

## RAPD 분석기법을 이용한 감자품종의 판정법 개발

The development of an identification system of potato cultivars by  
random amplified polymorphic DNA analysis technique

1995. 1

한국과학기술연구원  
부설유전공학연구소

# 제 출 문

한국과학기술연구원

부설 유전공학연구소장 귀하

본 보고서를 “ RAPD 분석기법을 이용한 감자품종의 판정법 개발” 사업의 최종  
보고서로 제출합니다.

1995. 1

연구책임자 : 정 혁(KIST 책임연구원)

연구 원 : 전 재 홍(KIST 선임연구원)

김 현 순(KIST 연구원)

최 경 화(KIST Post Doc.)

정 영 희(KIST 연수연구원)

이 석 종(KIST 연수연구원)

## 요 약 문

RAPD 분석기법을 이용한 감자품종의 판정법 개발에 관한 연구를 수행하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 기내배양의 환경속에서 계대배양되고 있는 11가지 재배품종의 감자의 DNA로부터 RAPD기술을 이용하여 빠른시간내에 효과적으로 서로의 품종을 확인하고 DNA polymorphism을 분석하여 각 품종간의 유연관계를 비교할 수 있었다.

2. PCR 반응은 annealing 온도를 35<sup>0</sup>C로 45회 증폭하였고 사용된 primer는 primer # 1인 5'TACGATGACG<sup>3</sup>, #2인 5'GAAACAGCGT<sup>3</sup>, #3인 5'GAGTCACGAG<sup>3</sup>, #4인 5'CAAACGGCAC<sup>3</sup>과 #5인 5'GGAC<sub>1</sub>GGAGT<sup>3</sup>의 5가지를 사용하였다. 또한 반응시 MgCl<sub>2</sub>의 농도를 조절함에 의해서 사용한 감자품종들을 효과적으로 구별할 수 있었다.

3. 품종 확인이 안된 10개의 방글라데시 감자를 Cardinal(네델란드품종)과 Kufri Sinduri(인도품종)을 사용하여 DNA polymorphism을 분석하고 각각의 근연관계를 비교한 결과 각 10가지의 방글라데시 감자들중 2가지는 네델란드품종과 가까운 연관관계에서 가졌으며 그리고 나머지 8개는 인도의 품종과 좀 더 가까운 연관 관계임을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로써 RAPD 기술을 이용하여 쉽고 빠른 방법으로 각 품종간의 분류 뿐만 아니라 서로간의 근연관계를 밝힐 수 있었다.

## SUMMARY

This study was carried out as experiment with the purpose of a study for the development of an identification system of potato cultivars by random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis technique. Followings are the results of the experiment.

1) Using the RAPDs, eleven commercial potato cultivars cultured in vitro were distinguished rapidly each other and We could compare the genetic relationship among cultivars by cluster analysis.

2) The annealing temperature of PCR reaction was 35<sup>0</sup>C and the amplification was performed in a DNA thermal cycler for 45 cycles. We used five primers, the sequence of five primers were as follows. Primer #1(5'TACGATGACG<sup>3</sup>), #2(5'GAAACAGCGT<sup>3</sup>), #3(5'GAGTCACGAG<sup>3</sup>), #4(5'CAAACGGCAC<sup>3</sup>), and #5(5'GGACTGGAGT<sup>3</sup>). And we could also effectively distinguish potato cultivars by controlling the concentration of MgCl<sub>2</sub>.

3) We found DNA polymorphic DNA markers and compared genetic relationship among ten indigenous Bangladesh potato varieties, Netherland cultivar, cv. Cardinal, and India cultivar, Kufri Sinduri. Two Bangladesh varieties, Shil Bilati and Hagrai, were more closely related to Cardinal than Kufri Sinduri, and the others were vice versa.

From this results, RAPD analysis represents a highly useful, rapid, and easy method of distinguishing and identifying potato cultivars and indigenous varieties of potato.

## CONTENTS

1. Introduction	6
2. Material and Method	8
3. Results and discussion	10
4. Conclusion	19
5. References	20

## 목 차

제 1 장 서론	6
제 2 장 재료 및 방법	8
제 3 장 결과 및 고찰	10
제 4 장 결론	19
제 5 장 인용문헌	20

## 제 1 장 서 론

감자는 영양번식작물로서 각각의 품종들은 주로 형태학적인 특성의 차이에 의해 구별되어지고 있다. 그리고 널리 재배되고있는 감자의 품종들은 대부분 4배체식물이기에 유전자에 있어서의 다양성때문에 육종뿐만아니라 감자의 특정유전자 분석등의 연구에도 많은 어려움을 안고 있다. 최근에 들어서는 기내배양에 의해 인공씨감자를 상업적인 규모로 생산, 이용하는 단계에 들었으며 특히 여러가지 유용한 유전인자가 감자내로 형질전환된 새로운 품종의 감자들이 만들어지고 있는 상태에 도달하였다. 일정하게 조절되고 있는 기내배양의 환경속에서 많은 감자의 품종을 형태적인 특성에 의해 판정하기에는 한계가 있으며 역시 형질전환된 새로운 품종의 감자를 형태적인 차이로만 구분할 수도 없다. 감자의 품종의 분류동정을 위하여 그동안 많은 연구가 수행되어져 괴경의 형태와 꽃 색깔, 잎 모양, 성장습관, 병 저항성 등의 형태, 생리학적 방법으로 비교, 분류되어 왔으며 이는 환경적인 요인에 의해서 달라질 수 있는 문제점을 가지고 있다. 이를 극복할 수 있는 방법으로 개발되어진 것이 isoenzyme 분석을 통한 생화학적 방법등으로 현재 널리 이용되고 있다(Desborough et al., 1968, Douches et al., 1991, Quiros et al., 1985). 그러나 사용 가능한 관련 효소의 수가 극히 제한되어 있기에 비교적 가까운 관계의 재배종의 분류에는 역시 많은 문제점이 있다.

