

# ‘미니향’ 만다린 과실에서 생육단계와 대목에 따른 과실 유기산 대사의 조절 특성

홍하림<sup>1,2</sup>  · 오은의<sup>1</sup> · 한승갑<sup>3</sup> · 윤수현<sup>3</sup> · 김호방<sup>4,5</sup> · 송관정<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 대학원 원예학과, <sup>2</sup>국립원예특작과학원 온난화대응농업연구소, <sup>3</sup>국립원예특작과학원 감귤연구소, <sup>4</sup>바이오메딕 생명과학연구소, <sup>5</sup>한라대학교 환경원예과

## Characterizing the Metabolic Regulation of Organic Acids in the Fruits of ‘Minihyang’ Mandarin at Different Developmental Stages and on Different Rootstocks

Ha Rim Hong<sup>1,2</sup> , Eun Ui Oh<sup>1</sup>, Seung Gap Han<sup>3</sup>, Su Hyun Yun<sup>3</sup>, Ho Bang Kim<sup>4,5</sup>, and Kwan Jeong Song<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticultural Science, Graduate School, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

<sup>2</sup>Research Institute of Global Warming & Agriculture, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Jeju 63240, Korea

<sup>3</sup>Citrus Research Institute, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Jeju 63607, Korea

<sup>4</sup>Life Science Research Institute, Biomedic Co., Ltd, Bucheon 14548, Korea

<sup>5</sup>Department of Environmental Horticulture, School of Equine Science and Horticulture, Cheju Halla University, Jeju 63092, Korea

\*Corresponding author: [kwansong@jejunu.ac.kr](mailto:kwansong@jejunu.ac.kr)

Received: 18 July 2023

Revised: 20 September 2023

Accepted: 23 October 2023

Published online: 31 May 2024

 OPEN ACCESS



HORTICULTURAL SCIENCE and TECHNOLOGY  
42(4):518-531, 2024  
URL: <http://www.hst-j.org>

pISSN : 1226-8763  
eISSN : 2465-8588

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright©2024 Korean Society for Horticultural Science.

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 디지털육종전환기술개발사업 지원을 받아 수행되었음, PJ322072-03-2-HD030.

## Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of different rootstocks on the organic acid content of ‘Minihyang’ mandarin at different developmental stages. The titratable acidity of ‘Minihyang’ fruit was the highest in the early stage and decreased rapidly during maturity. The level of acidity in the Flying Dragon rootstock was significantly higher than that in the trifoliolate orange rootstock at the early stage of growth, but the difference between them was insignificant during maturity. The content of organic acid showed a similar trend to that of titratable acidity, but the difference between rootstocks was very small. In the early stages of fruit development of ‘Minihyang’ mandarin, most of the organic acids were citric acid, but during maturation and ripening, malic acid was slightly more than citric acid. Unlike the decrease in citric acid, citrate synthase (CS) activity was maintained at a high level throughout the growing period. On the other hand, with the increase in malic acid, the activities of NAD-malic dehydrogenase (MDH) and NADP-malic enzyme (ME) gradually increased. The expression of CS genes related to citric acid synthesis increased gradually with fruit growth, while the expression of aconitase genes related to decomposition increased gradually. MDH and ME genes related to malic acid and oxalic acid synthesis in mitochondria increased with fruit ripening, while cytoplasmic MDH decreased. In addition, in the expression of *phosphoenolpyruvate*

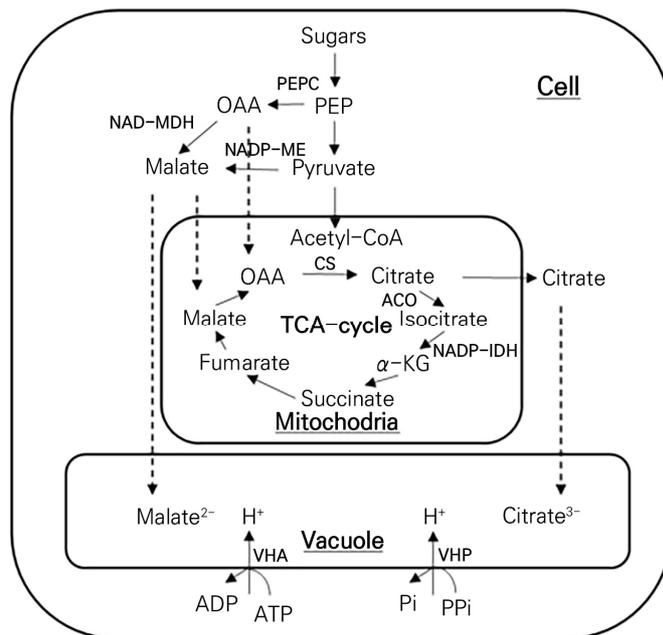
*carboxylase (PEPC)*, *PEPC1* was maintained high throughout the fruit growth period, while *PEPC2* showed a gradual increase. The organic acid content and composition of ‘Minihyang’ fruit were regulated by the degree of citric acid synthesis and decomposition and malic acid synthesis. In terms of accumulation of organic acids in vacuole, *ATPase* genes were expressed at a constant level, while *PPase* genes were not expressed consistently. The results of this study showed that the organic acid content and composition of ‘Minihyang’ fruit were regulated by the degree of citric acid synthesis and decomposition and malic acid synthesis.

**Additional key words:** citrus, enzyme activity, flying dragon, fruit quality, gene expression

## 서 언

과실에서 유기산 함량과 조성은 매우 중요하다. 과실의 유기산 함량은 당도에 따른 당산비를 결정하여 풍미와 품질에 영향을 미칠 뿐만 아니라(Etienne et al., 2013; Lin et al., 2015) adenosine triphosphate(ATP) 합성과 신호전달 물질의 하나로 스트레스 반응 조절에도 중요하게 작용한다(Batista-Silva et al., 2018). 과실의 유기산 함량은 일반적으로 생육초기에 가장 높고 과실의 비대 및 성숙과 더불어 점차 감소하는 경향을 보인다(Zhou et al., 2018; Liao et al., 2019; Moing et al., 2000). 과실의 유기산 조성은 과종 및 품종에 따라 달라질 수 있는데, 유기산 종류에 따라 맛, 향 및 식미 등에 영향을 미치는 2차 대사산물의 함량 변화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Alam et al., 2022).

가용성 당은 대부분 잎에서 합성되어 과실로 전류되어 축적되는 반면, 유기산은 과실에서 합성되고 조절된다(Guo et al., 2016). 유기산의 합성과 축적은 다양한 관련효소들의 작용으로 조절되는 것으로 알려져 있다. 잎으로부터 과실로 전류된 탄소 화물은 세포질의 해당과정에서 포스포엔올피루브산(PEP) 또는 피루브산으로 분해되는데, PEP는 수산 또는 사과산으로의 전



**Fig. 1.** Schematic representation of the major organic acid metabolic pathways in fruit cells. Diagrams are compiled and modified from Jiang et al. (2020) and Guo et al. (2016). PEP, phosphoenolpyruvate; PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; OAA, oxaloacetate; NAD-MDH, NAD-malate dehydrogenase; NADP-ME, NADP-malic enzyme; CS, citrate synthase; ACO, aconitase; NADP-IDH, NADP-isocitrate dehydrogenase; VHA, vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase; VHP, vacuolar H<sup>+</sup>-PPase; TCA-cycle, tricarboxylic acid cycle.

환에 이용될 수 있고, 피루브산은 미토콘드리아로 들어가서 아세틸-CoA로 변환되고 구연산 회로에서 구연산으로의 합성에 이용된다(Hirai, 1982; Chen et al., 2009a, 2009b; Zhou et al., 2018; Zhang et al., 2021; He et al., 2023). 구연산 회로에서 수산과 아세틸-CoA 결합의 구연산 합성에는 Citrate synthase(CS)가 촉매하고, 기질로 소모되는 수산에 대해서는 세포질의 PEP를 PEP carboxylase(PEPC) 촉매로 수산으로 전환하여 직접 공급하거나 세포질의 피루브산을 NADP-malic enzyme (ME) 촉매로 또는 세포질의 수산을 NAD-malate dehydrogenase(MDH) 촉매로 사과산으로 전환하여 구연산 회로의 하위 단계에서 간접 공급하게 된다. 반면 유기산의 축적은 구연산을 이소구연산으로 변환하는 aconitase(ACO) 및 이소구연산을 알파케토글루타르산으로 변환하는 NADP-siocitrate dehydrogenase(IDH)의 활성 감소와 액포로의 유입에 관여하는 vacuolar  $H^+$ -ATPase(VHA) 및 vacuolar  $H^+$ -PPase(VHP)이 활성 증가로 이루어진다(Fig. 1). 과종에 따른 사과산 또는 구연산 등 주요 유기산 성분의 결정에는 유기산 합성 및 분해의 대사과정이 다르게 조절되기 때문이다(Müller et al., 1996; Muñoz-Robredo et al., 2011; Batista-Silva et al., 2018; Zhang et al., 2021). 이들 대사과정에는 품종, 대목, 토양수분 등 재배 환경이 영향하여, 유기산의 조성 및 함량이 달라질 수 있는 것으로 알려져 있다(Violeta et al., 2010). 그러나, 과실의 가용성 당과는 달리 유기산의 조성 및 함량 변화에 미치는 이들 요인들의 생화학적 × 분자생물학적 조절에 대해서는 상대적으로 많이 알려져 있지 않다(Guo et al., 2018).

