

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001687-01

## 조속 생력형 감귤 품종개발

(Development of mandarin cultivar having  
early-maturing and labor-saving characteristics)

(주) 제 농

농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청

# 제 출 문

농림축산식품부장관 · 해양수산부장관 · 농촌진흥청장 · 산림청장 귀하

이 보고서를 “조속 생력형 감귤 품종개발” 프로젝트의 보고서로 제출합니다.

제1세부 : 연내수확용 부피경감 온주밀감 품종개발

제2세부 : 조속 홍피 만다린 품종개발

제3세부 : 조속 강세 만다린 품종개발

제4세부 : 적육 관피 만다린 품종개발

2017년 3월 30일

프로젝트 연구기관명 : (주) 제 농

프로젝트 책임자 : 이 충 선

세부프로젝트 연구기관명 : 국립원예특작과학원 감귤연구소

세부프로젝트 책임자 : 박 재 호

세부프로젝트 연구기관명 : 주식회사 제 농

세부프로젝트 책임자 : 이 충 선

세부프로젝트 연구기관명 : (주)바이오에그진앤틱

세부프로젝트 책임자 : 전 경 용

세부프로젝트 연구기관명 : 농업회사법인 한농바이오산업

세부프로젝트 책임자 : 김 시 현

# 요 약 문

## I. 제 목

- 조숙 생력형 감귤 품종개발
  - 제1세부 : 연내수확용 부피경감 온주밀감 품종개발
  - 제2세부 : 조숙 홍피 만다린 품종개발
  - 제3세부 : 조숙 강세 만다린 품종개발
  - 제4세부 : 적육 관피 만다린 품종개발

## II. 연구성과 목표 대비 실적

### 1. 1차년도(2013년)

과제 구분	연구개발의 목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1세부	○ 목표형질 자원이용 교배	○ 핵심 종자친, 화분친 선정 교배	100
	○ 획득 실생 파종 교잡종 선별	○ 실생 획득 파종 및 교배	100
2세부	○ 교배 및 실생 양성	○ 홍피계 품종 교배 및 육묘 - 클레멘틴×베니바에 외 1조합 1,835화 교배, 2,030개 종자 획득, 1,352주 실생 확보 ○ 홍피계 클레멘틴, 리, 56-423을 모본으로 자연수분 획득 종자 파종 및 육묘	100
	○ 유전자원 등록	○ 국립농업과학원 농업유전자원센터 3점 등록 완료(K243581~K243583)	100
3세부	○ 만감류 주심배 in vitro 육종 기술 확보	○ 만감류 미숙 종자 배배양 기술 확보 - In vitro culture를 통해 감귤류의 미숙 종자로부터 주심배 유도 및 배배양 기술 확보 - 만감류 종자 주심배 발아 특성 평가	100
	○ 만감류 종자의 기내 발아 특성 조사	○ 만감류 주심배 유도 5 품종 이상	100
	○ 만감류 주심배 배양 체 확보	○ 만감류 미숙종자 주심배 기내 배발생 유도 500 개체이상	100
	○ 만감류 유전자원 수집	○ 만감류 유전자원수집 3 건이상	100
4세부	○ 적육계 교배 및 교배실생 대량양성	○ 청견 교배실생 3,700개 확보 ○ 부지화의 교잡배 및 주심배 등 약 20,000개 확보 ○ 부지화 교잡배 및 주심배 조기 선발을 위한 DNA 표지 10종 확인	100
	○ 조기 육종 및 육묘 시스템 구축	○ 조기 육묘 시스템 구축을 위한 가온시설 330m <sup>2</sup> 구축	100
	○ 교잡배 및 미숙배 구제를 위한 조직배양 시스템 구축	○ 교잡배 및 미숙배 구제를 위한 조직배양시설 및 준비실 확보 66m <sup>2</sup>	100
	○ 유전자원 수집 및 등록 2건	○ 핑거라임 영양채 3종 수집 및 등록 3건	100

2. 2차년도(2014년)

과제 구분	연구개발의 목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1세부	○ 조숙성, 부피경감 자원이용교배	○ 종자친, 화분친 선정 교배	100
	○ 실생 성장유도	○ 교배실생 고집 성장 유도	100
2세부	○ 교배 및 실생 양성	○ 홍피 및 적육계 품종 교배 및 육묘 - 하레히메×올란도 외 6조합, 2,233화 교배, 3,304개 종자 획득, 2,165주 실생 확보 ○ 홍피계 품종[클레멘틴, 리, 56-423]에서 자연수분에 의해 획득한 실생묘 371주를 감귤 성목에 고집 후 1주지 성장 유도 ○ 교배친 활용을 위해 6품종 고집 및 교배수 확보	100
	○ 유전자원 등록	○ 국내 미등록 일본 감귤 품종 유전자원 등록 업무 추진	0
3세부	○ 만감류 교배 종자 배배양 기술 확보	○ 만감류를 모본으로 한 교배 조합을 구성 교배를 실시하고, 형성된 종자로부터 배양체 유도 ○ In vitro culture를 통해 교배 종자로부터 배배양 기술 확보 ○ In vitro에서 교배배와 주심배 판별 기술 확보	100
	○ 만감류 주심배 유도체 접목 및 순화 500 개체 이상	○ 기내에서 배양된 주심배 배양체를 탱자 대목에 접목 묘목 육성	100
	○ 만감류 주심배 특성 조사 및 연구	○ 부지화 미숙종자 유래 배양체의 변이 특성 조사 ○ 부지화 미숙종자의 세포학적 특성 조사	100
	○ 만감류 교배 라인 확보	○ 조숙성 감귤류 모본 부지화 부분 교배 조합 - 조생온주 (오이다, 성전온주) 모본× 부지화 부분 교배 및 교배 종자 기내 발아	100
4세부	○ 적육계 교배 및 교배실생 대량양성	○ 청견모본의 교배실생 4,000여주 확보 ○ 부지화의 교잡배 및 주심배 등 4,500주 확보 ○ 부지화 교잡배 및 주심배 조기 선발을 위한 SSR마커 선별 및 교잡배 일부 선발	100
	○ 조기 육종 및 육묘 시스템 구축	○ 조기 육묘 시스템 구축을 위한 시설 330㎡ 구축	100
	○ 교잡배 및 미숙배 구제를 위한 조직배양시스템 구축	○ 교잡배 및 미숙배 구제를 위한 조직배양 시설 66㎡ 조성 완료	100
	○ 유전자원 수집 및 등록 2건 등	○ 유전자원 영양체 3종 수집 및 유전자원센터 등록 3건	100

3. 3차년도(2015년)

과제 구분	연구개발의 목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1세부	○ 신규 교배	○ 핵심 종자친, 화분친 선정 교배	100
	○ 생장·결실 유도	○ 교배실생 고집 후 생장 유도	100
	○ 과실 특성조사	○ 선발개체 및 선행 연구과제에서 탐색	100
	○ 조숙, 무부피 개체 탐색	○ 선행 연구과제에서 탐색	100
2세부	○ 교배 및 실생 양성	○ 홍피 및 적육계 품종 교배 및 육묘 - 에히메28호×타로코 외 9조합, 3,619화 교배, 3,641개 종자 획득, 3,139주 실생 확보 ○ 클레멘틴×베니바에 외 1조합 교잡 실생묘 1,335주를 감귤 성목에 고집 후 1주지 생장유도	100
	○ 유전자원 등록	○ 국립농업과학원 농업유전자원센터 4점 등록 완료 (K251220~K251223)	100
	○ 우량계통 선발	○ 연내 수확 가능한 홍피 특성의 계통선발, JNM1(임시번호)	100
	○ 분자표지를 활용한 홍피 형질 조기 선발	○ SSR분자마커를 이용하여 하레히메×올란도 외 4조합 교잡 실생묘의 교잡 여부 판별 ○ 미네오라 외 3 품종의 re-sequencing data를 이용 하여 품종간 SNP, SSR marker 탐색	100
3세부	○ 만감류 주심배 사배체 유도기술 확보	○ 부지화, 발렌시아오렌지, 바담 오렌지, 레몬, 하귤 등 감귤류에 오리자린 처리를 통해 4배체를 유도하고, 4배체 식물체 확인 ○ 기내 배양체의 배수체 유도 기술 확보	100
	○ 만감류 교배종자 유도체 조합 100개체 이상 접목 및 순화	○ 교배종자 기내 발아체 174 라인을 탱자 대목에 접목하여 묘목 육성	100
	○ 만감류 주심배 유도체 접목 및 순화 500 개체 이상	○ 기내에서 배양된 주심배 배양체를 732라인을 탱자 대목에 접목 묘목 육성	100
	○ 만감류 주심배 우량계통 선발 1건 이상	○ 품종보호출원용 1 계통, 품종 특성 평가용 1 계통을 선발	100
4세부	○ 우수계통선발 등	○ 우수계통선발 및 출원 1건 ○ 육종의 효율성 향상을 위한 접목 자재 특허출원 1건	100
	○ 부지화 모본의 교잡배 선발	○ 교잡배 및 주심배 SSR마커 분석 ○ 교잡배 및 주심배 등 3800여 개체 이상 확보	100
	○ 단배성(모본) 품종의 교배실생 획득	○ 단배성(청건, 에히메28호, 클리멘타인) 모본 교배실생 18,000여주 확보	100
	○ 유년성 단축을 위한 보조가온시설 및 노지포장 방풍망 조성	○ 조기 육종 및 육묘 시스템 구축 을 위한 시설 구축 ○ 교배 효율성을 높이기 위한 모수 및 유전자원 포장 방풍망 조성(660m <sup>2</sup> )	100

4. 4차년도(2016년)

과제 구분	연구개발의 목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1세부	○ 신규 교배	○ 핵심 종자친, 화분친 선정 교배	100
	○ 육묘 및 접목	○ 교잡실생 육묘 및 탱자 절접	100
	○ 과실특성조사	○ 선발개체 및 선행 연구과제에서 탐색	100
	○ 조숙, 무부피 개체 탐색	○ 선행 연구과제에서 탐색	100
2세부	○ 교배 및 실생 양성	○ 홍피 및 적육계 품종 교배 및 육묘 - 피나소테아×올란도 외 14조합, 9,857화 교배, 28,247개 종자 획득 후 교배조합 별 육묘 중 ○ 하레히메×올란도 외 6조합에서 획득 한 교잡실생묘 2,057주를 감귤 성목에 고접 후 1주지 생장 유도	100
	○ 유전자원 등록	○ 국립농업과학원 농업유전자원센터 5점 등록완료 (K256365~K256369)	100
	○ 식물특허 출원	○ 우량계통 JNM1을 이용하여 특허 출원 완료	100
	○ 홍피 형질 연관 분자마커 탐색	○ 비교 유전체 분석, 문헌 분석 및 플라보노이드/ 카로티노이드 생합성 대사 경로 유전자 기반의 홍피 형질 관련 SNP 분자마커 발굴, (주)바이오메딕과 협력 연구	100
4세부	○ 우수계통선발 등	○ 우수계통선발	100
	○ 부지화 모본 이용 교잡배 선발	○ 교잡배 및 주심배 SSR마커 분석 ○ 교잡배 및 주심배 등 3,750여 개체 이상 확보	100
	○ 단배성(모본) 이용 교배실생 획득	○ 단배성(청견, 에히메28호, 클리멘타인) 모본 교배실생 5,000 여주 확보	100
	○ 지식재산권 확보	○ 품종명칭등록 3건 ○ 상표등록 6건 ○ 생산판매신고 2건 ○ 식물특허출원 1건	100

Ⅲ. 연구개발의 목적 및 필요성

국내 감귤산업은 최근 3년간 평균 생산액 및 생산량 각각 6,500억원 및 65만톤을 상회하고, 농가수도 30,797호(제주농가의 80%)를 차지하지만, 재배면적은 2000년 이후, 생산량은 2007년 이후 점차 감소하는 추세이다. 최근 미국 오렌지 수입량의 급증, 이스라엘 오렌지 및 자몽 수입

의 증가 등에 따른 국내시장에서의 외국산과의 경쟁심화로 감귤 산업경쟁력 향상이 절실한 실정이다. 또한 최근 이상기후에 따른 병해충 다발생, 고품질 생산비용의 증가로 고품질 과실의 안정적 생산이 크게 위협받고 있어 산업경쟁력이 약화되고 있다. 또 온주밀감은 낮은 당도, 부피성 등으로 인하여 품종 개량이 시급하나 응성불임 및 다배성의 특성을 갖고 있어 교잡에 의해 다른 형질을 도입하기 어려운 실정이고 실질적으로 교잡에 의한 온주밀감 품종을 개량한 사례는 전혀 없다.

감귤은 신품종 개발에 대한 육종적 접근이 어려운데 반하여, 품종개발 성과에 따라서는 산업경쟁력이 크게 달라지는 기회요인을 가지고 있다. 따라서 기존 감귤육종 기관인 국립원예특작과학원 감귤연구소, 제주특별자치도 농업기술원, 제주대학교와 더불어 Golden Seed 프로젝트에 참여한 민간 기업의 유기적인 협동연구를 통하여 육종기반을 확대 강화하여 종자산업 육성을 통한 감귤산업의 국제경쟁력을 높일 필요성이 있다. 따라서 본 과제는 최근의 소비자의 트렌드를 적극 반영하여 만다린류 중에서 단배성의 유전자원을 이용하여 연내 수확 가능하면서 고품질이고 부피발생이 없는 온주밀감과 유사한 만다린 품종개발, 기존 감귤 색과 차별화된 숙기가 빠르고 홍피색 과피를 갖는 만다린 품종개발, 연내 조기 수확이 가능한 주심배 유래 만다린 품종개발, 적색 과육에 껍질을 쉽게 벗길 수 있는 품종개발 등을 통하여 소비자의 다양한 기호도 요구 충족, 감귤 소비 촉진, 새로운 시장창출 및 기존 품종과의 유통차별화를 할 수 있을 것으로 사료된다. 특히 적육 계통의 품종은 자몽 및 오렌지 계통이 대부분으로 과육이 붉고 껍질 벗기기가 용이한 만다린 품종은 아직 상업화 되지 못했고, 적육에 의한 기능성 강화로 고기능성 성분을 이용한 2차 가공산업의 활성화도 추가로 기대된다. 따라서 위와 같은 우수한 감귤 품종의 농가 보급을 통하여 UPOV와 FTA등과 같은 대외적인 시련을 극복하고 제주지역 감귤산업의 지속적 발전과 농민 수익 증대, 일본 품종 재배로 인한 로열티 지급에 효과적으로 대응 할 것이다.

#### IV. 연구개발 내용 및 범위

과제구분	연구개발의 목표	연구개발 수행내용
1세부	○ 연내 수확 가능한 종자친, 화분친 선정 교배	○ 목표형질 자원이용 신규교배 - 매년 5월에 5~6 교배조합 구성 교배실시
	○ 교배실생 육묘 및 조기결실 유도	○ 교배실생 육묘 - 전년도 교배종자 파종 - 발아 후 조기 녹화 유도 및 교배실생 육묘 ○ 조기 생장 및 결실 유도 - 조기 생장 유도: 지주대 설치 - 결실 유도: 4년생 탱자에 절접 및 중간대목을 온주밀감 이용 고접실시
	○ 선발개체 및 선행 연구과제에서 탐색	○ 선발개체 과실 특성조사 - 조사시기: 11월 상순~12월 하순, 6회 - 조사개체수: 예비선발 5개체 - 조사항목: 과중, 당도, 산함량, 과피두께, 종자수 등 ○ 조숙, 무부피 과실착과수 탐색 - 선행연구 교잡실생: 50조합-조기 착색과 50개체 - 조사항목: 착색도, 과중, 당도, 산함량, 부피여부, 종자수 등 - 조사시기: 11월 상순~12월 하순
	○ 조숙, 난부피성 품종 육성 효율 증진	○ 성숙기 및 부피관련 유전자 탐색 - 기 탐색된 primer(SRAP) 이용 및 신규 primer 탐색 - 성숙기 관련: 온주밀감에서 숙기별 품종에서 관련 유전자 탐색 - 부피유무 관련: ‘청건’x‘진귤’ 등 2교배조합에서 난부피성 및 부피가 심한 개체를 대상으로 관련 유전자 탐색

과제 구분	연구개발의 목표	연구개발 수행내용
2세부	○ 교배 및 실생 양성	○ 홍피 및 적육계 품종 교배 및 육묘 ○ 조기개화를 유도하기 위하여 교잡실생묘를 감귤 성목에 고접 후 1주지 생장 유도
	○ 유전자원 등록	○ 국립농업과학원 농업유전자원센터에 등록
	○ 우량계통 선발	○ 연내 수확이 가능하고 과피색이 홍색을 띠는 계통 선발
	○ 식물특허 출원	○ 우량계통 JNM1을 이용하여 특허 출원 완료
	○ 분자표지를 활용한 홍피 형질 조기 선발 및 형질 연관 분자마커 탐색	○ 홍피 및 비홍피 감귤 품종의 re-sequencing data를 이용하여 품종간 SNP, SSR marker 탐색 ○ 비교 유전체 분석, 문헌 분석 및 플라보노이드/카로티노이드 생합성 대사 경로 유전자 기반 홍피형질 분자마커 발굴
3세부	○ 만감류 주심배 in vitro 육종 기술 확보	○ 만감류 미숙 종자 주심배 유도 및 배배양 기술 확보
	○ 만감류 주심배 유도체 접목 및 순화	○ 기내 배양체의 기외 순화 및 순화체 탱자 접목하여 주심배 유도체 확보
	○ 만감류 주심배 특성 조사 및 연구	○ 부지화 미숙종자 유래 배양체에서 결실된 라인에서 착과된 감귤류의 착색, 결실 시기 및 당도, 산도, 특성을 조사하고 특성 평가
	○ 만감류 교배 라인 확보	○ 조생온주(오이다, 성전온주)×부지화 교잡종자 기내 발아 ○ (삼전네이블, 하례조생, 궁천조생)×부지화 교잡종자 기내 발아 ○ 재래홍귤×부지화 교잡종자 기내 발아
	○ 만감류 유전자원 수집	○ 국내 미도입 우수 만감류 유전자원 수집
4세부	○ 적육 관피 만다린 품종 개발을 위한 교배조합 확보	○ 적육 관피 유전 형질을 보유한 유전자원(모로, 상귀넬로, 타로 코등)을 교배부분을 이용하여 단배성인 청건, 에히메28호, 하례히메, 클레멘타인 등과 다배성 모본인 부지화 등을 이용하여 교배 및 교잡배 선발
	○ 유용 유전자원 수집 및 등록	○ 해외에서 유용 유전자원 수집하여 국립유전자원센터에 등록
	○ 유년성 단축을 위한 육묘 체계 구축 및 조기 결실 유도	○ 조기 육묘체계 구축을 위한 보조 가온시설 구축 ○ 조기 착과가 가능한 교배조합으로 교잡배 선발 ○ 탱자, 스윙글 2년생 묘목을 이용하여 포트접목 후 정식하여 신초 유인 및 노지성목을 이용한 고접
	○ 다배성 모본에서의 교잡배 조기 선발	○ 다배성인 부지화 품종을 모본으로 교잡개체의 조기 선발방법 모색 ○ 교배일수별 종자를 채집하여 분자마커를 이용하여 적정 교배종자 수확시기 판별
	○ 착과 계통 과실특성 조사 및 우수계통 선발	○ 착과된 개체 및 선발된 개체에 대한 표현형질 등의 특성 조사
	○ 품종보호출원 ○ 특허출원 ○ 기타	○ 품종보호출원, 특허출원, 상표등록 등



## V. 연구개발결과

### 1. 연내 수확용 부피경감 온주밀감 품종개발

2013년부터 2016년까지 4개년동안 교배되어진 조합 수는 30조합이었고, 이중 6조합에서는 종자가 형성되지 않았으며 나머지 24조합에서 13,648립의 종자를 획득하였다. 이들 종자들은 비닐하우스 내에 설치된 육묘상에 파종하여 발아된 실생을 관리하고 있다. 일부 교잡실생은 탱자를 대목으로 절접을 실시하였고, 선행과제에서 탐색되어진 유망개체는 탱자에 절접 또는 온주밀감을 중간대목으로 한 고접을 실시하여 관리 중이다. 선행과제에서 수행되어진 결과물에서 35개체에서 목표 부합 형질을 보유하고 있는 개체 중 1차 선발된 개체는 총 4개체였고, 이중 2개체는 직무육성 신품종으로 선정되었다. 또한 유망 시 되는 20여 개체는 계속 관찰 중에 있다. 온주밀감의 주심배실생을 얻고자 수행되어진 교배실생 중에서 교잡이 이루어진 개체를 탐색하고자 RAPD 및 SSR 마커를 선발하였고, 이를 이용하여 교잡실생묘를 판별하였다. 또한 육종목표 중의 하나인 무핵성과 관련된 마커는 탐색되었으나, 품종간 성숙기와 관련된 마커의 탐색은 실패하였다. 온주밀감 재배에서 가장 큰 난제인 부피와 관련하여 관련형질을 교잡실생을 이용하여 관련 마커도 탐색되었다. 연구기간동안 3개국을 방문한 결과, 중국의 감귤연구소와는 국제공동과제를 수행하기로 협약된 이후 3년 기간의 과제를 수행 중에 있다. 캄보디아 출장에서는 열대지역에 적합한 감귤류의 육종방향을 설정할 수 있었고, 현지 교포가 원할 경우 현지 재배시험을 실시하기로 하였다. 미국 출장에서는 우리가 개발한 ‘탐나는봉’의 검역과정 및 육묘준비 상황, 재배예정지 점검 등이 이루어 졌다. 미국에는 2017년부터 본격적으로 묘목증식 사업이 시작될 것이다.

### 2. 조숙 홍피 만다린 품종개발

클레멘틴×베니바에 외 33개 조합에서 17,544화를 교배 하였고, 2,882개의 과실을 수확 하였으며 37,222개의 종자를 획득 하였다. 또한 14,359개의 교잡실생묘를 확보 하였다. 감귤 성목을 중간대목으로 활용하여 획득 한 교잡묘를 고접하고 1주지 유인 생장 및 수평 유인 생장을 통해 조기 개화 및 착과를 유도하고자, 3,763개의 교잡실생개체를 (주제농 소유 와홀리 소재 연구 포장의 비가림하우스 및 노지 포장의 감귤 나무에 고접을 실시하였다. 2014년 고접한 자연수분 유래 클레멘틴·리·56-423 실생 개체 중 7개체가 착과 되어 과실특성을 조사 하였다. 리를 모본으로 하여 착과된 실생 개체의 과실특성을 조사 한 바 과중은 150~300g, 과형지수는 103~130이며 원형 또는 편원형의 형태를 나타내고 있으며 당도는 11 °Brix내외 이며 산함량이 0.8 이하여서 당산비는 우수하게 확인 되었으나 과형의 모양이 기존 재배되고 있는 만다린 품종에 비하여 상대적으로 떨어지는 원추형의 모양을 띠는 개체가 있고, 과경 부위에 요철이 발생한 품종이 있었다. 과립의 양은 기존 품종에 비하여 매우 부족하였고, 과심이 치밀하지 못하여 빈공간이 많이 보였다. 과피색은 a 값이 30 정도를 나타내어 연한 주황색을 띠었다. 클레멘틴을 모본으로 한 실생에서는 과피색의 a 값이 35이상을 나타내는 개체가 있었으나, 내부에 종자가 다수 발생 하였고, 과중이 80g 정도인 소형과 이며, 과형지수가 140으로 편구형의 특성을 나타내어 기존 만다린 품종에 비하여 품질이 떨어지는 특성을 확인 할 수 있었다. 연내수확이 가능

하고 홍피색 특성을 띠는 우량계통인 JNM1은 헤히메28호×병감 조합의 교잡실생 개체이다. 수확기는 12월에서 1월로 에히메28와 유사하다고 할 수 있다. 과피의 색이 홍색(착색 a 값 : 35 이상)이다. 종자가 생기고 발생된 종자는 단배성의 특성을 가지고 있다. 과중은 약 110g이며 에히메28호에 비해 적다. 과형지수는 120 정도이며 편원형의 특징을 가지고 있다. 과피의 두께는 에히메28호에 비해 조금 얇다. 착색은 JNM1이 11월 27.76을 보이며 계속적으로 과피의 색이 진해지는 경향을 확인 하였다. 당도 또한 12월에 12°Brix를 보이다가 1월에는 13°Brix를 보이고 있다. 하지만, 산함량은 에히메28호 비하여 상대적으로 떨어지는 시기가 늦다고 할 수 있다. JNM1이외에 에히메28호×병감 조합의 교잡실생 개체 중 일부 개체를 선발하여 계속적으로 과실의 특성을 조사하였다. 분자표지를 활용하여 홍피 형질을 조기에 선발하고자 미네오라 외 3품종의 re-sequencing data를 이용하여 품종간 SNP, SSR marker를 탐색하였다. 또, SSR분자마커를 이용하여 에히메28호×병감 조합에서 유래한 비홍피 3계통(11-10, 11-26, 11-129)와 홍피 2계통(11-49, 11-132)의 교잡 여부를 판별하였다. 홍피 연관 분자마커는 감귤 품목의 I 프로젝트 2세부과제(과제명 : 감귤 주요형질 연관 분자표지 개발, 연구기관-(주)바이오메딕, 연구책임자-김호방)와의 협력연구를 통해 수행하였다.

### 3. 조속 강세 만다린 품종개발

조속 강세 만다린 품종을 개발하기 위하여, 부지화의 미발달종자의 배배양을 통해 유식물체들 유도하였다. 이들을 대목에 접목시키고, 부지화 품종과는 형태적으로 차이가 있고, 속기가 빠른 계통을 선발하고 과실의 특성을 조사하였다. 선발된 계통은 2017년도 상반기 품종출원 예정에 있으며, 시범포 조성을 위한 묘목을 생산하였다. 부지화와 온주를 교배 조합으로 한 발아체를 만들고, 이들로부터 교잡체와 주심배 유도체를 구분하기 위하여 SSR-maker를 개발하고, 교잡체 구분 기술을 확립하였다. 발렌시아 오렌지와 레몬의 배양체를 대한 oryzarin 처리를 통해 배수체를 유도하고 안정적인 4배체를 확인하고 4배체 유도 기술을 확립하였다.

### 4. 적육 관피 만다린 품종개발

본 연구는 2013~2016년 제주 제주시 화북동에 위치한 한농바이오산업(주) 기업부설육종연구소 육종포장에서 단배성 유전특성을 지닌 품종인 ‘청견’, ‘에히메28호’, ‘클레멘타인’ 등을 모본으로 적육계 특성을 지닌 ‘상귀넬리’, ‘모로오렌지’, ‘타르코오렌지’ 등의 블러드오렌지와 ‘병감’ 품종 등의 화분을 이용하여 교배를 실시하여 1차년도 약 3,700개, 2차년도 약 4,200개, 3차년도 약 18,000개, 4차년도에는 약 5,200개의 교잡 종자를 획득하여 육묘하고 있다. ‘레드산타(분류명 D2VBK139)’는 ‘에히메28호’와 ‘병감’ 품종을 교배하여 2015년 품종보호출원을 하였다. 외형적 특성으로는 과피색이 매우 붉고 껍질 벗김이 용이하다. 당도가 높고 산도는 조기에 감소되는 특성을 나타낸다. 일반적인 비가림하우스 재배에서 크리스마스를 전후하여 수확이 가능할 것으로 판단되어 품종명을 ‘레드산타’라 명명하여 국립종자원에 품종보호출원을 하였다. 그리고 일남1호의 아조변이로부터 선발된 ‘타라타라 극조생’은 대조구(일남1호)에 비해 수확기 당도가 2°Brix 정도 높으며 산도는 다소 낮은 경향을 보였으며 과육색과 과피색 등의 형태적인 차이를 보여 식물특허를 출원하였다. 또한 접목 후 대목 부위에 발생하는 순을 제거하는 작업에 따른 인건비 절약과 접목작업 및 관리의 효율성을 높이기 위하여 대목 부분 순

발생 억제용 피복자재를 개발하여 특허출원하였다. 적육계 품종 육종을 위해 국내에서 확보할 수 없는 유전자원과 형질을 수집 및 도입하여 육종을 위한 유전자원의 다양성을 확보함으로써 품종육성, 유전연구 및 생명공학 연구재료로 확보하여 향후에도 지속적으로 육종에 사용될 유전자원을 수집하여 국립유전자원센터에 12점을 등록하였다. 다배성 특성을 지닌 부지화 품종에서 교잡배를 선발하기 위하여 인공수분 후 90, 105, 125, 145, 180일에 과실을 채취하여 배분리 배양하였다. 인공수분 후 일수에 따라 배의 갯는 증가하는 경향을 나타내었으며, SSR 분석결과 수확 후 90일에서 교잡배 비율이 12%로 가장 높게 나타났다. 본 연구를 통해 선발된 품종과 국내 품종의 보급을 위해 선발실증포장 및 재배시험포장의 확대 운영하고 국내보급을 위한 묘목 생산과 해외 보급을 위한 해외바이어와 MOU체결 및 해외적응성시험을 본격적으로 시작될 것이다.

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

본 과제에의 연구성과 결과로는 특허출원 4건, 품종명칭등록 3건, 우량계통선발 7건, 품종보호출원 1건, 유전자원등록 24건, SCI 논문 1건, 국내외 학술발표 6건 등이다. 상기의 연구성과를 바탕으로 하여 향후 품종보호출원을 추가적으로 진행하고 이후 통상실시를 통하여 우수 품종을 농가에 보급할 것이다. 또한, 우리 과제에서 선발한 우수 품종의 시험포를 조성하여 현장평가를 진행하고 이들 품종을 중심으로 품평회 및 홍보를 실시하여 품종을 널리 알리고 학술발표대회에서 이들 품종에 대해 발표할 예정이다. 또한 선발된 품종과 국내 품종의 보급을 위해 선발실증포장 및 재배시험포장의 확대 운영하고 국내보급을 위한 묘목 생산과 해외 보급을 위한 해외바이어와 MOU체결 및 해외적응성시험을 본격적으로 시작될 것이다.

# SUMMARY

It is difficult to develop new varieties through citrus breeding. Depending on the performance of the varieties, it will contribute to the continuous development of the citrus industry in Jeju. There is a need to enhance the international competitiveness of the citrus industry by cultivating the seed industry and expanding the breeding base through organic cooperative research of private companies participating in the Golden Seed project along with the existing citrus breeding organization National Institute of Horticultural and Herbal Science Citrus Research Institute, Jeju Special Self-governing Province Agricultural Research and Extension Service and Cheju National University. This project is composed of four sub\_project reflecting the recent consumer trends (ex, Development of mandarin cultivar having early-maturing and within the year characteristics, Development of mandarin cultivar having early-maturing and reddish peel characteristics, Developing of Early Fruiting and Vigorous Mandarin Cultivar and Development of new citrus mandarin varieties with red pulp and loose-skin). We hope that the new citrus varieties developed by our project will meet the diverse needs of consumers, promote citrus consumption, create new markets and distinguish them from existing varieties. Finally, we will overcome external trials such as UPOV and FTA through the supply of superior new citrus varieties, and will respond effectively to the continuous development of the citrus industry in Jeju, to increase farmers' profits, and to provide royalties for cultivating Japanese varieties.

## **1. Development of mandarin cultivar having early-maturing and within the year characteristics**

This project was carried out with the aim of developing mandarin hybrid varieties which can be harvested within the year, and reduced the occurrence of rind puffing significantly. During the study period, 13,648 seeds were obtained from 24 crossing combinations, some of which were grafted to the trifoliate orange. and the prospective seedlings obtained in a previous study were top-grafted with using Satsuma mandarin as an intermediate stock. In the previous study, 35 seedlings matched the project goal were investigated. And 4 of them were primary selected by priority. Then two seedlings from the primary selection were selected as new varieties in 2016. Also we are keeping on observation of 20 promising seedlings. In order to find the hybrid seedling among nucellar seedlings, DNA primers were developed with using RAPD and SSR markers, and markers for seedless seedling were developed as well. We also found markers related to rind puffing but no markers related to maturation period.

## **2. Development of mandarin cultivar having early-maturing and reddish peel characteristics**

This Research was carried out to develop a new mandarin cultivar having early-maturing and reddish peel characteristics. In this project, we achieved all the goals of plant patents, selection of good mandarin variety lines, and registration of genetic resources. In the Clementine×'Benibae' and other 33 combinations, 17,544 flowers were crossed, 2,882 fruits were harvested and 37,222 seeds were obtained. In addition, 14,359 hybrid seedlings were obtained. In order to induce early flowering and fruiting, 3,763 hybrid seedlings were grafted on citrus tree and cultivated the one stem induction and horizontal induction of growth. 7 hybrid individuals of Clementine, 'Lee', and '56-423' which were originated from natural pollination, fruit characteristics were investigated. These individuals grafted on a citrus tree in 2014. As a result of examining the fruit characteristics of the hybrid seedlings of 'Lee', the fruit weight was 150~300g and the shape index of fruit was 103~130. The shape of the fruit is circular or round oblate, the sugar content is around 11 ° Brix and the acid content is less than 0.8. The skin color is light orange and the a value measured by color-difference meter is 30. In the case of the hybrid seedlings of Clementine, a value is 35 or higher in the skin color. But seeds were found in the inside, and the fruit was small sized with a weight of 80g. The shape of the fruit is oblate spheroid, and the shape index of fruit is 140. Therefore, it was confirmed that the quality was lower than that of existing mandarin varieties. JNM1 is an excellent hybrid seedlings of 'Ehime Kashi 28 gou' × 'Ponkan' cross combination, which can be harvested in the year and has the characteristic of reddish peel. The harvest season is similar to 'Ehime Kashi 28 gou' from December to January. That hybrid seedlings have reddish peel characteristics (a value : 35 or more). The seeds are produced and have the property of mono-embryony. The weight is about 110g and less than 'Ehime Kashi 28 gou'. The shape index of fruit is around 120 and has the characteristic of round oblate. The thickness of the skin is slightly thinner than 'Ehime Kashi 28 gou'. The a value of JNM1 showed 27.76 in November, and the reddish peel color gradually becomes thicker. The sugar content is 12 ° Brix in December and 13 ° Brix in January. The decrease in the amount of acidity is delayed compared with 'Ehime Kashi 28 gou'. In addition, some of the hybrid seedlings of the 'Ehime Kashi 28 gou' × 'Ponkan' cross combination were selected and fruit characteristics were investigated. In order to early select the reddish peel's hybrid seedlings using molecular markers, The SNP and SSR markers were searched using re-sequencing data of 'Minneola', 'Benibae', 'Seminole', and 'Sweetspring'. In addition, SSR molecular markers were used to determine the hybridization of the non-reddish peel 3 lines (11-10, 11-26, 11-129) and the reddish peel 2 lines (11-49, 11-132) Respectively.

### **3. Developing of Early Fruiting and Vigorous Mandarin Cultivar**

To develop the early ripening mandarin varieties, plantlets were induced by cultivation of undeveloped seeds from Shiranui mandarin. These plantlets were applied to the rootstock, and then citrus fruit which was morphologically different from Shiranui mandarin

cultivars was selected and their characteristics were investigated. The selected line is planned to be applied for the registration in the half of 2017, and seedlings were produced for the making demonstration field. We have developed a SSR-maker to distinguish hybrid from nucellar, and established the hybrid discrimination technique. The oryzalin treatment to the cultivars of Valencia orange and lemon led the induction of polyploids, the identification of stable tetraploids, and the establishment of four-fold induction technique.

#### **4. Development of new citrus mandarin varieties with red pulp and loose-skin**

The Hannong Bio Industry is located in Jeju Jeju-si Hwabuk-dong. Between 2013-2016, from 'Hannong Bio Industry', affiliated breeding institute's has developed new varieties. It was cross-breeding with between 'Kiyomi' (*Citrus unshiu* × *C. sinensis*), 'Ehime Kashi No. 28' (*C. sinensis* 'Nankou' × 'Amakusa'), 'Clementine' (*C. clementina*) and Sanguinelli' (*C. sinensis*), Moro (*C. sinensis*), Tarroco (*C. sinensis*) orange. Through this crossing, about 3,700 varieties were obtained in the first year, about 4,200 varieties in the second year, about 18,000 varieties in the third year, and about 5,200 varieties in the fourth year. The 'Redsanta' is protected by Korea Seed & Variety Service. It was cross-breeding with 'Ehime Kashi No. 28' (*C. sinensis* 'Nankou' × 'Amakusa') and 'Ponkan' (*C. reticulata*). The appearance characteristics are very red, easy to peel and have high sugar content. Also, The 'TaraTara' is early type mandarine and selected from the bud mutation 'Nichinana No. 1' (*C. unshiu*). It has higher sugar content (approximately 2%), lower acid than the 'Nichinana No. 1' and also it has different flesh and peel colour. From 2013 to 2016, new genetic resources were continuously imported for the citrus breeding and registered 12 new varieties in National Agrobiodiversity Center. The fruit was harvested at 90, 105, 125, 145 and 180 days after pollination in order to select the zygotic plants from the 'Shiranuhi' Mandarin [(*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*]. The number of embryo tends to increase by day after pollination and the ratio of zygotic embryo at 90 days after harvesting was the highest at 12%.

# CONTENTS

<b>Chapter 1 Outline of research and development</b> .....	<b>16</b>
Passage 1. Objective of research and development .....	16
Passage 2. Necessity of research and development .....	16
Passage 3. Goals and achievements of research and development .....	17
<b>Chapter 2 Present state of research and development</b> .....	<b>19</b>
Passage 1. Domestic Technology Level and Market Status .....	19
Passage 2. International Technology Level and Market Status .....	19
<b>Chapter 3 Experiments, results, and discussion</b> .....	<b>21</b>
Passage 1. Development of mandarin cultivar having early-maturing and within the year characteristics ..	21
Passage 2. Development of mandarin cultivar having early-maturing and reddish peel characteristics .....	45
Passage 3. Developing of Early Fruiting and Vigorous Mandarin Cultivar .....	70
Passage 4. Development of new citrus mandarin varieties with red pulp and loose-skin .....	92
<b>Chapter 4 Attainment of goal and contribution to society</b> .....	<b>111</b>
Passage 1. Attainment of goal of research and development .....	111
Passage 2. Contribution to society .....	114
<b>Chapter 5. Outcome and application plan of research and development</b> .....	<b>116</b>
Passage 1. Outcome of research and development .....	116
Passage 2. Application plan of research and development .....	120
<b>Chapter 6 Collected international scientific information</b> .....	<b>122</b>
<b>Chapter 7 Reference</b> .....	<b>123</b>

# 목 차

<b>제1장 프로젝트의 개요 및 성과목표</b> .....	16
제1절 연구개발의 목적 .....	16
제2절 연구개발의 필요성 .....	16
제3절 연구개발 목표 및 성과 .....	17
<b>제2장 국내외 기술개발 현황</b> .....	19
제1절 국내 기술수준 및 시장현황 .....	19
제2절 국외 기술수준 및 시장현황 .....	19
<b>제3장 연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	21
제1절 연내 수확용 부피경감 온주밀감 품종개발 .....	21
제2절 조숙 홍피 만다린 품종개발 .....	45
제3절 조숙 강세 만다린 품종개발 .....	70
제4절 적육 관피 만다린 품종개발 .....	92
<b>제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b> .....	111
제1절 연차별 연구개발 수행내용 및 목표 달성도 .....	111
제2절 관련 분야에의 기여도 .....	114
<b>제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획</b> .....	116
제1절 연구성과 목표 대비 실적 .....	116
제2절 성과활용 계획 .....	120
<b>제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b> .....	122
<b>제7장 참고문헌</b> .....	123



# 제 1 장 프로젝트의 개요 및 성과목표

## 제1절 연구개발의 목적

제주감귤은 ‘대학나무’라고 불릴 정도로 소득이 매우 높았고, 1964년부터 농어민소득증대사업에 따른 정부의 지원으로 급속히 재배면적이 늘어나기 시작하여 이후 40년 이상 온주밀감을 중심으로 지속적인 발전을 계속하여 왔다. 1990년대에 감귤 수입이 개방되면서 대체과일과의 경쟁이 이루어졌다. 2015년 기준 제주지역 감귤재배면적은 20,523ha이고 생산량은 635,000톤, 조수입은 6,022억 원이다. 만감류는 통상적으로 온주밀감보다 늦게 수확하는 감귤을 모두 포함하여 불리고 있다. 만감귤 재배면적은 2015년 2,112ha, 생산량은 67,406톤이고 조수입은 1,988억 원이다. 제주지역 농산물 조수입의 절반 이상을 감귤이 차지하고 있을 만큼 제주지역에서 감귤이 차지하는 비중은 매우 크다. 하지만 현재 제주에서 재배되고 있는 품종의 대부분은 일본 품종이며, 국내 육성 감귤 품종의 보급률은 매우 미흡하다. 또, 2013년 1월부터 신품종보호연명(UPOV)의 전면 발효에 따른 감귤 신품종에 대한 로열티 지급 분쟁 발생의 우려와 한미 FTA 및 한중 FTA 발효에 따른 감귤산업의 경쟁력 제고방안이 시급히 요청되어지고 있다. 감귤육종은 교배에 의해 종자를 획득하고 개화 후 열매를 맺기 까지 10년 이상이 소요되는 유년성과 수정 후 하나의 종자에 여러 개의 배를 갖는 다배성으로 인해 육종이 매우 어려운 작물이지만, 미국, 이스라엘, 일본 등 감귤 육종 선진국에서는 공공 영역은 물론 민간 영역의 육종 기반이 확대되어 국가 중요 경쟁력을 높이고 있고, 품종개발 성과에 따라서는 산업경쟁력이 크게 달라지는 기회요인을 가지고 있어 공공부분과 민간부분이 상호 협력을 통해 육종기반을 확대 강화하여 종자산업 육성을 통한 감귤산업의 국·내외 경쟁력을 높을 필요성이 대두되고 있다. 따라서 본 프로젝트를 통해 공공과 민간부분의 협업을 이루어 우수한 감귤 품종을 개발하고 농가에 보급하여 UPOV와 FTA등과 같은 대외적인 시련을 극복하고 제주지역 감귤산업의 지속적 발전과 농민 수익 증대, 일본 품종 재배로 인한 로열티 지급에 대응하는데 본 연구과제의 목적이 있다.

