리보솜 DNA의 ITS 영역을 이용한 제주도 재래감귤 ‘병굴’의 유전적 근연관계

진성범¹ · 박재호¹ · 박석만¹ · 이동훈² · 윤수현^{1*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤연구소, ²농촌진흥청 국립원예특작과학원 기획조정과

Genetic Phylogenetic Relationship of the Jeju Native *Citrus* ‘Byungkyool’ (*Citrus platymamma* Hort. ex Tanaka) using ITS (Internal Transcribed Spacer) Region of Nuclear Ribosomal DNA

Seong Beom Jin¹, Jae Ho Park¹, Suk Man Park¹, Dong Hoon Lee², and Su Hyun Yun^{1*}

¹Citrus Research Institute, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Jeju 63607, Korea

²Planning and Coordination Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Wanju 55365, Korea

Abstract : The 12 cultivars of the Jeju native *Citrus* are considered to have originated from China. However, the origin of the cultivar ‘Byungkyool’ (*Citrus platymamma* Hort. ex Tanaka) is not clearly known. We performed PCR analysis by using three primer sets designed from the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA (nrDNA) to analyze the phylogenetic relationship between the traditional citrus cultivars and the Byungkyool cultivar. Sequence length of the nrDNA ITS1 region of JNCPCRI (Jeju Native *Citrus platymamma* Citrus Research Institute) cultivar was 247 bp, 8th ITS2 region was 228 bp and the total ITS region (ITS1-5.8S-ITS2) was 638 bp. Analysis of the genetic relationship based on the sequence analysis at the ITS region of the JNCPCRI cultivar revealed that the ITS1 region of the cultivar was genetically the same as that of the Byungkyool (JQ990189) cultivar, and the ITS2 region was genetically similar to the Binkyool (JQ990180), Hongkyool (JQ990178), Danyooja (JQ990179), and Pyunkyool (JQ990181) cultivars. Moreover, the total ITS region in the 5.8S rDNA region was genetically similar to the Cheongkyool (JQ990183) cultivar and has been reported to originate from the Binkyool (JQ990180) and Pyunkyool (JQ990181) cultivars. Although the JNCPCRI cultivar was morphologically the same as the Byungkyool (JQ990189) cultivar, the ITS region showed genetic heterogeneity. Taken together, we conclude that the genetic variation in the ITS region of JNCPCRI cultivar suggests that it was propagated through fertilization with the surrounding citrus cultivars.

Keywords : Byungkyool (*Citrus platymamma* Hort. ex Tanaka), nrDNA, ITS, JNCPCRI, Phylogenetic relationship

서 언

예로부터 제주도 재래감귤 품종은 한방에서 진피 등으로 불리며 한약재료로 널리 이용되어 왔으며(Kim et al. 1979), 최근 들어 재래감귤 품종들은 향산화작용(Kim et al. 2009a, Yu et al. 2014), 항염증 효과 (Hyun et al. 2015, Yang et al. 2009), 활성 산소종 소거활성 (Kim et al. 2009b), 신경면역

기능 향상(Ko & Lee 2015) 등의 효과가 있다는 것이 보고되고 있다.

제주도내 재배되었던 재래감귤 품종들로는 금굴, 감자, 당감자, 산굴, 청굴, 동정굴, 유감, 당유자, 홍굴, 유자, 당금굴, 석금굴, 왜굴, 편굴, 사두감, 주감, 광굴, 빈굴, 지각, 병굴, 진굴 등 22개 품종들이 알려지고 있으나(Kim et al. 2001), 이 재래감귤 품종 중 생식용으로는 맛이 없고 품질이 떨어지는 품종들은 차차 새로운 품종으로 개량되어 지금은 병굴, 당유자, 유자, 청굴, 동정굴, 홍굴, 진굴 등 12가지 품종만이 보존되고 있다 (Kim et al. 2001). 고문서에 따르면 이 재래감귤 품종들은

*Corresponding author (E-mail: yunsh04@korea.kr + 82-64-730-4106 Fax: + 82-64-733-9564)

(Received on June 29, 2016. Accepted on August 31, 2016.)

선사시대부터 제주도에서 자생한 것으로 추정되며, 분명한 기원에 대해서는 불명확한 상태이다(Jung et al. 2005). 최근, 미국 식물 유전자원 시스템(U.S. National Plant Germplasm System)에 따르면(USDARS 2016), 이들 대부분의 품종들은 중국 혹은 일본 등 아시아 지역에 분포되어 있음을 알 수 있으나, 병굴 품종에 대한 정확한 분류학적 연구라든지 기원 연구는 미흡한 실정이다.

감귤에서 계통분류학적 연구는 형태학적(Barrett & Rhodes 1976, Scora 1975), 생화학적(Hirai et al. 1986, Herrero et al. 1996) 그리고 isozyme(Herrero et al. 1996), restriction fragment length polymorphism(RFLP)(Federici et al. 1998), random amplified polymorphic DNA(RAPD)(Deng et al. 1995), inter simple sequence repeat(ISSR)(Gulsen & Roose 2001), simple sequence repeat(SSR)(Luro et al. 2008) 등과 같은 분자마커를 이용하여 주로 연구되었다. 이들 분자마커 기술은 많은 식물들의 분류학적 연구에 광범위하게 이용되고 있다(Hazarika et al. 2014, Jung et al. 2005, Tingey & Tufo 1993, Whitkus et al. 1994). 또한, 세포질내에 존재하는 엽록체 및 미토콘드리아 게놈의 유전자 및 유전자간 염기서열 변이를 활용한 연구가 이용되고 있다(Cheng et al. 2005, Deng et al. 2007, Froelicher et al. 2011, Jung et al. 2005, Olmstead & Palmer 1994, Penjor et al. 2013). 최근에는 세포질내에 존재하는 18S, 5.8S, 28S rRNA를 암호화하는 종 보존부위인 핵 리보솜 DNA(nuclear ribosomal DNA, nrDNA)내 Internal Transcribed Spacer(ITS) 영역은 감귤류 분류군들에 대한 계통분류학적 연구에 광범위하게 이용되고 있다(Baldwin et al. 1995, Hynniewta et al. 2014, Pessina et al. 2011, Sun et al. 2015, Xu et al. 2006). ITS 영역은 핵 게놈에 존재하며 nrDNA 영역의 일부로 반복적인 염기서열 형태로 구성되어 있으며 양친으로부터 유전되는 특성을 갖고 있다. rRNA 영역은 근연종간에 거의 유전적 변이가 없는데 반하여 ITS 영역은 비교적 변이가 많이 일어나므로 종속 구별에 있어서 유익하게 이용되고 있다.

