



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

일반 탱자 및 비룡 탱자에서 자가수정  
및 주심배 유래의 구분 SSR 마커 선발

제주대학교 일반대학원

원 예 학 과

김 성 연

2023 년 2 월

일반 텡자 및 비룽 텡자에서 자가수정 및  
주심배 유래의 구분 SSR 마커 선발

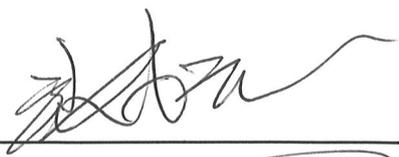
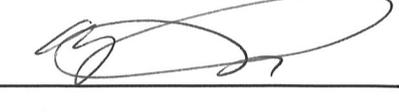
지도교수 송 관 정

김 성 연

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함

2022년 11월

김성연의 농학 석사학위 논문을 인준함

|       |           |                                                                                      |
|-------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 심사위원장 | 한 상 현 교수님 |  |
| 위 원   | 오 욱 교수님   |  |
| 위 원   | 송 관 정 교수님 |  |

제주대학교 일반대학원

2022년 11월

**Development of SSR Markers to Identify Self-  
fertilized and Nucellar Seedlings in Common Trifoliate  
Orange and Flying Dragon**

**Sung Yeon Kim**

(Supervised by professor **Kwan Jeong Song**, Ph.D)

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

**2022. 11**

This thesis has been examined and approved.

**DEPARTMENT OF HORTICULTURAL SCIENCES**

**GRADUATE SCHOOL**

**JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

## ABSTRACT

Most citrus rootstocks in Korea are seedlings of trifoliolate orange. It is mainly known as nucellar origin, but at a low rate, self-fertilized origins are mixed, and it is hard to identify visually. If some self-fertilized seedlings are mixed, the nonuniformity of citrus planting stocks will appear. Therefore, this study was conducted to evaluate the frequency of self-fertilized seedlings and to improve the uniformity of seedlings through selected SSR markers that identify nucellar and self-fertilized seedlings in trifoliolate oranges. Fifty-seven SSR markers based on the transcript analysis of twisted 'Flying Dragon (*Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon)' and straight Flying Dragon originated from self-fertilization, fifty-three SSR markers reported for distinguishing citrus varieties in Korea, and seven polymorphic SSR markers of trifoliolate orange reported abroad were included and applied. Twenty SSR markers were selected, identifying that they were heterozygous in the twisted Flying Dragon and homozygous in the straight Flying Dragon. A total of seven representative SSR markers, capable of double checking in one plant, were finally selected. As a result of origin analysis by applying the selected SSR markers to common trifoliolate oranges, more self-fertilized origins were detected from small plants than large plants when two seedlings were grown from one seed. In particular, the biggest plant did not have a self-fertilized origin when several plants were grown from one seed sown in vitro. Also, when the frequency of self-fertilized seedlings was evaluated in the first year and second year nursery, the self-fertilized origin was detected with 4.0% in large seedlings and 26% in small seedlings in the 1st year after sowing. Plants with poor growth were rogued and degenerated in the second year after sowing, and their self-fertilized origins were identified at a rate of 5.5%. The origin of citrus rootstocks was efficiently identified in this study using SSR markers. Utilizing these will not only increase the uniformity of the production of citrus planting stocks, but also make it possible to detect whether self-fertilized rootstocks influence plants with nonuniform growth of citrus.

# 목 차

|                                                   |     |
|---------------------------------------------------|-----|
| <b>ABSTRACT</b> .....                             | i   |
| 목 차 .....                                         | ii  |
| <b>LIST OF TABLES</b> .....                       | iii |
| <b>LIST OF FIGURES</b> .....                      | iv  |
| <b>I. 서언</b> .....                                | 1   |
| <b>II. 재료 및 방법</b> .....                          | 3   |
| 1. 식물재료 .....                                     | 3   |
| 2. Genomic DNA 추출 .....                           | 4   |
| 3. SSR markers 탐색 및 분석 .....                      | 4   |
| <b>III. 결과 및 고찰</b> .....                         | 13  |
| 1. 비룡 텡자에서 자가수정 및 주심배 유래 판별 SSR markers의 선발 ..... | 13  |
| 2. 일반 텡자에 자가수정 및 주심배 판별 SSR markers의 적용 .....     | 19  |
| 3. SSR markers를 이용한 일반 텡자 종자의 기내발아 특성 평가 .....    | 24  |
| <b>IV. 초록</b> .....                               | 29  |
| <b>V. 인용문헌</b> .....                              | 30  |

## LIST OF TABLES

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1.</b> SSR markers screened for identifying nucellar and self-fertilized seedlings in this study .....                                          | 6  |
| <b>Table 2.</b> The sequences of SSR primers screened for identifying the nucellar and self-fertilized origin in trifoliate orange seedlings .....       | 7  |
| <b>Table 3.</b> Genotyping of twenty straight ones with twenty SSR primers selected from twisted ‘Flying Dragon’ tripoliolate orange plants .....        | 17 |
| <b>Table 4.</b> Information of SSR primers selected for identification of self-fertilized seedlings in this study .....                                  | 18 |
| <b>Table 5.</b> Frequency of self-fertilized seedlings detected by SSR markers in the small sealed field .....                                           | 21 |
| <b>Table 6.</b> Frequency of self-fertilized seedlings evaluated by SSR markers the 1st year (seedling) and 2nd year (transplanting) nursery (n=2) ..... | 22 |
| <b>Table 7.</b> Frequency of self-fertilized seedlings evaluated by SSR markers in vitro seedlings .....                                                 | 27 |

## LIST OF FIGURES

- Fig. 1.** Two phenotypes of ‘Flying Dragon’ trifoliolate oranges. Twisted (A) and straight (B) ..... 14
- Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis of SSR markers amplified with some SSR primers in two representative plants of twisted ‘Flying Dragon’ trifoliolate orange (A) and with BRS12 (B), BRS18 (C), BRS36 (D), BRS45 (E), BM-CiSSR-218 (F), BM-CiSSR-248 (G) and mCrCIR07C09 primer (H) in 20 plants of straight ‘Flying Dragon’. M, 100bp molecular size marker; Ho, homozygous genotype; SFD, straight ‘Flying Dragon’ ..... 15
- Fig. 3.** Classification of common trifoliolate oranges by plant size in 1st year after sowing. Large (A) and small (B) seedlings ..... 23
- Fig. 4.** In vitro trifoliolate orange having single germinated seedling (A), two germinated seedlings (B), three or four germinated seedlings (C) and seedlings separated with plant size from four germinated seedlings (D) ..... 26
- Fig. 5.** Distinguishment of nucellar or self-fertilized origins by SSR markers amplified with BRS12 and mCrCIR07C09 primers in vitro germinated trifoliolate orange plants. 1-1 means the 1st seedling germinated from ‘1 seed’, 1-2 means the 2nd seedling germinated from ‘1 seed’ etc. M: 100 bp molecular size marker; S: self-fertilized genotype ..... 28

## I. 서언

감귤은 국내 과실 생산량의 1위(31.7%)를 차지하고 있고 1인당 연간 소비량은 12.6kg으로 가장 많이 소비되고 있어 감귤산업은 국가 및 지역 경제에 기여하는 바가 매우 크다(KOSIS, 2021; MAFRA, 2021). 감귤은 근부를 구성하는 대목 위에 재배 품종인 접수를 접목한 형태로 재배하여 생산되고 있다. 대목을 이용하면 과실의 개화 및 결실을 앞당길 수 있으며 과실의 수량과 품질의 개선, 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 대한 저항성의 증진을 도모할 수 있다. 국내에서는 감귤 대목으로 거의 대부분 탕자를 사용하고 있다. 탕자(*Poncirus trifoliata*)는 운향과(Rutaceae)에 속하며 감귤류로 분류되는 낙엽과수이다. 과실은 ponciridin 성분의 함유로 생식하기에는 부적합하다. 그러나 탕자는 온주밀감 등 많은 감귤에 대해 접목 친화성이 높고 내한성이 강하며 병저항성 및 바이러스와 선충 저항성 등 대목 특성이 매우 우수한 편이다(Chae et al., 2013).

탕자는 종자로 번식한다. 탕자를 비롯한 감귤류 종자는 배의 수에 따라 단배성(monoembryony) 또는 다배성(polyembryony)로 나누어지는데, 단배 종자를 갖는 감귤류는 소수이고 대다수가 다배성 종자를 갖는다. 다배성 종자에서는 많은 배가 생기는데, 그 중 수정된 배는 퇴화되는 경향이 강하여 거의 대부분은 주심조직에서 무성적으로 발생한 무성배(apomictic embryo)가 발달하기 때문에 실생의 대부분은 모본과 동일한 유전형질을 갖는다. 이 무성배는 주심세포로부터 체세포 분열에 의해서 형성되었기 때문에 주심배(nucellar embryo)라고 하는데, 균일한 생육을 하는 개체가 다수 필요한 경우 매우 유용할 수 있다(Andrade-Rodriguez 2005; Kepiro et al., 2007; Kishore et al., 2012). 탕자는 다배성이며, 대부분의

실생은 주심배 유래로 알려져 있다. 그러나 낮은 비율로 자가수정 또는 타가수정 유래가 혼재하여 번식하기도 하며, 이를 육안으로 구별하기는 거의 불가능한 실정이다. 자가수정 유래의 탱자묘가 혼재하여 대목으로 이용하게 되면 접수 품종의 생육에 차이를 나타낼 수 있기 때문에 과수 품질의 균일성을 저해하는 문제점을 야기한다(Gill et al., 2002). 이를 개선하기 위해서는 탱자 실생묘에서 자가수정 및 주심배 유래를 구분할 수 있어야 하고, 이에 따른 DNA marker의 개발이 필요한 실정이다.

