

감귤 유전체 연구 동향 및 전망

김호방 · 임상현 · 김재준 · 박영철 · 윤수현 · 송관정

Current status and prospects of citrus genomics

Ho Bang Kim · Sanghyun Lim · Jae Joon Kim · Young Cheol Park · Su-Hyun Yun · Kwan Jeong Song

Received: 16 December 2015 / Revised: 25 December 2015 / Accepted: 25 December 2015
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Citrus is an economically important fruit tree with the largest amount of fruit production in the world. It provides important nutrition such as vitamin C and other health-promoting compounds including its unique flavonoids for human health. However, it is classified into the most difficult crops to develop new cultivars through conventional breeding approaches due to its long juvenility and some unique reproductive biological features such as gamete sterility, nucellar embryony, and high level of heterozygosity. Due to global warming and changes in consumer trends, establishing

a systematic and efficient breeding programs is highly required for sustainable production of high quality fruits and diversification of cultivars. Recently, reference genome sequences of sweet orange and clementine mandarin have been released. Based on the reference whole-genome sequences, comparative genomics, reference-guided resequencing, and genotyping-by-sequencing for various citrus cultivars and crosses could be performed for the advance of functional genomics and development of traits-related molecular markers. In addition, a full understanding of gene function and gene co-expression networks can be provided through combined analysis of various transcriptome data. Analytic information on whole-genome and transcriptome will provide massive data on polymorphic molecular markers such as SNP, INDEL, and SSR, suggesting that it is possible to construct integrated maps and high-density genetic maps as well as physical maps. In the near future, integrated maps will be useful for map-based precise cloning of genes that are specific to citrus with major agronomic traits to facilitate rapid and efficient marker-assisted selection.

†These authors contributed equally to this work.

H. B. Kim[†]
㈜바이오메딕 생명과학연구소
(Life Sciences Research Institute, Biomedic Co., Ltd., Bucheon 14548, Korea)
제주대학교 생명공학부 바이오소재전공
(Faculty of Biotechnology, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)

S. H. Lim[†] · J. J. Kim
㈜바이오메딕 생명과학연구소
(Life Sciences Research Institute, Biomedic Co., Ltd., Bucheon 14548, Korea)

Y. C. Park
제주특별자치도 농업기술원 감귤육종센터
(Agricultural Research and Extension Services, Jeju Special Self-Governing Province, Seowipo 63556, Korea)

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

K. J. Song (✉)
제주대학교 생물산업학부 원예환경전공
(Faculty of Bioscience and Industry, SARI, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)
제주대학교 아열대농업연구소
(Research Institute for Subtropical Agriculture & Biotechnology, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)
e-mail: kwansong@jejunu.ac.kr

Keywords Citrus, Genome, Transcriptome, Molecular Markers, Genetic Map, Molecular Breeding

서론

감귤은 인도 동북부, 중국 서남부, 말레이시아, 인도네시아 및 호주 동부로 이어지는 광대한 지역이 원산지로서 4,000년 이상의 재배 역사를 가지고 있다(Nicolosi 2007). 전 세계적으로 가장 많이 생산되는 주요 과수 작물로서 연간 약 1.3억만톤 이상 생산되며, 중국, 브라질, 미국, 인도, 멕시코, 스페인 등 아열대 및 열대 지역을 중심으로

재배되고 있다(FAOSTAT 2014). 감귤 중 약 53%는 오렌지, 21%는 만다린, 11%는 레몬과 라임 계통, 나머지는 문단 및 자몽 계통이 생산되고 있다. 온화한 기후에서 재배되는 특성상 감귤은 추위에 약한데, 이들 중 문단, 레몬, 라임 계통은 내한성이 매우 약하고, 온주밀감과 금감은 상대적으로 내한성이 강한 편이다.

감귤은 비타민 C와 구연산 외에 약 60여 종의 다양한 기능성 플라보노이드를 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 채소나 다른 과일에서는 보고되지 않은 tangeretin, nobiletin과 같은 감귤 고유의 플라보노이드들이 밝혀졌는데, 이들은 암세포의 침윤 및 전이방지, 백혈병 세포의 분화촉진, 연골파괴 억제와 항산화작용, 순환기 계통 질병의 예방, 항염증, 항알레르기, 항바이러스 등에 효과적임이 보고되었다. 특히 감귤에 많이 들어있는 hesperidin, naringin과 같은 플라보노이드는 항균작용이 탁월하고, 혈압저하 효과가 있음이 보고되었다(Benavente-García and Castillo 2008; Iranshahi et al. 2015; Meiyanto et al. 2012; Orhan et al. 2015).

세계적으로 생산량이 가장 많은 과수로서의 경제적 중요성에도 불구하고, 여러 지역에서 재배되는 대다수 감귤 품종은 체계적인 교잡육종 프로그램을 통해서가 아니라 자연교잡 실생 또는 아조변이 등을 통해서 선발되어 이용되고 있는 실정이다. 감귤이 갖는 배우체 불임, 주심배 발생, 다배성(polyembryony), 타가 및 자가 불화합성 등 독특한 생식생물학적 특성과 잡종강세(heterosis)를 유도하는 높은 이형접합성(heterozygosity), 긴 유년기(juvenility), 나무의 크기 등의 특성으로 인해 유전 변이의 유전학 연구와 이를 활용한 전통 육종은 많은 시간과 노력 및 비용을 요구하고 있다. 또한 감귤에서 과실의 크기, 과형, 당도, 향기, 내병성, 종자수, 과피분리(easy peeling) 등의 주요 농업 형질은 질적형질이 아닌 양적형질과 관련되는 것으로 알려져 있다(Gmitter et al. 2012; Talon and Gmitter 2008).

지구 온난화의 영향으로 인한 급격한 환경변화(가뭄, 냉해 등)로 돌발적인 환경 스트레스에 노출될 우려가 커지고 있으며, 감귤 생산의 세계화, 국제 여행의 보편화 등으로 인해 감귤에 치명적인 질병이 급속히 전파될 가능성이 매우 높다. 따라서 국제적으로도 고품질의 안정적 감귤 생산 공급체계가 심각한 위협에 노출되고 있다. 또한 소비자 요구의 다양화로 소품종 대량 생산보다는 다품종 소량 생산을 위한 육종 프로그램으로의 변화가 요구되고 있는 실정이다(Talon and Gmitter 2008).

감귤의 고품질화, 품종의 다양화, 기후 변화 대응 안정 생산 체계 구축 등을 위해서는 과학적이며 체계적인 육종 프로그램의 도입이 요구되는 시점에 있다. 세대 진전과 교배 집단 육성이 비교적 자유로운 채소 작물들의 경우, 유전체 기반 육종 프로그램이 본격적으로 가동되고

있는 상황이다. 따라서 다른 작물들에서의 경우와 마찬가지로 유전체 분석 기반 감귤 육종 프로그램의 도입은 기존의 전통육종과 상호 조화를 이루어 신품종 육성의 가속화와 체계화가 이루어질 수 있을 것으로 전망된다. 본 논문에서는 감귤 유전체와 전사체 연구동향 및 유전자 지도, 분자마커 등에 관한 최근의 연구결과들을 소개하고자 한다.