제주감귤의 계통발생과 관련된 연구들로는 형태학적 특징(Kim 1988), isozymes(Moon et al. 1992), RAPD 분석(Oh 1996), 엽록체의 게놈을 이용한 분석을 통하여 연구되고 있다. 그러나 이들 분석 방법들은 돌연변이에 의한 품종들간을 구별하기 힘들고(Rahman et al. 2001), 재현성이 떨어진다는 단점을 갖고 있다(Hazarika et al. 2014). 또한, 일부 교잡종들은 양친의 미토콘드리아가 유전된다는 점에서 모계유전과 관련된 엽록체의 게놈을 이용한 분석 방법은 계통발생 분류에 있어 오류가

발생할 수 있다는 단점을 갖고 있다(Froelicher et al. 2011). 따라서, 본 연구에서는 양친으로부터 유전되는 특성을 갖고 있는 ITS 영역의 염기서열을 이용하여 본 연구소 내 재배되고 있는 병굴 품종과 GenBank에 등록된 병굴 품종간의 유연관계 분석과 재래감귤 품종들 간의 계통분류학적 유연관계를 조사하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 전체 게놈 DNA 추출

본 연구에 사용된 제주도 재래감귤 12품종[진귤(*Citrus sunki* Hort. ex Tanaka), 지각(*Citrus aurantium* L.), 병굴(*Citrus platymamma* Hort. ex Tanaka), 동정굴(*Citrus erythrosa* Hort. ex Tanaka), 홍굴(*Citrus tachibana* Tanaka), 청굴(*Citrus nippokoreana* Tanaka), 당유자(*Citrus grandis* Osbeck), 소유자(*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka), 사두감(*Citrus pseudogulgal* Hort. ex Tanaka), 감자(*Citrus benikoji* Hort. ex Tanaka), 빈굴(*Citrus leiocarpa* Hort. ex Tanaka), 편굴(*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka)]의 잎들은 2015년 9월 14일 감귤 연구소 내 보존 재배되고 있는 품종들로부터 수집하였다. 재래감귤 12품종의 잎들에 대한 전체 게놈 DNA 추출은 Automatic Nuclear extraction(MX 16, Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 추출하였다. 추출한 식물 전체 게놈 DNA는 -70℃에 보관하여 실험에 사용하였다.

ITS 영역 염기서열 구성 및 프라이머 디자인

재래감귤 중 병굴 품종의 계통분류학적 연구를 위한 프라이머 디자인은 핵 게놈에 존재하며 핵 리보솜 DNA 영역을 구성하고 있는 모든 유전자들을 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 GenBank에 등록된 염기서열을 다운받아 이용하였다.

18S ribosomal RNA 영역의 유전자 염기서열은 손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica*: Accesion No. AB250211), 기주밀감(*C. kinokuni*: Accesion No. JQ990159), 자몽(*Citrus x paradisi*: Accesion No. FJ641956), 감자(*C. benikoji* Hort. ex Tanaka: Accesion No. JQ990186) 그리고 당유자(*C. grandis* Osbeck: Accesion No. JQ990179)의 공통된 부분을 갖고 있는 18S ribosomal RNA 유전자부위로 구성하였고, ITS1, 5.8S ribosomal RNA, ITS2, 28S ribosomal RNA 유전자의 염기서열 구성은 기주밀감(Accesion No. JQ990159)의 유전자부위를 이용하였다.

ITS1 영역의 유전자를 증폭시키기 위하여, ITS1F1의 프라이머는 18S rDNA와 ITS1 부위를 포함하도록 제작하였고 ITS1R1의 프라이머는 ITS1와 5.8S rDNA 부위를 포함하도록 디자인하였다. 구성된 프라이머 조합은 PCR에 사용하였다.

ITS 영역의 PCR 증폭 및 산물 정제

핵 ribosomal DNA의 ITS1 그리고 ITS2 부위에 대한 PCR 증폭 산물을 얻기 위하여, ITS1과 ITS2 부위를 포함하고 있는 ITS1F1-ITS1R1 그리고 ITS2F2-ITS2R2 프라이머 조합을 PCR 증폭에 사용하였다(Fig. 1A). 또한, ITS1부터 ITS2까지의 ITS 전체 영역(ITS1-5.8S-ITS2)을 PCR 증폭시키기 위하여 ITS1F1와 ITS2R2 프라이머를 이용하였다(Fig. 1A). ITS 영역의 증폭을 위한 PCR 반응액은 AccuPower PCR Premix(Bioneer, Corp., Daejeon, Korea)[250 μ M dNTP, 1.5mM MgCl₂, 1.0unit Taq DNA polymerase, 10mM Tris-HCl(pH 9.0), 40mM KCl]에 주형 DNA 25-50ng 그리고 0.5pmol의 프라이머를 첨가하여 20 μ l로 조정하여 사용하였다. ITS 영역의 PCR 반응은 Takara PCR Thermal cycle(Takara, Bio Inc., Japan)에서 35cycle를 실시하였으며, denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 30초, annealing은 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 그리고 extension을 72 $^{\circ}$ C에서 40초간 수행하였다. 증폭된 PCR 생성물은 1.2% agarose gel에서 100V로 30분 동안 전기영동 하여 나타나는 밴드로 확인하였다. Agarose gel에서 확인된 PCR 증폭 산물은 GgenAll[®] Gel 정제 kit(GgenAll Biotechnology, Co., Seoul, Korea)를 이용하여 정제하였으며, 염기서열 결정은 (주) 솔젠트

(Solgent, Co., Daejeon, Korea)에 의뢰하였다.

ITS 영역의 sequence alignment 와 계통분석

본 연구소 내 재배되고 있는 재래감귤 병굴 품종에서 분리된 ITS 영역의 nucleotide (JNCPCRI)와 유전자 은행(GeneBank, NCBI)에 등록된(Sun et al. 2015) 다른 재래감귤 11품종들 간의 계통분석을 위하여, 재래감귤 11품종의 염기는 유전자 은행(GeneBank, NCBI)에서 다운받았다(Table 1). 모든 재래감귤의 염기서열은 fasta format으로 변환한 후 Bioedit(Hall, 1999)을 이용하여 편집하였으며 no gap으로 정렬한 후 multi Clustal W로 정렬하여 저장하였다. 계통학적 분석은 MEGA 5.0 프로그램을 사용하였고, 유전적 거리 계산은 kimura 2 - parameter를 이용하였으며, UPGMA기법으로 분계도를 작성하였다. 그리고 Bootstrap 값은 1,000회 반복하여 수행하였다.

