



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

석사학위논문

Microarray를 이용한 궁천온주
돌연변이 감귤의 유전적 분석

제주대학교 대학원

생명공학과

오 승 규

2014년 2월

Microarray를 이용한 공천온주 돌연변이 감귤의 유전적 분석

지도교수 김인중

오 승 규

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2014년 2월

오승규의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____(인)

위 원 _____(인)

위 원 _____(인)

제주대학교 대학원

2014년 2월

Genetic analysis from mutants
in *Citrus unshiu* Marc. cv. Miyagawa-Wase
using Microarray

Seung-Kyu Oh
(Supervised by professor In-Jung Kim)

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

2014. 2.

Department of Biotechnology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Abstract

I. 서론	1
-------------	---

Part 1. 돌연변이육종에 의한 감귤 우수 개체 선발	4
--------------------------------------	---

II. 재료 및 방법	5
-------------------	---

1. 식물 재료	5
----------------	---

2. 과실 형질 측정	6
-------------------	---

3. 엽육 및 과피 조직 관찰	8
------------------------	---

III. 결과 및 고찰	10
--------------------	----

1. 과실 크기	11
----------------	----

2. 과실의 과형지수	13
-------------------	----

3. 과실 당도	15
----------------	----

4. 과실 산함량	17
-----------------	----

5. 선발 가지	19
----------------	----

6. 엽육 및 과피 조직	21
---------------------	----

Part 2. 돌연변이 감귤 A3013의 유전적 분석	25
-------------------------------------	----

IV. 재료 및 방법	26
-------------------	----

1. 식물 재료	27
----------------	----

2. RNA 분리 및 cDNA 합성	28
---------------------------	----

3. Microarray	29
---------------------	----

4. Real-Time PCR	31
------------------------	----

V. 결과 및 고찰	33
------------------	----

1. 과실 total RNA.....	33
2. The Citrus 300K V.2 Microarray	34
3. Real-Time PCR	38
VI. 요약	40
VII. 참고문헌	41

List of tabs

표 1. 선발하여 다른 대목에 접목한 돌연변이 2차가지	19
표 2. 연도별 A3013의 형질	27
표 3. Microarray confirm용 primer 서열	31
표 4. Significantly changed Genes	34
표 5. COG analysis	35
표 6. TF up regulation	36
표 7. TF down regulation	37
표 8. Target 유전자별 A3013(M)과 대조구(C) 간 Real-Time PCR Ct값 비교	38

List of figures

그림 1. 온주밀감 표준 규격(국립농산물품질관리원)	6
그림 2. 엽육조직 관찰에 사용한 잎이 부위	9
그림 3. 2009년 돌연변이 2차가지의 표준규격에 따른 과실 크기 분포	11
그림 4. 2010년 돌연변이 2차가지의 표준규격에 따른 과실 크기 분포	12
그림 5. 2011년 돌연변이 2차가지의 표준규격에 따른 과실 크기 분포	12
그림 6. 2009년 돌연변이 2차가지의 과형지수 분포	13
그림 7. 2010년 돌연변이 2차가지의 과형지수 분포	14
그림 8. 2011년 돌연변이 2차가지의 과형지수 분포	14
그림 9. 2009년 돌연변이 2차가지의 당도 분포	15
그림 10. 2010년 돌연변이 2차가지의 당도 분포	16
그림 11. 2011년 돌연변이 2차가지의 당도 분포	16
그림 12. 2009년 돌연변이 2차가지의 산함량 분포	17
그림 13. 2010년 돌연변이 2차가지의 산함량 분포	18
그림 14. 2011년 돌연변이 2차가지의 산함량 분포	18
그림 15. 감귤 돌연변이체와 control 식물체 엽맥의 차이(엽기부)	21
그림 16. 감귤 돌연변이체와 control 식물체 책상조직의 차이(엽중양부)	21
그림 17. 감귤 돌연변이체와 control 식물체 해면상조직의 차이(엽중양부)	21
그림 18. 감귤 돌연변이체와 control 식물체 엽맥의 차이(엽선부)	22
그림 19. 감귤 돌연변이체와 control 식물체 유관속의 차이(엽선부)	22
그림 20. 감귤 돌연변이체와 control 식물체 엽육의 차이(엽선부)	22
그림 21. A3013 과피 평탄부위와 과피 융기부위의 차이	23
그림 22. A3013 과피 융기부위의 발달된 유관속	24
그림 23. Microarray 분석한 돌연변이 감귤 A3013	26
그림 24. Microarray 실험방법 모식도	29
그림 25. Citrus 300K Ver.2 Microarray probe 디자인	30
그림 26. Real-Time PCR thermal profile setup	32
그림 27. Total RNA	33

그림 28. Hierarchical Clustering. (log2 ratio 이용) 34
그림 29. 유전자별 A3013과 대조구 간 Real-Time PCR Ct값 비교 그래프 39
그림 30. Real-Time PCR Relative Quantity (Crossing Point) 39

Abstract

According to the changing international situation, high quality Domestic varieties of citrus are needed. As a result, this study began mutation breeding using radiation from *Citrus unshiu* Marc. cv. Miyagawa-Wase.

Radiation-induced mutations graft onto *Citrus unshiu*. Secondary mutant branches were numbered. Citrus mutations fruits were sampled from 2009. Collected fruits were measured diameter, weight, shell thickness, sweetness, acidity, and color. Many mutations were selected by measured data.

The cutting plane of mesophyll and rind tissues in A3013 were observed under the microscope. As a result, vessel and phloem in mesophyll is not the overarching difference between A3013 and control. However mesophyll tissue from A3013 is thicker than the control. The results of rind, cell gaps are thriving in flat part. On the other hand, it is found a lot of Vascular in protuberant part.

Microarray was used for genetic analysis about A3013. Hierarchical Clustering, COG(Clusters of Orthologous Groups) analysis, TF(Transcription factor) analysis was created by the microarray data. Confirming by Real-Time PCR can add credence to Microarray results. Primers were designed from five random ESTs. Of course, the difference between ESTs expression is more than twice. It was confirmed that Real-Time PCR results are similar to microarray.

Key words: *Citrus unshiu*, mutation breeding, mesophyll, rind, microscope, microarray, Real-Time PCR

I. 서론

온주밀감(satsuma mandarin)은 국내 과수 중 생산량 1위의 주요 과수이다. 2011년 생산량은 과수 중 전국 최대로 588천톤에 달하며, 이는 국내 과수 전체 생산량의 31.58%에 해당한다(제주특별자치도 감귤출하연합회, 2012). 최근 온난화현상에 의하여 전라남도과 충청남도 일부에서도 감귤을 재배하고 있으나 수확이 가능한 성과수는 거의 없고, 감귤은 대부분 제주에서 생산되고 있다. 따라서 감귤산업은 제주 경제에 많은 영향을 미치고 있다(김, 2006).

현재 우리나라는 미국을 포함하여 여러 국가들과 자유무역협정(FTA)을 체결하였거나 체결 중에 있다. 해외에서 농산물들이 저렴하게 수입되고 있고 오렌지 등이 소비자들에게 선호 받고 있어 감귤도 경쟁력을 갖기 위해서는 더욱 뛰어난 품종 선발이 필요한 실정이다.

또한 우리나라는 2002년 1월 7일자로 국제 식물 신품종 보호동맹(UPOV)의 50번째 회원국이 되었다(Choi, 2002). 이로서 우리나라도 세계적인 종자 및 식물자원 확보 경쟁에 발을 담그게 되었다. 국내에서 재배되는 감귤 대부분은 일본에서 도입된 품종인데, 2012년부터 UPOV 협약에 따라 품종보호제도가 전면 시행되어 일본에서 들여오게 될 신품종 감귤을 재배하는 농가들은 로열티를 지급해야 한다(박, 2008). 새로운 경쟁력 있는 품종을 원하는 이때에 지금까지와 같이 일본에서 신품종을 도입하는 것은 어려워졌다.

국내 국립원예특작과학원 감귤시험장에서 13품종, 제주특별자치도농업기술원에서 1품종을 선발하였다. '하례조생'은 '입간조생'과 '하귤'을 교배하여 나온 주심배실생 중에 선발되었는데, 당도가 높고 산도가 낮아 '궁천온주'를 대체할 수 있을 것으로 예상하고 있다(Yun *et al.*, 2008). 현재 농가에 보급된 2품종은 '상도조생', '하례조생' 품종이다. 이 두 품종은 농민들의 선호도가 낮아 전체 감귤재배면적의 1%조차 되지 않고 있다. 그러나 Ko(2011)는 하례조생을 통하여 감귤 신품종 개발의 기술적 가치가 높을 것이라 평가하고, 신품종개발사업에 경제적 타당성이 있다고 판단하였다. 지금부터 국내산 품종이 감귤 농가를 채워나갈 것

으로 기대한다.

현재 제주에서 재배되고 있는 감귤의 90% 이상이 ‘궁천조생’, ‘홍진조생’과 같은 온주밀감이다. 온주밀감은 내한성이 강하고 제주도 기후 및 토질에 뛰어난 적응력을 가져, 1980년대부터 30년 가까이 고소득 작물로 감귤의 주력 품종이었다. 온주밀감은 제주도에서 노지재배로 연내수확이 가능하다. 그러나 최근 오랜 지 수입이 증가하고, 만감류의 재배면적이 늘어났으며, 사과, 배, 포도 등의 다른 과수들의 신품종 도입이 활발해지면서 상대적으로 온주밀감은 품질이 낮아 저가 과실로 소비자들에게 인식되고 말았다(Yun et al., 2008; Ko, 2011).

DNA는 자외선, 이온화 방사선, 각종 화학물질 등에 의해 손상을 입는다. DNA가 손상되면 DNA 복제, 전사 등 세포의 필수 대사가 저해될 수도 있고, 심한 경우에는 세포가 사멸하거나 돌연변이를 일으키게 된다. 특히, 이온화 방사선(^{60}Co)은 직접 DNA와 작용하거나 물로부터 활성산소나 자유라디칼을 생산시키는 고효율의 돌연변이원이다(Lee et al. 2004). 돌연변이 육종은 인위적으로 유전적 변이를 유도하여 만든 돌연변이 개체들 중에서 가치가 있는 개체를 선발하는 방법이다. Stadler (1928)는 보리에 방사선을 처리하는 것으로, 작물에서 인위적인 돌연변이를 일으킬 수 있다는 사실을 처음 밝혀내었다. 그후, 전세계적으로 170가지 식물종에서 2700여 돌연변이 육종 품종이 보급되었다. 특히 미국, 이스라엘, 일본 등에서는 Citrus종의 돌연변이육종이 활발하다. 국내의 경우, 1960년대 이후 방사선을 이용한 육종을 시작하였고, 원평벼, 방사콩, 초영(마늘) 등의 다양한 품종이 등록되어 재배되고 있다(Lee et al., 2003). 그러나 과수에서는 본 연구가 시작된 2005년까지 전혀 시도되지 않고 있었다.

