

중부지방 적합 자운영 (*Astragalus sinicus* L.) 형질 특성 및 유전적 연관성 분석에 관한 연구

홍 선 희 · 김 재 윤^{1,*}

고려대학교 야생자원 식물종자은행, ¹고려대학교 생명과학대학 생명공학부

Study for Morphological and Genetic Characteristics of Chinese Milk Vetch (*Astragalus sinicus* L.) to Select Suitable Line in Central Area of Korea

Sun Hee Hong and Jae Yoon Kim^{1,*}

Seed Bank of Wild Resource Plants, Korea University, Seoul 02841, Republic of Korea

¹*College of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 02841, Republic of Korea*

Abstract - Although chemical fertilizers have a quick effect and broad applicability to agricultural fields, they have caused many problems like increasing soil acidity or decreasing soil organic matters. Environmental-friendly agriculture has been attempted in various ways such as organic agriculture, natural farming, low input and sustainable agriculture. The common interest of all environmental-friendly systems is to decrease burden to agricultural environment by low input of agricultural labor and materials. This study was conducted to estimate overwintering capacity and genetic distance among Chinese Milk Vetch (*Astragalus sinicus*, CMV) collections based on morphological characteristics and AFLP (Amplified fragment length polymorphism) analysis. Furthermore, the effect of CMV as green manure was observed in mix-cultured paddy fields with rice, sesame and sweet-potato. An another objective of this study was also to compare the pattern of weed occurrence in paddy fields with or without CMV and different rice transplanting times. The CMV collected from Paju district in central region of Korea was successively occurring through self-reseeding without artificial management. However, there was no noticeable difference in growth habit between Paju native CMV and introduced CMV from China which is currently used in farm fields. On the basis of multi-dimensional scaling and tree analyses, there are no significant difference of agricultural growth characteristics among Paju and chinese collections only excepting leaf angle and root length. The flowering time of Gurye collection was fast for 1 week as compared to other collections. AFLP that was commonly used for plant classification, was applied to exam the genetic variation of CMV collections. Total 579 PCR products and 336 polymorphic fragments were generated using 8 primer pairs.

Key words : *Astragalus sinicus* L., AFLP, Phylogenic tree

* Corresponding author: Jae Yoon Kim, Tel. 02-3290-3463,
Fax. 02-3290-3502, E-mail. janee@korea.ac.kr

서 론

피복 및 녹비작물은 그간 농약과 비료에 의존한 집약농업 하에서 그다지 주목받지 못하였다. 그러나 환경친화적 농업, 지속가능한 농업에 대한 이해와 필요성에 근거한 최근의 농업 패러다임은 자운영과 같은 녹비, 피복작물의 필요성이 어느 때 보다 절실하다.

농업 생태계에서 지속가능한 농업을 위해 여러 가지 재배 방식이 시도되고 있으나 농업인의 대다수가 노령화되고, 충분한 인력수급이 불가능한 상황에서 생력화 및 자재의 투여가 가장적은 녹비피복작물이 포함된 윤작체계가 가장 현실적이며, 광범위하게 적용될 수 있다고 생각된다.

또한 동계피복 월동녹비작물은 겨울철 휴한지의 토양유실 방지, 토양 물리구조 향상, 유기물 증가, 토양 미생물활성증가, 농지 녹화에 따른 심미적 만족감 등 많은 이점이 있어 앞으로 그 이용이 증가할 것으로 예상된다.

우리나라에 이용가능한 피복작물의 종류로는 호밀, 라이그래스, 벳치류, 유채류, 개자리류, 토끼풀류 등을 들 수 있다. 그러나 녹비로서의 가치를 따지면 근류균에 의한 공중질소 고정으로 비료효과를 가지는 콩과의 피복작물이 궁극적인 저투입, 지속가능한 농업을 위한 이상적인 양분공급 소재라 할 수 있을 것이다.

콩과의 녹비작물로는 자운영, 토끼풀, 붉은토끼풀, 헤어리벳치 등이 이용될 수 있다. 이들 중 토끼풀류는 다년생으로 월동 후 주작물과의 경합이 생기는 등의 관리상 난제가 있다. 헤어리벳치, 국명으로 털갈퀴덩쿨은 왕성한 녹비생산력, 강한 월동력으로 피복, 녹비작물로서 높은 가치를 지녔으나, 최근 도입된 종으로 국민정서에 어울리지 못하는 실정이다. 실제 포장에서 재배되는 모습은 개화기에도 심미적 만족감을 주지 못하며 ‘벳치쌀’, ‘털갈퀴덩쿨쌀’ 등의 어감에서도 고급스러움이나 정서상 정겨움을 주지 못한다. 도입종으로써 일출의 피해에 대한 연구도 전무하여 이에 대한 연구도 필요한 실정이다.

