

태백바람꽃(*Anemone pendulisepala*, Ranunculaceae)의 분자계통학적 검토

이 창 숙 · 이 남 숙 · 여 성 희^{1*}

이화여자대학교 분자생명과학부, ¹과학교육과

태백바람꽃 (*Anemone pendulisepala*)은 태백산에서 처음 보고된 후, 백두산에서도 발견된 적이 있으며, 회리바람꽃 (*A. reflexa*), 들바람꽃 (*A. amurensis*) 및 꿩의바람꽃(*A. raddeana*)과 혼생하여 분포하고 있다. 태백바람꽃은 총포엽의 중앙열편의 모양, 총포엽병의 길이, 꽃받침의 정단부, 줄기 내 중심주의 모양에 있어서 이들 세 분류군과 구별된다. 본 연구는 과거 제기되었던 태백바람꽃의 잡종 여부를 확인하고 분류학적 실체를 판단하기 위하여 형태적으로 유사한 회리바람꽃, 들바람꽃과 꿩의바람꽃과 함께 DNA 염기서열(ITS, *psbA-trnH*, *rps16*, *trnLF*)을 분석하였다. 분석결과 태백바람꽃은 핵 DNA인 ITS 구간에서 회리바람꽃과 동일한 염기서열을 가지며, 들바람꽃, 꿩의바람꽃 순으로 유집되었다. 태백바람꽃은 엽록체 DNA의 *rps16*구간에서 4개의 염기의 삽입, *trnLF*구간에서 2개 염기의 차이 및 6개 염기의 삽입에 의해 근연종들로부터 구분되었다. 또한 태백바람꽃은 형태적 특징에 의해 양친종으로 추정되었던 분류군들과 공유하는 염기서열이 없었고, 유전자다형성도 나타내지 않았다. 따라서 태백바람꽃은 독립된 종으로 처리되는 것이 타당하며, 유사종간의 교배종은 아닌 것으로 추정되었다.

주요어: 염기서열, 태백바람꽃, ITS, *psbA-trnH*, *rps16*, *trnLF*

미나리아재비과(Ranunculaceae)의 바람꽃속(*Anemone* L.) 식물은 세계적으로 약 70-90여종으로 대부분 북반구 저지대에 분포하나, 일부가 남반구 서늘한 지대에 분포하는 것으로 알려져 있다(Ohwi, 1965; Hoot *et al.*, 1994; Schuettpelz *et al.*, 2002). 이 속 식물의 특징은 근경에서 1-2개의 근생엽이 나오며, 한 개 내지 다수의 꽃이 모여 화서를 이루고, 꽃받침은 꽃잎 모양이고, 꽃잎은 없으며, 수과 열매를 갖는다(Hoot *et al.*, 1994; Lee, 1996). 바람꽃속 식물 중 태백바람꽃(*A. pendulisepala* Y. Lee), 회리바람꽃(*A. reflexa* Willd.), 꿩의바람꽃(*A. raddeana* Regel), 들바람꽃(*A. amurensis* Kom.), 숲바람꽃(*A. umbrosa* A. May), 세바람꽃

*교신저자:전화 02-3277-3793, 전송 02-3277-2684, anemone@ewha.ac.kr
접수: 2006년 11월 10일. 완료: 2006년 11월 29일.

(*A. stolonifera* Maxim.)은 *Anemone* 아속, *Anemone* 절, *Nemorosa* 그룹에 속하며, *Nemorosa* 그룹의 특징은 지하경이 발달하고, 총포 잎이 근생엽과 유사하고, 꽃받침은 5-6개, 난형이며, 북반구의 저지대나 숲 밑에서 자란다(Hoot *et al.*, 1994).

한국산 바람꽃속 식물로 Nakai (1911)와 Chung (1956)은 8종, Lee (1980)와 Lee (1996)는 12종 1변종, Lee (2006)는 13종 2변종을 보고하였으나, 형태학적 특징을 중심으로 기재한 것 외에 한국산 바람꽃속 식물에 대한 분류학적 연구가 진행된 바 없다. 한국산 바람꽃속 식물 중 태백바람꽃은 강원도 태백산에서 처음 발견 되어 신종 처리된 종으로 숲바람꽃과 회리바람꽃이 동일한 지역에 혼생하여 생육하며, 잎의 형태는 숲바람꽃과 유사하고 화피가 뒤로 젖혀지는 특징은 회리바람꽃과 유사하여 숲바람꽃과 회리바람꽃 사이의 잡종으로 추정된 바 있다(Lee, 2003). 그러나 태백바람꽃과 혼생한다고 보고된 숲바람꽃은 2004년부터 태백산과 백두산 등 현지에서 기재문과 특징을 확인한 결과 들바람꽃이 오동정된 것으로 확인하였다.