Microarray는 동시에 수천 개의 유전자 발현을 관찰할 수 있는 방법이다. Microarray는 유전자 기능분석·탐색, 의료, 생물환경연구 등 다양한 분야에서 응용되고 있으며, 2개의 개체에서 발현차이를 확인하는 것에 매우 유용한 방법이다. 본 연구에서는 RNA를 비교하여 돌연변이 개체와 대조구(궁천온주) 간의 유전자 발현차이를 비교하였다. 유발된 돌연변이 중 과실의 외형이 크게 변형되고 저장성이 높아진 개체 하나를 선택하여 대조구와 함께 RNA microarray를 수행하였다. Microarray 데이터의 타당성을 증명하기 위하여 Real-Time PCR을 수행하였다. Real-Time PCR은 PCR cycle 마다 증폭상황을 측정하여 template

DNA의 상대 정량을 알 수 있어 최근 northern blotting을 대신하여 많이 사용되고 있는 분석 기법이다.

본 연구에서는 온주밀감 ‘궁천조생’을 대상으로 방사선(^{60}Co)을 이용한 돌연변이 육종방법을 사용하였다. 변이체계에 대한 다양한 형질분석을 통해 당산비 우수, 부피과 억제 및 내한성 향상, 기능성 강화 품종을 개발함으로써 국산육성 내수 및 수출용감귤 품종으로 활용하고자 한다.

Part 1. 돌연변이육종에 의한
감귤 우수 개체 선발

II. 재료 및 방법

1. 식물 재료

본 연구는 감귤재료로 제주도 내에서 가장 많이 재배되고 있는 궁천조생 (*Citrus unshiu* Marc. cv. Miyagawa-Wase)을 사용하였다. 방사선 조사는 2005, 2006, 2년간에 수행하였다. 실험에 사용된 접수는 해당년도 3월과 8월에 제주대학교 서귀포 감귤원에서 채취하여 저온(8℃)보관하였다. 봄접 시기인 4월에 맞추어 제주대학교 방사선응용과학연구소의 방사선(⁶⁰Co) 조사시설에서 접수에 돌연변이를 유도하였다. 연구포장은 2군데로 나뉘어 있어 A포장에 310주, B포장에 206주의 궁천조생 나무에 고접한 후 경과를 지켜보았다. 이 중 생존한 나무에 2차가지별로 라벨링을 하였다. 2009년, 2010년, 2011년 11월말부터 각 가지별로 과실을 최대 5개까지 채집하였다.

2. 과실 형질 측정

1) 과중 및 과경(종경·횡경) 측정

전자식저저울(CAS(주), Korea)을 이용하여 과중을 0.1g 단위까지 측정하였다. Digital caliper (Mitutoyo Corporation, Japan)를 이용하여 종경과 횡경을 0.1 mm 단위까지 측정하였다.



그림 1. 은주밀감의 표준 규격(국립농산물품질관리원)

2) 색도 측정

색도는 육안으로 차이가 보이거나 다른 외형적 특징을 보이는 것만 측정하였다. Chroma meter CR-400(KONIKA MINOLTA, Japan)을 이용하여 기기를 감글 표면에 바짝 붙이고 측정하였다. 각각의 수치에서 L은 명도, a는 청색-적색도, b는 녹색-황색도를 나타낸다. a값은 0을 중심으로 클수록 적색에 가까워지고 작을수록 청색에 가까워진다. b값도 마찬가지로 0을 중심으로 클수록 황색에 작을수록 녹색에 가깝다는 것을 나타낸다.

3) 과피두께 측정

과경과 과중을 측정한 후, 과실을 세로로 반으로 자르고 아래위로 중앙부분인 과실의 측면에서 Digital caliper (Mitutoyo Corporation, Japan)를 이용하여 0.1mm 단위까지 측정하였다.

4) 당산도 측정

과피두께까지 측정이 완료된 과실의 껍질을 벗겨낸 과육을 착즙기를 이용하여 즙을 채취하였다. 채취한 즙을 산당도분석장치 NH-2000(HORIBA, Japan)에 약 4-5mL를 주사기로 삽입하여 당도와 산함량을 측정하였다.

3. 엽육 및 과피 조직 관찰

외형적 특이로 선발한 A3013과 바로 옆에 위치한 A3015의 엽육과 과피의 단면을 control과 함께 조직 및 세포 수준에서 정밀하게 현미경으로 관찰하였다.

형태관찰에 사용한 식물 재료는 2011년 11월 23일 채취한 성숙된 과실과 동일시기의 잎으로 하였다. 과실은 외과피의 과실 선단부, 중앙부, 기부로 나누어 5mm X 5mm의 크기로 절단하였으며 잎은 선단부, 중앙부, 기부 및 측맥부를 유관속이 포함되도록 약 5mm X 5mm의 크기로 절단하여 FAA용액에 고정된 후 Paraffin 법에 의해 10 μ m 두께의 횡단 절편을 만들고 Safranin과 Fast Green으로 2중 염색한 후 검경하였다.

감귤 돌연변이 식물체와 control의 형태를 관찰하기 위하여 FAA법을 이용하여 고정하였다. 식물의 절편을 5mm X 5mm의 크기로 절단하여 50% alcohol 90ml, formalin 5ml, acetic acid 5ml이 함유된 FAA 고정액에 넣은 후 vacuum을 걸어 식물조직내의 공기를 제거하며 24~72 시간동안 고정하였다.

고정이 완료된 조직은 제3butyl alcohol로 탈수 하였다. 시료를 50% alcohol에 5시간 처리한 후 I용액(Tert-Butyl alcohol 10ml, 95% Alcohol 40ml, 증류수 50ml)에서 5시간, II용액(Tert-Butyl alcohol 20ml, 95% Alcohol 50ml, 증류수 30ml)에서 37시간, III용액(Tert-Butyl alcohol 35ml, 95% Alcohol 50ml, 증류수 25ml)에서 5시간, IV용액(Tert-Butyl alcohol 10ml, 55% Alcohol 45ml, Cystal violet 1%)에서 18시간, V용액(Tert-Butyl alcohol 75ml, 100% Alcohol 25ml)에서 5시간, VI용액(Tert-Butyl alcohol 100ml)에서 각각 5시간, 72시간 동안 탈수 하였다.

탈수가 완료된 조직에 이미 녹여 놓은 paraffin solution을 서서히 부어주어 paraffin이 서서히 조직 속으로 침투해 들어가도록 하였다.

조직의 sectioning은 microtome을 이용하여 10 μ m 두께의 횡단 절편을 만들었다. Safranin과 Fast Green에 의한 2중 염색은 Xylene에서 각각 60분, 10분으로 2회 수행하였으며 Xylene:Alcohol에서 10분, 100%, 95%, 85%, 75% Alcohol에서 각각 10분씩 처리하였다. 그 후 1% Safranin에서 2시간 75% Alcohol에서 5분, 0.5% Fast green에서 30초, 95%, 100%, 100% Alcohol에서

각각 5분씩 처리하였다. 또한 Xylene:Alcohol에서 5분, Xylene에서 10분씩 2회 처리한 후 현미경을 이용하여 관찰하였다.



그림 2. 엽육조직 관찰에 사용한 잎의 부위

III. 결과 및 고찰

2009년에는 총 6,345개의 돌연변이 2차가지에서 과실 23,175개를 측정하였다. 2010년에는 2,257 가지에서 6,651개의 과실을 측정하였고, 2011년에는 2,710개의 돌연변이 2차가지에서 11,411 과실을 측정하였다. 측정된 값으로 가지별 평균값을 구하였다. 크기, 중량비, 당도, 산함량, 당산비 각각의 평균값의 분포를 Microsoft Excel을 이용하여 다음과 같이 나타내었다.

1. 과실 크기

온주밀감 품종인 궁천조생의 경우 작은 과실이 맛있다는 인식이 강하다. 실제로 큰 과실보다 작은 과실들이 평균적으로 당도가 우수하여 4~5번과가 최고가로 유통된다. 그러나 한라봉을 비롯한 만감류들은 오히려 큰 과실이 높은 가격을 받는다. 크기에 상관없이 당도가 일정하기 때문이다.

궁천조생도 8~10번과 정도의 큰 과실이 당도가 우수해진다면 더 많은 수익을 낼 수 있을 것으로 기대된다.

감귤의 농산물표준규격에 따라 1번과에서 10번과까지 나누어 그 분포를 보았다. 년도별로 큰 차이는 보이지 않았다. 3년간 모두 7~9번과가 가장 많았다.

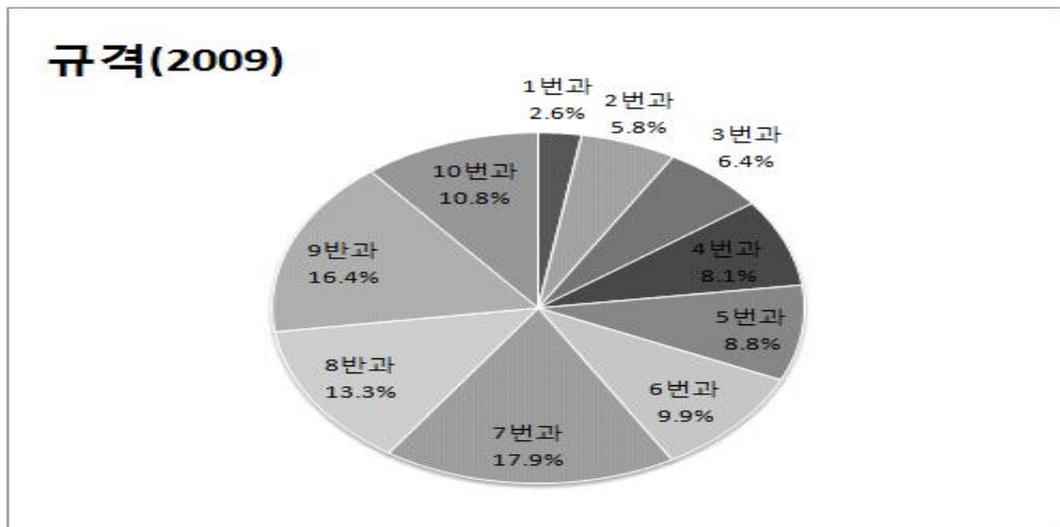


그림 3. 2009년 돌연변이 2차까지의 표준규격에 따른 과실 크기 분포. 1번과 (51mm이하): 166; 2번과(51~54mm); 371; 3번과(54~56mm); 404; 4번과 (56~58mm); 512; 5번과(58~60mm): 561; 6번과(60~62mm): 628; 7번과 (62~66mm): 1,134; 8번과(66~70mm): 846; 9번과(70~77mm): 1,038; 10번과 (77mm이상): 686.

