

RAPD 표지인자를 이용한 이탈리아 라이그라스 품종의 유전적 변이 및 유연관계 분석

임용우 · 이승재* · 신정섭* · 정영수* · 최기준 · 임영철 · 임근발 · 박병훈

Genetic Polymorphisms and Phylogenetic Relationships of Italian Ryegrass Cultivars Based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers

Yong Woo Rim, Seung Jae Lee*, Jeong Sheop Shin*, Young Soo Chung*, Kee Jun Choi,

Young Chul Lim, Keun Bal Lim, Beung Hoon Park

Summary

Eleven Italian ryegrass cultivars were examined for their genetic polymorphisms and phylogenetic relationships using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. In RAPD analysis of 34 random primers, 96 of total 162 bands obtained from 16 primers were polymorphic and sizes of polymorphic band ranged between 0.5 and 1.5kb. Number of bands amplified per primer was varied from 3 to 16 and average number was 14.8. Phylogenetic relationship among cultivars based on the RAPD analysis was examined using UPGMA computer program. In pairwise genetic similarity test of 11 Italian ryegrass cultivars, Grazer and Orlando showed highest coefficient of genetic similarity as 0.740, whereas Marshall and Orlando was lowest as 0.438. Eleven Italian ryegrass cultivars were grouped into 3 major clusters and genetic distance of clusters ranged between 0.567 and 0.646, indicating low level of genetic variation.

I. 서 론

이탈리안 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.)는 일년생 또는 월년생 목초이며 체세포 염색체수가 $2n = 2x = 14$ 인 2배 체종과 $2n = 4x = 28$ 인 4배 체종으로 나누어져 있다. 초기 생육이 빠르고, 단위 면적당 수량 및 영양가치가 우수하며, 가축의 기호성 또한 우수하여 양질의 조사료 생산을 위해 좋은 초종이다. 이 초종은 전형적인 채초형으로 기후의 변화

에 민감하여 여름의 고온이나 건조, 겨울의 추위 등에 약하나, 토양이 비옥하고 습하며 겨울이 따뜻한 기후지대에서는 생육이 우수하다. 우리나라에서는 주로 남부지방 (대전 이남)에서 답리작으로 재배되고 있으며, 청예, 건조, 사일리지 또는 방목형 목초로 이용할 수 있지만 주로 청예용 사료로 이용하는 경우가 많다. 1997년 우리나라 사료작물 목초 도입 종자 약 573톤 중 이탈리아 라이그라스가 약 381톤을 차지하여 총 수입 목초 종자의 66%를 차지하고

축산기술연구소 초지사료과 (National Livestock Research Institute, Suwon 441-350, Korea)

* 고려대학교 생명공학원 (Korea University, Seoul 136-701, Korea)

있을 정도로 중요한 초종이다.

작물 육종에 있어서 계통간이나 모집단 내의 연관 정도에 대한 분석은 선발효과를 평가하는 유용한 변수가 되며, 정확한 가계평가 또한 적절한 교배모본을 선발하기 위한 근거로 이용될 수 있다. 작물의 유전적 관계를 평가하는 방법으로는 과거에는 주로 작물의 농업형질의 형태적 특징 및 생화학적 인자인 동위효소 다형화 분석 등에 근거를 두어 왔지만, 분자생물학의 발달로 작물내의 유전적 다양성을 DNA 수준에서 분석하는 것이 가능하게 되었다. 널리 이용되는 DNA 인자로는 restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) 과 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 등을 들 수 있다. 동위효소 분석이 갖고 있는 유전적 변이의 제한성과 RFLP 방법이 갖고 있는 기술적인 어려움 때문에 polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 RAPD 분석이 널리 이용되고 있다. RAPD 방법은 열 저항성 Tag DNA polymerase의 발견으로 가능하게 되었으며, 인위적으로 합성한 oligonucleotide (primer)들을 이용하여 DNA의 denaturation, primer의 annealing과 DNA의 polymerization의 3단계를 반복적으로 실시하여 DNA의 특정 부위를 증폭시키는 방법이다. 증폭된 DNA 단편들의 다형성 (polymorphism) 때문에 작물의 분류 (Tinker 등, 1993; Fukuoka 등, 1992), 외래 유전자 도입 확인 (Devos와 Gale, 1992), 유전자원 평가 (Yu와 Nguyen, 1994), 집단 유전학의 양적 유전형질분석 (Chalmers 등, 1993), 유용 유전형질을 탐지할 수 있는 표지인자 개발 (Michelmore 등, 1991), 그리고 유전자 연관지도 작성 (Rowland and Levi, 1994) 등에 이용되고 있다.

