

## RAPD법을 이용한 고구마 품종간 유연관계 평가

이금표 · 박권우  
고려대학교 원예과학과

### Evaluation of Genetic Relationship among Sweetpotato Cultivars Using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis

Lee, Gung-Pyo · Park, Kuen-Woo  
Dept. of Horticultural Science, Korea University, Seoul 136-701, Korea  
\*corresponding author

**ABSTRACT** The present research was conducted to study genetic relationship and cultivar identification in sweet potato (*Ipomoea batatas*) using RAPD method. Thirteen cultivars of sweet potato in Korea were classified by UPGMA clustering method into three groups as follows; group I was corresponded to 'Choongsung100'; group II, 'Eunmi', 'Saengmi', 'Suwon147' and 'Yulmi'; group III, 'Hongmi', 'Jinmi', 'Kwandong95', 'Seonmi', 'Wonmi', 'Shinyulmi', 'Jeungmi', and 'Poongmi'. Identification using RAPD was generally consistent with breeding pedigree of those parents. However, inconsistent results may be caused by clonal variation. The results presented in this study suggest that RAPDs in sweetpotato are likely to be useful for cultivar identification and various procedures in breeding. The use of various DNA marker system assists selection programs for economically important trait, and may facilitate selection in earlier growing stage. This systems may enhance the prospects for improving sweet potato cultivar by accurate marking desirable traits at DNA level.

*Additional key words:* breeding program, DNA polymorphism, marker

### 서 언

고구마(*Ipomoea batatas*)의 원산지는 열대중앙아메리카로, 기록에 의하면 1763년 일본에서 우리나라에 도입되어 재배가 시도된 바 있다고 한다. 그러나, 실제적으로 국내품종의 재배가 이루어진 것은 1938년 '홍적'과 '충승 100호'의 교배로 만들어진 '수원 147호' (1938년)부터라고 할 수 있다. 우리나라의 주요 품종은 주로 식용으로 발전하여 왔으며, 약 15종 이상이 재배되어 왔다. 그러나, 최근에는 '신율미', '증미', '진미' 등의 2-3가지의 품종이 일반적으로 재배되고 있다. 고구마의 현재 재배종은 BB genome을 갖는 동질육배체 (2n=90)로서 *I. trifida*로부터 분화, 발전한 것으로 보고 있다. 고구마는 영양번식성 작물로서, 각 품종이 하나의 클론(clone)이라 할 수 있어, 생육환경에 따라 많은 변이가 발생할 수 있게 된다. 이에 따라, 재배상의 특별한 문제가 없는 한 지속적으로 과근을 이용하여 번식시켜 수확하게 되는 농가 및 육종가의 입장에서 품종이 섞여있을 경우, 이를 명확히 구분할 수 있는 방법이 현재까지는 극히 제한적이라 할 수 있다. 따라서, 분류와 판별에 다양한 표현형이 필요하게 되었는데, 고구마의 경우 기존의 동위효소(isozyme)를 이용한 품종 판별 및 분류는 판별인자의 다형화가 극히 제한적이었기 때문에 (Kennedy와 Thompson, 1991), 최근에는 RAPD (random amplified polymorphic DNA)법과 RFLP (restriction fragment length polymorphism)를 이용하고 있다.

RAPD법은 대개 9~11bp의 임의의 염기서열로 된 작은 primer를 이용하기 때문에 primer에 상응하는 영역 2 방향의 염기서열에 의해 확장된 genome 부위만을 증폭시키게 된다(Welsh와 McClelland, 1990). 이 방법은 agarose gel상에 나타나는 절편의 형태를 조사하면 되기 때문에 매우 간단하다. RAPD법에 의한 polymorphism은 한 품종에서 나타나다도 다른 품종에서는 안 나타날 수도 있으며 특히 계능이 달라지면 더욱 그렇다.

