

## Efficiency of Sex-linked Molecular Markers for the Selection of Seedlings Bearing Male Flowers in Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.)

Yeo Ok Park<sup>1</sup>, Ji-Young Shon<sup>1</sup>, Seong-Tae Choi<sup>1</sup>, Eun-Gyeong Kim<sup>1</sup> and Dong Wan Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Sweet Persimmon Research Institute, 30 Hagye-ro 138beon-gil, Jinjeong, Gimhae, Gyeongnam 50871, Korea

<sup>2</sup>Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

Received October 22, 2019 / Revised February 12, 2020 / Accepted March 9, 2020

Persimmon flowers are fruit-bearing female, pollen-bearing male, or hermaphrodite, containing both a pistil and a stamen. Using prominent PCNA persimmons as male parents is very important for breeding programs, as the selection procedure for new cultivars bearing male flowers requires a long time and a large field in a traditional crossbreeding method. To improve breeding efficiency through early selection of male flower-bearing plants at the seedling stage, analysis was performed on 88 major cultivars whose gender expressions are known, using two male flower selection markers recommended by Akagi et al. The *OGI* locus marker and *DISx-AF4S* marker results showed that 83 and 72 cultivars, respectively, matched in terms of gender expression and marker analysis. For the *OGI* locus marker, 890 plants were selected from 2,509 seedlings obtained from crossbreeding with the mother plant "Migamjosang," which was the breeding cultivar. Comparing the gender expression of the flowers and the marker with 1,186 crossbred seedlings, excluding the unfertilized and dead plants, inconsistencies were found in 401 plants (33.8%). For the *DISx-AF4S* marker, 636 plants were selected from 889 seedlings obtained from 12 cross-combinations. The results of the sex expression and marker analysis were compared to 379 plants, excluding the unfertilized and dead plants, and inconsistencies were found in 247 plants (65.2%). These results indicate that the examined *DISx-AF4S* and *OGI* locus markers would not be suitable for utilization in the breeding field.

**Key words** : Androecious, breeding, male flower, PCNA, selection

### 서 론

감(*Diospyros kaki* Thunb.)은 감나무과(Ebenaceae), 감나무속(*Diospyros*)에 속하는 목본성 다년생 식물이며, 원산지는 동아시아로 기원 전부터 재배되어 왔다[18]. 대부분의 식물은 자성과 응성의 기능을 모두 가지고 있는 자웅동체이다. 그러나 약 6%의 식물에서 응성체는 수꽃을, 자성체는 암꽃만을 생산한다. 감 꽃은 과실을 맺는 암꽃과 꽃가루를 내는 수꽃, 암술과 수술을 모두 가진 양성화가 있다. 품종에 따라서 암꽃만 맺는 것, 암꽃과 수꽃이 함께 맺는 것, 암꽃과 수꽃이 달리고 양성화도 함께 피는 것 등이 있다. 단감의 경우, 전통적인 교배육종 방법은 부분과 모본을 선정 후 인공교배를 하여 교배한 과실을 수확하고 종자를 재취하여 저장하였다가 다음해 파종, 정식하여 6~8년 정도 키운 다음, 착과하면 3년 정도 과실 특성을 조사하여 유망한 계통을 선발하고 있다. 감과 같은 과수작물

은 일정기간 영양생장을 하고 생식생장을 하는 유년성을 지니고 있어서 과실 착과나 꽃의 성 표현을 확인하기까지 장시간이 소요되는 어려운 점이 있다. 교배 과정에 부분으로 이용되는 수분수 품종으로는 '선사환'(Zenjimaruru, Pollination-Variant Non-Astringent), '사에후지'(Sae-Fuji, PVNA), '조홍시'(Johongsi, PVNA) 등이 있지만, 현재까지는 수꽃의 개화기간이 길고 수꽃 및 화분량이 많은 'Zenjimaruru'가 가장 널리 사용되고 있다. 그러나 'Zenjimaruru'는 불완전단감으로 교배육종의 부분으로 활용하면 다음세대에서 완전단감 계통을 획득할 확률이 낮아져 주로 6개의 단일 열성 대립유전자(*ast*)를 가진 완전단감을 부분으로 사용하고 있다[6]. 그러므로 교배에 활용할 완전단감 부분 육종 역시 완전단감 품종 육종만큼 중요하다고 할 수 있다. 작물육종에서 DNA 마커활용은 유전형질의 본질인 DNA의 염기서열 차이를 대상으로 하기 때문에 개체 간 변이 수준이 매우 높으며, 식물의 발육단계와 관계없이 안정적으로 모든 조직에서 탐지 할 수 있다. 또한 환경에 영향을 받지 않고, 유전자간의 상위작용이나 다면발현에 의한 영향을 받지 않아 전통적인 방법보다 정확한 선발과 유전학적 분류가 가능하다. 감에 있어서 이러한 DNA 마커를 이용한 분자마커 이용선발(MAS, marker-assisted selection) 연구는 유묘기 완전단감 형질 선발[9, 15, 16, 19], 유연관계[5, 13, 14, 17, 20, 21]에 국한되다 최근 품종 판별 분야로 점차 확대되고 있는

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3482, Fax : +82-55-213-3480

E-mail : [dwkim@changwon.ac.kr](mailto:dwkim@changwon.ac.kr)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

추세이다.

감나무속의 성 결정인자로 알려진 유전자로는 *OGI* (Japanese for female tree)와 *MeGI* (Japanese for female tree)가 있는데, *OGI*는 male-specific conservation을 나타내는 Y-specific sex-determinant candidate로써, 상염색체인 *MeGI* 유전자를 표적으로 하는 small RNA를 암호화하며, *MeGI*는 꽃밥(약)의 임성을 조절하는 homeodomain TF이다[2]. 한편, 감나무에서 발육중인 암꽃보다는 수꽃 꽃눈에서 *MeGI* promoter의 메틸화가 더욱 많이 발생하고, DNA methylation inhibitor는 발육중인 수꽃 꽃눈에서 암꽃을 형성하도록 유도하는데, Y-염색체를 가진 나무에서 *OGI*의 발현은 *OGI* promoter에 삽입된 short interspersed nuclear element (SINE)-like insertion에 의해 침묵된다[1].

