

RAPD Marker를 이용한 피 수집종의 유연관계 분석

김길웅* · 손재근* · 신동현* · 김경민* · 김학윤* · 이인중*

Analysis of Genetic Diversity in *Echinochloa* Species Using Random Amplified Polymorphic DNAs(RAPDs) Markers

Kil-Ung Kim*, Jae Keun Sohn*, Dong-Hyun Shin*, Kyung Min Kim*, Hak Yoon Kim* and In-Jung Lee*

ABSTRACT

Echinochloa species maintained by selfing for more than 10 years were classified using random amplified polymorphic DNAs(RAPDs) analysis. Seventy-four decamer of randomly sequence markers were used to classify intraspecific variation in *Echinochloa* species. The number of amplification products increased with increasing GC content of the primer in the range between 60% and 70% GC. Single-base substitutions of a primer altered amplification, providing new polymorphisms. The size of amplified DNA was mostly between 0.40kbp and 1.4kbp with the most common bands at 1.1kbp. *Echinochloa* species were detected with 6 primers which generated 26 polymorphic amplified DNAs. By hierarchical cluster analysis, *Echinochloa* species collected in Korea were divided into three groups. These results revealed that RAPD markers are useful tools for the determination of genetic variations in *Echinochloa* species.

Key words : *Echinochloa*, RAPD(Random amplified polymorphic DNAs) markers, Genetic distance

緒 言

우리 나라의 논과 밭에 주로 발생하는 일년생 잡초의 하나인 피속 잡초는 문제잡초의 하나로 그 방제 여부가 안정적인 작물생산과 밀접한 관계에 있다. 특히, 최근의 직파재배 면적의 증가는 이들 피속 잡초의 방제 필요성을 절실히 요구하고 있을 뿐만 아니라 제초제의 연용으로 인한 저항성 개체의 출현이 관찰되고

있으나 이들 종에 대한 정확한 분류가 미흡한 실정이어서⁸⁾ 어느 종이 제초제에 저항성을 나타내는 지에 대한 명확한 자료가 없는 실정이다. 우리 나라에 발생하는 피속 잡초의 분류는 많은 연구자들에 의해 시도된 바 있다^{1,2,3)}. 김등은 우리 나라에 발생하는 피속 잡초 종자의 제1포영의 형태적 차이에 근거하여 크게 3종(*Echinochloa crusgalli* var. *crusgalli*, *Echinochloa crusgalli* var. *pratricula*, *Echinochloa oryzicola*)으로 분류하여 보고한 바 있다^{6,7)}. 또한 동위효소

* 경북대학교 농과대학 농학과, Dept. of Agronomy, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

(’98. 2. 12 접수)

분석에 근거한 이들 피속 잡초의 분류가 종자의 제1포영의 형태에 의한 분류와 일치함을 밝혀 종자의 제1포영의 형태가 분류의 중요한 key임을 뒷받침하는 증거로 제시하였다⁷⁾. 그러나 이들 형태학적인 marker와 동위효소 marker를 이용한 분류는 이들 marker의 수적 제한으로 인한 신뢰성이 제기되고 있어, 아직 이들 피속 잡초에 대한 명확한 분류체계가 통일되지 않고 있는 실정이다.

최근 분자생물학의 발달로 개발된 RFLP(restriction fragment length polymorphisms)와 RAPD(random amplified polymorphic DNA) marker가 식물 분류에 적용될 수 있음이 제기된 이래 이들 marker를 이용한 식물 종 분류가 활발히 진행되고 있다^{9,10,17,18)}. Wang과 Tanksley(1989)는 벼 70품종을 10개의 RFLP marker를 이용하여 품종간의 다형성을 분석함으로써 자포니카와 인디카로 분류하였다. 특히 최근에 염색체 유전자로부터 임의로 설계된 짧은 primer를 이용한 PCR 증폭 산물은 RAPD(random amplified polymorphic DNA)라 불리는 다형성을 나타내어 RFLP 방법에 비하여 비교적 쉽게 유전적 차이를 밝힐 수 있음이 보고되었다¹⁵⁾. Zheng 등(1991)은 2개의 primer를 이용해 19개의 벼 품종의 원·근연성을 분석하는 데에 있어서 RAPD 방법으로 검정하였고, 또한 유연관계 분석을 위해 RAPD 방법의 유용성을 밝힌 바 있다.

