

ITS 염기서열에 의한 한국산 팽이눈속(*Chrysosplenium*)의 계통학적 연구

한종원, 양선규¹, 김현준, 장창기², 박정미³, 강신호*

세명대학교 자연약재과학과, ¹충북대학교 생물학과, ²공주대학교 생물교육과, ³국립생물자원관 고등식물연구과

Phylogenetic Study of Korean *Chrysosplenium* Based on nrDNA ITS Sequences

Jong-Won Han, Sun-Gyu Yang¹, Hyun-Jun Kim, Chang-Gee Jang²,
Jeong-Mi Park³ and Shin-Ho Kang*

Department of Natural Medicine Resources, Semyung University, Jecheon 391-711, Korea

¹Department of Biology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

²Department of Biology Education, Kongju National University, Gongju 314-701, Korea

³Vascular Plants research Division, National Institute of Biological Resources, Incheon 404-708, Korea

Abstract - The internal transcribed spacer (ITS) regions of nuclear ribosomal DNA from genus *Chrysosplenium* were sequenced to address phylogenetic relationship. ITS including 5.8S sequence varied in length from 647 bp to 653 bp. Among them, 219 sites were variable sites with parsimony-informative. The aligned sequences were analyzed by maximum parsimony (MP) and neighbor-joining (NJ) methods. In the strict consensus trees of parsimony analysis, the monophyly of *Chrysosplenium* was supported by 100% bootstrap value. The first clade, *C. pseudofauriei* was at the basal position of the genus, and others formed two clades with high bootstrap support. The second clade included Ser. *Pilosa* and Ser. *Oppositifolia* and third clade included Ser. *Alternifolia* and Ser. *Flagellifera*. The NJ trees showed essentially the same topology. Finally, DNA sequences of ITS regions were useful phylogenetic marker in this genus. Based on the ITS and ridge seed morphological results, *C. sphaerospermum* Maxim. and *C. valdepilosum* (Ohwi) S.H. Kang & J.W. Han were discussed their scientific names and taxonomic positions.

Key words - *Chrysosplenium*, Phylogeny, nrDNA ITS, Taxonomic treatments

서 언

팽이눈속(*Chrysosplenium* L.)은 범의귀과에 속하는 분류군으로 현재는 약 57~65종이(Hara, 1957; Pan, 2001) 분포하는 것으로 알려져 있다. 본 속은 남아메리카에 분포하는 2종을 제외하면, 주로 북반구에 제한적으로 분포하며, 북동아메리카에 2종, 북서아메리카에 4종, 유럽에 2종, 나머지 분류군이 대부분 동아시아에 분포하고, 그 중 중국에 35종, 일본에 18종이 분포한다(Spongberg, 1972; Pan, 2001; Iwatsuki *et al.*, 2001). 본 속은 Linne(1753)에 의해

처음으로 분류군이 설정된 이후에, Maximowicz(1877)가 본 속을 꽃받침의 형태에 따라 두 아속으로(*Gamosplenium*, *Dialyspelium*)으로 분류하고 몇 개의 절을 설정하였으며, 그 후 Franchet(1890)은 잎의 배열상태를 기준으로 두 개의 절(*Oppositifolia*, *Alternifolia*)로 구분한 바 있다. 이와 반대로 Hara(1957)는 Franchet의 분류는 자연분류가 아니라고 주장하면서 본 속을 17개 열로 구분하여 정리한 바 있다.

한국산 팽이눈속에 관한 연구는 Forbes and Hemsley (1887)가 최초로 보고한 이후, Palibin(1898), Nakai(1909), Chung(1937, 1965), Park(1949, 1974), Lee(1976), Lee (1996a), Lee(1996b) 등이 식물 목록 및 도감에서 보고한

*교신저자(E-mail) : idec5974@semyung.ac.kr

바 있다. 또한 Chung and Kim(1988)이 한국산 팽이눈을 *C. pseudofauriei* H. Lév(선팽이눈), *C. flaviflorum* Ohwi(누른팽이눈), *C. pilosum* var. *fulvum* (Terracc.) Hara(큰팽이눈), *C. pilosum* var. *valdepilosum* Ohwi(금팽이눈), *C. japonicum* (Maxim.) Makino(산팽이눈), *C. ramosum* Maxim.(가지팽이눈), *C. flagelliferum* F. Schmidt(애기팽이눈), *C. alternifolium* var. *sibiricum* Seringe ex DC.(시베리아팽이눈)으로 보고하여, 5종 3변종으로 정리하였으며, 최근 연구에서는 Kim(2007)이 5종 3변종에 대한 분류군의 검색표와 분포를 보고하였다.

