

감귤 분자육종을 위한 분자표지 개발 현황 및 전망

김호방 · 김재준 · 오창재 · 윤수현 · 송관정

Current status and prospects of molecular marker development for systematic breeding program in citrus

Ho Bang Kim · Jae Joon Kim · Chang Jae Oh · Su-Hyun Yun · Kwan Jeong Song

Received: 15 September 2016 / Revised: 15 September 2016 / Accepted: 20 September 2016

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Citrus is an economically important fruit crop widely growing worldwide. However, citrus production largely depends on natural hybrid selection and bud sport mutation. Unique botanical features including long juvenility, polyembryony, and QTL that controls major agronomic traits can hinder the development of superior variety by conventional breeding. Diverse factors including drastic changes of citrus production environment due to global warming and changes in market trends require systematic molecular breeding program for early selection of elite candidates with target traits, sustainable production of high quality fruits, cultivar diversification, and cost-effective breeding. Since the construction of the first

genetic linkage map using isozymes, citrus scientists have constructed linkage maps using various DNA-based markers and developed molecular markers related to biotic and abiotic stresses, polyembryony, fruit coloration, seedlessness, male sterility, acidless, morphology, fruit quality, seed number, yield, early fruit setting traits, and QTL mapping on genetic maps. Genes closely related to CTV resistance and flesh color have been cloned. SSR markers for identifying zygotic and nucellar individuals will contribute to cost-effective breeding. The two high quality citrus reference genomes recently released are being efficiently used for genomics-based molecular breeding such as construction of reference linkage/physical maps and comparative genome mapping. In the near future, the development of DNA molecular markers tightly linked to various agronomic traits and the cloning of useful and/or variant genes will be accelerated through comparative genome analysis using citrus core collection and genome-wide approaches such as genotyping-by-sequencing and genome wide association study.

H. B. Kim (✉) · J. J. Kim · C. J. Oh
(*)바이오메딕 생명과학연구소
(Life Sciences Research Institute, Biomedic Co. Ltd., Bucheon 14548, Korea)
e-mail: hobang@ibiomedic.co.kr

H. B. Kim
제주대학교 생명공학부 바이오소재 전공
(Major of Biomaterials, Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)

S.-H. Yun
국립원예특작과학원 감귤연구소
(Citrus Research Institute, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Seogwipo 63607, Korea)

K. J. Song (✉)
제주대학교 생물산업학부 원예환경전공
(Major of Horticultural Science, Faculty of Bioscience and Industry, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)
e-mail: kwansong@jejunu.ac.kr

K. J. Song
제주대학교 아열대농업연구소
(Research Institute for Subtropical Agriculture & Biotechnology, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)

Keywords Citrus, Genomics, Genetic Map, Molecular Breeding, Molecular Markers, Traits

서론

감귤류는 운향과(Rutaceae), 감귤나무아과(Aurantioideae)의 ‘true citrus fruit trees’ 그룹으로 분류되는 *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus* 속 등에 속하는 나무의 열매를 총칭한다(Nicolosi 2007; Penjor et al. 2013). 감귤은 인도 동북부, 중국 남부, 인도 차이나 반도와 말레이 제도의 열대 및 아열대 지역에서 기원해서 다른 대륙으로 퍼져나간 것으로 추정되고 있다

(Nicolosi 2007). 감귤은 세계적으로 생산량이 가장 많은 중요 과수작물이며(2013-2014년 기준 1.3억만톤), 열대 및 아열대 지역을 중심으로 광범위하게 재배되고 있다(FAOSTAT, 2014). 감귤은 비타민 C와 탄제리틴, 헤스페리딘과 같은 감귤 고유의 플라보노이드 등을 비롯하여 다양한 건강 기능성 성분을 함유하고 있는 중요 식품 소재이기도 하다.

세계적인 과수작물로서의 경제적 중요성에도 불구하고 현재 주로 재배되고 있는 대부분의 감귤 품종들은 체계적인 유전·육종 프로그램을 통해서 육성된 것이 아니라 자연 교잡 실생이나 눈 돌연변이(bud sport mutation)로부터 선발되어 이용되고 있는 실정이다(Talon and Gmitter 2008). 감귤은 일반적으로 3~7년 이내에 꽃을 피우고 열매를 맺으나 종에 따라 짧게는 1년에서 길게는 20년에 걸쳐 유년기(juvenility)를 갖기도 한다. 또한 많은 감귤 품종은 주심배 현상(nucellar embryony)을 통해 모체와 유전적으로 동일한 클론을 만들어낸다. 주심배는 종종 교잡배 보다 훨씬 왕성하게 발달하여 교잡배를 퇴화시킴으로써 교잡배의 발생 빈도를 현저히 떨어뜨린다. 따라서 긴 유년기, 자가불화합성, 주심배에 의한 다배성 등과 같은 감귤 고유의 식물학적 특성뿐만 아니라 주요 형질들에 관한 유전학적 이해의 부족, 주요 감귤류에 대한 계통·분류학적 이해의 결핍 등은 교잡 육종을 통한 감귤 품종 육성을 어렵게 하는 요인들이라고 할 수 있다.

전지구적 기후 변화에 의한 다양한 생물적, 비생물적 환경스트레스(병해충, 가뭄, 냉해 등)로 인해 고품질 감귤의 안정적 생산 체계가 위협을 받고 있다. 감귤 생산의 세계화, 국제 여행의 보편화 등으로 인해 감귤에 치명적인 병해충이 급속히 전파될 가능성이 매우 높다. 과실의 수량성, 품질 등을 유지하기 위한 병해충 방제에는 많은 노력과 비용이 소요될 뿐만 아니라 장기적이고 지속적인 방제는 환경뿐만 아니라 인간의 건강에 관한 문제도 유발할 수 있다. 지속적인 소비자 요구의 변화로 소품종 대량 생산보다는 다품종 소량 생산 체계로의 전환이 요구되고 있는 상황이다. 따라서 고품질, 다품종 및 환경 스트레스에 대한 저항성을 증가시키기 위한 감귤 육종 프로그램의 도입이 절실히 요구되고 있다(Kim et al. 2015). 감귤에서 환경스트레스 내성, 형태, 수량성, 품질 등을 비롯한 다양한 형질은 폴리진(polygene) 혹은 QTL (quantitative trait loci)에 의해 조절되기 때문에 통상적인 교배육종을 통해 목표 형질을 갖는 품종을 육성하기가 어렵다. 또한 식물체 크기, 유년성, 다배성 등의 특성은 육종 비용을 증가시키는 중요 요인이다. 따라서 다양한 목표 형질과 밀접하게 연관된 분자표지를 활용한 분자육종 프로그램의 도입은 목표 형질을 갖는 품종의 조기선발(marker-assisted selection, MAS)을 촉진시킬 뿐만 아니라 육종비용을 크게 절감할 수 있다.

유전체 정보는 구조 및 기능유전체 연구 분야뿐만 아니라 유전자 지도 작성 및 분자표지의 발굴을 통한 분자육종 분야에도 활발히 활용되고 있다. 감귤의 경우도 스위트오

렌지(*C. sinensis* cv. Valencia)와 ‘클레멘타인’ 만다린(*C. clementina* cv. Clemenules)에 대한 표준 유전체 해독이 이루어졌으며(Wu et al. 2014; Xu et al. 2013), 유전체 서열 기반의 분자표지 [single nucleotide polymorphism (SNP), simple sequence repeat (SSR), insertion-deletion (InDel)] 발굴 및 이를 활용한 표준 연관 및 물리지도 작성, 비교 유전체 지도 작성, 유전자 클로닝 등에 활용되고 있다(Biswas et al. 2014; Cuenca et al. 2013; Ollitrault et al. 2012). 따라서 감귤에서도 유전체 분석 기반의 분자육종 프로그램을 기존의 교배육종과 접목시킴으로써 체계적이며 목표형질 중심의 감귤 유전·육종 프로그램이 활성화될 것으로 전망되는 시점이다(Kim et al. 2015). 본 논문에서는 현재까지 발굴된 감귤 형질연관 주요 분자표지들을 정리하고 유전체 정보를 활용한 향후 발전방향을 고찰하고자 한다.