결과 및 고찰

ITS 영역의 염기서열분석

본 연구는 재래감귤 12품종 중 JNCPCRI 병굴 품종에 대한 계통학적 유연관계분석을 위하여 ITS1, ITS2 그리고 전체 ITS 유전자 영역(ITS1-5.8S-ITS2)의 프라이머 조합을 이용하여 PCR를 수행하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 것처럼 JNCPCRI 병굴을 포함한 재래감귤 12품종들의 ITS1과 ITS2 영역은 약 225-300bp의 PCR 증폭산물을 얻었다. 또한 전체 ITS 유전자

Table 1. List of Jeju native *Citrus* cultivars used in this study and their relevant information of specimen voucher and NCBI accession number.

No.	Cultivars		Tribe	Specimen voucher	GenBank acc. No.
	Generic name	Scientific name			
1	Dangyooja	<i>C. grandis</i> Osbeck	<i>Cephalocitrus</i>	kk-70	JQ990179
2	Binkyool	<i>C. leiocarpa</i> Hort. ex Tanaka	<i>Sinocitrus</i>	kk-71	JQ990180
3	Pyunkyool	<i>C. tangerina</i> Hort. ex Tanaka	<i>Sinocitrus</i>	kk-72	JQ990181
4	Cheongkyool	<i>C. nippokoreana</i>	<i>Sinocitrus</i>	kk-74	JQ990183
5	Jikak	<i>C. aurantium</i> L.	<i>Sinocitrus</i>	kk-75	JQ990184
6	Sadookam	<i>C. pseudogulgul</i> Hort. ex Tanaka	<i>Sinocitrus</i>	kk-76	JQ990185
7	Kamja	<i>C. benikoji</i> Hort. ex Tanaka	<i>Sinocitrus</i>	kk-77	JQ990186
8	Dongjeongkyool	<i>C. erythrosa</i> Hort. et Tanaka	<i>Sinocitrus</i>	kk-78	JQ990187
9	Jinkyool	<i>C. sunki</i> Hort. ex Tanaka	<i>Sinocitrus</i>	kk-79	JQ990188
10	Byungkyool	<i>C. platymamma</i> Hort. ex Tanaka	<i>Sinocitrus</i>	kk-80	JQ990189
11	Hongkyool	<i>C. tachibana</i> Tanaka	<i>Sinocitrus</i>	kk-69	JQ990178

* This table was referenced results of Sun et al. (2015).

Fig. 1. Nucleotide sequence of nrDNA for the primer design of ITS regions and the of JNCPCR rDNA regions. A: Sequence of 18 S ribosomal RNA gene regions were constructed by of *Opuntia ficus-indica* (Acc. No. AB250211), *C. kinokuni* (Acc. No. JQ990159) and *Citrus x paradisi* (Acc. No. FJ641956). ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 28S rRNA gene region were constructed by sequence of *C. kinokuni* (Acc. No. JQ990159). ITS1 and ITS2 spacer region gene was underlined. 18S, 5.8 and 28S ribosomal RNA gene regions were expressed by double arrow. ITS1F1, ITS1R1, ITS2F2 and ITS2R2 primers site were described by block box. B: JNCPCR cultivar used in this study is 'Byungkyool' (*C. platymamma* Hort. ex Tanaka) harvested in Citrus Research Institute. ITS1 and ITS2 spacer region was underlined and ITS2 region was represented by the bold underline. 18S, 5.8 and 28S rDNA regions were expressed by double arrow.

Fig. 2. PCR amplification using the nuclear internal transcribed spacer of Jeju Native *Citrus*. A: Ribosomal-RNA - coding gene regions (18 S, 5.8 S and 28 S) and spacer regions (ITS1 and ITS2) are indicated in the boxes. The arrows denote the positions of primers for PCR amplification. B: ITS PCR amplification of Jeju Native *Citrus*. A) PCR amplification of ITS1 region (ITS1F1 and ITS1R1 primer use); B) PCR amplification of ITS2 region (ITS2F2 and ITS2R2 primer use); C) PCR amplification of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region (ITS1F1 and ITS2R2 primer use). M; 20 bp Takara marker, lane 1; 'Binkyool', lane 2; 'Cheongkyool', lane 3; 'Hongkyool', lane 4; 'Dongjeongkyool', lane 5; 'Kamja', lane 6; Jinkyool', lane 7; 'Byungkyool', lane 8; 'Yuzu', lane 9; 'Pyunkyool', lane 10; 'Dangyooja', lane 11; 'Sadookam' and lane 12; 'Jikak'.

영역에 대한 JNCPCRI 병굴을 포함한 재래감귤 12품종 들의 PCR 결과는 약 550-700bp 의 증폭산물을 획득하였다(Fig. 2B-C). 이 PCR 결과는 Sun et al. (2015)이 보고한 재래감귤 품종들의 ITS 영역에 대한 길이와 비슷하였다. 따라서, 이 프라이머 조합은 재래감귤의 계통학적 유연관계 분석에 적용 할 수 있을 것으로 사료된다.

이들 프라이머 조합들(Fig. 2A)을 이용하여 본 연구소 내에서 재배되고 있는 재래감귤의 ITS1(18S, 5.8S rDNA 영역의 프라이머 서열을 제외한) 염기서열 길이는 246-248bp, ITS2(5.8S, 28S rDNA 영역의 프라이머 영역을 제외한 염기서열의 길이는) 227-228bp였고, 전체 ITS(18S, 28S rDNA 영역의 프라이머 서열을 제외한)유전자 영역은 636-638bp였다(자료 미제시). 위 결과는 ITS 영역을 이용한 Sun et al. (2015)의 결과와 유사하였

으며, 병굴(JNCPCRI) 품종의 ITS1 영역 염기서열 정보는 Fig. 2B에서 보는 바와 같이 247bp, 5.8S ribosomal RNA 유전자의 염기서열 길이는 163bp 그리고 ITS2 영역의 염기서열 길이는 228bp이었고, 전체 ITS 유전자 영역의 염기서열 길이는 638bp였다. 또한, ITS1, 5.8S ribosomal RNA 그리고 ITS2 영역의 G(구아닌) 그리고 C(시토신)의 함량은 각각 70.85%, 54.60% 그리고 70.61%였다(Table 2). Table 2에서 보는 바와 같이 이전 연구자(Sun et al. 2015)의 병굴(JQ990189) 품종의 ITS1과 5.8S ribosomal RNA 유전자 영역의 염기서열 길이는 본 연구 결과와 같았다. 따라서 JNCPCRI 병굴 품종의 ITS1 영역은 GenBank에 등록된 병굴(JQ990189)의 유전자와 거의 비슷한 크기를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 그러나 JNCPCRI 병굴 품종의 ITS2 영역 염기서열 길이는 228bp로 GenBank에 등록된 병굴

Table 2. Sequence length and G+C content (%) of the JNCPCRI ITS gene region and comparison between JNCPCRI and 'Byungkyool' cultivar registered in the GenBank.

