

제주 재래감귤(병귤)의 기초연관지도 작성 및 표준유전체 연구기반 구축

Construction of linkage map and establishment of the research infrastructure for the reference genome sequence in Jeju's wild citrus (Byungkyul)

주관연구기관	제주대학교
연구책임자	김재훈
발행년월	2013-02
주관부처	농촌진흥청
사업관리기관	농촌진흥청
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201300014280
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/02 16:21:10

저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

제 출 문

농촌진흥청 장 귀하

본 보고서를 “제주 재래감귤(병귤)의 기초연관지도 작성 및 표준유전체 연구기반 구축”과제의 보고서로 제출합니다.

연구수행기간 : 2011.05.01. ~ 2012.12.31.

제1세부연구과제 : 감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축

제2세부연구과제 : 제주 재래감귤(병귤) 기초 유전자지도 작성

2013. 2. 28

주관연구기관명	: 제주대학교
주관연구책임자	: 김 재 훈
연구 원	: 송 관 정
“	: 진 성 범
“	: 김 용 우
“	: 정 성 진
“	: 윤 정 훈
“	: 한 송 이
“	: 박 재 현
“	: 김 섯 별
“	: 오 은 의
“	: 장 수 중
“	: Anhdung
“	: Voleak

주관연구책임자 : 김재훈

주관연구기관장 : 제주대학교 산학협력단장

【별지 16】

완결과제 최종보고서

<표지>

일반과제 (0), 보안과제 ()

(과제번호 : PJ008217)

제주 재래감귤(병귤)의 기초연관지도 작성 및
표준유전체 연구기반 구축

(Construction of linkage map and establishment of the
research infrastructure for the reference genome
sequence in Jeju's wild citrus (Byungkyul))

제주대학교

농촌진흥청

요 약 문

I. 제 목

제주 재래감귤(병귤)의 기초연관지도 작성 및 표준 유전체 연구기반 구축

II. 연구개발의 목적 및 필요성

제주 재래감귤(병귤)의 염색체 핵형 결정과 기초 연관지도 작성에 의한 표준 유전체 연구기반 구축 및 유용유전자를 발굴 하고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

NGS 방법을 이용하여 제주 재래감귤 병귤의 유전체를 해독하고 comparative genomics를 이용하여 재래감귤의 유용 유전자인 글리코실화 반응 관련 유전자의 클로닝 및 유전자의 기능을 분석 하였다.

병귤의 기초 핵형을 분석하였고 병귤 유래의 분리집단을 이용한 RAPD 다형성 분석에 의한 기초 연관지도를 작성을 하였다. 또한 탱자 4배체를 이용하여 gene redundancy의 기초 data를 분석하였다.

IV. 연구개발결과

병귤의 유전체 해독을 위해 병귤의 잎에서 추출한 게놈 DNA와 illumina사의 Hi seq 2000을 이용하여 염기서열 분석 후 다양한 데이터 처리 과정을 거쳐 최종적으로 감귤 게놈의 약 68배에 해당하는 27.7GB를 확보하였다. 이렇게 확보된 데이터를 이용하여 약 21000여개의 scaffold를 제작하였고, 전체 감귤 게놈 사이즈의 약 92%에 해당하는 321Mb의 유전정보를 확보하였다. 그리고 애기장대와 sweet orange의 유전자 정보를 기반으로 한 병귤의 유전자 정보를 확인할 수 있는 web DB 구축을 완료 하였으며 전체 유전자에 대한 Gene ontology를 확인하였다. 본 과제에서는 보다 정밀한 병귤의 유전체 해독을 위한 추가 분석을 실시중에 있다. 또한 병귤 유전체 정보로부터 플라보노이드의 안정성과 수용성에 영향을 끼치는 유용유전자인 glucosyltransferase (GT)를 선발하고 선발된 유전자의 염기서열 정보를 바탕으로 유전자와 단백질의 발현 정보를 확인하여 유용 유전자들의 기능 분석을 실시하고 있는 중이다.

감귤의 고유 종(real species)의 동정, 유래분석 및 유연관계의 분석에 핵심이 되는

CMA 핵형분석법을 확립하였으며, 이를 활용하여 국가기관 유전자원 보존 제주 재래귤의 핵형분석을 수행하여 잡종의 유전자형 특성을 확인하게 되었고, 향후 보호수 지정 재래귤의 추가 분석을 통한 고유종의 유전자원 탐색이 시급함을 제시하였다. 제주 유일의 자생 재래귤(병귤)의 유전체 분석의 기초가 되는 연관지도를 작성하고, 클레멘타인의 유전정보와 비교하기 위해 병귤×클레멘타인 등의 분리집단을 양성하였고, pseudo-test cross strategy에 의한 RAPD DNA markers의 선발을 수행하여 64개 primers 및 110 DNA markers를 선발하였으며, 분리집단에서 이를 적용하여 RAPD 분석을 수행 중에 있으며, 분석이 완료되면 JointMap을 이용하여 기초 연관지도를 작성할 예정으로 있다. 무핵의 감귤 신품종 및 내환경성 대목 육종을 위해 전세계적으로 삼배체 및 사배체 육성 및 선발을 추구하고 있어서, 유전체 연구를 배수체 육종과 연계하기 위해 배수체 유도 및 배수체의 표현형 변이 분석과 methylation 분석을 통해 gene redundancy 조절 및 epigenetics에 대한 기초자료를 구축하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구를 통해 개발되는 재래감귤의 양적형질 유전자 물리지도 및 BAC 라이브러리 등 유전체 정보는 재래감귤의 유용유전자 탐색과 감귤 과실의 품질 및 기능성 향상을 위한 고부가가치 신품종 육성에 귀중한 자료로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

재래감귤의 염색체 분석을 통해 특정 단편과 표현형과의 변이를 연계시키는데 중요한 정보를 제공할 수 있으며, 개발된 유전자 지도를 바탕으로 목표 형질에 관여하는 후보유전자 분석, 품종의 조기 육성 및 차후 돌연변이체의 gene expression profile 분석은 다양한 분야에 크게 활용될 것으로 판단된다.

현재 공개된 감귤의 염기서열은 substitution mapping등의 기법을 이용하여 양적형질 유전자 (QTL)의 분리 및 특성 분석이 활발하게 진행되고 있으며, 본 연구에서 선발된 내병성, 내한성 등 관련 유용 유전자들 또한 동일한 기법을 이용하여 선택적으로 우량 품종에 직접 도입함으로써 우수 품종 개발에 이용할 수 있다.

염기서열 분석을 통해 확보할 수 있는 PCR marker들은 목표 유전자의 marker-assisted selection에 가장 적합한 분자표지로 이용될 수 있고 감귤 유전체간의 유사성에 비추어 다른 작물에서도 유사한 유전자를 쉽게 분리할 수 있는 기회를 제공할 것이다. 또한 본 연구를 통해 밝혀질 유전자들은 지금까지 보고되지 않은 새로운 종류의 유전자일 가능성이 매우 크며 이들 유전자들의 분자생물학적 연구를 통하여 유전양상을 규명하고 특허 등으로 보유할 수 있을 것으로 판단된다.

S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

○ Title : Construction of linkage map and establishment of the research infrastructure for the reference genome sequence in Jeju's wild citrus (Byungkyul)

The purpose of this study is establishment of the research infrastructure for the reference genome research and development to identify useful genes in Jeju's wild citrus (Byungkyul).

NGS method was used to decipher the Jeju's wild citrus (Byungkyul) genomic sequence. As a result, 27.7GB sequence data, which corresponds to about 68 folds of citrus genomic size, were obtained. From this data, about 21,000 scaffolds were assembled and 321 MB genomic information was obtained. These data corresponds to about 92 of the total genome size in citrus. To identify gene information of Byungkyul, We compared our data with genetic information of Arabidopsis and sweet orange.

In other study, we analyzed glucosyltransferase (GT) from Byungkyul genomic sequence information. Several genes were cloned and expressed in *E.coli*. The expressed proteins were characterized with various substrates to identify their specific activity.

Karyotyping by CMA (chromomycin A3) analysis and basic linkage mapping by pseudo-testcross strategy was conducted in the study. Chromosome was prepared from the young roots of nucellar seedlings and good chromosomes preparation was selected by DAPI and Giemsa staining. Thereafter they were finally stained by CMA. Byungkyul (*C. platyrrhynchos*) was evaluated to be 3C+11D+4E whereas, general characteristic CMA banding patterns of citrus was classified seven types (A, B, C, D, E, F, and Dst). The result indicated that Byungkyul had a hybrid origin and could not be real species.

Two parents {Byungkyul and clementine (*C. clementina*)} and six representatives of their F1 progeny were used for selecting Operon random primers showing the polymorphism. Total 37 primers were selected on the basis of pseudo-testcross strategy, which produced 71 RAPD markers showing 1:1 segregate ratio. These primers were applied to 100 progeny and segregate data were collected. The data were processed by JointMap 4.1 program to construct basic linkage maps. Finally 8

linkage groups were generated, whereas citrus has 9 chromosomes. The result indicated that more selection of DNA markers was required for constructing 9 linkage groups with high saturation.

목 차

제 1 장 서 론	1
1절 연구개발의 필요성	1
2절 연구개발의 목적	4
제 2 장 국내외 기술개발 현황	5
1절 국내 연구현황	5
2절 국외 연구현황	6
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	9
1절 연구수행 내용 및 방법	9
2절 주요 연구결과	11
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	28
1절 목표대비 대외 달성도	28
2절 정량적 성과	28
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	30
제 6 장 참고문헌	31

제1장 서론

제1절 연구개발의 필요성

감귤류는 전 세계적으로 2,000여종이 넘는 유전자원이 있다고 보고되고 있다. 이러한 감귤류는 그 원산지가 아시아 대륙의 동남부와 그 주변부로 추정되고 있으며, 현재 감귤류 유전자원을 효율적으로 수집, 보존, 평가 및 이용 체계를 구축하고 있는 국가로는 미국, 일본, 스페인 등이며 최근 중국이 활발한 연구활동을 보이고 있다.

감귤류 식물은 산업적으로 중요할 뿐만 아니라 이배체 ($2n=18$)의 식물체로서 9개의 염색체와 약 380Mb의 비교적 작은 게놈사이즈를 갖고 있다. 이는 애기장대 게놈의 약 3배 정도에 해당하며, 유전자원으로서의 가치 또한 매우 큰 작물이기 때문에 미국, 프랑스, 스페인, 브라질을 중심으로 감귤 유전체 연구 국제 컨소시엄이 조직되어 2007년부터 유전체규명을 위한 구체적 사업이 추진되고 있다.

감귤유전체연구국제컨소시엄은 2011년 1월 반수체 (haploid) 클레멘타인 감귤류에 대한 표준유전체(reference genome sequence)를 발표하였다. 중요 유전자 서열의 발표에는 일부 참여 국가의 반대가 있어 추이가 주목되고 있다. 앞으로 21세기에는 국부의 척도가 국가가 보유하는 유전자원의 양과 질에 따라 결정되며, 국가 및 기업 간에는 종자와 종자에 대한 정보 확보를 위한 경쟁이 더욱 치열해질 것으로 전망된다.

현재까지 감귤류에서 약 60여종의 flavonoid가 분리되었으며, 새로운 생리활성 성분이 계속하여 발견되고 있다. 감귤류에는 rutin, diosmin과 같은 일반적인 flavonoid와 hesperidin, naringin과 같은 감귤류 특유의 flavonoid, 그리고 채소나 과일에서는 보고되지 않은 감귤류 고유의 tangeretin, nobiletin과 같은 flavonoid가 함유되어 있다. 최근에는 tangeretin이 암세포의 침윤 및 전이방지, 암세포의 자살유도작용(apoptosis), 백혈병 세포의 분화촉진 등에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 이들의 기능성에 대한 평가로서 항산화작용, 순환기계통 질병의 예방, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스 등 다양한 기능들이 보고되었으며, 특히 감귤껍질 중의 naringin은 항균작용이 탁월하고, hesperidin은 혈압저하효과가 있음이 보고되었다. 이러한 flavonoid 생합성관련 유전자들이 중요성은 더욱 강조되고 있다.

최근 국내 과수산업은 FTA 협상 등에 따른 농산물시장이 개방됨에 따라 많은 위협을 받고 있다. 특히 가장 큰 위협에 처해있는 것이 제주에서 주로 재배되고 있는 감귤이며, 그 외 사과, 배, 포도, 감 등도 그 피해가 점차 확산될 것으로 예상되고 있다. 이에 따라 국내 과수산업의 국제경쟁력 강화를 위한 다양한 노력들이 전개되고 있고, 고품질 과일생산을 위한 신품종개발 연구들도 많이 이루어지고 있지만 현재까지 국내에서 감귤을 비롯한 과수의 분자생물학적 연구 기반은 아주 미흡한 실정이다.

감귤은 국내 생산량의 대부분이 제주지역에서 생산되고 있으나, 온난화에 따라 생산 지역의 남해안으로 확대되고 있다. 생산총액은 연평균 6000억 원 규모이고, 생산량은 연간 60만 톤으로 생산총액과 생산량에서 국내 과수 생산량 1위를 차지하고 있는 중요한 작물이다. 하지만 한미 FTA 체결 등에 따른 오렌지 수입개방으로 인하여 첼페시점인 2022년까지 연평균 750억 원 감소할 것으로 추정할 만큼 가장 피해가 우려되는 작물 중 하나이다. 따라서 품질 개선을 통한 경쟁력 강화가 무엇보다 절실한 상황이며, 그에 따른 감귤 유전자원에 대한 체계적 연구가 시급한 실정이다.

현재 국내에서 재배되고 있는 대부분의 감귤 품종은 일본에서 도입된 것으로 국제식물신품종 보호동맹협약 (UPOV)에 의해 감귤에서도 로열티를 지불해야 하는 상황이다. 또한 2012년이 되면 우리나라의 감귤도 품종보호 작물에 포함되어 지적재산권의 보호 관리가 강화되어, 앞으로는 종자산업법에 의한 품종보호권이 설정 등록되면 로열티를 지불해야 한다. 로열티를 지불하면서 감귤을 재배하기는 사실상 어려운 실정이므로 우리 품종의 육성은 매우 중요하고 시급한 문제가 되고 있다.

국내에서는 감귤 유전자원에 대한 체계적 개발이 이루어지고 있지 않아 감귤연구 뿐 아니라 감귤산업에 커다란 걸림돌이 되고 있다. 특히 제주에는 20여종의 제주재래감귤 품종이 있으나 멸종위기에 직면하고 있어 고품질의 국산 품종과 유용한 유전자원의 개발을 위한 육종소재의 보존차원에서 이들 재래감귤에 대한 확보와 안정적 유지관리가 필요한 실정이다.

국내에서 재배되고 있는 재래 감귤품종 중 병귤은 외국의 어떤 문헌에도 기록되어 있지 않은 순수 국산 품종으로 비교적 당도가 높고, 내한성과 병충해에 특히 강한 것으로 알려져 있다. 또한 재래감귤 중에서 향기가 가장 좋으며 제주에서는 예로부터 한방요법에 사용될 정도로 기능성 물질 또한 많이 함유하고 있는 것으로 보고되고 있다.

현재 제주에는 수령이 300년 이상 된 병귤나무가 있고, 천연기념물로 지정예고 되어 있다 (그림 1). 그러나 현재 병귤을 포함한 제주재래감귤에 대한 연구는 주로 유용성분의 함유량 분석에 대한 연구만 이루어지고 있을 뿐 유용 유전자의 개발이나 활용을 위한 BAC 및 cDNA 라이브러리 제작등 유전체 규명을 위한 구체적인 연구는 현재까지 이루어지고 있지 않다.

사회

재래 굴나무 천연기념물 지정

정재환기자

제주 재래종 굴나무가 천연기념물로 지정될 전망이다. 제주도는 문화재청이 제주시 도련동에 있는 재래종 굴나무류를 국가지정문화재인 천연기념물로 지정 예고했다고 30일 밝혔다.