감귤 분자마커 발굴 및 개발 현황

병저항성 연관 분자마커

바이러스, 박테리아, 곰팡이, 해충 등은 작물의 생장, 수량, 품질 등을 저해하는 주요 생물적 환경 스트레스이다. 감귤에서는 박테리아 병원균에 의한 황록병(citrus greening disease, *Candidatus liberibacter* spp.), 궤양병(citrus canker, *Xanthomonas citri* pv. *citri*), 곰팡이에 의한 더듬이병(citrus scab, *Elsinoe fawcettii*), 흑점병(melanose, *Diaprothe citri*), 갈색반점병[*Alternaria brown spot* (ABS), *Alternaria alternata* f. sp. *Citri*], 바이러스에 의한 갈색줄무늬오갈병(CTV, citrus tristeza virus), 점목부이상병(CTLV, citrus tatter leaf virus), 온주위축병(SDV, satusma dwarf virus), 모자이크바이러스(CiMV, citrus mosaic virus) 및 해충인 감귤선충(citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*) 등에 의해 많은 피해를 입고 있다. 이들 식물병 중에서 ABS, CTV, CiLV (citrus leprosis virus), 감귤 선충 저항성에 대한 연관 분자표지가 개발되었다.

Alternaria brown spot (ABS)

ABS는 감수성 감귤 종/품종들에서 과실과 어린 잎의 괴사병반, 낙엽, 낙과 등을 유도한다(Akimitsu et al. 2003). ‘클레멘타인’(*C. clementina* Hort. Ex Tan), ‘Willowleaf’ (*C. deliciosa* Ten), 온주밀감(*C. unshu* Mark) 등은 ABS에 저항성을 갖는다(Cuenca et al. 2013). 유전학적 연구 결과는 ABS 저항성이 단일 유전자좌위(genetic locus)에 의해 결정되며, 저항성과 감수성은 각각 열성(*aaM1*)과 우성 대립유전자(*AaM1*)에 의해 결정됨을 보여주었다(Cuenca et al. 2013; Dalkilic et al. 2005; Gulsen et al. 2010; Kohmoto et al. 1991). Gulsen 등(2010)은 ‘클레멘타인’ 만다린과 ‘올란드’ 탄젤로(*C. paradisi* Macf. cv. Duncan x *C. reticulata* Blanco cv. Dancy)의 F₁ 교배실생에 대해

다양한 분자표지를 활용한 연관지도를 작성하고, ABS 유전좌위가 ‘올란드’의 연관그룹 I에 위치함을 보고하였다. Cuenca 등(2013)은 ‘클레멘타인’ 만다린 유전체 정보를 기반으로 맵핑된 대규모 SNP 마커들에 대해 유전체 스캔(genome scan)을 활용한 BSA (bulked segregant analysis)와 SSR, SNP 마커를 이용한 상세 맵핑을 통해 3번 염색체의 동원체(centromere) 부근 3.3 Mb 영역이 ABS 저항성과 연관되어 있으며, 이 영역에는 병 저항성 관련 유전자들이 밀집해서 존재함을 보고하였다. 가까운 시일 내에 ABS 저항성 연관 후보 유전자가 클로닝 되어 형질전환 기술 등을 통해 그 기능이 확인될 것으로 전망된다.

Citrus tristeza virus (CTV)

CTV는 전세계적으로 가장 중요한 감귤 바이러스로서 두 가지 심각한 질병 증상 즉, 급성쇠약(quick decline)과 고점병(stem-pitting)을 야기한다. 전자는 사우어오렌지(*C. aurantium* L.) 대목에 접목시 감염된 접수의 접목부(graft union) 아래에서 체관부 괴사가 일어나서 나무가 죽게 된다. 후자는 대목에 관계없이 나무의 활력, 과실 크기 및 품질, 생산성을 떨어뜨린다(Gmitter et al. 2007). 탕자나무(*Poncirus trifoliata*)를 비롯한 일부 citrus 근연종들이 CTV에 저항성이 있는 것으로 알려졌다(Garnsey et al. 1987; Mestre et al. 1997a), *Citrus* 속에서는 일부 문단[C. *maxima* (Burm.) Merrill]이 저항성을 갖는다(Garnsey et al. 1997). CTV 저항성 유전자는 단일 우성 유전자로 밝혀졌고(Yoshida 1985, 1993), *Ctv*로 명명되었다(Gmitter et al. 1996). Fang과 Roose (1999)는 문단으로부터 단일 우성으로 유전되며, *Ctv*와는 독립적인 유전자인 *Ctv2*의 존재를 보고하였다. *Ctv* 유전자에 대한 map-based cloning (MBC)을 위하여 탕자나무를 이용한 교배 또는 여교배(backcross) 집단 등에 대해 BSA를 수행하여 저항성 연관RAPD (random amplified polymorphic DNA), ISSR (inter simple sequence repeat), RAPD-SCAR (sequence characterized amplified regions), RAPD-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 마커 등을 발굴하고, 이들을 이용하여 저항성 영역에 대한 연관지도 작성 및 marker-assisted selection (MAS)을 위한 노력들이 이루어졌다(Deng et al. 1997; Fang et al. 1998; Gmitter et al. 1996; Mestre et al. 1997b). *Ctv* 유전자의 MBC를 위하여 BAC (bacterial artificial chromosome) 라이브러리가 작성되었으며(Deng et al. 2001a; Yang et al. 2001), *Ctv*와 밀접하게 연관된 분자표지를 활용한 chromosome walking 및 RGC (resistance gene candidate) 마커를 이용한 BAC 클론 탐색을 통해 *Ctv* 영역을 포함하는 BAC 컨티그 맵이 작성되었다(Deng et al. 2001b; Yang et al. 2001). Yang 등(2003)은 *Ctv* 영역을 포함하는 282 Kb의 BAC 컨티그에 대한 염기서열을 결정하고 유전자 예측을 수행한 결과, 7개의 CC-NBS-LRR (coiled-coil-nucleotide-binding site-leucine-rich repeat) 유전자로 구성된 R gene cluster가 존재하고, 이들 중에 광범위한 저항성을 부여하는 *Ctv* 유전자가 존재할 수 있음을 제시하였

다. ‘Thong Dee’ 문단과 탕자나무 사이의 속간 교배에서 유래한 CTV 저항성 계통(USDA 17-74)에 대한 BAC 라이브러리로부터 각각 감수성 대립유전자와 저항성 대립유전자 영역을 갖는 2개의 BAC 컨티그를 확보하고 이들에 대한 염기서열을 비교 분석한 결과, 감수성 컨티그에는 존재하지 않는 2개의 CC-NBS-LRR 유전자(R2, R3)가 존재하였다(USDA patent No. 7126044). 두 유전자를 CTV 감수성인 자몽에 도입한 결과, R2 도입 자몽 형질전환체에서 CTV 감염에 저항성을 보였다(Rai 2006). 이상의 결과는 R2 혹은 R3가 *Ctv*임을 강력히 뒷받침하며, CC-NBS-LRR을 암호화하는 R2/R3 유전자는 MAS를 위한 유전자 마커로 활용될 수 있을 것이다. Asins 등(2012)은 CTV 저항성을 부여하는 주요 QTL의 위치가 문단, 사우어오렌지, 탕자나무 사이에 보존되어 있으며 연관그룹 4b에 위치함을 보고하였다.

Citrus leprosis virus (CiLV)

모든 스위트오렌지(*C. sinensis* L. Osb.) 품종은 CiLV에 대해 높은 감수성을 보이는 반면, 만다린(*C. reticulata* Blanco)과 일부 그 교잡 품종은 저항성을 갖는다(Bastianel et al. 2006; Rodrigues et al. 2003). Bastianel 등(2009)은 ‘Pêra’ 스위트오렌지와 ‘Murcott’ 탄골(*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* L. Osb.) 간의 여교잡 교배 실생들에 대한 저항성/감수성 분석을 통해 AFLP (amplified fragment length polymorphism)와 RAPD 마커로 작성된 유전지도의 연관 그룹 III에 CiLV에 저항성을 부여하는 하나의 QTL이 존재함을 확인하였으며, 추가 QTL이 존재할 수 있음을 제시하였다.