DISx-AF4S marker는 2배체인 곶감나무(*Diospyros lotus* L.)로부터 개발된 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker이다. 속씨식물에 속하는 대부분의 다른 2배체 식물에서 보고된 것처럼, *D. lotus*의 성결정도 heterogametic male type (XY type)에 의해 이루어진다. 마커 분석 결과는 수꽃이 피는 개체에서만 400 bp에서 밴드가 증폭되는 것을 알 수 있다[3].

관행 교배육종법으로 부분용 수꽃 신품종을 육성한다면 최종 선발까지 15년 정도의 장기간과 넓은 시험포장이 요구된다. 따라서 유묘기에 수꽃 착생 개체를 조기에 선발하여 육종 효율을 증진하고자 본 연구에서는 Akagi 등[3, 4]에 의해 보고된 수꽃 선발 마커들을 주요 품종 및 교배집단에 적용하여 부분용 수꽃 신품종 육성을 위한 MAS 활용 가능성을 검증하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 DNA 추출

경상남도농업기술원 단감연구소 시험포장에 재식되어 있는 주요 재배품종 88종(PCNA 33종, PVNA 23종, PVA 3종, PCA 28종, unknown 1종) (Table 1)과 완전단감과 비완전단감 간 교배조합으로부터 획득한 교배실생 2,509개체를 식물재료로 사용하였다(Table 2). 이들 식물재료를 대상으로 한 분자마커 검정을 위하여 2012, 2014년에 DNA 추출시료로 사용할 어린잎을 전엽 이후인 4월 하순부터 개화 전 5월 사이 2~3엽이 전개된 시기에 채집하였다. 수집한 잎은 즉시 -80°C에 보존하였으며, 필요할 때마다 액체질소로 마쇄하여 사용하였다. DNA는 액체질소로 마쇄한 잎 1 g으로부터 Plant Genomic DNA isolation kit (Core-bio, Seoul, Korea)를 사용하여 추출하였고 분광광도계(UV-2450, Shimadzu, Tokyo, Japan) 혹은 Pico200 (Picodrop, Hinxton, England)으로 정량, 정성 분석한 후 20 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup>가 되도록 희석하여 이용하였다.

### SCAR 마커분석

Akagi 등에 의해 개발한 *OGI* locus marker, *OGI*-candF1 (5'-CACAGTAGTCAT ATATTTTTAGC-3')와 *OGI*-spR (5'-CTGGCACACAAAATATTTTCAACCCT-3'), DISx-AF4 marker, DISx-AF4-3F (5'-ACATCCAAAGTTCTGGAGAATCA-3')와 DISx-AF4-3R (5'-ATTGGTGCTTGGTCAAACATATC-3')를 사용하여 마커형과 수꽃 형질간 연관성을 분석하였다. PCR mixture는 dNTPs 0.2 mM, *Taq* DNA polymerase 1 units, 10× reaction buffer 2  $\mu$ l가 포함된 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)와 10 pmole의 Forward, Reverse primer 각 4  $\mu$ l를 총 20  $\mu$ l로 혼합하여 사용하였다. PCR 조건은 PCR 기기(Biometra, Gottingen, Germany)를 이용하여 *OGI* locus marker는 94°C에서 3분간 1회, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초간 35회 반복하였으며, 최종적으로 72°C에서 7분간 extension을 수행하였다. DISx-AF4 marker의 PCR 조건은 94°C에서 30초간 1회, 98°C에서 10초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초간 30회 반복하였으며, 최종적으로 72°C에서 4분간 extension을 수행하였다.

PCR 증폭산물은 RedSafe™ (Intron, Seongnam, Korea)를 넣어 제조한 2% agarose gel (Bioshop Biotechnology, Canada)에 전기영동(1× Tris-borate-EDTA buffer) 후 Gel Documentation System (Bio-rad, California, USA)을 이용하여 반복 확인하였다.

### 개화기 성표현 조사

감 꽃의 개화기는 빠르면 5월 상순에서부터 중순에 걸쳐 품종마다 다르게 꽃이 핀다. 경상남도농업기술원 단감연구소 시험포장에 재식되어 있는 완전단감과 비완전단감 간 교배조합으로부터 획득한 교배실생 1,186개체의 개화기도 착과가 시작된 2016년부터 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 마커와 주요 품종 간 성 표현 일치 확률

마커의 실효성 있는 검증을 위하여 과실의 성 표현을 정확히 알고 있는 주요품종(88종)을 대상으로 *OGI*-spR/*OGI*-candF1조합과 DISx-AF4-3F/DISx-AF4-3R조합을 적용하여 분석하였다. 분석에 이용된 88품종은 PCNA 33종, PVNA 23종, PVA 3종, PCA 28종, unknown 1종으로 분류되었고, Origin에 따라서는 China 3종, Italy 1종, Spain 1종, Korea 29종, Japan 54종으로 나뉘어졌다(Table 1). 밴드 형성 유무에 따라 분석한 *OGI*-spR/*OGI*-candF1조합의 결과는 'Johongsi', '가라'(Kyara, PVNA), 'DS1' (DS1, PVNA), 'DS3' (DS3, PVNA), 'Okugoshu' (만어소, PCNA) 5품종에서 성 표현이 다른 것을 확인하였다. '대안단감'(Daeandangam, PCNA)은 주로 암꽃만 착생하나 수세가 약하여 잔가지가 많이 발생하면 수꽃을

Table 1. Comparing of the gender expressions and marker analysis results of persimmon cultivars and collection lines (*Diospyros kaki* Thunb.) tested in this study

