

한반도 고유종 큰꽃땅비싸리의 배수성과 종분화

김 원 희 · 김 소 영 · 최 병 희
인하대학교 자연과학대학 생명과학과

한국산 땅비싸리속 식물의 종분화를 연구하기 위해 염색체수, 형태적변이 및 RAPD분석을 실시하였다. 땅비싸리($2n=16$)와 쯤땅비싸리($2n=32$)의 염색체수는 기존의 보고와 일치하였다. 본 연구에서 큰꽃땅비싸리의 4배체($2n=32$)와 6배체($2n=48$) 집단이 새로 조사되었다. 큰꽃땅비싸리는 가야산 부근에서 땅비싸리와 쯤땅비싸리와 함께 자라고 있었다. 큰꽃땅비싸리는 이들 두 종에 비해 식물체 높이가, 잎 및 꽃이 더 크며, 땅비싸리 근연종에서 중요한 분류형질인 잎과 꽃의 털에서 땅비싸리와 쯤땅비싸리의 중간 형태를 보이고 있다. RAPD분석에서 큰꽃땅비싸리는 쯤땅비싸리와 더 유사하였으나, 4배체와 6배체 간에 차이를 보였다. 이러한 결과는 한반도 고유종인 큰꽃땅비싸리가 공동분포지인 가야산 지역에서 땅비싸리와 쯤땅비싸리 사이의 잡종현상과 함께 배수체현상에도 의해 기원된 것으로 사료된다.

주요어: 다중기원, 배수체, 염색체 수, 종분화, 큰꽃땅비싸리, RAPD

한반도에 분포하는 땅비싸리속(*Indigofera* L.) 식물에는 section *Psiloceratiae* (Gillette) Schrire 내에 subsection *Psiloceratiae* (=subsection *Decorae* Fang & Zheng)에 속하는 (Schrire, 1995; Fang and Zheng, 1989) 큰꽃땅비싸리 (*Indigofera grandiflora* B.Choi et S.Cho), 땅비싸리 (*I. kirilowii* Maxim.), 쯤땅비싸리 (*I. koreana* Ohwi)와 subsection *Pseudotinctoria* Fang & Zheng에 속하는 낭아초 (*I. pseudotinctoria* Matusm.)의 4종이 있다. 이들 중 쯤땅비싸리 및 큰꽃땅비싸리는 한반도 고유종이다.

큰꽃땅비싸리, 쯤땅비싸리와 땅비싸리는 한반도를 중심으로 분포하고, 형태적으로 유사하며 식물체의 크기, 소엽의 크기 및 화서의 길이에서 심한 변이를 나타내고 있다. 이에, Cho *et al.* (1997)은 땅비싸리와 쯤땅비싸리의 형태적 변이 및 분류에 관한 연구를 수행하여 소엽 이면의 털의 유무, 꽃의 크기와 꽃받침 열편의 길이가 땅비싸리와 쯤땅비싸리의 뚜렷한 식별형질이고, 두 종의 지리적 분포에 있어 땅비싸리는 한반도의 남서부 이외 지역에 분포하는 반면

*교신저자: 전화 032-860-7695, 전송 032-874-6737, kafka8823@naver.com

접수: 2005년 1월 27일. 완료: 2005년 6월 10일.

좁땅비싸리는 충남 해안지역부터 한국의 남서부 지역에 분포하여 지리적으로 떨어져 분포하는 대상종으로 자리 잡고 있음을 밝혔다. 또한, 좁땅비싸리의 염색체 수가 $2n=32$ 임을 처음으로 밝히면서, 땅비싸리속 분류군의 종분화와 배수체 현상사이의 관계를 언급하였다. 큰꽃땅비싸리의 분포는 경상남·북도 가야산으로 알려져 있으며, 염색체 수는 $2n=16$ 으로 밝혀져 있다(Choi, 1996; Choi and Kim, 1997; Cho *et al.*, 1997). 한편, 한국산 땅비싸리속의 분자계통학적 연구로는 Choi and Kim(1997)의 nrDNA의 ITS Sequences를 이용한 극동아시아 땅비싸리속의 종분화에 관한 연구가 있다. 이 연구결과는 ITS2 region에서 좁땅비싸리와 큰꽃땅비싸리 사이에 1bp의 차이만 나타나 두 종간의 유연관계가 매우 높고, 큰꽃땅비싸리로부터 좁땅비싸리가 종분화 한 것으로 추정하였다.

Random amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석법은 집단간 유전적 변이를 연구하는데 유용한 것으로 알려졌으며(Williams *et al.*, 1990), 특히 종내 변이 및 근연 종간의 유연관계 연구에 유용하게 이용되고 있다. RAPD법은 콩과식물 근연 분류군간의 유전적 변이 연구(Seok and Choi, 1998; Potokina *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2000; Theseng *et al.*, 2000; Kwon and Choi, 2001)와 종간, 종내 개체군간의 유연관계 및 종간잡종현상 연구에도 널리 이용되고 있다(Urbanska *et al.*, 1997; Neuffer *et al.*, 1997; Koontz *et al.*, 2001; Caraway *et al.*, 2001; González-Pérez *et al.*, 2004; Shim and Choi, 2004).

본 연구에서는 분포지가 특이하며 배수체 현상에 의한 종분화 가능성이 제기된 한국산 땅비싸리속의 분류군들에 대해 외부 형태 변이와 염색체 수를 재조사 하고, RAPD 분석법을 이용 분류군간 유연관계 및 유전적 변이를 비교하였으며, 한국 고유종 큰꽃땅비싸리의 기원을 밝히고자 하였다.

재 료 및 방 법

재료

본 연구에 사용된 재료는 인하대학교 생명과학과 식물표본실(IUI)에 소장된 식엽표본과 2003년 4월부터 2004년 5월까지 집단별로 채집한 생체 재료를 사용하였는데(Fig. 1, Tabel 1), 일부는 인하대학교 생명과학과 온실에 이식 재배하여 사용하였다. 사용한 재료의 증거표본은 인하대학교 생명과학과 식물표본실(IUI)에 보관하였다.

염색체 수

체세포 염색체 관찰을 위해 채집지에서 생체로부터 적출한 뿌리 근단 및 채집지로부터 이식 재배된 개체 또는 생장상에서 발아시킨 유식물의 뿌리 근단을 적출하여 0.002M 8-hydroxyquinoline에서 3-4시간 전 처리한 후, Aceto-alcohol(1:3)에 1시간 고정시켰다. 고정된 뿌리 근단을 58-60°C 1N HCl에서 10분간 가수분해 시킨 후 1% Aceto-orcein에 12시간

Table 1. Materials investigated for morphology, chromosome number and RAPD analysis of Korean *Indigofera*. MP: Morphology; CH: Chromosome; R: RAPD.

