

# RAPD방법에 의한 서양민들레 생육지별 유전적 변이 분석

## Analysis of genetic variance among *Taraxacum officinale* growing in each populated areas using RAPD

안영희<sup>1\*</sup> · 정규환<sup>1</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 생물자원과학계열

### I. 연구목적

민들레속 식물은 국화과(Compositae)의 민들레아과(Liguliflorae)에 속하는 쌍자엽성 다년생 초본식물로 전 세계적으로 약 200여종이 알려져 있으며 주로 북반구를 중심으로 온대지역에서 한대지역에 걸쳐 광범위하게 분포한다. 우리나라에는 민들레(*Taraxacum mongolicum*), 좁민들레(*T. hallasanensis*), 산민들레(*T. ohwianum*), 흰민들레(*T. coreanum*) 등 4종의 자생 민들레와 서양민들레 (*T. officinale*) 및 붉은씨서양민들레(*T. laevigatum*) 등의 귀화 종 2종이 생육하는 것으로 밝혀져 있다. 대부분의 민들레속 식물은 햇볕이 잘 드는 길 가장자리 및 초지대 혹은 인위적인 간섭이 심한 개활지 등에 흔히 자라는 식물로 예로부터 어린 잎을 식용하거나 약용, 관상용 등으로 이용되던 친숙한 식물이다. 그러나 최근 지구 사회의 국제화와 더불어 유럽으로부터 귀화종 민들레가 유입되어 전국적으로 자라고 있다. 일반적으로 귀화식물은 생태 전략적으로 성질이 강건하고 번식 효율이 상대적으로 높아 자생 종과의 경쟁에 있어서 종종 고유 생태계의 교란을 일으키는 경우가 많다. 이미 안 등(2002)은 민들레속 식물에서 RAPD 방법을 통해 자생종과 귀화종 사이에서 형태적으로는 물론 유전적으로 차이를 나타내는 것으로 보고한 바 있다.

대부분의 민들레속 식물은 유성생식과 단위생식을 겸비하는 식물로 보고되어 있다. 특히 서양민들레 및 붉은씨서양민들레 등의 귀화종은 단위생식에 의해 화분 분산자가 없는 불리한 환경하에서도 번식전략적 적응도가 매우 높아 오늘날 전 세계적으로 널리 분포되어 있는 식물종이 되었다. 특히 비휴면성인 서양민들레 종자는 자생종 민들레에 비해 종번식이 상대적으로 유리한 것으로 보고되어 있다(안과 최, 2000). 현재 우리나라 대부분의 지역에서는 귀화식물인 서양민들레 및 붉은씨서양민들레가 차지하고 있으며, 자생종 민들레류는 급격히 사라지고 있다. 이와 같은 결과는 단순히 귀화종 민들레류와의 생태적인 경쟁에서 자생종들이 도태되었거나 유전적으로 종간의 교잡에 의한 열성인자로 작용하는 자생종 민들레류의 형질적인 도태 가능성이 제시되고 있다. 그러나 민들레속 식물의 형태학적인 분류가 까다롭기 때문에 외관상의 관찰만으론 그 구체적인 내용을 밝히기 매우 어렵다. 그러므로 본 연구

에서는 특정 DNA를 단시간에 증폭시켜 생물 종간 또는 개체간의 유전적 변이를 규명할 수 있는 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA Analysis) 분석법을 이용하여 전국적으로 분포하고 있는 서양민들레의 생육지에 따른 유전적 변이를 밝히고자 시도하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시재료

자생민들레인 민들레, 산민들레 2종을 비롯하여 귀화종인 서양민들레를 우리나라 9개 지역에서 채집하여 신선한 잎을 채취, 4℃의 냉암실에 72시간 동안 보존하여 다당류를 제거한 다음 -74℃의 deep freezer에 저장하고 이를 RAPD 분석재료로 사용하였다.

