



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#) 

석사학위논문

동질사배체 탱자에서 염색체 배가와  
수체 표현형의 변이

제주대학교 대학원

원예학과

오 은 의

2012년 12월



# 동질사배체 탱자에서 염색체 배가와 수체 표현형의 변이

지도교수 송 관 정

오 은 의

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함

2012년 12월

오은의의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	<u>한 상 현 (인)</u>
위 원	<u>소 인 섭 (인)</u>
위 원	<u>송 관 정 (인)</u>

제주대학교 대학원

2012년 12월

# Chromosome Redundancy and Variation of Tree Phenotype in Autotetraploidy Trifoliolate Orange

Eun-Ui Oh

(Supervised by Professor Kwan Jeong Song)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the  
degree of Master of Science in Horticulture

2012. 12.

Department of Horticultural Science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## 목 차

목 차	i
Abstract	ii
List of Tables	iii
List of Figures	iv
I. 서 언	1
II. 재료 및 방법	3
1. 식물재료	3
2. 염색체 및 동질사배체 분석	3
3. 성장 특성 분석	4
4. 잎의 광합성 및 엽록소 지수 측정	4
5. 기공 특성 분석	4
6. Global cytosine DNA methylation의 평가	4
7. 통계 검정	5
III. 결과 및 고찰	6
1. 염색체 및 핵형 분석	6
2. 동질사배체의 수체 성장 및 생육 특성	8
3. Global cytosine DNA methylation의 정도	17
IV. 적 요	20
V. 참 고 문 헌	21
VI. 감 사 의 글	25

## Abstract

The study was conducted to investigate the possibility that epigenetic DNA methylation might cause tree phenotypic variation in autotetraploids through evaluating the phenotypic variation and DNA methylation in autotetraploids occurred spontaneously from diploid trifoliate orange. Chromosome analysis confirmed that fourteen plants of trifoliate oranges selected by flow cytometry were tetraploids ( $2n=36$ ) without any aneuploid. CMA staining determined that these plants were all autotetraploids with double chromosome set. Tree phenotypes, such as tree height, tree width, branching number, branching length, branching angle, internode length, and leaf characteristic, were varied in the autotetraploids. There was no significant difference in the photosynthetic rate, however, chlorophyll indexes were diverse in the autotetraploids. In addition, a wide range of variation was observed in stoma density and guard cell length. Analysis of global cytosine DNA methylation showed that there was a variation of the methylation level in population. More than half of 14 autotetraploids had at least 2 times higher than that of diploid trifoliate orange. The results indicated that tree phenotypic variation in autotetraploids might be related to global DNA methylation for reducing gene redundancy.

## List of Tables

Table 1.	Plant growth characteristics of autotetraploidy trifoliolate orange. ....	11
Table 2.	Leaf growth characteristics of autotetraploidy trifoliolate orange. ....	13
Table 3.	Photosynthetic rate and SPAD value at the leaves of autotetraploidy trifoliolate orange. ....	14
Table 4.	Stomata characteristics of autotetraploidy trifoliolate orange. ....	15
Table 5.	Frequency of global cytosine DNA methylation at the leaves of autotetraploidy trifoliolate orange. ....	19

## List of Figures

- Fig.1. CMA analysis of diploid trifoliolate orange karyotype (A), Giemsa stained chromosomes from the young leaf cells of tetraploid trifoliolate orange (B), and CMA analysis of tetraploid trifoliolate orange karyotype (C). .....7
- Fig.2. Variation of tree growth habit. (A), upright; (B), semi-upright; (C), spreading type. ....12
- Fig.3. Stomata prints of abaxial epidermis in tetraploid (A) and diploid (B) trifoliolate orange. ....16
- Fig.4. Chromatograph of global cytosine DNA metylation from standard solution (A) and a autotetraploidy trifoliolate orange (B). ....18

## I. 서언

감귤은 국내외 과수 산업에서 가장 중요한 작물의 하나이다(FAO, 2012; FIFAFF, 2011). 최근의 기후 변화에 따른 기상 이변, 돌발 병해충의 발생, 노동력 부족, 다양한 과실의 공급 증가 등은 세계적으로 감귤 산업의 다양한 위협 요인이 되고 있다. 특히 소비자들의 고품질, 친환경, 기능성 및 다양성에 대한 관심이 급격히 증가하고 있다. 이들 다양한 위협 요인과 소비자 요구에 신속히 대응하기 위해서는 다양한 변이의 창성과 우수 품종의 선발이 요구되고 있다. 이에 따라 매우 다양한 종내 및 종간 교배가 이루어지고 있다. 그런데 우수한 과실 형질을 나타내는 개체를 선발하더라도 과실의 종자가 많다면 신품종의 가치를 잃게 될 것이다(Recupero et al., 2005). 이는 감귤 등의 과수에서 존재하는 상당 기간의 유년성과 고도의 유전적 잡종성에 기인하여 불임 회복을 위한 추가적인 교배가 현실적으로 가능하지 않기 때문이다. 그러므로 고품질 무핵 품종의 육성을 위한 삼배체 육종이 국내외적으로 가장 중요한 육종목표의 하나가 되고 있다(Zhu et al., 2009; Ollitault et al., 2007).

무핵 삼배체의 육성에는 이배체와 사배체간의 정역교배가 가장 보편적이다(Ferrante et al., 2009; Recupero et al., 2005). 감귤 및 근연종의 대부분은 이배체( $2n=18$ )이다. 삼배체 육종을 위해서는 유전체가 배가된 사배체 양성이 필수적이다. 사배체의 양성은 콜히친 처리에 의한 인위유도(Dutt et al., 2010; Wakana et al., 2005), 체세포융합에 의한 인위유도(Medina-Urrutia et al., 2004; Grosser et al., 1994, 2000) 및 주심배 자연발생 사배체의 선발(Song et al., 2011; Ferrante et al., 2009; Kaneyoshi et al., 2008; Usman et al., 2006; Oiyama and Kobayashi, 1991)로 구분할 수 있다. 이들 중에서 주심배 배수체의 자연발생은 운향과의 감귤아과에 속하는 감귤속 식물은 물론 근연속인 탕자속 및 금감속에 서도 보고되어 왔다(Cameron and Frost, 1968). 이들 사배체의 발생빈도는 2-5% 내외로 알려지고 있다.