녹비로써 재배 역사가 오래된 자운영 (*Astragalus sinicus* L.)은 우리나라에 자생하는 콩과식물로서 토양 피복도가 뛰어나며 겨울철에도 토양을 비교적 양호하게 피복하는 식물종으로, 남부지방에서 사료용과 밀원용으로 재배되었으며, 녹비작물로 많이 이용됨은 물론 경관 작물로 그 중요성도 커지고 있다. 자운영은 다른 두과작물과 달리 담수조건에서도 종자가 부패하지 않고 벳 재배가 끝나는 가을까지도 종자의 활력을 온전히 유지할 수 있어 일단 조성이 되면 반복적인 재파종 없이 지속적으로 유지할 수 있는 특성을 가지고 있다(Kim *et al.* 2001). 논에서 재배할 경우 ha당 20~40 ton의 녹비 생산이 가능하고, 이로 인한 토양의 비옥도를 증

가시킴과 동시에 화분과 잡초의 발생을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Kim *et al.* 2001). 따라서 벳 이양작업의 효율을 떨어뜨리는 단점에도 불구하고 이양상의 장점이 많아 재배 면적은 꾸준히 증가될 것으로 예상된다(Jeong *et al.* 1996; Hong *et al.* 1997). 그러나 자운영은 월동력의 한계로 대전 이남의 남부지방에 국한되어 재배가 이루어져왔다. 재배적 조치로 월동력을 높이는 데는 한계가 있어 월동력이 강한 유전자원의 확보는 중북부지방에서의 자운영 재배를 가능하게 할 것이다.

현재 국내에서 자운영은 품종보호대상작물이 아닌 관계로 품종의 등록이 불가할 뿐 아니라 지역이나 주작물 재배 특성에 알맞은 품종의 육성이 전무한 상태로, 자운영 6 계통의 건물중과 초장 변이만 분석되었다. 고려대학교에 설치된 ‘야생초본식물자원종자은행’에서 수집, 보관된 국내의 15종의 자운영 계통 중에는 경기도 파주지역에서 자생하는 자운영도 포함되어 있다. 관찰 결과 수년간 같은 위치에서 자생이 확인되어 내한성이 높은 것이 확인되었다.

자운영 유전자원에 대한 평가는 아직 시도된 적이 없다. 일반적인 표현형 위주의 형태적 형질 외에 DNA 마커 특성을 활용한 수집종간 유연관계를 평가할 수 있다. DNA 마커는 수집종간 유전적 특성을 본질적으로 염기서열 수준에서 반영하며, 환경에 대한 변이가 없고, 재현성이 뛰어난 장점이 있다. 현재 DNA 특성 검정의 방법으로 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA), SSR(Simple Sequence Repeat) 등이 식물의 유연관계(Mo *et al.* 1998; Staub *et al.* 2000; Monforte *et al.* 2003), 품종의 식별(Cho *et al.* 1997; Kwon *et al.* 2003), 유전자 지도 작성(Debener and Mattiesch 1999) 등의 연구에 사용되고 있다.

최근에는 염기서열 분석 기술의 발달로 인하여 NGS(Next-Generation Sequencing) 방법을 이용하여 식물의 유전체를 분자 마커를 이용하지 않고 직접적으로 분석하여 유전체 정보를 활용할 수 있게 되었다. 또한 식물 유전체의 분석은 품종이나 유전자원의 순계 검정 및 유지에도 활용하여 SNP 마커 개발에 이용되고 있다(Davey *et al.* 2011). 그러나 식물의 유연 관계를 분석하기 위한 SNP 및 변이 분석에서는 활용에 제한을 나타내고 있다.

이들 중 RAPD가 간편성, RFLP가 재현성의 장점을 지니고 있는 가운데 가장 최근에 개발된 AFLP(Vos *et al.* 1995)는 이들의 장점을 합한 방법으로 분석방법이 월등하여 많은 연구자들이 이 기술을 선호한다(Lin and Kuo 1995; Mackill *et al.* 1996). Cho *et al.*(1997)의 연구에서도 AFLP는 RAPD 기법에 비해 두 배 이상의 경제적 효율이 있으며, SSR 기법

보다 우수한 효율을 지녔다고 보고하였다.

본 장에서는 수집된 자운영의 유연관계를 AFLP 기법으로 분석하고, 각 수집종의 월동률과 월동 중 토양 피복도 및 형태적 특성을 검정하고, 월동률이 높은 수집종과 그렇지 않은 수집종 간의 월동 관련 생리, 생태적 분석을 통해 향후 중복 부 지방 자운영 도입을 위한 내한성 자운영 선발에 중점을 둔다.

재료 및 방법

1. 자운영의 수집 및 포장 월동률

실험에 사용된 자운영은 2003년부터 2006년 사이 국내 자생 6 계통(파주, 구례, 익산1, 익산2, 해남, 진주)과 중국 9 계통을 수집하여 포장 월동률과 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism) 기법을 이용한 유사도 검정을 위해 사용되었다.

