

RAPD-SCAR 마커 조합을 이용한 국내 육성 사과 품종 판별

조강희^{1*} · 허 성² · 김현란¹ · 김정희¹ · 신일섭¹ · 한상은¹ · 김세희¹ · 김대현¹

¹국립원예특작과학원 과수과, ²국립원예특작과학원 사과시험장

Discrimination of Korean Apple Cultivars Using Combination of RAPD-SCAR Markers

Kang-Hee Cho^{1*}, Seong Heo², Hyun Ran Kim¹, Jeong-Hee Kim¹, Il Sheob Shin¹, Sang Eun Han¹, Se Hee Kim¹, and Dae-Hyun Kim¹

¹Fruit Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Suwon 440-706, Korea

²Apple Experiment Station, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Gunwi 716-812, Korea

Abstract. Conventional methods for identification of apple cultivars are based on the evaluation of sets of morphological characteristics, however, closely related cultivars often cannot be distinguished by morphological traits. This study was conducted to develop DNA markers for discrimination of the apple cultivars bred in Korea. Thirty random primers generated eighty-three random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from thirty-one Korean bred and introduced apple cultivars. Fifty-two RAPD fragments were cloned and sequenced for conversion into sequence characterized amplified region (SCAR) markers. Among them only seventeen SCAR markers resulted in the amplification of single major bands the same size as the RAPD fragment cloned. Several combinations of six (AN11_433, AN08_566, A408_592, AK17_653, AO04_711, AO04_779 or AW15_368, AN11_433, A408_592, AK17_653, AO04_711, AO04_779, or AL1_427, AN11_433, AN08_566, A408_592, AK17_653, AO04_779) to seven (AL1_427, AN11_433, AN08_566, A408_592, AK17_653, AM16_708, AO04_779 or A330_424, AN11_433, AG14_502, AN08_566, A408_592, AK17_653, AO04_779 or A330_424, AN11_433, AK14_564, A408_592, AK17_653, AM16_708, AT14_789) SCAR markers provided enough polymorphism to identify sixteen Korean apple cultivars among thirty-one tested cultivars. Therefore, application of the seventeen SCAR markers was sufficient to identify the thirty-one tested apple cultivars. These markers could be utilized as a reliable tool for cultivar discrimination of Korean apples.

Additional key words: polymorphism, RAPD, sequence

서 언

사과는 영년생 작물로서 종자로부터 개화 결실되는 시기까지 장기간이 소요되는 특징을 가지며, 유전자 조성이 잡박할 뿐 만 아니라 자가불화합성의 특징을 가지고 있다. 또한 수관면적도 상대적으로 커서 육종기간이 매우 길고 노력 및 비용이 많이 소요된다(Janick 등, 1996; Korban과 Chen, 1992). 우리나라의 교배를 통한 사과 품종 육성은 국립원예특작과학원에서 1988년 ‘홍로’ 품종을 시작으로 현재까지 18종의 품종이 육성되었다. 일반적으로 과수 국내 육성 품종들은 내수용과 수출용 모두 착과되지 않은 묘목상태로 공

급되고 있어 형태적으로 품종 판별이 거의 불가능하다. 또한 신 육성 품종들은 기존 품종들을 양친으로 사용하는 경우가 많아 유전적으로 매우 밀접하게 연관되어 있어 형태적 형질만으로 품종 구별이 더욱 어렵다. DNA 마커에 의한 품종 판별은 나무의 가지 또는 엽이나 과실과 같은 형태적 형질의 조사 없이 추출한 DNA를 이용하여 쉽고 정확하게 품종을 구분할 수 있기 때문에 유통 묘목에서 품종 혼입을 방지할 수 있고, 육종가의 권리 보호에도 매우 도움이 된다. 또한 DNA 마커는 품종의 유전적 특성을 본질적으로 반영하므로 환경의 영향을 받지 않아 표현형의 특성을 대체 하고 보완하는데 활용성이 높다. 현재까지 사과 품종 구분과 관련하여 random amplified polymorphic DNA(RAPD)(Goulão 등, 2001; Harada 등, 1993; Koller 등, 1993), amplified fragment length polymorphism(AFLP)(Goulão 등, 2001), simple sequence

*Corresponding author: khc7027@korea.kr

※ Received 4 May 2010; Accepted 26 July 2010.