외국의 팽이눈 속의 외부형태학적 연구는 Hara(1957)가 본 속을 정리한 이후 Kato *et al.*(1989)이 일본산 팽이눈 속을 대상으로 종자의 외부형태를 주사전자 현미경으로 관찰한 결과 종자의 형태는 절 및 종간 유연관계를 밝히는데 유용한 형질로 보고한 바 있다. 또한 팽이눈 속의 계통분류학적 연구는 Soltis *et al.*(2001)이 28분류군을 *matK*의 염기서열을 근거로 계통분류학적 연구와 생물지리학적 연구를 수행한 바 있다. 그러나 nrDNA ITS 구간에 대한 계통학적 연구는 수행된 바 없으며, 특히 국내에서는 본 속에 대한 계통학적 연구가 수행되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 ITS구간을 이용하여 계통분석을 수행하였으며, 분류학적으로 문제가 제기되는 *C. pilosum* var. *sphaerospermum*과 *C. pilosum* var. *valdepilosum*에 대한 분류학적 처리를 위해 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

본 연구에서 사용된 재료는 2009년 3월부터 2010년 5월까지 한국과 일본에서 채집한 생체재료를 사용하였으며, 생체를 수집하지 못한 *C. pilosum* Maxim. var. *pilosum*과 *C. alternifolium* L.는 중국식물원 표본관(PE)과 국립수목원 표본관(KH)에 보관된 표본에서 채취하여 사용하였으며, 증거표본은 세명대학교 자연약재과학과 식물표본실(NMR)에 보관하였다(Table 1). Outgroup은 과내 인근 분류군인 *Peltobokinia tellimoides*(Maxim.) H.Hara, *Mitella japonica* Maxim., *Astilbe rubra* Hook.f & Thomas ex Hook.f., *Saxifraga fortunei* var. *incislobata* (Engl. & Irmsch.) Nakai를 사용하였고, 이 중 *Peltobokinia tellimoides*(Maxim.) H.Hara와 *Mitella japonica* Maxim.은 Gene bank에 등록되어있는 염기서열을 이용하였다.

실험에 사용한 DNA의 추출은 Doyle and Doyle(1987)의 방법을 따랐으며 추출한 DNA는 Beckman spectrophotometer로 정량한 후 5 ng/μl로 희석하여 PCR을 위한 DNA로 사용하였다. DNA증폭은 DNA thermal Cycler (Biometra, Whatman Co.)로 수행하였으며 ITS 구간의 증폭을 위한 Primer는 Wen and Zimmer(1996)에 의한 N-nc18S10과 C26A를 사용하였다. PCR 조건은 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 2분을 cycle로 하여 40회 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 100 bp 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 사용하였으며, 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 methods(Kimura, 1980)로 계산된 염기변이 값을 기초로 한 Neighbor-joining tree(NJ)를 산출하였다(Saitou and Nei, 1987; Farris *et al.*, 1996).

결과 및 고찰

염기서열분석

본 연구에 사용된 팽이눈속에 대한 ITS의 염기서열은 5.8S 지역을 포함하여 총 647-653 bp로, 이 중 ITS1은 258-265 bp, ITS2는 218-225 bp, 5.8S는 165-167 bp인 것으로 나타났다. 총 염기의 길이가 가장 긴 종은 *C. pilosum* var. *pilosum*과 *C. alternifolium*이 653 bp의 염기를 가지고 있었고, 가장 짧은 종은 *C. ramosum*으로 646 bp의 염기를 가지고 있었다(Table 2). 정렬된 염기서열 총