No.	Cultivar	Sexuality in this study <sup>z</sup>	OGI marker <sup>y</sup>	DISx marker <sup>x</sup>	Type <sup>w</sup>	Origin
1	Johongsi	FM	A	P	PVNA	Korea
2	Nishimurawase	FM	P	P	PVNA	Japan
3	Zenjimaru	FM	P	P	PVNA	Japan
4	Akagaki	FM	P	P	PVNA	Japan
5	Shougatsu	FM	P	P	PVNA	Japan
6	Jamisi	FM	P	P	PVNA	Korea
7	Migamjosang	FM	P	P	PVNA	Korea
8	Sae-Fuji	FM	P	P	PVNA	Japan
9	Migatanigoshō	F	A	A	PVNA	Japan
10	Haschiuri	F	A	A	PVNA	Japan
11	Amahyakume	F	A	A	PVNA	Japan
12	Koharu	FM	P	P	PVNA	Japan
13	Kyara	F	P	P	PVNA	Japan
14	Sanggokuitsy	F	A	A	PVNA	Japan
15	Tenrubou	F	A	A	PVNA	Japan
16	Toyoga	F	A	P	PVNA	Japan
17	Niitsugaki	F	A	A	PVNA	Japan
18	Mizushima	F	A	A	PVNA	Japan
19	Baojiaozi	FM	P	P	PVNA	China
20	Kaki Tipo	F	A	P	PVNA	Italy
21	DS1	FM	A	P	PVNA	Korea
22	DS2	FM	P	P	PVNA	Korea
23	DS3	FM	A	P	PVNA	Korea
24	Rojo Brillante	F	A	P	PVA	Spain
25	Hachiya	F	A	P	PVA	Japan
26	Yaoki	F	A	P	PVA	Japan
27	Mikado	FM	P	P	PCNA	Japan
28	Okugoshō	FM	A	P	PCNA	Japan
29	Goshō	FM	P	P	PCNA	Japan
30	Tenjingoshō	F	A	P	PCNA	Japan
31	Hanagoshō	FM	P	P	PCNA	Japan
32	Kinshu	FM	P	P	PCNA	Japan
33	Taurei	FM	P	P	PCNA	Japan
34	Taishu	FM	P	P	PCNA	Japan
35	Maegawajiro	F	A	A	PCNA	Japan
36	Toyouchi	F	A	A	PCNA	Japan
37	Fujiwaragoshō	F	A	P	PCNA	Japan
38	Jiro	F	A	A	PCNA	Japan
39	Midai	F	A	A	PCNA	Japan
40	Mammoth	FM	P	P	PCNA	Japan
41	Sunami	F	A	A	PCNA	Japan
42	Mazumotowase Fuyu	F	A	A	PCNA	Japan
43	Uenishiwase	F	A	P	PCNA	Japan
44	Fuyu	F	A	A	PCNA	Japan
45	Ichikikeijiro	F	A	A	PCNA	Japan
46	Suruga	F	A	P	PCNA	Japan
47	Yaizuwasejiro	F	A	A	PCNA	Japan
48	Ro-19	F	A	A	PCNA	Japan
49	Wakasugikeijiro	F	A	A	PCNA	Japan

Table 1. Continued

No.	Cultivar	Sexuality in this study <sup>z</sup>	<i>OGI</i> marker <sup>y</sup>	DISx marker <sup>x</sup>	Type <sup>w</sup>	Origin
50	Daeandangam	FM	P	P	PCNA	Korea
51	IsaHaya	FM	P	P	PCNA	Japan
52	Wakakishiro	F	A	A	PCNA	Japan
53	Kastusa	F	A	A	PCNA	Japan
54	Youhou	F	A	A	PCNA	Japan
55	Izu	F	A	A	PCNA	Japan
56	Shinsyu	F	A	A	PCNA	Japan
57	Dongwon1	F	A	P	PCNA	Korea
58	Dongwon2	F	A	P	PCNA	Korea
59	Dongwon3	F	A	P	PCNA	Korea
60	Tonewase	F	A	A	PCA	Japan
61	Sugitawase	F	A	A	PCA	Japan
62	Superhiratanenashi	F	A	A	PCA	Japan
63	O-tanenashi	F	A	A	PCA	Japan
64	Hiratanenashi	F	A	A	PCA	Japan
65	Damopan	F	A	A	PCA	China
66	Wasezizya	F	A	A	PCA	Japan
67	Atago	FM	P	P	PCA	Japan
68	Wasesaijo	FM	P	P	PCA	Japan
69	Gogseung-Tabaegam	FM	P	P	PCA	Korea
70	O-miyawase	F	A	A	PCA	Japan
71	Sancheong-Danseongsi	FM	P	P	PCA	Korea
72	Sancheong-Kojongsi	FM	P	P	PCA	Korea
73	Sancheong-Godongsi	F	A	P	PCA	Korea
74	Saijo	F	A	A	PCA	Korea
75	Yeongdeong-Weolhasi	F	A	A	PCA	Korea
76	Myeongju-Kojongsi	F	A	A	PCA	Korea
77	Cheongdo-Bansi	F	A	A	PCA	Korea
78	Gyeongsan-Bansi	F	A	A	PCA	Korea
79	Uiseong-Sagoksi	F	A	A	PCA	Korea
80	Haman-Mulgam	F	A	A	PCA	Korea
81	Haman-Bansi	F	A	A	PCA	Korea
82	Goesan-Durigam	F	A	A	PCA	Korea
83	Suhong	F	A	A	PCA	Korea
84	Mireo	F	A	A	PCA	Korea
85	Sangjudungsi	F	A	A	PCA	Korea
86	Eunpungsunsi	F	A	P	PCA	Korea
87	Yeongju-Gojongsi	F	A	P	PCA	Korea
88	Diamond leaf persimmon	FM	P	P	-	China

<sup>z</sup>)FM: monoecious cultivar, F: female cultivar, -: data unknown

<sup>y</sup>)Genotype of a male-linked gene locus (*OGI*) SCAR marker (Akagi, 2016). A, absent; P, present.

<sup>x</sup>)DISx-AF4S SCAR marker (Akagi, 2014). A, absent; P, present.

<sup>w</sup>)PCNA, pollination-constant non-astringent; PVNA, pollination-variant non-astringent; PVA, pollination-variant astringent; PCA, pollination-constant astringent.

- DS1, DS2, DS3: Collection line, Bud sport from 'Nishmurawase'

- Dongwon 1, 2, 3: Collection cultivar, Bud sport from 'Uenishiwase'

- Diamond leaf persimmon: *D. rhombifolia* Hemsl.

We were collected from the orchard of the Sweet Persimmon Research Institute, Gyeongnam Agricultural Research & Extension Services, Gimhae.