Simple sequence repeats (SSR) marker는 DNA 표지의 하나로, 1~6bp의 반복서열인 microsatellite라 부르는 marker이다. 식물의 서로 다른 종이나 개체 사이에는 microsatellite의 반복수가 다르게 나타날 수 있는데, 이러한 반복서열 양쪽의 primer를 이용한 PCR 산물의 길이 차이를 분석함으로써 다형성을 확인할 수 있다. SSR marker는 대립유전자가 공우성으로 유전되며, 대립유전자의 종류가 많고, PCR을 통해 쉽고 간편하게 분석이 가능할 뿐만 아니라 재현성이 매우 높기 때문에 유전형 분석에 매우 유용하게 이용되고 있다(Koh et al., 2013; Fukui et al., 2020). 그러므로 감귤을 포함한 다양한 식물에서 품종판별, 유연관계 분석 및 형질연관 표지 개발을 위한 연구에 많이 활용되고 있다(Kim et al., 2004; Froelicher et al., 2008; Hwang et al., 2012; Mondal et al., 2015; Hong et al., 2016; Kashyap et al., 2018; Lee et al., 2018).

따라서 본 연구에서는 대목으로 사용되는 탱자의 유전적 균일성을 확보하기 위해 자가수정 및 주심배 유래를 효율적으로 구분할 수 있는 SSR markers를 선별하고자 하였다. 또한 선별한 SSR markers를 이용하여 탱자묘의 자가수정 유래의 빈도를 추정하고, 그 발생 양상을 분석하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료

일반 탕자(*Poncirus trifoliata*)와 비룡 탕자(*Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon)를 식물재료로 이용하였다.

비룡 탕자는 제주특별자치도 농업기술원 유전자원 포장(서귀포시 강정동, 33.2616°N, 126.4945°E)의 종자를 파종해 얻어진 실생을 이용하였으며 SSR markers 선발을 위해 사용하였다. SSR markers의 validation 분석에 사용한 일반 탕자는 제주특별자치도 농업기술원 유전자원 포장의 종자 파종 실생집단을 이용하였고, SSR markers 적용에는 제주 도외 지역(순천시 해룡면, 34.9138°N, 127.5376°E)의 종자를 파종한 묘목 집단을 이용하였다.

도외 지역 종자의 파종 육묘된 실생 집단은 파종 후 1년차 실생 집단과 2년차 정식된 묘목 집단을 이용하였으며, 각 집단은 약간의 격리 간격을 두고 조성된 독립적인 포장에서 관리되었다. 파종 1년차 집단에 비해 파종 2년차 집단은 생육이 비교적 균일한 편인데, 파종 1년 후 봄에 생육이 불량한 개체를 인위적으로 분리 도태시켜 정식하기 때문이다. 그러므로 파종 1년차 실생 집단에서는 묘목의 크기를 육안으로 큰 개체와 작은 개체로 구분하였고, 2년차 정식 집단에서는 평균 크기의 개체를 임의 선정하여 각각 50개체 2반복으로 구성하여 잎을 채취하였다.

또한 제주대학교 부설연구실습 포장(제주시 도련일동, 33.5042°N, 126.5873°E)의 종자를 MS 고품 배지에 기내배양하여 종자의 발아특성 분석에 사용하였다.

## 2. Genomic DNA 추출

식물체의 DNA 추출은 CTAB 방법에 따라 수행하였다(Doyle et al., 1990; Cheng et al., 2003). 비룽 탱자 및 일반 탱자의 잎을 채취하여 액체질소를 첨가해 분쇄한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 냉동보관하였다. CTAB 추출 용액(99.8% 2X CTAB + 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol, v/v)을 분말에 첨가하여 교반기로 잘 섞은 후 1시간 동안  $65^{\circ}\text{C}$ 의 heating block에서 가열했다. 이후 5분 동안  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 냉각시키고 phenol: chloroform: isoamyl alcohol(25: 24: 1, v/v)을 CTAB 추출 용액과 동일한 양으로 첨가해  $12,658\text{g}_n$ 에 15분 동안 원심분리(VS-15000 CFN II, Vision scientific Co., Ltd., Korea)하였다. 그리고 상정액을 취해 새로운 tube에 옮겼으며 동일한 양의 isopropyl alcohol을 넣고 잘 혼합하여 30분 동안  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉각시켜 DNA를 침전시켰다. 이후 동일한 조건으로 원심분리하였고 침전된 DNA pellet만을 회수한 후 70% ethanol과 100% ethanol로 차례로 세척해 건조시킨 후 TE buffer와  $1\ \mu\text{L}$ 의 RNase를 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 가열하여 DNA를 현탁하였다. 추출된 genomic DNA는 나노드롭(ND-1000, Thermo, USA)을 이용하여 농도를 측정한 후  $10\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 의 농도로 정량한 다음  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

## 3. SSR markers 탐색 및 분석

자가수정 및 주심배 유래 구분 SSR markers의 탐색을 위해 비룽 탱자의 전사체 분석을 통해 얻어진 SSR 정보를 탐색하였고 57개의 primers(BRS01~57)를 디자인하였다. 또한 국내에서 보고된 감귤 품종 구별 SSR markers 53개(Woo et al., 2020)와 탱자에서 보고된 다형성 SSR markers 7개(Kamiri et al.,

2018)를 추가하여 이용하였다(**Table 1**). 전체적으로 총 117개의 SSR primers를 탱자의 주심배 및 자가수정 유래 분석에 이용하였다(**Table 2**).

SSR markers 검정을 위한 PCR 용액의 조성은 10ng genomic DNA, 10X PCR buffer, 10mM dNTPs, 10pmol 양방향 primer, 0.5U Taq plus DNA polymerase (Dogsheng Biotech Co., Guangzhou, China)에 증류수를 첨가하여 총 20  $\mu$ L로 혼합하여 이용하였다. PCR 증폭은 T100TM Thermal cycler (Bio-Rad, CA, USA)를 사용하여 94°C에서 5분 동안 pre-denaturation을 실시한 뒤, denaturation은 94°C에서 10분, annealing은 52~55°C에서 1분, extension은 72°C에서 1분으로 총 35회 반복한 후 최종 extension을 72°C에서 10분간 수행하였다. PCR로 증폭된 SSR markers의 유형은 전기영동장치(MGU-602T, CBS Scientific, Del Mar, CA, USA)를 이용하여 2.8% agarose gel(PhileKorea, Korea)에서 전기영동 한 다음 gel documentation system(Azyre Biosystems, Dublin, CA, USA)을 이용하여 분석하였다.

**Table 1.** SSR markers screened for identifying nucellar and self-fertilized seedlings in this study

| Source of SSR markers                                                | No. of markers used for screening | Reference            |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| SSR markers designed by 'Flying Dragon' transcriptome analysis       | 57                                | -                    |
| SSR markers for identification of citrus varieties reported in Korea | 53                                | Woo et al. (2020)    |
| Polymorphic SSR markers reported in trifoliate orange                | 7                                 | Kamiri et al. (2018) |
| Total                                                                | 117                               |                      |

**Table 2.** The sequences of SSR primers screened for identifying the nucellar and self-fertilized origin in trifoliolate orange seedlings

| No. | Primer name |   | Sequence ( 5' → 3' )      |
|-----|-------------|---|---------------------------|
| 1   | BRS_SSR01   | F | CATTTAGCTGCCTTTCAAAATC    |
|     |             | R | GAATATTCCGTAAGCTGTTCTCTC  |
| 2   | BRS_SSR02   | F | ATTAGGGATCCAGATGTCATTAAC  |
|     |             | R | AATGACCTTTTCGTGAGATATGAG  |
| 3   | BRS_SSR03   | F | ACAGTCAACTGAACGTTGATAAAG  |
|     |             | R | ACAAGTACTGCTTATATTCCATGTG |
| 4   | BRS_SSR04   | F | CTAAAGGCAACACTTCTTCTTACA  |
|     |             | R | TCACTGCAGATGAAAAACAGAT    |
| 5   | BRS_SSR05   | F | CTTCTCTCGCTTTCTAAAACCAT   |
|     |             | R | GGTTTAATTCTAAATCAGCAGCTC  |
| 6   | BRS_SSR06   | F | TTGGTTCTGGATTTCAACTTC     |
|     |             | R | CTTATCATCCCCAATATAGATGC   |
| 7   | BRS_SSR07   | F | TACACCCTTGTAAGAGACTGTTGA  |
|     |             | R | GTTAAGTCCCAAAAAGGAGTTTG   |
| 8   | BRS_SSR08   | F | TCTAATAACGTGTGCAAAGATAGC  |
|     |             | R | CTTCACAGGATTTGAAGATGAGTC  |
| 9   | BRS_SSR09   | F | GTCATTACCACCCTCACAAG      |
|     |             | R | CAGTTTAACTTTTTCTTCGGGTGT  |
| 10  | BRS_SSR10   | F | AGGCGAATTATTGAACTGGATACT  |
|     |             | R | ATGTAGCTAGCAGCAACTAAGCA   |
| 11  | BRS_SSR11   | F | CAAGTTAAAGGCTTCTTTTACGAC  |
|     |             | R | TATAGATTATGGAAGCACAGCAAC  |
| 12  | BRS_SSR12   | F | GCTTAATAAACCTTCTTGGTGAAG  |
|     |             | R | AGTTGTAGGAGTGACGAAAATAG   |
| 13  | BRS_SSR13   | F | TATAACTGCCAATACCGTTATCCT  |
|     |             | R | GGACGTTTTGTTTGTGATTACTG   |
| 14  | BRS_SSR14   | F | CATCACATCTCAAACATAACAGTTG |
|     |             | R | GTGTTCCAAATGACAGTTGTTG    |
| 15  | BRS_SSR15   | F | TGAGTCTATGAGATGCTCTTCTTG  |
|     |             | R | GATTTTCCTCACATCTTCTTCAC   |
| 16  | BRS_SSR16   | F | GATATTATAAGTGCTTCCCCTGT   |
|     |             | R | GATTATGAAACCCTAACTCGGTAA  |
| 17  | BRS_SSR17   | F | GATAACGAGTCATTGGAGATCATT  |
|     |             | R | ACACTTTCTTTGAACGGACTAAAC  |
| 18  | BRS_SSR18   | F | TGTTGTAGCAGAAGGAGTAGTCAA  |
|     |             | R | TTCCTGAGAAGCTCTAAAACCTCTT |
| 19  | BRS_SSR19   | F | ATTGCACTATTTTCGTCACCTCCTA |
|     |             | R | AAGTGGGCAACAAAAAAGATGC    |
| 20  | BRS_SSR20   | F | CTTGCCAGATAATAATTCAGTGTG  |
|     |             | R | GCCTTTAAATAGTATTCGGTGAGA  |
| 21  | BRS_SSR21   | F | GACTACCAATGTCGTAGGGTTTAG  |
|     |             | R | CCTTGCAGTCAACAAGATATGAT   |