감귤 유전체 연구 현황

감귤 유전체 특성 및 연구 동향

감귤 및 근연 속(genus)은 기본적으로 2배체($2n=2x=18$)이나 Longley (1925)에 의해 최초로 자연발생 4배체인 금감(*Fortunella hindsii* Swing.)이 발견된 이래 3배체, 동질사배체, 6배체 등이 보고되었다(Gmitter et al. 2012). 감귤은 목본성 작물임에도 불구하고 비교적 작은 유전체 크기를 갖는 것으로 알려져 있다. 만다린(*C. reticulata* Blanco)은 360Mb, 문단[*C. maxima* (Burm.) Merrill]는 383Mb, 불수감(*C. medica* L.)은 398Mb의 평균 반수체 유전체 크기를 갖는 것으로 분석되었다(Ollitrault et al. 1994). 이러한 유전체 크기는 모델 식물인 애기장대 유전체(약 135Mb)의 약 3배 정도에 해당한다(The Arabidopsis Genome Initiative 2000).

감귤 유전체 해독을 위한 노력은 2003년에 국제 감귤 유전체 컨소시엄(ICGC, The International Citrus Genome Consortium)이 설립되면서 시작되었다. ICGC에는 미국, 프랑스, 이탈리아, 스페인의 대학 및 공공기관 소속 감귤 연구자들과 민간기업이 주도적으로 참여하였으며, 클레멘타인 만다린(*C. clementina* cv. Clemenules) 유래 반수체 클론에 대해 Sanger 플랫폼을 이용한 유전체 해독이 착수되었다. 이와 별도로 미국 플로리다대학교(UF-CREC, University of Florida Citrus Research and Education Center) 주도로 Roche 454 시퀀싱 플랫폼을 이용하여 2배체인 스위트 오렌지(*C. sinensis* cv. Ridge Pineapple)에 대한 유전체 해독이 착수되었다(Gmitter et al. 2012). 두 개의 감귤 유전체에 대한 일차 어셈블리 서열은 미국 에너지부의 Joint Genome Institute에서 운영하는 포털 사이트(phytozome.net)와 Tree Fruit Genome Database Resources (tfGDR; citrusgenomedb.org)에 공개된 바 있다(Gmitter et al. 2012).

여러 국가의 감귤 연구자들의 노력에 의해 2013년에 감귤 유전체에 대한 해독이 이루어졌는데, 최초의 감귤 표준 유전체 draft 서열은 중국 화중농업대학교의 감귤 연구 그룹에 의해 보고되었다(Xu et al. 2013). 중국 그룹은 세계적으로 가장 많이 재배되며 오렌지 주스 생산을 위해 주로 사용되는 ‘발렌시아’ 오렌지(*C. sinensis* cv. Valencia)에 대한 유전체 해독을 완료하였다. 감귤은 이형접합성

으로 인해 해독된 유전체의 분석에 복잡성 문제를 야기할 수 있다. 이를 해결하기 위하여 ‘발렌시아’ 오렌지 약배양에서 유래한 DH (double haploid) 계통에 대해 whole-genome shotgun paired-end-tag sequencing을 수행한 후, *de novo* 어셈블리를 통해 표준 유전체를 작성하였다. 이배체인 모본 ‘발렌시아’ 오렌지에 대해서도 shotgun sequencing을 수행하여 완전한 유전체 정보를 완성하였다. 또한 유전체 정보의 완성도와 gene annotation의 정확도를 높이기 위하여 4가지 조직(캘러스, 꽃, 잎, 열매)에 대해 shotgun RNA sequencing (RNA-seq)과 paired-end-tag RNA sequencing (RNA-PET)을 수행하였다. ‘발렌시아’ 오렌지 유전체 분석 결과, 20.5% (약 61.7Mb)는 repetitive element로 구성되며, 29,445개의 단백질 암호화 유전자가 예측되었다. 단백질 암호화 유전자들 중 약 절반은 이형접합 상태로 존재하였는데, 유전체 분석을 통해 감귤의 이형접합성이 입증된 것이다. 애기장대와 벼의 유전체에도 약 20%의 repetitive element가 존재한다는 점에서 볼 때(Goff et al. 2002; The Arabidopsis Genome Initiative 2000), 감귤도 상당히 밀집된 유전체를 갖는다고 할 수 있다. 스위트 오렌지가 문단과 만다린의 교잡종으로 추정되어 왔는데(Moore 2001; Nicolosi et al. 2000), 문단과 만다린 각 3품종에 대해 유전체 해독을 수행한 후, 스위트 오렌지 표준 유전체를 활용하여 single nucleotide polymorphism (SNP) 선호도를 분석한 결과, 스위트 오렌지는 문단과 만다린의 여교잡종(스위트 오렌지 = (♀문단 x ♂만다린) x ♂만다린)임이 입증되었다.

2014년에 ICGC는 클레멘타인 만다린(*C. clementina* cv. Clemenules) 유래의 반수체 식물을 재료로 Sanger dideoxy whole-genome shotgun 플랫폼을 기반으로 하여 약 25,000개의 단백질을 암호화하며 9개 pseudomolecule로 이루어진 301.4Mb의 고품질 감귤 표준 유전체 해독을 보고하였다(Wu et al. 2013). 아울러 Illumina 플랫폼을 이용하여 다양한 감귤(만다린 4품종, 문단 2품종, 스위트 오렌지와 사우어 오렌지 각 1 품종)에 대한 유전체 해독도 보고하였다(Wu et al. 2013). 핵과 엽록체 유전체에 대한 비교 유전체 분석 결과로부터 현재 재배중인 문단은 야생의 *C. maxima*로부터 선발되었으며, 만다린은 야생의 *C. reticulata*로부터 일부 *C. maxima* 유전체의 유전질 침투(introgression)에 의해 만들어졌고, 가장 광범위하게 재배되는 스위트 오렌지는 이전에 혼합된 개체의 자손이며, 사우어 오렌지는 *C. maxima*와 *C. reticulata*의 F1 hybrid임을 제시하였다.

