



Genetic diversity and geographic differentiation in the endangered *Primula farinosa* subsp. *modesta*, a subalpine endemic to Korea

Jae-Min Chung*, Sung-Won Son, Sang-Yong Kim, Gwang-Woo Park and Sung-Shik Kim

Plant Conservation Division, Korea National Arboretum, Pocheon, Gyeonggi 487-821, Korea

(Received 7 May 2013; Accepted 21 June 2013)

한반도 아고산대 특산 · 희귀식물 설앵초의 유전적 다양성과 지리적 분화

정재민* · 손성원 · 김상용 · 박광우 · 김성식

국립수목원

ABSTRACT: Many plant species in subalpine regions are under threat of extinction as a result of climate change. In this study, the genetic diversity and geographic differentiation of three regions and six populations of *Primula farinosa* subsp. *modesta* (Bisset & Moore) Pax in Korea were assessed using the ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) marker. The average genetic diversity ($P = 60.62$, $SI = 0.299$, $h = 0.190$) was relatively lower than that of other long-lived perennials, even though it is a self-incompatible species. AMOVA analysis showed that 50% of the total genetic diversity was partitioned among regions and Bayesian cluster analysis showed some remarkable geographic trends that were structured into 2 or 3 regions, suggesting limited gene flow among regions. Considering the population fragmentation, low level genetic diversity, and high genetic differentiation, it is essential to establish *in situ* and *ex situ* conservation strategies for *P. farinosa* subsp. *modesta*.

Keywords: alpine zone, endemic plant, *Primula farinosa* subsp. *modesta*, genetic diversity, ISSR marker.

적 요: 북방계 식물들의 잔존적 피난처인 아고산대에 분포하는 식물들은 기후변화에 따른 자생지 환경변화로 인해 멸종 및 멸절 위험에 크게 직면해 있는 실정이다. 본 연구는 한반도의 남부지역 아고산대에 제한적으로 분포하고 있는 특산식물이며 희귀식물인 설앵초(*Primula farinosa* subsp. *modesta* (Bisset & Moore) Pax)에 대한 유전적 다양성과 지리적 분화 양상을 구명을 통한 보존전략을 수립하기 위해 3지역 6집단 165개체를 대상으로 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) 분석을 수행하였다. 그 결과 집단 수준의 유전 다양성의 평균은 ($P = 60.62$, $SI = 0.299$, $h = 0.190$) 유사한 생활사를 갖는 다년생 초본류의 평균보다 낮은 수준이었으며, 이형화주의 특징을 갖는 *Primula*속의 근연 분류군들에 비해서도 다소 낮은 결과를 보였다. 유전적 분화도 구명을 위해 AMOVA(Analysis of molecular variance) 분석 결과 전체 유전변이 중 약 50%가 지역 간에 분포하는 결과를 보여 종내 지역간 분화도가 매우 높은 수준으로 판단되며, Bayesian cluster 분석 결과에서도 조사된 세 지역이 각각 독특한 유전적 cluster를 형성함으로써 개체군간 유전자 이동이 매우 제한적임을 암시하였다. 따라서 설앵초 집단의 급속한 분화도와 낮은 수준의 유전적 다양성, 지역간 높은 분화도 등의 특성들을 고려하여 설앵초 집단의 개체군 감소 및 멸절 방지를 위한 현지 내 · 외 보전 전략 수립이 시급한 것으로 판단된다.

주요어: 아고산대, 특산식물, 설앵초, 유전적 다양성, ISSR 표지자

*Author for correspondence: rhuso@korea.kr

<http://www.pltaxa.or.kr>

Copyright © 2013 the Korean Society of Plant Taxonomists

식물의 다양한 자생지 유형 중에서 고산(alpine)과 아고산(subalpine) 지역은 비교적 좁은 면적과 낮은 온도, 강한 태양광선 및 자외선 노출이 높은 특징 때문에 특이한 생태적 환경 및 다양한 생육지를 제공하므로, 생물지리학적 관점 뿐만 아니라 고산지역 적응 식물 종들을 위해 매우 중요한 의미를 지닌다(Nakhulshvili, 2013). 한반도에서 고산지역에 적응한 식물들은 플라이스토세(Pleistocene period) 빙하기 동안 극지 주변으로부터 유입되어 한반도에 넓게 확산 분포하였으며, 홀로세(Holocene period)에 들어서 기온이 상승하면서 대부분의 지역이 난·온대 식생으로 대체되면서 소멸되었고 아고산 지역은 이들 식물 종들의 피난처(refugia)로서 격리분포하게 되었다(Kong, 2002; Kong and Watts, 1993). 이처럼 아고산대에 잔존한 일부 식물 종들은 좁은 지역에 격리분포 됨으로서 적응과정을 통해 새로운 분류군으로 분화할 수 있으며, 그리고 많은 종 또는 집단들은 제한된 개체수와 생육지 및 개체군 분획화(fragmentation) 과정을 겪고 있으므로 향후 기후 변화가 진행될수록 멸종 및 멸절의 위험에 쉽게 노출되어 있다고 할 수 있다(Ceriani et al., 2009).

설앵초(*Primula farinosa* subsp. *modesta* (Bisset & Moore) Pax.)는 앵초과(Primulaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 자생지에서는 4월말에서 5월 중순까지 개화하며(J. Chung, pers. obs.), 벌류(*Osmia* spp., *Bombus* spp.)나 나비 등의 곤충에 의해 수분이 이루어지는 총매화로서(Ehrlén, et al., 2002), 종자로 주로 번식하지만 드물게 영양번식을 하기도 한다(Hambler and Dixon, 2003). 또한 화기 구조는 장주화(pin type)와 단주화(thrum type)로 구성된 이형화주(heterostyly)성 교배양식으로서, 같은 형태끼리는 자가불화합성(self-incompatibility) 기작에 의해 수정이 이루어지지 않는 것으로 알려져 있다(McKee and Richards, 1998; Richards, 2002).