Cultivars	Sequence length (bp)			G+C content (%)		
	ITS1	5.8S	ITS2	ITS1	5.8S	ITS2
<i>JNCPCRI</i> ^{z)}	247	163	228	70.85	54.60	70.61
<i>C. platymamma</i> ^{y)}	247	163	227	70.85	54.60	70.48

^{z)} JNCPCRI cultivar using in this study was harvested in Citrus Research Institute and the full name of JNCPCRI is the Jeju Native Citrus platymamma Citrus Research Institute.

^{y)} It is 'Byungkyool' (*C. platymamma* Hort. ex Tanaka) registered in the GenBank (JQ990189).

(JQ990189)의 염기서열보다는 길이가 길며 G(구아닌) 그리고 C(시토신)의 함량 또한 70.61%로 높았다. JNCPCRI 병굴 품종의 ITS2 영역 염기에 대하여 NCBI Blast로 상동성을 조사한 결과 빈굴(JQ990180), 편굴(JQ990181) 그리고 홍굴(JQ990178) 품종들과는 90% 이상의 상동성을 보였으나, 병굴(JQ990189) 품종과는 약 61%로 나타나 큰 상동성을 보이지 않았다. 즉, 같은 제주도 지역 내 재배되고 있는 병굴 품종들이지만 이들 품종들 간에 차이를 보이는 이유는 재래감귤 품종들의 번식자체가 수분 수정을 통한 종자번식으로 자생되어 왔기 때문에 Sun et al. (2015)의 연구결과와 차이점을 보이는 것이라 생각된다.

ITS1 영역의 유전적 유연관계분석

JNCPCRI 병굴 품종과 GenBank에 등록된 재래감귤 11품종의 ITS1 영역에 대한 염기서열 분기값(Sequence divergency)은 Kimura 2 - parameter 방법으로 계산하였다. 그 결과 JNCPCRI 병굴 품종은 GenBank에 등록된 병굴(JQ990189) 품종과의 염기서열 분기값이 0로 다른 품종들에 비하여 염기서열의 다양성

정도가 가장 낮았으며, 염기서열이 동일한 것으로 확인되었다. 그 다음으로 홍굴(JQ990178) 품종이 0.00426로 병굴(JQ990189) 품종 다음으로 염기서열 다양성 정도가 가장 낮았다(Table 3). 또한, 빈굴(JQ990180), 청굴(JQ990183), 그리고 편굴(JQ990181) 3품종이 모두 0.00852, 동정굴(JQ990187) 그리고 지각(JQ990184) 2품종이 모두 0.00855, 당유자(JQ990179) 품종이 0.01282, 진굴(JQ990188) 품종이 0.02609 순으로 염기서열 다양성 정도가 낮았다(Table 3). 그러나 사두감(JQ990185), 감자(JQ990186) 품종의 염기서열 분기값은 각각 0.12647, 0.15205로 재래감귤 11품종 중 염기서열 다양성 정도가 가장 높았다. 즉, 유전적으로 상이한 품종일 것이라고 생각된다(Table 3). 또한, GenBank에 등록된 재래감귤 11품종의 ITS1 영역에 대한 염기들을 이용하여 JNCPCRI 병굴 품종간의 유전관계는 MEGA 5.0 프로그램으로 분석하여 Group I과 Group II의 2개 그룹의 분류군으로 나누었다(Fig. 3A). Group I은 청굴(JQ990183), 홍굴(JQ990178), 진굴(JQ990188), 지각(JQ990184), 당유자(JQ990179), 편굴(JQ990181), 동정굴(JQ990187), 빈굴(JQ990180), 병굴(JQ990189), 그리고

Table 3. Sequence divergences in the ITS1 gene regions of JNCPCRI cultivar and related Jeju Native *Citrus* Varieties.

No.	Cultivars	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	<i>C. aurantium</i> (JQ990184)												
2	<i>C. benikoji</i> (JQ990186)	0.15205											
3	<i>C. erythrosa</i> (JQ990187)	0.00855	0.14118										
4	<i>C. leiocarpa</i> (JQ990180)	0.01718	0.16269	0.01718									
5	<i>C. grandis</i> (JQ990179)	0.02152	0.16784	0.02152	0.00425								
6	<i>C. nippokoreana</i> (JQ990183)	0.01718	0.16269	0.01718	0.00000	0.00425							
7	<i>C. platymamma</i> (JQ990189)	0.00855	0.15205	0.00855	0.00852	0.01282	0.00852						
8	<i>C. pseudogulgul</i> (JQ990185)	0.13054	0.05732	0.12013	0.14083	0.14585	0.14083	0.13054					
9	<i>C. sunki</i> (JQ990188)	0.02609	0.15205	0.01724	0.03496	0.03938	0.03496	0.02609	0.13054				
10	<i>C. tachibana</i> (JQ990178)	0.01288	0.15758	0.01288	0.00425	0.00853	0.00425	0.00426	0.13583	0.03058			
11	<i>C. tangerina</i> (JQ990181)	0.01718	0.16269	0.01718	0.00000	0.00425	0.00000	0.00852	0.14083	0.03496	0.00425		
12	JNCPCRI	0.00855	0.15205	0.00855	0.00852	0.01282	0.00852	0.00000	0.13054	0.02609	0.00426	0.00852	

Analyses were conducted using the Kimura 2-parameter model. The analysis involved 12 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 236 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 5.

Fig. 3. Phylogenetic analysis of the nrDNA ITS region isolated in JNCPCRI and other Jeju Native *Citrus* Cultivars (registered in the GenBank). A: Phylogenetic analysis of the nrDNA ITS1 region, B: Phylogenetic analysis of the nrDNA ITS2 region, C: Phylogenetic analysis of the nrDNA total ITS region (ITS1-5.8S rDNA-ITS2)

JNCPCRI 병굴 품종들이 포함되어 있으며, Group II에는 사두감(JQ990185)과 감자(JQ990186) 품종으로 구성되어 있다(Fig. 3A). 또한, Group I은 빈굴(JQ990180), 편굴(JQ990181), 청굴(JQ990183), 당유자(JQ990179)로 구성된 Ia, 홍굴(JQ990178), 병굴(JQ990189), JNCPCRI 품종으로 구성된 Ib, 지각(JQ990184), 동정굴(JQ990187) 품종으로 구성된 Ic 그리고 단일로 구성된 Id 진굴(JQ990188) 품종의 4개 분계조로 다시 나누었다(Fig. 3A). ITS1 영역의 염기를 이용하여 JNCPCRI 병굴 품종과의 유연관계를 조사한 결과 JNCPCRI 병굴 품종은 Group Ib 속하며 GenBank에 등록된 병굴(JQ990189) 품종과는 100% 동일한 품종이며, 홍굴(JQ990178) 품종과는 형태학적으로 서로 다르나 ITS1 영역에 100% 일치하는 결과를 얻었다.