일반적으로 사배체 감귤 및 탕자는 잎이 두껍고 크며, 줄기의 생장은 느리고 왜화성이며 직립성은 떨어진다. 과실의 수량은 낮고, 과실은 다소 크나, 과피가 두껍고 양낭의 수가 적은 편이다. 그러나 일부 사배체에서는 이와 반대의 경향을 나타내기도 한다(Cameron and Frost, 1968). 일부 감귤 동질사배체에서의 형태적 변이에 대해 보고된 바 있으나(Wakana et al., 2005; Lomero-Aranda et al., 1997), 아직까지도 변이의 정도와 그 기작에 대한 연구는 거의 알려진 바가 없다.

한편 일반 식물에서도 다양한 동질배수체 및 이질배수체가 보고된 바 있고, 일부 배수체들은 기존 이배체와 다른 표현형을 나타내기도 하고(Gunasekare and Ranatunga, 2003; Osborn et al., 2003), 변이를 보이기도 한다(Ye et al., 2010; Ranatunga and Gunasekare, 2003). 아직까지도 이들 기작에 대해서는 잘 알려져 있지 않으나 염색체 수의 증가와 더불어 증복된 대립 유전자 및 전사조절 인자들의 발현 증대, 유전자 재배열, 후성유전에 의한 유전자 발현 변화에 기인하는 것으로 알려지고 있다(Semon and Wolfe, 2007; Osborn et al., 2003). 후성유전은 유전체 염기서열의 변화가 아닌 유전체의 염기서열의 메틸화, 히스톤의 변형, 염색질의 구조변화에 기인한다. 식물의 이질배수체와는 달리 동질배수체에서 후성유전의 영향에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이다(Semon and Wolfe, 2007; Osborn et al., 2003).

따라서 본 연구에서는 이배체 탕자로부터 자연적으로 발생한 탕자 동질사배체의 표현형 및 유전체 메틸화 변이 정도를 분석하여 후성유전의 하나인 유전체 메틸화가 동질사배체의 표현형 변이의 요인으로 작용할 수 있음을 구명코자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료

제주특별자치도 국립원예특작과학원 감귤시험장에 재식된 이배체 탱자 주심배 유래의 3년생 사배체 탱자(*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) 14주와 대조군인 이배체 탱자 3주를 시험수로 이용하였다.

### 2. 염색체 및 동질사배체 분석

배수체 확인을 위해 Dutt et al. (2010)의 방법에 따라 염색체 분석을 수행하였다. 탱자 사배체 식물로부터 유엽을 채취하여 2mM 8-hydroxyquinoline (HQ) 용액에 담가 4°C에서 12시간 처리하였다. 이를 다시 고정액(메칠알코올 : 초산 = 3 : 1)에 올려 4°C에서 10시간 이상 처리하였다. 고정된 시료는 세포 분해 효소액(2% Cellulase Onezuka RS, 1% Macerozyme 및 0.3% Pectolyase Y-23)에서 37°C, 1시간 처리되었다. 효소처리 시료를 꺼낸 후 슬라이드글라스 상에 올려놓고 고정액과 핀셋으로 조직을 펼쳐 상온 건조시켰다. 건조한 슬라이드 시료를 2% Giemsa 용액을 이용하여 30분간 염색하였으며, 이를 현미경하에서 염색체 관찰을 통해 탱자 사배체 식물의 이수체 여부를 확인하였다.

동질사배체 여부를 확인하기 위하여 chromomycin A3 (CMA) 염색에 의한 핵형분석을 실시하였다. Befu et al. (2000)의 방법에 따라 McIlvaine's buffer와 5.0mM MgCl<sub>2</sub> buffer solution을 처리한 후 0.12 mg·mL<sup>-1</sup> CMA에 30분간 처리하고, McIlvaine's buffer로 슬라이드를 씻어주었다. 대비염색으로 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)를 20분간 처리한 후 형광현미경(LEICA DMRBE, Germany)으로 핵형분석을 통해 동질사배체 여부를 확인하였다.

### 3. 생장 특성 분석

재식된 탱자 사배체 식물로부터 수고, 수폭, 원가지 수, 원가지 길이, 분지각도, 마디길이를 조사하였다. 그리고 생장이 정지된 신초 상부의 잎에서 엽장, 엽폭, 잎의 두께, 엽병 길이를 조사하였다.

### 4. 잎의 광합성 및 엽록소 지수 측정

탱자 사배체 식물 상부의 가까운 잎에서 광합성 측정과 엽록소 지수를 측정하였다. 광합성 측정은 맑은 날 오전 10시~오후 12시 사이에 측정하였다. 광합성 측정은 LI-6400 portable photosynthesis system (LI-COR, Ltd., USA)을, 엽록소 지수는 SPAD-502 (Minolta, Japan)를 이용하여 측정하였다.

### 5. 기공특성 분석

탱자 사배체 식물의 잎 이면에 일반 메니큐어를 바른 후 건조시킨 다음, 이를 핀셋으로 분리하고 슬라이드글라스 위에 거치하여 현미경하에서 관찰하였다.

### 6. Global cytosine DNA methylation의 평가

탱자 사배체 식물의 잎 DNA를 CTAB법으로 추출하고, HClO<sub>4</sub>를 처리하여 DNA를 분해한 후 gradient HPLC (LC-20A HPLC series, Shimadzu, Japan)에 의한 nucleoside chromatogram을 분석하였다. 분석 칼럼은 Shimadzu ODS C18 (4.6mm×250mm, 5 $\mu$ m, Japan)을 사용하였고, 이동상은 7% acetic acid+3% acetonitrile+증류수의 A용매와 증류수로 이루어진 B용매로 사용하였다. 유속은 1mL/분, 온도는 40℃, 최대온도는 85℃로 이용하였다. Gradient 조건은 0.1~4min A용매 : B용매 = 99% : 1%, 4~4.5min A용매 : B용매 = 50% : 50%, 4.5~10min A용매 : B용매 = 100% : 0%, 10~10.01min A용매 : B용매 = 100% : 0%, 10.01~20min A용매 : B용매 = 0% : 100% 으로 20분간 분석하였다.

