국내 수집 감 품종을 이용한 EST-SSR marker 개발과 유전적 다양성 분석

서동휘, 정경미¹, 김세종¹, 김경민^{2*}

경북대학교 생태자원응용학부, ¹경북농업기술원 상주감시험장, ²경북대학교 응용생명과학부

Development of EST-SSR Markers and Analysis of Genetic Diversity Using Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb) Cultivars Collecting from Domestic

Dong Hywi Seo, Kyung Mi Jung¹, Se Jong Kim¹ and Kyung-Min Kim^{2*}

School of Applied Ecological Resources, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea

¹Sangju Persimmon Experiment Station, Gyeongbuk Agricultural Technology Administration, Sangju 742-842, Korea

²Division of Plant Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Abstract - Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb) fruit is one of the most important fruit and have been cultivated from ancient times in Korea. In this study, we found 16 EST-SSR markers that contained one or more EST-SSR sites from 246 cDNA sequences. The developing of EST-SSR marker analysis from 42 persimmon cultivars was compared by genetic relationships and morphological relationships using 6 qualitative traits (fruit related 6 traits) and 19 quantitative traits (flower related 19 traits). In this study, 25 primer sets were tested to identify PCR polymorphism and 14 potential EST-SSR primer pairs were selected. The result of morphological relationship EST-SSR marker analysis showed that the coefficient 0.02 was difficult to categorize in several groups. And then, coefficient 0.77 of genetic relationship showed that the group was classified as four groups. The result of correlation distance between genetic relationship and morphological relationship were investigated was low significance (-0.03). Our results also provided an optimized method for improvement of breeding efficiency and introduce of superior character at persimmon cultivars using EST-SSR markers which was useful for further investigation.

Key words - cDNA, Dendrogram, DNA marker, Persimmon

서 언

전세계에 분포하는 감나무 속(*Diospyros*) 식물은 대략 190여종이다. 그 중 과수로 이용되고 있는 것은 감(*Diospyros kaki* Thunb), 고욤(*Diospyros louts* L), 미국감(*Diospyros virginiana* L), 유시(*Diospyros oleifera* Cheng) 등 4종이다(Hwang *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2008). 감의 가공품인 꽃감의 소비가 증가하면서 재배면적과 생산량이 증가하고 있지만 생산비용으로 인해 가격이 저렴한 수입품이 늘어나고 있는 실정이다. 그 예로 꽃감의 2010년 10월까지

의 누적수입량은 2,494톤으로 2009년에 비해 42% 증가하였다. 감의 형태적 구분 방법에 있어서 식품(꽃감 등)을 만든 후에는 식별이 불가능하기 때문에 이를 악용하여 중국산 감을 이용해 식품을 제조 후 판매하는 행위가 늘어나고 있으며 이로 인해 판매자와 소비자의 피해가 증가하고 있다. 이런 문제들을 해결하는 데 있어 모든 생물이 고유하게 가지는 DNA 정보의 활용은 단시간에 재현성 높은 결과를 줄 수 있다는 점에서 매우 유용하다고 할 수 있다(Cho *et al.*, 2007).

지금 까지 식물 중 구분을 위하여 사용된 DNA 마커에는 RFLP(restriction fragment length polymorphism), RAPD(random amplified polymorphic DNAs), AFLP(amplified

*교신저자(E-mail) : kkm@knu.ac.kr

fragment length polymorphism), SSR(simple sequence repeat) 등이 있다(Powell *et al.*, 1996). 최근에는 다양한 조직에서 발현되는 유전자에 대한 대량의 정보를 알아내고 실제 발현되는 유전자를 근거로 유전자의 기능을 이해할 수 있을 뿐만 아니라, 염색체 위치를 밝히는데 유용한 EST (expressed sequence tags)-SSR 분석법이 많이 활용되고 있다(Kim *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2010; Qureshi *et al.*, 2004). 최근 들어서는 감을 재료로 DNA 마커를 이용한 유전적 분석은 RAPD(Je *et al.*, 2009; Yamagishi *et al.*, 2005; Yildiz *et al.*, 2007), AFLP(Cho *et al.*, 2007), RFLP(Hu *et al.*, 2008), SSR(Hwang *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2006; Naval *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009)을 이용해 분석한 바 있지만 AFLP분석과 RAPD분석은 실험의 어려움과 재현성 여부에 문제가 있으며, 연구에 사용된 재료가 주로 일본이나 중국품종이어서 우리 실정에 맞지 않고 PCR에 사용된 primer도 외국에서 개발한 primer를 사용해 우리나라 품종을 분석한 바 있다(Hwang *et al.*, 2010). 이런 품종 구분에 쓰인 마커는 고유의 것이 아니어서 앞으로 상업화가 된다면 로얄티 문제가 야기될 수 있다. 따라서, 본 연구는 경북농업기술원 감시험장에서 수집한 감 품종을 재료로 하여 품종구분을 할 수 있는 EST-SSR 마커를 개발하고 수집된 종들의 유연관계를 분석하여 육종의 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료 및 특성조사

