

RAPD 분석에 의한 고마리(마디풀과)의 유전적 변이 및 유연관계

김용현, 태경환, 김주환*

대전대학교 생명과학과

Genetic Variations and Relationships of *Persicaria thunbergii* (Sieb. & Zucc.) H. Gross ex Nakai (Polygonaceae) by the RAPD Analysis

Yong-Hyun Kim, Kyoung-Hwan Tae and Joo-Hwan Kim*

Department of Science, Daejeon University, Daejeon 305-716, Korea

Abstract - RAPD analyses were performed from twenty-four populations of *Persicaria thunbergii* (Sieb. & Zucc.) H. Gross ex Nakai. The length of amplified DNA fragments ranged from 200 to 1,900bp. 184 scorable RAPD markers were found from PCR reactions with sixteen random oligoprimers. Based on the results, populations of *Persicaria thunbergii* were classified into disturbance streams of urban and rural streams as well as natural streams. And the populations from natural streams showed having higher genetic similarites than those from highly disturbed streams. Also, the heterogenetic differences between the populations from natural and disturbed areas could be represented the results of the stream environmental changes.

Key words - Disturbance streams, Genetic similarites, Heterogenetic differences, Natural streams

서 언

마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 고마리 [*Persicaria thunbergii* (Sieb. & Zucc.) H. Gross ex Nakai]는 물가에 자라는 덩굴성 1년초로서 한국, 일본, 만주, 아무르, 우수리 등 온대지방에 주로 분포한다. 길이는 1m에 달하며 줄기에는 아래로 향한 가시가 존재하고, 잎은 짙은 녹색으로 털이 약간 있으며, 끝이 뾰족하고 엽저는 심장저이다. 꽃은 8~9월에 피며 10~20 개씩 뭉쳐 달리는 특징이 있다(Lee, 2003). 또한 해발고도 600m 이상인 산간계류지역에서부터 평지하천에 이르기까지, 자연성이 잘 보존된 지역에서 각종 인위적 교란이 일어난 곳까지 고루 분포하여 항시적으로 지역적 환경특성과 변화를 나타낸다. 수변식물로서 고마리의 이와 같은 특성을 이용하여 최근 분자생물학의 발달에 의해 생명공학기술을 환경생태분야에 접합시키는 시도에 활용할 수 있을 것으로 생각되나 아직까지는 분자유전학적 기술을 환경생태분야에 활용보다는 분류학적 논쟁 대상 해결에 이용되고 있는 실정이다. 지금까지는 환경평가에 생물지표를 이용하는 데는 한계가 있어서 대개 물리·화학적 분

석방법의 보조적인 자료로서만 활용되어 왔다. 현재까지 수환경의 평가 및 관리에 있어서도 주로 화학적 수질 항목 및 독성물질의 분석에 의존함으로써 하천생태계의 건전성에 대한 평가는 부분적이었으며, 특히 생태계의 기능에 대한 분석 부분은 매우 취약한 것이 현실이다. 따라서 개발 및 교란에 따른 환경 변화의 영향을 보완하기 위해 지표식물을 이용하여 각종 교란의 형태에 따른 수환경의 변화를 분석하고자 하였다. 우수생태계 내에서 환경의 교란(disturbance)은 생물군집의 구조와 기능을 결정하는 중요한 요인 중의 하나(Sousa, 1984; Lugthart and Wallace, 1992; Peterson and Stevenson, 1992; Townsend *et al.*, 1997)이므로, 각종 교란의 형태에 따른 수환경의 변화분석에 있어서 수변식물은 여러 가지 측면에서 그 유용성 높다. 환경 평가는 환경 속에 살고 있는 생물에 의해 평가될 때 환경 상태를 정확히 파악할 수 있으므로 분자유전학적 기술을 이용하여 환경 상태를 정확히 파악할 수 있다. 분자유전학적 기술 중 특히 RAPD(Williams *et al.*, 1990) 분석방법은 대상 분류군에 대한 지식이 없는 경우에도 이용 가능하며, 적은 시료로도 안정된 분석 결과를 산출할 수 있고, 발생단계와 무관하게 일정한 형태를 유지하고 있는 DNA의 특성으로 인해 성체뿐 아니라 어린개체나 환경변화에 변이성이 큰 대상의 분석에 활용이 가능하다. 또한 객관적 평가의 정확성 및 일관성을 확보할 수 있다는 장점이

*교신저자(E-mail) : sysbot@dju.kr

있다.

