

감 품종 판별용 SCAR 마커 개발

조강희^{1*} · 조광식² · 한점화¹ · 김현란¹ · 신일섭¹ · 김세희¹ · 천재안¹ · 황해성¹

¹국립원예특작과학원 과수과, ²국립원예특작과학원 배시험장

Development of Sequence Characterized Amplified Region Markers for Cultivar Identification in Persimmon

Kang Hee Cho^{1*}, Kwang-Sik Cho², Jeom Hwa Han¹, Hyun Ran Kim¹, Il Sheob Shin¹, Se Hee Kim¹, Jae An Chun¹, and Hae-Sung Hwang¹

¹Fruit Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Suwon 440-706, Korea

²Pear Experiment Station, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Naju 523-820, Korea

Abstract. Precise, fast, and cost-effective identification of crop cultivars is essential for plant breeder's rights. Traditional methods for identification of persimmon cultivars are based on the evaluation of sets of morphological characteristics. However, it is difficult to distinguish closely related cultivars using only morphological traits. This study was conducted to develop DNA markers for identification of the 32 persimmon cultivars in Korea and Japan. A total of 309 randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were identified using 40 different random primers. Various number of polymorphic bands ranged from 4 (OPP-08) to 14 (UBC159) were detected with an average of 7.7. Resulting 57 RAPD fragments were selected, and their sequences were determined for developing sequence characterized amplified region (SCAR) markers. As a result, 15 of 57 RAPD fragments were successfully converted to SCAR markers. Single polymorphic bands of the same size as or smaller than the RAPD fragments were amplified depending on SCAR markers. Among these markers, a combination of eight SCAR markers (PS225_200, PSN05_420, PSF13_523, PSN11_540, PS372_567, PS485_569, PSP08_635, and PS631_735) provided sufficient polymorphisms to identify 32 persimmon cultivars. These newly developed markers will be a fast and reliable tool to identify persimmon cultivars.

Additional key words: *Diospyros kaki*, polymorphism, RAPD, sequence

서 언

감나무(*Diospyros kaki* Thunb.)는 감나무과(Ebenaceae), 감나무속(*Diospyros*)에 속하는 낙엽성 교목이다. 대부분의 재배 감은 6배체($2n = 6x = 90$)이며 일부 무핵품종은 9배체($2n = 9x = 135$)로 알려져 있다(Narval et al., 2010; Zhuang et al., 1990). 감나무는 동아시아가 원산지로서 중국의 중북부, 일본, 우리나라의 중부 이남에 널리 재배되고 있다. 세계의 감 생산량은 4,285,954톤으로 그 중 중국(3,259,334톤), 한국(390,820톤), 일본(207,500톤)이 세계 전 생산량의 90%를 차지하고 있으며 우리나라의 감 생산량은 세계 2위이다(FAO,

2011). 감은 크게 단감과 떫은감으로 나눌 수 있고, 세분하여 과실 내 종자의 존재와 성숙기 과실의 떫은 맛의 유무 및 과육 색의 변화에 따라 완전단감(pollination-constant nonastringent, PCNA), 불완전단감(pollination-variant nonastringent, PVNA), 불완전떫은감(pollination-variant astringent, PVA), 그리고 완전떫은감(pollination-constant astringent, PCA)의 4가지로 분류된다(Du et al., 2009; Kanzaki et al., 2001). 이 중에서 수확 후 별도의 처리가 필요없는 완전단감이 상업적으로 가장 중요한 품종이지만 전세계에 분포되어 있는 대부분의 품종들은 떫은감에 속한다. 따라서 감 육종에 있어서 상업적으로 우수한 새로운 완전단감을 육성하는 것이 가장 중요한 육종 목

*Corresponding author: khc7027@korea.kr

※ Received 22 April 2013; Revised 9 August 2013; Accepted 1 October 2013.

© 2013 Korean Society for Horticultural Science

표이다. 현재 국내에서 재배되고 있는 감 품종은 완전단감인 ‘부유(Fuyu)’와 불완전단감인 ‘서촌조생(Nishimurawase)’ 등과 같은 일본품종이 대부분이다(Hwang et al., 2010).

우리나라의 감 육성품종은 ‘로망(Romang)’, ‘초시(Chosi)’ 등으로 2005년부터 현재까지 14품종이다. 새로운 품종 육성을 위하여 다양한 유전자원을 도입·보존·선발하는데 있어서 유전자원의 분류 및 특성을 정확히 파악하는 것이 중요하다. 그러나 감은 재래종 간의 다른 품종임에도 불구하고 동일한 품종명을 가지거나 여러 개의 다른 품종명을 가지고 있는 동일한 품종이 존재하여 품종을 정확히 구별하는데 어려움이 있다 (Soriano et al., 2006). 일반적으로 감 품종을 구분하는 방법은 원예적인 형태형질에 근거하고 있지만 재배방법과 환경

요인에 큰 영향을 받을 수 있다. 이와 달리 DNA 마커는 환경에 대한 영향을 배제할 수 있어 유전자원의 유전적 다양성 평가, 품종판별 등에 유용하게 사용되고 있다. 현재까지 감 유전자원 분류 및 품종 구분과 관련하여 restriction fragment length polymorphism(RFLP)(Maki et al., 2001; Nakamura and Kobayashi, 1994), randomly amplified polymorphic DNA(RAPD)(Badenes et al., 2003; Luo et al., 1995; Yamagishi et al., 2005), amplified fragment length polymorphism(AFLP)(Cho et al., 2007; Yonemori et al., 2008), sequence-related amplified polymorphism(SRAP)(Guo and Luo, 2006), simple sequence repeats(SSR)(Hwang et al., 2010; Naval et al., 2010; Park et al., 2012) 등과 같은 다양한 DNA 마커들이

Table 1. Information of the 32 persimmon cultivars used in this study.