이탈리안 라이그라스 육종 연구에 있어서 우량품종 육성을 위한 효과적인 선발과 육종 효과를 기대하기 위해서는 품종 및 계통간의 유전적 다양성 분석과 연관 정도에 관한 연구가 필요하다. 따라서 본 연구는 국내·외에서 육성된 이탈리안 라이그라스 품종들간의 유전적 다양성을 RAPD 방법을 이용하여 비교 분석하고 그들의 유전적 유연성 및 변이 정도를 알아 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

공시 재료로는 농촌진흥청 축산기술연구소 초지사료과에서 내한성 향상을 위해 육성된 이탈리안 라이그라스 합성종 LES 2, 3, 4, 5와 도입품종 중 조생종인 Florida 80, Grazer 및 Rustmaster, 그리고 중·만생종인 Marshall, Orlando, Fabio 및 Montblanc 등 총 11품종이 사용되었다 (표 1). 각 품종의 종자들은 프라스틱 16공 연결포트에서 발아시켜 실험실 실온조건하에서 재배하였다.

2. DNA의 추출

전체 DNA는 CTAB 방법 (Murray 및 Thompson, 1980)과 microextraction 방법 (Dich 및 Schubert, 1993)을 변형하여 추출하였다. 15일 자란 잎 0.1g 정도를 채취하여 1.5ml microcentrifuge tube에 넣은 후 추출용액 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25mM EDTA, 0.35M sorbitol, 0.1% β -mercaptoethanol] 30 μ l를 첨가하여 플라스틱 봉으로 마쇄하였다. 여기에 236 μ l 추출용액을 더 넣은 다음, 5% sarkosyl 용액 53 μ l을 넣고 잘 섞은 후 실온에서 5분 정도 처리하였다. 5M NaCl 용액 46 μ l와 0.7mM NaCl에 녹아있는 8.6% CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) 용액 37 μ l를 첨가하여 잘 섞은 뒤, 세포막을 제거하기 위해 65 $^{\circ}$ C에서 1시간 처리하였다. RNase (1mg/ml, DNase-free) 3 μ l을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켜 RNA를 분해시킨 다음, phenol/chloroform 추출 방법 (Sambrook 등, 1989)으로 DNA를 순수 분리하였다. 원심 분리한 상등액에 반량의 7.5M NH_4OAc 와 두 배의 95% 에틸알콜로 DNA를 1시간 정도 -70 $^{\circ}$ C에서 방치하여 침전시킨 후, 1,500rpm으로 10분간 원심분리 시켰다. 침전물을 80% 에틸알콜로 세척한 후 건조시킨 다음, 20 μ l의 TE buffer [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1mM EDTA]로 녹였다. DNA의 추출상태는 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 관찰하였고, DNA의 양은 Lamda DNA를 일련의 농도로 배열하여

Table 1. Agronomic characteristics of Italian ryegrass cultivars.