핵 내 ribosomal DNA인 ITS부위와, 엽록체 DNA인 *psbA-trnH* intergenic spacer, *rps16* intron, *trnLF* intergenic spacer와 *trnL* intron부위는 고등식물의 종간 또는 속간의 계통 유연관계를 파악하는데 유용한 자료로 이용되어 왔다(Corriveau and Coleman, 1988; Baldwin *et al.*, 1995; Downie and Katz-Downie, 1996; Compton and Culham, 2002; Cronn and Wendel, 2003). 따라서 본 연구에서는 자생지에서 혼생하는 태백바람꽃, 회리바람꽃, 평의바람꽃 및 들바람꽃과, 군외군으로서 지역적으로 격리되어 있는 세바람꽃을 대상으로 형태학적 조사를 하였고, 핵 DNA (ITS) 및 엽록체 DNA (*psbA-trnH*, *rps16*, *trnLF*)의 염기서열 분석을 바탕으로 태백바람꽃이 회리바람꽃과 들바람꽃의 잡종여부와 독립된 종으로 취급하는 것이 타당한지를 검토하고자 하였다.

재 료 및 방 법

식물재료: 태백바람꽃과 형태적으로 유사하며 자생지에서 혼생하고 있는 회리바람꽃, 들바람꽃과 평의바람꽃의 34개체를 군내군으로 사용하였고, 세바람꽃 2개체를 군외군으로 하여 총 36개체의 생체 재료를 사용하였으며, 모든 확증표본은 이화여자대학교 식물표본실(EWU)에 보관하였으며 실험에 사용된 분류군 및 채집지 정보는 Table 1과 같다.

DNA추출: 생체 잎을 액체질소로 분쇄한 후 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)로 추출하였다(Downie *et al.*, 2000). ITS증폭은 primer ITS4, ITS5, ITS2, ITS3 (White *et al.*, 1990)을 사용하였고, 엽록체 DNA는 *psbA-trnH* intergenic spacer, *rps16* intron, *trnLF* intergenic spacer와 *trnL* intron 부위를 증폭하였다. 이때 primer는 psbAF와 trnHR (Sang *et al.*, 1997)와 *rps16* 증폭시 3'exon과 5'exon (Oxelman *et al.*, 1997, Wallander and Albert, 2000), trnc, trnd, trne, trnf (Taberlet *et al.*, 1991)를 사용하였다. ITS구간의 경계는 기존에 발표된 염기서열과 비교하여 결정하였다(Tsai, 2003; Baldwin *et al.*, 1995; Downie *et al.*,

Table 1. Materials included in molecular analyses. Voucher specimens were deposited in the herbarium of Ewha Womans University (EWU) and sequences were submitted to GenBank sequence database.

Taxa (Abbreviation)	DNA accessions	Voucher specimens	GenBank accession number	
			ITS	<i>psbA-trnH</i> / <i>rps16</i> / <i>trnLF</i>
<i>A. amurensis</i> (Aamur)	21, 22, 24, 25, 27, 29, 58, 59, 52	GW, Taebaeksan, NLee <i>et al.</i> 04050011-6, 04050045-6, Beckdusan, NLee & SYeo 0505012	EF139263-71	EF139299-307/EF139371-9/ EF139335-43
<i>A. penduliseptata</i> (Apend)	15-20, 51-53, 60, 61	GW, Taebaeksan, NLee <i>et al.</i> 040501-6, 050402-3; NK, Beckdusan, NLee & SYeo 0505011, 0505013	EF139253-62	EF139289-98/EF139361-70/ EF139325-34
<i>A. raddeana</i> (Arad)	1-3, 5, 6, 8, 9, 55, 56	CJ, Georinsaseum, SYeo <i>et al.</i> 0510003, 0510006; CJ, Beohjeongsa, SYeo 0510011; GW, Taebaeksan, SYeo <i>et al.</i> 0505013, 050515; KG, Pungdo, NLee <i>et al.</i> 0505016-7; CB, Naejangsan, SYeo 060301-2	EF139244-52	EF139280-8/EF139352-60/ EF139316-24
<i>A. reflexa</i> (Aref)	30-33, 36, 37	GW, Taebaeksan, NLee <i>et al.</i> 040507-10; KG, Yoomyongsan, CLee 040509-10	EF139272-7	EF139308-13/EF139380-85/ EF139344-49
<i>A. stolonifera</i> (Asto)	41, 49	CJ, Hallasan, SYeo <i>et al.</i> 0305025-6	EF139242-3	EF139278-89/EF139350-1/ EF139314-15

2000; Lee *et al.*, 2004; Lee and Downie, 2006; Yoo *et al.*, 2005). PCR 조건은 94°C에서 1분, 54°C에서 1분, 72°C에서 2분을 cycle로 하여 36회 반복한 후 72°C에서 10분간 유지시켰다. PCR 산물은 AccuPrep PCR Purification Kit (Bioneer Inc, Korea)로 정제하였다. 염기서열분석은 Base station sequencer (MJ research, USA)를 사용하였다.

염기서열의 정렬 및 계통분석: 양방향의 염기서열은 Clustal X program (Gibson *et al.*, 1994)을 이용하였고, 세부 정렬은 수작업으로 완성하였다. 정렬한 염기서열은 다른 피자식물 연구 (Baldwin *et al.*, 1995)에서 일반적으로 수행하고 있는 PAUP* version 4.01b (Swofford, 2002)를 이용해 최대절약분석(Maximum parsimony analysis)을 하였고, Heuristic search를 이용하였으며, gap은 (Simmons and Ochoterena, 2000), 부수적인 독립된 형질로 처리하였다. 분석은 1000회 random stepwise로 반복하였으며, TBR branch swapping하여 Multrees를 구하였다. Bootstrap values (Felsenstein, 1985)는 100회 반복하여 분석하였고, TBR branch swapping하여 simple stepwise option으로 처리하였다. 또한 two-parameter methods (Kimura, 1980)로 계산된 유전적 거리값을 기초로 Neighbor-joining (NJ) search를 수행하였으며(Saitou and Nei, 1987; Farris *et al.*, 1995), 각 분류군들 간의 유전적 거리 분석은 uncorrected pairwise distance로 처리하였다.

