

발간등록번호

11-1543000-001681-01

**감귤 핵심집단 및 배수체 육종기반 구축**  
**(Gold Seed 프로젝트)**

(Establishment of core collection and polyploid breeding platform in citrus)

**제주대학교**

농림축산식품부 · 해양수산부 · 농촌진흥청 · 산림청

## 제 출 문

농림축산식품부장관 . 해양수산부장관 . 농촌진흥청장 . 산림청장 귀하

본 보고서를 “감귤 핵심집단 및 배수체 육종기반 구축” 프로젝트(세부프로젝트 “감귤 내병성 및 기능성 핵심집단 구축”, “감귤 주요형질 연관 분자표지 개발”, “반수체 유래 동질사배체를 이용한 무핵 삼배체 만다린 우량계통 육성”)의 최종보고서로 제출합니다.

2017 . 03. .

프로젝트 연구기관명 : 제주대학교

프로젝트 책임자 : 송 관 정

세부프로젝트 연구기관명 : 제주특별자치도농업기술원

세부프로젝트 책임자 : 박 영 철

세부프로젝트 연구기관명 : (주)바이오메딕

세부프로젝트 책임자 : 김 호 방

세부프로젝트 연구기관명 : 제주대학교

세부프로젝트 책임자 : 송 관 정

## 보고서 요약서

과제고유번호	213003-04-1-SBS10	해 당 단 계 연구 기 간	41개월	단 계 구 분	1/1
연구 사업 명	단 위 사 업 명	농식품기술개발(R&D)			
	세부 사업명	Golden Seed 프로젝트			
연구 과 제 명	프 로젝트 명	감귤 핵심집단 및 배수체 육종기반 구축			
	세부 프로젝트명	감귤 내병성 및 기능성 핵심집단 구축(제주특별자치도농업기술원/박영철)			
	(주관 연구기관/연구책임자)	감귤 주요 형질 연관 분자표지 개발(바이오메딕/김호방) 배수체 유래 동질사배체를 이용한 무핵 삼배체 만다린 우량계통 육성(제주대학교/송관정)			
연구 책임자	송관정	해당단계 참 여 연구원 수	총: 116명 내부: 114명 외부: 2명	해당단계 연구 개발비	정부:1,381,000천원 민간: 157,340천원 계:1,538,340천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 116명 내부: 114명 외부: 2명	총 연구개발비	정부:1,381,000천원 민간: 157,340천원 계:1,538,340천원
연구기관명 및 소속 부서명	제주대학교 생물산업학부 원예환경전공			참여기업명 : (주)바이오메딕	
위탁 연구	연구기관명: 제주대학교			연구책임자: 전용철	
요약				보고서 면수 : 148	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 감귤 유전자원 271점을 수집하고 195점을 등록하였으며 플라보노이드 등 예비핵심집단 6개를 구축함</li> <li>- 궤양병 저항성 연관 RAPD-SCAR 마커 1개, SNP 마커 28개와 더탱이병 저항성 연관 SNP 마커 16개, 홍피 연관 SNP 마커 1개 등 총65개 마커를 선발함</li> <li>- 콜히친을 절취한 액아에 감압 처리하여 동질사배체를 유도하는 기술체계를 확립하였으며, 자연발생배수체 23개체를 선발 육묘함</li> </ul>					

# 요 약 문

## I. 프로젝트명 : 감귤 핵심집단 및 배수체 육종기반 구축

(Establishment of core collection and polyploid breeding platform in citrus)

## II. 연구성과 목표 대비 실적

구분	품종개발		특허		논문		분자 마커	유전자원		primer 탐색	분리 집단 적용	책자 발간	핵심 집단 구축	병리 검정	기반 구축
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록						
최종목표			1	0	2	2	2	300	140	400	4	0	1	200	1
연구기간내 달성실적			2	1	0	4	65	271	195	1,50	13	1	6	173	1
달성율(%)			100	100	0	100	100	90	149	100	100	100	100	87	100

## III. 연구개발의 목적 및 필요성

- 감귤 교배육종 효율성 제고와 감귤 육종소재의 다양화를 위해 유전자원 도입확대가 필요하며 이들 유전자원에 대한 원예·육종학적 특성을 조사하여 체계적으로 정리할 필요가 있음
- 최근 감귤 육종에서 관심이 증가하고 있는 내병성, 기능성 품종 육성을 위하여 내병성 및 기능성 핵심집단을 구축함으로써 감귤 육종가들이 활용할 수 있도록 하고자 함
- 유전체 해독 및 생물정보학 기술의 발달은 유전체 기반 분자육종을 가속화시킬 것으로 전망됨
- 감귤의 육종연한을 단축하고 선발환경에 상관없이 객관적인 선발평가를 통한 선발효율 제고 및 육종 비용절감을 통한 조기선발 체계 확립이 요구됨
- 유전체 정보를 활용한 범용성 분자표지 개발 촉진과 MAS (Marker Assisted Selection) 실용화를 통한 육종의 과학화가 요구됨
- 무핵삼배체 품종개발 실용화 단계의 선진국과의 기술 격차를 줄이고 품종개발의 경쟁력을 제고하기 위해 무핵삼배체 육종기반 구축이 시급함
- 무핵삼배체 개발에는 사배체 교배친 확보가 필수적이며, 일본 등의 선진국에서와 같이 콜히친을 사용한 동질사배체 유도기술 개발이 요구됨

## IV. 연구개발 내용 및 범위

- 유전자원 도입 확대 및 안전 보존

- 도입확대 및 보존 : 국내외 보존기관 및 종묘업체로부터 접수 또는 종자 형태로 4년간 300점을 도입하고, 노지 또는 시설을 이용하여 보존하며, 감귤 육종가들에게 육종소재 제공
- [감귤품종] 책자 발간 : 원예·육종학적 특성은 현재 보유 유전자원 및 도입유전자원 등에 대하여 보존포장에서 내병성, 과실 품질특성, 종자수, 배수성 등을 조사 정리하여 육종가들에게 제공
- 내병성 및 기능성 핵심집단 구축
  - 1단계에서는 현재 보유하고 있는 유전자원을 중심으로, 2단계에서는 도입된 유전자원을 중심으로 분석하여 실내 및 포장 조사결과를 종합하여 핵심집단 구축
  - 내병성 핵심집단은 궤양병, 더덩이병, 검은점무늬병 핵심집단을 구축함
  - 기능성 핵심집단은 플라보노이드, 카로티노이드 핵심집단 2개를 구축함
- 감귤 주요형질 연관 분자표지 개발
  - 감귤 품종 및 교배 집단을 활용하여 분자생물학적 방법과 유전체학적 접근방법을 이용한 감귤 궤양병 내병성 연관 분자표지 개발
  - 감귤 품종 및 교배 집단을 활용하여 분자생물학적 방법과 유전체학적 접근방법을 이용한 감귤 더덩이병 내병성 연관 분자표지 개발
  - 감귤 품종 및 교배 집단을 활용하여 분자생물학적 방법과 유전체학적 접근방법을 이용한 감귤 홍피 형질 연관 분자표지 개발
  - 다배성 품종을 모본으로 사용하는 교배집단에서 교잡배와 주심배 유래 유묘를 객관적이고 체계적으로 구분하기 위한 분자표지 개발 및 분석 시스템 구축
- 감귤 동질사배체 유도기술 개발
  - 콜히친과 오리잘린의 처리 농도 및 시간, 처리방법 등의 요인을 분석 평가
- 자연발생배수체 선발 및 조기육묘
  - 단배성 품종을 교배모본으로 하여 인공교배 후 미숙종자를 기내 파종 발아한 후 배수성 검정을 통해 선발하고 순화시켜 육종포장에 조기 육묘
- 교배실생 조기결실 시스템 구축
  - 교배실생의 무측지 유인방식으로 육묘하고, 일부 교배실생에 대해 대목을 달리한 접목 영향과 수형관리 방식에 따른 영향을 평가

## V. 연구개발결과

해외로부터 감귤 유전자원 271점을 도입하였고, 기존 자원 4점을 포함하여 124점은 농촌진흥청 농업유전자원센터에 등록하여 2016년 6월에 IT번호를 부여 받았다. 추가로 2016년에 역시 농업유전자원센터에 등록을 요청하여 현재 71점에 대하여 임시 IT번호를 받아 놓은 상태이다. 도입한 유전자원은 만다린이 95점으로 가장 많았고, 스위트오렌지가 77점으로 다음으로 많았다. 도입한 자원을 적극적으로 재배를 권장하기 위한 의도로 레몬도 24점으로 비교적 많은 수를 도입하였다. 문헌 등을 통해 자원명, 학명, 기원, 주요 생육 및 과실품질 특성, 사진 등을 조사하여 도입 유전자원과 기존 보유 유전자원의 특성을 종합하여 [감귤품종] 이란 책자를 발간하였다.

제주지역 감귤 재배에서 중요한 문제를 일으키는 더덩이병, 궤양병, 검은점무늬병에 대하여 조사하였다. 더덩이병과 궤양병은 실내 또는 온실조건과 포장 조건에서 조사하였으며, 검은점무늬병은 포장조건에서만 조사하였다. 더덩이병 실내 검정은 선발한 접종농도  $6.3 \times 10^5$

conidia/ml를 살포하여 72점을 조사하였고 포장이병도 조사는 3년동안 221점에 대해 실시하였다. 궤양병 실내 검정은 선발된  $3.0 \times 10^7$  cfu/ml로 분무살포하여 30점을 조사하였고, 같은 농도로 온실조건에서 77점을 조사하였다. 궤양병 포장 이병도 조사는 4년동안 223점에 대해 조사하였다. 검은점무늬병은 3년동안 포장 이병도를 220자원에 대해 조사하였다.

플라보노이드, 카로티노이드, 더탱이병, 궤양병, 검은점무늬병에 대한 예비 핵심집단을 구축하였고, 이들과 과실품질 특성을 요인으로 하는 종합적인 예비핵심집단을 구축하였다. 핵심집단 구축에 활용한 자원은 플라보노이드 183개, 카로티노이드 195개, 더탱이병 221개, 궤양병 223개, 검은점무늬병 220 자원에 대해 실시하였다. 플라보노이드, 카로티노이드, 더탱이병 이병도, 궤양병 이병도, 검은점무늬병 이병도와 과실품질 등을 종합한 핵심집단은 조사 유형마다 조사 점수가 다르기 때문에 공통으로 조사가 된 164점을 이용하였다.

제주지역 감귤 재배에서 중요한 문제를 일으키는 더탱이병, 궤양병, 검은점무늬병에 대하여 조사하였다. 더탱이병과 궤양병은 실내 또는 온실조건과 포장 조건에서 조사하였으며, 검은점무늬병은 포장조건에서만 조사하였다. 더탱이병 실내 검정은 선발한 집중농도  $6.3 \times 10^5$  conidia/ml를 살포하여 72점을 조사하였고 포장이병도 조사는 3년동안 221점에 대해 실시하였다. 궤양병 실내 검정은 선발된  $3.0 \times 10^7$  cfu/ml로 분무살포하여 30점을 조사하였고, 같은 농도로 온실조건에서 77점을 조사하였다. 궤양병 포장 이병도 조사는 4년동안 223점에 대해 조사하였다. 검은점무늬병은 3년동안 포장 이병도를 220자원에 대해 조사하였다.

플라보노이드, 카로티노이드, 더탱이병, 궤양병, 검은점무늬병에 대한 예비 핵심집단을 구축하였고, 이들과 과실품질 특성을 요인으로 하는 종합적인 예비핵심집단을 구축하였다. 핵심집단 구축은 농촌진흥청에서 개발한 핵심집단 구축 프로그램인 PowerCore 1.0을 이용하였다. 플라보노이드 핵심집단은 183 자원의 14.8%에 해당하는 27 자원을 포함하였으며, 핵심집단의 적정성을 검정하는 척도인 CR(Coincidence Rate)의 91.56%로 높아 핵심집단으로서의 의미가 있었다. 카로티노이드 핵심집단은 195 자원의 6.1%에 해당하는 12개의 유전자원으로 구성되었으며 CR은 92.21%였다. 더탱이병 핵심집단은 전체 221 자원의 4.5%에 해당하는 10개의 유전자원으로 구성되어 졌고, CR은 100%였다. 궤양병 핵심집단은 총 223 자원의 8.1%에 해당하는 18개로 구성되었으며, CR은 100%였다. 검은점무늬병 핵심집단은 총 220 자원의 7.7%에 해당하는 17개의 유전자원으로 구성되었고 CR은 96%였다. 플라보노이드, 카로티노이드, 더탱이병 이병도, 궤양병 이병도, 검은점무늬병 이병도와 과실품질(과중, 과형지수, 과육율, 부피도, 과피두께, 당도, 산함량, 과피색) 등을 종합하여 종합 핵심집단을 구축하였다. 조사 유형마다 조사 점수가 다르기 때문에 공통으로 조사가 된 164점을 이용하였다. 종합 핵심집단은 전체의 25.6%로 구성되었고 CR은 97.56%였다.

세균성 병원균인 *Xanthomonas citri* pv. *citri*에 의해 야기되는 감귤 궤양병(citrus canker)은 감귤 산업에서 매우 중요한 식물 병의 하나이다. 감귤 궤양병은 나무의 활력을 떨어뜨려 생산성을 감소시킬 뿐만 아니라 조기 낙과를 유도하며 과실의 품질을 떨어뜨린다. 감귤 궤양병의 중요성에도 불구하고, 아직까지 궤양병 저항성 연관 분자표지는 개발된 바 없다. 궤양병 저항성 연관 분자표지를 개발하기 위하여 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 기반의 SCAR (sequence characterized amplified regions) 마커와 유전체 비교 분석을 통한 SNP (single nucleotide polymorphism) 마커가 개발되었다. RAPD-SCAR 마커 발굴을 위하여 ‘청견’(내병성 품종) x ‘궁내이에감’(이병성 품종) 교배 조합(1프로젝트 1세부프로젝트 제공)에서 유래한 내병성 계통 집단과 이병성 계통 집단에 대한 RAPD 스크리닝을 통해 4개의 후보 마

커들을 발굴하였고, 최종적으로 내병성 계통과 이병성 계통을 구분할 수 있는 1개의 RAPD-SCAR (SCAR-1) 마커를 확보하였다. SCAR-1 마커의 경우, 청견 유래의 품종을 교배 모본으로 사용하는 교배 집단으로부터 내병성 계통을 선발하는데 활용 가능한 것으로 판단된다. 유전체 해독 및 비교유전체 분석을 통해 궤양병 내병성 연관 분자표지를 발굴하고자 하였다. 이를 위하여 내병성 품종(‘청견’, ‘병굴’, ‘부지화’) 및 계통(‘청견’ x ‘궁내이에감’ 유래), 이병성 품종(‘하굴’, ‘궁내이에감’, ‘황금하굴’) 및 계통(‘청견’ x ‘궁내이에감’ 유래)에 대한 유전체 해독 및 비교 유전체 해독을 통해 내병성과 이병성 그룹간 다형성(polymorphism)을 보이는 642 개의 SNP를 발굴하였으며, R gene을 포함하여 병저항성에 관여할 것으로 판단되는 유전자들의 CDS (coding sequence) 구역에서 변이를 보이는 28개 SNP를 최종 선발하였다. 이들에 대해 14개 내병성 혹은 이병성 품종 및 계통에 적용한 결과, 2개의 SNP는 *Fortunella* 속에 속하며 내병성인 금감뿐만 아니라 *Citrus* 속의 내병성 품종과 이병성 품종을 구분할 수 있음을 보여주었다. 나머지 SNP 마커들의 경우에도 *Citrus* 속의 내병성과 이병성 품종에 따라 구분 가능함을 보여주었다. 따라서 금감에도 적용 가능한 2개의 SNP 마커는 범용 마커로 활용 가능할 것으로 판단된다.

곰팡이 병원균인 *Elsinoe fawcettii*에 의해 발병하는 감귤 더듬이병(citrus scab)은 이병성 품종의 어린 가지, 잎, 과일 등을 감염시키는데, 특히 과실에서 주스의 양과 품질을 현저히 떨어뜨린다. 더듬이병 저항성 연관 분자표지의 경우도 아직까지 개발된 바 없다. 더듬이병 저항성 연관 RAPD 기반의 SCAR 마커를 발굴하기 위하여 내병성 품종 그룹(‘청견’, ‘Fallglo’, ‘병굴’, ‘부지화’)과 이병성 품종 그룹(‘클레멘타인’, ‘홍진’, ‘궁천’, ‘일남1호’) 유래의 혼합 genomic DNA에 대해 RAPD 스크리닝을 수행하여 5개의 후보 마커를 발굴하였다. ‘청견’ x ‘클레멘타인’, ‘Fallglo’ x ‘홍진’ 교배 집단(1프로젝트 3세부프로젝트 제공)에 대한 스크리닝을 통해 최종적으로 2개의 더듬이병 저항성 연관 RAPD 마커를 발굴하였다. 더듬이병 내병성 연관 분자표지를 발굴하기 위하여 내병성 품종(‘청견’, ‘병굴’, ‘부지화’, ‘금감’, ‘세미놀’, ‘세또까’, ‘Fallglo’), 이병성 품종(‘클레멘타인’, ‘홍진’, ‘궁천’, ‘궁본’, ‘일남1호’)에 대해 유전체 해독 및 비교 유전체 해독을 통해 최종적으로 내병성과 이병성 그룹간 다형성(polymorphism)을 보이는 78개의 SNP를 발굴하였다. 최종적으로 내병성 품종과 이병성 품종을 구분할 수 있는 16개의 SNP 마커를 발굴하였다.

많은 감귤 품종은 아포믹시스(apomixis) 현상에 의해 하나의 종자 안에 교잡배와 더불어 유전적 조성이 모체와 거의 동일한 여러 개의 주심배(nucellar embryo)를 발달시키는 다배성 형질을 갖는다. 이러한 감귤의 독특한 생식생물학적 특징은 육종의 효율을 떨어뜨리고 비용을 증가시킴으로써 교배 육종에 의한 품종 육성을 심각하게 방해한다. 본 세부프로젝트에서는 감귤 교배집단에서 교잡배와 주심배 유래 유묘를 손쉽게 구분하기 위한 SSR (Simple Sequence Repeat) 마커를 개발하고, 분석 플랫폼(Citrus Genetic Hybrids ID™ Platform)을 구축하였다. 공개 정보와 비교 유전체 정보로부터 polymorphic SSR 후보 마커를 발굴하고, 감귤 품종들에 대한 다형성 테스트를 통해 최종적으로 17개의 다형성 SSR 마커를 선발하였다. 확보된 마커를 제주도농업기술원(1프로젝트 1세부프로젝트 수행)에서 수집한 101점의 감귤 유전자원(단배성 22점, 다배성 54점, 복합형 25점)에 적용하여 각 감귤 품종별로 각각의 대립유전자에 대한 크기(allele size) 자료를 구축하였다. 발굴된 SSR 마커 정보를 다배성 품종을 모본으로 사용한 다양한 감귤 교배조합에 적용하여 교잡배 판별에 효율적으로 활용될 수 있음을 검증하였다. 또한 개발한 마커를 감귤 GSP 과제의 타프로젝트에 분석 서비스 또는 제품 형태로 제공하여 교

배 육종시에 교잡배 유래 유묘의 조기 선발에 활용하였다.

감귤의 홍피 형질은 소비자들의 구매 욕구를 증대시키는 주요 시각적 형질 중의 하나이다. 감귤 홍피 형질 연관 분자표지 개발은 2프로젝트 2세부프로젝트를 수행하고 있는 (주)제농(과제명-조숙 홍피 만다린 품종 개발)과의 협력 연구를 통해 수행하였다. 홍피 형질 연관 분자표지를 개발하기 위하여 홍피 품종('미네오라', '베니바에', '세미놀')과 비홍피 품종('스위트스프링', '청견') 그룹에 대한 유전체 해독과 비교 유전체 분석을 통하여 홍피 그룹과 비홍피 그룹을 구별할 수 있는 9개의 후보 SNP 마커를 발굴하였다. 9개 SNP 마커를 '에히메28호' x '병감' 교배조합에서 유래한 홍피, 비홍피 계통들에 대해 HRM (high resolution melting) 기법을 적용하여 분석한 결과, 1개의 마커(CRP-HRM-Ciclev105220-2)가 홍피 계통과 비홍피 계통을 구분할 수 있음을 확인하였다. 이 SNP 마커에 대해서는 향후 더 많은 수의 추가 계통들에 대한 검정이 필요하다.

동질사배체 유도조건을 확립하기 위하여 콜히친과 오리잘린을 이용하여 다양한 처리방식에 대해 평가하였다. 수체상의 액아에 솜을 감싸 0.1-0.4% 콜히친을 주입하여 배수성을 유도하였으나 대부분 발아하지 못하고 고사하였다. 접수를 채취하여 0.1-0.4% 콜히친을 12-48시간 처리하여 20% 내외의 발아가 진행되었으며, 일부 4배성이 확인되었으나, 익년 재발아하여 고정도를 분석한 결과 고정되지 못한 것으로 확인되었다. 1-2mm 접아를 절취하여 0.2% 콜히친 처리 후 기내 접목하는 경우는 대부분 오염을 제어하지 못해 비효율적인 것으로 나타났다. 접아를 0.1-0.4% 감압 10-40분, 2시간 침지 후 암발아 탱자에 반미세 접목하여 신초 생장률 유도하여 배수성을 검정할 경우 4배성이 다수 유도되었으며, 가장 효율성이 높은 방법으로 판단되었다. 종자처리의 경우 발아율이 감소하거나, 유도효과가 나타나지 않았으며, 포트묘를 인위적엽하고 콜히친을 처리한 경우에는 발아가 빠르게 나타났으나, 키메라로 나타나, 추가적인 연구가 필요한 것으로 나타났다.

감귤에서 자연발생배수체는 단배성 품종의 과실에서 미발육 종자를 기내 배양하여 획득할 수 있다는 보고되어 왔다. 품종 간에 발생 빈도에 차이가 나타났으며, 선발한 18개체를 기외접목을 통해 순화하고 육종포장에 정식하였다. 일부 배수체는 고접을 실시하여 조기육묘 단계로 진행하였다. 무핵삼배체 종자의 형성율에 대해 사전 검토하기 위하여 호주와 이태리에서 4배성 꽃가루를 도입하고 단배성 품종에 교배한 다음 종자의 형성도를 평가하였다. 품종에 따라 종자형성도에 대한 반응에 차이가 크게 나타났으며, 2배체간 교배보다 종자 형성율이 매우 낮음을 확인할 수 있었다.

교배실생의 조기결실 시스템 확립을 위해 교배실생은 무촉지로 유인 생육되었으며, 좀더 유년성 단축을 앞당기기 위해 탱자와 스윙글 대목에 접목하여 단순 무촉지 유인과 무촉지 유인 후 접목을 비교코자 하였으며, 이 경우 대목의 영향과 수형관리 방식의 영향을 평가하고자 방임 및 무촉지 수형관리 방식으로 처리하여 육묘를 수행하였다. 초기 생육에는 차이가 없으나, 추가적으로 2-3년 더 연구가 지속되어야 확인할 수 있을 것으로 판단되었다.

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구는 감귤 품종 육종을 위한 기반구축 과제로서 유전자원을 수집하고 특성을 평가하여 감귤 육종가에 제공하여 육종효율을 높이는 것을 목적으로 한다. 본 연구는 연구과정에서도 획



득한 조사 결과를 골든씨드프로젝트 육종가에게 활용토록 하였음은 물론이고 『감귤품종』 책자를 발간하여 조사한 결과를 확산하였다. 『감귤품종』 책자는 자원명(영어, 일본어, 한자), 학명, 기원, 주요 생육 및 과실품질 특성, 사진, 기능성 및 포장 이병도 조사 결과를 종합하여 수록하여 육종가와 감귤 농업인에게 많은 도움이 될 것이라고 기대하고 있다.

본 연구 결과 중 기능성 및 내병성과 관련해서는 논문을 1건 이상 제출할 계획이고, 내병성 부분은 1단계 도입 유전자원에 대해 추가 조사를 실시하여 자원별 내병성을 정립해 나갈 예정이다. 본 연구에서 우리원에 보존중인 유전자원은 골든씨드프로젝트가 시작될 때부터 육종 분야 세부프로젝트에 활용되고 있으며, 2016년부터는 기관 자체 기능성 품종 육종사업에 활용하였다. 앞으로도 보존 및 도입한 자원에 대한 특성조사를 계속하고 정보와 육종소재를 제공하고자 한다.

본 연구를 통해 감귤 궤양병 내병성 연관 SCAR 마커 1개와 28개의 SNP 마커가 발굴되었으며, 더텅이병 내병성 연관 RAPD 마커 2개와 16개의 SNP 마커가 발굴되었다. 홍피 형질과 연관된 1개의 SNP 마커가 발굴되었다. 또한 교잡배와 주심배 유래 유묘를 쉽게 구분할 수 있는 17개의 SSR 마커가 발굴되어 이를 토대로 교잡배 판별 분석 시스템을 구축하였으며, 발굴된 SSR 마커에 대해서는 지식재산권 확보를 위해 국내 특허 출원을 하였다. 국내 전문학술지에 “감귤 분자육종을 위한 분자표지 개발 현황과 전망”에 관한 학술논문을 발표하였다. 학술논문은 감귤 육종 연구자들에게 다양한 형질에 관한 분자표지 개발 동향 파악과 활용방안 탐색에 도움이 될 것으로 전망한다. 본 과제를 통해 발굴된 분자표지들은 감귤 품목 GSP 프로젝트 참여과제와 국내 민간 육종가(기업) 등에 제공하여 목표 형질을 가진 품종의 조기 선발에 활용하도록 할 것이다.

콜히친 처리에 따른 동질사배체 유도기술의 확립으로 교배육종에 유용하게 이용되는 교배친 품종에 대해 동질사배체를 생산할 수 있도록 적용하여 동질사배체를 대량 개발하는데 활용하게 될 것이다. 이들 동질사배체들은 조기육묘 결실하여 수체 및 과실 특성을 평가하여 우수 개통을 선발하여 식물특허 출원으로 보호하고, 국내 육종가들에게 제공하여 무핵 품종개발에 활용토록 할 것이다. 자연발생 사배체는 조기육묘하여 꽃가루 제공을 통해 2배체와의 교배시 발생할 수 있는 교배 육종상의 애로사항을 미리 파악하여 무핵삼배체 육종기반의 조기 확립에 활용하게 될 것이다. 교배실생의 조기결실 시스템 확립을 위해 대목의 영향과 수형관리 영향을 평가하여 효율적인 교배실생 관리방안 및 조기 유년성 단축을 통한 교배육종의 경쟁력을 확보하는데 이용코자 하며, 동질사배체의 경우 유전체의 배가에 따른 유전자 발현량의 보정 등 유전육종의 연구소재로도 긴요하게 활용될 수 있을 것이다.

## SUMMARY

271 citrus genetic resources were introduced from abroad. 124 of them were registered in the Center for Agricultural Genetic Resources of the RDA in June 2016. In addition, in 2016, 71 of them have also been requested to register with the Center and has now received temporary IT numbers. Among the introduced genetic resources, mandarin was 95 followed by sweet orange(77). In order to encourage cultivation actively in Jeju, 24 lemons was also introduced. Many literatures were surveyed to collect informations of the resources such as names, scientific name, origins, growth and fruit quality characteristics, and photographs. Combining the literature surveys and our investigate results, we published a book named {Citrus Variety}

The analysis of flavonoids and carotenoids was carried out using a liquid mass chromatography(UPLC-MS/MS). Flavonoids were analyzed with 77 resources at coloring start time and 77 at harvesting time in satsuma mandarin, and 76 at harvesting time in other citrus resources. Carotenoids such as  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin was analyzed with 108 resources of sustuma mandarin and 87 of other mandarin at the harvest time.

Citrus scab, citrus canker and citrus melanose which cause important problems in citrus cultivation in Jeju were investigated. Citrus scab and citrus canker were examined under laboratory or greenhouse and open field conditions. Melanose was examined only under open field. The scab and citrus canker test carried out by spraying on 72 and 77 resources respectively. The survey of infection degree of citrus canker under open field was conducted for 223 resources for 4 years. And field test of citrus scab and melanose were 221 and 220 respectively for 3 years.

We have established preliminary core collections of flavonoids, carotenoids, citrus scab, citrus canker, melanose, and a comprehensive preliminary core collection that was aggregated with all the results and their fruit characteristics. Core collections was built using PowerCore 1.0, a core collection building program developed by RDA. For the core collection of flavonoid, carotenoid, citrus scab, citrus canker and melanose were used 183, 195, 221, 223 and 220 resources respectively. For the core collection colligated the results of flavonoids, carotenoids, scab, canker, melanose and fruit quality, 164 resources were used.

Citrus scab, citrus canker and citrus melanose which cause important problems in citrus cultivation in Jeju were investigated. Citrus scab and citrus canker were examined under laboratory or greenhouse and open field conditions. Melanose was examined only under open field. The scab test carried out by spraying the selected concentration of  $6.3 \times 10^5$  conidia/ml on 72 resources. The pathogen of citrus canker were sprayed with the selected concentration of  $3.0 \times 10^7$  cfu/ml on 77 resources. The survey of infection degree of citrus canker under open field was conducted for 223 resources for 4 years. And field test of citrus scab and melanose were 221 and 220, respectively, for 3 years.

Citrus canker caused by the bacterial pathogen, *Xanthomonas citri* pv. *citri*, is one of economically important plant diseases in the citrus industry. Citrus canker significantly affects the vitality of citrus trees, causing leaves and fruit to drop prematurely. Although the importance of the disease in citrus industry, molecular markers closely related to resistance against citrus canker are not currently available. In this project, we developed RAPD (random amplified polymorphic DNA) based SCAR (sequence characterized amplified regions) markers and comparative genomics based SNP (single nucleotide polymorphism) markers. In order to develop RAPD-SCAR markers, we performed comparative screening of RAPD markers using resistant F<sub>1</sub> group and susceptible F<sub>1</sub> group, which are obtained from the genetic crossing between *Citrus* hybrid 'Kiyomi' and *C. iyo* 'Miyachiyokan' (generously supplied by subproject No. 1 of project No. 1) and resulted in obtaining 4 candidate markers. We finally developed one RAPD-SCAR (SCAR-1) marker related to canker resistance. SCAR-1 will be possibly used for early selection of canker resistance lines from the genetic crosses using 'Kiyomi' as a parental line. We also developed molecular markers closely related to canker resistance from reference guided whole genome sequencing (WGS) and comparative genomics approaches. To do this approaches, we performed WGS and comparative genomics studies for canker resistance cultivars ('Kiyomi', *C. platyamma*, *Citrus* hybrid 'Shiranuhi') and resistant F<sub>1</sub> lines (originated from 'Kiyomi' x 'Miyachiyokan'), and susceptible cultivars (*C. natsudaidai*, 'Miyachiyokan', *C. natsudaidai*, *C. natsudaidai* 'Whanggumhagyul') and susceptible F<sub>1</sub> lines (originated from 'Kiyomi' x 'Miyachiyokan'), and mined 642 SNPs showing polymorphism between resistance group and susceptible group. From the SNP candidates, we finally selected 28 SNPs from CDS (coding sequence) of disease-related genes including *R* genes. The application of 28 SNPs to 14 of either resistant or susceptible cultivars and F<sub>1</sub> lines showed that 2 SNPs were useful for the selection of resistant cultivars or F<sub>1</sub> lines belonging to two citrus genera, *Fortunella* and *Citrus*. The other 26 markers also possibly were able to apply to the genus *Citrus*. Therefore, 2 SNPs can be used as universal markers for the early selection of canker resistant lines.

Citrus scab caused by the fungal pathogen, *Elsinoe fawcettii*, infects young shoots, leaves, and fruits of susceptible cultivars. Especially, the yield and quality of juice can be reduced in highly susceptible cultivars that become severely infected. Up to now, molecular markers closely related to resistance against citrus scab are not available. In order to develop RAPD-SCAR markers associated with scab resistance, we performed comparative RAPD screening using genomic DNA from scab resistance group ('Kiyomi', *Citrus* hybrid 'Fallglo', *C. platyamma*, 'Shiranuhi') and susceptible group (*C. clementina* 'Fina Sodea', *C. unshiu* 'Okitsu Wase', *C. unshiu* 'Miyagawa Wase', *C. unshiu* 'Nichinan 1 gou') and selected 5 marker candidates. Two RAPD markers related to resistance against citrus scab were then finally selected from further screening on two genetic crosses, 'Kiyomi' x 'Fina Sodea' and 'Fallglo' x 'Okitsu' (generously supplied subproject No. 3 of project No. 1). In order to develop SNP markers associated with scab resistance, we performed

reference-guided WGS for resistant cultivar group ('Kiyomi', *C. platymamma*, 'Shiranuhi', *Fortunella crassifolia*, *Citrus* hybrid 'Seminole', *Citrus* hybrid 'Setoka', 'Fallglo') and susceptible cultivar group ('Fina Sodea', 'Okitsu', 'Miyagawa Wase', *C. unshiu* 'Miyamoto Wase', 'Nichinan 1 gou') and comparative genomics, and 78 SNPs showing polymorphism between the two groups. We finally selected 16 SNPs to identify resistant and susceptible cultivars.

In most angiosperms, a single zygotic embryo usually develops per seed. However, in many cultivars of *Citrus*, many nucellar embryos alongside the zygotic embryo develop in an individual seed by the apomictic processes. The nucellar embryos are initiated directly from the maternal, nucellar tissue surrounding the embryo sac which contains a developing zygotic embryo, and are known to be genetically identical to the female parent. Therefore, the nucellar embryos greatly decrease breeding efficiency by traditional genetic crosses. *Citrus* breeding program requires DNA molecular markers to easily distinguish a zygotic embryo from nucellar embryos. In order to solve this problem, we developed SSR (Simple Sequence Repeat) markers to easily identify zygotic and nucellar individuals, and established analysis platform (Citrus Genetic Hybrids ID™ Platform). Polymorphic SSR marker candidates were mined from the public information and comparative genomics studies. We finally 17 polymorphic SSR markers from the polymorphism test among diverse citrus cultivar groups. We applied the SSR markers to 101 citrus genetic resources (monoembryony-22 cultivars, polyembryony-54 cultivars, mixed type-25 cultivars), which were collected by Agricultural Research and Extension Services, Jeju Special Self-governing Province, and established allele size and allele number data for 17 genetic locus per each cultivar. We applied the developed SSR markers to diverse genetic crosses using polyembryony cultivars as a female parent and proved usefulness of the markers in identifying zygotic and nucellar individuals. We supplied Citrus Genetic Hybrids ID™ Platform to the Golden Seed Project teams for citrus and helped them to increase breeding efficiency.

Red fruit peel of citrus is one of major visual traits raising purchasing desire of consumers. Development of molecular markers related to red fruit peel of citrus was performed by cooperation with Je Nong Inc. (operating Subproject No. 2 of Project No. 2; Subproject name - Development of mandarin cultivars with early harvest and red fruit peel traits). We performed reference-guided WGS for cultivars with red fruit peel (*Citrus* hybrid 'Minneola', *Citrus* hybrid 'Benibae', 'Seminole') and cultivars with normal fruit peel (*Citrus* hybrid 'Sweetspring', 'Kiyomi') and comparative genomics and mined 9 SNPs identifying red fruit peel and normal fruit peel groups. By using HRM (high resolution melting) method, we applied 9 SNP markers to F<sub>1</sub> lines with either red fruit peel or normal fruit peel, which were originated from the genetic cross *Citrus* hybrid 'Ehimekashi No. 28' x *C. platymamma*, and finally selected one marker (CRP-HRM-Ciclev105220-2) identifying lines with red fruit peel or normal fruit peel. The selected markers need further validation by applying them to additional F<sub>1</sub> lines from the genetic cross 'Ehimekashi No. 28' x *C.*

*platymamma*.

To establish the efficient induction conditions of autotetraploids, chemicals such as colchicine and orizalin and treatment methods, duration, and concentration were evaluated. Colchicine was injected into cotton covering axillary buds in a tree for 12 hrs to 48 hrs and most buds were failed to sprout and was evaluated to be inefficient. Budwoods having three axillary buds were immersed in 0.1-0.4% colchicine solution for 12, 24, and 48 hrs and then grafted commonly into trifoliolate orange rootstocks. The leaves from sprouts were analyzed for polyploid level by flow cytometry and some tetraploids and mixed ploids were detected. However, they were determined not to be solid tetraploids when analyzed again with new leaves sprouted in next season by flow cytometry. Mini segments of axillary bud with about 2 mm were immersed into 0-2 % colchicine solution for 2 hrs and then in vitro grafted in trifoliolate orange germinated in a dark. However, we could not control the micro organism contamination. Mini segments of axillary bud with about 2 mm were immersed into 0.1-0.4% for 12, 24, 48 hrs with vacuum treatment for 10, 20, and 40 min at an initial time and semi-micro grafted into trifoliolate orange germinated in a dark for about 2 weeks. The leaves cut from sprouts were analyzed by flow cytometry for ploidy level. Treatments with 0.1-0.2% colchicine for 12 or 24 hrs with 10 or 20 min vacuum were effective for autotetraploid induction. Seeds and small tree potted were immersed immersion into colchicine solution. but not much effective compared to previous method. Orizalin was not to be inefficient.

Spontaneous tetraploids or tetraploids were selected from the in vitro culture of undeveloped seeds collected from the fruits with artificial pollination. The frequency was so low, but spontaneous polyploids could be acclimatized successfully by ex vitro grafting and transplanted into breeding field. Some polyploids were top-grafted for promoting growth.

The grafting on trifoliolate orange or Swingle citromelo rootstocks and combined with single stem growth or allowance of branching was evaluated to affect the early flowering or advance of adult stage. To conclude its effect requires the a couple of years in the future. Some hybrids got flowering stage and fruits quality was evaluated for selection of new cultivars as promising candidates.

## CONTENTS

Chapter 1 Outline and performance goals of the project	14	12
Chapter 2 Current status of national and overseas technology development	22	
CHAPTER 3 Research contents and results	27	
Chapter 4 Achievement of goal and contribution to related field	134	
Chapter 5 R & D performance and performance utilization plan	139	
Chapter 6 Overseas science and technology information collected during the R & D process	141	
Chapter 7 References	142	

## 목 차

제 1 장	프로젝트의 개요 및 성과목표 .....	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	22
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	27
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	134
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	139
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	141
제 7 장	참고문헌 .....	142

# 제 1 장 프로젝트의 개요 및 성과목표

## 제 1 절 세부프로젝트 개요

### 1. 연구개발 필요성 및 목적

국내 감귤 산업은 거의 대부분 제주지역에 한정되어 생산됨에도 불구하고 최근 3년간 평균 65만톤 내외의 생산과 6,500억원 이상의 생산액을 유지하고 있어 국내 과수산업 및 제주 지역경제의 핵심을 이루고 있는 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 그러나 최근 사과 등 타 과수에서의 신품종 개발 및 보급 촉진에 의거한 국내 고품질 과실의 생산 증대와 외국 수입과실의 지속적인 증가에 따라 감귤산업의 경쟁력이 크게 위협받고 있으며, 고당도, 기능성 등 소비자들의 다양한 수요에 부응하는 품종개발이 매우 시급하다. 소비자 수요에 부응하기 위해 감귤 생산자들은 일본 품종을 무분별하게 도입하고 있으며 현재 재배되고 있는 대부분의 감귤 품종은 일본 품종으로 국내 품종의 자급율은 1.0% 미만이고 2012.1월 신품종보호연맹(UPOV)의 품종보호제도의 전면 개방에 따른 감귤 신품종 종자 및 종묘 로열티 지급 분쟁의 우려가 높은 편이다.

감귤은 목본식물로 유전적 조성의 잡박성, 오랜 유년성, 큰 수관 용적 등의 일반 과수 육종의 단점이외에 다배성의 무성생식과 배우체 불임의 독특한 교배육종의 제약성을 가지고 있어서 교배육종이 가장 어려운 과수로 알려져 있다. 국내 재배 80% 이상을 차지하고 온주밀감의 경우 꽃가루 임성이 매우 약해 화분친으로 거의 사용되고 있지 못하며, 종자친 사용의 경우에도 다배성의 특성으로 교잡실생 획득율은 교배실생의 10% 내외로 알려져 있다. 최근 지구온난화 및 기후변화에 의한 이상 저온 및 고온 발생의 기상이변 속출, 외래 병해충의 돌발발생이 국내외적으로 증가하고 있어, 안정생산 공급체계를 크게 위협하고 있기 때문에 세계적으로 감귤 육종목표는 매우 다양화되고 복합적으로 접근되고 있다. 이에 따라 기존의 단순 교배육종에서 세포융합, 배수체개발, 원연교배 등 다양한 육종 기술의 적용을 요구받고 있어서 내병성, 내환경성, 고품질을 성취하기 위한 육종연구진의 확대 및 협력체계 정비가 요구되고 있다.

국내 감귤육종은 국가연구기관(감귤시험장)에 의해 주도되어 왔으나, 한정된 인력으로 다양한 육종목표 실현 및 체계적인 접근이 쉽지 않으며, 민간 육종의 참여 확대 및 활성화가 시급히 요구되고 있다. 민간육종의 참여 확대 및 활성화를 위해서는 다양한 유전자원의 확보와 더불어 유전자원의 다양한 원예적 특성에 대한 상세한 정보의 구축과 활용 시스템이 필요하다. 유전자원별 내병성, 내충성, 기능성 성분, 배우체 임성, 자가불화합성, 과실 품질특성, 종자형성도, 수체 특성 등에 대한 정보 DB가 구축되어야 한다. 국내 감귤 유전자원 보유 수준은 400여점으로 선진국 대비 50%에도 미치고 못하고 있으며, 유전자원 특성평가 및 특성 DB 구축이 미흡하여 유전자원 확충 및 특성 검정이 매우 시급한 실정이다.



또한 육종의 경쟁력 확보를 위한 육종기간의 단축과 효율화 증대가 필요하며 육종목표에 맞춘 목표형질의 보유 여부에 대한 조기검정과 우량계통 조기선발 시스템 도입을 위한 분자표지의 개발과 적용이 시급하다. 지금까지 개발된 분자표지는 단순하여 다양한 집단에서의 활용도가 낮았으나 최근 미국, 스페인, 중국, 일본, 프랑스, 이태리 등 선진국에서는 유전체(염기서열) 및 유전정보 분석, 유전자 지도 작성 등을 통한 다양한 형질연관 분자표지 개발이 가속화되고 있어 조만간 활용도가 증대될 전망이다. 과거에는 isozyme, RFLP 또는 PCR 기반(RAPD, AFLP 등) 기법을 이용한 연관지도 작성 및 분자표지 개발이 이루어 왔으나, 최근 유전체 정보의 활용이 가능함에 따라, 염기서열 기반 SSR, SNP 마커의 발굴 및 이를 활용한 연관지도 작성, genome mapping, map-based cloning 등이 가능해지고 있다. 유전체 정보를 활용함으로써 범용성 분자표지의 개발이 촉진되고 MAS (Marker Assisted Selection) 실용화를 통한 육종의 과학화가 추구하고 있다. 특히 유용 분자표지는 특허 출원으로 보호를 강화하는 추세로 신품종은 물론 육종기술의 예측화가 더욱 심화될 가능성이 매우 높아지고 있다.

교배육종의 활성화에 힘입어 고품질 신품종의 개발이 증대되어 왔으나, 배우체의 임성과 교배종자 형성에 의존하는 교배육종의 특성상 다양한 품종의 도입과 교배 및 임성기회 확대에 따른 신품종 종자 형성도 증가의 문제가 새롭게 대두되고 있다. 국내 감귤 재배면적의 90% 이상을 차지하는 온주밀감은 배주와 꽃가루 모두 임성이 거의 없어서 교배육종을 수행하기 극히 어려운 상태에 있다. 시설 재배의 대표 품종인 ‘부지화’(한라봉), ‘세토카’(천혜향), ‘청견’의 경우는 배주는 임성이 있으나, 꽃가루가 불임으로 교배에 제한을 가지게 된다. 더욱이 ‘청견’을 제외하면 수정 후 형성되는 종자는 수정배와 체세포배(주심배)가 혼재하는 다배성으로 수정배보다는 주심배의 생육이 강하여 수정배는 발육이 불완전한 상태로 되어 종자가 성숙되어 과종하게 되면 거의 대부분 주심배만 발아하여 실생으로 자라나기 때문에 감귤에서 교배육종은 매우 어려운 실정이다. 그러므로 감귤 교배육종에 있어서 교배모본으로는 체세포배(주심배)가 발생하지 않은 단배성 품종을 이용하게 되고, 교배부본으로는 꽃가루 임성이 높은 품종을 이용하게 된다. 그러므로 감귤 교배육종에서 개발된 신품종은 대부분 배주의 임성은 보장되고, 꽃가루 임성은 매우 약한 특성을 나타낸다. 그러므로 신품종은 단일 품종의 시설재배의 경우는 종자형성이 미미하지만, 노지에서 꽃가루 제공이 가능한 품종이 주변에 존재하면 종자가 다수 형성되는 경우가 종종 발생하게 된다. 따라서 최근 스페인, 이태리, 이스라엘, 우루과이, 호주, 일본 등 선진국에서는 꽃가루 제공과 관계없이 종자형성이 거의 나타나지 않아 무핵(씨없음)이 되는 3배체 품종의 개발에 심혈을 기울여 왔고, 일부 3배체 품종은 농가에 보급되는 실용화 단계에 이르고 있다.

3배체 품종의 개발에는 먼저 4배체 품종을 개발한 후 2배체 품종과 교배하여 3배체 품종을 탐색하고 선별하는 방식과 자연발생 3배체 품종을 탐색하여 선별하는 방식으로 구분할 수 있다. 그런데 자연발생 3배체 개체의 출현빈도는 종 및 품종에 따라 다르게 보고되

고 있는데, 대체로 0.1-1.0% 내외로 매우 낮은 편이다. 반면 4배체 품종의 개발은 원형질체 융합(세포융합)에 의한 이질배수체 개발과 콜히친 등의 화학물질 처리에 의한 동질4배체 개발로 구분할 수 있다. 그러나 이질4배체의 경우는 이질적인 품종의 결합이고 다시 2배체 품종과 교배하게 되면 유전자 조합이 복잡하여 표현형 예측이 복잡하게 전개될 가능성이 매우 높다. 그러므로 이질4배체 개발보다 동질4배체 개발이 무핵 3배체 육종의 주요한 전제조건이 되고 있는 실정이다.

동질4배체 개발은 수박, 파프리카, 차나무 등은 물론 오렌지, 만다린과 같은 감귤에서도 주로 콜히친을 이용하여 보고되어 왔다. 그러나 이들 연구는 대부분 종자의 발아 후 어린 실생의 신초를 이용하거나, 캘러스 및 상배축 절편 등 조직배양계를 이용하여 보고되어 왔으며, 종 또는 품종에 따른 반응이 다르게 나타나는 것으로 알려지고 있다. 또한 실생 또는 체세포배발생 조직배양계를 이용한 경우, 과수에서는 유년기를 경과해야 교배에 이용할 수 있고, 유전적으로 균일성이 낮다는 제한점을 가지게 된다. 반면, 스페인 및 일본의 경우 감귤 신초의 액아를 절취하여 콜히친 처리 후 일반 접목법과는 다른 미세(micro) 접목 또는 반미세(semi-micro)접목으로 동질4배체 양성체계를 확립하여 육종에 이용하고 있다. 이에 따라 근본적으로 배우체 임성 상실을 통한 무핵(종자없음) 과실 생산을 위한 삼배체 품종의 개발을 서두르고 있으며, 무핵 삼배체의 개발은 사배체와 이배체간 교잡을 통해 가능하기 때문에 우량 사배체 육성이 절대적으로 필요한 실정이다.

사배체와 이배체간 교배에 의한 종자는 유전적 비율의 불균형으로 인해 배유 발달의 불량과 이에 따른 배 성장 억제로 정상 발달이 이루어지지 못하는 것으로 알려져 있어, 삼배체 교잡실생의 대량 생산을 위해서는 미숙배 배양기술 확립이 절대적으로 필요하다. 미숙배 배양은 기내 육종기술로 이를 포장에 전개하기 위해서는 순화과정이 필수적이며, 이에 대한 기술 확립도 필요하다. 일반적으로 사배체는 이배체보다 마디가 짧고 생육이 느려 유년성이 길어지는 것으로 알려져 있어, 조기 육묘를 위한 시스템 확립도 필요한 실정이다.

따라서 국내에서도 감귤 산업의 지속적인 경쟁력 확보를 위해서 교배에 이용할 다양한 유전자원을 확충하여 그 이용성을 평가하여 특성별 핵심집단을 구축하고, 육종 효율과 기간을 단축하기 위한 분자표지 개발 및 이용 시스템을 구축하며, 콜히친 처리를 통한 동질 4배체를 안정적이고도 효율적으로 양성할 수 있는 기술체계의 개발을 수행하고자 하였다.

## 2. 연구 목표 및 내용

### 가. 프로젝트 목표 및 내용

#### 1) 최종목표

- 감귤 내병성 및 기능성 핵심집단을 구축하고 주요 형질연관 분자표지를 개발하며 만다린 우량 동질 사배체의 선발 및 무핵 삼배체 육종기반을 구축한다.

2) 주요 내용

가) 내병성 및 기능성 핵심집단 구축

- 유전자원 도입 확대 (300점 도입) 및 안전 보존관리 시스템 구축
- 유전자원 특성평가 D/B 1건 구축과 내병성 및 기능성 기초 핵심집단 2개 구축

나) 주요 형질연관 조기선발 분자표지 개발 및 기반 구축

- 더텡이병 및 궤양병 연관 분자표지 탐색 및 분자표지 2건 개발
- 비교 유전체 분석을 통한 병저항성 연관 SNP/SSR 기초 분자표지 탐색

다) 동질사배체 및 무핵 삼배체 육종기반 구축

- 콜히친 이용 동질사배체 유도기술 탐색 및 기술체계 개발
- 만다린 교배친 동질사배체 20계통 육성

나. 프로젝트 연차별 목표 및 내용

연 차	연구개발의 목표	연구개발의 주요 내용
1차년도 (2013)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 감귤 유전자원 도입 확대 60점</li> <li>○ 분리집단의 더텡이병 저항성 검정 및 RAPD 탐색</li> <li>○ 동질배수체 유도조건 탐색</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전자원의 도입 확대와 유전자원 특성 자료 정리 및 개략적 분류</li> <li>○ 분리집단 더텡이병 저항성 검정과 RAPD 특이밴드 primers 탐색 및 청견 등 유전체 서열해독 후 비교유전체 분석</li> <li>○ 콜히친 처리 및 배수체 유도</li> </ul>
2차년도 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 감귤 유전자원 도입 확대 80점 및 보유 유전자원의 특성평가</li> <li>○ 더텡이병 저항성 RAPD/SCAR 마커 개발과 SNP/SSR 기초마커의 탐색</li> <li>○ 동질배수체 유도기술 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전자원 도입 확대와 더텡이병 및 플라보노이드 특성평가</li> <li>○ RAPD 및 SCAR 마커 개발 및 적용과 SNP/SSR 기초마커의 탐색</li> <li>○ 동질배수체 검정 및 고정 확인</li> </ul>
3차년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 감귤 유전자원 도입 확대 80점 및 보유 유전자원의 특성평가</li> <li>○ 분리집단의 궤양병 저항성 검정 및 RAPD 탐색과 SSR 기초마커의 탐색</li> <li>○ 교배친 동질배수체 유도 및 검정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전자원의 도입 확대와 궤양병 및 카로티노이드 특성평가</li> <li>○ 분리집단 궤양병 저항성 검정과 RAPD 특이밴드 탐색 및 SSR 기초마커 분석</li> <li>○ 교배친 동질배수체 대량 유도 및 검정</li> </ul>
4차년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 감귤 유전자원 도입 확대 80점 및 보유 유전자원의 특성평가와 기초 핵심집단 구축</li> <li>○ 궤양병 저항성 마커의 검정 및 SNP 기초마커의 탐색</li> <li>○ 교배친 동질배수체 증식 및 육묘</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전자원의 도입 확대와 기존 유전자원의 검은점무늬병·소립검은점무늬병 저항성검정 및 병저항성·기능성 기초 핵심집단 구축</li> <li>○ 궤양병 저항성 RAPD 및 SCAR 마커 개발과 SNP 기초마커의 분석</li> <li>○ 동질사배체 탱자대표 접목 및 조기육묘</li> </ul>

다. 세부프로젝트 연차별 목표 및 내용

1) 1세부프로젝트 : 감귤 내병성 및 기능성 핵심집단 구축

연 차	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 (2013)	○ 유전자원 도입 60개 ○ 유전자원 개략적 분류 및 특성 고찰	○ 국내외 감귤 유전자원 도입 및 육묘 ○ 종, 계통, 유래별 분류와 예비분석 ○ 병저항성 검정 유전자원 포트 육묘
2차년도 (2014)	○ 유전자원 도입 80개 ○ 더탱이병 저항성 평가 ○ 플라보노이드 특성 분석	○ 국내외 감귤 유전자원 도입 및 육묘 ○ 병저항성 검정 유전자원 포트 육묘 ○ 유전자원 플라보노이드 특성 분석
3차년도 (2015)	○ 유전자원 도입 80개 ○ 궤양병 저항성 평가 ○ 카로티노이드 특성 분석	○ 국내외 감귤 유전자원 도입 및 육묘 ○ 병저항성 검정 유전자원 포트 육묘 ○ 유전자원 카로티노이드의 특성 분석
4차년도 (2016)	○ 유전자원 도입 80개 ○ 검은점무늬병, 소립검은점무늬병 저항성 평가 ○ 기초 핵심집단 구축	○ 국내외 감귤 유전자원 도입 및 육묘 ○ 병저항성 검정 유전자원 포트 육묘 ○ 기존 유전자원의 병저항성 및 기능성 기초 핵심집단 2개 구축

2) 2세부프로젝트 : 감귤 주요형질 연관 분자표지 개발

연 차	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 (2013)	○ 분리집단 더탱이병 저항성 검정 및 RAPD 분석 ○ 유전체 서열 해독 및 비교유전체 분석	○ 더탱이병 분리집단 육묘 및 저항성 검정 과 BSA의 RAPD primers 탐색 ○ 병저항성 및 숙기 대표 종 및 품종의 유 전체 서열 Illumina HiSeq 해독 및 비교 유전체 분석
2차년도 (2014)	○ 더탱이병 저항성 RAPD 마커 및 SCAR 마커 개발 ○ 궤양병 분리집단 양성용 교배 ○ 비교 유전체 분석 및 기초 분자표지 탐색	○ 선발 primers의 분리집단 RAPD 분석 및 더탱이병 특이밴드 선발과 SCAR 전환 ○ 궤양병 분리집단 양성용 교배 ○ 비교 유전체 분석을 통한 SNP/SSR 기초 분자표지 탐색
3차년도 (2015)	○ 분리집단 궤양병 저항성 검정 및 RAPD 분석 ○ SSR 기초 분자표지의 분리집단 분석	○ 궤양병 분리집단 육묘 및 저항성 검정과 BSA의 RAPD primers 탐색 ○ 더탱이병 및 궤양병 분리집단의 SSR 기초 분자표지 적용분석
4차년도 (2016)	○ 궤양병 저항성 RAPD 마커 및 SCAR 마커 개발 ○ SNP 기초 분자표지의 분리집단 분석	○ 선발 primers의 분리집단 RAPD 분석 및 궤양병 특이밴드 선발과 SCAR 전환 ○ 더탱이병 및 궤양병 분리집단의 SNP 기초 분자표지 적용분석

3) 3세부프로젝트 : 반수체 유래 동질사배체를 이용한 무핵삼배체 만다린 우량계통육성

연 차	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 (2013)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동질배수체 유도조건 탐색</li> <li>○ 자연발생 배수체 선발</li> <li>○ 탱자대목 양성</li> <li>○ 교배실생 조기결실 시스템 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 콜히친 처리 및 배수체 유도                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 처리방법, 농도, 시간 등의 요인분석</li> <li>- 발아유도 및 배수성 검정</li> </ul> </li> <li>○ 교배 미발육종자 기내배양 및 배수체 선발</li> <li>○ 배수체 유도용 탱자대목 양성</li> <li>○ 교배실생 확보 및 육묘</li> </ul>
2차년도 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동질배수체 유도기술 확립</li> <li>○ 자연발생 배수체 선발</li> <li>○ 탱자대목 양성</li> <li>○ 교배실생 조기결실 시스템 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 콜히친 처리 및 배수체 유도                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 처리방법, 농도, 시간 등의 요인분석</li> <li>- 배수성 검정 및 고정도 분석</li> </ul> </li> <li>○ 자연발생 배수체 선발 및 순화</li> <li>○ 배수체 유도용 탱자대목 양성</li> <li>○ 교배실생 접목묘 양성</li> </ul>
3차년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 교배친 동질배수체 대량유도</li> <li>○ 자연발생 배수체 선발</li> <li>○ 사배체 화분도입 및 교배</li> <li>○ 탱자대목 양성</li> <li>○ 교배실생 조기결실 시스템 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 콜히친 처리 및 동질사배체 대량 유도                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 콜히친 대량 처리 및 배수체 검정</li> </ul> </li> <li>○ 자연발생 배수체 순화 및 포장 육묘</li> <li>○ 사배체 화분도입 및 교배</li> <li>○ 배수체 유도용 탱자대목 양성</li> <li>○ 교배실생 접목묘 양성 및 요인 처리</li> </ul>
4차년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 교배친 동질배수체 대량유도 및 검정(10계통)</li> <li>○ 자연발생 배수체 선발</li> <li>○ 사배체 화분도입 및 교배</li> <li>○ 탱자대목 양성</li> <li>○ 교배실생 조기결실 시스템 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 콜히친 처리 및 동질사배체 대량 유도                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 콜히친 대량 처리 및 배수체 검정</li> </ul> </li> <li>○ 자연발생 배수체 포장육묘 및 고접육묘</li> <li>○ 사배체 화분도입, 교배 및 삼배체 종자생산</li> <li>○ 배수체 유도용 탱자대목 양성</li> <li>○ 교배실생 접목묘 양성 및 요인 처리</li> </ul>

## 제 2 절 연구 성과목표 대비 실적

### 1. 프로젝트 연구개발 성과목표 대비 실적

성과지표 구분			단위	1년차		2년차		3년차		4년차		합계		
				목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	
과학 기술적 목표	국내 특허	출원	건					-	1	1	1	1	2	
		등록							-	1	-	1		
	논문	SCI						1	0	1	0	2	0	
		비SCI				1	1	-	1	1	2	2	4	
	학회 발표	국내		-	1	-	3	-	6	-	3	-	13	
		국제				-	1			-	1	-	2	
	반수체 유래계통										10	3	10	3
	분자마커 개발					-	6	1	0	1	59	2	65	

성과지표 구분		단위	1년차		2년차		3년차		4년차		합계		
			목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	
과학 기술적 목표	유전자원 등록	건					60	124	80	71	140	195	
	유전자원수집 및 분양		60	61	80	80	80	81	80	49	300	271	
	primer 탐색		200	910			200	1,040			400	1,950	
	기반구축								1	1	1	1	
	분리집단 적용		1	1	1	1	1	1	1	10	4	13	
	DB 구축												
	핵심집단 구축									-	6	-	6
	병리검정			100	72	100	101	-	0	200	173		
산업 경제적 목표	수입 대체 효과	분자마커	%			-	서비스 킷트	-	서비스 킷트			서비스 킷트	
		국내매출액	백만원			-	0.13	-	16.9			-	17.03
환경적 목표	시장조사보고서	건											
	정책조사보고서												
	인력양성												

## 2. 세부프로젝트 연구개발 성과목표 대비 실적

가. 1세부프로젝트 : 감귤 내병성 및 기능성 핵심집단 구축

성과지표 구분		단위	1년차		2년차		3년차		4년차		합계	
			목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적
과학 기술적 목표	국내 특허	출원										
		등록										
	논문	SCI										
		비SCI			1	1			1	1	2	2
	학회 발표	국내	-	1			-	2			-	3
		국제										
	반수체 유래계통											
	분자마커 개발											
	유전자원 등록	건					60	124	80	71	140	195
	유전자원수집 및 분양		60	61	80	80	80	81	80	49	300	271
	primer 탐색											
	기반구축											
	분리집단 적용											
DB 구축												
핵심집단 구축									-	6	-	6
병리검정				100	72	100	101	-	-	200	173	
산업 경제적 목표	수입 대체 효과	분자마커	%									
		국내매출액	백만원									

나. 2세부프로젝트 : 감귤 주요형질 연관 분자표지 개발

성과지표 구분			단위	1년차		2년차		3년차		4년차		합계			
				목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적		
과학 기술적 목표	국내 특허	출원	건					-	1	1	1	1	2		
		등록							-	1	-	1	1		
	논문	SCI								1	0	1	0	0	
		비SCI								-	1	-	1	1	
	학회 발표	국내				-	3	-	3	-	2			8	
		국제													
	반수체 유레계통														
	분자마커 개발					-	6	1	0	1	59	2	65		
	유전자원 등록														
	유전자원수집 및 분양														
	primer 탐색					200	910			200	1,040			400	1,950
	기반구축														
	분리집단 적용					1	1	1	1	1	1	1	10	4	13
	DB 구축														
핵심집단 구축															
병리검정															
산업 경제적 목표	수입 대체 효과	분자마커	%					서비스 키트		서비스 키트			서비스 키트		
		국내매출액	백만원					0.13		16.9			17.03		

다. 3세부프로젝트 : 반수체 유래 동질사배체를 이용한 무핵삼배체 만다린 우량계통육성

성과지표 구분			단위	1년차		2년차		3년차		4년차		합계		
				목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	
과학 기술적 목표	국내 특허	출원	건											
		등록												
	논문	SCI						1	0			1	0	
		비SCI						-	1			-	1	
	학회 발표	국내						-	1	-	1	-	2	
		국제				-	1			-	1	-	2	
반수체 유레계통									10	3	10	3		
분자마커 개발														
과학 기술적 목표	유전자원 등록		건											
	유전자원수집 및 분양													
	primer 탐색													
	기반구축									1	1	1	1	
	분리집단 적용													
	DB 구축													
핵심집단 구축														
병리검정														
산업 경제적 목표	수입 대체 효과	분자마커	%											
		국내매출액	백만원											

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내외 관련분야 기술개발 현황

#### 1. 감귤 내병성 및 기능성 핵심집단 구축

국내 감귤산업은 거의 대부분 제주지역에 한정되어 생산됨에도 불구하고 최근 3년간 평균 65만톤 내외를 차지하는 과수 생산량 제1의 과수이다. 하지만 현재 재배되고 있는 대부분의 감귤 품종은 일본 품종으로 국산품종 활용도가 아주 낮은 상황이다. 국내 감귤 품종 육종은 농촌진흥청 감귤연구소에서 거의 이루어지고 있고, 제주대학교에서 일부, 2011년부터는 제주특별자치도농업기술원에서 본격적으로 추진하고 있으며 관 및 대학이 주도하고 있는 실정이다. 돌연변이, 교배, 배수체 육종 등 육종기술 수준은 미국, 일본 등 선진국과 차이가 없으나 육종을 시작한지가 상대적으로 오래되지 않아, 2012년까지 개발된 품종은 18품종에 그치며 더군다나 농가에 보급되어 있는 품종은 감귤연구소에서 개발한 하례조생과 제주특별자치도 농업기술원에서 개발한 상도조생 등 일부 품종에 국한되어 있다.