따라서 본 연구에서는 다년간의 현장조사를 통하여 이미 수변지표식물로 확인된 고마리를 이용하여 하천을 자연성이 잘 보전되고 있는 자연적 수환경과 각종 인위적 교란을 받고 있는 교란형 하천으로 구분하여, 고도에 따른 수환경의 특성 및 교란 유형에 따른 지역집단 간 유전적 유사성 및 유전적 변이를 알아보 고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 재료는 2003년도 10월부터 2004년도 9월 까지 인간 간섭이 거의 일어나지 않은 자연적 수환경(강원도 방태천, 용암천, 홍천강, 내촌천, 한탄강, 경기도 가평천 등) 15지역과 인간 간섭에 따른 환경영향을 받은 교란된 하천(경기도 북하천, 신내천, 안성천, 포천천, 곡릉천, 충북 달천강, 성황천, 서울 중랑천 등) 9지역 등 총 24지역의 자생지로부터 직접 채집하여 실험에 사용하였고, 재료로 사용된 증거표본은 대전대학교 생물학과 식물표본실(TUT)에 보관하였다(Table 1).

DNA 추출

DNA 추출을 위하여 채집된 식물의 잎은 얼음과 함께 ice box를 이용하여 실험실로 운반하였다. 채집된 잎은 액체질소를 넣어 막자사발로 파쇄 하였다.

DNA 추출은 2X CTAB method (Doyle and Doyle, 1987)를 다소 변형한 아래의 방법으로 실시하였다. 약 1.0g의 분말조직을 0.5% 2- β -mercaptoethanol이 첨가된 15ml의 extraction buffer(2% CTAB; 100mM Tris, pH 8.0; 50mM EDTA, pH 8.0; 500mM NaCl)에 넣은 후 65°C에서 20분간 incubation하며, 조직 내 phenol 화합물, 탄닌 등의 불순물을 제거하기 위하여, extraction buffer에 2% PVP-40을 첨가하였다. Incubation 후 SEVAC용액(chloroform:Isoamyl alcohol=24:1) 7.5ml를 첨가하여, 8,000g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하고 이 부피의 2/3이 되는 양의 isopropanol을 첨가한 후, -20°C에서 12시간 이상 보관하였다가 8,000g로 30분간 원심분리하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA pellet은 70% ethanol로 세척한 후 TE buffer(1M Tris, 0.5M EDTA, pH 8.0)에 용해하며, GeneClean kit (Bio 101 Inc., CA, USA)와 Chelex 100(Bio-Rad Lab., CA, USA)을 이용하

Table 1. Materials and collection data of *Persicaria thunbergii* populations which were used in this study

Environment	Stream types	Investigation sites	Symb.	Date				
Natural stream (NS)	Mountaineous (over 600m alt.)	Bangtae stream (Bangtaesan)	Upstream Midstream Downstream	NSU1 NSU2 NSU3	7-8 Aug. 2004			
		Mountaineous + Flattened (400~500m alt.)	Gapyeong stream (Myeongjisan)	Midstream Downstream		NSM1 NSM2	7-8 Aug. 2004	
				Flattened (below 300m alt.)		Hantan river (Cheolwon)		Upstream Midstream Downstream
	Mountaineous valley (over 600m alt.)	Yongam stream (Chiaksan)	Downstream		NSU4		4 Sep. 2004	
			Mountaineous + Flattened (400~500m alt.)		Naecheon stream (Heoingseong)			Upstream Midstream Downstream
	Flattened (below 300m alt.)	Hongcheon river (Hongcheon)		Upstream Midstream Downstream		NSD4 NSD5 NSD6	5 Sep. 2004	
				Disturbance stream (DS)		Rural (by <i>Oryza sativa</i>)		Bokha stream (Icheon)
			Rural (by orchards)		Dalcheon river (Chungju)	DSV2		30 Oct. 2003
	Rural (by animal farms)	Maegok (Icheon)	DSV3		31 Oct. 2003			
	Disturbance stream (DS)	Urban (mid.-small city)	Sinnae stream (Yangpyeong)	DSC1		30 Oct. 2003		
Urban (Big city)		Jungrang stream (Seoul)	DSC2	2 Oct. 2004				
Rural (by <i>Oryza sativa</i>)		Anseong stream (Anseong)	DSV4		2 Oct. 2004			
Rural (by orchards)		Seonghwang stream (Goisan)	DSV5				2 Oct. 2004	
Rural (by animal farms)		Pocheon stream (Pocheon)	DSV6					3 Oct. 2004
Urban (mid.-small city)		Gokrueng stream (Paju)	DSC3					