수집된 자운영의 포장 월동률을 검정하기 위해 경기도 남양주시 와부읍 고려대학교 부속농장 시험포장을 9월 15일과 20일 2회 로터리 후 9월 21일 파종하였다. 포장에 10 a당 3 kg 수준으로 산파 후 약 1 cm 깊이로 복토하였다. 피복도는 월동 중인 2월 중순, 월동률은 3월 초순에 달관조사 하였으며, 개화시기는 달관조사 하였으며, 분지수, 엽각, 지하부 길이는 월동 전 11월 30일에 조사하였으며, 초장은 5월 27일에 조사하였다. 나머지 생육특성 조사는 3반복으로 실시하였다. 생초량 및 건물중은 50×50 cm 방형구로 3반복 채취 후 조사하였다.

2. Genomic DNA 추출

15개의 각 계통 내에서 20개체 이상의 자운영 잎 부분을 채취하여 막자사발로 액체질소를 이용하여 마쇄하였다. 마쇄된 잎을 잘 섞은 후 0.1 g을 채취하여 Murray와 Thompson (1980)의 DNA 추출 방법에 의하여 수행하였다.

3. AFLP 분석

추출한 genomic DNA에 5× reaction buffer [50 mM Tris-HCl(pH 7.5)] 5 μL, enzyme (3 U *EcoR* I 2 μL, 3 U *Mse* I 2 μL), D. W. 15.5 μL를 넣어 37°C에서 12시간 동안 digestion 한 후, 70°C에서 15분간 가열하였다. Digested genomic DNA 25 μL adaptor ligation solution [*EcoR* I/*Mse* I adapters, 0.4 mM ATP, 10 mM Tris-HCl(pH 7.5)] 24 μL, T4 DNA ligase 1 μL를 섞어서 3시간 동안 20°C에서 incubation한 후, adaptor

ligated DNA를 1/10로 dilution 시켰다. 5 μL adaptor ligated DNA, pre-amplification primer mix (AFLP® Starter Primer Kit, Invitrogen™) 40 μL, 10 X reaction buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl₂] 5 μL, 5 U Ex-Taq polymerase (TaKaRa BIO Inc.) 1 μL 넣어 total volume 51 μL를 맞추었다. PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc.)를 사용하여 PCR (94°C 30초, 56°C 30초, 72°C 1분을 30 cycle) 증폭을 실시하였다. Pre-amplification 된 DNA를 1/50로 희석하였다. 희석된 pre-amplified DNA (1/50) 2 μL, primer A (*EcoR* I) 0.6 μL, primer B (*Mse* I) 0.6 μL, dNTP 1.6 μL, 10 X reaction buffer 2.5 μL, BSA (Promega, 20 mg mL⁻¹) 0.5 μL, 5 U Ex-Taq polymerase (TaKaRa BIO Inc.) 0.2 μL D.W 17 μL를 넣어 total volume 25 μL에 맞췄다. PCR 조건은 94°C 1분간, 65 → 56°C로의 1분간, 72°C에서 1분으로 touch down PCR을 10 cycle 수행한 뒤, 94°C 30초, 56°C 30초, 72°C 1분으로 33 cycle을 실행하였다. 6% acrylamide gel에서 1500 V에서 전기영동 후 silver staining을 수행하였다.

4. 데이터 분석

1) 군집분석(Cluster analysis)

형태적 특성을 바탕으로한 군집분석은 Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, NTSYS v.2.11L (Applied Biostatistics Inc. 2002)를 이용하여 분석하였다. 분류방법에 사용된 거리의 기준척도는 유클리드 거리

$$E_{ij} = \sqrt{\sum_k (x_{ki} - x_{kj})^2}$$

를 사용하였으며, Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) (Sokal and Michener 1958) option을 이용하여 군집화 하여 같은 프로그램의 tree module을 이용하여 dendrogram을 만들었다.

AFLP 분석결과 얻어진 확연히 구분이 되는 밴드를 대상으로 “0”(absence), “1”(presence)의 이진법 데이터로 전환하여 분석에 임하였다. 각 식물종 간 유전적 근연도는 Nei와 Li (1979)의 유사성 계수 [$S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$], S_{xy} : sample x, sample y 사이의 similarity coefficient, N_{xy} : x, y 모두에 나타난 동일한 band 갯수, N_x : x에 나타난 band 갯수, N_y : y에 나타난 band 개수; DICE]를 이용하여 조사한 후, similarity matrix를 만들었다. Similarity matrix는 NTSYS v.2.11L의 Sequential, Agglomerative, Hierarchical and Nested clustering, SAHN (Sneath and Sokal 1973) 프로그램에서 UPGMA 분석을 사용하여 같은 프로그램의 TREE module

을 이용하여 dendrogram을 만들었다.