감귤 육종에 근간이 되는 유전자원은 세계적으로 6,000점이 분포한다고 알려져 있으며, 중국이 1,500여점, 일본 1,200여점, 미국 1,000여점, 인도 600여점, 태국 600여점, 인도네시아 500여점 정도로 알려져 있다(Khan 등, 2001). 반면, 국내 감귤 유전자원 보유 수준은 400여점(농촌진흥청 감귤실험장 400여점, 제주특별자치도농업기술원 240여점)으로 선진국 대비 50%에도 미치고 못하고 있는 실정이다. 감귤 유전자원 보존은 대부분 포장에서 보존되고 있고, 최근에는 보존포장의 효율적 활용을 위해 생육 억제 기내 배양(Slow growth of in vitro vegetative tissues) 방법(Engelman, 1997), 장기 저장을 위해 초저온 저장법-경정(Gonzalez-Arno, 1988), 종자(Mumford, 1979), 배주(Bajaj, 1984), 체세포배(Marin과 Duran-Vila, 1988), 체세포발생캘러스(Kobayashi 등, 1990) 등이 활용되고 있다. 국내에서도 사과, 포도 등 초저온 생장점 배양법을 확립하였고 2016년부터는 감귤도 초저온 생장점 배양법을 정립코자 연구를 추진하고 있다.

감귤 유전자원의 특성 평가는 전통적인 표현형과 분자생물학의 복합적으로 검토가 되고 있으며(Gmitter, 1999), 각국의 대표적인 감귤 유전자원 보존기관에서 이들 특성에 대한 데이터베이스를 운영하고 있다. 유용한 데이터베이스로는 Citrus Variety Collection(CVC, 미국)<sup>1)</sup>, Citrus Clonal Protection Program(CCPP, 미국)<sup>2)</sup>, Citrus Pages(프랑스)<sup>3)</sup>, National Citrus Germplasm Informational System(중국)<sup>4)</sup>, Genetic Resources Center(일본)<sup>5)</sup>, PGDB(일본)<sup>6)</sup>, Banco de germoplasma de cítricos(스페인)<sup>7)</sup>, 민간회사인

1) CVC: <http://www.citrusvariety.ucr.edu/index.html>

2) CCPP: <http://www.ccpp.ucr.edu/variety/index.html>

3) Citrus Pages: <http://citruspages.free.fr/home.html>

4) National Citrus germplasm informational system: <http://xt.cric.cn/zy/?lb=1>

5) Genetic Resources Center: [http://www.gene.affrc.go.jp/databases-plant\\_search.php](http://www.gene.affrc.go.jp/databases-plant_search.php)

6) PGDB: <http://pgdbj.jp/?ln=en>

7) Banco de germoplasma de cítricos: <http://www.ivia.gva.es/en/banco-de-germoplasma-de-citricos>



SQUADRITO(이탈리아)<sup>8)</sup> 등을 활용할 수 있다. 국내에서는 농촌진흥청 농업유전자원센터에서 운영하는 KACC(대한민국)<sup>9)</sup>가 알려져 있다.

감귤 기능성 성분에 대한 연구는 우리나라를 비롯한 대부분이 국가에서 다양하게 이루어지고 있으며, 내병성에 대한 분석은 미국, 호주 등 서양 국가에서 많이 이루어지고 있는 반면 우리나라, 중국, 일본 등은 상대적으로 연구가 적은 편이다. 핵심집단의 구축은 주로 전세계적으로 자원수가 매우 많은 곡류, 두류 등 초본식물을 중심으로 이루어지고 있으며, 과수에는 상대적으로 연구가 적은 편이나 최근 품종개발, 야생종, 변이종, 지방종 등 자원의 다양화에 따라 초저온 저장법과 더불어 과수 유전자원의 효율적 보존을 위해 연구가 진행되기 시작하고 있다.

## 2. 감귤 주요형질 연관 분자표지 개발

현재까지 감귤의 분자표지 개발은 다음과 같은 형질들에 관해 이루어지고 있다: 병저항성, 아포믹시스/다배성, 교잡배 판별, 과실 착색, 비생물적 스트레스(염분, 저온) 연관, 무핵(seedlessness), 웅성 불임, 신맛 적음((acidless), 생식[이형화주(heterostyly), 단위결실, 자가불화합성 등], 형태(나무, 잎, 꽃, 열매), 과실 품질(열매당 주스 함량, 주스 색 등), 종자수, 수량성, 조기 착과 등. 감귤의 경우, 현재까지 거의 대부분 QTL (quantitative trait loci) 마커가 개발된 실정에 불과하며, 유전자 수준까지 분자마커가 개발된 경우는 Citrus tristeza virus (CTV) 저항성 유전자(*ctv*)와 적육 유전자(*ruby*) 2건에 불과하다(Kim et al. 2016). 국내에서는 male fertility, 다배성, 교잡배 판별에 관한 분자표지가 개발된 바 있다(Yun et al. 2007; Kang et al. 2008; Chae et al. 2011).

유전체 정보는 구조 및 기능유전체 연구 분야뿐만 아니라 유전자 지도 작성 및 분자표지의 발굴을 통한 분자유종 분야에도 활발히 활용되고 있다. 감귤의 경우도 스위트오렌지 (*C. sinensis* cv. Valencia)와 ‘클레멘타인’ 만다린(*C. clementina* cv. Clemenules)에 대한 표준유전체 해독이 이루어졌으며(Wu et al. 2014; Xu et al. 2013), 유전체 서열 기반의 분자표지[single nucleotide polymorphism (SNP), simple sequence repeat (SSR), insertion-deletion (InDel)] 발굴 및 이를 활용한 표준 연관 및 물리지도 작성, 비교 유전체 지도 작성, 유전자 클로닝 등에 활용되고 있다(Biswas et al. 2014; Cuenca et al. 2013; Ollitrault et al. 2012). 따라서 감귤에서도 유전체 분석 기반의 분자유종 프로그램을 기존의 교배육종과 접목시킴으로써 체계적이며 목표형질 중심의 감귤 육전육종 프로그램이 활성화될 것으로 전망되고 있다(Kim et al. 2015).

## 3. 반수체 유래 동질사배체를 이용한 무핵삼배체 만다린 우량계통육성

국내 감귤육종은 1990년대 초반까지는 가지 변이 및 주심배 변이 선발에 의존하여 왔고,

8) SQUADRITO: [http://www.vivaisquadrato.it/index\\_en.php](http://www.vivaisquadrato.it/index_en.php)

9) KACC: <http://genebank.rda.go.kr/>

1994년 이후 단배성 품종을 이용한 교배 육종을 본격화하여 왔으며, 2010년부터 자체 개발한 중간모본을 이용한 세대진진을 수행하고 있다. 2014년 현재 14 품종을 출원하고 있으나, 주로 시설재배에 적합한 만감류에 해당하여 농가 보급은 미흡한 실정으로 있다. 또한 일부 체세포잡종 개발기술 및 방사선 돌연변이 육종연구가 감귤연구소 및 제주대학교에서 수행된 바 있으나, 기술체계 확립 단계에 있으며 농가에 보급할 수준의 품종을 개발하는 실용화 단계로 진입해 있지 못하다.

더욱이 자연발생 배수체 선발을 제외한 동질배수체 육종, 3배체 실생 대량양성을 위한 미숙배 구제 기술 개발, 세포질잡종 선발, 반수체 개발, 임성증진 기술 등은 현재까지 연구가 진행된 바 없는 실정이다. 자연발생 3배체 선발에 대해서는 제주대학교와 감귤연구소에서 연구가 진행된 바 있는데, 그 발생 빈도는 매우 낮으며, 품종에 따라 차이가 있는 것으로 확인되었다(Song 2010; Chae et al., 2012). 대체적으로 국내 감귤육종은 단순 교배 및 가지변이 선발 육종수준에 머물러 있어, 선진국 감귤육종 기술수준의 60% 내외로 평가되고 있다.

반면, 이태리, 스페인, 일본 등은 무핵 3배체 육종이 가장 활발히 수행되고 있으며, 무핵 3배체 품종이 개발되는 실용화 단계에 진입해 있다(Aleza et al., 2011; Vardi et al., 2008). 이태리는 1978년에 자연발생 4배체 선발 및 2배체와의 교배와 3배체 미숙배 구제를 통한 무핵 3배체 육종 프로그램을 시작하였다(Recupero et al., 2005). 스페인은 콜히친을 처리한 후 기내 미세접목을 통한 동질4배체 생산 기술을 확립하여(Aleza et al., 2009) 다양한 교배친에 대해 동질4배체를 개발하였으며, 2배체와의 교배를 통한 무핵 3배체 품종개발을 활발히 진행하고 있다. 일본의 경우는 1990년대 초반부터 배수체 육종연구를 수행하여 왔으며(Oiyama and Kobayashi. 1991), 1-2mm 크기의 액아를 절취하여 콜히친 처리 후 암발아 탱자 대목에 반미세(semi-micro)접목을 통해 동질4배체를 양성하는 기술을 확립하여 다양한 단배성 교배친에 대한 동질4배체 양성을 보고하고 있어, 그 재현성과 효율성이 가장 높은 동질4배체 생산기술을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다(Kaneyoshi et al., 2008).

## 제 2 절 연구결과가 기술개발현황에 차지하는 위치

국내 감귤품종 개발은 2012년 이후에도 꾸준히 이루어져 농촌진흥청 감귤연구소에서 2013년 이후 9품종, 제주특별자치도 농업기술원에서 2품종, 민간육종회사에서 1품종이 개발되었고, 2011년부터 본격적으로 감귤 육종을 시작한 제주특별자치도 농업기술원에서는 현재 13개체를 1차 선발하여 품종출원을 준비 중에 있다. 개발된 품종이 적기는 하지만 제주에서 재배되고 있는 감귤 종류가 만다린에 국한하여 볼 때 육종에 대한 기반은 구축되었다고 볼 수 있다. 감귤 유전자원은 세계적으로 6,000점이 분포한다고 알려져 있으나 본 과제를 추진하면서 같은 자원에 대하여 국가별로 다른 이름으로 부여되어 있음을 많이 확인할 수 있었

다. 2016년 현재 우리나라의 감귤 유전자원의 보유수는 600점을 상회하며 육종을 전제로 수집됨에 따라 유전자원 역시 육종기반 구축이 되었다고 볼 수 있다. 감귤 유전자원에 대한 초저온 생장점 배양도 농촌진흥청 농업유전자원센터에서 착수가 되어 금후 효율적인 보존 관리가 이루어 질 것으로 판단된다. 본 과제를 통해 과수에서 기본이 되는 과실품질특성, 플라보노이드, 궤양병 이병성 등을 조사하여 감귤 육종가가 활용할 수 있도록 기반을 구축하였으며, 핵심집단의 구축에서도 과수에서는 거의 보고되지 않았는데 적은 규모로나마 예비 핵심집단을 구축할 수 있었다.

현재까지 감귤의 분자표지 개발은 다음과 같은 형질들에 관해 이루어지고 있다: 병저항성, 아포믹시스/다배성, 교잡배 판별, 과실 착색, 비생물적 스트레스(염분, 저온) 연관, 무핵(seedlessness), 웅성 불임, 신맛 적음((acidless), 생식[이형화주(heterostyly), 단위결실, 자가 불화합성 등], 형태(나무, 잎, 꽃, 열매), 과실 품질(열매당 주스 함량, 주스 색 등), 종자수, 수량성, 조기 착과 등. 감귤의 경우, 현재까지 거의 대부분 QTL (quantitative trait loci) 마커가 개발된 실정에 불과하며, 유전자 수준까지 분자마커가 개발된 경우는 Citrus tristeza virus (CTV) 저항성 유전자(*ctv*)와 적육 유전자(*ruby*) 2건에 불과하다(Kim et al. 2016). 국내에서는 male fertility, 다배성, 교잡배 판별에 관한 분자표지가 개발된 바 있다(Yun et al. 2007; Kang et al. 2008; Chae et al. 2011).

유전체 정보는 구조 및 기능유전체 연구 분야뿐만 아니라 유전자 지도 작성 및 분자표지의 발굴을 통한 분자유종 분야에도 활발히 활용되고 있다. 감귤의 경우도 스위트오렌지(*C. sinensis* cv. Valencia)와 ‘클레멘타인’ 만다린(*C. clementina* cv. Clemenules)에 대한 표준유전체 해독이 이루어졌으며(Wu et al. 2014; Xu et al. 2013), 유전체 서열 기반의 분자표지 [single nucleotide polymorphism (SNP), simple sequence repeat (SSR), insertion-deletion (InDel)] 발굴 및 이를 활용한 표준 연관 및 물리지도 작성, 비교 유전체 지도 작성, 유전자 클로닝 등에 활용되고 있다(Biswas et al. 2014; Cuenca et al. 2013; Ollitrault et al. 2012). 따라서 감귤에서도 유전체 분석 기반의 분자유종 프로그램을 기존의 교배육종과 접목시킴으로써 체계적이며 목표형질 중심의 감귤 유전육종 프로그램이 활성화될 것으로 전망되고 있다(Kim et al. 2015).

감귤 궤양병과 더댕이병 내병성 및 홍피 형질의 경우, 유전 현상이나 유전 연관 지도 등에 관한 기초 연구가 이루어진 바가 없을 뿐만 아니라 연관 분자표지도 보고된 바가 없다. 교잡배 판별을 위한 분자표지(RAPD, ISSR, SSR)의 경우에도 국내와 국외 일부 연구자들에 의해 보고된바 있으나(Bastianel et al., 1998; Ruiz et al., 2000; De Oliveira et al., 2002; Scarano et al., 2002; Yun et al., 2007; Rao et al., 2008; Shareefa et al., 2009; Yildiz et al., 2013), 매우 제한된 교배조합에만 적용되었거나 범용성의 문제가 제기될 수 있다. 본 과제에서 발굴된 서열기반 다형성 SSR 마커의 경우, 주요 감귤 그룹(Grape fruit, Kumquat, Lime, Lemon, Mandarin, Pomelo, Sour orange, Orange, Citron, Tangor, Tangelo 등)에 전부 적용하여 범용성을 확인하였다. 따라서 본 과제를 통해 발굴된 감귤 궤양병과 더댕이병 내병성

및 홍피 형질연관 분자표지와 교잡배 판별 분자표지는 최근의 메가트렌드인 유전체 기반 연구와의 접목을 통해 발굴된 것으로써 국내·외의 유사 기술 개발 현황과 관련하여 기술적으로 대등한 수준에 도달한 것으로 판단된다.

이태리, 스페인, 일본 등 선진국에서는 감귤 동질 4배체 생산기술을 1990년대 전후로 연구하기 시작하여 현재 다양한 교배친에 대해 동질 4배체를 대량 확보하고 2배체와의 다양한 교배와 미숙배 구제를 통한 무핵 3배체 교배실생을 대량양성하고 있다. 현재 무핵 3배체 품종을 출원하여 보급하는 단계에 이르고 있다. 반면 국내에서는 2000년대 후반 원형질체 융합에 의한 이질 4배체 개발을 수행하고 있고, 2010년대 초반에 이르러 감귤 자연발생 3배체 선발하는 연구를 수행해 오고 있으나, 동질 4배체 양성에 대한 연구는 수행된 바가 없어 무핵 3배체 육종기반이 매우 취약한 실정이다. 본 연구를 통해 콜히친 처리에 의한 동질 4배체 양성에 대한 다양한 조건이 검토되었으며, 일부 동질 4배체를 획득함으로써 동질 4배체 개발기술 체계를 확립할 수 있었다. 또한 호주, 이태리 등에서 도입한 4배체 꽃가루를 2배체와 교배하여 종자 형성 정도를 분석하여 3배체 미숙배 구제기술 확립의 필요성을 확인하였다. 자연발생 4배체 및 3배체는 고접을 통한 조기 육묘를 수행함으로써 향후 2배체와의 교배 활용과 3배체의 무핵 정도를 평가할 수 있는 기반을 구축할 수 있었다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 감귤 내병성 및 기능성 핵심집단 구축

#### 1. 감귤 유전자원 도입 및 특성 조사

##### 가. 서론

생물다양성협약(CBD), 식량농업유전자원국제조약(ITPGRFA)을 등을 거쳐 유전자원 활용이 공정한 이익 공유를 위한 국제적 규범 나고야 의정서가 채택됨으로써 자원 확보가 국가적인 목표로 설정되고 있다. 국내에서도 농업유전자원 보존 관리 강화를 위하여 2008년에 제정된 농업유전자원 보존·관리 및 이용에 관한 법률을 2012년 농수산생명자원 보존·관리 및 이용에 관한 법률로 개정하고 농업유전자원 보존관리 및 이용을 강화시키고 있으며 해외 유전자원 도입에 적극적으로 나서고 있다. 감귤 유전자원은 자료마다 다르게 나타나고 있는데 전체적으로 약 6천점이 있다고 알려져 있고 중국 1,600여점, 미국 1,200여점, 일본 1,200여점, 인도 600여점, 태국 585점, 호주 500여점 정도를 보존하고 있다(Khan 등, 2001). 또한 브라질 2,850, 아르헨티나 1,433, 우루과이 792, 쿠바 304점을 보존하고 있다(Anderson, 2000). 국내 감귤 유전자원은 2012sus 현재 약 400점 정도로 농촌진흥청 감귤연구소와 제주특별자치도농업기술원에서 보존을 하고 있다. 유전자원 보존은 현지보존이 이상적이지만 손실 방지를 위해 인위적으로 포장을 조성하여 보존하는 현지의 보존 방식을 기본으로 하고 있다. 보존 자원의 규모가 커짐에 따라 유전자원 포장의 면적이 증가하고 인력과 비용이 증대됨에 따라 장기 저장을 위한 생육 억제 기내 배양(Slow growth of in vitro vegetative tissues) 방법(Engelman, 1997), 장기 저장을 위해 초저온 저장법- 경정(Gonzalez-Arno, 1988), 종자(Mumford, 1979), 배주(Bajaj, 1984), 체세포배(Marin and Duran-Vila, 1988), 체세포발생캘러스(Kobayashi 등, 1990)- 등이 활용되고 있다. 국내에서도 사과, 포도 등 초저온 생장점 배양법을 확립하였고 2016년부터는 감귤도 초저온 생장점 배양법을 정립코자 연구를 추진하고 있다.

본 연구는 자원 경쟁시대에 대처하기 위하여 다양한 유전자원을 수집하고, 이에 대한 생육 및 과실품질 특성을 조사하며, 분류 등을 실시하여 육종가에 제공함으로써 육종 효율을 높이기 위하여 실시하였다.

##### 나. 재료 및 방법

###### 1) 감귤 유전자원 도입 및 증식

미국, 중국, 일본 등 감귤 유전자원을 많이 보존하고 있는 국가의 기관 또는 업체를 통해 유전자원을 수집하였다. 수집시 고려사항은 첫째 국내에 없는 유전자원, 둘째 교배모본으로 이용가능한 단배성 자원, 셋째 기능성 품종 개발을 위한 과육색이 유색인 자원, 넷째 감귤 분류상 국내에 자원수가 적은 자원을 우선으로 수집하였다. 최근 황룡병, 과실파리 등 금지해충이 문제가 되는 국가에서 도입한 자원은 아직까지 금지품관리 중에 있으며 그렇지

않은 국가인 경우는 격리재배가 해제 되어 노지 포장에 일부가 정식되어 있다. 해외에서 유전자원의 도입되면 기본적으로 대목으로 이용되는 탱자에 4주를 접목하고 격리재배가 해제되면 그 중 생육이 우수한 2개체를 선택하여 노지 포장에 정식을 하고, 매년 생육이 불량한 자원에 대해서는 같은 방법으로 접목을 실시하여 손실을 방지하고 있다.

## 2) 도입 유전자원에 대한 문헌조사

도입 유전자원에 대한 세분류, 학명, 유래 등을 미국의 Citrus Variety Collection(CVC), Citrus Clonal Protection Program(CCPP), Citrus ID를, 프랑스의 Citrus Pages, 중국의 National Citrus Germplasm Informational System, 일본의 農林水産省品種登録ホームページ와 農研機構 果樹研究所, 스페인의 Banco de germoplasma de cítricos, 민간회사인 호주의 Sunraysia Nurseries사, 이탈리아의 SQUADRITO(이탈리아) 등을 검색하여 분류 및 특성을 조사하였다. 조사 특성으로는 자원명(영어, 일본어, 한자), 학명, 기원, 주요 생육 및 과실품질 특성, 사진 등이었다.

## 3) 보유 유전자원의 특성조사

도입보유 유전자원의 특성조사는 농촌진흥청 농업과학연구조사기준에 따라 과실크기, 과형, 과실품질, 80% 착색기 등을 조사하였으며, 이와 더불어 교배 모본에 대한 정보를 제공하기 위하여 보유 유전자원 종자수와 배수성(胚數性)을 조사하였다. 과실당 종자수는 5과를 기본으로 하여 종자수의 변이가 클 경우는 추가로 조사를 하여 결과를 도출하였으며, 단배성인지 다배성인지 여부를 묻는 배수성 조사는 상기에서 조사한 과실 모두에서 종자를 채취하여 이중 임의적으로 5개를 선택하여 그 안에 포함된 배의 수를 육안으로 조사하였다. 종자수와 마찬가지로 5개가 모두 일치할 경우에는 5개만을 조사하였으며 변동이 있을 경우에는 추가로 조사를 실시하여 결과를 도출하였다.

## 다. 결과 및 고찰

### 1) 감귤 유전자원 도입

유전자원 도입을 위해서 1차년도에 중국 절강성 감귤연구소와 업무협약을 실시하였고, 중국, 호주 등 4개국을 방문하여 유전자원 도입을 협의하였다. 더불어 유전자원 도입을 위해 2차년도에는 농림축산검역본부에 수입 금지품 수입 허가 2회를 받아 도입을 추진하였다. 1차년도에 61점, 2차년도에 80점, 3차년도 81, 4차년도 49점 등 총 271점을 해외로부터 도입하였고 이중 151점은 수입금지품 관리 중에 있으며(그림1-1), 기존 자원 4점을 포함하여 124점은 농촌진흥청 농업유전자원센터에 등록하여 2016년 6월에 IT번호를 부여 받았다. 추가로 2016년에 역시 농업유전자원센터에 등록을 요청하여 현재 71점에 대하여 임시 IT번호를 받아 놓은 상태이다(표1-1). 한편 도입 유전자원에 대해서는 세계적으로 가장 심각한 금지병인 황룽병(Citrus greening disease; HLB)으로부터의 안전성을 확보하기 위해

*Liberibacter americanus*, *Liberibacter africanus*, *Liberibacter asiaticus*에 대하여 PCR로 확인하였으며 다행스럽게도 황룡병에 감염된 도입 자원은 없어 안전하였다(그림1-2).

표 1-1. 도입 유전자원 목록 및 농업유전자원센터 등록 번호

번호	세구분	학명	자원명	IT번호#
1	만다린	<i>C. deliciosa</i>	Avana - Apireno	302097
2	만다린	<i>C. deliciosa</i>	Avana - Tardivo	302098
3	만다린	<i>C. unshiu</i>	China S-6 Satsuma	302099
4	만다린	<i>C. unshiu</i>	China S-7 Satsuma	302100
5	만다린	<i>C. reticulata</i>	Clementine * Pearl	302101
6	만다린	<i>C. clementina</i>	Corsica#1 Clementine	302102
7	만다린	<i>C. clementina</i>	Corsica#2 Clementine	302103
8	만다린	<i>C. unshiu</i>	Dobashi Beni satsuma	302104
9	만다린	<i>C. clementina</i>	Fina	302105
10	만다린	<i>C. reticulata</i>	Fremont	302106
11	만다린	<i>C. reticulata</i>	Furr(US) mandarin	302107
12	만다린	<i>C. reticulata</i>	Hansen mandarin	302108
13	만다린	<i>C. clementina</i>	Marisol clementine	302109
14	만다린	<i>C. reticulata</i>	Michal mandarin	302110
15	만다린	<i>C. clementina</i>	Nour	302111
16	만다린	<i>C. clementina</i>	Oroval	302112
17	만다린	<i>C. reticulata</i>	Primosole Mandarin	302113
18	만다린	<i>C. reticulata</i>	Rubidoux * mandarin	302114
19	만다린	<i>C. unshiu</i>	Selma Satsuma	302115
20	만다린	<i>C. unshiu</i>	Shirok Satsuma	302116
21	만다린	<i>C. reticulata</i>	Soh himtra mandarin	302117
22	만다린	<i>C. reticulata</i>	SRA 337 mandarin	302118
23	만다린	<i>C. clementina</i>	SRA 92 Clementine	302119
24	만다린	<i>C. reticulata</i>	Sun Chu Sha mandarin	302120
25	만다린	<i>C. reticulata</i>	Temple * Dancy	302121
26	만다린	<i>C. reticulata</i>	Temple X Minneola	302122
27	만다린	<i>C. reticulata</i>	USDA-88-3 Robison*Lee	302123
28	만다린	<i>C. unshiu</i>	Xie Shan Satuma	302124
29	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Akcay Sekeri Crescent	302125
30	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Bahianinha Araras Navel	302126
31	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Bream Tarocco	302127
32	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Cadenera	302128
33	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Campbell(nucellar)	302129
34	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Carter(old line)	302130
35	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Chapman Valencia orange	302131
36	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Chislett Navel	302132
37	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Cluster navel orange	302133
38	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Cogan	302134
39	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Cutter(nucellar)	302135
40	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Delfino	302136
41	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Eddy (old line)	302137
42	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Frost navel orange	302138
43	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Frost nucellar Valencia orange	302139
44	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Fukumoto	302140

번호	세구분	학명	자원명	IT번호#
45	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Gillemborg Navel	302141
46	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Gillette	302142
47	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Harward Late	302143
48	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Jincheng	302144
49	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Lima Acidless Orange	302145
50	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Madam Vinous	302146
51	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	McMahon Seedless Valencia	302147
52	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Navelate	302148
53	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Olinda(nucellar)	302149
54	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Palmer	302150
55	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Parent Washigton	302151
56	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Pehrson #3	302152
57	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Pehrson #4	302153
58	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Pineapple	302154
59	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Robertson	302155
60	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Robyn navel orange	302156
61	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Rocky Hill(old line)	302157
62	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Rohde Red Valencia Orange	302159
63	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Ruby(nucellar)	302160
64	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Rush T.I. Navel	302161
65	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Sanguina doble Fina	302162
66	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Shamouti	302163
67	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Skaggs Bonanza	302164
68	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Smith Red	302165
69	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Spring	302166
70	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	T.I. Sheldon Navel Orange	302167
71	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	T.I. Zimmerman Navel Orange	302168
72	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Trovita A	302169
73	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Vainiglia Sanguigno	302170
74	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Walker Joao Valencia Orange	302171
75	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Washington Sanguine	302172
76	문단	<i>C. maxima</i>	Chandler Pummelo	302173
77	문단	<i>C. hybrid</i>	Cocktail Hybrid	302174
78	문단	<i>C. maxima</i>	Reinking Pummelo	302175
79	그레이프프루트	<i>C. paradisi</i>	Rubidoux Grapefruit Hybrid	302176
80	문단	<i>C. maxima</i>	Sarawak Pummelo	302177
81	문단	<i>C. maxima</i>	Tahitian Pummelo	302178
82	문단	<i>C. maxima</i>	Thong Dee Pummelo	302179
83	문단	<i>C. maxima</i>	Valentine pummelo hybrid	302180
84	그레이프프루트	<i>C. paradisi</i>	Chironja Grapefruit Hybrid	302181
85	그레이프프루트	<i>C. paradisi</i>	Marsh, Reed Grapefruit	302182
86	레몬	<i>C. limon</i>	Dr. Strong (nucellar)	302183
87	레몬	<i>C. limon</i>	Frost (nucellar) Lisbon	302184
88	레몬	<i>C. limon</i>	Genoa	302185
89	레몬	<i>C. Limon</i>	Improved Meyer	302186
90	레몬	<i>C. limon</i>	Interdonato	302187
91	레몬	<i>C. limon</i>	Laphitiotiki lemon	302188
92	레몬	<i>C. limon</i>	Limonero Fino 49	302189
93	레몬	<i>C. limon</i>	Limonero Messina	302190



번호	세구분	학명	자원명	IT번호#
94	레몬	<i>Citrofortunella sp.</i>	Marrakech Limonette	302191
95	라임	<i>C. limetta</i>	Millsweet Limetta	302192
96	레몬	<i>C. limon</i>	Monroe Lisbon lemon	302193
97	레몬	<i>C. limettioides</i>	New Zealand lemonade	302194
98	레몬	<i>C. limetta</i>	Pomona sweet lemon	302195
99	레몬	<i>C. limon × C. medica</i>	Ponderosa	302196
100	레몬	<i>C. jambhiri</i>	Schaub Rough lemon	302197
101	레몬	<i>C. limon</i>	Taylor	302198
102	레몬	<i>C. limon</i>	Utt Allen Eureka Lemon	302199
103	레몬	<i>C. limon</i>	Villafranca	302200
104	레몬	<i>C. limon</i>	Walker	302201
105	레몬	<i>C. limon</i>	Yen Ben	302202
106	라임	<i>C. latifolia</i>	Bearss	302203
107	라임	<i>C. limonia</i>	Borneo Rangpur Lime	302204
108	라임	<i>C. aurantifolia</i>	Castello Lime	302205
109	기타	<i>Citrofortunella sp.</i>	Eustis Limequat	302206
110	라임	<i>C. limettioides</i>	Mary Ellen Lime	302207
111	라임	<i>C. limettioides</i>	Palestine sweet lime	302208
112	라임	<i>C. sp.</i>	Koster tangor	302209
113	만다린	<i>C. tangelo</i>	Pearl Tangelo	302210
114	만다린	<i>C. tangelo</i>	Ugli Tangor	302211
115	사우어오렌지	<i>C. aurantium</i>	Fraser Seville Sour Orange	302212
116	사우어오렌지	<i>C. aurantium</i>	Gou Tou Sour Orange	302213
117	씨트론	<i>C. medica</i>	S-1 Citron	302214
118	금감	<i>F. japonica</i>	Marumi Kumquat	302215
119	기타	<i>Citrofortunella sp.</i>	Nippon Orangequat	302216
120	금감	<i>F. margarita</i>	Nordman Nagami	302217
121	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Navelina 3.15	JJC373
122	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Navlina 7.5 Spain	JJC374
123	만다린	<i>C. clementina</i>	Nules	JJC375
124	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Newhall (old line)	JJC377
125	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Newhall(Califonia)	JJC378
126	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	D. Joao	JJC379
127	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Lane Late Navel	JJC382
128	그레이프프루트	<i>C. paradisi</i>	Marsh,Brwon Grapefruit	JJC386
129	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Midknight Valencia	JJC387
130	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Benyenda Navel	JJC389
131	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Benyenda Valencia	JJC390
132	사우어오렌지	<i>C. aurantium</i>	Hetsuka daidai	JJC391
133	레몬	<i>C. volkameriana</i>	Volkameriana	JJC392
134	그레이프프루트	<i>C. paradisi</i>	Shambar Grapefruit	JJC393
135	만다린	<i>C. clementina</i>	Sidi Aissa clementine	JJC394
136	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Atwood Navel	JJC395
137	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Ambersweet	JJC396
138	만다린	<i>C. reticulata</i>	Ougan	JJC397
139	만다린	<i>C. unshiu</i>	Oita wase	JJC398
140	만다린	<i>C. reticulata</i>	Kara mandarin	JJC400
141	그레이프프루트	<i>C. paradisi</i>	Grapefruit Cant Star Ruby	JJC402
142	만다린	<i>C. unshiu</i>	Kawada unshiu	JJC404

번호	세구분	학명	자원명	IT번호#
143	금감	<i>Citrofortunella sp.</i>	Tavares limequat	JJC405
144	탄골	<i>C. iyo</i>	Sawada Iyokan	JJC406
145	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Fisher	JJC407
146	라임	<i>C. australasica</i>	Finger lime green	JJC408
147	탄골	<i>C. sp.</i>	Tsunonozomi	JJC409
148	만다린	<i>C. unshiu</i>	YN-26	JJC412
149	만다린	<i>C. reticulata</i>	Bendi Guangju	JJC413
150	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Cara Cara	JJC414
151	만다린	<i>C. reticulata</i>	Comune	JJC415
152	만다린	<i>C. reticulata</i>	Hernandina	JJC416
153	만다린	<i>C. reticulata</i>	Loretina	JJC417
154	만다린	<i>C. reticulata</i>	Monreal apireno	JJC418
155	만다린	<i>C. reticulata</i>	Orogrande	JJC419
156	만다린	<i>C. reticulata</i>	Precoce	JJC420
157	만다린	<i>C. reticulata</i>	Rubino V.C.R	JJC421
158	만다린	<i>C. reticulata</i>	Tomatera	JJC422
159	탄젤로	<i>C. sp.</i>	Fallglo tangelo	JJC423
160	만다린	<i>C. reticulata</i>	Fuju	JJC424
161	사우어오렌지	<i>C. aurantium</i>	Gaocheng	JJC425
162	탄골	<i>C. sp.</i>	Himekoharu	JJC426
163	만다린	<i>C. reticulata</i>	Hongpisuanju	JJC427
164	탄골	<i>C. sp.</i>	Hongshigan	JJC428
165	만다린	<i>C. reticulata</i>	Huangguogan	JJC429
166	만다린	<i>C. reticulata</i>	Kaixuangan	JJC430
167	만다린	<i>C. reticulata</i>	Mantouhong	JJC431
168	만다린	<i>C. reticulata</i>	Nianju	JJC432
169	만다린	<i>C. reticulata</i>	Parson mandarin	JJC433
170	만다린	<i>C. reticulata</i>	Pixie	JJC434
171	만다린	<i>C. reticulata</i>	Xinshengxi No.3 Ponkan	JJC435
172	만다린	<i>C. reticulata</i>	Ruju	JJC436
173	만다린	<i>C. reticulata</i>	Tachibana	JJC437
174	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Tarocco Gallo	JJC438
175	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Tarocco Ippolito	JJC439
176	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Tarocco Meli	JJC440
177	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Tarocco Rosso	JJC441
178	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Tarocco Sant Alfio	JJC442
179	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Tarocco Scire	JJC443
180	만다린	<i>C. reticulata</i>	Wanmi No.3	JJC444
181	만다린	<i>C. reticulata</i>	Wu Gan Da Ju	JJC445
182	만다린	<i>C. reticulata</i>	Wuhe Zaoju	JJC446
183	만다린	<i>C. reticulata</i>	Yanxiwanlu Ponkan	JJC447
184	만다린	<i>C. subcompressa</i>	Zaoju	JJC448
185	만다린	<i>C. reticulata</i>	Zhuhongju	JJC449
186	사우어오렌지	<i>C. aurantium</i>	Zhuluan Sour Orange	JJC450
187	만다린	<i>C. reticulata</i>	Bagua ponkan	JJC451
188	만다린	<i>C. reticulata</i>	Shatangju	JJC452
189	금감	<i>Citrofortunella sp.</i>	Indio mandarinquat	JJC453
190	사우어오렌지	<i>C. bigaradia</i>	Bigarade Orange	JJC454
191	만다린	<i>C. reticulata</i>	Ponkan nucellar	JJC455

번호	세구분	학명	자원명	IT번호#
192	만다린	<i>C. clementina</i>	Caffin	
193	만다린	<i>C. reticulata</i>	Murcott	
194	만다린	<i>C. clementina</i>	Algerian Clementine	
195	만다린	<i>C. unshiu</i>	Aguzdera Satsuma	
196	문단	<i>C. hybrid</i>	May pomelo	
197	사우어오렌지	<i>C. bergamia</i>	Bergamot	
198	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Berri Valencia	
199	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Keenan Valencia	
200	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Frost washington(nucellar)	
201	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Thomson T.I. (Sheldon)	
202	레몬	<i>C. limon</i>	Fino lemon	
203	레몬	<i>C. limon</i>	Lisbon (Prior)	
204	레몬	<i>C. limon</i>	Dr. Strong (old line)	
205	라임	<i>C. hystrix</i>	Lime Kaffir (Malaya)	
206	씨트론	<i>C. medica</i>	Etrog (Ethrog) Citron	
207	만다린	<i>C. reticulata</i>	SRA63	
208	만다린	<i>C. reticulata</i>	Hongju	
209	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Mingliu Orange	
210	금감	<i>F. margarita</i>	Nagami Kumquat	
211	만다린	<i>C. reticulata</i>	Gonggan	
212	문단	<i>C. maxima</i>	Tosa pomelo	
213	파페다	<i>C. kizu</i>	Kizu	
214	만다린	<i>C. unshiu</i>	New nichinan1go	
215	문단	<i>C. grandis var. banokan</i>	Banokan	
216	만다린	<i>C. unshiu</i>	Nagobeniwase	
217	사우어오렌지	<i>C. balotina</i>	Barochin	
218	라임	<i>C. latifolia</i> × <i>C. limon</i>	Valencia lime	
219	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Fukumoto beni navel	
220	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Fukuhara orange	
221	문단	<i>C. pseudogulgul</i>	Shi zi you	
222	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Yamamizaka navel	
223	금감	<i>F. crassifolia</i>	Meiwa kumquat selection	
224	탄골	<i>C. sp.</i>	Hoshi tangor	
225	만다린	<i>C. tankan</i>	Tarumi 1 gou	
226	사우어오렌지	<i>C. aurantium</i>	Sudaikai	
227	문단	<i>C. maxima</i>	Anseikan	
228	만다린	<i>C. kinokuni</i>	Sakurajimakomikan	
229	파페다	<i>C. jabara</i>	Jabara	
230	파페다	<i>C. nagato-yuzukichi</i>	Nagato-yuzukichi	
231	금감	<i>F. obovata</i>	Fukushu kumquat	
232	탄골	<i>C. sp.</i>	Asumi	
233	탄골	<i>C. sp.</i>	Amaka	
234	만다린	<i>C. reticulata</i>	Kankitsu Chukanbohon Nou 6 Gou	
235	파페다	<i>C. sphaerocarpa</i>	Oita1gou	
236	만다린	<i>C. kinokuni</i>	Kizu seedless	
237	파페다	<i>C. sphaerocarpa</i>	Sobonokaori	
238	파페다	<i>C. genkou</i>	Genkou	
239	사우어오렌지	<i>C. sp.</i>	Summer fresh	
240	파페다	<i>C. junos</i>	Hanayu	

번호	세구분	학명	자원명	IT번호#
241	탄골	<i>C. sp.</i>	Haruhi	
242	만다린	<i>C. reticulata</i>	Ganpu miju	
243	만다린	<i>C. reticulata cv. Suavissima</i>	Ougan	
244	만다린	<i>C. tangor</i>	Tunokagayaki	
245	사우어오렌지	<i>C. bergamia</i>	Bergamot(Castagnaro)	
246	그레이프프루트	<i>C. paradisi</i>	Grapefruit Thompson pink(EAG)	
247	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Hockney 700 navel	
248	레몬	<i>C. limon</i>	Mayer(806)	
249	만다린	<i>C. reticulata</i>	Emperor	
250	만다린	<i>C. reticulata</i>	Hickson	
251	만다린	<i>C. reticulata</i>	Imperial	
252	만다린	<i>C. reticulata</i>	Late Emperor	
253	만다린	<i>C. reticulata</i>	W Murcott Afourer	
254	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Leng	
255	스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	Ryan	
256	문단	<i>C. maxima</i>	Nam Roi	
257	만다린	<i>C. unshiu</i>	Hinoakari	
258	만다린	<i>C. unshiu</i>	Hinoaska	
259	그레이프프루트	<i>C. paradisi</i>	HendersonRuby	
260	탄골	<i>C. sp.</i>	Setomi	
261	만다린	<i>C. unshiu</i>	Taguchi wase	
262	만다린	<i>C. unshiu</i>	Yasuda wase	
263	만다린	<i>C. unshiu</i>	Kagoshima Wase	
264	탄골	<i>C. sp.</i>	Daimasaki	
265	탄골	<i>C. sp.</i>	Sagakashi No.34	
266	금감	<i>Citrofortunella microcarpa</i>	Calamondin	
267	탄골	<i>C. sp.</i>	Nishinokaori	
268	만다린	<i>C. reticulata</i>	Nagano No. 3 ponkan	
269	만다린	<i>C. reticulata</i>	Jumbo ponkan	
270	만다린	<i>C. unshiu</i>	Taiko wase	
271	탄골	<i>C. sp.</i>	Mihaya	

# IT번호 : 숫자만 표기, JJC\*\*\*은 임시 IT번호임



그림 1-1. 도입 유전자원 관리상황(좌 : 수입금지품관리, 우 : 격리재배)

M 242 81 579 517 597 27 487 641 371 426 630 180 262 345 409 700

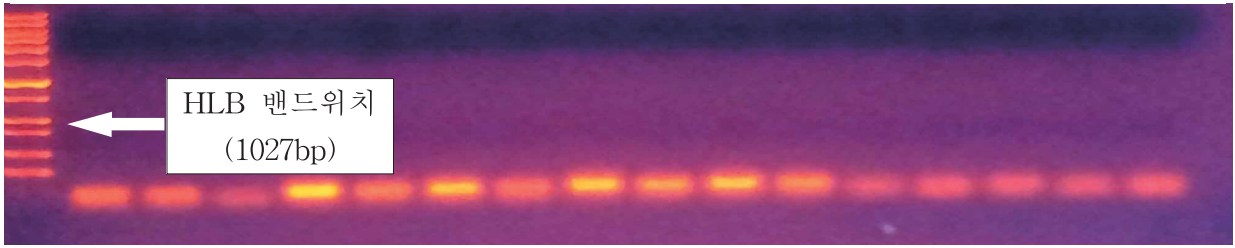


그림 1-2. PCR에 의한 황룡병(HLB) 검정

2) 도입 유전자원에 대한 문헌조사

감귤을 원예적으로는 *Citrus*속에 만다린, 스위트오렌지, 사우어오렌지, 문단, 그레이프프루트, 라임, 레몬, 씨트론, 파페다와 이들 간에 교잡종인 탄골, 탄젤로 등으로 구분하고 여기에 금감속과 탱자속을 포함하여 분류를 하고 있다. 도입한 유전자원은 제주에서 주로 재배되고 있는 온주밀감에 포함되는 만다린이 95점으로 가장 많았고, 스위트오렌지가 77점으로 다음으로 많았다. 자원을 도입하여 제주에서 적극적으로 재배를 권장하기 위한 의도로 레몬도 24점으로 비교적 많은 수를 도입하였으며, 온주밀감 다음으로 제주지역에 많이 재배되고 있는 만다린과 스위트오렌지의 교잡종인 탄골도 13점을 도입하여 육종에 활용코자 하였다(표1-2).

표 1-2. 도입 유전자원에 대한 문헌적 분류

세분류	자원수	세분류	자원수
만다린	95	씨트론	2
스위트오렌지	77	탄골	13
사우어오렌지	11	탄젤로	1
문단	13	금감	8
그레이프프루트	8	파페다	7
라임	10	기타	2
레몬	24	합 계	271

문헌을 통해 자원명(영어, 일본어, 한자), 학명, 기원, 주요 생육 및 과실품질 특성, 사진 등을 조사하여 매년 도입된 자원에 대한 자료집을 유인하여 GSP 육종 과제에 제공하였다. 최종적으로 1단계가 끝나는 시점인 4차년도에는 도입 유전자원과 기존 보유 유전자원의 특성을 종합하여 [감귤품종] 이란 책자를 발간하였다(그림1-3, 1-4).

1차년도 도입 유전자원의 주요 특성

1. Atwood navel

- 학명 : *Citrus sinensis* (L.) Osbeck
- 이명 : Atwood Early, Atwood Old Budline
- 기원 : Frank Atwood의 가지번이로 1935년 최초 발견
- 특성 : 가지는 밀생하고 다소 늘어지는 특성이 있다. 1년생 가지는 매끄러우나 2~3년생 가지는 흠이 발생한다. 가지는 없거나 있더라도 나중에 사라진다. 나무와 과실은 워싱턴네블과 거의 유사하나 착색이 약간 빠르고, 과피가 조금 더 매끄럽다
- 과실품질(캘리포니아)

조사시기	중경 (in.)	평균 (in.)	과피색	종자수	과피두께 (mm)	과중 (g)	당도 (Brix)	산함량 (%)
Oct 1-15	2.95	3.00	4.39	0	5.0	223	10.1	1.25
Oct 16-31	2.92	2.89	4.88	0	5.0	210	11.1	1.33
Nov 1-15	2.92	2.97	6.17	0	5.3	220	11.6	1.31
Nov 16-30	3.04	3.05	9.38	0	5.4	232	12.1	1.20
Dec 1-15	3.11	3.11	11.29	0	5.4	255	12.3	0.90
Dec 16-31	2.87	2.85	11.38	0	5.0	198	13.7	1.25

# 출처 : Citrus Colonial Protection Program



해외 도입 유전자원 특성

-감귤 골든씨드 프로젝트-

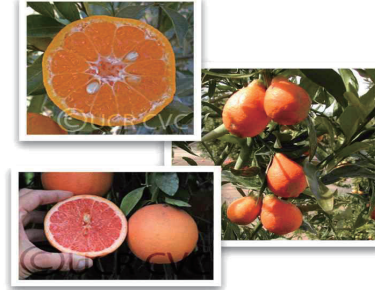


그림 1-3-1. 연차별 도입자원에 대한 특성집(좌: 1차년도, 우 : 2차년도)

3차년도 도입 유전자원의 주요 특성

- 골든씨드프로젝트 -

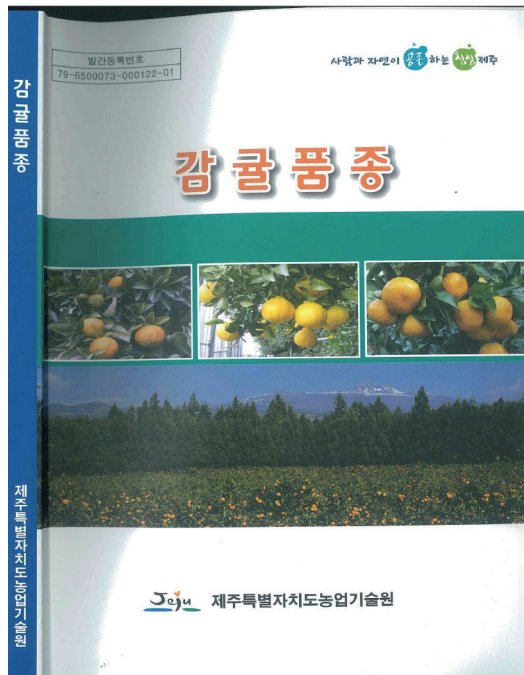
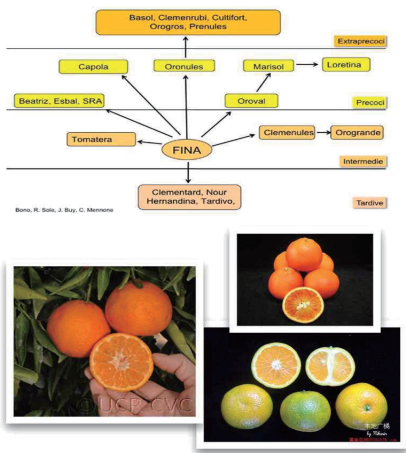


그림 1-3-2. 연차별 도입자원에 대한 특성집(좌: 3차년도, 우 : 4차년도)

차례

**제1장 감귤의 기원 및 분포** .....3

1-1. 세 계 .....3

1-2. 대한민국 .....5

**제2장 감귤 분류** .....12

2-1. 식물학적 분류 .....12

2-2. 원예학적 분류 .....19

**제3장 품종별 특성** .....21

3-1. 온주밀감류 .....23

· 극조생 온주밀감 .....23

· 조생 온주밀감 .....46

· 보통 온주밀감 .....60

3-2. 만다린, 탄골, 탄젤로류 .....78

· 만다린 .....78

· 탄골 .....105

· 탄젤로 .....134

3-3. 오렌지류 .....141

· 스위트오렌지 .....142

· 사우어오렌지 .....167

3-4. 문단, 그레이프프루트류 .....172

· 문단 .....173

· 그레이프프루트 .....181

3-5. 레몬, 라임류 .....189

· 레몬 .....190

· 라임 .....199

3-6. 파페다, 씨트론류 .....203

· 파페다 .....203

· 씨트론 .....209

3-7. 기타감귤류 .....211

3-8. 금감류 .....214

3-9. 뽕자류 .....219

**제4장 농업기술원 감귤품종 보존** .....223

4-1. 감귤품종 보존 배경 .....225

4-2. 품종보존 경과 .....225

4-3.년도별 품종 도입 내역 .....227

4-4. 국내육성 감귤 품종 .....230

4-5. 품종보존 성과 .....231

**제5장 감귤 육종** .....235

5-1. 감귤육종의 문제 .....237

5-2. 감귤육종 방법 .....247

5-3. 육종 기간 단축 기술 .....258

**부록**

□ 참고문헌 .....263

□ 일러두기 .....264

□ 품종색인 .....266

그림 1-4. [감귤품종] 책자의 주요 내용(목차)

국내 감귤 품종 개발의 육성목표는 고품질과 다양한 생산시기를 갖는 품종을 주요 목표로 하고 있으나, 최근에는 전세계적인 경향과 마찬가지로 기능성과 내병성에 대한 목표를 두고 교배 등을 추진하고 있는 실정이다. 이를 위해서는 다양한 교배 모본과 기능성 확보 등이 필요하며 내병성으로 알려진 자원도 필요한 실정이다. 기능성 감귤 품종 개발이 목표는 과육색이 노란색인 일반적인 감귤에 안토시안(스위트오렌지, 만다린) 또는 라이코펜(그레이프프루트)을 추가하는 것을 목표로 두는 경우가 많다. 도입 자원 중에는 39점이 단배성으로 교배 모본으로 이용가치가 높으며, 특히 단배성 만다린과 탄골은 직접적으로 이용이 가능하다. 과육색이 유색인 자원은 안토시안을 함유하여 적색인 만다린과 스위트오렌지 14점과 라이코펜을 함유하여 분홍색인 9점을 도입하였다. 특히 과육색이 짙은 만다린 품종 Rubino VCR은 만다린, 탄골을 주요 육종 대상으로 하는 국내에 귀중한 자원이라고 할 수 있다(표1-3). 또한 다양한 적육 스위트오렌지 자원들은 제주에서 적육이 발현여부를 검토하고 선발하여 재배할 수 있도록 장려할 예정으로 있다.

표 1-3. 특이 유전자원

구분	세분류	자원수	자원명
단배성 자원	만다린	11	Corsica #1, Corsica #2, Fina, Marisol, Nour, Oroval, SRA 92, Nules, Sidi Aissa, Caffin, Algerian
	탄골	5	Sawada Iyokan, Tsunonozomi, Hoshi tangor, Nishinokaori, Mihaya
	문단	13	Chandler, Cocktail Hybrid, Reinking, Sarawak, Tahitian, Thong Dee, Valentine pummelo hybrid, May, Tosa, Banokan, Shi zi you, Anseikan, Nam Roi
	라임	10	Millsweet Limetta, Bearss, Borneo Rangpur, Castello, Mary Ellen, Palestine sweet, Koster tangor, Finger(green), Kaffir(Malaya), Valencia
유색과육 자원	만다린	1	Rubino VCR
	스위트오렌지	13	Bream Tarocco, Delfino, Ruby(nucellar), Sanguina doble Fina, Smith Red, Vainiglia Sanguigno, Cara Cara, Tarocco Gallo, Tarocco Ippolito, Tarocco Meli, Tarocco Rosso, Tarocco Sant Alfio, Tarocco Scire
	그레이프프루트	5	Marsh Reed, Marsh Brown, Cant Star Ruby, Thompson pink(EAG), Henderson Ruby
	문단	4	Chandler, Reinking, Sarawak, Thong Dee

2) 보유 유전자원의 특성조사

가) 기존 보유자원의 분류

농업기술원에서 보유하고 있는 243점에 대하여 원예학적 분류를 실시한 결과, 만다린 143점(운주밀감 100점), 탄제린과 오렌지의 교잡종인 탄골 28점, 스위트오렌지 15점, 탄제린과 그레이프프루트 또는 탄제린과 문단의 교잡종인 탄젤로 10점, 사우어오렌지 7점, 유자 6점 등으로 분류되었다(표1-4).

표 1-4. 보유 유전자원의 세분류

세분류	학명	유전자원수
만다린	<i>C. unshiu</i>	100
	<i>C. reticulata</i>	43
탄골	<i>C. tangor</i>	28
탄젤로	<i>C. tangelo</i>	10
그레이프프루트	<i>C. paradisi</i>	10
스위트오렌지	<i>C. sinensis</i>	15
사우어오렌지	<i>C. aurantiuim</i>	7
문단	<i>C. maxima</i>	12
라임	<i>C. latifolia</i>	1
레몬	<i>C. limon</i>	4
파페다	<i>C. junos</i>	6
씨트론	<i>C. medica</i>	1
금감	<i>Fortunella spp.</i>	2
기타	<i>Poncirus spp.</i>	2
	<i>(C. reticulata x P. trifoliata)</i>	1
	<i>C. ichangensis</i>	1
합계		243



## 나) 기존 보유자원의 특성조사

보유 자원에 대하여 도입 유전자원과 마찬가지로 인터넷 등을 검색하여 특성을 조사하였다. 조사 내용은 자원명(영어, 일본어, 한자), 학명, 기원, 주요 수체 및 과신평형 등을 조사하였으며, 또한 기존자원에 대해서는 과신평형, 과형, 과신평질, 80% 착색기 등을 조사하여 농업유전자원센터 데이터베이스인 GMS에 등록하였다(그림 1-5, 그림 1-6). 이와 더불어 교배 모본에 대한 정보를 제공하기 위하여 보유 유전자원 종자수와 배수성(胚數性)을 조사하여 품질 특성결과와 함께 GSP 육종 과제 분야에 제공하였다(표1-5).