| Cultivar | Parentage | Astringent type ² | Origin |
|----------------------|--------------------------|------------------------------|--------|
| Aidzumishirazu | Chance seedling | PVA | Japan |
| Atago | Chance seedling | PCA | Japan |
| Cheongdo-Bansi | Chance seedling | PCA | Korea |
| Chosi | Johongsi × Nishinurawase | PVNA | Korea |
| Chuyeon | Nishinurawase × Johongsi | PVNA | Korea |
| Daeon Dangam | Chance seedling | PCNA | Korea |
| Deshimaru | Chance seedling | PCA | Japan |
| Fuyu | Chance seedling | PCNA | Japan |
| Hagakushi | Chance seedling | PCA | Japan |
| Hiratanenashi | Chance seedling | PVA | Japan |
| Ichidagaki | Chance seedling | PCA | Japan |
| Iwasedo | Chance seedling | PCA | Japan |
| Johongsi | Chance seedling | PVNA | Korea |
| Koshuhyakume | Chance seedling | PVA | Japan |
| Nishinurawase | Chance seedling | PVNA | Japan |
| Okugosho | Chance seedling | PCNA | Japan |
| Partner | Nishinurawase × Johongsi | PVA | Korea |
| Raotianhong | Chance seedling | PCA | Japan |
| Ro-19 | Fukurogosho × Hanagosho | PCNA | Japan |
| Romang | Ro-19 × Okugosho | PCNA | Korea |
| Sancheong-Danseongsi | Chance seedling | PCA | Korea |
| Shinhachiya | Chance seedling | PVA | Japan |
| Shinpei | Chance seedling | PCA | Japan |
| Shinsyu | Okitsu20 × Okitsu1 | PCNA | Japan |
| Shuren | Chance seedling | PCA | Japan |
| Taishu | Fuyu × IliG-16 | PCNA | Japan |
| Uiseong-Sagoksi | Chance seedling | PCA | Korea |
| Yeongdeok-Sangsi | Chance seedling | PCA | Korea |
| Yeongdong-Weolhasi | Chance seedling | PCA | Korea |
| Yokono | Chance seedling | PCA | Japan |
| Yotsumizo | Chance seedling | PCA | Japan |
| Zenzimaru | Chance seedling | PVNA | Japan |

²PCNA, pollination-constant nonastringent; PVNA, pollination-variant nonastringent; PCA, pollination-constant astringent; PVA, pollination-variant astringent.

이용되었다. 이 중 RAPD는 적은 양의 DNA를 이용하여 신속하게 저렴한 비용으로 유전적 다형성을 분석할 수 있다는 장점이 있어 사과(Goulão et al., 2001), 배(Lin et al., 2011), 복숭아(Yu et al., 2012), 포도(This et al., 1997) 등에서 품종 판별에 관한 연구가 보고되었다. 그러나 polymerase chain reaction(PCR) 반응 시 짧은 임의 프라이머를 이용하기 때문에 재현성에 문제가 있어 이를 개선한 sequence characterized amplified region(SCAR) 마커가 개발되어 사과, 배, 포도 등의 여러 작물의 품종 판별에 활용되고 있다(Cho et al., 2010, 2012; Vidal et al., 2000). 따라서 본 연구는 RAPD 분석을 통하여 감 품종 간 다형성을 나타내는 마커를 선별하고 이를 재현성 있는 SCAR 마커로 전환하여 보다 신속하고 정확하게 감 품종 판별에 활용할 수 있는 SCAR 마커를 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

시험재료 및 DNA 추출

감 품종 판별용 DNA 마커 개발을 위하여 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 보존 중인 감 국내 품종 11종과 일본에서 도입한 21종을 포함한 총 32품종을 이용하였다(Table 1). 품종 중에서 완전단감은 7품종, 불완전단감은 5품종이었

고, 완전뿔은감과 불완전뿔은감은 각 15, 5품종이었다. 감 어린 잎을 채취하고 액체질소로 곱게 마쇄한 후 DNeasy plant mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA의 순도는 0.8% 아가로스 겔에 전기영동하여 확인하였고 DNA 양은 분광광도계(NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)로 정량 분석하였다. PCR 분석에는 DNA를 10ng·μL⁻¹의 농도로 희석하여 이용하였다.

RAPD 분석

감 RAPD 분석에 적합한 프라이머를 선별하기 위해서 Operon(Operon Technologies, Alameda, CA, USA)과 University of British Columbia(UBC, Vancouver, BC, Canada)에서 제조된 10개의 염기로 구성된 260종의 프라이머(Operon series; F, G, K, M, N, O, P, Y; UBC conifer kit)를 검정하였다. 품종 간 다형성을 나타내는 RAPD 마커 선별에는 프라이머 검정에서 선별된 총 40종의 임의 프라이머를 이용하였다(Table 2). PCR 조건은 총 12.5μL의 반응액에 genomic DNA 40ng, 1×PCR buffer(Genetbio, Daejeon, Korea), 5pmol 임의 프라이머, 200μM dNTP, 3mM MgCl₂와 0.4units *Taq* DNA polymerase(Genetbio)를 첨가하였다. PCR 반응은 thermocycler (C-1000, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사

Table 2. List of the RAPD primers used in this study, their sequences, and their numbers of polymorphic fragments.

| No. | Primer | Sequence | No. of polymorphic fragments | No. | Primer | Sequence | No. of polymorphic fragments |
|-----|--------|-------------|------------------------------|-----|--------|------------|------------------------------|
| 1 | OPF-06 | GGGAATTCGG | 10 | 21 | UBC116 | TACGATGACG | 6 |
| 2 | OPF-13 | GGCTGCAGAA | 5 | 22 | UBC119 | ATTGGGCGAT | 6 |
| 3 | OPG-12 | CAGCTCACGA | 12 | 23 | UBC146 | ATGTGTTGCG | 13 |
| 4 | OPK-01 | CATTCGAGCC | 6 | 24 | UBC153 | GAGTCACGAG | 7 |
| 5 | OPK-10 | GTGCAACGTG | 7 | 25 | UBC159 | GAGCCCGTAG | 14 |
| 6 | OPM-15 | GACCTACCAC | 5 | 26 | UBC181 | ATGACGACGG | 8 |
| 7 | OPN-05 | ACTGAACGCC | 10 | 27 | UBC225 | CGACTCACAG | 8 |
| 8 | OPN-10 | ACAACCTGGGG | 5 | 28 | UBC254 | CGCCCCCATT | 10 |
| 9 | OPN-11 | TCGCCGCAA | 5 | 29 | UBC322 | GCCGCTACTA | 10 |
| 10 | OPN-12 | CACAGACACC | 9 | 30 | UBC336 | GCCACGGAGA | 5 |
| 11 | OPN-19 | GTCCGTA CTG | 9 | 31 | UBC372 | CCCACTGACG | 13 |
| 12 | OPO-07 | CAGCACTGAC | 7 | 32 | UBC460 | ACTGACCGGC | 5 |
| 13 | OPO-10 | TCAGAGCGCC | 5 | 33 | UBC485 | AGAATAGGGC | 10 |
| 14 | OPO-13 | GTCAGAGTCC | 8 | 34 | UBC499 | GGCCGATGAT | 5 |
| 15 | OPO-15 | TGGCGTCCTT | 12 | 35 | UBC504 | ACCGTGCGTC | 10 |
| 16 | OPO-19 | GGTGCACGTT | 8 | 36 | UBC507 | AGACGTACTC | 6 |
| 17 | OPP-08 | ACATCGCCCA | 4 | 37 | UBC519 | ACCGGACACT | 6 |
| 18 | OPP-09 | GTGGTCCGCA | 7 | 38 | UBC533 | GCACTACGC | 7 |
| 19 | OPY-09 | AGCAGCGCAC | 8 | 39 | UBC589 | GACGGAGGTC | 6 |
| 20 | OPY-17 | GACGTGGTGA | 6 | 40 | UBC631 | GGCTTAACCG | 6 |