repeats(SSR)(Galli 등, 2005; Gianfranceschi 등, 1998; Guilford 등, 1997), inter-simple sequence repeats(ISSR)(Goulão와 Oliveira, 2001)와 같은 다양한 DNA 마커들이 보고된 바 있다. RAPD와 AFLP 분석법은 재현성 문제와 분석에 많은 시간과 비용이 소요되는 단점이 있고 SSR 마커는 공우성으로 안정성이 높고 품종 구분에 효과적이거나 마커 개발에 비용이 많이 소요된다. Sequence characterized amplified region(SCAR) 마커는 RAPD 마커의 단점을 개선하기 위하여 선발된 RAPD 밴드의 염기서열을 분석한 후 상대적으로 긴 프라이머(18-24-mer)를 설계하여 높은 annealing 온도에서 PCR을 수행함으로써 재현성과 안정성이 높을 뿐만 아니라 프라이머 설계를 바꾸어 공우성 표지로 전환할 수도 있다(Paran과 Michelmore, 1993). 따라서 본 연구에서는 사과 국내 육성 신품종의 보다

신속하고 정확한 판별이 가능한 SCAR 마커를 개발하고 그 실용성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

시험재료 및 DNA 추출

본 연구에 사용한 재료는 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 보존 중인 사과 국내 육성 품종 16품종과 도입 15품종을 포함한 총 31품종을 이용하였다(Table 1). 사과 어린잎을 채취하고 DNeasy plant mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 0.8% 아가로스겔에 전기영동하여 확인하였고 DNA 양은 비색계(NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, MA,

Table 1. The list of cultivars used in this study including their parentage and origins.

No.	Cultivar name	Parentage	Origin
1	Hongro	Spur Earlyblaze × Spur Golden Delicious	Korea
2	Seokwang	Mollie's Delicious × Gala	Korea
3	Chukwang	Fuji × Mollie's Delicious	Korea
4	Saenara	Spur Earlyblaze × Spur Golden Delicious	Korea
5	Gamhong	Spur Earlyblaze × Spur Golden Delicious	Korea
6	Hwahong	Fuji × Sekaiichi	Korea
7	Sunhong	Hongro × Chukwang	Korea
8	Seohong	Tsugaru × Chukwang	Korea
9	Summer Dream	Tsugaru × Natsumidori	Korea
10	Honggeum	Senshu × Hongro	Korea
11	Manbok	Earlyblaze × Fuji	Korea
12	Hongso	Yoko × Hongro	Korea
13	Hongan	Fuji × Jonathan	Korea
14	Yeohong	Jonathan × Fuji	Korea
15	Green Ball	Golden Delicious × Fuji	Korea
16	Picnic	Fuji × Sansa	Korea
17	Tsugaru	Golden Delicious × Unknown	Japan
18	Sansa	Gala × Akane	Japan
19	Jonagold	Golden Delicious × Jonathan	USA
20	Golden Delicious	Grimes Golden × Unknown	USA
21	Red Delicious	Sport of Delicious	USA
22	Fuji	Ralls Janet × Delicious	Japan
23	Pink Lady	Golden Delicious × Lady Williams	Australia
24	Gala	Kidd's Orange Red × Golden Delicious	New Zealand
25	Mollie's Delicious	(Golden Delicious × Edgewood) × (Red Gravenstein × Close)	USA
26	Senshu	Unknown	Japan
27	Jonathan	Esopus Spitzenburg × Unknown	USA
28	Kougetsu	Golden Delicious × Jonathan	Japan
29	Ralls Janet	Unknown	USA
30	Yoko	Golden Delicious × Unknown	USA
31	Spur Earlyblaze	Unknown	USA

USA)로 정량한 후 $10\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 의 농도로 희석하여 PCR분석에 이용하였다.

RAPD 분석

사과 RAPD 분석에 적합한 프라이머를 선발하기 위해서 Operon(Operon Technologies, Alameda, CA, USA)과 University of British Columbia(UBC, Vancouver, BC, Canada)에서 제조된 10개의 염기로 구성된 228종의 프라이머를 검정하였다. 품종 간 다형성을 나타내는 RAPD 마커 선발에는 프라이머 검정에서 선발된 총 30종의 임의 프라이머를 이용하였다(Table 2). PCR 반응은 genomic DNA 40ng, $1 \times$ PCR buffer(Genetbio, Korea), 5pmol 임의 프라이머, 200 μM dNTP, 3mM MgCl₂와 0.4 units Taq DNA polymerase(Genetbio, Korea)를 첨가하여, 반응액을 12.5 μL 로 조정하여 사용하였다. PCR 반응은 thermocycler(iCycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 다음과 같은 프로그램으로 수행하였다 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 초기 변성시키고, 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45초(denaturing), 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45초(annealing); 그리고 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간(extension) 과정을 10회 반복 수행한 다음 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45초, 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45초, 그리고 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 30회 반복한 후 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 처리하였다. 증폭된 PCR 생성물은 1.4% 아가로스겔에서 150V로 3시간 동안 전기영동하여 품종 간 다형성을 탐색하였다.