근래에는 분자생물학의 발달로 DNA수준에서의 연구가 활발히 진행되고 있어 식물체 DNA의 제한효소의 절단 pattern의 차이로 분류하는 Restriction Fragments Length Polymorphism(RFLP)기술이 개발되어졌고 이로써 환경 요인, 조직의 형태 및 생리연령에 관계 없이 구별할 수 있게 되었다(Gorg R et al., 1992). 그러나 이 방법은 시간이 많이 걸리고 적당한 DNA probe가 개발되어 있어야 하며 방사선 동위원소를 사용해야하는 단점들을 갖고 있다.

최근들어 이들 RFLP 방법의 문제들을 해결할 수 있는 Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD)라는 새로운 기술이 개발되어져 실제 많은 작물에서 효율적으로 이용이 되고 있다(Demeke T et al., 1993, Hu J et al., 1991, Koller B et al., 1993, Wilde J et al., 1992, Williams JGK et al., 1990, Yang X et al., 1993). 이 기술은 Polymerase Chain

Reaction(PCR)반응을 이용한 것으로 임의의 염기 서열을 갖는 synthetic primer로써 genomic DNA의 특정한 단편만을 증폭하여 이를 agarose gel상에서 확인하는 방법이므로 극히 적은 양의 DNA를 사용할 수 있고 결과를 단 하루만에 얻을 수 있고 실험방법이 용이하다는 장점으로 널리 연구가 되어지고 있다. 또한 RAPD분석에 의해 얻어진 polymorphism은 유전자내의 point mutations, insertions, deletions, inversions등의 요인들에 의해 primer binding site가 바뀌거나 target DNA로부터 증폭된 단편의 크기를 변화되거나 없어지게되어 생긴 현상들로 효과적으로 genetic marker로 사용될 수 있다(Williams JGK et al., 1990).

본 실험실에서는 기내배양에 의해 인공씨감자를 상업적인 규모로 대량생산하여 이를 실제 이용하는 단계에 있으며 특히 여러가지 유용한 유전인자가 감자내로 형질전환된 새로운 품종의 감자들이 만들어지고 있는 상태이며 전 세계 각국의 상업적으로 중요한 감자의 품종을 기내배양 유지하고 있다. 그러므로 신속하고 용이한 품종의 비교 분류방법이 개발되어져야 이들 감자품종들을 효율적으로 유지관리할 수 있게 된다고 할 수 있다.

이러한 요구에 의해서 본 연구에서는 일정하게 조절되고 있는 기내배양의 환경속에서 계대배양되고 있는 많은 감자의 품종들을 빠른 시간내에 정확히 RAPD분석기법을 이용하여 분류, 판정법을 개발하고자 하였다.



## 제 2 장 재료 및 방법

### 식물재료

감자 식물재료로는 본실험실에서 기내배양중인 감자품종들중에서 전 세계적으로 유명한 감자 재배종 12종과 방글라데시 재래종 10가지 그리고 인도 재배종 한 가지등 총 23가지를 Table 1.에서와 같이 사용하였다. 본 실험실에서 대량 기내배양되고 있는 11종류의 세계적으로 주요한 재배종들을 1차적으로 분류하였고 그 후 이를 토대로 10종류의 방글라데시 재래종 감자들을 네델란드 재배종인 Cardinal과 인도 재배종인 Kufri Sindhuri와 비교하여 그 기원을 추적하여 보기로 하였다.

Table 1. Twelve commercial cultivars, ten Bangladesh indigenous varieties, and one India cultivar.

Cultivar No.	Cultivar	source	Variety No.	Variety	source
1	Atlantic	a	B1	Ausha	b
2	Bintje	a	B2	Lal Pakri	b
3	Dejima	a	B3	Challi Sha	b
4	Desiree	a	B4	Sada Gutti	b
5	Kennebec	a	B5	Cardinal	a
6	Irish Cobbler	a	B6	Kufri Sinduri	c
7	Red Pontiac	a	B7	Lal Shil	b
8	Russet Burbank	a	B8	Dohazuri	b
9	Shepody	a	B9	Patnai	b
10	Spunta	a	B10	Shil Bilati	b
11	Superior	a	B11	Festa Shil	b
			B12	Hagrai	b

a : commercial cultivars used for the study

b : Bangladesh indigenous varieties

c : India commercial cultivars

## Genomic DNA 추출

DNA의 추출은 Murray와 Thompson(1980)의 방법을 변형하여 사용하였다. 기내배양중인 감자 잎으로부터 시료를 채취, 액체질소에서 급냉하여 100mM Tris-HCl(pH 8.0), 100mM EDTA, 250mM NaCl, 100mM 2-mercaptoethanol을 함유하고 있는 extraction buffer를 넣어 막자사발에서 마쇄하였다. Proteinase-K(final 100 $\mu$ g/ml)을 첨가하여 55 $^{\circ}$ C에서 1~2시간 반응시켰다. 그 후 Phenol/Choroform으로 aqueousDNA층을 분리하고 여기에 2 volume의 ethanol로 DNA를 침전시키고 0.3ml의 RNase TE(20 $\mu$ g/ml of RNase)으로 녹여 37 $^{\circ}$ C에서 30분 반응하여 잔존의 RNA를 제거하였다. 그 후 Phenol/Choroform으로 aqueous DNA층을 재분리하고 여기에 0.6 volume의 isopropanol로 DNA를 재침전시켜 TE buffer에 녹였다. 이를 1차적으로 agarose gel electrophoresis하여 추출된 DNA의 파손여부와 양을 조사하였고 그 후 spectrophotometer를 사용하여 260nm에서 흡광도를 측정하여 DNA의 양을 정량한 후에 각 sample의 DNA 농도를 100ng/ $\mu$ l로 희석하여 사용하였다.