용하여 다음과 같은 프로그램으로 수행하였다 94°C에서 5분간 초기 변성시키고, 94°C에서 45초, 37°C에서 45초, 72°C에서 2분간 각각 denaturing, annealing, extension 과정을 10회 반복 수행한 다음 94°C에서 45초, 42°C에서 45초, 72°C에서 2분간 30회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 처리한 후 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR 산물을 ethidium bromide로 염색한 1.4% agarose gel에서 150V로 3시간 동안 전기영동하여 품종 간 다형성 밴드를 탐색하였다.

Data 통계분석

감 품종간 유전적 다양성을 파악하고자 RAPD 다형성 밴드의 유무에 따라 1(유)과 0(무)으로 코딩하여 multi-variate statistical package(MVSP) version 3.13(Kovach computing services)를 이용하여 분석하였다. Simple matching coefficient에 의해 유전적 유사도 값을 계산하고 이 값을 기초로 하여 비가중평균결합(unweighted pair-group method with arithmetic averages, UPGMA)법으로 집괴분석(cluster analysis)을 하여 dendrogram을 작성하였다.

품종 특이적인 선발 RAPD 마커의 SCAR 마커 전환

감 품종 특이적인 RAPD 마커의 염기서열 분석을 위해 선발된 DNA 밴드를 잘라내고 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 정제하였다. 이를 TOPO-TA cloning system(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 pCR2.1-TOPO vector에 넣어 *E. coli* TOP10에 형질전환시킨 후 DNA가 삽입된 균주를 선발하였다. 이 균주로부터 plasmid DNA를 분리하였고 삽입된 DNA 전 염기서열을 자동 DNA 분석기(ABI 3730xl, Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. RAPD 마커의 염기서열 분석 결과를 토대로 Primer3(<http://frodo.wi.mit.edu>) 프로그램을 이용하여 선발 프라이머의 10개의 염기를 포함하거나

포함하지 않는 20-24mer 크기의 SCAR 프라이머를 작성하였다. 1개의 RAPD 마커당 4조합 이상의 SCAR 프라이머를 검정하였다. PCR 반응은 총 15μL 반응액에 genomic DNA 40ng, 200μM dNTP, 5pmol SCAR 프라이머, 1×PCR buffer (Genetbio) 및 PCR 반응 시 비특이적 DNA 증폭을 최소화하기 위하여 0.5unit의 Hot-start *Taq* DNA polymerase(Genetbio)를 첨가하여 수행하였다. PCR 온도주기는 95°C에서 10분간 주형 DNA를 변성시킨 후 95°C에서 30초, 63-67°C에서 30초, 72°C에서 1분간 30회 반복하고 72°C에서 5분간 처리한 후 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.4% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

결과 및 고찰

RAPD 분석을 통한 감 품종 간 다형성 탐색

260종의 임의 프라이머를 분석하여 다형성 밴드 수가 많고 밴드가 선명하여 감 RAPD분석에 적합한 프라이머 40종을 선발하였다. 선발된 40종의 임의 프라이머를 이용하여 감 32품종을 대상으로 RAPD 분석한 결과 309종의 다형성 밴드가 선발되었다(Table 2). 프라이머에 따라 선발된 다형성 밴드의 수는 최소 4개(OPP-08)에서 최대 14개(UBC159)로 확인되었으며 평균 7.7개였다. 다형성이 높은 프라이머는 UBC146, UBC159, UBC372, OPG-12, OPO-15 등이었다. Je et al.(2009)은 동양 감에 대한 품종간 유연관계를 분석하기 위해 60품종을 대상으로 39개의 Operon 프라이머를 이용하여 RAPD 분석한 결과 1-7개의 다형성 밴드를 얻어 평균 4.7개의 다형성 수를 보고하였다. 본 실험에서 평균 다형성 밴드 수가 차이가 나는 이유는 RAPD 분석에 이용된 시험재료의 품종과 임의 프라이머의 종류가 다르고 다형성이 높은 프라이머를 선발하여 분석하였기 때문으로 판단되었다. Fig. 1은 UBC485 프라이머를 이용하여 증폭한 감 32품종의 RAPD profile을 나타낸 것이다. 약 200bp 크기의 밴

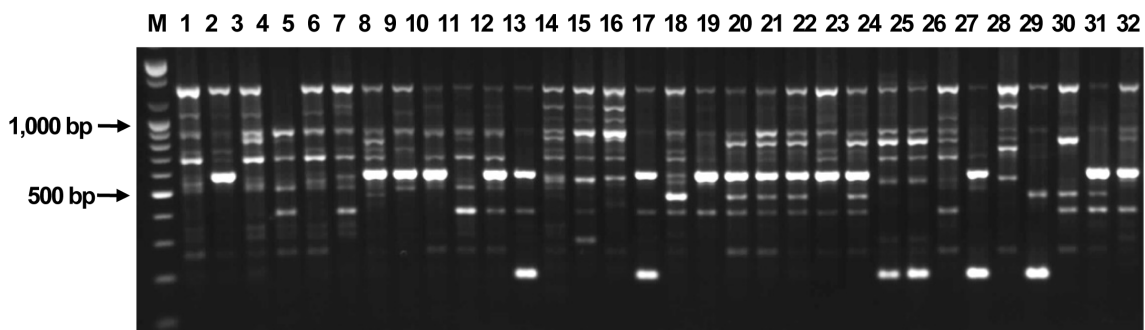


Fig. 1. RAPD banding pattern of UBC485 random primer in the 32 persimmon cultivars. Numbers 1-32 correspond to the persimmon cultivars listed in Table 4. M, 100 bp plus DNA ladder.