관리번호	입사번호	관련번호	서명번호	작업명	자원명	학명	종자부위	촬영일자	사건명	공제	도												
1	23866	JJC0194	A154	brancio amez	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	76.3	70.4	108.4	173.8	8.6	18.10	4.47	0328	0508	0520	0109	한자	76.3mm	
2	23867	JJC0195	A156		한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	72.2	83.1	114.5	163.9	3.2	8.23	3.14	0404	0518	0538	1119	한자	72.2mm	
3	23868	JJC0192	A152	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	97.6	87.3	111.7	204.1	8.4	12.72	1.26	0402	0511	0521	0521	한자	97.6mm	
4	23869	JJC0191	A101	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	83.3	71.5	116.5	226.3	5.5	11.76	1.38	0402	0514	0520	1114	한자	83.3mm	
5	23868	JJC0195	A136	유자	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	82.8	54.9	114.5	108.1	5.0	5.90	5.71	0401	0515	0523	1003	한자	82.8mm	
6	23872	JJC0181	A161	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	31.6	42.2	31.6	111.7	2.1	13.04	1.17	0304	0516	0523	1103	한자	42.2mm	
7	23864	JJC0140	A140	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	93.9	72.5	129.5	297.4	6.9	8.43	1.17	0301	0511	0520	1225	한자	93.9mm	
8	23862	JJC0137	A137	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	89.7	70.9	126.5	272.2	8.5	10.78	2.12	0404	0515	0524	1116	한자	89.7mm	
9	23865	JJC0152	A152	mandarin	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	39.7	31.6	125.7	24.4	2.5	12.30	3.97	0404	0516	0525	0515	한자	39.7mm	
10	23866	JJC0141	A141	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	75.6	73.2	103.3	200.1	5.9	10.97	1.57	0303	0511	0521	1213	한자	75.6mm	
11	23867	JJC0163	A163	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	57.9	85.2	88.9	98.2	3.9	16.00	1.94	0403	0507	0519	0519	1112	한자	85.2mm
12	23868	JJC0164	A164	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	92.9	86.9	124.1	209.2	15.9	7.92	2.95	0402	0518	0520	1125	한자	86.9mm	
13	23874	JJC0095	A095	mandarin or satsuman	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	69.9	51.8	133.7	121.2	4.1	13.18	1.14	0404	0512	0517	1106	한자	69.9mm	
14	23872	JJC0142	A142	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	81.7	57.3	107.5	117.1	5.4	11.20	2.36	0301	0518	0521	1229	한자	81.7mm	
15	23875	JJC0090	A090	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	82.7	101.6	228.1	4.6	11.05	1.04	0306	0508	0519	1123	한자	82.7mm		
16	23878	JJC0094	A094	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	76.9	73.7	104.3	234.2	5.6	11.81	1.59	0328	0510	0519	1113	한자	76.9mm	
17	23877	JJC0096	A096	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	81.5	67.2	106.5	176.3	6.1	12.07	1.96	0327	0506	0517	1123	한자	81.5mm	
18	23861	JJC0129	A129	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	47.5	36.3	124.0	43.5	3.0	9.93	4.48	0405	0508	0523	1109	한자	47.5mm	
19	23874	JJC0195	A195	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	45.2	49.0	92.2	94.4	2.4	12.19	1.77	0403	0509	0521	1120	한자	45.2mm	
20	23875	JJC0197	A197	hachibana o	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	34.9	25.0	137.1	15.3	1.4	12.00	2.61	0402	0516	0524	1123	한자	34.9mm	
21	23876	JJC0198	A198	hachibana o	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	49.2	48.2	119.0	62.7	2.9	9.98	3.99	0412	0515	0519	1112	한자	49.2mm	
22	23904	JJC0044	A044	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	85.7	50.0	131.4	106.0	3.9	16.27	1.45	0407	0507	0520	1109	한자	85.7mm	
23	23905	JJC0021	A021	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	67.7	47.1	141.8	109.6	3.1	10.85	1.03	0406	0510	0524	1114	한자	67.7mm	
24	23897	JJC0023	A023	방원	한자	JPN	2010	제주도농업기술원	강성근	71.7	50.8	141.3	117.9	3.8	11.60	1.04	0407	0516	0524	1124	한자	71.7mm	
25	23901	JJC0002	A002	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	85.1	92.1	124.9	111.8	3.5	16.44	6.91	0406	0513	0522	1101	한자	85.1mm	
26	23903	JJC0025	A025	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	63.1	48.0	141.7	96.8	2.9	8.64	0.82	0404	0513	0519	1071	한자	63.1mm	
27	23930	JJC0004	A004	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	63.9	47.0	194.6	97.1	2.9	16.16	1.01	0406	0516	0521	1009	한자	63.9mm	
28	23870	JJC0003	A003	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	61.9	49.9	124.1	97.6	2.6	8.73	1.07	0405	0513	0520	1101	한자	61.9mm	
29	23875	JJC0025	A025	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	63.9	45.7	136.9	101.7	3.0	8.91	1.11	0405	0516	0521	1008	한자	63.9mm	
30	23874	JJC0078	A078	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	64.9	47.8	195.0	99.0	3.1	11.21	1.08	0406	0514	0521	1125	한자	64.9mm	
31	23975	JJC0029	A029	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	64.7	45.9	141.1	101.5	3.4	9.99	0.93	0406	0513	0519	1018	한자	64.7mm	
32	23903	JJC0021	A021	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	59.3	59.3	117.8	95.1	3.9	10.32	1.29	0405	0513	0518	1015	한자	59.3mm	
33	23894	JJC0033	A033	방원	한자	JPN	2010	제주도농업기술원	강성근	60.0	62.2	108.1	111.3	2.3	10.01	1.21	0406	0513	0519	1020	한자	60.0mm	
34	23895	JJC0035	A035	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	65.7	44.4	125.4	73.5	2.6	8.94	1.00	0405	0514	0520	1107	한자	65.7mm	
35	23917	JJC0037	A037	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	63.0	46.7	138.0	86.1	2.9	10.19	1.12	0405	0511	0519	1071	한자	63.0mm	
36	23872	JJC0039	A039	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	63.7	48.7	130.7	101.0	3.5	9.94	1.02	0405	0510	0520	1014	한자	63.7mm	
37	23979	JJC0038	A038	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	60.9	45.0	135.2	92.0	3.1	9.37	1.19	0404	0508	0516	1071	한자	60.9mm	
38	23976	JJC0042	A042	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	63.9	45.9	139.5	91.2	2.7	8.92	1.07	0404	0511	0518	1014	한자	63.9mm	
39	23945	JJC0027	A027	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	63.1	50.7	136.2	117.9	3.3	8.19	1.19	0407	0514	0517	1022	한자	63.1mm	
40	23970	JJC0010	A010	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	62.6	59.4	105.2	101.1	3.1	8.59	1.09	0405	0514	0519	1022	한자	62.6mm	
41	23982	JJC0067	A067	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	69.5	54.7	135.2	135.2	3.0	10.19	1.07	0407	0524	0524	1023	한자	69.5mm	
42	23877	JJC0014	A014	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	62.6	50.3	120.8	97.7	3.1	11.82	1.82	0407	0514	0521	1024	한자	62.6mm	
43	23899	JJC0166	A166	방원	한자	KOR	2010	제주도농업기술원	강성근	62.9	50.0	125.9	109.0	2.5	10.11	1.16	0408	0515	0521	1031	한자	62.9mm	

그림 1-5. 농업유전자원센터 등록 유전자원 특성 정보

관리번호	입사번호	관련번호	학명	작업명	자원명	촬영부위	촬영일자	사건명	공제	도		
1	239761	JJC0001	CRS0114	Citrus unshiu	꽃나무	혼돈조생	학파상향	박영철	2008-11-16	56-423학파1.JPG	CR	1
2	239701	JJC0002	CRS0001	Citrus unshiu	꽃나무	혼돈조생	학파상향	박영철	2008-11-26	삼선학파11201.JPG	CR	1
3	239740	JJC0003	CRS0091	Citrus unshiu	꽃나무	대동조생	학파상향	박영철	2008-11-02	대동학파1-08.JPG	CR	1
4	239751	JJC0005	CRS0103	Citrus unshiu	꽃나무	삼봉조생	학파상향	박영철	2008-11-26	삼봉조생학파11201.JPG	CR	1
5	239705	JJC0006	CRS0095	Citrus unshiu	꽃나무	주관조생	학파상향	박영철	2008-11-02	주관학파1-08.JPG	CR	1
6	239707	JJC0007	CRS0102	Citrus unshiu	꽃나무	산야조생	학파상향	박영철	2008-11-26	산야학파21201.JPG	CR	1
7	234012	JJC0009	CRS0109	Citrus unshiu	꽃나무	화파특종주	학파상향	박영철	2008-11-26	화파특종학파21201.JPG	CR	1
8	239750	JJC0010	CRS0101	Citrus unshiu	꽃나무	회주조생	학파상향	박영철	2008-11-02	회주학파2-08.JPG	CR	1
9	239754	JJC0011	CRS0106	Citrus unshiu	꽃나무	남문조생	학파상향	박영철	2008-11-26	남문학파1-08.JPG	CR	1
10	239737	JJC0014	CRS0088	Citrus unshiu	꽃나무	교봉조생	학파상향	박영철	2008-11-02	교봉학파1-08.JPG	CR	1
11	239758	JJC0016	CRS0111	Citrus unshiu	꽃나무	팔봉조생	학파상향	박영철	2008-11-02	팔봉중간학파1-08.JPG	CR	1
12	239757	JJC0018	CRS0110	Citrus unshiu	꽃나무	진향조생	학파상향	박영철	2008-11-02	진향학파1-08.JPG	CR	1
13	239748	JJC0020	CRS0099	Citrus unshiu	꽃나무	미당조생	학파상향	박영철				

표 1-5. 보유 유전자원의 과실당 종자수 및 종자당 배의 수

구분	자원명	조사수 (과)	종자수 (개)	무핵과율 (%)	단배율 (%)	배의 수 (개)	
그레이프프루트	골든스페셜	16	26.9	0	77.8	1.6	
	그레이프프루트	14	44.1	0	0	3.5	
	레이루비	5	1.8	0	0	5.2	
레몬	레몬	3	8.7	0	0	-	
	리스본레몬	1.5	19.5	0	40	2	
	알렌레몬	4	12.6	0	62.9	2.8	
	후로스트유레카	6	11.8	0	33.3	-	
만다린	S-1153	11	5.5	18.2	-	1.3	
	감자	5	14.2	0	100	1	
	기주밀감	8.5	5.8	10	100	1	
	길전병감	17	9.7	0	0	5.4	
	남진해	2	1	50	0	4	
	댄시	4.5	6.7	0	0	7.2	
	데이지	4.5	14.8	0	95	1	
	동정귤	4	10	0	76.4	1.8	
	마코트	5	6	0	0	8.8	
	병감	22	11.8	0	0	4.6	
	병감(무종자)	5	3	20	0	-	
	병귤	5	19.4	0	0	5.6	
	빈귤	6.5	6.4	16.7	30	2	
	시쿠와샤	5	11.8	0	0	6.4	
	월로우립	1	1	0	0	6	
	인창귤	5.5	11.1	0	10	4.4	
	조향	5	9.5	25	0	7.8	
	중야3호 병감	6	4.5	10	0	3.3	
	진귤	4	17.1	0	0	6.6	
	클레멘틴	3	16.7	0	100	1	
	클레멘틴(이스라엘)	13	13.7	0	100	1	
	클레멘틴(프랑스)	7.5	11.4	0	100	1	
	편귤	4	18.1	0	56.3	1	
	피나소데아	4	3.8	20	100	1	
	홍귤	6.5	8.7	0	4.8	5.2	
	홍색귤	9	0.8	55.6	0	11.2	
	황금감	5	14.2	0	0	13.6	
	홍춘병감	9	7.1	11.1	0	-	
	문단	마두문단	16	26.9	11.1	100	1
		문단	6	31.5	0	100	1
사두감		6	29.7	0	100	1	
수유		16	33.6	11.1	100	1	
중국황화		3	18	66.7	100	1	
팔삭		16	14.9	11.1	100	1	
홍팔삭		16	9.8	22.2	100	1	
사우어오렌지	감하귤	20	25.4	0	26.9	2.6	
	삼보감	15	29.7	0	36.8	5.3	
	선홀트	8.5	13.8	0	57.8	1.5	

구분	자원명	조사수 (과)	종자수 (개)	무핵과율 (%)	단배율 (%)	배의 수 (개)
사우어오렌지	입화오렌지	13	20.3	0	54.5	3.3
	좌등	14	23.6	0	30.8	2.9
	지각	5.5	23.6	0	20	3
	하굴	15	21.7	0	6.7	3.4
	황금하굴	16	15.4	0	21.1	3.1
스위트오렌지	길전네블	6	1	83.3	0	-
	발렌시아레이트	7	2.9	15.6	0	7.4
	상키넬리	2	3	0	0	-
	햄린	5	2	0	0	7.4
유자	다전금	14	26.7	0	0	7.9
	대분취등	15	12.5	0	0	10.2
	목두유자	2	25.2	0	0	5
	산굴	21	6.9	0	0	4.2
	산근유자	7	25.6	0	0	4.2
	스타치	11.5	0	98.6	-	9
	재래유자	6	27.7	0	0	-
	카보스	5	18.4	0	0	-
탄골	56-423	16	20.8	0	87.5	1
	S-1129	14	0.6	86.4	100	1
	S-1144	5	13.6	0	0	7.6
	궁내이예감	6	9.3	0	100	1
	부지화	6	3.5	50	0	-
	사토노가오리	14	2.1	58.3	37.5	-
	세토카	3	1	33.3	0	-
	양골	5	7.8	0	0	9.6
	원교아단배성1호	4.5	0	90	100	1
	유명	16	1.4	70.2	-	10
	주건	20	6	0	10	3.8
	청건	6	0	100	100	1
	청봉	12	6.5	50	-	4.7
	춘향	4	11	16.7	0	5
	타마미	6.5	4.2	41.7	100	1
	하레히메	13	1.9	60	100	1
	홍진46	6	6.3	16.7	91.7	-
	홍진47	3	14.3	0	100	1
탄젤로	노바	4.5	0.2	80	0	4.5
	리	11	17.2	0	100	1
	미네올라	17	16.7	0	0	8
	서던엘로	5	0.2	80	0	3
	세미놀	17	16	0	0	7.2
	페이지	4.5	1.6	80	0	5.3
	웨어차일드	1	25	0	0	5.6
기타	금감자	5	6.5	16.7	0	7.4
	일향하	13	36.1	0	100	2.1
	하루카	4	11.8	0	28.3	2.8

## 2. 플라보노이드와 카로티노이드 분석

### 가. 서론

감귤에는 비타민 C, 플라보노이드, 카로티노이드, 리모노이드 등 다양한 기능성 성분을 함유하는 것으로 알려져 있으며, 플라보노이드는 60여 종이 존재하는 것으로 보고되고 있다(Horowitz과 Gentili, 1977). 감귤 플라보노이드의 효능에 항산화 작용(Mokbel과 Hashinaga, 2006), 항암작용(Yoshimizu 등, 2004), 순환기계 질환의 예방(Benavente와 Castillo, 2008), 면역증강작용(박 등, 2008), 모세혈관 강화 작용(손 등, 1992) 등이 보고되고 있다. 감귤에 존재하는 플라보노이드류는 flavanones, flavones과 polymethoxylated flavones으로 구분할 수 있고, 과즙에는 대부분 flavanones 형태로 존재한다. 이들 대부분 플라보노이드는 과피에 집중적으로 존재하며, flavanones은 과피의 안쪽 흰색 부위인 알베도층에 가장 많고, flavones은 과피의 황색부분인 플라베도 조직에 많이 분포한다(Nogata 등, 2006). Polymethoxylated flavones은 감귤 특이 플라보노이드로 과피의 정유에서 주로 검출된다(Gattuso 등, 2007). 또한, 과즙 중에는 44종이 플라보노이드가 존재하는 것으로 보고되었는데, 감귤 종류에 따라 성분과 함량 구성에 차이를 보이며 온주밀감에 포함되는 만다린류에는 flavanones인 헤스페리딘, 나리루틴, didymin 등 5종이, polymethoxylated flavones으로 시넨세틴, 탄제레틴, 노빌레틴 등이 분포한다고 하였다(Gattuso 등, 2007). 국내산 감귤의 플라보노이드 함량에 대한 연구로는 제주 재래귤(Kim 등, 2009), 만감류(Lee 과 Kang, 1997), 온주밀감(박 등, 2015; Kim 등, 2001), 감귤 착즙박(Yang 등, 2008) 등이 있고, 효능에 관한 연구로는 감귤 유래 생약(Nugroho 등, 2009; Hyon 등, 2010) 등이 보고되고 있으며, 기능성에 대한 연구로는 혈압강화효과(Son 등, 1992), 항산화 활성(Kim 등, 2009), 체장압 억제효과(Zhang 등, 2014), 비만억제(Choi 등, 2012) 등 다양하게 이루어지고 있다.

카로티노이드는 700종 이상이 존재하며  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin 등이 가장 많이 존재한다. 카로티노이드는 과실의 발달함에 따라 엽록소가 붕괴되는 과정에서 축적된다. 감귤은 다른 과수에 비해 카로티노이드의 종류가 가장 많은 과수이며, 품종에 따라 조성이 매우 다양하다(Gross, 1987). 감귤에서 카로티노이드에 대한 연구는 플라보노이드에 비해 상대적으로 적은 편이다. 감귤에는 18종이 카로티노이드가 함유되어 있다고 알려져 있으며(Ikoma, 2014). 카로티노이드는 프로비타민 A(Burton과 Ingold, 1984), 항암작용(Greenberg 등, 1990), 면역기능(Mathews-Roth, 1991), 심장질환 개선(Gerster, 1991), 간 기능 장애(Sugiura 등, 2005), 골다공증(Sugiura 등, 2011) 및 대사 증후군(Sugiura 등, 2008) 개선에 효과 등이 기능을 한다고 알려져 있다. Matsumoto 등(2007)은 18종의 감귤 품종에 대한 카로티노이드를 분석하고 과즙의 카로티노이드 종류와 함량에 따라 4그룹으로 분류하였다. 국내 카로틴에 대한 연구로는 품종별 총카로틴 함량(황과 윤, 1995), 온주밀감 껍질과 과육의 카로티노이드 함량(양 등, 2008), 유자의 껍질과 과육의 카로티노이드 함량(신 등, 2009), 영귤의 카로티노이드 함량(이 등, 2015) 등이 있다.

본 연구는 감귤 유전자원의 과즙 중 플라보노이드와 카로티노이드의 조성 및 함량을 분석하여 기능성 육성소재의 제공, 감귤 세분류별 특성 비교, 플라보노이드와 카로티노이드의 핵심집단을 구축코자 실시하였다.

## 나. 재료 및 방법

### 1) 시험재료 및 과실 품질분석

제주특별자치도농업기술원 감귤 유전자원 포장에 보존 중인 감귤류 중에 2013년과 2014년에 착과가 이루어진 자원을 대상으로 하였다. 온주밀감은 착색개시기와 수확기에 자원별로 과실을 채취하였고, 만감류는 80% 착색기에 자원별로 과실을 채취하여 과피를 제거한 후 착즙하여 당도 및 산함량을 측정하였고, 같은 시료를 -50℃에서 냉동 보관하면서 플라보노이드, 카로티노이드 분석용 시료로 사용하였다.

### 2) 플라보노이드 분석

품종별 과실의 착색개시기 과즙액에 5 mM ammonium formate와 0.1% formic acid을 함유하는 메탄올을 20배량 가한 다음 고속브랜더(Polytron PT3100D, Kinematica AG, Swizland)를 사용하여 5분 동안 10,000 rpm으로 추출 및 균질화한 후 0.2 µm membrane filter (Ministart RC 15, Satrius stedim, Germany)로 여과하여 기기분석용 검액을 조제하였다. 시료 검액을 액체질량분석기(UPLC-MS/MS, Acquity UPLC/TQD Triple Quadrupole Mass Spectrometry, Waters, USA)를 사용하여 표2-1과 표2-2의 분석조건에서 정성적 확인과 외부표준물질법으로 검량선을 작성하여 플라보노이드 성분을 정량하였다. 또한, ESI (Electrospray Ionization)법으로 이온화하여 positive와 negative mode를 병행하여 교차분석(cross cheking)을 하였으며, 각각의 플라보노이드 종류별 질량 스펙트럼(mass spectrum)을 해석하여 표2-2의 multiple reaction monitoring(MRM) mode의 모분자(precursor ion)와 딸분자(product ions) 이온을 설정하였다. 플라보노이드 표준용액은 5 mM ammonium formate와 0.1% formic acid을 함유하는 메탄올로 각각의 성분별로 0.1~10.0 mg/L 수준이 되도록 조제하여 이용하였다. 감귤에 함유하는 플라보노이드 성분은 분자량은 동일하나 화학구조가 다른 이성질체들이 존재하는 특성을 고려하여 시료의 UPLC-MS/MS 크로마토그램의 해석과 정량을 최적화하기 위하여 표2-2에서와 같이 FG-100과 FG-200 2그룹으로 나누어 혼합 표준용액을 조제하였다. 플라보노이드의 표준품은 표2-2에 나타낸 바와 같이 18종을 Sigma(USA), Merck(Germany), ChromaDex(USA)사에서 구입하여 사용하였다. 메탄올은 Burdick & Jackson에서 ammonium formate와 formic acid 등 분석 시약은 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였다.

표 2-1. 감귤 과즙 중 플라보노이드 분석을 위한 UPLC-ESI-MS/MS 분석조건

Parameter	Conditions		
Instrument	Acquity UPLC & TQD Triple Quadrupole Mass Spectrometry (Waters, USA)		
Column	Kinetex C18, 2.1 mm×100 mm, 1.7 μm (Phenomenex, USA)		
Column temp.	37.5 °C		
Injection volume	5 μl		
Flow rate	0.3 ml/min		
Mobile Phase A	Methanol with 5 mM ammonium formate & 0.1% formic acid		
Mobile Phase B	Water with 5 mM ammonium formate & 0.1% formic acid		
Gradient program	Time (min)	A (%)	B (%)
	Initial	13	87
	6.0	15	85
	10.0	25	75
	10.1	47	53
	10.5	47	53
	14.0	58	42
	15.5	95	5
	17.5	95	5
	18.0	13	87
20.0	13	87	
Ionization mode	ESI (Electrospray Ionization), positive & negative		
Capillary Voltage	3.0 kV		
Source temp.	135 °C		
Desolvation temp.	450 °C		
Gas flow	Desolvation 800 l/hr, Cone 50 l/hr		
Scan type	MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode		
Collision gas flow	0.15 ml/min (He, cell pressure 3.5×10 <sup>-3</sup> ~4.5×10 <sup>-3</sup> mBar)		

표 2-2. UPLC-ESI-MS/MS 플라보노이드 분석 표준품 그룹 및 MRM 조건[Unit: mass/charge(m/z)]

Flavonoids group (FG-100)	MRM condition		Flavonoids group (FG-200)	MRM condition	
	Precursor ion	Product ions D1/D2		Precursor ion	Product ions D1/D2
에리오시트린	ESI+ → 597.2	289.0/153.0	루틴	ESI+ → 611.1	303.0/465.0
	ESI- → 595.2	287.0/151.0		ESI- → 609.1	301.0/271.0
나리루틴	ESI+ → 581.1	273.0/418.0	네오에리오시트린	ESI+ → 597.2	289.0/153.0
	ESI- → 579.1	271.0/150.9		ESI- → 575.2	150.9/135.0
디오스민	ESI+ → 609.0	301.0/200.9	이소로이폴린	ESI+ → 579.1	271.0/443.1
	ESI- → 607.1	299.0/284.0			
헤스페리딘	ESI+ → 611.0	303.0/152.9	나린진	ESI+ → 581.1	273.0/152.9
	ESI- → 609.1	301.0/163.9		ESI- → 579.1	150.9/271.0
퀘르시트린	ESI+ → 449.1	303.0/128.9	네오헤스페리딘	ESI+ → 611.0	303.0/152.9
	ESI- → 447.1	301.0/271.0		ESI- → 609.1	301.0/163.9
나린제닌	ESI+ → 273.1	153.0/147.0	퀘르세틴	ESI+ → 303.0	152.9/229.0
	ESI- → 271.1	150.9/118.9		ESI- → 301.0	150.9/106.9
헤스페레틴	ESI+ → 303.1	177.0/152.9	아피제닌	ESI+ → 271.0	152.9/90.9
	ESI- → 301.1	163.9/135.9		ESI- → 269.0	116.9/150.9
탄제레틴	ESI+ → 374.0	344.0/182.9	디오스메틴	ESI+ → 301.0	258.0/286.0
노빌레틴	ESI+ → 403.1	372.9/182.9	시넨세틴	ESI+ → 373.1	343.1/152.9

### 3) 카로티노이드 분석

카로티노이드 성분으로 감귤에 함유하는 대표적인  $\beta$ -카로틴과  $\beta$ -크립토크산틴을 분석하였다. 품종별 과즙액에 5mM ammonium formate와 0.1% formic acid을 포함하는 메탄올을 가한 다음 고속브랜더(Polytron PT3100D, Kinematica AG, Swizland)를 사용하여 5분 동안 10,000 rpm으로 추출 및 균질화 시킨 후 적정 분석범위에 알맞도록 조절한 후 0.2 $\mu$ m membrane filter(Ministart RC 15, Satrius stedim, Germany)로 여과시켜 기기분석용 검액을 조제하였다. 정밀여과시킨 시료 검액을 액체질량분석기(UPLC-MS/MS, Agilent 1290 Infinity UPLC/ABSCIEX Qtrap 6500 Triple Quadrupole Mass Spectrometry, USA)를 사용하여 표2-3의 분석조건에서 정성적 확인과 외부표준물질법으로 검량선을 작성하여  $\beta$ -카로틴과  $\beta$ -크립토크산틴 성분을 정량하였다. 또한, ESI(Electrospry Ionization)법으로 이온화하여 positive mode에서 카로티노이드의 질량스펙트럼(Mass spectrum)을 토대로 표2-3의 multiple reaction monitoring(MRM) mode의 모분자(precursor ion, Q1)와 딸분자(product ion, Q3)의 이온쌍을 설정한 다음 분석하였다. 카로티노이드 표준용액은 5mM ammonium formate와 0.1% formic acid을 포함하는 85% 메탄올로 1~30ug/L 수준이 되도록 조제하였다.  $\beta$ -카로틴과  $\beta$ -크립토크산틴 표준품은 Sigma(USA)에서 메탄올은 Burdick & Jackson에서 formic acid 등 분석 시약은 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였다.

표 2-3. 카로티노이드 성분의 액체질량분석기(UPLC-MS/MS) 분석조건

Instrument	ABSCIEX Qtrap 6500 & Agilent 1290 Infinity (USA)		
Column	YMC Carotenoid (3mm×150mm, 3 $\mu$ m, Japan)		
Column temp.	30 °C		
Injection volume	5 $\mu$ l		
Flow rate	32ul/min		
Mobile Phase A	Methanol with 5mM ammonium formate & 0.1% formic acid		
Mobile Phase B	Water with 5mM ammonium formate & 0.1% formic acid		
Gradient program	Time(min)	A (%)	B (%)
	Initial	95	5
	7	95	5
Ionization mode	Electrospray Ionization(ESI), Positive ion		
Ion spray voltage	5500V		
Source/Gas parameter	Curtain gas(CG) 30, Ion source gas 1(GS1) 60, Ion source gas 2(GS2) 60, Temperature 400°C		
Scan type	MRM(Multiple Reaction Monitoring) mode		
MRM condition	$\beta$ -carotene : Q1/Q3 mass ranges 537.4/445.5 m/z		
	→ DP 90, EP 10, CE 20, CXP 20		
	$\beta$ -cryptoxantin : Q1/Q3 mass ranges 553.4/461.5 m/z		
	→ DP 90, EP 10, CE 20, CXP 20		

\* DP(Declustering potential, volts), EP(Entrance potential, volts)

CE(Collision energy, electron volts), CXP(Collision cell potential, volts)

#### 4) 통계 및 군집분석

플라보노이드와 카로티노이드 자원별 조성과 함량을 자료로 R(Version 3.1.1) 프로그램을 이용하여 군집분석을 실시하였다. 유사도는 기하학적 거리(Euclidean distance) 지수를, 계층적 군집분석(Hierarchical Clustering Method)은 Ward2 (Legendre and Legendre, 2012) 방식을 활용하여 덴드로그램을 작성하였다. 작성된 각각의 군집에 대한 특성은 역시 R 프로그램을 이용하여 Duncan 다중 검정을 실시하여 특성을 정리하였다.

### 다. 결과 및 고찰

#### 1) 플라보노이드

##### 가) 착색개시기 온주밀감

제주특별자치도농업기술원에 보존 중인 온주밀감 유전자원에 대하여 착색개시기 과즙의 플라보노이드 조성과 함량을 분석하였다. 전체 77 자원에 플라보노이드 분석결과는 표2-4와 같다. 착색 개시기 온주밀감 과즙에서는 flavanones(헤스페리딘, 나리루틴, 에리오시트린), flavones(이소로이폴린, 디오스민, 루틴), 그리고 polymethoxylated flavones(시넨세틴, 탄제레틴, 노빌레틴) 등 총 9종을 함유하고 있는 것으로 나타났다(그림2-1, 표2-4). Flavanones인 헤스페리딘과 나리루틴 함량이 가장 높았고, 다음으로 flavones인 디오스민 함량이 높았으며, 감귤 특유의 플라보노이드인 polymethoxylated flavones인 시넨세틴, 탄제레틴, 노빌레틴은 미량으로 검출되었다. Gattuso 등(2007)은 온주밀감을 포함하는 만다린류의 과즙 중 플라보노이드류는 11종이 검출되었고, 클레멘틴에는 나리루틴, 헤스페리딘, 나린진, 아피제닌, 디오스메틴, 디오스민이 함유되어 있다고 보고 하였는데, 온주밀감 과즙의 플라보노이드 조성은 클레멘틴과 다른 양상을 나타내어 감귤의 종류에 따라 성분 조성이 다양하다는 특성을 보여 주었다.

Nogota 등(2006)이 HPLC를 이용하여 온주밀감 과즙 중 플라보노이드 조성을 분석한 결과, 나리루틴, 헤스페리딘, 디오스민, 에리오시트린이 함유되어 있었고, 이와 강(1997)은 온주밀감의 한 품종인 흥진조생 과즙에는 헤스페리딘, 루틴, 퀘르시트린이 검출되었다고 하였는데, 본 시험 결과는 Nogota 등(2006)의 보고와는 달리 나리루틴과 헤스페리딘이 함유되는 것은 일치하나 디오스민과 에리오시트린이 나타나지 않았고, 대신 시넨세틴, 탄제레틴, 노빌레틴을 함유하는 것으로 나타나 차이를 보였다. 또한 이와 강(1997)이 보고와는 헤스페리딘과 루틴이 검출은 일치하였으나 나리루틴, 시넨세틴, 탄제레틴, 노빌레틴은 본 시험에서만 검출되어 차이가 있었다. 이러한 차이는 사용한 분석장비, 감귤의 품종특성, 수확시기나 재배환경 등에 기인한 결과라고 판단되며, 향후 지속적인 연구를 통한 보완이 필요할 것으로 사료된다.

감귤 과즙에 가장 많이 함유되어 있는 플라보노이드는 헤스페리딘으로 평균 156 mg/L로 히로시마7호가 995 mg/L로 가장 높고, 편산온주가 56.5 mg/L로 가장 낮게 나타났다. 이와 강(1997)도 흥진조생의 과즙 중 헤스페리딘 함량이 가장 높다고 하였고, 함유량은 18.1



mg/100 ml라고 하였는데, 본 시험에서는 흥진조생 헤스페리딘 함량이 81 mg/L로 더 높게 나타났다. 다음으로 항산화제로 많이 이용되는 butylated hydroxyanisole(BHA)과 같은 항산화능을 가지는 것으로 알려진(성 등, 2012) 나리루틴 함량은 86 mg/L 정도로 히노아카리가 310 mg/L로 가장 높고 청강조생이 26 mg/L로 가장 낮았다. 감귤에 특이적으로 나타나는 polymethoxylated flavone로서 적혈구 응집과 혈구침전 감소 작용을 하는 시넨세틴, 노빌레틴, 백혈병 세포의 성장을 저해하는 탄제레틴은 미량이지만 모든 품종에서 검출되었다. 시넨세틴 함량 범위는 0.01~0.44 mg/L (평균 0.06 mg/L)였다. 탄제레틴 함량 범위는 0.02~3.04 mg/L (평균 0.26 mg/L)였다. 노빌레틴 함량 범위는 0.05~7.05 mg/L (평균 0.58 mg/L)였다. Kawaii 등(1999)은 온주밀감에 포함된 만다린류에서 시넨세틴은 1.05 mg/100 ml, 탄제레틴은 0.26 mg/100 ml, 노빌레틴은 0.23 mg/100 ml 함유하고 있다고 보고한 바 있는데, 본 시험결과와 유사하였다.

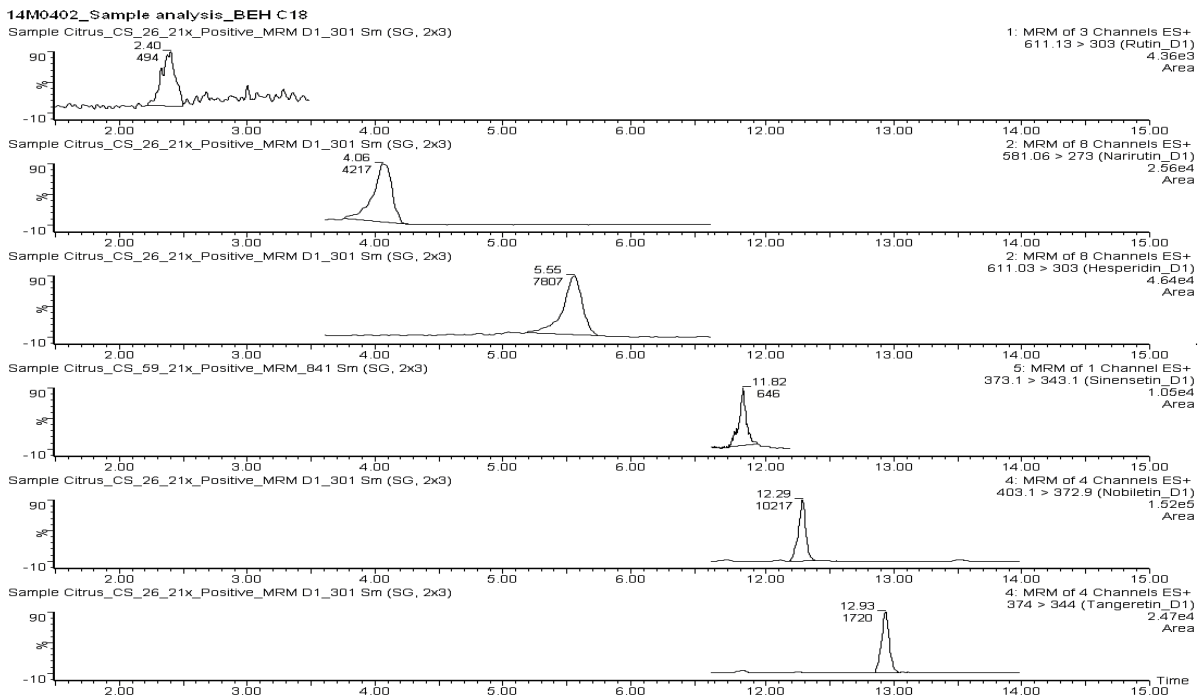


그림 2-1. 온주밀감 과즙 중 플라보노이드 크로마토그래피

표 2-4. 착색개시기 온주밀감 과즙 중 플라보노이드 조성 및 함량 (n=5) (Unit : mg/L)

자원명	Sin	Tan	Nob	Iso	Nar	Eri	Dio	Hes	Rut
S-1080	0.14	0.70	1.72	0.00	130.5	0.00	34.6	118.3	7.2
S-1152	0.05	0.02	0.10	0.00	33.2	0.00	0.0	82.7	3.9
S-1153	0.00	0.07	0.15	0.00	44.5	0.48	25.2	86.0	3.7
S-1161	0.02	0.02	0.06	0.00	32.8	0.00	0.0	79.2	4.0
강본조생	0.04	0.21	0.46	0.00	52.3	0.00	0.0	90.5	3.7
고림조생	0.03	0.09	0.21	0.00	101.5	0.00	0.0	69.2	2.7
곡천온주	0.03	0.07	0.15	0.00	37.0	0.00	0.0	92.6	1.4

자원명	Sin	Tan	Nob	Iso	Nar	Eri	Dio	Hes	Rut
교본조생	0.04	0.27	0.50	0.00	82.0	0.00	0.0	134.4	4.9
구능온주	0.04	0.03	0.15	0.00	37.6	0.00	0.0	91.1	2.1
구하조생	0.02	0.20	0.44	0.00	143.8	0.00	28.8	101.9	3.6
궁본조생1	0.02	0.18	0.48	0.00	123.4	0.00	40.8	139.5	9.0
궁본조생2	0.01	0.03	0.07	0.00	39.1	0.00	30.2	103.1	5.3
궁천조생	0.06	0.29	0.80	0.00	98.8	0.00	34.8	122.9	5.0
금촌온주	0.44	0.39	1.57	0.00	90.9	0.00	0.0	106.8	1.5
남감20호	0.01	0.05	0.14	0.00	44.1	0.00	29.5	101.0	4.6
남본조생	0.06	0.33	0.69	0.00	55.4	0.00	39.0	133.3	4.3
남원698	0.09	0.33	0.96	0.00	125.7	0.00	26.7	91.2	8.4
다원조생	0.01	0.03	0.07	0.00	50.1	0.00	27.1	95.8	2.9
당협조생	0.09	0.45	0.91	0.00	88.3	0.00	0.0	91.6	5.8
대진4호	0.12	0.53	1.02	0.00	188.5	0.00	21.0	89.9	0.0
대포조생	0.10	0.48	1.25	0.00	99.3	0.00	34.2	116.9	4.5
도엽조생	0.03	0.12	0.22	0.00	138.1	0.00	103.7	742.5	0.0
미택온주	0.02	0.11	0.24	0.00	83.3	0.00	33.4	118.0	3.4
백천	0.03	0.20	0.35	0.00	115.8	1.71	86.7	620.6	0.0
부사조생	0.02	0.11	0.20	0.00	52.0	0.00	26.2	92.8	3.2
북구조생	0.00	0.03	0.09	0.00	53.4	0.00	0.0	98.6	2.1
비후조생	0.02	0.06	0.16	0.00	68.3	0.00	25.7	87.8	5.5
사세보온주	0.01	0.07	0.15	0.00	45.5	0.00	42.6	145.7	3.5
산천조생	0.11	0.54	1.23	0.00	114.1	0.00	0.0	103.5	3.8
산하홍조생	0.03	0.02	0.12	0.00	32.2	0.00	0.0	82.0	2.2
삼다조생	0.02	0.16	0.25	0.00	128.7	2.40	86.3	617.8	0.0
삼보조생	0.03	0.04	0.11	0.00	24.4	0.00	0.0	89.9	5.0
삼조생	0.01	0.04	0.10	0.00	46.3	0.00	23.4	82.9	4.3
상도조생	0.18	0.81	1.76	0.00	85.7	0.00	0.0	90.5	2.9
상야조생	0.10	0.61	1.16	0.00	75.4	0.00	0.0	85.0	4.7
석지온주	0.10	0.24	0.44	0.00	79.3	0.00	18.6	79.8	0.0
석충조생	0.00	0.05	0.11	0.00	54.4	0.00	24.2	103.5	2.3
선온주	0.02	0.13	0.27	0.00	175.3	3.08	138.0	988.1	0.0
성전온주	0.01	0.09	0.16	0.00	73.1	0.00	27.7	98.0	2.8
송산조생	0.01	0.03	0.08	0.00	56.3	0.00	28.9	102.3	3.9
시문조생	0.05	0.22	0.55	0.00	104.8	0.00	62.0	212.1	5.4
신미택온주	0.02	0.13	0.32	0.00	115.7	0.00	38.1	130.3	6.3
신익조생	0.08	0.52	0.99	0.00	52.3	0.00	0.0	89.9	6.8
실버힐온주	0.10	0.51	0.94	0.00	73.2	0.00	26.7	114.3	0.0
안전조생	0.03	0.22	0.34	0.27	177.4	2.19	104.2	746.0	0.0
암기조생	0.01	0.22	0.29	0.00	59.9	0.00	34.1	116.7	5.2
애월조생	0.09	0.55	1.05	0.00	101.3	0.00	0.0	118.5	6.4

자원명	Sin	Tan	Nob	Iso	Nar	Eri	Dio	Hes	Rut
애향	0.09	0.25	0.32	0.00	72.9	0.00	27.6	97.4	2.0
역무조생	0.02	0.03	0.08	0.00	33.9	0.00	33.9	115.7	2.8
영전온주	0.01	0.06	0.14	0.00	56.3	0.00	21.3	91.3	0.0
원구조생	0.12	0.67	1.58	0.00	99.2	0.00	31.0	109.5	5.9
유라조생	0.05	0.18	0.46	0.00	77.6	0.00	0.0	100.4	8.0
이세온주	0.03	0.21	0.42	0.00	67.9	0.00	25.5	90.0	2.2
일남1호	0.06	0.20	0.50	0.00	127.2	0.00	0.0	79.2	4.6
임온주	0.00	0.08	0.14	0.00	95.0	0.00	0.0	116.6	2.1
입간조생	0.02	0.19	0.33	0.08	98.9	1.28	76.6	548.0	0.0
전구조생	0.02	0.20	0.44	0.00	117.1	0.00	46.7	159.5	6.9
정관조생	0.03	0.02	0.09	0.00	36.6	0.00	0.0	101.6	3.0
좌좌목온주	0.01	0.04	0.07	0.00	82.7	0.00	37.0	126.5	4.5
지환조생	0.03	0.14	0.21	0.12	105.4	1.35	88.2	631.6	0.0
천전온주	0.05	0.24	0.43	0.14	118.2	2.03	68.9	493.4	0.0
청강온주	0.03	0.06	0.15	0.00	26.3	0.00	0.0	74.1	0.9
청수4호	0.02	0.02	0.06	0.00	45.8	0.00	0.0	67.0	1.1
추광조생	0.02	0.15	0.39	0.00	130.4	0.00	40.5	138.4	7.7
충촌온주	0.21	0.61	1.34	0.00	71.7	0.00	0.0	86.4	1.1
탐나조생	0.04	0.38	0.73	0.00	86.0	0.00	29.9	105.6	2.8
팔정궁천	0.02	0.02	0.05	0.00	38.0	0.00	23.7	83.7	3.5
편산	0.07	0.09	0.58	0.00	69.5	0.00	0.0	56.5	1.3
풍복조생	0.06	0.33	0.75	0.00	87.2	0.00	0.0	80.9	4.5
하례조생	0.11	0.50	1.07	0.00	80.7	0.00	0.0	79.6	4.6
향산온주	0.02	0.03	0.08	0.00	104.3	0.00	0.0	107.9	2.1
흥진조생	0.03	0.19	0.36	0.00	66.6	0.00	0.0	81.1	3.1
히나노히메	0.38	3.04	7.05	0.00	263.4	0.00	46.1	157.5	7.6
히노사야까	0.01	0.06	0.14	0.00	69.8	0.00	18.1	77.4	0.0
히노아께보노	0.08	0.43	1.10	0.00	77.9	0.00	0.0	78.8	6.3
히노아카리	0.06	0.47	0.74	0.27	309.6	0.00	180.0	1288.4	0.0
히로시마7호	0.04	0.46	0.51	0.95	180.4	1.43	139.1	995.4	0.0
평균	0.06	0.26	0.57	0.02	88.07	0.21	29.05	188.50	3.3

# Flavonoid : Sin(시넨세틴), Tan(탄제레틴), Nob(노빌레틴), Iso(이소로이폴린), Nar(나리루틴), Eri(에리오시트린), Dio(디오스민), Hes(헤스페리딘), Rut(루틴)

플라보노이드 조성 및 함량을 기초로 R 프로그램을 이용 Ward2 방식으로 계층적 군집 분석을 실시하여 덴드로그램을 작성한 결과, 조사한 77 품종을 3 그룹으로 집단화 할 수 있었다(그림 2-2). 이소로이폴린, 에리오시트린이 다른 그룹과 달리 함유되어 있고, 디오스민과 헤스페리딘이 함량이 높은 그룹 A와 그렇지 않으면서 나린진이 함유되어 있는 그룹 B군로 구분할 수 있었다. 그룹 B는 그룹 B중 플라보노이드 함량이 높은 B1과 낮은 B2로 구분할 수 있었다. 온주밀감의 숙기와 관련된 분류인 극조생, 조생, 보통온주밀감은 A, B

그룹에 모두 분포하였고, 돌연변이 또는 주심배에 의한 온주밀감 품종의 가계도와도 상관 관계가 없는 것으로 나타났다. 착색개시기만을 기준하였을 때에 비록 성숙기가 늦은 품종 일수록 탄제레틴, 루틴, 헤스페리딘 함량이 감소하는 경향을 보이긴 하였으나 과즙 중 전체 플라보노이드 조성 및 함량과 성숙기와의 관계는 연관성이 적은 것으로 나타났다. 따라서 금후 성숙단계 및 이용부위에 대한 플라보노이드 특성 변화를 통한 연관성을 검토할 필요가 있다고 판단되었다.

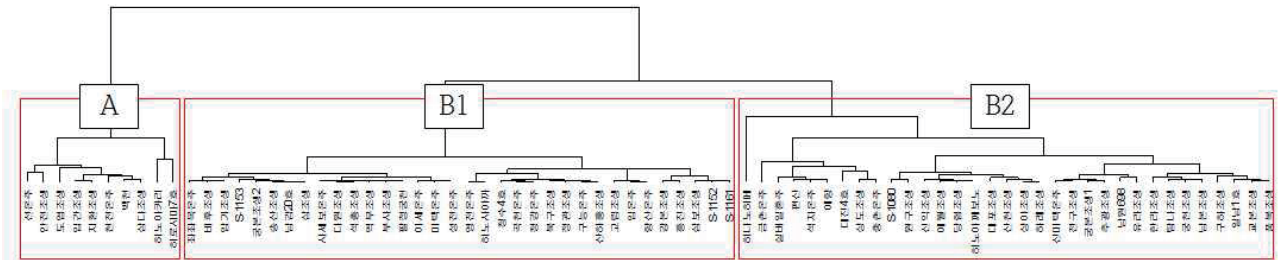


그림 2-2. 온주밀감 착색개시기 과즙 중 플라보노이드 조성 및 함량에 따른 군집분석

표 2-5. 군집분석에 따른 그룹별 플라보노이드의 조성 및 함량

세분류	Sin	Tan	Nob	Iso	Nar	Eri	Dio	Hes	Rut	
A	0.03 a <sup>z</sup>	0.24 ab	0.37 ab	0.20 a	159.11 a	1.53 a	109.46 a	783.45 a	0.00 b	
B	B1	0.02 b	0.07 b	0.15 b	0.00 b	54.25 c	0.01 b	15.81 b	95.36 b	3.03 a
	B2	0.10 b	0.46 a	1.04 a	0.00 b	103.08 b	0.05 b	21.00 b	124.15 b	4.53 a

# Flavonoid : 표2-4 참조, <sup>z</sup> DMRT p=0.05.

#### 나) 수확기 온주밀감

착색개시기와 마찬가지로 수확기(80% 착색기)에 온주밀감 유전자원별 과즙의 플라보노이드 조성 및 함량을 분석하였다. 전체 107 자원에 플라보노이드 분석결과는 표2-6과 같다. 수확기 온주밀감 과즙에는 착색 개시기 온주밀감 과즙과 비교하여 루틴이 검출되지 않은 반면 Flavanone인 나린진, 지환조생, 석촌조생, 대곡계림에서 소량으로 검출되었다. 착색 개시기와 비교하여 함량이 높은 플라보노이드 종류는 비슷하였고, polymethoxylated flavones을 제외하면 대체로 함량이 높아지는 결과를 보였다. 김 등(2001)은 HPLC를 이용한 온주밀감 과피의 시기별 플라보노이드 분석에서 루틴, 나린진, 헤스페리딘, 퀘르세틴, 헤스페레틴, 노빌레틴, 시넨세틴, 탄제레틴 등 8종이 검출되었고 과실의 성숙시기에 따라 플라보노이드 함량이 줄어드는 것으로 보고한 바 있다. 송 등(1998)도 9월 하순 궁천조생의 나린진 함량이 289 ug/ml, 헤스페리딘이 269 ug/ml 이었으며 9월 하순 이후 급격이 떨어진다고 하였는데 본 연구에서의 분석결과와 비교하면 나린진 함량은 매우 높고, 헤스페리딘 함량은 비슷한 결과를 보였다. 총 플라보노이드 함량이 가장 높은 품종은 헤스페리딘 함량이 매우 높은 유택조생이었고 헤스페리딘 함량이 적은 좌좌목온주가 가장 낮았으며 품종에 따른 차이가 많이 나타났다. 착색개시기보다 수확기에 플라보노이드 함량이 높은 이유는 품종의 다양성과 재배환경 등이 차이라고 생각되지만 보다 면밀한 검토가 필요하다고 판단

된다.

표 2-6. 수확기 온주밀감 과즙 중 플라보노이드 조성 및 함량 (n=5) (Unit : mg/L)

자원명	Sin	Tan	Nob	Iso	Nar	Eri	Dio	Hes	Nag
S-1080	0.01	0.02	0.05	0.00	77.4	0.91	46.6	352.5	0.0
S-1094	0.00	0.02	0.03	0.18	64.5	0.00	29.9	217.4	0.0
S-1153	0.00	0.02	0.02	0.00	48.0	1.00	79.3	443.5	0.0
S-1161	0.02	0.04	0.06	0.14	51.7	1.51	50.5	366.6	0.0
강본조생	0.01	0.06	0.12	0.00	149.9	5.46	72.7	550.1	0.0
고림조생	0.00	0.01	0.02	0.00	43.3	0.82	35.5	198.8	0.0
곡천온주	0.04	0.31	0.51	0.68	125.3	2.98	170.2	952.1	0.0
교본조생	0.00	0.02	0.05	0.07	99.2	2.34	78.1	590.5	0.0
구능온주	0.06	0.67	0.88	0.22	132.5	1.60	167.5	937.1	0.0
구하조생	0.05	0.38	0.60	0.00	80.1	1.29	36.3	263.5	0.0
궁본조생1	0.01	0.11	0.16	0.00	245.0	4.53	124.6	942.2	0.0
궁본조생2	0.01	0.04	0.04	0.00	27.2	0.00	33.7	244.8	0.0
궁천조생	0.00	0.02	0.02	0.00	90.4	0.00	42.7	322.9	0.0
금전조생	0.02	0.06	0.15	0.00	39.1	1.49	51.3	287.1	0.0
금촌온주	0.03	0.17	0.34	0.11	290.2	1.61	101.9	740.3	0.0
기구보조생	0.01	0.02	0.03	0.00	75.1	0.00	71.0	536.9	0.0
기주규온주	0.01	0.06	0.07	0.00	186.8	1.94	53.1	385.6	0.0
기지국온주	0.01	0.09	0.15	0.00	92.7	1.16	64.4	467.8	0.0
남감20호	0.01	0.03	0.05	0.00	61.0	0.85	61.4	464.5	0.0
남감4호	0.00	0.03	0.04	0.00	26.8	1.46	25.6	186.1	0.0
남본조생	0.01	0.06	0.13	0.10	294.5	4.29	190.0	1437.3	0.0
남원698	0.02	0.04	0.08	0.21	128.4	1.63	71.1	516.1	0.0
뇌호온주	0.01	0.05	0.09	0.00	31.7	0.78	44.8	325.5	0.0
다원조생	0.01	0.01	0.03	0.11	66.0	0.00	57.3	433.5	0.0
당협조생	0.01	0.04	0.08	0.00	155.2	2.16	40.1	291.5	0.0
대곡계림	0.00	0.02	0.02	0.00	35.2	0.75	54.6	413.1	3.4
대엽계	0.03	0.00	0.23	0.13	64.7	1.24	45.2	328.3	0.0
대진4호	0.02	0.15	0.19	0.00	160.2	3.28	76.3	577.2	0.0
대진5호	0.00	0.02	0.04	0.18	250.1	7.15	104.5	790.6	0.0
대포조생	0.01	0.03	0.08	0.00	125.3	1.18	44.5	323.0	0.0
덕삼조생	0.04	0.36	0.60	0.00	206.5	3.92	228.4	1277.5	0.0
도엽조생	0.01	0.03	0.05	0.00	70.8	3.10	80.8	586.7	0.0
모택온주	0.03	0.03	0.07	0.00	186.3	1.96	130.0	943.9	0.0
미택온주	0.00	0.02	0.04	0.00	62.4	0.97	63.2	353.4	0.0
백빈1호	0.07	0.49	0.75	0.22	206.2	10.53	170.9	1292.9	0.0
백천	0.02	0.04	0.09	0.07	59.6	1.13	54.5	304.9	0.0

자원명	Sin	Tan	Nob	Iso	Nar	Eri	Dio	Hes	Nag
번전온주	0.01	0.05	0.07	0.00	86.3	0.00	87.8	664.3	0.0
부사조생	0.00	0.02	0.04	0.06	127.2	1.76	48.3	365.5	0.0
부사견온주	0.02	0.04	0.04	0.21	44.1	0.77	33.3	242.1	0.0
북구조생	0.00	0.01	0.01	0.00	48.8	0.83	38.1	276.7	0.0
비후조생	0.05	0.22	0.35	0.26	110.4	1.51	90.5	506.4	0.0
사세보온주	0.01	0.05	0.08	0.10	26.6	6.16	74.5	416.9	0.0
산천조생	0.01	0.04	0.07	0.00	135.9	1.23	35.0	254.2	0.0
산하홍조생	0.00	0.02	0.03	0.00	32.6	0.00	33.0	249.8	0.0
삼다조생	0.01	0.03	0.04	0.00	69.5	0.94	81.6	456.3	0.0
삼보조생	0.00	0.02	0.06	0.00	31.4	0.00	31.0	234.3	0.0
삼산온주	0.00	0.01	0.01	0.00	60.0	1.39	36.1	272.8	0.0
삼조생	0.00	0.01	0.02	0.12	48.3	0.64	57.8	323.3	0.0
상도조생	0.01	0.06	0.11	0.00	126.1	1.98	46.1	348.8	0.0
상야조생	0.02	0.05	0.11	0.00	131.1	2.12	44.6	324.1	0.0
상전온주	0.03	0.29	0.33	0.01	171.9	5.76	208.7	1167.3	0.0
석지	0.01	0.05	0.08	0.00	59.3	1.71	54.9	398.7	0.0
석천온주	0.02	0.09	0.20	0.04	39.4	1.54	44.3	247.6	12.3
석충조생	0.00	0.01	0.03	0.00	34.7	0.74	35.1	196.2	0.0
선창동온주	0.01	0.08	0.12	0.00	78.0	0.74	50.2	364.7	0.0
성전온주	0.01	0.12	0.16	0.00	56.3	0.93	32.9	239.1	8.0
송산조생	0.00	0.02	0.03	0.00	51.6	0.80	50.0	378.1	0.0
수태랑온주	0.01	0.04	0.05	0.00	173.8	8.60	99.5	722.8	0.0
시문조생	0.02	0.09	0.19	0.00	128.5	1.68	52.1	378.4	0.0
신미택온주	0.00	0.03	0.06	0.00	74.5	1.75	81.9	458.0	0.0
신십만온주	0.03	0.16	0.30	0.00	383.1	3.70	179.4	1357.1	0.0
신익조생	0.02	0.13	0.19	0.00	79.4	1.18	50.0	362.9	0.0
신임온주	0.00	0.17	0.23	0.00	255.2	2.11	81.1	613.5	0.0
실버힐온주	0.00	0.05	0.06	0.00	175.4	1.95	89.6	677.4	0.0
십만온주	0.03	0.13	0.13	0.00	290.6	8.17	123.4	896.1	0.0
암기조생	0.00	0.01	0.02	0.00	74.1	1.04	42.7	322.6	0.0
애원9호	0.00	0.00	0.01	0.00	24.6	0.00	24.3	184.0	0.0
애월조생	0.00	0.02	0.03	0.00	72.0	1.07	108.3	605.9	0.0
애향	0.00	0.01	0.02	0.00	38.2	1.28	62.6	473.1	0.0
약사사	0.01	0.05	0.07	0.00	107.5	1.13	70.4	511.6	0.0
역무조생	0.00	0.01	0.01	0.04	24.2	0.67	29.6	223.8	0.0
영전온주	0.02	0.19	0.25	0.00	50.7	1.00	61.3	342.9	0.0
영조생	0.00	0.01	0.02	0.00	23.2	1.30	33.1	250.7	0.0
우좌미온주	0.01	0.13	0.18	0.03	107.2	1.92	178.6	998.9	0.0
원구조생	0.00	0.02	0.05	0.00	59.6	1.10	59.3	331.7	0.0
유라조생	0.01	0.04	0.07	0.00	105.2	1.92	89.7	678.7	0.0

자원명	Sin	Tan	Nob	Iso	Nar	Eri	Dio	Hes	Nag
유타조생	0.01	0.05	0.09	0.12	208.7	6.71	321.8	1800.1	0.0
이세온주	0.01	0.07	0.09	0.00	222.5	2.06	75.3	546.7	0.0
일남1호	0.01	0.05	0.08	0.00	245.2	2.53	159.1	1203.5	0.0
임온주	0.00	0.01	0.03	0.00	102.0	1.43	70.9	396.7	0.0
입간조생	0.03	0.19	0.35	0.00	83.1	1.34	113.8	636.4	0.0
전구조생	0.01	0.02	0.05	0.00	50.5	0.81	61.2	342.1	0.0
정관조생	0.01	0.03	0.06	0.00	102.5	0.00	54.3	394.8	0.0
좌좌목온주	0.00	0.01	0.01	0.00	59.7	0.58	0.0	0.0	0.0
준하홍온주	0.01	0.05	0.09	0.06	92.2	1.14	92.4	698.5	0.0
지환조생	0.01	0.07	0.14	0.13	0.0	2.32	179.5	1004.3	49.5
천전온주	0.03	0.41	0.45	0.08	166.6	2.98	173.9	973.0	0.0
청강조생	0.02	0.09	0.12	0.00	75.1	1.80	134.9	754.8	0.0
청도온주	0.01	0.02	0.04	0.00	30.3	1.12	43.8	331.6	0.0
청수4호	0.04	0.20	0.42	0.00	237.0	2.58	116.8	848.1	0.0
추광조생	0.01	0.01	0.03	0.00	119.8	1.63	37.4	271.4	0.0
충촌온주	0.02	0.05	0.10	0.00	136.8	1.24	80.6	585.4	0.0
탐나조생	0.01	0.04	0.10	0.35	92.6	1.07	60.8	460.2	0.0
팔정궁천	0.00	0.02	0.03	0.03	34.3	1.40	64.9	363.1	0.0
편산	0.03	0.14	0.25	0.00	164.9	4.12	124.4	903.3	0.0
평전	0.01	0.13	0.14	0.00	130.9	1.62	96.1	698.4	0.0
풍복조생	0.01	0.06	0.15	0.19	198.7	2.13	118.7	897.9	0.0
하파홍	0.02	0.04	0.07	0.04	48.9	1.34	41.4	313.3	0.0
향문감	0.04	0.07	0.17	0.00	160.8	1.60	74.3	539.5	0.0
향산온주	0.01	0.07	0.07	0.12	183.6	3.10	73.8	558.4	0.0
홍색굴	0.01	0.05	0.08	0.09	54.7	1.57	47.3	343.8	0.0
홍진조생	0.06	0.04	0.16	0.00	64.2	2.01	105.9	592.3	0.0
히나노히메	0.01	0.04	0.09	0.09	310.6	3.74	109.0	824.1	0.0
히노사야카	0.01	0.01	0.02	0.08	69.8	1.39	68.1	514.7	0.0
히노아께보노	0.01	0.06	0.12	0.00	118.3	1.56	45.1	327.3	0.0
히노아카리	0.01	0.04	0.07	1.09	141.5	2.29	152.6	853.5	0.0
히로시마7호	0.00	0.01	0.01	0.00	74.3	0.00	34.7	262.6	0.0
평균	0.01	0.08	0.13	0.05	109.40	1.94	79.59	534.61	0.69

# Flavonoid : Sin(시센세틴), Tan(탄제레틴), Nob(노빌레틴), Iso(이소로이폴린), Nar(나리루틴), Eri(에리오시트린), Dio(디오스민), Hes(헤스페리딘), Dim(디오스메틴),

플라보노이드 조성 및 함량을 기초로 R 프로그램을 이용 Ward2 방식으로 계층적 군집 분석을 실시하여 덴드로그램을 작성한 결과, 조사한 107 품종을 3 그룹으로 집단화 할 수 있었다(그림 2-3). 9개 플라보노이드가 모두 낮은 그룹 A에 대부분 자원들이 분포하였고, 나머지 그룹 B중 B1은 9개의 플라보노이드가 중간 정도, B2 그룹은 플라보노이드가 가장 많은 특성이 있었다. 착색개시기와 마찬가지로 온주밀감의 숙기와 관련된 분류인 극조생,

조생, 보통은주밀감은 A, B 그룹에 모두 분포하였고, 돌연변이 또는 주심배에 의한 온주밀감 품종이 가계도와도 상관관계가 없는 것으로 나타났다(표2-7).



