

돼지풀 및 단풍잎돼지풀의 ITS 염기서열 변이

김영동^{1*} · 박종욱² · 선병윤³ · 김기중⁴ · 이은주² · 김성희¹

한림대학교 생명과학과¹ · 서울대학교 생명과학부² · 전북대학교 생물과학부³
고려대학교 생명공학원⁴

국내에 분포하는 대표적 침입외래식물인 돼지풀과 단풍잎돼지풀이 나타내는 유전적 변이양상을 파악하기 위해 국내집단을 중심으로 돼지풀 157개체와 단풍잎돼지풀 46개체로부터 핵 rDNA의 ITS(Internal Transcribed Spacer)지역 염기서열을 분석하였다. 그 결과 돼지풀에서는 총 18개의 ITS 유형이, 단풍잎돼지풀에서는 4 개의 유형이 각각 검출되었다. 돼지풀의 경우 각각의 ITS 유형 간에는 1bp에서 7bp까지 차이가 나는 것으로 확인되었으며, 단풍잎돼지풀의 경우 각 유형 간에 1bp에서 2bp의 차이가 발견되었다. 돼지풀의 국내집단에서 18개에 이르는 다양한 ITS 유형이 검출되었다는 사실은 이 종이 우리나라에 여러 차례 반복해서 유입했기 때문인 것으로 풀이된다. 한편 일부 ITS 유형은 유전적 재조합에 의해 형성되었을 가능성이 있으며, 각각 한 개체에서만 발견된 12개의 소수 유형들은 점돌연변이 또는 그에 뒤이은 유전적 재조합에 의해 국내에서 독자적으로 기원했을 것으로 추정된다. 본 연구를 통해 침입과정에서 나타나는 돼지풀의 진화적 변화를 이해하는데 필요한 유용한 유전적 기초정보가 확보되었다.

주요어 : 돼지풀, 단풍잎돼지풀, ITS 변이, 유전적 재조합

돼지풀속(*Ambrosia* L.)은 국화과(Asteraceae)의 해바라기족(Heliantheae), 돼지풀아족(Ambrosinae)에 속하며, 전 세계적으로 약 30종이 분포하는데 지중해 지역에 자생하는 한 종(*A. maritima* L.)을 제외한 나머지 종은 모두 신대륙에 자생하고, 특히 북미지역에 가장 많은 종이 분포하는 것으로 알려져 있다(Payne, 1964; Robinson, 1981; Mabberley, 1990). 돼지풀아족 식물의 꽃은 풍매화이며, 취약응애가 특징인 국화과에 속하면서도 약이 분리되는 특성을 나타내는데 이 아족에는 돼지풀속 이외에 *Euphrosyne*, *Hymenoclea*, *Iva*, *Xanthium*, *Parthenium* 등이 포함된다(Robinson, 1981). 돼지풀속 식물가운데 국내에 귀화되어 분포하는 돼지풀(*Ambrosia artemisiifolia* L.)과 단풍잎돼지풀(*Ambrosia trifida* L.)은 일년생 초본으로 북미가

*교신저자 : 전화: (033) 248-2095, 전송: (033) 256-3420, ydkim@hallym.ac.kr

접수: 2005년 11월 24일, 완료: 2005년 12월 14일

원분포지이며, 우리나라에는 1960년대 이후부터 돼지풀을 시작으로 하여 중부지방을 중심으로 발견되기 시작했다(Park *et al.*, 2002). 이들은 물이나 새에 의해 다른 지역으로 산포되지만 많은 경우 인간의 활동에 의해 확산되는 것으로 알려져 있는데(Bassett and Crompton, 1975), 우리나라의 경우 단풍잎돼지풀이 주로 중부지방의 습기가 많은 토양에 그 서식지가 제한되는 반면, 돼지풀은 제주도와 울릉도를 포함한 전 지역의 길가나 내대지에 퍼져있다.

이들 종은 이입된 생육지에서 강한 생존능력을 나타내어 정착한 후 다수의 종자생산과 높은 종자발아율, 빠른 생육속도 등을 통해 농작물의 재배에 피해를 주거나 생육지역 내의 기존 종들을 모두 몰아냄으로써 군락의 종 조성을 현저히 낮춘다(Paek *et al.*, 1999). 또한 이들은 다량의 꽃가루 산포를 통해 늦여름과 초가을 사이에 인체알레르기를 유발함으로써 인간생활에 막대한 피해를 입히고 있어 우리나라의 국가지정 '생태계 위해 외래동식물' 가운데 가장 위해성이 높은 식물로 평가되고 있다(Koh *et al.*, 2000).

돼지풀 및 단풍잎돼지풀에 대한 그동안의 국내 연구는 Lim and Chun (1980)의 연구를 시작으로 Paek *et al.* (1999), Koh *et al.* (2000), Park *et al.* (2002)의 연구에 이르고 있다. 그러나 이들 연구는 주로 전체 외래식물의 분포를 조사하면서 이루어졌던 것이며 돼지풀이나 단풍잎돼지풀 자체에 대한 유전학적, 진화적 연구는 아직까지 이루어지지 못한 상태다.

한편, 외국의 경우 외래식물에 대한 생태학적 연구는 비교적 빈번하게 이루어지고 있으나 유전학적 및 진화학적 연구는 매우 드문 실정이라서 외래식물에 대한 집단유전학적 연구 역시 초기단계라고 말할 수 있다. 외래식물 집단에 대한 유전학적 연구는 빠르게 진행되는 진화를 이해하는데 아주 적절한 기회를 제공할 뿐만 아니라 (Ellstrand and Schierenbeck, 2000) 효과적인 생물학적 방제(biological control)에 대한 암시를 던져준다는 점에서 (Müller-Schärer *et al.*, 2004) 그 중요성이 더해가고 있다. 최근에 Meekins *et al.* (2001), Novak and Mack (2001), DeWalt and Hamrick (2004), 그리고 Maron *et al.* (2004)에 의해 각각 *Alliaria petiolat* (M. Bleb.) Cavara & Grande (십자화과), *Bromus tectorum* L. (벼과), *Clidemia hirta* (L.) D. Don (Melastomataceae), *Hypericum perforatum* L. (물레나물과)에 대한 유전학적 연구가 이루어진 바가 있는데, 이들은 동위효소를 이용하거나 ISSR, AFLP 등을 통해 DNA 변이를 연구함으로써 외래식물 개체군의 유전적 특징을 규명하고 이들의 기원 및 진화에 대한 논의를 진행한 것들에 해당한다.