Global cytosine DNA methylation 정도(%)는 {[methylated DNA cytosine/(non-methylated + methylated)] × 100}으로 측정하였다.

## 7. 통계 검정

통계처리는 Sigmastat 3.5 (SYSTAT software Inc., USA)를 이용하여 수행하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 염색체 및 핵형 분석

국립원예특작과학원 감귤시험장에서 flow cytometry 분석에 의해 이배체 탱자로부터 선발한 14주의 2년생 사배체 탱자 식물체 유엽으로부터 염색체 및 핵형 분석을 수행하였다(Fig. 1.). Giemsa 염색에 의한 염색체 수의 분석결과, 14주의 사배체 탱자 모두 이수체가 없는  $2n=36$  식물체로 확인되었다. CMA 염색에 의한 핵형 분석 결과, 이배체 탱자는  $4B+8D+6E$ 인 반면 사배체 탱자는 모두  $8B+16D+12E$ 로 나타나 동질사배체인 것으로 확인되었다.

Yamamoto et al. (2008)에 의하면 감귤류의 염색체는 크기가 작고 형태학적으로 비슷하기 때문에 분석하기가 쉽지 않지만, 형태학적으로 비슷한 염색체들도 CMA 염색을 통해 구분이 가능하다고 하였다. CMA에 의한 핵형은 7가지로 구분되는데, A type은 염색체 양쪽 끝 부분과 가운데 band 존재, B type은 가운데와 한쪽 맨 끝에 band 존재, C type은 양 끝 부분의 bands 존재, D type은 한쪽 맨 끝의 band 존재, E type은 band가 존재하지 않으며, F type은 가운데 band가 존재, Dst type은 한쪽 맨 끝의 band와 위성염색체의 band가 존재한다고 하였다. Miranda et al. (1997)에 의하면 이배체 탱자의 CMA 핵형은  $4B+8D+6E$ 의 형태로 나타난다고 하였는데, 본 연구 결과 동일하게 나타났으며, 사배체 탱자는  $8B+16D+12E$ 의 형태로 나타나서, 이배체 탱자의 염색체가 배가된 동질사배체인 것을 확인할 수 있었다.

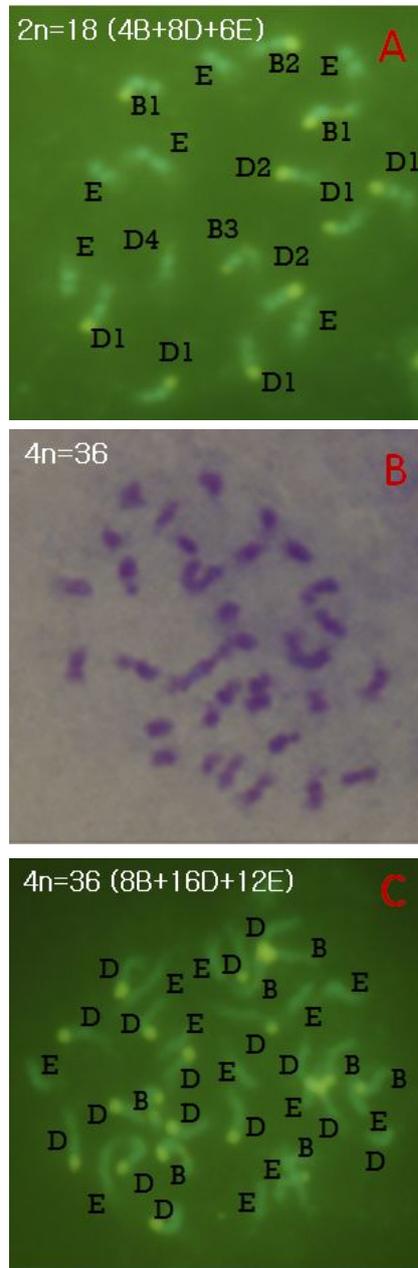


Fig. 1. CMA analysis of diploid trifoliate orange karyotype (A), Giemsa stained chromosomes from young leaf cells of tetraploid trifoliate orange (B), and CMA analysis of tetraploid trifoliate orange karyotype (C).

## 2. 동질사배체의 수체생장 및 생육특성

동질사배체 탱자식물체 14주의 생장 특성을 분석하기 위해 수고, 수폭, 원가지 수, 원가지 길이, 분지각도, 마디길이, 그리고 잎의 특성을 조사하였다(Table 1 and 2). 동질사배체의 수고는 57~110cm의 범위로, 수폭의 경우 39~70cm의 범위로 조사되었다. 동질사배체 14주 식물체 수고의 평균은 94.7cm로, 수폭의 평균은 55.5cm로 대조군 2배체 탱자와 비슷하여 다소 적은 경향을 나타내었다. 동질사배체 식물체의 원가지 수는 1~8개로 다양하게 나타났는데, 대부분이 5개 이상의 원가지를 가지고 있었으나, 3개 이하의 극히 적은 분지수를 나타내는 개체의 비율이 35.7%로 관찰되었다. 원가지 길이와 분지각도 및 마디길이에 있어서도 식물체마다 표현형 변이로 인해 다르게 나타나는 경향이 관찰되었다. 원가지 길이와 마디길이에 있어서는 이배체 탱자와 사배체 탱자를 비교했을 때에 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다. 그런데 분지각도에 있어서는 매우 좁게 나타나는 것과 매우 넓게 나타나는 일부 개체가 관찰되었다.

동질사배체 14주 식물체의 수형을 보면(Fig. 2.) 직립형은 6주, 반 직립형은 6주, 개장형 2주로 조사되었다. 이에 반해 대조군인 이배체 탱자는 모두 직립형으로 관찰되어 이배체 탱자의 특성상 수형은 직립형으로 자라는 특징이 있는 것으로 생각되어진다. 그러나 이배체 탱자의 조사집단이 적었기 때문에 이배체 탱자에서의 직립형 특성이 사배체와 구분될 수 있는 표현형인지는 분명치 않았다.