Taxa	No.	Localities	MP	CH	R	Vouchers (IUI)
<i>I. kirilowii</i>	1	Gamcheon-myeon, Gimcheon-si, Prov. Gyeongbuk	○	○	○	W.H.Kim 111, W.H.Kim 110
	2	Ssangnim-myeon, Koryeong-gun, Prov. Gyeongbuk	○		○	W.H.Kim 112
	3	Yongju-myeon, Hapcheon-gun, Prov. Gyeongnam			○	W.H.Kim 136
	4	Samyang-myeon, Okcheon-si, Prov. Chungbuk		○	○	W.H.Kim 137
	5	Seo-myeon, Hongcheon-gun, Prov. Gangwon-do			○	W.H.Kim 59
	6	Mt. Gyeyangsan, Gyesan-dong, Incheon			○	W.H.Kim 138
	7	Hanakkae Beach, Isl. Muuido, Incheon			○	H.B.Shim 31120
<i>I. koreana</i>	8	Mt. Yudalsan, Mokpo-si, Prov. Jeonnam			○	W.H.Kim 143
	9	Seongmun-myeon, Dangjin-gun, Prov. Chungnam			○	W.H.Kim 18
	10	Jinyeong-eup, Gimhae-si, Prov. Gyeongnam			○	J.Y.Lee 3051019
	11	Masan-myeon, Gurye-gun, Prov. Jeonnam			○	W.H.Kim 21
	12	Joma-myeon, Gimcheon-si, Prov. Gyeongbuk	○	○	○	W.H.Kim 125
<i>I. grandiflora</i>	13	Nonggonggeup, Daegu			○	W.H.Kim 123
	14	Yongju-myeon, Hapcheon-gun, Prov. Gyeongnam	○	○	○	W.H.Kim 126, 129
	15	Bugok-dong, Gimcheon-si, Prov. Gyeongbuk	○	○	○	W.H.Kim 30
	16	Joma-myeon, Gimcheon-si, Prov. Gyeongbuk	○	○	○	W.H.Kim 119, W.H.Kim 120
	17	Gacheon-myeon, Seongju-gun, Prov. Gyeongbuk		○	○	W.H.Kim 143
	18	Daega-myeon, Seongju-gun, Prov. Gyeongbuk		○	○	W.H.Kim 144
	19	Seongsan-myeon, Koryeong-gun, Prov. Gyeongbuk	○	○	○	W.H.Kim 122
	20	Suryun-myeon, Seongju-gun, Prov. Gyeongbuk			○	W.H.Kim 124
	21	Suryun-myeon, Seongju-gun, Prov. Gyeongbuk	○	○	○	Choi <i>et al.</i> 6654, W.H.Kim 41
	22	Gaya-myeon, Hapcheon-gun, Prov. Gyeongnam	○		○	W.H.Kim 117
	23	Ssangnim-myeon, Koryeong-gun, Prov. Gyeongbuk	○	○	○	W.H.Kim 118
	24	Yongju-myeon, Hapcheon-gun, Prov. Gyeongnam			○	W.H.Kim 142

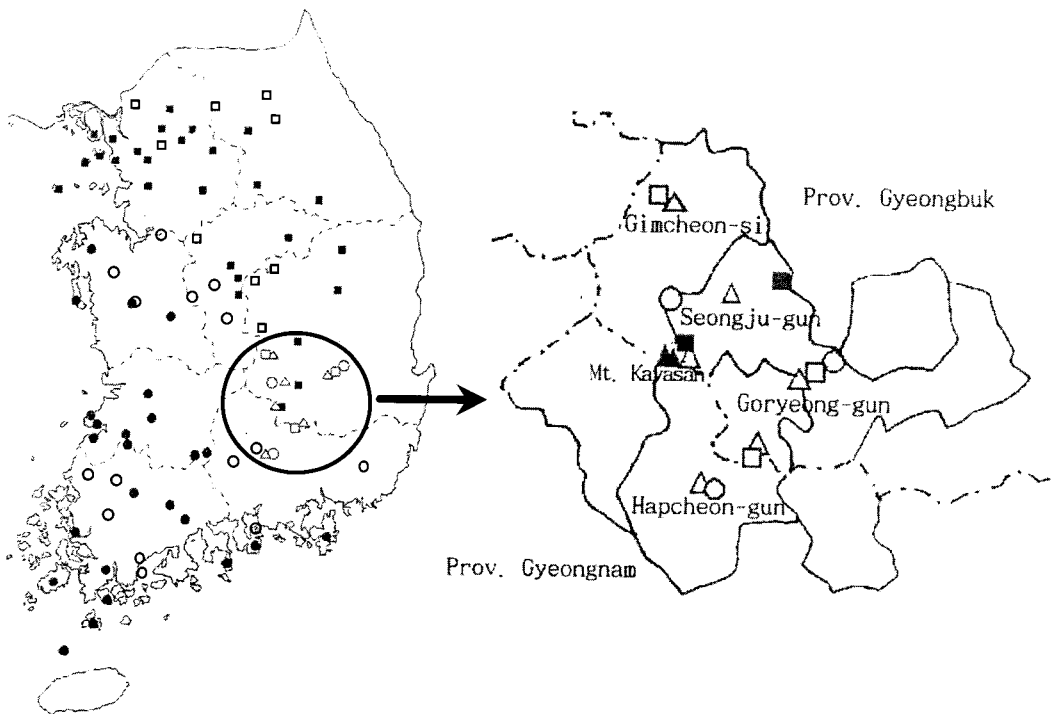


Fig. 1. Distribution of Korean *Indigofera*. Rectangular: *I. kirilowii*, [■: Cho *et al.* (1997), □: present], Circle: *I. koreana* [●: Cho *et al.* (1997), ○: present], Triangular: *I. grandiflora* (△: present).

동안 염색시킨 다음, 압착법으로 프레파라트를 만들어 광학 현미경(Optiphot-2, Nikon; Japan, $\times 1000$)으로 관찰한 후 사진 촬영 하였다.

외부형태 관찰

기존에 보고 된 큰꽃땅비싸리와 근연종의 식별형질들(Choi, 1996; Cho *et al.*, 1997)을 재검토하였고, 꽃의 세부구조를 관찰하였다(Table 2). 외부 형태형질의 측정은 Digital vernier calipers와 해부현미경(Leica MZ8, Leica; Germany $\times 6.3$)을 이용하였다.

