석 재료	32
2.2.2 NGS 분석과 유전체 분석 순서	33

2.2.3 표준 유전체	33
2.3 결과 및 고찰	36
2.3.1 NGS 염기 서열 분석	36
2.3.2 표준 유전체에 대한 비교	39
2.3.3 표준유전체에 대한 단일 염기 다형성 확인	41
2.3.4 부지화 유래 계통의 단일 염기 다형성 확인	47
2.3.5 부지화 유래 계통의 동질 단일 염기 다형성	53
2.3.6 부지화 유래 계통의 추정 변이 확인과 영향	60
2.3.7 부지화 유래 계통의 추정 변이에 의한 유전자 영향	64
2.3.8 KEGG 대사 경로 분석을 통한 단일 염기 다형성 발현 양상 .	65
결 론	74
인용문헌	77

SUMMARY

Citrus fruits are originated from the eastern part of the Himalayas and have been grown by human beings in the Americas, Southern Europe, Chile, and other countries in the world, including the East Asian growing.

In Korea, it was an important fruit that was cultivated in Jeju Island during the Three Kingdoms Period and exchanged with various parts of the Korean Peninsula, and was considered as central government present during the Joseon Dynasty. In the early 20th century, the Onju variety, which was introduced to Jeju Island from Japan, began to grow, and in the 1960s, the Onju variety was sent from Japan to Jeju by Korean resident in Japan, which gave the chance expanding the cultivation of Citrus fruit. Crops are grown in earnest only when they meet the two requirements : usability and suitability for cultivation, and they form a distinct product of breeding. Compared to the fact that citrus fruits have begun appearing in Korean history, it is only recently that the government has begun to launch the breeding programs for the development of new variety around its citrus test site. The introduction breedings, which imports the previously developed variety from outside the region and selects the appropriate variety through an adaptive test, is also seen as a form of breeding. However, the individual characteristics of the individual are different maternal and paternal strains, forming a subsequent pool that has a new genetic combination, adapting from these to the local environment. When developing a variety of species, such as mutant breeding, which induces variation and selects suitable individuals from a mutal pool, and applying the breeding technology to secure legitimacy to developed strains.

One important characteristic of understanding citrus fruits as a breeding

material is apomixis, which is the ability to produce fruits from cells derived from the mother without the fertilisation. Depending on embryony Citrus consist of two class one is monoembryony it give mono shoots the other is polyembryony has multi shoots.

C. hybrid 'Shiranui', also known as 'harabang,' was introduced from Japan and grown in Jeju. It has polyembryonic characteristics, when the culture is grown with a immature seed, resulting the plantlets originated from the nucella embryos. I

A study on the characteristics of the genome analysis of several varieties, the study of the characteristics of citrus genes, and the development of the gene analysis technology such as NGS was performed. The, information on the genome was revealed in NGS for the generalization, the selected systems, and the strains developed by the method of selection of variation, and the information on the variation was analyzed.

List of Tables

Table 1. Embryony of some citrus variteis	5
Table 2. Field data of some <i>C. hybrid</i> 'Shiranui' variants and 'Plato' derived from nucellar embryos.	22
Table 3. Comparison of sugar and acid compositions in 2014.	23
Table 4. Changes of sugar and acid contents.	24
Table 5. Changes of sugar contents and sugar composition.	25
Table 6. Changes of acids content and acid composition.	26
Table 7. Comparison of horizontal and vertical growth between <i>C. hybrid</i> 'Shiranui' and 'Plato' fruit.	29
Table 8. Summary of Reference genome (<i>C. clementina</i>)	35
Table 9. Summary of sequncing raw data.	37
Table 10. Summary of trimmed sequncing data.	38
Table 11. Summary of read mapping.	40
Table 12. Summary of SNP detection.	43
Table 13. Summary of SNP classification by genome structure.	44
Table 14. Summary of SNP classification by genome structure.	45
Table 15. Summary of SNP classification by genome structure.	46
Table 16. Summary of polymorphic-SNP detection between samples.	50
Table 17. Description of table 16.	51

Table 18. Number of SNPs in Citrus chromosomes.	52
Table 19. Number of homozygous SNPs.	56
Table 20. Number of Homozygous SNPs in Citrus chromosomes.	57
Table 21. Number of putative variants.	63
Table 22. KEGG analysis of HB-PL SNPs in genic area.	67
Table 23. KEGG analysis of HB-SUN SNPs in genic area.	68
Table 24. KEGG analysis of PL-SUN SNPs in genic area.	69
Table. 25 KEGG analysis results of HB-PL SNPs in the metabolism of terpenoids and polyketides.	70
Table. 26 KEGG analysis results of HB-SUN SNPs in the metabolism of terpenoids and polyketides.	71
Table. 27 KEGG analysis results of PL-SUN SNPs in the metabolism of terpenoids and polyketides.	72
Table 28. Carotenoid pathway genes that has SNP between HB-PL, HB-SUN and PL-SUN.	73

List of Figures

Figure 1. Formation of nucellar seedlings during the seed development in polyembryonic citrus varieties.	7
Figure 2. Embryogenesis of <i>C. hybrid</i> 'Shiranui' immature seeds.	15
Figure 3. Plantlets developed from <i>C. hybrid</i> 'Shiranui' nucellar embryos...	16
Figure 4. Grafts and cultivation of <i>C. hybrid</i> 'Shiranui' nucellar embryo scions.	17
Figure 5. First selection of <i>C. hybrid</i> 'Shiranui' nucellar embryo lines named 'Plato'.	18
Figure 6. Morphological variants of <i>C. hybrid</i> 'Shiranui' nucellar embryo lines that has different fruit shapes.	19
Figure 7. Morphologica differences between A. <i>C. hybrid</i> 'Shiranui' fruit and B. 'Plato' derived from nucellar embryos of <i>C. hybrid</i> 'Shiranui' immature seeds.	28
Figure 8. Varieties of <i>C. hybrid</i> 'Shiranui' A. <i>C. hybrid</i> 'shiranui' B. 'Plato' derived from immature seed of <i>C. hybrid</i> 'shiranui' C. 'Suneat' derived from bud variants of <i>C. hybrid</i> 'shiranui'.	32
Figure 9. Schematic diagram of genomic analysis.	34
Figure 10. Homozygous SNP and Heterozygous SNP.	55
Figure 11. Genetic map of HB-PL homozygous SNP.	58
Figure 12. Genetic map of HB-SUN homozygous SNP.	59
Figure 13. Putative variations that has different DNA sequence compaed with <i>C. clementina</i> and <i>C. hybrids</i> 'Shiranui'.	62
Figure 14. Division of two variants from mother variety by different process.	75

서 언

감귤류(*Citrus spp.*)는 히말라야의 동부에서 기원하여 전파되었고, 인류에 의해 재배되기 시작한 이래 동아시아 지역을 포함한, 미국, 칠레 등 아메리카, 남부유럽과 아프리카, 호주 등 전 세계에서 재배되고 소비되는 대표적인 과수 작물이다. 한국에서는, 삼국시대에 제주지역에서 재배가 되어, 한반도의 여러 지역으로 교류된 기록이 있고, 조선시대에는 중앙 정부로 진상될 만큼 중요한 과수로 여겨졌다. 20 세기초 일본에서 제주로 전래된 온주 품종이 재배되기 시작하고, 1960년대 제주 지역에서 일본으로 건너간 제일동포들에 의해 온주품종이 보내지면서, 재배가 확대되고 제주의 대표적인 과수로 자리한다. 작물은 유용성과 재배 적합성이라는 두 가지 요건을 충족하여야 본격적인 재배가 이루어지고, 품종이라는 구분 가능한 상품으로 자리를 잡는다. 감귤의 오랜 재배 역사에 비하여, 본격적으로 품종이 육성되기 시작한 것은 비교적 최근의 일이며, 2000년대에 들어서 비로소 국내에서 계획 육종에 의한 새로운 품종들이 발표되기 시작하였다. 외부에서 기존에 개발된 품종을 들여오고, 적응성 시험을 통해 적합한 품종을 선발 재배하는 도입 육종도 육종의 한 형태로 볼 수 있다. 하지만, 각자의 특성이 다른 모계와 부계로부터 새로운 유전적 조합을 갖는 후대 선발군을 형성 시키고, 이들로 부터 지역의 환경에 적응하며, 감미와 당도, 모양, 색 등이 우수한 품종을 선발하는 교배 육종과 기존에 재배되고 있는 품종에 특정 형질을 목적으로 선발조건을 조절하여 품종을 개량하거나, 방사선이나 화학적 변이 유도제를 처리하여, 변이를 유도하고, 변이 개체의 폭을 넓히고, 적합한 개체를 선발하는 돌연변이 육종 등 품종에 대한 이해와 육종 기술을 적용하여 품종을 선발할 때, 개발된 품종에 대한 정통성을 확보하고, 재배 생산 단계에서 품종보호권 행사 등으로부터 산업 안정성을 확보 할 수 있다.

육종 재료로서 감귤을 이해할 때 중요한 특성중 하나로 수정 과정 없이 모계에서 유래된 세포만으로 열매를 형성하는 무수정생식(apomixis)이 있다. 감귤은 품종에 따라 종자에 배우자를 통해 후대로 성장 가능한 접합배(zygote)만으로 이루어진 단배성 품종과 모계에서 유래되어 후대 식물체로 성장할 수 있는 주심배

(nucellar embryo)가 있어서, 교배된 종자를 받아 시킬 때, 교잡 받아체와 모계의 특성을 나타내는 주심배 식물체가 동시에 받아되는 다배성 품종이 있다. 일명 '한라봉'이라고 알려진 부지화 (*Citrus spp.* 'shiranui')는 1972년 청견 모계에 폰칸을 부계로 하여 일본에서 육성된 품종으로, 한국의 나주지역을 통해 국내로 도입되었으며, 제주에서 '한라봉'이라는 이름이 붙여지며, 본격적으로 재배되고 상업화되었다. 부지화는 한개 이상의 주심배를 갖고 있는 다배성 품종으로 모계로 하여 교배를 할 때, 여러 개의 받아체를 형성한다. 부지화 단일 품종만으로 재배가 이루어질 때, 부지화의 자가 불화합성으로 인해 종자형성이 거의 이루어지지 않는데, 이때 과육 내에 주심세포를 갖고 있는 아주 작은 미성숙종자를, 일정한 조건에서 배양하면, 배발생을 유도 할 수 있다.

본 연구에서는 부지화의 미성숙종자를 이용하여 배발생을 유도하고, 이로부터 기관 분화된 유식물체를 탱자대목에 절접하여 성목을 유도하고, 일정기간동안의 생장과정을 통해 착과된 계통들로부터 일반적인 부지화와는 형태가 다르고, 맛이 우수한 계통을 선발하고, 특성을 조사하였다. 몇몇 품종에 대한 유전체 분석과 감귤 유전자들에 대한 특성연구, NGS 등 유전체 분석기술의 발달로 유전체 정보에 대한 이해와 유전체 특성에 대한 이해는 품종선발에 대한 기존의 방식을 특성 발현후 선발에서 유전체 정보의 이해후 특성 예측과 특성 확인에 의한 선발 방식으로 육종의 틀이 바뀌어 갈 수 있다. 이에 부지화와 선발된 계통, 기존에 변이 선발 방식에 의해 개발된 품종에 대해서 NGS 방식으로 유전체에 대한 정보를 밝히고, 이들을 비교 분석하여, 각 선발 방식에 따른 변이의 진행과 유전자들의 특성을 비교하였다. 주심배 발생과 변이 선발에 기준이 되는 부지화 품종에 대하여, 주심배 계통과 변이 계통 모두에서 한 개의 염기단위에서 변이가 발생하는 SNP 가 형성됨을 보였고, 이들 SNP 가 발생에 대해 정량적 차이보다는 유전자로 발현되어 표현형에 직접적인 영향을 주는 정성적 차이가 나타남을 볼 수 있었다. 결론적으로 주심배 계통에 의한 선발은 기존에 모계와 유전적으로 동일하다기 보다는 일부의 유전적 변이가 일어나며, 일반 재배 상태에서 변이 선발 보다는 좀 더 유용하게 품종을 개량 할 수 있는 가능성이 있음을 보였다.

연구사

히말라야의 동부에서 기원한, 감귤류는 미오세(miocene) 후기에 동아시아로 전파된 것으로 여겨지고 있으며, 중국의 운남지역에서 발견되는 초기 감귤류의 화석(Xie S. et al, 2013)과 감귤류의 유전체에 대한 비교 결과(Wu G.A. et al 2018)들이 이를 뒷받침하고 있다. 이전 지질시대인 플리오세(pliocene)에는 오세아니아 지역에 감귤의 조상이 전파되어 오스트레일리아 라임의 기원이 되었다(Pfeil, B. E. et al 2008).

감귤은 인류에 의해 재배되기 시작된 이래 동아시아 지역을 포함한, 미국, 칠레 등 아메리카, 남부유럽과 아프리카, 호주 등 전세계에서 재배되고 소비되는 대표적인 과수 작물이 되었다. 한국에서도, 삼국시대 이전부터 제주지역에 감귤이 재배되고 있던 것으로 추정되고 있으며, 고려시대에는 감귤을 조세(租稅)로 부담하였다(고려사 세가권제7). 조선시대에는 제주에서 중앙 정부로 진상되는 주요 품목 중의 하나였으며 종묘(宗廟)에서 계절을 알리는 제물로 사용될 만큼 귀하게 여겨졌다(태종실록 1413년). 제주성과 도처에 감귤 과원(果園)을 만들어 체계적으로 관리와 재배를 하였으며, 제주의 귤나무를 순천 및 전라도의 해안지역에 옮겨 심는 등 재배 확산을 위해서도 노력하였다(태종실록 1413년). 제주에서 재배되고 있던 귤은 감자(柑子), 유자(柚子), 동정귤(洞庭橘), 유감(乳柑), 청귤(靑橘), 금귤(金橘), 산귤(山橘) 등이며, 당귤(唐橘), 왜귤(倭橘) 등이 중국과 일본으로 부터 들여와 재배되었다(성종실록 1472년).

20세기 초 일본에서 온주밀감이 들어오고, 일제강점기 제주로 이주해온 일본인들에 의해 온주, 하귤, 와싱턴네블, 기주밀감, 문단(文旦), 금감자, 팔삭(八朔), 금귤 등이 재배되기 시작하면서, 외래 감귤 품종이 본격적으로 재배되기 시작하였으며,(감귤박물관 <http://citrus.seogwipo.go.kr/>) 1950년대부터 제주 지역에서 일본으로 건너간 제일동포들에 의해 온주밀감을 포함한 감귤 묘목들이 보내지면서, 재배가 확대되고 제주의 대표적인 과수로 자리하였다(Song K.J 2013).

오랜 재배 역사에도 불구하고, 국내 감귤 육종의 역사는 길지 않다. 초기에는 농가에서 발견된 변이 계통을 농업기관에서 특성 조사하여 품종으로 육성되는 형

태였으며, 하귤의 변이로 발견된 황금 하귤과 온주 입간 조생의 가지변이에서 발견된 애월조생 등이 민간에서 발견되고, 농업기관에서 품종으로 육성되었다 (Park Y.C. 2011). 1991년 농촌진흥청 과수연구소 감귤시험장이 설치되면서, 본격적인 국가 단위 감귤 품종 개발이 시작되고, 육종 목표가 설정된 주요 감귤 계통 간에 교배가 이루어졌다. 이와 함께 지역내에서 기존 감귤 재배지에서 자연 변이된 감귤 계통을 찾기 위한 변이지 탐색 사업도 체계적으로 이루어 졌다. 그 결과 온주밀감 입간조생 품종에 하귤을 교배하여 얻은 실생 종자로부터 하례조생(Yun S.H. et al 2008)을 선발한 것을 시작으로 풍광(Park J.H. 2007), 탐나는 봉((Park J.H. 2011), 탐도 1호(Park J.H. 2009)등 새로운 감귤 품종이 농촌진흥청에서 개발되었다. 이후 제주농업기술원에서도 좌좌목 온주의 변이가치로부터 상도조생 품종이 선발되었으며(Park Y.C. et al 2013), 씨니트, 탐도3호(Park J.H. et al 2013), 윈터 프린스와 썬킹 등 다양한 감귤 품종이 꾸준히 개발되고 있다.

육종재료로서 감귤을 이해할 때 중요한 특성중 하나로 부계 유전자 유입 없이 모계에서 유래된 세포만으로 종자가 형성되는 무수정 생식(無受精生殖: apomixis)과 수정 없이도 열매가 형성되는 단위 결실(單爲結實:parthenocarpy) 특성이 있다.

단위 결실은 파인애플, 감, 씨 없는 포도 등에서와 같이 자연적 혹은 인공적 수분 없이도 과육 형성이 일어나는 현상을 일컫으며, 재배적으로 매우 중요한 특성이다(Okoro P. et al 2011). 감귤의 경우도 단위 결실에 의해서 열매를 맺을 수 있어서, 자가 불화성이거나, 응성불임 등으로 종자를 맺지 않는 계통이 재배적으로 바람직하며, 종자 형성이 안 되는 무종자(無種子:seedless)계통 선발은 중요한 육종 목표가 되고 있다(Vardi A. et al, 2018).

감귤은 종자가 형성될 때 수정으로 형성되는 접합배(接合胚:zygotic embryo)외에 배주(胚珠:ovule)의 주심세포(珠心細胞:nucellus)에서 유래된 주심배(珠心胚:nucellar embryo)를 형성 할 수 있고, 주심배 형성 여부에 따라, 종자 내에 주심배 형성 없이 수정에 의한 접합배 형성만 이루어지는 단배성(單胚性: mono-embryony) 품종과 한 개의 이상의 주심배와 접합배로 이루어지는 다배성(多胚性:poly-embryony) 품종으로 나눌 수 있다. (Table.1)

Table 1. Embryony of some citrus variteis

단배성 품종(Monoembryony)			다배성 품종 (Polyembryony)		
감귤명	영명	교배계통 및 육성방법	감귤명	영명	교배계통 및 육성방법
궁내이예감	<i>C. iyo</i> 'Myauchiiyokan'	이예감 변이선발	무봉	<i>C. hybrid</i> 'Mubong'	<i>C. hybrid</i> 'Shiranui' X <i>C. hassaku</i>
리	<i>C. reticulata</i>	<i>C. clementina</i> X <i>C. hybrid</i> 'Tangelo'	세토카	<i>C. hybrid</i> 'Setoka'	<i>C. hybrid</i> 'Kiyomi' X <i>C. sinensis</i> 'Trovita'
문단	<i>C. grandis</i>	불명	진지향	<i>C. hybrid</i> 'Tsunokaon'	<i>C. hybrid</i> 'Kiyomi' X <i>C. unshiu</i> 'Okitsu Wase'
사두감	<i>C. pseudogulgul</i>	채래품종	당유자	<i>C. grandis</i>	채래품종
서지향	<i>C. hybrid</i> 'Nishinokaon'	<i>C. hybrid</i> 'Kiyomi' X <i>C. sinensis</i> 'Trovita'	리스본레몬	<i>C. limon</i> 'Lisbon lemon'	불명
에히메28호	<i>C. hybrid</i> 'Ehime Kashi 28 gou'	<i>C. hybrid</i> 'Nakou' X <i>C. hybrid</i> 'Amakusa'	길전네블	<i>C. sinensis</i> 'Yoshida navel'	위싱턴 네블오렌지 변이선발
클레멘틴	<i>C. clementina</i>	불명	그레이프 프루트	<i>C. paradisi</i>	불명
팔삭	<i>C. hassaku</i>	우발실생	미네올라	<i>C. hybrid</i> 'Minneola'	<i>C. paradisi</i> 'Duncan' X <i>C. hybrids</i> 'Dancy'
하레히메	<i>C. hybrid</i> 'Harehime'	<i>C. hybrid</i> 'E-647' X <i>C. unshiu</i>	발렌시아레이트	<i>C. sinensis</i> 'Valencia late'	불명
청견	<i>C. hybrid</i> 'Kiyomi'	<i>C. unshiu</i> ' Miyagawa Wase' X <i>C. sinensis</i> ' Trovita'	베니바에	<i>C. hybrid</i> 'Benibae'	<i>C. unshiu</i> 'Hayashi unshiu' X <i>C. sinensis</i>
탐도3호	<i>C. hybrid</i> 'Tamdo 3'	<i>C. hybrid</i> 'Kiyomo' X <i>C. reticulata</i> 'Sunburst'	탐도1호	<i>C. hybrid</i> 'Tamdo 1'	<i>C. hybrid</i> 'Kiyomi' X <i>C. platymamma</i>

※ Data Provided by Park Y.C.

감귤의 주심배는 그림 1에서와 같이, 감귤의 씨방(子房:ovary)에 있는 밑씨 배주(胚珠:ovule)에서 감수 분열 이후 유사분열(有絲分裂:mitosis)을 통해 난세포(卵細胞:egg cell)가 형성되어 가는 과정에서 배낭(胚囊:embryo sac) 주변을 둘러싸고 있던 배주의 체세포(體細胞:somatic cell)인 주심세포로부터 만들어진다(Hand M.L. et al, 2014). 주심배는 자연 상태에서는 수정이 이루어진 이후 발달된 배유(胚乳:endosperm)의 영양분을 접합배와 함께 이용하여 발아하고, 한 개의 종자로부터 주심배와 접합배로부터 유래된 복수의 식물체로 발달한다. (Kishore K. et al 2012) 수정이 이루어 지지 않거나, 수정이 이루어져 접합배가 형성되었으나, 배유 발달이 이루어지지 않은 경우, 종자에서는 주심배가 형성되어도, 자체적인 영양 공급 능력이 없어 독립적인 발아나 식물체 형성이 이루어지지 않는다. 이러한 경우 배배양(胚培養:embryo culture)을 통해, 주심배나 접합배로부터 유도된 식물체를 얻을 수 있다.