Table 2. Marker-assisted selection (MAS) for male flowering candidate persimmon plants (*Diospyros kaki* Thunb.) from various cross combinations using *male*-linked gene locus (*OGI*) specific marker OGI-spR/OGI-candF1

Cross year	Cross combination	Total	No. selected male flowering candidates
2011	Migamjosaeng X Taishu	320	233
	Migamjosaeng X 104 (line)	122	53
	Uenishiwase X Tiashu	137	72
	Hachiya X Tiashu	129	38
	Migamjosaeng X Taishu 2	55	26
	Tiashu X Tiashu	35	0
2013	Sunami X Taishu	339	14
	Sunami X 104 (line)	54	3
	Fuyu X Taishu	568	127
	Taishu X Taurei	12	11
	Taishu X Kinshu	2	2
	Fuyu X 104 (line)	443	98
	Black persimmon (PVNA) X Taishu	174	115
	Soshu X Tiashu	78	63
	Tiashu X Tiashu	39	33
	Black persimmon (PCA) X Taishu	2	2
total		2,509	890

맷으며, ‘이사하야’(IsaHaya, PCNA)의 경우 수꽃이 착생하지 않는다고 하였다[12]. 그러나, ‘Daehandangam’, ‘IsaHaya’ 품종의 장기간 재배 경험 상 유목기 포트 재배 시, 10년 내의 수령일 때도 2년 정도 수꽃이 피는 것을 확인하였고, 수령이 17년 생인 당시에도 수꽃이 착생 되어 성 표현에 수꽃이 착생하는 것으로 표기하였다. 수집 계통 ‘DS1’, ‘DS3’은 ‘서촌조생’(Nishmurawase, PVNA)으로부터 나온 아조변이지로 성 표현형을 보면 ‘DS1’, ‘DS2’, ‘DS3’ 3계통 모두 수꽃이 착생 된다. 그러나, *OGI* locus marker 분석 결과를 보면 ‘DS2’에서만 960 bp에서 밴드 형성을 확인하였고, ‘DS1’, ‘DS3’에서는 밴드가 증폭되

지 않아 성 표현과 차이가 있었다. 밴드 형성 유무 결과와 성 표현을 대조한 결과, 총 88품종에서 5품종이 차이가 있었고, 우리나라 3품종(Johongsi, DS1, DS3)이 이에 속하였다.

또한, 밴드 형성 유무에 따라 분석한 DISx-AF4-3F/DISx-AF4-3R조합의 결과, ‘Kyara’, ‘풍강’(Toyoga, PVNA), ‘Kaki Tipo’ (Kaki Tipo, PVNA), ‘Rojo Brillante’ (Rojo Brillante, PVA), ‘갑주백목’(Hachiya, PVA), ‘야오끼’(Yaoki, PVA), ‘천신어소’(Tenjingosho, PCNA), ‘등원어소’(Fujiwaragosho, PCNA), ‘상서조생’(Uenishiwase, PCNA), ‘준하’(Suruga, PCNA), ‘동원1’(Dongwon1, PCNA), ‘동원2’(Dongwon2, PCNA), ‘동원3’

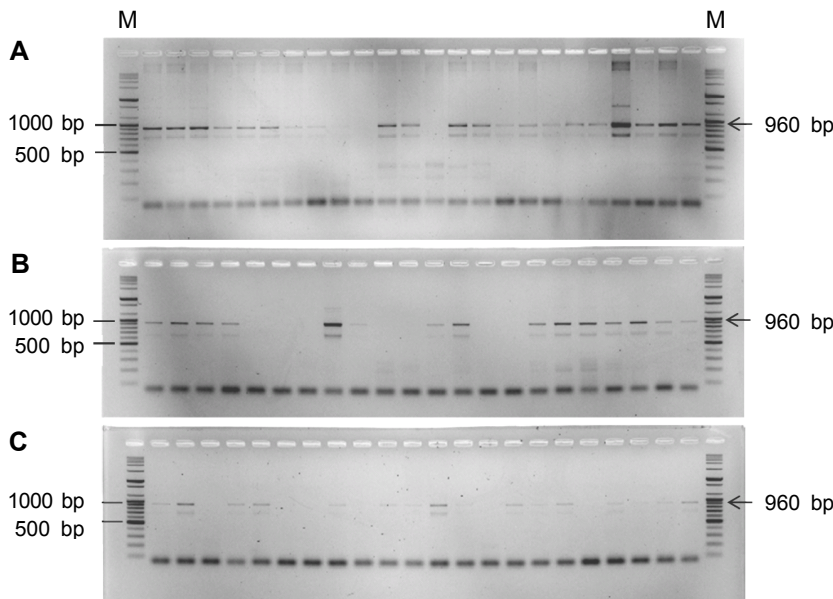


Fig. 1. Agarose gel image showing the segregation of the SCAR markers in breeding population by the primer pair OGI-spR/OGI-candF1. M, 100-bp plus size marker; A, Migamso-saeng X Taishu; B, Migamjosaeng X 104 (line); C, Uenishiwase X Tiashu. For a PCR by primer pair OGI-spR/OGI-candF1, monoecious cultivars showed the 960-bp fragment while female cultivars showed no band.

(Dongwon3, PCNA), ‘산청고동시’(Sancheong-Godongsi, PCA), ‘은풍준시’(Eunpungsunsi, PCA), ‘영주고종시’(Yeongju-Gojongsi, PCA) 16품종에서 성 표현이 다른 것을 확인하였다. (18.2%) 이 중 우리나라 품종인 ‘Dongwon1’, ‘Dongwon2’, ‘Dongwon3’, ‘Sancheong-Godongsi’, ‘Eunpungsunsi’, ‘Yeongju-Gojongsi’ (6품종)이 포함되었다.