Cultivar	Winter hardiness* (1~9)	Leafyness (1~9)	Leaf color **	Leaf width ***	Lodging (1~9)	Regrowth (1~9)	Heading date	Plant height (cm)
Florida 80	2	3	G	M	5	3	5. 9	79
Grazer	2	4	G	M	5	3	5. 9	80
Rustmaster	1	2	G	M	3	3	5. 10	84
.....								
Marshall	3	3	G	M	3	5	5. 18	88
LES 2	3	3	G	M	1	3	5. 19	81
LES 3	2	1	DG	M	1	2	5. 19	85
LES 4	3	1	DG	M	2	3	5. 19	87
LES 5	2	3	G	M	2	1	5. 17	85
Orlando	2	2	LG	M	3	1	5. 19	88
Montblanc	4	3	G	W	1	2	5. 18	89
Fabio	3	2	DG	W	3	1	5. 17	89

* 1: good, 9: bad.

** LG: light green, G: green, DG: dark green.

*** M: medium, W: wide.

ethidium bromide (EtBr)로 직접 염색하여 측정하였다.

3. DNA의 증폭

Canada의 British Columbia 대학에서 구입한 인위 합성된 ten-mer (10 nucleotides) primer들 중에서 34가지를 본 실험에 사용하였다. DNA 증폭을 위하여 0.27 μ M primer와 2ng genomic DNA 용액에 1.5X buffer [12.5mM Tris-HCl (pH 8.0), 62.5 mM KCl, 0.125% Triton X-100], 1.5mM MgCl₂, 200 μ M dNTP (Takara), 10 μ l BSA (Promega)와 0.5U의 DynaZyme (*Thermus brockianus*, Finnzymes, Finland)을 첨가하여 총 14 μ l로 하였고, 동일량의 mineral oil을 혼합액에 첨가하였다. PCR 기종은 Perkin-elmer 9600을 이용하였으며, 증폭 조건은 94 $^{\circ}$ C (denaturation) 15초, 35 $^{\circ}$ C (annealing) 30초, 72 $^{\circ}$ C (extension) 1분으로 총 45 cycle을 수행하였으며, 마지막 extension은 7분간 보충하였다. 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel로 전기영

동한 다음, EtBr로 염색시킨 후 UV light에서 비교 관찰 하였다.

4. DNA Band 양상 분석

모든 marker는 증폭된 DNA 조각의 존재 유무에 따라서 유는 (+), 무는 (-)로 표시 하였으며, 각 품종들 간에 유전적 유의성 (genetic similarity) 수치와 각 품종간에 계통원을 만들기 위해 Sneath와 Sokal (1973)에 의해 개발된 microcomputer program인 unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA, version 2.0)을 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

본 실험에 사용된 primer 34개 중 16개의 primer에서 polymorphic 양상을 나타내었으며 (표 2), 나머지 18개의 primer에서는 증폭은 되었으나 band들의 대부분이 single band로 monomorphism을 나타내었다.

16개의 primer에서 얻어진 총 band 수는 162개였다. 각 primer 마다 증폭된 band 수는 3개 (primer 273)에서 16개 (primer 291)까지 band 수가 다양하게 나타났으며, 각 primer 당 나타난 평균 band 수는 14.8개였다. 총 162개 band 중 polymorphic 양상을 나타낸 band 수는 총 96개로 polymorphism 비율은 59%였으며, 증폭된 DNA band의 크기는 120bp~1.8kb 범위에 존재했고, 주로 분포한 band의 범위는 0.5kb~1.5kb였다. Polymorphic band 수는 primer 당 2개 (primer 275)에서 11개 (primer 291)까지로 primer 246에서는 증폭된 총 10개의 band가 전부 polymorphic하였으며, primer 269의 경우는 총 14개의 band 중 3개 (21.4%)만이 polymorphism을 나타내어 primer 중 polymorphic 비율이 가장 낮았다. 밀 (*Triticum aestivum* L.) 간장 근동질 계통의 RAPD 분석의 경우에는 총

