



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

만다린의 배수체간 교잡에서
종자 형성과 3배체 후대 생성의 반응

박 지 영

제주대학교 대학원

원예학과

2024년 2월

만다린의 배수체간 교잡에서
종자 형성과 3배체 후대 생성의 반응

지도교수 송 관 정

박 지 영

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함

2023년 12월

박지영의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	한 상 현 교수	
위 원	오 욱 교수	
위 원	송 관 정 교수	

제주대학교 대학원

2023년 12월

목 차

목차.....	i
요약	ii
LIST OF TABLES	iv
LIST OF FIGURES	v
I. 서언	1
II. 재료 및 방법	3
1. 식물재료	3
2. 인공 수분 및 화분관 신장.....	3
3. 종자 분류 및 기내 파종.....	5
4. 배수성 검증.....	5
III. 결과 및 고찰	7
1. 배수성에 따른 수정의 영향.....	7
2. 교배조합에 따른 종자 형성도.....	7
3. 교배조합에 따른 3배체 식물체 획득률.....	12
IV. 인용문헌.....	18
V. ABSTRACT.....	22

만다린의 배수체간 교잡에서 종자 형성과 3배체 후대

생성의 반응

박지영

제주대학교 대학원 원예학과

요약

감귤에서 종자가 없는 무핵 특성은 주요한 육종 목표의 하나이다. 3배체 품종은 무핵을 얻는 가장 안정적인 방법이고, 4배체와 2배체 간 또는 2배체 간 교잡으로 육성될 수 있다. 본 연구는 감귤의 배수성에 따른 교잡에서 종자 형성의 특성과 3배체의 획득 정도를 평가하고자 수행되었다. $4x \times 2x$, $2x \times 4x$ 및 $2x \times 2x$ 교잡에서 정상종자의 형성은 각각 과실당 0.2개, 0.2개 및 2.6개로 $2x \times 2x$ 교잡에서 가장 많이 형성(85.0%)되었고, 부분 발육 종자는 각각 0.7개, 0.1개 및 0.2개로 $4x \times 2x$ 교잡에서 가장 많이 형성(35.3%)되었으며, 미발육종자는 각각 1.1개, 1.0개 및 0.3개로 $2x \times 2x$ 교잡에서 가장 낮게 나타났다. 식물체는 성숙한 과실의 종자를 기내배양하여 획득하였으며 배수성은 배수성 검정기로 분석하였다. 교잡종자의 식물체 획득은 $2x \times 2x$ 교잡의 경우 대부분 2배체(98.8%)이고, $4x \times 2x$ 교잡의 경우 3배체 73.0% 및 4배체 식물체 27.0%, 그리고 $2x \times 4x$ 교잡의 경우 2배체 식물체 14.3%, 3배체 57.1% 및 4배체 식물체 28.6%로 나타났다. 2배체 식물체는 대부분 정상종자로부터 획득되었으며, 3배체 및 4배체 식물체는 부분 발육 종자 및 미발육종자로부터 대부분 획득되었다. 본 연구결과

3배체 품종의 육성을 위해서는 $4x \times 2x$ 교잡을 이용하는 것이 가장 효율적이며
부분 발육 종자 및 미발육종자의 기내배양이 수반되어야 함을 확인할 수 있었다.

LIST OF TABLES

Table 1. Parents of mandarin used in hybridizations.....	4
Table 2. Fruit set and seed formation according to interploid cross combinations.....	10
Table 3. Recovery and ploidy level of plants obtained from in vitro seed culture in different interploid crosses.....	13

LIST OF FIGURES

- Fig. 1.** Pollen tube growth in pistils ($4n \times 2n$, 'Benibae' \times 'Clemenules' $2n \times 4n$, 'Ehime Kashi 28 gou' \times 'Kanpei' $2n \times 2n$, 'Ehime Kashi 28 gou' \times 'Clemenules'). Scale bar indicates 200 μm8
- Fig. 2.** Sections of fruits at harvest. (A) $4x$ 'Benibae' \times $2x$ 'Clemenules', (B) $2x$ 'Ehime Kashi 28 gou' \times $4x$ 'Kanpei', and (C) $2x$ 'Tamami' \times $2x$ 'Clemenules'.....9
- Fig. 3.** Ploidy level determination by flow cytometry analysis. (A) tetraploid control, (B) triploid of 'Benibae' \times 'Clemenules', and (C) tetraploid of 'Benibae' \times 'Clemenules'15

I. 서언

감귤은 아열대 기원의 2배체 ($2n= 2x = 18$) 식물로, 수천년 전부터 재배되어 전세계에 퍼졌으며 세계에서 가장 광범위하게 생산되는 과수 작물이다(Ollitrault and Navarro, 2011). 감귤은 약 130개 국가에서 재배되고 있으며 주요 생산국은 중국, 브라질, 미국, 멕시코 등으로, 이들 국가의 2021년 기준 생산량은 세계 총 생산량의 49.9%인 약 8천만 톤을 기록하고 있다(FAO, 2021).

단위결과성은 속씨식물에서 수정되지 않고도 정상적인 과실로 발달할 수 있는 현상으로 감귤에서 무핵 과실을 생산하기 위한 필수적인 특성이며(Vardi et al., 2008; Montalt et al., 2021), 소비자들은 종자가 없는 과실을 선호하기 때문에 무핵 과실은 감귤 육종에 있어서 가장 중요한 특성이자 주요 육종 목표의 하나이다(Yamamoto et al., 1995). 자가불화합성은 무핵 과실을 생산하는 단위결과와 관련되어 있으며(Gambetta et al., 2013), 자가불화합성과 관련된 무핵 정도는 타 품종 임성 꽃가루의 존재에 크게 영향을 받는다(Recupero et al., 2005). 다양한 품종의 보급으로 인해 품종간 교배 기회가 늘어나면서 타 품종 임성 꽃가루의 유입에 의한 종자 형성 문제는 스페인 등에서 널리 보고되었다(Recupero et al., 2005; Navarro et al., 2015). 스페인에서 가장 널리 재배되고 있는 ‘클레멘타인’은 자가불화합성으로 단일 품종 재배 시 무핵 과실을 생산할 수 있다. 그러나 만생종 만다린의 수요를 충족하기 위해 ‘Nova’, ‘Fortune’ 등의 품종들이 도입되었고, 과실에서 종자 형성 문제가 발생되었다. ‘클레멘타인’의 꽃가루와 자방은 불임이 아니기 때문에 수분이 가능하고 타 품종에 의해 수분될 수 있기 때문에 두 품종 모두에서 종자가 있는 과실이 형성되어 경제적 손실이