병굴-수령310년

그림 1. 천연기념물로 지정 예고된 수령 310년의 병굴나무

1990년대 이후 분자생물학과 유전공학 기술이 급속히 발전하면서 모델 식물체나 주식 작물을 포함한 여러 식물체에서 다양한 형태의 유전체 분석방법이 개발 보급되면서 경제형질에 영향을 미치는 유전자 또는 유전체 영역을 해독할 수 있게 되었다. 경제형질에 영향을 미치는 유전자를 탐색하기 위한 방법으로는 크게 양적형질 유전자좌(quantitative trait loci) 지도작성과 후보유전자 분석방법이 적용되어오고 있다. 분자유전자지도와 QTLs 분석을 이용하여 양적형질의 유전적 변이에 관여하는 유전자좌의 수, 염색체 상의 위치, 개별 유전자들의 영향력 등에 대한 정보, 유전 양식, 다면발현 효과, 그리고 상위성 효과등의 분석이 가능해졌고, 감귤도 과거에 애기장대나 벼와 같은 감귤 유전체연구 국제컨소시엄을 구축하여 감귤 유전체 해독을 위한 여러 가지 응용연구가 진행되고 있고, 이러한 연구에 적극 참여하여 국제적 공조를 통한 정보의 확보가 절실하다.

이러한 최근의 연구 양상은 연구 대상 식물의 육종기간을 단축시키고, 우량형질의 선발 효율을 높이기 위해 보다 정확한 위치나 효과를 분석할 수 있는 분자마커의 개발 및 확보가 요구되고 있고, 이러한 요구를 충족하기 위한 방법으로 고밀도화 된 분자 유전자 지도의 작성이 필요하다는 공통된 인식하에 연구가 활발하게 진행 중에 있다.

분자 마커의 개발은 작물 계통의 분석을 위한 아주 중요한 단계이며, 또한 유전자 지도는 유전체 구성, 작물 종의 진화, 근연 작물종의 유전체 상동성 등에 대한 보다 훌륭한 연구를 가능하게 할 뿐 아니라 경제적으로 유용한 형질의 유전자를 발굴할 수 있도록 한다. 다양한 병 저항성 품종이나 내한성 그리고 육종기간의 단축 품종등 농업형질이 우수한 품종의 선발 등에도 분자마커 및 유전자 지도가 매우 유용하게 사용될 수 있다.

따라서, 멸종위기에 처해 있는 제주재래감귤인 병귤의 유전체 규명을 위한 연구는 제주감귤에 대한 고유한 유전정보를 확보할 수 있고, 많은 유용한 유전자를 분리할 수 있을 것이다. 또한, 확보한 유전정보는 대규모로 database화함으로써 유전공학/분자생물학적 연구를 위한 기초 자료를 제공할 수 있을 것이며, 이러한 정보들은 감귤 및 과수연구에 신기원을 마련할 것이고 바이오기술의 국제경쟁력 제고 차원에서도 매우 중요하여 반드시 연구되어야 할 필요성이 있다.

또한 제주도내의 난지연구소와 농업기술원을 비롯한 일부 감귤 관련 연구기관에서는 전통적인 감귤 재배 및 생리에 중심을 둔 연구를 진행하고 있어 본 연구를 통하여 개발/제공되는 감귤류의 유전자 및 유전체 분석 정보들은 감귤의 영양성, 맛 또는 병저항성 연구등 감귤의 신품종 개발연구에 커다란 시너지 효과를 줄 수 있을 것으로 예상된다.

제2절 연구개발의 목적

본 연구에서는 제주재래감귤인 병귤의 유전체 구조 해석 및 유전체 해독을 위하여 고밀도 유전자 지도 및 BAC 클론을 확보하여 유전체 클론 뱅크를 확보하고, 표준유전체에 기초한 유전체 초안을 완성하고 유전자 영역의 서열해독을 통한 유전체 해독 기반을 구축을 목표로 한다. 과제의 수행에 따른 염기서열 및 유전지도의 정보 DB를 구축하여 유전체 정보의 활용기술을 개발하고, 신품종 개발을 위한 유전육종의 기초기술 확보를 목표로 한다.

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 연구 현황

국내 유전체 연구는 2000년을 전후하여 정부의 주도하에 대규모 유전체 사업단의 주도로 급속도의 성장을 보인 것은 사실이나, 미국이나 일본등과 같은 생명공학 연구 선진 국가와 비교할 때 아직 지원 규모면에서 더욱 확대되어야 하며 정부 차원의 꾸준한 지원이 필요한 상황이다.

국내의 식물기능 유전체 연구도 다양한 유전체나 유전자 정보가 축적되어 있는 벼, 배추 그리고 고추를 중심으로 이루어지고 있고, 유전체 연구를 통해 생물자원의 가치를 높이고 활용성을 증대시키고자 하는 노력을 기울이고 있다. 과수작물 중의 하나인 재래감귤과 같은 유용한 생물자원에 대한 유전체 연구는 다양한 작물의 비교유전체 연구에도 많은 기여를 할 것으로 기대되고 있으나, 체계적인 연구는 미흡한 상황이다.

국내에서 수행되었던 감귤연구의 대부분은 제주대학교를 중심으로 제주도내 여러 연구기관에서 온주밀감과 일부 제주재래감귤이 함유하고 있는 기능성 성분의 종류와 추출에 관련된 연구가 대부분이었으나, 현재는 침체위기에 놓여 있는 제주 감귤산업을 극복하기 위하여 형질전환 식물체를 이용한 고품질 감귤 신품종 개발에 대한 연구도 비교적 활발히 이루어지고 있다.

최근 들어 제주대학교 감귤유전자원은행, 아열대원예산업연구소, 농촌진흥청 감귤시험장등에서는 감귤의 조기 숙성 및 개화관련 유전자와 당 합성 유전자등 유용유전자를 발굴하고 이를 감귤에 도입하는 형질전환 식물체를 제작하여 산업적으로 가치가 높은 감귤 신품종을 개발하려는 연구와 감귤의 원형질체 융합을 이용하여 신품종을 개발하는 연구를 수행 중에 있으나 연구 능력 확충이 필요한 실정이다.

농촌진흥청 감귤시험장에서는 현재 제주도에서 재배되고 있는 감귤 품종들의 유전적 특성을 밝히기 위한 몇몇 재래감귤의 핵형 관련 연구를 FISH법을 이용한 염색체 관찰을 통해 감귤의 핵형분석을 수행하고 있으나, 체계적인 연구가 필요하다.

제주대학교 감귤유전자원소재은행에서는 2007년도부터 제주에서 재배되고 있는 온주밀감, 한라봉 그리고 재래감귤인 진귤과 지각에 대한 cDNA 라이브러리를 제작하고, 유전자 및 서열정보를 확보하려는 노력을 하고 있으며, 감귤의 유전발현 양상을 microarray로 분석하고, 유용유전자 발굴을 통한 감귤유전 정보와 관련된 연구를 수행하고 있으나 한정된 예산과 연구 인력으로 체계적인 유전자원의 분석과 개발에 어려움을 보이고 있다.

제2절 국외 연구 현황

감귤의 대표적인 국외 연구현황으로 미국, 일본, 중국, 오스트리아, 브라질, 프랑스, 이탈리아, 스페인, 이스라엘 등으로 구성된 감귤 유전체연구 국제컨소시엄에서 감귤연구에 대한 국제적 공조를 이루고 있다.

감귤유전체연구 국제컨소시엄에서 미국, 이탈리아, 프랑스, 브라질이 주도하여 클로멘타인 감귤류와 sweet orange에 대한 reference genome을 2011년 1월 말에 발표하였고 (그림 2), 이를 기반으로 하는 유전체 연구가 더욱 활성화되고 있다.

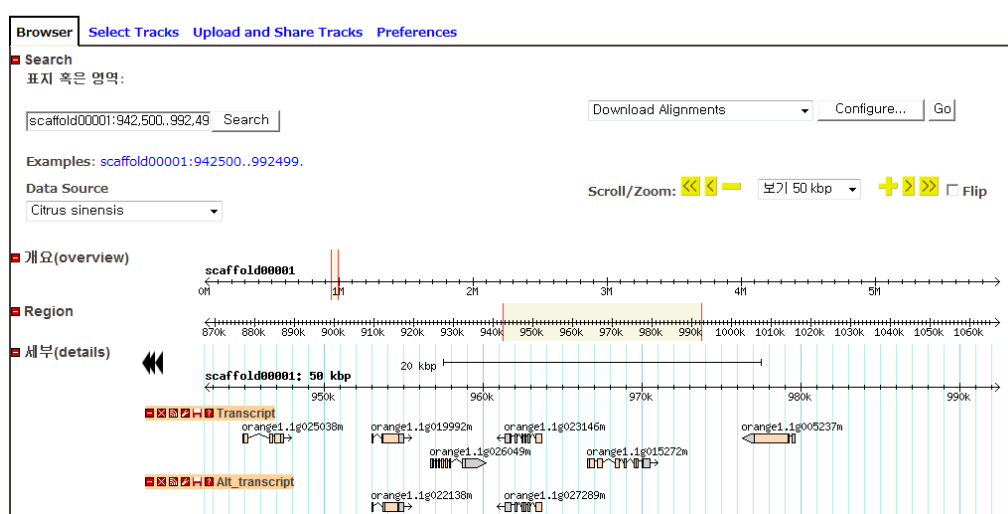


그림 2. phytozome.net에 공개된 Citrus sinensis (sweet orange)의 유전체 정보

미국의 경우 국가적 차원에서 감귤류의 생리기능성 연구가 진행되어지고 있다. 특히 미국 농무성 산하연구소인 Citrus and Subtropical products Research Laboratory에서 1931년부터 지속적으로 감귤의 생리기능성 연구가 진행되고 있으며, 산학연을 통하여 감귤류를 이용한 생리 기능성 신제품 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 뿐만 아니라 일본에서는 과거에 수행하던 온주밀감의 품종개량에서 최근에는 수입개방화에 따른 대책으로 오렌지 대체를 위한 중간잡종 신품종 육성의 강화를 위한 연구와 오래전부터 수행해 온 감귤의 기능성 연구 뿐 아니라 온주밀감의 BAC 및 cDNA 라이브러리 구축을 통한 유전자 연구 등을 병행하고 있다. 최근에는 일본 각지에서 발견되는 재래감귤의 수집과 기능성 물질의 함유에 관련된 연구들이 활발히 수행되어지고 있다.

중국의 감귤산업은 최근 급속도로 발전하고 있으며, 재배면적은 세계 1위, 생산량은 브라질에 이어 세계 2위 (1,700만톤)를 차지하고 있다. 중국에서의 감귤 연구는 주로 생산시기 조절 및 품질향상을 위한 재배기술 보급과 신품종 개발 등의 연구를 수행하고 있다. 신품종 개발에 있어서는 이미 교배육종을 통하여 다양한 품종들이 개발되어

있었으며, 최근에는 분자유종법을 이용한 신품종 개발에도 활발한 연구를 진행하고 있다.

또한 여러 나라에서 병해충과 바이러스 저항성 계통의 형질전환 감귤류를 개발하고 있으며, 감귤류의 과피에서 추출한 리모닌이나 노미린 등이 향암물질로 밝혀져 이러한 기능성 물질이 도입된 형질전환 감귤품종 생산 연구도 진행 중이다. 최근에는 미국과 터키에서 감귤나무잎 갈색무늬병 (citrus blight)에 저항성과 관련된 유전자가 도입된 품종을 만들기도 하였다. 또한 pectin methylesterase 유전자를 발렌시아 오렌지의 원형질체내에 도입 및 재분화에 성공을 거두기도 하였다. 이외의 여러 국가에서도 활발히 감귤의 형질전환에 관한 연구를 진행 중에 있다. 이렇듯 감귤 유전공학의 이용은 농업적 이용에서부터 이제는 고부가 가치성으로 인식이 되어 하나의 산업용 소재로 인식하는 새로운 개념의 식물유전공학 분야로 발전이 되어왔다.

감귤의 연관 유전자 지도는 1990년대부터 RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), SSR(Simple sequence Repeats), AFLP (amplified fragment length polymorphism)와 같은 다양한 마커들을 기본으로 하여 현재까지 14개 품종의 감귤과 탕자종들로 부터 유전자 지도가 제작되어 보고되었다 (표 1). 최근에는 Gulsen 등 (2010)이 총 609개의 분자마커 (Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), simple sequence repeats (SSR), inter- simple sequence repeat (ISSR), peroxidase gene polymorphism (POGP), resistant gene analog (RGA), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD))들을 이용하여 만다린 감귤 품종의 유전자 지도를 제작하였다 (그림 3).

표 1. 현재까지 보고된 감귤류의 linkage maps

References	Marker types	Markers	Linkages	cM	Crosses number ^a
Torres et al. 1985	Isozymes	5	2		1a, 1b
Liou 1990	RFLP, isozymes	35	8	314	2
Durham et al. 1992	RFLP, isozymes	52	11	533	3
Jarrell et al. 1992	RFLP, isozymes	38	10	351	4
Cai et al. 1994	RAPD, RFLP, isozymes	189	9	1,192	3
Luro et al. 1996		34 for <i>C. grandis</i> 95 for <i>Poncirus</i>	7 12	600 1,503	5a, 5b
Kijas et al. 1997	RFLP, ISSR	48	12	410	4
de Simone et al. 1998	AFLP, RAPD, RFLP	247 for <i>C. aurantium</i> 92 for <i>C. latipes</i>	20 12	1,000 600	6
Ling et al. 1999	AFLP, RFLP, isozyme	337	11	1,026	3
Garcia et al. 1999	RAPD, RFLP, CAPS, isozyme	69	3		7b
Cristofani et al. 1999	RAPD	63 for <i>C. sunki</i> 62 for <i>P. trifoliata</i>	10 8	732 866	8
Roose et al. 2000	RAPD, RFLP, ISSR	156	16	701	4
Sankar and Moore 2001	ISSR, RAPD, RFLP, isozymes	310	9	874	3
Ruiz and Asins 2003	RAPD, SSR, IRAP	48 for <i>Poncirus</i> 120 for <i>C. aurantium</i>	10 17		7a, 7b, 7c
Omura et al. 2000	CAPS	120	9	801	9

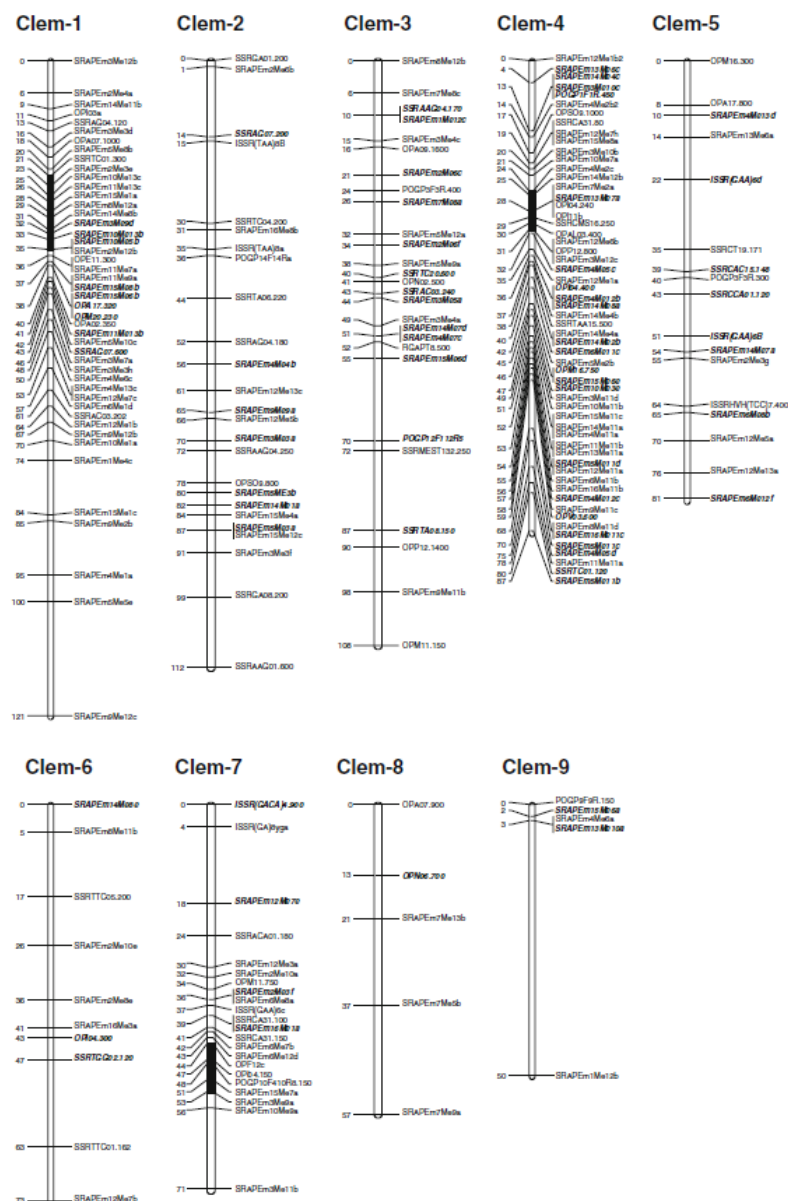


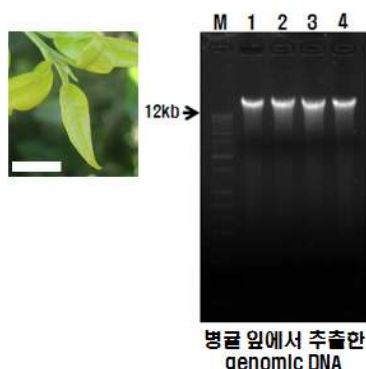
그림 3. 다양한 분자 마커 (SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA, RAPD)들을 이용하여 제작된 만다린 감귤의 genetic linkage map

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구수행 내용 및 방법

1. NGS 방법을 이용한 제주 재래감귤 병굴의 유전체 해독 및 comparative genomics를 이용한 재래감귤의 유용 유전자 대량 확보

서귀포시 농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤시험장에서 채집한 병굴의 새순으로부터 Genome DNA를 추출(NucleoSpin® Plant II kit)하였다.