선발 품종 특이 RAPD 마커의 SCAR 마커 전환

선발된 품종 특이적인 RAPD 마커의 염기서열 분석을 위

해 선발된 DNA 밴드를 잘라내고 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 TOPO-TA cloning system(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 pCR2.1-TOPO vector에 넣어 *E. coli* TOP10에 형질전환시킨 후 DNA가 삽입된 균주를 선발하였다. 이 균주로부터 plasmid DNA를 분리하였고 삽입된 DNA 전 염기서열을 자동 DNA 분석기(ABI 310, Perkin Elmer, Boston, USA)를 이용하여 분석하였다. 선발된 RAPD 마커의 염기서열 분석 결과를 토대로 하여 선발 프라이머의 10개의 염기를 포함하거나 포함하지 않는 24-28 mer 크기의 SCAR 프라이머 작성은 Primer3(<http://frodo.wi.mit.edu>) 프로그램을 이용하였고, 1개의 RAPD 마커당 4조합 이상의 SCAR 프라이머를 검정하였다. PCR은 총 15 μL 반응액에 genomic DNA 40ng, 200 μM dNTP, 5pmol SCAR 프라이머, $1 \times$ PCR buffer(Genetbio, Korea) 및 PCR 반응시 비특이적 DNA 증폭을 최소화하기 위하여 0.5unit의 Hot-start Taq DNA polymerase(Genetbio, Korea)를 첨가하여 수행하였다. PCR 온도주기는 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 주형 DNA를 변성시킨 후 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 63 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 30회 반복하고 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 처리한 후 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.4% 아가로스겔에서 전기영동하여 확인하였다.

결과 및 고찰

RAPD 분석을 통한 사과 품종 간 다형성 탐색

선발된 30종의 임의 프라이머를 이용하여 사과 31품종을

Table 2. The list of RAPD primers and their sequences for identification of 31 apple cultivars.

No.	Primer	Sequence	No. of selected RAPD marker	No.	Primer	Sequence	No. of selected RAPD marker
1	OPG-14	GGATGAGACC	5	16	OPT-14	AATGCCGCAG	3
2	OPG-17	ACGACCGACA	2	17	OPT-16	GGTGAACGCT	2
3	OPG-19	GTCAGGGCAA	1	18	OPU-17	ACCTGGGGAG	7
4	OPK-14	CCCGCTACAC	3	19	OPV-04	CCCCTCACGA	1
5	OPK-17	CCCAGCTGTG	4	20	OPV-12	ACCCCCACT	4
6	OPL-01	GGCATGACCT	2	21	OPV-14	AGATCCCGCC	6
7	OPL-12	GGGCGGTACT	2	22	OPW-10	TCGCATCCCT	2
8	OPL-17	AGCCTGAGCC	2	23	OPW-15	ACACCGGAAC	1
9	OPM-15	GACCTACCAC	2	24	OPW-20	TGTGGCAGCA	1
10	OPM-16	GTAACCAGCC	3	25	UBC-330	GGTGGTTTCC	3
11	OPN-08	ACCTCAGCTC	4	26	UBC-408	CCGTCTCTTT	1
12	OPN-10	ACAACCTGGGG	3	27	UBC-530	AATAACCGCC	2
13	OPN-11	TCGCCGCAA	2	28	UBC-550	GTCGCCTGAG	2
14	OPO-04	AAGTCCGCTC	2	29	UBC-554	TCATCCAGGG	4
15	OPT-06	CAAGGGCAGA	5	30	UBC-667	CGCAGAAATC	2