감귤은 한국을 비롯한 전세계에서 산업적으로 가장 중요한 과실의 하나인데, 이는 당, 유기산, 아미노산, 카로티노이드, 플라보노이드 및 무기염류 등 다양한 건강 기능성 성분들을 다량 함유하고 있는 것과 관계된다(Guo et al., 2016; Sheng et al., 2017; Sadka, 2019). 최근 국내에서는 사과 및 수입과실과의 경쟁력을 높이기 위해 다양한 고당도 및 기능성 품종들이 개발되어 보급되고 있다. 국립원예특작과학원 감귤연구소에서 최근 육성 보급되고 있는 ‘미니향’ 만다린(*Citrus reticulata* Blanco)은 30–40g의 작은 과실 크기임에도 불구하고 13°Brix 내외의 고당도 품질 특성을 가지고 있어 재배 범위가 확대되고 있다(Yun et al., 2019; Hong et al., 2022). 일반적으로 감귤은 탕자(*Poncirus trifoliata*(L.) Raf.)를 대목으로 사용하고 있는데, ‘미니향’ 만다린의 경우 수세가 너무 강하여 꽃눈 형성이 부족하고 충분한 착과량 확보가 여의치 않은 실정이다. 이에 따라, 탕자 대목보다 왜화성이 더 높은 비롱탕자(*P. trifoliata* var. *monstrosa* Swing.)가 대안으로 제시되고 있으나, 아직까지 이들 대목에 따른 ‘미니향’ 만다린 과실의 수량 및 품질 특성에 대해서는 연구가 매우 부족한 실정이다(Hong et al., 2022; Kim et al., 2023).

감귤 등의 과수에서 품종 및 재배조건은 물론 대목도 과실의 가용성 당, 유기산 및 안토시아닌 등 품질관련 성분 함량에 영향을 주는 중요한 요인 중의 하나이다(Continella et al., 2018; Sarkhosh et al., 2021). 감귤에서 가용성 당의 함량은 대사관련 효소 및 유전자 발현 조절과 밀접하게 연관되어 있으며, 대목은 수송부위 활력 및 대사 조절과 관련하여 당 함량에 영향을 주는 것으로 알려지고 있다(Hong et al., 2022). 유기산의 경우도 함량 변화가 대사관련 유전자 발현 조절과 매우 밀접하게 관계되는 것으로 보고되고 있으며(Guo et al., 2016; Alam et al., 2022), 대목은 유기산의 함량은 물론 조성에도 영향을 주는 것으로 보고되고 있다(Legua et al., 2014; Feng et al., 2018).

따라서, 본 연구는 ‘미니향’ 과실에서의 생육단계에 따른 유기산의 조성 및 함량 변화와 대사관련 효소의 활성 및 유전자 발현 양상과의 관계는 물론 대목의 영향 정도를 평가하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물 재료

제주특별자치도 서귀포시 남원읍에 위치한 국립원예특작과학원 감귤연구소(33°30′24″ N, 126°61′19″ E)의 무가온 하우스에 2.9 × 2.0m로 재식된 4년생 ‘미니향’(*C. reticulata* Blanco) 만다린을 시험수로 이용하였다. 대목으로 탕자와 비롱탕자

를 각각 이용하여 고집한 후 양성된 묘목을 재식되었다. 전정, 관수, 시비 및 병해충 관리 등을 포함한 일반 재배관리는 일반 온주밀감 재배법에 준하여 수행하였다.

과실 비대 초기인 8월 13일부터 성숙기인 12월 7일까지 총 4회[개화 후 100일(과실 비대 초기), 150일(비대 후기), 185일(성숙기), 220일(수확기)] 탱자 또는 비룡탕자의 접목 ‘미니향’ 만다린 각 9주의 나무로부터 나무당 9개씩 수관 중간 바깥 부위로부터 평균과 크기의 과실에 대해 무작위로 채취하였다(Hong et al., 2022). 이 중 3개의 과실은 산도 측정에, 3개는 유기산 함량 분석에, 그리고 나머지 3개의 과실은 유전자 발현 분석에 각각 이용하였다. 유기산 함량, 효소 활성 및 유전자 발현 분석용 시료는 수확 후 곧바로 현장에서 과피와 양낭막을 분리한 후 액체질소로 즉시 사양을 동결시킨 다음 분석 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하였다.

### 과실의 당도, 산도 및 유기산 함량 분석

과실의 당도와 산도는 과즙을 착즙한 후 디지털 당산도측정기(GMK-707R, G-won Hitech Ltd., Daegu, Korea)를 이용하여 측정되었다(Hong et al., 2022). 유기산 함량 분석을 위해 급속 동결하여 초저온 냉동고에 보관 중인 사양조직을 해동시킨 후, 2겹의 거즈로 싸서 착즙한 다음 3mL을 취하고 증류수 6mL를 가하여 희석하였다. 이를 15,000xg에서 10분간 원심분리하여 상정액을 취한 후 Sep-Pak C18 cartridge(Waters Co., Milford, MA, USA)와 0.45 $\mu\text{m}$  syringe filter(Cytiva, Co., Maidstone, UK)로 여과한 다음 분석시료로 이용하였다. 유기산의 분석은 CapcellPac C18(4.6  $\times$  250mm, 5 $\mu\text{m}$ , Agilent, USA) 컬럼과 UV-Visible 검출기(SPD-20A, Shimadzu, Japan)가 장착된 HPLC(LC-20AT, Shimadzu, Japan)를 이용하여 이동상 0.01M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ (pH 2.3), 시료 10 $\mu\text{L}$ , 유속 1mL $\cdot\text{min}^{-1}$ , 컬럼온도 30 $^{\circ}\text{C}$ 의 조건에서 수행하였다.

### 효소 추출 및 활성 분석

유기산 대사 관련 효소 추출은 Chen et al.의 방법(2009b)을 일부 변형하여 수행하였다. 급속 동결 사양 시료 2g을 10mL 추출 용액[50mM Tris-HCl(pH 7.5), 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 2mM EDTA, 0.5mM PMSF, 0.1%(v/v) BSA, 1%(v/v) Triton X, 10%(v/v) Glycerol, 2%(v/v) PVPP]과 혼합하여 유발 및 유봉으로 마쇄하고 20,000xg, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리하였다. Desalting buffer [1M Hepes-KOH(pH 7.2), 0.2M  $\text{MgCl}_2$ , 4.8mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10%(v/v) glycerol]를 이용하여 Sephadex PD-10 column(Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ, USA)를 전처리한 후 원심분리 상층액 2.5mL를 loading한 후 3.5mL를 회수하였고, 이를 조효소액으로 사용하였다.

CS의 활성 측정은 Chen et al.의 방법(2009b)을 일부 변형하여 수행하였으며, 1mL 반응액[50mM Tris-HCl(pH 7.8), 0.1mM 5,5'-DTNB, 0.2mM acetyl-CoA, 0.5mM oxaloacetic acid(OAA) 및 조효소액]을 이용하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응을 진행한 후 412nm absorbance( $A_{412}$ )에서 정량하였다. NAD-MDH의 활성 측정은 Merlo et al.의 방법(1993)을 일부 변형하여, 1mL 반응액[50mM Tris-HCl(pH 7.8), 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5mM EDTA, 0.2mM  $\beta$ -NADH, 2mM OAA 및 조효소액], 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응을 진행하여  $A_{340}$ 에서 정량하였다. PEPC의 활성 분석은 Lane et al.의 방법(1969)을 일부 변형하여 1mL 반응액[40mM Tris-HCl(pH 8.5), 10mM  $\text{KHCO}_3$ , 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 2mM PEP, 0.5mM glutathione, 0.24mM NADH 및 조효소액], 25 $^{\circ}\text{C}$ ,  $A_{340}$ 에서 수행되었다. NADP-ME의 활성은 Hirai and Ueno의 방법(1977)을 일부 변형하여 1mL 반응액[80mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.4mM  $\text{MnSO}_4$ , 0.1mM EDTA, 1mM 1,4-DTT, 0.2mM NADP, 3mM malic acid 및 조효소액], 25 $^{\circ}\text{C}$ ,  $A_{340}$ 에서 측정되었다.

효소 활성 산출을 위한 총 단백질 함량은 Bradford의 방법(1976)으로 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad 500-0001, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하여 595nm에서 비색 정량되었다.