RAPD 분석

DNA 추출은 Doyle & Doyle(1987)의 변형된 방법(Seok and Choi, 1998)과 Plant extraction kit(iNtRON BIOTECHNOLOGY)를 사용하였으며, 추출된 DNA는 일정한 농도를 위하여 분광광도계로 정량한 후 $2-5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 가 되도록 희석하였다. DNA 증폭은 60개의 10-base oligonucleotide primer(Operon Technologies, Inc.)를 사용하였고, 전체 반응액을 25

μ 로 하여 Thermal cycler(Perkin Elmer 9600, 2700)를 사용했으며, 95°C에서 5분간 denaturation시킨 후, 94°C 1분, 35°C 1분, 72°C 2분을 45회 반복하였다. 최종적으로 72°C에서 10분동안 extension 반응을 시킨 후 전기영동 할 때까지 4°C에 보관하였다. 증폭된 DNA 3 μ 를 취하여 1 μ 의 gel loading buffer(Promerger, Blue/ Orange loading dye)와 혼합하고, 1.5% agarose gel에 넣고 1× TAE buffer속에서 70V로 4시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동 후 UV(Dual-intensity Transilluminator)로 확인하고, Image analyzer(Pharmacia Biotech)로 촬영하여 분석하였다. Molecular standard markers는 100bp DNA Ladder와 λ DNA/HindIII marker(Promerger)를 사용하였다. RAPD 밴드의 유·무에 따라 0과 1로 코딩한 후, 유사도 지수를 구하였다. 유사도 지수는 Nei & Li(1979)에 의해 보고된 것과 같은 Dice(1945) coefficient를 NTSYS computer programs(Version 2.11)를 사용하여 계산하였고, UPGMA phenogram을 작성하였다.

결 과

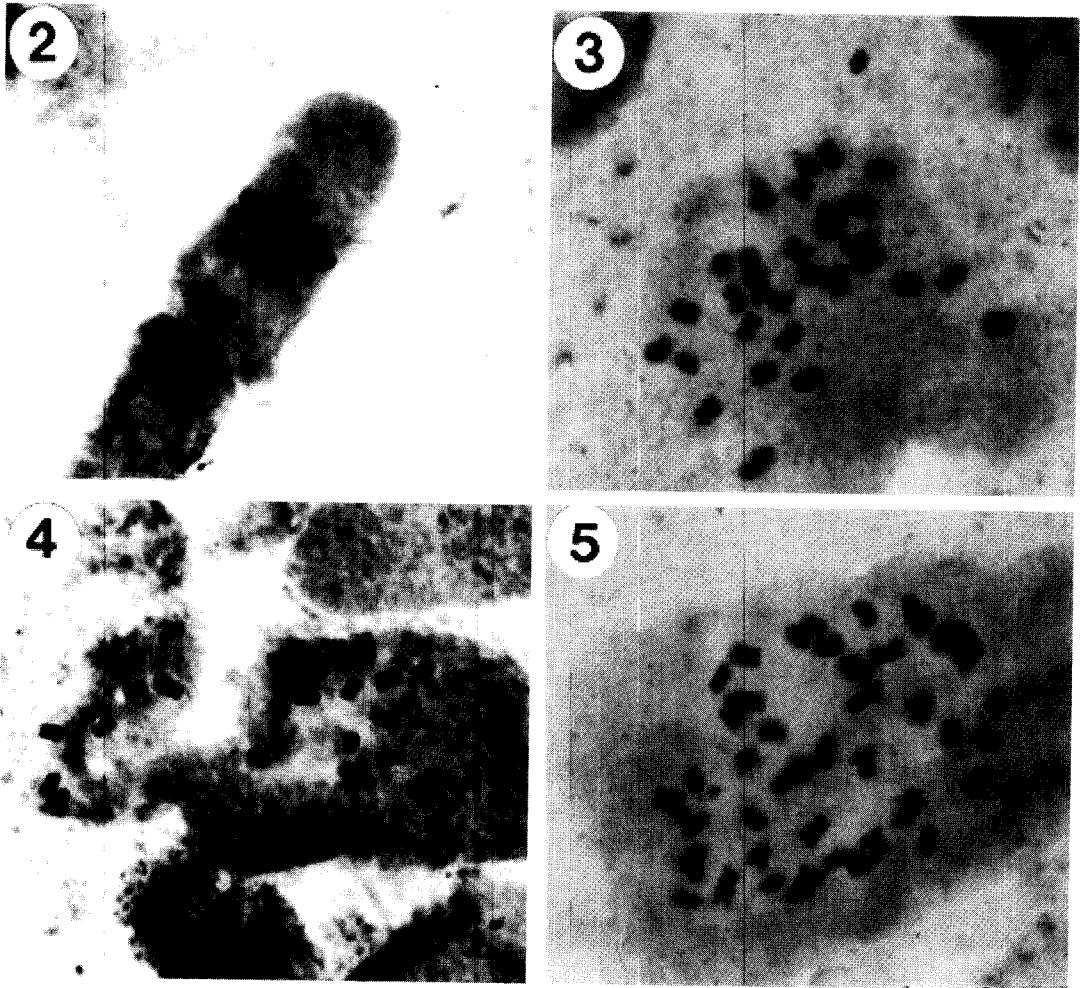
지리적 분포 및 생육지

큰꽃땅비싸리는 Choi(1996)에 의해 경상남·북도 가야산에서 처음 발견되었는데, 이번조사 결과 경북 김천시 지역으로부터 경북 성주군·고령군과 경남 합천군 일대에서도 분포가 확인되었다(Fig. 1). 특히, 경북 김천시 지역에서는 큰꽃땅비싸리와 땅비싸리가 혼재하여 생육하는 것이 조사되었고, 경남 합천군 지역에서는 큰꽃땅비싸리와 좁땅비싸리의 혼재 생육이 조사되었다. 따라서 지금까지 지리적으로 분리되어 분포하는 것으로 알려졌던 큰꽃땅비싸리, 좁땅비싸리와 땅비싸리가 가야산일대를 중심으로 혼재되어 생육하는 것이 확인되었다. 또한, 경남과 경북의 경계지역인 가야산 일대가 좁땅비싸리와 땅비싸리의 분포 경계지역인 것으로 나타났다.

땅비싸리와 좁땅비싸리의 생육지는 일반적으로 숲 가장자리 등산로나 무덤가와 같이 햇빛이 양호한 곳을 선호하고 건조하거나 비옥도가 떨어지는 척박한 토양과 바위 틈과 같은 암석지대에서도 잘 자라는 특성이 있다. 반면, 큰꽃땅비싸리는 숲 가장자리 안쪽의 다소 그늘지고 습하며 부엽토 성분이 섞여 있는 토양을 선호하는 것으로 조사되어, 앞의 두 종과 차이를 나타냈다.