현재까지 스위트 오렌지와 클레멘타인 만다린에 대한 표준 유전체가 완성된 상황이다. 현재 이들 유전체 정보를 활용하여 gene annotation (Wang et al. 2014), 기능, 전사 조절 및 내병성 유전자군에 대한 상세분석(de Paula Santos Martins et al. 2015; Hou et al. 2014; Hu et al. 2015; Islam et al. 2014; Wang et al. 2015; Xie et al. 2015), 서열/구조 변

이 분석 및 분자마커 발굴(Biswas et al. 2014; Chen and Gmitter 2013; Jiao et al. 2013; Liu et al. 2013), 엽록체 유전체 분석(Carbonell-Caballero et al. 2015; Redwan et al. 2015; Su et al. 2014) 등에 활발히 활용되고 있다.

국내에서는 농진청 차세대바이오그린 21 사업의 일환으로 제주 재래귤 중의 하나인 병귤(*C. platymamma*)에 관한 유전체 해독이 이루어졌으나 아직 논문 발표가 이루어지지 않았으며, Lee 등(2015)은 최근 병귤 엽록체 유전체 해독에 관해 보고하였다. 병귤 엽록체 유전체는 160,121 염기쌍으로 이루어져 있으며, 유전체 정보를 이용한 계통분석 결과 스위트 오렌지와 가장 가까운 유연관계를 보여주었다. 본 연구팀에서 클레멘타인과 병귤 유전체에 대한 비교 유전체 분석을 수행한 결과, 13,286개의 다형성 SNP와 521개의 다형성 SSR (simple sequence repeat)을 발굴하였다(미발표 자료).

감귤 전사체 분석 동향

NGS 기술을 이용한 감귤의 전사체 연구는 2012년부터 보고되기 시작했다. 보고된 논문들은 약 1.2-4GB 염기서열에 해당하는 15~50 million raw reads를 생산하였고, 생산된 reads는 The Institute for Genomic Research (TIGR) unigene dataset, the *Citrus sinensis* unigene set (NCBI Unigene Build)와 phytozome database를 reference로 사용하였다. 두 개의 감귤 품종에 대한 표준 유전체가 완성되었지만 연구자가 관심 있는 감귤 품종에 대하여 *de novo* assembly한 후 public database를 이용하여 유전자를 탐색하여 보고하고 있다.

RNA-Seq을 이용한 감귤의 연구는 병, 숙기, 색에 대한 연구가 상대적으로 다른 형질보다 많이 보고되었다. 황룡병, 궤양병, 더뎡이병, 흑점병 등의 감귤 병 중 전세계적으로 가장 관심이 있는 황룡병에 대한 연구가 가장 활발히 이루어지고 있으며, 우리나라에서 발생하고 있는 궤양병, 더뎡이병에 대하여 RNA-Seq을 이용한 전사체 연구는 아직 보고되어 있지 않다. Martinelli 등(2012)은 황룡병을 일으키는 *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CaLas)에 감염된 스위트 오렌지 과피와 감염되지 않은 과피를 이용하여 전사체 연구를 수행하였는데, 감염 과피에서 광합성의 명반응, ATP 합성에 관련된 유전자가 증가되고, protein degradation, misfolding process가 활성화되었다. 또한 살리실산, 자스몬산 관련 유전자가 증가되고, 지베렐린, 사이토키닌 연관 유전자가 억제됨을 보고하였다. Zhong 등(2015)은 CaLas을 red tangerine 뿌리에 감염시키고 50일 후에 감염된 뿌리와 감염되지 않은 뿌리에서 전사체를 분석하였다. 총 3,956개 유전자가 샘플간 차별적인 발현을 보였는데, 이들의 연구 결과와 앞선 보고를 종합하여 CaLas 감염은 cell wall modification, protease-involved protein

degradation, carbohydrate metabolism, hormone synthesis, stress response에 관련된 생물학적 경로에 영향을 주는 것이 확인되었다. 또한 뿌리 특이적으로 ubiquitin-dependent protein degradation pathway, secondary metabolism, cytochrome P450와 Fe, Zn, N, P와 같은 영양분 흡수와 전달에 관련된 유전자들의 발현이 감소되는 변화를 보고하였다.

감귤 숙기는 생산 시기와 연관되어 있으므로 연구가 활발히 진행되고 있다. 과실 발달은 단계적으로 크기 증가, 당 증가, 과피색의 변화가 수반되며, 감귤 성숙에는 당 증가, 산 감소, 카로티노이드 축적 등이 서로 연결되어 있다. 성숙의 과정은 매우 복잡하고 유전학적으로도 체계적인 프로그램에 의해 진행되는 데 주로 돌연변이를 이용하여 연구가 이루어지고 있다. Wu 등(2014)은 개화 후 170일, 190일, 210일에서 숙기가 늦어진 자연적 돌연변이와 숙기가 정상인 ‘Fengwan’ 오렌지의 전사체를 조사하였다. 총 628개의 차별적으로 발현되는 유전자가 확인되었고, abscisic acid (ABA) 경로가 숙기에 중요한 역할을 수행할 것으로 추정되었다. 식물 호르몬인 ABA는 오렌지의 주 색소인 카로티노이드 경로에 의해 생산되는 물질을 전구체로 사용하여 합성되는데, 이들 연구에서 차별적으로 발현되는 유전자들로 확인된 sugar metabolism, cell wall-related metabolism과 서로 연결되어 감귤 숙기 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되었다. Zhang 등(2014)도 숙기가 늦어진 자연적 돌연변이와 숙기가 정상인 ‘Jincheng’ 오렌지의 전사체 조사에서, ABA, sucrose, 자스몬산 경로가 서로 긴밀히 연계되어 감귤 숙기에 영향을 주는 것으로 보고하였다. 또한 cell wall metabolism과 관련된 pectinesterase 유전자가 성숙 정도와 연관되어 있으며, PP2C, PYR/PYL, SnRK2 등의 신호전달 연관 특정 유전자들도 관련되고 있는 것으로 알려졌다.

과실 색은 품질의 주요 구성 요소인데, 감귤에서는 카로티노이드 축적의 결과로 알려져 있다(Guo et al. 2015; Kato et al. 2007; Sugiyama et al. 2010). 카로티노이드는 식물 호르몬, 신호물질, 비타민 A 등의 전구체이자 항산화 역할을 수행하여, 암을 비롯한 여러 질병 예방과 영양학적으로 도움이 되는 물질이다(Kato et al. 2007). 감귤 과피와 과육 부분에서 β -carotene, lycopene을 비롯한 115개 이상의 다양한 카로티노이드로 구성되어 성숙 단계에 따라 과육(pulp)과 과피(flavedo) 색이 변하게 되며, 이는 성숙과 색소 발달에 대한 생물학적 경로가 카로티노이드 합성 경로를 중심으로 밀접하게 연관되어 있음을 보여준다. 주로 과피색 및 과육색 돌연변이체를 이용하여 색소 관련 전사체 연구가 진행되고 있다. Guo 등(2015)은 ‘Guanxi’ 문단에서 과육 부분은 색이 같으나 일반 과피보다 β -carotene 함량이 10.5배 많은 자연발생 돌연변이체와 보통의 개체를 가지고 전사체 연구를 수행하였는데, β -carotene

