

Weed & Turfgrass Science was renamed from both formerly Korean Journal of Weed Science from Volume 32 (3), 2012, and formerly Korean Journal of Turfgrass Science from Volume 25 (1), 2011 and Asian Journal of Turfgrass Science from Volume 26 (2), 2012 which were launched by The Korean Society of Weed Science and The Turfgrass Society of Korea founded in 1981 and 1987, respectively.

## DNA 염기서열에 기초한 벼과 잡초의 분자생물학적 동정

이정란<sup>1\*</sup> · 김창석<sup>1</sup> · 이인용<sup>1</sup> · 오현주<sup>1</sup> · 김종현<sup>2</sup> · 김선유<sup>2</sup>

<sup>1</sup>국립농업과학원, <sup>2</sup>국립생물자원관

## Identification of Korean Poaceae Weeds Based on DNA Sequences

Jeongran Lee<sup>1\*</sup>, Chang-Seok Kim<sup>1</sup>, In-Yong Lee<sup>1</sup>, Hyun-Ju Oh<sup>1</sup>, Jung Hyun Kim<sup>2</sup>, and Sun Yu Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Academy of Agricultural Science, Iseo 565-852, Korea

<sup>2</sup>National Institute of Biological Resources, Incheon 404-708, Korea

**ABSTRACT.** Korean Poaceae includes approximately 80 species of the agricultural weeds. Precise species identification is the first step for more effective weed management in the agricultural fields. However, the identification of species in Poaceae is not easy without the assistance of taxonomists or identification experts although they are relatively easy to distinguish from the plants of the other family by the unique characteristics of caryopsis. Thus, DNA barcode was suggested as an alternative powerful technique for species identification by using short sections of DNA from a specific region of the genome. Two standard barcode markers of vascular plants, chloroplast *rbcL* and *matK*, and a supplementary nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) region were used for barcode of major Korean Poaceae weeds, 403 individuals of 84 taxa. All the barcode markers revealed a good level of sequencing success with the lowest 73.7% for *matK* and the highest 88.8% for *rbcL*. The barcode sequences were deposited to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database for public use. Combined *matK* and ITS showed very high resolving power with 92.9%. Besides the identification of weeds for weed management, the generated DNA barcode data could be used for many other applications such as rapid biodiversity assessment and conservation prioritization.

**Key words:** Identification, *matK*, nrITS, *rbcL*, Poaceae, Vascular plant barcode

Received on February 15, 2015; Revised on March 10, 2015; Accepted on March 12, 2015

\*Corresponding author: Phone) +82-63-238-3322, Fax) +82-63-238-3838; E-mail) kongsarang@korea.kr

© 2015 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/3.0>) which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서 론

국내 벼과(Poaceae Barnhart) 식물은 약 6아과 96속 252 분류군이 기록되어있으며(Park et al., 2011) 그 중에서 돌피(*Echinochloa crus-galli* (L.) P.Beauv.), 바랭이(*Digirtaria ciliaris* (Retz.) Koel.) 등 약 80여종의 잡초를 포함하고 있다. 돌피는 논과 밭에서 모두 문제가 되는 잡초로 특히 나도논피(*E. oryzoides* (Ard.) Fritsch)와 매우 유사하고 (Lee et al., 2013) 특히 밭에서 문제가 되는 바랭이는 좁바랭이(*D. radicata* (Presl) Miq.), 민바랭이(*D. violascens* Link.) 등이 함께 분포하나 외부 형태적 형질에 기초하여 동정하는데 어려움이 많다. 이와 같이, 벼과 식물은 영과의 독특한 형질에 의해

다른과의 식물들과는 비교적 쉽게 구분이 되지만 벼과 내에서는 식별전문가의 도움없이 정확한 동정을 하는 것이 쉽지 않다. 또한 분류학자들도 자신의 전공 분류군에 한하여 종 동정이 가능하고(Chase and Fay, 2009), 세계적으로 식별전문가는 점점 줄어드는 실정으로 종을 빠르고 정확하게 동정하는 것이 점점 어려운 현실이 되고 있다. 그러나 농경지에서 효율적으로 잡초를 관리하기 위해서는 잡초를 정확하게 분류하는 것이 선행되어야한다.

DNA 바코드는 Hebert et al. (2003)에 의해 제안되고 생물다양성협약(Convention on Biodiversity)에서 권고하는(CBD GTI 9조 및 13조) 표준 종 동정 방법으로 계놈의 짧은 표준 범위로부터 DNA를 분리하여 종간의 DNA 변이

로 형태적 분류 지식없이 종을 빠르고 쉽고 정확하게 동정하는 것이 가능하다. 이러한 DNA 바코드 방법은 분류전 공자가 아니어도 간단한 분자생물학적 실험만 습득하면 가능하기 때문에, 종식별전문가의 부재하에서 형태학적으로 동정하기 어려운 분류군을 동정하는 대안으로 최근에 매우 활발하게 이용되고 있다. 동물과 조류(algae)에서는 미토콘드리아 CO1 유전자를 DNA 바코드 표준 유전자로 이용하고 있으나 고등식물에서는 미토콘드리아 DNA의 진화 속도가 너무 느려서 즉, 돌연변이율이 낮아 종식별에 이용하기에 적절하지 않아(Chase and Fay, 2009) 고등식물에서는 엽록체 DNA의 유전자 부위인 *rbcL*과 *matK* 조합의 이용을 권고하고 있다(CBOL Plant Working Group, 2009). 그러나 *rbcL*과 *matK* 조합은 바코드 갭이 매우 낮아 적절하게 종을 동정하기 어려운 문제점이 있고(Lahaye et al., 2008) 이 두 유전자는 모두 모계 plastid 마커로 잡종의 경우 모계 종으로 동정이 될수 있다는 단점이 있는 반면, 양친유래 마커 즉, 핵 DNA 유전자의 경우 multiple copy로 존재하거나 종종 cloning을 해야하는 번거로움이 있기 때문에 표준 마커로의 이용이 어렵다는 주장이 있다(Chase and Fay, 2009). 그럼에도 불구하고 핵 DNA의 ribosomal internal transcribed spacer (ITS) 부위를 함께 바코드에 이용하면 보완이 될것이라는 많은 주장이 있다(Chen et al., 2010; China Plant BOL Group, 2011; Kress and Erickson, 2007).

