

프로젝트 최종실적보고서

편집순서 1 (표지)

<p>(뒷면)</p> <p>주 의 (편집순서 8)</p> <p>(15 포인트 고딕계열)</p> <p>↑ 6cm ↓</p>	<p>1 1 0 0 5 2 5</p> <p>방사선을 이용한 고품질 감귤신품종 육성</p> <p>농림축산식품부 해양수산부 농촌진흥청 산림청</p> <p>↑ 3cm ↓</p>	<p>(앞면)</p> <p>발간등록번호 11-1543000-000954-01</p> <p>5cm ↓</p> <p>방사선을 이용한 고품질 감귤신품종 육성 (Breeding of New Citrus Cultivar by Use of Gamma Ray Irradiation)</p> <p>제주대학교</p> <p>↑ 9cm ↓</p> <p>농림축산식품부 · 해양수산부 · 농촌진흥청 · 산림청</p> <p>↑ 4cm ↓</p>
---	---	--

제 출 문

농림축산식품부장관 · 해양수산부장관 · 농촌진흥청장 · 산림청장 귀하

이 보고서를 “방사선을 이용한 고품질 감귤신품종 육성” 프로젝트의 보고서로 제출합니다.

2015년 9월 15일

프로젝트 연구기관명 : 제주대학교

프로젝트 책임자 : 김 인 중

세부프로젝트 연구기관명 : 제주대학교

세부프로젝트 책임자 : 김 인 중

세부프로젝트 연구기관명 : 제주대학교

세부프로젝트 책임자 : 이 효 연

세부프로젝트 연구기관명 : 제주대학교

세부프로젝트 책임자 : 김 민 영

요 약 문

I. 제 목

방사선을 이용한 고품질 감귤 신품종 육성

II. 연구성과 목표 대비 실적

○ 당산비 향상, 수확기 분산, 기능성 강화 등의 특성을 갖는 돌연변이 감귤 계통을 선발하여 신품종 감귤 품종을 개발하였음

가. 연구개발의 최종목표

국외로의 수출경쟁력을 갖춘 품종을 육성하기 위해 제주도에서 가장 많이 재배되고 있는 궁천조생 품종에 방사선을 이용한 돌연변이를 유도하여 구축하여 있는 돌연변이개체로부터, 선발을 통해

- 당도 11 °Brix이상, 산도 0.8~0.9%의 당산비 우수
- 부피과 억제 및 내한성 향상을 통한 출하시기의 조절
- 기능성 강화를 통한 가공제품 및 소비시장 확대

가 가능한 품종을 1개 이상 개발하여 국산육성 수출용감귤 품종으로 활용하고자 함.

나. 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	품종개발		특허		논문		학술 발표	유전자원		국내 매출액	종자 수출액	기술 이전	홍보	인력 양성
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록					
최종목표	2	1	2	2	6	10								
소계	7				16									
실적			9		9	9	19						8	8
소계	9				18		19						8	8
달성율(%)	0		450	0	150	90								

-돌연변이 가지 선발 후 2차 접목 후의 최종 선발에 따라 품종보호출원은 달성하지 못했으나, 동일하게 품종보호를 받을 수 있는 특허출원을 3건(국내 2건, PCT 1건), 연구를 통해 획득한 기술 및 지식에 대한 특허출원 6건을 달성하여 **연구결과의 실용화에 대한 실적(출원 및 등록 합계)을 목표(7건) 대비 실적(9건)으로 약 130%로 초과 달성함. 학술논문은 목표(16건) 대비 실적(18)으로 약 112%로 초과달성함(SCI논문은 목표 대비 150% 달성함)**

-**품종개발 출원 대신 개발 우수계통에 대한 국내특허출원 2건(아라온주, 제대온주), PCT특허출원 1건(아라온주)를 수행하였음**

III. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 국내(제주)에서 재배되고 있는 감귤품종의 대부분은 일본에서 도입된 품종으로 국산 품종의 보급률은 매우 미미한 실정임

○ 소득 증대, 열대과일의 수입, 소비자 기호의 변화에 의해 과일 소비는 감소할 것으로 예상되어 소비자 기호에 적합하면서 신규 소비시장을 창출할 수 있는 감귤 품종의 개발이 요구됨

○ 미국, 이스라엘 등에서 활발히 적용되어 우수한 성과를 나타내고 있는 방사선조사를 통한 돌연변이의 유기와 선발을 국내 재배 감귤인 온주를 대상으로 하여 우수한 형질을 나타내는 감귤 신품종이 육성될 필요가 있음

○ 감귤연구소의 교배육종, 농업기술원의 교배육종 및 돌연변이 가지 수집과 더불어 인위적인 돌연변이 유기를 통해 감귤 육종의 상승작용 유도

IV. 연구개발 내용 및 범위

- 감마선 조사를 통해 돌연변이 가지를 유기하고 이를 감귤성목에 접목하여 돌연변이 가지의 대량 확보, 육종포장 등의 인프라 구축
- 돌연변이 가지로부터 착과된 과실에 대한 형질(당도, 산도, 색도 등) 조사
- 1차 선발된 돌연변이 가지로부터 논의 채취하여 2차 접목 수행 후, 2차 선발
- 2차선발을 통해 우수 형질이 고정된 개체의 특성 조사
- 선발 돌연변이 계통을 대상으로 현미경 관찰을 통한 세포 및 조직 수준에서의 변화 관찰
- 선발 돌연변이 계통의 2차 대사산물(플라보노이드, 카로티노이드 등)의 함량을 분석하고, 이들 감귤 품종의 생리활성을 분석함으로써 기능성 소재로서의 활용가능성 검토

V. 연구개발결과

- 1차 선발 및 2차 선발을 통해 과형변이(예: 제대온주), 과색(홍색) 변이, 과일 성숙시기 변이(예: 아라온주), 당산비 향상 변이, 복합형질 변이 등의 특성을 나타내는 계통을 선발하였음
- 일부 선발 돌연변이 계통을 대상으로 Microarray 분석을 통해 차별 발현을 보이는 유전자에 대한 정보를 획득하였음
- 현미경 관찰을 통해 돌연변이 계통의 일부에서 과피 조직의 차이를 확인하였으나, 대부분의 계통에서는 잎과 과실에서 별다른 차이를 나타내지 않았음
- 일부 선발돌연변이 계통에서 플라보노이드 성분의 변화를 관찰할 수 있으며, D-limonene 항산화활성, 항암활성, 세포독성 등에 대한 조사를 수행하였음

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 육성된 계통들을 식물특허출원, 품종보호출원 등을 통해 품종으로서 보호받을 수 있는 장치를 마련하고, 참여기업 또는 선도농가, 영농조합법인 등과 협력관계를 구축하여 시험 생산을 통해 개발된 감귤 돌연변이 계통의 생산을 통한 경제성 추구

○ 학부생 및 대학원생 지도에 구축된 돌연변이육종 인프라와 연구과정을 통해 습득한 지식을 활용하여 교육의 내실화를 추구하고, 육종분야로의 신규인력 진입의 활성화를 유도함

SUMMARY

(영문요약문)

Citrus mutants were induced by the irradiation of citrus budsticks with gamma ray irradiation. The mutated budsticks had been grafted onto stems of mature citrus tree. The phenotypes of fruits produced onto mutated branches were analyzed on the sugar content, acidity, color, shape, etc. Several new citrus lines showing better phenotypes such as red color, higher sugar content, lower acidity, different fruit maturation, different shape compared to control citrus, Miyagawa-wase early Satsuma mandarin, were selected and then re-grafted onto stem of mature citrus tree. Ara mandarin shows late maturation time, late January to early February in Jeju island. Jedae mandarin represents rough peel skin and smooth albedo layer, and higher contents of some flavonoid components. Genetic analysis on Jedae mandarin compared Satsuma mandarin was performed through microarray analysis.

Microscopic observation of citrus mutant fruits indicated similar patterns except for peel of Jedae mandarin, which decreased collapse. Three mutant plants demonstrating improved fruit quality were selected on the results of the primary screening and compared with wild-type citrus plant for evaluation of the phenolic composition and the antioxidant potential. The results show that irradiation induced changes in total phenolic and flavonoid contents of the fruit peel and pulp, and leaves of citrus mutants, as well as in D-limonene content and antioxidant activity. HPLC analysis demonstrated that hesperidine, narirutin and rutin were variably distributed in citrus mutants. The DPPH, superoxide and hydrogen peroxide scavenging activities were significant higher ($p < 0.05$) for the pulp, leaf and peel extracts of citrus mutants, with IC_{50} value ranges of 1.02–1.10, 2.59–2.84, 0.82–0.91 mg/mL, respectively, but lower nitric oxide scavenging activities for the peel and pulp extracts of citrus mutants, as compared with the corresponding values of citrus wild-type. Both citrus wild-type and mutant fruits obtained from same citrus tree were grouped on the results of the secondary screening and their antioxidant and anticarcinogenic activities were investigated. Mutant peel and pulp samples contained high contents of total phenolics, total flavonoids and pigments. Moreover, all flavonoids (naringin, hesperidine, narirutin and rutin) detected by UPLC analysis demonstrated significant alterations in citrus mutants. Citrus mutant fruit peels exhibited significantly higher activities on H_2O_2 scavenging and metal chelating activities compared with those of citrus wild-type. They also inhibited the growth and induced apoptosis in various human cancer cells, A549, HepG2, HCT116, MCF-7 and Hela cells.

The obtained results implicate that citrus mutants induced by gamma irradiation may contribute to variations in antioxidant and anticancer activities as well phenotypes.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction and Objectives

Chapter 2. Background

Chapter 3. Methods and Results

Chapter 4. Discussion

Chapter 5. Further Studies

Chapter 6. Research Information

Chapter 7. References

<Supplementary Materials> Investigation Report on Patent, Research Paper, and Market

목 차

제 1 장 프로젝트(세부프로젝트 포함)의 개요 및 성과목표

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

제 1 장 개요 및 성과목표

1. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 감귤산업의 경제성 측면

- 세계 감귤류 생산량(2009-2010년)은 123 백만톤(약 1억 2천만톤 내외 생산)으로 과일 전체 생산량 554,793천톤의 약 1/5로서 생산량이 1위임(자료 : <http://www.fao.org/>)
- 우리나라 감귤의 생산량은 과수 총생산량의 1/4 이상을 차지하여 우리나라에서 생산량이 가장 많은 과수임

<표 1> 연도별 주요과실 생산 동향(농림부)

(단위 : 천ha, 톤)

연도별	구분	주요 과 실 류						
		총과실 합계	감귤	사과	배	복숭아	포도	감
2012	면적	160	21	30	14	14	17	30
	생산량	237	692	395	173	202	278	401
2013	면적	161	21	30	13	15	17	29
	생산량	252	682	494	282	193	260	352
2014	면적	162	21	30	13	15	16	28
	생산량	270	722	475	303	210	269	2428

자료 : 농림부, 「농림통계연보」 각년도. (www.kosis.kr)

- 감귤 재배면적은 2014년 2만1,388ha로 제주특별자치도 총경지면적 5만6,693ha의 38%이고, 감귤재배 농가수는 제주특별자치도 전체 농가수 3만4천645호의 약 89.6%에 해당하는 3만1천27호로 제주도의 생명산업으로 불리우고 있음
- 과일이 농업생산액에서 차지하는 비중이 2003년 7%에서 2013년 9%로 증가하여 약 4조 1천 억원의 생산액을 달성하였음. 이 중 감귤이 차지하는 비중이 22.1%로서 사과에 이어서 2위를 차지하고 있음. (농업전망 2015, KREI)

농업생산액에서 과일 비중: 2003년 7% → 2013년 9%

(2013년 기준 농업생산액 44조 6천억 중 과일은 4조 1천억 원)



과일 생산액 중 감귤 비중 22%

	사과	배	감귤	단감	포도	복숭아	기타
비중(%)	25.5	7.6	22.1	7.8	12.5	6.8	17.8

자료: 농림수산물주요통계, 농림축산식품부

○감귤은 온주밀감 중심으로 재배되고 있어 전체 면적에서 자치하는 비중이 90% 이상임. 시설형태별 온주밀감은 노지온주와 하우스온주 재배면적이 꾸준히 감소하는 반면, 월동온주는 증가하고 있음. 만감류는 한라봉 품종이 70% 애외를 차지하고 있지만 최근 천혜향이나 레드향 등의 품종 생산이 증가하는 추세임(농업전망 2015, KREI)

표 6-20. 감귤 작형별·품종별 재배면적

단위: ha, (%)

	온주밀감				만감류			전체
	노지	월동	하우스	계	한라봉	기타	계	
2002	24,425 (96.8)	272 (1.1)	537 (2.1)	25,234	621 (63.8)	353 (36.2)	974	26,248
2007	18,987 (95.3)	578 (2.9)	368 (1.8)	19,933	1,137 (75.5)	369 (24.5)	1,506	21,476
2012	18,037 (92.9)	1,090 (5.6)	296 (1.5)	19,422	1,365 (68.7)	622 (31.3)	1,987	21,362
2013	17,796 (92.0)	1,268 (6.6)	272 (1.4)	19,336	1,404 (69.3)	622 (30.7)	2,026	21,334
2014	17,554 (91.1)	1,451 (7.5)	272 (1.4)	19,276	1,459 (70.8)	603 (29.2)	2,062	21,338

주: 관호 안은 해당 품종의 비중임. 2012~14년 품종별 면적은 농업관측센터 추정치임.
자료: 과수실태조사(2002, 2007년), 통계청(2012~14년 전체)

○ 한·미 FT의 발효로 2015년 미국산 신선 오렌지는 15%의 계절관세(3-8월)가 적용되어 2018년에는 무관세가 되어 수입량이 증가될 것으로 예상됨

나. 감귤 수출·입 현황 측면

○ 수출은 1990년 캐나다·싱가포르 등에 179톤을 수출한 이래, 1996년까지는 1,000톤 수준이었으나 1997년 이후 환율 상승 등에 따른 가격 경쟁력 확보와 수출시장 다변화, 수출 촉진 지원시책, 수출단지 조성 등에 힘입어 연간 6,000톤 이상으로 급증하였고, 그 이후 수출이 증가해 2002년 거의 1만여톤에 육박하였음. 그렇지만, 그 이후 국내감귤가격의 호조로 수출물량은 격감해 2008년 1천여톤에 불과한 것으로 나타났음. 현재의 감귤수출행태는 국내소비 잔여물량을 밀어내는 수출 행태를 벗어나지 못하고 있어, 스페인, 미국 등 감귤수출 선진국의 최고품을 선별해 수출하는 전략과는 상반되고 있음.

○ 감귤 수출은 생산량에 비해 미미한 수준이지만 최근 들어 3천 톤 내외가 수출되고 있음. 주요 수출국은 캐나다, 영국, 미국, 러시아 등으로 다양한 편임.

○ 오렌지수입은 2003~2008년 평균 121.9천톤으로 1995년 15천톤에 비해 거의 8배 규모로 급증하는 등 신선과일류의 수입의 증가추세가 가파른 것으로 나타났음. 2014년에는 전년보다 미국 캘리포니아지역의 냉해과 수입단가의 상승으로 인해 36% 감소하였음. 신선오렌지의 수입은 3-5월에 70-80%가 이루어지고 있어 노지온주에 미치는 영향은 크지 않음(농업전망 2015, KREI)

표 6-23. 한국의 신선 오렌지 월별 수입량

	단위: 천 톤												
	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월	전체
2000	2.4	13.0	10.7	25.2	23.0	5.1	7.1	3.8	3.0	2.2	1.0	2.4	99.0
2005	7.3	15.1	34.6	31.7	21.2	1.7	1.3	2.0	1.8	1.9	0.3	4.4	123.0
2010	4.9	9.1	29.3	39.8	14.3	3.2	1.0	1.1	2.3	1.3	1.2	2.7	110.1
2013	8.2	13.1	53.1	51.6	13.3	1.7	1.5	1.6	2.8	2.6	0.6	2.6	152.7
2014	4.1	12.3	36.9	29.4	3.6	2.9	1.6	1.5	2.4	1.8	0.4	1.7	98.4

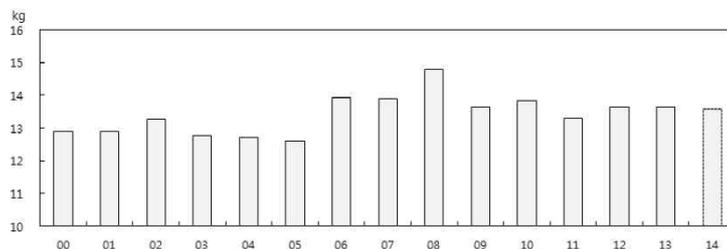
자료: 한국무역협회

- 1995년 WTO 출범으로 농업은 세계화와 개방화가 빠르게 진행되고, 경쟁에 입각한 국제분업과 전문화 체제로 돌입하였으며 WTO/DDA 협상, 한·일 FTA, 한·미 FTA, 한·아세안 FTA, 한·EU FTA 등 향후 농업부문의 국가간 수출입에 따른 관세인하 등 국제교역은 지금보다 더욱 확대되어 감귤산업을 비롯한 제주의 농업은 매우 어려운 입장에 처해 있는 것이 사실임.

다. 감귤산업의 사회·문화·지리학적 측면

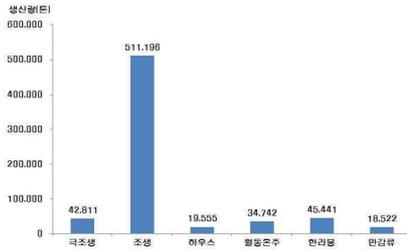
- 한국 소비자들의 감귤 선택기준은 단순한 당도만을 요구하는 것이 아니라 당산비(당도/산도), 즉 적당한 당도를 갖추면서 신맛이 그다지 높지 않은 감귤을 요구하고 있고, 캐나다 등 서구에서는 적절한 산도의 감귤을 선호하고 있으므로 일정수준의 당도 확보와 산도를 낮추는 연구가 진행된다면 향후 감귤의 국제경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 사료됨
- 제주특별자치도는 국내 유일의 감귤생산지이지만 서귀포시의 일부 온난한 지역을 제외하면, 노지재배가 가능한 감귤류는 내한성이 강한 온주밀감에 국한되어 있음
- 토양의 대부분은 화산회토이고 연간 강우량은 1,400~1,700mm로 많고 일조시간은 2,000시간 내외로 적은 편이어서 노지에서 생산되는 감귤의 당함량은 낮고 산함량은 높은 편임
- 감귤 1인당 연간 소비량은 207년 16kg을 정점으로 계속 감소하는 추세임. 2011년부터 안정적인 생산량을 바탕으로 소비량이 14kg 수준을 유지하고 있음(농업전망 2015, KREI)

그림 6-14. 감귤 1인당 연간 소비량(3년 이동평균)



주: 1인당 소비량=(생산량+수입량-수출량)/인구수
 자료: 농림축산식품부, 「농림축산식품 주요통계」, 각 연도

라. 재배 감귤품종의 특성 및 품종육성 측면



구분	극조생	조생	하우스	월동온주	만라봉	만감류	합계
면적(ha)	1,514	15,651	262	1,223	1,399	528	20,577
생산량(톤)	42,811	511,196	19,555	34,742	45,441	18,522	672,267

<2013년 품종별 감귤 생산량>

- 온주밀감의 극조생, 조생, 중·만생종 중 조생종이 88.8%(2008년)를 차지함으로 인해 출하기간이 집중됨으로 홍수출하가 진행되어 가격형성에 악영향을 주고 있음
- 이에 대한 대책으로 간벌과 재배작형의 다형화, 품종갱신 등이 진행되고 있음. 즉, 온주밀감을 중심으로 하우스밀감 재배, 월동 비가림 재배 작형에 의한 연중생산 시스템의 구축, 부지화를 비롯한 만감류의 도입, 월동 비가림 재배기술에 의한 여름 출하형 극만생종 카라만다린 품종선발, 다공질반사필름을 이용한 최고품질 온주밀감 생산 등의 재배기술이 발전하고 있음
- 우리나라 감귤생산은 아직 재배 품종과 면적, 생산량이 제한적이고 낮은 당도와 높은 산함량 등 품질이 떨어지는 문제를 가지고 있어 육종을 통한 품질 향상으로 농가의 소득 증대를 이룰 수 있는 연구방안이 필요함
- 미국, 일본 등에서 활발히 연구가 진행되고 있는 방사선을 이용한 과수품종 육성은 국내의 경우 전무한 실정임. 최근 정읍방사선연구소 주도로 채소 및 식량·화훼작물 대상으로 하는 방사선돌연변이 육종이 시도 중에 있음
- 감귤을 비롯한 과수생리 특성상 채소작물에 비해 장기간의 유년기가 존재하며, 돌연변이를 이용한 육종과정 중 선발과정으로의 진입에도 최소 3-4년의 시일이 소요됨으로 인해 돌연변이 후보개체군의 확보여부가 5년 내에 품종개발의 가시적인 성과를 달성하는 핵심요소임
- 감귤의 기능성에 관한 기존 연구에서 비만억제, 항산화, 혈류개선 등에 효과적이며, 동맥경화증, 인슐린 내성, 간 기능장애 등 만성질환과 상관관계가 있음이 밝혀졌으나 방사선 조사를 통해 개발된 신품종에서의 새로운 기능성 성분 및 기존 품종과의 효과 차이, 기능성 물질의 생물학적 이용 가능성, 독성·기능성 성분의 작용기작 등을 규명하는 연구가 필요함
- 감귤을 이용한 미래의 건강·미용·식품 산업은 기능성 물질의 함유량과 그 효능분석에 달려 있다고 예상되는 바 필요한 유효성분이 최대로 함유된 품종개발을 위한 연구가 필요함

- 감귤은 제주도의 가장 대표산업이며 제주도 경제의 26% 차지할 만큼의 주요 산업이나, 최근 대내외적으로 감귤산업은 하향추세에 있음. 정부의 다양한 대책에도 불구하고, 현실적으로 미흡함. 감귤유통조절명령제, 감귤대북지원 확대, 공무원의 간벌·열매숙기·감귤판촉 동원, 감귤가공물량의 확대 등 기존의 감귤정책을 총동원하여 노력하였지만, 감귤의 공급과잉과 품질저하, 경쟁과일의 공급과잉으로 감귤값이 폭락하고 있음
- 또한 한·미 FTA 등이 발효되면 감귤생과와 오렌지주스의 관세가 대폭 감축 또는 제로 관세화가 되면, 현재의 제주감귤산업의 주요 정책중의 하나인 감귤유통조절명령제, 감귤가공공장의 운영 등이 매우 곤란한 실정임. 런던협약에 의해 2012년도부터는 감귤가공공장의 감귤박 해양투기가 금지됨
- 따라서 감귤을 둘러싼 국내외 여건하에서 현재의 생과출하와 단순착즙가공의 형태로는 더 이상 감귤문제를 해결하기에는 한계에 달하고 있다는 공감대가 형성되고 있는 가운데, 그에 대한 대안으로서 고기능 감귤 품종이 대두되고 있음
- 최근 기능성 식품에 대한 관심이 높아지면서 기능성 물질 함유 여부가 품질의 주요인자가 되고 있음. 예로부터 감귤은 플라보노이드(Flavonoid) 등 25종 이상의 기능성 물질을 함유하고 있어 한방 생약재료로 사용돼 왔고, 감귤의 기능성 물질은 콜레스테롤 저하기능, 항염증, 다이어트 기능을 하는 것으로 최근 연구결과가 속속 밝혀지고 있기 때문이다.
- 따라서 본 세부과제에서는 감귤 돌연변이에 의한 성분변화가 생리활성에 미치는 영향을 분석함으로써 감귤시장의 활로 모색에 기여하도록 함

마. 돌연변이 육종의 안전성 측면

- 돌연변이 육종은 기존 품종의 형질을 유지하면서 단점인 형질을 특이적으로 보완하는 기술임. 대부분의 감귤품종은 매우 이질적이어서 교배-선발을 통해 후손을 부모의 형질을 나타내게 하는데 어려움이 수반됨
- 방사선을 포함한 돌연변이원에 의한 돌연변이는 자연적으로 발생하는 돌연변이와 근본적인 성질에서 다르지 않다고 받아들여지고 있으며, 유전자변형 기술과 같은 비자연적인 변화와 같은 논란이 없음.
- 이에 따라 돌연변이육종에 의해 개발된 품종에 대한 안전성 절차 등의 특별한 규정이 전세계적으로 존재하지 않으며, 국내외에서 무궁화 등의 화훼작물과 감귤 등의 다양한 작물에서도 돌연변이육종을 통해 개발된 품종에 대한 안전성 심사 등을 수행하지 않고 상용화되고 있음(Roose and Williams, 2007).
- 감자, 양파, 마늘, 밤, 생버섯, 건조버섯 등의 식품에 방사선 조사가 허용되었고, 미국 등의 세계 여러나라에서 1963년부터 식품에 이용해왔음. 안전성에 대한 논란은 없음

2. 연구성과 목표 대비 실적

가. 연구개발의 최종목표

국외로의 수출경쟁력을 갖춘 품종을 육성하기 위해 제주도에서 가장 많이 재배되고 있는 궁천조생 품종에 방사선을 이용한 돌연변이를 유도하여 구축하여 있는 돌연변이개체로부터, 선발을 통해

- 당도 11 °Brix이상, 산도 0.8~0.9%의 당산비 우수
- 부피과 억제 및 내한성 향상을 통한 출하시기의 조절
- 기능성 강화를 통한 가공제품 및 소비시장 확대

가 가능한 품종을 1개 이상 개발하여 국산육성 수출용감귤 품종으로 활용하고자 함.

- ① 고품질 돌연변이 감귤선발과 2차접목을 통한 품종 고정화
- ② 유전체, 생리학적, 구조 분석을 통해 돌연변이 형질의 상세분석
- ③ 기능성 성분분석 및 효과분석을 통해 감귤시장의 확대 모색

나. 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	품종개발		특허		논문		학술발표	유전자원		국내매출액	종자수출액	기술이전	홍보	인력양성
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록					
최종목표	2	1	2	2	6	10								
소계	7				16									
실적			9		9	9	19						8	8
소계	9				18		19						8	8
달성율(%)	0		450	0	150	90								

-돌연변이 가지 선발 후 2차 접목 후의 최종 선발에 따라 품종보호출원은 달성하지 못했으나, 동일하게 품종보호를 받을 수 있는 특허출원을 3건(국내 2건, PCT 1건), 연구를 통해 획득한 기술 및 지식에 대한 특허출원 6건을 달성하여 **연구결과의 실용화에 대한 실적(출원 및 등록 합계)을 목표(7건) 대비 실적(9건)으로 약 130%로 초과 달성함. 학술논문은 목표(16건) 대비 실적(18)으로 약 112%로 초과달성함(SCI논문은 목표 대비 150% 달성함)**

-**품종개발 출원 대신 개발 우수계통에 대한 국내특허출원 2건(아라온주, 제대온주), PCT특허출원 1건(아라온주)를 수행하였음**

제 2 장 국내외 기술개발 현황

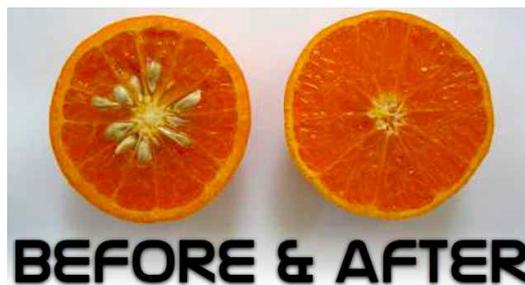
1. 국내 기술 개발 현황

- 국내 감귤 재배면적은 2만 1천 ha 수준으로 2013년 생산량은 전년대비 6.2% 감소하였음. 노지온주가 전체 감귤 재배면적의 84.0%를 차지하나, 최근 상대적으로 수익성이 높은 월동온주와 만감류의 비중이 증가하는 추세에 있음
- 제주에서 재배되고 있는 감귤의 품종이 다양화하고 있음. 한라봉, 천혜향, 황금향, 레드향, 청건 등의 만감귤 재배 면적이 계속적으로 증가추세에 있음.
- 만감류 재배면적은 2012년 말 현재 한라봉 1천362ha, 천혜향 190ha, 레드향 75ha, 황금향 44ha, 청건 66ha 등으로 이들은 색과 맛, 향, 껍질 벗기기 등에 있어 차이를 보임
- 국가적으로 수행하는 골든씨드프로젝트(GSP)의 10대 작물에 감귤도 포함되어 있으며, 고전적인 교배 육종을 통해 적색 감귤을 개발하려는 연구가 진행되고 있음
- 제주도의 감귤품종연구는 교배육종을 중심으로 수행하고 있는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤시험장과 감귤돌연변이가진신고의 중심기관인 제주특별자치도농업기술원과 제주대학교, 외국의 우수품종을 도입하여 현장적응성 시험과 재배실험을 통해 품종보급과 갱신의 중추적 역할을 수행중인 제주감귤농업협동조합, 인위적 돌연변이 기법을 이용한 감귤돌연변이육종을 수행 중인 제주대학교 본연구팀이 그 역할을 담당하고 있음
- 암의 치료를 위하여 현재 사용되어지고 있는 다양한 종류의 항암제들은 개개인에 따라서 약리작용이 다르게 나타나고, 독성에 의한 부작용이 문제점으로 지적되고 있음. 따라서 암치료법에 병행하여 자연계에 존재하는 천연물질로부터 분리한 물질을 생체방어기전에 이용함으로써 암을 구축하고자 하는 시도가 활발히 진행되고 있는데 식물에서 추출한 성분을 이용하여 여러 가지 치료약뿐만 아니라 암 예방을 위한 기능성 물질로 활용하려는 연구가 많이 행해지고 있음. 따라서 암환자에게 대체 보완용법의 이미지를 심어주고 과학적으로는 그 효과가 입증된 새로운 암 치료법이 있다면 이상적일 것임
- 최근 천연물 중 flavonoid는 항산화 물질로서 큰 관심을 끌고 있으며 국내에서 자란 고유 식물종의 flavonoid류의 생리활성기작에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음. 이들 가운데 다양한 생리활성을 지닌다고 알려져 있는 naringin은 감귤류의 과피에 많이 존재하고 최근 연구에서는 췌장암과 위암, 간암세포의 악성세포의 성장을 중지시키는 작용과 발암물질에 의해 손상되어진 세포를 보호하는 항암작용을 한다고 보고 되어 있음. 또한 암세포에서 손상된 DNA를 수복하는데 도움을 주며 사람의 전립선암 세포

주에 DNA 복구 효과가 있다고 보고되고 있음. 최근 naringin은 백혈병 세포의 증식에 매우 효율적임이 보고된 바 있으며, 이는 세포주기의 G1기 arrest 및 apoptosis 유도과 연관이 있다고 알려져 있음. 아울러 naringenin 또한 강력한 항암효과가 있음이 보고된바 있지만, naringin이 naringenin 보다 저농도에서 더욱 효과적으로 apoptosis 를 유도할 수 있는 것으로 알려져 있음. 이러한 naringin의 다양한 효능들이 보고되고 있지만 분리된 특정물질의 항암효과에 대한 메카니즘에 대한 연구는 거의 없으며, naringin의 항암효과에 대한 연구 또한 아주 미흡한 상태임

2. 국외 기술 개발 현황

- Bermejo 등(2011)에 의하면 Moncada mandarin의 경우 돌연변이에 의해 종자수뿐만아니라 당조 증가, 산함량 증가, 작은 크기, 높은 플라보노이드 와 카로틴함량, 비타민 C 함량의 증가 등의 결과를 나타내어, 본 연구의 접근방법을 통해서도 당산비가 개선된 품종을 개발할 수 있을 것으로 판단됨
- 본 연구팀과 협력관계에 있는 미국 UC Riverside의 Mikeal Roose 교수팀에서 Tango와 DaisySL이외에 FairchildLS, KinnowLS, Gold Nugget Mandarin, Shasta Gold Mandarin, Tahoe Gold Mandarin, Yosemite Gold Mandarin을 방사선을 이용한 돌연변이 육종을 통해 개발하여 미국내에서 보급 중에 있음



<Kinnow (left) and KinnowLS (right) mandarin from UC Riverside>

- 이들 돌연변이 Mandarin계 품종들은 종자수의 감소뿐만아니라 성숙시기와, 과색, 과즙성, 과육의 치밀성 등에 차이가 있어 본 연구의 접근 전략을 통해 고품질 온주밀감 품종의 개발이 가능하다는 증거가 됨
- 2012년 11월 18-23일에 스페인에서 개최되었던 제12회 International Citrus Congress에서 미국, 아르헨티나, 중국, 칠레, 남아프리카공화국, 모로코, 터키, 브라질, 스페인, 파키스탄 등의 다양한 국가의 연구자들이 감귤을 대상으로 돌연변이 육종결과들을 발표하였음
- 선진 각국에서는 자연계에 널리 존재하는 천연물질로부터 효능이 우수한 반면 독성이 없는 항암 및 암예방제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있음. 미국의 경우 국립암센

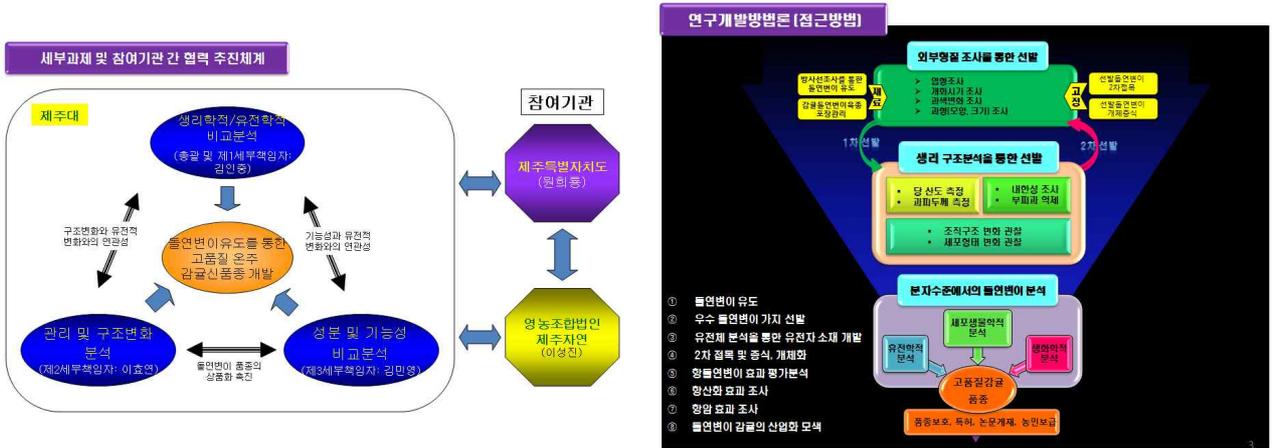
터에서 천연 암예방후보물질 중 16종을 선정하여 전임상 및 임상시험을 진행하고 있으며, 일본, 중국 등 아시아 국가의 경우 천연소재의 생리활성 연구가 미국보다 활발히 진행되고 있음

- 감귤류에 대한 연구는 나린진이나 헤스페리딘과 같은 주요 플라보노이드 외에 폴리메톡시플라본이나 쿠마린 등 새로운 생리활성 성분의 발견과 아울러 항궤양, c-AMO phosphodiesterase 저해, 항알레르기, 항염증, 항진통 등의 생리작용을 하는 것으로 보고되고 있으며, 현재 과육과 과피의 신규성분의 분리, 과실의 암 예방물질, 분리성분의 발암 억제 효과 등의 검토가 이루어지고 있음. 감귤류의 특징적 성분인 폴리메톡시플라본은 혈소판 응집억제, 임파구 증식억제, 항궤양 등의 생물활성을, 노빌레틴은 항산화 작용을 비롯하여 마우스 피부암 억제작용을 나타내며, 헤스페리딘이나 디오스민은 랫드의 구강, 식도, 방광암을 억제하는 것으로 보고됨, 이외에 큐어세틴이나 류테오닌도 발암 억제 효과를 가지는 것으로 보고됨(Rein 등, 2013)
- 미국 오레곤 주립대학의 최근 연구발표에 따르면 감귤류에 포함된 플라보노이드가 노화 방지는 물론 암을 비롯한 여러가지 성인병 예방에 효과를 나타내며, 암과 심질환에 대한 효과를 포함한 모든 메카니즘이 상대적으로 적은 양의 플라보노이드에 의해 유도되는데 이는 백신의 효과에 비유될 수 있다고 함
(<http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>)
- 2008년 미국 버지니아 주립대학 메시 암센터/분자의학연구소 연구진들이 췌장암을 예방 및 치료하는 유전자요법 시험결과, 사람의 췌장암이 이식된 마우스에 감귤에 포함되어 있는 식이성분과 사이토카인의 유전자를 조합하여 투여시 암세포가 감수성을 보이며 자연사멸이 촉진되었다는 결과를 발표함 (Lebedeva 등, 2008)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 연구 개발 이론적, 실험적 접근방법

○ 아래 모식도의 접근방법을 통해 최종 목표 달성



<제1세부과제: 생리적 특성 및 유전적 분석을 통한 돌연변이체 선발>

(1) 실험재료: 궁천조생

○ 1925년 후쿠오카현 재래온주 가지변이로부터 개발된 조생 온주 밀감으로서 수세 강하고, 가지 신장이 좋으며, 결실이 양호하여 해거리가 적은 특성이 있음. 11월 상,중순 성숙하여 특정시기에 집중적으로 수확하는 단점이 있음. 과피두께가 두껍고 열과와 일소현상, 탄저병이 적음. 과실맛은 양호하여 우리나라 사람이 선호하며, 속껍질(albedo층)이 얇아 상품성이 우수함. 이에 따라 제주 전지역에서 재배되고 있는 감귤 품종 중 최다 생산 품종임.



그림 1. 궁천조생

(2) 돌연변이 유도

○ 제주특별자치도농업기술원의 협조에 의해 궁천조생의 1년생 여름 가지를 2월에 채취한 것을 공급받아 저온저장고에 보관함. 이를 4월 하순~5월 중순 사이에 감귤가지의 측아에 제주대학교 원자력과학기술연구소의 감마선(Co⁶⁰) 조사시설을 이용하여 방사선 0~120

Gy를 조사한 후, 측아를 감귤성목 또는 탕자묘목에 접목(2개의 눈접)을 수행하여 돌연변이 가지를 유도함

- 방사선량별 생존률을 조사하여 LD50 값을 조사함. 그 결과 궁천조생의 LD50은 80 Gy로 선행연구를 통해 확정하였음. 이를 통해 추가적인 접목은 80 Gy조사를 수행한 후 이루어졌음.



그림 2. 돌연변이 감귤의 유기 과정

(3) 돌연변이체의 당도와 산도의 측정을 통한 당산비 우수 감귤 선발

- 전체 약 20,000개 돌연변이 가지로부터 1~3차년도 연구를 통해서 선발된 가지와 신규 착과 가지(서귀포의료원포장 196가지), 아열대농업생명과학연구소 포장의 착과(651가지)된 과실을 수확한 후, 참여기업의 비파괴선과기를 활용하여 당·산도를 측정하여 대략적인 양상을 확인한 후, 정확한 측정값을 얻기 위해 계통별로 양과망에 담아 참여기업과 제주대학교 내의 저온저장고(5℃)에 보관되어 있던 감귤로부터 과실의 즙을 착즙하였음. 산당도분석장치 수소이온농도자수미터(HORIBA) NH-2000(日園連, Japan)를 이용하여 과즙 약 4~5mL를 주사기로 주입한 후, 당도와 산도를 동시에 측정. 이 수치를 이용하여 당산비 우수 돌연변이 가지 선발에 활용
- 색차계(Chroma meter CR-400, 미놀타)를 이용하여 과피의 색차의 변화를 보이는 돌연변이 과실의 색도(L, a, b, a/b)를 색차계를 이용하여 측정
- 돌연변이체의 과형 등의 외부형질 관찰 및 개화시기 조사 등을 통한 돌연변이 선발
 - 돌연변이 2차가지에 결실한 과실을 수확한 후, 저울과 Vernier caliper를 이용하여 무게(과중)와 과실의 횡경, 종경, 과피두께 등을 각각 측정
 - 개화시기는 평균 만개시기를 기준으로 5월 초순~하순에 걸쳐 착화 및 착과양상을 관

찰을 통해 조사

-2차 접목하여 고정화된 가지의 내병성을 5월~11월에 걸쳐 잎과 과실의 외형적 관찰을 통해 조사함

선발 기준

1. 일반 :

- ① 당산도: 11°Brix이상, 산도 0.8~0.9%
- ② 개화시기: 조기, 만기
- ③ 착색시기: 조기, 만기
- ④ 기타: 과실 무게, 중경, 횡경, 과피두께 등

2. 외형 :

- ① 과실, 꽃, 잎의 형태
- ② 향과 식감
- ③ 과실의 색깔 변화: 색차



○ 선발 돌연감귤의 저장성 조사

-2차선발 및 외형적 변화(색깔의 변화 등)를 보인 돌연변이 감귤을 저온 저장고(5℃)에서 저장기간에 따른 당도, 산도, 경도, 색도 등의 연속적 변화를 조사하였음.