동질사배체에서의 잎 길이는 28~38cm의 범위로, 엽폭은 14~21cm 범위에서 조사되었다. 잎 길이는 다양하게 나타났으며, 사배체 탱자 10주가 이배체 탱자보다 길게 나타났다. 엽폭에 있어서도 사배체 식물체내 변이가 다양하게 나타났으나 모든 개체에서 이배체의 엽폭보다 크게 나타났다. Usman et al. (2006)와 Wakana et al. (2005)에 의하면 이배체의 경우 사배체보다 엽폭이 1.13~1.5배가 넓다고 하는데, 본 연구결과 대조군 이배체 탱자보다 사배체 탱자 14개 모두 엽폭은 넓은 경향을 보였으며, 그 비율은 1.04%~1.51% 범위에 있었다.

엽 두께는 0.22~0.34mm 범위로, 엽병 길이는 5~15cm 범위에서 조사되었다. 엽 두께는 14개 사배체 식물체 중 50%가 이배체보다 적거나 같았고, 50%이상은

두꺼운 것으로 나타났고, 엽병 길이는 Acc. no. 5의 15.1 cm를 제외하고는 이배체 탱자보다 짧은 것으로 조사되어 동질사배체 식물체에서 수체 형질마다 표현이 다르게 나타나는 것을 알 수 있었다.

사배체 탱자 식물 상부의 가장 가까운 앞에서 측정된 광합성율과 엽록소 지수를 Tabal 3에 나타내었다. 사배체 탱자의 광합성율은  $17\sim 21 \mu\text{mole CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  범위에서 나타났고, 사배체 탱자간에도 광합성율에 차이가 있었다. 이배체 탱자 식물체의 광합성율과 비교할 때 1개체만 제외하고는 같거나 높은 수준이었다.

Romro-Aranda et al. (1997)에 의하면 감귤 사배체 잎은 이배체 잎보다 세포당 광합성율이 낮다고 하였는데, 본 연구 결과에서도 오히려 사배체의 식물체가 이배체식물체보다 광합성율이 높은 경향을 보였다. 그러므로 이러한 차이가 환경의 차이에 기인한 것인지 또는 배수체 특성에 기인한 것인지에 대해서는 보다 상세한 연구가 필요한 것으로 생각되었다.

SPAD 값에 의한 엽록소 지수에 있어서 사배체 식물에서는 전체적으로 48~75의 범위로 나타났는데, 이는 이배체 식물체의 엽록소 지수인 62와 비교할 때 분리되는 경향처럼 나타났다. Romro-Aranda et al. (1997)에 의하면 엽록소 지수는 환경에 따라 배수체간에도 차이가 생기는 것으로 알려져 있는데, 본 연구 결과도 비슷하였다. 그러나 사배체 식물체간 엽록소 지수의 차이가 환경에 의한 차이인지, 아니면 유전자 발현차이에 기인한 것인지는 분명치 않았으며 다양한 후성학적 연구가 필요하다고 생각되었다.

사배체 식물체간의 기공의 크기와 밀도를 비교를 Table 4와 Fig. 3에 나타내었다. 사배체 식물체의 기공밀도는  $97\sim 166 \text{ mm}^2$ 의 범위로, 공변세포 길이는  $28\sim 50 \mu\text{m}$ 의 범위에서 나타났다. 기공밀도는 사배체 식물체 모두 이배체 식물보다 낮았으며, 기공크기도 1개체(Acc. no. 4)만 제외하고서는 모두 크게 나타났다. 그러나 개체에 따라서는 Acc. no. 6의 경우에서와 같이 대조군 이배체 식물체 기공 밀도에 비해 46% 수준으로 매우 낮은 것도 조사되었다. 기공의 크기와 기공 수는 식물이 다배체일수록 기공이 크고, 기공 수가 줄어들며(Usman et al., 2006), 공변세포의 길이로 기공의 크기를 비교할 때 사배체는 이배체보다 크게 나타나는데(Song et al., 2011), 본 연구 결과 사배체 탱자에서 대조군 이배체 탱자보다

Acc. no. 4를 제외하고는 공변세포의 길이가 긴 것으로 조사되었다. 일반적으로 기공밀도와 크기는 배수성을 구별하는 기준으로 알려져 있다. 그러나 차나무에서 모든 삼배체가 이배체보다 기공밀도가 낮게 나타나는 것이 아니기 때문에 기공 밀도와 배수성의 상관성이 존재하지 않아 배수성 선별의 기준이 될 수 없다고 보고된 바가 있다(Gunasekara와 Ranatunga, 2003). 오히려 차나무의 경우 모든 사배체식물체 공변세포의 엽록체수가 이배체의 엽록체수보다 많이 관찰되는 일관된 경향을 보여 공변세포의 엽록체수가 배수성을 구별하는 기준이 될 수 있다고 알려져 있다(Ranatunga와 Gunasekara, 2003). 그러므로 탱자에서도 공변세포의 엽록체수를 통해 배수성을 선별할 수 있는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다고 생각되어진다. 또한 Khan et al. (1992)와 Lee et al. (2008)에 의하면 분화되는 감귤 사배체 L-1층에서 분화되는 잎의 표피에 존재하는 기공의 거대화가 관찰되었다고 하였는데, 본 연구에서도 대조군 이배체 탱자와 비교했을 때 사배체 탱자사이에서 거대화되는 경향을 관찰할 수 있었다.

본 연구결과 탱자에서 같은 동질사배체일지라도 수고, 수폭, 원가지 수, 원가지 길이, 분지각도, 마디길이, 잎의 특성, 광합성율, 엽록소 지수, 기공밀도 등이 식물체마다 표현형 변이가 나타나는 것을 알 수 있었다. 또한 이배체 탱자와 사배체 탱자간의 비교하였을 때 표현형마다 비슷한 경향을 보이기도 하고, 다른 경향도 보이기도 하는 것을 알 수 있었다. 그러나 식물 수세 성장특성에 대한 표현형 변이에는 다양한 요인이 작용할 수 있기 때문에 추후 더욱 상세한 연구가 필요하다고 생각되어진다.

Table 1. Plant growth characteristics of autotetraploidy trifoliolate orange.