따라서 본 연구는 농경지에 발생하는 벼과 잡초를 대상으로 엽록체 DNA의 *rbcL*과 *matK*, 핵 DNA의 ITS 부위를 바코드하고 그 결과를 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에 등록하여 일반인들이 쉽게 이용할 수 있는 기초 자료를 축적하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물 재료

경기도, 강원도, 충청도, 전라도, 경상도, 제주도와 울릉도 등 전국에서 84분류군 341 생태형을 채집하고 국립생물자원관에서 28종 62생태형의 표본을 대출하여 총 84분류군

403생태형을 엽록체 DNA의 *rbcL*과 *matK*, 핵 DNA의 ITS 부위를 이용하여 바코드하였다(Supplementary table 1). 본 연구에 이용한 식물재료는 Chen and Peterson (2006)과 Park et al. (2011)에 근거하여 동정하였다. 전국에서 채집한 341 점은 확증표본을 제작하여 국립농업과학원 표본관(HCCN)에 보관하였다. 바코드 염기서열은 미국의 국립생물공학정보센터(NCBI)에 제출하여 GenBank 번호를 부여받아 공개하였다.

### DNA 추출, PCR 증폭, 염기서열 분석

계놈 DNA 추출과 PCR 증폭반응과 증폭반응에 이용한 primer는 Lee et al. (2015)에 따랐으며 염기서열분석은 GenoTech (Dajeon, Korea)에서 수행하였다.

### 바코드 갭 및 해상력 분석

분석된 염기서열은 Lasergen 8.1.5 (CodonCode Corp, Dedham, MA, USA)를 이용하여 contig를 작성하고 Clustal W를 이용하여 정렬한 후 육안 편집을 거쳤다. 각 마커별 그리고 엽록체 DNA의 *rbcL*과 *matK*, 핵 DNA의 ITS 조합의 분류군간, 분류군내 염기서열 변이는 MEGA 6.06 프로그램 이용하여 Kimura 2-Parameter (K2P) distance model로 산출하였다(Tamura et al., 2013). 최소 중간 변이와 최대 종내 변이를 SigmaPlot 13 (Systat Software Inc., USA)으로 도식화하여 바코드 갭을 조사하였다(Theodoridis et al., 2012). Neighbor-joining dendrogram (Saitou and Nei, 1987)을 작성하여 각 분류군의 단계통 형성여부와 각 마커별 종식별 해상력을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### DNA 염기서열 분석

각 마커별 바코드 염기서열은 미국 NCBI에 제출하여 GenBank 번호를 부여받았다(Table 1). 각 마커별 염기서열 분석 성공률은 *rbcL*에서 88.7%로 가장 높았고, *matK*에서 73.7%로 가장 낮았으며 ITS는 80.9%의 성공률을 보였다(Table 2). 각 마커별 염기서열 분석률을 살펴보면, *rbcL*은

**Table 1.** NCBI GenBank accession numbers deposited in this study.

Subfamily	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	ITS
Panicoideae	KC164294 - KC164345 KF163490 - KF163557 KF163796 - KF163803	KF163707 - KF163795 KF163804 - KF163833	KF163597 - KF163706 KF163834 - KF163849
Pooideae	KF712931 - KF713076	KF713077 - KF713172	KF713173 - KF713299
Choridoideae			
Bambusoideae	KP056828 - KP056917	KP056918 - KP057004	KP057005 - KP057084
Arundinoideae			

**Table 2.** Sequencing success for the three individual barcode regions. The numbers indicate the numbers of successfully sequenced individuals. The numbers in parentheses indicate the rate of sequencing success (%).

Subfamilies Markers	Panicoideae	Pooideae	Chloridoideae	Bambusoideae	Arundinoideae	Total
<i>rbcL</i>	122 (91.7)	146 (89.6)	65 (86.7)	14 (93.3)	11 (91.7)	358 (88.8)
<i>matK</i>	115(86.5)	95 (58.3)	63 (84.0)	13 (86.7)	11 (91.7)	297 (73.7)
ITS	120 (90.2)	126 (77.3)	64 (85.3)	8 (53.5)	8 (66.7)	326 (80.9)

대나무아과(Bambusoideae)에서 가장 높고(93.3%) 나도바랭이아과(Chloridoideae)에서 가장 낮았으나(86.7) 벼과 전체에서 비교적 높은 염기서열 분석 성공률을 보였다. *matK*의 경우는 물대아과(Arundinoideae)에서 가장 높은(91.7%) 염기서열 분석 성공률을 보인 반면 포아풀아과(Pooideae)에서는 현저히 낮은(58.3%) 성공률을 나타냈고, ITS의 염기서열 분석 성공률은 기장아과(Panicoideae)에서 가장 높고(90.2%) 대나무아과에서 가장 낮았다(53.5%). 벼과의 어느 분류군에서나 좋은 염기서열 분석 성공률을 나타낸 *rbcL*과 달리 *matK*와 ITS는 분류군별로 다른 염기서열 분석 성공률을 보여 분석하고자 하는 분류군에 따라 적절한 마커의 선택이 벼과를 바코딩하는데 중요한 요인 중의 하나로 생각된다. 특히, *rbcL*과 ITS는 단일 프라이머와 단 한 번의 시도로 PCR 증폭과 염기서열 분석이 성공적으로 진행된 반면, *matK*는 일부 분류군의 염기서열 분석에 중간 프라이머가 필요한 경우가 종종 있었다. 이는 바코딩하고자 하는 부위의 증폭길이가 길고 A-T 서열의 반복이 많기 때문일 것으로 추정된다. 고등식물의 표준마커로 이용되고 있는 *matK*는 전체 염기서열에 보존된 염기서열이 부족하여 바코딩에 적절한 짧은 부위를 증폭할 수 있는 프라이머의 제작이 어렵다. Kress and Erickson (2007)은 육상식물에서 39.3%의 낮은 PCR 증폭률을 보이고 프라이머 제작에 어려움이 있어서 육상식물의 표준 바코드마커로 이용하는 것은 부적절하다고 하였다. 그러므로 벼과의 경우 *matK* 부위를 바코딩하기 위하여 중간 프라이머가 필요했던 점과 중간 프라이머의 사용에도 불구하고 포아풀아과와 같은 분류군에 따라 극히 낮은 염기서열 분석 성공률을 나타냈다는 점은 특히 고려할 만하다. ITS에서 낮은 염기서열 분석 성공률을 보인 대나무아과(53.5%)와 물대아과(66.7%)는 *rbcL*과 *matK*에서는 높은 성공률을 보여서 표준 마커만으로 바코딩이 가능하였다.