**Table 1.** Sequence of primers used in this experiment (Guo et al., 2016)

Gene	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
<i>Phosphoenolpyruvate carboxylase1 (PEPC1)</i>	GTGCGATCCCGTCTATCTGT	AAGGCTCAAGGCCACTTTTT
<i>PEPC2</i>	GGCATGCAAAACACTGGTGA	CATGTTTCATTACGGCTTGGAC
<i>NAD-malate dehydrogenase (MDH)</i>	ATTCGTGGCGGAAGTTTTG	GCGGTTTCGTCAGGTATTCAGT
<i>Malate dehydrogenase1 (MDH1)</i>	GCCATTACATTGTTAGCGTCC	CACCAAGTAGCGGCGGAAT
<i>MDH2</i>	TGCCCCATCGCATCTTCT	CCCAACCAAAGCCTAAAAACCT
<i>NAD-malic enzyme (ME)</i>	GGGGAGAAAGTCCTCATAACAGT	CTCCAGCACCCAGGAACAA
<i>Citrate synthase1 (CS1)</i>	GGTGCCCCCAATATTAACAA	AGAGCTCGGTCCCATATCAA
<i>CS2</i>	ACTGGTGTATGGATGCGACA	TCTTCGTTCTGTGGCATTTG
<i>Aconitase1 (ACO1)</i>	ACAGCCTATGAGCATGGTCTTG	TTGGCAATGGTAGCACGGT
<i>ACO2</i>	GGCAATGATGAAGTGATGGCT	GTTGGAACATGGACCGTCTTT
<i>ACO3</i>	TGCAGCAATGAGGTACAAGGC	TCACACCCAGAAGCATTGGAC
<i>NADP-isocitrate dehydrogenase1 (IDH1)</i>	GAAAATTGGGGATTGGGATT	CAACAGAGGTGCAGTCAAA
<i>IDH2</i>	CAGCGGACATGTGAACAATC	CCGTCCATTTCACGATAGG
<i>IDH3</i>	TACCGGGTTCATCAGAAAGG	AGGCTGCTTCCAGTTTCTCA
<i>Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-c3 (VHA-c3)</i>	GTATGGGACGGCGAAGAGTG	CAAGCGAGACCCGAAGACAA
<i>VHA-D</i>	ATTCTTCCTTTGCCCTGATTG	TTTCACATAAGCAGCACGACA
<i>Vacuolar H<sup>+</sup>-PPase1 (VHP1)</i>	CGAGCAGCAACAGCGACAAGA	CCACAGACCCAGGAAAACGA
<i>VHP3</i>	CCCTGCACATAACAACACAG	TGCTGACTCCTTTCCTTGCT

### Quantitative Real-Time (qRT)-PCR 분석

사양 조직의 RNA 추출은 급속 동결한 사양 시료를 석영사와 PVPP를 함께 막자사발에 넣은 후 액체질소를 가하고 유봉을 이용하여 분말을 만든 다음, Biomedic<sup>®</sup> RNaxzol<sup>™</sup> Reagent(Biomedic Co., Ltd., Bucheon, Korea)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 수행되었다. 추출한 총 RNA의 정량 및 정성 분석은 비색계(DeNovix DS-11+, DeNovix, Inc., Wilmington, DE, USA)와 1.2%(v/v) 아카로오스 젤의 전기영동으로 수행되었다. cDNA는 PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent kit(TaKaRa, Inc., Kusatsu, Japan)를 이용하여 합성되었다. *CitPEPC1*, *CitPEPC2*, *CitCS1*, *CitCS2*, *CitACO1*, *CitACO2*, *CitACO3*, *CitNAD-MDH*, *CitMDH1*, *CitMDH2*, *CitNAD-ME*, *CitNADP-IDH1*, *CitNADP-IDH2*, *CitNADP-IDH3*, *CitVHA-c3*, *CitVHA-D*, *CitVHP1*, *CitVHP3*에 대한 프라이머를 Guo et al.(2016)가 제시한 서열정보를 이용하여 제작하였다(Table 1). 총 20μL의 반응액[4μL cDNA, 0.8μL forward and reverse gene-specific primers(각 10pmol/μL), 10μL ToPreal qPCR 2x premix(Enzynomics, Inc., Daejeon, Korea), 5.2μL 멸균수]에 대해 LightCycler<sup>®</sup> 480 II real-time PCR system(Roche Diagnostics GmbH, Ltd., Mannheim, Germany)을 이용하여 95°C에서 5분 변성 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 20초, 72°C에서 30초의 조건으로 총 45회 반복하여 qRT-PCR을 수행하였다. qRT-PCR은 3회의 생물학적 반복과 2회의 기술적 반복으로 수행되었고, 유전자 발현량을 comparative C<sub>T</sub> 법(Schmittgen and Livak, 2008)에 의해 2-(Ct target gene-Ct housekeeping gene, β-actin) 값으로 산출하였다.

### 통계 분석

통계적 유의성 검정은 SigmaStat 3.0 software(Systat Software Inc., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여  $p = 0.05$  수준에서 T-test로 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 과실의 당도, 산도 및 유기산 함량 변화

과실의 생육 및 대목에 따른 ‘미니향’ 만다린 과실의 당도와 산도에 미치는 영향을 Table 2에 나타내었다. 과실 생육에 따른 당도 및 산도의 변화는 ‘하례조생’ 및 ‘궁천조생’ 온주밀감의 경우와 매우 유사하였으나, 당도는 1.0°Brix 정도 높고, 산도는 0.3% 정도 낮은 경향이였다(Kim et al., 2012). 대목에 따른 과실의 당도는 생육기 내내 비룡탱자 대목에서 탱자에 비해 높게 나타나는 반면, 산도는 비대 초기를 제외하면 거의 차이가 없었다. 당도는 과실 비대 초기의 차이가 수확기까지 비슷한 수준으로 유지되어 0.5–0.9°Brix 내외의 차이를 보였다. 반면 산도는 과실 비대 초기 0.6%의 함량 차이를 보였으나, 성숙기에는 0.1% 이내로 미미한 차이를 나타냈다. 이는 비룡탱자를 이용한 오렌지와 온주밀감에서 보고된 연구결과와 매우 유사하였다(Noda et al., 2001; Mademba-Sy et al., 2012; Andersen and Brodbeck, 2015; Domingues et al., 2021). 일반적으로 감귤에서 대목은 과실의 당도와 산도에 모두 크게 영향을 주는 것으로 알려져 있는데(Bassal, 2009; Yildiz et al., 2013; Legua et al., 2014; Raddatz-Mota et al., 2019; Caruso et al., 2020), 본 연구결과와는 차이가 있었다. ‘만다레드’ 만다린의 경우 과실의 산도는 성숙기 기상 환경의 영향을 받아 달라질 수도 있으며, 대목에 따라 그 정도가 다르게 보고된 바 있다(Caruso et al., 2020). 또한 나무의 수령에 따른 과실 산도의 영향을 보면 ‘Gunda Gunda’ 오렌지의 경우 27년생까지 유기산 함량이 계속 증가하였으나, ‘Kinnow’ 만다린의 경우 18년생까지 증가하다, 이후 감소하는 경향이 보고되었다(Khalid et al., 2012; Aregay et al., 2021). 그러므로 과실 산도에 미치는 대목의 영향 정도를 정확히 평가하기 위해서는 수령 및 재배환경 등을 고려하여 추가적으로 중장기적인 연구가 필요하다고 판단되었다(Kim et al., 2012).

‘미니향’ 과실의 대목 및 생육단계에 따른 유기산 함량을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 과실 비대 초기에 구연산은 사과산의 10배 내외의 높은 함량을 나타내었으나, 이후 점차 감소하여 성숙 후기 및 수확기에는 사과산 함량보다도 약간 낮아지는 수준을 나타내었다. 구연산과 사과산 이외에 아스코브산, 수산, 석신산, 젖산 등이 소량 검출되었으나, 함량의 변화는 미미하여, 수확기 아스코브산을 제외하면 유의차는 없었다. 본 연구결과와는 달리 온주밀감, 오렌지 등 대부분 감귤에서의 유기산은 구연산이 60–90% 내외를 차지하여 사과산의 1.5–10배 정도 높게 함유하고 있으며, ‘하례조생’ 온주밀감의 경우 성숙기의 구연산은 5.52mg·g<sup>-1</sup>, 사과산 2.34mg·g<sup>-1</sup>의 수준으로 보고되어 왔다(Yamaki, 1989; Kim et al., 2012; Wang et al., 2014; Ordóñez-Díaz et al., 2020). 또한 ‘미니향’의 교배친인 ‘기주밀감’ 및 ‘병감’의 유기산 조성에서도 매우 유사한 경향을 보이고 있다(Chen et al., 2012; Ornelas-Paz et al., 2017). 그러므로 ‘미니향’ 만다린의 높은 사과산 함유 특성은 다른 품종과의 차별성을 부여할 수 있는 특성으로 판단되나, 그 유전적 배경에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다. 과실 생육 초기와는 달리 성숙기 유기산 함량의 감소는 과실 성숙을 촉진하기 위한 다양한 성분 합성과 관련한 호흡 기질로서의 이용과 관계된다(Seymour et al., 2013). 그러나 ‘미니향’ 과실에서의 구연산 함량의 급속한 감소가 호흡기질로서의 이용에 의한 것인지는 명확치 않다. 더욱이 구연산 및 사과산 등의 유기산들은 신호전달 및 질소대사와 관련하여 과실의 크기에도 영향을 주는 것으로 알려지고 있다

**Table 2.** Changes of soluble solids and acidity at days after anthesis (DAA) in the fruit of ‘Minihyang’ mandarin grafted on trifoliolate orange (TO) and Flying Dragon (FD) rootstocks

DAA	Soluble solids (°Brix)			Titratable acidity (%)		
	TO	FD	Significance <sup>y</sup>	TO	FD	Significance
100	7.1 ± 0.08 <sup>z</sup>	7.8 ± 0.09	*	3.22 ± 0.22	3.82 ± 0.06	*
150	8.2 ± 0.11	9.1 ± 0.30	*	0.73 ± 0.03	0.83 ± 0.06	ns
185	11.0 ± 0.23	11.5 ± 0.18	ns	0.65 ± 0.04	0.70 ± 0.06	ns
220	12.6 ± 0.15	13.5 ± 0.10	*	0.67 ± 0.02	0.74 ± 0.04	ns

<sup>z</sup>All values represent mean ± SE. (n = 9).