Accession no.	Tree height (cm)	Tree width (cm)	Branching (no.)	Branch length (cm)	Branching angle	Internode length (cm)	Tree growth habit			
1	57	46	5	27.6±1.5 <sup>w</sup>	cd <sup>x</sup>	63.0±8.0	ab	19.3±1.8	bd	SU <sup>y</sup>
2	99	64	7	27.2±4.3	cd	66.8±5.0	ab	21.4±1.6	abc	SU
3	98	62	2	34.4±1.0	bcd	68.0±6.4	ab	17.6±0.5	c	U
4	102	42	8	21.5±1.7	d	64.8±7.9	ab	17.8±2.1	c	U
5	94	62	8	29.0±3.1	cd	58.8±5.2	ab	21.8±1.8	abc	S
6	79	67	5	29.1±4.4	cd	58.0±7.3	ab	20.3±1.0	abc	SU
7	106	46	1	29.4±1.2	bcd	68.2±9.7	ab	17.9±1.5	c	U
8	110	58	7	40.1±6.0	a	50.4±12.1	bc	19.9±1.0	bc	S
9	109	45	7	22.3±0.7	d	80.0±6.7	a	18.0±2.4	bc	U
10	110	58	2	38.6±1.6	ab	46.0±6.0	c	24.2±2.5	ab	SU
11	87	52	5	26.6±2.3	cd	65.6±7.1	ab	23.0±2.5	abc	SU
12	80	39	3	32.6±0.7	abc	54.0±9.8	bc	21.0±1.3	abc	SU
13	85	70	3	34.6±1.4	abc	82.6±3.6	a	20.3±2.0	abc	U
14	110	66	6	26.5±4.3	cd	73.0±10.0	ab	26.2±2.9	a	U
Control <sup>z</sup>	112	70	6	34.0±2.5	abc	63.0±4.4	ab	20.3±1.3	abc	U

<sup>w</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05.

<sup>x</sup>Mean ± standard error

<sup>y</sup>U: Upright, SU: Semi-upright; S: Spreading type.

<sup>z</sup> Diploid trifoliolate orange



Fig. 2. Variation of tree growth habit. A, upright; B, semi-upright; C, spreading type.

Table 2. Leaf growth characteristics of autotetraploidy trifoliolate orange.

Accession no.	Length (mm)	Width (mm)	Thickness (mm)	Petiole length (mm)	
1	28.0±2.3 e	16.2±0.6 <sup>x</sup>	bcdef <sup>y</sup>	0.31±0.01 abc	11.0±1.4 bcd
2	36.9±2.7 abc	17.7±2.5	bcdef	0.30±0.02 abc	11.8±0.9 bc
3	28.5±0.9 de	14.7±0.9	def	0.30±0.01 abc	11.5±0.9 bc
4	31.5±1.4 bcde	16.5±0.3	bcdef	0.27±0.02 abc	8.0±0.7 de
5	37.7±2.5 ab	18.1±1.4	abcde	0.27±0.01 abc	15.1±1.2 a
6	35.6±1.7 abcd	18.5±0.8	abcd	0.25±0.08 ab	9.7±1.1 cd
7	29.9±2.7 cde	14.3±1.2	ef	0.34±0.02 a	6.6±0.4 e
8	40.7±2.1 a	20.7±1.3	a	0.28±0.01 abc	10.1±0.9 bcd
9	34.4±2.7 abcde	18.0±0.8	abcde	0.22±0.01 c	10.3±0.6 bcd
10	31.3±2.8 bcde	15.5±1.5	cdef	0.28±0.01 abc	5.3±0.8 e
11	38.2±2.9 ab	20.1±1.8	ab	0.27±0.03 abc	13.1±1.4 ab
12	32.1±0.9 bcde	17.1±1.5	abcdef	0.24±0.01 bc	10.3±0.6 bcd
13	32.1±1.2 bcde	14.7±0.6	cdef	0.25±0.01 abc	12.0±1.2 bc
14	38.2±3.3 ab	18.9±1.2	abc	0.32±0.03 ab	12.4±1.3 abc
Control <sup>z</sup>	29.9±2.1 cde	13.7±0.4	f	0.27±0.02 abc	13.3±0.7 abc

<sup>x</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05.

<sup>y</sup>Mean ± standard error

<sup>z</sup>Diploid trifoliolate orange

Table 3. Photosynthetic rate and SPAD value at the leaves of autotetraploidy trifoliate orange.

Accession no.	Photosynthesis rate ( $\mu\text{mole CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	SPAD value
1	20.9±0.6 <sup>x</sup> a <sup>y</sup>	59.3±1.2 cde
2	19.9±0.8 ab	71.7±1.5 a
3	20.0±1.1 ab	57.0±0.6 de
4	18.7±0.3 abc	75.5±2.2 a
5	19.2±0.7 abc	55.3±2.6 ef
6	19.1±0.6 abc	66.1±2.4 b
7	20.8±0.7 a	73.0±1.7 a
8	20.1±0.8 ab	64.2±1.9 bc
9	19.3±0.5 abc	73.4±1.8 a
10	19.2±0.2 abc	65.2±1.8 cd
11	19.7±0.5 abc	57.3±1.7 de
12	16.5±0.9 d	48.5±0.8 g
13	17.9±0.7 bcd	61.2±2.4 bcde
14	19.4±0.5 abc	50.8±2.8 fg
Control <sup>z</sup>	17.5±0.6 cd	62.0±1.1 bcd

<sup>x</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05.

<sup>y</sup>Mean ± standard error

<sup>z</sup>Diploid trifoliate orange

Table 4. Stomata characteristics of autotetraploidy trifoliate orange.

Accession no.	Stomata density (No./mm <sup>2</sup> )	Guard cell length (μm)
1	119.0± 2.6 <sup>x</sup> cd <sup>y</sup>	46.7±1.0 a
2	130.0±10.4 c	42.2±0.7 b
3	124.5± 5.5 de	42.2±0.7 b
4	132.8±11.1 c	28.5±1.1 d
5	123.0± 7.2 cd	42.4±0.9 c
6	165.8± 3.7 b	33.0±0.3 b
7	128.5± 3.1 c	41.5±1.1 b
8	107.8± 4.5 def	43.0±0.9 b
9	123.8± 4.7 cd	42.5±0.7 b
10	97.0± 2.1 f	49.6±0.6 a
11	100.0± 2.7 ef	40.4±2.3 b
12	107.3± 2.0 def	40.2±0.8 b
13	114.8± 6.5 cde	42.5±1.1 b
14	131.5± 2.3 c	41.8±0.9 b
Control <sup>z</sup>	210.3± 3.0 a	31.3±1.0 cd

<sup>x</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05.