### 종내, 종간 변이

각 분류군별 염기서열의 변이는 *rbcL*에서 18.4%, *matK*에서 41.2%, ITS에서 68.4%로 핵DNA의 ITS 부위에서 가장 높았다. 종내 변이를 보이는 분류군은 *rbcL*에서 24분류군, *matK*에서 30분류군, ITS에서 49분류군이었으며 이들의 종

내 변이율은 평균 0.03%, 0.09%, 0.34%로 핵 DNA의 ITS구간에서 가장 높은 종내 변이율을 보였다. 마커들의 조합으로 분석한 평균 종내 변이율은 표준마커 조합인 *rbcL* + *matK*에서 0.07%, *rbcL* + ITS에서 0.15%, *matK* + ITS에서 0.25%, *rbcL* + *matK* + ITS에서 0.12%로 *matK*와 ITS의 조합에서 가장 높은 종내 변이율을 보였다(Table 3). 나도바랭이(*Chloris virgata* Sw.), 개솔새(*Cymbopogon goeringii* (Steud.) A.Camus), 오리새(*Dactylis glomerata* L.), 그령(*Eragrostis ferruginea* (Thunb.) P.Beauv.), 좁새그령(*Eragrostis minor* Host), 갯쇠보리(*Ischaemum antheophoroides* (Steud.) Miq.), 쇠보리(*Ischaemum aristatum* L.), 나도바랭이새(*Microstegium vimineum* (Trin.), 개기장(*Panicum bisulcatum* Thunb.), 참새피(*Paspalum thunbergii* Kunth ex Steud.), 새포아풀(*Poa annua* L.), 가는금강아지풀(*Setaria pallidifusca* (Schumach.) Stapf & C.E.Hubb.), 솔새(*Themeda triandra* var. *japonica* (Willd.) Makino) 13 분류군은 모든 마커를 이용한 분석에서 종내변이를 보이지 않았고 특히, 개솔새, 오리새, 그령, 좁새그령, 쇠보리, 갯쇠보리, 나도바랭이새, 참새피, 새포아풀, 솔새 11 분류군은 모든 바코딩마커 조합(*rbcL* + *matK*, *rbcL* + ITS, *matK* + ITS, *rbcL* + *matK* + ITS)에서도 종내 변이를 보이지 않아 이 종들은 국내에서 단일 생태형을 갖을 가능성이 높은 것으로 사료되므로 추후 더 많은 지역의 샘플을 포함하여 확인할 필요가 있다.

단일 마커의 종간변이율은 *rbcL*에서 3.45%, *matK*에서 6.62%, ITS에서 22.23% 이었다. 마커들의 조합으로 분석한 평균 종간변이율은 표준마커 조합인 *rbcL* + *matK*에서 0.07%, *rbcL* + ITS에서 0.15%, *matK* + ITS에서 0.25, *rbcL* + *matK* + ITS 0.12%로 *matK*와 ITS의 조합에서 가장 높은 종간변이율을 보였다(Table 3). 쥐꼬리새풀(*Sporobolus fertilis* (Steud.) W. Clayton)은 *rbcL*을 제외한 모든 단일마커와 마커의 조합에서 잠자리피(*Trisetum bifidum* (Thunb.) Ohwi), 쥐보리(*Lolium multiflorum* Lamarck), 호밀풀(*Lolium perenne* L.) 등과 가장 종간변이가 큰 분류군으로 파악되었다.

두 개체 이상의 생태형을 갖는 분류군의 최대 종내변이와 최소 종간변이의 차이가 0보다 클 때 바코드 갭이 있는 것으로 정의하는 바코드 갭(Theodoridis et al., 2012)은 *rbcL*이 91.8%, *matK*가 96.4%, ITS가 91.6%, *rbcL* + *matK*가

**Table 3.** Characteristics of the seven DNA barcodes evaluated in Korean Poaceae.

Barcode (No. of sequences)	No. of sequenced samples (No. of species)	Variable sequences (%)	Species represented by multiple individuals	No. of species showing intraspecific divergence	Interspecific variation (average %)	Intraspecific variation (average e%)	Percentage of species exhibiting barcoding gap	Resolving power (%)
<i>rbcL</i> (1,096)	358 (85)	202 (18.4)	78	24	0~6.23 (3.45)	0~0.48 (0.03)	91.8	75.0
<i>matK</i> (1,032)	297 (84)	425 (41.2)	81	30	0~12.22 (6.62)	0~1.09 (0.09)	96.4	78.6
ITS (722)	326 (83)	494 (68.4)	76	49	0~44.13 (22.23)	0~4.35 (0.34)	91.6	76.2
<i>rbcL</i> + <i>matK</i> (2,180)	286 (80)	948 (43.5)	77	34	0~37.70 (15.70)	0~0.85 (0.07)	96.3	82.1
<i>rbcL</i> + ITS (1,806)	292 (78)	844 (46.7)	74	49	0~34.20 (22.30)	0~1.51 (0.15)	94.9	83.3
<i>matK</i> + ITS (1,792)	244 (76)	1,394 (77.8)	73	50	0~125 (54.50)	0~4.28 (0.25)	96.1	92.9
<i>rbcL</i> + <i>matK</i> + ITS (2,889)	240 (77)	1,588 (55.0)	74	50	0~53.10 (26.50)	0~1.23 (0.12)	96.1	86.9

