

석사학위논문

RAPD 분석을 이용한 감귤 교잡실생의 동정



제주대학교 대학원

원예학과

윤진웅

2005년 7월

RAPD 분석을 이용한 감귤 교잡실생의 동정

지도교수 송 관 정

윤 진 응

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함

2005년 7월

윤 진 응의 농학 석사학위 논문으로 인준함

심사위원장 _____

위 원 _____

위 원 _____

제주대학교 대학원

2005년 7월

Identification of Zygotic Seedlings Using
RAPD in *Citrus*

Jin-Ung Yun

(Supervised by Professor Kwan Jeong Song)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF HORTICULTURE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

July, 2005

목 차

목 차	i
Summary	ii
List of Tables	iii
List of Figures	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 식물재료	4
2. Total DNA 분리	5
3. RAPD 분석	6
1) PCR 반응 및 전기영동	6
2) Random primer 선발 및 RAPD 분석	6
III. 결과 및 고찰	8
1. 교배 과실의 종자 형성도 및 종자발아 특성	8
2. RAPD 분석에 의한 교잡실생의 동정	13
IV. 적 요	30
V. 참고 문헌	31
VI. 감사의 글	34

Summary

This study was conducted to evaluate the efficiency of cross-breeding with major mandarins including 'Miyagawa wase' (*C. unshiu*), 'Okitsu wase' (*C. unshiu*), and 'Shiranuhi' (*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*) grown in Jeju island. We investigated the seed formation of mandarin fruits and seed germination characteristics, the frequency and distribution of zygotic seedlings per seed using RAPD, and the influence of pollen parents.

Satsuma mandarin ranged in the average number of seeds per fruit from 1.1 to 1.2, however 'Shiranuhi' ranged from 0.9 to 2.5 with a variation caused by pollen parents. The average rate of seed germination was 88.3% and the average number of seedlings per seed was 9.46.

Five random primers (UBC439, OPK14, OPY14, OPA-08, and OPJ-08) amplifying specific DNA markers for pollen parents were selected. RAPD analysis was carried out with OPA-08 and OPJ-08 for seedlings of 'Miyagawa wase' × 'Ponkan', with UBC439, OPK14, and OPA-08 for seedlings of 'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo', with OPY14 and OPA-08 for 'Shiranuhi' × 'Ponkan', and with OPK14 and OPA-08 for 'Shiranuhi' × 'Swingle citrumelo', respectively. The frequency of zygotic seedlings per seed resulted in 13.42% for 'Miyagawa wase', 9.8% for 'Okitsu wase', and 0~3.85% for 'Shiranuhi', respectively.

The analysis of distribution of zygotic seedling and nucellar seedlings germinated from one seed indicated that 45% of zygotic seedlings were positioned in the biggest seedlings for 'Miyagawa wase' and 60% zygotic seedlings were positioned in the third big seedlings for 'Okitsu wase'. In case of 'Shiranuhi', it was insufficient to evaluate the distribution of zygotic seedlings due to a shortage of zygotic seedlings identified. The results indicate that further study should be conducted to determine the effect of pollen parents on frequency and distribution of zygotic seedlings definitely.

List of Tables

Table 1.	Cross combinations used in this experiment.	4
Table 2.	Random primers and their sequence and GC content used in this experiment.	7
Table 3.	Seed formation of mandarin fruits harvested from four different crosses.	8
Table 4.	Germination characteristics of mandarin seeds obtained from four different crosses.	10
Table 5.	Classification of seeds obtained from four different crosses on the basis of the number of seedlings.	11
Table 6.	Frequency and distribution of zygotic seedlings in 'Miyagawa wase'.	18
Table 7.	Frequency and distribution of zygotic seedlings in 'Okitsu wase'.	24
Table 8.	Distribution of zygotic seedling from 'Shiranuhi' × 'Swingle citrumelo'.	29

List of Figures

Fig. 1.	DNA amplification of both of each parent and mixed seedlings of 'Miyagawa wase' × 'Ponkan' using OPA-08.	14
Fig. 2.	DNA amplification of individual seedlings of 'Miyagawa wase' × 'Ponkan' using OPA-08.	15
Fig. 3.	DNA amplification of both of each parent and mixed seedlings of 'Miyagawa wase' × 'Ponkan' using OPJ-08.	16
Fig. 4.	DNA amplification of individual seedlings of 'Miyagawa wase' × 'Ponkan' using OPJ-08.	17
Fig. 5.	Growth comparison of greatest zygotic seedlings identified by RAPD with nucellar seedlings germinated from one seed of 'Miyagawa wase' × 'Ponkan'.	18
Fig. 6.	DNA amplification of both of each parent and mixed seedlings of 'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo' using UBC439.	19
Fig. 7.	DNA amplification of individual seedlings of 'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo' using UBC439.	20
Fig. 8.	DNA amplification of both of each parent and mixed seedlings of 'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo' using OPK14.	21

Fig. 9. DNA amplification of individual seedlings of 'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo' using OPK14.	21
Fig. 10. DNA amplification of both of each parent and mixed seedlings of 'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo' using OPA-08.	22
Fig. 11. DNA amplification of individual seedlings of 'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo' using OPA-08.	23
Fig. 12. Zygotic seedlings identified by both of RAPD and tri- or bi- foliate leaves in progeny of 'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo'.	25
Fig. 13. DNA amplification of individual seedlings of 'Shiranuhi' × 'Ponkan' using OPY14.	26
Fig. 14. DNA amplification of individual seedlings of 'Shiranuhi' × 'Ponkan' using OPA-08.	26
Fig. 15. DNA amplification of both of each parent and mixed seedlings of 'Shiranuhi' × 'Swingle citrumelo' using OPK14.	27
Fig. 16. DNA amplification of individual seedlings of 'Shiranuhi' × 'Swingle citrumelo' using OPK14. ...	28
Fig. 17. DNA amplification of individual seedlings of 'Shiranuhi' × 'Swingle citrumelo' using OPA-08.	28

I. 서 론

감귤(citrus)은 운향과(Rutaceae)의 7개 아과 중 액상의 과육과 혁질의 과피로 이루어진 형태의 과실(hesperidium)을 갖는 감귤아과(Aurantinoideae)에 속하는 식물을 총칭한다. 이들은 아시아 남동부에서 기원하여 유사 이전에 원산지 인근에 전파되고 중세기에 유럽에 소개되고, 이후 전대륙으로 전파되었다고 추정하고 있다(Davies와 Albrigo, 1994; Reuther 등, 1968; Spiegel-Roy와 Goldschmidt, 1996). 감귤의 유전체는 9개의 염색체($2n=18$)로 이루어져 있는데(Davies와 Albrigo, 1994), 유전체 크기는 약 5.63×10^8 bp로 작은 편이다(Guerra, 1984). 현재 전 세계적으로 널리 재배하고 있는 오렌지, 만다린 등의 종들은 감귤속(*Citrus*)에 속하는데, 경제적 재배는 금감속(*Fortunella*)과 탕자속(*Poncirus*)을 포함한 3속에 대해 이루어지고 있다. 국내에서 재배하고 있는 감귤은 대부분 온주밀감이고, 부지화 등의 만감류인 만다린 계통과 금감이 일부를 차지하고 있는 실정이다.

국내 감귤 생산량은 647천톤('04년) 내외로 전 세계 감귤 생산량 104,506천톤('02년)의 약 0.6%를 차지하고 있다(FAO, 2003; 김 등, 2005). 품종 구성에 있어서는 온주밀감이 약 93%이고, 기타가 약 7%이다. 감귤의 생산액은 제주 농업 총생산액의 36.3%('00년)를 차지하는 제주의 경제를 지탱하는 핵심 기간산업의 하나이다. 그런데 최근 감귤의 품질저하에 따른 과실가격 하락과 농가소득의 감소는 생산농가와 지역경제의 어려움으로 이어졌다. 일조부족 등 기후적인 요인과 다비에 의한 고수량 재배방식이 주요 요인으로 알려지고 있다(오, 2005). 그러므로 내재해성 고품질 신품종 개발과 타이백 멀칭재배 등 인위적인 품질향상 기술개발 및 실용화가 시급한 실정이다.

식물의 육종은 생식과 유전의 인위적인 조절인데, 교배육종에서는 교배친의 선발과 교배 후 양성한 후대 분리집단의 선발을 포함한다. 그러므로 육종의 성패는 후대 분리집단의 규모와 선발의 효율 정도에 좌우된다고 할 수 있다. 다른 과수에서와 같이 감귤에서도 유전자 조성의 이형접합도가 매우 높아 후대 집단의 규모화가 중요하다. 그런데 자가불화합성, 교배불친화성, 배우체 불임성, 무수정생식에 의한 다배성의 특성은 후대집단의 규모화를 어렵게 한다. 선발효율과 관련한 요인으로는 유년성, 수관용적 등이 있다. 감귤의 유년성은 5~15년 내외이다(Davies와 Albrigo, 1994; Reuther 등, 1968). 그러므로 다른 과수들보다도 육종효율이 낮으며, 육종기간이 길고 육종비용도 높다.

감귤에 특이적인 다배성 형질은 후대집단 양성과 선발효율에 모두 영향을 미친다. 다배성은 한개 종자 내에 2개 이상의 배가 발달하는 것인데, 정핵과 난세포가 결합한 접합자로부터 발달한 교잡배(또는 유성배)와 배주의 주심조직으로부터 발달한 주심배(또는 무성배)가 공존하게 되는 것이다. 다배성의 정도는 유전적 요인에 의해 달라져 종 및 품종에 따라 차이가 있다. 또한 화분친의 영향을 받기도 하고, 환경의 영향에 따라서도 달라질 수 있다(Reuther 등, 1968). 온주밀감의 경우는 20.8 내외(김, 2005)이나 화분친과 환경에 따른 영향 평가가 불충분하고, '부지화'의 경우는 보고된 바가 없다.

종자 내 배의 수에 있어서의 차이와는 달리 대배와 실생의 수는 거의 일정한 편이다. 레몬의 경우 품종에 따른 종자 당 배의 수는 1.64~8.96 범위이나, 대배의 수와 실생수는 유사한 1.5 내외이었다(Reuther 등, 1968). 그런데 주심배 실생의 비율은 종과 품종에 따라 다르다. 'Dancy'와 'Kara'의 경우 100%에 가깝고, 'Kiyomi'와 'Clementine'의 경우 0%로 알려져 있다. 온주밀감의 경우는 86% 내외로 알려져 있으나(Davies와 Albriego, 1994; Reuther 등, 1968) 품종 및 환경의 영향 등에 대한 자료가 매우 부족한 실정이다.

온주밀감은 암수 배우체 모두 임성이 낮고 교잡배 비율이 낮다(한과 권, 1996). 그러므로 온주밀감의 신품종 육종을 효율적으로 수행하기 위해서는 배주의 임성을 높이고, 종자 내 배의 수를 줄이며, 교잡 실생의 조기동정 기술이 필요하다. 배주의 임성과, 종자 내 배의 수는 환경의 영향으로 인위적인 조절이 어려운 편이다.

교배집단 내에서 교잡 실생의 조기식별은 과거에 주로 육안 식별에 의존하여 왔다. 이 경우는 중간잡종에서 삼염성과 배의 색 및 형태에 의존하여 주로 수행하였다. 그러나 근연종간 또는 품종간 교배의 경우는 형태적인 특성에 의존한 육안식별이 매우 어렵다(Davies와 Albriego, 1994). 그러므로 교잡 실생과 주심배 실생을 조기에 구별하기 위한 방법으로 생화학적 또는 분자생물학적 기법이 일부 연구되어 왔다.