대상으로 RAPD 분석한 결과 재현성 있고 품종 판별용 마커로 이용할 수 있는 83개의 마커를 선발하였다(Table 2). 프라이머에 따라 선발된 다형성 밴드의 수는 1-7개로 평균 2.8개였다. 다형성이 많은 프라이머는 OPU-17과 OP-V14였고, OPG-14, OPT-06, OPK-17 등에서도 품종 판별에 이용될 수 있는 마커들이 선발되었다. Goulão 등(2001)은 사과 41 품종을 대상으로 32개의 Operon 프라이머로 RAPD 분석한 결과 2-9개의 다형성 밴드를 얻어 평균 5.9개의 다형성 수를 보고하였다. 본 실험에서 평균 다형성 밴드 수가 적은 이유는 RAPD 마커의 SCAR 마커로의 전환을 고려하여 재현성 있는 다형성 밴드만을 선발하였기 때문으로 판단되었다. RAPD 분석은 기술적으로 단순하여 품종 구분이나 marker-assisted selection 등 여러 분야에 아직까지 이용되고 있으나 실험 조건이나 장비 등에 따라 민감하게 반응하여 밴드양상이 달라지는 단점이 있다(Ellsworth 등, 1993; Mularlidharan과 Wakeland, 1993). Koller 등(1993)은 사과 11개 품종을 대상으로 각각의 품종에 대해 시간을 달리하여 5번씩 RAPD 분석을 반복하여 수행한 결과 단일 품종의 밴드패턴이 일정하지 않고 밴드의 수에서 차이가 나는 것이 관찰되었다고 보고한 바 있다. 따라서 본 실험에서는 프라이머 별로 RAPD 분석을 2번씩 반복하여 재현성 있게 나타나는 밴드만을 마

커로 선발하였다. Fig. 1(A)는 Operon L01 프라이머로 증폭한 사과 품종의 RAPD profile을 나타낸 것이다. 약 850bp 크기의 밴드는 국내 육성 품종인 ‘홍로’, ‘선홍’, ‘홍소’, ‘피크닉’과 도입품종인 ‘Sansa’, ‘Pink Lady’와 ‘Gala’에서만 증폭되었고, 약 340bp의 밴드는 ‘서광’ 품종에서만 특이적으로 증폭되었다(Fig. 1A). 그 외에도 OPM-16 프라이머로 증폭된 약 710bp의 밴드는 ‘홍소’, ‘여홍’, ‘그린볼’, ‘Tsugaru’, ‘Jonathan’, ‘Yoko’, ‘Spur Earlyblaze’ 품종에서만 나타났고, OPG-14 프라이머의 약 500bp의 밴드는 ‘서광’, ‘추광’, ‘새나라’, ‘감홍’, ‘선홍’, ‘Golden Delicious’, ‘Mollie’s Delicious’ 품종에서만 증폭되었다.

사과 품종 판별용 SCAR 마커 개발

RAPD 분석은 PCR 반응 시 염기 10개의 프라이머가 genomic DNA 상에 여러 곳에 작용하여 다량의 변이를 검출하는 장점이 있는데 반하여 낮은 온도에서 비교적 짧은 프라이머를 annealing 시키기 때문에 미세한 반응조건의 차이에 따라 비특이적인 밴드가 출현하여 안정적인 검출에 문제가 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 RAPD 마커 선발에 사용하는 프라이머의 길이를 늘려주어 반응의 안정성을 높인 SCAR의 사용이 요구된다(Paran과 Michelmore, 1993). 또한

