

엽록체 DNA의 *matK*와 *atpB-rbcL* 염기서열 분석에 의한 제비꽃속(*Viola*)의 계통유연관계

유 기 역* · 장 수 길 · 이 우 철
강원대학교 자연과학대학 생명과학부

제비꽃속 42집단에 대한 계통 유연관계를 알아보기 위하여 엽록체 DNA의 *matK* 유전자와 *atpB-rbcL* intergenic spacer 지역에 대한 염기서열을 분석하였다. *MatK* 분석에서는 노랑제비꽃절과 장백제비꽃절이 독립된 clade를 형성하였으며, 진정제비꽃절의 5개 아절은 paraphyletic하게 분리되었다. *AtpB-rbcL* 분석에서는 노랑제비꽃절이 단계통을 형성하였지만, 장백제비꽃절은 잔털제비꽃을 제외한 제비꽃아절 분류군들이 포함되어 있는 clade의 자매군을 형성하였고, 진정제비꽃절은 paraphyletic한 분계조로 분리되어, *matK* 유전자와는 장백제비꽃절과 잔털제비꽃의 위치에 차이를 보였다. 두 가지 유전자의 염기서열 자료를 융합하여 분석한 결과는 제비꽃속 분류군들이 크게 3개의 분계조로 유집되는 것으로 나타났다. 즉, 기본염색체 수가 $x=6$ 인 노랑제비꽃절과 장백제비꽃절은 아욱제비꽃아절과 낚시제비꽃아절($x=10$)에 속하는 분류군들이 포함된 clade의 자매군을 형성하면서 분리되었고, 잔털제비꽃은 진정제비꽃절의 콩제비꽃아절과 고깔제비꽃아절($x=10$ 또는 12)의 분류군들과 함께 분계조를 이루었으며, 잔털제비꽃을 제외한 제비꽃아절($x=12$)의 19개 집단도 하나의 clade를 형성하였다. 그러나 outgroup으로 부터 clade 각각의 기원에 대해서는 선행된 ITS와 *trnL-F* 지역에 의한 결과와는 일치하지 않는 것으로 나타났다.

색인어: 계통유연관계, 엽록체 DNA, 제비꽃속, *atpB-rbcL*, *matK*.

서 론

제비꽃속(*Viola*)은 제비꽃과(Violaceae)에 속하는 초본 또는 소관목으로 제비꽃과 내에서 가장 많은 분류군이 포함되어 있으며 전 세계에 약 525-600여 종이 북온대지역을 중심으로 널리 분포한다(Clausen, 1964; Ballard, 1996). 특히 한국, 중국, 일본 등 동아시아의 온대지역에는 특산종들이 비교적 많이 분포되어 있는 것으로 알려져 있다(Hashimoto, 1967). 본 속

*교신저자: 전화 033-250-8531, 전송 033-251-3990, yooko@kangwon.ac.kr

접수: 2007년 1월 26일. 완료: 2007년 3월 5일

식물은 온대지역에 광범위하게 분포하고 형태 및 생육습성이 다양하기 때문에 분류 및 계통학적으로 매우 흥미 있는 분류군이다. 그러나 근연종간에는 형태적으로 매우 비슷하고, 종내변이 또한 심하여 종의 범위를 설정하는데 어려움이 있으며, 생육습성에 대한 상세한 연구가 미흡하고 근연종간에는 교잡이 자유롭게 일어나 다양한 형태의 중간형들이 출현하는 등 분류학적으로 취급하기 어려운 분류군이기도 하다(Russell & Risser, 1960). 특히 자연 상태에서 잡종의 출현은 생태적 지위의 차이에 대해 억제되는 것으로 알려져 있으나 인위적인 자연환경의 변화는 새로운 잡종의 출현을 가능하게 하여 분류에 혼란을 초래하게 된다(Russell, 1960, Russell & Risser, 1960). 한국산 역시 종간 또는 종내 집단 사이에는 형태적 변이가 매우 심하여 학자에 따라서 한국 분포종을 50분류군(Nakai, 1922), 48분류군(정 등, 1949), 64분류군(이, 1969)으로 분류하는 등 많은 이견이 있다.

제비꽃속에 대한 분류체계는 Gingins (1823)가 3개의 절로 나눈 것을 시초로 하여, Becker (1925)는 3절 6아절 3계열, Maekawa and Hashimoto (1963)는 8절 5아절 7계열로 분류하였고, 한국산에 대하여는 김(1986)이 비교형태학적 연구를 통해 3절 6아절 8계열로 정리한 바 있다. 특히 가장 많은 분류군이 포함되어 있는 진정제비꽃절(sect. *Nomimium*)의 분류계급 설정에 있어서는 많은 의견 차이를 보이고 있어(김, 1986; Ballard *et al.*, 1999) 세부적인 연구의 필요성이 요구된다.

한국산에 대한 연구 중 분류군들의 분포에 대한 연구를 제외하면 최근에는 분류군의 기원을 밝히려는 연구가 활발히 수행되어 염색체수 및 핵형분석, DNA polymorphism을 통해 종간유연관계가 밝혀진 바 있다(Choi *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002). 분자계통학적인 연구로는 유 등(2004)이 RAPD, ISSR과 PCR-RFLP 분석을 실시하여 종간유연관계를 밝혔으며, 최근에는 핵 DNA의 ITS지역과 엽록체 DNA의 *trnL*-F지역 염기서열 분석을 통한 계통학적 연구가 수행된 바 있다(유 등, 2005; 유와 김, 2006). 한편 일부분류군에 대한 분자계통학적 연구로는 형태적으로 많은 변이를 보이는 태백제비꽃과 근연분류군에 대한 분류학적 연구(박, 2005; 황, 2006; 장 등, 2006)가 수행되기도 하였다.

본 연구에서는 주로 외부형태 형질에 의해 분류되거나 일부분류군에 대한 분류학적 유연관계가 밝혀졌을 뿐, 최근 일부 연구(유 등, 2004, 2005; 유와 김, 2006)를 제외하고는 분자계통학적 연구가 수행되지 않은 한국산 제비꽃속 식물에 대하여 제비꽃속의 계통유연관계 분석에 유용한 방법으로 알려져 있고(Ballard, 1996), 다른 유전자지역에 비해 변형이 적고 피자식물 분류군에서 계통학적 유연관계를 밝히는데 널리 사용되고 있는 엽록체 DNA의 *matK*와 *atpB-rbcL*지역의 염기서열을 분석하여 DNA data에 기초한 계통을 파악하고, 김(1986)의 외부형태형질에 따른 분류체계와 선행 연구(유 등, 2004, 2005; 유와 김, 2006) 결과와 비교하여 속내 분류계급에 대한 평가와 종간 유연관계를 파악하고자 한다.