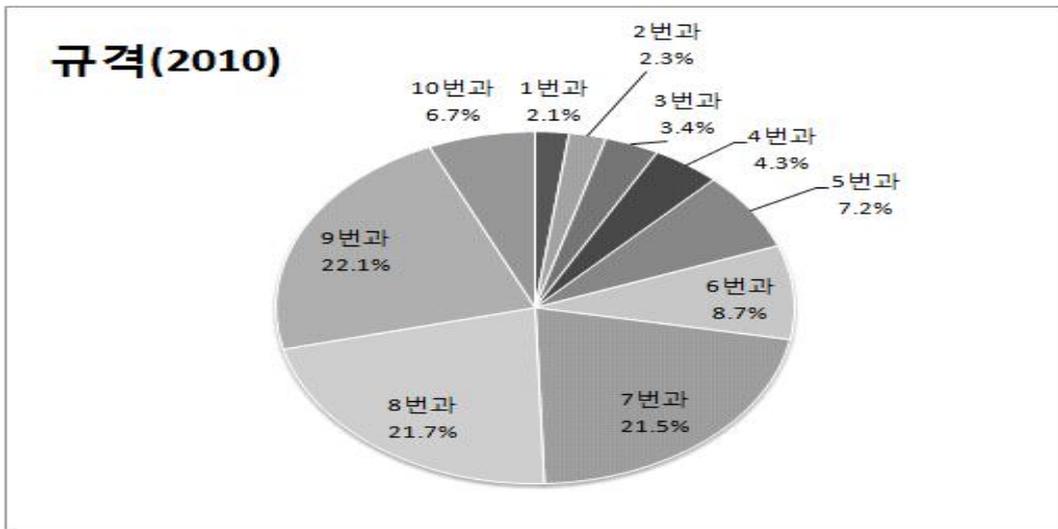


그림 4. 2010년 돌연변이 2차가지의 표준규격에 따른 과실 크기 분포. 1번과(51mm이하): 47; 2번과(51~54mm): 52; 3번과(54~56mm): 76; 4번과(56~58mm): 96; 5번과(58~60mm): 163; 6번과(60~62mm): 195; 7번과(62~66mm): 485; 8번과(66~70mm): 490; 9번과(70~77mm): 499; 10번과(77mm이상): 150.

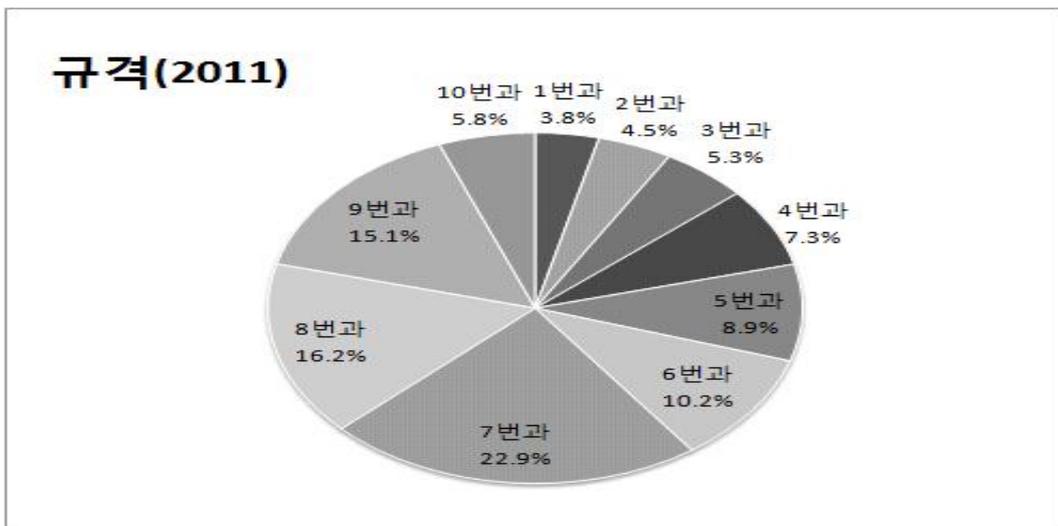


그림 5. 2011년 돌연변이 2차가지의 표준규격에 따른 과실 크기 분포. 1번과(51mm이하): 104; 2번과(51~54mm): 122; 3번과(54~56mm): 143; 4번과(56~58mm): 198; 5번과(58~60mm): 241; 6번과(60~62mm): 275; 7번과(62~66mm): 619; 8번과(66~70mm): 437; 9번과(70~77mm): 408; 10번과(77mm이상): 158.

2. 과실의 과형지수

온주밀감은 대체로 아래위로 살짝 눌린 구형이다. 따라서 종경보다 횡경이 크다. 같은 Citrus속이지만 레몬의 경우 종경이 더 긴 럭비공 모양을 하는 것도 있다. 제주에서 많이 재배되는 한라봉과 같이 꼭지깃 부분이 상당히 많이 볼록 튀어나와 종경이 길어지는 품종도 있다. 종경을 횡경으로 나눈 값을 하나의 외형적 특징을 나타내는 수치로 정하여 분류하였다.

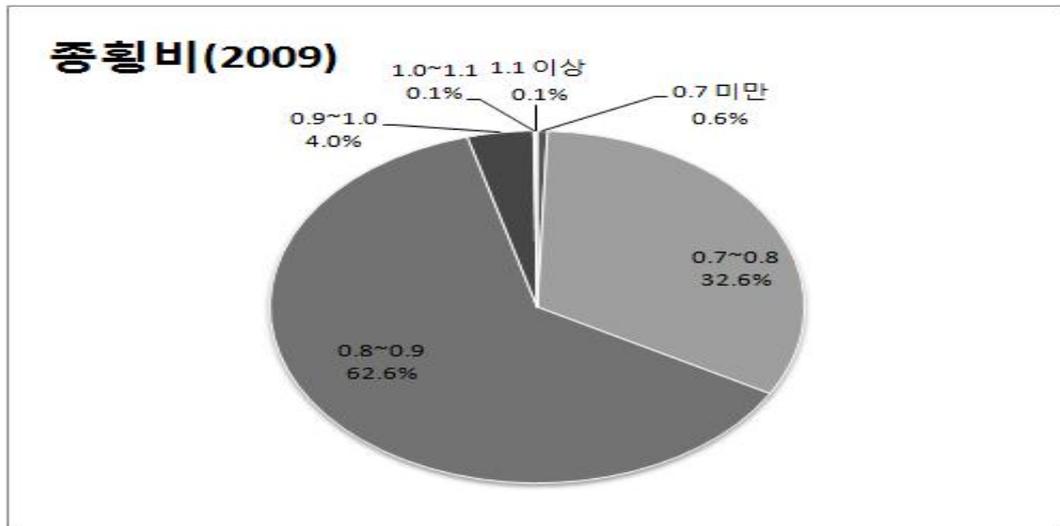


그림 6. 2009년 돌연변이 2차까지의 과형지수 분포. 0.7미만: 39; 0.7~0.8: 2,067; 0.8~0.9: 3,973; 0.9~1.0: 253; 1.0~1.1: 7; 1.1이상: 7.

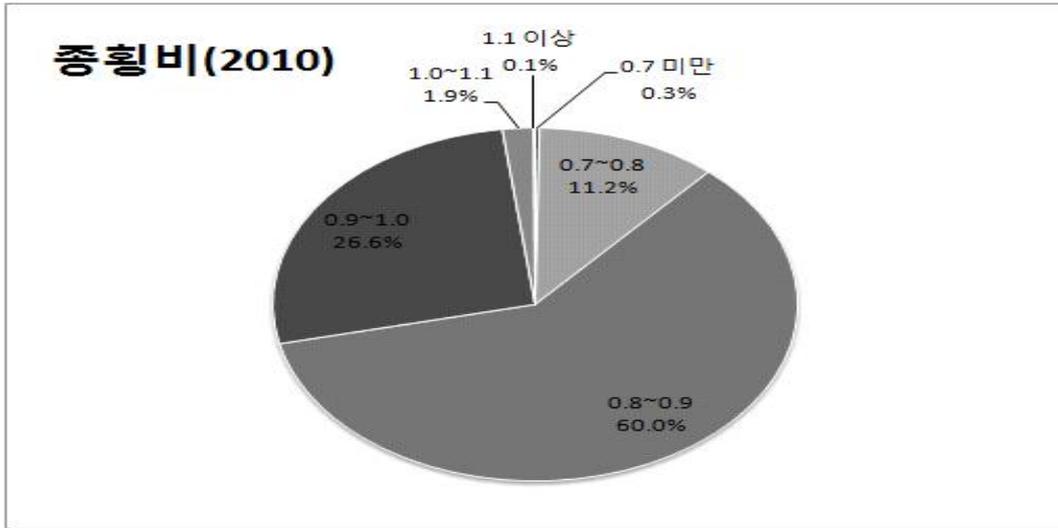


그림 7. 2010년 돌연변이 2차가지의 과형지수 분포. 0.7미만: 6; 0.7~0.8: 252; 0.8~0.9: 1,351; 0.9~1.0: 599; 1.0~1.1: 43; 1.1이상: 2.

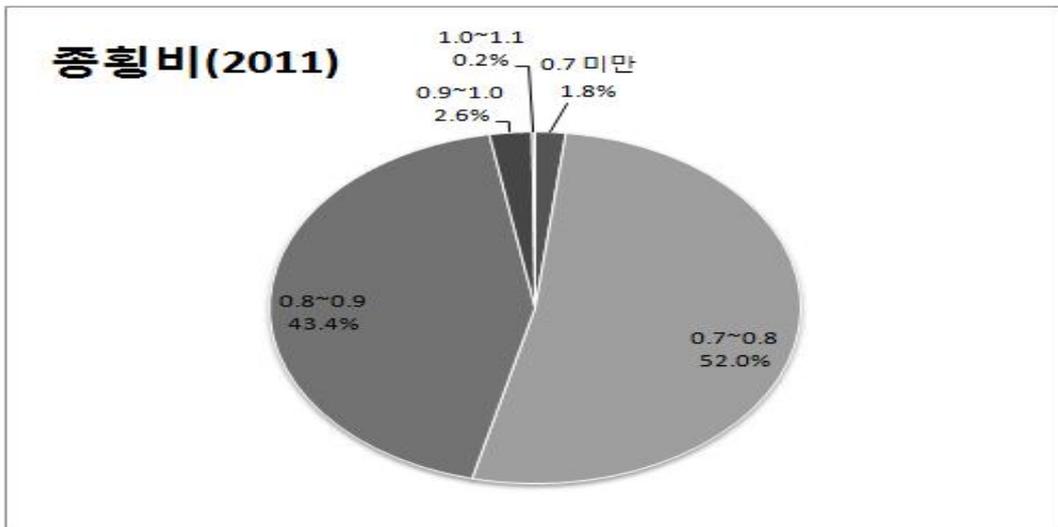


그림 8. 2011년 돌연변이 2차가지의 과형지수 분포. 0.7미만: 50; 0.7~0.8: 1,406; 0.8~0.9: 1,174; 0.9~1.0: 70; 1.0~1.1: 5; 1.1이상: 0.

3. 과실 당도

현재 국내 최고의 고품질 감귤브랜드인 ‘블로초’의 당도 기준이 12°Bx 이상이다. 그 기준을 통과하는 가지가 2009년과 2011년에는 각각 2.2%, 3.5%로 상당히 많은 양이 나왔으나 2010년에는 0.3% 밖에 되지 않았다. 2010년에는 해거리 현상으로 과실도 적게 달렸다.