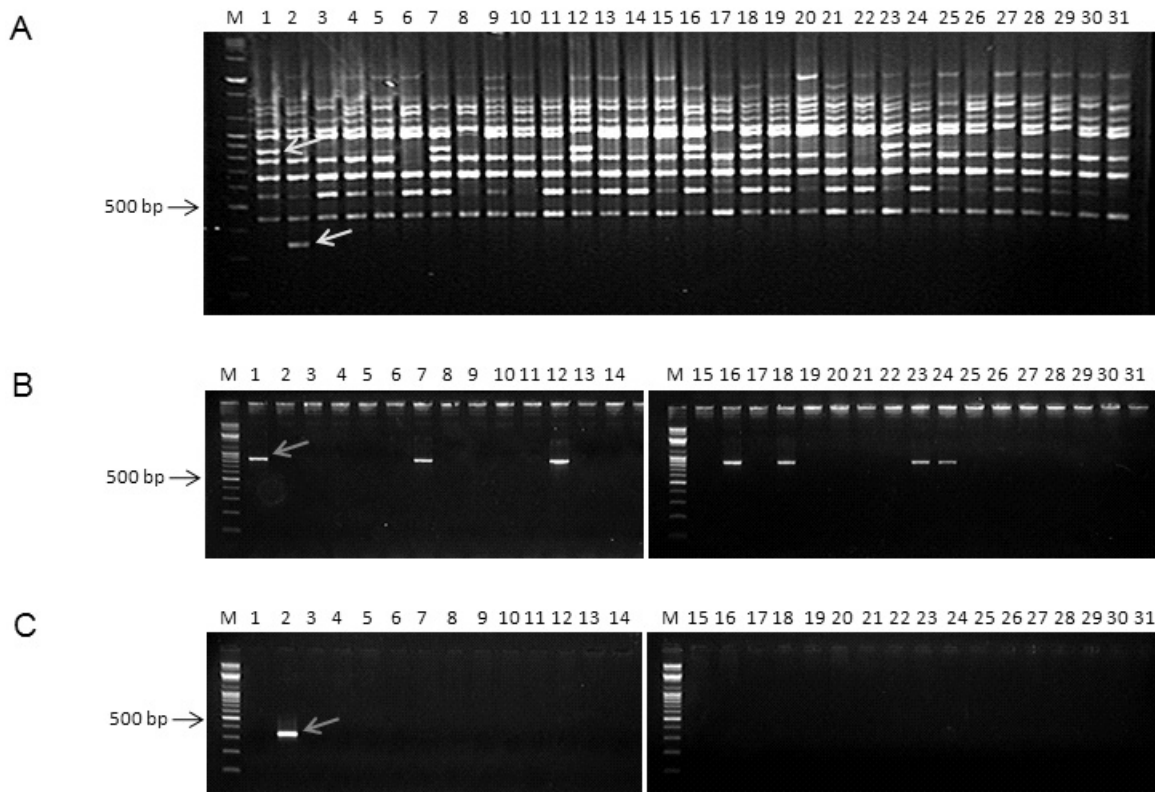


Fig. 1. Amplified fragment patterns of OPL-01 random primer from 31 apple cultivars (A) and converted into SCAR markers (B, C). Arrows indicated RAPD and SCAR markers. A, RAPD markers; B, AL01_851 SCAR marker; C, AL01_343 SCAR marker. Lanes 1-31 corresponded to the apple cultivars listed in Table 1. M, 100 bp plus DNA ladder.

Bernet 등(2003)도 RAPD 분석의 낮은 재현성을 해결하기 위해서는 폴리아크릴아마이드겔을 이용하는 high-resolution 전기영동 하에서 재현성 있는 밴드만을 선발해야 하고, 특이적인 프라이머를 제작하기 위해 클로닝과 염기서열을 분석하여 SCAR 또는 cleaved amplified polymorphic sequence(CAPS)와 같은 마커로 전환해야 한다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 선발된 품종 특이적 RAPD 밴드 중 1,000bp 이하 크기의 52종을 대상으로 하여 클로닝과 염기서열 분석을 통해 SCAR 마커로 전환하고자 하였다. 그 결과 사과 품종을 구분할 수 있는 총 17종의 품종 특이적 SCAR 마커가 개발되었고(Table 3), SCAR 프라이머의 염기서열은 Table 3에 나타내었다. OPL01 프라이머로부터 증폭된 약 850bp와 340bp 크기의 RAPD 밴드는 염기서열 분석 결과 각각 851bp와 343bp 크기로 염기서열 양끝에 RAPD에 사용하였던 10개의

염기서열이 존재하여 선발된 RAPD 마커의 염기서열로 확인되었다. 이들은 SCAR 마커로 전환 후 단일밴드로 나타나 품종 동정을 용이하게 해 주었고(Fig. 1B, C), 이들 SCAR 마커를 AL01_851과 AL01_343으로 명명하였다. AL01_343 마커는 31개 품종 중 ‘서광’ 품종에서만(Table 4, Fig. 1C) 특이적으로 증폭되었고, AT06-453는 ‘홍로’ 품종에서만 나타나 쉽게 품종 판별이 가능하였다(Table 4). UBC408 프라이머에서 유래한 약 590bp 크기의 밴드는 A408_592 SCAR 마커로 전환되었는데 ‘홍로’, ‘서광’, ‘새나라’, ‘선홍’, ‘만복’, ‘홍소’, ‘여홍’, ‘피크닉’, ‘Sansa’, ‘Jonathan’, ‘Kougetsu’, ‘Yoko’, ‘Spur Earlyblaze’ 품종에서 증폭되었다. OPO04 프라이머로 증폭된 710bp와 780bp 크기의 밴드는 각각 AO04_711과 AO04_779 마커로 전환되었다. AO04-711마커는 ‘홍로’, ‘감홍’, ‘홍금’, ‘만복’, ‘홍안’, ‘여홍’, ‘Tsugaru’, ‘Jonagold’,

Table 3. Developed 17 SCAR markers and primer sequences delivered from selected RAPD markers.