본 연구에서는 국내에 분포하는 대표적 침입외래식물인 돼지풀과 단풍잎돼지풀이 나타내는 유전적 변이양상을 파악하기 위해 핵리보솜의 ITS(Internal Transcribed Spacer)지역의 염기서열 분석을 수행하였다.

재 료 및 방 법

국내에 분포하는 돼지풀속 식물의 ITS 지역 염기서열 변이를 조사하기 위해 돼지풀의 경

Table 1. Collection data and ITS types of *Ambrosia artemisiifolia*(Aa) and *A. trifida*(At) for the genetic variation studv.

DNA no.	Locality	ITS type	DNA no.	Locality	ITS type
Aa027	Gangwon, Gangneung	3	Aa051	Gyeongbuk, Cheongdo	4
Aa022	Gangwon, Goseong	1	Aa052	Gyeongbuk, Cheongdo	1
Aa024	Gangwon, Goseong	1	Aa171	Wolsan, Namgu	1
Aa040	Gangwon, Goseong	1	Aa172	Wolsan, Namgu	3
Aa028	Gangwon, Donghae	1	Aa118	Incheon, Ganghwa	4
Aa029	Gangwon, Samcheok	2	Aa119	Incheon, Ganghwa	1
Aa037	Gangwon, Samcheok	1	Aa120	Incheon, Ganghwa	5
Aa025	Gangwon, Sokcho	1	Aa002	Jeonnam, Gangjin	1
Aa039	Gangwon, Sokcho	2	Aa015	Jeonnam, Gorye	2
Aa026	Gangwon, Yangyang	2	Aa004	Jeonnam, Boseong	12
Aa038	Gangwon, Yangyang	1	Aa001	Jeonnam, Wando	1
Aa032	Gangwon, Yeongwol	3	Aa003	Jeonnam, Jangheung	3
Aa044	Gangwon, Yeongwol	2	Aa005	Jeonbuk, Namwon	1
Aa188	Gangwon, Inje	1	Aa007	Jeonbuk, Iksan	17
Aa031	Gangwon, Jeongseon	16	Aa008	Jeonbuk, Iksan	3
Aa042	Gangwon, Jeongseon	2	Aa006	Jeonbuk, Jeonju	1
Aa043	Gangwon, Jeongseon	2	Aa016	Jeju, Namcheju	1
Aa105	Gangwon, Chuncheon	2	Aa018	Jeju, Bukcheju	1
Aa019	Gangwon, Chuncheon	1	Aa017	Jeju, Jeju-shi	15
Aa178	Gangwon, Chuncheon	8	Aa009	Chungnam, Nonsan	1
Aa030	Gangwon, Taebaek	1	Aa175	Chungnam, Yesan	1
Aa035	Gangwon, Taebaek	9	Aa176	Chungnam, Yesan	7
Aa033	Gangwon, Pyeonchang	1	Aa177	Chungnam, Yesan	3
Aa045	Gangwon, Pyeonchang	3	Aa010	Chungnam, Cheonan	3
Aa046	Gangwon, Pyeonchang	2	Aa173	Chungnam, Cheonan	2
Aa020	Gangwon, Hongcheon	11	Aa174	Chungnam, Cheonan	4
Aa021	Gangwon, Hongcheon	1	Aa164	Chungbuk, Eumseong	1
Aa137	Gangwon, Hwacheon	1	Aa160	Chungbuk, Jecheon	1
Aa138	Gangwon, Hwacheon	2	Aa161	Chungbuk, Jecheon	1
Aa139	Gangwon, Hwacheon	2	Aa162	Chungbuk, Jecheon	1
Aa189	Gangwon, Hwacheon	1	Aa163	Chungbuk, Jecheon	4
Aa190	Gangwon, Hwacheon	1	Aa153	Chungbuk, Jeungpyong	2
Aa191	Gangwon, Hwacheon	4	Aa154	Chungbuk, Jeungpyong	2
Aa192	Gangwon, Hwacheon	1	Aa158	Chungbuk, Jeungpyong	2
Aa193	Gangwon, Hwacheon	1	Aa159	Chungbuk, Jeungpyong	4
Aa194	Gangwon, Hwacheon	1	Aa168	Chungbuk, Cheongwon	10
Aa195	Gangwon, Hwacheon	3	Aa169	Chungbuk, Cheongwon	2
Aa034	Gangwon, Hoengseong	5	Aa093	Chungbuk, Cheongwon	2
Aa041	Gangwon, Hoengseong	1	Aa094	Chungbuk, Cheongwon	1
Aa117	Gyeonggi, Gwangju	2	Aa152	Chungbuk, Cheongju	18
Aa013	Gyeonggi, Gwangju	1	Aa155	Chungbuk, Cheongju	1
Aa113	Gyeonggi, Kimpo	2	Aa156	Chungbuk, Cheongju	2
Aa114	Gyeonggi, Kimpo	2	Aa157	Chungbuk, Cheongju	2
Aa115	Gyeonggi, Kimpo	2	Aa207	UAS: MA, Boston	1
Aa014	Gyeonggi, Namyangju	1	Aa196	Russia: Grandnun's house 1	1
Aa011	Gyeonggi, Anseong	2	Aa197	Russia: Grandnun's house 1	1
Aa012	Gyeonggi, Yongin	1	Aa198	Russia: Grandnun's house 1	3
Aa186	Gyeonggi, Icheon	1	Aa199	Russia: Grandnun's house 1	3
Aa187	Gyeonggi, Icheon	1	Aa200	Russia: Grandnun's house 1	1
Aa179	Gyeonggi, Icheon	1	Aa201	Russia: Grandnun's house 1	3
Aa180	Gyeonggi, Icheon	1	Aa202	Russia: Grandnun's house 1	1
Aa181	Gyeonggi, Icheon	1	Aa203	Russia: Kharke lake 2	1
Aa182	Gyeonggi, Icheon	4	Aa204	Russia: Kharke lake 2	2

Table 1. continued.