**Table 2.** (continued)

| No. | Primer name |   | Sequence ( 5' → 3' )      |
|-----|-------------|---|---------------------------|
| 22  | BRS_SSR22   | F | ATGGAAGTAATTGGTAGAACTGGA  |
|     |             | R | ACTGGGATCAGAATTAACATCATC  |
| 23  | BRS_SSR23   | F | GGTCAAGATTTGGAGGAGTAAAC   |
|     |             | R | CTAATATCCATGGAAGCCTCATCT  |
| 24  | BRS_SSR24   | F | GGCAATAACATAAGTTCCTCAAAG  |
|     |             | R | GGTGATAATTTCACTACCACAA    |
| 25  | BRS_SSR25   | F | GATCATGTTACATTCACCCATCTA  |
|     |             | R | AGGACATGGAGTGATATTTTCGT   |
| 26  | BRS_SSR26   | F | CAAAAAGCAGACTTTGGATTTC    |
|     |             | R | TATTCTTATTCTTCTCGGCGATAC  |
| 27  | BRS_SSR27   | F | CGATCCTTGAACAGTTTCTATCTT  |
|     |             | R | AGATAGACATTGAAAAGACCTTGC  |
| 28  | BRS_SSR28   | F | AGCAAGTGATGATGAGGATATAAAG |
|     |             | R | CTGAAAGGTGCATATAATTCAGTG  |
| 29  | BRS_SSR29   | F | CACAAGGTCATTAACAAGAGTGTC  |
|     |             | R | CAACTGATTATATAGCTGCTCTCG  |
| 30  | BRS_SSR30   | F | TTTCAGTGGCTTTATTTGCTTC    |
|     |             | R | AGAAACCTGGCTTGTAAGATTC    |
| 31  | BRS_SSR31   | F | GTGTGGGTTCTCAACATCTACTAA  |
|     |             | R | CAGGTCCTTATTTAACACAATCC   |
| 32  | BRS_SSR32   | F | ATCAGATGGTTCAGTCTATAATG   |
|     |             | R | TATGAGCAAGAATCCTGAGATTAG  |
| 33  | BRS_SSR33   | F | CTTTTGACAAATTGGAGGAAGATC  |
|     |             | R | GTAGCAGCAAATTTCTTTAGTGTC  |
| 34  | BRS_SSR34   | F | GACGTGGAACCTTAAACCCTAT    |
|     |             | R | GATTAGCAGCAATAACAGGTGAG   |
| 35  | BRS_SSR35   | F | CTCCACGTGTCAAGTCAAATCAT   |
|     |             | R | ATGTTGGATGAACCAAGGGAGTAT  |
| 36  | BRS_SSR36   | F | GTTTAATAAGTTGAATGGGTCGATC |
|     |             | R | CAGATCCAATAACAATTCCGGCA   |
| 37  | BRS_SSR37   | F | ATCTAGGGTTTGGGAATTTCAAC   |
|     |             | R | TTCACAGCCTCCATGTCTATAA    |
| 38  | BRS_SSR38   | F | CACGCTTTATGTTGCTGGTAAAC   |
|     |             | R | TTCAGCTTTTACTTGGTTTACCTC  |
| 39  | BRS_SSR39   | F | GATATCTTCAAACCGGATCCTAAC  |
|     |             | R | TCGAAGATTTACAAGGTTTGTCTG  |
| 40  | BRS_SSR40   | F | CATCCACTTCACTATCAGTTTCTC  |
|     |             | R | TCAGCCAGTTAACAACACAAGCA   |
| 41  | BRS_SSR41   | F | GTTAGCTATGGCCTATGTATAAGTG |
|     |             | R | AGCTTGTGTTTGGTTTGAAGTGTAG |
| 42  | BRS_SSR42   | F | CATCTCCCTCCTTATCTGAAACAT  |
|     |             | R | TCGATATTCGAAGACTGGAAGAATG |

**Table 2.** (continued)

| No. | Primer name  |   | Sequence ( 5' → 3' )                        |
|-----|--------------|---|---------------------------------------------|
| 43  | BRS_SSR43    | F | CTATCTATCTGTCTATAGCCATCT                    |
|     |              | R | ATCTTGTTTCAGTACGAACTCGTC                    |
| 44  | BRS_SSR44    | F | TCTCTTATAGCCTAGCTATTCCGA                    |
|     |              | R | TGCAGTTTGGCTCGATTACTATA                     |
| 45  | BRS_SSR45    | F | AGGATTCGTTGAAGGAAGTGGA                      |
|     |              | R | CTAACCAAAGATGATCCCTACAAG                    |
| 46  | BRS_SSR46    | F | TAAACACCAAGACAGACTAGCAAC                    |
|     |              | R | TCGATCAGGTGCATTTAATCTAAC                    |
| 47  | BRS_SSR47    | F | CTAACGCAGATGGAGCATTAAATC                    |
|     |              | R | GACGTCAGTCATCACCAACAATTA                    |
| 48  | BRS_SSR48    | F | CTGCTGATTCTGTAAATGTTTCTG                    |
|     |              | R | TGGGTCTTTCTATTCTTCTCAAATG                   |
| 49  | BRS_SSR49    | F | AACTGAACTCGGAGGATTCATAGT                    |
|     |              | R | GAAGTGCCAAGAAATGCAAAGAGA                    |
| 50  | BRS_SSR50    | F | GTGTTGATGAATTCTTGTTTCAAG                    |
|     |              | R | TCGTTAGCATCACTCTATGGAATGT                   |
| 51  | BRS_SSR51    | F | CTTCCCAGGTCTCAATCTCATA                      |
|     |              | R | CAACAGCAACATCTTCTTCTTACGT                   |
| 52  | BRS_SSR52    | F | TACTGCCTCCTCCTAAACCTATAT                    |
|     |              | R | CTCACGGAATGGTCAGTTTATGT                     |
| 53  | BRS_SSR53    | F | AGAAACTTTATTCCGGGTCGTGA                     |
|     |              | R | TTCCGATAATCGCGTTAAGAGTTG                    |
| 54  | BRS_SSR54    | F | GAAACTAAATTGACGGAGTGTGTTGT                  |
|     |              | R | GAGCATTTCAGACATTTGAGGATT                    |
| 55  | BRS_SSR55    | F | AATGGCTTCTTTCAGCTGCTTATC                    |
|     |              | R | TGGGTTTCATTGTGAATTGGTTTGTG                  |
| 56  | BRS_SSR56    | F | GAGATTGACTTTGTGGTGGTTAC                     |
|     |              | R | CTTTACAAACACAAACAGCCTGCA                    |
| 57  | BRS_SSR57    | F | TCGTGGAATTGAATCTCTCAAATTC                   |
|     |              | R | GTGTTTGATTGCAGGCAAATTC                      |
| 58  | BM-CiSSR-012 | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTGGGCTCAGTTCTTCTCTACTC   |
|     |              | R | GCATTAGGCTTCTCTCATACC                       |
| 59  | BM-CiSSR-013 | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTGGTGGCATAACATAACATACATA |
|     |              | R | GCAACATCTGGA ACTACTCA                       |
| 60  | BM-CiSSR-032 | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTGCCTGAGTTTCTTTGTTATG    |
|     |              | R | CATTCCATCGTCTCTATTGT                        |
| 61  | BM-CiSSR-043 | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTATTAGTGCGGGTAAGATGAA    |
|     |              | R | AAGGATTTGGTGTAGGAAGTAA                      |
| 62  | BM-CiSSR-073 | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTCCGACAAGGAGATGAAGATAG   |
|     |              | R | TTCTAACAGCACCAAGCAG                         |
| 63  | BM-CiSSR-077 | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTTGTATTTATTTCTGACTACGACC |
|     |              | R | ATGCGTTTGGTGTGTGTT                          |