2) 다차원척도법(Multi-Dimensional Scaling: MDS)

개체들 간의 상대적인 거리를 계산하여 사람이 인지할 수 있는 2차원 평면상에 상대적 거리로 나타내는 방법인 다차원 척도법은 NTSYSpc 2.1을 이용하였다. 구해진 두 거리 사이의 적합도를 측정하는 통계치인 stress는 다음의 두가지 식에 의해 계산되었다.

$$\text{Stress1} = \sqrt{\frac{\sum (d_{ij}^* - \hat{d}_{ij})^2}{\sum d_{ij}^{*2}}} \quad \text{Stress2} = \sqrt{\frac{\sum (d_{ij}^* - \hat{d}_{ij})^2}{\sum (d_{ij}^* - \bar{d}^*)^2}}$$

결과 및 고찰

1. 자운영 수집 계통 간의 월동 전, 후 생육 특성 비교

본 연구는 월동 전, 후 자운영 유전자형들의 생태적 특성 차이를 조사하였다. 임진강변에서 자생하는 파주 계통은 다른 계통에 비하여 지상부 발육이 더디고 분지수가 작았으나 엽각과 지하부 길이에서 독특한 특성을 보였다(Table 1). 식물체의 엽각은 광합성 시 수광 능력과도 관련이 있으며 월동기간 중 내동성과도 관련이 있다고 알려져 있다(Meinzer *et al.* 1985). 파주 계통의 엽각은 다른 계통에 비하여 5도 이상 작았는데, 본 연구에서 엽각은 지표면으로부터의 각도이므로 엽각이 작다는 것은 엽이 직립하지 않고 포복형이라는 것을 의미한다. 파주 계통의 작은 엽각은 식물체가 월동기간 중에 지표에 낮게 포복하여 월동하는 능력이 클 수 있다

는 것을 의미하는 것이다. 월동 작물인 맥류에서 초형이 포복형일수록 월동률이 높음(Song *et al.* 1982)을 감안할 때 자운영의 경우도 포복형이 월동률이 높을 것으로 생각된다. 또한 지하부의 발육도 생태적으로 월동력을 높이는 데 기여한다. 동해(凍害)의 경우 많은 경우 저온에 의한 피해는 물론 겨울철 한발에 의한 피해가 동반되는 경우가 많으므로 관부 발달과 더불어 관근과 직근의 발달이 좋은 자운영이 겨울철 한해에 의한 피해를 회피할 수 있으므로 내동성이 좋을 것으로 보인다. 계통 간에 이러한 지하부 생육의 차이를 고려

Table 1. Comparisons of growth characteristics among Chinese Milk Vetch (CMV) collections before overwintering

Collections	No. of branch/plant	Root length (cm)	Angle of branch (°)	Coverage (%)
China-E*	5.67	6.38	69.17	70
China-L**	5.83	6.35	67.50	80
China-1	6.00	4.98	70.83	40
China-2	6.33	5.73	66.67	60
China-3	5.67	6.17	69.17	70
China-4	6.50	5.72	60.83	80
China-5	6.50	5.33	68.33	70
China-6	6.67	5.62	66.67	70
China-7	5.67	6.40	67.50	80
Jinju	5.50	5.22	68.33	70
Gurye	6.17	5.98	67.50	60
Haenam	5.67	5.42	67.50	70
Iksan-1	5.33	5.78	67.50	50
Iksan-2	5.50	4.88	69.17	30
Paju	5.33	6.70	61.67	80
LSD _{0.05}	1.64	1.33	10.38	

*: Early maturing type CMV from China

** : Late maturing type CMV from China

Table 2. Comparisons of growth characteristics among CMV collections after overwintering

Collections	Over-wintering rate (%)	Initial flowering date	Flowering date	Plant height (cm)	Fresh weight (ton/10 a)	Dry weight (ton/10 a)
China-E*	60	4/27	5/05	86.7	1.76	0.16
China-L**	65	4/30	5/05	73.3	1.63	0.16
China-1	30	4/23	5/02	76.7	1.91	0.22
China-2	50	4/27	5/05	85.8	1.90	0.20
China-3	50	4/30	5/05	81.7	1.70	0.20
China-4	70	5/02	5/08	77.5	1.67	0.16
China-5	50	4/30	5/05	80.0	1.84	0.21
China-6	40	4/27	5/05	82.5	1.83	0.21
China-7	60	4/27	5/05	75.8	1.65	0.16
Jinju	50	4/27	5/02	80.0	1.89	0.19
Gurye	60	4/20	4/30	74.2	1.69	0.15
Haenam	60	4/27	5/05	70.0	1.62	0.16
Iksan-1	50	4/27	5/05	85.8	1.61	0.17
Iksan-2	30	4/25	5/05	78.3	1.76	0.19
Paju	70	4/27	5/05	70.0	2.17	0.22
LSD _{0.05}	—	—	—	19.03	0.70	0.08

*: Early maturing type CMV from China

** : Late maturing type CMV from China

Table 3. Euclidean distance between populations of collected CMV using morphological characteristics