감귤의 교배 육종에 있어 단배성 품종은 부계와 모계의 형질이 혼합된 새로운 품종을 개발하는데 적합하고, 일본에서 궁천조생과 트로비타 오렌지로부터 만들어진 청견(*C. hybridus* 'Kiomi')과 같은 단배성 품종(西浦昌男 外 1983) 서지향, 부지화, 진지향, (Park Y. C. 2011) 탐도3호 (Park J.H. 2013)과 같은 품종이 육성되는데 기여하였고, 국내에서도 원교아단배성 1호, 원교아단배성 2호와 같은 단배성 품종이 개발되어 육종 중간 모본으로 활용되고 있다.

감귤의 다배성 특성은 감귤의 교배 육종에 있어 교배되는 두 계통의 형질을 가지고 있는 접합배와 주심배 유래 식물체가 함께 발아되어 구분이 어렵고, 주심배 계통이 수세가 강해서 접합배 계통이 생육하지 못하고 퇴화되는 등 감귤 교배 육종의 제약 요소로 인식되었고, 감귤 주심배 계통은 균일한 특성의 대목을 얻기 위한 방법 정도로 여겨졌다.(Khan I. 2007) 하지만, 분자마커(molecular markers)를 이용하여 주심배와 접합배를 구분하면, 다배성 품종을 모계로 이용 하더라도 조기에 구분하여 선발에 이용할 수 있고(Golein B. et al 2011), 주심배 계통에서도 형태와 성장 특성이 다른 변이체들이 만들어짐으로서, 기존에 어느 정도의 시장성이 인정된 품종을 일부 형질들이 개선된 품종을 육성할 수 있어, 다배성 여부에 관계없이 감귤 육종 소재로 활용되고 있다(Krueger R. R. 2003).

주심배를 비롯하여 무수정생식에 의해서 만들어진 계통들은 모계의 유전형과 상

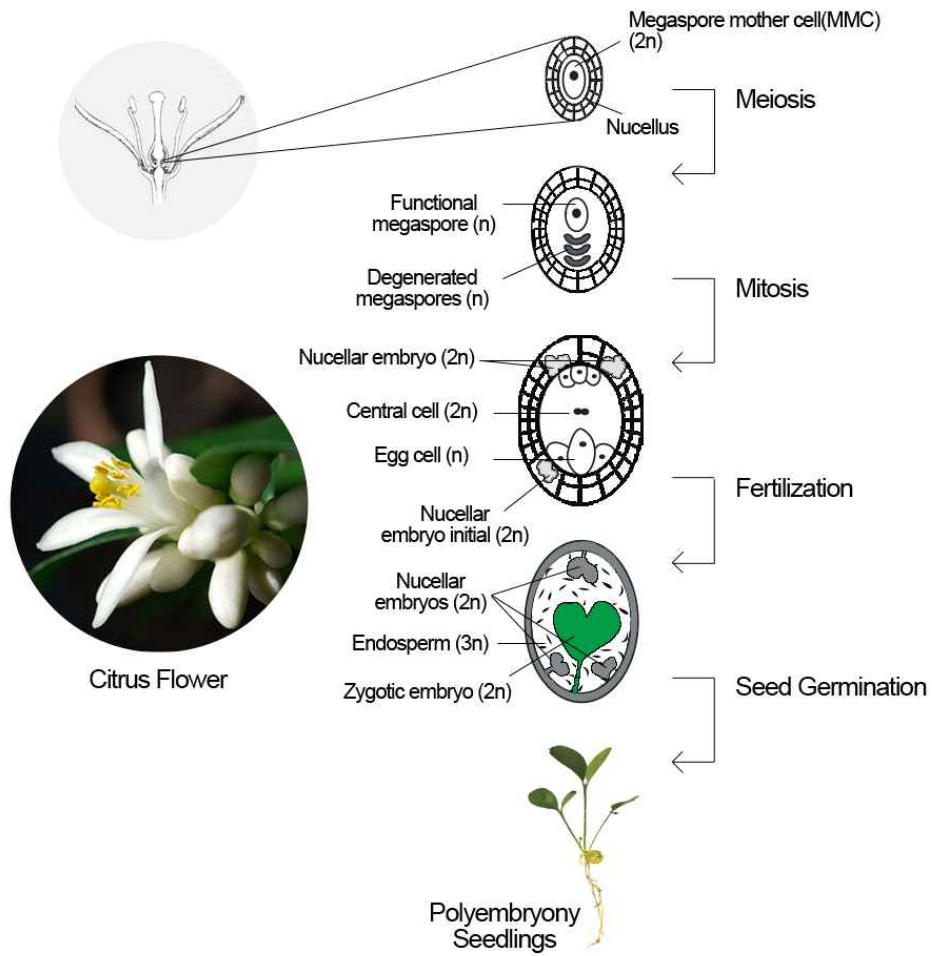


Figure 1. Formation of nucellar seedlings during the seed development in polyembryonic citrus varieties.

당한 유사성을 나타남에도 불구하고, 유전적 변이체가 빈번하게 나타나며, 이는 주심배와 무수정생식 계통이 만들어질 때 유전적 변이가 확대될 수 있는 세포현상이 존재할 가능성을 보여준다(Kumar S. 2017). 가능한 세포현상으로는 첫째, 개개의 무수정생식 계통에 돌연변이가 누적되어 유전적 변이 계통을 형성할 수 있으며, 둘째 무수정 생식 과정에서 적고, 불규칙적인 양의 부계 유전자가 혼입되어 재조합이 일어나고, 새로운 유전 계통이 만들어질 수 있다는 것이다. 그리고, 셋째는 선택적 (facultative) 생식 과정이 있어 조건과 상황에 따라 무수정 생식 계통군에 유전적 변이를 유발할 가능성이 있다는 것이다.(Adolesson S, 2007, Balloux F, et al 2003, Bengtsson B.O. 2003) 또 다른 가능성으로는 주심세포와 대포자세포(大孢子細胞: megaspore)를 비롯한 배주 세포들에서 후성 유전 전달기구가 배주 세포들의 분화 시기나 그 이전에 모식물체에서 경험된 정보를 수정 생식 계통과 무수정 생식 계통에 전달하며 그 결과 모계로부터 유전적 변이가 형성된 계통들이 만들어질 수 있다. 또한 주심배로 분화가 가능한 주심세포의 증식과정에서 주심세포 유전체에 발생한 유전적 변이와 메틸화(methylation)된 정보가 주심배로 분화되기 직전 세포로 전달되고, 이로부터 분화된 주심배는 수정된 형태의 모계 유전 정보를 가지게 되며, 후대 계통에서 표현형이 달라진 자손이 만들어진다.

유전체(遺傳體 :genome)에는 종(種:species)으로서의 특성을 발현하게 하는 생명 정보가 들어있다. 2003년도에 십여 년에 걸친 인간 유전체 분석 계획(Human Genome Project) 끝에 인간의 전체 유전자 서열이 발표되었고(IHGSC 2004), 같은 해 감귤 분야에서도 국제 감귤 유전체 컨소시엄(ICGC, The International Citrus Genome Consortium)이 설립되면서 전체 감귤 유전체 해독을 위한 국제간 공동 연구가 시작되었다(Kim H. B. et al 2015). 자연 상태에서 감귤의 특성은 부계와 모계에서 온 한 쌍 이상의 유전체로 구성된 유전정보의 발현 결과이며, 유전체 분석에 있어 복수 유전체의 존재는 대립 유전자 간의 서열, 특정 유전자위에서 염기 서열 다형성과 유전자 삽입과 소실에 의한 유전자 서열 변화 등으로 동일 위상에 존재하는 전체 유전체 정보를 구성하는데 제한 요소가 된다. 이러한 이유로 유전체 정보 해석의 기준이 되는 표준 유전체 형성에는 한 개의

유전자 세트를 가지는 반수체 유전체 분석 재료의 수립이 필요하다. (Forster B. P. et al 2007) 감귤 유전체 해독과 표준 유전체 수립을 위한 국제 컨소시엄에서는 클레멘타인 품종(*C. clementina* cv. Clemenules)에 대한 반수체를 수립하여 (Aleza P. et al 2009), 클론에 대해 Sanger 플랫폼을 이용한 유전체 해독을 수행하였다. (Terol J. et al 2008) 또 국제 컨소시엄과는 별도로 미국의 플로리다 대학교를 중심으로 스위트 오렌지 이배체 (*C. sinensis* cv. Ridge Pineapple)를 재료로 유전체를 분석하여, 공개하였으며, 2013년에는 중국 연구그룹의 주도로 발렌시아 스위트 오렌지(*C. sinensis*)에서 반수체를 유도하고 이로부터 만들어진 이배체를 이용하여 전체 유전체 서열을 해독하고, 감귤 유전체 표준안으로 발표하였다(Xu Q. et al 2013). 2017년에는 온주 감귤 이형 2배체의 NGS 분석 염기 서열을 혼성체 조립(Hybrid assembly)을 통해 구성한 유전체 서열이 발표되었다. (Shimizu T. et al 2017) 이러한 감귤 유전체 정보의 축적으로 유전체 기반 연관 분석 (genome-wide association studies:GWAS)와 유전체 수준 선발 (genomic selection: GS)과 같이 유전체 정보를 활용한 품종을 선발하는 기법들이 개발과 더불어 품종 선발에 오랜 시간이 걸리는 감귤과 과수 육종 기간을 단축시켜 줄 것으로 기대되고 있다(Minamikawa M.F. 2017).

본 연구에서는 부지화의 다배성 특성을 이용하여, 미성숙종자로부터 유래된 주심배 유래 식물체를 유도하고, 이들로부터 기존 부지화와 비교하여 과형이 다르고, 조기 수확 가능한 계통을 선발하고, NGS 분석을 통해 유전체를 분석하였다. 또한 부지화 품종과 부지화의 아조변이에 의해 선발된 씨니트 품종에서도 NGS 분석을 통해 전체 유전체 정보를 분석하고, 부지화의 주심배에서 유도된 계통과 비교하여, 선발 방식에 따른 변이를 유전체 수준에서 비교하였다.

제1장 부지화 주심배 배양체로부터 우수 계통 선발 및 특성

1.1 서론

부지화(不知火 : *C. hybrid* 'Shiranui') 품종은 국내에는 '한라봉'이라는 상품명으로 잘 알려져 있으며, 1990년대 초반 일본에서 도입되어 제주지역과 육지부의 남해안 지역을 비롯하여 충주 등 내륙지역에 까지 널리 재배되고 있다. 부지화는 1972년 일본 나가사키현(長崎縣)에 위치한 농림수산성 과수시험장 구치노쯔(口之津) 지역 시험포장에서 온주감귤 가지변이에서 선발된 궁천조생(宮川早生 : *C. unshiu* 'Miyagawa Wase')과 트로비타 오렌지 (*C. sinensis* 'Trovia')를 교배하여 선발된 단배성 품종인 청견(淸見 : *C. hybrid* 'Kiyomi') 품종을 모계로 하고, 중앙 3호 폰칸 (中野3号 : *C. reticulata*)을 부계로 하여 육성되기 시작하였다. 당도가 비교적 높고, 과실에 불룩한 꼭지를 형성하며, 껍질을 벗기기 쉽고, 특유의 향이 있다. (Matsumoto, 2001) 숙기는 대체로 2월 중순에서 3월 초순으로 비교적 늦고, 궤양병(Canker)과 더뎡이병(Scab)에 대한 내병성이 있는 것으로 알려져 있으며(日本果樹研究, 品種一覽), 품종 육성국가인 일본에서는 'Shiranui'와 'Dekopon'이라는 이름으로 재배되고 있다. 이후 다른 나라로 전파되어, 한국에서는 'Hallabong', 미국에서는 'Sumo Mandarin', 브라질에서는 'Kinsei'라는 이름으로 상업화되었다.

부지화는 재배 과수로서 뿐만 아니라, 껍질을 벗기기 쉬운 온주밀감과 폰칸의 특징과 오렌지의 특성을 고루 갖고 있어, 육종 소재로서 가치가 크다. 하지만, 꽃가루 형성능이 약하고, 다배성인 특성이 있어 부분과 모본 모두에서 육종 소재로 이용하는데 기술적인 제약이 따른다. 이러한 약점에도 불구하고, 부지화를 이용한 여러 품종이 개발되고 있는데, 농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤연구소에서는 부지화 실생배양을 통해 만생품종 '탐나는봉'과, 부지화를 모본으로 하여 팔삭(*C. hassaku*)을 교배시켜 선발한 '무봉'을 육성한 바 있으며, 제주지역의 재배농가와 제주특별자치도 농업기술원에 의해 부지화의 아조변이 선발된 '씨니트' 품

종이 국내에서 개발되었다. 또한, 부지화의 육성 국가인 일본에서는 부지화에 신감하(新甘夏: *C. natsudaikai* 'Shinamanatsu') 화분을 수분하여 얻어진 주심배 품종인 사가과시34호(佐賀果試34号: *C. hybrid* 'Sagakashi 34 gou')와 부지화에 머cott(Murcott : *C. reticulata*)를 교배하여 얻어진 주심배 품종인 히노유타카(肥豊: *C. hybrid* 'Hinoyutaka') 등이 있다.

제주지역의 주된 부지화 재배 형태인 시설하우스 재배 조건에서, 종자는 매우 드물게 형성된다. 이는 부지화 품종 자체가 꽃가루 형성이 잘 이루어지지 않으며, 꽃가루가 형성되어도 수술대가 짧고, 암술대가 길어, 자가 수분이 일어나기 어려운 구조를 가지고 있으며, 외부와 일정 부분 격리 되는 시설하우스에서는 별과 같은 수분 매개충도 드물어 수정 기회가 제한되기 때문인 것으로 여겨진다. 반면, 노지 재배 조건에서는 빈번하게 종자 형성이 일어나는 데, 이 경우 다른 품종의 감귤류가 인접하여 있는 경우가 많으며, 이를 받아시켜 부지화 자연 실생 주심배 계통 선발에 이용 할 수 있다.

본 연구에서는 부지화의 열매에서 배유 발달이 이루어지지 않은 미성숙종자를 분리하여, 기내 배양을 하고, 배발달을 통해 형성된 배양체 순화 계통들 중에서 모품종과 과형이 다르고, 숙기가 기존의 부지화 품종보다 빠른 계통을 선발하고 그 특성을 조사하였다.

1.2 재료 및 방법

1.2.1 미성숙종자 유래 부지화 계통 선발

형태와 크기를 달리하는 부지화 과실로부터 미성숙 종자를 채취하여 살균과 소독을 실시하고, MS 배지를 기본으로 특정 호르몬 조건(NAA 0.1mg/L, Kinetin 1mg/L, or NAA 0.1mg/L, BA 1mg/L) 25℃, 12시간 명암주기에서 배양체를 유도하였다. 이들을 배분화 과정을 통해 식물체로 완전히 분화시키고, 분화된 식물체는 경화(hardening) 과정을 거쳐 대목에 접목함으로써 선발 모본을 만들었으며, 이를 포장에 정식하여, 착과되는 과실의 특성을 조사하였다.

1.2.2 부지화 계통의 형태적 특성조사

부지화와 부지화의 미성숙종자로부터 유래된 선발 계통 플라토의 형태적 특성을 비교하기 위하여, 서귀포시 토평동에 소재한 시험포장에서 2015년 9월부터 12월까지 착과된 열매의 가로에 대한 세로의 비율인 종횡비(縱橫比)를 디지털 캘리퍼를 이용해서 측정하였다. 부지화와 플라토당 각기 10개의 열매를 매월 15일 전후 동일한 열매를 측정하였고, 성장중 열과가 발생한 시료는 열과 발생이후에는 측정에서 제외하였다.

1.2.3 유리당 및 유기산 분석

부지화 미성숙종자 배양체에서 유래된 선발체와 부지화에서 위치가 각기 다른 과실 세 개 씩을 채취하여 유기산 함량 및 총산 비교 분석하였다.

당도는 당도계(N-1, Atago, Japan)로 분석하였고, 총산은 0.1N NaOH로 적정하여 구연산으로 환산하여 계산하였다. 유리당 함량은 착즙한 시료 1-5g을 50% ACN 50 mL를 가하여 30분간 초음파 추출(3회) 하였다. 추출물은 분석조건에 알맞도록 희석한 다음 Sep-Pak C18 cartridge(Waters)를 통과시킨 후 0.45 μm membrane filter(Woongki Science co. Ltd., Seoul, Korea)로 여과한 것을

HPLC(Waters 2695, Waters Associate Inc., Milliford, MA, USA)로 분석하였다. 분석 칼럼은 Prevail™ Carbohydrate ES(4.6×250 mm, 5 μm, Grace, Japan), 검출기는 ELSD, 이동상으로는 acetonitrile과 3차 증류수를 7:3으로 혼합하여 분당 0.8 mL의 속도로 이동시켰다. 유리당 함량은 농도별로 제조한 각각의 표준물질(Sigma)을 HPLC로 분석하여 얻은 표준곡선으로부터 정량하였다.

유기산 분석을 위한 HPLC 조건은 Prevail™ organic acid(4.6 × 150 mm, 3 μm, Grace, Japan) 컬럼을 사용하여 PDA 210 nm에서 검출하였으며, 이동상으로는 pH 2.5로 조정된 25 mM KH₂PO₄ 용액을 분당 0.5 mL의 속도로 이동시켰다. 분리된 각 피크는 유기산 표준물질과 retention time을 비교하여 동정하고, 표준곡선으로부터 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

1.3.1 부지화 미성숙종자 배양체 유래 계통 선발

부지화 미성숙종자는 배유 발달이 이루어 지지 않아 일반적인 조건에서는 발아가 되지 않는다(그림1-A). 이를 MS 기본배지에 호르몬을 처리하고, 배양하면, 종자로부터 세포의 증식과 함께 배발달(embryogenesis)이 일어난다. 이때 형성되는 배양체는 구형(globular 그림 2-B)과 어뢰형(torpedo 그림 2-D), 심장형(heart 그림 2-E)을 거쳐 다양한 배(胚:embryo)모양을 거쳐서(그림2-F.G.H.I) 점차 일반적인 식물체 모양(그림3-A)을 형성하며 분화 발달한다. 한 개의 미발달 종자에서는 다수의 배가 형성된다.(그림 2-G) 이는 부지화 품종이 다배성인 특성에 기인한 것으로 보이며, 한 개의 미성숙종자에서 한 개에서 수십개의 배로 나뉘며, 각기 독립적인 발달하여 식물체를 형성한다.(그림 3-B.C) 식물체로 분화된 배양체는 기내에서 일정기간 동안 경화(硬化:hardening)과정(그림 3-E)을 거쳐 대목에 접목시켜(그림 3-F) 성목으로 증식시킨다.

이때 성목으로 만들어진 각 식물체는 부지화의 주심배 계통들이며, 이들이 성장을 거쳐 개화하여 열매가 형성된 이후 각 열매의 특성을 비교하여(그림 4), 2011년 5개의 착과 계통중 과형이 둥글고, 과피가 얇은 1계통을 선발(그림5)하고, 선발명 '플라토'로 이름 붙였다.

부지화의 미성숙종자 주심배로부터 유래된 여러 계통은 형태와 생장 특성이 과형과 숙기등 다양한 차이를 나타낸다(그림 6). 주심배에서 유래된 후대 식물체가 모계의 유전형질과 동일함으로 모식물과 동일한 특성을 나타낸다는 기존의 생각과는 다르게, 실제 주심배 계통의 전개과정에서는 다양한 변이 계통이 나타난다. 이는 주심배 선발이 기존에 품종에 대한 검증이 어느 정도 이루어져, 시장성과 재배 안정성이 확보된 품종에 대하여, 과형, 착색 등의 외형적 특성과 숙기, 맛 등의 특성이 변화된 품종으로 개량하는데 유용한 육종 방법이 될 수 있음을 보여 준다.

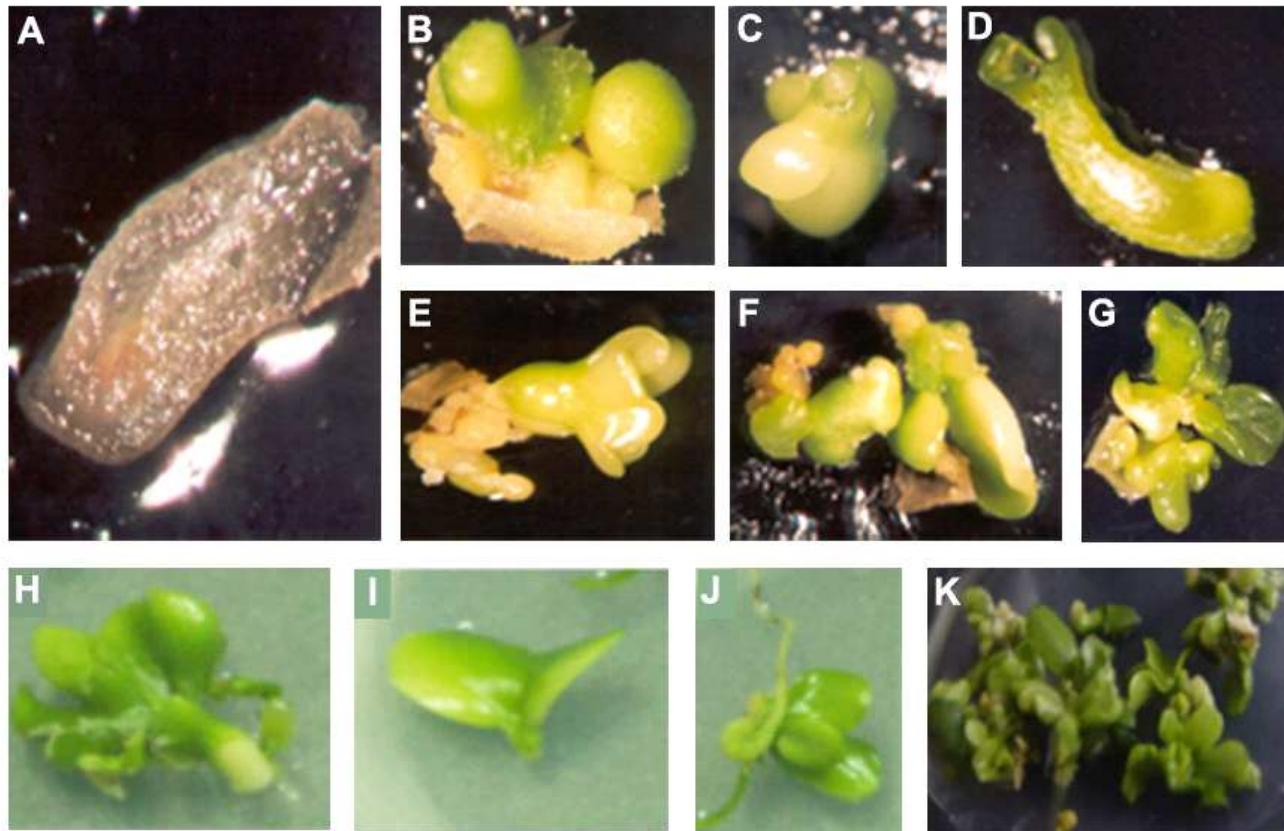


Figure 2. Embryogenesis of *C. hybrid* 'Shiranui' immature seeds.