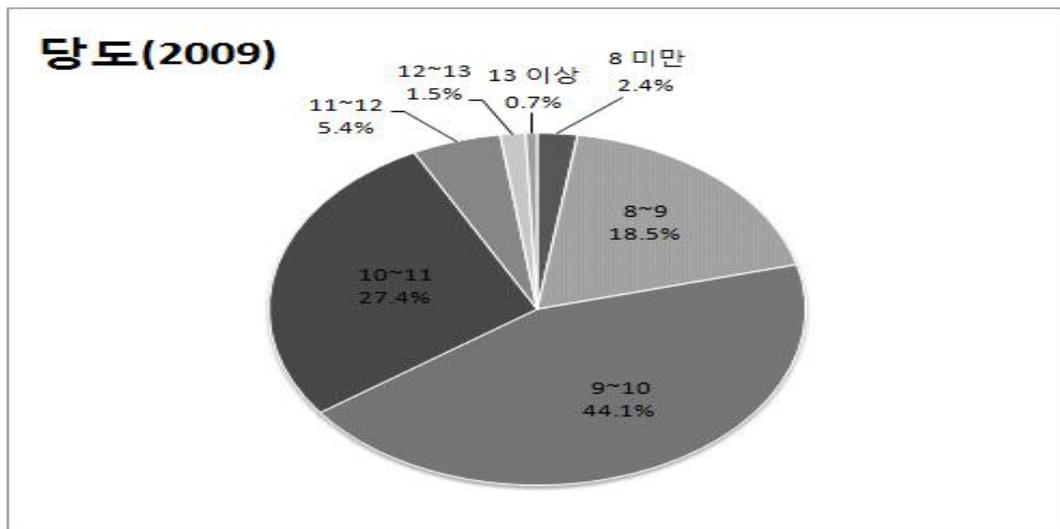


그림 9. 2009년 들연변이 2차까지의 당도 분포. 8°Bx 미만: 153, 8~9°Bx: 1,173; 9~10°Bx: 2,793; 10~11°Bx: 1,738; 11~12°Bx: 340; 12~13°Bx: 96; 13°Bx 이상: 44.

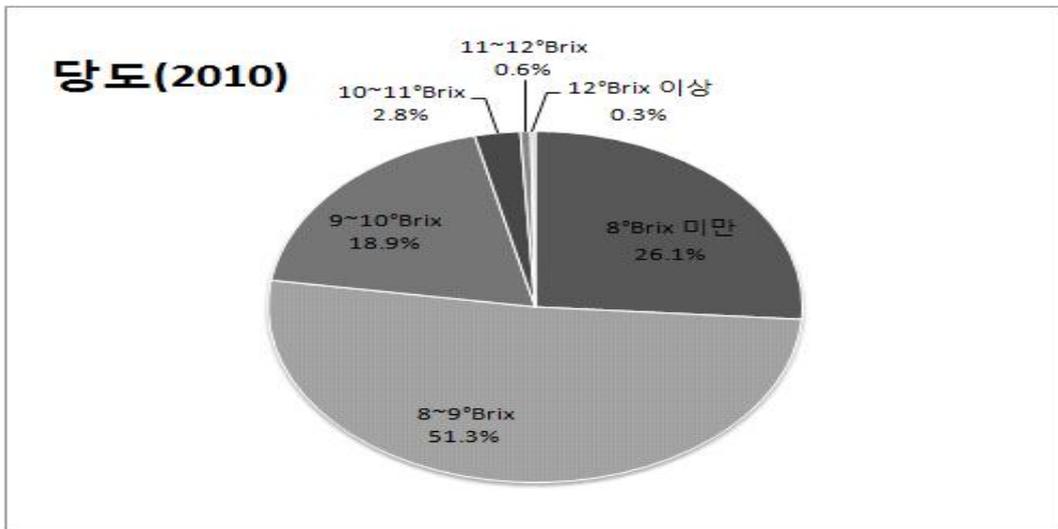


그림 10. 2010년 돌연변이 2차까지의 당도 분포. 8°Bx 미만: 588, 8~9°Bx: 1,154; 9~10°Bx: 426; 10~11°Bx: 62; 11~12°Bx: 14; 12°Bx 이상: 6.

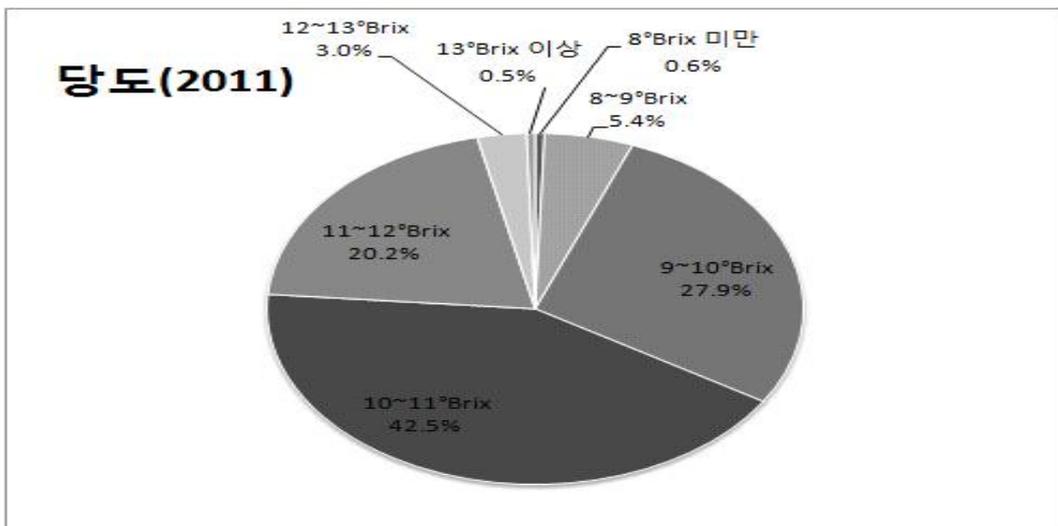


그림 11. 2011년 돌연변이 2차까지의 당도 분포. 8°Bx 미만: 15, 8~9°Bx: 145; 9~10°Bx: 756; 10~11°Bx: 1,150; 11~12°Bx: 547; 12~13°Bx: 80; 13°Bx 이상: 14.

4. 과실 산함량

산함량은 일반적으로 당도와 별도로 계산하지는 않지만 일반적인 감귤의 당도 기준으로 산함량이 1% 미만인 경우 감미가 좋고, 0.7% 미만이 되면 신맛이 거의 느껴지지 않는다고 한다. 앞서 언급한 ‘블로초’의 경우, 당도 12°Bx 이상, 산함량 1.0% 미만을 그 기준으로 한다.

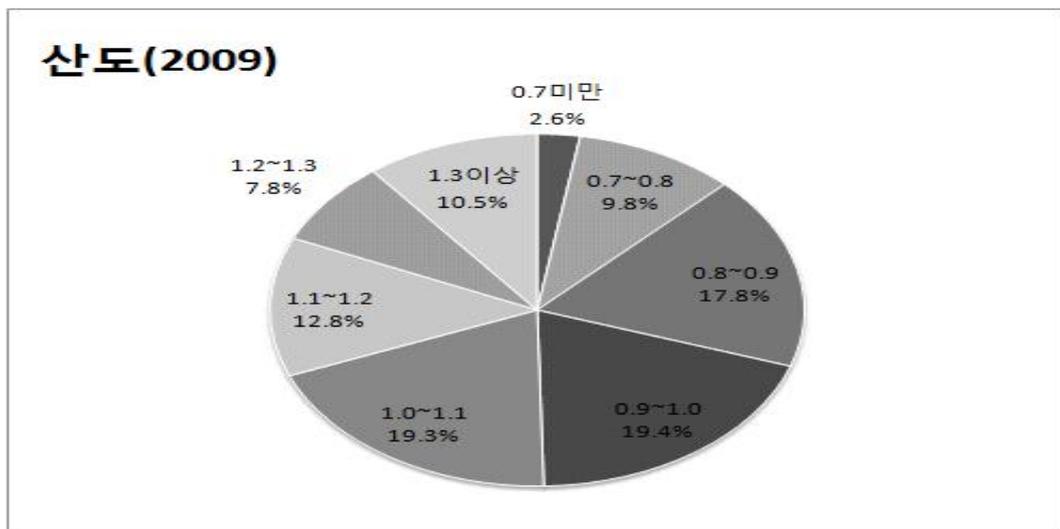


그림 12. 2009년 돌연변이 2차까지의 산함량의 분포. 0.7% 미만: 163; 0.7~0.8%: 620; 0.8~0.9%: 1,129; 0.9~1.0%: 1,232; 1.0~1.1%: 1,223; 1.1~1.2%: 810; 1.2~1.3%: 492; 1.3% 이상: 668.

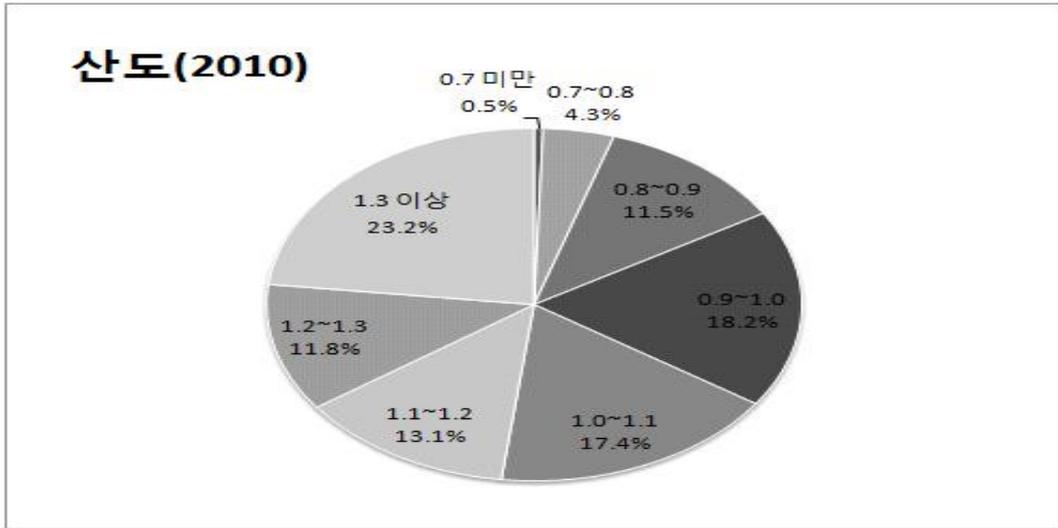


그림 13. 2010년 돌연변이 2차까지의 산함량의 분포. 0.7% 미만: 12; 0.7~0.8%: 96; 0.8~0.9%: 259; 0.9~1.0%: 410; 1.0~1.1%: 392; 1.1~1.2%: 295; 1.2~1.3%: 265; 1.3% 이상: 521.