Table 1. Collection data of Korean *Viola* species used in this study. Voucher specimens were deposited at the herbarium of the Kangwon National University (KWNU).

Taxa	Voucher	Source	<i>matK</i>	<i>atpB-rbcL</i>
Section <i>Dischidium</i> 장백제비꽃절				
<i>V. biflora</i> 장백제비꽃	Paik s.n.	Japan, Mt. Rishiri	DQ842607	DQ834784
Section <i>Chamaemelianum</i> 노랑제비꽃절				
<i>V. orientalis</i> 노랑제비꽃	Yoo924	Korea, Mt. Samyung	DQ842569	DQ834746
<i>V. brevistipulata</i> var. <i>minor</i> 털노랑제비꽃	Yoo810	Korea, Mt. Daeam	DQ842570	DQ834747
Section <i>Nomimium</i> 진정제비꽃절				
Subsection <i>Hypocarpae</i> 아욱제비꽃아절				
<i>V. collina</i> 둥근털제비꽃	Yoo814	Korea, Mt. Samyung	DQ842571	DQ834748
<i>V. hondoensis</i> 아욱제비꽃	Yoo837	Korea, Ulleungdo	DQ842572	DQ834749
<i>V. hondoensis</i> 아욱제비꽃	Yoo1124	Japan, Saitamahyun	DQ842594	DQ834771
Subsection <i>Trigonocarpae</i> 낚시제비꽃아절				
Series <i>Campylostylae</i> 줄방제비꽃계열				
<i>V. acuminata</i> 줄방제비꽃	Yoo799	Korea, Mt. Myoungji	DQ842573	DQ834750
<i>V. sachalinensis</i> 왜줄방제비꽃	Kim s.n.	Korea, Mt. Baekdu	DQ842608	DQ834785
<i>V. websteri</i> 왕제비꽃	Chon s.n.	Korea, Mt. Yoomyong	DQ842574	DQ834751
Series <i>Rostratae</i> 낚시제비꽃계열				
<i>V. ovato-oblonga</i> 긴잎제비꽃	Yoo931	Korea, Mt. Halla	DQ842575	DQ834752
<i>V. kusanoana</i> 큰줄방제비꽃	Yoo863	Korea, Ulleungdo	DQ842576	DQ834753
<i>V. grypoceras</i> 낚시제비꽃	Yoo826	Korea, Kwanumsa	DQ842577	DQ834754
for. <i>albiflora</i> 흰낚시제비꽃	Yoo868	Korea, Mt. Halla	DQ842578	DQ834755
var. <i>exilis</i> 애기낚시제비꽃	Yoo833	Korea, Mt. Halla	DQ842579	DQ834756
Subsection <i>Bilobatae</i> 콩제비꽃아절				
Series <i>Verecundae</i> 콩제비꽃계열				
<i>V. verecunda</i> 콩제비꽃	Yoo975	Korea, Ulleungdo	DQ842580	DQ834757
<i>V. verecunda</i> 콩제비꽃	Yoo1129	Japan, Shinzuku	DQ842581	DQ834758
Series <i>Raddeanae</i> 선제비꽃계열				
<i>V. raddeana</i> 선제비꽃	Yoo030603	Korea, Wondong	DQ842582	DQ834759
Subsection <i>Vaginatae</i> 고깔제비꽃아절				
<i>V. rossii</i> 고깔제비꽃	Yoo030514	Korea, Haenam	DQ842583	DQ834760
<i>V. rossii</i> 고깔제비꽃	Yoo030823	Japan, Maruyama	DQ842584	DQ834761
<i>V. diamantiaca</i> 금강제비꽃	Yoo030513	Korea, Mt. Bokkye	DQ842585	DQ834762
<i>V. yazawana</i> 애기금강제비꽃	Yoo988	Korea, Mt. Seorak	DQ842586	DQ834763
Subsection <i>Patellares</i> 제비꽃아절				
Series <i>Pinnatae</i> 남산제비꽃계열				
<i>V. chaerophylloides</i> 남산제비꽃	Yoo823	Korea, Mt. Samyung	DQ842587	DQ834764
<i>V. dissecta</i> 간도제비꽃	Zhou s.n.	China, Yanging	DQ842609	DQ834786

Table 1. (Continued).

Taxa	Voucher	Source	matK	atpB-rbcL
Series <i>Chinensis</i> 제비꽃계열				
<i>V. woosanensis</i> 우산제비꽃	Yoo s.n.	Korea, Ulleungdo	DQ842588	DQ834765
<i>V. albida</i> 태백제비꽃	Yoo796	Korea, Mt. Myoungji	DQ842589	DQ834766
for. <i>takahashii</i> 단풍제비꽃	Yoo030520	Korea, Mt. Daedeok	DQ842590	DQ834767
<i>V. phalacrocarpa</i> 털제비꽃	Yoo030514-1	Korea, Haenam	DQ842591	DQ834768
<i>V. japonica</i> 왜제비꽃	Yoo030428	Korea, Mt. Halla	DQ842593	DQ834770
<i>V. japonica</i> 왜제비꽃	Yoo030823-1	Japan, Maruyamahyun	DQ842602	DQ834779
<i>V. japonica</i> 왜제비꽃	Yoo1127	Japan, Mt. Maruyama	DQ842592	DQ834769
<i>V. hirtipes</i> 흰털제비꽃	Park030506	Korea, Cheolwon	DQ842595	DQ834772
<i>V. patrinii</i> 흰제비꽃	Yoo936	Korea, Chejudo	DQ842596	DQ834773
<i>V. lactiflora</i> 흰젖제비꽃	Yoo831	Korea, Mt. Samyung	DQ842597	DQ834774
<i>V. mandshurica</i> 제비꽃	Yoo916	Korea, Chejudo	DQ842598	DQ834775
<i>V. seoulensis</i> 서울제비꽃	Lee & Heo3029	Korea, Mt. Sambang	DQ842599	DQ834776
<i>V. yedoensis</i> 호제비꽃	Yoo030520-1	Korea, Mt. Daedeok	DQ842600	DQ834777
Series <i>Variiegatae</i> 알록제비꽃계열				
<i>V. keiskei</i> 잔털제비꽃	Yoo858	Korea, Myoungji	DQ842601	DQ834778
<i>V. variegata</i> 알록제비꽃	Yoo967	Korea, Myoungji	DQ842603	DQ834780
var. <i>chinensis</i> 자주알록제비꽃	Yoo030429	Korea, Yanggu	DQ842604	DQ834781
Series <i>Patellares</i> 뾰제비꽃계열				
<i>V. selkirkii</i> 뾰제비꽃	Yoo030429	Korea, Mt. Myoungji	DQ842605	DQ834782
<i>V. violacea</i> 자주잎제비꽃	Yoo983	Korea, Chejudo	DQ842606	DQ834783
<i>Hybanthus floribundus</i>	Chase 2201K	Royal Botanic Gardens	DQ842613	DQ834787

