

## RAPD, ISSR과 PCR-RFLP를 이용한 한국산 제비꽃속(*Viola*)의 종간 유연관계

유기억<sup>1\*</sup>·이우철<sup>1</sup>·권오근<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>강원대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>2</sup>농촌진흥청 원예연구소)

한국산 제비꽃속 32분류군과 일본산 2집단 등 총 34집단에 대한 유연관계를 알아보기 위하여 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA), ISSR(inter simple sequence repeat) 및 PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism) 분석을 실시하였다. RAPD 분석에서는 40개의 primer 중 6개가 분류군 전체에서 반응을 보였고 이로부터 총 70개(98.6%)의 다형화 밴드를 얻었으며, ISSR 분석에서는 4개의 primer로 부터 28개(96.6%)의 다형화 밴드를 얻었다. 염색체 DNA의 non-coding부분을 이용한 PCR-RFLP 분석에서는 반응이 일어난 4지역에서 증폭된 약 6.78 kb의 DNA 각각에 대하여 15가지 제한효소를 처리한 결과 총 80개의 restriction site를 얻었으며 그중 16 site는 polymorphic하게 나타나 20%의 다형화를 보였다. 본 연구에서 다룬 3가지 형질에 의한 유집분석 결과 각각의 형질에 의해서는 서로 일치하지 않는 유집형태를 보였지만 3가지 형질을 통합한 결과는 진정제비꽃절(sect. *Nomimium*)내 아절과 계열간 구분이 명확하게 나타났으며 무경종과 유경종도 구별이 가능하여 외부형태형질에 의한 기존의 분류체계와 일치하였다. 그러나 노랑제비꽃절(sect. *Chamaemelianium*)은 진정제비꽃절과 독립적인 군을 형성하지 않고 진정제비꽃절 내 무경종그룹인 *Patellares*아절과 *Vaginatae*아절 사이에 위치하여 나타났다. 형태적인 변이가 매우 심한 분류군으로 알려진 태백제비꽃군(*V. albida* complex)은 *Patellares*아절 내에서 하나의 군으로 유집되어 *Pinnatae*계열로 처리하는 것이 타당할 것으로 생각된다. 본 연구에서 사용한 3가지 형질 중 RAPD 분석방법은 ISSR과 PCR-RFLP 분석보다 제비꽃속의 종간 유연관계를 밝히는데 더 유용한 것으로 판단된다.

주요어 : 제비꽃속, PCR-RFLP, RAPD, ISSR, 유연관계분석

제비꽃속(*Viola*)은 제비꽃목(Violales)의 제비꽃과(Violaceae)에 속하는 초본 또는 소관목으로 제비꽃과 중에서 가장 진화한 속이며(Melchior, 1925) 전세계에 약 450여 종이 온대지역을 중심으로 널리 분포한다(Cronquist, 1981).

제비꽃속에 대한 분류체계는 Gingins(1823)가 주두의 형태에 따라 sections *Nomimium*, *Dischidium*, *Chamaemelianium*, *Melianium*, *Leptidium*의 5절로 분류한 것이 기준이 되고 있

\* 교신저자: 전화: (033) 250-8531, 전송: (033) 251-3990, 전자우편: yooko@kangwon.ac.kr  
(접수: 2004년 2월 20일, 완료: 2004년 2월 27일)

으며, Becker(1925)는 제비꽃속 식물의 다양성에 비하여 Gingins의 분류체계가 너무 광범위함을 지적하면서 본 속을 14절 28아절 7계열로 세분하기도 하였다. 그러나 이러한 분류계급은 연구자에 따라 아절을 절로 승격시키기도 하며 새로운 절을 설정하는 등 혼란이 가중되고 있다(Nakai, 1922b, 1928; Ishidoya, 1929; Takenouchi, 1955; Maekawa and Hashimoto, 1963).

제비꽃속의 분포에 관한 연구로는 Becker(1925), Valentine *et al.*(1968)이 유럽산에 대하여, Brainerd(1921, 1924), Clausen(1927, 1929), Russell(1958a, b, 1965), Russell and Risser (1960)는 북미산을 연구하였고, 동아시아산은 Makino(1902), Ishidoya(1929), Takenouchi (1955), Maekawa and Hashimoto(1963), Satake and Ito(1965, 1966a, b), Hashimoto(1967), Hama (1975) 등에 의해 분포 및 생태적 특성이 밝혀졌다. DNA수준에서의 계통분류학적 연구는 Ballard(1996), Ballard *et al.*(1997, 1998, 1999)과 Cortes-Palomec and Ballard(2002)에 의한 연구가 있으며 Ballard and Sytsma(2000)는 제비꽃속의 biogeography, Nadot(2000)는 화분에 대한 연구를 수행하였다.

한국산 제비꽃속에 대한 종합 연구는 Palibin(1899)이 태백제비꽃(*V. albida*)을 신종으로 발표하면서 15종의 제비꽃속 식물을 기재한 것이 처음이다. Nakai(1909, 1911)는 우리나라 분포종을 19종 1품종으로 보고한 후 많은 신종을 발표하면서 한국산을 30종 8변종 1품종으로 정리하였고 이를 Gingins의 분류체계에 따라 3개의 절로 분류함으로써 윤곽이 밝혀지게 되었다(Nakai, 1916). 그 후 Nakai(1922a)는 섬제비꽃(*V. takeshimana*), 갑산제비꽃(*V. kapsanensis*), 흰갑산제비꽃(*V. kapsanensis* var. *albiflora*) 및 노랑제비꽃(*V. xanthopetala*)을 새로 기재하며 한국산을 41종 8변종 1품종으로 보완하였고 이후에도 동아시아산(1922a, b)이나 일본(1925, 1928)에 분포하는 제비꽃속에 대한 연구를 수행하면서 한국에 분포하는 종류들에 대해서도 발표하여 최종적으로는 한국산을 42종 14변종 2품종으로 정리하였다(Nakai, 1952). 한편 Ishidoya(1929)는 만주와 한국에 분포하는 제비꽃 종류를 Becker의 분류체계에 따라 9절로 분류하였고, 한국산을 38종 4변종으로 정리하였다. 이외에도 Maekawa(1954)는 한국분포종을 33종 2변종 16품종, Hashimoto(1967)는 32종이 분포하는 것으로 보고하였고, 국내 연구자들 중 Chung(1959)은 37종 6변종, 이(1969)는 48종 13변종 3품종, 그리고 박(1974)은 43종 3품종으로 정리하는 등 한국분포 종에 대해서는 분류학자에 따라 많은 견해 차이를 보이고 있다. 이외에 잎 표피 및 종자의 형태(이와 이, 1968), 염색체수 관찰(Lee, 1967, 1969), 성분분석(이와 육, 1972, 1975; Kim and Ko, 1980), 화분의 형태(황과 김, 1985), 종분화론적 연구(황, 2002)가 부분적인 종을 대상으로 수행된 바 있다. 한편 김(1986)은 30종 1변종을 대상으로 잎의 비교형태학적 연구를 수행한 후 기존의 분류체계와 비교하여 한국산을 3절 6아절 8계열로 정리하였다.

제비꽃속에 속하는 종들은 근연종간에도 형태적으로 매우 비슷하여 식별이 어렵고 또한 종내 변이가 심하게 나타나 종의 한계설정이 어려우며, 근연종간에 자유롭게 교잡이 일어나 매우 다양한 형태의 중간형들이 출현하므로 분류학적으로 취급하기 어려운 분류군 중의 하나이다(Russell, 1960). 한국산 역시 종간 또는 종내 형태적 변이가 매우 심하여 학자에 따라서는 한국 분포종을 50분류군(Nakai, 1922a), 48분류군(정 등, 1949), 64분류군(이, 1969)으로 분류하

는 등 종의 한계를 설정하는데 많은 이견이 있다. 또한 한국산 전체에 대한 분류학적 연구가 수행된 것은 김(1986)의 연구이외에는 없고 DNA수준에서의 연구 또한 전무한 실정이다.