발생하였다(Recupero et al., 2005; Navarro et al., 2015). 세계적으로 무핵 과실을 생산할 수 있는 3배체 품종과 3배체를 생산하기 위한 식물재료로서 4배체 품종의 개발이 다양하게 시도되고 있다(Cameron and Burnett, 1978; Grosser et al., 2000; Grosser et al., 2014). 3배체 품종은 일반적으로 배우체 불임으로 간주되고(Otto and Whitton, 2000), 이는 환경변화에 거의 영향을 받지 않는다(Recupero et al., 2005). 그러므로 3배체 품종의 개발은 무핵 감귤의 상업적 품종을 개발하기 위한 중요한 육종 전략의 하나이다(Ollitrault et al., 2008).

교배 육종은 국내 과수 육종에서 가장 빈번하게 사용되는 방법으로 감귤 외에 사과, 배, 키위, 복숭아 등에서도 이용되고 있다(Chung et al., 2020). 감귤에서 3배체 식물은 2배체 간 교배에서 미감수분열의 $2n$ 배낭세포와 반수체 꽃가루의 결합(Esen and Soost, 1971) 또는 4배체와 2배체간 교배를 통해 획득될 수 있다(Cameron and Burnett, 1978; Esen et al., 1978). 이들 교배에서 3배체 식물은 주로 부분 발육 종자에서 얻어지는 것으로 알려져 있으나 이에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 특히 많은 감귤 품종들은 주심조직으로부터의 체세포배 발달에 의한 다배성의 특성을 보유하고 있는데, 이 경우 교잡모본에서의 교잡배 퇴화에 의한 교잡실생 형성이 저하되어 교잡육종의 걸림돌로 작용하게 되므로 교잡육종에서의 단배성 모본의 이용 여부는 매우 중요하다(Aleza et al., 2010a). 따라서 본 연구는 단배성의 4배체와 2배체 및 단배성의 2배체와 4배체 간 교배 조합에 따른 종자 형성도와 후대 3배체 식물의 생산 정도를 평가하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

제주대학교 실습농장 및 제주특별자치도 농업기술원 유전자원 포장에 재식된 ‘감평(Kanpei)’, ‘베니바에(Benibae)’, ‘에히메과시 28호(Ehime Kashi 28 gou)’, ‘청건(Kiyomi)’, ‘클레멘타인(Clemenules)’, ‘타로코(Tarocco)’, ‘타마미(Tamami)’를 식물재료로 이용하였다(Table 1). ‘감평’, ‘베니바에’ 및 ‘타로코’는 콜히친 처리로 육성된 동질 4배체이다. 종자친으로 이용된 품종들은 ‘타마미’를 제외하고 모두 단배성 품종이며 ‘타마미’는 87.5%의 확률로 단배성 종자를 생산하는 품종이다. 꽃가루 채취 및 인공수분은 2022년 4월 말부터 5월 초 사이에 수행되었다. 개화하기 직전의 꽃에서 약을 분리하여 여과지를 올려둔 패트리디쉬에 모아 25.0℃ 조건 하에서 32~48시간 내외 건조하여 개약시켰다. 이를 작은 병에 담아 교배에 사용하기 전까지 -20.0℃에서 보관하였다.

2. 인공 수분 및 화분관 신장 관찰

교배조합에 따라 -20.0℃에 저장해 두었던 꽃가루로 인공수분하였다. 교배가 정상적으로 이루어졌는지 확인하기 위해 인공수분 10일 후 각 교배조합에 따라 암술을 채취하였다. 암술을 FAA(formalin : acetic acid : 70% ethanol, 1 : 1 : 18, v/v/v) 용액에 넣어 4.0℃에서 암상태로 고정시켰다. 고정된 암술은 3차 증류수로 15분간 4~5번 침지·세척하였고, 2N NaOH 용액에 두어 60.0℃에서 80~90분 동안 연화처리한 다음, 다시 3차 증류수로 15분간 4~5회 침지·세척하였다. 연화된 암술은 0.1% aniline blue(0.1% aniline blue를 0.1 N K₃PO₄에 용해)에

Table 1. Parents of mandarin used in hybridizations.

Cultivar name (ploidy)	Scientific name	Embryony
Benibae (autotetraploid)	$(C. unshiu \times C. sinensis) \times C. reticulata$	Mono
Clemenules (diploid)	<i>C. clementina</i> hort. ex Tan	Mono
Ehime Kashi 28 gou (diploid)	$(C. unshiu \times C. clementina) \times [(C. unshiu \times C. sinensis) \times C. unshiu] \times C. reticulata$	Mono
Kanpei (autotetraploid)	$\{(C. unshiu \times C. sinensis) \times C. sinensis\} \times C. reticulata$	Poly
Kiyomi (diploid)	$C. unshiu \times C. sinensis$	Mono
Tamami (diploid)	$(C. unshiu \times C. sinensis) \times C. reticulata$	Poly
Tarocco (autotetraploid)	<i>C. sinensis</i>	Poly

두어 상온에서 암상태로 24시간 동안 염색하였다. 염색된 암술은 암술대와 자방이 분리되도록 자르고, 암술대와 자방을 세로로 다시 잘랐다(Pok et al., 2015). 자른 암술의 절편체를 슬라이드 글라스에 올리고 커버 글라스를 덮어 누른 후 단면을 형광현미경 (Leica DMRBE, Leica Co., Germany)으로 관찰하였다.