RAPD법을 사용하여 증폭된 DNA 단편들은 근친계통 내에서도 다형화(polymorphic)하므로 동식물의 분류, 집단유전학과 계통분석 등에 널리 이용되고 있다 (Tinker 등, 1993; Viering 등, 1994). 또한, 특정 형질에 연관된 RAPD polymorphism을 이용하여 유전자 연관지도 작성에 응용되고 있다(Chaparro 등, 1994; Rowland와 Levi, 1994). 이들 방법은 DNA 증폭에 기초를 두기 때문에 target

DNA의 sequence에 대한 정보가 전혀 필요치 않으며(Rafalski 등, 1991). 또한 인위적으로 합성한 deca-mer (10 nucleotides) 혹은 그 이상의 oligonucleotides를 이용하는 방법으로서 무작위 primer (deca-mer)의 경우 410=1,048,576의 서로 다른 염기배열 조합을 가질 수 있다(Welsh와 McClelland, 1990). 이러한 백만개 이상의 primer들 중에서 몇 가지만을 이용하여도 기존의 RFLP 기술에 의해서 나타날 수 있는 DNA 변이보다도 월등히 많은 poly morphism을 얻을 수 있는 장점이 있다(Martin 등, 1991).

본 실험은 고구마의 체계적이고 효율적인 육종과 품종 혹은 계통간의 유전 특성에 따른 변이도 작성 및 분류 확립을 위하여 실시되었으며, 나아가 유전적 변이와 품종분류에 이용될 수 있는 RAPD marker를 구명하고자 하였다.

### 재료 및 방법

공시재료는 작물시험장에서 분양 받은 고구마 13품종 ('충승 100호', '수원 147호', '홍미', '은미', '진미', '선미', '원미', '생미', '풍미', '율미', '신율미', '증미', '관동 95')의 잎을 채취하여 사용하였다.

Genomic DNA의 추출은 Kim 등 (1997)의 방법을 다소 변형시켜 이용하였다. 상단에서 5번째까지의 연녹색 어린 잎을 멸균한 1.5ml Eppendorf 튜브의 뚜껑으로 3~4개씩 따서 튜브에 넣은 후 5 µl (한 방울)의 1% (v/v) 2-mercaptoethanol을 넣고 잘 마쇄한 후 300 µl extraction buffer (250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 200mM Tris/HCl (pH 8.0))를 넣고 잘 섞어 실온에서 30분간 방치하였다. 여기에 10% polyvinylpyrrolidone (soluble PVP, Sigma, MW 10000) 90 µL를 첨가하여 잘 섞은 후 1/2 vol.의 7.5M ammonium acetate (NH<sub>4</sub>OAc)를 넣고 4°C에서 30분간 반응시켰다가 chloroform/isoamyl-alcohol을 1vol. 넣고 2~3분동안 반응시킨 후 10분 동안 원심분리(10,000g, 4°C)하여 상등액을 분리하여 1vol.의 isopropanol을 넣고 -20°C에서 30분 동안 침전시켰다. Isopropanol 혼합물은 침전 후 4°C에서 10분간 원심분리(10,000g)하여 상등액을 따라 버리고 침전물을 말린 후 500 µL TE buffer (10mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.1mM EDTA (pH 8.0))에 녹여

**Table 1.** Optimum concentration and conditions for RAPD protocol of sweet potato.

Component	Concentrations or conditions	
	Evaluated	Optimum
Template DNA	0.5, 1.0, 2.0, 4.0 ng/ µL	1-2 ng/ µL
MgCl <sub>2</sub>	0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mM	1.5 mM
dNTP	50, 100, 200, 400 µM	200 µM
Primer	0.09, 0.18, 0.27, 0.36 µM	0.27 µM
DNA polymerase (Dynazyme)	0.009, 0.018, 0.027, 0.036 units/ µL	0.018 units/ µL

**Table 2.** The list of 15 random primers and their sequences used in RAPD for genetic relatedness and cultivar identification of sweetpototato.