147개의 band 중 113개 (77%)가 polymorphism을 나타냈고, primer 당 polymorphic band 수는 7~15개로 나타났으며, 평균 band 수는 9.4개라고 보고하였다 (Hong 및 Park, 1996). Ahn 등(1996)은 국내·외의 총 10개 벼 (*Oryza sativa* L.) 품종의 RAPD 분석에서 73개의 primer를 사용하여 총 204개의 band를 얻었고, 그 중 30% 정도인 61개 band가 10개 품종들 중에서 적어도 1개 이상의 polymorphism을 나타내었다고 보고하였으며, Yu와 Nguyen (1994)은 13개 벼 품종에서 42개의 primer로 총 260개의 band를 얻었고 polymorphic band 수는 208개 (80%)임을 보고하여, 본 실험의 RAPD 분석에서 이탈리아 라이그라스의 polymorphic 비율이 59%인 것과 비교할 때 상당히 높은 비율을 나타내었다.

Table 2. List of the random primers used in RAPD reaction.

Primer Accession No.*	Sequence	GC content (%)	Total No. of band	No. of Polymorphic band
202	5' - GAGCACTTAC - 3'	50	12	7
209	5' - TGCCTGGAG - 3'	60	9	5
221	5' - CCCGTCAATA - 3'	50	12	7
236	5' - ATCGTAGGTG - 3'	50	10	8
239	5' - CTGAAGCGGA - 3'	60	6	2
245	5' - CGCGTGCCAG - 3'	80	11	5
246	5' - TATGGTCCGG - 3'	60	10	10
256	5' - TGCAATCGAA - 3'	50	10	7
259	5' - GGTACGTACT - 3'	50	11	6
268	5' - AGGCCGCTTA - 3'	60	13	9
269	5' - CCAGTTCGCC - 3'	70	14	3
273	5' - AATGTCGCCA - 3'	50	3	2
275	5' - CCGGGCAAGC - 3'	80	6	2
289	5' - ATCAAGCTGC - 3'	50	12	6
291	5' - AGCTGAAGAG - 3'	50	16	11
294	5' - TGATTGGCCA - 3'	50	7	6
계			162	96

* Primer accession number of University of British-Columbia in Canada.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

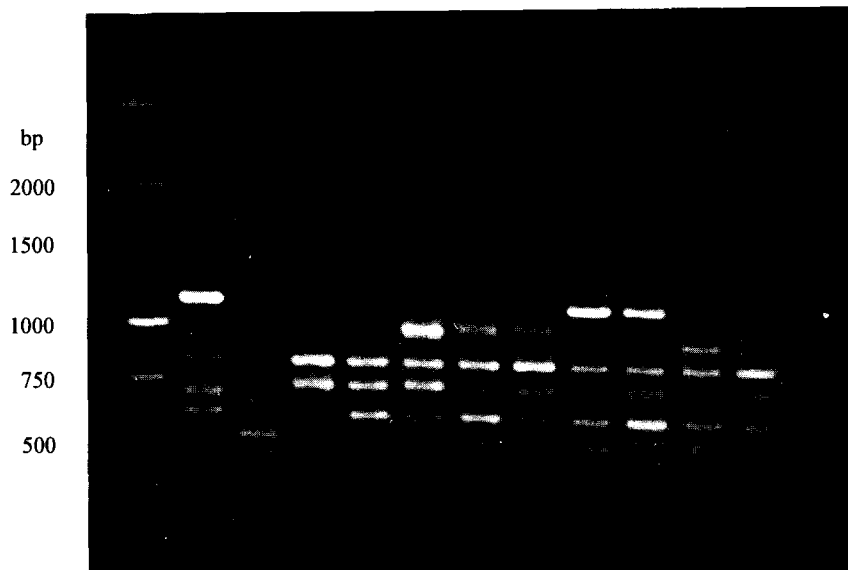


Fig. 1. RAPDs of 11 Italian ryegrass cultivars using primer 236 (5' -ATCGTAGGTG-3'). M: marker 1Kb ladder, lane 1: Florida 80, 2: Marshall, 3: LES 2, 4: LES 3, 5: LES 4, 6: LES 5, 7: Grazer, 8: Rustmaster, 9: Orlando, 10: Fabio, 11: Montblanc.