## 제2절 연구개발의 필요성

전 세계 감귤 품종 중 우리나라 기후에서 연내 수확 가능 품종은 온주밀감이 유일하며 열과성, 탄저병 저항 및 가지변이에 의해 생겨난 조숙성이 회귀되지 않는 점 등을 고려하여 조생온주 중 가장 결점이 적은 계통으로 선정하여 표준이 되고 있다. 이 온주밀감은 낮은 당도, 부피성 등으로 인하여 품종 개량이 시급하나 웅성불임의 특성을 갖고 있어 교잡에 의해 다른 형질을 도입하기 어려운 실정이다. 온주밀감을 종자친으로 한 수천 개의 실생 중에서 무핵, 내한성이며, 병해충 저항성이고 단배성이어서 육종친으로 활용 가능한 ‘청건’이 육성되면서 이후 많은 품종이 개발되었다. 그러나 이 새로 육성된 품종들은 당도가 높으나 온주밀감보다 높은 온도에서 제 특성이 발휘되고 대부분 만숙성이어서 시설 내에서 재배되어야 하는 품종들이다. 따라서 연내수확이 가능하면서 부피에 강하고, 시설이 없는 노지재배에서도 당도상승이 용이한 새로운 계통의 감귤 품종 육성이 필요한 것이다. 현재 생산되고 있는 부지화(한라봉), 세토카(천혜향)

등 시설 만다린은 2월 이후 수확해야 최고의 품질이 발휘되는 품종으로 연내 조기 출하 시 품질 저하 및 불균일한 품질 문제가 심각하므로 품질이 일정하게 보유하면서 연내 수확 가능한 연말연시 선물용 고품질 만다린 품종개발이 시급히 요청되고 있다. 또한 제주도 주요 재배품종인 온주밀감은 밝은 오렌지색으로 만다린 중 탄제린 계통의 붉은홍색 품종은 차별화된 경험을 소비자에게 제공할 수 있다. 따라서 홍색의 과피와 연내 수확이 가능한 만다린 품종 및 과육이 적육이며 껍질 제거가 용이한 차별화된 우수 만다린 품종개발로 감귤소비촉진 및 산업 경쟁력 제고가 필요하다. 특히 적육 계통의 품종은 자몽 및 오렌지 계통이 대부분으로 과육이 붉고 껍질 벗기기가 용이한 만다린 품종은 아직 상업화 되지 못했고, 적육에 의한 기능성 강화로 고기능성 성분을 이용한 2차 가공산업의 활성화도 추가로 기대된다. 따라서 위와 같은 우수한 감귤 품종의 농가 보급을 통하여 UPOV와 FTA등과 같은 대외적인 시련을 극복하고 제주지역 감귤산업의 지속적 발전과 농민 수익 증대, 일본 품종 재배로 인한 로열티 지급에 효과적으로 대응 할 것이다. 제주지역 만감류 재배는 지속적인 증가 추세이나 일부 품목에 집중되고 있는 실정이다. 민간육종 활성화로 감귤 신품종 개발 촉진 및 체계화된 묘목 생산 유통 체계를 구축하여 선진 종묘체계의 확산이 필요하며, 종묘산업의 우위선점이 요구되어진다.

### 제3절 연구개발 목표 및 성과

#### 1. 연구개발의 최종 목표 및 주요 내용

##### 가. 연구개발의 최종목표

본 프로젝트의 최종목표는 부피 되지 않고 시설 없이도 재배 가능한 연내 수확형 조숙성 밀감 품종 1개 선발, 조숙성이면서 과피색이 붉은 만다린 우수품종 1개, 우량계통 1개 선발, 조숙성이면서 수세가 강한 주심배 유래 만다린 우수품종 1개, 우량계통 1개 선발, 과육색이 붉으면서 껍질 벗기기 쉬운 만다린 우수품종 1개 우량계통 1개를 선발하는 것이다.

##### 나. 주요 내용

부피 되지 않고 연내 수확이 가능한 조숙성 밀감 품종을 개발하기 위하여 핵심 종자친과 화분친을 선정 후 교배를 실시하였고, 발아 후 조기 녹화 유도를 통하여 교배실생 유묘의 건실화를 도모하였다. 실생묘의 조기 결실을 유도하고자 4~5년생 탱자에 절접을 하거나 온주밀감을 중간대목으로 하여 고접을 실시하였다. 선발개체의 과실 특성조사를 수행하여 조숙·무부피 과실 착과수 탐색을 완료하였다. 다배성 종자친에서 교배종자는 대부분 종자친과 동일하지만 5% 내외의 개체는 교잡된 개체가 발생되므로 주심배실생 중 교잡개체 판별에 필요한 마커를 선발하였고, 신규교배 주심배실생에 적용할 프라이머도 개발하였다. 또한 연내 수확 및 부피 유무를 조기에 판별하고자 온주밀감에서 숙기별로 관련 유전자를 탐색하였고, 교잡실생 및 난부피성 및 부피가 심한 온주밀감 품종을 대상으로 관련 유전자를 탐색하였다. 본 과제의 연구연과를 이용 특허출원, 우량계통 선발, SCI 논문 발표, 국내외 학술발표를 완료하였다.

홍피계 만다린 우수 품종을 육성하기 위하여 교배 실생 개체를 대량으로 양성하고자, 홍피

및 적육계 특성을 지닌 감귤 품종을 교배 양친으로 선정하여 교배를 실시하였고, 교배 조합별 착과 된 과실에서 종자를 채취하고 위 종자를 유리온실, 폐쇄형식물공장 등에서 발아를 유도하고 24구 및 12구 육묘포트를 이용하여 획득한 교잡실생개체의 조기 생육을 유도하고, 온주밀감 성목을 중간대목으로 하여 확보 한 교배조합별 교잡실생개체를 고접 후 1주지로 생장시키며 조기 개화 및 착과를 유도하였다. 또한 국내 미등록 우수 감귤 유전자원을 도입 하여 본 과제에 활용하며, 조숙 홍피 특성을 가진 우수 계통을 선발하고, 분자표지를 활용하여 조기에 효과적으로 홍피형질의 조합 개체를 선발 할 수 있도록 연구를 추진하였고 본 연구를 통하여 획득한 결과물을 이용 특허를 출원 하였다.

조숙 강세 만다린 품종을 개발하기 위하여, 부지화의 미발달종자의 배배양을 통해 유식물체들을 유도 하고 이들을 대목에 접목하였다. 부지화 품종과는 형태적으로 차이가 있고, 속기가 빠른 계통을 선발하고 과실의 특성을 조사하였다. 부지화와 온주를 교배 조합으로 한 발아체를 만들고, 이들로부터 교잡체와 주심배 유도체를 구분하기 위하여 SSR-maker를 개발하고, 교잡체 구분 기술을 확립하였다. 발렌시아 오렌지와 레몬의 배양체를 대한 oryzarin 처리를 통해 배수체를 유도하고 안정적인 4배체를 확인하고 4배체 유도 기술을 확립하였다.

적육 관피 만다린 우수 품종을 개발하기 위한 교배조합은 유전변이가 높고 조기착과가 가능한 단배성 품종과 형질이 우수하다고 판단되는 다배성 품종을 교배모본으로 하였으며 적육계 관피 형질을 보유한 유전자원을 교배 부분으로 이용하였다. 다배성 모본을 이용한 교잡배 선발을 위한 적정 수확시기를 규명하기 위해 수분 후 90, 105, 125, 145, 180일에 과실을 채취하여 배분리 배양을 실시하였다. 수분 후 일수에 따라 배의 개수는 점점 증가하는 경향을 나타내었으며, SSR 분석결과 인공수분 후 90일에서 교잡배 비율이 12%로 가장 높게 나타났다. 적육계 품종 육성을 위해 국내에서 확보할 수 없는 유전자원과 우수한 형질을 수집하였고, 이를 품종육성, 유전연구 및 생명공학 연구재료로 활용할 수 있도록 국립유전자원센터에 12점을 등록하였다. 유년성 단축과 육묘체계 구축을 위하여 비가림 하우스 시설 내 가온 시설을 조성하여 연중 육종 체계를 구축하였다. 조기 착과를 위해 교배 실생을 조기에 수확하여 겨울철 가온 하우스에서 육성한 후 포트에 육성된 대목에 접목 후 정식하여 1주지유인과 성목에 고접을 통해 조기 착과를 유도하였다. 본 연구과제를 통해 얻은 결과를 이용하여 품종보호출원 1건, 특허출원 2건, 상표등록 6건 등을 완료 하였다.

## 2. 연구성과

본 프로젝트의 연구는 우수 품종육성을 위한 목표형질 보유 교배집단의 대량 양성 및 조기 결실을 유도하는 것에 중점을 두었으며, 연내수확 부피경감 교배집단, 조숙 홍피 만다린 교배집단, 주심배 유래 만다린 교배집단, 적육관피 만다린 교배집단을 대량 양성 하였고, 교배실생 및 주심배 실생의 조기 결실을 유도 하였다. 또한, 식물특허 출원 4건, 품종명칭등록 3건, 우량 계통선발 7건, 품종보호출원 1건, 유전자원등록 24건, SCI 논문 1건, 국내 및 국외 학술발표 6건, 상표등록 6건, 생산판매신고 2건, 분자마커 개발 2건 및 국제육종 네트워크 구축 등의 성과를 도출 하여 본 과제에서 목표로 하였던 성과를 초과 달성하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내 기술수준 및 시장현황

국내 감귤산업은 최근 3년간 평균 생산액 및 생산량 각각 6,500억원 및 65만톤을 상회하고, 농가수도 30,797호(제주농가의 80%)를 차지하였고, 재배면적 2000년 이후, 생산량은 2007년 이후 점차 감소하는 추세이다. 국내 과수 종묘시장 규모는 250억원/연 내외로 추정되며, 종묘 생산 실적은 4백만주/년 내외이고, 연간 수요 9백만주 내외로 추정되고 있다.

우리나라의 감귤 유전자원 보유수는 선진국 대비 높은 수준이나, 유전자원 특성 평가시스템이 확립되어 있지 못하고, 단순 보존 수준에 그치고 있어 육종 활용도가 낮다. 반면, 미국, 브라질, 일본 등 선진국의 감귤 유전자원 보유점수가 많을 뿐만 아니라 유전자원 보존 효율을 높이고 소실을 방지하는 시스템을 구축하고 있다. 특히 특성평가 체계 및 특성의 D/B화가 확립되어 육종에의 활용도를 높이고 있다.

노지재배가 가능한 내한성 품종은 제주도에서 널리 재배되고 있는 온주밀감 계통뿐이고, 그 외의 품종은 대부분 시설에서 재배되고 있는 실정이지만 '부지화' 등 일부 만감류 품종이 노지재배가 시도되고 있지만 서귀포시 해안 쪽을 제외한 면적확대는 매우 제한적이다. 따라서 국내에서 노지에서도 부피 없는 감귤품종을 개발하려는 시도는 계속되고 있지만 교잡실생의 조기 결실체계 구축 미흡으로 품종 선발에 장기간이 소요되고 있는 실정이다.

국내에서 감귤육종은 농촌진흥청 국립원예특작과학원 산하의 감귤연구소, 제주특별자치도 농업기술원, 제주대학교 등 3개 기관에서만 이루어지고 있다가 Golden Seed 프로젝트를 통하여 제주도내 3개의 민간업체가 감귤육종에 참여하게 되었다. 감귤연구소의 경우에는 1994년 설립 초기부터 열악한 조건과 제한적인 유전자원을 이용한 감귤육종연구가 수행되어 2004년에 온주밀감 신품종인 '하례조생'이 처음 발표된 이후 지금까지 온주밀감 3품종, 연내수확 계통 및 만감류 7품종, 오렌지 1품종, 레몬 1품종 등이 품종보호출원 및 등록이 이루어졌다. 제주특별자치도 농업기술원 및 제주대학교인 경우에는 2005년부터 육종연구가 본격적으로 수행되고 있는데 도농업기술원인 경우에는 교잡육종 및 아조변이 선발을 이용한 육종연구, 제주대학교에서는 방사선조사를 이용한 품종 육성, 도내 민간업체에서는 교잡육성을 통하여 차별화된 품종을 육성하기 위한 연구를 진행하고 있어 조만간 좋은 결과가 기대되고 있다.

### 제2절 국외 기술수준 및 시장현황

전 세계적으로 주요 감귤 생산국가에서 새로운 품종을 육성하는 목표는 거의 동일하다. 즉 중자가 없는 무핵성의 품종, 당도가 높고 산함량이 낮은 고품질의 품종, 껍질벗김이 쉬운 박피용이성 품종, 감귤류에 주로 함유되는 Terpen계 탄수화물, Flavonoid 및 Limonoid 등 기능성 성분이 다량 함유되어있는 기능성 품종, 한해 및 건조 등 자연재해에 대한 내성을 내재해성 품종, 병해충에 대한 내성을 가진 내병성 품종 등을 개발하는 것이다.

미국, 스페인, 중국 등에서의 감귤 주산지는 겨울철 기후가 온난하여 내한성이 약한 품종도 대부분 노지에서 재배되고 있지만, 10년 주기의 한파에 대응한 장기적인 목표에서 내한성연구

는 꾸준히 진행되고 있다. 일본인 경우 고품질 만감류인 ‘감평’, ‘세토카’, ‘부지화’ 등 지난 10년간 다수의 품종을 육성하였고 최근에는 기능성 물질인  $\beta$ -cryptoxanthin이 다량 함유된 ‘베니바에’, ‘타마미’ 등의 품종을 개발하였지만 이들 품종의 상업적인 재배는 크게 진전되지 못한 실정이다. 또한 최근에는 방사선조사에 의해 품질은 좋지만 종자가 많은 오렌지와 탄제린 품종을 무핵화 시키려는 연구가 활발히 진행되고 있다(2008, 2012). 한편 종자가 맺히는 만다린을 화분친으로 활용하고 후대에 가서 다시 종자를 무핵화 시키는 방법으로 품종을 육성하고 있고, 인위적인 3배체 육성 및 극소립 종자에서의 3배체 유기 등을 통하여 무핵화를 시도하고 있다.

최근에는 감귤육종에서도 유전자표지 개발, 원형질 융합 등의 분자유종학적으로 신품종을 개발하려는 시도가 활발히 진행되고 있으나 그 효율이 미미하기 때문에 오히려 교잡에 의한 품종 육성이 더 효율적이고 빠르게 진행되고 있다. 즉 목표 형질에 근접한 핵심 자원을 확보하여 교배하고 조기 착과기술을 적용하여 특성검정을 실시하는 재래식 육종방법이 확실하고 효율적인 방식으로 인식되고 있다. 그렇지만 새로운 품종을 개발하는데 반드시 필요한 것은 품질이 우수한 유전자원이다. 특히 성숙기별 종자친으로 사용할 수 있는 단배성품종의 확보이다. 감귤육종의 가장 큰 난제 중의 하나는 다배성이라는 특성 때문인데, 세계 각국에서 개발된 우수한 품종들은 거의 대부분이 다배성이다. 다행히도 일본에서 우수한 품질의 ‘청견’을 개발하였지만 이 품종은 3월에 성숙되는 만숙성 감귤이다. 따라서 ‘부지화’, ‘세토카’ 등 우수한 만숙성 감귤 신품종은 육성되었지만 연내에 수확이 가능한 교잡 신품종은 거의 없는 실정이다. 이는 연내에 성숙이 가능하여 종자친으로 이용할만한 단배성 품종이 없기 때문이다.

자원도입에 있어서 미국, 이스라엘 등의 국가에서 품종 개발 시 정부 연구기관에서 육성하더라도 특허를 출원하고 재배농가로의 공급도 고가에 이루어지고 있으며, 국내 유전자원으로 반입도 통제되고 있어 자원 확보에 한계가 있다. 또한 일본인 경우에는 다양한 품종을 개발하고 있는데 자국에서 육성된 감귤 신품종들이 한국으로 무단 반출되었다는 판단에 따라 한국 내에서 품종 보호출원 및 로열티 부과를 위하여 사전 현지 조사 및 동향을 파악하고 있어 조만간 한국 내에서 품종보호출원 및 실시가 이루어질 것으로 판단됨에 따라서 개발된 지 오래된 품종은 유전자원으로 도입 가능하지만 품질이 떨어지기 때문에 교배친으로의 사용은 효율성이 저하되고 신품종의 국내 도입은 점차 매우 어려운 실정으로 이는 감귤 육종의 한계라 할 수 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 연내 수확용 부피경감 온주밀감 품종개발

#### 1. 목표형질 자원이용 교배실시

연내에 수확이 가능한 개체를 육성하기 위한 교배교합 구성에서 연내에 성숙되는 단배성 품종을 종자친으로 사용하여야 하는데, 이러한 유전자원이 절대적으로 부족한 실정에서 많은 애로사항이 있다. 다행히도 우리 연구소에서 육성된 자원을 이용하고, 외국에서 도입된 몇 안 되는 자원을 이용하고 화분친을 다양하게 구성하여 교배조합을 편성하였다.

우선 본 과제가 수행되기 전인 2013년에 교배되어진 조합구성을 살펴보면 신예감×좌좌목, 신예감×(청견×기주), 신예감×SEINANNOHIKARI, LEE×춘견, 신예감×LH-32, HAREHIME×NOVA, NOVA×HARUMI, ROBINSONE×HARUMI, (청견×기주)×ML14, (청견×기주)×(대포조생 주심배2)의 조합에서 10,000여 립의 종자를 획득하여 파종 후 실생 9,000개 확보하여 생육중이다. 여기서 ‘신예감’은 우리 연구소에 개발된 신품종이고, ( )내의 개체는 교잡개체 중에서 우수한 형질을 지닌 교잡개체이다.

2014년에는 ‘KG03 × 세이난노히카리’, ‘하레히메’ × ‘GP12’ 등 9조합을 구성하여 교배를 실시한 결과 6조합에서 2,670립의 종자가 채종되었고 3조합에서는 종자가 형성되지 않았다(표 1).

표 1. 2014년 신규 교배 조합 및 채종 종자 수

교배모본	교배부분	채종 종자 수 (립)	비 고
KG03	세이난노히카리	0	종자친: 자체 보유 교잡종
	미하야	260	
하레히메	하레히메 × 기주밀감	600	화분친: 자체 보유 교잡종
	GP-12	0	"
베니마돈나	Kmu-23	0	"
CG-109	하레히메 × 기주밀감	1,040	종자·화분친: 자체 보유 교잡종
LH-32	하레히메 × 기주밀감	310	"
KW-61	MP-52	400	"
	MP-16	60	"
계	9조합	2,670	3조합은 종자 미형성

2015년에는 우리 연구소에서 육성된 단배성 중간모본인 원교아단배성 1호와 2호를 교배모본으로 사용하였고, 추가로 ‘프린스청견’과 ‘베니마돈나’를 또한 연구소 육성 조숙 단배성인 ‘BP-12’개체를 사용하여 총 5조합을 구성하여 교배한 결과 ‘원교아단배성2호’ × ‘05-프린스 4-6’의 조합을 제외한 4조합에서 180립의 종자를 채종하였다(표 2, 그림 1). 여기서 교배부분인

화분친은 전부 우리 연구소에서 얻어진 자원을 활용하였다.

표 1. 2015년 신규 교배조합 및 채종 종자 수

교배모본	교배부분	채종 종자 수 (립)	비 고
원교아단배성2호	05-프린스 4-6	0	화분친: 자체 보유 교잡종
원교아단배성1호	05-청견 4-52	16	"
프린스청견	05-청견 4-52	13	"
베니마돈나	05-청견 4-52	12	"
BP-12	05-P청견 5-4	147	종자·화분친: 자체 보유 교잡종
계	5조합	180	1조합은 종자 미형성



그림 1. 교배되어진 종자친의 결실상태

2016년도에는 ‘원교아단배성1호’ × ‘05-프린스 4-6’ 등 5조합을 교배할 계획이었으나 6조합을 교배하여 이중 2개 조합에서는 종자가 형성되지 않았고, 나머지 4조합에서 798립의 종자를 획득하였다. 종자가 형성되지 않은 조합의 화분친은 ‘06-남향 2-9’와 ‘06-프린스 4-6’개체인데, ‘06-남향 2-9’는 극조숙성이므로 처음 화분친으로 사용하였는데 종자형성이 안되어 이 개체는 화분활력이 매우 약하다고 할 수 있고, ‘06-프린스 4-6’는 연내 성숙되는 개체로 2015년에 이어 2년 연속 종자가 형성되지 않아 차후 화분활력을 활성화한 후 화분친으로 사용함이 바람직하다고 사료된다.

표 3. 2016년 신규 교배조합 및 채종 종자 수

교배모본	교배부분	채종 종자 수 (립)	비 고
원교아단배성1호	05-프린스 4-6	0	화분친: 자체 보유 교잡종
원교아단배성1호	04-P청 1-26	305	"
원교아단배성1호	06-남향 9-33	64	"
프린스청견	04-P청 1-26	99	"
프린스청견	04-P청 4-11	330	"
탐도3호	06-남향 2-9	0	"
계	6조합	798	



그림 2. 교배되어진 종자친의 결실상태

이상 2013년부터 2016년까지 4개년동안 교배되어진 조합 수는 30조합이었고, 이중 6조합에서는 종자가 형성되지 않았으며 나머지 24조합에서 13,648립의 종자를 획득하였다. 이들 종자들은 비닐하우스 내에 설치된 육묘상에 파종하여 발아된 실생을 관리하고 있다.

## 2. 교배실생 육묘 및 결실유도

2013년부터 획득된 교배종자를 효율적으로 관리하여 조기에 착과시킬 목적으로 수행된 연구에서 우선 비닐하우스 내에 육묘상을 설치하여 내부에 소형 온풍기를 이용하여 일정온도를 유지하였고, 주간 고온 및 야간 저온 시에는 온도유지를 위하여 자동개폐기로 육묘상 비닐을 개폐하였다. 종자를 파종한 결과 발아가 빠른 조합이 있는가 하면 늦으면서 불균일하게 발아되는 교배조합으로 구분할 수 있었는데, 대체적으로 'Lee' × '춘견', '성전온주' × '신예감', 및 'KG03' × '상주3' 조합에서 발아율이 매우 미흡함을 보였다(그림 3, 표 4).

이후 매년마다 교배하여 획득된 종자들도 비닐하우스 내의 육묘상에서 발아시켰고, 발아된 육묘는 직경 18cm의 화분에 이식하였다(그림 4). 일부 교배조합은 2년생 실생을 탱자에 절집을 실시하여 조기에 건설한 묘목상태를 유지시키도록 하였다.





(시설 내의 육묘상)



(정상적인 발아상태)



(늦고 불균일한 발아상태)

그림 3. 교배종자의 발아시설 및 발아상태

표 4. 교배조합별 발아정도<sup>z)</sup>

교배 조합	발아율 정도 <sup>y)</sup>	교배조합	발아율정도 <sup>y)</sup>
노바 * 춘견	3	LEE * 춘견	1
하레히메 * 노바	2	성전 * 신예감	1
신예감 * ML14	4	신예감 * 좌좌목	4
신예감 * 세이난노히카리	4	KG03 * 상주3	1
KG03 * ML14	4		

z) 파종 : 12월 12일, 발아 조사일 : 2월 4일

y) 발아율정도 : 0=0%, 1= 0~20%, 2=20~40%, 3=40~60%, 4=60%이상



(교배 실생유묘)



(유묘의 화분이식)



그림 4. 연도별 교배실생 발아 및 탱자접목 상태

2년차인 2014년부터 본격적으로 탱자를 이용한 절접 및 온주밀감을 중간대목으로 이용한 고 접을 시행하였다. 탱자를 대목으로 사용한 경우에는 5~8년생 탱자를 이용하였고, 온주밀감은 노지포장에 재식되어진 수령 15년생의 나무를 이용하여 봄철에는 3~5월에, 가을철에는 9월에 실시되었다. 탱자대목에는 주로 전년도에 파종하여 육묘된 2년생 어린 교배실생묘를 교배조합 별 최대 100주, 최소 20주를 접목하였고, 온주밀감을 중간대목으로 하는 경우에는 교배실생 중 에서 착과가 이루어진 다음 과실분석 후 유망한 개체로 판단된 '06-남향 2-9' 및 '06-남향 9계 열'의 5개체 등 6개체를 개체별로 5주씩 접목하였다.



(교배 실생유묘)



(화분 식재 탱자 접목 상태)

그림 5. 2013년 교배실생 및 탱자접목 상태



그림 6. 2014~2015년 교배종자 탱자대목을 이용한 접목 상태



그림 7. 우량개체 및 선발개체에 대한 온주밀감 중간대목으로 한 고접실시

### 3. 양액급여에 의한 교잡실생묘 조기 성장유도 방법 구명

교잡실생을 육묘하면서 조금이라도 건실하면서 속성으로 성장시켜 조기에 결실될 수 있도록 성장유도 방법을 구명하려고, 관행으로 시비되던 양분 외에 인위적으로 양분이 배합된 양액을 투여하여 관행시비와 비교하였다.

양액조성은 표 5와 같이 A액과 B액으로 구분하였고, 이들 양액을 각각 1/2, 1, 2, 4배액을 주 1회, 화분당 500ml을 관주하였고, 대조구로 관비구, 관행상토(무비료)구 및 펠라이트(무비료)

등과 비교하였다. 시용한 결과 A액과 B액을 1/2~2배액을 시용하였을 때 생장이 양호하였고, 2배 이상 또는 1/2이하의 양액을 2개월 이상 시용하였을 때는 과잉 또는 결핍증상이 발생되었다. 관행상토를 이용한 경우 관비를 희석하여 시용한 결과에서는 생장이 양호하였고, 양분의 과잉이나 결핍증상은 보이지 않았다. 한편 육묘포트의 크기에 따라서도 생육에 영향을 미쳤는데 3ℓ의 중대형 포트에서는 5개월간 비효가 유지됨을 알 수 있었으나 150ml의 극소형 지피포트에서 육묘하는 경우에는 비료 부족현상이 뚜렷하였다(그림 8). 화분 내 토양의 전기전도도는 양액성분이 진할수록 높은 경향이고, 성분액이 낮을수록 전기전도도는 낮았다(그림 9)

결론적으로 교잡실생묘를 조기에 건설하게 육묘하기 위해서는 초기부터 용량이 충분한 포트에서 육묘용 상토를 이용하여 식재하고 주기적으로 관비를 시용함이 매우 적절하다고 할 수 있다.

표 5. 교잡실생묘 조기 생장을 위한 양액 성분조성<sup>2)</sup>

양액 성분	A액: 성분함량(%)	B액: 성분함량(%)
전질소	8.5	13.0
수용성 인산	9.5	0.0
수용성 칼리	22.0	21.0
수용성 고토	5.5	-
수용성 철	0.35	-
수용성 붕소	-	0.2
수용성 망간	-	0.07
수용성 아연	-	0.007
수용성 칼슘	-	14.0

<sup>2)</sup> 물 10ℓ에 A, B액을 각각 10~15g씩 용해, 희석하여 주 1회 화분당 500ml 관주, 관수는 물 3ℓ를 담은 트레이에 주 2회 자연 저면 관수되게 함.

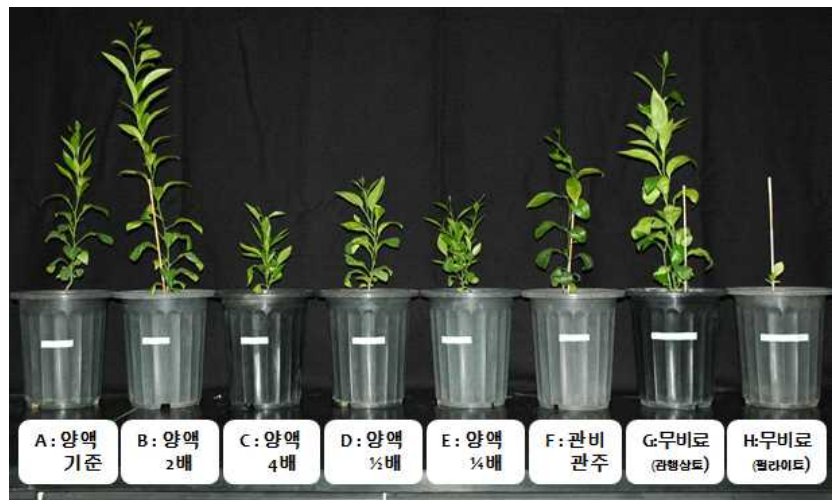


그림 8. 양액 급여 상황 및 처리별 실생묘의 생육상태

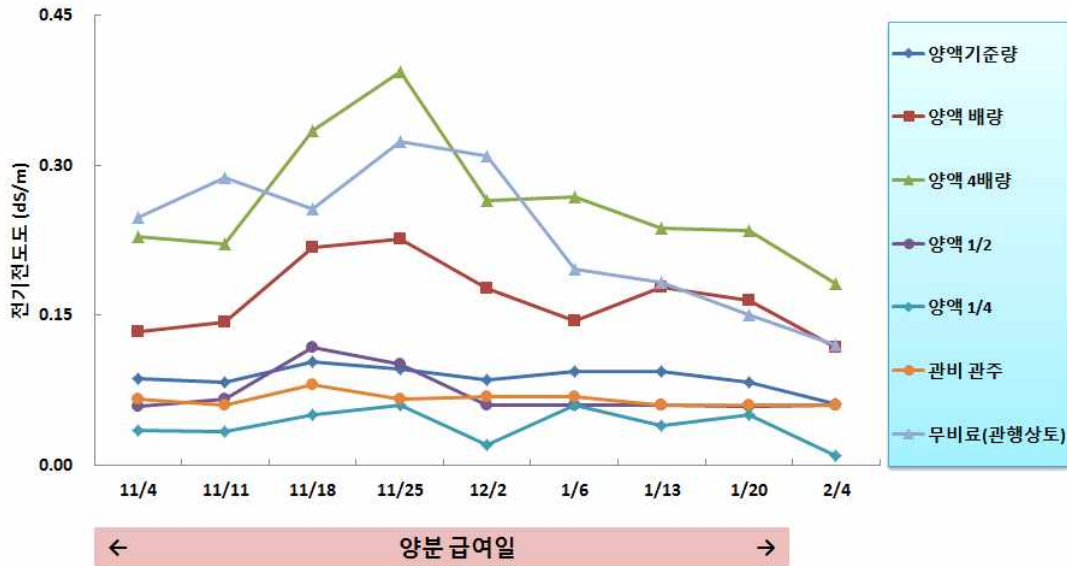


그림 9. 양액 및 관비 급여에 의한 실생 초기 성장 유도조건에서 처리별 토양 전기전도도 비교

#### 4. 조숙 난부피 과실 탐색 및 분석

##### 가. 예비 선발개체에 대한 과실분석

연내 성숙되는 조숙성이면서 온주밀감에서 문제가 되는 부피가 발생되지 않은 과실을 탐색한 결과 과제수행 초기에는 ‘Lee’ × ‘하례조생’ 교배조합의 LH-32 및 36번 개체가 유망시 되었다. 이 2개체는 과피색이 붉고 당도가 높아서 유망계통으로 선발되었다(그림 10). 이들 2개체에 대한 과실을 계속 조사한 결과, ‘LH-32’인 경우에는 2014년도에 착과된 과실의 11월 산함량이 1.11%, 1월 산함량은 0.94%로 낮아서 연내 수확의 가능성을 보였지만, 2015년도에 착과된 과실의 산함량은 10~12월의 산함량이 1.5%이상으로 상당히 높음을 보였고 당도는 10~11°Brix로 2014년도 과실과 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 과실에 종자가 함유되고 있음을 알 수 있다(표 6).

‘LH-36’인 경우에 전반적으로 과실크기도 150g정도로 크고, 과피두께도 얇으면서 종자도 거의 없지만 당도가 예상보다 낮아서 온주밀감 대비 당산비가 낮은 편이다(표 7). 따라서 이 2개체는 연내에 수확이 가능하다 할 수 있고 부피가 없는 개체지만 재배적인 상황에서 불안정성을 지니고 있고, 품질도 상대적으로 낮아서 본 과제의 목적에 부합된다고 할 수 없다.

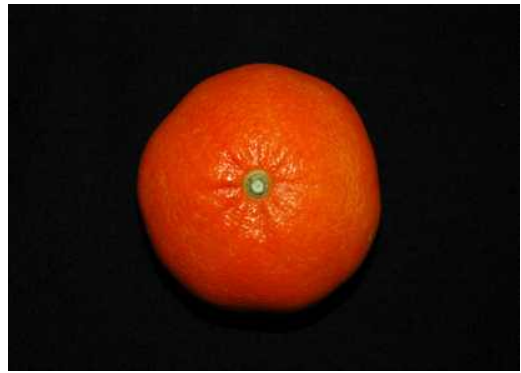


그림 10. 예비 선발개체였던 'LH-32'의 결실 및 'LH-36'의 과실

표 6. 예비 선발개체인 'LH-32'의 시기별 과실특성

조사일	과 중 (g)	과육율 (%)	과형 지수	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당 도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
2014.11.10	154.4	84.7	122	1.9	2.7	10.1	1.11	9.1	19.9
2015.01.07	165.2	83.7	124	2.1	2.2	11.9	0.94	12.6	36.2
2015.10.26	84.1	83.5	125	1.8	3.5	9.6	2.12	4.6	1.6
2015.11.17	94.5	83.9	130	1.8	0.6	10.7	1.63	6.8	26.8
2015.12.08	90.8	83.2	129	1.9	3.6	11.0	1.54	7.4	30.9

표 7. 예비 선발개체인 'LH-36'의 시기별 과실특성

조사일	과 중 (g)	과육율 (%)	과형 지수	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당 도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
2014.11.06	133.7	81.5	120	2.6	7.8	8.3	0.97	8.6	-10.40
2015.10.26	142.0	84.8	129	2.0	0.0	8.4	1.25	6.7	-15.30
2015.11.17	163.5	82.8	128	2.5	0.0	9.4	0.87	10.8	16.68
2015.12.08	166.4	83.7	121	2.4	0.0	10.5	0.90	11.6	28.54

#### 나. 선행연구의 교잡실생에서 난부피성 과실 탐색

위에서 예비선발된 개체가 과제목표에 부적합하다고 판단됨에 따라 선행연구에서 수확시기가 늦지만 난부피성인 개체를 탐색하여 조숙화시킬 목적으로 탐색한 결과 '청견' × '궁천조생'의 교배조합에서 1개체(개체명: 01-KM-1-4), '궁천조생' × 'Lee'조합에서 1개체(개체명: Mil-4) 등 2개체가 탐색되었다(그림 11).

그러나 이들 개체는 부피가 발생되지 않지만 산함량이 너무 높아서 수확 후 일정기간 저장 후 출하를 하거나, 이듬해 2~3월에 수확해야 하는 개체들이기 때문에 본 연구과제의 목적과 부합되는 아닌 것으로 판단되었다(표. 8, 9).



(‘01-KM-1-4’개체의 착과 및 단면도)

(‘Mil-4’개체의 착과 및 단면도)

그림 11. 선행과제에서 난부피성 과실탐색 결과

표 8. 선행연구에서 난부피성 개체로 탐색된 ‘01-KM-1-4’의 과실풍특성

조사 일자	과형 지수	과 중 (g)	과육율 (%)	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
‘11.01.20	115	68.7	76.8	2.5	0.0	14.0	1.75	8.07	17.7
‘12.01.17	122	83.3	78.2	2.7	0.0	12.1	1.24	9.79	14.6
‘12.03.09	117	86.6	75.8	3.2	1.0	12.9	1.07	11.97	21.5
‘14.02.14	123	78.6	78.6	2.4	0.0	12.4	0.97	12.78	24.2

표 9. 선행연구에서 난부피성 개체로 탐색된 ‘Mil-4’의 과실풍특성

조사 일자	과형 지수	과 중 (g)	과육율 (%)	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
‘14.11.19	130	60.2	86.6	1.2	0.0	9.3	1.38	6.8	1.8
‘14.12.04	133	78.2	80.5	1.7	0.0	9.5	1.35	7.0	6.1
‘15.01.07	126	53.6	83.7	1.3	0.0	10.6	1.13	9.3	24.6

다. 선행과제에서 수행되어진 교잡실생에서 목표부합 개체탐색

기관 고유과제를 수행하면서 얻어진 교잡실생 중에서 본 과제목표에 부합된 개체를 2015년 11월 20일에 탐색한 결과 과제의 설정 목표에 맞는 개체들이 다량 조사되었다(표 10). 우선 ‘06-남향 2-9’개체인 경우에는 과실크기가 온주밀감정도이면서 당도가 상대적으로 높고, 산함량도 낮아서 10월 중순부터 수확하여도 충분히 경쟁력이 있는 개체라 예상된다. 또한 ‘남향’을 종자친으로 하고 ‘Encore’를 화분친으로한 개체군들은 전반적으로 당산비가 12전후로 좋으면서 식감도 매우 훌륭하지만 과실색상이 옅은 황색을 띠고 있고, 종자가 1~2개 함유된다는 것이 단점이다.

2015년 12월 16일에 실시된 조숙 무부피 개체 선발을 위한 품평회에서는 시기가 늦은 관계로 산함량이 다소 높은 개체들이 추천되었지만, ‘06-남향 2-9’개체는 극조생 온주밀감에 대응하기 위한 개체로(표 11), ‘06-남향 9-20’ 및 ‘06-남향 9-36’개체는 조생종 온주밀감에 대응하기 위한 개체로 1차 선발하였다(표 12, 13).