<sup>y</sup>Mean ± standard error

<sup>z</sup>Diploid trifoliate orange

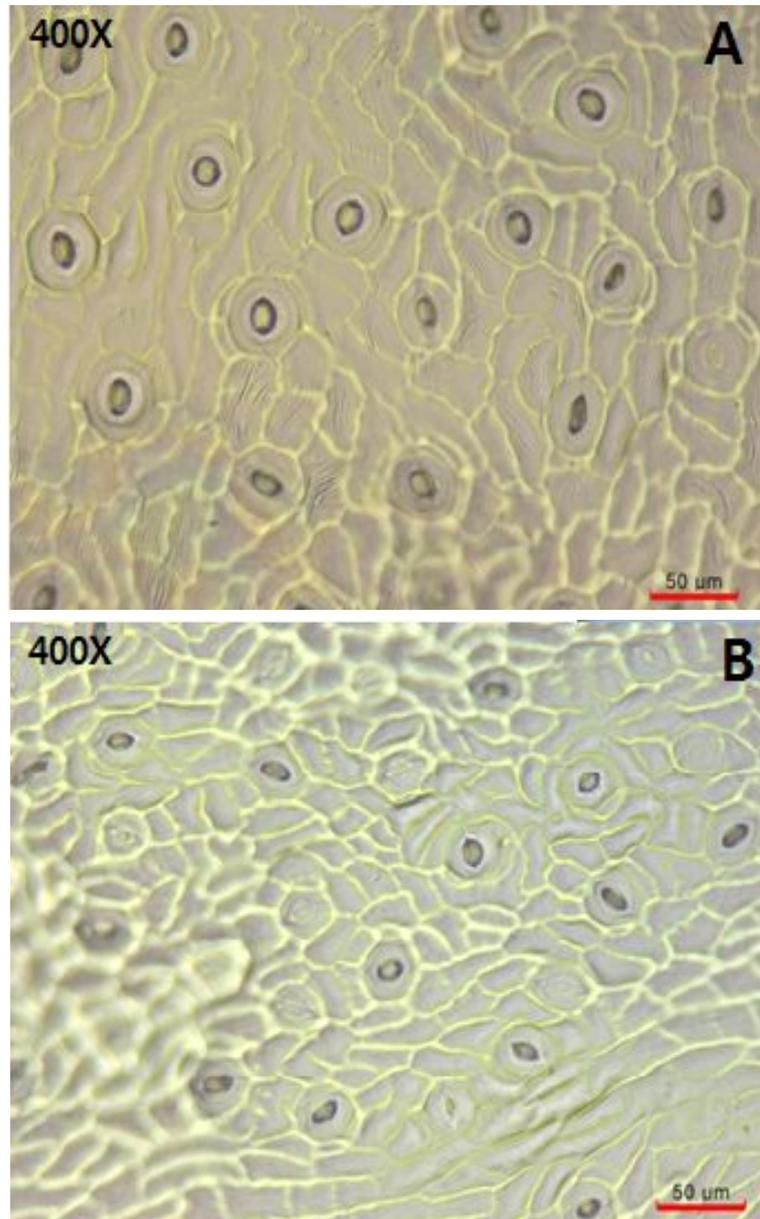


Fig. 3. Stomata prints of abaxial epidermis in tetraploid (A) and diploid (B) trifoliate orange.

### 3. 동질사배체 탱자의 global cytosine DNA methylation 정도

Gradient HPLC 분석에 의한 탱자 동질사배체 식물체의 global cytosine DNA methylation percent를 분석하였다(Table 5 및 Fig. 4). 탱자 동질사배체 식물체의 Global cytosine DNA methylation을 분석한 결과 6.4~17.6% 범위로 나타났으며, 개체 간 methylation 정도에 변이가 존재함을 확인할 수 있었다. 14개 사배체 식물체의 절반이 이배체 식물체의 methylation 수준을 비교하였을 때 2배 이상 높게 나타났는데, 이것은 gene redundancy를 줄이기 위한 것으로 생각되어진다. Johnaton et al. (2005)에 의하면 HPLC 분석을 통해 식물의 DNA methylation을 평가하고, 후생학적인 변화의 특징에 대해 알 수 있다고 하였다. Huh et al. (2008)에 의하면 DNA상의 5-메틸시토신 제거는 치밀한 염색질(condensed chromatin) 구조를 느슨하게 풀어주어, 결과적으로 유전자 발현의 촉진을 유도한다고 하였다. 본 연구에서도 global cytosine DNA methylation 수준에 따라서 하나의 계놈에 수많은 에피게놈(epigenome)이 존재할 수 있으며, 각 개체는 다른 유전자 발현 양상과 함께 다른 표현형을 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 또한 유전체 메틸화 수준이 앞에서 조사했던 동질사배체 탱자의 생장특성, 광합성을, 엽록체 지수, 기공밀도 등에 있어서 표현형 변이의 하나의 요인으로 작용하고 있는 것으로 보여 졌다.