의 증가는 카로티노이드 합성 경로에서 β -carotene을 분해하는 CCD, BCH, NCED, ZEP 유전자들의 발현량의 감소와 연관되어 있음을 밝혔다. 총 303개의 유전자가 차별적으로 발현되었는데, carbon metabolism, starch/sucrose metabolism, 아미노산 생합성과 연관된 핵심 유전자들이 β -carotene 축적과 관련되어 있었다. Yu 등(2012)은 과육색이 적색인 스위트 오렌지 돌연변이체를 이용하여 다른 종에서와 같이 카로티노이드 합성 경로에서 PSY, ZDS처럼 lycopene 합성 관련 유전자들의 발현은 증가하고 LCYb, CCS같은 lycopene 분해 관련 유전자들의 발현은 감소한다고 하였다. 또한 돌연변이체에서 미토콘드리아에서 작용하는 TCA cycle, coupling electron transfer, oxidative phosphorylation 등에 관련 있는 유전자들의 발현에도 변화가 있었으며 PSY, ZDS 등이 lycopene을 합성하기 위한 phytoene desaturation의 촉매와 전자 전달에 있어서의 연관성이 제시되었다.

감귤 병, 숙기, 색 등의 형질 연구 외에도 생물학적 메커니즘을 이해하기 위하여 RNA-Seq을 이용하여 전사체를 분석하였다. 예를 들어, 미량 영양소인 붕소 결핍으로 나타나는 생리장애 증상에 대한 메커니즘, 생물학적 제재를 이용한 병 저항성 향상, 과실 착과량이 다음해 개화 유도에 미치는 영향 등이 보고되었다. Yang 등(2013)은 붕소 결핍에 따라 생리장애 증상을 4단계로 나누어 전사체를 분석하여 사이토키닌 신호 전달경로가 생리장애 초기단계에 중요한 역할을 할 수 있다고 제시하였다. Hershkovitz 등(2013)은 유용 미생물인 yeast *Metschnikowia fructicola*를 자몽 과피에 처리하였을 때 green mold를 일으키는 *Penicillium digitatum*의 억제 기작에 대해 보고하였다. Shalom 등(2014)은 과다결실에 따른 가지의 전사체를 비교하여 해거리현상(격년결과)이 ABA 및 옥신의 상호작용과 관련되어 있음을 보고하였다.

국내에서 감귤 전사체 분석은 아직 활발하게 이루어지고 있지 않은 실정이다. 온주밀감(*C. unshiu* cv. Nichinan No. 1) 미숙과에 대한 expressed sequence tags (ESTs) 분석이 이루어졌으며(Boo et al. 2007), DNA microarray 방법을 이용해 온주밀감(*C. unshiu* cv. Miyagawa Wase), 청견(*C. unshiu* Markov. x *C. sinensis*), 당유자(*C. grandis*), 하귤(*C. natsudaidai*)간 전사체 비교분석이 보고되었다(Park et al. 2012). 또한 microarray 기법을 이용하여 온주밀감(*C. unshiu* cv. Miyagawa Wase)에서 아조변이체들과의 전사체 비교 분석 연구가 수행된 바 있다(Park et al. 2010; Suh et al. 2013).

유전자 지도

유전자 연관지도 작성은 교배 집단으로부터 비효율적이며 시간 소요가 많은 표현형 기반의 선발 대신에 쉽게 수

치화할 수 있으며 중립적인 분자마커 기반의 목표형질 선별을 용이하게 한다. 감귤 잎의 동위효소(isozymes)를 이용한 최초 연관지도 작성이 보고된 이래(Torres et al. 1985), 현재까지 주로 감귤과 탕자에 대해 다양한 분자마커 활용의 연관지도가 보고되어 왔다(Chen et al. 2008; Gulsen et al. 2010). 2000년대 이전까지는 주로 동위효소, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), restriction fragment length polymorphism (RFLP), inter-simple sequence repeat (ISSR) 마커 등이 활용되었으나 집단 특이적으로 인한 범용화의 문제나 개발의 어려움 등으로 인해 marker-assisted selection (MAS)을 수행하기에는 부적절한 것으로 여겨진다(Talon and Gmitter 2008). 이러한 문제점을 보완하기 위하여 sequence characterized amplified region (SCAR), cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS), SSR, SNP 마커 등이 개발되어 활용되기 시작하였다(Chen et al. 2008; Gulsen et al. 2010). 기존에 발굴된 제한된 수의 RAPD, AFLP, SSR 마커 등으로는 감귤 유전자 지도의 정밀도 향상이 어렵기 때문에 ESTs 기반의 대규모 SSR 마커를 발굴하여 사용하거나 다양한 마커들에 대한 통합 연관지도 작성이 이루어졌다(Chen et al. 2006; Chen et al. 2008; Gulsen et al. 2010). Ollitrault 등(2012)은 EST, 유전체 라이브러리 및 bacterial artificial chromosome (BAC) 말단 서열 정보로부터 다형성 SSR, SNP, Insertion-Deletion (InDel) 마커를 발굴하고 클레멘타인 만다린에 대해 961개 마커, 1084.1cM에 대한 표준 유전자 지도를 작성하였으며, 문단, 스위트 오렌지와 연관지도 비교 분석도 수행하였는데, 이들 유전자 지도들은 클레멘타인 만다린의 표준 유전체 서열 분석에 유용하게 활용되었다(Wu et al. 2014).

감귤에서 유전체, 유전자 또는 양적형질 유전자좌(QTLs)에 대한 유전자 지도 작성을 위해 다양한 교배조합들이 사용되고 있는데(Chen et al. 2008), 탕자[*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]와의 교배집단을 사용하는 경우가 많다. 그 이유로 탕자는 감귤이 갖고 있지 않은 다양한 환경스트레스 내성 및 병해충 저항성 형질[저온, citrus tristeza (CTV), *Phytophthora* 뿌리 썩음병, 선충 등] 등을 가지고 있기 때문에 감귤과의 속간 교배를 통해 이들 형질을 도입하기 위한뿐만 아니라 삼출엽의 우성 형질로 인해 교잡배 유래 유식물 판별이 용이하기 때문이다(Chen et al. 2008; Talon and Gmitter 2008). 병저항성(바이러스, 궤양병, 흑점병 등), 환경스트레스 내성, 아포믹시스, 주심배, 종자수 등 다양한 형질을 결정하는 유전자좌들에 대한 연관분석이 이루어졌다(Chen et al. 2008). 최근 Cuena 등(2013)은 클레멘타인 만다린 유전체 정보로부터 SSR과 SNP 마커를 발굴하고, 연관분석을 통해 *Alternaria alternata*에 의해 발병하는 *Alternaria brown spot*에 저항성을 부여하는 3.3Mb 영역을 확보하고, 병 저항성 유전자들이 밀집해서 존재

함을 보고하였다.