표 10. 산함량 1.0%이하, 종자수 5개 이하의 개체에 대한 과실특성(2015. 11. 20)

개체명	과 중 (g)	과육율 (%)	과형 지수	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당 도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
06-남향 2-9	97.9	81.4	127	2.1	0.0	12.0	0.70	17.20	27.21
06-P청 8-59	54.4	74.7	108	2.6	5.4	12.3	0.73	16.81	33.81
06-P청 8-116	69.4	81.9	120	1.9	0.0	9.3	0.86	10.91	31.52
06-남향 9-29	200.4	78.3	108	3.6	0.0	9.9	0.86	11.44	4.51
06-남향 9-7	152.2	80.3	115	3.2	0.0	10.5	0.87	12.09	13.50
06-남향 9-3	117.5	77.4	109	3.3	0.0	10.6	0.89	11.89	13.76
06-남향 3-18	172.4	75.1	115	4.1	0.0	10.7	0.89	11.98	11.66
06-남향 9-8	161.4	81.6	121	2.7	0.8	11.2	0.89	12.51	14.65
06-남향 9-23	163.0	78.8	114	3.4	0.0	11.1	0.90	12.31	11.20
06-남향 9-36	186.5	78.2	105	3.5	1.0	11.2	0.91	12.31	17.83
06-P청 8-98	80.6	85.9	131	1.5	0.0	9.4	0.91	10.33	28.07
06-남향 9-6	173.0	81.2	113	3.0	0.0	11.2	0.93	12.06	16.11
06-남향 9-20	169.0	81.8	108	2.6	0.4	10.6	1.00	10.68	10.13
06-P청 8-126	149.0	79.8	116	3.0	3.8	11.3	1.01	11.14	25.80
06-사토 6-46	109.6	81.3	110	2.1	0.0	8.3	1.01	8.21	26.55

표 11. '06-남향 2-9'의 과실특성

조사월일	과 중 (g)	과육율 (%)	과피두께 (mm)	종자수	당 도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
2015.01.19	78.2	84.7	1.7	0.0	13.9	0.87	15.98	24.88
2015.11.02	100.5	82.6	2.0	0.0	10.5	0.85	12.31	16.62
2015.11.20	97.9	81.4	2.1	0.0	12.0	0.70	17.20	27.21
2015.12.02	114.7	81.4	2.2	0.0	11.8	0.68	17.30	29.89

표 12. '06-남향 9-20'의 과실특성

조사월일	과 중 (g)	과육율 (%)	과피두께 (mm)	종자수	당 도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (a)
2014.12.08	265.5	76.2	4.0	1.8	10.8	0.86	12.53	19.43
2014.12.23	282.8	76.0	4.2	3.0	10.9	0.80	13.59	20.35
2015.01.09	272.8	70.4	5.0	1.8	11.0	0.79	14.05	23.43
2015.11.20	169.0	81.8	2.6	0.4	10.6	1.00	10.68	10.13
2015.12.02	236.4	79.9	3.3	0.0	11.0	0.92	12.03	15.77

표 13. '06-남향 9-36'의 과실특성

조사월일	과 중 (g)	과육율 (%)	과피두께 (mm)	종자수	당 도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (a)
2014.01.15	297.2	65.4	5.8	1.0	10.7	0.66	16.21	27.48
2014.12. 8	261.3	76.6	4.0	2.8	11.4	1.11	10.22	19.87
2015.01.19	286.6	73.7	4.4	2.0	11.2	0.81	13.86	25.57
2015.11.20	186.5	78.2	3.5	1.0	11.2	0.91	12.31	17.83

라. 1차 선발된 개체와 대조품종과의 과실품질 비교

'06-남향 9-20' 및 '06-남향 9-36'의 과실크기는 온주밀감보다 2배 이상 크고, 베니마돈나의 과실크기와는 비슷하다. 또한 껍질은 대조품종보다 다소 두껍지만 과육율은 비슷한 경향을 보였으며 12월 2일 조사된 자료에서 당산비는 대조품종보다 낮지만 온주밀감보다는 당도가 높고, 산함량도 1%미만으로 품질이 우수하다는 것을 알 수 있고, 베니마돈나보다는 당도가 낮지만 산함량이 낮기 때문에 당산비가 높았다. 과실의 착색은 온주밀감이나 베니마돈나보다 옅은 황색을 띄고 있어서 이것이 가장 큰 단점이라 할 수 있다(표 14, 그림 12). 또한 이들 개체들은 1월 중순이 되어도 부피는 전혀 발생되지 않았는데, 2월 하순에 경미한 부피현상을 보였다(그림 13).

표 14. '06-남향 9-20' 및 '06-남향 9-36'과 대조품종과의 과실품질 비교

계통명	조사월일	과 중 (g)	과육율 (%)	과형 지수	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당 도 (°Bx)	산 도 (%)	당산비	착색도 (a*)
06-남향 -9-20	15.11.20	169.0	81.8	108	2.6	0.4	10.6	1.00	10.68	10.13
	15.12.02	236.4	79.9	108	3.3	0.0	11.0	0.92	12.03	15.77
06-남향 -9-36	15.11.20	186.5	78.2	105	3.5	1.0	11.2	0.91	12.31	17.83
	15.12.02	184.7	77.9	107	3.3	1.2	11.4	0.98	11.64	20.83
온주밀감	15.12.02	83.6	76.5	127	2.3	0.1	10.9	0.82	13.36	25.70
베니마돈나	15.11.30	185.6	81.9	103	2.4	0.0	12.8	1.09	11.74	29.01



(06-남향 2-9)



(06-남향 9-20)



(06-남향 9-36)

그림 12. 1차 선발된 개체의 착과상태





(온주밀감) (06-남향 9-36)  
 그림 13. 온주밀감과 '06-남향 9-36'과의 부피 발생 상황(2016. 1. 19)

한편 2015~2016년도 조사된 과실특성조사에서 20여 개체가 유망 시 되는데, 이중 함유종자수가 많은 '06-P청 8-72'등 8개체를 제외하고는 지속적인 관찰이 필요하다고 할 수 있고(표 15, 16, 17), 2015년도에 1차 선발된 개체 중에 '06-남향 2-9'개체는 식감이 푸석한 감이 강하여 계속 관찰할 필요가 있다. '05-P청 8-126'개체는 2015년과 2016년에 조사된 자료 및 식감을 분석한 결과 연내에 수확이 가능하고 맛이 진하여 1차 선발하였다(표 18).

표 15. 연내 수확 가능 주요 개체에 대한 과실특성(2015. 11. 20)

개체명	과 중 (g)	과육율 (%)	과형 지수	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당 도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
06-남향 2-9	172.4	75.1	115	4.1	0.0	10.7	0.89	11.98	11.66
06-P청 8-72	86.3	72.3	131	3.1	12.8	10.5	0.90	11.71	33.98
06-P청 8-116	149.0	79.8	116	3.0	3.8	11.3	1.01	11.14	25.80

표 16. 연내 수확 가능 개체에 대한 과실특성

계통명	조사월일	과 중 (g)	과육율 (%)	과형 지수	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당 도 (°Bx)	산 도 (%)	당산비	착색도 (a*)
06-P청-3-37	14.01.15	102.7	66.9	115	3.6	0.0	10.5	0.64	16.41	29.27
	15.01.19	92.2	66.3	118	4.0	0.0	12.2	0.74	16.39	26.07
06-P청-5-2	15.01.19	128.4	71.0	112	3.6	0.0	13.6	1.02	13.33	31.87
06-사토-6-27	15.01.19	117.3	80.5	104	2.4	0.0	12.9	0.72	17.96	28.77
	16.01.18	107.4	81.5	103	2.3	0.0	12.3	0.68	18.06	27.04
04-P청-5-46	14.01.15	155.1	80.4	116	3.0	0.0	11.5	0.46	25.15	35.17
	15.02.16	103.3	78.0	108	3.0	0.0	13.5	0.52	25.73	33.04
	15.12.14	135.0	77.2	120	3.7	0.0	11.2	0.45	24.63	35.91

표 17. 연내 수확 가능 개체에 대한 과실특성(2016. 12. 1)

개체명	과 중 (g)	과육율 (%)	과형 지수	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당 도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
06-P청 3-24	95.5	71.1	112	3.9	0.0	12.1	0.97	12.44	26.65
06-사토 6-31	101.7	87.4	118	0.8	0.0	11.9	0.91	13.16	31.29
06-P청 8-126	92.2	85.8	118	1.4	0.0	11.1	0.99	11.17	22.07
06-청견 1-270	199.0	78.4	98	3.6	0.0	9.0	0.94	9.51	29.00
06-P청 3-27	182.5	72.1	119	3.9	0.2	10.9	0.79	13.71	14.84
06-P청 8-17	118.2	82.1	114	1.7	2.6	11.4	1.05	10.88	23.91
06-P청 8-44	74.5	78.2	112	2.0	3.4	10.4	0.68	15.22	31.42
04-P청 4-122	125.4	81.2	138	2.0	3.6	10.7	0.82	13.07	31.29
06-P청 8-51	69.1	86.0	138	0.9	5.4	12.6	1.05	12.00	26.75
06-P청 2-1	84.7	83.3	116	1.3	6.0	10.1	0.69	14.72	15.51
06-사토 6-12	70.5	77.4	123	1.9	7.2	11.4	0.98	11.68	33.69
04-P청 4-92	178.1	84.9	128	2.2	10.8	10.3	0.82	12.65	26.75
06-P청 8-42	95.3	79.4	127	2.1	12.4	10.0	0.69	14.55	18.97
04-P청 4-21	84.2	77.6	113	2.4	21.0	11.7	0.85	13.81	33.75
06-P청 8-11	94.2	78.3	141	2.0	27.0	10.9	1.01	10.85	30.70

표 18. '06-P청 8-126'개체에 대한 조사시기별 과실특성

조사일자	과 중 (g)	과육율 (%)	과형 지수	과피두께 (mm)	과심폭 (mm)	종자수 (개)	당도 (Bx)	산도 (%)	당산비	착색 (*a)
'15. 11. 20	149.0	79.8	116	3.0	10.4	3.8	11.3	1.01	11.14	25.80
'15. 12. 02	130.0	82.5	116	2.6	12.7	1.2	11.3	1.00	11.25	28.41
'16. 11. 02	114.7	86.3	120	1.8	7.9	1.2	10.3	1.00	10.24	1.02
평균	131.2	82.9	117	2.5	10.3	2.1	10.9	1.01	10.88	18.4

마. 직무육성신품종 심의회 상정

지금까지 1차 선발되어진 4개체 중에서 '06-남향 9-36'개체는 '제감 나-51호'로, '06-P청 8-126'개체는 '제감 나-54호'로 각각 개체명을 부여하여 2016년 직무육성신품종 과수분과 심의회에 상정하여 2016년도 감귤 신품종으로 선정되었다.

(1) 제감 나-51호(06-남향 9-36)의 주요 특성

나무세력이 강하고, 나무모양은 직립성이다. 과실 착색은 9월 하순부터 시작되어 11월 하순에 완전히 착색되며, 과실성숙기는 12월 상순이다. 과실크기는 평균 240g정도로 온주밀감보다 2.5배 정도 크다. 껍질두께는 4.2mm로 온주밀감의 2.3mm보다 두껍지만 껍질벗김이 매우 수월하다. 성숙기의 과피색과 과육색은 등색으로 온주밀감보다 적색기운이 약하지만 성숙기의 당도

가 11.0°Brix정도이나, 산함량이 0.9%내외이고, 과즙이 많고 알갱이가 탱글탱글하여 식감이 아주 독특하다. 자가불화합성이어서 종자가 형성되지 않지만 꽃가루가 있는 다른 품종의 꽃가루에 의해 수정이 되면 종자가 형성되는데, 종자의 배는 다배이다.

표 19. 조사 연도별 '제감 나-51호'와 대조품종의 과실특성

계통명	조사월일	과중 (g)	과육율 (%)	과형 지수	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당도 (°Bx)	산도 (%)	당산비	착색도 (a*)
제감 나-51호	14.01.15	297.2	65.4	110	5.8	1.0	10.7	0.66	16.21	27.48
	14.12. 8	261.3	76.6	108	4.0	2.8	11.4	1.11	10.22	19.87
	15.01.19	286.6	73.7	112	4.4	2.0	11.2	0.81	13.86	25.57
	15.11.20	186.5	78.2	105	3.5	1.0	11.2	0.91	12.31	17.83
	15.12.02	184.7	77.9	107	3.3	1.2	11.4	0.98	11.64	20.83
궁천조생	15.12.02	83.6	76.5	127	2.3	0.1	10.9	0.82	13.36	25.70

표 20. '제감 나-51호'와 대조품종의 과실특성 비교(2015. 12. 02)

계통명	과중 (g)	과육율 (%)	과형 지수	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당도 (°Bx)	산도 (%)	당산비	착색도 (a*)
제감 나-51호	184.7	77.9	107	3.3	1.2	11.4	0.98	11.64	20.83
궁천조생	83.6	76.5	127	2.3	0.1	10.9	0.82	13.36	25.70
T-Test(0.05)	**	n.s	**	**	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s



그림 14. 제감 나-51호의 과실 및 착과상태

(2) 제감 나-54호(06-P청 8-126)의 주요 특성

나무세력은 중간정도이고, 나무모양은 개장성이다. 과실 착색은 9월 하순부터 시작되어 11월 하순에 완전히 착색되지만 과실성숙기는 11월 중순이며, 과실크기는 평균 130g 정도로 온주밀감보다 크고, 껍질두께는 2.5mm로 온주밀감과 비슷한 두께이다. 성숙기에도 완전히 착색되지

얇은 상태이므로 과실전체의 약 10%는 녹색이 잔존하는데, 완전히 착색되는 11월 하순에는 온주밀감보다 진한 등색이 된다. 성숙기의 당도가 10.5°Brix내외이나 산함량이 1.0%내외이고, 과즙이 많고 진하여 온주밀감보다 색다른 식미를 제공한다. 성숙기인 11월 중순 이후에도 당도 증가는 계속되고 산함량은 감소되며, 기상조건에 의해 늦게 수확되어도 부피가 발생되지 않는다. 자가불화합성이어서 종자가 형성되지 않지만 꽃가루가 있는 다른 품종의 꽃가루에 의해 수정이 되면 종자가 형성되는데, 종자의 배는 단배이다.

표 21. 조사 연도별 ‘제감 나-54호’와 대조품종의 과실특성

계통명 (품종명)	조사일자	과 중 (g)	과육율 (%)	과형 지수	과피두께 (mm)	과심폭 (mm)	종자수 (개)	당도 (Bx)	산도 (%)	당산비	착색 (*a)
제감 나-54호	'15.11.20	149.0	79.8	116	3.0	10.4	3.8	11.3	1.01	11.14	25.80
	'15.12.02	130.0	82.5	116	2.6	12.7	1.2	11.3	1.00	11.25	28.41
	'16.11.02	114.7	86.3	120	1.8	7.9	1.2	10.3	1.00	10.24	1.02
	평균	131.2	82.9	117	2.5	10.3	2.1	10.9	1.01	10.88	18.4
궁천조생	'15.12.02	83.6	76.5	127	2.3	12.0	0.1	10.9	0.82	13.36	25.70
	'16.11.02	134.7	83.7	139	2.3	15.0	0.0	7.9	0.78	10.21	4.00
	평균	109.2	80.1	133	2.3	13.5	0.0	9.4	0.80	11.78	14.85

표 22. ‘제감 나-54호’와 대조품종의 과실특성 비교(2016. 11. 02)

계통명 (품종명)	과 중 (g)	과육율 (%)	과형 지수	과피두께 (mm)	과심폭 (mm)	종자수 (개)	당도 (Bx)	산도 (%)	당산비	착색 (*a)
제감 나-54호	114.7	86.3	120	1.8	7.9	1.2	10.3	1.00	10.24	1.02
궁천조생	134.7	83.7	139	2.3	15.0	0.0	7.9	0.78	10.21	4.00
T-Test(0.05)	**	*	**	**	**	n.s	**	**	n.s	n.s



그림 15. 제감 나-54호의 과실 및 착과상태

5. 육종효율 증진에 관한 연구

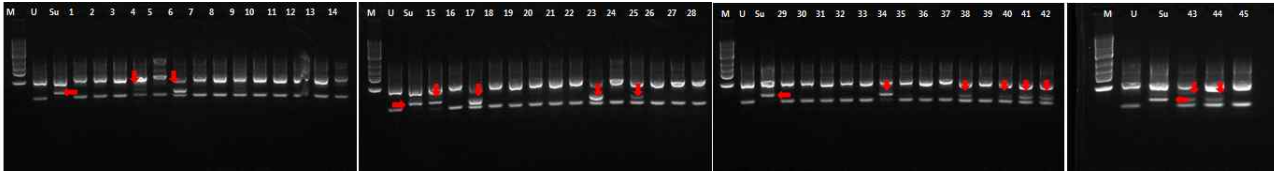
가. RAPD에 의한 주심배실생의 교잡배 판별용 분자표지 마커 선발

분자유종의 한 방법인 RAPD를 활용함에 있어서 UBC프라이머를 이용하여 다배성종자의 주심배실생에서 교잡되어진 배와 주심조직에서 분열된 주심배를 구분할 수 있는 프라이머를 선발하고, 선발된 UBC프라이머를 각각 염기서열을 판독함으로서 주심배와 교잡배를 육묘초기에 구분하여 육종효율을 높이고자 하였다. 시험재료는 온주밀감을 종자친으로 사용하였기에 온주밀감에서 발현되지 않는 밴드를 갖고 있는 primer를 선발하고 선발된 primer를 이용하여 교잡배의 유무를 판단하였다. 연구결과 UBC프라이머 700개 중에서 화분친에 특이적인 프라이머 51개를 선발하였는데, 이중 UBC27, UBC41, UBC425 및 UBC547인 경우에는 시험재료로 사용되어진 품종에 공통적으로 적용할 수 있는 프라이머였으며 나머지는 일부 품종만 적용할 수 있었다(표 23).

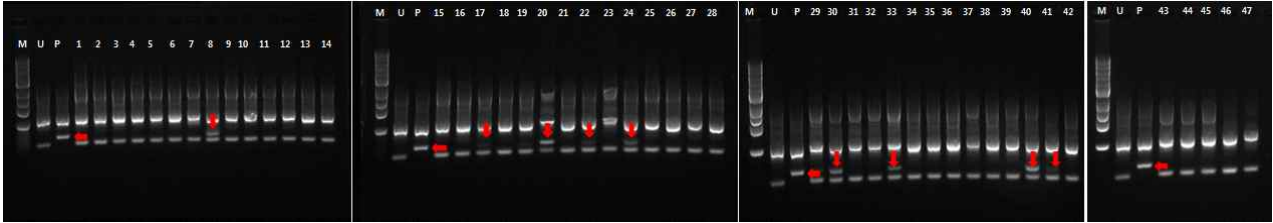
UBC27 primer를 이용하여 ‘궁천조생’ × ‘Sunburst’ mandarin의 교배조합과 ‘남감’ × ‘병감’의 교배조합 및 ‘남감’ × ‘기주밀감’의 교배조합에서 주심배와 교잡배를 구분한 결과 ‘궁천조생’ × ‘Sunburst’의 교배조합에서는 29%가 교잡실생으로 추정되었다. ‘남감’ × ‘병감’의 교배조합에서는 19%, ‘남감’ × ‘기주밀감’의 교배조합에서는 30%가 교잡실생이라고 추정되었다(그림 16, 표 24).

표 23. RAPD방법을 이용한 화분 특이적인 primer 선발

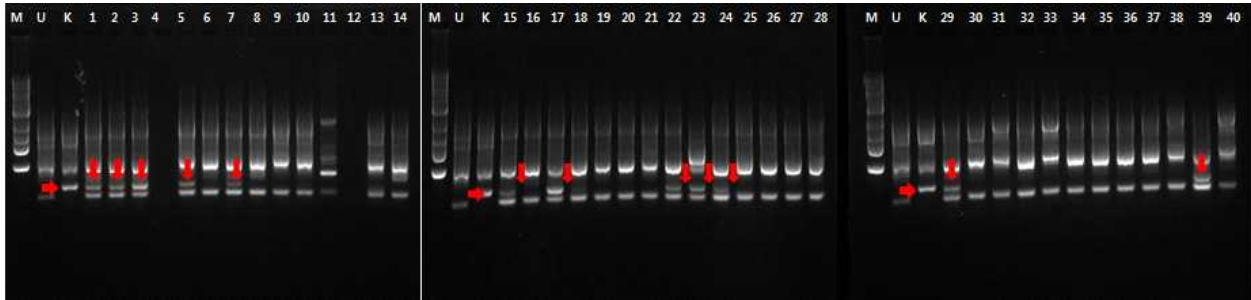
No.	Primer	염기서열	증폭산물크기 (bp)	공통선발가능 감귤	공통선발불가능 감귤
1	UBC27	TTTGGGGGGA	149	전부	-
2	UBC41	TTAACCGGGG	903	전부	-
3	UBC254	CGCCCCATT	260	일부분	3, 4
4	UBC568	ACCTGTTCTC	200	일부분	3
5	UBC425	CTAATCTCGC	250-300	전부	-
6	UBC451	CTAATCTCGC	300	일부분	5, 6, 7, 8, 10
7	UBC487	GTGGCTAGGT	200-300	일부분	4, 5
8	UBC528	GGATCTATGC	200	일부분	5
9	UBC547	TATGACCTGG	200	전부	-
10	UBC605	CCGATCATTC	100-200	일부분	6, 7, 8, 9, 10
11	UBC617	CGGACTATGT	100-200	일부분	5, 6, 7, 8, 9, 10
12	UBC695	GCTAATCAGC	200-300	일부분	5
등	나머지 39개 primer				



(궁천조생 × Sunburst)



(남감 × 병감)



(남감 × 기주밀감)

그림 16. UBC27 primer를 이용한 각 교배조합별 교잡실생체 판별

표 24. RAPD방법을 이용한 감귤 교배조합별 주심배실생에서 교잡 실생을 조사

교배조합	분자마커	증폭산물크기 (bp)	전체 실생묘 (개)	교잡실생체 추정 (개)	교잡실생율 추정 (%)
궁천 x Sunburst	UBC27	149	45	13	29
남감 x 병감			47	9	19
남감 x 기주밀감			40	12	30

#### 나. SSR마커를 이용한 감귤 교잡배 판별

본 연구는 RAPD방법에 의한 교잡배 판별과 별도로 수행된 것으로 (주)바이오메딕 생명과학 연구소에 의뢰하여 분석되었다. 연구목적은 온주밀감을 이용한 품종개발에서 온주밀감은 다배성이어서 교잡배를 얻기가 어렵고, 교잡배가 출현되어도 재식 후 10년 이상 육묘 후 결실되는 상태를 파악하여야 하기 때문에 실생묘가 어린 육묘 때에 다배성을 탐색하여 집중 관리하고자 함이다. 재료는 ‘남감’ × ‘Sunburst’ 교배조합 등 총 5개 조합에서 얻어진 실생묘의 잎을 사용하였으며, 교잡배 판별을 위하여 BMCi-SSR-012, BMCi-SSR-111 및 BMCi-SSR-115 마커를 사용하였다. 분석결과 ‘남감20호’ × ‘Sunburst’ 교배조합 82개체 중 4개체가, ‘성전운주’ × ‘Lee’ 교배조합에서 44개체 중 42개체, ‘궁천조생’ × ‘Lee’ 교배조합은 42개체 중에서 12개체, ‘성전운주’ × ‘태전병감’의 교배조합에서는 50개체 중 무려 48개체가 교잡배로 판별되었다. 또한 ‘좌좌목운주’ × ‘태전병감’의 교배조합에서는 39개체 중 9개체가 교잡배로 판별되었는데, 교잡배 비

율이 높은 조합은 사전에 교잡배로 의심받는 개체들을 SSR마커로 교잡배인지 주심배인지 확인한 결과이기 때문에 높은 비율의 교잡배가 판별되었다.

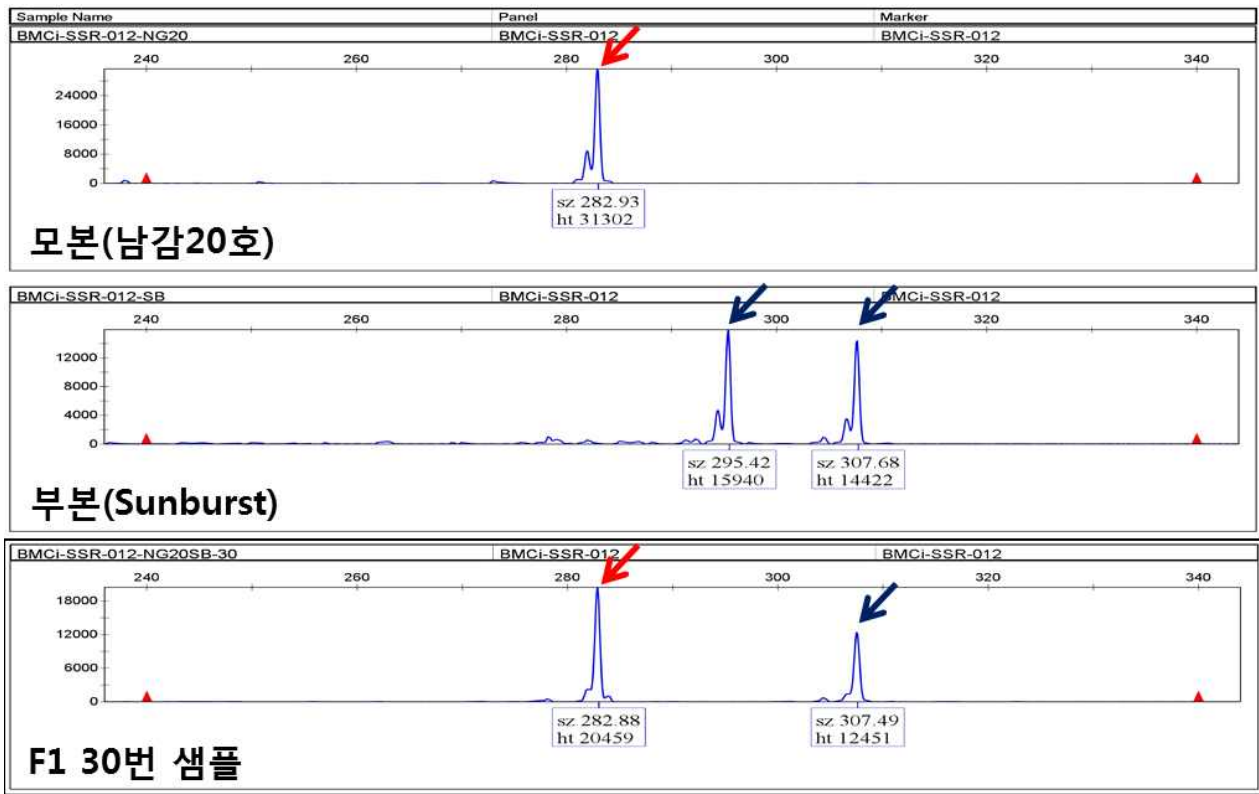


그림 17. '남감20호' × 'Sunburst' 교배실생에서 SSR마커를 이용한 교잡배 판별

#### 다. 품종별 숙기관련 마커 탐색

감귤속에 속하는 식물은 고도의 잡종체로서 이들을 그 어떤 마커를 활용하여 구분한다는 것을 상당한 연구가 필요하다. 더구나 품종별로 성숙기의 차이를 구분할 수 있다는 것은 단지 밴드의 차이가 있을지라도 그 품종 고유의 밴드일 수도 있어서 더욱 신중을 기해야 한다. 본 연구는 온주밀감을 시험재료로 이용하여 극조생성, 조생성, 만생성의 품종을 갖고 SRAP방법에 의해 숙기관련 마커를 선별하고자 하였다. 온주밀감은 다른 개체와의 교잡에 의해 품종이 분화된 것이 아니고 자연돌연변이 또는 주심배실생에서의 돌연변이체로 발견되어 품종화되었기 때문이다. 연구결과 f6/r15 primer는 극조생인 암기조생의 밴드는 조생인 궁천조생과 만생인 청도온주와는 다른 bp를 갖고 있었으며, f1/r25 및 f4/r35 primer는 조생종에서만 보이는 밴드가 형성되었다. 또한 f4/r32와 f5/r52 primer는 만생종에서만 특이밴드가 형성되었다(표 25, 그림 18).

표 25. 온주밀감에서 SRAP방법에 의해 숙기관련 band 형성

No.	PCR증폭된산물의 band 다양성				증폭산물의크기 (bp)
	SRAP primer	극조생(암기조생)	조생(궁천조생)	만생(청도온주)	
19	f6/r15	o	-	-	1600-1700
		-	o	o	1800-2000
21	f1/r25	-	o	-	1800-2000
24	f4/r35	-	o	-	500
5	f4/r32	-	-	o	1300-1400
6	f5/r52	-	-	o	1000-1100

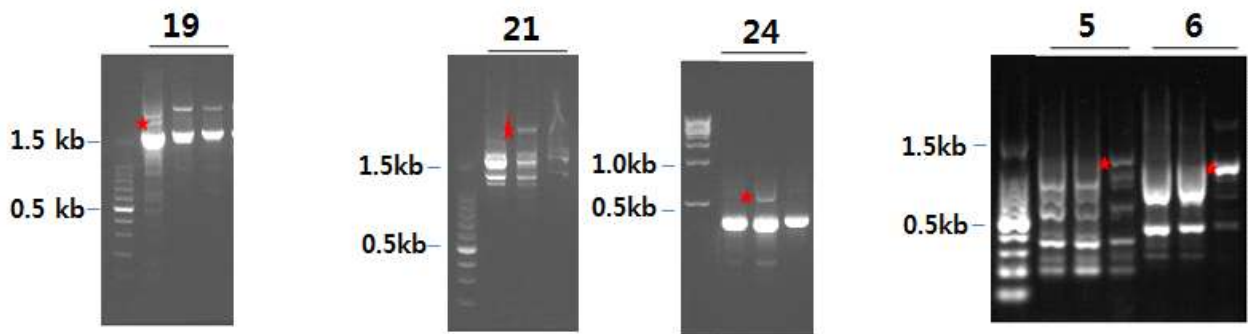


그림 18. 온주밀감에서 SRAP방법에 의해 primer별 숙기와 관련된 band 형성

한편 우리 연구소에서 개발된 ‘탐나는봉’은 ‘부지화’의 배유배양을 통해서 얻어진 것으로 ‘부지화’보다 성숙기가 늦다고 할 수 있는 품종이다. 즉, ‘부지화’가 성숙되는 시기에 당도가 높지만 산함량도 높아서 성숙기가 늦다고 할 수 있는 품종이다. 이 두 품종을 재료로 하여 성숙기 형질 연관 SNP 분자마커를 개발하고자 하였다. 본 연구는 (주)바이오메딕 생명과학연구소에 의뢰하여 분석되었다. 재료는 탐나는봉과 대조군으로 부지화 및 바이오메딕에서 보관 중인 샘플을 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 SNP자리별로 3차에 걸친 PCR 증폭 결과 모두 유의미한 결과를 얻지 못하여(그림 19) 이는 차후 다른 방법으로 시도할 필요가 있다.



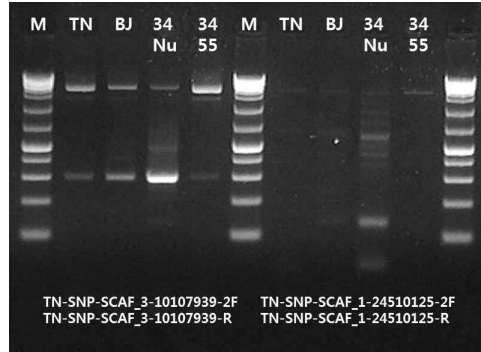


그림 19. 탐나는봉과 부지화 등 대조군의 DNA를 PCR 증폭 후 2차 실험 후 밴드 비교  
(TN: 탐나는봉, BJ: 부지화, 34NU: Hb-34NU, 3455: Hb-3455)

라. 온주밀감에서 난부피성 품종 조기 개발을 위한 마커 탐색

온주밀감 중에서 성전온주는 만숙성이면서 부피발현이 거의 없는 품종으로 알려져 있다. 이 품종은 궁천조생의 가지변이에서 유래된 품종으로 겉모양이 토마토와 같이 매끈하고 맛이 진하면서 부피발생이 없지만 재배면적이 널리 확대되지 못한 것은 재배하는 기간에 궁천조생으로 환원된다는 점 때문이다. 따라서 궁천조생과 성전온주 2품종을 이용하여 부피와 관련된 SRAP primer를 선별하고 마커를 탐색하고자 하였다. 연구결과 11개의 SRAP primer에서 궁천조생과 성전온주 간의 구분할 수 있는 밴드가 형성되어 차후 유용하게 활용하고자 한다(표 26, 그림 20). 그러나 이 결과는 두 품종간의 질적형질에서 많은 차이가 있기 때문에 품종 간 특이 밴드일 가능성도 배제할 수 없다.

표 26. ‘궁천조생’과 ‘성전온주’에서 SRAP primer별 band 다양성

No.	PCR 증폭된 산물의 band 다양성			증폭산물의 크기 (bp)
	SRAP primer	부피과 형성(궁천조생)	부피과 미형성(성전온주)	
1	f3/r32	o	-	800
		o	-	1500
2	f4/r42	-	o	1400-1500
3	f10/r42	-	o	1500
5	f10/r41	o	-	500
6	f17/r15	o	-	2000
8	f1/r37	-	o	1500
11	f4/r27	-	o	1000
		o	-	1550
12	f1/r37	o	-	1200-1300
13	f3/r47	o	-	1400-1500
14	f10/r47	-	o	1000
20	f2/r18	-	o	800

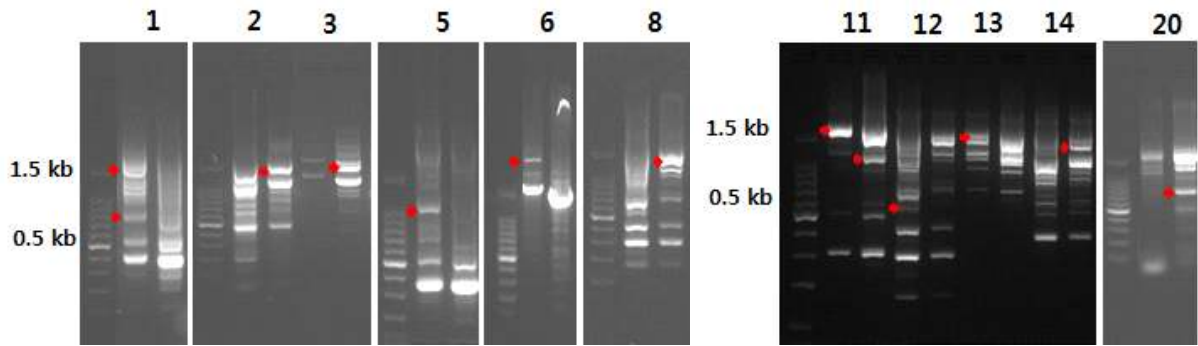


그림 20. '궁천조생'과 '성전온주'에서 SRAP primer별 형성된 band양상

마. 교잡개체에서의 부피유무 관련 유전자 탐색

온주밀감 중에서 난부피성 및 부피가 심한 품종을 대상으로 관련 유전자 탐색을 시도하였으나 난관에 봉착되어 유전자 탐색에 실패함으로써 부피가 심한 개체를 화분친으로 한 교배조합 중 '청견' × '진굴'의 교잡실생 중에서 부피가 심한 개체와 부피가 없는 개체들을 대상으로 관련 유전자를 탐색하고자 하였다. 본 연구는 (주)바이오메딕 생명과학연구소에 의뢰하여 분석되었다. 분석결과, D11, G6, N7, N16 등 4개의 RAPD 마커를 선발하였는데, 선발된 4개의 마커 중 N7마커인 경우 부피형질 연관 RAPD 마커일 가능성이 매우 높은 것으로 판단되었고, 나머지 3개의 마커도 부피형질 연관 마커로 활용이 가능하다고 판단되었다. 차후 부피관련 마커를 확대할 필요가 있는데, 교배조합별로 다시 탐색해야 하는 부담이 있다.

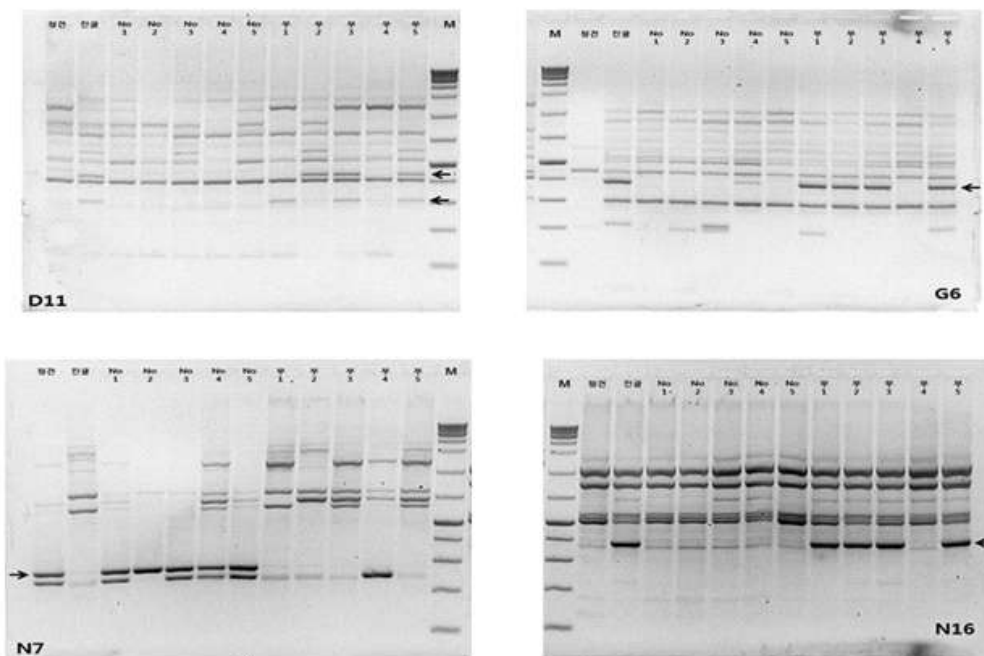


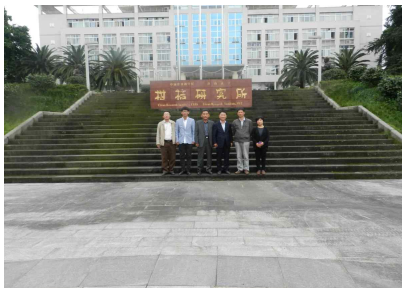
그림 21. 부피 및 난부피성 형질에 대한 모본(청견)과 부분(진굴) 및 F1계통들에 대한 RAPD 마커 선발 결과

## 6. 유전자원 수집 및 감귤품종 수출을 위한 해외출장

### 가. 중국 출장결과

출장의 목적은 중국의 유전자원 탐색과 감귤 연구 현황 파악 및 육종, 가공 이용 분야 국제 공동연구 협의하고자 수행되었던 것이다. 출장기간은 2014년 10월 28일부터 11월 1일까지 4박 5일간 이었다. 출장지역은 중국 충칭직할시였는데, 중국 농업과학원 감귤연구소가 이곳에 위치하고 있다.

주요 결과를 요약하면 중국 감귤연구소와의 교류를 확대 시킬 수 있게 되었다. 중국농업과학원 감귤연구소는 중국 감귤연구의 심장이다. 이곳에서 중국감귤산업에 투입될 최신기술이 개발되고, 감귤연구를 이끌어갈 인재들이 양성되는 것이다. 따라서 이들과의 교류는 곧 중국감귤연구에 대한 최신 정보의 습득이 가능하고 미래의 연구분야에 대한 예상이 가능하다. 또한 이번 출장을 통해 국제공동연구 수행을 위해 지속적인 이메일 교환을 약속하였고 향후 RFP 제출을 통해 2015년 국제공동연구에 응모하기로 합의하였다. 이러한 국제공동연구를 통해 중국의 우수한 유전자원을 수집하고 선진 마커기술을 획득하여 우리나라 감귤산업의 발전에 기여할 수 있을 것으로 사료되는데, 출장결과로 2015년부터 3년간 중국농업과학원 감귤연구소와 우리 감귤연구소간 국제공동연구과제를 수행하고 있다.