잎의 플로보노이드 및 coumarin의 박층크로마토그래피 분석(Tatum 등, 1978), 잎 휘발성 물질의 gas 크로마토그래피 분석(Weinbaum 등, 1982), 뿌리와 잎의 동위효소 분석(문과 고, 1991; Roose와 Traugh, 1988; Soost와 Williams, 1980), 신초 추출물의 갈변 정도(Spiegel-Roy와 Goldschmidt, 1996), RAPD 분석(Bastianel 등, 1998; Luro 등, 1995; Maria 등, 2004), SSR 분석(Luro 등, 1995; Oliveira 등, 2000), 그리고 flow cytometry 및 ISSR-PCR 분석(Tusa 등, 2002)이 보고되어 왔다.

그런데 동위효소 분석 등 생화학적 분석은 효소의 선택과 분석된 조직의 형

태와 시기에 따라 정확도가 낮아지는 단점이 있다(Bastianel 등, 1998; Tusa 등, 2002). 이에 반해 DNA 분석은 다형성이 높고 환경에 의한 영향이 거의 없어 최근 연구가 증가하는 추세이다. 이 중에서 RAPD 분석은 쉬운 편이고 비용도 비싸지 않은 편이어서 보편적인 추세에 있다.

따라서 본 연구에서는 국내 감귤 주요 품종인 ‘궁천조생’, ‘홍진조생’, ‘부지화’에서 교잡육종의 효율을 평가하는 기초 자료를 확보코자 품종의 과실당 교배종자 형성 정도와 종자 당 발아 실생 수, 그리고 RAPD 분석에 의한 교잡 실생의 비율 및 분포와 화분친의 영향을 분석하였다.



II. 재료 및 방법

1. 식물재료

식물재료로는 제주대학교 감귤화훼과학기술센터 육묘하우스 내에 화분에 재식된 탕자대목 접목묘 7년생 '궁천조생'(*C. unshiu* Marc. cv. Miyagawa wase) 및 '홍진조생'(*C. unshiu* Marc. cv. Okitsu wase)과 남원에 위치한 농가 하우스 내에 탕자대목 및 '궁천조생'에 기부 절접 4년생 '부지화'(((*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*) cv. Shiranuhi)를 이용하여 교배하였다. 교배는 2004년 5월 초에 '궁천조생'×'Ponkan', '홍진조생'×'Swingle citrumelo', '부지화'×'Ponkan', '부지화'×'Swingle citrumelo'의 4개 조합(Table 1)에 대하여 수행하였다.

Table 1. Cross combinations used in this experiment.

Cross No.	Seed parent	Pollen parent
1	'Miyagawa wase' (<i>Citrus unshiu</i> (Mak.) Marc.)	'Ponkan' (<i>C. reticulata</i> Blanco)
2	'Okitsu wase' (<i>C. unshiu</i> (Mak.) Marc.)	'Swingle citrumelo' (<i>C. paradisi</i> × <i>Poncirus trifoliata</i>)
3	'Shiranuhi' ((<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>)	'Ponkan' (<i>C. reticulata</i> Blanco)
4	'Shiranuhi' ((<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>)	'Swingle citrumelo' (<i>C. paradisi</i> × <i>P. trifoliata</i>)

자방친의 만개기를 전후하여 교배 4~5일 전에 'Ponkan'과 'Swingle citrumelo'의 나무로부터 꽃잎이 떨어지기 직전의 꽃을 절취하여 약을 모으고 개약기에서 1일간 개약 후 화분을 채취하였다. 인공수분은 완전히 열개한 꽃과 어린 봉오리 상태의 꽃은 모두 제거해 버리고 풍선상의 꽃에 대하여 꽃잎을 벌

리거나 일부를 제거한 후 화분용 붓을 이용하여 수행하였다. 시설 내 재식한 상태이어서 교배 후의 이중 화분오염 방지 조치는 따로 하지는 않았다. 교배수의 관리는 관행의 재배관리 방식에 준하여 수행하였다. 과실 성숙기에 이르러 과실을 수확하고 70% 에칠알코올로 과실 표면을 10분 정도 소독하였다. 무균대에서 소독한 과실의 적도 부분을 메스로 잘라 반으로 절개한 후 핀셋으로 종자를 채취하였다. 채종한 종자는 미리 준비한 MT 배지에 파종하고 조직배양실(28℃, 16시간 광주기)에서 발아를 유도하였다. 발아유도 3개월 후 종자 당 실생 수를 조사하였고 형태는 육안 관찰하였다.

2. Total DNA 분리

기내에서 3개월 이상 생육한 식물체의 유엽을 채취한 후, 이를 막자사발에 넣어 액체질소로 얼린 다음 막자로 마쇄하였다. 마쇄 조직의 total DNA 분리는 G-spinTM Genomic DNA Extraction Kit (for plant) (iNtRON, Korea) 및 G-spinTM Iip For Plant Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON, Korea)를 이용하여 수행하였다.

먼저 G-buffer 390 μ l를 막자 머리에 적시게 하여 사발에 넣고 새로운 1.5 ml tube에 모아서 넣었다. Enhancer 용액 6.5 μ l와 Poteinase K 용액 및 RNase A 용액 각 10 μ l씩을 tube에 넣고 잘 섞은 후 65℃에서 15~30분 동안 배양하였다. 세포를 보다 잘 용해시키기 위해 배양하는 동안 매 5분마다 tube를 수회 inverting하였다. PPT buffer 100 μ l를 첨가하고 vortexing한 후 얼음에서 5분 동안 정치하였다. 이를 13,000 rpm에서 7분 동안 원심분리한 후 상정액 중 200 μ l를 새로운 1.5 ml tube에 옮겼다. Binding buffer 650 μ l를 넣고 잘 섞었다. 섞은 용액을 G-spinTM column에 넣고 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리한 후 걸러져 나온 용액을 버렸다. Washing buffer A 용액 500 μ l를 G-spinTM column에 넣고 다시 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리한 후 걸러져 나온 용액을 버렸다. Washing buffer B 용액 500 μ l를 G-spinTM column에 넣고 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리한 후 걸러져 나온 것을 버리고 나서 재차 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리를 수행하였다. 그리고 G-spinTM column을 뚜껑이 잘려진 새로운 1.5ml tube에 넣고 elution buffer 100 μ l를 필터에 직접 넣고 실온에서 1분 동안 정치 후 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하였다. 이후 G-spinTM column을 제거하고 추출한 DNA 용액을 새로운 1.5ml tube에 넣고 4℃에 보관하여 필요시 사용하였다.

3. RAPD 분석

1) PCR 반응 및 전기영동

PCR 반응액은 AccuPower PCR Premix (BIONEER, Korea) (dNTP 250 μ M, $MgCl_2$ 1.5 mM, *Taq* DNA polymerase 1 unit, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, KCl 40 mM)에 template DNA 25 ng과 primer 50 pmoles를 첨가 혼합하여 총 반응액 20 μ l로 조성하였다. PCR 반응은 PC-808 thermocycler (ASTECH, Japan)에서 94 $^{\circ}$ C 2분 DNA의 예열 및 변성을 거친 다음 94 $^{\circ}$ C 1분 변성, 42 $^{\circ}$ C 1분 결합, 72 $^{\circ}$ C 1.5분 신장의 40회 반복 후, 72 $^{\circ}$ C 7분 안정화 과정으로 수행하였다. 그리고 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

증폭된 산물을 1 mg/ml의 ethidium bromide가 들어있는 1.5% agarose gel (Cambrex, U.S.A.)에 5 μ l loading하고 MGU-602T 전기영동 장치(CBS. SCIENTIFIC CO., U.S.A.)에서 POWER PAC 300 power supply (BIO-RAD, U.S.A.)를 이용하여 167 V의 전압으로 50분 동안 전기영동을 하였다. DNA 증폭 분리양상은 UV transilluminator 상에서 EDAS 290 시스템(Kodak, U.S.A.)으로 사진 촬영하였다.



2) Random primer 선발 및 RAPD 분석

‘홍진조생’ \times ‘Swingle citrumelo’, ‘궁천조생’ \times ‘Ponkan’, ‘부지화’ \times ‘Ponkan’, ‘부지화’ \times ‘Swingle citrumelo’의 4개 교배조합에서 교잡 실생의 동정에 적합한 random primer를 선발하고자 감귤 DNA분석에서 이미 보고된 Operon사의 OPK14, OPY14, OPX20, 그리고 OPL03의 4종(윤, 2001) 및 Conifer Operons (OPA-06~OPY-17)의 23종과 UBC사(Univ. of British Columbia Biotechnology Lab., Canada)의 UBC401~UBC450 50종, 총 77종의 random primer를 대상으로 PCR을 수행한 후 자방친에는 없고 화분친에는 존재하는 특이 band를 발생시키는 5종의 random primer를 선발하였다(Table 2).

선발한 5종의 random primer에 대해서는 발아한 식물체의 어린 잎을 채취한 후 6개씩 혼합하고 추출한 DNA에 대해 RAPD를 수행하였다. 그 결과 화분친 특이 증폭 band를 보이는 DNA에 대해서는 다시 개체별로 DNA를 추출한

후 RAPD를 수행하여 교잡 실생을 동정하였다.

Table 2. Random primers and their sequence and GC content used in this experiment.

Primer	Sequence (5' - 3')	GC content (%)
UBC439	GCC CCT TGA C	70
OPK14	CCC GCT ACA C	70
OPY14	GGT CGA TCT G	60
OPA-08	GTG ACG TAG G	60
OPJ-08	CAT ACC GTG G	60



III. 결과 및 고찰

1. 교배 과실의 종자 형성도 및 종자발아 특성

‘궁천조생’×‘Ponkan’, ‘홍진조생’×‘Swingle citrumelo’, ‘부지화’×‘Ponkan’, ‘부지화’×‘Swingle citrumelo’의 4개 조합에 대한 교배 과실 당 종자 형성 특성을 Table 3에 나타내었다. 과실 당 평균 종자수는 ‘궁천조생’과 ‘홍진조생’에서는 각각 1.1과 0.9로 유사하였다. 그런데 ‘부지화’에서는 ‘Ponkan’의 화분을 이용한 경우는 1.3으로 온주밀감보다 약간 높은 경향이었으나, ‘Swingle citrumelo’의 화분을 이용한 경우는 2.5로 2배 이상 높게 나타났다. 그러나 종자 충실도를 고려할 경우에는 온주밀감과 ‘부지화’의 경우 종자 형성도 면에서 거의 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 3. Seed formation of mandarin fruits harvested from four different crosses.

Cross	Fruits (No.)	Total seeds (No.)	Full seeds (No.)	Aver. no. seeds one fruit	Aver. no. full seeds one fruit
'Miyagawa wase' × 'Ponkan'	158	179	140	1.1	0.9
'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo'	97	122	95	1.3	1.0
'Shiranuhi' × 'Ponkan'	15	14	7	0.9	0.5
'Shiranuhi' × 'Swingle citrumelo'	19	48	23	2.5	1.2
Total	289	363	265	1.2	0.9

감귤속(*Citrus*) 과실에서 종자 생산은 유전적 요소 또는 배우자의 발생, 수분 또는 수정의 용이성, 주심배의 가입 또는 배의 생존에 미치는 환경적 요소에 의해 영향을 받게 된다(Frost와 Soost, 1968). 본 실험에서는 과실 당 총 종자수의 비교에서 온주밀감에서보다 ‘부지화’에서 높게 나타났는데, 이는 유전적인 요인으로 생각되었다. 그러나 ‘부지화’에서 ‘Swingle citrumelo’의 화분을 이용한 경우 ‘Ponkan’의 화분을 이용한 경우보다 높게 나타난 것은 화분의 임성에 의한 차이라고 하기보다는 교배불친화에 의해 나타나는 현상으로 추정되었다. 이는 동일한 ‘Ponkan’의 화분을 ‘궁천조생’에 인공수분하여 교배한 결과에서는 ‘홍진조생’에서 ‘Swingle citrumelo’의 화분을 이용한 경우의 종자 형성도에서 거의 차이가 없었고, 또한 ‘부지화’가 ‘청견’×‘Ponkan’의 교배에서 유래한 것으로부터 교배불친화의 영향으로 판단되었다.