드는 완전단감인 ‘만어소(Okugosho)’와 완전뽕은감인 ‘의성사곡시(Uiseong-Sagoksi)’, ‘신평(Shinpei)’, ‘삼련(Shuren)’, ‘횡야(Yokono)’ 등에서 증폭되었다. 그 외에도 UBC254 프라이머로 증폭된 약 690bp의 밴드는 완전뽕은감인 ‘산청단성시’와 불완전뽕은감인 ‘평핵무(Hiratanenashi)’에서만 증폭되었고, OPO-15 프라이머의 약 430bp의 밴드는 불완전뽕은감인 ‘신봉옥(Shinhachiya)’과 완전뽕은감인 ‘요천홍(Raotianhong)’, ‘데시마루(Deshimaru)’에서만 증폭되었다. PCR을 이용하는 RAPD 분석은 유전자원을 구분하는데 높은 효율성과 경제성을 갖추면서 많은 종을 대상으로 중간 및 종 내의 유전적 근연관계를 연구하는데 많이 활용되고 있으나 PCR 증폭조건, 반응액의 조성 등에 따라 밴드양상이 달라 재현성이 떨어진다는 단점이 있다(Gallego and Martínez, 1997). 따라서 RAPD 분석에서 다형성이 탐색되면 그 재현성을 반복 실험을 통하여 검증해야 할 필요성이 있다. 본 실험에서는 프라이머별로 RAPD 분석을 2회 반복하여 재현성 있게 나타나는 밴드만을 마커로 선발하였다.

감 품종의 유전적 다양성 분석

RAPD마커를 이용하여 감 32품종에 대한 UPGMA 방법에 의해 집괴분석한 결과(Fig. 2) 전체 유사도 값은 0.523-0.829의 범위였다. 가장 높은 유사도 값(0.829)을 나타낸 것은 ‘부

유(Fuyu)’와 이를 모본으로 육성된 ‘태추(Taishu)’ 간이었으며, 가장 낮은 유사도 값(0.523)을 나타낸 것은 ‘의성사곡시(Uiseong-Sagoksi)’와 ‘신봉옥(Shinhachiya)’ 간이었다. 국내 육성품종인 ‘로망(Romang)’은 ‘로-19(Ro-19)’와 ‘만어소(Okugosho)’를 교배한 품종으로 양친과 각각 0.777과 0.808의 높은 유사도 값을 나타냈다. 감 32품종의 평균 유사도 값은 0.651이었으며, 가장 높은 평균 유사도 값(0.698)을 나타낸 것은 완전단감인 ‘태추(Taishu)’였고, 가장 낮은 것(0.613)은 완전뽕은감인 ‘요천홍(Raotianhong)’이었다. 본 실험재료로 이용한 품종들의 평균 유사도 값은 0.613-0.698의 범위로, 이러한 낮은 유사도 지수는 품종들간의 유전적 조성 차이가 크기 때문으로 판단된다. 불완전뽕은감인 ‘파트너(Partner)’와 불완전단감인 ‘추연(Chuyeon)’은 양친이 ‘서촌조생(Nishinurawase)’과 ‘조흥시(Johongsi)’로 동일하지만 유사도 값은 0.668였으며, ‘조흥시(Johongsi)’와 ‘서촌조생(Nishinurawase)’의 교배를 통해 육성된 불완전단감인 ‘초시(Chosi)’는 ‘파트너(Partner)’, ‘추연(Chuyeon)’과 각각 0.648, 0.793의 유사도 값을 나타냈다. 완전뽕은감인 ‘의성사곡시(Uiseong-Sagoksi)’와 ‘영동월하시(Yeongdong-Wolhasi)’의 유사도 값은 0.642로 SSR 마커로 분석한 유사도 값 0.62와 비슷한 결과를 나타냈다(Hwang et al., 2010). 불완전단감인 ‘조흥시(Johongsi)’와 완전단감인 ‘부유(Fuyu)’는 동일