**Table 2.** (continued)

| No. | Primer name   |   | Sequence ( 5' → 3' )                       |
|-----|---------------|---|--------------------------------------------|
| 64  | BM-CiSSR-082  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTACCTGAGCCCTTTTTGGTTT   |
|     |               | R | GCCAGATCAAGGCTCAAATC                       |
| 65  | BM-CiSSR-087  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTCAGATCCTATTGCAGAGGCA   |
|     |               | R | GCCCATTTGTATTGCCATTT                       |
| 66  | BM-CiSSR-093  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTCCCCCTCTTCTTTCACACAA   |
|     |               | R | GGTGAGCAGCCATCTTCTTC                       |
| 67  | BM-CiSSR-094  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTGAATTGGGAGGACGAACTGA   |
|     |               | R | CGAGCCCTAGACAGAGATGG                       |
| 68  | BM-CiSSR-100  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTGTTTTTCAGCTGGATTTCGAGG |
|     |               | R | CACGTGTCTCTGGA ACTT                        |
| 69  | BM-CiSSR-111  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTCCGATACAGCACAAAGCAAA   |
|     |               | R | TGGAAAGAGAGAAGCCAAGC                       |
| 70  | BM-CiSSR-115b | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTCGGTGTGTATTGGGTACACG   |
|     |               | R | GCTTTTTTCGAAAGCGTCAAG                      |
| 71  | BM-CiSSR-137  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTGCAACGTGTACTGACGCTTG   |
|     |               | R | GCTCGTATCTGAAGCTCGCC                       |
| 72  | BM-CiSSR-159  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTATGACCTCAAACGGTGAGCA   |
|     |               | R | CTTCCACATCCGAACCGACA                       |
| 73  | BM-CiSSR-162  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTGCTAGGGTTCCAGACTTCCAG  |
|     |               | R | GATTTGGCCGATCGAAAGCC                       |
| 74  | BM-CiSSR-165  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTAGCAACTTAAGGTCCTTCACGA |
|     |               | R | TTCTCTGCTCTGCTGTGCAT                       |
| 75  | BM-CiSSR-201  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTCAACAGTACCTGATGGTCCG   |
|     |               | R | TTCTGAAATCCAGTCCCCTC                       |
| 76  | BM-CiSSR-202  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTCCCTCTTCAAGAACTGAGCC   |
|     |               | R | CACCAGCTGTTTGCTGTTTT                       |
| 77  | BM-CiSSR-203  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTACAACGCACCAAGTCAATGT   |
|     |               | R | GTTGCGTCATCCATTTTGTC                       |
| 78  | BM-CiSSR-204  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTCCATGACCCACTTTCCTAC    |
|     |               | R | ATTCCGGTAGGTTGAAATCG                       |
| 79  | BM-CiSSR-208  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTGGATGCTTGGCCTGATTAT    |
|     |               | R | ATTGTCACCGAAGCACCATA                       |
| 80  | BM-CiSSR-210  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTGCCAGGATTGAAGGGTTTTA   |
|     |               | R | TGTGAACAAGGGCAACAGAT                       |
| 81  | BM-CiSSR-217  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTATAATGGAAGCGTCGGATTC   |
|     |               | R | GCCTAACGGCCAGAGTTTAC                       |
| 82  | BM-CiSSR-218  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTTATGTCTACTGGTTCGCAGGC  |
|     |               | R | GTTGTCCCCTTGATAACCACC                      |
| 83  | BM-CiSSR-221  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTGGTCCCTTGGAGAAGGTTG    |
|     |               | R | CATGACCAAATGTCGGGTTA                       |
| 84  | BM-CiSSR-224  | F | TGTA AAAACGACGGCCAGTAACCCCTTGTCAAGTGATCC   |
|     |               | R | TCTTCTTCAGTTGGTGCCTG                       |

**Table 2.** (continued)

| No. | Primer name  |   | Sequence (5' → 3')                      |
|-----|--------------|---|-----------------------------------------|
| 85  | BM-CiSSR-225 | F | TGTA AACGACGGCCAGTGTAAAGGGGTTGTGAGGCAA  |
|     |              | R | CAACAGGTTTCGACCATGAC                    |
| 86  | BM-CiSSR-226 | F | TGTA AACGACGGCCAGTATTAAGGCTGGAAATGCCA   |
|     |              | R | ATTCTGCTGACGCTTCAATG                    |
| 87  | BM-CiSSR-230 | F | TGTA AACGACGGCCAGTTCATCAGCCATTCCATCTA   |
|     |              | R | ATCTGAACCCCTCCAATCCTG                   |
| 88  | BM-CiSSR-238 | F | TGTA AACGACGGCCAGTACTATGCGGCTCGAACTTTT  |
|     |              | R | TCACCTTCACAACCGAACAT                    |
| 89  | BM-CiSSR-239 | F | TGTA AACGACGGCCAGTACATGCCATAGGAAGCAAC   |
|     |              | R | CACCTTCTCATCAATCACGG                    |
| 90  | BM-CiSSR-240 | F | TGTA AACGACGGCCAGTGCTGCTGCTGCTAGTTTGTC  |
|     |              | R | AAAGATGGCAATGGGTTAGG                    |
| 91  | BM-CiSSR-241 | F | TGTA AACGACGGCCAGTGGTCCTTTGGAGAAGGTTGA  |
|     |              | R | CATGACCAAATGTCGGGTTA                    |
| 92  | BM-CiSSR-243 | F | TGTA AACGACGGCCAGTCCATCCCTGTAAATTCCACC  |
|     |              | R | ATTGGTCGTTTCCTTTCTG                     |
| 93  | BM-CiSSR-245 | F | TGTA AACGACGGCCAGTTTTCCAGGAGCTTACCAAG   |
|     |              | R | TGCGTTCATGGTCAGTATT                     |
| 94  | BM-CiSSR-246 | F | TGTA AACGACGGCCAGTCCCTAGGGAAATTTGGGAAT  |
|     |              | R | GCACTCGAGAGTTCTCGTTAAG                  |
| 95  | BM-CiSSR-247 | F | TGTA AACGACGGCCAGTATCTGTGTTTGGTCGCATGT  |
|     |              | R | GGAAGATTACCGGACTTGGA                    |
| 96  | BM-CiSSR-248 | F | TGTA AACGACGGCCAGTGCTCGGTTCTTGCACTGA    |
|     |              | R | GTCTGCAAACCCTGTTGATG                    |
| 97  | BM-CiSSR-249 | F | TGTA AACGACGGCCAGTATGGGCAAGAACAGGAAATC  |
|     |              | R | CCATAGGATTTGCATGAGGA                    |
| 98  | BM-CiSSR-253 | F | TGTA AACGACGGCCAGTAATTCCTGCTCCAAACCAG   |
|     |              | R | TCCAACAACCTGAACACGGT                    |
| 99  | BM-CiSSR-254 | F | TGTA AACGACGGCCAGTTAAATCCCTCGGAAACAGG   |
|     |              | R | CTTTGCATGTTCAACGTTCC                    |
| 100 | BM-CiSSR-256 | F | TGTA AACGACGGCCAGTCTCTCTGAACCTGACACCGA  |
|     |              | R | TTTTCTCCACCCTTTCAACC                    |
| 101 | BM-CiSSR-258 | F | TGTA AACGACGGCCAGTGGTAAGCACCTGCAAACCTGA |
|     |              | R | ATTATGCAATTCCTCCTGGC                    |
| 102 | BM-CiSSR-260 | F | TGTA AACGACGGCCAGTTCATCTGAACGGACCACAAT  |
|     |              | R | TAAGTCACTTGCTTCCCTG                     |
| 103 | BM-CiSSR-262 | F | TGTA AACGACGGCCAGTCAGTTTCATCCCACTGATGC  |
|     |              | R | ACCAAGCGTCCTTAACAACA                    |
| 104 | BM-CiSSR-264 | F | TGTA AACGACGGCCAGTAGGGGTGCTGAGCATAAAAT  |
|     |              | R | ATACCCCGTCGTGGAATTAG                    |
| 105 | BM-CiSSR-266 | F | TGTA AACGACGGCCAGTCGTAGCCAAAACCTCCCAAAT |
|     |              | R | CCGAAGATGGAGGGAATAA                     |

**Table 2.** (continued)

| No. | Primer name  |   | Sequence ( 5' → 3' )                   |
|-----|--------------|---|----------------------------------------|
| 106 | BM-CiSSR-268 | F | TGTAAAACGACGGCCAGTTCTGTGGCTCACTTCACTCC |
|     |              | R | GAAGACGACAGATGCTGGAA                   |
| 107 | BM-CiSSR-270 | F | TGTAAAACGACGGCCAGTTGCTGTAAGTGCAGTGCAAA |
|     |              | R | GGGACGAGCATCTTCCTTTA                   |
| 108 | BM-CiSSR-271 | F | TGTAAAACGACGGCCAGTCCCCCAAATGCTGAGTAGT  |
|     |              | R | AAAGGGAGAGAGTTGGCTGA                   |
| 109 | BM-CiSSR-272 | F | TGTAAAACGACGGCCAGTATAGGTCCCCACAATGGAAA |
|     |              | R | GGGCATAAATGAATTGGGTC                   |
| 110 | BM-CiSSR-273 | F | TGTAAAACGACGGCCAGTGCATCATACGTTCAAGCCAC |
|     |              | R | TCTTGTGCTCTCCTGTGACC                   |
| 111 | mCrCIR02G12  | F | AAACCGAAATACAAGAGTG                    |
|     |              | R | TCCACAAACAATAACAACG                    |
| 112 | mCrCIR02D04b | F | CTCTCTTTCCCCATTAGA                     |
|     |              | R | AGCAAACCCCAACAAC                       |
| 113 | mCrCIR03D12a | F | GCCATAAGCCCTTTCT                       |
|     |              | R | CCCACAACCATCACC                        |
| 114 | mCrCIR03F05  | F | CTAAGGAAGAGTAGAGAGCA                   |
|     |              | R | TAAAATCCAAGGTTCCA                      |
| 115 | mCrCIR02D03  | F | CAGACAACAGAAAACCAA                     |
|     |              | R | GACCATTTTCCACTCAA                      |
| 116 | mCrCIR02A09  | F | ACAGAAGGTAGTATTTTAGGG                  |
|     |              | R | TTGTTTGGATGGGAAG                       |
| 117 | mCrCIR07C09  | F | GACCCTGCCTCCAAAGTATC                   |
|     |              | R | GTGGCTGTTGAGGGGTTG                     |