	China-L	China-E	China-1	China-2	China-3	China-4	China-5	China-6	China-7	Jinju	Gurye	Haenam	Iksan-1	Iksan-2	Paju
China-L*	0.000														
China-E**	0.140	0.000													
China-1	0.099	0.071	0.000												
China-2	0.035	0.126	0.097	0.000											
China-3	0.063	0.078	0.056	0.056	0.000										
China-4	0.135	0.080	0.117	0.105	0.092	0.000									
China-5	0.079	0.063	0.053	0.066	0.020	0.079	0.000								
China-6	0.056	0.095	0.072	0.032	0.035	0.082	0.039	0.000							
China-7	0.111	0.035	0.048	0.096	0.055	0.076	0.043	0.065	0.000						
Jinju	0.062	0.080	0.045	0.055	0.018	0.096	0.025	0.032	0.051	0.000					
Gurye	0.111	0.051	0.032	0.100	0.062	0.095	0.053	0.071	0.024	0.053	0.000				
Haenam	0.163	0.045	0.076	0.149	0.107	0.105	0.093	0.117	0.054	0.102	0.053	0.000			
Iksan-1	0.029	0.133	0.094	0.021	0.062	0.119	0.075	0.042	0.101	0.058	0.100	0.151	0.000		
Iksan-2	0.086	0.071	0.026	0.077	0.045	0.099	0.041	0.051	0.039	0.030	0.029	0.080	0.075	0.000	
Paju	0.175	0.060	0.118	0.152	0.121	0.068	0.105	0.123	0.074	0.120	0.089	0.063	0.160	0.109	0.000

*: Late maturing type CMV from China
 **: Early maturing type CMV from China

하면 저온에 의한 내동성과 겨울철 한발에 의한 피해를 줄이기 위해서는 초형이 포복형이고 뿌리 발달이 좋은 자운영 계통을 육성하는 것이 바람직할 것이다.

수집된 자운영 계통 간 월동 후 생육특성은 계통별로 30~70% 수준이었으나 월동률에 의한 이듬해 생소수량의 차이는 크지 않은 것으로 나타났다(Table 2). 그러나 시험이 실시된 2006~2007년 겨울은 평균 기온이 1월 기준 예년보다 약 5°C 이상 높았던 점을 감안하면 비교적 높은 수준의 월동력을 보였고, 발 재배 시 30% 이상의 월동률 확보로 이듬해 안정적인 생초 생산을 할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 사정상 자운영 파종이 늦어지거나 월동 중 기온이 낮을 때는 적절한 입모수 확보가 월동에 유리하며, 재배적 조치로써 월동률 증진을 위해 힘써야 한다.

또 하나의 중요한 특성인 개화 및 성숙 시기는 수집 계통 간 차이를 보였는데 구레 계통의 경우 개화시가 타 계통 대비 일주일 가량 빨랐으며, 개화성기 또한 가장 빠른 결과를 보였다. 조기개화형 자운영의 개발은 많은 이점이 있다. 작부체계상 적용 가능한 작물이 많아지며, 꽃이 지는 시기는 비슷하여 좀 더 오랜 기간 관상용 가치를 보전할 수 있다.

조사된 형태적 특성(Tables 1, 2) 중 월동률과 피복도를 제외한 양적형질을 이용한 유클리드거리(Table 3) 분석 결과 가장 낮은 중국-3 계통과 진주 계통 사이의 0.018로부터 가장 큰 중국-L 계통과 파주 계통의 0.175 사이 값을 보였다. NTSYSpc 프로그램의 UPGMA 방법을 이용한 군집분석 결과는 Fig. 1과 같다. Coefficient 값 0.07을 기준으로 4개의 그룹이 생성되는데 익산-1, 중국-L, 중국-2 계통은 초장이 긴 계통끼리 그룹화 되었고, 중국-E, 해남, 파주 계통은 동일한 개화시기를 갖고, 높은 월동률을 갖는 것으로 나타났다. 2차

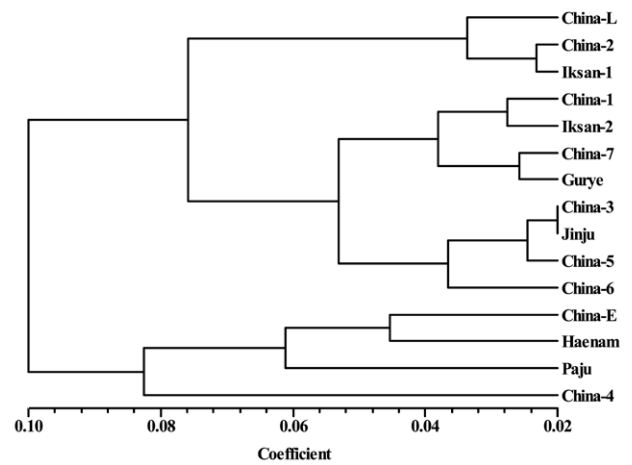


Fig. 1. UPGMA cluster dendrogram of collected CMV based on morphological characteristics.

원 평면상에 상대적 거리로 나타내는 다차원 척도 분석에 의해서도 형질을 이용한 각 계통의 그룹화가 비교적 일치하는 모습을 보였다. Fig. 1의 coefficient 값 0.07을 기준으로 생성된 4개의 그룹을 Fig. 2의 2차원 평면도에 대입한 결과 형으로 배열되는 경향을 보였는데 평면의 왼쪽 방향 벡터는 월동률이 높아지는 경향이었고, 오른쪽은 긴 초장을 갖는 특성을 보였다. 또한 그래프의 위쪽에 위치할수록 개화시기가 늦는 경향이 있었다.