본 연구에서는 김(1986)의 분류체계 하에서 주로 외부형태 형질에 의해 분류되어온 국내 제비꽃속 식물에 대하여 유연관계 분석에 널리 사용되고 있는 RAPD, ISSR 및 PCR-RFLP 분석 등을 실시하여 종간/내유연관계를 알아보고 기존 형태 형질에 의한 분류체계와 비교하고자 하며, 이 방법들이 제비꽃속 식물의 분류에 유용한가를 알아 보고자 한다.

## 재료 및 방법

실험재료는 2003년 3월부터 8월까지 우리나라와 일본에서 채집한 생체재료를 강원대학교 온실에 이식하여 사용하였으며, 증거표본은 강원대학교 생물학과 식물표본실(KWNU)에 보관하였다. 실험에 사용된 분류군 및 채집지는 Table 1과 같다.

실험에 사용할 DNA의 추출은 Doyle and Doyle(1987)의 방법을 따랐으며, 추출한 DNA는 Beckman spectrophotometer로 정량한 후 5ng/ $\mu$ l로 희석하여 PCR을 위한 DNA로 사용하였다. PCR은 Williams *et al.*(1990)의 방법을 따랐으며 DNA 증폭은 DNA Thermal Cycler (Biometra, Whatman Co.)로 수행하였다.

RAPD를 위한 primer는 Operon사의 random decamer 40종류를 사용하였으며, ISSR은 UBC primer 12종류 (2-bp 9종류, 4-bp 3종류)를 사용하였다. PCR 조건은 94°C에서 1분, 35°C에서 1분, 72°C에서 2분을 cycle로 하여 45회 반복한 후 72°C에서 10분간 더 유지시켰으며, ISSR primer는 annealing 온도를 48°C로 하였다. 증폭된 DNA는 1.2% agarose gel에 전기영동한 후 UV하에서 polaroid camera로 촬영하였다. 분자량 비교를 위한 marker로는 100 bp DNA ladder와 100 bp Plus DNA Ladder를 사용하였다.

PCR-RFLP는 Demasure *et al.*(1995)에 따라 9부분의 cpDNA non-coding region을 대상으로 하였으며 PCR 조건은 92°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분을 cycle로 하여 45회 반복한 후 72°C에서 10분간 더 유지시켰 주었다. 증폭된 DNA는 15가지의 제한효소(*Hae*III, *Msp*I, *Taq*I, *Hin*II, *Ava*I, *Dra*I, *Hind*III, *Pst*I, *Rsa*I, *Bgl*I, *Bgl*II, *Bcl*I, *Bam*HI, *Xba*I, *Eco*RI)를 처리한 후 1.5% agarose gel에 전기영동하였고 UV하에서 band를 확인하고 polaroid camera로 촬영하였다. 분자량 비교를 위한 marker로는 100 bp Plus DNA Ladder를 사용하였다.

유연관계분석은 촬영된 gel 사진을 근거로 증폭된 밴드를 각각 하나의 운영분류단위(OTU, operational taxonomic unit)로 취급하여 RAPD, ISSR 및 PCR-RFLP 각각에 대한 자료행렬(data matrix)을 작성하였다. 유연관계 분석을 위한 유사도는 similarity coefficient 값

Table 1. Collection data of Korean *Viola* species used in this study.

Taxa	Common name	Abbrev.	Collecting site and date
Section <i>Chamaemelanium</i>	노랑제비꽃절		
<i>V. orientalis</i>	노랑제비꽃	ORI	GW* : Yanggu (03. 4. 28)
<i>V. brevistipulata</i> var. <i>minor</i>	털노랑제비꽃	BRE	GW : Yanggu (03. 8. 7)
Section <i>Nomimium</i>	진정제비꽃절		
Subsection <i>Hypocarpae</i>	아욱제비꽃아절		
<i>V. collina</i>	등근털제비꽃	COL	GW : Yanggu (03. 4. 28)
<i>V. hondoensis</i>	아욱제비꽃	HON	GB : Ulleungdo (03. 4. 22)
Subsection <i>Trigonocarpae</i>	낙시제비꽃아절		
Series <i>Campylostylae</i>	줄방제비꽃계열		
<i>V. acuminata</i>	줄방제비꽃	ACU	GG : Myoungjisan (03. 4. 29)
<i>V. websteri</i>	왕제비꽃	WEB	GG : Yoomyongsan(03. 5. 6)
Series <i>Rostratae</i>	낙시제비꽃계열		
<i>V. ovato-oblonga</i>	긴잎제비꽃	OVA	JJ : Hallasan (03. 5. 3)
<i>V. kusanoana</i>	큰줄방제비꽃	KUS	GB : Ulleungdo (03. 4. 23)
<i>V. grypoceras</i>	낙시제비꽃	GRY	JJ : Kwanumsa (03. 5. 2)
for. <i>albiflora</i>	흰낙시제비꽃	GRA	JJ : Kwanumsa (03. 5. 2)
var. <i>exilis</i>	애기낙시제비꽃	GRE	JJ : Hallasan (03. 5. 3)
Subsection <i>Bilobatae</i>	콩제비꽃아절		
Series <i>Verecundae</i>	콩제비꽃계열		
<i>V. verecunda</i>	콩제비꽃	VER	GB : Ulleungdo (03. 4. 23)
<i>V. verecunda</i>	콩제비꽃	VES	Japan : Tokyo (03. 8. 22)
Subsection <i>Vaginatae</i>	고깔제비꽃아절		
<i>V. rossii</i>	고깔제비꽃	ROS	JN: Haenam (03. 5. 14)
<i>V. rossii</i>	고깔제비꽃	ROT	Japan : Tokyo (03. 8. 22)
<i>V. diamantiaca</i>	금강제비꽃	DIA	GW : Bokkyesan (03. 5. 8)
<i>V. yazawana</i>	개금강제비꽃	YAZ	GW : Seoraksan (03. 6. 4)
Subsection <i>Patellares</i>	제비꽃아절		
Series <i>Pinnatae</i>	남산제비꽃 계열		
<i>V. chaerophylloides</i>	남산제비꽃	CHA	GW : Yanggu (03. 4. 28)
Series <i>Chinensis</i>	제비꽃계열		
<i>V. woosanensis</i>	우산제비꽃	WOO	GB : Ulleungdo (03. 4. 23)
<i>V. albida</i>	태백제비꽃	ALB	GG : Myoungjisan (03. 4. 29)
for. <i>takahashii</i>	단풍제비꽃	ALT	GW: Daedeoksan (03. 5. 20)
<i>V. phalacrocarpa</i>	털제비꽃	PHA	JN: Haenam (03. 5. 14)
<i>V. japonica</i>	왜제비꽃	JAP	JJ : Hallasan (03. 5. 4)
<i>V. hirtipes</i>	흰털제비꽃	HIR	GW : Cheolwon (03. 5. 10)
<i>V. patrinii</i>	흰제비꽃	PAT	JJ : Sankumburi (03. 5. 6)
<i>V. lactiflora</i>	흰것제비꽃	LAC	GW : Yanggu (03. 4. 28)
<i>V. mandshurica</i>	제비꽃	MAN	JJ : Hallasan (03. 5. 4)
<i>V. seoulensis</i>	서울제비꽃	SEO	GW : Sambangsan (02. 6. 14)
<i>V. yedoensis</i>	호제비꽃	YED	GW: Daedeoksan (03. 5. 20)
Series <i>Variiegatae</i>	알록제비꽃계열		
<i>V. keiskei</i>	잔털제비꽃	KEI	GG : Myoungjisan (03. 4. 29)
<i>V. variegata</i>	알록제비꽃	VAR	GG : Myoungjisan (03. 4. 29)
var. <i>chinensis</i>	자주알록제비꽃	VAC	GW : Yanggu (03. 4. 28)
Series <i>Patellares</i>	피제비꽃계열		
<i>V. selkirkii</i>	피제비꽃	SEL	GG : Myoungjisan (03. 4. 29)
<i>V. violacea</i>	자주잎제비꽃	VIO	JJ : Hallasan (03. 5. 6)

\* GB : Gyeongsangbuk-do, GG : Gyeonggi-do, GW : Gangwon-do, JJ : Jeju-do, JN : Jeollanam-do.

