

털개구리미나리(*Ranunculus cantoniensis*)의 분자계통학적 유연관계 및 종분화

이창숙¹ · 이남숙¹ · 여성희^{*2}

(¹이화여자대학교 자연과학대학 생명과학과², 이화여자대학교 사범대학 과학교육학과)

미나리아재비속(*Ranunculus*)의 털개구리미나리(*R. cantoniensis*)의 분자계통학적 유연관계를 조사하고 잡종화 가설을 추정하기 위하여, 근외군을 포함한 8분류군의 25개 DNA재료를 대상으로 핵 DNA와 엽록체 DNA의 염기서열을 분석하였다. 털개구리미나리와 근연종에 대하여 maximum parsimony와 maximum likelihood방법으로 분석한 핵 DNA의 ITS 계통수와 psbA-trnH, rps16, trnL 유전자 구간의 염기서열을 조합한 엽록체 DNA 계통수에서, 털개구리미나리는 짓가락나물과 가장 가깝고, 개구리미나리, 왜젓가락나물 순으로 유연관계를 나타내었다. 이러한 분자계통학적 유연관계는 털개구리미나리가 왜젓가락나물과 가장 가깝다는 기존의 외부형태학적 보고와 일치하지 않았다. 염기서열 분석에서 털개구리미나리는 조사된 분류군 중 유일하게 다형성을 나타냄으로서, 염색체수와 핵형에 의하여 보고된 털개구리미나리의 다형성을 지지하였다. 털개구리미나리는 ITS에서 짓가락나물과 왜젓가락나물의 표지 유전자를 공유하고, 엽록체 DNA에서 왜젓가락나물의 표지 유전자를 공유하였다. 이 결과는 염색체수와 핵형에 의하여 제시되었던 털개구리미나리가 짓가락나물과 왜젓가락나물의 잡종화에 의하여 종분화되었다는 가설을 지지하였으며, 왜젓가락나물이 모계이며, 짓가락나물이 부계로 추정된다.

주요어: 털개구리미나리, 종분화, ITS, psbA-trnH, rps16, trnL

미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 식물인 털개구리미나리(*R. cantoniensis* DC.)는 식물체에 털이 많고, 근생엽은 불규칙하고 날카로운 톱니를 가지며, 경생엽은 세갈래로 갈라지고 잎자루는 짧다. 열매는 집합과로 둥글고 수과는 도란형이며, 화탁은 긴타원형이다(여, 1985; 이, 1996). 털개구리미나리의 염색체는 $2n=32$ 로 보고되었으나(Kurita, 1955), $2n=31$ 과 $2n=33$ 인 개체들이 관찰되어서 털개구리미나리의 다형성(polymorphism)이 제시되었다 독립하

*교신저자: 전화 (02)3277-3793, 전송 (02)3277-2684, 전자우편 anemone@ewha.ac.kr

(접수 2004년 11월 8일자, 완료 2004년 12월 15일)

여, 새로운 서식처에 적응할 때 비로소 이배수체 분류군으로 된다(Stebbins, 1984; 1981; Takahashi, 2003). 이러한 이배수 현상(aneuploidy)은 자연상태에서 교배 후 부모로부터 1985). 털개구리미나리의 지역별 다형성은 염색체 수 뿐 만 아니라 핵형(Okada and Tamura, 1977), ITS 염기서열분석에서도 보고된 바 있다(Kang *et al.*, 2001).

털개구리미나리의 핵형변이는, 염색체수가 $2n=16$ 이며 외부 형태적으로 털개구리미나리와 유사한 왜젓가락나물의 종내 배수현상(intraspecific polyploid)에 의하여 일어난다고 가정하였다(Tamura, 1978). 왜젓가락나물의 일본내 3지역(Matsuyama, Oaru, Karatsu) 개체군들을 인위적으로 교배시켜서 얻은 배수화된 개체군들의 꽃가루 염성민도를 조사결과, 교배 후 염성도가 높은 Matsuyama집단의 왜젓가락나물이 털개구리미나리의 화분형태와 가장 가까운 것으로 보고하였다(Okada, 1981). 이러한 털개구리미나리와 왜젓가락나물의 근연성은 외부 및 내부형태, 핵형과 화분 등에 의한 계통학적 연구에서도 보고된 바 있다(여, 1985).

그러나 Okada(1984)는 털개구리미나리가 왜젓가락나물($2n=16$)과 젓가락나물(*R. chinensis* Bunge; $2n=16$)의 교배종이라는 가설을 설정하고, 두 종간의 인위적인 종간교배(interbreeding) 실험을 통하여 털개구리미나리가 왜젓가락나물과 젓가락나물의 교배에 의해 분화됨을 증명하고자 하였으나 종간 교배 후 처음 1세대의 꽃가루 염성율과 종자 결실율은 낮았다. 그러나, 연속적인 세대에 걸친 인위 교배 실험 결과 꽃가루의 염성율과 종자 결실율이 높아졌다는 결과를 바탕으로 두 종간 교배를 통하여 털개구리미나리($2n=32$)가 종분화되었음을 보고한 바 있다(Okada, 1989). 이러한 종간 교배현상은 자연상태에서 빈번히 일어나며, 새로운 분류군을 유도하는 중요한 요소로 작용하고 있음이 알려져 있다(Grant, 1981).

핵내 ribosomal DNA인 ITS부위와 엽록체 DNA구간을 함께 분석하는 것이 고등식물의 종간 또는 속간의 계통 유연관계를 파악하는데 중요한 자료로 이용되어 왔다(Rieseberg and Soltis, 1991; Baldwin *et al.*, 1995; Downie and Katz-Downie, 1996). 또한 ITS부위와 엽록체 DNA부위의 정보는 *Rubus*속의 다른 그룹내의 잡종해석에 대한 정보를 제공해 왔다(Alice and Campbell, 1999; Lawrence and Cambell, 1999; Lawrence *et al.*, 2001; Andrea and Simpson, 2004).

따라서 본 연구는 미나리아재비속식물 중 털개구리미나리와 유사한 왜젓가락나물, 젓가락나물, 개구리미나리(*R. tachiroei* Franch. et Sav.)를 대상으로 핵 DNA와 엽록체 DNA의 염기서열을 분석하여 형태학적 및 세포학적 연구에서 제시된 털개구리미나리와 근연종들의 분자 계통학적 유연관계를 추정하고, 아울러 털개구리미나리의 종분화 가설을 검토하고자 한다.

재 료 및 방 법

털개구리미나리(*R. cantoniensis* DC)의 변이를 최소화하기 위해 형태적으로 가장 전형적인 털개구리미나리 개체들을 택하였으며, 근연 분류군인 왜젓가락나물(*R. quercifolius*), 젓

Table 1. Materials of *Ranunculus* for sequence analysis.

Taxa (DNA accession number*)	Collection
<i>R. cantoniensis</i> (1) 털개구리미나리	Jejudo, Sangdeokcheon, June 30, 2003
(2)	Jejudo, Sangdeokcheon, June 30, 2003
(3)	Jejudo, Hangeong-myeon, Yongsuri, June 26, 2003
(8)	Jejudo, Hangeong-myeon, Yongsuri, May 21, 2004
(12)	Seoul, Yangjaecheon, June 1, 2004
<i>R. chienensis</i> (1)젓가락나물	Jejudo, Hangeong-myeon, Yongsuri, May 21, 2004
(2)	Jejudo, Hangeong-myeon, Yongsuri, May 21, 2004
(3)	Jejudo, Hangeong-myeon, Yongsuri, May 21, 2004
(4)	Seoul, Yangjaecheon, June 1, 2004
(5)	Seoul, Yangjaecheon, June 1, 2004
<i>R. silerifolius</i> (3)웨젓가락나물	Jejudo, Seongpanak, May 21, 2001
(4)	Jejudo, Seongpanak, May 21, 2001
(6)	Jejudo, Seongpanak, May 21, 2001
(184)	Jejudo, Muryeonga-ri, July 27, 2001
(185)	Jejudo, Muryeonga-ri, July 27, 2001
<i>R. tachiroei</i> (178)개구리미나리	Jejudo, Muryeonga-ri, July 27, 2001
(107)	Jejudo, Muryeonga-ri, July 27, 2001
(111)	Jejudo, Muryeonga-ri, July 27, 2001
(2)	Jejudo, Hallasan, 1700m, July 22, 2004
(4)	Jejudo, Hallasan, 1700m, July 22, 2004
<i>R. acris</i> var. <i>nipponicus</i> (25)산미나리아재비	China, Jangbaeksan, June 1, 2001,
<i>R. japonicus</i> (11)미나리아재비	Gyeongbuk, Gayasan, June ?, 2001
<i>R. crucilobus</i> (5)바위미나리아재비	Jejudo, Hallasan, June 10, 2001
<i>R. repense</i> (7)기름미나리아재비	Russia, ?, June 22, 2001
(8)	Russia, ?, June 22, 2001

* The accession numbers were designated to each taxon.

가락나물(*R. chinensis*)와 개구리미나리(*R. tachiroei*)의 각 분류군에서 5개의 DNA accessions을 채집하였다. 군외군으로 *Ranunculus*속 4분류군에서 5개의 accessions을 사용하였다. 사용된 DNA 재료는 생육지에서 채취한 후 확진 표본을 제작하였고, 일부는 이화여자대학교 약초원에 이식 재배한 개체의 신선한 잎을 사용하였다(Table 1).

DNA추출및증폭: 재료는 액체 질소로 분쇄한 후 CTAB 방법(Doyle & Doyle, 1987) 또는 Dneasy Plant Mini Kit (Quagen, Germany)를 이용해 추출하였다(Downie *et al.*, 1996). ITS 증폭은 primer ITS 4, ITS 5, ITS 2, ITS 3 (White *et al.*, 1990)을 이용하여 Downie *et al.* (2000)의 방법으로 실행하였다. 엽록체 DNA는 psbA-trnH 구간의 intergenic space(IGS:

Sang *et al.*, 1997), intron rps16(Oxelmann *et al.*, 1997, Wallander and Albert, 2000), trnL(Taberlet *et al.*, 1991)을 증폭하였다. PCR산물은 AccuPrep PCR Purification Kit (Bioneer Inc, Korea)를 사용하였고, 염기서열 분석기기는 Base station sequencer(MJ research, USA)를 이용하였다.