*NSU: Up of Natural Stream, NSM: Middle of Natural Stream, NSD: Down of Natural Stream, DSC: Disturbance Stream at City, DSV: Disturbance Stream at Village

여 DNA를 정제 하였다. 정제된 DNA는 0.7% Agarose gel로 전기영동한 후 1% EtBr로 염색하여 UV illuminator상에서 관찰하였다.

PCR 및 DNA 증폭

추출된 DNA로부터 RAPD절편의 증폭반응은 Perkin-Elmer 9700 thermal cycler에서 수행되었다. PCR반응은 전체 25 μ l 부피로 행하며, 10~50ng DNA, 1 unit Taq DNA Polymerase, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.5 μ M primer 및 200 μ M의 각 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 등이 포함되어 있다. Primer는 NAPS (University of British Columbia)에서 제작된 No. 1-100의 10-mer oligoprimer를 이용하였으며, 다음의 PCR반응에 사용되었다. ① 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 pre-denaturation, ② 94 $^{\circ}$ C에서 1분간, 44 $^{\circ}$ C에서 2분간, 72 $^{\circ}$ C에서 2분으로 구성된 amplifying cycle을 35회 반복, ③ 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분동안 extension으로 구성된 3단계의 PCR과정을 거쳐 DNA product를 만들어 내었다. 이때 각각의 primer에 대한 상기의 PCR 과정을 통한 screening을 실시하여, 선택된 primer별로 3회 이상의 반복실험을 수행하여 재현성이 뚜렷한 것만을 유용한 primer로 결정하였다. PCR을 통하여 합성된 DNA product는 1 \times 10⁻⁴% EtBr이 포함된 1.5% agarose gel로 전기영동하여 UV-illuminator상에서 100bp marker와 함께, 1D-PCR program(Kodak Software, 2002)을 이용하여 band의 정확한 위치와 존재유무 및 크기를 확인하고 이를 촬영하였다.

자료분석

RAPD결과는 전기영동화면에 나타난 각 band를 하나의 형질로 취급하여 유, 무에 따라 각기 1과 0으로 표시하고, 전체 OTU에 대한 자료행렬을 작성하였으며, PAUP*4.0(version 4.08b; Swofford, 2001)을 이용하여, UPGMA방법에 의한 phenogram를 작성하여 각 OTU간의 유전적 유사성을 검토하였다.

결과 및 고찰

수환경 변화에 따른 지표식물인 고마리의 지역개체군별 분자 마커분석을 위하여 RAPD 분석방법을 수행하였다. 본 연구는 UBC-NAPS(University of British Columbia - Nucleic Acid Product System)의 10-mer oligo primer 100개(No. 1-100)를 사용하여 실시하였으며, 일차적으로 100개의 primer를 screening한 후, PCR반응 여부에 따라 반응에 적합한 primer를 선별하였다. 이후 선별된 primer를 대상으로 3회의 반복실험을 통하여 지속적인 반응이 일어난 primer는 16개였다. 24지역의 고마리개체군이 PCR과정을 통하여 증폭된 RAPD 절편들은 200bp에서 1,900bp 사이의 구간에서 주로 관찰되었다(Fig. 1). RAPD marker의 수는 총 184개였으며, 각 primer마다 1-19개로 다양하게 나타났고(Table 2), 취급된 개체군사이에 동일하거나 서로 다른 밴드양상이 관찰되었다.