추출된 병굴 Genome DNA의 서열 분석을 위하여 shotgun paired end (insert size 500bp)와 Long mate pair (5kb)라이브러리를 제작하였고, 서울대학교 NICEM의 Illumina/HiSeq 200을 이용한 Next Generation sequencing (NGS)기법으로 서열분석을 실시하였다.

NGS 시퀀스 데이터는 bacterial 유래 genome과 duplicated read 그리고 low quality read와 low frequency reads등을 제거하는 Raw data preprocessing 과정을 진행하여 순수한 병굴 게놈의 유전체 정보만을 확보하였다. 이렇게 확보된 병굴 게놈 유전체 정보는 현재까지 공개된 다양한 Assembly software들을 이용하여 Contig 정보 (Contig No, Contigs Length, N50)와 Scaffold 정보 (Scaffold No, Scaffold length, N50)등을 도출하였다. 위에서 제작된 병굴 유전체 정보의 Predicted gene 정보를 확인하기 위해 유전체 정보가 공개된 Sweet orange와 애기장대를 reference로 하여 Gene prediction을 실시하였다. Gene prediction 후 확보된 유전자들은 Gene Ontology 분석을 통해 유전자 각각의 기능을 유추하였다. 그리고 병굴 게놈 유전체 정보는 CLC reference assembler를 이용하여 감귤 유전체연구 국제컨소시엄에서 공개한 sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck)의 염기서열과 비교 분석을 실시하였다.

2. 글리코실화 반응 (glycosylation) 관련 유전자의 클로닝 및 유전자 기능 분석

해독된 유전체의 정확성을 확인하고, 활용성을 높이기 위하여 감귤에서 중요한 역할

을 하는 유전자군 분석을 실시하였다.

감귤류를 포함한 모든 식물체에의 잎, 꽃, 뿌리, 열매, 줄기 등에 많이 함유되어 있는 플라보노이드는 항균, 항암, 항바이러스, 항염증의 활성을 지니며, 생체 내 산화작용을 억제한다고 알려져 있다. 이러한 플라보노이드의 대부분은 당과 결합하여 플라보노이드 글리코시드의 형태가 되는데 이런 플라보노이드의 글리코실레이션 (glycosylation)은 이차 대사물질의 복잡성에 관여하는 필수적인 변환과정이고 천연물 생합성의 마지막 단계에서 발생하여 플라보노이드의 안정성과 수용성에 영향을 끼친다.

본과제를 통해 제작한 병귤 유전체 정보로 부터 약 76개의 Glucosyltransferase (GT) 게놈 염기서열 정보를 확인하였다. 이러한 염기서열 정보로부터 각각의 GT에 대한 open reading frame (ORF)를 제작하여 당합성 관련 유전자들의 기능 분석 연구를 수행하였다. 본 연구에서는 위에서 선발한 76개의 GT 유전자들 중 한라봉의 잎에서 추출한 total RNA로부터 In-Fusion^R SMARTerTM cDNA Library Construction Kit (Clontech, USA)를 이용하여 싱글 cDNA를 합성 후, 병귤 유전체 정보를 이용하여 제작한 유전자 특이적 프라이머와 Reverse-transcriptase (RT)-PCR 기법을 이용하여 우선적으로 8개의 유전자에 대한 Full-length cDNA를 클로닝 하였다. 이렇게 분리한 유전자들은 염기서열 확인 후 단백질 발현 벡터인 pGEX 4T-1과 pGEX 4T-3 벡터에 삽입 후 재조합 단백질을 합성하였다. 합성한 재조합 단백질들의 효소활성은 플라보노이드 (apigenin, eriodictyol, kaempferol, luteolin, naringenin, quercetin)를 기질로 이용하여 HPLC로 분석하였다. 8개의 유전자중 기질의 활성을 확인한 6개의 유전자들은 RT-PCR 을 이용하여 조직별 발현양상 분석을 하였다.

3. 제주 재래귤(병귤)의 기초 핵형분석

병귤의 어린 주심배 실생 근단이나, 신초의 유엽을 채취하여 2mM 8-HQ (4°C) 10시간 전처리한 후 고정액(4°C)에서 10시간 이상 처리한 다음, 효소액으로 세포벽을 분해시키고, 염색체를 슬라이드글라스 위에 펼친다. DAPI 염색으로 염색체 시료를 선별한 후 탈염한 다음 CMA 염색하여 형광현미경하에서 1,000×로 염색체 핵형을 분석하였다.

4. 병귤 유래의 분리집단을 이용한 RAPD 다형성 분석에 의한 기초 연관지도 작성

병귤의 교배 분리집단 양성 및 형질 유전분석 기반구축을 위해 병귤 유래의 교배집단을 양성하기 위해 클레멘타인X병귤, 청견X병귤, 청견X클레멘타인의 교배 후 종자를 획득한 다음 파종하여 실생 분리집단을 양묘하였다. RAPD 다형성 분석에 의한 다형성 primers 및 markers를 선발키 위해 1년차 operon random primer A~O series에 이어 2년차 OPP~OPZ, OPAA~AP series 600개 primers를 pseudo-test cross 원리에 기초해서 screening(양친 중 한 친에 존재하고 다른 한 친에 존재하지 않는 markers 생성) 한

후, 선발한 primers 및 RAPD markers에 대해 분리집단에서의 분리양상을 분석하였다. 그리고 RAPD markers의 분리 결과를 JointMap을 이용하여 연관지도를 작성하였다.

5. 탕자 4배체를 이용한 gene redundancy 기초 data 분석

동질배수체의 gene redundancy의 분석을 위해 온주밀감의 가지를 절취하여 콜히친 용액(3농도×3시간)에 침적 처리 또는 솜을 이용해 식물체 가지에 직접 콜히친(3농도×3수준)을 처리하여 배수체를 유도하게 됨. 처리 후 탕자 대목에 접목한 신초 또는 식물체 처리 가지의 생장 유도 후 새로 나온 가지의 잎을 채취하여 배수성을 분석함(그림 1).



그림 1. 온주밀감의 동질배수체 유도를 위한 콜히친 처리

탕자 4배체의 이수체 여부를 확인하고 표현형 분석을 위해 탕자 4배체의 염색체수 분석으로 이수체 여부를 확인하였고, 광합성 특성 등의 표현형 변이 정도를 조사하였다.

탕자 4배체 식물의 잎 DNA를 CTAB법으로 추출하고 HClO_4 를 처리하여 DNA를 분해한 후 gradient HPLC에 의한 nucleoside chromatogram을 분석하고 global cytosine DNA methylation 정도($\%[\text{methylated DNA cytosine}/(\text{non-methylated} + \text{methylated})] \times 100$)를 측정하였다.

제2절 주요 연구결과

1. NGS 방법을 이용한 제주 재래감귤 병균의 유전체 해독 및 comparative genomics를 이용한 재래감귤의 유용 유전자 대량 확보

서열 분석한 병균 잎의 NGS 데이터를 처리하여, 추정되는 감귤의 전체 게놈 사이즈 (약 350Mb)의 123배에 해당하는 43Gb의 염기서열 정보를 shotgun paired end (insert size 500bp)를 통해 확보하였다. 이렇게 확보한 NGS 데이터로부터 bacterial 유래

genome과 duplicated read 그리고 low quality read와 low frequency reads등을 제거하는 Raw data preprocessing 과정을 진행하였다 (Table 1). Qn은 시퀀싱 raw data의 quality를 지칭하는 말로 Q20은 하나의 read를 forward와 reverse로 읽었을 때 염기서열의 일치율이 99.5%, Q25는 99.9% 이상 일치하는 서열만을 선별한 것이다. 아래 표에서 보면 Q20의 경우 감귤 게놈의 약 68배에 해당하는 27.7GB, Q25일 때는 감귤 게놈의 약 61배에 해당하는 25.0GB의 게놈이 얻어진 것을 볼 수 있다. 최종적으로, 본 과제에서는 감귤 게놈의 약 68배에 해당하는 27.7GB를 이용하여 병귤 게놈 유전체 정보를 구축하였다.

Table 1. 제주 재래감귤 병귤의 게놈의 Raw Data 분석 결과

Data Info	Insert Size	RawData ^a	Step1 ^b	Step2 ^c	Step3 ^d	Filtered Data ^e
Q20	500bp	42.6Gb	38.4Gb(90.1%)	31.1Gb(73.0%)	27.7Gb(65.0%)	27.7Gb(67.9x)
Q25	500bp	42.6Gb	38.4Gb(90.1%)	27.8Gb(65.3%)	25.0Gb(58.7%)	25.0Gb(61.3x)

^a Original raw data that is filtered bacterial genome by ref mapping work.

^b For each generation, amount of data after removing duplicated reads.

^c For Step1, amount of data after trimming low quality.

^d For Step2, remained data after removing low frequency reads.

^e Final raw data which used for genome assembly.

이렇게 확보된 병귤 게놈 정보를 NGS Cell, Velvet 그리고 SOAP등의 Assembly 프로그램을 이용하여 Contig No, Length 그리고 N50등을 비교 분석 하였다 (Table 2). Contig의 개수가 적으면 각각의 contig 염기서열이 길고, N50이 크다는 것은 전체 염기서열의 길이 중 절반에 해당하는 염기서열의 길이가 길다는 것이다. 아래의 표로 보면, NGS cell의 데이터의 결과가 contig의 개수가 가장 적고 N50의 값이 가장 크게 나왔다. Total length (coverage)의 경우 Velvet의 경우가 321 Mb로 감귤 게놈사이즈에 가장 근접하였다.

Table 2. 다양한 Assembly 프로그램을 활용한 병귤 게놈 데이터 분석 결과

Assembly Data	RawData(X)	Total Length (Coverage)	# of Contig	N50	Min / Max
NGS Cell (Q20)	27.7Gb(67.9x)	286Mb	177,699	3,520bp	200bp/93,973bp
NGS Cell (Q25)	25.0Gb(61.3x)	283Mb	176,765	3,477bp	200bp/95,023bp
SOAP – 31mer	27.7Gb(67.9x)	495Mb	362,440	3,233bp	200bp/94,117bp
SOAP – 41mer	27.7Gb(67.9x)	495Mb	370,401	2,953bp	200bp/126,301bp
SOAP – 61mer	27.7Gb(67.9x)	561Mb	417,029	3,746bp	200bp/113,276bp
Velvet – 41mer	27.7Gb(67.9x)	321Mb	276,250	2,467bp	200bp/37,527bp

Shotgun paired end (insert size 500bp)와 함께 제작한 Long Mate pair (insert size 5kb) 데이터를 위에서 소개한 것과 동일한 방법으로 data preprocessing 과정을 수행

후 21만 여개의 contig와 약 318mb의 게놈 유전정보 그리고 3kb의 N50등을 확보하였다. 이들 중 제일 긴 contig의 길이는 112kb정도였고, 평균 contig의 길이는 약 1.5kb로 확인되었다 (Table 3).

보다 정확한 유전정보를 나타내기 위해 gap closing등의 방법을 이용하여 두 개의 데이터를 하나의 유전체 정보로 통합하여 scaffold를 만들었다. 이러한 일련의 과정을 수행 후 20,818개의 scaffold를 확보하였는데 이는 전체 감귤 게놈 사이즈의 약 92%에 해당하는 321Mb의 유전정보를 내포하였다. 이 scaffold들을 분석한 결과 약 61kb정도의 N50을 확인하였고, 제일 긴 사이즈의 scaffold는 약 1.9MB로 나타났으며, 평균 15.4kb의 길이를 갖는 것으로 확인되었다. 그리고 전체 염기서열 정보 321MB 중 약 4.5%인 14만 여개가 시퀀싱 에러인 N으로 확인되었다 (Table 3). 이러한 결과는 현재 유전체 정보가 공개된 sweet orange에서 나타나는 N의 비율 (약 20%)보다 상당히 적은 양으로 나타났다.

Table 3. 병귤 게놈의 Shotgun paired end와 Long Mate pair 분석 결과

	No	Length	N50	Largest	Average	N's No
Contig	213,214	317,645,963	3,060	112,382	1,490	14,948,666
Scaffold	20,818	321,419,687	60,719	1,875,194	15,440	14,477,504

위에서 확보한 병귤 게놈 데이터로부터 CLC reference assembler를 이용하여 감귤 유전체연구 국제컨소시엄에서 공개한 sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck)의 게놈 유전체와 비교 분석을 실시한 결과, 본 과제에서 확보한 병귤의 게놈 유전체는 sweet orange의 약 98%영역을 차지하는 것으로 확인되었다. 그리고 병귤 게놈 유전체와 sweet orange와의 비교 분석을 통해 3백만개 이상의 SNP 정보를 확인할 수 있었다. SNP의 종류로는 Insertion과 Deletion type이 각각 13만개와 18만개 정도로 나타났으며, 나머지 3백 1십만개 정도는 Difference type으로 보여 지고 있다 (Table 4). 이러한 병귤의 SNP 정보는 감귤의 분자유종과 다양한 외부의 환경과 스트레스에 대한 저항성을 연구하는데 훌륭한 자료로 이용 가능할 것이라 판단된다.

Table 4. 병귤 게놈 유전체로부터 확보한 SNP 정보

Total SNP No	3,438,414
Insertion	130,387
Deletion	182,717
Difference	3,125,310
SNP Frequency	102

본 과제에서 NGS 방법을 이용하여 제작한 병귤의 게놈 유전체 정보로부터 애기장대와 sweet orange의 유전자 정보를 기반으로 병귤의 유전자 정보를 확인하였다 (그림 1, Table 5). Sweet orange를 기반으로 유전자 검색을 한 결과, 전체 유전자 개수는 약

49,000여개로 나타났으며 유전자 전체 길이는 49MB가 넘는 것을 알 수 있었고 전체 유전자의 평균 길이는 1,011bp로 확인되었다. 애기장대의 유전자 정보를 기반으로 검색한 결과, 46,000여개의 유전자가 검색되었으며, 44MB에 해당하는 유전자 전체 길이를 포함하고 있었고 945bp의 평균 유전자 길이를 갖는 것으로 나타났다.