우리나라에 분포하는 설앵초는 분류학적 처리에 대해 학자에 따라 이견이 존재하는데, 일본에 자생하는 *P. modesta* var. *fauriei* (Franch.) Takeda와 같은 것으로 인지하거나(Lee, 1996b), 혹은 *modesta*의 다른 변종인 *P. modesta* var. *hannasanensis* T.Yamaz.로 인지하기도 한다(Yamazaki, 1993; Park, 2007). 하지만 Yamazaki (2003)는 *P. farinosa* subsp. *modesta* (Bisset & Moore) Pax의 종내 분류군을 정리하면서 *P. modesta* var. *fauriei* (Franch.) Takeda를 *P. farinosa* subsp. *modesta* var. *fauriei* (Franch.) Miyabe의 이명으로 처리하였고 이 분류군이 일본의 쿠릴, 홋카이도, 혼슈 지역에 분포한다고 하였으며, 우리나라의 제주도에 분포하는 분류군을 *P. farinosa* subsp. *modesta* var. *hannasanensis* (Yamazaki) Yamazaki, 그리고 한반도 남부지역에 분포하는 분류군을 *P. farinosa* subsp. *modesta* var. *koreana* Yamazaki로 각각 구분하기도 하였다.

한반도에 분포하는 광의의 설앵초(*P. farinosa* subsp. *modesta*) 집단은 주로 남부지역에 위치한 지리산과 덕유

산과 가야산을 포함한 남동부 지역 아고산지대와 제주도의 한라산 아고산 지역에 고립되어 분포하고 있으며(Oh, 1980; Lee, 1996b), 특히 지리산과 덕유산에는 현재 소수의 개체들만 암석지를 피난처 삼아 잔존해 있는 실정이다(J. Chung, pers. obs.). 그리고 설앵초 자생지의 대부분이 접근이 쉽거나 등산로를 따라 쉽게 노출됨으로서 답압과 남채 등 인위적인 교란의 위협이 증가되고 있으며, 또한 자생지 특성상 기후변화에 의한 식생 천이의 가속화로 대부분의 집단이 분획화되거나 자생지 교란과 함께 개체수가 급격히 줄어들고 있는 추세이다(J. Chung, pers. obs.).

한편 설앵초는 산림청 희귀식물목록집에 EN(위기종)으로 지정되어 있으며(Korea National Arboretum, 2008), 환경부의 식물구계학적 특정식물 급에 속해 있기도 하다(ME, 2006).

멸종위기종의 효과적인 보전대책을 수립하기 위해서는 해당분류군에 대한 생물학적 특성과 서식지의 환경특성에 대한 정보가 필수적이다(Orians and Soulé, 2001). 이와 더불어 식물 종의 유전적 특성 및 구조에 관한 정보 또한 유전자 흐름이나 집단의 적응 능력 등 해당 분류군의 진화 역사에 대한 이해를 넓혀 줌으로써 보전 전략 수립을 위한 기초자료로서 매우 중요한 정보를 제공해 준다고 할 수 있다(Avise, 1994; Hamrick and Godt, 1996; Hart and Clark, 1997). 특히 잔존적 고산식물의 경우 대개 자생지의 분획화 및 감소로 집단의 크기가 제한적이어서 유전적 부동이나 근친교배 등에 의한 유전 다양성의 손실이 변화하는 환경에 대해 적응능력 상실로 이어져 멸종 위협이 높아지게 되는데(Barrett and Kohn, 1991; Ellstrand and Elam, 1993; Hilfiker et al., 2004), 이러한 정보들은 향후 대상 식물 종의 보전전략 수립 시 매우 중요한 정보를 제공해준다는 점에서 멸종위기식물의 유전적 특성과 구조에 대한 이해는 보전생물학에서 매우 중요한 요소라 할 수 있다.

따라서 본 연구는 ISSR(inter simple sequence repeats) 표지자를 이용하여 한반도 특산이며 멸종위기에 처한 설앵초 집단의 유전적 다양성 및 구조 분석을 통한 집단 및 지역 간 유전적 분화 양상 및 유연관계를 추정하여 향후 설앵초의 보전대책 수립을 위한 정보를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 자생지 특성 및 재료

현재 한반도에 분포하고 있는 설앵초의 자생 집단은 대부분 해발 1,000 m 이상 되는 산지 정상부의 비교적 수광량이 풍부한 지역에 위치하고 있었다.

조사된 세 지역 중 제주도 지역은 한라산의 해발고 1,500 m이상의 아고산지대에 넓게 분포하고 풍부한 개체수를 유지하고 있었으며, 한라산의 동사면(1,500~1,950 m) 보다는 서사면(1,500~1,700 m)지역에 훨씬 많은 개체들이 분포하였다. 그러나 한라산의 아고산 지역에까지 전달래

와 철쭉, 산철쭉 등이 기후변화에 따라 확산되어 우점하면서 설앵초 자생지는 눈향나무와 시로미, 백리향 등 아고산 적응 식생과 함께 교란을 받으면서 개체수가 급감하고 있는 실정이다.

경남의 남동부 지역에 위치한 집단들은 대부분 해발 1,000 m 이상의 정상부근 초원지대의 나출지와 등산로를 따라 간헐적으로 분포하고 있으나, 기후변화에 의해 산정부까지 급속하게 확산되어 우점하고 있는 새(*Arundinella hirta* (Thunb.) Koidz.)와 역새(*Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* (Andersson) Rendle), 산오이풀(*Sanguisorba hakusanensis* Makino) 등 초본류와 미역줄나무(*Tripterygium regelii* Sprague & Takeda)와 진달래(*Rhododendron mucronulatum* Turcz.), 철쭉(*Rhododendron schlippenbachii* Maxim.) 등의 목본류의 강한 피압에 의해 자생지가 분획화 되거나 교란되어 개체수가 급격히 감소하고 있는 추세이다. 가야산 지역은 해발 1,200 m 이상의 정상부 초원지대 나출지와 바위틈, 등산로를 따라 분포하고 있었으나 등산로 주변에는 답압 및 불법 채취로 대부분의 개체가 사라진 반면, 최근 탐방로 재정비와 탐방로 외 출입통제가 강화됨으로서 출입통제 구역 내 수광량이 풍부한 나출지역에는 비교적 많은 개체들이 증가하는 추세에 있다.