RAPD 분석에 의한 유전적 비유사도 지수행렬에 의하면, 고마리 개체군은 자연적 수환경에서는 비유사도지수가 0.029에서

Table 2. The code and sequences of primer analysed, total number of bands and fragment size which were used in *Persicaria thunbergii*

Primer	Sequence (5' → 3')	Total no. of bands	Fragment size range (bp)
4	CCT GGG CTG G	10	600-1600
17	CCT GGG CCT C	14	300-1200
23	CCC GCC TTC C	8	400-1600
29	CCG GCC TTA C	18	200-1200
31	CCG GCC TTC C	9	500-1200
34	CCG GCC CCA A	9	500-1500
55	TCC CTC GTG C	1	400
60	TTG GCC GAG C	8	300-1500
63	TTC CCC GCC C	19	300-1900
65	AGG GGC GGG A	12	400-1700
72	GAG CAC GGG A	11	600-1800
73	GGG CAC GCG A	9	400-1700
81	GAG CAC GGG G	13	500-1600
82	GGG CCC GAG G	13	600-1900
83	GGG CTC GTG G	13	500-1500
96	GGC GGC ATG G	17	400-1600
Total		184	
Mean/primer		11.5	

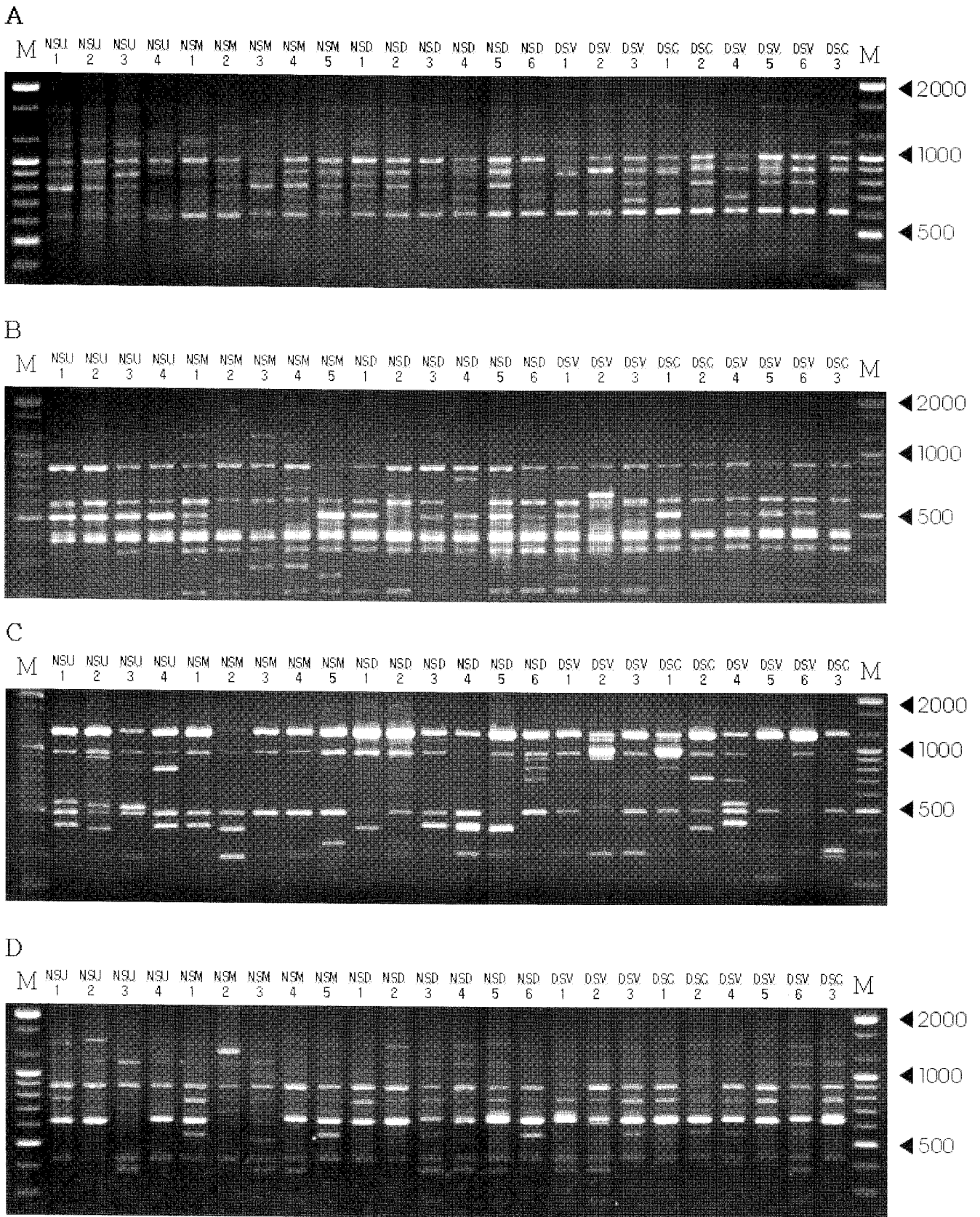


Fig. 1. RAPD electrophoresis photograph for populations of *Persicaria thunbergii*. Refer the abbreviations in Table 1. (M: molecular markers ; A, primer No. 4 ; B, primer No. 17 ; C, primer No. 29 ; D, primer No. 34).

Table 3. Genetic dissimilarity matrix calculated by Nei and Li's (1972) genetic coefficient based on RAPDs analysis of *Persicaria thunbergii*

	NSU1	NSU2	NSU3	NSU4	NSM1	NSM2	NSM3	NSM4	NSM5	NSD1	NSD2	NSD3	NSD4	NSD5	NSD6	DSV1	DSV2	DSV3	DSC1	DSC2	DSV4	DSV5	DSV6	DSC3	
NSU1	-																								
NSU2	0.029	-																							
NSU3	0.043	0.036	-																						
NSU4	0.044	0.050	0.052	-																					
NSM1	0.048	0.058	0.062	0.032	-																				
NSM2	0.051	0.049	0.046	0.042	0.049	-																			
NSM3	0.057	0.055	0.058	0.053	0.051	0.043	-																		
NSM4	0.057	0.058	0.072	0.051	0.045	0.053	0.047	-																	