<sup>†</sup> Percentage of species exhibiting barcoding gap and resolving power are based on the definition of Theodoridis et al. (2012)

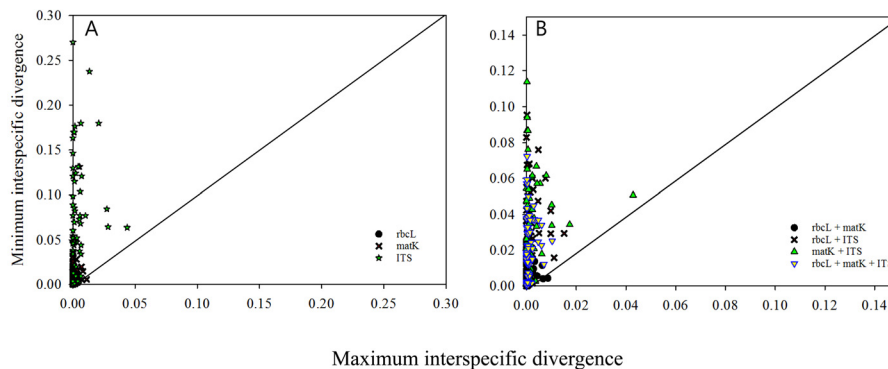
96.3%, *rbcL* + ITS가 94.9%, *matK* + ITS가 96.1%, *rbcL* + *matK* + ITS가 96.1%로 단일마커 뿐만 아니라 모든 마커조합이 매우 높은 바코드 갭을 갖는 것으로 분석되었다(Table 3). 단일 마커(A)와 마커들의 조합(B)에 의한 바코드 갭을 나타낸 플랏에서도 두 플랏간에 큰 차이가 없는 것으로 나타나서 본 연구에 이용된 세 마커는 단일마커 또는 조합으로 벼과 바코드에 유용한 것으로 판단된다.

#### 바코드 해상력과 분류학적 고찰

Neighbor-joining (NJ) 계통수(not shown, provided upon request)의 단계원 형성여부에 근거한 바코드 종식별 해상력을 살펴보면 *rbcL*이 75.0%, *matK*가 78.6%, ITS가 76.2%로 단일 마커에서는 *matK*가 가장 높았고 *rbcL*에서 가장 낮았다.

단일 마커들을 조합하여 살펴보면 *rbcL* + *matK*에서 82.1%, *rbcL* + ITS에서 83.3%, *matK* + ITS에서 92.9%, *rbcL* + *matK* + ITS에서 86.9%로 종식별 해상력이 현저히 높아지는 결과를 얻었으며 특히, *matK* + ITS 조합은 매우 높은 해상력을 보여(Table 3) 벼과식물의 바코딩에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

각 마커에 의해 생성된 NJ 계통수들은 분류군의 단계원 형성에 차이를 보였는데 단일마커와 각 조합에서 생성된 일곱 개의 NJ 계통수에서 공통적으로 단계원이 형성되지 않은 독새풀(*Alopecurus aequalis* Sobol.)과 털독새풀(*A. japonicus* Steud.)은 분자분류학적으로 동종으로 생각되며 형태적 특징을 검토한 후 동종으로 처리할 수 있을 것으로 생각된다. 나도바랭이새(*Microstegium minimeum* (Trin.) A.



**Fig. 1.** Plots of minimum interspecific distance versus maximum intraspecific distances for the individual (A) and the combined barcode regions (B). Each data point represents a species for which two or more individuals were sampled. Species, which fall above the line, exhibit a barcoding gap. Good barcode gaps were represented at both plots.

Camus)와 민바랭이새(*M. japonicum* (Miq.) Koidz.)는 *rbcL*과 ITS의 계통수에서 동종으로 유집되었으나 민바랭이새가 *matK* 염기서열 분석에 실패하여 동종 가능성 여부를 확인할 수 없었다. 민바랭이새의 생태형 보완과 형태적 형질을 고려하여 추후 확인하여야 할 것으로 생각된다. *rbcL* 계통수에서 구주개밀(*Elymus repens* (L.) Gould.), 속털개밀(*E. ciliaris* Tzvelev.)과 개밀(*E. tsukushiensis* Honda), 비노리(*Eragrostis multicaulis* Steud.)와 큰비노리(*E. pilosa* (L.) P.Beauv.), 쇠보리(*Ischaemum aristatum* L.)와 갯쇠보리(*I. antheophoroides* (Steud.) Miq.)의 종식별이 가능하지 않았으나 *matK*와 ITS 계통수에서는 각각 다른 종으로 식별이 가능하였다. 반면, *rbcL*과 ITS의 계통수에서 뚜렷하게 다른 종으로 식별되지 않아 동종으로 유집되었던 쇠돌피(*Polypogon fugax* Nees ex Steud.)와 갯쇠돌피(*P. monpelienis* (L.) Desf.)는 *matK*계통수에서 단계원을 형성하였다. 또한 *matK*에서 식별되지 않던 나도겨풀(*Leersia japonica* Honda)과 좁겨풀(*L. oryzoides* (L.) Sw.)은 *rbcL*과 ITS의 계통수에서 뚜렷하게 다른 종으로 식별되었다.