## PCR반응 및 전기영동

PCR반응은 volume을 100  $\mu$ l로 하여 반응액의 최종 농도는 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin, 0.2 mM dNTP, 1 pM primer, 0.1  $\mu$ g의 genomic DNA, 1.0 unit 의 Taq DNA polymerase(Perkin-Elmer Cetus)로 사용하였으며 PCR 기기는 Hybaid Thermal Cycler를 이용하였다. 사용된 primer는 Table 2와 같은 sequence를 가지며 한국생공에 의뢰하여 합성한 10mer-primer를 이용하였다. 초기 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응후 45 cycle을 1.0 분간 94 $^{\circ}$ C denaturation, 1.0분간 35 $^{\circ}$ C annealing과정과 2.0 분간의 72 $^{\circ}$ C extension 반응을 하도록하였고 그 후 10.0 분동안의 72 $^{\circ}$ C extension 반응을 수행하였다. 증폭된 polymorphic DNA 절편을 1.5% agarose gel에서 5 V/Cm로 5시간동안 전기영동하여 EtBr로 염색하여 UV상에서 확인하였다.

## 유전분석

전기영동에 의해 확인된 각각의 polymorphic band를 이용하여 각 품종간의 근연관계를 분석하기 위하여 임(1993)등의 방법에 의하여 Similarity Index를 구하였는데 similarity index program은 Statistical Ecology Program의 cluster분석법 중 dissimilarity index를 IBM personal computer 486DX를 사용하여 구하고 품종간 유의도를 분석하였다.

### 제 3 장 결과 및 고찰

RAPD 기술을 이용하여 주요한 감자 재배종 12종과 방글라데시 재래종 10가지 그리고 인도 재배종 한 가지사이의 근연관계를 비교분석하기 위하여 아래 Table 2와 같은 5가지의 primer를 사용하였다. Primer #1~4는 각각 UBC(University of British Columbia) code의 116,131,153,184에 해당하며 primer #5는 Operon Technologies사의 OPB-04에 해당하는 primer이다.

Table 2. The sequence of RAPD primers used for the study.

Primer No.	Sequence( 5' - 3' )
Primer #1	TACGATGACG
Primer #2	GAAACAGCTT
Primer #3	GAGTCACGAG
Primer #4	CAAACGGCAC
Primer #5	GGAAGGGAGT

적정  $MgCl_2$  농도를 결정하기 위하여 primer #2으로 Superior 품종으로 0, 1, 2, 3, 4 mM로  $MgCl_2$  의 농도를 달리하여 PCR 반응을 한 결과 fig.1에서와 같이 1mM 농도까지는 band가 나타나지 않았고 2mM 농도에서 4개의 band가 나오기 시작하였다.  $MgCl_2$ 의 농도가 증가하면 nonspecific binding의 확률이 높아지게되므로 예상했던대로 본 실험의 결과에서도 4mM에서는 4개의 굵은 band와 10개 이상의 희미한 band들이 나타났으나 서로 구별이 잘 안되는 nonspecific한 binding의 결과로 생각되어 적정  $MgCl_2$ 의 농도는 3mM로 정하였다.

본 실험실에서 대량 기내배양되고 있는 11종류의 세계적으로 주요한 재배종들을 5개의 primer를 사용하여 1차적으로 분류하였는데 여기에서 polymorphism을 나타내는 31개의 RAPD marker를 찾아내었고 그 결과는 Table 3과 같다.

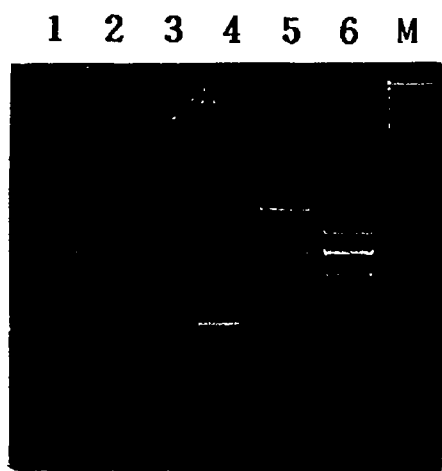


Figure 1. RAPD patterns by the primer #2 with various MgCl<sub>2</sub> concentrations. Lane 1: negative control, Lane 2: 0 mM MgCl<sub>2</sub>, Lane 3 : 1 mM MgCl<sub>2</sub>, Lane 4: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, Lane 5: 3 mM MgCl<sub>2</sub>, Lane 6: 4 mM MgCl<sub>2</sub>, Lane M: MW size marker.