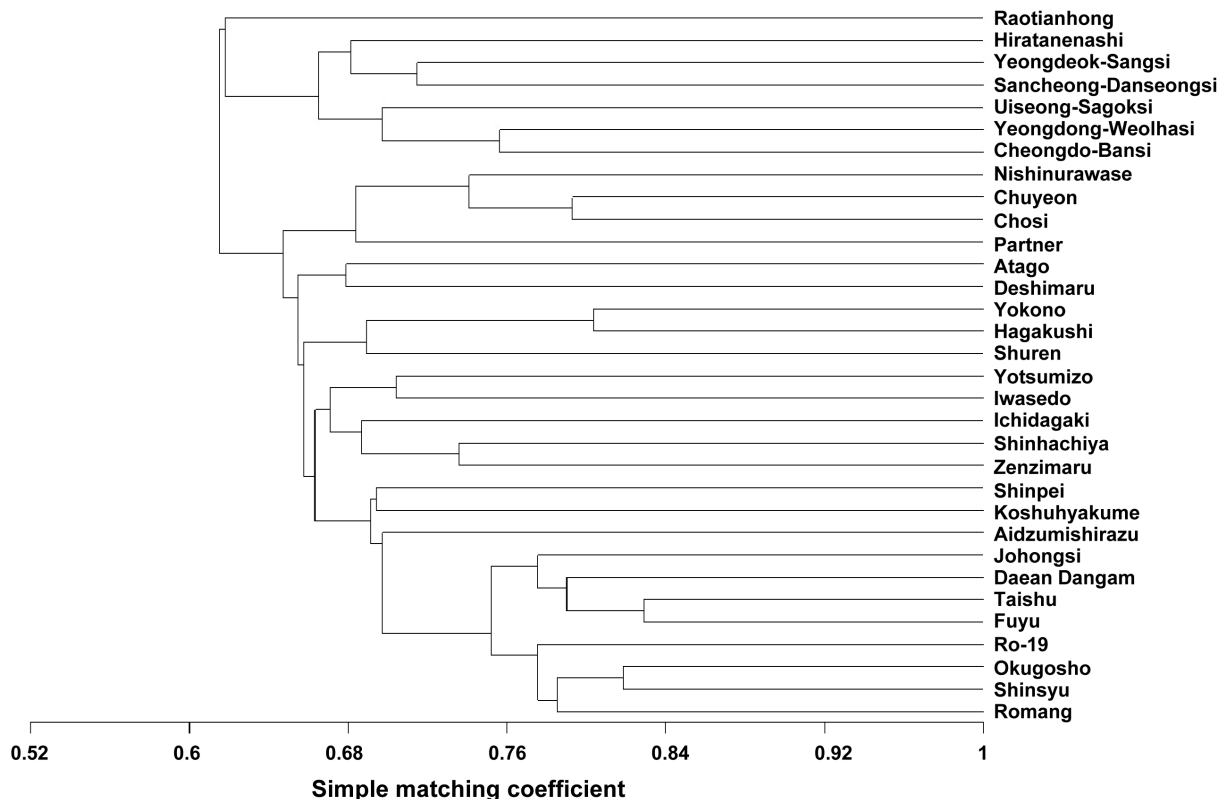


Fig. 2. Dendrogram of the 39 pear cultivars based on UPGMA cluster analysis using genetic similarity.

한 그룹으로 보고되었는데(Hwang et al., 2010; Je et al., 2009) 본 결과에서도 ‘조흥시(Johongsi)’와 단감품종들은 동일 그룹으로 분포되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 보고된 기존의 감 유연관계 분석 결과와는 사용한 실험재료가 달라 정확한 비교 분석은 어렵지만 기존의 보고와 동일하게 본 실험의 RAPD 분석에 따른 품종 분류 결과는 짧은 맛이 소실되는 품종의 탈삼 특성과 육성내력과 대체적으로 일치하는 것을 알 수 있었다. 금후 형태적 형질 특성과의 비교도 함께 이루어진다면 합리적인 결론을 유추해 낼 수 있을 것으로 판단된다.

감 품종 판별용 SCAR 마커 개발

RAPD 분석은 PCR 반응 시 대부분 10-12-mer의 짧은 프라이머가 genome상의 여러 곳에 작용하여 다량의 변이를 검출할 수 있다는 장점이 있지만 낮은 온도에서 비교적 짧은 프라이머를 annealing시키기 때문에 미세한 반응조건의 차이에 따라 비특이적인 밴드가 출현하여 안정적인 검출에 문제가 있다. Bernet et al.(2003)은 특히 식물에 있어서 RAPD

분석의 재현성에 문제가 되는 3가지 주요인으로 *Taq* DNA polymerase-buffer-MgCl₂의 상호연관, DNA 및 프라이머로 보고하였다. 따라서 RAPD 결과의 재현성과 정확성이 낮아 실용적으로 품종 판별에 활용하기는 어려운 실정이다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 RAPD 마커 선발에 사용하는 프라이머의 길이를 늘려주어 반응의 안정성을 높인 SCAR 마커가 Paran and Michelmore(1993)에 의해 제시되었다. RAPD 분석의 낮은 재현성을 해결하기 위해서는 아가로스 겔보다 분해능이 높은 아크릴아마이드를 이용하는 고해상도 전기영동 하에서 재현성 있는 밴드만을 선별하여 SCAR 또는 cleaved amplified polymorphic sequence(CAPS)와 같은 마커로 전환해야 한다는 보고도 있다(Bernet et al., 2003) 따라서 본 실험에서는 선발된 품종 특이적 RAPD 밴드 중 1,000bp 이하 크기의 57종을 대상으로 하여 클로닝과 염기서열 분석을 통해 SCAR 마커로 전환하고자 하였다. 그 결과 감 품종을 구분할 수 있는 총 15종의 품종 특이적 SCAR 마커가 개발되었고(Table 3), SCAR 프라이머의 염기서열은 Table 3에 나타내었다. OPF-13과 UBC631 프라이머로부터

Table 3. Fifteen SCAR primer pair sequences derived from cloned RAPD fragments.

| RAPD marker | SCAR marker | Primer sequence (5' → 3') | Annealing temperature (°C) | Amplicon size (bp) |
|-------------|-------------|---|----------------------------|--------------------|
| UBC225_222 | PS225_200 | F: CGACTCACAGCACAGCCACACTT R: AGAATGTGTGTGGGTCGACTAT | 63 | 200 |
| UBC254_346 | PS254_346 | F: CGCCCCCATTACCAACTCATATAA R: CGCCCCCATTGTGAATGGGCAGTC | 63 | 346 |
| OPN05_429 | PSN05_420 | F: CTTCGCATTTTGTGAGTGGTACTTTT R: ACTGAACGCCACGAAAGTGCTCT | 63 | 420 |
| OPO15_481 | PSO15_433 | F: CTCTCCCTGACGGTTGATTG R: ATATTTAGGATGTGTTGTGGCTCA | 63 | 433 |
| OPF13_523 | PSF13_523 | F: GGCTGCAGAAGGCGACATCAAAGG R: GGCTGCAGAACAGGATTTTCACTA | 65 | 523 |
| UBC519_525 | PS519_525 | F: ACCGGACACTTCACCCATACTGT R: ACCGGACACTCATATAGAGGTGAT | 67 | 525 |
| OPN11_540 | PSN11_540 | F: TCGCCGCAAACAACTACTACTAG R: TCGCCGCAAAGGGAATACCCAGGT | 65 | 540 |
| UBC372_567 | PS372_567 | F: CCCACTGACGAAGGAAGCAAGAAG R: CCCACTGACGTCTTAACCTAGAAC | 63 | 567 |
| UBC485_569 | PS485_569 | F: AGAATAGGGCGTAGAGGGCAGTCA R: AGAATAGGGCCACGTACCCAAGCA | 65 | 569 |
| OPN12_631 | PSN12_631 | F: CACAGACACCAAGTCAAGCCCAAG R: CACAGACACCCATTCCATATTTA | 63 | 631 |
| OPP08_666 | PSP08_635 | F: CCTAGATAACAAATCGACACCACA R: ACATCGCCCATCGTGGAGGGATAG | 63 | 635 |
| UBC254_693 | PS254_693 | F: CGCCCCCATTAAATAGTTATCCAAT R: CGCCCCCATTAGTAAGCGCGTCT | 63 | 693 |
| UBC631_735 | PS631_735 | F: GGCTTAACCGCAACATTCAAACAA R: GGCTTAACCGTATTGCAGACGGT | 63 | 735 |
| UBC533_767 | PS533_767 | F: GCATCTACGCAGGGTAAAGGGTAT R: GCATCTACGCACTCCTTTATCGCT | 67 | 767 |
| UBC372_779 | PS372_779 | F: CCCACTGACGACCAAGTCTAACAT R: CCCACTGACGGTTGATCGTGGATT | 63 | 779 |