3. 종자 분류 및 기내 파종

성숙기에 과실을 수확하여 70.0% 에탄올에 10분간 침지하여 표면 살균한 후 무균상에서 종자를 채취하였다. 종자는 완전히 발육한 정상종자, 70.0% 내외로 발육한 부분 발육 종자, 그리고 미발육종자인 쪽정이의 3가지로 구분하였고, 30.0g/L sucrose와 8.0g/L plant agar가 첨가된 MS 배지(Murashige and Skoog, 1962)에 파종하였다. 종자가 발아하면 30.0g/L sucrose, 1.0mg/L BA, 0.1mg/L NAA 및 8.0g/L plant agar가 첨가된 MS 배지로 옮겨주고 1개월마다 배지를 교환하였다. MS 배지는 121.0℃에서 15분간 고압멸균한 후 이용하였으며 pH는 5.8로 맞추었다. 종자 및 식물체는 $25.0 \pm 1^\circ\text{C}$ 온도 조건과 16시간의 일장 하에서 생육되었다.

4. 배수성 검정

배수성 검정은 배수성 분석기(flow cytometry, PA-II, Partec, Munster, Germany)를 이용해 분석되었으며, 배수체 검정은 Song et al.(2011)의 방법으로 수행되었다. 기내에서 자란 어린 식물체의 잎($< 50\text{mm}^2$)을 채취하여 세포벽을 분해하는 nuclei extraction buffer 용액 400.0 μL 를 넣고 약 30초간 면도날로 잘게 자른 후 30.0 μm 필터에 여과시켰다. 이를 1.6mL 4,6-diamidino-2-

phenylindole (DAPI) 용액으로 염색하고 약 1분 후 배수성을 분석하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 배수성에 따른 수정의 영향

감귤의 배수체 간 교잡에서 수정 과정에서의 배수성 영향을 평가하기 위해 인공수분 후 암술 내 화분관 신장을 관찰하였다(Fig. 1). 인공수분 10일 후, 발아한 많은 꽃가루들의 화분관이 암술대 내로 신장하고 자방에 도달하여 정상적인 수정과정을 보이고 있음을 확인할 수 있었다. 감귤의 경우 동질4배체의 꽃가루 발아율은 상응하는 2배체 꽃가루와 거의 비슷한 수준으로(Aleza et al., 2012a), 교잡과정에서 배수성만이 꽃가루 발아율에 관여하는 요인은 아니며(Lora et al., 2022) 발아율이 다소 낮더라도 수정에는 문제가 없다고 알려진 바 있다(Viloria and Grosser, 2005). 수박에서 *in vivo* 발아시험 결과 4배체보다 2배체에서 월등히 많은 수의 화분관이 신장한다는 보고가 있지만(Kim et al., 2019), 이와 대조적으로 본 연구에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 그러므로 배수체 간 교잡에서 화분관의 신장과 수정에 미치는 배수성의 영향은 매우 적을 것으로 생각된다.

2. 교배조합에 따른 종자 형성도

각 교배조합에 따른 과실의 단면을 Fig. 2에 나타내었으며 착과량과 종자 형태에 따른 종자 수를 Table 2에 나타내었다. $4x \times 2x$ 교배조합의 착과율은 24.8%, $2x \times 4x$ 은 14.2%, $2x \times 2x$ 은 14.0%로 $4x \times 2x$ 교배조합에서 착과율이 높게 나타났다. 또한, ‘Benibae’×‘Clemenules’ 조합에서 37.8%로 착과율이 가장 높았다. 반면 ‘Benibae’와 ‘Ehime Kashi 28 gou’를 정역교배한 결과 착과율은 각각

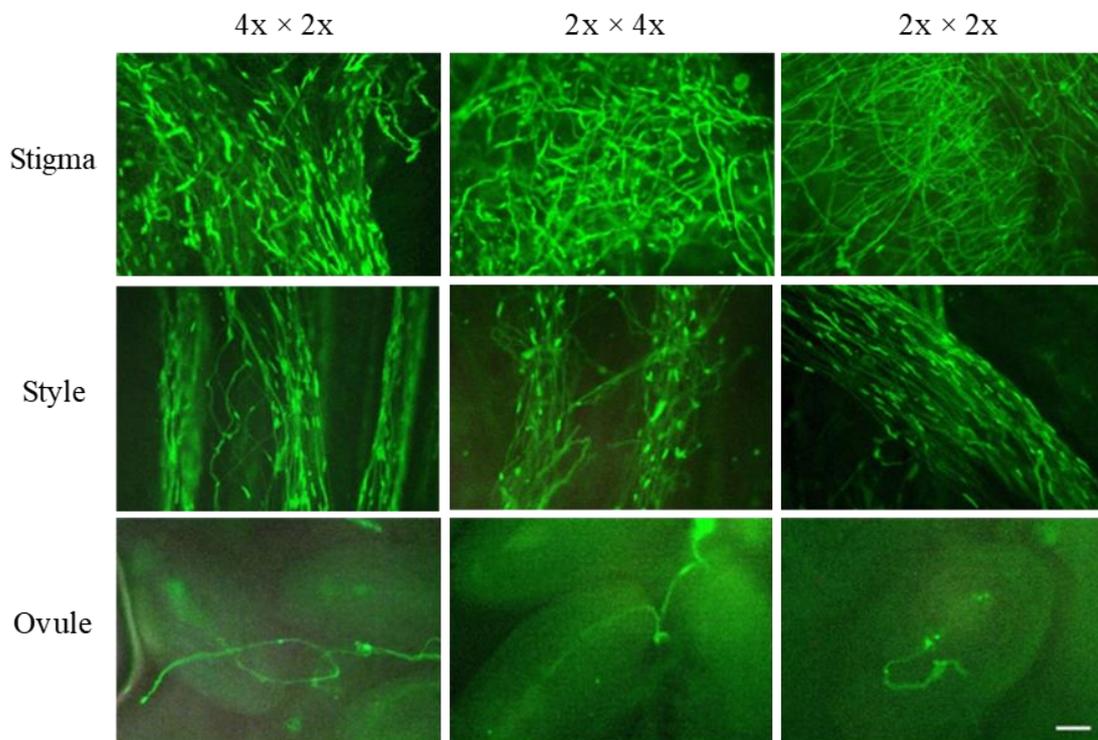


Fig. 1. Pollen tube growth in pistils (4n×2n, 'Benibae' × 'Clemenules' 2n×4n, 'Ehime Kashi 28 gou' × 'Kanpei' 2n×2n, 'Ehime Kashi 28 gou' × 'Clemenules'). Scale bar indicates 200 μm.