DNA no.	Locality	ITS type	DNA no.	Locality	ITS type
Aa183	Gyeonggi, Icheon	4	Aa205	Russia: Kharke lake 2	4
Aa184	Gyeonggi, Icheon	2	Aa206	Russia: Kharke lake 2	1
Aa185	Gyeonggi, Icheon	4	At140	Gangwon, Chunchon, Seomyon	1
Aa133	Gyeonggi, Pocheon	2	At141	Gangwon, Chunchon, Seomyon	1
Aa062	Gyeongnam, Kimhae	2	At142	Gangwon, Chunchon, Seomyon	2
Aa063	Gyeongnam, Kimhae	4	At143	Gangwon, Chunchon, Seomyon	2
Aa064	Gyeongnam, Kimhae	2	At144	Gangwon, Chunchon, Seomyon	2
Aa065	Gyeongnam, Kimhae	2	At145	Gangwon, Chunchon, Seomyon	2
Aa075	Gyeongnam, Masan	2	At146	Gangwon, Chunchon, Seomyon	4
Aa076	Gyeongnam, Masan	1	At147	Gangwon, Chunchon, Seomyon	2
Aa077	Gyeongnam, Masan	2	At148	Gangwon, Chunchon, Seomyon	1
Aa069	Gyeongnam, Milyang	6	At149	Gangwon, Chunchon, Seomyon	1
Aa070	Gyeongnam, Milyang	1	At150	Gangwon, Chunchon, Seomyon	1
Aa071	Gyeongnam, Milyang	1	At151	Gangwon, Chunchon, Seomyon	1
Aa072	Gyeongnam, Haman	1	At095	Gangwon, Chunchon, Songam	1
Aa073	Gyeongnam, Haman	1	At096	Gangwon, Chunchon, Songam	1
Aa074	Gyeongnam, Haman	1	At097	Gangwon, Chunchon, Songam	1
Aa053	Gyeongnam, Hapcheon	5	At098	Gangwon, Chunchon, Songam	1
Aa054	Gyeongnam, Hapcheon	1	At099	Gangwon, Chunchon, Songam	1
Aa055	Gyeongnam, Hapcheon	1	At100	4	1
Aa059	Gyeongbuk, Gyeongsan	1	At101	Gangwon, Chunchon, Songam	1
Aa060	Gyeongbuk, Gyeongsan	2	At102	Gangwon, Chunchon, Songam	1
Aa061	Gyeongbuk, Gyeongsan	1	At103	Gangwon, Chunchon, Songam	1
Aa170	Gyeongbuk, Gyeongju	2	At104	Gangwon, Chunchon, Songam	1
Aa047	Gyeongbuk, Goryeong	3	At134	Gangwon, Hwacheon	1
Aa048	Gyeongbuk, Goryeong	1	At135	Gangwon, Hwacheon	2
Aa049	Gyeongbuk, Goryeong	4	At136	Gangwon, Hwacheon	2
Aa090	Gyeongbuk, Goonwi	5	At121	Gyeonggi, Yeoncheon	1
Aa091	Gyeongbuk, Goonwi	4	At122	Gyeonggi, Yeoncheon	2
Aa092	Gyeongbuk, Goonwi	1	At123	Gyeonggi, Yeoncheon	2
Aa056	Gyeongbuk, Seongju	6	At106	Gyeonggi, Paju	1
Aa057	Gyeongbuk, Seongju	1	At107	Gyeonggi, Paju	1
Aa078	Gyeongbuk, Andong	1	At108	Gyeonggi, Paju	1
Aa079	Gyeongbuk, Andong	4	At109	Gyeonggi, Paju	1
Aa080	Gyeongbuk, Andong	3	At124	Gyeonggi, Paju	2
Aa087	Gyeongbuk, Yeongju	3	At125	Gyeonggi, Paju	1
Aa088	Gyeongbuk, Yeongju	5	At126	Gyeonggi, Paju	2
Aa089	Gyeongbuk, Yeongju	13	At127	Gyeonggi, Paju	2
Aa081	Gyeongbuk, Yeongcheon	2	At129	Gyeonggi, Paju	1
Aa082	Gyeongbuk, Yeongcheon	2	At130	Gyeonggi, Paju	3
Aa083	Gyeongbuk, Yeongcheon	14	At131	Gyeonggi, Paju	1
Aa066	Gyeongbuk, Euryong	1	At132	Gyeonggi, Paju	2
Aa067	Gyeongbuk, Euryong	2	At110	Incheon, Seogu	1
Aa068	Gyeongbuk, Euryong	5	At111	Incheon, Seogu	1
Aa084	Gyeongbuk, Euseong	2	At112	Incheon, Seogu	2
Aa085	Gyeongbuk, Euseong	1	At165	Chungbuk, Cheongwon	1
Aa086	Gyeongbuk, Euseong	1	At166	Chungbuk, Cheongwon	1
Aa050	Gyeongbuk, Cheongdo	6	At167	Chungbuk, Cheongwon	1

우 71개 지역에서 145개체, 단풍잎돼지풀의 경우 8개 지역에서 46개체를 각각 채집하여 분석의 재료로 삼았다. 돼지풀의 경우에는 러시아 2개 지역에서 채집된 11개체와 미국 1개 지역에서 채집된 1개체를 추가적으로 포함하여 연구를 수행하였다(Table 1).