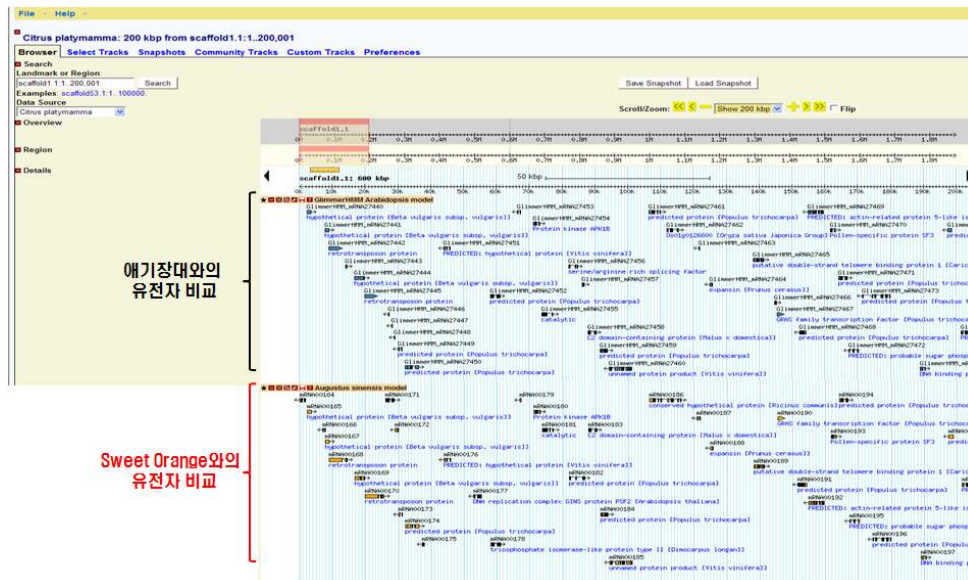


그림 1. Sweet orang와 애기장대의 유전자 정보를 기반으로 구축한 병굴 계놈의 유전자 정보 (<http://ngs.snu.ac.kr/cgi-bin/gb2/gbrowse/cp/>)

Table 5. Sweet orang와 애기장대의 유전자 정보를 기반으로 한 병굴 계통 분석 결과

Program	Augustus	GlimmerHMM
Training Model	Citrus sinensis	Arabidopsis
Gene No	49,005	46,651
Gene Length (bp)	49,568,185	44,090,469
Average gene Length (bp)	1,011	945
Gene Density (bp)	6.559	6.890

병굴 계놈 데이터에서 검색된 유전자들의 Gene Ontology (GO)를 Cellular Component, Molecular Function 그리고 Biological Process등의 그룹으로 나누어서 분석한 결과는 그림 2에서 그림 4에 표시되어 있다. Cellular component category의 경우 (그림 2), cell과 macromolecular complex에 존재하는 유전자는 sweet orange와 clementina의 비율이 비슷하나, 병굴의 경우는 낮게 나타난다. 이와는 달리 organelle와 extracellular region, 그리고 membrane-enclosed lumen의 경우 병굴이 가장 높게 나타나고 sweet orange와 clementina는 낮게 나타나는 것으로 보인다.

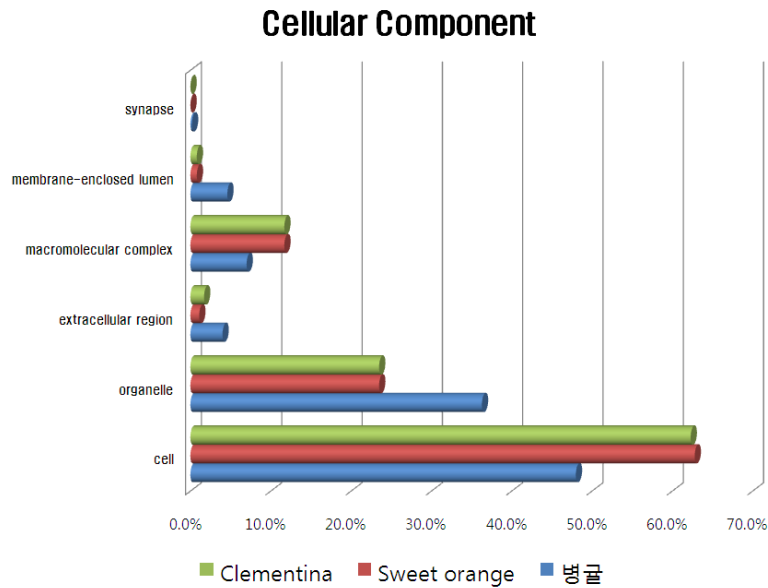


그림 2. Cellular Component에 속한 병귤 게놈의 유전자의 분포

Molecular function category의 경우 (그림 3), catalytic activity와 binding에 관여하는 유전자는 전체의 80%를 차지하는 반면에 나머지 그룹은 많이 존재하지 않는 것으로 보인다. 이러한 결과는 catalytic activity와 binding에 관여하는 유전자의 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

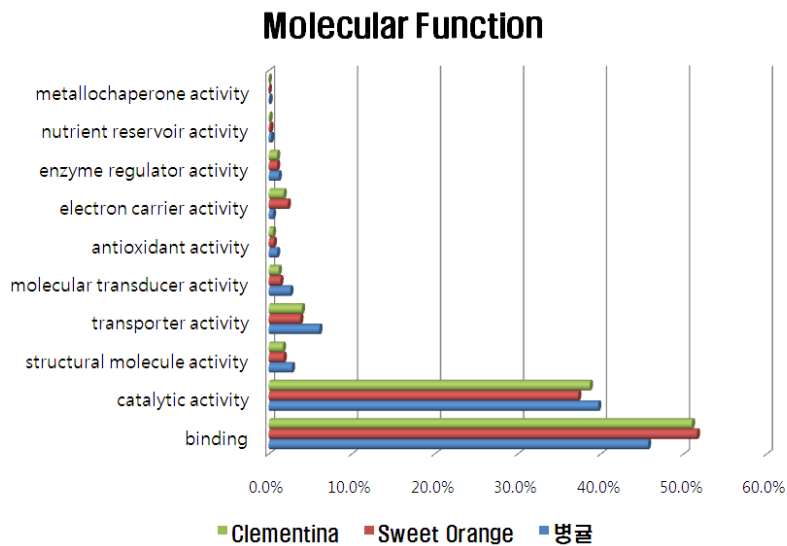


그림 3. Molecular Function에 속한 병귤 게놈의 유전자의 분포

Biological process category의 경우 (그림 4), metabolic process와 cellular process의 경우 clementina와 sweet orange는 매우 많이 포함되어 있는걸로 보인다. 하지만, 병귤의 경우 다른 종의 40%만 차지한다. Immune system process, reproduction, multi-organism process, multicellular organismal process, 그리고 developmental

process는 병귤이 sweet orange와 clementina 보다 높은 분포를 보이고 있다. 전반적으로 병귤의 경우 모든 biological process가 고르게 분포하는 걸로 보인다.

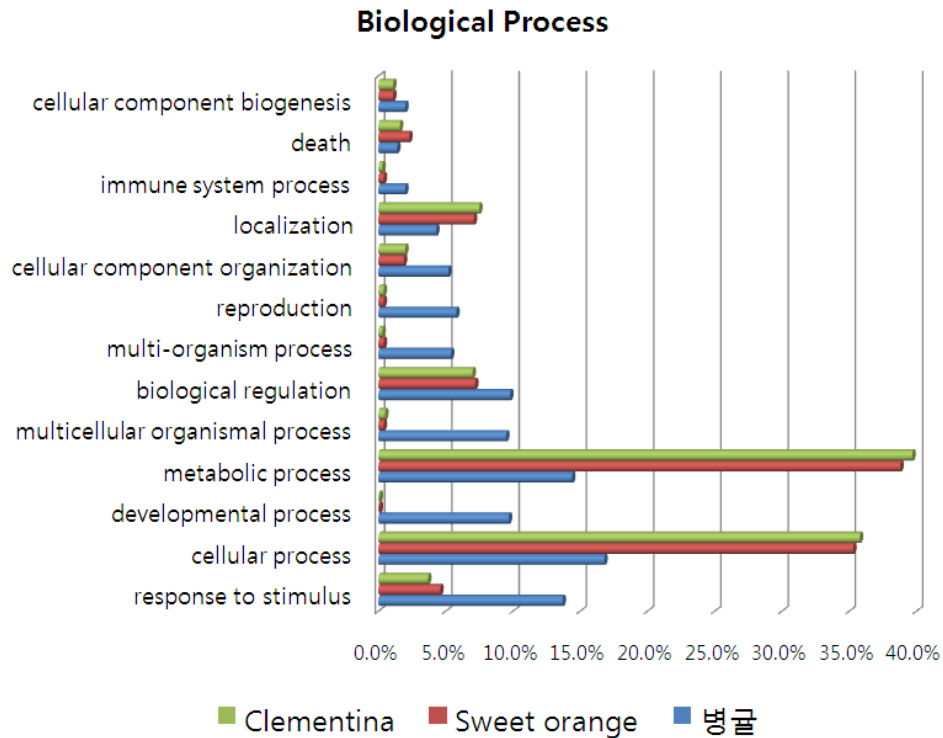


그림 4. Biological Process에 속한 병귤 게놈의 유전자의 분포

본 과제에서는 1차년도에 제작한 short-read (500bp)와 mate-pair (5kb) 라이브러리 외에 200bp, 600bp short-read와 2kb mate-pair 라이브러리의 추가적인 제작 및 시퀀싱 분석을 실시하고 있다. 본 과제에서 제작한 병귤 게놈 유전 정보를 바탕으로 병귤 게놈의 예상 사이지를 알아보기 위해 19mer K-value를 이용해 분석을 실시하였다. 그 결과 그림 5와 같이 2개의 곡선을 갖는 그래프의 형태를 갖는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 본 연구에 사용된 병귤의 게놈이 heterozygote하다는 것을 보여주는 한 예라고 할 수 있다.

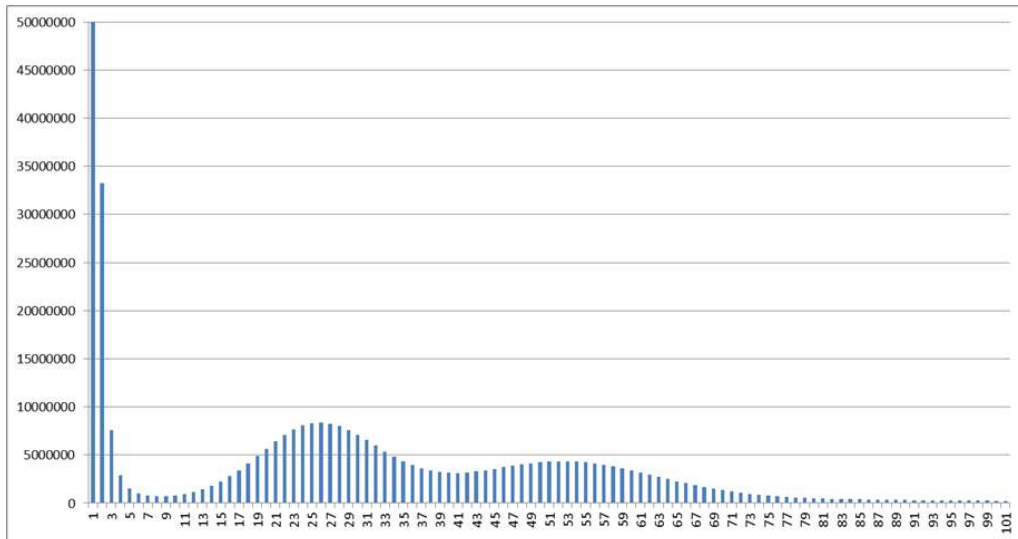


그림 5. 19mer K-value를 이용한 병균 게놈의 예상 분포도

위의 그림 5와 같은 결과를 보완하여 보다 정밀한 병균 게놈 유전체의 완성을 위해 1차년도에 제작한 short-read (500bp)와 mate-pair (5kb) 라이브러리 외에 200bp, 600bp short-read와 2kb mate-pair 라이브러리의 추가적인 제작 및 시퀀싱 분석을 실시하고 있다. 이후 기존의 라이브러리와 새롭게 제작된 라이브러리의 추가 분석 결과를 통해 보다 정밀하고 완성도 높은 병균 genome 유전체의 제작을 목표로 하고 있다.

2. 글리코실화 (glycosylation) 관련 유전자의 클로닝 및 유전자 기능 분석

본 과제에서 제작된 병균의 게놈 DNA 유전체 정보의 정확성 및 활용성을 확인하고, 유용 유전자 발굴을 위하여 약 76개의 Glucosyltransferase (GT)군 에 대한 유전자 염기서열 정보를 분석 하였다. 그 중 대부분의 GT 유전자에서 공통적으로 가지고 있는 PSPG (Plant Secondary Product Glucosyltransferase) box와 상동성이 큰 유전자 48개를 선발하였으며(Table 6) 각각의 full-length cDNA 영역을 얻을 수 있는 유전자 특이적 프라이머를 제작하였다.

Table 6. PSPG box와 상동성이 높은 병골 유래 GT 유전자

No	유전자명	scaffold 위치	길이	No	유전자명	scaffold 위치	길이
1	GT3363(mRNA 13728)	scaffold3363.1:17814..19304	1491	25	GT209(mRNA 32503)	scaffold209.1:52441..53877	1437
2	GT3591(mRNA 14519)	scaffold3591.1:6944..8533	1473	26	GT612(mRNA 42811)	scaffold612.1:78159..79604	1446
3	GT2282(mRNA 9149)	scaffold2282.1:194..1660	1467	27	GT7(mRNA 32606)	scaffold7.1:456259..457677	1419
4	GT285(mRNA 35033)	scaffold285.1:95134..96555	1422	28	GT86(mRNA 26359)	scaffold86.1:36900..38426	1527
5	GT259(mRNA 34201)	scaffold259.1:61434..62843	1410	29	GT433(mRNA 38845)	scaffold433.1:104466..106001	1536
6	GT1669(mRNA 5139)	scaffold1669.1:42601..44028	1428	30	GT734(mRNA 44846)	scaffold734.1:72654..74165	1512
7	GT150(mRNA 30327)	scaffold150.1:184364..185740	1377	31	GT209-2(mRNA 32508)	scaffold209.1:77526..78748	900
8	GT173(mRNA 34037)	scaffold173.1:16569..18230	1365	32	GT886(mRNA 46486)	scaffold886.1:31317..33566	1029
9	GT676(mRNA 43569)	scaffold676.1:24282..25805	1524	33	GT7434(mRNA 21629)	scaffold7434.1:1073..2429	1182
10	GT4851(mRNA 17772)	scaffold4851.1:5861..7348	1488	34	GT1888(mRNA 6815)	scaffold1888.1:20651..22299	1302
11	GT129(mRNA 30071)	scaffold129.1:81358..82830	1473	35	GT279(mRNA 34915)	scaffold279.1:44596..47036	1431
12	GT150-2(mRNA 30328)	scaffold150.1:187475..188851	1377	36	GT279-2(mRNA 34917)	scaffold279.1:49904..51929	1446
13	GT1736(mRNA 5871)	scaffold1736.1:35598..37085	1488	37	GT315(mRNA 42294)	scaffold315.1:9084..11195	1224
14	GT212(mRNA 33804)	scaffold212.1:141768..143258	1491	38	GT433-2(mRNA 38846)	scaffold433.1:113573..115139	1299
15	GT2457(mRNA 10035)	scaffold2457.1:27697..29205	1509	39	GT629(mRNA 43496)	scaffold629.1:20526..22190	1404
16	GT1884(mRNA 6830)	scaffold1884.1:36347..37861	1515	40	GT629-2(mRNA 43493)	scaffold629.1:1143..3368	1209
17	GT2457(mRNA 10034)	scaffold2457.1:17847..19325	1479	41	GT629-3(mRNA 43495)	scaffold629.1:14418..15969	1407
18	GT3292(mRNA 13525)	scaffold3292.1:11764..13233	1470	42	GT1993(mRNA 7436)	scaffold1993.1:20695..22683	843
19	GT848(mRNA 45964)	scaffold848.1:33598..35052	1455	43	GT589(mRNA 41903)	scaffold589.1:4498..8307	1728
20	GT3257(mRNA 13451)	scaffold3257.1:11999..13832	1470	44	GT848-2(mRNA 45965)	scaffold848.1:36359..40325	2010
21	GT8424(mRNA 22559)	scaffold8424.1:1..2553	1827	45	GT589-2(mRNA 41902)	scaffold589.1:3292..3963	672
22	GT3(mRNA 34831)	scaffold3.1:930603..932057	1455	46	GT315-2(mRNA 42293)	scaffold315.1:5992..6507	516
23	GT1230(mRNA 1768)	scaffold1230.1:46378..47805	1428	47	GT612-2(mRNA 42813)	scaffold612.1:85477..86037	561
24	GT124(mRNA 31230)	scaffold124.1:100374..101237	864	48	GT96(mRNA 30938)	scaffold96.1:109340..111643	1539

Table 6과 같이 48개의 선발된 유전자 중 우선적으로 8개의 유전자 (GT3363, GT3591, GT2282, GT285, GT259, GT1669, GT150, 그리고 GT173)에서 Full-length cDNA 염기서열을 확인하였다 (Table 7).