그림 1은 primer number 236 (5'-ATCGTAGGTG-3')을 이용한 RAPD 분석으로 총 10개의 band 중 8개의 polymorphic band를 선발하여 표지인자 차이 의한 유전적 유의성 (genetic similarity) 분석을 위해 사용하였다.

조사된 이탈리아 라이그라스 11개 품종들 중 품종 특이 RAPD 표지인자로서 한 개 품종 (LES 2)을 제외한 모든 품종에서 공통적으로 가지고 있는 표지인자로는 primer 236에서 얻어진 1,000bp (primer 236-1,000으로 명명), primer 268-1,100 (Montblanc), primer 256-1,300 (Orlando), primer 245-1,400 (Florida 80), primer 291-1500 (Rustmaster) 등으로 나타났으나, 한 품종에만 존재하는 특이 band는 없었다. 그러나 2개 품종만 공통적으로 존재하는 band들로서는 primer 268-890 (Florida 80 및 Fabio)와 primer 294-150 (Orlando 및 Fabio)로서 이 표지인자들은 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) 표지인자

로 전환할 수 있는데, 이는 RAPD band 말단 부분의 염기서열을 분석하고 말단의 18~24bp의 primer를 제작하여 PCR로 증폭된 절편을 품종 특이 표지인자로 이용하는 것이다. Shin 등 (1995)은 39종류의 수박 (*Citrullus vulgaris* L.) 품종에서 몇 개의 품종을 구별할 수 있는 8개의 특이 표지인자를 선발하였고, Hong 및 Park (1996)은 밀 간장 근동질 유전자 32계통의 RAPD 분석에서 12개의 primer를 이용하여 7개의 특이 표지인자를 선발하였으며, Rim 등(1995)은 밀의 밀납 wax 와 waxless 계통사이에서 조사된 총 108개의 primer 중 17개의 primer에서 polymorphism을 나타냈음을 보고 하였다.

모든 polymorphic band는 증폭된 DNA 단편의 유, 무에 따라 1, 0으로 표시하여 유전자원간의 공통인 band 값인 유전적 유의성 (genetic similarity)을 Nei와 Li(1979)의 방법으로 계산하였다. 이 수치를 UPGMA에 입력하여 집단분석 (Clustering)을 하였

다. 표 3은 11개 품종간의 유전적 유의성 (genetic similarity)을 나타낸 것인데, 유의성 계수가 1에 가까울수록 품종 상호간에 유전적 유의성이 높은 것이다. 품종간의 유전적 유의성 비교 결과는 Grazer와 Orlando가 0.740으로 가장 유전적 근연관계에 있는

것으로 나타났으며 Marshall과 Orlando가 0.438으로 가장 원연관계에 있는 것으로 나타났다. 국내에서 육성된 LES 합성종들간의 유의성 계수는 LES 3과 4가 0.615, LES 4와 5가 0.625로 LES 종들 중에서 높은 상관 계수를 나타내었다.

Table 3. Matrix of pairwise genetic distance among 11 Italian ryegrass cultivars.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1*	-										
2	0.531	-									
3	0.500	0.573	-								
4	0.625	0.635	0.583	-							
5	0.490	0.542	0.594	0.615	-						
6	0.448	0.583	0.531	0.490	0.625	-					
7	0.542	0.490	0.521	0.688	0.573	0.552	-				
8	0.531	0.479	0.448	0.469	0.625	0.458	0.594	-			
9	0.594	0.438	0.552	0.573	0.521	0.542	0.740	0.583	-		
10	0.573	0.521	0.510	0.635	0.646	0.625	0.635	0.583	0.604	-	
11	0.536	0.531	0.521	0.604	0.490	0.552	0.583	0.510	0.615	0.635	-

* 1: Florida 80, 2: Marshall, 3: LES 2, 4: LES 3, 5: LES 4, 6: LES 5, 7: Grazer, 8: Rustmaster, 9: Orlando, 10: Fabio, 11: Montblanc.