DNA는 채취된 유식물의 연한 잎 5g을 액체질소로 갈아 CTAB 방법(Doyle and Doyle, 1987)으로 추출하였고, 이 total DNA를 1X TE buffer에 녹인 후 EtBr-CsCl 농도구배 초원

Table 2. Size of ITS regions of *A. artemisiifolia*. and *A. trifida*.

species	ITS1	5.8S	ITS2	Total size
<i>A. artemisiifolia</i> L.	263bp	162bp	227bp	652bp
<i>A. trifida</i> L.	263bp	162bp	226bp	651bp

심분리방법(60,000rpm, 7시간) 및 투석법으로 정제하였다(Palmer, 1986). Polymerase chain reaction (PCR)은 주형 DNA 20–50 ng, 10X buffer 10 μ l, 200 μ M의 dNTPs 8 μ l, 50 pmol의 프라이머 각 1 μ l, 2.5 units의 ExTaq (Takara Co.) 및 증류수가 포함된 총 100 μ l의 반응액을 95 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 1차 해리한 후, 해리 95 $^{\circ}$ C 1분, annealing 50 $^{\circ}$ C 1분, extension 72 $^{\circ}$ C 1분으로 구성된 반응을 30회 반복한 후 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 extension하여 수행하였다. PCR 반응액은 QIAquick Gel extraction kit (Qiagen Inc., Valencia, CA)로 정제하였으며 이를 통해 얻어진 DNA를 염기서열 결정에 사용하였다. PCR과 염기서열 결정에는 White *et al.*(1990)에 의해 제작된 프라이머를 사용하였으나 프라이머 ITS1의 경우 다음과 같이 밑줄 친 두 개의 염기를 달리하는 primer (5'-GGAAGGAGGAAGTCGTAACAAGG-3')를 별도로 제작하여 사용하였다. 염기서열은 PCR 산물을 클로닝과정을 거치지 않고 직접 ABI PRISM 377 (PE Applied Biosystems) 염기서열 자동분석기를 이용해 결정하였다.

결정된 염기서열의 ITS 1, 2 구간은 기존의 연구 결과(Suh *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2004)와 비교하여 결정하였고, Clustal W (ver. 1.6, Thompson *et al.*, 1995) 및 최종 수작업으로 정렬하였다. 정렬 결과 발생한 gap은 이후 분석과정에서 결여형질(missing characters)로 처리하였다. 각 ITS 유형간의 염기서열 분석은 PAUP^{*} ver. 4.0b (Swofford, 2002)를 사용하여 수행하였다.

결 과

1. ITS 염기서열 분석

본 연구결과 돼지풀과 단풍잎돼지풀의 ITS 지역의 염기서열의 길이는 5.8S 지역을 포함해서 각각 651bp와 652bp로 나타나 돼지풀이 단풍잎돼지풀에 비해 1bp 더 길었다. 두 종 모두에서 ITS 1 지역이 ITS 2 지역에 비해 더 길었으며 돼지풀과 단풍잎돼지풀의 길이 차이는 ITS 2 지역의 길이 차이에 기인했다(Fig. 1, Table 2). 종 내에서 개체간의 각 ITS 지역의 길이 차이는 전혀 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

본 연구 결과 돼지풀 및 단풍잎돼지풀의 ITS 염기서열에서 개체간 차이를 보이는 여러 개

```

[
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 ]
A-a TYPE 1 TCGAACCTGCACACCAGAACGCCDGGGAACAGTAAAAACATCAGCTAAGCGGGGATCGAAGCTTATGTTTCGATCCTTGTGAGGCCCTGTGGTGTGTGCTATGCTGCACCATCCATTTGGGGCATCATGG [135]
A-a TYPE 2 ..... [135]
A-a TYPE 3 ..... [135]
A-a TYPE 4 ..... [135]
A-a TYPE 5 ..... [135]
A-a TYPE 6 ..... [135]
A-a TYPE 7 ..... [135]
A-a TYPE 8 ..... [135]
A-a TYPE 9 ..... [135]
A a TYPE 10 ..... [135]
A-a TYPE 11 ..... [135]
A-a TYPE 12 ..... [135]
A-a TYPE 13 ..... [135]
A-a TYPE 14 ..... [135]
A-a TYPE 15 ..... [135]
A a TYPE 16 ..... [135]
A-a TYPE 17 ..... [135]
A-a TYPE 18 ..... [135]
A-t TYPE 1 ..... T ..... C G ..... C ..... C ..... T ..... AC ..... G AA ..... [135]
A-t TYPE 2 ..... T ..... T ..... C G ..... C ..... C ..... T ..... AC ..... G AA ..... [135]
A-t TYPE 3 ..... T ..... T ..... C G ..... C ..... C ..... T ..... AC ..... G AA ..... [135]
A-t TYPE 4 ..... T ..... T ..... C G ..... T ..... C ..... C ..... T ..... AC ..... G AA ..... [135]

```

```

[
140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 ]
A-a TYPE 1 ATTTCACGGAGACACAATAACAAACCCCGGCACGATGTGCCAAGGAAACTAAACTTAAAGGGCCTGTGCTACTGCCGCCCTTCCGCGTGTGCBCGTTGTATGTGBCATCTTTGTTAAACCTAAACGACT [270]
A-a TYPE 2 ..... A ..... [270]
A a TYPE 3 ..... T ..... [270]
A-a TYPE 4 ..... T ..... [270]
A-a TYPE 5 ..... T ..... [270]
A-a TYPE 6 ..... T ..... [270]
A-a TYPE 7 ..... T ..... [270]
A-a TYPE 8 ..... A ..... [270]
A-a TYPE 9 ..... [270]
A a TYPE 10 ..... A ..... [270]
A-a TYPE 11 ..... A ..... [270]
A-a TYPE 12 ..... T ..... [270]
A-a TYPE 13 ..... T ..... [270]
A-a TYPE 14 ..... A ..... [270]
A-a TYPE 15 ..... A ..... [270]
A-a TYPE 16 ..... A ..... [270]
A-a TYPE 17 ..... A ..... [270]
A-a TYPE 18 ..... A ..... [270]
A-t TYPE 1 ..... T ..... G ..... C ..... C ..... T ..... T ..... [270]
A-t TYPE 2 ..... T ..... G ..... CT ..... C ..... T ..... T ..... [270]
A-t TYPE 3 ..... T ..... G ..... C ..... C ..... T ..... T ..... [270]
A-t TYPE 4 ..... T ..... G ..... C ..... C ..... T ..... T ..... [270]