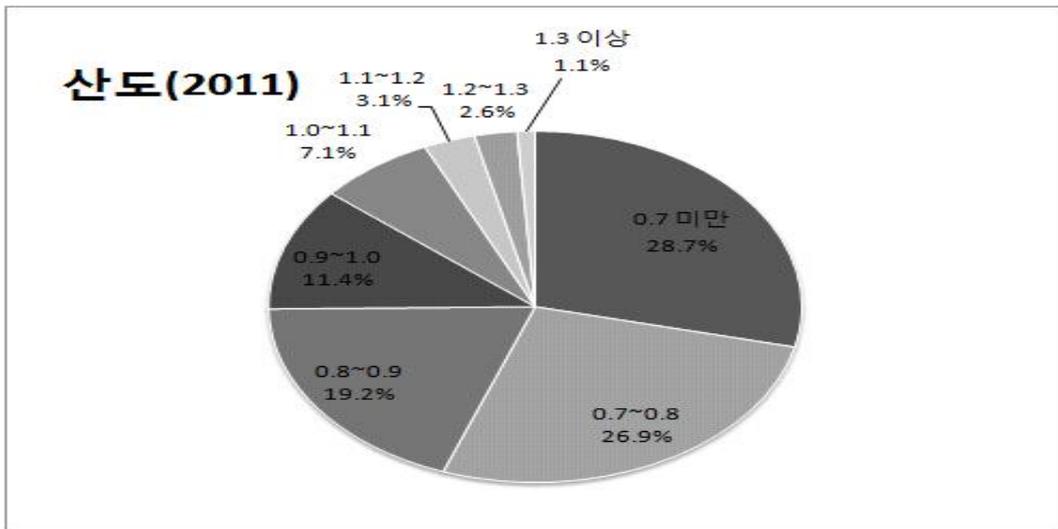


그림 14. 2010년 돌연변이 2차까지의 산함량의 분포. 0.7% 미만: 777; 0.7~0.8%: 728; 0.8~0.9%: 520; 0.9~1.0%: 308; 1.0~1.1%: 191; 1.1~1.2%: 84; 1.2~1.3%: 70; 1.3% 이상: 29.

5. 선발 가지

당산이 우수 하거나 외형적으로 특이한 것, 혹은 성숙 시기가 다른 것을 위주로 선발하였다. 가지상태에 따라 선발한 가지 전부에서 접수를 채취 할 수는 없었다. 아래의 표 1은 선발한 가지 중에 형질의 안정성 검증을 위하여 2013년 4월에 접수를 채취한 가지목록이다.

표 1. 선발하여 다른 대목에 접목한 돌연변이 2차가지

가지 번호	우수 형질	선발년도		
		2009	2010	2011
A0336	당산 우수			○
A1504	당산 우수	○		
A3013	외형 특이, 저장성 증가	○	○	
B0314	당산 우수			○
B0317	당산 우수			○
B1606	당산 우수			○
B9205	당산 우수			○
C1414	당산 우수			○
C5623	당산 우수			○
C6507	당산 우수			○
C6519	당산 우수			○
C6522	당산 우수			○
C6821	당산 우수			○
E0409	당산 우수			○
E0412	당산 우수		○	
E2211	초록색	○		
E2304	홍색, 고산	○		
E2320	대과, 당산 우수	○		
G0101	당산 우수, 저산	○		
G0214	당산 우수, 극저산	○		
G0302	대과, 당산 우수, 극저산	○		
G0309	대과, 당산 우수, 극저산	○		

continued from previous page.

G1306	고당		○	
G1309	당산 우수		○	
G1404	당산 우수	○		
G1405	당산 우수	○		
G1514	당산 우수	○		
G1904	대과, 당산 우수	○		
H0116	당산 우수	○		
H0118	당산 우수		○	
H0304	당산 우수	○		
H0313	당산 우수	○		
H1201	당산 우수		○	
H1202	당산 우수		○	
H2507	초록색, 당산 우수	○		
I1404	당산 우수		○	
J1208	홍색, 익엽		○	○
J1209	홍색, 익엽		○	○
K0308	당산 우수	○		
K0708	당산 우수	○		
K1405	당산우수 저산	○		
K1619	당산 우수			○
K1820	당산 우수			○
K2005	당산 우수, 저산	○		
K2006	당산 우수, 저산	○		
L0105	고당		○	

6. 엽육 및 과피 조직

1) 엽육조직



그림 15. 감귤 돌연변이체와 control 식물체 엽맥의 차이(엽기부)

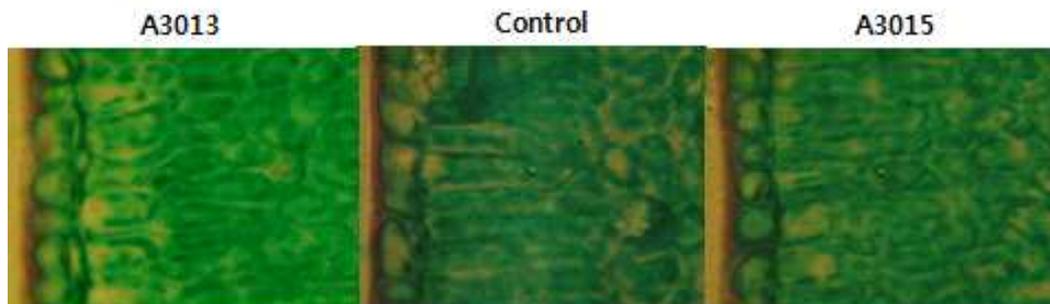


그림 16. 감귤 돌연변이체와 control 식물체 책상조직의 차이(엽중양부)

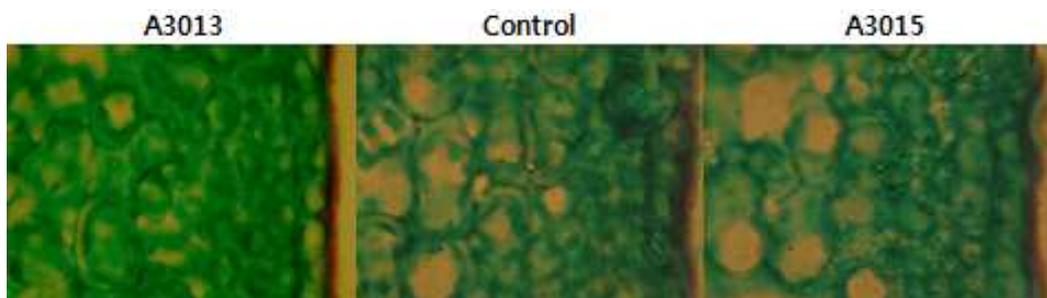


그림 17. 감귤 돌연변이체와 control 식물체 해면상조직의 차이(엽중양부)



그림 18. 감귤 돌연변이체와 control 식물체 엽맥의 차이(엽선부)



그림 19. 감귤 돌연변이체와 control 식물체 유관속의 차이(엽선부)

물관부 세포와 체관부 세포의 뚜렷한 차이를 발견할 수 없다.



그림 20. 감귤 돌연변이체와 control 식물체 엽육의 차이(엽선부)

엽육조직은 그림 20과 같이 A3013은 control에 비해서 엽육조직의 두께가 약간 두껍다.

2) 과피조직

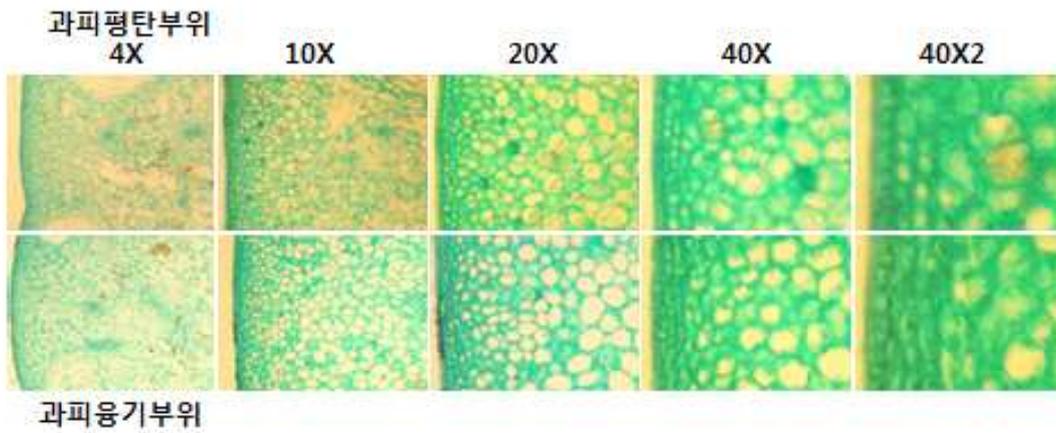


그림 21. A3013 과피 평탄부위와 과피 융기부위의 차이

A3013 변이체의 과실은 과피가 과실의 길이방향으로 융기된 부분이 있는데 과피의 평평한 부분과 융기된 부분사이에 해부형태학적 차이의 유무를 관찰하였다. 그 결과 평평한 부분에는 세포가 파괴된 세포간극이 많이 발달되어 있는데 비하여 융기된 부분에는 유관속이 많이 분포하고 있었다.

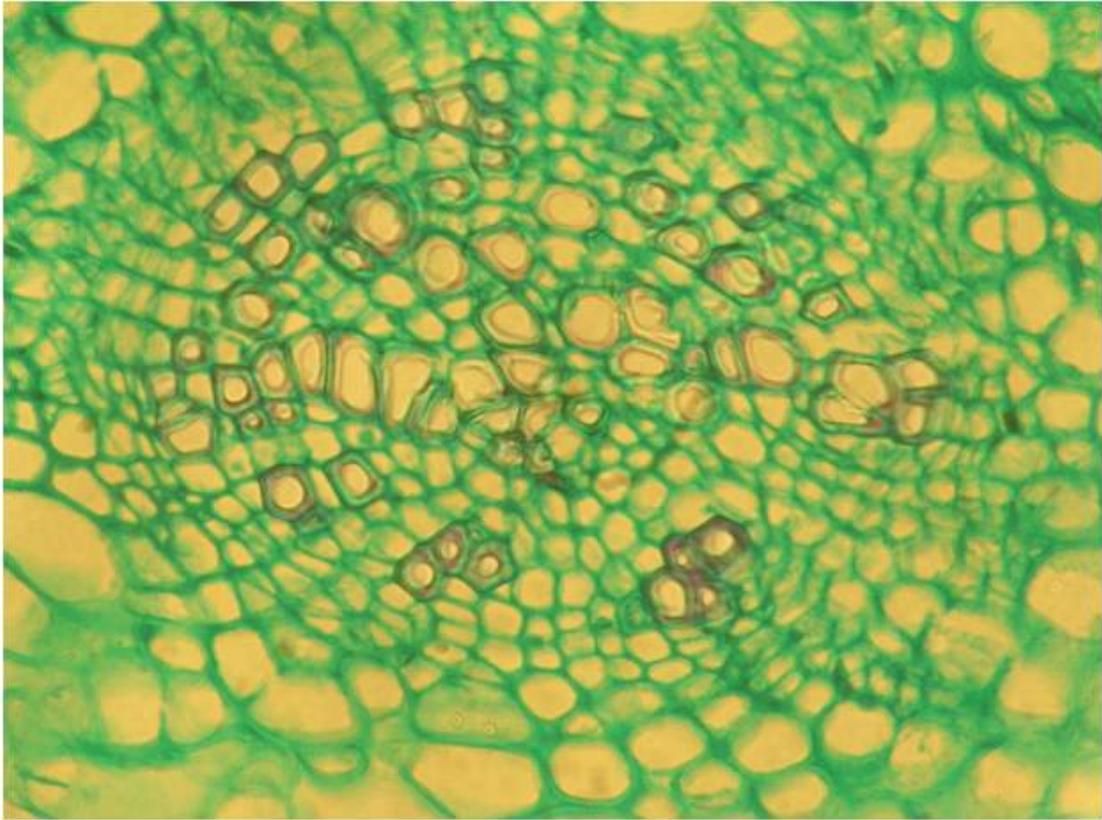


그림 22. A3013 과피 유통부위의 발달된 유관속

그림 22의 A3013의 과피 유통부에 발달된 유관속은 중앙에 물관부가 있고 주위에 체관부가 있는 외사포위 유관속이며 물관부가 많이 분포되어 있었다.