Table 3. Classification of the 31 RAPD markers in eleven potato cultivars.

		cultivar #1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11
Primer #1	A	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
	B	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
	C	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
	D	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	E	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	G	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	I	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Primer #2	A	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
	B	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	C	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
	D	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
	F	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Primer #3	A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	C	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	D	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

continued

	cultivar	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11
Primer #4	A	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
	B	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
	C	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
	D	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Primer #5	A	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
	B	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	D	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
	E	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

+ present, - absent

Cultivar #1: Atlantic, cultivar #2: Bintje, cultivar #3: Dejima, cultivar #4: Desiree, cultivar #5: Kennebec, cultivar #6: Irish Cobbler, cultivar #7: Red Pontiac, cultivar #8: Russet Burbank, cultivar #9: Shepody, cultivar #10: Spunta, cultivar #11: Superior

위의 결과로써 적어도 2개 이상의 primer를 사용한다면 기내배양되고 있는 11종류의 세계적으로 주요한 재배종들을 완벽히 구별해 낼 수 있게 되었으며 위의 RAPD marker를 기초로 하여 쉽게 서로 간의 근연관계를 분석할 수 있게 되었다. Primer #1은 가장 많은 9개의 polymorphic DNA marker를 300bp에서 1600bp사이에서 보였는데 실제로 희미한 band까지 생각하면 쉽게 11개 품종 모두를 구별할 수 있었다(Fig. 2)

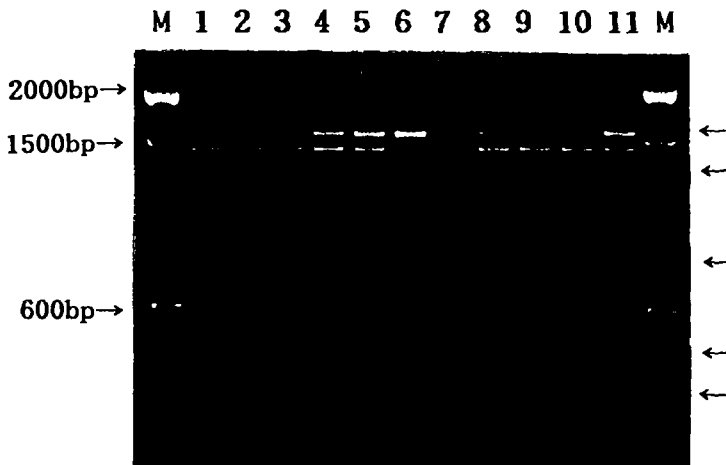


Figure 2. Polymorphisms among eleven potato cultivars with primer #1. Lane M: DNA size marker(BRL 100bp ladder), lane 1: Atlantic, 2: Bintje, 3: Dejima, 4: Desiree, 5: Kennebec, 6: Irish Cobbler, 7: Red Pontiac, 8: Russet Burbank, 9: Shepody, 10: Spunta, 11: Superior

Primer #1으로는 1600bp, 1300bp근처와 770bp, 750bp, 730bp부근과 470bp, 380bp자리의 근처에서 뚜렷히 구별되는 marker를 가지고 있으며(fig.2) primer #2의 경우, 1500bp에서 2000bp사이에서 1600bp와 1700bp,1750bp,1800bp,1900bp군이 있어서 Atlantic의 경우 독특하게 1600bp marker를 가지고 있어 쉽게 구별이 가능했고 1700bp,1800bp,1900bp군들은 세가지가 항상 같이 나타나는 양상을 보이거나, 아예 없거나 아니면 1750bp marker를 보이는 세부류의 양상을 보였다(fig.3). 또한 850bp와 1000bp에서의 marker의 유무에 의해서도 쉽게 판별이 가능하였다. Primer #4를 사용했을때 1600bp와 1150bp에서 구별하는 것과 뚜렷히 구별되는 530bp와 570bp의 marker군에서는 570bp marker가 단독으로 존재하는 것과 530bp marker가 단독으로 존재하는 것, 그리고 두 marker 세가지가 공존하는 세 부류로 명확히 분류가 가능하였다(fig.4).

위의 RAPD 분석결과를 계통분석용 프로그램으로 cluster analysis방법중 Similarity Index(SI)를 구하여 각 품종간의 근연관계를 밝혔다(fig.5). 그 결과 Atlantic과 Bintje, Dejima와 Russet Burbank가 SI가 각각 0.16, 0.17로 가장 가까운 관계였고 Atlantic과 Irish Cobbler가 SI가 0.59로 가장 먼 관계에 있음을 알 수 있었다.

방글라데시 재래종 10가지 그리고 네델란드 재배종인 Cardinal과 인도 재배종 한 가지사이의 근연관계를 비교분석하기 위하여 4가지의 primer를 사용하였다. Primer #1을 사용하였을 때에 네델란드 재배종인 Cardinal과 인도 재배종인 Kufri Sinduri와 indigenous방글라데시 varieties사이에 뚜렷한 구분을 할 수 있었고 방글라데시 재래종인 Shil Bilati와 Hagrai는 Cardinal과 유사한 marker를 일부 나타내었다(fig.6). 2100bp marker에서 10번과 12번이 Cardinal과 인도 재배종인 Kufri Sinduri와 같이 band를 보이지 않았고 570bp, 550bp, 540bp, 470bp, 440bp, 390bp의 marker 군을 보였는데 570bp,390에서는 Cardinal 특이적인 band를 보였고 방글라데시 재래종인 Shil Bilati와 Hagrai가 570bp의 band를 보여 Cardinal과 가까운 관계임을 보였다. 550bp의 경우는 10번과 12번을 제외한 모든 방글라데시 재래종에서 band를 보였고 540bp는 유일하게 인도 재배종인 Kufri Sinduri에서만 band를 나타내었다. 470bp의 marker의 경우에는 Cardinal과 인도 재배종인 Kufri Sinduri를 제외한 전 방글라데시 재래종에서 marker를 보여 같은 혈연관계에 있음을 확인할 수 있었고 또한 10번과 12번이 네델란드 재배종인 Cardinal쪽의 혈연관계가 가까움을 짐작할 수 있었다.