따라서 이들 3지역 6집단으로부터 각 집단별로 18~33개체 총 165개체를 채집하였으며(Table 1), 각 개체별 생리적 피해를 최소로 줄이기 위해 개체별 어린 1개씩의 잎만을 채취하였다. 동일한 현연관계의 개체가 선발되지 않도록 하기 위해 개체 간 일정한 거리를 두어 채취하였으며, 각 집단의 위치와 면적 및 크기를 조사하였다(Table 1).

2. DNA 추출 및 ISSR PCR

DNA 추출은 Doyle and Doyle(1987)의 CTAB 방법을 수정한 Saghai-Marooof et al. (1984)의 방법에 따라 추출하였다. ISSR(Inter Simple Sequence Repeat) 표지자 분석을 위한 primer는 UBC (University of British Columbia)에서 제작된

Table 1. Location and altitude, size for 6 natural populations of *Primula farinosa* subsp. *modesta*.

| Regions | Pop. | Locality | Altitude (m) | Population size | No. of individuals |
|-------------|------|-------------------------|--------------|-----------------|--------------------|
| Gyeongnam 1 | GJ | Gyeongnam, Miryang-si | 1,240 | 150-200 | 25 |
| | CH | Gyeongnam, Miryang-si | 1,128 | 200-300 | 33 |
| | SB | Gyeongnam, Yangsan-si | 1,042 | 200-300 | 36 |
| Gyeongnam 2 | GY | Gyeongnam, Hapchoen-gun | 1,415 | 500-600 | 18 |
| Jeju | HLA | Jeju-do | 1,940 | >10,000 | 30 |
| | HLB | Jeju-do | 1,600 | >20,000 | 23 |

100개중에서 screen과정을 통해 재현성이 높고 변이가 풍부한 5개(#808, #811, #814, #827, #845)를 선정 후 PCR을 수행하였다. Polymerase chain reaction (PCR)은 template DNA 5~10 ng, 1X PCR reaction buffer, 0.1 mM dNTPs, 0.0025% BSA, 0.6 unit Taq DNA polymerase, 0.375 μ M의 primer에 total volume이 총 15 μ L 되도록 증류수를 첨가하였다.

이러한 반응액을 94°C에서 5분 동안 initial denaturation 후 deanturation 94°C 30초, annealing temperature는 primer 별로 50~54°C 30초, extension 72°C 1분으로 구성된 반응을 45회 반복한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 extension하여 수행하였다.

증폭산물은 1X TBE buffer를 사용하여 1.6% agarose gel에서 3시간 동안 전기영동한 후, Ethium Bromide 염색법으로 UV 조명 아래서 밴드의 유무를 판정하여 data matrix를 작성하였다.

3. 자료 분석

UV 조명하에 촬영된 전기영동 Gel 사진으로부터 재현성이 높고 다형성을 보이는 band만을 유전분석에 이용하였다. 각 size별로 분석된 band를 유전자좌의 산물로 간주하였으며, band의 존재 유무에 따라 “1(출현)”과 “0(비출현)”으로 코딩하여 단일 유전자좌의 두 개의 대립유전자와 관련된 두 가지 표현형의 빈도로 data matrix를 작성하였다.

ISSR 표지자의 우성적 특성을 고려하여 모든 유전분석은 band의 존재 여부에 따른 빈도를 근거로 분석이 수행되었다. 하지만 다른 연구 결과와의 비교를 위해서 열성 표현형의 빈도를 이용하여 Hardy-Weinberg 평형 가정 하에 기대되는 대립유전자의 빈도를 추정하여 Nei's (1973) 유전자 다양도(h)를 추정하였다.

POPGENE 프로그램(Yeh et al., 1999)을 이용하여 다형적 유전자좌의 비율(P)과 유전자당 대립유전자수(A), 유전자좌당 유효대립유전자 수(A_e), Shannon's information index (S) (Shannon and Weaver, 1949)를 각각 계산하였다. 유전 다양성의 집단 내 또는 집단 간의 계층적 분포양상을 알아보기 위해 Arlequin 3.1 (Excoffier and Schneider, 2005)을 이용하여 AMOVA (analysis of molecular variance) 분석을 수행하였다. 집단 간 유연관계를 파악하기 위해 유전적 거리를 근거로 PHYLIP v3.5c (Felsenstein, 1993)의 NEIGHBOR 프로그램에서 UPGMA (Sneath and Sokal, 1993)방법으로 유집한 후 최종적으로 FigTree v.1.3. 프로그램을 이용해서 dendrogram을 산출하였다.

또한 설앵초 집단의 유전적 cluster의 존재여부를 파악하기 위해서 STRUCTURE ver 2.3 (Pritchard et al., 2007) 프로그램을 이용하여 Bayesian clustering 분석을 수행하였다. 연관된 대립유전자의 빈도의 가정 하에 admixture model (F model; Falush et al., 2003)을 이용하여 적절한 cluster의 수를 찾기 위해 가상의 cluster 수 K 를 1부터 6까지 각각 10

회 반복하여 simulation을 수행하였다. 이때 각 simulation에서 최대 반복 횟수(MCMC, Markov Chain Monte Carlo)는 200,000으로 설정하였고, 최초 샘플링된 100,000개의 추정치는 모형의 안정성을 위해 제외하였다(burn-in). 최적의 K값을 결정하기 위해 ΔK 가 최대인 $K=2$ 와 log-likelihood $\ln P(X/K)$ 값이 최대치를 보이며 안정화를 이루는 $K=3$ 을 선정하였다(Evanno et al., 2005).