본 연구는 경북농업기술원 상주감시험장에서 보존종인 중 가운데 완전뚫은감 37종, 불완전뚫은감 1종, 완전단감 2종, 불완전단감 2종을 포함하여 42개 수집 종을 이용하여 (Table 1), UPOV 조사 기준 [(http://www.seed.go.kr, 2007, Persimmon (Diospyros kaki L.)] 에 따라 과실에 관련된 6개 질적형질인 과실무게, 과신허경, 과경길이, 과경굵기, 과실중경 등이며, 19개의 양적형질은 과신허단면 일반적모양, 과실중단면의 정단부 모양, 과실직경대비 꽃받침크기, 꽃받침 자세, 종자색, 과즙량, 과실옆에서 본 일반적인 모양, 과정부 골의 정도, 과정부 동심원균열, 과정부 열과, 과실 세로 홈, 과실 배꼽 홈 깊이, 꽃받침의 홈, 과피색, 과육색, 과육 갈색 반점정도, 종자측면 모양, 뚫은 맛, 꽃받침 부착정도 등의 형태적인 특성을 조사하였다.

총 RNA 추출 및 genomic DNA 추출

총 RNA는 Get pure RNA Kit(Dojindo Co., Japan)를 사용하여 추출하였다. '상주수꽃감'의 신선한 감 잎 0.1 g 을 막자사발에 넣고 액체질소를 사용해 마쇄한 후, 1.5 mL 튜브에 시료를 옮겨 500 μ L lysis buffer와 5 μ L 2-mercaptoethanol를 넣어주었다. 교반 후 13,000 rpm으로 5 분간 원심분리하고 상층액을 새로운 1.5 mL 튜브에 옮겨 같은 양의 ethanol을 넣고 잘 섞은 후 13,000 rpm으로 2분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 1.2 mL ethanol (70%)을 넣고 교반 후 13,000 rpm으로 2분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후 200 μ L DNase I working solution을 첨가하여 침전물을 용해하였다. 37°C에서 15분간 반응 후 50 μ L precipitation solution I을 다시 넣고 교반한 후, 50 μ L precipitation solution II를 첨가하여 다시 교반하고 13,000rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 같은 양의 ethanol을 첨가하고 13,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후, 상층액을 완전히 제거하고 1.2 mL 70% ethanol을 넣어 피펫을 사용해 침전물을 수세하였다. 침전물을 완전히 건조시킨 후 30 μ L RNase free water에 용해하고 -80°C deep freezer에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Genomic DNA의 추출은 42개 감 수집종의 각각 잎 0.1 g 을 DNeasy plant mini kit(QIAGEN Co., Germany)을 사용해 Kim *et al.* (1997) 방법을 응용하여 DNA를 추출하였다. 추출한 용액은 Nano-drop 2000(Thermo Scientific, USA)분광광도계를 사용해 농도를 측정된 뒤 10 ng/ μ L로 맞추어 -20°C에 보관 후 실험에 사용하였다.

cDNA library 제작

cDNA library는 cDNA Synthesis Kit(TaKaRa Co., Japan)와 cDNA PCR Library Kit(TaKaRa Co., Japan)를 같이 사용하여 제작하였다. 2 μ L 5X 1st strand synthesis buffer, 0.5 μ L dNTP mixture(10 mM), 0.5 μ L RNase inhibitor(20 unit/ μ L), 1 μ L Oligo dT RA primer(1 μ g/ μ L), 0.5 μ L M-MLV reverse transcriptase를 혼합하고 5.5 μ L의 주형 RNA를 첨가하여 총량을 10 μ L로 조정하였다. 이것을 실온에 10 분간 반응시키고 42°C에서 1시간 처리하고 80°C에서 5분간 가열하여 first strand cDNA를 제작하였다.

이 first strand cDNA는 second strand cDNA 제작에 이용하였다. 10 μ L first strand cDNA synthesis mix와

Table 1. Persimmon cultivars assayed for genetic variation using EST-SSR markers and morphological traits