재 료 및 방 법

실험재료는 2003년 3월부터 2006년 6월까지 우리나라와 일본에서 채집한 생체재료를 강원대학교 온실에 이식한 것을 사용하였으며, 증거표본은 강원대학교 생물학과 식물표본실(KWNU)에 보관하였다. 넓은 분포역을 갖는 아욱제비꽃, 콩제비꽃, 고깔제비꽃, 왜제비꽃 등은 일본산과 한국산을 구별하여 사용하였으며 실험에 사용된 분류군 및 채집지 정보는 Table 1과 같다. Outgroup으로는 제비꽃속과 가장 근연으로 알려진(Ballard, 1996) *Hybanthus*속의 *H. floribundus*를 사용하였다.

실험에 사용할 DNA의 추출은 Doyle and Doyle (1987)의 방법을 따랐으며, 추출한 DNA는 Beckman spectrophotometer로 정량한 후 5 ng/ μ l로 희석하여 PCR을 위한 DNA로 사용하였다. DNA 증폭은 DNA Thermal Cycler (Biometra, Whatman Co.)로 수행하였으며 matK를

Table 2. Characteristics of *matK* gene and *atpB-rbcL* intergenic spacer region, separate and combined data for 42 populations of Korean *Viola* and outgroup.

Characters	<i>matK</i>	<i>atpB-rbcL</i>	Combined (<i>matK</i> + <i>atpB-rbcL</i>)
Length of sequence region (bp)	1596-1602	961-996	2557-2592
Aligned length	1608	1063	2671
No. of variable sites	159	37	196
No. of informative sites	73	27	100
Sequence distance			
<i>Viola</i> + outgroup	0-8.414	0-1.974	0-5.86
Within <i>Viola</i>	0-2.138	0-1.972	0-1.96
No. of alignment gaps	7	17	24

위한 primer는 Johnson & Soltis (1994)의 *trnK*-3914F와 *trnK*-2R을 사용하였으며, *atpB-rbcL*지역의 증폭을 위한 primer는 Setoguchi *et al.* (1997)의 primer 2와 5를 사용하였다. PCR 조건은 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 2분을 cycle로 하여 45회 반복한 후 72°C에서 10분간 더 유지시켰다. 증폭된 DNA는 1.2% agarose gel에 전기영동한 후 UV하에서 확인하였으며 Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega)을 이용하여 정제하였다. 분자량 비교를 위한 marker로는 100 bp DNA ladder와 100bp Plus DNA Ladder를 사용하였다. 염기서열 분석은 ABI prism 377A automated DNA sequencer(Applied Biosystems)를 이용하여 cycling sequencing 방법으로 수행하였다.

염기서열은 Sequencher (Gene codes Corporation, Ann Arbor, Michigan), Clustal X (Gibson *et al.*, 1994)를 이용하여 정렬하였으며, 최종 세부정렬은 수작업을 통해 수행하였다. 정렬된 염기서열은 PAUP 4.02b (Swofford, 1998)을 사용하여 parsimony analysis를 하였으며, 분석방법은 Heuristic search를 이용하고, 그에 따른 option으로는 ACCTRAN, MULPARS, 그리고 TBR을 이용하였다. 또한 각 분계도의 지지정도를 알아보기 위하여 bootstrap (Felsenstain, 1985)을 이용하였다. 분석방법은 1000회를 반복하였으며 이를 통한 계통수를 찾아내었다. 또한 two-parameter method (Kimura, 1980)로 계산된 염기변이 값을 산출하였다(Farris *et al.*, 1996).