NSM5	0.057	0.051	0.068	0.058	0.052	0.055	0.058	0.030	-																
NSD1	0.047	0.039	0.042	0.046	0.045	0.053	0.049	0.047	0.041	-															
NSD2	0.058	0.052	0.067	0.052	0.045	0.059	0.044	0.039	0.030	0.038	-														
NSD3	0.060	0.060	0.064	0.056	0.057	0.053	0.048	0.056	0.066	0.044	0.062	-													
NSD4	0.054	0.059	0.054	0.050	0.061	0.054	0.041	0.048	0.055	0.041	0.052	0.043	-												
NSD5	0.059	0.057	0.073	0.053	0.051	0.057	0.053	0.037	0.034	0.045	0.032	0.065	0.054	-											
NSD6	0.062	0.055	0.061	0.049	0.041	0.061	0.051	0.039	0.034	0.036	0.035	0.064	0.053	0.033	-										
DSV1	0.080	0.073	0.073	0.063	0.069	0.091	0.077	0.063	0.062	0.057	0.066	0.076	0.067	0.052	0.040	-									
DSV2	0.071	0.063	0.062	0.060	0.065	0.069	0.069	0.051	0.051	0.046	0.040	0.078	0.054	0.042	0.040	0.051	-								
DSV3	0.065	0.062	0.073	0.058	0.064	0.068	0.058	0.046	0.042	0.053	0.046	0.078	0.060	0.041	0.037	0.031	0.036	-							
DSC1	0.069	0.064	0.068	0.060	0.058	0.073	0.067	0.045	0.043	0.048	0.042	0.071	0.055	0.042	0.040	0.044	0.031	0.032	-						
DSC2	0.066	0.061	0.065	0.062	0.062	0.061	0.064	0.055	0.057	0.052	0.049	0.073	0.058	0.041	0.041	0.053	0.042	0.046	0.041	-					
DSV4	0.098	0.101	0.096	0.083	0.086	0.082	0.081	0.077	0.088	0.084	0.088	0.073	0.077	0.081	0.074	0.075	0.075	0.069	0.067	0.061	-				
DSV5	0.066	0.069	0.072	0.069	0.068	0.064	0.062	0.059	0.061	0.070	0.073	0.072	0.064	0.061	0.051	0.046	0.063	0.047	0.053	0.049	0.057	-			
DSV6	0.059	0.065	0.066	0.058	0.049	0.068	0.063	0.049	0.048	0.060	0.046	0.069	0.065	0.044	0.046	0.057	0.052	0.040	0.048	0.042	0.062	0.039	-		
DSC3	0.058	0.069	0.065	0.066	0.050	0.067	0.070	0.052	0.052	0.057	0.051	0.080	0.064	0.047	0.045	0.053	0.049	0.044	0.047	0.050	0.064	0.044	0.025	-	