UPGMA 분석에 의해 이탈리아 라이그라스 품종간의 유전적 유연관계를 Dendrogram으로 나타낸 것이 그림 2이다. 그림에서와 같이 크게 3개의 군으로 나누어졌는데, 첫 번째 군은 Florida 80, Marshall, LES 3, LES 2, 두 번째군은 LES 4, Fabio, LES 5, 세 번째 군은 Grazer, Orlando, Montblanc 등으로 분류되었다. 3개로 분류된 군은 유전적 거리가 0.567~0.646 범위에 주로 분포하여 품종간의 유전적 거리가 멀지 않은 것으로 나타났다.

RAPD 방법은 사용방법이 간단하고 소요시간이 적게 들며, 적은 양의 DNA 시료로도 분석이 가능하다는 장점이 있으며, 증폭된 DNA 단편들의 polymorphism 때문에 작물의 분류 (Tinker 등, 1993; Fukuoka 등, 1992), 유전자원 평가 (Yu와 Nguyen, 1994) 등에 널리 이용되고 있다. 그러나 RAPD 방법은 유용 유전 형질을 탐지할 수 있는 표지인자 개발

이나, 작물의 품종 특이 표지인자 개발, 또는 가축의 경우, 예를 들어 한우 판별 표지인자 개발 등과 같은 경우에는 재현성이 떨어진다는 지적을 받으나, 이런 점은 SCAR 표지인자로 전환하여 보완할 수 있다.

지금까지 RAPD 방법을 이용하여 작물 품종군의 분류를 시도한 보고는 많으나 (Tinker 등, 1993; Fukuoka 등, 1992; Yu와 Nguyen, 1994), 사료작물 목초들의 RAPD 방법을 이용한 근연관계 분석은 시도된 바 없어 앞으로 이탈리아 라이그라스 품종들 외에 다른 초종들의 품종 및 계통간 유전적 근연관계 분석에 유용하게 이용할 수 있을 것이다. 결론적으로 이탈리아 라이그라스 11개 품종들간의 RAPD 방법을 이용한 유전적 변이 분석을 통해서 총 34개의 primer 중 18개의 primer에서 monomorphic band를 얻었고, 품종간의 유의성 계수가 0.43~0.740 범위를 나타내어 품종간에 유의성이 높은 것으로 나타나,

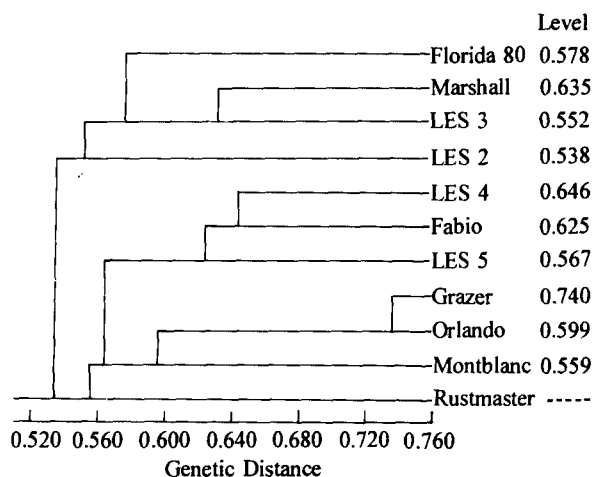


Fig. 2. Dendrogram of 11 Italian ryegrass cultivars based on DNA marker differences. Values on the baseline indicate the average genetic distance between cultivars.

품종들간의 유전적 변이폭은 좁은 것으로 나타났다. 이러한 낮은 유전적 변이폭은 이탈리아 라이그라스의 육종면에서 보면, 유용한 유전 농업형질의 개선을 위한 육종 노력에 제약을 줄 것으로 사료되어, 유전자원의 광범위한 수집 및 근연종과의 교잡을 통해 유전적 변이폭을 넓혀 육종효율을 높여야 할 것으로 사료된다.