Table 7. 8개 GT유전자의 nucleic acid와 amino acid 사이즈

유전자 이름	nucleic acid	amino acid
GT150	1377bp	459aa
GT1669	1428bp	476aa
GT259	1410bp	470aa
GT285	1422bp	474aa
GT173	1365bp	455aa
GT2282	1467bp	489aa
GT3363	1491bp	497aa
GT3591	1473bp	491aa

염기서열이 확인된 8개 유전자들은 단백질 발현 벡터인 pGEX 4T-1과 pGEX 4T-3 벡터에 삽입 후 재조합 단백질을 합성하였다. 재조합 단백질의 발현을 확인 후 이 재조합 단백질들의 효소활성을 다양한 flavonoid 기질 (apigenin, eriodictyol, kaempferol, luteolin, naringenin, quercetin)과 HPLC 방법을 이용하여 분석하였다.

Naringenin과 Quercetin을 이용한 효소 활성 분석 결과, GT3363, GT173, 그리고 GT285의 경우 두 개의 기질에서 모두 활성을 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 그림 5에 보이듯이 GT3363(B, E)의 경우 naringenin과 quercetin 두 개의 기질 모두 매우 높은 활성을 나타내는 것으로 보인다. naringenin(A)은 플라보노이드 7-O-글리코사이드

(C)를 생산하는 전형적인 기질이며, quercetin(D)은 플라보노이드 3-O-글리코사이드(F)를 생산하는 전형적인 기질이다.

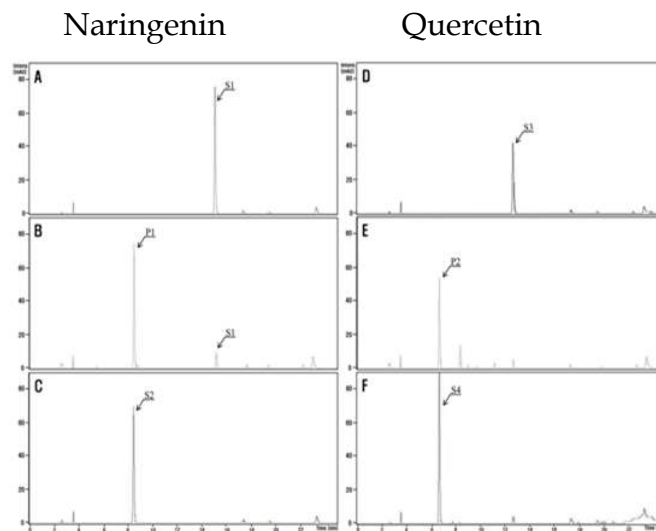


그림 5. GT3363의 HPLC분석결과

(A) naringenin (B) naringenin의 반응 생성물 (C) naringenin 7-O-glucoside (D) quercetin (E) quercetin의 반응 생성물 (F) quercetin 3-O-glucoside

GT173과 GT285의 경우 GT3363에 비해 quercetin(D)에서는 매우 높은 활성을 나타내 나, naringenin(A)은 활성이 약하게 나타나는 것을 확인하였다 (그림 6).

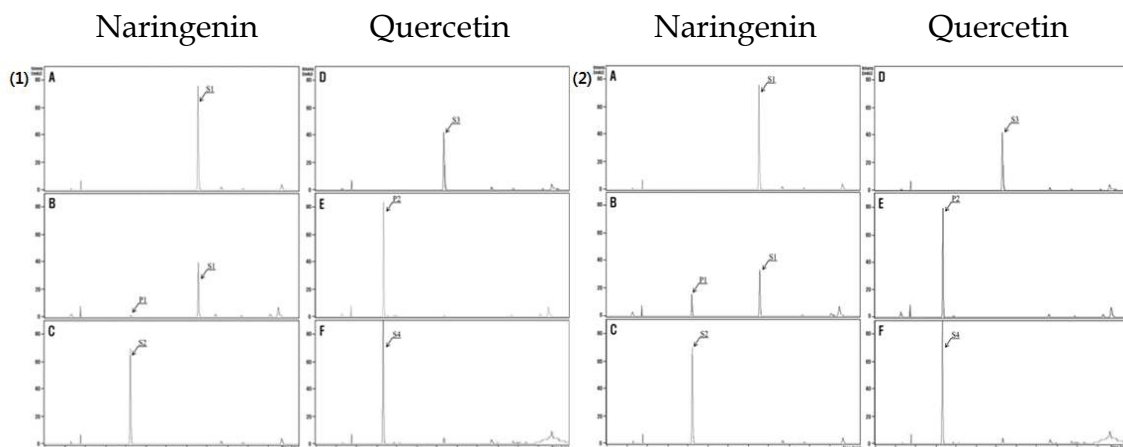


그림 6. GT173(1)과 GT285(2)의 HPLC분석결과

(A) naringenin (B) naringenin의 반응 생성물 (C) naringenin 7-O-glucoside (D) quercetin (E) quercetin의 반응 생성물 (F) quercetin 3-O-glucoside

GT3591과 GT2282는 naringenin 7-O-글리코사이드에서 동일하게 매우 약한 활성을

보이는 것을 확인할 수 있었다 (그림 7). 결과적으로 두 유전자는 매우 비슷한 활성을 나타내는 것으로 보이는데 그 이유로 여기서 분석한 다른 GT 유전자들 보다 이 둘 사이의 PSPG box 상동성이 95%이상으로 높기 때문일 것으로 판단된다.

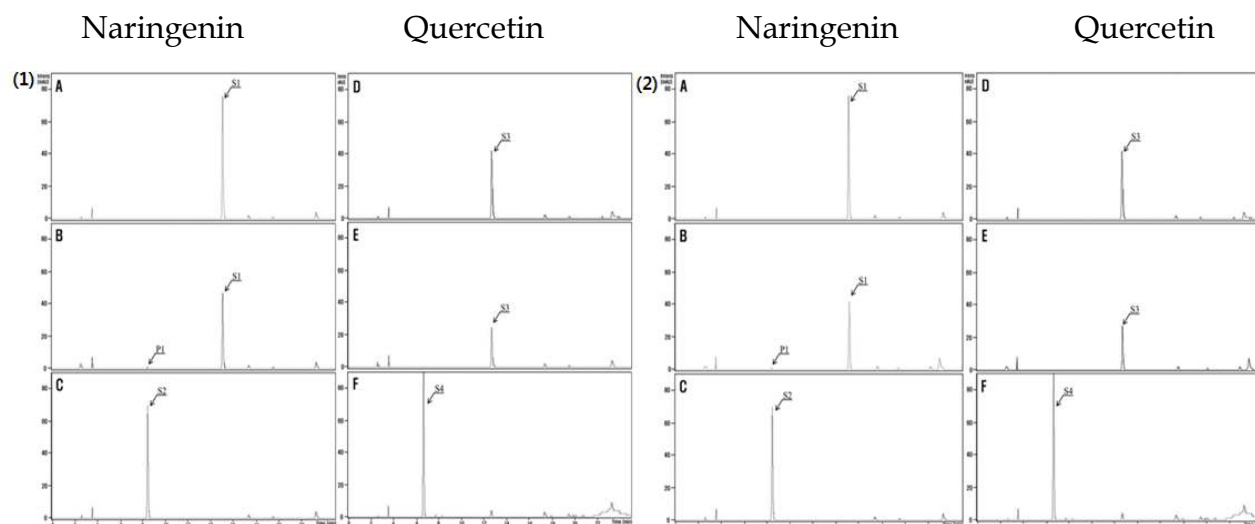


그림 7. GT3591(1)과 GT2282(2)의 HPLC분석결과

(A) naringenin (B) naringenin의 반응 생성물 (C) naringenin 7-O-glucoside (D) quercetin (E) quercetin의 반응 생성물 (F) quercetin 3-O-glucoside

GT259의 경우 매우 흥미롭게도 quercetin을 기질로 하였을 때 3-O-글리코사이드가 아닌 다른 글리코사이드 생산물을 생성하는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 8F). 이러한 결과로 볼 때 GT259에서 생성되는 생산물에 대한 정확한 동정이 필요한 것으로 판단되어 지며 본 연구팀에서는 이 생산물의 정확한 동정과 명확한 단백질의 구조를 알아보기 위해 LC-MS 그리고 LC-MS/MS등을 이용하여 단백질의 구조를 밝히는 연구를 진행중에 있다.

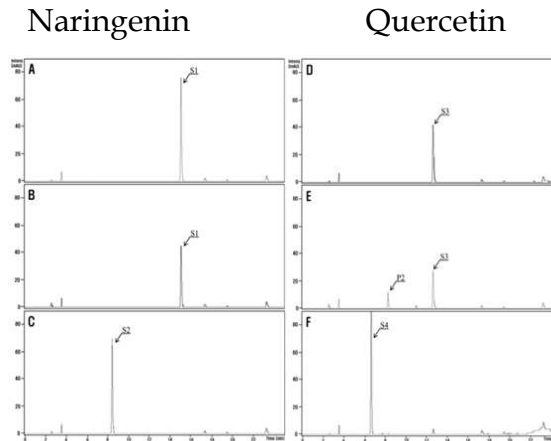


그림 8. GT259의 HPLC분석결과

(A) naringenin (B) naringenin의 반응 생성물 (C) naringenin 7-O-glucoside (D) quercetin (E) quercetin의 반응 생성물 (F) quercetin 3-O-glucoside

반면에, GT150과 GT1669는 naringenin과 quercetin 기질에 활성이 없음을 확인하였다. 이러한 결과들은 한라봉에서 분리한 각각의 GT 유전자들이 가지 다른 기질 특이성을 갖는다는 것을 단적으로 보여주는 결과이다.

naringenin과 quercetin에서 높은 활성이 보이는 것으로 확인된 GT3363의 경우 다른 플라보노이드 기질(apigenin(1), eriodictyol(2), kaempferol(3), luteolin(4))을 이용하여 활성분석을 수행하였다 (그림9). 그림에서 보는 것과 같이 서로 다른 4개의 기질을 이용했을 때 활성이 약하긴 하지만 standard에서 나타나는 것 이외에 다른 또 하나의 생성물 피크가 나타나는 것을 확인 할 수 있다. 여기서 나타난 다른 생성물 피크의 확인을 위해서 GT259와 마찬가지로 LC-MS 그리고 LC-MS/MS등을 이용하여 단백질의 구조를 밝히는 연구를 진행할 예정이다.

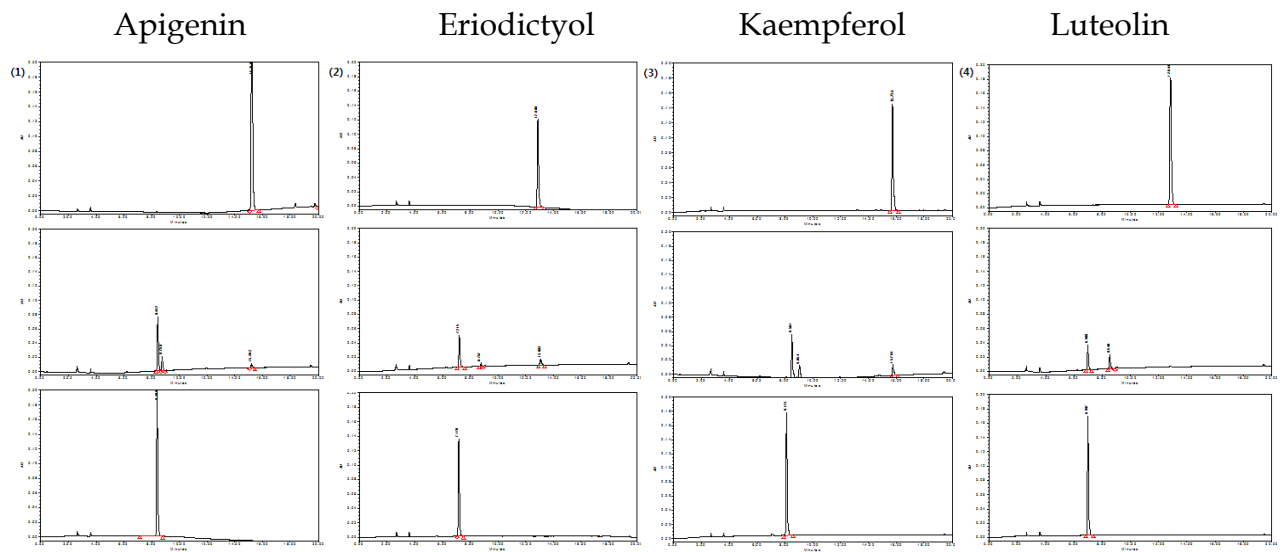


그림 9. GT3363의 HPLC 분석

HPLC를 결과에서 활성을 나타내는 6개 GT유전자의 조직별 발현을 분석하기 위해 RT-PCR을 수행하였다 (그림 10). GT3363의 경우 꽃잎에서는 약하게 발현되어지나 나머지 조직에서는 높은 발현을 나타내는것을 확인할 수 있고, GT3591, GT173, 그리고 GT2282의 경우 꽃과 과실에서는 발현이 약하나, 줄기와 잎에서는 높은 발현을 보이는 것을 확인할 수 있다. 그리고 GT259는 모든 조직에서 발현이 높게 나타내는 것을 확인하였고 흥미롭게도 GT285의 경우 다른 조직에 비해 잎이 매우 약하게 발현된다는 것을 확인하였다.

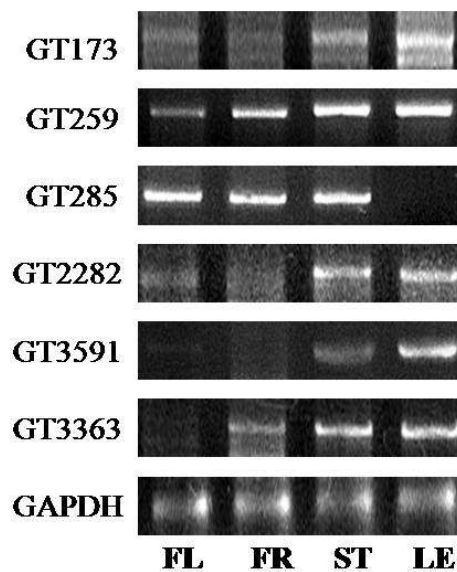


그림 10. 한라봉의 각 조직에서 추출한 RNA를 이용한 GT유전자들의 발현패턴
FL, 꽃; FR, 과실; ST, 줄기; LE, 잎

본 연구팀에서는 위에서 설명한 8개 GT유전자 외에 병굴 유전체 정보를 통해 확인된 나머지 70여개의 GT 유전자에 대해서도 단백질 활성 및 조직별 발현 패턴에 대한 연구를 진행하고 있다. 차기 연구사업을 통하여 정밀한 병굴 genome 유전체의 완성을 목표로 하고, 더불어 유용 유전자를 발굴하고 분석함으로써, 유전체 정보의 활용성을 확대시켜 나갈 예정이다.