(중국감귤연구소 전경)



(상호협회사항 논의)



(유전자원포장 전경)

그림 22. 중국 감귤연구소에서 활동상황

### 나. 캄보디아 출장결과

캄보디아로 출장을 간 목적은 ‘국내 육성 감귤품종의 해외 수출을 위한 사전조사’이다. 캄보디아에 거주하는 한인교포가 농장을 경영하고 있어서 캄보디아에 우리 품종을 수출할 경우 현지 기후 및 토양 적응관계 등을 조사하기 위하여 2015년 12월 22일부터 2015년 12월 27일까지 캄보디아의 파일린 지역에서 6일간 수행되었다.

출장결과, 캄보디아의 파일린(Pailin) 인근 지역은 캄보디아에서 가장 감귤이 많이 재배되고 있는 지역이고, 기온도 건기의 최저기온이 15℃이므로 고온에 의한 감귤나무의 이상생리현상은 없을 것으로 예상되었다. 다른 지역과 달리 이 지역은 작은 계곡이 많고, 계곡물이 계속 흐르기 때문에 건기의 물 부족은 문제가 되지 않고 있었다. 이 지역은 산간지역이지만 고온이면서 토양은 비옥하고 물빠짐이 양호한 사질양토이기 때문에 나무 생장이 왕성하여 열대 지역에 맞는 매뉴얼이 필요하다고 판단되었다. 감귤을 재식하기 전에 이 지역의 황룡병 발생여부 및 전염상태를 미리 파악할 필요가 있고, 탕자 등 대목의 현지 적응능력도 조사할 필요가 있다고 사료되었다. 국내 육성 품종 중에서 온주밀감류보다는 만감류 품종을 현지에 수출한다면 현지의 기상과 토양조건에 적응력이 높을

것으로 사료되어 가능성이 높다고 여겨졌고, 현지의 기상에서 감귤이 성숙되어도 착색이 이루어지지 않아 녹색인 상태의 청과로 출하되기 때문에 차후 우리가 육성한 감귤 품종을 수출할 경우에는 당도 증가와 산빠짐이 늦더라도 15℃이상의 온도(한국의 10월)에서 먼저 착색이 이루어지는 등 열대지방에 적용할 수 있는 수출용 품종을 개발할 필요가 있다고 사료되었다.



그림 23. 현지에 심겨진 ‘부지화’ 묘목의 생육상태 점검

#### 다. 미국 출장결과

본 출장의 목적은 국내 육성 감귤新品种 ‘탐나는봉’의 해외 적응성 시험을 수행하고자 현지 검역상황 및 종자 수출 예정 단지 현황을 점검하고, 현지 재배시험 계획서를 수립할 목적으로 2016년 6월 13일부터 6월 17일 까지 5일간 수행되었다. 출장기간동안 방문기관은 우리가 육성한 ‘탐나는봉’을 검역하고 있는 캘리포니아대학 리버사이드캠퍼스와 ‘탐나는봉’을 재배하고자 준비하고 있는 M PARK INC. 회사였다.

미국에서의 식물검역 절차는 우리와는 상이하지만 2년간 진행되며, 현재까지 ‘탐나는봉’의 검역 결과에서 특이사항은 발견되지 않았고, 2017년 5월에 검역절차가 완료된다고 통보받았다(그림 24). M PARK회사의 농장은 미국의 대표적인 감귤인 오렌지의 최대 생산지의 하나인 Orange Cove에 위치하고 있는데, 이 지역은 천혜의 조건을 가진 감귤 재배지라고 할 수 있다. 우리 품종인 ‘탐나는봉’은 식재 예정지가 이미 구비되어 있고, 묘목 대량 증식준비도 이미 완료된 상태로 2017년부터는 본격적인 묘목증식이 가능할 것으로 판단되었다(그림 25). 또한 우리 연구원이 미국 현지에 상주하면서 재배시험을 할 수는 없지만, 우리 교포회사인 M PARK의 관계자를 통하여 생육상황을 생육전환기별로 사진 및 e-메일로 자료 작성이 가능하므로 차후 GSP 2단계 기획에서 미국 현지 재배시험 설계를 추가하여 시험을 진행한다면 미국에서의 ‘탐나는봉’ 재배지침이 구체적으로 작성될 수 있을 것으로 기대된다(그림 26).



그림 24. 캘리포니아의 CCPP에서 ‘탐나는봉’의 검역절차



그림 25. 대목 육묘 현장 및 관수 시스템



그림 26. ‘부지화’ 집목수 상태 및 착과 상태

## 제2절 조숙 홍피 만다린 품종개발

### 1. 교 배

#### 가. 연구 내용 및 방법

##### (1) 교배조합

본 연구는 연내 수확이 가능하며 외피의 색이 홍색을 띠어 기존의 감귤 품종과는 차별성을 가진 우수한 만다린 품종을 육성하고자 수행되었다. 교잡 육종에 의해 새로운 개체를 선발하고자 화분친은 단배성 특성을 가지고 있는 품종을 선택 하였고, 종자친은 홍피·적육 특성을 지니고 있는 품종을 선택하여 교배를 진행 하였다.

##### (2) 조숙 홍피 품종 개발을 위한 교배

교배는 교배 양친을 선정 하고 화분친으로 사용 할 품종의 화분을 수집하였다. 교배를 시작하기 전 종자친으로 사용 할 품종의 꽃 중에서 주두액이 충분하고 꽃의 활력이 좋은 꽃을 제외 한 나머지 꽃들은 모두 제거를 한 후 붓을 이용하여 화분친의 꽃가루를 종자친 꽃의 주두에 수분 시켰다.

#### 나. 결과 및 고찰

##### (1) 교배 조합별 내역

GSP 1단계 연구기간 동안 클레멘틴×베니바에 외 33개 조합에서 17,544화를 교배 하였고, 2,882개의 과실을 수확 하였으며 37,222개의 종자를 획득 하였다. 연구기간 1차(2013)~3차(2015)년도 기간 사이에 교배에 의하여 획득한 교잡실생 개체는 6,656개 이다. 4차(2016)년도 연구 기간에 획득한 교잡 실생개체는 현재 조합별로 발아를 유도 하고 있다. 2차년도 교배 조합 중 클레멘틴×올란도, 클레멘틴×베니바에 조합에서 착과율이 매우 저조하여 6개의 교잡실생 개체를 획득하였는데, 이는 교배 당시 수분이 정상 적으로 이루어지지 않아 착과율이 낮은 것으로 사료 된다. 이를 보완하기 위해 2차년도에 클레멘틴을 모본으로 하여 방임수분에 의하여 형성된 과실을 수확 하고 2,040개의 실생 개체를 추가로 확보 하였다. 2차년도 리×올란도 조합과 3차년도 리×베니바에, 리×P. star ruby 조합에서 역시 획득 한 과실의 수가 매우 적은 데 이는 교배에 사용한 종자친에 이상이 있는 것으로 추정 하고 있다.

<표 1. 년도별 교배조합 내역, 조합별 교배화수, 수확 과실수, 획득 종자수, 득묘수>

년도	교배조합	교배화수	수확 과실수	획득 종자수	득묘수
2013	클레멘틴×베니바에	1,017	80	694	579
	청견×베니바에	818	81	1,336	1,021
2014	하레히메×올란도	125	40	64	11
	하레히메×플레임	116	15	13	2
	에히메28호×올란도	294	70	110	93
	에히메28호×P. star rubby	322	38	1	1
	클레멘틴×올란도	586	4	61	2
	클레멘틴×베니바에	192	1	25	4
	리×올란도	598	3	54	12
	클레멘틴 모계		465	2,976	2,040
2015	에히메28호×타로코	476	90	6	5
	에히메28호×페이지	439	72	305	238
	에히메28호×레드블러쉬	137	60	36	27
	피나소데아×레드블러쉬	316	48	834	788
	피나소데아×페이지	311	77	1,886	1,818
	리×베니바에	145	0	0	0
	리×P. star rubby	910	0	0	0
	리×클레멘틴	720	8	162	82
	청견×세미놀	88	20	352	276
	청견×상귀넬리	77	10	60	42
2016	피나소데아×올란도	1,000	81	1,223	1,218
	피나소데아×노바	507	96	1,039	1,030
	Wil King×올란도	415	126	1,211	*
	Wil King×페이지	274	48	392	*
	에히메28호×레이루비	284	60	375	366
	에히메28호×플레임	172	21	44	44
	에히메28호×타로코	169	11	0	0
	에히메28호×미하야	259	22	98	95
	에히메28호×베니바에	1,658	329	2,340	2,246
	리×블러드샤무티	168	12	123	121
	리×스타루비	1,075	11	20	20
	리×베니바에	660	33	964	935
	청견×리	1,133	251	4,730	682
	클레멘틴(이)×미하야	613	232	5,810	561
	클레멘틴(이)×세미놀	1,470	367	9,878	*
<b>합계</b>		<b>17,544</b>	<b>2,882</b>	<b>37,222</b>	<b>14,359</b>

<\* : 교배 조합별 획득 종자를 확보 후 발아 유도 중임>

## 2. 종자수확 및 파종

### 가. 연구 내용 및 방법

교배 조합별로 획득 한 종자는 세척 후 12시간 정도 실온에서 수분을 충분히 건조시키고 지 피포트 또는 50구 원예용 트레이에 원예용상토를 충전 시킨 후 파종하였다. 파종 시 종자의 외 피를 제거하여 파종하기도 하였는데, 외피를 제거 할 경우 일반 파종 시 보다 15일 빠르게 발 아가 진행됨을 확인 하였다. 파종 후 폐쇄형 식물공장 내 육묘실 및 유리온실에서 야간 15~20℃를 유지하며 발아를 유도 하였다. 파종 후 약 20일 경과 한 이후에 순차적으로 발아가 진행 됨을 확인 하였다. 유리온실에서는 야간 온도를 확보하기 위하여 재배단 밑부분에 전기열선을 설치하였고 상부에는 비닐 자동개폐시설을 이용하여 야간에 닫히고, 주간에는 열리도록 별도의 시설을 설치하였다.



<그림 1. 에히메28호×베니바에 조합에서 형성된 종자(좌), 피나소데아×올란도 조합에서 형성된 종자(가운데), 청견×리 조합에서 형성된 종자(우)>



<그림 2. 지피포트를 이용하여 획득 종자 발아유도(좌), 폐쇄형 식물공장 내 육묘실에서 종자 발아 유도(가운데), 유리온실 내 재배단에 열선 및 비닐 자동개폐시설을 이용하여 발아유도(우)>

## 3. 조기결실유도

### 가. 연구 내용 및 방법

#### (1) 교잡실생묘 육묘



발아를 시작 한 개체는 12구 육묘포트 또는 24구 육묘포트에 이식하여 유리온실 내에서 생육을 유도 하였다. 포트에 충전하는 상토는 일반 원예범용 상토(50L)와 중량 상토(20kg)를 2:1의 비율로 혼합 후 관수하여 상토가 충분히 물을 흡수하게 한 후 포트에 상토를 충전 후 교잡실생개체를 이식 하였다. 이식 후 30일이 경과 한 후에는 멀티피드(11-11-33-미량원소) 500배, 하이파칼(15.5-0-0-26.5) 1,000배 희석 하여 전기동력 분무기를 이용하여 포트에 관주하였다. 교잡묘 육묘에 12구 육묘포트를 이용하고 앞서 기술한 방법으로 주 2회 관주를 하면 통상적으로 종자를 획득 후 고집에 까지 약 16개월 육묘를 하게 되는 데 고집에 적당한 충실한 크기의 묘를 얻는 것이 가능하다고 판단된다. 하지만 4차년도에는 획득 한 종자의 개수가 많고 육묘시설이 한정 되어 있어 24구 육묘포트를 이용하여 육묘를 하고 있다.



<그림 3. 12구 포트 및 사각포트를 이용한 감귤 교잡묘 육묘, 에히메28호×올란도(좌), 에히메28호×P. star ruby(가운데), 클레멘틴×베니바에(우)>

(2) 양액재배 시설을 이용한 교잡실생묘 육묘

일반적으로 새로운 품종을 육성하기 위하여 교배를 실시하고 종자를 획득 후 약 16개월 이상을 육묘 하여야 절집 또는 고집이 가능하다. 이러한 시간상의 문제를 단축시키기 위하여 양액재배시설을 이용하여 감귤 교잡묘를 육묘하는 연구를 진행 하였다. 예를 들어 교배 한 조합에서 11월에 종자를 획득 하고 양액재배 시설에 파종하여 다음 해 5월 경 고집 또는 절집을 실시하는 것을 목표로 하였다. 500L 100배액 기준으로 하여 EC : 1.0, pH : 5.8, 2일 1회 양액을 급여하는 것으로 하였고 1회 급여시 개체 당 300ml를 공급하는 것으로 설정하였다. 2015년 1월 8일에 최초 양액 공급을 시작 하였고, 2차년도에 획득 한 클레멘틴 모계 자연수분 실생 880주, 에히메28호×올란도 3주를 재배하였다. 초기의 생육은 육묘포트를 이용한 재배에 비하여 우수하나 관행 육묘에 비하여 시간의 경과에 다른 생육의 차이점이 없는 것으로 판단 되었다.

<표 2. 감귤 교배 실생묘 양액 조성표>

A액	B액
질산칼슘 50kg	질산칼륨 17kg
질산칼륨 17kg	제1인산암모늄 5kg
킬레이트철 0.4kg	제1인산칼륨 1.5kg
질산 300ml	황산칼륨 2kg
	황산마그네슘 18kg
	황산망간 0.075kg
	몰리브덴산나트륨 0.005kg
	질산 300ml



2015년 1월



2015년 3월



2015년 11월

<그림 4. 양액재배 시설을 이용한 실생묘 육묘>

(3) 1주지 및 수평 유인 생장

감귤은 상대적으로 긴 유년성을 가지고 있고 이러한 감귤의 특성이 감귤 육종의 문제점 중의 하나이다. 이를 해결하기 위하여 육종기간을 단축 시키는 일이 매우 중요하다고 할 수 있다. 실생묘를 그대로 식재하지 않고 온주밀감을 중간대목으로 접목하거나 탱자에 접목을 실시하면 조기에 개화 및 착과를 유도 할 수 있다. 이는 유년기가 짧은 대목이나 이미 개화와 결실이 이루어지는 온주밀감 중간대목에 명확하지는 않지만 존재하는 것으로 알려진 개화 호르몬과 연관이 있는 것으로 추정하고 있다. 또 교배 실생을 접목부 지표면으로부터 1.8~2m까지 1주지로 유인하고 9~11월 사이에 나머지 부분을 지표면과 수평 또는 45° 이내로 유인하면 조기에 개화와 결실을 유도할 수 있다(奥代 등, 1980)

제주시 조천읍 와흘리 소재 (주)제농 감귤 육종 포장내 비가림 하우스 및 노지 포장에 있는 감귤나무에 2014년 4월 자연수분 유래 클레멘틴 실생 282주, 리 실생 85주, 56-423 실생 4주, 2015년 3월에는 1차년도에 획득 한 클레멘틴×베니바에, 청견×베니바에 조합에서 획득 한 교잡 실생묘 1,335주, 2016년 4월에는 2차년도에 획득 한 교잡실생묘 2,057주를 고접 하였다. 비가림 하우스에 고접한 실생묘는 1주지로 유인 생장 시키다가 9~11월에 지표면과 수평으로 자라도

록 유인생장을 시켰다. 노지에 고점한 실생묘는 3m 지지대를 사용하여 1주지 형태로 유인 생장 시키고 있다.



<그림 5. 자연수분 유래 실생묘 1주지 및 수평 유인 생장(좌), 2015년 고점 감귤교잡묘 1주지 및 수평 유인 생장(우)>



<그림 6. 2016년 노지 포장에 고점 후 1주지 유인 생장 시키고 있는 감귤교잡묘>

## 나. 결과 및 고찰

### (1) 과실특성 조사

2014년 4월 비가림 하우스 내 온주밀감 성목에 고점한 자연수분 유래 클레멘틴, 리 실생 개체에서 2016년 5월 착화가 되었고 동년 11월 착과된 개체에 대하여 과실특성 조사를 실시 하였다. 클레멘틴을 모본으로 한 실생 중 4개체와 리를 모본으로 한 실생 중 3개체에서 착과를 확인 하였다.

리를 모본으로 하여 착과된 실생 개체의 과실특성을 조사 한 바 과중은 150~300g, 과형지수는 103~130이며 원형 또는 편원형의 형태를 나타내고 있으며 당도는 11 °Brix내외 이며 산함량이 0.8 이하여서 당산비는 우수하게 확인 되었으나 과형의 모양이 기존 재배되고 있는 만단린 품종에 비하여 상대적으로 떨어지는 원추형의 모양을 띠는 개체가 있고, 과경 부위에 요철이 발생한 품종이 있었다. 과립의 양은 기존 품종에 비하여 매우 부족하였고, 과심이 치밀하지 못하여 빈 공간이 많이 보였다. 과피색은 a 값이 30 정도를 나타내어 연한 주황색을 띠었

다.

클레멘틴을 모본으로 한 실생에서는 과피색의 a 값이 35이상을 나타내는 개체가 있었으나, 내부에 종자가 다수 발생 하였고, 과중이 80g 정도인 소형과 이며, 과형지수가 140으로 편구형의 특성을 나타내어 기존 만다린 품종에 비하여 품질이 떨어지는 특성을 확인 할 수 있었다.

<표 3. 클레멘틴 및 리를 모본으로 한 실생 개체의 과실특성>

번호	조사 일시	과중 (g)	과형 지수	과육율 (%)	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
14-03-14*	16.11.15	355.5	110.8	91.7	3.94	0.0	9.9	0.51	19.41	12.87
	16.11.22	340.7	113.7	82.7	2.74	0.0	10.7	0.55	19.45	24.51
	16.12.15	250.3	117.1	80.2	3.28	0.0	11.4	0.62	18.39	25.28
14-03-16*	16.11.15	107.9	108.4	84.6	3.38	3.0	9.9	0.81	12.22	18.59
	16.11.22	156.2	103.2	81.7	3.29	14.0	10.6	0.49	21.63	21.12
	16.12.15	133.5	99.7	83.2	2.70	5.0	11.2	0.95	11.79	31.49
14-03-19*	16.11.15	232.6	124.6	87.6	1.89	0.0	10.0	0.60	16.67	16.18
	16.11.22	269.8	129.5	87.1	2.11	0.0	10.5	0.55	19.10	21.95
	16.12.15	275.2	123.7	86.2	2.02	0.0	11.8	0.69	17.10	26.14
	16.12.22	235.0	129.2	86.3	2.33	0.0	12.3	0.75	16.40	25.66
	16.12.29	241.9	129.9	85.0	2.39	0.0	12.6	0.62	20.32	28.27
	17.01.12	189.2	135.8	85.2	2.00	0.0	13.6	0.59	23.05	24.41
14-04-16**	16.11.22	31.0	111.9	79.4	1.70	2.0	8.9	2.10	4.24	16.62
14-05-09**	16.11.22	105.5	119.2	83.7	2.46	5.0	9.2	0.50	18.40	34.06
14-12-19**	16.11.15	84.0	141.0	79.7	3.07	25.0	9.9	0.51	19.41	35.01
	16.11.22	83.1	135.1	81.8	2.11	27.5	10.3	0.81	12.72	37.83
	16.12.15	74.8	142.4	81.4	2.06	17.5	11.3	0.89	12.70	37.82
	16.12.22	56.6	131.2	82.3	1.88	20.5	10.5	1.57	6.69	30.41
14-13-08**	16.11.15	33.8	114.8	66.1	3.41	5.7	9.9	0.66	15.00	24.81

<\* : '리'를 모본으로 한 실생개체, \*\* : '클레멘틴'을 모본으로 한 실생개체>



<그림 7. 14-03-16의 과경부, 배꼽 및 단면>



<그림 8. 14-12-19의 과경부, 배꼽 및 단면>

#### 4. 우수계통 선발

##### 가. 연구내용 및 방법

###### (1) 육성 경위

우수한 특성을 갖는 만다린 품종을 육성하고자 에히메28호를 종자친으로 하고 병감을 화분친으로 하여 교배를 실시 후 교잡실생 개체를 획득하고 육묘하여 온주밀감을 중간대목으로 고접 후 1주지 유인생장 시켜 착화 및 착과를 유도 하였고 과실의 특성조사를 실시 후 우수한 개체를 선발하여 추가적으로 특성을 조사하였다. 선발 된 개체 중 1개체는 JNM1으로 임시 계통번호를 부여하고 2016년 12월 특허를 출원하였다.

현재 제주지역에서 재배되고 있는 만감류 중 연내 수확이 가능한 품종은 에히메28호 이고, 과피의 색이 홍색을 띠고 있는 감평이 1월 중순이며, 세또까지는 2월 상순에서 하순 사이이고, 부지화의 경우는 2월~3월이 수확의 적기이다. 따라서, 본 과제에서의 조숙성의 기준은 에히메28호와 유사하고, 과피색·당도·산도 등의 특성은 감평을 기준으로 하여 품종개발의 목표를 정하였다.

##### 나. 결과 및 고찰

###### (1) 과실의 특성

JNM1은 에히메28호×병감 조합의 교잡실생 개체이다. 수확기는 12월에서 1월로 에히메28와 유사하다고 할 수 있다. 과피의 색이 홍색(착색 a 값 : 35이상)이다. 종자가 생기고 발생된 종자는 단배성의 특성을 가지고 있다. 과중은 약 110g이며 에히메28호에 비해 적다. 과형지수는 120 정도이며 편원형의 특징을 가지고 있다. 과피의 두께는 에히메28호에 비해 조금 얇다. 착색은 JNM1이 11월 27.76을 보이며 계속적으로 과피의 색이 진해지는 경향을 확인 하였다. 당도 또한 12월에 12°Brix를 보이다가 1월에는 13°Brix를 보이고 있다. 하지만, 산함량은 에히메28호 비하여 상대적으로 떨어지는 시기가 늦다고 할 수 있다. 2016년 조사에서는 과중은 약 140g 정도이고 과형지수는 120 정도를 보이고 있다. 과중은 2015년 조사에서 보다 약 20g 정도가 증가 하였다. 과피의 색은 색차계를 이용하여 측정 하였을 때의 a 값이 35 정도를 나타내

어 홍피의 특성을 가지고 있는 것으로 확인 되었으며, 당도는 약 13°Brix 이다. 산함량은 1월 이후에 1이하로 감소가 되는 것으로 확인 되었다. 부피의 경우는 발생하지 않았을 때를 0으로 하고 매우 심했을 때를 3으로 한다면 1월 말에 약 0.2의 값을 보여 진행이 되고 있음을 확인 하였다. 저장성의 부분은 추가적인 조사가 필요 하다고 생각이 되지만 과피가 두껍지가 않고 모본의 특성을 고려하였을 때 에히메28와 비슷한 특성을 보일 것으로 추정하고 있다.

<표 4. JNM1과 에히메28호의 과실특성 비교>

	조사 일시	과중 (g)	과형 지수	과육율 (%)	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
JNM1	15.11.02	111.8	127.1	84.8	1.92	0.0	12.2	1.96	6.22	27.76
	15.11.16	122.0	123.2	85.9	1.93	0.0	12.0	1.66	7.23	34.83
	15.11.27	128.4	118.9	85.4	2.18	2.2	12.1	1.47	8.23	34.50
	15.12.09	117.4	115.2	85.8	1.79	1.0	12.1	1.46	8.29	33.64
	15.12.15	126.8	119.9	84.6	2.06	0.2	12.5	1.39	8.99	37.63
에히메28호	15.11.02	242.9	117.1	85.6	2.54	0.0	10.1	1.10	9.18	18.99
	15.11.16	208.3	108.7	87.3	2.09	0.0	10.3	1.17	8.80	25.39
	15.11.27	252.4	111.7	83.5	3.00	0.0	12.3	1.01	12.18	32.31
	15.12.09	260.7	111.6	82.7	2.49	0.0	11.0	1.00	11.00	32.52
	15.12.15	308.3	121.1	80.3	3.18	0.0	12.0	0.96	12.50	35.73

<표 5. JNM1 과실특성 - 2015년>

	조사 일시	과중 (g)	과형 지수	과육율 (%)	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
JNM1	15.12.23	124.2	115.9	84.3	2.10	1.2	13	1.27	10.24	37.09
	15.12.30	101.0	111.7	83.9	1.91	0.6	13	1.20	10.83	38.03
	16.01.05	107.3	119.7	83.7	2.11	0.6	13.2	1.23	10.73	38.57
	16.01.13	102.9	120.6	83.3	2.16	1.7	13.4	1.15	11.65	38.83

<표 6. JNM1 과실특성 - 2016년>

	조사 일시	과중 (g)	과형 지수	과육율 (%)	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
JNM1	16.11.16	140.2	122.7	86.8	2.09	0.6	11.1	1.58	7.03	28.04
	16.11.22	145.4	126.8	86.9	2.16	0.0	11.4	1.40	8.14	28.45
	16.12.15	157.9	128.8	85.6	2.13	0.0	13.2	1.07	12.34	36.19
	16.12.22	146.2	126.3	85.9	2.27	0.0	14.1	1.36	10.37	36.36
	16.12.29	159.4	122.5	84.7	2.35	0.0	12.9	0.98	13.16	35.58
	17.01.12	136.2	118.8	83.9	2.33	0.6	12.7	1.09	11.65	33.11
	17.01.19	128.9	114.7	83.9	2.25	0.0	13.1	1.18	11.10	35.51
	17.01.26	127.8	124.8	84.9	2.11	0.0	14.6	1.10	13.27	34.38
	17.02.03	107.1	113.0	84.1	2.22	0.8	14.0	1.06	13.21	33.95



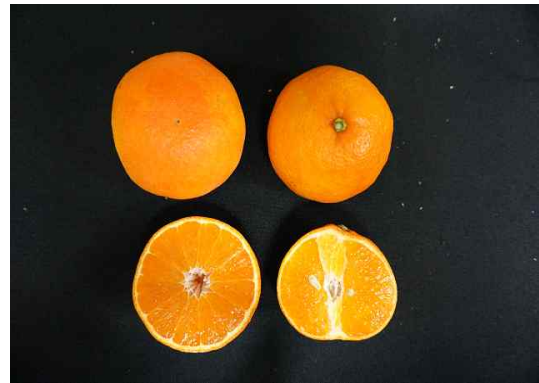
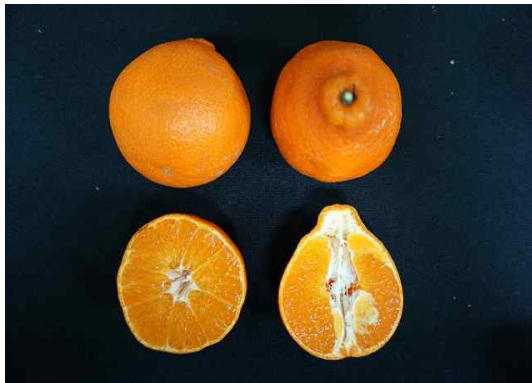
<그림 9. JNM1(좌), 에히메28호(우)>

JNM1이외에 에히메28호×병감 조합의 교잡실생 개체 중 일부 개체를 선발하여 계속적으로 과실의 특성을 조사하였다. 특히 109번과 132번 개체의 경우 과피의 색이 홍색이며 당도 12°Brix, 산함량 1% 내외를 보이고 있다. 109번은 한라봉 처럼 과경부에 봉(neck)이 발생하며 한라봉에 비하여 횡경이 조금 짧아 과형지수는 89정도를 보이고 있다. 132번은 과중이 290g 정도이며 과형지수는 115정도를 나타내고 있으며 에히메28호와 매우 유사한 특성을 가지고 있는 것으로 판단된다. 선발 된 개체에 대해서는 향후 지속적인 특성 조사를 실시 할 예정이며, 최종 선발이 필요한 품종에 대해서는 착화·착과 습성, 수량성, 수세, 해거리 정도 등의 항목에 대한 정밀특성조사를 실시 할 예정이다.

<표 7. 에히메28호×병감 조합 교잡실생개체들의 과실특성>

	조사 일시	과중 (g)	과형 지수	과육율 (%)	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
11-10	16.11.16	134.0	94.8	76.6	3.42	0.0	10.7	1.78	6.01	8.56
	16.11.22	161.8	97.0	76.9	3.52	1.6	11.0	1.55	7.10	12.63
	16.12.15	157.0	102.3	79.4	2.94	0.0	11.6	1.12	10.36	21.14
	16.12.22	165.6	100.9	75.4	3.91	3.0	11.6	1.15	10.09	25.99
	16.12.29	156.9	97.2	77.1	3.35	0.6	12.0	1.16	10.34	27.42
	17.01.12	174.0	95.9	74.0	4.08	5.8	12.3	1.07	11.50	24.41
	17.01.19	170.7	97.4	74.3	3.78	4.2	12.2	0.96	12.71	31.04
	17.01.26	169.1	99.6	77.5	3.71	4.8	11.9	0.77	15.46	31.25
	17.02.03	196.8	108.6	78.8	3.60	1.8	11.8	0.93	12.69	30.81
11-26	16.11.16	119.0	153.0	81.6	2.39	0.0	11.7	0.67	17.46	22.49
	16.11.22	130.2	138.7	81.9	2.47	0.0	11.4	0.60	19.00	21.12
	16.12.15	124.7	141.5	82.1	2.22	0.0	11.9	0.65	18.31	25.29
	16.12.22	122.6	147.6	81.3	2.50	0.0	12.6	0.87	14.49	27.28
	16.12.29	114.9	143.4	81.8	2.32	0.0	12.6	0.69	18.26	26.98
	17.01.12	126.8	147.8	78.4	2.77	0.0	13.8	0.75	18.40	28.65
	17.01.19	129.8	149.4	80.0	2.69	0.0	13.0	0.79	16.46	29.88
	17.01.26	120.1	144.8	80.1	2.69	0.0	13.0	0.70	18.57	28.24
	17.02.03	104.5	144.7	80.0	2.60	0.0	14.0	0.87	16.09	28.16

	조사 일시	과중 (g)	과형 지수	과육율 (%)	과피두께 (mm)	종자수 (개)	당도 (°Brix)	산함량 (%)	당산비	착색 (*a)
11-109	16.11.16	187.6	100.9	87.3	1.76	0.0	10.1	1.28	7.89	30.50
	16.11.22	197.3	89.7	86.2	1.91	0.0	11.4	1.31	8.70	34.28
	16.12.15	194.5	83.8	84.8	1.89	0.6	11.5	1.17	9.83	34.59
	16.12.22	178.1	83.6	84.4	1.87	0.2	11.9	1.15	10.35	35.68
	16.12.29	204.8	87.4	83.2	2.28	0.0	12.3	0.92	13.40	36.97
	17.01.12	165.1	87.2	85.7	1.66	0.0	12.6	1.18	10.68	35.18
	17.01.19	175.9	89.5	85.0	1.77	0.2	13.4	1.08	12.41	36.48
	17.01.26	196.9	89.4	82.7	1.98	0.0	13.9	0.99	14.04	35.43
	17.02.03	201.1	92.0	82.2	2.12	0.8	13.3	0.91	14.62	36.23
11-129	16.11.16	177.3	117.6	82.8	2.78	3.4	11.7	0.82	14.27	19.08
	16.11.22	191.8	113.0	82.6	2.31	5.4	11.9	0.63	18.89	20.30
	16.12.15	166.3	117.0	85.0	2.12	2.8	12.6	0.77	16.36	23.88
	16.12.22	148.0	108.0	82.8	2.31	0.4	11.9	0.60	19.83	21.93
	16.12.29	177.5	112.8	82.4	2.71	2.4	12.9	0.56	23.04	24.84
	17.01.12	179.6	114.7	82.8	2.30	2.2	13.2	0.53	24.91	26.47
	17.01.19	138.8	118.2	84.3	2.11	0.4	13.6	0.53	25.66	27.16
	17.01.26	124.5	115.3	85.0	1.81	2.0	12.5	0.48	26.04	24.55
	17.02.03	154.7	119.8	83.5	2.26	0.0	16.7	0.70	23.86	30.47
11-132	16.11.16	278.0	114.0	85.4	3.12	1.0	11.2	1.12	10.00	29.54
	16.11.22	259.6	118.7	85.4	3.01	0.0	11.8	0.93	12.69	33.35
	16.12.15	254.9	118.1	84.5	2.94	0.0	13.3	1.05	12.67	32.93
	16.12.22	241.4	113.3	85.2	2.56	1.6	12.8	1.07	11.96	30.81



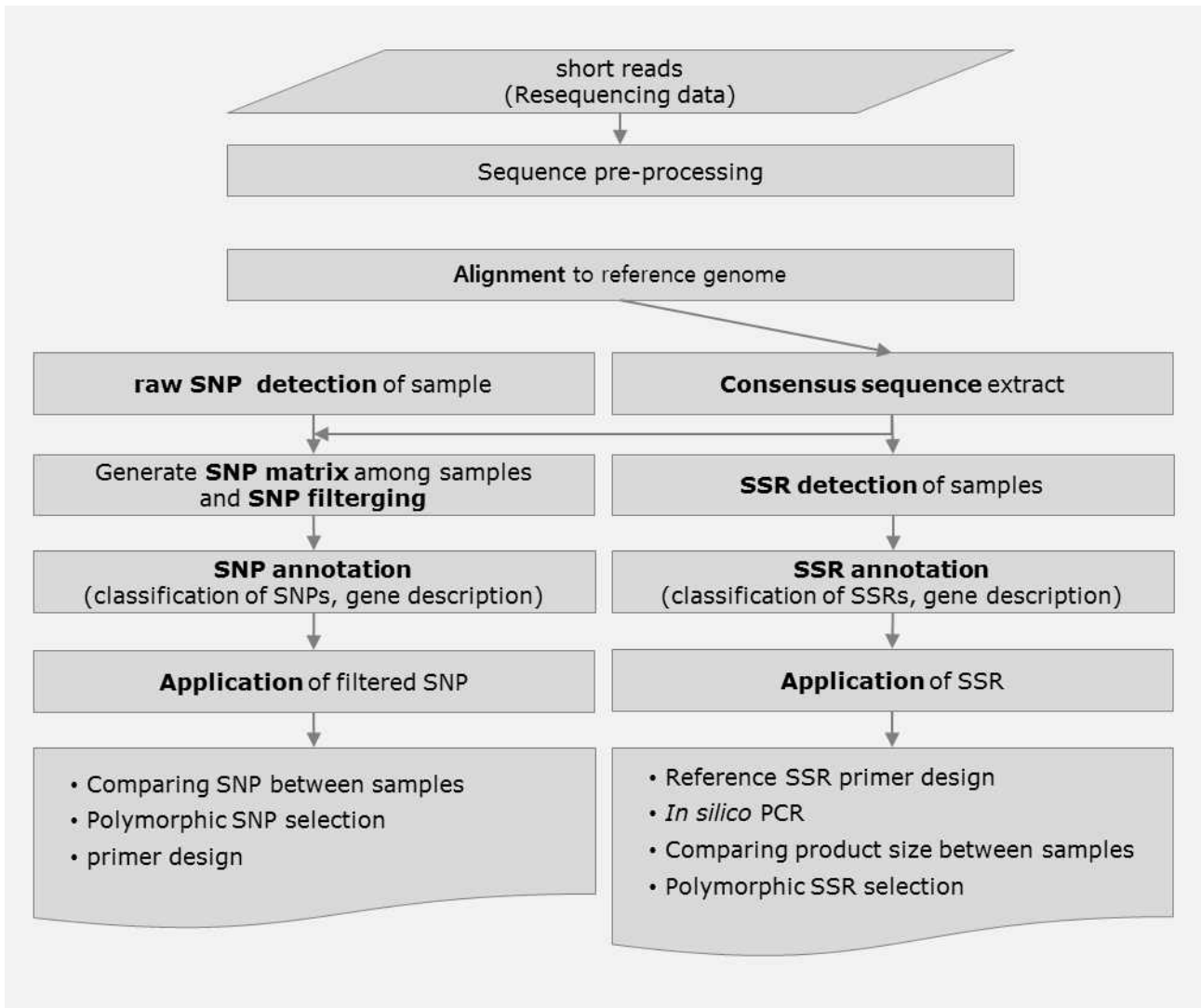
<그림 10. 11-109(좌) 및 11-132(우)>

## 5. 감귤 4종 re-sequencing data를 이용한 품종간 SNP, SSR marker 탐색

### 가. 연구내용 및 방법

#### (1) 분석 모식도





<그림 11. 분석모식도>

## (2) 분석 방법

### (가) Sequence pre-processing

Short reads의 전처리 과정을 위하여 SolexaQA (v.1.13) package [1]의 DynamicTrim과 LengthSort 프로그램을 사용하였다. DynamicTrim은 phred score에 따라 short read의 양쪽 끝의 bad quality base를 잘라내고 양질의 cleaned read로 정제하는 과정을 수행하며, LengthSort는 DynamicTrim에서 너무 많은 base가 잘린 read를 제거하는 과정을 수행하였다. DynamicTrim의 phred score  $\geq 20$ 을, LengthSort 과정은 short read length  $\geq 25$ bp 사용하였다.

### (나) Alignment to reference genome

전처리 과정을 통과한 cleaned reads를 BWA (0.6.1-r104) [2] 프로그램을 사용하여 표준유전체에 mapping을 수행하였다. mapping은 표준유전체와 시퀀싱한 샘플간의 raw SNP (In/Del)을 detection하기 위한 선행 과정으로서 BAM format의 파일을 생성하며, 다음의 옵션 이외에

는 기본 값을 사용하였다.

- maximum number of gap extensions (-e) = 50
- seed length (-l) = 30
- maximum differences in the seed (-k) = 1
- number of threads (-t) = 16
- mismatch penalty (-M) = 6
- gap open penalty (-O) = 15
- gap extension penalty (-E) = 8

(다) Raw SNP detection 및 consensus sequence 추출

Clean reads를 표준유전체에 mapping하여 생성된 BAM format의 파일을 SAMtools (0.1.16) [3] 프로그램을 사용하여 raw SNP (In/Del)을 detection하고, consensus sequence를 추출 하였고, 다음의 옵션 이외에는 기본 값을 사용 하였다.

- minimum mapping quality for SNPs (-Q) = 30
- minimum mapping quality for gaps (-q) = 15
- minimum read depth (-d) = 3
- maximum read depth (-D) = 270
- min indel score for nearby SNP filtering (-G) = 30
- SNP within INT bp around a gap to be filtered (-w) = 15
- window size for filtering dense SNPs (-W) = 15

(라) Generate SNP matrix

분석대상 간의 SNP 비교분석을 수행하기 위해 *SEEDERS in-house* script[4]를 이용하여 샘플간 통합 SNP matrix를 작성 하였다. 각 샘플을 표준유전체와 비교하여 얻은 raw SNP position을 후보로 하여 합집합의 리스트를 구축하고, 이 때, 빈 영역(non-SNP loci)은 샘플의 consensus sequence로부터 채워 넣는 filling 과정을 거쳐 matrix를 작성 하였다. 이후 샘플 간의 SNP비교를 통해 mis-calling된 SNP를 필터하고, SNP를 유형 구분 기준에 따라 분류 하였다.

**\*\*\* SNP 유형 구분 기준 \*\*\***

- **Homozygous:** SNP read depth  $\geq 90\%$
- **Heterozygous:**  $40\% \leq$  SNP read depth  $\leq 60\%$
- **기타:** Homozygous/Heterozygous 유형으로 구분할 수 없는 경우

(마) Classification of SNP

Calling된 SNP 좌를 표준유전체의 위치정보를 기반으로 'intergenic/genic-region'으로 분류 하고, genic-region은 다시 'cds/intron region'으로 세부 분류를 수행 하였다.

(바) 품종간 SNP 변이탐색

샘플간 통합 SNP matrix를 대상으로, 비교품종 간의 동일 SNP좌의 염기서열을 비교하여

서로 SNP인 경우 (polymorphic SNP)를 선발 하였다.