(4) 탱자묘목을 대목으로 사용하여 선발된 돌연변이 개체의 증식용 접목 수행

○ 1차 및 2차선발된 돌연변이 가지의 측아를 감귤성목(고접) 및 탱자묘목(아접)에 2차접목 수행하였음(서귀포의료원 포장 1168대목, 270대목; 아열대농업생명과학연구소 하우스 445대목, 노지 810대목)

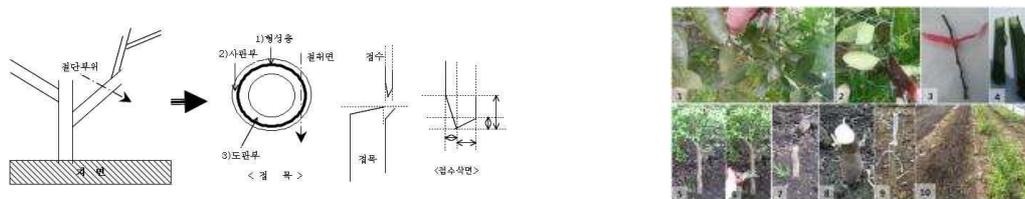


그림 3. 접목 방법 모식도

(5) 선발돌연변이 증식 개체의 정식

○ 아열대농업생명과학연구소와 실습연구센터의 협조를 받아 제주시 2곳, 서귀포시 2곳에 증식한 개체를 정식하여 현장실증시험 대비함

(6) 최종 선발돌연변이 과실 특성 분석

○ 최종 선발돌연변이 계통 중 착과(해거리로 인해)된 과실의 형질(당·산도 등)의 안정적 발현

변이육종포장의 영향, 관수, 잡초관리, 전정, 병해충 관리 등의 일반 재배관리를 통한 착과 조절, 형질 발현, 유실 방지 등을 수행하였음

(4) 선발돌연변이 개체 증식용 포장 정비

- 제1세부과제에서 증식한 돌연변이 개체를 식재할 수 있도록 포크레인 등을 이용한 포장 정비 및 시비

<제3세부과제: 돌연변이체의 성분 및 효과분석>

(1) 감귤 부위별 추출시료 준비

- 방사선 조사를 통해 감귤돌연변이체를 유도하고, 선발된 돌연변이가지에 착과된 과실 중 색깔, 모양, 당산도 변화를 보이는 부위별(과육, 과피, 잎) 추출물의 활성성분 도출을 위한 용매추출
- 수확한 시료는 농약 및 기타 불순물의 제거를 위해 물로 2회 세척함. 과실은 과육과 과피를 분리하고 잎부위와 함께 두께 0.3 cm로 slice하여 -70 °C 초저온냉장고에서 3일간 동결한 후, 72 시간 동결건조함
- 감귤을 이용하여 flavonoid를 분석한 기존 문헌들 중 Senevirathne(2010) 등의 연구를 토대로 100% methanol을 추출용매로 선정함
- 추출조건은 동결건조된 감귤부위를 각각 분쇄기로 마쇄한 후 0.5 mm mesh로 분말화함. 분말화한 감귤시료 2.5 g에 250 mL의 100% methanol을 각각 넣고(10 mg/mL), 24시간동안 25 °C에서 shaking incubator를 이용하여 추출함

(2) 감귤 부위별 2차대사산물 분석

- 총 폴리페놀 함량 분석: 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis의 방법을 변형하여 측정함. 감귤시료 추출물을 0.45 µm 실린지 필터로 여과한 후 Folin - Ciocalteu 시약(50%), 95% ethanol, DW를 가함. 5분 후 5% Na₂CO₃ 용액을 첨가한 후 혼합하고 1시간동안 발색시킨 다음 microplate reader를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하고 gallic acid 표준용액을 사용하여 구한 검량선에 의해 정량함
- 총 플라보노이드 함량 분석: 감귤시료 추출물을 0.45 µm 실린지 필터로 여과한 후 추출물에 NaNO₂ 용액(5%), DW를 가함. 6 분 후 10% AlCl₃ 용액을 첨가한 후 다시 6 분간 실온에서 incubation함. 4% NaOH 용액을 첨가한 후 DW로 총용량을 맞추고 잘 혼합한 다음 15 분간 실온에서 incubation함. microplate reader를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하고 rutin 표준용액을 사용하여 구한 검량선에 의해 정량함

- 통계처리: 모든 실험은 3회 반복하여 평균값과 표준편차로 나타내었고, SPSS program(12.0)의 Mann-Whitney U test를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 각 군의 대조군과의 유의성 여부를 검정하였다.

(3) 2차대사산물: 플라보노이드 성분 및 함량 분석

- HPLC 분석 조건을 확립하고 활성성분 규명을 위한 부위별(과육, 과피, 잎) 추출물의 플라보노이드 성분 분석
- HPLC 시스템은 Waters(Milford, MA)의 600 pump를 사용하였으며 W2998 UV-VIS detector를 이용하여 280 nm의 파장에서 플라보노이드를 검출함. 분석에는 Shimadzu 사(Japan)의 Shim-pack VP-ODS(C_{18}) column(4.6X150 mm, 5 μ m)이 사용됨
- Sigma(St. Louis, MO, US)에서 구입한 rutin, naringin, neohesperidin, hesperidin, narirutin, naringenin, hesperetin의 7가지 standard를 사용하여 HPLC로 크로마토그램을 작성하여 가장 양호한 검출파장을 선택하고, peak의 분리를 위해 플라보노이드 분석에 적합한 mobile phase 조건을 확립함[Eluent A, acetonitrile/acetic acid(1000/5); Eluent B, DW/acetic acid(1000/5); flow rate, 1 mL/min]. 확립된 mobile phase 조건으로 각 추출물을 10 μ L injection하고 standard curve를 이용하여 분석

(4) 감귤 부위별 리모넨 함량 분석

- 당화 부산물 중에 함유된 D-limonene의 측정은 GC-MS(GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu, Japan)를 이용하여 분리하였다. 고정상으로는 RTX-5MS(30 m \times 0.25 mm ID, 0.25 μ m film) 컬럼을, 이동상은 헬륨을 사용하였으며 유속은 1 mL/분이었음. GC 오븐은 0에서 2분까지 50 $^{\circ}$ C로 유지시킨 후, 3 $^{\circ}$ C/분의 속도로 80 $^{\circ}$ C까지 증가시키고 140 $^{\circ}$ C에서 280 $^{\circ}$ C까지 3 $^{\circ}$ C/분의 속도로 승온하였음. MS 분석 조건은 45 eV와 500 quadrupole, 200 ion source 온도를 사용하였고, 주입구(injector)의 온도는 250 $^{\circ}$ C이었음. 리모넨은 GC 크로마토그램을 작성하여 동정하고, standard curve를 이용하여 그 함량을 분석함

(5) 감귤 부위별 항산화능 측정

- DPPH를 이용한 라디칼 소거능 측정: 100% methanol로 추출한 여러 농도의 시료용액 100 μ L에 실험직전에 제조한 동량의 4 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액을 첨가 혼합하고 빛이 들어가지 않도록 하여 10분간 실온에서 incubation함. 517 nm에서 microplate reader (Spectra MR, Dynex, VA, US)를 이용하여 흡광도를 측정하여 소거능을 다음공식에 의해 산출함

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(C-CB) - (S-SB)]}{(C-CB)} \times 100;$$

S: absorbances of the sample, SB: blank sample, C: control, CB: blank control

- Superoxide 라디칼 소거능 측정: 시험관에 50 mM Na₂CO₃ 완충용액(pH 10.5) 1.2 mL, 3 mM xanthine 100 μL, 3 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 100 μL, 0.15% bovine serum albumin 용액 100 μL, 0.75 mM nitro blue tetrazolium (NBT) 100 μL의 혼합용액과 시료 100 μL를 넣어 25 °C incubator에서 10분간 반응시키고, 6 mU/mL xanthine oxidase (XOD) 100 μL를 가하여 25 °C의 incubator에서 20분 더 반응시킨 후, 6 mM의 CuCl₂ 20 mL를 첨가하고 560 nm에서 흡광도를 측정함
- Hydrogen peroxide 소거능 측정: 96 well plate에 시료와 blank, control을 구분하여 각 효소별 시료 80 μL에 인산완충용액(0.1 M, pH 5.0) 100 μL와 10 mM의 H₂O₂ 20 μL를 혼합하여 37 °C incubator에서 5 분간 반응시켰으며, 시료에는 실험 직전 제조한 1.25 mM 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonicacid (ABTS) 30 μL, blank에는 증류수 30 μL를 각각 첨가한 후, peroxidase (1 U/mL) 30 μL를 시료와 blank에 가하여 37 °C의 incubator에서 10분 반응시킨 다음 microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정함
- Nitric oxide 소거능 측정: 시료 50 μL에 인산완충용액(pH 7.0)으로 제조한 동량의 10 mM sodium nitroprusside를 첨가하여 25 °C incubator에서 3 시간 반응시킨 후, 100 μL의 griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% N-1-naphthylethylene diamine dihydrochloride in 2.5% polyphosphoricacid)와 혼합하여 5 분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정함
- 라디칼의 50%를 소거할 수 있는 소거농도 IC₅₀(mg/mL)를 dose-response 곡선의 수식으로 부터 계산하여 시험군 간의 항산화 활성을 비교함
- 통계처리: 모든 실험은 3회 반복하여 평균값과 표준편차로 나타내었고, SPSS program(12.0)의 분산분석(ANOVA)과 Duncan's multiple range test을 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정함

(6) 비교분석

- 방사선을 조사하지 않은 재래품종을 대조군으로 하여 2차 선발 돌연변이 감귤의 성분 및 함량과 비교

(7) 세포배양

- 본 실험에 사용된 HCT116 (인간대장암세포)는 McCoy's 5A medium, A375 (인간흑색종세포), Hela (인간자궁경부암세포), MCF-7 (인간유방암세포)은 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), A549 (인간폐암세포)은 Ham's F-12, HepG-2 (인간간암세포)는 minimum essential medium eagle배지에서 배양하였으며, 정상세포주 16HBE140- (인간폐

세포), CHANG (인간간세포)은 각각 DMEM/F-12, DMEM 배지에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin과 L-glutamine 을 첨가하여 37°C 습윤한 CO₂incubator(5%CO₂/95%air)에서 배양함. 세포가 배양용기의 80% 정도 증식하였을 때 적정수의 세포를 유지하기 위하여 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양하였고 배양액은 3-4일마다 교환함.

(8) 세포생존율 측정

- 세포 생존율 측정은 6 well plate에 세포를 2×10^6 cells/well이 되도록 분주하고 감귤 돌연변이 추출물을 농도별로 처리한 후 세포배양액과 0.4% trypan blue를 동량으로 넣어 hemacytometer를 이용하여 세포의 증식 정도를 광학현미경으로 관찰함. 측정은 모두 세 번 이루어졌으며, 시험물질을 첨가하지 않은 대조군 세포수를 100%로 하여 각 시험물질의 상대적인 생존율을 구함.

(9) Cell cycle 분석

- 시험 세포주(2×10^6 cells/well)에 감귤 돌연변이 추출물을 72시간 동안 처리한 후 세포를 회수하여 PBS로 세척하고 70% 에탄올로 4°C에서 30분 동안 고정함. 고정된 세포는 1200 rpm으로 12분 동안 원심분리한 다음 상층액을 제거하고 1% FBS가 포함된 PBS로 2-3회 세척함. 준비된 세포를 500 µg/ml의 PI로 염색한 후 10 µg/µl의 RNase가 포함된 PBS (1% FBS)에 넣어 37°C에서 30분 간 반응시키고 BD FACS calibur™ flow cytometer (BD biosciences, San Jose, CA, US)를 이용하여 세포주기를 분석함.

(10) DNA fragmentation 분석

- 세포(2×10^6 cells/well)에 감귤 돌연변이 추출물을 처리하여 72시간 동안 배양하고, 세포를 수집하여 genalute™ mammalian genomic DNA mini prep kit로 DNA를 분리함. 분리한 DNA는 1.8% agarose gel에서 60-120분(50 V) 동안 전기영동하여 EtBr로 염색하고 UV transilluminator 하에서 DNA 단편화 현상을 관찰함.

(11) Nitrite 생성량 측정

- 감귤 돌연변이 추출물을 처리한 배양용기에서 100 µl의 배지를 취하여 동량의 griess reagent를 첨가하고 이를 10분 간 실온에서 반응시켜 oxidation products인 NO₂⁻ 생성 정도를 540 nm 파장에서 측정하였으며, 이때 NO₂⁻ 농도에 대한 표준곡선은 NaNO₂를 사용하여 작성함.

(12) Reverse transcription-polymerase chain (RT-PCR)에 의한 mRNA 발현 분석

- 감귤 돌연변이 추출물을 처리한 세포를 모은 다음 TRI reagent를 처리하여 total RNA를 분리하였으며, 분리된 RNA는 UV spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, GE healthcare, US)로 정량한 후 TOP script™ one-step RT PCR kit와 각각의 primer, DEPC water를 넣고 유전자증폭기(Genepro, Bioer Tech, Hangzhou, China)에서 증폭함. mRNA 발현 수준을 비교하기 위하여 각 PCR 산물을 EtBr이 첨가된 1.5% agarose gel에서 60-90분(50 V) 동안 전기영동하였으며, β-actin을 internal control로 사용함.

(13) 통계 처리

- 본 실험의 결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 통계 처리는 student's t-test에 의해 $p < 0.05$ 인 경우 유의한 것으로 판정함.

2. 연구내용 및 연구결과

[제1세부: 생리적 특성 및 유전적 분석을 통한 돌연변이체 선발]

가. 돌연변이 감귤 육종 포장 조성

- 제3세부과제와 협력하여 4군데의 돌연변이 감귤 육종 포장을 조성하였음. 제주시 방면에 제1시험포장은 1,2차 선발한 증식 돌연변이 감귤의 정식에 사용 중에 있으며, 제4시험 포장은 탕자화분을 이용한 선발 계통의 접목용 개체의 유지에, 서귀포시 방면의 제2시험포장은 1,2차 선발 계통의 고정화 및 돌연변이 감귤의 정식에, 제3시험포장은 1차 선발 및 2차 선발 돌연변이 계통의 접목에 사용 중에 있음.



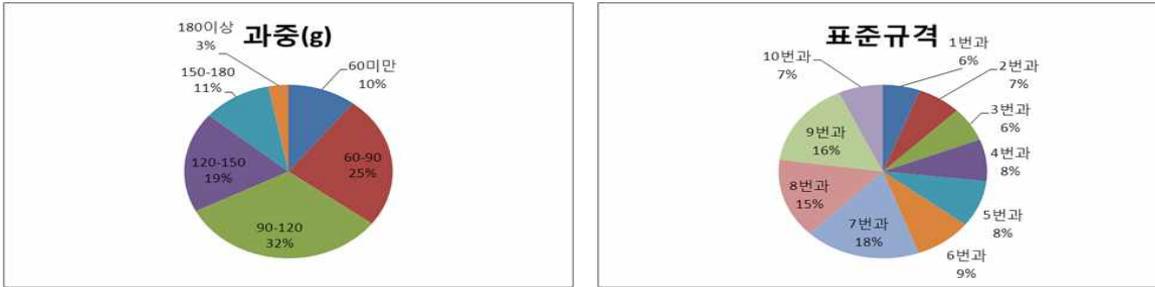
나. 돌연변이 감귤의 형질 조사

- 2009년에 3690개의 돌연변이 2차가지에서 12880개의 과실을 측정하였고, 2010년에는

1180개의 가지에서 3331개의 과실을, 2011년에는 1672개의 가지에서 7001개의 과실을, 2012년에는 1853가지에서 8419개의 과실을, 2013년에는 1387가지로부터 5668개의 과실을, 2014년에는 2264개의 가지로부터 10064개의 과실을 대상으로 당도, 산도, 중경, 황경, 과중 등을 조사하였음.

○ 이중 2014년 12월 초에 수확한 감귤을 대상으로 조사한 감귤의 형질은 다음과 같음.

(1) 돌연변이 가지 평균별 과중 및 표준규격에 따른 크기 분포

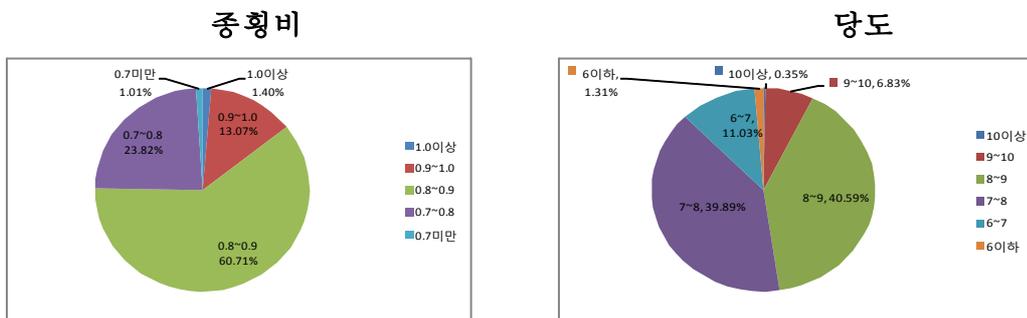


(2) 연도별 규격 분포

	2009	2010	2011	2012	2013	2014
1번과	2.1%	3.6%	4.8%	3.8%	18.4%	5.8%
2번과	5.2%	3.7%	5.2%	6.5%	10.6%	6.8%
3번과	5.9%	4.9%	6.2%	5.3%	10.6%	6.4%
4번과	8.0%	5.7%	7.9%	8.0%	13.1%	7.8%
5번과	8.0%	7.8%	8.9%	11.6%	8.3%	8.7%
6번과	9.3%	9.2%	10.3%	10.6%	11.1%	8.9%
7번과	18.1%	19.9%	21.5%	22.1%	13.4%	18.0%
8번과	13.7%	21.2%	16.1%	17.7%	8.6%	14.8%
9번과	18.2%	19.2%	14.2%	13.1%	5.1%	15.9%
10번과	11.5%	4.8%	4.9%	1.3%	0.8%	6.9%

-각 조사연도의 기후와 온주감귤이 가지고 있는 해거리 현상에 의해 착과되는 감귤의 크기가 다른 것을 알 수 있음. 작년(2014)에는 크기가 큰 감귤 생산이 많았음.

(3) 돌연변이 가지 평균별 중황비 및 당도 분포

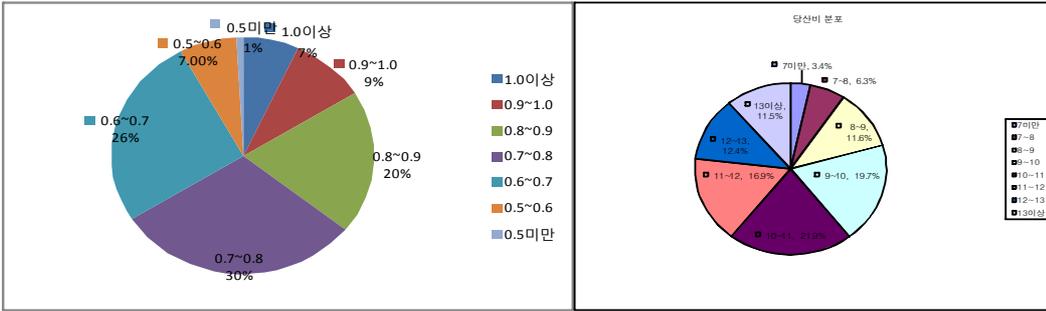


(4) 연도별 당도분포

	2009	2010	2011	2012	2013	2014
8°Brix미만	1.5%	31.0%	0.6%	1.2%	42.7%	52.1%
8~9°Brix	14.3%	45.1%	5.1%	9.6%	32.1%	41.9%
9~10°Brix	45.4%	19.9%	27.2%	25.8%	12.6%	6.9%
10~11°Brix	30.4%	3.3%	42.7%	30.8%	7.1%	0.3%
11~12°Brix	5.6%	0.5%	21.5%	27.3%	2.5%	0.0%
12°Brix이상	2.8%	0.2%	3.0%	5.4%	3.0%	0.0%

-마지막 년도의 경우 가을 기후가 좋지 못해 고당도의 과실이 많지 않았음

(5) 돌연변이 가지 평균 산도 및 당산비 분포



(6) 연도별 당산비 분포

	2009	2010	2011	2012	2013	2014
7미만	6.5%	41.4%	0.6%	4.6%	0.5%	3.4%
7~8	10.2%	23.4%	1.7%	8.6%	0.3%	6.3%
8~9	17.9%	18.8%	3.8%	14.8%	4.3%	11.6%
9~10	20.5%	8.8%	7.3%	16.7%	14.1%	19.7%
10~11	18.6%	4.6%	12.0%	20.0%	19.7%	21.9%
11~12	13.2%	2.4%	13.9%	16.7%	21.7%	16.9%
12~13	7.8%	0.6%	15.5%	18.6%	17.2%	12.4%
13이상	5.4%	0.1%	15.2%	0.0%	22.2%	11.5%

-2014년 착과된 감귤에서 감귤이 커짐에 따라 당산비가 높은 과실의 비율이 2013년보다 낮아졌음.

나. 돌연변이 감귤의 형질 조사를 통한 우수 계통 선발

(1) 당산비 우수 계통

○ 1-3차년도 선발계통: 접목을 통한 증식 중에 있음

	선발가지		중경	횡경	과중	과피두께	당도	산도	당산비
1	6s4a15	4	51.66	67.74	139.04	2.66	12.28	0.89	13.8
2	6s8a56	13	48.98	56.68	86	2.8	12.8	0.95	13.5
3	6s8a14	10	49.94	59.42	96.44	2.94	12.12	1.00	12.2
4	6s8a65	22	53.24	65.74	126.8	2.68	13.16	0.74	17.9
5	6s8a65	23	49.6	62.32	99.94	2.5	13.12	0.65	20.2
6	6s6b17	4	41.68	51.64	64.62	2.08	12.02	0.92	13.0
7	6s6b17	23	49.44	60.4	101.96	2.78	12.02	0.86	14.0
8	6s8a7	27	52.7	56.88	89.66	3.04	12.48	1.08	11.6
9	6s8a92	16	48.6	59.1	98.84	2.26	15.34	1.03	14.9
10	6s6b12	7	49.8	62.48	103.98	1.78	13.92	1.04	13.4

11	6s6b12	14	54.1	61.1	103.9	1.6	13.72	1.03	13.4
12	6s6b12	38	45.98	58.42	80.88	2.02	12.06	1.09	11.1
13	6s4a91	12	41.94	48.12	61.88	2.04	13.1	0.85	15.4
14	6s4a92	10	53.94	59.06	95.22	2.76	12.1	0.78	15.6
15	6s6a72	3	43.4	56.22	76.3	2.32	12.32	0.69	18.0
16	6s6a83	12	42.6	58.5	83.68	2.5	12.38	0.70	17.7
17	6s6a85	18	49.24	58.28	85.46	2.08	12.7	0.81	15.7
18	6s6a97	6	44.7	60.6	88	1.82	12.54	0.82	15.3
19	6s6a104	19	44.04	65	95.98	2.08	12.26	0.73	16.9
20	6s8a10	10	47.34	60.48	92.7	2.154	12.42	0.90	13.9

○ 5차년도 선발: 제3시험포장에서 선발한 개체를 2차 선발을 위해 접목하였음

	계통	과실종경 (mm)	과실횡경 (mm)	과중 (g)	과피두께 (mm)	과피의 색도			당도 Brix%	산도 %
						L	a	b		
1	SNa13-11	61.612	82.052	184.68	2.862	60.982	28.654	99.552	9.50	0.636
2	SJc3-2	53.288	67.118	119.48	2.858	62.61	25.79	36.18	10.38	0.9625
3	SRa3-1	51.712	62.614	107.02	2.294	52.98	30.31	35.048	9.56	0.638
4	SCa14-5	52.072	67.016	125.96	1.494	61.072	29.302	35.416	9.54	0.77
5	SBc21-4	53.952	71.368	115.3	3.04	60.206	29.28	35.096	9.36	0.686
6	Slc3-3	61.574	68.842	158.22	1.84	64.514	28.034	37.554	9.2	0.856
7	SJa1-2	40.836	56.354	77.98	2.178	59.224	30.15	33.438	9.32	0.626
8	SRa1-4	48.39	58.85667	104.3	2.136667	62.18667	28.73	35.58667	9.8	0.756667
9	SGa13-1	63.086	78.316	179.98	3.652	62.062	30.388	36.244	9.3	0.818
10	SFa1-3	46.686	57.372	79.7	2.264	66.936	26.454	38.672	10.04	0.914
11	SJa1-4	43.86	52.442	63.1	2.358	58.386	29.586	33.178	9.24	0.686
12	SBa16-7	52.378	60.942	94.08	2.864	63.922	26.534	37.292	9.24	0.82

○ 4차년도 선발: 2차선발을 위해 탱자대목에 접목하였음

육종포장	돌연변이 가지
서귀포의료원	6s4b11-9, 6s6b12-25, 6s6b12-38, 6s6b16-10,25,27,28, 6s6b17-23, 6s6c3-14, 6s6c27-2, CGT1-9, CH4-1, CO6-2,8, CQ2-9,56, CR1-7 (총 17개)
아열대농업생 명과학연구소	SAA1-1, SFA1-4, SFA7-8, SGA13-1,3, SHA3-1,2, SHC3-1,3, SLA1-1,4,6, SLA21-6, SLc1-5,7,8, SLc3-1,3,4, SJA1-1,2,4, SJC1-1,2, SKA27-4,5, SLA19-7, SLA3-1,8, SMA5-4, SMC5-6,8, SNA11-3, SPC13-10, SQc7-3,4 (총 36개)

(2) 색깔(홍색) 변이 계통

○ 다수의 홍색 돌연변이 계통이 1차 선발되어 2차 선발 중에 있음. 계통에 따라 당도와 산도의 특성이 다르나 많은 계통에서 당도가 향상되고 익엽의 특성이 나타남. 과피의 경도가 온주 감귤에 비해 증가하여 오렌지와 유사한 특성을 나타냄

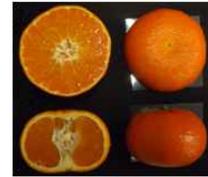
○ 6s4d12-8 계통

연도	과실 종경	과실 횡경	과중	과피 두께	당도	산도	당산비	색도			
								L	a	b	a/b
2009	63.8	74.6	188.6	4.2	10.3	0.95	10.8	59.86	60.67	57.97	1.05
2013	53.9	70.1	145.5	2.6	11.6	1.1	10.5	61.4	41.1	59.8	0.69



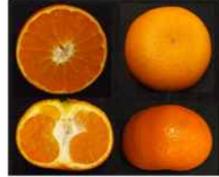
○ 6s8a7-27 계통

종경 mm	횡경 mm	과형지 수	무게 g	과피두께 mm	당도 °Brix	산도 %	과피색도		
							L	a	b
50.04	67.65	135	121.15	2.30	12.39	1.13	59.82	42.40	57.21



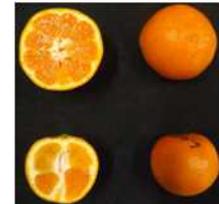
○ 6s6b7-8 계통

종경 mm	횡경 mm	과형지 수	무게 g	과피두께 mm	당도 °Brix	산도 %	과피색도		
							L	a	b
53.99	69.01	128	139.36	2.48	13.18	0.96	62.52	39.34	61.29

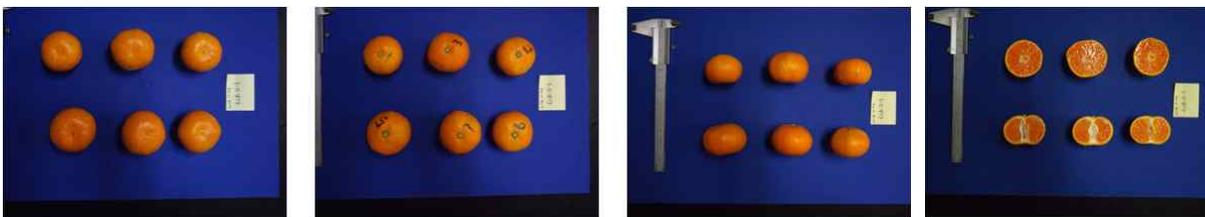


○ 6s8c23-7 계통

종경 mm	횡경 mm	과형지 수	무게 g	과피두께 mm	당도 °Brix	산도 %	과피색도		
							L	a	b
48.75	54.92	113	68.18	3.17	13.43	0.98	64.68	36.88	64.36



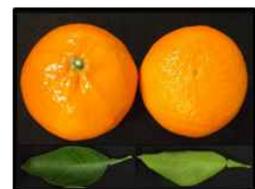
○ 6s8c23-3 계통



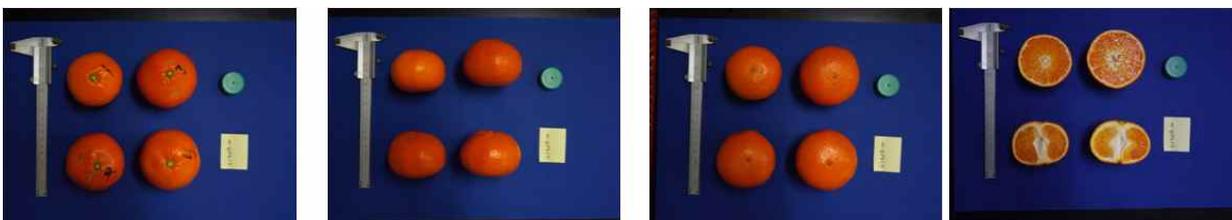
과실종경 (mm)	과실횡경 (mm)	과중 (g)	과피두께 (mm)	과육의 색도/ 과피의 색도			당도 Brix%	산도 %
				L	a	b		
52.96375	60.97375	142.1625	2.26	54.36875	32.9225	30.37625	10.475	1.31

○ 6s4d13-20 계통

종경 mm	횡경 mm	과형지 수	무게 g	과피두께 mm	당도 °Brix	산도 %	과피색도		
							L	a	b
55.5	69.7	126	144.8	2.8	7.7	0.5	61.84	36.70	57.88

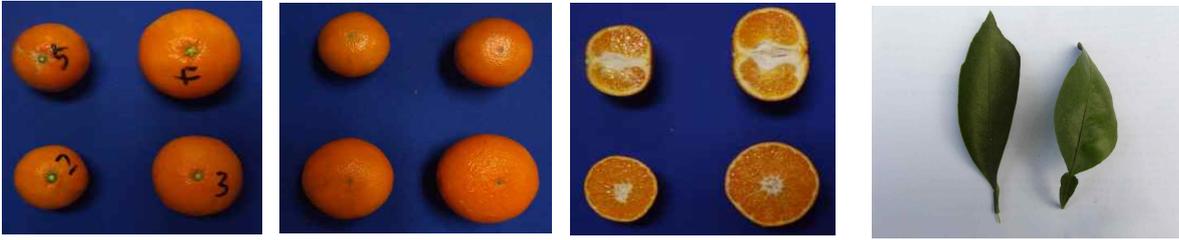


○ 6s4d14-30 계통



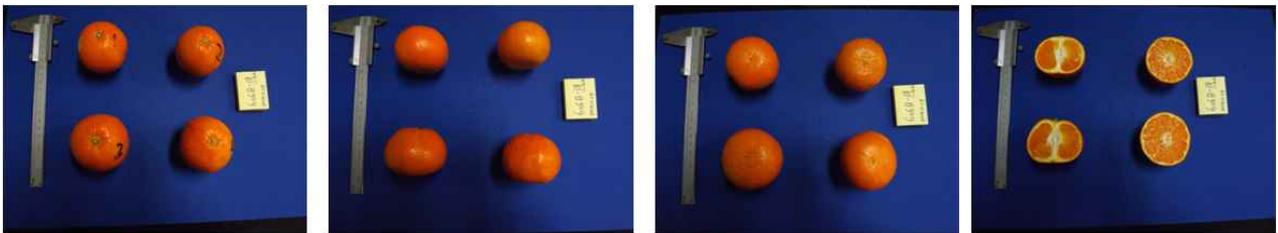
과실종경 (mm)	과실횡경 (mm)	과중 (g)	과피두께 (mm)	과육의 색도/ 과피의 색도			당도 Brix%	산도 %
				L	a	b		
56.69714	70.48857	138.8143	2.835714	56.42429	36.17714	31.42	10.21429	1.165714

○ 6s6b16-27 계통



과실 종경 (mm)	과실 횡경(mm)	과중 (g)	과피 두께 (mm)	당도 (°Brix)	산도 (wt%)	과피색도		
						L	a	b
48.552	59.574	93.3	2.424	12.12	1.014	61.736	40.25	59.682

○ 6s6b18-22 계통



과실종경 (mm)	과실횡경 (mm)	과중 (g)	과피두께 (mm)	과피의 색도			당도 Brix%	산도 %
				L	a	b		
49.3	61.235	97.375	2.0675	55.85	37.2025	31.2225	11.5	1.2625

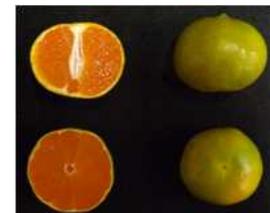
(3) 만숙과 계통

개체번호	종경 (mm)	횡경 (mm)	과중 (g)	과피두께 (mm)	당도 (°Brix)	산도 (%)
6s6b4 - 16	46	54	65.9	2.3	10.8	0.63
6s6b5 - 18	59.1	64.2	111.6	3.05	9.05	0.57
6s4d6 - 24	47.54	58	79.2	2.2	9.9	1.02
6s8b4-12	50	58.1	94.6	2.1	8.9	0.68
Control	40.14	54.5	60.88	2.14	9.9	0.97



○ 6s4b5-16 계통

종경 mm	횡경 mm	과형지 수	무게 g	과피두께 mm	당도 °Brix	산도 %	과피색도		
							L	a	b
36.25	44.20	122	40.55	0.94	9.20	1.01	63.88	-6.88	57.20

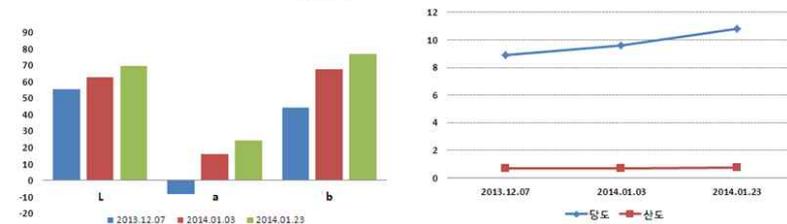
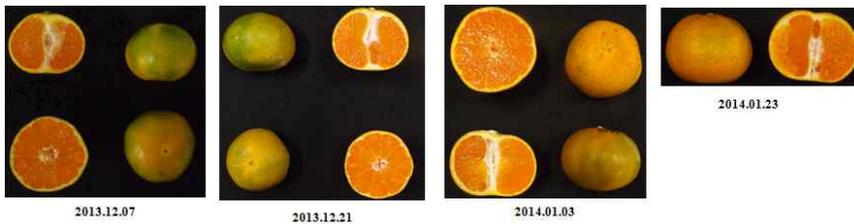


-과피가 매우 얇아 과육과의 밀착성이 나타남. 저장성이 좋아질 것으로 예상됨

○ 만숙과 계통(6s8b4-12, 아라온주로 명명)의 수확시기별 당산도 변화

아라온주											
연도	과실 종경 (mm)	과실 횡경 (mm)	과중 (g)	과피 두께 (mm)	당도 (°Brix)	산도 (wt%)	당산비	Hunter color value			수확시기
								L(Light-ness)	a(Red-ness)	B(Yellowness)	
2009	50.1	62	99.5	1.7	9.4	0.99	9.5	71.2	-8.9	67.9	12월 중순
2010	51.4	55.6	79.3	2.4	8	1.21	6.6	62.4	-9.9	57	12월 초
2012	50.8	60.7	100.1	2.2	8.2	0.97	8.6	51.6	-10.6	41.5	12월 초
2013	47.15	57.47	86.1	2.64	10	0.87	11.5	59.9	-9.7	54.2	12월 초
공천조생											
2009	53.8	63.8	116.3	1.6	9.3	0.92	10.1	61.56	22.47	60.84	12월 중순
2010	52.9	58.8	102.3	2.1	9	1.09	8.3	65.29	23.72	62.27	12월 초
2012	50.1	60	94.6	2.4	9.6	0.9	10.9	61.81	26.36	60.17	12월 초
2013	46.3	58.88	82.2	2.1	9.1	0.9	10	69.1	27.4	72.79	12월 초

품종	종경	횡경	무게	색차			당도	산도	과피 두께	수확 시기
	mm	mm	g	L	a	b	°Brix	wt%	mm	
아라온주	47.15	57.47	86.1	59.86	-9.65	54.24	10	0.87	2.64	13.12.07
	49.95	56.66	94.6	62.72	15.93	67.6	9.6	0.75	2.18	14.01.03
	48.07	58.7	87.2	69.4	24.37	72.62	10.8	0.77	1.85	14.01.23
공천조생	46.3	58.88	82.2	69.1	27.4	72.79	9.1	0.9	2.1	13.12.07
	48.15	60.64	90.6	66.86	27.46	68.38	9.9	0.81	2.16	14.01.03
	44.69	55.96	74.34	65.6	32.76	71.58	9.9	0.64	2.56	14.01.23



-과실의 수확시기를 1월 하순으로 늦출수록 당도가 증가되는 특성이 있고, 산도는 0.7 이상으로 유지하고 있는 특성이 있음. 또한 부피과도 관찰되지 않음

-활용: 설 전 수확 감귤로서 재배가 가능. 수확시기의 분산에 따른 감귤 가격의 안정화가 기대됨

(4) 과형변이 계통

○ 6s6c3-24 계통

종경 mm	횡경 mm	과형지 수	무게 g	과피두께 mm	당도 °Brix	산도 %	과피색도		
							L	a	b
44.04	40.66	92	37.54	2.04	12.50	1.70	62.43	36.62	60.84

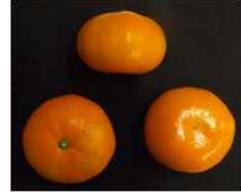


-과형지수가 100이 되지 않아 종경이 횡경보다 긴 특성 있고, 당도와 산도가 높아 오렌지 맛과 유사한 특성이 있음. 과실의 전체 크기가 작음

-한입에 먹기에 좋아 생과로서 차별성을 가지고 판매가 가능할 것으로 예상됨

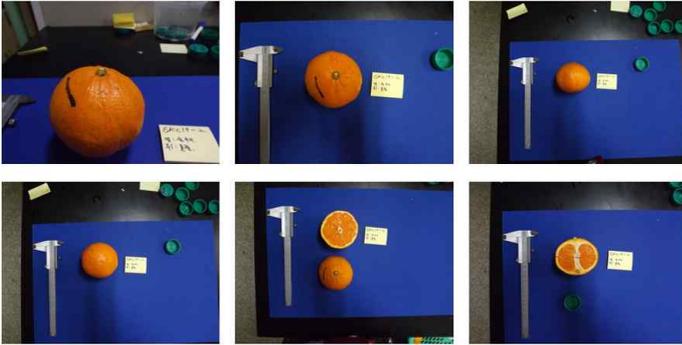
○ 6s6b2-25 계통

종경 mm	횡경 mm	과형지 수	무게 g	과피두께 mm	당도 °Brix	산도 %	과피색도		
							L	a	b
42.08	63.22	150	93.22	2.33	10.26	0.68	64.78	32.79	66.37



-과형지수가 150으로서 횡경이 종경에 비해 커서 납작한 모양을 나타냄. 산도가 낮아져서 당산비가 매우 높은 특성을 나타냄. 외형이 흥진조생과 닮아 있으나 당산비에 차이가 많이 남.

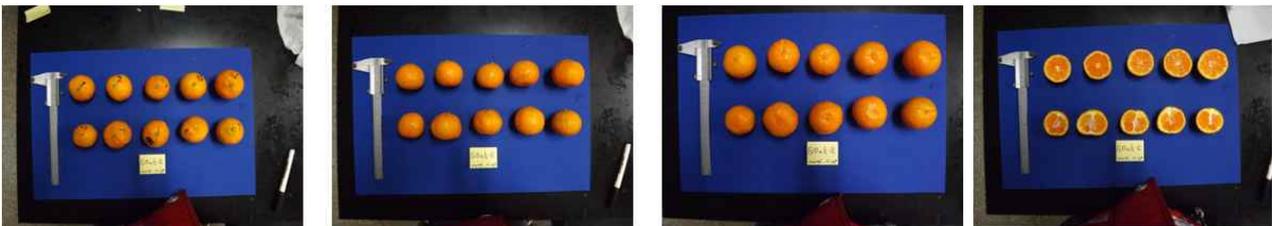
○ SKc19-2 계통



과실종경 (mm)	과실횡경 (mm)	과중 (g)	과피두께 (mm)	과피의 색도			당도 Brix%	산도 %
				L	a	b		
67.19	75	176.6	4.02	61.52	30.74	35.48	8.8	0.7

-감귤 꼭지부분에 약간의 골이 있으며 과피두께가 두껍고, 과실의 탄력성이 좋음. 즉, 과육과 과피간의 밀착성이 좋음

○ SOa5-5 계통



과실종경 (mm)	과실횡경 (mm)	과중 (g)	과피두께 (mm)	과피의 색도			당도 Brix%	산도 %
				L	a	b		
45	49.65	48.92	3.496	59.286	27.378	33.849	7.31	0.637

-형태는 아래의 4a30-13 계통과 유사한 특성이 있음. 차이에 대한 지속적인 연구가 필요함

○ 6s4a30-13 계통(제대온주로 명명)



-외형적으로 감귤 꼭지로부터 세로 방향으로 골이 생겨있는 모습으로 과피가 거친 특성이 있음. 그러나 Albedo층은 매끈해 과육과 밀착하는 특성이 있음. 골은 어린 과실에서 뚜렷하다가 성숙하면서 약해지는 것을 관찰할 수 있음

-감귤 형질 분석

제대은주										
연도	과실 총경(mm)	과실 횡경(mm)	과중 (g)	과피 두께(mm)	당도 (°Brix)	산도 (wt%)	Hunter color value			수확시기
							L	a	b	
2009	62.3	78.1	156.73	4.2	10.2	0.97	64.41	33.95	64.66	12월 중
2010	54.8	66.5	131.6	2.1	7.8	0.78	67.78	29.56	72.44	12월 초
2011	52.8	62.6	110.3	2.6	10.8	0.69	69.5	26.5	72.4	12월 초
2013	34.9	46.3	41.1	2.5	11.8	0.85	66.48	30.69	68.77	12월 초
2014	65.35	64.64	126.3	4.02	7.4	1.25	59.55	30.51	34.84	12월 초
궁천조생										
2009	43.7	50.1	67.4	2.3	8.2	0.83	66.88	26.96	73.37	12월 초
2010	51.7	56.6	94.0	2.0	8.8	1.00	67.56	31.13	70.31	12월 초
2011	50.1	60.0	94.6	2.4	9.6	0.9	39.36	28.77	72.18	12월 초
2013	45.5	60.4	88.2	2.4	10.2	0.82	67.58	32.36	69.57	12월 초
2014	57.6	61.38	102	3.44	7.4	1.25	58.33	30.74	33.32	12월 초

-플라보노이드 성분 분석

함량 (mg/100 g 과피 건량)	2010년		2014년	
	Hesperidin	Narirutin	Hesperidin	Narirutin
Control (궁천조생)	463.1 ± 1.11	60.8 ± 1.51	75.3 ± 0.85	12.2 ± 1.34
제대은주	546.6 ± 3.38*	78.5 ± 0.61*	125.6 ± 1.01*	22.4 ± 0.29*

*는 대조군과 비교하여 유의미한 차이를 보인 값을 나타낸다 (p<0.05).