<sup>y</sup>\* and ns indicate significant and non-significant by T-test at 5% level, respectively.

(Batista-Silva et al., 2018). 이전의 연구에서 비룡탕자는 탕자에 비해 성숙기 ‘미니향’ 과일 크기를 증가시켰는데(Hong et al., 2022), 유기산의 함량의 변화와는 연관성이 낮은 것으로 보아졌다. Raddatz-Mota et al.(2019)는 감귤류 5개의 대목에서 레몬 과실의 유기산 함량을 비교하였을 때, 볼카머 레몬과 비룡탕자 대목의 경우 다른 대목에 비해 구연산 함량이 증가하였으나 다른 유기산 성분이 변화에는 영향하지 않았다고 하였다. 또한 Aguilar-Hernández et al.(2020)의 연구에서는 대목과 품종의 여러 조합에서 구연산과 사과산은 차이를 보이지 않은 반면, 아스코브산과 수산의 함량은 차이가 있었다고 하였다. 그러므로 본 연구에서의 ‘미니향’ 만다린 과실의 유기산 함량에 미치는 대목의 영향은 당도에 비해 매우 미미한 수준이며, 이는 접수 품종과 대목 품종 간의 조합 반응에 의한 것으로 간주된다.

### 유기산 대사관련 효소 활성의 변화

‘미니향’ 과실의 생육단계 및 대목에 따른 유기산 대사관련 효소 활성은 Fig. 2와 같다. 구연산 합성의 핵심단계로 알려진 4개의 효소 중에서는 NAD-MDH가 18.8–65.7nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein 내외로 가장 높고, 이어서 CS 24.3–36.1nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein 내외, NADP-ME 0.2–1.5nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein 내외, PEPC 0.12–0.36nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein 내외 순으로 나타났다. PEPC의 활성은 과실 성숙기에 해당하는 만개 후 185일까지 0.12–0.14nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein 매우 낮은 수준으로 유지되다가 익음 단계인 만개 후 220일에 0.21–0.36nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein 수준까지 약간 증가하였으며, 특히 비룡에서 활성 증가의 폭이 다소 크게 나타났다. NAD-MDH는 과실 비대 초기에 해당하는 만개 후 100일에는 18.8–19.3nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein 수준으로 다소 낮은 수준이었으나, 비대기 후기에 해당하는 만개 150일 이후부터 활성이 55.2–57.5

**Table 3.** Organic acid contents (mg·g<sup>-1</sup>FW) at different days after anthesis (DAA) in the fruits of ‘Minihyang’ mandarin grafted on trifoliolate orange (TO) and Flying Dragon (FD) rootstocks

DAA	Rootstock	Citric acid	Malic acid	Ascorbic acid	Oxalic acid	Succinic acid	Lactic acid	Total
100	TO	37.56 ± 0.90 <sup>z</sup> (90.0) <sup>y</sup>	3.52 ± 0.17 (8.4)	0.52 ± 0.03 (1.2)	0.10 ± 0.01 (0.2)	0.04 ± 0 (0.1)	- <sup>x</sup>	41.73 ± 1.06 (100)
	FD	37.78 ± 0.69 (91.0)	3.12 ± 0.19 (7.5)	0.46 ± 0.06 (1.1)	0.09 ± 0.01 (0.2)	0.04 ± 0 (0.1)	-	41.50 ± 0.80 (100)
	Significance <sup>w</sup>	ns	ns	ns	ns	ns		ns
150	TO	7.79 ± 0.27 (64.0)	3.50 ± 0.16 (28.8)	0.78 ± 0.08 (6.4)	0.06 ± 0 (0.5)	0.03 ± 0 (0.3)	-	12.17 ± 0.27 (100)
	FD	10.11 ± 0.19 (71.3)	3.19 ± 0.10 (22.5)	0.78 ± 0.04 (5.5)	0.06 ± 0 (0.5)	0.04 ± 0 (0.3)	-	14.18 ± 0.13 (100)
	Significance	*	ns	ns	ns	ns		*
185	TO	4.93 ± 0.82 (40.7)	6.49 ± 0.49 (53.6)	0.54 ± 0.03 (4.5)	0.08 ± 0.01 (0.7)	0.04 ± 0 (0.3)	0.02 ± 0.01 (0.2)	12.11 ± 1.34 (100)
	FD	5.13 ± 0.31 (45.2)	5.68 ± 0.21 (50.0)	0.44 ± 0.04 (3.9)	0.06 ± 0.00 (0.5)	0.04 ± 0 (0.3)	0.01 ± 0 (0.1)	11.36 ± 0.46 (100)
	Significance	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
220	TO	5.52 ± 0.17 (43.1)	6.62 ± 0.25 (51.7)	0.51 ± 0.02 (4.0)	0.07 ± 0 (0.6)	0.04 ± 0 (0.3)	0.04 ± 0 (0.3)	12.80 ± 0.13 (100)
	FD	5.92 ± 0.03 (43.7)	7.07 ± 0.33 (52.2)	0.41 ± 0.02 (3.0)	0.07 ± 0 (0.5)	0.05 ± 0 (0.3)	0.03 ± 0 (0.2)	13.54 ± 0.32 (100)
	Significance	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns

<sup>z</sup>All values represent mean ± SE (n = 3).

<sup>y</sup>All values in parentheses indicate percentage.

<sup>x</sup>Represents not detectable

<sup>w</sup>\* and ns indicate significant and non-significant by T-test at 5% level, respectively.

nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein 수준으로 증가하여 높은 수준으로 유지되었다. 대목 간 NAD-MDH 활성의 유의적인 차이는 없었다. NADP-ME의 활성은 만개 100일 후에는 0.1nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein 이하로 매우 미미하였으나, 만개 150일 후부터 증가하기 시작하여 만개 후 185일 및 220일에는 1.0–1.5nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein 내외로 높게 유지되는 경향이 있었다. 대목에 따른 유의적인 차이는 없었으나, 만개 후 165일에는 비룡탕자에서, 그리고 만개 후 220일에는 탕자에서 다소 높은 경향을 나타냈다. CS의 활성은 과실 생육기 내내 24.3–36.1nmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> protein 내외로 높은 수준을 유지하였으며, 만개 후 100일부터 220일까지 서서히 감소하는 경향이 있었다. 대목에 의한 유의적인 차이는 없었으나, 비룡탕자에서 만개 후 185일 및 220일에 약간 낮은 경향을 보였다.

과실 생육기 유기산 함량과 효소 활성을 비교할 때, 만개 100일 후의 과실 비대 초기 높은 구연산과 낮은 사과산의 함량과 비대 후기인 만개 후 150일 이후 구연산의 감소 및 사과산의 증가는 CS 활성 감소와 NAD-MDH 및 NADP-ME 활성 증가와 관계되는 것으로 보아졌다(Table 3 and Fig. 2). 사과산의 합성은 주로 PEPC와 NAD-MDH의 활성과 관계된다고 보고(Miller et al., 1998; Jiang et al., 2019; Moing et al., 2000)되어 왔는데, 본 연구결과에서의 NAD-MDH 및 NADP-ME 활성 증가에도 불구하고 PEPC 활성이 낮은 것과는 차이가 있었다. PEPC의 활성은 기질 특이성이 높아 낮은 수준에서도 수산 합성에 기여하며(Zhang et al., 2021), PEP를 CS의 기질인 피르루산 및 acety-CoA의 공급을 촉진하기 위한 기작과 관계되는 것으로 보여지나, 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다. 또한 과실에서 구연산 함량의 변화는 CS의 활성보다는 aconitase(ACO)의 활성과 관계 깊은 것으로 알려져 있다(Sadka et al., 2000; Sadka et al., 2001). 이와 관련한 ACO 활성 분석에 대해서도 추가적인 연구가 요구된다.