Part 2. 돌연변이 감귤
A3013의 유전적 분석

IV. 재료 및 방법

1. 식물 재료

2009년, 2010년, 2011년 3년간의 조사를 바탕으로 특이한 외형적 변이를 보인 감귤 가지 하나를 선택하여 그 과실과 일반 궁천조생의 과실을 수확기에 따서 초저온(-70℃)에 보관하였다. 이 과실을 Microarray 분석에 사용하였다. A3013은 2011년도에 충분히 많이 달리지 않았다. 2011년도에 달린 몇 개의 과실은 유전적 분석을 위하여 사용했기 때문에 형질 조사 수행을 위한 과실이 없었다.



그림 23. Microarray 분석한 돌연변이 감귤 A3013.

표 2. 연도별 A3013의 형질.

년도	종경 (mm)	횡경 (mm)	과중 (g)	당도 (°Bx)	산함량 (%)	색도		
						L	a	b
2009	62.0 ±1.3	80.6 ±1.5	179.9 ±6.8	8.5 ±0.1	0.76 ±0.02	66.15 ±0.75	26.76 ±2.45	67.52 ±1.33
2010	54.8 ±1.9	66.5 ±2.1	131.6 ±11.0	7.8 ±0.1	0.78 ±0.02	68.22 ±0.47	24.53 ±1.06	74.19 ±0.78

2. RNA 분리 및 cDNA 합성

1) RNA 분리

실험군(A3013)과 대조군의 과실을 각각 액체질소를 사용하여 곱게 마쇄하였다. 마쇄한 조직을 튜브에 옮기고, 조직 1g당 RNAiso plus(TAKARA, Japan) 30ml를 첨가하였다. 이를 상온에 5분간 둔 후, 4℃, 12,000×g로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 새 튜브로 옮기고 cholroform 0.2 volume을 첨가하고 강하게 섞어주었다. 다시 상온에 5분간 두었다가 4℃, 12,000×g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 덜어서 새 튜브로 옮기고 isopropanol을 RNAiso plus 넣었던 양의 동량으로 첨가하였다. 상온에 10분간 두고나서 4℃, 12,000×g로 10분간 원심분리 하였다. Pellet만 남기고 액을 제거한 후, 제거한 액만큼 차가운 75% EtOH를 넣었다. 4℃, 7,500×g로 5분간 원심분리 하고 다시 pellet만 남기고 나머지는 제거하였다. 진공펌프를 이용하여 15분간 건조시키고 DEPC-treated water에 녹였다.

2) cDNA 합성

분리한 RNA는 전기영동으로 확인한 후, cDNA 합성에 사용하였다. Template RNA 1 μ g과 Oligo(dT) primer 300pmol에 DEPC-treated H₂O를 총 10 μ l가 되도록 넣어 맞추었다. 65℃에 5분간 둔 후, 얼음에 꽂아 빠르게 식혔다. 여기에 5× RTase M-MLV buffer(TAKARA, Japan) 4 μ l, 각각 10 mM인 dNTP mixture 1 μ l, RNase inhibitor 20units, RTase M-MLV (RNase H⁻)(TAKARA, Japan) 200units을 첨가하고 DEPC-treated H₂O로 총 20 μ l를 맞추었다. 부드럽게 섞어주고 42℃에서 60분간 반응시켰다. 바로 70℃에서 10분을 더 준 후, 얼음에 꽂아 식혔다.

3. Microarray

발현 프로파일은 The Citrus 300k Microarray V.2로 수행하였다. National Center for Biotechnology Information(NCBI)로부터 Citrus clementina 118,365개, Citrus reticulata 55,980개, Citrus sinensis 208,909개, Citrus unshiu 19,066개의 Expressed Sequence Tag(EST)들을 다운로드 받아서 감귤류 전체에 사용할 수 있도록, 85,231개의 일치하는 서열을 생성하였다. 기존의 coding sequence(CDS)안에서 4개의 probe를 설계하던 V.1과 달리 각 유전자의 끝에서 60bp 앞과 종결코돈에서 시작하는 서열, 앞의 두 서열과 30bp씩 겹치는 서열 3가지로 설계되었다. 324,164개의 이들 일치 서열들로부터 probe 서열을 추출하였고 gfp, gus, hyg, bar, kan와 같은 Selection marker들도 포함시켜 125,956 probe를 디자인하였다. probe의 평균 길이는 60-nt, Tm 값은 75℃에서 85℃로 조절되었다.

Microarray는 NimbleGen Inc.(<http://nimblegen.com/>)에서 제조되었다.

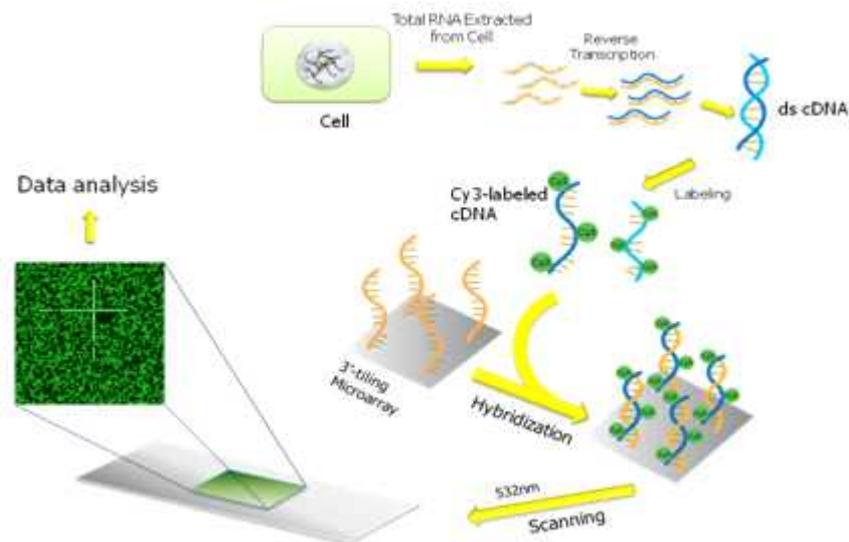


그림 24. Microarray 실험방법 모식도

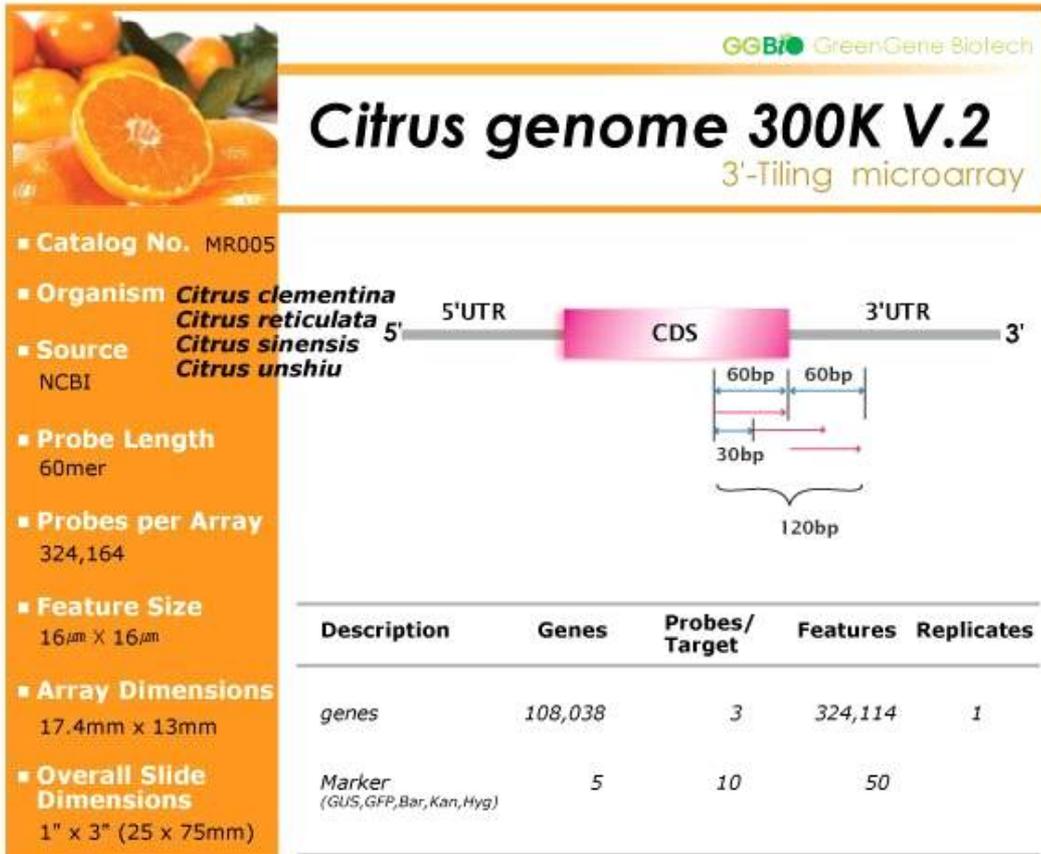


그림 25. Citrus 300K Ver.2 Microarray probe 디자인

4. Real-Time PCR

1) Primer design

Target은 발현차가 2배 이상인 EST 중 임의로 5가지를 골랐다. 해당 EST의 CDS로부터 아래와 같이 primer를 디자인하였다. House keeping gene으로는 Elongation factor 1- α 를 선택하였다.

표 3. Microarray confirm용 primer 서열

Target	Fold change	Primer
Citrus_EST C030831	2.50	TATTGGGAACGGACGCAGGT GCCCCATCATCTCCTTCCT
Citrus_EST C002695	2.47	ATGGCACGCGCGATACTTTT GCCGCCGAGAGTTGGAATA
Citrus_EST C007308	-2.46	TGTGCATTTGTGGTGGCTCA CATATGACACCGGCCCATCC
Citrus_EST C042845	-2.86	CTGCTGCTGGCTGCTCTGAA AGGCCGCACATAGAGCTTGC
Citrus_EST C007840	-3.38	TTCAAGGGCGAAACCAAGGA CTGGCGCTGAGAGTCGTTGA
Elongation factor 1- α		ATTGACAAGCGTGTGATTGAGC TCCACAAGGCAATATCAATGGTA

2) 방법

Optical Tube(Agilent Technologies, Great Britain)에 Ultra pure Water 7 μl , iQ™ SYBR® Green Supermix(BIO-RAD) 10 μl , cDNA 1 μl , primer쌍 각각 1 μl 을 넣고 Spin down 하였다. Thermal Cycler Dice Real Time System Lite TP700(TAKARA, Japan)를 이용하여 Real-Time PCR하였다.