ITS2 영역의 유전적 유연관계분석

JNCPCRI 병굴 품종과 GenBank에 등록된 재래감굴 11품종의 ITS2 영역에 대한 염기서열 분기값(Sequence divergency)을 계산한 결과, 빈굴(JQ990189), 당유자(JQ990179), 홍굴(JQ990178), 편굴(JQ990181) 품종은 0.00886로 다른 재래감

굴 품종들에 비하여 염기서열의 다양성 정도가 가장 낮았다(Table 4). 즉 JNCPCRI 병굴 품종의 염기서열은 이 4품종의 염기서열과 비슷하며 유전적으로 유사하다는 것이 확인되었다(Table 4). 반면, GenBank에 등록된 병굴(JQ990189) 품종은 염기서열의 분기값이 0.04073으로 재래감굴 11품종 중 염기서열 다양성 정도가 3번째로 높았다(Table 4). Yao et al. (2010)의 보고에 따르면 ITS2 영역은 염기서열이 변화가 높게 나타나기 때문에 식물의 계통분류와 발생연구에 있어서 ITS1보다는 ITS2 영역의 염기를 이용한 연구들이 수행되고 있는데(Raveendar et al. 2015a, Raveendar et al. 2015b), 본 연구 결과에서도 ITS1 영역 보다는 ITS2 영역의 유전적인 변화가 많다는 것을 알 수 있었다. 따라서, 감굴의 계통분류와 발생연구에 있어서 ITS2 영역을 이용한 연구가 바람직하다고 생각된다. 그리고, ITS2 영역에 대한 염기들을 이용하여 JNCPCRI 병굴 품종과 재래감굴 품종간의 유연관계를 분석한 결과 Group I과 Group II의 2개의 분류군으로 나눌 수 있었고, Group I는 다시 3개의 분계조 나눌 수 있었다. JNCPCRI 병굴 품종은 Ia에 속하여 있으며, 빈굴(JQ990180), 당유자(JQ990179), 홍굴

Table 4. Sequence divergences in the ITS2 gene regions of JNCPCRI cultivar and related Jeju Native *Citrus* Varieties

No.	Cultivar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	<i>C. aurantium</i> (JQ990184)												
2	<i>C. benikoji</i> (JQ990186)	0.08955											
3	<i>C. erythrosa</i> (JQ990187)	0.04540	0.10896										
4	<i>C. leiocarpa</i> (JQ990180)	0.03160	0.09425	0.03614									
5	<i>C. grandis</i> (JQ990179)	0.03160	0.09425	0.03614	0.00000								
6	<i>C. nippokoreana</i> (JQ990183)	0.04088	0.10438	0.04080	0.00886	0.00886							
7	<i>C. platymamma</i> (JQ990189)	0.03610	0.09890	0.02697	0.03149	0.03149	0.03610						
8	<i>C. pseudogulgul</i> (JQ990185)	0.08468	0.01335	0.10391	0.08933	0.08933	0.09940	0.09393					
9	<i>C. sunki</i> (JQ990188)	0.02697	0.08915	0.04549	0.03150	0.03150	0.04075	0.03614	0.08426				
10	<i>C. tachibana</i> (JQ990178)	0.03160	0.09425	0.03614	0.00000	0.00000	0.00886	0.03149	0.08933	0.03150			
11	<i>C. tangerina</i> (JQ990181)	0.03160	0.09425	0.03614	0.00000	0.00000	0.00886	0.03149	0.08933	0.03150	0.00000		
12	JNCPCRI	0.04088	0.10438	0.04543	0.00886	0.00886	0.01784	0.04073	0.09940	0.04075	0.00886	0.00886	

Analyses were conducted using the Kimura 2-parameter model. The analysis involved 12 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 227 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 5.

(JQ990178), 편굴(JQ990181) 품종과 유전적으로는 가장 근연 관계에 있음이 확인되었다. 하지만, GenBank에 등록된 병굴(JQ990189) 품종은 동정굴(JQ990187)과 함께 Ic에 속하며 JNCPCRI 병굴 품종과는 유전적으로 유연관계가 멀다는 것이 확인되었다(Fig. 3B). 모든 재래감귤은 화분수정에 의하여 많은 종자를 생산할 수 있는 자가합성 품종들(Chae et al. 2012, Song et al. 2011, Yun et al. 2007)이며, 화분수정으로 인하여 유전적으로 다른 실생묘를 생산할 수 있는 유성배를 갖고 있다(Dhillon et al. 1993). 또한, 이들 품종들은 주변에 재배되고 있는 화분 임성의 높은 품종들과의 수정을 통하여 종자를 형성할 수 있는 자가합성 품종들이다(Chae et al. 2012, Song et al. 2011). 따라서 본 결과처럼 JNCPCRI 병굴 품종의 ITS2 영역 유전자가 빈굴(JQ990180), 당유자(JQ990179), 홍굴(JQ990178), 편굴(JQ990181) 품종들과 유전적으로는 근연관계에 있다는 것은 이들 품종들과 수정을 통하여 변이가 생긴 것으로 판단 할 수 있다.

전체ITS 영역의 유전적 유연관계분석

JNCPCRI 병굴 품종과 GenBank에 등록된 재래감귤 11품종의 전체 ITS 유전자 영역에 대한 염기서열 분기값(Sequence divergency)을 계산한 결과, 홍굴(JQ990178) 품종이 JNCPCRI 병굴 품종과의 염기서열 분기값이 0.00483로 다른 품종들에 비하여 염기서열 다양성 정도가 가장 낮았으며, 그 다음으로 빈굴(JQ990180) 그리고 편굴(JQ990181) 2품종이 0.00644, 당유자(JQ990179) 품종이 0.00806 그리고 청굴(JQ990183) 품종이 0.00968 순으로 낮았다(Table 5). 반면에 병굴(JQ990189) 품종이 0.01456으로 JNCPCRI 병굴 품종과의 염기서열 다양성 정도가 재래감귤 11품종 중 6번째로 높게 나타났다(Table 5). 결과적으로 이들 재래감귤 11품종 중 홍굴(JQ990178) 품종은 다른 재래감귤 품종들에 비하여 JNCPCRI 병굴 품종간에 염기 구성이 가장 비슷한 것으로 나타났다(Table 5), 위 결과는 ITS2 영역의 염기를 이용한 유연관계 결과와 유사하였다.