Table 1. Collection and Genbank accession numbers of the taxa

Taxa	Abbr.	Source and voucher	Gene bank number
<i>C. pseudofauriei</i> H.Lév 1	CPSE1	Taebaek-si, Gangwon-do NMR: S.H.Kang <i>et al.</i> 2010095	JN375554
<i>C. pseudofauriei</i> H.Lév 2	CPSE2	Yeongdong-gun, Chungcheongbuk-do NMR: S.H.Kang <i>et al.</i> 2010094	JN375555
<i>C. flaviflorum</i> Ohwi 1	CFLV1	Yeongdong-gun, Chungcheongbuk-do NMR: S.H.Kang <i>et al.</i> 2010092	JN375556
<i>C. flaviflorum</i> Ohwi 2	CFLV2	Gapyeong-gun, Gyeonggi-do NMR: S.H.Kang et J.W.Han 2009001	JN375557
<i>C. pilosum</i> Maxim. var. <i>pilosum</i>	CPIL	Russia KH: KHB 1063405	JN375558
<i>C. pilosum</i> var. <i>sphaerospermum</i> H.Hara 1	CSPH1	Seosan-si, Chungcheongnam-do NMR: S.H.Kang et J.W.Han 2009037	JN375559
<i>C. pilosum</i> var. <i>sphaerospermum</i> H.Hara 2	CSPH2	Wonju-si, Gangwon-do NMR: S.H.Kang <i>et al.</i> 2010079	JN375560
<i>C. pilosum</i> var. <i>sphaerospermum</i> H.Hara 3	CSPH3	Jeju island, Jeju-do NMR: S.H.Kang et J.W.Han 2009044	JN375561
<i>C. pilosum</i> var. <i>sphaerospermum</i> H.Hara 4	CSPH4	Yangsan-si Gyeongsangnam-do NMR: S.H.Kang et J.W.Han 2009056	JN375562
<i>C. pilosum</i> var. <i>sphaerospermum</i> H.Hara 5	CSPH5	Honshu, Japan KYO: 1063342	JN375563
<i>C. pilosum</i> var. <i>valdepilosum</i> Ohwi 1	CVAL1	Gunwi-gun, Gyeongsangbuk-do NMR: S.H.Kang et J.W.Han 2009054	JN375564
<i>C. pilosum</i> var. <i>valdepilosum</i> Ohwi 2	CVAL2	Jeongseon-gun, Gangwon-do NMR: S.H.Kang et J.W.Han 2009073	JN375565
<i>C. pilosum</i> var. <i>valdepilosum</i> Ohwi 3	CVAL3	Inje-gun, Gangwon-do NMR: S.H.Kang et J.W.Han 2009075	JN375566
<i>C. pilosum</i> var. <i>valdepilosum</i> Ohwi 4	CVAL4	Wonju-si, Gangwon-do NMR: S.H.Kang et J.W.Han 2009092	JN375567
<i>C. japonicum</i> (Maxim.) Makino 1	CJAP1	Hiroshima Pref., Japan NMR: S.H.Kang <i>et al.</i> 2010023	JN375568
<i>C. japonicum</i> (Maxim.) Makino 2	CJAP2	Namyangju-si, Gyeonggi-do NMR: S.H.Kang <i>et al.</i> 2010083	JN375569
<i>C. japonicum</i> (Maxim.) Makino 3	CJAP3	Jeju island, Jeju-do NMR: S.H.Kang <i>et al.</i> 2010056	JN375570
<i>C. japonicum</i> (Maxim.) Makino 4	CJAP4	Ulleung island, Gyeongsangbuk-do NMR: S.H.Kang <i>et al.</i> 2010096	JN375571
<i>C. alternifolium</i> L.	CALT	Poland PE: 01505547	JN375572
<i>C. ramosum</i> Maxim.	CRAM	Wonju-si, Gangwon-do NMR: S.H.Kang <i>et al.</i> 2010077	JN375573
<i>C. flagelliferum</i> F.Shmidt 1	CFLG1	Ulleung island, Gyeongsangbuk-do NMR: S.H.Kang <i>et al.</i> 2010097	JN375574
<i>C. flagelliferum</i> F.Shmidt 2	CFLG2	Jeongeup-si, Jeollabuk-do NMR: S.H.Kang <i>et al.</i> 2010006	JN375575
<i>Peltobokinia tellimoides</i> (Maxim.) H.Hara	PELT	Nagano, Kiso-fukushima, Tochimoto, Japan	AB248847
<i>Mitella japonica</i> Maxim.	MILT	Nagasaki, Takaki, Todoroki-kyo, Japan	AB492413
<i>Astilbe rubra</i> Hook.f & Thomas ex Hook.f	ASTI	Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, Korea NMR: S.H.Kang et J.W.Han 2009099	JN375577
<i>Saxifraga fortunei</i> var. <i>incislobata</i> (Engl. & Irmsch.) Nakai	SAXF	Bonghwa-gun, Gyeongsangbuk-do, Korea NMR: S.H.Kang <i>et al.</i> 2010098	JN375556

Table 2. Length and G+C contents in ITS regions of *Chrysosplenium* and the outgroup

Taxa	ITS1		5.8S		ITS2		Total	
	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)
CPSE1	263	51.7	166	51.0	220	48.2	649	50.4
CPSE2	263	50.2	166	51.0	220	48.6	649	49.9
CFLV1	264	45.1	166	51.0	218	40.8	648	45.1
CFLV2	264	45.5	166	51.0	218	40.4	648	45.2
CPIL	265	46.8	167	49.0	221	42.5	653	46.0
CSPH1	264	45.8	166	52.0	219	42.0	649	45.9
CSPH2	264	45.8	166	52.0	219	42.0	649	46.1
CSPH3	264	45.5	166	52.0	219	42.0	649	45.9
CSPH4	264	45.5	165	52.0	219	42.0	648	46.0
CSPH5	261	46.7	166	51.0	219	41.6	646	46.1
CVAL1	263	46.8	166	51.0	218	39.9	647	45.5
CVAL2	263	46.4	166	51.0	218	40.4	647	45.6
CVAL3	263	46.8	166	51.0	218	40.4	647	45.7
CVAL4	262	47.3	166	51.0	218	40.4	646	46.0
CJAP1	261	46.4	166	51.0	221	44.8	648	47.3
CJAP2	261	45.6	166	51.0	221	45.7	648	46.9
CJAP3	261	46.0	166	51.0	220	45.9	647	47.2
CJAP4	261	46.0	166	51.0	221	44.8	648	47.0
CALT	265	45.3	166	51.0	222	45.9	653	47.1
CRAM	262	48.1	166	51.0	218	42.2	646	46.6
CFLG1	258	41.5	165	52.0	225	44.4	648	45.6
CFLG2	259	40.5	166	51.0	225	44.4	650	44.6
PELT	268	48.5	166	51.0	224	46.4	658	48.4
MILT	266	47.4	166	52.0	220	48.6	652	48.6
ASTI	267	66.3	166	52.0	225	64.4	658	62.5
SAXF	271	35.8	165	52.0	214	43.0	650	41.6