염기서열의 정렬 및 계통분석: 양방향의 염기서열은 Clustal X program(Gibson *et al.*, 1994)을 이용하여 정렬하였고, 세부 정렬은 수작업을 통해 완성하였다. 정렬된 염기서열은 다른 피자식물 연구(Baldwin *et al.*, 1995)에서 일반적으로 수행하고 있는 PAUP version 4.01b (Swofford, 2002)를 이용하여 최대절약분석(Maximum parsimony analysis)을 하였으며, heuristic search를 이용하였다. ITS에서는 gap을 missing data로 처리하였으며, 엽록체 DNA 부위에서는 gap을 fifth base로 처리하였다. Multrees는 1000회 random stepwise로 반복하고, TBR branch swapping으로 작성하였다. Bootstrap values (Felsenstein, 1985)는 100회 반복하여 분석하였고, TBR branch swapping하여 simple stepwise option으로 처리하였다. 최대 절약 분석에 이어서 Maximum likelihood분석은 10회 반복, random addition으로 Heuristic search를 하였다. 아울러 Neighbor-joining search (Saitau and Nei, 1987; Farris *et al.*, 1996)을 수행하였다. 또한 각 분류군들 사이의 염기변이분석은 uncorrected pairwise distance로 처리하였다.

결 과

염기서열분석:

본 연구에서 분석한 유전자의 염기서열 정렬 결과는 Table 2와 같다.

ITS: 25 accessions에 대하여 615 positions의 염기가 정렬되었다. 이 중 549개의 염기는 일정하였고, 나머지 66개의 염기에 변화가 있었으며, 그 중 61개가 계통학적 해상력을 갖는 형질이었다. 본 결과에서 털개구리미나리(*R. cantoniensis*)와 근연종인 왜젓가락나물(*R. silerifolius*), 젓가락나물(*R. chinensis*)와 개구리미나리(*R. tachiroei*)의 염기서열이 모두 611 position이었다. 조사된 분류군들의 염기조성의 평균은 A가 23.4%, C가 24.2%, G가 27.0%, T가 25.4%이었고, G+C의 염기조성은 50.7-52.1%로 나타났다. 본 연구에서 균외균을 포함하여 조사된 미나리아재비속의 염기변이는 0.000-8.092%이나 균외균을 제외한 털개구리미나리와 근연종들 사이의 염기변이는 0.000-2.128%로 나타났다. 털개구리미나리-젓가락나물과의 염기 변이는 0.164-0.327%이었고, 털개구리미나리-왜젓가락나물의 염기변이는 1.316-2.128% 이었다. 털개구리미나리-개구리미나리와의 염기변이는 0.825-1.146%로 낮게 나타났다.

psbA-trnH: 20 accessions에 대한 381 positions의 염기가 정렬되었다. 이 중 261개의 염기는 일정하였고, 나머지 120개의 염기에 변화가 있었으며, 그 중 112개가 계통학적 해상력을 갖는 형질이었다. 본 결과에서 젓가락나물(*R. chinensis*)와 개구리미나리(*R. tachiroei*)의 염기

Table 2. Summary of sequence characteristics and statistics for the individual DNA regions of *Ranunculus cantoniensis* and the related taxa.

Characteristic	ITS	psbA-trnH	rps16	trnL	Combined data (psbA-trnH, rps16, trnL)
No. of taxa included	25	20	18	18	18
Sequence characteristics					
Length of sequenced region (range)	609-611	300-374	830-841	505-528	1635-1728
Aligned length	615	381	848	528	1757
Variable sites	66	120	68	40	1332
Parsimony informative sites	61	112	54	38	205
Pairwise uncorrected distance(range)	0.000-8.092	0.000-7.84	0.000-3.867	0.000-2.049	0.000-3.679
Mean GC content(%)	51.26	32.43	33.05	34.45	33.35
Tree statics					
Length	72	129	69	40	231
Consistency index(CI)	0.9444	0.9769	0.9855	1	0.9784
Retention index(RI)	0.9792	0.9862	0.9924	1	0.9884
Rescaled consistency index(RCI)	0.9248	0.9632	0.9780	1	0.9670

서열이 모두 358 positions으로 가장 길었다. 염기조성은 조사된 전체 분류군의 평균이 A가 38.0%, C가 18.9%, G가 13.5%, T가 29.5%였고, G+C의 염기조성은 31.6-32.7%였다. 조사된 염기변이는 0.000-7.841%이나 균외군을 제외한 털개구리미나리와 근연종들 사이의 염기변이는 0.000-1.959%이었다. 털개구리미나리-젓가락나물의 염기변이는 1.112-1.959%이었고, 털개구리미나리-왜젓가락나물, 털개구리미나리-개구리미나리의 염기변이는 각각 0.000-0.840%를 나타내었다.

rps16: 18 accessions의 염기서열 정렬 결과 848 positions을 얻었다. 이중 780개의 염기는 일정하였고, 나머지 68개의 염기에 변화가 있었으며, 그 중 54개가 계통학적 해상력을 갖는 형질이었다. 왜젓가락나물의 염기서열이 841 positions으로 가장 길었다. 조사된 분류군들의 염기조성 평균은 A가 35.4%, C가 14.3%, G가 18.8%, T가 31.5%였고, G+C의 염기조성은 32.0-34.0%이었다. 균외군을 포함하여 조사된 염기변이는 0-4.12%이나 균외군을 제외한 털개구리미나리와 유사분류군들의 염기변이는 0.000-0.742%로 낮았다. 분류군들 사이의 염기변이는 털개구리미나리-젓가락나물, 털개구리미나리-개구리미나리의 경우 각각 0.123-0.240%이었고, 털개구리미나리-왜젓가락나물의 경우 0.000-0.617%로 나타났다.

trnL: 18 accessions의 염기서열 정렬 결과 528 positions을 얻었다. 이중 488개의 염기는 일정하였고, 나머지 40개의 염기에 변화가 있었으며, 그 중 38개가 informative character이었다. 근내군인 털개구리미나리와 유연분류군의 염기서열이 모두 522 positions로 균외군 보다 길었고, 부위별 정렬된 특징은 Table 2와 같다. 염기조성은 조사된 전체분류군의 평균이 A가

37.8%, C가 15.3%, G가 19.2%, T가 27.7%였고, G+C의 염기조성은 34.0-34.7%였다. 군외군을 포함하여 조사된 염기변이는 0.000-2.043%이나 군외군을 제외한 군내 분류군들 사이의 염기변이는 0.000-0.194%이었다. 털개구리미나리-젓가락나물의 염기변이는 0.192-0.194%이었고, 털개구리미나리-왜젓가락나물의 염기변이는 0.192-0.192%이었다. 털개구리미나리-개구리미나리의 염기변이는 0.000-0.193%로 가장 낮았다.

엽록체 DNA(combined psbA-trnH+rps16+trnL): 18 sample의 염기서열 정렬 결과 1757 positions을 얻었다. 이 중 205개의 염기는 일정하였고, 나머지 1332개의 염기에 변화가 있었으며 그 중 205개가 informative character이었다. 본 결과에서 왜젓가락나물의 염기서열이 1720 positions로 가장 길었고, 부위별 정렬된 특징은 Table 2와 같다. 염기조성은 조사된 전체 분류군의 평균이 A가 36.7%, C가 15.5%, G가 17.8%, T가 29.9%였고, G+C의 염기조성은 32.6-33.6%였다. 군외군을 포함하여 조사된 염기변이는 0.000-3.679%이었으나, 군외군을 제외한 분류군들간의 염기변이는 0.000-0.536%로서, 털개구리미나리-젓가락나물 0.350-0.410%, 털개구리미나리-왜젓가락나물 0.117-0.179%, 털개구리미나리-개구리미나리 0.059-0.175%로 나타났다.

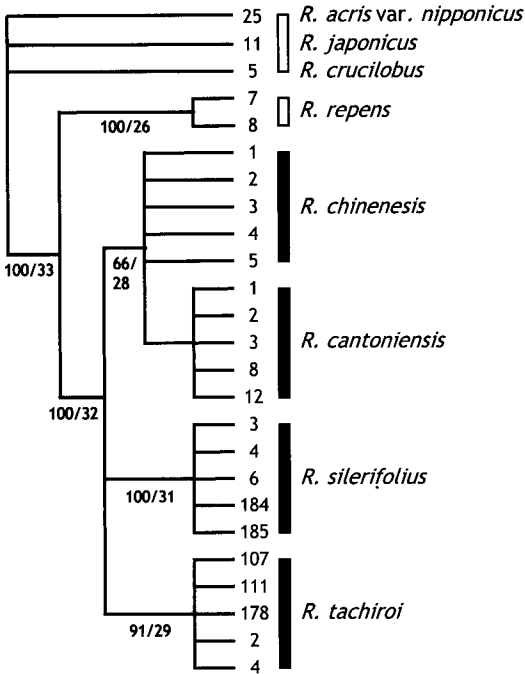
계통학적유연관계:

ITS: 25개의 ITS 염기서열의 최대절약분석(Maximum parsimony)결과, 계통수의 길이는 72개였으며, uninformative character를 제외한 Consistency Index(CI)는 0.9444, Retention Index(RI)는 0.9792, Rescaled Consistency Index(RCI)는 0.9248로 나타났다. 얻어진 Strict consensus tree는 Fig. 1-1과 같으며, bootstrap values는 66-100%로 평균 92%이었다. 분석 결과 털개구리미나리(*R. cantoniensis*)와 근연분류군은 32개의 synapomorphic change와 100% bootstrap value로 나머지 군외군과 분리된 분계조(clade)를 나타내었다. 또한 군외군인 산미나리아재비(*R. acris* var. *nipponicus*), 미나리아재비(*R. japonicus*), 바위미나리아재비(*R. crucilobus*)그룹은 33개의 synapomorphic change와 100% bootstrap value로 나머지 분류군들과 구분되었다. 털개구리미나리는 근연분류군과 하나의 분계조를 형성하였으며, 특히 털개구리미나리는 젓가락나물과 paraphyletic한 그룹으로 28개의 synapomorphic change와 66% bootstrap value로 같은 분계조를 형성하여 다른 근연분류군들 보다 더 유사한 결과를 나타냈다.