증폭된 약 520bp와 730bp 크기의 RAPD 밴드는 염기서열 분석 결과 523bp와 735bp 크기로 염기서열 양끝에 RAPD에 사용하였던 10개의 염기서열이 존재하여 선발된 RAPD마커의 염기서열로 확인되었다. 이들은 SCAR 마커로 전환 후 단일밴드로 나타나 품종 동정을 용이하게 해 주었고(Figs. 3A and 3B), 이들 SCAR 마커를 PSF13_523과 PS631_735으로 명명하였다. PSF13_523마커는 완전단감인 ‘부유(Fuyu)’, ‘태추(Taishu)’, ‘신추(Shinsyu)’, ‘만어소(Okugosho)’와 완전붉은감인 ‘청도반시(Cheongdo-Bansi)’, ‘영동월하시(Yeongdong-Weolhasi)’, ‘의성사곡시(Uiseong-Sagoksi)’, ‘산청단성시(Sancheong-Danseongsi)’, ‘영덕상시(Yeongdeok-Sangsi)’, ‘횡야(Yokonon)’와 불완전붉은감인 ‘평핵무(Hiratanenashi)’, ‘회진신부시(Aidzumishirazu)’에서만 증폭되었다(Table 4). PS631_735마커는 최근 국내에서 육성된 품종을 포함한 불완전붉은감인 ‘파트너(Partner)’와 불완전단감인 ‘초시(Chosi)’, ‘추연(Chuyeon)’, ‘서촌조생(Nishinurawase)’, 완전단감인 ‘태추(Taishu)’와 완전붉은감인 ‘영동월하시(Yeongdong-Weolhasi)’, ‘시전시(Ichidagaki)’, ‘삼련(Shuren)’, ‘데시마루(Deshimaru)’의 9품종에서 증폭되었다. UBC372 프라이머에서 유래한 약 770bp 크기의 밴드는 PS372_779 SCAR 마커로 전환되었는데 일본에서 도입된 완전붉은감인 ‘갑주백목(Koshuhyakume)’과 ‘암뢰호(Iwasedo)’의 2품종에서만 나타났다. UBC254 프라이머로 증폭된 약 350bp와 690bp 크기의 밴드는 각각 PS254_346과 PS254_693 마커로 전환되었다. PS254_346마커는 ‘청도반시(Cheongdo-Bansi)’, ‘산청단성시(Sancheong-Danseongsi)’, ‘영덕상시(Yeongdeok-Sangsi)’, ‘갑주백목(Koshuhyakume)’, ‘시전시(Ichidagaki)’, ‘데시마루(Deshimaru)’, ‘평핵무(Hiratanenashi)’, ‘회진신부시(Aidzumishirazu)’에서만 나타나 RAPD분석과 동일한 결과를 얻었다.

본 실험에서는 선발된 57종의 RAPD 마커 중에서 15종만이 SCAR 마커로 전환되었다. 이는 RAPD 반응의 결과로

증폭된 많은 단편들이 선발된 다형성 밴드에 동일한 크기의 염기서열들이 혼재되어 있고(Paran and Michelmore, 1993), 또한 미세한 크기 차이를 가진 다형성 밴드를 아가로스 겔 상에서 분리해 내기 어렵기 때문에 선발된 RAPD 마커 중 약 26%만 SCAR 마커로 전환된 것으로 판단되었다. 그 외 나머지 RAPD 마커에서 유래한 프라이머를 이용하여 PCR 분석 결과 품종 간 차이가 없는 단일한 양상을 보였다. 이는 RAPD 마커가 보였던 다형성이 genomic DNA에 대한 짧은 RAPD 프라이머의 비특이적인 annealing 반응에 의하여 나타난 것으로 프라이머 길이가 긴 SCAR 프라이머를 이용할 경우 이러한 문제가 극복되어 다형성이 사라지기 때문인 것으로 추정되었다(Xu et al., 1995). 이와 달리 확실한 다형성을 갖는 SCAR 마커는 프라이머 결합부위의 뚜렷한 염기서열의 차이 또는 증폭된 염기서열 내의 구조적인 재배열에 의해 생긴 RAPD 다형성에서 유래된 것으로 판단되었다(Paran and Michelmore, 1993).

DNA 마커를 활용한 작물의 품종 판별은 형태적 특성에 근거한 분류 결과를 보완하여 정확성과 객관성을 확보할 수 있기 때문에, 육종가의 권리를 보호하기 위한 실제적인 수단으로서 DNA 마커의 중요성이 대두되고 있다. 품종 판별을 목적으로 DNA 마커를 이용할 경우에는 경제성과 효율성을 감안하여 가능한 적용하는 마커 수를 최소화해야 한다(Kim et al., 2006). 본 실험에서는 개발된 SCAR 마커 중 최소 8종(PS225_200, PSN05_420, PSF13_523, PSN11_540, PS372_567, PS485_569, PSP08_635, PS631_735)의 조합을 적용하여 증폭된 밴드 수와 크기에 따라 총 32품종의 국내 육성 또는 도입품종의 판별이 가능하였다. 증폭된 밴드 수는 품종에 따라 최소 1개에서 최대 6개였고, 평균 4개였다. ‘갑주백목(Koshuhyakume)’은 8종의 SCAR 마커 중에서 PSP08_635 마커에서만 증폭되었고, 완전단감인 ‘로망(Romang)’은 3종의 PS225_200, PSN11_540, PS372_567 마커