DISx-AF4S marker는 2배체인 고욤나무(*Diospyros lotus* L.)로부터 개발되었고 수꽃 후대와 밀접하게 관련 있다고 보고되었지만[3] 아직 감나무속에서의 마커 적용 검토 결과 보고는 미흡한 수준이다. Zhang 등[23]이 감나무속과 감나무속 간 교배실생에 DISx-AF4S marker 적용 검토하여 표현형과 대조한

결과를 보면, *Diospyros lotus*, *Diospyros kaki* 29품종, *D. kaki* 교배 후대 F1 (8개체)를 포함한 48개체에서 성 표현형과 genotyping 분석결과가 일치한다고 하였다. 또한, Origin에 따라 China 87종, Japan 25종, Korea 3종, USA 1종을 포함한 116품종에 적용 검토한 결과, ‘감백목’(양성화, PVNA, Japan), ‘Shangcheng Dongshi’ (양성화, PCA, China), ‘Xiangyang Shuishi’ (양성화, PCA, China), ‘Luotian Tianshi’ (암꽃, PCNA, China) 4품종에서 성 표현과 마커 적용 분석 결과가 다른 것을 보고 하였다. ‘Shangcheng Dongshi’, ‘Xiangyang Shuishi’, ‘Luotian Tianshi’ 중국 품종은 아직 재배 경험이 없어서 성 표현을 확인 못하였지만 Zhang 등[23]이 ‘감백목’을

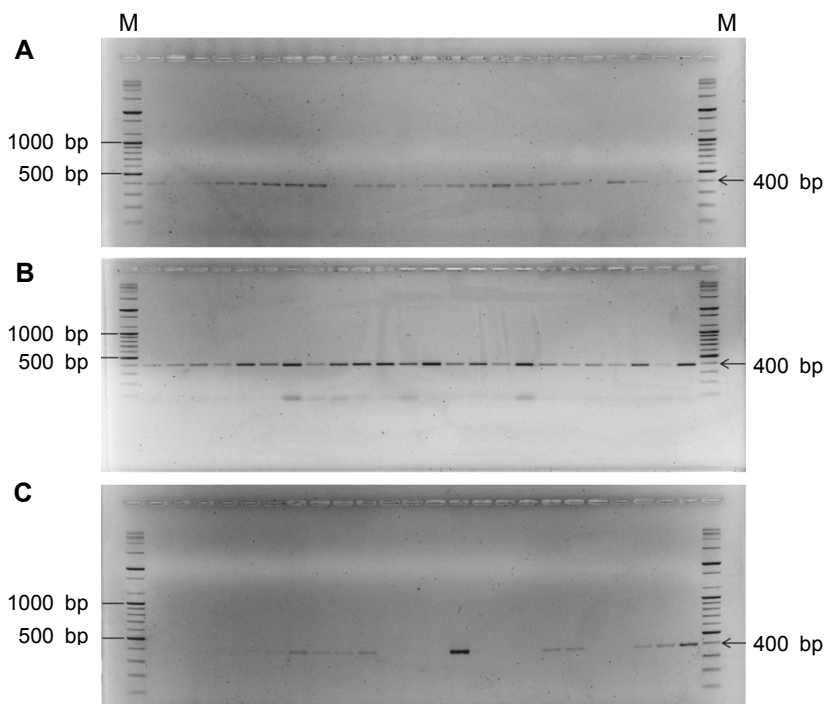


Fig. 2. Agarose gel image showing the segregation of the SCAR markers in breeding population of Sunami X Taishu (A), Soshu X Taishu (B), Migamjosaeng X 104 (line) (C), DISx-AF4-3F/DISx-AF4-3R marker specific 400-bp fragment. M, 100-bp plus size marker. For a PCR by primer pair DISx-AF4-3F/DISx-AF4-3R, monoecious cultivars showed the 400-bp fragment while female cultivars showed no band.

Table 3. Marker-assisted selection (MAS) for male flowering candidate persimmon plants (*Diospyros kaki* Thunb.) from various cross combinations using DISx-AF4S marker

Cross year	Cross combination	Total	No. selected male flowering candidates
2011	Migamjosaeng X 104 (line)	122	70
	Uenishiwase X Tiashu	137	92
	Hachiya X Tiashu	129	71
	Migamjosaeng X Taishu 2	55	30
	Tiashu X Tiashu	35	34
2013	Sunami X Taishu	104	77
	Taishu X Taurei	12	12
	Taishu X Kinshu	2	2
	Black persimmon (PVNA) X Taishu	174	132
	Soshu X Tiashu	78	78
	Tiashu X Tiashu	39	36
	Black persimmon (PCA) X Taishu	2	2
	total	889	636

Table 4. Phenotype observation and *OGI* locus marker amplification in F1 progeny derived from 16 cross-combinations

Cross year	Cross combination	Sexuality observation		<i>OGI</i> gene marker
		Phenotype <sup>z</sup>	Number	Mismatch number
2011	Migamjosaeng X Taishu	♀	83	58
		♂	2	0
		♀ ♂	13	1
		total	98	59
	Migamjosaeng X 104 (line)	♀	22	8
		♂	4	1
		♀ ♂	17	4
		total	43	13
	Uenishiwase X Tiashu	♀	78	44
		♂	0	0
♀ ♂		2	0	
total		80	44	
Hachiya X Tiashu	♀	41	10	
	♂	0	0	
	♀ ♂	8	3	
	total	49	13	
Migamjosaeng X Taishu 2	♀	10	6	
	♂	0	0	
	♀ ♂	9	3	
	total	19	9	
Tiashu X Tiashu	♀	6	0	
	♂	0	0	
	♀ ♂	1	1	
	total	7	1	
2013	Sunami X Taishu	♀	182	7
		♂	3	3
		♀ ♂	11	11
		total	196	21
	Sunami X 104 (line)	♀	35	2
		♂	1	1
		♀ ♂	1	1
		total	37	4
	Fuyu X Taishu	♀	237	58
		♂	14	9
♀ ♂		23	13	
total		274	80	
Taishu X Taurei	♀	5	5	
	♂	1	0	
	♀ ♂	1	0	
	total	7	5	
Taishu X Kinshu	♀	1	1	
	♂	0	0	
	♀ ♂	0	0	
	total	1	1	
Fuyu X 104 (line)	♀	225	57	
	♂	4	4	
	♀ ♂	29	15	
	total	258	76	

Table 4. Continued

Cross year	Cross combination	Sexuality observation		OGI gene marker
		Phenotype <sup>z</sup>	Number	Mismatch number
2013	Black persimmon(PVNA) X Taishu	♀	91	61
		♂	2	1
		♀♂	3	0
		total	96	62
	Soshu X Tiashu	♀	14	12
		♂	2	0
		♀♂	0	0
		total	16	12
	Tiashu X Tiashu	♀	2	1
		♂	3	0
		♀♂	0	0
		total	5	1
	Black persimmon (PCA) X Taishu	♀	y	-
		♂	-	-
		♀♂	-	-
		total	-	-
total			1,186	401

<sup>z</sup>)Observed between late April and early July, from 2016 to 2019.