속(genus)수준에서 살펴보면, *rbcL*의 계통수는 강아지풀속(*Setaria* P.Beauv.), 개기장속(*Panicum* L.), 드렁새속(*Leptochloa* P.Beauv.), 포아풀속(*Poa* L.), 참새귀리속(*Bromus* L.), 갯보리속(*Elymus* L.), 수수속(*Sorghum* Moench)의 일곱 속, *matK* 계통수는 포아풀속, 드렁새속, 강아지풀속, 개기장속의 네 속, ITS 계통수는 강아지풀속, 개기장속, 드렁새속, 돌피속(*Echinochloa* P.Beauv.)의 네 속이 단계원을 형성하지 않았다. 강아지풀속, 개기장속, 드렁새속은 단일 마커 뿐만 아니라 마커조합에 의해 생성된 NJ 계통수에서 공통적으로 단계원을 형성하지 않아 이 세 속의 단계원은 계통 분류학적으로 재검토가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 각 마커별로 단계원을 나타낸 포아풀속, 참새귀리속, 갯보리속, 수수속, 돌피속은 마커의 조합에 따라 단계원을 형성하였다. 본 연구에 이용된 몇몇 분류군은 각각의 계통수에서 약간의 다른 유연관계를 나타냈다. 예를 들면, 포아풀아과의 갈풀(*Phalaris arundinaceae* L.), 메귀리(*Avena fatua* L.) 등은 *rbcL*과 *matK*, ITS 계통수에서 각각 다른 분류군과 단계원을 형성하였다(Lee et al., 2015). 벼과 전체에서도 포아풀아과와 마찬가지로 엽록체 DNA *rbcL*과 *matK*의 계통수에서 차이를 보였던 유연관계는 ITS를 이용하였을 때 *matK* 계통수와 유사성이 더 높은 것으로 분석되었다. 그러므로 바코드뿐만 아니라 분자계통학적 연구에서도 다양한 마커들의 조합을 이용하면 더 해상력이 높은 유연관계를 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

육상식물은 동물의 CO1과 같이 하나의 표준화된 바코드 구간이 존재하지 않아 Consortium for Barcode of Life plant working group (2009)은 PCR 증폭과 염기서열 분석 성공

률, 종식별 해상력, 프라이머의 보편성, 양방향 염기서열 정보의 확보, 경제성 등을 고려하여 육상식물의 표준 바코드 구간으로 엽록체 DNA의 유전자 *rbcL*과 *matK*의 조합을 선정하여 72% 이상 종을 식별할 수 있었다. 그러나 China Plant Barcode of Life group (2011)은 75과 141속 5,583종을 이용한 바코드에서 *rbcL*과 *matK*의 조합은 속 수준에서는 식별력이 높았으나 그 이하 분류군에서는 매우 낮은 식별력을 보였고, 분류군별로 매우 다른 식별력을 보였다고 보고하였다. 예를 들면, CBOL Plant Working Group (2009)이 주로 이용한 난과(Ochidaceae) 식물에서는 매우 높은 식별력을 보인 반면 벼목(Poales), 녹나무목(Laurales), 마목(Dioscoreales), 미나리목(Apiaceae), 남가새목(Zygophyllales)과 같은 분류군에서는 식별력이 매우 낮았다. 그러나 핵 DNA의 ITS를 추가한 경우 *rbcL*과 *matK*의 종식별 해상력 49.7%가 69.7-79.1%까지 증가되는 결과를 얻어 ITS 또는 최소한 ITS의 일부 구간인 ITS2를 바코드에 활용하여야 한다고 주장하였다. ITS 부위를 이용하여 마다가스카 등대풀속(*Euphorbia*)을 바코딩한 Aubriot et al. (2013)도 ITS 단독 또는 *matK*와의 조합에서 거의 100% 종식별 해상력의 유용한 결과를 얻었다.

본 연구에서 ITS부위는 80.9%의 PCR 증폭 및 염기서열 분석 성공률과 76.2%의 종식별 해상력을 나타냈으나 *rbcL*과의 조합으로 83.3%, *matK*와의 조합으로 92.9%까지 종식별 해상력을 높일 수 있었다. 이는 표준마커 *rbcL*과 *matK* 조합의 종식별 해상력(82.1%)보다 높은 결과로 특히, ITS와 *matK* 조합은 표준마커의 조합보다 약 10% 이상 높은 결과이다. 그러나 두 마커에 공통으로 분석된 샘플 수는 244점으로 전체 분석 샘플의 약 60.5%에 불과하여 *rbcL* + *matK*에 공통 분석된 샘플 286점(71.0%)보다 약 10% 가량의 샘플을 분석할 수 없었다는 단점이 있다. 그러므로 *matK* 마커를 이용한 PCR 증폭과 염기서열 분석 성공률을 높일 수 있도록 중간 프라이머를 제작 하는 등 보완을 거쳐 ITS와 조합하여 바코드에 이용하면 충분히 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

## 요 약

최근에 전 세계적으로 동물, 식물뿐만 아니라 균류, 해조류 등에서 활발하게 이용하는 DNA 바코드는 계통 DNA의 단편을 이용해 종들 간의 DNA 변이를 발견하여 형태적 지식 없이 정확하게 종을 동정하고 분류하는 방법이다. 고등 식물에서는 단일마커로 바코드 조건을 충족할 수 없어 엽록체 DNA의 *rbcL*과 *matK* 유전자를 표준마커로 이용하고 있다. 본 연구는 식물 표준 바코드마커와 핵 DNA의 ITS 부위를 이용하여 국내 벼과 식물 252 분류군 중 주로 농경

지에서 발생하는 잡초 총 84분류군 403생태형을 바코드하여 데이터베이스를 구축하기 위하여 수행하였다. 바코드 결과 PCR 증폭과 염기서열 분석 성공률은 *rbcL*에서 가장 높았으며 *matK*에서 가장 낮았다. 그러나 바코드 갭과 종 식별 해상력은 *matK*에서 가장 높았다. 80.9%의 염기서열 분석 성공률을 보인 ITS는 *matK*와의 조합에서 92.9% 까지 종 식별 해상력을 높일 수 있어 벼과 바코드에 매우 유용한 조합이었다. 벼과의 바코드데이터는 미국의 국립생물공학정보센터에 기탁하여 genbank 번호를 부여받아 공개하였다. 그러므로 형태적으로 동정이 어려운 벼과 잡초를 *matK*와 ITS 부위의 염기서열을 분석하여 미국의 국립생물공학정보센터에 기탁한 데이터와 비교함으로써 쉽고 간편하게 동정할 수 있게 되었다.

**주요어:** 벼과 식물, 바코드, *matK*, *rbcL*, nrITS

## Acknowledgement

This research was supported by a project from the Cooperative Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ010068) of the RDA.