703 position 중 363개의 염기는 변화가 없었고, 나머지 338개의 염기 변화가 있었으며, 변화를 가지는 염기서열 중 informative character는 219개였다. 전체 분류군의 염기조성은 ITS 1구간이 40.5–51.7%, ITS 2 구간이 39.9–48.6%, 5.8S 구간이 49.0–52.0%로 나타났으며, 전체구간의 G+C의 염기조성은 41.6%–62.5%로 평균 47.0%를 나타내었다. 유전적 다양성은 같은 종간에는 0.003–1.727%의 값을 보였고, 다른 종간에는 *C. alternifolium* (CALT)과 *C. japonicum*(CJAP2)이 1.090%으로 가장 낮았으며, *C. pseudofauriei*(CPSE1)와 *C. flagelliferum* (CFLG1)이 15.624%로 가장 높았다(Table 3). 피자식물에서 nrDNA의 ITS 구간은 크기와 염기서열에서 매우 다양하다(Baldwin *et al.*, 1995). 팽이눈속의 ITS구간 염기서열은 ITS 1 구간 (258–265 bp)의 길이가 ITS 2 구간(218–225 bp)보다 더

길게 나타났으며, 이는 다른 피자식물의 대부분의 경우와 유사했다(Baldwin *et al.*, 1995; Suh *et al.*, 1993; Kim and Jasen, 1994; Sang *et al.*, 1995). G+C의 염기조성은 ITS 1 구간이 40.5–51.7%로 기존의 연구보다 낮은 수준이었으며(approximately over 50–60%), ITS 2 구간 또한 39.9–48.6%로 기존의 연구보다 조금 낮은 수준이었다(approximately over 50–70% in Baldwin *et al.*, 1995). 5.8S coding 구간은 165–167 bp로 기존의 연구와 비슷하였으며, G+C 염기조성은 49.0–52.0%로 기존의 연구와 비슷하였다(approximately over 50–60%).