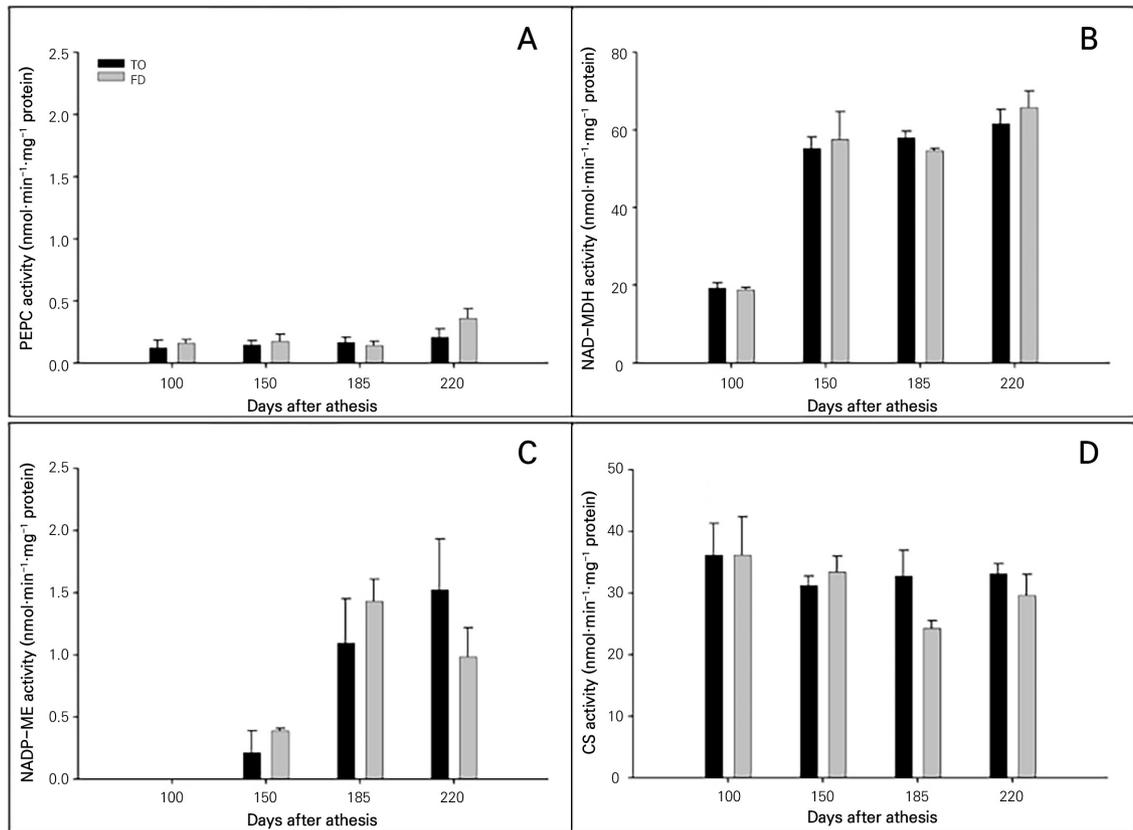
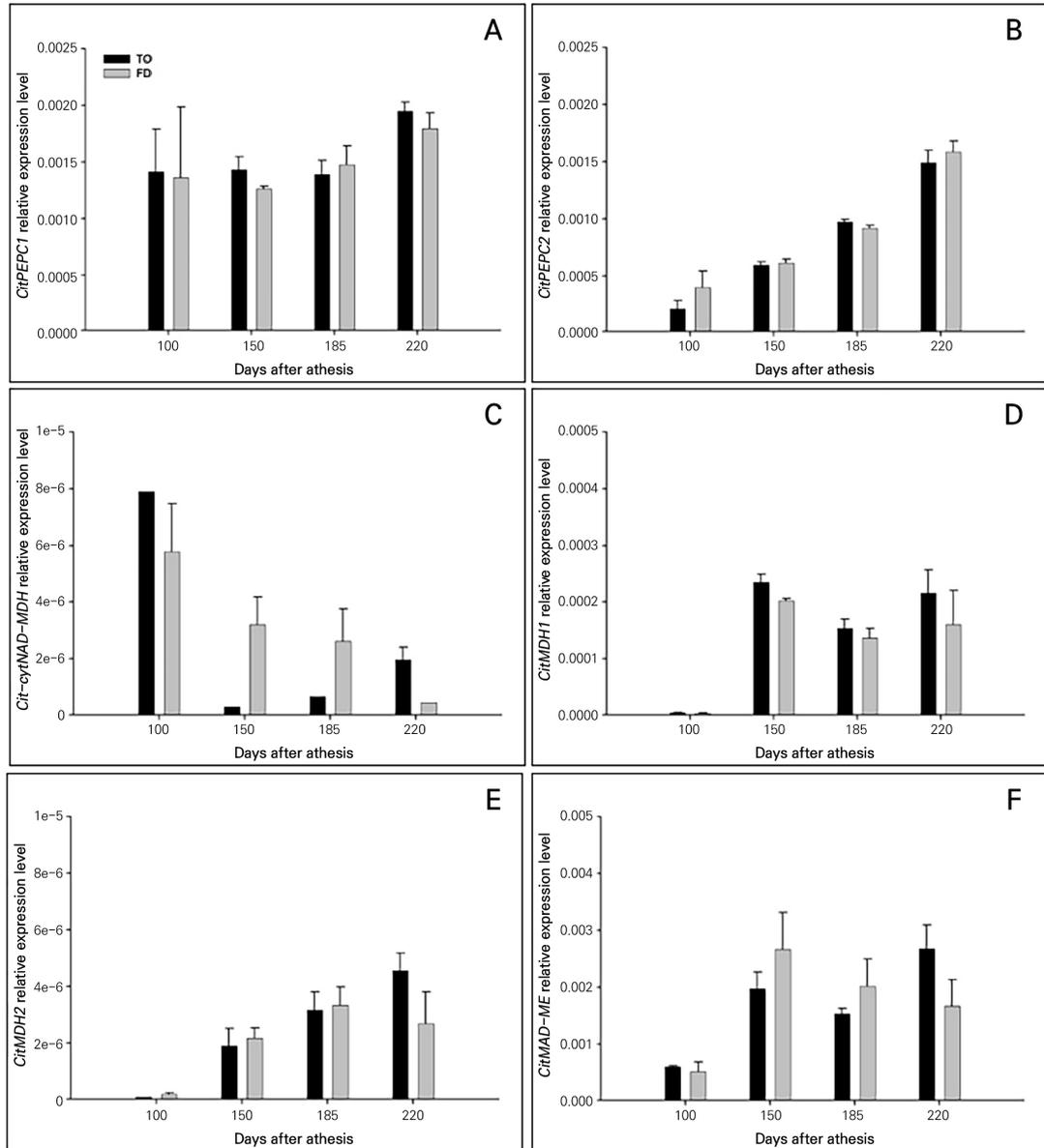


Fig. 2. Organic acid metabolic enzyme activities at different days after anthesis in the fruit of 'Minihyang' mandarin grafted on trifoliolate orange (TO) and Flying Dragon (FD) rootstocks. (A) PEPC activity; (B) NAD-MDH activity; (C) NADP-ME activity; (D) CS activity. Vertical bars represent mean ± SE (n = 3).

### 유기산 대사관련 유전자 발현의 변화

‘미니향’ 과실의 생육단계 및 대목에 따른 유기산 대사관련 유전자의 발현 분석 결과는 Fig. 3과 같다. PEP로부터의 수산 합성 관련 *PEPC1*의 발현은 과실 생육기간 내내 일정하게 유지되는데 반해, *PEPC2*의 발현은 성숙 과정에서 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3A and 3B). 전체적인 *PEPC*의 발현 정도는 높은 편은 아니었다. 수산으로부터 사과산 합성을 조절하는 *NAD-MDH*의 발현은 매우 낮은 수준이었으나, 대목에 따른 과실 생육기 발현 정도는 다르게 나타났다(Fig. 3C). 탕자의 경우



**Fig. 3.** Real-time fluorescence quantitative PCR analysis for the relative expression of organic acid metabolism-related genes at different days after anthesis in the fruits of ‘Minihyang’ grafted on trifoliate orange (TO) and Flying Dragon (FD) rootstocks. (A) *Citrus phosphoenolpyruvate carboxylase1* (*CitPEPC1*); (B) *CitPEPC2*; (C) *Citrus cytosolic NAD malate dehydrogenase* (*CitcytNAD-MDH*); (D) *CitMDH1*; (E) *CitMDH2*; (F) *Citrus malic enzyme* (*CitMAD-ME*); (G) *Citrus citric acid synthase1* (*CitCS1*); (H) *CitCS2*; (I) *Citrus aconitase1* (*CitAco1*); (J) *CitAco2*; (K) *CitAco3*; (L) *Citrus NADP-isocitrate dehydrogenase1* (*CitNADP-IDH1*); (M) *CitNADP-IDH2*; (N) *CitNADP-IDH3*; (O) *Citrus vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-c3* (*CitVHA-c3*); (P) *CitVHA-D*; (Q) *Citrus vacuolar H<sup>+</sup>-PPase1* (*CitVHP1*); (R) *CitVHP3*. Vertical bars represent mean  $\pm$  SE (n = 3).