## References

- Aubriot, X., Lowry, P.P., Cruaud, C., Couloux, A. and Haevermans, T. 2013. DNA barcoding in a biodiversity hot spot: potential value for the identification of Malagasy *Euphorbia* L. listed in CITES Appendices I and II. *Mol. Ecol. Res.* 13:57-65.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:12794-12797.
- Chase, M.W. and Fay, M.F. 2009. Barcoding of Plants and Fungi. *Sci.* 325:682-683.
- Chen, S. and Peterson, P.M. 2006. Vol.22 Poaceae (Gramineae), pp. 1-651. In *Flora of China*, eds. Z. Y. Wu, et al. Missouri Botanical Garden, CO & Harvard Univ. Herbaria, MA, USA.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., et al. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE* 5(1):e8613(8611-8618).
- China Plant BOL Group. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) Should be incorporated into the core barcode for seed plants. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:19641-19646.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and Waard, J.R.d. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *P. R. Soc. London, Series B* 270:313-321.
- Kress, W.J. and Erickson, D.L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2(6):e508.
- Lahaye, R., Bank, M.v.d., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., et al. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:2923-2928.
- Lee, J., Kim, C.S. and Lee, I.Y. 2015. Molecular identification of Pooideae, Poaceae in Korea. *Weed Turf. Sci.* 4(1) in press. (in Korean)
- Lee, J., Kim, C.S. and Lee, I.Y. 2013. Identification of *Echinochloa oryzicola* (Vasinger) Vasinger and *E. oryzoides* (Ard.) Fritsch in Korea. *Kor. J. Pla. Tax.* 43:56-62. (in Korean)
- Park, S.H., Lee, Y.M., Chung, S.Y., Chang, G.S., Kang, W.C., et al. 2011. Illustrated grasses of Korea (Revised and enlarged edition). Pocheon, Kyonggido, Korea: Korea National Arboretum.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing evolutionary trees. *Mol. Bio. Evol.* 4:406-425.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- Theodoridis, S., Stefanaki, A., Tezcan, M., Aki, C., Kokkini, S., et al. 2012. DNA barcoding in native plants of the *Labiatae* (Lamiaceae) family from Chios Island (Greece) and the adjacent Çeşme-Karaburun Peninsula (Turkey). *Mol. Ecol. Res.* 12:620-633.

### Supplementary table 1. The plant list used in this study.

Scientific name	Korean name	No. of samples	Sample voucher*
<i>Agrostis clavata</i>	Heengyeoisak	3	PB-257 (GG), NIBR-13 (JB), NIBR-33 (JB)
<i>Alopecurus aequalis</i>	Ttuksaepul	5	PB-5 (GG), PB-13 (JN), PB-33 (GW), PB-45 (CB), PB-69 (GG)
<i>Alopecurus japonicus</i>	Teolttuksaepul	3	PB-14 (JN), NIBR-30 (JJ), NIBR-39 (GW)
<i>Andropogon brevifolius</i>	Soeipul	2	PB-239 (CN), PB-256 (JN)
<i>Arthraxon hispidus</i>	Jogaepul	5	PB-224 (GG), PB-275 (GN), PB-280 (JN), PB-336 (GW), PB-365 (GN)
<i>Arundinella hirta</i>	Sae	6	PB-194 (GW), PB-213 (GB), PB-270 (JB), PB-287 (GN), PB-293 (GG), PB-298 (JJ)
<i>Avena fatua</i>	Maegwiree	3	PB-9 (JN), NIBR-35 (GG), NIBR-60 (JJ)

**Supplementary table 1.** The plant list used in this study (continued).

Scientific name	Korean name	No. of samples	Sample voucher*
<i>Beckmannia syzigachne</i>	Gaepee	7	PB-12 (JN), PB-20 (JN), PB-29 (GG), PB-56 (CN), PB-68 (GG), PB-85 (GW), NIBR-37 (DG)
<i>Bromus catharticus</i>	Keunysisakpul	7	PB-11 (JN), PB-94 (GG), PB-130 (GN), PB-136 (GB), PB-164 (JB), PB-190 (GB), PB-320 (JJ)
<i>Bromus inermis</i>	Jomchamsaegwiree	4	PB-31 (GG), PB-36 (GB), PB-53 (CN), PB-198 (GB)
<i>Bromus japonicus</i>	Chamsaegwiree	7	PB-7 (GG), PB-23 (JN), PB-30 (GG), PB-49 (GB), PB-57 (CN), PB-60 (GG), PB-86 (GW)
<i>Bromus rigidus</i>	Ginggarakbipsaegwiree	6	PB-15 (JN), PB-51 (CN), PB-58 (CN), PB-383 (JN), NIBR-10 (IC), NIBR-54 (JJ)
<i>Bromus tectorum</i>	Teolbipsaegwiree	7	PB-42 (GB), PB-50 (CN), PB-81 (GG), PB-83 (GW), PB-384 (JN), PB-389 (GW), PB-395 (CN)
<i>Calamagrostis epigeios</i>	Sanjopul	8	PB-89 (GW), PB-95 (GG), PB-103 (GG), PB-113 (CN), PB-143 (IC), PB-201 (GB), NIBR-27 (JB), NIBR-40 (CN)
<i>Chloris virgata</i>	Nadobaraengee	5	PB-147 (GG), PB-331 (GW), PB-401 (IC), PB-402 (CB), NIBR6 (IC)
<i>Cleistogenes hackelii</i>	Daesaepul	5	PB-354 (DG), PB-360 (GN), PB-368 (GG), NIBR26 (JN), NIBR45 (JJ)
<i>Cymbopogontortilis</i> var. <i>goeringii</i>	Gaesolsae	3	PB-285 (GN), PB-294 (GG), PB-303 (JJ)
<i>Cynodon dactylon</i>	Oosanjandee	6	PB-91 (GG), PB-179 (GB), PB-315 (JJ), PB-338 (GW), NIBR57 (JB), NIBR61 (JN)
<i>Dactylis glomerata</i>	Orisae	8	PB-4 (GG), PB-10 (JN), PB-34 (GW), PB-64 (GG), PB-141 (IC), PB-193 (GW), PB-209 (CB), PB-218 (CN), PB-276 (GN)
<i>Digitaria ciliaris</i>	Baraengee	5	PB-100 (GG), PB-123 (GN), PB-158 (JB), PB-176 (GW), PB-322 (JJ)
<i>Digitaria violascens</i>	Minbaraengee	5	PB-278 (JN), PB-307 (JJ), PB-328 (GG), PB-333 (GW), PB-350 (GN),
<i>Digitariaradiciosa</i>	Jombaraengee	3	PB-220 (JN), PB-329 (GG), PB-356 (GN),
<i>Echinochloa crusgalli</i>	Dolpee	6	PB-80 (CN), PB-97 (GG), PB-114 (CN), PB-170 (JB), PB-187 (GB), PB-312 (JJ)
<i>Echinochloa crusgalli</i> var. <i>echinata</i>	Moolpee	5	PB-159 (JB), PB-240 (CN), E114 (BS), E65 (IC), PB-313 (JJ)
<i>Echinochloa oryzoides</i>	Nonpee	4	E25 (GW), E46 (JB), PB-259 (GG), E127 (GN)
<i>Eleusine indica</i>	Wangbaraengee	7	PB-98 (GG), PB-115 (CN), PB-132 (GN), PB-169 (JB), PB-204 (CB), PB-215 (GB), PB-316 (JJ)
<i>Elymus ciliaris</i>	Sokteolgaemil	6	PB-2 (GG), PB-24 (JN), PB-37 (GB), PB-65 (GG), PB-180 (GW), PB-208 (CB)
<i>Elymus dahuricus</i>	Gaetbori	6	PB-226 (GG), PB-242 (CN), PB-391 (CN), PB-398 (IC), NIBR-47 (JN), NIBR-52 (JB)
<i>Elymus mollis</i>	Gaetgeuryeong	2	PB-390 (JN), PB-392 (CN)
<i>Elymus repens</i>	Goojoogaemil	9	PB-22 (GG), PB-111 (CN), PB-144 (IC), PB-181 (GW), PB-184 (GB), PB-217 (CN), NIBR-2 (IC), NIBR-36 (JJ), NIBR-43 (GB)
<i>Elymus tsukushiensis</i>	Gaemil	7	PB-6 (GG), PB-21 (GG), PB-25 (JN), PB-40 (GB), PB-71 (GG), PB-128 (GN), PB-182 (GB)
<i>Eragrostis</i>	Neunsoochamsaegyeureong	3	NIBR35 (JN), PB-258 (GG), PB-282 (GN)
<i>Eragrostis ferruginea</i>	Geuryeong	6	PB-101 (GG), PB-133 (GG), PB-191 (GB), PB-205 (CB), PB-323 (JJ), PB-372 (JB)