염색체 수

땅비싸리, 좁땅비싸리와 큰꽃땅비싸리가 혼재되어 생육하는 것으로 조사된 지역(Fig. 1, Table 1)을 중심으로 염색체 수를 조사한 결과(Table 2) 땅비싸리는 $2n=16$ (Fig. 2)과 좁땅비싸리는 $2n=32$ (Fig. 3)로 선행 연구결과와 같은 결과를 얻었다. 큰꽃땅비싸리의 염색체 수는 $2n=32$ (Fig. 4)과 $2n=48$ (Fig. 5)이 조사되었고, 기존에 보고된(Choi, 1996) $2n=16$ 의 2배체는



Figs. 2-5. Somatic chromosome photographs of Korean *Indigofera* species. 2. *I. kirilowii* from Gimcheon-si ($2n=16$), 3. *I. koreana* from Gimcheon-si ($2n=32$), 4. *I. grandiflora* from Gimcheon-si ($2n=32$), 5. *I. grandiflora* from Goryeong-gun ($2n=48$).

조사되지 않았다. 큰꽃땅비싸리는 경북 김천시 지역에서는 4배체($2n=32$) 집단만 조사되었고 경북 성주군·고령군 일대와 경남 함천군에서는 6배체($2n=48$) 집단만 조사되어 4배체와 6배체 집단들이 혼재 생육하지 않으며 지리적으로 분리되어 생육하고 있는 것으로 나타났다 (Table 2).

형태적 특징과 변이

땅비싸리와 줄땅비싸리 및 큰꽃땅비싸리 세 종간의 외부 형태적 차이를 비교하였다. 특히

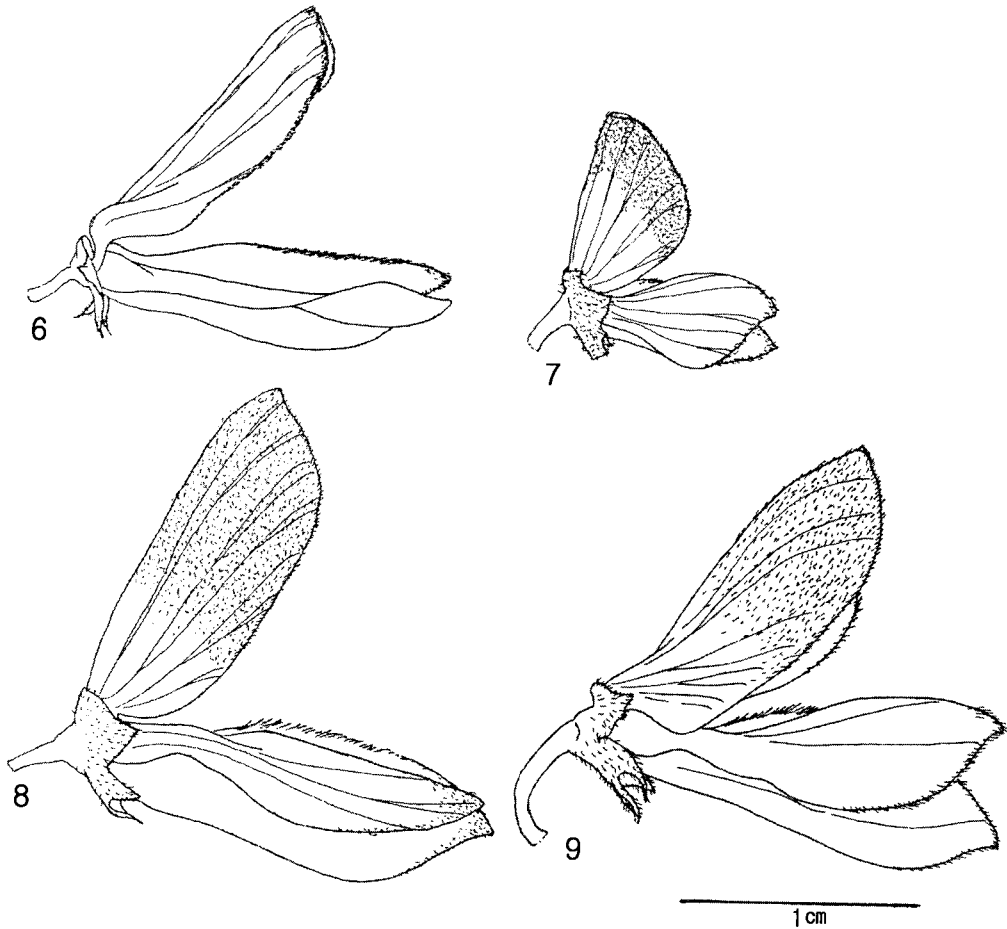
Table 2. Chromosome numbers of Korean *Indigofera*.

Taxa	2n	Previous results		Present results	
		Authors		Regions	2n
<i>I. kirilowii</i>	16	Kawakami (1930), Sugiura (1931), Kodama (1967)		Gimcheon-si	16
				Okcheon-si	16
<i>I. koreana</i>	32	Cho <i>et al.</i> (1997)		Gimcheon-si	32
				Hapcheon-gun	32
<i>I. grandiflora</i>	16	Choi (1996)		Gimcheon-si	32
				Seongju-gun	48
				Goryeong-gun	48
				Hapcheon-gun	48

Table 3. A comparison of taxonomic characters among the population of Korean *Indigofera*.

Taxa	<i>I. kirilowii</i>		<i>I. koreana</i>				<i>I. grandiflora</i>			
	1	2	12	14	15	16	22	21	23	19
Population										
Chromosome No.	2n=16		2n=32		2n=32		2n=48			
Hairs on leaflets upper/lower per 4 mm ²	36/23	23/3	11/0	5/0	26/27	13/12	8/8	6/12	0/18	9/21
Length of standard (cm)	1.57	1.61	1.18	0.82	1.58	1.69	1.65	1.72	1.76	1.84
Length of calyx teeth (cm)	0.15	0.18	0.12	0.12	0.15	0.22	0.12	0.27	0.17	0.09
Hairs on standard	margin only		←———— about a half of upper surface —————→							
Hairs on calyx	margin only		←———— a whole part of surface —————→							

Cho *et al.*(1997)의 연구 결과에서 땅비싸리속의 주요한 분류형질로 판단된 꽃의 길이와 소엽의 털의 분포 등을 정밀 관찰하였다(Table 3). 꽃의 길이를 조사한 결과 큰꽃땅비싸리 4배체와 6배체는 모두 Choi(1996)가 기재한 큰꽃땅비싸리 꽃의 길이의 변이 폭에 포함되었다. 꽃의 기관의 이면과 꽃받침 열편에 산포하는 털의 정도에 있어 중간 차이가 발견되었다. 땅비싸리는 기관 가장 자리에만 견모가 분포하는(Fig. 6, Table 3) 반면 줌땅비싸리와 큰꽃땅비싸리 4배체와 6배체에서 모두 기관 이면의 1/2이상을 견모가 덮고 있는 것이 관찰되었다(Figs. 7-9, Table 3). 꽃받침 열편의 길이에 있어서 땅비싸리와 줌땅비싸리의 중간에 뚜렷한 차이를 보이는 반면, 큰꽃땅비싸리의 꽃받침 열편의 길이는 4배체에서 0.14-0.22 cm로, 6배체



Figs. 6-9. Flowers of *Indigofera*. 6. *I. kirilowii*; 7. *I. koreana*; 8. *I. grandiflora* (tetraploid); 9. *I. grandiflora* (hexaploid).