No.	Cultivars	Fruit type	No.	Cultivars	Fruit type
1	Yeongdongmeoggam	PCA ^z	22	Sancheongkkurigam	PCA
2	Milyangmulgam	PCA	23	Yecheonbuchaegam	PCA
3	Yeongdeogsangsi	PCA	24	Gabjubaegmog	PVNA
4	Yeongdeogttabaegam	PCA	25	Seongjumeoggam	PCA
5	Sangjususugam	PCA	26	Yecheonsusi	PCA
6	Sangjuguseulgam	PCA	27	Park 36	PCA
7	Sangjuskochgam	PCA	28	Seupeopyeonghaegmu	PCA
8	Sancheongdanseongchalgam	PVA ^y	29	Sancheongduligam	PCA
9	Sanguwonsi	PCA	30	Sancheongchalgam	PCA
10	Andongsusigam	PCA	31	Yeongdongbansi	PCA
11	Bonghwagolgam	PCA	32	Sancheongdanseongsi	PCA
12	Bonghwabansi	PCA	33	Yeongdongsusi	PCNA
13	Sancheonggodongsi	PCA	34	Samrangjwa	PCA
14	Andongjoggam	PCA	35	Sancheongdaegoksi	PCA
15	Yeongjugojongsi	PCA	36	Milsugam	PCA
16	Yeongjudongugam	PCA	37	Yesanbansi	PCA
17	Seonsahwan	PVNA ^w	38	Sinchu	PCNA ^x
18	Aerang	PCA	39	Sangchugam	PCA
19	Miryanggaebansi	PCA	40	Ppyojori	PCA
20	Miryanggodongsi	PCA	41	Siheunggojongsi	PCA
21	Miryangbansi	PCA	42	Sejo	PCA

^zPCA: pollination constant astringent. ^yPVA: pollination variant astringent. ^xPCNA: pollination constant nonastringent.^wPVNA: pollination variant nonastringent.

15 μ L 5X 2nd strand synthesis buffer, 1.5 μ L dNTP mixture(10 mM)를 제작한 후 DEPC수로 총량을 71 μ L로 조정하였다. 그 다음 1 μ L *E. coli* DNA polymerase I(20 unit/ μ L)과 1 μ L *E. coli* RNase H/*E. coli* DNA ligase mixture를 넣어 섞어주었다. 16°C에서 2 시간 반응 후에 72°C에서 가열한 후, 2 μ L T4 DNA polymerase(1 unit/ μ L)를 첨가해 잘 섞은 뒤 37°C에서 10 분간 반응하였다. 연쇄반응 방지를 위해 6 μ L stop solution(0.2M EDTA, 2 mg/mL glycogen, pH 8.0)를 넣어준 후, 순수한 second strand cDNA를 얻기 위해 동량의 PCI(phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1)를 넣고 1 분 동안 교반 후 15,000 rpm에서 5 분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 1.5 mL 튜브에 옮겨 동량의 CI (chloroform : isoamyl alcohol 24 : 1)를 넣어준 후 1 분 동안 잘 섞은

후 다시 15,000 rpm에서 5 분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 1.5 mL에 옮겨 동량의 4 M ammonium acetate와 isopropanol을 넣어주고 -80°C에 1 시간 보관 후 15,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 완전히 제거하고 1 mL 70% ethanol을 넣어 피펫을 사용해 침전물을 세정하였다.

침전물을 완전히 건조시킨 후 5 μ L RNase free water에 용해한 후, second strand cDNA에 Ex TaqTM polymerase (TaKaRaCo., Japan)를 사용하여 양 말단에 제한효소 영역(*EcoRI*)을 가진 adaptor(GAATTC)를 합성하였다. 30 μ L second strand cDNA, 5 μ L 10X Ex Taq buffer, 4 μ L dNTP mixture(2.5 mM), 1 μ L CA primer(20 pmole/ μ L, 5'-CGTGGTACCATGGTCTAGAGT-3'), 1 μ L RA primer (20 pmole/ μ L, 5'-CTGATCTAGACCTGCAGGCTC-3'),

0.5 μ L TaKaRa Ex TaqTM (5 unit/ μ L), 8.5 μ L nuclearase free water로 혼합하고 총 반응액은 50 μ L로 조정 후 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C 2 분 반응 후, 94°C 30 초, 60°C 30 초, 72°C 3 분으로 35 cycle 증폭하고 72°C 10 분간 추가로 반응하였다. PCR 산물 중 1 μ L를 1.0% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide에 염색한 후, UV transilluminator에서 cDNA합성을 확인하였다. 앞에서 제작한 cDNA library PCR을 효소와 불순물을 제거하기 위해 PCR purification kit(QIAGEN Co., Germany)로 정제하고 pGEM-T Easy Vector(Promega Co., USA)에 ligation하였다. 5 μ L 2X rapid ligation buffer, 1 μ L T4 DNA ligase(3 unit/ μ L), pGEM-T Easy Vector (50 ng/ μ L)와 cDNA PCR product를 1 : 1 비율로 맞춘 후 nuclearase free water로 총량을 10 μ L로 조정하고 4°C에서 12 시간 반응하였다.

5 μ L ligation product와 50 μ L DH5 α competent cell을 섞은 후 얼음에서 30 분간 반응시키고 42°C에서 1 분간 처리하였다. 다시 얼음에서 2 분간 처리하고 250 μ L LB broth (10 g Bacto tryptone, 5 g Bacto yeast extract, 5 g NaCl)을 첨가하여 37°C에서 180 rpm으로 1 시간 동안 배양하였다. 배양액은 LB 평판 배지(100 ppm ampicillin, 0.5 mM IPTG, 80 μ g/mL X-Gal 첨가)에 도말한 후 37°C에서 12 시간 동안 배양하였다. 배양 후 나온 푸른색 콜로니와 흰색 콜로니 중 포지티브 흰색 콜로니를 선발한 후 5 mL LB broth(10 g Bacto tryptone, 5 g Bacto yeast extract, 5 g NaCl)에 넣어 37°C에서 14 시간 이상 배양하였다.