군외군 중 3개의 분류군들(outgroup I)은 기는미나리아재비(*R. repense*: outgroup II)와 구분되었다. 기는미나리아재비는 염기 결실 3개, 염기 삽입 4개, 염기 치환 27개에 의해 털개구리미나리 및 유사분류군과 분리되었다. 군내군 내에서 털개구리미나리와 젓가락나물은 92번, 207번, 225번, 407번 염기가 동일하여 왜젓가락나물 및 개구리미나리와는 다른 분계조를 형성하였다. Maximum likelihood에 의한 계통수 분석결과도 Maximum parsimony결과와 거의 일치하였다(Fig. 1).

psbA-trnH: 20개의 염기서열의 최대절약분석결과, 계통수의 길이는 129개였으며, uninformative character를 제외한 CI는 0.9769, RI는 0.9862, RCI는 0.9632로 나타났다. 얻어

Maximum parsimony tree



Maximum likelihood tree

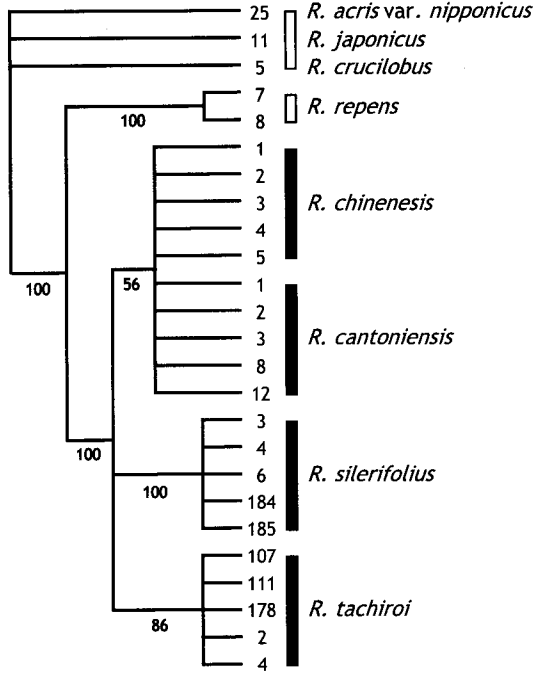


Fig. 1. Phylogenetic trees for ITS of *Ranunculus cantoniensis* and related taxa reconstructing using maximum parsimony and maximum likelihood method. The parsimony tree is a strict consensus tree of 72 equally parsimony tree(CI=0.9444 and RI=0.9792 excluding uninformative characters). Bootstrap percentages/the number of changes are provided below each branch(white line: outgroup, black line: ingroup).

진 Strict consensus tree는 Fig. 2와 같으며, bootstrap values는 52-100%로 평균 81%이었다. 분석 결과 군외군으로 처리한 기는미나리아재비(*R. repense*: outgroup II)가 군내군인 털개구리미나리 및 근연분류군과 함께 25개의 synapomorphic change와 100% bootstrap value로 나머지 군외군(outgroup I)으로부터 분리된 분계조를 나타내었다. 군외군인 기는미나리아재비는 23개의 synapomorphic change와 79% bootstrap value로 군내군 중 짓가락나물과 같은 분계조를 이루므로서 ITS결과와 다르게 나타났다. 털개구리미나리는 왜짓가락나물과 함께 paraphyletic 그룹으로 나타났다.

제 1 분계조인 군외군(outgroup I)은 7개의 결실된 염기와 57개의 삽입된 염기, 9개의 염기 치환에 의해 다른 군외군인 기는미나리아재비(outgroup II), 털개구리미나리 및 근연분류군으로 부터 분리되었다. 군외군인 기는미나리아재비는 14개의 결실된 염기, 1개의 삽입된 염기,

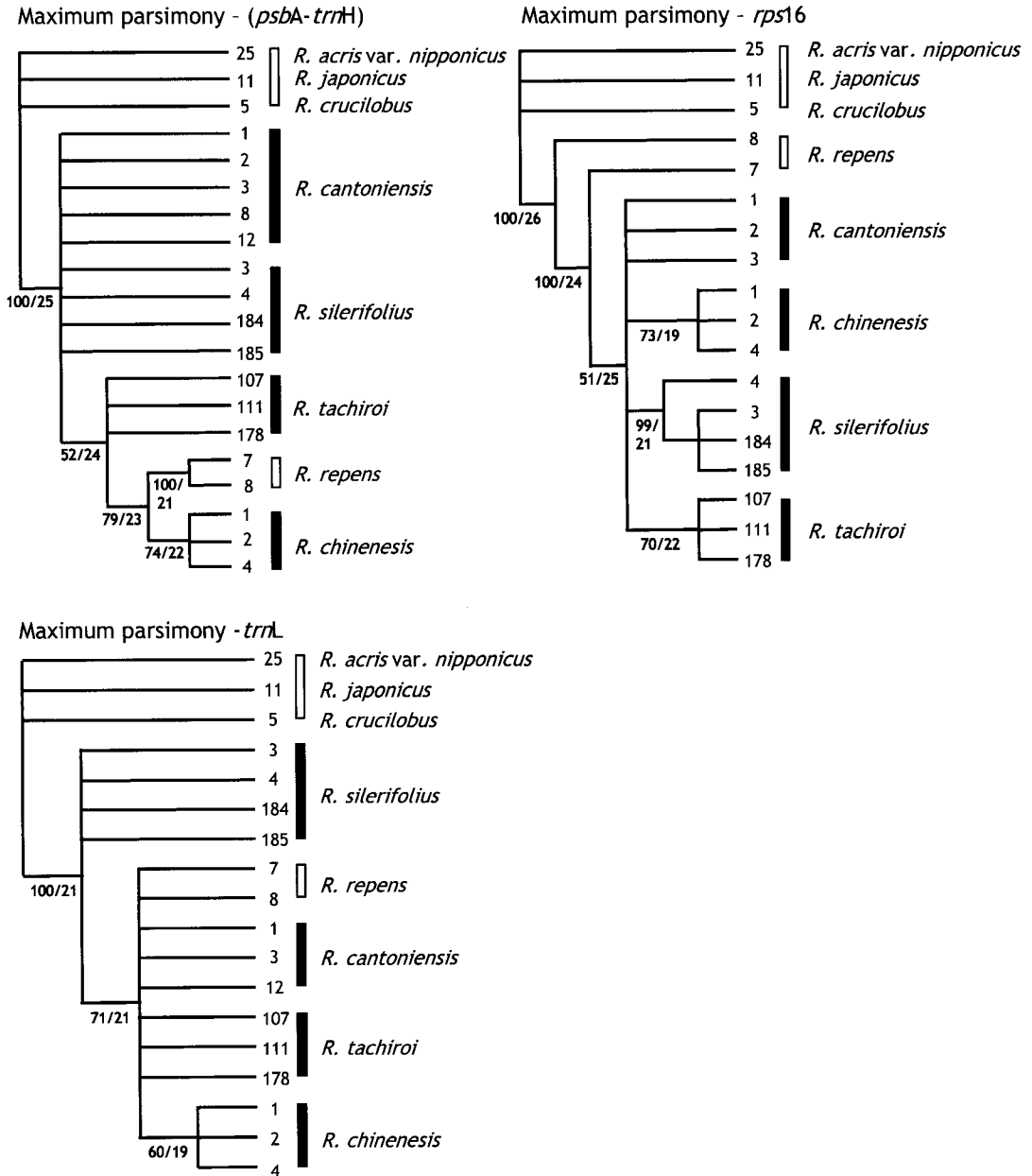


Fig. 2. Phylogenetic trees for *psbA-trnH*, *rps16* and *trnL* of *Ranunculus cantoniensis* and related taxa reconstructing by maximum parsimony and maximum likelihood method. Bootstrap percentages/the number of changes are provided below each branch (white line: outgroup, black line: ingroup).

그리고 4개(47번(T→A), 144번(T→C), 145번(T→A), 146번(T→C))의 염기치환에 의해 군내군인 털개구리미나리 및 유사분류군으로 부터 구분되었다. 그러나 군외군인 기는미나리아재비는 179번 염기 삽입(A)개, 3개의 염기치환(251(C→T), 252번(T→C), 254번(A→G))에 의해 군내군 내에서 짓가락나물과 같은 분계조를 형성하였다. Maximum likelihood에 의한 계통수 분석결과도 Maximum parsimony결과와 거의 일치하였다(Fig. 2).

rps16: 18개의 염기서열의 최대절약분석결과, 계통수의 길이는 69개였으며, uninformative character를 제외한 CI는 0.9855, RI는 0.9924, RCI는 0.9780%로 나타났다. 얻어진 Strict consensus tree는 Fig. 2와 같으며, bootstrap values는 51-100%(평균 79%)이었다. 군외군으로 처리한 기는미나리아재비는 군내군인 털개구리미나리 및 근연분류군과 26개의 synapomorphic change와 100% bootstrap value로 나머지 군외군으로 부터 분리된 분계조를 형성하였다. 군외군인 기는미나리아재비는 24개의 synapomorphic change와 100% bootstrap value로 털개구리미나리 및 근연분류군들로 부터 분리된 분계조를 구성하였다. 짓가락나물, 왜짓가락나물과 개구리미나리는 각각 단계통으로 나타났다.

*Ranunculus*속내에 제 1 분계조인 3개의 군외군들은 6개의 결실된 염기와 8개의 삽입된 염기, 21개의 염기치환에 의해 군외군인 기는미나리아재비, 털개구리미나리 및 근연분류군으로 부터 분리되었다. 군내군인 털개구리미나리 및 근연분류군은 5개의 삽입된 염기와, 5개(370번(G→A), 529번(G→T), 549번(A→G), 674번(C→A), 844번(G→A))의 염기치환에 의해 군외군인 기는미나리아재비로 부터 구분되었다(Fig. 2). Maximum likelihood에 의한 계통수 분석결과도 Maximum parsimony결과와 거의 일치하였다.

trnL: 18개의 염기서열의 최대절약분석결과, 계통수의 길이는 40개였으며, uninformative character를 제외한 CI는 1.0000%, RI는 1.0000%, RCI는 1.0000%를 나타내었다. 얻어진 Strict consensus tree는 Fig. 2와 같으며, bootstrap values는 60-100%(평균 77%)이었다. 군외군으로 처리하였던 기는미나리아재비는 21개의 synapomorphic change와 100% bootstrap value에 의해 나머지 군외군으로 부터 분리된 분계조를 형성하였다. 군외군인 기는미나리아재비는 20개의 synapomorphic change와 71% bootstrap value로 군내군인 털개구리미나리, 짓가락나물과 개구리미나리로 부터 분리된 분계조를 구성하였다. 기는미나리아재비, 털개구리미나리 및 왜짓가락나물은 paraphyletic한 분계양상을 보였고, 짓가락나물은 단계통으로 나타났다.

제 1 분계조인 3개의 군외군(outgroup I)은 6개의 결실된 염기와 23개의 삽입된 염기, 7개의 염기치환(107번(G→A), 114번(A→G), 217번(A→G), 240번(C→T), 318번(A→G), 470번(A→G))에 의하여 군외군 기는미나리아재비(outgroup II)와 털개구리미나리 및 근연분류군의 분계조로 부터 분리 양상을 보였다. 군내군인 짓가락나물은 26번 염기가 A대신 C, 526번 염기가 T대신 G로 치환되어 기는미나리아재비, 털개구리미나리, 왜짓가락나물과 개구리미나리로 구성된 분계조로 부터 분리되었다(Fig. 2). Maximum likelihood에 의한 계통수 분석결과는 Maximum parsimony결과와 거의 일치하였다.