을 이용하였으며, 유집분석은 NTSYS-pc(version 2.02j, Applied Biostatistics, Setauket, New York, USA)를 사용하였고, 비가중산술법(UPGMA, unweighted pair-group method using

Table 2. The list of six arbitrary and four ISSR primers used in this study.

Primer	Sequence(5' to 3')	Primer	Sequence(5' to 3')
OPC-01	TTC GAG CCA G	OPC-16	CAC ACT CCA G
OPC-02	GTG AGG CGT C	ISSR1	(CT) <sub>8</sub> RT
OPC-08	TGG ACC GGT G	ISSR2	(CT) <sub>8</sub> TG
OPC-12	TGT CAT CCC C	ISSR3	(CA) <sub>6</sub> RY
OPC-13	AAG CCT CGT C	ISSR4	(CACA) <sub>4</sub>

arithmetic average)으로 유집하였다. 또한 분석은 RAPD, ISSR 및 PCR-RFLP 각각에 대하여 수행한 후 비교하였으며 3가지 자료를 합한 data도 분석하여 비교하였다.

## 결 과

### Primer의 선발 및 전기영동 분석

#### RAPD분석

RAPD분석을 위하여 총 40종류의 decamer primer를 이용한 스크린 결과 37개 primer에서 DNA 증폭 반응을 보였으며, 이중 6개 primer 만이 34분류군 전체에서 증폭되었다(Table 2). 증폭된 DNA단편의 크기는 0.1-3.0 kb까지 다양하게 나타났으며 주로 0.5-1.0 kb 사이에 위치하였고 중간/내 동일하거나 서로 다른 밴드 양상을 보였다(Fig. 1). 분류군 전체에서 반응을 보인 6종류의 primer로부터 총 71개의 밴드가 관찰되었으며, 이 중 다형화(polymorphism)를 보이는 밴드는 70개로 primer 한 개당 평균 11.6개의 높은 다형화 밴드를 보이는 것으로 나타났다. 각 primer별 밴드의 수는 6개(OPC-13)부터 17개(OPC-01)로 다양하게 나타났으며 평균 11.8개였다.

#### ISSR 분석

ISSR분석을 위한 microsatellite primer 12종류에 대한 primer screen 결과 9종류에서 반

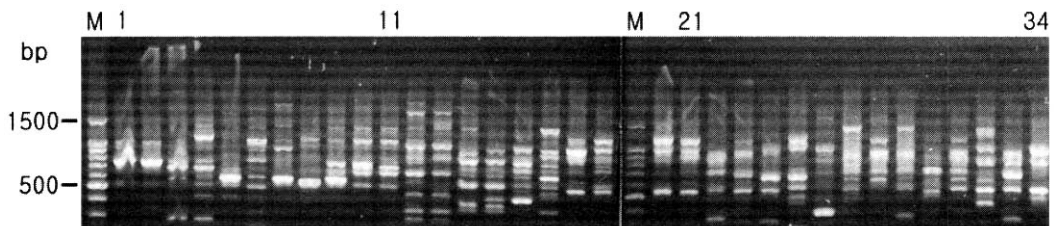


Fig. 1. RAPD profiles by OPC-01 of the analyzed plants.

Table 3. Number of polymorphic restriction sites generated by single digests of 15 restriction enzymes and the sizes of cpDNA fragments amplified by each primer pair.

Primer pair <sup>a</sup>	4-bp cutter			5-bp cutter	6-bp cutter				No. of polymorphic site	Size (bp)
	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Hin</i> FI	<i>Ava</i> I	<i>Dra</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> I		
A	-	-	-	1	1	1	2	-	5	1600
B	-	-	-	-	-	-	1	1	2	1500
C	-	-	-	3	-	1	-	-	4	2200
D	2	1	1	-	-	1	-	-	5	1480
Total	2	1	1	4	1	3	3	1	16	6780

<sup>a</sup> A, *trnH*[tRNA-His(GUS)]-*trnK*[tRNA-Lys(UUU) exon 1]; B, *psbC*[psII 44kd protein]-*trnS* [tRNA-Ser(UGA)]; C, *psaA*[PS I(P 700 apoprotein A1)]-*trnS*[tRNA-Ser(GGA)]; D, *trnS*[tRNA-Ser(GGA)]-*trnT*[tRNA-Thr(UGU)].

응을 보였으며 이 중 4개 primer가 분류군 전체에서 증폭되었다(Table 2). 증폭된 DNA 단편 크기는 0.1-2.5 kb까지 다양하게 나타났으며 주로 0.5-2.0 kb 사이에 위치하였다(Fig. 2). 4종류의 primer로부터 총 29개의 밴드를 얻었으며 이중 28개 밴드는 polymorphic하게 나타나 96.6%의 높은 polymorphism을 보였다. Primer별 밴드의 수는 6개([CACA]<sub>4</sub>)부터 11개([CT]<sub>8</sub>RT)까지 다양하였으며, primer 한개당 평균 7.25개로 나타났다.

#### PCR-RFLP 분석

엽록체 DNA 상의 9개 non-coding 지역을 증폭한 결과 4개 primer pair에서 반응을 보였다. 4지역에서 증폭된 약 6.78 kb의 DNA 각각에 대하여 15가지의 제한효소를 처리한 결과 총 80개의 restriction site를 얻었으며 그중 16 site는 polymorphic하게 나타나 20%의 polymorphism을 보였다(Fig. 3). Primer pair별 polymorphic site는 *psbC*[psII 44kd protein]-*trnS*[tRNA-Ser(UGA)]가 2개로 가장 적었고, *trnH*[tRNA-His(GUS)]-*trnK*[tRNA-Lys(UUU) exon 1]과 *trnS*[tRNA-Ser(GGA)]-*trnT*[tRNA-Thr(UGU)]가 각각 5개로 가장 많았다(Table 3).

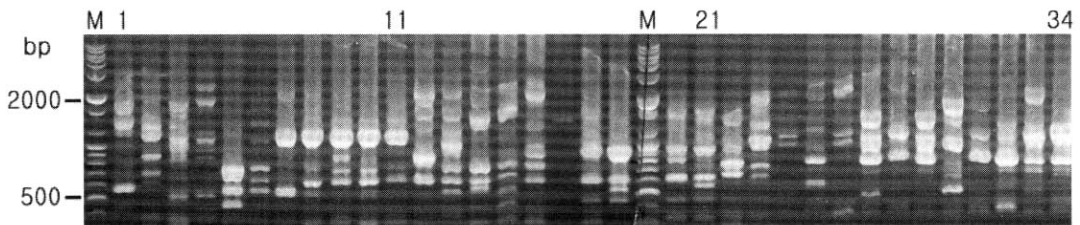


Fig. 2. ISSR profiles by (CT)<sub>8</sub>RT primer of the analyzed plants.

Table 4. Data matrix of cpDNA restriction sites in Korean *Viola*.

No.	Enzyme	Primer*	Variation(bp)	1 <sup>†</sup>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34							
1	<i>Hinf</i> I	A	750-600-150	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0					
2	<i>Ava</i> I	A	1200+100=1300	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
3	<i>Dra</i> I	A	300+50=350	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
4	<i>Hind</i> III	A	880+810=1690	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1				
5	<i>Hind</i> III	A	880-800=80	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0				
6	<i>Hind</i> III	B	1500-800=700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
7	<i>Pst</i> I	B	950-300=1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1			
8	<i>Hinf</i> I	C	800-680=120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1				
9	<i>Hinf</i> I	C	600-500=100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
10	<i>Hinf</i> I	C	450-300=150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
11	<i>Dra</i> I	C	1600+100=1700	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
12	<i>Hae</i> III	D	450-160=610	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1		
13	<i>Hae</i> III	D	600-450=150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
14	<i>Msp</i> I	D	580-560=20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
15	<i>Taq</i> I	D	500+100=600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	<i>Dra</i> I	D	1200-900=300	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*A, *trnH*[tRNA-His(GUS)]-*trnK*[tRNA-Lys(UUU) exon 1]; B, *psbC*[*psII* 44kd protein]-*trnS* [tRNA-Ser(UGA)]; C, *psaA*[*PS I*(P 700 apoprotein A1)]-*trnS*[tRNA-Ser(GGA)]; D, *trnS* [tRNA-Ser(GGA)]-*trnT*[tRNA-Thr(UGU)].