결 과

1. 설앵초 집단의 유전적 다양성 및 구조

설앵초 집단의 유전다양성 분석에 사용된 5개의 ISSR primer에서 총 33개의 증폭산물을 관찰할 수 있었으며, primer당 평균 6.6개의 다형성 증폭산물을 얻을 수 있었다. 이 중 제주도 지역과 내륙에서 나타난 고유밴드는 각각 2개로 나타났다(자료 미제공). 6개 집단에 대한 다형적 유전자좌의 비율(P)은 51.5~66.7%의 범위로 평균 60.6%였으며, SB와 GY 집단이 66.7%로 가장 높은 비율을 보였고, CH 집단이 51.5%로 가장 낮은 결과를 보였다. 유전자좌당 유효 대립유전자수(A_e)는 1.28~1.39의 범위로 평균 1.34의 결과를 보였는데, 역시 GY집단이 1.39로 가장 높았고, CH 집단이 1.28의 가장 낮은 결과를 보였다. 집단 수준에서 설앵초 집단의 Nei's genetic diversity (h)와 Shannon index (SI)는 각각 평균 0.190와 0.299의 값을 보였는데, GY 집단이 각각 0.231과 0.338로서 가장 높은 값을 보였으며, CH 집단이 각각 0.163과 0.256으로 비교적 낮은 수준을 보였다. 반면, 중 수준에서의 Nei's genetic diversity (h)와 Shannon index (SI)는 각각 0.521로 0.342로서 집단 수준의 유전 다양성에 비해 매우 높은 수준의 다양성을 보였다(Table 2).

2. 지역 및 집단 간 유전적 분화 및 유연관계

설앵초의 조사된 6개 자연집단에 대해 AMOVA를 이용한 분산요소의 비교에서 중 수준의 전체 유전변이 중 52%는 집단 내 개체간의 차이에 기인하였으며, 48%는 집단 간에 존재하는 것으로 나타났다(Table 3). 한편 설앵초 집단을 3개의 지역으로 구분하여 AMOVA 분석을 실시한 결과 지역 간의 유전적 변이가 50%로 분할되었으며 지역 내 집단 간에는 6%로 나타나 집단 간의 유전변이가 주로 지역 간에 기인하는 것으로 나타났다(Table 3).

각 집단 간 Nei(1978)의 유전적 거리를 계산한 결과 평균 0.304로 나타났으며, 같은 지역에 해당하는 HLA과 HLB 집단 간에서 0.016 이었고, GJ, CH, SB 집단 간에는 0.059~0.146의 범위를 보였다. 지역별로는 경남1과 제주도 지역 사이의 평균이 0.622, 경남2와 제주 지역사이에는 평균 0.762로서 매우 먼 거리를 보였으나, 경남1과 경남2 지역사이에는 리적 거리와 상응하게 0.323로 다소 가까운 거리를 나타냈다(Table 4).

집단 간 유전적 거리에 근거한 UPGMA 유집분석을 실시한 결과 지리적으로 같은 지역에 속하는 CH, GJ, SB 집단이 하나의 cluster를 형성하였으며, 다음으로 HLA, HLB 집단이 소그룹을 형성한 후 GY 집단과 유집됨으로서 나머지 cluster를 형성하였다(Fig. 1).

Table 2. Genetic diversity within 6 populations of *Primula farinosa* subsp. *modesta*.

| Subpop. | <i>N</i> | <i>P</i> | <i>A</i> | <i>A_e</i> | <i>SI</i> | <i>h</i> |
|---------|----------|----------|----------|----------------------|-----------|----------|
| GJ | 25 | 57.6% | 1.58 | 1.31 | 0.274 | 0.187 |
| CH | 33 | 51.5% | 1.52 | 1.28 | 0.256 | 0.163 |
| SB | 36 | 66.7% | 1.67 | 1.34 | 0.316 | 0.197 |
| GY | 18 | 66.7% | 1.67 | 1.39 | 0.338 | 0.231 |
| HLA | 30 | 63.6% | 1.64 | 1.36 | 0.327 | 0.203 |
| HLB | 23 | 57.6% | 1.58 | 1.33 | 0.282 | 0.161 |
| Mean | 27.5 | 60.62% | 1.61 | 1.34 | 0.299 | 0.190 |
| Total | 165 | 93.9% | 1.94 | 1.64 | 0.521 | 0.342 |

Note. *N*; number of individuals analyzed, *P*; percentage of polymorphic loci, *A*; number of alleles per locus, *A_e*; effective number of alleles per locus, *SI*; Shannon and Weaver (1949) index, *h*; Nei's (1973) genetic diversity.

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) from 6 populations of *Primula farinosa* subsp. *modesta*.

| Level of variation | df | SS | MS | % |
|--------------------|-----|---------|---------|----|
| Population level | | | | |
| Among population | 5 | 437.229 | 87.446 | 48 |
| Within population | 159 | 534.674 | 3.363 | 52 |
| Regional level | | | | |
| Among regions | 2 | 385.760 | 192.880 | 50 |
| Among population | 3 | 51.468 | 17.156 | 6 |
| Within population | 159 | 534.674 | 3.363 | 44 |

Note. SS; sum of squares, MS; mean squares, %; proportion of genetic variability. * ($P < 0.001$).