감귤 선충(citrus nematode)

감귤 선충은 뿌리에 심각한 손상을 일으켜 생산성을 떨어뜨리는 주요 근권 기생충으로써 선충-저항성 대목의 선발은 감귤 육종을 위한 주요 목표 중의 하나이다. 대부분의 *Poncirus*는 감귤 선충에 저항성이 있으며, 탕자나무 유래의 일부 속간 교잡종에서 유전되는 것으로 알려져 있다(Gmitter et al. 2007). 선충 감수성인 ‘클레멘타인’ 만다린과 저항성인 Swingle citrumelo (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) 간의 여교배 속간 조합에서 유래한 교배 실생에 대한 표현형 분석 결과, 저항성에는 폴리진이 관여함이 제시되었다. 또한 BSA를 통해 감귤 선충 저항성에 50% 이상을 기여하는 하나의 주요 QTL (*Tyr1*)이 확인되었으며, 이는 우성 유전자로서 조부 화분친인 탕자나무로부터 여교배 집단으로 유전됨이 확인되었다(Ling et al. 2000). 병 저항성에 관여하는 유전자 중에서 NBS-LRR 그룹에 속하는 RGC 마커가 *Tyr1* QTL 영역에 맵핑되었다(Deng et al. 2000; Gmitter et al. 2007).

아포믹시스 및 다배성 형질연관 분자마커

대부분의 현화 식물에서는 하나의 종자에서 하나의 교잡배

(zygotic embryo)가 발달한다. 그러나 많은 감귤 품종에서 포자체 아포믹시스(sporophytic apomixis) 현상에 의해 많은 수의 주심배가 하나의 종자 안에서 교잡배와 더불어 발달한다. 주심배는 발달 중인 교잡배를 함유하고 있는 배낭(embryo sac)을 둘러싸고 있는 모체 유래의 주심 조직(nucellar tissue)에서 발달하는 체세포배(somatic embryo)이다. 따라서, 주심배는 모체와 동일한 유전형을 갖는 유식물로 발달하게 되는데, 종종 주심배가 교잡배에 비해 훨씬 더 왕성하게 발달하여 교잡배를 퇴화시킨다(Barcaccia and Albertini 2013; Kepiro and Roose 2007; Koltunow et al. 1996). 아포믹시스 현상에 의한 다배성은 많은 감귤 품종에서 발견되는 유전 형질이며, 전통적 교배 육종에 의한 감귤 신품종 육성에 커다란 걸림돌로 작용하고 있다.

전술한 바와 같이 많은 감귤 품종에서 아포믹시스에 의해 하나의 종자 안에 여러 개의 배가 발달하는 다배성 현상이 보편적으로 발생한다. 초기에는 다배성이 단순한 방식에 의해 유전되며, 하나의 우성 유전좌위에 의해 결정되는 것으로 알려졌으나(Iwamasa et al. 1967; Parlevliet and Cameron 1959), 종자당 배의 수가 감귤류에서 매우 다양하다는 사실로부터 다배성 발현에 또 다른 유전 기작이 존재할 수 있음이 제시되었다(Ueno et al. 1967). Hong 등(2001)은 단배성과 다배성간의 교배조합들로부터 다배성 형질의 분리비 분석 등을 통해 *Citrus*와 *Poncirus* 속에서 아포믹시스를 조절하는 2개의 상보적인 우성 유전자가 존재함을 제시하였다.

García 등(1999)은 아포믹시스와 다배성에 관한 유전 분석 결과로부터 아포믹시스와 연관된 6개의 QTL (*Apo1* ~ *Apo6*)을 발굴하였으며, 이 중에서 2개 QTL은 다배성과도 연관됨을 보고하였다. 이러한 결과는 아포믹시스와 다배성을 조절하는 공통의 유전 기작 외에 일부 다른 기작도 존재할 수 있음을 암시한다. Raga 등(2012)도 다배성 연관 3개의 QTL 마커를 발굴하고, García 등(1999)에 의해 발굴된 바 있는 *Apo2*가 주요 QTL임을 보고하였다. 또한 발굴한 3개의 마커가 *C. reshni*, *C. aurantium*, *C. volkameriana*에서 유래한 후대로부터 다배성 대목의 조기 선발을 위한 분자표지로 활용될 수 있음을 제시하였다.

Kang 등(2008)은 단배성 및 다배성 계통의 조기 선발에 필요한 분자마커를 개발하기 위하여 단배성인 ‘청견(Kiyomi)’ [궁천조생(*C. unshu* Marcow) x ‘Trovita’ orange (*C. sinensis* (L.) Osbeck)]과 다배성인 ‘진귤’(*C. sunki*)의 교배실생 개체들과 교배친에 대하여 PCR-RAPD를 수행하여 다형성을 보이는 후보 마커를 선발한 후, 단배성 계통과 다배성 계통 집단을 이용한 BSA-RAPD를 통해 단배성 계통 특이적인 RAPD-SCAR 마커를 발굴하였다. 또한 Nakano 등(2008)은 ‘청견’과 ‘궁천조생(Miyagawa wase)’ 교배 조합에서 유래한 F₁ 집단에 대해 EST (expressed sequence tag) 기반과 RAPD 마커를 이용한 BSA를 수행하여 연관 SCAR 마커를 발굴하고, 연관지도에 대한 상세 맵핑을 수행하였다. 또한 조합친과 후대에서 다

배성 유전좌위에 대한 haplotyping을 수행하여 ‘청견’이 다배성 유전좌위와 ‘궁천조생’의 우성 마커 사이에서의 재조합에 의한 재조합 haplotype을 가짐을 제시하였다.

Kepiro와 Roose (2010)는 *C. maxima* (단배성) x *P. trifoliata* (다배성) 교배 분리집단에서 극단의 단배성과 다배성 형질을 보이는 집단에 대해 AFLP 마커를 이용한 BSA를 수행하여 *P. trifoliata*에서 다배성(아포믹시스)과 밀접하게 연관된 분자표지를 발굴하였다. 두 형질에 대해 분리비 변형(segregation distortion)이 관찰되며, F₁ 잡종 사이에서 다배성 종자의 비율에 대해 변이의 폭이 크다는 사실로부터 이 형질을 조절하는 또 다른 유전자가 있음을 제시하였다. 이는 다배성이 QTL에 의해 결정된다는 García 등(1999)의 결과와도 일치한다.

차등 유전자 발현 분석을 통해 다배성 품종들에서 특이적으로 발현되는 유전자들이 탐색되었는데, *msg-2* 유전자는 기존에 기능이 알려진 유전자와 전혀 상동성을 보이지 않았다(Nakano et al. 2013). 배주 발달 및 체세포 배 발달 과정에서의 상세한 발현 분석을 통해, 저자들은 *msg-2*가 체세포의 초기 세포 형성을 억제하는 기능을 할 것으로 추정하였다. 향후 다배성과 단배성에 대한 다양한 유전자원들에서 *msg-2*의 존재 유무 및 서열 변이 분석 등을 통해 유전자 마커로 개발 가능할 것으로 사료된다.

교잡배 판별 분자마커

많은 감귤 품종에서 아포믹시스에 의한 다배성 현상이 보편적으로 발생하는데, 감귤의 이러한 독특한 생식 생물학적 특성은 전통적 교배 육종에 의한 품종 육성에 커다란 걸림돌로 작용하고 있다. 감귤은 대부분 대목 유식물에 접목을 해서 품종을 증식시키는데, 대목의 유전형이 일정하게 유지되는 것이 접수의 최대 성능 발휘를 위해서도 매우 중요하다. 주심배 유래 클론 식물을 대목 생산에 활용하는 것이 효율적인데, 대부분의 대목 품종은 다배성이다. 따라서, 체계적인 감귤 육종 프로그램을 위해서는 교잡배와 주심배를 효율적이고도 재현성 있게 구분할 수 있는 기술 개발이 요구되며, 이는 육종 비용 절감 및 대목 품질 표준화에도 크게 기여할 것으로 사료된다.

교잡배와 주심배를 구분하기 위하여 분광학적 방법(Pieringer and Edwards 1967), 형태적 특성 분석(Cameron 1979), 동위효소(isozyme) 분석 기법(Soost et al. 1980), 크로마토그래피법(Weinbaum et al. 1982), RAPD 분석 기법(Bastianel et al. 1998; Yun et al. 2007) 등이 개발되었으나, 객관성, 재현성, 효율성 등의 문제가 제기되었다. SSR 마커는 고도의 다형성(polymorphism), 공우성(co-dominance), 유전체 내에서의 광범위하고도 고른 분포 등으로 인해 품종 구분 등을 비롯한 다양한 분야에 활용되고 있는 DNA 분자마커이다.