No. <sup>2</sup>	Sequences	GC content
303	5'-GCGGGAGACC-3'	80
305	5'-GCTGGTACCC-3'	70
312	5'-ACGGCGTCAC-3'	70
313	5'-ACGGCAGTGG-3'	70
322	5'-GCCGCTACTA-3'	60
333	5'-GAATGCGACG-3'	60
335	5'-TGGACCACCC-3'	70
337	5'-TCCCGAACCG-3'	70
348	5'-CACGGCTGCG-3'	80
349	5'-GGAGCCCCCT-3'	80
352	5'-CACAAACGGGT-3'	60
354	5'-CTAGAGGCCG-3'	70
364	5'-GGCTCTCGCG-3'	80
372	5'-CCCCTGACG-3'	70
389	5'-CGCCCGCAGT-3'	80

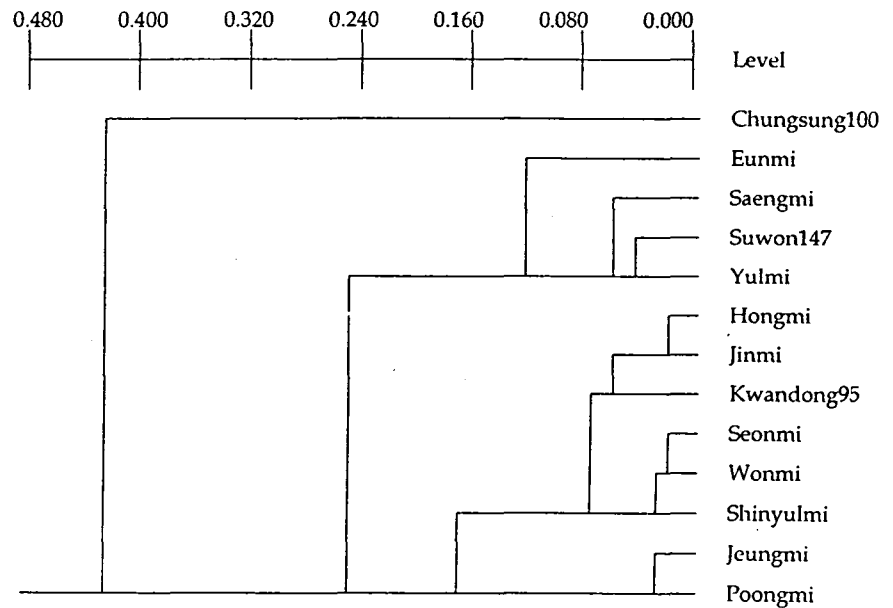
<sup>2</sup> Accession number of UBC (University of British Columbia) primer set.

RNase 2 μL를 넣고 37°C에서 15분간 반응시켜 RNA를 제거하고 다시 chloroform/isoamylalcohol을 1vol. 넣고 반응시킨 후 원심분리하여 상등액을 취한 후, 이것을 다시 isopropanol로 침전시켜 30 μL의 3차 증류염수로 녹여 DNA를 얻었다.

고구마의 유연관계분석을 위한 primer는 Canada의 British Columbia 대학에서 구입한, 인위 합성된 deca-mer (10 nucleotides)들 중에서 예비실험을 통하여 다양한 poly-morphism이 인정된 15개의 primer를 사용하였고, DNA 증폭 반응시의 농도 및 반응조건은 표 1과 같이 최적화 실험을 통하여 결정하였다. DNA 증폭 반응을 위한 첨가요소의 기준량은 0.27 μM primer와 1~5ng genomic DNA 용액에 1X buffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, FINNZYNES Oy, Finland), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTP mix(dATP, dTTP, dGTP, dCTP, FINNZYNES Oy, Finland)와 0.018 units/μl의 Dynazyme (Thermus brockianus, FINNZYNES Oy, Finland)을 첨가하여 총 14ul로 하고, 동일량의 mineral oil을 첨가액에 overlay한 것을 기준으로 하였다. 증폭조건은 Perkin Elmer Thermocycler

4800으로 94°C(denaturation) 20초, 37°C(annealing) 40초, 72°C(extension) 1분으로 총 45cycles을 수행하였으며 cycle 전 초기 denaturation을 95°C에서 5분 동안 시켰고, 마지막 extension은 72°C에서 15분간 하였다. 증폭된 DNA는 1.4% agarose gel로 전기영동한 다음 EtBr(ethidium bromide)로 염색시킨 후 UV light에서 비교 관찰하였다.