(사) SNP 마커 개발

비교품종 간의 polymorphic SNP좌를 target으로 하여 HRM(High Resolution Melting)용 SNP 마커를 개발하였다. 그러나 primer 디자인 시에, target loci에 인접한 다양한 변이 (SNP, In/Del)로 인해 primer를 디자인하는데 어려움이 있는 SNP좌는 마커 후보 대상에서 제외될 수 있다. primer는 Primer3 (v2.3.5) [5] 프로그램을 사용하여 다음의 조건 이외에는 기본 값을 만족하는 primer를 디자인 하였다. 이후 *in silico* PCR을 수행하여 게놈상에 한 번 관찰되는 primer를 선발 하였고 이는 추천하는 primer set 후보로 분류 하였다.

변이	Product size	Primer size	Melting temp.
SNP	80~150 bp	20~24 bp (optimum 20bp)	55~65°C (optimum 60°C)
In/Del	80~200 bp	20~24 bp (optimum 20bp)	55~65°C (optimum 60°C)

(아) SSR detection

Clean reads를 표준유전체에 mapping하여 생성된 consensus sequence 파일을 MISA (v1.0) 프로그램을 이용하여 raw SSR을 detection 하였다. SSR detection 조건은 아래와 같다.

♦ definition(unit_size,min_repeats):	2-6 3-5 4-4 5-3 6-2 7-2 8-2 9-2 10-2
♦ interruptions(max_difference_between_2_SSRs):	20

나. 결과 및 고찰

(1) Sequence pre-processing

<표 8. DynamicTrim data 통계치>

Sample description	No. of reads	Avg. Length (bp)	Total length(bp)	Trimmed/raw*	Genome coverage*
미네오라 (MN)	61,125,934	88.58	5,414,433,293	87.70%	≈27.27X
	61,125,934	75.14	4,593,141,805	74.40%	
베니바에 (BB)	63,547,946	88.54	5,626,547,120	87.66%	≈28.34X
	63,547,946	75.13	4,774,480,849	74.39%	
세미놀 (SN)	63,505,767	88.53	5,622,214,623	87.65%	≈28.35X
	63,505,767	75.30	4,781,841,037	74.55%	
스위트스프링 (SS)	62,435,349	88.79	5,543,520,618	87.91%	≈27.77X
	62,435,349	74.45	4,648,392,066	73.71%	
<b>4ea</b>	<b>501,229,992</b>	<b>81.81</b>	<b>41,004,571,411</b>	<b>81.00%</b>	

♦ Trimmed/raw: Total length of trimmed read / total length of raw read

♦ Genome coverage: 각 샘플의 Total read length를 예측 genome size(=367 Mb)로 나눈 값.

<표 9. LengthSort data 통계치>

Sample description	No. of reads	Avg. Length (bp)	Total length(bp)	Trimmed/raw	Genome coverage*
MN	53,696,252	93.01	4,994,042,255	80.89%	≈25.78X
	53,696,252	83.19	4,467,207,107	72.36%	
BB	55,912,620	93.05	5,202,723,438	81.06%	≈26.83X
	55,912,620	83.03	4,642,398,481	72.33%	
SN	55,751,090	93.09	5,189,756,814	80.91%	≈26.81X
	55,751,090	83.38	4,648,452,650	72.47%	
SS	54,452,596	93.27	5,079,024,937	80.54%	≈26.15X
	54,452,596	82.94	4,516,313,101	71.62%	
<b>4ea</b>	<b>439,625,116</b>	<b>88.12</b>	<b>38,739,918,783</b>	<b>76.52%</b>	

♦ **Trimmed/raw:** Total length of trimmed read / total length of raw read

♦ **Genome coverage:** 각 샘플의 Total read length 를 예측 genome size(=367 Mb)로 나눈 값.

(2) Alignment to reference genome

<표 10. Summary of read mapping>

Sample	No. of total reads	No. of mapped reads	Mapped region* (percentage %)
MN	107,392,504	86,059,978 (80.14%)	280,403,556 (95.00%)
BB	111,825,240	87,195,417 (77.97%)	286,546,457 (97.08%)
SN	111,502,180	88,641,673 (79.50%)	279,952,511 (94.84%)
SS	108,905,192	85,061,650 (78.11%)	277,461,526 (94.00%)

♦ **Mapped region:** 분석에 사용된 reference genome(301Mb) 대비, read mapping 되어 cover 하는 영역.

♦ **Percentage:** Mapped region/(reference genome - reference 의 N 영역)

(3) Genome-wide SNP and SSR

(가) SNP and SSR detection of sample

① SNP detection

각 샘플의 raw SNP를 이용하여 감귤 4 품종간의 통합 SNP matrix를 작성하고, 필터 기준을 통과한 SNP들을 ‘homozygous/heterozygous/기타’ 유형으로 구분하였다.

<표 11. Summary of SNP detection>

Sample	No. of total SNP	No. of Homozygous	No. of Heterozygous	No. of 기타
MN	1,829,362	594,235	592,888	642,239
BB	1,929,155	324,571	709,336	895,248
SN	1,951,697	597,401	654,503	699,793
SS	2,027,582	792,029	574,344	661,209

♦ **No. of Homozygous :** Reference genome에 mapping된 샘플의 reads의 90%가 동일한 SNP type을 나타내는 경우

♦ **No. of Heterozygous:** Reference genome에 mapping된 샘플의 reads의 40%~60%만 동일한 SNP type을 나타내고, 나머지는 reference genome과 동일한 type을 나타내는 경우

♦ **No. of 기타:** homozygous/heterozygous으로 구분할 수 없는 경우

청견[CK], 베니바에[BB], 세미놀[SN], 미네오라[MN], 스위트스프링[SS]의 polymorphic SNP를 추출하기 위해 해당 샘플을 이용한 통합 matrix를 작성하고 필터 기준을 통과한 SNP들을

‘homozygous/heterozygous/기타’ 유형으로 구분 하였다.

<표 12. Summary of SNP detection of all samples>

Sample	No. of total SNP	No. of Homozygous	No. of Heterozygous	No. of 기타
CK	2,113,271	669,908	603,065	840,298
SN	1,969,226	603,389	659,145	706,692
BB	1,949,413	327,843	716,336	905,234
SS	2,055,718	802,550	581,571	671,597
MN	1,845,532	600,077	596,992	648,463

- ♦ **No. of Homozygous:** Reference genome에 mapping된 샘플의 reads의 90%가 동일한 SNP type을 나타내는 경우
- ♦ **No. of Heterozygous:** Reference genome에 mapping된 샘플의 reads의 40%~60%만 동일한 SNP type을 나타내고, 나머지는 reference genome과 동일한 type을 나타내는 경우
- ♦ **No. of 기타:** homozygous/heterozygous으로 구분할 수 없는 경우

② SSR detection

각 샘플의 raw SSR을 이용하여 감귤 4품종 간의 통합 SSR matrix를 작성하고, 필터 기준을 통과한 SSR들을 motif 별로 분류하였다.

<표 13. Summary of SSR detection>

Motif type	Ref.	MN	BB	SN	SS
P2*	18,892	16,171	16,568	16,037	15,664
P3*	11,601	9,832	9,904	9,770	9,598
P4*	5,971	4,936	4,956	4,905	4,827
P5*	10,996	9,172	9,141	8,971	8,899
P6*	196,031	168,887	167,664	167,255	165,330
P7*	59,087	49,388	48,924	48,764	48,092
P8*	21,693	17,359	17,236	17,142	16,811
P9*	9,553	7,278	7,162	7,125	6,974
P10*	3,646	2,534	2,538	2,481	2,380
<b>Total</b>	<b>337,470</b>	<b>285,557</b>	<b>284,093</b>	<b>282,450</b>	<b>278,575</b>

- ♦ **p2:** di-nucleotide 예) (AC)6
- ♦ **p3:** tri-nucleotide 예) (AAG)5
- ♦ **p4:** tetra-nucleotide 예) (AAGT)4
- ♦ **p5:** penta-nucleotide 예) (AAAGT)3
- ♦ **p6:** hexa-nucleotide 예) (AAAAGG)2
- ♦ **p7:** hepta-nucleotide 예) (CAAAAAT)2
- ♦ **p8:** octa-nucleotide 예) (CGTATTCA)2
- ♦ **p9:** nona-nucleotide 예) (ATGAATACG)2
- ♦ **p10:** deca-nucleotide 예) (ATGAATACGG)2

청견[CK], 베니바에[BB], 세미늘[SN], 미네오라[MN], 스위트스프링[SS]의 polymorphic SSR을 추출하기 위해 해당 샘플을 이용한 통합 SSR matrix를 작성하였다.

<표 14. Summary of SSR detection of all samples>

Motif type	Ref.	CK	MN	BB	SN	SS
P2*	18,635	14,637	15,954	16,340	15,814	15,453
P3*	11,457	9,229	9,717	9,789	9,653	9,477
P4*	5,928	4,715	4,898	4,919	4,866	4,792
P5*	10,895	8,678	9,092	9,065	8,898	8,820
P6*	195,240	165,333	168,321	167,124	166,697	164,805
P7*	58,812	48,424	49,219	48,763	48,598	47,934
P8*	21,574	16,916	17,294	17,174	17,086	16,751
P9*	9,512	7,101	7,258	7,149	7,104	6,954
P10*	3,622	2,440	2,527	2,531	2,472	2,374
<b>Total</b>	<b>335,675</b>	<b>277,473</b>	<b>284,280</b>	<b>282,854</b>	<b>281,188</b>	<b>277,360</b>

- ♦ p2: di-nucleotide 예) (AC)6
- ♦ p3: tri-nucleotide 예) (AAG)5
- ♦ p4: tetra-nucleotide 예) (AAGT)4
- ♦ p5: penta-nucleotide 예) (AAAGT)3
- ♦ p6: hexa-nucleotide 예) (AAAAGG)2
- ♦ p7: hepta-nucleotide 예) (CAAAAAT)2
- ♦ p8: octa-nucleotide 예) (CGTATTCA)2
- ♦ p9: nona-nucleotide 예) (ATGAATACG)2
- ♦ p10: deca-nucleotide 예) (ATGAATACGG)2

(나) Classification of SNP and SSR

① Classification of SNP

<표 15. Summary of SNP classification by genome structure>

Sample	No. of total SNP	Region	Total	Homozygous	Heterozygous	기타
MN	1,829,362	CDS	193,702	46,062	82,233	65,407
		Intron	300,656	75,323	123,878	101,455
		UTR	76,852	19,585	29,869	27,398
		Genic-region	550,160	136,089	227,038	187,033
		Intergenic-region	1,279,202	458,146	365,850	455,206
BB	1,929,155	CDS	211,499	22,876	99,812	88,811
		Intron	327,109	35,171	151,836	140,102
		UTR	83,649	9,247	37,167	37,235
		Genic-region	599,006	65,030	277,651	256,325
		Intergenic-region	1,330,149	259,541	431,685	638,923
SN	1,951,697	CDS	209,590	47,814	90,593	71,183
		Intron	321,774	75,987	135,624	110,163
		UTR	82,322	19,314	33,086	29,922
		Genic-region	590,933	138,259	249,283	203,391
		Intergenic-region	1,360,764	459,142	405,220	496,402
SS	2,027,582	CDS	212,949	56,697	87,273	68,979
		Intron	327,066	90,692	130,141	106,233
		UTR	84,745	24,467	31,694	28,584
		Genic-region	601,370	165,756	239,304	196,310
		Intergenic-region	1,426,212	626,273	335,040	464,899

※ 표준유전체(*Citrus clementina*)의 유전자 영역이 overlap되는 경우가 존재하기 때문에 (Exon+Intron)에서의 총 SNP수는 중복으로 count되므로 "Genic-region"의 수치와 같지 않을 수 있음.

② Classification of SSR

<表 16. Summary of SSR classification by genome structure>

Sample	No. of total SSR	Region	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Ref.	335,675	Intron	3,063	1,263	1,151	1,358	23,290	8,156	2,781	913	386
		CDS	124	1,205	35	80	16,565	1,845	571	679	54
		UTR	975	581	293	429	7,369	2,378	683	269	119
		Genic-region	4,013	2,938	1,422	1,802	45,474	11,920	3,904	1,787	536
		Intergenic-region	14,879	8,663	4,549	9,194	150,557	47,167	17,789	7,766	3,110
SN	281,188	Intron	2,693	1,094	961	1,111	20,597	6,986	2,244	684	267
		CDS	105	1,047	28	67	15,240	1,681	517	592	42
		UTR	892	501	261	367	6,603	2,067	550	202	88
		Genic-region	3,556	2,548	1,201	1,491	40,870	10,321	3,207	1,420	381
		Intergenic-region	12,481	7,222	3,704	7,480	126,385	38,443	13,935	5,705	2,100
BB	282,854	Intron	2,696	1,088	952	1,075	20,101	6,787	2,193	675	274
		CDS	111	1,015	28	71	14,982	1,638	497	573	42
		UTR	870	507	256	347	6,465	2,005	536	196	83
		Genic-region	3,545	2,514	1,190	1,438	40,031	10,032	3,123	1,387	382
		Intergenic-region	13,023	7,390	3,766	7,703	127,633	38,892	14,113	5,775	2,156
SS	277,360	Intron	2,662	1,084	966	1,112	20,588	6,940	2,270	692	278
		CDS	113	1,049	30	74	15,235	1,646	510	589	43
		UTR	857	497	253	367	6,619	2,060	551	206	81
		Genic-region	3,501	2,537	1,199	1,496	40,861	10,241	3,232	1,426	387
		Intergenic-region	12,163	7,061	3,628	7,403	124,469	37,851	13,579	5,548	1,993
MN	284,280	Intron	2,698	1,099	979	1,141	20,793	6,986	2,284	711	278
		CDS	112	1,064	32	68	15,327	1,701	521	604	43
		UTR	880	504	260	366	6,664	2,122	558	207	83
		Genic-region	3,551	2,572	1,218	1,519	41,191	10,387	3,257	1,460	389
		Intergenic-region	12,620	7,260	3,718	7,653	127,696	39,001	14,102	5,818	2,145

(4) 품종간 변이 탐색 및 마커 개발

(가) SNP

① Polymorphic SNP detection

감귤 통합 SNP matrix에서 비교샘플 간에 동일 SNP 좌를 비교하여 서로 SNP인 경우(polymorphic SNP)를 선별하였다.

<표 17. Summary of polymorphic SNP detection between samples>

No. of SNP loci.	비교조합	Polymorphic loci*	Non-polymorphic loci*
3,851,837	CK vs BB	442,250	913,830
	CK vs SN	655,301	985,667
	CK vs MN	729,630	938,257
	SS vs BB	624,062	822,945
	CK, SS vs BB, SN, MN	30,189	158,705

\* **No. of SNP loci:** 샘플간의 비교 가능한 Total SNP 좌. (=SNP matrix loci)  
 \* **Polymorphic loci:** 비교샘플 간에 동일 SNP 좌에서 서로 polymorphism 을 보이는 경우.  
 \* **Non-polymorphic loci:** 비교샘플 간에 동일 SNP 좌에서 동일한 genotype 인 경우.

② HRM (High Resolution Melting) primer design

Polymorphic SNP를 target으로 하여 HRM primer를 디자인하되, 결과의 정확성을 높이기 위해 엄격한 기준의 필터과정을 거치며 primer 디자인은 reference genome 서열을 사용 하였다.

<표 18. Summary of HRM primer-set>

비교 대상	No. of polymorphic SNP*	No. of HRM candidate	No. of primer	No. of recommend*
CK vs BB	442,250	365,710	64,421	28,395
CK vs SN	655,301	544,143	99,216	38,411
CK vs MN	729,630	607,474	116,138	44,797
SS vs BB	624,062	517,863	101,865	49,688
CK, SS vs BB, SN, MN	30,189	24,995	6,130	4,333

♦ **Polymorphic SNP:** 비교샘플 간에 동일 SNP 좌에서 서로 polymorphism을 보이는 경우.  
 ♦ **No. of recommend:** 디자인된 primer-set 중에서 product sequence의 염기서열이 모두 read mapping되어 base의 비교과정을 통과한 primer로서 추천하는 primer-set의 개수를 의미함.



(나) SSR

① Polymorphic SSR detection & primer design

감귤 4 품종 통합 SSR matrix에서 비교샘플 간에 동일 SSR좌를 비교하여 서로 polymorphic 관계인 경우(polymorphic SSR)를 선발 하였다.

<표 19. Summary of polymorphic-SSR detection between samples>

No. of SSR loci	구분	CK vs BB	CK vs SN	CK vs MN	SS vs BB
272,570	<b>Polymorphic loci</b>	<b>29,115</b>	<b>32,176</b>	<b>32,120</b>	<b>30,763</b>
	Non-polymorphic loci	180,442	175,616	175,555	175,393
	Unknown loci	39,728	40,711	40,380	43,127
	Ambiguous loci	23,285	24,067	24,515	23,287

\* **No. of SSR loci:** 샘플간의 비교 가능한 Total SSR 좌. (=SSR matrix loci)

\* **Polymorphic loci:** 가상 PCR 을 수행하여 품종 간에 예상 product size 의 차이를 보이는 경우.

\* **Non-polymorphic loci:** 가상 PCR 을 수행하여 품종 간에 예상 product size 의 차이가 없는 경우.

\* **Unknown loci:** primer 영역의 서열부분이 결실(base=N)되어 있어 가상 PCR 을 수행하지 못해 비교를 할 수 없는 경우.

\* **Ambiguous loci:** 가상 PCR 수행 시, genome 상에 multi-band 로 나타날 가능성이 있으며, 이로 인해 품종 간 예상 product size 를 비교할 수 없는 경우.

<표 20. Summary of SSR primers>

비교대상	No. of SSR primer	No. of Recommend
<b>CK vs BB</b>	29,115	3,725
<b>CK vs SN</b>	32,176	4,171
<b>CK vs MN</b>	32,120	3,725
<b>SS vs BB</b>	30,763	3,994

\* **SSR Primer:** 가상 PCR을 수행하여 품종 간에 예상 product size의 차이를 보이는 경우.

\* **Recommend:** 품종 간 예상 product size의 차이를 보이지만, 그 이유가 SSR 영역 내에 존재하는 경우를 선발함.

## 6. SSR 마커를 이용한 감귤 교잡배 판별

### 가. 연구내용 및 방법

#### (1) 시료

에히메28호(AH28)×병감(BG) 교배조합 유래 6개 F1 계통(11-49, 11-109, 11-132, 11-10, 11-26, 11-129)의 잎 시료에 대해 Biomedic® gDNA Extraction Kit (Cat. No. BM-K140)를 이용하여 genomic DNA (이하 gDNA)를 추출한 후 본 실험의 재료로 사용하였다. 실험의 대조군으로는 모본(에히메28호)과 부분(병감)의 DNA(바이오메딕 자체 보유)를 사용하였다.

#### (2) 교잡배 선발

##### (가) M13-tailed PCR 및 genotyping

10  $\mu$ l의 PCR 반응 용액에 genomic DNA (~10 ng)와 제작된 10  $\mu$ M의 M13-tailed forward primer 0.2  $\mu$ l, reverse primer 1  $\mu$ l와 6-FAM labeled M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') primer 1  $\mu$ l, DSBio HSTM mix 5  $\mu$ l, 멸균 증류수를 첨가하여 혼합한 후, ABI 2720 thermal cycler (Applied Biosystems)를 이용하여 M13-tailed PCR을 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 열변성(heat denaturation)하고, 이어서 15회 사이클의 PCR 반응(94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초의 온도 변화 사이클)과 20회 사이클의 PCR 반응(94°C 30초, 53°C 30초, 72°C 30초의 온도 변화 사이클)을 연속하여 수행한 후 마지막으로 72°C에서 30분간 최종 신장(final extension) 반응을 시켰다. 반응이 종료된 PCR 증폭 산물은 1.0% agarose gel에서 전기영동을 통해 확인한 후, ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 통하여 genotyping을 실시하였다. Genotyping 결과는 GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems)를 통하여 분석하였다.

### 나. 결과 및 고찰

#### (1) 시료

6점의 시료로부터 gDNA를 추출한 후 전기영동을 통해 확인하였고(자료 미제시), 각각 약 10 ng/ $\mu$ l 이하의 농도로 실험에 사용하였다.

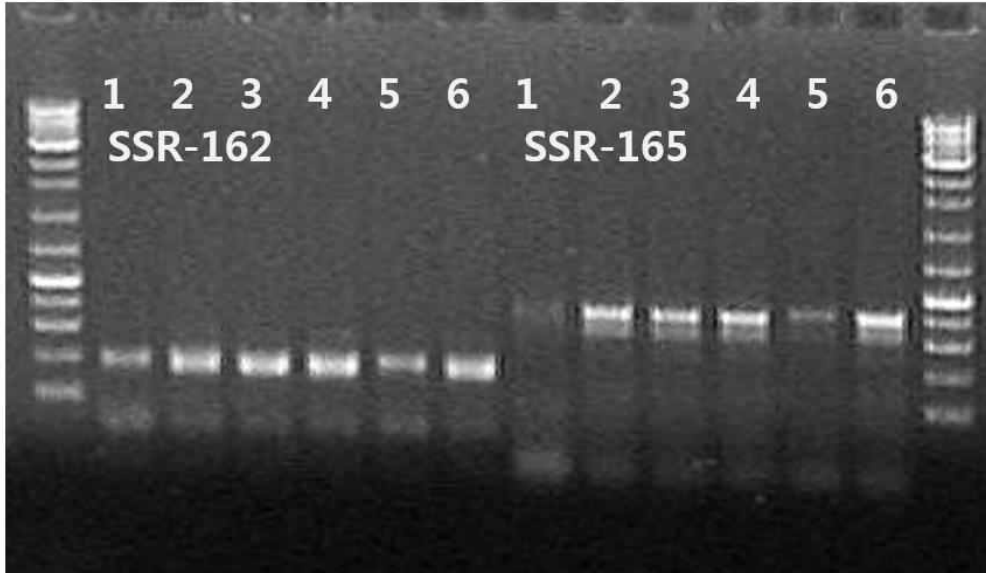
#### (2) SSR 마커 genotyping을 통한 교잡배 선발

##### (가) 에히메28호와 병감 간의 다형성 SSR 마커정보

에히메28호와 병감간에 다형성을 보이는 2개의 SSR 마커(Bm-CiSSR-162, Bm-CiSSR-165)를 사용하였다[(주)바이오메딕 지적재산권, 특허출원중]. Bm-CiSSR-162 마커의 경우, 에히메28호에서는 194, 209 bps (base pairs) 크기의 2개 대립유전자를 검출하며, 병감에서는 186, 206 bps 크기의 2개 대립유전자를 검출한다. Bm-CiSSR-165 마커의 경우, 에히메28호에서는 402 bps (base pairs) 크기의 1개 대립유전자를 검출하며, 병감에서는 417 bps 크기의 1개 대립유전자를 검출한다.

(나) M13-tailed PCR 및 genotyping

6개 시료의 gDNA에 대해 BMCi-SSR-162와 Bm-CiSSR-165 2개 마커를 이용하여 각각 M13-tailed PCR를 수행한 후 전기영동을 통해 확인하였고(그림12.), fragment analysis를 통한 genotyping을 수행 하였다.



<그림 12. BMCi-SSR-162와 Bm-CiSSR-165 마커를 이용한 PCR 산물의 전기영동 결과>

모본, 부분 및 6개 F1계통에 대해 fragment analysis를 통한 genotyping 수행 결과는 표 21과 같다.

<표 21. 에히메28호×병감 교배 조합의 6개 F1 계통에 대한 genotyping 수행 결과>

구 분		Bm-CiSSR-162	Bm-CiSSR-165
비홍피	11-10	186/194	402
	11-26	209	0/417
	11-129	186/194	402/417
홍피	11-49	209	0/417
	11-109	194/209	402
	11-132	186/194	402

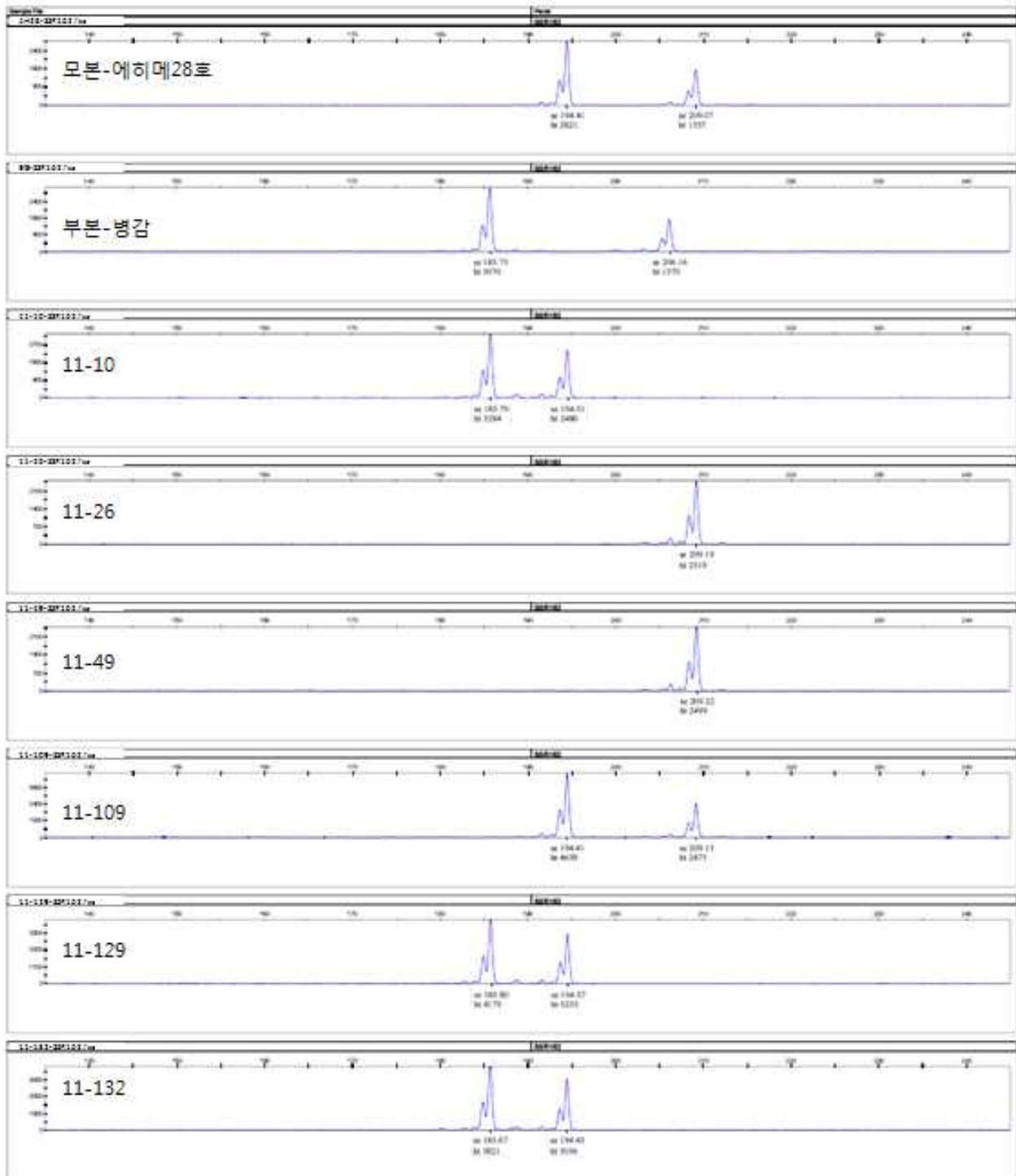
BMCi-SSR-162 마커를 이용한 genotyping 결과, 2개의 비홍피 시료(11-10, 11-129)와 1개의 홍피 시료(11-132)가 모본(194 bp)과 부분(186 bp)의 대립 유전자를 갖는 것으로 미루어 교잡배 유래 개체로 판별되었다(그림 13.).

BMCi-SSR-165 마커를 이용한 genotyping 결과, 1개의 비홍피 시료(11-129)는 모본(417 bp)과 부분(402 bp)의 대립 유전자를 동시에 가졌으나, 1개의 비홍피 시료(11-26)와 1개의 홍피 시료 (11-49)의 경우, 부분의 대립유전자만(417 bp) 되었다. 부분의 대립유전자만 검출된 개체의 경우도 교잡배 유래 개체로 판별하였는데, 그 이유는 다음과 같다. BM-CiSSR-165 유전좌

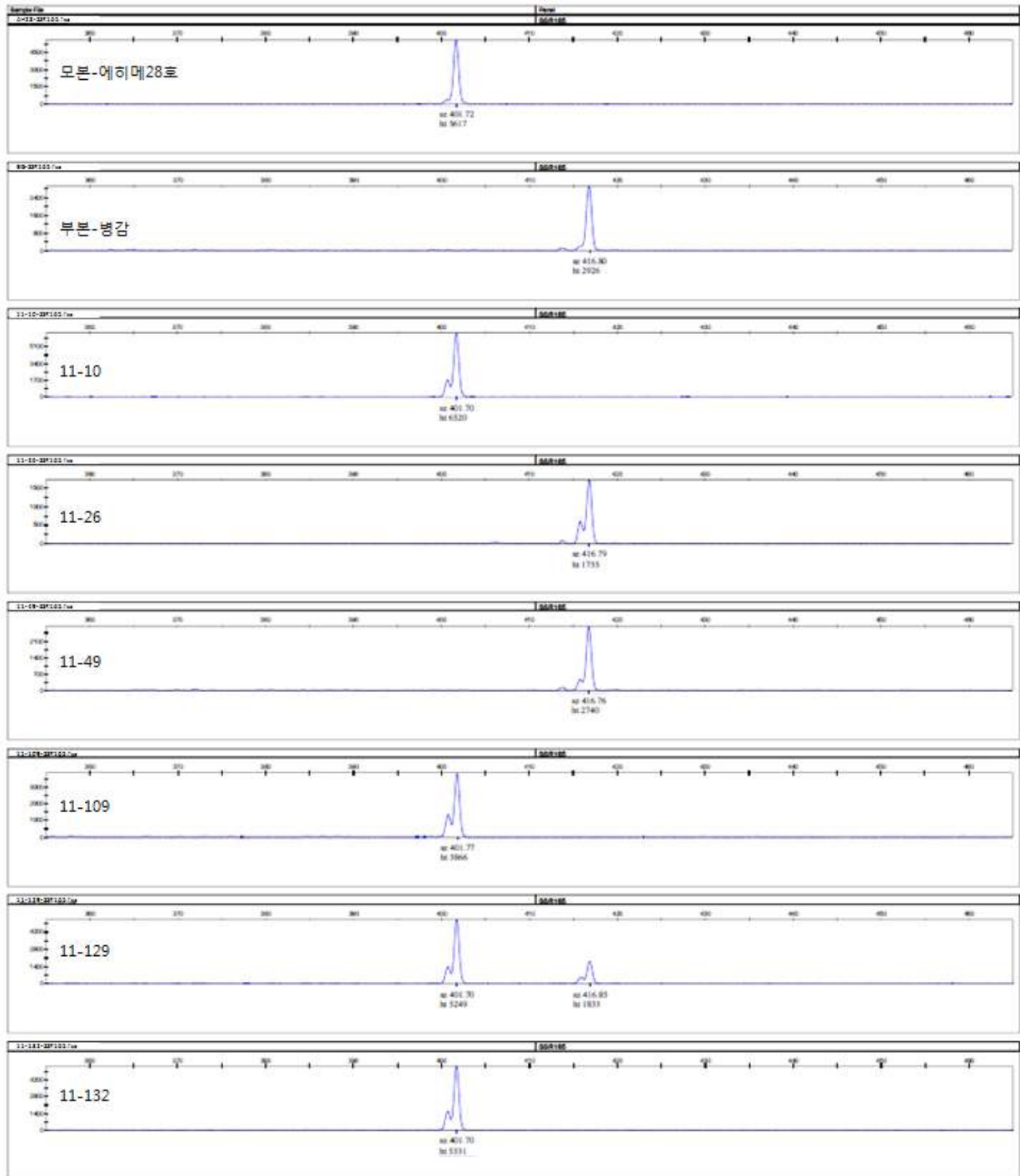
위(마커)에 대해 모본(자방친)에서는 하나의 대립유전자만이 검출되어 상동접합(homozygote)으로 판단할 수 있으나, 실제로는 대립유전자가 이형접합(heterozygote) 상태로 존재하기 때문에 생긴 현상으로 판단된다. 즉, 모본(자방친)에서 BM-CiSSR-165 유전좌위는 한쪽 상동염색체는 무효 대립유전자(null allele) 상태로 존재하는 것으로 사료된다. 따라서 무효 대립유전자를 갖는 배우체(gamete)와의 수정에 의해 유래한 F1 식물체는 BM-CiSSR-165 유전좌위(마커)에 대해 부분(화분친)의 대립유전자만이 검출될 수 있다.

결론적으로, 에히메28호×병감 교배조합에서 유래한 비홍피 3계통(11-10, 11-26, 11-129)와 홍피 2계통(11-49, 11-132)은 모본(자방친)과 부분(화분친)간의 교잡에 의한 계통으로 판단된다.

홍피 연관 분자마커는 감귤 품목의 I 프로젝트 2세부과제(과제명 : 감귤 주요형질 연관 분자표지 개발, 연구기관-(주)바이오메딕, 연구책임자-김호방)와의 협력연구를 통해 수행하였다.



<그림 13. BM-CiSSR-162 마커를 이용한 genotyping 결과>



<그림 14. BM-CiSSR-165 마커를 이용한 genotyping 결과>

## 제3절 조속 강세 만다린 품종개발

### 1. 만감류 주심배 in vitro 육종 기술 확보

#### 가. 연구 내용 및 방법

형태와 크기를 달리하는 부지화 과실로부터 미발달 종자를 채취하여 살균과 소독을 실시하고, MS 배지를 기본으로 특정 호르몬 조건하에서, 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.

#### 나. 결과 및 고찰

부지화는 “한라봉”이라는 상품명으로 잘 알려져 있으며, 온주밀감과 오렌지의 교배종인 청견(淸見)오렌지(*Citrus unshiu* Marc. × *C. sinensis* Osbeck)에 폰칸(*Citrus reticulata*)을 교배하여 얻은 품종으로 1990년대 초반 일본에서 도입되어 재배되고 있는 품종이다. 부지화는 온주밀감과 오렌지의 특성을 골고루 갖고 있어 좋은 품종으로서 뿐 아니라, 육종 소재로 가치가 있으나, 꽃가루 형성능이 약하고, 다배성인 특성이 있어 육종에 널리 이용하는데 제약이 있다. 부지화 과실에서는 수정이 이루어지지 않아 종자가 형성되지 않은 미발달 종자가 과육속에 존재하며, 이 미발달 종자에는 재생가능한 주심세포가 존재하며, 이를 분화 발달 시킬 경우 모계와 거의 동일한 유전형질을 가지고 있는 후대 개체를 얻을 수 있다.

그림 1 과 그림 2 에서 보이는 바와 같이, 특정 조건에서 부지화의 미발달 종자로부터 유도된 분화체는 구형(globular)과 어뢰(torpedo)형의 배모양을 나타내고, 점차 일반적인 식물체 모양을 형성하며 분화발달한다. 한 개의 미발달 종자에서는 다수의 배가 형성된다. 이는 부지화 품종이 다배성인 특성에 기인한 것으로 보이며, 종자에 따라 한 개에서 수십개의 배로 나뉘며, 각기 독립적으로 발달하여 식물체를 형성한다.

본 과제에서는 자연상태에서는 분화 발달되지 못하고 퇴화되는 부지화의 미발달 종자로부터 식물체를 유도하는 기내 배양 기술을 확립하였다. 이들로부터 유래된 식물체들은 기존의 우수한 품종에서 숙기, 착색, 성장과 같은 형질이 개선된 계통을 선발할 수 있는 모본을 획득에 이용하고자 한다.



① 부지화 미발달종자

② 배발생 유도

③ 배분화

그림1. 부지화 미발달 종자로부터 배발생이 유도되며, 한 개의 미발달종자로부터 다수의 배가 발생한다. 이들은 구형, 심장형, 어뢰형의 배과정을 걸쳐 점차유식물체로 분화된다.



④ 부지화 배분화 및 유식물체 유도

그림2. 분화된 유식물체는 경화과정을 거쳐 대목에 접목하고, 이들로부터 부지화 미발달종자 유래 배양체 집단을 형성한다.



## 2. 부지화 교배배 및 주심배 기내 유도

부지화 계통은 다배성인 동시에 꽃가루 형성이 불량하여, 국내에서는 그 특성이 우수함에도 감귤 육종재료로 널리 이용되지 못하고 있다. 만감류인 부지화의 특성을 나타내며, 숙기와 생력도가 강한 계통을 선발 육성하기 위하여, 온주밀감 계통의 성전온주로부터 꽃가루를 얻고, 부지화를 모본으로 교배를 실시하였다. 모본으로 이용한 계통은 M16계통과 유년성이 탈피되어 개화가 시작된 배배양체 유래 계통에 교배를 실시하였고, 한라봉 M16 X 성전온주에서 58개의 종자를 비롯하여, BA 28 X 성전온주, BA 34 X 성전온주, BA 141 X 성전온주로부터 각각 16개, 13개, 27개의 종자를 획득하였다. 이들 종자를 기내 발아시켜, 부지화 종자의 주심배 형성 갯수와 교잡배와 주심배 유래 식물체의 구분 기술을 개발하는데 이용하였다.

부지화 계통에 성전온주를 교배시킨 과실에서는 완전한 종자가 형성되었으며, 이는 부지화와 성전온주 사이에는 교잡배 형성능이 있음을 나타낸다. 지속적인 교배를 통하여 우수계통 선발에 이용될 수 있는 조합임을 나타낸다.

기내발아된 종자들은 2 - 7 개 정도의 다중 발아 특성을 보였으며, 이는 부지화 과실에서 획득된 종자내에 성전온주의 꽃가루와 수정되어 형성된 교잡체 식물체와 부지화의 모계 세포로부터 유래된 주심계통 식물체가 혼합되어 있음을 나타내고, 이들을 교배 조합으로 하여 품종을 육성하는 경우, 교잡체를 조기 판별할 수 있는 기술이 필요함을 보여준다.



① 부지화 X 성전온주 결실체      ② 부지화 X 성전온주 결실체 기내 발아유도

그림 3. 부지화를 모본으로 성전온주 꽃가루를 수정시켜 과실을 얻고, 이들로부터 형성된 종자를 채취하여 MS를 기본으로 한 배지에서 발아시킨다. 종자에 따라 2-7개 정도의 발아체가 형성되고 이는 한 개의 교잡배와 다수의 주심배 유래 발아체가 혼합되어 있음을 보여준다.

### 3. 만감류 교배 종자 배배양 기술 확보와 교배라인 확보

온주밀감과 부지화는 과실에 종자를 맺지 않는 품종으로 개화시 꽃가루 형성이 잘 이루어지지 않아 교배하여 감귤 품종을 육성하는 것이 어렵다. 또한 교배가 이루어져 종자가 형성되더라도 다배성인 특성으로 인해 교잡배 발달이 주심배에 비하여 위축되어 외부 파종 후 발아되어 자라는 식물체의 대부분은 모본과 유전적형태가 동일하거나, 매우 유사한 주심배 식물체가 형성이 되어, 교배를 통해 얻은 종자를 발아하여 교잡 품종을 얻기가 어렵다. 이로 인해 부지화와 온주를 교배 조합으로 하여 새로운 품종을 얻는데는 상당한 어려움이 있다. 부지화로부터 수분에 필요한 꽃가루를 형성시키고, 이를 확보할 수 있는 기술을 확보하고, 부지화의 꽃가루를 확보 하였다. 확보된 꽃가루를 오이다 조생, 삼전네이블, 하례조생, 상도조생을 모본으로 하여 교배 실시하였으며, 이들중 오이다 온주 X 부지화 교배 조합에서 착과된 38개의 과실에서 47개의 종자를 확보하고, 이들의 기내발아 시켰다. 각 종자에서 형성된 기내 발아체를 육안으로 개수한 결과 3 - 20 개 내외의 발아체를 형성하고 있음을 볼수 있었고, 이들을 분리 증식하여 각각의 독립된 개체로 증식시켰다.