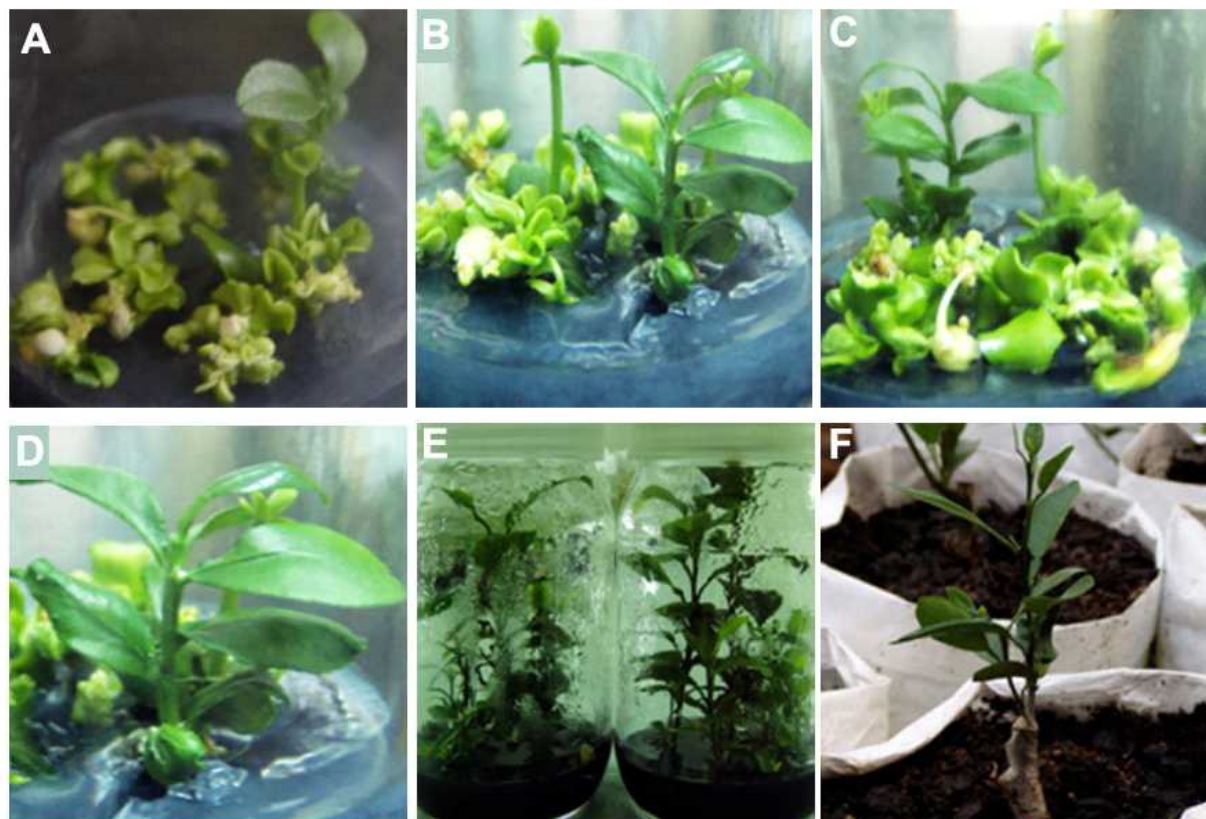


Figure 3. Plantlets developed from *C. hybrid* 'Shiranui' nucellar embryos.

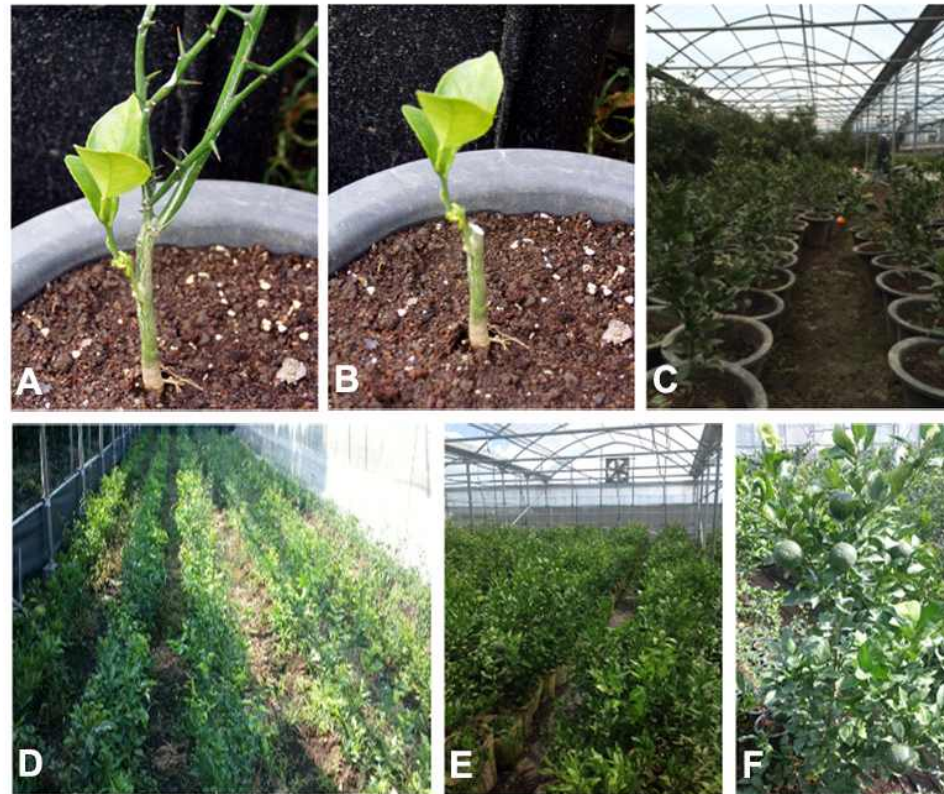


Figure 4. Grafts and cultivation of *C. hybrid* 'Shiranui' nucellar embryo scions.

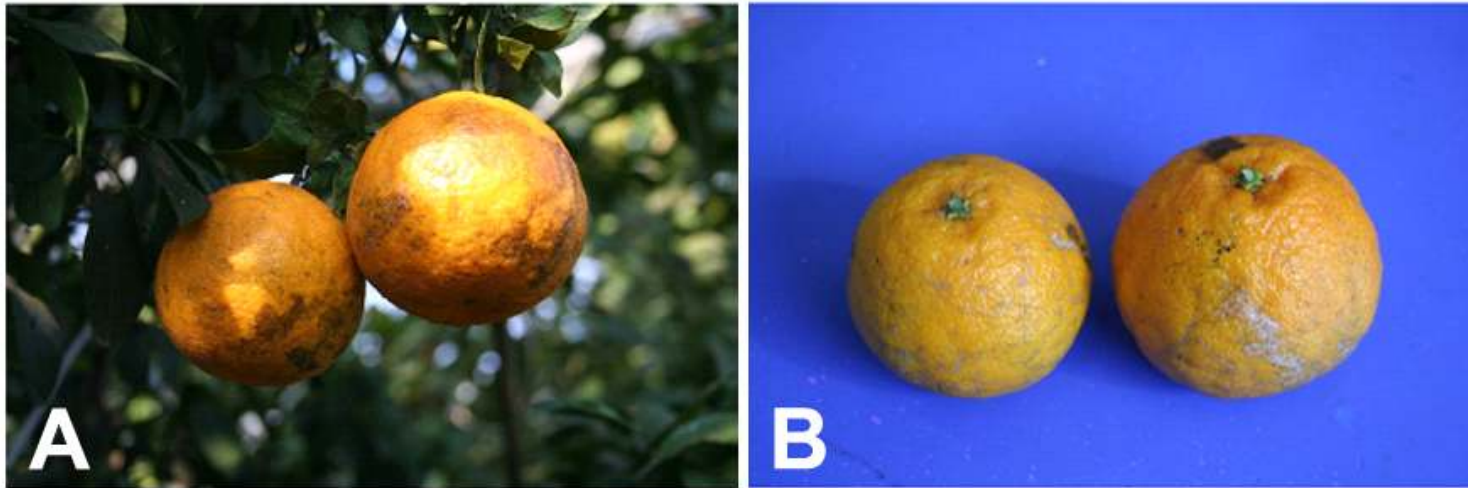


Figure 5. First selection of *C. hybrid* 'Shiranui' nucellar embryo lines named 'Plato'.

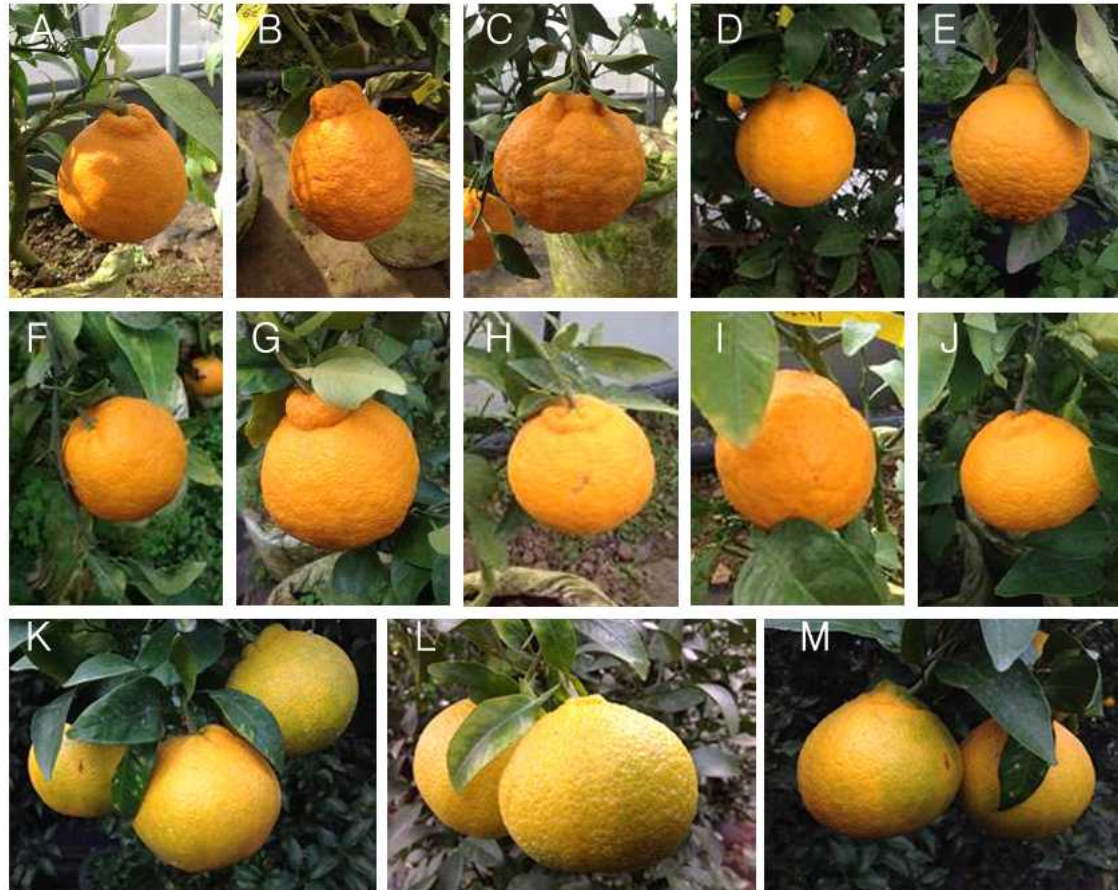


Figure 6. Morphological variants of *C. hybrid* 'Shiranui' nucellar embryo lines that has different fruit shapes.

1.3.2 부지화 미성숙종자 배양체 유래 계통의 맛 특성 비교

서귀포시 토평동에 소재한 시험포장에서 수확된 부지화와 플라토 열매 비교군과 비슷한 시기 서귀포시 지역 상효동에서 재배된 부지화와 씨니트, 상호와 신레리 지역에서 재배된 부지화 M16A 계통과 씨니트 비교군의 당도와 산 함량 측정 결과를 비교하였다. 플라토는 모품종인 부지화에 비하여 감산(減酸)이 빠른 특징이 있어, 조기 수확이 가능하다. 2014년 11월 16일과 수확하여 당도와 산도를 비교한 결과 부지화에 비하여 당도는 높고 산도는 낮게 나타났으며, 2015년 1월 12일 수확한 플라토와 부지화에서도 플라토가 당도는 높고 산도는 낮게 나타났다. 비슷한 시기, 부지화와 씨니트, 부지화 M16A와 씨니트의 당도, 산도 측정 결과와 비교했을때, 당도가 높고, 산함량은 대체로 낮은 것으로 나타났다.(표2)

2014년 11월 토평동 포장의 다른 부지화와 플라토 열매에서 측정된 당도, 산도, 유기산 조성에서도, 부지화의 당도는 11.7 - 12.0 Brix, 산함량 1.19 - 1.62 %로 나타났다. 플라토의 경우는 당도 11.6 - 13.1 Brix, 산함량 0.96 - 1.15 %으로 나타났다. 플라토가 부지화에 비교하여, 비슷한 당도 범위를 나타냄에 비하여, 산 함량은 20 - 50 % 낮은 것으로 나타났으며, 이는 플라토가 부지화에 비하여 감산이 빠르기 때문이다. 부지화는 11월 중순경부터 과일 착색은 이루어지지만, 산 함량이 높고, 당도가 충분히 오르지 않아 감산과 당도 상승이 이루어지는 1월 중순 이후 수확하여, 출하된다. 반면 플라토는 11월 중순경부터 착색은 물론 먹을 수 있을 만큼의 감산이 이루어져, 기존의 부지화보다는 조기 수확이 가능한 특성을 갖고 있다. 그리고, 산 함량과 함께 산조성도 부지화와는 다른 특성을 보였다(표3, 표4).

2015년 10월부터 12월까지 부지화와 플라토의 과일 후기 생장과 성숙기 동안의 당도 변화와 당 성분 변화를 측정 비교하였다. 부지화와 플라토의 과일 성숙에 따른 당함량 비교에서 10월부터 11월 사이에 당 함량이 급격히 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 당 함량은 굴절 당도계에 의한 측정 결과와는 다르게, 부지화에서 조금 높게 나타났다. 당 조성면에서는 플라토가 부지화에 비하여 수크로스(Sucrose) 함량이 높게 나타났고, 과당과 포도당 함량은 낮게 나타났다. 유기산 함량과 조성변화에 있어서도, 과일이 성숙해 감에 따라 구연산(Citric acid) 함량

이 급격히 감소하고, 사과산(Malic acid) 함량이 증가함을 보였다.

감귤의 맛과 상품성을 결정할 때 당도가 감귤의 등급을 나누는 중요한 기준이 되고 있다. 하지만 인간이 느끼는 맛과 감미는 특정 당성분 함량에 따라 달라지는 단순한 감각이 아니라, 당성분의 조성비, 산도와 향(Flavor)를 구성하는 성분, 심지어는 쓴맛과 무기물의 함량에 따라서도 달라지는 복합적인 감각이다. 본 연구에서는 현재 조건에서 분석 가능한 성분만을 비교하여 입맛으로 느껴지는 감각 차이를 설명하는데 부족하나, 감귤 품종의 선발과 교배 혹은 육종 방법의 선택에 있어서, 맛 구성 성분과 조성비, 함량 등의 이해는 품종 선발의 성패를 결정하는 중요한 요소가 될 것이다.

Table 2. Field data of some *C. hybrid* 'Shiranui' variants and 'Plato' derived from nucellar embryos.

Experimental Field	Variety	Sweetness	Acid content	Acid ratio	Color (a*)
*Sang-hyo	Suneat	11.1	0.91	12.2	29.86
(2013. 12. 2)	Shiranui	11.0	0.95	11.6	23.48
*Sang-hyo	Suneat	13.0	0.89	14.6	32.40
(2014. 1. 6)	Shiranui	12.9	0.92	14.0	27.58
*Sang-hyo	Suneat	11.9	1.04	11.4	28.5
(2014.12.30)	M16A	11.7	1.06	11.0	24.8
*Shin-yerie	Suneat	12.9	1.17	11.0	29.1
(2014.12.30)	M16A	12.8	1.22	10.5	27.0
**To-pyung	Plato	12.3	1.07	11.5	
(2014. 11.16)	Shiranui	11.8	1.39	8.5	
**To-pyung	Plato	14.2	0.84	16.9	
(2015. 1. 12)	Shiranui	13.0	0.89	14.6	

* : Data from Jeju Rural Agricultural Research Center

** : Experimental filed of Bio-Agr Ltd. at Seogwipo-si

Table 3 . Comparison of sugar and acid compositions in 2014.

Samples	Oxalic acid	Tartaric acid	Malic acid	Citric acid	Total acid(%)	Sugar (Brix)
HB1-1	0.027	n.d	0.187	0.121	1.21	11.9
HB1-2	0.007	n.d	0.167	0.131	1.19	11.7
HB1-3	0.002	n.d	0.265	0.120	1.42	12.0
HB2-1	0.006	0.022	0.160	0.148	1.59	11.7
HB2-2	0.004	0.018	0.274	0.163	1.62	11.8
HB2-3	0.021	0.018	0.378	0.129	1.32	11.8
Avg.	0.011	0.010	0.239	0.135	1.39	11.82
P1-1	0.041	0.018	0.333	0.090	1.02	11.6
P1-2	0.002	0.013	0.375	0.096	0.96	13.1
P1-3	0.005	0.012	0.384	0.075	1.02	12.2
P2-1	n.d	0.011	0.442	0.092	1.13	12.0
P2-2	n.d	0.011	0.421	0.081	1.12	12.2
P2-3	n.d	0.012	0.410	0.091	1.15	12.7
Avg.	0.008	0.013	0.394	0.088	1.07	12.30

HB : *C. hybrid* 'shiranui'

P1, P2 : 'Plato' derived from immature seed of *C. hybrid* 'shiranui'

Table 4. Changes of sugar and acid contents.