결 과

염기서열의 특징: 본 연구에서 다룬 37분류군의 총 42집단에 대한 염록체 DNA의 *matK*

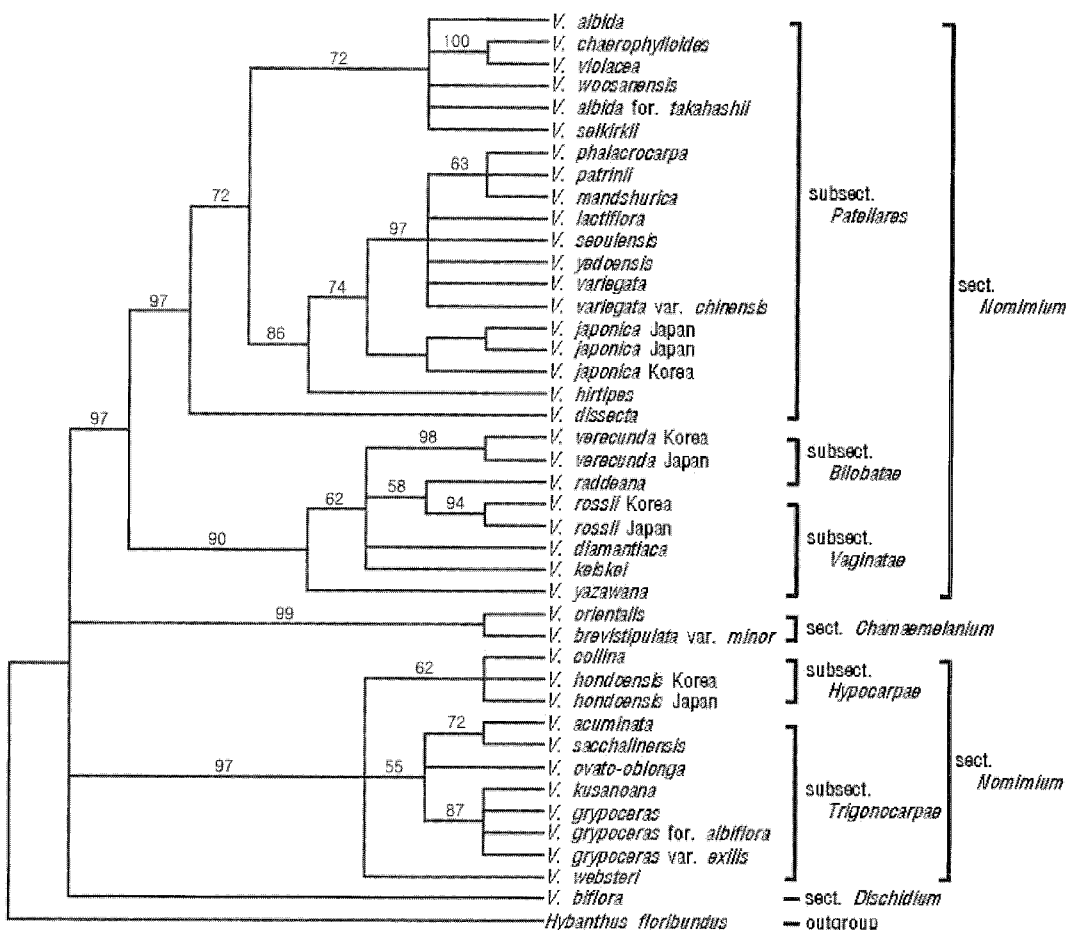


Fig. 1. Strict consensus tree of 40 equally parsimonious trees (281 steps, CI=0.886, RI=0.931, RC=0.824) based on 73 phylogenetically informative changes in *matK* gene. The bootstrap values are indicated above branches.

gene과 *atpB-rbcL* intergenic spacer 지역에 대한 염기서열을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 유전자의 길이는 *matK* gene이 1596-1602 bp의 범위로 정렬된 총 염기서열은 1608 bp였으며 이 중 1449 bp는 염기서열 변화가 없었고, 나머지 159 bp는 염기서열 변화가 있었으며 이 중 73 bp가 공유파생형질이었다. Gap은 대부분 1-7 bp였으며, 염기변이는 outgroup을 포함하여 0-8.41%로 나타났고, outgroup을 제외한 41집단에서는 0-2.13%로 낮게 나타났다. 종내 집단별 변이는 콩제비꽃과 왜제비꽃은 변이가 없었으며 고깔제비꽃은 0-0.31%, 아욱제비꽃은

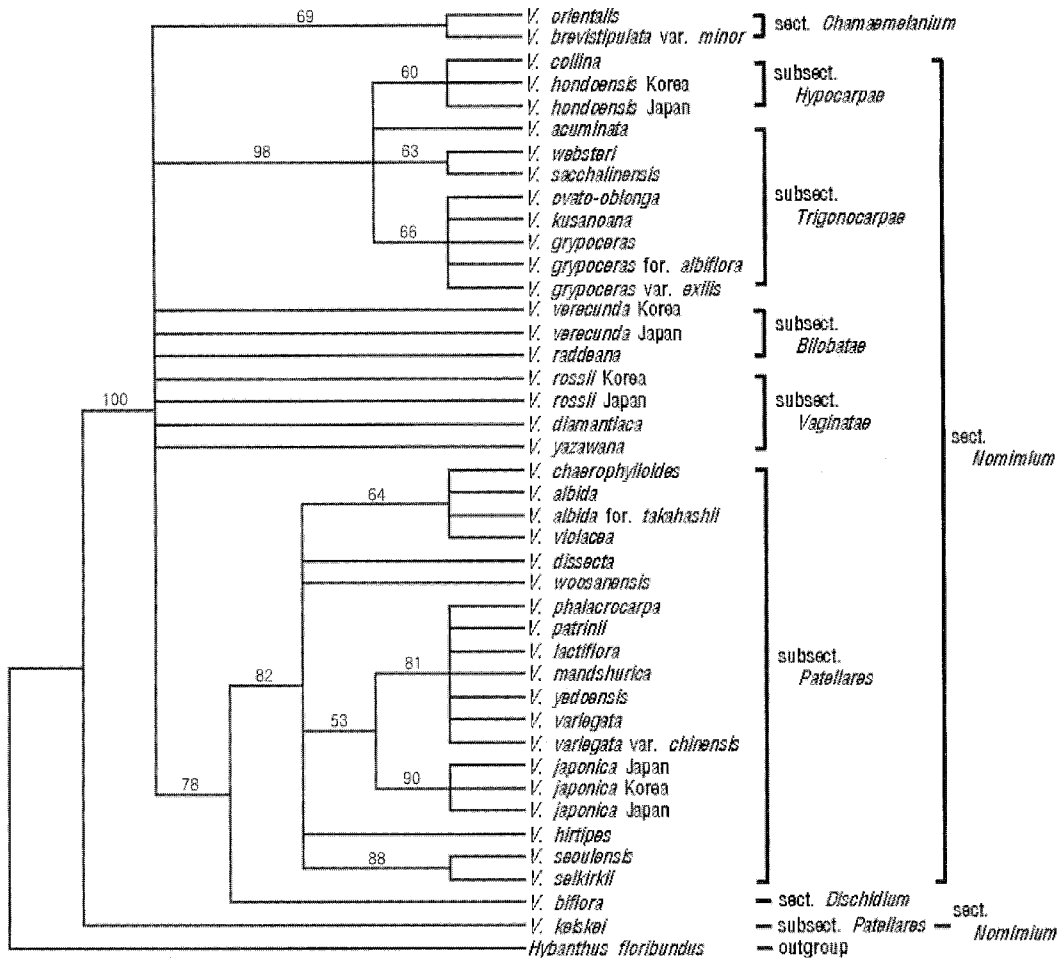


Fig. 2. Strict consensus tree of 8 equally parsimonious trees (73steps, CI=0.934, RI=0.963, RC=0.871) based on 27 phylogenetically informative changes in *atpB-rbcL* intergenic spacer regions. The bootstrap values are indicated above branches.

0-0.10%로 나타났다. *AtpB-rbcL* intergenic spacer 지역은 961-996 bp로 나타났고, 정렬된 총 염기는 1063 bp였으며 이 중 1026 bp는 염기서열 변화가 없었고, 37 bp는 염기서열 변화가 있었으며 이 중 27 bp가 공유파생형질이였다. Gap은 1-17 bp로 다양하게 나타났으며, 223-232번 위치에 10 bp, 344-355 bp 위치에 12 bp, 378-394번 위치에 17 bp의 삽입된 염기가 존재하였다. 염기변이는 outgroup을 포함하여 0-1.97%로 낮게 나타났으며, outgroup을 제외한 41집단에서도 0-1.97%로 낮게 나타났다. 종내 집단별 변이는 콩제비꽃은 변이가 없었으

며 고갈제비꽃은 0-0.13%, 아욱제비꽃은 0-0.13%, 그리고 왜제비꽃은 0-0.25%로 나타났다. 두가지 자료를 결합한 결과에서는 정렬된 총 2671 bp의 염기서열 중 2375 bp는 염기서열의 변화가 없었고, 196 bp는 변이가 존재하였으며, 그 중 100개가 계통학적으로 유용한 공유파생형질이였다. 조사된 42집단의 염기변이는 outgroup을 포함하여 0-5.86%로 낮게 나타났고, outgroup을 제외한 41집단에서도 0-1.96%로 나타났다. 한편 종내 집단별 변이는 콩제비꽃은 변이가 없었으며 고갈제비꽃은 0-0.19%, 아욱제비꽃은 0-0.12%, 왜제비꽃의 3집단은 0-0.16%로 낮게 나타났다.