부지화 X 성전온주를 교배하여 얻은 교배종자 기내 발아 유도체에서 SSR maker를 이용하여 Hybrid를 구분 선발하였다. 기내 배양 조건에서 한 개의 종자에서 형성된 여러 발아체를 구분 증식하고 이들에게서 DNA를 분리하여, 온주와 부지화를 구분 가능하다고, 1차 선발된 10 조합 SSR 프라이머를 이용 PCR을 수행 하였으며, 이들 중에서 교잡배로 나타나는 라인을 선발 하였다. 아래 그림에서 부지화를 모본으로하고 성전온주를 부분으로 한 조합에서 시료 5 번과 같이 배양체의 외형적 특성이 다르고, PCR 밴드 패턴으로 구분이 되는 교잡체를 구분 할 수 있었다.



그림 4. 오이다 온주 X 부지화 조합에서 형성된 종자의 기내 배양체. 모본인 오이다 온주는 다배성 계통으로 종자 한 개에서 3-20 개의 다중 발아 보였고, 이는 한 개의 교잡배와 다수의 주심배 계통이 혼재하기 때문이다.

#### 4. 부지화 온주 교배 조합 교잡배 구분 SSR marker 선발

##### 가. 연구 내용 및 방법

부지화 X 성전온주, 오이다 온주 X 부지화로부터 얻어진 종자에서 교잡체와 주심배 발아체를 구분하기 위하여 부지화, 성전온주, 오이다 온주로부터 gDNA를 분리하고, 이들을 Microsatellite MS PCR Amplification을 통해 세가지 품종을 구분할 수 있는 마커를 선발하였다.

- BMCi-SSR-A set Primer의 PCR 증폭을 위해, 1 ul (>50 ng/ul) gDNA, 각각 0.2ul primer (F/R, 10 pmol/ul), 5ul Taq polymerase Mix 를 혼합하여 최종10 ul 부피로 PCR을 진행하였다. PCR 조건은 다음과 같다. 95°C에서 3분간 열변성 후, 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초 (35 cycle)을 수행한 후 60°C에서 30분간 최종반응을시키고, 2% agarose gel 에서 전기영동하여 증폭된 산물들의 밴드를 확인하였다.

- BMCi-SSR-B set Primer는 1 ul (>50 ng/ul) gDNA, 각각 0.2ul primer (F/R, 10 pmol/ul), 5ul Taq polymerase Mix 를 혼합하여 최종10 ul 부피로 PCR을 진행하였으며, 95°C에서 5분간 열변성 후, 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초(35 cycle)을 수행한 후 72°C에서 10분간 최종 반응을 시킨 후 2% agarose gel에서 전기영동하여 증폭된 산물들의 밴드를 확인하였다

- BMCi-SSR-C set Primer는 1 ul (>50 ng/ul) gDNA, 각각 0.2ul primer (F/R, 10 pmol/ul), 5ul Taq polymerase Mix를 혼합하여 최종10 ul 부피로 하여 PCR을 진행하고, 었다. 94°C에서 5분간 열변성 후, 94°C 30초, 58°C 30초 ,72°C 30초(15cycle)을 수행한 후 94°C 30초, 53°C 30초 ,72°C 30초(20 cycle)를 수행한 후72°C에서 7분간 최종반응을 시킨후 2% agarose gel에서 전기 영동하여 증폭된 산물들의밴드를 확인하였다.

전기영동상에서 차이가 확인된 시료의 Microsatellite Genotyping 을 위해서 1 ul gDNA(>50 ng/ul), 각각 0.2ul SSR forward primer (10 pmole/ul), 1ul forward primer5'에 FAM dye를 붙인 primer(10 pmole/ul)와 1ul reverse primer (10 pmole/ul)를 사용하여 94°C에서 5분간 열변성 후, 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초(15cycle)을 수행한 후 94°C 30초, 53°C 30초, 72°C 30초 (20 cycle)를 수행하고, 68°C에서 30분간 최종 반응하여 증폭된 산물을 전기 영동하여 밴드를 확인하였다. 이후genotyping을 수행하기에 적절한 농도로 멸균수 희석한 후, 1 ul 를 취하여 9ul의 혼합용액과 혼합하고 95°C에서 3분간 열변성시키고 4°C에서 충분히 식힌 뒤 ABI 3730 Sequencer를 이용하여 genotyping을 진행하고, GeneMapperv4.1 소프트웨어를 사용하여 결과를 분석하였다.

##### 나. 결과 및 고찰

부지화를 대조군으로 성전온주, 오이다온주 품종을 대상으로 SSR marker A set (66 set), B set (40 set), C set (10 set) 총 116 set를 대상으로 PCR 수행한 결과 A set 11종, B set 8종, C set 3종의 SSR marker에서 차이가 나타나는 것 확인하였고, 이중에서 뚜렷하게 차이를 보

이는 A set 3종, B set 8종, C set 4 종, 총15개의 SSR marker를 선별(Fig. 1.)하였다. 이렇게 선별된 SSR marker는 각각의 forward primer의 5'말단에 FAM modification을 하여 fragment analysis가 가능하게 하였다. 이렇게 modification된 primer를 이용하여 PCR, genotyping을 수행하였다. 그 결과 BMCi-SSR-012,MCi-SSR-013, BMCi-SSR-032, BMCi-SSR-055, BMCi-SSR-082, BMCi-SSR087, BMCi-SSR-093 BMCi-SSR-100 BMCi-SSR-107, 총 9종의 SSR marker에서 한라봉과 성전온주, 오이다 온주를 구분할 수 있음을 확인하였다.

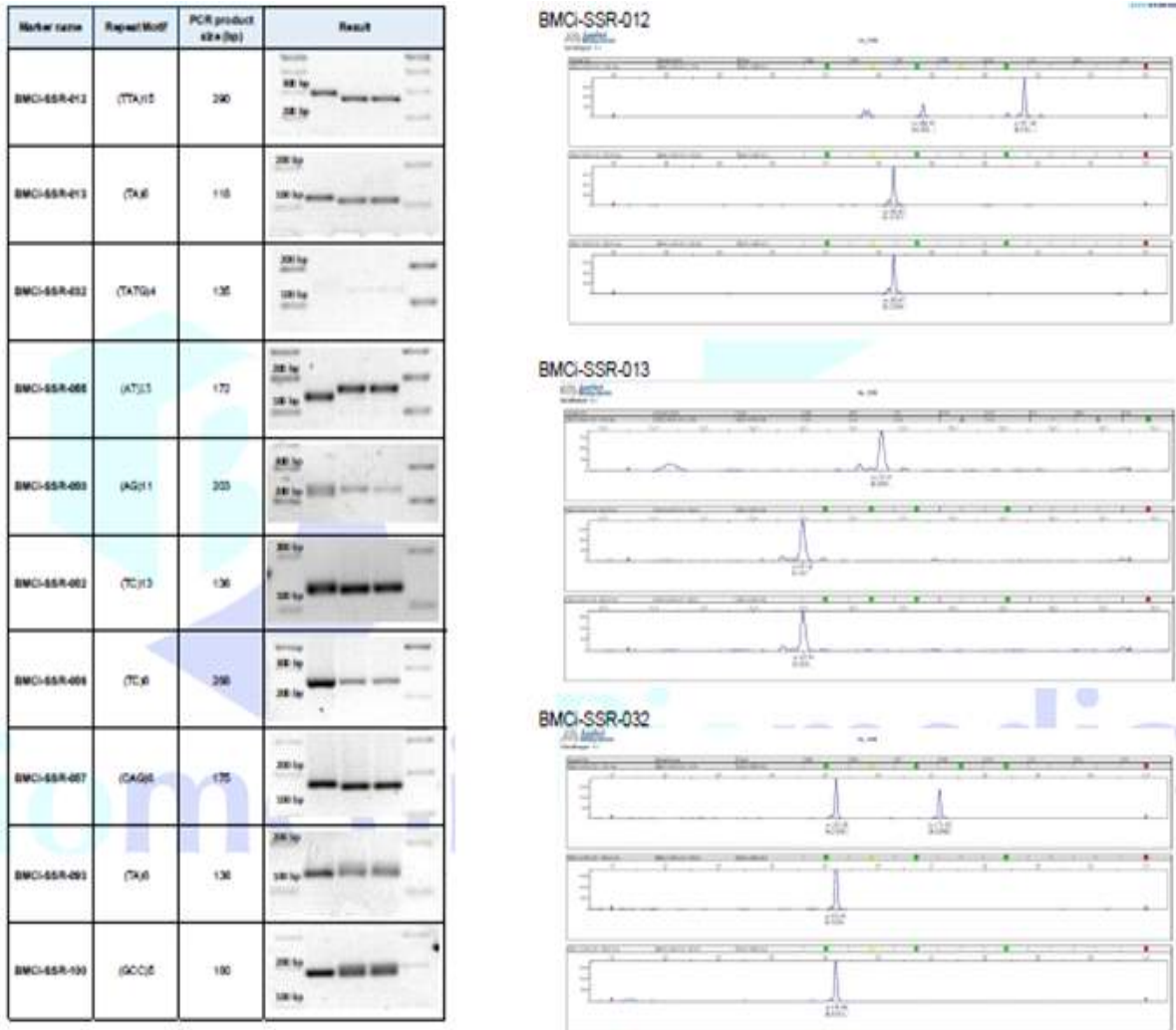


그림 5. BMCi-SSR-012,MCi-SSR-013, BMCi-SSR-032, BMCi-SSR-055, BMCi-SSR-082, BMCi-SSR087, BMCi-SSR-093 BMCi-SSR-100 BMCi-SSR-107, 총 9종 SSR marker의 2% agarose gel 전기영동사진과 3730 Sequencer를 이용하여 genotyping 패턴 결과. 부지화와 온주 사이에는 구분 되는 패턴 차이를 보이나, 온주계통인 성전과 오이다 품종 간에는 차이를 보이지 않았다.

감귤류 유전체 정보 해석을 통해 Screening된 116 citrus SSR maker set 중에서 부지화, 성전 온주, 오이다 온주간의 품종 구분이 가능한 것으로 확인된 최종 9 set를 이용하여 주심배 유래 식물체와 교잡체를 구분하고, 실제 활용이 가능한지 알아보기 위하여 부지화 X 성전온주를 교배하여 얻은 114 seeds, 387 seedlings에서 gDNA를 분리하고, 각 primer를 조합으로 PCR을 수행하였다. 부지화와 온주계통의 품종 구분이 가능한 9 set 중 SSR-012, SSR-093 두 set가 부지화 X 성전온주를 구분할 수 있었다.

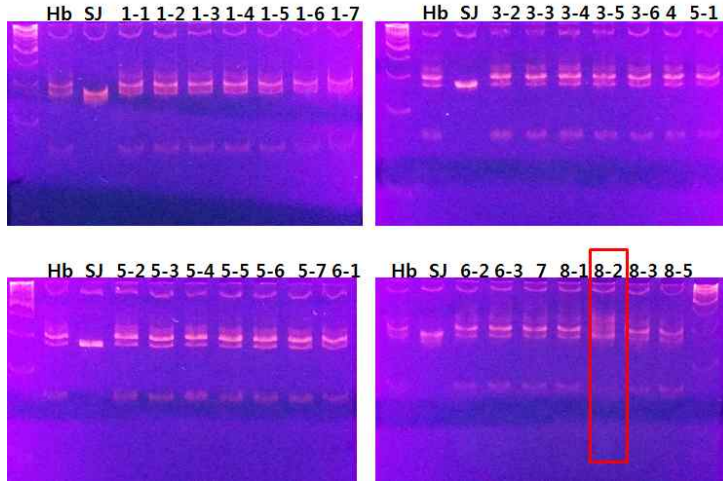


그림 6. SSR-012 maker를 이용한 부지화 X 성전온주 교잡체구분 및 선발. 각각의 종자에서 형성된 발아체들에서 gDNA를 분리하여 PCR 수행 결과 교잡체와 주심계통을 구분할 수 있었다. Hb:부지화, SJ:성전온주

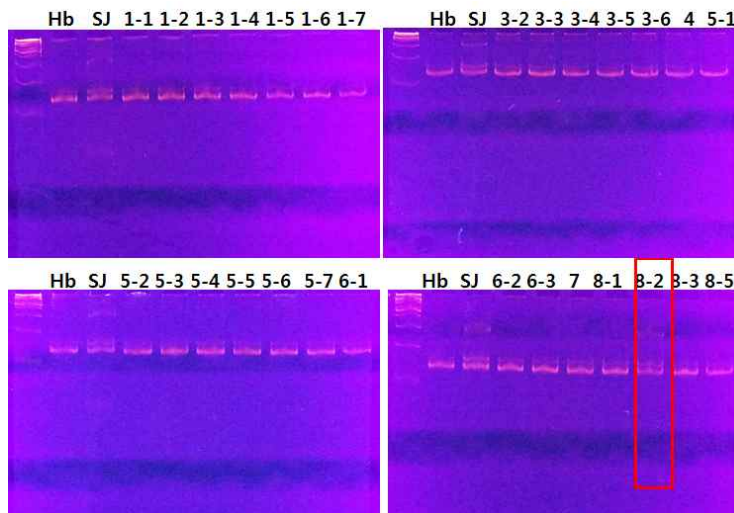


그림 7. SSR-093 maker를 이용한 부지화 X 성전온주 교잡체 구분 및 선발. 각각의 종자에서 형성된 발아체들에서 gDNA를 분리하여 PCR 수행 결과 교잡체와 주심계통을 구분할 수 있었다. Hb:부지화, SJ:성전온주

감귤 육종 방법에 있어, 다배성 품종을 모계로 이용하는 경우, 교배 종자를 얻어 파종하고 전 개하는 과정에서 얻어지는 발아체의 대다수는 주심배에서 유래된 발아체일 가능성이 크다. 모계의 형질을 유지하며, 일부 형질만을 개량하기 위하여 주심배를 이용하는 경우가 아닌 한, 감

꿀 육종에서 주심배 유래 발아체의 발생은 바람직하지 못한 요소이다. 이에 교배 종자의 전개 과정에서 교잡체를 조기에 구분하여 선별하고, 주심배 발아체도 모본에서 개량이 필요한 특정 형질에 중점을 두어 관리하여, 육종의 효율성을 기대할 수 있게된다. 부지화, 성전온주, 오이다 온주간의 품종 구분이 가능하고, 실제 부지화와 성전 온주 사이에서 교잡배 구분이 가능한 marker를 선별함으로써 교배 종자가 형성이 되는 부지화와 성전온주를 육종 소재로 하는 교배 육종과 다배성인 부지화와 성전온주의 주심배 유래 계통으로부터, 조숙성, 착색, 환경 적응성등이 개량된 품종을 육성하는데 활용할 수 있게 되었다.

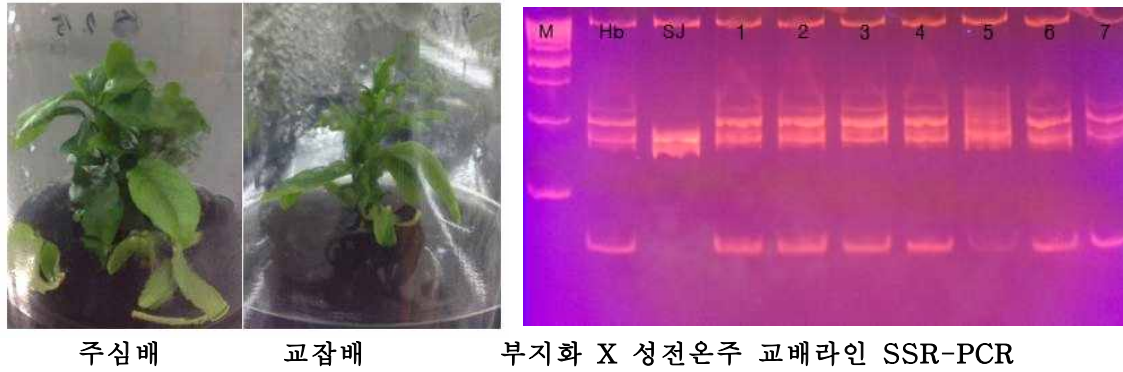


그림 8. 부지화 X 성전온주 교배조합에서 얻어진, 발아체의 기내 배양 모습과 SSR-PCR 전기영동 사진. Hb: 부지화, SJ: 성전온주 1-7 : 종자발아 라인

## 5. 부지화 미발달 종자 배양체 우수 계통 선발

부지화의 미발달 종자에서 주심세포의 배발달(Embryogenesis)에 의해 분화 발생된 결실체중 과일 형태가 일반 부지화와 다르고 동일 재배 조건에서 숙기가 1 개월이상 단축된 계통을 선발하여 특성을 조사하였다. 선발은 과실이 생장기에서 성숙기로 접어드는 10월 중순경부터 결실체중에서 착색 속도, 과형 등의 변화를 살피고, 12월 초순 과실들의 식감을 평가하고, 당도, 산도등을 비교하여 선발하였다. 이들 중 무가운 비가림 시설 조건에서 일반 부지화 품종보다 조성숙을 보이며, 과실의 봉우리가 형성되지 않으며, 껍질이 얇고, 감산이 빠른 한 계통을 우선 선발하였다.



그림 9. 부지화와 부지화 미발달종자 배양체 선발 계통의 착과와 과실의 형태적 차이. A:부지화 착과, B:부지화 과실 옆면, C:부지화 과실 윗면, D:부지화 미발달종자 배양체 선발계통 착과, E: 선발계통 옆면, F:선발계통 윗면

과수의 경우 계통 선발, 품종 출원 및 등록 이후, 직접 현장에서 재배 생산되기 위해서는 정식 재배 규모의 시범포에서 3 - 5년 정도 재배 시험을 통해 재배 안정성, 생산 과실의 균일성 등이 확보되어야 한다. 먼저, 정식 재배에 따른 병해충 발생 양상과 그에 따른 예방 및 방제 방법이 있어야 하고, 생장 특성과 상품성 기준에 따른 적절한 시비 및 관리체계가 수립되어 있어야 한다. 일반 밭작물이나 단기 재배 작물인 경우 종묘 및 종자 불량에 의한 피해가 대부분 당해에 그친다. 반면 작물 감귤인 경우 묘목 식재 후 정식 수확까지 최소 3년 정도의 기간이 필요하다. 묘목 생장이 이루어지고, 수확이 시작되어 수입이 발생하기 까지 오랜 기간이 걸리는 만큼, 새로운 품종으로 갱신하려는 농가는 품종 선택에 신중을 기할 수밖에 없고, 재배적으로 안정된 품종을 선택하려고 한다.

선발 포장에서 선발된 계통은 통상적인 조건에서 재배시험을 할 경우, 병해충, 생리 장애, 결과 형성 과정에서 이전과는 다른 문제점들이 드러나기 시작한다. 새로운 감귤 품종의 보급에 있어, 충분한 재배 시험이 이루어지지 않은 상태에서 묘목을 보급 할 경우 확인되지 않은 문제점들이 나타나게 되고, 이러한 문제들은 품종에 대한 단점이 부각되는 각인효과를 초래할 가능성이 있다. 국내 육성 감귤보급이 저조하고, 해외 육성 품종 재배가 다수인 현재의 시장 환경에서 재배 안정성이 확보되지 않은 계통이나 품종을 조기 보급하려 할 경우 이러한 문제점에 대한 충분한 고찰이 이루어져야 할 것이다.

부지화 미발달 종자 배양체 선발계통은 계통은 2015년도 모수로부터 접수를 채취하여 1,000본의 접목묘를 생산하였다. 이는 2 X 2m 수간폭 재식 조건에서 7,000m<sup>2</sup> 시범포를 조성할 수 있는 규모이고, 선발 계통의 재배 안정성과 품종 출원에 필요한 기초연구를 수행할 계획이었으나, 2016년도 초반 과제가 3차년도로 조기종결 결정 됨으로서 후속 연구는 진행되지 못하였다.



그림 10. 부지화와 선발 계통의 무가운 재배 조건 착과 모습과 묘목 증식 A:부지화 B:계통선발 C:계통선발체 증식



## 6. 부지화 미발달 종자 배양체 유래 선발 계통의 형태 특성 조사

부지화의 미발달 종자 배양체에서 선발된 계통의 형태 성장 특성과 과실의 성숙도 변화를 당도, 당성분 변화, 산도, 유기산 성분 변화를 비교 조사하였다.

선발된 계통은 대조군인 부지화와 과실모양이 형태적으로 구분된다. 부지화는 국내에서는 한라봉, 품종이 육성된 일본에서는 데코폰 이라는 이름으로 시장에 유통되고 있으며, 과실 상부에 뾰족하게 튀어나온 봉우리 형태를 갖고 있으며, 이는 소비자들이 다른 감귤류와 부지화를 구분하는 특징이 된다. 반면, 선발된 계통은 그림에서 보는 바와 같이 봉우리 모양을 형성하지 않고, 과실 상부가 평평한 특징을 나타낸다.

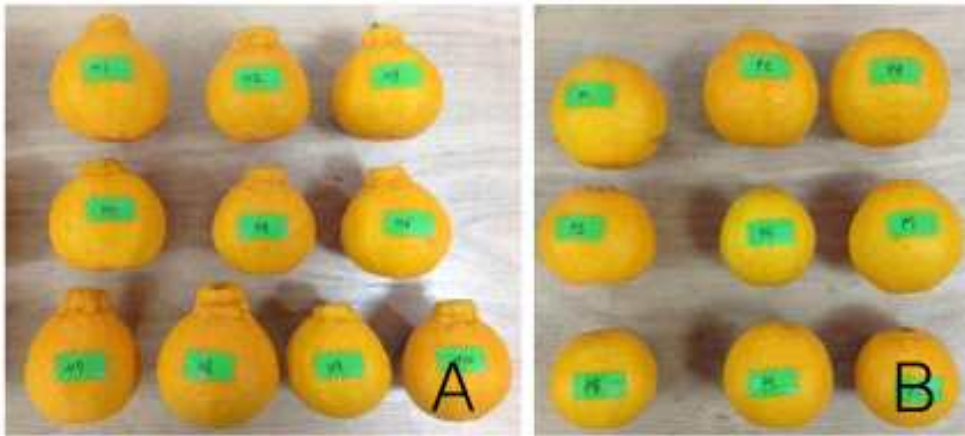


그림 11. 부지화와 선발 계통의 형태적 차이 형성에 사용된 과실 비교. 총 10개의 과실의 중성장과 횡성장을 2015년 9 - 10 월 까지 비교하였으며, 선발계통중 1개 과실은 열과로 인해 중간 폐기되었다. A : 부지화 대조군 B : 선발 계통

2015년 9월 17일부터 12월 16일까지 한달 간격으로 과일의 후기생장과 성숙기 동안의 과실의 높이와 횡폭을 측정하여 과실성장 특성을 비교 하였다. 환경 차이에 의한 과실 형태 차이를 최소화 하기 위하여, 일반적인 부지화 재배 환경에 심겨진 두 개체를 비교 하였고, 선발계통과 대조군 부지화의 거리는 3m이내에 위치하였다. 과일 높이에 대한 비를 비교하였을 때 부지화는 1.12 내외로 높이가 횡폭에 비하여 큰 타원 형태임에 비해 선발된 계통은 높이와 횡폭의 비가 1.00 거의 비슷한 구형의 과일 형태를 나타내었다. 이는 부지화의 봉우리 형성에 기인한 결과로 보이며, 봉우리의 제외된 형태는 유사한 것으로 보인다. 이는 봉우리 형성에 영향을 주는 과일의 전체적인 형태는 선발계통, 부지화 모두 9월 이전 형성되고, 선발계통은 후기 중 성장에 비하여 폭 생장이 우세하게 나타나 부지화와는 다른 형태를 나타낸다.

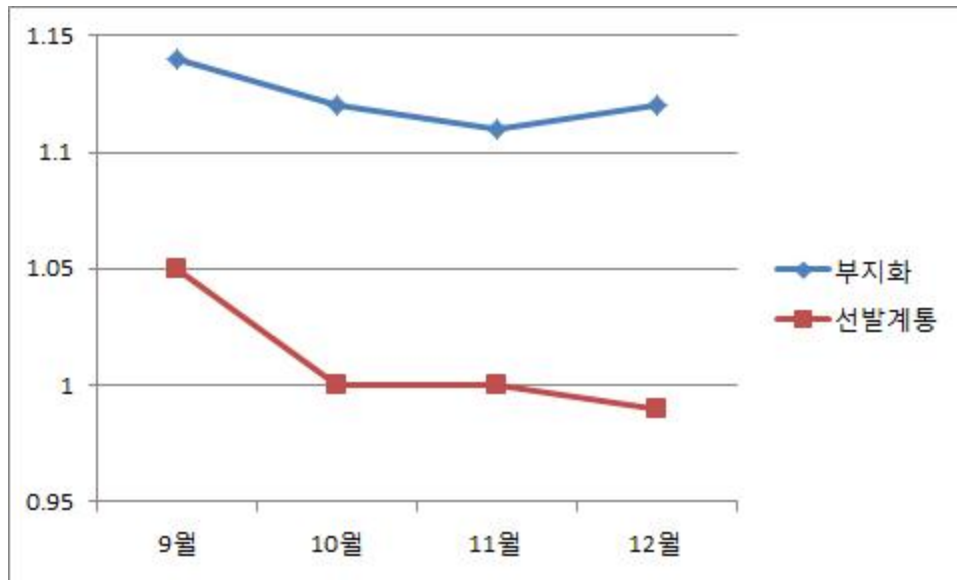


그림 12. 부지화와 선발계통의 종횡비 측정을 통한 과실 형태 형성 비교. 종횡비가 1인 경우 구형을 의미하고, 1 이상인 경우 세워진 계란형, 1 이하인 경우 눌혀진 계란형을 의미한다. 부지화와 선발계통의 과실형태는 9월 이전에 형성이 되며, 과실의 부피 성장과 함께 종성장과 횡성장이 이루어진다. 과실부피 성장기에 선발계통은 횡성장이 우세하게 일어나, 특유의 형태를 이루게 된다.

표 1. 부지화와 선발 계통의 종횡성장 비교

	2015년 9월 17일			2015년10월14일			2015년11월16일			2015년12월16일		
	폭	높이	종횡비	폭	높이	종횡비	폭	높이	종횡비	폭	높이	종횡비
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
<b>평균</b>	<b>1.05</b>			<b>1.00</b>			<b>1.00</b>			<b>0.99</b>		
H1	74.61	84.91	1.14	79.95	87.06	1.09	94.48	103.7	1.10	90.33	92.87	1.03
H2	69.48	78.56	1.13	71.97	79.54	1.11	87.11	95.65	1.10	83.15	94.23	1.13
H3	75.88	82.01	1.08	74.08	77.9	1.05	89.29	93.61	1.05	87.05	92.43	1.06
H4	70.45	74.78	1.06	69.05	78.58	1.13	84.72	95.27	1.12	84.14	94.65	1.12
H5	69.22	77	1.11	71.6	77.88	1.09	88.59	91.67	1.03	84.62	89.63	1.06
H6	67.69	77.1	1.14	69.36	77.72	1.12	88.54	94.88	1.07	85.56	93.15	1.09
H7	70.04	87.24	1.25	75.37	90.5	1.20	88.96	107.8	1.21	86.81	106.2	1.22
H8	76.48	91.02	1.19	79.2	86.02	1.09	96.44	115.1	1.19	91.54	113.1	1.24
H9	65.2	73.18	1.12	68.43	76.15	1.16	78.29	86.48	1.10	81.11	86.5	1.07
H10	67.76	80.62	1.19	71.63	83	1.16	83.24	93.88	1.13	83.71	97.95	1.17
<b>평균</b>	<b>1.14</b>			<b>1.12</b>			<b>1.11</b>			<b>1.12</b>		

P 1-10 : 선발계통

H 1-10 : 부지화

## 7. 부지화 미발달 종자 배양체 유래 선발 계통의 형태 특성 조사

### 가. 연구 내용 및 방법

2014년 11월 부지화 미발달종자 배양체 유래 선발체와 부지화에서 한나무에 각 과실 세 개씩을 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 분석 조건에 알맞도록 희석한 다음 Sep-Pak C18 cartridge(Waters)를 통과시킨 후 0.45  $\mu$ m 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  $\mu$ m, 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  $\mu$ m, Grace, Japan) 컬럼을 사용하여 PDA 210 nm에서 검출하였으며, 이동상으로는 pH 2.5로 조정된 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 용액을 분당 0.5 mL의 속도로 이동시켰다. 분리된 각 피크는 유기산 표준물질과 retention time을 비교하여 동정하고, 표준곡선으로부터 정량하였다.

### 나. 결과 및 고찰

분석 결과 2014년 11월 중순 부지화의 당도는 11.7 - 12.0 Brix, 산함량 1.19 - 1.62 %로 나타났으며, 미발달종자 선발체의 경우는 당도 11.6 - 13.1 Brix, 산함량 0.96 - 1.15 %로 나타났다. 이는 선발체가 대조군과 비슷한 당도 범위를 나타냄에 비하여, 산 함량은 20-50 % 낮은 것으로 나타내며, 대조군인 부지화에 비하여 감산이 빠름을 나타낸다.. 이는 선발체가 11월 중순경부터 수확하여 먹을수 있음을 의미하고, 부지화의 수확과 출하가 산 함량이 높아 과실 착색이 이루어지고, 당도가 일정이상 되더라도, 산 함량이 높아 신맛이 강하게 나타나 출하가 되지 못하는 단점을 극복할 수 있음을 의미한다. 즉 선발체는 12월 중하순 수확 출하가 가능할 수 있는 특성을 갖고 있음을 나타내며, 맛 특성 또한 산 함량이 낮고 사과산(malic acid) 함량이 높아 부지화와는 다른 과실맛을 나타낸다.

표 2 . 2014년도 부지화 미발달종자 배양체 유래 선발체와 부지화의 유기산 함량 및 총산 비교

시료	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
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

HB : 부지화 대조군

P1, P2 : 미발달종자 배양체 유래 선발체

선발 계통의 증식과 함께 2015년 10월부터 12월까지 계통선발체의 과실 후기 성장과 성숙기 동안의 당도 변화와 당 성분 변화를 측정 비교하였다. 당도 및 산도 변화에서 선발 계통 선발은 2014년도 11월 결과에 비하여 차이는 낮지만, 부지화와 비교하여 2 - 8% 산 함량이 낮고, 감산이 일찍 일어나는 특성을 보였으며, 부지화는 다른 맛과 유기산 조성 차이를 나타내었다. 이러한 결과를 종합할 때 일반 부지화에 비하여 조기에 출하가 가능한 조숙 품종이 될 수 있음을 보여 준다. 이후 본격적인 재배 규모의 포장에서 표본수를 늘리고, 재배 환경을 달리하여 자료 수집 및 자료 보강이 이루어져야 하나, 과제 조기 종결로 후속 연구를 진행되지 못했다.

표 3. 부지화와 선발계통의 당도 및 산도 변화

시료	2015년 10월		2015년 11월		2015년 12월	
	당도	산함량	당도	산함량	당도	산함량
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
<b>평균</b>	<b>10.70</b>	<b>1.21</b>	<b>12.10</b>	<b>0.97</b>	<b>13.70</b>	<b>0.91</b>
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
<b>평균</b>	<b>10.73</b>	<b>1.29</b>	<b>12.43</b>	<b>0.98</b>	<b>13.70</b>	<b>0.94</b>

단위 : 당도(Brix), 산함량(%)

표4. 부지화와 선발계통의 유리당 함량 및 함량 변화

(단위: g/100g)

Component	2015년 10월				2015년 11월				2015년 12월			
	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
<b>평균</b>	<b>1.42</b>	<b>1.40</b>	<b>3.60</b>	<b>6.42</b>	<b>2.05</b>	<b>2.00</b>	<b>6.13</b>	<b>10.18</b>	<b>2.01</b>	<b>1.91</b>	<b>7.41</b>	<b>11.33</b>
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
<b>평균</b>	<b>1.57</b>	<b>1.52</b>	<b>3.77</b>	<b>6.86</b>	<b>2.27</b>	<b>2.25</b>	<b>5.77</b>	<b>10.29</b>	<b>2.30</b>	<b>2.17</b>	<b>7.27</b>	<b>11.75</b>

표 5. 부지화와 선발계통의 유기산 함량 및 함량 변화

(단위: g/100g)

Component	2015년 10월				2015년 11월				2015년 12월			
	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
<b>평균</b>	<b>0.063</b>	<b>0.053</b>	<b>0.243</b>	<b>0.359</b>	<b>0.060</b>	<b>0.217</b>	<b>0.086</b>	<b>0.363</b>	<b>0.128</b>	<b>0.273</b>	<b>0.033</b>	<b>0.434</b>
<b>편차</b>	<b>0.012</b>	<b>0.006</b>	<b>0.017</b>	<b>0.027</b>	<b>0.035</b>	<b>0.007</b>	<b>0.014</b>	<b>0.043</b>	<b>0.003</b>	<b>0.047</b>	<b>0.011</b>	<b>0.056</b>
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
<b>평균</b>	<b>0.080</b>	<b>0.052</b>	<b>0.262</b>	<b>0.393</b>	<b>0.038</b>	<b>0.208</b>	<b>0.084</b>	<b>0.342</b>	<b>0.138</b>	<b>0.259</b>	<b>0.017</b>	<b>0.414</b>
<b>편차</b>	<b>0.027</b>	<b>0.006</b>	<b>0.046</b>	<b>0.073</b>	<b>0.001</b>	<b>0.050</b>	<b>0.016</b>	<b>0.040</b>	<b>0.006</b>	<b>0.023</b>	<b>0.005</b>	<b>0.022</b>



8. 만감류 주심배 사배체 유도기술 개발

감귤 육종 과정에서 종자 형성은 감귤의 상품성을 제약하는 요소이며, 맛과 향이 뛰어나고, 숙기와 착색이 좋은 여러 계통이 종자가 형성되어 상업화에 실패 한다. 종자 형성이 없는 감귤 계통을 육종하기 위한 방법으로 배수체 감귤을 이용하는데, 각 품종별로 만들어진 배수체는 상업성 있는 감귤을 육종하기 위한 가치있는 육종모본이 된다.

이에 (주) 바이오에그가 확보하고 있는 부지화, 발렌시아 오렌지, 바탐 오렌지, 하귤, 레몬등의 기내 배양체에 오리자린 50-100 uM을 12-24시간 처리하여, 배수체를 유도하였다. Flow cytometry 핵형 분석을 통하여 배수체 형성 여부를 확인하였으며, 감귤류의 종류와 처리 방법에 따라 40-100%의 배수체를 선발 할 수 있었으며, 레몬의 경우에는 분석한 시료 모두 혼성체로 나타났다. 이로서 감귤 품종의 기내 배양체를 이용한 배수체 유도 기술을 확보하였다.

표 6. 만감귤 배양에에서 배수체 유도 조건과 배수체 형성

Material	Treat	Treatment	Number	결과
Lemon	5d 24hr	5개 체	②	2,4배체
			③	2,4배체
			④	2,4배체
			⑤	2,4배체
하귤	5d 24hr	9개 체	③	4배체
			④	2,4배체
			⑤	2,4배체
			⑥	2,4배체
			⑨	4배체
Valencia orange	3d 24hr	4개 체	①	?배체
			②	4배체
			③	4배체
	5d 24hr	3개 체	⑤	4배체
			⑥	4배체
			⑦	4배체
			⑨	2,4배체
7d 12hr	1개 체	⑩	4배체	

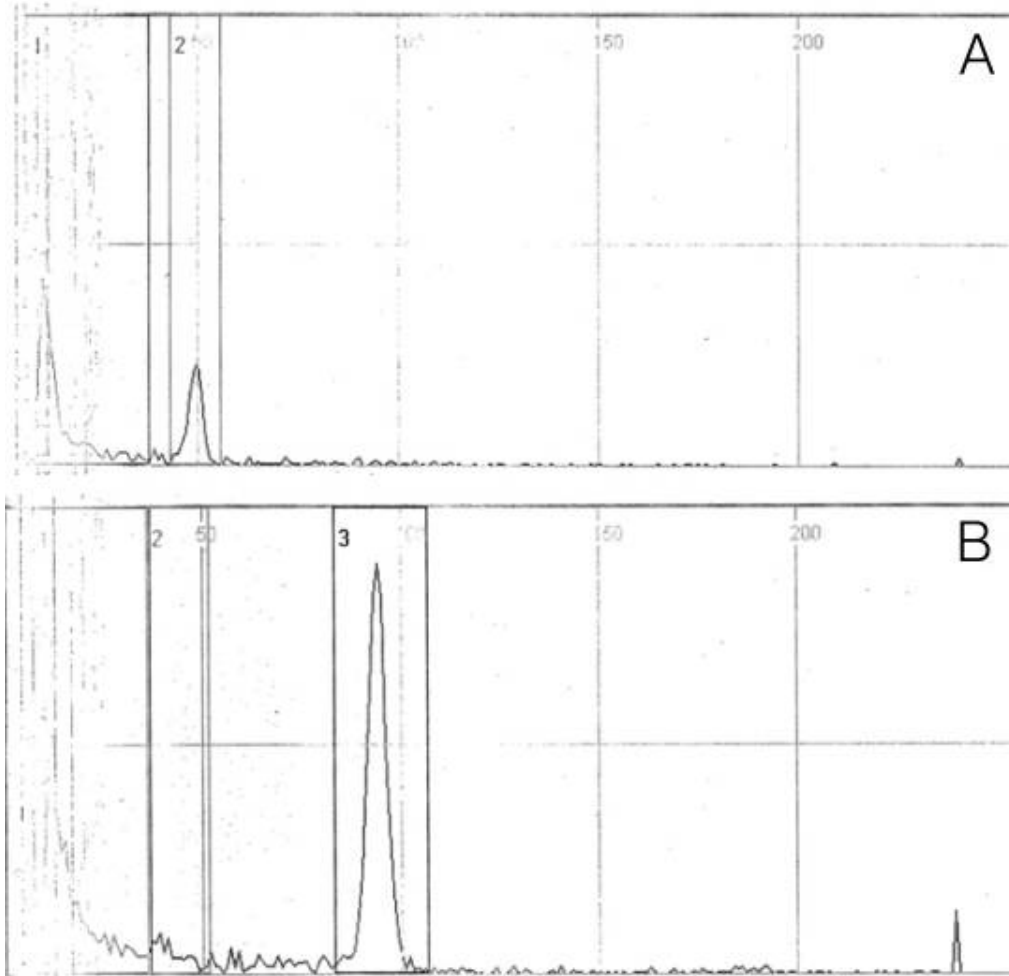


그림 13. 2배체와 4배체의 Flow cytometry 결과. 발렌시아 오렌지의 배양체와 에 oryzarin으로 배수체 처리를 하여 형성된 배양체를 Flow cytometry 핵형분석을 통해 배수성 확인 결과, 대조군은 2배체를 나타내고, 처리군에서 2배체 혼입이 없는 완전한 4배체가 형성됨을 확인하였다. A: 발렌시아 오렌지 배양체 2배체 대조군, B: 발렌시아 오렌지 배양체 4배체 확인

## ▷ 국내 학회 학술 발표

○ 2015년도 국내에서 개최된 한국식물생명공학회 (6월), 한국육종학회 (7월) 두 번의 학술 행사에 조숙강세 만다린 품종개발에서 이루어진 성과를 포스터 발표하였다. 학술 행사와 발표 내용은 다음과 같다.

### 1. 한국식물생명공학회 (2015년 6월)

- Next generation sequencing analysis of Two Progenies That Originate from Ovule culture and Bud mutation of Shiranuhi mandarin ((Citrus unshiu X Citrus sinensis) X Citrus reticulata).