또한 *C. volkameriana* Pascuale의 과실에서 평균 총 종자수 및 충실한 종자수는 각각 35와 29개 이었다(Maria 등, 2004). 반면, 온주밀감에 하귤의 화분을 교배한 경우 과실 당 평균 충실 종자수는 2.8개였다(한과 권, 1996). 본 실험에서도 한과 권(1996)의 경우에서와 유사하게 모든 조합에서 과실 당 평균 종자수는 1.2개였고 충실 종자 수는 0.9개였다. 위와 같이 *C. volkameriana* Pascuale에 비해 ‘궁천조생’, ‘홍진조생’, 그리고 ‘부지화’의 만다린 품종에서 과실 당 종자수가 작은 이유는 화분 및 배주의 불임성과 관련하여 수분 또는 수정이 용이하지 못하기 때문일 것으로 생각되었다.

MT 배지에 과종하여 배양 3개월 후에 조사한 종자 발아율, 종자 당 평균 실생수 등 종자발아 특성을 Table 4에 나타내었다. 평균 종자 발아율은 88.3%였는데, ‘궁천조생’에서 가장 높은 92.5%를 나타낸 반면 ‘부지화’×‘Ponkan’의 경우 63.6%로 가장 낮았다. 그러나 이 경우 불충실한 종자의 과종에 기인하였으며, 충실한 종자는 거의 100% 발아하는 것으로 나타났다. 그러므로 품종과 화분친에 따른 종자 발아율의 차이는 없는 것으로 추정되었다.

평균 종자 당 발아한 실생수는 ‘궁천조생’×‘Ponkan’ 조합에서는 9.36개, ‘궁천조생’×‘Swingle citrumelo’ 조합에서는 10.18개, ‘부지화’×‘Ponkan’ 조합에서는 10.71개, ‘부지화’×‘Swingle citrumelo’ 조합에서는 8.31개, 그리고 4개 조합 평균 종자 당 실생수는 9.46개였다. 그러나 품종간 차이와 화분친에 의한 영향에 대해서는 불명확하였다.

Table 4. Germination characteristics of mandarin seeds obtained from four different crosses.

Cross	Total seeds (No.)	Full seeds (No.)	Seeds sown (No.)	Seeds germinated (No.)	Germination (%)	Total seedlings (No.)	Aver. no. seedlings one germ.	Seed loss (%)
'Miyagawa wase' × 'Ponkan'	179	140	161	149	92.5	1395	9.36	10.1
'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo'	122	95	58	51	87.9	519	10.18	52.5
'Shiranuhi' × 'Ponkan'	14	7	11	7	63.6	75	10.71	21.4
'Shiranuhi' × 'Swingle citrumelo'	48	23	34	26	76.5	216	8.31	29.2
Total	363	265	264	233	88.3	2205	9.46	27.3

김(2005)에 의하면 온주밀감과 'Ponkan'의 평균 배의 수는 각각 20.8개와 30.4개 이었다. 또한 Frost와 Soost(1968)에 의하면 온주밀감의 평균 종자 당 실생수는 1.44개 이었다. 그러므로 이들의 차이가 파종 및 발아 조건에 따라 달라지는 것인지, 아니면 또 다른 원인이 있을 수 있다고 생각된다. Frost와 Soost(1968)는 종자 당 배의 수는 한 나무에서 조차도 매우 다양하고, 그 평균 수는 변종에 따라 크게 다르며, 다배성을 가지고 있는 많은 종 안에서는 일반적으로 일관성이 없다고 하였다. 또한 종자 당 배의 수는 나무의 북쪽 편과 수령이 높아질수록 현저하게 증가하고, 품종에 따라 차이는 있지만 종자 당 배의 수 보다는 종자 당 실생수가 작았다. 종자 당 배수와 종자 당 실생수는 Kishiu mandarin은 각 1.02개와 1.00개, Triumph grapefruit은 각 1.18개와 1.08개, Rangpur lime은 각 1.70개와 1.08개, 오렌지는 각 2.79개와 1.31개, 그리고 Rough lemon은 각 2.90개와 2.00개 등 품종에 따라 다양하였다.

Table 5. Classification of seeds obtained from four different crosses on the basis of the number of seedlings.

cross	Seedling group (Subtotal seeds no.), Percent										S/S ⁽¹⁾
	Seedlings germinated from one seed (No.)										
	Frequency of seeds (No.)										
'Miyagawa wase'	1-5 (44), 29.5%					6-10 (49), 32.9%					9.4
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	2	7	14	9	12	6	6	15	13	9	
×	11-15 (36), 24.2%					16-20 (15), 10.1%			21<		10.7
'Ponkan'	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
	10	12	5	3	6	2	4	3	5	1	5
'Okitsu wase'	1-5 (13), 25.5%					6-10 (22), 43.1%					10.7
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	-	2	1	4	6	-	4	8	5	5	
×	11-15 (8), 15.7%					16-20 (5), 9.9%			21<		10.2
'Swingle citrumelo'	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
	1	2	-	4	1	-	1	2	2	-	3
'Shiranuhi'	1-5 (10), 38.5%					6-10 (10), 38.5%					8.3
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	2	-	3	-	5	2	1	1	3	3	
×	11-15 (2), 7.7%					16-20 (2), 7.7%			21<		8.3
'Swingle citrumelo'	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
	1	-	-	1	-	-	-	2	-	-	2
'Shiranuhi'	1-5 (2), 28.6%					6-10 (2), 28.6%					8.3
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1	
×	11-15 (2), 28.6%					16-20 (-)			21<		8.3
'Ponkan'	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1

⁽¹⁾S/S: average number of seedlings per seed.

발아 실패수에 따른 종자의 빈도를 Table 5에 나타내었다. ‘궁천조생’에서 종자 당 실패 수는 1~26개, ‘홍진조생’에서는 2~35개, 그리고 ‘부지화’에서는 1~26개로 다양하였다. 그런데 Maria 등(2004)에 의하면 *C. volkameriana* Pasquale의 경우 종자 당 배 수는 1~6개 이었고, 평균 배의 수는 1.5개 이었다. Frost와 Soost(1968)에 의하면 종에 따라 다르지만 가장 많은 배의 수를 나타내는 종은 *C. mitis*로 종자 당 배의 수가 8.96개이었으며, 발아 실패 수는 1.62개이었다. 그러므로 지금까지의 연구보고와 비교할 때 매우 높은 수치를 나타내고 있어, 이것이 배양 중에 체세포 배가 분화하여 발아하는 것인지, 또는 다른 원인이 존재하는 것인지는 불명확하였다.

한편 오염 등으로 인한 평균 종자 손실률은 27.3%이었으며, ‘홍진조생’에서 52.5%를 나타내어 관리상의 문제점이 발생할 수 있음을 알 수 있었다. 그런데 Bastianel 등(1998)의 보고한 약 25 %의 종자 손실률과는 거의 차이가 없었다.



2. RAPD 분석에 의한 교잡실생의 동정

‘궁천조생’×‘Ponkan’의 실생으로부터 교잡 실생을 동정하기 위해 OPA-08과 OPJ-08 2개의 random primer가 선발되었다. 선발한 OPA-08과 OPJ-08, 2개의 random primer를 이용하여 ‘궁천조생’×‘Ponkan’ 교배조합의 실생에 대한 RAPD 분석결과 다형성 단편의 크기는 800에서 6,000 bp까지 다양하게 나타났다(Fig. 1, 2, 3, 및 4).

OPA-08 primer의 경우에 ‘Ponkan’에 특이적인 OPA-08₂₅₀₀, OPA-08₂₀₀₀, 및 OPA-08₁₂₅₀ 3개의 marker가 증폭되었는데, 각각의 marker에 대하여 교잡 실생을 포함할 가능성이 있는 14개, 6개, 및 12개 총 19개 혼합 실생 DNA를 확인하였다(Fig. 1). 확인한 19개 혼합 실생에 대해 다시 개체별 DNA를 추출하고 동일 primer로 RAPD 분석을 수행하여 OPA-08₂₅₀₀, OPA-08₂₀₀₀, 및 OPA-08₁₂₅₀ marker에 의해 16개, 8개, 및 11개 총 15개의 교잡 실생을 동정하였다(Fig. 2). 그런데 혼합 실생 일 DNA의 RAPD 확인 결과로부터 개체별 DNA의 RAPD 분석에서 교잡 실생을 동정할 수 없었던 Fig. 1의 lane 27, 39, 43 및 108, 4개 DNA의 경우에는 OPA-08₂₅₀₀, OPA-08₂₀₀₀, 및 OPA-08₁₂₅₀ marker가 불분명하게 증폭된 것임에도 불구하고 개체별 DNA 분석을 수행한 결과이다.

OPJ-08 primer의 경우에 ‘Ponkan’에 특이적인 OPJ-08₆₀₀₀ marker를 발생시켰고, 이로부터 교잡 실생을 포함할 가능성이 있는 10개 혼합 실생 DNA를 확인하였다(Fig. 3). 이들 혼합 실생을 구성하는 개체에 대해 다시 각각의 DNA를 추출하고 동일 primer로 RAPD 분석을 수행한 결과 9개의 교잡 실생을 동정할 수 있었다(Fig. 4).