Table 1. Material used for morphological and RAPD analysis

Species	Location	Collection date
민들레	국립수목원(포천)	2001. 3
산민들레	국립수목원(포천)	2001. 3
서양민들레 1	Kew garden(영국)	2001. 5
서양민들레 2	서울시 종각	2001. 8
서양민들레 3	광교산(경기도 수원시)	2001. 9
서양민들레 4	오산(미군기지주변)	2001. 9
서양민들레 5	평택항(경기도)	2001. 9
서양민들레 6	중앙대학교 교정(안성)	2001. 7
서양민들레 7	서운산(경기도 안성)	2002. 4
서양민들레 8	충남대학교 교정(대전)	2001. 8
서양민들레 9	부산대학교(부산)	2002. 5

### 2. DNA 추출

Deep freezer에 저장된 민들레 잎 조직 0.5g을 액체질소와 함께 충분히 마쇄한 후, DNA 추출용액(0.2M Tris-HCl, 0.05M EDTA, pH 8.0, 0.5M NaCl, 0.5% SDS)을 첨가하여 혼합하고 65℃에서 1시간 배양한 다음 4℃에서 12,000rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액만을 분리하였다. 상층액과 동량의 Chloroform : Phenol (1 : 1)을 넣어 20분간 실온에서 혼합시킨 후 4℃에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액만을 취했다. 상층액의 2배에 해당하는 ethanol을 첨가하여 잘 섞은 다음 -20℃에서 1시간 동안 두었다가 4℃에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 pellet를 건조시킨 후 1X TE

buffer를 넣어 용해한 다음 RNase (10 $\mu$ g/mL)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 처리하였다. 반응량의 1/10에 해당하는 3M sodium acetate를 첨가한 후, 최종 량의 2배에 해당하는 ethanol을 넣고 섞은 후 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 두었다가 4 $^{\circ}$ C에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거한 다음 70% ethanol을 넣어 혼합한 후 4 $^{\circ}$ C에서 12,000rpm으로 다시 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 다음 pellet은 실온에서 건조시킨 후 TE buffer에 녹여 4 $^{\circ}$ C에 보관하여 사용하였다.

### 3. DNA 증폭

PCR에 사용된 primer는 Operon사의 10-mer primer kit를 사용하였다. 본 연구에 사용된 일부 primer의 염기 서열과 GC content(%)는 별도의 표에 나타내었다. 10개의 염기 서열로 구성된 random primers(Operon Technologies Co., USA)를 이용한 각 민들레 종들의 PCR 반응은 다음과 같다. 각 종들의 genomic DNA 50ng, 10 $\times$ buffer 2.5 $\mu$ l, 2mM MgCl<sub>2</sub> 2 $\mu$ l, 2mM dNTP 2 $\mu$ l, random primer 20ng, Taq polymerase 1unit를 각각 혼합한 후 최종 량을 25 $\mu$ l로 하여 반응하였다. DNA 증폭 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation한 후, 95 $^{\circ}$ C에 1분, 35 $^{\circ}$ C에 2분, 72 $^{\circ}$ C에 2분간 반응시켜 총 55 cycles를 반복한 다음 72 $^{\circ}$ C로 10분간 extension하여 특정 DNA band들을 증폭하였다. 사용한 PCR 장치는 MWG-Biotech사의 Primus 96Plus (Germany)를 사용하였으며, mineral oil은 사용하지 않았다.

Table 2. List of arbitrary 10-mer primers used in this RAPD analysis.

Operon primer No.	Sequence(5' to 3')	GC content(%)
OPA-01	CAGGCCCTTC	70
OPB-01	GTTTCGCTCC	60
OPC-01	TTCGAGCCAG	60
OPD-01	ACCGCGAAGG	70
OPE-01	CCCAAGGTCC	70
OPF-01	ACGGATCCTG	60
OPO-01	GGCACGTAAG	60
OPS-01	CTACTGCGCT	60
OPW-01	CTCAGTGTCC	60
OPAA-01	AGACGGCTCC	70
The others 10 ea.		

#### 4. 생육지별 서양민들레의 유연관계 분석

증폭된 DNA는 EtBr(ethidium bromide)을 포함한 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 UV transilluminator로 출현한 밴드를 확인한 후, polaroid 카메라로 촬영하였다. 증폭되어 분리된 밴드의 분자량은  $\lambda$ DNA/HindIII DNA stand marker로 추정하였다. 분자량에 따른 밴드의 유무를 확인하고 기초자료 행렬을 작성한 후 이를 근거로 Treecon을 이용해 계산하여 유사도 값을 구하고, UPGMA(Unweighted pair-group method with arithmetic average) 방법으로 phenogram을 작성하여 비교 검토하였으며 결과를 임의로 100 반복하는 Bootstrap 방법으로 분석하였다.