### III. 결과 및 고찰

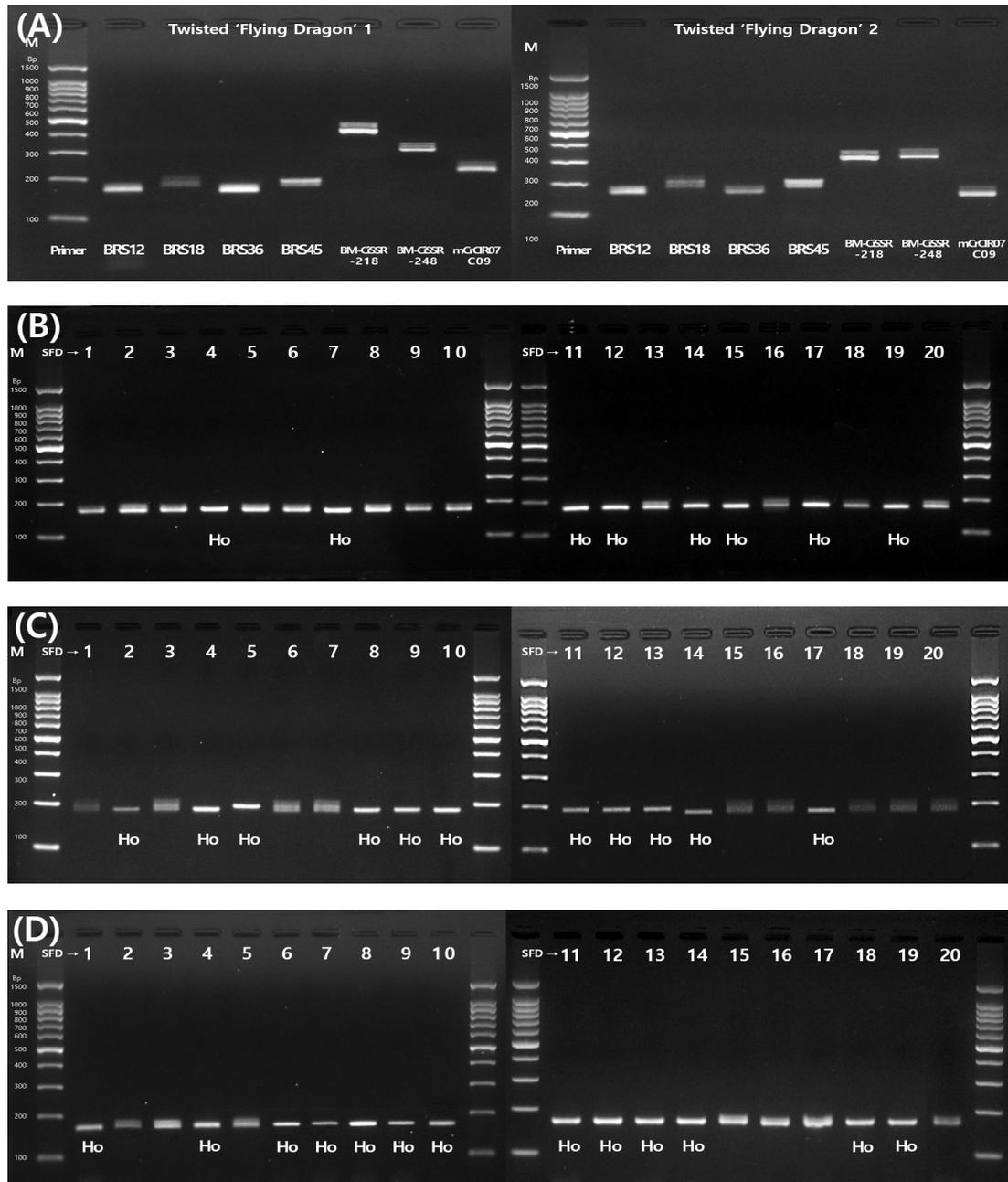
#### 1. 비룽 탱자에서 자가수정 및 주심배 유래 판별 SSR markers의 선발

비룽 탱자는 보통 뒤틀린(twisted) 줄기와 가시의 외형(Fig. 1A)을 가지는 것이 특징이다. 그러나 자가수정 유래의 경우 이러한 외형적 성질이 사라져 곧은(straight) 줄기와 가시를 가지는 비뒤틀림 외형(Fig. 1B)을 가지는 것으로 알려져 있다(Andrade-Rodriguez et al., 1995; Mademba-Sy et al., 2012). 그러므로 뒤틀림 외형의 식물체에서 이형접합체로 나타내는 SSR markers는 비뒤틀림 외형의 자가수정 식물체에서는 동형접합체로 나타낼 수 있기 때문에 자가수정 및 주심배 유래 판별이 가능할 수 있을 것이다(Fig. 2).

뒤틀림 외형의 비룽 탱자와 비뒤틀림 외형의 비룽 탱자를 각각 20개씩 선정하여 117개의 SSR primers를 적용한 결과, 총 20개의 SSR primers를 1차 선발할 수 있었다(Table 3). 이 중 중복성을 최소화하고 비뒤틀림 외형의 비룽 탱자에서 2개 이상의 SSR markers에서 동형접합을 나타내도록 double check이 가능한 총 7개의 SSR primers를 최종 선발하였다(Table 4). 총 20개의 비뒤틀림 식물체 중 비룽 탱자 3번과 20번에서 선발된 SSR markers들이 동형접합형을 보이지 않았다. 이는 이들 식물체가 실제 자가수정 식물체이지만 선발된 SSR markers 영역에서는 구별되지 않는 경우이거나 또는 이들 식물체가 외형적으로 비뒤틀림으로 보였지만 실제로는 주심배일 경우의 하나로 생각된다. Khan et al. (1988)에 의하면 탱자에서 isozyme 분석으로 자가수정과 주심배 유래를 명확히 구분할 수 있다고 하였다. 그러므로 이들 식물체에 대해서는 자가수정 및 주심배를 구분하는 isozyme 분석 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각되었다.



**Fig. 1.** Two phenotypes of 'Flying Dragon' trifoliolate oranges. Twisted (A) and straight (B).



**Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis of SSR markers amplified with some SSR primers in two representative plants of twisted 'Flying Dragon' trifoliolate orange (A) and with BRS12 (B), BRS18 (C), BRS36 (D), BRS45 (E), BM-CiSSR-218 (F), BM-CiSSR-248 (G) and mCrCIR07C09 primer (H) in 20 plants of straight 'Flying Dragon'. M, 100bp molecular size marker; Ho, homozygous genotype; SFD, straight 'Flying Dragon'.

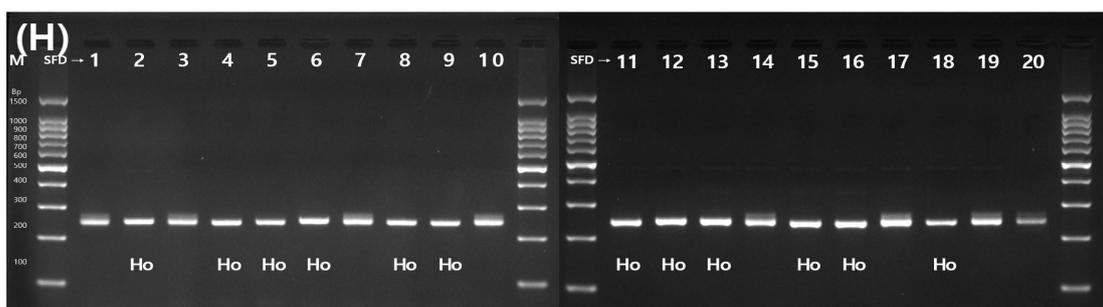
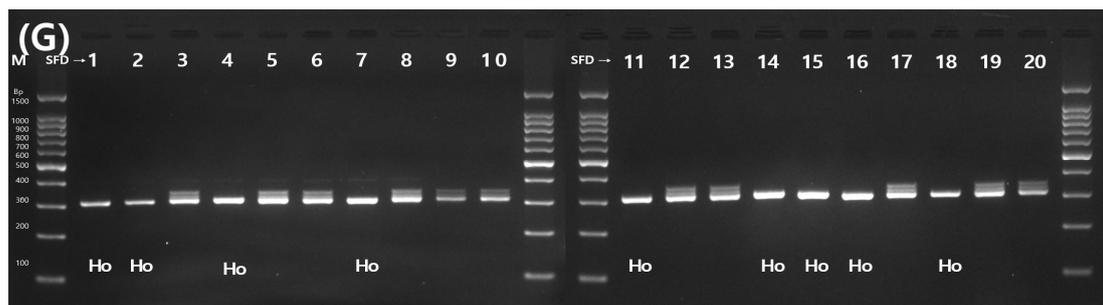
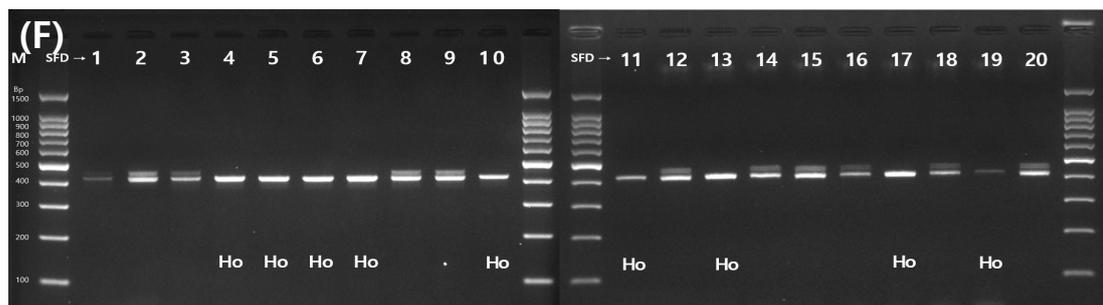
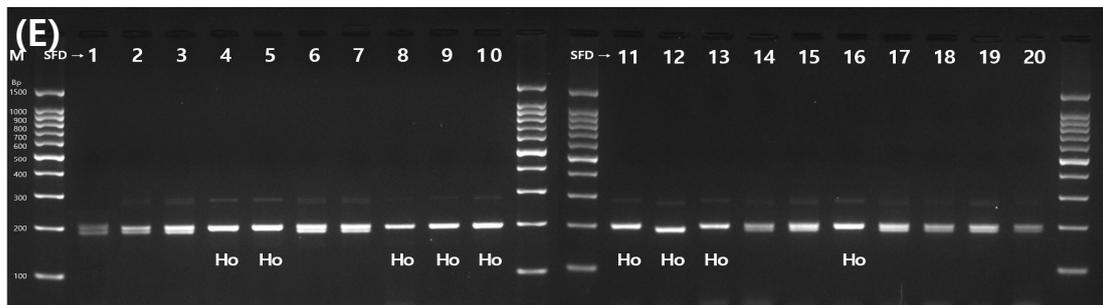


Fig. 2. (continued).