배양액은 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리 한 후 Qiaprep spin miniprep kit(QIAGEN Co., Germany)를 사용하여 추출하였다. 상층액을 제거하고 250 μ L P1 buffer를 넣어 균체를 녹인 후 1.5 mL 튜브에 옮겨 250 μ L P2 buffer를 넣고 조심스럽게 섞어주었다. 350 μ L N3 buffer를 첨가하고 13,000 rpm으로 10 분간 원심분리 한 후, 상층액을 새로운 1.5 mL 튜브에 옮기고 다시 13,000 rpm으로 5 분간 원심분리하여 상층액을 새로운 1.5 mL 튜브에 옮겼다. 700 μ L를 spin column에 옮기고 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리 후 column에 걸린 하층액을 버렸다. 500 μ L PB buffer를 넣고 13,000 rpm으로 1분간 원심분리 한 후, 750 μ L를 PE buffer를 넣어 plasmid DNA를 세정하였다. 하층액을 버리고 여분의 용액을 완전히 제거하고 spin column을 1.5 mL 튜브에 넣어 30 μ L nuclearase free water로

plasmid DNA를 용해한 후 추출하였다.

제한효소 처리

추출한 plasmid DNA의 cDNA 유, 무를 확인하기 위해 제한효소 *EcoRI*(TaKaRa Co., Japan)을 처리해 주었다. 1 μ L plasmid DNA, 0.5 μ L *EcoRI*, 2 μ L 10X buffer(H)에 16.5 μ L nuclearase free water를 넣어 총 20 μ L로 맞춘 후 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 제한효소로 처리한 plasmid DNA를 연쇄반응방지를 위해 10분 동안 얼음에서 처리한 후 0.8% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide에 염색한 후, UV transilluminator에서 cDNA 삽입 유, 무를 확인하였다.

DNA sequencing 및 primer design

cDNA가 pGEM-T-easy vector에 삽입이 확인된 plasmid DNA를 SolGent사(SolGent Co., Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 얻어진 염기서열을 분석한 결과를 Microsatellite analysis 프로그램(<http://www.wsmartins.net/websat/>)을 사용하여 EST sequence상의 SSR site를 분석한 후, SSR site를 이용하여 forward primer와 reverse primer를 작성하였다. 최종적으로 선별된 EST sequence는 DDBJ/EMBL/GenBank nucleotide sequence database에 등록하였고, 그 accession number는 AB734662에서 AB734675까지이다.

EST-SSR 마커를 이용한 다형성 분석

EST-SSR 마커 다형성 분석을 위해 개발한 25개의 EST-SSR primer set를 사용하였다. 먼저 5개 수집종의 DNA 샘플을 이용하여 1차 PCR 검정을 하고 PCR이 성공적으로 이루어졌음을 확인 후 모든 품종에 대한 2차 PCR 검정을 하였다. PCR용액의 조성은 4 μ L HiPi PCR Premix(Elpisbio, Korea)를 10 ng의 genomic DNA, forward primer 및 reverse primer는 각각 1 μ L(20 pmole/ μ L)을 섞은 후 nuclearase free water를 사용해 20 μ L로 조정 후, PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C 5 분간 반응하고 다시 94°C에서 30 초, 56~58°C에서 30 초, 72°C 45 초로 35 cycle 증폭하고 72°C 5 분간 추가로 반응하였다. PCR 산물은 QIAxcel(QIAGEN Co., Germany)을 사용하여 증폭된 band를 확인하였으며, QX DNA size marker(FX174/*HaeIII*)를 통해 크기를 확인하였다. EST-SSR primer에

서 증폭된 band의 유, 무에 따라서, 나타난 band는 1로 하고, 나타나지 않은 band는 0으로 하여 유전적 다양성 지표인 polymorphic information content 값의 분석을 PCR을 통해 증폭된 산물의 크기를 QX DNA size marker (FX174/*Hae*III) band를 기준으로 측정하여 작성하였으며, Noise cut off 20%, 100% contrast (1~100%)로 조절하여 확인이 가능한 밴드만을 선별하였으며 band peak의 붉은 색 부분과 data table의 size(bp), conc.(ng/μL)를 참조하였다.