0.073의 유전적 상이성을 나타내었고, 교란된수환경에서는 0.025에서 0.075의 낮은 상이성을 나타내어서 같은 수환경내에서 높은 유전적 유연관계를 보였으며, 자연적 수환경과 교란된 수환경에서는 0.037에서 0.101의 상이성을 나타내어, 자연적 수환경과 교란된 수환경 사이의 비유사도 지수의 큰 차이는 보이지 않았으나 서로 다른 수환경끼리는 유전적으로 거리가 있는 것으로 나타났다(Table 3).

RAPD 분석결과를 기초로 UPGMA방법에 의한 유집분석을 수행한 결과, 고마리 개체군은 크게 3종류의 유집군을 형성하는 것이 관찰되었다. 첫 번째는 자연적 수환경집단의 상류지역과 일부 중류지역의 고마리가 하나의 유집군(group I)을 형성하였고, 두 번째는 자연적 수환경집단의 하류지역과 일부 중류지역에 분포하는 고마리의 유집군(group II)였으며, 마지막으로 교란된 수환경 집단으로 뚜렷한 유집군(group III)을 형성하였다(Fig. 2). 특기할만한 사항은 군집별로 유집되는 형태가 자연적 수환경의 중·하류군집과 교란된수환경군집이 유집된 후 최종

적으로 자연적 수환경의 상류군집과 유집되는 것으로 나타났다. 이는 자연적 수환경의 중·하류지역으로 분류된 지역이 하류지역의 오염원에 의하여 교란되어 나타난 결과로 해석될 수도 있다. 하지만, 각각의 고마리 개체군은 유사한 수환경 내에서는 유전적으로 거리가 가까운 것으로 나타났으며, 다른 수환경간에는 유전적인 차이를 나타내어 이들 사이의 유전적 이질성(heterogenetic difference)이 있는 것으로 생각된다. 또한, group I 이 생육하는 자연적 수환경지역에 대한 보전대책의 수립마련이 우선적으로 검토되어야 하며, group III가 생육하는 지역의 하천 복원에 있어서 유사한 입지의 자연적 수환경과의 비교검토가 절실히 필요한 것으로 생각된다.

이와 같은 결과는 인간의 간섭이 거의 일어나지 않았다고 판단되는 자연적 수환경과 교란된 수환경에 생육하는 고마리 개체군간에 뚜렷한 유전적 거리가 있음을 나타내었고, 이와 더불어 자연적 수환경 중류와 하류가 많은 인간간섭에 훨씬 더 쉽게 노출되어 있다는 것을 알 수 있었다.