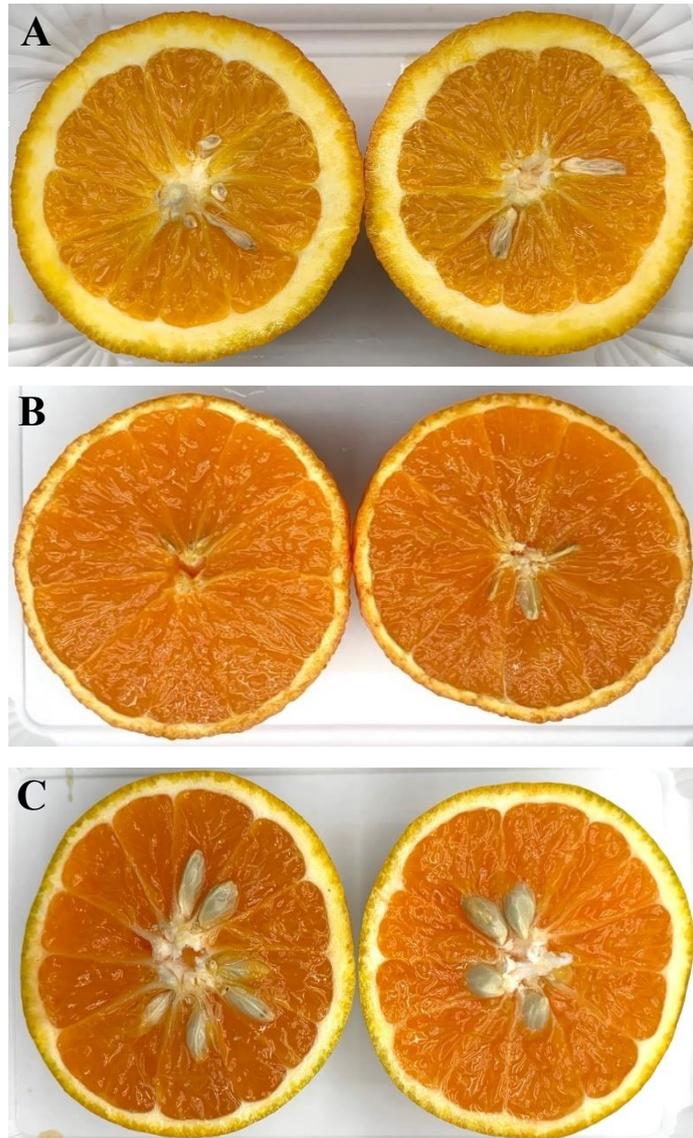


Fig. 2. Sections of fruits at harvest. (A) 4x 'Benibae' × 2x 'Clemenules', (B) 2x 'Ehime Kashi 28 gou' × 4x 'Kanpei', and (C) 2x 'Tamami' × 2x 'Clemenules'.

Table 2. Fruit set and seed formation according to interploid cross combinations.

Interploid cross	Seed parent	Pollen parent	No. of pollinated flowers	No. of fruit sets (%)	Seed formation (%)			Total
					Fully developed	Partially developed	Undeveloped	
4x × 2x	Benibae	Clemenules	37	14 (37.8)	3 (7.9)	15 (39.5)	20 (52.6)	38
	Benibae	Ehime Kashi 28 gou	68	12 (17.6)	1 (7.7)	3 (23.1)	9 (69.2)	13
	Total		105	26(24.8)	4 (7.8)	18 (35.3)	29 (56.9)	51
2x × 4x	Clemenules	Benibae	84	0 (0.0)	-	-	-	-
	Ehime Kashi 28 gou	Benibae	111	28 (25.2)	2(11.8)	4 (23.5)	11 (64.7)	17
	Ehime Kashi 28 gou	Kanpei	166	35 (21.1)	11(14.0)	8 (10.1)	60 (75.9)	79
	Ehime Kashi 28 gou	Tarocco	53	9(17.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (100.0)	11
	Kiyomi	Kanpei	4	1(25.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0
	Tamami	Benibae	89	13(14.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	1
	Tamami	Kanpei	114	2(1.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (100.0)	4
Total		621	88(14.2)	13(11.6)	12 (10.7)	87 (77.7)	112	
2x × 2x	Ehime Kashi 28 gou	Clemenules	108	30(27.8)	57(90.5)	6 (9.5)	0 (0.0)	63
	Tamami	Clemenules	135	4(3.0)	34(77.3)	0 (0.0)	10 (22.7)	44
	Total		243	34(14.0)	91(85.0)	6 (5.6)	10 (9.3)	107

17.6% 및 25.2%로, 2배체와 4배체 'Kinnow'의 정역교배에서 보고된 바 (Jaskani et al., 2005)와 마찬가지로 $2x \times 4x$ 교잡에서 착과율이 높게 나타났다.