DNA 마커 기반의 연관지도와 물리지도(궁극적으로는 유전체의 DNA 서열)를 통합시키는 것은 유전체 분석의 정확도를 높이는 데 중요하다. 복잡한 유전체의 물리지도 작성은 BAC 라이브러리 작성, BAC 말단 서열 결정 및 콘티그 배열을 기반으로 한다. 감귤에서는 탕자를 비롯한 5종/계통/품종에 대해 만들어진 BAC 라이브러리를 기반으로 부분적 물리지도가 작성되었다(Talon and Gmitter, 2008). BAC 라이브러리와 BAC 말단 서열은 탕자 유래의 단일 우성 유전자(*Ctv*)에 대해 유전자 지도 기반 상세 연관분석을 통한 후보 유전자의 클로닝(Deng et al. 2001; Yang et al. 2001)과 SSR, SNP, InDel 마커 발굴을 통한 표준 유전자 지도 작성 등에 활용되었다(Ollitrault et al. 2012). 최근, 스위트 오렌지의 표준 유전체 서열 정보로부터 발굴한 5,824개 SSR 마커에 대한 물리지도가 작성되었다(Biswas et al. 2014).

분자마커

감귤에서 전통 교배육종의 효율을 높이거나 병원균 감염 여부를 판별하기 위한 DNA 기반의 분자마커들이 개발되었다(Table 1). 교배육종 효율 증진을 위하여 무핵, 다배성, 산도, 조기결실, 아포믹시스, 종자수, 자가불화합성, 웅성불임, 병해충(바이러스, 선충, 궤양병, *Alternaria brown spot* 등) 저항성, 내재해성(내한성, 내염성) 후보 유전자 연관 RAPD, RFLP, SCAR 마커들이 발굴되었다. 흑점병, 궤양병, 황룡병 등을 비롯한 주요 감귤 병원균의 감염 여부를 판별할 수 있는 다양한 형태의 분자마커 및 다배성 품종을 모본으로 하는 교배 육종에서 교잡배를 판별하기 위한 마커들도 개발되어 있는 상황이다.

최근에는 RNA-Seq을 이용한 전사체 분석을 통하여 품종별, 조직별 분자마커를 개발하기에 이르렀다. Terol 등(2015)은 감귤 12개 품종의 4개 조직에 대하여 73,797 전사체를 확인하였고, 농업적 관심 유전자의 분자마커를 탐색하였다. Liang 등(2015)은 문단의 RNA를 추출하여 12GB 정보량을 생산하고 *de novo assembly*한 후, NCBI non-redundant database, Swiss-Prot protein database, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database와 Clusters of Orthologous Groups (COG) database 등 총 4개의 database를 사용하여 기존의 2개 표준 유전체에서 보고한 감귤 unigene들보다 많은 57,212개 unigene을 확인하였다. 또한 10,276개 SSR과 67,720개 SNP를 탐색하였다. 이 중 1,035개 SSR 마커를 사용하여 유전자 지도를 작성하였고, 44개 다른 감귤 accession을 구분할 수 있는 29개 다형성 SSR 마커를 발굴하였다.

현재 유전체 분석 결과를 기반으로 기초 분자표지(SNPs, SSRs, InDels 등) 발굴은 이루어지고 있으나(Biswas et al.

Table 1 Currently available molecular markers for citrus

Group	Traits	Candidate gene	Marker type	References or Patents
Pathogen/insect resistance	Citrus canker (<i>Xanthomonas citri</i>)	<i>WRKY22, GSTI</i>	gene	Shi et al. 2014
	Alternaria brown spot (<i>Alternaria alternata</i>)	NA	SSR/SNP	Cuenca et al. 2013
	Citrus tristeza virus (CTV)	<i>Ctv</i>	QTL	Asins et al. 2012
	Citrus leprosis virus (CiLV)	<i>CiLV</i>	QTL	Bastianel et al, 2009
	Citrus tristeza virus (CTV)	<i>Ctv</i>	gene	Deng et al. 2001
	Nematode	NA	QTL	Ling et al. 2000
	Citrus tristeza virus (CTV)	<i>Ctv2</i>	RAPD/RFLP	Fang et al. 1999
	Citrus tristeza virus (CTV)	<i>Ctr</i>	SCAR	Deng et al. 1997
	Citrus tristeza virus (CTV)	<i>Ctv</i>	RAPD	Mestre et al. 1997
	Citrus tristeza virus (CTV)	<i>Ctv</i>	RAPD	Gmitter et al. 1996
Morphological traits	Citrus tristeza virus (CTV)	<i>Rcan6, Rcan6</i>	Gene	US, patent No. 07126044
	Self-incompatibility (S allele)	S allele	RAPD	Kim et al. 2013
	Polyembryony	<i>Msg-2</i>	gene	Nakano et al. 2013
	Morphological traits	NA	QTL	Sahin-Cevik and Moore 2012
	Seedlessness	NA	RAPD	Chavez and Chaparro 2011
	Fruit setting in young citrus	NA	QTL	Gulsen et al. 2011
	Seedlessness	NA	AFLP/SCAR	Xiao et al. 2009
	Polyembryony	NA	SCAR	Nakano et al. 2008
	Polyembryony	NA	SCAR	Kang et al. 2008
	Yield and seed number	NA	QTL	Garcia et al. 2000
	Apomixis	<i>Apo2</i>	QTL	Garcia et al. 1999
	Fruit acidity	NA	RAPD	Fang et al. 1997
	Male sterility		SCAR	Korea, patent No. 1010996240000
Stress tolerance	Freeze tolerance	NA	QTL	Weber et al. 2003
	Na ⁺ /Cl ⁻ accumulated trait	NA	QTL	Tozlu et al. 1999
Detection (Pathogens, zygotes etc.)	Zygotic hybrids		RAPD	Jin et al. 2015
	Zygotic hybrids		SSR	Yildiz et al. 2013
	Citrus canker		SSR	Ngoc et al. 2009
	Citrus black spot (<i>Guignardia citricarpa</i>)		RAPD	Stringari et al. 2009
	Citrus canker	<i>hrpW</i>	gene	Korea, patent No. 1005995250000
	Citrus greening disease (HLB, <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>)	miRNA, siRNA	miRNA, siRNA	US, patent No. 20140134266
	Citrus greening disease (HLB)		gene	China, patent No. 103525943
	Citrus pathogens		oligonucleotide	China, patent No. 101956023
Citrus greening disease (HLB)		protein	US, patent No. 20140127718	

2014; Chen and Gmitter 2013; Liu et al. 2013; Wu et al. 2014; Xu et al. 2013), 형질연관 마커의 개발은 아직 이루어지고 있지 않다. Table 1에서와 같이 분자유전학적 방법을 토대로 일부 분자마커가 개발되어 왔으나, 이들을 활용한 분자유전학을 위해서는 더 다양한 형질과 연관된 마커가 개발되어야 한다. 특히, 과수의 특성상 이미 개발된 마커

들이 다른 품종에서는 적용이 잘 안되는 점도 나타나고 있다. 따라서 감귤 유전체를 활용하여 대량의 분자마커들을 지속적으로 개발할 필요가 있으며, 다양한 형질과 품종 연관 마커의 개발도 시급한 실정이다.