Primer #2를 사용했을 때에도 유사한 결과를 보였는데(fig.7) 1700bp, 1800bp, 1900bp의 세 band가 나란히 나타나는 가운데 Cardinal의 경우는 1700bp만 홀로, 그리고 인도 재배종인 Kufri Sinduri의 경우에는 1700bp, 1800bp의 두 band가 동시에 나머지 방글라데시 재래종의 경우에는 세 band가 동시에 나타났다. 여기에서도 방글라데시 10번과 12번은 1700bp한 band만

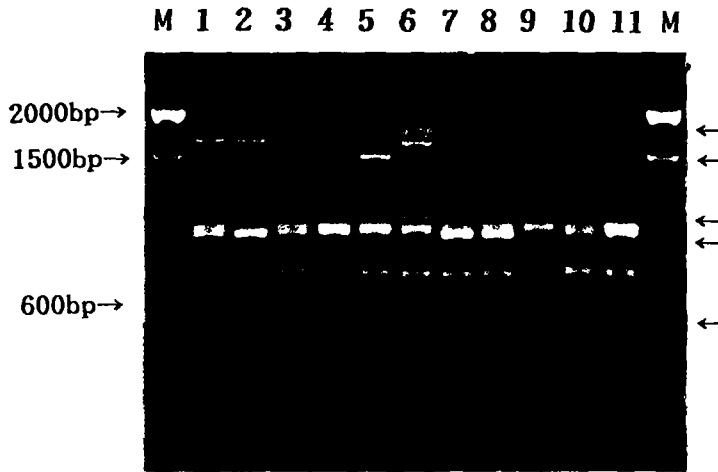


Figure 3. Polymorphisms among eleven potato cultivars with primer #2.  
 Lane M: DNA size marker(BRL 100bp ladder), lane 1: Atlantic, 2: Bintje,  
 3: Dejima, 4: Desiree, 5: Kennebec, 6: Irish Cobbler, 7: Red Pontiac,  
 8: Russet Burbank, 9: Shepody, 10: Spunta, 11: Superior

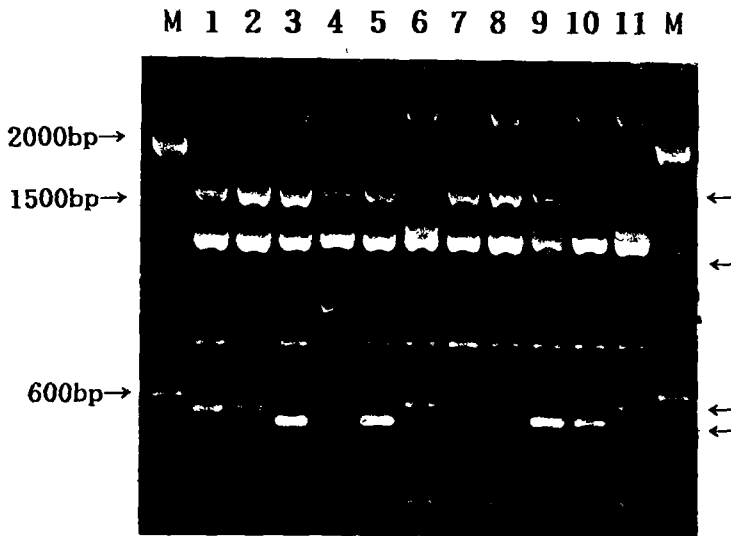


Figure 4. Polymorphisms among eleven potato cultivars with primer #4  
 Lane M: DNA size marker(BRL 100bp ladder), lane 1: Atlantic, 2: Bintje  
 3: Dejima, 4: Desiree, 5: Kennebec, 6: Irish Cobbler, 7: Red Pontiac  
 8: Russet Burbank, 9: Shepody, 10: Spunta, 11: Superior

나타내어 인도계보다는 네델란드계에서 유래했음을 짐작할 수 있었고 550bp에서 8번과 10번 11번 만이 band를 나타내어 방글라데시 재래종간의 차이를 볼 수 있었다. Primer #3의 경우는 MgCl<sub>2</sub>의 농도를 1mM로 낮추어서 nonspecific band의 숫자를 크게 줄였는데 Fig.8에서와 같이 1100bp와 500bp에서 방글라데시 재래종 특유의 band를 볼 수 있었는데 다만 1100bp의 경우에 Cardinal과 방글라데시 재래종 4번 11번이 band를 보이지 않고 인도 재배종인 Kufri Sinduri에서 band가 나타나 1,2,3,7,8,9 10,12번이 인도계와 관련이 있음을 시사하였다. 또한 690bp의 Cardinal 특유의 band가 이번에는 4번과 11번에서 나타났고 540bp의 경우는 인도 재배종인 Kufri Sinduri에서만 나타났다. 500bp와 470bp에는 10개의 방글라데시 재래종에서만 특이하게 band를 보였는데 500bp만 있는 1,2,3,7,8,9번과 470bp만 있는 4,11번 그리고 둘 다 존재하는 10번과 12번으로 명확히 구분이 되었다. Primer #4를 사용시에 530bp과 570bp에서 특이한 marker를 찾을 수 있었는데 Cardinal의 경우가 570bp 만을, Kufri Sinduri의 경우가 530bp의 band만을 보였고 나머지 방글라데시 재래종의 경우에는 두band가