이전 연구자들의 보고에 따르면 병굴 품종은 당유자(JQ990179), 편굴(JQ990181), 홍굴(JQ990178), 빈굴(JQ990180) 품종들은 사두감(JQ990185), 빈굴(JQ990180) 품

Table 5. Sequence divergences in the total ITS gene regions of JNCPCRI cultivar and related Jeju Native *Citrus* Varieties

No.	Cultivar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	<i>C. aurantium</i> (JQ990184)												
2	<i>C. benikoji</i> (JQ990186)	0.10613											
3	<i>C. erythrosa</i> (JQ990187)	0.01948	0.10925										
4	<i>C. leiocarpa</i> (JQ990180)	0.01788	0.11158	0.01948									
5	<i>C. grandis</i> (JQ990179)	0.01951	0.11341	0.02113	0.00160								
6	<i>C. nippokoreana</i> (JQ990183)	0.02117	0.11536	0.02113	0.00321	0.00482							
7	<i>C. platymamma</i> (JQ990189)	0.01620	0.10944	0.01293	0.01456	0.01620	0.01620						
8	<i>C. pseudogulgul</i> (JQ990185)	0.09859	0.02776	0.10173	0.10399	0.10580	0.10772	0.10189					
9	<i>C. sunki</i> (JQ990188)	0.01955	0.10591	0.02278	0.02448	0.02613	0.02781	0.02279	0.09838				
10	<i>C. tachibana</i> (JQ990178)	0.01624	0.10976	0.01784	0.00160	0.00321	0.00482	0.01293	0.10219	0.02284			
11	<i>Citrus tangerina</i> (JQ990181)	0.01788	0.11158	0.01948	0.00000	0.00160	0.00321	0.01456	0.10399	0.02448	0.00160		
12	JNCPCRI	0.01788	0.11158	0.01948	0.00644	0.00806	0.00968	0.01456	0.10399	0.02448	0.00483	0.00644	

Analyses were conducted using the Kimura 2-parameter model. The analysis involved 12 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 624 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 5.

종들과 염기서열 구성이 가장 유사하다고 하였는데(Jung et al. 2005, Sun et al. 2015), 본 연구에서도 JNCPCRI 병굴 품종은 홍굴(JQ990178), 빈굴(JQ990180), 편굴(JQ990181), 당유자(JQ990179) 그리고 청굴(JQ990183) 품종과 유전적으로 가깝다는 점에서 이전 연구자들(Jung et al. 2005, Sun et al. 2015)의 결과와 비슷하였다. 하지만 본 연구 결과에서 얻어진 JNCPCRI 병굴 품종은 이전 연구자(Sun et al. 2015)가 GenBank에 등록된 병굴(JQ990189) 품종과는 염기서열 분기값이 0.01456로 염기서열 다양성 정도가 GenBank에 등록된 재래감굴 11품종 중 6번째로 높은 결과를 얻었다(Table 5). 이와 같은 결과는 ITS2 영역의 유전적인 차이로 인하여 형태학적으로 동일한 품종이지만 유전적으로 차이를 보인 것이라 판단 할 수 있었다.

전체 ITS 유전자 영역에 대한 염기들을 이용하여 JNCPCRI 병굴 품종간의 근연관계를 조사한 결과 Group I과 Group II의 2개 분류군과 4개의 분계조로 나눌 수 있었다. Group I에는 빈굴(JQ990180), 편굴(JQ990181), 당유자(JQ990179), 홍굴(JQ990178), 청굴(JQ990183), JNCPCRI 병굴, 동정굴(JQ990187), 병굴(JQ990189), 지각(JQ990184) 그리고 진굴(JQ990188) 품종으로 구성되어 있으며, Group II에는 감자(JQ990186) 그리고 사두감(JQ990185) 품종의 그룹으로 구성되어 있다(Fig. 3C).

또한, Group I은 4개의 분계조로 다시 나눌 수 있는데, 빈굴(JQ990180), 편굴(JQ990181), 당유자(JQ990179), 홍굴(JQ990178), 청굴(JQ990183), JNCPCRI 병굴 품종들은 Ia, 동정굴(JQ990187)과 병굴(JQ990189) 품종은 Ib, 지각(JQ990184) 품종은 Ic 그리고 진굴(JQ990188) 품종은 Id로 나눌 수 있었다. 비록, JNCPCRI 병굴과 GenBank 등록된 병굴(JQ990189) 품종은 동일한 GroupI에 속하나 다른 분계조에 속하여 있는 점으로 보아 유전적으로는 근연관계가 멀다는 것이 확인 되었다. 반면에, Ia에 속하는 빈굴(JQ990180), 편굴(JQ990181), 당유자(JQ990179), 홍굴(JQ990178) 그리고 청굴(JQ990183) 품종은 JNCPCRI 병굴 품종과는 형태학적으로는 서로 다르나 유전적으로 근연관계에 있으며, 이 중 청굴(JQ990183) 품종은 유전적으로 가장 근연관계에 있음이 확인되었다(Fig. 3C). 또한, JNCPCRI 병굴 품종은 빈굴(JQ990180) 그리고 편굴(JQ990181) 품종들로부터 기원된 것으로 생각되며, Ia에 속하는 품종들간의 오랜 기간 동안 재배되는 과정에서 수정을 통하여 유전적으로 변이가 발생한 것으로 생각된다(Dhillon et al. 1993, Sun et al. 2015). 모계 유전과 관련된 엽록체 trnL-trnF 스페이스 영역을 이용하여 GenBank에 등록된 재래감

굴 11품종과 유연관계를 비교 분석하였을 때 병굴 품종은 독립된 단일 품종으로 구성되어 있다고 하였다(Jung et al. 2005). 하지만, 본 연구에서는 JNCPCRI 병굴 품종이 GenBank에 등록된 유자(AY321663), 감자(AY321666), 진굴(Y321665) 품종들과 근연관계가 가까웠고, 지각(AY321661) 품종과는 근연관계가 가장 멀었다. 또한, 병굴(AY321659) 품종과는 염기의 변이를 보이는 site가 372개 중 4개 나타났으며, 근연관계 또한 위 3 품종(유자, 감자, 진굴)들에 비하여 멀게 나타났다(자료 미제시). 위 결과로 병굴 품종은 모계 유전 된 것이 아니라 수정을 통한 종자 번식된 것으로 판단 되었다. 따라서, JNCPCRI 병굴 품종은 GenBank에 등록된 병굴(JQ990189) 품종과 유전적으로 유연관계가 떨어진 것이 아닌가 판단할 수 있었다.