Samples	2015 Oct.		2015 Nov.		2015 Dec.	
	Sweetnees (Brix)	Acid content(%)	Sweetnees (Brix)	Acid content(%)	Sweetnees (Brix)	Acid content(%)
HB-1	10.3	1.55	11.6	0.93	13.4	0.90
HB-2	11.2	1.12	13.6	1.05	14.4	0.92
HB-3	10.6	1.50	12.4	1.07	13.2	1.01
Avg.	10.73	1.29	12.43	0.98	13.70	0.94
PL-1	10.4	1.21	12.8	0.91	13.6	0.89
PL-2	11.0	1.21	11.4	1.04	13.9	0.85
PL-3	9.4	1.42	12.4	0.96	13.6	0.98
Avg.	10.70	1.21	12.10	0.97	13.70	0.91

HB : *C. hybrid* 'shiranui'

PL : 'Plato' derived from immature seed of *C. hybrid* 'shiranui'

Table 5. Changes of sugar contents and sugar composition

(g/100g)

Component	2015 Oct.				2015 Nov.				2015 Dec.			
	Fructose	Glucose	Sucrose	Total sugar	Fructose	Glucose	Sucrose	Total sugar	Fructose	Glucose	Sucrose	Total sugar
PL-1	1.62	1.57	4.66	7.86	2.14	2.07	6.34	10.55	1.99	1.86	7.66	11.51
PL-2	1.30	1.30	3.29	5.89	1.88	1.82	5.77	9.46	1.98	1.87	7.65	11.50
PL-3	1.32	1.32	2.86	5.50	2.13	2.11	6.29	10.53	2.06	2.00	6.94	10.99
Avg.	1.42	1.40	3.60	6.42	2.05	2.00	6.13	10.18	2.01	1.91	7.41	11.33
SD	0.15	0.12	0.77	1.03	0.12	0.13	0.26	0.51	0.04	0.06	0.34	0.24
HB-1	1.46	1.44	3.19	6.09	2.13	2.11	5.37	9.60	2.25	2.13	7.32	11.71
HB-2	1.58	1.54	3.56	6.68	2.42	2.40	6.22	11.03	2.45	2.30	7.58	12.33
HB-3	1.68	1.59	4.55	7.82	2.28	2.25	5.72	10.25	2.21	2.08	6.90	11.20
Avg.	1.57	1.52	3.77	6.86	2.27	2.25	5.77	10.29	2.30	2.17	7.27	11.75
SD	0.09	0.06	0.57	0.72	0.12	0.12	0.35	0.58	0.10	0.09	0.28	0.46

HB : *C. hybrid* 'shiranui'PL : 'Plato' derived from immature seed of *C. hybrid* 'shiranui'

Table 6. Changes of acids content and acid composition

(g/100g)

Component	2015 Oct.				2015 Nov.				2015 Dec.			
	Oxalic acid	Malic acid	Citric acid	Total	Oxalic acid	Malic acid	Citric acid	Total	Oxalic acid	Malic acid	Citric acid	Total
PL-1	0.052	0.060	0.233	0.344	0.100	0.210	0.102	0.412	0.127	0.298	0.039	0.465
PL-2	0.061	0.048	0.234	0.343	0.043	0.223	0.078	0.345	0.126	0.302	0.040	0.468
PL-3	0.076	0.051	0.263	0.390	0.036	0.218	0.078	0.333	0.132	0.218	0.020	0.369
Avg.	0.063	0.053	0.243	0.359	0.060	0.217	0.086	0.363	0.128	0.273	0.033	0.434
SD	0.012	0.006	0.017	0.027	0.035	0.007	0.014	0.043	0.003	0.047	0.011	0.056
HB-1	0.105	0.055	0.266	0.426	0.038	0.245	0.066	0.351	0.140	0.284	0.014	0.438
HB-2	0.051	0.045	0.214	0.310	0.038	0.151	0.090	0.299	0.142	0.238	0.013	0.394
HB-3	0.084	0.056	0.305	0.445	0.036	0.227	0.095	0.376	0.132	0.255	0.023	0.409
Avg.	0.080	0.052	0.262	0.393	0.038	0.208	0.084	0.342	0.138	0.259	0.017	0.414
SD	0.027	0.006	0.046	0.073	0.001	0.050	0.016	0.040	0.006	0.023	0.005	0.022

HB : *C. hybrid* 'shiranui'PL : 'Plato' derived from immature seed of *C. hybrid* 'shiranui'

1.3.3 부지화 미성숙종자 배양체 유래 선발 계통의 형태 특성

부지화의 미성숙 종자 배양체에서 선발된 플라토의 모품종과 구분되는 외형적 특성을 보인다. 일본의 육성국가인 일본에서 부지화가 상품화되는 과정에서 과일에 봉우리 모양을 특징으로 한 '데코폰' 이라는 이름으로 시장화 되었다. 부지화를 도입한 한국에서도 봉우리 모양을 특징으로 '한라봉'이라는 이름으로 시장에 유통되기 시작하였으며, 봉우리 형태의 과형은 소비자들에게 부지화가 다른 품종의 감귤과 구분 짓게 하는 중요한 특성이 되고 있다.

플라토는 부지화와는 달리 봉우리 모양을 형성하지 않는 특징이 있다. 형태적으로는 구형에 가깝거나, 좌우가 긴 형태를 나타낸다. 이는 최초 선발시 주요한 형태적 특성이었으며, 2011년도 최초 선발이후(그림 형태적 특성이 유지되고 있다. 2015년 9월 17일부터 12월 16일까지 한 달 간격으로 부지화와 플라토 열매의 성숙기 동안, 과실의 높이와 횡폭을 측정하여 생장 특성을 비교하였다. 환경 차이에 의한 과실 형태 차이를 최소화하기 위하여, 일반적인 부지화 재배 환경에 심겨진 두 개체를 비교 하였고, 선발계통과 대조군 부지화의 거리는 반경 3m 이내에 있는 성목을 선정하였다.

열매의 횡폭과 높이에 대한 비율을 측정 한 중횡비가 부지화는 1.14 ± 0.07 에서 1.11 ± 0.06 로 측정되고, 플라토는 1.05 ± 0.07 에서 0.99 ± 0.08 범위로 측정된다. 두 계통 모두 초기의 중횡비가 크고, 숙기가 진행 될수록 적어진다. 이는 열매 생장에 있어 초기에는 종생장이 우세하고, 후기로 갈수록 횡생장이 우세함을 의미 한다. 부지화와 플라토 모두 측정 초기에 형성된 과형이 후기까지 유지가 되며, 횡생장과 종생장이 후기까지 동시에 이루어진다. 그림 은 측정에 사용한 부지화와 플라토 열매를 수확하여 비교한 사진이며, 두 계통 사이에 형태적 차이가 있음을 보여준다.

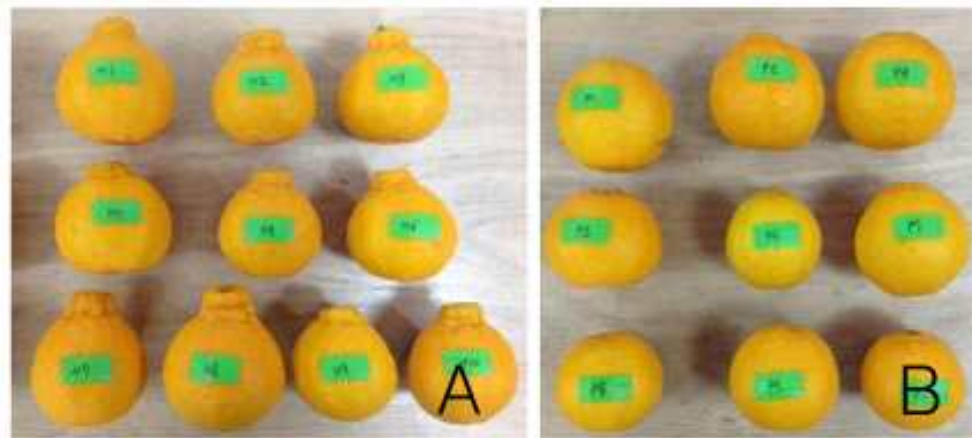


Figure 7. Morphological differences between A. *C. hybrid* 'Shiranui' fruit and B. 'Plato' derived from nucellar embryos of *C. hybrid* 'Shiranui' immature seeds.

Table 7. Comparison of horizontal and vertical growth between *C. hybrid* 'Shiranui' and 'Plato' fruit.

	2015. 9. 17.			2015. 10. 14.			2015. 11. 16.			2015. 12. 16.		
	W	H	H/W	W	H	H/W	W	H	H/W	W	H	H/W
P1	67.11	73.78	1.10	77.93	80.81	1.04	84.42	86.2	1.02	82.98	88.54	1.07
P2	73.36	76.89	1.05	83.23	84.07	1.01	88.83	89.68	1.01	91.98	91.31	0.99
P3	73.56	77.11	1.05	81.90	84.58	1.03	88.89	87.82	0.99	91.83	89.97	0.98
P4	71.46	71.12	1.00	76.32	76.65	1.00	열과	열과	-	열과	열과	-
P5	65.18	64.61	0.99	76.96	72.21	0.94	80.98	74.78	0.92	85.11	78.08	0.92
P6	55.60	65.74	1.18	66.22	65.77	0.99	74.04	80.35	1.09	75.18	84.64	1.13
P7	66.01	75.55	1.14	77.02	84.11	1.09	84.96	91.84	1.08	85.7	94.52	1.10
P8	62.48	62.88	1.01	64.93	63.4	0.98	75.34	72.8	0.97	81.02	73.87	0.91
P9	68.87	67.36	0.98	71.79	68.41	0.95	87.34	80.16	0.92	86.23	77.46	0.90
P10	64.61	63.73	0.99	66.78	64.74	0.97	81.52	79.28	0.97	78.52	75.07	0.96
Avg.	66.82	69.88	1.05 ±0.07	74.31	74.47	1.00 ±0.04	82.92	82.55	1.00 ±0.06	84.28	83.72	0.99 ±0.08
H1	74.61	84.91	1.14	79.95	87.06	1.09	94.48	103.7	1.10	95.93	97.93	1.02
H2	69.48	78.56	1.13	71.97	79.54	1.11	87.11	95.65	1.10	88.75	99.29	1.12
H3	75.88	82.01	1.08	74.08	77.9	1.05	89.29	93.61	1.05	92.65	97.49	1.05
H4	70.45	74.78	1.06	69.05	78.58	1.13	84.72	95.27	1.12	89.74	99.71	1.11
H5	69.22	77	1.11	71.6	77.88	1.09	88.59	91.67	1.03	90.22	94.69	1.05
H6	67.69	77.1	1.14	69.36	77.72	1.12	88.54	94.88	1.07	91.16	98.21	1.08
H7	70.04	87.24	1.25	75.37	90.5	1.20	88.96	107.8	1.21	92.41	111.26	1.20
H8	76.48	91.02	1.19	79.2	86.02	1.09	96.44	115.1	1.19	97.14	118.16	1.22
H9	65.2	73.18	1.12	68.43	76.15	1.16	78.29	86.48	1.10	86.71	91.56	1.06
H10	67.76	80.62	1.19	71.63	83	1.16	83.24	93.88	1.13	89.31	103.01	1.15
Avg.	70.68	80.64	1.14 ±0.05	73.06	81.44	1.12 ±0.04	87.97	97.80	1.11 ±0.05	91.40	101.13	1.11 ±0.06

P 1-10 : 'Plato' derived from immature seed of *C. hybrid* 'shiranui'

H 1-10 : *C. hybrid* 'shiranui'

W : Width H : Height

제 2 장 부지화 주심배 배양체 선발 계통의 유전체 특성

2.1 서 론

유전체(遺傳體:genome)는 특정 종(種)이 나타내는 생명현상에 대한 정보를 담고 있다. 종의 성장과 영속(永續)의 과정 속에서 종간의 상호작용과 종과 환경간의 상호작용이 기록되고, 개체가 한세대를 지나는 동안의 활동이 유전체에 기록되어, 시간적 공간적 변화 속에서도 유전체 정보 활용을 통해 종의 고유한 특성이 발현되고 변화해 간다. 2003년도 인간 유전체에 대한 염기서열 해독은 생명 현상의 해석과 예측에 대한 기대를 가져왔고, 다른 종들의 유전체를 유전체 염기서열 해독을 촉진시키는 계기가 되었다. 감귤에서도 2003년 감귤 유전체 해독을 위한 국제 컨소시엄(ICGC, The International Citrus Genome Consortium)이 만들어지 이후, 클레멘타인 품종(*C. clementina* 'Clemenules')을 비롯하여, 스위트 오렌지(*C. sinensis* 'Ridge Pineapple'), 발렌시아 스위트 오렌지(*C. sinensis* 'Valencia') 온주 감귤(*C. unshui*)의 전체 유전체 염기 서열이 해독되었고, 감귤 유전체 데이터베이스에서는 8종의 감귤류 유전체 서열정보가 제공되고 있다.

NGS(Next Generation Sequencing)법의 개발은 기존의 염기 서열 분석 방법에 비하여, 시간과 비용면에서 획기적인 발전을 가지고 왔고, 기존의 특정 유전자나 유전자 부위에 대한 연구와 전사체(轉寫體:transcriptome)와 발현체(發現體:proteome) 연구에서 유전체의 직접 정보 해석으로 관심을 전환하는 계기가 되었다. 작물의 생육 특성, 수량, 맛과 풍미, 내병성과 같은 형질을 이해하고, 이를 활용하여 좀 더 유용한 품종을 육성하려는 노력들은 끊임없이 이어져 왔다. 특히 양적 형질 위치 (quantitative trait locus, QTL)와 같이 서로 표현형(表現型:phenotype)에 영향을 주는 형질 사이의 연관 정도를 분석하고, 연관 지도를 작성함으로써 두 교배친 사이에서 만들어지는 후대에서 특정 형질을 가지는 개체의 빈도를 높이는데 활용되고 있다(Brachi B et al 2011). 그러나, 대립 형질의 다양성과 유전체상의 표현의 한계로 극히 제한적으로 이용된다. 이러한 한계를 극복하기 위한 방법으로 유전체 수준의 비교를 통해 형질들이 직접 상관관계를 밝히

려는 노력(Genome Wide Association Approach GWAS)들이 이어지고 있고, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)와 감귤류(*Citrus spp*)그유전체 수준의 다양한 시도가 이루어지고 있다.

본 연구에서는 모본인 부지화 품종과 부지화의 미성숙종자의 주심배로 부터 선발된 우수 계통 '플라토'와 부지화 재배 과원에서 아조변이에 의해 선발되어진 '씨니트' 품종의 전체 유전체를 NGS를 통해 분석하고, 이들의 전체 유전체를 비교하여 각 비교군에서 발생하는 변이를 탐색하고, 이들로부터 특정 형질의 변화를 설명할 수 있는지를 살펴보았다.

2. 재료 및 방법

2.2.1 NGS 분석 재료

제주특별자치도 농업기술원 감귤품종 보존포에서 유지되고 있는, 부지화 품종과 부지화의 미성숙종자 배양체에서 선발된 우수 계통 '플라토', 부지화 아조변이에 의해 선발되어 조기 착색되는 특성을 가진 '씨니트' 품종을 NGS 분석을 위한 재료로 이용하였다(그림 8).

'플라토'는 기존의 부지화와는 달리 봉 형성이 되지 않아, 외형적으로 부지화와 구분되며, 신맛이 빨리 감소되는 조기감산 특성이 있다. 부지화와는 다른 감미를 나타내며, 껍질이 얇아 탈피가 쉬운 특성이 있다. '씨니트' 품종은 2008년 부지화의 약독 바이러스 계통인 M16A 에서 가지변이로 선발되어, 2016년 3월 등록된 품종이다. 부지화와 특성이 유사하고, 오렌지색 계통으로 조기 착색이 일어나는 특징이 있다.



Figure 8. Varieties of *C. hybrid* 'Shiranui' A. *C. hybrid* 'shiranui' B. 'Plato' derived from immature seed of *C. hybrid* 'shiranui' C. 'Suneat' derived from bud variants of *C. hybrid* 'shiranui'.

2.2.2 NGS 분석과 유전체 분석 순서

NGS 분석을 통해서 읽혀진 짧은 DNA 서열 정보들을 염기서열 정도에 따라 구분하고, 일정 수준 이상의 염기서열 정보들을 모아 *C. clementina* 표준 유전체(reference genome)를 중심으로 서열을 정렬(alignment)한다. 중복 되는 서열과 중첩부위를 통해 공통서열(consensus sequence)을 연결하여, 각 재료의 유전체 정보를 구성한다. 구성된 유전체 정보는 NGS 염기서열 분석시 서열 출현 빈도(depth)와 변이(variation) 등과 함께 SNP와 In/Del 분석이 가능한 (주)씨더스사의 *SEEDERS in-house* script 프로그램을 이용하여 raw SNP (In/Del) 및 SSR detection 후에, 샘플 간의 SNP(In/Del) 및 SSR matrix를 작성하고, 유의한 SNP(In/Del) 및 SSR 후보 선별을 위한 자료정리 (filtering) 과정을 진행하였다. 전체적인 NGS와 SNP 분석과정은 그림 9를 통해 나타내었다.

2.3 표준 유전체 (Reference genome)

Phytozome 식물 비교 유전체 정보 사이트(<https://phytozome.jgi.doe.gov/>)에서 클레멘틴(*C. clementina*) 반수체를 기준으로 구성된 *Citrus clementina* v1.0 을 SNP와 In/Del 등의 유전체 분석에 표준유전체로 사용하였다. *Citrus clementina* v1.0 은 301.4 Mb의 염기서열 크기로 1,398개의 scaffolds에 걸쳐 2.1% gaps이 있으며, 전체 유전체 서열의 7배에 해당하는 서열 분석 정보에 의해 구성되었어졌다. ~21-51 Mbp에 이르는 감귤의 9개 염색체의 96% 정보를 담고 있으며, 1,560 M의 ESTs와 단백질 구조 예측에 의한 24,533 단백질 발현 유전자좌(protein coding loci)를 가지고 있으며, 표준 유전체에 대한 정보는 표 8과 같다.

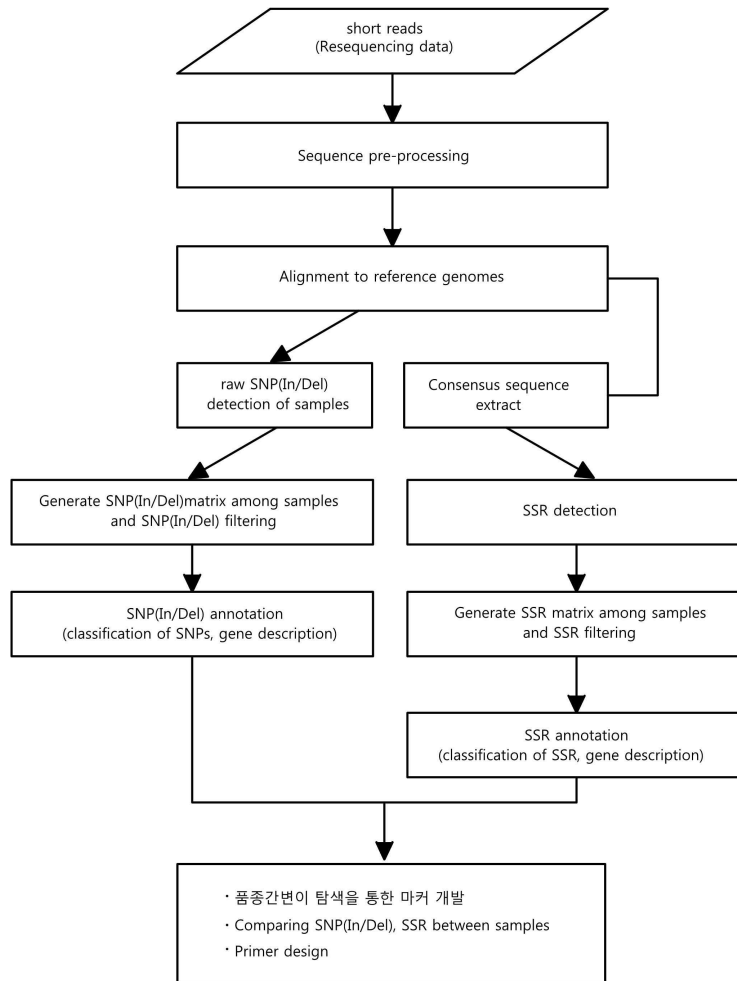


Figure 9. Schematic diagram of genomic analysis.

Table 8. Summary of Reference genome (*C. clementina*)

Name	No.	length (bp)	N count (bp)
Scaffolds*	1,398	301,386,998	6,218,033
Gene	24,533	74,722,319	178,176
Transcripts	33,929	57,938,503	4,206
Proteins	33,929	14,051,832	-

2.3 결과 및 고찰

2.3.1 NGS 염기 서열 분석

일루미나(Illumina)사의 Paired-end read를 기본 염기 서열 분석 도구로 분석된 결과는 표 9에 나오는 바와 같다. 읽혀진 염기 서열의 평균 길이는 100bp 정도이고, 부지화(HB), 플라토(PL), 씨니트(SUN) 각 계통에 대하여 47,644,723개, 55,088,459개와 56,163,499개의 각기 다른 짧은 DNA 서열 정보(Short read data)를 얻어서 4,764,472,300 bp, 5,508,845,900 bp와 5,616,349,900 bp의 염기서열 정보를 얻을 수 있었으며(표 9), 이는 301.4 Mbp의 클레멘틴 유전체를 기준으로 할 때, 각기 31.22 X, 36.10X와 36.81X의 유전체 정보량에 해당하는 결과이다. 이를 기준으로 의미 있는 염기서열 분석을 위하여, Probability value (between 0 and 1): 0.05, Phred quality score (between 0 and 40) : 20, Min read length (bp) : 25를 기준으로 염기 서열 분석 정보를 정리한 결과, 부지화(HB)에 대하여 평균 88.22 bp, 81.06 bp 의 서열 단편 각 41,814,656개를 얻어서 3,688,755,573 bp와 3,389,356,559bp의 서열 정보를 획득하였으며, 이는 염기 서열 분석 정보 정리 전 서열 정보에 대하여, 77.42%와 71.14%의 정보량을 얻은 결과이며, 표준 유전체 기준으로 약 23배 정보량 (Genome coverage)에 해당된다. 플라토에 대해서는 평균 87.15 bp와 79.5bp의 서열 단편 각 48,345,208개를 얻어서 4,213,411,161 bp와 3,843,315,571 bp에 해당되는 서열 정보와 염기 서열 분석 정보 정리 전 서열 정보에 대해, 77.42%와 71.14%의 표준 유전체의 약 26 배 정보량을 얻었다. 씨니트는 평균 86.86 bp와 78.79bp 의 서열 단편 각 49,141,564개에 대하여 4,268,499,304 bp와 3,872,018,205 bp 서열을 얻었으며, 이는 염기 서열 분석 정보 정리 전 서열 정보에 대해 76.00%와 68.94%, 표준 유전체에 대해서는 약 27 배 정보량이다(표 10). NGS 분석에 있어 분석의 신뢰도는 유전체 정보량과 관련이 있으며 사과의 '후지' 품종에서 체세포 변이에 의해 선발된 '단홍', '한가위', '베니쇼건(Benishogun)', '야타카(Yataka)' 품종의 NGS 분석을 통한 비교 연구에서는 평균 17배의 유전체 정보량이 이용되었다. (H.S. Lee 2016)

Table 9. Summary of sequencing raw data.