```

```

[
280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 ]
A-a TYPE 1 CTCGGCACGGATATCTCGGCTCAGBCATCGATGAAGAAGCTAGCAAAATGGGATACCTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATGAGTTTTGAACGCAAGTTGCGGCCGAAGCCATCCGTTGAGGGCA [405]
A-a TYPE 2 ..... [405]
A-a TYPE 3 ..... T ..... [405]
A-a TYPE 4 ..... [405]
A a TYPE 5 ..... [405]
A-a TYPE 6 ..... [405]
A-a TYPE 7 ..... [405]
A-a TYPE 8 ..... T ..... [405]
A-a TYPE 9 ..... [405]
A a TYPE 10 ..... [405]
A-a TYPE 11 ..... [405]
A-a TYPE 12 ..... T ..... [405]
A-a TYPE 13 ..... T ..... [405]
A-a TYPE 14 ..... T ..... [405]
A-a TYPE 15 ..... [405]
A-a TYPE 16 ..... [405]
A a TYPE 17 ..... [405]
A a TYPE 18 ..... [405]
A-t TYPE 1 ..... [405]
A-t TYPE 2 ..... [405]
A-t TYPE 3 ..... [405]
A-t TYPE 4 ..... [405]

```

```

[
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 ]
A-a TYPE 1 CCGTCTGCTGGGGCTCACGGATCAGCTGCGCCCAACCATAGACTCCCTTTTGG-AGCTTTGGTTGGGGGGGAGATGGTCTCCCGTGCCTATGATGGTGTGGTGGGCTAAATAGGAGTCTCATCAAGAGGG [539]
A-a TYPE 2 ..... A ..... [539]
A-a TYPE 3 ..... [539]
A-a TYPE 4 ..... A ..... [539]
A-a TYPE 5 ..... [539]
A-a TYPE 6 ..... A ..... [539]
A-a TYPE 7 ..... [539]
A-a TYPE 8 ..... A ..... [539]
A-a TYPE 9 ..... G ..... [539]
A-a TYPE 10 ..... A ..... [539]
A-a TYPE 11 ..... [539]
A-a TYPE 12 ..... A ..... [539]
A-a TYPE 13 ..... [539]
A-a TYPE 14 ..... G ..... [539]
A a TYPE 15 ..... [539]
A-a TYPE 16 ..... [539]
A-a TYPE 17 ..... A ..... [539]
A-a TYPE 18 ..... A ..... [539]
A-t TYPE 1 ..... A ..... CA CA ..... G TA ..... C--- ..... G ..... [537]
A-t TYPE 2 ..... A ..... CA CA ..... G TA ..... C--- ..... G ..... [537]
A-t TYPE 3 ..... A ..... CA CA ..... G TA ..... C--- ..... G ..... [537]
A-t TYPE 4 ..... A ..... CA CA ..... G TA ..... C--- ..... G ..... [537]

```

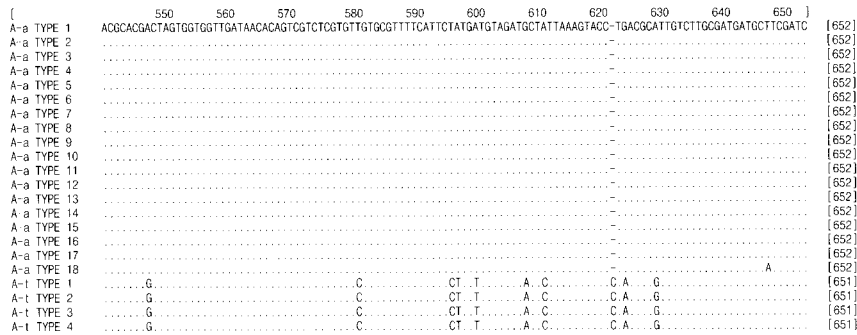


Fig. 1. Aligned ITS sequences of 22 types from *A. artemisiifolia* (18 types) and *A. trifida* (4 types). ITS 1: 1-263; 5.8S: 264-425; ITS 2: 426-654.

의 유형이 존재한다는 것이 확인되었다. 돼지풀의 ITS는 총 18개의 ITS 유형(14개 사이트에서 변이 확인)을 포함하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 각각의 유형은 최소한 1 bp에서 최대 7bp까지 차이가 났는데 가장 큰 차이는 유형 18과 유형 12, 13 사이에서 각각 관찰되었고 각 유형간의 염기서열 분기 정도(100 X p value)는 0.15에서 1.03에 달했다. 한편 단풍잎돼지풀의 경우에는 총 4개의 ITS 유형이 관찰되었으며 염기서열 분기 정도는 0.15에서 0.3에 이르렀다(Table 3).

돼지풀에서 발견된 18개의 ITS 유형은 2개 이상의 개체를 포함하는 6개의 주요 유형과 1개의 개체에서만 나타나는 기타 소수 유형으로 세분되었다(Fig. 1, Table 1). 유형 1은 Aa001을 포함한 68개체, 유형 2는 Aa011을 포함한 38개체가 지니는 것으로 나타나 두 유형이 연구에 포함된 돼지풀 157개체의 67.9%를 차지하는 것으로 계산되었다. 나머지 주요 유형 3은 Aa003을 포함한 16개체, 유형 4는 Aa049을 포함한 14개체, 유형 5는 Aa 034을 포함한 6개체, 유형 6은 Aa050을 포함한 3개체에서 나타났고, 기타 유형 7부터 유형 18은 Aa176, Aa178, Aa035, Aa168, Aa020, Aa004, Aa089, Aa083, Aa017, Aa031, Aa007, 그리고 Aa152에서 각각 출현했다.