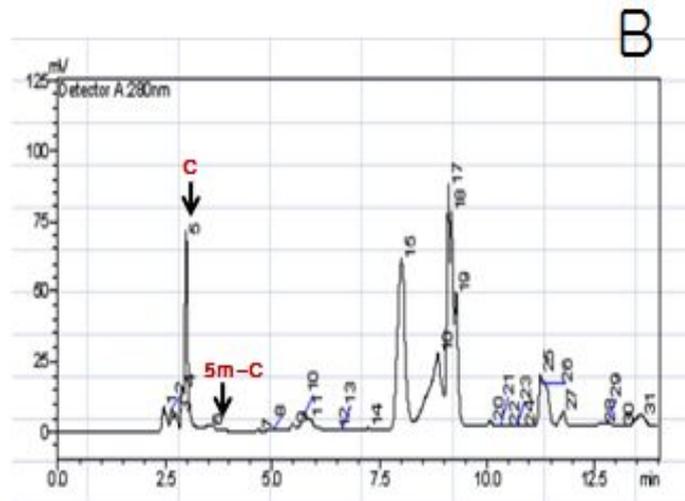
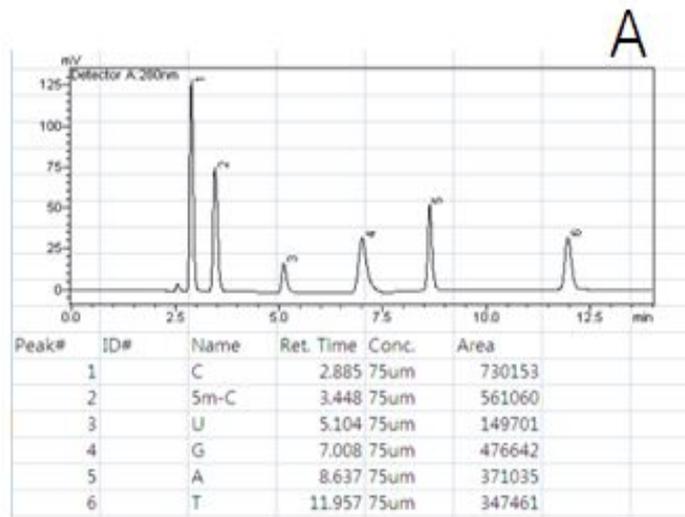


Fig. 4. Chromatograph of global cytosine DNA metylation from standard solution (A) and a autotetraploidy trifoliate orange (B).

Table 5. Frequency of global cytosine DNA methylation at the leaves of autotetraploidy trifoliate orange.

Accession no.	Global cytosine DNA methylation (%)
1	7.1±0.6 <sup>x</sup> cd <sup>y</sup>
2	14.1±0.7 b
3	7.7±1.7 cd
4	7.6±0.7 cd
5	8.0±0.5 c
6	7.8±0.7 cd
7	12.7±0.8 b
8	6.5±0.6 cd
9	13.4±0.1 b
10	6.4±0.7 cd
11	14.5±0.8 b
12	15.0±0.5 ab
13	17.6±2.4 a
14	13.7±0.4 b
Control <sup>z</sup>	4.8±0.5 d

<sup>x</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P = 0.05.

<sup>y</sup>Mean ± standard error

<sup>z</sup>Diploid trifoliate orange

#### IV. 적요

이배체 탱자로부터 자연적으로 발생한 탱자 동질사배체의 수체형질 관련 표현형 및 유전체 메틸화 변이 정도를 분석하여 후성유전의 하나인 유전체 메틸화가 동질사배체의 표현형 변이의 요인으로 작용할 수 있음을 구명코자 본 실험을 수행하였다. 이배체 탱자에서 유래된 14개의 사배체 탱자 식물체부터 염색체를 분석하여 이수체가 없는  $2n=36$  식물체로 확인하였다. CMA 핵형분석 결과 염색체가 배가 된 동질사배체임을 확인할 수 있었다. 동질사배체에서 수고, 수폭, 원가지수, 원 가지길이, 분지각도, 마디길이, 잎의 특성 등 동질사배체 수체 표현형의 변이가 나타남을 확인하였다. 또한 동질사배체 광합성율에 큰 차이는 없었지만, SPAD 값에 의한 엽록소 지수에 있어서는 표현형이 다양하게 나타나는 것을 알 수 있었다. 그 외에도 기공밀도와 공변세포 길이에 있어서 광범위하게 변이가 관찰되는 것을 알 수 있었다. Global cytosine DNA methylation의 분석한 결과 개체 간 methylation 정도에 차이가 존재하였다. 14개의 동질사배체 탱자의 절반이 이배체 탱자의 methylation과 비교하였을 때 2배 이상으로 나타난 것을 확인하였다. 본 연구결과 동질사배체에서 수체 형질변이가 gene redundancy를 줄이기 위한 Global cytosine DNA methylation과 관계되는 것임을 확인하였다.

## V. 참고문헌

- Befu, M., A. Kitajima, Y.X. Lin, and K. Hasegawa. 2000. Classification of 'Tosa-Buntan' pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.), 'Washington' navel orange (*C. sinensis* [L.] Osb.) and trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) chromosomes using young leaves. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 69:22-28.
- Camero, J.W. and Frost, H.B. 1968. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: W. Reuther, L.D. Batchelor, and H.J. Webber (eds). The Citrus Industry. Vol. II. Univ. Calif. Press, Berkeley, p.325-370.
- Dutt, M., M. Vasconcellos, K.J. Song, F.G. Gmitter, Jr, and J.W. Grosser. 2010. In vitro production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata*) using cell suspension culture. Euphytica 173:235-242.
- Ferrante, S.P., S. Lucretti, S. Reale, A. De Patrizio, L. Abbate, N. Tusa, and M.T. Scarano. 2009. Assessment of the origin of new citrus tetraploid hybrids ( $2n=4x$ ) by means of SSR markers and PCR based dosage effects. Euphytica 173: 223-233.
- Food and Agricultural Organization (FAO). 2012. <http://www.fao.org/>.
- Grosser, J.W., E.S. Louzada, Jr. Gmitter, and J.L. Chandler. 1994. Somatic hybridization of complementary citrus rootstock: Five new hybrids. Hort. Sci. 29:812-813.
- Grosser, J.W., P. Ollitrault, and O. Olivares-fuster. 2000. Invited Review: Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. Biol. Plant. 36:434-449.

Gunasekare, M.T.K., and M.A.B. Ranatunga. 2003. Polyploidy in tea (*Camellia sinensis* L.) and its application in tea breeding: a review. S. L. J Tea Sci. 68(2):14-26.

Huh, J.H., M.J. Bauer, T.F. Hsieh, and R.L. Fischer. 2008. Cellular programming of plant gene imprinting. Cell 132:735-44.

Jaskani, M.J., M.M. Khan, and I.A. Khan. 2002. Growth, morphology and fruit comparison of diploid and tetraploid Kinnow mandarin. Pak. J. Agri. Sci. 39: 126-128.