Samples	No. of Reads	Avg. length	Total length (bp)	Genome coverage*
HB	47,644,723	100	4,764,472,300	≈ 31.22X
PL	55,088,459	100	5,508,845,900	≈ 36.10X
SUN	56,163,499	100	5,616,349,900	≈ 36.81X

HB : *C. hybrid* 'shiranui'

PL : 'Plato' derived from immature seed of *C. hybrid* 'shiranui'

SUN : 'Suneat' derived from bud variants of *C. hybrid* 'shiranui'

Table 10. Summary of trimmed sequencing data.

Samples	No. of Reads	Avg. length	Total length (bp)	Trimmed/Raw*	Genome coverage*
HB	41,814,656	88.22	3,688,755,573	77.42%	≒23.19X
	41,814,656	81.06	3,389,356,559	71.14%	
PL	48,345,208	87.15	4,213,411,161	76.48%	≒26.40X
	48,345,208	79.5	3,843,315,571	69.77%	
SUN	49,141,564	86.86	4,268,499,304	76.00%	≒26.67X
	49,141,564	78.79	3,872,018,205	68.94%	

HB : C. hybrid 'shiranui'

PL : 'Plato' derived from immature seed of C. hybrid 'shiranui'

SUN : 'Suneat' derived from bud variants of C. hybrid 'shiranui'

2.3.2 표준 유전체에 대한 비교

클레멘틴(*C. clementina*)반수체를 기준으로 구성된 *Citrus clementina* v1.0에 대하여 부지화, 플라토, 씨니트로부터 얻어진, 염기서열 정보를 비교하고, 전체 유전체에 대한 정보량을 분석하였다. 부지화와 플라토, 씨니트에 대해서 각기 83,629,312 개, 96,690,416 개와 98,283,128개의 서열 정보(Reads)를 도출 했으며, 이들 중 부지화는 서열 정보의 83.63%인 69,937,762개 플라토는 83.40%, 80,643,295개 씨니트는 83.43%인 81,998,387 개가 클레멘틴의 유전체 상에서 맵핑(mapping)되었다(표 11). 이는 301.4Mb에 이르는 표준 유전체에 대해 부지화가 278,9Mb(92.54%), 플라토 281,0Mb (93.25%), 씨니트 281.3Mb (93.32%)에 해당하는 정보량으로 '후지' 사과에서 유래된 체세포 변이 품종의 NGS 분석에 이용된 평균 68.4%의 유전체 정보량보다 높은 수치이며, 이는 표준 유전체에 대한 정보량 배수(genome coverage)와 상관관계가 있다.

Table 11. Summary of read mapping.

Samples	Total reads #	Mapped reads #	Mapped region*
HB	83,629,312	69,937,762 (83.63%)	278,912,588 (92.54%)
PL	96,690,416	80,643,295 (83.40%)	281,033,860 (93.25%)
SUN	98,283,128	81,998,387 (83.43%)	281,256,824 (93.32%)

HB : C. hybrid 'shiranui'

PL : 'Plato' derived from immature seed of C. hybrid 'shiranui'

SUN : 'Suneat' derived from bud variants of C. hybrid 'shiranui'

2.3.3 표준유전체에 대한 단일염기 다형성 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) 확인

C. clementina v1.0 표준 유전체에 부지화, 플라토, 씨니트의 염기서열을 맵핑(mapping)하여 표준 유전체와 각 품종 사이의 일차 SNP matrix를 작성하고, 서열 분석 결과(reads)가 3회 이상이고, 맵핑 정도(mapping quality)가 30 이상이며, 두 개의 대립유전자 존재하는 경우에 SNP가 있는 것으로 판단하였으며, 맵핑이 이루어지지 않아 염기서열을 알 수 없는 경우에 SNP 분석대상에서 배제하였다. SNP가 있음이 확인된 부위에 대해서는 'homozygous/heterozygous/기타' 유형으로 구분하였는데, read depth가 90% 이상인 경우는 Homozygous, read depth가 40 - 60% 범위에 있는 경우 Heterozygous로 구분하고, 기타는 Homozygous/Heterozygous 유형으로 구분할 수 없는 경우로 구분하였다.

클레멘틴 표준 유전체에 대한 부지화와 플라토, 씨니트의 총 SNP 개수는 각기 2,216,390개, 2,337,163개, 2,339,832개로 플라토와 씨니트 품종이 부지화에 비하여 약 5.5%, 5.7% 정도 많은 SNP 개수를 나타낸다. 표 12 에서 표준유전체에 대해서 맵핑된 염기서열 비율이 부지화가 92.54%로 플라토 93.25%, 씨니트 93.32%로 부지화가 적게 나타나고 있으나, 전체 유전체량에 대한 비율로 보았을때 플라토와 씨니트가 부지화보다 클레멘틴에 대한 SNP 발생 개수와 비율이 높게 나타나며, 이는 부지화 모품종에 대하여 어느 정도의 변이가 진행된 것으로 볼 수 있다.

각 품종의 표준 유전체에 대한 SNP 개수는 부지화, 2,216,390개(표 13), 플라토, 2,337,163개(표 14), 씨니트, 2,339,832개(표 15) 이고, NGS 분석된 전체 유전체에 대한 비율은 부지화가 0.79%이며, 플라토와 씨니트에서는 둘 모두 0.83% 정도의 비율로 나타난다. SNP 유형별로는 부지화가 493,971개의 homozygous SNP와 468,835개의 heterozygous SNP를 가지고 있으며, 플라토는 homozygous SNP 521,280개와 heterozygous SNP 536,594개, 씨니트는 homozygous SNP 522,374개, heterozygous SNP 538,314개를 가지고 있다. 또한 유형을 구분할 수 없는 SNP는 부지화가 1,253,584개, 플라토 1,279,289개, 씨니트가 1,279,144개로 전체 SNP의 약 55%는 유형 분류가 이루어지지 않았다.

유전체는 단백질(Proteins)과 rRNA와 tRNA 등의 유전자 산물(Gene products)에 직접적으로 관여되는 유전자 부위(Genic region)와 유전자 산물이 만들어 지지 않는 유전자간 부위(Intergenic region)으로 구성되며, 유전자 부위는 RNA와

mRNA 거쳐 단백질로 직접 발현되는 CDS(Coding sequence)와 유전자의 발현 조절에 관여 하는 UTR(Untranslated region), 단백질 발현부위 사이에 존재하는 인트론(Intron) 영역으로 구성된다.

부지화는 표준유전체에 대하여 2,216,390개의 SNP를 나타내었고, 이는 301.4Mb의 염기서열의 0.74% 이다. 유전자 부위에 551,505개의 SNP와 유전자간 부위에 1,664,885개의 SNP를 나타내었다. 부지화의 NGS 분석을 통해 얻어진 유전체 정보 중 74,722,319bp가 유전자 부위에 해당되고, 226,664,679bp는 유전자간 부위이며, 각 부위별 SNP 비율은 0.74% 와 0.73% 로 거의 유사하다. 유전자 부위인 CDS, UTR, 인트론에 대해서 각기 0.49%, 0.47%, 1.77%로 인트론 부위에서 직접적인 발현 부위보다 높은 SNP 비율을 나타내었다. 이는 전체 유전자 상에서 내재적인 혹은 외재적인 요인에 의해 발생하는 변이가 전체 유전체 내에서 비교적 고르게 일어나고 있음을 의미한다. 유전자 부위에서 염기 서열의 위치와 기능에 따라, CDS와 UTR에 발생하는 SNP가 0.47%와 0.49%로 1.77%를 나타내고 있는 인트론보다 훨씬 적은 비율로 나타난다. 이는 유전자의 직접 발현에 관여하는 CDS나 UTR 부위에 변이가 발생하는 경우 변이가 생장과 생명현상 유지에 부정적인 영향을 주는 경우 변이가 발생한 개체가 자연 소실되어 유전체상에 변이 정보가 유지되지 못함을 의미한다. 또한 인트론 부위에 발생한 변이는 유전체상에 변이 정보가 누적되어 유지되고 있음을 의미한다.

플라토에서는 표준유전체에 대하여 2,337,163개의 SNP를 나타냈으며, 571,466개의 SNP가 유전자 부위에서, 1,765,697개의 SNP가 유전자간 부위에서 나타났으며, 각 부위별 SNP 비율로는 0.76% 와 0.74%를 나타내었다. 플라토에서도 부지화에서 보였던 바와 같이 유전자 부위인 CDS, UTR, 인트론에 대한 SNP 비율이 각기 0.48%, 0.51%, 1.84%로 인트론 부위에서 직접적인 발현 부위보다 높은 비율을 나타냈다.

써니트 품종의 경우, 표준유전체에 대하여 2,339,832개의 SNP를 나타냈으며, 571,906개의 SNP가 유전자 부위에서, 1,767,926개의 SNP가 유전자간 부위에서 나타났으며, 각 부위별 SNP 비율로는 0.77% 와 0.78%를 나타내었다. 써니트에서도 부지화와 플라토에에서 보여졌던 바와 같이 유전자 부위인 CDS, UTR, 인트론에 대한 SNP 비율이 각기 0.48%, 0.51%, 1.84%로 인트론 부위에서 직접적인 발현 부위보다 높은 비율을 나타냈다.

Table 12. Summary of SNP detection.

Sample	No. of Total SNP	No. of Homozygous (read depth \geq 90%)	No. of Heterozygous (40% \leq read depth \leq 60%)	No. of ambiguous (homo/heterozygous로 구분할 수 없는 경우)
HB	2,216,390	493,971	468,835	1,253,584
PL	2,337,163	521,280	536,594	1,279,289
SUN	2,339,832	522,374	538,314	1,279,144

HB : C. hybrid 'shiranui'

PL : 'Plato' derived from immature seed of C. hybrid 'shiranui'

SUN : 'Suneat' derived from bud variants of C. hybrid 'shiranui'

Table 13. Summary of SNP classification by genome structure.

Samples	No. of Total SNP	Region	Total	Homozygous	Heterozygous	기타
HB	2,216,390	UTR (size=15,783,007bp)	77,215	16,722	20,946	39,547
		CDS (size=42,155,496bp)	197,436	41,421	54,622	101,393
		Intron (size=16,783,816bp)	297,172	65,327	83,528	148,317
		Genic-region (size=74,722,319bp)	551,505	119,354	152,928	279,223
		Intergenic-region (size=226,664,679bp)	1,664,885	374,617	315,907	974,361

HB : C. hybrid 'shiranui'

Table 14. Summary of SNP classification by genome structure.

Samples	No. of Total SNP	Region	Total	Homozygous	Heterozygous	기타
PL	2,337,163	UTR (size=15,783,007bp)	80,259	17,024	24,830	38,405
		CDS (size=42,155,496bp)	203,242	41,880	66,328	95,034
		Intron (size=16,783,816bp)	308,827	66,930	102,918	138,979
		Genic-region (size=74,722,319bp)	571,466	121,664	186,695	263,107
		Intergenic-region (size=226,664,679bp)	1,765,697	399,616	349,899	1,016,182

PL : 'Plato' derived from immature seed of C. hybrid 'shiranui'

Table 15. Summary of SNP classification by genome structure.

Samples	No. of Total SNP	Region	Total	Homozygous	Heterozygous	기타
SUN	2,339,832	UTR (size=15,783,007bp)	80,127	17,042	24,855	38,230
		CDS (size=42,155,496bp)	203,417	42,062	66,681	94,674
		Intron (size=16,783,816bp)	309,171	67,043	103,578	138,550
		Genic-region (size=74,722,319bp)	571,906	121,961	187,597	262,348
		Intergenic-region (size=226,664,679bp)	1,767,926	400,413	350,717	1,016,796

SUN : 'Suneat' derived from bud variants of C. hybrid 'shiranui'

2.3.4 부지화 유래 계통의 단일염기 다형성 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) 확인

부지화, 플라토, 씨니트 세 가지 품종에 대한 통합 SNP matrix에서 비교 품종 간에 동일 SNP 좌를 비교하여 서로 간에 SNP인 경우를 나타내는 다형성 SNP(polymorphic SNP)를 선별하여 표 16과 같이 나타내었다. .

부지화와 플라토, 부지화와 씨니트, 플라토와 씨니트를 비교하였을 때, 각기 52,550개, 51,767개와 23,380개의 SNP가 나타난다. 이는 전체 유전체에 대하여 0.017%, 0.017%, 0.008% 비율이며, 각 품종 사이에 비교 가능한 전체 SNP 개수에 대해서는 1.75%, 1.72%, 0.78%에 해당한다.

감귤류는 총 9개의 염색체(chromosome)로 구성되어 되어 있다. 각 염색체상에서 나타나는 SNP의 개수는 염색체 크기가 가장 큰 3번 염색체에서 가장 높게 나타나며 대체로 염색체의 크기에 비례하는 것으로 나타났다 (표 18). 한 개의 염기 서열 변이에 의해 SNP가 만들어질 때, 유전자 부위(genic region)의 변이는 유전자간 부위(intergenic region)의 변이 보다 더 직접적으로 표현형과 특성에 영향을 준다. 염색체상에 SNP를 유전자 부위와 유전자간 부위로 나누고, SNP 개수를 비교 분석하고, 염색체상의 SNP 개수에 대한 유전자 부위의 SNP 비율을 비교하였다. 부지화와 플라토, 부지화와 씨니트, 플라토와 씨니트 각 경우에 있어 염색체 별로 16.66 - 34.46 %, 17.71 - 34.77 %, 13.11 - 24.89 % 범위에서 유전자 부위 SNP가 나타났고, 부지화와 플라토, 부지화와 씨니트에서 각 염색체에 대한 SNP 비율은 3% 이내의 범위에서 비교적 일정하게 나타났다. 부지화에 대하여 플라토와 씨니트가 유사한 SNP 개수와 각 염색체별로 유사한 유전자 부위 SNP 비율을 나타내는데, 품종으로 선별하기 위한 구분성을 나타내기 까지 모본으로부터 일정정도의 SNP 변이 누적이 일어나며, 모본이 갖는 건전성이 유지되는 일정 범위의 변위 범위가 존재할 수 있음을 의미한다. 부지화로부터 파생되어 구분성이 나타나기 시작한 플라토와 씨니트 두 계통의 SNP를 비교하는 경우, 앞의 두 비교군에 비하여 SNP의 개수는 44% 수준으로 적게 나타나고, 유전자 부위에 SNP가 나타는 부위도 13.11 - 24.89 % 로 전체 유전체에서 25% 정도에 해당하는 유전자 부위의 비율보다 낮게 나타난다.

유전체 상에 무작위적인(random) SNP 변이가 일어난다고 가정했을 때 전체적인 변이의 누적에 따라 염색체 위치에 관계없이 일정 비율의 SNP 분포가 일어나고, 유전자 부위와 유전자간 부위에도 기능에 관계없이 일정한 비율의 SNP 변이가 일어나며, 이는 염색체와 특정 부위의 크기와 상관관계가 있을 것이다. 그러나, 유전자 부위 SNP 비율은 염색체에 따라 차이가 있으며, 7번과 4번 염색체에서 SNP 비율이 높고 1번과 5번 염색체에서 상대적으로 낮게 나타나며, 최대 2배 정도의 차이를 보인다. 이는 각 염색체별로 발생하는 SNP의 중요도와 심각성에 따라 변이가 나타난 세포와 함께 유지되거나, 소실되었음을 나타낸다. 세포의 생장이나, 발달에 긍정적인 영향을 주는 변이는 세포의 생존과 유지에 따라 축적이 되고, 부정적인 변이는 세포를 사멸시키거나 생장을 저해시켜 소실되며 결과적으로 유전체상의 SNP 변이로는 남지 않게 된다.

유전체 상에는 내재적인, 혹은 외재적인 요인에 의해 SNP가 출현한다. 유전자 부위에 출현된 SNP는 세포의 직접적인 기능에 영향을 주고 세대 진전에 따라 누적된 SNP는 품종의 특성에 직접 영향을 주어 기존 품종과는 다른 구분성이 나타나게 한다.

플라토는 부지화의 미성숙종자(immatute seed)를 기내 배양(in vitro culture)하여 얻어진 계통이다. 꽃가루에 의한 수정이 이루어 지지 않아 배유(胚乳: endosperm) 발달이 일어나지 않은 미성숙 종자에 있는 주심세포가 분화 발달하여 완전한 식물체로 형성되고, 이를 탕자와 스윙글과 같은 대목에 접붙혀 기존의 부지화와 다른 특성을 나타내는 계통으로 선발하였다. 종자내에 있는 주심세포의 유전체에는 모본 식물의 생장과정에서 유전체상에 표현된 후성유전(epigenetic) 정보가 담겨져 있고, 단일 주심 세포에서 첫 유전체 복제가 일어날 때의 일어나는 변이가 연속적으로 후대 세포에 전달되어 분화 발달된 식물체의 표현형에 영향을 줄 수 있다. 또한, 기내 배양조건은 자연적인 발달 과정보다 변이 생성이 쉽고, 빈번하게 일어난다. 미국의 플로리다 대학교에서는 1984년부터 함린(Hamlin)과 발렌시아(Valencia) 오렌지 두 가지 품종의 기내 배양을 기관분화(organogenesis)와 배 발달(ombryogenesis) 과정, 원형질체(protoplast), 주심배(nucellar)로 부터 2000 여개의 계통을 만들고, 이들로 부터, 조숙과 만숙 발렌시아 계통을 선발하였으며, 착색과 고품분량이 개선된 함린 계통을 선발하였다. 이

과정에서 기관분화와 원형질체로 만들어진 계통이 배 발달 과정과 주심배로부터 만들어진 계통보다 외형적 변이 정도가 높게 나타났고, 발렌시아 품종이 함린 품종보다 체세포 변이가 높게 나타났다.

씨니트 품종은 부지화 재배 과원에서 열매 착색이 일찍 이루어지는 계통이 발견되고, 조기 착색 형질이 안정적으로 발현되어 2013년 품종이 등록된 부지화 아조변이 선발 계통이다. 아조변이 선발은 돌연변이 선발이라고 불리우며, 모본에 대해서 다른 특성과 구분성이 나타내는 계통 선발을 목적으로 이루어지고, 품종이 형성된 후, 모본의 형질을 유지하며 숙기, 착색 등, 일부 형질이 개선된 품종을 육성하는 방법으로 주로 이용된다.

Table 16. Summary of polymorphic-SNP detection between samples.

No. of SNP loci*	Classification	HB vs. PL	HB vs. SUN	PL vs. SUN
3,002,876	Polymorphic loci*	52,550	51,767	23,380
	Non-polymorphic loci*	837,644	843,380	1,014,772
	Ambiguous loci*	1,861,845	1,859,345	1,858,518
	Unknown loci*	88,299	87,627	46,283
	Filtered loci*	162,538	160,757	59,923

HB : C. hybrid 'shiranui'

PL : 'Plato' derived from immature seed of C. hybrid 'shiranui'

SUN : 'Suneat' derived from bud variants of C. hybrid 'shiranui'

Table 17. Description of table 16

- * No. of SNP loci : 샘플간의 비교 가능한 Total SNP좌. (=SNP matrix loci)
 - * Polymorphic loci : 비교샘플 간에 동일 SNP 좌에서 서로 polymorphism을 보이는 경우.
 - * Non-polymorphic loci : 비교샘플 간에 동일 SNP 좌에서 동일한 genotype인 경우.
 - * Ambiguous loci : 비교샘플 간에 동일 SNP 좌에서 '기타'유형으로 인해 polymorphism을 확인하기 어려운 경우.
 - * Unknown loci : 비교샘플 간에 동일 SNP좌에서 '결실'로 인해 polymorphism을 확인하기 어려운 경우.
 - * Filtered loci : 비교샘플 간에 동일 SNP좌에서 'read depth < 3' 조건을 만족하지 못하는 경우.
-

Table 18. Number of SNPs in Citrus chromosomes.

Scaffolds	HB-PL SNP No.				HB-SUN SNP No.				PL-SUN SNP No.			
	Total	Genic	Intergenic	Genic Ratio	Total	Genic	Intergenic	Genic Ratio	Total	Genic	Intergenic	Genic Ratio
Scaffold_1	4410	847	3563	19.20	4275	780	3495	18.24	1723	226	1497	13.11
Scaffold_2	6283	1331	4952	21.18	6330	1359	4971	21.46	2700	481	2219	17.81
Scaffold_3	12234	3069	9165	25.08	12034	3134	8900	26.04	5956	1183	4773	19.86
Scaffold_4	3488	1202	2286	34.46	3344	1163	2181	34.77	1495	350	1145	23.41
Scaffold_5	5012	835	4177	16.66	4843	858	3985	17.71	2420	334	2086	13.80
Scaffold_6	4406	934	3472	21.19	4433	950	3483	21.43	1812	342	1470	18.87
Scaffold_7	5369	1596	3773	29.72	5219	1671	3548	32.01	2049	510	1539	24.89
Scaffold_8	7286	1628	5658	22.34	7229	1585	5644	21.92	3480	593	2887	17.04
Scaffold_9	4062	857	3205	21.09	4055	888	3167	21.89	1746	318	1428	18.21
Total	52550	12,299	40,251	23.44	51767	12,388	39,374	23.94	23380	4,337	19,044	18.55

HB : C. hybrid 'shiranui'

PL : 'Plato' derived from immature seed of C. hybrid 'shiranui'

SUN : 'Suneat' derived from bud variants of C. hybrid 'shiranui'

2.3.5 부지화 유래 계통의 동질 단일염기 다형성(Homozygous SNP)의 확인

부지화와 부지화에서 유래된 플라토, 씨니트는 한 쌍의 유전체를 갖는 이배체(diploid) 식물이며, 그림에서 보는바와 같이 각 품종에서 NGS 분석을 통해 얻어진 서열 정보 단편을 표준유전체에 비교하고, 염기 서열을 결정해가는 과정에서 표준유전체와는 다른 염기 서열이 나타나는 경우 SNP라고 볼 수 있다. SNP에서 중첩되는 염기 서열 단편들에서 달라진 염기 서열이 동일한 경우에는 대립 유전자상의 염기 서열이 동일한 동질 SNP로 볼 수 있으며, 표준유전체와는 다르며, 두 개의 서열이 나타나는 경우는 이질 SNP (heterozygous SNP)로 판단할 수 있다(그림 10) .