$4x \times 2x$ 교잡에서 종자는 과실당 2.0개, $2x \times 4x$ 교잡에서 1.3개, $2x \times 2x$ 교잡에서는 3.1개가 형성되었으며, Aleza et al.(2010b, 2012a, 2012b)보다 과실당 종자수는 적게 형성되었다. $4x \times 2x$ 교잡에서 정상종자는 과실당 0.2개, 부분 발육 종자는 0.7개 및 미발육종자는 1.1개로 각각 나타났으며 $2x \times 4x$ 교잡에서는 과실당 정상종자 0.2개, 부분 발육 종자 0.1개 및 미발육종자 1.0개로 나타났다. $2x \times 2x$ 교잡에서는 과실당 정상종자는 2.6개, 부분 발육 종자는 0.2개 및 미발육종자는 0.3개로, 정상종자는 $2x \times 2x$ 에서 가장 많이 나타났고 미발육종자는 가장 적게 나타났다. Aleza et al.(2012b)와 마찬가지로 $4x \times 2x$ 교잡에서 정상종자보다 부분 발육 종자가 많이 형성되었으며, 정상종자의 형성이 $2x \times 4x$ 교잡보다 많다(Jaskani et al., 2005)는 보고와는 달리 큰 차이가 나타나지 않았다. $4x \times 2x$ 교잡에서 정상종자는 7.8%, 부분 발육 종자는 35.3%, 미발육종자는 56.9%의 비율로 형성되었고, $2x \times 4x$ 교잡에서 정상종자는 11.6%, 부분 발육 종자는 10.7%, 미발육종자는 77.7%로 형성되었다. $2x \times 2x$ 교잡은 정상종자가 85.0%, 부분 발육 종자가 5.6%, 미발육종자가 9.3%로 형성되었다.

$2x \times 4x$ 교잡에서 전체 종자 중 미발육종자의 발생이 많았는데, 이는 배와 배유의 배수성 비율과 연관된 것으로 생각된다. 배와 배유의 배수성 비율이 2:3($2x \times 2x$) 또는 3:5($4x \times 2x$)인 경우 종자는 정상적으로 생존 가능한 식물체를 형성하지만, 비율이 3:4($2x \times 4x$)인 경우 3x의 배를 갖는 종자에서는 대부분 식물체로의 정상적인 발달이 진행되지 못하며 몇 개의 종자에서만 정상 식물체로 성장할 수 있다고 보고되었다(Esen and Soost, 1973; Esen et al., 1978). 배유는 배보다 먼저 발달하고(Brink and Cooper, 1947), 배의 형태형성 초기단계

를 조절한다(Lester and Kang, 1998). 그러므로 배와 배유 사이의 염색체 수 불균형이 두 조직 사이의 생리적 관계를 교란시켜 먼저 배유의 퇴화를 초래하고 이후 배가 퇴화되기 때문에(Esen and Soost, 1973) $2x \times 4x$ 교잡에서 미발육종자가 많이 나타나는 것으로 생각된다.

3. 교배조합에 따른 3배체 획득률

종자를 배지에 파종하여 식물체를 획득하였는데 이들 조합의 식물체 획득률은 $4x \times 2x$ 교잡에서 72.5%, $2x \times 4x$ 교잡에서 18.8%, 그리고 $2x \times 2x$ 교잡에서 78.5%로 나타났다(Table 3). Aleza et al.(2012a, 2012b)에 의하면 $2x \times 4x$ 와 $4x \times 2x$ 교배의 종자 발아율은 두 조합에서 모두 높게 나타나고 큰 차이가 없었으나 본 연구에서는 $2x \times 4x$ 교배의 발아율 및 식물체 획득률이 매우 낮게 나타났다. 정상종자와 부분 발육 종자가 발아하지 못하고 고사하는 경향을 보였으나 그 이유가 불분명하기 때문에 이에 어떤 요인이 관여한 것인지 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Oiyama and Kobayashi(1990)에 따르면 $2x \times 4x$ 교배의 미발육종자는 배의 유무에 따라 2가지 형태로 존재하며, 미발육종자 중 24.9%가 배가 없는 미발육종자로 나타났다. 본 연구에서 미발육종자의 형태를 구분하지는 않았으나, $4x \times 2x$ 교배의 경우 29개의 미발육종자 중 18개(62%)에서 식물체를 획득한 반면 $2x \times 4x$ 교배에서는 87개의 미발육종자 중 식물체 획득은 15개(17%)에 불과했기 때문에 $2x \times 4x$ 교배에서 배가 없는 미발육종자의 발생이 많았을 것으로 생각된다.

Table 3. Recovery and ploidy level of plants obtained from in vitro seed culture in different interploid crosses.

Interploid cross	Seed parent	Pollen parent	No. of fully developed seeds				No. of partially developed seeds				No. of undeveloped seeds			
			Total	2x	3x	4x	Total	2x	3x	4x	Total	2x	3x	4x
4x × 2x	Benibae	Clemenules	3(3)	-	2	1	12(15)	-	11	1	16(20)	-	12	4
	Benibae	Ehime Kashi 28 gou	1(1)	-	-	1	3(3)	-	-	3	2(9)	-	2	-
	Total		4(4)	-	2	2	15(18)	-	11	4	18(29)	-	14	4
2x × 4x	Clemenules	Benibae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ehime Kashi 28 gou	Benibae	1(2)	-	1	-	0(4)	-	-	-	0(11)	-	-	-
	Ehime Kashi 28 gou	Kanpei	5(11)	1	4	-	0(8)	-	-	-	14(60)	2	6	6
	Ehime Kashi 28 gou	Tarocco	0	-	-	-	-	-	-	-	1(11)	-	1	-
	Kiyomi	Kanpei	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tamami	Benibae	0	-	-	-	-	-	-	-	0(1)	-	-	-
	Tamami	kanpei	0	-	-	-	-	-	-	-	0(4)	-	-	-
	Total		6(13)	1	5	-	0(12)	-	-	-	15(87)	2	7	6
2x × 2x	Ehime Kashi 28 gou	Clemenules	52(57)	52	-	-	2(6)	2	-	-	0	-	-	-
	Tamami	Clemenules	30(34)	29	1	-	0	-	-	-	0(10)	-	-	-
	Total		82(91)	81	1	-	2(6)	2	-	-	0(10)	-	-	-