감귤 유전체 연구 향후 전망

현재까지 2개 감귤 품종(‘발렌시아’ 스위트 오렌지, ‘클레멘타인’ 클레멘타인 만다린)에 대한 고품질의 표준 유전체가 완성된 상태이다. 유용 핵심자원, 변이체(아조변이, 주심배 유래 변이 등), 교배 분리집단 등에 대해 표준유전체 기반 유전체 및 전사체 분석, 비교유전체 분석, GBS (genotyping-by-sequencing) 등을 통해 유용 유전자, 변이 유전자, 형질연관 분자마커 발굴 등에 관한 연구가 가속화될 것으로 전망된다. 2014년 일본 시즈오카에서 열린 감귤 생명공학 심포지엄에서 확보한 정보에 의하면 일본의 경우, 50여 개의 감귤 품종에 대한 유전체 및 전사체 해독을 진행하고 있다. 따라서 향후, 본격적인 유전체 기반 감귤류 품종 육성 경쟁이 매우 치열해질 것으로 전망된다. RNA-seq을 이용한 전사체 분석을 통해 조직 발달 단계, 다양한 내·외부 환경 변화 등에 따른 유전자 발현에 대한 정보를 확보하고, 이를 바탕으로 co-expression 네트워크 분석을 수행함으로써 유전자 발현 조절과 유전자 기능 연구 등도 활발히 이루어질 것이다(Du et al. 2015; Wong et al. 2014)

고품질의 표준 유전체 서열이 확보됨으로써 염기서열 기반의 다양한 다형성 분자마커(SSR, SNP, InDel 등)들이 발굴되고 있다. 이들을 활용한 고밀도 유전자 연관지도가 일부 작성되었거나 작성될 것이며, 또한 빠른 시일 내에 분자마커 기반의 유전자 연관지도와 서열 기반의 물리지도가 통합될 것이다. 통합 유전자 지도를 통해 병해충 저항성, 감귤 특유의 식물학적 특성 및 과실 품질관련 유전자들에 대한 상세 연관분석, 유전자 클로닝 및 유전자 기능 검정 등이 비교적 용이하게 이루어질 것이다.

유전자 변형 기술이 작물의 수량성, 품질, 병저항성 등 다양한 형질을 개선시키기 위하여 광범위하게 사용되고 있다. 최근에 개발되었으며, 2014년 Nature 선정 10대 미래 기술의 하나인 Cas9/single guide RNA (sgRNA)와 같은 표적 유전체 교정(targeted genome editing) 기술이 식물을 유전적으로 변형시키기 위해 성공적으로 사용되고 있다(Gaj et al. 2013; Woo et al. 2015). 감귤에서도 스위트 오렌지를 재료로 유전체 교정을 위한 시도가 이루어지고 있다(Jia and Wang, 2014). 유전체 편집 기술은 감귤 형질 개선이나 유전자 기능 연구뿐만 아니라 SNP 분자마커의 검증에 대한 연구에도 중요하게 활용될 것으로 전망된다. 유전체 편집 기술을 접목시키기 위해서는 조직배양 및 형질전환 체계 등이 잘 확립되어야 한다. 감귤의 경우, 다양한 방법을 통해 다양한 유전자들에 대해 여러 품종의 형질전환이 이루어지고 있다(Bachchu et al. 2011; Donmez et al. 2013; Han et al. 2005). 감귤은 유전체 편집 기술의 적용을 위한 기반이 잘 구축되어 있으므로 앞으로 감귤 분자유종이 매우 효율적으로 이루어질 수 있을

것으로 전망된다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청 Golden Seed 프로젝트 사업(원예종자사업단, 과제번호 : 213003-04-3-SBS10)에 의해 이루어진 것임.

적 요

감귤은 전 세계적으로 가장 많이 생산되는 주요 과수작물이고 비타민 C와 구연산 및 감귤 고유의 플라보노이드를 비롯한 다양한 기능성 성분으로 인해 건강 기능성 식품 소재로도 각광받고 있다. 그러나 긴 유년기와 배우체 불임, 주심배 발생 및 고도의 유전적 잡종성 등 감귤 특유의 생식생물학적 특성으로 인해 교배를 통한 전통 육종의 품종개발에 있어서는 가장 어려운 작물에 속한다. 지구 온난화, 소비자 욕구 변화 등으로 인해 고품질 감귤의 안정적 생산과 품종 다양화를 위한 체계적 육종 프로그램의 도입이 시급한 실정이다. 감귤에서도 분자 육종 프로그램을 통한 품종 육성을 위해 세계적으로 가장 많이 재배되는 스위트 오렌지와 클레멘타인 만다린에 대한 고품질 표준 유전체 정보가 최근에 확보되었다. 표준유전체 서열을 기반으로 다양한 품종 및 교배집단들에 대한 유전체 해독, 비교유전체 분석, GBS 등을 통해 형질연관 마커 발굴, 유전자 기능 연구 등이 이루어질 것으로 전망된다. 아울러 다양한 전사체 분석이 이루어지고 있으며, 유전자 기능 및 유전자 co-expression 네트워크의 이해를 증진할 수 있을 것이다. 유전체 및 전사체 분석을 통해 확보한 대규모 SNP, InDel 및 SSR의 다형성 분자마커 big data를 이용한 고밀도 연관 및 물리 지도 작성이 이루어지고 있고, 궁극적으로 통합지도 작성이 이루어지게 될 것이다. 이를 통해 가까운 장래에 감귤 특이 주요 농업형질 연관 유전자의 정확도 높은 map-based 클로닝 및 빠르고 효율적인 분자표지 선발육종이 이루어질 것이다.