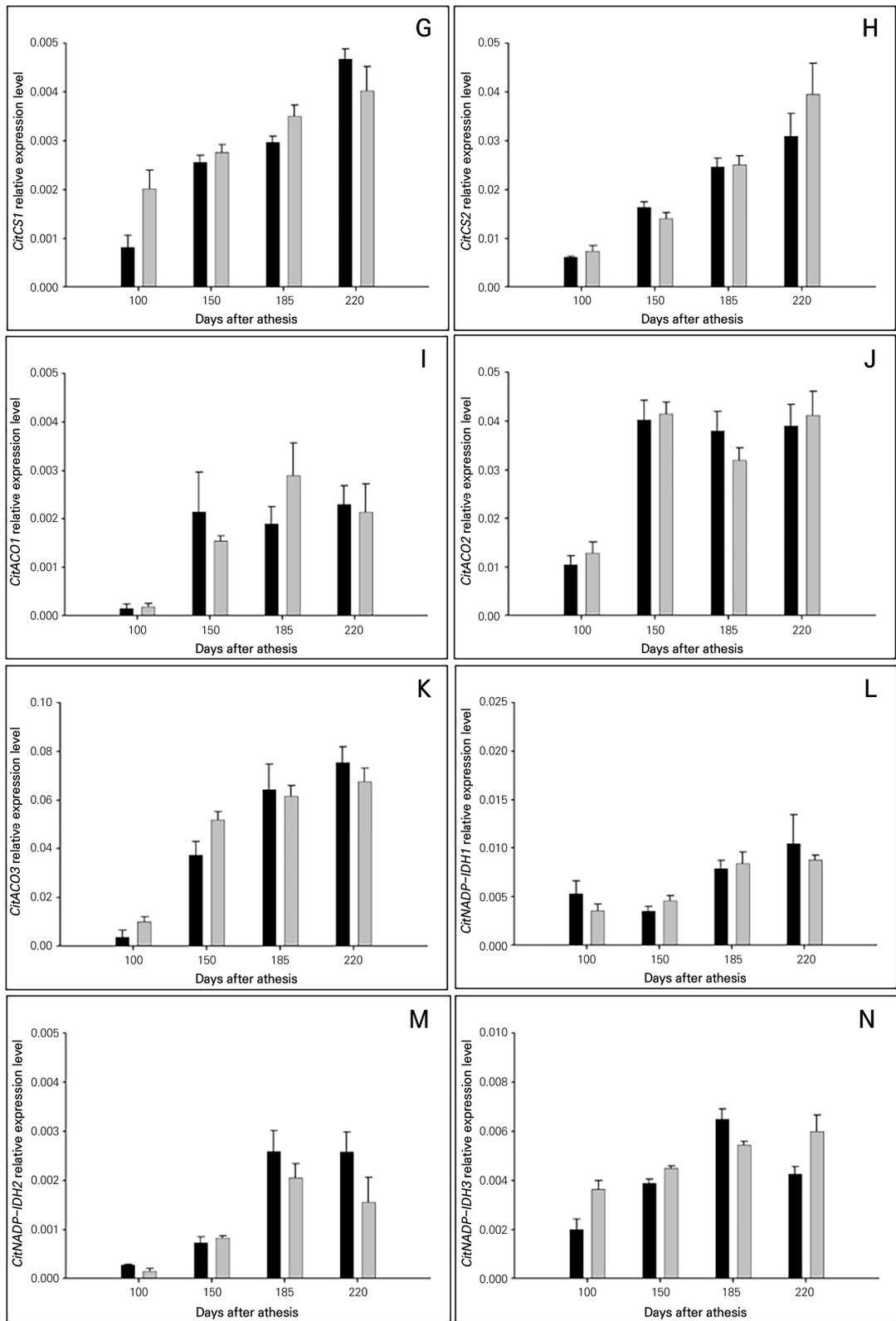


Fig. 3. Real-time fluorescence quantitative PCR analysis for the relative expression of organic acid metabolism-related genes at different days after anthesis in the fruits of 'Minihyang' grafted on trifoliate orange (TO) and Flying Dragon (FD) rootstocks (Continued).

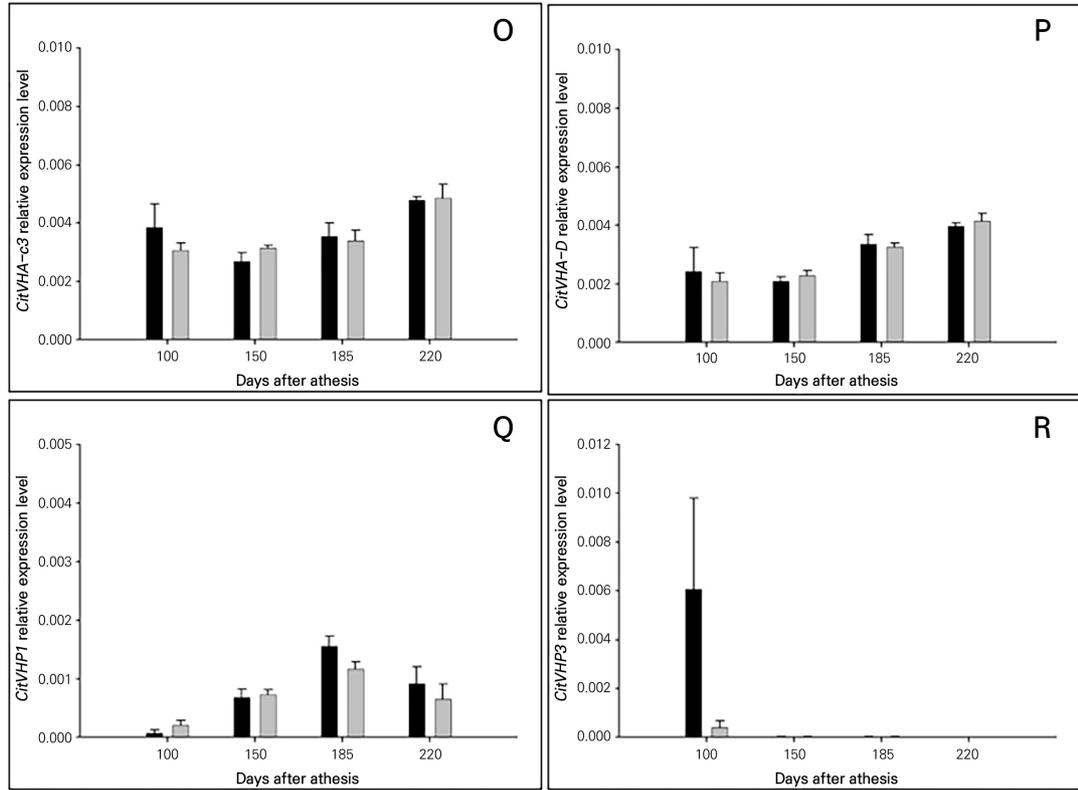


Fig. 3. Real-time fluorescence quantitative PCR analysis for the relative expression of organic acid metabolism-related genes at different days after anthesis in the fruits of ‘Minihyang’ grafted on trifoliolate orange (TO) and Flying Dragon (FD) rootstocks (Continued).

과실 비대 초기에 다소 높은 수준에서 성숙 초기에 급속히 낮아져 유지되는 반면, 비룡탕자의 경우 점진적으로 감소하는 양상을 보였다. 구연산 회로에서 사과산으로부터 수산 합성을 조절하는 *MDH1*과 *MDH2*의 발현 수준은 매우 낮은 수준이었으나, 대체로 과실 생육과 더불어 증가하였다. 또한 이들 *isogene* 간 발현 양상은 약간 차이가 있었고 대목 간 차이는 거의 없었다. 미토콘드리아 내에서 피루브산으로부터 사과산 합성을 조절하는 *ME*의 발현은 다른 유전자의 발현과 비교할 때 중간 수준이었으며 과실 비대 초기보다 성숙기에 높게 나타났고 대목의 영향은 일정하지 않았다. 이들 유전자들은 과실 생육 초기보다 성숙기에 사과산이 증가한 것과 일치하는 경향이였다. 그리고 전반적인 대사 조절의 *PEPC* 및 *MDH*의 유전자 발현은 *PEPC* 및 *MDH* 활성과도 거의 일치하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 또한 이들 결과는 ‘벤디자오’ 만다린(Alam et al., 2022)과 백향과(Zhang et al., 2021)에서 보고된 것과도 매우 유사하게 나타났다.

구연산 합성과 관련한 *CS1*와 *CS2*의 발현은 과실 생육과 더불어 점차 증가하였으며, *CS1*보다는 *CS2*의 발현이 높게 나타났다(Fig. 3G and 3H). 구연산의 분해를 촉매하는 *ACO*의 경우는 3개 *isogenes*의 발현 양상은 비슷한 경향을 보였는데, 과실 비대 초기에는 낮았으나 성숙기에 증가하여 높게 유지되었다. *ACO1*의 발현이 다른 *ACO2* 및 *ACO3*의 발현보다 낮았으며, 대목에 따른 차이는 거의 나타나지 않았다. Isocitrate의 석신산으로 분해 관련 *NADP-IDH*의 발현은 대체로 3종의 *isogenes* 모두 과실 생육과 더불어 점차 증가하는 경향이였으며, 대목 간의 차이는 나타나지 않았다. 이들 유전자들은 과실 비대 초기의 구연산 함량 증가 및 성숙과 더불어 구연산 함량이 점차 감소하는 것과 밀접하게 관계되었다. 과실 생육 초기에는 구연산의 분해와 관계되는 *ACO* 및 *IDH*의 활성과 관계되었으며 *CS1*의 발현 증가와는 반대의 경향이였다. 이는 과실 생육과 더불어 구연산 함량보다는 분해의 증가에 기인함을 보여주는 것이라고 할 수 있다(Wang et al., 2014; Jiang et al., 2020; Zhang et al., 2021;

Alam et al., 2022). 한편 과실 생육과 더불어 점차 증가하는 *CS1*와 *CS2*의 발현 양상은 과실 생육기 내내 거의 같은 수준으로 유지되는 *CS* 활성과는 다소 차이가 있었다(Fig. 2). 이는 백향과에서의 *CS* 발현과도 다른 양상이었다(Zhang et al., 2021). 그러므로 과실 성숙기 *CS1*와 *CS2*의 발현 증가는 전사 후 변형과 관계되어 *CS* 활성이 생육 초기와 동등한 수준으로 유지되는 것으로 보아졌으며, 추가적인 연구가 필요하다고 판단되었다.