부지화와 플라토, 부지화와 씨니트, 플라토와 씨니트 세 개의 유전체 비교군에서 나타난 전체 SNP 중에서 동질 SNP만을 선별하였다. 부지화와 플라토 비교군에서는 636개의 동질 SNP가 유전자 부위에 95개, 유전자간 부위에 541개, 비율로는 14.93%와 85.04%로 나타났고, 부지화와 씨니트 비교군에서는 616개의 동질 SNP에 유전자 부위에서 94개 유전자간 부위에서 522개가 확인되었으며, 15.25%와 84.74% 비율로 나타났다. 플라토와 씨니트 비교군에서는 175개의 동질 SNP에 33개의 유전자 부위 SNP와 142개의 유전자간 부위 SNP가 확인되었으며, 전체 동질 SNP중 비율은 18.85%와 81.14%로 나타났다(표 19).

전체 SNP에 대한 동질 SNP의 비율은 부지화와 플라토, 부지화와 씨니트, 플라토와 씨니트에 있어 1.21%, 1.18%, 0.74%로 나타난다.

부지화와 플라토, 부지화와 씨니트, 플라토와 씨니트에 대해 염색체 상에서 나타나는 동질 SNP의 분포와 비율은 표 20 에서 나타난 바와 같다. 부지화와 플라토 비교군에서 표현형과 특성에 직접 영향을 주는 유전자 부위 SNP 변이는 염색체에 따라 5.75 - 29.03 % 비율로 나타나며, 4번 염색체에서의 유전자 부위 동질 SNP 변이율이 가장 높고, 5번 염색체에서 유전자 부위 변이율이 가장 낮게 나타난다. 부지화와 씨니트 비교군에 있어서는 유전자 부위 SNP 변이가 염색체에 따라 5.45 - 28.26 % 비율로 나타나며, 7번 염색체에서의 유전자 부위 동질 SNP 변이율이 가장 높고, 9번 염색체에서 유전자 부위 변이율이 가장 낮게 나타난다. 플라토와 씨니트 비교군에 있어서는 유전자 부위 SNP 변이가 염색체에 따라 0 -

66.27 % 비율로 나타나며, 7번 염색체에서의 유전자 부위 동질 SNP 변이율이 가장 높고, 1번과 6번 염색체에서는 동질 염색체 유전자 부위 변이가 나타나지 않았다.

전체 SNP에서 유전자 부위에 SNP가 발생하는 비율은 부지화와 플라토에 있어서는 23.44% 부지화와 씨니트에 있어서는 23.94%가 나타나며, 플라토와 씨니트에서는 18.55% 정도가 보여 진다. 반면, 동질 SNP에서 유전자 부위의 비율은 부지화와 플라토가 16.30%, 발생하는 비율은 부지화와 씨니트 16.42%, 플라토와 씨니트 20.63%로 전체 SNP에 대한 결과와는 다른 양상으로 나타난다.

플라토와 씨니트에 대한 비교에서 전체 SNP 발생에 대한 유전자 부위의 비율은 부지화와 플라토, 부지화와 씨니트에 대한 비율 보다 낮게 나타나고, 전체 동질 SNP에 대한 유전자 부위의 SNP 발생 비율은 두 비교군 보다 높게 나타난다. 이는 플라토와 씨니트의 비교군에서의 SNP 발생이 정량적으로는 부지화에 대한 비교군 보다 적지만 정성적으로 영향력이 높음을 의미한다.

유전체내에서 변이가 발생하는 경우 SNP 변이가 일어난 부위가 이질 SNP인 경우 변이가 발생하더라도 대립되는 유전자가 보완적인 역할을 하므로 변이에 대한 영향이 상당부분 상쇄되고, 변이가 발생한 세포도 기본적인 생명 현상이 유지되며, 변이가 보전될 수 있다. 그러나, 동질 SNP가 발생하는 경우 변이의 영향을 세포가 전부 감당할 수 있어야 하며, 변이가 세포의 성장과 발달에 부정적인 영향을 주는 경우 발생한 변이는 세포의 퇴화와 함께 유전체에 보존되지 않고 소멸하게 된다.

플라토와 씨니트 두 계통은 각기 다른 방법과 과정에 의해 육성이 되었지만, 부지화에 대하여 정량적인 비교를 했을 때 변이 유발되는 비율과 분포가 상당히 유사하다. 이는 두 계통의 육성과정에서 유발되는 변이가 유사한 세포과정 (cellular process)에서 비롯되었을 개연성을 제시한다.

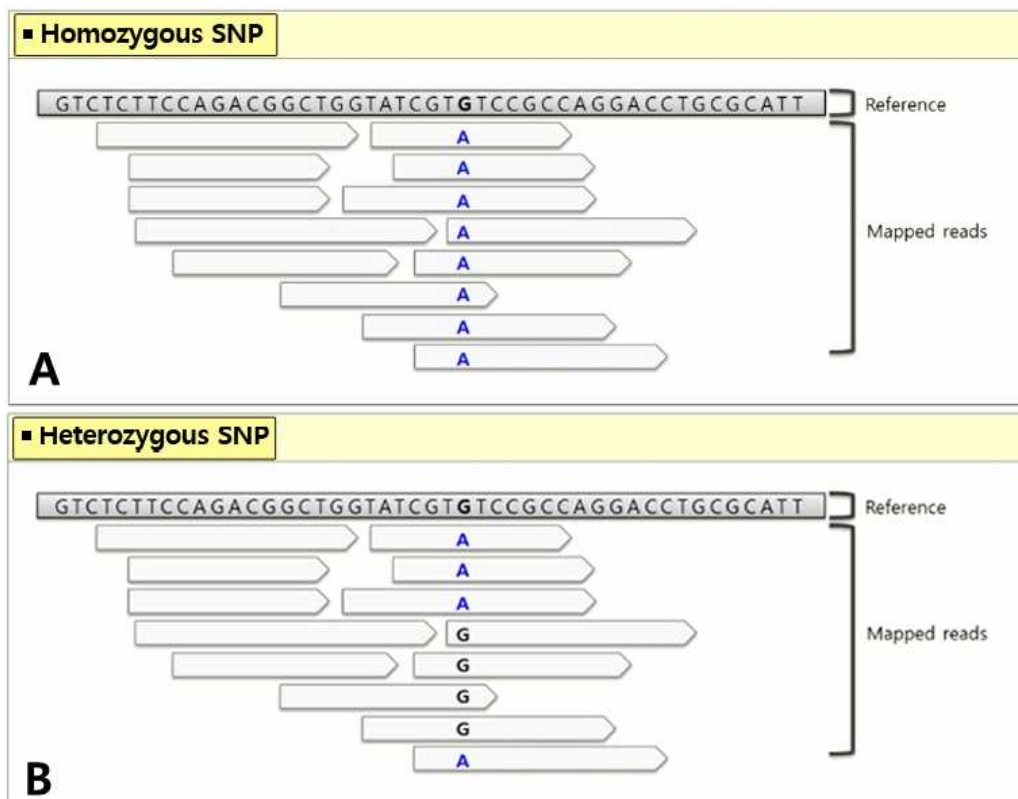


Figure 10. Homozygous SNP and Heterozygous SNP.

Table 19. Number of homozygous SNPs.

	HB-PL			HB-SUN			PL-SUN		
	Total	Genic	Intergenic	Total	Genic	Intergenic	Total	Genic	Intergenic
No of Homozygous SNP	636	95	541	616	94	522	175	33	142

HB : C. hybrid 'shiranui'

PL : 'Plato' derived from immature seed of C. hybrid 'shiranui'

SUN : 'Suneat' derived from bud variants of C. hybrid 'shiranui'

Table 20. Number of Homozygous SNPs in Citrus chromosomes.

Scaffolds	HB-PL Homozygous SNP No.				HB-SUN Homozygous SNP No.				PL-SUN Homozygous SNP No.			
	Total	Genic	Intergenic	Genic Ratio	Total	Genic	Intergenic	Genic Ratio	Total	Genic	Intergenic	Genic Ratio
Scaffold_1	34	6	28	17.65	34	8	26	23.53	5	0	5	0.00
Scaffold_2	79	9	70	11.39	106	11	95	10.38	22	4	18	18.18
Scaffold_3	166	20	146	12.05	167	36	131	21.56	55	12	43	21.82
Scaffold_4	31	9	22	29.03	32	7	25	21.88	11	3	8	27.27
Scaffold_5	87	5	82	5.75	71	7	64	9.86	38	7	31	18.42
Scaffold_6	24	2	22	8.33	19	4	15	21.05	5	0	5	0.00
Scaffold_7	70	16	54	22.86	46	13	33	28.26	3	2	1	66.67
Scaffold_8	98	18	80	18.37	86	5	81	5.81	24	2	22	8.33
Scaffold_9	47	10	37	21.28	55	3	52	5.45	12	3	9	25.00
Total	636	95	541	16.30	616	94	522	16.42	175	33	142	20.63

HB : C. hybrid 'shiranui'

PL : 'Plato' derived from immature seed of C. hybrid 'shiranui'

SUN : 'Suneat' derived from bud variants of C. hybrid 'shiranui'

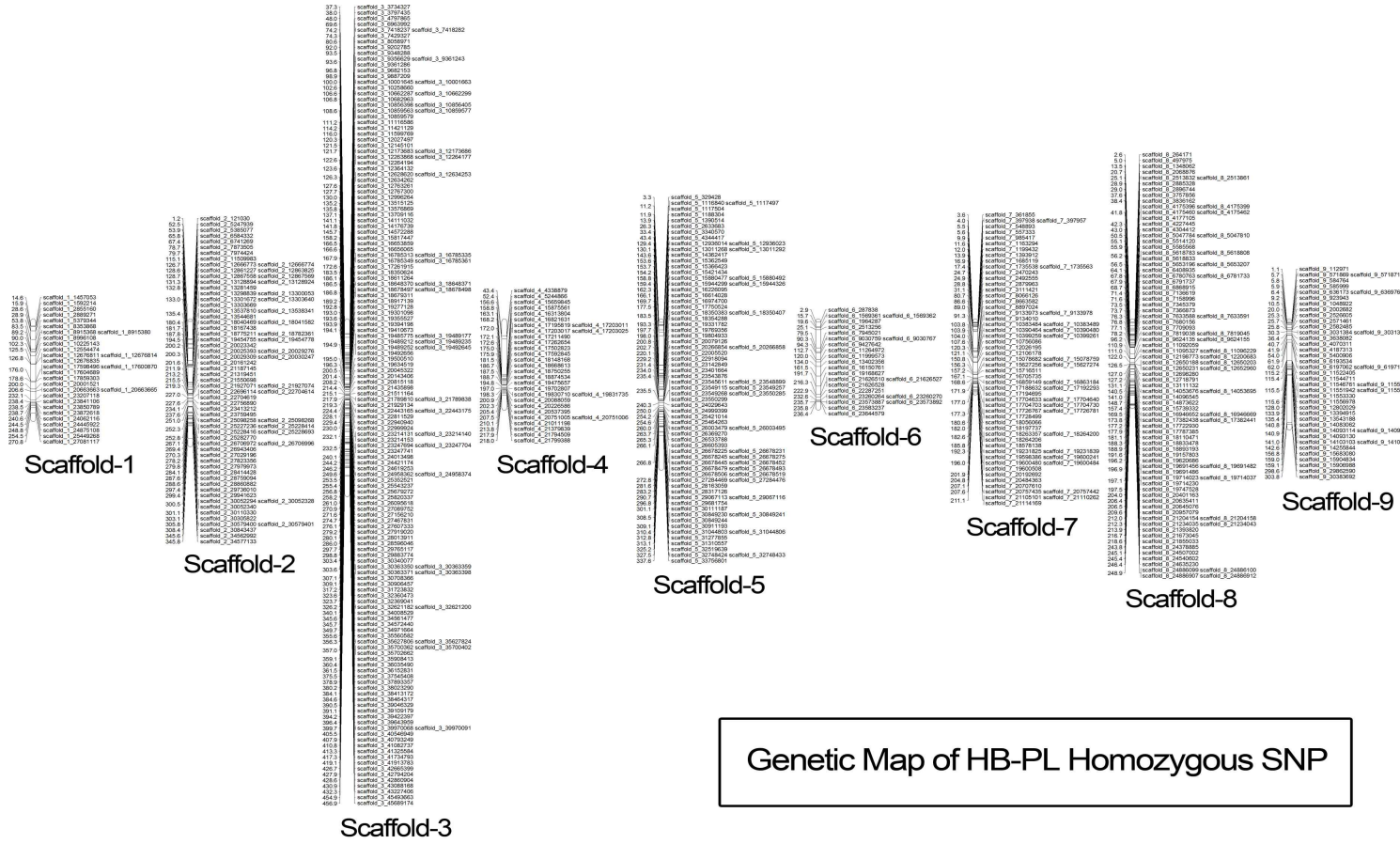


Figure 11. Genetic map of HB-PL homozygous SNP.

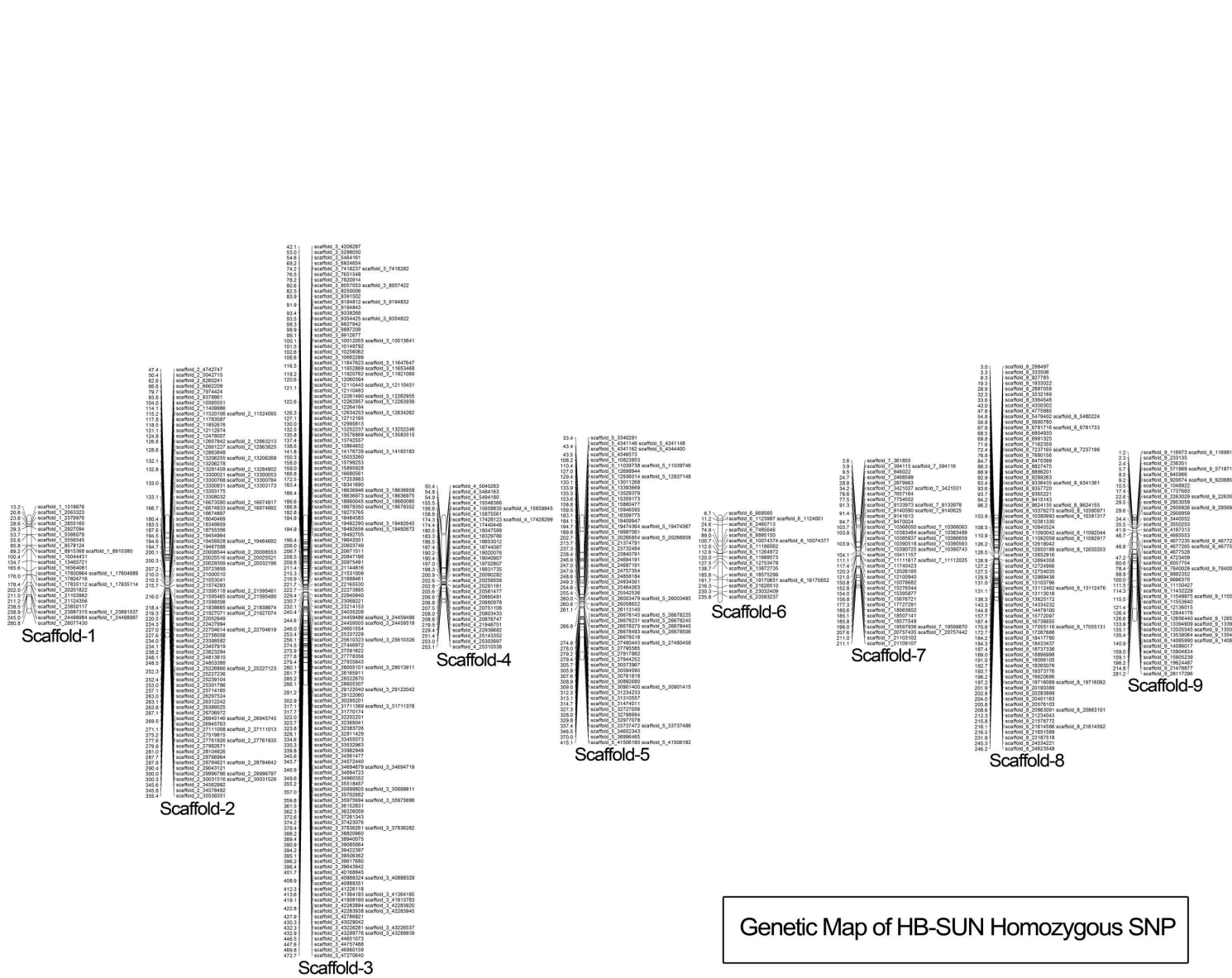


Figure 12. Genetic map of HB-SUN homozygous SNP.

2.3.6 부지화 유래 계통의 추정 변이(Putative variation) 확인과 영향

전체 동질 SNP에서 *C. clementina* 표준 유전체와 부지화의 NGS 분석된 유전체 정보를 기준으로 플라토와 씨니트의 NGS 분석한 유전체 정보를 비교하여, 표준 유전체와 부지화 유전체 상에서는 같고 플라토와 씨니트에는 염기서열 변이가 일어난 SNP만을 구분 분석하였다(그림 13). 클레멘틴과 부지화에서 염기서열이 같고, 부지화에서 분화된 계통에서만 변이가 나타나는 경우, 분화된 계통의 특성 결정에 중요한 역할을 할 수 있는 변이라 가정을 하고, 이들 변이의 정도와 변이 양상, 변이가 일어난 유전에 대해서 확인하였으며, 이들 변이를 추정 변이(putative variation)라 하였다.

클레멘틴과 부지화, 플라토의 비교군에서 128개의 SNP 변이가 확인 되었으며, 유전자 부위에는 7개 유전자간 부위에는 121개의 변이가 발생했다. 클레멘틴과 부지화, 씨니트 비교군에서는 유전자 부위에 17개, 유전자간 부위에 117개가 총 134개의 SNP가 발생했으며, 클레멘틴, 플라토, 씨니트, 비교군에서는 유전자 부위에 9개 유전자간 부위에 63개 총 72개의 변이가 발생하였다. 각 비교군별로 전체 SNP 개수에 대한 추정변이의 비율은 부지화와 플라토, 부지화와 씨니트, 플라토와 씨니트에서 각각 0.24%, 0.26%, 0.30%의 비율로 일어난다. 동질 SNP에 대한 비율이 각 1.2%, 1.2%, 0.74%로 부지화와 플라토, 부지화와 씨니트의 비율이 유사하고, 플라토와 씨니트에 대해서는 감소하는데 비해, 추정 변이 비율은 약간 증가하는 경향을 보인다. 부지화와 플라토, 부지화와 씨니트, 플라토와 씨니트에서 동질 SNP와 추정 변이의 비율을 비교해 보았을때, 전체에 대한 비율은 각기 20.12%, 21.75%, 41.14%이고, 유전자 부위에 대한 비율은 7.37%, 18.08%, 27.27% 이며, 유전자간 부위에 대한 비율은, 22.37%, 22.41%, 44.36%를 나타낸다(표 21). 유전자간 부위의 비율이 부지화와 플라토, 부지화와 씨니트에서 유사하다는 것은 모본인 부지화로부터 계통으로 분화될 때 누적된 변이, 즉 변이도가 유사하다는 것을 의미한다. 플라토와 씨니트 비교군에서 전체 동질 SNP 중 추정 변이의 비율이 44.36%로 두 비교군보다 2배 정도 높게 나타나는데 이는 플라토와 씨니트상에 나타나는 변이가 서로 간에 연관되어 있지 않고 서로 독립적이며, 두 계통이 분화되어 가고 있음을 의미한다.