References

- Asins MJ, Fernandez-Ribacoba J, Bernet GP, Gadea J, Cambra M, Gorrís 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
- Bachchu MAA, Jin SB, Park JW, Boo KH, Sun HJ, Kim YW, Lee HY, Riu KZ, Kim JH (2011) Functional expression of

- miraculin, a taste-modifying protein, in transgenic Miyagawa Wase satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) J Korean Soc Appl Biol Chem 54:24-29
- Bastianel M, Cristofani-Yaly M, de Oliveira AC, Freitas-Astua 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
- Benavente-García O, Castillo J (2008) Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. J Agric Food Chem 56:6185-6205
- 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
- Boo KH, Kim DW, Kim S, Jin SB, Kim JH, Lee HY, Riu KZ (2007) Construction and profiling of a cDNA library from young fruit of satsuma mandarin. J Plant Biol 50:403-409
- Carbonell-Caballero J, Alonso R, Ibañez V, Terol J, Talon M, Dopazo J (2015) A phylogenetic analysis of 34 chloroplast genomes elucidates the relationships between wild and domestic species within the genus *Citrus*. Mol Biol Evol 32:2015-2035
- 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, Zhou P, Choi YA, Huang S, Gmitter Jr FG (2006) Mining and characterization microsatellites from citrus ESTs. Theor Appl Genet 112:1248-1257
- Chen C, Bowman KD, Choi YA, Dang PM, Rao MN, Huang S, Soneji JR, Greg McCollum T, Gmitter Jr FG (2008) EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. 4:1-10
- Chen C, Gmitter Jr FG (2013) Mining of haplotype-based expressed sequence tag single nucleotide polymorphisms in citrus. BMC Genomics 14:746
- 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
- de Paula Santos Martins C, Pedrosa AM, Du D, Gonçalves LP, Yu Q, Gmitter Jr FG, Costa MG (2015) Genome-wide characterization and expression analysis of major intrinsic proteins during abiotic and biotic stresses in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.). PLoS One 10:e0138786
- Deng ZN, Huang S, Xiao SY, Gmitter FG (1997) Development and characterization of SCAB markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata*. Genome 40:697-704
- Deng Z, Tao Q, Chang YL, Huang S, Ling P, Yu C, Chen C, Gmitter Jr FG, Zhang HB (2001) 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
- Donmez D, Sismek O, Izgu T, Kacar YA, Mendi YY (2013) Genetic transformation in *Citrus*. Scientific World J 2013:491207
- Du D, Rawat N, Deng Z, Gmitter Jr FG (2015) Construction of citrus gene coexpression networks from microarray data using random matrix theory. Hortic Res 2:15026
- 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
- Food and Agricultural Organization (FAO) (2014) FAOSTAT. <http://www.fao.org/>
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Casbased methods for genome engineering. Trends Biotechnol 31:397-405
- Garcia 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
- Garcia MR, Asins MJ, Carbonell EA (2000) QTL analysis of yield and seed number in *Citrus*. Theor Appl Genet 101:487-493
- Gmitter FG, 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 Jr FG, Chen C, Machado MA, de Souza AA, Ollitrault P, Froehlicher Y, Shimizu T (2012) Citrus genomics. Tree Genet Genomes 8:611-626
- Goff et al., (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science 296:92-100
- 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
- Guo F, Yu H, Xu Q, Deng X (2015) Transcriptomic analysis of differentially expressed genes in an orange-pericarp mutant and wild type in pummelo (*Citrus grandis*) BMC Plant Biol 15:44
- 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
- HersHKovotz V, Sela N, Taha-Salaime L, Liu J, Rafael G, Kessler C, Aly R, Levy M, Wisniewski M, Droby S (2013) De-novo assembly and characterization of the transcriptome of *Metschnikowia fructicola* reveals differences in gene expression following interaction with *Penicillium digitatum* and grapefruit peel. BMC Genomics 14:168
- Hou XJ, Li SB, Liu SR, Hu CG, Zhang JZ (2014) Genome-wide classification and evolutionary and expression analyses of citrus MYB transcription factor families in sweet orange. PLoS One 9:e112375
- Hu XM, Shi CY, Liu X, Jin LF, Liu YZ, Peng SA (2015)

- Genome-wide identification of citrus ATP-citrate lyase genes and their transcript analysis in fruits reveals their possible role in citrate utilization. *Mol Genet Genomics* 290:29–38
- Iranshahi M, Rezaee R, Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F (2015) Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. *Life Sci* 137:125–32
- Islam MZ, Hu XM, Jin LF, Liu YZ, Peng SA (2014) Genome-wide identification and expression profile analysis of citrus sucrose synthase genes: investigation of possible roles in the regulation of sugar accumulation. *PLoS One* 9:e113623
- Jia H, Wang N (2014) Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One* 9:e93806
- Jiao WB, Huang D, Xing F, Hu Y, Deng XX, Xu Q, Chen LL (2013) Genome-wide characterization and expression analysis of genetic variants in sweet orange. *Plant J* 75:954–964
- Jin SB, Yun SH, Park JH, Park SM, Koh SW, Lee DH (2015) Early identification of citrus zygotic seedlings using pollen-specific molecular markers. *Korean J Hort Sci Biotechnol* 33:598–604
- Kang SK, Yun SH, Lee DH (2008) Development a SCAR marker linked to polyembryonic trait in citrus. *Korean J Hort Sci Tech* 26:51–55
- Kato M, Matsumoto H, Ikoma Y, Kuniga T, Nakajima N, Yoshida T, Yano M (2007) Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes and carotenoid cleavage dioxygenase genes during fruit maturation in the juice sacs of ‘Tamami’, ‘Kiyomi’ tangor, and ‘Wilking’ mandarin. *J Japan Soc Hort Sci* 76:103–111
- 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
- Lee M, Park J, Lee H, Sohn SH, Lee J (2015) Complete chloroplast genomic sequence of *Citrus platymamma* determined by combined analysis of Sanger and NGS data. *Hort Environ Biotechnol* 56:704–711
- Liang M, Yang X, Li H, Su S, Yi H, Chai L, Deng X (2015) De novo transcriptome assembly of pummelo and molecular marker development. *PLoS One* 10(3):e0120615
- Ling P, Duncan LW, Deng Z, Dunn D, Hu X, Huang S, Gmitter FG (2000) Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. *Theor Appl Genet* 100:1010–1017
- Liu SR, Li WY, Long D, Hu CG, Zhang JZ (2013) Development and characterization of genomic and expressed SSRs in citrus by genome-wide analysis. *PLoS One* 8:e75149
- Longley AE (1925) Polycary, polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. *J Wash Acad Sci* 15:347–351
- Martinelli F, Uratsu SL, Albrecht U, Reagan RL, Phu ML, Britton M, Buffalo V, Fass J, Leicht E, Zhao W, Lin D, D’Souza R, Dacis CE, Bowman KD, Dandekar AM (2012) Transcriptome profiling of citrus fruit response to huanglongbing disease. *PLoS One* 7(5):e38039
- Meiyanto E, Hermawan A, Anindyajati (2012) Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pac J Cancer Prev* 13:427–436
- Mestre PF, Asins MJ, Pina JA, Carbonell EA, Navarro L (1997) Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L) Raf. *Theor Appl Genet* 94:458–464
- Moore GA (2001) Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends Genet* 17:536–540
- 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, OX, UK, pp 19–43
- Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet* 100:1155–1166
- Ngoc LBT, Verniere C, Vital K, Guerin F, Gagnevin L, Brisse S, Ah-You N, Pruvost O (2009) Development of 14 minisatellite markers for the citrus canker bacterium, *Xanthomonas citri* pv. *Citri*. *Mol Ecol Resources* 9:125–127
- Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Duperray C (1994) Nuclear genome variation in *Citrus*. *Fruits* 49:390–393
- 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
- Orhan IE, Nabavi SF, Daglia M, Tenore GC, Mansouri K, Nabavi SM (2015) Naringenin and atherosclerosis: a review of literature. *Curr Pharm Biotechnol* 16:245–251
- Park JW, Lee HY, Riu KZ, Yun SH, Kim JH, Boo KH, Jin SB, Bachchu MAA, Kim YW, Lee DS (2010) Expression profiling of cultivar-related genes in satsuma mandarins, Miyagawa Wase and Ueno Wase. *J. Kor Soc Appl Biol Chem* 53:691–701
- Park JW, Jin SB, Boo KH, Chung SJ, Yun SH, Bachchu MAA, Yun JH, Han SI, Riu KZ, Kim JH (2012) Comparative analysis among four citrus species by DNA microarray. *Kor J Breed Sci* 44:229–237
- Redwan RM, Saidin A, Kumar SV (2015) Complete chloroplast genome sequence of MD-2 pineapple and its comparative analysis among nine other plants from the subclass Commelinidae. *BMC Plant Biol* 15:196
- Sahin-Cevik M, Moore GA (2012) Quantitative trait loci analysis of morphological traits in *Citrus*. *Plant Biotechnol Rep* 6:47–57
- Shalom L, Samuels S, Zur N, Shlizerman L, Doron-Faigenboim A, Blumwald E, Sadka A (2014) Fruit load induces changes in global gene expression and in abscisic acid (ABA) and indole