3. 제주 재래굴(병굴)의 기초 핵형분석

감굴의 CMA 핵형분석법을 확립하고 국가기관 유전자원 보존 제주 재래굴의 핵형분석을 수행하였는데, 모두 hybrid 유전자형을 가지고 있음이 확인(그림 2)되어, 보호수로 지정된 재래굴을 분석하여 고유종의 유전자형을 갖는 유전자원을 탐색할 필요성을 제시하였다.

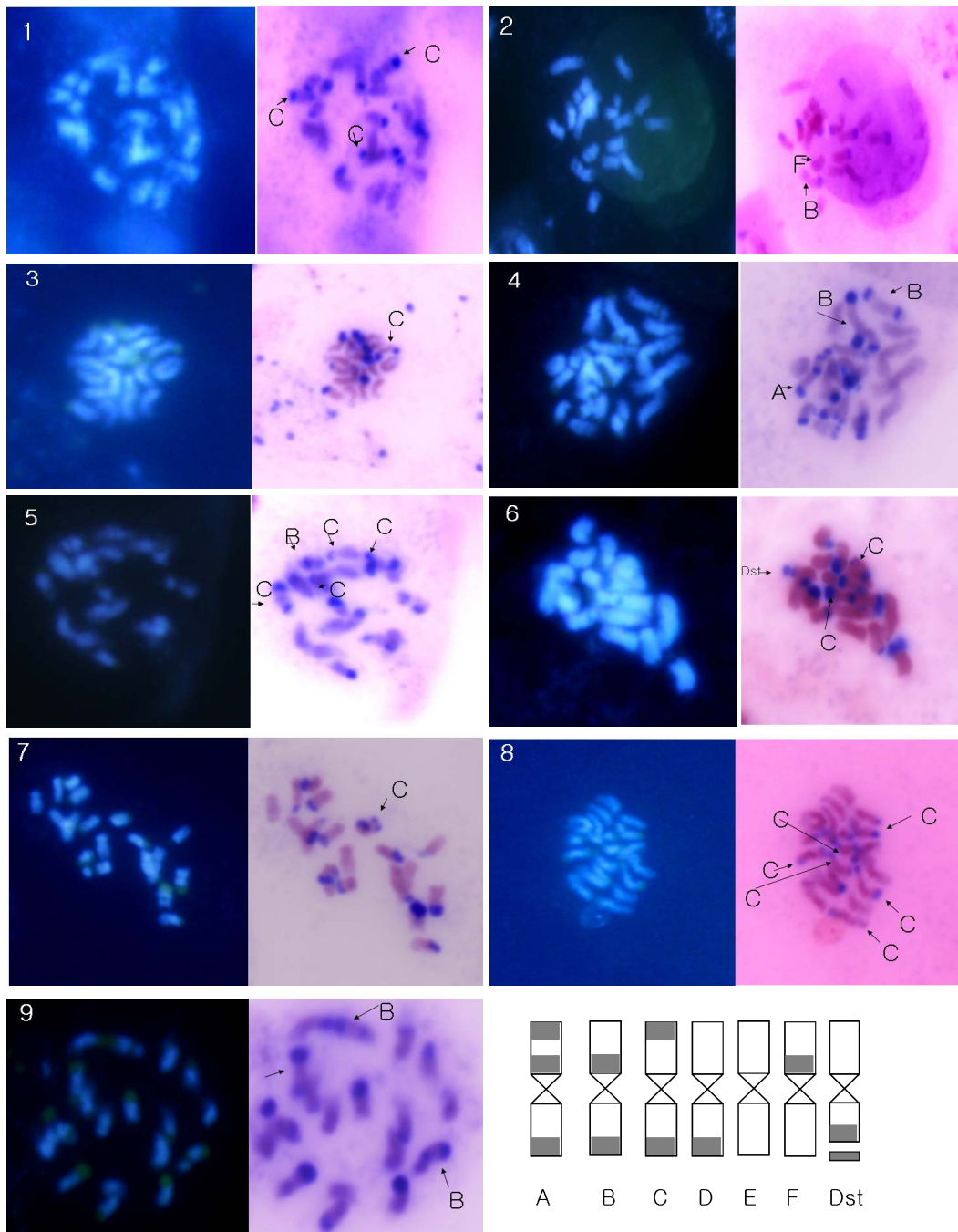


그림 2. 제주 재래골의 DAPI 및 CMA 핵형 분석(1. 병골, 3C+11D+4E; 2.홍골, 1B+11D+5E+1F; 3. 빈골, 1C+10D+7E; 4. 동정골, 1A+2B+8D+7E; 5. 당유자, 1B+4C+9D+4E; 6. 진골, 2C+12D+3E+1Dst; 7. 유자, 1C+14D+3E; 8. 사두감, 6C+7D+5E; 9. 청골, 2B+1C+11D+4E. (2012. 5. 한국원예학회 발표)

4. 병골 유래의 분리집단을 이용한 RAPD 다형성 분석에 의한 기초 연관지도 작성

전년도 병골×클레멘타인, 청견×병골의 교배종자를 각각 530립, 313립을 파종하여 371 개체, 219개체를 획득하여 육묘 중에 있고, 또한 전년도 교배실생 청견×클레멘타인, 병

꿀×클레멘타인 150개체, 34개체를 육묘하고 있다(그림 3).



당년도 병굴 교배실생



전년도 병굴 교배실생 육묘



청견 교배실생 정식

그림 3. 병굴 유래 교배 분리집단 양성

전년도 병굴, 클레멘타인 및 교배실생 6개체의 DNA로부터 operon primers를 이용하여 PCR를 수행한 후 양친 중 어느 한 친에만 존재하고 실생집단에서 분리되는 DNA markers를 생성(pseudo-test cross strategy)하는 primers와 DNA markers를 screening 하였다. 전년도 240개 primers screening하여 37개 primers 및 71개 DNA markers 선발 이후, 금년도 추가로 600개 primers를 screening하여 27개 primers 및 39개 DNA markers를 선발하였으며(표 1), 최종 선발한 64개 primers 이용해서 96개 교배실생의 DNA를 추출하고 RAPD를 수행 중에 있다.

표 1. Operon random primers의 screening을 통한 분리 DNA markers의 선발

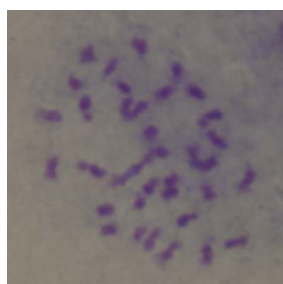
프라이머	선발 마커
OPA-01 ~ 20	OPA 3-1,000; 600; 500; 350
OPB-01 ~ 20	
OPF-01 ~ 20	OPF 14-1,000/ OPF 15-2,000; 500/ OPF 16-520; 400/ OPF 9-900
OPG-01 ~ 20	OPG 12-800/ OPG 19-1,400; 1,050; 400
OPH-01 ~ 20	OPH 1-700/ OPH 3-1,000; 400/ OPH 4-1,050; 480/ OPH 6-2,960; 2,000; 1,200; 800/ OPH 12-1,800; 1,300; 1,000; 950/ OPH 13-950; 750/ OPH 14-700/ OPH 15-950/ OPH 20-980; 750; 460
OPI-01 ~ 20	OPI 4-1,050; 700; 600; 500/ OPI 8-2,400; 2,000; 1,200; 500; 400/ OPI18- 1,680; 480
OPJ-01 ~ 20	OPJ 1-930/ OPJ 2-700/ OPJ 4-2,960; 2,000; 510/ OPJ 7-1,000; 500; 400/ OPJ 9-1,800; 510/ OPJ 14-1,600/ OPJ 16-1,600
OPK-01 ~ 20	
OPL-01 ~ 20	OPL 4-480/ OPL 5-495/ OPL 6-480
OPM-01 ~ 20	OPM 3-490
OPN-01 ~ 20	
OPQ-01 ~ 20	OPQ 2-1,200; 700/ OPQ 6-700/ OPQ 9-500/ OPQ 12-600; 400/ OPQ 16-400/ OPQ 17-600/ OPQ 20-600; 350
OPR-01 ~ 20	OPR 6-800
OPQ-01 ~ 20	OPQ 20-800; 1,500
OPR-01 ~ 20	OPR 1-1,000/ OPR 7-1,200/ OPR 9-400; 1,500/ OPR 12-500
OPS-01 ~ 20	
OPT-01 ~ 20	OPT 8-700/ OPT 9-1,500/ OPT 13-800; 1,200
OPU-01 ~ 20	
OPV-01 ~ 20	OPV 11-750/OPV 12-300/ OPV 14-600
OPW-01 ~ 20	OPW 6-1,000; 1,300
OPX-01 ~ 20	
OPY-01 ~ 20	OPY 10-500; 900
OPZ-01 ~ 20	OPZ 10-900/ OPZ 19-300
OPAA-01 ~ 20	OPAC 19-900/ OPAF 1-900; 1,200/ OPAI 17-400; 500; 2,000/ OPAO 19-950/ OPAP 3-200; 1,550; 2,050/ OPAP 10-400/ OPAP 12-1,000
OPAP-01 ~ 20	
840개	64개 promoters & 110 markers

RAPD분석 완료 후 DNA markers의 분리 정도를 정리한 후 JoinMap으로 기초연관 지도를 작성하였다. 선발 RAPD marker 수의 제한으로 9개 염색체에 맞는 연관지도를 그려내지는 못하였다(그림 4).

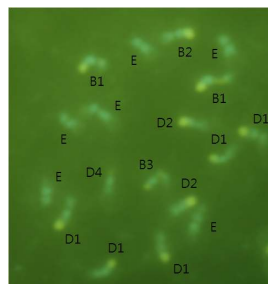
5. 탱자 4배체를 이용한 gene redundancy 기초 data 분석

온주밀감의 동질배수성 유도를 위해 온주밀감의 가지를 절취하여 콜히친(0.1, 0.2, 0.4ppm $\times$ 6h, 12h, 24h) 처리 후 탱자에 접목(54 shoots with 3 buds)하여 신초 생장을 유도한 다음 새로 자란 나온 가지의 잎을 flow cytometry로 분석하였으나, 배수체를 획득하지 못하였다. 하수스내 식물체 가지의 눈(bud)에 직접 콜히친(0.1, 0.2, 0.4ppm $\times$ 1h, 3h, 5h)을 처리(총 189 buds)한 후 가지생장을 유도하여 생육 중에 있다. 향후 새로 자라나온 잎을 flow cytometry로 분석하였으나, 사배체가 유도되지 않은 것으로 분석되었다.

4배체 탱자식물의 과실 종자를 파종한 후 육묘된 식물체를 대상으로 flow cytometry 분석을 통해 선발한 14개의 4배체 탱자 식물체 유엽으로부터 염색체수를 분석하였다. 염색체 분석결과 이수체가 없는 $2n=36$ 식물체로 확인하였으며, 이들 식물체의 염색체는 CMA 핵형 분석을 수행하여 동질사배체임을 확인하였다(그림 5). 또한 이들 식물체의 표현형 변이는 전년도 조사한 마디수, 절간장, 가지길이, 기공밀도, 공변세포 길이, 엽록소 지수에 이어, 추가로 광합성 특성을 조사하였다(표 2).



4배체 탱자의 Giemsa 염색



2배체 탱자의 CMA
핵형분석(4B+8D+6E)

그림 4. 탱자의 염색체 분석

탱자 동질배수체에서의 표현형 변이가 chromatin-remodeling과 관계가 있는지 여부를 확인하기 위하여 gradient HPLC 분석에 의한 global cytosine DNA methylation percent를 분석(그림 6)하였는데, 6.4~17.6% 범위로서 개체 간 methylation 정도에 변이가 존재하였으며, 조사한 14개체 중 절반이 이배체의 methylation 4.8~7.2%과 비교할 때 2배 이상을 나타내고 있어서 gene redundancy를 줄이기 위한 것으로 보아진다(표 2). 또한 이것이 수고, branching, 생장습성, 절간장, 가지길이, 기공밀도, 광합성을 등의 표현형 변이가 methylation과 관계되는 것으로 추정되어 진다.

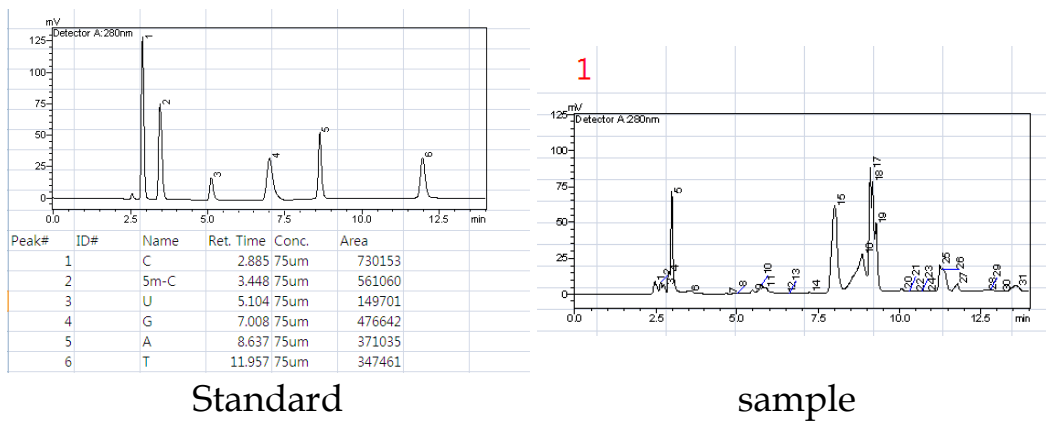


그림 5. Methylation 분석

표 2. 탱자 4배체 식물체의 광합성을 및 global cytosine DNA methylation 빈도

Tetraploid accession no.	Photosynthesis rate ($\mu\text{mole CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Global cytosine DNA methylation (%)	SPAD value
1	20.9±0.6	7.1±0.6	60.0
2	19.9±0.8	14.1±0.7	71.0
3	20.0±1.1	7.7±1.7	55.8
4	18.7±0.3	7.6±0.7	74.0
5	19.2±0.7	8.0±0.5	54.9
6	19.1±0.6	7.8±0.7	66.1
7	20.8±0.7	12.7±0.8	76.0
8	20.1±0.8	6.5±0.6	61.6
9	19.3±0.5	13.4±0.1	72.0
10	19.2±0.2	6.4±0.7	65.1
11	19.7±0.5	14.5±0.8	59.8
12	16.5±0.9	15.0±0.5	49.5
13	17.9±0.7	17.6±2.4	58.1
14	19.4±0.5	13.7±0.4	46.4
Control 1 (diploid)	17.5±0.6	6.1±0.4	64.0
Control 2 (diploid)	20.3±0.3	4.8±0.5	67.4
Control 3 (diploid)	19.3±0.6	7.2±0.6	68.9

제4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제1절 목표대비 달성도

1. 당초 제주 재래감귤(병귤)의 표준유전체 해독 연구기반 및 DB 구축을 목표로 연구하여 NGS 기법을 이용하여 병귤 게놈 DNA 염기서열을 분석하였으며 DB 또한 구축하였다.

2. 제주 재래귤(병귤)의 기초 핵형 분석은 CMA염색법에 의해 병귤의 핵형분석과 근연종과의 핵형을 비교하였으며 분리집단 양성 및 RAPD 다형성 분석과 JoingMap 이용 연관지도를 작성하였으며 배수체 phenotypes 및 DNA methylation 분석을 하였다.