2. AFLP를 이용한 유연관계 분석

AFLP를 이용한 자운영 계통 간의 유연관계를 검정하기

위하여 8개 primer 조합을 이용한 결과 조합당 34~121개의 밴드를 생성했으며, 평균 72.28개, 총 579개의 밴드를 확인할 수 있었다(Table 4). 관찰된 밴드 중 polymorphism을 보인 밴드는 총 243개로 총 밴드의 61.54% 수준이었다. E+ AAC/M+CTA 조합은 총 34개의 밴드를 생성하여 가장 낮은 수율을 보였으나 polymorphism을 보인 밴드 수는 이 중 79.41%인 27개로 가장 높은 비율을 보였다. E+ACT/M+CAT 조합에서는 총 121개의 밴드를 생성하여 가장 많은 밴드를 관찰할 수 있었으며, 54.55%인 66개의 polymorphism 밴드를 보였다. 각 계통 간 유사성 계수(Table 5)는 중국-4와 구례 계통 간 가장 먼 0.826에서 중국-7과 중국-4, 중국-6의 0.939 사이의 값을 보였다. 이를 토대로 각 계통 간의 근연관계를 덴드로그램으로 표시하면 Fig. 3과 같다. 구례 계통은

형태적인 분류기준에서도 개화시기에 대해서 타 계통과 큰 차이를 보였는데 유전적 근연관계의 검증에서도 비교적 큰 차이를 보였다. 파주 계통은 엽각 및 지하부 발육이 타 계통과 차이를 보였으며, 유전적 근연관계의 추정에서도 타 계통 간의 차이보다 유전적으로도 거리가 먼 결과를 보였다. Fig. 3에서 coefficient 값 0.88을 기준으로 4개의 그룹으로 나눌 수 있다. 구례, 익산-2, 파주, 그 외 12 계통의 4 그룹 중 12개 계통이 속한 그룹은 중국 수집 계통 모두를 포함하고 있다. 또한 해남과 진주 계통도 포함하고 있는데 진주와 해남 계통은 각 지역 일반 농가의 논에서 수집한 계통으로 우리나라 자운영 소비량의 전량을 중국에서 수입한 종자를 사용하는 점으로 미루어 보아 중국 계통과 유사하게 나타난 것으로 생각된다.

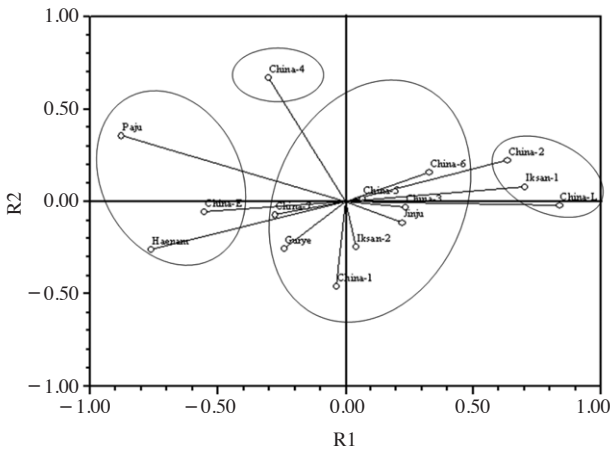


Fig. 2. Multi-Dimensional Scaling (MDS) analysis of collected CMV based on morphological characteristics.

Table 4. Polymorphisms produced from 8 AFLP primer pairs in CMV

Primer pair	Number of AFLP bands			polymorphic frequency(%)
	Total*	Mono**	Poly***	
E + AAC/M + CAG	38	11	27	71.1
E + AAC/M + CTA	34	7	27	79.4
E + AAG/M + CAC	37	17	20	54.1
E + ACC/M + CAA	74	32	42	56.8
E + ACG/M + CAT	56	15	41	73.2
E + ACT/M + CAT	121	55	66	54.6
E + ACT/M + CTC	109	41	68	62.4
E + ACA/M + CTT	110	65	45	40.9
All	579	243	336	
Avg.	72.4	30.4	42	61.5

*: The Total number of AFLP bands observed

** : The number of monomorphic AFLP bands detected

***: The number of polymorphic bands

Table 5. Genetic similarity coefficient between populations of collected CMV using Nei and Li's method