**Table 3.** Genotyping of twenty straight ones with twenty SSR primers selected from twisted ‘Flying Dragon’ trifoliate orange plants

| SSR primer   | Plant no. |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | No. of homozygous primers |
|--------------|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------------------|
|              | 1         | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |                           |
| BRS12        | He        | He | He | Ho | He | He | Ho | He | He | He | Ho | Ho | He | Ho | Ho | He | Ho | He | Ho | He | 8                         |
| BRS13        | He        | Ho | He | He | He | He | Ho | Ho | Ho | He | He | He | He | Ho | Ho | He | Ho | Ho | He | He | 8                         |
| BRS16        | He        | Ho | He | Ho | He | He | Ho | He | He | He | Ho | He | He | He | He | Ho | Ho | Ho | He | He | 7                         |
| BRS17        | He        | He | He | He | He | Ho | He | He | He | Ho | He | Ho | Ho | Ho | He | He | Ho | He | He | He | 6                         |
| BRS18        | He        | Ho | He | Ho | Ho | He | He | Ho | He | He | Ho | He | He | He | 11                        |
| BRS26        | He        | Ho | He | Ho | He | He | He | He | He | Ho | Ho | Ho | He | He | Ho | Ho | He | Ho | He | He | 8                         |
| BRS30        | He        | He | He | He | He | He | He | He | He | Ho | Ho | Ho | He | Ho | Ho | He | Ho | He | Ho | He | 7                         |
| BRS31        | He        | He | He | Ho | He | Ho | Ho | He | He | He | He | He | Ho | Ho | Ho | Ho | Ho | He | He | He | 8                         |
| BRS32        | Ho        | He | He | Ho | Ho | Ho | Ho | He | He | He | He | He | Ho | He | He | He | He | Ho | Ho | He | 8                         |
| BRS36        | Ho        | He | He | Ho | He | Ho | He | He | He | Ho | Ho | He | 13                        |
| BRS39        | He        | He | He | Ho | Ho | He | He | Ho | Ho | Ho | Ho | Ho | Ho | He | He | Ho | He | He | He | He | 9                         |
| BRS45        | He        | He | He | Ho | Ho | He | He | Ho | Ho | Ho | Ho | Ho | Ho | He | He | Ho | He | He | He | He | 9                         |
| BRS48        | He        | Ho | He | He | He | He | He | Ho | Ho | Ho | He | He | Ho | He | Ho | Ho | He | He | He | He | 7                         |
| BRS49        | He        | He | He | He | Ho | He | Ho | Ho | Ho | He | He | Ho | He | He | He | He | Ho | He | He | He | 6                         |
| BRS54        | Ho        | He | He | He | He | He | Ho | Ho | Ho | He | He | He | He | Ho | Ho | He | Ho | Ho | He | He | 8                         |
| BRS56        | He        | He | He | He | Ho | He | He | He | He | He | Ho | He | Ho | He | Ho | He | He | Ho | He | He | 5                         |
| BM-CiSSR-218 | He        | He | He | Ho | Ho | Ho | Ho | He | He | Ho | Ho | He | Ho | He | He | He | Ho | He | Ho | He | 9                         |
| BM-CiSSR-248 | Ho        | Ho | He | Ho | He | He | Ho | He | He | He | Ho | He | He | Ho | Ho | Ho | He | Ho | He | He | 9                         |
| BM-CiSSR-249 | He        | He | He | Ho | He | He | Ho | He | He | Ho | Ho | He | Ho | He | He | Ho | Ho | Ho | He | He | 8                         |
| mCrCIR07C09  | He        | Ho | He | Ho | Ho | Ho | He | Ho | Ho | He | Ho | Ho | Ho | He | Ho | Ho | He | Ho | He | He | 12                        |

He, heterozygous; Ho, homozygous genotype.

**Table 4.** Information of SSR primers selected for identification of self-fertilized seedlings in this study

| SSR primer   | Sequence (5' → 3')                                                     | Repeat motif                                        | Product size (bp) | Tm (°C) |
|--------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------|---------|
| BRS12        | F : GCTTAATAAACCTTCTTGGTGAAG<br>R : AGTTGTAGGAGTGACGAAAATAG            | (CTG) <sub>5</sub>                                  | 173               | 52      |
| BRS18        | F : TGTTGTAGCAGAAGGAGTAGTCAA<br>R : TTCCTGAGAAGCTCTAAACTCTT            | (GAA) <sub>8</sub>                                  | 194               | 55      |
| BRS36        | F : GTTAAATAAGTTGAATGGGTCGATC<br>R : CAGATCCAATAACAATTCCGGCA           | (TGA) <sub>5</sub>                                  | 170               | 54      |
| BRS45        | F : AGGATTCGTTGAAGGAAGTGGA<br>R : CTAACCAAAGATGATCCCTACAAG             | (CGG) <sub>5</sub>                                  | 197               | 54      |
| BM-CiSSR-218 | F : TGTA AACGACGGCCAGTTATGTCTACTGGTCGCAGGC<br>R : GTTGTCCCCTTGATACCACC | (GGGAT) <sub>4</sub>                                | 236-444           | 55      |
| BM-CiSSR-248 | F : TGTA AACGACGGCCAGTGCTCGGTTCTTGCATACTGA<br>R : GTCTGCAAACCCTGTTGATG | (TGA) <sub>6</sub>                                  | 316-327           | 55      |
| mCrCIR07C09  | F : GACCCTGCCTCCAAAGTATC<br>R : GTGGCTGTTGAGGGGTTG                     | (GA) <sub>7</sub> N <sub>11</sub> (GA) <sub>9</sub> | 240–256           | 55      |

## 2. 일반 탱자에 자가수정 및 주심배 판별 SSR markers의 적용

제주농업기술원 포장의 종자를 파종해 108개의 종자에서 실생묘가 획득되었다. 다배성인 탱자는 한 종자에서 여러 개의 묘가 발생할 수 있는데 한 종자에서 한 개의 묘만 자란 묘목은 88개, 한 종자에서 두 개의 묘가 자란 묘목은 20개였다. 한 종자에서 한 개의 묘만 자란 묘목에서 임의로 40개를 선정하였고, 한 종자에서 두 개의 묘가 자란 묘목 각 20개 모두 선정하여 선발된 7개의 SSR markers를 적용하였다.

일반 탱자 전체에서 한 종자에서 한 개의 묘만 자란 묘목 40개에서는 10개체가 동형접합을 나타내었고 두 개의 묘가 발생한 20개 탱자 종자의 40개 묘목 중 7개체가 동형접합을 나타내어 자가수정 비율은 각각 25.0% 및 17.5%로 나타났다(Table 5). 이 중 큰 실생에서 5.0%, 작은 실생에서 12.5%가 자가수정으로 판별되어 한 종자에서 발생한 두 개의 묘목 중 큰 묘목보다 작은 묘목에서 더 많은 자가수정 유래가 나타남을 확인할 수 있었다. 이를 통해 Anderson et al. (1991)이 보고한 바와 같이, 가장 크고 빠르게 자란 실생묘는 주심배일 확률이 높고, 작은 실생묘는 자가수정일 가능성이 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 다배성 종자에서 수정배와 주심배 간의 공간 및 양분적 경합과 주심배 강세 현상과 관계되는 것으로 보였다(Koltunow, 1993; Villegas-Monter 2022).

또한, 전체 일반 탱자 종자 60개에서 자란 80개 묘목의 자가수정을 판별한 결과, 17개체가 동형접합을 나타내어 21.3%가 자가수정으로 판별되었다. 이는 일반 탱자의 자가수정 유래 비율이 통상적으로 알려진 5~10% 내외보다 높은 편이었다(Khan et al., 1988; Roose et al., 1988). 일반 탱자에서 자가수정 유래 비율은 계통, 연차, 그리고 장소 등에 따라 다르게 나타난다고 알려져 있다(Khan et al.,

1988; Moore et al., 1988). 그러므로 본 연구에서 높게 나타난 자가수정 비율이 연차 및 지역 환경과 관계되는 것인지에 대해서는 보다 상세한 연구가 필요하다고 보아졌다.

한편 도외 지역에서 대목용 일반 탱자 종자를 채취해 파종한 실생묘를 대상으로 SSR markers를 적용하여 자가수정 비율을 평가하였다. 파종 1년차의 경우 자가수정 비율은 큰 크기 실생 집단에서 4.0%, 그리고 작은 크기의 실생 집단에서 26.0%로 나타나 큰 묘목보다 작은 묘목에서 자가수정 비율이 높게 나타났다 (Table 6, Fig. 3). 또한 평균적으로는 파종 후 1년차 실생 집단의 경우, 자가수정 유래 비율은 15.0%로 나타나 이전 시험에서 분석된 21.3% 보다는 낮았으며 일반적으로 알려진 5~10% 내외보다는 높았다. 이는 파종 후 1년차 실생 집단에서는 실생 묘목의 크기가 불균일하여 큰 크기 실생 집단과 작은 크기 실생 집단으로 구분해 평가했기 때문이며, 작은 크기 실생 묘목에서 자가수정 비율이 높아 평균 자가수정 유래 비율에 영향을 준 것으로 보인다. 반면 파종 후 1년차의 큰 크기 실생묘는 자가수정이 4.0%로 판별되어 일반적으로 알려진 자가수정 비율에 근접했다. 한편 파종 후 2년차의 정식된 묘목 집단에서는 자가수정이 6.6%의 비율로 나타났다. 이는 일반 탱자에서 통상적으로 알려진 5~10%의 범위에 있었으며 정식 시에 자가수정 가능성이 높은 작은 개체들이 도태된 것과 관계되는 것으로 생각되었다.

**Table 5.** Frequency of self-fertilized seedlings detected by SSR markers in the small sealed field

| Seedling type | No. of sowed seeds     | No. of seedlings | No. of self-fertilized seedlings | Germinating order |          |
|---------------|------------------------|------------------|----------------------------------|-------------------|----------|
|               |                        |                  |                                  | 1st               | 2nd      |
| Single        | 40 (66.7) <sup>z</sup> | 40               | 10 (25.0)                        | -                 | -        |
| Double        | 20 (33.3)              | 40               | 7 (17.5)                         | 2 (5.0)           | 5 (12.5) |
| Total         | 60 (100.0)             | 80               | 17 (21.3)                        | -                 | -        |

<sup>z</sup>Frequency (%).