모든 다형화 밴드 (polymorphic band)는 증폭된 DNA 조각의 존재유무에 따라 밴드가 나타난 것은 1, 밴드가 나타나지 않는 것은 0으로 하여 Nei dissimilarity



**Fig. 1.** Phenogram of 13 Korean sweet potato cultivars based on UPGMA cluster analysis of similarity value derived from the RAPD data.

(genetic distance) index (Nei와 Li, 1979)를 사용하여 분석하였으며, 그 식은 다음과 같다 : Dissimilarity =  $1 - 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$ ,  $N_{XY}$  = 유전자형 X와 Y사이에서 같은 분자량의 증폭된 DNA 조각의 수,  $N_X$  = 유전자형 X에서 증폭된 DNA 조각의 수,  $N_Y$  = 유전자형 Y에서 증폭된 DNA 조각의 수. 고구마 품종간의 유전 특성에 따른 변이도 작성을 위하여 NTSYS program (Exeter Software, Setauket, N.Y.)을 사용하였으며, Sneath와 Sokal(1962)에 의해 개발된 비가중산술방식 (UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic averages)을 통계방식으로 채택하였다. 재현성있는 결과를 위하여 순수분리한 DNA는 회석 후 1개의 primer (No. 333)로 3번의 반복실험을 실시하였으며, DNA polymerase는 Dynazyme 한 가지만을, PCR tube는 Perkin Elmer사의 Thin Wall 만을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

RAPD법은 인위합성한 deca-mer (10 nucleotides) 또는 그 이상의 oligonucleotides를 primer로 사용하여 열 저항성 DNA 중합효소 (heat-resistant DNA polymerase)를 처리하고 DNA의 denaturing, primer의 annealing과 DNA polymerization의 반복적인 과정으로 DNA의 특정부위를 증폭시키는 방법으로서, 고구마에 실시한 결과 다양한 polymorphism이 관찰되어 유전적 변이 분석이 가능하였다. 예비실험을 통하여 선별한 15개의 primer는 GC content가 60%인 것은 3개, 70%인 것은 7개, 80%인 것은 5개였으며 (표 2), 실험결과 이들 모두 polymorphism을 보여주었다. 선정

된 15개의 primer로 PCR을 실시한 결과 나타난 총 band 수는 116개로, 각 primer 마다 증폭된 band 수는 6개 (primer No. 321)에서 13개 (primer No. 389) 까지 band수가 다양하게 나타났으며, 각 primer 당 나타난 band 수는 8.2개였다. 그 중 다양한 polymorphism을 보이는 band는 총 54개로 분석에는 이것만을 사용하였다.

모든 polymorphic band는 증폭된 DNA 단편의 존재 유무에 따라서 존재하는 것은 1, 존재하지 않는 것은 0으로 표시하여 Nei와 Li (1979)의 방법으로 계산하였다.

고구마 13개의 품종에서 나타난 RAPD band의 비교 결과 얻어진 genetic distance (1-F) 값의 평균은 0.170이었다. 이것은 36개의 수수품종들간의 비교에서 0.117인 것으로 볼 때 (Tao 등, 1993) 유전자원들간의 변이가 상당히 큰 것으로 보여진다. 각각의 고구마 간에 나타난 1-F 값 중에 가장 높은 수치를 나타낸 것은 0.556으로서 '충승 100호'와 '은미' 간의 비교에서 관찰되었다. '충승100호'는 평균 1-F 값(0.389)이 전체 평균값(평균 0.170)과 비교할 때 가장 높게 나타나 가장 많은 유전적 변이를 나타내었다. 1-F data matrix를 이용하여 UPGMA 방법으로 집단(cluster) 분석을 실시한 결과, 그림 1과 같은 phenogram으로 나타낼 수 있었다. 그림 1에 의하면 13개의 고구마 유전자원은 3개의 major group으로 나누어졌다.