-3세부 과제에서 플라보노이드 성분을 분석한 결과 Hesperidin과 Narirutin의 플라보노이드 성분의 함량이 돌연변이 제대은주에서 증가한 것으로 나타났음

-활용 : 플라보노이드 강화 가공품(주스 등), 관상용 등

(5) 복합형질

○ 6s6b4-12 계통

연도	과실 총경	과실 횡경	과중	과피 두께	당도	산도	색도			
							L	a	b	a/b
2010	39.5	26.0	56.9	2.3	10.2	1.02	63.33	17.66	60.90	0.29
2013	39.2	49.4	56.2	1.9	6.1	0.5	60.3	2.22	56.8	0.04



-외형은 개구리참외와 비슷하여 초록색 바탕에 노란색 줄이 있고, 1월 하순에도 완숙하지 않는 특징이 있음. 과피의 두께가 약간 두꺼워지나 부피과는 1월 말까지 관찰되지 않음. 당도는

9.3 - .8 Brix, 산도는 0.9 - 1 %로서 궁천은주에 비해 당도와 산도가 낮은 특성이 있음

-특이하게도 궁천조생과는 다른 독특한 향이 나고, 전체적으로 맛이 다른 특성이 있음

-활용: 차류 등의 가공품, 관상용 등

○ NCM-1 계통

번호	종경	횡경	무게	착색			당도	산도	두께
				L	a	b			
C1	45.5	60.4	88.2	67.58	32.36	69.57	10.2	0.82	2.4
C2-1	43.4	54.7	76.5	67.95	30.49	70.08	11.7	1.11	1.9
C2-2	46.9	58.6	88.8	66.70	33.19	70.30	11.4	1.03	2.1
NCM-1	45.6	56.2	77.4	78.80	0.69	60.34	9.4	0.82	1.9



-과실이 단단하며, 전체적으로 노란색을 나타냄. 과실의 착과 초기시기부터 노란색을 나타내며 11월 중하순에 전체적으로 노란색을 나타냄. 산도가 낮아 당산비가 높아 식감이 좋음. 잎에도 노란색과 초록색이 함께 있는 알비노 현상을 나타냄

-활용: 관상용, 조기 수확용

(6) 기타: 개화시기, 병저항성 등 형질

-5월 초·중순인 만개시기인 궁천조생의 특성을 바탕으로 조사를 수행하였으나 개화시기가 빨라지거나 늦어진 특성을 안정적으로 보이는 1차 선발 계통은 없었음. 일부 과실의 성숙시기가 늦어진 만숙의 특성을 보이는 계통의 경우에도 개화시기에는 별다른 변화가 없었음

-노지에서 선발하고 있는 돌연변이 가지에서 관행적으로 감귤을 재배하는 실험 조건에서 특이하게 병저항성을 나타내는 우수 계통은 선발할 수 없었음. 이에 대한 조사는 선발한 계통을 중심으로 추후 조사나 구축된 돌연변이 가지를 대상으로 하여 병해충 관리의 재배기법을 달리 하여 저항성 있는 가지를 선발하는 전략이 필요함. 이에 대한 연구는 향후 연구과제에서 수행하고자 함

(7) 선발 계통의 어린 과실(2015년 7월 17일 채취)의 특성 조사

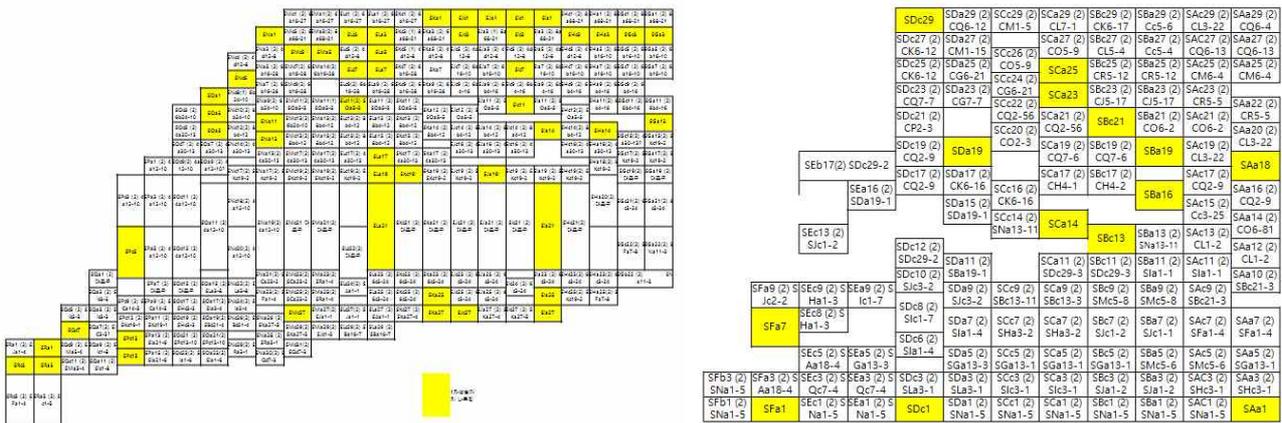
계통	과실 종경	과실 횡경	과중	과피 두께	당도	산도	색도			경도	
							L	a	b	Albedo	과육
대조구	28.53	29.54	12.9	4.12	7.3	1.67	24.24	-5.83	7.18	0.96	0.9
6b4-16	27.05	27.90	10.7	5.78	7.2	2.29	26.41	-7.42	8.37	0.94	0.84
6c3-21	30.77	28.60	12.9	5.07	X (착즙 불가)	X (착즙 불가)	28.28	-6.61	8.10	0.98	0.96
8b4-12	28.58	28.01	11.6	3.89	5.9	1.96	29.37	-7.66	8.35	0.92	0.88
4a30-13	31.78	34.13	17.2	3.59	6.9	2.15	27.54	-6.66	8.13	0.85	0.86
6b16-10	29.65	30.73	14.6	4.95	X (착즙 불가)	X (착즙 불가)	27.52	-6.93	8.07	1.1	0.92



다. 우수 돌연변이 계통의 증식 후 정식(2세부과제와 공동으로 수행)

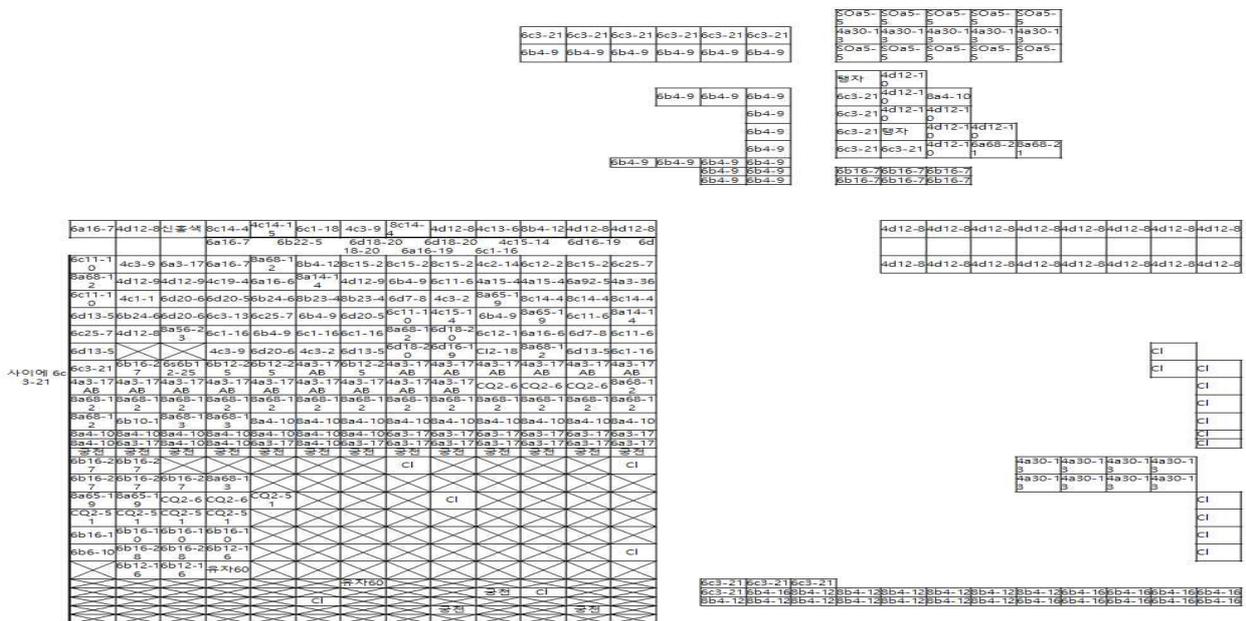
- 선발을 통해 당산도 개선, 과형 변이, 과색 변이, 과실 성숙시기 변이 등의 경제성이 있는 것으로 1차 또는 2차 선발을 통해 선발된 돌연변이 가지로부터 눈(bud)을 탱자 대목 또는 성목에 접목하여 돌연변이 개체의 증식 및 품종 출원에 대비함
- 성목에의 접목은 아열대농업생명과학연구소의 궁천조생 가지에 접목을 수행하였고, 탱자대목은 서귀포의료원 근처의 동흥동 포장에 2012년에 식재된 탱자를 대목으로 사용하여 2014년에 접목한 후, 2015년 3월에 이식하여 정식하였음

(1) 성목에 접목(아열대농업생명과학연구소)



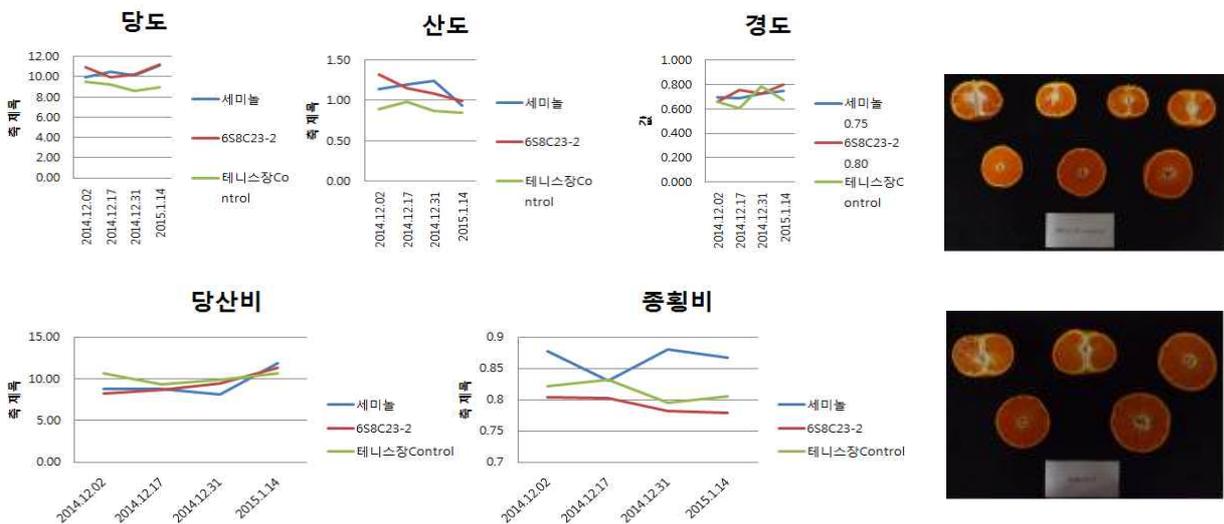
(2) 탱자대목에 접목(동흥동 포장) 후 이식

① 동흥동포장에 정식



라. 우수 돌연변이 계통의 저장성 조사

- 홍색돌연변이 계통의 과실을 대상으로 저온(5°C)에서 저장하면서 형질을 조사함
- 홍색 돌연변이 계통인 6S8C23-2를 대상으로 저온 상태에서 보관하면서 2주 간격으로 형질을 조사한 결과 당도의 경우 저장기간에 따라 궁천조생은 감소하였으나, 홍색돌연변이 감귤은 당도가 유지되었음. 산도의 경우 홍색돌연변이가 궁천온주에 비해 높았으나, 저온에 따라 1%까지 감소하여, 당산비가 저장기간에 따라 증가하였음. 또한 부피과와 부패과도 관찰할 수 없었음. 따라서 수출용 감귤로서 활용가능할 것으로 사료됨



마. 유전체 분석을 통한 유전자 소재 개발

- 대상 돌연변이 계통: 과형의 변화를 나타내었던 6s4a30-13의 잎(1차년도) & 과육(2차년도)에서 발견되는 유전자를 대조구인 궁천조생의 잎 & 과육과 비교

(1) Gene selection

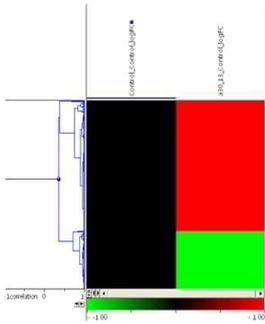
- 선별기준
 - ① Fold change : 2 fold 이상

1-1. Significantly changed Genes: 전체목록은 <첨부자료 >

Sample set	Up regulation (fold)			Down regulation (fold)			전체 유의유전자수 (fold)		
	2	3	4	2	3	4	2	3	4
Control_a3013(과실)	5570	149	18	4860	1070	339	10,430	1,219	357
Control_a3013(잎)	1398	242	84	620	67	9	1,640	309	93

1-2. Hierarchical Clustering (log2 ratio 이용)

(2) Functional grouping



2-1. GO(Gene Ontology) analysis

- 1-1.에서 유의하게 분류된 유전자를 GO로 기능분류 (FDR5% 적용)

Sample set	Up regulation	Down regulation	전체 유의유전자수
Control_a3013(과실)(4 fold) (2 fold)	5 (20)	69 (632)	74 (652)
Control_a3013(잎) (2 fold)	506	249	755

- GO category 분류 (FDR 5% 적용)

Sample set	Biological process	Cellular component	Molecular function	Total
Control_a3013(과실) (4 fold)	7	1	16	24
Control_a3013(잎) (2 fold)	0	0	0	0

2-2. Metabolic Pathways

2-1.GO analysis에서 유의하게 분류된 유전자를 애기장대 데이터베이스와 연계하여 KEGG로 (<http://www.arabidopsis.org/biocyc/>, <http://www.genome.ad.jp/kegg/>) 분류하였음.

Sample set	Up regulation	Down regulation	전체 유의유전자수
Control_a3013(과실)	0	0	0
Control_a3013(잎)	0	0	0

2-3. TF(Transcription factor)

Sample set	Up regulation	Down regulation	전체 유의유전자수
Control_a3013(과실)	5	18	23
Control_a3013(잎)	47	40	87

(3) COG analysis

3-1. Clusters of Orthologous Groups(COG) analysis (a3013-과실)

과실	COG Definition	2-Fold up		2-Fold down	
		과실	잎	과실	잎
INFORMATION	Translation, ribosomal structure and	69	21	42	16

STORAGE AND PROCESSING	biogenesis				
	RNA processing and modification	63	16	33	11
	Transcription	73	15	58	6
	Replication, recombination and repair	31	7	32	4
	Chromatin structure and dynamics	20	5	10	3
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	cycle control, cell division, chromosomepartitioning	26	5	8	4
	Nuclear structure	8	0	4	0
	Defense mechanisms	12	4	10	3
	Signal transduction mechanisms	132	24	119	20
	Cell motility	16	10	20	3
	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1	0	0	0
	Cytoskeleton	27	0	23	1
	Extracellular structures	1	2	4	0
	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	92	13	75	6
	Posttranslational modification, protein turn-over, chaperones	151	39	129	25
METABOLISM	Energy production and conversion	67	15	71	10
	Carbohydrate transport and metabolism	100	25	109	18
	Amino acid transport and metabolism	77	14	69	9
	Nucleotide transport and metabolism	20	5	8	1
	Coenzyme transport and metabolism	22	6	26	4
	Lipid transport and metabolism	67	17	94	6
	Inorganic ion transport and metabolism	39	6	67	2
	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	62	25	105	6
POORLY CHARACTERIZED	General function prediction only	274	102	247	35
	Function unknown	96	5	66	8

(4) 생물정보분석을 통해 발현차이를 많이 보이는 유전자

4-1. 돌연변이에서 4배 이상 발현이 증가된 대표 유전자: trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein(8.56, 7.67, 6.58, 6.31, 5.56, 5.47, 5.28), NOVEL CAP-BINDING PROTEIN(6.03), ATLOX2, LOX2|LOX2 (LIPOXYGENASE 2)(5.86), JMT (JASMONIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE)(5.65), TTN7 (TITAN7)(5.55), S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein(5.47), RER1 (RETICULATA-RELATED 1) (5.41), pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein(5.39), ACT domain-containing protein(5.37), |leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein(5.22) 등

4-2. 돌연변이에서 4배 이상 발현이 감소된 대표 유전자: hydrolase(-6.66), protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein(-4.76), leucine-rich repeat family protein(-4.11), ECT6 (evolutionarily conserved C-terminal region 6)(-4.05), 상동성없는 유전자 등

4-3. 발현차이를 많이 보이는 유전자에 대한 기능에 대한 생물정보 분석

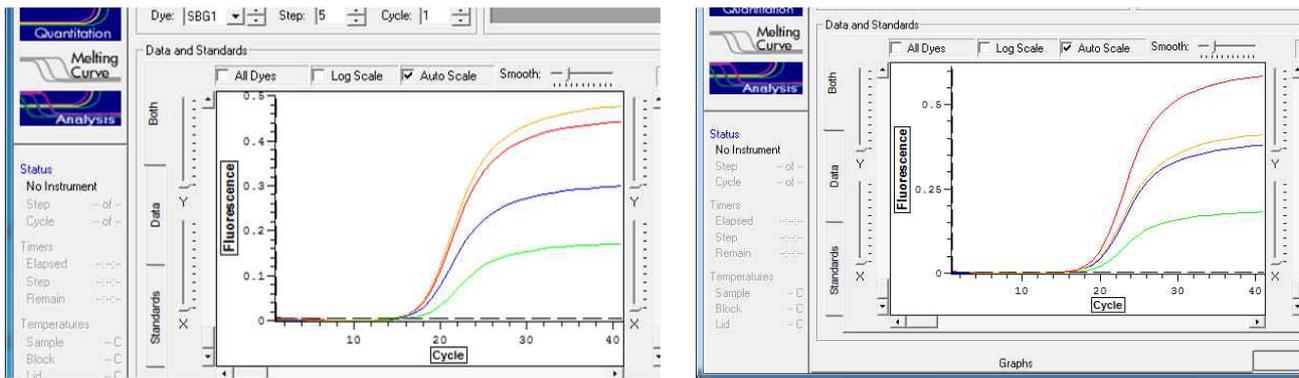
-발현이 증가된 trypsin inhibitor의 경우 multigene family로 식물에 존재하며, 그 종류에 따라 발현의 양상이 많이 다른 것을 볼 수 있음. 세포질에 존재하거나 세포벽 등에 존재하며, 잎, 자엽, 과실, 종자 등의 다양한 기관에 존재하며, 식물의 발달시기 또한 초기, 중기 등으로 많이 다른 것을 확인할 수 있음

-현재까지 밝혀진 trypsin inhibitor의 기능은 주로 질병에 대한 저항성과 관련되어 연구가 진행되어 있으나, 다양한 발현장소와 시기로 인해 다른 기능이 있을 것으로 추정되기도 함. 토마토에서 밝혀진 trypsin inhibitor의 경우 과실의 발달시기에 따라 다른 발현양상을 나타내고 있음. 심지어 품종에 따라 존재하는 유전자의 종류가 다르기도 함.

4-4. Real time-PCR을 통한 발현 증가 확인

-Flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase, Actin depolymerizing factor, Ca²⁺-binding protein (centrin/caltractin)에 대한 프라이머를 합성하여 Real time-PCR을 통해 microarray 결과를 검증함.

유전자	프라이머 서열
ubiquitin-protein ligase	5'-CGGAAACCCCGAAACAACAG 5'-TTGTTCCGGTGGTCGGTCTT
Flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase	5'-GATCCTGTGGACCCCGAGAA 5'-CCGAAATGGAGCTCGTGACC
Actin depolymerizing factor	5'-AGGAGTGCCGATGTGCTGTG 5'-GCCCCATCATCTCCTTCT
Ca ²⁺ -binding protein (centrin/caltractin)	5'-GGACCGAAAAGGAACAACG 5'-AGCCGAAACCCTCCACACAA



-위의 그래프에서 초록색(돌연변이 감귤에서 발현의 차이를 보이지 않는 유전자; ubiquitin-protein ligase)의 발현과 비교하여 발현 증가 유무를 확인함. actin depolymerization factor(주황색)는 오히려 발현이 감소되었으나 나머지 2개의 유전자는 발현의 증가를 확인함

- 홍색과 익엽의 특성을 나타내면서 고당의 형질을 나타내는 것으로 선발된 6s4d12-8 계통의 과실을 대조구 과실과 Expression microarray 분석을 수행하였음. 그 결과 4배 이상의 차이를 보이는 유전자는 아래 표와 같았음.

Sample set	Up regulation	Down regulation	전체 유의유전자수
6s4d12-8	211	346	557

- GO(Gene Ontology) analysis

-앞에서 유의하게 분류된 유전자를 GO로 기능분류 하였음.

Sample set	Up regulation	Down regulation	전체 유의유전자수
6s4d12-8	45	90	135

- GO category 분류 (FDR 5% 적용)

Sample set	Biological process	Cellular component	Molecular function	Total
6s4d12-8	17	2	9	28

○ Metabolic Pathways

-GO analysis에서 유의하게 분류된 유전자를 애기장대 데이터베이스와 연계하여 KEGG로 (<http://www.arabidopsis.org/biocyc/>, <http://www.genome.ad.jp/kegg/>) 분류하였음.

Sample set	Up regulation	Down regulation	전체 유의유전자수
6s4d12-8_Control	0	1	1

-TF(Transcription factor)

Sample set	Up regulation	Down regulation	전체 유의유전자수
6s4d12-8_Control	8	28	36

○ Clusters of Orthologous Groups(COG) analysis (6s4d12-8 계통 과실): Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism 관련 유전자의 경우 돌연변이체에서 발현이 2배이상 감소된 유전자의 수가 75개로 나타나 가장 특징적인 양상을 보여주었음. 이를 통해 색깔(홍색)의 변화와 일치하는 microarray 분석 결과를 나타낸 것으로 사료됨. 다음으로 Carbohydrate transport and metabolism관련된 유전자의 발현의 차이가 가장 크게 나타났으며, 이를 통해 돌연변이 감귤의 당도의 변화가 유발되었을 것으로 사료되며, 실제로 당도 측정을 통해 당도가 향상된 돌연변이임을 확인.

과실	COG Definition	Fold up (>2)	Fold down (<1/2)
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis	22	7
	RNA processing and modification	12	9
	Transcription	14	30
	Replication, recombination and repair	9	8
	Chromatin structure and dynamics	5	4
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	cycle control, cell division, chromosomepartitioning	7	3
	Nuclear structure	1	1
	Defense mechanisms	5	10
	Signal transduction mechanisms	21	41
	Cell motility	4	14

	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	0	0
	Cytoskeleton	4	8
	Extracellular structures	2	2
	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	4	12
	Posttranslational modification, protein turn-over, chaperones	30	38
METABOLISM	Energy production and conversion	15	40
	Carbohydrate transport and metabolism	32	39
	Amino acid transport and metabolism	25	32
	Nucleotide transport and metabolism	8	5
	Coenzyme transport and metabolism	3	11
	Lipid transport and metabolism	12	39
	Inorganic ion transport and metabolism	19	22
	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	13	75
POORLY CHARACTERIZED	General function prediction only	72	85
	Function unknown	15	20

○ 대조구 감귤에 비해 돌연변이 감귤과실에서 발현량의 차이(증가 또는 감소)를 유전자를 각각 50개씩(총 100개) 목록을 작성하였음.

1	Citrus_ES TC07445 2	Control	103	1	Swiss_protein_id=sp P07052 PRR2_TOBAC : (57.38% match : score=75.9) Pathogenesis-related protein R minor form OS=Nicotiana tabacum PE=2 SV=1 Cdd_domain : (62.50matching : target=gn CDD 109375 : score=73. A_thaliana_homologue=AT4G11650.1
		6s4d12-8	7588	73.67	
2	Citrus_ES TC07445 1	Control	39	1	Swiss_protein_id=sp P07052 PRR2_TOBAC : (57.38% match : score=75.9) Pathogenesis-related protein R minor form OS=Nicotiana tabacum PE=2 SV=1 Cdd_domain : (62.50matching : target=gn CDD 109375 : score=73. A_thaliana_homologue=AT4G11650.1
		6s4d12-8	5472	140.31	
3	Citrus_ES TC07592 7	Control	25	1	
		6s4d12-8	1358	54.32	
4	Citrus_ES TC08682 2	Control	234	1	Cdd_domain : (35.48matching : target=gn CDD 48531 : score=51.2 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s01920.1 Ricinus_Communis_match= 28327.m000369 A_thaliana_homologue=AT5G60640.1
		6s4d12-8	6348	27.13	
5	Citrus_ES TC08856 8	Control	185	1	Cdd_domain : (30.36matching : target=gn CDD 115896 : score=33.
		6s4d12-8	2632	14.23	
6	Citrus_ES TC07417 6	Control	147	1	Swiss_protein_id=sp Q84P23 4CLL9_ARATH : (45.52% match : score=99.8) 4-coumarate--CoA ligase-like 9 OS=Arabidopsis thaliana GN=4CLL9 PE=1 SV=2 Cdd_domain : (23.11matching : target=gn CDD 111991 : score=115 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0015s10430.1 Ricinus_Communis_match= 30147.m013769 A_thaliana_homologue=AT5G63380.1
		6s4d12-8	4532	30.83	
7	Citrus_ES TC07390 6	Control	244	1	
		6s4d12-8	3624	14.85	

8	Citrus_ES TC07009 1	Control	38	1	Cdd_domain : (40.00matching : target=gn CDD 115493 : score=33.
		6s4d12-8	3616	95.16	
9	Citrus_ES TC07018 0	Control	77	1	Swiss_protein_id=sp Q39065 COPT1_ARATH : (60.78% match : score=67.0) Copper transporter 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=COPT1 PE=2 SV=2 Cdd_domain : (37.04matching : target=gn CDD 112937 : score=60. A_thaliana_homologue=AT5G59030.1
		6s4d12-8	1332	17.3	
10	Citrus_ES TC07173 0	Control	123	1	
		6s4d12-8	4895	39.8	
11	Citrus_ES TC07371 8	Control	1199	1	
		6s4d12-8	16202	13.51	
12	Citrus_ES TC08954 8	Control	30	1	Cdd_domain : (33.78matching : target=gn CDD 133727 : score=52.
		6s4d12-8	2007	66.9	
13	Citrus_ES TC09735 2	Control	181	1	Swiss_protein_id=sp Q9SUC0 3HIDH_ARATH : (62.03% match : score=92.0) Probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial OS=Arabidopsis thaliana GN=At4g20930 PE=2 SV=3 Cdd_domain : (43.24matching : target=gn CDD 130753 : score=80. A_thaliana_homologue=AT4G20930.1
		6s4d12-8	3868	21.37	
14	Citrus_ES TC11645 7	Control	128	1	
		6s4d12-8	2722	21.27	
15	Citrus_ES TC11585 0	Control	61	1	
		6s4d12-8	1256	20.59	
16	Citrus_ES TC11645 8	Control	29	1	
		6s4d12-8	4143	142.86	
17	Citrus_ES TC11648 7	Control	34	1	
		6s4d12-8	5223	153.62	
18	Citrus_ES TC11666 4	Control	33	1	Cdd_domain : (29.17matching : target=gn CDD 133728 : score=33.
		6s4d12-8	4290	130	
19	Citrus_ES TC11148 3	Control	24	1	
		6s4d12-8	1759	73.29	
20	Citrus_ES TC11136 7	Control	25	1	Cdd_domain : (32.05matching : target=gn CDD 133689 : score=35.
		6s4d12-8	1061	42.44	
21	Citrus_ES TC09871 2	Control	156	1	
		6s4d12-8	2544	16.31	
22	Citrus_ES TC10333 6	Control	129	1	
		6s4d12-8	2568	19.91	
23	Citrus_ES TC10624 4	Control	118	1	Cdd_domain : (35.11matching : target=gn CDD 48531 : score=51.2 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s01920.1 A_thaliana_homologue=AT5G60640.1
		6s4d12-8	3163	26.81	
24	Citrus_ES TC10768 4	Control	318	1	Cdd_domain : (39.44matching : target=gn CDD 140175 : score=49.
		6s4d12-8	5076	15.96	
25	Citrus_ES TC06934 4	Control	35	1	A_thaliana_homologue=AT4G26410.1
		6s4d12-8	1077	30.77	
26	Citrus_ES TC06919 6	Control	147	1	
		6s4d12-8	4962	33.76	
27	Citrus_ES TC04699 4	Control	221	1	Cdd_domain : (24.68matching : target=gn CDD 107219 : score=37.
		6s4d12-8	9487	42.93	

28	Citrus_ES TC04075 7	Control	141	1	COG=QR : Iron/ascorbate family oxidoreductases Swiss_protein_id=sp O04847 DV4H_CATRO : (59.39% match : score=209) Deacetoxyvindoline 4-hydroxylase OS=Catharanthus roseus GN=D4H PE=1 SV=2 Gene_Ontology : [GO:0030942 "endoplasmic reticulum signal peptide Cdd_domain : (46.60matching : target=gn CDD 112006 : score=105 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0011s15970.1 Ricinus_Communis_match= 29603.m000517 A_thaliana_homologue=AT1G06620.1
		6s4d12-8	2447	17.35	
29	Citrus_ES TC05938 9	Control	87	1	Cdd_domain : (31.51matching : target=gn CDD 133768 : score=34.
		6s4d12-8	2450	28.16	
30	Citrus_ES TC05983 0	Control	52	1	Cdd_domain : (46.10matching : target=gn CDD 109320 : score=143
		6s4d12-8	2203	42.37	
31	Citrus_ES TC06001 9	Control	33	1	Swiss_protein_id=sp Q9FJK8 RP8L4_ARATH : (34.07% match : score=64.3) Probable disease resistance RPP8-like protein 4 OS=Arabidopsis thaliana GN=RPP8L4 PE=2 SV=1 Cdd_domain : (15.85matching : target=gn CDD 133697 : score=33. A_thaliana_homologue=AT5G48620.1
		6s4d12-8	1855	56.21	
32	Citrus_ES TC03950 5	Control	44	1	COG=OE : Serine carboxypeptidases (lysosomal cathepsin A) Swiss_protein_id=sp Q9C7Z9 SCP18_ARATH : (48.01% match : score=422) Serine carboxypeptidase-like 18 OS=Arabidopsis thaliana GN=SCPL18 PE=2 SV=2 Gene_Ontology : [GO:0003674 "molecular_function" evidence=ND] Cdd_domain : (40.22matching : target=gn CDD 109505 : score=463 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s29870.1 Ricinus_Communis_match= 30099.m001722 A_thaliana_homologue=AT1G73270.1
		6s4d12-8	1489	33.84	
33	Citrus_ES TC03667 1	Control	175	1	Swiss_protein_id=sp Q9C554 EXPA1_ARATH : (91.51% match : score=195) Expansin-A1 OS=Arabidopsis thaliana GN=EXPA1 PE=2 SV=1 Cdd_domain : (75.86matching : target=gn CDD 129070 : score=183 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0010s17440.2 Ricinus_Communis_match= 29813.m001510 A_thaliana_homologue=AT1G69530.1
		6s4d12-8	2386	13.63	
34	Citrus_ES TC00063 1	Control	17	1	Swiss_protein_id=sp Q9SB81 PER42_ARATH : (89.71% match : score=262) Peroxidase 42 OS=Arabidopsis thaliana GN=PER42 PE=1 SV=2 Cdd_domain : (39.26matching : target=gn CDD 29388 : score=157) Populus_trichocarpa_match= POPTR_0004s01510.1 Ricinus_Communis_match= 29842.m003595 A_thaliana_homologue=AT4G21960.1
		6s4d12-8	2105	123.82	
35	Citrus_ES TC03134 6	Control	102	1	Swiss_protein_id=sp Q9C554 EXPA1_ARATH : (83.53% match : score=281) Expansin-A1 OS=Arabidopsis thaliana GN=EXPA1 PE=2 SV=1 Cdd_domain : (72.06matching : target=gn CDD 129070 : score=140 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0010s17440.2 Ricinus_Communis_match= 29813.m001510 A_thaliana_homologue=AT1G69530.1
		6s4d12-8	1683	16.5	
36	Citrus_ES TC03196 3	Control	62	1	COG=S : Uncharacterized membrane protein Swiss_protein_id=sp P47818 CCC1_YEAST : (41.30% match : score=131) Protein CCC1 OS=Saccharomyces cerevisiae GN=CCC1 PE=1 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0003674 "molecular_function" evidence=ND] Cdd_domain : (52.89matching : target=gn CDD 29966 : score=323) Populus_trichocarpa_match= POPTR_0010s11480.1 Ricinus_Communis_match= 29968.m000636 A_thaliana_homologue=AT2G01770.1
		6s4d12-8	1644	26.52	

37	Citrus_ES TC03594 2	Control	22	1	Swiss_protein_id=sp O22476 BRI1_ARATH : (34.69% match : score=86.7) Protein BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=BRI1 PE=1 SV=1 Cdd_domain : (26.12matching : target=gn CDD 128515 : score=69. Populus_trichocarpa_match= POPTR_0016s02970.1 Ricinus_Communis_match= 29835.m000647 A_thaliana_homologue=AT3G47570.1
38	Citrus_ES TC06007 9	Control	203	1	Cdd_domain : (20.00matching : target=gn CDD 133728 : score=33.
		6s4d12-8	7799	38.42	
39	Citrus_ES TC06320 6	Control	92	1	Cdd_domain : (62.50matching : target=gn CDD 128845 : score=39.
		6s4d12-8	1250	13.59	
40	Citrus_ES TC06795 5	Control	45	1	Cdd_domain : (31.82matching : target=gn CDD 109966 : score=39.
		6s4d12-8	3095	68.78	
41	Citrus_ES TC06801 7	Control	263	1	Cdd_domain : (23.08matching : target=gn CDD 32326 : score=31.6
		6s4d12-8	4826	18.35	
42	Citrus_ES TC06801 8	Control	243	1	Cdd_domain : (23.08matching : target=gn CDD 32326 : score=31.6
		6s4d12-8	13886	57.14	
43	Citrus_ES TC06879 0	Control	86	1	Cdd_domain : (43.48matching : target=gn CDD 133726 : score=33.
		6s4d12-8	1229	14.29	
44	Citrus_ES TC06771 5	Control	73	1	
		6s4d12-8	1046	14.33	
45	Citrus_ES TC06750 1	Control	75	1	A_thaliana_homologue=AT3G54020.
		6s4d12-8	1660	22.13	
46	Citrus_ES TC06547 0	Control	73	1	Swiss_protein_id=sp Q9SZL8 FRS5_ARATH : (30.58% match : score=54.7) Protein FAR1-RELATED SEQUENCE 5 OS=Arabidopsis thaliana GN=FRS5 PE=2 SV=1 Cdd_domain : (38.81matching : target=gn CDD 111941 : score=68. A_thaliana_homologue=AT3G07500.1
		6s4d12-8	2733	37.44	
47	Citrus_ES TC06604 3	Control	44	1	Cdd_domain : (21.37matching : target=gn CDD 133727 : score=52.
		6s4d12-8	1349	30.66	
48	Citrus_ES TC06742 5	Control	140	1	Cdd_domain : (22.92matching : target=gn CDD 133725 : score=32.
		6s4d12-8	7875	56.25	
49	Citrus_ES TC06742 6	Control	46	1	Cdd_domain : (22.92matching : target=gn CDD 133725 : score=32.
		6s4d12-8	4098	89.09	
50	Citrus_ES TC00045 8	Control	42	1	COG=R : Cellular protein (glioma tumor suppressor candidate region gene 2) Swiss_protein_id=sp O22892 GSR2_ARATH : (58.52% match : score=238) Uncharacterized protein At2g40430 OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g40430 PE=2 SV=2 Cdd_domain : (22.63matching : target=gn CDD 116381 : score=119 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0008s07560.1 Ricinus_Communis_match= 29729.m002321 A_thaliana_homologue=AT2G40430.1
		6s4d12-8	2775	66.07	
51	Citrus_ES TC06787 9	Control	6357	1	
		6s4d12-8	285	-22.31	
52	Citrus_ES TC06387 4	Control	1428	1	Cdd_domain : (26.92matching : target=gn CDD 133723 : score=31.
		6s4d12-8	22	-64.91	
53	Citrus_ES TC07036 1	Control	1769	1	
		6s4d12-8	38	-46.55	
54	Citrus_ES TC07036 2	Control	11831	1	
		6s4d12-8	590	-20.05	

55	Citrus_ES TC07644 3	Control	1683	1	Cdd_domain : (19.23matching : target=gnl CDD 119393 : score=50. A_thaliana_homologue=AT1G52990.1
		6s4d12-8	83	-20.28	
56	Citrus_ES TC06373 3	Control	8367	1	Swiss_protein_id=sp P43309 PPO_MALDO : (71.58% match : score=95.5) Polyphenol oxidase, chloroplastic OS=Malus domestica PE=2 SV=1 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0011s04710.1 Ricinus_Communis_match= 29851.m002367
		6s4d12-8	331	-25.28	
57	Citrus_ES TC06369 0	Control	1455	1	Cdd_domain : (19.08matching : target=gnl CDD 130701 : score=38.
		6s4d12-8	93	-15.65	
58	Citrus_ES TC04700 4	Control	1150	1	Swiss_protein_id=sp P49098 CYB5_TOBAC : (40.54% match : score=77.0) Cytochrome b5 OS=Nicotiana tabacum PE=2 SV=1 Cdd_domain : (63.27matching : target=gnl CDD 109239 : score=80. Populus_trichocarpa_match= POPTR_0014s01940.1 A_thaliana_homologue=AT5G48810.1
		6s4d12-8	74	-15.54	
59	Citrus_ES TC04900 1	Control	1148	1	
		6s4d12-8	29	-39.59	
60	Citrus_ES TC05731 5	Control	1183	1	Cdd_domain : (31.01matching : target=gnl CDD 111297 : score=56.
		6s4d12-8	46	-25.72	
61	Citrus_ES TC05869 4	Control	3502	1	Cdd_domain : (51.81matching : target=gnl CDD 115193 : score=111 A_thaliana_homologue=AT5G52390.1
		6s4d12-8	204	-17.17	
62	Citrus_ES TC08006 5	Control	1271	1	Cdd_domain : (30.00matching : target=gnl CDD 114802 : score=33.
		6s4d12-8	14	-90.79	
63	Citrus_ES TC08284 4	Control	1790	1	Cdd_domain : (32.00matching : target=gnl CDD 133791 : score=32.
		6s4d12-8	107	-16.73	
64	Citrus_ES TC11096 7	Control	13246	1	Swiss_protein_id=sp P51613 CHIB_VITVI : (86.67% match : score=63.2) Basic endochitinase OS=Vitis vinifera GN=CHIT1B PE=2 SV=1 Cdd_domain : (86.36matching : target=gnl CDD 109248 : score=54.
		6s4d12-8	263	-50.37	
65	Citrus_ES TC11096 5	Control	1134	1	A_thaliana_homologue=AT4G24380.1
		6s4d12-8	72	-15.75	
66	Citrus_ES TC11098 7	Control	2495	1	
		6s4d12-8	94	-26.54	
67	Citrus_ES TC11217 1	Control	1698	1	
		6s4d12-8	67	-25.34	
68	Citrus_ES TC11381 3	Control	2473	1	Cdd_domain : (38.46matching : target=gnl CDD 111364 : score=35.
		6s4d12-8	62	-39.89	
69	Citrus_ES TC10420 2	Control	5079	1	
		6s4d12-8	307	-16.54	
70	Citrus_ES TC09781 6	Control	2541	1	Cdd_domain : (38.12matching : target=gnl CDD 115193 : score=134 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0015s13050.1 Ricinus_Communis_match= 30147.m013734 A_thaliana_homologue=AT5G52390.1
		6s4d12-8	121	-21	
71	Citrus_ES TC08348 6	Control	1635	1	Cdd_domain : (24.36matching : target=gnl CDD 133727 : score=53.
		6s4d12-8	24	-68.13	
72	Citrus_ES TC08953 1	Control	3896	1	Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s22450.1
		6s4d12-8	51	-76.39	
73	Citrus_ES TC09304 4	Control	1009	1	Swiss_protein_id=sp A7IZZ2 TPS2_CANSA : (45.24% match : score=66.2) (+)-alpha-pinene synthase, chloroplastic OS=Cannabis sativa PE=1 SV=1 Cdd_domain : (40.91matching : target=gnl CDD 29478 : score=48.1
		6s4d12-8	27	-37.37	