<sup>†</sup>1, ORI; 2, BRE; 3, COL; 4, HON; 5, ACU; 6, WEB; 7, OVA; 8, KUS; 9, GRY; 10, GRA; 11, GRE; 12, VER; 13, VES; 14, ROS; 15, ROT; 16, DIA; 17, YAZ; 18, CHA; 19, WOO; 20, ALB; 21, ALT; 22, PHA; 23, JAP; 24, HIR, 25, PAT; 26, LAC; 27, MAN; 28, SEO; 29, YED; 30, KEI; 31, VAR; 32, VAC; 33, SEL; 34, VIO. Abbreviations of the OTUs are given in Table 1.

유연관계 분석

RAPD분석

RAPD분석을 위해 선발된 6개의 arbitrary primer로부터 얻은 71개의 band를 이용한 유집분석 결과는 34분류군이 유사도지수 0.60-0.96의 범위 내에서 몇 개의 군을 형성하였다. 유

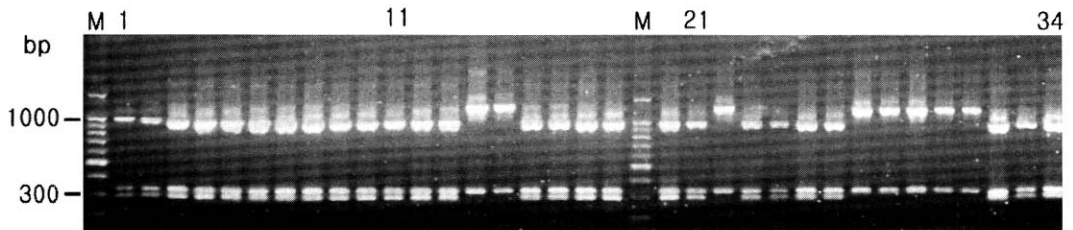


Fig. 3. Electrophoretic patterns of RFLP by *pst*I from amplified DNA of *psbC*[*psII* 44kd protein]-*trnS*[tRNA-Ser(UGA)].

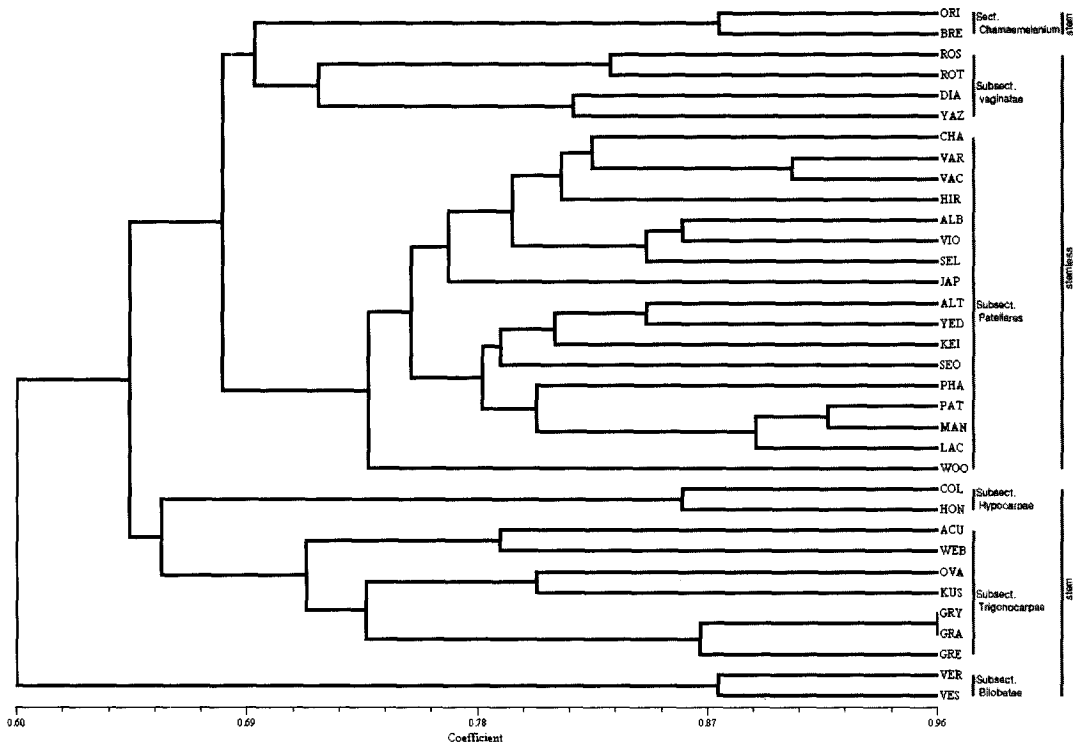


Fig. 4. Phenogram of *Viola* based on analysis of PCR amplified fragments produced by six arbitrary RAPD primers. Abbreviations of the samples are given in Table 1.

경종 중 *Chamaemelanium*절에 속하는 노랑제비꽃과 털노랑제비꽃은 무경종의 *Vaginatae*아절군과 함께 유집되었으며, 유경종의 나머지 분류군들은 *Hypocarpae*아절과 *Trigonocarpace*아절이 하나의 군으로 유집되었고 *Bilobatae*아절의 2종류도 하나의 군으로 유집되었다. 한편 *Vaginatae*아절을 제외한 무경종의 *Patellares*아절에 속하는 17분류군은 유사도 0.74 수준에서 커다란 군을 형성하였다(Fig. 4).

#### ISSR분석

Primer screen과정을 통해 선발된 4종류의 microsatellite primer로부터 얻은 29개 밴드를 이용한 자료행렬을 바탕으로 유집분석을 실시한 결과는 Fig. 5와 같다. 유집결과 34분류군은 유사도지수 0.49-0.90의 범위내에서 몇 개의 소그룹을 형성하였다. 즉, 유경종의 *Chamaemelanium*절과 *Bilobatae*아절은 유사도 0.62 정도에서 잘 유집되었고 *Hypocarpae*아절은 나머지 분류군들과는 가장 멀게 군을 형성하였고, *Trigonocarpace*아절은 무경종인