에서는 0.09-0.27 cm (Table 3)로 땅비싸리와 좀땅비싸리의 꽃받침 열편 길이의 변이 폭을 모두 포함하는 것으로 조사되었다. 큰꽃땅비싸리 4배체와 6배체와 좀땅비싸리는 꽃받침 전체에 털이 분포하는 반면, 땅비싸리에서는 꽃받침 열편 끝에만 털이 분포하였다 (Figs. 6-9, Table 3). 땅비싸리와 좀땅비싸리의 중요 분류 형질인 소엽의 털의 분포에 있어 큰꽃땅비싸리의 경우 양면에 비슷하거나 이면에 약간 더 많은 털이 분포하였다 (Table 3). 이와 같은 외부 형태 형질의 조사 결과에서 큰꽃땅비싸리는 좀땅비싸리와 기관 이면과 꽃받침에 분포하는 털의 정도와 소엽 상면에 분포하는 털의 면적당 개수에서 유사성을 나타냈으나, 땅비싸리와는 소엽 상면과 더불어 이면에도 분포하는 털의 특징이 유사하였다. 그러나 지리적으로 분리되어 분포하는 큰꽃땅비싸리 4배체 집단과 6배체 집단 사이에 뚜렷한 외부 형태적 변이는 발견되지

않았다(Figs. 8-9).

RAPD 분석

땅비싸리속 3종의 각 집단(Table 1)에서 얻어진 genomic DNA를 10-base random primer (Operon Technologies, Inc.) 60개를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 비교 가능한 밴드가 나타난 11개 primers를 선정하였다(Table 4). 11개 primers로부터 얻어진 유용한 밴드는 122개였는데, 이 중 90.2%인 110개 밴드가 polymorphic하게 나타났고, 12개 밴드가 monomorphic하게 나타났다.

종 간 차이를 보인 밴드 중 OPA-08 primer의 1750bp, OPA-11 primer의 800bp, 400bp와 OPA-17 primer의 3000bp는 땅비싸리에서만, OPA-17 primer의 450bp는 큰꽃땅비싸리에서만 나타나는 종 고유의 genetic markers였다(Figs. 10-13). 쯤땅비싸리의 genetic marker는 나타나지 않았다. 실험에 사용된 종내 모든 집단에서 나타나지는 않았으나 각각의 종에서만 나타난 종 특이적 밴드는 땅비싸리 18개, 쯤땅비싸리 4개와 큰꽃땅비싸리 5개로 나타났다(Table 4).

종간·집단간 밴드 pattern을 비교 분석한 결과 땅비싸리와 큰꽃땅비싸리 두 종이 공통으로 갖는 Type A 밴드 pattern은 3개, 쯤땅비싸리와 큰꽃땅비싸리 두 종이 공통으로 갖는 Type B 밴드 pattern은 14개로 나타나 큰꽃땅비싸리는 땅비싸리보다 쯤땅비싸리와 유전적 유연관계가 더 가깝게 나타났다(Table 4). 이는 Choi and Kim(1997)의 ITS 염기서열 분석과 일치 하는 결과이다. 큰꽃땅비싸리 4배체와 6배체에서 조사된 82개 밴드 중 35%인 29개 밴드가 monomorphic 하였다. 또한, 땅비싸리, 쯤땅비싸리와 큰꽃땅비싸리에서 모두 나타나는 밴드 Type C₀는 35개, 땅비싸리, 쯤땅비싸리와 큰꽃땅비싸리 4배체만 공유하는 Type C₁은 5개, 땅비싸리, 쯤땅비싸리와 큰꽃땅비싸리 6배체만 공유하는 Type C₂는 1개로 나타났다(Table 4). 큰꽃땅비싸리의 배수체간 차이를 보면, OPA-07 primer의 890bp 밴드와 OPC-19 primer의 800bp에서 6배체 집단에서만 밴드가 나타나 4배체와 유전적 차이를 보여 주었다.

각 primer 당 나타난 band의 유무에 따라 작성한 유사도 지수를 UPGMA법에 의해 분석하여 phenogram(Fig. 14)을 얻었다. 종간 유연관계에 있어서는 큰꽃땅비싸리는 땅비싸리 보다 쯤땅비싸리와 먼저 유집되어 Choi and Kim(1997)의 결과를 지지 하는 것으로 나타났고, 큰꽃땅비싸리는 4배체와 6배체 집단으로 나뉘어졌다.