형태적 유연관계 분석 및 유전적 유사성 검정

경북농업기술원 상주감시험장에서 수집한 42품종에 각 품종의 과실크기, 과실의 횡단면과 종단면 등 25개의 형태적 특징을 조사한 것과 EST-SSR 마커에 의해 조사된 자료를 이용하여 NTsys software 프로그램을 사용하여 dendrogram을 작성하였다. NTsys software 프로그램을 사용하여 유연관계를 분석한 후, phylogenetic tree를 작성하였으며, 분석조건은 비가중산술법(UPGMA; unweighted pair group method with arithmetic)을 사용하였다. 형태적 유연관계와 유전적 유연관계의 유사성 검정은 NTsys software 프로그램 중 Mantel test를 통해 확인하였다.

결과 및 고찰

식물재료 및 형태적 분석

본 연구에 사용하기 위해 경북농업기술원 상주감시험장에서 수집한 42개를 대상으로 형태적 특성을 UPOV 기준에 따라 조사한 결과 Fig. 1과 같다. 과실무게(fruit weight), 과신허경(fruit diameter), 과실종경(fruit height), 과경굵기(fruit stalk thickness), 과경길이(fruit stalk length), 종자무게(seed weight)로 6가지 양적형질과 과신허단면일반적인 모양(fruit general shape in cross section), 과실종단면의 정단부 모양(fruit shape of apex in longitudinal section), 꽃받침 크기(과실직경대비 꽃받침크기, calyx size), 꽃받침 자세(attitude of calyx), 종자색(seed color), 과즙량(fruit juice), 과형(fruit general shape in lateral view), 과정부 골의 정도(grooving at apex of fruit), 과정부 동심원 균열(shallow concentric cracking around apex of fruit), 과정부 열과(fruit cracking of apex), 과실 세로 홈(longitudinal grooving of fruit), 과실 배꼽 홈깊이(calyx attachment of fruit), 꽃받침의 홈(groove at calyx end of fruit), 과피색(fruit color of skin), 과육색(fruit color of fresh), 과육의 갈색 반점(presence of fruit

Fig. 1. Distributions of 42 persimmon collected cultivar for 6 quantitative characteristics. A: Fruit stalk length (mm). B : Fruit stalk thickness(mm). C: Fruit diameter (mm). D: Fruit height (mm). E : Fruit weight (g). F : Seed weight (g).

brown specks in fresh), 종자측면 모양(seed shape in lateral view), 짧은 맛(fruit astringency), 꽃받침 부착 정도(cracking at calyx end of fruit) 등 19가지의 질적 형질을 조사하여 분포도를 작성한 결과는 Fig. 2와 같다.

6가지의 양적형질은 정규분포를 나타내었으며, 질적형질에서 꽃받침 자세, 꽃받침 끝의 주름, 꽃받침의 홈, 과정부 동심원 균열, 과즙, 과정부 열과, 과피색, 과육색, 과즙량, 짧은 맛, 과육 갈색반점 정도, 종자색 등은 한가지 특성이

Fig. 2. Distributions of 42 persimmon cultivar for 19 qualitative characteristics. A: Calyx size. B: Calyx attachment of fruit. C: Groove at calyx end of fruit. D: Attitude of calyx. E: Cracking at calyx end of fruit. F: Fruit general shape in lateral view. G: Longitudinal grooving of fruit. H: Shallow concentric cracking around apex of fruit. I: Fruit cracking of apex. J: Grooving at apex of fruit. K: Fruit general shape in cross section. L: Fruit shape of apex in longitudinal section. M: Fruit astringency. N: Presence of fruit brown specks in fresh. O: Fruit juice (volume). P: Fruit color of fresh. Q: Fruit color of skin. R: Seed shape in lateral view. S: Seed color.

높은 빈도로 나타나 변이의 폭이 좁은 반면에 꽃받침의 부착 정도, 꽃받침 크기, 과형, 과실의 종단면 과정부 모양과 횡단면 모양, 종자측면 모양 등은 넓은 변이 폭을 보여 형태적 품종 구분에 활용도가 높은 형질로 판단되었다.

SSR 마커 분석

마커 개발을 위해 작성한 cDNA가 삽입된 총 252개의 plasmid를 sequencing하였다. 분석된 염기서열을 DNA STAR SeqMan II-expert sequence analysis software (version 5.01)를 이용하여 EST-SSR 마커로 이용될 forward primer와 reverse primer 25개를 선발하였다. 선발된 25

개의 primer set를 Microsatellite analysis 프로그램(<http://www.wsmartins.net/websat/>)을 사용하여 sequence상의 EST-SSR site를 분석한 결과 총 146개의 EST-SSR site를 찾아낸 후 이 부분을 사용하여 EST-SSR primer를 제작하였다. 다형성 분석을 위해 개발한 25개의 EST-SSR primer pair를 사용하여, 먼저 5개 수집종의 DNA를 이용하여 1차 PCR 후 2.5% agarose gel에 전기영동을 수행한 결과 primer별로 band를 확인할 수 있었다. 이중 재연성이 높은 EST-SSR 마커로 이용될 14개의 primer set를 선발하였다(Table 2). PCR로 증폭한 후 확인할 수 있는 band는 총 63개였고, PIC 값(대립인자 다형성에 미치는