부지화와 플라토, 부지화와 씨니트의 유전자 부위에 대한 추정 변이 비율, 유전자간 부위가 유사한데 비하여 7.37%, 18.08%로 차이가 난다. 이는 모본으로 부터의 세대 진전과 환경 노출이 이루어진 기간에 따라 유전자 부위의 변이도 다르고, 계통의 육성 선발 방법이 다른데 기인된 것으로 보인다. 유전자 부위에 변이가 나타날 때 동질 SNP 변이로 대립유전자에 변이가 보상 혹은 상쇄되지 못하는 경우 세포의 생장 발달에 부정적인 영향을, 추정 변이로 유지되지 못하고 소실된다. 이때 변이의 발생 부위에 따라 세포의 생장 발달에 부정적인 영향을 주지 않는 경우는 변이가 보존되어 후대에 전달되며, 세대 진전에 따라 유전체에 누적되어 변이도는 증가한다. 플라토는 2004년 기내 배양체를 탕자 대목에 접목하여 증식과 계통선발을 하고 2008년 착과된 계통중에서 선발되었으며, 최초 착과된 모본으로부터 NGS 분석을 실시하여, 미성숙종자로부터 성체 선발되기 까지 기간이 비교적 짧다. 반면, 씨니트는 1990년대 말 조성된 부지화 과원에서 2007년 아조변이가 발견되어 육성되었으며, 지속적인 전지(剪枝)와 전정(剪定) 작업으로 새순 형성이 반복되어, 과원 조성이후 성목에서 세대 진전이 이루어진 계통으로 볼 수 있다.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	
1	Ref.chr (C/IT Pos)	Ref	HB	HB_depth	PL	PZ_depth	Genic/Inter	Transcript	Gene.feature	best_Arabid	best_Arabid	best_Arabid	best_tomat	best_tomat	InterPro.Id	InterPro.desc			
2	scaffold_5	17750524	A	T	6 6	A	10 11	Ciclev10000 Ciclev10000 CDS	AT3G47570.1	Leucine-rich	Solyc06g076	Receptor like kinase, RLK							
3	scaffold_5	30111187	C	G	3 3	C	3 3	Ciclev10000 Ciclev10000 CDS	AT4G27190.1	NB-ARC dom	Solyc02g036	Cc-nbs-lrr, resistance protein							
4	scaffold_5	26003479	T	C	3 3	T	11 12	Ciclev10000 Ciclev10000 CDS	AT1G31970.1	STRS1	DEA(D/H)-br	Solyc08g076	ATP depende	IPR011545	DNA/RNA helicase, DEAD/DE				
5	scaffold_5	26003495	C	T	3 3	C	12 13	Ciclev10000 Ciclev10000 Intron	AT1G31970.1	STRS1	DEA(D/H)-br	Solyc08g076	ATP depende	IPR011545	DNA/RNA helicase, DEAD/DE				
6	scaffold_5	31310557	G	A	3 3	G	7 7	Ciclev10003 Ciclev10003 CDS	AT5G27220.1	Frigida-like p	Solyc01g096	RNA polyme	IPR012474	Frigida-like					
7	scaffold_9	2002682	A	T	8 8	A	15 16	Ciclev10004 Ciclev10004 UTR	AT3G21430.1	ALY3,ATALY	DNA binding	Solyc01g067	Always early	IPR010561	DIRP				
8	scaffold_9	11546761	G	A	3 3	G	19 20	Ciclev10004 Ciclev10004 Intron	AT1G65810.2			Solyc12g013	Helicase sen1 (AHRD V1	----	B6K5E8_SCHJY)				
9	scaffold_9	11544711	T	C	5 5	T	6 6	Ciclev10004 Ciclev10004 Intron	AT1G65810.2			Solyc12g013	Helicase sen1 (AHRD V1	----	B6K5E8_SCHJY)				
10	scaffold_9	584764	T	G	9 10	T	18 20	Ciclev10004 Ciclev10004 Intron	AT5G49580.1	Chaperone C	Solyc07g026	Chaperone p	IPR003095	Heat shock protein DnaJ					
11	scaffold_9	571871	T	C	9 10	T	17 18	Ciclev10004 Ciclev10004 UTR	AT3G06510.1	AT5FR2,SFR2	Glycosyl hyd	Solyc01g056	Beta-glucosid	IPR018120	Glycoside hydrolase, family 1				
12	scaffold_9	571869	G	T	9 10	G	18 19	Ciclev10004 Ciclev10004 UTR	AT3G06510.1	AT5FR2,SFR2	Glycosyl hyd	Solyc01g056	Beta-glucosid	IPR018120	Glycoside hydrolase, family 1				
13	scaffold_9	30383692	A	T	5 5	A	14 15	Ciclev10004 Ciclev10004 Intron	AT5G53130.1	ATCNGC1,C1	cyclic nucleo	Solyc12g010	Cyclic nuclec	IPR000595	Cyclic nucleotide-binding				
14	scaffold_9	4070311	C	A	4 4	C	3 3	Ciclev10006 Ciclev10006 UTR	AT5G62950.1			Solyc11g007	Calcitonin pe	IPR019000	RNA polymerase III, subunit C				
15	scaffold_9	923943	C	C	11 12	T	5 5	Ciclev10006 Ciclev10006 CDS	AT1G50420.SCL-3,SCL3, scarecrow-lik	Solyc05g053	GAI-like prot	IPR005202	GRAS transcription factor						
16	scaffold_9	112971	A	G	6 6	A	10 11	Ciclev10006 Ciclev10006 CDS	AT1G02520.1	PGP11	P-glycoprote	Solyc06g005	Lipid A expo	IPR003439	ABC transporter-like				
17	scaffold_1	27081117	C	T	3 3	C	5 5	Ciclev10007 Ciclev10007 Intron	AT3G11710.1	ATKRS-1	lysyl-tRNA sy	Solyc06g073	Lysyl-tRNA s	IPR002313	Lysyl-tRNA synthetase, class I				
18	scaffold_1	2889271	G	C	6 6	G	16 16	Ciclev10009 Ciclev10009 CDS	AT5G11500.1			Solyc08g066	Coiled-coil d	IPR008532	Protein of unknown function				
19	scaffold_1	2855160	G	A	5 5	G	21 22	Ciclev10010 Ciclev10010 CDS	AT5G25752.1	ATRBL11,RBL	rhomboid-lik	Solyc08g066	Rhomboid fa	IPR002610	Peptidase S54, rhomboid				
20	scaffold_1	17598496	C	G	3 3	C	10 11	Ciclev10010 Ciclev10010 CDS	AT4G21700.1	Protein of ur	Solyc02g076	Unknown Protein (AHRD V1)							
21	scaffold_1	17604689	T	C	3 3	T	10 10	Ciclev10010 Ciclev10010 CDS	AT4G21700.1	Protein of ur	Solyc02g076	Unknown Protein (AHRD V1)							
22	scaffold_1	23872618	C	G	5 5	C	12 13	Ciclev10010 Ciclev10010 Intron	AT3G14460.1	LRR and NB-	Solyc08g007	Cc-nbs-lrr, resistance protein							
23	scaffold_6	32250270	T	C	0 0	T	12 14	Ciclev10010 Ciclev10010 Intron	AT1G67140.1	SM5ET5	HEAT repeat	Solyc02g025	HEAT repeat	IPR011080	Armadillo-like helical				

Figure 13. Putative variations that has different DNA sequence compaed with *C. clementina* and *C. hybrid* 'Shiranui'

Table 21. Number of putative variants.

	HB-PL			HB-SUN			PL-SUN		
	Total	Genic	Intergenic	Total	Genic	Intergenic	Total	Genic	Intergenic
Homozygous SNP	636	95	541	616	94	522	175	33	142
Putative Variants	128	7	121	134	17	117	72	9	63
Ratio of Variants	20.12	7.37	22.37	21.75	18.08	22.41	41.14	27.27	44.36

HB : *C. hybrid* 'shiranui'

PL : 'Plato' derived from immature seed of *C. hybrid* 'shiranui'

SUN : 'Suneat' derived from bud variants of *C. hybrid* 'shiranui'

2.3.7 부지화 유래 계통의 추정 변이(Putative variation)에 의한 유전자 영향

유전자 부위에서 각 부지화 계통에 대해 추정 변이가 일어나는 유전자를 확인한 결과 클레멘틴과 부지화, 플라토 계통 비교군에서는 9개의 유전자에서 추정 변이가 일어나고, 이중 3개의 추정 변이가 LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein (AT3G14460), Serine carboxypeptidase-like 34(AT5G23210),과 Scarecrow-like 3(AT1G50420)에서 일어나며, Mo25 family protein(AT5G47540: Calcium-binding protein 39)를 비롯한 4개의 추정 변이가 인트론 부위에서 발생한다.

클레멘틴과 부지화, 씨니트 계통 비교군에서는 총 17개의 추정변이가 확인되고, 이중 7개의 추정변이가 6개의 유전자 DUF593 (AT4G13630:IFA-binding protein), Os02g0504100 protein Fragment (AT2G38430), Beta glucosidase 17(AT2G44480), Phloem protein 2-B15(AT1G09155), Homolog of carrot EP3-3 chitinase(AT3G54420), Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARLI 4) family(AT4G35110)의 단백질 발현부위에서 변이가 확인되며, Phloem protein 2-B15(AT1G09155)에서는 두 개의 추정 변이가 확인된다.

클레멘틴과 플라토에 씨니트 계통을 비교한 경우는 유전자 부위에 발생한 9개의 추정변이가 NB-ARC domain-containing disease resistance protein (AT4G27190)과 Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein(AT1G12775)의 단백질 발현 부위에서 확인되며, NB-ARC domain-containing disease resistance protein (AT4G27190)에서는 2개의 추정변이가 확인된다. 그리고, Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein(AT1G68300)를 비롯한 6개의 단백질 유전자의 인트론에 추정변이가 확인된다.

2.3.8 KEGG 대사 경로 분석을 통한 단일 염기 다형성(SNP) 발현 양상

각 계통에서 유전자 부위에 발생한 SNP의 영향을 알아보기 위하여, 전체 유전체 상의 유전자 부위 SNP와 유전자 부위에서 인트론을 제외한 SNP, 단백질 코딩 부위(CDS: coding sequence)에 나타나는 SNP로 구분하여 KEGG 대사 경로 분석을 실시하였다. 유전자 부위는 단백질과 유전자 산물의 발현을 조절에 관여하는 조절부위(UTR: untranslated region)과 단백질 코딩 부위(CDS: coding sequence), 인트론(intron)으로 나뉘며, 조절 부위와 단백질 코딩 부위에 발생한 SNP는 세포의 성장과 분화 발달에 직접적인 영향을 주며, 인트론에 발생한 SNP는 영향이 적다는 가정 하에 SNP가 세포의 대사과정에 영향을 주는지를 조사하였다.

전체 부지화와 플라토 비교군(표 22)에서 전체 유전자 부위에 발생한 SNP에 대한 단백질 코딩 부위 SNP의 비율은 36.36% - 80.43%이고, 기타 이차 대사산물의 생합성 경로에 관여하는 단백질에서 발생한 SNP 비율이 가장 높고, 탄수화물 대사에 관여하는 단백질에 발생한 SNP 비율이 가장 낮다. 부지화와 씨니트 비교군(표 23)에서는 21.88% - 55.1%이며, 플라토 비교군과 같이 기타 이차 대사산물의 생합성 경로에 관여하는 단백질에서 발생한 SNP 비율이 가장 높았으나, 조효소(cofactors)와 비타민(vitamins) 생합성 경로에 관여하는 단백질에 발생한 SNP 비율이 가장 낮게 나타났다.

부지화와 플라토 비교군과 씨니트 비교군에서 각 대사경로상에 나타나는 유전자 부위에 나타는 SNP의 개수는 10개의 비교 대상 대사경로에서 플라토군이 5개의 대사 경로에서 씨니트군에서는 4개의 대사 경로에서 높게 나타나고, 한 개의 경로에서는 같은 수의 SNP를 나타낸다. 반면, 단백질 코딩 부위에 나타나는 SNP는 플라토군에서 1 - 29개 까지 높게 나타난다. 또한 테르페노이드(terpenoids)와 폴리케티드(polyketides) 대사를 제외한 전체 대사경로에서 플라토 비교군(표 25)이 단백질 코딩 부위 SNP 비율이 높게 나타나며, 기타 이차대사산물 생합성 경로에서는 25.33% 까지 높게 나타났다. 씨니트 계통은 모본이 부지화보다 과일 착색이 빠르고, 짙은 오렌지색을 특징으로 한다. 카로테노이드는 감귤 과피색의 주 성분이며, 테르페노이드 경로를 통해 생합성된다. 씨니트군의 KEGG 대사 분석

에서 테르페노이드와 폴리케티드 대사 경로에 관련되는 유전자 부위 SNP는 플라톤균(표 25)에서 41개, 씨니트균(표 26)에서 36개가 발생하며, 이중 카로테노이드 생합성에 관련된 SNP는 각, 7개와 9개로 씨니트균에서 높게 나타나며, 단백질 발현 부위에 해당되는 SNP는 각 5개씩이다. 단백질 발현 부위에 SNP가 확인 카로테노이드 생합성관련 유전자로는 Phytoene desaturase 3가 씨니트균에서만 확인되고, Cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 1이 플라톤균에서 확인되며, Abscisic aldehyde oxidase 3를 포함한 4종류에서 SNP가 나타나며, SNP가 나타나는 위치는 각 유전자에 따라 차이를 보인다(표28).

세포의 대사 경로에 관여하는 단백질의 조절 부위 대한 SNP 발생은 세포의 생장, 분화, 발달에 영향을 끼칠 가능성이 높으며, 필수 대사 과정에 관여하는 유전자에 대한 SNP 일수록 영향이 크다. 특히, SNP 발생이 세포 대사에 부정적인 영향을 주는 경우 세포의 퇴화와 함께 유전체내에서 소실되어 남아 있지 않게 된다. 부지화에 대한 플라톤균과 씨니트균에 있어서도 필수 대사 과정에 관여하는 단백질 코딩 부위에 대한 SNP 발생 비율이 이차 대사 과정에 관여하는 단백질 코딩 부위 SNP 비율이 대체로 적게 나타난다.

Table 22. KEGG analysis of HB-PL SNPs in genic area.

	HB-PL			
	Genic-All	Genic-Intron(-)	Genic-CDS	CDS-Ratio(%)
*Carbohydrate metabolism	231	108	84	36.36
*Energy Metabolism	65	32	25	38.46
*Lipid metabolism	118	64	52	44.07
*Nucleotide metabolism	66	39	31	46.00
*Amino acid metabolism	157	88	76	48.41
*Metabolism of other amino acids	47	30	22	46.81
*Glycan biosynthesis and metabolism	34	17	17	50
*Metabolism of cofactors and vitamins	57	27	21	36.84
*Metabolism of terpenoids and polyketides	41	26	18	43.90
*Biosynthesis of other secondary metabolites	46	38	37	80.43

Table 23. KEGG analysis of HB-SUN SNPs in genic area.

	HB-SUN			
	Genic-All	Genic-Intron(-)	Genic-CDS	CDS-Ratio(%)
*Carbohydrate metabolism	222	123	74	33.33
*Energy Metabolism	71	37	22	30.99
*Lipid metabolism	112	47	28	25.00
*Nucleotide metabolism	76	34	17	22.37
*Amino acid metabolism	157	87	47	29.94
*Metabolism of other amino acids	40	16	11	27.50
*Glycan biosynthesis and metabolism	32	23	14	43.75
*Metabolism of cofactors and vitamins	64	28	14	21.88
*Metabolism of terpenoids and polyketides	36	31	17	47.22
*Biosynthesis of other secondary metabolites	49	33	27	55.10

Table 24. KEGG analysis of PL-SUN SNPs in genic area.

	PL-SUN			
	Genic-All	Genic-Intron(-)	Genic-CDS	CDS-Ratio(%)
*Carbohydrate metabolism	131	64	36	27.48
*Energy metabolism	33	19	6	18.18
*Lipid metabolism	72	33	14	19.44
*Nucleotide metabolism	49	19	14	28.57
*Amino acid metabolism	87	47	29	33.33
*Metabolism of other amino acids	31	17	11	35.48
*Glycan biosynthesis and metabolism	18	10	6	33.33
*Metabolism of cofactors and vitamins	34	23	11	32.35
*Metabolism of terpenoids and polyketides	27	15	10	37.03
*Biosynthesis of other secondary metabolites	35	17	12	34.28

Table. 25 KEGG analysis results of HB-PL SNPs in the metabolism of terpenoids and polyketides

	HB-PL			
	Genic-All	Genic-Intron(-)	Genic-CDS	CDS-Ratio(%)
* Metabolism of terpenoids and polyketides	41	26	18	43.90
Terpenoid backbone biosynthesis	16	9	4	25.00
Monoterpenoid biosynthesis	1	0	0	0.00
Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	5	4	4	80.00
Diterpenoid biosynthesis	5	3	3	60.00
Carotenoid biosynthesis	7	5	5	71.43
Brassinosteroid biosynthesis	3	2	2	66.67
Zeatin biosynthesis	4	3	0	0.00

Table. 26 KEGG analysis results of HB-SUN SNPs in the metabolism of terpenoids and polyketides.

	HB-SUN			
	Genic-All	Genic-Intron(-)	Genic-CDS	CDS-Ratio(%)
*Metabolism of terpenoids and polyketides	36	31	17	47.22
Terpenoid backbone biosynthesis	12	8	4	33.33
Monoterpenoid biosynthesis	1	0	0	0.00
Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	3	1	0	0.00
Diterpenoid biosynthesis	4	2	1	25.00
Carotenoid biosynthesis	9	8	5	55.56
Brassinosteroid biosynthesis	4	3	3	75.00
Zeatin biosynthesis	3	1	0	0.00

Table. 27 KEGG analysis results of PL-SUN SNPs in the metabolism of terpenoids and polyketides.

	PL-SUN			
	Genic-All	Genic-Intron(-)	Genic-CDS	CDS-Ratio(%)
* Metabolism of terpenoids and polyketides	27	15	10	37.04
Terpenoid backbone biosynthesis	10	6	1	10.00
Monoterpenoid biosynthesis	0	0	0	0.00
Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	4	1	1	25.00
Diterpenoid biosynthesis	3	1	1	33.33
Carotenoid biosynthesis	6	4	4	66.67
Brassinosteroid biosynthesis	3	2	2	66.67
Zeatin biosynthesis	1	1	1	100.00

Table 28. Carotenoid pathway genes that has SNP between HB-PL, HB-SUN and PL-SUN.

TAIR 10	Gene Name	HB-PL	HB-SUN	PL-SUN
AT2G27150	AAO3; Abscisic aldehyde oxidase 3	●	●	●
AT3G19270	CYP707A4; Cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 4	●	●	
AT4G14210	PDS3; Phytoene desaturase 3		●	●
AT4G19170	NCED4; nine-cis-Epoxycarotenoid dioxygenase 4	●	●	●
AT4G19230	CYP707A1; Cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 1	●		
AT4G32810	CCD8; Carotenoid cleavage dioxygenase 8	●	●	●

결론

배유형성이 되지 않은 부지화의 미성숙종자를 이용하여 배양한 결과, 배(胚)발달 단계를 통해 형성된 분화체를 얻을 수 있었으며, 이들을 대목에 접목하여 성장시킨 성목들 중에서 모본인 부지화와 과형과 생장특성이 달라진 '플라토' 계통을 선발할 수 있었다. 이는 다배성인 부지화 품종의 미성숙종자에는 분화되지 않은 주심세포가 존재하며, 이들을 특정 조건에서 배양하면, 부지화 주심배 계통 선발군(群)을 만들 수 있음을 보였다. 이는 미성숙종자를 유도를 포함한 다배성 감귤 품종의 주심배 계통을 이용한 육종과 품종개량 방법이 기본품종의 특성을 유지하면서 일부 특성을 부여하고자 할 때 유용한 방법이 될 수 있음을 의미한다.

선발된 플라토 계통과 부지화의 아조변이 선발 계통인 씨니트 품종과 부지화 품종에 대해서 전체 유전체를 NGS법을 통해 분석하고, 유전체 서열을 클레멘틴을 표준유전체와 부지화 NGS 서열에 대해 비교하였을 때 플라토 비교군과 씨니트 비교군에서 나타나는 SNP의 개수와 비율, 염색체상의 빈도 등은 유사하게 나타났다. 이는 모품종으로부터 구분성을 갖는 새로운 계통이 되는 과정에서 형태, 착색과 같은 외형적 변화와 생장과 맛 특성 등이 변화하고, 구분성을 갖는 변화가 일어나기 까지 일정 수준 이상의 변이율이 필요하고, 이러한 변이 누적의 결과 육안으로 선발할 수 있는 변이종(variant)이 형성됨을 보였다. 각 변이에 대해서 부지화와 클레멘틴 비교군에 대한 플라토와 부지화와 클레멘틴 비교군에 대한 씨니트의 비율이 유사성은 주심배 형성에 의한 변이 과정과 아조변이에 의한 변이 과정이 유사한 세포 과정에 의해 일어날 수 있음을 의미한다. 주심배는 식물의 생식기관인 배주에서 기원함으로 주심배의 기본 세포인 주심 세포가 체세포이긴 하나, 후대의 유지를 여러 세포 현상에 영향을 받을 가능성이 크다. 그러므로, 주심배는 모계 세포를 기본으로 하지만 모계와는 다른 표현형을 가질 개연성이 크다고 볼 수 있고, 후성 유전과 같은 유전자 수정에 따라 어느 정도의 유전적 변이가 진행되는 것으로 볼 수 있다. 아조변이의 경우 통상적으로 무작위적 변이로 이해되었으나, 품종이 환경에 적응하여 가는 과정에서 나타나는 적극적인 변이 현상으로 이를 조정하는 세포과정이 존재할 수 있다.

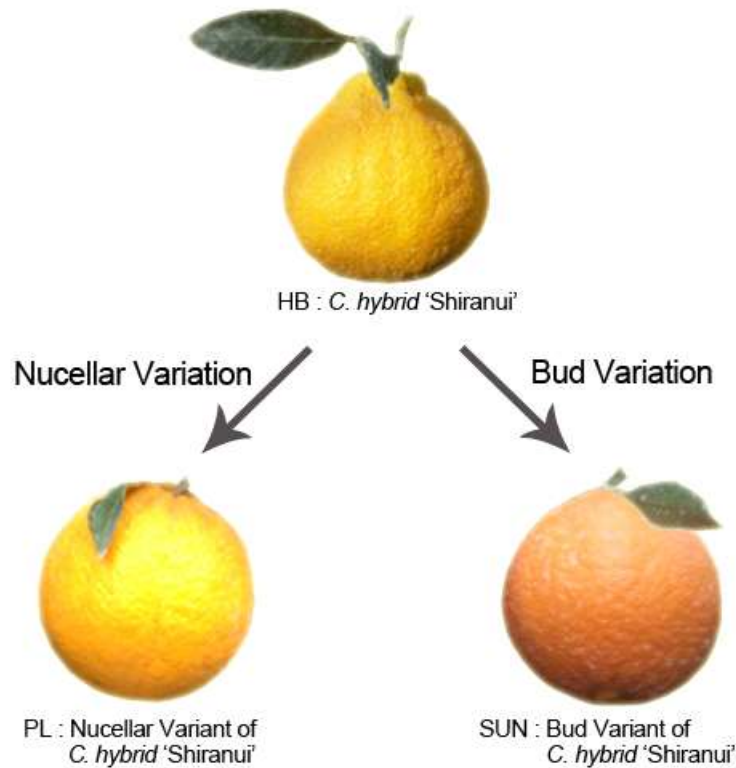


Figure 14. Division of two variants from mother variety by different process.