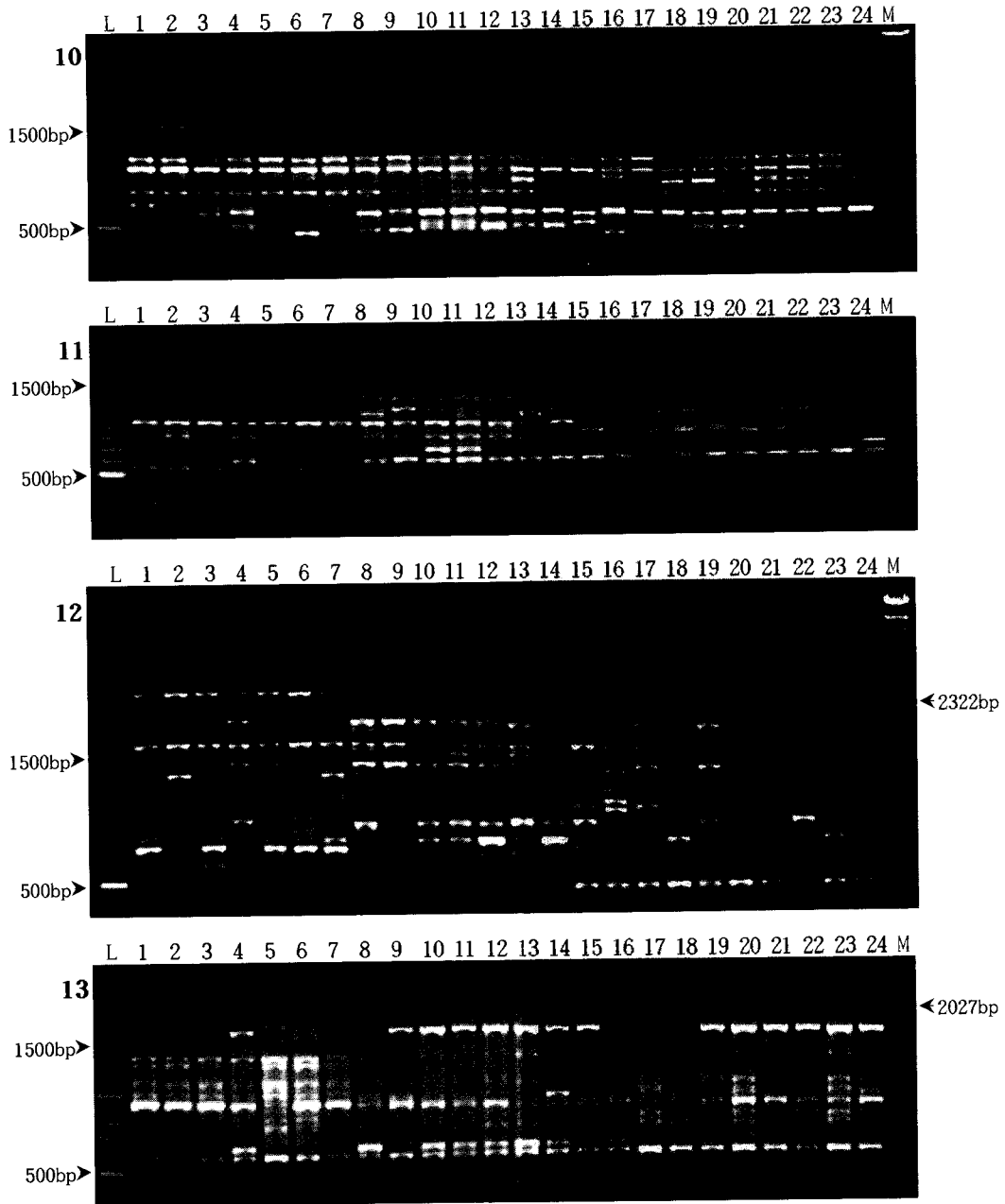
고 찰

경상도 가야산에서만 생육이 확인되었던 큰꽃땅비싸리의 생육지가 경북 김천시, 고령군, 성주군 일대와 경남 합천군 일대로 새롭게 조사되었다. 또한, 이 지역에서 땅비싸리와 쯤땅비싸리가 큰꽃땅비싸리와 혼재 생육하며 분포가 남서와 동북으로 나뉘는 것이 확인되었다. 이는 한반도의 다른 지역에서는 생육이 확인 되지 않는 큰꽃땅비싸리가 땅비싸리와 쯤땅비싸리의

Table 4. Common bands among the species or polyploidy of Korean *Indigofera*

Primer	Type*	Band (bp)	<i>I. kirilowii</i>	<i>I. koreana</i>	<i>I. grandiflora</i>	
			2n=16**	2n=32**	2n=32**	2n=48**
OPA-06 5'-GGTCCCTGAC-3'	B	680	-	±	-	±
	C ₀	1300	±	+	±	+
OPA-07 5'-GAAACGGGTG-3'	C ₀	1200	+	+	+	+
	C ₁	900	±	±	+	-
	M	890	-	-	-	+
OPA-08 5'-GTGACGTAGG-3'	M	1750	+	-	-	-
	C ₁	1000	+	+	±	-
	C ₀	800	±	+	±	±
OPA-10 5'-GTGATCGCAG-3'	A	550	±	-	-	±
	A	1270	±	-	-	±
OPA-11 5'-CAATCGCCGT-3'	C ₀	1000	±	±	±	±
	C ₀	1200	+	±	+	+
	B	900	-	+	+	+
	M	800	+	-	-	-
OPA-16 5'-AGCCAGCGAA-3'	C ₀	1490	±	+	+	±
	B	2300	-	±	+	+
OPA-17 5'-GACCGCTTGT-3'	C ₀	1600	+	+	+	+
	C ₀	1600	+	+	+	+
	B	1500	-	±	-	±
	C ₂	1400	±	+	-	+
	M	450	-	-	+	+
OPC-09 5'-CTCACCGTCC-3'	C ₁	1800	±	±	±	-
	C ₀	1300	+	+	+	+
	B	1200	-	±	±	±
OPC-11 5'-AAAGCTGCGG-3'	B	2400	-	+	±	±
	C ₀	2322	±	±	+	+
	C ₁	1700	+	+	+	-
	M	750	+	-	-	-
OPC-19 5'-GTTGCCAGCC-3'	C ₀	1700	±	±	±	±
	A	800	±	-	-	+
	C ₁	650	±	±	±	-
	B	450	-	±	-	±

*Type A: *I. kirilowii* and *I. grandiflora*, Type B: *I. koreana* and *I. grandiflora*, Type C₀: *I. kirilowii*, *I. koreana* and *I. grandiflora* (tetraploid and hexaploid), Type C₁: *I. kirilowii*, *I. koreana* and *I. grandiflora* tetraploid, Type C₂: *I. kirilowii*, *I. koreana* and *I. grandiflora* hexaploid, Type M: species or population marker. ** + band present, - absent, ± present or absent.



Figs. 10-13. RAPD patterns of Korean *Indigofera*. The sample numbers are corresponding to those of Table 1. **10:** primer OPA-7; **11:** primer OPA-8; **12:** primer OPA-17; **13:** primer OPC-19; L: 100 bp DNA Ladder; M: λDNA/HindIII marker.