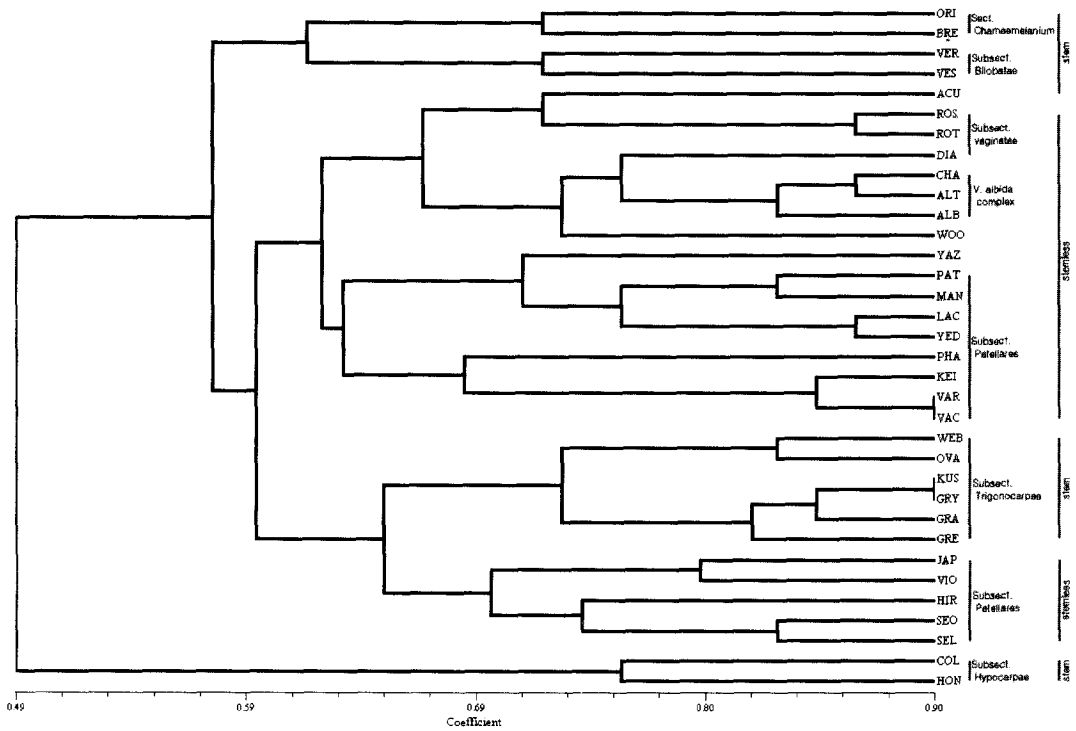


Fig. 5. Phenogram of *Viola* based on analysis of PCR amplified fragments produced by four ISSR primers. Abbreviations of the samples are given in Table 1.

*Patellares* 아질의 일부 종들과 함께 유집되었다. 나머지 무경종 종류들은 유사도 0.63 수준에서 하나의 군을 형성하였고 특히 *V. albida* complex에 해당하는 남산제비꽃, 태백제비꽃, 단풍제비꽃 등 3종류도 하나의 군으로 잘 유집되었다.

PCR-RFLP 분석

증폭반응을 보인 엽록체 DNA 상의 4개 primer pair를 15가지의 제한효소 처리를 통해 80개의 restriction site를 얻었으며 이중 16 site만이 polymorphism을 보였다. 그러나 많은 경우 종간에 차이가 없거나 있더라도 같은 변이양상을 보이는 종류가 많았으며 종내 또는 집단간 변이도 나타나지 않았다. 다형화를 보인 16 site에 대한 자료행렬은 Table 4와 같다.

그 결과 34분류군은 유사도지수 0.62-1.0범위에서 단계통군으로 유집되었다. 이들은 크게 두개의 군을 형성하는데, 첫 번째 군에는 줄방제비꽃, 잔털제비꽃과 단풍제비꽃이 포함되어 있으며, 두 번째 군은 나머지 31분류군들이 유사도 0.70정도에서 커다란 군을 형성하였다. 두 번째 군은 다시 3개의 군 즉, *Nomimium*질의 *Bilobatae*아질, *Vaginatae*아질과 태백제비꽃이 포함된 군, 무경종 중 *Patellares*아질의 12분류군이 포함된 군, 그리고 *Chamaemelum*질,

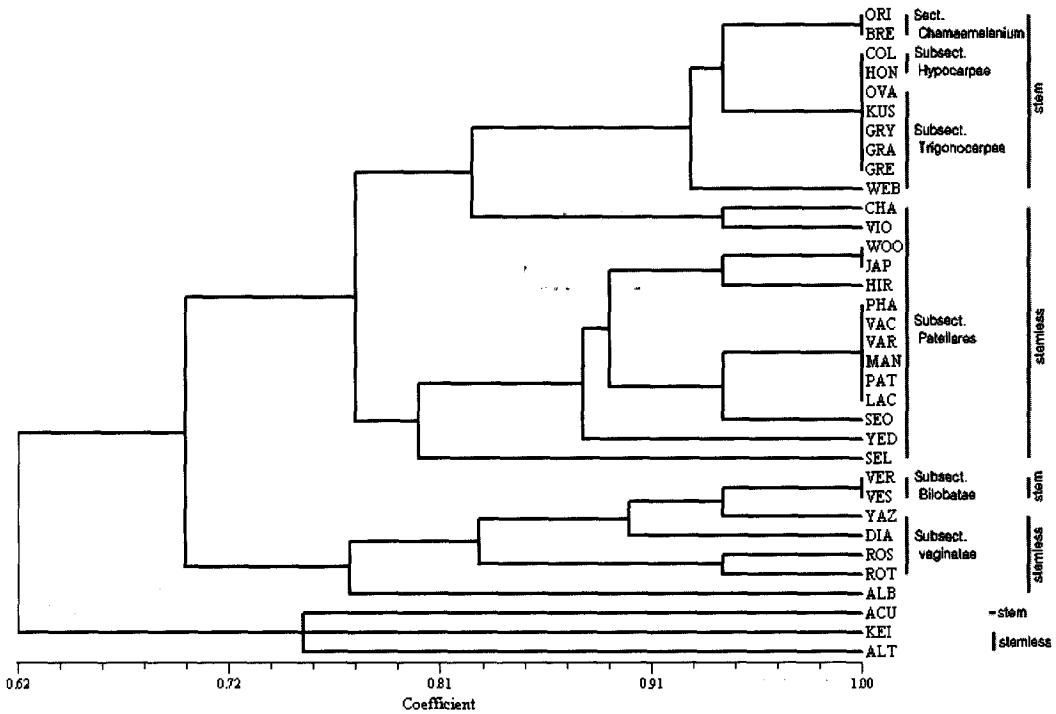


Fig. 6. Phenogram of *Viola* based on analysis of PCR-RFLP produced by four primer pairs. Abbreviations of the samples are given in Table 1.

*Hypocarpae*아절, 줄방제비꽃을 제외한 *Trigonocarpeae*아절, 그리고 남산제비꽃과 자주잎제비꽃이 포함된 군으로 유집되었다(Fig. 6).

Combined data 분석

RAPD, ISSR과 PCR-RFLP분석을 통하여 관찰된 총 116개 marker를 토대로 34분류군에 대한 유연관계 분석을 실시한 결과는 Fig. 7과 같다. 그 결과 유사도지수 0.60-0.93의 범위내에서 몇 개의 군이 형성되었다. 유경종에 속하는 분류군들은 크게 3개의 군으로 유집되었다. 즉, *Bilobatae*아절의 콩제비꽃 두집단은 나머지 분류군들과는 가장 멀게 유집되었으며, *Hypocarpae*아절과 *Trigonocarpeae*아절도 하나의 군을 형성하였고, *Chamaemelum*아절은 2개의 무경종 군 사이에 유집되어 나타났다. 무경종에 속하는 분류군들은 크게 2개의 군으로 대표 되었는데 하나는 *Vaginatae*아절의 4종류가 포함된 것으로 유사도 0.71정도에서 유집되었으며 두 번째는 *Patellares*아절에 포함되는 종류들이 커다란 군을 형성하였고 아절 내 계열 수준에서도 잘 유집되었다.