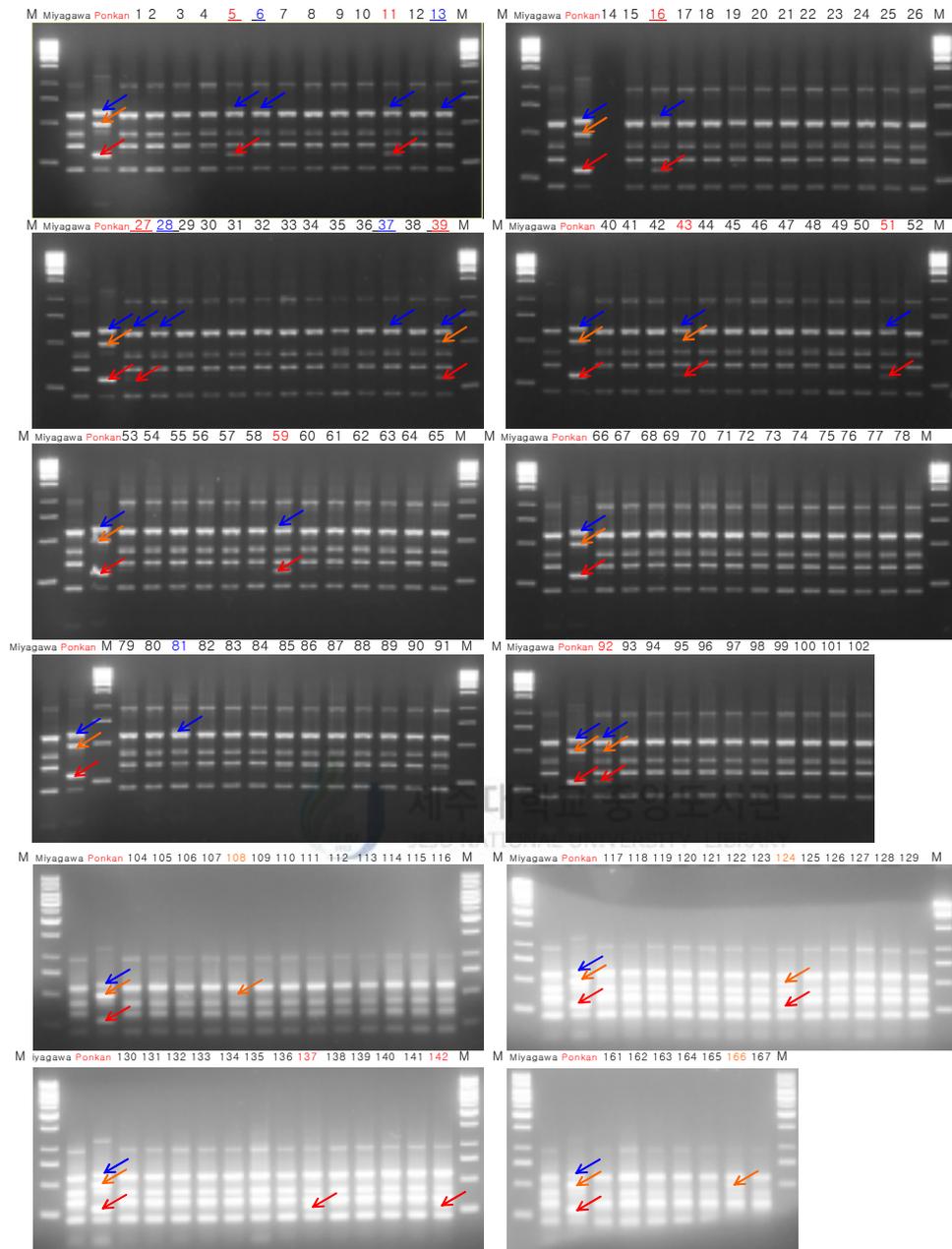


Fig. 1. DNA amplification of both of each parent and mixed seedlings of 'Miyagawa wase' × 'Ponkan' using OPA-08. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

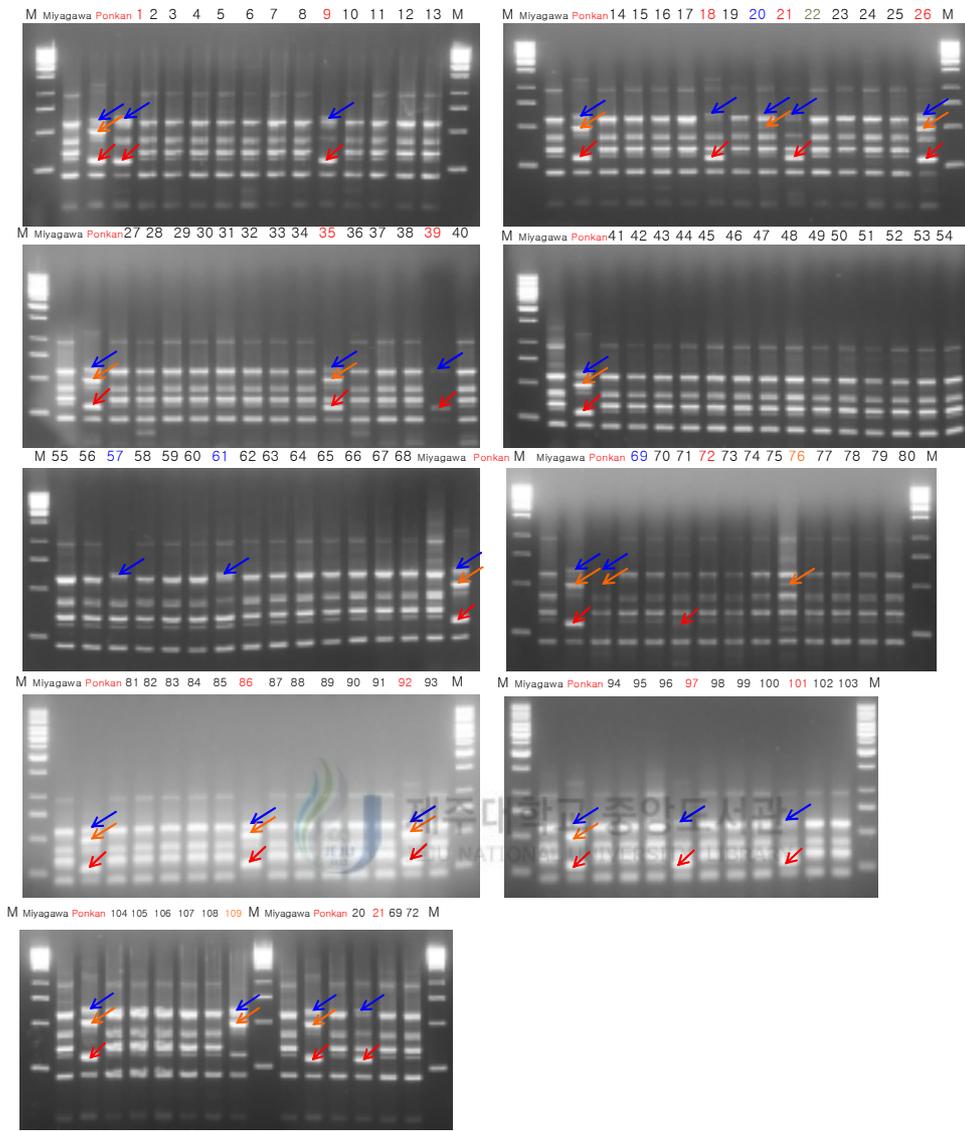


Fig. 2. DNA amplification of individual seedlings of 'Miyagawa wase' × 'Ponkan' using OPA-08. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

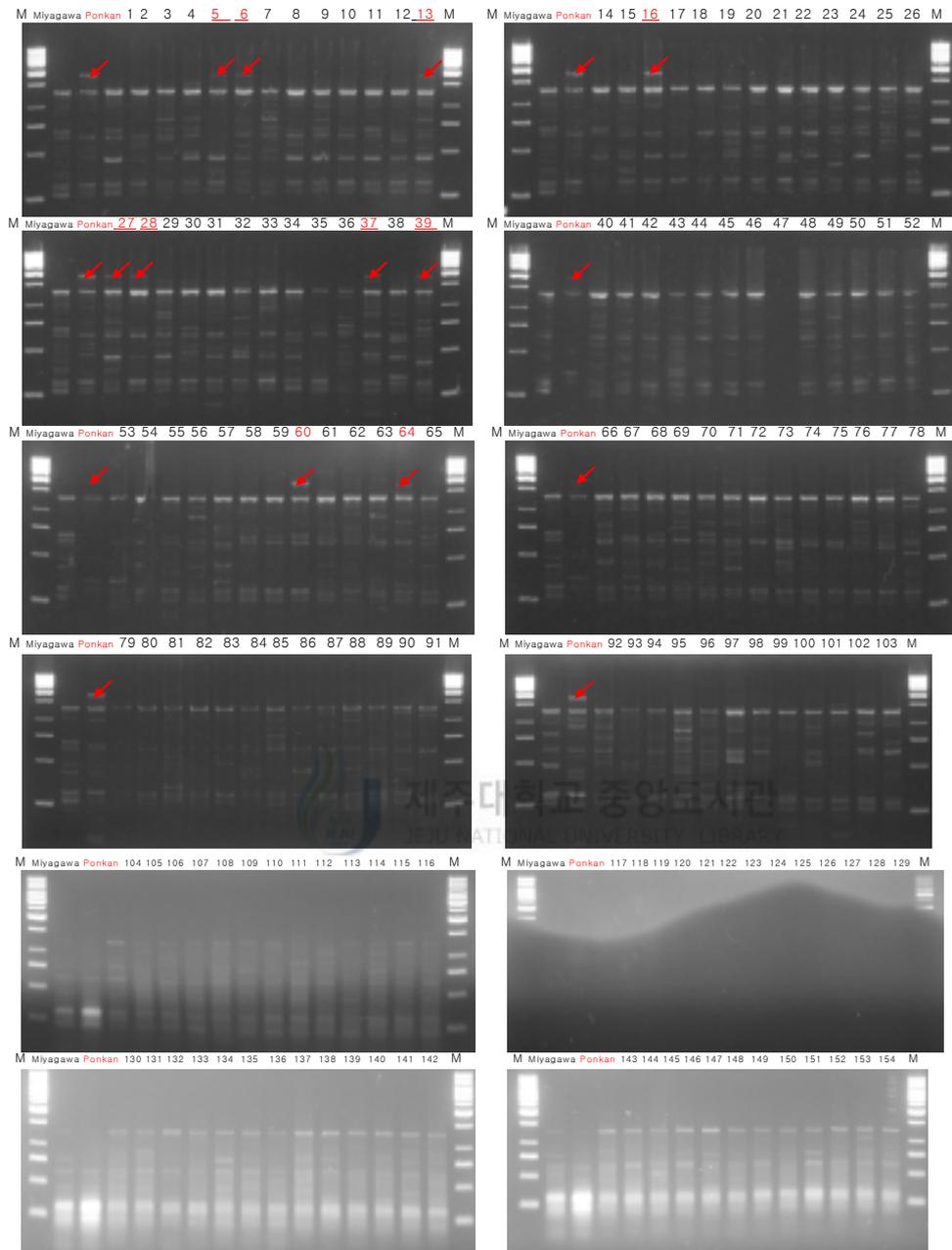


Fig. 3. DNA amplification of both of each parent and mixed seedlings of 'Miyagawa wase' × 'Ponkan' using OPJ-08. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

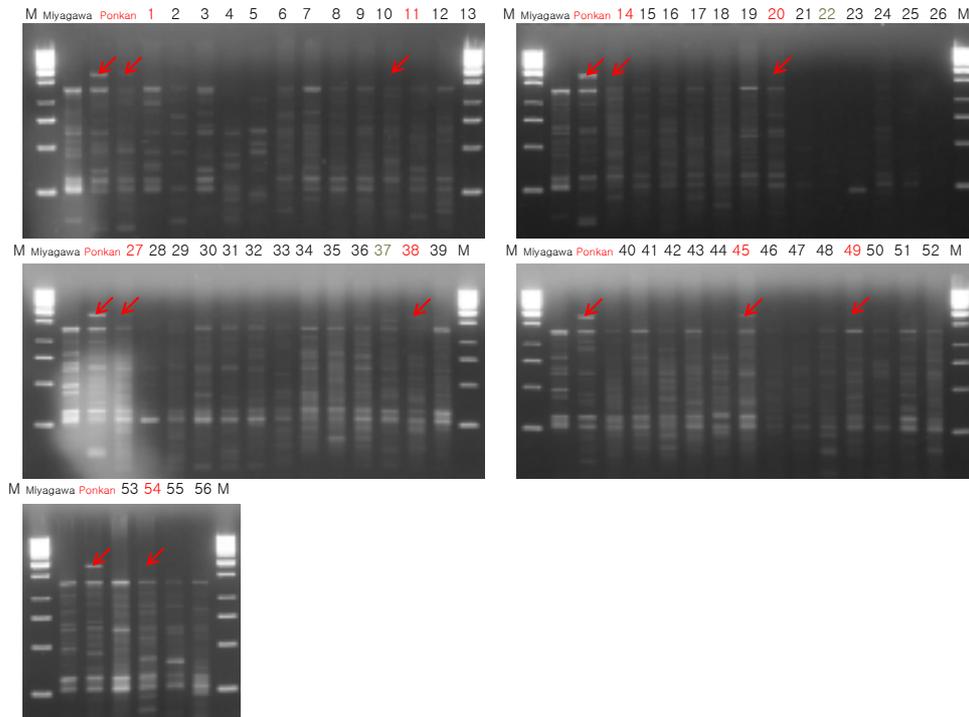


Fig. 4. DNA amplification of individual seedlings of 'Miyagawa wase' × 'Ponkan' using OPJ-08. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

'궁천조생'×'Ponkan'의 실생에서 OPA-08 및 OPJ-08의 2개 random primer로 RAPD 분석결과 교잡 실생으로 확인한 각각의 15개체와 9개체 중 4개체가 중복으로 동정되어 총 20개의 교잡 실생을 동정할 수 있었다(Fig. 2, 4). 한 종자에서 나온 여러 실생 중 동정된 교잡 실생이 식물체 크기별 분포에서 차지하는 위치를 Table 6에 나타내었다. 확인한 20개의 교잡 실생 중 9개체가 평균 종자 당 실생수 9.36개에서 가장 먼저 발아하여 가장 크게 자란 식물체에 해당하여 45%를 차지하였다(Fig. 5). 크기가 3번째 이상으로 큰 실생수는 교잡 실생 중 70%인 14개였다.