계통학적 분석

ITS 염기서열의 최대절약 분석결과 전체 670단계의 길이를 갖는 2개의 가장 짧은 계통수를 얻으며, consistency

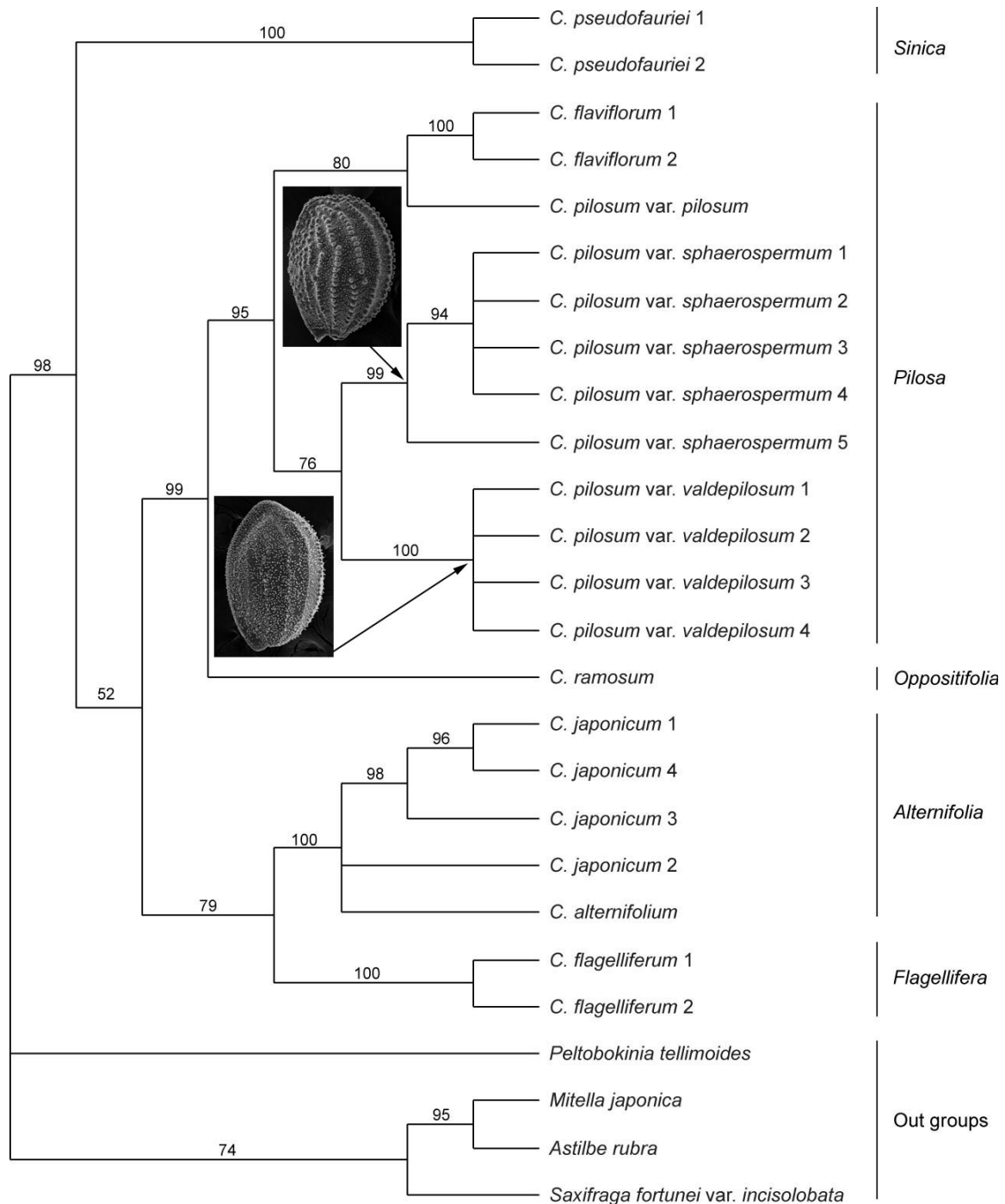


Fig. 1. Strict consensus tree of 2 most parsimonious trees of nrDNA ITS. Bootstrap values in 1000 replicates.

index(CI)는 0.728, retention index(RI)는 0.774, rescaled consistency index(RC)는 0.563을 나타내었다. 얻어진 strict consensus tree는 Fig. 1과 같으며, Maximum likelihood tree와 염기변이에 기초하여 얻어진 NJ 분석에서도 일부 bootstrap 값의 차이를 제외하고는 같은 결과를 보였다(Fig.

2). 그 결과 한국산 팽이눈속의 분류군들은 100%의 높은 bootstrap 값에 의해 단계통을 형성하였고, 절 수준에서 몇 개의 분계조를 형성하였다.