Combineddata(psbA-trnH+rps16+trnL): 18개의 염기서열의 최대절약분석결과, 계통수의 길이는 231개였으며, uninformative character를 제외한 CI는 0.9784, RI는 0.9884, RCI는

Table 3. Informative nucleotide sites in ITS (Appendix 1) and combined sequences of cpDNA (Appendix 2) to infer the speciation of *Ranunculus cantoniensis*.

Taxa (accession number*)	ITS						cp DNA
	92	207	407	457	560	585	180
<i>R. cantoniensis</i> (1)	C	G	C	C	C	G	-
(털개구리미나리) (3)	C	G	C	C	C	G	-
(12)	C	G	C	C	C	G	-
<i>R. chinensis</i> (1)	C	G	C	T	C	G	A
(젓가락나물) (2)	C	G	C	T	C	G	A
(4)	C	G	C	T	C	G	A
<i>R. silerifolius</i> (3)	T	A	T	C	T	A	-
(왜젓가락나물) (4)	T	A	T	C	T	A	-
(184)	T	A	T	C	T	A	-
(185)	T	A	T	C	T	A	-
<i>R. tachiroei</i> (107)	T	A	T	T	T	A	A
(개구리미나리) (111)	T	A	T	T	T	A	A
(178)	T	A	T	T	T	A	A

* The accession numbers were designated to each taxon.

0.9670%를 나타냈다. Strict consensus tree는 Fig. 5와 같으며, bootstrap values는 63-100%로 평균 91.8%를 얻었다. 군외군으로 처리하였던 기는미나리아재비(outgroup II)는 군내군인 털개구리미나리 및 유연분류군과 함께 26개의 synapomorphic change와 100% bootstrap value로 나머지 군외군(outgroup I)으로 부터 분리된 분계조를 나타내었다. 군외군인 기는미나리아재비는 25개의 synapomorphic change와 95% bootstrap value로 군내군인 털개구리미나리, 젓가락나물과 개구리미나리와 동일한 분계조를 구성하였고, 털개구리미나리는 단계통을 나타내는 젓가락나물, 왜젓가락나물, 개구리미나리와 paraphyletic한 분계양상을 나타내었다.

제 1 분계조인 3개의 군외군(outgroup I)은 19개의 결실된 염기와 88개의 삽입된 염기, 37개의 염기치환에 의해 군외군 기는미나리아재비(outgroup II)와 털개구리미나리 및 근연분류군으로부터 분리되었다. 또한 군외군인 기는미나리아재비(outgroup II)는 5개의 염기 삽입, 5개의 염기 치환에 의해 군내군들로 부터 분계양상을 나타내었다(Fig. 3). Neighbor-joining에 의한 계통수분석결과는 Maximum parsimony결과와 거의 일치하였다(Fig. 3).

털개구리미나리의 종분화: ITS의 염기서열에서 털개구리미나리는 젓가락나물의 표지유전자(marker gene)를 5개 염기, 즉 92번(C), 207번(G), 407번(C), 585번(G), 560번(C)를 공유하였고, 117번 염기에서 왜젓가락나물의 C를 공유하였다. 엽록체 DNA 염기서열에서 털개구리미나리는 왜젓가락나물의 표지유전자인 457번 염기 C를 공유하였다(Table 3).

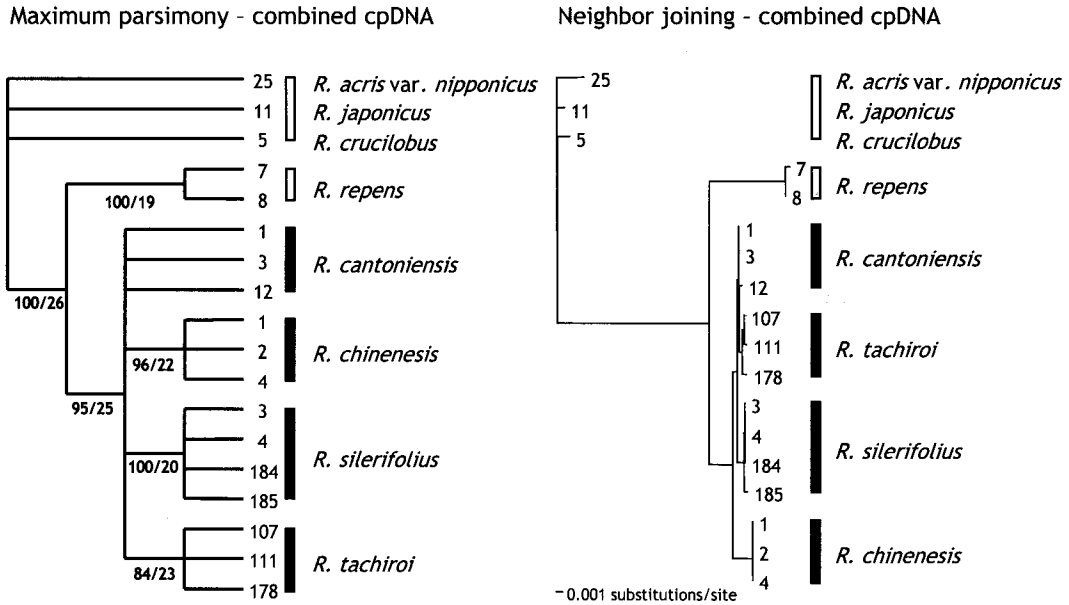


Fig. 3. Phylogenetic trees for combined cpDNA of *Ranunculus cantoniensis* and related taxa reconstructing by maximum parsimony and maximum likelihood method. The parsimony tree is a strict consensus tree of 231 equally parsimony tree(CI=0.9784, RI=9884). Bootstrap percentages/the number of changes are provided below each branch(white line: outgroup, black line: ingroup).

고찰

털개구리미나리의 염색체수와 핵형의 다형성에 대하여 한국과 일본에서 지역별 조사 연구된 바 있다(Okada and Tamura, 1977; Okada 1981; Fujishima 1983; Kang *et al.*, 2001). 본 연구에서는 가장 전형적인 외부 형태 특징을 지닌 털개구리미나리 5개체를 핵 DNA의 ITS 분석 결과 4개의 염기에서 다형성이 나타났고, 엽록체 DNA의 rps16과 trnL 구간은 매우 보존적이었으나, psbA-trnH 구간의 2개의 염기에서 다형성을 나타냈다. 이것은 털개구리미나리의 다형성이 집단 뿐 아니라 개체 수준에서도 나타난다는 염색체에 관한 선행연구 결과를 지지한다.

털개구리미나리와 근연분류군들(왜젓가락나물, 젓가락나물, 개구리미나리)의 분자적 유연관

Table 4. Morphological comparison of *Ranunculus cantoniensis* and related taxa from the data by Yeau (1985).

Characters	<i>R. silerifolius</i>	<i>R. cantoniensis</i>	<i>R. chinensis</i>	<i>R. tachiroei</i>
Sepal length(mm)	3.0-5.0	3.0-5.5	4.0-5.0	4.0-5.3
width(mm)	1.5-2.2	2.1-3.5	1.8-2.8	2.0-4.0
Petal length(mm)	3.3-6.3	4.2-6.3	3.5-4.5	4.5-7.5
width(mm)	1.8-2.9	1.8-2.9	1.8-3.0	1.7-2.6
Plant height(cm)	17-55	17-57	18-50	53-112
Radical leaves length (cm)	3.5-11.7	2.5-8.8	3.2-8.3	8.4-15.0
lobe length(cm)	2.7-6.3	2.1-6.4	2.2-5.6	4.2-8.5
width(cm)	1.6-5.9	1.5-5.7	1.8-4.6	5.2-7.5
terminal lacinia length(mm)	3.7-5.2	1.0-6.0	2.0-9.0	2.0-7.0
width(mm)	3.1-5.7	2.0-7.2	2.0-4.0	2.0-4.0
Fruits head shape	round	round	elongate-oblong	round
Achene beak	long & hooked	long & straight	short	long & hooked
Receptacle shape				
hair	round	oblong	oblong	round
Stem shape	present	present	densely cover with white	
hair	appressed hair glabrous	rigid & appressed	rigid & spread	rigid & appressed
Radical leaves shape	dissected into 3 petiolate	dissected into 3 petiolate	tripartite almost to base	dissected into 3 petiolate
hair	appressed	appressed	appressed & rigid	appressed & rigid

계와 외부형태적인 유연관계를 비교하기 위해 여(1985)의 외부형태적인 특징을 이용하였다 (Table 4). 털개구리미나리와 왜젓가락나물은 17개 형질 중 9개의 형질(꽃받침 길이, 꽃잎 길이, 열매의 크기, 잎몸 세열길기와 너비, 열매의 모양, 화탁의 털, 경생엽의 모양과 털의 재질)이 유사하였다. 젓가락나물과는 2개(경생엽의 길이와 화탁의 모양), 개구리미나리와는 6개(꽃잎의 너비, 꽃받침의 너비, 열매의 모양, 화탁의 털의 분포, 줄기의 털, 경생엽의 모양)형질이 유사하였다. 여(1985)의 한국산 미나리아재비속 식물 14분류군의 형태, 화분의 형태, 핵형 등의 형질을 분석한 분계도에서도 털개구리미나리와 왜젓가락나물의 유사성이 제시되었다.

그러나 이러한 형태적 분석결과는 분자계통학적 유연관계와 일치하지 않았다. ITS의 분석 결과 뿐만 아니라, 엽록체 DNA (psbA-trnH, rps16, trnL)의 combined data 분석 결과와도 일치하지 않았다. 즉, 털개구리미나리의 ITS 염기조성은 젓가락나물과 가장 가깝고, 그 다음이 개구리미나리, 왜젓가락나물 순이었다. 계통수에서도 털개구리미나리는 젓가락나물과 유집된 후 개구리미나리, 왜젓가락나물과 동일한 분계조를 이루었다. 형태 분석과 분자 분석 결과의 불일치는 본 연구에서 균외균으로 처리한 기는미나리아재비(*R. repens* L.)에 대해서도

마찬가지이다. 즉, 여(1985)의 형태적 분계도에서 기는미나리아재비를 털개구리미나리, 왜젓가락나물, 젓가락나물 및 개구리미나리와 같은 그룹으로 보았으나, 본 연구 결과에서는 trnL과 psb-trnH부위에서는 군내군에 유입되었을 뿐 ITS와 rps16의 염기서열에서는 많은 부분이 상이하여 군내군의 분류군들로 부터 분리되었다.