액포 내 유기산의 축적과 관련한 *VHA* 및 *VHP*의 경우 *VHA-c3* 및 *VHA-D*의 발현은 서로 비슷하게 성숙과 더불어 서서히 증가하는 양상이었으나, *VHP1*의 발현은 성숙과 더불어 증가하다가 익음 단계에서 다시 감소하는 경향이었고 *VHP3*의 발현은 생육 초기에만 나타나고 이후 매우 미미한 수준에서 유지되어 *VHA* 및 *VHP*의 발현 양상은 달랐으며, *VHP*의 *isogenes* 간에도 발현 양상은 다르게 나타났다. 본 연구결과는 Guo et al.(2016)이 오렌지에서 보고한 바와 매우 유사하였다. 이는 감귤의 유기산의 액포 내 축적과 관련해서는 *VHA*보다는 *VHP*의 역할이 보다 중요하고, 가용성 당의 액포 내 축적과 관련해서는 *VHP*보다는 *VHA*의 역할이 보다 더 중요하게 작용함을 보여주는 것이라 판단되었다. 그러나 과실 생육과 관련한 유기산의 함량 증가와 액포막  $H^+$  펌프와 관계되는 *VHP*와 *VHA*의 역할에 대해서는 추가적으로 보다 상세하게 연구할 필요가 있다고 보아진다.

## 초 록

‘미니향’ 만다린에서 과실 생육단계에 따른 유기산 함량 변화와 대목에 의한 영향을 평가하고자 본 연구를 수행하였다. ‘미니향’ 과실의 적정산도는 비대 초기에 높았고, 성숙기 이후 급격히 감소하여 낮게 유지되었다. 탱자보다 비룡탕자 대목에서 생육 초기에 유의적으로 높은 수준이었으나, 이후 성숙기의 차이는 미미하였다. 유기산의 함량은 적정 산도와 유사한 경향이었으나, 대목 간의 차이는 매우 적은 편이었다. 과실 생육 초기에는 대부분 구연산이었으나, 성숙기 이후는 오히려 사과산이 구연산보다 약간 많은 경향이었다. 구연산의 감소와 달리 citrate synthase(*CS*) 활성은 생육기 내내 높게 유지되었다. 반면 사과산의 증가와 더불어 NAD-malic dehydrogenase(*MDH*)와 NADP-malic enzyme(*ME*)의 활성은 점차 증가하는 경향이였다. 한편 구연산 합성관련 *CS* 유전자들의 발현은 과실 생육과 더불어 점차 증가하였고, 분해관련 aconitase 유전자들의 발현은 점차 증가하는 경향이였다. 사과산 및 수산 합성관련 미토콘드리아 내 작용 *MDH* 및 *ME* 유전자들은 과실 성숙과 더불어 증가하는 경향이였으나, 세포질 작용 *MDH*는 반대로 감소하는 경향이였다. 또한 phosphoenolpyruvate carboxylase(*PEPC*)의 발현에서는 *PEPC1*은 과실 생육기 내내 높게 유지된 반면 *PEPC2*는 점차 증가하는 경향을 나타냈다. 액포 내 유기산 축적과 관련해서는 *ATPase* 유전자들은 발현이 일정하게 유지되는 반면, *PPase* 유전자들의 발현은 일정하지 않았다. 본 연구결과 ‘미니향’ 과실의 유기산 함량 및 조성은 구연산 합성 및 분해와 사과산 합성 정도에 의해 조절되는 것으로 나타났다.

**추가 주요어 :** 감귤, 효소 활성, 비룡탕자, 과실 품질, 유전자 발현

## Literature Cited

- Aguilar-Hernández MG, Sánchez-Rodríguez L, Hernández F, Forner-Giner MÁ, Pastor-Pérez JJ, Legua P (2020) Influence of new citrus rootstocks on lemon quality. *Agron J* 10:974. doi:10.3390/agronomy10070974
- Alam SM, Liu DH, Liu YZ, Han H, Hussain SB, Ateeq M (2022) Molecular elucidation for the variance of organic acid profile between citrus top and bottom canopy fruits. *Sci Hortic* 302:111181. doi:10.1016/j.scienta.2022.111181
- Andersen PC, Brodbeck BV (2015) Yield, tree size, and fruit quality of mature ‘Owari’ and ‘Brown Select’ Satsuma on *Poncirus trifoliata* ‘Rubidoux’ and ‘Flying Dragon’ Rootstocks in North Florida. *HortScience* 50:1650-1653. doi:10.21273/HORTSCI.50.11.1650
- Aregay N, Belew D, Zenebe A, Haile M, Gebresamuel G, Girma A (2021) Tree age and harvesting season affected physico-chemical and bioactive compounds of elite type of Gunda Gundo Orange (*Citrus* Spp) in the northern Ethiopia. *Inter J Fruit Sci* 21:26-39. doi:10.1080/15538362.2020.1852150
- Bassal MA (2009) Growth, yield and fruit quality of ‘Marisol’ clementine grown on four rootstocks in Egypt. *Sci Hortic* 119:132-137. doi:

10.1016/j.scienta.2008.07.020

- Batista-Silva W, Nascimento VL, Medeiros DB, Nunes-Nesi A, Ribeiro DM, Zsögön A, Araújo WL** (2018) Modifications in organic acid profiles during fruit development and ripening: correlation or causation? *Front Plant Sci* 9:1689. doi:10.3389/fpls.2018.01689
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Caruso M, Continella A, Modica G, Pannitteri C, Russo R, Salonia F, Arlotta C, Gentile A, Russo G** (2020) Rootstocks influence yield precocity, productivity, and pre-harvest fruit of mandared pigmented mandarin. *Agron J* 10:1305. doi:10.3390/agronomy10091305
- Chen FX, Liu XH, Chen LS** (2009a) Developmental changes in pulp organic acid concentration and activities of acid-metabolising enzymes during the fruit development of two loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars differing in fruit acidity. *Food Chem* 114:657-664. doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.003
- Chen LS, Tang N, Jiang HX, Yang LT, Li Q, Smith BR** (2009b) Changes in organic acid metabolism differ between roots and leaves of *Citrus grandis* in response to phosphorus and aluminum interactions. *J Plant Physiol* 166:2023-2034. doi:10.1016/j.jplph.2009.06.010
- Chen M, Kiang Q, Yin XR, Lin Q, Chen JY, Allan AC, Xu XJ, Chen KS** (2012) Effect of hot air treatment on organic acid- and sugar-metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit. *Sci Hortic* 147:118-125. doi:10.1016/j.scienta.2012.09.011
- Continella A, Pannitteri C, La Malfa S, Legua P, Distefano G, Nicolosi E, Gentile A** (2018) Influence of different rootstocks on yield precocity and fruit quality of ‘Tarocco Scirè’ pigmented sweet orange. *Sci Hortic* 230:62-67. doi:10.1016/j.scienta.2017.11.006
- Domingues AR, Marcolini CDM, Gonçalves CHDS, Resende JTVD, Roberto SR, Carlos EF** (2021) Rootstocks genotypes impact on tree development and industrial properties of ‘Valencia’ sweet orange juice. *Horticulturae* 7:141. doi:10.3390/horticulturae7060141
- Etienne A, Génard M, Lobit P, Mbéguié-A-Mbéguié D, Bugaud C** (2013) What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *J Exp Bot* 64:1451-1469. doi:10.1093/jxb/ert035
- Feng S, Niu L, Suh JH, Hung WL, Wang Y** (2018) Comprehensive metabolomics analysis of mandarins (*Citrus reticulata*) as a tool for variety, rootstock, and grove discrimination. *J Agric Food Chem* 66:10317-10326. doi:10.1021/acs.jafc.8b03877
- Guo LX, Shi CY, Liu X, Ning DY, Jing LF, Yang H, Liu YZ** (2016) Citric acid accumulation-related gene expression and/or enzyme activity analysis combined with metabolomics provide a novel insight for an orange mutant. *Sci Rep* 6:1-12. doi:10.1038/srep29343
- Guo SH, Niu YJ, Zhai H, Han N, Du YP** (2018) Effects of alkaline stress on organic acid metabolism in roots of grape hybrid rootstocks. *Sci Hortic* 227:255-260. doi:10.1016/j.scienta.2017.09.051
- He G, Chen X, Hou X, Yu X, Han M, Qiu S, Li Y, Qin S, Wang F** (2023) UPLC-Q-TOF/MS-based metabolomic analysis reveals the effects of asomate on the citrus fruit. *Curr Res Food Sci* 6:100523. doi:10.1016/j.crfs.2023.100523
- Hirai M** (1982) Accelerated sugar accumulation and ripening of loquat fruit by exogenously applied ethylene. *J Jpn Soc Hortic Sci* 51:159-164. doi:10.2503/jjshs.51.159
- Hirai M, Ueno I** (1977) Development of citrus fruits: Fruit development and enzymatic changes in juice vesicle tissue. *Plant Cell Physiol* 18:791-799
- Hong HR, Oh EU, Han SG, Yun SH, Kim HB, Song KJ** (2022) Characterization of soluble sugar content, related enzyme activity and gene expression in the fruits of ‘Minihyang’ mandarin on different rootstocks. *Horticulturae* 8:47. doi:10.3390/horticulturae8010047
- Jiang CC, Fang ZZ, Zhou DR, Pan SL, Ye XF** (2019) Changes in secondary metabolites, organic acids and soluble sugars during the development of plum fruit cv. ‘Furongli’ (*Prunus salicina* Lindl.). *J Sci Food Agr* 99:1010-1019. doi:10.1002/jsfa.9265
- Jiang Z, Huang Q, Jia D, Zhong M, Tao J, Liao G, Huang C, Xu X** (2020) Characterization of organic acid metabolism and expression of related genes during fruit development of *Actinidia eriantha* ‘Ganmi 6’. *Plants* 9:332. doi:10.3390/plants9030332
- Khalid S, Malik AU, Saleem BA, Khan AS, Khalid MS, Amin M** (2012) Tree age and canopy position affect rind quality, fruit quality, and rind nutrient content of ‘Kinnow’ mandarin (*Citrus nobilis* Lour × *Citrus deliciosa* Tenora). *Sci Hortic* 135:137-144. doi:10.1016/j.scienta.2011.12.010
- Kim SB, Oh EU, Park JH, Yun SH, Oh HW, Kang JB, Koh SW, Oh HJ, Song KJ** (2012) Fruit growth, sugar, and acid characteristic in leafy and leafless fruits of Satsuma mandarin. *Kor J Hort Sci Technol* 30:642-649. doi:10.7235/hort.2012.12129
- Kim SS, Park YS, Han SG** (2023) Characterization of flavonoid, free amino acid, volatiles components of ‘Minihyang’ fruit, a new cultivar *Citrus reticulata*. *Korean J Breed Sci* 55:244-253. doi:10.9787/KJBS.2023.55.3.244
- Lane MD, Maruyama H, Easterday RL** (1969) Phosphoenolpyruvate carboxylase from peanut cotyledons. *Method Enzymol* 13:277-283. doi:10.1016/0076-6879(69)13048-7
- Legua P, Forner JB, Hernández FCA, Forner-Giner MA** (2014) Total phenolics, organic acids, sugars, and antioxidant activity of mandarin (*Citrus clementina*): Variation from rootstock. *Sci Hortic* 174:60-64. doi:10.1016/j.scienta.2014.05.004
- Liao L, Dong T, Qiu X, Rong Y, Wang Z, Zhu J** (2019) Nitrogen nutrition is a key modulator of the sugar and organic acid content in citrus fruit. *PLoS ONE* 14:e0223356. doi:10.1371/journal.pone.0223356
- Lin Q, Wang C, Dong W, Jiang Q, Wang D, Li S, Chen M, Liu C, Sun C, Chen K** (2015) Transcriptome and metabolome analyses of sugar and organic acid metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit during fruit maturation. *Gene* 554:64-74. doi:10.1016/j.gene.2014.10.025
- Mademba-Sy F, Lemerre-Desprez Z, Lebegin S** (2012) Use of Flying Dragon trifoliate orange as dwarfing rootstock for citrus under tropical climatic conditions. *HortScience* 47:11-17. doi:10.21273/HORTSCI.47.1.11
- Merlo L, Ferretti M, Ghisi R, Passera C** (1993) Developmental changes of enzymes of malic acid metabolism in relation to respiration, photosynthesis, and nitrate assimilation in peach leaves. *Physiol Plantarum* 89:71-76. doi:10.1111/j.1399-3054.1993.tb01788.x