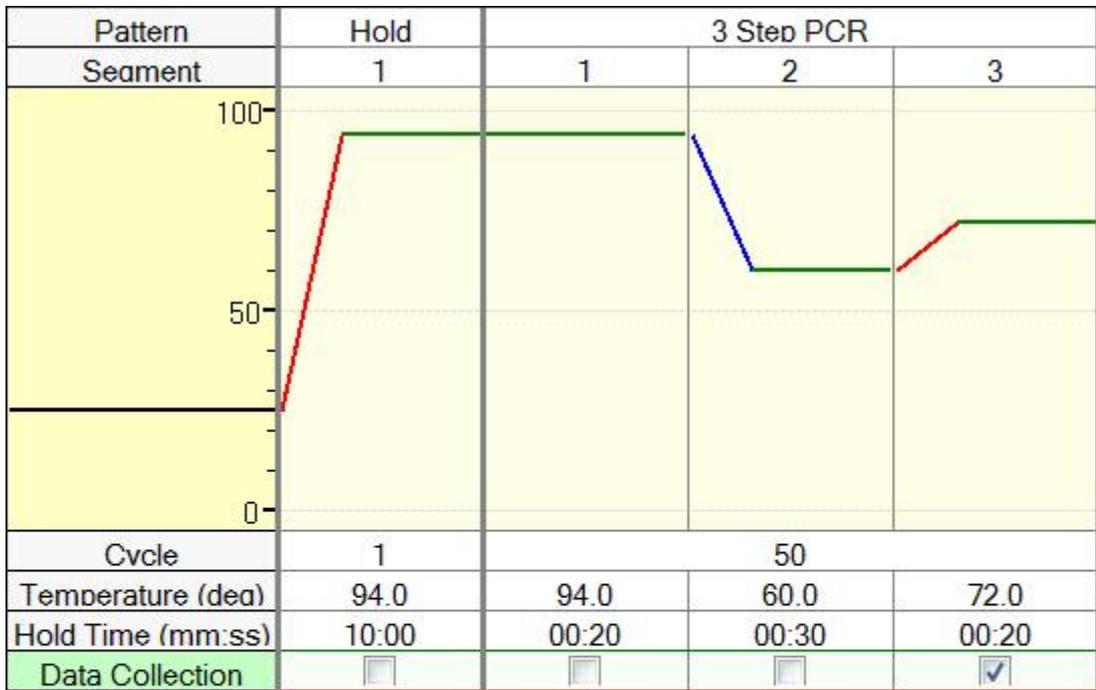


그림 26. Real-Time PCR thermal profile setup

V. 결과 및 고찰

1. 과실 total RNA

A3013 과실로부터 분리한 total RNA는 $0.096\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이고 순도는 1.71이다.
Control 과실로부터 분리한 total RNA는 $0.088\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이고 순도는 1.83이다.

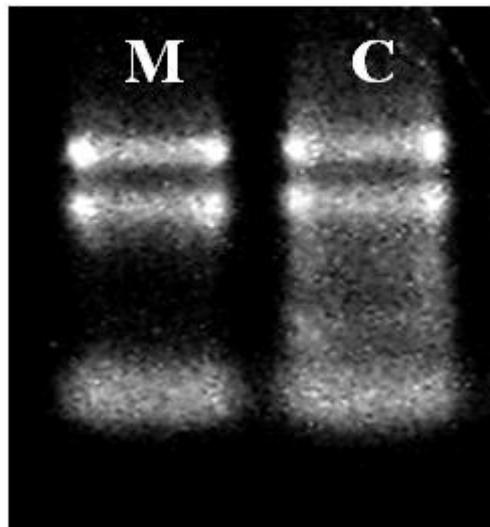


그림 27. Total RNA of Citrus. 1% agarose gel. M: a3013, C: control.

2. The Citrus 300K V.2 Microarray

표 4. Significantly changed Genes. Fold change가 2이상 이고, P value가 0.05미만인 Gene를 선택하였다.

Up regulation	Down regulation	전체 유의유전자수
18	339	357

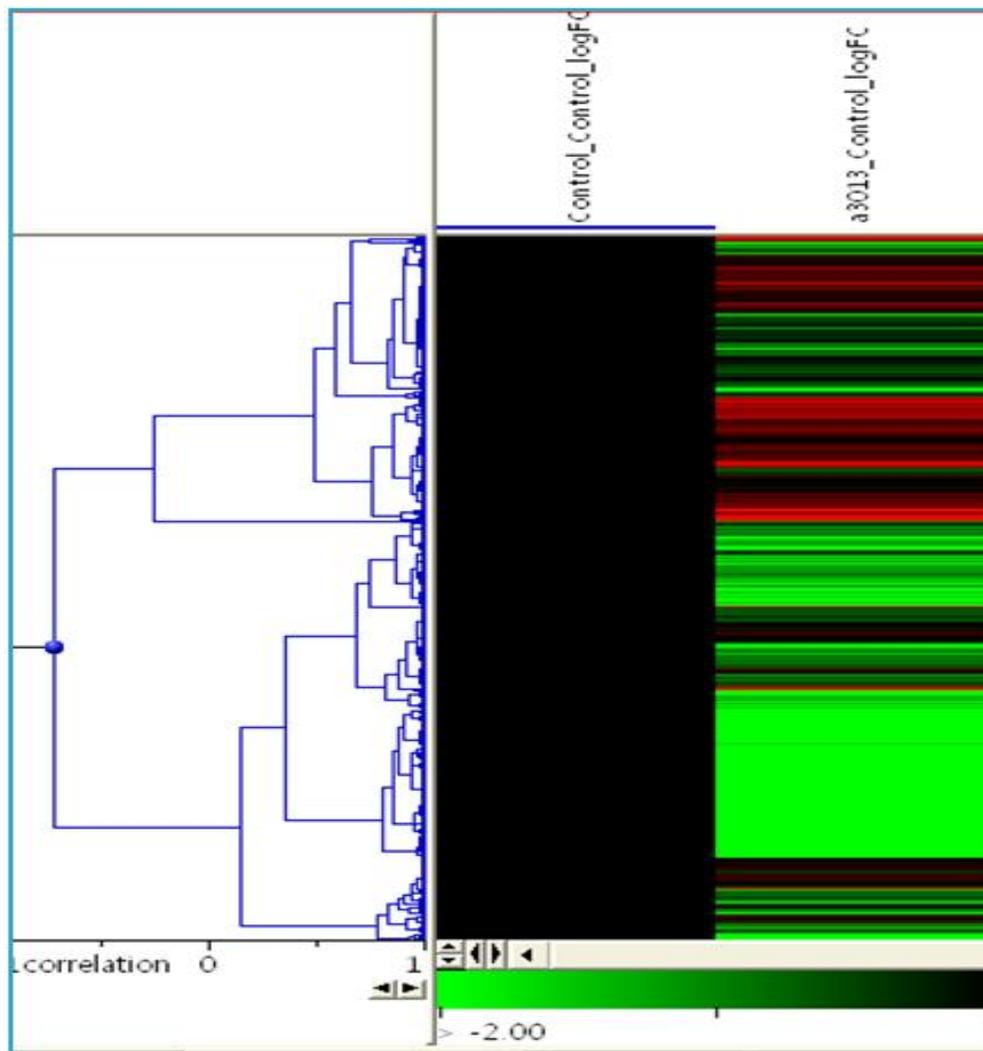


그림 28. Hierarchical Clustering. (log2 ratio 이용)

1) Clusters of Orthologous Groups(COG) analysis

☒ 5. COG analysis

COG	COG Definition	Fold up	Fold down
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING			
J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	69	42
A	RNA processing and modification	63	33
K	Transcription	72	58
L	Replication, recombination and repair	31	32
B	Chromatin structure and dynamics	20	10
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING			
D	cycle control, cell division, chromosomepartitioning	24	8
Y	Nuclear structure	8	4
V	Defense mechanisms	12	9
T	Signal transduction mechanisms	132	117
N	Cell motility	16	20
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesisN	1	0
Z	Cytoskeleton	25	23
W	Extracellular structures	1	4
U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	92	74
O	Posttranslational modification, protein turn-over, chaperones	147	128
METABOLISM			
C	Energy production and conversion	67	69
G	Carbohydrate transport and metabolism	100	102
E	Amino acid transport and metabolism	75	67
F	Nucleotide transport and metabolism	20	8
H	Coenzyme transport and metabolism	22	26
I	Lipid transport and metabolism	65	92
P	Inorganic ion transport and metabolism	38	64
Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	59	102
POORLY CHARACTERIZED			
R	General function prediction only	268	243
S	Function unknown	96	66
Total		1,375	1,278

2) Transcription factor(TF) analysis

㉮ 6. TF up regulation

SEQ ID	pfam ID	pfam abb.	Description
Citrus_EST C030728	pfam00249	Myb_DNA- binding	Myb-like DNA-binding domain
Citrus_EST C037955	pfam05368	NmrA	NmrA-like family
Citrus_EST C038124	pfam00097	zf-C3HC4	Zinc finger
Citrus_EST C042485	pfam00249	Myb_DNA- binding	Myb-like DNA-binding domain
Citrus_EST C042486	pfam00249	Myb_DNA- binding	Myb-like DNA-binding domain

㉞ 7. TF down regulation

SEQ_ID	pfam ID	pfam abb.	Description
Citrus_ESTC 002050	pfam03106	WRKY	WRKY DNA -binding domain
Citrus_ESTC 002903	pfam00646	F-box	F-box domain
Citrus_ESTC 004722	pfam05368	NmrA	NmrA-like family
Citrus_ESTC 007533	pfam05624	LISCH7	LISCH7. This family consists of mammalian LISCH7 protein homologues. LISCH7 is a liver-specific BHLH-ZIP transcription factor..
Citrus_ESTC 010164	pfam00319	SRF-TF	SRF-type transcription factor (DNA-binding and dimerisation domain)
Citrus_ESTC 011761	pfam04621	ETS_PEA3_N	PEA3 subfamily ETS-domain transcription factor N terminal domain
Citrus_ESTC 038111	pfam00646	F-box	F-box domain
Citrus_ESTC 043244	pfam05712	MRG	MRG
Citrus_ESTC 049836	pfam00646	F-box	F-box domain
Citrus_ESTC 051050	pfam05764	YL1	YL1 nuclear protein
Citrus_ESTC 054447	pfam00646	F-box	F-box domain
Citrus_ESTC 057315	pfam08347	CTNNB1_binding	N-terminal CTNNB1 binding
Citrus_ESTC 065028	pfam03381	CDC50	LEM3 (ligand-effect modulator 3) family / CDC50 family
Citrus_ESTC 066049	pfam00046	Homeobox	Homeobox domain
Citrus_ESTC 066750	pfam04621	ETS_PEA3_N	PEA3 subfamily ETS-domain transcription factor N terminal domain
Citrus_ESTC 068692	pfam05764	YL1	YL1 nuclear protein
Citrus_ESTC 082941	pfam07777	MFMR	G-box binding protein MFMR
Citrus_ESTC 109209	pfam08347	CTNNB1_binding	N-terminal CTNNB1 binding

3. Real-Time PCR

Elongation factor 1- α 의 실험군과 대조군 사이의 Ct값 차이가 0.34로 0.5보다 작아 거의 동량임이 인정된다. Citrus_ESTC030831은 Microarray fold값에 비해 Real-Time PCR에서는 Ct값 차가 크게 나지 않지만 Microarray와 Real-Time PCR에서 모두 실험군에서 발현량이 높은 것을 알 수 있다. 그 외의 다른 EST는 Real-Time PCR에서도 Microarray 결과와 유사하게 발현차를 보여주고 있다.