Ruiz 등(2000)은 자기수분 집단과 중간 교배 집단에 동위효소 분석법과 SSR 분자마커를 적용하여 교잡배 검출 효율

을 분석한 결과, 동위효소법에 비해 분자마커가 보다 높은 다형성과 효율성으로 교잡배를 검출할 수 있음을 보여주었다. De Oliveira 등(2002)은 탄골류인 'Murcott'과 스위트오렌지인 'Pêra' 사이의 교배조합에서 유래한 유식물로부터 교잡배를 구분하기 위하여 잎 정단부의 형태 분석(장폭비)과 SSR 마커를 병합하여 사용하였다. 저자들은 두 방법을 병용하여 사용할 경우, 선발의 정확도를 높일 수 있을 뿐만 아니라, 시간과 분자마커 사용에 소요되는 비용을 절약할 수 있다고 제시하였다. 대목은 토양 유래 병원균에 대한 저항성을 결정함으로써 나무의 성능과 유년성 등에 크게 영향을 미칠 뿐만 아니라, 나무의 크기, 수량성, 과실 품질, 다양한 토양에 대한 적응성 등에도 영향을 미친다(Davies and Albrigo 1994). 사우어오렌지가 오랫동안 대목으로 사용되어 왔으나 일부 CTV 균주 감염에 매우 취약한 것으로 알려져 있다. Rao 등(2008)은 사우어오렌지를 대체할 새로운 대목 품종을 개발하기 위하여 문단 유전자원('Nakon', 'Pink Java', 'Thong Dee')과 만다린의 유전질 침투 잡종('Page', 'Minneola')간의 교배 조합 집단으로부터 후보 대목들을 선발하고 RAPD와 EST-SSR 마커를 적용하여 최종적으로 주심배 유래의 엘리트 대목 2개를 선발하였다. Yildiz 등(2013)은 자방친으로 만다린 품종, 화분친으로 발렌시아 오렌지와 자몽 품종을 이용한 교배조합에서 얻은 유식물들로부터 교잡배만을 선발하기 위하여 SSR 마커를 적용하였다. 따라서 SSR 마커가 감귤 교잡배와 주심배의 구분을 위한 유용한 분자표지로 활용될 수 있음을 제시하여 준다.

과실 착색 연관 분자마커

엽록소 이외에 감귤 열매의 과피 또는 과육에 색깔을 부여하는 주요 색소는 카로티노이드와 플라보노이드/안토시아닌이다. 감귤에서 카로티노이드 색소는 노란색, 오렌지색, 짙은 오렌지색, 분홍색을 부여하는데, 특히 라이코펜은 일부 자몽과 오렌지에서 선명한 분홍색을 부여한다. 안토시아닌은 적육 오렌지에서만 핏빛의 적색 과육을 만들어낸다(Chen et al. 2015; Ladaniya 2008).

Phytoene synthase (PSY)는 카로티노이드 생합성 경로 초기 단계에서 두 분자의 geranylgeranyl diphosphate (GGPP)를 기질로 C₄₀ 카로티노이드인 phytoene을 합성하는데 관여하는 효소이다. 오렌지색 과육을 갖는 스위트오렌지에는 두 개의 매우 유사한 PSY 유전자(*CsPsy1a*, *CsPsy1b*)가 존재하는데, 과실 성숙 전 과정에 걸쳐 과피에서는 두 개의 유전자가 비슷한 수준으로 발현되나, 과육에서는 *Psy1a* 유전자가 훨씬 강하게 발현되었다. 대장균에서의 발현을 통해 효소 활성을 측정된 결과, *CsPsy1a*가 *CsPsy1b*에 비해 훨씬 효소 활성이 높다는 것이 확인되었다. 흰색 과육을 갖는 문단 'Gaophuang' 품종에서 *Psy1b* 유전자는 발현되나 *Psy1a* 유전

자는 발현되지 않는다. 오렌지와 문단 사이의 카로티노이드 생합성 유전자 발현 분석 결과는 유전자 발현에서의 차이와 카로티노이드 축적에서의 차이 사이에는 밀접한 연관이 없음이 확인되었다. *Psy1a*과 *Psy1b* 염기서열을 비교한 결과, 3-bp 유형(AAT)의 SSR 반복 단위 개수에 차이를 보였는데, SSR 반복 수에 대한 돌연변이체들을 대장균에서 발현시켜 활성을 측정된 결과, SSR 반복 수와 효소 활성 사이에 밀접한 상관관계가 있음이 밝혀졌다(Zeng et al. 2013). 따라서 감귤 PSY 유전자에 있어서의 SSR 변이를 분자마커로 개발하여 카로티노이드 함량이 높은 개체의 선발에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

적육 오렌지는 고품량의 안토시아닌으로 인해 항산화 활성이 매우 높다(Jayaprakasha and Patl 2007). 적육 오렌지 주스의 섭취는 당뇨 환자에서 산화적 스트레스를 감소시키며(Bonina et al. 2002), 산화적 스트레스로부터 DNA를 보호하고(Riso et al. 2005), 심혈관 질환 위험 인자를 감소시킬 수 있고(de Pascual-Teresa et al. 2010), 비만세포 발달과 체중 증가를 제한함으로써 비만에 대한 저항성을 부여하는 것으로도 알려졌다(Titta et al. 2010). 적육 오렌지에서 과육의 충분한 착색에는 과일 성숙기 때의 일교차가 중요하며, 후숙시 저온 처리에 의해서도 착색을 유도할 수 있다(Butelli et al. 2012; Latado et al. 2008). 적육 오렌지에서 안토시아닌 생합성을 조절하며 *Ruby* 유전자로 명명된 MYB 전사조절인자의 프로모터 부위에 *Copia*-유사 레트로트랜스포존(retrotransposon)이 삽입되었음이 확인되었다. *Ruby* 유전자는 열매 특이적으로 발현되며, 저온 스트레스에 의한 레트로트랜스포존의 활성화에 의해 유전자 발현이 촉진됨으로써 안토시아닌 합성이 유도된다는 사실이 밝혀졌다(Butelli et al. 2012). 저자들은 문단, 만다린, 일반 오렌지, 적육 오렌지, 적육 오렌지와 만다린간의 F1 잡종을 재료로 서열 분석 및 분자생물학적 분석을 통해 6가지 대립유전자(*R*, *r-1*, *r-2*, *R^D-1*, *R^D-2*, *R^D-3*)가 존재함을 보여주었다. *r-1*은 3번째 엑손에 종결코돈을 가져서 불활성의 *Ruby* 단백질을 암호화하며, *r-2*는 첫번째, 두번째 엑손과 5' 상류지역에 결실(deletion)이 존재하는 불활성의 대립유전자이다. *R^D*는 우성의 대립유전자이며, *Ruby* 유전자 상류에 레트로트랜스포존 또는 LTR (long terminal repeat)을 갖는다. *R^D-1*과 *R^D-2*는 이탈리아 기원의 적육 오렌지가 가지는 대립유전자인데, *R^D-2*는 하나의 LTR만을 가지며, 클론 증식 과정에서 재조합에 의해 출현한 것으로 추정하였다. *R^D-3*는 중국 기원의 변종에서 유래했으며, 레트로트랜스포존의 삽입 방향과 서열에 있어서 이탈리아 기원 품종들과 차이를 보인다. *Ruby* 유전 좌위에 존재하는 이들 대립유전자간의 조합 중에 우성인 *R^D* 대립유전자를 가질 경우, 적육 표현형이 나타남을 제시하였다(Butelli et al. 2012). 현재, 본 저자의 연구소에서는 이들 *Ruby* 대립유전자를 검출할 수 있는 DNA 분자표지를 개발하고 있다.