RAPD marker	SCAR marker	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)
OPL01_343	AL01_343	F: GGCATGACCTCAAACATGACAATATT R: GGCATGACCTAGCCGTCCTAGGTT	343
OPW15_368	AW15_368	F: GGATATGTACGTGGAACTTTGGTTTC R: ACACCGGAACTATATGTAAACAATCTGA	368
UBC330_424	A330_424	F: GATATTTCCGTGTTTTCGGACTAC R: GGTGGTTTTCTAAGTAGAGCCACA	424
OPL01_427	AL01_427	F: ACAACTGGGGAGGCACAAGG R: ACAACTGGGGTCCTCATCC	427
OPN11_433	AN11_433	F: CGCCGCAAAGGAAGAACAACAAGAAA R: CGCCGCAAAGCCACCTTGCTGATG	433
OPT06_453	AT06_453	F: CAAGGGCAGACAGACATATATTCATAG R: CAAGGGCAGAGGTCAGAGGACAGC	453
OPG14_502	AG14_502	F: AGTACTTGGATTTAACGGAGGACATGA R: CAGATCTTGACTAAGACCCTGGATAAG	502
OPN08_566	AN08_566	F: ACCTCAGCTCTACATGATGCCGAA R: ACCTCAGCTCGGTCATTGCATATAA	566
OPK17_574	AK17_574	F: CCCAGCTGTGATTTTACCTTTTCT R: CCCAGCTGTGACCTATTACGAAGC	574
OPK14_575	AK14_575	F: CCCGCTACCCATTTTGTGTACGTGT R: TAGCCAAAGACTCCACTATAAGGAGG	575
UBC408_592	A408_592	F: CCGTCTCTTTACTATAACTAACCCCTTC R: CCGTCTCTTTTCGTTTCAGGAATTTTCC	592
OPK17_653	AK17_653	F: CCCAGCTGTGACATAACAAAAAATATC R: CCCAGCTGTGAGGGAGTGGCTCGA	653
OPM16_708	AM16_708	F: ATTAACAACTGGAGCTCAAAACCTCAA R: GTAACCAAGCCCAATAACCAACCCAACT	708
OPO04_711	AO04_711	F: AAGTCCGCTCACCAGTAACATAAAA R: AAGTCCGCTCCAGATAAAAAGGAGT	711
OPO04_779	AO04_779	F: AAGTCCGCTCAAATCCACCTCAAG R: AAGTCCGCTCTACAGACTGTTCAAT	779
OPT14_789	AT14_789	F: AATGCCGAGCAGATAAGTAATCTCTA R: AATGCCGAGTAAGAAACCTTGAAGGA	789
OPL01_851	AL01_851	F: CATCAAAGCTTAAAGACTCAAGCAGCTT R: GGCATGACCTGGCTGTTAACTTTG	851

'Red Delicious', 'Fuji', 'Senshu', 'Ralls Janet', 'Yoko', 'Spur Earlyblaze' 품종에서 증폭되었고, AO04_779 마커는 '추광', '새나라', '화홍', '선홍', '서홍', '만복', '홍소', '홍안', '피크닉', 'Red Delicious', 'Fuji', 'Jonathan', 'Kougetsu', 'Yoko' 품종들에서만 나타났다. 또한 AK17_653 마커는 '홍로', '서광', '추광', '선홍', '썸머드림', '만복', '홍소', 'Pink Lady', 'Mollie's Delicious' 품종의 판별 마커로 이용 가능하였다(Table 4). 그러나 개발된 SCAR 마커가 품종들의 pedigree data를 반영하지는 못하였다. 선발된 RAPD 마커의 염기서열을 바탕으로 제작한 SCAR 프라이머가 모두 단일밴드로는 합성되지 않았고 RAPD 마커인 OPK17_650과 OPN08_850 등은 SCAR 전환 후 프라이머 조합에 따라 공우성 마커(co-dominant)로 나타났다. 또한 나머지 SCAR 프라이머들은 PCR 반응 후 RAPD분석에서는 확인할 수 없었던 품종에서 증폭되어 나타났는데 이와 같은 현상은 RAPD 마커를 SCAR 마커로 전환하는 과정에서 흔히 나타나는 것으로