Group I은 '충승100호', group II는 '은미', '생미', '수원147', '율미', 그리고 group III는 '홍미', '진미', '관동95', '선미', '원미', '신율미', '증미', '풍미'로 나누어졌다. Group II는 평균 1-F 값이 0.094이고, group III는 0.133으로 전체 평균 0.170보다 낮아 유전자원들간에 변이가

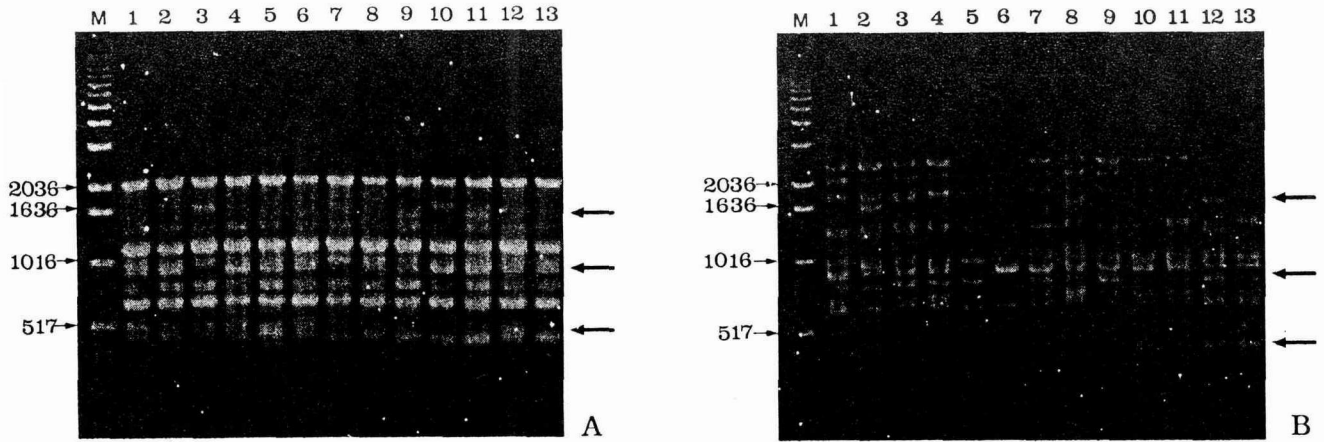


Fig. 2 Ethidium bromide stained amplification products from sample genomic DNA of 13-cultivar sweet potato. Left profile of A was produced by primer UBC333 (5'-GAATGACG-3') and B was produced by primer UBC389(5'-CGCCCGCAGT-3'). Molecular size marker (1kb DNA ladder, BRL) is shown in lane m. Arrows indicate polymorphic bands. Each lane of 1 to 13 indicates as follows: (1) 'choonsung100', (2) 'Eunmi', (3) 'Suwon147', (4) 'Jinmi', (5) 'Yulmi', (6) Jeungmi', (7) 'Seonmi', (8) 'Poongmi', (9) 'Hongmi', (10) 'Shinyulmi', (11) 'Wonmi', (12) 'Kwandong95', (13) 'Saengmi'.

상대적으로 작음을 알 수 있었다. Group II에서 '수원147호'와 '수원147호' x '농립 26호'로 만들어진 '은미'가 유전적으로 가까움을 보여주며, Group III에서는 '황미' x '황미'계열로 만들어진 '진미'와 모계가 역시 '황미'였던 '선미'와 '홍미'가 같은 group으로 구분되었다. 전체적으로 볼 때, 유전적 거리가 가장 먼 품종들은 1-F 값이 0.556인 '충승100호'와 '은미'로 나타났고, '원미'와 '선미', 그리고 '홍미'와 '진미'는 1-F 값이 0에 가까워 매우 근연임을 보여주었고, 더 다양한 primer를 적용하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다. Nei dissimilarity (genetic distance) index (Nei와 Li, 1979)의 계산치를 토대로 비가중산술방식 (UPGMA)으로 분류한 결과는 대체로 육성모부본의 유전자형과 일치함을 나타내고 있고, 상이한 점은 영양계의 변이에 의한 것으로 추측된다.