비생물적 스트레스 연관 분자마커

염분과 저온은 작물의 생장, 생산성, 재배면적 등을 제한하는 주요 환경 요인이다. 감귤류에서 자몽, 레몬, 오렌지, 탱자나무 등은 염분에 매우 민감하나, ‘Rangpur’ 라임(*Citrus hybrid*)과 ‘Cleopatra’ 만다린(*C. reshni*) 등은 강한 내염성을 갖는다(Maas 1993). 임계치를 넘어서는 Na^+ 과 Cl^- 의 축적은 세포 내 이온 독성을 야기할 수 있으나, 이 문제는 이들 이온의 흡수를 제한하는 대목을 선발함으로써 최소화할 수 있다(Maas 1993). 염분 스트레스는 특히 내염성 감귤 대목 품종들에서 항산화 효소 활성을 증가시키며, 잎에 Na^+ 과 Cl^- 을 축적하는 감수성 품종과 달리, 내염성 품종은 뿌리에 축적한다(Balal et al. 2012). 다년생 목본식물에서 내염성은 폴리진에 의해 결정되는 형질로 알려져 있다(Maas 1993). 따라서 통상적인 교배육종을 통해 내염성 품종을 육성하기가 매우 어려우나, 내염성 연관 주요 유전좌위를 발굴하고 연관 분자표지를 활용한 선발이 가능할 것이다. 염분과 비염분 조건하에서 키운 탱자나무 x 문단 간의 속간 교배조합에서 유래한 여교배(BC_1) 집단을 분석하여 Na^+ 과 Cl^- 의 축적, Cl^-/Na^+ 비율, 염분 조건하에서의 생장 및 건물(dry mass) 생산과 연관된 QTL 맵이 작성되었다(Tozlu et al. 1999a, 1999b). Raga 등(2014)은 일종의 역유전학(reverse genetics) 방식을 통해 SOS1/2 (salt overly sensitive), NHX1 (Na^+/H^+ exchanger), CCC (cation-chloride cotransporter), Ethrec (ethylene receptor)를 암호화하는 내염성 후보 유전자들이 내염성 대목 선발을 위한 분자표지로 활용될 수 있음을 제시하였다. Raga 등(2016)은 대목으로 주로 활용되는 두 품종 즉, 내염성이 강한 ‘Cleopatra’ 만다린과 내염성이 약한 탱자나무의 교배집단에서 유래한 주심배 교잡 식물체를 재료로 수행한 유전분석을 통해 내염성과 연관된 60가지 형질(형태적 형질, 잎과 뿌리에서 각종 이온의 축적 농도, 잎의 수분 퍼텐셜, 잎과 뿌리의 수분 함량 등)의 대부분이 유전력이 있음을 제시하였고, interval mapping과 다중 QTL 맵핑을 통해 ‘Cleopatra’ 만다린과 *Poncirus*의 연관지도 상에 98개 QTL의 위치를 결정하였다.

감귤에서의 내한성은 여러 개의 유전좌위가 조합되어 작용하는 QTL에 의해 결정되는 것으로 알려져 있다(Weber et al. 2003). 감귤에서 내한성 유전좌위와 분자표지를 발굴하기 위한 최초의 시도로 Cai 등(1994)은 문단과 탱자나무 간의 속간 교배에서 유래한 여교배(BC_1) 집단을 재료로 RAPD 연관지도를 작성하고, 3개 *COR* (cold-acclimation-response) 유전자에 대한 RFLP 맵핑을 통해 연관지도 상에서의 위치를 결정하였다. Weber 등(2003)은 저온에 초감수성인 문단과 초내한성인 탱자나무 간의 F1 유사검정교배(pseudo-testcross) 집단을 재료로 다양한 분자표지[RAPD, CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences), SCAR, STS (sequence-tagged site)]를 이용하여 모본과 부분에 대한 연관지도를 작성하고, interval mapping을 통해 모본과 부분에서의 내한성과 연관된 QTL

을 결정하였다. 마커의 포화도를 높이고, 내한성 연관 QTL 맵핑을 위하여 Hong 등(2015)은 EST와 BAC 말단 서열에서 유래한 신규 SSR 마커를 발굴하여 기존의 마커와의 통합 연관지도를 작성하였으며, 서로 다른 연관 그룹에 위치하는 4개의 내한성 연관 QTL의 발굴을 보고하였다.

기타 형질 연관 분자마커

무핵(seedlessness)은 소비자들에 의한 과실 섭취의 편리성, 가공 편이성 등의 측면에서 감귤의 주요 육종 목표 중의 하나이다. 무핵은 자가불화합성, 웅성 혹은 자성 불임, 수정 후 배 발달의 조기 정지, 염색체 이상 등과 같은 여러 요인들에 의해 발생한다(Ollitrault et al. 2007; Yamasaki et al. 2007). Chavez와 Chaparro (2011)는 유전분석을 통해 무핵 형질이 단일 우성 유전자에 의해 결정될 수 있음을 제시하였다. Ponkan 만다린(*C. reticulata* Blanco.)에서 무핵 연관 분자표지를 발굴하기 위하여 Xiao 등(2009)은 AFLP 마커 탐색 후, 2개의 연관 SCAR 마커를 개발하였다. 또한 Chavez와 Chaparro (2011)는 RAPD 마커를 이용한 BSA를 수행하여 무핵 연관 마커를 선발한 후 부분 연관지도 상에서의 위치를 결정하였다. Kinnow 만다린에서도 2개의 무핵 연관 RAPD 마커가 보고되었다(Altaf et al. 2014).

웅성 불임(male sterility)에 의해 무핵 과실이 만들어지며, 감귤에서 세포질 웅성 불임은 2개 이상의 주요 유전자에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다(Nakano et al. 2001). Chae 등(2011)은 웅성 불임인 ‘청견’ x ‘진굴’ (*C. sunki*) 교배 조합에서 유래한 F1 교배 집단에 대해 SRAP (sequence-related amplification polymorphism) 마커를 이용한 BSA를 통해 male fertility 연관 SCAR 마커를 개발하였다. 감귤에서 무핵 현상에 대한 원인 중의 하나인 배우체 자가불화합성(gametophytic self-incompatibility)은 S 유전자와 화분과 주두(pistil) 사이의 상호작용에 의해 결정된다(Ollitrault et al. 2007; Pok et al. 2015). Kim 등(2013)은 분리비 분석을 통해 자가불화합성은 우성 유전자에 의해 결정됨을 제시하였으며, 자몽에서 자가불화합성과 연관된 후보 RAPD 마커를 발굴하였다. 또한 과실 당 농도 수 형질에 관한 QTL 맵핑 연구가 이루어진 바 있다(García et al. 2000).

감귤 열매의 가장 독특한 특징 중의 하나가 과립낭 세포(juice sac cell)의 액포에 다량의 유기산을 축적한다는 것이다. 구연산(citric acid)이 감귤 열매에 축적되는 주요 유기산이며, 많은 감귤 품종에서 과즙의 1-5%를 축적한다(Fang et al. 1997). 신맛이 적은(acidless) 품종이 오렌지, 문단, 라임, 레몬 등에서 선발되어 왔는데, “Siamese sweet” 문단의 경우, 과즙의 적정 산함량(titratable acid content)이 0.1 ~ 0.2%에 불과하다(Cameron and Soost 1977). 몇몇 교배집단을 이용한 유전분석 결과, 신맛 적음(acidless) 형질은 단일 열성 유전자(*acitric*, *ac*)에 의해 결정될 수 있음이 제시되었다(Canel et al.

1995; Cameron and Soost 1977). Fang 등(1997)은 RAPD 마커를 이용한 BSA를 수행하여 *acitric* 연관 마커를 선발하고, 연관 지도 상에서의 위치를 결정하였으며, 연관 RAPD 마커를 유전형(*Ac/Ac*, *Ac/ac*, *ac/ac*) 결정이 가능한 공우성의 SCAR와 RFLP 마커로 전환하였다. Asins 등(2015)은 QTL 맵핑을 통해 동일 연관그룹의 서로 다른 위치에 존재하는 2개의 주요 *Ac* QTL을 확인하였다. 이러한 결과는 이형접합 유전형(*Ac/ac*)을 갖는 개체가 중간 정도의 산도를 갖는다는 결과와 더불어 신맛 적음 형질은 완전 열성 형질이 아니며(Fang et al. 1997), 이에 관여하는 추가 유전자가 존재할 수 있음을 제시한다.

감귤 속 내에서는 생장, 생식, 형태 등을 포함하여 상당히 다양한 표현형적 변이가 관찰된다. 생식[이형화주(*heterostyly*), 단위결실, 자가불화합성 등], 형태(나무, 잎, 꽃, 열매), 과실 품질(열매당 주스 함량, 주스 색 등), 종자수, 수량성, 조기 착과 등의 형질에 관해 다양한 교배집단을 재료로 연관 지도에 대한 QTL 맵핑이 여러 연구 그룹에 의해 수행되었다(Asins et al. 2015; Garcia et al. 2000; Gulsen et al. 2011; Sahin-Cevik and Moore 2012).