74	Citrus_ES TC09718 1	Control	3726	1	
		6s4d12-8	225	-16.56	
75	Citrus_ES TC04599 8	Control	2065	1	Cdd_domain : (27.84matching : target=gn CDD 133700 : score=40. Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s16550.2 Ricinus_Communis_match= 29625.m000706 A_thaliana_homologue=AT3G44450.1
		6s4d12-8	104	-19.86	
76	Citrus_ES TC04363 8	Control	1852	1	Gene_Ontology : [GO:0030325 "adrenal gland development" evidence=I Cdd_domain : (41.56matching : target=gn CDD 111421 : score=75. Populus_trichocarpa_match= POPTR_0003s06860.1 Ricinus_Communis_match= 29727.m000464 A_thaliana_homologue=AT1G72430.1
		6s4d12-8	112	-16.54	
77	Citrus_ES TC00842 4	Control	1461	1	Swiss_protein_id=sp Q93X23 MYRS_QUEIL : (55.75% match : score=282) Myrcene synthase, chloroplastic OS=Quercus ilex PE=1 SV=1 Cdd_domain : (51.89matching : target=gn CDD 29478 : score=364) Populus_trichocarpa_match= POPTR_0019s01460.1 Ricinus_Communis_match= 29771.m000073 A_thaliana_homologue=AT3G25820.1
		6s4d12-8	20	-73.05	
78	Citrus_ES TC00779 6	Control	2605	1	Swiss_protein_id=sp Q6J163 5NG4_PINTA : (32.19% match : score=93.6) Auxin-induced protein 5NG4 OS=Pinus taeda PE=2 SV=1 Cdd_domain : (17.56matching : target=gn CDD 109930 : score=54. Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s15780.1 Ricinus_Communis_match= 29916.m000515 A_thaliana_homologue=AT5G47470.1
		6s4d12-8	18	-144.7 2	
79	Citrus_ES TC00861 7	Control	8972	1	Swiss_protein_id=sp O74913 YJ72_SCHPO : (27.06% match : score=125) Uncharacterized protein C757.02c OS=Schizosaccharomyces pombe GN=SPCC757.02c PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0005089 "Rho guanyl-nucleotide exchange factor Cdd_domain : (19.15matching : target=gn CDD 30800 : score=57.4 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0014s01970.1 Ricinus_Communis_match= 30170.m013766 A_thaliana_homologue=AT4G24220.1
		6s4d12-8	193	-46.49	
80	Citrus_ES TC00882 1	Control	3937	1	COG=R : Ras-related small GTPase, Rho type Swiss_protein_id=sp Q6EP31 RAC5_ORYSJ : (99.17% match : score=244) Rac-like GTP-binding protein 5 OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=RAC5 PE=2 SV=2 Gene_Ontology : [GO:0007520 "myoblast fusion" evidence=IMP;IDA] Cdd_domain : (90.43matching : target=gn CDD 133333 : score=252 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s13700.2 Ricinus_Communis_match= 29602.m000209 A_thaliana_homologue=AT1G75840.1
		6s4d12-8	101	-38.98	
81	Citrus_ES TC00949 9	Control	5275	1	COG=Q : Alcohol dehydrogenase, class III Swiss_protein_id=sp P14673 ADH1_SOLTU : (89.74% match : score=656) Alcohol dehydrogenase 1 OS=Solanum tuberosum GN=ADH1 PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0051082 "unfolded protein binding" evidence=ID Cdd_do main : (52.03matching : target=gn CDD 131865 : score=478 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0007s03890.1 Ricinus_Communis_match= 28353.m000053 A_thaliana_homologue=AT1G77120.1
		6s4d12-8	350	-15.07	

82	Citrus_ES TC00572 0	Control	14774	1	<p>COG=R : Predicted chitinase Swiss_protein_id=sp P51613 CHIB_VITVI : (70.74% match : score=480) Basic endochitinase OS=Vitis vinifera GN=CHIT1B PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0004568 "chitinase activity" evidence=IDA] Cdd_domain : (78.02matching : target=gn CDD 109248 : score=474 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s14380.1 Ricinus_Communis_match= 29797.m000356 A_thaliana_homologue=AT3G12500.1</p>
		6s4d12-8	292	-50.6	
83	Citrus_ES TC00465 1	Control	2436	1	<p>Gene_Ontology : [GO:0008150 "biological_process" evidence=ND] Cdd_domain : (33.33matching : target=gn CDD 136712 : score=33. Ricinus_Communis_match= 30027.m000827 A_thaliana_homologue=AT4G10265.1</p>
		6s4d12-8	58	-42	
84	Citrus_ES TC00078 9	Control	1651	1	<p>COG=Q : O-methyltransferase Swiss_protein_id=sp Q43095 CAMT_POPTM : (73.21% match : score=313) Caffeoyl-CoA O-methyltransferase OS=Populus tremuloides PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0000398 "nuclear mRNA splicing, via spliceosom Cdd_domain : (56.73matching : target=gn CDD 110590 : score=300 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s10270.1 Ricinus_Communis_match= 29801.m003158 A_thaliana_homologue=AT4G34050.1</p>
		6s4d12-8	56	-29.48	
85	Citrus_ES TC00122 6	Control	7502	1	<p>COG=I : Cis-prenyltransferase Swiss_protein_id=sp Q56Y11 DDPS2_ARATH : (59.38% match : score=110) Dehydrodolichyl diphosphate synthase 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g58770 PE=2 SV=2 Cdd_domain : (40.82matching : target=gn CDD 30370 : score=83.2 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s05010.1 Ricinus_Communis_match= 29681.m001337 A_thaliana_homologue=AT5G58770.1</p>
		6s4d12-8	358	-20.96	
86	Citrus_ES TC00122 7	Control	4664	1	<p>COG=I : Cis-prenyltransferase Swiss_protein_id=sp Q56Y11 DDPS2_ARATH : (53.57% match : score=193) Dehydrodolichyl diphosphate synthase 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g58770 PE=2 SV=2 Gene_Ontology : [GO:0006585 "dopamine biosynthetic process from ty Cdd_domain : (48.95matching : target=gn CDD 110269 : score=164 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s05010.1 Ricinus_Communis_match= 29681.m001337 A_thaliana_homologue=AT5G58770.1</p>
		6s4d12-8	230	-20.28	
87	Citrus_ES TC00273 9	Control	3710	1	<p>Gene_Ontology : [GO:0007422 "peripheral nervous system development Cdd_domain : (25.64matching : target=gn CDD 118302 : score=44. Populus_trichocarpa_match= POPTR_0016s11010.1 Ricinus_Communis_match= 29815.m000502 A_thaliana_homologue=AT3G10040.1</p>
		6s4d12-8	134	-27.69	
88	Citrus_ES TC01774 8	Control	3866	1	<p>COG=I : Cis-prenyltransferase Swiss_protein_id=sp Q56Y11 DDPS2_ARATH : (60.48% match : score=148) Dehydrodolichyl diphosphate synthase 2 OS=Arabidopsis thaliana GN=At5g58770 PE=2 SV=2 Gene_Ontology : [GO:0006585 "dopamine biosynthetic process from ty Cdd_domain : (43.22matching : target=gn CDD 29593 : score=114) Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s05010.1 Ricinus_Communis_match= 29681.m001337 A_thaliana_homologue=AT5G58770.1</p>
		6s4d12-8	206	-18.77	

89	Citrus_ES TC02618 3	Control	2970	1	COG=Q : O-methyltransferase Swiss_protein_id=sp O65862 CAMT1_POPTR : (77.88% match : score=169) Caffeoyl-CoA O-methyltransferase 1 OS=Populus trichocarpa GN=CCOAOMT1 PE=2 SV=1 Cdd_domain : (65.66matching : target=gn CDD 110590 : score=162 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s10270.1 Ricinus_Communis_match= 29801.m003158 A_thaliana_homologue=AT4G34050.1
		6s4d12-8	41	-72.44	
90	Citrus_ES TC04106 5	Control	1508	1	COG=MW : Fasciclin and related adhesion glycoproteins Swiss_protein_id=sp Q66GR0 FLA17_ARATH : (63.25% match : score=335) Fasciclin-like arabinogalactan protein 17 OS=Arabidopsis thaliana GN=FLA17 PE=2 SV=1 Cdd_domain : (29.85matching : target=gn CDD 111375 : score=87. Populus_trichocarpa_match= POPTR_0016s06680.1 Ricinus_Communis_match= 29854.m001118 A_thaliana_homologue=AT5G06390.1
		6s4d12-8	49	-30.78	
91	Citrus_ES TC04179 7	Control	1502	1	Swiss_protein_id=sp Q93X23 MYRS_QUEIL : (57.70% match : score=631) Myrcene synthase, chloroplastic OS=Quercus ilex PE=1 SV=1 Cdd_domain : (47.37matching : target=gn CDD 29478 : score=686) Populus_trichocarpa_match= POPTR_0019s01340.1 Ricinus_Communis_match= 29771.m000073 A_thaliana_homologue=AT3G25810.1
		6s4d12-8	13	-115.5 4	
92	Citrus_ES TC04256 5	Control	8625	1	Swiss_protein_id=sp Q8S9G6 T5AT_TAXCH : (33.16% match : score=213) Taxadien-5-alpha-ol O-acetyltransferase OS=Taxus chinensis PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0005575 "cellular_component" evidence=ND] Cdd_domain : (35.53matching : target=gn CDD 111364 : score=348 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0019s06040.1 Ricinus_Communis_match= 29822.m003503 A_thaliana_homologue=AT5G17540.1
		6s4d12-8	442	-19.51	
93	Citrus_ES TC04315 3	Control	4268	1	COG=M : Chitinase Swiss_protein_id=sp P29060 CHIA_TOBAC : (73.16% match : score=391) Acidic endochitinase OS=Nicotiana tabacum PE=1 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0006032 "chitin catabolic process" evidence=NA Cdd_domain : (57.19matching : target=gn CDD 119356 : score=437 Populus_trichocarpa_match= POPTR_1540s00210.1 Ricinus_Communis_match= 30174.m008677 A_thaliana_homologue=AT5G24090.1
		6s4d12-8	263	-16.23	
94	Citrus_ES TC03679 9	Control	5351	1	COG=Q : O-methyltransferase Swiss_protein_id=sp Q43095 CAMT_POPTM : (76.52% match : score=389) Caffeoyl-CoA O-methyltransferase OS=Populus tremuloides PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0003713 "transcription coactivator activity" e Cdd_domain : (61.97matching : target=gn CDD 110590 : score=340 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s10270.1 Ricinus_Communis_match= 29801.m003158 A_thaliana_homologue=AT4G34050.1
		6s4d12-8	115	-46.53	
95	Citrus_ES TC03582 9	Control	5280	1	Cdd_domain : (65.77matching : target=gn CDD 115193 : score=198 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0015s13050.1 Ricinus_Communis_match= 30147.m013734 A_thaliana_homologue=AT5G52390.1
		6s4d12-8	246	-21.46	

96	Citrus_ES TC02993 6	Control	1879	1	Swiss_protein_id=sp P17801 KPRO_MAIZE : (50.31% match : score=163) Putative receptor protein kinase ZmPK1 OS=Zea mays GN=PK1 PE=2 SV=2 Gene_Ontology : [GO:0004674 "protein serine/threonine kinase activ Cdd_domain : (36.30matching : target=gn CDD 109137 : score=136 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0007s03700.1 Ricinus_Communis_match= 27747.m000116 A_thaliana_homologue=AT5G60900.1
		6s4d12-8	93	-20.2	
97	Citrus_ES TC03192 5	Control	2707	1	Cdd_domain : (58.33matching : target=gn CDD 115194 : score=154 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0004s11630.1 Ricinus_Communis_match= 29847.m000248 A_thaliana_homologue=AT3G29970.1
		6s4d12-8	46	-58.85	
98	Citrus_ES TC03347 3	Control	2591	1	Swiss_protein_id=sp O23693 MLO4_ARATH : (47.89% match : score=187) MLO-like protein 4 OS=Arabidopsis thaliana GN=MLO4 PE=2 SV=2 Gene_Ontology : [GO:0003674 "molecular_function" evidence=ND] Cdd_domain : (35.98matching : target=gn CDD 111934 : score=183 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0005s11350.1 Ricinus_Communis_match= 29656.m000483 A_thaliana_homologue=AT1G11000.1
		6s4d12-8	56	-46.27	
99	Citrus_ES TC03410 8	Control	6055	1	Cdd_domain : (61.86matching : target=gn CDD 115193 : score=191 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0012s13140.1 Ricinus_Communis_match= 30147.m013734 A_thaliana_homologue=AT5G52390.1
		6s4d12-8	313	-19.35	
100	Citrus_ES TC00006 9	Control	8305	1	Swiss_protein_id=sp O04887 PME2_CITSI : (96.88% match : score=195) Pectinesterase 2 OS=Citrus sinensis GN=PECS-2.1 PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0008150 "biological_process" evidence=ND] Cdd_domain : (59.26matching : target=gn CDD 110119 : score=153 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0002s14640.1 Ricinus_Communis_match= 30174.m008846 A_thaliana_homologue=AT2G45220.1
		6s4d12-8	296	-28.06	

○ 감귤의 색깔을 결정하는 색소형성과 관련된 유전자의 발현양상

- 카로티노이드 물질대사 관련 유전자의 발현차이 분석: Zeaxanthin cleavage dioxygenase 유전자를 제외하고 카로티노이드의 물질대사에 관여하는 유전자의 발현이 감소한 것으로 나타남. microarray 분석에 사용한 6s4d12-8과 유사한 형질을 나타내는 6s6a46-17을 대상으로 제3세부과제에서 카로티노이드에 대한 성분을 분석한 결과 전체 카로티노이드 함량이 감소한 것을 확인할 수 있었음. 이를 통해 돌연변이의 홍색 형질이 카로티노이드 성분의 함량의 감소와도 연관성이 있을 가능성을 제시해주고, microarray의 결과와 성분 분석 간에 상관관계가 존재함을 알 수 있었음.

Citrus_ESTC 034476	Control	235	1	COG=Q : Beta, beta-carotene 15,15'-dioxygenase and related enzymes Swiss_protein_id=sp Q84K96 ZCD_CROSA : (50.91% match : score=119) Zeaxanthin cleavage dioxygenase, chromoplast OS=Crocus sativus GN=ZCD PE=2 SV=1 Cdd_domain : (39.09matching : target=gn CDD 111897 : score=117 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s15430.1 Ricinus_Communis_match= 29827.m002661 A_thaliana_homologue=AT4G19170.1
	6s4d12-8	2194	9.34	
Citrus_ESTC 114984	Control	3824	1	Swiss_protein_id=sp O49901 ZDS_NARPS : (86.05% match : score=75.5) Zeta-carotene desaturase, chloroplastic/chromoplastic OS=Narcissus pseudonarcissus GN=ZDS1 PE=2 SV=1 Cdd_domain : (76.00matching : target=gn CDD 131779 : score=47. A_thaliana_homologue=AT3G04870.1
	6s4d12-8	1655	-2.31	

Citrus_ESTC 020170	Control	1081	1	COG=Q : Beta, beta-carotene 15,15'-dioxygenase and related enzymes Swiss_protein_id=sp Q84KG5 CCD_CROSA : (74.77% match : score=180) Carotenoid cleavage dioxygenase OS=Crocus sativus GN=CCD PE=2 SV=1 Cdd_domain : (46.04matching : target=gnl CDD 111897 : score=150 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s27270.1 Ricinus_Communis_match= 29864.m001501 A_thaliana_homologue=AT3G63520.1
	6s4d12-8	284	-3.81	
Citrus_ESTC 008511	Control	4403	1	COG=Q : Amine oxidase Swiss_protein_id=sp Q9FV46 ZDS_TARER : (87.80% match : score=228) Zeta-carotene desaturase, chloroplastic/chromoplastic OS=Tagetes erecta PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0046148 "pigment biosynthetic process" evidenc Cdd_domain : (75.61matching : target=gnl CDD 131779 : score=238 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0013s03470.1 Ricinus_Communis_match= 30128.m008623 A_thaliana_homologue=AT3G04870.1
	6s4d12-8	2153	-2.05	
Citrus_ESTC 041836	Control	1315	1	COG=Q : Beta, beta-carotene 15,15'-dioxygenase and related enzymes Swiss_protein_id=sp Q84KG5 CCD_CROSA : (78.30% match : score=332) Carotenoid cleavage dioxygenase OS=Crocus sativus GN=CCD PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0008150 "biological_process" evidence=ND] Cdd_domain : (42.31matching : target=gnl CDD 111897 : score=239 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s27260.1 Ricinus_Communis_match= 29864.m001501 A_thaliana_homologue=AT3G63520.1
	6s4d12-8	449	-2.93	
Citrus_ESTC 018698	Control	3067	1	COG=I : Squalene synthetase Swiss_protein_id=sp P37271 PSY_ARATH : (61.42% match : score=148) Phytoene synthase, chloroplastic OS=Arabidopsis thaliana GN=PSY1 PE=2 SV=2 Cdd_domain : (36.22matching : target=gnl CDD 29477 : score=84.7 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0017s02080.1 Ricinus_Communis_match= 28611.m000105 A_thaliana_homologue=AT5G17230.1
	6s4d12-8	1525	-2.01	
Citrus_ESTC 034476	Control	235	1	COG=Q : Beta, beta-carotene 15,15'-dioxygenase and related enzymes Swiss_protein_id=sp Q84K96 ZCD_CROSA : (50.91% match : score=119) Zeaxanthin cleavage dioxygenase, chromoplast OS=Crocus sativus GN=ZCD PE=2 SV=1 Cdd_domain : (39.09matching : target=gnl CDD 111897 : score=117 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s15430.1 Ricinus_Communis_match= 29827.m002661 A_thaliana_homologue=AT4G19170.1
	6s4d12-8	2194	9.34	
Citrus_ESTC 008600	Control	5088	1	COG=CR : Kynurenine 3-monooxygenase and related flavoprotein monooxygenases Swiss_protein_id=sp Q40412 ABA2_NICPL : (25.41% match : score=66.2) Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic OS=Nicotiana plumbaginifolia GN=ABA2 PE=1 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0003674 "molecular_function" evidence=ND] Cdd_domain : (27.37matching : target=gnl CDD 30999 : score=167) Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s31500.1 Ricinus_Communis_match= 27436.m000290 A_thaliana_homologue=AT4G38540.1
	6s4d12-8	619	-8.22	

-플라보노이드 물질대사 관련 유전자의 발현차이 분석: Chalcone-flavonone isomerase 를 제외하고 나머지 유전자들의 발현량은 대조구에 비해 감소한 것을 확인할 수 있었고, 이를 통해 이들 유전자들의 발현양상의 변화가 돌연변이 감광의 색깔 변화에 기여했을 가능성을 제시함. 제3세부의 동일형질을 보이는 돌연변이 계통을 이용하여 성분분석한 결과 일부

플라보노이드 성분의 함량은 감소한 반면 다른 성분(예: hesperidin)의 함량은 증가한 것을 확인할 수 있었음. 아래 표는 플라보노이드 성분을 key word로 검색하여 발현의 보이는 것을 정리한 것이지만, 발현양상의 큰 차이를 나타내는 유전자들을 살펴볼 때 플라보노이드 합성에 관여하여 색깔의 변화를 유도할 수 있는 유전자로서 O-methyltransferase의 경우 돌연변이에서 20배나 40배의 발현의 감소를 보여줌. 이를 통해 이러한 유전자의 발현차이기 색깔의 변화에 기여했을 가능성을 강력하게 제시해 줌.

Citrus_EST C016630	Control	499	1	Swiss_protein_id=sp O65333 CFI_ELAUM : (32.09% match : score=67.8) Chalcone--flavonone isomerase OS=Elaeagnus umbellata GN=CHI PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0005575 "cellular_component" evidence=ND] Cdd_domain : (23.48matching : target=gnl CDD 111337 : score=56. Populus_trichocarpa_match= POPTR_0019s08610.2 Ricinus_Communis_match= 29729.m002368 A_thaliana_homologue=AT5G05270.1
	6s4d12-8	1226	2.46	
Citrus_EST C073508	Control	2436	1	Swiss_protein_id=sp P51106 DFRA_HORVU : (50.00% match : score=64.3) Dihydroflavonol-4-reductase OS=Hordeum vulgare GN=ANT18 PE=3 SV=1 Cdd_domain : (38.89matching : target=gnl CDD 138686 : score=33. A_thaliana_homologue=AT5G19440.1
	6s4d12-8	1152	-2.11	
Citrus_EST C104482	Control	2084	1	Swiss_protein_id=sp Q84KP0 DFRA_PYRCO : (40.00% match : score=53.1) Bifunctional dihydroflavonol 4-reductase/flavonone 4-reductase OS=Pyrus communis GN=DFR PE=1 SV=1 Cdd_domain : (32.39matching : target=gnl CDD 132506 : score=43. A_thaliana_homologue=AT2G02400.1
	6s4d12-8	787	-2.65	
Citrus_EST C028266	Control	1777	1	COG=Q : Cytochrome P450 CYP2 subfamily Swiss_protein_id=sp O04773 C75A6_CAMME : (48.33% match : score=119) Flavonoid 3',5'-hydroxylase OS=Campanula medium GN=CYP75A6 PE=2 SV=1 Cdd_domain : (37.93matching : target=gnl CDD 109135 : score=115 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0331s00210.1 Ricinus_Communis_match= 30190.m011007 A_thaliana_homologue=AT4G12330.1
	6s4d12-8	183	-9.71	
Citrus_EST C030051	Control	1096	1	COG=Q : Cytochrome P450 CYP2 subfamily Swiss_protein_id=sp Q9SBQ9 F3PH_PETHY : (45.88% match : score=153) Flavonoid 3'-monooxygenase OS=Petunia hybrida GN=CYP75B2 PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0005575 "cellular_component" evidence=ND] Cdd_domain : (31.10matching : target=gnl CDD 109135 : score=87. Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s16800.1 Ricinus_Communis_match= 29706.m001271 A_thaliana_homologue=AT1G13110.1
	6s4d12-8	489	-2.24	
Citrus_EST C022826	Control	1820	1	COG=Q : Cytochrome P450 CYP2 subfamily Swiss_protein_id=sp Q9SBQ9 F3PH_PETHY : (44.52% match : score=103) Flavonoid 3'-monooxygenase OS=Petunia hybrida GN=CYP75B2 PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0005575 "cellular_component" evidence=ND] Cdd_domain : (34.96matching : target=gnl CDD 109135 : score=82. Populus_trichocarpa_match= POPTR_0003s06460.1 Ricinus_Communis_match= 29706.m001271 A_thaliana_homologue=AT3G26200.1
	6s4d12-8	264	-6.89	

Citrus_EST C002534	Control	8887	1	COG=R : Sulfotransferase Swiss_protein_id=sp P52836 F3ST_FLACH : (45.83% match : score=169) Flavonol 3-sulfotransferase OS=Flaveria chlorifolia PE=1 SV=2 Gene_Ontology : [GO:0003674 "molecular_function" evidence=ND] Cdd_domain : (33.75matching : target=gnl CDD 109729 : score=144 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0003s19290.1 Ricinus_Communis_match= 35683.m000014 A_thaliana_homologue=AT5G07010.1
	6s4d12-8	3124	-2.84	
Citrus_EST C002117	Control	12374	1	COG=Q : Cytochrome P450 CYP2 subfamily Swiss_protein_id=sp Q9SBQ9 F3PH_PETHY : (43.45% match : score=389) Flavonoid 3'-monooxygenase OS=Petunia hybrida GN=CYP75B2 PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0005575 "cellular_component" evidence=ND] Cdd_domain : (33.26matching : target=gnl CDD 109135 : score=310 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s16800.1 Ricinus_Communis_match= 29706.m001271 A_thaliana_homologue=AT5G07990.1
	6s4d12-8	3111	-3.98	
Citrus_EST C002212	Control	3506	1	COG=Q : Cytochrome P450 CYP2 subfamily Swiss_protein_id=sp Q9SBQ9 F3PH_PETHY : (40.45% match : score=382) Flavonoid 3'-monooxygenase OS=Petunia hybrida GN=CYP75B2 PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0008150 "biological_process" evidence=ND] Cdd_domain : (33.33matching : target=gnl CDD 109135 : score=300 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s16800.1 Ricinus_Communis_match= 29706.m001271 A_thaliana_homologue=AT5G07990.1
	6s4d12-8	1659	-2.11	
Citrus_EST C002533	Control	14323	1	COG=R : Sulfotransferase Swiss_protein_id=sp P52839 FSTL_ARATH : (44.24% match : score=276) Flavonol sulfotransferase-like OS=Arabidopsis thaliana GN=At2g03760 PE=1 SV=2 Gene_Ontology : [GO:0003674 "molecular_function" evidence=ND] Cdd_domain : (33.58matching : target=gnl CDD 109729 : score=233 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0003s19290.1 Ricinus_Communis_match= 35683.m000014 A_thaliana_homologue=AT5G07010.1
	6s4d12-8	5078	-2.82	
Citrus_EST C003462	Control	4255	1	COG=V : Flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase Swiss_protein_id=sp P51105 DFRA_GERHY : (27.81% match : score=111) Dihydroflavonol-4-reductase OS=Gerbera hybrida GN=DFR PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0005575 "cellular_component" evidence=ND] Cdd_domain : (17.53matching : target=gnl CDD 30800 : score=62.8 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0018s10950.2 Ricinus_Communis_match= 27622.m000153 A_thaliana_homologue=AT4G30470.1
	6s4d12-8	2114	-2.01	
Citrus_EST C001158	Control	2883	1	COG=Q : Cytochrome P450 CYP2 subfamily Swiss_protein_id=sp Q9SBQ9 F3PH_PETHY : (37.04% match : score=299) Flavonoid 3'-monooxygenase OS=Petunia hybrida GN=CYP75B2 PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0005575 "cellular_component" evidence=ND] Cdd_domain : (31.52matching : target=gnl CDD 109135 : score=330 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s07860.1 Ricinus_Communis_match= 30190.m011008 A_thaliana_homologue=AT4G12300.1
	6s4d12-8	1105	-2.61	

Citrus_EST C008845	Control	2504	1	<p>COG=Q : Cytochrome P450 CYP2 subfamily Swiss_protein_id=sp Q9SBQ9 F3PH_PETHY : (41.07% match : score=320) Flavonoid 3'-monooxygenase OS=Petunia hybrida GN=CYP75B2 PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0005575 "cellular_component" evidence=ND] Cdd_domain : (32.57matching : target=gnl CDD 109135 : score=309 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s16800.1 Ricinus_Communis_match= 29706.m001271 A_thaliana_homologue=AT3G26330.1</p>
	6s4d12-8	304	-8.24	
Citrus_EST C006234	Control	5828	1	<p>COG=Q : Cytochrome P450 CYP2 subfamily Swiss_protein_id=sp Q9SBQ9 F3PH_PETHY : (36.10% match : score=235) Flavonoid 3'-monooxygenase OS=Petunia hybrida GN=CYP75B2 PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0008150 "biological_process" evidence=ND] Cdd_domain : (29.89matching : target=gnl CDD 109135 : score=205 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s07850.1 Ricinus_Communis_match= 30190.m011007 A_thaliana_homologue=AT4G12300.1</p>
	6s4d12-8	468	-12.45	
Citrus_EST C005594	Control	20329	1	<p>Swiss_protein_id=sp P52577 IFRH_ARATH : (74.52% match : score=472) Isoflavone reductase homolog P3 OS=Arabidopsis thaliana GN=At1g75280 PE=1 SV=1 Cdd_domain : (54.47matching : target=gnl CDD 114110 : score=325 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0002s03580.1 Ricinus_Communis_match= 30170.m014063 A_thaliana_homologue=AT1G75280.1</p>
	6s4d12-8	5297	-3.84	
Citrus_EST C044273	Control	2316	1	<p>COG=Q : Cytochrome P450 CYP2 subfamily Swiss_protein_id=sp O04773 C75A6_CAMME : (48.15% match : score=87.4) Flavonoid 3',5'-hydroxylase OS=Campanula medium GN=CYP75A6 PE=2 SV=1 Cdd_domain : (33.85matching : target=gnl CDD 109135 : score=68. Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s07860.1 Ricinus_Communis_match= 30190.m011008 A_thaliana_homologue=AT4G12320.1</p>
	6s4d12-8	742	-3.12	
Citrus_EST C044555	Control	2717	1	<p>COG=Q : Cytochrome P450 CYP2 subfamily Swiss_protein_id=sp P48418 C75A1_PETHY : (58.88% match : score=123) Flavonoid 3',5'-hydroxylase 1 OS=Petunia hybrida GN=CYP75A1 PE=2 SV=1 Cdd_domain : (39.58matching : target=gnl CDD 109135 : score=104 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0001s07850.1 Ricinus_Communis_match= 30190.m011007 A_thaliana_homologue=AT4G12330.1</p>
	6s4d12-8	367	-7.4	
Citrus_EST C042679	Control	3150	1	<p>COG=GC : UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase Swiss_protein_id=sp Q9ZQ95 FOGT1_ARATH : (56.88% match : score=557) Flavonol-3-O-glycoside-7-O-glucosyltransferase 1 OS=Arabidopsis thaliana GN=UGT73C6 PE=2 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0006816 "calcium ion transport" evidence=ISS]< Cdd_domain : (25.99matching : target=gnl CDD 109266 : score=92. Populus_trichocarpa_match= POPTR_0012s04600.1 Ricinus_Communis_match= 29579.m000198 A_thaliana_homologue=AT2G36790.1</p>
	6s4d12-8	1355	-2.32	
Citrus_EST C039353	Control	1080	1	<p>COG=V : Flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase Swiss_protein_id=sp P51108 DFRA_MAIZE : (36.81% match : score=189) Dihydroflavonol-4-reductase OS=Zea mays GN=A1 PE=3 SV=1 Gene_Ontology : [GO:0003674 "molecular_function" evidence=ND] Cdd_domain : (27.38matching : target=gnl CDD 30800 : score=136) Populus_trichocarpa_match= POPTR_0002s00600.1 Ricinus_Communis_match= 30170.m013804 A_thaliana_homologue=AT2G33590.1</p>
	6s4d12-8	132	-8.18	

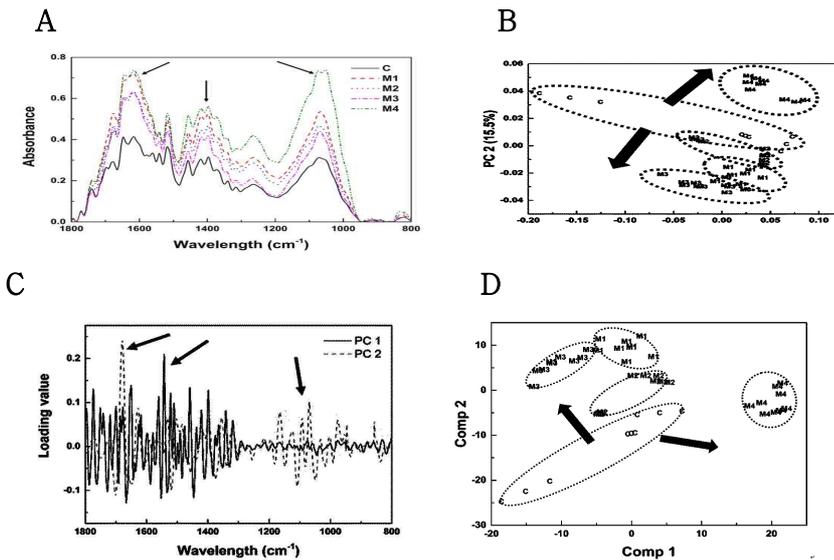
Citrus_EST C026183	Control	2970	1	COG=Q : O-methyltransferase Swiss_protein_id=sp O65862 CAMT1_POPTR : (77.88% match : score=169) Caffeoyl-CoA O-methyltransferase 1 OS=Populus trichocarpa GN=CCOAOMT1 PE=2 SV=1 Cdd_domain : (65.66matching : target=gn CDD 110590 : score=162 Populus_trichocarpa_match= POPTR_0009s10270.1 Ricinus_Communis_match= 29801.m003158 A_thaliana_homologue=AT4G34050.1
	6s4d12-8	41	-72.44	

바. 돌연변이 감귤을 이용한 FT-IR 스펙트럼 기반 다변량통계 분석기법에 의한 당산도 예측 모델링

○ 당산도의 차이를 보이는 돌연변이 4계통을 대상으로 8월의 과실의 FT-IR의 스펙트럼을 수행하여 이를 바탕으로 11월의 당도와 산도를 예측하는 모델링을 구축함

계통	과실 수	8월		11월	
		당도 (°Brix)	산도 (%)	당도 (°Brix)	산도 (%)
대조구(궁천조생)	5	6.2±0.13	2.19±0.03	8.4±0.42	0.64±0.04
8a68-12(M1)	5	6.2±0.29	1.82±0.08	10.3±1.88	0.99±0.25
4c25-1(M2)	5	6.2±0.53	1.81±0.08	8.4±0.23	0.79±0.08
SHa1-2(M3)	5	6.3±0.38	2.09±0.16	9.7±0.83	0.61±0.06
SBa3-4(M4)	5	6.3±0.26	1.75±0.07	9.5±0.18	0.65±0.03

○ FT-IR 스펙트럼과 다변량 통계분석



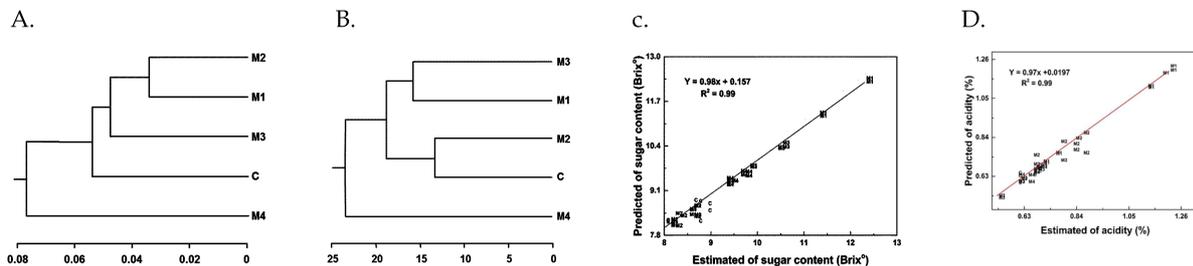
(A) 미성숙 과실의 스펙트럼 측정용 시료들을 이용하여 측정한 FT-IR 스펙트럼 데이터로, 화살표는 각각의 감귤 시료 사이의 유의미한 변화가 있는 부분을, C는 *Citrus unshiu* Marc. Cv. Miyagawa-Wase을, M1은 돌연변이 라인 1을, M2는 돌연변이 라인 2를, M3는 돌연변이 라인 3을, 그리고 M4: 돌연변이 라인 4를 나타냄.

(B)는 표준화된 스펙트럼 데이터의 PCA(Principal component analysis, 주성분분석) 결과 중 PCA 스코어를 나타낸 그래프로, 원형의 점선은 클러스터의 경계를 나타내며, C는 *Citrus unshiu* Marc. Cv. Miyagawa-Wase, M1은 돌연변이 라인 1, M2는 돌연변이 라인 2, M3는 돌연변이 라인 3, 그리고 M4는 돌연변이 라인 4를 나타냄.

(C)는 표준화된 스펙트럼 데이터의 PCA(Principal component analysis, 주성분분석) 결과 중 PCA 스코어의 하중값 (loading values) 플롯을 나타내는 그래프로, 화살표는 도 2의 클러스터링에서 유의미한 역할을 하는 FT-IR 영역을, C는 *Citrus unshiu* Marc. Cv. Miyagawa-Wase, M1은 돌연변이 라인 1, M2는 돌연변이 라인 2, M3는 돌연변이 라인 3, 그리고 M4는 돌연변이 라인 4를 나타냄.

(D)는 PLS-DA 스코어 플롯을 나타내는 그래프로, 원형의 점선은 감귤 종류에 시료의 클러스터 경계를 나타내며, C는 *Citrus unshiu* Marc. Cv. Miyagawa-Wase, M1은 돌연변이 라인 1, M2는 돌연변이 라인 2, M3는 돌연변이 라인 3, 그리고 M4는 돌연변이 라인 4를 나타냄.

○ 다변량통계분석을 통해 당산도에 대한 계통별 분석 및 당도, 산도의 예측 정확도



A는 HCA 덴드로그램(dendrogram) 중 PCA 덴드로그램(dendrogram) 분석 결과로, C는 *Citrus unshiu* Marc. Cv. Miyagawa-Wase, M1은 돌연변이 라인 1, M2는 돌연변이 라인 2, M3는 돌연변이 라인 3, 그리고 M4는 돌연변이 라인 4를 나타냄.

B는 HCA 덴드로그램(dendrogram) 중 PLS-DA 덴드로그램(dendrogram) 분석 결과로, C는 *Citrus unshiu* Marc. Cv. Miyagawa-Wase, M1은 돌연변이 라인 1, M2는 돌연변이 라인 2, M3는 돌연변이 라인 3, 그리고 M4는 돌연변이 라인 4를 나타냄.

C는 성분별 함량 예측 PLS 모델링을 적용하여 얻은 당도에 대한 예측도 평가 결과로, 미성숙 과실을 이용하여 분석한 예측값과, 성숙된 과실을 이용하여 측정된 실제 측정값 사이의 선형 회귀 분석 결과를 나타냄(회귀상관계수, $R^2=0.99$).

D는 개발한 성분별 함량 예측 PLS 모델링을 적용하여 얻은 산도에 대한 예측도 평가 결과로, 미성숙 과실을 이용하여 분석한 예측값과, 성숙된 과실을 이용하여 측정된 실제 측정값 사이의 선형 회귀 분석 결과를 나타냄(회귀상관계수, $R^2=0.99$).