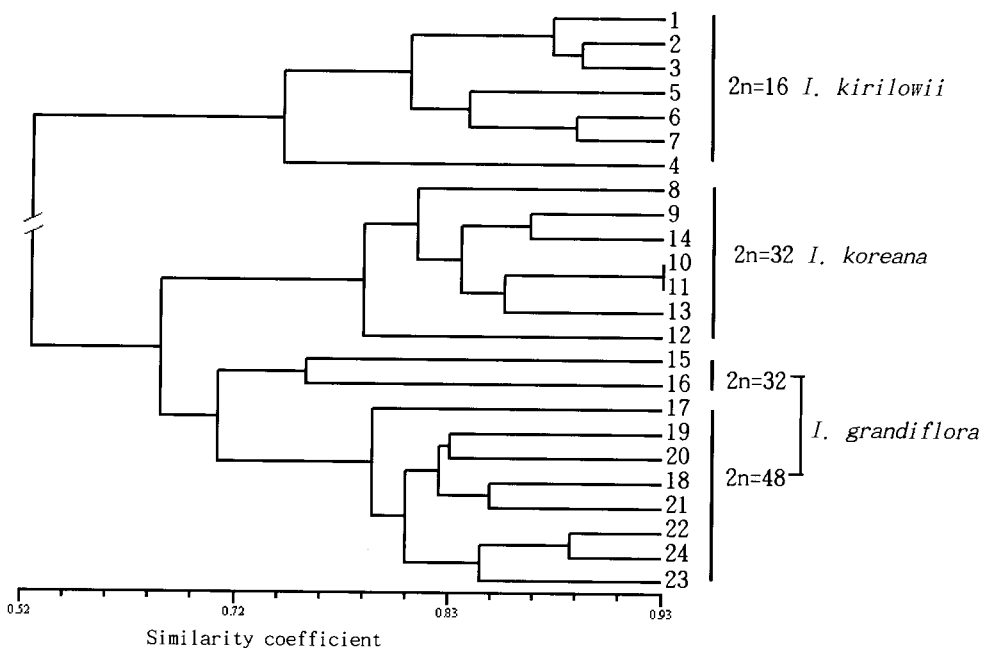


Fig. 14. A phenogram generated by UPGMA based on Dice similarity index, showing the relationship among the species and populations of Korean *Indigofera*.

분포 경계지역에서만 국소 분포하는 것이라 하겠다(Fig. 1). 큰꽃땅비싸리의 외부 형태 형질 중 기관이면과 꽃받침 및 소엽 표면의 털의 분포정도가 좀땅비싸리와 유사한 반면, 꽃의 길이와 소엽 이면에 분포하는 털에서 땅비싸리와 유사하였다(Table 3). 또한 땅비싸리속의 중요 분류형질로 인식된(Cho *et al.*, 1997) 꽃받침 열편의 길이는 땅비싸리와 좀땅비싸리의 꽃받침 길이 변이 폭을 모두 포함하였다(Table 3). 이와 같이 큰꽃땅비싸리는 땅비싸리와 좀땅비싸리의 분포 경계 지역에만 국소 분포하며 땅비싸리속의 중요 분류 형질인 소엽의 털의 분포와 꽃받침 열편의 길이, 꽃의 구조 등에서 땅비싸리와 좀땅비싸리 양쪽의 특징을 갖고 있는 것을 통해 땅비싸리와 좀땅비싸리의 잡종현상에 의해 형성되었을 것으로 사료된다. Choi(1996)에 의해 2배체(2n=16)로 보고 된 큰꽃땅비싸리는 본 연구를 통해 4배체(2n=32)와 6배체(2n=48)가 새롭게 조사되어 3가지 cytotype을 갖는 배수체로 밝혀졌다(Table 2). 배수체 현상은 종분화 메카니즘 중 하나로서 식물에서 높은 빈도로 일어난다고 보고 되어있다(Stebbins, 1971; Levin, 1983). 현존하는 식물 중 단자엽식물의 경우 58%, 쌍자엽식물의 경우는 43%가 배수체에 의한 종으로 알려져 있다(Grant 1963, 1981). 배수체는 일반적으로 양친종에 비해 외부형질이 크며 환경 인자에 대해 내성이 강한 특성을 갖는 것이 입증되어있다(Rost *et al.*, 1997). 또한, 배수체 현상은 식물체 전체를 변화시킬 수도 있고, 콩과 식물의 뿌리혹과 같은

특정 영양기관에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Grant 1981). 큰꽃땅비싸리는 생식형질인 꽃의 크기가 양친종인 땅비싸리와 좁땅비싸리보다 크며(Figs. 6-9, Tabel 3), 혼재 생육지 내에서 양친종들에 비해 다소 그늘지고 습한 부엽토 성분이 있는 곳을 선호하는 것으로 조사되어 새로운 환경의 생육지에 적응한 배수체의 특징을 보여주는 것으로 사료된다. 이와 같이 4배체와 6배체를 가지며(Figs. 2-5, Table 2), 생식형질의 비대화, 생육지의 차이 등의 특징을 보이는 큰꽃땅비싸리는 개화시기가 비슷한(Cho, 1995) 땅비싸리와 좁땅비싸리의 혼재 생육지 내에서 두 종의 잡종현상과 함께 배수체 현상에 의해 종분화 된 것으로 사료하였다.

식물체에서 배수체 현상과 중간 잡종현상에 의한 종의 다중기원에 관한 연구들이 보고 된 바있다(Cook *et al.*, 1998; Segraves *et al.*, 1999; Soltis and Soltis, 1993, 1999; Solits *et al.*, 1992, 1995; Otto and Whitton, 2000). 큰꽃땅비싸리 4배체 집단과 6배체 집단은 뚜렷한 외부 형태적 차이를 보이지 않으나, 생육지가 지리적으로 분리되어 있다(Figs. 8-9, Table 2). 또한 RAPD 분석결과 두 배수체 집단은 Type C₁과 C₂ 밴드 pattern에 의해서 유전적 차이를 보였다(Table 4, Figs. 10, 14). 이와 같은 큰꽃땅비싸리 배수체 집단들의 분포 특성과 RAPD의 유전적 특성에 기초하여, 4배체 집단과 6배체 집단이 각기 다른 형성과정을 거친 다중기원인 것으로 추정된다.

인 용 문 헌

- Caraway, V., G. D. Carr and C. W. Morden. 2001. Assessment of hybridization and introgression in lava-colonizing Hawaiian *Dubautia* (Asteraceae: Madiinae) using RAPD markers. *Amer. J. Bot.* 88: 1688-1694.
- Cho, S. K. 1995. A taxonomic study of *Indigofera kirilowii* and its related species (Leguminosae) in East Asia. Master's thesis of Inha Univ. (In Korean)
- _____, B. H. Choi and J. H. Kim. 1997. Morphological variations and taxonomy of *Indigofera kirilowii* and *I. koreana* (Leguminosae). *Korean J. Pl. Taxon.* 27: 73-87. (In Korean)
- Choi, B. H. 1996. *Indigofera grandiflora* (Leguminosae), a new species from Korea. *J. Plant Biol.* 39: 145-148.
- _____, and J. H. Kim. 1997. ITS sequences and speciation on Far Eastern *Indigofera* (Leguminosae). *J. Plant Res.* 110: 339-346.
- Cook, L. M., P. S. Soltis, S. J. Brunfeld and D. E. Soltis. 1998. Multiple independent formations of *Tragopogon* tetraploids (Asteraceae): evidence from RAPD markers. *Molecular Ecology* 7: 1293-1302.
- Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 295-302.