털개구리미나리는 외부형태 및 핵형분석에 의해 왜젓가락나물의 종내잡종 또는 왜젓가락나물과 젓가락나물의 중간 잡종에 의하여 종분화된 것으로 추정되어 보고된 바 있다. 본 연구결과 털개구리미나리는 ITS에서 젓가락나물의 표지유전자 5개, 왜젓가락나물의 표지유전자 1개를 공유하는 점에서 털개구리미나리의 종분화가 왜젓가락나물의 종내배수화에 의한 가설(Tamura, 1978)보다는 두 종간의 잡종화에 의한다는 가설(Okata, 1984)을 지지하였다. 또한 대부분(73%이상)의 피자식물의 경우 엽록체 유전자가 모계에서 왔다고 한 가설(Harris and Ingram, 1991)로 미루어, 털개구리미나리의 엽록체 DNA에서 왜젓가락나물의 표지유전자 1개를 공유함으로써 추정된 두 아버지 종 중 왜젓가락나물이 모계임을 추정할 수 있다.

사 사

본 연구는 환경부 차세대핵심환경기술개발사업의 연구비 지원(과제 번호 052-041-026)으로 수행되었습니다.

인 용 문 헌

- Anderea, W. and B. B. Simpson, 2004. Molecular genetic evidence for intergeneric hybridization among endemic Hispaniolan *Bursera*(Burseraceae). *Amer. J. Bot.* 91: 976-984.
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Camoell, and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82 : 247-277.
- Doyle, J. J., D. E. Soltis and P. S. Soltis. 1985. An intergeneric hybrid in the Saxifragaceae: evidence from ribosomal RNA genes. *Amer. J. Bot.* 72: 1388-1391.
- Doyle, J. J. and J. A. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.* 19: 11-15.
- Downie, S. R. and D. S. Katz-Downie. 1996. A molecular phylogeny of Apiaceae

- subfamily Apioideae: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Amer. J. Bot.* 83: 234-251.
- _____, _____, and K. Spalik. 2000. A phylogeny of Apiaceae tribe Scandiceae: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Amer. J. Bot.* 87: 76-95.
- Farris, J. S., V. A. Albert, M. Källersjö, D. Lipscomb and A. G. Kluge. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fujishima, H. 1983. Karyological and biogeographical studies of *Ranunculus silerifolius* Lev. from Tottori Prefecture. *J. Fac. Educ. Tottori Univ., Nat. Sci.* 32: 31-37.
- _____. 1985. Cytological studies on to varieties of *Ranunculus silerifolius* Lev. in Japan. *Jap. J. Genet.* 60: 215-224.
- _____ and M. Kurita. 1974. Chromosome studies in Ranunculaceae XXVI. Variation in karyotype of *Ranunculus ternatus* var. *glaber*. *Mem. Ehime Univ., Nat. Sci. Ser. B.* 7: 62-68.
- Gibson, T., D. Higgins and J. Thompson. 1994. Clustal X Program. EMBL, Heidelberg, Germany.
- Goepfert, D. 1974. Karyotypes and DNA content in species of *Ranunculus* L. and related genera. *Bot. Notiser* 127: 464-489.
- Grant, V. 1981. *Plant speciation*. 2nd. ed. Columbia Univ. Press, New York.
- Harris, S. A. and R. Ingram. 1991. Chloroplast DNA and biosystematics: the effects of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon* 40: 393-412.
- Kang, S-H. and S. J. Yang. 2001. Intraspecific genetic variation of ITS regions between two karyotypes in *Ranunculus cantoniensis* (*Ranunculus*). *Korean J. Pl. Taxon.* 31: 57-68.
- Kurita, M. 1955. Cytological studies in Ranunculaceae I. The karyotype analysis in the genus *Ranunculus*. *Bot. Mag.* 66: 94-97.
- _____. 1957a. Chromosome studies in Ranunculaceae. Karyotypes of the subtribe Ranunculinae. *Rep. Biol. Inst. Ehime Univ.* 2: 1-8.
- _____. 1957b. Chromosome studies in Ranunculaceae. Karyotypes of *Eranthis* and some other genera. *Mem. Ehime Univ., Nat. Sci. Ser. B.* 2: 325-334.
- Lawrence, A. A. and C. S. Campbell. 1999. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Amer. J. Bot.* 86: 81-97.
- _____, T. Eriksson, B. Eriksen and C. S. Campbell. 2001. Hybridization and gene flow

- between distantly related species of *Rubus* (Rosaceae): Evidence from Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region Sequences. *Syst. Bot.* 26: 769-778.
- Okada, H. 1981. On sexual isolation caused by karyotype variations in *Ranunculus silerifolius* Lev. *J. Jap. Bot.* 56: 41-49.
- _____. 1984. Polyphyletic Allopolyploid Origin of *Ranunculus cantoniensis* (4x) from *R. silerifolius* (2x) x *R. chinensis* (2x). *Pl. Syst. Evol.* 148: 89-102.
- _____. 1989. Cytogenetical changes of offsprings from the induced tetraploid hybrid between *Ranunculus silerifolius* (2n=16) and *R. chinensis* (2n=16) (Ranunculaceae). *Pl. Syst. Evol.* 167: 129-136.
- _____ and M. Tamura. 1977. Chromosome variations in *Ranunculus quelpaertensis* and its allied species. *J. Jap. Bot.* 52: 360-369.
- Oxelamn, B., M. Liden and D. Berglund. 1997. Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae(Caryophyllaceae). *Pl. Syst. Evol.* 206: 393-410.
- Rieseberg, L. H. and D. E. Soltis. 1991. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evol. Trends Pl.* 5: 65-84.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The Neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sang, T., J. Crawford, and T. F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Amer. J. Bot.* 84: 1120-1136.
- Stebbins, G. L. 1984. Polyploid and the distribution of the arctic-alpine flora: new evidence and a new approach. *Bot. Helv.* 94: 1-13.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.01b10. Sunderland: Sinauer Associates. MA, USA.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Pl. Molec. Biol.* 17: 105-1109.
- Takahashi, C. 2003. Physical mapping of rDNA sequences in four karyotypes of *Ranunculus silerifolius* (Ranunculaceae). *J. Plant Res.* 116: 331-336.
- Tamura, M. 1978. Nelalense specimens of *Ranunculus* and its allied genera preserved in British Museum (Natural History). *Sci. Rep. Osaka Univ.* 27: 99-117.
- Wallander, E. and V. A. Albert. 2000. Phylogeny and classification of Oleaceae based on rps16 and trnL-F sequence data. *Amer. J. Bot.* 87: 1827 - 1841.
- 여성희. 1985. 한국산 미나리아재속(*Ranunculus*)식물의 계통분류학적 연구. 이화여자대학교 박사학위논문.
- 이영노. 1996. 한국식물도감. 교학사. 서울.

Appendix 1. Aligned ITS sequences in nrDNA from the 25 accessions examined. Dashes are gaps required for alignment. Dots in the sequences denote same nucleotide state as the first taxon. Refer Table 1 for taxon abbreviation.

[10	20	30	40	50	60	70	80	90	100]
R_acris_nipponicus_25	TGTCGAAACCTGCTTAGCAGACGACCTGTGAACATGTCAAAAAGTACCTAAGTGGATTGTTGATGGGTGCGAGCCCTGATTCATCTGCTTGGTGGATCGT										
R_japonicus_11										
R_crucilobus_5										
R_repense_7	A			A			C	T	T	G
R_repense_8	A			A			C	T	T	G
R_cantoniensis_1	A			C	A		T			G
R_cantoniensis_2	A			C	A		T			G
R_cantoniensis_3	A			C	A		T			G
R_cantoniensis_8	A			C	A		T			G
R_cantoniensis_12	A			C	A		T			G
R_chinensis_1	A			C	A		T			G
R_chinensis_2	A			C	A		T			G
R_chinensis_3	A			C	A		T			G
R_chinensis_4	A			C	A		T			G
R_chinensis_5	A			C	A		T			G
R_silerifolius_3	A			C	A		T			G
R_silerifolius_4	??	A			C	A		T			G
R_silerifolius_6	A			C	A		T			G
R_silerifolius_184	A			C	A		T			G
R_silerifolius_185	A			C	A		T			G
R_tachiroei_107	A			C	A		T			G
R_tachiroei_111	A			C	A		T			G
R_tachiroei_178	A			C	A		T			G
R_tachiroei_2	A			C	A		T			G
R_tachiroei_4	A			C	A		T			G

[110	120	130	140	150	160	170	180	190	200]
R_acris_nipponicus_25	AGAGTTGATTGCATCCCTTGGGATCGTITGTACTTTGCGTTTCTAGCACAAACATAAAAAATCCGGC6CGGATTAGCGTCAAGGAAATCTTAGCGGAAAC-AA										
R_japonicus_11										
R_crucilobus_5				A						
R_repense_7	G...C.....A...T.G.T...GGTCT.....G.....C.....G.G.....T.....A.....										
R_repense_8	G...C.....A...T.G.T...GGTCT.....G.....C.....G.G.....T.....A.....										
R_cantoniensis_1	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_cantoniensis_2	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_cantoniensis_3	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_cantoniensis_8	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_cantoniensis_12	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_chinensis_1	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_chinensis_2	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_chinensis_3	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_chinensis_4	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_chinensis_5	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_silerifolius_3	G...C.....G...T.G.T.CGGT.CG.....G.....C.....T.....G.G.....T.....										
R_silerifolius_4	G...C.....G...T.G.T.CGGT.CG.....G.....C.....T.....G.G.....T.....										
R_silerifolius_6	G...C.....G...T.G.T.CGGT.CG.....G.....C.....T.....G.G.....T.....										
R_silerifolius_184	G...C.....G...T.G.T.CGGT.CG.....G.....C.....T.....G.G.....T.....										
R_silerifolius_185	G...C.....G...T.G.T.CGGT.CG.....G.....C.....T.....G.G.....T.....										
R_tachiroei_107	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_tachiroei_111	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_tachiroei_178	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_tachiroei_2	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										
R_tachiroei_4	G...C.....G...T.G.T.CGGT.G.....G.....C.....G.G.....T.....										