그림 2-3. 온주밀감 수확기 과즙 중 플라보노이드 조성 및 함량에 따른 군집분석

표 2-7. 군집분석에 따른 그룹별 플라보노이드의 조성 및 함량

Group	Sin	Tan	Nob	Iso	Nar	Eri	Dio	Hes	Dim	
A	0.01b	0.04b	0.07b	0.03b	73.7b	1.10b	54.1c	372.8c	0.3a	
B	B1	0.01b	0.08b	0.13b	0.04b	187.7a	3.84a	110.8b	788.0b	0.0a
	B2	0.04a	0.26a	0.40a	0.20a	168.3a	3.45a	160.3a	971.0a	3.3a

# Flavonoid : 표2-6 참조, <sup>z</sup> DMRT p=0.05.

#### 다) 만감류

과피가 80% 착색되는 시기에 온주밀감을 제외한 감귤 유전자원(이하 만감류)에 대해 과즙의 플라보노이드 조성 및 함량을 분석하였다. 총 76자원에 대해 분석을 실시한 결과, 수확기 온주밀감 9종보다 네오헤스페리딘, 네오에리오시트린, 아피제닌 등 3종이 더 많은 12종의 분석되었다. 나린진은 레몬, 스위트오렌지, 탄젤로에서, 네오헤스페리딘과 네오에리오시트린은 레몬, 스위트오렌지, 탄골, 탄젤로에서 분석되지 않았으며, 아피제닌은 스위트오렌지에서 미량 검출되었다. 총 플라보노이드 함량은 그레이프프루트류가 가장 높고, 다음으로 스위트오렌지류가 높았으며 과폐다, 사우어오렌지, 문단류는 낮게 나타났다. 그레이프프루트는 특히 나리루틴 함량이 매우 높았고 헤스페리딘 함량은 상대적으로 적었으며, 레몬은 에리오시트린 함량이 특이적으로 높은 특성이 있고 만다린은 디오스민과 헤스페리딘 함량이 높은 경향이었고, 문단은 나리루틴과 네오헤스페리딘 함량이 다소 높았으며, 사우어오렌지는 네오에리오시트린 함량이 특이적으로 높았다. Nogata 등(2006)이 분석결과에서도 그레이프프루트인 경우 나린진 함량이 매우 높았고, 레몬과 라임에는 에리오시트린이 특이적으로 높았으며, 사우어오렌지는 네오에리오시트린이 높게 나타났는데 본 시험이 결과와 비슷하였다. 또한 같은 세분류에서도 품종에 따라 조성 및 함량에 많은 차이를 보였다. Peterson 등(2006)도 사우어오렌지는 특이적으로 나린진, 네오에리오시트린 함량이 높다고 하였다. 스위트오렌지는 헤스페리딘 함량이 높았으나 나린진과 네오헤스페리딘은 분석되지 않았으나 아피제닌의 특이적으로 소량 검출되어 Nogata 등(2006)이 결과와 유사한 경향이 있었다. 과폐다는 전반적으로 함량이 낮게 나타났고, 나린진, 네오헤스페리딘, 네오에리오시트린 등이 분석되지 않았다.



표 2-8. 만감류 세분류별 플라보노이드 조성 및 함량

세분류	자원수	Sin	Tan	Nob	Iso	Nar	Eri	Dio	Hes	Nag	Neh	Nee	Api	Total
그레이프프루트	3	0.07	0.47	0.70	1.15	235.8	0.5	15.8	91.9	1136.2	41.8	2.18	0.00	1526.59
레몬	1	0.04	0.44	0.75	0.66	1.5	130.5	60.8	340.1	0.0	0.0	0.00	0.00	534.70
만다린	14	0.45	2.58	4.06	0.92	41.3	10.5	143.1	851.1	10.8	8.3	0.15	0.00	1073.36
문단	8	0.09	0.54	0.89	0.51	119.2	4.1	12.8	76.5	174.2	34.8	5.68	0.00	429.29
사우어오렌지	8	0.03	0.46	0.38	0.18	54.6	0.7	16.9	110.5	176.6	35.7	39.98	0.00	436.04
스위트오렌지	10	2.04	0.71	3.17	0.10	94.9	3.3	161.1	989.8	0.0	0.0	0.14	0.02	1255.30
파페다	9	0.10	0.14	0.29	0.01	73.5	4.7	29.9	198.8	38.5	20.5	1.93	0.00	368.38
탄콜	20	0.17	0.27	0.59	0.86	92.5	2.4	114.0	743.7	0.3	0.0	0.00	0.00	954.81
탄젤로	3	0.08	0.61	0.78	0.13	74.6	2.0	81.1	601.0	0.0	0.0	0.00	0.00	760.34

# Flavonoid : Sin(시넨세틴), Tan(탄제레틴), Nob(노빌레틴), Iso(이소로이폴린), Nar(나리루틴), Eri(에리오시트린), Dio(디오스민), Hes(헤스페리딘), Nag(나린진), Neh(네오헤스페리딘), Nee(네오에리오시트린), Api(아피제닌)

자원별 총 플라보노이드 함량은 만다린류인 조향에서 가장 높았고, 스위트오렌지인 상귀넬리, 그레이프프루트류인 그레이프프루트, 스위트오렌지류인 삼전네블, 만다린인 기주밀감, 탄콜류인 미호콜에서 다른 자원에 비해 매우 높았다. 그레이프프루트가 나린진 함량이 특이하게 높은 것을 제외하면 다른 자원들은 헤스페리딘 함량이 높은 특징을 나타냈다. 스위트오렌지 중 발렌시아오렌지에 속하는 발렌시아레이트는 감귤류 특이 polymethoxylated flavones인 시넨세틴이, 만다린류인 흥춘병감은 노빌레틴과 탄제레틴 함량이 높게 나타났다. 기주밀감은 이소로이폴린 함량은 특이적으로 높았고, 미호콜은 나리루틴 함량이 가장 높았다. 후로스트유레카 레몬은 에리오시트린 함량이, 상귀넬리와 삼전네블은 디오스민 함량이, 제주 재래귤 당유자는 네오헤스페리딘이, 좌등과 지각에는 네오에리오시트린이 다른 품종에 비해 특이적으로 높은 특성을 나타냈다.

표 2-9. 만감류 자원별 플라보노이드 조성 및 함량

자원명	Sin	Tan	Nob	Iso	Nar	Eri	Dio	Hes	Nag	Neh	Nee	Api
폴든스페살	0.04	0.17	0.20	0.00	23.9	0.8	30.1	168.1	111.5	94.3	5.0	0.00
그레이프프루트	0.11	1.02	1.50	3.46	387.4	0.8	10.9	60.9	2553.6	15.5	1.5	0.00
피스타루비	0.08	0.22	0.39	0.00	296.1	0.0	6.4	46.8	743.4	15.5	0.0	0.00
후로스트유레카	0.04	0.44	0.75	0.66	1.5	130.5	60.8	340.1	0.0	0.0	0.0	0.00
감자	0.02	0.24	0.24	0.00	23.8	7.0	14.1	106.6	0.0	0.0	0.0	0.00
기주밀감	0.31	1.68	4.01	11.50	87.2	1.9	425.0	2377.3	0.0	0.0	0.0	0.00
길전병감	0.15	0.88	1.64	0.07	19.5	2.4	150.1	1090.5	0.0	0.0	0.0	0.00
노바	0.11	0.12	0.25	0.00	14.2	0.9	76.6	428.5	0.0	0.0	0.0	0.00
동정귤	0.87	0.19	1.06	0.00	56.4	0.8	44.8	325.4	0.0	0.0	0.0	0.00
병감	0.49	5.46	7.58	0.21	55.8	2.8	265.5	1485.2	0.0	0.0	0.0	0.00
병귤	0.99	11.61	15.27	0.41	104.8	78.7	117.4	656.8	0.0	0.0	0.0	0.00
빈귤	0.03	0.08	0.40	0.28	12.2	0.6	82.6	461.9	0.0	54.6	0.0	0.00
올란도	0.14	0.51	0.76	0.00	39.6	0.6	162.2	907.6	0.0	0.0	0.0	0.00
인창귤	0.28	1.29	2.74	0.00	63.1	45.4	26.9	195.3	0.0	0.0	0.0	0.00

자원명	Sin	Tan	Nob	Iso	Nar	Eri	Dio	Hes	Nag	Neh	Nee	Api
중야3호병감	0.22	1.38	1.79	0.16	32.2	1.6	224.9	1258.0	0.0	0.0	0.0	0.00
페이지	0.67	0.23	0.56	0.24	32.4	3.8	228.4	1277.5	0.0	0.0	0.0	0.00
편굴	0.09	0.73	1.04	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0	151.4	61.8	2.1	0.00
홍춘병감	1.88	11.70	19.46	0.00	37.0	1.0	185.2	1345.3	0.0	0.0	0.0	0.00
당유자	0.22	2.52	3.78	0.00	78.3	16.0	0.0	0.0	201.4	154.4	35.2	0.00
마두문단	0.03	0.07	0.07	0.00	0.0	0.0	1.6	11.6	638.7	3.6	5.6	0.00
사두감	0.04	0.22	0.52	0.00	140.5	7.6	1.7	9.8	0.0	0.0	0.0	0.00
수유	0.01	0.09	0.12	0.43	123.8	0.0	1.7	12.6	186.2	0.0	0.0	0.00
일향하	0.02	0.08	0.20	0.16	45.1	0.7	53.3	298.1	0.0	0.0	0.0	0.00
중국황화	0.34	1.03	2.15	3.45	396.9	6.4	3.6	27.4	0.0	0.0	0.0	0.00
팔삭	0.06	0.10	0.15	0.00	88.7	0.7	15.6	113.5	139.7	41.0	1.3	0.00
홍팔삭	0.01	0.17	0.14	0.00	80.4	1.1	24.9	139.2	227.5	79.1	3.3	0.00
감하굴	0.04	0.91	0.61	0.00	42.1	0.0	5.7	43.4	162.1	26.1	0.0	0.00
선홀트	0.01	0.22	0.21	0.00	17.4	5.3	11.0	61.5	85.9	55.2	31.2	0.00
신감하	0.00	0.31	0.22	0.00	176.9	0.0	11.2	84.9	0.0	0.0	0.0	0.00
입화오렌지	0.02	0.26	0.20	1.46	77.8	0.0	12.0	86.9	189.4	29.5	0.0	0.00
좌등	0.12	0.49	0.69	0.00	0.0	0.0	20.6	155.6	270.1	93.1	148.7	0.00
지각	0.01	0.15	0.29	0.00	0.0	0.0	41.3	231.3	203.7	0.0	138.2	0.00
하굴	0.00	0.80	0.53	0.00	57.3	0.0	16.7	93.3	340.1	41.3	1.7	0.00
황금하굴	0.02	0.54	0.26	0.00	65.6	0.0	16.8	127.4	161.4	40.5	0.0	0.00
길전네블	2.19	0.51	2.91	0.00	65.8	1.8	63.7	462.7	0.0	0.0	0.0	0.00
대삼도네블	0.29	0.21	0.67	0.24	50.3	3.8	111.3	622.7	0.0	0.0	0.0	0.00
발렌시아레이트	4.75	1.64	6.59	0.01	30.5	0.6	106.4	595.4	0.0	0.0	0.0	0.00
백유네블	0.90	0.14	0.99	0.08	85.4	1.2	69.2	503.0	0.0	0.0	1.4	0.17
복일네블	1.65	0.28	1.97	0.00	93.5	2.8	88.1	640.2	0.0	0.0	0.0	0.00
삼전네블	0.98	0.59	1.98	0.18	160.7	10.9	420.8	2354.0	0.0	0.0	0.0	0.00
상귀넬리	2.82	0.79	4.59	0.37	178.9	5.1	440.4	2463.9	0.0	0.0	0.0	0.00
영목네블	4.30	1.58	7.41	0.00	167.1	3.8	139.2	1011.4	0.0	0.0	0.0	0.00
청가네블	1.13	0.57	2.41	0.08	80.9	1.9	66.7	484.2	0.0	0.0	0.0	0.00
타로코	1.41	0.73	2.20	0.00	36.3	0.9	104.8	760.9	0.0	0.0	0.0	0.00
다전금	0.01	0.02	0.05	0.00	27.0	0.0	18.5	103.7	15.7	9.6	0.0	0.00
대본취등	0.05	0.41	0.53	0.00	26.2	0.0	21.3	154.8	26.2	15.7	6.0	0.00
산굴	0.04	0.03	0.11	0.00	52.8	27.3	16.6	125.4	31.1	17.9	5.0	0.00
소유자	0.34	0.13	0.55	0.00	125.6	0.5	37.7	273.8	60.7	33.1	1.9	0.00
스타치	0.00	0.03	0.03	0.00	15.4	11.0	13.1	73.5	14.9	9.2	0.0	0.00
목두유자	0.07	0.16	0.50	0.09	108.0	2.2	43.8	331.1	59.3	30.9	0.0	0.00
산근유자	0.00	0.01	0.01	0.00	30.0	0.0	17.1	95.4	15.1	8.6	0.0	0.00
재래유자	0.35	0.17	0.54	0.00	122.3	1.2	40.4	293.1	65.1	37.1	2.1	0.00
카보스	0.02	0.27	0.27	0.00	154.5	0.5	60.5	338.4	58.2	22.3	2.4	0.00
56-423	0.07	0.25	0.50	2.81	52.4	2.4	153.4	1160.5	0.0	0.0	0.0	0.00
S-1129	0.02	0.10	0.15	0.42	19.6	0.6	20.9	116.9	0.0	0.0	0.0	0.00
대곡이예감	0.01	0.05	0.07	0.00	72.9	3.8	53.9	391.2	0.0	0.0	0.0	0.00
미호콜	0.13	0.45	1.12	0.87	406.4	3.5	373.9	2091.6	0.0	0.0	0.0	0.00
부지화	0.31	0.12	0.25	0.71	102.7	1.1	40.7	295.8	0.0	0.0	0.0	0.00
사토노가오리	0.20	0.03	0.05	0.85	24.7	0.6	38.0	287.2	0.0	0.0	0.0	0.00
세토카	0.36	0.04	0.29	0.13	64.7	2.3	6.9	50.3	6.8	0.0	0.0	0.00
엘렌데일	0.07	0.47	0.53	0.10	80.3	1.4	143.0	799.7	0.0	0.0	0.0	0.00
궁내이예감	0.05	0.19	0.37	0.00	83.3	1.7	65.5	475.6	0.0	0.0	0.0	0.00
유명	0.13	0.15	0.25	0.21	120.8	1.5	98.5	745.0	0.0	0.0	0.0	0.00

자원명	Sin	Tan	Nob	Iso	Nar	Eri	Dio	Hes	Nag	Neh	Nee	Api
조향	0.17	1.10	2.11	6.96	299.3	4.6	350.1	2647.8	0.0	0.0	0.0	0.00
주건	0.08	0.11	0.67	0.44	45.9	2.9	115.2	644.6	0.0	0.0	0.0	0.00
진지향	0.12	0.30	1.34	0.00	122.3	9.6	101.8	739.4	0.0	0.0	0.0	0.00
청건	0.28	0.12	0.31	0.00	76.2	2.7	76.3	577.2	0.0	0.0	0.0	0.00
청봉	0.59	0.57	1.16	0.32	54.0	1.1	64.6	469.3	0.0	0.0	0.0	0.00
탐도1호	0.19	0.07	0.09	0.19	45.8	0.9	197.1	1102.7	0.0	0.0	0.0	0.00
하레히메	0.02	0.47	0.52	0.05	44.8	0.5	87.6	490.2	0.0	0.0	0.0	0.00
하루미	0.24	0.30	0.81	0.00	44.8	1.5	52.4	380.6	0.0	0.0	0.0	0.00
홍진46호	0.17	0.16	0.31	0.00	33.8	2.4	42.2	306.6	0.0	0.0	0.0	0.06
히레야카	0.13	0.40	0.91	3.12	55.6	2.1	197.1	1102.6	0.0	0.0	0.0	0.00
미네오라	0.07	0.22	0.47	0.00	32.5	1.1	86.9	630.9	0.0	0.0	0.0	0.00
세미늘	0.08	1.41	1.55	0.39	75.4	1.8	116.0	877.2	0.0	0.0	0.0	0.00
스위트스프링	0.08	0.21	0.31	0.00	116.0	3.3	40.6	294.7	0.0	0.0	0.0	0.00

# Flavonoid : 표2-8 참조

플라보노이드 조성 및 함량을 기초로 계층적 군집분석을 실시하여 덴드로그램을 작성한 결과, 조사한 76 품종을 3 그룹으로 집단화 할 수 있었다(그림2-4). 네오헤스페리딘을 제외한 모든 검출된 플라보노이드 함량이 높은 그룹 A와 나머지는 그룹 B군로 구분할 수 있었다. 그룹 B는 그룹 B중 네오헤스페리딘이 높은 B1과 헤스페리딘의 높은 B2로 구분할 수 있었다. 그룹 A에는 그레이프프루트류, 레몬, 스위트오렌지가 많이 분포하였고, B1 그룹에는 파페다, 사우어오렌지가, B2 그룹에는 탄골, 만다린이 주로 분포하는 경향이었으나 감귤 세분류와 온전하게 일치하지는 않은 결과를 보였다(표2-10). Nogata 등(2006)은 플라보노이드 분석결과를 이용하여 군집분석을 실시하였을 때 일부 품종을 제외하고 다나카의 감귤 분류시스템과 대체적으로 일치하였다고 하였는데 본 연구결과에서는 플라보노이드 분석결과만으로는 감귤의 분류에 이용하기는 다소 어려울 것으로 판단되었다.

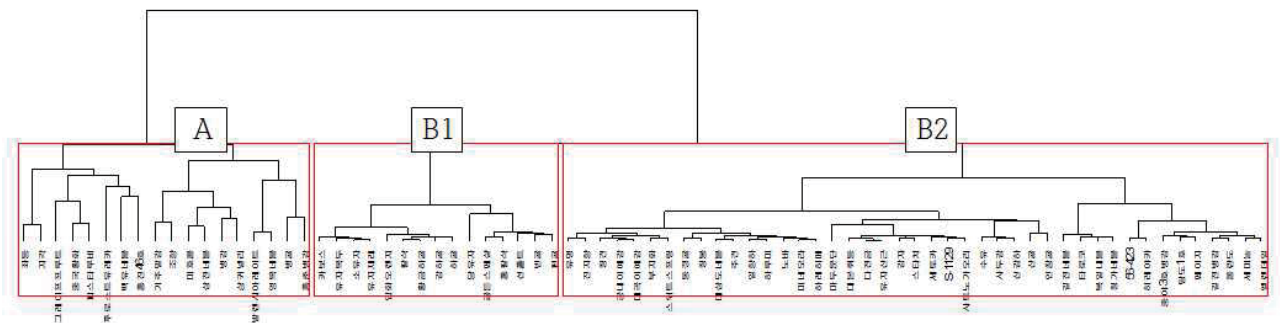


그림 2-4. 만감류 과즙 중 플라보노이드 조성 및 함량에 따른 군집분석

표 2-10. 군집분석에 따른 그룹별 플라보노이드의 조성 및 함량

자원명	Sin	Tan	Nob	Iso	Nar	Eri	Dio	Hes	Nag	Neh	Nee	Api	
A	1.03 a	2.24 a	4.29 a	1.56 a	151.6 a	14.12a	171.1a	1038.9 a	209.5ns	6.9 b	16.1a	0.01 a	
B	B1	0.09 b	0.48 b	0.62 b	0.12 b	70.3 b	1.93b	26.5 b	168.8 b	134.2	53.4a	5.7 ab	0.00 b
	B2	0.29 b	0.33 b	0.74 b	0.26 b	60.0 b	3.79 ab	76.2 b	492.1 b	21.7	1.5 b	0.4 b	0.00 b

# Flavonoid : 표2-9 참조, <sup>Z</sup> DMRT p=0.05.

## 2. 카로티노이드

### 가) 온주밀감

제주특별자치도농업기술원에 보존 중인 온주밀감 유전자원에 대하여 108점에 대하여 수확기 과즙의 비타민의 전구물질인  $\beta$ -carotene과 피부암, 대장암에 억제 효과가 크다고 알려진  $\beta$ -크립토크산틴을 분석하였다.  $\beta$ -carotene 함량은 1.52~55.72 ug/100ml 범위였으며 평균은 19.87 ug/100ml이었다.  $\beta$ -carotene 함량이 가장 높은 품종은 온주밀감 계통인 대엽계가 가장 높고, 남감4호, 부사견온주, 성전온주 품종이 뒤를 이었으며 가장 작은 품종은 대진5호와 대진4호였다.  $\beta$ -크립토크산틴 함량은 0.33~12.80 ug/100ml 범위였으며 평균은 6.4 ug/100ml 이었다. 충촌온주와 편산 품종에서 가장 높고 홍색굴에서 가장 낮았다(표 2-11). 황과 윤(1995)은 온주밀감 과즙의 총 카로티노이드 함량은 0.82~10.64 mg/100g 이며 이중  $\beta$ -크립토크산틴의 20%,  $\beta$ -카로틴이 1% 정도를 차지한다고 하였는데 본 연구에서  $\beta$ -카로틴함량이 더 높고, 두 성분 모두 함량이 낮게 분석되어 졌다.  $\beta$ -크립토크산틴이 많은 상위 10개 품종 중에 국내에서 육성한 하례조생이 포함되어 있어 금후 재배확대를 위한 귀중한 자료로 삼을 만 하였다.

표 2-11. 만감류 자원별 플라보노이드 조성 및 함량

자원명	$\beta$ -카로틴	$\beta$ -크립토크산틴	자원명	$\beta$ -카로틴	$\beta$ -크립토크산틴
S-1080	15.82	7.28	송산조생	22.40	8.01
S-1094	29.84	6.24	수태랑온주	19.92	4.65
강분조생	17.60	7.33	시문조생	30.40	5.65
고립조생	17.92	5.86	신미택온주	13.36	8.52
곡천온주	29.76	7.21	신십만온주	28.64	3.72
히로시마7호	20.32	6.72	신익조생	16.56	7.36
교분조생	18.88	7.32	신임온주	13.21	8.58
구능온주	10.88	8.34	실버힐온주	25.92	4.29
구하조생	20.08	7.26	십만온주	31.44	4.62
궁분조생1	11.62	6.70	안전조생	26.48	8.06
궁분조생2	16.96	6.46	암기조생	19.76	7.02
궁천조생	3.22	0.46	애원9호	21.60	8.05
금전조생	14.96	9.39	애월조생	14.14	6.17
금촌온주	28.40	6.14	애향	13.49	5.79
기구보조생	13.32	6.93	약사사	32.56	5.51
기주규온주	24.80	6.38	역무조생	15.92	5.02
남감20호	21.52	6.56	영전온주	19.44	6.54
남감4호	36.88	2.70	영조생	21.76	6.30
남분조생	22.16	9.22	우좌미온주	31.60	5.38
남원698	10.44	4.31	원구조생	18.88	7.84
뇌호온주	22.80	6.76	유라조생	26.96	7.76
다원조생	25.12	7.02	유택조생	13.02	8.61

자원명	$\beta$ -카로틴	$\beta$ -크립토크산틴	자원명	$\beta$ -카로틴	$\beta$ -크립토크산틴
당협조생	17.12	7.67	이세온주	17.52	5.58
대곡계림	22.00	7.44	일남1호	16.88	7.77
대엽계	52.72	5.54	임온주	13.54	4.87
대진4호	1.72	2.18	입간조생	24.48	8.01
대진5호	1.52	1.04	전구조생	11.38	5.30
대포조생	16.40	5.75	정관조생	20.40	8.14
덕삼조생	12.02	2.42	좌좌목온주	17.28	7.10
도엽조생	22.72	6.86	준하홍온주	24.96	4.53
모택온주	22.48	4.86	지환조생	30.56	8.82
미택온주	18.48	8.86	천전온주	22.08	5.78
백천온주	23.68	4.07	청강조생	31.60	4.89
번전온주	11.73	6.75	청도온주	26.72	5.33
부사건온주	35.12	6.30	청수4호	16.03	7.75
부사조생	23.84	7.59	추광조생	15.32	7.36
북구조생	23.84	7.20	충촌온주	18.00	12.80
비후조생	11.33	7.80	키노쿠니온주	16.56	5.27
사세보온주	16.48	4.58	탐나조생	22.64	6.46
산천조생	16.24	6.01	팔정궁천	24.40	7.58
산하홍조생	6.35	2.29	편산	15.62	12.18
삼다조생	19.44	7.93	평진	22.00	3.94
삼보조생	22.80	6.98	풍복조생	19.84	8.57
삼산온주	17.28	9.65	하례조생	30.96	9.58
삼조생	18.48	8.74	하파홍온주	15.72	5.36
상도조생	15.10	6.54	향문감	5.70	1.63
상야조생	12.78	6.57	향산온주	26.08	4.53
상전온주	26.16	7.65	홍색굴	3.06	0.33
석지	23.44	4.48	홍진조생	14.50	8.25
석천조생	29.44	7.32	히나노히메	5.25	3.54
석충조생	19.04	6.75	히노사야카	13.55	5.29
선온주	18.64	7.86	히노아스카	13.50	5.75
선창등온주	23.76	6.33	히노아카리	27.92	8.70
성전온주	34.16	5.08	히노아케보노	14.68	0.42

카로티노이드 조성 및 함량을 기초로 계층적 군집분석을 실시하여 덴드로그램을 작성한 결과, 조사한 온주밀감 108자원을 3 그룹으로 집단화 할 수 있었다(그림 2-5). 그룹 A는  $\beta$ -카로틴함량이 가장 높고,  $\beta$ -크립토크산틴 함량도 높은 자원들이 집단이었으며, 그룹 B는  $\beta$ -카로틴과  $\beta$ -크립토크산틴 함량이 모두 적은 자원들이 속해 있었으며 마지막 C 그룹은  $\beta$ -크립토크산틴이 매우 높고  $\beta$ -카로틴 함량도 비교적 높은 자원들이 포함되어 있었다(표 2-12). 플라보노이드에서와 같이 카로티노이드 분석에서도 카로티노이드 조성 및 함량과 온주밀감 숙기와는 관계가 없었다.

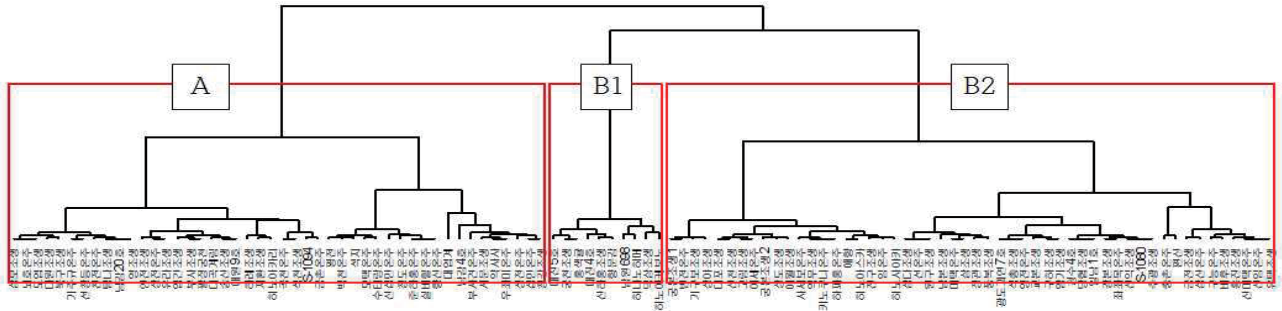


그림 2-5. 온주밀감 과즙 중 카로티노이드 조성 및 함량에 따른 군집분석

표 2-12. 군집분석에 따른 그룹별 카로티노이드의 조성 및 함량

그룹	$\beta$ -카로틴	$\beta$ -크립토크산틴
A	26.9 a	6.2 b
B	6.4 c	1.9 c
C	16.2 b	7.3 a

<sup>Z</sup> DMRT p=0.05.

#### 나. 만감류

만감류 87자원에 대하여 80% 착색시기에 과즙 중  $\beta$ -카로틴과  $\beta$ -크립토크산틴의 함량을 분석하였다.  $\beta$ -카로틴은 만다린, 그레이프프루트, 탄젤로에서 많이 나타났고, 다른 감귤류 레몬, 문단, 사우어오렌지, 스위트오렌지, 파페다와는 함량이 차이가 있었다.  $\beta$ -크립토크산틴은 탄귤류, 탄젤로, 만다린 순으로 높았으며, 그레이프프루트와 문단이 가장 적었다(표 2-13). 온주밀감은  $\beta$ -크립토크산틴 함량 평균이 6.4 ug/100ml 이어서 다른 감귤류에 비해 피부암, 대장암에 억제 효과가 크다고 알려진  $\beta$ -베타크립토크산틴 함량이 높게 나타났다.

표 2-13. 만감류 자원별 카로티노이드 조성 및 함량

세구분	자원수	$\beta$ -카로틴	$\beta$ -크립토크산틴
그레이프프루트	3	21.1	0.2
레몬	2	2.1	1.2
만다린	22	22.9	2.7
문단	8	3.2	0.3
사우어오렌지	9	6.1	1.5
스위트오렌지	11	6.4	1.3
탄귤	18	14.4	3.1
탄젤로	6	20.9	2.7
파페다	8	5.3	1.4

자원별로 살펴보면  $\beta$ -크산틴 함량은 0.8-49.7 ug/100ml 범위였으며 평균은 13.2 ug/100ml 였고, 만다린류인 조향과 미하야, 그레이프프루트류인 스타루비가 가장 높았으며, 문단류인 중국황화와 파페다인 산근유자, 다전금 등이 가장 낮게 나타났다.  $\beta$ -크립토크산틴의 함량은 0.0~9.3 ug/100ml 범위였으며, 제주 재래귤인 동정귤, 스위트오렌지류인 백유네블 등이 높았으며, 문단류와 그레이프프루트류는 매우 적었다(표2-14).

표 2-14. 만감류 자원별 플라보노이드 조성 및 함량

세구분	품종명	β-카로틴	β크립토크산틴	세구분	품종명	β-카로틴	β크립토크산틴
그рей프 프루트	골든스페살	2.8	0.3	사우어 오렌지	하귤	2.5	0.3
	그рей프프루트	13.2	0.1		황금하귤	16.3	2.5
	스타루비	47.4	0.2		길전네블	3.34	0.33
레몬	알렌레몬	1.8	1.1	스위트 오렌지	대삼도네블	3.62	0.29
	후로스트유레카	2.3	1.4		발렌시아레이트	7.03	0.34
만다린	감자	3.4	0.2		백유네블	18.00	8.71
	기주밀감	33.7	2.4		복일네블	2.13	1.30
	길전병감	23.9	2.3		삼전네블	5.47	0.46
	노바	16.4	1.6		상귀넬리	9.05	0.69
	동정귤	18.7	9.3		영목네블	3.74	0.34
	미하야	45.4	4.5		워싱턴네블	4.84	0.62
	미호콜	34.8	3.8		청가네블	3.14	0.43
	병감(무종자)	35.1	4.7		타로코	9.86	0.71
	병귤	27.0	0.4		56-423	35.52	1.71
	빈귤	31.6	1.0		S-1129	6.55	2.32
	올란도	8.2	0.7		궁내이예감	23.52	6.66
	입화오렌지	17.9	6.7		대곡이예감	2.19	0.35
	조향	49.7	2.2		부지화	14.52	1.31
	중야3호병감	31.9	3.3	세토카	6.94	3.11	
	진귤	27.9	0.7	유명	17.20	6.95	
	페이지	11.7	1.5	진지향	5.21	2.14	
	편귤	9.6	0.4	천초	1.74	2.33	
	피나소데아	12.4	1.6	청건	6.05	1.05	
	하레야카	21.0	2.6	청봉	19.68	2.74	
	훼어차일드	11.2	2.3	탐도1호	27.52	0.42	
홍춘병감	19.2	6.3	하레히메	22.56	3.41		
인창귤	13.2	0.6	하루미	15.72	8.10		
문단	당유자	4.3	0.6	탄젤로	홍진46	8.62	1.35
	마두문단	3.0	0.0		남향	21.60	4.03
	문단	3.7	0.1		리	26.00	2.72
	사두감	3.2	0.6		미네오라	12.95	1.22
	수유	4.8	0.1		사토노카오리	17.28	2.09
	팔삭	2.6	0.3		세미놀	34.96	5.62
	홍팔삭	3.4	0.3		스위트스프링	11.39	0.39
	중국황화	0.8	0.1		타마미	22.96	4.21
사우어 오렌지	감하귤	3.1	0.6	파페다	다전금	1.45	0.63
	삼보감	3.9	0.3		대본취등	5.26	1.76
	선홀트	1.6	0.3		산귤	2.99	0.46
	신감하	2.6	0.4		소유자	1.92	1.35
	좌등	2.0	2.0		스다치	1.53	1.11
	지각	21.0	5.7		목두유자	2.26	1.23
	카보스	1.6	1.0		산근유자	1.16	0.65
					재래유자	25.52	4.11





2003). 최근 감귤병에 대한 전세계적으로 최대의 관심사는 황룡병, 역병, 궤양병 등이며 국내에서는 검은점무늬병, 더뎡이병, 잿빛곰팡이병, 궤양병 등이 관심 대상 질병이다.

궤양병은 세균성 질병으로 병원균은 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 이며, 동남아시아에서 기원하여 전 세계로 전파되었다. 제주에서 주로 재배되고 있는 온주밀감은 비교적 내성이 있어 약제 방제가 가능하지만 최근 늘어가는 만감류인 경우에는 문제가 될 수 있으며 세계적으로는 궤양병에 취약한 스위트오렌지나 레몬을 재배하는 지역에서는 큰 문제로 대두되고 있다. 더뎡이병은 *Elsinoe fawcettii*가 일으키는 곰팡이성 병균으로 제주에서 주로 재배되는 온주밀감은 더뎡이병에 가장 취약하여 발병이 많고 부지화, 청견 진지향 등은 더뎡이병에 면역성이 있다. 검은점무늬병은 *Diaporthe citri*가 일으키는 곰팡이성 질병으로 제주지역 감귤원에 가장 많은 피해를 주는 병해로서 전체 농약살포의 절반이상을 차지하는 병해이다(김 등, 2003).

감귤에서 병에 대한 저항성에 관해서는 재래감귤은 검은점무늬병에 강하였으며, 진귤을 제외한 11종은 더뎡이병에 저항성이 있었고, 궤양병에는 감자, 병귤, 청귤, 빈귤, 홍귤 등이 저항성이 있다고 보고한 바 있다(김, 1988). Matsumoto 등(2003)은 서지향이 더뎡이병에 저항성이 있다고 하였고, Souza 등(2011)은 *C. deliciosa*, *C. tangerina*, *C. nobilis* 등은 더뎡이병에 저항성이 높고, 프레몬트, 클레멘틴, 머코트, 러프레몬, 올란도, 타히티안라임, 랑퍼라임 등은 저항성이 낮으며, 스위트오렌지, 문단, 그레이프프루트는 더뎡이병에 면역이 있는 것으로 보고 하였다.

감귤에서 궤양병 저항성을 조사하기 위해서 바늘을 이용한 상처 접종으로 병반의 크기, 조직내 병원균의 성장을 비교하거나(Koizumi와 Kuhara, 1980), 스프레이를 이용한 무상처 접종법(Graham 등, 1992)을 이용하여 조사한 결과, 스위트오렌지는 감수성, 온주밀감은 중도 저항성, 유자는 저항성으로 분류한 바 있다. 궤양병 저항성은 또한 잎의 생육단계에 가장 큰 영향을 받는데 잎의 2/3이상 자랐을 때 가장 감수성이라고 보고하였다(Gottwald와 Graham, 1992).

본 연구는 감귤 유전자원에 대한 더뎡이병, 궤양병, 검은점무늬병 이병도를 조사하여 제주 지역에 문제가 되는 병에 대한 저항성을 판단하고 금후 육종자료로 활용코자 수행하였다.

## 나. 재료 및 방법

### 1) 실내검정

#### 가) 더뎡이병

실내 더뎡이병 저항성 검토를 위하여 화분에 정식된 탱자에 유전자원을 접목하여 발생한 새순을 이용하였다. 유전자원의 선택은 감귤의 세분류에 따른 유전자원수 분포를 기반으로 포장에서의 특성이 비슷한 온주밀감에서 시료를 대폭 줄이고, 특성이 다양한 탄골과 탄젤로의 분석 숫자를 확대하여 100점을 선정하여 더뎡이병 분석 시료로 이용하였다. 감귤 더뎡이병 병원성 검정 시스템 확립을 위하여 감귤 잎이 5-6개를 포함하고 있는 감귤 가지

를 채취하여 절단 부분을 1% 차아염소산 나트륨으로 표면 살균한 후, 살균수가 담겨 있는 플라스크에 꽂아 실험에 사용하였다. 감귤 더듬이병균 농도를  $6.3 \times 10^5$  conidia/ml 또는  $6.3 \times 10^4$  conidia/ml 로 조정하여 감귤 잎에 분무 살포하였더니  $6.3 \times 10^5$  conidia/ml 농도로 접종한 잎에서는 병반이 많이 형성되어 더듬이병 저항성 검정 농도로 이용하였다. 더듬이병 저항성 검정은 선발된 농도를 스프레이를 이용하여 감귤 잎에 이슬이 맺힐 정도로 살포하였다. 접종한 감귤 잎은 상대습도 99% 유지되는 dew chamber 에서 28°C에서 감귤 잎에 형성되는 병반의 진행 과정을 관찰하였다. 병 발생 정도는 감귤 더듬이병균 접종 20일 후에 감염된 병반 수를 계수하여 '전체 병반수/조사엽수'로 측정하였다. 온실검정은 2년차에 도입하여 금지품 관리중인 유전자원에 대하여 실내검정 방법을 참고하여 검정을 실시하였다. 다만 온실검정에서는 더듬이병 균총을 잘게 자른 후 원심분리한 상층액을 PDA 배지에서 2일 배양한 배양액에 석영사를 넣은 후 뿔뿔한 솔로 잎의 뒷면에 빗질하듯 하여 다소 상처를 주는 방법을 이용하였다. 조사는 접종 1개월 후에 실시하였다.

#### 나) 궤양병

실내 궤양병 저항성 검토를 위하여 시료는 더듬이병 실내검정과 같은 방법으로 실시하였으며, 온실에서 처리는 온실에 정식된 유전자원에서 발생한 어린 잎에 궤양병 균을 접종하여 조사하였다. 감귤 궤양병 저항성 검정을 위한 적정 처리농도 선별을 위하여 감귤 잎이 5-6개를 포함하고 있는 감귤 가지를 채취하여 절단 부분을 1% 차아염소산 나트륨으로 표면 살균한 후 살균수가 담겨 있는 플라스크에 꽂아 실험에 사용하였다. 감수성 품종을 대상으로 감귤 궤양병균을 농도를  $3.0 \times 10^7$  cfu/ml로 접종한 후 접종 20일 후 형성된 병반 수를 조사한 결과, 병반이 200개 이상 나타나 감귤 궤양병을 저항성 검정 농도로 이용하였다. 선발된 농도를 이용하여 화분에 육묘된 유전자원의 신초에 궤양병균을 처리하여 접종한 감귤 잎은 상대습도 99% 유지되는 dew chamber 에서 25°C에서 감귤 잎에 형성되는 병반의 진행 과정을 관찰하였다. 병 발생 정도는 감귤 궤양병균 접종 20일 후에 감염된 병반 수를 계수하여 '전체 병반수/조사엽수'로 측정하였다. 온실검정은 2년차에 도입하여 금지품 관리중인 유전자원에 대하여 실내검정 방법을 참고하여 검정을 실시하였다. 다만 온실검정에서는 YN배지에서 2일 배양한 배양액에 석영사를 넣은 후 뿔뿔한 솔로 잎의 뒷면에 빗질하듯 하여 다소 상처를 주는 방법을 이용하였다. 조사는 접종 13일 후에 실시하였다.

### 2) 포장이병도 조사

#### 가) 더듬이병

서귀포시 강정동 제주특별자치도농업기술원에 노지 유전자원 포장에 보존 중인 감귤 유전자원에 대하여 2014년, 2015년, 2016년 3회에 걸쳐 더듬이병 발생 양상을 조사하였다. 조사는 농촌진흥청 농업과학기술 연구조사분석기준 감귤 더듬이병 조사기준을 적용하였고 유전자원 주수가 1주가 대부분이어서 조사나무는 각 1주로 1주에서 회전하면서 봄순 12개 이

상씩을 대상으로 발병잎과 조사잎을 세어 발병엽율을 구하고 이를 이용하여 발병도를 산출하였다.

#### 나) 궤양병

서귀포시 강정동 제주특별자치도농업기술원에 노지 유전자원 포장에 보존 중인 감귤 유전자원에 대하여 2013년, 2014년, 2015년 3회에 걸쳐 궤양병 발생 양상을 조사하였다. 조사는 농촌진흥청 농업과학기술 연구조사분석기준 감귤 궤양병 조사기준을 적용하였고 유전자원 주수가 1주가 대부분이어서 조사나무는 각 1주로 1주에서 회전하면서 봄순 12개 이상씩을 대상으로 발병잎과 조사잎을 세어 발병엽율을 구하고 이를 이용하여 발병도를 산출하였다.

#### 다) 검은점무늬병

서귀포시 강정동 제주특별자치도농업기술원에 노지 유전자원 포장에 보존 중인 감귤 유전자원에 대하여 2014년, 2015년, 2016년 3회에 걸쳐 검은점무늬병 발생 양상을 조사하였다. 조사는 농촌진흥청 농업과학기술 연구조사분석기준 감귤 검은점무늬병 조사기준을 적용하였고 유전자원 주수가 1주가 대부분이어서 조사나무는 각 1주로 1주에서 회전하면서 30과 이상씩을 대상으로 조사하여 발병과 조사한 과실수를 세어 발병과율을 구하고 이를 이용하여 발병도를 산출하였다.

### 다. 결과 및 고찰

#### 1) 실내검정

##### 가) 더뎡이병

정밀하고 정확한 내병성 검정을 위해서는 실내 검정이 필요한데 실내 검정을 위해서는 감귤 더뎡이병균 농도를  $6.3 \times 10^5$  conidia/ml와  $6.3 \times 10^4$  conidia/ml 로 조정하여 감귤 잎에 분무 살포한 결과  $6.3 \times 10^5$  conidia/ml 농도로 접종한 잎에서는 병반이 많이 형성되었으며 이 보다 낮은 농도에서는 병반이 뚜렷하게 감소하여  $6.3 \times 10^5$  conidia/ml 농도를 선발하였다(그림 3-1, 3-2).



그림 3-1. 감귤 더뎡이병(*Elsinoe fawcettii*) 접종 20일 후 감수성 감귤 품종 잎.

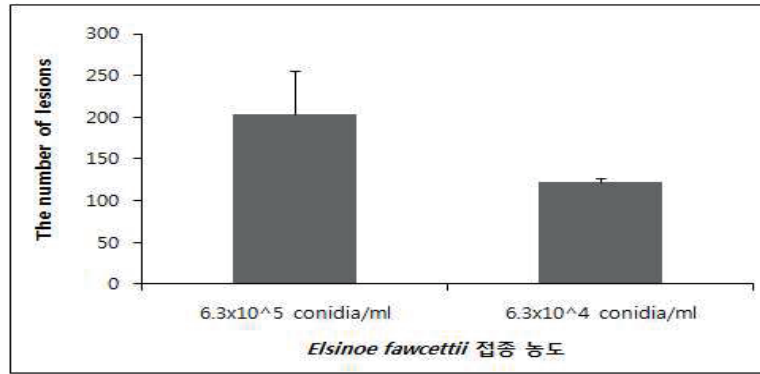


그림 3-2. 더뎡이병균 농도 별 접종 20일 후 감수성 감귤 품종 잎에서의 병반 수.

화분에서 육묘된 유전자원 72점에 대해 더뎡이병 저항성 실내검정을 실시한 결과 79.2% 유전자원이 병반을 나타내지 않았고, 5.5%인 4개 자원은 잎당 병반수가 2개로 다른 유전자원에 비해 감수성이 있었으나 병반수가 잎당 0~2개로 품종별 저항성을 설명하기에는 어려움이 있었다(표 3-1). 현(2000)은 스위트오렌지, 청견, 당유자, 진귤, 사두감, 팔삭, 좌등은 저항성이었으며, 남향, 러프레몬, 감자, 사우어오렌지, 인창귤은 감수성을 보였다고 하였는데 본 조사 결과에서는 팔삭과, 스위트오렌지류 중 청가네블과 풍광네블은 저항성이 있는 것으로 나타났으나 워싱턴네블은 감수성으로 나타났다. 반면 남향과 온주밀감, 인창귤은 더뎡이병에 약하다고 하였는데 온주밀감, 인창귤, 남향은 저항성이 있는 것으로 나타나 차이를 보였다. Matsumoto 등(2003)은 세토카와 마코트가 저항성이 있다고 하였는데 본 시험결과와 일치하였다.

2016년에 격리재배 중인 유전자원을 대상으로 더뎡이병 저항성을 조사한 결과, 2016년 7, 8, 9월 3차례의 접종에서도 전혀 병반이 나타나지 않아 감귤 더뎡이병 저항성을 온실에서 검정하기에는 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 실내 실험과 비교하였을 때 28℃와 습도 90% 이상을 유지하기가 어려운 데 기인한 것으로 판단되었다.

표 3-1. 더뎡이병 실내 검정 결과

병반 수/잎	자원명	유전자원수 (비율%)
0	인창귤, 하루미, 하레히메, 청도온주, 포춘, 홍진조생, 남진해, 청가네블, 다진금, 궁천조생, 성진온주, 진지향, 마코트, 영과금감, 세미놀, 윌로우립, 피나소데아, 탐도1호, 부지화, 부치마루, 삼보감, 사토노가오리, 유라조생, 스위트스프링, 미네올라, 데이지, 미호콜, 리스본레몬, 팔삭, 일향하, 세토미, 암기조생, 감평, 산하홍조생, 일남1호, 타마미, 킹, 56-423, 서던레드, 조향, 노바, 엘렌데일, 기주밀감, 세토카, 황금하귤, 유명, 동정귤, 스윙글시트루멜로, 월킹, 남향, 라임, 레드블러쉬, 발렌시아레이트, 타로코, 풍광네블, 피스타루비	57(79.2)
1	서던레드, 에히메28호, 홍춘병감, 청견, 병귤, 천초, 유자, 대곡이예감, 청봉, S-1144, 지각	11(15.3)
2	워싱턴네블, 주건, 기주밀감, 후로스트유레카	4(5.5)

나) 궤양병

제주도 감귤원에서 분리한 궤양병원균을 이용하여 감수성 품종을 대상으로  $3.0 \times 10^7$  cfu/ml 농도를 살포한 결과, 병반이 200개 이상으로 나타나 유전자원 궤양병 저항성 농도로 선별하였다(그림 3-3). 선별한 농도로 궤양병원균을 현탁하여 스프레이를 이용하여 포트육묘 중인 유전자원 30점에 대하여 어린잎의 앞뒷면에 살포하여 접종 20일 후에 저항성을 조사한 결과, 병반이 없는 자원수가 33.3%를 차지하고 감수성이 높은 자원이 16.7%를 차지하였으나, 일반적으로 생각되는 궤양병 저항성과는 거리가 있었다(표3-2).

Das(2003)은 그레이프프루트류, 라임류, 탕자류는 감수성이 높고, 스위트오렌지, 사우어 오렌지, 레몬은 감수성이며, 만다린과 문단은 다소 저항성이고, 시트론과 금감은 저항성이 높다고 하였다. 현(2004)은 궤양병 저항성 검정시 접종 방법, 농도, 환경에 따라 결과가 다양하게 나타난다고 하였고, 온주밀감과 청견은 중도 저항성이며, 유자는 저항성이 높고, 스위트오렌지는 감수성이 높았다고 하였다. 본 시험에서는 청견, 유자 등이 저항성을 라임과 그레이프프루트류인 피스타루비가 감수성을 나타내는 등 보고와 유사한 결과를 보였으나 스위트오렌지류인 청가네블과 타로코, 레몬류인 리스본레몬이 저항성을 보이는 등 보고와는 다소 차이가 있었다.

표 3-2. 궤양병 실내검정 결과

병반수/잎	품종명
0	올란도, 남향, 미네올라, 미호콜, 사토노가오리, 스윙글, 좌등, 청견, 황금하귤, 청가네블
2	인창굴, 유자, 리스본레몬, 타로코
5	다전금, 조향, 유라조생, 그레이프프루트
15	삼보감, 문단, 기주밀감, 세토카
30	노바
50	세토미, 지각
>100	56-423, 일남1호, 라임, 진지휘, 피스타루비



그림 3-2. 감귤 궤양병 접종 20일 후 감수성 감귤 품종 잎. (A) 감염된 감귤 가지 (B)-(E) 감귤 궤양의 병반이 형성된 감귤 잎. 감귤 궤양병원균 접종 농도  $3.0 \times 10^7$  cfu/ml.

2년차에 도입하여 현재 금지품 관리중인 유전자원에 대하여 궤양병 실내검정 방법을 참고하여 온실에서 검정을 실시하였다. 일반적으로 궤양병에 저항성인 금감에서 이병도가 가장 낮았으며 궤양병에 비교적 약한 그레이프프루트와 라임에서 이병도가 높았다. 하지만 궤양병에 감수성이 높아 궤양병 검정 식물로 이용하는 레몬인 경우와 역시 궤양병에 감수성이 높은 스위트오렌지는 그레이프프루트와 라임에 비해 이병도가 낮게 나타났다(표3-3). Das(2003)와 비교하면 감수성인 그레이프프루트류, 라임류과 스위트오렌지, 저항성인 금감은 일치하였으나, 저항성이라고 하였던 씨트론은 궤양병에 감염 증상이 나타났다. 이는 병원균을 접종할 때 상처에 의한 접종으로 인해 병증이 많았던 이유로 생각된다.



그림 3-3. 감귤 궤양병 온실 평가 상황 및 접종시 사용한 붓

표 3-3. 감귤 종류별 궤양병 온실검정 결과

세분류	자원수	이병도
금감	3	0.6 ± 1.0
라임	3	5.2 ± 3.3
레몬	15	2.9 ± 2.1
만다린	17	2.6 ± 2.2
문단	3	2.8 ± 2.8
사우어오렌지	1	5.0
스위트오렌지	29	3.6 ± 2.3
씨트론	2	2.8 ± 4.0
그레이프프루트	2	5.3 ± 0.5
탄귤	1	3.7
탄젤로	1	2.3
	77	3.2 ± 2.3

전체 77개 자원 중에 병반이 나타나지 않은 품종은 비율은 13%, 심하게 나타난 비율은 4% 정도였다. 궤양병에 가장 민감한 품종은 Utt Allen 레몬, Ambersweet 스위트오렌지, Cluster 스위트오렌지, Mary Ellen 라임, Ruby 스위트오렌지였고, 병증이 나타나지 않은 품종은 금감류에 속하는 Nippon Orangequat, 라임류인 Eustis Limequat, 레몬에 속하는 Limonero Messina, 만다린에 속하는 Soh Himtra, Hansen, Nour, Avani apireno, 문단류인

Cocktail hybrid, 스위트오렌지인 Carter(old line)와 씨트론인 Etrog Citron 등이었다(표 3-4). 온실 조건에서도 기존에 알려진 저항성과는 상이한 특성을 보여 실험실 또는 온실에서 퀘양병 저항성을 조사시에는 반복을 아주 많이 하거나 정밀한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단되었다.

표 3-4. 유전자원별 퀘양병 온실검정 결과

세구분	품종명	병반	세구분	품종명	병반
금감	Nordman nagami	1.67±1.16	문단	Thong Dee Pummelo	5.67±4.17
	Nippon Orangequat	0.00±0.00		Valentine Pummelo hybrid	2.67±2.52
	Eustis Limequat	0.00±0.00	사우어 오렌지	Fraser Seville Sour orange	5.00±2.00
라임	Mary Ellen Lime	9.00±0.00	스위트 오렌지	Sanguina double Fina	1.67±1.16
	Bearss	3.00±2.00		Cutter(nucellar)	4.34±1.16
	Castello Lime	3.67±1.16		Parent Wasington	7.00±3.47
레몬	Laphitiotiki Lemon	5.00±2.00		Cluster	8.34±1.16
	New Zealand lemonade	1.67±1.16		Gillemborg Navel	4.34±1.16
	Millsweet Limetta	3.67±1.16		Spring	4.34±1.16
	Limonero Messina	0.00±0.00		Carter(old line)	0.00±0.00
	Frost Lisbon	3.00±2.00		Walker	0.67±0.58
	Yen Ben	3.00±0.00		Ambersweet	7.67±1.16
	Taylor	1.00±0.00		Shamouti	3.00±2.00
	Monroe	1.00±0.00		D. joao	5.00±2.00
	Interdonato	1.67±1.16		Frost(Nucellar)	3.00±2.00
	Villafrances	0.34±0.58		Skaggs Bonaza	4.34±1.16
	Schab Rough Lemon	3.67±3.06		Pehrson#3	2.34±1.16
	Improved Meyer	5.00±2.00		Newhall(old line)	3.00±0.00
	Marrakech Limoette	2.34±1.16	Haward late	1.67±1.16	
	Utt Allen	7.67±1.16	Ruby	9.00±0.00	
	Ponderosa	5.00±2.00	Navelate	3.00±0.00	
만다린	Soh Himtra Mandarin	0.00±0.00	Trovita A	4.34±1.16	
	Hansen	0.00±0.00	Chapman(nucellar)	3.00±2.00	
	Corsica#1 clementine	2.34±1.16	Rocky Hill	3.00±0.00	
	Seedless Kishu	1.00±0.00	Rohde Red	0.34±0.58	
	Michal	5.00±2.00	Frost(nucellar)	3.00±0.00	
	Selma Satsma	1.67±1.16	Washington Sanguine	5.67±1.16	
	Clementine Nour	0.00±0.00	Pehrson#4	5.67±3.06	
	Avani apireno	0.00±0.00	Bahianinha Araras navel	3.67±1.16	
	China S-6 Sastuma	5.67±3.06	Dr. Strong(Nucellar)	1.67±1.16	
	Clementine Marisol	1.00±0.00	Robyn	1.67±1.16	
	SRA63 Clementine	3.00±0.00	Olinda(nucellar)	0.67±0.58	
	Corsica#2 clementine	2.34±1.16	씨트론	S-1 Citron	5.67±1.16
	Primosole mandarin	5.67±1.16		Etrog Citron	0.00±0.00
	Sun Chu Sha mandarin	3.00±0.00	그레이프 프루트	Shamber GF	5.00±0.00
	Xie Shan clementine	5.67±1.16		Marsh Brown GF	5.67±2.31
Clementine de Nules	1.67±1.16	탄콜	Ugli Tangor	3.67±1.16	
Clementine Oroval	5.67±2.31		탄젤로	Pearl Tangelo	2.34±2.31
문단	Cocktail hybrid	0.00±0.00			

2) 포장이병도 조사

가) 더뎡이병

더뎡이병 저항성 실내 검정 결과와 비교하여 병저항성 판단 자료로 활용하고자 포장에서 농촌진흥청연구개발사업조사기준을 기초로 더뎡이병 이병정도를 조사하였다. 감귤 유전 자원 221점에 대하여 2014년부터 2016년까지 3년동안 포장에서의 이병도를 조사한 결과, 그레이프프루트류는 전혀 발병이 없었으며 스위트오렌지와 파페다 등도 이병도가 매우 낮게 나타났다(표3-5, 3-7). 온주밀감도 전체 만감류와 동일한 양상을 보였다. 자원별로 보면 감염 증상이 나타나지 않은 자원은 136개로 전체의 61%를 차지하였고 서지향과 지각에서 이병도가 높았다(표3-6).

Nelson(2008)은 스위트오렌지, 문단, 그레이프프루트는 저항성 또는 면역성이 있다고 하였고 프레몬트, 클레멘틴, 마코트, 올란도, 타히티 라임, 온주밀감은 감수성이 있다고 하였는데 본 시험 결과에서는 본 결과에서는 그레이프프루트가 저항성을 보인 것은 일치하나 스위트오렌지에서도 저항성이 다소 나타나 다른 결과를 보였다. 한편 현(2002)은 그레이프프루트가 더뎡이병에 이병성이 있다고 하여 서로 다른 결과를 보였다.

표 3-5. 감귤 종류별 더뎡이병 포장 이병도

세분류	자원수	이병도
그레이프프루트	2	0.0 ± 0.0
금감	2	1.7 ± 1.2
레몬	2	0.5 ± 0.7
만다린	139	0.5 ± 0.9
문단	11	1.0 ± 1.2
사우어오렌지	9	1.1 ± 1.4
스위트오렌지	11	0.1 ± 0.3
탄골	30	0.9 ± 1.4
탄젤로	6	0.8 ± 1.0
파페다	9	0.3 ± 0.7
	221	

Nelson(2008)과 현(2000)은 온주밀감이 더뎡이병에 감수성이 높다고 하였는데 본 조사 결과에서는 총 112자원 중 43자원은 더뎡이병 증상이 관찰되었으나 나머지 69 자원은 증상이 나타나지 않았다. 이는 조사기간 동안 전체적으로 방제가 잘 되어서건 또는 더뎡이병 발생 조건이 맞지 않아서건 간에 병 발생이 적었던 것이 주요 원인으로 판단다. 또 온주밀감 중에서도 품종에 따라 더뎡이병에 대한 저항성은 다르다고 판단된다.