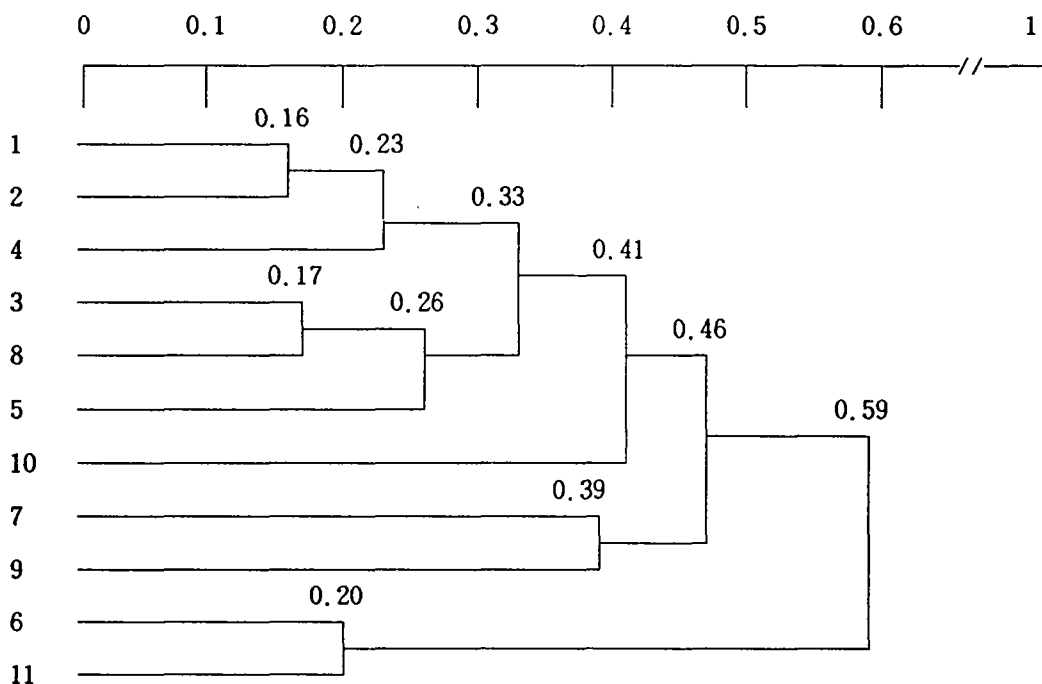


Figure 5. Phenogram of clustering pattern for 11 cultivars of potato. 1: Atlantic, 2: Bintje, 3: Dejima, 4: Desiree, 5: Kennebec, 6: Irish Cobbler, 7: Red Pontiac, 8: Russet Burbank, 9: Shepody, 10: Spunta, 11: Superior



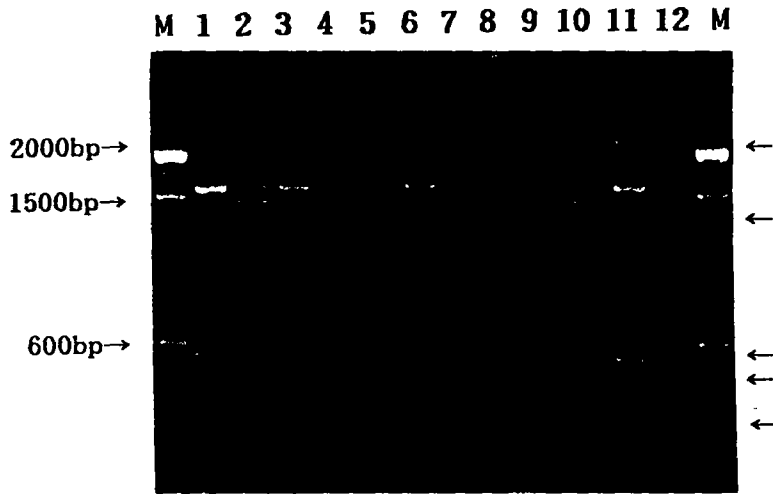


Figure 6. Polymorphisms among twelve potato varieties with primer #1. Lane M: DNA size marker(BRL 100bp ladder), lane 1: Ausha, 2: Lal Pakri, 3:Challi Sha, 4: Sada Gutti, 5: Cardinal, 6: Kufri Sinduri, 7:Lal Shil, 8: Dohazuri, 9: Patnai, 10: Shil Bilati, 11: Festa Shil, 12: Hagrai

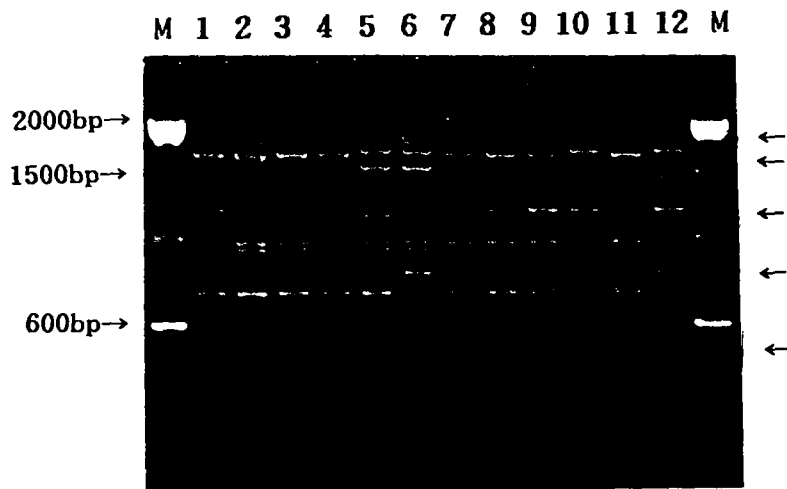


Figure 7. Polymorphisms among twelve potato varieties with primer #2 Lane M: DNA size marker(BRL 100bp ladder), lane 1: Ausha, 2: Lal Pakri, 3:Challi Sha, 4: Sada Gutti, 5: Cardinal, 6: Kufri Sinduri, 7:Lal Shil, 8: Dohazuri, 9: Patnai, 10: Shil Bilati, 11: Festa Shil, 12: Hagrai