	Paju	Gurye	Iksan-1	Iksan-2	Haenam	Jinju	China-E	China-L	China-1	China-2	China-3	China-4	China-5	China-6	China-7
Paju	1.000														
Gurye	0.850	1.000													
Iksan-1	0.866	0.855	1.000												
Iksan-2	0.837	0.833	0.865	1.000											
Haenam	0.887	0.855	0.892	0.868	1.000										
Jinju	0.878	0.863	0.876	0.866	0.916	1.000									
China-E*	0.875	0.856	0.885	0.895	0.916	0.932	1.000								
China-L**	0.868	0.838	0.881	0.848	0.904	0.905	0.904	1.000							
China-1	0.861	0.839	0.888	0.870	0.895	0.891	0.898	0.892	1.000						
China-2	0.863	0.854	0.879	0.866	0.903	0.907	0.915	0.892	0.906	1.000					
China-3	0.858	0.828	0.860	0.854	0.875	0.886	0.895	0.874	0.893	0.883	1.000				
China-4	0.856	0.826	0.885	0.862	0.890	0.898	0.902	0.884	0.908	0.901	0.894	1.000			
China-5	0.854	0.843	0.885	0.858	0.902	0.896	0.911	0.867	0.885	0.917	0.865	0.902	1.000		
China-6	0.873	0.859	0.886	0.874	0.914	0.909	0.931	0.904	0.898	0.904	0.895	0.895	0.895	1.000	
China-7	0.889	0.865	0.904	0.868	0.927	0.917	0.934	0.910	0.904	0.924	0.887	0.939	0.910	0.939	1.000

*: Early maturing type CMV from China

** : Late maturing type CMV from China

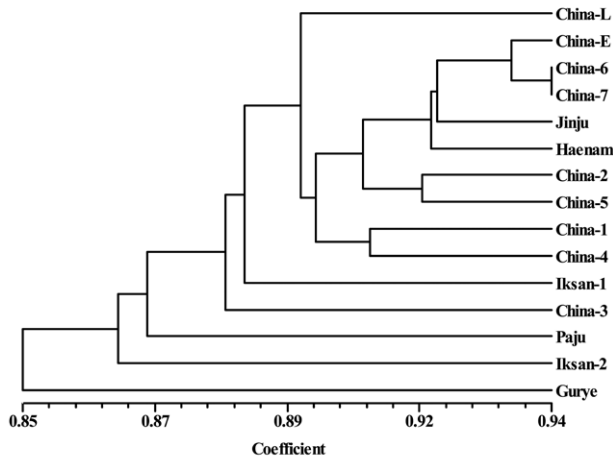


Fig. 3. UPGMA cluster dendrogram of CMV collections based on the AFLP analysis.

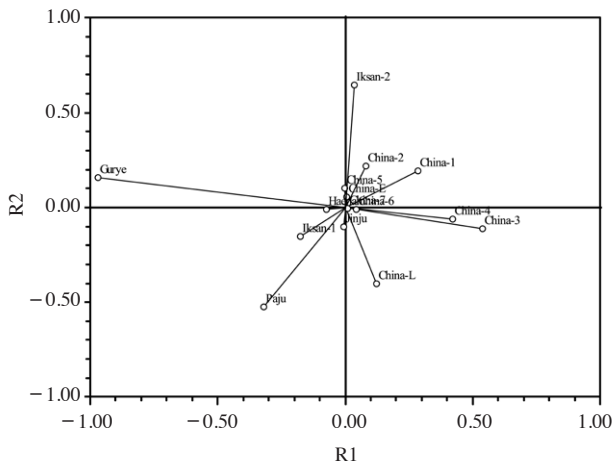


Fig. 4. MDS analysis of CMV collections based on the AFLP analysis.

나머지 3개의 계통 중 구례 계통은 형태적 특성에 있어서도 가장 빠른 개화시기를 보였는데 본 결과에서처럼 타 계통과의 유전적 차이가 형태적 차이를 나타냈을 것으로 생각된다. 또한 파주 계통은 뿌리 길이, 월동전 분지수, 엽각에서 타 수집종과 차이를 보였는데 유전적 근연도 검증에서도 타 수집종과 차이를 보였다.

이러한 차이는 Fig. 4에서와 같이 다차원 척도법에 의한 평면상에서 더욱 두드러진다. 국내 계통들의 산포도가 크며, 본 결과에 따르면 해남, 진주, 익산-1 계통은 중국에서 수입된 종자일 것으로 추정되며, 구례, 익산-2, 파주 계통은 국내 자생종이거나, 중국에서 수입된 후 각 계통이 각자의 서식처에서 서식처마다의 고유한 환경에 대한 특이적인 선발압을 겪으면서 각 계통 고유의 특성을 가지게 된 것으로 생각할

수 있다.

그러나 AFLP에 근거한 유전적 근연관계와 형태적 자료를 바탕으로 한 근연관계 간의 차이는 분자마커 유사도 지수를 바탕으로 일부분 설명할 수는 있지만 그렇지 못한 부분도 있다. 식물체 자체의 다양한 유전적 특성이 균일하게 형태적 특성으로 반영되지 못하였거나, QTL(Quantitative Trait Loci)적인 요소에서 초래되었을 가능성을 제기할 수 있다 (Dillmann *et al.* 1997; Chowdhury *et al.* 2001; Bernet *et al.* 2003).