교잡종자의 기내 배양으로 획득된 식물체의 유업을 채취하여 배수성 검정기로 배수성을 분석했으며(Fig. 3), 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 배수성 검정 결과 3배체는 $4x \times 2x$ 교잡의 정상종자에서 2개(50.0%), 부분 발육 종자에서 11개(73.3%) 및 미발육종자에서 14개(77.8%)가 획득되었다. 2배체는 획득되지 않았으며 나머지 2개는 모두 4배체로 나타났다. 본 연구에서 3배체는 정상종자보다 부분 발육 종자와 미발육종자에서 많이 획득되었다. Aleza et al.(2012b)는 4배체 ‘클레멘타인’에 2배체 ‘클레멘타인’의 꽃가루를 교배하여 0.5%의 확률로 4배체를 획득하였는데, SSR 마커를 이용해 분석한 결과 이는 자가수정 유래였으며, ‘클레멘타인’은 자가불화합성으로 자가수정될 확률이 낮기 때문에 4배체 발생 빈도가 매우 낮게 나타나게 된 것으로 보고하였다. ‘베니바에’의 경우 자가불화합성 정도가 아직 알려지지 않았기 때문에 이에 관련한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

$2x \times 4x$ 교잡에서는 정상종자에서 5개(83.3%), 부분발육종자에서 0개 및 미발육종자에서 7개(46.7%)의 3배체가 획득되었다. 4배체는 미발육종자에서 6개(40.0%)가 획득되었고 나머지는 2배체로 나타났으며 2, 3, 4배체 모두가 획득되었다. 감귤에서 단배성 품종을 종자친으로 이용하였을 때 미발육종자에서 다양한 다배성 종자가 형성될 수 있다. Aleza et al.(2012a)는 $2x \times 4x$ 교잡에서 미발육종자의 67.0%가 단배, 33.0%가 다배였으며, Oiyama et al.(1990)는 배가 있는 286개의 미발육종자에서 78.0%가 단배성, 나머지는 다배성으로 보고한 바 있다. 반면, 본 연구에서는 미발육종자에서 다배성 종자가 형성되지 않았으나, 3배체로 판별된 다배성 미발육종자는 수정배 유래이기 때문에(Oiyama and Kobayashi, 1991), 다배성 및 단배성 종자에 따른 유전자형의 다양성은 차이가 없을 것으로

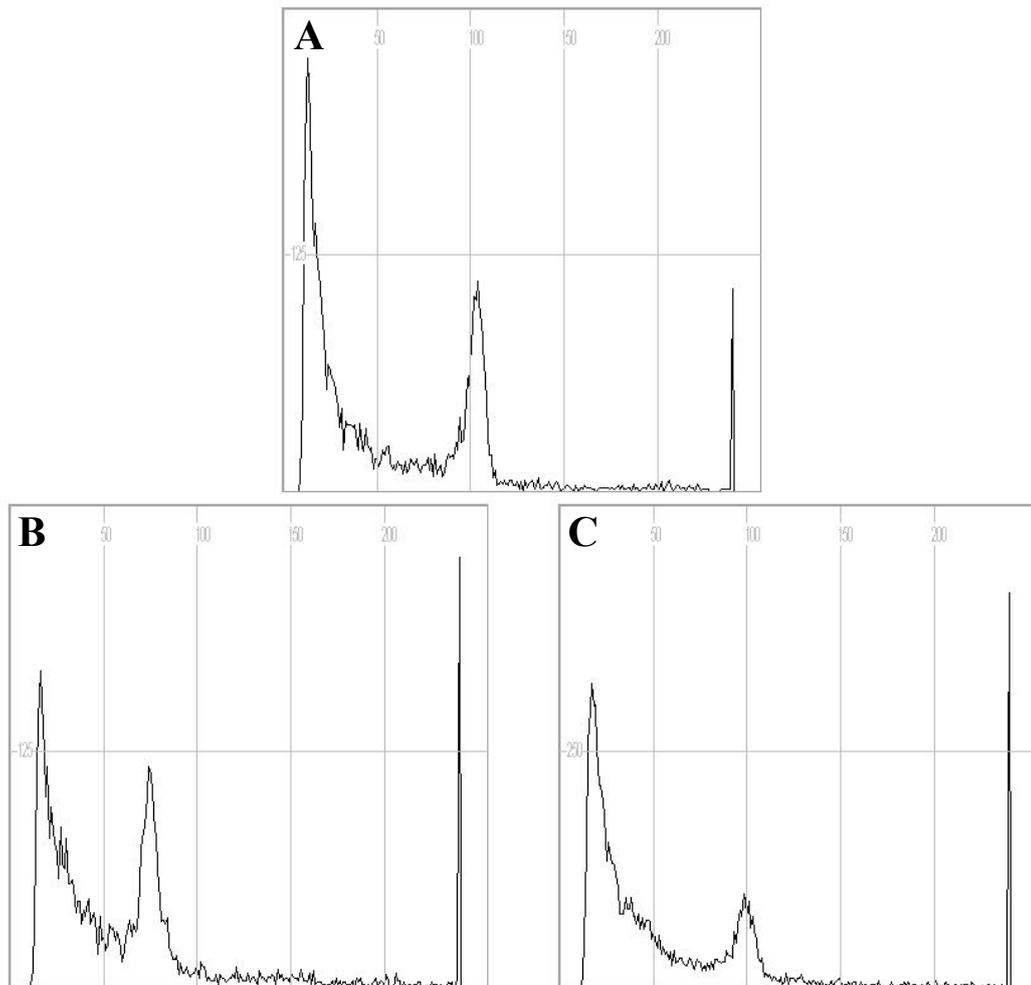


Fig. 3. Ploidy level determination by flow cytometry analysis. (A) tetraploid control, (B) triploid of 'Benibae'×'Clemenules', and (C) tetraploid of 'Benibae'×'Clemenules'.