Table 6. Frequency and distribution of zygotic seedlings in 'Miyagawa wase'.

Seeds germinated (No.)	Primer	Zygotic seedlings (No.)	Zygotic seedlings (%)	Size order of seedlings germinated from one seed					
				1	2	3	4	5	6-12
149	OPA-08	15		7	1	3	1	1	2
	OPJ-08	9		5	-	2	1	-	1
	Total (No.)	20	(13.4)	9	1	4	2	1	3
	(%)	(100)		(45)	(5)	(20)	(10)	(5)	(15)

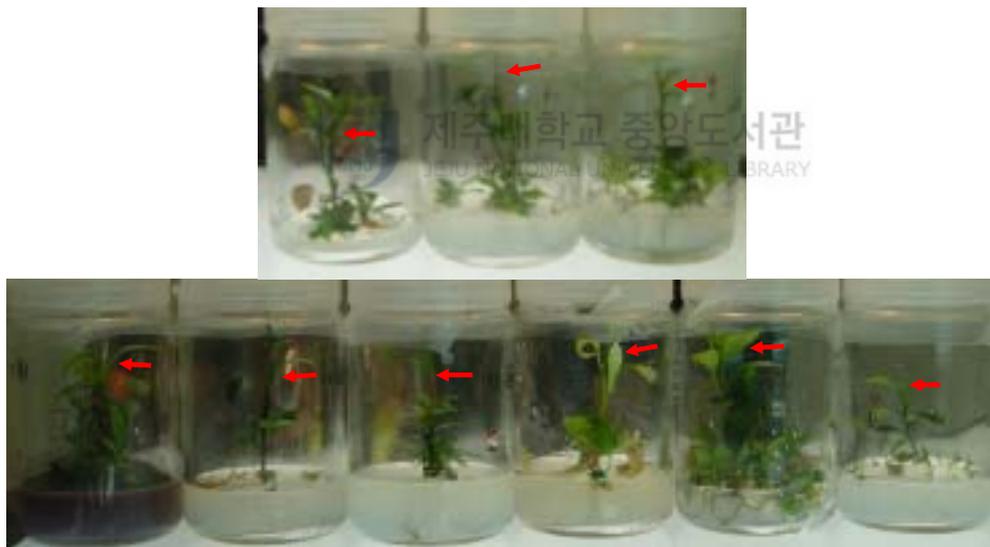


Fig. 5. Growth comparison of greatest zygotic seedlings identified by RAPD with nucellar seedlings germinated from one seed of 'Miyagawa wase' × 'Ponkan'.

선발한 UBC439, OPK14, 및 OPA-08, 3개의 random primer를 이용하여 ‘홍진조생’×‘Swingle citrumelo’ 교배조합의 실생에 대한 RAPD 분석결과 다형성 단편의 크기는 500에서 8,000 bp까지 다양하게 나타났다(Fig. 6, 7, 8, 9, 10 및 11). UBC439 primer에 대해서는 ‘Swingle citrumelo’에 특이적인 UBC439₂₅₀₀ marker 1개가 동정되었다(Fig. 6). UBC439₂₅₀₀ marker에 의해 교잡 실생을 포함할 가능성이 있는 혼합 실생 DNA로부터 4개를 확인하였다(Fig. 6). 그리고 4개 혼합 실생에 대해 다시 각각의 개체로부터 DNA를 추출하여 동일 primer로 RAPD 분석한 결과 UBC439₂₅₀₀ marker에 의해 1개의 교잡 실생이 동정되었다(Fig. 7). 혼합 실생의 DNA 4개(Fig. 6의 lane 10, 29, 35 및 39) 중 1개(Fig. 6의 lane 10)를 제외하고 교잡 실생을 동정할 수 없었던 것은 UBC439₂₅₀₀ marker의 존재가 불분명한 것까지 포함하여 개체별 DNA의 RAPD 분석을 수행한 결과로 보아졌다(Fig. 6).

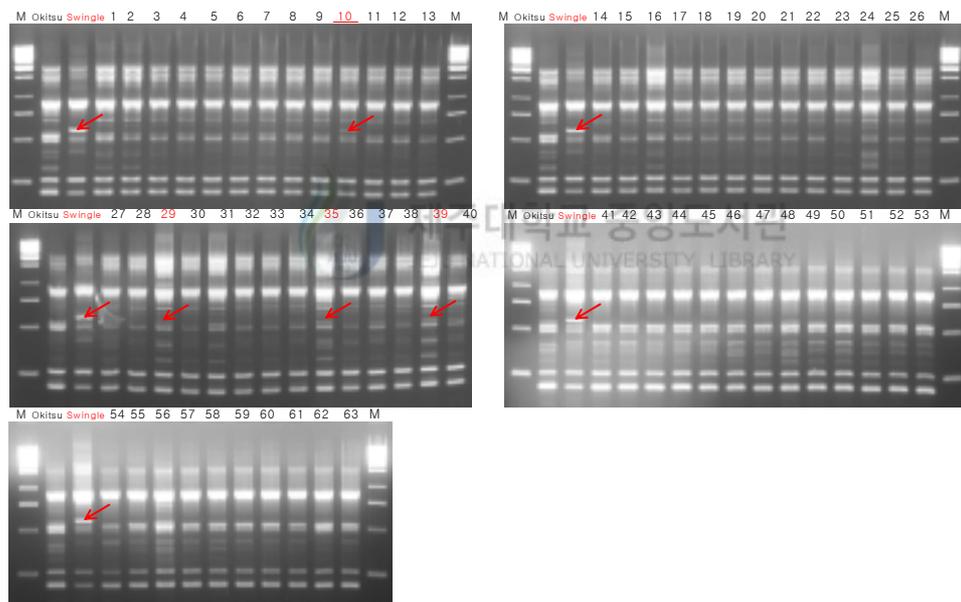


Fig. 6. DNA amplification of both of each parent and mixed seedlings of ‘Okitsu wase’ × ‘Swingle citrumelo’ using UBC439. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

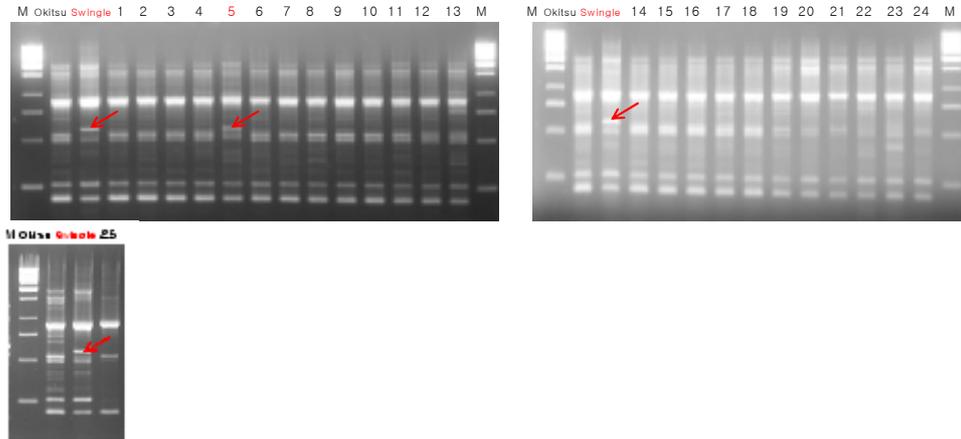


Fig. 7. DNA amplification of individual seedlings of 'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo' using UBC439. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).



OPK14 primer의 경우에 'Swingle citrumelo'에 특이적인 OPK14₁₇₅₀ 및 OPK14₁₈₀₀ 2개의 marker가 동정되었다. 각각의 marker에 대하여 교잡 실생을 포함할 가능성이 있는 각각 1개와 6개, 총 7개의 혼합 실생 DNA를 확인하였다 (Fig. 8). 확인한 7개 혼합 실생에 대해 다시 개체별로 DNA를 추출하고 동일 primer로 RAPD 분석을 수행한 결과 OPK14₁₇₅₀, OPK14₁₇₅₀ marker로 각각 1개와 4개, 이 중 1개체가 중복되어 총 4개의 교잡 실생을 찾았다(Fig. 9). 혼합 실생의 DNA 7개 중 3개가 제외되고 4개에서만 교잡 실생을 동정할 수 있게 된 것은 OPK14₁₈₀₀ marker의 존재가 불분명한 것까지 포함하여 개체별 DNA의 RAPD 분석을 수행한 결과로 보아졌다(Fig. 9).