Table 2. Sequence analysis of selected amplified from different Dispyros kaki collected cultivars using EST-SSR markers

EST-SSR name	Repeat motif of sequenced product	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Expected product size (include primers) (bp)	Accession No.
P52-58	A(10), A(11)	AGTAGGTGAGAT TCGGCATTIT	GCCGAAAGGAGA CTTCAGAC	570	AB734662
P52-78	TTTTG(2), T(13), (14),T(16)	ACTAGTGATTCTG CTCGAGCT	GATTGGTCTAGA TCAGGCAAAA	553	AB734663
P52-93	A(10), A(11)	TAAGTAGGTGGG CCTAAAGCAA	TGCAGGCTCGCT GATCTA	359	AB734664
P52-97	TGTTT(2), T(11)	ACTAGTGATTAG GCTCGAGC	GATTAGAGTCGA CTAAGTAGGTA	433	AB734665
P52-109	TTTTG(2), T(10), T(12)	ACTAGTGATTGA CCATGGTACC	GATTGGTCTAGA TCAGCCAAAAA	405	AB734666
P66-61	T(10), T(14), T(15), T(16)	TGCAGGCTCGCT GATCTA	GTAGGTGGAATT AAGAAGCTCAAC	552	AB734667
P66-67	T(12), T(13)	ACTAGTGATTCC ATGGTACCAC	GATTAGTCGACT AAGTAGGTGGC	617	AB734668
P66-68	A(14), A(15)	ACTAGTGATTCC ATGGTCTAGAG	GATTTCGACCTAC TTAGTCGACT	403	AB734669
P66-71	T(10), T(14)	ACTAGTGATTAT CTAGACCTGCA	GATTAGTCGACT AAGTAGGTGAT	221	AB734670
P66-75	A(11), A(14), A(19)	ACTAGTGATTCT AGATCAGGCAA	TACTGATCTAGA CCTGCAGGC	493	AB734671
P66-78	A(13), A(15), A(16)	GATTAGAGTCGA CTAAGTAGGTG	TTTGTCTGATCTA GACCTGCAG	348	AB734672
P66-94	T(11), T(12), T(14), T(20)	ACTAGTGATTCC TGCAGGCTC	GATTGGTCTAGA TCAGGTCTAG	641	AB734673
P91-96	T(11), T(12)	ACTAGTGATTAC TCTAGACCA	TAGATCAGCGAG CCTGCA	550	AB734674
P66-132	T(12), T(13), T(15), T(18)	ACTAGTGATTTG GTACCACGC	GATTAGTCGACT AAGTAGGTGCG	443	AB734675

Fig. 3. Amplification of 42 persimmon cultivars using P66-71 primer. M : size marker, Lanes 1~42 : The name of cultivars was liked record in Table 1.

값)은 0.000에서 0.880까지 분포하였으며, 그 평균은 0.672이었으며, PIC 값이 0.7이상 인 마커들은 P52-109, P52-107, P52-58, P52-97, P66-61, P66-67, P66-132 였다. Fig. 3은 P66-71 primer로 증폭한 밴드 양상이다. Kwon *et al.* (2009)이 토마토에서 SSR 마커 33개 중 PIC 값이 7.0이 넘는 것은 11개(33.3%)로 보고하면서 품종 구분에 아주 유용하게 사용될 것이라고 보고한 바 있으며, 본 실험에서 총 14개 EST-SSR 마커 중에서 7 개(43.8%)의 마커는 PIC 값이 7.0을 넘고 있음으로 EST-SSR 마커를 이용하여 감 품종을 정확하게 구분할 수 있을 것이라 생각된다. 선발한 14개의 primer pair를 이용해 42개 수집종의 DNA를 PCR 분석한 결과 primer에 의해 나타난 band는 총 2~5개가 증폭되었으며, 크기는 42 bp~640 bp까지 분포하였고, 품종에 따라 차이가 확실한 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 최근에 Qureshi *et al.* (2004)은 목화에서 9,948개의 sequence 분석을 이용하여 84개의 EST-SSR primer를 만들어 연구를 하였고, Kim *et al.* (2010)은 장미에서 30개의 EST-SSR 마커를 이용한 바 있다. Oh *et al.* (2010)은 당근의 EST sequence를 바탕으로 한 50개의 마커를 이용하여 당근의 계통 분류 및 여러 가지 형질관련 분자 마커 연구에 활용을 보고하였다. 본 연구에서 개발한 16개의 EST-SSR 마커는 감 품종 및 여러 가지 형질관련 연구에 활용이 가능 할 것으로 생각된다.