### III. 결과 및 고찰

본 실험의 결과 125~2322bp에서 다양한 다형성 밴드들이 관찰되었다. 선택한 primer 중 OPD 16, OPS 1을 제외한 임의의 primer 20개 중 다형성 밴드가 나타나는 primer 10개를 선발하여 이를 토대로 서양민들레의 생육지에 따른 유전적 변이에 대한 RAPD 실험을 수행하여 총 40개의 polymorphic band가 나타났다. 서양민들레의 생육지별 개체의 RAPD 분석 결과로는 자생종 S1, S2와 귀화종 서양민들레 S3~11까지 2군으로 나누어지며 동일종에서도 형태적으로 동일하지만 지역간의 종내 유전적 변이가 일어났음을 확인할 수 있었다.

또한 자생종 민들레와 지역별 서양민들레의 비유사 계수를 살펴본 결과, 가장 가까운 것은 S1인 민들레와 S2인 산민들레로 비유사계수가 5.556이며 가장 먼 것으로는 산민들레인 S2와 수원 광교산의 서양민들레인 S5가 42.857로서 가장 먼 것으로 나타났다. 지역간 서양민들레의 유전적 변이에 있어서 원종인 S3을 기준으로 했을 때 도시화가 많이 이루어진 S4와 인위적인 간섭이 적은 장소인 S5와 S9의 산간지역에서 변이가 더 많이 발생한 것을 알 수 있었으며, 반면에 도시화가 진행중인 곳에서의 유전적 거리가 낮게 나타났다.

또한 Bootstrap방법으로 분석한 결과 자생종민들레와 서양종민들레는 독립적으로 분리되어 있으며 민들레 S1과 산민들레 S2는 100% 연결되어 있으며 지역별 서양민들레 산에서 서식하고 있던 서양민들레인 S5와 S9변이 94% 연결되어 있고 영국 Kew Garden의 서양민들레인 S3과 S4, 6, 7, 8, 10, 11 경우는 매우 낮은 연결 값을 나타냈다.

이와 같은 결과는 경쟁자들에 대한 서양민들레 생태형들의 반응과 경쟁자들의 반응, 유전적인 구조가 생물학적인 환경에 의해 영향을 받을 수 있다는 것을 감안하고 생태형 사이에서 보이는 생물학적인 환경에 대한 서로 다른 반응은 개체군내에 일조 한다고 한다. 또한 오랜 시간이 흐르는 동안 환경적인 요인에 의해 또는 진화에 의해 많은 유전적인 변이가 발생할 수도 있다. 그러므로 도심지라도 종간 생태적 경쟁과 생물학적인 환경변이가 적은 안성, 대전, 부산 등의 대학교정에서 유전적변이가 적은 것으로 사료된다. 그리고 한국에 서식

하는 서양민들레들은 환경적 교란이 심하고 사람들의 왕래가 빈번한 도심지역에서 변이가 심해지고 인위적인 교란은 적지만 충해, 포식자, 그리고 중간 경쟁자들이 무생물적인 요인들에 의해 조절될 수도 있지만, 그들의 조성과 풍부성 또한 식물의 환경에 직접적인 영향을 미치게 되므로 산간지역에서도 유전적인 변이가 높게 나타난 것으로 사료된다. 귀화식물인 서양민들레가 최근 수십년 동안에 급속한 경제성장과 더불어 각지에서 도시화가 크게 진행되었기 때문에 자연환경의 입지가 교란되어 경관이 크게 변모된 곳인 도심지나 무역항, 외국 군기지, 학교 주변 등지에서 외래 식물인 귀화식물이 종과 군락레벨에서 크게 번무하여 귀화중심을 이루고, 다시 그곳을 거점으로 하여 각종 매체에 의해 분포를 확대하여 자생식물의 생태적 지위가 위협을 받게 되고, 더욱이 그러한 입지가 귀화식물로 완전히 대체 되는 현상에서 관찰되어 교통량이 비교적 적고 인간에 의한 환경압과의 관계를 해석하는데 유효한 실험이 될 것이라 사료된다.

## 참고문헌

1. 안영희, 박대식, 정규환. 2002. RAPD 방법에 의한 자생종 민들레류와 귀화종 민들레류의 유연관계 분석. 한국환경생태학회 학술논문발표논문집 76-79.
2. 안영희, 최광율. 2002. 자생 민들레류와 서양민들레 종자의 발아특성 차이. 한국환경생태학회지 14(3) : 199-204.