

독도 돌피의 분류학적 실체

최경수, 손오경, 손성원¹, 김상준¹, 유광필², 박선주*

영남대학교 이과대학 생명과학과, ¹국립수목원, ²동북아시아식물연구소

Taxonomic Identity of *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. var. *crus-galli* in Dokdo

Kyoung-Su Choi, Ogyeong Son, Sung-Won Son¹, SangJun Kim¹, Kwang-pil Yoo² and SeonJoo Park*

Department of Life science, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

¹Korea National Arboretum, Pochen 487-821, Korea

²Institute of Northeast Asian Plant, Gangnam-Gu, Seoul 135-757, Korea

Abstract - Molecular study were conducted to evaluate taxonomic identities of *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. and *Echinochloa crus-galli* var. *echinata* (Willd.) Honda in Dokdo. *Echinochloa crus-galli* complex of two species 26 individuals analyse based on nuclear ribosomal DNA (ITS region) and cpDNA (*trnH-psbA*, *trnL-F*). At a result, two species were same sequence. Characters the length of the lemma and the length of the awn traits were identity of the species was unclear. According to, Taxonomy treatments that is based on existent morphological characters should thinks again. On the other hand, in the case of ITS, *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. and *Echinochloa crus-galli* var. *echinata* (Willd.) Honda at the Dokdo forms from other clades with individuals that is collected at land area and Ulleungdo. These result is showing that is flowing independent evolution trends.

Key words - *Echinochloa* complex, Dokdo, Molecular Data

서 언

*Echinochloa*속 식물은 벼과(Poaceae)에 속하며, 전 세계적으로 50여종이 분포한다(Michael, 1994; 2001). 동아시아 지역에는 *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv., *Echinochloa colonum* (L.) Link, 그리고 *Echinochloa oryzicola* (Vasinger) Vasinger 등이 자생한다고 알려져 있다(Yabuno, 1984). 이 중 *Echinochloa crus-galli*는 var. *crus-galli*, var. *praticola* Ohwi와 var. *formosensis* Ohwi의 변종이 있다고 보고되어 있다(Ohwi 1962; Yabuno 1984). 물피의 경우 *Echinochloa crus-galli* var. *formosensis* Ohwi, *E. crus-galli* var. *riukiensis* Ohwi, *Panicum oryzicola* Vasinger 등의 이명이 존재한다(Korea National Arboretum and The Plant Taxonomic Society of Korea, 2007). 국내에 분포하는 *Echinochloa*속에는 돌피(*E. crus-galli* (L.) Beauv. var. *crus-galli*),

물피(*E. crus-galli* var. *echinata* (Willd.) Honda), 좁돌피(*E. crus-galli* var. *praticola* Ohwi), 논피(*E. oryzoides* (Ard.) Fritsch)가 분포한다고 알려져 있다(Korea National Arboretum and The Plant Taxonomic Society of Korea, 2007). *Echinochloa*속의 돌피와 물피의 경우 Lee(1980)는 물피는 첫째 포영의 길이가 소수의 1/2~3/5로서 포영이 때 때로 굳어지고 물에서 자란다는 형질로 돌피와 분류했다. 또한 돌피는 까락은 짧게 끝난다로 기재하였으며, 물피의 까락은 20~25mm이다로 기재하고 있어(Lee 1980; Lee 1996) 까락의 길이에 대하여 정확한 형질이 모호한 상태이다. 분류학적 연구로는 Chun *et al.*(1988)과 Kim *et al.*(1989)이 제 1포영의 초장, 조형 및 수의 형태와 망의 유무, 그리고 제1포영의 형태적인 차이를 근거로 한 외부형태를 중심으로 수행되었으며, Kim *et al.*(1998)은 *Echinochloa*속을 중심으로 6개의 primer를 선정, 유전적 거리분석방법을 통한 분자계통학적 연구를 수행하였다.

외부형태학적으로 돌피와 물피의 경우 까락을 기준으로

*교신저자(E-mail) : sjpark01@ynu.ac.kr

종의 한계 설정을 하지만 연속적인 변이가 관찰되는 등 형질이 불분명하다. 물피의 경우 물에서 자란다고 알려져 왔지만 독도의 경우에는 돌피와 물피가 혼재되어 있다고 보고된 바 있다(Lee *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2010).

본 연구에서는 고등식물의 계통분석에 널리 이용되고 있으며, 양친 유전성(biparental inheritance)을 가지고 coding 지역보다 빠르게 진화하여 유전자간의 변이성이 높은 편인 nuclear ribosomal DNA(nrDNA)의 ITS 지역과 chloroplast DNA(cpDNA)의 비교적 느린 진화가 일어나는 coding 지역이 아닌 높은 변이율을 가지고 있는 non-coding 지역인 *trnH-psbA*, *trnL-F* 지역을 사용하였다(Palmer *et al.*, 1988; Clegg *et al.*, 1991; Soltis *et al.*, 1992). 이처럼 세 지역 모두 coding 지역보다 빠르게 변화하는 지역을 선정하여 돌피와 물피 사이의 염기치환이나 돌연변이 확인에 주안점을 두었다.

따라서, 본 연구는 이전부터 제기 되어온 독도의 돌피와 물피의 종의 실체를 확인하고, 나아가 울릉도 및 육지의 돌피, 물피를 비교하여 이들의 지리적 특징 및 종의 실체를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

재료

까락이 짧은 돌피, 까락이 긴 물피, 외부형태학적으로 중간 형태를 띠는 개체, 까락이 없는 좀돌피(*E. crus-galli* var. *praticola* Ohwi)를 포함한 근연 분류군을 재료로 사용하였다. 본 연구에서 사용된 재료는 2011년 6월부터 10월까지 자생지에서 직접 채집하여 사용하였다(Table 1). 채집된 재

료는 건조표본으로 제작하여 영남대학교 식물표본관(YNUH)에 보관하였다.

DNA 추출, PCR 및 염기서열

DNA 추출은 생체를 이용하여 Precellys 24 Homogenizer (Bertin Technologies, France)를 이용하여 분쇄시킨 후, Loockerman and Jansen(1996)의 방법으로 추출하였다. ITS 지역의 증폭은 primer ITS4, ITS5(White *et al.*, 1990)를 이용하였으며, *psbA-trnH*의 증폭은 primer *psbAF*와 *trnHR* (Sang *et al.*, 1997)를 이용하였고, *trnL-F*의 증폭은 Taberlet *et al.*(1991)에 의해 제작된 primer c, d, e, f를 사용하였다. 각 지역의 증폭을 위한 Polymerase Chain Reaction(PCR) 반응용액의 조성은 주형 DNA 20~50ng, 10X Dstar-Taq, DNA buffer 2.5 µl, 10mM의 dNTPs mix 0.5 µl, 10 pmol의 primer 각각 1 µl, 2.5 unit의 Dstar-Taq DNA polymerase 0.13 µl(Solgent Co., Korea)에 total volume이 총 25 µl가 되도록 증류수를 조절하여 첨가하였다. 조제된 PCR반응 용액은 95°C에서 2분 동안 predenaturation을 한 후, 95°C 20초, 50°C 40초, 72°C 1분을 하나의 주기로 하여 35회 반복한 후 최종적으로 72°C에서 5분간 extension하였다.

염기서열의 정렬 및 계통수 분석

계통학적 분석으로 각 염기서열들은 Geneious pro v5.4 (Drummond *et al.*, 2011)으로 조합, 정렬 하였고 최종 세부 정렬은 수작업을 통하여 수행하였다. 정렬된 염기서열은 PAUP* ver. 4.0b10(Swofford, 2003)으로 Heuristic search를 이용하여 maximum parsimony(MP) 분석방법을 이용하

Table 1. Plant materials for this study

Taxon	Population	Number of individuals	Sample No.
<i>E. crus-galli</i> var. <i>crus-galli</i>	Dokdo, Gyeongsangbuk-do	5	DD01-1~DD01-5
	Ulleungdo, Gyeongsangbuk-do	6	UL01-1~UL01-6
	Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do	3	GS01-1~GS01-3
	Pohang-si, Gyeongsangbuk-do	2	PH01-1~PH01-2
	Uljin-gun, Gyeongsangbuk-do	1	UJ01
	Hupo-eup, Gyeongsangbuk-do	2	HP01-1~HP01-2
	Samcheok-si, Gangwon-do	2	SC01-1~SC01-2
<i>E. crus-galli</i> var. <i>echinata</i> Honda	Dokdo, Gyeongsangbuk-do	2	DD02-1~DD02-2
	Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do	2	GJ02-1~GJ02-2
<i>E. crus-galli</i> var. <i>praticola</i> Ohwi	Pohang, Gyeongsangbuk-do	1	Outgroup(YNUH215)

였다. 각 분계도의 지지정도를 알아보기 위하여 Bootstrap (Felsenstein, 1985)를 이용하였다. 이러한 분석방법은 무작위로 100회를 반복하였으며 이를 통해 계통수를 찾아내어 Consistency index(CI; Kluge and Farris, 1969), Retention index(RI; Farris, 1989)을 산출하였다.

결과 및 고찰

분자계통학적 분석

분자 계통학적 연구로 nrDNA의 ITS 지역 분석결과, 총 길이는 592 bp, Pairwise distance는 99.9%였으며 G + C 함량은 60.1%로 나타났다. MP tree를 비교 분석한 결과, 독도의 돌피와 물피, 울릉도의 돌피 한 개체가 70%의 bootstrap value로 분계조를 형성하였으며, 울릉도와 육지의 돌피와

물피가 한 분계조를 형성하였다(Fig. 1A). 돌피와 물피의 각 분류군에서 염기서열의 차이는 관찰되지 않았으며, 지역에 의한 차이는 확인되었다. 다른 지역의 돌피, 물피와는 다르게 독도의 돌피, 물피와 울릉도의 한 개체의 경우 한 개의 염기서열이 G가 아닌 C를 나타내고 있었다(Fig. 2).

cpDNA의 *trnH-psbA* 지역의 비교 분석 결과 총 길이는 620 bp, Pairwise identity는 99%였으며, G + C 함량은 38.4%였다. 염기서열 확인 결과, 돌피와 물피 그리고 근연 분류군인 좁돌피 중 포항의 돌피 한 개체, 경산의 돌피 한 개체를 제외하고는 차이점이 없었다(Fig. 2).

MP tree 분석결과 모든 개체가 한 분계조에 있으면서 포항의 한 개체와 경산의 한 개체가 다른 분계조를 형성하고 있었다(Fig. 1B).

cpDNA의 *trnL-F* 지역의 비교 분석 결과 총 길이는 836 bp,

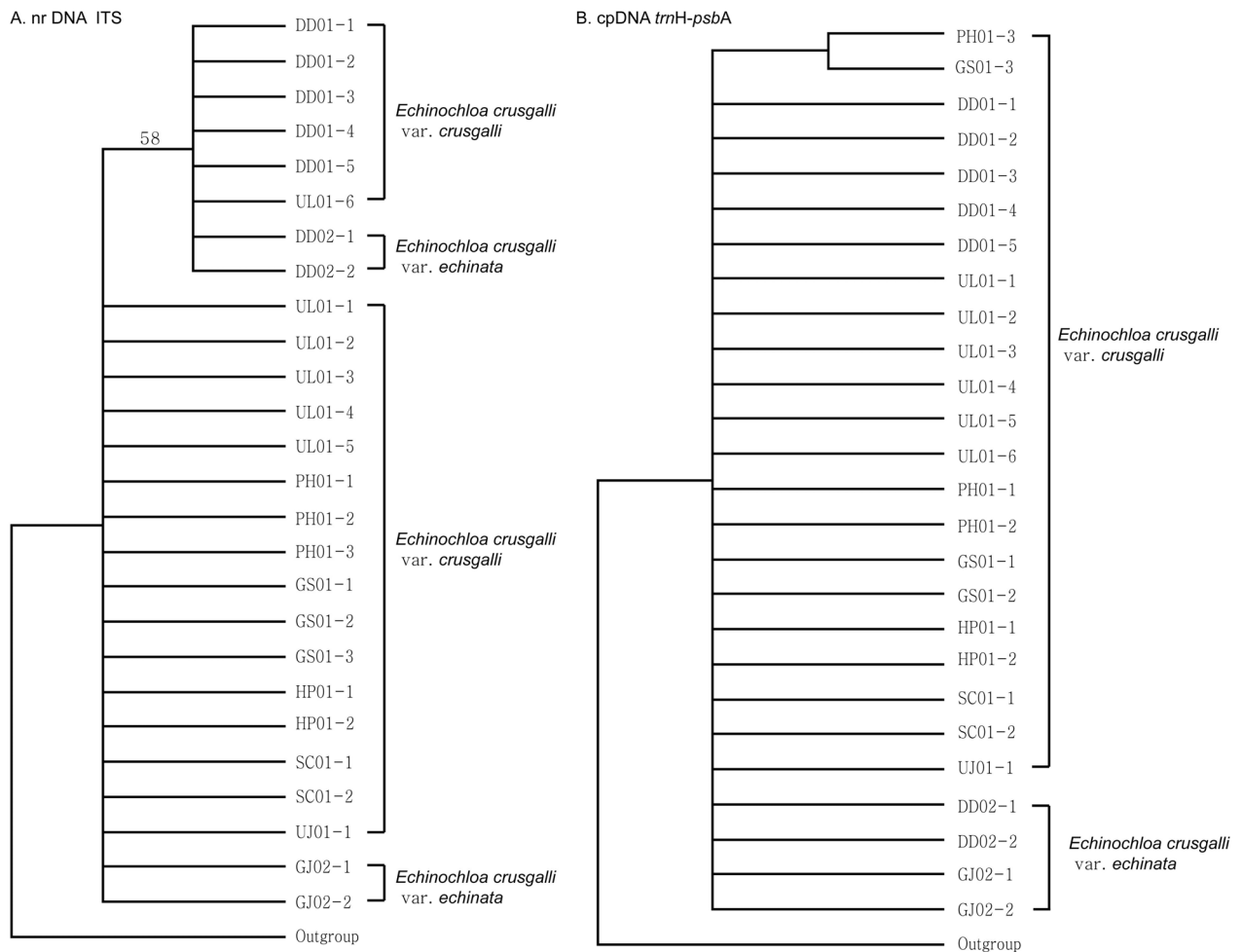


Fig. 1. Phylogenetic relationship of *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli* and *E. crus-galli* var. *echinata*. A. Maximum Parsimony tree of nr DNA ITS. B. Maximum Parsimony tree of cpDNA *trnH-psbA*.

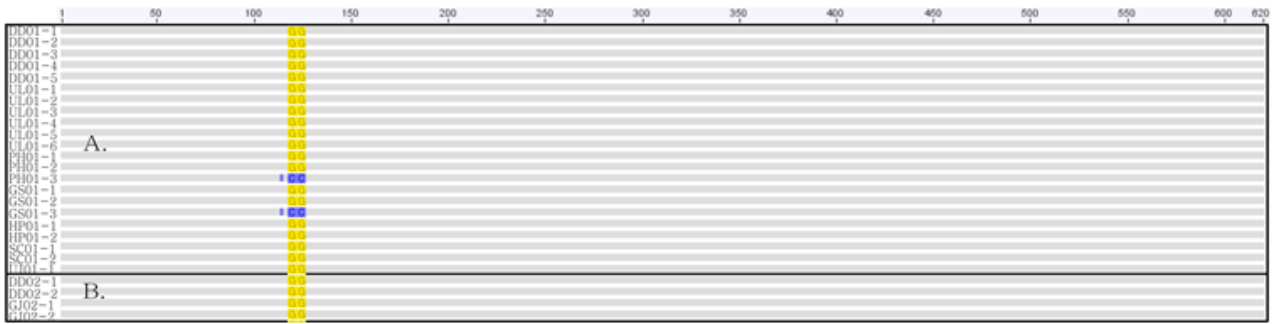


Fig. 2. The variable sites in the aligned(cpDNA *trnH-psbA*) Sequences of *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli* (A.) and *E. crus-galli* var. *echinata* (B).

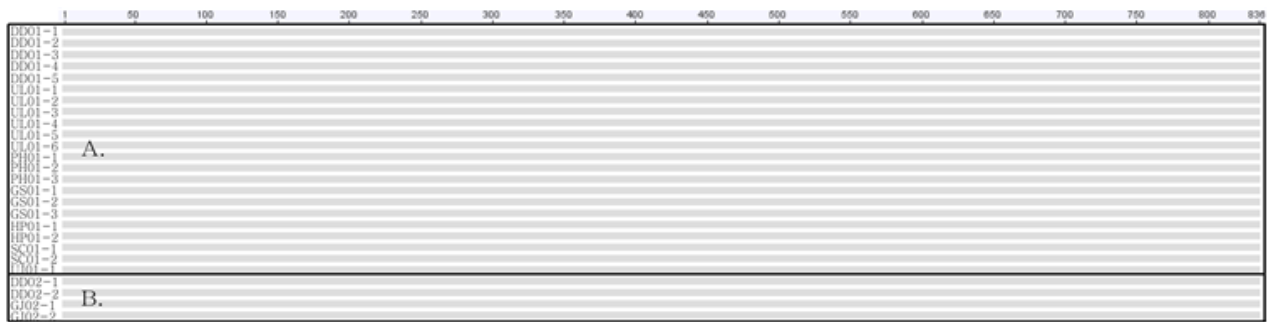


Fig. 3. The variable sites in the aligned(cpDNA *trnL-F*) Sequence of *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli* (A.) and *E. crus-galli* var. *echinata* (B).

Pairwise distance는 100%였으며, G + C 함량은 33.9%로 나타났다. 지역과 종에 상관없이 한 분계조를 나타냈으며 염기서열이 외군을 포함하여 모두 동일하였다(Fig. 3).

독도 돌피, 물피의 종의 실제

지금까지 조사된 독도의 식물 중 돌피와 물피의 경우 학자들 간에 견해가 다양하였다. Lee(1978), Sun *et al.*(2002), Lee *et al.*(2007) 등은 돌피만 기재하였으며, Lee and Joo (1958), Park *et al.*(2010)의 경우 물피만 기재하였다. Lee *et al.*(2007)은 독도의 돌피와 물피의 두 종이 존재하는지, 혹은 돌피의 생태형으로써 물피가 존재하는지에 대하여 문제점을 제기하였다. nrDNA ITS 실험 결과 물피와 돌피의 차이는 없는 것으로 나타났으며, 특이하게 지역별로 나뉘어 졌다(Fig. 4). 육지와 울릉도의 돌피와 물피가 묶여지며, 그 중 울릉도의 돌피 한 종과 독도의 돌피, 물피가 묶여지는 것을 확인 하였다. 본 실험 결과에서는 Lee(1978), Sun *et al.*(2002), Lee *et al.*(2007) 등이 발표한 독도에는 돌피만 존재한다는 견해와 일치하였다.

cpDNA *trnH-psbA*, *trnL-F* 지역의 분석결과도 이를 뒷받침해준다. *trnH-psbA* 지역의 염기서열을 보면 물피와 돌피의 종의 한계성보다는 포항과 경산의 돌피 한 개씩 2bp 씩의 차이점을 확인 할 수 있다(Fig. 2). 이는 돌피와 물피가 각각 독립된 종이 아님을 보여주고 있는 것이다. 또한 *trnL-F*의 경우 채집한 모든 개체에서 염기서열 차이점을 찾을 수 없었다(Fig. 3).

trnH-psbA 지역의 경우, 특히 포항과 경산 개체의 경우 생태적으로 다른 지역과 다르게 주위에 논이 있는 곳에서 채집을 실시하였으며 이러한 채집지의 생육지 차이가 개체 변이의 형태로 나타난 것으로 생각된다.

이에 따라 물피의 경우 돌피의 생태적 환경에 의한 생태 종으로 사료되며, 독도에 자생하는 종은 돌피로 처리하는 게 타당하다고 생각된다.

독도 돌피의 이동 경로

nrDNA의 ITS 실험 결과, 육지와 울릉도의 돌피가 한 분계조를 이루며, 그 안쪽에 독도의 돌피와 울릉도의 한 개체

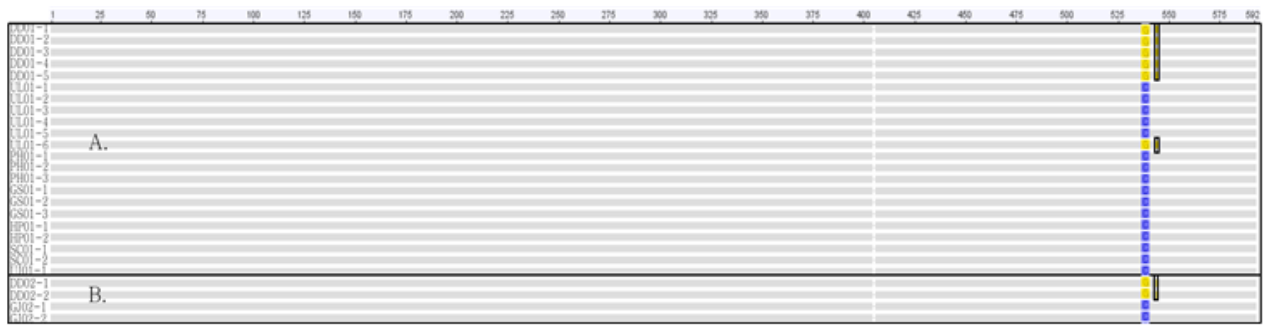


Fig. 4. The variable sites in the aligned (ITS) Sequences of *Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli* (A.) and *E. crus-galli* var. *echinata* (B).

가 같은 분계조를 이루고 있는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 이는 매우 단편적이지만, 육지의 돌피가 울릉도를 거쳐 독도로 이동했다고 가정할 수 있다. 또한 울릉도 한 개체를 포함한 독도의 돌피는 이동 후 환경에 맞게 적응하고 있다고 추정할 수 있다. 결론적으로 gene flow의 경우를 보면 육지의 돌피가 울릉도로 이동하였고 최근에 독도로 유입되어 적응하고 있다고 생각되며, 이러한 이동경로를 명확하게 하기 위해서는 좀 더 많은 개체수를 포함하여 한반도 돌피의 이동경로를 추적해야 할 것으로 생각된다.

적 요

독도에 자생하는 벼과(Poaceae) 식물인 돌피(*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.)와 물피(*Echinochloa crus-galli* var. *echinata* (Willd.) Honda)의 분류학적 실체를 조사하였다. *Echinochloa crus-galli* complex에 속하는 2분류군 26개체에 대한 ITS, *trnH-psbA* 및 *trnL-F*의 염기서열을 분석하였다. 그 결과 독도의 돌피와 물피를 포함한 조사된 두 분류군은 유전자구간에서 동일한 염기서열을 나타내는 것으로 관찰되었다. 따라서 호영 및 까락 등의 연속적인 형질로 두 분류군을 구분하는 기존의 형태형질에 근거한 분류학적 처리는 재고가 필요할 것으로 보인다. 한편, ITS 경우, 독도에서 채집된 물피와 돌피 개체들은 울릉도 및 육지에서 채집된 개체들과는 별개의 분계조를 형성함으로써 독립된 진화 경로를 거치고 있음을 보여 주었다.

사 사

이 논문은 2012년도 교육과학기술부 지정 정책중점연구

소와 대구지방환경청의 지원사업에 의해서 연구되었음.

인용문헌

- Chun, J.C., H.S. Shin and J.S. Kim. 1988. Gross morphological and herbicide susceptibility variation in collections of *Echinochloa* species. Korean J. Weed Sci. 8(1):9-14 (in Korean).
- Clegg, M.T., G.H. Learn and E.M. Golenberg. 1991. Molecular evolution of chloroplast DNA. In Evolution at the Molecular Level. Selander, R.K., A.G. Clark and T.S. Whittman (eds.), Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts (USA). pp. 135-149.
- Drummond, A.J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, J. Heled, M. Kearse, R. Moir, S. Stomes-Havas, S. Sturrock, T. Thierer and A. Wilson. 2011. Geneious v. 5.5, Available from <http://www.geneious.com>.
- Farris, J.S. 1989. The retention index and the rescaled consistency index. Cladistics 5:417-419.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.
- 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. Korean J. Weed Sci. 9(2):141-148 (in Korean).
- Kim, K.U., K.S. Jae, D.H. Shin and K.M. Kim. 1998. Analysis of genetic diversity in *Echinochloa* species using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) Markers. Kor. J. Weed Sci. 18(1):76-83 (in Korean).
- Kluge, A.G. and J.S. Farris. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. Syst. Zool. 18:1-32.
- Korea National Arboretum and The Plant Taxonomic Society of Korea. 2007. A Synonymic List of Vascular Plants in

- Korea. Korea National Arboretum, Pocheon, Korea. p. 203 (in Korean).
- Lee, D.B and S.W. Joo. 1958. Review of Flora of Ulleung. Collection of Dissertations for Liberal Arts and Sciences of Korea University. 3:223-296 (in Korean).
- Lee, D.H., S.H. Cho and J.H. Park. 2007. The analysis of vascular plant species composition in Dok-do Island. Korean J. Pl. Taxon 37(4):545-563 (in Korean).
- Lee, T.B. 1978. Flora of Dokdo. Nature Conservation. 22:16-19 (in Korean).
- Lee, T.B. 1980. Illustration flora of Korea. Hyangmunsa, Seoul, Korea. pp. 827-829 (in Korean).
- Lee, W.T. 1996. Lineamenta florae Koreae. Academy Press, Seoul, Korea. pp. 795-797 (in Korean).
- Lookerman, D.J. and R.K. Jansen. 1996. The use of herbarium material for DNA studies. In Sampling the Green World. Stussey, T.J. and S. Sohmer (eds.), Columbia university Press, New York, USA. pp. 205-220.
- Micheal, P. 1994. Distribution and taxonomy of *Echinochloa*-A world view with a key to the species occurring in China. In Proceedings of the 5th Weed Science Conference of China (Kunming, China, 25-30 November 1994). Weed Science Society of China, Kunming, China. pp. 161-166.
- Micheal, P. 2001. The taxonomy and distribution of *Echinochloa* species (barnyard grasses) in the Asian-Pacific region, with a review of pertinent biological studies. In Proceeding of the 18th APWSS Conference (Beijing, China, 28 May-2 June 2001). Standard Press of China. Beijing, pp. 57-66.
- Ohwi, J. 1962. [On Japanese *Echinochloa*.] Acta Phytotax. Geobot. 20:50-55 (in Japanese with Latin diagnosis).
- Palmer, J.D., B. Osorio and W.F. Thompson. 1988. Evolutionary significance of inversions in legume chloroplast DNAs. Curr. Genet. 14:65-74.
- Park, S.J., I.G. Song, S.J. Park and D.O. Lim. 2010. The Flora and Vegetation of Dokdo Island in Ulleung-gun, Gyeong-sanbuk-do. Kor. J. Env. Eco. 24(3):264-278.
- Sang, T., D.J. Crawford and T.F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticular evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). Ame. J. Bot. 84:1120-1136.
- Sworfford, D.L. 2003. PAUP* : Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), ver. 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Soltis, D.E., P.E. Soltis and B.G. Milligan. 1992. Intraspecific chloroplast DNA variation: Systematic and phylogenetic implications. In Molecular Systematics of Plants. Soltis, P.S., D.E. Soltis and J.J. Doyle (eds.), Chapman and Hall, New York, USA. pp. 117-150.
- Sun, B.U., M.R. Sul, J.A. Im, C.H. Kim and T.J. Kim. 2002. Evolution of endemic vascular plants of Ulleungdo and Dokdo in Korea-floristic and cytotoxic characteristics of vascular flora of Dokdo. Kor. J. Pl. Tax. 32(2):143-158.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. 17:1105-1109.
- White, T.J., T. Birns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols : A guide to methods and applications, Innis, M., D. Gelfand, J. Sninsky and T. White (eds.), Academic Press, San Diego, USA. pp. 315-322.
- Yabuno, T. 1984. A biosystematic study of *Echinochloa oryzoides* (Ard.) Fritsc. Cytologia 49:673-678.

(Received 1 April 2013 ; Revised 10 June 2013 ; Accepted 19 August 2013)