**Supplementary table 1.** The plant list used in this study (continued).

Scientific name	Korean name	No. of samples	Sample voucher*
<i>Eragrostis japonica</i>	Gaksigeuryeong	6	PB-374 (JB), PB-399 (GG), NIBR22 (JJ), NIBR23 (GN), NIBR32 (JJ), NIBR51 (GN)
<i>Eragrostis minor</i>	Jomsaegyeryong	5	PB-235 (GG), PB-236 (GN), PB-237 (JB), PB-238 (CN), PB-335 (GW)
<i>Eragrostis multicaulis</i>	Binoree	4	PB-82 (GG), PB-88 (GW), PB-163 (JB), PB-199 (GB)
<i>Eragrostis pilosa</i>	Keunbinoree	6	PB-131 (GN), PB-148 (GG), PB-178 (GW), PB-188 (GB), PB-211 (CB), PB-263 (JN)
<i>Eriochloa villosa</i>	Nadogaeppee	8	PB-116 (CN), PB-122 (GN), PB-185 (GW), PB-210 (CB), PB-216 (GB), PB-223 (GG), PB-299 (JJ)
<i>Festuca arundinacea</i>	Keungimeuteol	6	PB-35 (GW), PB-46 (GB), PB-47 (GG), PB-61 (GG), PB-162 (JB), PB-200 (GB)
<i>Hemarthria sibirica</i>	Soeichigipul	5	PB-121 (GN), PB-154 (JB), PB-225 (GG), PB-247 (CN), PB-358 (DG)
<i>Hierochloe odorata</i>	Hyangmo	4	PB-28 (GG), PB-379 (GW), NIBR-17 (CB), NIBR-59 (DG)
<i>Imperata cylindrica</i> var. <i>koenigii</i>	Ddee	5	PB-8 (GG), PB-16 (JN), PB-39 (GB), PB-75 (CN), PB-142 (IC)
<i>Isachne globosa</i>	Gijangdaepul	3	PB-102 (GG), PB-243 (CN), PB-362 (JN)
<i>Ischaemum antheophoroides</i>	Gaetsoeiboree	3	PB-222 (IC), PB-253 (CN), PB-305 (JJ), PB-306 (JJ)
<i>Ischaemum crassipes</i>	Soeiboree	2	PB-232 (JJ), PB-250 (CN)
<i>Leersia japonica</i>	Nadogyepul	5	PB-54 (CN), PB-73 (GG), PB-155 (JB), PB-262 (JN), PB-281 (GN)
<i>Leersia oryzoides</i>	Jomgyepul	3	PB-343 (GG), PB-370 (JB), NIBR1 1 (GN)
<i>Leersia oryzoides</i> var. <i>japonica</i>	Gyeopul	2	NIBR20 (GG), NIBR3 (GW)
<i>Leptochloa chinensis</i>	Drungsae	4	PB-373 (JB), NIBR9 (BS), NIBR4 6 (JJ), NIBR 62 (GW)
<i>Leptochloa fusca</i>	Gaetdrungsae	3	PB-151 (GG), PB-369 (JB), PB-397 (IC), NIBR5 (GW)
<i>Lolium multiflorum</i>	Jwibori	5	PB-18 (JN), PB-381 (JN), NIBR4 (IC), NIBR-18 (JJ), NIBR-42 (DG)
<i>Lolium perenne</i>	Homilpul	3	PB-66 (GG), NIBR-28 (JN), NIBR-55 (GW)
<i>Microstegium vimineum</i>	Minbaraengisae	2	PB-327 (JJ), PB-366 (GN)
<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	Mooluksae	2	PB-32 (GG), PB-125 (GN)
<i>Miscanthus sinensis</i> var. <i>purpurascens</i>	Uksae	3	PB-254 (GG), PB-273 (JN), PB-286 (GN)
<i>Oplismenus undulatifolius</i>	Jooreumjogaepul	4	PB-120 (GG), PB-160 (JB), PB-249 (CN), PB-274 (GN)
<i>Panicum bisulcatum</i>	Gaegijang	5	PB-292 (GG), PB-308 (JJ), PB-334 (GW), PB-364 (GN), PB-371 (JB)
<i>Panicum dichotomiflorum</i>	Migookgaegijang	5	PB-149 (GN), PB-150 (GG), PB-175 (JB), PB-192 (GB), PB-311 (JJ)
<i>Paspalum dilatatum</i>	Keunchamsaeppee	3	PB-301 (JJ), PB-302 (JJ), PB-321 (JJ)
<i>Paspalum distichum</i> var. <i>indutum</i>	Tulmoolchamsaeppee	3	PB-266 (JN), PB-326 (JJ), PB-352 (GN)
<i>Paspalum thunbergii</i>	Chamsaeppee	9	PB-134 (GG), PB-161 (JB), PB-177 (CB), PB-219 (JN), PB-230 (GG), PB-289 (JN), PB-290 (GN), PB-309 (JJ), PB-348 (GN)
<i>Pennisetum alopecuroides</i>	Sookeuryeong	5	PB-206 (GB), PB-212 (GW), PB-228 (GG), PB-269 (JN), PB-300 (JJ)
<i>Phalaris arundinacea</i>	Galpul	6	PB-43 (GB), PB-52 (CNPB-63 (GG), PB-84 (GW), NIBR-21 (JB), NIBR-48 (JB)
<i>Phragmites australis</i>	Galdae	5	PB-41 (GB), PB-48 (CN), PB-70 (GG), PB-124 (GN), PB-167 (JB)