생각된다. $2x \times 4x$ 교잡에서 4배체의 발생에 관한 연구가 보고되었다(Oiyama et al., 1991; Jaskani et al., 2007). 이때 4배체는 감수분열되지 않은 자성배우체와 감수분열된 웅성배우체 간 결합의 결과이며, 이는 $2x$ 꽃가루에 의한 자연 수정으로 인해 반수체 난세포 내 염색체가 두 배 증가하거나 또는 불화합성인 대립 유전자의 특정 조합이 존재하는 경우 $2x$ 꽃가루에 의해 2배체 난세포가 먼저 수정되는 메커니즘에 기인한다(Esen and Soost, 1972). 또한, 주심배가 발달하여 4배체를 형성하는 경우도 있지만 대부분 두 부모의 형질이 유전된 잡종 4배체를 형성한다는 연구 결과가 보고되었다(Xie et al., 2019). 수정배 유래의 4배체이기 때문에 3배체를 생산하기 위한 새로운 4배체 품종으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

$2x \times 2x$ 교잡에서는 정상종자의 단 1개(1.2%)에서만 3배체가 획득되었고, 나머지는 모두 2배체였다. $2x$ 배우체의 형태와 발생빈도는 품종의 유전자형과 환경 조건이 관련되어 있지만(Barcaccia et al., 1997), 일반적으로 2배체 간 교잡에서 미감수분열의 $2x$ 배우체 발생빈도는 낮기 때문에(Cameron and Frost, 1968; Esen and Soost, 1971; Geraci et al., 1975) 3배체 획득률이 매우 낮은 편이다.

본 연구결과 $4x \times 2x$ 교잡에서 획득한 37개의 식물체 중 27개의 3배체(73.0%), $2x \times 4x$ 교잡에선 21개의 식물체 중 12개의 3배체(57.1%)가 획득되었다. $4x \times 2x$ 교잡에서 각 종자 형태에 따라 3배체는 과실당 0.08개, 0.42개 및 0.53개가 획득되었고, $2x \times 4x$ 교잡에서는 과실당 정상종자에서 0.06개, 미발육 종자에서 0.08개의 3배체가 획득되었다. $2x \times 2x$ 교잡에서는 과실당 정상종자에서만 0.03개의 3배체가 획득되었다. 4배체는 $4x \times 2x$ 교잡에서 10개(27.0%),

2x×4x 교잡에서 6개(28.6%)가 획득되었고, 2x×2x 교잡에서는 획득되지 않았다. 4x×2x 교잡에서 각 종자 형태에 따라 4배체는 과실당 0.08개, 0.15개 및 0.15개로 모든 종자형태에서 획득되었고, 2x×4x 교잡에서는 미발육종자에서만 과실당 0.07개의 4배체가 획득되었다. 그러므로 3배체의 생산은 2x×4x 교잡보다 4x×2x 교잡이 성공적이었으며, Esen et al.(1978)과 Aleza et al.(2012b)의 결과와 일치하였다. 그러나 이와는 반대로 2x×4x에서 종자가 4x×2x교잡보다 적게 형성되었고, 식물체 획득률이 낮았기 때문에 4x×2x 교잡에서 2x×4x 교잡보다 4배체 획득률이 높게 나타났다.

감귤의 배수성에 따른 교잡에서 4x×2x 교잡을 이용하는 것이 3배체 획득에 가장 유리할 것으로 생각되며, 4x×2x 교잡에서 정상종자보다는 부분 발육 종자 및 미발육종자에서 3배체가 많이 획득되었다. 또한 배수성이 다른 품종 간 교배에서는 부분 발육 종자 및 미발육종자의 형성이 많기 때문에 기내 배양이 수반되어야 할 것으로 생각된다. 그러나 아직 ‘베니바에’의 자가불화합성이나 2x×4x 교잡에서 식물체 획득률이 낮았던 원인에 대해 알지 못하기 때문에 이에 관한 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

인 용 문 헌

- Aleza P, Juarez J, Ollitrault P, Navarro L** (2010a) Polyembryony in non-apomictic citrus genotypes. *Ann Bot* 106:533-545
- Aleza P, Juarez J, Cuenca J, Ollitrault P, Navarro L** (2010b) Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from $2x \times 2x$ sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. *Plant Cell Rep* 29:1023-1034
- Aleza P, Juarez J, Cuenca J, Ollitrault P, Navarro L** (2012a) Extensive citrus triploid hybrid production by $2x \times 4x$ sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant Cell Rep* 31:1723-1735
- Aleza P, Juarez J, Hernandez M, Ollitrault P, Navarro L** (2012b) Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on $4x \times 2x$ sexual hybridisations. *Tree Genet Genomes* 8:1293-1306
- Barcaccia JG, Tavoletti S, Falcinelli M, Veronesi F** (1997) Environmental influences on the frequency of meiotic and apomeiotic megasporogenesis in a diploid mutant of alfalfa. *Crop Sci* 37:70-76
- Brink RA, Copper DC** (1947) The endosperm in seed development. *Bot Rev* 13(8):423-477
- Cameron JW, Burnett RH** (1978) Use of sexual tetraploid seed parents for production of triploid citrus hybrids. *HortScience* 13:167-169
- Chung KH, Nam EY, Kwon JH, Hur YY, Kwon SI, Kim YK, Ma KB, Yun SH, Lee MH, Park WH et al.** (2020) The history, current status and future prospects of fruit breeding in Korea. *Korean J Breed Sci* 52:144-160

- Esen A, Soost RK** (1971) Unexpected triploids in citrus: their origin, identification, and possible use. *J Hered* 62:329-333
- Esen A, Soost RK** (1973) Seed development in citrus with special reference to $2X \times 4X$ crosses. *Am J Bot* 60:448-462
- Esen A, Soost RK, Geraci G** (1978) Seed set, size and development after $4x-2x$ and $4x-4x$ crosses in *Citrus*. *Euphytica* 27:283-293
- Food and Agriculture Organization (FAO)** (2021) Citrus fruit annual statistics. Citing website. <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citrus-fruit/en/>. 03 Sep 2023.
- Gambetta G, Gravina A, Fasiolo C, Fornero C, Galiger S, Inzaurrealde C, Rey F** (2013) Self-incompatibility, parthenocarpy and reduction of seed presence in ‘Afourer’ mandarin. *Sci Hortic* 164:183-188.
- Grosser JW, Kainth D, Dutt M** (2014) Production of colchicine-induced autotetraploids in pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) through indirect organogenesis. *HortScience* 49:944-948
- Grosser JW, Ollitrault P, Olivares-Fuster O** (2000) Somatic hybridization in citrus: An effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cell Dev B* 36:434-449
- Jaskani MJ, Khan IA, Khan MM** (2005) Fruit set, seed development and embryo germination in interploid crosses of citrus. *Sci Hortic* 107:51-57
- Jaskani MJ, Khan IA, Khan MM, Abbas H** (2007) Frequency of triploids in different interplodial crosses of citrus. *Pak J Bot* 39:1517-1522
- Kim TB, Lim JH, Jeong JH, Seong MH, Kim KC, Jeon HG, Noh JJ** (2019) Production of diploid seedless watermelon using tetraploid watermelon pollen. *Hortic Sci Technol*