[210	220	230	240	250	260	270	280	290	300]
R_acris_nipponicus_25	AGCGTTGTGCCTTCACTGGCATAACGTCAAGATCCCATCTACTCAAAGCTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTTGCATCGATGAAGAACGTAGCGA										
R_japonicus_11										
R_crucilobus_5										
R_repense_7	C	TG	C							
R_repense_8	C	TG	C							
R_cantoniensis_1	G.T.....T...T...T.C.....										
R_cantoniensis_2	G.T.....T...T...T.C.....										
R_cantoniensis_3	G.T.....T...T...T.C.....C.....										
R_cantoniensis_8	G.T.....T...T...T.C.....										
R_cantoniensis_12	G.T.....T...T...T.C.....										
R_chinensis_1	G.T.....T...T...T.C.....										
R_chinensis_2	G.T.....T...T...T.C.....										
R_chinensis_3	G.T.....T...T...T.C.....										
R_chinensis_4	G.T.....T...T...T.C.....										
R_chinensis_5	G.T.....T...T...T.C.....										
R_silerifolius_3	G.T.A.....T...T...C.....										
R_silerifolius_4	G.T.A.....T...T...C.....										
R_silerifolius_6	G.T.A.....T...T...C.....										
R_silerifolius_184	G.T.A.....T...T...C.....										
R_silerifolius_185	G.T.A.....T...T...C.....										
R_tachiroei_107	G.T.A.....T...T...T.C.....										
R_tachiroei_111	G.T.A.....T...T...T.C.....										
R_tachiroei_178	G.T.A.....T...T...T.C.....										
R_tachiroei_2	G.T.A.....T...T...T.C.....										
R_tachiroei_4	G.T.A.....T...T...T.C.....										

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400		
R_acris_nipponicus_25	ATGCGATAC	TGGTGTGA	ATTCGAGA	ATCCCGTGA	ACCATCGAG	TTTTGAACG	CAAGTTGC	CCCCGAA	ACCTTTAG	GTGAGGG	CACGCTC	GCCTGGGC [399]
R_japonicus_11	[399]
R_cruciolobus_5	[399]
R_repense_7	G.....	[399]
R_repense_8	G.....	[399]
R_cantoniensis_1	G.....	[399]
R_cantoniensis_2	G.....	[399]
R_cantoniensis_3	G.....	[399]
R_cantoniensis_8	G.....	[399]
R_cantoniensis_12	G.....	[399]
R_chinensis_1	G.....	[399]
R_chinensis_2	G.....	[399]
R_chinensis_3	G.....	[399]
R_chinensis_4	G.....	[399]
R_chinensis_5	G.....	[399]
R_silerifolius_3	G.....	[399]
R_silerifolius_4	G.....	[399]
R_silerifolius_6	G.....	[399]
R_silerifolius_184	G.....	[399]
R_silerifolius_185	G.....	[399]
R_tachiroei_107	G.....	[399]
R_tachiroei_111	G.....	[399]
R_tachiroei_178	G.....	[399]
R_tachiroei_2	G.....	[399]
R_tachiroei_4	G.....	[399]

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500			
R_acris_nipponicus_25	GTCACACAC	GCCTCGCT	CCCCACCA	ACCTAGTT	G-TTGGAG	AGCGGAG	ATTGGCCCC	CCCGAGT	CCITTTGG	ACACGGT	CGGCACAA	AATTTGGTCC	CCGGC [498]
R_japonicus_11	[498]
R_cruciolobus_5	G.....	[498]
R_repense_7	TA.....	G-A.G.....	T.....	G.....	[498]
R_repense_8	TA.....	G-A.G.....	T.....	G.....	[498]
R_cantoniensis_1	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_cantoniensis_2	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_cantoniensis_3	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_cantoniensis_8	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_cantoniensis_12	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_chinensis_1	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_chinensis_2	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_chinensis_3	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_chinensis_4	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_chinensis_5	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_silerifolius_3	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_silerifolius_4	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_silerifolius_6	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_silerifolius_184	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_silerifolius_185	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_tachiroei_107	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_tachiroei_111	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_tachiroei_178	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_tachiroei_2	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]
R_tachiroei_4	T.....	A.....	G-A.G.....	T.....	T.....	G.....	T.....	T.....	T.....	T.....	T.....	[498]

	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600			
R_acris_nipponicus_25	CAGCGAGT	GTGCGGGT	CAGCGGTGG	TTTATA---	TCCTCCA	AAAGACA	AAATGAC	CGCGTGC	CTCGATT	GTTGG-	ATCGAA	ACGACCT	CGAAAGCCAT [594]
R_japonicus_11	[594]
R_cruciolobus_5	[594]
R_repense_7	-G..TTT	T.....	-G.....	T.....	C.....	[595]
R_repense_8	-G..TTT	T.....	-G.....	T.....	C.....	[595]
R_cantoniensis_1	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_cantoniensis_2	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_cantoniensis_3	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_cantoniensis_8	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_cantoniensis_12	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_chinensis_1	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_chinensis_2	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_chinensis_3	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_chinensis_4	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_chinensis_5	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_silerifolius_3	A.....	-G..-TT	TT.....	G..A.....	A.....	[596]
R_silerifolius_4	-G..-TT	TT.....	G..A.....	A.....	[596]
R_silerifolius_6	-G..-TT	TT.....	G..A.....	A.....	[596]
R_silerifolius_184	-G..-TT	TT.....	G..A.....	A.....	[596]
R_silerifolius_185	-G..-TT	TT.....	G..A.....	A.....	[596]
R_tachiroei_107	T.....	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_tachiroei_111	T.....	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_tachiroei_178	T.....	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_tachiroei_2	T.....	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]
R_tachiroei_4	T.....	-G..-TT	T.....	A.....	G..A.....	[596]

	610	
[]
R_acris_nipponicus_25	TTATGGCATTACCC	[609]
R_japonicus_11	[609]
R_crucilobus_5	[609]
R_repense_7	...C.....	[610]
R_repense_8	...C.....	[610]
R_cantoniensis_1	[611]
R_cantoniensis_2	[611]
R_cantoniensis_3	[611]
R_cantoniensis_8	[611]
R_cantoniensis_12	[611]
R_chinensis_1	[611]
R_chinensis_2	[611]
R_chinensis_3	[611]
R_chinensis_4	[611]
R_chinensis_5	[611]
R_silerifolius_3	[611]
R_silerifolius_4	[611]
R_silerifolius_6	[611]
R_silerifolius_184A..	[611]
R_silerifolius_185?	[611]
R_tachiroei_107	[611]
R_tachiroei_111	[611]
R_tachiroei_178	[611]
R_tachiroei-2	[611]
R_tachiroei_4	[611]

Appendix 2. Aligned combined cpDNA sequences from the 18 accessions examined. Dashes are gaps required for alignment. In total 1757 base, psbA-trnH is from 1 to 381, rps16 is from 382 to 1229, and trnL is from 1239 to 1757. Dots in the sequences denote same nucleotide state as the first taxon. Refer Table 1 for taxon abbreviation.

[10	20	30	40	50	60	70	80	90	100]	
R_acris_nipponicus_25		TTGGCTACATCGCCCTTC	GTGCTTATTGTTTTAT	-----	CCATTCTAATTTGAATTTTT	ATCTATGTTATGTACAGAA	AAAAG	-----	TATA			[84]
R_japonicus_11		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[84]
R_crucilobus_5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[84]
R_repense_7			C	CAAACCAATA	.C			C		C	TAAAG	[100]
R_repense_8			C	CAAACCAATA	.C			C		C	TAAAG	[100]
R_cantoniensis_1			C	CAAACCAAAAT	.C			C		C	TAAAG	[99]
R_cantoniensis_3			C	CAAACCAAAAT	.C			C		C	TAAAG	[99]
R_cantoniensis_12			C	CAAACCAAAAT	.C			C		C	TAAAG	[99]
R_chinensis_1			C	CAAACCAAAAT	.C			C		C	TAAAG	[99]
R_chinensis_2			C	CAAACCAAAAT	.C			C		C	TAAAG	[99]
R_chinensis_4			C	CAAACCAAAAT	.C			C		C	TAAAG	[99]
R_silerifolius_3			C	CAAACCAAAAT	.C			C		C	TAAAG	[99]
R_silerifolius_4			C	CAAACCAAAAT	.C			C		C	TAAAG	[99]
R_silerifolius_184			C	CAAACCAAAAT	.C			C		C	TAAAG	[99]
R_silerifolius_185			C	CAAACCAAAAT	.C			C		C	TAAAG	[99]
R_tachiroei_107			C	CAAACCAAAAT	.C			C		C	TAAAG	[99]
R_tachiroei_111			C	CAAACCAAAAT	.C			C		C	TAAAG	[99]
R_tachiroei_178			C	CAAACCAAAAT	.C			C		C	TAAAG	[99]

[110	120	130	140	150	160	170	180	190	200]		
R_acris_nipponicus_25		AAAAATAAA	TAATTCACCAACTCAA	-----	-----	ACTTAAGTAAGAAA	-----	-----	AAAAA	-----	CTTATGC	[135]	
R_japonicus_11		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[135]	
R_crucilobus_5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[135]	
R_repense_7		AG	AGG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACT	A	C	T	AGC	TTTTTTTCACTTAAAA	GGACAAAAA	.G	[200]
R_repense_8		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACT	A	C	T	AGC	TTTTTTTCACTTAAAA	GGACAAAAA	.G	[200]
R_cantoniensis_1		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACTTAA	-----	-----	-----	-----	GGAAAAAAA	-----	-----	[183]
R_cantoniensis_3		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACTTAA	-----	-----	-----	-----	GGAAAAAAA	-----	-----	[183]
R_cantoniensis_12		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACTTAA	-----	-----	-----	-----	GGAAAAAAA	-----	-----	[183]
R_chinensis_1		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACTTAA	-----	-----	-----	A	GGAAAAAAA	-----	-----	[184]
R_chinensis_2		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACTTAA	-----	-----	-----	A	GGAAAAAAA	-----	-----	[184]
R_chinensis_4		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACTTAA	-----	-----	-----	A	GGAAAAAAA	-----	-----	[184]
R_silerifolius_3		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACTTAA	-----	-----	-----	-----	GGAAAAAAA	-----	-----	[183]
R_silerifolius_4		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACTTAA	-----	-----	-----	-----	GGAAAAAAA	-----	-----	[183]
R_silerifolius_184		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACTTAA	-----	-----	-----	-----	GGAAAAAAA	-----	-----	[183]
R_silerifolius_185		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACTTAA	-----	-----	-----	-----	GGAAAAAAA	-----	-----	[183]
R_tachiroei_107		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACTTAA	-----	-----	-----	A	GGAAAAAAA	-----	-----	[184]
R_tachiroei_111		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACTTAA	-----	-----	-----	A	GGAAAAAAA	-----	-----	[184]
R_tachiroei_178		AG	AG	TTTAAGTCATTTTTTTTTT	CACTTAA	-----	-----	-----	A	GGAAAAAAA	-----	-----	[184]