SCAR마커를 처음 제안한 Paran과 Michelmore(1993)도 언급한 바 있다. 이들은 RAPD 반응의 결과로 많은 단편들이 증폭되는데 다형성 밴드를 포함하고 있는 아가로스겔 부분에는 같은 크기의 염기서열들이 혼재되어 있을 가능성이 있으며, 따라서 확실한 다형성을 갖는 SCAR 마커는 프라이머 결합부위의 뚜렷한 염기서열의 차이 또는 증폭된 염기서열 내의 구조적인 재배열에 의해 생긴 RAPD 다형성에서 유래된 경우라고 보고하였다. 또한 Xu 등(1995)도 포도의 대목 품종 구별이 가능하였던 RAPD 마커를 SCAR 마커로 전환하였을 때 대목 간의 다형성이 사라지는 것은 RAPD 마커가 보였던 다형성이 genomic DNA에 대한 짧은 RAPD 프라이머의 비특이적인 annealing 반응에 의하여 나타난 것으로 프라이머 길이가 길어진 SCAR 프라이머를 이용할 경우는 이러한 mismatch가 극복되어 다형성이 사라지기 때문이라고 설명하였다. 이와 같이 사라진 다형성을 회복하기 위한 방법으로는 프라이머 길이의 조절, annealing 온도의 조절, 다

Table 4. Genotypes detected by 17 SCAR markers among 31 apple cultivars.

Cultivar No.	SCAR marker																
	AL01_343	AW15_368	A330_424	AL01_427	AN11_433	AT06_453	AG14_502	AN08_566	AK17_574	AK14_575	A408_592	AK17_653	AM16_708	AO04_711	AO04_779	AT14_789	AL01_851
1	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
2	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
3	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-
4	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
5	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
6	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
7	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
8	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
10	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
11	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
13	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
14	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
15	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
16	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
17	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-
18	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
19	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-
20	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
21	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
22	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
23	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
24	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
25	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
26	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
27	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
28	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
29	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
30	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
31	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-

+ : Presence of marker, - : absence of marker

양한 제한효소의 처리가 시도되었으나(Jun 등, 2005; Paran과 Michelmore, 1993; Xu 등, 1995) 많은 노력이 필요한데 반하여 다형성을 얻지 못하는 경우가 있다. 본 실험에서는 미세한 크기 차이를 가진 다형성 밴드를 아가로스 젤 상에서 분리해 내기 어렵기 때문에 Paran과 Michelmore(1993)이 언급한 바와 같이 선발된 다형성 밴드에 여러 밴드들이 혼재되어 있을 가능성이 있어 RAPD 마커 중 약 33%만 SCAR 마커로 전환된 것으로 추정되었다.

본 실험에서는 개발된 SCAR 마커는 소수의 국내에서 육성되고 앞으로 유망품종으로 기대되는 신품종들과 기존 도입 품종들을 대상으로 하였기 때문에 다양한 사과 유전자원에 적용하기는 어렵지만 개발된 17종의 SCAR 마커 중 다양한 6-7조합을 이용하여 16종의 사과 국내 육성 품종의 판별이 가능하였다. 품종 판별에 이용된 SCAR 마커 6조합으로는 예를 들면 AN11_433, AN08_566, A408_592, AK17_653, AO04_711, AO04_779와 AW15_368, AN11_433, A408_592, AK17_653, AO04_711, AO04_779, 또는 AL1_427, AN11_433, AN08_566, A408_592, AK17_653, AO04_779이다. 품종 판별이 가능한 SCAR 마커 7조합으로는 AL1_427, AN11_433, AN08_566, A408_592, AK17_653, AM16_708, AO04_779와 A330_424, AN11_433, AG14_502, AN08_566, A408_592, AK17_653, AO04_779 또는 A330_424, AN11_433, AK14_564, A408_592, AK17_653, AM16_708, AT14_789이다. 개발된 이들 SCAR 마커는 PCR기기와 아가로스겔 전기영동 장치만 갖춘 실험실에서 쉽고 편리하게 분석할 수 있는 장점이 있다. 금후 사과 품종 판별을 위해서는 기존품종이나 신품종에 대해 효율적으로 다형성을 검출하는 기술이 필요하므로 AFLP나 SSR 분석 등을 이용하여 DNA 다형성 정보를 계속 축적할 필요가 있다고 판단된다.