**Table 6.** Frequency of self-fertilized seedlings evaluated by SSR markers the 1st year (seedling) and 2nd year (transplanting) nursery (n=2)

| Year after sowing  | Plant size  | Self-fertilization frequency <sup>z</sup> (%) |
|--------------------|-------------|-----------------------------------------------|
| 1st(seedling)      | Large       | 4.0 ± 0.04 <sup>y</sup>                       |
|                    | Small       | 26.0 ± 0.02                                   |
|                    | Mean        | 15.0 ± 0.03                                   |
| 2nd(transplanting) | Large-Small | 6.6 ± 0.02                                    |

<sup>z</sup> One replicate consisted of 50 plants.

<sup>y</sup> Mean ± standard error.



**Fig. 3.** Classification of common trifoliate oranges by plant size in 1st year after sowing. Large (A) and small (B) seedlings.

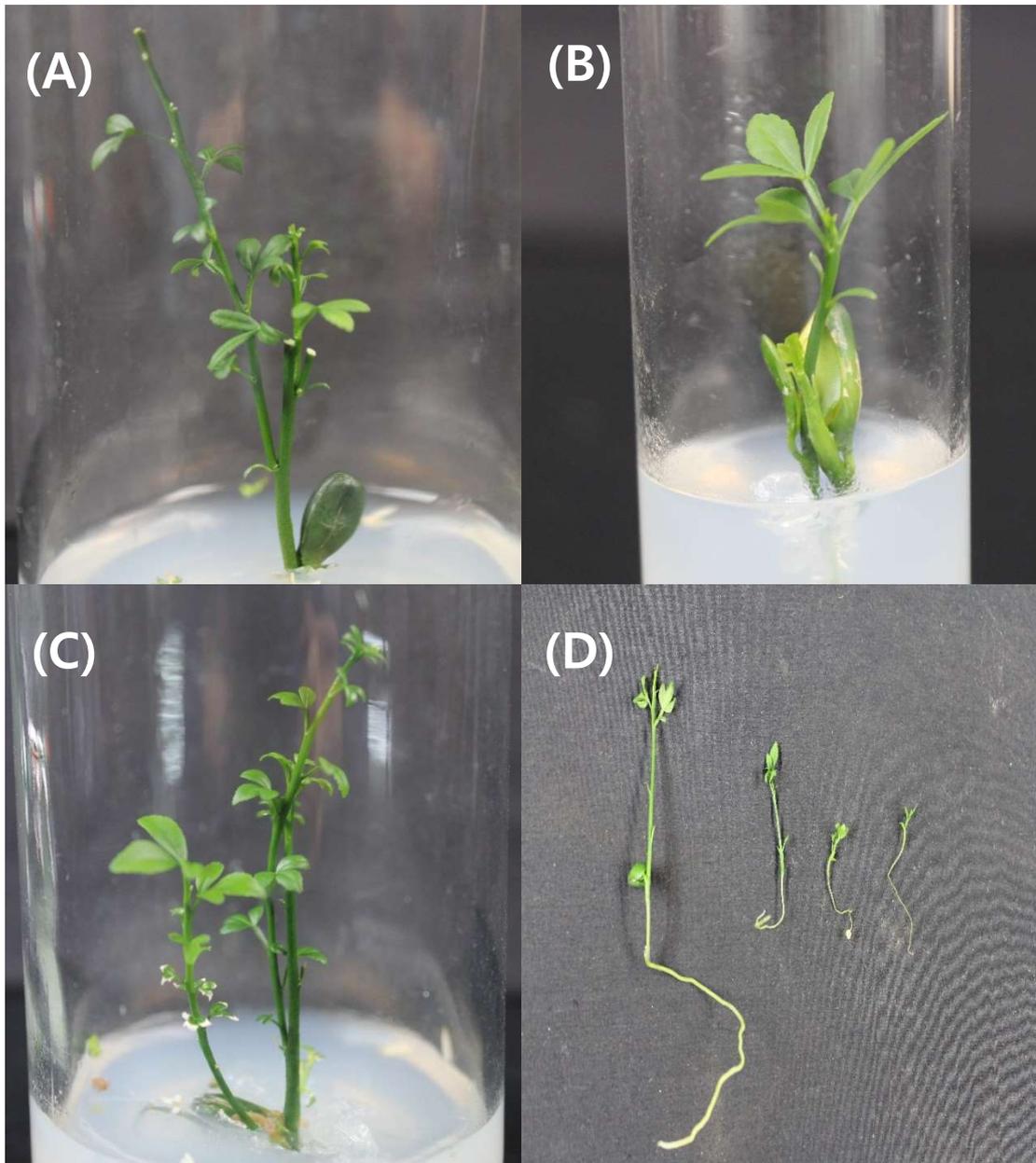
### 3. SSR markers를 이용한 일반 탱자 종자의 기내발아 특성 평가

감귤의 다배성 종자에서 여러 개체가 발생했을 때 품종에 따라 수정배 및 주심배 유래 비율에 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Yun et al., 2007). 이전 시험의 경우 탱자 종자에서 2개의 발아 식물체가 얻어지는 경우에는 2번째 발아 식물체에서, 그리고 묘포장 실생묘의 경우에는 작은 개체에서 자가수정 유래 비율이 높게 나타났다(Table 5, Table 6). 그러므로 추가적으로 탱자 종자를 기내과종하여 여러 개체가 발생하였을 경우 주심배 유래의 비율과 분포에 대해 분석하였다.

기내 과종 40개의 탱자 종자로부터 11개(27.5%)의 종자에서 한 개의 실생묘가 자라 올라왔고 14개(35.0%)의 종자에서 2개의 실생묘가, 그리고 15개(37.5%)의 종자에서 3개 이상의 실생묘가 발생하였다(Fig. 4 및 Table 7). 이에 대한 SSR markers의 적용결과, 한 종자에서 한 개의 실생묘가 자란 경우는 11개 중 3개가 자가수정 유래로 확인되어 자가수정 유래가 27.3%로 나타났다. 한 종자에서 2개의 실생묘가 자란 경우는 14개 종자에서 발생한 식물체 28개 중 4개 실생묘가 자가수정으로 확인되어 14.3%를 나타냈고, 모두 작은 실생묘에서 자가수정이 확인되었다. 3개 이상의 실생묘가 자란 경우에는 15개 종자에서 발생한 식물체 56개 중 2개 실생묘가 자가수정으로 확인되어 3.6%로 나타났다. 그 중 하나는 가장 작은 실생묘에서, 남은 하나는 2번째 크기의 실생묘에서 자가수정으로 나타났다(Fig. 5). 그러므로 총 95개의 실생묘에서 자가수정으로 확인된 실생묘는 9개로, 9.5%의 비율로 나타났다. 이 중 한 개의 실생묘가 자란 묘목에서는 3개가 자가수정 유래로 3.2%를 나타냈고, 두 개 이상의 실생묘가 자란 묘목에서는 2번째 크기의 실생묘에서 5.3%, 그리고 3번째 또는 4번째

크기의 실생묘에서 1.1%로 확인됐다(Table 7).

그러므로 한 종자에서 2개 이상의 실생묘가 발생했을 때 가장 큰 실생묘는 주심배일 확률이 높고 그보다 늦게 발아한 실생묘에서 자가수정으로 나타날 확률이 높았다. 이 같은 결과는 자가수정 유래 실생묘가 주심배 유래 실생묘와의 경합 과정에서 생육이 저해됐기 때문으로 생각된다. Koltunow et al. (1993)와 Aleza et al. (2010)에 의하면 다배성 감귤 종자에서 자가수정배 및 주심배의 발달 차이는 주심배의 빠른 발생 개시와 함께 영양분에 대한 경쟁 및 이용 가능성의 차이를 반영하기 때문이다. 따라서 자가수정 유래는 주심배보다 생존하여 발아하기 어렵고, 발아하여도 크기가 작고 생육이 불량한 편이다. 그러므로 시험 2에서 이미 기술한 바와 같이 정식 시에 이들 자가수정 유래의 작은 개체들은 인위적으로 분리되어 배제될 가능성이 매우 높은 것으로 생각된다.

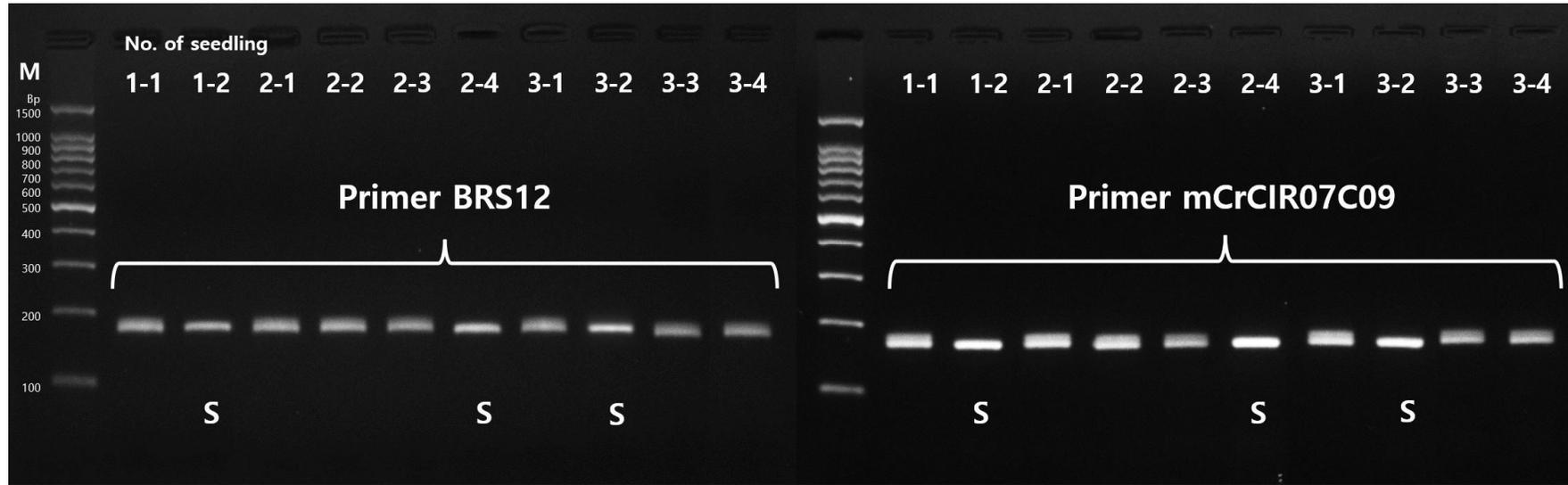


**Fig. 4.** In vitro trifoliate orange having single germinated seedling (A), two germinated seedlings (B), three or four germinated seedlings (C) and seedlings separated with plant size from four germinated seedlings (D).