플라토와 씨니트를 비교한 변이에서 부지화와 클레멘틴에 대한 변이량이 정량적으로는 적으나, 정성적으로는 차이가 크게 나타나는 것은 부지화로부터 각기 독립적으로 변이된 두 계통 간에 분화가 일어나고 있다고 볼 수 있다(그림 14).

동질 SNP 중에서 클레멘틴과 부지화에서 염기 서열이 같고, 부지화에서 분화된 계통에서만 변이가 나타나는 경우, 분화된 계통의 특성 결정에 중요한 역할을 할 수 있는 변이라 가정을 하고, 이들을 추정 변이(putative variation)라고 하였으며, 부지화와 플라토, 부지화와 씨니트의 유전자 부위에 대한 추정 변이 비율을 비교하였을 때, 유전자간 부위의 추정 변이 비율이 유사한데 비하여, 씨니트 계통에서 7.37%대 18.08%로 높게 나타난다. 이는 모본으로 부터의 세대 진전과 환경 노출이 이루어진 기간에 따라 유전자 부위의 변이와 제어 방식이 다른데 기인된 것으로 보인다.

플라토 계통과 씨니트에서 유전적 변이 비교에 있어, 유전자 부위 단일 염기 다형성(genic area SNP)에 있어 단백질 발현 부위(CDS)에 대한 변이 형성 비율이 주심배에서 유래한 플라토 계통이 아조변이 계통인 씨니트 보다 높게 나타난다. 이는 주심배 계통의 변이 형성이 아조변이 의한 변이 형성보다 정교하게 조절되고 있음을 의미하고, 주심배 유도과 주심세포의 배양시 특정 조건에 따라 변이의 방향을 조절할 수 있음을 의미한다. 이러한 결과, 감귤이 갖고 있는 다배성과 주심배 특성은 감귤 품종의 육종의 제한 요소가 아니라, 기존에 선발이 되고, 충분한 재배 안정성이 확보된 품종에 변이를 유도하면서 형질이 개선된 계통을 확보할 수 있는 유용한 수단이며, 육종 교배 라인에 따라 넓은 폭의 변이 계통이 전개되는 교배 육종에 대해 상호 보완적인 육종법으로 적용할 수 있을 것이다.

인 용 문 헌

Adolesson S. (2007) The spread of apomixis and its effect on resident genetic variation. *J Evol Biol* 20: 1933-1940.

AGI (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000, 408:796-815.

Aleza P. et al (2009) Recovery and characterization of a *Citrus clementina* Hort. ex Tan. 'Clemenules' haploid plant selected to establish the reference whole *Citrus* genome sequence *BMC Plant Biol.* 2009; 9: 110

Andrade-Rodriguez, M. et al (2005) Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. *Agrociencia* 39, 371 - 383.

Aravin A. A. et al (2008) A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell* 31:785-799.

Asins M. J. et al (2012) The position of the major QTL for citrus tristeza virus resistance is conserved among *Citrus grandis*, *C. aurantium* and *Poncirus trifoliata*. *Mol Breed* 29:575-587

Balloux F. et al (2003) The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics* 164: 1635-1644.

Batygina, T. B. (1999) Genetic heterogeneity of seeds: embryological aspects.

Fiziol. Rast. 46, 438 - 454.

Batygina, T. B. et al (2007) Phenomenon of polyembryony: genetic heterogeneity of seeds. Russ. J. Dev. Biol. 38, 126 - 151.

Bengtsson B. O. (2003) Genetic variation in organisms with sexual and asexual reproduction. J Evol Biol 16: 189- 199.

Biswas M. K. et al (2014) Genome wide characterization of short tandem repeat markers in sweet orange (*Citrus sinensis*). PLoS One 9:e104182

Blanchard, M. L. et al (2010) Does polyembryony confer a competitive advantage to the invasive perennial vine *Vincetoxicum rossicum* (Apocynaceae)- Am. J. Bot. 97, 251 - 260.

Boo K. H. et al (2007) Construction and profiling of a cDNA library from young fruit of satsuma mandarin. J Plant Biol 50:403-409

Brachi B. et al (2011) Genome-wide association studies in plants: the missing heritability is in the field. Genome Biol. Vol.12:232

Carvalho M. P. et al (2005) *Anacardium humile* A. St. Hil. (Anacardiaceae) seedling emergence evaluated by means of small samples. Rev. Bras. Bot. 28, 627 - 633.

Chavez D. J. et al (2011) Identification of markers linked to seedlessness in *Citrus kinokuni hort. ex Tanaka* and its progeny using bulked segregant analysis. HortSci 46:693-697

Chen C. et al (2008) EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. 4:1-10

Chen C. et al (2013) Mining of haplotype-based expressed sequence tag single nucleotide polymorphisms in citrus. *BMC Genomics* 14:746

Choi Y. et al (2002) DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell* 110: 33-42.

Cuenca J. et al (2013) Genetically based location from triploid populations and gene ontology of a 3.3-mb genome region linked to *Alternaria* brown spot resistance in citrus reveal clusters of resistance genes. *PLoS One* 8:e76755

Curtolo et al. (2017) QTL mapping for fruit quality in Citrus using DArTseq markers *BMC Genomics* Vol. 18:289

Donmez D. et al (2013) Genetic transformation in Citrus. *Scientific World J* 2013:491207

Du D. et al (2015) Construction of citrus gene coexpression networks from microarray data using random matrix theory. *Hortic Res* 2:15026

Fang D.Q. et al (1997) Development of molecular markers linked to a gene controlling fruit acidity in citrus. *Genome* 40:841-849

Fischer, C..et al (1997) Induction of zygotic polyembryos in wheat: influence of auxin polar transport. *Plant Cell* 9, 1767 - 1780.

Forster B. P. et al (2007) The resurgence of haploids in higher plants. Trends in Plant Science Vol 12:368-375.

Gaj T. et al (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Casbased methods for genome engineering. Trends Biotechnol 31:397-405

Ganeshiah, K. N. et al (1991) Evolution of polyembryony: consequences to the fitness of mother and offspring. J. Gen. 70, 103 - 127.

Garcia M. R. et al (2000) QTL analysis of yield and seed number in Citrus. Theor Appl Genet 101:487-493

Garcia R. et al (1999) Genetic analysis of apomixis in Citrus and Poncirus by molecular markers. Theor Appl Genet 99:511-518

Gehring M. et al (2009) Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. Science 324:1447-1451

Gmitter F. G. et al (2012) Citrus genomics Tree Genetics & Genomes 8:611-626

Goff et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). Science 296:92-100

Golein B. et al (2011) Identification of zygotic and nucellar seedlings in citrus interspecific crosses by inter simple sequence repeats (ISSR) markers African Journal of Biotechnology Vol. 10(82)

Grossniklaus U. et al (2001) How to avoid sex: the genetic control of

gametophytic apomixis. *Plant Cell* 13, 1491 - 1498.

Gulsen O. et al (2010) A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. *Euphytica* 173:265-277

Gulsen O. et al (2011) QTL analysis and regression model for estimating fruit setting in young citrus trees based on molecular markers. *Sci Hortic* 130:418-424

Guo F. et al (2015) Transcriptomic analysis of differentially expressed genes in an orange-pericarp mutant and wild type in pummelo (*Citrus grandis*) *BMC Plant Biol* 15:44

Gupta P. et al (1996) Apomixis and polyembryony in the guggul plant, *Commiphora wightii*. *Ann. Bot.* 78, 67 - 72.

Haberer G. et al (2005) Structure and architecture of the maize genome. *Plant Physiol* 2005, 139:1612-1624.

Hand. M. L. et al (2014) The Genetic Control of Apomixis: Asexual Seed Formation *Genetics* June 1, 2014 vol. 197 no. 2 441-450

Hotchkiss, E. E. et al (2008) Survival and performance of the invasive vine *Vincetoxicum rossicum* (Apocynaceae) from seeds of different embryo number under two light environments. *Am. J. Bot.* 95, 447 - 453.

Hou X. J. et al (2014) Genome-wide classification and evolutionary and expression analyses of citrus MYB transcription factor families in sweet orange. *PLoS One* 9:e112375

Hsieh T. F. et al (2009) Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm. *Science* 324:1451-1454.

Hu X. M. et al (2015) Genome-wide identification of citrus ATP-citrate lyase genes and their transcript analysis in fruits reveals their possible role in citrate utilization. *Mol Genet Genomics* 290:29-38

Huh J. H. et al (2008) Cellular programming of plant gene imprinting. *Cell* 132:735-744.

IHGSC (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome
NATURE | VOL 431 | 21 931-945

Minamikawa M. F. et al (2017) Genome-wide association study and genomic prediction in citrus: Potential of genomics-assisted breeding for fruit quality traits *Scientific Reports* Vol. 7 : 4721

Iranshahi M. et al (2015) Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. *Life Sci* 137:125-32

Islam M. Z. et al (2014) Genome-wide identification and expression profile analysis of citrus sucrose synthase genes: investigation of possible roles in the regulation of sugar accumulation. *PLoS One* 9:e113623

Jaskani, M. J. et al (2005) Fruit set, seed development and embryo germination in interploid crosses of citrus. *Sci. Hort.* 107, 51 - 57.

Jia H. et al (2014) Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One* 9:e93806

Jiao W. B. et al (2013) Genome-wide characterization and expression analysis of genetic variants in sweet orange. *Plant J* 75:954-964

Jin S. B. et al (2015) Early identification of citrus zygotic seedlings using pollen-specific molecular markers. *Korean J Hort Sci Biotechnol* 33:598-604

Kang S. K. et al (2008) Development a SCAR markerlinked to polyembryonic trait in citrus. *Korean J Hort Sci Tech* 26:51-55

Kato M. et al (2007) Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes and carotenoid cleavage dioxygenase genes during fruit maturation in the juice sacs of 'Tamami', 'Kiyomi' tangor, and 'Wilking' mandarin. *J Japan Soc Hort Sci* 76:103-111

Kepiro, J. L. et al (2007) Nucellar embryony. In: Khan, I.A. (Ed.), *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI, Wallingford, pp. 141 - 150.

Khan I. (2007) *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology* Chap 5. 141-149

Kim H. B. et al (2015) Current status and prospects of citrus genomics *Journal of Plant Biotechnology* Vol. 42. 4 326-335

Kishore K. et al (2012) Polyembryony and seedling emergence traits in apomictic citrus *Scientia Horticulturae* 138 101-107

Kobayashi, S. et al (1981) Role of the primordium cell in nucellar embryogenesis in citrus. In: *Proceedings of 4th International Citrus Congress*, Tokyo, International Society of Citriculture, pp. 44 - 48.

Koltunow A M. (1993) Apomixis Embryo Sacs and Embryos Formed without Meiosis or Fertilization in Ovules The Plant Cell, Vol. 5, 1425-1437

Koltunow, A. M. (2000) The genetic and molecular analysis of apomixis in the model plant hieracium. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 42, 61 - 72.

Koltunow, A. M. et al (1995) Anther, ovule, seed, and nucellar embryo development in Citrus sinensis cv. Valencia. Can. J. Bot. 73, 1567 - 1582.

Kondo, T. et al (2002) Ecophysiology of seed germination in Erythronium japonicum (Liliaceae) with underdeveloped embryos. Am. J. Bot. 89, 1779 - 1784.

Krueger R. R. (2003) Use of Molecular Markers in the Management of Citrus Germplasma Resources J.Amer. Hort. Sci 128(6): 827-837

Kumar S. (2017) Epigenetic Control of Apomixis: A New Perspective of an Old Enigma Adv Plants Agric Res , 7(1):

Lauria M. et al (2004) Extensive maternal DNA hypomethylation in the endosperm of Zea mays. Plant Cell 16:510-522.

Lee M et al (2015) Complete chloroplast genomic sequence of Citrus platymamma determined by combined analysis of Sanger and NGS data. Hort Environ Biotechnol 56:704-711

Liang M. et al (2015) De novo transcriptome assembly of pummelo and molecular marker development. PLoS One 10(3):e0120615

Ling P. et al (2000) Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. *Theor Appl Genet* 100:1010-1017

Lisch D. (2009) Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2009, 60:43-66.

Liu S. R. et al (2013) Development and characterization of genomic and expressed SSRs in citrus by genome-wide analysis. *PLoS One* 8:e75149

Makarevich G. et al (2008) Mechanism of PHERES1 imprinting in Arabidopsis. *J Cell Sci* 121: 906-912.

Marilyn A. et al (1993) Embryogenesis in higher plants: an overview. *Plant Cell* 5, 1361 - 1369.

Martinelli F. et al (2012) Transcriptome profiling of citrus fruit response to huanglongbing disease. *PLoS One* 7(5):e38039

Martinez-Gomez, P. et al (2003) Sexual polyembryony in almond. *Sex. Plant Reprod.* 16, 135 - 139.

Mathieu O. et al (2007) Transgenerational stability of the Arabidopsis epigenome is coordinated by CG methylation. *Cell* 2007, 130: 851-862.

Matzke M. et al (2009) RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr Opin Cell Biol* 21:367-376.

McCormick S. (2004) Control of male gametophyte development. *Plant Cell* 16 Suppl:S142-S153.

Mendes-Rodrigues C. et al (2008) Seedlings emergence and polyembryony in two species of *Inga* (Mimosaceae). 2nd Int. Sym. Sav. Trop. Brasilia, 12 - 17.

Mendes-Rodrigues C. et al (2011) Does polyembryony reduce seed germination and seedling development in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae: Bombacoideae) *Am. J. Bot.* 98, 1613 - 1622.

Meuwissen T. H. E. et al (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*. Vol.157:1819-1829

Moore G. A. (2001) Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends Genet* 17:536-540

Morales-Ruiz T. et al(2006) DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6853-6858.

Mosher RA. et al(2009) Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of *Arabidopsis*. *Nature* 460:283-286.

Nakano M. et al (2008) Mapping and haplotyping of the flanking region of the polyembryony locus in *Citrus unshiu* Marcow. *J Japanese Soc Hort Sci* 77:109-114

Nakano M. et al (2013) Characterization of genes associated with polyembryony and in vitro somatic embryogenesis in *Citrus*. *Tree Genet Genomes* 9:795-803

Ngoc L. B. T. et al (2009) Development of 14 minisatellite markers for the citrus canker bacterium, *Xanthomonas citri* pv. *Citri*. *Mol Ecol Resources* 9:125-127

Nicolosi E. et al (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet* 100:1155-1166

Oakeley E. J. (1997) Developmental changes in DNA methylation of the two tobacco pollen nuclei during maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11721-11725.

Okoro P. et al (2011) Genetic evidence of developmental components of parthenocarpy in Apomictic *Musa* species *Journal of Plant Breeding and Crop Science* Vol. 3(8), pp. 138-145,

Ollitrault P. et al (1994) Nuclear genome variation in Citrus. *Fruits* 49:390-393
O

Ollitrault P. et al (2012) A reference genetic map of *Citrus clementina* hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. *BMC Genomics* 13:593

Park J. H. et al (2007), New Navel Orange Cultivar 'Poong Kwang' *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 27(S), 45-45

Park J. H. et al (2009), A New Citrus Cultivar 'Tamdo No.1' *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 27(S), 45-45

Park J. H. et al (2011), A New Citrus Cultivar 'Tamnabong' *HORTICULTURE ABSTRACTS*, 138-138

Park J. H. et al (2013) A New Citrus Cultivar 'Tamdosamho' Korean Journal of Horticultural Science & Technology 31(S1), 134-135

Park Y. C. (2011) Citrus Varieties and Their Characteristics in Jeju

Park Y. C. et al (2013) Characteristics of New Satsuma Mandarin Cultivar 'Sangdojosaeng' The Korean Journal of Plant Resources Vol 26 : 1 pp.143-147

Pfeil, B. E. & Crisp, M. D.(2008) The age and biogeography of Citrus and the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) in Australasia and New Caledonia. Am. J. Bot. 95, 1621-1631

Sahin-Cevik M. et al (2012) Quantitative trait loci analysis of morphological traits in Citrus. Plant Biotechol Rep 6:47-57

Savidan, Y. (2000) Apomixis genetics and breeding. Plant Breed. Rev. 18, 13 - 85.

Scalon, S. D. P. Q. et al (2003) Initial growth of Bombacopsis glabra (Pasq.) A. Robyns seedlings under shading conditions. Rev. Arv. 27, 753 - 758.

Shaanker U. et al (1997) Conflict between parent and offspring in plants: predictions, processes and evolutionary consequences. Curr. Sci. 72, 932 - 939.

Shimizu T. et al (2017) Draft Sequencing of the Heterozygous Diploid Genome of Satsuma (Citrus unshiu Marc.) Using a Hybrid Assembly Approach. Front Genet. Vol. 8: 180

Slotkin R. K. (2009) Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of

transposable elements in pollen. *Cell* 136:461-472.

Song K. J. et al (2013) Chap 3. The CITRUS The History of Korean Horticultural Science 186-201

Su H. J. et al (2014) Complete chloroplast genome sequence of Omani lime (*Citrus aurantiifolia*) and comparative analysis within the Rosids. *PloS One* 9:e113049

Sugiyama A. et al (2010) Structure and expression levels of alleles of *Citrus zeaxanthin epoxidase* genes. *J Japan Soc Hort Sci* 79:263-274

Terol J et al (2015) An RNA-Seq-based reference transcriptome for citrus. *Plant Biotechnol J* doi: 10. 1111/pbi.12447.[Epub ahead of print]

Terol J. et al (2008) Development of genomic resources for *Citrus clementina*: Characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences *BMC Genomics*, 9:423

Vardi A. et al (2018) Induction of Seedlessness in Citrus: From Classical Techniques to Emerging Biotechnological Approaches *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 133(1):117-126

Wakana, A. et al (1987) Adventive embryogenesis in Citrus: the occurrence of adventive embryos without pollination or fertilization. *Am. J. Bot.* 74, 517 - 530.

Wang J. et al (2014) *Citrus sinensis* annotation project (CAP): a comprehensive database for sweet orange genome. *PLoS One* 9:e87723

Wang X. et al (2017) Genomic analyses of primitive, wild and cultivated citrus provide insights into asexual reproduction Nature Genetics volume 49, pages 765-772 (2017)

Wang Y. et al (2015) Genome-wide comparative analysis reveals similar types of NBS genes in hybrid Citrus sinensis genome and original Citrus clementine genome and provides new insights into non-TIR NBS genes. PLoS One 10:e0121893

Weber C. A. et al (2003) Mapping freeze tolerance quantitative trait loci in a Citrus grandis x Poncirus trifoliata F-1 pseudo-testcross using molecular markers. J Amer Soc Hort Sci 128:508-514

Wong D. C. J. et al (2014) Annotation of gene function in citrus using gene expression information and co-expression networks. BMC Plant Biol 14:186

Wu G.A. et al (2018) Genomics of the origin and evolution of Citrus Nature Vol. 554 :311-330

Wu G. A et al (2013) Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. Nat Biotech 32:656-662

Wu J. et al (2014) An integrative analysis of the transcriptome and proteome of the pulp of a spontaneous late-ripening sweet orange mutant and its wild type improves our understanding of fruit ripening in citrus. J Exp Bot 65:1651-1671

Xiang, C. et al (1988) Frequency and characteristics of nucellar and zygotic

seedlings in 12 Citrus rootstocks. *Sci. Hort.* 37, 47 - 59.

Xiao JP et al (2009) Identification of AFLP fragments linked to seedlessness in Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and conversion to SCAR markers. *Sci Hort* 121:505-510

Xie S. et al (2013) *Citrus linczangensis* sp. n., a Leaf Fossil of Rutaceae from the Late Miocene of Yunnan, China *International Journal of Plant Sciences* Vol. 174, Number 8 pp. 1201 - 1207

Xie R et al (2015) The ARF, AUX/IAA and GH3 gene families in citrus: genome-wide identification and expression analysis during fruitlet drop from abscission zone A. *Mol Genet Genomics* 290:2089-2105

Xu Q et al. (2013) The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat Genet* 45:59-66

Yadegari R. et al (2004) Female gametophyte development. *Plant Cell* 16 Suppl:S133-S141.

Yang C. Q. et al (2013) Digital gene expression analysis of corky split vein caused by boron deficiency in 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck) for selecting differentially expressed genes related to vascular hypertrophy. *PLoS One* 8(6):e65737

Yeung, E. C. et al (1993) Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor. *Plant Cell* 5, 1371 - 1381.

Yildiz E. et al (2013) Identification of zygotic and nucellar individuals

produced from several citrus crosses using SSRs markers. Not Bot Horti Agrobo 41:478-484

Yu K. et al (2012) Transcriptome changes during fruit development and ripening of sweet orange (*Citrus sinensis*). BMC Genomics 13:10

Yun S. H. et al (2008) New Cultivar Developed : A New Early Maturing Satsuma Mandarin Cultivar, "Haryejaeng" The Korean Journal of Breeding Science vol40 Number 2 pp.184-187

Zhang J. Z. et al (2014) Involvements of PCD and changes in gene expression profile during self-pruning of spring shoots in sweet orange (*Citrus sinensis*). BMC Genomics 15:892

감귤박물관 http://citrus.seogwipo.go.kr/index.php/contents/story/history/derive/derive_03

국사편찬위원회 한국사데이터베이스 <http://db.history.go.kr/>

果樹研究所 品種一覽 不知火(しらぬひ) <https://www.naro.affrc.go.jp/fruit/kih/>

西浦昌男 外 (1983) 칸킷新品種"淸見"について 果樹試場報告. B, 興津 10 p. 1-9