<sup>y</sup>)Unfertilized seedlings.

In these conventional crosses, we used its occasional male flowers as male parents, which were collected from the orchard of the Sweet Persimmon Research Institute, Gyeongnam Agricultural Research & Extension Services, Gimhae.

양성화라고 보고한 것과 다르게 우리나라에서는 ‘감백목’은 암꽃만 착생한다. 또한, Akagi 등[4]이 보고한 자료를 보면 같은 품종 ‘감백목’의 경우, 교토대학교 과수 시험포장에서의 표현형은 암꽃으로, 히로시마 과수 시험장내에서의 표현형은 양성화로 조사되었다. 이처럼 같은 일본 내에서도 재배환경에 따라 성 표현이 다를 수도 있다.

Akagi 등[4]은 총 172품종에 OGI locus marker를 적용하여 분석한 결과와 꽃의 성 표현을 비교 대조 시 24품종에서 일치하지 않았고(14%), Zhang 등[24]은 male-linked gene locus (OGI)의 검증을 위해서 9개 *Diospyros species*를 포함한 62품종 (사곡시1, 사곡시2, 단성시, Korea 3종 포함)을 대상으로 성 표현과 대조한 결과, 마커 결과와 모두 일치한다 보고하였다. 감의 분류에 있어 PCNA type은 다시 Japanese PCNA (J-PCNA)와 Chinese PCNA (C-PCNA)로 나뉘어지며, PCNA 형질의 유전적 특성이 다르다[3]. 자연탈삼은 질적으로 유전되는 형질이며, J-PCNA에서는 열성 형질이지만[6], C-PCNA에서는 우성 형질이고, C-PCNA와 J-PCNA간 교배를 한 F1 세대 에서 PCNA : non-PCNA가 1:1 비율로 분리되는데[7, 8], 우성 형질인 자연탈삼력으로 인해 C-PCNA가 감 육종 산업에서 주목을 받기도 했다. Akaki 등[4]과 Zhang 등[24]이 같은 OGI locus marker를 각 보유하고 있는 품종에 적용했으나 그 결과가 일치하지는 않았다. 이는 두 나라 PCNA 감의 유전적 차이에 의한 결과이지 않을까 추론해본다.

이처럼 같은 품종이라도 재배환경에 따른 성 표현이 다를 수 있고, 수꽃 착생 여부를 판별 가능하게 하는 마커의 적용 결과 또한 다를 수가 있어 마커의 효율성에 있어서 면밀한 검토가 필요하다고 판단하였다.

**다양한 교배조합으로부터 나온 교배실생 적용**

마커의 효율성을 검증해 보는 동시에 수꽃 착생개체를 선발하고자 OGI-spR/OGI-candF1조합, DISx-AF4S-3F/DISx-AF4-3R조합을 적용하여 분석하였다. OGI-spR/OGI-candF1조합의 경우 2011년, 2013년도에 ‘Migamjosaeng’ (모본, PVNA)에 ‘Taishu’ (부본, PCNA)을 교배한 조합을 포함한 여러 교배조합으로부터 나온 실생 2,509개체를 대상으로 마커 분석을 한 결과, 전체의 35.5%에 해당하는 890개체가 수꽃 착생 후보개체로 판별되었다(Fig. 1, Table 2). 또한, ‘Migamjosaeng’에 ‘Taishu’를 교배한 조합을 포함한 여러 교배조합으로부터 나온 실생 889개체를 대상으로 DISx-AF4S-3F/DISx-AF4-3R조합을 적용하여 마커 분석을 한 결과, 전체의 71.5%에 해당하는 636개체가 수꽃 착생 후보개체로 판별되었다(Fig. 2, Table 3).

**선발 마커 분석 결과와 성 표현 비교분석 결과**

OGI-spR/OGI-candF1조합을 분석 완료한 교배실생 2,509개체 중 아직 착과가 되지 않았거나 고사한 개체를 제외한 1,186개체를 대상으로 꽃의 성 표현을 조사 하였다(Table 4).



Table 5. Phenotype observation and DISx-AF4 marker amplification in F1 progeny derived from 12 cross-combinations

Cross year	Cross combination	Sexuality observation		DISx-AF4 marker
		<sup>z</sup> Phenotype	Number	Mismatch number
2011	Migamjosaeng X 104 (line)	♀	22	13
		♂	4	3
		♀ ♂	17	3
		total	43	19
	Uenishiwase X Tiashu	♀	76	57
		♂	0	0
		♀ ♂	2	0
		total	78	57
	Hachiya X Tiashu	♀	41	19
		♂	0	0
		♀ ♂	8	1
		total	49	20
Migamjosaeng X Taishu 2	♀	10	2	
	♂	0	0	
	♀ ♂	9	0	
	total	19	2	
Tiashu X Tiashu	♀	6	6	
	♂	0	0	
	♀ ♂	1	0	
	total	7	6	
Sunami X Taishu	♀	57	46	
	♂	2	0	
	♀ ♂	1	0	
	total	60	46	
Taishu X Taurei	♀	5	5	
	♂	1	0	
	♀ ♂	1	0	
	total	7	5	
Taishu X Kinshu	♀	1	1	
	♂	0	0	
	♀ ♂	0	0	
	total	1	1	
2013	Black persimmon(PVNA) X Taishu	♀	89	74
		♂	2	0
		♀ ♂	3	1
		total	94	75
Soshu X Tiashu	♀	14	14	
	♂	2	0	
	♀ ♂	0	0	
	total	16	14	
Tiashu X Tiashu	♀	2	2	
	♂	3	0	
	♀ ♂	0	0	
	total	5	2	
Black persimmon (PCA) X Taishu	♀	<sup>y</sup> -	-	
	♂	-	-	
	♀ ♂	-	-	
	total	-	-	
total			379	247

<sup>z</sup>Observed between late April and early July, from 2016 to 2019.