[210	220	230	240	250	260	270	280	290	300]	
R_acris_nipponicus_25		TCTATAACTTAAGTAAAA	AAAAAACGCGAGTAGTAAT	ATACCCGACTCTTGTCTG	GAACAAGAGTCGGGTATT	ACTACTGCAACTTCAACGACT	CATATACA					[235]
R_japonicus_11		-----	-----	-----	-----	-----	-----					[235]
R_crucilobus_5		-----	-----	-----	-----	-----	-----					[235]
R_repense_7		GGC	-----	-----	-----	TC	G					[293]
R_repense_8		GGC	-----	-----	-----	TC	G					[293]
R_cantoniensis_1		GC	-----	-----	-----	-----	-----					[276]
R_cantoniensis_3		GC	-----	-----	-----	-----	-----					[276]
R_cantoniensis_12		GC	-----	-----	-----	-----	-----					[276]
R_chinensis_1		GC	-----	-----	-----	TCAG	-----					[277]
R_chinensis_2		GC	-----	-----	-----	TCAG	-----					[277]
R_chinensis_4		GC	-----	-----	-----	TCAG	-----					[277]
R_silerifolius_3		GC	-----	-----	-----	-----	-----					[276]
R_silerifolius_4		GC	-----	-----	-----	-----	-----					[276]
R_silerifolius_184		GC	-----	-----	-----	-----	-----					[276]
R_silerifolius_185		GC	-----	-----	-----	-----	-----					[276]
R_tachiroei_107		GC	-----	-----	-----	-----	-----					[277]
R_tachiroei_111		GC	-----	-----	-----	-----	-----					[277]
R_tachiroei_178		GC	-----	-----	-----	-----	-----					[277]

[310	320	330	340	350	360	370	380	390	400]	
R_acris_nipponicus_25		CTAAGAC	-----	CTAAGTC	TAGCCATTATAGATGGA	ACTTCAACAGCAGCTAAGT	CTAGAGGGGAAT	????????????????				[319]
R_japonicus_11		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----				[319]
R_crucilobus_5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[319]
R_repense_7		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[393]
R_repense_8		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[393]
R_cantoniensis_1		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[376]
R_cantoniensis_3		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[376]
R_cantoniensis_12		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[376]
R_chinensis_1		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[377]
R_chinensis_2		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[377]
R_chinensis_4		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[377]
R_silerifolius_3		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[376]
R_silerifolius_4		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[376]
R_silerifolius_184		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[376]
R_silerifolius_185		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[376]
R_tachiroei_107		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[377]
R_tachiroei_111		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[377]
R_tachiroei_178		TAAAAACACTAAGAC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	CGGCTTGAAGGACGTGATC		[377]

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
[
R_acris_nipponicus_25	?GTTGGGATTTTACATCCACCATTCATAGGGATTAGAGGTGCTCTGGCTCGACATAGTCTGTCTACACGTAACCCCTCATTAGTGGGTTGTGAA										[419]
R_japonicus_11	G.....										[419]
R_crucilobus_5	G.....										[419]
R_repense_7	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[493]
R_repense_8	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[493]
R_cantoniensis_1	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[476]
R_cantoniensis_3	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[476]
R_cantoniensis_12	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[476]
R_chinensis_1	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[477]
R_chinensis_2	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[477]
R_chinensis_4	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[477]
R_silerifolius_3	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[476]
R_silerifolius_4	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[476]
R_silerifolius_184	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[476]
R_silerifolius_185	C.....C.....A..G.....T.....G.....										[476]
R_tachiroei_107	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[477]
R_tachiroei_111	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[477]
R_tachiroei_178	G.....C.....A..G.....T.....G.....										[477]

	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
[
R_acris_nipponicus_25	TTAAAGTAAATAGTACACGATGTAGCTCGAGCAAAAAGGATTAATTTCTTTTCAGAGGTAAGGATCTAGGGTTAATGTCAAATCAATAGTTGGAACAAC										[519]
R_japonicus_11										[519]
R_crucilobus_5										[519]
R_repense_7C.....A.....										[593]
R_repense_8C.....A.....										[593]
R_cantoniensis_1A.....										[576]
R_cantoniensis_3A.....										[576]
R_cantoniensis_12A.....										[576]
R_chinensis_1A.....										[577]
R_chinensis_2A.....										[577]
R_chinensis_4A.....										[577]
R_silerifolius_3A.....										[576]
R_silerifolius_4A.....										[576]
R_silerifolius_184A.....										[576]
R_silerifolius_185A.....										[576]
R_tachiroei_107A.....A.....										[577]
R_tachiroei_111A.....A.....										[577]
R_tachiroei_178A.....A.....										[577]

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
[
R_acris_nipponicus_25	TTTGTGATCATCTCGATATATAAATTTGAAAGATCAATTTGAACAAAA---CCCTTCTTGATTGAAACTTTTGTGGAAATGGAAAAACTA										[614]
R_japonicus_11										[614]
R_crucilobus_5										[614]
R_repense_7G.....										[688]
R_repense_8G.....										[688]
R_cantoniensis_1G.....										[671]
R_cantoniensis_3G.....										[671]
R_cantoniensis_12G.....										[671]
R_chinensis_1G.....										[672]
R_chinensis_2G.....										[672]
R_chinensis_4G.....										[672]
R_querpaer_tensis_3G.....CCCAA.....										[676]
R_querpaer_tensis_4G.....CCCAA.....										[676]
R_querpaer_tensis_184G.....CCCAA.....										[676]
R_querpaer_tensis_185G.....CCCAA.....										[676]
R_tachiroei_107G.....										[672]
R_tachiroei_111G.....										[672]
R_tachiroei_178G.....										[672]

	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	
[
R_acris_nipponicus_25	TTTCGATCAAAGTGATCACACGGGAATCAAGCATTCACATGATTTTCGA-----TAAATCACAAAAGGTATGTTGCTGCCATTTTGAATGATTC										[707]
R_japonicus_11										[707]
R_crucilobus_5										[707]
R_repense_7C.....TAGTCAA.....										[788]
R_repense_8C.....TAGTCAA.....										[788]
R_cantoniensis_1A.....TAGTCAA.....										[771]
R_cantoniensis_3A.....TAGTCAA.....										[771]
R_cantoniensis_12A.....TAGTCAA.....										[771]
R_chinensis_1T.....TAGTCAA.....										[772]
R_chinensis_2T.....TAGTCAA.....										[772]
R_silerifolius_3A.....TAGTCAA.....										[776]
R_silerifolius_4A.....TAGTCAA.....										[776]
R_silerifolius_184A.....TAGTCAA.....										[776]
R_silerifolius_185A.....TAGTCAA.....										[776]
R_tachiroei_107A.....TAGTCAA.....										[772]
R_tachiroei_111A.....TAGTCAA.....										[772]
R_tachiroei_178A.....TAGTCAA.....										[772]

```
[
      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900]
R_acris_nipponicus_25 AGGATCACCGAAGTAATGTCTAAACCCAATGATTCAAAACAAAGATAAACGATCCTGGAACAAGAAAACGCCAATTTAAATGTCTCAATAATTTGAGCA [807]
R_japonicus_11 .....A.....C..... [807]
R_cruciolobus_5 .....A.....C..... [807]
R_repense_7 .....A.....C..... [888]
R_repense_8 .....A.....C..... [888]
R_cantoniensis_1 .....A.....C..... [871]
R_cantoniensis_3 .....A.....C..... [871]
R_cantoniensis_12 .....A.....C..... [871]
R_chinensis_1 .....A.....C..... [872]
R_chinensis_2 .....A.....C..... [872]
R_chinensis_4 .....A.....C..... [872]
R_silerifolius_3 .....A.....C..... [876]
R_silerifolius_4 .....A.....C..... [876]
R_silerifolius_184 .....A.....C..... [876]
R_silerifolius_185 .....A.....C..... [876]
R_tachiroei_107 .....A.....C..... [872]
R_tachiroei_111 .....A.....C..... [872]
R_tachiroei_178 .....A.....C..... [872]
```

```
[
      910      920      930      940      950      960      970      980      990     1000]
R_acris_nipponicus_25 GAAAAAAGAAATAAAAATAAGGAATAAAAGGTGGATTTTAAAGAGACAAAATTTGGTTAGAGAGAGCTCAATAAAGAAAATGTAAGGATTCGGGGT [907]
R_japonicus_11 .....A.....C..... [907]
R_cruciolobus_5 .....A.....C..... [907]
R_repense_7 .....G.....T.....A.....C.....A.....C..... [987]
R_repense_8 .....G.....T.....A.....C.....A.....C..... [987]
R_cantoniensis_1 .....-T.....GG.....T.....A.....C.....A.....C..... [970]
R_cantoniensis_3 .....-T.....GG.....T.....A.....C.....A.....C..... [970]
R_cantoniensis_12 .....-T.....GG.....T.....A.....C.....A.....C..... [970]
R_chinensis_1 .....-T.....GG.....T.....A.....C.....A.....C..... [971]
R_chinensis_2 .....-T.....GG.....T.....A.....C.....A.....C..... [971]
R_chinensis_4 .....-T.....GG.....T.....A.....C.....A.....C..... [971]
R_silerifolius_3 .....-T.....A.....GG.....-T.....A.....C.....A.....C..... [974]
R_silerifolius_4 .....-T.....A.....GG.....-T.....A.....C.....A.....C..... [974]
R_silerifolius_184 .....-T.....A.....GG.....-T.....A.....C.....A.....C..... [974]
R_silerifolius_185 .....-T.....A.....GG.....-T.....A.....C.....A.....C..... [974]
R_tachiroei_107 .....-T.....A.....GG.....T.....A.....C.....A.....C..... [971]
R_tachiroei_111 .....-T.....A.....GG.....T.....A.....C.....A.....C..... [971]
R_tachiroei_178 .....-T.....A.....GG.....T.....A.....C.....A.....C..... [971]
```

```
[
      1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100 ]
R_acris_nipponicus_25 TTTGAACCTTTGAGAATTATCTAACTTGAGTTATAAGTACGAAATGTTTTTTCTTTTCGGGTTTTTCGGTAAGGAAGAAAAACGAACATAAATTATTATA [1007]
R_japonicus_11 ..... [1007]
R_cruciolobus_5 ..... [1007]
R_repense_7 .....G.....A.....A.....C..... [1082]
R_repense_8 .....G.....A.....A.....C..... [1082]
R_cantoniensis_1 .....A.....G.....A.....A.....C..... [1065]
R_cantoniensis_3 .....A.....G.....A.....A.....C..... [1065]
R_cantoniensis_12 .....A.....G.....A.....A.....C..... [1065]
R_chinensis_1 .....A.....G.....A.....A.....C..... [1066]
R_chinensis_2 .....A.....G.....A.....A.....C..... [1066]
R_chinensis_4 .....A.....G.....A.....A.....C..... [1066]
R_silerifolius_3 .....A.....G.....A.....A.....C..... [1069]
R_silerifolius_4 .....A.....G.....A.....A.....C..... [1069]
R_silerifolius_184 .....A.....G.....A.....A.....C..... [1069]
R_silerifolius_185 .....A.....G.....A.....A.....C..... [1069]
R_tachiroei_107 .....A.....G.....A.....A.....C..... [1066]
R_tachiroei_111 .....A.....G.....A.....A.....C..... [1066]
R_tachiroei_178 .....A.....G.....A.....A.....C..... [1066]
```

```
[
      1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200]
R_acris_nipponicus_25 TAGTTTAATTAATTATTTTA----TAGATCTATAATTGCACTCTAT-ATAGTATAATCTAAATTTGAATCATTCTTTCTCGAGCCGTACGAGGAAAAAA [1101]
R_japonicus_11 .....G..... [1101]
R_cruciolobus_5 .....G..... [1101]
R_repense_7 .....G.....G.....C.....G.....C.....G..... [1177]
R_repense_8 .....G.....G.....C.....G.....C.....G..... [1177]
R_cantoniensis_1 .....G.....G.....TTTTA.....C.....G.....C.....G..... [1165]
R_cantoniensis_3 .....G.....G.....TTTTA.....C.....G.....C.....G..... [1165]
R_cantoniensis_12 .....G.....G.....TTTTA.....C.....G.....C.....G..... [1165]
R_chinensis_1 .....G.....G.....TTTTA.....C.....G.....C.....G..... [1166]
R_chinensis_2 .....G.....G.....TTTTA.....C.....G.....C.....G..... [1166]
R_chinensis_4 .....G.....G.....TTTTA.....C.....G.....C.....G..... [1166]
R_silerifolius_3 .....G.....G.....TTTTA.....C.....G.....C.....G..... [1169]
R_silerifolius_4 .....G.....G.....TTTTA.....C.....G.....C.....G..... [1169]
R_silerifolius_184 .....G.....G.....TTTTA.....C.....G.....C.....G..... [1169]
R_silerifolius_185 .....G.....G.....TTTTA.....C.....G.....C.....G..... [1169]
R_tachiroei_107 .....G.....G.....TTTTA.....C.....G.....C.....G..... [1166]
R_tachiroei_111 .....G.....G.....TTTTA.....C.....G.....C.....G..... [1166]
R_tachiroei_178 .....G.....G.....TTTTA.....C.....G.....C.....G..... [1166]
```