○ FT-IR 스펙트럼과 다변량 통계분석을 활용하여 감귤의 기능성 성분 함량 예측과 품종 판별에 적용하는 결과를 얻어 특허출원 중에 있음

<제2세부과제: 돌연변이체의 관리 및 구조변화분석>

가. 연구포장 일부 이전 및 신규 조성



-서귀포의료원 신축에 의해 기존 육종포장으로 사용하던 포장에 식재되어 있던 나무(돌연변이 원목)을 월평동포장으로 이식함. 그 결과 일부 나무만이 생존함. 제주시 월평동 포장으로의 감귤나무 이식: 총 705 그루를 이식하였음



<제주시 월평포장 정비 및 방풍망 설치>



<감귤나무이식(제주시 월평동)>



<정비전 월평동포장 모습>



<월평동포장 정비>

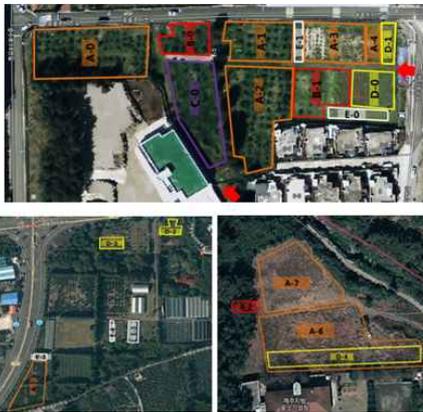
나. 돌연변이 육종 포장관리

○ 돌연변이 감귤의 개체를 유지하여 선발에 활용하기 위한 육종포장을 시기별로 관리 수행: 예초(4월~10월), 전정(2월), 병해충관리(4월~10월), 감귤수확(11월~12월), 시비(2월, 8월) 등



○ 관리원(제주대학교 농림원으로 정년퇴직한 감귤관리 전문가; 조승권)을 채용하여 전문적인 관리를 수행함

○ 돌연변이 개체 증식용 포장 조성: 선발된 돌연변이 개체를 탱자 대목에 접목하여 생육 중인 돌연변이 우수 선발 계통의 정식에 필요한 포장을 정비하여 조성함



위) 서귀포의료원 옆 감귤실습센터

아래) 좌-아열대농업생명과학연구소, 우-제주시 월평동

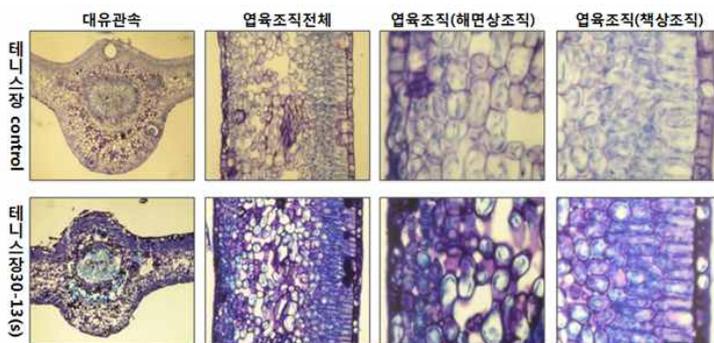
- A-0 ~7 구역 : 방사선돌연변이 고점목 (2009 ~ 2011년)
- B-0 ~2 구역 : 방사선돌연변이 2차선발 절점목 (2012 ~ 2013년)
- E-0 ~5 구역 : 방사선돌연변이 선발 절점목 (2014년)

○ 우수 돌연변이 계통의 증식 후 정식(1세부과제와 공동으로 수행-27 쪽에 기재함))

다. 돌연변이 감귤의 구조 변화 분석

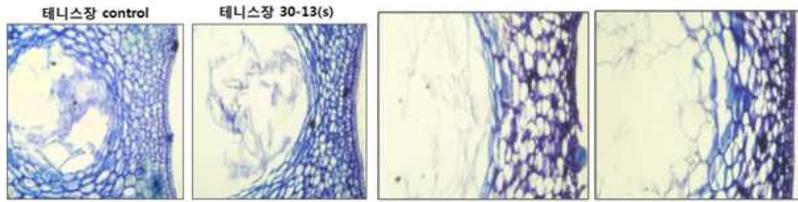
○ 과형돌연변이 계통인 제대온주(6s4a30-13, 2차선발)의 구조 관찰(고정화 개체)

(1) 잎



-돌연변이 감귤의 잎에서 대조구와 유관속의 크기는 비슷하였으나, 엽육조직의 두께가 돌연변이에서 두꺼웠음(1차 선발 원목에서의 관찰결과와 동일)

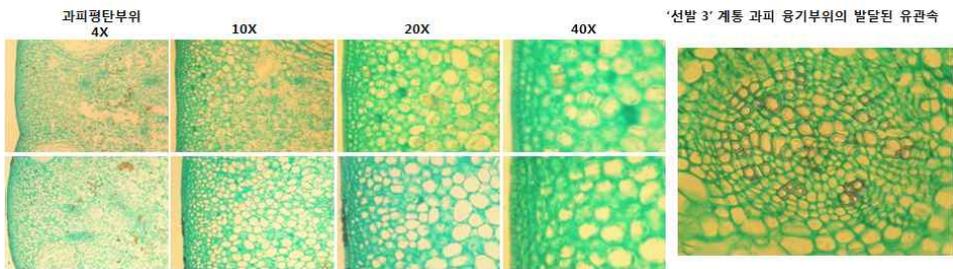
(2) 과실의 과피



어린 과실(6월)

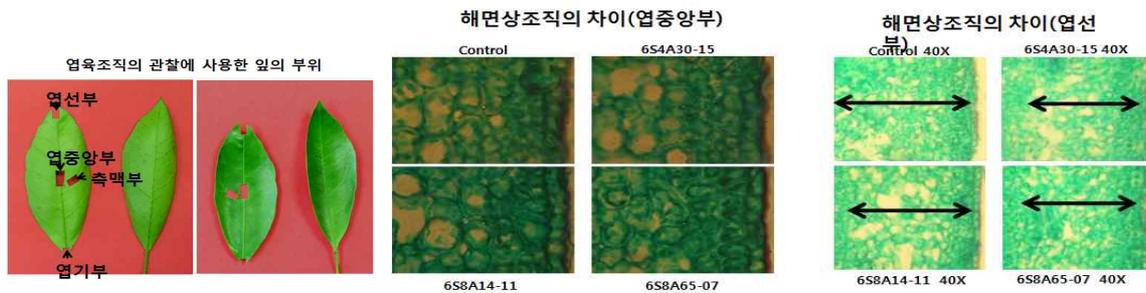
성숙 과실(12월)

-대조구와 비교시 성숙과실에서 표피세포의 붕괴가 지연되는 경향을 관찰할 수 있었고, 융기된 부분에 유관속이 많이 분포하고 있었음

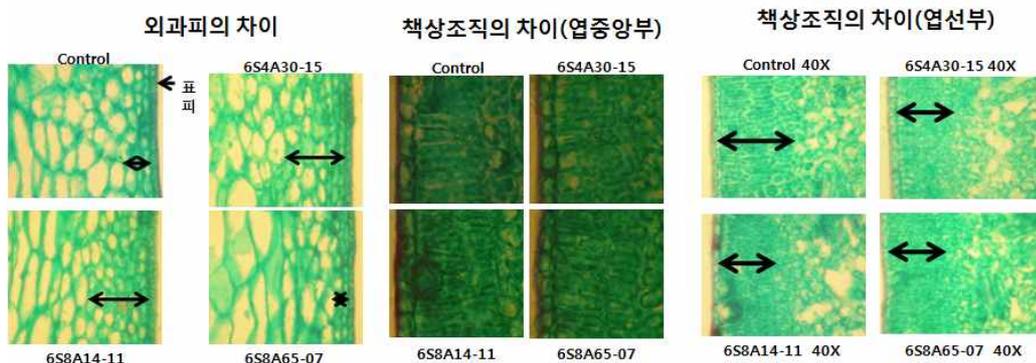


- 과피의 평평한 부분에는 세포가 파괴된 세포간극이 많이 발달되어 있는데 비하여 융기된 부분에는 유관속이 많이 분포. 과피 융기부에 발달된 유관속은 중앙에 물관부가 있고 주위에 체관부가 있는 외사포위 유관속이며 물관부가 많이 분포되어 있음

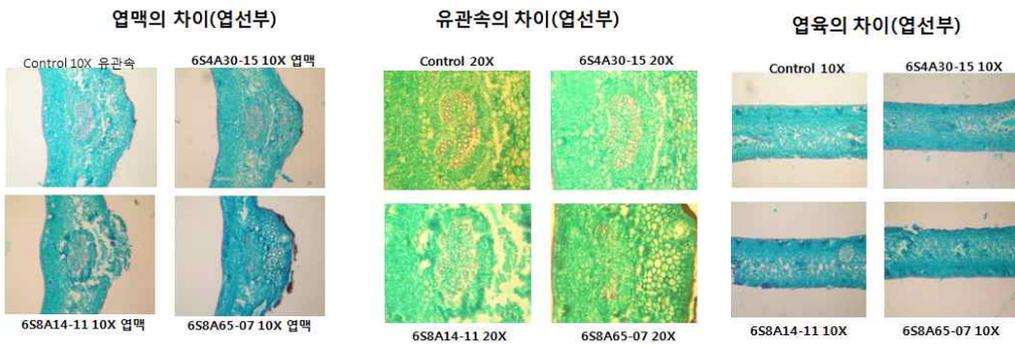
○ 다른 계통의 구조 관찰



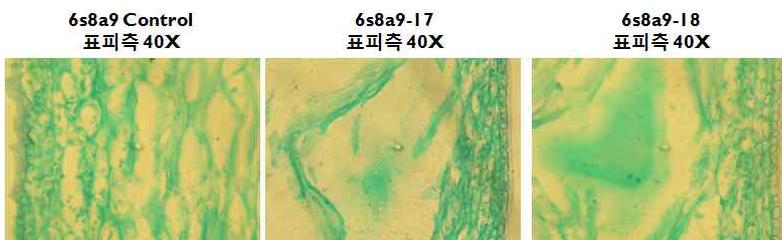
-해면상조직은 control에 비해서 3종의 변이체가 모두 세포간극이 많았으며 두께는 변이체들이 얇았음.



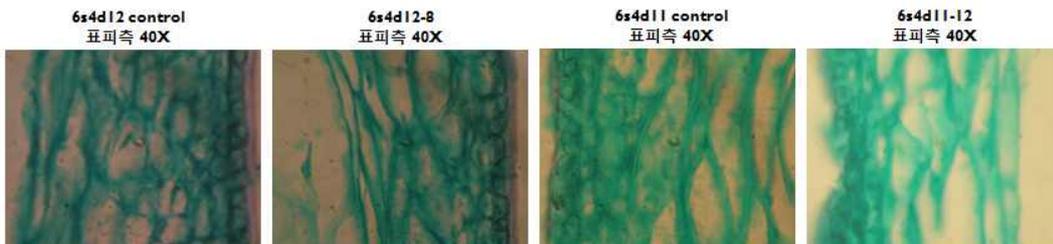
-궁천조생과 돌연변이 계통 간에 뚜렷한 차이가 없음



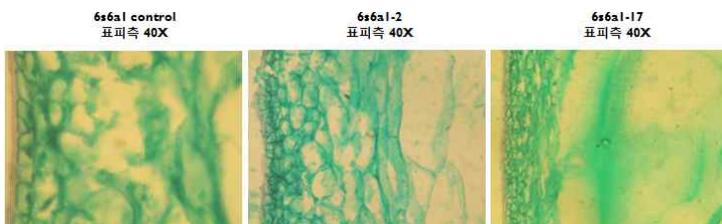
-엽맥과 엽육, 유관속에 뚜렷한 차이가 없음



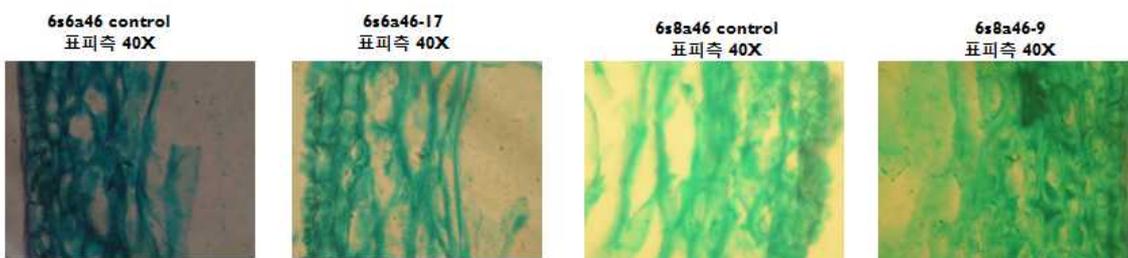
-돌연변이 계통이 control에 비하여 표피세포의 붕괴가 지연되는 경향을 보임



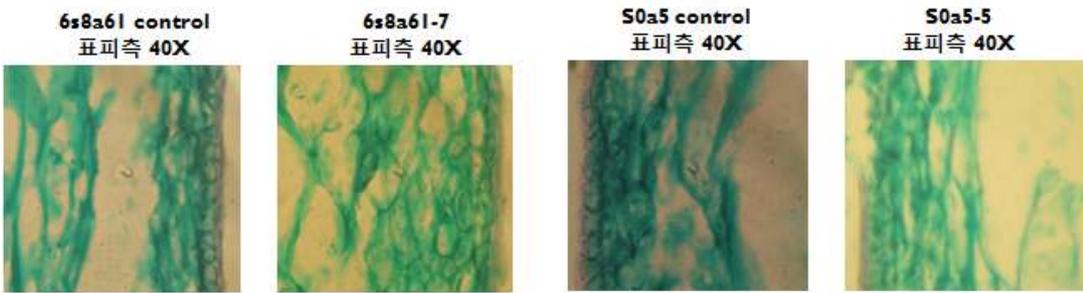
-궁천조생과 돌연변이 계통 간에 뚜렷한 차이가 없음



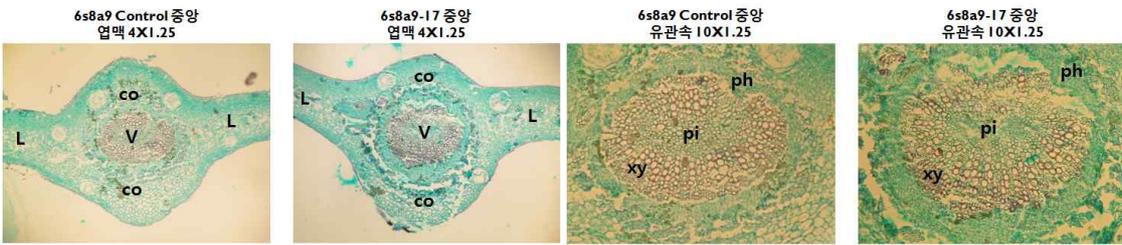
-관찰결과: 돌연변이가 control에 비하여 외과피 표피세포가 작음



-관찰결과: 6s6a46-17의 외과피가 붕괴되고, 다른 돌연변이에서는 뚜렷한 차이가 보이지 않음

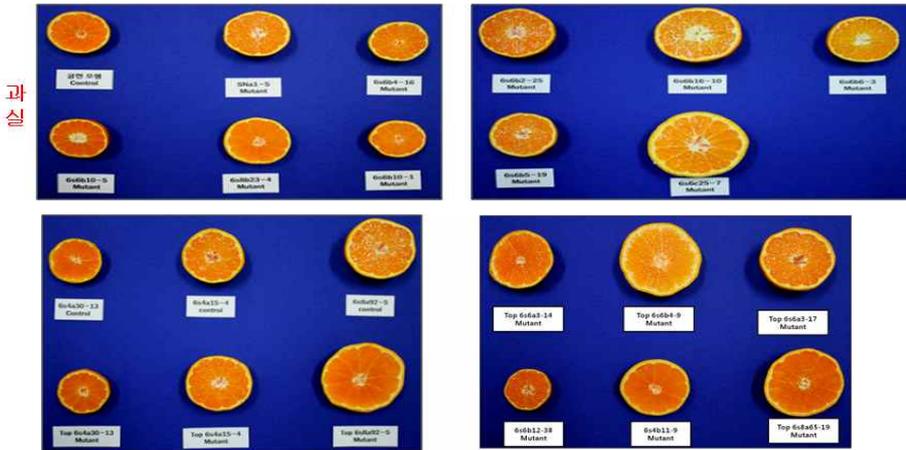


-공천조생과 돌연변이 계통 간에 뚜렷한 차이가 없음

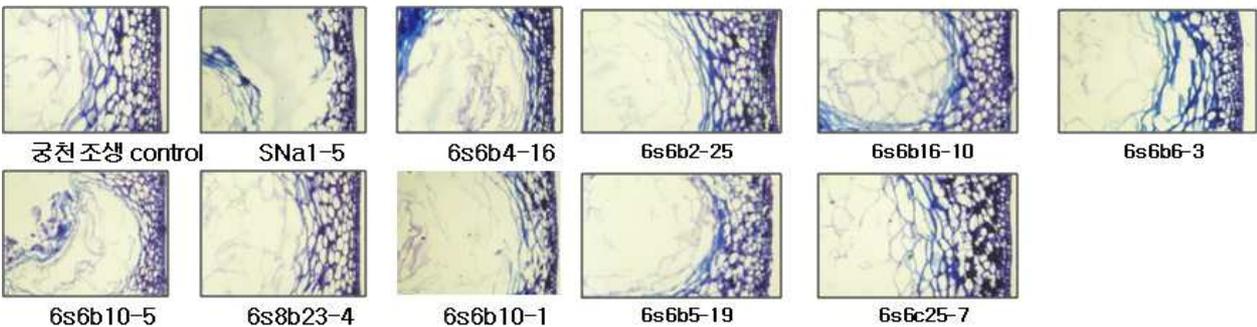


-관찰결과: 돌연변이 계통의 체관부조직이 발달되어 있음

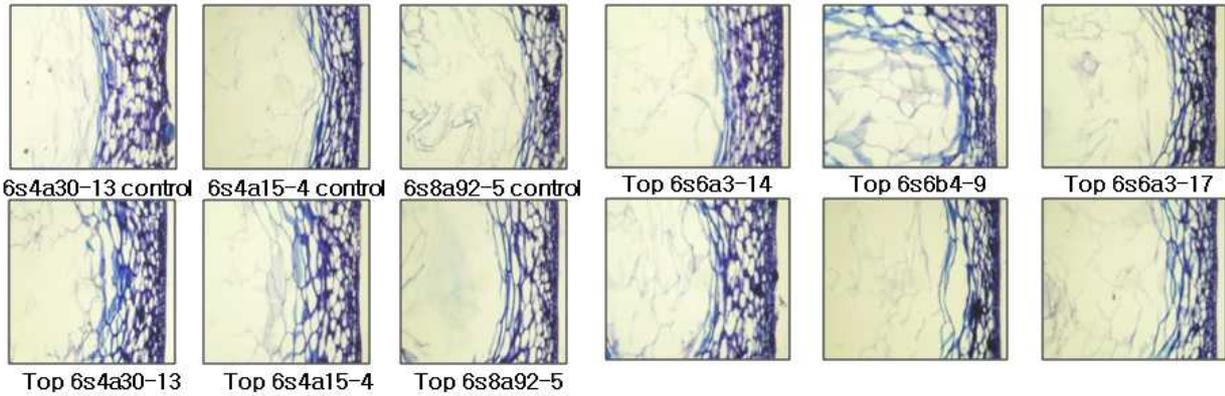
○ 추가선발 계통의 구조 관찰



과피



과피

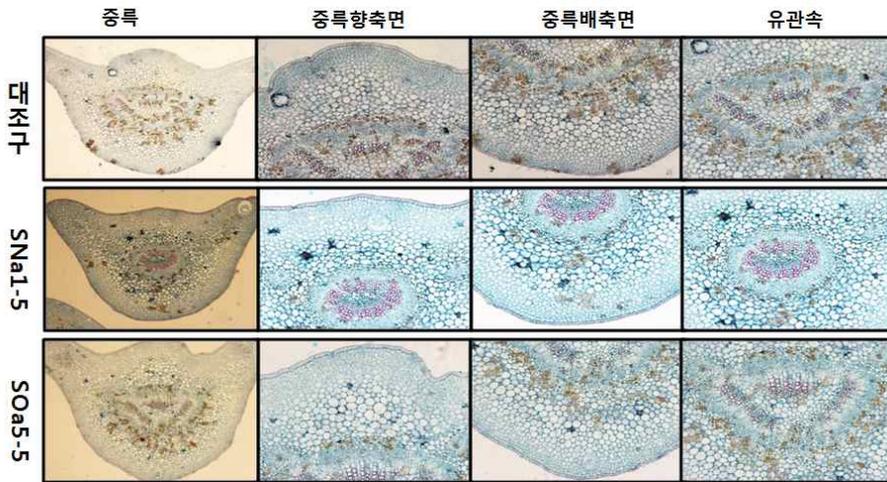


-관찰결과: 뚜렷한 차이가 보이지 않음

○ 2차 선발돌연변이 감귤(2014년 5월 24일, 7월 8일)의 어린 잎과 어린 과실의 구조 관찰

포장	5월 24일(토)		7월 8일 채취(과실)	비고
테니스장	대조구	잎, 꽃, 과실	○	
	6s4a15-3	잎		
	6s4a15-5	잎, 과실2	○	
	6s4a30-13(제대운주)	잎	○(하우스)	
	6s4a3-30	잎, 과실1	○	
	6s4a3-36	잎		
	6s6a3-14	잎		
	6s6a3-17	잎, 과실2	○	
	6s6a3-17	잎		
	6s6a92-5	잎		
	6s8a14-14	잎, 과실4	○	
	6s8a4-10	잎, 과실4, 꽃2	○	
	6s8a65-19	잎		
	6s8a65-23	잎		
	6s8a65-25	잎, 꽃2, 과실3	○	
	6s8a65-7	잎, 과실 2	○	
	6s8a68-12	잎		
	6s8a68-21	잎		
	6s8a7-27	잎, 과실1	○	
	6s6b16-10	잎, 꽃, 과실3	○	
	6s6b16-27	잎, 꽃2, 과실3	○	
	6s6b4-16	잎		
	6s6b4-9	잎		
6s6b7-A	잎, 과실2, 꽃	○		
6s8b4-12	잎			
6s6c3-20	잎, 과실2	○		
아열대농업 생명과학연구소	대조구	잎, 과실, 꽃	○	
	SOa5-5	잎, 과실8, 꽃	○	
	SNa1-5	잎, 과실4, 꽃		

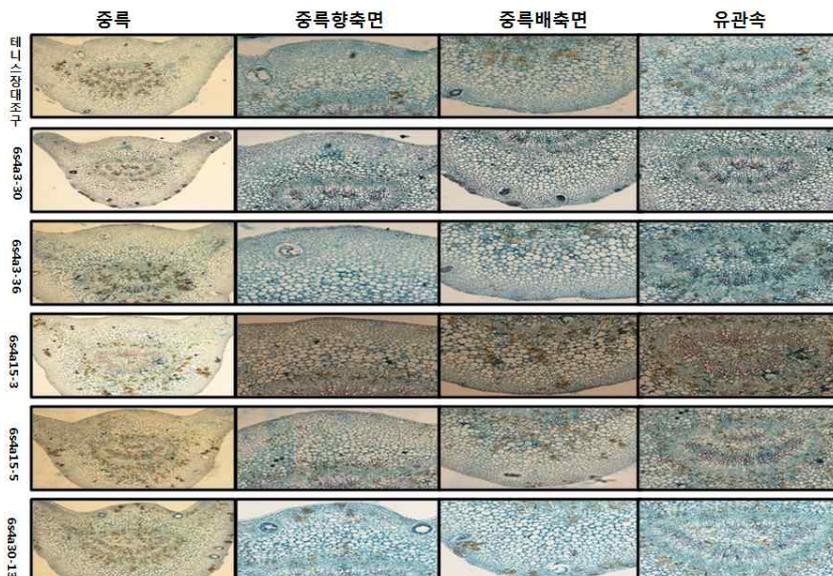
(1) 잎



-잎의 중륵은 외부형태와 내부조직 등이 대조구와 뚜렷한 차이가 없음. 향측면, 배측면은 한 층의 표피와 두꺼운 피층으로 구성되어 있으며, 중앙에는 유관속이 발달된 형태를 가지고 있음, 대조구와 별다른 차이가 없음.

-대조구와 과형 변이인 SOa5-5(제대온주 유사) 유관속은 두개의 병립유관속으로 구성되어 있지만 SNa1-5(당산비 향상)은 외사포위유관속으로 되어있음. 병립유관속은 외측에는 사부조직이 형성되어 있고, 내측에는 목부조직이 형성 되어 있음, 또한 배측면 쪽으로 휘어져 띠모양을 이루고 휘어진 안쪽부분에 수가 반달모양으로 잘 발달되어 있음. 수의 향측면 쪽에 있는 독립된 작은 병립유관속은 수 쪽으로 목부조직이 있고 반대쪽에는 사부조직이 발달되어 있음

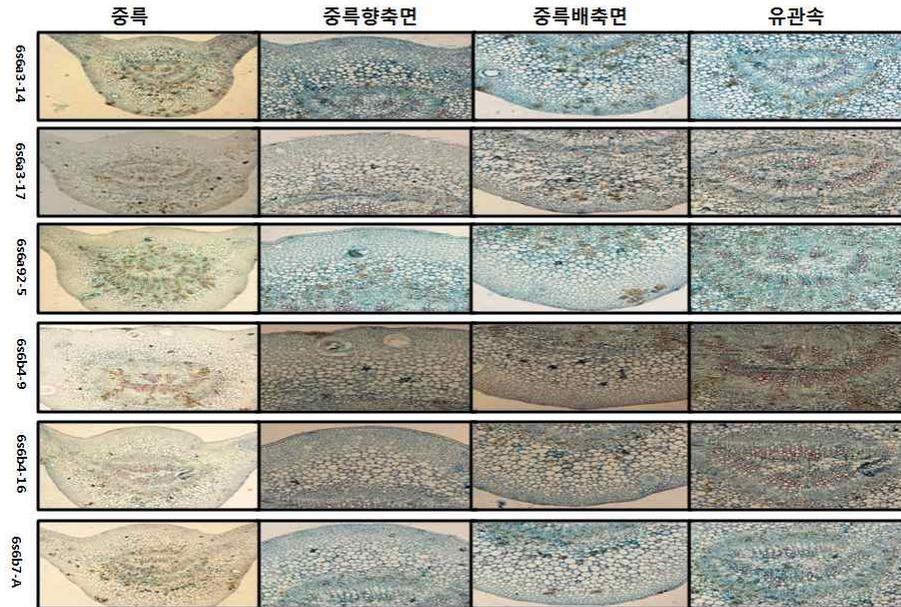
-SNa1-5는 외사포위유관속으로 외측에는 사부조직이 타원형의 링모양으로 잘 발달되어 있고 내측에는 목부조직으로 사부조직과 동일한 모양으로 발달되었으며, 목부 조직 사이에 유조직이 형성되어 있음. 또한 안쪽에 수 조직이 형성되어 있는데 대조구보다 빈약하게 형성되어 있는 편임. 유관속계의 변이는 광합성 산물의 수송(운반)에 영향을 주어 당산비의 변화에 영향을 주었을 것으로 추정됨. 이에 따라 이 계통의 재배시 고품질 감귤 생산을 위한 과실 1개당 엽수가 달라질 것으로 예상되어 전정, 적과 등의 재배 기술이 달라져야 함으로 이에 대한 추후 연구가 필요함.



-제대온주(6s4a3-30)는 중륵의 크기와 유관속의 크기 작으며, 향측면과 배측면의 피층의 두께 또한 얇음

-6s4a3-36은 향측면과 배측면의 피층조직이 두껍게 잘 발달되어 있음

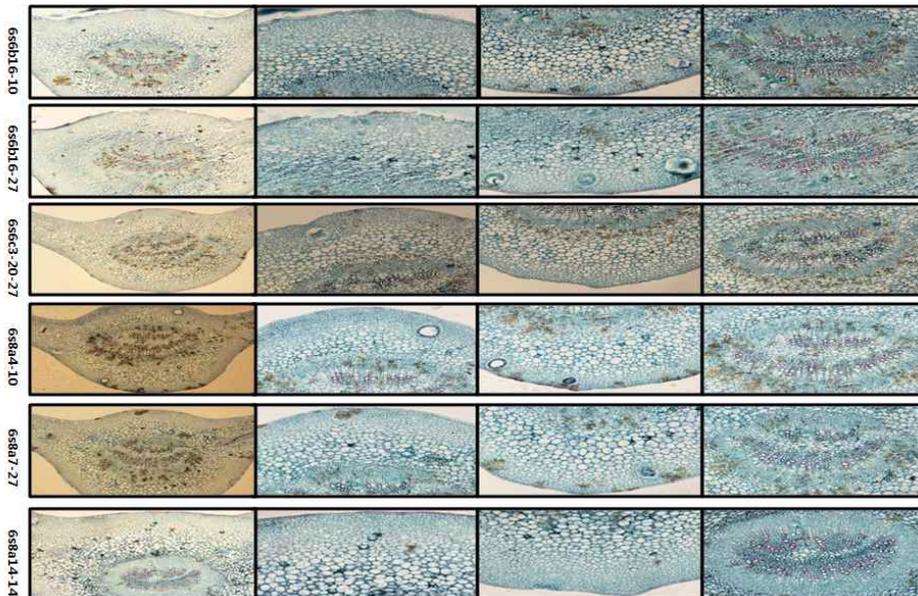
-다른 개체들은 뚜렷한 차이를 발견하지 못함



-6s6a3-14는 중륵의 크기가 작게 발달되어 있음

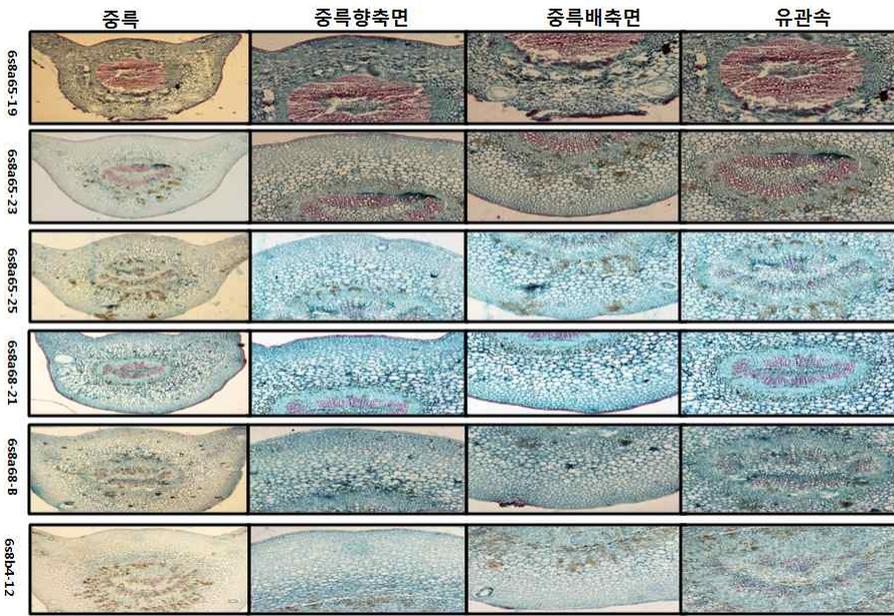
-6s6b4-9(만생 계통)는 중륵의 크기가 크게 잘 발달되어 있음

-다른 개체들은 뚜렷한 차이점을 발견하지 못하였음



-6s8a14-14(당산비 우수)는 중륵,향측면, 배측면, 유관속이 크게 잘 발달되어 있으며, 사부조직 또한 두껍게 발달되어 있음. 유관속의 발달과 사부조직 두께의 변화는 뿌리를 통한 무기염류의 흡수와 광합성 산물의 수송에 변화를 통해 감귤의 품질(당도, 산도 등)의 변화가 발생할 수 있음. 이에 따른 재배 기법도 달라져야 하므로 이에 대한 연구가 추후에 진행되어야 함.

-다른 개체들은 뚜렷한 차이점을 발견하지 못하였음.



-6s8a65-19(당산비 개선)는 유관속에 있는 목부 조직이 잘 발달되어 있고, 사부조직은 반대로 빈약하게 형성되어 있음. 이에 따라 재배시 엽수 등의 조절 등과 관련된 재배 기술에 대한 확립도 필요할 것으로 추론됨

-6s8b4-12는 중륵과 유관속 크기가 크게 잘 발달되어 있음

-다른 개체들은 뚜렷한 차이점을 발견하지 못하였음

(2) 과피

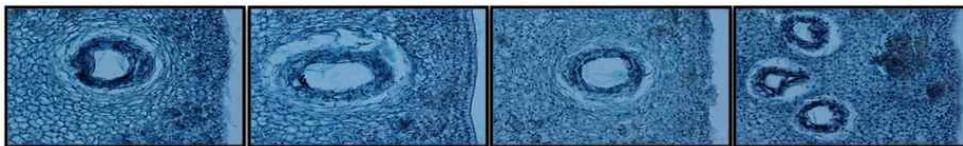
○ 2014년 5월 24일 채취



대조구

SNa1-5

SOa5-5

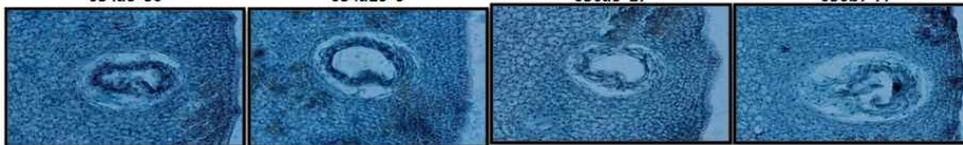


6S4a3-30

6S4a15-5

6S6a3-17

6S6b7-A

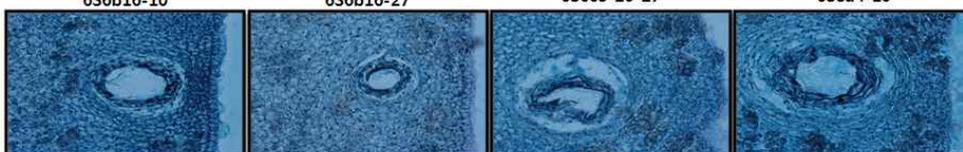


6S6b16-10

6S6b16-27

6S6c3-20-27

6S8a4-10



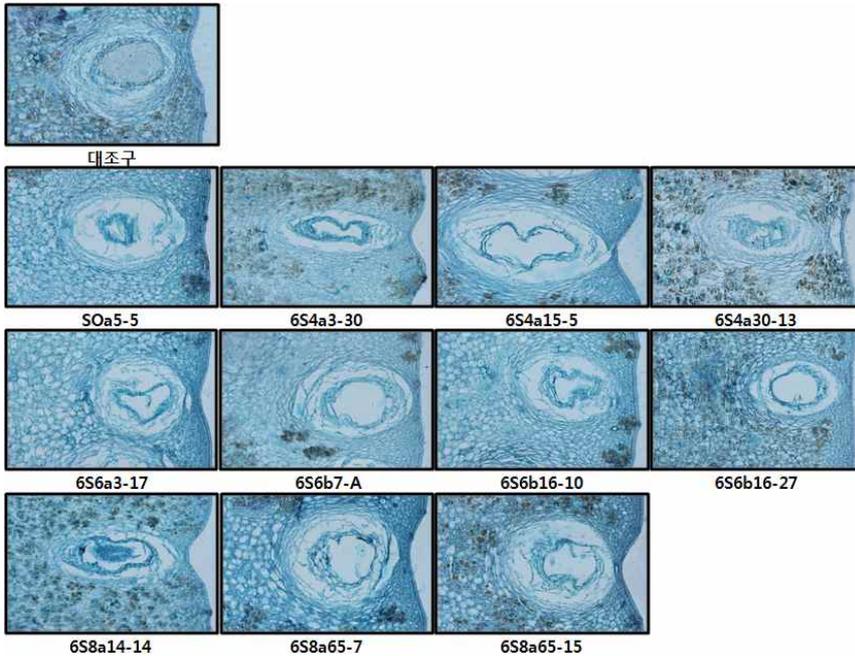
6S8a7-27

6S8a14-14

6S8a65-7

6S8a65-25

○ 2014년 7월 8일 채취



○ 두 채취시기 모두에서 뚜렷한 차이를 관찰하지 못함

[제3세부 : 돌연변이체의 성분 및 효과분석]

가. 1차 선발 돌연변이감귤 부위별 추출물의 항산화 활성 연구

- 1차년도 연구에서는 방사선 조사를 통해 유도된 감귤 돌연변이 가지에 착과된 과실 중 색깔, 모양, 당산도 변화를 보이는 과육 및 과피 부위와 잎을 대상으로 2차대사산물(총 폴리페놀과 플라보노이드) 함량과 성분을 측정함
- 고품질 감귤생산과 감귤의 적정생산을 위하여 감귤나무의 가지치기, 간벌, 폐원 등으로 발생되는 감귤 잎은 현재 대부분 소각을 하고 있어 또 다른 환경요인을 유발할 수 있으므로 이의 활용방안에 대한 기초자료를 제공하고자 감귤 과실 외에도 감귤 잎 부위를 기능성 성분 분석을 위한 시험대상에 포함시킴
- 시험군은 제1세부과제 연구결과를 토대로 2세부과제에서 유지하고 있는 돌연변이 개체로부터 생산된 감귤계통을 형질에 따라 5개의 그룹으로 구별하여 (1) Control(방사선 조사하지 않은 대조군); (2) 6S8a65-7(당산비 우수계통); (3) 6S8a14-11(붉은색을 띠는 시료, 홍색계통); (4) 6S4a30-15(6a4a30-13에 대한 추가적인 대조군); (5) 제대온주(6a4a30-13 계통, 표면이 울퉁불퉁해진 과형변이 시료군)으로 정하여 성분 분석을 수행함
- 모든 실험은 3회 반복하였으며 실험치는 평균값과 표준편차로 나타내었고, SPSS

program(12.0) 중에서 분산분석(ANOVA)을 실시하여 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple range test에 의해 검정함($p < 0.05$)

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

- 페놀성 물질은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가진다. phenolic hydroxyl기를 가지고 있는 페놀성 물질은 단백질 및 기타 거대분자들과 결합하는 성질이 있으며 항산화 효과 등의 생리활성 기능도 갖는다^(1, 2). 본 연구에서는 gallic acid를 표준물질로 사용하여 검량선을 작성하고 이로부터 각 시험군 감귤의 (i)잎, (ii)과피 및 (iii)과육 부위 추출물들의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다(mg gallic acid/100 g dried sample).
- 잎부위의 총 폴리페놀 함량은 6S8914-11(7995 mg/100 g)이 control(7557 mg/100 g)과 유사한 함량을 보인 것을 제외하고는 모든 시험군에서 control에 비해 상대적으로 높은 총 폴리페놀 함량을 보였다($p < 0.05$): 6S8965-7(당산비 우수군)에서 가장 높은 폴리페놀 함량(13240 mg/100 g)을 나타내었다(Figure 1).
- 감귤류의 과피는 종자와 같은 다른 부위보다 더 많은 폴리페놀류를 함유하고 있다는 이전 연구결과⁽²⁾와 같이, 본 연구에서도 과육과 잎 부위와 비교하여 과피부위가 더 많은 폴리페놀을 함유하고 있는 것으로 나타났다(Figure 1). 과피부위의 총 폴리페놀 함량은 6a4a30-13(표면이 울퉁불퉁해진 과형변이 시료군)을 제외하고는 모든 시험군에서 control에 비해 높은 함량을 보였으며($p < 0.05$), 6S8965-7(당산비 우수군)에서 23787 mg/100 g의 함량을 보여 control(15098 mg/100 g)보다 약 1.6배 정도 더 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 1).
- 과피 분석 결과와 유사하게 과육 부위의 총 폴리페놀 함량은 6a4a30-13(표면이 울퉁불퉁해진 과형변이 시료군, 4825 mg/100 g)을 제외하고는 모든 시험군에서 control(9142 mg/100 g)에 비해 높은 함량을 보였다($p < 0.05$): 6S4a30-15(21765 mg/100 g) \geq 6S8a14-11(21164 mg/100 g) $>$ 6S8a65-7(13787 mg/100 g) 순이었다(Figure 1).

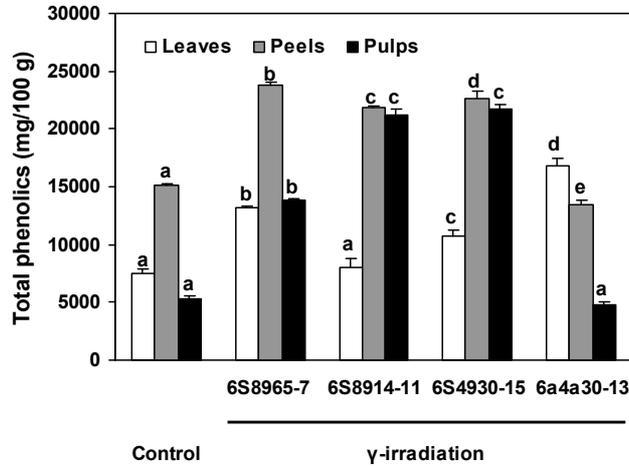


Figure 1. Total phenolic composition of citrus fruits and leaves harvested from non-irradiated and irradiated (100Gy) branches. Values are means \pm S.D. of three separated experiments. ^{a-e} Mean values not sharing the same letter above the bars are significantly different at $p < 0.05$ by one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

- 페놀류 중에서도 가장 많은 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려진 플라보노이드 (flavonoids)는 구조에 따라 flavones, flavanones, flavonols, isoflavons, anthocyanidins, flavanols(또는 catechins)로 구분할 수 있으며, 감귤류는 이 중 isoflavones를 제외한 5개 group의 60개 이상의 플라보노이드들이 밝혀졌다⁽³⁾. 이들 플라보이드는 항산화 활성, 항염증 활성, 동맥경화증 예방, 항암효과, 항균 활성등의 생리활성을 가지고 있다는 연구결과가 보고되었다^(4,7). 본 연구에서는 rutin을 표준물질로 사용하여 검량선을 작성하고 이로부터 각 시험군 감귤의 (i)잎, (ii)과피 및 (iii)과육 부위 추출물들의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다 (mg rutin/100 g dried sample).
- 잎부위의 총 플라보노이드 함량은 6S4930-15(4333 mg/100 g)과 6a4a30-13(11991 mg/100 g) 군이 control(2441 mg/100 g)과 비교하여 높은 함량을 보인 반면, 6S8a14-11(766 mg/100 g)과 6S8a965-7(1090 mg/100 g)군에서는 control에 비해 낮은 플라보이드량을 보였다($p < 0.05$) (Figure 2). 6S4a30-15군과 6a4a30-13군은 control보다 총 폴리페놀 함량 뿐만 아니라 총 플라보노이드 함량에 있어서도 더 많은 것으로 나타났다(Figures 1 and 2).
- 과피부위의 총 플라보노이드 함량은 6a4a30-13군을 제외하고는 모든 시험군에서 control(6766 mg/100 g)에 비해 유사한 함량을 보였다. 6a4a30-13(과형변이군)에서 10460 mg/100 g의 함량을 보여 control(6766 mg/100 g)보다 약 1.5배 정도 더 높은 플라보노이드 함량을 나타내었으며(Figure 2), 이 수치는 총 폴리페놀 함량에 대해 78%를 차지하고 있는 것으로 나타났다. 이외 각 시험군의 총 폴리페놀에 대한 총 플라보노이드 함량은 약 30%

로 control(45%)에 비해 낮은 비율을 보였다(Figures 1 and 2).

- 과피부위에서의 총 플라보노이드 결과와 유사한 경향을 나타내었으나, 6a4a30-13군(4825 mg/100 g)의 과육부위 총 플라보노이드 함량은 control(5317 mg/100 g)에 비해 낮은 함량을 보였으며($p < 0.05$), 이 수치는 총 폴리페놀 함량에 대해 46%를 차지하고 있는 것으로 나타나 6S8914-11군(41%) 및 control(53%)과 유사한 비율을 보였다(Figures 1 and 2). 6S8914-11군(26%)과 6S4930-15군(27%)의 경우 높은 폴리페놀 함량을 보인데 반해 상대적으로 낮은 플라보노이드 함량을 보였다(Figures 1 and 2).