Gyoeng Lyong Jeon<sup>1</sup>, Hyun jeong Oh<sup>1</sup>, Sunyung Yoon<sup>1</sup>, Kyung Hwan Boo<sup>1</sup>, Youngchul Park<sup>3</sup>, Sanghyun Lim<sup>2</sup>, Ho Bang Kim<sup>2</sup>

1. Bio-Agr, Co., Ltd., 102-1 Shinkwang-ro Jeju-si Jeju Korea

2. Life Sciences Research Institute, Biomedic Co., Ltd., Bucheon 420-852, Korea

3. Citrus Breeding Center, Jeju Special-Self Governing Province, Agricultural Research & Extension Services, Jeju 697-828 Korea

To investigate the genomic difference between the two progenies and mother plant Shiranuhi mandarin called 'Hallabong(HB)' we performed the next-generation sequencing analysis. One of the progeny BA-37 that present early ripening, different fruit shape originated from ovule culture of immature seed of Shiranuhi mandarin another progeny named as 'sunneat' comes from bud mutation has early and deeply coloring characters. Between the three citrus relatives 3,002,876 SNP loci were identified, and the results give the 52,550 polymorphic loci HB vs BA-37. 51,767 polymorphic loci HB vs. sunneat, and 23,380 polymorphic loci BA-37 vs sunneat. The results of polymorphic SSR detection give the 48,896 SSR loci and the 1,481 polymorphic-SSR loci HB vs BA-37. 1,518 polymorphic-SSR loci HB vs. sunneat, and 1,324 polymorphic-SSR loci BA-37 vs. sunneat.

### 2. 한국육종학회 (2015년 7월)

- Identification of Hybrids using SSR markers from Polyembryonic Citrus Breeding Lines.

Sun-Yung Yoon<sup>1</sup>, Hyo-Min Ahn<sup>1</sup>, Hyun-Jeong Oh<sup>1</sup>, Kyung-Hwan Boo<sup>1</sup>, Ho-Bang Kim<sup>2</sup>, Gyoeng-Lyong Jeon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Bio-Agr, Co., Ltd., 102-1 Shinkwang-ro, Jeju 690-813, Republic of Korea

<sup>2</sup> Life Sciences Research Institute, Biomedic Co., Ltd., Bucheon 420-852, Republic of Korea

Polyembryony in many citrus varieties is an impediment in breeding because it makes hard to identify hybrids after crossbreeding. So, it has become imperative for developing efficient methods to distinguish zygotic seedling generated from polyembryonic seed

depending on citrus variety. Simple sequence repeat(SSR) marker is one of useful systems for such purpose. However, SSR markers to separate zygotic seedlings derived from the crossbreeding between 'Marita unshiu' (Citrus unshiu) 'Seongjeon' and 'Shiranuhi mandarin' [(C. unshiu x C. sinensis) x C. reticulata] 'Hallabong' have not been developed yet. In this study we tried to identify an effective SSR marker to screen zygotic seedling after crossbreeding between 'Seongjeon' and 'Hallabong'. For this investigation, 387 seedlings were generated from 114 seeds produced from crossing those two varieties. A total of 116 SSR markers were tested to identify a special marker for distinguishing origin, zygotic or nucellar seedling. As a result, two markers, SSR012 and SSR093, were found to be more effective than other markers. These two SSR markers might be useful to select zygotic individuals in crossbreeding between 'Seongjeon' and 'Hallabong'.

## 제4절 적육 관피 만다린 품종개발

### 1. 적육 관피 만다린 우수품종 및 우량계통 선발

#### 가. 적육 관피 만다린 품종개발을 위한 단배성 모본이용 교배실생 확보

시험재료는 2013~2016년 제주 제주시 화북에 위치한 한농바이오산업(주) 기업부설육종연구소의 감귤모수포장에서 청견, 에히메28호, 클레멘타인 등의 단배성 모본에 만개기에 상귀넬리, 모로오렌지, 타로코오렌지 등의 적육계 화분을 개화 당일의 꽃에서 직접 채취하여 교배하였다.

1차년도에는 단배성인 청견을 모본으로 적육계 품종인 ‘상귀넬리’, ‘스타루비’, ‘플레임’, ‘레드블러쉬’ 품종을 총 375개의 꽃에 교배하여 총 3,701개 종자를 확보, 파종하여 접목을 실시한 후 가지를 1주지 유인을 통해 조기 개화를 유도하였다(Table 1).

Table 1. 1차년도 단배성 모본의 교배수량 및 획득 종자수

교배조합		교배수	과실수	종자수	과실당 종자수(개)
청견	상귀넬리	184	79	2,107	26.7
	스타루비	35	19	52	2.7
	플레임	70	29	356	12.3
	레드블러쉬	86	48	1,186	24.7
합 계		375	175	3,701	-

2차년도에는 단배성인 청견을 모본으로 모로, 타로코, 상귀넬리 및 클레멘타인을 726개의 꽃에 교배하여 4,194개 종자를 획득하여 파종 및 접목을 실시한 후 조기 개화를 유도하였다(Table 2).

Table 2. 2차년도 단배성 모본의 교배수량 및 획득 종자수

교배조합		교배수	과실수	종자수	과실당 종자수(개)
청견	모로	390	67	257	3.8
	타로코	148	30	54	1.8
	상귀넬리	163	62	634	10.2
	클레멘타인	25	5	65	13.0
	기타	752	385	3,184	8.3
합 계		726	164	4,194	-

3차년도에는, 단배성 모본인 청견, 에히메28호, 클레멘타인 3 품종에 적육계 특성을 지닌 ‘상귀넬리’, ‘타로코오렌지’, ‘모로오렌지’를 부분으로 하여 총 2,860개의 꽃을 교배하였고, 이중 1,697개 과실을 수확하여 18,633개의 종자를 획득 및 육묘하였다(Table 3).

교배 모본과 부분에 따른 착과율을 비교하였는데, ‘상귀넬리’, ‘타로코오렌지’가 각각 58.69%, 타로코가 56.27%로 46.06%를 나타낸 모로오렌지에 비해 높았으며, 교배모본에 따른 착과율은

‘에히메28호’ 64.53%, ‘청견’ 56.16%, ‘클레멘타인’ 53.66%, ‘부지화’ 41.59% 순이었다. 교배 부분에 따른 과실당 획득 종자수는 ‘상귀넬리’ 6.8개, ‘모로오렌지’ 3.3개, ‘타로코’ 0.8개 순이었고, 교배 모본에 따른 과실당 획득 종자수는 ‘클레멘타인’ 17.2개, ‘청견’ 17.0개, ‘부지화’ 6.4개, ‘에히메28호’ 3.3개 순이었다(Fig. 1)

부분으로 이용한 ‘모로오렌지’ 및 ‘상귀넬리’에 대하여 화분관 발아실험을 실시하였는데, ‘상귀넬리’의 화분관 신장이 어느 정도 양호한 편이었으나, ‘타로코오렌지’는 화분관 신장이 잘 이뤄지지 않는 경향을 보여, 향후 다양한 적육계 품종의 육종을 위해 화분발아율이 높은 ‘타로코오렌지’ 계통을 수집할 필요성이 있다고 사료된다(Fig. 2)

Table 3. 3차년도 단배성 모본의 교배수량 및 획득 종자수

모본	부분	교배수	과실수	종자수	과실당 종자수(개)
청 견	상귀넬리	762	489	13,334	27.27
	타 로 코	450	204	67	0.33
	모 로	274	141	765	5.42
에히메28호	상귀넬리	392	288	2,338	8.1
	타 로 코	385	271	47	0.2
	모 로	379	187	76	0.4
클레멘타인	상귀넬리	100	64	1,640	25.6
	타 로 코	82	41	317	7.7
	모 로	36	12	49	4.1
합	계	2,860	1,697	18,633	-

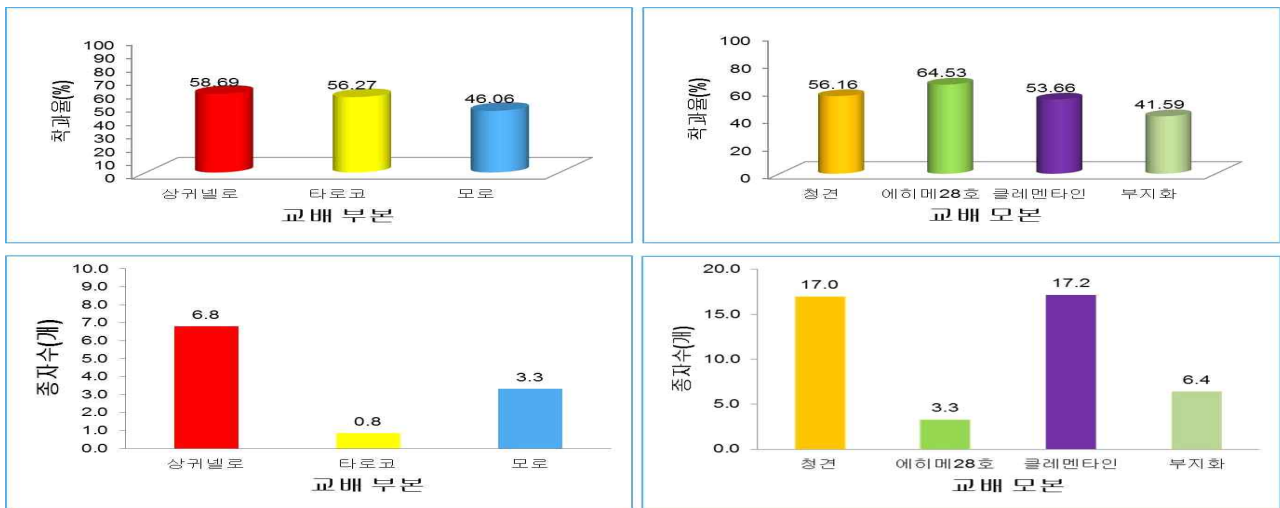


Fig 1. 교배 부분 및 모본에 따른 착과율 및 종자수 비교



Fig. 2. 블러드 계통 품종의 화분발아 및 화분관 신장

4차년도에는 단배성인 ‘청견’, ‘클레멘타인’, ‘에히메28호’, ‘하레히메’, ‘미하야’를 모본으로하여 ‘모로오렌지’, ‘타로코오렌지’, ‘상귀넬리’ 등을 1,415개의 꽃에 교배하여, 5,213개의 종자를 획득하여 파종하였다(Table 4).

Table 4. 4차년도 단배성 모본의 교배수량 및 획득 종자수

모본	부분	교배수	과실수	종자수	과실당 종자수(개)
청견	아놀드블러드	12	4	5	1.3
	모로	79	30	142	4.7
	EK65	16	4	16	4.0
클레멘타인	아놀드블러드	131	102	1,861	18.2
	모로	152	46	143	3.1
	상귀넬리	152	62	850	13.7
에히메28호	아놀드블러드	86	50	228	4.6
	모로	213	96	358	3.7
	상귀넬리	145	100	692	6.9
	타로코	131	70	8	0.1
	EK65	12	7	25	3.6
하레히메	모로	123	31	83	2.7
	상귀넬리	147	90	745	8.3
	EK65	4	2	3	1.5
미하야	상귀넬리	8	6	42	7.0
	모로	4	2	12	6.0
합	계	1,415	702	5,213	-

나. 조기착과 유도를 통한 과실 특성조사 및 우량계통 선발

교배실생을 접목하여 접목 후 다음해에 조기 착과를 유도하여 여러 과실이 착과되어 생육조사 및 수확 후 과실 특성 조사 등을 통해 우량계통을 선발하고 있다(Fig. 3).





Fig 3. 청견×블러드 계통 교배실생의 접목 후 2년차 조기 착과유도(2015년 11월)

적육 및 관피 품종선발의 자체 선발기준은 과피색은 미국 UC Riverside 대학의 감귤 과피 색 등급시스템의 가지적인 12이상의 수치와 색채색차계를 이용하여 적색을 나타내는 a값 40.0(MINOLTA, CR-400) 이상 두 가지 방법을 병행하여 기준을 설정하였다. 과육색은 수확 후 과실을 횡단면으로 절단한 후 구분된 비교 수치 5에 해당하는 계통을 적육으로 판단하고 (Fig. 4a), 관피 정도는 선발된 계통의 과피를 탈피시켜본 후 1~9사이의 수치중 5이상에 해당 되는 것을 관피로 판단하여 선발하고 있다(Fig 4b).

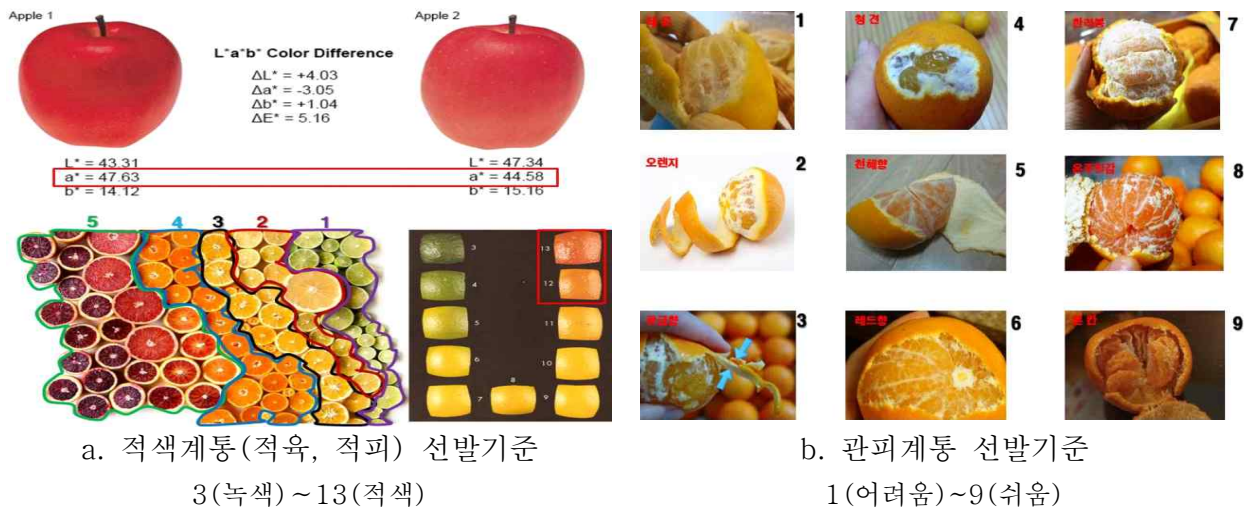


Fig 4. 적육계 및 관피 선발 기준

다. 신품종보호출원 및 특허 출원

(1) 레드산타

‘에히메28호’와 ‘병감’의 교배조합 D2VBK139는 외형적 특성으로는 과피색이 매우 붉고, 껍질 벗김이 용이하며, 당도도 높은 특성을 나타내었다(Table 5, Fig. 5). 수확기는 일본 도입 품종인 ‘하레히메’, ‘에히메28호’(국내 상표명: 황금향)와 비슷하지만 과피색이 붉고 예뻐며 또한 껍질 벗김이 양호하여 일본 품종 대비 경쟁력이 있을 것으로 판단되어 품종명을 ‘레드산타’라 명하고 국립종자원에 신품종보호출원(출원번호 2015-698)을 완료하였다(Fig. 5).



Table 5. 레드산타 품종의 과실 특성

조사일자	과중 (g)	횡경 (mm)	종경 (mm)	당도 (°Brix)	산함량 (%)	총자수 (개)	부피 지수	착색도 (과피a값)
2015. 11. 30	103.7	64.0	48.0	13.2	1.45	0.0	0.0	37.5
2015. 12. 28	144.8	72.2	53.0	13.6	1.27	0.6	0.6	40.6
2016. 01. 04	120.7	65.5	53.14	13.1	1.17	0.0	1.0	41.0
2016. 01. 11	138.4	72.9	54.5	13.2	1.09	1.2	1.2	40.7



품종보호출원번호 통지서

출원일자 : 2015.12.7	품종보호 출원번호 : 출원 2015 - 698
	품종명칭 출원번호 : 명칭 2015 - 1723

작 물 명 : 감귤(만감류)  
 품종 명칭 : 레드산타  
 출 원 인 : 농업회사법인 한농바이오산업(주)  
 주 소 : [Redacted]

2015년12월07일

국립종자원



Fig. 5. 품종보호출원(출원품종명 : 레드산타)

(2) 타라타라 극조생

‘타라타라 극조생’은 일본에서 도입된 품종인 일남1호의 아조변이지로부터 선발되었다. 일남1호에 비해 수확기 당도는 약 2°Brix 정도가 높으며 산도는 다소 낮은 경향을 보였다. 또한 같은 시기 착색도를 나타내는 과피 및 과육의 색차계 a값은 대조구(일남1호)에 비해 차이를 보였다. ‘타라타라 극조생’ 품종은 대조구(일남1호)에 비해 과피가 1.9배 정도 두꺼운 형태적 다른 큰 차이를 나타내고 다소 울퉁불퉁하여 외관상으로 차이를 보인다(Table 6, Fig. 6). 따라서 ‘타라타라 극조생’은 조기 출하를 목표로 하는 경우 시장성이 높을 것으로 판단된다. 따라서 대조구에 비해 형질(당도)이나 형태(과피)적인 특징에 대해 차이가 있다고 판단되어 특허출원을 하였다(Fig. 7).

Table 6. 타라타라 극조생의 과실특성

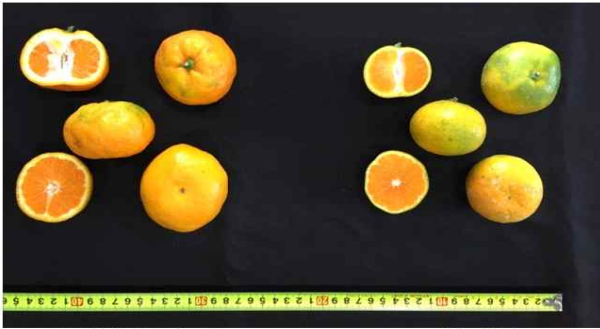
구분	조사일	종경 (mm)	횡경 (mm)	무게 (g)	당도 (°Bx)	산도 (%)	과피	과피	과피	과육	과육	과육
							L값	a값	b값	L값	a값	b값
타라타라	9월 9일	35.3	44.9	36.8	11.34	1.71	56.1	-5.1	13.4	49.5	12.2	32.9
극조생	10월 10일	38.5	51.1	49.1	12.61	0.96	54.9	12.8	24.9	39.2	17.3	24.3
일남1호	9월 9일	36.6	46.1	41.4	9.07	1.77	58.4	-6.4	15.8	50.3	7.4	30.1
극조생	10월 10일	40.2	52.8	60.8	10.25	0.93	56.5	2.8	25.9	39.0	15.1	22.4



<타라타라 극조생>



<일남1호>



<타라타라 극조생>

<일남1호>



<타라타라 극조생>

<일남1호>

Fig. 6. 극조생계통 우량계통 선발

발급번호 : 2-5-2017-008796314

출원사실증명원  
CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name	농업회사법인 한농바이오산 업 주식회사 hanong bio industry corporatio n co.,ltd	주민번호 Residence No	
	주소		전화번호	
발명자 Inventor	성명 Name		주민번호 Residence No	
	주소		전화번호	
	성명 Name		주민번호 Residence No	
대리인 Agent	주소		전화번호	
	성명 Name		대리인 번호	
출원번호 Application Number	특허-2016-0142202 PATENT-2016-0142202		출원일자 Filing Date	2016년 10월 28일 OCT 28, 2016
발명(고안)의 명칭, 디자인을 표현할 물품, 상표(서비스마크)류 구분 Title of Invention, Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark	장류 신품종 "타라타라 극조생" Novel citrus variety "Taratara geukjosaeng"			
종도	확인용	IPC 분류	A01H 5/08	
최종저분상태		최종저분일		

위 사실을 증명함.  
This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korea  
an Intellectual Property Office

발급일자 : 20170207

2017년 02월 07일

특허청  
COMMISSIONER

발급일자 : 20170207

Fig. 7. 출원사실증명원(타라타라 극조생)

라. 대목 순 발생차단을 위한 접목 보조장치 개발

과수육종에서 유년성 조기 타과를 위해 대목을 이용한 접목은 조기 생육을 위한 방법 중에 하나이며, 묘목의 생산 및 증식을 위해서도 대목을 이용한 접목은 필수적이다. 대목을 이용하는 경우 접목 후 대목의 원줄기 부분에서 다량의 순이 발생하는데 접수의 생육이 안정될 때까지 수개월 동안에 발생하는 순제거 작업 등의 추가적인 노동력이 필요하다(Fig. 8).

대목 부분에서 발생하는 순 제거 작업에 따른 인건비 절약과 접목작업 및 관리의 효율성을 높이기 위하여 대목부분 순 억제용 피복자재를 개발하게 되었다.



Fig. 8. 접목 후 대목에서 순이 발생하여 접수의 생육을 억제 시키는 모습

다공질 필름을 이용하고 윗부분의 광을 차단하였을 경우 대목 부분의 순 발생이 억제되었다. 그러나 다공질 필름이 얇고 경도가 약해 접목 후 씌우기 작업이 다소 불편한 경향이 있었다. PVC 필름을 이용하고 윗부분의 광을 차단하지 않고 그대로 씌운 경우 대목 윗부분에서 순이 다소 발생되는 경향이 있었다.

다공질 필름을 이용하고 윗부분의 광을 차단하지 않은 경우 대목 윗부분에서 일부 순 발생이 되었다. 또한 다공질 필름이 얇고 경도가 약해 접목 후 씌우기 작업 및 바람과 비에 의해 움직이는 경향이 있었다. PVC 흑색 필름을 이용하여 대목 윗부분의 광을 차단하였을 경우 대목 전체에 순 발생이 억제 되었다. 또한, 다공질 필름에 비해 두껍고 경도가 단단하여 접목 후 씌우기 작업 등이 편리하고 비, 바람 등에도 고정이 잘 되어 가장 효과가 좋은 것으로 판단되었으며 접목 40일 후의 조사를 보면 대목 순발생은 0.6개로 거의 발생이 되지 않았으며 접수 생장도 139.1mm로 양호한 것으로 조사되었다(Table 7). 따라서 접목 후 감귤 대목부분 순 발생 억제 및 방지를 통해 접수의 생육을 왕성하게 하고 기존 순 제거 작업에 따른 추가 노동력이 필요하지 않아 인건비 절약과 관리의 효율성 증대를 위한 순 발생을 차단하는 접목장치 개발로 특허 출원(출원번호: 제10-2015-0116765)하였다(Fig. 9).

Table 7. 처리별 접수 및 대목의 순 발생 정도

구분	접수생장		대목생장	
	신초길이(mm)	엽수(개)	측지수(개)	측지길이(mm)
무처리	119.6	5.4	3.1	96.0
다공질 광차단	132.0	6.9	1.3	29.3
다공질	149.1	8.1	1.4	112.7
검정PVC	91.6	5.9	1.4	122.7
접목보조장치	139.1	8.7	0.6	4.9

\*접목 40일 후 조사



처리 4      처리 3      처리 2      대조구      처리 1

출원사실증명원  
CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name 한농산업인 한농바이오산 업 주식회사 Hanung Bio Industry corpo ration co., Ltd	주민번호 Residence No	
발명자 Inventor	성명 Name [Redacted]	주민번호 Residence No	
대리인 Agent	성명 Name [Redacted]	주민번호 Residence No	
출원번호 Application Number	원안(그림)의 명칭 Title of Invention, Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark	출원일자 Filing Date	2015년 08월 19일 AUG 19, 2015
	특허청장 COMMISSIONER		

Fig. 9. 처리별 접수 및 대목의 순발생 정도 모습과 출원사실증명원

마. 기타 지식재산권 확보

품종명칭등록(비바리레드, 비바리허브향, 레드산타) 3건, 생산판매신고(비바리레드, 비바리허브향) 2건을 국립중자원에 등록하였으며, 상표등록(굴빛과랑) 6건을 등록하였다(Fig. 10).

관인생략  
등록필증지서

담당자: 최경희 전화: 031-467-0113 FAX: 031-467-0116  
인터넷 홈페이지: www.ksars.or.kr  
국립중앙도서관 한국과학기술정보연구원

번호: 2016-284  
시행일자: 2016. 2. 17  
수신: [Redacted]  
대리인: 동업회사법인 한농바이오산업(주) 김지현

제 목: 품종명칭등록통지

귀하께서 출원명칭을 등록하신 품종명칭이 지식재산권법 제109조제4항의 규정에 의하여 아래에 같이 등록명칭으로 등록되었습니다.

국립중자원장

품종 생산·수입판매 신고증명서

신고번호: 03-0005-2016-3  
품종명칭 등록출원번호: 40-2016-000802

신정인: [Redacted]  
발명명칭: 동업회사법인 한농바이오산 (주)  
신명: [Redacted]  
특정자: [Redacted]

품종이 속하는 작물의 학명 및 명칭: Citrus spp. (과)  
품종의 명칭: 비바리레드 (Bibari red)

2016년 08월 24일  
국립중자원장

품종 생산·수입판매 신고증명서

신고번호: 03-0005-2016-4  
품종명칭 등록출원번호: 40-2016-000874

신정인: [Redacted]  
발명명칭: 동업회사법인 한농바이오산 (주)  
신명: [Redacted]  
특정자: [Redacted]

품종이 속하는 작물의 학명 및 명칭: Citrus spp. (과)  
품종의 명칭: 비바리허브향 (Bibari herbhyang)

2016년 08월 24일  
국립중자원장

출원번호: 5-5-2017-008796314

출원사실증명원  
CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name 한농산업인 한농바이오산 업 주식회사 Hanung Bio Industry corpora tion co., Ltd	주민번호 Residence No	
대리인 Agent	성명 Name [Redacted]	주민번호 Residence No	
출원번호 Application Number	원안(그림)의 명칭 Title of Invention, Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark	출원일자 Filing Date	2016년 10월 28일 OCT 28, 2016
	특허청장 COMMISSIONER		



Fig. 10. 기타 지식재산권 확보 현황

바. 해외 유용 유전자원 수집 및 등록

적육계 품종 육종을 위해 국내에서 확보할 수 없는 유전자원과 형질을 수집 및 도입하여 육종을 위한 유전자원의 다양성을 확보함으로써 품종육성, 유전연구 및 생명공학 연구재료로 확보하여 향후에도 지속적으로 육종에 사용될 유전자원을 수집하여 국립유전자원센터에 12점을 등록하였다(Table 8).

Table 8. 유용 유전자원 수집 및 유전자원 등록현황

번호	생명자원명	특성	등록		
			등록인	등록일	등록번호
1	Finger lime (Sunshine Yellow)	유색(녹색, 노란색, 적색) 과육 및 길고 얇은 과피	한농바이오산업(주)	2014년 2월 1일	K231591
2	Finger lime (Collette)	유색(녹색, 노란색, 적색) 과육 및 길고 얇은 과피	한농바이오산업(주)	2014년 2월 1일	K231592
3	Finger Lime (Ricks Red)	유색(녹색, 노란색, 적색) 과육 및 길고 얇은 과피	한농바이오산업(주)	2014년 2월 1일	K231593
4	Kassia Lime	수세가 강하며 유연성 조기 타과를 위한 대목 활용	한농바이오산업(주)	2015년 1월 6일	K247093
5	Troyer Citrange	수세가 강하며 유연성 조기 타과를 위한 대목 활용	한농바이오산업(주)	2015년 1월 6일	K247094
6	Cleopatra Mandarin	수세가 강하며 유연성 조기 타과를 위한 대목 활용	한농바이오산업(주)	2015년 1월 6일	K247095
7	Dwarf Kaffir Lime	수세가 강하며 유연성 조기 타과를 위한 대목 활용	한농바이오산업(주)	2015년 11월 21일	K252377
8	Red Centre Lime	유색계 유전자원으로 활용	한농바이오산업(주)	2015년 11월 21일	K252378
9	Bush Lemon	유색계 유전자원으로 활용	한농바이오산업(주)	2015년 11월 21일	K252379
10	Arnold Blood Orange	유색계 유전자원으로 활용	한농바이오산업(주)	2016년 7월 28일	K256566
11	Nules Clementine	교배 모본으로 활용	한농바이오산업(주)	2016년 7월 28일	K256567
12	West Indian Seedling	수세가 강하며 유연성 조기 타과를 위한대목 활용	한농바이오산업(주)	2016년 7월 28일	K256568

사. 유년성 단축을 위한 접목 및 육종포장 조성

2013년에는 자체예산을 투입하여 대목육묘하우스를 구축(99m<sup>2</sup>)하였고, 교배유전자원 및 모수포장도 조성하였다. 2015년에는 조기육묘체계 구축을 위한 보조 가온시설 구축(330m<sup>2</sup>)하여 겨울철 최저 온도를 18℃ 정도에 유지할 수 있는 시스템 구축하였다. 유년기 단축 및 조기 결실을 위해 접목을 위한 대목(탱자 6,300개, 스윙글 5,944개)을 포트 파종하여 육묘하였다(Fig. 11).



Fig. 11. 조기육묘체계 구축을 위한 보조가온시설 구축 및 육묘현황(330㎡)

2014년, 2015년 자체 예산을 투입(시설하우스 1,650㎡)하여 탱자 및 스윙글 대목 4,000주 정식하였으며, 청견 교배실생(1,000주)을 접목 및 지주대 작업을 완료하였고, 노지 육종포장(660㎡)을 조성하여 청견 교배실생 접목묘(1,000주)를 정식 및 조기 착과유도를 위한 지주대 작업을 완료하였다(Fig. 12).



Fig. 12. 조기착과 유도를 위한 시설하우스 및 노지 육종포장 조성

2016년에는 2015년 교배조합 실생 약 3,000개체에 대하여 하우스내 접목을 실시하였고, 노지육묘포장에는 감귤 성목에 고접(2,600개체)을 완료하였다. 그리고 포트에 교배실생 접목(4,500개체)실시하였고 노지포장에 실생묘 약 3,000개체를 정식하였다(Fig. 13).



Fig. 13. 육종 하우스내 대목을 이용한 접목 및 노지의 고접과 가온 하우스내 포트접목 모습

## 2. 다배성 모본(부지화)에서의 조기 교잡배 선발 시스템 개발

### 가. 재료 및 방법

시험재료는 2015~2016년 제주 제주시 화북에 위치한 한농바이오산업(주) 기업부설육종연구소의 감귤모수포장에서 '부지화' 품종 만개기에 '상귀넬리' 화분을 개화 당일의 꽃에서 직접 채취하여 인공수분을 통해 교배를 하였다. 인공수분 후 90, 105, 125, 145, 180일에 과실을 채취하여 인공수분 후 일수에 따른 과실 크기, 과중을 조사한 후 종자를 채취하여 기내배양에 이용하였다.

### 배 배양(embryo rescue)

수확된 과실의 표면 이물질을 제거하기 위해 흐르는 물에 세척하였다. 그리고 기내 배양을 위하여 70% 알콜(v/v)에 30분 정도 침지하여 살균한 후 멸균수로 3번 정도 세척하였다. 과실

의 물기가 충분히 제거된 후 과실을 횡으로 잘라 종자를 채취한 후 배를 분리를 하며 기내배양을 하였다(Fig. 14).

부지화 배배양에 적합한 배지의 종류를 구명하기 위하여 MS (Murashige and Skoog, 1962), MT (Murashige and Tucker, 1969), B5 (Gamborg et al, 1968) 배지를 이용하였고, sucrose 3%, malt extract 500mg/L, adenine sulphate 25mg/L+agar 0.8%, pH 5.8를 공통으로 첨가하였다. 배 배양된 개체들은 2~3주후 MS배지를 기본으로 한 증식배지(sucrose 3%, BA 1mg/L, NAA 0.1mg/L)에 계대배양을 하였다.

인공수분 후 90일 된 과실로부터의 배 배양 재분화 조건을 구명하기 위하여 MS 배지를 기본배지로 하여, sucrose (30, 50, 70g, 90g, 120g/L)와 GA3 (0, 0.5, 1, 2.5, 5mg/L) 농도를 달리 하였다. 또한, malt extract 500mg/L, adenine sulphate 25mg/L+agar 0.8%, pH 5.8를 공통으로 첨가하였다. 배 배양된 개체들은 4주 후 MS배지를 기본으로 한 증식배지(sucrose 3%, BA 1mg/L, NAA 0.1mg/L)에 계대배양을 하였다.



Fig. 14. Embryo rescue from the 'Shiranuhi' Mandarin [*(C. unshiu × C. sinensis) × C. reticulata*]× 'Sanguinelli' (*C. sinensis*) Hybrid

#### 식물 재료 및 genomic DNA 추출

인공수분 후 일수별로 종자 약 30개와 종자의 독립적인 각 배 배양체로부터 재분화한 신초 조직을 채취하여 이용하였다. 채취한 종자와 잎은 액체질소를 이용하여 얼린 후 마쇄하였고, Biomedic® gDNA Extraction kit를 이용하여 genomic DNA 추출하였다. 분리된 genomic DNA의 양과 질은 각각 DeNovix DS-11+Spectrophotometer (DeNovix, Wilmington, DE, USA)와 아가로스 겔 전기영동을 통해 결정하였다.

#### PCR-RAPD 마커 선발

'부지화', '상귀넬리', '모로오렌지'(이탈리아 1), '모로오렌지'(이탈리아 2), '타로코오렌지', '플레임', '레드블러쉬', '스타루비'에 대하여 교잡배 판별 RAPD 프라이머 선발을 위해 Exgene Plant SV kit (GenoAll) 를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 프라이머는 20개의 프라이머를 이용하였다(Table 9).



Table 9. RAPD primer using zygotic embryo detection.

No.	Primer name	Sequence (5'→3')	No.	Primer name	Sequence (5'→3')
1	A01	CAGGCCCTTC	11	A11	CAATCGCCGT
2	A02	TGCCGAGCTG	12	A12	TCGGCGATAG
3	A03	AGTCAGCCAC	13	A13	CAGCACCCAC
4	A04	AATCGGGCTG	14	A14	TCTGTGCTGG
5	A05	AGGGGTCTTG	15	A15	TTCCGAACCC
6	A06	GGTCCCTGAC	16	A16	AGCCAGCGAA
7	A07	GAAACGGGTG	17	A17	GACCGCTTGT
8	A08	GTGACGTAGG	18	A18	AGGTGACCGT
9	A09	GGGTAACGCC	19	A19	CAAACGTCGG
10	A10	GTGATCGCAG	20	A20	GTTGCGATCC

12.5uL의 PCR 반응용액에 ‘부지화’와 ‘타로코오렌지’의 genomic DNA를 주형으로 50pmol의 primer, 6.25uL의 2X Taq Mix(Dongsheng Biotech)와 멸균 증류수를 첨가하여 혼합한 후, ABI 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 열 변성(heat denaturation)하고, 이어서 35회 사이클의 PCR 반응(94°C 60초, 35°C 30초, 72°C 90초)을 연속하여 수행한 후 마지막으로 72°C에서 7분간 최종 신장(final extension) 반응을 시켰다. 반응이 종료된 PCR 증폭 산물은 1.0% agarose gel에서 전기영동을 통해 확인하였다.

#### SSR (simple sequence repeat) 및 Genotyping 분석

모본(부지화)과 부분의 genomic DNA를 주형으로 하여 김 등(2016)의 감귤 교잡배와 주심배 구별용 SSR 마커 Bmi94 forward (5'-TGTA AAAACGACGGCCAGTGAATTGGGAGGACGA ACTGA-3') and reverse (5'-CGAGCCCTAGACAGAGATGG-3'), Bmi111 forward (5'-TGT AAAACGACGGCCAGTCCGATACAGCACAAAGCAA-3') and reverse (5'-TGGAAAGAG AGAAGCCAAGC-3'), Bmi115 forward (5'-TGTA AAAACGACGGCCAGTTCGGTGTGTATT GGGTACACG-3') and reverse (5'-TGGAAAGAGAGAAGCCAAGC-3') SSR 프라이머를 이용하였다. SSR 마커들에 대해서 10uL의 PCR 반응용액에 모본과 부분의 genomic DNA를 주형으로 각각 10µM의 M13-tailed forward primer 0.2uL, reverse primer 1uL와 6-FAM labeled M13 (5'-TGTA AAAACGACGGCCAGT-3') primer 1uL, DSBio HSTM mix 5uL, 멸균 증류수를 첨가하여 혼합한 후, ABI 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems)를 이용하여 M13-Tailed PCR을 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 열 변성(heat denaturation)하고, 이어서 15회 사이클의 PCR 반응(94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초)과 20회 사이클의 PCR 반응(94°C 30초, 53°C 30초, 72°C 30초)을 연속하여 수행한 후 마지막으로 72°C에서 30분간 최종 신장(final extension) 반응을 시켰다. 반응이 종료된 PCR 증폭 산물은 1.0% agarose gel에서 전기영동을 통해 확인한 후, ABI 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 통하여 genotyping을 실시하였다.

Genotyping 결과는 GeneMapper v.4.1 (Applied Biosystems)를 통하여 분석하였다. PCR산물

의 peak size는 LIZ-500을 size standard로 사용하여 결정되었다.

#### 통계분석

모든 실험은 완전임의배치 3반복으로 수행하였으며, 수집한 데이터는 무료 통계프로그램인 R프로그램(Version 3.2.3)을 이용하여 p0.05수준에서 통계 분석하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

##### 과실 및 종자의 형태적인 특성

인공수분 후 일수에 따른 부지화와 상귀넬리 교배과실은 과실 발달단계에 따라 횡경, 종경 및 과중은 성장속도가 현저하게 증가하였고, 180일에 과피가 착색되었다(Fig. 15).

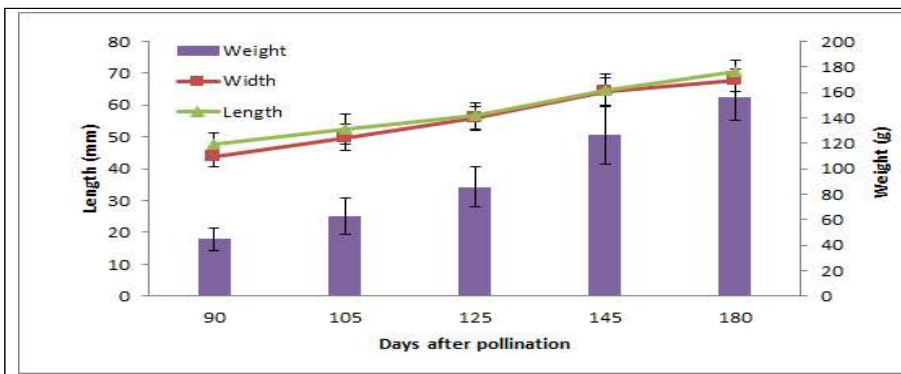


Fig. 15. Characteristics of fruit growth after pollination in ‘Shiranuhi’ Mandarin [(*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*] × ‘Sanguinelli’ (*C. sinensis*) Hybrid

인공수분 후 일수에 따른 종자 개수와 정상 종자수는 90일 때가 가장 높게 나타난 반면에, 종자길이와 배의 갯수는 시기가 경과할수록 증가하는 경향을 나타내었다(Table 10).

인공수분 후 125일부터는 종자에서 배를 포함한 배유조직의 분리가 일어나기 시작하였다(Fig. 16). 인공수분 후 180일 이후부터는 성숙된 종자의 형태를 완전히 갖추고 있어 이때가 부지화 교배종자의 완숙기로 판단되며, 부지화 과실 발달 역시 종자의 성숙과 비례함을 나타내었다.

Table 10. Total seeds and number of embryos per seed dissected from fruit of different developmental stages.

Days	Total Seeds	Normal seeds	Abnormal seeds	Length of seed (mm)	No. of Embryos per seeds
90	12.67±5.09a <sup>z</sup>	12.30±5.09a	0.37±0.55c	6.11±0.87d	9.03±7.44c
105	10.04±5.35ab	10.07±5.14ab	0.33±0.65c	7.62±0.87c	9.02±2.94c
125	10.04±4.75ab	8.20±4.66bc	2.20±3.27b	8.78±1.07b	13.58±5.69b
145	11.87±4.88ab	7.17±3.99bc	4.70±3.26a	9.48±1.11ab	16.61±5.26a
180	8.40±5.72b	5.40±5.03c	3.00±2.94b	10.13±1.21a	17.16±6.47a

<sup>z</sup>Mean separation within columns by Duncan’s multiple range test at 5 % level. .