Johnston, J.W, K. Harding, D.H. Bremmer, G. Souch, J. Green, P.T. Lynch, B. Grout, and E.E. Benson. 2005. HPLC study of plant DNA methylation: A study of critical methodological factors. Plant Physiol. Biochem. 43:844-853.

Kaneyoshi, J., T. Furuta, M. Kurao, and S. Yamaguchi. 2008. Induced tetraploid by colchicine treatment in some monoembryonic Citrus cultivars and triploidy production by using the tetraploid as seed parents. Hort. Research 7:5-10.

Song, K.J., S.B. Kim, J.H. Park, E.U. Oh, K.G. Lee, D.W. Kim, J.H. Kang, J.S. Kim, J.H. Oh, and F.G. Gmirrer. 2011. Frequency and growth characteristics of polyploids occurred spontaneously in some mandarin hybrid. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29:617-622.

Lee, D.H., J.H. Park, Y.E. Moon, H.J. An, and S.H. Yun, J.W. Hyun, H.U. Choi and S.K. kang. 2008. Tetraploid induction in miscellaneous citrus using colchicine. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 26:154-159.

Medina-Urrutia, V., K.F.L. Madera, P. Serrano, G. Ananthakrishnan, J.W. Grosser, W.W. Guo. 2004. New intergeneric somatic hybrids combining amblycarpa mandarin with six trifoliate/trifoliolate hybrid selections for lime rootstock

improvement. HortScience 39:355–360.

Ministry for Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries (MFAFF). 2011. Food, Agriculture, Forestry and Fisheries Statistical Yearbook. p. 118–119.

Miranda, M., F. Ikeda, T. Endo, T. Moriguchi, M. Omura. 1997. Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. Chromosome Res. 5:86–92.

Oiyama, I. and S. Kobayashi. 1991. Citrus pentaploids from small seeds of diploid  $\times$  diploid crosses. Hort. Sci. 26:292–293.

Osborn, T.C., J.C Pires, J.A. Birchler, D.L. Auger, Z.J Chen, H.S. Lee, L. Comai, A. Madlung, R.W. Doerge, V. Colot, and R.A. Martienssen. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. Trends Genet. 19:141–147.

Ranatunga, M.A.B., and M.T.K Gunasekare. 2003. A comparative assessment of some morphological and anatomical attributes to identify markers for screening polyploid genotypes of tea (*Camellia sinensis* L.). S. L. J. Tea Sci. 68(1):12–19.

Recupero, G.R., G. Russo, and S. Recupero. 2005. New promising citrus triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. Hort. Sci. 40:516–520.

Romero-Aranda, R., B.R. Bondada, J.P. Syvertsen, and J.W. Grosser. 1997. Leaf characteristics and net exchange of diploid and autotetraploid citrus. Ann. Bot. 79:153–160.

Sémon M., and K.H Wolfe. 2007. Consequences of genome duplication. 2007. Curr. Opin. Genet. Dev. 17:505–512.

Usman, M., T. Saeed, M.M. Khan, and B. Fatima. 2006. Occurrence of spontaneous polyploids in citrus. Hort. Sci. (PRAGUE) 33(3):124-129.

Wakana, A., N. Hanada, S.M. Park, I. Fukudome, and K. Kajiwara. 2005. Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicines. J. Fac. Agr. Kyushu Univ. 50:93-102.

Yamamoto, M., A.A. Abkenar, R. Matsumoto, T. Kubo, S. Tominaga. 2008. CMA staining analysis of chromosomes in several species of Aurantioideae. Genet. Res. Crop Evol. 55:1167-1173

Ye Y.M., J. Tong, X.P. Shi, W. Yuan, G.R Li. 2010. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica L.*). Scientia Hortic. 124: 95-101

Zhu, S.P., J-K. Song, Z-Y. Hu, B. Tan, Z-Z. Xie, H-L. Yi, and X-X. Deng. 2009. Ploidy variation and genetic composition of open-pollinated triploid citrus progenies. Bot. Studies 50:319-324.

## VI. 감사의 글

제가 2년간의 석사 생활을 마무리하며 이 논문을 쓰게 되었습니다. 먼저 학부생 때부터 부족한 저를 지금까지 학문의 길로 이끌어주시고, 많은 가르침과 아낌없는 격려를 보내 주신 송관정 교수님께 진심으로 감사드립니다. 미흡한 제 논문을 바쁘신 와중에도 많은 지도를 해주신 소인섭 교수님, 한상헌 교수님 정말 감사드립니다. 그리고 저의 대학원 생활동안 많은 가르침을 주시고 지켜봐주신 박용봉 교수님, 문두길 교수님, 강훈 교수님, 조영열 교수님께 감사드립니다.

이 논문을 쓰기까지 옆에서 함께 고생해준 재현오빠, 셋별언니, 승민오빠, 수중오빠, Voleak, Dung, Panha, 형주, 지연이에게 감사의 마음을 전합니다. 또한 항상 조언과 격려를 해주시는 연구실 가족들 - 김영걸 박사님, 송인관 박사님, 김태균 연구사님, 이민석 연구원님, 미선언니, 이경옥 팀장님, 보경언니, 효민언니, 희범오빠, 성철오빠에게 감사의 마음을 전합니다. 그리고 부족한 저에게 관심을 가져주시고 많은 가르침과 조언을 해주신 채치원 박사님, 차미경 선생님, 이 논문에 많은 도움을 주신 Lu 교수님께 감사드립니다.

마지막으로 제 옆에서 언제나 묵묵히 믿음과 사랑으로 지켜봐주시는 사랑하는 아버지, 어머니, 할머니, 항상 누나가 최고라고 말해주는 재욱이, 우리집의 귀염둥이 막내 현지, 친동생처럼 나를 잘 따라주는 연숙, 명희, 그리고 나머지 가족들, 옆에서 든든하게 지켜봐주고 투정도 다 받아주는 내 사랑 명구에게 감사의 마음을 전합니다.

지면상 이름을 적지 못했지만 제가 여기까지 올 수 있게 도움을 주신 많은 분들에게 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

2012년 12월

오 은 의 올림