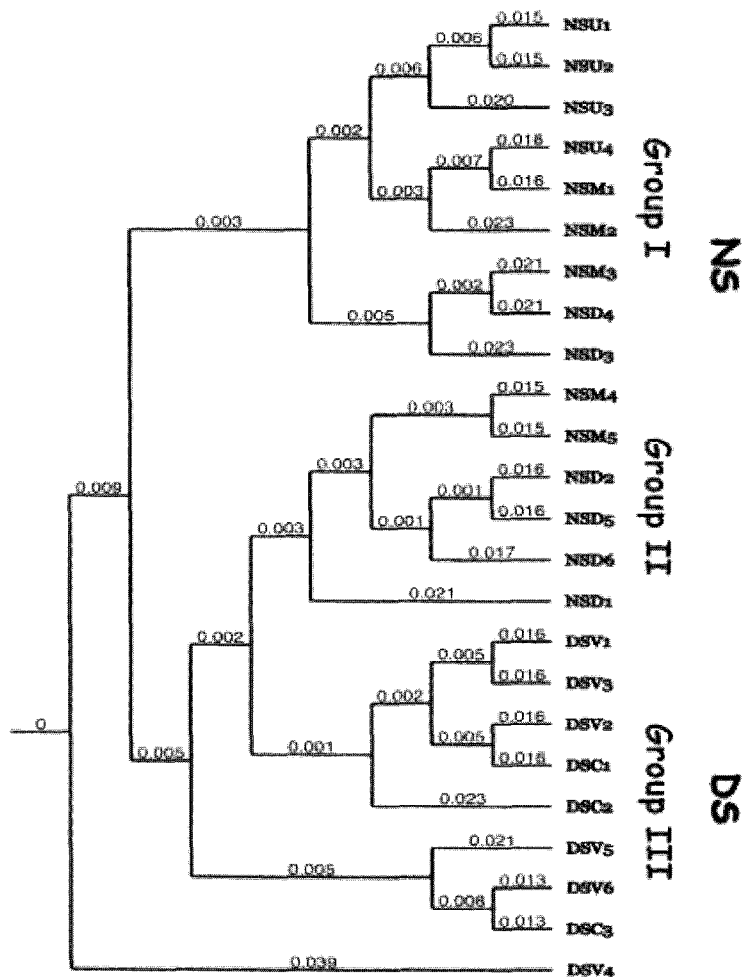


Fig. 2. A UPGMA phenogram of 24 populations of *Persicaria thunbergii* based on RAPD analysis.

적 요

고마리의 24개 지역집단으로부터 PCR을 통한 RAPD 분석을 실시하였다. PCR을 통해 증폭된 RAPD절편들은 200-1, 900bp 사이의 구간에서 관찰되었다. 총 16개의 oligoprimers를 이용한 효소중합반응에서 184개의 유효한 polymorphic band markers를 확인하였다. RAPD 분석결과를 기초로 UPGMA 방법에 의한 유집분석을 수행한 결과, 고마리 개체군은 교란형 하천(도시하천, 농촌하천)과 자연적 수환경으로 유집되었고, 교란형 하천 보다 자연적 수환경의 고마리 개체군끼리 유전적 유연 관계가 높은 것으로 나타났다. 또한 자연적 수환경과 교란형 하천에 생육하는 고마리 개체군간에 뚜렷한 유전적 한계를 나타내어 이들 사이의 유전적 이질성이 있는 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 환경부 차세대핵심환경기술개발사업의 연구비 지원(052-031-017)으로 수행되었습니다.

인용문헌

Doyle, J. J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation methods for

small quantities of fresh tissues. *Phytochemical Bulletin*. 17: 144-163.

Lee, T. B. 2003. *Coloured Flora of Korea*. pp. 264 (in Korean).

Lugthart, G. J. and J. B. Wallace. 1992. Effects of disturbance on benthic functional structure and production in mountain streams. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 19: 138-164.

Peterson, C. G. and R. J. Stevenson. 1992. Resistance and resilience of lotic algal communities: importance of disturbance timing and current. *Ecol.* 73: 1445-1461.

Sousa, W. P. 1984. The role of disturbance in natural communities. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 353-391.

Townsend, C. R., M. R. Scarsbrook and S. Doledec. 1997. Quantifying disturbance in streams: alternative measures of disturbance in relation to macroinvertebrate species traits and species richness. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 16: 531-544.

Williams, J., A. Kubelik, J. Rafalski and S. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6231-6239.

(접수일 2007. 12. 7; 수락일 2007. 12. 26)