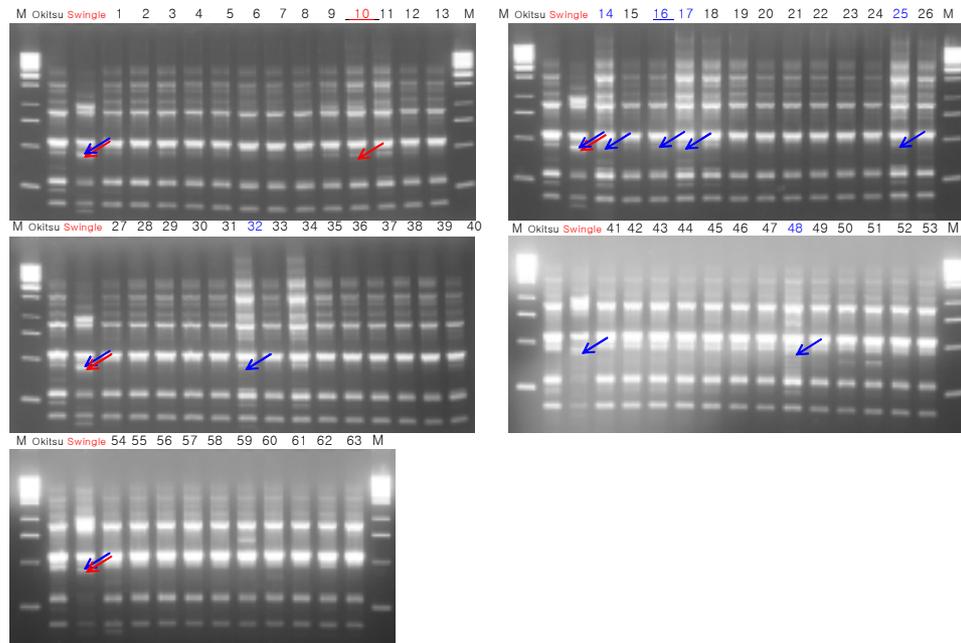


Fig. 8. DNA amplification of both of each parent and mixed seedlings of 'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo' using OPK14. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

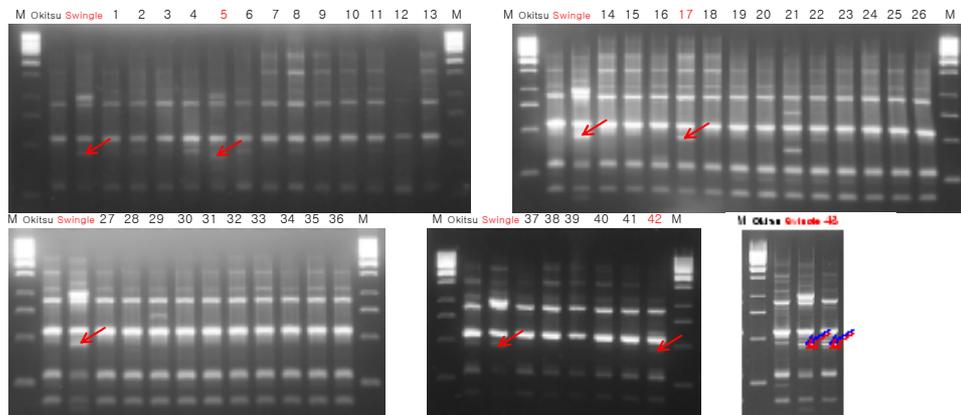
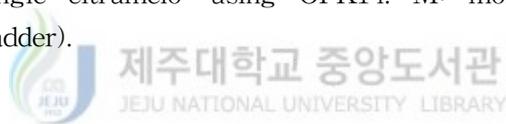


Fig. 9. DNA amplification of individual seedlings of 'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo' using OPK14. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

OPA-08 primer의 경우에 ‘Swingle citrumelo’에 특이적인 OPA-08₅₀₀₀, OPA-08₃₀₀₀ 및 OPA-08₁₀₀₀ 3개의 marker가 동정되었다. 각각의 marker에 대하여 교잡 실생을 포함할 가능성이 있는 혼합 실생 DNA 각각 6개, 2개 및 1개, 총 6개를 확인하였다(Fig. 10). 확인한 6개 혼합 실생에 대해 다시 개체별로 DNA를 추출하고 동일 primer로 RAPD 분석을 수행한 결과 OPA-08₅₀₀₀, OPA-08₃₀₀₀ 및 OPA-08₁₀₀₀ marker로 각각 1개, 3개 및 2개, 총 3개의 교잡 실생을 찾았다(Fig. 11). 혼합 실생의 DNA 6개 중 3개가 제외되고 3개에서만 교잡 실생을 동정할 수 있게 된 것은 OPA-08₅₀₀₀ marker의 존재가 불분명한 것까지 포함하여 개체별 DNA RAPD 분석을 수행한 결과로 보아졌다(Fig. 10).

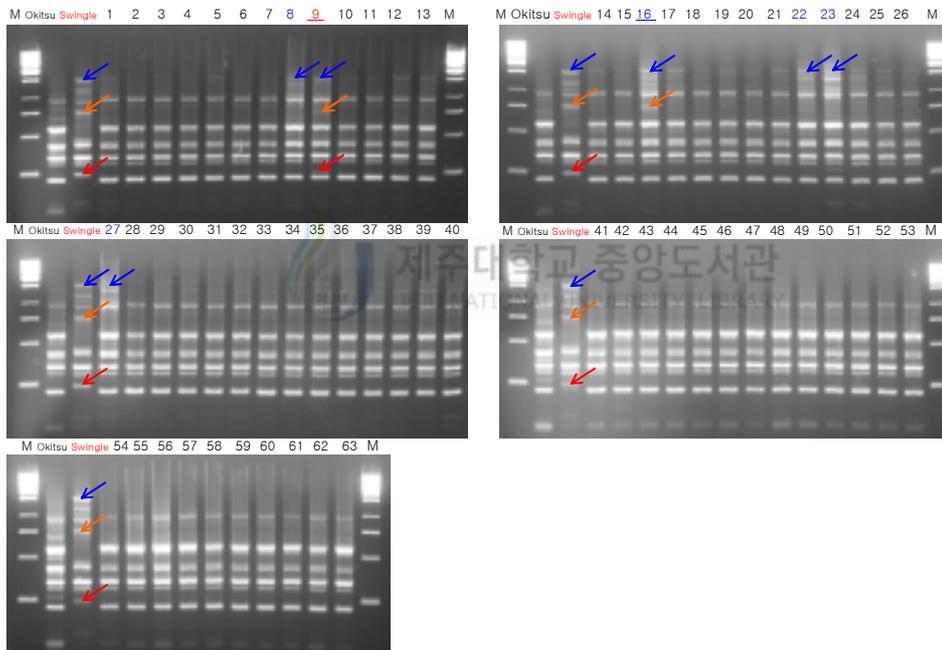


Fig. 10. DNA amplification of both of each parent and mixed seedlings of ‘Okitsu wase’ × ‘Swingle citrumelo’ using OPA-08. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

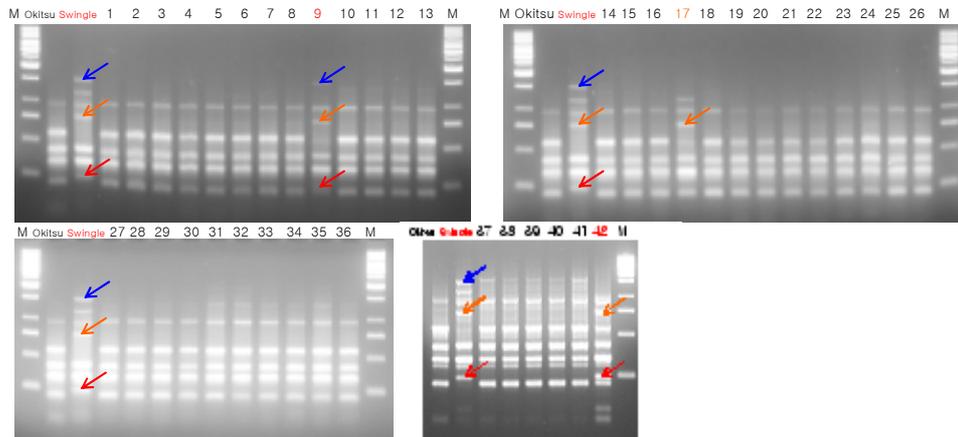


Figure. 11. DNA amplification of individual seedlings of 'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo' using OPA-08. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

'홍진조생'×'Swingle citrumelo'의 실생에서 'Swingle citrumelo'에 특이적인 marker를 발생시키는 UBC439, OPK14 및 OPA-08, 3개의 random primer로 RAPD 분석을 수행한 결과 교잡 실생으로 확인한 각각의 1개체, 4개체 및 3개체, 총 5개체(3개체 중복 확인)의 교잡 실생을 동정할 수 있었다(Fig. 7, 9 및 11). 한 종자에서 나온 여러 실생 중 동정된 교잡 실생이 식물체 크기별 분포에서 차지하는 위치를 Table 7에 나타내었다. 확인한 5개의 교잡 실생 모두 평균 종자 당 실생수 10.18개에서 5번째 이내에 분포하였다. 교잡 실생의 45%가 종자 내 발아 실생 중 가장 크게 자란 것에 해당하는 '궁천조생'에서와는 달리 '홍진조생'에서는 1~2번째 큰 실생에서는 교잡 실생이 동정되지 않았고 크기가 3번째인 위치에 교잡 실생의 60%인 3개가 분포하였다. 주심배 실생이 수세가 왕성하고 초기에 발아하여 일반적으로 크게 자란다고 알려진 것(Frost와 Soost, 1968)과는 달리, Maria 등(2004)은 교잡 실생이 잡종일 때 생육이 왕성하다고 보고하였는데, 본 연구에서는 '궁천조생'과 '홍진조생' 간의 차이가 화분친의 영향인지, 아니면 연차에 따른 환경 등의 영향에 기인한 것인지는 불분명하였다.

Table 7. Frequency and distribution of zygotic seedlings in 'Okitsu wasé'.

Seeds germinated (No.)	Primer	Zygotic seedlings (No.)	Zygotic seedlings (%)	Size order of seedlings germinated from one seed					
				1	2	3	4	5	6-12
	UBC439	1		-	-	1	-	-	-
	OPK14	4		-	-	2	1	1	-
58	OPA-08	3		-	-	2	1	-	-
	Total (No.)	5	(8.6)	-	-	3	1	1	-
	(%)	(100)		(0)	(0)	(60)	(20)	(20)	(0)



Fig. 12는 3종류 primer (UBC439, OPK14, OPA-08)와 잎의 특성을 가지고 동시에 교잡 실생으로 확인된 5개체의 교잡 실생 사진을 나타낸 것이다. '홍진 조생'×'Swingle citrumelo'의 교배 실생 중 18-3, 29-5 및 41-4, 3개의 교잡 실생만이 화분친인 'Swingle citrumelo'의 특성인 3엽 특성을 나타내었다. 반면 교배 실생 14-3과 35-5는 2엽을 가지고 있었다. 그런데 OPK14 primer로는 3엽을 가지고 있는 3개체 중 1개체인 18-3 교잡 실생을 동정할 수 없었다. 반면 OPA-08 primer로는 3엽 특성을 가지고 있는 교잡 실생 18-3, 29-5 및 41-4, 3개체 모두를 동정할 수 있었다. 또한 OPK14 primer로 2엽을 가진 교잡 실생 모두를 동정할 수 있었다.

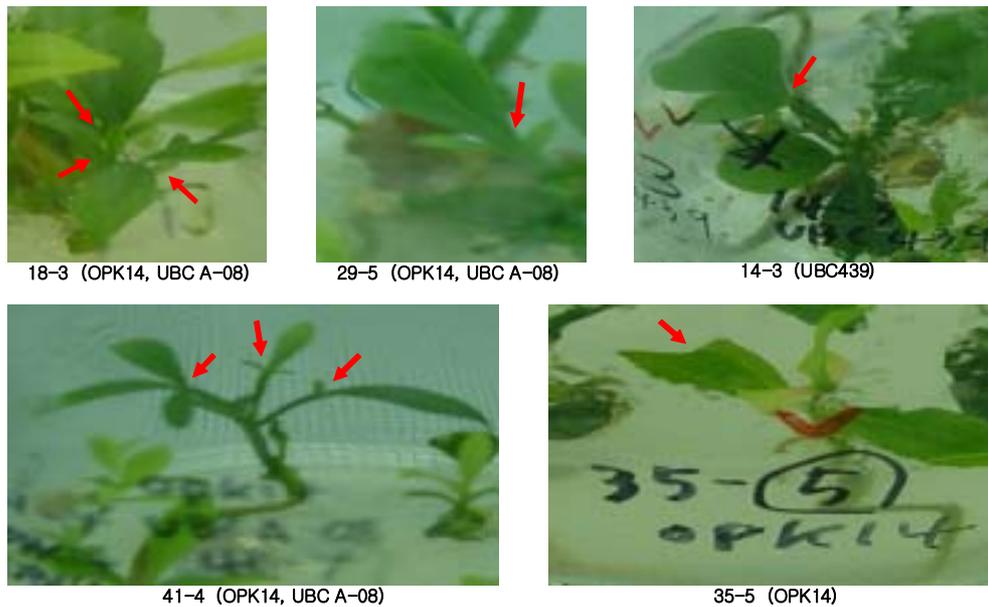


Fig. 12. Zygotic seedlings identified by both of RAPD and tri- or bi-foliate leaves in progeny of 'Okitsu wase' × 'Swingle citrumelo'.