<sup>y</sup>Unfertilized seedlings.

In these conventional crosses, we used its occasional male flowers as male parents, which were collected from the orchard of the Sweet Persimmon Research Institute, Gyeongnam Agricultural Research & Extension Services, Gimhae.

총 1,186개체의 마커 분석 결과와 성 표현을 비교한 결과 401개체가 불일치한 것을 확인하였다(33.8%). Zhang 등[24]은 교배실생 143개체에 적용하여 마커 분석 결과와 성 표현을 비교 분석한 결과, 이중 95개체가 수꽃이 착생하는데 10개체가 성 표현과 일치하지 않는다고 하였다(10.5%). DISx-AF4S-3F/DISx-AF4-3R조합 분석 완료한 889개체 중 아직 착과가 되지 않았거나 고사한 개체를 제외한 379개체를 대상으로 꽃의 성 표현을 조사하였다(Table 5). 총 379개체의 마커 분석 결과와 성 표현을 비교한 결과 247개체가 불일치한 것을 확인하였다(65.2%).

Zhang 등[22-24]은 2개의 sex-linked molecular marker, DISx-AF4S와 OGI locus marker의 적용 검토 결과 거의 90% 효율성이 있다고 보고하였다. 이는 우리나라 교배실생에 적용하여 분석한 결과와 상당한 차이가 있다. 감의 유전체는 기본 6배체이며, 일부 무핵 품종은 9배체이다. 감은 유전적으로 복잡하며 2배체인 *Diospyros lotus* L.로부터 개발된 DISx-AF4S marker를 6배체인 감에 적용하기에는 그 flexibility가 또 포괄하지 못하는 이유도 있다고 보여진다. 실제, 완전단감 형질과 관련된 유전자(AST)로부터 개발된 완전단감 선발 마커를 교배실생에 적용하여 표현형과 대조할 결과를 보더라도 완전단감과 완전단감 교배조합으로부터 나온 후대(F1)의 탈삼형질별 표현형이 다양한 것을 볼 때 감 자체의 높은 heterozygosity도 요인으로 작용하는 것 같다[16]. 또, 중국, 일본 그리고 우리나라 품종의 유전적 차이가 있고, 각 국가마다 보유하고 있는 품종 및 계통을 교배하여 나온 교배실생들을 대상으로 적용하여 분석한 결과 역시 표현형질과는 다르게 마커 검증 결과 차이가 나는 요인이 될 수 있다고 생각한다. 마커 분석결과와 교배실생들의 성 표현 일치 확인 작업이 계속해서 필요하나, 우리나라 품종 및 교배실생에 적용하여 본 결과들을 종합하여 볼 때, DISx-AF4S와 OGI locus marker는 유묘기에 다양한 교배 집단에서 효율적으로 수꽃 착생 개체를 선발하는데 유용하지 않을 것으로 판단된다.

과수에 있어서도 유전체 정보는 유전자 지도 작성 및 분자표지의 발굴을 통한 분자유종 분야에도 활발히 활용되고 있다 [10, 11]. 그러나 감을 포함해 개발된 분자표지의 실제 적용 검증에 대한 보고는 드문 실정이다. 다른 과수작물 감귤, 사과, 배, 포도와는 다르게 감은 표준 유전체 해독이 이루어지지 않은 상태이며, 육종가의 입장에서 실제 현장에 필요한 마커 개발, 검증 후 적용까지 상당히 어려운 부분이 있다. 따라서 유전체 분석 기반의 분자유종 프로그램을 기존의 교배육종과 접목시킴으로써 체계적이며 목표형질 중심의 감 유전·육종 프로그램 개발이 필요하다고 판단된다.

## 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01270602)

의 지원에 의해 이루어진 것임.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Akagi, T., Henry, I. M., Kawai, T., Comai, L. and Tao, R. 2016a. Epigenetic regulation of the sex determination gene MeGI in polyploid persimmon. *Plant Cell* **28**, 2905-2915.
- Akagi, T., Henry, I. M., Tao, R. and Comai, L. 2014. A Y-chromosome-encoded small RNA acts as a sex determinant in persimmons. *Science* **346**, 646-650.
- Akagi, T., Kajita, K., Kibe, T., Morimura, H., Tsujimoto, T., Nishiyama, S., Kawai, T., Yamane, H. and Tao, R. 2014. Development of molecular markers associated with sexuality in *Diospyros lotus* L. and their application in *D. kaki* Thunb. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* **83**, 214-221.
- Akagi, T., Kawai, T. and Tao, R. 2016b. A male determinant gene in diploid dioecious *Diospyros*, OGI, is required for male flower production in monoecious individuals of Oriental persimmon (*D. kaki*). *SCI Hortic.* **213**, 243-251.
- Du, X., Zhang, Q. and Luo, Z. 2009. Development of retrotransposon primers and their utilization for germplasm identification in *Diospyros* spp. (Ebenaceae). *Tree Genet. Genomes* **5**, 235-245.
- Ikeda, I., Yamada, M., Kurihara, A. and Nishida, T. 1985. Inheritance of astringency in Japanese persimmon (in Japanese with English summary). *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* **54**, 39-45.
- Ikegami, A., Yamada, K., Sugiura, A., Sato, A. and Yamada, M. 2004. Segregation of astringency in F<sub>1</sub> progenies derived from crosses between pollination-constant, nonastringent persimmon cultivars. *Hortic. Sci.* **39**, 371-374.
- Ikegami, A., Eguchi, S., Yonemori, K., Yamada, M., Sato, A., Mitani, N. and Kitajima, A. 2006. Segregation of astringent progenies in the F<sub>1</sub> populations derived from crosses between a Chinese pollination-constant nonastringent (PCNA) 'Luo Tian Tian Shi', and Japanese PCNA and pollination-constant astringent (PCA) cultivars of Japanese origin. *Hortic. Sci.* **41**, 561-563.
- Kanzaki, S., Akagi, T., Masuko, T., Kimura, M., Yamada, M., Sato, A., Mitani, N., Ustunomiya, N. and Yonemori, K. 2010. SCAR Markers for practical application of marker-assisted selection in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) breeding. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* **79**, 150-155.
- Kim, H. B., Kim, J. J., Oh, C. J., Yun, S. H. and Song, K. J. 2016. Current status and prospects of molecular marker development for systematic breeding program in citrus. *J. Plant Biot.* **43**, 261-271.
- Kim, S. H., Park, S. J., Cho, K. H., Lee, H. C., Lee, J. W. and Choi, I. M. 2017. Development of SNP markers for the identification of apple flesh color based on RNA-Seq data. *J. Plant Biot.* **44**, 372-378.