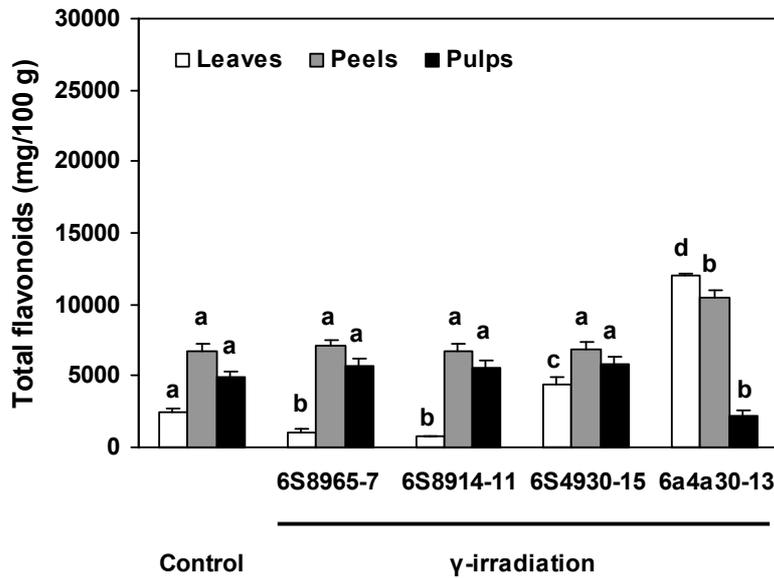


Figure 2. Total flavonoid composition of citrus fruits and leaves harvested from non-irradiated and irradiated (120 Gy) branches. Values are means \pm S.D. of three separated experiments. ^{a-e} Mean values not sharing the same letter above the bars are significantly different at $p < 0.05$ by one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests.

(3) 플라보노이드 성분 및 함량 측정

- Flavonoid는 자연계에 널리 분포하는 담황색 또는 노란색 계통의 색소화합물로서 benzopyrane 계통이며 carotenoid 색소와 함께 중요한 색소중에 하나이다. 식물 중에는 대부분 당과 결합한 배당체 형태로 존재하며, 하루 섭취량이 약 23-1000 mg 정도이고 부작용이 없는 것으로 알려져 있다⁽⁸⁾. 감귤류에는 다양한 flavonoid가 존재하는 것으로 알려지고 있다. 본 연구에서도 rutin, naringin, neohesperidin, hesperidin, narirutin, naringenin, hesperetin(7종)의 flavonoid를 중심으로 각 시험군 감귤의 (i)잎, (ii)과피 및 (iii)과육 부위 추출물들의 flavonoid 함량을 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석시 7종의 flavonoid 크로마토그램(Figure 3)을 작성하고 각 flavonoid의 함량을 분석한 결과를 Tables 1-3에 요약하였

다.

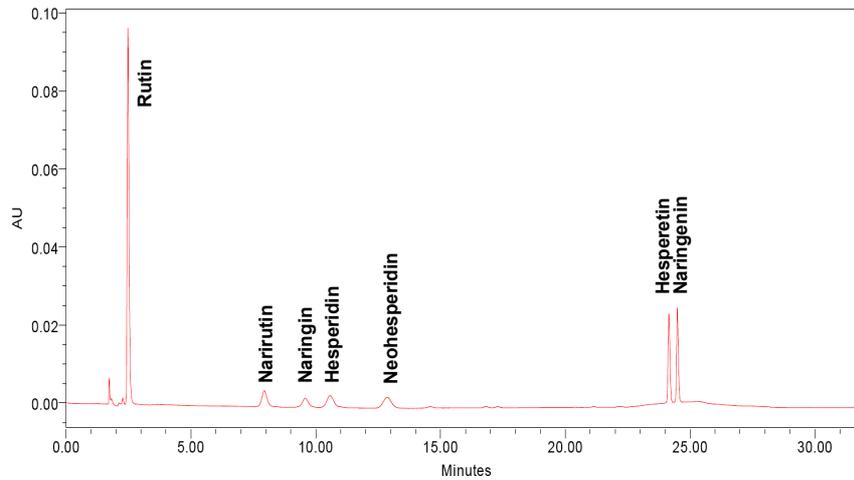


Figure 3. HPLC chromatogram of flavonoid standard.

- Table 1에서 보인 바와 같이 감귤 잎에서 추출한 조추출물중의 flavonoid 함량을 비교해 보면, rutin과 naringin은 모든 시험군에서 control(254.1 mg/100 g과 30.9 mg/100 g)에 비해 낮게 검출되었으며($p < 0.05$), 이 중 6S8a14-11군(134.1 mg/100 g)에서 rutin이, 6S4a30-15군(14.6 mg/100 g)에서 naringin이 가장 적은 함량을 나타내었다. Hesperidin 또한 control(829.5 mg/100 g)에 비해 모든 시험군에서 낮게 검출되었으며($p < 0.05$), 6a4a30-13군(248.3 mg/100 g)에서 가장 적은 함량을 보였다. Narirutin 분석 결과에서는 6S89b5-7군(22.0 mg/100 g), 6S8a14-11군(26.8 mg/100 g), 6a4a30-13군(23.1 mg/100 g)이 control(18.8 mg/100 g)에 비해 높은 함량을 보인 반면 6S4a30-15군(14.6 mg/100 g)에서 적은 함량을 나타내었다($p < 0.05$). Neohesperidin 성분은 모든 시험군에서 control과 비교하여 유의한 차이를 보이지 않았으며, naringenin과 hesperetin 성분은 검출되지 않았다.

Table 1. Flavonoid composition of citrus leaves harvested from non-irradiated and irradiated (120 Gy) branches

Content (mg/100 g dry matter)	RT*	NG	NHD	HD	NRT	NGN	HT
Control	254.1 ± 2.07 ^a	30.9 ± 3.04 ^a	43.3 ± 1.43	829.5 ± 1.86 ^a	18.8 ± 0.65 ^a	nd**	nd
6S8a65-7	186.6 ± 1.76 ^b	20.6 ± 1.43 ^b	42.0 ± 1.66	292.9 ± 2.02 ^b	22.0 ± 1.16 ^b	nd	nd
6S8a14-11	134.1 ± 2.72 ^c	21.7 ± 1.13 ^b	42.0 ± 2.50	293.9 ± 1.47 ^b	26.8 ± 0.91 ^c	nd	nd
6S4a30-15	158.3 ± 0.98 ^d	14.6 ± 0.51 ^c	40.7 ± 1.32	345.1 ± 2.79 ^c	12.8 ± 0.34 ^d	nd	nd
6a4a30-13	186.4 ± 0.99 ^b	17.4 ± 0.48 ^c	43.3 ± 0.79	248.3 ± 1.29 ^d	23.1 ± 0.30 ^b	nd	nd

* RT, Rutin hydrate; NG, Naringin; NHD, Neohesperidin; HD, Hesperidin; NRT, Narirutin; NGN, Naringenin; HT, Hesperetin

** Not detected

^{a-d} Values with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$)

- 감귤 과피 추출물등의 flavonoid 함량 비교 결과, rutin과 narirutin은 모든 시험군에서

control(65.7 mg/100 g과 60.8 mg/100 g)에 비해 유사하거나 높게 검출되었다($p<0.05$) (Table 2). Rutin과 narirutin 성분 모두 6S4a30-15군에서 114.3 mg/100 g과 162.8 mg/100 g을 보여 가장 높게 검출되었다. Hesperidin 성분은 6S8a14-11군(340.3 mg/100 g)을 제외한 모든 시험군에서 control과 비교하여 높은 함량을 나타내었다($p<0.05$). Naringin, neohesperidin, naringenin 및 hesperetin 성분은 검출되지 않았다.

Table 2. Flavonoid composition of citrus peels harvested from non-irradiated and irradiated (120 Gy) branches

Content (mg/100 g dry matter)	RT*	NG	NHD	HD	NRT	NGN	HT
Control	65.7 ± 0.47 ^a	nd**	nd	463.1 ± 1.11 ^a	60.8 ± 1.51 ^a	nd	nd
6S8a65-7	72.1 ± 0.93 ^b	nd	nd	573.7 ± 3.71 ^b	93.7 ± 0.61 ^b	nd	nd
6S8a14-11	64.0 ± 0.87 ^c	nd	nd	340.3 ± 5.94 ^c	111.3 ± 1.23 ^c	nd	nd
6S4a30-15	114.3 ± 0.68 ^d	nd	nd	969.4 ± 1.14 ^d	162.8 ± 1.90 ^d	nd	nd
6a4a30-13	66.1 ± 0.63 ^a	nd	nd	546.6 ± 3.38 ^c	78.5 ± 0.61 ^c	nd	nd

* RT, Rutin hydrate; NG, Naringin; NHD, Neohesperidin; HD, Hesperidin; NRT, Narirutin; NGN, Naringenin; HT, Hesperetin

** Not detected

^{a-e} Values with different superscripts in a column are significantly different ($p<0.05$)

- Rutin 성분은 6S8965-7군(54.9 mg/100 g)을 제외한 모든 시험군에서 control(57.7 mg/100 g)에 비해 높게 검출된 반면, Hesperidin 함량은 6a4a30-13군(276.3 mg/100 g)을 제외한 시험군에서 control(178.8 mg/100 g) 보다 적은 함량을 나타내었다($p<0.05$) (Table 3). narirutin은 6S4930-15군(89.6 mg/100 g)을 제외한 모든 시험군에서 control(92.4 mg/100 g)에 비해 유사하거나 높게 검출되었다($p<0.05$) (Table 2). 감귤과피 분석결과와 마찬가지로 naringin, neohesperidin, naringenin 및 hesperetin 성분은 검출되지 않았다.
- 제대온주(6s4a30-13)은 과실의 과피와 과육에서 Hesperidin과 narirutin의 함량이 증가된 것을 확인함. 이러한 결과는 1세부과제에서 육성한 제대온주 계통은 기능성강화 감귤 주스 등의 가공식품의 소재로서 활용될 가능성을 제시함

Table 3. Flavonoid composition of citrus pulps harvested from non-irradiated and irradiated (120 Gy) branches

Content (mg/100 g dry matter)	RT*	NG	NHD	HD	NRT	NGN	HT
Control	57.7 ± 0.93 ^a	nd**	nd	178.8 ± 0.43 ^a	92.4 ± 0.59 ^a	nd	nd
6S8a65-7	54.9 ± 1.68 ^b	nd	nd	145.1 ± 1.35 ^b	93.4 ± 0.16 ^a	nd	nd
6S8a14-11	83.8 ± 0.81 ^c	nd	nd	105.4 ± 0.67 ^c	131.9 ± 0.60 ^b	nd	nd
6S4a30-15	60.1 ± 1.72 ^d	nd	nd	152.8 ± 0.86 ^d	89.6 ± 0.94 ^c	nd	nd
6a4a30-13	59.4 ± 0.26 ^{ad}	nd	nd	276.3 ± 2.07 ^e	132.2 ± 1.53 ^b	nd	nd

* RT, Rutin hydrate; NG, Naringin; NHD, Neohesperidin; HD, Hesperidin; NRT, Narirutin; NGN,

Naringenin; HT, Hesperetin

** Not detected

^{a-e} Values with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$)

^{ad} This mean was not significantly different from a mean with “a”, and was not significantly different from another mean with “d”. However, means with different letters were significantly different at the level of 0.05.

- 제1세부과제와 2세부과제 연구결과를 통해 방사선 조사에 의해 유도된 1차 선발 돌연변이 가지에 착과된 과실 중 제1세부과제 연구결과를 토대로 시험군을 정하고(Figure 4), 과육, 과피 및 잎 부위를 대상으로 리모넨 함량과 항산화능을 측정하였다.

시험군	샘플번호	특징
Group 1	Control	방사선 조사하지 않은 대조군
Group 2	6S8a65-7	당산비 우수군
Group 3	6S8a14-11	붉은색을 띠는 시료군 (홍색계통)
Group 4	제대은주 (6a4a30-13)	표면이 울퉁불퉁해진 과형변이 시료군

SAMPLE PREPARATION (HARVESTS NOV. 2010)

Budsticks were exposed to a cobalt (⁶⁰CO) γ -irradiator at the doses of 120 Gy



2.5 g of different parts (Leaves, Peels and Pulps) of mutant citrus was dissolved in 250 mL of 100% MeOH, kept in the shaking incubator at 25 °C for 24 h, and then purified by using a Sep-Pak C18 cartridge and a 0.45 μ m membrane filter

Figure 4. Citrus samples used in this study

(4) 감귤 부위별 리모넨 함량 분석

- D-limonene이 주성분인 감귤 정유는 감귤과피 flavedo층의 유선(oil glands)중 함유되어 있는 방향성분으로, 살균, 살충효과 같은 다양한 생물활성을 가지고 있어 세정제, 식품향료, 의약품 등에 첨가제로 이용되고 있으며, 최근 무좀균과 비듬균의 생장억제에 감귤정유가 효과적으로 식품 및 공중보건제품의 소재로 적합하다는 연구결과가 발표되었다. 본 연구에서는 감귤 정유의 주성분인 limonene을 대상으로 GC 크로마토그램을 작성하고 (Figure 5), 그 함량을 비교하였다. 잎 부위에서 limonene의 함량변화를 분석한 결과 Group 2(436.3

mg/100 g)와 Group 4(204.9 mg/100 g)에서 방사선을 조사하지 않은 Group 1(대조군, 126.4 mg/100 g)과 비교하여 유의하게 그 함량이 증가한 반면, Group 3 (48.4 mg/100 g)에서는 유의하게 감소하였다(Figure 6). 과피 부위에서는 모든 방사선 조사군에서 limonene 함량이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 가장 큰 함량을 나타낸 Group 3 (23843.7 mg/100 g)은 대조군(11222.1 mg/100 g)에 비해 약 2 배정도 증가하였다 (Figure 6).

- 이러한 결과는 1세부에서 홍색감귤로 선발한 Group 3계통에서 D-limonene의 고함량의 결과는 세정제, 식품향료, 의약품 등에 첨가제로 이용이 가능한 계통인 결과를 제시함

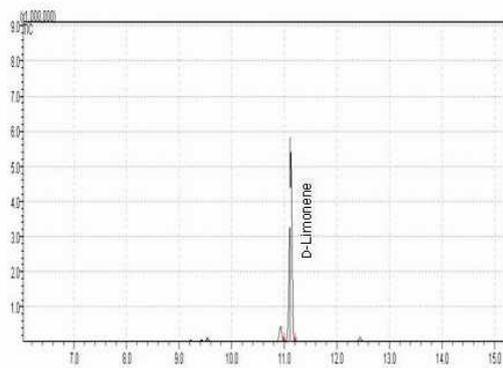


Figure 5. Gas chromatogram of D-limonene standard

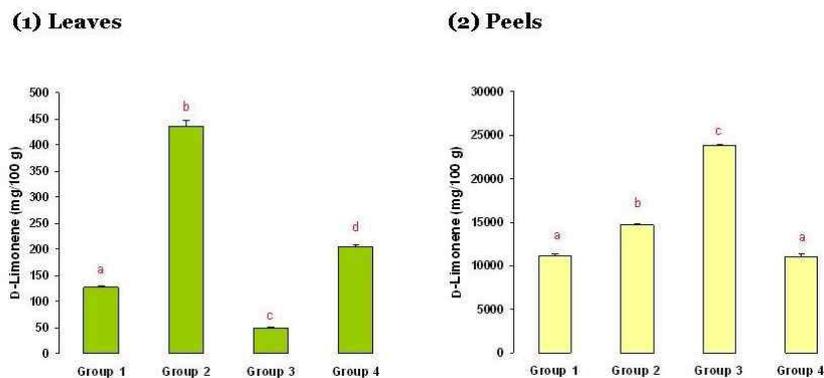


Figure 6. D-limonene (mg/100 g dry weight) of citrus leaves and peels harvested from non-irradiated and irradiated (120 Gy) branches. Mean \pm S.D. for $n=3$; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-d} Values with different superscripts on bar graphs are significantly different ($p < 0.05$)

(5) DPPH를 이용한 라디칼 소거능 측정

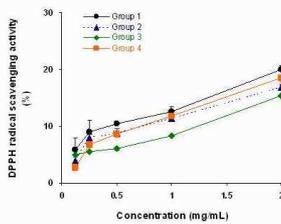
- DPPH는 항산화 물질에 의하여 환원되어 탈색되는 안정한 자유 라디칼로서 항산화 물질의 항산화 효과 측정 시 많이 사용되는 방법이다. 시료의 DPPH 소거능을 측정한 결과는

Figure 7와 같다. 잎부위에서는 Group 1(대조군)의 IC₅₀값은 5.52 mg/mL으로 Group 4 (5.61 mg/mL)의 값과 유사하였으나 Group 2 (6.46 mg/mL)와 Group 3 (7.41 mg/mL)에서 유의하게 그 값이 증가함을 보여 라디칼 소거능이 Group 1과 Group 4에 비해 낮은 라디칼 소거능을 보였다(Figure 7). 과피부위에서는 모든 방사선 조사군에서 대조군과 비교하여 유의하게 높은 IC₅₀값을 보인 반면, 과육부위에서는 과피부위의 결과와 상반되게 모든 방사선 조사군에서 유의하게 낮은 IC₅₀값을 보였다(Figure 7).

(1) Leaves

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	5.52 ± 0.358 ^a	6.46 ± 0.333 ^b	7.41 ± 0.253 ^c	5.61 ± 0.261 ^a

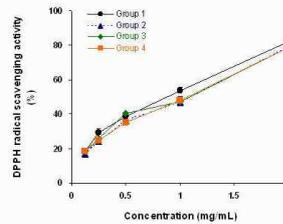
Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)



(2) Peels

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	1.00 ± 0.050 ^a	1.11 ± 0.051 ^b	1.08 ± 0.027 ^b	1.10 ± 0.011 ^b

Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-b} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)



(3) Pulp

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	1.13 ± 0.027 ^a	1.02 ± 0.004 ^b	1.03 ± 0.007 ^b	1.10 ± 0.004 ^b

Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)

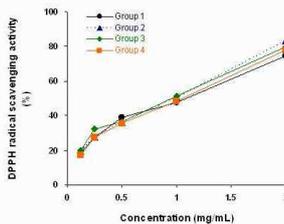


Figure 7. DPPH radical scavenging activity of citrus leaves, peels and pulps harvested from non-irradiated and irradiated (120Gy) branches. Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)

(6) Superoxide 라디칼 소거능 측정

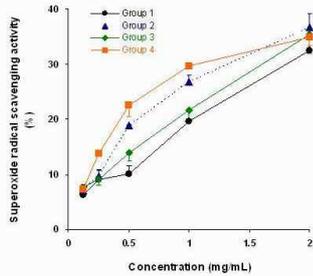
- 정상적인 산화적 인산화의 과정 중 0.4 - 4%는 superoxide로 전환되며 생성된 superoxide는 다른 활성산소종으로 전환되어 직·간접적으로 세포손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. superoxide는 내인성 항산화 방어기전(특히 superoxide dismutase, SOD)을 통해 빠르게 과산화수소로 전환되지만 세포내 산화환원 균형이 깨질 경우에 산화적 스트레스가 일어나게 되며 그 결과 세포내 거대분자 또는 직접적인 세포손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 잎부위에서는 모든 방사선 조사군에서 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Figure 5). 과피부위에서는 Group 2와 Group 3이 대조군(0.86 mg/mL)에 비해 유의하게 높은 IC₅₀값(0.98 mg/mL과 1.03 mg/mL)을 보인 반면, Group 4에서 IC₅₀값이 0.63 mg/mL으로 가장 높은 라디칼 소거활성을 나타내었다(Figure 5). 과육부위에서는 대조군과 유사하거나(Group 2), 낮

은 활성을 보였다(Figure 8)

(1) Leaves

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	3.15 ± 0.450	2.59 ± 0.194	2.84 ± 0.239	2.64 ± 0.121

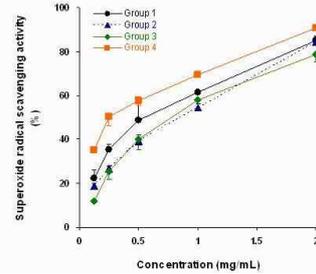
Mean ± S.D. for n=3



(2) Peels

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	0.86 ± 0.054 ^a	0.98 ± 0.017 ^b	1.03 ± 0.025 ^b	0.63 ± 0.026 ^c

Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different ($p < 0.05$)



(3) Pulp

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	0.72 ± 0.001 ^a	0.72 ± 0.056 ^a	0.95 ± 0.080 ^b	0.89 ± 0.067 ^b

Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different ($p < 0.05$)

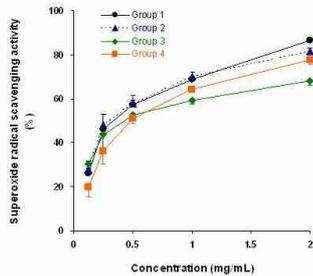


Figure 8. Superoxide radical scavenging activity of citrus leaves, peels and pulps harvested from non-irradiated and irradiated (120Gy) branches. Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different ($p < 0.05$)

(7) Hydrogen peroxide 소거능 측정

○ 생체에서 생성된 hydroxyl radical 같은 활성 산소종은 높은 반응성을 가지며, 생체내 방어 기전이 와해되는 심한 산화적 스트레스는 세포상해를 일으키며 necrosis와 apoptosis 같은 세포 사멸사를 유발하게 된다. 일부위에서는 superoxide 소거능 결과와 마찬가지로 대조군과 비교하여 모든 방사선 조사군의 IC₅₀값이 유의한 차이를 보이지 않았다(Figure 9). 과피부위의 Group 4, 과육부위의 Group 2와 3이 대조군보다 낮은 활성을 나타낸 반면, 과피부위의 Group 2와 3, 과육부위의 Group 4가 높은 hydrogen peroxide 소거능을 보이는 것으로 나타났다(Figure 9).

(8) Nitric oxide 소거능 측정

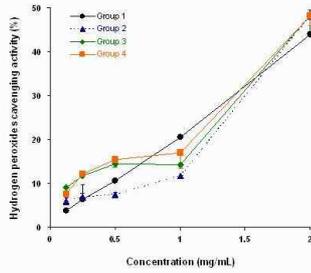
○ nitric oxide(NO)는 생체내에서 NO synthase(NOS) 효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 반응성이 강한 라디칼이다. NO는 여러 생리적 기능에 있어 중추적 역할을 하지만 과량생성 시 염증반응을 일으키고 조직의 파괴 및 면역체계에 이상을 일으켜 암을 비롯한 질병을 유발한다고 보고되고 있다. 일부위에서는 시험군간 소거활성에 있어 유의한 차이를 보

이지 않았다(Figure 10). 과피부위에서는 Group 2와 Group 3의 IC₅₀값이 각각 1.11 mg/mL 과 1.02 mg/mL으로, 과육부위의 Group 3(0.75 mg/mL)과 Group 4(0.76 mg/mL)와 함께 과 피(0.92 mg/mL)와 과육(0.66 mg/mL) 부위의 대조군에 비해 낮은 NO 소거능을 가지는 결과를 보였다(Figure 10).

(1) Leaves

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	2.31 ± 0.041	2.31 ± 0.063	2.27 ± 0.180	2.21 ± 0.107

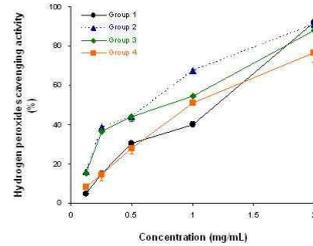
Mean ± S.D. for n=3



(2) Peels

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	1.09 ± 0.013 ^a	0.82 ± 0.005 ^b	0.91 ± 0.032 ^b	1.18 ± 0.058 ^c

Mean ± S.D. for n=3. Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different ($p < 0.05$)



(3) Pulps

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	1.35 ± 0.068 ^a	1.82 ± 0.137 ^b	1.83 ± 0.072 ^b	1.17 ± 0.066 ^c

Mean ± S.D. for n=3. Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different ($p < 0.05$)

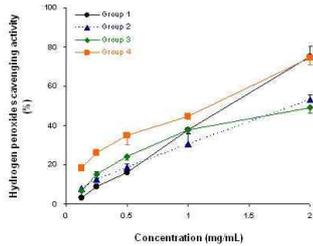
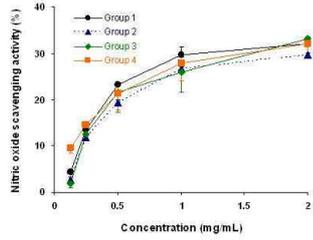


Figure 9. Hydrogen peroxide scavenging activity of citrus leaves, peels and pulps harvested from non-irradiated and irradiated (120Gy) branches. Mean ± S.D. for $n=3$; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different ($p < 0.05$)

(1) Leaves

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	2.82 ± 0.160	3.08 ± 0.057	2.83 ± 0.374	3.00 ± 0.338

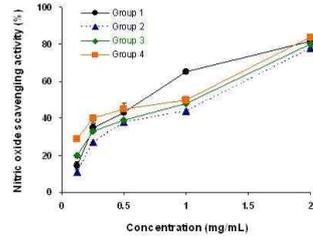
Mean ± S.D. for n=3



(2) Peels

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	0.92 ± 0.032 ^a	1.11 ± 0.012 ^b	1.02 ± 0.013 ^b	0.90 ± 0.018 ^a

Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a,b} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)



(3) Pulp

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	0.66 ± 0.031 ^a	0.65 ± 0.013 ^a	0.75 ± 0.014 ^a	0.76 ± 0.062 ^b

Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a,b} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)

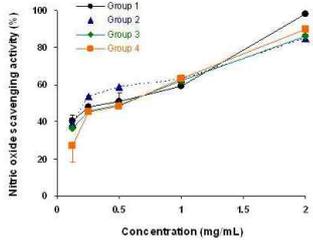


Figure 10. Nitric oxide scavenging activity of citrus leaves, peels and pulps harvested from non-irradiated and irradiated (120Gy) branches. Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-b} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)

(9) 라디칼의 50%를 소거할 수 있는 소거농도 IC₅₀ (mg/mL) 값 비교

○ 비교 방사선을 조사하지 않은 대조군과 방사선 조사된 1차선발 돌연변이 가지에서 착과된 과실 및 잎 부위의 라디칼 소거활성(IC₅₀)을 비교한 종합결과를 Figure 11에 나타내었다. 방사선 조사군의 감귤 과육부위에서 대조군에 비해 DPPH 라디칼 소거능이 뛰어난 것으로 나타났으며, superoxide 라디칼 소거능은 과피부위의 Group 4에서 활성이 높은 것으로 나타났다. 또한 과피부위의 Group 2와 3, 과육부위의 Group 4가 높은 hydrogen peroxide 소거능을 보였으나, NO 소거능력은 방사선 조사 시험군의 모든 부위에서 대조군과 유사하거나 낮은 활성을 보였다(Figure 11).

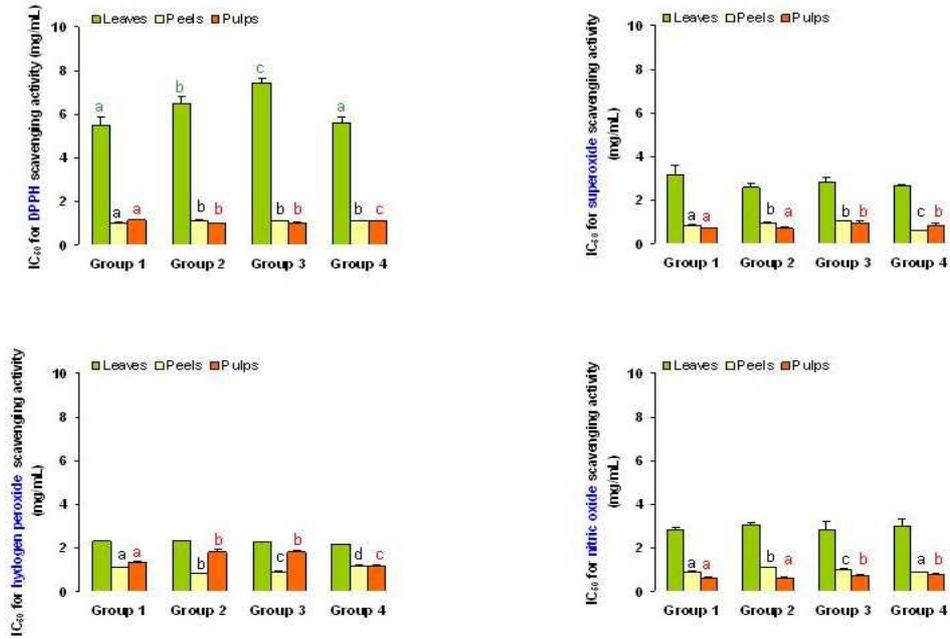


Figure 11. IC₅₀ of citrus leaves, peels and pulps harvested from non-irradiated and irradiated (120Gy) branches on various antioxidant activities. Mean ± S.D. for *n*=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts on bar graphs are significantly different (*p* < 0.05)

나. 2차 선발 돌연변이감귤의 부위별 추출물의 대사산물 분석

○ 방사선 조사를 통해 유도된 2차 선발 돌연변이 가지와 동일한 감귤나무에 방사선이 조사되지 않은 두개의 가지를 쌍으로 하여, 착과된 과실 중 제1세부과제 연구결과를 토대로 시험군을 정하고(Figure 12), 과육 및 과피 부위를 대상으로 2차 대사산물 중 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량과 성분을 측정하였다.

시험군	샘플번호	특징
Group 1-1	6s6a46-17 control	방사선 조사하지 않은 대조군
Group 1-2	6s6a46-17	붉은색을 띠는 시료군
Group 2-1	6s6a78-17 control	방사선 조사하지 않은 대조군
Group 2-2	6s6a78-17	부피과무, 과형우수, 당산비우수 시료군
Group 3-1	6s6a1-2 control	방사선 조사하지 않은 대조군
Group 3-2	6s6a1-2	익엽, 원형, 부피과무, 당산도 저하 시료군
Group 4-1	6s6a30-13 control	방사선 조사하지 않은 대조군
Group 4-2	6s6a30-13	표면이 울퉁불퉁해진 과형변이 시료군
Group 5-1	신흥리 control	방사선 조사하지 않은 대조군
Group 5-2	신흥리	붉은색을 띠는 자연돌연변이 시료군

SAMPLE PREPARATION (HARVESTS NOV. 2011)

Budsticks were exposed to a cobalt (⁶⁰CO) γ -irradiator at the doses of 120 Gy

[SUBJECT PAIRS: Harvests from same citrus tree]	
Group 1 [6s6a46-17]	- 1: citrus control (non-irradiated shoots) - 2: citrus mutant derived from irradiated shoots, which showed the red peel color
Group 2 [6s4a78-17]	- 1: citrus control (non-irradiated shoots) - 2: citrus mutant derived from irradiated shoots, which showed the large-sized, rough peel shape and comparatively high sugar/acid ratio
Group 3 [6s4a1-2]	- 1: citrus control (non-irradiated shoots) - 2: citrus mutant derived from irradiated shoots, which showed the pinnate leaves, large-sized, rough peel shape and comparatively low sugar/acid ratio
Group 4 [6s4a30-13]	- 1: citrus control (non-irradiated shoots) - 2: citrus mutant derived from irradiated shoots, which showed the rough peel shape
Group 5 [Shinheungri]	- 1: citrus control (non-irradiated shoots) - 2: spontaneous citrus mutant derived from non-irradiated shoots, which showed the red peel color

25 g of different parts (Peel and Pulp) of mutant citrus was dissolved in 500 mL of 100% MeOH, kept in the shaking incubator at 25 °C for 72 h, and then purified by using a 0.45 μ m membrane filter

Figure 12. Citrus samples used in this study

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

○ 폴리페놀은 식물류에서 플라보노이드류를 비롯한 기타 단순 phenol류, phenolic acid, phenyl propanol류, quinone류 등을 포함하고 있으며, 감귤류의 과피에는 이러한 페놀 화합물이 종자나 과육에 비해 많이 함유되어 있다고 알려져 있다. 폴리페놀의 함량 측정결과는 Figure 13에 제시한 바와 같이 과육 부위와 비교하여 과피부위가 더 많은 폴리페놀을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 과피부위의 총 폴리페놀 함량은 Group 1과 Group 3의 방사선 조사군이 각 대조군에 비해 유의한 차이를 보인 것을 제외하고는 방사선을 조사하지 않은 대조군과 유사한 함량을 보였다(Group 2, 4 and 5). 과육부위 역시 Group 4 방사선 조사군(32223 mg/100 g)이 대조군에(41774 mg/100 g) 비해 유의하게 감소한 것을 제외하고는 대조군과 비슷한 총 폴리페놀 함량을 나타내었다(Figure 13).

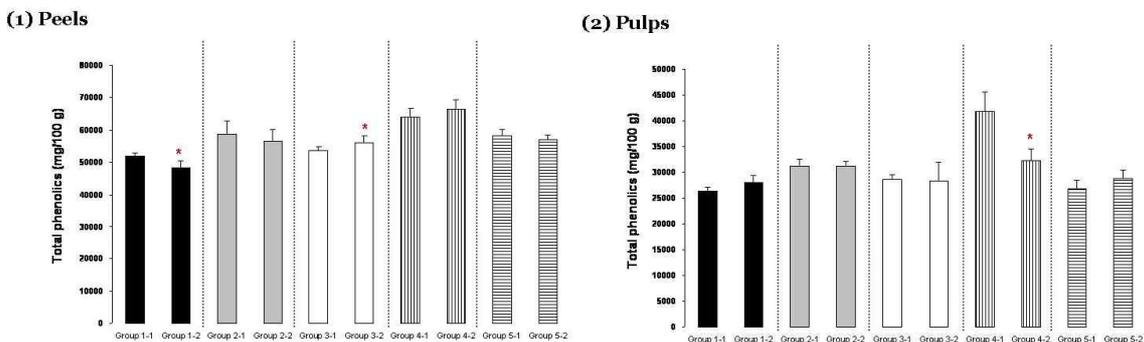


Figure 13. Total phenolic composition of citrus peels and pulps harvested from non-irradiated and irradiated (120Gy) branches. Values are means \pm S.D. of three separated experiments. Mean values between untreated and hydrolysis residues were compared using Mann-Whitney U test. *Values are significantly different ($p < 0.05$).

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

- 과피부위의 총 플라보노이드 함량은 모든 시험군에서 그 대조군보다 유의하게 증가된 함량을 보였다. 과육부위에서는 Group 3의 경우 방사선 조사군이 대조군에 비해 유의하게 증가한 함량을 보인 반면 Group 4는 함량이 유의하게 감소함을 보였다(Figure 14).

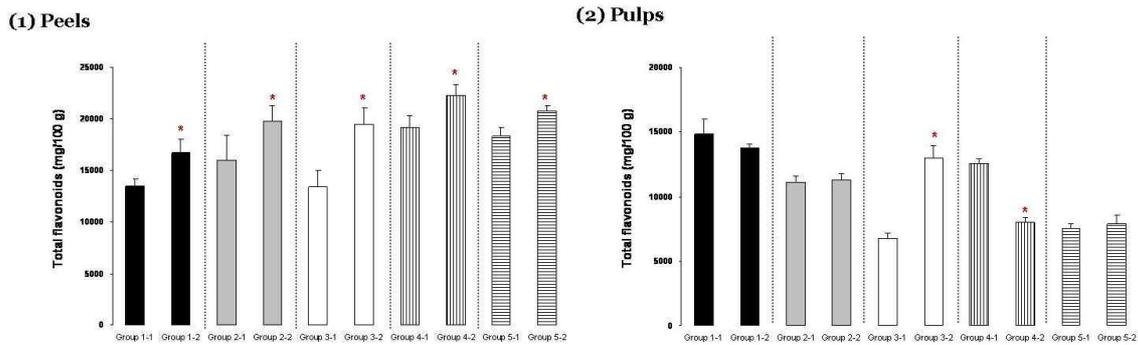


Figure 14. Total phenolic composition of citrus peels and pulps harvested from non-irradiated and irradiated (120 Gy) branches. Values are means \pm S.D. of three separated experiments. Mean values between untreated and hydrolysis residues were compared using Mann-Whitney U test. *Values are significantly different ($p < 0.05$).

- 방사선 조사를 통해 유도된 1차 선발 돌연변이 가지에 착과된 과실 중 제1세부과제 연구결과를 토대로 시험군을 정하고(Figure 15), 과육, 과피 및 잎 부위를 대상으로 리모넨 함량과 항산화능을 측정하였음

시험군	샘플번호	특징
Group 1	Control	방사선 조사하지 않은 대조군
Group 2	6S8965-7	당산비 우수군
Group 3	6S8914-11	붉은색을 띠는 시료군
Group 4	6a4a30-13	표면이 울퉁불퉁해진 과형변이 시료군

SAMPLE PREPARATION (HARVESTS NOV. 2010)

Budsticks were exposed to a cobalt (^{60}Co) γ -irradiator at the doses of 120 Gy



2.5 g of different parts (Leaves, Peels and Pulp) of mutant citrus was dissolved in 250 mL of 100% MeOH, kept in the shaking incubator at 25 °C for 24 h, and then purified by using a Sep-Pak C18 cartridge and a 0.45 μm membrane filter

Figure 15. Citrus samples used in this study

(3) 감귤 부위별 리모넨 함량 분석

- D-limonene이 주성분인 감귤 정유는 감귤과피 flavedo층의 유선(oil glands)중 함유되어 있는 방향성분으로, 살균, 살충효과 같은 다양한 생물활성을 가지고 있어 세정제, 식품향료, 의약품 등에 첨가제로 이용되고 있으며, 최근 무좀균과 비듬균의 생장억제에 감귤정유가 효과적으로 식품 및 공중보건제품의 소재로 적합하다는 연구결과가 발표되었음. 본 연구에서는 감귤 정유의 주성분인 limonene을 대상으로 GC 크로마토그램을 작성하고(Figure 16), 그 함량을 비교하였음. 잎 부위에서 limonene의 함량변화를 분석한 결과 Group 2(436.3 mg/100 g)와 Group 4(204.9 mg/100 g)에서 방사선을 조사하지 않은 Group 1(대조군, 126.4 mg/100 g)과 비교하여 유의하게 그 함량이 증가한 반면, Group 3 (48.4 mg/100 g)에서는 유의하게 감소하였음(Figure 17). 과피 부위에서는 모든 방사선 조사군에서 limonene 함량이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 가장 큰 함량을 나타낸 Group 3 (23843.7 mg/100 g)은 대조군(11222.1 mg/100 g)에 비해 약 2 배정도 증가하였음(Figure 17).
- 이러한 결과는 65~66 쪽에 제시된 결과와 일치하는 결과로서 Group 3의 홍색감귤 계통에서 D-limonene의 함량이 높아 이를 소재로 활용한 화장품의 개발이 가능할 것임

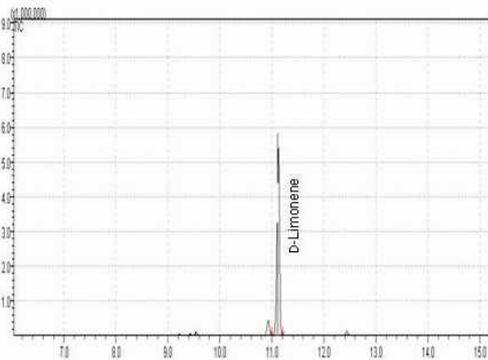


Figure 16. Gas chromatogram of D-limonene standard

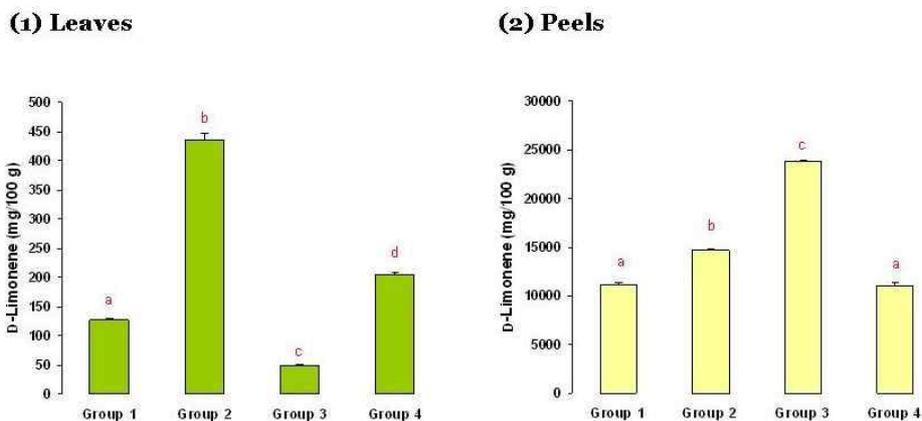


Figure 17. D-limonene (mg/100 g dry weight) of citrus leaves and peels harvested from non-irradiated and irradiated (120Gy) branches. Mean \pm S.D. for $n=3$; Data

were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a~d} Values with different superscripts on bar graphs are significantly different ($p < 0.05$)

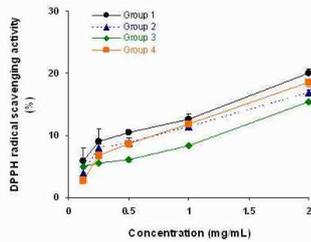
(4) DPPH를 이용한 라디칼 소거능 측정

○ DPPH는 항산화 물질에 의하여 환원되어 탈색되는 안정한 자유 라디칼로서 항산화 물질의 항산화 효과 측정 시 많이 사용되는 방법임. 시료의 DPPH 소거능을 측정한 결과는 Figure 18와 같다. 잎부위에서는 Group 1(대조군)의 IC₅₀값은 5.52 mg/mL으로 Group 4 (5.61 mg/mL)의 값과 유사하였으나 Group 2 (6.46 mg/mL)와 Group 3 (7.41 mg/mL)에서 유의하게 그 값이 증가함을 보여 라디칼 소거능이 Group 1과 Group 4에 비해 낮은 라디칼 소거능을 보였음(Figure 18). 과피부위에서는 모든 방사선 조사군에서 대조군과 비교하여 유의하게 높은 IC₅₀값을 보인 반면, 과육부위에서는 과피부위의 결과와 상반되게 모든 방사선 조사군에서 유의하게 낮은 IC₅₀값을 보였음(Figure 18).