본 실험에서 '궁천조생'의 경우 화분친 특이 DNA marker 생성 primer를 2개(OPA-08 및 OPJ-08) 선발하여 RAPD 분석을 수행한 결과 동정한 교잡 실생의 비율은 13.42%이었다. 반면 '홍진조생'의 경우 화분친 특이 DNA marker 생성 primer를 3개(UBC439, OPK14 및 OPA-08) 선발하여 RAPD 분석을 수행한 결과 동정한 교잡 실생의 비율은 9.8%이었다. 이는 온주밀감에서 교잡 실생 비율이 14% 내외라는 Frost와 Soost(1968)의 보고와 유사하였다. 본 실험에서 Frost와 Soost(1968)의 보고보다 다소 낮게 나타난 것은 primer의 선발이 불충분하여 RAPD 분석에 이용한 primer 수가 2~3개로 한정되어 발생하는 문제일 수도 있을 것이나 '홍진조생'의 경우, 화분친 특이 primer를 3개 사용했음에도 불구하고 '궁천조생'보다도 교잡 실생 발생율이 낮게 나타난 것으로 보아, 환경 등의 영향에 의한 변이로 추정되었다.

'부지화'×'Ponkan'의 교배 실생으로부터 교잡 실생을 동정하기 위해 2개의 OPY14 및 OPA-08의 random primer가 선발되었다. 이들 선발 primer를 이용하여 수행한 RAPD 분석 결과를 Fig. 13 및 14에 나타내었다. 이들 primer에 의

해 증폭된 단편의 크기는 200~6,000 bp로 다양하였으며, 7~8개의 단편이 생성되었다. 이는 감귤 72개의 품종에 대한 OPY14 primer의 RAPD 분석에서 모두 8개의 뚜렷한 단편이 생성되었다는 윤(2002)의 보고와 유사하였다. ‘부지화’ × ‘Ponkan’의 실생에서 ‘Ponkan’에 특이적인 단편은 각각 1개씩 동정되었으나 (OPY14₅₀₀₀ 및 OPA-08₁₂₀₀), 이를 marker로 한 교잡 실생의 동정에서는 발견하지 못했다.

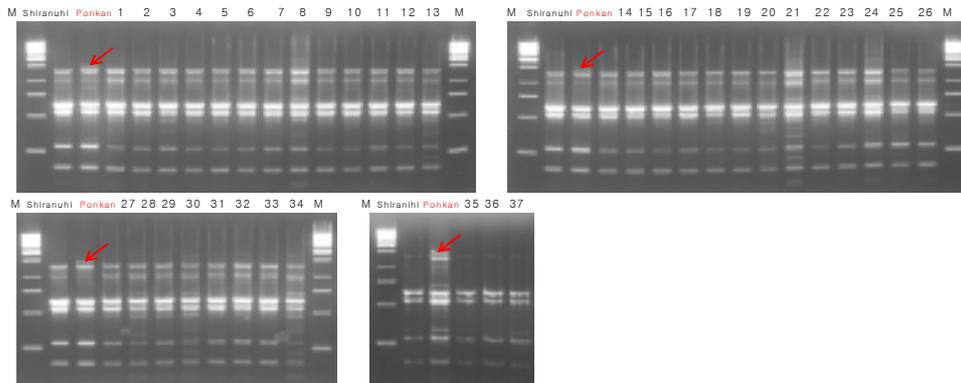


Fig. 13. DNA amplification of individual seedlings of ‘Shiranuhi’ × ‘Ponkan’ using OPY14. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

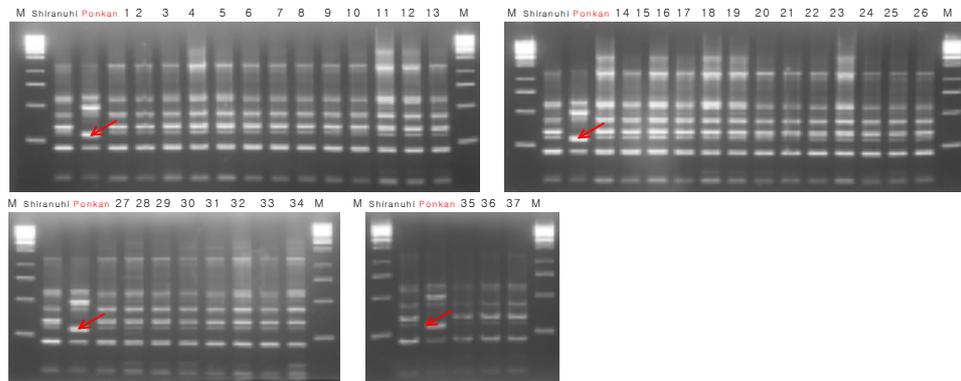


Fig. 14. DNA amplification of individual seedlings of ‘Shiranuhi’ × ‘Ponkan’ using OPA-08. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

‘부지화’×‘Swingle citrumelo’ 교배 실생으로부터 교잡 실생을 동정하기 위해 2개의 OPK14 및 OPA-08의 random primer를 선발하였다. 이들 선발 primer를 이용하여 수행한 RAPD 분석 결과를 Fig. 15 및 16에 나타내었다. 이들 primer에 의해 증폭된 단편의 크기는 200~7,000 bp로 다양하였으며, 8~9개의 단편이 생성되었다. OPK14 primer의 경우에 ‘부지화’×‘Swingle citrumelo’에 특이적인 OPK14₁₈₀₀ marker가 증폭되었는데, OPK14₁₈₀₀ marker에 대한 교잡 실생을 포함할 가능성이 있는 혼합 실생 DNA 2개를 확인하였다(Fig. 15). 확인된 2개 혼합 실생에 대해 다시 개체별 DNA를 추출하고 동일 primer로 RAPD 분석을 수행한 결과 OPK14₁₈₀₀ marker에 의해 1개의 교잡 실생을 동정하였다(Fig. 16). 그런데 혼합 실생 앞 DNA의 RAPD 확인 결과로부터 개체별 DNA의 RAPD 분석에서 교잡 실생을 동정할 수 없었던 것은 불명확하게 보이는 것을 포함한 결과로 생각된다. OPA-08 primer의 경우에 특이적인 marker OPA-08₁₀₀₀이 탐색되었으나 이를 marker로 한 교잡 실생은 동정되지 않았다(Fig. 17).

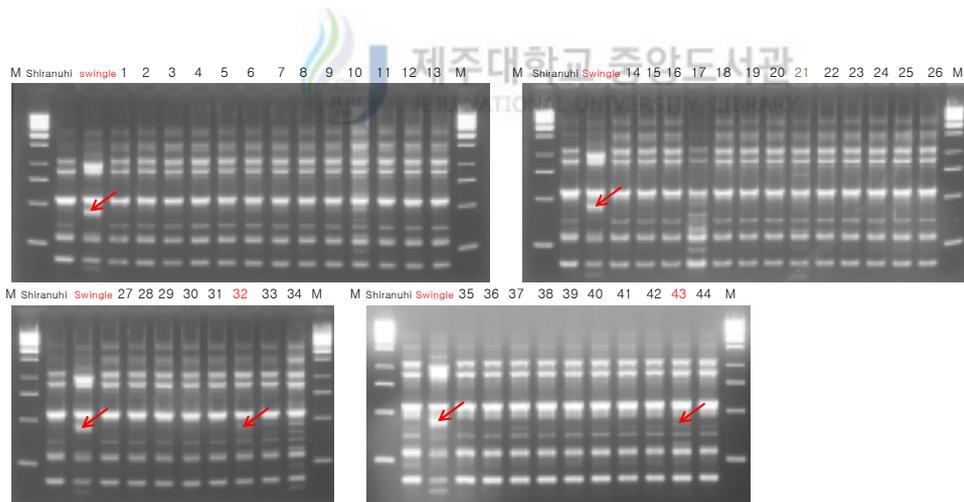


Fig. 15. DNA amplification of both of each parent and mixed seedlings of ‘Shiranuhi’ × ‘Swingle citrumelo’ using OPK14. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

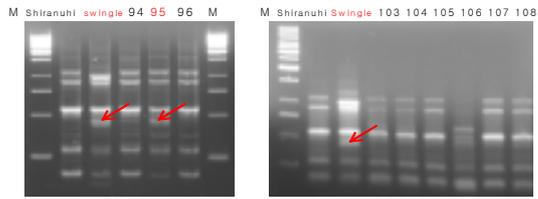


Fig. 16. DNA amplification of individual seedlings of 'Shiranuhi' × 'Swingle citrumelo' using OPK14. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

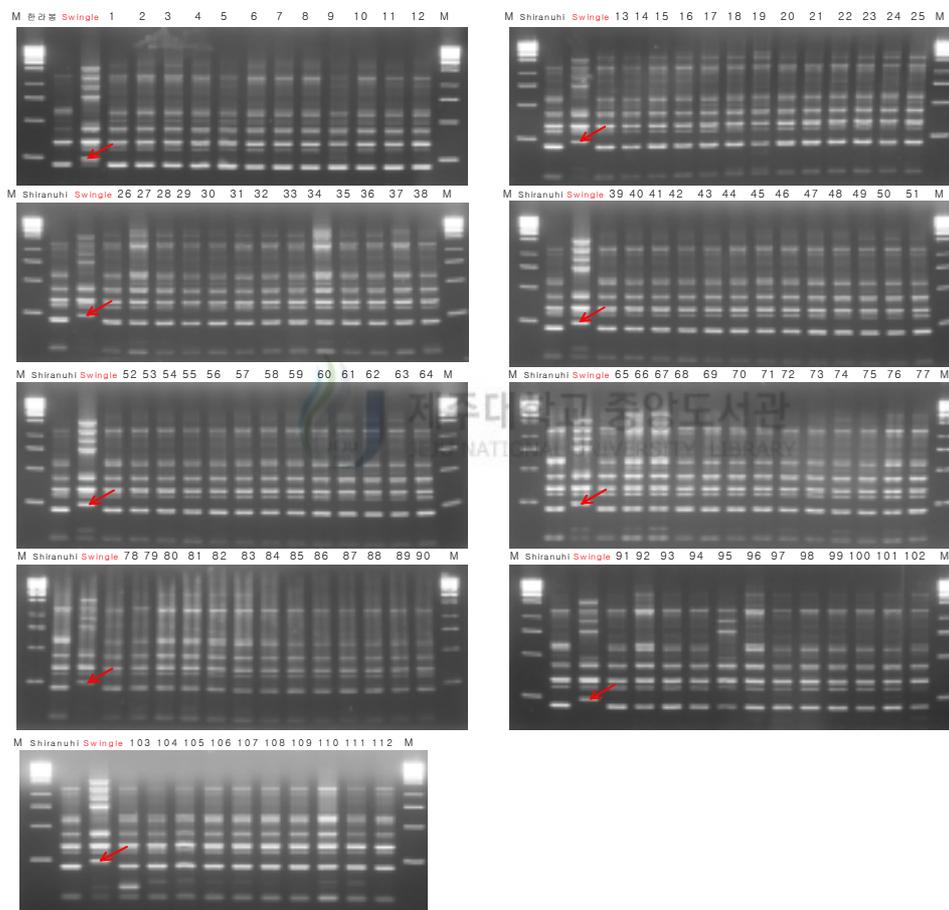


Fig. 17. DNA amplification of individual seedlings of 'Shiranuhi' × 'Swingle citrumelo' using OPA-08. M: molecular weight markers (1 kb DNA Ladder).