Table 4. Nei's genetic distance (above diagonal) and genetic identity (below diagonal) between *Primula farinosa* subsp. *modesta* populations.

| Population | GJ | CH | SB | GY | HLA | HLB |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| GJ | - | 0.059 | 0.046 | 0.324 | 0.462 | 0.535 |
| CH | 0.943 | - | 0.064 | 0.352 | 0.476 | 0.528 |
| SB | 0.955 | 0.938 | - | 0.295 | 0.405 | 0.447 |
| GY | 0.723 | 0.703 | 0.744 | - | 0.245 | 0.299 |
| HLA | 0.630 | 0.621 | 0.667 | 0.782 | - | 0.016 |
| HLB | 0.585 | 0.590 | 0.640 | 0.742 | 0.985 | - |

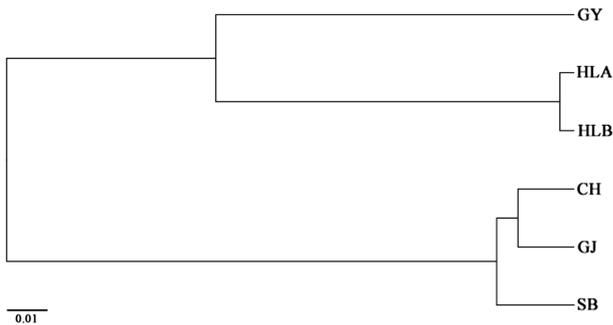


Fig. 1. Dendrogram using the UPGMA method based on Nei's (1972) genetic distance by ISSR markers on 6 populations of *Primula farinosa* subsp. *modesta*. Abbreviation for populations are listed on Table 1.

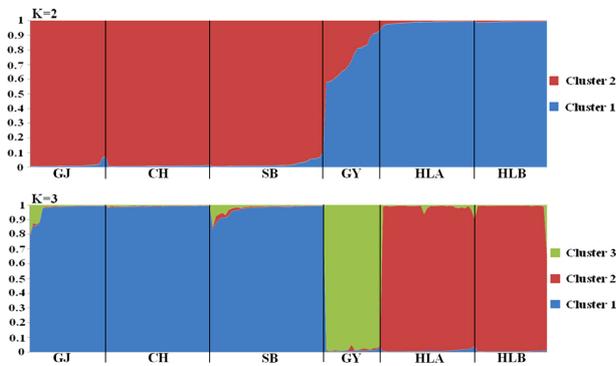


Fig. 2. Classification of individuals from 6 populations of *Primula farinosa* subsp. *modesta* into cluster (K = 2, K = 3) identified using the STRUCTURE method (Pritchard et al., 2007). Each vertical bar in the histograms represents the proportion of the membership coefficients to the K clusters in each individual.

Table 5. The means of cluster membership coefficient of 6 populations of *Primula farinosa* subsp. *modesta* by K value.

| K value | Cluster | GJ | CH | SB | GY | HLA | HLB |
|---------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| K=2 | Cluster 1 | 0.012 | 0.007 | 0.019 | 0.748 | 0.989 | 0.993 |
| | Cluster 2 | 0.988 | 0.993 | 0.981 | 0.252 | 0.011 | 0.007 |
| K=3 | Cluster 1 | 0.967 | 0.991 | 0.970 | 0.008 | 0.008 | 0.004 |
| | Cluster 2 | 0.005 | 0.004 | 0.010 | 0.010 | 0.979 | 0.977 |
| | Cluster 3 | 0.028 | 0.005 | 0.019 | 0.982 | 0.014 | 0.019 |

설앵초의 조사된 6개 자연집단의 유전적 cluster의 존재 여부를 알아보기 위해 Bayesian cluster 분석을 실시한 결과 log-likelihood $LnP(X/K)$ 값은 K=3일 때 최대치를 보였으며 이후 안정화 되었고, 또한 K 값은 K=2일 때 최대값을 보여 최적의 cluster 수를 각각 2, 3으로 판단하고 모든 개체를 대상으로 각 cluster에 대한 membership coefficient를 구하였다. K=2일 때 HLA, HLB집단과 GJ, CH, SB집단은 각

각 cluster1과 cluster2에 높은 membership coefficient(0.9 이상)로 포함되어 뚜렷한 구조적 차이를 보여주었으나, GY집단의 경우는 cluster 1에 대한 0.748, cluster 2에 대해 0.252의 membership coefficient를 나타내었다(Fig. 2; Table 5). 또한 K=3일 때 각 집단들은 각각의 cluster에 대해 높은 membership coefficient(0.9 이상)를 보여주면서 지역별로 뚜렷하게 구조화 되는 경향을 보여주었다(Fig. 2; Table 5).

고찰

설앵초 집단의 유전적 다양성

다양한 우성 표지자(ISSR, RAPD, AFLP)를 통해 조사된 동일 식물 집단의 유전적 다양성 지수는 비슷한 수준으로 나타나는 것으로 보고되고 있으며, 따라서 다른 표지자 간 직접적인 비교도 가능한 것으로 알려져 있다(Nybom, 2004; Kim et al., 2010).

한반도 특산식물이며 멸종위기에 처한 설앵초의 6개 자연집단에서 관찰된 집단 수준의 유전적 다양성의 평균 ($P = 60.62\%$, $SI = 0.299$, $h = 0.190$)은 RAPD 마커로 분석한 다년생 초본류의 평균($h = 0.242$, Nybom, 2004)보다는 낮게 나타났으며, 제한된 분포영역을 가지는 특산식물의 평균($h = 0.191$, Nybom, 2004)과 비슷한 수준을 보였다.

또한 동일한 ISSR 표지자로 분석한 *Primula*속의 식물종인 *P. interjacens* ($I = 0.345$, $h = 0.236$, Xue et al., 2004)와 *P. sikkimensis* ($I = 0.322$, Wang et al., 2008), *P. ovalifolia* ($SI = 0.313$, Nan et al., 2003), *P. farinosa* ($I = 0.21$, $SI = 0.33$, Reisch et al., 2005)과 비교하면, 설앵초 집단에서 관찰되는 유전적 다양성은 다소 낮은 수준을 보였다.

대상 식물종의 지리적 분포와 교배양식, 집단의 크기와 면적 등의 요소들은 집단 내 그리고 집단 간의 유전적 다양성 및 구조를 결정짓는 매우 중요한 인자들이며, 그 중에서 교배양식은 직접적인 유전자 교환에 관여하기 때문에 식물 집단의 유전적 구조의 형성에 매우 중요한 영향을 미친다고 할 수 있다(Hamrick and Godt, 1989).

