

세업 한국들잔디 변이체 식별을 위한 SCAR 마커 개발

정성진 · 박수정 · 최영인 · 김인경 · 이가연 · 김현중 · 이금주*

충남대학교 원예학과

SCAR markers were developed to identify zoysiagrass mutants exhibiting fine leaf characteristics

Sung Jin Chung, Su Jeong Park, Young In Choi, In-Kyung Kim, Ka-Yeon Lee, Hun-Joong Kim, Geung-Joo Lee*

Department of Horticulture, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received on 4 June 2013, revised on 17 June 2013, accepted on 17 June 2013

Abstract : Polymorphic bands of two fine-leaf zoysiagrass mutants (CNU 70-1, CNU 70-2) induced via a gamma-ray irradiation on seeds of *Zoysia japonica* were obtained by using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. The genotype-specific fragments were then converted into PCR-based sequence characterized amplified region (SCAR) markers, which are now amenable to detecting them among other zoysiagrass species widely noticeable in Korea. The CNU 70-1-specific primer set amplified about 900 bp successfully, while the CNU 70-6 marker produced the expected 1,500 bp band, by which those markers were nominated by CNU 70-1_900 and CNU 70-6_1500 SCARs, respectively. The developed SCAR markers can be an applicable tool in sod industry where illegal appropriation hampers breeder's right and profits due to the turfgrass plant vegetatively propagating.

Key words : PCR amplicon, RAPD primer, SCAR marker, Turfgrass mutant, Zoysiagrass

I. 서론

한국 잔디(Korean lawngrass; *Zoysia* spp.)는 국내에 이용되고 있는 지표 피복식물 중 중요한 소재로써 미국의 경우에는 2002년 62.2조원의 잔디산업 생산량과 37.7조원의 부가가치를 창출했고, 총 82만개의 일자리를 창출하는 경제적 가치가 높은 효자산업이고, 국내는 잔디 파생산업(비료, 농약, 시설, 고용 등)까지 고려해볼 때 임산물 총 생산량(2002년 1.1조원)을 훨씬 능가하는 작물이다(Ministry of Agriculture & Forestry, 2003; Haydu et al., 2006).

한국잔디(*Zoysia* spp.)는 한국, 중국 및 일본을 포함한 극동 아시아 원산의 타카수정 작물로서 종내 및 종간 교잡도 가능하므로 바빌로프의 유전자중심설에 따르면 우리나라에서 우성형질을 보이는 잔디 유전자원이 풍부하고 유전 다양성이 가장 높을 것으로 추정되지만 국내에 이용되고 있는 품종은 90% 이상이 단일 종 또는 품종으로 시장이

형성되어 있다(Beard, 1973; Bae et al., 2010). 또한 한국 잔디류는 대부분 지하경 또는 포복경을 이용하여 영양번식을 하기 때문에 기존 잔디유통시장에서는 생산지역을 따라 '장성잔디', '안양중지' 또는 '삼덕중지' 등의 이름으로 불리어져 잔디품종 및 원품종에 대한 구분이 모호하고 시장의 혼란을 가중시켜왔다.

이제까지 radom amplified polymorphic DNA (RAPD)를 활용한 잔디의 유전자원의 다양성 평가와 분류에 대한 연구는 많이 보고되고 있지만(Curley and Jung, 2004; Rajasekar et al., 2007; Fard et al., 2012), RAPD 기반 sequence characterized amplified region (RAPD-SCAR) 마커의 개발에 관한 연구는 상대적으로 미흡하였고(Scheef et al., 2003; Abraham et al., 2005; Hyun et al., 2010), 특히 한국잔디에 이용한 보고는 학술대회에서의 포스터 발표가 전부였다(Kang et al., 1999). 기존의 RAPD 분석에 비하여 재현성이 우수하고 안정적이어서 품종의 식별이나 농산물의 원산지 구분을 위한 활용에 더 장점을 가지고 있다고 하겠다.

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5734

E-mail address: gilee@cnu.ac.kr

본 연구는 국내 잔디 신품종의 출원이 증가하는 시점에서 이들 품종들을 식별할 수 있는 PCR기반 DNA 마커의 개발을 위한 기술확립에 그 목적을 두고 있다. 이를 위하여 본 연구실에서 돌연변이 기술을 이용하여 유도된 한국잔디 세엽 돌연변이체 2계통에 기존에 많이 활용된 효소에 의한 제논의 무작위 절단 방법을 통해 얻어진 특이 DNA 절편을 PCR 조건에 적합한 염기서열 기반 프라이머 제작을 목적으로 이용하였다. 그 결과 실험실내에서 손쉽게 식별이 가능한 형태의 분자마커를 개발할 수 있었고 이러한 기술을 기반으로 향후 한국 잔디 종(species) 또는 품종의 식별을 위한 많은 DNA 표지마커의 개발이 상용화될 수 있을 것으로 기대된다.

II. 재료 및 방법

1. 한국잔디 세엽 변이체 및 대조 한국잔디 유전자원

한국 들잔디 세엽 변이체 식별을 위한 SCAR 마커개발을 위하여 충남대학교 원예학과에서 보유하고 있는 방사선 돌연변이체를 활용하였다(Lee, 2008a). 방사선을 이용한 물리적 돌연변이 처리 기술은 한국 잔디에 최근에 활용되고 있고 잔디의 잎, 색, 그리고 제조제 저항성 등 일부 형질의 변화에 효과적인 수단이 되고 있다(Lee et al., 2008a; Lee et al., 2008b). 한국 들잔디 종자에 방사선을 이용하여 유도된 세엽 변이체는 발아 후 단일 식물체를 개개의 화분에 옮겨 유리온실에서 관리되고 있었으므로 다른 한국잔디와의 혼합은 일어나지 않았고 형태적 및 유전적 변이 특성을 기초로 들잔디 야생형과는 다른 변이체로 확인되었다(Data not presented). 또한 변이개체와 함께 본 실험에 이용된 대조 한국잔디종에는 한국 들잔디(*Zoysia japonica*) 야생형(방사선 비처리 종자에서 유래), 한국 들잔디 ‘안양중지’, 깻잔디(*Zoysia sinica*), 그리고 금잔디(*Zoysia matrella*)가 포함되었다(Fig. 1과 Fig. 4).

2. 세엽 변이체 한국잔디 특이 DNA 밴드확보를 위한 RAPD 분석

SCAR marker 개발을 위해 사용한 변이체 계통(CNU 70-1과 CNU 70-6)과 4개의 대조 한국잔디 유전자원으로부터 CTAB 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다(Kang et al., 2008). 실험에 이용된 한국잔디 변이계통의 특이적 SCAR 마커 개발을 위하여 40여 개의 RAPD 프라이머를 구입하여(바이오니아, 대전) 조사하였고, 그 중 다른 한국잔디와 달리 2계통에서 특이적 다형성을 보이는 2개의 10-mer 오픈 프라이머가 최종 선정되었다(Table 1). 선정된 프라이머와 증폭기(Takara TP600, Takara, Japan)를 이용하여 RAPD-PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 일차적으로 변성을 유도한 후 94°C에서 30초간 DNA 이중가닥을 분리하였고, 36°C에서 1분간 DNA 복원(annealing), 72°C에서 2분간 연장과정을 총 35회 반복하여 수행하였다. 최종적으로 72°C에서 7분간 PCR 산물의 안정화를 수행하였다. PCR 완료 후 1% 아가로즈 겔을 이용한 전기영동을 통해 PCR 반응 결과를 확인하였다(Fig. 1).

3. 변이체 특이 SCAR 마커의 제작

RAPD 분석을 통해 확인된 특이 DNA 절편은 밴드 위치의 겔을 잘라 TA-cloning vector에 삽입하였다(Life Technology, Carlsbad, CA). Vector에 삽입된 특이 밴드의 염기서열 분석을 위해 42°C에서 열 충격(heat-shock) 방법을 이용하여 대장균(*E. coli*, DH5a)안으로의 형질전환을 실시하였다. 형질전환된 대장균들은 항생제(ampicillin)가 포함된 LB-agar 배지에 도말 후 37°C 배양기에서 15시간 동안 배양하여 형질전환된 대장균의 증식 여부를 확인하였다. 증식된 대장균 균락들 중 원래의 RAPD 특이밴드 삽입여부를 확인하기 위해 각각의 균락과 벡터에 포함된 M13 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 조건은 RAPD 분석과 같은 방법으로 실시하였으나 증폭 횟수

Table 1. RAPD primers used for zoysiagrass mutant-specific DNA fragments.

RAPD primer no. ¹⁾	5' to 3' sequence
N8005	GAAACGGGTG
N8032	GACCAGCGAA

¹⁾RAPD primers were purchased from Bioneer Inc., Daejeon, Korea.

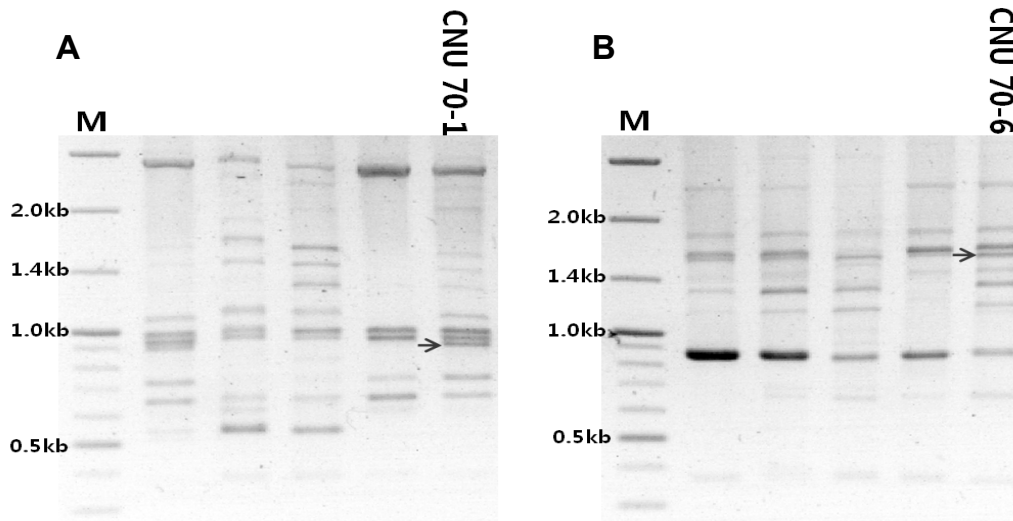


Fig. 1. RAPD amplification profiles of five zoysia species or mutants using random primers N8005 (A) or N8032 (B). Zoysiagrass species indicated are *Zoysia japonica* ‘Jungji’ (Lane 1), *Zoysia japonica* (wild type; lane 2), *Zoysia sinica* (lane 3), *Zoysia matrella* (lane 4), mutant CNU 70-1 (lane 5 of A), and mutant CNU 70-6 (lane 5 of B). M; 100 bp plus DNA marker.

Table 2. Zoysiagrass mutant-specific SCAR primer pairs which were designed from the amplified and cloned RAPD fragments.

SCAR marker	Primer name ¹⁾	5' to 3' Sequence	Annealing temperature ²⁾
CNU70-1_900	70-1_900F	GAAACGGGTGATGATTGGATG	50
	70-1_900R	GAAACGGGTGAGTCCTACC	
CNU70-1_1500	70-6_1500F	TCAGCACACCGGTTATCTCACG	60
	70-6_1500R	CACCAGAAAAGGAGCTCTGGCC	

¹⁾The numbers preceding the F (Forward) and R (Reverse) refer to the approximate size of the SCAR band in bp.

²⁾Optimum annealing temperature for each set of SCAR marker primers.

를 총 25회 반복하여 수행하였다. PCR이 완료된 후 1% 아가로즈 젤 전기영동법에서 특이밴드의 삽입 여부를 확인하였다.

특이밴드가 삽입된 것으로 확인된 대장균 균락들 중 3개를 선별한 후 항생제(ampicillin)가 포함된 각각의 액체 LB 배지에 넣고 37°C 진탕 배양시킨 후 15시간 동안 배양 후 대장균에 포함된 DNA를 추출하였다. 이렇게 추출된 플라스미드 DNA는 염기서열 분석 장치 ABI 3130XL(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 분석에 필요한 프라이머는 TA-cloning vector에 포함된 M13 primer 쌍을 사용하였다. 이후 분석된 특이밴드의 염기서열을 바탕으로 Forward(F)와 Reverse(R)를 한 쌍으로 하는 변이체 특이 SCAR 마커 프라이머를 디자인하였다(Table 2).

4. SCAR 마커의 검증

제작된 SCAR 프라이머 쌍을 이용한 특이적 밴드의 패턴 여부는 PCR 방법을 이용하여 검증하였다(Fig. 4). N8005와 N8032 프라이머를 이용한 RAPD 결과로부터 이 염기서열을 바탕으로 제작한 SCAR 마커 프라이머 쌍으로 PCR을 수행하였다(Table 2). PCR 조건은 94°C에서 5분간 일차 변성을 실시한 후 94°C에서 30초간 DNA 이중가닥의 분리, 58°C에서 30초간 DNA 복원, 72°C에서 40초간 연장 과정을 총 25회 반복하여 수행하였고 최종적으로 72°C에서 7분간 PCR 산물의 안정화를 유도하였다. PCR을 완료한 후 1% 아가로즈 젤을 이용한 전기영동을 통해 PCR 반응 결과를 최종 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

RAPD 마커는 유전체 염기서열 정보가 없는 많은 식물의 유전다양성 및 타겟 유전자의 증폭에 매우 유용한 마커 시스템이지만, 우성 마커군에 포함되므로 원하는 유전자가 있다(1) 또는 없다(0)의 형태로 구분만이 가능하고 특정 유전자좌에 있는 대립유전자가 동형접합체(homologous) 형태인지 이형접합체(heterologous)인지를 알 수가 없다(Kumar and Gurusubramanian, 2011). 또한 PCR 반응 조건(DNA 양, 반응 혼합물질, 연쇄반응 횟수 등)에 따라 효소반응이 영향을 받으므로 결과의 재현성이 떨어지고 준비과정이 복잡하다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 PCR 기반 염기서열에 기초한 SCAR 마커의 개발이 필요하게 되었다.

엽록이 야생형 들잔디에 비하여 좁은 돌연변이체는 시각적으로 구분이 가능하지만 방사선에 의한 변이여부를 검증

하기 위하여 본 실험에서는 제한효소를 이용하여 무작위 DNA 절편의 염기서열 비교를 실시하였다. 또한 품종 출원 시 야생형 들잔디와 변이체를 구분할 수 있는 분자적 기법의 필요성에 따라 분석한 결과 RAPD 프라이머 N8005와 N8032를 이용하여 CNU 70-1과 CNU 70-6 세엽 변이체 각각에서 기존 한국잔디류와 다형성을 보이는 변이체 특이 DNA 절편(각각 약 900 bp 및 1,500 bp 미만의 절편)을 얻을 수가 있었다(Fig. 1A &1B).

CNU 70-1과 CNU 70-6 세엽 변이체 특이 다형성을 보인 DNA 절편은 클로닝 벡터에 삽입 후 대장균에서 증식한 후 삽입된 부위의 절편을 염기서열 분석한 결과 CNU 70-1 특이 다형성 절편은 869 bp 크기로 증폭되었고(Fig. 2), CNU 70-6 세엽 변이체 특이 다형성 절편은 1,463 bp로 증폭되었다(Fig. 3). 변이체 특이 염기서열을 기초로 SCAR 마커 프라이머 쌍을 작성하여(Table 2) 변이체와 다른 국내



Fig. 2. DNA sequence of RAPD-derived DNA fragment of about 900 bp specific to the CNU 70-1 fine-leaf mutant. The sequence of RAPD primer (N8005) is indicated in the boxes and the SCAR primer pair is shown with the lines.

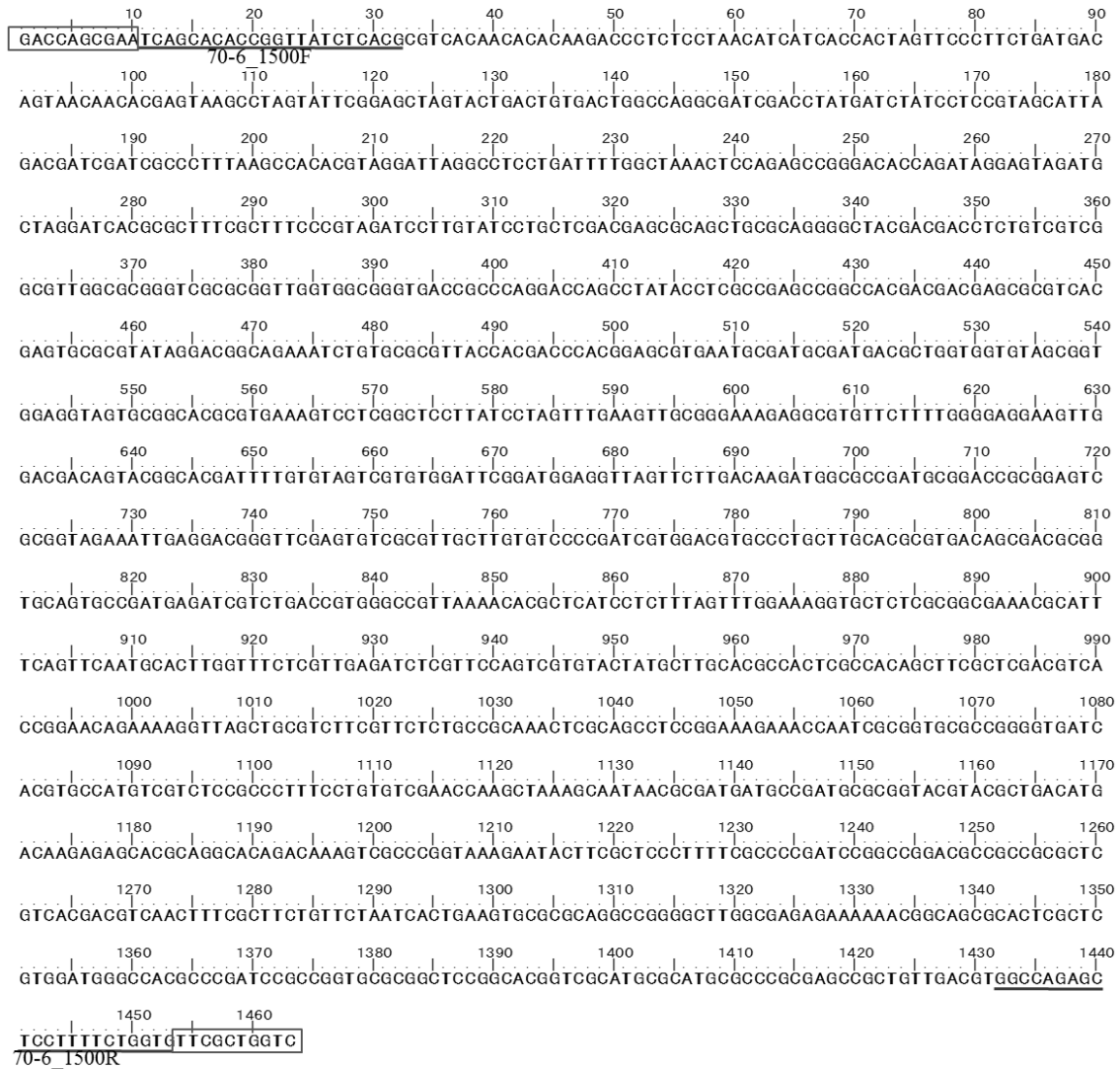


Fig. 3. Fig. 2. DNA sequence of RAPD-derived DNA fragment of about 1,500 bp specific to the CNU 70-6 fine-leaf mutant. The sequence of RAPD primer (N8032) is indicated in the boxes and the SCAR primer pair is shown with the lines.

에서 생육하고 있는 4종의 한국잔디(들잔디, 중지, 갯잔디 및 금잔디)를 대상으로 기대했던 DNA 절편이 성공적으로 증폭이 되는지 조사한 결과 예상했던 크기의 변이체 특이 밴드를 다른 한국잔디에서는 나타나지 않고 변이체에서만 증폭되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한 제작된 SCAR 마커 프라이머를 위한 PCR 조건을 적용할 때 다른 비특정 밴드의 출현을 볼 수 없었고 58°C에서 30초간 DNA 복원(annealing)을 위한 PCR 조건이 기대하던 절편만을 성공적으로 증폭할 수 있는 적정 조건임을 알 수 있었다.

영양번식 작물이 한국잔디는 신품종이 개발된 후 지하경이나 포복경을 이용하여 대량증식이 가능하여 신품종 고유의 특성을 유지할 수 있다는 점에서 매우 유리한 장점을

가지고 있지만, 쉽게 영양체 일부를 이용하여 다른 곳에서도 증식 및 생산이 가능하기 때문에 육종가의 권리를 보호하기가 쉽지 않다. 현재 국내 잔디 생산지역에는 이러한 이유로 많은 변이종 또는 생태종의 혼입이 가능하다고 할 수 있고 이러한 현상이 지속될 경우 품종 고유의 특성이 혼재된 품질이 낮은 잔디의 공급과 신뢰성이 떨어져 잔디 유통시장의 혼란을 초래할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서 보여준 PCR-기반 DNA 마커 기술을 활용한다면 신규 개발 품종 별로 품종 고유의 식별 마커를 개발할 수 있고, 개발된 마커를 이용하여 잔디산업의 혼란을 최소화할 수 있고, 궁극적으로 다른 농산물과 같이 원산지 증명의 근거 자료로 활용할 수 있을 것이라고 생각한다.

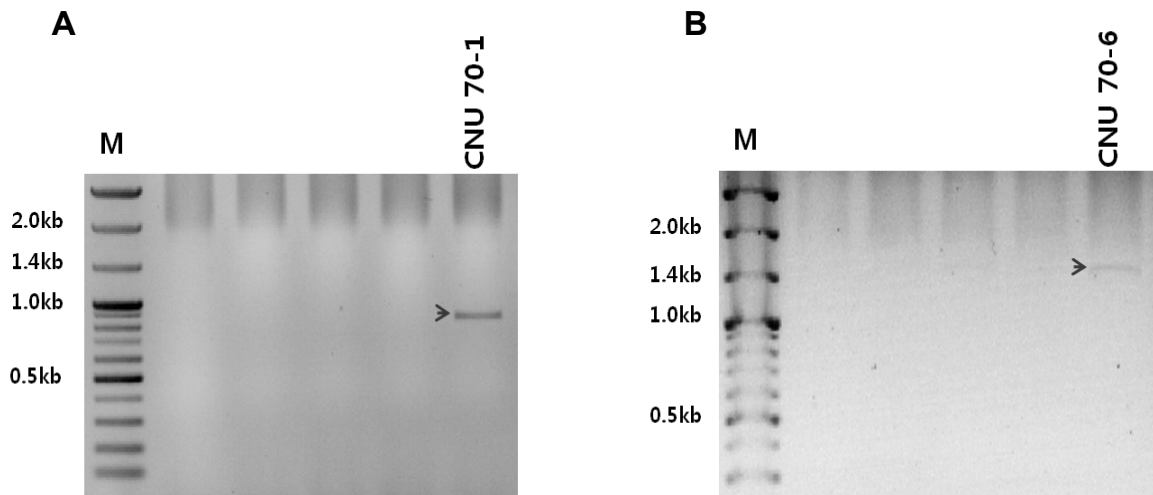


Fig. 4. Amplification of PCR-based SCAR markers for the zoysiagrass mutants. A; CNU70-1_900 SCAR marker for CNU 70-1 mutant, B; CNU70-6_1500 SCAR marker for CNU 70-6 mutant. Zoysiagrass species indicated are *Zoysia japonica* (wild type; lane 1), *Zoysia sinica* (lane 2), *Zoysia matrella* (lane 3), *Zoysia japonica* ‘Jungji’ (lane 4), mutant CNU 70-1 (lane 5 of A), and mutant CNU 70-6 (lane 5 of B). M; 100 bp plus DNA marker.

IV. 결론

한국 잔디는 지하경과 포복경을 가지고 있어 주로 영양 번식을 통해 증식이 되고 있다. 이 경우 잔디 생산포장에는 시간이 경과하면서 다양한 품종의 유입이 가능하고 원산지가 불분명한 혼입종으로 인하여 잔디 뗏장 시장은 물론이고 고급 잔디를 요구하는 골프장과 같은 수요처에서는 병해충 및 일반 관리면에서 많은 혼란을 초래하고 있다. 국내 잔디 유통체계의 확립과 육종가의 품종 권리보호를 위하여 정확한 품종 및 원산지를 구분할 수 있는 PCR 기반의 분자 마커 개발이 필요한 실정이다. 본 연구에서는 충남대에서 개발한 신규 세엽 한국잔디 변이계통을 이용하여 식별이 가능한 DNA 마커의 개발을 시도하였다. 우선 RAPD 프라이머를 이용하여 변이계통 특이 DNA 조각을 얻었고, 특이 밴드는 TA-cloning vector에 삽입 후 대장균에 형질전환하여 배양하였고, 이로부터 추출된 플라스미드 DNA의 염기서열 분석을 실시하여 최종적으로 변이체 유전자 특이 SCAR 마커 프라이머를 작성할 수 있었다. CNU 70-1 변이체 특이 SCAR 마커(CNU70-1_900)는 예상했던 대로 다른 한국잔디 들잔디(야지), 한국잔디 중지, 갯잔디, 금잔디에서는 보이지 않는 특이 식별밴드를 보였고(약 900 bp), CNU 70-6 변이체 식별을 위한 SCAR 마커(CNU70-6_1500) 역시 변이체 특이 밴드를(약 1500 bp) 증폭하는데 성공하였다. 본 연구를 통해 얻어진 잔디 품종 식별을 위한 분자마

커 개발기술은 영양번식을 주요 번식수단으로 하는 한국잔디류의 유통시장에 활용되어 품종 개발자의 권리보호와 원산지 식별 등 잔디시장에 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 산림청 산림과학기술개발사업(SI111012L020100)과 농촌진흥청 바이오그린21 사업의 식물분자유종사업단의 지원(PJ0081312012)에 의하여 수행되었습니다.

참고 문헌

- Abraham E, Aa M, Honig J, Kubik C, Bonos SA. 2005. The use of scar markers to identify Texas x Kentucky bluegrass hybrids. *International Turfgrass Society Research Journal* 10:495-500.
- Bae EJ, Park NC, Lee KS, Lee SM, Choi JS, Yang GM. 2010. Distribution and morphology characteristics of native zoysiagrasses (*Zoysia* spp.) grown in south Korea. *Korea Turfgrass Science* 245:97-105.
- Beard JB. 1973. *Turfgrass: science and culture*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA.
- Curley J, Jung G. 2004. RAPD-based genetic relationships in Kentucky bluegrass: comparison of cultivars, interspecific hybrids, and plant introduction. *Crop Science* 44:1299-1306.
- Fard JRF, Moghaddam MRF, Kafi M. 2012. Evaluation of

- genetic diversity among some genotypes of Kentucky bluegrass by RAPD molecular markers. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 53:298-303.
- Haydu JJ, Hodges AW, Hall CR. 2006. Economic impacts of the turfgrass and lawncare industry in the United States. *TurfNews* 30:52, 54-56.
- Hyun SJ, Shim SR, Ahn BJ. 2010. Analysis of hybridization in Korean ecotypes of *Poa pratensis* L. using RAPD and SCAR markers. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 28:281-287.
- Kang BC, Kamkung Y, Shin HK. 1999. Analysis of the genetic variation in Anyang Joonggi and development of Anyang Joonggi specific DNA marker. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 17:197.
- Kang SY, Lee GJ, Lim KB, Lee HJ, Park IS, Chung SJ, Kim JB, Rhee HK. 2008. Genetic diversity among Korean bermudagrass (*Cynodon* spp.) ecotypes characterized by morphological, cytological and molecular approaches. *Molecules and Cells* 25:163-171.
- Kumar NS, Gurusubramanian G. 2011. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Science Vision* 11:116-124.
- Lee, GJ. 2008a. Integration of breeding efforts for high-valued turfgrass in Korea. Summer International Turfgrass Symposium in 2011-turfgrass research in changeable weather. Asia Turfgrass Society Symposium 45-67.
- Lee HJ, Lee GJ, Kim DS, Kim JB, Ku JH, Kang SY. 2008b. Determination of the optimum dose range for a mutation induction of turfgrasses by a gamma-ray. *Korea Turfgrass Science* 22:25-34.
- Lee HJ, Lee GJ, Kim DS, Kim JB, Ku JH, Kang SY. 2008c. Selection and physiological characterization of glyphosate-tolerant zoysiagrass mutants derived from a gamma ray irradiation. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 26:454-463.
- Ministry of Agriculture and Forestry. 2003. Agricultural and forestry statistical yearbook.
- Rajasekar S, Fei SZ, Christians NE. 2007. Analysis of genetic diversity in colonial bentgrass (*Agrostis capillaries* L.) using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54:45-53.
- Scheef EA, Casler MD, Jung G. 2003. Development of species-specific SCAR markers in bentgrass. *Crop Science* 43:345-349.