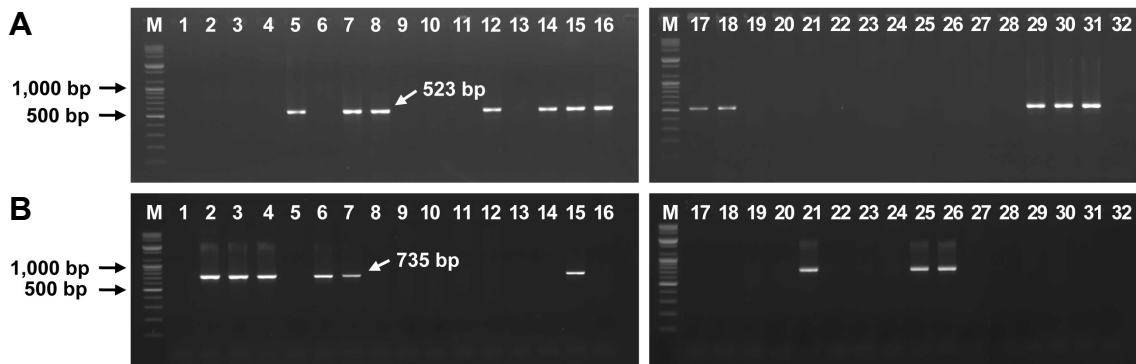


Fig. 3. Amplified fragment patterns of the SCAR markers PSF13_523 (A) and PS631_735 (B) in the 32 persimmon cultivars. Numbers 1-32 correspond to the persimmon cultivars listed in Table 4. M, 100 bp plus DNA ladder.

Table 4. Result of 15 SCAR marker analysis for 32 persimmon cultivars.

| SCAR marker | Cultivar No. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | | | |
| PS225_200 | + ^z | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | | |
| PS254_346 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | | |
| PSN05_420 | - | - | + | - | - | + | + | - | + | - | + | + | - | - | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | | |
| PSO15_433 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | | |
| PSF13_523 | - | - | - | - | + | - | + | + | - | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | |
| PS519_525 | + | - | + | + | + | - | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | |
| PSN11_540 | + | - | - | - | + | + | - | - | - | + | - | + | - | - | - | + | - | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - | |
| PS372_567 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - | + | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | |
| PS485_569 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | + | - | |
| PSN12_631 | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| PSP08_635 | - | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| PS254_693 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| PS631_735 | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PS533_767 | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - |
| PS372_779 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| No. of SCAR markers | 6 | 4 | 6 | 5 | 8 | 7 | 8 | 7 | 7 | 8 | 6 | 9 | 5 | 5 | 7 | 7 | 8 | 7 | 6 | 6 | 6 | 5 | 7 | 6 | 8 | 10 | 7 | 5 | 8 | 5 | 7 | 5 | 5 | | |

^z+, Presence of SCAR marker; -, absence of SCAR marker. 1, Romang; 2, Partner; 3, Chosi; 4, Chuyeon; 5, Fuyu; 6, Nishinurawase; 7, Taishu; 8, Shinsyu; 9, Daeam Dangam; 10, Johongsi; 11, Zenzimaru; 12, Okugosho; 13, Ro-19; 14, Cheongdo-Bansi; 15, Yeongdong-Weolhasi; 16, Uiseong-Sagoksi; 17, Sancheong-Danseongsi; 18, Yeongdeok-Sangsi; 19, Koshuhyakume; 20, Shinhachiya; 21, Ichidagaki; 22, Iwasedo; 23, Raotianhong; 24, Shinpei; 25, Shuren; 26, Deshimaru; 27, Yotsumizo; 28, Hagakushi; 29, Yokono; 30, Hiratanenashi; 31, Aidzumishirazu; 32, Atago.

에서 다형성이 검출되었다. 또한 ‘부유(Fuyu)’는 PS225_200, PSF13_523, PSN11_540, PS372_567, PSP08_635 마커 5종에서 다형성이 나타났다. 본 실험에서 개발된 SCAR 마커는 작물의 생육시기와 상관없이 고가의 실험장비 필요 없이 간단한 PCR 기기와 아가로스 겔 전기영동 장치만 갖춘 실험실에서 대량의 시료를 쉽고 정확하게 분석할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 감의 생산·유통 과정 중 품종 판별에 따른 문제 발생 시 객관적이고 신속한 판별 기술로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 개발된 SCAR 마커는 소수의 국내 육성 품종과 일반적으로 재배되는 품종을 대상으로 하였기 때문에 앞으로 다양한 유전자원에 적용하여 DNA 다형성 정보를 얻고 그 결과에 따라 추가 보완할 필요성이 있다고 판단된다.

초 록

중요 작물의 신속·정확하고 비용 면에서 효율적인 품종 판별은 실용적인 육종과 육종가의 권리 보호를 위해 필수적이다. 감 품종을 구분하는 전통적인 방법은 형태적인 특성 평가를 근거로 하지만 유전적으로 밀접하게 연관되어 있는 품종들은 형태적 형질에 의해 품종을 구별하기는 어렵다. 본 연구는 국

내와 일본 감 32 품종을 판별할 수 있는 신뢰성 있는 DNA 마커를 개발하고자 수행하였다. 40종의 임의 프라이머를 이용한 RAPD 분석을 통해 품종 간 다형성을 나타내는 밴드 309종을 획득하였다. 프라이머에 따라 얻은 다형성 밴드 수는 4(OPP-08)-14(UBC159)개로 평균 7.7개였다. SCAR 마커로 전환하기 위해 57종의 RAPD 단편들을 선별하여 염기서열을 분석하였고 그 중 15종이 SCAR 마커로 전환되었다. 개발된 15종의 SCAR마커는 프라이머 조합에 따라 RAPD 단편과 동일한 크기나 작은 크기의 단일 밴드가 증폭되었다. 이들 마커 중 8종(PS225_200, PSN05_420, PSF13_523, PSN11_540, PS372_567, PS485_569, PSP08_635, PS631_735)의 조합을 적용하여 증폭산물의 수와 크기에 따라 감 32품종의 판별이 가능하였다. 새로 개발된 마커들은 감 품종 판별을 위해 신뢰성 있는 수단으로서 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

추가 주요어 : 감나무, 다형성, RAPD, 염기서열

인용문헌

Badenes, M., A. Garcés, C. Romero, M. Romero, J. Clavé, M. Rovira, and G. Llácer. 2003. Genetic diversity of introduced