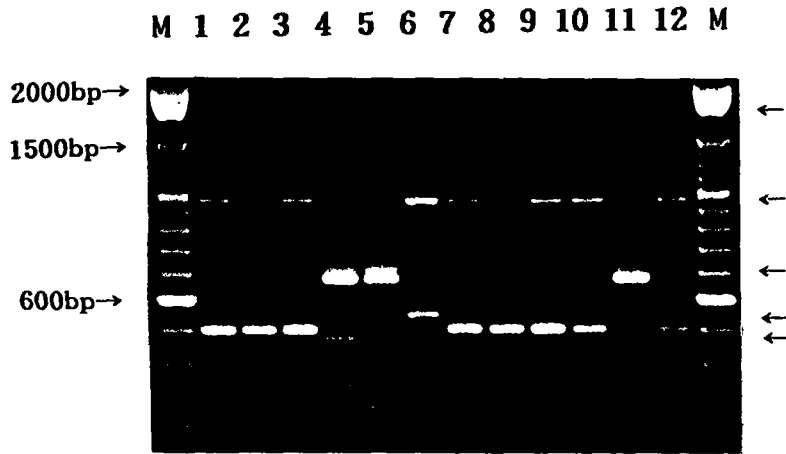


Figure 8. Polymorphisms among twelve potato varieties with primer #3. Lane M: DNA size marker(BRL 100bp ladder), lane 1: Ausha, 2: Lal Pakri, 3:Challi Sha, 4: Sada Gutti, 5: Cardinal, 6: Kufri Sinduri, 7: Lal Shil, 8: Dohazuri, 9: Patnai, 10: Shil Bilati, 11: Festa Shil, 12: Hagrai

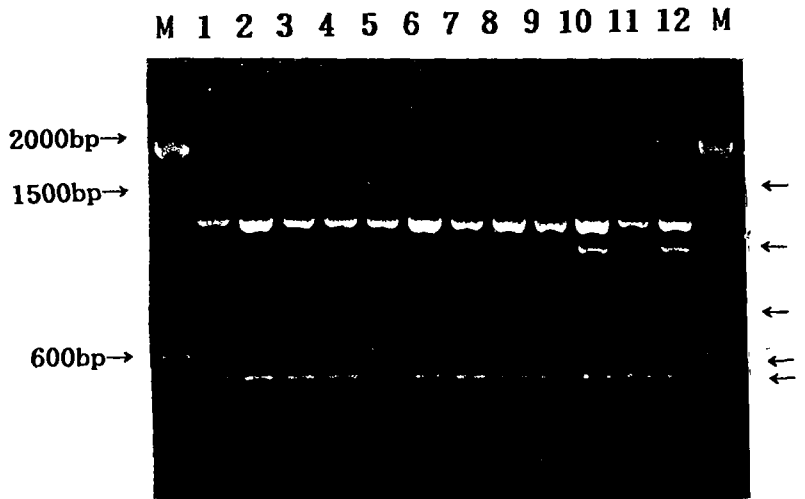


Figure 9. Polymorphisms among twelve potato varieties with primer #4. Lane M: DNA size marker(BRL 100bp ladder), lane 1: Ausha, 2: Lal Pakri, 3:Challi Sha, 4: Sada Gutti, 5: Cardinal, 6: Kufri Sinduri, 7: Lal Shil, 8: Dohazuri, 9: Patnai, 10: Shil Bilati, 11: Festa Shil, 12: Hagrai

동시에 나타났으나 10번과 12번 만이 인도계와 같은 530bp의 band를 보여 이번에는 인도계의 Kufri Sinduri와의 근연관계가 있음을 시사하였다.

위의 RAPD 분석결과들을 계통분석용 프로그램으로 cluster analysis방법중 Similarity Index(SI)를 구하여 방글라데시 재래종 10가지 그리고 네델란드 재배종인 Cardinal과 인도 재배종사이의 근연관계를 비교분석한 결과 다음과 같았다(fig.10). 10개의 방글라데시 재래종중 Lal Pakri, Challi Sha와 Lal Shil은 거의 같은 polymorphism을 보여 같거나 아주 가까운 관계에 있음을 알 수 있었다. 이들은 적어도 사용한 4개의 primer에서 나온 marker로는 구분하기가 힘들었고 단지 희미한 band로 다소의 차이를 구분할 수 있을 정도였다. 방글라데시 재래종사이에는 Dohazuri와 Patnai가 그다음으로 서로 가까웠으며 Sada Gutti와 Festa Shil이 서로 유사하였다. Shil Bilati와 Hagrai는 그 근원이 네델란드 계통인 Cardinal과 보다 가까웠으며(SI=0.55) 나머지 8개의 품종은 인도 재배종인 Kufri Sinduri에는 0.49, 그리고 Cardinal과는 0.74의 SI값을 보여 인도계통에 보다 가까운 근연관계를 보였다.