결 과

형태학적 분석: 태백바람꽃은 화피가 뒤로 젖혀지며, 화경의 털이 많고, 자방은 피침상 긴 타원형이며, 엽병의 길이가 20mm이하이고, 꽃의 직경이 25mm이하인 점에 있어서 회리바람꽃과 유사하였다(Fig. 1, Table 2). 그러나 총포엽의 크기가 30mm이상이고, 총포엽 윗면에만 털이 분포하며, 꽃받침은 난상 긴타원형이고, 털이 없으며, 길이 12-15mm이고, 흰색인 점에서 들바람꽃과 유사하였으며, 줄기의 횡단면은 수조직이 차 있고, 화경 횡단면에서 목부의 모양이 초생달형이 아닌(non-crecent) 점에서는 꿩의바람꽃과 유사하였다(Table 2). 한편 태백바람꽃은 총포엽의 중앙엽편이 피침상이며, 총포엽병의 길이가 40-70 mm이고, 꽃받침의 정단부가 뾰족하며, 줄기내 횡단면에 반원형의 목부를 갖는다는 점에서 이들 세 종으로 부터 구분되었다(Fig. 1, Table 2). 개화기는 태백바람꽃, 회리바람꽃, 들바람꽃이 모두 5월에 꽃이 피는 반면, 꿩의바람꽃은 4-5월로 일찍 꽃이 피었다.

염기서열분석: 조사한 36개의 DNA에 대한 ITS 염기서열을 정렬한 결과는 560 bp로서 이중 537개의 염기는 일정하였고, 나머지 23개의 염기서열에 변이가 있었으며 그 중 22개 염기가 계통학적으로 해상력을 갖는 형질(informative character)이었다. 본 결과에서 ITS 1부위는 177 bp, 5.8S는 163 bp, ITS 2 부위는 220-221 bp로 ITS 2부위가 ITS 1 부위보다 길었으며, 이는 다른 피자식물(Sim *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2003; Downie *et al.*, 2000)과 같은 결과를 나타내었다. 들바람꽃의 염기서열은 균외군을 포함하여 조사된 바람꽃속 내 분류군 중 560 bp로 가장 길었고, 부위별 정렬된 특징은 Table 3과 같다. 조사된 전체분류군에서 염기조성

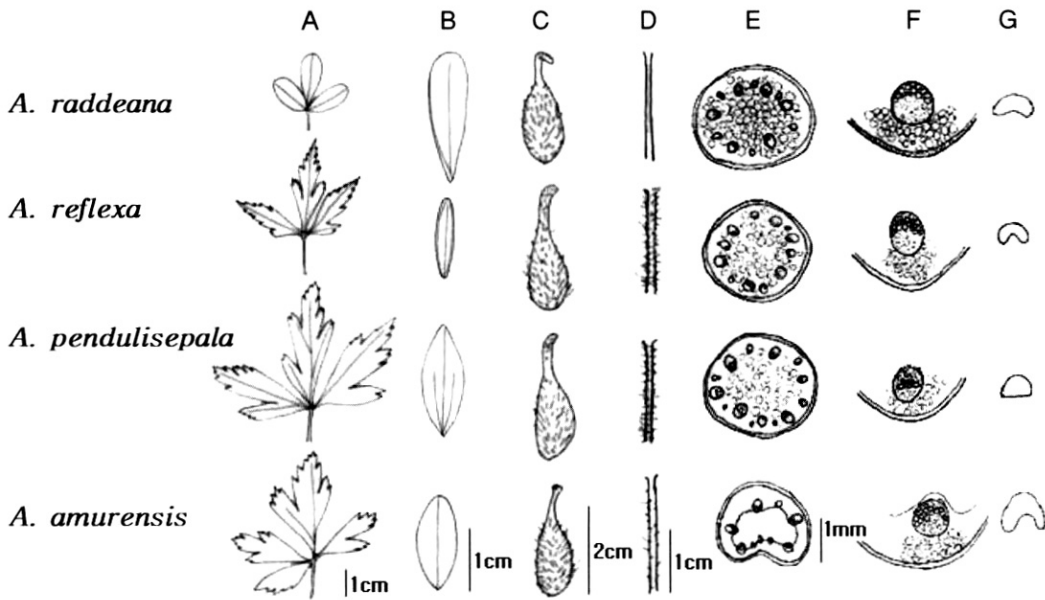


Fig. 1. Morphological comparisons of *Anemone pendulisepala* and related taxa. Involucre (A), sepals (B), ovary (C), pedicels (D), cross sectional view of petiole (E, F) and shape of xylem (G).