한편, 단풍잎돼지풀의 ITS 유형은 2개의 주요 유형(유형 1이 30개체, 유형 2는 14개체)과 2개의 기타 유형(유형 3 과 4, 각 1개체)으로 나타났다(Fig. 1).

2. ITS 유형의 지역별 분포

돼지풀에서 발견된 대부분의 주요 ITS 유형들은 전국적인 분포양상을 나타냈다(Table 1). 특히 유형 1의 경우 제주도를 포함한 남한 전역에 분포하였고, 유형 2와 3 역시 우리나라 전역에 분포하는 양상을 보였다. 그러나 유형 4와 5는 주로 내륙 중앙지역을 따라 남북으로 분포했고 나머지 소수 유형들은 각각의 유형이 전국에 걸쳐서 특정지역에만 각각 달리 분포하는 양상을 보였다. 본 연구에 포함된 11개의 러시아 개체 가운데 6개체가 유형 1에 해당했으며 유일하게 포함된 미국 개체의 경우도 같은 유형에 속했다.

Table 4. Pairwise sequence distance between 22 ITS types detected from *A. trifida* and *A. artemisiifolia*. Absolute distances are shown above the diagonal, and sequence divergence values(X100) by uncorrected p distance method are below diagonal.

ITS type	At1	At2	At3	At4	Aa1	Aa2	Aa3	Aa4	Aa5	Aa6	Aa7	Aa8	Aa9	Aa10	Aa11	Aa12	Aa13	Aa14	Aa15	Aa16	Aa17	Aa18
At1	0	1	1	1	37	37	39	38	38	39	40	39	38	39	38	40	40	37	39	40	40	39
At2	0.15	0	2	2	38	38	40	39	39	40	41	40	39	40	39	41	41	38	40	41	41	40
At3	0.15	0.3	0	2	38	38	40	39	39	40	41	40	39	40	39	41	41	38	40	41	41	40
At4	0.15	0.3	0.3	0	38	38	40	39	39	40	41	40	39	40	39	41	41	38	40	41	41	40
Aa1	5.49	5.64	5.64	5.64	0	1	2	1	1	2	3	2	1	2	1	3	3	1	2	3	3	4
Aa2	5.51	5.66	5.66	5.66	0.15	0	2	1	2	1	1	1	2	1	2	4	4	2	1	1	1	1
Aa3	5.79	5.94	5.94	5.94	0.3	0.3	0	2	1	1	2	1	2	3	3	1	1	1	4	4	4	5
Aa4	5.64	5.79	5.79	5.79	0.15	0.15	0.3	0	2	1	2	1	2	1	2	4	4	2	3	2	2	3
Aa5	5.64	5.79	5.79	5.79	0.15	0.3	0.15	0.3	0	1	2	3	1	3	2	2	2	1	3	4	4	5
Aa6	5.79	5.94	5.94	5.94	0.3	0.15	0.15	0.15	0.15	0	1	2	2	2	3	3	3	2	4	3	3	4
Aa7	5.94	6.08	6.09	6.08	0.44	0.15	0.3	0.3	0.3	0.15	0	3	3	3	4	4	4	3	3	2	2	3
Aa8	5.79	5.94	5.94	5.94	0.3	0.15	0.15	0.15	0.44	0.3	0.44	0	3	2	3	3	3	2	4	3	3	4
Aa9	5.65	5.79	5.79	5.79	0.15	0.3	0.3	0.3	0.15	0.3	0.44	0.44	0	3	2	3	3	2	3	4	4	5
Aa10	5.79	5.94	5.94	5.94	0.3	0.15	0.44	0.15	0.44	0.3	0.44	0.3	0.44	0	3	5	5	3	4	3	3	4
Aa11	5.64	5.79	5.79	5.79	0.15	0.3	0.44	0.3	0.3	0.44	0.59	0.44	0.3	0.44	0	4	4	2	3	4	4	5
Aa12	5.94	6.08	6.08	6.08	0.44	0.59	0.15	0.59	0.3	0.44	0.59	0.44	0.44	0.74	0.59	0	2	2	5	6	6	7
Aa13	5.94	6.08	6.08	6.08	0.44	0.59	0.15	0.59	0.3	0.44	0.59	0.44	0.44	0.74	0.59	0.3	0	2	5	6	6	7
Aa14	5.52	5.67	5.67	5.67	0.15	0.3	0.15	0.3	0.15	0.3	0.44	0.3	0.3	0.44	0.3	0.3	0.3	0	3	4	4	5
Aa15	5.79	5.94	5.94	5.94	0.3	0.15	0.59	0.44	0.44	0.59	0.44	0.59	0.44	0.59	0.44	0.74	0.74	0.44	0	1	3	4
Aa16	5.94	6.09	6.09	6.09	0.44	0.15	0.59	0.3	0.59	0.44	0.3	0.44	0.59	0.44	0.59	0.89	0.89	0.59	0.15	0	2	3
Aa17	5.94	6.09	6.09	6.09	0.44	0.15	0.59	0.3	0.59	0.44	0.3	0.44	0.59	0.44	0.59	0.89	0.89	0.59	0.44	0.3	0	3
Aa18	5.79	5.94	5.94	5.94	0.59	0.15	0.74	0.44	0.74	0.59	0.44	0.59	0.74	0.59	0.74	1.03	1.03	0.74	0.59	0.44	0.44	0

한편, 한 지역에서 3 개체 이상을 채집하여 분석했을 경우 대부분 2 유형 이상이 출현하였고, 특히 인천시 강화, 강원도 평창, 충남 예산, 경북 군위 등의 경우 각각에서 복수로 채집된 3 개체가 모두 다 서로 다른 ITS 유형을 지니고 있는 것으로 나타났다(Table 1).