유연관계 분석

42개 감 수집종의 형태형질을 가지고 NTsys program을 사용해 유연관계를 나타내는 phylogenetic tree를 작성하였다. 형태적 유연관계에서는 여러 그룹이 형성되었지만

coefficient가 0.02 이하로 분석되어 형태적 특성만으로는 감 수집종을 분류하기는 어려웠다(Fig. 4A). 밀수감과 시흥고종시, 영주고종시와 영주동우감, 밀양물감과 신주는 EST-SSR 마커에서 분석한 범위 내에서 유사한 유전적 거리로 나타났고, 선사환은 그룹에서 떨어져 있었다. 개발한 14개의 EST-SSR primer를 사용하여 유전적 유연관계를 분석 결과 coefficient가 0.77에서 크게 3개 그룹으로 분류되었는데, 여기에는 상주수수감과 상주수꽃감, 밀양반시와 밀양고동시, 영동반시와 영동수시는 같은 그룹으로 분석되었다(Fig. 4B). 또한 형태적 분석에서 동일하게 나타난 3쌍은 밀수감과 시흥고종시가 II 그룹과 III 그룹에 있었고, 영주동우감과 영주고종시는 I 그룹과 II 그룹에, 밀양물감과 신주는 II 그룹과 III 그룹에 나누어져 있다. 따라서 형태적 분석과 유전적 분석의 상관관계를 조사한 결과 형태적 분석의 유사도 거리와 유전적 분석의 유사도 거리의 r 값이 -0.03으로 유의성이 매우 낮게 연관되어 있었다 (Fig. 5).

이는 Kwon *et al.* (2009)이 토마토에서 형태적 마커와 유전적 마커와의 관계가 0.644로 높게 나타나 어느 정도 품종 구분에 이용할 수 있을 것으로 보고하고 있으나, 본 실험에서는 낮은 값(-0.03)이 나타나 형태적 마커만으로는 감 품종을 정확하게 분류할 수 없어 육종 계획에 활용할 수 없을 것으로 판단된다. 한국의 재래감은 대부분 뽕으로 경상남도와 전라남북도 및 강원도, 영동지역을 중심으로 주로 분포되어 있다. 국내 뽕은감에 대한 분류 연구는 원예적 생육 및 형태적 특성을 중심으로 진행되어 Cho & Cho (1965)는 전국에 분포하는 186종을 분류하였다. Yang (1998)은 전라북도에 분포하는 지방 재래감 35종을 수집하

Fig. 4. Dendrogram depicting the classification of 42 persimmon cultivars constructed using UPGMA and based on 25 morphological traits (A) and EST-SSR markers (B). The major clusters are marked on the left side of the dendrogram. The scale at the bottom is Jaccard's coefficient of similarity.

여 그 분포를 보고하였고, Kim (1993)은 재래감 110종을 다변량해석법과 동위효소분석으로 11개군으로 구분하였다. 2006년 상주 감시험장에서는 108종의 토종감 분류를 재배 유래, 분포, 과실의 특성 등 형태적으로 분류하여 보고한바 있다(Sangju Persimmon Experiment Station, Gyeongbuk Agricultural Technology Administration, 2006). 본 연구의 결과로 얻어진 마커의 분류 결과의 coefficient가 0.02 이하 이기 때문에 실질적인 형태적 분류는 어렵다고 판단 됨으로 감의 분류 조사기준도 제고되어야 한다고 판단된다. 또한 Cho *et al.* (2007)는 AFLP 기법으로 22품종의 감에

서 989개 증폭 밴드를 얻어 유전적 유연관계를 비교하였고, Hwang *et al.* (2010)은 20개의 SSR 마커로 48개의 감 유전자원을 분석하였다. 따라서 본 실험에서 14개의 EST-SSR 마커를 개발하여 정확하고 신속하게 품종 구분과 형질관련 및 감 품종 육종에 활용에 이용 가능성이 크다고 사료된다.

적 요

본 연구는 감 수집종의 분류 및 품종 육종을 위하여 EST-SSR 마커를 개발해 유전적 유연관계를 분석하고, 형태적

Fig. 4. Continued

Fig. 5. Comparison between EST-SSR markers and morphological distance using the Mantel test. Black circle : morphological traits, White circle : Expressed band with EST-SSR markers.

유연관계를 비교 분석하여 DNA 마커의 효율성을 극대화한 연구 결과이다. 경북농업기술원 상주감시험장에서 수집한 42품종을 대상으로 6가지의 양적형질(과실크기, 과고, 과경, 과경굵기, 과경길이, 종자크기)과 19가지의 질적형질(횡단면, 종단면, 골의 정도, 얇은 동심원 균열, 옆모양, 정부열과, 세로홈, 꽃받침 끝 주름, 배꼽 홈길이, 꽃받침 쪽의 홈, 꽃받침 크기)을 사용하여 형태적 유연관계를 분석하였다. 유전적 유연관계를 분석하기 위해 수집한 감에서 cDNA library를 만들어 sequence를 분석한 후, PCR을 통해 얻은 polymorphism이 인정되는 25개의 primer set에서 16개의 EST-SSR primer set를 선별하였다. 수집한 감 42품종의 형태적 유연관계와 개발한 14개의 EST-SSR 마커를 이용하여 유전적인 유연관계를 분석한 결과 형태적