12. Orchardiaceae 6 persimmon, pp125, Agricultural and Fishing Villages Culture Association, a division, JAPAN.
13. Park, Y. H., Je, H. G., Park, Y. O., Kim, S. C., Hwang, J. H., Lee, Y. J. and Son, B. G. 2009. Evaluation of genetic relationships among persimmon cultivars introduced and indigenous in Korea using RAPD. *Kor. J. Hortic. Sci.* **27**, 448-455.
14. Park, Y. H., Hwang, J. H., Park, Y. O., Kim, S. C., Lee, Y. J., Kang, J. S., Choi, Y. W. and Son, B. G. 2010. Evaluation of genetic diversity among persimmon cultivars (*Diospyros kaki* Thunb.) using microsatellite markers. *J. Life Sci.* **20**, 632-638.
15. Park, Y. O., Jae, H. J., Hwang, J. H., Kim, S. C., Lee, Y. J., Son, B. G. and Park, Y. H. 2013. Development of a SCAR marker for a selection of poillnation-constant non-astringent trait in persimmon (*Diospyros Kaki* Thunb.). *J. Agr. Life Sci.* **47**, 47-65.
16. Park, Y. O., Jae, H. J., Shon, J. Y., Choi, S. T., Kim, S. C., Cho, Y. C., Hong, K. P. and Park, Y. H. 2016. Efficiency of sequence characterized amplified region markers for selecting non-astringent persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). *Plant Breed. Biotechnol.* **4**, 336-344.
17. Soriano, J. M., Pecchioli, S., Romero, C., Vilanova, S., Llacer, G., Giordani, E. and Badenes, M. L. 2006. Development of microsatellite markers in polyploidy persimmon (*Diospyros kaki* L) from an enriched genomic library. *Mol. Ecol. Notes* **6**, 368-370.
18. Yonemori, K., Sugiura, A. and Yamada, M. 2000. Persimmon genetics and breeding. *Plant breeding reviews. J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **19**, 191-225.
19. Yonemori, K., Sugiura, A., Kanzaki, S., Sato, A. and Yamada, M. 2003. Molecular marker for selecting pollination-constant non-astringent (PCNA) type persimmon at the juvenile stage. *Acta Hortic.* **622**, 189-203.
20. Yonemori, K., Kanzaki, S., Honsho, C., Akagi, T. and Parfitt, D. E. 2008a. Phylogeny and cultivar development of *Diospyros kaki* a survey based on molecular analyses. *Adv. Hortic. Sci.* **22**, 261-268.
21. Yonemori, K., Honsho, C., Kitajima, A., Aradhya, M., Giordani, E., Bellini, E. and Parfitt, D. E. 2008b. Relationship of European persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cultivars to Asian cultivars characterized using AFLPs. *Genet. Resour. Crop Ev.* **55**, 81-89.
22. Zhang, M., Zhang, P., Xu, L., Guo, D., Luo, Z. and Zhang, Q. 2018. Research progress of sex determination and sex-linked markers in persimmon. *J. FRUIT Sci.* **35**, 610-619.
23. Zhang, P. X., HE, H., Luo, Z. R., Yang, Y., Wang, R. Z. and Zhang, Q. L. 2016a. Validation of male sex-linked DISx-AF4S marker in persimmon and F1 progenies. *Acta Hortic.* **43**, 47-54.
24. Zhang, P. X., Yang, S. C., Liu, Y. F., Zhang, Q. L., Xu, L. Q. and Luo, Z. R. 2016b. Validation of a male-linked gene locus (*OGL*) for sex identification in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) and its application in F1 progeny. *Plant Breed.* **135**, 721-727.

## 초록 : 감 수꽃 착생 실생개체 선발 마커의 효율성 검증

박여옥<sup>1</sup> · 손지영<sup>1</sup> · 최성태<sup>1</sup> · 김은경<sup>1</sup> · 김동완<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>경상남도농업기술원 단감연구소, <sup>2</sup>창원대학교 미생물학과)

감 꽃은 과실을 맺는 암꽃과 꽃가루를 내는 수꽃, 암술과 수술을 모두 가진 양성화가 있다. 관행 교배육종법으로 부분용 수꽃 신품종을 육성한다면 최종 선발까지 15년 정도의 장기간과 넓은 시험포장이 요구된다. 유묘기에 수꽃 착생 개체를 조기에 선발하여 육종효율을 증진하고자 꽃의 성표현을 알고 있는 주요 품종 88개체를 대상으로 Akagi 등(2014)이 보고한 수꽃 선발 마커들의 적용 효과를 검증하였다. *OGL* locus marker와 DISx-AF4S marker 적용 결과 각각 83품종, 72품종에서 꽃의 성표현과 분석 결과가 일치하였다. 육성품종인 '미감조생'을 모본으로 한 교배조합 등으로부터 나온 실생 2,509개체에 *OGL* locus marker 수꽃 선발 마커를 적용하여 890개체를 선발하였고, 분석 완료한 교배실생 중 아직 착과가 되지 않았거나 고사한 개체를 제외한 1,186개체를 대상으로 꽃의 성표현과 마커 분석 결과를 비교하였을 때 401개체가 불일치한 것을 확인하였다(33.8%). 다양한 교배조합으로부터 나온 실생 889개체에 DISx-AF4S marker를 적용하여 분석한 결과 636개체를 선발하였다. 분석 완료한 교배실생 중 아직 착과가 되지 않았거나 고사한 개체를 제외한 379개체를 대상으로 꽃의 성표현과 마커 분석 결과를 비교하였고 247개체가 불일치한 것을 확인하였다(65.2%). 이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 검토한 DISx-AF4S, *OGL* locus marker는 육종현장에서 활용하기에 유용하지 않을 것으로 판단된다.