감귤 분자유종에의 향후 전망

현재까지의 감귤 분자유종은 주로 일부 형질에 대한 유전적 특성 분석, 표현형, 동위효소 또는 다형성 분자표지(RAPD, SSR, SCAR, SRAP, RGC, ISSR 등)를 이용한 연관 지도, 형질 연관 분자마커(RAPD, SCAR, AFLP, RGC 등) 발굴, BAC 라이브러리 작성 및 QTL 맵핑 등이 이루어져 왔다. 현재까지 형질관련 유전자 클로닝이 이루어진 것은 CTV 저항성 유전자(*Ctv*)와 적육 관련 *Ruby* 유전자 2건에 불과하다. 지금까지 개발된 일부 형질 연관 분자마커들의 경우도 범용성, 정확성, 효율성 등이 검증되어야 할 것으로 판단된다. 따라서 분자표지를 활용한 감귤 분자유종은 아직 초보적인 수준에 머물러 있는 실정이다.

최근에 스위트오렌지와 클레멘타인 만다린에 대한 고품질의 표준 유전체가 완성되었다(Wu et al. 2014; Xu et al. 2013). 두 개의 표준 유전체 정보는 서열기반의 분자표지(SNP, SSR, InDel) 발굴 및 이를 활용한 표준 연관 및 물리지도 작성, 비교 유전체 지도 작성, gene annotation, 표준 유전체 기반 전사체 분석 등에 활발히 활용되고 있다. 형질 연관 분자표지의 정밀도 향상, 형질 연관 유전자 클로닝의 가속화를 비롯한 유전체 기반 감귤 분자유종이 본격적으로 시작될 것으로 전망되는 시점이다. 또한 감귤 유전자원 및 핵심 집단(core collection)에 대해 표준 유전체 기반 유전체 분석을 바탕으로 비교 유전체 분석, GBS (genotyping-by-sequencing), GWAS (genome wide association study) 등을 통해 감귤의 다양한 형질과 연관된 유용/변이 유전자 클로닝, 형질연관 분자

마커 발굴 및 개발 등에 관한 연구가 가속화될 것으로 전망된다.

최근 식물 유전자 기능 연구 및 다양한 농업 형질 개선 등에 ZFN (zinc-finger nuclease), TALEN (transcription activator-like effector nuclease), Cas9/single guide RNA (sgRNA)와 같은 표적 유전체 교정(targeted genome editing) 기술이 사용되고 있다(Gaj et al. 2013; Woo et al. 2015). 감귤에서도 스위트오렌지를 재료로 유전체 교정을 위한 시도가 이루어진 바가 있다(Jia and Wang 2014). 감귤의 경우, 유전체 교정을 위한 필수 기술인 조직배양 및 형질전환 기술이 비교적 잘 구축되어 있는 상황이다(Han et al. 2005; Donmez et al. 2013). 형질전환을 필요로 하지 않는 VIGS (virus-induced gene silencing) 기술은 유년기가 긴 감귤에서 유전자 기능 연구를 통한 분자마커 검증 등에 적합한 방법이다. VIGS 벡터의 제작 및 담배와 감귤에의 적용을 위한 시도가 이루어지고 있다(Talon and Gmitter 2008). 앞으로 형질연관 분자마커의 검증, 유전자 기능 연구 등과 같은 감귤 분자유종의 다양한 분야에 표적 유전체 교정 및 VIGS 기술이 활발히 활용될 것으로 전망된다.

적 요

세계적인 과수작물로서의 경제적 중요성에도 불구하고, 감귤 생산은 주로 자연교잡 실생이나 논 돌연변이로부터의 선발 또는 단순 품종 도입 등을 통해 이루어지고 있는 실정이다. 긴 유년기, 다배성, 자가불화합성과 같은 감귤 고유의 식물학적 특성, 주요 형질들(병저항성, 수량성, 품질 등)의 QTL에 의한 조절 등은 전통 육종을 통한 우수 품종의 개발을 어렵게 하는 요인이다. 지구 온난화에 의한 생산 여건의 급격한 변화, 소비자 요구 다양화 등은 고품질 감귤의 조기 선발과 안정적 생산, 품종 다양화, 육종 비용 절감 등을 위한 체계적인 감귤 분자유종 프로그램의 도입을 요구하고 있다. 동위효소를 이용한 최초의 감귤 연관 지도 작성이 이루어진 이래, 다양한 분자표지를 이용한 연관 지도 작성, 생물(CTV, CiLV, ABS, 선충) 및 비생물적(염분, 저온) 스트레스, 아포믹시스, 다배성, 과실착색(카로티노이드, 안토시아닌), 무종자, 웅성불임, 신맛 적음, 생식, 형태(나무, 잎, 꽃, 열매 등), 과실 품질, 종자수, 수량성, 조기 착과 등과 연관된 분자표지 발굴, QTL 맵핑 등이 이루어졌다. CTV 저항성과 적육(안토시아닌 축적) 형질에 대해서는 유전자 클로닝이 이루어졌고, 교배 육종 효율 증대 및 비용 절감을 위해 교잡배와 주심배를 구분하기 위한 다수의 simple sequence repeat (SSR) 분자표지가 개발되었다. 최근, 스위트오렌지와 ‘클레멘타인’ 만다린에 대한 고품질의 표준 유전체가 완성되어 유전체 기반 감귤 분자유종을 위한 토대가 마련되었다. 표준 유전체 정보를 토대로 대규모 분자표지(SNP, SSR, InDel) 기반의 표준 연관 및 물리지도 작성, 비교 유전체 지도 작성, gene

annotation, 전사체 분석 등이 활발히 이루어지고 있다. 감귤 유전자원 및 핵심집단에 대해 표준 유전체 기반 비교 유전체 분석, GBS (genotyping-by-sequencing), GWAS (genome wide association study) 등을 통해 감귤의 다양한 형질과 연관된 분자마커 발굴 및 개발, 유용/변이 유전자 클로닝 등에 관한 연구가 가속화될 것으로 전망된다. 또한 표적 유전체 교정 및 VIGS (virus-induced gene silencing) 기술도 유전자 마커의 검증을 비롯한 감귤 분자육종 프로그램에 활발히 이용될 것이다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청 Golden Seed 프로젝트 사업(원예중자사업단, 과제번호: 213003-04-4-SBS30, 세부프로젝트 책임자: 김호방)에 의해 이루어진 것임.