의 평균은 A 21.78%, C 32.29%, G 29.50%, T 16.43%였고, G+C의 염기조성은 59.21-62.14%였다. 조사된 바람꽃속 내 분류군간의 유전적 거리(pairwise distance)는 0.00-3.41%이었으나 군외군을 제외한 분류군간 유전적 거리는 0.00-1.61%이었으며, 태백바람꽃은 회리바람꽃과 0%로 유전적 거리가 없었으며, 들바람꽃과 가장 먼 유전적 거리(1.25-1.61%)를 나타내었다 (Table 4).

36개 종류(accessions)의 엽록체 DNA의 각 부위를 조합한 부위의 염기서열을 정렬한 결과 2,057 bp로 나타났다. 이 중 1,883개의 염기는 일정하였고, 나머지 174개의 염기서열에 변이가 있었으며, 그 중 167개 염기가 계통학적으로 해상력을 갖는 형질(informative character)이었다. 조사된 분류군 중 세바람꽃의 염기서열이 2,004 positions으로 가장 길었고, 부위별로 정렬된 특징은 Table 3와 같다. 조사된 전체 분류군에 대한 염기조성의 평균은 A 35.52%, C 16.47%, G 17.12%, T 30.89%였고, G+C의 염기조성은 32.94-33.79%로 매우 낮았다. 조사된 바람꽃속의 분류군간 유전적 거리는 0.00-2.41%이었다. 태백바람꽃은 군내군 중 회리바람꽃과의 유전적 거리가 가장 가까웠고(0.10%), 평의바람꽃과 가장 멀었으며(0.36%), 군외군인 세바람꽃과는 2.0%이었다(Table 4). 각 분류군에서, 염기의 indel부위는 세바람꽃이 11개, 평의바람꽃과 태백바람꽃이 각각 15개, 회리바람꽃이 16개, 들바람꽃이 17개로 나타났다.

Table 2. Comparative morphological characters between *Anemone peduliseepala* and related taxa in Korea.

Characters	<i>A. peduliseepala</i>	<i>A. reflexa</i>	<i>A. amurensis</i>	<i>A. raddeana</i>
Petiole				
length (mm)	13-14	15-16	30-40	30-60
presence of hair	heavily pubescent	slightly pubescent	slightly pubescent	glabrous
Involucre				
margin	serrulate	serrulate	serrulate	entire
hair	pubescent in adaxial surface	pubescent in both surface	pubescent in adaxial surface	glabrous
Sepal				
color	white	yellow green	white	white with pink
shape	ovate or elliptical, reflexed	oblanceolate, reflexed	ovate or elliptical, spreading	oblong, spreading
length (mm)	12-15	6-8	12	15-20
width (mm)	4.0-6.0	1.5-2.0	5.0-6.0	4.0-5.0
hair	glabrous	pubescent on abaxial surface	glabrous	glabrous
Pith of petiole	solid	solid	hollow	solid
Xylem shape	semicircle	crescent	crescent	slightly crescent
Flowering period	May	May	May	Apr-May

Table 3. Summary of ITS and cpDNA sequence characteristics for *Anemone pendulisepala* and related taxa in Korea.

Region	Size (bp)	Aligned length	Informative sites	Pairwise distance
ITS 1	177	177	9	0.00-4.50
5.8S	163	163	0	0.00
ITS 2	220-221	221	13	0.00-4.61
ITS 1+5.8S+ITS 2	559-560	560	22	0.00-3.41
psbA-trnH	291-304	305	18	0.00-1.35
rps16	833-850	870	67	0.00-2.30
trnLF	834-870	889	82	0.00-2.87
Combined cpDNA	1,966-2,004	2,057	167	0.00-2.41

Table 4. Pairwise distance (%) of ITS (below diagonal) and cpDNA (above diagonal) of *Anemone pendulisepala* and related taxa. See Table 1 for taxa abbreviation.

Taxa	Asto	Arad	Apen	Aamu	Aref
Asto	-	1.84-1.95	1.95-2.00	2.30-2.41	1.19-2.00
Arad	2.72-2.89	-	0.31-0.36	0.66-0.76	0.30-0.36
Apen	2.71-2.71	1.07-1.07	-	0.18-0.54	0.10-0.10
Aamu	3.23-3.41	1.25-1.61	0.18-0.54	-	0.46-0.51
Aref	2.71-2.71	1.07-1.07	0.00	0.18-0.54	-

계통학적 분석: 36개체의 ITS 염기서열의 최대절약분석결과, 계통수의 길이는 23단계이었으며, uninformative character를 제외한 일관성지수(Consistency Index, CI)는 0.99, 보존지수(Retention Index, RI)는 0.99로 나타났다. 최대절약분석 결과 얻어진 Strict consensus tree는 Fig. 2와 같으며, bootstrap 값은 67-100%로 평균 85.3%이었다. 분석 결과 태백바람꽃은 회리바람꽃 및 들바람꽃과 측계통(paraphyletic)을 나타내었다. ITS에 의한 최대절약계통수에서, 들바람꽃은 개체간 변이는 있었으나 100% bootstrap 값으로 하나의 분계조를 형성하였고, 태백바람꽃 및 회리바람꽃과 86% bootstrap 값으로 태백바람꽃-들바람꽃-회리바람꽃 분계조를 형성하였다. 태백바람꽃-들바람꽃-회리바람꽃 분계조 다음으로 평의바람꽃이 100% bootstrap