*Primula*속 식물들 중 대부분(약 91% 정도)은 이형화주의 화기구조를 갖는 것으로 보고되고 있는데(Richards, 2002), 한반도에 분포하는 설앵초 역시 장주화와 단주화의 두 가지 화기형태를 갖고 있으며, 같은 type을 갖는 개체 간에는 수정이 이루어지지 않는 자가불화합(self-incompatible) 특징을 보이며 의무적으로 타가수분을 하는 식물이다(McKee, 1998). 일반적으로 타가수분을 하는 식물은 근친교배를 하는 식물에 비해 높은 유전적 다양성을 유지하는 것으로 보고되고 있다(Nybom, 2004). 한 예로 이형화주 현상을 보이는 *P. interjacens*의 경우 비록 중국 운남성 지역에만 제한적으로 분포하는 지역 특산식물이지만, 높은 유전적 다양성($I = 0.345$, $h = 0.236$)을 보유하는 것으로 알려져 있으며(Xue et al., 2004), 이에 반해 역시 스코틀랜드 특산식물이지만 단형화주(homostyly)로서 자가수

분도 하는 것으로 알려진 *P. scotica*의 경우는 4개 집단에 대한 RAPD 분석결과 유전적 다양성이 전혀 발견되지 않았다(Glover and Abbott, 1995).

하지만 다년생 초본으로 이형화주의 화기구조로서 드물게 무성번식도 병행하는 것으로 알려진(Hambler and Dixon, 2003; McKee, 1998) 설앵초의 경우 집단수준에서 관찰되는 다소 낮은 수준의 유전적 다양성은 주목할 만하다.

그리고 교배양식 이외에도 지리적 분포범위와 집단의 크기 또한 유전적 다양성 및 구조에 영향을 미칠 수 있는 중요한 인자인데, 대개 집단 크기가 작거나 분포범위가 좁은 희귀식물의 경우 유전적 부동과 병목현상 및 근친교배 등의 원인으로 인해 낮은 유전적 다양성을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다(Barrett and Kohn, 1991; Hilfiker et al., 2004; Chung et al., 2013a). 한 예로 Jacquemyn et al. (2009)은 설앵초와 같이 이형화주의 화기 형태를 갖는 *P. elatior*을 대상으로 새로운 집단의 정착 후 유효집단크기의 감소와 유전적 부동이 집단의 유전적 다양성 감소에 직접적인 원인임을 보고한 바 있다.

한반도에 분포하는 설앵초 집단의 경우도 과거 플라이스토세(Pleistocene period) 빙하기 동안 남하하여 한반도 남부지역에 까지 국지적으로 분포한 후 홀로세 온난기 동안 대부분의 분포 역은 식생 천이에 의한 대체식생의 잠식으로 소멸되었고, 일부 집단들은 대체식생의 자심이 어려운 아고산지대의 일부 산정부를 피난처(refugia)로 삼아 적응 및 분화해 온 것으로 보고되고 있으며(Chung et al. 2013b), 이후 기후변화에 따른 산림식생의 천이가 가속화된다면 이들 집단들도 주변 식생에 피압 되거나 교란되어 개체 수는 급격히 감소되거나 멸절될 것으로 사료된다.

따라서 이러한 지사학적 및 진화사로 미루어 볼때 설앵초의 집단들은 식생 천이에 따른 집단 및 자생지의 분획화 및 개체 수 감소로 인해 지속적인 유전적 부동 현상을 겪었을 것으로 추정되며, 이러한 요인들이 설앵초 집단의 낮은 유전적 다양성에 영향을 미친 것으로 판단된다.

비록 본 연구에서는 우성 표지자인 ISSR 분석을 통해 설앵초 집단의 유전적 다양성에 대한 추정 하였지만, 향후 설앵초의 유전다양성에 대한 좀 더 폭넓은 이해를 하기 위해서는 우성 표지자 뿐만 아니라 공우성 표지자를 이용한 추가적인 분석이 필요하며, 또한 집단 내 공간적 유전구조에 대한 이해와 현지 내 복원을 고려하여 세밀한 공간구조에 대한 연구도 필요할 것으로 판단된다.

설앵초 집단의 유전적 분화 및 유연관계

Nyblom (2004)은 RAPD 표지자를 이용하여 집단 간 평균 유전적 분화정도(Φ_{ST})를 추정한 결과, 다년생 초본류의 경우 0.25, 특산식물이나 제한된 분포를 보이는 식물들이 0.26~0.34, 타가수분과 자가수분을 하는 식물들은 각각 0.27과 0.65로 추정된다고 보고하였다. 이처럼 식물 집단

간의 유전적 분화(genetic differentiation) 정도는 일반적으로 다년생 초본이며 타가교배를 하는 식물에서는 비교적 낮은 값은 갖는 것으로 알려져 있다(Loveless and Hamrick, 1984). 따라서 다년생 초본식물이며, 이형화주에 의해 타가수분을 선호하는 *Primula* 속 식물들은 집단 간 대체로 낮은 수준의 유전적 분화 양상을 보이는 경우가 많았다: *P. veris* (G_{ST} =0.039, Antrobus and Lack, 1993)와 *P. vulgaris* (F_{ST} =0.165, Van Rossum and Triest, 2003), *P. farinosa* (Φ_{ST} =0.2059, Reisch et al., 2005). 따라서 기존에 조사된 *Primula* 속의 다른 식물들과 비교해 볼 때 설앵초의 집단 간 유전적 분화도(Φ_{ST} =0.48)는 매우 높은 수준인 것으로 판단할 수 있다.

한편 지역별 수준에서 AMOVA분석을 실시한 결과 전체 유전변이의 50%가 지역 간의 차이에 기인하는 것으로 나타났으며, 집단 간에는 단지 6%로서 전체적으로 설앵초의 개체간(44%)의 변이를 제외한 집단 간에 분포하는 유전변이의 대부분은 지역 간에 차이에 기인하는 것으로 추정되었다.