(1) Leaves

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	5.52 ± 0.358 ^a	6.46 ± 0.333 ^b	7.41 ± 0.253 ^c	5.61 ± 0.261 ^a

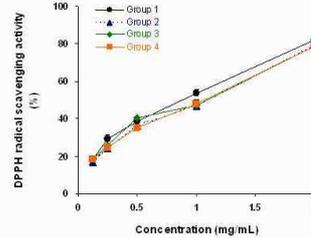
Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a~c} Values with different superscripts in a row are significantly different ($p < 0.05$)



(2) Peels

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	1.00 ± 0.050 ^a	1.11 ± 0.051 ^b	1.08 ± 0.027 ^b	1.10 ± 0.011 ^b

Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a~c} Values with different superscripts in a row are significantly different ($p < 0.05$)



(3) Pulp

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	1.13 ± 0.027 ^a	1.02 ± 0.004 ^b	1.03 ± 0.007 ^b	1.10 ± 0.004 ^a

Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a~c} Values with different superscripts in a row are significantly different ($p < 0.05$)

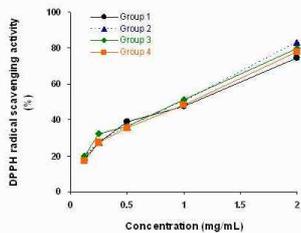


Figure 18. DPPH radical scavenging activity of citrus leaves, peels and pulps harvested from non-irradiated and irradiated (120Gy) branches. Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a~c} Values with different superscripts in a row are significantly different ($p < 0.05$)

(5) Superoxide 라디칼 소거능 측정

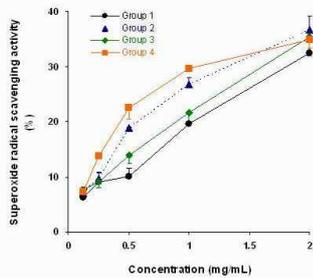
○ Superoxide 라디칼 소거능 측정: 정상적인 산화적 인산화의 과정 중 0.4 - 4%는 superoxide 로 전환되며 생성된 superoxide는 다른 활성산소종으로 전환되어 직·간접적으로 세포손상을

유발하는 것으로 알려짐. superoxide는 내인성 항산화 방어기전(특히 superoxide dismutase, SOD)을 통해 빠르게 과산화수소로 전환되지만 세포내 산화환원 균형이 깨질 경우에 산화적 스트레스가 일어나게 되며 그 결과 세포내 거대분자 또는 직접적인 세포손상을 일으키는 것으로 알려져 있음. 잎부위에서는 모든 방사선 조사군에서 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았음(Figure 19). 과피부위에서는 Group 2와 Group 3이 대조군(0.86 mg/mL)에 비해 유의하게 높은 IC₅₀값(0.98 mg/mL과 1.03 mg/mL)을 보인 반면, Group 4에서 IC₅₀값이 0.63 mg/mL으로 가장 높은 라기칼 소거활성을 나타냄(Figure 19). 과육부위에서는 대조군과 유사하거나(Group 2), 낮은 활성을 보임(Figure 19)

(1) Leaves

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	3.15 ± 0.450	2.59 ± 0.194	2.84 ± 0.239	2.64 ± 0.121

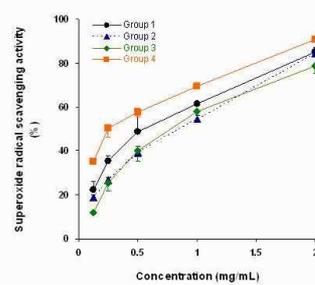
Mean ± S.D. for n=3



(2) Peels

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	0.86 ± 0.054 ^a	0.98 ± 0.017 ^b	1.03 ± 0.025 ^b	0.63 ± 0.026 ^c

Mean ± S.D. for n=3. Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05).



(3) Pulp

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	0.72 ± 0.001 ^a	0.72 ± 0.056 ^a	0.95 ± 0.080 ^b	0.89 ± 0.067 ^b

Mean ± S.D. for n=3. Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05).

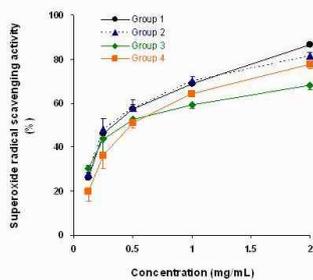


Figure 19. Superoxide radical scavenging activity of citrus leaves, peels and pulps harvested from non-irradiated and irradiated (120Gy) branches. Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)

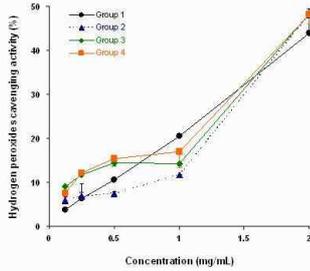
(6) Hydrogen peroxide 소거능 측정

- Hydrogen peroxide 소거능 측정: 생체에서 생성된 hydroxyl radical 같은 활성 산소종은 높은 반응성을 가지며, 생체내 방어기전이 와해되는 심한 산화적 스트레스는 세포손해를 일으키며 necrosis와 apoptosis 같은 세포 사멸사를 유발하게 됨. 잎부위에서는 superoxide 소거능 결과와 마찬가지로 대조군과 비교하여 모든 방사선 조사군의 IC₅₀값이 유의한 차이를 보이지 않음(Figure 20). 과피부위의 Group 4, 과육부위의 Group 2와 3이 대조군보다 낮은 활성을 나타낸 반면, 과피부위의 Group 2와 3, 과육부위의 Group 4가 높은 hydrogen peroxide 소거능을 보이는 것으로 나타남(Figure 20).

(1) Leaves

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	2.31 ± 0.041	2.31 ± 0.063	2.27 ± 0.180	2.21 ± 0.107

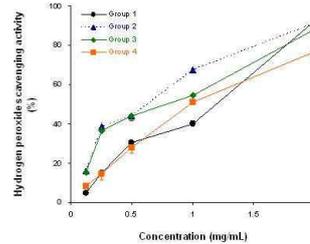
Mean ± S.D. for n=3



(2) Peels

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	1.09 ± 0.013 ^a	0.82 ± 0.005 ^b	0.91 ± 0.032 ^c	1.18 ± 0.058 ^d

Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-d} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)



(3) Pulp

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	1.35 ± 0.068 ^a	1.82 ± 0.137 ^b	1.83 ± 0.072 ^b	1.17 ± 0.066 ^c

Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)

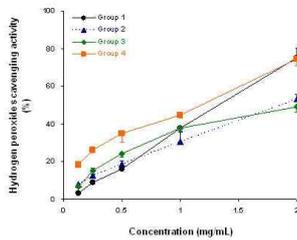


Figure 20. Hydrogen peroxide scavenging activity of citrus leaves, peels and pulps harvested from non-irradiated and irradiated (120Gy) branches. Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)

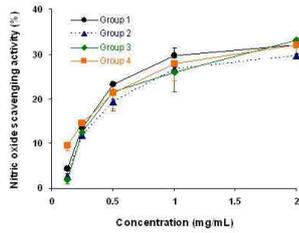
(7) Nitric oxide 소거능 측정

- Nitric oxide 소거능 측정: nitric oxide(NO[•])는 생체내에서 NO[•] synthase(NOS) 효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 반응성이 강한 라디컬임. NO[•]는 여러 생리적 기능에 있어 중추적 역할을 하지만 과량생성 시 염증반응을 일으키고 조직의 파괴 및 면역체계에 이상을 일으켜 암을 비롯한 질병을 유발한다고 보고됨. 일부부위에서는 시험군간 소거활성에 있어 유의한 차이를 보이지 않았음(Figure 21). 과피부위에서는 Group 2와 Group 3의 IC₅₀값이 각각 1.11 mg/mL과 1.02 mg/mL으로, 과육부위의 Group 3(0.75 mg/mL)과 Group 4(0.76 mg/mL)와 함께 과피(0.92 mg/mL)와 과육(0.66 mg/mL) 부위의 대조군에 비해 낮은 NO 소거능을 가지는 결과를 보임(Figure 21).

(1) Leaves

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	2.82 ± 0.160	3.08 ± 0.057	2.83 ± 0.374	3.00 ± 0.338

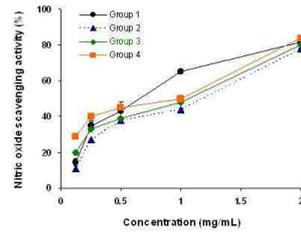
Mean ± S.D. for n=3



(2) Peels

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	0.92 ± 0.032 ^a	1.11 ± 0.012 ^a	1.02 ± 0.013 ^a	0.90 ± 0.018 ^a

Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-b} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)



(3) Pulps

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
IC ₅₀ (mg/mL)	0.66 ± 0.031 ^a	0.65 ± 0.013 ^a	0.75 ± 0.014 ^a	0.76 ± 0.062 ^a

Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-b} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)

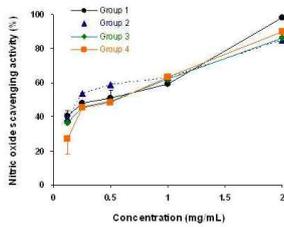


Figure 21. Nitric oxide scavenging activity of citrus leaves, peels and pulps harvested from non-irradiated and irradiated (120Gy) branches. Mean ± S.D. for n=3; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-b} Values with different superscripts in a row are significantly different (p < 0.05)

(8) 라디칼의 50%를 소거할 수 있는 소거농도 IC₅₀ (mg/mL) 값 비교

○ 방사선을 조사하지 않은 대조군과 방사선 조사된 1차선발 돌연변이 가지에서 착과된 과실 및 잎 부위의 라디칼 소거활성(IC₅₀)을 비교한 종합결과를 Figure 8에 나타냄. 방사선 조사군의 감귤 과육부위에서 대조군에 비해 DPPH 라디칼 소거능이 뛰어난 것으로 나타났으며, superoxide 라디칼 소거능은 과피부위의 Group 4에서 활성이 높은 것으로 나타남. 또한 과피부위의 Group 2와 3, 과육부위의 Group 4가 높은 hydrogen peroxide 소거능을 보였으나, NO[•] 소거능력은 방사선 조사 시험군의 모든 부위에서 대조군과 유사하거나 낮은 활성을 보임(Figure 22).

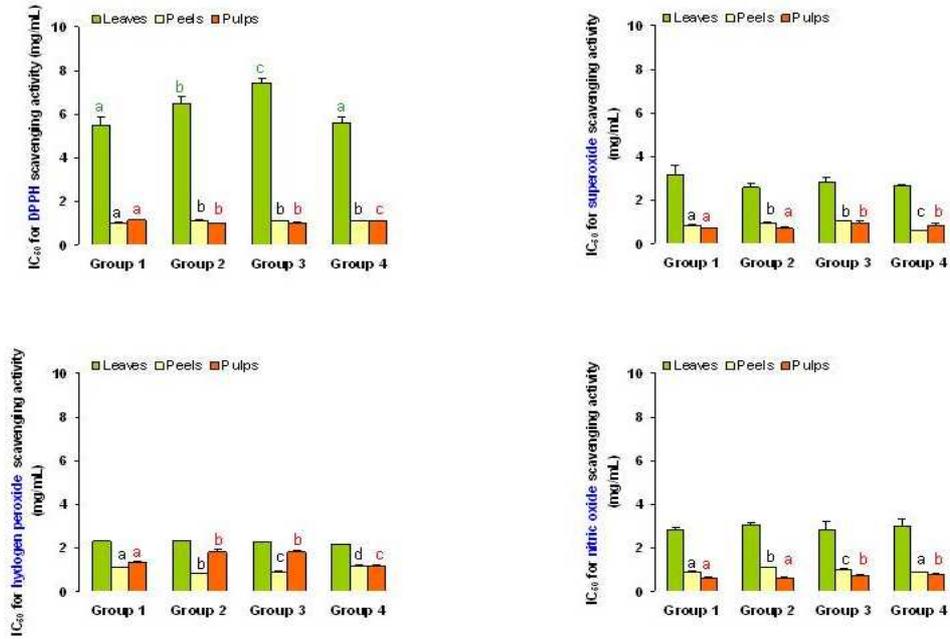


Figure 22. IC₅₀ of citrus leaves, peels and pulps harvested from non-irradiated and irradiated (120Gy) branches on various antioxidant activities. Mean ± S.D. for $n=3$; Data were statistically analyzed one-way analyses of variance followed by Duncan's multiple range tests; ^{a-c} Values with different superscripts on bar graphs are significantly different ($p < 0.05$)

다. 감귤 추출물 제조 및 항암활성 조사

(1) 시험대상 돌연변이 감귤 선별

- 1, 2차 선발가지에서 착과된 돌연변이 감귤 샘플들의 2차대사산물 성분과 생리활성 결과, 연속적으로 수확되어지며 우수한 활성을 보이는 6a4a30-13을 시험대상 돌연변이 감귤로 선정하고 동일나무에 착과된 대조군 과실과 비교하여 항암 활성, 세포주기 교란 및 apoptosis 유도 활성 연구를 진행함

(2) 돌연변이 감귤 추출물의 암세포 증식 억제

- 돌연변이 감귤 추출물의 항암 활성을 알아보기 위하여 다양한 암종을 대상으로 증식 억제 효과를 조사하였을 때 처리 농도가 증가함에 따라 인간 대장암 HCT116 세포, 인간 유방암 MCF-7 세포, 인간 자궁경부암 Hela 세포에 대한 성장 저해가 관찰되었으나 A375 세포의 경우 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(Figure 23).

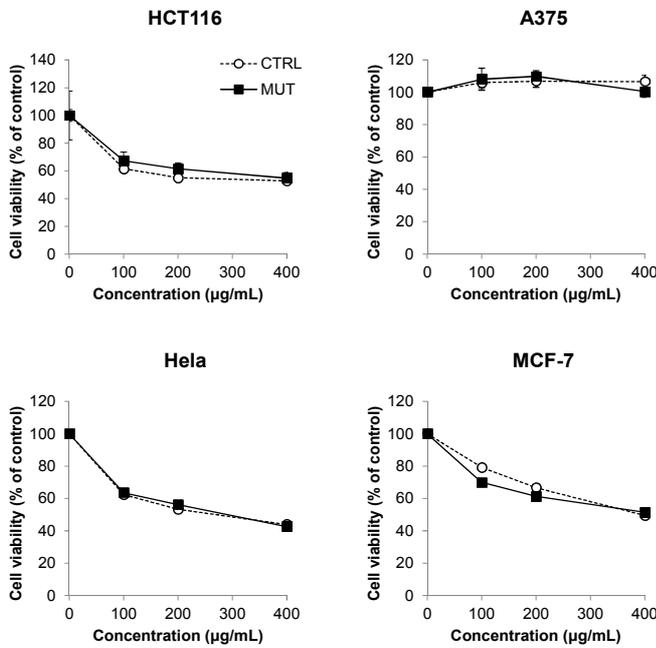


Figure 23. Growth inhibition of various human cancer cells after treatment with citrus fruits. The cells were treated with indicated concentration of citrus fruits for 72 hours. Each point is the mean \pm SD of three experiments.

마. 돌연변이 감귤 추출물에 의한 정상 세포와 암세포 증식양상변화 조사

(1) 정상세포와 암세포 증식양상

- 암은 우리나라에서 사망률이 1위인 질병으로, 그 중에서도 간암 및 폐암은 높은 빈도로 발생하는 반면 치료에 대한 효과가 낮고 예후가 극히 불량한 종양으로 잘 알려져 있음. 종양치료에는 방사선 요법이나 항암 요법, 유전자 치료 등 여러 방법이 동원되고 있지만 부작용과 많은 유해성을 가지고 있는 관계로 안전하고 관능상의 문제가 적은 항암 치료제를 찾고 그 작용 기전을 알아내는 연구가 각광받고 있음.
- 돌연변이 감귤 추출물이 암종과 정상세포의 증식에 미치는 영향과 그 유효농도를 설정하기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포 생존율 변화를 측정하였음. 돌연변이 감귤 추출물을 농도별(0-400 µg/mL)로 72시간 동안 처리한 결과 그림 2과 같은 양상을 나타내었는데, 인간 폐암 A549 세포와 인간 간암 HepG2 세포의 경우 400 µg/mL 처리 시 약 70%의 생존율을 나타내며 암세포에 대한 증식 억제 효과를 보인 반면, 각각의 정상세포에 대해서는 독성을 나타내지 않는 것으로 관찰되어 보다 안전한 항암 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대됨

(Figure 24)

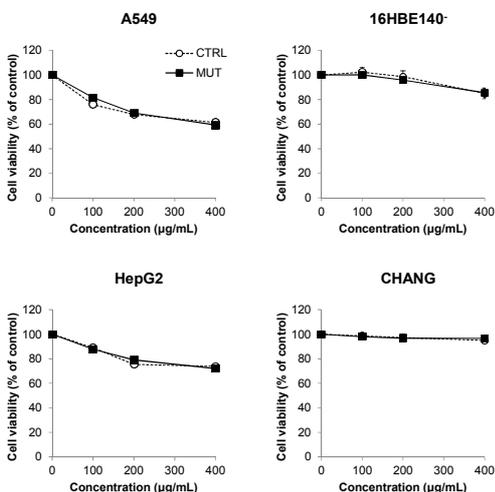


Figure 24. Growth inhibition of various cells after treatment with citrus fruits. The cells were treated with indicated concentration of citrus fruits for 72 hours. Each point is the mean \pm SD of three experiments.

(2) 돌연변이 감귤 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발

- Apoptosis는 체계적인 신호전달 과정을 통해 일어나는 능동적인 세포사로 조직 손상 및 감염에 의한 apoptosis의 실패는 암을 비롯한 각종 질환의 원인이 되며, 암세포의 apoptosis 기전 활성화를 통한 암 치료제 개발이 활기를 띠고 있음. 본 연구에서 돌연변이 감귤 추출물에 의한 암세포의 증식 억제 작용에 apoptosis가 수반되는지 파악하기 위하여 간암 및 폐암 세포주와 각각의 정상세포를 대상으로 sub-G1 발생빈도를 조사함
- 돌연변이 감귤 추출물이 나타내는 세포사멸 작용을 탐색하였을 때, 인간 간암 HepG2 세포 및 인간 폐암 A549 세포의 sub-G1의 발생빈도가 무처리 군에 비해 유의적으로 증가하였고, 각각의 정상세포에서의 apoptosis 유발은 관찰되지 않았음(Figure 25)

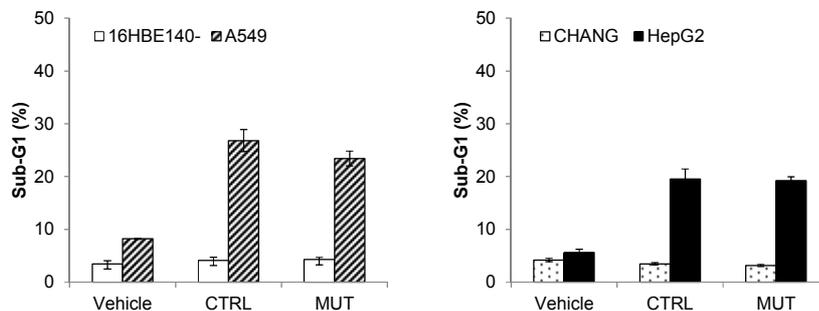


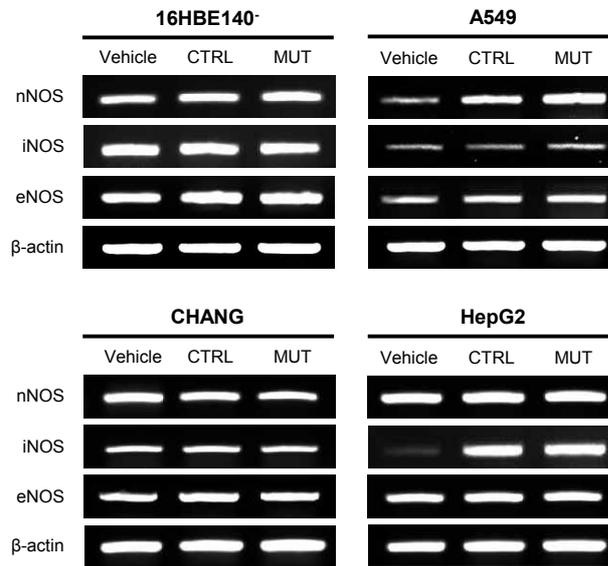
Figure 25. Dose effect of citrus fruit induced apoptosis in various cell lines. Cells were treated with citrus fruits for 72 hour, stained with PI, analyzed for cell cycle using flow cytometry. Results are expressed as mean \pm SD from three separated experiments.

(3) 돌연변이 감귤 추출물의 nitrite 생성

- Nitric oxide (NO^\bullet)는 3가지 nitric oxide synthase (NOS): neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS)로 부터 합성되는 물질로 생체 내에서 항상성을 조절하고 신경계와 면역계의 주요매개인자로 작용함. NO^\bullet 는 체내 산화방어체계에 의해 제거되지만 과다 생성된 NO^\bullet 의 양이 항산화계에 의해 소거되지 않을 때 야기되는 nitrosative stress는 기능 상실, 핵의 응축, DNA 단편화 등을 초래하며 암세포의 apoptosis를 향진시키는 것으로 알려져 있음
- NO^\bullet 는 암종에서 발생량에 따라 apoptosis를 향진시키는 작용을 하기 때문에 본 연구에서는 감귤 돌연변이에 의해 유도된 apoptosis의 새로운 표적을 제시하기 위해 NO^\bullet 와의 상관관계를 검토하였음. Figure 26에 제시된 바와 같이 방사선 무처리군에서 nitrosative stress 유발에 의한 세포 손상이 관찰되어 선행 연구 결과를 뒷받침함과 동시에, 감귤 돌연변이에서도 이와 유사한 현상이 야기되었음

- 보다 상세히 기술하자면 A549와 HepG2 세포에서 감귤 돌연변이 처리에 따라 nitrite 발생이 유의적으로 증가하여 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 DMSO 처리군과 비교하여 약 2.2배 증대되었음. Nitrite 발생의 분자적 근원 파악을 위해 추가적으로 3가지 NOS 동형 단백질에 대한 RT-PCR을 시행한 바 Figure 26A와 같이 병리학적 상태에 주요한 역할을 수행하는 NOS가 효과적으로 활성화되는 것을 확인할 수 있었으며, 그 중에서도 A549에서는 nNOS가, HepG2에서는 iNOS가 현격하게 활성화되었음

A



B

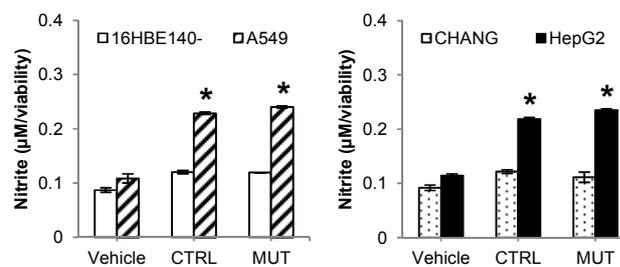


Figure 26. Citrus mutant fruits induced accumulation of nitrite. Alterations in the expression of NOS isoform during citrus mutant fruits induced apoptosis (A). Actin was used as internal control. (B) Nitric oxide (NO^*) production was determined as nitrite in supernatants of human cancer cells for 72 h in complete medium in the presence of 400 $\mu\text{g/ml}$ of citrus mutant fruits. Release of was measured using Griess reagent. Each point is the mean \pm SD of three experiments. *, $p < 0.05$ compared with DMSO vehicle.

(4) 돌연변이 감귤 추출물의 세포주기 교란

- 세포의 증식과 사멸은 세포주기에 의해 결정되며, cyclin, cyclin dependent kinase (CDK), cyclin dependent kinase inhibitor 등과 같은 세포주기 조절인자에 의하여 조절됨. 정상세포에서 세포가 노쇠하게 되면 세포주기 조절인자들이 이를 감지하여 세포 사멸을 유도하지만, 암세포에서는 이러한 세포주기 조절 기능이 비정상적으로 작동하여 세포가 무한 증식하고 전이되는 특징을 나타냄
- 현재까지 세포주기 조절에 관여하는 cyclin의 종류는 총 18가지 (A, B1-2, C, D1-3, E1-2, F, G1-2, H1, K, T1-2, H)가 알려져 있으며, 이들이 CDK와 결합하여 세포주기를 전환시키는 것으로 알려져 있음. G1/G0기에 관여하는 cyclin에는 cyclin D와 E가 있으며, 이들은 G1/G0기에 활성화되어 S기로의 이행을 조절함. Cyclin A는 S 및 G2/M기의 후반기에 활성화되는 반면, cyclin B는 G2/M기의 checkpoint 감시를 제어함으로써 DNA 합성과 세포증식에 주요한 요소로 작용함
- 간암 및 폐암 세포주에 대한 돌연변이 감귤의 세포독성이 세포주기에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 flow cytometry로 세포주기 변화를 탐색하였음. 세포주기 유형을 살펴보면, 대조군 및 돌연변이 감귤 추출물에 의해 인간 간암 HepG2 세포 및 간 정상 CHANG 세포에서는 G2/M기의 세포빈도가 증가되는 mitotic arrest가 나타났으나 인간 폐암 A549 세포와 정상 폐 세포 16HBE140-의 경우에는 대조군에 의해 유발된 mitotic arrest가 돌연변이 감귤 추출물에 의해 해소되는 현상이 관찰되어(Table 5), 향후 정확한 기전 분석이 필요할 것으로 보임

Table 5. Citrus induced cell cycle arrest in various cell lines.

	Group	% of control		
		G0/G1	S	G2/M
16HBE140- (normal)	Vehicle	83.72 ± 1.414	3.29 ± 0.263	12.99 ± 1.251
	CTRL	81.36 ± 0.284	4.00 ± 0.230	14.64 ± 0.304
	MUT	83.67 ± 1.510	3.93 ± 0.713	12.41 ± 0.889
A549 (lung cancer)	Vehicle	50.01 ± 6.734	25.52 ± 1.850	24.46 ± 5.183
	CTRL	37.18 ± 2.393	18.09 ± 0.843	44.74 ± 1.654
	MUT	51.66 ± 1.092	22.68 ± 0.713	25.67 ± 1.805
CHANG (normal)	Vehicle	63.51 ± 0.579	18.36 ± 0.958	18.13 ± 0.958
	CTRL	65.84 ± 0.142	19.03 ± 0.153	15.13 ± 0.120
	MUT	66.26 ± 0.488	18.78 ± 0.493	14.95 ± 0.790
HepG2 (liver cancer)	Vehicle	74.85 ± 1.120	15.29 ± 0.663	9.87 ± 1.074
	CTRL	77.472 ± 1.472	10.50 ± 0.713	12.36 ± 0.862
	MUT	77.55 ± 0.842	10.15 ± 0.963	12.30 ± 0.122

(5) IAP family 발현에 미치는 감귤 돌연변이의 영향

- 자연사멸에 관여하는 여러 생화학적 표지인자 중 antagonist로 작용하는 IAP 단백질은 전사 조절인자인 nuclear factor kappa B의 조절을 받아 최종적으로 caspase와 직간접적으로 결합함으로써 그들의 apoptotic 활성을 억제하는 것으로 보고되어있음
- 이와 같은 사실을 바탕으로 방사선 무처리군과 감귤 돌연변이 처리에 따른 IAP family의 신호전달 양상을 분석한 결과 A549와 HepG2 세포에서 공통적으로 survivin의 활성이 현격히 저해됨을 관찰할 수 있었음(Figure 27). 한편 XIAP와 cIAP-2는 암세포종에 따라 발현 양상이 상이하게 조절되어 감귤 돌연변이 처리 시 HepG2 세포에서는 XIAP와 cIAP-2의 활성 감소가 수반된 반면 A549 세포의 경우에는 발현 변화를 확인할 수 없었음(Fig. 3). IAP 중 유일하게 survivin의 비활성화는 세포사멸뿐 아니라 세포주기 중 G2/M기의 이행을 저하시켜 암종의 성장을 저해하는 것으로 조사되어 앞선 발현 변화는 cell cycle과 연관되어 조사되어야 할 것으로 추측됨

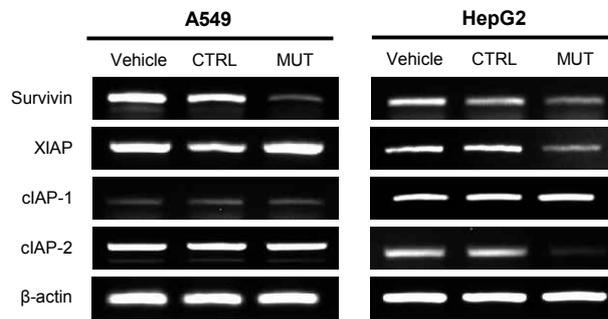


Figure 27. Inhibition of IAPs signaling is responsible for the antitumor activity of citrus mutant fruits. The expression of related IAPs in human cancer cells was measured by RT-PCR. Actin was used as internal control.

- 결론적으로 상기의 연구결과를 종합하여 추론해볼 때 본 연구에서 평가된 감귤 돌연변이는 NO[•] 생성 및 IAP 활성 저해에 의해 인체 암세포의 apoptosis를 유발하는 것으로 확인되었으며, 추후 본 연구결과를 토대로 감귤 돌연변이의 암세포 사멸기전에 대한 상세한 기전규명이 이루어져야 할 것으로 판단됨

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연도별 연구목표 및 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2010)	제1세부과제: 생 리적 특성 및 유전적 분석을 통한 돌연변이 체 선발	○ 감귤돌연변이체 형질조사	100	-전체 돌연변이가지(약 20,000개)를 대상으로 착과된 과실에 대한 외부 형질관찰
		○ 생리학적 및 유전학적 비교분석	95	-돌연변이감귤을 이용한 당산도 측정, 과색측정, 유전체 분석(30개 이상의 유전자) -Real time-PCR 등을 활용한 유전자의 차별발현 확인(6월 말까지 완료)
		○ 돌연변이가지 1차 추가선발 (30가지)	477	-형질조사를 바탕으로하는 고품질 돌연변이 66가지(당도 및 당산비 우수) 및 색깔돌연변이 77개의 가지 선발
	제2세부과제: 돌연 변이체의 관리 및 구조변화분 석	○ 돌연변이 개체 증식 및 2차접목	100	-선행연구를 통해 선발된 가지의 측아를 이용하여 탱자묘목과 감귤성목에 접목 수행 -고품질 감귤품종(청견)을 대상으로 방사선을 이용한 돌연변이 유도 후 탱자묘목에 접목 수행
		○ 돌연변이 감귤의 구조변화 분석	100	-선발돌연변이 감귤의 현미경적 구조 변화 관찰(잎을 위주로)
	제3세부과제: 돌연변이체의 성분 및 효과분석	○ 1차선발 돌연변이감귤의 대사산물 분석	100	○ 선발돌연변이감귤 30가지 중 색깔변화를 보이는 감귤가지를 대상으로 2차대사산물 함량 및 종류 분석

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2011)	제1세부과제: 생리적 특성 및 유전적 분석을 통한 돌연변이체 선발	○ 돌연변이 가지 2차 선발(15가지) 및 접목	135	-1차 선발돌연변이 가지 60개를 대상으로하여 제주특별자치도 농업기술원 김영호 박사와의 협의를 통해 안정적인 형질의 발현을 나타내는 2차로 돌연변이 가지 20개 선발 -방사선응용과학연구소와의 협력관계를 통해 청견을 대상으로 돌연변이유도 및 접목
		○ 돌연변이체 형질조사	100	-전체 돌연변이가가지(약 20,000개)를 대상으로 착과된 과실에 대한 외부형질(과형, 엽형, 개화시기 등)의 계속적인 관찰 -제주특별자치도농업기술원의 육종전문가의 도움을 받아 선발 수행
		○ 돌연변이감귤의 생리학적 비교분석	100	-돌연변이감귤을 이용한 당산도, 과색, 과중 등 측정
		○ 돌연변이감귤의 유전체 비교분석	100	-돌연변이감귤(6s4a30-13)의 과실과 일반 감귤(궁천조생) 과실을 대상으로 microarray 분석을 수행(50개 이상의 유전자) -1차년도에서 획득한 일에서의 결과와 비교하여 공동 발현변화 유전자 분석 -이로부터 돌연변이 특이발현 유전자를 이용한 품종분별 분자마커로 활용가능성 조사
	제2세부과제: 돌연변이체의 관리 및 구조변화분석	○ 선발돌연변이가가지의 2차접목	100	-1차년도에서 선발된 돌연변이가가지의 측아를 이용하여 탱자묘목과 감귤성목에 접목 수행 -제주대학교방사선응용과학연구소와 아열대농업생명과학연구소와의 협력을 통해 수행
		○ 감귤 정식 및 포장 정비	100	-1차년도에서 2차 접목한 돌연변이개체를 감귤포장에 정식. 이를 위한 포장정비 -육종포장(병해충, 관수, 전정 등) 관리
		○ 돌연변이감귤의 구조변화 분석	100	-선발돌연변이 감귤의 현미경적 구조 변화 관찰(과피와 과육을 위주로)
	제3세부과제: 돌연변이체의 성분 및 효과분석	○ 1차 선발 돌연변이감귤 부위별 추출물의 향산화 활성 연구	100	○ 제1세부과제에서 1차 선발된 돌연변이감귤의 부위별 추출물을 대상으로 향산화 효과 및 리모넨 성분 분석
		○ 2차 선발 돌연변이감귤의 부위별 추출물의 대사산물 분석	100	○ 제1세부과제에서 2차 선발된 돌연변이감귤의 부위별 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 분석

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2012)	제1세부과제: 생 리적 특성 및 유전적 분석을 통한 돌연변이 체 선발	○ 돌연변이 가지 2차 선발(15가 지)	100	-1차 선발돌연변이 가지 60개를 대 상으로하여 안정적인 형질의 발현 을 나타내는 2차 돌연변이 가지 20개 추가선발한 후, 탱자대목에 2 차 접목을 수행하였음 -접목을 통해 선발된 돌연변이 가 지의 고정화 및 고정화된 돌연변 이 개체의 정식 수행
		○ 돌연변이체 형질조사	100	-감귤돌연변이체를 대상으로 착과 된 과실에 대한 외부 형질(개화시 기, 색깔변화 등)의 관찰 및 1차년 도에 2차접목(성목)한 돌연변이체 의 형질조사 -감귤돌연변이체와 대조군 감귤의 1,810가지에 착과된 과실(8,167개) 의 당도, 산도, 과색, 과중 등 측정 -대목으로서의 유용 특성 조사: 수 세, 질병저항성 등
		○ 돌연변이감귤의 유전체 비교 분석	100	-홍색과 익엽, 당도증가의 형질을 보이는 돌연변이감귤(6s4d12-8)을 이용한 유전체 분석: 발현이 감소 했거나 증가한 100개의 유전자 및 카로티노이드(8개), 플라보노이드 (20개) 물질대사 관여 유전자 -외국 돌연변이체(3품종) 대상 유전 체 분석 결과와의 비교 분석
	제2세부과제: 돌연 변이체의 관리 및 구조변화분 석	○ 돌연변이감귤의 구조변화 분 석	100	-선발돌연변이 감귤에 대한 현미경 적 구조 변화의 관찰을 통해 형질 발현의 안정성 검증
		○ 선발돌연변이가지의 2차접목	100	-2차년도에서 2차선발된 가지를 대 상으로 탱자묘목과 성목에 2차접 목 수행
		○ 감귤포장 관리	100	-아열대농업생명과학연구소의 협 력과 전임관리원을 통해 3개의 감귤포장(아열대연구소, 서귀포 동홍동, 제주시월평동)의 재배관 리(병해충, 관수, 전정등) -돌연변이형질의 안정적 발현과 각 세부과제의 분석용 실험시료 공급
	제3세부과제: 돌연변이체의 성분 및 효과분석	○ 2차 선발 돌연변이감귤의 부위별 추출물의 항산화활성 분석	100	○ 제1세부과제에서 2차 선발된 돌연변이감귤의 부위별 항산화활성 분석

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
4차 연도 (2013)	제1세부과제: 생리적 특성 및 유전적 분석을 통한 돌연변이체 선발	○ 외형관찰과 형질 측정을 통한 우수 돌연변이 가지 선발	100	- 돌연변이 가지(서귀포의료원포장 196가지; 아열대연구소 651가지)에 착과된 과실의 당도와 산도 측정을 통해 당산비 우수 개체 선발 및 관찰과 색차계 측정을 통한 색깔 변이 개체 신규 선발
		○ 선발 돌연변이 및 고정 돌연변이 감귤의 형질조사, 형질발현 안정성 조사	100	- 선발된 감귤돌연변이체(서귀포의료원포장 원목 81가지; 고접목 31개)와 대조군 감귤을 대상으로 과형, 당도, 산도, 과색, 과중 측정 - 1~3차년도의 연구를 통해 선발된 가지와 고접을 통해 유기된 가지를 대상으로 형질 발현의 안정성(당·산도, 색깔변화 중심) 조사 및 최종 선발 - 선발된 가지를 2014년 4월 하순~5월 초순에 탱자대목에 접목 수행
		○ 선발 돌연변이 개체의 증식을 통한 계통의 안정적 확보	100	- 서귀포시 포장에 3차년도 접목 개체의 이식 수행 - 참여기업인 제주자연과 협의를 통해 산업화가 가능한 선발 개체 선정, 이를 농장에 접목하여 착과후 형질분석을 통해 산업화 추진하기로 함 - 1,2차 선발을 통해 고품질의 특성을 나타내는 접수를 채취하여 탱자대목에 접목 수행(2693대목) - 3차년도에 고접을 통해 최종 선발된 돌연변이 감귤의 접수를 채취하여 각 계통별 20개 이상의 탱자대목에 접목하여 증식
	제2세부과제: 돌연변이체의 관리 및 구조변화분석	○ 돌연변이 감귤의 구조변화 분석을 통한 돌연변이 개체의 특징 조사	100	- 2012년 신규 선발 돌연변이 감귤을 중심으로 신생잎과 과실을 재료로 하여 현미경관찰 수행
		○ 돌연변이 개체 증식용 포장 조성을 통한 계통 육성 기반 조성	100	- 차년도 증식용 접목 대비 탱자대목 확보(화분 1700개)과 포장(1,344그루)에 식재 - 1세부과제의 돌연변이 개체의 증식과 유기돌연변이 개체의 정식에 필요한 포장 조성 - 유기 및 증식 돌연변이 개체의 정식(2014년 4월 완료)

		<p>○ 감귤포장 관리를 통한 감귤 개체 유지 및 증식 기반 조성</p>	100	<p>-아열대농업생명과학연구소와 전임 관리원을 통한 3개의 감귤육종포장(아열대농업생명과학연구소, 서귀포의료원, 제주시월평동)의 재배 관리(영양, 병해충, 관수, 전정, 잡초 등 관리) -1~3차년도의 선발과정을 통해 탈락한 가지 및 감귤나무 제거 및 포장 정비 -제1세부 및 제3세부과제에 분석용 시료 공급</p>
제3세부과제: 돌연변이체의 성분 및 효과분석		<p>○ 시험대상 돌연변이 감귤 선별</p>	100	<p>○ 1, 2차 선발가지에서 착과된 돌연변이 감귤 샘플들의 2차대사산물 성분과 생리활성 결과의 정밀분석을 통한 시험대상 돌연변이 감귤 선별 ○ 시료 전처리 및 추출과정 확립 ○ 감귤 분말시료와 추출물 제조</p>
		<p>○ 항암활성 조사</p>	100	<p>○ 시험세포주: 인간 대장암 HCT 116 세포, 인간 자궁경부암 Hela 세포, 인간 유방암 MCF-7 세포, 인간 흑색종 A375 세포 등 ○ MTT assay에 의한 암세포별 증식 억제능 조사 ○ 용량-반응 및 시간-반응 관계 평가를 통한 용량-독성 곡선 작성 ○ 용량-반응 분석을 통한 역치(Threshold) 용량 설정</p>
		<p>○ 정상세포와 암세포 증식양상변화 조사</p>	100	<p>○ 시험세포주 - 인간 폐 정상세포 16HBE140- vs. 인간 폐 암세포 A549 - 인간 간 정상세포 CHANG vs. 인간 간 암세포 HepG2 ○ MTT assay에 의한 성장 저해 효과 탐색</p>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
5차 연도 (2014)	제1세부: 생리적 특성 및 유전적 분 석을 통한 돌연변 이체 선발	선발돌연변이 증식 개체의 정식	100	-아열대농업생명과학연구소와 제주 대학교 실습센터의 협조를 받아 제 주시 2곳, 서귀포시 2곳에 증식한 개체를 정식하였음
		선발돌연변이 개체 증식	100	-4차년도에서 증식을 통해 20개체 이상이 확보되지 않거나 신규 선 발한 돌연변이의 증식을 위한 접목 수행
		돌연변이 가지를 대상으로 1,2 차 선발	100	-아열대농업생명과학연구소(S-계 통)와 서귀포의료원(C-계통)을 대 상으로 1차 신규 선발 -2011년 고접목을 대상으로 착과된 과실과 잎 등의 형질 관찰 및 조사. 이를 통한 2차 선발
		최종 선발돌연변이 과실 특성 분석	100	-최종 선발돌연변이 계통 중 착과 (해거리로 인해)된 과실의 형질(당· 산도 등)의 안정적 발현 검증 및 저 장성, 수확시기 등을 조사 -저장성조사: 저장 시기별 2차선발 계통 감귤의 당산비 변화 조사
	제2세부: 돌연변이 체의 관리 및 구조 변화분석	돌연변이의 구조분석	100	-제1세부과제에서 2차 선발한 돌연 변이 감귤을 대상으로 하여 과실 발달시기별 구조변화 분석(과실발 달 초기의 차이에 집중하여 수행) -고당도, 저산도, 저장성 향상 등을 나타내는 공통 관찰 결과를 선발에 활용
		선발돌연변이 개체 증식용 포장 정비	100	-제1세부과제에서 증식한 돌연변이 개체를 식재할 수 있는 포장 정비
		돌연변이 육종 포장 관리	100	-육종포장의 재배관리(병해충, 관 수, 전정, 잡초제거 등)를 통한 제1 세부 및 제3세부과제에 공급용 감 귤 실험재료 생산
	제3세부과제: 돌연변이체의 성분 및 효과분석	○ 세포주기(Cell cycle) 및 자연사멸(Apoptosis) 유도능 조사	100	○ 역치 고용량 범위에서 Flow cytometry를 이용한 세포주기 교란 작용 및 자연사멸 유도능 조사
		○ 암세포 자연사멸 유도과 산화질소 발생과의 연관성 분석	100	○ Griess assay를 통한 산화질소 발생 변화 분석
		○ 암세포 자연사멸 유도와 관련된 IAP mRNA 발현양상 조사	100	○ RT-PCR을 이용한 발현 분석