References

- Akimitsu K, Peever TL, Timmer LW (2003) Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. *Mol Plant Pathol* 4:435-446
- Altaf S, Khan MM, Jaskani MJ, Khan IA, Usman M, Sadia B, Awan FS, Ali A, Khan AI (2014) Morphogenetic characterization of seeded and seedless varieties of Kinnow Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). *Australian J Crop Sci* 8:1542-1549
- Asíns MJ, Fernández-Ribacoba J, Bernet GP, Gadea J, Cambra M, Gorris MT, Carbonell EA (2012) The position of the major QTL for citrus tristeza virus resistance is conserved among *Citrus grandis*, *C. aurantium* and *Poncirus trifoliata*. *Mol Breed* 29:575-587
- Asíns MJ, Raga V, Bernet GP, Carbonell EA (2015) Genetic analysis of reproductive, vegetative and fruit quality traits to improve *Citrus* varieties. *Tree Genet Genomes* 11:117
- Balal RM, Khan MM, Shahid MA, Mattson NS, Abbas T, Ashfaq M, Garcia-Sanchez F, Ghazanfer U, Gimeno V, Iqbal Z (2012) Comparative studies on the physiobiochemical, enzymatic, and ionic modifications in salt-tolerant and salt-sensitive citrus rootstocks under NaCl stress. *J Amer Soc Hort Sci* 137:86-95
- Barcaccia G, Albertini E (2013) Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma *Plant Reprod* 26:159-179
- Bastianel M, Schwarz SF, Colleta-Filho HD, Lin LL, Machado MA, Koller OC (1998) Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. *Genet Mol Biol* 21:123-127
- Bastianel M, Oliveira AC, Cristofani M, Guerreiro Filho O, Freitas-Astúa J, Rodrigues V, Astúa-Monge G, Machado MA (2006) Inheritance and heritability of resistance to citrus leprosis. *Phytopathol* 96:1092-1096
- Bastianel M, Cristofani-Yaly M, de Oliveira AC, Freitas-Astúa J, Garcia AAF, de Resende MDV, Rodrigues V, Machado MA (2009) Quantitative trait loci analysis of citrus leprosis resistance in an interspecific backcross family of (*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* L. Osbeck) x *C. sinensis* L. Osb. *Euphytica* 169: 101-111
- Biswas MK, Xu Q, Mayer C, Deng X (2014) Genome wide characterization of short tandem repeat markers in sweet orange (*Citrus sinensis*). *PLoS One* 9:e104182
- Bonina FP, Leotta C, Scalia G, Puglia C, Trombetta D, Tringali, G, Roccazzello AM, Rapisarda P, Saija A (2002) Evaluation of oxidative stress in diabetic patients after supplementation with a standardised red orange extract. *Diabetes Nutr Metab* 15:14-19
- Butelli E, Licciardello C, Zhang Y, Liu J, Mackay S, Bailey P, Reforgiato-Recupero G, Martin C (2012) Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. *Plant Cell* 24:1242-1255
- Cai Q, Guy CL, Moore GA (1994) Extension of the linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. *Theor Appl Genet* 89:606-614
- Cameron JW, Soost RK (1977) Acidity and total soluble solids in citrus hybrids and advanced crosses involving acidless orange and acidless pummelo. *J Am Soc Hort Sci* 102:198-201
- Cameron JW (1979) Sexual and nucellar embryony in F1 hybrids and advanced crosses of *Citrus* and *Poncirus*. *J Am Soc Hort Sci* 104:408-410
- Canel C, Bailey-Serres JN, Roose ML (1995) *In vitro* [¹⁴C] citrate uptake by tonoplast vesicles of acidless citrus juice cells. *J Am Soc Hort Sci* 120:510-514
- Chae CW, Dutt M, Yun SH, Park JH, Lee DH (2011) Development of a SCAR marker linked to male fertility traits in 'Jinkyool' (*Citrus sunki*). *J Life Sci* 21:1659-1665
- Chavez DJ, Chaparro JX (2011) Identification of markers linked to seedlessness in *Citrus kinokuni* hort. ex Tanaka and its progeny using bulked segregant analysis. *HortSci* 46:693-697
- Chen C, Lo Piero AR, Gmitter F Jr (2015) Pigments in citrus. In: C Chen, (ed), *Pigments in Fruits and Vegetables*, Springer, New York, pp 165-187
- Cuenca J, Aleza P, Vicent A, Brunel D, Ollitrault P, Navarro L (2013) Genetically based location from triploid populations and gene ontology of a 3.3-mb genome region linked to *Alternaria* brown spot resistance in citrus reveal clusters of resistance genes. *PLoS One* 8:e76755
- Dalkilic Z, Timmer LW, Gmitter FG Jr (2005) Linkage of an *Alternaria* disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. *J Am Soc Hort Sci* 130:191-195
- Davies FS, Albrigo LG (1994) *Citrus*. CAB International, Wallingford, UK
- De Oliveira AC, Garcia AN, Cristofani M, Machado MA (2002) Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. *Euphytica* 128:397-403
- De Pascual-Teresa, S, Moreno DA, Garcia-Viguera C (2010) Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *Int J Mol Sci* 11:1679-1703

- Deng Z, Huang S, Xiao SY, Gmitter FG (1997) Development and characterization of SCAR markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata*. *Genome* 40:697-704
- Deng Z, Huang S, Ling P, Chen C, Yu C, Weber CA, Moore GA, Gmitter FG Jr (2000) Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences in citrus. *Theor Appl Genet* 101:814-822
- Deng Z, Tao Q, Chang YL, Huang S, Ling P, Yu C, Chen C, Gmitter FG Jr, Zhang HB (2001a) Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for citrus and identification of BAC contigs containing resistance gene candidates. *Theor Appl Genet* 102:1177-1184
- Deng Z, Huang S, Ling P, Yu C, Tao Q, Chen C, Wendell MK, Zhang HB, Gmitter FG Jr (2001b) Fine genetic mapping and BAC contig development for the citrus tristeza virus resistance gene locus in *Poncirus trifoliata* (Raf.). *Mol Genet Genomics* 265:739-747
- Donmez D, Sismek O, Izgu T, Kacar YA, Mendi YY (2013) Genetic transformation in *Citrus*. *Scientific World J* 2013:491207
- Fang DQ, Federici CT, Roose ML (1998) A high-resolution linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genetics* 150:883-890
- Fang DQ, Federici CT, Roose ML (1997) Development of molecular markers linked to a gene controlling fruit acidity in citrus. *Genome* 40:841-849
- Fang DQ, Roose ML (1999) A novel gene conferring citrus tristeza virus resistance in *Citrus maxima* (Burm.) Merrill. *Hortsci* 34:334-335
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Casbased methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31:397-405
- García R, Asins MJ, Forner J, Carbonell EA (1999) Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. *Theor Appl Genet* 99:511-518
- García MR, Asins MJ, Carbonell EA (2000) QTL analysis of yield and seed number in *Citrus*. *Theor Appl Genet* 101:487-493
- Garnsey SM, Barrett HC, Hutchison DJ (1987) Identification of citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophactica* 19:187-191
- Garnsey SM, Su HJ, Tsai MC (1997) Differential susceptibility of pummelo and Swingle citrumelo to isolates of citrus tristeza virus. In: Da Graca JV, Moreno P, Yokomi RK (eds), Proc. 13th Conf. Intl. Organ. Citrus Virologists, Univ. California Press, Riverside, CA, USA pp 138-146
- Gmitter FG Jr, Xiao SY, Huang S, Hu XL, Garnsey SM, Deng Z (1996) A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. *Theor Appl Genet* 92:688-695
- Gmitter FG Jr, Deng Z, Chen C (2007) Cloning and characterization of disease resistance genes. In: I Khan, (ed), Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology, CAB International, Oxfordshire, UK, pp 287-305
- Gulsen O, Uzun A, Canan I, Seday U, Canihos E (2010) A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. *Euphytica* 173:265-277
- Gulsen O, Uzun A, Seday U, Kafa G (2011) QTL analysis and regression model for estimating fruit setting in young citrus trees based on molecular markers. *Sci Hortic* 130:418-424
- Han SH, Ahn HJ, Kang SG, Kim HY (2005) Expression of green fluorescent protein gene in the callus of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* cv. Miyagawa Wase) by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Hort Environ Biotechnol* 46:39-42
- Hong QB, Xiang SQ, Chen KL, Chen LG (2001) Two complementary dominant genes controlling apomixis in genus *Citrus* and *Poncirus*. *Acta Genet Sin* 28:1062-1067
- Hong QB, Ma XJ, Gong GZ, Peng ZC, He YR (2015) QTL mapping of citrus freeze tolerance. *Acta Hort* 10.17660/ActaHortic.2015.1065.57
- Iwamasa M, Ueno I, Nishiura M (1967) Inheritance of nucellar embryony in *Citrus*. *Bull Hort Res Sta Japan*, ser B 7:1-10
- Jayaprakasha GK, Patl BS (2007) In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chem* 101:410-418
- Jia H, Wang N (2014) Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One* 9:e93806
- Kang SK, Yun SH, Lee DH (2008) Development of a SCAR marker linked to polyembryonic trait in citrus. *Korean J Hort Sci Tech* 26:51-55
- Kepiro JL, Roose ML (2007) Nucellar embryony. In: IA Khan, (ed), Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology, CAB International, Oxfordshire, UK, pp 141-149
- Kepiro JL, Roose ML (2010) AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata*. *Tree Genet Genomes* 6:1-11
- Kim HB, Lim S, Kim JJ, Park YC, Yun SH, Song KJ (2015) Current status and prospects of citrus genomics. *J Plant Biotechnol* 42:326-335
- Kim JH, Handayani E, Wakana A, Sakai K, Sato M, Han JH (2013) Segregation of self-incompatible hybrid seedlings in crosses with grapefruit and possible RAPD markers for the S gene alleles. *J Faculty Agric Kyushu Univ* 58:269-275
- Kohmoto K, Akimitsu K, Otani H (1991) Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxins. *Phytopathol* 81:719-722
- Koltunow AM, Hidaka T, Robinson SP (1996) Polyembryony in *Citrus*: Accumulation of seed storage proteins in seeds and in embryos cultured in vitro. *Plant Physiol* 110:599-609
- Ladaniya M (2008) Citrus fruit: biology, technology and evaluation. Elsevier Inc, Oxford, UK
- Latado RR, Tognato PC, Silva-Stenico ME, do Nascimento, LM, dos Santos PC (2008) Anthocyanin accumulation and physical and chemical characteristics of blood orange fruits during cold storage. *Rev Bras Frutic* 30:604-610
- Ling P, Duncan LW, Deng Z, Dunn D, Hu X, Huang S, Gmitter FG Jr (2000) Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. *Theor Appl Genet* 100:1010-1017
- Maas EV (1993) Salinity and citriculture. *Tree Physiol* 12:195-216
- Mestre PF, Asins MJ, Pina JA, Navarro L (1997a) Efficient search