**Table 7.** Frequency of self-fertilized seedlings evaluated by SSR markers in vitro seedlings

| Seeding type   | No. of seeds           | No. of seedlings | No. of self-fertilized seedlings | Germinating order |          |            |
|----------------|------------------------|------------------|----------------------------------|-------------------|----------|------------|
|                |                        |                  |                                  | 1st               | 2nd      | 3rd or 4th |
| Single         | 11 (27.5) <sup>z</sup> | 11               | 3 (27.3)                         | 3 (27.3)          | -        | -          |
| Double         | 14 (35.0)              | 28               | 4 (14.3)                         | 0 (0.0)           | 4 (14.3) | -          |
| Triple or more | 15 (37.5)              | 56               | 2 (3.6)                          | 0 (0.0)           | 1 (1.8)  | 1 (1.8)    |
| Total          | 40 (100.0)             | 95               | 9 (9.5)                          | 3 (3.2)           | 5 (5.3)  | 1 (1.1)    |

<sup>z</sup>Frequency (%).



**Fig. 5.** Distinguishment of nucellar or self-fertilized origins by SSR markers amplified with BRS12 and mCrCIR07C09 primers in vitro germinated trifoliolate orange plants. 1-1 means the 1st seedling germinated from '1 seed', 1-2 means the 2nd seedling germinated from '1 seed' etc. M: 100 bp molecular size marker; S: self-fertilized genotype.

## IV. 초록

국내 감귤 대목으로는 거의 대부분 탱자 실생묘를 사용하고 있다. 탱자 실생묘는 대부분 주심배 유래이고, 자가수정 유래가 낮은 비율로 혼재되어 있으나 육안 구별은 거의 불가능하다. 자가수정 유래의 탱자묘가 일부 혼재하게 되면 감귤 묘목의 불균일성이 나타나게 된다. 그러므로 탱자 실생묘에서 자가수정 및 주심배 유래를 구분하는 SSR 마커의 선발을 통해 자가수정 유래의 빈도를 평가하고 묘목의 균일성을 높이는데 활용하고자 본 연구를 수행하였다. 뒤틀림 외형의 비롱 탱자와 자가수정 유래의 비뒤틀림 외형의 비롱 탱자에 비롱 탱자전사체 분석 기반의 SSR markers 57개, 국내 보고된 감귤 품종 구별 SSR markers 53개, 그리고 외국에서 보고된 탱자의 다형성 SSR markers 7개를 합쳐 총 117개의 SSR markers를 적용하였다. 뒤틀림 외형에서 이형접합체로, 그리고 비뒤틀림 외형에서는 동형접합체로 나타내는 SSR markers 20개를 선발하였으며, 이 중 한 개체에서 double check가 가능한 7개를 최종 선발하였다. 선발된 SSR markers를 일반 탱자에 적용하여 유래 분석을 실시한 결과, 한 종자에서 두 개의 묘가 발생했을 때 큰 식물체보다 작은 식물체에서 더 많은 자가수정 유래가 확인됐으며, 기내파종되어 여러 개체를 발생시켰을 때 가장 큰 개체에서는 자가수정이 확인되지 않았다. 한편 육묘장의 파종 1년차 실생 집단 중 키가 큰 실생묘에서는 4.0%, 작은 실생묘에서는 26.0%로 자가수정 유래가 확인되었다. 생육이 불량한 개체를 분리 도태시킨 파종 2년차 정식 집단에서는 자가수정이 6.6%의 비율로 나타났다. 본 연구를 통해 SSR markers는 감귤 대목의 자가수정 및 주심배 유래를 효율적으로 구분할 수 있었으며, 이를 활용하면 감귤 묘목 생산의 균일성을 높임은 물론 감귤에서 생육이 불균일한 개체에서 자가수정 유래 탱자 대목의 영향 여부에 대해 확인이 가능하게 될 것이다.

## 인 용 문 헌

- Aleza P, Juárez J, Ollitrault P, Navarro L (2010)** Polyembryony in non-apomictic citrus genotypes. *Ann Bot* 106:533-545
- Anderson CM, Castle WS, Moore GA (1991)** Isozymic identification of zygotic seedlings in swingle citrumelo *Citrus paradisi* X *Poncirus trifoliata* nursery and field populations. *J Amer Soc Hort Sci* 116:322-326
- Andrade-Rodriguez M, Montecillo C, Villegas-Monter A, Gutierrez-Espinosa MA, Carrillo-Castaneda G, Garcia-Velazquez A (2005)** Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. *Agrociencia* 39:371-383
- Chae CW, Yun SH, Park JH, Kim MJ, Han SG, Kang SB, Koh SW, Han SH (2013)** Improvement of seed germination in a spontaneous autotetraploid of poncirus and chlorophyll fluorescence of seedlings in salt stress. *J Life Sci* 23:1079-1087
- Cheng FS, Roose ML (1995)** Origin and inheritance of dwarfing by the citrus rootstock *Poncirus trifoliata* 'Flying Dragon'. *J Amer Soc Hort Sci* 120:286-291
- Cheng YJ, Guo WW, Yi HL, Pang XM, Deng X (2003)** An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species. *Plant Mol Biol Rep* 21:177-178
- Doyle JJ, Doyle JL (1990)** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- Froelicher Y, Dambier D, Bassene JB, Costantino G, Lotfy S, Didout C, Beaumont V, Brottier P, Risterucci AM, Luro F, Ollitrault P (2008)** Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Mol Ecol Resour* 8:119-122
- Fukui K (2020)** Genetic and breeding the second edition of the plant. Seoul, Korea: Worldscience

- Gill MIS, Chawla N, Chopra HR (2002)** Isozyme characterization and indexing of in vitro raised nucellars in *Citrus* rootstocks. *Indian J Hort* 59:122-126
- Hong JH, Che CW, Choi KJ, Kwon YS (2016)** A database of simple sequence repeat (SSR) marker-based DNA profiles of *Citrus* and related cultivars and germplasm. *Korean J Hort Sci Technol* 34:142-153
- Hwang JH, Kim HJ, Chae Y, Choi HS, Kim MK, Park YH (2012)** Evaluation of germplasm and development of SSR markers for marker-assisted backcross in tomato. *Korean J Hort Sci Technol* 30:557-567
- Kamiri M, Stiff M, Costantino G, Dambier D, Kabbage T, Ollitrault P, Froelicher Y (2018)** Preferential homologous chromosome pairing in a tetraploid intergeneric somatic hybrid (*Citrus reticulata* + *Poncirus trifoliata*) revealed by molecular marker inheritance. *Front Plant Sci* 9:1557
- Kashyap K, Banu S, Shrivastava M, Ramchiary N (2018)** Study of polyembryony and development of molecular markers for identification of zygotic and nucellar seedlings in Khasi mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). *Int J Environ Agric Biotechnol* 3:2456-1878
- Kepiro JL, Roose ML (2007)** Nucellar embryony. *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. Wallingford, UK: CABI
- Khan IA, Roose ML (1988)** Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliolate orange. *J Amer Soc Hort Sci* 113:105-110
- Kim KM, Nam WL, Kwon YS, Sohn JK (2004)** Development of doubled-haploid population and construction of genetic map using SSR markers in rice. *J Plant Biotechnol* 31:179-184
- Kishore K, Monika N, Rinchen D, Lepcha B, Pandey B (2012)** Polyembryony and seedling emergence traits in apomictic *Citrus*. *Sci Hort* 138:101-107

- Koh HJ, Kwon SY, Thomson M (2015)** Current technologies in plant molecular breeding: A Guide Book of Plant Molecular Breeding for Researchers. New York, USA: Springer
- Koltunow AM (1993)** Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5:1425-1437
- Korean Statistical Information Service (KOSIS) (2021)** <https://kosis.kr>. Accessed 02 December 2022
- Lee JY, Seo MS, Won SY, Lim KA, Shin LS, Choi DS, Kim JS (2018)** Construction of a genetic map using the SSR markers derived from “Wonwhang” of *Pyrus prifolia*. *Korean J Breed Sci* 50:434-441
- Mademba-Sy F, Lemerre-Desprez Z, Lebegin S (2012)** Use of Flying Dragon trifoliolate orange as dwarfing rootstock for citrus under tropical climatic conditions. *HortScience* 47:11-17
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (2021)** <https://kass.mafra.go.kr>. Accessed 02 December 2022
- Mondal B, Pramanick S, Saha R, Karmakar M (2015)** Application of simple sequence repeat markers for demarcation of *Citrus reticulata* nucellar and hybrid seedlings. *Int J Biosci* 6:128-133
- Moore GA, Castle WS (1988)** Morphological and isozymic analysis of open-pollinated citrus rootstock populations. *J Hered* 79:59-63
- Roose ML, Prechtel SN (1988)** Identification and performance of citrus trees on nucellar and zygotic rootstocks. *J Amer Soc Hort Sci* 113:100-105
- Villegas-Monter A, Matinez-Ochoa EDC, Andrade-Rodriguez M, Villegas-Velazquez I (2022)** *Citrus* polyembryony. In *Advances in Citrus Production and Research*. London, UK: IntechOpen
- Woo JK, Yun SH, Yi KU, Park YC, Lee HY, Kim MJ, Lee Y, Song KJ, Kim HB (2020)**

Identification of citrus varieties bred in Korea using microsatellite markers. *Hortic Sci Technol* 38:374-384

**Xiang C, Roose ML (1988)** Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in 12 *Citrus* rootstocks. *Sci Hortic* 37:47-59

**Yun JU, Yang HB, Jung YH, Yun SH, Kim KS, Kim CS, Song KJ (2007)** Identification of zygotic and nucellar mandarin seedlings using randomly amplified polymorphic DNA. *Hortic Environ Biotechnol* 48:171-175