제2절 정량적 성과

세부(협동)과제명	과제 책임자	성과물 유형	성 과 물 명	성과물 주담당자	적용 년월	승인 여부
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	생명정보 등록■기탁	제주 재래감귤(병귤)의 cDNA 라이브러리	김재훈	2011.1 1.11	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	산업재산 권(출원)	감귤 캘러스 세포의 제조방법	김재훈	2011.1 1.23	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	학술발표 (국제)	Embryogenic Callus Induction from Undeveloped Ovules of 12 Jeju Native Citrus Species	김재훈	2011.1 0.27	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	학술발표 (국제)	Molecular Cloning, Sequence Analysis and Functional Analysis of a Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase from Citrus platymamma Hort. ex. tanaka	김재훈	2011.1 0.27	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	학술발표 (국제)	Cloning, Expression and Characterization of Flavonoid Glycosyltransferase from Citrus Reticulata cv. Siranui	김재훈	2011.1 0.27	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	학술발표 (국제)	Construction and Characterization of a full-length cDNA library for the citrus platymamma hort. ex. Tanaka	김재훈	2011.0 5.16	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	홍보성과	제주 재래 감귤 ‘병귤’ 유전체, 국내 최초로 연구된다. (시사제주)	김재훈	2011.0 6.21	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	홍보성과	제주대, 재래감귤 병귤의 380만 유전자 염기서열 밝힌다! (제주소리)	김재훈	2011.0 6.21	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	홍보성과	제주산 재래 감귤 유전자 연구 국내 최초 ‘추진’ (미디어제주)	김재훈	2011.0 6.21	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	홍보성과	제주대, 제주감귤 유전체 사업 유치 (제주투데이)	김재훈	2011.0 6.21	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	홍보성과	제주 재래품종 ‘병귤’ 유전적 특성 파헤친다. (헤드라인제주)	김재훈	2011.0 6.21	승인

감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	홍보성과	제주 병귤 유전체 해독 눈 앞에 다가왔다 (제주일보)	김재훈	2011.12.07	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	홍보성과	재래 감귤 유전자원 발굴한다 (제주도민일보)	김재훈	2011.06.21	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	홍보성과	제주대, 제주감귤 유전체 사업 유치 (제주일보)	김재훈	2011.06.21	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	홍보성과	감귤의 미래 유전자에 달렸다 (제주일보)	김재훈	2011.12.12	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	학술발표 (국제)	Cloning and biochemical characterization of a flavonoid glycosyltransferase in Citrus reticulata cv. Siranui	김재훈	2011.05.16	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	DB 구축 및 활용	제주 재래감귤(병귤)의 게놈 유전체 정보	김재훈	2012.09	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	논문게재 (비SCI)	Comparative Analysis among Four Citrus Species by DNA Microarray	김재훈	2012.09.28	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	학술발표 (국제)	Production of a recombinant miraculin protein in transgenic citrus cell suspension cultures	김재훈	2012.11.18	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	학술발표 (국제)	Genomic sequencing and comparative analysis of Citrus platymamma Hort.ex. Tanaka (Byungkyool) by using next-generation sequencing technology	김재훈	2012.11.18	승인
감귤 유전체 해독 기반 및 DB 구축	김재훈	학술발표 (국내)	Characterization of a Novel Flavonoid Glucosyltransferase from Citrus reticulata cv. Siranui [(Citrus unshiu X Citrus sinensis) X Citrus reticulata]	김재훈	2012.11.08	승인

제5장 연구개발결과의 활용계획

제1절 연구개발결과의 활용방안

본 연구를 통해 개발되는 재래감귤의 양적형질 유전자 물리지도 및 BAC 라이브러리 등 유전체 정보는 재래감귤의 유용유전자 탐색과 감귤 과실의 품질 및 기능성 향상을 위한 고부가가치 신품종 육성에 귀중한 자료로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

재래감귤의 염색체 분석을 통해 특정 단편과 표현형과의 변이를 연계시키는데 중요한 정보를 제공할 수 있으며, 개발된 유전자 지도를 바탕으로 목표 형질에 관여하는 후보유전자 분석, 품종의 조기 육성 및 차후 돌연변이체의 gene expression profile 분석은 다양한 분야에 크게 활용될 것으로 판단된다.

현재 공개된 감귤의 염기서열은 substitution mapping 등의 기법을 이용하여 양적형질 유전자 (QTL)의 분리 및 특성 분석이 활발하게 진행되고 있으며, 본 연구에서 선발된 내병성, 내한성 등 관련 유용 유전자들 또한 동일한 기법을 이용하여 선택적으로 우량 품종에 직접 도입함으로써 우수 품종 개발에 이용할 수 있다.

염기서열 분석을 통해 확보할 수 있는 PCR marker들은 목표 유전자의 marker-assisted selection에 가장 적합한 분자표지로 이용될 수 있고 감귤 유전체간의 유사성에 비추어 다른 작물에서도 유사한 유전자를 쉽게 분리할 수 있는 기회를 제공할 것이다. 또한 본 연구를 통해 밝혀질 유전자들은 지금까지 보고되지 않은 새로운 종류의 유전자일 가능성이 매우 크며 이들 유전자들의 분자생물학적 연구를 통하여 유전양상을 규명하고 특허 등으로 보유할 수 있을 것으로 판단된다.

제2절 연구개발결과의 활용계획

NGS 방법을 이용한 제주 재래감귤 병균의 유전체 해독 및 comparative genomics를 이용한 재래감귤의 유용 유전자 대량 확보 관련 논문을 2013년에 투고할 예정이며 글리코실화 반응 관련 유전자의 클로닝 및 유전자 기능 분석 관련 논문 또한 2013년 내에 투고할 예정이다.

병균 및 제주 재래귤의 CMA 핵형 동정 및 비교와 탱자 4배체의 표현형 변이와 gene redundancy 관련 논문은 원예과학기술지에 2012년내에 투고 예정이며 병균의 기초 연관지도 작성은 한국원예학회 2013년 춘계학술발표대회에서 발표할 예정이며 또한 원예과학기술지에 2013년 전반기에 투고할 예정이다.

제6장 참고문헌

- 국회 한미 FTA 특위, 2007, 한·미 **FTA**의 경제적 효과 분석
- Chunxian Chen et al., 2008, EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*, *Tree Genetics & Genomes*, 4:1- 10
- C. Ruiz and M. J. Asins, 2003, Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps, *Theor Appl Genet* 106:826- 836
- INTERNATIONAL CITRUS GENOME CONSORTIUM, 2003, DRAFT OF THE INTERNATIONAL CITRUS GENOME CONSORTIUM WHITE PAPER
- Kim. I.-J et al., 2001. Isolation and characterization of cDNAs encoding β -carotene hydroxylase in *Citrus*. *Plant Sci.* 161: 1005 - 1010.
- Koh, J. S. 2001. *Citrus Industry*, Jeju-Munhwasa, Korea.
- Sung-Ku Kang et al., 2008, Extensive Chromosomal Polymorphism Revealed by Ribosomal DNA and Satellite DNA Loci in 13 *Citrus* Species, *Mol. Cells* 26, 319-322
- Lee. S.-H, J.-h. Kim, H.-C. Jeong, Y.-T. Yang and J.-S. Koh. 2007. Changes of Major Constituents by Soaking of *Citrus platymamma* Peel with Spirit Solution. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50: 154-159
- Masashi Yamamoto et al., 2006, Self- and Cross-incompatibility of Various *Citrus* Accessions, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75 (5): 372- 378.
- Mitsuo OMURA 2005, GENOME ANALYSIS AND BREEDING IN CITRUS, *Gamma Field Symposia*, No. 44, 25 - 30
- M. Jannati et al., 2009, Genetic diversity analysis of Iranian citrus varieties using micro satellite (SSR) based markers, *Journal of Horticulture and Forestry*, 1(7) 120-125
- Osman Gulsen et al., 2010, A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers, *Euphytica*, 173:265- 277
- Roberto Pedroso de Oliveira et al., 2004, Skewed RAPD markers in linkage maps of *Citrus*, *Genetics and Molecular Biology*, 27(3) 437-441
- Soo-Youn CHOI et al., 2007, Correlation between Flavonoid Content and the NO Production Inhibitory Activity of Peel Extracts from Various *Citrus* Fruits, *Biol. Pharm. Bull.* 30(4) 772—778

주 의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「 _____ 사업 」의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서의 내용을 인용·발표할 때는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「 _____ 사업 」의 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개해서는 안됩니다.

제주 재래감귤(병귤)의 유전체 해독

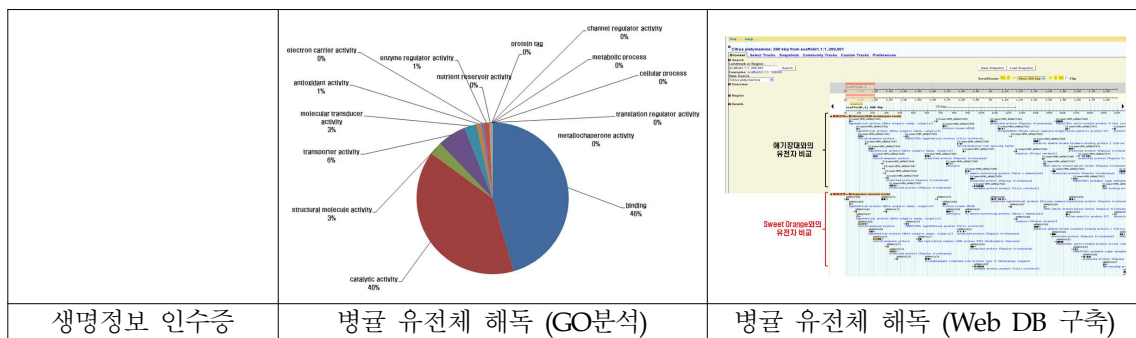
□ 연구 배경

○ 제주 재래감귤(병귤)은 외국의 어떤 문헌에도 기록되어 있지 않은 국산 품종

- 국내 과수산업은 FTA협상 등 농산물시장 개방에 의한 위협에 노출
- 현재 국내에서 재배되고 있는 대부분의 감귤 품종은 국제식물신품종 보호동맹협약 (UPOV)에 의해 로열티를 지불해야 하는 상황
- 국내에서는 감귤 유전자원에 대한 체계적 개발이 이루어지고 있지 않아 감귤연구 뿐 아니라 감귤산업에 커다란 걸림돌로 작용
- 제주재래감귤에 대한 유전체 규명을 위한 연구는 전무한 실정

□ 주요 연구성과

- 병귤의 미성숙과실의 과피에서 약 3000여개의 cDNA 라이브러리 제작
 - EST 정보는 농촌진흥청 NABIC에 등록 (접수번호 : NS-0010)
 - 병귤 cDNA 라이브러리 제작 및 분석 내용은 “원예과학기술지”에 투고
- NGS 분석 기술을 이용한 병귤의 유전체 분석 수행
 - 데이터 처리과정을 거쳐 27.7GB(감귤 게놈의 약 68배) 확보
 - 염기서열 분석결과 321Mb의 유전정보 확보(감귤 게놈의 약 92%)
 - sweet orange의 유전체 정보와 비교 분석 결과, 병귤의 게놈 유전체는 sweet orange의 약 98%영역을 차지
 - 애기장대와 sweet orange의 유전자 정보를 기반으로 병귤의 Gene ontology 및 web DB 구축 완료



□ 파급효과

- 제주 재래감귤(병귤)의 유전체 해독에 따른 국가 경쟁력 강화

- 감귤 신품종의 개발을 통해 FTA 체결에 대한 대응책 마련과 감귤산업의 국제 경쟁력 제고에 기여
- 재래감귤의 유전체 연구 내용과 cDNA database는 국제적으로 진행되고 있는 citrus genome project의 성공적인 수행과 완전한 유전자의 배열을 파악하는데 공헌

어젠다		예산사업명	차세대바이오그린 21_ 차세대유전체연구사업
과제번호	PJ008217	연구과제명	제주 재래감귤(병귤)의 기초연관지도 작성 및 표준유전체 연구기반 구축
연구자	제주대학교 김재훈, T. , E-mail:		

플라보노이드 당합성 관련 유전자의 클로닝 및 유전자 기능 분석

□ 연구 배경

○ 감귤류를 포함한 식물체에 많이 함유되어 있는 것으로 알려진 플라보노이드는 항암, 항산화, 과실의 성숙등에 활성을 지니는 것으로 보고됨.

- 플라보노이드 글리코실레이션은 당전이효소에 의해 안정화되고, 체내 흡수율에 도움을 줌.

- 플라보노이드 당합성 관련 유전자의 유전정보 확보를 통해 생합성 및 분해대사 연구에 활용 할 수 있으며, 보다 고품질의 감귤생산에 이용 가능함.

□ 주요 연구성과

○ 2011년 본 과제를 통해 제작한 병귤 유전체 정보로부터 약 76개의 Glucosyltransferase (GT) 게놈 염기서열 정보를 확인함.

- 그 중 대부분의 GT 유전자에서 공통적으로 가지고 있는 PSPG (Plant Secondary Product Glucosyltransferase) box와 상동성이 큰 유전자 약 50여 개를 선발하고 우선적으로 8개의 유전자 (GT3363, 3591, 2282, 285, 259, 1669, 150, 그리고 GT173)에서 Full-length cDNA 염기서열을 확인함.

- 염기서열이 확인된 8개 유전자들의 재조합 단백질들의 효소활성을 다양한 flavonoid 기질 (apigenin, eriodictyol, kaempferol, luteolin, naringenin, quercetin)과 HPLC 방법을 이용하여 분석함.

- GT173, 3363, 285의 경우 naringenin과 quercetin에서 모두 활성을 보이는 것을 확인

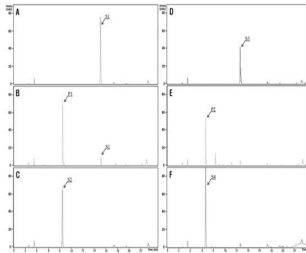
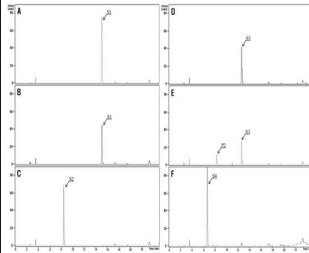
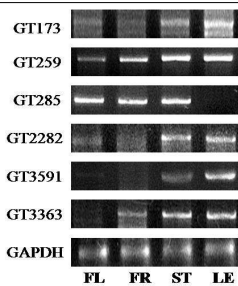
- 특히 GT3363의 경우 다른 플라보노이드 기질 (apigenin, eriodictyol, kaempferol, luteolin)에도 활성이 보이는 것을 확인

- GT3591과 GT2282는 naringenin에서 활성을 나타내는 것으로 보이고 GT259의 경우는 흥미롭게도 quercetin을 기질로 하였을 때 다른 글리코사이드 생산물을 생성하는 것을 확인