- 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.
- Fang, Y.-Y. and C.-Z. Zheng. 1989. A study on the genus *Indigofera* Linn. from China. *Acta Phytotax. Sin.* 27: 161-177.
- González-Pérez, M. A., J. Caujapé-Castells and P. A. Sosa. 2004. Molecular evidence of hybridization between the endemic *Phoenix canariensis* and the widespread *P. dactylifera* with Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) markers. *Plant Syst. Evol.* 247: 165-175.
- Grant, V. 1963. *The Origin of Adaptations*. Columbia Univ. Press, New York.
- _____. 1981. *Plant Speciation* (2nd ed.). Columbia Univ. Press, New York
- Kawakami, I. 1930. Chromosome numbers in Leguminosae. *Bot. Mag. (Tokyo)* 44: 319-328.
- Kodama, A. 1967. A cytological studies on root nodules of some species in Leguminosae 2. *Bot. Mag. (Tokyo)* 80: 92-99.
- Koontz, J. A., P. S. Soltis and S. J. Brunsfeld. 2001. Genetic diversity and tests of the hybrid origin of the endangered yellow larkspur. *Conserv. Biol.* 15: 1608-1618.
- Kwon, S. K and B. H. Choi. 2001. Taxonomy of Korean endemic species of *Vicia hirticalycina* based on morphological and genetic variations. *Korean J. Pl. Taxon.* 31: 15-31. (In Korean)
- Levin, D. A. 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *Am. Nat.* 122: 1-25.
- Luo, M. C., K. K. Hwu and T. C. Huang. 2000. Taxonomic study of Taiwan *Astragalus* based on genetic variation. *Taxon* 49: 35-46.
- Neuffer, B., H. Auge, H. Mesch, U. Amarell and R. Brandl. 1999. Spread of violets in polluted pine forests: morphological and molecular evidence for the ecological importance of interspecific hybridization. *Mol. Ecol.* 8: 365-377.
- Otto, S. P. and J. Whitton, 2000. Polyploid incidence and evolution. *Ann. Rev. Genet.* 34: 401-437.
- Potokina, E., N. Tomooka, D. A. Vaughan, T. Alexandrova and R.-Q. Xu. 1999. Phylogeny of *Vicia* subgenus *Vicia* (Fabaceae) based on analysis of RAPDs and RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Gen. Res. Crop Evol.* 46: 149-161.
- Rost, T. L., M. G. Barbour, C. R. Stocking and T. M. Murphy. 1998. *Plant Biology*. Wadsworth Publishing Company, California. Pp. 274
- Schrire, B. D. 1995. Evolution of the tribe Indigofera (Leguminosae-Papilionoideae). *In* *Advance in Legume Systematics, Part 7: Phylogeny*. M. D. Crisp & J. J. Doyle (eds.), Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 161-244.
- Segraves, K. A., J. N. Thompson, P. S. Soltis and D. E. Soltis. 1999. Multiple origins of polyploidy and the geographic structure of *Heuchera grossulariifolia*. *Molecular Ecology.* 8: 253-262.

- Seok, D. I. and B. H. Choi. 1998. Taxonomic relationships in East Asian *Vicia* species with unijugate leaves based on random amplified polymorphic DNA markers. *J. Plant Biol.* 41: 201-207.
- Shim, H. B. and B. H. Choi. 2004. RAPD marker variations between and within the species of Korean *Suaeda*. *Korean J. Pl. Taxon.* 34: 63-74. (In Korean)
- Soltis, D. E. and P. S. Soltis. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Crit. Rev. Plant Sci.* 12: 243-273.
- _____ and P. S. Soltis. 1999. Polyploid: recurrent formation and genome evolution. *Tree* 14: 348-352.
- Soltis, P. S., J. J. Doyle and D. E. Soltis. 1992. Molecular data and polyploid evolution in plant. In *Molecular Systematics of Plants*. Soltis, P. S., J. J. Doyle and D. E. Soltis (eds.), Chapman and Hall, New York. Pp. 177-201.
- _____, 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). *Amer. J. Bot.* 82: 1329-1341.
- Stebbins, G. L. 1971. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Addison-Wesley publishing, Massachusetts.
- Sugiura, T. 1931. A list of chromosome numbers in angiospermous plant. *Bot. Mag. (Tokyo)* 45: 353-355.
- Theseng, F. S., T. K. Lin and S. T. Wu. 2000. Relations of genus *Glycine* subgenus *Soja* and *Glycine formosana* Hosok. collected from Taiwan: Revealed by RAPD analysis. *J. Jap. Bot.* 75: 270-279.
- Urbanska, K. M., H. Hurka, E. Landolt, B. Neuffer and K. Mummenhoff. 1997. Hybridization and evolution in *Cardamine* (Brassicaceae) at Urnerboden Central Switzerland: biosystematic and molecular evidence. *Plant Syst. Evol.* 20: 233-256.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucl. Acid Res.* 18: 6531-6535.

Ployploidy and speciation in Korean endemic species of *Indigofera grandiflora* (Leguminosae)

Won-Hee Kim, So-Young Kim and Byoung-Hee Choi

Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Chromosome number, morphological variation and RAPD analysis were investigated to study on the speciation of *Indigofera* in Korea. Chromosome numbers of *I. kirilowii* ($2n=16$) and *I. koreana* ($2n=32$) are consistent with the previous reports. In this study tetraploid ($2n=32$) and hexaploid ($2n=48$) of *I. grandiflora* are newly observed. *Indigofera grandiflora* is distributed around Mt. Kaya area together with *I. kirilowii* and *I. koreana*. The former species has the larger sizes in plant height, leaves and flowers than the latter two and shows intermediate form between the two species in hairs on leaves and flowers which are one of the most important taxonomic characters in this group. In the RAPD analysis, *I. grandiflora* is similar to *I. koreana* than *I. kirilowii* but RAPD band patterns revealed difference between tetra- and hexaploid of the species. These results suggested that Korean endemic species of *I. grandiflora* ($2n=16, 32, 48$) might has multiple origin through polyploidization and/or hybridization between *I. kirilowii* ($2n=16$) and *I. koreana* ($2n=32$) around Mt. Kaya area where the latter two grow together.

Key words: Chromosome number, *Indigofera grandiflora*, multiple origin, polyploidy, RAPD, speciation.

*Corresponding author: Phone +82-32-860-7695, Fax +82-32-874-6737, kafka8823@naver.com