- and local Spanish persimmon cultivars revealed by RAPD markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 50:579-585.
- Bernet, G.P., S. Bramardi, D. Calvache, E.A. Carbonell, and M.J. Asins. 2003. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breed.* 122:146-152.
- Cho, D.H., I.J. Chun, S.T. Kwon, Y.S. Song, and Y.D. Chou. 2007. Genetic relationships of Korean astringent persimmon varieties using AFLP analysis. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 25:114-118.
- Cho, K.H., I.S. Shin, S.H. Kim, J.H. Kim, D.H. Kim, Y.K. Shin, and H.S. Hwang. 2012. Identification of Korean pear cultivars using combinations of SCAR markers. *Hort. Environ. Biotechnol.* 53:228-236.
- Cho, K.H., S. Heo, H.Y. Kim, J.H. Kim, I.S. Shin, S.E. Han, S.H. Kim, and D.H. Kim. 2010. Discrimination of Korean apple cultivars using combination of RAPD-SCAR markers. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:825-835.
- Du, X.Y., Q.L. Zhang, and Z.R. Luo. 2009. Comparison of four molecular markers for genetic analysis in *Diospyros* L. (Ebenaceae). *Plant Syst. Evol.* 281:171-181.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011. FAOSTAT database. <http://faostat.fao.org/>
- Gallego, F.J. and I. Martínez. 1997. Method to improve reliability of random amplified polymorphic DNA markers. *BioTechniques* 23:663-664.
- Goulão, L., L. Cabrita, C.M. Oliveira, and J.M. Leitão. 2001. Comparing RAPD and AFLPTM analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. *Euphytica* 119:259-270.
- Guo, D.L. and Z.R. Luo. 2006. Genetic relationships of some PCNA persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) from China and Japan revealed by SRAP analysis. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53:1597-1603.
- Hwang, J.H., Y.O. Park, S.C. Kim, Y.J. Lee, J.S. Kang, Y.W. Choi, B.G. Son, and Y.H. Park. 2010. Evaluation of genetic diversity among persimmon cultivars (*Diospyros kaki* Thunb.) using microsatellite markers. *J. Life Sci.* 20:632-638.
- Je, H.J., Y.O. Park, S.C. Kim, J.H. Hwang, Y.J. Lee, B.G. Son, and Y.H. Park. 2009. Evaluation of genetic relationships among persimmon cultivars introduced and indigenous in Korea using RAPD. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 27:448-455.
- Kanzaki, S., K. Yonemori, and A. Sugiura. 2001. Identification of molecular markers linked to the trait of natural astringency loss of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:51-55.
- Kim, S.H., J.W. Chung, J.K. Moon, S.H. Woo, Y.G. Cho, S.K. Jong, and H.S. Kim. 2006. Discrimination of Korean soybean cultivars by SSR markers. *Kor. J. Crop Sci.* 51:658-668.
- Lin, J., X.C. Wang, Y.H. Chang, and J.G. Fang. 2011. Development of a novel and efficient strategy for practical identification of *Pyrus* spp (Rosaceae) cultivars using RAPD fingerprints. *Genet. Mol. Res.* 10:932-942.
- Luo, Z.R., K. Yonemori, and A. Sugiura. 1995. Evaluation of RAPD analysis for cultivar identification of persimmons. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 64:535-541.
- Maki, S., K. Oyama, T. Kurahashi, T. Nakahira, T. Kawabata, and T. Yamada. 2001. RFLP analysis for cultivar identification of persimmons. *Sci. Hort.* 91:407-412.
- Nakamura, Y. and S. Kobayashi. 1994. DNA restriction fragment length variability in *Diospyros kaki* and related *Diospyros* species. *HortScience* 29:809-811.
- Naval, M. del M., E. Zuriaga, S. Pecchioli, G. Llácer, E. Giordani, and M.L. Badenes. 2010. Analysis of genetic diversity among persimmon cultivars using microsatellite markers. *Tree Genet. Genom.* 6:677-687.
- Park, Y.O., D.S. Park, J.Y. Son, S.T. Choi, S.C. Kim, G.P. Hong, and Y.H. Park. 2012. Evaluation of genetic diversity among persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) collection lines and cultivars using simple sequence repeat markers. *Kor. J. Breed. Sci.* 44:127-135.
- Paran, I. and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.
- Soriano, J.M., S. Pecchioli, C. Romero, S. Vilanova, G. Llácer, E. Giordani, and M.L. Badenes. 2006. Development of microsatellite markers in polyploidy persimmon (*Diospyros kaki* Lf.) from an enriched genomic library. *Mol. Ecol. Notes* 6:368-370.
- This, P., C. Cuisset, and J.M. Boursiquot. 1997. Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. *Am. J. Enol. Vitic.* 48:492-501.
- Vidal, J.R., P. Delavault, M. Coarer, and A. Defontaine. 2000. Design of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar-specific SCAR primers for PCR fingerprinting. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1194-1201.
- Xu, H., D.J. Wilson, S. Arulsekar, and A.T. Bakalinsky. 1995. Sequence-specific polymerase chain-reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (*Vitis*) rootstocks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120:714-720.
- Yamagishi, M., S. Matsumoto, A. Nakatsuka, and H. Itamura. 2005. Identification of persimmon (*Diospyros kaki*) cultivars and phenetic relationships between *Diospyros* species by more effective RAPD analysis. *Sci. Hort.* 105:283-290.
- Yonemori, K., A. Sugiura, and M. Yamada. 2000. Persimmon genetics and breeding. *Plant Breed. Rev.* 19:191-225.
- Yonemori, K., C. Honsho, A. Kitajima, M. Aradhya, E. Giordani, E. Bellini, and D.E. Parfitt. 2008. Relationship of European persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cultivars to Asian cultivars, characterized using AFLPs. *Genet. Resour. Crop Evol.* 55:81-89.
- Yu, M.L., W.Y. Wang, R.J. Ma, Z.J. Shen, and J.G. Fang. 2012. An improved strategy based on RAPD markers efficiently identified 95 peach cultivars. *Genet. Mol. Res.* 11:1158-1168.
- Zhuang, D.H., A. Kitajima, M. Ishida, and Y. Sobajima. 1990. Chromosome numbers of *Diospyros kaki* cultivars. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 59:289-297.