첫 번째 분계조는 bootstrap 값 100%의 높은 지지율로 Ser. *Sinica*에 속하는 *C. pseudofauriei*가 가장 기부

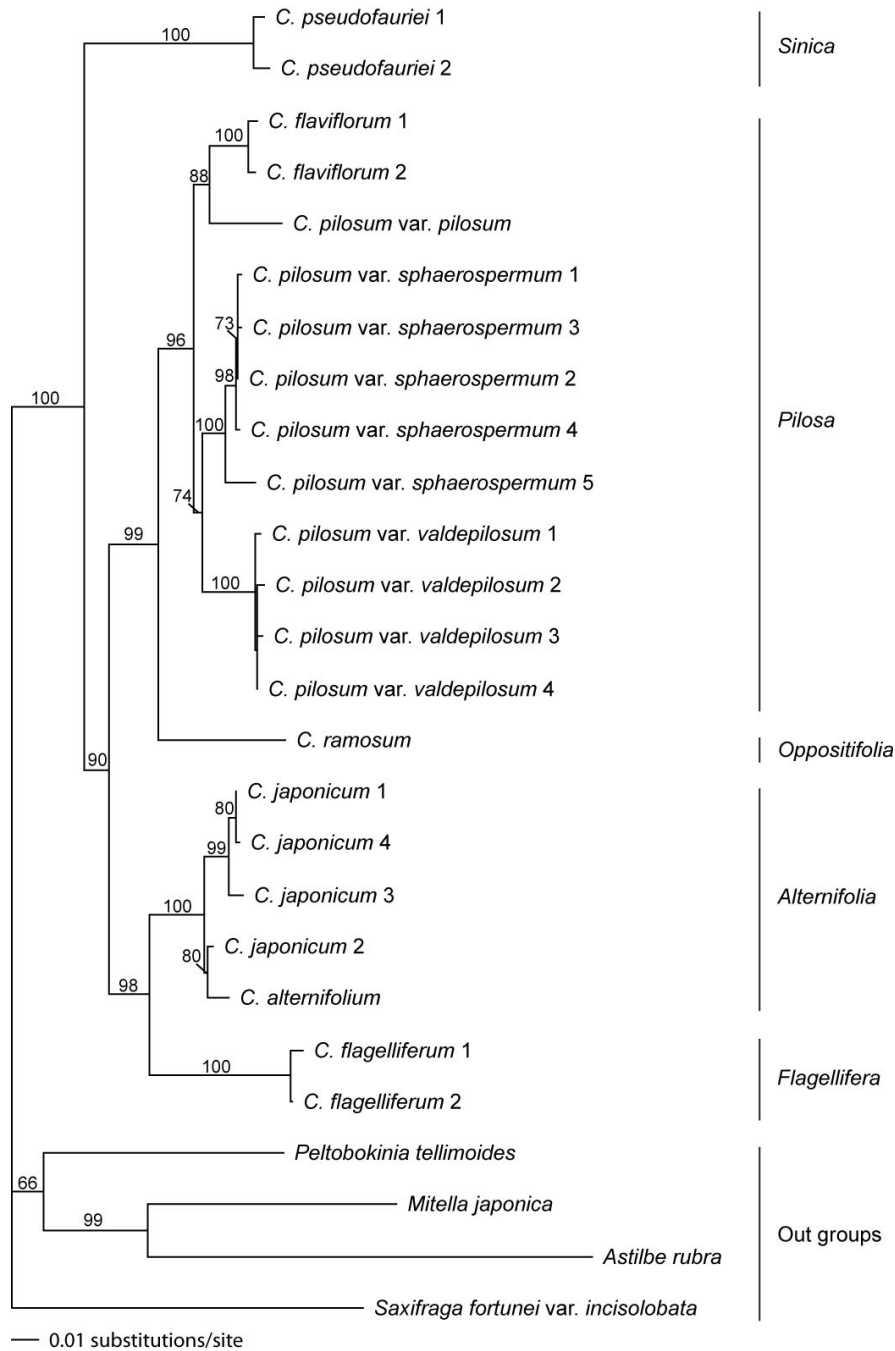


Fig. 2. Neighbor joining tree of nrDNA ITS. Numbers above lines represent bootstrap values in 1000 replicates.

에 위치하였다. 이 종은 한반도 전역, 만주, 우수리 일대에 분포하고 일본에는 *C. pseudofauriei*의 변종인 *C. pseudofauriei* var. *niponense*가 대마도에 분포한다 (Iwatsuki *et al.*, 2001). *C. pseudofauriei* 분계조로부터 다시 크게 두 개의 분계조가 형성되었는데, 하나의 분계조는 *C. pilosum* var. *pilosum*, *C. pilosum* var. *sphaerospermum*,

C. pilosum var. *valdepilosum*, *C. flaviflorum*이 속하는 Ser. *Pilosa*와 *C. ramosum*이 속하는 Ser. *Oppositifolia*가 서로 자매군을 이루며 형성하였고(bootstrap, 95%), 다른 분계조는 *C. alternifolium*, *C. japonicum*이 속하는 Ser. *Alternifolia*와 *C. flagelliferum*이 속하는 Ser. *Flagellifera*가 자매군을 이루며 형성하였다(bootstrap, 79%; Fig. 1).

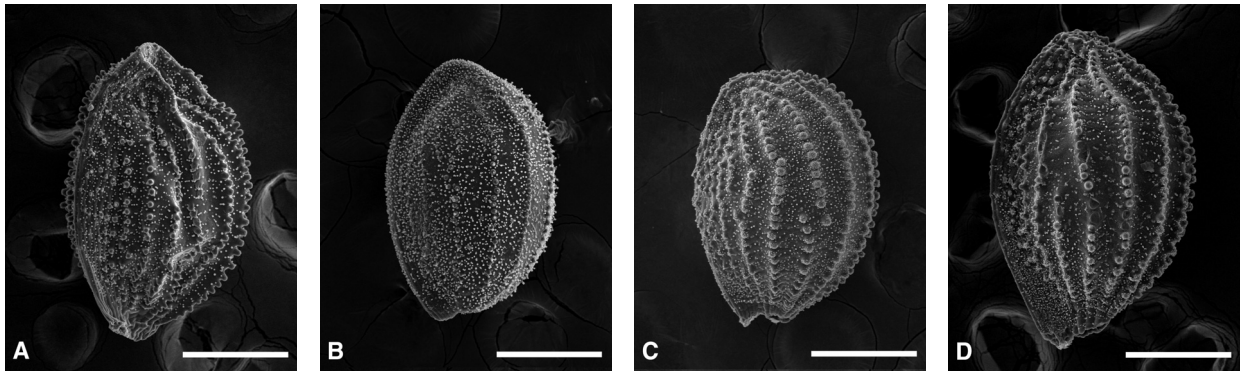


Fig. 3. Seed surface feature of some species. A: *C. pilosum* B: *C. pilosum* var. *valdepilosum* C: *C. pilosum* var. *sphaerospermum* (Korea); D: *C. pilosum* var. *sphaerospermum* (Japan), scale bar: 0.27 mm; (A-C were cited from Han *et al.*, 2010).