따라서 피속 잡초의 분류에 대한 보다 명확한 분석방법으로서 DNA marker의 이용 가능성을 제시함과 동시에 종자 형태에 의한 분류의 타당성을 검정하고자, 본 연구실에서 1986년 우리 나라 전역에서 수집하여 매년 자식시켜 보관중인 피속 잡초 수집종 33종을 대상으로 RAPD marker를 이용하여 수집종간 다형성을 보이는 marker를 탐색하여 분류를 시도함과 동시에 PCR 방법을 통한 유용유전자의 marker를 탐색하기 위한 기초자료로 이용하고자 본 실험을 실시하였다.

材料 및 方法

실험재료 및 RAPD markers

본 시험은 전국 11지역(Table 1)에서 1986년 수집하여 경북대학교 농과대학 포장에서 매년 자식시켜 보관중인 31수집종과, 일본의 Yabuno 박사로부터 1986년 분양 받아 유지 증식하고 있는 *Echinochloa crusgalli* var. *crusgalli*와 *Echinochloa crusgalli* var. *praticola*를 실험재료로 이용하였다. 또한 이들 피속 잡초와 벼와의 유연관계를 규명하기 위하여 자포니카의 Toyohatamochi, 인디카의 Dular, 및 통일형의 밀양 23호를 이용하였다.

피속 잡초 분류를 위한 markers는 Operon사(Operon Technologies, Inc. Alameda, CA)에서 제작된 10-mer primer 가운데에서 金과 孫(1997)이 벼의 유전자 연관지도 작성을 위해 사용한 primer와 동일한 74개의 primer를 이용하였다.

DNA 추출 및 RAPD 분석

식물체의 총 DNA의 추출은 1997년 6월 20일에 파종하여 경북대학교 포장에서 4주 자란 식물체의 지상부를 채취하여 CTAB법(Rogers and Bendich 1994)에 의해 아래와 같이 추출했다. 각 식물체의 건전한 잎 1g을 막자사발에 넣고 액체질소로 냉동시킨 상태에서 미세한 분말로 마쇄하고 2x CTAB buffer 2ml와 1x CTAB 1ml를 넣어 혼합한 다음, 1.3ml 폴리프로필렌튜브에 옮겨서 55℃에 30분 동안 반응시키면서 2~3회 가볍게 혼합하였다. 여기에 동일한 양의 chloroform을 넣어 30분간 둔 다음 원심분리(4,000rpm, 7분, 15℃)한 후 상층액을 e-튜브에 옮겨서, 10% CTAB-NaCl와 chloroform을 넣고 잘 혼합하여 원심분리(4,500 rpm, 10분, 15℃)하여 상층액을 새로운 e-튜브에 옮겼다. ppt(precipitation) CTAB 용액(1% CTAB, 50mM Tris pH8.0, 10mM EDTA)을 넣어 12시간 이상 상온에 방치한 다음 원심분리(2,500 rpm, 5분, 20℃)하여 상층액을 버리고 1M NaCl-TE와 isopropanol를 넣어 DNA를 엉키게

Table 1. Morphological characteristics of *Echinochloa* species used in this study.