계통학적 분석: *MatK* 염기서열 자료를 분석한 결과에서는 진정제비꽃질의 제비꽃아절, 콩제비꽃아절, 그리고 고갈제비꽃아절에 속하는 분류군들이 하나의 분계조를 형성하였으며, 아욱제비꽃아절과 낚시제비꽃아절에 포함된 분류군들도 독립된 분계조를 형성하였다. 또한 노랑제비꽃질과 장백제비꽃질도 각각 독립된 clade를 형성하였다(Fig. 1). *AtpB-rbcL* 염기서열 분석 결과는 노랑제비꽃질, 진정제비꽃질의 아욱제비꽃아절과 낚시제비꽃아절, 그리고 잔털제비꽃을 제외한 제비꽃아절에 포함된 분류군들이 독립적인 분계조를 형성하는 것으로 나타났으나 장백제비꽃질은 잔털제비꽃을 제외한 제비꽃아절 분류군들이 포함된 clade를 위한 자매군으로 분계조를 형성하였다(Fig. 2). 따라서 *matK*와 *atpB-rbcL*의 독립적인 분석에서는 두 data가 노랑제비꽃질이 독립적으로 유집되는 점에서는 일치하였으나, 장백제비꽃질과 잔털제비꽃이 분리되는 위치는 차이를 보였다. 두가지 염기서열 자료를 유합하여 분석한 결과에서 계통수는 크게 3개의 clade를 형성하였다(Fig. 3). 즉, (1) 122개의 synapomorphic change와 76%의 bootstrap value로 지지되는 첫 번째 clade는 기본염색체 수가 $x=6$ 인 노랑제비꽃질과 장백제비꽃질이 진정제비꽃질의 아욱제비꽃아절과 낚시제비꽃아절($x=10$)에 속하는 분류군들이 포함된 clade를 위한 자매군을 형성하면서 유집되었고, (2) 잔털제비꽃은 진정제비꽃질의 콩제비꽃아절과 고갈제비꽃아절($x=10$ or 12)에 속하는 분류군들과 함께 4개의 공유파생형질과 71%의 bootstrap 지지도를 가지고 독립적인 분계조를 형성하였으며, (3) 잔털제비꽃을 제외한 제비꽃아절($x=12$)에 속하는 19집단은 9개의 synapomorphic change와 99%의 높은 bootstrap 지지도를 가지고 하나의 clade를 형성하였다.

고 찰

한국산 제비꽃속 식물에 대한 분자계통학적 연구를 통한 유전자의 ingroup내 염기변이는 ITS의 경우 3.0-16.11%로 매우 높았고(유 등, 2005), *trnL-F*지역의 경우에는 0-2.47%로 나타났는데(유와 김, 2006), 본 연구에서 사용한 *matK*의 경우는 0-2.13%, *atpB-rbcL* intergenic spacer지역은 0-1.97%로 낮게 나타나 핵DNA에 의한 염기변이는 엽록체 DNA에 의한 것 보다 매우 높게 나타났으며 엽록체 DNA내에서는 *trnL-F*, *matK*, *atpB-rbcL* 순으로 낮게 나타

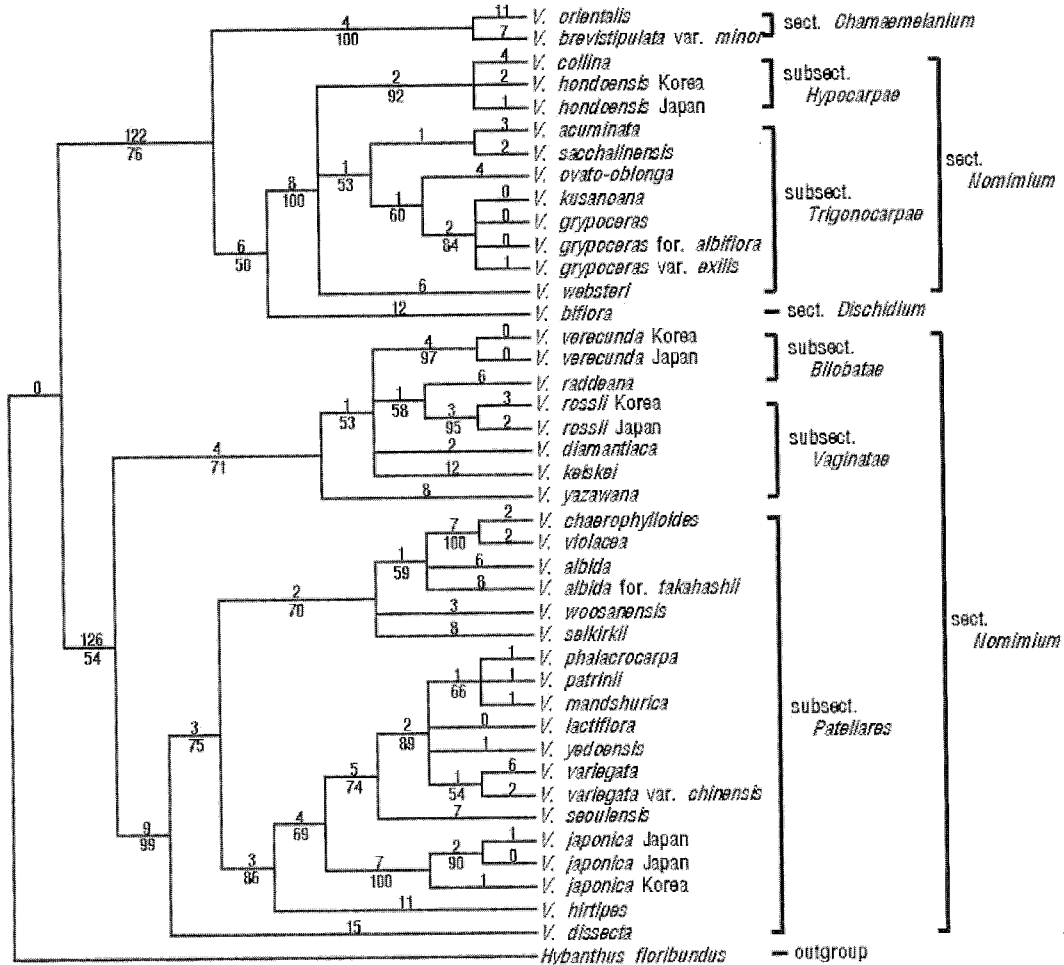


Fig. 3. Strict consensus tree of two equally parsimonious trees (363 steps, CI=0.862, RI=0.922, RC=0.795) based on 100 phylogenetically informative changes in combined data sets. The numbers of changes are indicated above branches and bootstrap values are found below branches.