유연관계에서는 여러 그룹이 형성되었지만 coefficient가 0.02 이하로 형성되어 형태적 특성을 사용해 분류하기는 어려웠다. 유전적 유연관계는 coefficient 0.77에서 3개 그룹으로 분류되어, 상주수수감과 상주수꽃감, 밀양반시와 밀양고동시, 영동반시와 영동수시는 각각 같은 그룹으로 분류되었다. 형태적 분석과 유전적 분석의 상관관계를 조사한 결과 형태적 분석의 유사도 거리와 유전적 분석의 유사도 거리 간의 값이 -0.03으로 유의성이 매우 낮게 나왔다. 본 실험에서 얻어진 분자마커는 (EST-SSR 마커) 국내 감육종 효율 증진뿐만 아니라 우수형질을 도입하는데 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

이 논문은 2013년도 농림수산식품부 학술연구비(111153 022HD120)에 의하여 연구되었음.

인용문헌

- 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, S.K. and T.H. Cho. 1965. Studies on the local varieties of persimmon in Korea. *Res. Rep. RDA* 8:147-190 (in Korean).
- Guo, D., H. Zhang and Z. Luo. 2006. Genetic relationships of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis. *Plant Sci.* 170:528-533.
- http://www.seed.go.kr. 2007. Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.).
- Hu, D., Q. Zhang and Z. Luo. 2008. Phylogenetic analysis in some *Diospyros* spp. (Ebenaceae) and Japanese persimmon using chloroplast DNA PCR-RFLP markers. *Sci. Hor.* 117:32-38.
- 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.
- Kim, C.S., C.H. Lee, J.S. Shin, Y.S. Chung and N.I. Hyung. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nuc. Aci. Res.* 25:1085-1086.
- Kim, J.K., D.C. Ahn, H.J. Oh, K.H. Kim, Y.M. Choi, S.Y. Oh, N.J. Kang, B.R. Jeong, Z.H. Kim and Y.H. Park. 2010. Skewed inheritance of EST-SSR alleles in reciprocal crosses of cut roses. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:618-626.
- Kim, T. C. 1993. Taxonomic studies of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb) by multivariate and isozyme analysis. Ph.D. Thesis, Seoul Nat'l. Univ. (in Korean).
- Kwon, Y.S., S.G. Park and S.I. Yi. 2009. Assessment of genetic variation among commercial tomato (*Solanum lycopersicum* L.) varieties using SSR markers and morphological characteristics. *Genes Genom.* 31:1-10.
- Lim, T.H., Y.H. Choi, I.K. Song, K.R. Kim, D.W. Lee and S.M. Lee. 2008. Survey of actual condition of management of persimmon orchards in Sangju, Gyeongbuk in 2007 and 2008. *Korean J. Pesticide Sci.* 12:414-420.
- Naval, M.D.M., E. Zuriaga, S. Pecchioli, G. Llacer, E. Giordani and M.L. Badenes. 2010. Analysis of genetic diversity among persimmon cultivars using microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes* 6:677-687.
- Oh, G.D., E.M. Hwang, E.J. Shim, S.J. Jeon and Y.D. Park. 2010. EST profiling for seed, hair characteristic and development of EST-SSR and SNP markers in carrot. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:1025-1038.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. A comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2:225-238.
- Sangju Persimmon Experiment Station, Gyeongbuk Agricultural Technology Administration. 2006. ToJongGam PumJong HeaSul (토종감품종해설). pp. 1-245.
- Qureshi, S.N., S. Saha, R.V. Kantety and J.N. Jenkins. 2004. EST-SSR: A new class of genetic markers in cotton. *J. Cotton Sci.* 8:112-123.
- Yamagishi, M., S. Mastumoto, A. Nakatsuka and H. Iramura. 2005. Identification of persimmon (*Diospyros Kaki*) cultivars and phonetic relationships between *Diospyros* species by more effective RAPD analysis. *Sci. Hor.* 105:283-290.
- Yang, D.S. 1998. Researches on the distribution, genetic relation, and characteristics of local persimmon varieties grown in Jeollabuk-do. Ph.D. Thesis, Jeju National Univ.
- Yıldız, M., S. Bayazıt, S. Cebesoy and S. Aras. 2007. Molecular diversity in persimmon (*Diospyros Kaki* L.) cultivars growing

around Hatay province in Turkey. Afr. J. Biotechnol.
6:2393-2399.
Zhang, Y.F., Q.L. Zhang, Y. Yang and Z.R. Luo. 2009.

Development of Japanese persimmon core collection by
Genetic distance sampling based on SSR markers. Bio. &
Bio. 23:1474-1478.

(Received 25 January 2013 ; Revised 9 April 2013 ; Accepted 14 June 2013)