Accessions	Plant height	Tiller no.	Node no.	Plant type ¹⁾	1,000-grain weight	Collection places
01	131.2	61.2	7.7	S	1.89	Milyang
02	129.4	89.2	9.2	E	2.10	Milyang
03	180.5	49.5	9.2	E	1.18	Milyang
04	138.3	50.7	7.3	S	1.09	Suweon
05	117.4	89.2	7.0	S	2.52	Suweon
06	88.7	75.4	6.4	S	1.25	Suweon
07	91.5	53.0	6.8	S	0.92	Iri
08	104.9	38.8	7.5	S	1.48	Iri
09	156.7	38.2	8.5	S	1.21	Kwangju
10	118.3	40.2	6.8	S	2.15	Kwangju
11	87.5	48.7	5.8	S	1.14	Taegu
12	96.4	52.3	5.7	S	1.40	Taegu
13	82.4	32.0	5.2	S	1.35	Pohang
14	79.0	32.2	4.2	S	1.42	Pohang
15	135.1	76.3	7.5	E	2.73	Pyonsan
16	94.3	72.0	6.3	S	1.14	Chinju
17	74.8	57.5	6.8	S	1.18	Kyeryong
18	105.2	55.5	5.5	S	0.99	Kyeryong
19	119.5	46.5	7.8	S	1.58	Chinju
20	185.3	43.7	9.0	E	1.24	Milyang
21	121.8	73.0	8.2	S	1.20	Milyang
22	122.3	50.8	6.8	S	1.24	Suweon
24	115.4	95.8	7.8	E	3.84	Taegu
25	136.3	78.2	7.7	S	1.23	Taegu
28	102.0	57.5	6.7	S	1.45	Kyeryong
29	103.6	48.5	6.2	S	1.54	Pyonsan
30	124.9	59.7	7.8	S	1.59	Kyeryong
31	109.3	46.2	8.0	S	2.18	Ulleung
32	160.6	56.7	8.5	E	2.82	Ulleung
35	109.8	43.8	7.2	S	1.40	Daejeon
37	83.8	59.3	6.0	S	1.24	Daejeon
38	190.7	20.2	11.7	E	2.09	Cheju
39	115.4	44.7	7.5	C	1.16	Japan
40	90.7	61.7	6.5	E	1.07	Japan

¹⁾ C : creeping type, E : erect type, S : spreading type

한 다음 회수하였다. 이렇게 회수된 DNA를 80% 에탄올로 세척하여 건조시키고 TE buffer로 100배 희석한 다음 0.8% agarose gel에 전기영동하고 260nm UV하에서 ethidium bromide (EtBr)에 의해 나타난 염색정도로서 DNA 농도를 조절하여 PCR 반응에 이용하였다.

DNA 증폭용 시료 준비는 200 μ l microcentrifuge 튜브에 시료 DNA 2ng, primer(Operon Technologies, Inc. Alameda, CA ; Table 2) 10 μ M,

dATP, dTTP, dGTP, dCTP를 각각 2.5mM, 10x buffer(10mM Tris pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂), Taq DNA polymerase 0.5u를 섞은 다음 총 10 μ l되게 한 후 PCR을 수행하였다. PCR의 thermal cycle은 먼저 DNA 초기 denaturation의 time delay file(96 $^{\circ}$ C, 5분), 총 35회의 thermocycle file(denaturation : 96 $^{\circ}$ C, 30초 ; annealing : 36 $^{\circ}$ C, 30초 ; extension : 72 $^{\circ}$ C, 1분)과 extension time delay file(72 $^{\circ}$ C, 7분)로 시행하였다. 본 실험

험에서는 Perkin Elmer사의 PCR system 2400을 이용하였다. 중합효소반응으로 증폭시킨 시료를 1.2% agarose gel에 전기영동(50 volts, 2시간)하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV램프 아래에서 band를 관찰하였다.

유연관계분석

증폭된 band의 유무에 따라 유는 1, 무는 0으로 표시하여, 각 시료의 공통된 band의 genetic similarity(F)를 Nei와 Li(1979)의 방법으로 $F = 2M_{xy}/(M_x + M_y)$ (Mx와 My의 시료 각각에서 나타난 증폭 band의 총수, Mxy; X와 Y시료의 공통 band수) 式으로 계산한 후, 1-F하여 시료간의 genetic distance(GD)를 구하였다. 피 수집종 간의 유연관계는 GD를 NTSYS Complete Program으로 처리하여 Complete-linkage clustering 방법에 의해 분석하였다.

結果 및 考察

피 수집종의 주요 형태적 특성을 조사한 바 (Table 1), 수집종의 초장은 74.8~164.0cm로 분포하고 있었으며 분얼수는 46.0~89.2개로 조사되어 수집종 간 아주 다양한 변이를 보였다. 또한 수집종의 초형은 본 실험 결과에서는 편이상 크게 직립형, 포복형, 중간형으로 대별하였으나 뚜렷한 불연속성의 변이현상으로 관찰되지 않아 구별이 어려웠다. 뿐만 아니라 수집종 간의 개화기, 줄기 색, 까락의 유무, 엽폭, 엽장 등도 아주 큰 변이를 보였다(자료 미제시). 그러나 수집종의 천립중은 0.92~2.82g으