났다. Ballard *et al.* (1999)은 제비꽃속의 중간 ITS지역 염기변이가 피자식물내에서 가장 크다고 하였으며, 제비꽃과 내 속간 또는 속 이하의 계통분류에 매우 유용한 형질을 가진 유전자로 인정하였는데 한국산에 대한 결과에서도 일치하는 결과를 보였다.

제비꽃속의 속내 분류체계는 주두의 형태, 꽃의 색깔, 지하경의 유무, 탁엽의 모양, 엽맥의 유형에 따라 설정되어 왔다(Gingins, 1823; Becker, 1925; Yuzepchuk, 1949; Wang, 1991; 김,

1986). 이에 의하면 한국산 제비꽃속은 3개의 절, 즉 노랑제비꽃절(sect. *Chamaemelanium*), 장백제비꽃절(sect. *Dischidium*), 진정제비꽃절(sect. *Nomimium*)로 대별된다(김, 1986). 유 등(2005)은 nrITS 분석에서 노랑제비꽃절과 장백제비꽃절이 자매군을 형성하면서 진정제비꽃절과는 독립된 분계조를 형성하며, *trnL-F* 염기서열 분석 결과(유와 김, 2006)에서는 노랑제비꽃절이 88%의 bootstrap 지지도를 가지고 독립적인 분계조를 만들지만, 장백제비꽃절은 진정제비꽃절의 콩제비꽃아절, 제비꽃아절, 고깔제비꽃아절에 포함된 분류군을 위한 clade에 자매군을 형성하면서 두 분계조 사이에 위치하여 차이를 보이는 것으로 보고하였다. 본 연구 결과에서도 두개의 절은 *trnL-F* 지역 염기서열 분석에 의한 결과와 일치하게 나타났으나 자매군 형성은 진정제비꽃절의 아욱제비꽃아절과 낚시제비꽃아절 분류군들이 포함된 clade에 유집되어 차이를 보였다. 가장 많은 분류군이 포함되어 있는 진정제비꽃절의 5개 아절은 paraphyletic한 분계조를 형성하였으며, 아욱제비꽃아절은 monophyletic하게 분리되었지만 나머지 4개 아절에 속하는 분류군들은 paraphyletic한 분계조를 형성하였다. 한편 아절 내 계열(series)들도 선행연구(유 등, 2005; 유와 김, 2006)와 마찬가지로 분류군의 위치가 서로 다르게 유집되어 구별이 불가능한 것으로 나타나, RAPD, ISSR, PCR-RFLP 분석을 통한 결과(유 등, 2004)와는 상이한 결과를 보였다.

제비꽃속의 염색체수는 기본염색체수가 $x=6$ 인 것이 가장 원시적인 분류군으로 알려져 있고 배수성에 의해 $x=12$ 인 종들로 분화되었을 것으로 추정하고 있다(Clausen, 1927; Miyaji, 1929, Ballard, 1996; Ballard *et al.*, 1999). 그러나 $x=10$ 또는 12인 분류군들의 기원에 대해서는 학자들간에 많은 이견이 있다. 본 연구 결과에서 $x=6$ 인 outgroup을 중심으로 가장 먼저 기부에 분계조를 형성한 것은 $x=6$ 을 가지는 유경종인 노랑제비꽃절에서 $x=6$ 인 장백제비꽃절과 $x=10$ 인 진정제비꽃절의 낚시제비꽃아절과 아욱제비꽃아절에 속하는 분류군들이 포함된 clade로 분화되고, $x=12$ 인 진정제비꽃절의 제비꽃아절, 고깔제비꽃아절, 콩제비꽃아절에 속하는 분류군들은 배수성에 의해 outgroup으로부터 독립적으로 분화한 것으로 보아 Ballard (1996)의 의견을 지지하였다. 그러나 outgroup으로 부터 clade 각각의 기원에 대해서는 선행연구(유 등, 2005; 유와 김, 2006)와 차이를 보이는 것으로 나타나 $x=10$ 또는 $x=12$ 인 분류군들에 대한 정확한 기원을 찾기 위해서는 추가적인 연구의 필요성이 인정된다.

형태적으로 매우 심한 변이를 보이는 태백제비꽃과 근연분류군인 남산제비꽃과 단풍제비꽃의 유연관계에 대하여 유 등(2004)은 3분류군에 대한 분류학적 위치의 재설정을 언급하면서, 유사분류군, 즉 간도제비꽃(*V. dissecta*), *V. eizanensis*, *V. sieboldiana*와의 관계도 면밀히 재검토할 필요가 있음을 지적한 바 있다. 박(2005)은 ITS 분석을 통한 태백제비꽃군의 종분화론적 연구를 통해 남산제비꽃과 태백제비꽃이 하나의 분계조를 형성하고 단풍제비꽃은 단풍제비꽃-태백제비꽃 및 단풍제비꽃-남산제비꽃의 형태적 중간형과 분계조를 형성하는 것으로 나타나 유 등(2005)의 결과와는 차이를 보였다. 최근 장 등(2006)은 3분류군에 대한 잎의 형태적 변이에 의한 극단형을 7개 유형으로 세분하여 분류학적 연구를 수행한 결과 주두, 종자, 화분 및 해부학적 형질에서 커다란 차이를 보이지 않았고, 한국 북부지역에 분포하는 간도제비꽃, 유럽과 북미에 분포하는 것으로 알려진 *V. pinnata*, 일본에 분포하는 *V. eizanensis*와