- Miller SS, Driscoll BT, Gregerson RG, Gantt JS, Vance CP (1998) Alfalfa malic acid dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. *Plant J* 15:173-184. doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00192.x
- Moing A, Rothan C, Svanella L, Just D, Diakou P, Raymond P, Gaudillère JP, Monet R (2000) Role of phosphoenolpyruvate carboxylase in organic acid accumulation during peach fruit development. *Physiol Plantarum* 108:1-10. doi:10.1034/j.1399-3054.2000.108001001.x
- Müller ML, Irgens-Kiesecker U, Rubinstein B, Taiz L (1996) On the mechanism of hyperacidification in lemon: comparison of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activities of fruits and epicotyls. *J Biol Chem* 271:1916-1924. doi:10.1074/jbc.271.4.1916
- Muñoz-Robredo P, Robledo P, Manríquez D, Molina R, Defilippi BG (2011) Characterization of sugars and organic acids in commercial varieties of table grapes. *Chil J Agr Res* 71:452. doi:10.4067/S0718-58392011000300017
- Noda K, Okuda H, Iwagaki I (2001) Relationship between growth and IAA and ABA levels in Citrus rootstock seedlings. *J Jpn Soc Hortic Sci* 70:258-260. doi:10.2503/jjshs.70.258
- Ordóñez-Díaz JL, Hervalejo A, Pereira-Caro G, Muñoz-Redondo JM, Romero-Rodríguez E, Arenas-Arenas FJ, Moreno-Rojas JM (2020) Effect of rootstock and harvesting period on the bioactive compounds and antioxidant activity of two orange cultivars ('Salustiana' and 'Sanguinelli') widely used in juice industry. *Processes* 8:1212. doi:10.3390/pr8101212
- Ornelas-Paz JJ, Meza MB, Obenland D, Rodríguez K, Jain A, Thornton S, Prakash A (2017) Effect of phytosanitary irradiation on the postharvest quality of seedless Kishu mandarins (*Citrus kinokuni mukakukishu*). *Food Chem* 230:712-720. doi:10.1016/j.foodchem.2017.02.125
- Raddatz-Mota D, Franco-Mora O, Mendoza-Espinoza JA, Rodríguez-Verástegui LL, de León-Sánchez FD, Rivera-Cabrera F (2019) Effect of different rootstocks on Persian lime (*Citrus latifolia* T.) postharvest quality. *Sci Hortic* 257:108716. doi:10.1016/j.scienta.2019.10.8716
- Sadka A, Dahan E, Cohen L, Marsh KB (2000) Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiol Plantarum* 108:255-262. doi:10.1034/j.1399-3054.2000.108003255.x
- Sadka A, Dahan E, Or E, Roose ML, Marsh KB, Cohen L (2001) Comparative analysis of mitochondrial citric acid synthase gene structure, transcript level, and enzymatic activity in acidless and acid-containing Citrus varieties. *Funct Plant Biol* 28:383-390. doi:10.1071/PP010136
- Sadka A, Shlizerman L, Kamara I, Blumwald E (2019) Primary metabolism in citrus fruit as affected by its unique structure. *Front Plant Sci* 10:1167. doi:10.3389/fpls.2019.01167
- Sarkhosh A, Shahkoomahally S, Asis C, McConchie C (2021) Influence of rootstocks on scion leaf mineral content in mango tree (*Mangifera indica* L.). *Hortic Environ Biotechnol* 62:725-735. doi:10.1007/s13580-021-00355-w
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3:1101-1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
- Seymour GB, Østergaard I, Chapman NH, Knapp S, Martin C (2013) Fruit development and ripening. *Annu Rev Plant Biol* 64:219-241. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120057
- Sheng L, Shen D, Luo Y, Sun X, Wang J, Luo T, Zeng Y, Xu J, Deng X, Cheng Y (2017) Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid treatment affects citrate and amino acid accumulation to improve fruit quality and storage performance of postharvest citrus fruit. *Food Chem* 216:138-145. doi:10.1016/j.foodchem.2016.08.024
- Violeta NOUR, Trandafir I, Ionica ME (2010) HPLC organic acid analysis in different citrus juices under reversed phase conditions. *Not Bot Horti Agrobo* 38:44-48
- Wang XY, Wang P, Qi YP, Zhou CP, Yang LT, Liao XY, Wang LQ, Zhu DH, Chen LS (2014) Effects of granulation on organic acid metabolism and its relation to mineral elements in Citrus grandis juice sacs. *Food Chem* 145:984-990. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.021
- Yamaki YT (1989) Organic acids in the juice of citrus fruits. *J Jpn Soc Hortic Sci* 58:587-594. doi:10.2503/jjshs.58.587
- Yildiz E, Hakan Demirköser T, Kaplankiran M (2013) Growth, yield, and fruit quality of 'Rhode Red Valencia' and 'Valencia Late' sweet oranges grown on three rootstocks in eastern Mediterranean. *Chil J Agr Res* 73:142-146. doi:10.4067/S0718-58392013000200009
- Yun SH, Kim M, Park SM (2019) New citrus cultivar. NIHHS, RDA, Korea
- Zhang X, Wei X, Ali MM, Rizwan HM, Li B, Li H, Jia K, Yang X, Ma S, et al. (2021) Changes in the content of organic acids and expression analysis of citric acid accumulation-related genes during fruit development of yellow (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) and purple (*Passiflora edulis* f. *edulis*) Passion Fruits. *Int J Mol Sci* 22:5765. doi:10.3390/ijms22115765
- Zhou Y, He W, Zheng W, Tan Q, Xie Z, Zheng C, Hu C (2018) Fruit sugar and organic acid were significantly related to fruit Mg of six citrus cultivars. *Food Chem* 259:278-285. doi:10.1016/j.foodchem.2018.03.102