로 변이의 폭은 컸으나 뚜렷한 두 군으로 분류가 가능하였다. 이상의 결과와 김 등(1989)이 보고한 지역 수집종의 초장, 분얼수, 초형 등의 외부형태학적 특성을 종합하여 보면, 우리나라에 발생하는 피속 잡초는 아주 다양한 외부형태적 변이를 나타내고 있음을 관찰할 수 있었다. 따라서 이들 외부형태적 특징만으로 피속 잡초를 분류하기란 어려운 것으로 나타났다. 또한 종자의 제1포영(glum)의 형태에 의한 피속 잡초의 분류 역시 *Echinochloa crusgalli* 종의 두 변종인 *praticola*(돌피)와 *crusgalli*(물피) 간의 명확한 구별이 어려웠다.

따라서 보다 정확하게 식물의 다양성을 구분하기 위해 널리 사용되고 있는 RAPD marker를 이용하여 피속 잡초의 분류를 시도하였다. 피의 genomic DNA와 74개의 RAPD marker와의 PCR을 3반복 수행하여 그 중 가장 명확한 band를 보이는 6개의 primer는 OPT08, OPU20, OPH02, OPK20, OPL03, OPM15로 나타났다 (Table 2). 이들 primer의 GC 함량은 60~70%로 구성되어 있으며 10개의 염기로 구성되어 있어서, genomic DNA 분석에서 많은 다형성 band를 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 피 수집종 간에 다형성을 나타내는 band는 OPT08의 경우 1.3kb, 1.0kb, 0.66kb이었으며, OPU20은 1.4kb, 1.3kb, 1.1kb, 0.83kb, 0.75kb, 0.64kb, 0.62kb, OPH02는 0.83kb, 0.56kb, 0.49kb, OPK20은 1.3kb, 1.25kb, 0.94kb, 0.86kb, 0.74kb, 0.72kb, 0.62kb, 0.54kb, OPL03은 1.2kb, 1.0kb, 0.9kb, 0.86kb, 0.72kb, OPM15는 0.72kb로 나타났다. 따라서 6개의 primer로 증폭된 band는 31개이

Table 2. List of primer and their nucleotide sequences used in RAPD analysis and the size of detectable polymorphic bands obtained by PCR.

Name of operon code	Sequence(5' to 3')	Obtained band(kb)
OPT08	AACGGCGACA	1.5, 1.3*, 1.0*, 0.96, 0.8, 0.66*, 0.64
OPU20	ACAGCCCCCA	1.4*, 1.3*, 1.1*, 0.83*, 0.75*, 0.64*, 0.62*
OPH02	TCGGACGTGA	0.83*, 0.56*, 0.40*
OPK20	GTGTCGCGAG	1.3*, 1.25*, 0.94*, 0.86*, 0.74*, 0.72*, 0.62*, 0.54*
OPL03	CCAGCAGCTT	1.2*, 1.0*, 0.9*, 0.86, 0.72*
OPM15	GACCTACCAC	0.72*

* polymorphic band

었으며, 이 가운데 다형성을 나타내는 band는 26개(83.9%)로 조사되었다. Zheng 등(1991)은 2개의 primer를 이용해 19개의 벼 품종의 원·근연성을 분석한 바 있고, 최근에는 김(1997)은 74개의 primer를 사용하여 벼의 유연관계를 분석하였다. 이들 실험과 본 실험의 primer수가 다른 것은 시료의 다양성과 primer의 특성에 의한 것으로 사료된다. 피 수집종과 벼 품종중 통일형인 밀양 23호, 인디카형인 Dular, 자포니카형인 Toyohatamochi들과의 PCR을 수행하여 얻어진 결과에서 증폭된 band중에서 벼와 피에 공히 존재하는 band는 OPT08(0.64kb), OPU20(1.1, 0.75, 0.64kb), OPK20(0.94kb) 등의 5개로 나타났다. 이는 앞으로 피와 벼의 원·근연 관계를 규명하는데 이용하는데 기초자료로 이용될 것으로 사료된다.

Fig. 1은 6개 primer중 OPL03의 결과를 나타낸 것으로, 여기서 나타난 1.2kb, 1.0kb, 0.9kb, 0.72kb의 band는 수집종 간 차이를 보이고 있는 다형성 band로 종 판별에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 본 실험에서 전체 밴드의 83.9%가 변이를 보인 것은 Yu와 Nguyen(1994)이 42개의 primer로 13개 벼 품종을 판별했을 때 보고한 80%와 유사한 변이율을 보였다. 그러나 본 실험에서는 보다 적은 수의 primer(6개)를 사용하여 수집종들을 분류할 수 있어 보다 효율적이라 사료된다.