V. chaerophylloides var. *sieboldiana* 등 국내, 외에 분포하는 유사분류군을 포함한 총 28개 집단의 ITS와 27 집단의 *trnL*-F 지역 염기서열분석 결과에서도 3분류군은 독립적인 분계조를 형성하지 않고 서로 중복되어 유집되는 경향을 보였다. 본 연구 결과에서도 두 염기서열 자료를 유합하여 분석한 결과에서는 3분류군이 70%의 bootstrap 지지도를 가지고 독립적인 분계조를 형성하였지만 자주잎제비꽃, 피제비꽃 및 우산제비꽃 등이 함께 포함되어 있어 외부 형태에 의한 결과(김, 1986)와는 일치하지 않았다. 이러한 결과는 ITS분석 결과(유 등, 2005)를 제외한 다른 선행연구(유 등, 2004; 유와 김, 2006)에서도 유사한 경향을 보였다. 이와 같이 태백제비꽃과 근연 분류군들이 엽형을 제외한 형질에서 매우 유사한 특징을 보이며, 엽형의 변이가 다양한 이유는 일의 형태적인 분화가 진행 중 이거나(Kim *et al.*, 1991), 잡종형성에 의한 방사진화 때문인 것으로 추정된다(황, 2006; 장 등, 2006). 한편 3분류군의 기원에 관하여 Maximowicz (1877)는 *V. pinnata*가 간도제비꽃과 남산제비꽃의 원형일 것으로 추측하였으며, Ito (1962)는 *V. pinnata*는 유럽에 분포하는 종으로 지역적 차이가 심하여 간도제비꽃에서 남산제비꽃이 분화되었을 것이라고 주장한 바 있다. 염색체 수에 있어서도 간도제비꽃, 남산제비꽃, 단풍제비꽃과 태백제비꽃은 $2n=24$ (Miyaji, 1929; Lee, 1967; Ge *et al.*, 1987; Wang, 1991)인데 비해 *V. pinnata*는 $2n=48$ (Clausen, 1927; Gershoy, 1928)로 차이가 있다. 본 연구 결과에서도 간도제비꽃은 3분류군이 포함되어 있는 잔털제비꽃을 제외한 제비꽃아절 분류군이 포함되어 있는 clade의 자매군을 형성하여 원형으로서의 가능성을 제시하였으며 이는 Ito (1962), 장 등(2006)의 견해와 일치하는 것이다. 한편 피제비꽃과 남산제비꽃의 잡종으로 알려져 있고 울릉도에 한정되어 분포하는 우산제비꽃은 모종과 같은 분계조에 포함되어 있기는 하지만 뚜렷한 분계조를 형성하지 못하므로 선행연구(유 등, 2004, 2005; 유와 김, 2006)와 마찬가지로 외부형태에 의한 결과와는 일치하지 않았다. 최근 이(2006)는 제비꽃속 내 형태적으로 변이가 심한 극단품들을 신분류군으로 기재하였다. 즉, 태백제비꽃과 비슷하나 잎이 긴 삼각형이고 꽃잎이 주름지는 것을 오골제비꽃(*V. albida* Palibin var. *rugata* Y. Lee), 뿌리가 흰색이고 잎이 2-3장으로 적으며 꽃이 홍청색이고 꽃잎에 검은 분홍색줄이 있는 것을 제주제비꽃(*V. chejuensis* Y. Lee & Y. Oh), 잎은 왜제비꽃과 비슷하나 잎 가장자리에 깊은 톱니가 있는 것을 창덕제비꽃(*V. palatina* Y. Lee), 그리고 단풍제비꽃과 남산제비꽃의 잡종으로 인정되는 개체를 완산제비꽃(*V. wansanensis* Y. Lee)으로 명명하였다. 그러나 이들 분류군들은 본 연구에서 다른 태백제비꽃과 근연분류군의 유연관계에서 처럼 형태적인 변이가 매우 심하여 현재 종분화가 진행 중인지 아니면 환경에 따른 일시적인 변이 현상인지에 대한 것이 정확하지 않으므로 모종과의 분류학적 유연관계를 명확히 밝히기 위해서는 분자계통학적 연구나 세포학적 연구 등 종합적인 검토가 필요하다고 생각된다.

한편 잔털제비꽃은 우리나라 평북, 함남 이남에 분포하며 일본에 분포(이, 1996)하는 비교적 흔히 분포하는 종류로 알려져 있는데 외부형태에 의한 결과(김, 1986)와 DNA를 이용한 계통학적 연구(유 등, 2004, 2005)에서는 진정제비꽃아의 제비꽃아절에 포함되었으나, 엽록체 DNA를 이용한 유와 김(2006)에 의한 결과에서는 콩제비꽃아절과 고깔제비꽃아절이 포함되어 있는 분계조에 위치하여 차이를 보였다. 본 연구에서도 *matK* 염기서열 자료를 분석한 것

두 종류의 염기서열을 유합하여 분석한 결과는 유와 김(2006)의 결과와 일치하는 것으로 나타났다지만, *atpB-rbcL*의 염기서열을 분석한 결과에서는 잔털제비꽃이 outgroup으로부터 가장 먼저 분화한 것으로 나타나 차이를 보였다.

이상의 결과에서 제비꽃속 분류군들의 분자계통학적 결과는 유전자간에 서로 다른 결과를 보이고, 형태적으로도 변이가 매우 심하며, 특히 염색체수에 있어서는 자생지에 따라 같은 종 내에서도 많은 변이가 나타나는 것으로(Choi *et al.*, 1996) 보고되고 있으므로, 제비꽃속의 계통을 논하기 위해서는 다양한 유전자분석이 필요할 것으로 생각되며, 또한 아절이나 계열 등 속내 하위분류군에 대한 연구는 전 세계에 분포하는 많은 집단을 대상으로 종합적인 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2005-003-C00153).