고 찰

본 연구를 통해 국내외에 분포하는 돼지풀속 식물 203 개체에서 발견된 다양한 ITS 유형은 돼지풀의 확산과 진화연구에 있어서 주목할 만한 결과로 생각된다. 특히 돼지풀의 경우 국내에 최소한 18개 이상의 유형이 존재한다는 사실은 본 종의 짧은 국내 유입 역사를 고려할 때 매우 높은 변이라고 생각된다. 이는 일차적으로 돼지풀이 우리나라에 여러 차례 반복해서 유입했기 때문인 것으로 풀이된다. 이 같은 해석은 국내에서 발견된 5개의 주요 ITS 유형 가운데 4개의 유형이 러시아에서도 분포한다는 사실로 뒷받침될 수 있다. 그러나 국내에서 조사된 돼지풀 12개체는 각각 독자적인 유형을 지니고 있는 것으로 보아 일부 유형은 국내에서 자체적으로 형성되었을 가능성도 있을 것으로 보인다. 새로운 ITS 유형의 형성은 점 돌연변이에 의해서도 일어날 수도 있지만 서로 다른 두 유형 간의 유전자 재조합에 의해서도 일어날 수도 있는 것으로 알려져 있다(Álvarez and Wendel, 2003). 본 연구 결과 돼지풀의

경우에도 유형 4의 경우 유형 1의 ITS 1지역과 유형 2의 ITS 2지역의 조합이고, 유형 5의 경우 유형 3의 ITS 1지역과 유형 1의 ITS 2지역으로 각각 구성되어 있음을 알 수 있어 재조합을 통한 새로운 유형의 출현 가능성을 뒷받침 하고 있다. 한편 단 한 개체에서만 발견되는 소수 유형들 역시 점돌연변이 및 그에 뒤이은 다른 유형간의 유전적 조합을 통해 형성되었을 가능성을 배제할 수 없다. 서로 다른 두 ITS 유형이 교배를 통해 만났을 때 두 유형 모두 독자적으로 존재하여 자손에게 전달되거나(Suh *et al.*, 1993; Soltis *et al.*, 1995) 둘 가운데 하나가 소멸하기도 하는데(Wendel *et al.*, 1995) 돼지풀의 경우에는 유전적 조합을 통해 새로운 유형의 ITS를 생성해내어 이와 같은 다양성을 확보하게 되었을 것으로 추정된다. 그러나 일부 소수 개체들(Aa152, Aa007, Aa004, Aa089 등)은 5개의 주요 ITS 유형과는 다른 독자적 기원을 갖거나, 또는 이들 주요 유형에서 일어난 점돌연변이를 통해 국내에서 새롭게 출현했을 가능성도 있는 것으로 추정된다.

단풍잎돼지풀은 돼지풀에 비해 ITS염기서열에 있어서 더 낮은 변이도를 나타냈다. 다른 곳에 비해 상대적으로 많은 개체가 조사되었던 강원도 지역의 예를 보면 돼지풀의 경우 총 40 개체에서 9개의 ITS 유형이 관측된 반면 단풍잎돼지풀의 경우 총 25개체서 3개의 유형만이 관측되었다. 이 같은 차이는 단풍잎돼지풀이 돼지풀에 비해 국내에 더 나중에 유입되었다는 사실과 관계가 있을 것으로 생각된다. 그러나 유전적 변이도는 종 자체의 특성일 수도 있으며, 이는 각각의 원본포지 집단에 대한 조사의 필요성을 말해준다.

본 연구에서 확인된 각 ITS 유형의 지역적 분포를 살펴보면 특정 유형이 특정 지역에 집중적으로 분포하는 양상 즉, 유전적 변이의 지역별 구조화 현상은 관측되지 않았다. 특히 많은 지역에 있어서 복수로 채집된 개체들이 서로 다른 ITS 유형을 지니고 있는 것으로 나타나 다양한 유형들이 이미 전국적으로 확산되어 혼재하고 있음을 알 수 있다. 따라서 ITS 염기서열 변이분석을 통한 돼지풀의 유입 및 확산경로 파악 가능성은 현재로서는 거의 없는 것으로 생각된다. 그러나 ITS 염기서열 변이를 분석하여 미국 캘리포니아 해안에 유입된 녹조류의 기원지를 밝힌 예(Jousson *et al.*, 2000)를 보았을 때 침입외래종이 유입된 즉시 조사가 이루어지고, 충분히 많은 변이를 지니는 적절한 DNA 마커를 사용할 경우 외래종의 원산지 규명 및 확산경로 분석도 가능하리라고 본다.

Fisher(1930)는 자연선택에 대한 반응에서의 진화율이 집단내에 현존하는 유전적 변이도에 비례한다는 사실을 지적한 바 있다. 외래식물이 지니는 유전적 다양성이 성공적인 침입에 있어서 필수적인 역할을 담당하는지는 불분명하며(DeWalt and Hamrick, 2004), 심지어 일부 동물종의 경우에는 불리할 수도 있다는 연구결과도 있으나(Tsutsui *et al.*, 2000), 본 연구결과 돼지풀의 ITS 염기서열에서 관측된 높은 변이도는 진화적 관점에서 봤을 때 돼지풀의 전세계적 고속확산과 무관하지 않을 것으로 생각된다. 돼지풀속 식물에서 ITS 지역의 염기서열 변이가 충분히 검출되었다는 점은 이 DNA 지역이 우리나라의 대표적 침입외래식물인 돼지풀의 진화연구에 중요한 마커가 될 수 있음을 암시한다. 침입외래식물종이 원식지를 떠나 다른 지역으로 침입하여 빠르게 확산 및 정착(colonization)되는 과정은 자연상태에서 일어나는 일종의 진화적 실험이라고 볼 수 있고, 이 과정에서 일어나는 집단내 유전적 변화를 면밀

히 관찰할 경우 생물진화의 일면을 더욱 깊게 이해할 수 있다는 점에서 외래식물에 대한 분자유전학적 연구는 환경생태적 중요성 뿐 아니라 진화학적 의미가 매우 크다고 말할 수 있다. 향후 이와 같은 진화적 변화를 이해하기 위해서는 국내집단 뿐 아니라 돼지풀의 원분포 지역을 포함한 보다 광범위한 집단유전학적 연구가 반드시 필요하다.