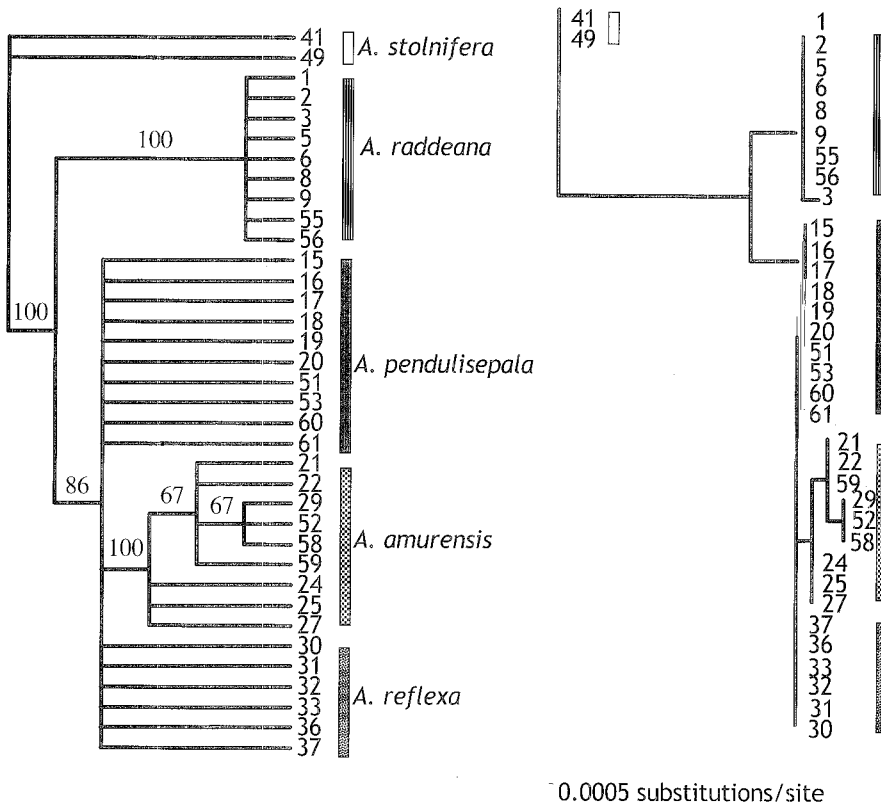


Fig. 2. ITS trees generated by maximum parsimony and neighbour-joining method in ITS sequences. The maximum parsimony tree is a strict consensus tree of 23 equally parsimony trees (CI=0.99, excluding uninformative characters; RI=0.99). Bootstrap values are shown above each branch.

값으로 분계조를 형성하면서 군외군인 세바람꽃으로부터 분리되었다.

NJ searching한 계통수 분석 결과도 최대절약분석 결과와 거의 일치하였으나 태백바람꽃은 하나의 분계조를 형성하며 단계통으로 나타났다(Fig. 2). ITS 1과 ITS 2를 분리하여 분석한 계통수는 ITS 1과 ITS 2를 통합하여 분석한 결과와 일치하는 양상을 보였다. 또한 조사한 36개 DNA의 5.8S부위의 염기서열은 변이 없이 보존적인 양상을 나타내었다.

36개체에 대한 조합된 엽록체 DNA의 염기서열의 최대절약분석 결과, 계통수의 길이는 183 개였으며, uninformative character를 제외한 일관성지수는 0.97, 보존지수는 0.99로 나타났다. Strict consensus tree는 Fig. 3과 같았고, bootstrap 값은 64-100%로 평균 86.3%이었으며, 태백바람꽃은 회리바람꽃 및 들바람꽃과 100% bootstrap 값으로 뚜렷하게 분리된 단계통의 분계조를 형성하였다. 또한 군내군인 태백바람꽃-들바람꽃-회리바람꽃 그룹은 98% bootstrap