인 용 문 헌

- 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.
- _____, 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.
- Becker, W. 1925. *Viola*. In Engler, A. and K. Prantl, 2nd eds., 21 Bd. Die Naturlichen Pflanzenfamilien. Pp. 363-377.
- Choi, H. W., J. S. Kim and J. W. Bang. 1996. Chromosome numbers and DNA polymorphism of *Viola* in Korea. *Korean J. Genetics* 18: 241-248.
- Clausen, J. 1927. Chromosome number and the relationship of species in the genus *Viola*. *Ann. Bot.* 41: 677-714.
- _____. 1964. Cytotaxonomy and distributional ecology of western North American violets. *Madrõno* 17: 173-204.
- 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.
- Farris, J., V. Albert, M. Källersjö, D. Lipscomb and A. 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: 789-791.
- Ge, C. -J, Y. -K. Li, Y. Zhou and P. -S. Hsu. 1987. Observations on the chromosome numbers of medicinal plants of Shandong Province (III). *Acta Botanica Yunnanica* 9: 333-338.
- Gershoy, A. 1928. Studies in North American violets. I. General considerations. *Vermont Agril. Exp. Sta. Bull.* 279. P. 18.
- Gibson, T., D. Higgins and J. Thompson. 1994. Clustal X Program. EMBL, Heidelberg, Germany.
- Gingins, F. 1823. Memoire sur la Famille des Violacees. *Mem. Soc. Phy. His. Natur. Geneve.* Paschoul, Geneva.
- Hashimoto, T. 1967. *Violets of Japan.* Sungmoondang, Tokyo.
- Ito, E. 1962. Observations on the variations of the *Chaerophylloides*-group of *Viola* in Japan. *Bulletin of the National Science Museum of Japan* 6: 192-203.
- Johnson, L. A and D. E. Soltis. 1994. *MatK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s.str. *Syst. Bot.* 19: 143-156.
- Kim, Ok-Rye, Jin Kyung Kwon and Ki Sun Kim. 2002. Karyotype analysis of the genus *Viola* native to Korea. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 43: 523-530.
- Kim, K. S., B. Y. Sun, S. S. Whang and G. H. Chung. 1991. Biosystematic study on the genus *Viola* in Korea - Comparative morphology of the *Viola albida* complex. *Korean J. Bot.* 34: 229-238.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Lee, Y. N. 1967. Chromosome number of flowering plants in Korea (1). *J. Kor. Res. Inst.* 11: 455-478.
- Maekawa, F. and T. Hashimoto. 1963. *Violets of Japan: 2.* Shibundo-shinko-sha, Tokyo. Pp. 1-9.
- Maximowicz, C. J. 1877. Diagnoses plantarum novarum asiaticarum. *Bull. Acad. Imp. Sci. Saint-Petersbourg* 23: 312-314.
- Miyaji, Y. 1929. Studien über die Zahlen Verhältnisse der Chromosomen bei der Gattung *Viola*. *Cytologia* 1: 28-58.
- Nakai, T. 1922. *Violae Novae Japonicae.* *Bot. Mag. (Tokyo)* 34: 29-39.
- Russell, N. H. 1960. Studies in the photoperiodic responses of violets (*Viola*). The

- Southwestern Naturalist 5: 177-186.
- _____ and A. C. Risser, Jr. 1960. The hybrid nature of *Viola emarginata* (Nuttall) Leconte. *Brittonia* 12: 298-305.
- Setoguchi, H., M. Ono, H. Koyama and M. Tsuda. 1997. Molecular phylogeny of *Nothofagus* (Nothofagaceae) based on the *atpB-rbcL* intergenic spacer of chloroplast DNA. *J. Plant Res.* 110: 469-484
- Swofford, D. L. 1998. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Version 4.02b Sinauer Asso. Inc., Massachusetts.
- Wang, C. 1991. *Reipublicae Popularis Sinicae*. Science Press, 51: 1-148. (in Chinese)
- Yuzepchuk, S. V. 1949. Violaceae. *In* Flora of the URSS. Shishkin, B. K. and E. G. Bobrov (eds.), Vol. XV. Leningrad. Pp. 262-360.
- 김경식. 1986. 한국산 제비꽃속 식물의 비교형태학적 연구. 성균관대학교 박사학위논문. 수원.
- 박소연. 2005. 태백제비꽃의 종분화론적 연구. 전북대학교 교육학석사학위논문. 전주.
- 유기억, 김종화. 2006. 엽록체 DNA의 *trnL-trnF* 지역 염기서열에 의한 한국산 제비꽃속 (*Viola*) 식물의 유연관계 분석. *화훼연구회지* 14: 232-240.
- 유기억, 이우철, 권오근. 2004. RAPD, ISSR과 PCR-RFLP를 이용한 한국산 제비꽃속(*Viola*)의 종간 유연관계. *식물분류학회지* 34: 43-61.
- _____, 장수길, 이우철. 2005. ITS 염기서열에 의한 한국산 제비꽃속(*Viola*)의 계통 유연관계. *식물분류학회지* 35: 7-23.
- 이영노. 2006. 새로운 한국식물도감. 교학사, 서울.
- 이우철. 1996. 한국식물명고. 아카데미서적, 서울.
- 이창복. 1969. 우리나라의 식물자원. 서울대논문집, 농생계. 20: 158-159.
- 장수길, 이우철, 유기억. 2006. 태백제비꽃과 근연 분류군의 분류학적 연구. *식물분류학회지* 36: 163-187.
- 정태현, 도봉섭, 심학진. 1949. 조선식물명집 I. 초본편. 조선생물학회편. Pp. 85-88.
- 황성수. 2006. 태백제비꽃군 ITS DNA 염기서열 분석. *자원식물학회지* 19: 628-633.

Phylogenetic Relationships of Korean *Viola* (Violaceae) Based on *matK* and *atpB-rbcL* Sequence Data of Chloroplast DNA

Ki-Oug Yoo*, Su-Kil Jang and Woo-Tchul Lee

Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Phylogenetic studies were conducted for 42 populations of Korean *Viola* based on *matK* gene and *atpB-rbcL* intergenic spacer region of chloroplast DNA. In the *matK* tree, section *Chamaemelanium* and *Dischidium* were formed as a distinct group. Five subsections of section *Nomimum* were paraphyletic. In *atpB-rbcL* intergenic spacer region analysis, two species of sect. *Chamaemelanium* were monophyletic, and section *Dischidium* was placed sister to subsection *Patellares* clade except for *V. keiskei*. Five subsections of section *Nomimum* were also paraphyletic as *matK* tree. The separate data analyses were incongruent in the relationships among 42 populations, especially for the position of section *Dischidium* and *V. keiskei*. The combined analyses of two chloroplast regions showed three major clades; section *Chamaemelanium* and *Dischidium* (x=6) formed a sister to subsections *Hypocarpae* and *Trigonocarpae* (x=10) clade; subsections *Bilobatae* and *Vaginatae* (x=10 or 12) formed a clade with *V. keiskei*; and 19 populations of subsection *Patellares* (x=12) except for *V. keiskei* were recognized as an independent clade within section *Nomimum*. Although combined data suggest three major clades of Korean *Viola*, the origins of each clade from outgroup were discordance with previous ITS and *trnL-F* data.

Key words: *atpB-rbcL* chloroplast DNA, *matK*, *Viola*.

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