- for new resistant genotypes to the citrus tristeza closterovirus in the orange subfamily Aurantioideae. *Theor Appl Genet* 95:1282-1288
- Mestre PF, Asins MJ, Pina JA, Carbonell EA, Navarro L (1997b) Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L) Raf. *Theor Appl Genet* 94:458-464
- Nakano M, Nesumi H, Yoshioka T, Yoshida T (2001) Segregation of plants with undeveloped anthers among hybrids derived from the seed parent, 'Kiyomi' (*Citrus unshiu* × *C. sinensis*). *J Japan Soc Hort Sci* 70:539-545
- Nakano M, Shimizu T, Kuniga T, Nesumi H, Omura M (2008) Mapping and haplotyping of the flanking region of the polyembryony locus in *Citrus unshiu* Marcow. *J Japanese Soc Hort Sci* 77:109-114
- Nakano M, Kigoshi K, Shimizu T, Endo T, Shimada T, Fujii H, Omura M (2013) Characterization of genes associated with polyembryony and *in vitro* somatic embryogenesis in *Citrus*. *Tree Genet Genomes* 9:795-803
- Nicolosi E (2007) Origin and taxonomy. In: I Khan, (ed), *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CAB International, Oxfordshire, UK, pp 19-43
- Ollitrault P, Froelicher Y, Dambier D, Luro F, Yamamoto M, Khan IA (2007) Seedless and ploidy manipulation. In: I Khan, (ed), *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CAB International, Oxfordshire, UK, p 197-218
- Ollitrault P, Terol J, Chen C, Federici CT, Lotfy S, Hippolyte I, Ollitrault F, Bérard A, Chauveau A, Cuenca J, Costantino G, Kacar Y, Mu L, Garcia-Lor A, Froelicher Y, Aleza P, Boland A, Billot C, Navarro L, Luro F, Roose ML, Gmitter FG, Talon M, Brunel D (2012) A reference genetic map of *Citrus clementina* hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. *BMC Genomics* 13:593
- Parlevliet JE, Cameron JW (1959) Evidence on the inheritance of nucellar embryony in *Citrus*. *Proc Am Soc Hort Sci* 74:252-260
- Penjor T, Yamamoto M, Uehara M, Ide M, Matsumoto N, Matsumoto R, Nagano Y (2013) Phylogenetic relationships of *Citrus* and its relatives based on *matK* gene sequences. *PLoS ONE* 8(4):e62574.
- Pieringer AP, Edwards GJ (1967) Identification of nucellar and zygotic citrus seedlings by infrared spectroscopy. *J Am Soc Hort Sci* 86:226-234
- Pok P, Oh EU, Yi 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. *Hort Environ Biotechnol* 56:225-232
- Raga V, Bernet GP, Carbonell EA, Asins MJ (2012) Segregation and linkage analyses in two complex populations derived from the citrus rootstock Cleopatra mandarin. Inheritance of seed reproductive traits. *Tree Genet Genomes* 8:1061-1071
- Raga V, Bernet GP, Carbonell EA, Asins MJ (2014) Inheritance of rootstock effects and their association with salt-tolerance candidate genes in a progeny derived from 'Volkamer' lemon. *J Amer Soc Hort Sci* 139:518-528
- Raga V, Intrigliolo DS, Bernet GP, Carbonell EA, Asins MJ (2016) Genetic analysis of salt tolerance in a progeny derived from the citrus rootstocks Cleopatra mandarin and trifoliolate orange. *Tree Genet Genomes* 12:34
- Rai M (2006) Refinement of the Citrus tristeza virus resistance gene (*Ctv*) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Mol Biol* 61:399-414
- Rao MN, Soneji JR, Chen C, Huang S, Gmitter FG Jr (2008) Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like *Citrus* rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. *Tree Genet Genomes* 4:113-124
- Riso P, Visioli F, Gardana C, Grande S, Brusamolino A, Galvano F, Galvano G, Porrini M (2005) Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. *J Agric Food Chem* 53:941-947
- Rodrigues JCV, Kitajima EW, Childers CC, Chagas CM (2003) Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. *Exp Appl Acarol* 30:161-179
- Ruiz C, Paz Breto M, Asins MJ (2000) A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. *Euphytica* 112:89-94
- Sahin-Cevik M, Moore GA (2012) Quantitative trait loci analysis of morphological traits in *Citrus*. *Plant Biotechnol Rep* 6:47-57
- Soost RK, Williams TE, Torres AM (1980) Identification of nucellar and zygotic seedlings of *Citrus* with leaf isozymes. *HortSci* 15:728-729
- Talon M, Gmitter FG Jr (2008) Citrus genomics. *Inter J Plant Genomics Article ID* 528361
- Titta L, Trinei M, Stendardo M, Berniakovich I, Petroni K, Tonelli C, Riso P, Porrini M, Minucci S, Pelicci PG, Rapisarda P, Reforgiato Recupero G, Giorgio M (2010) Blood orange juice inhibits fat accumulation in mice. *Int J Obes (Lond)* 34: 578-588
- Tozlu I, Guy CL, Moore GA (1999a) QTL analysis of Na⁺ and Cl⁻ accumulation related traits in an intergeneric BC₁ progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and nonsaline environments. *Genome* 42:692-705
- Tozlu I, Guy CL, Moore GA (1999b) QTL analysis of morphological traits in an intergeneric BC₁ progeny of *Citrus* and *Poncirus* under saline and non-saline environments. *Genome* 42:1020-1029
- Ueno I, Iwamasa M, Nishiura M (1967) Embryo number of various varieties of Citrus and its relatives. *Bull Hort Res Sta Japan ser.* B7:11-22
- Weber CA, Moore GA, Deng Z, Gmitter FG Jr (2003) Mapping freeze tolerance quantitative trait loci in a *Citrus grandis* × *Poncirus trifoliata* F-1 pseudo-testcross using molecular markers. *J Amer Soc Hort Sci* 128:508-514
- Weinbaum SA, Cohen E, Spiegel-Roy P (1982) Rapid screening of 'Satsuma' mandarin progeny to distinguish nucellar and zygotic seedlings. *Hort Sci* 17:239-240
- Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins.

- Nat Biotechnol 33:1162-1164
- Wu GA et al (2014) Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. Nat Biotechnol 32:656-662
- Xiao JP, Chen LG, Xie M, Liu HL, Ye WQ (2009) Identification of AFLP fragments linked to seedlessness in Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and conversion to SCAR markers. Sci Hortic 121:505-510
- Xu Q et al (2013) The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). Nat Genet 45:59-66
- Yamasaki A, Kitajima A, Ohara N, Tanaka M, Hasegawa K (2007) Histological study of expression of seedlessness in *Citrus kinokuni* 'Mukaku Kishu' and its progenies. J Amer Soc Hort Sci 132:869-875
- Yang ZN, Ye XR, Choi S, Molina J, Moonan F, Wing RA, Roose ML, Mirkov TE (2001) Construction of a 1.2-Mb contig including the citrus tristeza virus resistance gene locus using a bacterial artificial chromosome library of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Genome 44:382-393
- Yang ZN, Ye XR, Molina J, Roose ML, Mirkov TE (2003) Sequence analysis of a 282-kb region surrounding the citrus tristeza virus resistance gene (*Ctv*) locus in *Poncirus trifoliata* L. Raf. Plant Physiol 131:482-492
- Yildiz E, Kaplankiran M, Demirköser TH, Uzun A, Toplu C (2013) Identification of zygotic and nucellar individuals produced from several citrus crosses using SSRs markers. Not Bot Horti Agrobo 41:478-484
- Yoshida T (1985) Inheritance of susceptibility to citrus tristeza virus in trifoliolate orange. Bull Fruit Trees Res Sta 82:17-26
- Yoshida T (1993) Inheritance of immunity to citrus tristeza virus of trifoliolate orange in some citrus intergeneric hybrids. Bull Fruit Trees Res Sta 90:33-43
- 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. Hort Environ Biotechnol 48:171-175
- Zeng W, Xie Z, Yang X, Ye J, Xu Q, Deng X (2013) Microsatellite polymorphism is likely involved in phytoene synthase activity in *Citrus*. Plant Cell Tiss Organ Cult 113:449-458