- acetic acid (IAA) homeostasis in citrus buds. *J Exp Bot* 65:3029–3044
- Shi Q, Febres VJ, Jones JB, Moore GA (2014) Responsiveness of different citrus genotypes to the *Xanthomonas citri* ssp. citri-derived pathogen-associated molecular pattern (PAMP) flg22 correlates with resistance to citrus canker. *Mol Plant Pathol* 16:507–520
- Stringari D, Glienke C, de Christo D, Maccheroni W, de Azevedo JL (2009) High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the citrus black spot. *Brazilian Arch Biol Technol* 52:1063–1073
- Sugiyama A, Ikoma Y, Fujii H, Shimada T, Endo T, Shimizu T, Omura M (2010) Structure and expression levels of alleles of *Citrus* zeaxanthin epoxidase genes. *J Japan Soc Hort Sci* 79:263–274
- Su HJ, Hogenhout SA, Al-Sadi AM, Kuo CH (2014) Complete chloroplast genome sequence of Omani lime (*Citrus aurantiifolia*) and comparative analysis within the Rosids. *PLoS One* 9:e113049
- Suh SJ, Lee SH, Lee DH, Kim IJ (2013) Transcriptome analysis of a spontaneous reddish mutant in Miyagawa Wase satsuma mandarin. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 56:391–399
- Talon M, Gmitter Jr FG (2008) Citrus genomics. *Inter J Plant Genomics* Article ID 528361
- Terol J, Tadeo F, Ventimilla D, Talon M (2015) An RNA-Seq-based reference transcriptome for citrus. *Plant Biotechnol J* doi: 10.1111/pbi.12447.[Epub ahead of print]
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815
- Torres AM, Mau-Lastovicka T, Williams TE, Soost RK (1985) Segregation distortion and linkage of *Citrus* and *Poncirus* isozyme genes. *J Hered* (1985) 76:289–294
- Tozlu I, Guy CL, Moore GA (1999) 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
- Wang J, Chen D, Lei Y, Chang JW, Hao BH, Xing F, Li S, Xu Q, Deng XX, Chen LL (2014) *Citrus sinensis* annotation project (CAP): a comprehensive database for sweet orange genome. *PLoS One* 9:e87723
- Wang Y, Zhou L, Li D, Dai L, Lawton-Rauh A, Srimani PK, Duan Y, Luo F (2015) Genome-wide comparative analysis reveals similar types of NBS genes in hybrid *Citrus sinensis* genome and original *Citrus clementine* genome and provides new insights into non-TIR NBS genes. *PLoS One* 10:e0121893
- Weber CA, Moore GA, Deng Z, Gmitter FG (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
- Wong DCJ, Sweetman C, Ford CM (2014) Annotation of gene function in citrus using gene expression information and co-expression networks. *BMC Plant Biol* 14:186
- 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 (2013) Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nat Biotech* 32:656–662
- Wu J, Xu Z, Zhang Y, Chai L, Yi H, Deng X (2014) An integrative analysis of the transcriptome and proteome of the pulp of a spontaneous late-ripening sweet orange mutant and its wild type improves our understanding of fruit ripening in citrus. *J Exp Bot* 65:1651–1671
- 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
- Xie R, Pang S, Ma Y, Deng L, He S, Yi S, Lv Q, Zheng Y (2015) The ARF, AUX/IAA and GH3 gene families in citrus: genome-wide identification and expression analysis during fruitlet drop from abscission zone A. *Mol Genet Genomics* 290:2089–2105
- Xu Q et al. (2013) The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat Genet* 45:59–66
- Yang CQ, Liu YZ, An JC, Li S, Jin LF, Zhou GF, Wei QJ, Yan HQ, Wang NN, Fu LN, Liu X, Hu XM, Yan TS, Peng SA (2013) Digital gene expression analysis of corky split vein caused by boron deficiency in ‘Newhall’ navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck) for selecting differentially expressed genes related to vascular hypertrophy. *PLoS One* 8(6):e65737
- 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* 44:382–93
- Yildiz E, Kaplankiran M, Demirkeser 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
- Yu K, Xu Q, Da X, Guo F, Ding Y, Deng X (2012) Transcriptome changes during fruit development and ripening of sweet orange (*Citrus sinensis*). *BMC Genomics* 13:10
- Zhang JZ, Zhao K, Ai XY, Hu CG (2014) Involvements of PCD and changes in gene expression profile during self-pruning of spring shoots in sweet orange (*Citrus sinensis*). *BMC Genomics* 15:892
- Zhong Y, Cheng CZ, Jiang NH, Jiang B, Zhang YY, Wu B, Hu MI, Zeng JW, Yan HX, Yi GJ, Zhong GY (2015) Comparative transcriptome and iTRAQ proteome analyses of citrus root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. *PLoS One* 10:e0126973