그림 2와 같이 primer를 달리할 경우, 각 품종마다 특이한 다형화 현상을 나타내어, 각 품종마다의 구별이 가능하다 할 수 있다. 이에 따라, esterase 동위효소와 피근 protein band type에 의해서 구분하기 어려웠던 품종들인 '원미', '풍미', '진미', '생미', '관동95' 등의 구분에 매우 유용한 54개의 specific band가 관찰되었다. 이를 통하여 확실한 품종구분의 가능성이 시사되고 있다. 이들의 총 polymorphic band를 존재유무로 구별하여 UPGMA clustering으로 분류하고 dendrogram을 작성한 결과, 그 유전적인 배경은 매우 다양함을 볼 수 있었고, 각 품종마다의 육성계보와 거의 일치하는 결과를 보여주었다. 본 결과는 앞으로 영양번식을 위주로 하는 고구마 육종을 위한 중요한 판단기준이 되는 선발 marker로서 의미를 갖을 수 있을 것으로 기대된다.

## 적 요

본 실험은 RAPD (random amplified polymorphic DNA)를 이용하여 국내에서 육성된 13개 품종의 고구마 (*Ipomoea batatas*)를 대상으로 유연관계분류 및 품종구분 가능성을 탐색하였다. RAPD를 이

용하여 고구마 품종을 비가중산술법 (UPGMA)으로 3개의 그룹으로 분류할 수 있었는데, 그룹 I은 '충승100호'로, 그룹 II는 '은미', '생미', '수원147호'와 '울미', 그룹 III는 '홍미', '진미', '관동95', '선미', '원미', '신율미', '중미', '풍미'로 나뉘어졌다. RAPD를 이용한 분류 결과는 대체로 육성모부본의 유전자형과 일치함을 나타내고 있고, 상이한 점은 영양계의 변이에 의한 것으로 추측된다. 앞으로 이러한 marker system을 이용하여 육종시 조기에 원하는 형질을 갖는 계통을 선별할 수 있을 것이며, 이에 따라 다양한 고구마 품종의 육종프로그램과 품종판별에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

추가주요어 : DNA 다형화, 표지인자, 육종 프로그램

## 인용문헌

- Chaparro, J. X., D. J. Werner, D. O. Malley, and R. R. Sederoff. 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological, isozyme, and RAPD markers in peach. *Theor. Appl. Genet.* 87: 805-815.
- Kennedy, L. S. and P. G. Thompson. 1991. Identification of sweetpotato cultivars using isozyme analysis. *HortScience* 26: 300-302.
- 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. *Nucleic Acids Res.* 25(5):1085-1086.
- Martin, J. M., T. K. Blake, and E. A. Hockett. 1991. Diversity among north american spring barley cultivars based on coefficients of parentage. *Crop Sci.* 31:1131-1137.
- Nei, M and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA.* 76:5269-5273.
- Rafalski, J. A., S. V. Tingey, and J. G. K. Williams. 1991. RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. *Ag. Biotech. News Info.* 3:645-648.
- Rowland, L. J. and A. Levi. 1994. RAPD-based genetic linkage map of blueberry derived from a cross between diploid species (*Vaccinium darrowi* and *V. elliotii*). *Theor. Appl. Genet.* 87:863-868.
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf. 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon.* 1:33-40.
- Tao, Y., J. M. Manners, M. M. Ludlow, and R. G. Henzel. 1993. DNA polymorphisms in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Theor. Appl. Genet.* 86:679-688.
- Tinker, N. A., M. G. Fortin and D. E. Mather. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationship in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 85:976-984.
- Viering, R. A., Z. Xiang, C. P. Joshi, M. L. Gilbert, and H. T. Nguyen. 1994. Genetic diversity among elite *Sorghum* lines revealed by restriction fragment length polymorphisms and random amplified polymorphic DNAs. *Theor. Appl. Genet.* 87:816-820.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18:7213-7218.