표 3-6. 온주밀감 유전자원별 더뎡이병 포장 이병도

자원명	병반	자원명	병반	자원명	병반
S-1080	4.17+2.45	부사견온주	0.0±0.0	원구조생	0.0±0.0
S-1094	0.0±0.0	부사조생	0.83+1.18	유라조생	0.0±0.0
S-1141	0.0±0.0	북구조생	0.0±0.0	유택조생	0.0±0.0
S-1153	0.0±0.0	비후조생	0.0±0.0	이세온주	0.0±0.0
S-1161	1.39+1.96	사세보온주	1.57+1.23	일남1호	1.29+1.82
가고시마조생	0.0±0.0	산천조생	0.0±0.0	임온주	0.52+0.74
강본조생	2.94+4.16	삼다조생	1.57+1.15	입간조생	0.0±0.0
고림조생	0.0±0.0	삼보조생	0.0±0.0	전구조생	1.39+1.96
곡천온주	3.12+4.41	삼산온주	0.0±0.0	정관조생	0.83+1.18
교본조생	0.0±0.0	삼조생	0.0±0.0	좌좌목온주	0.69+0.98
구능온주	0.0±0.0	상도조생	4.11+5.81	준하홍온주	0.0±0.0
구하조생	0.26+0.37	상야조생	0.46+0.65	중생1	0.0±0.0
궁본조생1	0.88+1.24	상전온주	0.38+0.54	지환조생	0.0±0.0
궁본조생2	0.0±0.0	석지온주	0.0±0.0	천전온주	0.0±0.0
궁천조생	1.22+1.72	석천온주	0.83+1.18	청강조생	0.0±0.0
금전조생	0.0±0.0	석총조생	1.02+1.44	청도온주	0.0±0.0
금촌온주	0.0±0.0	선온주	1.62+0.33	추광조생	1.32+1.86
기구보조생	0.0±0.0	선창등온주	0.83+1.18	충촌온주	0.81+1.14
기주규온주	0.0±0.0	성전온주	0.0±0.0	탐나조생	0.0±0.0
남감20호	0.0±0.0	송산조생	0.0±0.0	팔정궁천	0.0±0.0
남감4호	2.14+3.03	수태랑온주	0.85+1.2	편산	0.0±0.0
남본조생	0.0±0.0	시문조생	0.0±0.0	평전	0.81+1.14
남원698	0.0±0.0	신미택온주	0.82+1.16	풍복조생	0.0±0.0
뇌호온주	0.0±0.0	신십만온주	0.0±0.0	하레야카	0.0±0.0
다원조생	0.0±0.0	신익조생	0.83+1.18	하레조생	1.98+2.81
당협조생	0.0±0.0	신임온주	0.69+0.98	하파홍온주	1.12+1.58
대곡계림	3.22+4.56	실버힐온주	0.0±0.0	향문감	0.0±0.0
대엽계	0.0±0.0	십만온주	0.0±0.0	향산온주	0.98+1.39
대진4호	0.0±0.0	안전조생	1.28+1.81	홍색굴	0.0±0.0
대진5호	0.83+1.18	암기조생	0.0±0.0	홍진조생	0.0±0.0
대포조생	2.78+3.94	애원9호	0.0±0.0	히나노히메	0.0±0.0
덕삼조생	3.89+5.5	애월조생	0.88+1.24	히노사야카	1.32+1.86
도엽조생	0.6+0.84	애향	2.94+4.16	히노아께보노	0.0±0.0
모택온주	0.0±0.0	약사사	0.0±0.0	히노아스카	0.0±0.0
미택온주	0.0±0.0	역무조생	0.0±0.0	히노아카리	0.0±0.0
백빈1호	1.67+2.36	영전온주	0.0±0.0	히로시마7호	0.0±0.0
백천온주	0.0±0.0	영조생	0.0±0.0		
번전온주	0.0±0.0	우좌미온주	0.0±0.0		

만감류 자원별로는 총 109 자원 중 67개가 병발생이 없어 저항성을 보였으며, Matamoto 등(2003)이 더뎡이병 저항성이라고 보고한 서지향이 가장 이병율이 높았다. 스위트오렌지류인 풍광네블이 다른 스위트오렌지와는 달리 이병이 된 것은 다른 스위트오렌지는 성목이고, 풍광네블은 유목기인 것에 기인한 것으로 생각된다. Yosida 등(2003)은 금감류인 부치마루가 저항성이 있다고 하였고 현(2000)은 금감이 약간이 저항성이 있다고 하였는데 본

조사 결과에서는 금감이 약간의 저항성을 부치마루는 이병성을 보여 차이가 있었다. 파페다 중 유자류는 저항성을 나타내었고, 클레멘틴은 Nelson(2008)의 취약하다고 하였으나 본 조사 결과에서는 이병이 전혀 이루어지지 않았다. 결과적으로 조사기간 3년 동안 더덩이병 발생이 적었고, 더덩이병 병원균이 유형에 따라 조사결과가 다양하게 나타나는 것으로 판단되며, 때문에 제주지역 환경에서의 보다 면밀한 조사나 장기적인 조사가 필요할 것으로 생각된다.

표 3-7. 유전자원별 더덩이병 포장 이병도

세분류	자원명	이병도	세분류	자원명	이병도	
그레이프프루트	그레이프프루트	0.0±0.0	스위트오렌지	대삼도네블	0.0±0.0	
	버간디	0.0±0.0		발렌시아레이트	0.0±0.0	
금감	금감	0.85±1.2		백유네블	0.0±0.0	
	부치마루	2.5±3.54		복일네블	0.0±0.0	
레몬	리스본레몬	1.04±1.47		블러드샤무티	0.0±0.0	
	알렌레몬	0.0±0.0		삼전네블	0.0±0.0	
만다린	감자	2.86±4.04		영목네블	0.0±0.0	
	기주밀감	1.46±2.07		워싱턴네블	0.0±0.0	
	길진병감	0.0±0.0		청가네블	0.0±0.0	
	남진해	0.0±0.0		풍광네블	1.11±1.57	
	동정굴	0.0±0.0	탄골	56-423	0.6±0.84	
	미호콜	0.0±0.0		M16A	0.0±0.0	
	병감	0.0±0.0		S-1129	0.0±0.0	
	병굴	1.11±1.57		S-1144	0.91±1.29	
	빈굴	0.94±1.33		감평	1.67±2.36	
	삼보감	2.5±3.54		궁내이예감	0.0±0.0	
	서던레드	0.0±0.0		다이마사키	0.0±0.0	
	시쿠와샤	0.0±0.0		대곡이예감	0.0±0.0	
	양콜	0.0±0.0		베니바에	0.0±0.0	
	인창굴	1.39±1.96		부지화	0.83±1.18	
	조향	0.42±0.59		비풍	0.0±0.0	
	중야3호병감	0.0±0.0		사가34	0.52±0.74	
	진굴	0.0±0.0		사토노가오리	1.72±2.44	
	청굴	0.0±0.0		서지향	6.9±9.75	
	클레멘틴(뉴)	0.0±0.0		세이난노히카리	0.0±0.0	
	클레멘틴(이)	0.0±0.0		세토미	0.0±0.0	
	클레멘틴(프)	0.0±0.0		세토카	0.85±1.2	
	편굴	0.0±0.0		승산이예감	0.0±0.0	
	포춘	0.0±0.0		청견변이	2.38±3.37	
	하레야카	0.0±0.0		에히메28호	1.67±2.36	
	하루카	0.0±0.0		유명	0.0±0.0	
	홍굴	0.0±0.0		주건	0.0±0.0	
	홍춘병감	0.86±1.22		진지향	0.0±0.0	
	문단	골든스페셜		0.0±0.0	천초	0.0±0.0
		당유자		3.19±4.51	청견	1.67±2.36
		마두문단		0.0±0.0	청봉	0.0±0.0

	만백유	0.83+1.18	탄젤로	춘향	2.5+3.54
	문단	0.0±0.0		탐도1호	0.0±0.0
	사두감	0.0±0.0		하레히메	2.95+4.17
	수유	2.5+3.54		하루미	0.0±0.0
	일향하	0.81+1.14		홍진47	0.79+1.12
	중국황화	0.0±0.0		리	1.29+1.82
	팔삭	1.67+2.36		미네올라	0.83+1.18
	홍팔삭	2.5+3.54		서던옐로	0.0±0.0
	사우어오렌지	감하귤		1.5+2.13	파페다
금감자		0.0±0.0	스위트스프링	0.0±0.0	
선홀트		0.0±0.0	다전금	0.0±0.0	
신감하		1.01+1.43	대분취등	1.33+0.56	
입화오렌지		0.69+0.98	산귤	0.0±0.0	
좌등		2.5+3.54	소유자	0.0±0.0	
지각		4.17+5.89	스타치	0.0±0.0	
하귤		0.0±0.0	유자목두	0.0±0.0	
황금하귤		0.0±0.0	유자산근	0.0±0.0	
스위트오렌지	길전네블	0.0±0.0	유자재래	0.0±0.0	
			카보스	1.61+2.28	

나) 궤양병

궤양병 저항성 검토를 위한 기초자료로 활용코자 보유 유전자원에 대한 범수에 있는 잎의 궤양병 발생정도를 농촌진흥청 농업과학기술 연구조사분석기준에 따라 223점에 대해 조사하였다. 감귤 종류별로는 그레이프프루트류가 가장 이병이 심하였고, 스위트오렌지와 레몬이 뒤를 이었으며, 금감속은 감염 증상이 없었다. Das(2003)의 보고와 비교하면 그레이프프루트류, 스위트오렌지, 레몬은 감수성이며, 금감, 만다린과 문단은 저항성으로 나타나 결과가 일치하였다.

표 3-8. 감귤 종류별 궤양병 포장 이병도

세분류	자원수	이병도
그레이프프루트	2	54.5 ± 46.1
금감	2	0.0 ± 0.0
레몬	2	18.8 ± 7.8
문단	12	2.0 ± 2.5
사우어오렌지	10	7.5 ± 6.1
스위트오렌지	12	33.4 ± 14.8
파페다	7	6.0 ± 9.6
탄귤	28	8.3 ± 8.9
탄젤로	9	14.9 ± 17.3
만다린	139	2.3 ± 5.7
	223	

온주밀감은 체적으로 이병도가 낮아 궤양병에 중도저항성을 보여 Koizumi와

Kuhara(1980)의 온주밀감의 중도저항성을 보인다는 보고와 일치하였다. 하지만 세부 자원별로 살펴보면 대부분 궤양병 증상이 없었고 곡천온주와 약사사는 다소 심하게 발생하여 자원간에 차이가 있는 것으로 보인다.

표 3-9. 온주밀감 유전자원별 궤양병 포장 이병도

자원명	이병도	자원명	이병도	자원명	이병도
S-1080	4.3+7.4	부사조생	0.3+0.6	유라조생	0.0±0.0
S-1094	0.0±0.0	북구조생	0.0±0.0	유태조생	0.0±0.0
S-1141	0.0±0.0	비후조생	0.0±0.0	이세온주	0.0±0.0
S-1153	0.0±0.0	사세보온주	0.0±0.0	일남1호	0.1+0.2
S-1161	0.0±0.0	산천조생	2.1+3.7	임온주	1+1.9
강본조생	0.0±0.0	삼다조생	1.3+1.6	입간조생	0.8+1.1
고림조생	0.0±0.0	삼보조생	0.0±0.0	전구조생	0.7+1.2
곡천온주	12.5+21.6	삼산온주	0.0±0.0	정관조생	1+1.5
교본조생	0.6+1.1	삼조생	0.0±0.0	좌좌목온주	0.6+0.7
구능온주	0.0±0.0	상도조생	0.3+0.5	준하홍온주	0.0±0.0
구하조생	0.7+0.9	상야조생	0.0±0.0	중생1	0.0±0.0
궁본조생1	0.0±0.0	상전온주	3+3.8	지환조생	4+6.9
궁본조생2	0.0±0.0	석지온주	0.0±0.0	천전온주	0.0±0.0
궁천조생	1.4+2.4	석천온주	2.8+5.5	청강조생	0.0±0.0
금전온주	0.0±0.0	석총온주	0.0±0.0	청도온주	1.1+1.5
금촌온주	0.9+1.3	선온주	0.0±0.0	청수4호	0.0±0.0
기구보조생	4.9+7.3	성전온주	0.0±0.0	추광조생	1.3+1.9
기주규온주	0.0±0.0	송산조생	0.0±0.0	충촌온주	0.0±0.0
남감20호	2.6+3	수태랑온주	1+1.5	키노쿠니온주	0.0±0.0
남감4호	0.7+1.4	시문조생	0.0±0.0	탐나조생	0.5+0.6
남본조생	0.0±0.0	신미택온주	0.0±0.0	팔정궁천	0.0±0.0
남원698	0.0±0.0	신십만온주	2.9+3.4	편산	0.0±0.0
뇌호온주	3.4+4.6	신익조생	3+5.2	평전	4.8+9.7
다원조생	0.0±0.0	신임온주	0.8+1.5	풍복조생	0.0±0.0
당협조생	0.0±0.0	실머힐온주	0.0±0.0	하례조생	0.0±0.0
대곡계림	2.3+3.4	십만온주	1.3+1.9	하파홍온주	0.0±0.0
대엽계	0.0±0.0	안전조생	0.0±0.0	향문감	0.5+0.7
대진4호	1.3+1.8	암기조생	1.7+2.4	향산온주	0.0±0.0
대진5호	4.7+7	애원9호	0.0±0.0	홍색굴	0.6+1.2
대포조생	0.6+1	애월조생	1.7+2	홍진조생	0.0±0.0
덕삼조생	1.6+2.1	애향	1.4+1.9	히나노히메	0.0±0.0
도엽조생	0.0±0.0	약사사	11.8+16.7	히노사야카	0.0±0.0
미택온주	0.0±0.0	역무조생	1.3+1.9	히노아게보노	0.0±0.0
백빈1호	0.0±0.0	영전온주	1.3+1.8	히노아스카	0.0±0.0
백천온주	0.0±0.0	영조생	0.9+1.3	히로시마7호	0.0±0.0
변전온주	0.0±0.0	우좌미온주	0.0±0.0		
부사건온주	0.0±0.0	원구조생	0.0±0.0		

만감류는 그레이프프루트류인 버간디가 가장 궤양병 발생이 심하였고, 스위트오렌지는

공통적으로 높은 경향이였다. 금감류와 파페다 중 유자는 강한 저항성을 보였다. 파페다류 중 흔히 유자라고 불리우는 다전금, 소유자, 목두, 산근, 재래유자는 조사한 앞에서는 증상이 없었지만 과피에는 궤양증상이 있었는데 이는 가시에 의해 상처받은 과피에 병원균이 침입에 따른 것으로 생각되었다. 부지화 계열인 비풍, 사가34호 등은 궤양병에 강한 특성을 보여 현(2004)이 보고와 일치하였으며, 만다린 중 병감은 저항성으로 클레멘틴은 이병성으로 나타났다. 제주지역 노지조건에서 그레이프프루트, 스위트오렌지, 레몬, 클레멘틴은 궤양병이 심각한 문제를 초래할 수 있을 것으로 판단되었다.

표 3-10. 만감류 유전자원별 궤양병 포장 이병도

세구분	품종명	병반	세구분	품종명	병반
그레이프 프루트	그레이프프루트	21.8+8.7	스위트 오렌지	길전네블	39.9+21.9
	버간디	87.1+18.2		대삼도네블	35.1+22.5
금감	금감	0.0±0.0		발렌시아레이트	24.4+21
	부치마루	0.0±0.0		백유네블	35.4+19.7
레몬	리스본레몬	13.3+11.3		복일네블	37.6+17.8
	알렌레몬	24.4+21.7		블러드샤무티	15.7+1.4
만다린	감자	0.3+0.6		삼전네블	24.9+23.2
	기주밀감	2+2.8		영목네블	39.5+38.4
	길전병감	2.1+2.7		위싱턴네블	21.5+18.9
	남진해	15.9+27.6		청가네블	57.4+32.6
	동정굴	0.5+0.5	타로코	10.9+9.3	
	미호쿨	2.3+4.3	풍광네블	58.5+35.6	
	병감	0.0±0.0	파페다	다전금	0.0±0.0
	병굴	0.4+0.8		대본취등	25+14.7
	빈굴	5.4+10.7		소유자	2.5+5
	산굴	13.7+8		스타치	13+16.2
	삼보감	1+1.9		유자목두	1.5+2.5
	서던레드	30.1+37.7		유자산근	0.3+0.7
	서던엘로	27.7+23.6		유자재래	0.0±0.0
	시쿠와샤	1.7+3.4		카보스	18.4+13.8
	양쿨	5.8+6.8	탄굴	56-423	20.5+24.3
	인창굴	0.0±0.0		S-1129	8.8+12.5
	입화오렌지	6.6+3.8		S-1144	5+6.7
	조향	23.1+30.3		감평	12.3+19
	중야3호병감	0.0±0.0		궁내이예감	0.0±0.0
	진굴	0.3+0.6		다이마사키	0.0±0.0
	청굴	0.0±0.0		대곡이예감	9.5+9.2
	클레멘틴(뉴)	0.0±0.0		베니바에	22.1+22.5
	클레멘틴(이)	24.1+26		부지화	0.5+1
	클레멘틴(프)	30.4+37.3		부지화(M16A)	0.6+1.2
	편굴	1.7+3.5		비풍	0.2+0.5
	하레야카	20.1+26.4		사가34호	0.0±0.0
	하루카	1.8+1.6	사토노가오리	32.2+37.9	
	홍굴	0.0±0.0	서지향	28.3+28.9	
	홍춘병감	0.7+1.2	세이난노히카리	19+31.8	

문단	골든스페셜	1+1.3		세토카	0.0±0.0
	당유자	7.6+7.4		세토미	9.2+10.1
	마두문단	0.6+1		승산이예감	24.8+38.6
	만백유	2.8+3.4		에히메28호	15.1+4.7
	문단	3.1+4.6		유명	0.2+0.3
	사두감	6.4+8.9		주건	7+9.9
	수유	0.0±0.0		진지향	5.4+8.3
	일향하	1.5+3.1		천초	0.3+0.6
	중국황화	0.2+0.3		청건	2.1+4.2
	팔삭	0.5+0.6		청봉	1.1+2.2
	홍팔삭	0.9+1.3		춘향	9.9+16.7
	사우어오렌지	감하굴		4.5+6.6	탄젤로
금감자		4.7+6	탐도1호	1.9+2.7	
선홀트		0.6+1.3	포춘	12.2+17.9	
신감하		6.8+7.7	하레히메	10.4+11.3	
좌등		0.7+1.4	하루미	4.9+6.7	
지각		6.5+4.9	홍진47호	22.4+22.4	
하굴		9.5+16.7	리	51.9+25.7	
황금하굴		17.7+14.2	미네오라	19.2+24	
			세미놀	0.0±0.0	
			스위트스프링	0.2+0.3	

#### 다) 검은점무늬병

포장에서 검은점무늬병 발병율은 조사는 농촌진흥청 농업과학기술 연구조사분석 기준을 적용하였으며, 검은점무늬병 병반정도 기준은 그림 3-4와 같이 설정하였다. 총 220 자원에 대하여 조사를 실시한 결과, 그레이프프루트류가 가장 이병도가 높았으며, 다음으로 스위트 오렌지와 온주밀감에서 높은 경향을 보였다. 특히 그레이프프루트류는 줄기와 열매에서 모두 커다란 딱지가 생성될만큼 민감한 결과를 보였다.



그림 3-4. 검은점무늬병 병반정도 기준

표 3-11. 감귤 세분류별 검은점무늬병 포장 이병도

세분류	자원수	이병도
그레이프프루트	1	28.6
금감	2	18.3 ± 17.2
기타	1	6.6
레몬	26	13.7 ± 13.3
문단	12	12.4 ± 15.1
사우어오렌지	8	7.4 ± 3.6
스위트오렌지	11	22.0 ± 16.8
온주밀감	116	20.5 ± 9.7
파페다	7	11.7 ± 4.2
탄골	31	15.7 ± 11.3
탄젤로	5	17.4 ± 10.9
계	220	

검은점무늬병에 비교적 감수성을 나타내는 온주밀감 중에서도 키노쿠니온주와 선온주에 서 이병도가 높게 나타났으며, 품종간에 차이가 나타나고, 온주밀감의 숙기 관련 구분인 극 조생, 조생, 보통온주 간에는 차이가 없었다(표3-12).

표 3-12. 온주밀감 자원별 검은점무늬병 포장 이병도

자원명	이병도	자원명	이병도	자원명	이병도
S-1080	19.6	번전온주	6.2	우좌미온주	28.3
S-1094	9.2	봉현1호	8.3	원구조생	17.7
S-1141	2.2	봉현3호	11.1	유라조생	20.1
S-1152	11.5	부사견온주	16.3	유택조생	16.3
S-1153	23.8	부사조생	29.5	이세온주	12.4
S-1161	41.3	북구조생	6.7	일남1호	15.0
가고시마조생	11.1	비후조생	8.1	임온주	41.1
강분조생	26.0	사세보온주	20.6	입간조생	17.6
고림조생	18.8	산천조생	20.2	전구조생	26.9
곡천온주	15.8	삼다조생	12.7	정관조생	15.0
히로시마7호	20.4	삼보조생	27.7	좌좌목온주	15.9
교분조생	33.7	삼산온주	14.8	준하홍온주	18.6
구능온주	8.7	삼조생	18.4	중생1	20.4
구하조생	22.8	상도조생	21.9	에향	12.3
궁분조생1	11.5	상야조생	32.3	지환조생	18.7
궁분조생2	37.7	상전온주	26.7	천전온주	25.8
궁천조생	20.6	석지온주	33.2	청강조생	17.2
금전조생	31.0	석천온주	14.4	청도온주	14.6
금촌온주	12.3	석충조생	16.8	청수4호	35.4
기구보조생	29.6	선온주	43.6	추광조생	39.9
기주규	19.9	선창등온주	7.8	충촌온주	15.4
남감20호	16.9	성전온주	11.7	키노쿠니온주	51.1
남감4호	13.7	송산조생	28.1	탐나조생	15.3
남분조생	12.8	시문조생	43.3	팔정궁천	15.2

자원명	이병도	자원명	이병도	자원명	이병도
남원698	28.7	신미택온주	23.3	편산	18.3
너호온주	36.3	신십만온주	16.7	평진	13.9
다원조생	14.9	신익조생	22.2	풍복조생	22.2
당협조생	19.8	신임온주	20.5	하례조생	13.6
대곡계림	12.4	실버힐온주	20.7	하과홍온주	12.3
대엽계	4.2	십만온주	10.4	향문감	17.0
대진4호	15.4	아그주데라온주	6.3	향산온주	29.2
대진5호	23.4	안전조생	29.5	홍색굴	18.1
대포조생	20.2	암기조생	33.8	홍진조생	29.7
덕삼조생	14.3	애원9호	16.4	히나노히메	39.0
도엽조생	19.2	애월조생	39.3	히노사야카	21.3
모택온주	23.3	약사사	22.7	히노아스카	26.9
미택온주	32.1	역무조생	31.1	히노아카리	20.5
백빈1호	7.7	영전온주	25.8	히노아케보노	3.4
백천온주	5.3	영조생	15.6		

스위트오렌지인 대삼도네블과 탄골류인 청봉에서 이병도가 높았다. 한편 부지화와 부지화 유래 품종인 비풍, 사가34호는 이병도가 낮아 검은점무늬병에 강한 모습을 보였다. 김(1988)이 재래굴은 검은점무늬병에 저항성이 있다고 하였는데 본 조사에서도 감자, 동정굴, 병굴, 인창굴, 당유자, 사두감 등은 저항성을 나타냈다. 반면 빈굴, 편굴 등은 반점은 크지 않지만 이병도는 높은 경향이었다(표3-13).

표 3-13. 만감류 자원별 검은점무늬병 포장 이병도

세분류	자원명	이병도	세분류	자원명	이병도	세분류	자원명	이병도
그рей프 프루트	그рей프프루트	28.6	문단류	금감자	2.8	탄골	S-1129	16.6
				당유자	0.2		S-1144	2.4
만백유	1.9	감평		22.6				
문단	39.5	부지화		4.7				
사두감	0.7	세토미		11.9				
일향하	33.0	춘향		20.7				
팔삭	1.2	타마미		10.5				
홍팔삭	0.0	탐도1호		21.5				
프린스청견	5.6							
홍진47	14.8							
군내이예감	0.0							
다이마사키	20.4							
대곡이예감	17.8							
베니바에	3.2							
비풍	2.1							
사가과시34호	0.4							
세이난노히카리	12.7							
세토카	33.4							
애원과시28호	6.1							
유명	36.7							
주견	13.3							
진지향	11.6							
천초청견	36.5							
청봉	17.5							
청봉	42.7							
포춘	15.8							
하례히메	24.1							
하루미	13.4							
만다린	감자	0.6	사우어 오렌지	선홀트	3.1	스위트 오렌지	길전네블	9.3
	기주밀감	8.8		감하굴	7.9		대삼도네블	66.7
	길진병감	0.2		신감하	11.6		백유네블	6.8
	남진해	11.1		좌등	4.2		복일네블	27.2
	동정굴	3.2		지각	9.0		삼진네블	9.3
	미호콜	32.8	하굴	10.0	영목네블		12.0	
	병감	3.0	황금하굴	2.7	위싱톤네블		20.5	
	병굴	5.1			칭가네블		28.1	
	빈굴	34.5			타로코		28.9	
	산굴	7.6			풍광네블		14.8	
	삼보감	12.4			발렌시아레이트		18.8	
	시쿠와사	54.6						
	앙콜	26.7						
	입화오렌지	6.0						
	인창굴	6.6						
조향	26.5							
중야3호병감	4.7							
진굴	21.3							
클레멘틴(뉴질랜드)	3.5							
클레멘틴(이스라엘)	17.1							



	클레멘틴(프랑스)	28.8		대본취등	12.9			
	편골	17.7		소유자	11.4			
	하레야카	4.4	파페다	다전치	7.1	탄젤로	리	31.7
	하루카	9.9		스다치	20.3		미네오라	5.8
	홍골	10.0		유자목	11.8		사토노카오리	11.1
	홍춘병감	2.6		유자산근	9.3		세미늘	12.3
				유자채래	9.3		스위트스프링	25.9
				카보스	11.1			
문단	마두문단	23.9	탄골	56-423	30.9			
	수유	13.7		M-16A	12.0			
	중국황화	1.2						
	폴든스페살	30.6						

#### 4. 예비핵심집단 구축

##### 가. 서론

1970년 미국 남부 옥수수 재배지대에 호마엽고병이 대대적으로 발생하여 수량감소가 심각하였던 적이 있다. 그 이유는 1대 잡종을 생산하는 양친의 유전적 다양성이 극도로 단순화되어 있었기 때문이었다. 이 충격으로 세계 각국에서는 유전자원을 수집하여 보존하는데 관심을 갖게 되고 1974년에는 국제식량농업기수(FAO)에서도 국제식물유전자원의원회(IBPGR)를 설립하여 유전자원 수집·보존·활용을 추진하기 시작하였다. 이에 따라 특히 부존 유전자원이 많은 개발도상국을 중심으로 유전자원 수집 보존의 급격하게 증가하게 되는데 유전자원의 양적 팽창은 유전자원 수집보존의 근본 목적인 안전보존과 활용에 지장을 줄 정도로 심각한 문제를 야기하였다. 이러한 양적 문제를 해소하기 위하여 Frankel(1984)은 핵심수집단을 만들 것을 제안하였으며 이후 세계 각국의 많은 종자은행과 국제기관에서 핵심수집단을 작성하여 유전자원이 이용성과 효율적인 보존에 활용하고 있다(농업생명공학연구원, 2002). 핵심수집단이란 최소한의 중복으로서 작물종과 그 근연종의 유전적 다양성을 대표하는 제한적인 유전자원 세트이다(Frankel, 1984).

핵심수집단 구축이 유전자원 보존 수가 너무 많아 효율적인 보존과 활용이 어려움을 해소하기 위한 목적이기 때문이기 때문에 주로 유전자원 수가 많은 곡류, 두류 등에서 연구와 활용되고 있고, 비교적 자원수가 적은 과수 자원에서는 연구가 적게 이루어지고 있다. 대표적인 핵심수집단으로는 국제보리핵심수집단(Knüpffer와 van Hintum, 1995), 호주의 영년생 두류 핵심수집단(Brown 등 1987), 미국의 땅콩 핵심수집단(Holbrook 등, 1993)이 있다. 어떤 경우에는 핵심수집단을 전체 집단의 일부만을 대표하도록 작성하기도 하는데 인도의 참깨 재래종 핵심수집단(Bisht 등, 1998), 조합능력이 높은 재래종 옥수수집단(Radovic과 Jelovac 1994), 병저항성 완두 핵심수집단(Matthews와 Ambrose 1994) 등이 알려져 있다.

Spillane 등(미발간)이 조사한 바에 따르면 대부분의 핵심집단의 크기는 전체 수집단의 5~20%에 있었다. Yonezawa 등(1995)은 최적표본 크기는 자원간 중복성의 정도, 핵심자원 유지를 위해 유용한 자원 및 entry의 갯수 빈도에 크게 달려있고 20~30%가 적당할 것이라고 하였으며, Charmet와 Balfourier(1995) 그리고 Bisht 등(1998)은 핵심수집단의 크기와

그룹핑 전략을 분석하고 5~10%가 최적의 크기이고 거기에는 전체 집단의 75~90%의 다양성을 포함하고 있어야 한다고 한 바 있다. 반면 Noirot 등(1996)은 특히 양적 유전형질의 유전적 다양성을 목표로 하는 경우 20~30% 정도의 좀더 큰 규모를 제안하였다.

본 연구는 기능성 성분분석 결과와 내병성 분석 결과를 가지고 전체 집단의 일부 특성만을 대표하는 핵심수집단을 만들며, 최종적으로 감귤의 분류, 과실품질, 기능성, 내병성을 포함하는 핵심수집단을 구축하여 감귤 육종 및 연구에 활용코자 실시하였다.

#### 나. 연구방법

감귤 과즙 중 플라보노이드, 카로티노이드 분석 결과와 포장에서 3년 이상 조사한 궤양병, 더닝이병, 검은점무늬병 조사결과를 자료로 하여 농촌진흥청에서 개발한 PowerCore(V.1.0) 프로그램을 이용하여 핵심집단을 구축하였다.

#### 다. 결과 및 고찰

##### 1) 플라보노이드 핵심집단

감귤 플라보노이드 조성 및 함량 분석 결과를 바탕으로 예비 핵심집단을 조사한 결과 183품종의 플라보노이드 조성 및 함량 유형을 안정적 보존하기 위해서는 전체 자원수의 14.8%에 해당하는 27개의 유전자원을 보존할 필요가 있는 것으로 나타났다. 세분류별로는 조사한 자원수가 가장 많은 만다린에 8점으로 가장 많았고 스위트오렌지는 전체 조사 자원수의 50%인 5점이 포함되어 졌다.

표 4-1. 수확기 플라보노이드 조성 및 함량에 예비핵심집단

세분류	전체조사 자원수	핵심집단 자원수	자원명
그레이프프루트	3	2	그레이프프루트, 피스타루비
레몬	1	1	후로스트유레카
만다린	121	8	병귤, 병감, 홍춘병감, 유택조생, 기주밀감, 인창귤, 다원조생, 일남1호
문단	8	1	당유자
사우어오렌지	8	4	좌등, 입화오렌지, 하귤, 선홀트
스위트오렌지	10	5	상귀넬리, 타로코, 백유네블, 길전네블, 영목네블
파페다	9	1	카보스
탄골	20	4	조향, 홍진46호, 미호콜, 하레야까
탄젤로	3	1	세미놀
전체	183	27	

핵심집단의 크기는 전체 조사집단의 14.8%로 Charmet와 Balfourier(1995)가 제시한 5~10% 보다는 크지만, Noirot 등(1996)이 제시한 20~30% 보다는 작았다. 또한 핵심집단의 적정성을 검정하는 척도인 CR(Coincidence Rate)의 91.56%로 높아 핵심집단으로서의 의미가 있었다. Hu 등(2000)은 핵심집단의 전체 집단을 대표하기 위해서는 CR이 80% 이상을

넘어야 한다고 하였다. 한편 김 등(2007)은 MD, VD와 VR이 통계적으로 전체집단과 핵심 집단의 일치성을 설명하는 수단이나 핵심집단은 통계적인 일치보다는 유전적 다양성을 보존하기 위한 것이므로 CR보다는 핵심집단을 구축하는데 중요성이 적으며, 일반적으로 MD(Mean difference)와 VD(Variance difference)는 작으면 좋고 CR(Coincidence rate)와 VR(Variable rate)는 높으면 좋다고 하였다.

표 4-2. 수확기 플라보노이드 조성 및 함량에 예비핵심집단의 특성

전체 자원수 (개. A)	핵심집단 자원수 (개. B)	비율 (A/B %)	MD(%)	VD(%)	CR(%)	VR(%)
183	27	14.8	58.4	68.6	91.56	65.14

# Mean Difference(MD), Variance Difference(VD), Coincidence Rate(CR), Variable Rate (VR).

## 2) 카로티노이드 핵심집단

카로티노이드 조성 및 함량 분석 결과를 바탕으로 감귤 세분류를 예비 핵심집단 구축 데이터에 포함하여 예비 핵심집단을 조사한 결과 195 자원의 카로티노이드 조성 및 함량 유형을 안정적 보존하기 위해서는 전체 자원수의 6.1%에 해당하는 12개의 유전자원을 보존할 필요가 있는 것으로 나타났다. 세분류별로는 조사한 자원수가 가장 많은 만다린에 3 점으로 가장 많았고 다음으로 탄콜류가 많았다.

표 4-3. 수확기 카로티노이드 조성 및 함량에 예비핵심집단

세분류	전체조사 자원수	핵심집단 자원수	자원명
그레이프프루트	3	1	스타루비
레몬	2	1	후로스트유레카
만다린	130	3	홍춘병감, 비후조생, 편산
문단	8	1	중국황화
사우어오렌지	9	1	좌등
스위트오렌지	11	1	백유네블
파페다	8	1	재래유자
탄콜	18	2	56-423, 미하야
탄젤로	6	1	세미늘
전체	195	12	

핵심집단의 크기는 전체 조사집단의 6.1%로 Charmet와 Balfourier(1995)가 제시한 5~10% 범위에 포함되어 규모로는 좋은 결과를 보였다. 핵심집단이 전체집단의 대표성을 나타내는 CR은 92.21%로 Hu 등(2000)이 제한한 80% 이상이었고, 통계적으로 의미를 갖는 MD와 VD는 낮고, VR은 높아 핵심집단으로서의 충분한 가치가 있을 것으로 판단되었다.

표 4-4. 수확기 카로티노이드 조성 및 함량에 예비핵심집단의 특성

전체 자원수 (개/A)	핵심집단 자원수 (개/B)	비율 (A/B %)	MD(%)	VD(%)	CR(%)	VR(%)
195	12	6.1	12.3	45.89	92.21	120.39

# Mean Difference(MD), Variance Difference(VD), Coincidence Rate(CR), Variable Rate (VR).

3) 더탱이병 핵심집단

2014~2016년까지 3년간 노지 포장에서 더탱이병 이병도를 조사한 결과를 바탕으로 감귤 세분류를 예비 핵심집단 구축 데이터에 포함하여 예비 핵심집단을 조사한 결과 221 자원의 더탱이병 관련 유전자 다양성을 위해서는 전체 자원수의 4.5%에 해당하는 10개의 유전자원을 보존할 필요가 있는 것으로 나타났다. 감귤 세분류를 핵심집단 구축의 질적 자료로 활용하였고, 조사항목의 단수이기 때문에 핵심집단이 작고 세분류별로 모두 각각 1개씩 포함 되어졌다고 생각되어 진다.

표 4-5. 더탱이병 관련 예비핵심집단

세분류	전체 자원수	핵심집단 자원수	자원명
그레이프프루트	2	1	버간디
레몬	2	1	리스본레몬
만다린	139	1	대곡계림
문단	11	1	당유자
사우어오렌지	9	1	지각
스위트오렌지	11	1	풍광네블
파페다	9	1	카보스
탄골	30	1	서지향
탄젤로	6	1	세미놀
금감	2	1	부치마루
전체	221	10	

감귤 핵심집단의 크기는 전체 조사집단의 4.5%로 Charmet와 Balfourier(1995)가 제시한 5~10% 범위에 포함되어 규모로는 좋은 결과를 보였다. 핵심집단이 전체집단의 대표성을 나타내는 CR은 100%로 Hu 등(2000)이 제한한 80% 이상이었다. 하지만 통계적으로 의미를 갖는 MD와 VD는 높고, VR은 낮은 특성이 있었다.

표 4-6. 수확기 카로티노이드 조성 및 함량에 예비핵심집단

전체 자원수 (개/A)	핵심집단 자원수 (개/B)	비율 (A/B %)	MD(%)	VD(%)	CR(%)	VR(%)
221	10	4.5	76.63	71.91	100	44.08

# Mean Difference(MD), Variance Difference(VD), Coincidence Rate(CR), Variable Rate (VR).

4) 궤양병 핵심집단

2013~2016년까지 4년간 노지 포장에서 궤양병 이병도를 조사한 결과를 바탕으로 감귤 세분류를 예비 핵심집단 구축 데이터에 포함하여 예비 핵심집단을 조사한 결과 223 자원의 궤양병 관련 유전자 다양성을 위해서는 전체 자원수의 8.1%에 해당하는 18개의 유전자원을 보존할 필요가 있는 것으로 나타났다. 감귤 세분류를 핵심집단 구축의 질적 자료로 활용하였고, 조사항목의 단수이기 때문에 핵심집단이 작고 세분류별로 전체적으로 고르게 포함 되어졌다고 생각되어 진다.

표 4-7. 궤양병 관련 예비핵심집단

세분류	전체 자원수	핵심집단수	자원명
그레이프프루트	2	1	버간디
레몬	2	1	리스본레몬
만다린	139	3	클레멘틴(프랑스), 인창귤, 약사사
문단	12	2	중국황화, 홍팔삭
사우어오렌지	10	2	선홀트, 황금하귤
스위트오렌지	12	3	풍광네블, 발렌시아라이트, 영목네블
파페다	7	2	대본취등, 스타치
탄귤	28	2	춘향, 송산이예감
탄젤로	9	1	리
금감	2	1	부치마루
전체	223	18	18

감귤 핵심집단의 크기는 전체 조사집단의 8.1%로 Charmet와 Balfourier(1995)가 제시한 5~10% 범위에 포함되어 규모로는 좋은 결과를 보였다. 핵심집단이 전체집단의 대표성을 나타내는 CR은 100%로 Hu 등(2000)이 제한한 80% 이상이었다. 하지만 통계적으로 의미를 갖는 궤양병 핵심집단에서와 마찬가지로 MD와 VD는 높고, VR은 낮은 특성이 있었다.

표 4-8. 궤양병 관련 예비핵심집단의 특성

전체 자원수 (개/A)	핵심집단 자원수 (개/B)	비율 (A/B %)	MD(%)	VD(%)	CR(%)	VR(%)
223	18	8.1	72.92	74.9	100	54.05

# Mean Difference(MD), Variance Difference(VD), Coincidence Rate(CR), Variable Rate (VR).

5) 검은점무늬병 핵심집단

2014~2016년까지 3년간 노지 포장에서 검은점무늬병 이병도를 조사한 결과를 바탕으로 감귤 세분류를 예비 핵심집단 구축 데이터에 포함하여 예비 핵심집단을 조사한 결과 220 자원의 검은점무늬병 관련 유전자 다양성을 위해서는 전체 자원수의 7.7%에 해당하는 17개의 유전자원을 보존할 필요가 있는 것으로 나타났다. 감귤 세분류를 핵심집단 구축의 질적 자료로 활용하였고, 조사항목의 단수이기 때문에 핵심집단이 작고 세분류별로 전체적으

로 고르게 포함 되어졌다고 생각되어 진다.

표 4-9. 검은점무늬병 관련 예비핵심집단

세분류	전체 자원수	핵심집단 자원수	자원명
그레이프프루트	1	1	그레이프프루트
레몬	2	1	알렌레몬
만다린	131	3	시쿠와샤, 인창굴, 키노쿠니온주
문단	12	2	문단, 마두문단
사우어오렌지	8	2	선홀트, 황금하굴
스위트오렌지	11	2	대삼도네블, 발렌시아레이트
파페다	7	2	소유자, 재래유자
탄굴	31	2	청봉, 56-423
탄젤로	5	1	리
금감	2	1	금감
전체	210	17	17

감굴 핵심집단의 크기는 전체 조사집단의 7.7%로 Charmet와 Balfourier(1995)가 제시한 5~10% 범위에 포함되어 규모로는 좋은 결과를 보였다. 핵심집단이 전체집단의 대표성을 나타내는 CR은 96%로 Hu 등(2000)이 제한한 80% 이상이였다. 하지만 통계적으로 의미를 갖는 MD와 VD는 낮고, VR은 높은 특성이 있었다.

표 4-10. 검은점무늬병 관련 예비핵심집단의 특성

전체 자원수 (개/A)	핵심집단 자원수 (개/B)	비율 (A/B %)	MD(%)	VD(%)	CR(%)	VR(%)
220	17	7.7	36.03	62.93	96.00	105.06

# Mean Difference(MD), Variance Difference(VD), Coincidence Rate(CR), Variable Rate (VR).

### 라. 종합

2013~2016년까지 1단계에서 조사한 플라보노이드, 카로티노이드, 더댕이병 이병도, 궤양 병 이병도, 검은점무늬병 이병도와 과실품질(과중, 과형지수, 과육율, 부피도, 과피두께, 당도, 산함량, 과피색) 등을 종합적으로 하여 Powercore 프로그램으로 핵심집단을 구성하였다. 기능성, 포장 병이병도, 과실품질 조사 점수가 서로 다르기 때문에 공통으로 조사가 된 164점을 이용하였다. 164 자원을 이용하여 핵심집단을 구축한 결과 전체의 25.6%에 해당하는 42 자원이 포함되어 있었으며, Noirot 등(1996)이 제시한 20~30% 범위에 있었다. 또한 핵심집단의 적정성을 검정하는 척도인 CR의 97.56%로 높아 핵심집단으로서의 의미가 있었다.

표 4-11. 감귤 유전자원 예비핵심집단

세분류	전체 자원수	핵심집단 자원수	자원명
그рей프프루트	2	2	그레이프프루트, 골든스페살
만다린	113	19	풍복조생, 병귤, 병감(무종자), 기주밀감, 히나노히메, 덕삼조생, 구능온주, 지환조생, 청강조생, 충춘온주, 유태조생, 기구보조생, 인창귤, 편귤, 석지, 삼산온주, 애원9호, 조향, 미호콜
문단	7	4	당유자, 중국황화, 마두문단, 수유
사우어오렌지	8	3	지각, 황금하귤, 하귤
스위트오렌지	8	6	발렌시아레이트, 백유네블, 복일네블, 길전네블, 대삼도네블, 청가네블
파페다	8	4	카보스, 재래유자, 산귤, 스타치
탄귤	14	3	S-1153, 56-423, 청봉
탄젤로	4	1	미네올라
전체	164	42	

감귤 핵심집단의 크기는 전체 조사집단의 25.6%로 Charmet와 Balfourier(1995)가 제시한 5~10% 보다는 컷으나, Noiroit 등(1996)이 제시한 20~30% 범위에는 포함되었다. 핵심집단이 전체집단의 대표성을 나타내는 CR은 97.26%로 Hu 등(2000)이 제한한 80% 이상이었다. 통계적으로 의미를 갖는 MD와 VD는 낮고, VR은 높은 특성이 있었다.

표 4-12. 감귤 유전자원 예비핵심집단의 특성

전체 자원수 (개/A)	핵심집단 자원수 (개/B)	비율 (A/B %)	MD(%)	VD(%)	CR(%)	VR(%)
164	42	25.6	31.7	49.1	97.26	100.31

# Mean Difference(MD), Variance Difference(VD), Coincidence Rate(CR), Variable Rate (VR).

## 제 2 절 감귤 주요형질 연관 분자표지 개발

### 1. 감귤 궤양병 연관 분자표지 개발

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 식물재료

본 실험에 사용한 감귤 품종 및 교배집단은 I-1세부프로젝트(수행기관-제주도농업기술원; 연구책임자-박영철), I-3세부프로젝트(수행기관-제주대학교; 연구책임자-송관정), II-2세부프로젝트[수행기관-(주)제농; 연구책임자-이충선]에서 제공받아 사용하였다. 감귤 궤양병 및 더듬이병 내병성 연관 분자표지 개발을 위해 사용된 품종 및 교배조합은 다음과 같다: 사용 품종-청견, 궁내이에감, 하귤, 황금하귤, 병귤, 부지화, 감평, 서지향, 병감, 세미놀, 금감, 세트카, 베니바에, 미네오라, 하레히메, 대곡이에감, 리스본레몬, 푸치마루, 그레이프후르트, 대본취등, 폴글로, 클레멘타인, 흥진조생, 궁친, 궁본, 일남1호; 사용 교배조합-청견 x 궁내이에감, 청견 x 클레멘타인, Fallglo x 흥진조생. 홍피 연관 분자표지 개발을 위해 사용된 품종 및 교배조합은 다음과 같다: 사용 품종-미네오라, 베니바에, 세미놀, 스위트스프링, 청견; 사용 교배조합-에히메28호 x 병감. 교잡배 판별 분자표지 개발을 위해 사용된 품종 및 교배조합은 다음과 같다: 사용 품종-I-1세부프로젝트에서 수집한 101점의 감귤 유전자원; 사용 교배조합-세트카 x 만백유, 하루미 x 만백유, 노바 x 만백유, 페이지 x 만백유, 세트카 x 문단, 청견 x 세미놀, 에히메 28호 x 올란도, 하레히메 x 올란도.

##### 2) Genomic DNA의 추출

Genomic DNA (이하 gDNA)는 잎 조직으로부터 추출하였다. 채취한 잎 조직은 액체질소로 얼려 gDNA 추출시까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 게놈 DNA는 Biomedic<sup>®</sup> Plant gDNA Extraction Kit(Biomedic Co., Korea)를 이용하여 추출하였다. 추출한 게놈 DNA의 양과 질은 각각 DeNovix DS-11+ Spectrophotometer(DeNovix, 미국)와 아가로스 겔 전기영동을 통해 결정하였다. 유전체 해독을 위한 DNA의 품질은 Bioanalyzer 2100(Agilent Technologies, 미국)을 이용하여 추가로 분석하였다.

##### 3) 유전체 해독

유전체 해독을 위한 paired-end DNA 라이브러리는 TruSeq<sup>®</sup> DNA Library Prep Kits (Illumina, 미국)를 사용하여 제작하였다. Illumina HiSeq 2500 플랫폼을 이용하여 각각의 감귤 품종에 대해 대략 6 기가바이트의 서열 정보를 얻었다. 생성된 raw reads는 SolexaQA package(v.1.13; Cox et al. 2010)의 DynamicTrim 및 LengthSort 소프트웨어를 이용하여 trimming을 수행하였다. Trimming 후 얻어진 clean reads에 대해 반수체(haploid)인 *C. clementina* 'Clemenules'에 대한 표준 유전체에 맵핑을 수행하였으며, Burrows-Wheeler Aligner(BWA) 프로그램(0.6.1-r104)을 이용하여 consensus 서열을 확보하였다.



#### 4) 유전체 정보로부터 SSR 마커의 확보 및 프라이머 디자인

Consensus 서열에서 SSR 서열을 파악하기 위하여 MicroSatellite (MISA) 소프트웨어 (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)가 사용되었다. SSR의 존재 여부를 파악하기 위하여 2-10개 뉴클레오티드 모티프로 이루어진 SSR만을 고려하였다. 각 SSR의 최소 반복 단위는 다음과 같다: 2개 뉴클레오티드 모티프에 대해 6회, 3개 뉴클레오티드 모티프에 대해 5회, 4개 뉴클레오티드 모티프에 대해 4회, 5개 뉴클레오티드 모티프에 대해 3회, 6-10개 뉴클레오티드 모티프에 대해 2회. SSR의 특징 분석은 MISA 파일들에 대한 통계분석으로부터 얻어졌다. MISA 분석으로부터 얻어진 정보는 SSR 모티프의 증폭을 위한 프라이머 디자인에 사용되었다. 프라이머의 디자인을 위하여 Primer3 소프트웨어(v2.3.5)(Untergasser et al. 2012)를 사용하였다. 프라이머 디자인은 다음과 같은 기준에서 수행하였다: 프라이머 길이는 18-24bp (최적 20bp), 프라이머의 GC%는 20-80%(최적 50%), 프라이머의 T<sub>m</sub> 값은 55-65°C(최적 60°C), PCR 산물의 크기는 150-500bp.

#### 5) SSR 다형성의 *in silico* 분석

SSR 마커들의 *in silico* 다형성 분석은 virtual PCR 방법을 사용하여 수행하였다. 즉, 표준 유전체 정보에서 유래한 한 쌍의 프라이머 서열을 각 품종의 consensus 서열에 맵핑하였다. SSR 모티프의 양쪽에 프라이머 디자인을 하기에 충분한 길이의 서열을 가질 경우, SSR 마커 개발을 위한 후보로 정하였다. 또한 한 곳에만 배열되는 프라이머를 SSR 마커 후보로 선발하였다. *In silico*로 생성된 amplicon들을 품종간에 예측된 amplicon 사이즈와 비교하였다. Amplicon 사이즈가 차이가 나는 경우에만 다형성 SSR 마커로 구분하였다.

#### 6) SSR 마커의 다형성 테스트

다형성 SSR 마커의 선발을 위하여 감귤 품종의 gDNA를 시료로 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 20ng의 gDNA, 5 $\mu$ l의 2 x HS<sup>TM</sup> Taq mix (0.3unit/ $\mu$ l HS Taq DNA polymerase, 3.2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.4mM dNTPs 함유)(Dongsheng Biotech., China), 0.2 $\mu$ l의 10pmol 정방향 프라이머, 0.2 $\mu$ l의 10pmol 역방향 프라이머를 함유하는 10 $\mu$ l의 반응부피에 ABI 2720 thermal cycler(Applied Biosystems, USA)를 사용하여 수행하였다. PCR 증폭산물은 증폭여부와 다형성 여부를 확인하기 위하여 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동하였다.

#### 7) M13-tailed SSR 마커를 이용한 유전형 분석(genotyping)

SSR 마커를 이용한 유전형 분석을 위한 DNA 단편 분석은 M13-tailed PCR 방법 (Schuelke, 2000)을 사용하여 수행하였다. 게놈 DNA는 핵산가수분해효소가 제거된 멸균 증류수(Biomedic)에 10 ng/ $\mu$ l이 되도록 희석하였다. PCR 반응은 20ng gDNA, 5 $\mu$ l 2 x HS<sup>TM</sup> Taq mix (0.3unit/ $\mu$ l HS Taq DNA polymerase, 3.2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.4mM dNTPs 함유)

(Dongsheng Biotech), 0.2 $\mu$ l 10pmol M13-tailed 정방향 프라이머, 1  $\mu$ l 10pmol 역방향 프라이머, 1 $\mu$ l 10pmol 6-FAM 표지된 M13 프라이머 (5'-6-FAM-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'; 서열번호 35)를 함유하는 10 $\mu$ l의 반응부피에 ABI 2720 thermal cycler (Applied Biosystems)를 사용하여 수행하였다. PCR 증폭을 위한 조건은 다음과 같다: 초기 열변성(1회)-94도 5분, 1차 DNA 증폭(총 15회 반복)-94도 30초, 58도 30초, 72도 30초; 2차 DNA 증폭(총 20회 반복)-94도 30초, 53도 30초, 72도 30초, 최종 신장 반응(1회)-72도 30분. PCR 증폭산물은 증폭여부를 확인하기 위하여 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동하였다. PCR 증폭산물에 대한 DNA 절편분석은 ABI3730 DNA Analyzer(Applied Biosystems)를 이용하여 전술한 바와 같이 수행한 후, 대립유전자의 크기는 GeneMapper 소프트웨어(ver. 4.0; Applied Biosystems)를 사용하여 분석하였다.

#### 8) SNP 발굴

확보된 consensus 서열로부터 품종간의 SNP 비교분석을 수행하기 위해 Kim 등(2014)의 방법에 따라 샘플간 통합 SNP matrix를 작성하였다. 각 품종을 표준유전체와 비교하여 얻은 raw SNP position을 후보로 하여 합집합의 리스트를 구축하고, 빈 영역(non-SNP loci)은 샘플의 consensus 서열로부터 채워 넣는 filling 과정을 거쳐 매트릭스를 작성하였다. 이후 품종간의 SNP 비교를 통하여 잘못 콜링된 SNP를 필터하고, SNP를 유형 구분 기준(homozygous, heterozygous, 기타)에 따라 분류하였다. 콜링된 SNP loci를 표준유전체의 위치정보를 기반으로 intergenic/genic 지역으로 분류하고, genic 지역은 다시 CDS와 intron 구역으로 세부 분류하였다. 품종간 통합 SNP 매트릭스를 대상으로 비교조합 품종간의 동일 SNP loci의 염기서열을 비교하여 서로간 SNP인 경우(polymorphic SNP)를 선별하였다.

#### 9) SNP HRM 프라이머 디자인 및 HRM

비교 품종간의 polymorphic SNP loci를 타겟으로 하여 HRM(high resolution melting)을 위한 SNP 마커를 디자인하였다. 프라이머는 Primer3 소프트웨어(v2.3.5)를 사용하여 아래의 기준에 따라 프라이머를 디자인하였으며, in silico PCR을 수행하여 게놈 상에 한번만 관찰되는 프라이머를 선별하였다: 증폭 크기 80-150bp, 프라이머 길이 20-24bp(최적 20bp), melting temperature 55-65도(최적 60도).

제작된 프라이머를 이용한 HRM은 다음과 같이 수행하였다. 전체 15 $\mu$ l의 HRM 반응 용액에 gDNA 15ng과 제작된 10 $\mu$ M forward/reverse primer를 각각 0.375 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub>를 1.8 $\mu$ l 그리고 High Resolution Melting Master Mix(Roche) 7.5 $\mu$ l를 혼합한 후, Roche LightCycler® 480II(Roche)를 이용하여 HRM을 수행하였다. HRM은 95°C에서 5분간 pre-incubation 단계를 거친 후, 45회 사이클의 증폭단계(95°C 10초, 60°C 10초, 72°C 10초)를 연속하여 진행하였고, 다음 단계로 95°C 1분, 40°C 1분, 65°C 1초 후 95°C까지 천천히 온도를 올리며 data를 기록하는 melting 단계 후, 40°C로 cooling 단계를 수행하여 분석하였다.

## 10) RAPD PCR

RAPD 분석을 위하여 Operon 기반의 520개 프라이머를 사용하였다. PCR 용액의 조성은  $5\text{ng}/\mu\text{l}$  gDNA,  $50\ \mu\text{M}$  RAPD primer  $1\ \mu\text{l}$ , 2X PCR Mix (Dongsheng Biotech.)  $5\ \mu\text{l}$ , 멸균 증류수를 혼합하여 총  $10\ \mu\text{l}$  반응용액을 이용하였다. 혼합한 용액은 ABI 2720 thermal cycler(Applied Biosystems)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은  $95^\circ\text{C}$ 에서 10분간 열변성(heat denaturation)하고, 이어서 35회 사이클의 PCR 반응( $95^\circ\text{C}$  1분,  $35^\circ\text{C}$  30초,  $72^\circ\text{C}$  1분 30초의 온도 변화 사이클)을 연속하여 수행한 후 마지막으로  $72^\circ\text{C}$ 에서 5분간 최종 신장(final extension) 반응을 시켰다. 반응이 종료된 PCR 증폭 산물을 1.2% agarose gel에서 전기영동을 통해 변이가 보이는 마커를 선발하였다.

## 11) T-vector 클로닝, 염기서열 결정 및 SCAR 마커 전환

Polymorphic RAPD PCR 밴드를 pGEM-T vector(Promega)에 클로닝하였다. 정제된 플라스미드 DNA에 대해 M13F와 M13R 프라이머를 사용하여 BigDye Terminator cycle sequencing kit(Applied Biosystems)를 이용한 PCR을 수행하고, 3730 DNA analyzer(Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 결정된 염기서열은 MultAlin(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) 프로그램을 이용하여 하나의 컨티그로 만들고 Primer3 소프트웨어(v2.3.5)(Untergrasser et al. 2012)를 사용하여 SCAR 프라이머를 디자인하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### 1) RAPD-SCAR 마커 개발

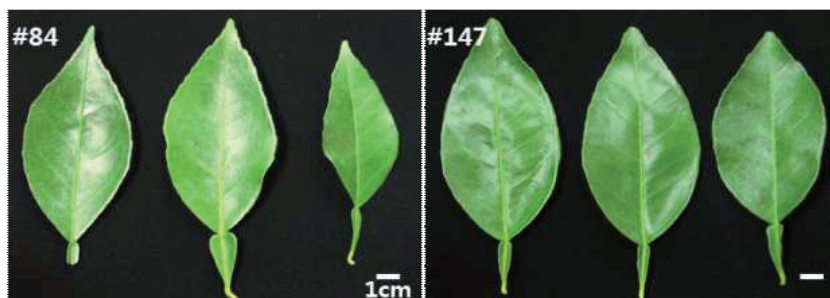


그림 5-1. F1 내병성을 보이는 개체들에서 채취한 잎의 예시 사진

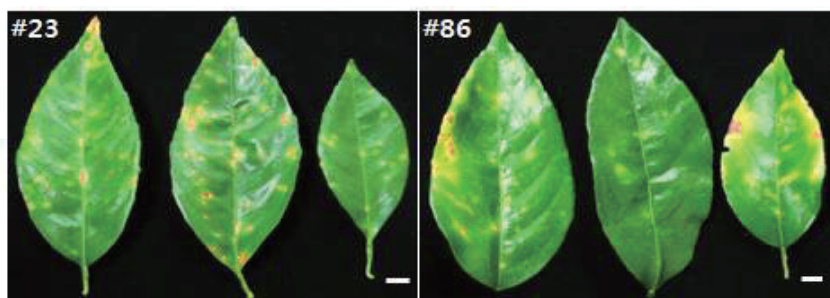


그림 5-2. F1 이병성을 보이는 개체들에서 채취한 잎의 예시 사진

제주도농업기술원은 국내 보유 감귤유전자원 중 2001년부터 궤양병에 강한 청견(모본)과 궤양병에 약한 궁내이에감(부분)의 교배를 통하여 현재 165개의 F1 실생묘를 보유하고 있다. 본 연구에서는 F1 실생묘 집단을 재료로 감귤 궤양병 연관 RAPD-SCAR 마커를 개발하고자 하였다. F1 실생묘는 궤양병에 대한 정도를 다양하게 나타내었으며, 제주도농업기술원에서는 궤양병 정도를 농진청 농업과학기술 연구조사 분석기준에 따라 2년간(2011년 8월, 2013년 8월)에 걸쳐 field test를 수행하였다. 궤양병 연관 RAPD-SCAR 마커 개발을 위하여 모본인 청견, 부분인 궁내이에감 및 field test 결과를 바탕으로 5개씩의 F1 내병성 개체들과 F1 이병성 개체들의 잎을 채취하였으며, 각각 대표적인 두개 라인들에서 채취한 잎들의 표현형은 아래 그림과 같다(그림 5-1, 2).

1차적으로 청견과 궁내이에감을 대상으로 500개 RAPD 마커 중 217개 RAPD 마커에서 polymorphic bands를 확인하였고, 2차적으로 217개 RAPD 마커를 이용하여 5개씩의 F1 내병성 개체들과 F1 이병성 개체들 중 우선적으로 내병성, 이병성 각각 2개씩의 샘플을 대상으로 polymorphic bands를 확인한 결과, 8개의 RAPD 마커에서 차이를 보였다. 3차적으로 8개 RAPD 마커를 이용하여 채취한 5개 샘플 중 나머지 3개씩의 F1 내병성, 이병성 개체들에 적용한 결과, 4개의 RAPD 마커에서 내병성, 이병성 샘플 간 차이를 보였다(자료 미제시). 최종적으로 4개 RAPD 마커를 SCAR 마커로 전환하여 F1 내병성, 이병성 개체들에 대하여 확대 적용을 수행하였다. 4개 SCAR 마커 중 SCAR-1 마커는 F1 내병성, 이병성 샘플 간 차이를 보였고(그림 5-3). SCAR-1 마커의 locus는 궤양병 연관 locus 내에 있어 궤양병 연관 마커로 사용가능함을 보여주었다.

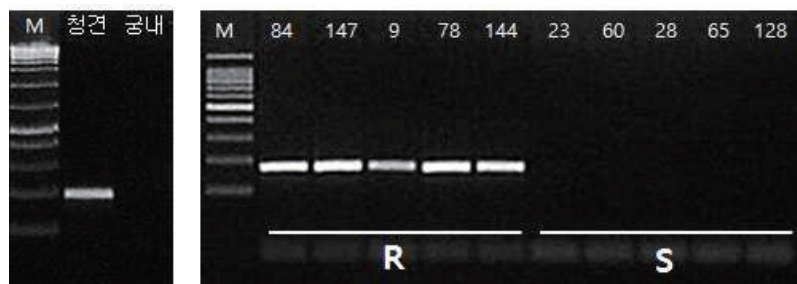


그림 5-3. SCAR-1 마커를 사용한 F1 내병성, 이병성 개체들에 대한 PCR 결과. R, 내병성(resistant); S, 이병성(sensitive).

SCAR-2, 3, 4 마커들의 경우는 각각 80%, 75%, 50%의 F1 내병성, 이병성 샘플 간 차이를 보였다(그림 5-4, 5, 6). 즉, SCAR-2, 3, 4 마커들의 locus는 궤양병 연관 locus와 인접하게 연관되어 있음을 보여준다. SCAR-2, 3, 4 마커에 해당하는 유전자는 전사조절자(homoeodomain-like protein, F-box/RNI-like protein) 및 병 저항 유전자(disease resistance protein)임을 확인하였다.