‘부지화’×‘Ponkan’과 ‘부지화’×‘Swingle citrumelo’의 교배 실생에 대한 RAPD 분석결과 OPK14₁₈₀₀ marker에 의해 1개의 교잡 실생만이 동정되었다. 이 확인된 1개의 교잡 실생이 한 종자 내의 여러 교배실생 중 크기 순서가 어떻게 되는지를 Table 9에 나타내었다. 동정된 교잡 실생은 평균 종자당 실생수인 8.31개에서 크기가 5번째에도 들지 못할 정도로 작았고 화분친인 ‘Swingle citrumelo’의 특성인 3엽 특성을 가지고 있지도 않았다.

Table 8. Distribution of zygotic seedling from ‘Shiranuhi’×‘Swingle citrumelo’.

Seeds germinated (No.)	Primer	Zygotic seedlings (No.)	Zygotic seedlings (%)	Size order of zygotic seedlings in one seed					
				1	2	3	4	5	6-12
26	OPK14	1	(3.85)	-	-	-	-	-	1

본 실험에서 ‘부지화’×‘Ponkan’ 및 ‘부지화’×‘Swingle citrumelo’의 실생집단에서는 화분친 특이적인 DNA marker를 생성하는 OPY14, OPA-08, OPK14의 3개 primer를 선발하여 RAPD 분석결과 1개의 교잡 실생 만을 동정할 수 있었다. 종자 당 교잡 실생의 비율은 각 0% 및 3.85%로 나타났다. 그러므로 획득 교배 종자수는 적은 편이었다. 따라서 ‘부지화’의 경우는 교잡 실생 발생율이 낮은 유전적 특성을 가지고 있는 것으로 생각되었다.

IV. 적요

본 연구에서는 국내 감귤 주요 품종인 ‘궁천조생’, ‘홍진조생’, ‘부지화’에서 교잡육종의 효율을 평가하는 기초 자료를 확보코자 품종의 과실당 교배종자 형성 정도와 발아 특성, 그리고 RAPD 분석에 의한 교잡 실생의 비율 및 분포와 화분친의 영향을 분석하였다.

과실 당 평균 교배종자 수는 온주밀감의 경우 1.1~1.2개 이었으나, ‘부지화’의 경우는 화분친의 영향에 따라 0.9~2.5개로 변이가 컸다. 평균 종자 발아율은 88.3%였으며, 발아종자 당 평균 실생 수는 9.46개 이었다.

화분친 특이 증폭 DNA marker를 생성하는 random primer 5개(UBC439, OPK14, OPY14, OPA-08 및 OPJ-08)를 선발하였다. ‘궁천조생’×‘Ponkan’의 경우에는 OPA-08 및 OPJ-08을, ‘홍진조생’×‘Swingle citrumelo’의 경우에는 UBC439, OPK14 및 OPA-08을, ‘부지화’×‘Ponkan’의 경우에는 OPY14 및 OPA-08을, 그리고 ‘부지화’×‘Swingle citrumelo’의 경우에는 OPK14 및 OPA-08을 이용하여 RAPD 분석을 수행하였다. 종자 당 교잡 실생 비율은 ‘궁천조생’에서 13.42%, ‘홍진조생’에서 9.8%, 그리고 ‘부지화’에서는 0~3.85% 내외로 나타났다.

교잡 실생의 종자 내 분포는 ‘궁천조생’의 경우 45%가 1번 식물체에, ‘홍진조생’의 경우 60%가 3번 식물체에 위치하였으나, ‘부지화’의 경우는 교잡 실생의 수가 적어 명확치 않았다. 화분친에 의한 교잡 실생의 빈도와 분포에 미치는 영향은 밝혀지지 않았다.

V. 참 고 문 헌

- Bastianel, M., S.F. Schwarz, H.D. Coleta Filho, L.L. Lin, M.M., and O. C. Koller. 1998. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. Genet. Mol. Biol. vol. 21, n. 1.
- Davies, F.S. and L.G. Albrigo. 1994. Citrus. pp. 12-107. Cab International.
- FAO. 2003. Citrus production. Rome, Italy.
- Frost, H.B. and R.K. Soost. 1968. Seed reproduction : development of gametes and embryos. pp. 290-324. In : The Citrus industry vol. II. (Revised ed.). W. Reuther, L.D. Batchelor, and H.J. Webber (eds.) Univ. Calif. Div. Agri. Sci. Berkley, Calif.
- Guerra, M.S. 1984. Cytogenetics of Rutaceae. II. Nuclear DNA content. Caryologia 37: 219-226.
- 한해룡 그리고 권오균. 1996. 감귤원예신서. pp. 3~234. 선진문화사. 서울.
- 김광식. 2005. 제주 감귤의 육종 현황과 방향. pp. 54-68. In: 감귤 신제품 육종방향과 감귤산업 전망. 제주대학교 아열대농업생명과학연구소.
- 김경필, 백재홍, 이원진, 그리고 박미성. 2005. 과일부문 수급 동향과 전망 pp. 577-652. In : 농업전망 2005. 오세익 외 56명. 한국경제농촌연구원.

- Luro, F., F. Laigret, J.-M. Bové, and P. Ollitrault. 1995. DNA Amplified Finger printing, A Useful Tool for Determination of Genetic Origin and Diversity Analysis in Citrus. Hort Science 30: 1063-1067.
- Maria, A.-R., Angel V.-M., Guillermo C.-C., and Armando G.-V. 2004. Polyembryony and identification of Volkamerian lemon zygotic and nucellar seedlings using RAPD. Pesq. agropec. bras., Brasilia, v.39, n.6, pp.551-559.
- 문두길 그리고 고광출. 1991. 제주 재래 감귤의 동위효소 분석과 교배실생의 조기식별 방법에 관한 연구. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 32: 59-65.
- 오홍식. 2005. 제주감귤산업의 발전전략. pp. 9-26. In : 감귤원예(1, 2월). 제주감귤농협협동조합.
- Oliveira, A.C., V.M. Novelli, A.N. Garcia, M. Cristofani, and M.A. Machado. 2000. Identification of Sexual and Nucellar citrus seedlings through Single and Duplex PCR of Simple Sequence Repeat Loci. Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congr. 138-141.
- Roose, M.L. and S.N. Traugh. 1988. Identification and performance of Citrus Trees on Nucellar and Zygotic Rootstocks. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113: 100-105.
- Reuther, L.D., Batchelor & H.D. Weeber (Eds). 1968. The Citrus Industry. vol. 2. University of California. USA.

- Soost, R.K. and T.E. Williams. 1980. Identification of Nucellar and Zygotic Seedlings of *Citrus* with leaf Isozymes. HortScience 15: 728-729.
- Spiegel-Roy, P. and E.E. Goldschmidt. 1996. Genetic improvement in *Citrus*. pp. 185-220. In : Biology of Citrus. Cambridge.
- Tatum, J.H., C.J. Hearn, and R.E. Berry. 1978. Characterization of *Citrus* Cultivars by Chemical Differentiation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103: 492-496.
- Tusa, N., L. Abbate, S. Ferrante, S. Lucretti, and M.-T. Scarano. 2002. Identification of zygotic and nucellar seedlings in *citrus* interploid crosses by means of isozymes, flow cytometry and ISSR-PCR. Cellular & Molecular Biology Letters. Volume 7, pp. 703-708.
- Weinbaum, S.A., E. Cohen, and P. Spiegel-Roy. 1982. Rapid Screening of 'Satsuma' Mandarin Progeny to Distinguish Nucellar and Zygotic seedlings. HortScience 17: 239-240.
- 윤수현. 2001. RAPD를 이용한 감귤 및 근연속의 분류. 제주대학교 석사 학위논문.

VI. 감사의 글

대학원에 진학하기 전에는 만만하게 보였던 대학원생활을 하나하나 경험해 나갈수록 실험과 공부가 쉬운 일은 아님을 알게 되었습니다. 이러한 조그마한 경험을 하며 이 과정을 지나간 사람들이 존경스러웠고 석사학위 뿐 아니라 박사학위를 받고 교수로 재직 중이신 교수님들이 너무나 존경스러웠습니다. 실험을 하며 뜻대로 되지 않아 포기하고 싶을 때 “두려워 말고 믿기만 하라” 말씀하시며 끝까지 도전케 도우신 하나님께 감사합니다. 그리고 무엇보다 저를 믿어 주시고 물심양면으로 도와주신 사랑하는 부모님께 감사합니다. 또한 대학원 시작부터 끝나는 날까지 공부하고 실험할 수 있도록 배려해 주신 송관정 교수님께 감사합니다. 학비와 생활비를 챙겨주실 뿐만 아니라 연구자의 자세와 마음을 몸소 가르쳐 주셔서 감사합니다. 바쁘신 와중에서도 논문심사를 해 주신 문두길 교수님, 한상헌 교수님께 감사합니다. 학부 때뿐만 아니라 대학원 생활 때도 아낌없이 지도 편달해 주신 한해룡 교수님, 백자훈 교수님, 장전익 교수님, 박용봉 교수님, 소인섭 교수님, 강훈 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 지도교수님을 소개시켜 주시고 1달 동안 일본 어학연수를 갈 수 있도록 배려해 주신 김찬식 교수님께도 감사드립니다. 그리고 실험에 대해 자상하게 또 자세히 가르쳐 주신 사모님께 감사드립니다. 그리고 다 되었던 실험결과가 잘 나오지 않아 집에서 절망하고 누워있을 때 다시 일어날 수 있도록 기도해주고 격려해준 아내 될 정미씨에게 감사합니다. 실험실에서 함께 지내며 같이 실험하고 고생한 김태균 연구사님, 오선열 선배님, 성범형, 보경, 미선, 효민, 희범, 셋별, 보연, 은진, 종훈, 성철, 일희, 동욱 에게 감사의 마음을 전합니다. 아낌없이 격려해 주신 대학원 동료와 선배님들께도 감사드립니다. 그리고 실험 재료를 주시고 실험에 대해 꼼꼼히 물어보시고 가르쳐주신 윤수현 연구사님께 감사합니다. 그리고 바쁘신 와중에도 실험실에 오셔서 실험에 대해 하나하나 가르쳐주신 정용환 박사님께 감사드립니다. 실험을 해나가며 힘들 때마다 아낌없이 기도해주시고 관심 가져 주신 조마가 목사님을 비롯해 양기드온 목사님 가정, 대학원 팀 그리고 여호수아 가족 여러분께 감사를 드립니다. 옆에서 저를 잘 챙겨준 영웅이 에게 감사합니다. 그리고 옆에만 있어도 든든한 치원이 형에게도 감사합니다. 감사의 글을 쓰며 느끼는 것은 이렇게 졸업할 수 있는 것이 나의 혼자 힘으로만 된 것이 아니었음을 깨닫게 됩니다. 지면상 이름은 적지 못했지만 제게 도움을 주신 많은 분들께 고개를 숙여 진심으로 감사의 마음을 전합니다.