증폭된 DNA band의 유무에 의해 "1"과 "0"으로 기호화하여 Nei와 Li(1976)의 통계분석을 이용하여 수집종간 유전자 거리를 비교한 바(Table 3), 18개 수집종 간의 유전자 거리의 범위는 0.027에서 0.727이었다. 일본 Yabuno 박사

로부터 분양 받은 *Echinochloa crusgalli* var. *crusgalli*(ECC)는 우리 나라의 수집종 중 38번과 유전자 거리가 0.027로 가장 가깝게 나타났으며, *Echinochloa crusgalli* var. *praticola*(ECP)는 수집종 28번과 유전자 거리가 0.250으로 가장 가깝게 나타났다. 수집종 가운데에서 유전자 거리가 가장 먼 수집종은 28번과 5번, 30번과 22번 수집종으로 0.727의 유전자 거리를 보였다. 본 실험에 사용된 모든 피 수집종과 벼의 자포니카형, 인디카형 및 통일형과의 유전자 거리를 비교한 바 피 수집종과 통일형인 밀양 23호가 가장 가깝게 나타났다(자료 미제시).

피 수집종 간의 유연관계는 Genetic distance(GD)를 NTSYS Complete Program으로 처리하여 Complete-linkage clustering으로 나타낸 바(Fig. 2), 수집종은 크게 3그룹으로 나눌 수 있었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 피속 잡초 가운데 벼와 유사한 외부형태를 보이는 *Echinochloa oryzicola*(2, 5, 15, 24, 30, 31, 32)는 동일군으로 분류되었다. 김 등(1989)은 우리 나라에 발생하는 피속 잡초를 Yabuno(1983)의 분류방법에 근거하여 종자의 외부 형태에 따라 3그룹인 *Echinochloa crusgalli* var. *crusgalli*, *Echinochloa crusgalli* var. *praticola*, *Echinochloa oryzicola*로 분류하고 있으며, Park 등(1995)은 형태적 특성에 의해 크게 2그룹으로 분류한 바 있다. 본 연구의 결과 피속 잡초는 크게 3그룹으로 나눌 수 있었으며, Yabuno의 분류 방식에 근거한 김 등의 분류와 다소 유사한 것으로 나타났다. 그러나 본 연구와 김 등의 연구결과는 완전히 일치하지 않아 금후 이 분야의 계

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M 17 18 19 20 21 22 24 25 28 29 30 31 32 35 37 38 c p

Fig. 1. DNA polymorphisms detected by amplification of genomic DNA via PCR, using single short primers, 5'-CCAGCAGCTT-3'(OPL03). Lane M; size marker provided by EcoR I/HindIII-digested lambda.

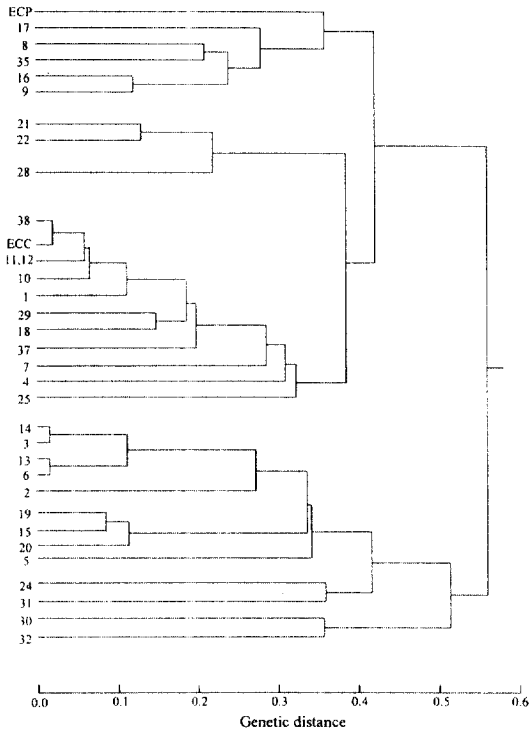


Fig. 2. Dendrogram constructed from banding patterns produced by 6 RAPD primers showing three groups of *Echinochloa* species.