식물의 집단 간 유전적 분화(genetic differentiation)는 교배양식 외에 물리적 및 생리적 장벽에 의한 유전자 이동(gene flow)의 차단과 개체군 및 개체 수 감소에 의한 유전적 부동(genetic drift) 등의 영향을 받는 것으로 보고되고 있다(Jacquemyn et al., 2004; Wang et al., 2008). 한반도에 분포하는 설앵초 집단은 제주도 한라산 지역과 한반도 남부 일부지역의 1,000 m 이상의 아고산 지역에 주로 분포하고 있는데, 이처럼 아고산지역 산정부나 능선부를 피난처로 제한적으로 분포함으로써 집단 간에 지리적으로 격리되어 있고, 집단 내에서도 주변 식생의 천이와 피압으로 집단은 심각하게 분획화가 되거나 소멸되어 왔으며, 현재에도 계속 진행 중으로 멸절 위기에 처한 상태이다.

이처럼 설앵초 자연집단의 분포 양상 및 자생지 환경특성으로 인해 인접 집단 간 화분의 제한적 이동과 원활한 종자산포가 어렵기 때문에 유전자 흐름이 제한적인 것으로 추정할 수 있으며, 이러한 요인들이 설앵초의 지역 간 및 집단 간 높은 유전적 분화를 야기한 것으로 판단된다. 실제로 설앵초 집단에 대한 Nm 값이 0.591으로(표로 제시되지 않음)서 다소 낮은 결과를 보이는데, 이들 지역 간의 제한된 유전자 흐름을 설명해 준다고 할 수 있다.

한편 Yamazaki (2003)는 한반도에 분포하는 설앵초(*P. farinosa* subsp. *modesta*)를 엽저의 형태가 절저인 육지형(*Primula farinosa* subsp. *modesta* var. *koreana* Yamazaki)과 도피침형의 잎과 유저 형태의 엽저를 가진 제주도형(*Primula farinosa* subsp. *modesta* var. *hamasanensis* (Yamazaki) Yamazaki)로 구분하여 보고 하였는데, 본 연구에서 실시한 Bayesian cluster 분석 결과 가상의 $K=2$ 와 $K=3$ 에서 각각 유전적인 구조를 형성하여 지역간 유전적 분화 양상이 명확히 확인 되었는데, 이 결과는 Yamazaki (2003)의 형태적 특징에 의한 지역간 분화 결과를 크게 지

지한 것으로서 향후 설앵초에 대한 분류학적 논의에 대한 정보를 제공 할 수 있을 것으로 보인다.

설앵초와 같이 아고산지대에 잔존적으로 격리 분포하는 북방계 식물들은 현재 심각한 멸종 및 멸절 위협에 직면하고 있다. 이런 지사학적 분포 양상을 갖는 대부분의 식물 종은 개체수가 적어 근친교배와 유전적 부동에 의한 유전적 다양성의 감소 등에 의해 개체군 생존능력 (population viability)의 저하로 지속적인 개체 수 감소 및 멸절이 우려되며(Kim et al., 2006), 또한 무분별한 자생지 개발과 남획 등이 더해질 때 더욱 가속화 될 것으로 예측된다.

설앵초의 자생지는 대부분 수광량이 좋은 노출된 지역과 등산로 주변으로서 다압과 남획 및 난개발 등의 위협에 무방비로 노출되어 있는 실정이다.

따라서 자생지에 대해 유전적 특성을 기초로 한 적절한 현지 내 및 현지 외 보전방안이 시급한 실정이며, 특히 현지 내 보전전략 수립 및 실행을 위해서는 국립공원과 산림청, 지방자치단체, 시민단체와의 상호 협력이 중요하다고 사료된다. 또한 이와 더불어 종자의 산포와 집단 내 P-type과 T-type 개체의 비율과 분포, 공간적 유전구조, 대량 증식법 개발 등의 종생물학적 연구를 통해 적절한 현지 내 · 외 보전전략이 필요하다고 판단된다.

사 사

본 연구는 국립수목원 '희귀 · 특산식물 보존 및 복원 인프라 구축 (KNA1-2-10, 10-1)' 연구개발사업의 지원으로 수행되었습니다.

인용문헌

- Antrobus, S. and A. J. Lack. 1993. Genetics of colonizing and established of *Primula veris*. *Heredity* 71: 252-258.
- Avisé, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural history and Evolution*. Chapman and Hall, London.
- Barrett, S. C. H. and J. R. Kohn. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants; Implications for conservation. *In Genetics and Conservation of Rare Plants*. Falk, D. A. and K. E. Holsinger (eds.), Oxford University Press, Oxford, U. K. Pp. 3-30.
- Ceriani, R. M., S. Pierce and B. Cerabolini. 2009. The survival strategy of the alpine endemic *Primula glaucescens* in fundamentally unchanged throughout its climate envelope despite superficial phenotypic variability. *Plant Ecology*. 204: 1-10.
- Chung, M. Y., J. Lopez-Pujol, M. O. Moon, J. M. Chung, C. S. Kim, B. Y. Sun, K. J. Kim, and M. G. Chung. 2013. Comparison of genetic diversity in the two arctic-alpine plants *Diapensia lapponica* var. *ovata* (Diapensiaceae) and *Empetrum nigrum* var. *japonicum* (Empetraceae) between Sakhalin in Russia Far East and Jeju Island in Korea, The southernmost edge of their distribution range. *Population Ecology* 55: 159-172.
- Chung, M. Y., J. M. Chung, J. Lopez-Pujol, S. J. Park, and M. G. Chung. 2013. Genetic diversity in three species of *Forythia* (Oleaceae) endemic to Korea: Implications for population history, taxonomy, and conservation. *Biochemical Systematics and Ecology* 47: 80-92.
- Doyle, J. J. and J. A. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Ehrlén, J., S. Käck and J. gren. 2002. Pollen limitation, seed predation and scape length in *Primula farinosa*. *Oikos* 97: 45-51.
- Ellstrand, N. C. and D. R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size; Implication for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Excoffier, L. G. L. and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0.: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Falush, D., M. Stephens, and J. K. Pritchard. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1564-1587.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP v3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA. USA.
- Glover, B. J. and R. J. Abbott. 1995. Low genetic diversity in the Scottish endemic *Primula scotica* Hook. *New Phytologist* 129: 147-153.
- Hambler, D. J. and J. M. Dixon. 2003. *Primula farinosa* L. *Journal of Ecology* 91: 694-705.
- Hamrick, J. L. and M. J. W. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. *In Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Clegg, M. T., A. L. Kahler and B. S. Weri (eds.), Sinauer Associates, Sunderland, Pp. 43-63.
- Hamrick, J. L. and M. J. W. Godt. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. *In Conservation Genetics*. Avisé, J. C. and J. L. Hamrick (eds.), Chapman and Hall, New York. Pp. 281-304.
- Hartl, D. L. and A. G. Clark. 1997. *Principle of Population Genetics*. Sinauer Association Inc., Sunderland, Massachusetts, Pp. 524.
- Hilfiker, K., F. Gugerli, J. P. Schütz, P. Rotach and R. Holderegger. 2004. Low RAPD variation and female-biased sex ratio