두 번째 분계조인 Ser. *Pilosa*에서는 *C. pilosum* var. *pilosum*은 *C. flaviflorum*과 bootstrap 80%의 비교적 높은 지지율로 단계원을 형성하였고, *C. pilosum*의 두 변종인 *C. pilosum* var. *sphaerospermum*과 *C. pilosum* var. *valdepilosum*이 단계원을 형성하며(bootstrap 76%), 서로 자매군을 형성하여, 기존의 분류체계와는 다른 결과를 나타내었다. *C. pilosum* complex는 종내 변이가 심하여 분류학적 계급의 의견이 다양한 분류군이었으며, 그 동안 *C. pilosum* complex는 종자의 형태, 꽃의 크기, 포엽의 색깔, 털의 분포에 따라 구분되었다. 특히 종자의 형태에서 *C. pilosum* var. *pilosum*과 *C. pilosum* var. *sphaerospermum*이 매우 잘 발달된 능선이 있고, *C. pilosum* var. *valdepilosum*은 능선이 미약하게 형성된다(Fig. 3; Hara, 1957; Chung and Kim, 1988; Han *et al.*, 2010). Hara(1957)는 *C. pilosum* var. *sphaerospermum*과 *C. pilosum* var. *valdepilosum*에서 종자에 형성되는 능선이 차이가 있지만, 두 분류군을 별개의 종으로 취급할 정도는 아니라고 언급하였다. 그러나 종자형태의 특징은 유연관계가 있는 분류군의 이해와 계급성질에 많은 정보를 제공하였으며(Orndruff, 1978), 이러한 종자의 특징은 속이하의 분류계급 설정에 유용하게 사용되는 형질이다(Sharma *et al.*, 1977; Rejdali, 1990; Buss *et al.*, 2001; Sa *et al.*, 2010). 또한 *C. pilosum* var. *pilosum*은 중국, 러시아, 한반도 북부지역에 분포하고, *C. pilosum* var. *valdepilosum*은 중국과 한반도에 분포하며, *C. pilosum* var. *sphaerospermum*은 한반도 중부 이남과 일본에 분포하는 등 비교적 지리적 분포가 명확한 점, 본 연구의 분자생물학적 연구결과 등을 미루어 볼 때, 계급의 재설정이 필요할 것으로 판단된다.

세 번째 분계조는 Ser. *Flagellifera*와 Ser. *Alternifolia*이었는데(bootstrap 79%), Ser. *Alternifolia*의 분류군 중 *C. japonicum*은 한국 전역, 일본 전역에 분포하고, *C. alternifolium*은 유럽에 분포하며, 한국 북부와 중국, 일본의 북해도 지역에는 본 연구에서는 제외된 분류군인 *C. alternifolium* var. *sibiricum*이 분포한다. 본 연구에서는 일본과 한반도의 제주도, 울릉도에 분포하는 *C. japonicum*이 단계원으로 형성되었으며, 폴란드의 *C. alternifolium*, 한반도의 *C. japonicum*과 각각 자매군을 형성하여 기존의 분류체계를 명확하게 설명하지 못하였다. *C. japonicum*은 학자에 따라 *C. alternifolium* var. *japonicum*으로 처리된 경우도 있으므로, 좀 더 다양한 연구를 통한 분류체계의 성립이 요구된다.

한국산 팽이눈의 분자생물학적 연구결과 ITS 구간은 본 속의 유용한 계통분석 마커로 확인되었으며, 연구결과를 바탕으로 아래와 같이 두 분류군에 대하여 분류학적 처리를 수행하였다.

Taxonomic treatment

Chrysosplenium sphaerospermum Maxim. in Bull. Acad. Imp. St.-Petersbourg 23:349 (1877).

Chrysosplenium multicaule Franch. et Sav., Enum. Pl. Jap. 2:361. (1877).

Chrysosplenium vidalii Franch. et Sav., Enum. Pl. Jap. 2:361 (1878).

Chrysosplenium barabatium Nakai in Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 13:273 (1914).

Chrysosplenium hallaisanense Nakai in Repert. Spec.

Nov. Regni Veg. 13:273 (1914).

Chrysosplenium fulvum Terracc. in Bull. Soc. Bot. Genève, Ser. 2, 7, 156 (1915).

Chrysosplenium pilosum Maxim. var. *sphaerospermum* (Maxim.) H. Hara in Jour. Fac. Sci. Univ. Tokyo sect. 3, Bot. 7:50 (1957).

Chrysosplenium pilosum Maxim. var. *fulvum* (Terracc.) H. Hara in Jour. Fac. Sci. Univ. Tokyo sect. 3, Bot. 7:50 (1957).

국명: 큰괭이눈(Keun-gwaeng-i-nun)

논의: 한국산 괭이눈속 중 *C. pilosum* complex 집단에 대하여 학자간의 많은 이견이 있으며, 최근의 연구에서 한국에 분포하는 *C. pilosum* complex 는 *C. pilosum* var. *fulvum*과 *C. pilosum* var. *valdepilosum* 2분류군으로 보고한 바 있다(Chung and Kim, 1988; Kim, 2007). *Chrysosplenium pilosum* var. *sphaerospermum* Maxim. 과 *C. pilosum* var. *fulvum*은 Hara(1957)에 의해 별개의 분류군으로 인식되어 왔으며, 한국에는 *C. pilosum* var. *fulvum*이 분포하고 일본에는 두 분류군이 모두 분포하는 것으로 알려져 왔다. 그러나 최근 연구결과에서 두 분류군이 외부형태적으로 큰 차이가 없다고 언급하며, *C. pilosum* var. *sphaerospermum*(Maxim.) Hara의 이명으로 처리하고 있다(Iwatsuki et al., 2001). 본 연구에서도 정확한 학명의 사용을 위하여 한국과 일본의 여러 표본관에서 두 분류군의 표본을 검토하고, *C. pilosum* var. *fulvum*의 기준표본과 type locality에서 채집된 *C. pilosum* var. *sphaerospermum*의 표본을 확인하고, ITS의 염기서열을 분석한 결과 본 분류군을 종으로 취급하는 것이 타당한 것으로 판단되어 본 분류군의 학명을 *C. sphaerospermum* Maxim.으로 사용하였다.