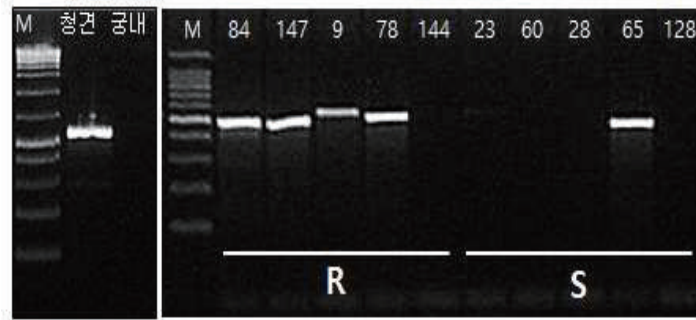


그림 5-4. SCAR-2 마커를 사용한 F1 내병성, 이병성 개체들에 대한 PCR 결과.

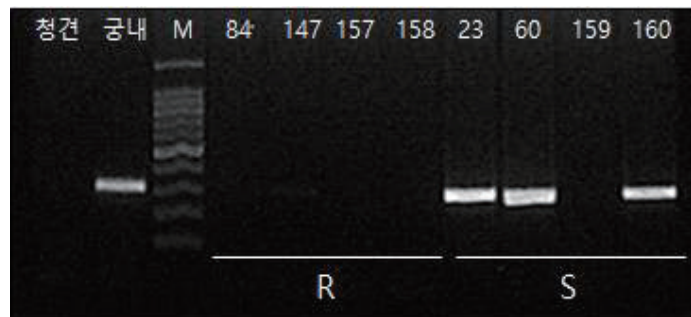


그림 5-5. SCAR-3 마커를 사용한 F1 내병성, 이병성 개체들에 대한 PCR 결과.

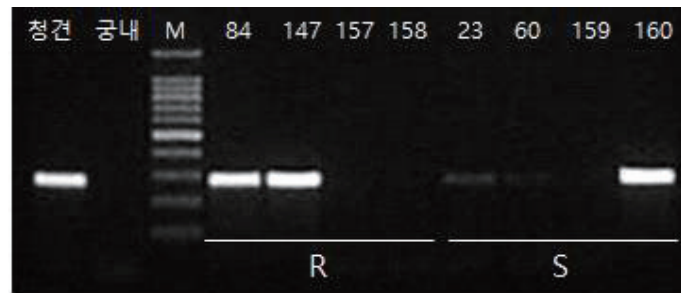


그림 5-6. SCAR-4 마커를 사용한 F1 내병성, 이병성 개체들에 대한 PCR 결과.

일반적으로 병 저항 유전자는 양적형질과 연관되어 있다고 알려져 있다. 이 실험에서 확인한 SCAR 마커가 여러 개이고, 각각 locus가 다른 것으로 미루어 감귤 궤양병 연관 유전자는 여러 개일 것으로 판단된다.

즉, 이 연구로부터 개발된 SCAR 마커의 경우에 청견, 궁내이에감 품종에는 적용이 가능하였다. 제주도농업기술원의 요청으로 청견, 궁내이에감, 감평, 서지향, 병감에 SCAR-1을 적용한 결과, 청견 계통인 서지향, 감평에서는 PCR band가 확인됐으나, 내병성 품종이지만 청견 계통과 연관이 없는 병감에서는 PCR band가 확인되지 않았다. 따라서 한정된 수의 SCAR 마커를 이용하여 궤양병 연관 다른 품종에 확대 적용하기에는 다소 제한에 있을 것으로 판단되므로 향후 감귤 궤양병 내병성과 연관된 더 많은 분자마커의 개발이 필요하다.

## 2) SNP 마커 개발

2-1) Public data의 활용

감귤 궤양병 연관 분자 마커를 개발하기 위하여 논문에 나와 있는 데이터를 활용하였다. 궤양병 연관 분자 마커에 대한 논문은 현재까지 없으며, 마이크로어레이를 이용하여 궤양병에 내병성을 보이는 품종 및 형질전환체에서 차별적으로 발현되는 유전자에 대한 몇 편의 논문이 발표되었다. 이 중 두 편의 논문(Fu and Liu, 2013; Fu et al., 2012)으로부터 내병성, 이병성 품종에서 차별적으로 발현되는 30개 유전자의 염기서열을 확보하였다. 차별적으로 발현되는 유전자에 대한 정보일 뿐 유전자내 변이에 대한 정보는 전무하기 때문에 IGV (integrative genomics viewer)를 활용하여 reference genome으로 이용하는 *C. clementina*와 *C. sinensis* 간의 SNP를 탐색함. 총 30개 유전자 중 두 품종 간 polymorphic SNPs을 보이는 4개(13%)의 유전자(Cit.5734, Cit.15509, Cit.11548, Cit.11721)에 대하여 프라이머를 제작하고, 내병성 품종인 청견, 병귤, 부지화와 이병성 품종인 하귤, 궁내이예감, 황금하귤에 적용하였다. Genotyping 결과, 탐색한 총 30개 중 2개 SNPs (6.6%)에서 각각 3개씩의 내병성, 이병성 품종을 구분하였다(그림 5-7).

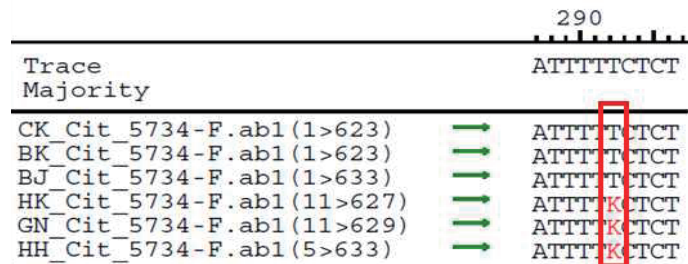


그림 5-7. 논문 데이터를 활용하여 내병성, 이병성 품종간 polymorphic SNP의 확인에 대한 예시. CK, 청견; BK, 병귤; BJ, 부지화; HK, 하귤; GN, 궁내이예감; HH, 황금하귤.

또한 이 두 마커에 대하여 궤양병 연관 6품종에 확대 적용하였다(그림 5-8A와 B). 확대 적용 결과, 첫 번째 마커(그림 8A)는 대곡이예감을 제외하고는 내병성 염기와 동일하였으며, 두 번째 마커는 내병성인 금감이 이병성 염기와 동일하고 첫 번째 마커와는 달리 MN, BB도 이병성 염기와 동일하였다. 두 마커의 다른 결과로 미루어 궤양병 품종 확대 적용에는 상당한 제약이 있었으며, 또한 정확도를 높이기 위하여 더 많은 마커의 발굴이 요구된다.

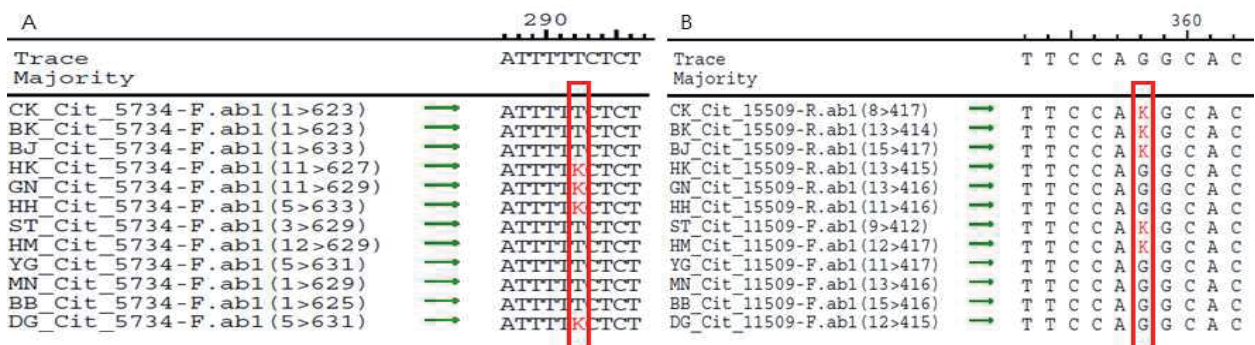


그림 8. 논문 데이터를 활용하여 발굴된 SNP 마커에 대한 품종 확대 적용. ST, 세또까; HM, 하레히메; YG, 영과금감; MN, 미네오라; BB, 베니바에; DG, 대곡이예감.

그러나 현재까지 논문에 나온 데이터의 경우에 발현 양에서의 차이를 보이는 유전자일 뿐, 유전자 내 변이에 대한 정보는 없으므로 변이를 탐색하기 위한 최적의 자료는 아닌 것으로 판단된다. 단, 마커를 개발하기 위하여 차별적인 발현을 보이는 유전자의 목록은 우선적으로 변이를 탐색해 볼 유용한 정보이다. 따라서 유용 유전자내 변이 탐색을 통하여 형질 연관 분자 마커 발굴을 위한 자체의 유전체 분석이 필요하다고 판단하였다.

## 2-2) 유전체 정보 활용

감귤 유전자원 보유기관 중의 하나인 제주도농업기술원에서 발행한 제주의 감귤 품종과 특성(2011)에 의하면, 국내 보유 감귤 유전자원 중 탄골류 품종인 청견, 부지화와 탄젤로 품종인 세미놀이 궤양병에 강한 것으로 알려져 있으며, 탄골류 중 궁내이예감과 기타 감귤류로 분류되는 하귤은 궤양병 발생이 심한 것으로 알려져 있다. 감귤 궤양병 연관 SNP 마커를 개발하기 위하여 궤양병에 대하여 저항성을 보이는 청견과 이병성을 보이는 하귤 유전체의 resequencing data를 활용하여 유전체 비교 분석을 수행하였다.

Illumina HiSeq 플랫폼을 통해서 얻어진 평균 101 bp reads의 수는 샘플당 34,400,000개 이상으로서 총 읽은 염기서열의 길이는 청견의 경우 6,950,872,318 bp이었고, 하귤의 경우 7,069,200,080 bp였다. 이 길이는 유전체 해독을 위하여 Phytozome database (www.phytozome.net)로부터 사용한 reference genome인 *C. clementina*의 약 301 Mb genome size의 약 23 배를 커버할 것으로 판단하였다. Sequence quality를 고려하여 reads를 trimming 하였을 때, reads의 길이는 88~92 bp 정도였으며, reads의 총 갯수는 청견과 하귤에서 각 31,670,344개와 32,222,489개로 약 19배의 genome coverage를 보였다. 이 reads를 대상으로 reference genome에 대해 mapping 하여서 청견은 약 271 Mb(약 90%), 하귤은 약 276 Mb(약 92%)의 reads-mapping region을 확보하였다(표 2-1).

표 2-1. 청견, 하귤 품종의 유전체 해독을 위한 시퀀싱 정보량.

Sample	Total reads #	Mapped reads #	Reads-mapping region
청견	63,340,688	50,343,165(79.48%)	271,488,980 (90.08%)
하귤	64,444,978	48,951,447(75.96%)	276,159,545 (91.63%)

Reference genome과 각 품종에서의 염기변이를 비교한 후에 두 품종간의 SNP를 비교하였다. 두 샘플간의 SNP 비교분석은 각 샘플을 reference와 비교하여 얻은 총 SNPs에 대하여 두 품종간 polymorphic SNP를 탐색하였는데, 청견과 하귤간에 1,960,182 polymorphic SNPs가 확인되었다. 이 중 191,085 polymorphic SNPs가 coding sequence (CDS) 내에 있음이 탐색되었고, 또한 병저항성과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 잘 알려진 *R* gene (NBS-LRR)의 CDS 내에서 7,828개의 polymorphic SNPs를 확인하였다(표 2-2). 또한 청견

과 하귤간에서 132,628 polymorphic INDELs을 확인하였다(표 2-3). 이들 중 3,050개 polymorphic INDELs이 CDS 내에 있음을 탐색하였고, NBS-LRR 유전자내의 polymorphic INDELs은 141개였다.

표 2-2. 청견, 하귤간 탐색된 polymorphic SNPs와 CDS 내 SNPs.

비교 샘플	Polymorphic SNPs	Intergenic region	Genic region	SNPs in CDS
청견 vs. 하귤	1,960,182	1,419,170	541,012	191,085
NBS-LRR (505 transcripts)			9,888	7,828

표 2-3. 청견, 하귤간 탐색된 polymorphic INDELs과 CDS 내 INDELs.

비교 샘플	Polymorphic INDELs	Intergenic region	Genic region	INDELs in CDS
청견 vs. 하귤	132,628	94,962	37,666	3,050
NBS-LRR (182 transcripts)			323	141

청견과 하귤 두 품종간 polymorphic SNPs, INDELs의 수가 많아서 형질연관 변이 탐색이 어려울 것으로 판단되었다. 이에 2차적으로 궤양병에 내병성을 보이는 다른 품종인 병귤, 부지화 및 RAPD 마커 개발에 사용한 F1 내병성 개체들의 혼합 샘플 등 내병성 연관 3개 샘플과 궤양병에 이병성을 보이는 황금하귤, 궁내이에감 및 F1 이병성 개체들의 혼합 샘플 등 이병성 연관 3개 샘플들에 대한 추가 유전체 분석을 수행하였다.

이들에 대한 유전체 정보량은 reference genome인 *C. clementina*의 약 16-18 배의 genome coverage를 보이며, 약 90-95%(약 271-285 Mb)의 reads-mapping region을 확보하였다(표 2-4).

표 2-4. 내병성 및 이병성 품종들의 유전체 해독을 위한 시퀀싱 정보량.

형질	품종	Genome coverage	Reads-mapping region
내병성	청 견	≈18.79X	271,488,980 (90.08%)
	병 귤	≈16.42X	271,215,236 (89.99%)
	부지화	≈15.64X	276,889,817 (91.87%)
	F1 R lines	≈17.16X	284,942,040 (94.54%)
이병성	하 귤	≈19.18X	276,159,545 (91.63%)
	황금하귤	≈16.30X	279,323,699 (92.68%)
	궁내이에감	≈17.14X	277,761,358 (92.16%)
	F1 S lines	≈18.39X	285,349,880 (94.68%)



표 2-5. 내병성, 이병성 비교 그룹간 polymorphic SNPs 탐색.

Sample	Traits	Total SNP	공통 SNP	비교그룹 간의 Polymorphic SNPs
청견	내병성	1,899,394	90,824	642
부지화		1,287,741		
병굴		1,820,674		
F1 R lines		1,437,952		
하굴	이병성	2,260,077	150,871	
궁내이에감		1,545,324		
황금하굴		1,775,843		
F1 S lines		1,418,969		

표 2-5에서 보는 바와 같이 케양병 내병성 4 샘플간의 공통적인 90,824개 SNPs와 이병성 4 샘플간의 공통적인 150,871개 SNPs가 탐색되었으며, 이들 두 그룹 사이에서 642개 polymorphic SNPs가 탐색되었다. 청견과 하굴 간의 1,960,182개 polymorphic SNPs에서 약 99.97%의 SNPs가 제외되었다. 즉, 상당 수(99.7%)에 해당하는 SNP는 청견, 하굴간 케양병을 제외한 다양한 형질과 연관되어 있을 것으로 추측된다. 총 642개 polymorphic SNPs 중 CDS 내 변이를 보이는 100개 polymorphic SNPs를 선발하고, 이 중 false positive를 제외시키기 위하여 IGV (integrative genomics viewer)에서 SNPs를 확인하였다. 이 중 50개 polymorphic SNPs에 대하여 genotyping을 수행한 결과, 실험적으로 33개 polymorphic SNPs가 내병성인 청견, 부지화, 병굴과 이병성인 하굴, 궁내이에감, 황금하굴에서 구분됨을 확인하였다(그림 2-9). Sequencing으로 28개 SNPs를 확인하였고, 5개 SNPs는 HRM (high-resolution melting) 방법으로 확인하였다.

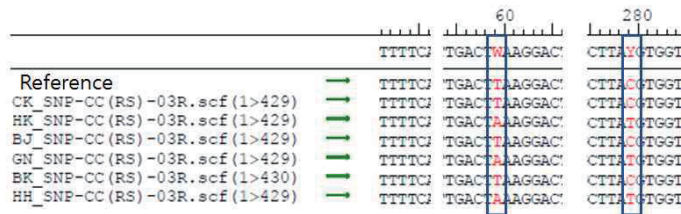


그림 2-9. SNP-3 마커를 이용한 내병성, 이병성 품종 간의 genotyping 결과.

이 33개 SNPs가 발생한 유전자는 전사조절자(EREBF, serine/threonine protein kinase, Myb-like TF, PHD finger protein, F-box protein), transporter (ABC transporter, peptide transporter), 단백질 분해(peptidase, cysteine proteinase, subtilase), defense (LRR protein kinase, R gene)임을 확인하였다. 이들 유전자는 감귤 9개 염색체에 고르게 분포하였는데, 이것으로 보아 감귤 케양병과 관련하여 다양한 유전자들이 연관되어 있다고 추정되며, 이는 품종마다 다른 유전자들이 관여할 수 있음을 시사한다. 이에 유전체 분석을 통하여 sequencing으로 확인한 28개 SNPs를 이용하여 다른 내병성, 이병성 품종에 확대 적용하였다(표 2-6).

표 2-6. 내병성, 이병성 품종에 확대 적용한 28개 SNPs에 대한 genotyping 결과.

Primer #	R	S	SN	YG	ST	BB	MN	HM	DG	LM
3	T	A	A	T	A	A	A	T	A	W
4	C	T	Y	C	Y	Y	Y	C	T	C
6	A	W	A	T	A	A	A	A	W	W
8	C	S	S	C	C	S	S	C	S	S
12	R	G	G	A	G	R	R	R	G	G
13	G	R	G	G	G	G	G	G	R	N/A
19	A	W	W	A	A	W	A	A	W	N/A
20	W	A	A	A	W	A	W	W	A	A
21	C	Y	C	C	C	Y	C	C	Y	Y
22	R	A	A	A	R	A	A	G	A	R
C5	Y	T	T	Y	T	T	Y	T	Y	N/A
28	A	W	A	A	A	A	A	A	W	W
30	A	M	M	C	A	C	C	M	C	W
31	Y	C	C	T	Y	C	C	Y	C	Y
32	Y	T	Y	T	T	Y	Y	T	T	T
33	Y	C	Y	C	C	Y	Y	C	C	Y
34	C	M	C	C	C	M	C	C	M	C
35	C	M	C	C	C	M	C	C	M	M
37	C	S	S	C	C	C	S	C	S	S
39	R	A	A	A	A	A	A	R	A	A
41	T	W	W	T	T	N/A	W	T	W	T
42	A	R	A	A	A	A	A	A	R	A
43	A	R	R	A	A	R	R	A	R	W
44	T	Y	Y	T	T	T	T	T	Y	T
45	T	W	W	A	T	T	T	T	W	W
46	A	R	A	G	A	A	A	A	R	R
48	G	S	S	C	S	S	S	G	S	N/A
49	C	Y	C	C	C	C	C	C	Y	Y

주) R, 내병성 3품종; S, 이병성 3품종; SN, 세미놀; YG, 영과금감; ST, 세또까; BB, 베니바에; MN, 미네오라; HM, 하레히메; DG, 대곡이예감; LM, 리스본레몬; N/A, genotyping이 되지 않음; 노란색 하이라이트, 내병성 그룹과 SNP가 같거나 이병성 그룹의 SNP와는 다른 SNP.

이 연구로부터 개발된 궤양병 연관 SNP 마커의 확대 적용 결과, 하레히메는 4개, 금감은 5개 마커를 제외하고는 모두 내병성 품종에서 보이는 SNP와 같았고, 반대로 대곡이예감은 2개를 제외하고는 모두 이병성 SNP와 같았다. 속(genus)이 다름에도 불구하고 대표적 궤양병 내병성 품종인 금감은 28개 중 23개 SNP가 적용되는 점으로 보아서 본 연구에서 개발된 SNP 마커는 범용으로 적용 가능할 것으로 사료된다. 또한 이병성 품종 중 하나인 대곡이예감에서 2개 SNP만이 내병성과 같은 것으로 보아 개발된 SNP는 궤양병 연관 SNP일 가능성이 크다고 판단된다. 단, 궤양병 내병성 품종으로 알려진 세또까와 세미놀의 경우에 각각 21개(75%), 12개(43%) SNP가 내병성과 같은 SNP로 확인되었다. 이 결과로 보아 다양한 조합의 SNP를 이용하는 것이 다양한 품종을 검정하기 위하여 바람직하다고 사료된다.

이에 이에 3개의 마커를 3품종[내병성-푸치마루(PM); 이병성-그레이프후르트(GF), 대본취등(DB)]에 확대 적용하여 내병성, 이병성간 구분되는 것을 확인하였다(그림 2-10). 품종 외에 교배실생묘에 적용가능 여부를 확인하기 위하여 청견 x 궁내이예감 F1 실생묘에 적용하였다. 개발한 28개 SNP 마커 중 내병성 4 품종(청견, 부지화, 병굴, 세미놀)과 이병성

4 품종(하균, 궁내이에감, 황금 하균, 레몬)을 구분할 수 있는 10개의 SNP 마커를 선별하여 각각 2개씩의 F1 내병성 라인 및 이병성 라인을 대상으로 genotyping을 수행하였다. 수행한 10개 SNP 마커 중 1개의 SNP 마커가 F1 실생묘를 구분할 수 있었다(그림 2-11). 이 SNP는 병저항성 기작에 관여하는 것으로 알려져 있는 *R* gene내에 있는 것으로 확인되었다. *R* gene은 병저항성과 연관하여 가장 잘 알려져 있으나, 감귤 *R* gene에 대한 유전체 정보는 최근 Wang et al (2015)에 의해 *C. sinensis*와 *C. clementina* 유전체 분석으로 발표된 바 있다. 궤양병, 더덩이병 등에 대한 *R* gene의 중요성과 활용을 염두에 두어 본 연구에서도 국내에서 모본으로 주로 사용되는 청견 유전체 분석으로부터 150개의 TNL (TIR-NBS-LRR) 유전자와 165개의 CNL (CC-NBS-LRR) 유전자에 대한 정보를 확보하였다(자료 미제시). 본 연구에서 개발된 28개 SNP는 궤양병 연관 품종 구분 및 이 품종을 이용한 교배육종에 적용 가능성을 확인하였다.



그림 2-10. 내병성 및 이병성에 확대 적용한 SNP 마커에 대한 genotyping 결과.

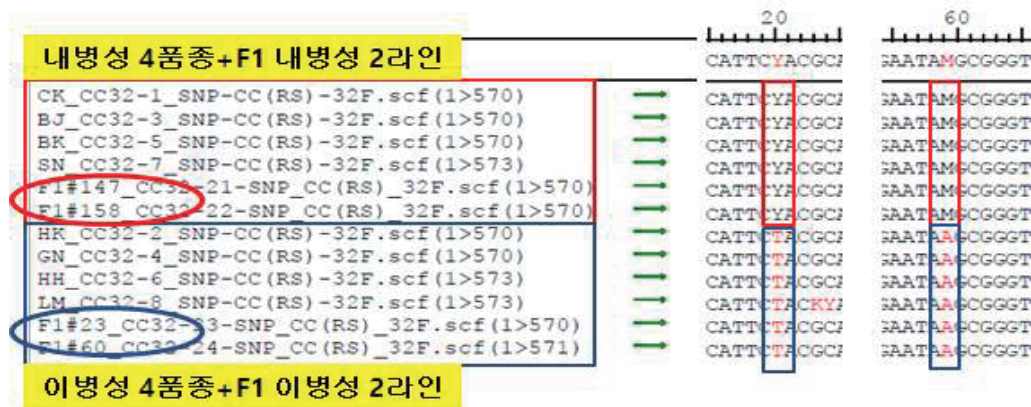


그림 2-11. 내병성, 이병성 및 F1 실생묘에 적용한 SNP에 대한 genotyping 결과.

## 2. 감귤 더덩이병 연관 분자표지 개발

### 가. 재료 및 방법

감귤 궤양병 연관 분자표지 개발에서와 동일한 식물재료 및 연구방법을 이용하였다.

### 나. 결과 및 고찰

### 1) RAPD 마커 개발

더뎡이병은 궤양병과 더불어 과실의 품질 저하 및 생산에 문제를 일으키는 것으로 알려져 있다. 아직 더뎡이병 연관 분자마커는 개발되어 있지 않은 실정이다. 국내 감귤 유전자원 중 더뎡이병에 강한 청견, Fallglo와 더뎡이병 발생이 심한 클레멘타인, 홍진의 교배를 통하여 현재 제3세부과제(세부과제 책임자-제주대학교, 송관정 교수)에서 청견 x 클레멘타인 교배실생 150 개체와 Fallglo x 홍진조생 교배실생 120 개체를 육성하였다. 청견, 클레멘타인 및 Fallglo, 홍진에 대하여 각각 RAPD 마커를 탐색하였다. 이에 대한 예시(E18~F15)는 다음과 같다(그림 2-12). 청견과 클레멘타인 간에서는 145개 RAPD 마커에서 polymorphic bands를 확인함. Fallglo와 홍진 간에서는 143개 RAPD 마커에서 polymorphic bands를 확인하였다.

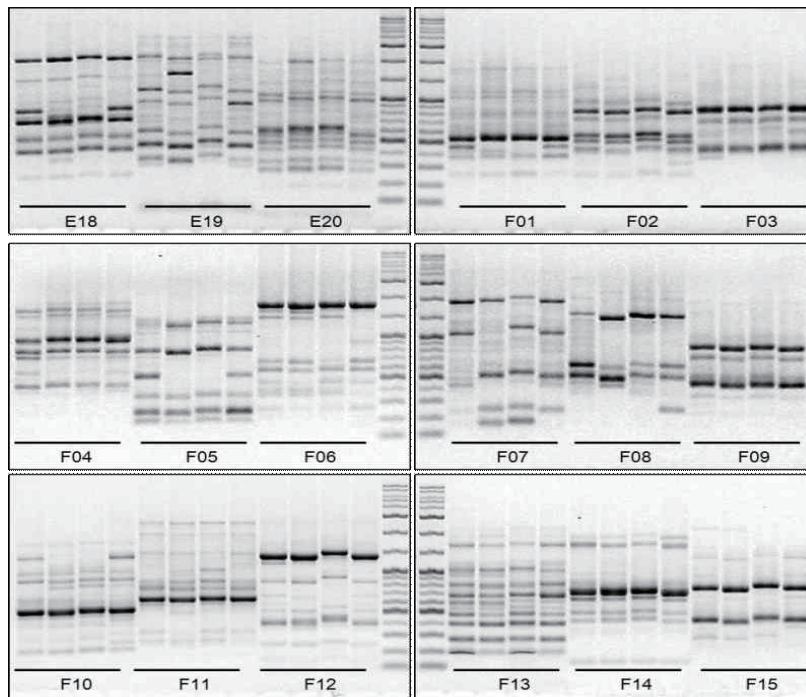


그림 2-12. 청견, 클레멘타인과 Fallglo, 홍진 간에서 RAPD 마커 E18~F15에 의한 polymorphic DNA의 확인.

더뎡이병 F1 교배 실생묘는 아직 병원균 감염이 되지 않아 형질 분석이 이뤄지지 않은 상태이다. 이에 F1 내병성, 이병성 라인들에 적용을 할 수 없는 관계로 다른 내병성, 이병성 품종에 적용하였다. 더뎡이병 연관 RAPD-SCAR 마커 발굴을 위하여 다른 내병성 품종인 병굴, 부지화와 이병성 품종인 궁천, 일남1호를 사용하였다. 즉, 내병성, 이병성 4품종씩(청견, Fallglo, 병굴, 부지화 vs 클레멘타인, 홍진, 궁천, 일남1호)의 genomic DNA를 각각 섞어 내병성, 이병성 2 그룹에 앞서 품종 간 polymorphic bands를 보인 RAPD 마커를 적용하였다. 이들 내병성 그룹과 이병성 그룹 간에 차이를 보이는 5개 후보 마커를 발굴하였다(그림 2-13).

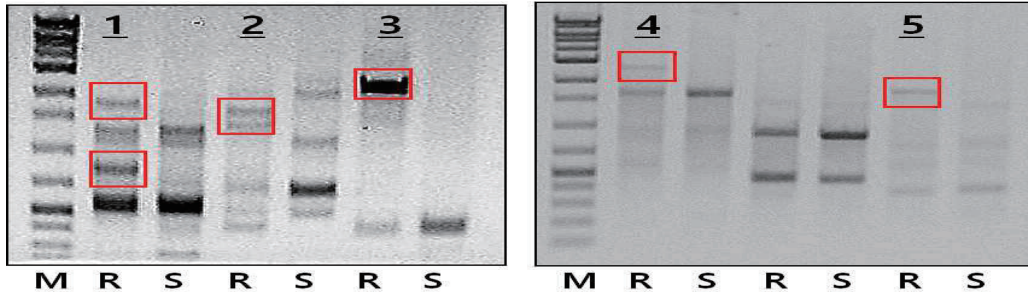


그림 2-13. RAPD-1, 2, 3, 4, 5 마커의 내병성, 이병성 그룹간 전기영동 사진.

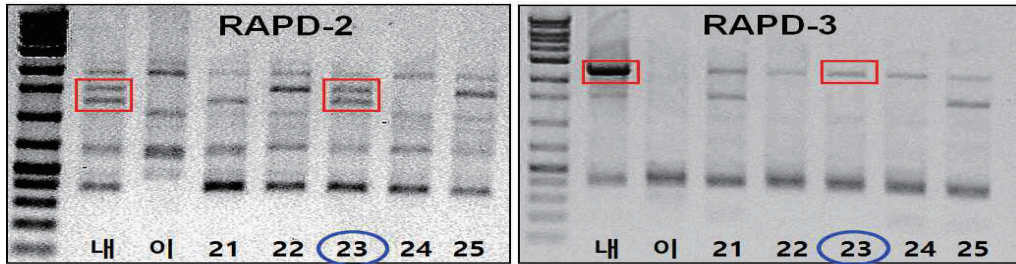


그림 2-14. RAPD-2, 3 마커를 이용하여 청건 x 클레멘타인 F1 5개 실생묘에 적용한 전기영동 사진.

이 5개 RAPD 마커를 F1 교배 실생묘에 적용하여 교배 실생묘간 분리가 되는지의 여부를 확인하였다. 청건 x 클레멘타인 F1 5개 라인에 RAPD 마커를 적용하였을 때, 5개 라인 중 1개의 라인에서 RAPD-2, 3번 마커가 보이는 polymorphic bands를 가지는 것으로 확인되었다(그림 2-14). 즉, #23 라인은 더댕이병 내병성을 보일 가능성이 있으며, 마커의 검정을 위하여 추후 계통별 병 검정을 수행하여야 한다.



그림 2-15. RAPD-2 마커를 이용하여 Fallglo x 흥진 F1 20개 실생묘에 적용한 전기영동 사진.



그림 2-16. RAPD-3 마커를 이용하여 Fallglo x 흥진 F1 20개 실생묘에 적용한 전기영동 사진.

Fallglo x 흥진 F1 20개 실생묘에 5개 RAPD 마커를 적용한 결과, RAPD-2, 3번은 20개 계통에서 분리되는 현상을 보이고, RAPD-1, 4, 5번은 20개 모두 동일한 PCR products를 보였다. RAPD-2번은 F1 4개 계통에서 내병성 품종과 동일한 polymorphic bands를 보이며 (그림 2-15), RAPD-3번은 F1 6개 계통에서 내병성 품종과 동일한 polymorphic bands를 보였다(그림 2-16). 이들 중 18번 계통은 RAPD-2, 3번 모두에서 내병성 품종과 동일한 polymorphic bands를 보였다. 즉, RAPD-2, 3번 마커는 더탱이병 연관 locus 내에 있을 가능성이 있기 때문에 SCAR 마커로 전환하고자 한다. 단, 2개의 마커만이 후보이므로 다양한 품종에 적용하기 어려울 수 있으며, 더탱이병의 경우 우리나라 등 일부 국가에 국한된 문제여서 그런지 논문이 많지 않고, 발현차이를 보이는 유전자에 대한 자료도 없기 때문에 유전체 정보 활용이 필수로 판단되었다.

## 2) SNP 마커 개발

더탱이병은 방어 기작은 크게 두 가지로 나뉜다고 보고되어 있어서 내병성 품종을 두 그룹으로 나누어 분석하였다. 즉, 내병성 3 품종(청견, 세미놀이, 세또까)과 이병성 5품종, 그리고 또 다른 내병성 3품종(병굴, 부지화, 금감)과 이병성 5품종에 대하여 분석을 수행하였다. Illumina HiSeq에서 얻어진 101 bp reads의 수는 부지화가 가장 적으며, 세미놀이 가장 많았다. 유전체 해독을 위하여 Phytozome database (www.phytozome.net)로부터 사용한 reference genome인 *C. clementina*의 약 301 Mb genome size에 비교하여 read 수가 가장 적은 부지화는 약 16배, 가장 많은 세미놀은 약 27배를 커버하였다(표 7). 이 reads를 대상으로 reference genome에 대해 mapping 하였을 때에 금감을 제외하고는 모두 90% 이상의 reads-mapping region을 확보하였다(표 2-7). 금감의 경우에 reference genome의 약 20.5 배에 해당하는 시퀀싱 정보를 얻었으나 mapping region은 약 76%로 다른 품종들에 비하여 확연히 떨어짐을 볼 수 있었다 이는 유일하게 금감(*Fortunella crassifolia*)이 reference (*Citrus clementina*)와 속이 다른 것과 연관이 있는 것으로 사료된다. 즉, 속간 유전자의 차이와 구조가 서로 다름을 추정할 수 있다.

표 2-7. 내병성 및 이.병성 품종들의 유전체 해독을 위한 시퀀싱 정보량.

형질	품종	Genome coverage	Mapping region
내병성	금감	≈20.52X	76.37%*
	병굴	≈16.42X	89.99%
	부지화	≈15.64X	91.87%
	세미놀이	≈26.81X	94.84%
	세또까	≈18.13X	91.85%
	Fallglo	≈19.28X	94.21%
	청견	≈18.79X	90.08%
이병성	클레멘타인	≈17.68X	97.48%*
	흥진	≈16.14X	90.45%
	궁천	≈17.92X	90.59%
	궁본	≈18.14X	90.56%
	일남1호	≈17.66X	90.67%

Reference genome과 각 품종에서의 염기변이를 비교한 후에 내병성, 이병성 품종간의 SNP를 비교하였다. 감귤의 경우 품종조차도 높은 heterozygosity를 보이므로 3가지 유형의 SNP로 나누어 조사하였다. 즉, homozygous SNP (reference genome에 mapping된 샘플의 reads의 90%가 동일한 SNP), heterozygous SNP (reference genome에 mapping된 샘플의 reads의 40-60%만 동일한 SNP)와 기타(homozygous/heterozygous로 구분할 수 없는 경우)로 나누어 조사하였다(표 2-8). 내병성, 이병성 샘플간의 SNP 비교분석은 각 샘플을 reference와 비교하여 얻은 총 SNPs에 대하여 샘플간 polymorphic SNP를 탐색하였다. 단, 실험상으로 검정시 어려움으로 인하여 기타 SNP의 유형은 제외하였다. 총 4가지 비교조합별 polymorphic SNP를 탐색하였는데, 교배조합인 청견, 클레멘타인간 890,243 polymorphic SNP가 탐색되었다. 다른 교배조합인 fallglo, 홍진 간에서는 921,456 polymorphic SNP가 탐색되었다. 두 교배조합 모두 polymorphic SNP와 non-polymorphic SNP의 비율은 약 1:3 정도로 확인되었다. কে양병 품종과 마찬가지로 두 품종간의 polymorphic SNP는 수십만 개에 이르므로 내병성, 이병성 품종들의 그룹간 polymorphic SNP 탐색을 필요로 한다.

표 2-8. 샘플별 SNP 유형 분류.

Sample	No. of total SNP	No. of Homozygous	No. of Heterozygous	No. of 기타
병귤	1,276,758	505,344	395,011	376,403
청견	2,187,550	693,471	622,203	871,876
클레멘타인	755,002	6,204	397,762	351,036
Fallglo	1,057,697	389,137	335,446	333,114
금감	949,130	855,138	42,929	51,063
부지화	1,275,602	439,727	435,384	400,491
홍진	1,922,790	755,910	479,561	687,319
일남1호	1,853,571	753,407	464,572	635,592
궁본	1,924,073	771,391	466,311	686,371
궁천	1,834,864	745,290	461,880	627,694
세또까	1,449,827	603,832	426,962	419,033
세미늘	2,019,538	622,994	670,573	725,971

표 2-9. 비교조합별 polymorphic SNP와 R gene내 polymorphic SNP 수.

비교조합	Polymorphic SNPs	Polymorphic SNPs in R genes
청견 vs 클레멘타인	890,243	12,265
Fallglo vs 홍진	921,456	11,522
금감, 병귤, 부지화 vs 궁천, 궁본, 홍진, 일남 1호, 클레멘타인	25,262	267
청견, 세미늘, 세또까 vs 궁천, 궁본, 홍진, 일남 1호, 클레멘타인	62,021	764

더탱이병 방어 기작에 따라 나눈 첫 번째 내병성 그룹(청견, 세미늘, 세또까)과 이병성 5 품종간에 62,021 polymorphic SNP가 탐색되었으며(표 2-9), 두 번째 내병성 3품종(병귤, 부지화, 금감)과 이병성 5품종간에는 25,262 polymorphic SNP가 탐색되었다. 두 내병성 그

룹에서 보이는 polymorphic SNP 개수의 차이는 앞서 언급했던 것처럼 금감의 경우에 속이 다른 관계로 다른 두 품종(병굴, 부지화)과 공통의 SNP 수가 상대적으로 적어서 이병성 그룹과 비교했을 때 첫 번째 그룹보다 적은 수의 polymorphic SNP가 탐색된 것을 사료된다.

내병성 두 그룹과 이병성 품종들 간의 수 만개의 polymorphic SNP가 탐색되었는데, 이 중 내병성 두 그룹 간 공통의 SNPs를 조사하였다. 공통적인 polymorphic SNP는 78개가 탐색되었고, 이들 78개 polymorphic SNP는 CDS에 17개, intron에 15개, UTR에 5개, intergenic region에 41개가 존재하였다. 총 78개 polymorphic SNP 중 genic region에 위치한 29개 polymorphic SNP를 대상으로 IGV 상에서 SNP를 확인하고 genotyping을 위하여 프라이머를 제작하였다. Genotyping 결과, 29개 중에서 16개 polymorphic SNP가 내병성 7 품종(청견, 세미놀, 세또까, 금감, 병굴, 부지화, fallglo)과 이병성 5품종(궁천, 궁본, 흥진, 일남1호, 클레멘타인)간에서 구분됨을 확인하였다(그림 2-17,18,19). 나머지 13개 SNP는 특정 품종에서의 INDEL 부위가 확인되어 검정이 어려웠으므로 이들에 대해서는 다른 방향의 프라이머를 사용하여 sequencing을 진행해 볼 필요가 있다.

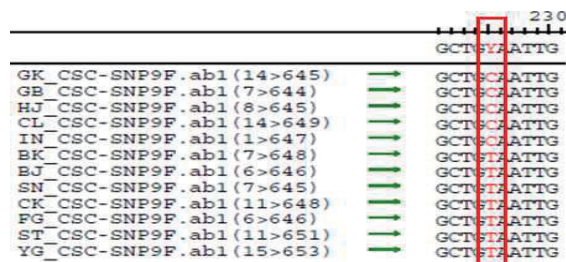


그림 2-17. SNP-9번 마커를 이용한 12품종의 genotyping 결과. GK, 궁천; GB, 궁본; HJ, 흥진; CL, 클레멘타인; IN, 일남1호; BK, 병굴; BJ, 부지화; SN, 세미놀; CK, 청견; FG, fallglo; ST, 세또까; YG, 금감.

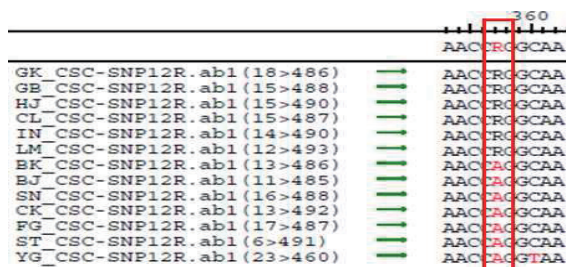


그림 2-18. SNP-12번 마커를 이용한 13품종의 genotyping 결과.

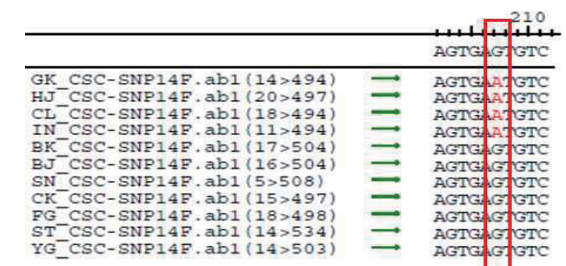


그림 2-19. SNP-14번 마커를 이용한 11품종의 genotyping 결과.



그림 2-17,18,19에서 탐색된 polymorphic SNP는 신호전달 매개자(serine/threonine kinase, protein phosphatase)와 단백질분해에 작용하는 유전자 내에 발생하였으며, 이들은 다른 식물들의 병 방어기작과 연관되어 있다고 보고되었다. 병 방어기작과 연관되어 가장 잘 알려진 R gene내 polymorphic SNPs도 조사하였다(표 2-9). R gene내 polymorphic SNPs는 첫 번째 내병성 그룹(청견, 세미놀, 세또까)과 이병성 5품종 간에 764개의 polymorphic SNP가 탐색되었다(표 2-9). 두 번째 내병성 3품종(병굴, 부지화, 금감)과 이병성 5품종 간에는 267개의 polymorphic SNP가 탐색되었다. 위에서 조사한 두 그룹간 공통적인 78개의 polymorphic SNPs 중에서 3개 polymorphic SNPs가 같은 R gene의 CDS 내에 존재함을 확인하였으며, 두 개의 SNP는 9 bp 간격으로 이에 대한 genotyping 결과는 그림 2-20과 같다.

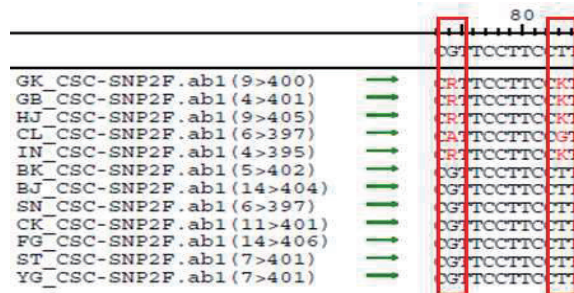


그림 2-20. SNP-2번 마커를 이용한 12품종의 genotyping 결과.

표 2-10. 내병성, 이병성 품종에 확대 적용한 16개 SNP에 대한 genotyping 결과.

Primer #	R(6 품종)	S(4 품종)	YG	CL	HM	RI	BB	MN	LM
2	G	R	R	A	G	R	G	G	A
3	A	W	A	W	A	W	A	A	A
4	C	Y	C	Y	C	Y	C	C	C
9	T	C	T	Y	T	T	T	T	T
12	A	R	R	R	A	A	A	R	R
14	G	R	G	R	G	G	G	G	G
16	A	M	A	M	A	A	A	A	M
17	C	Y	C	Y	C	C	C	C	C
20	C	Y	C	Y	C	C	C	C	C
21	T	A	W	A	W	T	T	T	T
22	A	W	N/A	W	A	A	A	A	N/A
24	A	M	A	M	A	M	A	A	A
25	G	R	G	A	G	A	G	G	G
26	A	W	W	A	W	A	A	A	A
27	A	W	A	W	A	A	W	A	A
29	T	Y	T	Y	T	T	T	T	T

R gene내 3개 polymorphic SNPs중 2개는 non-synonymous SNP로 확인됨, 즉, Leu이 Met으로, Val이 Leu으로 아미노산이 바뀌어 구조적인 변화를 일으킬 것으로 판단된다. R gene은 다른 단백질과 상호작용하여 신호를 인식, 전달하는 역할을 하므로 구조적인 변화는 큰 영향을 미칠 수 있다. 이에 2 non-synonymous SNP로 인한 3차 구조 변화에 대한

조사가 필요하며, 이는 더뎡이병 형질 연관에 아주 중요한 유전자 중의 하나일 수 있다. 더뎡이병 연관 마커 개발을 위한 분석으로부터 탐색되어 genotyping으로 검정한 총 16개 polymorphic SNPs에 대하여 다른 품종에 확대 적용하였다(표 2-10).

### 3) SSR 마커 개발

SSR 마커는 SNP에 비교하여 그 수가 훨씬 적고, 종 간 보존이 상대적으로 잘되어 있어서 분자 마커 개발을 위하여 현재도 발굴하여 사용되고 있다. *C. sinensis*에서 50,846개 SSRs이 보고된 바 있는데(Biswas et al., 2014), 이는 평균적으로 146.4 SSRs/Mb로 존재하는 것으로 확인된다. *C. clementine*에서는 80,708개 SSRs이 보고되었다(Liu et al., 2013). 이는 평균 268 SSRs/Mb 존재하는 것으로 확인되며, 실험적으로 95개 SSRs을 이용하여 18개 품종을 구별하는데 사용할 수 있음을 같은 논문에서 보고하였다. 더뎡이병 연관하여 내병성, 이병성 그룹간 SSR 마커가 잘 보존되어 분자마커로서의 활용 가능성을 살펴보았다. SNP 분자마커 탐색으로부터 얻어진 품종들의 유전체 정보를 활용하여 품종별 SSR 마커를 탐색하였다. 일차적으로, reference genome과 비교하여 각 품종에서의 SSR을 탐색하였다(표 2-11,12). 보고된 두 품종에서 발굴된 SSR 수보다 본 연구에서 많은 수의 SSR이 탐색되었는데, 이는 SSR 발굴 시, SSR의 반복수의 기준이 다른 것이 큰 영향을 준 것으로 사료된다.

표 2-11. 내병성 7품종에 대한 SSR 유형별 탐색된 수.

Motif type	CK	SN	ST	BJ	BG	FN	FG
P2	13,344	14,318	14,076	14,289	13,093	9,340	14,732
P3	8,410	8,728	8,651	8,817	8,209	6,239	9,027
P4	4,431	4,583	4,522	4,703	4,377	3,201	4,793
P5	8,179	8,376	8,321	8,675	8,093	5,629	8,793
P6	159,962	161,247	161,657	166,646	158,198	126,544	166,357
P7	46,687	46,861	47,126	48,819	45,801	35,543	49,017
P8	16,247	16,401	16,482	17,326	15,971	11,803	17,417
P9	6,828	6,842	6,932	7,310	6,650	4,663	7,336
P10	2,352	2,366	2,323	2,562	2,120	1,351	2,620
<b>Total</b>	<b>266,440</b>	<b>269,722</b>	<b>270,090</b>	<b>279,147</b>	<b>262,512</b>	<b>204,313</b>	<b>280,092</b>

표 2-12. 이병성 5품종에 대한 SSR 유형별 탐색된 수.

Motif type	CK	SN	ST	BJ	BG	FN	FG
P2	13,344	14,318	14,076	14,289	13,093	9,340	14,732
P3	8,410	8,728	8,651	8,817	8,209	6,239	9,027
P4	4,431	4,583	4,522	4,703	4,377	3,201	4,793
P5	8,179	8,376	8,321	8,675	8,093	5,629	8,793
P6	159,962	161,247	161,657	166,646	158,198	126,544	166,357
P7	46,687	46,861	47,126	48,819	45,801	35,543	49,017
P8	16,247	16,401	16,482	17,326	15,971	11,803	17,417
P9	6,828	6,842	6,932	7,310	6,650	4,663	7,336
P10	2,352	2,366	2,323	2,562	2,120	1,351	2,620
<b>Total</b>	<b>266,440</b>	<b>269,722</b>	<b>270,090</b>	<b>279,147</b>	<b>262,512</b>	<b>204,313</b>	<b>280,092</b>

표 2-13. 교배조합간 polymorphic SSR 수.

구분	청견 vs 클레멘타인	Fallglo vs 흥진
Polymorphic SSR	3,725	3,994
Non-polymorphic SSR	200,982	109,335

이차적으로, 탐색된 SSR을 교배 조합간 polymorphic SSR을 탐색하였다(표 2-13). Fallglo, 흥진간의 교배조합에서 약간 많은 SSR이 발굴되었지만 품종 간 비교에서는 표 2-13에서 보는 바와 같이 실험상으로 검정하기에는 많은 수의 SSR이 탐색되어 다수의 품종들을 같이 비교하는 것이 필요하다고 판단된다. 내병성, 이병성 그룹간 polymorphic SSR은 탐색 중에 있으며, 탐색 후 genotyping을 수행하여 다른 품종으로 확대 적용 할 예정이다. 확대적용 후, 필요에 의해 SNP 마커로 전환하여 개발된 16개 SNP 마커에 더하여 사용 가능여부를 살펴볼 예정이다.

### 3. 감귤 교잡배 판별 SSR 마커 개발

#### 가. 재료 및 방법

감귤 궤양병 연관 분자표지 개발에서와 동일한 식물재료 및 연구방법을 이용하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

##### 1) 감귤 교잡배 판별을 위한 SSR 마커 개발

대부분의 피자식물(angiosperm)에서 종자당 하나의 배(embryo)가 발달한다. 그러나 부지화(일명, 한라봉)를 비롯한 많은 다배성(polyembryony) 감귤 품종에서 무수정 생식(apomixis) 현상에 의해 하나의 종자 안에 접합배(zygotic embryo) 외에도 주심배(nucellar embryo)가 발달한다. 주심배는 배주(ovule) 내에서 배낭(embryo sac)을 둘러싸는 주심조직(nucellar tissue)에서 발달하며, 유전적 조성이 모본과 동일한 것으로 알려져 있다. 따라서 주심배는 교배육종 효율을 상당히 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다. 따라서 감귤 교배 육종 과정에서 교잡배와 주심배를 손쉽게 구분하기 위한 DNA 분자마커가 필요하다. 본 세부프로젝트에서는 감귤 교배집단에서 교잡배 유래 유묘를 손쉽게 구분하기 위한 SSR (Simple Sequence Repeat) 마커를 발굴하고자 하였다.

감귤에서 주심배와 교잡배 또는 그 유래의 식물체를 구분하는 다형성 SSR 마커를 선별하기 위한 첫 단계로 Luro 등(2008)에 의해 보고된 Expressed Sequence Tag (EST) 기반의 41개 SSR과 Ollitrault 등(2010)에 의해 보고된 bacterial artificial chromosome (BAC) end 유래의 77개 SSR 정보를 사용하였다. 더 많은 다형성 SSR 마커를 확보하기 위하여, 'Fina Sodea' 클레멘타인 만다린과 병굴에 대한 표준 유전체 기반 resequencing과 비교 유전체 분석을 토대로 *in silico* 발굴을 통해 확보한 40 개의 다형성 후보 SSR 마커를 사용

하였다. 또한 하귤과 황금하귤에 대한 비교 유전체 분석으로부터 확보한 10 개의 다형성 후보 마커를 사용하였다. 이들 SSR 마커들에 대해 아가로스 겔 전기영동 양상과 DNA 단편 분석(fragment analysis) 결과를 토대로 여러 감귤 그룹에 속하는 11개 품종간에 다형성을 보이는 SSR 마커를 선발하였다(자료 미제시): 즉, 레몬 그룹 - 'Lisbon' 레몬(*C. limon* 'Lisbon lemon'); 만다린 그룹 - 클레멘타인 만다린(*C. clementina*), 궁천조생(*C. unshiu* 'Miyagawa Wase'), 홍진조생(*C. unshiu* 'Okitsu Wase'), 일남1호(*C. unshiu* 'Nichinan 1 gou'); 사우어오렌지 그룹 - 하귤(*C. natsudaidai*); 오렌지 그룹 - *C. sinensis* 'Sanggwinnelli'; 시트론 그룹 - *C. sphaerocarpa*, 유자(*C. junos*); 탄귤 그룹 - 부지화(*C. hybrida* 'Shiranuhi'), 청견(*Citrus hybrid* 'Kiyomi'). SSR 마커들의 다형성 테스트를 통해 최종적으로 17 개의 다형성 SSR 마커를 선발하였으며, BM-CiSSR-xxx로 명명하였다(자료 미제시).

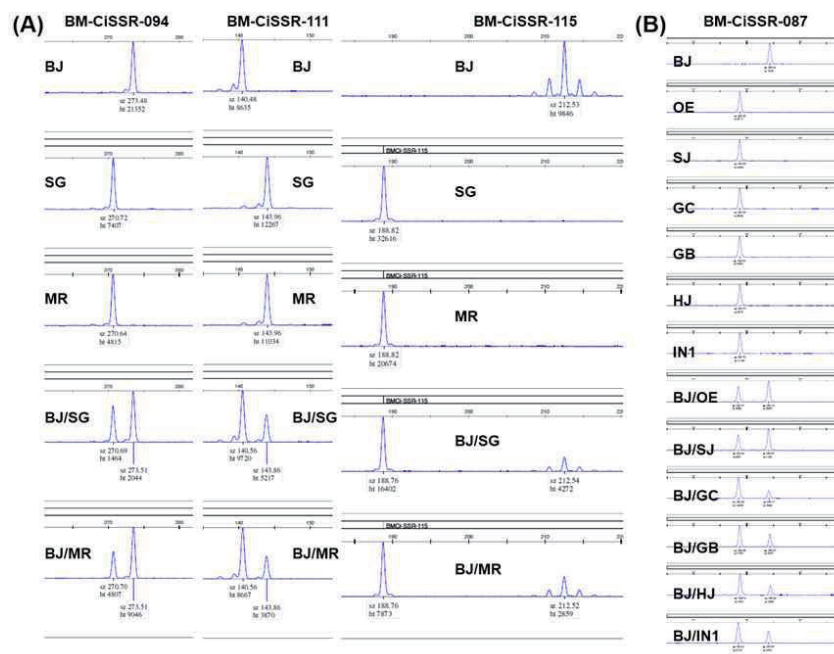


그림 2-21. 감귤 교잡배 판별 SSR 마커를 활용한 fragment analysis 예시. (A) 부지화(♀)x오렌지류(♂) 교배조합에서 3개의 SSR 마커를 활용한 교잡배 판별 예시. BJ, 부지화; SG, 상귀넬로; MR, 모로; BJ/SG, 부지화와 상귀넬로의 교잡배; BJ/MR, 부지화와 모로의 교잡배. (B) 부지화(♀)x온주밀감류(♂) 교배조합에서 1개의 SSR 마커를 활용한 교잡배 판별 예시. BJ, 부지화; OE, 오이다; SJ, 성전; GC, 궁천; GB, 궁본; HJ, 홍진; IN1, 일남1호; BJ/OE, 부지화와 오이다의 교잡배; BJ/SJ, 부지화와 성전의 교잡배; BJ/GC, 부지화와 궁천의 교잡배; BJ/GB, 부지화와 궁본의 교잡배; BJ/HJ, 부지화와 홍진의 교잡배; BJ/IN1, 부지화와 일남1호의 교잡배.

발굴된 polymorphic SSR 마커들로부터 부지화(♀) x 오렌지류(♂) 교배시 교잡배 판별에 활용가능한 3개의 SSR 마커를 발굴하였으며, 부지화(♀) x 온주밀감류(♂) 교배시 교잡배 판별에 활용가능한 3개의 SSR 마커를 발굴하였다. 개발한 마커를 감귤 GSP 과제의 2 프로젝트 1세부(국립원예특작과학원 감귤연구소-연내 수확용 부피경감 온주밀감 품종 개

발), 2세부[(주)제농-조숙 홍피 만다린 품종 개발], 3세부[(주)바이오에그진엔텍-조숙 강세 만다린 품종개발] 및 4세부[한농바이오산업(주)-적육 관피 만다린 품종 개발]에 분석 서비스 또는 제품을 제공하여 교배 육종시에 교잡배의 조기 선발에 활용하고 있다(그림 2-21).

「Citrus Genetic Hybrids Detection Kit」 및 분석 플랫폼을 출시하여(그림 2-22) 현재 21,021,000원의 매출을 확보하였으며, 향후 매출의 점진적 확대가 전망된다. 「Citrus Genetic Hybrids Detection Kit/System」 제품(분석 서비스 형태)을 감귤 육종 프로그램이 운영되고 있는 지중해/중남미/호주 지역 등에 수출하기 위하여 영문과 스페인어 브로셔를 제작하였다(그림 2-23).

**Citrus Genetic Hybrids ID™ Platform**

The flowchart shows the process: **Samples** (Leaf, Developing seeds) → **Analysis** (Genotyping for parent plants: Male, Female; Genotyping for F1 plants: Male, Female, Hybrid) → **Report**.

**Citrus Genetic Hybrids Detection Kit** details:

**특징** (Description):  
 - 다양한 품종(종교배)에서 유래한 유전자 발현 패턴을 분석하여 교잡배를 식별하는 데 사용됩니다.  
 - 교잡배를 식별하는 데 사용되는 유전자 마커는 교잡배의 유전자 발현 패턴을 식별하는 데 사용됩니다.  
 - 교잡배를 식별하는 데 사용되는 유전자 마커는 교잡배의 유전자 발현 패턴을 식별하는 데 사용됩니다.  
 - 교잡배를 식별하는 데 사용되는 유전자 마커는 교잡배의 유전자 발현 패턴을 식별하는 데 사용됩니다.

**특징** (Features):  
 - Taq polymerase 미생물 사용으로 염색이 빠릅니다.  
 - Hot Start Taq polymerase를 사용하여 비특이적 증폭을 방지합니다.  
 - DNA ladder를 사용하여 PCR 결과의 정확성을 보장합니다.

Kit No.	Contents	Price
BM-DK-7001	- 2x HS Taq polymerase mix - SSR primer sets - 100 bp DNA ladder - Nuclease-free water	문의
BM-DK-7001G	- 2x HS Taq polymerase mix - SSR primer sets - 100 bp DNA ladder - Nuclease-free water - Plant genomic DNA-prep kit (125 prep)	문의

제품 구입 및 분석 서비스 문의: Tel : 032-218-1515 E-mail : info@biomedic.co.kr  
 | 바이오에그진 | 경기도 부천시 한곡길 276 무궁화역사빌딩 (본사 908호, 연구소 908호)  
 www.biomedic.co.kr

그림 2-22. 감귤 교잡배 판별 분자마커 제품 소개 브로셔 및 분석 플랫폼(Citrus Genetic Hybrids ID™ Platform).

**Citrus Genetic Hybrids Detection Kit** (English) and **Kit de detección de híbridos genéticos para cítricos** (Spanish).

**Product Description:**  
 - In most angiosperms, a single embryo usually develops per seed. However, in some cultivars of Citrus, many nucellar embryos alongside the zygotic embryo develop in an individual seed by apomictic processes. The nucellar embryos are isolated directly from the maternal nucellar tissue surrounding the embryo sac containing a developing zygotic embryo, and is known to be genetically identical to the female parent. Therefore, the nucellar embryos greatly decrease breeding efficiency by genetic crosses. Citrus breeding programs require DNA molecular markers to easily identify nucellar embryos and zygotic embryo.  
 - In order for Citrus breeders to easily identify zygotic embryo-derived seedlings from the genetic crosses, Life Sciences Research Institute, Biomedic Co., Ltd. developed SSR (Simple Sequence Repeat) marker sets.

**Product Features:**  
 - Designed to maximize researcher's convenience by using Taq polymerase mixture.  
 - By using Hot Start Taq Polymerase which provides highly specific amplification, the clear and clean PCR results without non-specific amplification are guaranteed.  
 - Guarantee confident selection of zygotic embryo-derived seedlings by using several selective SSR markers.