	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	
[R_acris_nipponicus_25	GCTCCTATACGTTTCTAAGGGGGGATTTTTGGATTGAGCCTTGGTATGGAACATACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCTTGAATTAATA										[1201]
R_japonicus_11	C.....										[1201]
R_crucifolius_5	C.....										[1201]
R_repense_7	C.....										[1277]
R_repense_8	C.....										[1277]
R_cantonensis_1	C.....	A.....									[1265]
R_cantonensis_3	C.....	A.....									[1265]
R_cantonensis_12	C.....	A.....									[1265]
R_chinensis_1	C.....	A.....				C.....					[1266]
R_chinensis_2	C.....	A.....				C.....					[1266]
R_chinensis_4	C.....	A.....	?????. ????			C.....					[1266]
R_silerifolius_3	C.....	A.....									[1269]
R_silerifolius_4	C.....	A.....									[1269]
R_silerifolius_184	C.....	A.....									[1269]
R_silerifolius_185	C.....	A.....									[1269]
R_tachiroei_107	C.....	A.....	???????????????								[1266]
R_tachiroei_111	C.....	A.....	?????. ? T??								[1266]
R_tachiroei_178	C.....	A.....	??								[1266]

	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	
[R_acris_nipponicus_25	ATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGCTTTCAGAAAGCAAAAAAGGG-----ATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAAGCAA										[1285]
R_japonicus_11										[1285]
R_crucifolius_5										[1285]
R_repense_7			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1377]
R_repense_8			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1377]
R_cantonensis_1			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1365]
R_cantonensis_3			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1365]
R_cantonensis_12			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1365]
R_chinensis_1			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1366]
R_chinensis_2			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1366]
R_chinensis_4			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1366]
R_silerifolius_3			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1369]
R_silerifolius_4			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1369]
R_silerifolius_184			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1369]
R_silerifolius_185			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1369]
R_tachiroei_107			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1366]
R_tachiroei_111			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1366]
R_tachiroei_178			A.....	G.....	TTCAGAAAGCAAAGGG					[1366]

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	
[R_acris_nipponicus_25	TAGAGTTAACTACGTTGATCGAGGAATCCTTCTATTTTAAATTCGCCAAAAGGATGAACCCATATACGTACGTACAATAACGTAATAAAATAGGAAAGAGGC										[1385]
R_japonicus_11										[1385]
R_crucifolius_5										[1385]
R_repense_7	G.....			G.....			T.....			[1477]
R_repense_8	G.....			G.....			T.....			[1477]
R_cantonensis_1	G.....			G.....			T.....			[1465]
R_cantonensis_3	G.....			G.....			T.....			[1465]
R_cantonensis_12	G.....			G.....			T.....			[1465]
R_chinensis_1	G.....			G.....			T.....			[1466]
R_chinensis_2	G.....			G.....			T.....			[1466]
R_chinensis_4	G.....			G.....			T.....			[1466]
R_silerifolius_3	G.....			G.....			T.....			[1469]
R_silerifolius_4	G.....			G.....			T.....			[1469]
R_silerifolius_184	G.....			G.....			T.....			[1469]
R_silerifolius_185	G.....			G.....			T.....			[1469]
R_tachiroei_107	G.....			G.....			T.....			[1466]
R_tachiroei_111	G.....			G.....			T.....			[1466]
R_tachiroei_178	G.....			G.....			T.....			[1466]

	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600	
[R_acris_nipponicus_25	GACCCAAATCCAAATCTTTATTTTTATGTTATATGCAAAACAATAAAGAAATCTTGCATTCGAAGTTGAAGTAATAATATTCA-----TTGATC										[1478]
R_japonicus_11										[1478]
R_crucifolius_5										[1478]
R_repense_7				G.....			ATATTCA			[1571]
R_repense_8				G.....			ATATTCA			[1571]
R_cantonensis_1				G.....			ATATTCA			[1559]
R_cantonensis_3				G.....			ATATTCA			[1559]
R_cantonensis_12				G.....			ATATTCA			[1559]
R_chinensis_1				G.....			ATATTCA			[1560]
R_chinensis_2				G.....			ATATTCA			[1560]
R_chinensis_4				G.....			ATATTCA			[1560]
R_silerifolius_3				G.....			ATATTCA			[1563]
R_silerifolius_4				G.....			ATATTCA			[1563]
R_silerifolius_184				G.....			ATATTCA			[1563]
R_silerifolius_185				G.....			ATATTCA			[1563]
R_tachiroei_107				G.....			ATATTCA			[1560]
R_tachiroei_111				G.....			ATATTCA			[1560]
R_tachiroei_178				G.....			ATATTCA			[1560]

[1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700]	
R_acris_nipponicus_25	AAATCAGTTATTCTATAACCTGGTAGATTTTTTAAAGAAGTACTGGTTGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCCATATACATGTCAATATCAATACCGAC										[1578]
R_japonicus_11										[1578]
R_crucilobus_5										[1578]
R_repense_7								G.		[1671]
R_repense_8								G.		[1671]
R_cantonensis_1								G.		[1659]
R_cantonensis_3								G.		[1659]
R_cantonensis_12								G.		[1659]
R_chinensis_1								G.		[1660]
R_chinensis_2								G.		[1660]
R_chinensis_4								G.		[1660]
R_silerifolius_3								G.		[1663]
R_silerifolius_4								G.		[1663]
R_silerifolius_184								G.		[1663]
R_silerifolius_185								G.		[1663]
R_tachiroei_107								G.		[1660]
R_tachiroei_111								G.		[1660]
R_tachiroei_178								G.		[1660]

[1710	1720	1730	1740	1750]	
R_acris_nipponicus_25	AAAAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAAATCCGTCGACTTTAAAAATCGTGAGGGGTC						[1635]
R_japonicus_11	?						[1635]
R_crucilobus_5 A						[1635]
R_repense_7					T.	[1728]
R_repense_8					T.	[1728]
R_cantonensis_1					T.	[1716]
R_cantonensis_3					T.	[1716]
R_cantonensis_12					T.	[1716]
R_chinensis_1					T.	[1717]
R_chinensis_2					T.	[1717]
R_chinensis_4					T.	[1717]
R_silerifolius_3					T.	[1720]
R_silerifolius_4					T.	[1720]
R_silerifolius_184					T.	[1720]
R_silerifolius_185					T.	[1720]
R_tachiroei_107					T.	[1717]
R_tachiroei_111					T.	[1717]
R_tachiroei_178					T.	[1717]

Molecular phylogenetic relationships and speciation of *Ranunculus cantoniensis* (Ranunculaceae)

Chang Shook Lee¹, Nam Sook Lee¹, and Sung Hee Yeau^{2*}

(¹Department of Life Sciences, and ²Department of Science Education, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea)

To investigate molecular phylogenetic relationships and to test hypothesis of hybrid origin of *Ranunculus cantoniensis* (Ranunculaceae), the sequences of nrDNA and chloroplast DNA were analyzed for 8 taxa and 25 accessions including 5 accessions of outgroup. In the phylogenetic trees by analyses of maximum parsimony and maximum likelihood for ITS nrDNA sequences and combined data of psbA-trnH, rps16 and trnL sequences of cpDNA, *R. cantoniensis* was most closely related to *R. chinensis*, and then to *R. taciroi* and *R. silerifolius*. The molecular phylogenetic relationships were not congruent with the previous report that *R. cantoniensis* was most closely related to *R. silerifolius*. In the sequence analysis of ITS and psbA-trnH, rps16, trnL for *R. cantoniensis* and the related taxa, *R. cantoniensis* showed polymorphism. It supported that the polymorphism also was reported in chromosome number and karyotype of *R. cantoniensis*. *Ranunculus cantoniensis* shared the marker gene of *R. chinensis* and *R. silerifolius* in ITS, and one of *R. silerifolius* in cpDNA. These results supported the hypothesis that *R. cantoniensis* was caused by hybridization between *R. chinensis* and *R. silerifolius* based on chromosome number and karyotype, and also estimated that *R. silerifolius* might be of maternal origin and *R. chinensis* be paternal.

Key words: *Ranunculus cantoniensis*, speciation, ITS, psbA-trnH, rps16, trnL

*Corresponding author: Phone +82-2-3277-3793, Fax +82-2-3277-2684, e-mail nemone@ewha.ac.kr