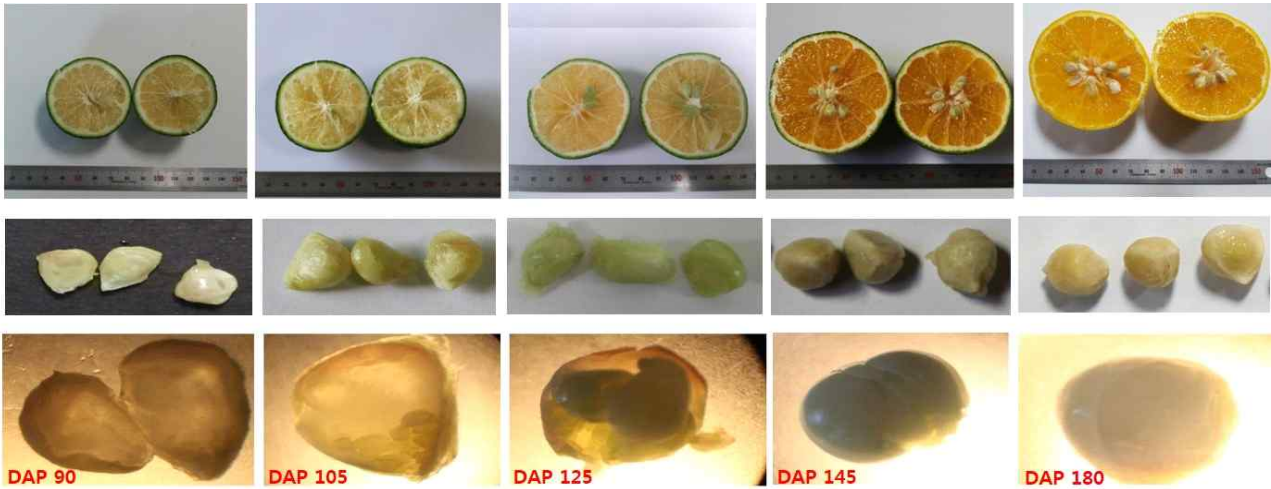


Fig. 16. Embryos and seed dissected from fruit of different developmental stages.

인공수분 후 일수 및 배지의 종류에 따른 배 배양체의 재분화

인공수분 후 일수에 따라 발아율은 90일이 평균 25.0%, 105일이 58.1%, 125일이 69.6%, 145일 74.9%, 180일이 70.7%로 145일까지는 현저하게 증가하다가 그 이후 감소하는 경향이였다. 뿌리 발생은 105일까지는 이뤄지지 않았으나, 125일 28.9%, 145일 55.4%, 180일 59.3%로 현저하게 증가하였다. 수분후일수에 따른 발아율과 발근율에는 유의차가 있는 반면에 배지의 종류에 따른 발아율과 발근율에 대한 영향은 미미하였다(Table 11).

**Table 11.** Effect of Inorganic elements components of media on das after pollination (DAP) of embryo germination and rooting of ‘Shiranuhi’ Mandarin [(*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticula*] × ‘Sanguinelli’ (*C. sinensis*) Hybrid after 2-3 weeks of culture.

DAP (A)	Media type (B)	Germination (%)	Rooting (%)
90	MT	45.04±24.49 <sup>z</sup>	0
	MS	42.05±19.56	0
	B5	21.97±16.82	0
105	MT	58.00± 3.77	0
	MS	61.81±11.55	0
	B5	54.44±15.26	0
125	MT	69.60± 8.81	28.33±12.13
	MS	73.31±11.46	29.69±14.02
	B5	66.00± 8.67	28.60±12.58
145	MT	74.64± 7.86	48.53± 7.40
	MS	73.88± 5.56	61.22± 3.89
	B5	76.11±10.87	56.34± 8.12
180	MT	66.90± 6.62	55.00± 7.33
	MS	72.34±10.88	58.06±11.86
	B5	72.88± 6.34	64.78± 6.36
(A) DAP		***	***
(B) Media type		NS	NS
(A) × (B)		NS	NS

<sup>z</sup>Mean ± SE.

NS, \*\*\* Nonsignificant or significant at  $P= 0.001$ , respectively.

인공수분 후 90일에서는 재분화 조건 구멍에서는 생존율은 sucrose 120g/L와 GA<sub>3</sub> 무처리구에 따른 가장 높은 약 99.7%를 나타내었으나, 발아율은 sucrose 5g/L와 GA<sub>3</sub> 5mg/L에서가 약 79.0%서 높게 나타났다. 발근율은 sucrose 3g/L와 GA<sub>3</sub> 5mg/L일때 21.5%로 가장 높아, sucrose 농도가 낮으며 GA<sub>3</sub>농도가 높을수록 잘 발생되는 경향을 나타내었다(Table 12).

**Table 12** Effect of different concentration of Gibberellin 3 (GA<sub>3</sub>) and sucrose on survival, germination, rooting from 90 days after pollination (DAP) of in ‘Shiranuhi’ Mandarin [(*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*] × ‘Sanguinelli’ (*C. sinensis*) Hybrid after 4 weeks of culture.

Sucrose (g/L)	GA <sub>3</sub> (mg/L)	Survival (%)	Germination (%)	Rooting (%)
30	0	72.86±9.11abcd	23.57±15.63c	0b
	0.5	72.82±24.82abcd	39.25±20.90bc	4.17±4.25b
	1	87.78±5.93abcd	60.66±8.41ab	5.01±1.65b
	2.5	70.94±10.32bcd	54.7±10.83abc	3.81±5.39b
	5	69.57±6.08cd	59.01±4.26abc	21.45±12.98a
50	0	91.17±8.33abcd	41.49±20.21abc	0b
	0.5	79.78±3.34abcd	40.14±12.96bc	1.11±0.91b
	1	71.12±20.75bcd	50.03±11.42abc	1.25±1.77b
	2.5	98.52±1.39ab	66.35±5.05ab	5.58±2.56b
	5	94.86±4.16abcd	78.97±7.87a	15.23±3.16a
70	0	97.50±2.97abc	63.47±4.57ab	0b
	0.5	66.87±5.79d	49.48±4.99abc	4.07±4.29b
	1	86.81±14.87abcd	54.09±7.27abc	0b
	2.5	93.70±5.47abcd	57.59±13.45abc	5.32±6.38
	5	96.45±0.36abc	64.82±6.70ab	2.35±1.75b
90	0	94.21±5.01abcd	68.08±3.79ab	0b
	0.5	99.52±0.67a	69.30±10.41ab	0b
	1	92.32±4.37abcd	70.29±5.50ab	0b
	2.5	98.33±1.36ab	63.22±18.07ab	0b
	5	81.37±3.45abcd	54.29±14.07abc	0.37±0.52b
120	0	99.68±0.45a	67.15±0.92ab	0b
	0.5	93.33±9.43abcd	57.40±18.61abc	0b
	1	90.67±8.22abcd	51.74±4.49abc	0b
	2.5	97.78±3.14abc	66.23±14.00abc	0b
	5	97.43±2.37abc	48.92±15.72abc	1.33±1.89b

All materials were cultured on MS medium + 0.8% agar + malt extract 500mg/L, Adenine sulphate 25mg/L+ 0.8% agar, pH5.8

Data represents mean value ± SE of three replicates. Mean values followed by same letters within a column are not significantly different according to Duncan’s multiple range test (DMART) at 5 % level.

PCR-RAPD와 SSR 마커를 이용한 교잡배 선발

감귤류(*Citrus spp.*)는 교잡배 뿐만 아니라 비생식세포(주심배) 기원의 다배성 배들이 존재하기 때문에 육종목표의 육구를 만족시키기에 적합한 다배성 품종에서의 교잡배 선발이 매우 어렵다. 온주밀감의 경우 다배성으로서 주심배실생 발생이 많고 교잡실생의 출현율은 10~15%에 불과하여 교잡실생 확보가 어렵고, 형태적으로 주심배실생과 교잡실생의 판별이 어려워 이의 식별이 주요한 과제로 생각되고 있다(송, 2013). 일부 연구에서 잎 특성이 확연한 품종을 부분으로 하여 교잡배와 주심배를 선발하는 방법도 있으나 대부분은 주심배 육종에 이용되고 있으며 교잡배 육종에는 한계가 있어 현재 육종에 쓰이는 우수 품종들에게 적용하기는 더욱 어렵다. 한편, 우수한 품종 특성(당도, 식미, 과형)을 가지고 있는 부지화는 다배성 식물로 이에 해당한다.

본 연구에서는 부지화와 상귀넬리 조합의 교잡배를 조기 선발하기 위하여 PCR-RAPD 마커 및 SSR 마커를 이용하였다. ‘부지화’ 및 ‘블러드오렌지’(적육계) 7품종에 대하여 PCR-RAPD를 수행하였다. 20개의 프라이머 가운데 품종 또는 계통간 특이성을 나타내는 10종의 프라이머에서 RAPD 변이들이 확인되었다. 선발된 프라이머를 이용하여 1차적으로 교잡배와 주심배를 판별하는데 적용이 가능할 것으로 판단되었다.(Fig. 17).

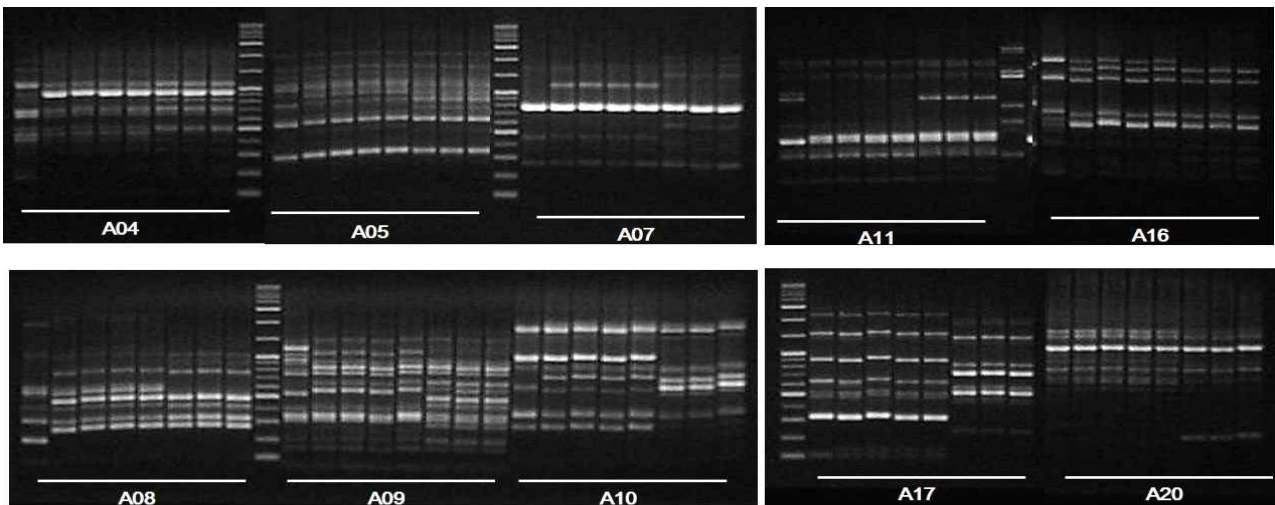


Fig. 17. PCR using RAPD primer in ‘Shiranuhi’ Mandarin [(*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*] and blood orange.

분석에 이용된 3개의 SSR 마커에 대한 PCR 증폭산물을 확인한 결과는 Fig. 18과 같다.

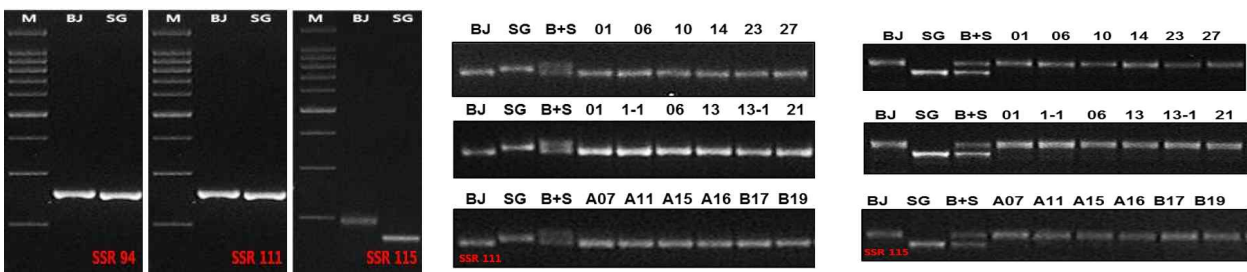


Fig. 18. PCR analysis using SSR94, SSR111, SSR115 primer in ‘Shiranuhi’ Mandarin [(*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*] × ‘Sanguinelli’ (*C. sinensis*) Hybrid. BJ, Shiranuhi, SG,

인공수분 후 일수에 따른 종자 SSR 분석결과 교잡배는 90일에서 100%, 105일 30%, 125일 10%로 145일과 180일에서는 검출되지 않았다(Fig. 19). 종자의 독립적인 각 배 배양체로부터 재분화한 신초 조직에 대한 SSR 분석결과는 Table 13과 같다. 인공수분 후 일수에 따른 종자에 대한 교잡배 비율은 수분후 90일에서 12.1%, 105일 7.6%, 125일 6.8%, 145일 1.0%, 180일 4.1%였고, 배분리 배양체에 대한 교잡배 비율로 보면 90일이 5.2%, 105일 1.5%, 125일 0.8%, 145일 0.1%, 180일 0.7%였다. 이 결과는 인공수분 후 일수에 따라 종자 상태로 SSR분석한 결과와 비슷한 경향을 나타내었다(테이타 미제시). 이는 Rangan 등(1969)의 라임에서 인공수분 후 100~120일 때 미숙배 분리배양을 통해 교잡배를 얻은 결과와도 상응하는 경향이였다. 또한, 배 갯수가 적은 품종일수록 단배종자를 형성하는 비율이 높고 또한 일반적으로 배 갯수가 적은 품종이 배 갯수가 많은 품종보다 교잡배의 발육이 더 건전하므로 잡종의 비율을 높일 수 있다는 보고도 있다. De pasqual와 Puglia(1998) 교잡배는 주심배에 의존적인 양상을 띠며, 종자당 주심배 개수를 낮추면 교잡배의 크기와 생존 가능성을 높일 수 있다고 보고 하였다. 또한 본 연구 결과에서는 부지화가 인공수분 후 일수에 따라 배 갯수가 현저하게 증가하는 경향을 보이고 있어 교배종자를 조기에 채취하여 배 분리배양하는 것이 높은 확률의 교잡배 선발에 유리할 것으로 판단된다. 따라서, 본 연구결과의 접합배 조기선발 기술을 활용하여 우수한 품종특성(당도, 식미, 과형)을 지니고 있는 다배성 감귤(온주밀감, 만다린류 등) 품종으로의 적용 확대가 가능할 것으로 기대된다.

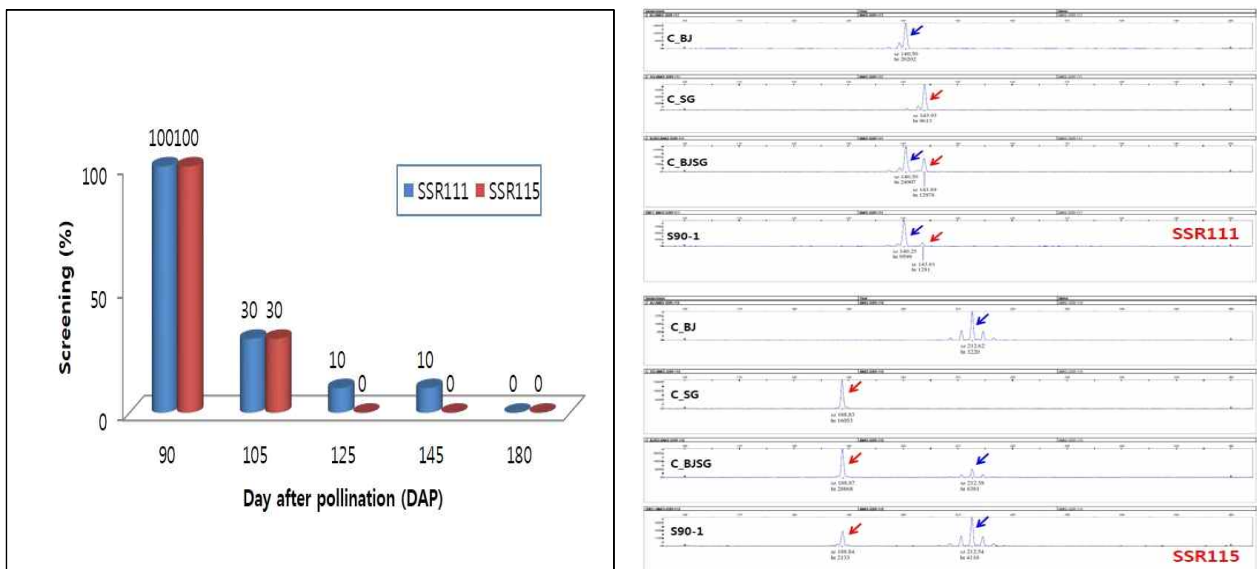


Fig. 19. Screening of zygotic seed by day after pollination in 'Shiranuhi' Mandarin [(*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*] × 'Sanguinelli' (*C. sinensis*) Hybrid.

Table 13. SSR genotyping analysis of ‘Shiranuhi’ Mandarin [(*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*] × ‘Sanguinelli’ (*C. sinensis*) Hybrid.

DAP	No. of seed	No. of analyzed embryos	No. of SSR genotyping confirmed	Zygotic ratio (%)	
				Seeds	Embryos
90	58	134	7	12.1	5.2
105	118	614	9	7.6	1.5
125	103	858	9	6.8	0.8
145	98	675	1	1.0	0.1
180	97	576	4	4.1	0.7

교잡배 SSR분석을 통해 얻어진 개체는 계대배양을 통해 증식한 후에 기외접목하여 비닐하우스 내에서 순화시키며 육묘하고 있다(Fig. 20).



Fig. 20. Zygotic plants of blood orange × ‘Shiranuhi’ Mandarin [(*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*] Hybrid.

## 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제1절 연차별 연구개발 수행내용 및 목표 달성도

#### 1. 1차년도(2013년)

과제 구분	연구개발의 목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1세부	○ 목표형질 자원이용 교배	○ 핵심 종자친, 화분친 선정 교배	100
	○ 획득 실생 파종 교잡종 선별	○ 실생 획득 파종 및 교배	100
2세부	○ 교배 및 실생 양성	○ 홍피계 품종 교배 및 육묘 - 클레멘틴×베니바에 외 1조합 1,835화 교배, 2,030개 종자 획득, 1,352주 실생 확보 ○ 홍피계 클레멘틴, 리, 56-423을 모본으로 자연수분 획득 종자 파종 및 육묘	100
	○ 유전자원 등록	○ 국립농업과학원 농업유전자원센터 3점 등록 완료(K243581~K243583)	100
3세부	○ 만감류 주심배 in vitro 육종 기술 확보	○ 만감류 미숙 종자 배배양 기술 확보 - In vitro culture를 통해 감귤류의 미숙 종자로부터 주심배 유도 및 배배양 기술 확보 - 만감류 종자 주심배 발아 특성 평가	100
	○ 만감류 종자의 기내 발아 특성 조사	○ 만감류 주심배 유도 5 품종 이상	100
	○ 만감류 주심배 배양 체 확보	○ 만감류 미숙종자 주심배 기내 배발생 유도 500 개체이상	100
	○ 만감류 유전자원 수집	○ 만감류 유전자원수집 3 건이상	100
4세부	○ 적육계 교배 및 교배실생 대량양성	○ 청견 교배실생 3,700개 확보 ○ 부지화의 교잡배 및 주심배 등 약 20,000개 확보 ○ 부지화 교잡배 및 주심배 조기 선발을 위한 DNA 표지 10종 확인	100
	○ 조기 육종 및 육묘 시스템 구축	○ 조기 육묘 시스템 구축을 위한 가온시설 330m <sup>2</sup> 구축	100
	○ 교잡배 및 미숙배 구제를 위한 조직배양 시스템 구축	○ 교잡배 및 미숙배 구제를 위한 조직배양시설 및 준비실 확보 66m <sup>2</sup>	100
	○ 유전자원 수집 및 등록 2건	○ 핑거라임 영양체 3종 수집 및 등록 3건	100



2. 2차년도(2014년)

과제 구분	연구개발의 목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1세부	○ 조숙성, 부피경감 자원이용교배	○ 종자친, 화분친 선정 교배	100
	○ 실생 성장유도	○ 교배실생 고집 성장 유도	100
2세부	○ 교배 및 실생 양성	○ 홍피 및 적육계 품종 교배 및 육묘 - 하레히메×올란도 외 6조합, 2,233화 교배, 3,304개 종자 획득, 2,165주 실생 확보 ○ 홍피계 품종[클레멘틴, 리, 56-423]에서 자연수분에 의해 획득한 실생묘 371주를 감귤 성목에 고집 후 1주지 성장 유도 ○ 교배친 활용을 위해 6품종 고집 및 교배수 확보	100
	○ 유전자원 등록	○ 국내 미등록 일본 감귤 품종 유전자원 등록 업무 추진	0
3세부	○ 만감류 교배 종자 배배양 기술 확보	○ 만감류를 모본으로 한 교배 조합을 구성 교배를 실시하고, 형성된 종자로부터 배양체 유도 ○ In vitro culture를 통해 교배 종자로부터 배배양 기술 확보 ○ In vitro에서 교배배와 주심배 판별 기술 확보	100
	○ 만감류 주심배 유도체 접목 및 순화 500 개체 이상	○ 기내에서 배양된 주심배 배양체를 탕자 대목에 접목 묘목 육성	100
	○ 만감류 주심배 특성 조사 및 연구	○ 부지화 미숙종자 유래 배양체의 변이 특성 조사 ○ 부지화 미숙종자의 세포학적 특성 조사	100
	○ 만감류 교배 라인 확보	○ 조숙성 감귤류 모본 부지화 부분 교배 조합 - 조생온주 (오이다, 성전온주) 모본× 부지화 부분 교배 및 교배 종자 기내 발아	100
4세부	○ 적육계 교배 및 교배실생 대량양성	○ 청견모본의 교배실생 4,000여주 확보 ○ 부지화의 교잡배 및 주심배 등 4,500주 확보 ○ 부지화 교잡배 및 주심배 조기 선발을 위한 SSR마커 선별 및 교잡배 일부 선발	100
	○ 조기 육종 및 육묘 시스템 구축	○ 조기 육묘 시스템 구축을 위한 시설 330m <sup>2</sup> 구축	100
	○ 교잡배 및 미숙배 구제를 위한 조직배양시스템 구축	○ 교잡배 및 미숙배 구제를 위한 조직배양 시설 66m <sup>2</sup> 조성 완료	100
	○ 유전자원 수집 및 등록 2건 등	○ 유전자원 영양체 3종 수집 및 유전자원센터 등록 3건	100

3. 3차년도(2015년)

과제 구분	연구개발의 목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1세부	○ 신규 교배	○ 핵심 종자친, 화분친 선정 교배	100
	○ 생장·결실 유도	○ 교배실생 고집 후 생장 유도	100
	○ 과실 특성조사	○ 선발개체 및 선행 연구과제에서 탐색	100
	○ 조숙, 무부피 개체 탐색	○ 선행 연구과제에서 탐색	100
2세부	○ 교배 및 실생 양성	○ 홍피 및 적육계 품종 교배 및 육묘 - 에히메28호×타로코 외 9조합, 3,619화 교배, 3,641개 종자 획득, 3,139주 실생 확보 ○ 클레멘틴×베니바에 외 1조합 교잡 실생묘 1,335주를 감귤 성목에 고집 후 1주지 생장유도	100
	○ 유전자원 등록	○ 국립농업과학원 농업유전자원센터 4점 등록 완료 (K251220~K251223)	100
	○ 우량계통 선발	○ 연내 수확 가능한 홍피 특성의 계통선발, JNM1(임시번호)	100
	○ 분자표지를 활용한 홍피 형질 조기 선발	○ SSR분자마커를 이용하여 하레히메×올란도 외 4조합 교잡 실생묘의 교잡 여부 판별 ○ 미네오라 외 3 품종의 re-sequencing data를 이용 하여 품종간 SNP, SSR marker 탐색	100
3세부	○ 만감류 주심배 사배체 유도기술 확보	○ 부지화, 발렌시아오렌지, 바탐 오렌지, 레몬, 하귤 등 감귤류에 오리자린 처리를 통해 4배체를 유도하고, 4배체 식물체 확인 ○ 기내 배양체의 배수체 유도 기술 확보	100
	○ 만감류 교배종자 유도체 조합 100개체 이상 접목 및 순화	○ 교배종자 기내 발아체 174 라인을 탱자 대목에 접목하여 묘목 육성	100
	○ 만감류 주심배 유도체 접목 및 순화 500 개체 이상	○ 기내에서 배양된 주심배 배양체를 732라인을 탱자 대목에 접목 묘목 육성	100
	○ 만감류 주심배 우량계통 선발 1건 이상	○ 품종보호출원용 1 계통, 품종 특성 평가용 1 계통을 선발	100
4세부	○ 우수계통선발 등	○ 우수계통선발 및 출원 1건 ○ 육종의 효율성 향상을 위한 접목 자재 특허출원 1건	100
	○ 부지화 모본의 교잡배 선발	○ 교잡배 및 주심배 SSR마커 분석 ○ 교잡배 및 주심배 등 3800여 개체 이상 확보	100
	○ 단배성(모본) 품종의 교배실생 획득	○ 단배성((청견, 에히메28호, 클리멘타인) 모본 교배실생 18,000여주 확보	100
	○ 유년성 단축을 위한 보조가온시설 및 노지포장 방풍망 조성	○ 조기 육종 및 육묘 시스템 구축 을 위한 시설 구축 ○ 교배 효율성을 높이기 위한 모수 및 유전자원 포장 방풍망 조성(660㎡)	100

4. 4차년도(2016년)

과제 구분	연구개발의 목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1세부	○ 신규 교배	○ 핵심 종자친, 화분친 선정 교배	100
	○ 육묘 및 접목	○ 교잡실생 육묘 및 탱자 절접	100
	○ 과실특성조사	○ 선발개체 및 선행 연구과제에서 탐색	100
	○ 조숙, 무부피 개체 탐색	○ 선행 연구과제에서 탐색	100
2세부	○ 교배 및 실생 양성	○ 홍피 및 적육계 품종 교배 및 육묘 - 피나소테아×올란도 외 14조합, 9,857화 교배, 28,247개 종자 획득 후 교배조합 별 육묘 중 ○ 하레히메×올란도 외 6조합에서 획득 한 교잡실생묘 2,057주를 감귤 성목에 고접 후 1주지 생장 유도	100
	○ 유전자원 등록	○ 국립농업과학원 농업유전자원센터 5점 등록완료 (K256365~K256369)	100
	○ 식물특허 출원	○ 우량계통 JNM1을 이용하여 특허 출원 완료	100
	○ 홍피 형질 연관 분자마커 탐색	○ 비교 유전체 분석, 문헌 분석 및 플라보노이드/ 카로티노이드 생합성 대사 경로 유전자 기반의 홍피 형질 관련 SNP 분자마커 발굴, (주)바이오메딕과 협력 연구	100
4세부	○ 우수계통선발 등	○ 우수계통선발	100
	○ 부지화 모본 이용 교잡배 선발	○ 교잡배 및 주심배 SSR마커 분석 ○ 교잡배 및 주심배 등 3,750여 개체 이상 확보	100
	○ 단배성(모본) 이용 교배실생 획득	○ 단배성(청견, 에히메28호, 클리멘타인) 모본 교배실생 5,000 여주 확보	100
	○ 지식재산권 확보	○ 품종명칭등록 3건 ○ 상표등록 6건 ○ 생산판매신고 2건 ○ 식물특허출원 1건	100

제2절 관련 분야에의 기여도

한국의 감귤육종은 국립원예특작과학원 감귤연구소 주도로 진행되어 왔으며, 2011년 제주특별자치도농업기술원에 감귤육종센터가 설치되면서 두 개의 기관에서 진행이 되어 오다가 2013년 Golden Seed 프로젝트에 의해 민간 기업이 감귤육종 분야에 참여하게 되었다. 이를 통하여

보다 왕성한 품종개발이 이루어질 것으로 기대하고 있다. 민간육종의 활성화를 통하여 향후 독자적인 품종개발이 가능할 것이며, 이에 따라 보다 많은 품종들이 개발 되어질 것이라고 사료된다. 이는 제주지역 감귤산업의 지속적인 발전의 원동력이 될 것이다. 국가 감귤육종 기관과 민간 감귤육종 기업의 유기적인 협동연구를 통하여 우수 품종을 계속적으로 농가에 공급을 하고, 이는 UPOV 및 FTA 확대에 대비한 감귤의 경쟁력 확보에 매우 중요한 요인이 될 수 있다.

과수의 특성 때문에 감귤육종에는 긴 기간이 소요 되지만 4년 이라는 기간 동안 과제에 참여한 민간 기업에서 품종보호출원, 우량계통선발, 특허출원, 품종생산수입판매신고, 육종기반 구축, 감귤유전자원등록 등의 많은 성과들을 도출 하고 있다. 또한 감귤육종에 참여하는 기술 인프라가 확대 되면서 보다 역동적인 감귤육종이 이루어질 것이고 최종적으로 제주 감귤산업의 지속적 발전에 큰 기여를 할 것이다.

## 제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제1절 연구성과 목표 대비 실적

#### 1. 정량적 성과

(단위 : 건수)

구분		특허		신품종				유전 자원 등록	논문		학회 발표
		출원	등록	품명 명등록	우량 계통선발	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표							8			
	달성							6			
2차년도	목표							8			1
	달성							3			2
3차년도	목표				4			9		1	
	달성	1			6	1		7	1		2
4차년도	목표	3		2	1			9			1
	달성	3		3	1			8			2
계	목표	3		2	5			34		1	2
	달성	4		3	7	1		24	1		6

2. 지적재산권 확보(특허, 신제품보호출원, 품종명칭등록, 상표등록, 생산판매신고)

구분	지식재산권 등 명칭	국명	출원		
			출원인	출원일	출원번호
특허출원	순발생을 차단하는 접목 장치	대한민국	한농바이오산업(주)	2015.08.19.	10-2015-0116765
특허출원	감귤 신제품 타라타라 극조생	대한민국	한농바이오산업(주)	2016.10.28.	10-2016-0142202
특허출원	감귤 신제품 JNM1	대한민국	(주)제농	2016.12.21	10-2016-0175193
특허출원	연내 수확이 가능하며 과실 크기가 증대된 신제품 감귤 및 이의 육종방법	대한민국	농촌진흥청장	2016.12.22	10-2016-0176759
신제품 보호출원	레드산타	대한민국	한농바이오산업(주)	2015.12.07.	2015-698
품종명칭 출원	레드산타	대한민국	한농바이오산업(주)	2015.12.07	명칭 2015-1723
품종명칭 등록	레드산타	대한민국	한농바이오산업(주)	2016.02.17	감귤(만감류)-9
품종명칭 등록	비바리레드	대한민국	한농바이오산업(주)	2016.08.24.	40-2016-000862
품종명칭 등록	비바리허브향	대한민국	한농바이오산업(주)	2016.08.24.	40-2016-000874
상표등록	굴빛과랑 (제03류)	대한민국	한농바이오산업(주)	2016.10.28.	40-2016-0091532
상표등록	굴빛과랑 (제29류)	대한민국	한농바이오산업(주)	2016.10.28.	40-2016-0091535
상표등록	굴빛과랑 (제30류)	대한민국	한농바이오산업(주)	2016.10.28.	40-2016-0091537
상표등록	굴빛과랑 (제31류)	대한민국	한농바이오산업(주)	2016.10.28.	40-2016-0091539
상표등록	굴빛과랑 (제32류)	대한민국	한농바이오산업(주)	2016.10.28.	40-2016-0091540
상표등록	굴빛과랑 (제35류)	대한민국	한농바이오산업(주)	2016.10.28.	40-2016-0091544
생산판매 신고	비바리레드	대한민국	한농바이오산업(주)	2016.08.24.	03-0005-2016-3
생산판매 신고	비바리허브	대한민국	한농바이오산업(주)	2016.08.24.	03-0005-2016-4

### 3. 논문

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	화분 특이적 마커를 이용한 감귤 교잡종 실생묘의 조기 동정	원예과학 기술지	진성범	33(4)	대한민국	한국원예학회	SCI

### 4. 분자마커

번호	특성	보유건수	주요내용	활용년도
1	부지화 X 성진은주 교잡체 구분 Markers	2	- SSR 012 부지화 X 은주교잡체 구분 maker : (Size 290, (TTA)15 repeat motif) - SSR 093 부지화 X 은주교잡체 구분 marker (Size 136, (TA)6 repeat motif)	2014

### 5. 유전자원등록

번호	특성	수집	등록			기타
			등록인	등록일	등록번호	
1	홍색 과피 Washington nivel 변이	일본 종묘회사를 통하여 감귤 영양체 수집	(주)제농 김태형	2014년 3월 19일	K243581	
2	청견 변이	일본 종묘회사를 통하여 감귤 영양체 수집	(주)제농 김태형	2014년 3월 19일	K243582	
3	Comuna orange 변이	일본 종묘회사를 통하여 감귤 영양체 수집	(주)제농 김태형	2014년 3월 19일	K243583	
4	탄골	일본 종묘회사를 통하여 감귤 영양체 수집	(주)제농 김태형	2015년 7월 22일	K251220	
5	탄골	일본 종묘회사를 통하여 감귤 영양체 수집	(주)제농 김태형	2015년 7월 22일	K251221	
6	탄골	일본 종묘회사를 통하여 감귤 영양체 수집	(주)제농 김태형	2015년 7월 22일	K251222	
7	마이크로시트러스	일본 종묘회사를 통하여 감귤 영양체 수집	(주)제농 김태형	2015년 7월 22일	K251223	
8	탄골	일본 종묘회사를 통하여 감귤 영양체 수집	(주)제농 김태형	2016년 6월 21일	K256365	
9	문단	일본 종묘회사를 통하여 감귤 영양체 수집	(주)제농 김태형	2016년 6월 21일	K256366	
10	문단	일본 종묘회사를 통하여 감귤 영양체 수집	(주)제농 김태형	2016년 6월 21일	K256367	

번호	특성	수집	등록			기 타
			등록인	등록일	등록번호	
11	기타	일본 종묘업자를 통하여 감귤 영양체 수집	(주)제농 김태형	2016년 6월 21일	K256368	
12	문단	일본 종묘업자를 통하여 감귤 영양체 수집	(주)제농 김태형	2016년 6월 21일	K256369	
13	유색(녹색, 노란색, 적색) 과육 및 길고 얇은 과피	Australia 묘목회사	한농바이오 산업(주)	2014년 2 월 1일	K231591	
14	유색(녹색, 노란색, 적색) 과육 및 길고 얇은 과피	Australia 묘목회사	한농바이오 산업(주)	2014년 2 월 1일	K231592	
15	유색(녹색, 노란색, 적색) 과육 및 길고 얇은 과피	Australia 묘목회사	한농바이오 산업(주)	2014년 2 월 1일	K231593	
16	조기착과용 교배실생 대목 활용	Australia 묘목회사	한농바이오 산업(주)	2015년 1 월 6일	K247093	
17	조기착과용 교배실생 대목 활용	Australia 묘목회사	한농바이오 산업(주)	2015년 1 월 6일	K247094	
18	조기착과용 교배실생 대목 활용	Australia 묘목회사	한농바이오 산업(주)	2015년 1 월 6일	K247095	
19	조기착과용 교배실생 대목 활용	Australia 묘목회사	한농바이오 산업(주)	2015년 11 월 21일	K252377	
20	유색계 유전자원으로 활용	Australia 묘목회사	한농바이오 산업(주)	2015년 11 월 21일	K252378	
21	유색계 유전자원으로 활용	Australia 묘목회사	한농바이오 산업(주)	2015년 11 월 21일	K252379	
22	유색계 유전자원으로 활용	Australia 묘목회사	한농바이오 산업(주)	2016년 8 월 16일	K256566	
23	조기착과용 교배실생 대목 활용	Australia 묘목회사	한농바이오 산업(주)	2016년 8 월 16일	K256567	
24	유색계 유전자원으로 활용	Australia 묘목회사	한농바이오 산업(주)	2016년 8 월 16일	K256568	



## 6. 국제 육종 네트워크 구축



## 제2절 성과활용 계획

### 1. 품종보호출원

- 품종보호출원 품종: ‘선킹’(제감 나-51호) 및 ‘노을향’(제감 나-54호) 등 2품종
- 출원시기: 2017년 6월
- 기대효과: 임시보호권 부여로 산업화 가능

### 2. 출원품종에 대한 통상실시

- 통상실시 예정 품종: ‘선킹’ 및 ‘노을향’ 등 2품종
- 통상실시 공고일: 2017년 11월
- 기대효과: 조기에 농가보급이 가능

### 3. 학술발표

- 발표대회명: 한국원예학회 춘계 및 추계학술발표대회

- 발표일정: 2017년 5월 또는 10월
- 발표제목: 연내 수확형 부피없는 감귤 신품종 ‘선킹’  
연내 수확형 부피없는 감귤 신품종 ‘노을향’

#### 4. 품종특성 설명회

- 설명회 일정: 2017년 12월
- 출품 품종: ‘선킹’ 등 최소 2품종, 부지화 미발달종자 배양체 유래 선발계통 (품종명 미정)
- 설명 대상: 국내 육묘업자 및 선진농가, 생산 희망 생산자 단체 및 개별농가

#### 5. 해외 시장 개척

- 국내 육성 감귤품종의 해외적응성시험 추진
- 수출시장 개척을 위한 신규 현지 딜러 발굴

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

## 제 7 장   참고문헌

- Ollitrault, P., Dambier, D., Sudahono, Mademba-Sy, F., Luro, F. and Aubert, B. 1998. Biotechnology for triploid mandarin breeding. *Fruits* 53, 307-317.
- Murashige T. & Skoog F. 1962 A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol.Plant.* 15, 473-497.
- Murashige T. & Tucker D.P.H. 1969 Growth factor requirements of citrus tissue culture. pp. 1155-1161 in Chapman H. D. (ed.) *Proc. 1st Int. Citrus Symp. Vol. 3, Univ. Calif., Riverside Publication.*
- Gamborg O.L, Miller R.A. & Ojima K., *Exp. Cell Res.*, (1968), 50, 151 - 158
- Rangan, T.s., T. Murashige and W.P. Bitters. 1969. In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in Citrus. *Proc. 1stInt. Citrus Symp.* 1: 225-229.
- 김호방, 우진규, 김재준 2016. 감귤교잡배와 주심배 구별용 SSR분자마커 및 이의 용도(특허출원번호 10-2016-0138634)
- 진성범, 윤수현, 박재호, 박석만, 고상욱, 이동훈. 2015. 화분 특이적 마커를 이용한 감귤 교잡종 실생묘의 조기 동정. *원예과학기술지.*
- 고정삼. 2007. 제주감귤. 제주문화.
- 교회중 외 26인. 2012. 신고식물육종학. 향문사.
- 박재호. 2007. 한국의 감귤육종 현황과 전략. 동북아의 감귤육종 현황과 전략에 관한 국제 심포지엄.
- 송관정. 2013. Golden Seed 프로젝트 품목별 상세기획 보고서.
- 송관정. 2013. 감귤. *한국원예학회 기타간행물*, 5:186-201.
- 제주특별자치도감귤출하연합회. 2015년산 감귤유통처리 분석. <http://www.citrus.or.kr>
- 국립종자원. <http://www.seed.go.kr>

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부.해양수산부.농촌진흥청.산림청에서 시행한 Golden Seed 프로젝트 사업(원예종자사업단, 과제번호 : 213003044CGT00)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부.해양수산부.농촌진흥청.산림청에서 시행한 Golden Seed 프로젝트 사업(원예종자사업단, 과제번호 : 213003044CGT00)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.