Genotyping using BMDI-SSR-087 marker      Genotyping using BMDI-SSR-111 marker

Catalog Number	Product Contents	Price
BM-DK-7001	- 2x HS Taq polymerase mix - SSR primer sets - 100 bp DNA ladder - Nuclease-free water	Inquiry
BM-DK-7001G	- 2x HS Taq polymerase mix - SSR primer sets - 100 bp DNA ladder - Nuclease-free water - Plant genomic DNA-prep kit (125 prep)	Inquiry

For purchasing and analysis service inquiry, Tel : 032-218-1515; e-mail : info@biomedic.co.kr  
 Biomedic Co., Ltd., Mugwang-Office Building, 276 Gilju-ro, Woonni-gu, Bucheon-si, Gyeonggi-do, Korea 420-852 (Main Office #908, Life Sciences Research Institute #904) www.biomedic.co.kr

**Descripción del producto:**  
 - En la mayoría de las angiospermas, un solo embrión se desarrolla por semilla. Sin embargo, en algunas variedades de cítricos, muchos embriones nucelares se desarrollan junto al embrión cigótico en una sola semilla por proceso de apomixis. Los embriones nucelares se desarrollan directamente del tejido nucelar materno que rodea el saco embrionario que contiene al cigoto en desarrollo, y son genéticamente idénticos al progenitor femenino. Por esta razón, el embrión nucelar tiene menor eficiencia reproductiva por cruces genéticos. El sistema de cría de los cítricos requiere ADN marcador molecular para identificar fácilmente los embriones nucelares y cigóticos.  
 - Con el fin de facilitar a los criadores de cítricos la identificación del embrión cigótico derivado de cruces genéticos, en el Instituto de Investigación de Genética de la Vida, Biomedic Co., Ltd. desarrolló marcadores SSR (Simple Sequence Repeat).

**Beneficios del producto:**  
 - Diseñado para maximizar la conveniencia de los científicos mediante el uso de mezcla de Taq Polimerasa.  
 - Proporcione amplificación altamente específica y el resultado limpio mediante el uso de Hot start Taq Polimerasa el cual reduce el riesgo de amplificación inespecífica o no deseada.  
 - Garantizar la selección segura de plantas derivadas del embrión cigótico mediante el uso de los varios marcadores selectivos SSR.

Genotipado usando marcador BMDI-SSR-087      Genotipado usando marcador BMDI-SSR-111

Número de Catálogo	Contenido del producto	Price
BM-DK-7001	- 2x HS Taq polymerase mix - SSR primer sets - 100 bp DNA ladder - Nuclease-free water	Consulta
BM-DK-7001G	- 2x HS Taq polymerase mix - SSR primer sets - 100 bp DNA ladder - Nuclease-free water - Plant genomic DNA-prep kit (125 prep)	Consulta

Para consultas de compra y servicio de análisis, Tel : 032-218-1515; e-mail : info@biomedic.co.kr  
 Biomedic Co., Ltd., Mugwang-Office Building, Gilju-ro, 276 Woonni-gu, Bucheon-si, Gyeonggi-do, Korea 420-852 (Main Office #908, Life Sciences Research Institute #904) www.biomedic.co.kr

그림 2-23. 감귤 교잡배 판별 분석 서비스 플랫폼인 「Citrus Genetic Hybrids Detection Kit/System」의 해외 수출을 위한 영문(왼쪽) 및 스페인어(오른쪽) 브로셔.

2) 감귤 교잡배 판별 SSR 마커의 추가 선발 및 확대 적용

체계적이며 목표지향적인 감귤 육종 프로그램을 위해 101 점의 감귤 유전자원을 수집하였다. 다배성은 많은 감귤 품종에서 발견되는 유전형질이며, 전통적 교배 육종에 의한 감귤 신품종 육성에 커다란 걸림돌로 작용하고 있다. 수집된 감귤 유전자원을 본격적인 육종 프로그램에 사용하기 전에, 어떠한 유전자원이 주심배에 의해 야기된 다배성 표현형을 갖는지를 조사하기 위하여 먼저 성숙종자에 대한 다배성 검정을 수행하였다. 101 점의 유전자원 중에서, 22 점은 단배성, 54점은 다배성 표현형을 보였다. 나머지 25점은 하나의 열매에 단배성인 종자와 다배성인 종자가 섞여있는 혼합형을 보였다(표 2-15). 종합해서 정리하면, 현재까지 수집된 감귤 유전자원에 대한 다배성 분석 결과, 다배성 형질이 다양한 감귤 그룹에 광범위하게 분포함을 보여준다. 이전에 보고된 바에 따르면, 주요 감귤 그룹에서 주심배 유식물의 출현빈도는 감귤 그룹에 따라 0 에서(‘Kishiu’ 만다린과 11개 푸멜로 품종)에서 100%까지(‘Dancy’와 “Kara” 만다린) 다양하다(Frost and Soost, 1968; Kepiro and Roose, 2007). 혼합형을 구분된 문단(*C. grandis*)을 제외하고, 본 연구에서 조사된 푸멜로 그룹에 속하는 모든 품종은 단배성이었다. 주심배를 갖는 나무에 의해 만들어진 모든 종자가 여러 개의 성숙한 배를 갖는 것은 아니다. 정상적인 유성생식이 주심배 형질을 가진 유전형(genotype)에서도 일어날 수 있다. 주심배 형질을 가진 유전형은 몇 가지 서로 다른 유형의 종자를 만들어 낼 수 있다: 즉, 하나의 성숙한 교잡배를 갖는 종자, 하나의 성숙한 주심배를 갖는 종자. 여러 개의 성숙한 주심배를 갖는 종자, 하나의 성숙한 교잡배와 하나 이상의 성숙한 주심배를 갖는 종자(Wakana and Uemoto, 1988; Kepiro and Roose, 2007). 그러므로 혼합형을 보여주는 25개의 감귤 유전자원도 다배성으로 분류될 수 있다.

표 2-15. 감귤 유전자원에 대한 다배성 확인.

Citrus group	품종명	Seed No.	Embryo type	Citrus group	품종명	Seed No.	Embryo type	Citrus group	품종명	Seed No.	Embryo type	
Grape fruit	Pstarb ruby	3.0	P	문단	당유자	6.5	Mx	유자	대전금	25.0	P	
	골든스페이스	18.5	Mx		마두문단	17.2	M		대보취동	11.3	P	
	그레이프푸룻	44.0	P		만백유	0.0	Seedless		산골	6.2	P	
Kumquat	금감	1.3	Seedless		문단	31.5	M		소유자	29.0	Seedless	
	푸치마루	3.0	Seedless		사두감	29.7	M		스타치	0.0	Seedless	
Lime	라임	0.0	Seedless		수유	21.3	M		유자목두	28.3	Seedless	
	레몬	8.7	P		일항하	44.7	M		유자산근	24.0	P	
Lemon	리스본레몬	23.0	Mx		팔삭	8.8	M		유자채대	27.7	P	
	말레몬	15.7	Mx		홍팔삭	1.9	M		56-423	22.0	Mx	
	후로스트유레카	11.0	Mx		김하골	20.0	Mx		S-1129	0.0	Seedless	
	기주밀감	10.0	M		삼보감	25.2	Mx		궁내이에감	9.3	M	
Mandarin	길전병감	12.7	P	Sour orange	선솔트	16.7	Mx	Tangor	대곡이에감	5.7	Mx	
	노바	0.0	Seedless		신감하	18.5	Mx		부지화	3.5	P	
	덴시	5.3	P		좌동	23.7	Mx		비품	0.0	Seedless	
	데미지	16.0	Mx		지각	26.2	P		세토카	1.0	P	
	동정골	10.7	Mx		카보스	18.4	P		유명	0.0	Seedless	
	미호골	0.0	P		하골	20.3	Mx		주건	6.3	Mx	
	병감	11.0	P		황금하골	15.0	Mx		진지향	0.2	Seedless	
	병감우종자	3.0	P		월전네물	1.0	P		침초	0.0	Seedless	
	빈골	4.7	P		발렌시아라이트	2.3	P		침견	0.0	Seedless	
	올란드	0.0	Seedless		백유네물	0.2	P		침봉	0.0	Seedless	
	원교아단배성1호	0.0	Seedless		복일네물	0.0	Seedless		하례희메	0.0	Seedless	
	일화오렌지	19.7	Mx	삼전네물	0.0	Seedless	하루미	0.0	Seedless			
	조향	4.5	P	상귀넬리	3.0	P	Tangelo	미네오라	10.3	P		
	중아3호병감	4.0	P	영목네물	0.0	Seedless		사토노카오리	0.3	Mx		
	진골	14.3	P	청가네물	0.0	Seedless		세미늘	13.0	P		
	클레멘틴	16.7	M	타로코	0.0	Seedless		스위트스프링	1.4	Mx		
	Mandarin	페이지	0.0	Seedless	Satsuma mandarin	함린	3.0	P	Unclassified	타마미	8.0	M
편골		20.7	Mx	금죽우주		0.0	Seedless	인창골		12.3	P	
피나소데아		3.8	M	기주구		0.0	Seedless	중국황화		18.0	M	
하루카		13.7	Mx	청수4호		0.0	Seedless	홍진46호		6.3	Mx	
홍골		8.6	Mx	홍죽우주		0.0	Seedless	홍진47호		14.3	M	
홍우병감		7.1	P	편사		0.0	Seedless					
문단		금감자	13.5	P		황문감	0.0	Seedless				

6개 감귤 그룹에 속하는 11개 품종에 대한 다형성 테스트를 통해 선발한 17개의 SSR

마커를 이용하여 M13-tailed PCR 방식을 이용하여 101 점의 감귤 유전자원에 대한 유전형 분석을 수행하였다(표 16). 실험에 사용된 자원에 대해 각 마커별 검출 가능한 대립유전자의 수(allele number)는 최소 5개(BM-CiSSR-087)~최대 16개(BM-CiSSR-162)였다. BM-CiSSR-162 마커가 가장 높은 다형성을 가지며, 각 마커별 대립유전자의 크기와 수는 표 16에 정리하였다.

표 2-16. 17개 polymorphic SSR 마커를 이용한 101개 감귤 유전자원의 유전형 분석(예시).

Citrus group	Species/Cultivar name	국명	BM-CiSSR-082	BM-CiSSR-087	BM-CiSSR-093	BM-CiSSR-094	BM-CiSSR-100	BM-CiSSR-111
	<i>C. aurantium</i>	지각	154	189	152/166	268/277	198/206	141
	<i>C. sphaerocarpa</i>	카보스	145/156	184/189	152/156	271	192/204	141/147
	<i>C. natsudaikai</i>	하귤	154	184/189	152/156	271/274	198/203	140
	<i>C. natsudaikai</i> 'Whanggumhagyu'	황금하귤	153	184/189	152/156	271/274	197/203	140
Orange	<i>C. sinensis</i> 'Yoshida Navel'	길전네블	155	184/189	152/156	271	198/203	144
	<i>C. sinensis</i> 'Valencia Late'	발렌시아레이트	156	184/189	152/156	271	198/203	144
	<i>C. sinensis</i> 'Shirayanagi Navel'	백유네블	155	184/189	152/156	271	198/203	144
	<i>C. sinensis</i> 'Fukuichi Navel'	복일네블	155	184/189	152/156	271	197/203	144
	<i>C. sinensis</i> 'Morita Navel'	삼전네블	155	184/189	152/156	271	199/203	140
	<i>C. sinensis</i> 'Sanguinelli'	상귀넬리	155	184/189	154/156	268/271	198/203	140/147
	<i>C. sinensis</i> 'Suzuki Navel'	영목네블	156	184/189	152/156	271	198/203	144
	<i>C. sinensis</i> 'Seike Navel'	청가네블	155	184/189	152/156	271	198/203	144
	<i>C. sinensis</i> 'Tarocco'	타로코	156	184/189	152/156	271	198/203	144
	<i>C. sinensis</i> 'Hamlin'	함린	156	184/189	152/156	271	198/203	144
	Citron	<i>C. junos</i> 'Tadanishiki'	다전금	145/151	189	152	271	192/206
<i>C. sphaerocarpa</i>		대본취등	145/156	184/189	152/156	271	192/203	140/147

(중간 생략)

Unclassified	<i>Citrus</i> spp. 'Inchangkyul'	인창귤	150/155	184	152	274	198/206	140
	<i>C. pseudogulgu</i>	중국황화	156	189	152/154	271	198/203	141/144
	<i>Citrus</i> hybrid 'Okitsu no. 46'	홍진 46 호	152/156	184/189	152	268/274	198/203	140
	<i>Citrus</i> hybrid 'Okitsu no. 47'	홍진 47 호	154	189	152/156	271/277	203	141/144
	<i>Citrus</i> hybrid 'Haruka'	하루카	153	184/192	152/156	271	203	140
Allele No.			10	5	6	8	9	8

자방친과 화분친간 다형성을 보이는 SSR 마커를 적용하여 다배성 품종을 자방친으로 사용한 교배조합들에서 유래한 F1 식물체 집단으로부터 교잡배 유래 식물체를 구분 가능한지의 여부를 조사하였다. 다배성 자방친 품종으로는 '세또카', '하루미', '노바', '페이지', 화분친으로는 '만백유'와 '문단'을 사용하였다. 비교실험을 위한 단배성 자방친 품종으로는 '청견', '에히메 28호(*Citrus* hybrid 'Ehime Kashi 28 gou')', '하레히메', 화분친으로는 '세미놀'과 '올란도'를 사용하였다. 각 교배조합간 자방친과 화분친 간에 다형성을 보이며 분석이 용이한 마커는 다음과 같다: '세또카' x '만백유' - BM-CiSSR-032, BM-CiSSR-100; '하루미' x '만백유' - BM-CiSSR-032, BM-CiSSR-073, BM-CiSSR-077; '노바' x '만백유' - BM-CiSSR-032, BM-CiSSR-159, BM-CiSSR-115b; '페이지' x '만백유' - BM-CiSSR-077, BM-CiSSR-115b; '세또카' x '문단' - BM-CiSSR-032, BM-CiSSR-100; '청견' x '세미놀' - BM-CiSSR-013; '에히메 28호' x '올란도' - BM-CiSSR-012, BM-CiSSR-087; '하레히메' x '올란도' - BM-CiSSR-012, BM-CiSSR-013,

BM-CiSSR-087.

각 교배조합별로 다형성 SSR 마커를 사용하여 교잡배 여부를 판별하기 위한 유전형 (genotype) 분석을 수행한 결과, 다배성 품종을 자방친으로 사용한 5개 교배조합 중에서 ‘세토카’ x ‘만백유’ 교배조합에서 1개, ‘페이지’ x ‘만백유’ 교배조합에서 3개의 교잡배가 확인되었다(표 16; 그림 24, 25). 그러나 ‘하루미’ x ‘만백유’, ‘노바’ x ‘만백유’, ‘세토카’ x ‘문단’ 교배조합의 경우에는 사용된 모든 마커에서 교잡배를 확인할 수 없었다(표 16). 반면, 단배성 품종을 자방친으로 사용한 ‘청견’ x ‘세미놀’, ‘에히메 28호’ x ‘올란도’, ‘하레히메’ x ‘올란도’ 3개 교배조합에서 유래한 모든 F<sub>1</sub>식물은 각각의 분석 유전좌위에 대해 자방친의 대립유전자와 화분친의 대립유전자를 동시에 갖는 교잡배로 확인되었다(표 2-16).

표 2-16. 여러 교배조합 유래 F1 계통들에 대해 polymorphic SSR 마커를 이용한 교잡배 유래 개체의 확인. P, polyembryony; M, monoembryony.

Genetic Crosses <sup>a</sup>	Embryony type of female plant <sup>b</sup>	Used SSR markers <sup>c</sup>	No. of tested plant <sup>d</sup>	No. of genetic hybrid <sup>e</sup>
Citrus hybrid 'Setoka' x C. maxima 'Banbeivu' <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	BM-CiSSR-032 <sup>c</sup> BM-CiSSR-100 <sup>c</sup>	98 <sup>d</sup>	1 <sup>e</sup>
Citrus hybrid 'Harumi' x C. maxima 'Banbeivu' <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	BM-CiSSR-115b <sup>c</sup>	38 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>
C. reticulata 'Nova' x C. maxima 'Banbeivu' <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	BM-CiSSR-115b <sup>c</sup>	98 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>
C. reticulata 'Page' x C. maxima 'Banbeivu' <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	BM-CiSSR-115b <sup>c</sup> BM-CiSSR-077 <sup>c</sup>	48 <sup>d</sup>	3 <sup>e</sup>
Citrus hybrid 'Setoka' x C. maxima <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	BM-CiSSR-032 <sup>c</sup>	54 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>
Citrus hybrid 'Kivomi' x Citrus hybrid 'Seminole' <sup>a</sup>	M <sup>b</sup>	BM-CiSSR-013 <sup>c</sup>	5 <sup>d</sup>	5 <sup>e</sup>
Citrus hybrid 'Ehimekashi No. 28' x Citrus hybrid 'Orlando' <sup>a</sup>	M <sup>b</sup>	BM-CiSSR-012 <sup>c</sup> BM-CiSSR-087 <sup>c</sup>	5 <sup>d</sup>	5 <sup>e</sup>
Citrus hybrid 'Harehime' x Citrus hybrid 'Orlando' <sup>a</sup>	M <sup>b</sup>	BM-CiSSR-012 <sup>c</sup> BM-CiSSR-013 <sup>c</sup> BM-CiSSR-087 <sup>c</sup>	5 <sup>d</sup>	5 <sup>e</sup>

‘페이지’ x ‘만백유’ 교배조합에서 3개 식물체가 교잡배 유래로 판단되었는데, BM-CiSSR-115b마커로 유전형 분석을 수행한 결과, 화분친의 대립유전자 피크가 낮게 나오거나(37번, 45번) 화분친의 대립유전자만 검출되었다(40번). 이들 3개의 식물체가 교잡배 유래인지의 여부를 재검정하기 위하여 BM-CiSSR-077마커로 유전형 분석을 수행한 결과, 40번과 45번 식물체의 경우 자방친과 화분친의 대립유전자를 동시에 갖는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 37번 식물체의 경우, 검출된 2개의 대립유전자 중에서 하나는 자방친의 대립유전자와 일치하였으나 다른 하나의 대립유전자는 자방친과 화분친에 존재하지 않는 새로운 대립유전자였다. BM-CiSSR-115b마커를 이용한 40번 식물의 유전형 분석에서 화분친의 대립유전자만 검출되는 반면, BM-CiSSR-077마커의 경우 자방친과 화분친의 대립유전자를 모두 검출하였다(그림 25). 이러한 결과는 BM-CiSSR-115b 유전좌위(마커)에 대해 자방친에서는 하나의 대립유전자만이 검출되어 상동접합(homozygote)으로 판단할 수 있으나(그림 2-25A), 실제로는 대립유전자가 이형접합(heterozygote) 상태로 존재하기 때문에 생긴 현상으로 판단된다. 즉, 자방친에서 BM-CiSSR-115b 유전좌위는 한쪽 상동염색체는 무효 대립유전자(null allele) 상태로 존재하는 것으로 사료된다. 따라서 무효 대립유전자를 갖는 배



우체(gamete)와의 수정에 의해 유래한 F1 식물체는 BM-CiSSR-115b 유전좌위(마커)에 대해 화분친의 대립유전자만이 검출된다. BM-CiSSR-077마커를 이용한 37번 식물체의 유전형 분석 결과에서 자방친과 화분친에 존재하지 않는 새로운 대립유전자가 검출되었다. BM-CiSSR-077은 2개 염기(AT)가 반복되는 SSR 마커인데, 37번 식물체에서 새로 출현한 대립유전자는 화분친 또는 자방친의 대립유전자에 비해 4개 염기가 길거나 짧다(그림 25B). SSR 변이는 세대당 유전좌위당  $10^{-2} \sim 10^{-6}$ 의 속도로 일어나며, 이는 단백질 암호화 구역에서의 점 돌연변이(point mutation) 속도에 비해 매우 높은 것으로 알려져 있다(Li et al., 2002). SSR의 불안정성은 반복단위의 수에 있어서의 변화가 대표적인데, SSR 변이(반복단위의 증가 혹은 감소)의 주요 기작은 DNA 복제과정에서 DNA 가닥의 미끄러짐(slippage)과 DNA 가닥 사이의 재조합(recombination)으로 알려져 있다(Li et al., 2002; Ellegren, 2004). BM-CiSSR-077 유전좌위에 대해 37번 식물체에서 새로운 대립유전자의 출현은 배우체 생성 과정에서 상기 두 가지 기작 중의 하나에 의해 발생한 것으로 사료된다.

다양한 다배성 품종을 자방친으로 사용한 교배조합에서 유래한 F1 식물체들에 대해 SSR 마커를 이용한 유전형 분석 결과는 주심배에 의한 다배성 현상이 교배육종의 효율을 현저히 떨어뜨릴 뿐만 아니라 육종 비용의 막대한 증가를 유발시킴을 제시하여 준다. 따라서 다형성 SSR 마커를 활용한 교잡배 판별은 효율적인 분자육종 체계를 구축하는데 있어서 매우 유용한 기술이라 할 수 있다.

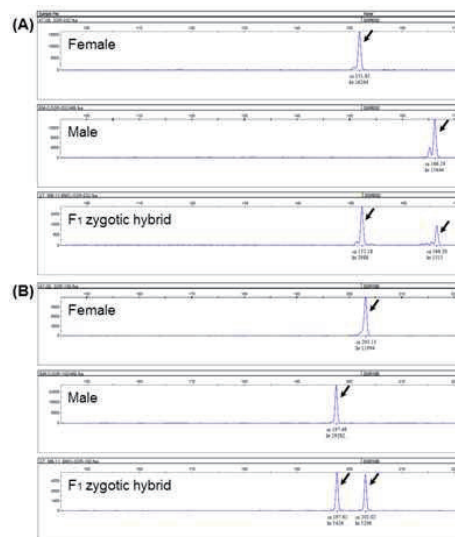


그림 2-24. ‘세또카’ x ‘만백유’ 교배조합에서 BM-CiSSR-032 마커(A)와 BM-CiSSR-100 마커(B)를 이용한 유전형 분석 결과. Female, 자방친(‘세또카’); Male, 화분친(‘만백유’); F<sub>1</sub> zygotic hybrid, 자방친과 화분친의 대립유전자를 갖는 교잡배. 화살표는 검출된 대립유전자 피크를 나타냄.

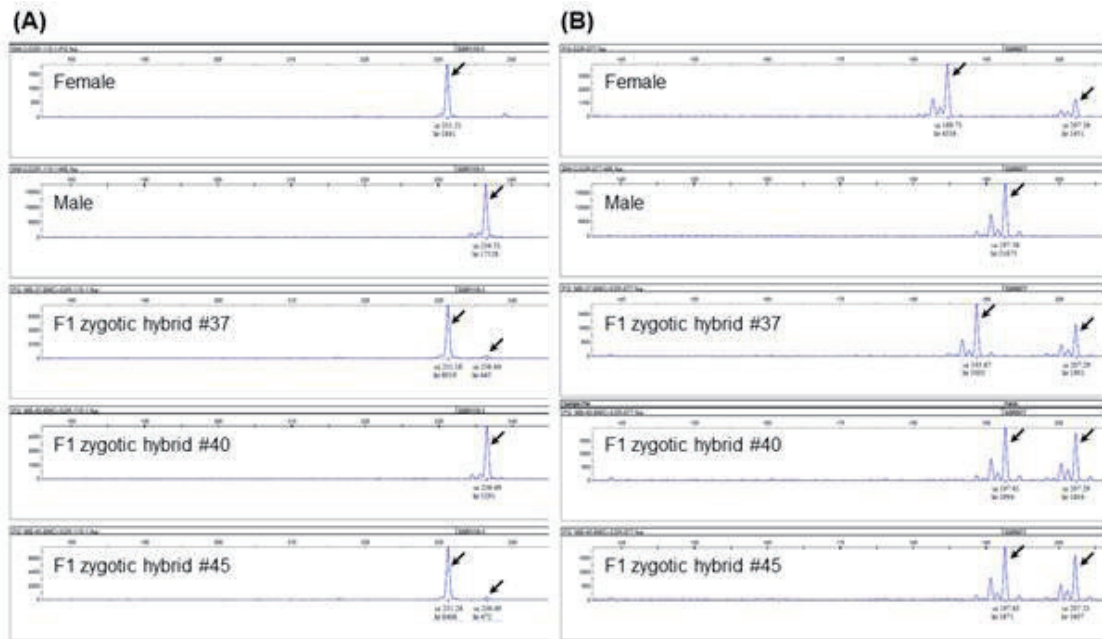


그림 2-25. ‘페이지’ x ‘만백유’ 교배조합에서 BM-CiSSR-115b 마커(A)와 BM-CiSSR-077 마커(B)를 이용한 유전형 분석 결과. Female, 자방친(‘페이지’); Male, 화분친(‘만백유’); F<sub>1</sub> zygotic hybrid, 자방친과 화분친의 대립유전자를 갖는 교잡배. 화살표는 검출된 대립유전자 피크를 나타냄.

#### 4. 감귤 홍피 형질연관 분자표지 개발

##### 가. 재료 및 방법

감귤 궤양병 연관 분자표지 개발에서와 동일한 식물재료 및 연구방법을 이용하였다.

##### 나. 결과 및 고찰

###### 1) 유전체 정보 분석 및 홍피 형질 연관 후보 SNP 마커 발굴

감귤 홍피 형질 연관 분자표지 개발은 2프로젝트 2세부프로젝트를 수행하고 있는 (주)제농(과제명-조숙 홍피 만다린 품종 개발)과의 협력 연구를 통해 수행하였다. 감귤 홍피 관련 분자표지를 개발하기 위하여 (주)제농으로부터 홍피 연관 품종인 미네오라(MN), 베니바에(BB), 세미놀(SN)과 홍피가 아닌 스위트스프링(SS)을 제공받아 유전체 분석을 수행하였다. 유전체 서열 확보는 Illumina HiSeq 플랫폼을 이용하여 수행하였으며, Illumina HiSeq에서 얻어진 reads를 대상으로 quality를 조사하고 reads를 trimming하였다. Reference genome으로 사용된 *Citrus clementina* (Phytozome v9.1: [www.phytozome.net](http://www.phytozome.net))에 reads를 alignment하여 reference genome을 대상으로 각 품종별 consensus sequence를 작성하였다. 품종별 약 33-34x 정도의 reference genome을 커버할 정도의 유전체 정보량을 확보하였다. 생산된 reads의 quality를 SolexaQA package를 이용하여 trimming 한 후, 품종별로 약 25-26x 정도의 reference genome을 커버할 정도의 유전체 정보를 최종적으로 확보하였다(표 2-17). 이 정보량은 품종당 reference genome의 94% 이상을 커버함으로 분자 마커 개

발을 위하여 변이 분석을 수행하였다(표 2-18). 홍피색을 띄지 않는 품종이 스위트스프링(SS) 하나이므로 기존에 본 세부프로젝트에서 확보한 비홍피 청건(CK) 품종을 포함하여 reference genome과 비교하여 품종당 SNP를 추출하였다. Reference genome에 mapping된 샘플의 reads의 90%가 동일한 SNP type을 나타내는 경우를 homozygous SNP라 하고, 40%~60%만 동일한 SNP type을 heterozygous SNP로 분류하였다(표 2-19). 최종, 홍피 품종과 비홍피 품종간 SNP를 추출하였다(표 2-20).

표 2-17. Trimming 후의 유전체 정보 데이터.

Sample name	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>4 ea</b>	<b>439,625,116</b>	<b>88.12</b>	<b>38,739,918,783</b>	<b>76.52%</b>	

표 2-18. Reference genome에 대한 reads mapping 결과.

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%)

표 2-19. Reference와 비교 유전체 분석을 통한 SNP 발굴 결과.

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

표 2-20. 홍피와 비홍피 품종 간 SNP 발굴 결과.

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

홍피 품종인 미네오라, 바니바에, 세미늘, 클레멘타인과 비홍피 품종인 청건, 스위트스프링의 염기서열을 IGV 상에서 비교하여 24개의 SNP 지역에 대하여 HRM 분석용 프라이머를 제작하였다. 제작된 마커는 9개의 CDS 지역과 4개의 UTR, 9개의 Intron 지역 그리고 2개의 intergenic 지역에 위치하고 있다(자료 미제시). 제작된 마커를 이용하여 HRM을 수행한 결과 Melting Curves에서 9개의 마커(38%)가 홍피와 비홍피 2개의 그룹으로 나뉘어지는 결과를 나타내어 홍피 관련 마커로 선정하였다(그림 2-26).

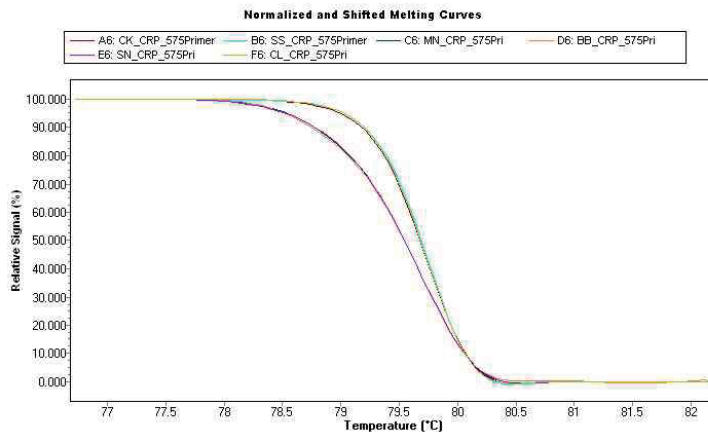


그림 2-26. Terpenoid cyclase protein (Ciclev10006575)의 SNP가 홍피 그룹과 비홍피 그룹을 구분함을 보여주는 HRM 검정 예시.

2) 홍피 형질 연관 후보 SNP 마커의 교배 분리집단에서의 적용

홍피 형질 연관 후보 SNP 마커의 교배 분리집단에서의 적용 가능 여부를 확인하기 위하여 (주)제농으로부터 에히메28호(AH28)와 병감(BG) 교배조합 유래 6개 F1 계통(홍피 계통 3개-11G149, 11G209, 11G232; 비홍피 계통 3개-11G110, 11G126, 11G229)의 잎 시료를 제공받았다. 실험에서 대조군으로 홍피 샘플인 미네오라(MG)와 비홍피 샘플인 스위트스프링(SS)을 사용하였고, 부모세대인 AH28과 BG 샘플도 함께 실험에 사용하였다. 상기 시료들로부터 genomic DNA 를 추출하여 9개 SNP 후보 마커들에 대해 HRM 분석을 수행하였다. 9개의 마커 중에서 CRP-HRM-Ciclev105220-2 마커의 경우, 비홍피 품종인 스위트스프링과 3개 비홍피 계통, 홍피 품종인 미네오라와 3개 홍피 계통을 구분함을 보여주었다(그림 2-27; 표 2-21). 따라서 CRP-HRM-Ciclev105220-2 마커는 에히메28호와 병감 교배조합에서 홍피 계통의 조기 선발에 활용될 수 있는 마커로 판단되나 더 많은 수의 추가 계통들에

대한 추가 검정이 필요하다.

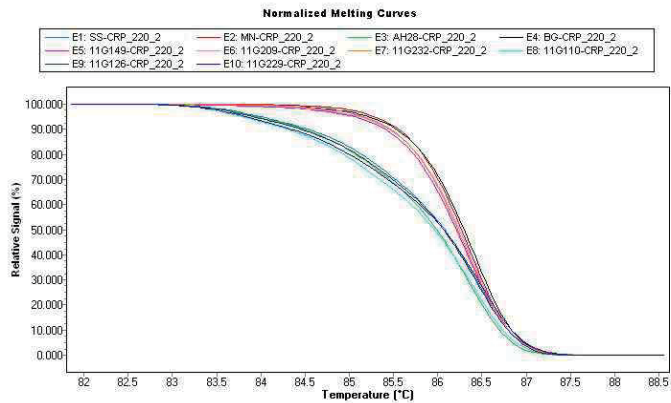


그림 2-27. CRP-HRM-Ciclev105220-2 마커를 스위트스프링(SS), 미네오라(MN), 에히메28호(AH28), 병감(BG)과 에히메28호x병감 교배조합 F1 6 계통(11G149, 11G 209, 11G232, 11G110, 11G126, 11G229)에 적용한 결과.

표. 2-21. HRM 마커를 스위트스프링(SS), 미네오라(MN), 에히메28호(AH28), 병감(BG)과 에히메28호x병감 교배조합 F1 6 계통(11G149, 11G 209, 11G232, 11G110, 11G126, 11G229)에 적용한 결과를 그래프의 형태에 따라 2개의 그룹으로 나누어 표시.

구분	마커	06575	20042	23578-1	05787	105220-2	22253	16841-2	9-30375856	11841-2
	품종/계통									
비홍피	스위트스프링	1	2	2	1	1	1	2	1	-
홍피	미네오라	2	1	1	2	2	2	1	2	-
모본	에히메28호	2	1	1	1	1	2	1	1	-
부분	병감	1	1	1	2	2	2	1	2	-
홍피	11G149	2	1	1	2	2	2	1	2	-
	11G209	2	1	1	1	2	2	1	2	1
	11G232	1	1	1	1	2	2	1	1	-
비홍피	11G110	1	1	1	1	1	2	1	2	-
	11G126	1	1	1	1	1	2	1	1	-
	11G229	1	1	1	2	1	2	1	1	-

### 제 3 절 반수체 유래 동질사배체를 이용한 무핵 삼배체 우량계통 육성

#### 1. 동질사배체 유도기술 확립 및 대량 유도

##### 가. 재료 및 방법

##### 1) 콜히친 처리 및 배수성 유도

콜히친 처리 및 배수성 유도는 수체상 액아 직접처리 후 생장유도 방식, 접수 침적처리 및 일반 접목 후 생장유도 방식, 접수의 액아 절취 침적처리 및 기내 암발아 탱자묘 접목 후 생장유도 방식, 접수의 액아 절취, 침적처리 및 온실 암발아 탱자접목 후 생장유도 방식, 종자의 침적처리 후 파종 발아유도 방식, 수체 잎 제거 및 침적처리 후 생장유도 방식의 6가지 방식으로 수행하였다. 수체상 액아 직접처리 후 생장유도 방식은 중생선발과 베니바에 온주밀감 품종의 봄순에 잎을 제거하고 액아를 솜으로 감싸고 파라필름으로 감아 고정한 후 0.1, 0.2, 0.3% 농도의 콜히친을 주입하고 광분해를 억제하기 위해 호일로 피복하여 12, 24, 48시간 동안 처리하였다.

접수 침적처리 및 일반 접목 후 생장유도 방식은 신초 당 3개의 액아를 포함하도록 하였으며, 처리 당 5개의 신초를 설정하였다. 또한 접수를 채취한 후 0.1, 0.2, 0.3% 농도의 콜히친 용액에 12, 24, 48시간 동안 침지한 다음 포트에 심겨진 탱자 대목에 접목하였다. 처리 접수는 3개의 눈을 포함하도록 하였으며, 처리별 접수의 수는 청견에서 9개, 하레히메에서 7개, 중생선발에서 14개였다. 또한 청견, 타로코, 남진해 품종에 대해 처리 시간을 약간 달리(24, 48, 72시간)하여 10개 접수씩 처리하였다. 품종에 대해 1처리 후 생장이 유도된 다음 신엽의 일부를 절취하여 배수성검경기(flow cytometry, PA-II, Partec, Munster, Germany)로 배수성을 분석하였다(그림 6-1).



<수체상 처리>



<수체 처리 후 생육>



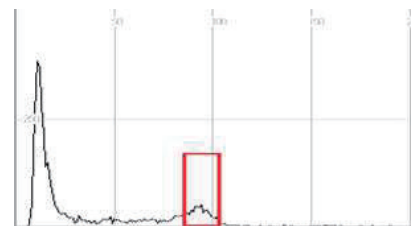
<배수성 검경기>



<접수처리 후 접목>



<접목 후 발아>



<배수성 검정>

그림 6-1. 감귤 콜히친 처리 전후의 식물체 및 배수성 검경기

접수의 액아 절취, 침적처리 및 기내 암발아 탱자묘 반미세 접목 후 성장유도 방식은 전년도 생육한 가지를 봄에 발아 전 채취하거나 봄순의 가지를 당해연도에 채취하여 액아만을 후 2mm 내외의 크기로 절취한 후 0.2% 농도의 콜히친 용액에 2시간 동안 침지하였다. 이를 기내 암발아 탱자에 클린벤치에서 반미세(semi-micro) 절접한 다음, MS 액체 배지에서 성장을 유도하였다(그림 6-2).

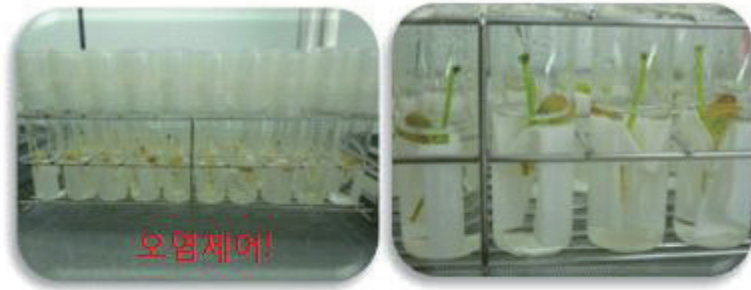
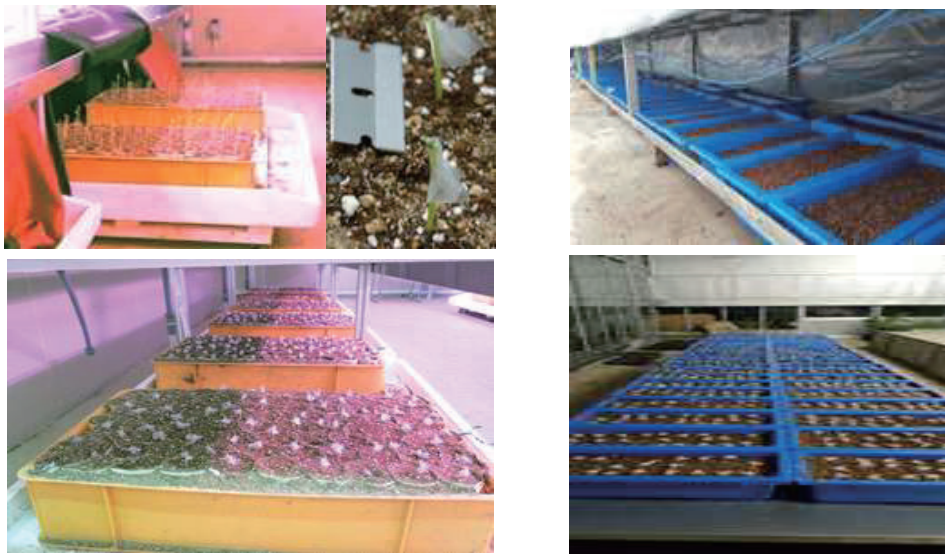


그림 6-2. 감귤 콜히친 처리 후 기내접목 및 배양

접수의 액아 절취, 침적처리 및 온실 암발아 탱자접목 후 성장유도 방식은 전년도 생육한 가지를 봄에 발아 전 채취하거나 봄순의 가지를 당해연도에 채취하여 액아만을 후 2mm 내외의 크기로 절취한 후 0.1, 0.2, 0.4% 농도의 콜히친 용액에 10, 20, 40분 동안 감압과 함께 2시간 침지하였다. 탱자 종자 파종 후 암상태에서 2주 내외 발아시킨 탱자의 줄기에 절접방식으로 처리한 액아를 반미세접목하였다. 접목 부위를 파라필름으로 감은 후 박과 식물의 접목 집계를 이용하여 고정하였으며, 인공광 설치의 성장조절실 또는 자연광 상태의 온실에서 성장을 유도하였다(그림 6-3).



<반미세접목 및 성장조절실 성장유도>

<반미세접목 및 온실 성장유도>

그림 6-3. 감귤 콜히친 처리 후 반미세 접목 및 성장유도

종자 처리 방식은 다배성 품종에 대해 과실에서 종자를 채취한 후 종피 일부를 제거하

고 0.05, 0.2, 0.8% 농도의 콜히친 용액에 24, 48, 72시간의 침지 처리한 다음 파종상에 파종하여 발아시켰다. 또한 수체 잎 제거 및 침적처리 후 생장유도 방식은 포트에 심겨진 감귤의 잎을 모두 제거하여 7일 내외로 발아를 유도한 다음 식물체를 0.1% 농도의 콜히친 용액에 10분 동안 침지하여 처리하였다. 이후 조직배양 순화실에서 생장이 유도되었으며, 발아한 신초의 잎을 절취하여 배수성을 검정하였다.

## 2) 오리잘린 처리 및 배수성 유도

오리잘린 처리는 콜히친 처리와 유사하게 수행하였다. 신초 당 3개의 액아를 포함하도록 접수를 채취한 후 0.01, 0.02, 0.04% 농도의 오리잘린 용액에 24, 48, 72시간 동안 침지한 다음 포트에 심겨진 탕자 대목에 접목하여 생장을 유도하였다. 청견, 감평, 성전온주 등의 품종을 이용하였으며, 처리 당 10개 접수를 이용하였다. 또한 침지 2시간을 고정하고 감압을 10분과 20분으로 달리하여 처리하였다. 그 외에도 종자의 종피를 일부 제거한 후 0.005, 0.02, 0.08% 농도의 오리잘린 용액에 24, 48, 72시간 동안 침지한 후 파종상에 파종하여 발아를 유도하였다.

## 3) 배수성 고정도 분석

4배성 또는 2배성과 4배성이 혼재하는 신엽을 포함하는 액아를 발아하도록 유도한 후 새로 자라난 신엽을 절취하여 배수성검경기로 배수성 고정 여부를 분석하였다.

## 나. 결과 및 고찰

### 1) 콜히친 처리 및 배수체 유도

중생선발과 베니바에 온주밀감의 수체상 액아에 직접 콜히친을 처리한 후 생장을 유도하였는데, 베니바에의 경우는 모든 액아가 발아하지 않고 고사하였고, 중생선발의 경우는 3개 액아가 발아하였으나, 배수성 검경결과 모두 2배성으로 판정되었다. 콜히친 처리 후 액아가 대부분 고사하여 발아율이 낮은 것은 다소 연약한 신초를 선정 처리한 것은 물론 0.4%의 다소 높은 농도와 48시간의 장시간 처리와 관계되는 것으로 생각된다. 또한 발아한 신초의 배수성에 변화가 없는 것은 처리한 콜히친이 액아 내부의 생장점까지 침투하지 못했거나 또는 침투가 일부 되었다라도 생장점 분열 시기와 일치하지 못했기 때문인 것으로 생각되었다.

청견, 베니바에, 중생선발의 3개 품종에 대해 접수를 절취하여 3개의 액아를 갖도록 조제한 다음 콜히친 침지 후 탕자에 접목하여 생장한 신초의 잎을 절취하여 배수성 검정을 수행한 결과는 표 6-1과 같다. 품종과 처리 농도 및 시간에 따라 발아율 및 4배성 발생율에 있어서는 다소 차이를 나타내었다. 품종에 따라서는 처리 후 액아 발아율은 하례히메에서 다소 높은 33.9%를, 중생선발에서 가장 낮은 11.4%를 나타내었으나, 4배성 발생율은 청견에서 다소 높은 6.6%를, 하례히메에서 다소 낮은 2.6%를 나타내었다. 처리 농도 및 시간



에 따라서는 처리 농도와 시간이 짧을수록 액아 발아율과 4배성의 발생율이 높아지는 경향이 있었다.

표 6-1. 감귤 접수 콜히친 처리 및 일반 접목 후 신초의 배수성 평가 (1년차).

품종	농도 %	시간 hr	처리수	발아수	배수성				
					2X	Chimeric	4X	고정도	
청견	0.1	12	27	8	5	1	2	-	
		24	27	16	4	6	6	-	
		48	27	1	1	0	0	-	
	0.2	12	27	4	0	2	2	-	
		24	27	6	3	0	3	-	
		48	27	0	0	0	0	-	
	0.4	12	27	3	1	0	2	-	
		24	27	2	1	0	1	-	
		48	27	0	0	0	0	-	
	소계			243	40(16.5%)	15	9	16(6.6%)	0
	하레히메	0.1	12	21	18	16	2	0	-
			24	21	20	15	4	1	-
48			21	8	6	2	0	-	
0.2		12	21	8	5	1	1	-	
		24	21	5	3	1	1	-	
		48	21	1	1	0	0	-	
0.4		12	21	4	1	1	2	-	
		24	21	0	0	0	0	-	
		48	21	0	0	0	0	-	
소계			189	64(33.9%)	48	11	5(2.6%)	0	
중생선발		0.1	12	42	9	0	5	4	-
			24	42	9	6	3	0	-
	48		42	1	0	0	1	-	
	0.2	12	42	9	0	6	3	-	
		24	42	7	1	4	2	-	
		48	42	4	3	1	0	-	
	0.4	12	42	3	1	0	2	-	
		24	42	1	0	0	1	-	
		48	42	0	0	0	0	-	
	소계			378	43(11.4%)	11	19	13(3.4%)	0

청견, 타로코, 남진해 품종에 대해 침적 시간을 이전의 품종과 달리 24, 48, 72시간으로 변형하여 처리한 결과는 표 6-2와 같다. 처리시간이 길어짐에 따라 발아율이 크게 감소하였고, 이에 따라 배수성 획득도 제한적으로 나타났다. 품종에 따른 반응도 이전 실험과 유사하게 다른 것으로 나타났다. 청견의 경우는 이전의 실험과 비교하여 발아율과 배수성 반응이 낮게 나타났는데, 이는 접수의 상태 및 대목의 상태와 접목 후 온도 및 물 관리 등 식물 관리상의 차이에 의한 것으로 생각되어졌다. 그러므로 콜히친 처리 및 접목관리 등 배수체 유도에 있어서 숙련된 기술이 요구됨을 알 수 있었다.

병귤, 진귤, 천초, 조향 등 다배성 품종의 종자를 채취하여 종피를 일부 제거하고 처리 당 재래귤 90립씩, 재배품종 200립씩 총 5,220립을 콜히친 용액에 침지한 후 파종하였는데, 발아

하지 않아 배수성 분석을 하지 못하였다. 이는 5월의 온실의 온도가 고온으로 관리되었고, 종자를 3개월 저장함으로서 발아력이 감소하였으며, 종피를 제거하여 처리함으로서 침투가 용이하여 농도 장애의 발생 등 복합적으로 작용하여 발아하지 못한 것으로 판단되었다.

표 6-2. 감귤 접수 콜히친 처리 및 일반 접목 후 신초의 배수성 평가 (2년차).

품종	농도 %	시간 hr	처리수	발아수	배수성			
					2X	Chimeric	4X	고정도
청견	0.1	24	30	3	3	-	-	
		48	30	5	4	1	-	
		72	30	0				
	0.2	24	30	1	1	-	-	
		48	30	0				
		72	30	0				
	0.4	24	30	0				
		48	30	0				
		72	30	0				
	소계			270	9(3.3%)	8	1	-
타로코	0.1	24	30	4	4	-	-	
		48	30	3	3	-	-	
		72	30	0				
	0.2	24	30	0				
		48	30	0				
		72	30	0				
	0.4	24	30	0				
		48	30	0				
		72	30	0				
	소계			270	7(2.6%)	7	-	-
남진해	0.1	24	30	0				
		48	30	0				
		72	30	0				
	0.2	24	30	0				
		48	30	0				
		72	30	0				
	0.4	24	30	0				
		48	30	0				
		72	30	0				
	소계			270	0(0%)			

접목 후 활착을 증진하고 생육을 촉진하기 위해 조직배양계를 이용하는 방식을 청견과 하례조생 품종을 이용하여 평가하였다. 그러나 접수의 액아를 멸균하는 것이 완벽하지 못하여 오염율이 70% 정도로 매우 높게 나타났으며, 기외의 경우 접목부를 집계로 고정할 수 있음에 반해 기내에서는 집계를 사용하지 못하게 됨으로서 접목부 유합이 저하되는 경향을 나타내어, 활착 증진 및 생육 촉진의 방향과는 반대의 결과를 나타내었다. 일부 활착하여 발아한 신초의 경우 2배성으로 나타나서, 배수성 유도에도 효율성을 보장하지 못했다.

접수의 액아 절취, 침적처리 및 온실 암발아 탱자접목 후 생장유도 방식이 청견, 하례히메, 감평 등 4개 품종을 이용하여 평가되었다(표 6-3). 처리 후 활착율에 있어서는 품종별

로 차이는 없는 편이었는데, 배수성 획득율에 있어서는 감평에서 다소 높고 나타났다. 콜히친 농도와 감압처리 시간에 있어서는 콜히친 농도 0.1% 또는 0.2% 및 감압 10분 또는 20분 처리에서 효과적인 것으로 나타났다. 전체적으로 총 11,900개 접아에 대해 활착율은 6%로 720개가 활착되었으며, 4배성 18개로 총 처리에 대해 0.15%, 활착수에 대해 2.5%를 보였으며, 키메라는 총 처리에 대해 0.03%, 활착수에 대해 0.56%를 나타내었다. 이들 식물체 및 배수성 검정은 그림 6-4와 같다.

표 6-3. 감귤 접수 콜히친 2시간 침지 처리 및 반미세 접목 후 신초의 배수성 평가.

품종	농도 %	감압 min	처리수	발아수	배수성			
					2X	Chimeric	4X	고정도
칭견	0.1	10	400	47	47	-	-	
		20	500	39	39	-	-	
		40	300	5	5	-	-	
	0.2	10	400	28	26	-	2	
		20	700	34	34	-	-	
		40	300	3	3	-	-	
	0.4	10	300	9	9	-	-	
		20	400	3	3	-	-	
		40	300	1	1	-	-	
	소계			3,600	169(4.7%)	167	0	2
하레히메	0.1	10	300	58	56	1	1	
		20	400	32	32	-	-	
		40	300	12	12	-	-	
	0.2	10	400	36	35	-	1	
		20	600	43	43	-	-	
		40	300	8	8	-	-	
	0.4	10	300	11	11	-	-	
		20	300	6	6	-	-	
		40	300	2	2	-	-	
	소계			3,200	208(4.7%)	206	1	2
감평	0.1	10	500	53	44	1	8	
		20	400	41	36	2	3	
		40	200	14	14	-	-	
	0.2	10	300	31	30	-	1	
		20	300	28	26	-	2	
		40	200	8	8	-	-	
	0.4	10	300	7	7	-	-	
		20	300	6	6	-	-	
		40	200	1	1	-	-	
	소계			2,700	189(7.0%)	172	3	14
기타	0.1	10	400	40	40	-	-	
		20	400	32	32	-	-	
		40						
	0.2	10	400	43	43	-	-	
		20	400	25	25	-	-	
		40						
	0.4	10	400	9	9	-	-	
		20	400	5	5	-	-	
		40						
	소계			2,400	145(6.0%)	145	0	0

타마미 및 스위트 스프링 등 포트에 심겨진 나무의 잎을 모두 제거하고 0.1% 농도의 콜히친 용액에 가지를 10분간 침지하여 처리한 후 생육상에서 발아를 유도하였다. 대부분 눈들이 발아하여 콜히친 처리 후 암발아 탱자에 접목하는 경우와 비교하여 활착 정도는 매우 높은 편이었다. 1개월 정도 후에는 3-4매의 잎이 자라 올라올 정도로 발아가 상당히 빨리 진행되었다. 배수성 분석결과 타마미 키메라 1개, 스위트 스프링 키메라 2개가 선발되었다 (그림 6-5).



그림 6-4. 감귤 콜히친 처리 전후의 식물체 및 배수성 검경기



그림 6-5. 감귤 포트묘 콜히친 침지 처리 및 키메라 선발

## 2) 오리잘린 처리 및 배수성 유도

청건, 감평, 성전은주 3품종에 대해 3개 눈을 갖도록 접수를 채취하고 오리잘린을 침지한 후 포트에 심겨진 탱자 대목에 접목하여 생육을 유도하였다. 품종별로 10개 접수를 처리하여 총 270개씩의 액아 처리를 한 결과는 표 6-4와 같다. 품종에 따라 활착율에 다소 차이가 있으나, 평균 30% 내외의 활착율을 보여 콜히친에 비해 매우 높게 나타났다. 그럼에도 불구하고 배수성을 검정한 결과 모두 2배성으로 나타났다.

청건 만다린에서 절취된 2mm 내외의 접아를 오리잘린 0.01, 0.02, 0.04% 농도의 용액에 2시간 침지하여 처음 침지 시 감압 10분 및 20분 처리를 병행하였다(표 6-5). 암발아 탱자에 반미세 접목 후 활착율은 2.4%로 콜히친 처리와 크게 차이는 없는 편이었으나, 배수성 검정 결과 모두 2배성으로 나타났다.

그러나 앞의 콜히친 처리와 비교하여 오리잘린보다 덜 효과적이라고 말할 수는 없을 것

으로 생각되었으며, 추가적으로 처리 농도 또는 침지 시간을 좀더 길게 하여 재평가해야 할 것으로 생각되었다.

표 6-4. 감귤 접수 오리잘린 침지 처리 및 탱자대목 일반 접목 후의 신초의 배수성 평가.

품종	농도 %	시간 hr	처리수	발아수	배수성			
					2X	Chimeric	4X	고정도
청견	0.01	12	30	8	8	-	-	
		24	30	12	12	-	-	
		48	30	9	9	-	-	
	0.02	12	30	19	19	-	-	
		24	30	23	23	-	-	
		48	30	11	11	-	-	
	0.04	12	30	23	23	-	-	
		24	30	19	19	-	-	
		48	30	10	10	-	-	
	소계			270	134(49.6%)	134	0	0
감평	0.01	12	30	11	11	-	-	
		24	30	12	12	-	-	
		48	30	9	9	-	-	
	0.02	12	30	17	17	-	-	
		24	30	10	10	-	-	
		48	30	8	8	-	-	
	0.04	12	30	10	10	-	-	
		24	30	8	8	-	-	
		48	30	3	3	-	-	
	소계			270	82(30.4%)	82	0	0
성전온주	0.01	12	30	1	1	-	-	
		24	30	5	5	-	-	
		48	30	1	1	-	-	
	0.02	12	30	4	4	-	-	
		24	30	1	1	-	-	
		48	30	3	3	-	-	
	0.04	12	30	3	3	-	-	
		24	30	5	5	-	-	
		48	30	2	2	-	-	
	소계			270	25(9.3%)	25	0	0

표 6-5. 감귤 접수 오리잘린 2시간 침지 처리 및 반미세 접목 후 신초의 배수성 평가.

품종	농도 %	감압 min	처리수	발아수	배수성			
					2X	Chimeric	4X	고정도
청견	0.01	10	300	15	15	-	-	
		20	300	12	12	-	-	
	0.02	10	300	4	4	-	-	
		20	300	8	8	-	-	
	0.04	10	300	4	4	-	-	
		20	300	1	1	-	-	
	소계			1,800	44(2.4%)	44	0	0

### 3) 4배성 고정도 분석

1년차 실험에서 접수 콜히친 처리 및 접목 후 4배성으로 확인된 잎의 액아가 이듬해 재차 발아 성장한 신초의 잎을 절취하여 배수성 여부를 검정하였다. 그림 6-6에서와 같이 4배성인 부위의 상단에서 절취하여 신초를 유도한 경우에도 모두 2배성으로 나타났다. 이는 신초 내부의 기 분화된 잎의 성장분열 과정에서 콜히친 영향을 받아 2X와 4X가 혼재하는 양상을 보였으며, 내부 깊숙이 침투하여 성장점의 분열까지는 영향을 주지 못한 것으로 생각되었다.

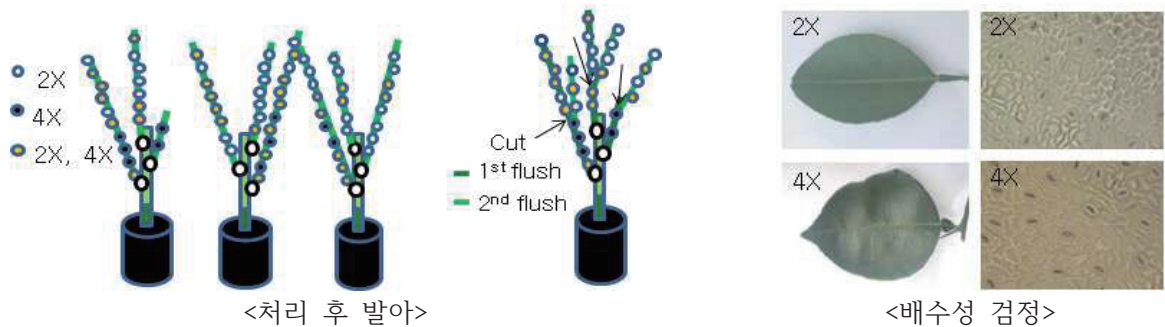


그림 6-6. 콜히친 처리 및 접목 후 발아가 유도된 신초(좌측)와 절단 후 2차 성장유도 모식도.

## 2. 자연발생 배수체 선발 및 조기 육묘

### 가. 재료 및 방법

#### 1) 자연발생 배수체 선발

감귤을 인위교배 후 과실 성숙기에 과실을 수확한 다음 클린벤치에서 종자를 채취하여 미발육 종자를 분리한다(그림 6-7). 미발육 종자의 종피 일부를 절단한 후 MT 고체 배지에 파종하여 발아를 유도한다. 발아한 식물의 잎을 절취하여 배수성을 검정하고, 자연발생 3배체 또는 4배체의 배수성 식물을 선발한다.



<교배 종자의 구분>

<미발육 종자 기내 파종>

<배수성 검정>

그림 6-7. 감귤 미발육 종자의 기내파종 및 자연발생 배수체 선발.

#### 2) 자연발생 배수체 조기 육묘

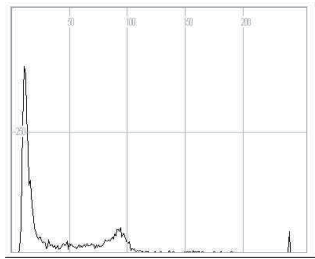
배수성 검경기(flow cytometry)로 배수성이 확인된 식물은 탕자 포트묘에 기외 접목하여

순화시킨 후 염색체 검정을 통해 배수성을 확인한 후 육종포장에 정식하여 육묘한다. 육종 포장 정식 후 접목이 가능한 수준으로 생장이 진행되면, 접수를 채취하여 2개 이상씩 고접하여 조기 육묘를 수행한다.

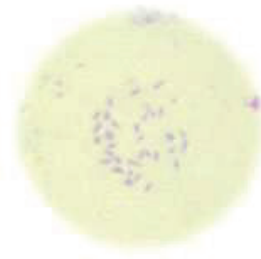
## 나. 결과 및 고찰

### 1) 자연발생 배수체 선발

2010년 교배 후 미발육 종자를 채취하여 2011년 기내배양한 후 배수성 검경기로 배수체가 확인된 천초 3배체 3개체와 4배체 1개체를 선발하였다(그림 6-8). 또한 2012년 교배 후 미발육 종자를 채취한 후 2013년 봄에 987립을 기내 과중하여 9개의 3배체를 선발하였다. 자연발생 배수체 선발율은 3% 내외로 나타났으나 품종에 따라 다르게 나타났으며(표 6-6), 이는 Song et al. (2011)의 복와 유사하였다. 2013년 하레히메 등 인공교배 후 미숙종자 922립을 획득하여 2014년 기내과중 후 배양하였으며, 배수성 검정결과 3배체 11개체(하레히메 5개체, 베니바에 1개체, Fallglo 5개체)를 선발하였다(표 6-7). 2014년 베니바에 등 3조합 365화를 교배하여 74개 착화된 후, 이로부터 2015년에 미숙종자 811립을 획득하여 기내 배양하였으며 2015년 배수성 검정결과 모두 2배체로 판정되었다. 추가적으로 크클레멘타인, 하굴 품종에서 각각 3배체 1개 및 2개를 선발하였다.