ITS 영역을 이용하여 감굴에 대한 유연관계를 분석한 Sun et al. (2015)등에 의하면 당유자(JQ990179) 품종을 제외한 나머지 재래감굴 품종들은 *Sinocitrus*종에 속하며, 재배지역에 관계 없이 재래감굴들은 유전적으로 근연관계가 비슷하다고 하였다. 그러나 GenBank에 등록된 병굴(JQ990189) 품종과 본 연구소 내에서 재배되고 있는 병굴(JNCPCRI) 품종간에는 유전적으로 근연관계가 Ia 분계조에 속하는 품종들에 비하여 멀다는 점에서 같은 모계에서 분리 증식된 것이 아니라 종자번식을 통하여 오랜 기간 동안 번식되어 왔기 때문에 유전적으로 변이가 생긴 것으로 생각된다. 따라서, 차후 제주도내에 보존 되고 있는 병굴 품종들에 대한 정확한 기원 규명을 위하여 유전적인 근연관계를 조사 할 필요가 있다고 판단된다.

적 요

제주도내 재래감굴 12품종들에 대한 기원은 대부분 중국으로부터 유래 한 것으로 사료되고 있다. 그러나, 병굴(*Citrus platymamma* Hort. ex Tanaka) 품종에 대한 기원은 정확하게 알려진 바가 없다. 따라서, 본 연구는 재래감굴 병굴 품종에 대한 기원 규명 과 재래감굴 품종들 간의 계통분류학적 연구 목적으로, 최근 식물 계통분류학적 유연관계 분석에 이용되고 있는 핵 리보솜 DNA내 ITS 영역의 프라이머를 디자인하여 PCR를 수행하였다. JNCPCRI(Jeju Native *Citrus platymamma* Citrus Research Institute) 병굴의 ITS1 유전자 영역은 247bp 였고 ITS2 유전자 영역은 228bp, 전체 ITS 유전자 영역(ITS1-5.8S-ITS2)은 638bp 였다. JNCPCRI 병굴의 ITS1 유전자 영역 염기서열 분석을 기초로 하여 유연관계를 분석한 결과 JNCPCRI 품종은 GenBank에 등록된 병굴(JQ990189) 품종과

유전적으로 동일하였고, ITS2 유전자 영역은 빈굴(JQ990180), 홍굴(JQ990178), 당유자(JQ990179) 그리고 편굴(JQ990181) 품종과 유전적으로 비슷하였으며, 전체 ITS 유전자 영역은 홍굴(JQ990178) 품종과 유전적으로 비슷하였다. 또한, 전체 ITS 유전자 영역으로 JNCPCRI 품종의 계통학적 근연관계를 분석한 결과 청굴(JQ990183) 품종과 가장 근연관계에 있으며, 빈굴(JQ990180) 그리고 편굴(JQ990181) 품종으로부터 기원된 것으로 조사되었다. 반면에, JNCPCRI 품종은 병굴(JQ990189) 품종과 형태학적으로 동일하나 ITS 영역은 유전적으로 상이성을 보였다. 위 결과로 JNCPCRI 품종은 주변 품종들간의 수정을 통하여 ITS 영역이 유전적으로 변이가 생긴 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 PJ01027304 사업과 박사후 연구원 지원 프로그램에 의해 수행되었음.

REFERENCES

1. Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 82: 247-277.
2. Barrett HC, Rhodes AM. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Syst. Bot.* 1: 105-136.
3. Chae CW, Yun SH, Park JH, Kim MJ, Koh SW, Song KJ, Lee DH. 2012. Frequency of spontaneous polyploids in monoembryonic Jeju native citrus species and some mandarin cultivars. *Journal of Life Science* 22: 871-879.
4. Cheng Y, Vicente MC, Meng H, Guo W, Tao N, Deng X. 2005. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in *Citrus* and related genera. *Tree Physiol.* 25: 661-672.
5. Deng ZN, Gentile A, Nicolosi E, Domina F, Vardi A, Tribulato E. 1995. Identification of *in vivo* and *in vitro* lemon mutants by RAPD marker. *J. Hortic. Sci.* 70: 117-125.
6. Deng ZN, Malfa S La, Xie XM, Xiong XG, Gentile A. 2007. Identification and evaluation of chloroplast uni- and trinucleotide sequence repeats in citrus. *Sci. Hortic.* 111: 186-192.
7. Dhillon RS, Kaundal GS, Cheema SS. 1993. Nucellar embryony for propagating *Citrus*. *Indian Hortic.* 38: 44-45.
8. Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML. 1998. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (*Rutaceae*) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 96: 812-822.
9. Froelicher Y, Mouhaya W, Bassene JB, Costantino G, Kamiri M, Luro F, Morillon R, Ollitrault P. 2011. New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genetics & Genomes* 7: 49-61.
10. Gulsen O, Roose ML. 2001. Lemons: diversity and relationships with selected *Citrus* cultivars and species and comparison with related genera. *Theor. Appl. Genet.* 72: 170-177.
11. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
12. Hazarika TK, Hazarika BN, Shukla AC. 2014. Genetic variability and phylogenetic relationships studies of genus *Citrus* L. with the application of molecular markers. *Genet. Resour Crop Evol.* 61: 1441-1454.
13. Herrero R, Asins MJ, Pina JA, Carbonell EA, Navarro L. 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1327-1334.
14. Hirai M, Kozaki I, Kajiura I. 1986. Isozyme analysis and phylogenetic relationship of *Citrus*. *Japan. J. Breed.* 36: 377-389.
15. Hynniewta M, Malik SK, Rao SR. 2014. Genetic diversity and phylogenetic analysis of *Citrus* (L) from north-east India as revealed by meiosis, and molecular analysis of internal transcribed spacer region rDNA. *Meta Gene* 237-251.
16. Hyun JM, Park KJ, Kim SS, Park SM, Lee YJ, An HJ. 2015. Antioxidant and Anti-inflammatory Effects Solvent Fractions from the Peel of the Native Jeju Citrus 'Hongkyool' and 'Pyunkyoo'. *Journal of Life Science* 25: 1132-1138.
17. Jung YH, Kwon HM, Kang SH, Kang JH, Kim SC. 2005. Investigation of the phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (*Rutaceae*) and related species in Korea using plastid trnL-trnF sequences. *Sci. Hortic.* 104:

- 179-188.
18. Kim CM, Kim KS, Kim MH, Huh IO. 1979. Taxonomical and Phytochemical Studies of *Citrus* Plants Native to Je Ju Island (I) Flavour Patterns of the *Citrus* Peel Oils and One of the *Citrus* Flavonoids. J. Pharmacogn. 10: 13-16.
 19. Kim YC, Koh KS, Koh JS. 2001. Changes of flavonoids in the peel of Jeju native citrus fruits during maturation. Food Sci. Biotechnol. 10: 483-487.
 20. Kim YD, Ko WJ, Koh KS, Jin JY, Hyun KS. 2009a. Composition of flavonoids and antioxidative activity from juice of Jeju native citrus fruits during maturation. Korean J. Nutr. 42: 278- 290.
 21. Kim YD, Mahinda S, Koh KS, Jeon YJ, Kim SH. 2009b. Reactive oxygen species scavenging activity of Jeju native citrus peel during maturation. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 462-469.
 22. Kim HY. 1988. Distribution, taxonomy, horticultural characters of the local *Citrus* spp. in Cheju, and the genetic markers among them. Ph.Diss., Cheonnam National University., Korean.
 23. Ko WC, Lee SR. 2015. Effect of immature *Citrus sunki* peel extract on neuronal cell death. Korean J. Med. Crop Sci. 23: 144-149.
 24. Luro F, Costantino G, Terol J, Argout X, Allario T, Wincker P, Talon M, Ollitrault P, Morillon R. 2008. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules Clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping. BMC Genomics 9: 1471-2164.
 25. Moon DK, Ko KC. 1992. Isozymes as genetic markers in *Citrus* growing in Cheju and their use for identification of nucellar and zygotic seedlings. II. PGI, PGM, IDH, GOT and MDH isozymes. J. Korean Soc. Hortic. Sci. 33: 132-145.
 26. Oh JB. 1996. Classification of *Citrus* growing in Cheju by RAPD and selection of markers for species or cultivars identification. M.S. Thesis, Cheju National University, Korean.
 27. Olmstead RG, Palmer JD. 1994. Chloroplast DNA systematic: a review of methods and data analysis. Am. J. Bot. 81: 1025-1224.
 28. Penjor T, Yamamoto M, Uehara M, Ide M, Matsumoto N, Matsumoto R, Nagano Y. 2013. Phylogenetic relationships of *Citrus* and its relatives based on matK gene sequences. PloS one. 8: e62574.
 29. Pessina D, Gentil R ` , Barcaccia G, Nicolè S, Rossi G, Barbesti S, Sgorbati S. 2011. DNA content, morphometric and molecular marker analyses of *Citrus limonimeditica*, *C. limon* and *C. medica* for the determination of their variability and genetic relationships within the genus *Citrus*. Sci. Hortic. 129: 663-673.
 30. Rahman MM, Nito N, Isshiki S. 2001. Cultivar identification of ‘Yuzu’ (*Citrus junos* Sieb. Ex Tanaka) and related acid *Citrus* by leaf isozymes. Sci. Hortic. 87: 191-198.
 31. Raveendar S, Lee JR, Park JW, Lee GA, Jeon YA, Lee YJ, Cho GT, Ma KH, Lee SY, Chung JW. 2015a. Potential use of ITS2 and *matK* as a two-locus DNA barcode for identification of *Vicia* species. Plant Breed. Biotech. 3: 58-66.
 32. Raveendar S, Lee JR, Park JW, Lee GA, Jeon YA, Lee WH, Cho GT, Ma KH, Lee SY, Chung JW. 2015b. Identification of genus *Vigna* using ITS2 and *matK* as a two-locus DNA barcode. Plant Breed. Biotech. 3: 153-159.
 33. Scora RW. 1975. On the history and origin of citrus. Bull. Torrey Bot. Club 102: 369-375.
 34. Song KJ, Kim SB, Park JH, Oh EU, Lee KG, Kim DW, Kang JH, Kim JS, Oh JH, Gmitter FG. 2011. Frequency and growth characteristics of polyploids occurred spontaneously in some mandarin hybrids. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 29: 617-622.
 35. Sun YL, Kang HM, Han SH, Park YC, Hong SK. 2015. Taxonomy and phylogeny of the genus citrus based on the nuclear ribosomal dna its region sequence. Pak. J. Bot. 47: 95-101.
 36. Tingey SV, Tufo JP. 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. Plant Physiol. 101: 349-352
 37. USDARS (United States Department of Agricultural Research Service). 2016. “ U.S. National Plant Germplasm System” <http://www.ars-grin.gov/npgs/index.html#> (accessed March 29,2016).
 38. Xu CJ, Bao L, Zhang B, Bei ZM, Ye XY, Zhang SL, Chen KS. 2006. Parentage analysis of huyou (*Citrus changshanensis*) based on internal transcribed spacer sequences. Plant Breed. 125: 519-522.
 39. Yao H, Song JY, Liu C, Luo K, Han JP, Li Y, Pang XH, Xu HX, Zhu YJ, Xiao PG, Chen SL. 2010. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and

- Animals. PloS one. 5: e13102.
40. Yang EJ, Lee HJ, Kang GJ, Park SS, Yoon WJ, Kang HK, Cho SK, Yoo ES. 2009. Anti-inflammatory Effect of Dangyuja (*Citrus grandis* Osbeck) Leaves in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. Food Sci. Biotechnol. 18: 1063-1070.
41. Yu EA, Kim HG, Song Y, Kim GS, Kim JH, Kim DY, Jin JS, Lee SJ, Sung NJ, Shin SC. 2014. Determination of flavonoids in the peel of Jingyul (*Citrus sunki* Hort. Ex Tanaka) using a HPLC-MS/MS and the antioxidant activity. J. Agric. Life Sci. 48: 227-234.
42. Yun JU, Yang HB, Jung YH, Yun SH, Kim KS, Kim CS, Song KJ. 2007. Identification of Zygotic and Nucellar Mandarin Seedlings Using Randomly Amplified Polymorphic DNA. Hort. Environ. Biotechnol. 48: 171-175.
43. Whitkus R, Doeet J, Wendel F. 1994. Nuclear DNA markers in systmatics and evolution. In: Philps RL. Vasil JK (eds) DNA-based markers in plants. Kluwer Academic Publ Dordrecht. The Netherlands, pp 116-141.