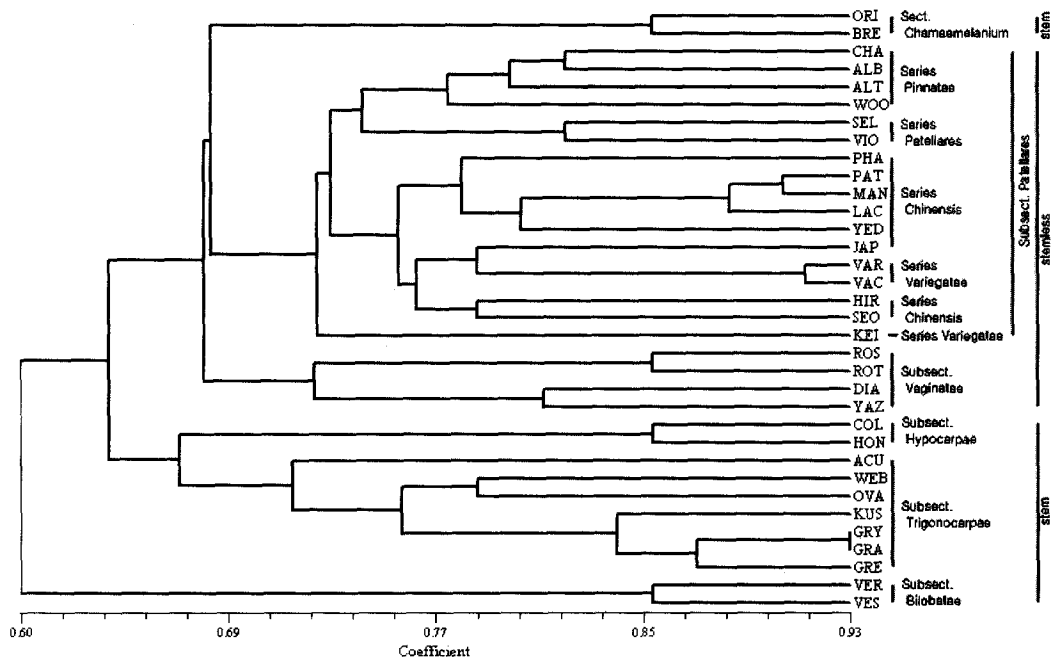


Fig. 7. Phenogram of *Viola* based on RAPD, ISSR and PCR-RFLP combined data. Abbreviations of the samples are given in Table 1.

## 고 찰

### 선발된 Primer의 특징

일반적으로 증폭 반응이 일어난 random(10-mer) primer의 염기서열 중 guanine(G)과 cytosine(C)의 함량은 PCR 증폭에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데(Fritsch *et al.*, 1993), 본 연구에서도 분류군 전체에서 증폭이 일어난 6종류의 primer에는 G와 C의 수가 60% 이상 포함되어 있었다. Random primer를 이용한 증폭방법은 중간 분류 또는 종내 분류에 있어서 적은 양의 DNA를 가지고도 많은 양의 증폭된 DNA를 얻어낼 수 있고, 경제적이다라는 장점을 가지고 있지만 종사이에서 보여지는 상동성과 실험의 재현성에 문제가 있는 것으로 알려져 있는데(Williams *et al.*, 1993) 제비꽃 종류의 경우 40개의 primer를 사용했음에도 불구하고 뚜렷한 재현성을 보이는 primer는 단지 6개로 매우 낮은 재현성을 보였다. 동식물내 분자마커 생산에 효과적인(Zietkiewicz *et al.*, 1994) 방법으로 알려져 있는 ISSR primer의 경우에도 guanine과 cytosine이 포함되어 있는 (AC), (AG), (CT), (GA), (GT) 등의 반복 염기를 포함하는 primer는 뚜렷한 밴드를 생성하였고 다형화 밴드도 많이 나타났다.

Cortes-Palomec and Ballard(2002)는 ISSR 분석을 이용하여 형태적으로 유사한 멕시코산 *Viola* 2종류에 대한 gene flow를 추정한 바 있는데, 본 연구 결과에서도 도출된 29개의 마커가 96.6%의 높은 polymorphism을 보여 중간 유연관계를 분석하는데 유용한 방법으로 생각된다. Demesure *et al.*(1995)에 의한 엽록체 DNA상의 non-coding region에 대한 universal primer pair를 이용한 RFLP분석은 infrageneric level (Messinger *et al.*, 1999; Potokina *et al.*, 1999; Choi and Wen, 2000)이나 중간 또는 종내 유연관계 분석(Yoo *et al.*, 2001)에 널리 사용되는데 본 연구에서는 4가지 primer pair로부터 16개 site의 polymorphic band만을 얻어 RAPD와 ISSR 분석에 의한 결과 보다는 매우 낮은 다형화를 보였으며 종간에 같은 변이 양상을 보이는 종류도 많이 나타났다. 이처럼 중간 변이가 매우 낮은 이유는 사용된 제한효소의 종류와도 연관이 있을 것으로 생각되어 좀더 다양한 효소를 처리하거나 두가지 제한효소를 이용하여 double digestion과정 등을 수행한다면 보다 많은 polymorphic site를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

#### 속내 분류계급의 유연관계

제비꽃속의 속하 분류계급은 주두의 형태나 지하경의 유무, 탁엽의 모양, 엽맥의 유형에 따라 절, 아절, 계열 등이 설정되어 왔다(Gingins, 1823; Becker, 1925; Yuzepchuk, 1949; Wang, 1991; 김, 1986). 본 연구에서 사용한 RAPD, ISSR, PCR-RFLP 분석자료를 통한 유집분석 결과 각각의 phenogram은 일부 아절이나 계열 수준에서의 유집은 가능하였지만 일부 종들은 형태적 특징에 의한 분류와는 전혀 다르게 유집되는 경향을 보였다. 그러나 3가지 data를 종합한 결과에서는 아절과 계열수준에서 34분류군이 잘 유집되어 나타났다.

*Chamaemelanium*절은 주두가 구형이고 돌출부는 없으며 양측면 아래에 돌기모가 있고 엽맥상은 정주맥이며, 측맥은 1차맥을 가지는 특징으로 국내에 분포하는 다른 두 절, 즉 *Dischidium*절과 *Nomimum*절과는 구별된다(김, 1986). 그러나 본 연구 결과 *Chamaemelanium*절은 RAPD, ISSR, PCR-RFLP 뿐만아니라 combined된 결과에서도 독립적인 군으로 유집되지 않고 *Nomimum*절의 *Vaginatae*아절, *Bilobatae*아절, *Hypocarpae*아절과 *Trigonocarpae*아절과 각각 유집되었고 combined 결과에서는 *Patellares*아절과 *Vaginatae*아절 사이에 위치하였다. 본 절에 속하는 분류군들은 학자에 따라 많은 종으로 세분하기도 하며(Nakai, 1922b), 최근 황(2002)은 한국산 *Chamaemelanium*절의 분류학적 연구를 통해 국내 분포종을 2종 2변종으로 정리하였다. 또한 *Chamaemelanium*절은 엽색체수와 주두의 형태 등이 *Dischidium*절과 유사해 두 절을 통합하는 의견도(Clausen, 1929) 있어 *Chamaemelanium*절의 정확한 분류학적 위치 파악을 위해서는 좀더 많은 분류군을 대상으로한 광범위한 연구가 수행되어야 할것으로 생각된다.

국내에서 가장 많은 종들을 포함하는 *Nomimum*절은 학자에 따라 분류체계의 설정에 많은 이견이 있는 절이다(김, 1986). Gingins(1823)는 주두공이 앞으로 돌출하여 부리 같은 모양을 형성하는 종류를 모두 *Nomimum*절로 묶는데 비하여, Becker(1925)는 본 절에 속하는 많은 종들이 주두형태에 차이가 있고 생육습성도 다양함을 지적하면서 Gingins의 *Nomimum*절을

8개의 아절로 세분하였다. 김(1986)은 Becker(1925)의 분류기준을 바탕으로하고 둥이사가산을 중심으로 연구된 문헌(Ishidoya, 1929; Takenouchi, 1955; Maekawa and Hashimoto, 1963)을 종합하고 잎의 형태와 엽맥의 특징을 바탕으로 한국산 *Nomimium* 절을 6개 아절로 구분하고 *Bilobatae* 아절과 *Trigonocarphae* 아절은 각각 2개의 계열로 구분하였으며 가장 많은 분류군이 포함되어 있는 *Patellares* 아절은 4개의 계열로 세분하였다. 본 연구결과 RAPD와 combined data의 phenogram은 김(1986)에 의한 *Nomimium* 절의 분류체계와 일치하게 유집되어 나타났으며 *Bilobatae* 아절은 phenogram의 basal 위치에, 그리고 절 내 무경종과 유경종도 각각 하나의 군을 형성하였다. 그러나 ISSR과 PCR-RFLP의 경우 형성된 군들은 유경종인 줄방제비꽃과 콩제비꽃이 무경종인 종류들과 유집되는 등 일부종들이 형태적인 특징에 의한 분류와는 상관없이 유집되는 경향을 보였다.