사 사

본 논문의 심사를 맡아주신 심사자들에 대해 사의를 표합니다. 본 연구는 환경부 차세대 연구 지원사업(과제번호 052-043-014)에 의해 수행되었습니다.

인 용 문 헌

- Álvarez, I. and J. F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogen. Evol.* 29: 417-434.
- Bassett, I. J. and C. W. Crompton. 1975. The biology of Canadian weeds. 11. *Ambrosia artemisiifolia* L. and *A. pilostachya* DC. *Can J. Plant Sci.* 55:463-476.
- DeWalt, S. J. and J. L. Hamrick. 2004. Genetic variation of introduced Hawaiian and native Costa Rican populations of an invasive tropical shrub, *Clidemia hirta* (Melastomataceae). *Amer. J Bot.* 91(8): 1155-1162.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Ellstrand, N. C. and K. A. Schierenbeck. 2000. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 7043-7050.
- Fisher, R. A. 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford, Clarendon Press.
- Jousson, O., J. Pawlowski, L. Zaninetti, F. W. Zechman, F. Dini, G. Di Guiseppe, R. Woodfield, A. Millar, and A. Meinesz. 2000. Invasive alga reaches California. *Nature* 408: 157-158.
- Kim, Y.-D., S.-H. Kim, L. R. Landrum. 2004. Taxonomic and phylogeographic implications from ITS phylogeny in *Berberis* (Berberidaceae). *J Plant Res.* 117: 175-182.
- Koh, K. S., J. G. Na, M. H. Suh, J. H. Kil, Y. B. Ku, J. H. Yoon, H. K. Oh, and S. H. Park. 2000. The effects of Alien plants on ecosystem and their management (I). National Institute of Environmental Research. (in Korean).

- Lim, Y. J. and E. S. Chun. 1980. The distribution of naturalized plants in Korea. Korean Journal of Botany 23: 69-83.
- Maron, J. L., M. Vila, R. Bommarco, S. Elmendorf, and P. Beardsley. 2004. Rapid evolution of an invasive plant. Ecological Monographs 74(2): 261-280.
- Meekins, J. F., H. E. Ballard, and B. C. McCarthy. 2001. Genetic variation and molecular biogeography of a North American invasive plant species (*Alliaria petiolata*, Brassicaceae). Int. J Plant Sci. 162(1): 161-169.
- Müller-Schärer, H., U. Schaffner, and T. Steinger. 2004. Evolution in invasive plants: implications for biological control. Trends in Ecology and Evolution 19(8): 417-422.
- Mabberley, D. J. 1990. The plantbook. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Novak, S. J. and R. N. Mack. 2001. Tracing plant introduction and spread: Genetic evidence from *Bromus tectorum* (cheatgrass). BioScience 51(2): 114-122.
- Paek, W. K., K. J. Chang, and W. T. Lee. 1999. The distribution and vegetation of ragweed. Korean Natural Conservation Committee. pp. 5-26. (in Korean).
- Palmer, J. D. 1986. Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. Meth. Enzymol. 118: 167-186.
- Park, S. H., J. H. Shin, Y. M. Lee, J. H. Lim, and J. S. Moon. 2002. Distribution of Naturalized Alien Plants in Korea. Korea National Arboretum. (in Korean).
- Payne, W. 1964. A re-evaluation of the genus *Ambrosia* (Compositae). Journal of the Arnold Arboretum 45(4): 401-438.
- Robinson, H. 1981. A revision of the tribal and subtribal limits of the Heliantheae (Asteraceae) (Smithsonian contributions to botany). Smithsonian Institution Press.
- Soltis, P. S., G. M. Plunkett, S. J. Novak, and D. E. Soltis. 1995. Genetic variation in *Tragopogon* species: Additional origins of the allotetraploids *T. mirus* and *T. miscellus* (Compositae). Am. J. Bot. 82: 1329-1341.
- Suh, Y., L. B. Thien, H. E. Reeve, and E. A. Zimmer. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. Am. J. Bot. 80: 1042-1055.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*, phylogenetic analysis using parsimony(*and other methods), version 4.0b. Sinauer, Sunderland.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1995. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.

- Tsutsui, N.D., Suarez, A.V., Howay, D.A., Case, T.J. 2000. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 5948-5953.
- Wendel, J. F., A. Schnabel, and T. Seelanan. 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 280-284.
- 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, Pp. 315-322.

ITS sequence variations in common ragweed and giant ragweed

Young-Dong Kim^{1*} · Chong-Wook Park² · Byung-Yun Sun³
Ki-Joong Kim⁴ · Eun-Ju Lee² · Sung-Hee Kim¹

¹Department of Life Science, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea;

²School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea;

³Faculty of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea;

⁴School of Life Sciences & Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Genetic variation of notorious invasive plants, common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) and giant ragweed (*Ambrosia trifida* L.) were examined using the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. A total of 18 different ITS types were detected from 156 individuals of common ragweed sampled mainly from the southern part of Korean peninsula whereas four types were identified from 46 individuals of giant ragweed. High sequence diversity observed from common ragweed in Korean populations was interpreted as multiple introduction. Genetic recombination was suggested as possible method for the production of some of the ITS types while point mutation was mainly responsible for the origin of the sequence diversity. This study provided some of basic genetic information needed for understanding of the evolutionary process in ragweed during invasion.

Key words: common ragweed, giant ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, *Ambrosia trifida*, ITS

*Corresponding author : Phone: +82-33-248-2095, FAX: +82-33-245-3420, ydkim@hallym.ac.kr