적 요

본 연구는 중복부지방 적응성 자운영 선발 및 수집 계통 간 형태적, 유전적 근연관계를 분석한 것으로서 총 수집된 16개 자운영 계통 중 파주종은 엽각이 적고, 지하부의 발육이 좋아 형태적 형질이 월동에 적합한 초형이었다. 또한 구례 수집종은 개화기가 타 수집종에 비해 일주일 가량 빨랐다. 유전적 근연관계를 검증하기 위해 8개 primer 조합으로 AFLP를 실시한 결과 총 579개의 밴드를 얻었으며, 이 중 polymorphism을 갖는 밴드는 61.54%인 336개 밴드였다. AFLP 데이터를 이용해 군집분석을 실시한 결과 계통 간 유사도 지수는 0.826~0.939 사이의 값을 가지며, 구례와 파주 수집종은 타 수집종과 유전적 유사도에서 비교적 큰 차이를 보였다.

사 사

본 연구는 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2014R1A1A1003621).

REFERENCES

Arnon DI. 1949. Copper enzyme in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-15.
 Bernfeld P. 1955. Amylases, Alpha and Beta. *Meth. Enzymology* 1:149-158.
 Bernet GP, S Bramardi, D Calvache, EA Carbonell and MJ Asins. 2003. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding.* 122:146-152.
 Cho JY, CS Kim and SY Lee. Effects of Pre-cultivation of

- Chines Milk Vetch (*Astragalus sinicus* L.) on Rice Growth and Development. Korean J. of Agricultural Science 20: 103-108.
- Cho YS, SK Hong, MT Song, HP Moon, JH Lee and NS Kim. 1997. Comparison of Genetic Variation Among Rice Varieties Detected by RAPD, AFLP and SSRP. Gene & Genomics 20:117-128.
- Chowdhury AK, P Srinives, P Tongpamnak and P Saksoong. 2001. Genetic diversity based on morphology and RAPD analysis in vegetable soybean. Korean J. Crop. Sci. 46:112-120.
- Davey JW, PA Hohenlohe, PD Etter, JQ Boone, JM. Catchen and ML Blaxter. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. Nat. Rev. Genet. 12:499-510.
- Dexter ST, WE Tottingham and LF Graber. 1932. Investigation of the hardiness of plants by measurement of electrical conductivity. Plant Physiol. 7:63-78.
- Dillmann C, A Bar-Hen, D Guérin, A Charcosset and A Murgineux. 1997. Comparison of RFLP and morphological distances between maize *Zea mays* L. inbred lines. Consequences for germplasm protection purposes. Theor. Appl. Genet. 95:92-102.
- Meinzer FC, GH Goldstein and PW Rundel. 1985. Morphological changes along an altitude gradient and their consequences for an andean giant rosette plant. Oecologia 65:278-283.
- Kwon YS, JY Moon, Y Kwon, DY Park, WM Yoon, I Song and S Yi. 2003. AFLP analysis for cultivar discrimination in radish and chinese cabbage. Korean J. Breed. 35:319-328.
- Lin JJ and J Kuo. 1995. AFLP: A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. FOCUS 17:66-70.
- Mackill DJ, Z Zhan, ED Redona and PM Colowit. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. Genome 39:969-977.
- Maughan PJ, MA Saghai-Marroof, GR Buss and GM Huestis. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. Theor. Appl. Genet. 93:392-401.
- Mo SY, SH Im, GD Go, CM Ann and DH Kim. 1998. RAPD analysis for genetic diversity of melon species. Korea. J. Hort. Sci. & Technol. 16:21-24.
- Monforte AJ, J Garcia-Mas and P Arus. 2003. Genetic variability in melon based on microsatellite variation. Plant Breeding 122:153-157.
- Murray M and W Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acid Res. 8:4321-4325.
- Nei M and WH Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5269-5273.
- Seigelman HW and SB Hendricks. 1958. Photocontrol of alcohol, aldehyde and anthocyanin production in apple skin. Plant Phys. 33:409-413.
- Sneath PHA and RR Sokal. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification.
- Sokal R and C Michener. 1958. A statistical method for evaluating statistical relationships. Univ. Kansas Sci. Bull. 38:1409-1438.
- Song YN, GE Cho, DJ Maeng and JH Nam. 1982. Studies on the physio-ecological components for improvement of ideo-type winter wheat. Korean J. Breed 14:125-138.
- Staub JE, Y Danin-Poleg, G Fazio, T Horejsi, N Reis and N Katzir. 2000. Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. Euphytica 115:225-241.
- Stergios BG and GS Howell. 1973. Evaluation of viability tests for cold stressed plants. Am. Soc. Hort. Sci. 98:325-330.
- Vos P, R Hogers, M Bleeker, M Reijans, T. van de Lee, M Hornes, A Frijters, J Pot, J Peleman, M Kuiper and M Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414.
- Yoshida S, DA Forno, FH Cook and KA Gomez. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. 3rd Ed. IRRI. pp. 46-49.

Received: 17 September 2016

Revised: 19 September 2016

Revision accepted: 20 September 2016