*Trigonocarphae* 아절의 *Rostratae* 계열과 *Campylostylae* 계열은 다른 분류계급으로 이전 또는 같은 군으로 통합하기도 한다(Anonymous, 1977). 본 연구에서 두 계열은 ISSR과 combined data의 분석에서 왕제비꽃이 긴잎제비꽃과 유집되고 낚시제비꽃군과 큰줄방제비꽃이 유집되어 계열간 구별이 불가능하였지만 RAPD분석에서는 구분이 가능하였다. 한편 PCR-RFLP 분석에서는 왕제비꽃이 *Rostratae* 계열과 *Hypocarpae* 아절, 그리고 *Chamaemelum* 절이 유집된 군의 자매군으로 나타나고 줄방제비꽃은 전혀 다른 분류군과 유집되어 많은 차이를 보였다. 김(1986)은 낚시제비꽃계열 내 큰줄방제비꽃의 엽연 형태와 엽맥의 특징이 다른 분류군들과 차이가 있어 분류학적 위치의 재검토가 필요함을 지적하였는데 본 연구의 PCR-RFLP 결과에서는 *Rostratae* 계열에 속하는 분류군내에 변이가 없고 나머지 3가지 형질에서도 차이 없이 잘 유집되어 큰줄방제비꽃의 분류학적 위치는 잘 지지되었다. Becker(1925)와 Ishidoya(1929)는 왕제비꽃을 콩제비꽃이나 선제비꽃과 동일한 군으로 묶기도 하였는데 DNA 수준에서는 잘 구분되어 왕제비꽃을 줄방제비꽃과 함께 동일한 계열로 구분한 Takenouchi(1955)의 분류체계를 지지하였다.

*Patellares* 아절의 아절 내 분류체계는 잎의 특징에 많은 변이가 있어 분류계급 설정에 많은 혼동을 주는 종류로 김(1986)은 4개의 계열로 정리하였다. 본 연구결과에서 combined data는 *Chinensis*와 *Pinnatae*, *Patellares* 계열이 잘 유집되어 나타났으며 *Variegatae* 계열은 ISSR결과에서 잘 유집되었다.

*Chinensis* 계열과 *Pinnatae* 계열에 속하는 남산제비꽃, 단풍제비꽃, 태백제비꽃 등은 형태적으로 너무 유사해 같은 아절 또는 같은 계열에 포함시키기도 하며(Becker, 1925; Takenouchi, 1955; Maekawa and Hashimoto, 1963; Anonymous, 1977), 단엽이라는 특징 때문에 서로 독립적인 종으로 취급되는 경우도 있다(Ishidoya, 1929; 김, 1986). 김 등(1991)은 태백제비꽃군의 종분화론적 연구를 통해 이 그룹의 모종을 태백제비꽃으로 하고 단풍제비꽃과 남산제비꽃을 변종으로 취급하였다. DNA수준에서 combined data는 이들 3분류군이 우산제비꽃과 더불어 *Patellares* 아절 내에서 독립적인 군을 형성하여 다른 종들과는 차이를 보였다. 따라서 태백제비꽃 군은 Wang(1991)의 연구에서 처럼 적어도 독립적인 분류계급으로 설정하거나 태백제비꽃과 단풍제비꽃을 남산제비꽃이 포함되어 있는 *Pinnatae* 계열로 이전시키는 것이 바람직

할 것으로 생각되며 이와 유사한 분류군, 즉 *V. dissecta*, *V. eizanensis*, *V. sieboldiana*와의 관계도 면밀히 재검토할 필요가 있다고 판단된다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지역대학우수과학자지원 연구(R05-2003-000-10566-0)지원으로 수행되었음.

### 인용문헌

- Anonymous. 1977. Flora Plantarum Herbacearum Chinae Boreali-Orientalis. Tomus 6. Sci. Publ. Pp. 79-129.
- Ballard, H. E., Jr. 1996. Phylogenetic relationships and infrageneric groups in *Viola* (Violaceae) based on morphology, chromosome number, natural hybridization and Internal Transcribed Spacer(ITS) sequences. Ph.D. dissertation. Univ. of Wisconsin, Madison.
- \_\_\_\_\_, M. D. Devine and K. J. Sytsma. 1997. Centrifugal allopatric speciation in the *Viola canadensis* complex (Violaceae) based on ITS DNA sequences. Amer. J. Bot.(supplement) 84: 177.
- \_\_\_\_\_, K. Inoue and K. J. Sytsma. 1998. Phylogenetic relationships and biogeography of Japanese violets (*Viola*) based on ITS DNA sequences. Amer. J. Bot.(supplement) 85: 108.
- \_\_\_\_\_, K. J. Sytsma and R. R. Kowal. 1999. Shrinking the violets: Phylogenetic relationships of infrageneric groups in *Viola* (Violaceae) based on ITS DNA sequences. Syst. Bot. 23: 439-458.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 2000. Evolution and biogeography of the woody Hawaiian violets (*Viola*, Violaceae): Arctic origins, herbaceous ancestry, and bird dispersal. Evolution 54: 1521-1532.
- Becker, W. 1925. *Viola*. In Engler, A. and K. Prantl, 2nd eds., 21 Bd. Die Naturlichen Pflanzenfamilien, Pp. 363-377.
- Brainerd, E. 1921. Violets of North America. Vt. Agr. Exp. Sta. Bul. p. 224.

- \_\_\_\_\_. 1924. Some natural violet hybrids of North America. Bull. Verm. Agr. Exp. Sta. 239: 1-205.
- Choi, H. K and J. Wen. 2000. A phylogenetic analysis of *Panax* (Araliaceae): integrating cpDNA restriction site and nrDNA ITS sequence data. Pl. Syst. Evol. 224: 109-120.
- Chung, T. H. 1959. A key of the species of Violaceae from Korea. J. Plant Biol. 2: 25-26.
- Clausen, J. 1927. Chromosome number and the relationship of species in the genus *Viola*. Ann. Bot. 41: 677-714.
- \_\_\_\_\_. 1929. Chromosome number and the relationship of some North American species of *Viola*. Ann. Bot. 43: 741-764.
- Cortes-Palomec, A. and H. E. Ballard. 2002. Isolation mechanisms and gene flow between co-occurring species of Mexican *Viola* (Violaceae). 2002 Botany Conference, (abstracts) p. 57.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press, New York.
- Demesure, B., N. Sodzi and R. J. Petit. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. Molec. Ecol. 4: 129-131.
- Doyle J. J. and J. S. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.
- Fritsch, P., M. A. Hanson, C. D. Spore, P. E. Pack and L. H. Reiseberg. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. Pl. Molec. Biol. 11: 10-20
- Gingins, F. 1823. Memoire sur la Famille des Violacees. Mem. Soc. Phy. His. Natur. Geneve. Paschoul, Geneva.
- Hama, E. 1975. The wild violets of Japan in color. Sungmoondang, Tokyo.
- Hashimoto, T. 1967. Violets of Japan. Sungmoondang, Tokyo.
- Ishidoya, T. 1929. Review of *Viola* from Korean and Manshuria. Jour. Chosen Nat. Hist. Soc. 8: 15-17.
- Kim, C. M. and W. J. Ko. 1980. Chemotaxonomic study on the genus *Viola* in Jeju Island. J. Plant Biol. 23: 85-90.
- Lee, Y. N. 1967. Chromosome numbers of flowering plants in Korea(1). J. Kor. Res. Inst. 11: 455-478.
- \_\_\_\_\_. 1969. Chromosome numbers of flowering plants in Korea (2). J. Kor. Res.