초 록

사과 품종을 구분하는 일반적인 방법은 형태적인 특성 평가를 근거로 하지만 유전적으로 밀접하게 연관되어 있는 품종들은 형태적 형질에 의해 품종을 구별하기는 불가능하다. 본 연구는 사과 국내 육성 품종을 정확히 판별할 수 있는 DNA 마커를 개발하고자 수행하였다. 국내육성과 도입 사과 31품종으로부터 30종의 임의 프라이머를 이용한 RAPD 분석을 통해 품종 간 다형성을 나타내는 마커 83종을 얻었다. SCAR 마커로 전환하기 위해 52종의 RAPD 단편들을 클로닝 및 염기서열 분석을 하였고 이들 중에서 17종의 SCAR 마커가 클로닝된 RAPD 단편과 동일한 크기의 단일 밴드가 증폭되었다. SCAR 마커 중 6종(AN11_433, AN08_566,

A408_592, AK17_653, AO04_711, AO04_779와 AW15_368, AN11_433, A408_592, AK17_653, AO04_711, AO04_779, 또는 AL1_427, AN11_433, AN08_566, A408_592, AK17_653, AO04_779) 또는 7종의(AL1_427, AN11_433, AN08_566, A408_592, AK17_653, AM16_708, AO04_779와 A330_424, AN11_433, AG14_502, AN08_566, A408_592, AK17_653, AO04_779 또는 A330_424, AN11_433, AK14_564, A408_592, AK17_653, AM16_708, AT14_789) 조합을 이용하여 국내 육성 16품종의 판별이 가능하였다. 따라서 17종의 SCAR 마커를 적용하여 총 31품종의 국내 육성 또는 도입품종의 구분이 가능하였으며 이들 SCAR 마커는 금후 사과 국내 육성 품종 판별을 위해 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단되었다.

추가 주요어 : 다형성, RAPD, 염기서열

인용문헌

- Bernet, G.P., S. Bramardi, D. Calvache, E.A. Carbonell, and M.J. Asins. 2003. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding* 122:146-152.
- Ellsworth, D.L., K.D. Rittenhouse, and R.L. Honeycutt. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques* 14:214-217.
- Galli, Z., G. Halaz, E. Kiss, L. Heszky, and J. Dobránszki. 2005. Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers. *HortScience* 40:1974-1977.
- Gianfranceschi, L., N. Seglias, R. Tarchini, M. Komjanc, and C. Gessler. 1998. Simple sequence repeats for genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96:1069-1076.
- Goulão, L. and C.M. Oliveira. 2001. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus × domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122:81-89.
- Goulão, L., L. Cabrita, C.M. Oliveira, and J.M. Leitão. 2001. Comparing RAPD and AFLP™ analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. *Euphytica* 119:259-270.
- Guilford, P., S. Prakash, J.M. Zhu, E. Rikkerink, S. Gardiner, H. Bassett, and R. Forster. 1997. Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 94:249-254.
- Harada, T., K. Matsukawa, T. Sato, R. Ishikawa, M. Niizeki, and K. Saito. 1993. DNA-RAPD detect genetic variation and paternity in *Malus*. *Euphytica* 65:87-91.
- Janick, J., J.N. Cummins, S.K. Brown, and M. Hemmat. 1996. Apples. p. 1-77. In: J. Janick, J.N. Moore, eds, *Fruit Breeding, Vol I: Tree and Tropical Fruits*. John Wiley and Sons, N.Y.
- Jun, J.H., K.H. Chung, S.B. Jeong, and H.J. Lee. 2005. Identification of RAPD and AFLP markers linked to the fruit acidity gene D in Peach (*Prunus persica*). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*

- 46:43-48.
- Koller, B., A. Lehmann, J.M. McDermott, and C. Gessler. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85:901-904.
- Korban, S.S. and H. Chen. 1992. Apples. P. 203-227. In: F. Hammerschlag, R. Litz, eds, *Biotechnology of perennial fruit tree crops*. CAB International, Oxnard, C.A.
- Muralidharan, K. and E.K. Wakeland. 1993. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. *BioTechniques* 14:362-364.
- Paran, I. and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.
- Xu, H., D.J. Wilson, S. Arulsekar, and A.T. Bakalinsky. 1995. Sequence-specific polymerase chain-reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (*Vitis*) rootstocks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120:714-720.