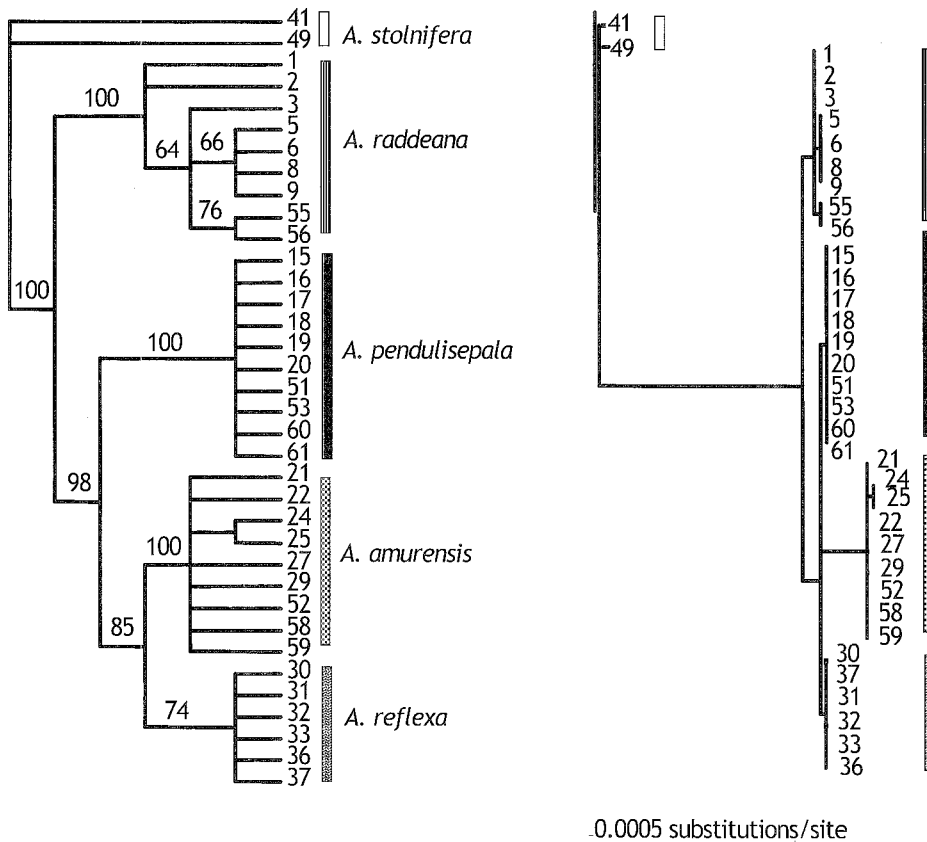


Fig. 3. Chloroplast DNA trees generated by maximum parsimony and neighbour-joining method. The maximum parsimony tree is a strict consensus tree of 183 equally parsimony trees (CI=0.97, excluding uninformative characters; RI=0.99). Bootstrap values are shown above each branch.

값으로 평의바람꽃의 분계조와 분리된 다른 하나의 분계조를 형성하였으며, 군내군의 분류군들은 군외군인 세바람꽃과 100% bootstrap 값으로 뚜렷하게 분리되었다. NJ search한 계통수에서도 태백바람꽃은 최대절약계통수에서와 마찬가지로 뚜렷하게 단계통으로 나타났다(Fig. 3).

태백바람꽃의 표지유전자: ITS의 염기서열에서 태백바람꽃은 회리바람꽃과 동일하였다. 한편, 군내군에서 평의바람꽃은 367번(C), 406번(C)염기에서, 들바람꽃은 490번(T), 666번(A)에서 각각 염기서열의 차이를 나타내었고, 642번(C)에서 삽입된 고유 염기를 가졌다(Table 5). 엽록체 DNA (*psbA-trnH*, *rps16*, *trnLF*) 중 *psbA-trnH*의 염기서열에서 태백바람꽃은 고유의 염기서열을 갖지 않았으나, *rps16*의 염기서열 내 600번-603번(TTTT)염기의 삽입에

Table 5. Informative nucleotide sites in ITS and cpDNA (*psbA-trnH*: 1-305, *rps16*: 206-1,175, *trnLF*: 1,176-2,057) to infer the taxonomic status of *Anemone pendulisepala* in Korea. Numbers of lower column showed gaps cpDNA: 1 (AAA), 2 (AAAAAAA), 3 (TTTT), 4 (TCAATGAAATG), 5 (TACAGAAA), 6 (TGTTAA).

Taxa/positions	463344555	111111	3335568891	111111111
	965609345	912333	3485902710	234467777
	9750326	56014	8762909008	760505888
			3	642148348
<i>A. raddeana</i>	TTACCAA-G	CAA-12	T-CG-3CC4C	ATATTT--C
<i>A. reflexa</i>	CGGTTAC-G	-AAAA2	TTCGT3TC4C	A5TCTT---
<i>A. pendulisepala</i>	CGGTTAC-G	-AAA12	ATCGTTCC4C	A5TCT6TT-
<i>A. amurensis</i>	CGGTTTCCA	-CTAAA	TTTA-3CTTG	-5TCCT---
<i>A. stolonifera</i>	TGATTAATG	-AA-12	ATCG-3CC4C	A5TCTTGAA

의해 고유성을 가졌으며, *trnLF*의 염기서열 1783번과 1784번에서 2개의 고유 염기, 1758번-1763번(TGTTAA) 염기의 결실에 의해서 근연종들로부터 구분되었다(Table 5). 회리바람꽃 *rps16*의 염기서열 중 829번(T)염기에서 고유한 표지유전자를 가지며, 들바람꽃은 *psbA-trnH*의 염기서열 중 115번(C)과 126번(T)염기에서 2개의 표지유전자, *rps16*의 염기서열 중 386번(T), 552번(A), 870번(T)과 1083번(G)의 4개의 표지유전자, *trnLF*의 염기서열 중 1604번(C)에서 1개의 표지유전자를 가졌으며, 1276번 염기에서 결실이 있었다(Table 5).

고 찰

태백바람꽃과 형태적으로 가장 유사하였던 식물은 회리바람꽃으로, 화피가 아래로 처지며, 화경의 털의 분포 유형, 자방의 모양, 엽병의 길이, 꽃의 직경이 유사하였다. 들바람꽃과는 총포엽의 크기와 털의 분포, 꽃받침의 크기, 색, 모양과 털의 유무에서 유사하였고, 꿩의바람꽃과는 줄기의 횡단면의 형태가 유사하였다. 한편 태백바람꽃은 총포엽의 중앙엽편의 모양, 총포엽병의 길이, 꽃받침의 정단부의 모양, 줄기 내 물관부의 모양에 있어서 이들 종과 구별되는 형질을 가졌으므로 태백바람꽃은 혼생하는 회리바람꽃 및 들바람꽃과는 뚜렷이 구분되었다.