<배수성 검정>



<염색체 분석>

그림 6-8. 감귤 미발육 종자의 기내과중 및 자연발생 배수체 선발.

표 6-6. 2012 교배 미발육 종자의 기내 배양 및 자연배수체 선발 현황.

품 종	미발육 종자 기내 과중수	발아수	검정수		비발아수	기타 (오염 폐기)
			2n	3n		
베니바에	164	102	101	1(생존)	21	41
유명	108	91	91	0	15	2
하레히메	498	68	61	7(생존2)	13	417
청건	115	11	11	0	3	101
Ellendale	52	7	7	0	3	42
클레멘타인	30	8	8	0	-	22
윌킹	20	2	1	1(고사)	-	18
계	987	289	280	9(생존3)	55	643

표 6-7. 2013 교배 미발육 종자의 기내 배양 및 자연배수체 선발 현황.

종자친	과실수	완전종자수	부분종자수	미숙종자수	배수성	
					3X	4X
하레히메	74	706	145	759	5	-
Fallglo	11	160	0	10	5	-
베니바에	5	56	4	5	1	-
계	90	922	149	774	11	-

2) 자연발생 배수체 조기 육묘

2010년 교배로부터 획득한 천초 3배체 1개와 4배체 1개를 2012년 기외 접목하여 순화한 다음, 염색체 분석으로 배수성을 확인한 후 2013년 봄에 육종포장에 정식하였다(그림 6-9). 2012년 교배하여 2013년 3배체로 선발된 하레히메 2개체와 베니바에 1개체와 함께, 2013년 Fallglo 등 교배 미숙종자로부터 2014년 획득한 3배체 11개체(하레히메 5, 베니바에 1, Fallglo 5)에 대해 2014년 기외 접목으로 순화시킨 후 2015년 육종포장에 정식하였다(그림 6-9). 또한 2015년 3배체로 선발된 하귤 2개체와 클레멘타인 1개체를 2016년 기외 접목으로 순화한 후 포트 육묘하였다.



<배수체 육종포장 정식>



<3배체 순화 및 육묘>



<3배체 육종포장 정식>

그림 6-9. 감귤 배수체 기외접목 순화 및 육종포장 정식.

또한 2010년 교배로부터 획득하여 육종포장에 정식한 천초 3배체 1개와 4배체 1개에 대해 2015년 고접을 실시하여 조기육묘를 수행하고 있다(그림 6-10). 이들 고접 개체들은 2017년에 개화가 예상되며 이후 2배체와의 교배를 통한 무핵 3배체 실생양성에 활용할 수 있을 것으로 예측되고 있다.



그림 6-10. 감귤 배수체 고접 및 조기 육묘.



### 3. 4배체 화분도입 및 3배체 교배종자의 획득 평가

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 식물재료 및 교배

호주 및 이태리 등 4배체 감귤을 보유하고 있는 국가로부터 4배체 꽃가루를 제공받아, 국내 또는 현지에서 교배를 통해 3배체 교배종자를 확보한다. 2배체와 4배체간 교배 후 수확기에 성숙과실 내 완전종자와 미숙종자의 형성율을 분석하여 향후 동질 4배체의 대량개발할 경우 무핵 3배체 대량양성을 위한 3배체 미숙배 구제기술의 구현 여부를 판단하고자 하였다. 2015년에 호주 현지교배를 수행하였으며, 2016년에는 국내에서 교배를 수행하였다.

##### 2) 3배체 종자 획득율 평가

교배과실의 수확기에 클린벤치에서 종자를 채취하여 완전종자와 미숙종자의 빈도를 평가하였으며, 완전종자는 온실에서 포트 파종하고, 미숙종자는 기내배양을 통해 발아 유도 후에 배수성 여부를 분석하여 평가한다.

#### 나. 결과 및 고찰

호주로부터 2015년 4월 냉동보관 중인 4배체 Fremont와 Mucott 꽃가루를 국제우편을 통해 확보하였으나, 검역 등의 절차에 따른 시일 경과로 인해 꽃가루 활력이 소실되어 교배에 이용하지 못하였다(그림 6-11). 또한 2015년 9월호주 현지에서 [(Ellendale×Glen)×US119]×4X Fremont 등 3조합 교배처리 하였으나, 여름철 고온 건조로 인해 착과되지 못하였다.

2015년 9월 호주 현지 개화기에 4배체 Fremont와 Mucott의 꽃가루를 채취하여 인편을 통해 도입하였다. 2016년 4월에 이태리로부터 4배체 오렌지 Tarocco와 Bindo 품종의 꽃가루를 국제우편으로 도입하였다. 화분활력 검정결과 Bindo 품종은 약 70% 정도의 발아율을 보유하고 있었으나, Tarocco의 경우는 발아가 거의 되지 않았다. 이는 Tarocco 품종이 원래 꽃가루 형성율이 낮은 것과 관계되는 것으로 판단되었다.

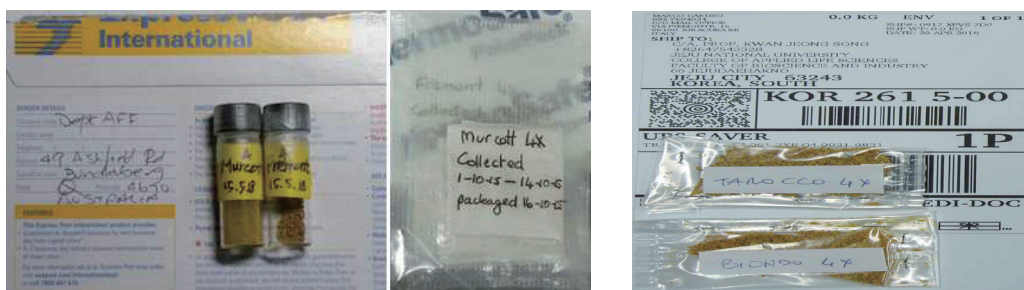


그림 6-11. 감귤 4배체 꽃가루 도입. 좌(호주), 우(이태리).

2016년에 이들 4배체 꽃가루를 이용하여 베니바에, 에히메28호, 청견, 타마미 등 단배성

품종에 교배를 수행하였으며, 과실이 성숙한 12월 말에 수확하여 종자 형성도를 조사하였다(그림 6-12, 표 6-8). 2배체간 교배보다 완전종자의 형성율이 매우 낮았으며, 미숙종자도 많은 편은 못되었다. 이는 기존에 보고된 4배체와 2배체 간 교배시 배와 배유의 유전적 불균일에 의해 종자 형성율이 감소한다는 보고(Ollitrault et al., 2007)와 일치하였다. 그러므로 3배체 종자를 대량 획득하기 위해서는 충분한 대량 교배를 수행하거나, 미숙배 구제를 수행해야 할 것으로 판단되었다.

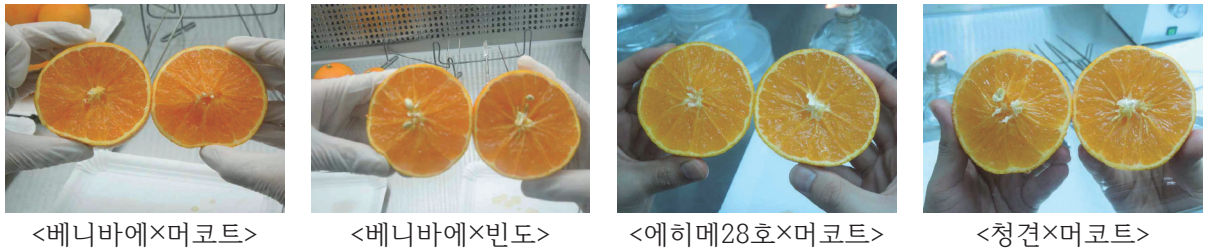


그림 6-12. 감귤 4배체 교배 과실의 종자 형성도.

표 6-8. 감귤 4배체와 2배체 간 교배에서의 종자 형성도.

교배조합	과실수	종자수		
		완전종자	미숙종자	미발육종자
베니바에×Fremont	6	1	16	55
베니바에×머코트	8	3	30	58
베니바에×Bindo	22	18	59	28
에히메28호×Fremont	15	0	3	268
에히메28호×머코트	17	2	27	268
타마미×빈도	30	42	165	652
타마미×머코트	3	0	6	113
청견×머코트	22	7	57	574
계	123	73(0.6립/과)	363(3립/과)	-

#### 4. 탱자 포트묘 양성 및 이용

##### 가. 재료 및 방법

콜히친 처리 후 접목에 이용할 탱자 대목을 양성하기 위해 탱자 종자를 확보하여 저온 저장 후 봄에 포트에 암발아 과종하여 매년 탱자 대목을 자체 확보할 수 있도록 하였다. 또한 접목 후 활착이 되지 못해 탱자 대목으로 이용할 수 있는 것은 큰 포트로 옮겨 육묘하였다.

##### 나. 결과 및 고찰

콜히친 처리 후 기외 접목용 탱자 대목이 요구되어 1년차 1천주 자체 육묘 및 2천주 육묘 구입하여 포트묘 3천주를 양성하였다. 2년차부터는 탱자 종자를 확보하여 암발아 과종

하고 콜히친 및 오리잘린 처리에 필요한 포트 유묘를 매년 3천주 이상씩 양성하여 이용하였다. 또한 기외 접목 후 활착되지 못한 탱자 유묘는 다시 용량이 큰 포트에 옮겨 2천주를 양성하여 교배실생 접목에 이용하였다(그림 6-13).



그림 6-13. 탱자대목의 포트묘 양성.

## 5. 교배실생 조기 결실 시스템 확립

### 가. 재료 및 방법

2011년 클레멘타인×병굴 등의 교배조합으로부터 획득한 교배실생 2,400주 등 이미 육종포장에 정식된 총 7,900주 내외의 교배실생에 대해 무촉지 방식으로 육묘하여, 조기 개화 및 결실이 이루어지도록 하였다. 또한 자연발생 배수체 선발을 위한 교배 후의 교잡종자를 과종하여 완전종자에 대해서는 과종하고 육묘한 다음 육종포장에 정식하여 무촉지 육묘하였다.

육종기간을 단축할 목적으로 유년성에 영향을 주는 요인을 분석코자 성년상에 근접한 교배실생들의 수체 상단으로부터 접수를 채취하여 탱자 대목과 스윙글 대목으로 구분하여 접목하고 초기 생장을 비교하였으며, 교배실생과의 유년성 단축에 대한 비교 처리를 수행하였다. 또한 탱자 대목에서는 접목 후 자연방임과 재차 무촉지 육묘로 구분 처리하여 접목 후 수형관리 방식이 유년성에 영향을 주는 정도를 분석코자 하였다.

기존 교배실생 중에서 성년상으로 진입하여 개화 결실이 되는 개체에 대해서는 과실의 성숙기에 과실의 크기, 무게, 당산도, 종자수 등 교배실생의 과실특성을 조사하였다.

### 나. 결과 및 고찰

#### 1) 교배실생의 무촉지 육묘

2011년 클레멘타인×병굴 등의 교배조합으로부터 획득한 교배실생 2,400주 등 육종포장에 정식된 총 7,900주 내외의 교배실생을 무촉지 방식으로 육묘를 수행하였다(그림 6-14). 또한 자연발생 배수체 선발을 위해 2012년부터 연차적으로 교배하여 획득한 완전종자를 이듬해 매년 포트에 과종하여 육묘한 후 육종포장에 정식하고 무촉지 방식으로 육묘하였다(그림 6-15).



그림 6-14. 2011년 이전 교배한 교배실생의 육묘 현황



<2011 교배실생 2014년 정식 및 육묘>

<2012 교배실생의 2014년 봄 정식 및 2013년 육묘>

그림 6-15. 2011년 이후 교배한 교배실생의 육묘 현황

2013년의 경우 2012년 교배한 청건×감평 등 4조합으로부터 총 454립의 교배종자를 획득 및 파종하여 261개체의 교배실생을 획득하였으며(발아율 57.4%), 239주를 육종포장에 정식하였다. 2014년의 경우, 청건×감평 등 3조합에서 총 811립의 교배종자를 획득하여 파종하였다(그림 6-16). 2015년의 경우, 청건 등 705립을 파종하여 504주를 포트 육묘하였다(그림 6-16).



<2012 교배종자의 파종(2013.6) 및 육묘 >



<2013 교배종자 파종 및 2014 육묘>



<2014 교배종자 파종 및 2015 육묘>

그림 6-16. 교배종자의 파종 및 포트 육묘.

## 2) 조기결실 요인분석

조기결실 요인을 예비 분석하기 위하여 2차년도에 탱자 및 스윙글 대목에 2주씩 반복하여 교배실생 8계통을 접목한 후 육종포장에 정식하였으며, 탱자 대목에서 수형구성(무촉지 및 방임)의 비교를 위해 7계통에 대해 2반복으로 접목하여 육묘하였다(그림 6-17). 초기 생육에 있어서는 대목과 수형관리 처리 간에 차이를 나타내지 않았다(표 6-9). 또한 독립포장에서 대목 및 수형 구성의 영향을 분석하기 위해 교배실생 50계통을 2반복으로 접목하여 육묘하였으며, 25세트의 비교가 가능하도록 활착하였으며, 20cm 내외로 성장하여 2개 내외의 측지를 형성하였다(그림 6-17). 추후 지속적으로 관리하여 대목 및 수형 구성에 따른 유년성의 영향 평가를 수행할 예정이다. 그 외에도 조기결실을 유도하기 위해 교배실생 754 개체를 접목하였는데, 353개체가 활착하여 육묘되고 있다.



그림 6-17. 대목 및 수형 구성에 따른 교배실생의 생육

표 6-9. 대목 및 수형 구성에 따른 접수 품종의 초기생육 비교.

처 리	신초길이	마디수
탱자(보통)	11.8cm	4.8
스윙글(보통)	12.4cm	5.3
탱자(무촉지)	13.5cm	5.4

### 3) 교배실생의 과실특성 평가

2012년 교배하여 양성된 청견×윙킹 만다린 조합에서 1개체, 청견×클레멘타인 조합에서 1개체가 개화하여 착과되었으며, 2015년 평가된 과실특성은 그림 6-18와 같다. 과실의 숙기는 1월

이후로 예측되었으며 당도는 낮고 산도는 높은 편이었다. 결실 과실이 1개만으로 충분한 조사가 되지 못하였으며, 추후 결실되는 상태에 따라 지속적인 평가가 필요하였다.



과중 : 83.1g  
과피두께 : 5.2mm  
양낭수 : 9  
당도 : 11.0 Brix  
산도 : 1.5%  
종자수 : 10

<교배실생 청견×윌킹>

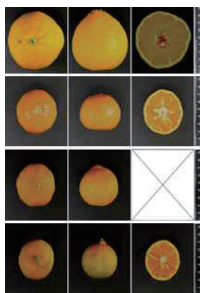


과중 : 83.5g  
과피두께 : 4.2mm  
양낭수 : 11  
당도 : 13.5 Brix  
산도 : 1.35%  
종자수 : 16

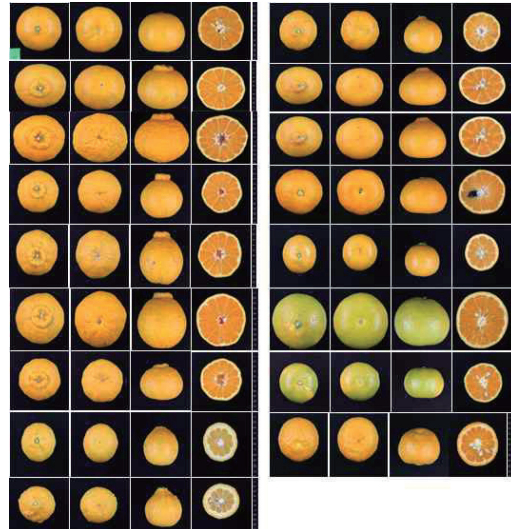
<교배실생 청견×클레멘타인>

그림 6-18. 2012년 이전 교배실생의 착과(2015.1.14 조사)

2015년에는 교배실생 15주에서 개화가 이루어졌고 10주에서 착과되어(그림 6-19), 11월 말 및 12월초에 과실특성을 조사하였으며, 그 결과는 표 6-10과 같다. 대부분의 계통에서 종자가 형성되었으며, 당도가 높은 편은 아니었으며 산함량이 높은 경향이 있었다. 2016년에는 교배실생 20주에서 개화가 이루어졌고 17주에서 착과되어(그림 6-19), 12월말에 과실특성이 조사되었으며, 그 결과는 표 6-11과 같다. 과실의 특성은 2015년의 경향과 유사하게 나타났으나, 1계통에서 종자가 형성되지 않으면서 당산미가 좋은 특성을 보여, 선발 가능성을 보여 주었다. 향후 교배실생들이 성년상으로 진입하게 됨에 따라 과실 특성을 분석하게 된다면 신품종 선발 가능성이 충분히 있을 것으로 판단되고 있다.



<2015년 교배실생 착과 및 과실 형태>



<2016년 교배실생 착과 및 과실 형태>

그림 6-19. 교배실생의 착과 및 과실 특성.

표 6-10. 교배실생의 2015년 과실특성.

교배실생 계통	착과수	과중(g)	당도(Brix)	산도(%)	종자수
1	2	-	-	-	-
2	2	198	9.8	0.7	9
3	2	-	-	-	-
4	15	192	8.7	1.1	0
5	23	86	10.7	3.9	7
6	2	77	11.7	1.1	5
7	5	73	11.7	3.5	2
8	10	78	13.3	3.9	9
9	25	69	13.2	1.6	14
10	14	60	13.4	3.7	9

표 6-11. 교배실생의 2016년 과실특성.

교배실생 계통	착과수	과중(g)	당도(Brix)	산도(%)	종자수
1	2	122	10.8	0.7	17
2	16	187	12.7	1.6	0
3	2	363	14.9	0.8	0
4	4	207	14.4	1.0	0
5	3	218	13.3	1.7	0
6	6	255	12.3	0.9	0
7	11	164	14.2	2.0	0
8	1	58	9.6	1.6	9
9	4	47	9.8	1.5	19
10	5	59	11.6	1.2	8
11	2	138	10.7	0.5	11
12	1	117	13.5	0.6	0
13	2	217	11.5	1.2	0
14	14	50	11.6	0.9	8
15	6	187	8.4	1.1	18
16	5	78	9.4	0.7	7
17	1	92	11.8	0.7	11

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연도별 목표 달성도

감귤 교배육종 효율성 제고와 육종소재의 다양화를 위해 국내외 유전자원을 수집하고, 보유 또는 도입된 유전자원의 원예·육종학적 특성을 조사하여 감귤 육종가 및 농업인에게 제공하여 활용토록 하고자 하였다. 또한 보유 유전자원에 대하여 금후 육종목표인 내병성, 기능성 품종 육성을 위하여 내병성 및 기능성을 분석하여 핵심집단을 구축함으로써 감귤 육종가들이 활용할 수 있도록 하였다. 또한 조사한 자료와 사진은 농업유전자원센터가 운영하는 유전자원 관리 프로그램(GMS)에 업그레이드 하였다. 유전자원은 총 271을 도입하였고, 과즙 중 플라보노이드, 카로티노이드를 분석하였으며, 궤양병은 4년간, 더뎡이병과 검은점무늬병은 3년간 포장 이병도를 조사하여 병 저항성을 분석하였다. 예비핵심집단은 플라보노이드, 카로티노이드, 궤양병, 더뎡이병, 검은점무늬병과 이들과 과실품질을 합쳐 종합적으로 예비핵심집단을 구축하였다.

정량적 목표인 논문은 100%, 유전자원 수집은 90%, 유전자원 등록은 139%, 병리검정은 86.5%를 추진하였으며, 추가로 포장이병도 조사 더뎡이병 221점, 궤양병 223점, 검은점무늬병 220점을 조사하였고, 2단계 골든씨드 프로젝트에서 제외됨에 따라 2단계에 추진코자 하였던 핵심집단을 1단계에서 구축하였다.

표 4-1. 제1세부프로젝트의 정성적 연구목표대비 달성도.

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
1년차	○ 유전자원 도입 60개 ○ 유전자원 개략적 분류 및 특성 고찰	○ 국내외 감귤 유전자원 도입 및 육묘 ○ 종, 계통, 유래별 분류와 예비분석	100
2년차	○ 유전자원 도입 80개 ○ 더뎡이병 저항성 검정 ○ 플라보노이드 특성 분석	○ 국내외 감귤 유전자원 도입 및 육묘 ○ 실내 더뎡이병 저항성 검정 ○ 궤양병 포장 이병도 조사 ○ 유전자원 플라보노이드 특성 분석	100
3년차	○ 유전자원 도입 80개 ○ 궤양병 저항성 검정 ○ 카로티노이드 특성 분석	○ 국내외 감귤 유전자원 도입 및 육묘 ○ 실내 및 온실조건 궤양병 검정 ○ 궤양병, 더뎡이병, 검은점무늬병 포장 이병도 조사 ○ 유전자원 카로티노이드의 특성 분석	100
4년차	○ 유전자원 도입 80개 ○ 검은점무늬병 저항성 검정	○ 국내외 감귤 유전자원 도입 및 육묘 ○ 궤양병, 더뎡이병, 검은점무늬병 포장 이병도 조사	100



감귤 주요형질 연관 분자표지 개발에 있어서는 병저항성 2품종(청견, 하귤)과 숙기별 변이 온주밀감 4품종(궁천, 궁본, 흥진, 일남1호)에 대해 유전체 정보를 해독하고 분석하였으며 SNP, SSR, INDEL 등의 기초 분자표지가 탐색되었다. 궤양병, 더뎡이병 연관 분자표지가 탐색되었으며, 숙기연관 분자표지는 물론 껍질의 착색을 나타내는 홍피 연관 분자표지에 대해서도 탐색되었다. 병저항성에 대해서는 RAPD 마커의 탐색과 개발 후 SCAR 마커로의 전환이 수행되었으며, 분리집단에 적용하여 validation을 수행하였다. 또한 교배육종의 효율성을 높이기 위한 다배성 모본에서의 교잡배 조기관별 마커를 개발하여 육종현장에 활용할 수 있도록 실용화 플랫폼을 구축하였다.

표 4-2. 제2세부프로젝트의 정성적 연구목표대비 달성도.

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
1차년도 (2013)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 병저항성 2품종 및 숙기별 온주밀감 3품종의 유전체 정보 해독 및 분석</li> <li>○ 궤양병 분리집단 저항성 검정 및 RAPD 마커 탐색</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 궤양병 연관 2품종 및 숙기별 4품종의 유전체 서열 해독 및 유전체 비교 분석</li> <li>○ 궤양병 내병성과 이병성의 분리집단에 대해 500개 RAPD 마커 탐색 및 더뎡이병 모본(2품종)과 부분(2품종)에 대해 205개 RAPD 마커 탐색</li> </ul>	100
2차년도 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 궤양병 저항성 RAPD 마커 및 SCAR 마커 개발</li> <li>○ 더뎡이병 분리집단 양성용 교배 및 육성</li> <li>○ 비교유전체 분석 및 기초 분자표지 탐색</li> <li>○ 숙기 연관 품종의 생리·생화학적 특성 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 선발된 RAPD 프라이머를 활용하여 분리집단에 대한 RAPD 분석, 궤양병 특이 밴드 선발과 SCAR 마커 전환 및 교배 분리집단 적용</li> <li>○ 더뎡이병 분리집단 양성 및 육묘</li> <li>○ 내병성 및 숙기 관련 품종의 유전체 정보 및 추가 내병성, 이병성 품종/계통들을 포함한 비교 유전체 분석을 통해 SNP, SSR, INDEL 등 기초 분자표지 탐색 및 genotyping을 통한 검정.</li> <li>○ 감귤 교잡배 판별용 SSR 마커 발굴</li> <li>○ 숙기 관련 품종에 대해 발육단계에 따른 색도, 당도, 산도의 측정 및 카로티노이드 생합성 유전자 발현 분석</li> </ul>	100

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
3차년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 더뎡이병 저항성 연관 polymorphic RAPD 마커 발굴</li> <li>○ 유전체 서열 해독 및 비교유전체 분석</li> <li>○ 궤양병 분자마커 후보를 활용한 유전자원 및 교배 분리집단 스크리닝</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2개 교배조합의 모본과 부분본에 대해 RAPD 마커 세트를 활용한 다형성 RAPD 마커를 선발하고, 내병성 집단과 이병성 집단에 대한 2차 선발을 통해 더뎡이병 연관 후보 RAPD 마커 선발, RAPD 밴드 클로닝의 및 염기서열 결정</li> <li>○ 더뎡이병 내병성 유전자원 4개, 이병성 유전자원 4개에 대한 WGS 및 비교유전체 분석을 통해 다형성 SNP/SSR/INDEL 마커 발굴 및 validation 수행</li> <li>○ 궤양병 분자마커 후보(SNP, SCAR 등)를 활용하여 내병성 유전자원 및 교배 분리 집단에의 확대 적용</li> </ul>	100
4차년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 궤양병 저항성 연관 SCAR 마커의 유전자원/교배 분리집단에의 적용</li> <li>○ 더뎡이병 저항성 연관 RAPD 마커의 SCAR 전환 및 유전자원/교배 분리집단에의 적용</li> <li>○ SNP를 포함한 유전체 기반 분자마커의 유전자원 및 궤양병/더뎡이병 분리집단에의 적용</li> <li>○ 교잡배 판별 SSR 마커의 multiplex genotyping 시스템 확립</li> <li>○ 홍피 형질 연관 분자마커 탐색</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 내병성, 이병성 집단간 비교유전체 분석과 검정 과정을 통해 확보한 궤양병 저항성 연관 28개 SNP 마커의 내병성 유전자원에의 적용</li> <li>○ 내병성, 이병성 집단간 비교유전체 분석과 검정 과정을 통해 확보한 더뎡이병 저항성 연관 16개 SNP 마커의 내병성 유전자원에의 적용</li> <li>○ 교잡배 판별에 활용 가능한 17개 다형성 SSR 마커의 확보 및 101점의 감귤 유전자원에 적용하여 자원별 각 대립유전자 정보 구축</li> <li>○ 교잡배와 주심배 유래 식물체의 조기판별을 위한 분석 플랫폼(Citrus Genetic Hybrids ID™ Platform) 구축</li> <li>○ 홍피 품종과 비홍피 품종 그룹에 대한 WGS과 비교 유전체 분석 및 구별 마커 후보 SNP 마커 발굴</li> </ul>	100

감귤 동질4배체를 효율적으로 유도하는 기술체계의 개발을 수행하였다. 콜히친을 처리하는 방식에 있어서 수체 직접처리, 접수 처리 및 일반 접목, 접아 처리 및 반미세 접목, 접아 처리 및 기내접목, 종자처리 등의 방식과 처리 농도 및 처리 시간과 침투율 증진 방식 등이 평가되었다. 또한 자연발생 배수체의 발생빈도를 평가함은 물론 자연발생 배수체를 선발하여 기외 접목을 통해 순화하고 육묘하여 육종포장에 정식하였다. 또한 조기육묘를 위해 고접을 수행하

였다. 무핵 3배체 교배실생의 조기양성을 위하여 선진국의 4배체 꽃가루를 도입하여 교배를 수행하였으며, 3배체종자의 형성도를 평가하였다. 교잡실생의 조기결실 시스템 구축을 위해 교잡실생을 시설 육묘하였으며, 대목 및 수형관리에 따른 요인을 분석하기 위한 기반을 구축하였고, 일부 조기결실 교배실생의 착과 과실의 특성을 조사하였다.

표 4-3. 제3세부프로젝트의 정성적 연구목표대비 달성도.

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
1년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동질배수체 유도조건 탐색</li> <li>○ 자연발생 배수체 선발</li> <li>○ 탱자대목 양성</li> <li>○ 교배실생 조기결실 시스템 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 콜히친 처리에 의한 동질사배체 유도조건 탐색</li> <li>○ 교배 미발육 종자의 기내배양 및 자연발생 배수체 선발</li> <li>○ 배수체 유도 및 배수체의 조기결실 유도용 탱자 대목의 포트육묘</li> <li>○ 교배실생 조기결실 요인 분석을 위한 교배실생 재료 육성</li> </ul>	100
2년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동질배수체 유도조건 확립</li> <li>○ 자연발생 배수체 선발 및 순화</li> <li>○ 탱자대목 양성</li> <li>○ 교배실생 조기결실 요인 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 콜히친 처리 사배성의 고정도 분석 및 콜히친과 오리잘린 처리에 의한 사배성 유도</li> <li>○ 교배 미발육 종자의 기내배양으로 자연발생 배수체 선발 3개, 순화 4개</li> <li>○ 탱자포트묘 1,000주 육묘 및 노지육묘 2,000주 추가 양성</li> <li>○ 교배실생 250여주 추가 양성 및 교배실생의 접목묘 양성</li> </ul>	100
3년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동질배수체 유도조건 확립 및 대량유도</li> <li>○ 자연발생 배수체 선발 및 육묘</li> <li>○ 사배체 화분도입 및 교배</li> <li>○ 탱자대목 양성</li> <li>○ 교배실생 조기결실 시스템 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 액아 4,500개 콜히친 처리 및 사배성 유도</li> <li>○ 자연발생 배수체 선발 및 순화, 정식 및 고접 육묘</li> <li>○ 사배체 꽃가루 도입 및 교배</li> <li>○ 탱자포트묘 5,000주 육묘 및 일반노지묘 2,000주 양성</li> <li>○ 교배실생 접목묘 양성 및 육종포 정식</li> <li>○ 대목 및 수형에 따른 조기결실 영향평가용 420주 접목 및 108주 활착</li> </ul>	100
4년차	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 동질배수체 유도조건 확립 및 대량유도</li> <li>○ 자연발생 배수체 조기육묘</li> <li>○ 사배체 화분도입 및 교배</li> <li>○ 탱자대목 양성</li> <li>○ 교배실생 조기결실 시스템 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 액아 4,500개 콜히친 처리 및 사배성 유도</li> <li>○ 자연발생 배수체 포장육묘 및 고접 관리</li> <li>○ 사배체 꽃가루 도입 및 교배</li> <li>○ 탱자포트묘 5,000주 육묘 및 이용</li> <li>○ 교배실생 육묘 및 접목묘 관리</li> </ul>	100

## 제 2 절. 관련분야에 의 기여도

제1세부프로젝트에서 수집된 감귤 유전자원은 병저항성 및 기능성 성분에 대한 핵심집단의 구축으로 교배육종의 소재로서 활용되어 체계적인 교배육종의 기반을 구축하는데 기여하게 될 것이다. 핵심집단이 구축되면 유전자원의 보존을 효율적으로 접근할 수 있고, 육종 목표형질에 따른 육종소재의 선택을 지향함으로써 교배육종의 효율성을 높이는데 기여할 것이다. 더욱이 과수분야에서는 처음으로 핵심집단에 대한 접근이 시도된 만큼 타과수에도 적용이 확대될 것으로 생각된다.

제2세부프로젝트에서 개발된 감귤 궤양병과 더덩이병 내병성 연관 및 홍피 형질 연관 분자표지(SCAR, SNP)들은 향후 이들 형질을 갖춘 계통의 조기 선발에 활용할 수 있을 것이다. 또한 감귤 교잡배 유래 식물체의 조기 판별을 위한 분석 시스템인 Citrus Genetic Hybrids ID™ Platform은 육종 비용과 노동력을 절감시킴으로써 육종 효율 개선에 매우 유용하게 적용될 것이다. 본 과제를 통해 개발된 형질연관 분자표지와 교잡배 조기 판별 시스템은 전통 교배 육종과의 융합을 통해 과학적이며 체계화된 목표 지향적 감귤 분자육종 프로그램 구축을 통한 국내 감귤 산업의 발전과 경쟁력 강화에 크게 기여할 것이다.

제3세부프로젝트에서 개발된 콜히친 처리에 의한 동질4배체 유도기술은 유망 교배친의 동질4배체 확대에 활용하여 무핵 3배체 교배육종의 기반을 확립하는데 기여하고 있다. 이는 타과수 분야에도 적용하여 배수체 육종에 활용도를 높일 것으로 예상된다. 동질4배체의 경우 유전정보량의 배가로 세포내 유전자 발현에 있어서 보정과정을 거치게 되기 때문에 후성유전에 기인한 다양한 변이를 창출하게 되어 육종소재 확충에도 크게 기여하게 될 것이다. 감귤에서 4배체와 2배체의 교배에서 배와 배유간의 유전자량 불균형에 기인한 3배체 종자의 형성을 저해하는 것으로 알려져 있는데, 어느 정도인지에 대한 정보가 알려져 있지 않다. 본 프로젝트에서 개발된 동질4배체를 이용하여 기관내 유전자량 불균형에 따른 현상을 구명하는 연구를 촉진하게 될 것이며, 3배체 종자의 확보를 효율적으로 수행하게 하는 미숙배 구제기술의 연구도 촉발할 것으로 전망된다. 또한 육종기간을 단축시키기 위한 방안으로 대목 및 접목의 효과, 수형관리의 영향 등을 평가하게 됨으로서 교배육종의 효율성 제고에도 크게 기여하게 될 것이다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구는 감귤 품종 육종을 위한 기반구축 과제로서 유전자원을 수집하고 특성을 평가하여 감귤 육종가에 제공하여 육종효율을 높이는 것을 목적으로 한다. 본 연구는 연구과정에서도 획득한 조사 결과를 골든씨드프로젝트 육종가에게 활용토록 하였음은 물론이고 『감귤품종』 책자를 발간하여 조사한 결과를 확산하였다. 『감귤품종』 책자는 자원명(영어, 일본어, 한자), 학명, 기원, 주요 생육 및 과신품질 특성, 사진, 기능성 및 포장 이병도 조사 결과를 종합하여 수록하여 육종가와 감귤 농업인에게 많은 도움이 될 것이라고 기대하고 있다.

본 연구 결과 중 기능성 및 내병성과 관련해서는 논문을 1건 이상 제출할 계획이고, 내병성 부분은 1단계 도입 유전자원에 대해 추가 조사를 실시하여 자원별 내병성을 정립해 나갈 예정이다. 본 연구에서 우리원에 보존중인 유전자원은 골든씨드프로젝트가 시작될 때부터 육종 분야 세부프로젝트에 활용되고 있으며, 2016년부터는 기관 자체 기능성 품종 육종사업에 활용하였다. 앞으로도 보존 및 도입한 자원에 대한 특성조사를 계속하고 정보와 육종소재를 제공하고자 한다.

본 과제를 통해 구축된 교잡배/주심배 판별 분석 시스템인 『Citrus Genetic Hybrids ID™ Platform』의 경우, 감귤 품목 GSP 과제에 참여한 타세부프로젝트에 분석 서비스를 제공하여 실제 감귤 육종 프로그램에 활용하고 있다. 상기 분석 시스템에 대해 기술실시를 실행할 계획이며, 국내·외 감귤 육종가(기업)에 확대 개방하여 산업화를 추진할 계획이다. 교잡배/주심배 판별 분석 시스템의 경우, 감귤 교배 육종 프로그램을 운영 중이나 감귤 분자생물학 분야의 연구개발 투자 수준이 낮을 것으로 판단되는 중남미권, 지중해 연안권, 호주권, 동남아시아권에 집중하여 홍보할 예정이다. 아울러 고유 마커 정보의 유출, 검역 등의 문제가 발생할 수 있으므로 키트 등의 제품 형태 보다는 DNA 형태로 시료를 제공받아서 분석 서비스를 제공할 것이다. 당사의 대립 유전자 size database에 등록되어 있지 않은 품종의 경우, 고유 마커 정보를 적용하여 의뢰인에게 최적의 마커 조합 정보를 제공함으로써 국내 감귤 품종 database의 확장에도 기여할 것이다. 교잡배 판별 분석 시스템인 『Citrus Genetic Hybrids ID™ Platform』을 국내·외에 홍보하기 위하여 국문, 영문, 스페인어 브로셔를 제작하였으며(제3장 연구개발 수행 내용 및 결과 참조), 해외 학회, 박람회, 전시회 등을 통해 기술 홍보를 통한 사업화 또는 기술 이전 등을 추진할 계획이다.

감귤 교잡배 판별 분자표지의 경우 현재 국내 특허 출원을 진행하였으며(출원번호 10-2016-0138634; 기술의 명칭-감귤 교잡배와 주심배 구별용 SSR 분자마커 및 이의 용도), 지식재산권 확보가 가능할 것으로 예상되고 있다. 상기 교잡배/주심배 판별 분자표지의 개발 및 적용과 관련하여 2017년 상반기에 SCI급 국제학술지에 논문 투고를 준비하고 있으며, 현재 논문 원고의 작성을 완료한 상태이다. 감귤 궤양병 내병성 연관 분자표지의 경우도 내병성과 이병성의 추가 유전자원들에 적용하여 기술의 객관성, 정확성, 범용성 등이 확보되면 2017년 하반기에 지식재산권 출원과 학술 논문 투고를 진행할 계획이다.

또한 본 과제를 통해 확보된 감귤 궤양병, 더텡이병 내병성 및 홍피 형질 연관 분자표지

의 경우, 다양한 유전자원 및 교배 집단에 확대 적용하여 범용성을 검정하고자 한다. 또한 현재까지 확보된 다양한 감귤 품종(총 20개 품종)에 대한 유전체 정보들은 다양한 감귤 육종 형질 연관 분자표지 개발, 품종 육성권리 보호를 위한 기술 개발 등을 포함한 다양한 연구개발 분야에 최대한 활용할 예정이다.

본 과제에서 확립된 콜히친 처리 동질 4배체 유도 기술에 대해서는 2018년 상반기에 SCI 논문게재에 활용할 것이며, 획득된 동질 4배체에 대해서는 조기결실을 통해 수체 및 과실 특성 분석 후 중간모본으로 식물특허 출원할 예정이다. 선발된 동질 4배체 교배친에 대해서는 육종기관 및 민간업체에 분양하여 감귤 무핵 3배체 육종에 활용토록 하여 감귤 육종기술의 조기선진화에 활용하게 될 것이다. 또한 확립된 기술체계를 이용하여 유용 교배친의 동질 4배체 대량 양성에 이용하게 될 것이다.

자연발생 3배체는 무핵 3배체 품종개발에 활용하고, 4배체는 고접 조기 육묘하여 2배체와의 교배를 통한 무핵 3배체 교배실생 대량양성에 이용할 것이다. 또한 2배체와의 교배시 종자형성도를 분석하고 미숙배 구제 기술체계 확립을 통한 무핵 3배체 육종기반 구축에 활용할 것이다. 교배실생의 탱자 및 스윙글 대목의 접목에 따른 유년성에 미치는 영향과 수형관리에 따른 유연성에 미치는 영향에 대해서는 추가적으로 분석하여 유년성 단축 조기결실 시스템 구축에 활용하고 육종기관 및 민간육종업체에 그 기술정보를 제공토록 할 예정이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구를 진행하면서 수집한 해외과학기술 정보는 감귤 품종 특성을 조사할 수 있는 유용한 해외 감귤 데이터베이스를 검색하였다.

표 1. 감귤 품종 특성을 살펴보기 위한 유용한 인터넷 주소

주소명	인터넷 주소	국가
Citrus Variety Collection(CVC)	<a href="http://www.citrusvariety.ucr.edu/index.html">http://www.citrusvariety.ucr.edu/index.html</a>	미국
Citrus Clonal Protection Program(CCPP)	<a href="http://www.ccpp.ucr.edu/variety/index.html">http://www.ccpp.ucr.edu/variety/index.html</a>	미국
Citrus Pages	<a href="http://citruspages.free.fr/home.html">http://citruspages.free.fr/home.html</a>	프랑스
National Citrus Germplasm Informational System	<a href="http://xt.cric.cn/zy/?lb=1">http://xt.cric.cn/zy/?lb=1</a>	중국
Genetic Resources Center	<a href="http://www.gene.affrc.go.jp/databases-plant_search.php">http://www.gene.affrc.go.jp/databases-plant_search.php</a>	일본
Plant Genome DataBase	<a href="http://pgdbj.jp/?ln=e">http://pgdbj.jp/?ln=e</a>	일본
Banco de germoplasma de cítricos	<a href="http://www.ivia.gva.es/en/banco-de-germoplasma-de-citricos">http://www.ivia.gva.es/en/banco-de-germoplasma-de-citricos</a>	스페인
Salvatore Squadrito's Nurseries	<a href="http://www.vivaisquadrito.it/index_en.php">http://www.vivaisquadrito.it/index_en.php</a>	이탈리아
Korean Agricultural Culture Collection (KACC)	<a href="http://genebank.rda.go.kr/">http://genebank.rda.go.kr/</a>	대한민국

## 제 7 장 참고문헌

- Aleza P, Froelicher Y, Schwarz S, Agunsi M, Hernandez M, Juarez J, Luro F, Morillon R, Navarro L, Ollitrault P (2011) Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Ann Bot* 108:37-50
- Anderson C (2000) Citrus germplasm resources and their use in Argentina, Brazil, Chile, Cuba, and Uruguay. *Proc IX ISC*, 1, 123-125
- Bajaj YPS (1984) Induction and growth in frozen embryos of coconut and ovules of citrus. *Current Sci* 53:1215 - 1216
- Bastianel M, Schwarz SF, Colleta-Filho HD, Lin LL, Machado MA, Koller OC (1998) Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. *Genet Mol Biol* 21:123-127
- Benavente-Garcia O and Castillo J (2008) Update on uses and properties of Citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem.* 56:6185-6205
- Bisht IS, Mahajan RK, Loknathan TR, Agrawal RC (1998) Diversity in Indian sesame collection and stratification of germplasm accessions in different diversity groups. *Genet Resour Crop Evol* 45:325-335
- Biswas MK, Xu Q, Mayer C, Deng X (2014) Genome wide characterization of short tandem repeat markers in sweet orange (*Citrus sinensis*). *PLoS One* 9:e104182
- Brown AHD, Grace JP, Speer SS (1987) Designation of a "core" collection of perennial Glycine. *Soybean Genet Newsl* 14:59-70
- Burton GW, Ignold KU (1984) Ingold. "β-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant." *Science* 224:569-574
- Chae CW, Dutt M, Yun SH, Park JH, Lee DH (2011) Development of a SCAR marker linked to male fertility traits in 'Jinkyool'(*Citrus sunki*). *J Life Sci* 21:1659-1665
- Charmet G, Balfourier F (1995) The use of geostatistics for sampling a core collection of perennial ryegrass populations. *Genet Resour Crop Evol* 42:303-309
- Choi JH, Park YH, Lee LS, Lee SP, Yu MH (2013) Antioxidant activity and inhibitory effect of Aster scaber Thunb. extract on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Korean J Food Sci Technol* 45:356-363
- Cuenca J, Aleza P, Vicent A, Brunel D, Ollitrault P, Navarro L (2013) Genetically based location from triploid populations and gene ontology of a 3.3-mb genome region linked to *Alternaria* brown spot resistance in citrus reveal clusters of resistance genes. *PLoS One* 8:e76755
- Das AK (2003) Citrus canker-A review. *J Appl Hortic* 5:52-60
- De Oliveira AC, Garcia AN, Cristofani M, Machado MA (2002) Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. *Euphytica* 128:397-403



- Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5:435–445
- Engelman F (1997) In vitro conservation methods. p. 119–162. In: BV Ford–Lloyd, JH Newbury, JA Callow, eds, *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*. CABI, Wallingford, UK
- Frankel OH (1984) Genetic perspectives of germplasm conservation. *Genetic manipulation: impact on man and society*. Cambridge University Press, Cambridge, 161–170
- Frost HB, Soost RK (1968) Seed reproduction: development of gametes and embryos. *In* W Reuther, LD Batchelor, HJ Webber, eds, *The Citrus Industry*, Vol 1. University of California Press, Berkeley, USA, pp 290 - 324
- Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C (2007) Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules* 12:1641 - 1673
- Gerster H (1991) Potential role of  $\beta$ -carotene in the prevention of cardiovascular disease, *Int J Vitam Nutr Res*, Vol. 16, p. 277–283
- Gmitter FG, Krueger RR, Roose ML (1999) Citrus germplasm characterization by phenotype and molecular markers. p. 46–62. In: P Broadbent, SR Sykes, KB Bevington, D Hailstones, eds, *Proc the Citrus Germplasm Conservation Workshop*. Brisbane, Australia, October 1997
- Gonzalez–Arnao MT, Engelmann F, Urra C, Morenza M, Rios A (1988) Cryopreservation of citrus apices using the encapsulation–dehydration technique, *CryoLetters* 19:177 - 182
- Gottwald TR, Graham JH (1992) A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. *Phytopathology* 82:930–935
- Graham JH, Gottwald TR, Riley TD, Achor D (1992) Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology* 82:1319–1325
- Greenberg ER, Baron JA, Stukel TA, Stevens MM, Mandel JS, Spencer SK, Elias PM, Lowe N, Nierenberg DW, Bayrd G, Vance JC, Freeman DH, Clendenning WE, Kwan T (1990) "A clinical trial of beta carotene to prevent basal–cell and squamous–cell cancers of the skin." *New England J Medicine* 323.12: 789–795
- Gross J (1987) *Carotenoids: Pigments in Fruits*. Academic Press, London
- Holbrook CC, Anderson WF (1995) Evaluation of a core collection to identify resistance to late leafspot in peanut. *Crop Sci* 35:1700–1702
- Holbrook CC, Anderson WF, Pittman RN (1993) Selection of a core collection from the U.S. germplasm collection of peanut. *Crop Sci*. 33:859–861
- Horowitz RM, Gentili B (1977) Flavonoid constituents of citrus. p. 397–426. In: S Nagy, PE Shaw, MK Veldhuis, eds, *Citrus Science and Technology*, AVI Publishing Co. Inc.. Westport, CT (USA). Vol. I
- Hu J, Zhu J, Xu HM (2000) Methods of constructing core collections by stepwise clustering with three sampling strategies based on the genotypic values of crops. *Theor Appl Genet* 101:264–268

- Hyon JS, Kang SM, Senevirathne M, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, Oh CK, Jeon YJ, Kim SH (2010) Antioxidative activities of extracts from dried *Citrus sunki* and *C. unshiu* peels. J Korean Soc Food Sci Nutr 39:1 - 7 (in Korean)
- Hyun JW, Yi PH, Hwang RY, Moon KH (2013) Aspect of incidence of the major citrus diseases recently. Research in Plant Disease, 19:102-107
- Ikoma Y, Matsumoto H, Masaya KATO (2014) The characteristics of carotenoid biosynthesis in citrus fruit. Japan Agric Res Quart:JARQ, 48(1):9-16
- Kahn TL, Krueger RR, Gumpf DJ, Roose ML, Arpaia ML, Batkin TA, Bash JA, Bier OJ, Clegg MT, Cockerham ST, Coggins CW, Durling D, Elliott G, Mauk PA, McGuire PE, Orman C, Qualset CO, Roberts PA, Soost RK, Turco J, Van Gundy SG, Zuckerman B (2001) Citrus Genetic Resources in California, Genetic Resources Conservation Program, 15-27
- Kang SK, Yun SH, Lee DH (2008) Development of a SCAR marker linked to polyembryonic trait in citrus. Korean J Hort Sci Tech 26:51-55
- Kaneyoshi J, Furuta T, Curao M, Yamaguchi S (2008) Induced tetraploid by colchicine treatment in some monoembryonic Citrus cultivars and triploidy production by using the tetraploid as seed parents. Hort Res 7:5-10
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M (1999) Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. J Agric Food Chem 47:3565 - 3571
- Kepiro JL, Roose ML (2007) Nucellar embryony. In IA Khan, ed, Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology, CAB International, Oxfordshire, UK, pp 141-149
- Kim KW, Chung HK, Cho GT, Ma KH, Chandrabalan D, Gwag JG, Park YJ (2007) PowerCore: a program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing core sets. Bioinformatics 23:2155-2162
- Kim HB, Lim S, Kim JJ, Park YC, Yun SH, Song KJ (2015) Current status and prospects of citrus genomics. J Plant Biotechnol 42:326-335
- Kim HB, Kim JJ, Oh CJ, Yun SH, Song KJ (2016) Current status and prospects of molecular marker development for systematic breeding program in citrus. J Plant Biotechnol 43:261 - 271
- Kim JE, Oh SK, Lee JH, Lee BM, Jo SH (2014) Genome-wide SNP calling using next generation sequencing data in tomato. Mol Cells 37:36-42
- Kim YC, Koh KS, Koh JS (2001) Changes of some flavonoids in the peel of satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) harvested during maturation. Agric Chem Biotechnol 44(3):143 - 146
- Kim YD, Ko WJ, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH (2009) Composition of flavonoids and antioxidative activity from juice of Jeju native citrus fruits during maturation. Korean J Nutr. 42(3):278 - 290
- Knüpfper H, van Hintum TJ (1995) The barley core collection: an international effort. Core collections of plant genetic resources, 171-178
- Kobayashi S, Sakai A, Oiyama L (1990) Cryopreservation in liquid nitrogen of cultured

- navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) nucellar cells and subsequent plant regeneration. *Plant Cell Tiss Organ Culture* 23:15 - 20
- Koizumi M, Kuhara S (1980) Evaluation of citrus plants for resistance to bacterial canker disease in relation to the lesion extension. *Bulletin of the Fruit Tree Research Station, D (Kuchinotsu)*, 55(3):73-92
- Lee CH, Kang YJ (1997) HPLC analysis of some flavonoids in citrus fruits. *Korean J Post-harvest Sci Technol Agri Products*. 4(2):181 - 187
- Lee JE, Kim JH, Kim MY (2015) Changes in phenolic composition, antioxidant and antidiabetic properties of Jeju *Citrus sudachi* as influenced by maturity. *J Life Sci* 25: 1311-1318
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11:2453-2465
- Liu S-R, Li W-Y, Long D, Hu C-G, Zhang J-Z (2013) Development and characterization of genomic and expressed SSRs in *Citrus* by genome-wide analysis. *PLoS ONE* 8(10):e75149.
- Luro FL, Costantino G, Terol J, Argout X, Allario T, Wincker P, Talon M, Ollitrault P, Morillon R (2008) Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics* 9:287
- Marin ML, Duran-Vila N (1988) Survival of somatic embryos and recovery of plants of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) after immersion in liquid nitrogen. *Plant Cell Tiss Organ Culture* 14:51 - 57
- Mathews-Roth MM (1991) Recent progress in the medical applications of carotenoids. *Pure Appl Chem* 63:147-156
- Matsumoto R, Yamamoto M, Kuniga T, Okudai N, Yamada Y, Takahara T, Oiyama I, Ishiuchi D, Murata H, Asada K, Ikemiya H, Shichijo T, Yoshinaga K, Uchihara S, Ieki H (200). New citrus cultivar Nishinokaori. *Bull Nat'l Institute Fruit Tree Scice* 2:17-23
- Matsumoto H, Ikoma Y, Kato M, Kuniga T, Nakajima N, Yoshida T (2007) Quantification of carotenoids in citrus fruit by LC-MS and comparison of patterns of seasonal changes for carotenoids among citrus varieties. *J Agri Food Chem* 55:2356-2368
- Matthews P, Ambrose MJ (1994) Development and use of a 'core' collection for the John Innes Pisum collection. In *Evaluation and exploitation of genetic resources pre-breeding*, Clermont Ferrand (France), 15-18 Mar 1994. EUCARPIA
- Mokbel MS, Hashinaga F (2006) Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. *Food Chem* 94:529-534
- Mumford PM, Grout BWW (1979) Desiccation and low temperature (-196°C) tolerance of *Citrus limon* seed. *Seed Sci Technol* 7:407 - 410
- Nelson S (2008) Citrus scab
- Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishil T, Yano M, Ohta H (2006) Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:178-192

- Noirot M, Hamon S, Anthony F (1996) The principal component scoring: a new method of constituting a core collection using quantitative data. *Genet Resour Crop Evol* 43:1-6
- Nugroho A, Park MG, Jin SE, Choi JS, Park HJ (2009) Quantitative analysis of flavanone glycosides and peroxynitrite scavenging effect of the five oriental medicinal drugs (*Aurantii nobilis* Pericarpium, *Citrii unshiu* Pericarpium, *Citrii unshiu* Semen, *Aurantii Fructus*, *Poncirii Fructus*). *Kor J Pharmacogn* 40(4):370 - 375 (in Korean)
- Oiyama I, Kobayashi S (1991) Citrus pentaploids from small seeds of diploid × diploid crosses. *HortScience* 26:292-2
- Ollitrault F, Terol J, Pina JA, Navarro L, Talon M, Ollitrault P (2010) Development of SSR markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in *Citrus*. *American J Bot* e124 - e129
- Ollitrault P, Terol J, Chen C, Federici CT, Lotfy S, Hippolyte I, Ollitrault F, Bérard A, Chauveau A, Cuenca J, Costantino G, Kacar Y, Mu L, Garcia-Lor A, Froelicher Y, Aleza P, Boland A, Billot C, Navarro L, Luro F, Roose ML, Gmitter FG, Talon M, Brunel D (2012) A reference genetic map of *Citrus clementina* hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. *BMC Genomics* 13:593 doi: 10.1186/1471-2164-13-593
- Ollitrault P, Froelicher Y, Dambier D, Luro F, Yamamoto M (2007) Seedless and ploidy manipulation. p. 197-218. In: I. Khan (ed) *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, CABI, USA
- Park JH, Kang BW, Kim JE, Seo MJ, Lee YC, Lee JH, Joo WH, Choi YH, Lim HS, Jeong YK, and Lee BK (2008) Effect of ethanol extract from peel of *Citrus junos* and *Poncirus trifoliata* on antioxidant and immune activity. *J Life Sci*, 18:403-408
- Radovic G, Jelovac D (1994) The possible approach in maize core collection development. In *Evaluation and exploitation of genetic resources pre-breeding*, Clermont Ferrand (France), 15-18 Mar 1994. EUCARPIA
- Rao MN, Soneji JR, Chen C, Huang S, Gmitter FG Jr (2008) Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like *Citrus* rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. *Tree Gen and Genom* 4:113-124
- Recupero GR, Russo G, Recupero S (2005) New promising Citrus triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. *HortScience* 40:516-520
- Ruiz C, Breto MP, Asins MJ (2000) A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica* 112:89-94
- Scarano MT, Abbate L, Ferrante S, Lucretti S, Tusa N (2002) ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. *Plant Cell Rep* (2002) 20:1162 - 1166
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnol* 18:233-234
- Shareefa M, Singh AK, Manish S, Dubey AK (2009) Differentiation of nucellar and zygotic

- seedlings in citrus using ISSR markers. *Indian J of Agr Sci* 79:884–889
- Shin JH, Lee SJ, Kang MJ, Yang SM, Sung NJ (2009) Biological activities of Yuza grown in different areas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:1485–1491
- Son HS, Kim HS, Kwon TB, Ju JS (1992) Isolation, purification and hypotensive effects of bioflavonoids in *Citrus sinensis*. *J Korean Soc Food Nutr* 21:136–142
- Song EY, Choi YH, Kang KH, Koh JS (1998) Free sugar, organic acid, hesperidin, naringin and inorganic elements changes of Cheju citrus fruits according to harvest date. *Korean J Food Sci Technol* 30:306–312
- Song KJ, Kim SB, Park JH, Oh EU, Yi K, Kim DW, Kang JH, Kim JS, Oh JH, Gmitter FG (2011) Frequency and growth characteristics of polyploids occurred spontaneously in some mandarin hybrids. *Korean J Hortic Sci Technol* 29:617–633
- Souza MCD, Stuchi ES, Goes AD (2011) Reaction of tangerines genotypes to *Elsinoe fawcettii* under natural infection conditions. *Crop Breed Appl Biotechnol* 11:77–81
- Sugiura M et al (2005) High serum carotenoids are inversely associated with serum gamma-glutamyl transferase in alcohol drinkers within normal liver function. *J Epidemiology* 15:180 - 186
- Sugiura M et al (2008) Associations of serum carotenoid concentrations with metabolic syndrome: Interaction with smoking. *British J Nutrition* 100:1297 - 1306
- Sugiura M et al (2011) Dietary patterns of antioxidant vitamin and carotenoid intake associated with bone mineral density: Findings from post-menopausal Japanese female subjects. *Osteoporosis International* 22:143 - 152
- Sung NH, Jo YJ, Park CW, Woo SM, Jang SY, Choi IW, Jeong YZ (2012) Characteristics of alcohol fermentation in citrus hydrolysates through narirutin addition. *Korean J Food Preserv* 19:153 - 158 (in Korean)
- Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3–new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40(15):e115
- Vardi A, Levin I, Carmi N (2008) Induction of seedlessness in Citrus: from classical techniques to emerging biotechnological approaches. *J Amer Hort Sci* 133:117–126
- Wakana A, Uemoto S (1988) Adventive embryogenesis in *Citrus* (Rutaceae). II. Post-fertilization development. *American J Bot* 75:1031 - 1047
- Wang Y, Zhou L, Li D, Dai L, Lawton-Rauh A, Srimani PK, Duan Y, Luo F (2015) Genome-wide comparative analysis reveals similar types of NBS genes in hybrid *Citrus sinensis* genome and original *Citrus clementine* genome and provides new insights into non-TIR NBS genes. *PLoS One*. 10(3):e0121893.
- Wang HJ, Yoon KR (1995) Carotenoid pigment of citrus fruits cultivated in Korea. *Korean J Food Sci Technol* 27:950–957
- Wu GA et al (2014) Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nat Biotechnol* 32:656–662
- Xu Q et al (2013) The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat Genet* 45:59–66
- Yang YT, Kim MS, Hyun KH, Kim YC, Koh JS (2008) Chemical constituents and

- flavonoids in citrus pressed cake. Korean J Food Preservation 15:94-98
- Yildiz E, Kaplankiran M, Demirköser TH, Uzun A, Toplu C (2013) Identification of zygotic and nucellar individuals produced from several citrus crosses using SSRs markers. Not Bot Horti Agrobo 41:478-484
- Yonezawa K, Nomura T, Morishima H (1995) Sampling strategies for use in stratified germplasm collections. p. 35-54. In: T Hodgkin, AHD Brown, T.J.L van Hintum, EAV Morales, eds, Core Collections of Plant Genetic Resources, John Wiley and Sons, UK
- Yoshimizu N, Otani Y, Saikawa Y, Kubota T, Yoshida M, Furukawa T, Kumai K, Kameyama K, Fujii M, Yano M, Sato T, Ito A, Kitajima M (2004) Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. Aliment Pharmacol Ther 1:95-101
- Yun JU, Yang HB, Jung YH, Yun SH, Kim KS, Kim CS, Song KJ (2007) Identification of zygotic and nucellar mandarin seedlings using randomly amplified polymorphic DNA. Hort Environ Biotechnol 48:171-175
- Zhang Y, Dou H, Li H, He Z, Wu H (2014) The citrus flavonoid nobiletin inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells *in vitro*. J Korean Soc Food Sci Nutr 23:225 - 229
- 김광식, 김동환, 이성찬, 현재욱 (2003) 감귤 병해충의 진단과 방제(2판)
- 김한용 (1988) 濟州 在來 柑橘(Citrus spp.)의 分類와 有用形質 및 遺傳標識에 關한 研究, 전남대학교 박사학위 논문
- 농업생명공학연구원 (2002) 식물유전자원 핵심수집단 번역서 서문
- 박영철, 양영택, 김진영, 이창훈, 강상훈, 강중훈 (2015) 온주밀감 유전자원의 과즙 중 플라보노이드 특성 및 군집 분석. 한국자원식물학회지, 28(1), 16-25
- 현재욱 (2000) 감귤 더듬이병균의 분화조사 및 병 저항성 유전자원 개발. 제주농업시험장 보고서 402-416
- 현재욱 (2004). 감귤 품종별 궤양병 저항성 평가, 제주농업시험장 보고서, 337-347