속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

摘 要

피속 잡초 수집종 33종을 대상으로 RAPD marker를 이용하여 피 수집종 간의 유전적변이를 알아보고, 수집종들을 판별할 수 있는 DNA marker를 선별하기 위하여 본 실험을 수행한 결과를 요약하면 다음과 같다. Operon사에서 제작된 74개의 10-mer RAPD primer 가운데에서 명확한 다형성을 보이는 6개 primer를 선별하였다. 이들 primer로 PCR에서 증폭된 밴드는 31개이었으며 이 가운데 다형성을 나타내는 band는 26개(83.9%)로 나타났다. 피 수집종 간의 유연 관계를 분석한 결과 공시된 피 수집종은 크게 3그룹으로 분류할 수 있었다.

引 用 文 獻

1. 全載哲 · 申鉉承 · 金種奭. 1988. 피속 잡초 수집종의 외부형태적 변이와 제초제에 대한 내성차이. 한국잡초학회지. 8(1) : 9-14.
2. 任日彬 · 具磁玉 · 李載滢 · 趙鏞燮. 1988. 한국산 피 [*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.] 수집종의 잡초생태학적 분류에 관한 연구. 제 I 보. 수집종 피의 양적 및 질적 형질의 변이. 한국잡초학회지. 8(3) : 273-282.
3. 任日彬 · 具磁玉 · 李榮萬. 1989. 한국산 피 [*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.] 수집종의 잡초생태학적 분류에 관한 연구. 제 II 보. 다변량 해석법에 의한 수집종 피의 분류. 한국잡초학회지. 9(1) : 1-15.
4. Kim, K.M. 1997. Analysis of genetic distance using RAPDs in rice. Korean J. Breed.. 29 : 327-332.
5. Kim, K.M. and J.K. Sohn. 1997. Construction of linkage map using RAPD and RFLP markers in rice. Kor. J. Breed.. 29 : 383-392.
6. Kim, K.U., J.H. Kim and I.J. Lee. 1989. Classification of *Echinochloa* species collected in Korea by method of seed morphology and their response to annual herbicides. Kor. J. Weed Sci.. 9 : 141-148.
7. Kim, K.U., J.H. Kim and I.J. Lee. 1989. Biochemical identification of *Echinochloa* species collected in Korea. 12th APWSS. 519-531.
8. 李漢圭. 1988. 한국 잡초의 학명 표기에 대한 제언. 한국잡초학회지. 8(1) : 90-98.
9. Lopez-Martinez, N. and R.D. Prado. 1995. A molecular assessment of genetic diversity in *Echinochloa* spp. Brighton Crop Protection Conference-Weeds. 5A : 445-450.
10. McCouch, S.R., G. Kochert, Z.H. Yu., Z.Y. Wang, G.S. Khush, W.R. Coffman and S.D. Tanksley. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 76 : 815-

11. Nei M. and W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restrictions endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76 : 5269-5273.
12. Park S.J., K.U. Kim and D.H. Shin. 1995. Systematical classification of *Echinochloa* species. 15th APWSS. 756-758.
13. Rogers, S.O. and A.J. Bendich. 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi, *In* : Plant Molecular Biology Manual, S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort, D.P.S. Verma eds. Kluwer Academic Publishers, Belgium, D1 : 1-8.
14. Wang, Z.Y. and S.D. Tanksley. 1989. Restriction fragment length polymorphism in *Oryza sativa* L.. Genome. 32 : 1113-1118.
15. Williams, J.G.K., K.J. Kubelik, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res.. 18 : 6531-6535.
16. Yabuno, T. 1983. Biology *Echinochloa* species. *In* : Weed Control in Rice. International Rice Research Institute. Losbonos Laguma, Philippines. pp.307-318.
17. Yu, Z.H., D.J. Mackill, J.M. Bonman and S.D. Tanksley. 1991. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 81 : 471-476.
18. Yu, L.X. and H.T. Nguyen. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars(*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet.. 87 : 668-672.
19. Zheng, K.L., B. Shen and H.R. Qian. 1991. DNA polymorphisms generated by arbitrary primed PCR in rice. Rice Genetics Newsletter. 8 : 134-136.