- Inst. B.L. 2: 141-145.
- Maekawa, F. 1954. Violaceae. *In* Enumeratio Spermatophytarum Japonicum. III. Hara, H. (ed.), Iwanami, Tokyo, Pp. 194-227.
- \_\_\_\_\_ and T. Hashimoto. 1963. Violets of Japan : 2. Shibundo-shinko-sha, Tokyo, Pp. 1-9.
- Makino, T. 1902. Observations on the Flora of Japan. *Bot. Mag. (Tokyo)* 16: 125-142.
- Melchior, H. 1925 Die Phylogenetische Entwicklung der Violaceen und die Naturlichen verwantschaftsverhaltnisse ihrer gattungen. *In* Repertorium specierum novarum regni vegetabilis. Beitrage Zur systematik und pflanzengeographie, Vol. 2, Repertoriums, Fedde, F. (ed), Dahlem, Berlin, Pp. 83-125.
- Messinger, W., K. Hummer and A. Liston. 1999. *Ribes* (Grossulariaceae) phylogeny as indicated by restriction-site polymorphisms of PCR-amplified chloroplast DNA. *Pl. Syst. Evol.* 217: 185-195.
- Nadot, S., H. E. Ballard Jr, J. B. Creach and I. Dajoz. 2000. The evolution of pollen heteromorphism in *Viola*: a phylogenetic approach. *Pl. Syst. Evol.* 223: 155-171.
- Nakai, T. 1909. Flora Koreana I. *J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo* 26: 62-74.
- \_\_\_\_\_. 1911. Flora Koreana II. *J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo* 31: 445-447.
- \_\_\_\_\_. 1916. *Viola coreanae*. *Bot. Mag. (Tokyo)* 30: 276-289.
- \_\_\_\_\_. 1922a. *Violae Novae Japonicae*. *Bot. Mag. (Tokyo)* 34: 29-39.
- \_\_\_\_\_. 1922b. Notes on *Viola*. *Bot. Mag. (Tokyo)* 36: 52-61, 84-93, 118-121.
- \_\_\_\_\_. 1925. Notes sur les Violettes du Japan. *Bull. Soc. Bot. (France)* 73: 180-195.
- \_\_\_\_\_. 1928. *Violae ad Floram Japonicum Novae*. *Bot. Mag. (Tokyo)* 42: 556-566.
- \_\_\_\_\_. 1952. A synoptical sketch of Korean Flora. *Bull. Nat. Sci. Mus.* 31: 1-152.
- Palibin, J. 1899. Conspectus Florae Koreae I. *Acta Horti. Petrop.* 17: 30-36.
- 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. *Genet. Resources Crop Evol.* 46: 149-161.
- Russell, N. H. 1958a. The violets of Minnesota. *Proc. Minnesota Acad. Sci.* 25-26: 126-191.
- \_\_\_\_\_. 1958b. The violets of the Tennessee I. Key to the species and distribution maps. *Castanea* 23: 63-76.
- \_\_\_\_\_. 1960. Studies in the photoperiodic responses of violets (*Viola*). The



- Southwestern Naturalist 5: 177-186.
- \_\_\_\_\_. 1965. Violets (*Viola*) of central and eastern United States: An introductory survey. SIDA 2: 1-113.
- \_\_\_\_\_ and A. C. Risser. 1960. The hybrid nature of *Viola emarginata*. Brittonia 12: 298-305.
- Satake, Y. and E. Ito. 1965. Taxonomic study of the Japanese *Viola* 2. Chasmogamous flower of the stemless group. Bull. Natl. Sci. Mus., Tokyo 8: 119-237.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1966a. Taxonomic study of the Japanese *Viola* 3. Chasmogamous flower of the caulescent group. Bull. Natl. Sci. Mus., Tokyo 9: 247-256.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1966b. Taxonomic study of the Japanese *Viola* 4. Chasmogamous flower of the caulescent group. Bull. Natl. Sci. Mus., Tokyo 9: 437-455.
- Takenouchi, M. 1955. Brief notes on the taxonomy, ecology and geographic distribution of species of *Viola* indigenous to Manchuria and Inner-Mongolia. Sci. Contr. Tung-pei Teach. Univ. 5: 65-95.
- Valentine, D. H., H. Merxmüller and A. Schmidt. 1968. Violaceae. In *Florae Europea II*. Thulin, T. G., V. H., Heywood, N. A. Burgers, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walter and D. A. Webb (ed.), Cambridge, Pp. 270-282.
- Wang, C. 1991. Reipublicae Popularis Sinicae. Science Press, 51: 1-148. (in Chinese)
- Williams, J. G. K., A. R. K. Kubelik, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.
- \_\_\_\_\_, M. K. Hanafey, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Meth. Enzymol. 218:704-740.
- Yoo, K. O., K. J. Malla and J. Wen. 2001. Chloroplast DNA variation of *Panax* (Araliaceae) in Nepal and its taxonomic implications. Brittonia 53: 447-453.
- Yuzepchuk, S. V. 1949. Violaceae. In *Flora of the URSS*. Shishkin, B. K. and E. G. Bobrov (eds.), Vol. XV. Leningrad, Pp. 262-360.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.
- 김경식. 1986. 한국산 제비꽃속 식물의 비교형태학적 연구. 성균관대학교 박사학위논문. 수원.

- \_\_\_\_\_, 선병윤, 황성수, 정국현. 1991. 한국산 제비꽃속의 종분화론적 연구-태백제비꽃군의 비교형태학적 연구. 식물학회지 34: 229-238.
- 박만규. 1974. 한국쌍자엽식물지. 정음사, 서울. Pp. 272-279.
- 이우철, 육창수. 1972. 금강제비꽃 잎의 flavonoid 배당체에 대하여. 식물분류학회지 5: 43-45.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. 1975. 한국산 제비꽃속의 성분에 의한 분류. 식물분류학회지 6: 1-7.
- 이영로, 이우철. 1968. 제비꽃속 식물의 잎표피와 종자의 형태학적 연구. 생활과학논문집 1: 35-39.
- 이창복. 1969. 우리나라의 식물자원. 서울대논문집, 농생계. 20: 158-159.
- 정태현, 도봉섭, 심학진. 1949. 조선식물명집 I. 초본편. 조선생물학회편. Pp. 85-88.
- 황성수. 2002. 한국산 제비꽃속 노랑제비꽃질의 분류학적 연구-형태학적 형질을 중심으로. 식물분류학회지 32: 397-416.
- \_\_\_\_\_, 김경식. 1985. 제비꽃속 화분의 형태학적 연구. 전북대 기초과학연구소 논문집 8: 53-59.

## Interspecific relationships of Korean *Viola* based on RAPD, ISSR and PCR-RFLP analyses

Yoo, Ki-Oug<sup>1\*</sup>, Woo-Tchul Lee<sup>1</sup> and Oh-Keun Kwon<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea;  
<sup>2</sup>National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 441-440, Korea)

Molecular taxonomic studies were conducted to evaluate interspecific relationships in Korean *Viola* 34 taxa including two Japanese populations using RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), ISSR (inter simple sequence repeat) and PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis. Only six and four primers out of 40 arbitrary and 12 ISSR primers were screened for 34 taxa, and were revealed 70 (98.6%) and 28 (96.6%) polymorphic bands, respectively. Fifteen restriction endonucleases produced 80 restriction sites and size variations from the large single copy region of cpDNA, 16 (20%) of which were polymorphic. The separate analyses from the RAPD, ISSR and PCR-RFLP data were incongruent in the relationships among 34 taxa, but combined data was in accordance with previous infrageneric classification system based on morphological characters, especially the subsection and series level. Section *Chamaemelanium* placed between subsect. *Patellares* and *Vaginatae* of section *Nomimium* was not formed as a distinct group. *Viola albida* complex including three very closely related taxa was recognized independent group within subsect. *Patellares* in combined data tree. This result strongly suggested that they should be treated to series *Pinnatae*. RAPD analysis was very useful to clarify the interspecific relationships among the species of Korean *Viola* than ISSR and PCR-RFLP analyses.

**Key words:** *Viola*, PCR-RFLP, RAPD, ISSR, relationships

---

\* Corresponding author: Phone: +82-33-250-8531, FAX: +82-33-251-3990,  
e-mail: yooko@kangwon.ac.kr