표 8. Target 유전자별 A3013(M)과 대조구(C) 간 Real-Time PCR Ct값 비교

Target	Microarray Fold change	Sample	Ct	Ct(C)-Ct(M)
Citrus_EST C030831	2.50	A3013	35.30	0.43
		Control	35.73	
Citrus_EST C002695	2.47	A3013	28.36	1.29
		Control	29.65	
Citrus_EST C007308	-2.46	A3013	26.73	-0.91
		Control	25.82	
Citrus_EST C042845	-2.86	A3013	28.84	-1.78
		Control	27.06	
Citrus_EST C007840	-3.38	A3013	41.87	-2.22
		Control	39.65	
Elongation factor 1- α		A3013	27.44	0.34
		Control	27.78	

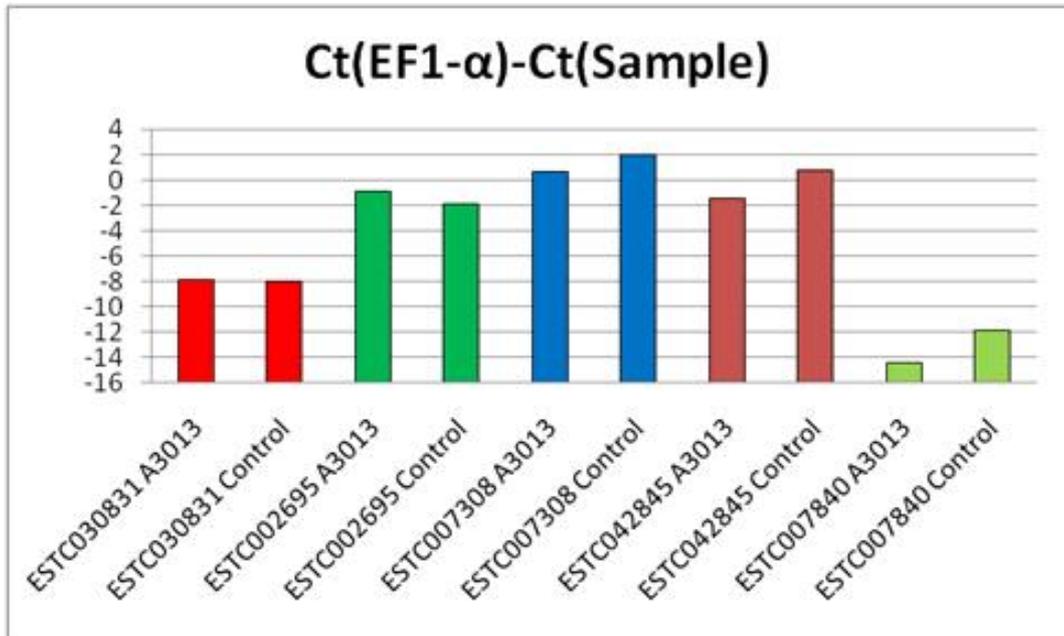


그림 29. 유전자별 A3013과 대조구 간 Real-Time PCR Ct값 비교 그래프

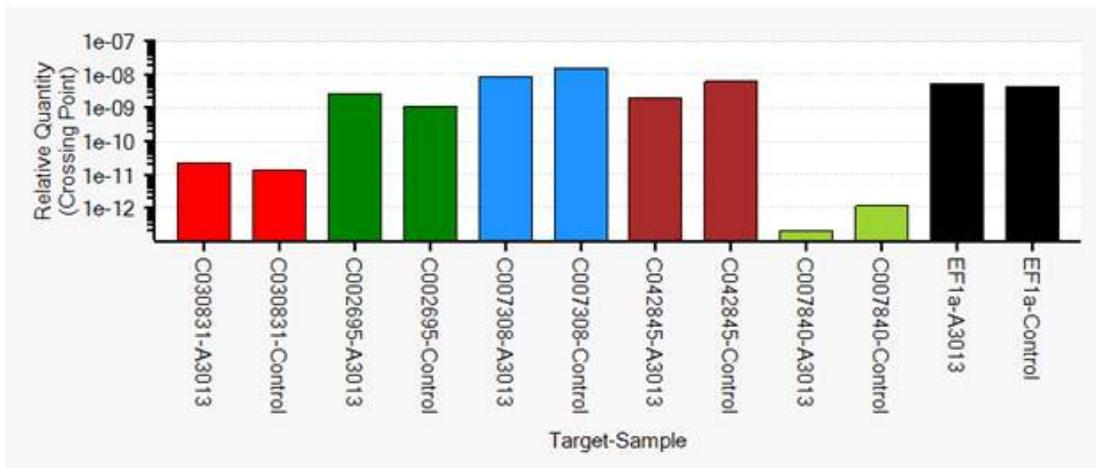


그림 30. Real-Time PCR Relative Quantity (Crossing Point)

VI. 요약

변화하는 국제적 정세에 따라 고품질 국산품종의 감귤이 필요로 하게 되었다. 이에 따라 본 연구에서는 국내에서 가장 많이 재배되는 온주밀감 품종인 궁천조생을 바탕으로 이온화 방사선(^{60}Co)을 이용하여 돌연변이 육종을 수행하였다.

궁천조생으로부터 접수를 채취해 이온화 방사선(^{60}Co)으로 돌연변이를 유도하였다. 돌연변이 유도된 접수를 다시 궁천조생 성목에 접목하여 재배하였다. 접수로부터 올라온 2차가지마다 번호를 부여하였다. 2009년부터 각각의 2차가지마다 과실을 5개까지 채취하였다. 2009년에는 총 6,345개의 돌연변이 2차가지에서 과실 23,175개를 채집하였고, 2010년에는 2,257개의 가지에서 6,651개의 과실을, 2011년에는 2,710개의 돌연변이 2차가지에서 11,411개의 과실을 채집하였다. 채집한 과실에서 과실 크기(중경, 황경), 무게, 과피 두께, 당도, 산함량, 색도를 측정하였다. 측정한 데이터를 바탕으로 다수의 돌연변이 2차가지를 선발하여, 형질의 안정성 테스트에 들어갔다. 그 중 외형적 변화가 큰 A3013의 엽육조직과 과피조직의 절단면 현미경 관찰도 수행하였다. 그 결과, 엽육조직의 물관과 체관부에서는 뚜렷한 차이가 없지만 control보다 엽육조직이 두꺼운 것을 확인할 수 있었다. A3013 변이체의 울퉁불퉁한 과피조직의 경우는 평평한 부분에는 세포간극이 많이 발달되어 있는데 비하여 융기된 부분에는 유관속이 많이 분포하는 것을 볼 수 있었다.

A3013이 외형적 특징이 확연할 뿐 아니라 저장성도 좋다. 이 개체를 Microarray를 이용하여 유전적 분석을 해보았다. Microarray 데이터를 바탕으로 Hierarchical Clustering, COG(Clusters of Orthologous Groups) analysis, TF(Transcription factor) analysis를 수행하였다. Microarray 결과에 신빙성을 더하기 위하여 Real-Time PCR을 이용한 confirm을 수행하였다. 발현차가 2배 이상인 EST 중에 임의로 5개를 선정하여 primer를 제작하였다. 5개의 EST가 Microarray와 Real-Time PCR에서 유사한 결과를 보여줌을 확인하였다.

VII. 참고문헌

Choi KJ. (2002) International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV) and Its 1991 Convention. Korean journal of horticultural science & technology. 20(2):151-159.

Ko SB. (2011) A Study on the Technology Evaluation of Development of New Variety of Citrus. The Korea Academia-Industrial cooperation Society. 2011(2):781-784.

Lee YK, Chang HH, Jang YS, Huh JH, Hyung SW, Chung HY (2004) Microarray Analysis of Radiation Related Gene Expression in Mutants of *Bacillus lentimorbus* WJ5 Induced by Gamma Radiation. Korean journal of environmental biology. 22(3):472-477.

Lee IS, Kim DS, Choi SR, Song HS, Lee SJ, Lim YP, Lee YI. (2003) Selection and Agronomics Characterization of Radiation-Induced Variants in Rice. Korean journal of plant biotechnology. 30(3):227-232.

Park JW, Boo JH, Jin SB, Al Bachchu MA, Yun SH, Kim YW, Lee DS, Lee HY, Riu KJ, Kim JH. (2010) Expression Profiling of Cultivar-related Genes in Satsuma Mandarins, Miyagawa Wase and Ueno Wase. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 53(6):691-701.

Romanowski, T., A. Markiewicz, N. Bednarz, K. P. Bielawski. (2007) Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR. Postepy Hig Med Dosw. (online), 2007; 61: 500-510.

Son YJ. (2012) A Study on the Priority and Evaluation Criteria of Domestic Support Measures according to FTA. *International Commerce and Information Review*. 14(1): 301-314.

Stadler LJ. 1928. Mutations in barley induced by x-rays and radium. *Science* 68: 186-187.

Yan, J., F. Yuan, G. Long, L. Qin, Z. Deng. (2010) Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis in citrus. *Molecular Biology Reports*. DOI 10.1007/s11033-011-0925-9.

Yun SH, Kim SJ, Kim HY, Park JH, An HJ, Kang SK, Moon YI, Kim KS, Koh SW, Kim CM, Lee DH (2008) A New Early Maturing Satsuma Mandarin Cultivar, 'Haryejosaeng'. *Korean journal of breeding*. 40(2):184-187.

김창명. (2006) 제주 감귤 산업의 발전 전략. *식품저장과 가공산업*. 5(2):2-11.

박형순. (2008) 품종보호 배경과 제도. *한국조경수협회*. 102:38-42.

2011년산 감귤유통처리분석. (2012) 제주특별자치도 감귤출하연합회.

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 끝없는 정성과 인내, 책임감으로 저를 지도하고 이끌어주신 김인중 교수님께 먼저 감사의 인사를 올립니다. 포기할 뻔한 저를 다시 일으켜 세우시고 꾸짖어주시고 희망을 보여주신 것에 다시 한번 감사드립니다.

그리고 바쁘신 와중에도 저의 논문을 봐주시고 조언해주신 김민영 교수님, 제주특별자치도농업기술원 김영효 박사님께 감사드립니다.

제가 슬럼프에 빠져 힘들어할 때 격려해주고 조언해주며 같이 해법을 찾아봐주시고 도와주신 연구실의 서수정 박사님, 허지만 선배님, 송승엽 선배님, 이성훈 선배님, 그리고 김성우, 김종성에게도 감사드립니다. 또한 가까이에서 함께 하는 것만으로도 많은 힘이 되어주던 대학원 여러 선배님들, 동기와 후배들, 학과 조교 선생님에게도 감사의 인사를 드립니다.

마지막으로 제게 삶을 주시고 언제나 사랑과 믿음으로 지켜봐주신 부모님과 희망찬 내일을 이야기하며 힘이 되어주던 친구들에게도 감사의 마음을 전하며 이 논문을 바칩니다.