ITS와 cpDNA (*psbA-trnH*, *rps16*, *trnLF*)의 염기서열 분석 결과, 태백바람꽃은 회리바람꽃과 ITS에서 유전적 거리가 없었고 cpDNA에서도 유전적 거리가 낮은 것으로 나타났다. 파자식물의 종간 유전적 거리는 매우 다양하게 보고되었는데, *Magnolia*속의 cpDNA부위에서

0.03-1.05%이었으며(Qiu *et al.*, 1995), *Heloniopsis*속의 *matK*에서 0.26-0.71%이었다(Fuse *et al.*, 2004). *Cicuta*속의 ITS의 중간 유전적 거리는 1.20-4.10%로 나타났고, cpDNA *psbI-trnK* 5' 부위에서는 0.81-1.40%이었다(Lee and Downie, 2006). ITS에 의한 국내 제비꽃속의 유전적 거리는 3.00-16.11%이었고, 종하 분류군들 간의 유전적 거리는 1.00% 이하로 나타났다(Yoo *et al.*, 2005). 국내산 미나리아재비속 미나리아재비절 내 분류군간의 ITS 유전적 거리는 0.01-0.66%로 매우 낮았으며(Yeau *et al.*, 2004), 털개구리미나리와 근연종간 ITS 유전적 거리는 0.16-1.15%로 나타났다(Lee *et al.*, 2004). 난과 식물에서도 유전적 거리에 의해 종의 한계를 결정하기는 어려운 것으로 보고되어 있다(Lee *et al.*, 2006). 따라서 태백바람꽃의 유전적 거리 값이 낮기는 하지만 피자식물의 유전적 거리의 범주에 속하므로 종으로 인정하는데 무리가 없는 것으로 판단된다.

계통분석 결과에서 태백바람꽃은 회리바람꽃 및 들바람꽃과 하나의 분계조를 형성하고 있으므로 이 두 종과 유연관계가 가까운 분류군으로 추정된다. 태백바람꽃은 cpDNA의 계통분석 결과 100% bootstrap value로 단계통군을 형성하였으며, 아울러 태백바람꽃은 *rps16*의 염기서열 내에서, 다른 분류군들과 달리 600번-603번 염기에서 TTTT가 삽입되었고, *trnLF*의 1783번과 1784번 염기에서 2개(TT)의 표지유전자를 가지며, 1758번-1763번 염기에서 TGTAA이 결실되어 근연종들로부터 뚜렷이 구분되었다. 따라서 태백바람꽃이 단계통군을 형성하고 고유인자를 갖는 특징은 태백바람꽃을 종으로 처리한 것이 타당함을 뒷받침한다고 볼 수 있다. 잡종인 경우 핵 염기서열에 있어 부모종의 표지유전자를 공유하거나 유전자다형성 현상이 나타나는데(Cronn and Wendel, 2003; Rieseberg, 1997; Lee *et al.*, 2004), 태백바람꽃에서는 추정된 양친종의 표지유전자를 공유하는 유전자다형성이 나타나지 않았으므로 유사종간의 잡종은 아닌 것으로 추정된다.

사 사

본 연구는 환경부 차세대핵심환경기술개발사업의 연구비 지원(과제번호 052-061-025) 으로 수행되었습니다.

인 용 문 헌

- 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.
- Compton, J. A. and A. Culham. 2002. Phylogeny and circumscription of tribe Actaeae Ranunculaceae. *Sys. Bot.* 27: 502-511.
- Cronn, R. and J. F. Wendel. 2003. Cryptic trysts, genomic mergers, and plant speciation. *New Phytologist* 161: 133-142.
- Corriveau, J. L. and A. W. Coleman. 1988. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *Amer. J. Bot.* 75: 1443-1458.
- Chung, T. H. 1956. Korean Flora II. Shinzisa, Seoul. Pp. 1009-1010. [In Korean]
- 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., M. Källersjö, A. G. Kluge and C. Bult. 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fuse, S., N. S. Lee and M. N. Tamura. 2004. Biosystematic studies of the genus *Heloniopsis* (Melanthiaceae) II. Two new species from Korea based on morphological and molecular evidence. *Taxon* 53: 949-958.
- Gibson, T., D. Higgins and J. Thompson. 1994. Clustal X Program. EMBL, Heidelberg, Germany.
- Hoot, S. B., A. A. Reznick, and J. D. Palmer. 1994. Phylogenetic Relationships in *Anemone* (Ranunculaceae) based on Morphology and chloroplast DNA. *Syst. Bot.* 19: 169-200.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*: 11-120.
- Lee, C. S., N. S. Lee and S. H. Yeau. 2004. Molecular phylogenetic relationships and