- indicate genetic drift in small populations of the dioecious conifer *Taxus baccata* in Switzerland. *Conservation Genetics* 5: 357-365.
- Jacquemyn, H., O. Honnay, P. Galbusera and I. Roldán-Ruiz. 2004. Genetic structure of the forest herb *Primula elatior* in a changing landscape. *Molecular Ecology* 13: 211-220.
- Jacquemyn, H., K. Vandepitte, I. Roldán-Ruiz and O. Honnay. 2009. Rapid loss of genetic variation in a founding population of *Primula elatior* (Primulaceae) after colonization. *Annals of Botany* 103: 777-783.
- Kim, Z. S., D. G. Jo, J. H. Jeong, Y. H. Kim, K. O. Yoo and K. S. Cheon. 2010. Genetic diversity and structure of *Pulsatilla tongkangensis* as inferred from ISSR markers. *Korean Journal of Plant Resources* 23: 360-367. (in Korean)
- Kong, W. S. and D. Watts. 1993. *The Plant Geography of Korea: with an emphasis on the Alpine Zones*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Kong, W. S. 2002. Species composition and distribution of Korean alpine plants. *Journal of the Korean Geographical Society* 37: 357-370. (in Korean)
- Korea National Arboretum. 2008. *Rare Plants Data Book in Korea*. Geobook, Seoul. Pp. 148. (in Korean)
- Lee, W. T. 1996. *Lineamenta Florae Koreae*. Academy publishing Co., Seoul. Pp. 846. (in Korean)
- Loveless, M. D. and J. L. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant population. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65-95.
- McKee, J. and A. J. Richards. 1998. The effect of temperature on reproduction in five *Primula* species. *Annals of Botany* 82: 359-374.
- Ministry of Environment Republic of Korea. 2006. *A Guide to the Third National Natural Environment Research*. Ministry of Environment. Pp. 114-155. (in Korean)
- Nakhutsrishvili, G. 2013. *The vegetation of Georgia (South Caucasus)*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Nan, P., S. H. Shi, S. L. Peng, C. J. Tian and Y. Zhong. 2003. Inter-population congruence in Chinese *Primula ovalifolia* revealed by chemical and molecular marker using essential oils and ISSRs. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences* 58: 57-61.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity on plant. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Oh, S. Y. 1980. *A Review of the Family Primulaceae of Korea*. Research Review of Kyungpook National University 29: 379-417. (in Korean)
- Orians, G. H. and M. E. Soulé. 2001. Whither conservation biology research? *Conservation Biology* 15: 1187-1188.
- Park, C. W. and S. C. Ko. 2007. Primulaceae Batsch ex Borkh. *In The Genera of Vascular Plants of Korea*. Park, C.-W. (ed.), Academy Publishing Co., Seoul. Pp. 498-499.
- Pritchard, J. K., X. Wen and D. Falush. 2007. *Documentation for Structure Software: Version 2.2*. University of Chicago, Chicago, Pp. 1-36.
- Reisch, C., A. Anke and M. Rhl. 2005. Molecular variation within and between ten populations of *Primula farinosa* (Primulaceae) along an altitudinal gradient in the northern Alps. *Basic and Applied Ecology* 6: 35-45.
- Richards, J. 2002. *Primula*, New edition. BT Batford, London.
- Saghai-maroo, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamic. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 8014-8018.
- Shannon, C. E. and W. Weaver. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, Illinois.
- Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*, Freeman Co., San Francisco. Pp. 573.
- Van Rossum, F., S. C. De Sousa and L. Triest. 2004. Genetic consequences of habitat fragmentation in an agricultural landscape on the common *Primula veris*, and comparison with its rare congener, *P. vulgaris*. *Conservation Genetics* 5: 231-245.
- Wang, F. Y., X. J. Ge, X. Gong, C. M. Hu and G. Hao. 2008. Strong Genetic Differentiation of *Primula sikkimensis* in the East Himalaya-Hengduan Mountains. *Biochemical Genetics* 46: 75-87.
- Xue, D. W., X. J. Ge, G. Hao and C. Q. Zhang. 2004. High Genetic Diversity in a Rare, Narrowly Endemic Primrose Species: *Primula interjacens* by ISSR Analysis. *Acta Botanica Sinica* 46: 1163-1169.
- Yeh, F. C., R. C. Yang and T. Boyle. 1999. POPGENE. Microsoft Windows based freeware for population genetic analysis. Release 1.31. University of Alberta, Edmonton.
- Yamazaki, T. 1993. Primulaceae. *In Flora of Japan*, Vol. a. Iwatsuki, K., T. Yamazaki, D. E. Boufford and H. Ohba (eds.), Kodansha Ltd., Tokyo. Pp. 92-93.
- Yamazaki, T. 2003. Intraspecific taxa in *Primula farinosa* L. subsp. *modesta* (Bisset & Moore) Pax. *Journal of Japanese Botany* 78: 295-299. (in Japanese)