IV. 적 요

국내·외에서 육성된 이탈리아 라이그라스의 11개 품종의 유전적 다양성을 RAPD 방법을 이용하여 그들의 유전적 변이 및 근연관계를 분석한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 사용된 primer 34개 중 16개의 primer에서 polymorphic 양상을 나타내었으며, 16개의 primer에서 얻어진 총 162개 band 중 polymorphic band 수는 총 96개로 polymorphism 비율은 59%였으며, 증폭된 DNA band의 대부분은 0.5kb~1.5kb 범위를 나타내었다.

2. 각 primer마다 증폭된 band 수는 3개~16개로서

다양하게 나타났으며, 각 primer 당 나타난 평균 band 수는 14.8개 였고, polymorphic band 수는 primer 당 2개~11개로 분포되었다.

3. 품종간의 유전적 유의성 비교 결과는 Grazer와 Orlando가 0.740으로 가장 유전적 근연관계에 있는 것으로 나타났으며, Marshall 과 Orlando가 0.438으로 가장 원연관계에 있는 것으로 나타났다. 국내에서 육성된 LES 합성종들 간의 유의성 계수는 LES 3과 4가 0.615, LES 4와 5가 0.625로 LES 종들 중에서 높은 상관계수를 나타내었다.

4. UPGMA 분석에 의해 이탈리아 라이그라스 품종간의 유전적 유연관계를 Dendrogram으로 나타낸 그림은 크게 3개의 군으로 나누어졌는데, 첫 번째 군은 Florida 80, Marshall, LES 3, LES 2, 두 번째 군은 LES 4, Fabio, LES 5, 세 번째 군은 Grazer, Orlando, Montblanc 등으로 분류되었다. 3개로 분류된 군은 유전적 거리가 0.567~0.646 범위에 주로 분포하여 품종간의 유전적 거리가 멀지 않은 것으로 나타났다.

V. 인용 문헌

1. Ahn S.N., H.W. Park, H.C. Choi, and H.P. Moon. 1996. Fingerprinting of japonica rice cultivars using RAPD markers. Korean J. Breed. 28(2):178-183.
2. Chalmers, K.J., U.M. Barua, C.A. Hackett, W.T.B. Thomas, R. Waugh, and W. Powell. 1993. Identification of RAPD markers linked to genetic factors controlling the milling energy requirement of barley. Theor. Appl. Genet. 87: 314-320.
3. Devos, K.M., and M.D. Gale. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. Theor. Appl. Genet. 84:567-572.
4. Dich, V., and I. Schubert. 1993. Midiprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenolics. Nucl. Acids Res. 21:3328.

5. Fukuoka S., K. Hosaka, and O. Kamijima. 1992. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Jpn. J. Genet.* 67:243-252.
6. Hong, B.H., and C.S. Park. 1996. Phylogenetic analysis of wheat near-isogenic lines for culm length with RAPD marker. *Korean J. breed.* 28(4): 420-428.
7. Michelmore, R.W, I. Paran, and R. V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis. A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:9828-9832.
8. Murray, J.M., and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8:4321-4325.
9. Nei, M., and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
10. Rim, Y.W., J.H. Nam, M.W. Park, and J.S. Shin. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to detect the useful genes of wheat. *RDA Journal of Agricultural Science* 37:147-159.
11. Rowland, L.J., and A. Levi. 1994. RAPD-based genetic linkage map of blue berry derived from a cross between diploid species (*Vaccinium darrowi* and *V. elliotii*). *Theor. Appl. Genet.* 87:863-868.
12. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning-laboratory manuals* (2nd Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
13. Shin, J.S., S.J Lee, and K.W. Park. 1995. Genetic diversity in watermelon (*Citrullus vulgaris* L.) germ-plasm through RAPD analysis. *Korean Journal of Breed.* 27(1):94-107.
14. Sneath, P.H.A., and R.R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, USA.
15. Tinker, N.A., M.G. Fortin, and D.E. Mather. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 85:976-984.
16. Yu L.W., and H.T. Nguyen. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oriza Sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 87:668-672.