2. 관련분야의 기술발전예의 기여도

- 국내 감귤생산액은 매년 약 6,000억원을 나타내고 있고, 생산량면에서 국내 1위의 과수작물임. 국내 총 감귤생산량이 비록 전세계 감귤류 연평균 생산량 1억톤(FAO 집계)의 0.6%에 불과하지만, 우리나라 과수 총생산량의 1/4 이상을 차지하여 우리나라에서 생산량이 가장 많은 과수임. 한·미 FTA, 한·EU FTA, 한·중·일 FTA 등의 수입개방화와 UPOV 등의 가입에 의한 로열티지급 문제 등을 고려할 때 국내에서 자체 육성된 감귤 품종의 확보는 국내 감귤 농업의 생존과도 직결되는 문제임. 이에 따라 국내 자체 육성품종의 확보는 수입감귤에 대한 경쟁력 확보 효과가 클 것으로 예상됨
- 매년 국내 가공용 감귤로서 10만톤 정도가 소비되고 있으나, 비상품과 등의 사용으로 인한 경쟁력 저하와 가공적합용 감귤품종의 부재로 인해 감귤가공식품 시장은 제한되어 있음. 매년 오렌지수입은 2003~2008년 평균 121.9천톤이고, 오렌지 농축액의 수입도 3만~5만톤 정도가 수입되고 있어, FTA 발효시 그 수입량은 급격히 증대될 것으로 예상되고 있음. 고품질 자체 육성품종의 확보는 이에 대한 전략으로서 감귤소비시장의 확대에도 기여할 것으로 예상됨
- 이에 따라 신품종 감귤의 육성은 수입감귤에 대한 적극적 방어전략으로서 활용이 가능하고, 올해부터 전지역으로 수출이 가능한 미국과 2009년 말에 첫 수출의 쾌거를 달성한 영국이나 러시아 등으로의 수출확대에도 크게 기여할 수 있을 것으로 예상됨. 또한 신품종을 이용한 다양한 기능성강화 감귤가공품의 개발을 통해 감귤소비시장의 확대를 유도할 수 있을 것으로 예상됨
- 감귤은 우리나라 제 1의 과실로서 매우 중요한 위치를 차지하고 있음에도 불구하고 제주도를 제외한 지역에서의 연구는 거의 전무한 상황이며, 현재 가공용으로 유통되고 있는 감귤의 양은 전체 감귤 생산량의 약 15%에 지나지 않아 감귤이 본격적으로 출하되는 시기에는 가격이 폭락해 농가가 어려움을 겪고 있으므로 감귤소재의 차별화된 연구를 통한 다양한 활용성이 요구되어짐
- 육성한 우수 계통의 품종화 및 농민 보급을 통한 감귤 생산을 통해 일본에 예속되어 있는 감귤 품종의 국산화에 기여할 수 있고, 재배 품종의 다양화에 기여하여 감귤 소비시장의 확대와 감귤 농가의 소득 증대에도 기여할 수 있을 것으로 예상하고 있음
- 기능성 강화 품종 확보: 기능성 식품소재로서의 감귤위상을 강화하고, 식품소재로서의 이용성 다양화
- 학문적 관점에서 발암 위험성을 증가시킬 수 있는 다양한 감염과 질병, 염증 현상의 이해와 그 기전을 규명하는 동시에 산화적 스트레스(oxidative stress)을 억제하기 위한 천연 항산화 물질의 개발 활용방안을 연구함으로써 최종적으로는 암을 포함한 다양한 질병의 예방, 억제

및 치료방안(chemoprevention)을 제시할 수 있을 것으로 사료됨

- 감귤 기능물질의 항산화, 항암효과 및 기전에 관한 정보를 기능성 식품, 의약품 개발에 응용하여 산업화 시킬 수 있으며, 이로 파생되는 여러 관련 분야의 연구 또한 활성화 시킬 수 있을 것으로 기대됨. 아울러 국민 보건 향상 및 난치병에 대한 치료방안을 제시함으로써 국가 생산성을 향상시킬 수 있을 것임
- 감귤의 항산화효능 연구는 오래 전부터 매우 활발히 진행되어 왔으나, 감귤소재를 이용한 암제어 기작에 대한 연구는 전무함
- 현재까지 암예방 효과가 있는 과실을 포함한 식물 식이성분들이 많이 알려지고 있으나 효능에 대한 결과만 있을 뿐 효능에 대한 과학적 증거를 제시할 수 있는 여건은 턱없이 부족함. 따라서 탁월한 효능을 가지고 있는 암 예방제 선별 및 이에 대한 기전 연구는 절실히 필요함
- 새로운 암예방제 탐색에 필요한 지표물질 선정 및 이를 이용한 암예방제 효능의 과학적 근거제시는 특허 및 연구개발의 근거 자료로 필요하기 때문에 이에 알맞은 신뢰성 있는 생체 지표의 사용 및 모델 확립이 절실함. 또한 우리나라에서 가장 많이 생산되는 감귤에서 암 예방 소재를 탐색하고 그 작용기전을 밝히고자 하는 노력은 향후 국제시장에서 경쟁력을 창출하는데 필요하다고 사료됨

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발 성과

가. 연구개발 성과목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구분	품종개발		특허		논문			유전자원		기술 이전	홍보	인력 양성
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI	학술 발표	수집	등록			
최종목표												
1차년도	목표					1						
	실적					2	3				2	1
2차년도	목표				1	1						
	실적					1	1					
3차년도	목표			1		1	2					
	실적				2	1	2					1
4차년도	목표	1		1	1	2	3					
	실적			3		4	2	4				3
5차년도	목표	1	1		1	2	3					
	실적			6		3	3	9			6	2
소 계	목표	2	1	2	2	6	10					
	실적			9		9	9	19			8	7
종료 1차년도					5	3	1	1			3	
종료 2차년도				1	2							1
종료 3차년도		1		2	1							
종료 4차년도		2	1		1							
종료 5차년도			2									
소 계		3	3	3	9	3	1	1			3	1
합 계		3	3	12	9	11	10	20			11	8

나. 품종개발

세부적으로 전부(건별로)기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다									
구분	품종 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	

다. 특허

지식재산권									
구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원*			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
특허	만생은주인 감귤 변종 식물 '아라운주'	대한민국	제주대학교 산학협력단	2014.6.26	10-2014-0078832				
특허	FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석을 이용한 감귤의 품종 및 당도 및 산도 예측 방법	대한민국	제주대학교 산학협력단	2014.6.26	10-2014-0078834				보정제출
특허	감귤 유래의 CuCRTISO-like 프 로모터 및 이를 포함하는 재조합 벡터	대한민국	제주대학교 산학협력단	2014.6.26	10-2014-0078848				
특허	FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석을 이용한 감귤의 품종을 대사 체 수준에서 식별하는 방법	대한민국	제주대학교 산학협력단	2014.7.9	10-2014-0085960				보정제출
특허	FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석을 이용한 감귤의 기능성 성분 함량 예측 방법	대한민국	제주대학교 산학협력단	2014.7.9	10-2014-0085955				보정제출
특허	조생은주인 감귤 변종 식물 '제대은주'	대한민국	제주대학교 산학협력단	2015.6.29	10-2015-0092516				
특허	감귤 유래 CuCRTISO-like 프 로모터 및 이를 포함하는 재조합 벡터	대한민국	제주대학교 산학협력단	2015.6.29	10-2015-0092513				
특허	FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계 분석을 이용한 과실의 당도 및 산도 예측 방법	PCT	제주대학교 산학협력단	2015.6.26	PCT/KR 2015/006580				
특허	만생은주인 감귤 변종 식물 '아라운주'	PCT	제주대학교 산학협력단	2015.6.26	PCT/KR 2015/006584				

라. 논문(국내외 전문학술지) 게재

게재연월일	논문명	학술지명	권(호)	페이지수	국명	SCI여부 (SCI/비SCI)
2010.10.31	Induction and selection of citrus mutant by	Journal of Radiation Industry	4(3)	215-219	대한민국	비SCI

	gamma-irradiation					
2011.02.28	Current state of citrus mutation breeding (2010)	Journal of Asian Agriculture and Biotechnology	27(1)	67-72	대한민국	비SCI
2012.02.28	Current State of Citrus Mutation Breeding (2011) : Comparison of mutants of the annual survey results	Journal of Asian Agriculture and Biotechnology	28(1)	85-90	대한민국	비SCI
2012.09.25	Changes in the phenolic composition of citrus fruits and leaves prepared by gamma irradiation of budsticks	Life Science Journal	9(3)	1281-1285	중국	SCI
2012.09.25	Characterization of the antioxidant properties of citrus mutants induced by Gamma-rays	Life Science Journal	9(3)	1495-1500	중국	SCI
2013.02.28	감귤 돌연변이 육종 현황 (2012년)	Journal of Subtropical Agriculture and Biotechnology	29(1)	89-94	대한민국	비SCI
2013.08.31	Transcriptome analysis of a spontaneous reddish mutant in Miyagawa wase Satsuma mandarin	Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry	56(4)	391-399	대한민국	SCI
2013.09.17	Analysis of bioactive compounds in gamma irradiation-induced citrus mutants	Life Science Journal	10 (9S)	404-408	미국	SCI
2013.09.17	Free radical scavenging and ferrous ion chelating activities of citrus fruits derived from induced mutations with gamma irradiation	Life Science Journal	10 (9S)	401-403	미국	SCI
2014.02.28	Discrimination of High Functional African Yams using FT-IR Fingerprinting Combined by Multivariate Analysis and Quantitative Prediction of Functional Compounds by PLS Regression Modeling	Korean Journal of Horticultural Science & Technology	32(1)	105-114	대한민국	SCI
2014.02.28	Current state of citrus mutation breeding (2013)	Journal of Subtropical Agriculture and Biotechnology	30(1)	65-70	대한민국	비SCI
2014.02.28	Microscopic observation of leaves in citrus mutants	Journal of Subtropical Agriculture and Biotechnology	30(1)	11-15	대한민국	비SCI
2014.09.28	Polyphenols and antioxidant capacity of a spontaneous reddish	Natural Product Research	28(22)	2036-2039	영국	SCI

	mutant in Satsuma mandarin, <i>Shinheungri</i>					
2015.02.28	Structural characteristics of a spontaneous reddish citrus mutant through microscopic observation	Journal of Subtropical Agriculture and Biotechnology	31(1)	47-50	대한민국	비SCI
2015.02.28	Current state of citrus mutation breeding (2014)	Journal of Subtropical Agriculture and Biotechnology	31(1)	41-45	대한민국	비SCI
2015.02.28	FT-IR 스펙트럼 기반 다변량통계분석기법에 의한 감귤의 대사체 수준 식별체계 확립	Journal of Subtropical Agriculture and Biotechnology	31(1)	17-24	대한민국	비SCI
2015.04.22	The promoter from the Citrus unshiu carotenoid isomerase gene directs differential GUS expression in transgenic Arabidopsis	Molecular Breeding	35(5)	116	네덜란드	SCI
2015.6.22	Sugar and acid content of citrus prediction modeling using FT-IR fingerprinting in combination with multivariate statistical analysis	Food Chemistry	190	1027-1032	미국	SCI
2015.07	Monthly metabolic changes and PLS prediction of carotenoid content of citrus fruit by combined fourier transform infrared spectroscopy and quantitative hplc analysis	Plant Biotechnology Reports.	9(4)	247-258	대한민국	SCI
2015	Anticancer Effect of Citrus Fruit Prepared by Gamma Irradiation of Budsticks	Journal of Life Science		revision	대한민국	비SCI
2015	Investigation into Effects of Transgenic Glufosinate-Resistant Zoysia Grasses with Herbicide Application on Bacterial Communities under Field Conditions	Journal of Plant Biology		accepted	대한민국	SCI
2015	Discrimination of citrus fruits using Fourier Transform Infrared Fingerprinting Combined by Quantitative Prediction of Bioactive Compounds by Partial Least Squares Regression Modeling	Applied Spectroscopy		revision	미국	SCI

마. 학술발표

발표일시	논문명	학술대회명	발표	개최국
2010.10.23	Citrus mutational breeding by gamma ray irradiation in Korea	2010년도 한국원예학회 임시총회 및 추계학술발표회	포스터	대한민국
2010.11.05	방사선을 이용한 감귤돌연변이 육종	(사)한국방사선산업학회 2010년 학술발표대회	포스터	대한민국
2011.05.27	Current state of citrus mutation breeding by gamma ray	사)한국원예학회 2011년 정기총회 및 제94차 추계학술발표회	포스터	대한민국
2011.07.08	감귤 돌연변이체 유기를 통한 신품종 육성 현황	한국육종학회 정기학술발표회 및 심포지엄	포스터	대한민국
2011.10.21	Changes of carotenoid contents between wild type and natural mutant of citrus by quantitative HPLC analysis	2011 International Symposium & Annual Meeting of the KSABC	포스터	대한민국
2012.07.06	감마선 조사를 통한 감귤 돌연변이 육종현황(2012)	2012 한국육종학회·식물분자유종사업단 공동 국제심포지엄	포스터	대한민국
2013.05.24	감귤돌연변이육종 현황	(사) 한국원예학회 창립 50주년 · 국립원예특작과학원 개원 60주년 기념 국제심포지엄 및 2113 추계학술발표회	포스터	대한민국
2013.10.11	Polyphenolic components and antioxidant potential of citrus mutants induced by gamma-rays	International conference of KSMCB	포스터	대한민국
2013.11.01	감귤 돌연변이체를 이용한 기능성 색소 연구	2013 한국원예학회 임시총회 및 제99차 추계학술발표회	포스터	대한민국
2013.11.01	감귤 인위돌연변이 계통 A3013의 특성 분석	2013 한국원예학회 임시총회 및 제99차 추계학술발표회	포스터	대한민국
2013.12.06	Promoter analysis of citrus carotenoid isomerase gene in transgenic Arabidopsis	2013 한국식물생명공학회 추계학술발표회 및 정기총회	포스터	대한민국
2014.7.3	The promoter from the Citrus unshiu carotenoid isomerase gene directs differential GUS expression in transgenic Arabidopsis	2014 한국육종학회, 차세대BG21사업단, 골든씨드프로젝트사업단 공동심포지엄	포스터	대한민국
2014.08.28	Anticancer Effect of Citrus Fruit Prepared by Gamma irradiation of Budsticks	한국생명과학회 국제학술대회	포스터	대한민국
2014.10.23	Discrimination of citrus using FT-IR fingerprinting combined by quantitative prediction of functional compounds by PLS regression modeling	2014 한국원예학회 임시총회 및 제101차 추계학술발표회	포스터	대한민국
2014.10.23	Physiological activities of Jeju Citrus sudachi fruit by harvesting time	한국분자세포생물학회 국제학술대회	포스터	대한민국
2015.1.12	Abiotic stress and	Plant & Animal Genome	포스터	미국

사. 인력양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	학위수여일	학위자명	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타*
1	2011.2	이성훈		1			1						1
2	2013.2	임순재			1		1						1
3	2013.8	김성우		1			1						1
4	2014.2	김지혜			1			1					1
5	2014.2	변지희			1			1					1
6	2014.2	오승규		1			1						1
7	2014.8	송승엽	1				1						1
8	2015.2	이연지			1			1					1
합 계			1	3	4	0	5	3	0	0	0	0	8

*제주권

2. 성과활용 계획

(1) 실용화 · 산업화 계획(기술실시 등)

○ 품종 특성별 생산 및 유통 전략 수립 및 추진

- 개발 품종의 시험재배에 감귤선도농가를 참여시켜 개발 품종의 우수성을 농민참여를 통해 확인함. 현장적응성 시험재배 등을 통해 생육조건, 병해충 특성 등에 대한 평가 수행
- 아라온주: 만생 특성으로 인해 '설'명절 노지 수확감귤로 특색을 살려 고품질 온주 감귤로서 생산. 현재 1월 말~2월 초 생산시 제주감귤협동조합의 '블로초' 브랜드보다 품질이 좋음. 이에 대한 생산을 감귤영농조합법인 등과 협력체계 구축을 통한 생산하고, 감귤협동조합과 연계하여 새로운 브랜드를 창출하고자 함
- 제대온주: 과형의 변이 및 기능성 성분, 저장성의 향상 등으로 인해 이에 대한 강점을 활용한 플라보노이드 강화 감귤 주스를 생산하기 위한 제주식품회사와 연계, 수출감귤 품종으로의 특성화하기 위한 감귤협동조합과의 연계, 과형을 활용한 관상용 감귤로의 판매하기 위한 묘목업체와의 연계를 추진하고자 함
- 홍색감귤: 고당도 및 저장성 향상 등의 형질을 나타내어 생과로서의 성공가능성이 높아 새로운 브랜드를 구축하여 감귤협동조합이나 지역감귤조합과 연계하여 국내 시장뿐만 아니라 해외 수출 품종으로서도 유망하여 새로운 감귤 시장을 개척하고자 함. 더불어 홍색감귤은 D-limonene의 함량이 대조구에 2배이상 높으므로 세정제 등의 소재로서 활용이 가능함. 천연화장품 업체와 연계하여 상용화하고자 함.

○ 개발 감귤 품종의 참여기업(농업조합법인 제주자연)에 전용실시 또는 통상실시에 대한 협의를 통해 신규 브랜드 창출 및 독점 생산 체계 구축을 통한 생산량 조절 체계 구축

- 선도농가, 감귤지역조합 등과 협력체계를 구축하여 품종별 생산체계 구축 및 부가가치 생산. 재배 품종의 품질의 안정적 발현의 추적 조사 및 재배 기술의 지속적인 개선 필요. 이와 연계한 품종별 경제성(수익성) 평가 수행
- 개발 품종에 대한 지식지주회사 또는 학내 기업 등을 통해 보유 품종과 특허에 대한 기술 이전을 실시하여 실용화 추진
- 유관속계의 변화(유관속의 종류 변이, 사부 두께 등)에 따른 재배기법의 확립이 필요하여 농업기술원, 감귤재배농가와 협력하여 품종에 따른 고품질 감귤 생산 재배기술을 확립하고자 함

(2) 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

- 구축한 돌연변이 육종 인프라를 활용하여 분자유종학 수업, '종자산업'연계 전공의 교육에의 활용
- 개발 품종의 농민보급에 필요한 품종품평회 개최, 방송 및 신문 등에 기사제공을 통한 홍보, '제주신문'의 컬럼 집필자로서 감귤 신품종 육성에 대한 일반인 대상 교육 및 홍보
- 아열대농생명융복합산업인재양성사업단의 '종자산업'연계전공의 담당교수로서 구축된 인프라와 확보 기술을 활용하여 학부생의 육종 실험 강화를 통해 육종분야로의 진출에 대한 동기 부여

(3) 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- 현장실증 실험을 거쳐 우수 계통의 품종 출원 및 특허출원을 통한 품종보호, 특허출원 중인 2개 우수 품종의 해외 품종 출원(미국, 일본 등)
- 특허출원 또는 품종보호출원된 품종에 대한 내용을 한국원예학회 국문지(SCI) 등에 품종 논문으로 발표

(4) 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

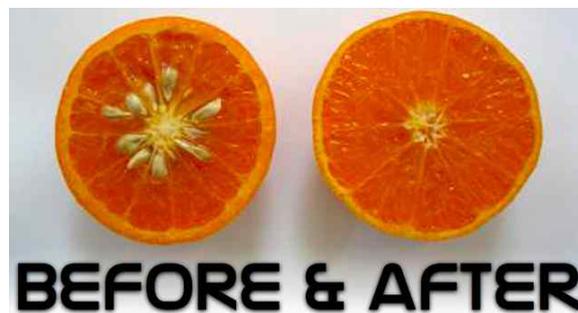
- 2단계 GSP사업에 진입하여 지속적인 연구를 수행하여 품종의 개발 및 상용화 실현
- 제주특별자치도농업기술원과 협력하여 개발 우수 계통의 현장실증 실험을 수행하여 국내외 품종 출원 및 농민보급 추진함

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 논문 및 특허 검색을 통해 습득한 해외 과학기술 정보

○ Bermejo 등(2011)에 의하면 Moncada mandarin의 경우 감마선 조사에 의한 돌연변이에 의해 종자 수뿐만아니라 당도 증가, 산함량 증가, 작은 크기, 높은 플라보노이드와 카로틴함량, 비타민 C 함량의 증가 등의 결과를 나타내어, 본 연구의 접근방법을 통해서도 당산비가 개선된 품종을 개발할 수 있을 것으로 판단됨

○ 본 연구팀과 협력관계에 있는 미국 UC Riverside의 Mikeal Roose 교수팀에서 Tango와 DaisySL이외에 FairchildLS, KinnowLS, Gold Nugget Mandarin, Shasta Gold Mandarin, Tahoe Gold Mandarin, Yosemite Gold Mandarin을 방사선을 이용한 돌연변이 육종을 통해 신규 품종을 개발하여 특허출원 후 미국 내에 보급 중에 있음



(Kinnow (left) and KinnowLS (right) mandarin from UC Riverside)

○ 이들 돌연변이 Mandarin계 품종들은 종자수의 감소뿐만아니라 성숙시기와, 과색, 과즙성, 과육의 치밀성 등에 차이가 있어 본 연구의 접근 전략을 통해 고품질 온주밀감 품종의 개발이 가능하다는 증거가 됨

○ 2012년 11월 18-23일에 스페인에서 개최되었던 제12회 International Citrus Congress에서 미국, 아르헨티나, 중국, 칠레, 남아프리카공화국, 모로코, 터키, 브라질, 스페인, 파키스탄 등의 다양한 국가의 연구자들이 감귤을 대상으로 돌연변이 육종결과들을 발표하였음

○ 감마선 조사는 높은 돌연변이 개체를 유도할 수 있고, 개선된 형질을 갖는 새로운 돌연변이를 창출하기 위해 생리적 특성을 변형시키는 효과적인 방법으로 사용되어 왔음(Ahloowalia and Maluszynski 2001, Bermejo et al 2011, Predieri, 2001). 감마선에 의해 생성된 자유라디칼은 식물세포의 구조와 기능, 대사에 변화를 일으켜서 경제적으로 중요한 여러가지 품종을 개발하고, 상업적으로 유용한 변화를 일으킬 수 있음(Kim et al., 2012; Wi et al., 2007). 많은 유용한 돌연변이 품종들이 영양변식하는 식물에서 감마선 조사에 의해 개발되었음(Ahloowalia and Maluszynski, 2001; Predieri, 2001).

2. 해외 과학자와의 교류(학술회의 참가 등)를 통한 해외과학기술정보

○ 세계 최대의 유전체학회인 PAG XXIII 참석을 통한 돌연변이 연구 현황 파악 및 선발기술 관련 정보의 습득

(1) Verifying the Mandarin Breeding: Lessons from Parentage Analysis of Citrus Varieties(Tokuro Shimizu, NARO Institute of Fruit Tree Science)



- 유전체연구 결과를 육종에 활용하는 방법과 현재 개발된 품종의 유래를 분석하는 결과를 얻었음. 현재 제주에서 재배되고 있는 하루미 등의 품종의 부분과 모본 등에 대한 정보를 습득함

(2) High Throughput Sequence-Based Screening with Keypoint Mutation Breeding (Michiel van Eijk, KeyGene)



- KeyGene회사가 추진하고 있고, 연구자들에게 서비스하고 있는 기술과 연구에 대해 설명함. 콩의 인위적 돌연변이체를 대량으로 창출하여 이로부터 효율적으로 선발하는 phenotyping 기술 등에 대한 사례를 중심으로 설명함

제 7 장 참고문헌

- Ahloowalia BS, Maluszynski M, 2001. Induced mutations—A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*. 118: 167–73.
- Bermejo A, Pardo J, Cano A, 2011. Influence of gamma irradiation on seedless citrus production pollen germination and fruit quality. *Food Nutr Sci*. 2: 169–80.
- Kim MY, Soon Jm, Kim JH, Kim IJ, Lee HY, Lee DS, Lee YJ, Byun JH, Kim JH, Kim JY, Jeong SR, Kim JH, Moon SH, 2012. Changes in the phenolic composition of citrus fruits and leaves prepared by gamma irradiation of bud sticks. *Life Science Journal*. 9(3).1281– 1285.
- Levedeva IV, Su Z, Vozhilla N, Chatman L, Sarkar D, Dent P, Athar M, fisher PB, 2008. Chemoprevention by perillyl alcohol coupled with viral gene therapy reduces pancreatic cancer pathogenesis. 7: 2042.
- Predieri S, 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tiss Org*. 64: 185–210.
- Senevirathne M, Kim S H, Kim Y D, Oh C Y, Oh M C, Ahn C B, Je J Y, Kee W W, Heon Y J (2010) Effect of far-infrared radiation drying of citrus press-cakes on free radical scavenging and antioxidant activities. *Journal of Food Engineering*, 97, 168–176.
- Wi SG, Chung BY, Kim JS, Kim JH, Baek MH, Lee JW, Kim YS, 2007. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron*. 38: 553–64.
- Roose ML, Williams TE, 2007. Mutation Breeding. *In* *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*(edited by I. Khan). CAB International.
- Rein, MJ, Renouf M, Cruz-Hernandez C, Actis-Goretta L, Thakkar SK, Silva Md, 2013. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br J Clin Pharmacol*. 75(3): 588–602
- KREI(한국농촌경제연구원), 농업전망 2015-수급안정방안, 현장에서 찾는다.
- KOSIS(국가통계포털) 홈페이지(www.kosis.kr)
- <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids> (플라보노이드의 기능성에 대한 자료)

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

과제명	방사선을 이용한 고품질 감귤신품종 육성		
주관연구책임자	김인중	주관기관	제주대학교

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
방사선이용 감귤돌연변이육종	이스라엘/미국	95	95	100	
감귤유전적분석	미국/스페인	90	80	100	

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	전체 기간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	(방사선이용돌연변이육종)	(감귤유전적분석)
Keyword	mandarin, irradiation, tree, name	citrus, gene, mandarin/감귤, 유전자
검색건수	미국등록 226건, 유럽 35건, PCT 93건	미국 221건, 유럽 89건, 한국 1,162건
유효특허건수	미국 9건	미국 5건, 한국 4건
핵심특허 및 관련성	특허명	Citrus tree named 'KinnowLS'
	보유국	미국
	등록년도	2013.7.16
	관련성(%)	90
	유사점	Co ⁶⁰ 조사를 통한 mandarin 육종
차이점	온주밀감에 대한 보고없음	유전자분리 및 이용 돌연변이체로부터 유용 유전자분리 특허 없음

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	(방사선이용돌연변이육종)	(감귤유전적분석)	
Keyword	citrus, gamma ray	citrus, mutation, comparative	
검색건수	30	40건	
유효논문건수	1	7건	
핵심논문 및 관련성	논문명	Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets.	Identification and comparative profiling of miRNAs in an early flowering mutant of trifoliolate orange and its wild type by genome-wide deep sequencing
	학술지명	Plant Cell Reports	PLoS One
	저자	Froelicher Y, Bassene JB, Jedidi-Neji E, Dambier D, Morillon R, Bernardini G, Costantino G, Ollitrault P.	Sun LM, Ai XY, Li WY, Guo WW, Deng XX, Hu CG, Zhang JZ.
	게재년도	2007	2012
	관련성(%)	80	95
	유사점	감마선조사에 의한 감귤돌연변이육종	Citrus속의 돌연변이 유전적 분석
	차이점	Pollen에 방사선 조사한 것으로 측아에 조사하는 것과는 조건이 다르고, 온주밀감이 아님	온주감귤 돌연변이체에 대한 분석결과 없음

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 국내의 감귤 생산량은 해거리현상에 의한 년도간 변화가 심한 편이며, 최근 10년간(1999~

2008)의 평균 생산량은 65만 톤으로 동기간 전세계 감귤류 연평균 생산량 1억톤(FAO 집계)의 0.6%에 불과함. 감귤의 생산량은 우리나라 과수 총생산량의 1/4 이상을 차지하여 우리나라에서 생산량이 가장 많은 과수임.

- 감귤산업의 조수입은 1996년산 6,079억원을 기록한 이후 계속 2002년산까지는 감소되고 있는데 감귤가격이 대폭 하락했던 1999~2002년산 4개년 평균은 3,436억원으로 거의 절반 수준으로 하락했음. 그렇지만 2003년부터 감귤유통조절명령제의 실시와 감귤품질의 향상, 1999년 이후 2002년까지의 감귤가격 폭락의 여파로 인한 대규모 폐원에 따른 감귤생산량의 조정으로 2003년산 4,704억원으로 증가했고, 2004년산은 6,105억원, 2005년산은 6,006억원으로 회복되는 추세를 보여주고 있다. 그러나 2007년산은 과잉생산과 품질하락으로 4,318억으로 감소하였으나 2008년산 6,313억원으로 다시 회복되었음.

<감귤재배 및 생산 추이>

연도	재배면적(ha)	생산량(톤)	조수입(백만원)	재배농가수(호)
2000	25,796	563,341	370,811	36,590
2001	25,408	646,023	361,667	36,296
2002	25,207	788,679	316,494	35,078
2003	24,560	645,587	470,415	33,957
2004	22,048	595,591	610,491	31,233
2005	21,430	661,992	600,600	30,659
2006	21,382	631,324	660,288	30,747
2007	20,965	747,376	431,883	31,005
2008	20,937	592,160	631,325	31,027

자료 : 제주농협지역본부, 「감귤유통처리실태분석」, 각 년도.

- 국내에서 재배되고 있는 감귤품종은 일본에서 도입된 ‘궁천조생’과 ‘홍진조생’이 국내 감귤 재배 면적의 80%이상을 차지하고 있으나, 최근 들어 한라봉(부지화), 천혜향(세토까) 등의 만감류 재배가 증가하고 있음
- 온주밀감의 극조생, 조생, 중·만생종 중 조생종이 88.8%(2008년)를 차지함으로 인해 출하기간이 집중됨으로 홍수출하가 진행되어 가격형성에 악영향을 주고 있음

<감귤품종별 재배면적(2007)>

품종	극조생온주	조생온주	보통온주	한라봉	천혜향	금감	기타
면적(ha)	1,882	15,483	171.7	1,062	87	81	278.8
비율(%)	9.9	81.3	0.9	5.6	0.5	0.4	1.4

자료 : 농촌진흥청 감귤시험장

- 현재 감귤출하량의 90%가 생과로 소비되고 있으며, 매년 감귤가공용 출하량은 10만 톤 정도로 꾸준히 유지하고 있음. 그러나 대부분의 감귤가공용은 상품성이 떨어지는 감귤을 가공용으로 사용하고 있어, 감귤가공품 시장의 확대에는 한계가 존재함

〈감귤 용도별 처리 현황〉

(단위 : 톤)

구 분	합 계	생 과			가 공	기 타
		도외상품	수출	군납		
1996	479,980	436,856	744	757	11,733	29,890
1997	693,200	613,357	3,413	977	13,785	61,668
1998	543,980	505,047	6,277	1,262	5,012	26,382
1999	638,740	558,868	6,524	1,649	33,142	38,557
2000	563,341	422,097	6,663	1,857	27,468	105,256
2001	646,023	518,197	7,306	1,823	47,445	71,252
2002	788,679	519,509	9,454	2,118	112,359	145,239
2003	645,587	467,567	7,928	2,028	120,333	47,731
2004	595,591	408,250	5,562	1,526	100,517	79,736
2005	661,992	491,260	3,642	158	125,343	41,589
2006	631,324	450,087	2,813	822	109,496	68,106
2007	747,376	513,746	4,212	1,180	138,782	89,456
2008	592,160	427,669	1,371	463	88,664	73,993

자료 : 제주농협지역본부, 「감귤유통처리실태분석」, 각 년도.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 세계 감귤류 생산량(2007년)은 117,382천톤(약 1억 1천만톤 내외 생산)으로 과일 전체 생산량 554,793천톤의 약 1/5로서 생산량이 1위임.

〈세계의 주요과일 생산량(2007년기준)〉

(단위 : 천톤)

과실별	계	감귤류	바나나	포도	사과	망고·구아바	배	파인애플	기타
생산량	554,793	117,382	85,856	67,221	65,971	33,446	20,579	20,911	143,427

자료 : <http://www.fao.org/>

- 우리나라의 온주밀감을 포함하는 세계의 탄제린류(탄제린, 만다린, 클레멘타인) 생산량은 27,865천톤이며 중국이 15,185천톤, 스페인 1,974천톤, 일본 1,066천톤, 브라질 1,206천톤, 미국 328천톤 등임.

<세계의 감귤류 품종별 생산현황(2007년기준)>

구 분	계	오렌지	탄제린류(탄제린, 만다린, 클레멘타인, 사스마)	레몬,라임	그레이프후르트
생산량(천톤)	110,279	64,764	27,865	12,673	4,977
비 율(%)	100.0	58.7	25.3	11.5	4.5

자료: <http://www.fao.org/>

- 특히 중국의 감귤재배면적은 1,901천ha(2007년 기준)으로 세계 1위, 한국의 88배이며 생산량은 21,056천톤으로 세계 1위, 한국의 27배로써 세계의 17.9%를 차지하고 있음. 품종별로 보면 탄제린류는 15,185천톤, 오렌지는 3,173천톤, 자몽·포멜로 541천톤, 레몬·라임 842천톤, 기타 1,316천톤 등임.

<세계의 탄제린류 국가별 생산량(2007년기준)>

계	중 국	스페인	일 본	브라질	미국	한국	기 타
25,659(천톤)	15,185	1,974	1,066	1,206	328	778	7,329
100.0%	54.5	7.1	3.8	4.3	1.6	2.8	26.3

자료 : <http://www.fao.org/>

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 본 연구를 통해 개발될 것으로 예상되는 고품질 감귤품종의 이용성은 크게 3방향으로 볼 수 있음

(1) 현 재배품종의 품종갱신용 품종 공급

- 조생종 온주밀감의 총 감귤재배면적의 80%이상을 차지함으로 인해 발생하는 11월 하순~12월 중순까지의 홍수출하와 이로 인한 감귤가격 폭락을 방지하고, 미국으로부터의 수입오렌지와 향후 일본 및 중국으로부터 온주밀감의 수입에 대비한 국제경쟁력을 갖춘 품종을 개발, 보급함으로써 농민 소득의 안정화와 감귤산업 발전에 기여
- 현재의 주재배품종인 온주밀감의 주요 수확시기와 달리 1월 중순이후에 수확이 가능하다면 출하시기의 분산을 유도할 수 있을 뿐만 아니라, 높은 가격을 받을 수 있어 농민들의 소득을 향상시킬 수 있을 것으로 사료됨
- 다품종 연중 소량 생산체제로의 변화를 유도하기 위한 자체 육성 품종을 보급함으로써 생산시기의 분산과 재배작형의 다양화를 통해 밀감 수입원을 연중 분산시켜 소득의 안정화 가능
- 국내 재배되고 있는 대부분의 감귤 품종은 일본으로부터 도입된 것으로 이를 국산 자체 개발 품종으로 대체가 가능할 것으로 예상되고 있으며, 농업기술원 등과의 협력체계를

통해 이를 추진하고 있음

(2) 감귤 가공용 개발품종을 이용한 가공제품 개발

- 기능성의 강화 및 색깔 변화 등의 돌연변이 감귤품종을 이용하여 감귤농축액을 이용한 다양한 가공제품 개발 가능
- 색깔변화(오렌지색 -> 붉은색) 감귤의 이용은 소비자에게 색깔마케팅(color marketing)을 통한 소비시장의 확대를 유도
- 항산화성 또는 항암성 등의 생리활성능을 나타내는 기능성성분의 함량이 증가되거나 새로운 물질의 생성을 나타내는 돌연변이품종은 생과로서 (1)의 품종갱신용 품종으로서 이용될 수 있을뿐만아니라, 기능성식품소재로서 이용이 가능함

(3) 국제경쟁력을 갖춘 품종으로부터 생산된 수출용 감귤 생산

- 저장성 및 당산비의 향상을 나타내는 신품종의 개발은 국내 소비시장의 확대뿐만 아니라 제주생산 감귤의 수입제한이 철폐된 미국을 비롯한 해외시장(러시아, 중국, 일본 등)에 대한 수출이 유망할 것으로 사료되나 수출 현장에 맞는 품질을 갖추어야 함
- 생산된 감귤의 수출뿐만아니라, 품종 자체를 수출함으로써 품종사용에 대한 로열티를 받을 수 있어 품종주권을 확보할 수 있음

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	0	0	1	2	10	13
경제적 파급효과	0	0	5	10	50	65
부가가치 창출액	0	0	2	5	10	17
합 계	0	0	8	17	70	95

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

- 감귤돌연변이육종과 관련된 기존 특허는 만다린 등의 서구에서 선호하는 품종에 초점이 맞추어져 있고, 목적형질 또한 무종자, 색깔변화, 조기성숙 등에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 국내의 소비자가 절대적으로 선호하며, 향후 미국 등을 비롯한 서구에서도 선호도가 높아질 것으로 예상되는 만다린 계통 중 Satsuma mandarin(온주밀감)을 대상으

로 당산비의 향상과 기능성 성분 함량 증가, 수확시기의 변화 등의 방향으로 연구를 추진하였고, 이 중 과형의 변이 및 기능성 성분 변이 1품종, 만숙과 특성 1품종의 총 2품종을 국내에 특허출원하였고, 이 중 1건은 PCT 출원 중에 있음. 추가로 선발되는 계통을 계속적으로 특허 및 품종보호 등록을 국내 및 국외에 출원할 계획임

- 유전자 및 기능성 신규소재의 개발에 대한 기존 특허는 질병저항성과 기능성의 일부 유전자에 맞추어져 있고, 재배되고 감귤품종으로부터의 개발에 치중되어 있으므로, 본 연구과제는 인위적으로 유도한 감귤돌연변이 개체를 이용하여 변화된 형질과 발현 유전자 및 기능성 성분과의 상관성 분석을 통해 다양한 형질전환을 통한 유전자변형 감귤의 생산에 필요한 유전자소재의 개발과 식품소재로서 이용 가능한 기능성 소재를 개발하는 방향으로 연구를 추진하여 유전자와 기능성 소재에 대한 특허를 국내 및 국외에 출원할 계획임

2) 논문분석 측면

- 감귤돌연변이육종과 관련된 기존 논문은 pollen에 방사선을 조사한 후, pollination 과정을 거쳐 haploid 품종을 만드는 데 치중되어 있고, 개발된 감귤품종에 대한 보고된 논문은 거의 없으므로, 본 연구과제에서는 품종등록 후 품종에 대한 논문을 원예과학기술지 등에 게재할 예정임. 기능성성분 분석을 통한 2차대사산물의 생합성에 중점을 두고 연구를 추진하였고, 이와 관련된 연구결과를 Life Science Journal, Food Chemistry 등의 학술지에 게재하였음
- 감귤돌연변이체에 대한 유전적 분석에 대한 기존 논문은 자연돌연변이체의 전사체 및 단백질 분석에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 유도된 돌연변이체에서 형질과 유전자 발현의 변화간의 연관성을 분석하는 방향으로 연구를 추진하여 유전체분석에 관한 논문 등을 Gene, Molecular Breeding 등의 학술지에 게재할 계획임

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국외시장 분석결과 오렌지 등을 중심으로 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 쇠퇴기에 접어들었으므로, 본 연구과제에서는 소비시장이 확대되고 있는 클레멘타인, 만다린 등의 온주밀감과 비슷한 품종의 고품질화를 추구하는 방향으로 연구를 추진하여 고품질 온주감귤의 신규 품종을 성공리에 개발하고 있음. 향후 이를 상용화하여 선도농가 또는 지역농협과 협력관계를 통해 신규 브랜드를 가지고 감귤 소비시장 확대에 기여할 수 있을 것임
- 국내 및 국외시장 분석결과 감귤은 생과위주로 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 이에 대한 시장은 쇠퇴기에 접어들었으므로, 본 연구과제에서는 가공을 통한 고부가가치화에 적합한 감귤품종을 개발하는 방향으로 연구를 추진하였고, 플라보노이드 성분 강화 및 색깔 변이를 통한 기능성 성분의 변화가 발생한 신규 감귤 품종의 개발을 통해 기능성 강화 감귤가공 제품 등을 생산이 기대되고 있음. 시제품을 개발할 계획을 가지고 있음

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청에서 시행한 GSP원예종자사업단의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청에서 시행한 GSP원예종자사업단의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.