- speciation of *Ranunculus cantoniensis* (Ranunculaceae). Korean J. Pl. Taxon. 34: 335-358 (in Korean).
- _____, _____ and _____. 2006. Taxonomic status of *Goodyera rosulacea* Y. Lee: Molecular evidence based on ITS and *trnL* sequences. Korean J. Pl. Taxon. 36: 189-207 (in Korean).
- _____ and S. R. Downie. 2006. Phylogenetic relationships within *Cicuta* (Apiaceae tribe Oenantheae) inferred from nuclear rDNA ITS and cpDNA sequence data. Can. J. Bot. 83: 453-468.
- Lee, T. B. 1980. Illustrated flora of Korea. Hyang Mun-Sa, Seoul (in Korean).
- Lee, W. T. 1996. Coloured Standard Illustrations of Korean Plants. Academy Publishing, Seoul (in Korean).
- Lee, Y. N. 2003. I. A new taxon of Ranunculaceae. Bulletin of Korean Plant Research. 3: 2-4 (in Korean).
- _____. 2006. Flora of Korea. Gyohaksa, Seoul (in Korean).
- Nakai, T. 1911. Flora Koreana II. J. Coll. Sci. Imp. Univ. 31: 226-227.
- Ohwi, J. 1965. Flora of Japan. Shibundo, Tokyo (in Japanese).
- Oxelman, B., M. Liden and D. Berglund. 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). Pl. Syst. Evol. 206: 393-410.
- Qiu, Y.-L., C. R. Parks and M. W. Chase. 1995. Molecular divergence in the Eastern Asia-Eastern North America disjunct section *Rytidospermum* of *Magnolia* (Magnoliaceae). Amer. J. Bot. 82: 1589-1598.
- Rieseberg, L.H. 1997. Hybrid origins of plant species. Ann. Rev. Eco. Syst. 28: 359-389.
- 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., D. J. Crawford and R. F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). Amer. J. Bot. 84: 1120-1136.
- Schuettpelz, E., S. B. Hoot, R. Samuel, and F. Ehrendorfer. 2002. Multiple origins of Southern Hemisphere *Anemone* (Ranunculaceae) based on plastid and nuclear sequence data. Plant Syst. Evol. 231: 143-151.
- Sim, J.-K., H.-D. Park and S.-J. Park. 2002. Phylogenetic study of Korean *Iris* (Iridaceae) based on nrDNA ITS sequences. Korean J. Pl. Taxon. 32: 33-53.
- Shin, K.-S., Y. K. Shin, J.-W. Kim and K.-H. Tae. 2003. Phylogeny of the genus *Goodyera* (Orchidaceae; Cranichideae) in Korea based on nuclear ribosomal DNA ITS region sequences. J. Plant Biol. 45: 182-187.
- Simmons, M. P. and H. Ochoterena. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. Syst. Bot. 49: 369-381.

- Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 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: 1105–1109.
- Tsai, C. 2003. Molecular phylogeny, biogeography, and evolutionary trends of the genus *Phalaenopsis* (Orchidaceae). Ph. D. thesis, Univ. of National Sun Yat-sen, Kaohsiung, Taiwan, Pp. 224.
- Wallander, E. and V. A. Albert. 2000. Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnLF* sequence data. *Amer. J. Bot.* 87: 1827 - 1841.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322. *In* PCR Protocols: A guide to methods and applications. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds.), Academic Press, San Diego.
- Yeau, S. H., C. S. Lee and N. S. Lee. 2004. A taxonomic review of section *Acris* of *Ranunculus* L. based on ITS sequences. *Korean J. Pl. Taxon.* 34: 173–190 (in Korean).
- Yoo, K., S. Jang and W. Lee, 2005. Phylogeny of Korean *Viola* based on ITS sequences. *Korean J. Pl. Taxon.* 35: 7–23 (in Korean).

Molecular Phylogenetic Study of *Anemone pendulisepala* (Ranunculaceae)

Chang Shook Lee, Nam Sook Lee and Sung Hee Yeau^{1*}

Dept. of Life Sciences, ¹Dept. of Science Education,
Ewha Womans University, Seoul 120–750, Korea

Anemone pendulisepala, recently described as a new species, is distributed in sympatry with *A. reflexa*, *A. amurensis*, and *A. raddeana* at Mt. Taebaek and Mt. Baekdu. *Anemone pendulisepala* was previously proposed to be a hybrid species between *A. reflexa* and *A. amurensis* because it displays overlapping features with them in involucre shape, petiole length, sepal apex and xylem shape. To verify the taxonomic status and to examine the hybridity of *A. pendulisepala*, sequences of ITS region of nuclear ribosomal DNA and the *psbA-trnH*, *rps16* and *trnLF* region of cpDNA from 36 accessions of 5 taxa including outgroup were analyzed. In maximum parsimony tree based on ITS sequences, *A. pendulisepala* had the same sequences of *A. reflexa* and was clustered with monophyletic *A. amurensis*, and then *A. raddeana*. *Anemone pendulisepala* was distinguished from the other taxa by having four base insertion in *rps16* region, two species-specific bases and six base insertion in *trnLF* region. In the phylogenetic trees of combined cpDNA, *A. pendulisepala* showed monophyly with the bootstrap 100%. *Anemone pendulisepala* exhibited no polymorphism and shared no sequences with putative parental or related taxa examined in this study. Molecular data suggest that *A. pendulisepala* should be a distinct species, and no evidence of the hybridization was detected.

Key words: *Anemone pendulisepala*, ITS, *psbA-trnH*, *rps16*, *trnLF*

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