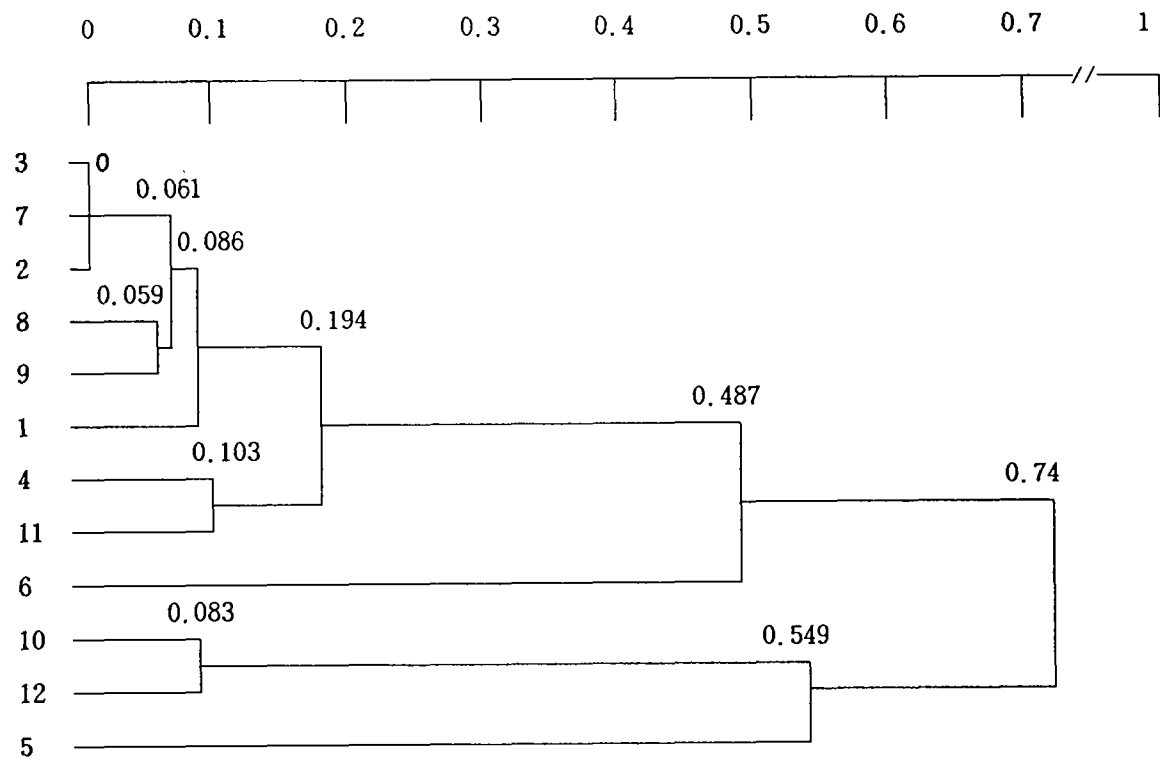


Figure 10. Phenogram of clustering pattern for 10 indigeous Bangladesh varieties, one India cultivar and cv.Cardinal of potato.

## 제 4 장 결 론

기내배양의 환경속에서 계대배양되고 있는 11가지 품종의 감자의 DNA로부터 RAPD기술을 이용하여 빠른시간내에 효과적으로 서로의 품종을 확인하고 DNA polymorphism을 분석하여 각 품종간의 유연관계를 비교할 수 있었다. PCR 반응은 annealing 온도를 35<sup>0</sup>C로 45회 증폭하였고 사용된 primer는 primer # 1인 5<sup>'</sup>TACGATGACG<sup>3</sup>, #2인 5<sup>'</sup>GAAACAGCGT<sup>3</sup>, #3인 5<sup>'</sup>GAGTCACGAG<sup>3</sup>, #4인 5<sup>'</sup>CAAACGGCAC<sup>3</sup>과 #5인 5<sup>'</sup>GGACTGGAGT<sup>3</sup>의 5가지를 사용하였다. 또한 반응시 MgCl<sub>2</sub>의 농도를 조절함에 의해서 사용한 감자품종들을 효과적으로 구별할 수 있었다. 품종 확인이 안된 10개의 방글라데시 감자를 Cardinal(네델란드품종)과 Kufri Sinduri(인도품종)을 사용하여 DNA polymorphism을 분석하고 각각의 근연관계를 비교한 결과 각 10가지의 방글라데시 감자들중 2가지는 네델란드품종과 가까운 연관관계에서 가졌으며 그리고 나머지 8개는 인도의 품종과 좀 더 가까운 연관 관계를 확인할 수 있었다.

이상의 결과로써 RAPD 기술을 이용하여 쉽고 빠른 방법으로 각 품종간의 분류 뿐만 아니라 서로간의 근연관계를 밝힐 수 있었다.

## 제 5 장 인 용 문 헌

Demeke T, LM Kawchuk, DR Lynch 1993 Identification of potato cultivars and clonal variants by random amplified polymorphic DNA analysis. Am Potato J 70 : 561-570.

Desborough SL, SJ Peloquin 1968 Potato variety identification of electrophoretic patterns of tuber proteins and enzymes. Am Potato J 45 : 220-229

Douches DS, K Ludlam 1991 Electrophoretic characterization of North American potato varieties. Am Potato J 68: 767-780

Gorg R, U Schachtschabel , E Ritter, F Salamini, C Gebhardt 1992 Discrimination among 136 tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. Crop Sci 32 : 815-819

Hu J, CF Quiros 1991 Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Rep 10 : 505-511

Koller B, JM Lehmann, JM McDermott, C Gessler 1993 Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor Appl Genet 85 : 901-904

Quiros CF, N McHale 1985 Genetic analysis of isozyme variants in diploid and tetraploid potatoes. Genetics 111: 131-145

Lim YP, CS Shin, SJ Lee, YN Youn, JS Jo 1993 Survey of proper primers and genetic analysis of Korean Ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer) variants using the RAPD technique. Korean J Ginseng Sci 17 : 153-158

Murray MG, WF Thompson 1980 Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA.  
Nucleic Acids Res 8 : 4321-4325

Wilde J, R Waugh, W Powell 1992 Genetic fingerprinting of Theobroma clones using  
randomly amplified polymorphic DNA markers. Theor Appl Genet 83 : 871-877

Williams JGK, AR Kubelik, KJ Livak, JA Rafalski, SV Tingey 1990 DNA polymorphisms  
amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res  
18:6531-6535

Yang X, C Quiros 1993 Identification and classification of celery cultivars  
with RAPD markers. Theor Appl Genet 86 : 205-212