- 반면에 GT150과 GT1669는 기질에 활성이 없음을 확인

○ HPLC 결과에서 활성을 나타내는 6개의 GT 유전자의 조직별 발현을

수행함

<table><tr><th>No</th><th>유전자명</th><th>scf4id</th><th>길이</th><th>No</th><th>유전자명</th><th>scf4id</th><th>길이</th></tr><tr><td>1</td><td>GT173aRNA 1173</td><td>scf4id1731.11734.1504</td><td>1405</td><td>25</td><td>GT299aRNA 12033</td><td>scf4id209.12044.13877</td><td>1437</td></tr><tr><td>2</td><td>GT192aRNA 14518</td><td>scf4id1921.14444.4511</td><td>1473</td><td>26</td><td>GT212aRNA 42111</td><td>scf4id411.17318.7404</td><td>1446</td></tr><tr><td>3</td><td>GT202aRNA 1448</td><td>scf4id2021.12146.1486</td><td>1467</td><td>27</td><td>GT79aRNA 30305</td><td>scf4id71.45258.45377</td><td>1453</td></tr><tr><td>4</td><td>GT353aRNA 10313</td><td>scf4id3531.15124.34515</td><td>1452</td><td>28</td><td>GT68aRNA 33393</td><td>scf4id681.13893.38420</td><td>1527</td></tr><tr><td>5</td><td>GT279aRNA 14071</td><td>scf4id2791.145434.62843</td><td>1453</td><td>29</td><td>GT423aRNA 38451</td><td>scf4id423.124464.24043</td><td>1556</td></tr><tr><td>6</td><td>GT146aRNA 11339</td><td>scf4id1461.14265.44638</td><td>1458</td><td>30</td><td>GT734aRNA 44446</td><td>scf4id734.17054.74545</td><td>1552</td></tr><tr><td>7</td><td>GT150aRNA 10377</td><td>scf4id151.14834.18740</td><td>1577</td><td>31</td><td>GT209.2aRNA 52546</td><td>scf4id209.17524.74748</td><td>905</td></tr><tr><td>8</td><td>GT179aRNA 14073</td><td>scf4id1771.13395.18231</td><td>1563</td><td>32</td><td>GT88aRNA 44446</td><td>scf4id881.11217.13568</td><td>1573</td></tr><tr><td>9</td><td>GT67aRNA 45649</td><td>scf4id671.14262.24043</td><td>1524</td><td>33</td><td>GT743aRNA 21623</td><td>scf4id743.14073.2429</td><td>1582</td></tr><tr><td>10</td><td>GT467aRNA 17772</td><td>scf4id4671.15461.744</td><td>1588</td><td>34</td><td>GT184aRNA 44511</td><td>scf4id1841.20193.2429</td><td>1621</td></tr><tr><td>11</td><td>GT149aRNA 10071</td><td>scf4id1491.14238.45353</td><td>1473</td><td>35</td><td>GT279aRNA 14515</td><td>scf4id279.14456.4706</td><td>1451</td></tr><tr><td>12</td><td>GT125.2aRNA 10138</td><td>scf4id1251.18747.18895</td><td>1577</td><td>36</td><td>GT179.2aRNA 14073</td><td>scf4id179.14994.5209</td><td>1446</td></tr><tr><td>13</td><td>GT178aRNA 14071</td><td>scf4id1781.13398.17895</td><td>1488</td><td>37</td><td>GT113aRNA 42746</td><td>scf4id113.1594.1139</td><td>1594</td></tr><tr><td>14</td><td>GT123aRNA 18804</td><td>scf4id123.14574.14528</td><td>1495</td><td>38</td><td>GT143.2aRNA 18844</td><td>scf4id143.111273.112139</td><td>1599</td></tr><tr><td>15</td><td>GT147aRNA 14071</td><td>scf4id1471.17467.20201</td><td>1528</td><td>39</td><td>GT167aRNA 44446</td><td>scf4id167.13206.2106</td><td>1645</td></tr><tr><td>16</td><td>GT184aRNA 48303</td><td>scf4id1841.13647.37851</td><td>1515</td><td>40</td><td>GT529.2aRNA 41493</td><td>scf4id529.11441.1358</td><td>1699</td></tr><tr><td>17</td><td>GT171aRNA 10104</td><td>scf4id1711.17467.19215</td><td>1476</td><td>41</td><td>GT529.2aRNA 41493</td><td>scf4id529.11441.1358</td><td>1697</td></tr><tr><td>18</td><td>GT102aRNA 11021</td><td>scf4id1021.11714.11021</td><td>1479</td><td>42</td><td>GT189aRNA 7456</td><td>scf4id1891.11049.24031</td><td>1491</td></tr><tr><td>19</td><td>GT468aRNA 45646</td><td>scf4id4681.13398.19252</td><td>1453</td><td>43</td><td>GT143aRNA 42103</td><td>scf4id143.14048.4307</td><td>1728</td></tr><tr><td>20</td><td>GT157aRNA 14411</td><td>scf4id1571.11194.14011</td><td>1475</td><td>44</td><td>GT184aRNA 41601</td><td>scf4id1841.14018.4515</td><td>2013</td></tr><tr><td>21</td><td>GT842aRNA 12559</td><td>scf4id8421.11253</td><td>1507</td><td>45</td><td>GT389.2aRNA 41601</td><td>scf4id3891.1326.383</td><td>472</td></tr><tr><td>22</td><td>GT79aRNA 14071</td><td>scf4id71.13395.19257</td><td>1455</td><td>46</td><td>GT113.2aRNA 42746</td><td>scf4id113.1594.1139</td><td>1597</td></tr><tr><td>23</td><td>GT138aRNA 1148</td><td>scf4id1381.14021.47451</td><td>1458</td><td>47</td><td>GT113.2aRNA 42746</td><td>scf4id113.1594.1139</td><td>1597</td></tr><tr><td>24</td><td>GT149aRNA 11230</td><td>scf4id1491.118574.10220</td><td>1604</td><td>48</td><td>GT68aRNA 33393</td><td>scf4id681.13893.11845</td><td>1539</td></tr></table>	No	유전자명	scf4id	길이	No	유전자명	scf4id	길이	1	GT173aRNA 1173	scf4id1731.11734.1504	1405	25	GT299aRNA 12033	scf4id209.12044.13877	1437	2	GT192aRNA 14518	scf4id1921.14444.4511	1473	26	GT212aRNA 42111	scf4id411.17318.7404	1446	3	GT202aRNA 1448	scf4id2021.12146.1486	1467	27	GT79aRNA 30305	scf4id71.45258.45377	1453	4	GT353aRNA 10313	scf4id3531.15124.34515	1452	28	GT68aRNA 33393	scf4id681.13893.38420	1527	5	GT279aRNA 14071	scf4id2791.145434.62843	1453	29	GT423aRNA 38451	scf4id423.124464.24043	1556	6	GT146aRNA 11339	scf4id1461.14265.44638	1458	30	GT734aRNA 44446	scf4id734.17054.74545	1552	7	GT150aRNA 10377	scf4id151.14834.18740	1577	31	GT209.2aRNA 52546	scf4id209.17524.74748	905	8	GT179aRNA 14073	scf4id1771.13395.18231	1563	32	GT88aRNA 44446	scf4id881.11217.13568	1573	9	GT67aRNA 45649	scf4id671.14262.24043	1524	33	GT743aRNA 21623	scf4id743.14073.2429	1582	10	GT467aRNA 17772	scf4id4671.15461.744	1588	34	GT184aRNA 44511	scf4id1841.20193.2429	1621	11	GT149aRNA 10071	scf4id1491.14238.45353	1473	35	GT279aRNA 14515	scf4id279.14456.4706	1451	12	GT125.2aRNA 10138	scf4id1251.18747.18895	1577	36	GT179.2aRNA 14073	scf4id179.14994.5209	1446	13	GT178aRNA 14071	scf4id1781.13398.17895	1488	37	GT113aRNA 42746	scf4id113.1594.1139	1594	14	GT123aRNA 18804	scf4id123.14574.14528	1495	38	GT143.2aRNA 18844	scf4id143.111273.112139	1599	15	GT147aRNA 14071	scf4id1471.17467.20201	1528	39	GT167aRNA 44446	scf4id167.13206.2106	1645	16	GT184aRNA 48303	scf4id1841.13647.37851	1515	40	GT529.2aRNA 41493	scf4id529.11441.1358	1699	17	GT171aRNA 10104	scf4id1711.17467.19215	1476	41	GT529.2aRNA 41493	scf4id529.11441.1358	1697	18	GT102aRNA 11021	scf4id1021.11714.11021	1479	42	GT189aRNA 7456	scf4id1891.11049.24031	1491	19	GT468aRNA 45646	scf4id4681.13398.19252	1453	43	GT143aRNA 42103	scf4id143.14048.4307	1728	20	GT157aRNA 14411	scf4id1571.11194.14011	1475	44	GT184aRNA 41601	scf4id1841.14018.4515	2013	21	GT842aRNA 12559	scf4id8421.11253	1507	45	GT389.2aRNA 41601	scf4id3891.1326.383	472	22	GT79aRNA 14071	scf4id71.13395.19257	1455	46	GT113.2aRNA 42746	scf4id113.1594.1139	1597	23	GT138aRNA 1148	scf4id1381.14021.47451	1458	47	GT113.2aRNA 42746	scf4id113.1594.1139	1597	24	GT149aRNA 11230	scf4id1491.118574.10220	1604	48	GT68aRNA 33393	scf4id681.13893.11845	1539			
No	유전자명	scf4id	길이	No	유전자명	scf4id	길이																																																																																																																																																																																																				
1	GT173aRNA 1173	scf4id1731.11734.1504	1405	25	GT299aRNA 12033	scf4id209.12044.13877	1437																																																																																																																																																																																																				
2	GT192aRNA 14518	scf4id1921.14444.4511	1473	26	GT212aRNA 42111	scf4id411.17318.7404	1446																																																																																																																																																																																																				
3	GT202aRNA 1448	scf4id2021.12146.1486	1467	27	GT79aRNA 30305	scf4id71.45258.45377	1453																																																																																																																																																																																																				
4	GT353aRNA 10313	scf4id3531.15124.34515	1452	28	GT68aRNA 33393	scf4id681.13893.38420	1527																																																																																																																																																																																																				
5	GT279aRNA 14071	scf4id2791.145434.62843	1453	29	GT423aRNA 38451	scf4id423.124464.24043	1556																																																																																																																																																																																																				
6	GT146aRNA 11339	scf4id1461.14265.44638	1458	30	GT734aRNA 44446	scf4id734.17054.74545	1552																																																																																																																																																																																																				
7	GT150aRNA 10377	scf4id151.14834.18740	1577	31	GT209.2aRNA 52546	scf4id209.17524.74748	905																																																																																																																																																																																																				
8	GT179aRNA 14073	scf4id1771.13395.18231	1563	32	GT88aRNA 44446	scf4id881.11217.13568	1573																																																																																																																																																																																																				
9	GT67aRNA 45649	scf4id671.14262.24043	1524	33	GT743aRNA 21623	scf4id743.14073.2429	1582																																																																																																																																																																																																				
10	GT467aRNA 17772	scf4id4671.15461.744	1588	34	GT184aRNA 44511	scf4id1841.20193.2429	1621																																																																																																																																																																																																				
11	GT149aRNA 10071	scf4id1491.14238.45353	1473	35	GT279aRNA 14515	scf4id279.14456.4706	1451																																																																																																																																																																																																				
12	GT125.2aRNA 10138	scf4id1251.18747.18895	1577	36	GT179.2aRNA 14073	scf4id179.14994.5209	1446																																																																																																																																																																																																				
13	GT178aRNA 14071	scf4id1781.13398.17895	1488	37	GT113aRNA 42746	scf4id113.1594.1139	1594																																																																																																																																																																																																				
14	GT123aRNA 18804	scf4id123.14574.14528	1495	38	GT143.2aRNA 18844	scf4id143.111273.112139	1599																																																																																																																																																																																																				
15	GT147aRNA 14071	scf4id1471.17467.20201	1528	39	GT167aRNA 44446	scf4id167.13206.2106	1645																																																																																																																																																																																																				
16	GT184aRNA 48303	scf4id1841.13647.37851	1515	40	GT529.2aRNA 41493	scf4id529.11441.1358	1699																																																																																																																																																																																																				
17	GT171aRNA 10104	scf4id1711.17467.19215	1476	41	GT529.2aRNA 41493	scf4id529.11441.1358	1697																																																																																																																																																																																																				
18	GT102aRNA 11021	scf4id1021.11714.11021	1479	42	GT189aRNA 7456	scf4id1891.11049.24031	1491																																																																																																																																																																																																				
19	GT468aRNA 45646	scf4id4681.13398.19252	1453	43	GT143aRNA 42103	scf4id143.14048.4307	1728																																																																																																																																																																																																				
20	GT157aRNA 14411	scf4id1571.11194.14011	1475	44	GT184aRNA 41601	scf4id1841.14018.4515	2013																																																																																																																																																																																																				
21	GT842aRNA 12559	scf4id8421.11253	1507	45	GT389.2aRNA 41601	scf4id3891.1326.383	472																																																																																																																																																																																																				
22	GT79aRNA 14071	scf4id71.13395.19257	1455	46	GT113.2aRNA 42746	scf4id113.1594.1139	1597																																																																																																																																																																																																				
23	GT138aRNA 1148	scf4id1381.14021.47451	1458	47	GT113.2aRNA 42746	scf4id113.1594.1139	1597																																																																																																																																																																																																				
24	GT149aRNA 11230	scf4id1491.118574.10220	1604	48	GT68aRNA 33393	scf4id681.13893.11845	1539																																																																																																																																																																																																				
PSPG box와 상동성이 높은 병굴 유래 GT 유전자	GT3363의 HPLC 분석	GT259의 HPLC 분석	GT유전자의 조직별 발현패턴																																																																																																																																																																																																								

□ 파급효과

○ 당합성 관련 유전자의 유전정보 확보를 통한 고품질 과실 생산의 가능 할 뿐만 아니라 천연물을 이용한 표적치료제로서의 개발이 가능함

○ 생리 및 물질대사 기능 분석 등의 결과도출을 통해 감귤 분자유종 및 고품질 감귤 생산의 기반 확립에 기여함

어젠다		예산사업명	차세대바이오그린 21_ 차세대유전체연구사업	
과제번호	PJ008217	연구과제명	제주 재래감귤(병귤)의 기초연관지도 작성 및 표준유전체 연구기반 구축	
연구자	제주대학교 김재훈, T. , E-mail:			

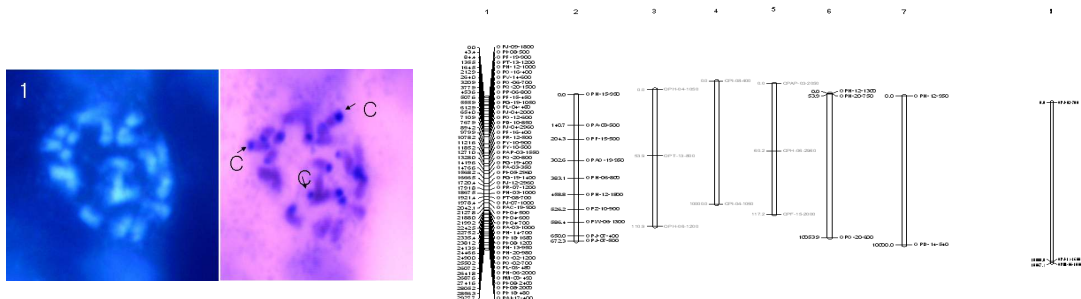
병굴 CMA 핵형분석 및 기초 연관지도 작성

□ 연구 배경

- 제주 재래굴 중 유일하게 자생종으로 알려진 병굴의 유래와 유전체 및 유전정보의 해석으로 활용가치 개발이 요구됨
 - 자생 재래굴 병굴의 육종가치 또는 식물학적 가치에 대한 평가가 외형 및 성분분석에 국한되어 제한적으로 수행되어 왔음
 - 자생종인 병굴의 염색체가 동형 상태인지 이형 상태인지에 대한 확인을 통해 고유종 개념의 적용 여부와 타지역 유래를 추정할 수 있음
 - 유전체 해석 및 유전정보 해석을 위한 기초 연관지도가 필요함

□ 주요 연구성과

- 병굴의 CMA 핵형 분석
 - CMA 핵형분석 결과 3C+11D+4E로 나타나 이형 상태로 분석되었으며 고유종 개념이 아닌 교잡종 기원으로 추정됨
- 병굴의 기초 연관지도 작성
 - 240개의 Opeon primers의 RAPD 분석에 의해 pseudo-test cross 개념의 분리집단으로부터 37개 다형성 primers에 기초한 71개 markers를 선발함
 - 이들 선발 RAPD markers를 분리집단에 적용 markers의 분리 양상을 분석한 후 JointMap 프로그램으로 연관지도를 그려냄



〈병굴 CMA핵형〉

〈병굴 기초 연관지도 작성〉

□ 파급효과

- 병굴의 이형체 CMA 핵형을 WGS 해석의 정당성을 제공
- 병굴 기초 연관지도 작성으로 연관지도 포화도 증진 연구의 바탕을 제공

어젠다		예산사업명	차세대바이오그린21사업
과제번호	PJ008217	연구과제명	제주 재래굴의 연관지도 작성 및 표준유전체 연구기반 구축
연구자	제주대학교 생물산업학부 송관정, T.		, E-mail: