

Research Article

바코드에 의한 보풀속(Genus *Sagittaria* L.) 보풀과 벗풀의 동정

김미정, 이정란*, 김진원, 이인용

국립농업과학원

Molecular Identification of *Sagittaria trifolia* and *S. aginash* Based on Barcode

Mi-Jung Kim, Jeongran Lee*, Jin-Won Kim, and In-Yong Lee

National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Korea

Abstract

Since sulfonylurea (SU) herbicide-resistant *Monochoria korsakowii* in Seosan reclaimed land in 1998 was reported first, herbicide-resistant weed species and their area of occurrence have been steadily increasing. In recent years, *Sagittaria trifolia* resistant to SU herbicides has been reported in Gimhae, Gyeongnam province. While collecting *S. trifolia* for constructing barcode database of major weeds we were suspicious by the continuous variation in the leaf morphology of the species. In order to identify the *S. trifolia* from *S. aginash* we barcoded the species collected from domestic using ITS and compared the sequence variation with the ITS sequences of *S. aginash* downloaded from NCBI. As a result, it was found that the plants collected from the domestic did not have any variation among individuals although they showed wide morphological variation. On the other hand, interspecific variation between *S. trifolia* and *S. aginash* was 4.6%. Plants that are difficult to identify using morphological characters can be identified quickly and accurately using the barcode technique. Herbicide-resistant weeds may require different management practices depending on the species even in the same genus. Domestic herbicide-resistant weeds are steadily increasing. Therefore, accurate identification of these species must be preceded for effective weed control.

Keywords: Barcode, ITS, *Sagittaria aginash*, *Sagittaria trifolia*

서론

국내에서는 1998년에 서산간척지에서 처음으로 sulfonylurea (SU)계 제초제 저항성 물옥잠 (*Monochoria korsakowii* Regel & Maack)이 보고된 이후 현재까지 제초제 저항성 논 잡초의 초종 및 발생면적이 꾸준히 증가하고 있다(Lee et al., 2017). 최근에는 경남 김해지역의 벼 이앙재배



OPEN ACCESS

*Corresponding author:

Phone. +82-63-238-3322

Fax. +82-63-238-3838

E-mail. kongsarang@korea.kr

Received: January 31, 2018

Revised: March 15, 2018

Accepted: March 21, 2018

© 2018 The Korean Society of Weed Science and
The Turfgrass Society of Korea.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

논에서 SU계 제초제에 대한 저항성 벼풀(*Sagittaria trifolia* L.)이 보고되었으며(Park et al., 2013) 이는 ALS 유전자 염기서열의 점돌연변이에 의해 197번째 아미노산 proline이 leucine이나 serine으로 치환된 결과임이 알려졌다(Won et al., 2015, 2017).

보풀속(Genus *Sagittaria* L.)은 택사과에 속하는 일년생 또는 다년생 수생식물로 전 세계에 약 100여 종이 주로 온대와 열대에 집중적으로, 그러나 거의 전 세계에 분포한다(Qingfeng et al., 2006). 국내 보풀속에는 올미(*S. pygmaea* Miq.), 벼풀, 보풀 3종이 자연상에서 발견되는 것으로 알려져 있다(Kim and Choi, 2007). 이들 3종 중 올미는 잎 중앙부가 갈라지는 화살엽을 갖지 않는 뚜렷한 특징에 의해 쉽게 구분된다. 그러나 벼풀과 보풀은 잎의 특징에서 개체변이가 매우 심하게 나타나고 그 변이가 연속적이라 두 종을 잘못 동정할 가능성이 매우 높다. Shin et al. (1997)은 두 종을 옆쪽, 상부 열편 엽선의 각, 하부 열편 엽저의 형태와 같은 잎의 형태적 형질을 수리분류학적으로 조사한 결과 이들 형질은 두 종을 동정하는데 있어 유의성이 있으나 변이폭도 겹치는 것으로 조사되어 잎 형질만으로 두 종을 동정하면 잘못 동정할 가능성이 높음을 시사하였다. Shiga et al. (2017)은 실제 국내 및 일본의 표본관에서 발견된 보풀 표본에서 오동정된 표본이 많았다고 하였다. 또한, 국내외 여러 문헌을 검색한 결과 두 종의 가장 큰 비교형질은 괴경을 갖는 포복경과 엽액의 구경의 유무로 조사되었다(Kim and Choi, 2007; Qingfeng et al., 2006; Ohwi, 1984). 그러나 이와 같은 형질은 정확한 형질의 차이를 이해하지 못하는 상태에서 시료를 채취할 경우가 많아 여전히 잘못 동정할 가능성이 있다.

국내 농경지 문제잡초의 바코드 DB를 구축하기 위하여 벼풀을 채집하던 중 발견된 벼풀의 형태적 변이 폭이 매우 넓어 두 종의 정확한 동정이 필요하다고 판단되었으며 또한, 기존에 발표된 벼풀이 보풀(*S. aginashi* Makino)일 가능성도 배제할 수 없었다. 따라서 국내 농경지에서 채집된 *Sagittaria*속 잡초의 Internal transcribed spacer (ITS) 염기서열을 비교하여 두 종을 동정하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

본 연구에 이용된 식물재료는 국내 경기 여주, 포천, 양평, 전북 장수, 충북 증평, 괴산, 경남 하동 논에서 2017년 6-9월에 채집하여 DNA를 분리하고 확증표본을 제작하였다(Table 1). 채집된 재료의 잎의 변이 양상을 파악하기 위하여 33장의 잎을 대상으로 Shin et al. (1997)에 의해 각 분류군간 유의성 있는 차이가 있는 형질인 하부 열편의 폭, 잎의 양쪽 오목한 두 곳 사이의 거리와 상부 열편 엽선의 각을 측정하였다.

Table 1. Plant materials used in this study.

Voucher	Collection site	GPS	GenBank no.
WB-132	Jinae-ri 647-1, Yeosu-si, GG	37°18'26"N 127°40'45"E	MG674131
WB-235	Goi-ri, 1069, Hadong-gun, GN	35° 03' 29"N 127° 54' 26"E	MG674132
WB-239	Dokgok-gil, 67, Pocheon-si, GG	35° 03' 29"N 127° 54' 26"E	MG674133
WB-251-1	Sangjapo-ri, 360-4, Yangpyeong-gun, GG	37° 25' 19"N 127° 32' 14"E	MG674134
WB-251-2	Sangjapo-ri, 360-4, Yangpyeong-gun, GG	37° 25' 19"N 127° 32' 14"E	MG674135
WB-265	Sinjeon-ri, 803-5, Jangsu-gun, JB	37° 25' 19"N 127° 32' 14"E	MG674136
WB-314	Sagok-ri, 1092-10, Jeungpyeong-gun, CB	37° 25' 19"N 127° 32' 14"E	MG674137
WB-317	Somae-ri, 831-2, Goesan-gun, CB	37° 25' 19"N 127° 32' 14"E	MG674138

바코드 분석을 위하여 DNA는 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA)를 이용하여 제공되는 방법에 따라 분리하였다. ITS PCR 증폭반응은 20 ng의 genomic DNA, 0.2 mM의 dNTP, 50 mM의 KCl을 포함하는 1X PCR Buffer, 10 pmole의 ITS5, ITS4 primer (White et al., 1990) 그리고 1 unit의 *Taq* DNA polymerase를 혼합하여 수행하였다. 증폭반응은 T-100 thermal cycler (BIO-RAD)를 이용하여 95°C에서 5분간 pre-denaturation 후, 95°C에서 1분간 denaturation, 50°C에서 1분간 annealing 그리고 72°C에서 1분간 extension을 40회 수행하였다. 염기서열분석은 GenoTech (Daejeon, Korea)에서 수행하였다.

분석된 염기서열은 Lasergen 8.1.5 (CodonCode Corp, Dedham, MA, USA)를 이용하여 contig를 작성하고 BioEdit 7.1.3의 Clustal W를 이용하여 정렬한 후 육안 편집을 거쳤다(Hall, 1999). 본 연구에서 분석된 염기서열을 비교하기 위하여 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에서 보풀과 올미의 ITS 염기서열을 내려 받았으며 accession 번호는 보풀 LC278398, LC278400, LC278401, LC169553, 올미 JF978484, 벚풀 JF978494 이었다. 내려 받은 염기서열은 MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) 프로그램에서 Clustal W를 이용하여 본 시험에서 분석된 염기서열과 함께 정렬하였다. Kimura 2-Parameter (K2P) distance model 옵션으로 중간 변이를 산출하고 Neighbor-joining dendrogram을 작성하여 벚풀과 보풀의 유연관계를 확인하였다.

본 연구에 이용된 벚풀의 확증표본은 국립농업과학원 표본관(HCCN)에 보관하였으며 ITS 바코드 염기서열은 NCBI에 제출하여 GenBank 번호를 부여 받았다.

결과 및 고찰

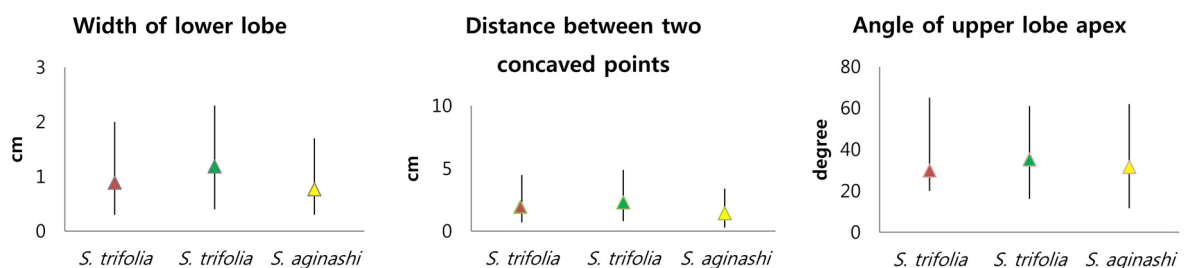
Shiga et al. (2017)이 조사한 KH 표본 중 잎의 폭이 좁은 많은 벚풀이 보풀로 잘못 동정되어 있었듯이 국내 농경지에서 채집한 벚풀의 엽형은 잎의 폭이 좁은 것에서부터 넓은 것까지 매우 심한 형태적 변이를 보였다(Fig. 1, Table 2). Shin et al. (1997)은 잎의 하부 열편의 폭 등 7개 형질을 측정하고, 이들 형질들 간의 비율 형질 등 총 11개의 형질을 이용하여 주성분 분석을 한 결과 잎의 오목한 두 지점 사이의 거리, 하부 열편의 폭, 상부 열편의 엽선 각이 높은 양의 값을 갖는 형질이라고 하였다. 이와 같은 세 가지 형질을 조사한 결과 잎의 오목한 두 지점 사이의 거리는 0.7-4.5 cm, 하부 열편의 폭은 0.3-2.0 cm, 상부 열편의 엽선 각은 20-65° 이었다(Table 2). 그러나 이들 세 가지 형질 모두 변이 폭이 뚜렷이 구분되지 않아 보풀속 식물을 분류하는 중요한 형질로 이용할 수 없음을 확인하였다(Fig. 2).



Fig. 1. Leaf variation of *Sagittaria trifolia* collected from Yangpyeong, Gyeonggido.

Table 2. Ranges and means for three characters of *S. trifolia* and *S. aginash* used in this study and Shin et al. (1997).

Characters	Range	<i>S. trifolia</i> ¹	<i>S. trifolia</i> ²	<i>S. aginash</i> ²
Width of lower lobe (cm)	Min.-Max	0.3-2.0	0.4-2.3	0.3-1.7
	Mean±SD	0.89±0.39	1.19±0.39	0.77±0.27
Distance between two concaved points (cm)	Min.-Max	0.7-4.5	0.8-4.9	0.3-3.4
	Mean±SD	1.87±0.89	2.3±0.78	1.44±0.56
Angle of upper lobe apex (degree)	Min.-Max	20-65	16.2-61	11.7-62
	Mean±SD	29.94±12.07	35.28±10.81	31.72±9.85

¹This study.²Shin et al. (1997).**Fig. 2.** Range and mean for three morphological characters of *Sagittaria trifolia* and *S. aginashi* in Korea. The lengths of bars indicate the range of leaf variation observed. Red triangle is the mean of *S. trifolia* measured in this study. Green and yellow triangles indicate the mean of each character of the species obtained from Shin et al. (1997).

이와 같이 개체간에 형태적 변이가 매우 심하여 종내 또는 종간 분류군간의 한계가 모호하고 정확한 동정이 어려운 경우, 형태에 의존하지 않는 바코드 기법을 이용하면 비교적 쉽게 종을 동정 할 수 있다. 따라서 벚풀의 정확한 동정을 위하여 바코드 기법을 이용하였다. 본 종의 바코드 표준 마커인 *rbcL*과 *matK*는 NCBI에 등록되어있는 정보가 없어서 핵 DNA의 5.8S ribosomal RNA를 포함하는 ITS 부위의 염기서열을 이용하였으며 분석한 염기서열은 NCBI에 제출하여 GenBank (MG674131-MG674138) 번호를 받았다.

분석에 이용된 국내수집 벚풀 8점의 5.8S ribosomal RNA를 포함하는 ITS 염기서열은 671 bp 이었으며 개체간의 종내 염기서열 변이는 없었다. 이는 NCBI에서 내려 받은 벚풀(JF978494)의 염기서열과도 100% 일치하여 전체 채집종은 형태적 변이와 상관없이 모두 종내 변이가 없는 벚풀인 것으로 확인되었다. 보풀과의 유연관계를 확인하기 위하여 NCBI에서 내려 받은 보풀의 5.8S ribosomal RNA를 포함하는 ITS 염기서열도 671 bp 이었으며 보풀 개체간 염기서열 변이는 없었다(Shiga et al., 2017). 벚풀과 보풀은 분석된 염기서열 671 bp 중에 33 bp의 염기서열 치환이 있었고, 벚풀과 올미는 28 bp, 보풀과 올미는 단지 8 bp의 염기서열 치환이 발견되었다. 종간 변이는 벚풀과 보풀 간에 4.6%, 벚풀과 올미는 4.3%, 보풀과 올미는 0.12%로 벚풀과 보풀은 다른 종과의 변이보다 높은 변이율을 보임으로써 벚풀과 보풀은 유전적으로 많은 차이가 있음을 알 수 있었다.

Neighbor-joining 계통수(Fig. 3)의 유연관계에서도 분석에 이용된 모든 벚풀은 NCBI에서 내려 받은 벚풀(JF97849)과 완벽하게 하나의 clade에 계통을 형성하며, 화살엽의 유무에 의해 쉽게 구별했던 보풀과 올미가 가까운 유연관계를 나타낸 후 벚풀과 다시 유연관계를 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, 형태적으로 화살엽을 갖는 벚풀과 보풀은 화살엽을 갖지 않는 특징으로 분류되는 올미와의 유연관계보다 더 먼 것으로 나타나는 매우 흥미로운 결과를 얻었다.

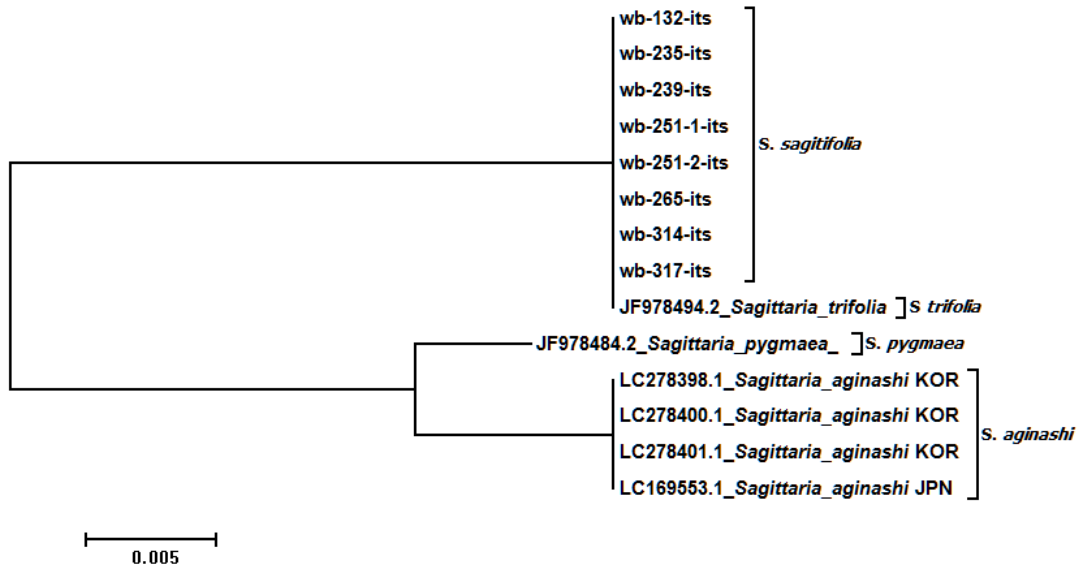


Fig. 3. Neighbor-joining tree inferred from the analysis of nrDNA ITS from *Sagittaria*. Branch lengths are proportional to distances estimated from the two-parameter method of KIMURA. *Sagittaria trifolia* showed the furthest pairwise divergence while *S. aginashi* and *S. pygmaea* showed the closest relationship.

효율적인 잡초 관리를 위해서는, 잡초를 잘못 동정하는 경우 정확한 방제법을 놓칠 수 있으므로 정확한 종 동정이 선행되어야 할 것이다(Mennan and Kaya-Altop, 2012). 캐나다 온타리오 남서부지방에 자생하는 비름속(*Amaranthus* L.)은 atrazine 저항성과 감수성 종이 혼재하여 종에 따라 다른 방제법이 요구되었다(Warwick and Weaver, 1980). 이와 같이, 같은 속의 잡초라 할지라도 종에 따라 다른 관리법이 필요한 경우가 있어 정확한 종 동정은 매우 중요하다. 국내에서도 제초제저항성 잡초는 꾸준히 확산되고 있으며 이들 제초제저항성 잡초의 효율적인 관리를 위해서는 정확한 종 동정이 필요하다.

진화속도가 빠른 ITS 구간은 multicopy로 존재하여 종종 클로닝을 해야 하는 어려움이 있어 고등식물의 표준 바코드마커에서 제외되었으나 클로닝없이 염기서열 분석이 가능할 경우 유용한 추가 바코드가 될 수 있다고 하였다(CBOL Plant Working Group, 2009). 보풀속과 같이, 분류군에 따라서는 ITS 만으로도 충분히 바코드가 가능한 경우가 있다. 본 연구에서도 비록 ITS가 식물의 표준 바코드 마커는 아니지만 ITS 염기서열만으로도 보풀과 형태적으로 구별하기 쉽지 않은 벚풀을 쉽고 빠르고 간단하게 동정해 낼 수 있었다. 그러므로 벚풀과 같이 형태적으로 뚜렷한 종 동정이 어려운 경우 바코드는 강력한 분류 동정대안이 될 수 있다.

요약

1998년에 서산간척지에서 SU계 제초제저항성 물옥잠이 보고된 이후 제초제저항성 면적 및 초종이 꾸준히 증가하고 있으며 최근에는 경남 김해지역에서 SU계 제초제저항성 벚풀이 보고되었다. 농경지 주요잡초의 바코드 데이터베이스를 확보하기 위하여 국내 농경지에서 벚풀을 채집하던 중 본 종의 잎 형태의 변이가 불연속으로 매우 심한 것을 발견하여 보풀의 오동정 가능성에 대한 의심이 들었다. 오동정의 가능성을 확인하기 위하여 국내 농경지에서 채집한 다양한 엽형 변이를 갖는 개체들의 ITS 염기서열을 분석하고 NCBI에서 보풀과 벚풀의 ITS 염기서열을 내려받아 종내, 종간 변이를 조사하였다. 그 결과 국내에서 채집한 모든 개체의 ITS 염기서열은 671 bp로 모

두 동일하였으며 보풀과는 33 bp의 염기서열 치환, 즉 4.6%의 종간변이를 보여 다양한 엽형변이와 상관없이 국내에서 채집한 벼풀은 모두 벼풀인 것이 확인되었다. 이와 같이, 형태적 형질을 이용하여 정확한 동정이 어려운 종들은 바코드 기술을 이용하여 신속하고 정확하게 동정할 수 있다. 제초제저항성 잡초는 동일한 종에서도 종에 따라 다른 관리법이 요구될 수 있으며 국내 제초제저항성 잡초는 꾸준히 늘고 있다. 그러므로 효과적인 잡초 방제를 위해서는 이들 종의 정확한 동정이 선행되어야 한다.

주요어: 동정, 바코드, 벼풀, 보풀, ITS

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the project from the Cooperative Research Program for Agricultural Science & Technology Development of the Rural Development Administration, Korea under Grant number PJ012640.

REFERENCES

- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 106(31):12794-12797.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41.
- Kim, H.J. and Choi, H.K. 2007. 188. Alismataceae Vent, pp. 1070-1072. In: Flora of Korea Editorial Committee (Ed.). The genera of vascular plants of Korea. Academy Publishing Co., Seoul, Korea.
- Lee, J., Kim, J.W. and Lee, I.Y. 2017. Distribution and spread of cyhalofop-butly and penoxsulam resistant *Echinochloa* spp. in Korean paddy fields. *Weed Turf. Sci.* 6(4):345-349. (In Korean)
- Mennan, H. and Kaya-Altup, E. 2012. Molecular techniques for discrimination of late watergrass (*Echinochloa oryzicola*) and early watergrass (*Echinochloa oryzoides*) species in Turkish rice production. *Weed Sci.* 60(4): 525-530.
- Ohwi, J. 1984. Flora of Japan (in English): A Combined Much Rev. and Extended Transl. by the Author of His Flora of Japan (1953) and Flora of Japan, Pteridophyta (1957). Smithsonian Institution, Washington, USA.
- Park, T.S., Lee, I.Y., Seong, K.Y., Cho, H.S., Kim M.H., et al. 2013. Alternative herbicides to control herbicide-resistant and troublesome weeds in paddy fields. *Weed Turf. Sci.* 2(3):248-253. (In Korean)
- Qingfeng, W., Haynes, R.R. and Hellquist, C.B. 2006. Alismataceae. *FOC* 23:84-89 http://flora.huh.harvard.edu/china/mss/volume23/Flora_of_China_Vol_23_Alismataceae.pdf.
- Shiga, T., Tsubota, K. and Choi, H.J. 2017. Actual distribution and present status of a threatened aquatic plant, *Sagittaria aginashi* (Alismataceae), in Korea. *Kor. J. Pla. Tax.* 47(3):180-188.
- Shin, H.C., Cha, H.C. and Choi, H.K. 1997. Taxonomic studies of the Korean Alismataceae: numerical analyses of *Sagittaria sagittifolia*-*S. aginashi* complex. *Kor. J. Pla. Tax.* 27(4):471-480. (In Korean)
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- Warwick, S.I. and Weaver, S.E. 1980. Atrazine resistance in *Amaranthus retroflexus* (redroot pigweed) and *Amaranthus powellii* (green pigweed) from southern Ontario. *Can. J. Plant Sci.* 60(4):1485-1488.

- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. In: Innis, N., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T. (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Application. Academic Press, Inc., NY, USA.
- Won, J.C., Ha, J., Kang, K.S., Pyon, J.Y., Park K.W., et al. 2015. Resistance mechanism to ALS inhibitors in the *Sagittaria trifolia* collected in paddy fields of Kimhae, Korea. Proc. Kor. Weed Sci. Soc. Conf. 35(2):24-25. (In Korean)
- Won, O.J., Won, J.C., Kim, Y.T., Lee, J., Lee, J.J., et al. 2017. *Sagittaria trifolia* resistant to ALS inhibitors and its population dynamics in paddy fields of Korea. The 26th Asian-Pacific Weed Science Society Conference, Kyoto, Japan. p. 272.