37:520-527

- Lester RN, Kang JH** (1998) Embryo and endosperm function and failure in *Solanum* species and hybrids. *Ann Bot* 82:445-453
- Lora J, Garcia-Lor A, Aleza P** (2022) Pollen development and viability in diploid and doubled diploid citrus species. *Front Plant Sci* 13:862813
- Marti N, Mena P, Canovas JA, Micol V, Saura D** (2009) Vitamin C and the role of citrus juices as functional food. *Nat Prod Commun* 4:677-700
- Montalt R, Vives MC, Navarro L, Ollitrault P, Aleza P** (2021) Parthenocarpy and self-incompatibility in Mandarins. *Agronomy* 11:2023
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 15:473-479
- Navarro L, Aleza P, Cuenca J, Juarez J, Pina JA, Ortega C, Navarro A, Ortega V** (2015) The mandarin triploid breeding program in Spain. *Acta Hort* 1065:389-395
- Oiyama I, Kobayashi S** (1990) Polyembryony in undeveloped monoembryonic diploid seeds crossed with a *Citrus* tetraploid. *HortScience* 25:1276-1277
- Oiyama I, Kobayashi S, Yoshinaga K, Ohgawara T, Ishii S** (1991) Use of pollen from a somatic hybrid between *Citrus* and *Poncirus* in the production of triploids. *HortScience* 26:1082
- Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Froelicher Y** (2008) Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. *Plant Breed Rev* 20:323-354
- Ollitrault P, Navarro L** (2012) Citrus. *In*: ML Badenes, DH Byrne, ed, Handbook of plant breeding: Fruit breeding, Vol 8. Springer, NY, pp 623-662

- Otto SP, Whitton J** (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu Rev Genet* 34: 401-437
- Pok P, Oh EU, Lee K, Kang JH, Ko BY, Kim HB, Song KJ** (2015) Characterization of microspore development and pollen tube growth response to self- and cross-pollination in Jeju old local citrus species. *Hortic Environ Biotechnol* 56:225-232
- Recupero GR, Russo G, Recupero S** (2005) New promising citrus triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. *HortScience* 40:516-520
- Song KJ, Kim SB, Park JH, Oh EU, Lee KU, Kim DW, Kang JH, Kim JS, Oh JH, Gmitter FG** (2011) Frequency and growth characteristics of polyploids occurred spontaneously in some Mandarin hybrids. *Hortic Sci Technol* 29:617-622
- Vardi A, Levin I, Carmi N** (2008) Induction of Seedlessness in Citrus: From Classical Techniques to Emerging Biotechnological Approaches. *J Am Soc Hortic Sci* 133:117-126
- Viloria Z, Grosser JW** (2005) Acid citrus fruit improvement via interploid hybridization using allotetraploid somatic hybrid and autotetraploid breeding parents. *J Am Soc Hortic Sci* 130:392-402
- Xie KD, Yuan DY, Wang W, Xia QM, Wu XM, Chen CW, Chen CL, Grosser JW, Guo WW** (2019) Citrus triploid recovery based on $2x \times 4x$ crosses via an optimized embryo rescue approach. *Sci Hortic* 252:104-109
- Yamamoto M, Matsumoto R, Yamada Y** (1995) Relationship between sterility and seedlessness in citrus. *J Jpn Soc Hortic Sci* 64:23-29

Response of Mandarins to Seed Formation and Triploid Progeny Production in Interploid Crosses

Ji Young Park

Department of Horticultural Science

The Graduate School Jeju National University

Abstract

Seedlessness is the most important characteristic and one of breeding purpose in citrus. Triploid is the most reliable way to secure seedlessness and could be developed by crosses between tetraploids and diploids, or diploids and diploids. The study was conducted to evaluate the characteristics of seed formation and recovery frequency of triploid in interploid crosses. In crosses of $4x \times 2x$, $2x \times 4x$, and $2x \times 2x$, normal seed formation rate was the highest (85.0%) in crosses of $2x \times 2x$, followed by crosses of $4x \times 2x$ and $2x \times 4x$. Partially developed seeds were obtained at the highest rate (35.3%) from crosses of $4x \times 2x$ with 0.7, followed by $2x \times 2x$ and $2x \times 4x$ with 0.2 and 0.1 per fruit, respectively. The number of undeveloped seeds was 1.1, 1.0, and 0.3 per fruit from the crosses of $4x \times 2x$, $2x \times 4x$, and $2x \times 2x$, and the lowest frequency was recorded in the crosses of $2x \times 2x$. The plants were rescued by in vitro culture of seeds extracted from mature fruits, and ploidy levels were analyzed by flow cytometry. In crosses of $2x \times 2x$, diploid plants were mostly obtained with 98.8%, in $4x \times 2x$, triploid with 73.0%

and tetraploid with 27.0%, and in $2x \times 4x$, diploid with 14.3%, triploid with 57.1%, and tetraploid with 28.6%, respectively. Then, diploid plants were obtained mostly from normal seeds and triploid and tetraploid mostly from partially developed seeds and undeveloped seeds. The results indicated that crosses of $4x \times 2x$ is the most efficient and in vitro culture should be applied to rescue plants from partially developed and undeveloped seeds in triploid breeding program.