**Supplementary table 1.** The plant list used in this study (continued).

Scientific name	Korean name	No. of samples	Sample voucher*
<i>Phragmites japonicus</i>	Dalbburipul	5	PB-44 (GB), PB-92 (GW), PB-107 (GG), PB-145 (IC), PB-168 (JB)
<i>Poa annua</i>	Saepoapul	8	PB-1 (GG), PB-17 (CN), PB-19 (JN), PB-67 (GG), PB-110 (CN), PB-189 (GW), PB-207 (CB), NIBR-15 (JJ)
<i>Poa pratensis</i>	Wangpoapul	3	PB-3 (GG), PB-27 (JN), PB-38 (GB)
<i>Polypogon fugax</i>	Seoidolpee	4	PB-26 (JN), PB-221 (JN), PB-382 (JN), NIBR-44 (GB)
<i>Polypogon monspeliensis</i>	Gaetsoeidolpee	2	PB-394 (CN), NIBR-49 (JN)
<i>Pseudoraphis ukishiba</i>	Mooljandee	3	PB-117 (GG), PB-203 (CB), PB-265 (JN)
<i>Setaria chondrachne</i>	Joajaabee	4	S154 (JJ), PB-261 (JB), PB-351 (GN), PB-349 (GN)
<i>Setaria faberi</i>	Gaeulgangajipul	5	PB-99 (GG), PB-109 (CN), PB-173 (JB), PB-319 (JJ), K235 (GN)
<i>Setaria glauca</i>	Geumgangajipul	4	PB-174 (JB), PB-255 (GG), S136 (GB), PB-318 (JJ)
<i>Setaria pallidifusca</i>	Ganeungeumgangajipul	4	PB-127 (GN), PB-172 (JB), S151 (GG), PB-310 (JJ)
<i>Setaria viridis</i>	Gangajipul	5	PB-77 (GG), PB-79 (CN), PB-87 (GW), PB-171 (JB), S135 (GB)
<i>Setaria viridis</i> var. <i>pachytachys</i>	Gaetgangajipul	2	PB-231 (GG), S152 (JJ)
<i>Sorghum halepense</i>	Siriasoosoesae	2	PB-260 (GG), PB-268 (JN)
<i>Spodiopogon cotulifer</i>	Gireumsae	4	PB-245 (CN), PB-272 (JB), PB-291 (GN), PB-339 (GG)
<i>Sporobolus fertilis</i>	Gwiggorisaeapul	7	NIBR7 (IC), NIBR14 (GG), PB-135 (GN), PB-166 (JB), PB-251 (CN), PB-288 (GN), NIBR 8(JJ)
<i>Themeda triandra</i> var. <i>japonica</i>	Solsae	5	PB-140 (IC), PB-214 (GB), PB-229 (GG), PB-248 (CN), PB-271 (JB)
<i>Trisetum bifidum</i>	Jamjaripee	13	PB-62 (GG), PB-72 (GG), PB-78(CN), PB-90 (GW), PB-157 (JB), PB-385 (JN), PB-386 (IC), PB-388 (GW), PB-393 (CN), NIBR-16 (GN), NIBR-24 (GN), NIBR-41 (GN), NIBR-50 (GB)
<i>Vulpia myuros</i>	Deulmooksae	8	PB-55 (CN), PB-74 (GG), PB-76 (CN), PB-139 (IC), PB-156 (JB), PB-378 (JJ), PB-380 (JN), PB-387 (IC)
<i>Zizania latifolia</i>	Jool	3	PB-152 (JB), PB-342 (GG), PB-347 (GN)
<i>Zoysia sinica</i>	Gaetjandee	5	PB-227 (GG), PB-252 (CN), PB-267 (JN), PB-283 (GN), PB-375 (JB)

\*GG: Gyonggi-do, CB: Choongchungbuk-do, CN: Choongchungnam-do, JB: Jeollabuk-do, JN: Jeollanam-do, GW: Gangwon-do, GB: Gyongsangbuk-do, GN: Gyongsangnam-do, JJ: Jeju-do, IC: Incheon, DG: Daegu