Examined species

Korea, Gangwon-do: Wonju-si, Mt. Chiaksan, 1 May. 2010, *S.H. Kang et al.* 2010079 (NMR). **Gyeonggi-do:** Gapyeong-gun, Mt. Myeongjisan, 21 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009063-2009064 (NMR); Gunpo-si, Mt. Surisan, 22 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009070-2009071 (NMR); Namyangju-si, Mt. Cheonmasan, 22 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009068-2009069 (NMR); Pocheonsi, Gwangneung, 1 May. 2009, *S.H.*

Kang et J.W. Han 2009082-2009084 (NMR), 27 Apr. 1913, *Nakai*, 00022134 (Syntype of *C. barbatum*, TI). **Gyeongsangnam-do:** Goheung-gun, Mt. Bongnaesan, 8 Apr. 2010, *S.H. Kang et al.* 2010040-2010041 (NMR); Yangsan-si, Mt. Cheonseongsan, 11 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009056 (NMR). **Gyeongsangbuk-do:** Cheongsong-gun, Bohyeonsan, Mt. 1 Jul. 2006, 60327-60329 (KWNU); Gunwi-gun, Mt. Palgongsan, 11 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009057-2009057 (NMR); Gimcheon-si, Mt. Sudosan, 22 Mar. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009035-2009035 (NMR); Bonghwa-gun, Mt. Cheongnyangsan, 30 Apr. 2010, *S.H. Kang et al.* 2010068 (NMR); Yecheon-gun, Yongmunsan, 15, Apr. *S.H. Kang et J.W. Han* 2009025 (NMR). **Jeollanam-do:** Gurye-gun, Mt. Baegunsan, 3 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009046 (NMR); Jangseong-gun, Mt. Naejangsan, 20, Mar. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009027-2009030 (NMR); Jangheung-gun, Mt. Guksabong, 21 Mar. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009031-2009034 (NMR). **Jeollabuk-do:** Muju-gun, Mt. Deogyusan, 24 Apr. 2007, *Kim et al.*, *KHB1183002* (KH); Iksan-si, Mt. Mireuksan, 27 Mar. *S.H. Kang et J.W. Han* 2009040-2009041 (NMR); Jangsu-gun, Mt. Pyomoksan, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009047-2009048 (NMR); **Jeju-do:** Jeju-si, Mt. Muljaroreum, 11, Mar. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009044-2009045 (NMR); Jeju-si, Mt. Hallasan, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009094-2009095 (NMR), 17 Apr. 1907, *U. Faurie*, 000222134, (Lectotype of *C. hallaisanens*, TI); Jeju-si, Mt. Barimeoreum, 16 May. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009087 (NMR). **Chungcheongnam-do:** Seosan-si, Mt. Dobisan, 27 Mar. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009037-2009039 (NMR); Asan-si, Mt. Gwangdeoksan, 28 Mar. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009042-2009043 (NMR). **Chungcheongbuk-do:** Yeongdong-gun, Mt. Samdobong, 12 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009059-2009060 (NMR); Cheongju-si, Mt. Seondosan, 18 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009061-2009062 (NMR); Chungju-si, Baegun-myeon, 9 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009049 (NMR).

Japan: Honshu: Mikawa, 6 May. 1955, *Kazuo Insmi*, 14051 (TI); Saitama, Chichibugun, Otakimura, Kawamata, 23 May. 1989, *Akinari Yokota*, 992 (TI); Nagano, 21 May. 1979, *S. Terabayashi & T. Yahara*, 35 (TI); Gifu, 1 Apr. 1996, *Hiroshi Takahashi*, 16464 (KYO); Gumma, 19 Apr. 2005, *Kazuaki Masuda*, 3277 (KYO); Kyoto, 12 Mar. 1999, *S. Tsugaru & T. Takahashi*, 27323 (KYO); Nagano, 25 May. 1963, *M. Jotta*, 12219 (KYO). **Kyushu:** Miyasaki, Mt. Wanizuka, 8 May. 1927, *Kaneloshi Kondo* (TI); Hizen, Mt. Unzen, 23 May. 1929, *S. Saito s.n.* (TI).

Chrysosplenium valdepilosum (Ohwi) S.H. Kang & J.W. Han, *comb. et stat. nov.*

Basionym: *Chrysosplenium pilosum* Maxim. var. *valdepilosum* Ohwi in Fedde, Report. 36:52 (1934). **Type:** Korea, Kannan, Gempori, 26 Jun. 1932, *Ohwi*, 565 (holotype, Kyo).

국명: 금괭이눈(Geum-gwaeng-i-nun)

논의: *C. pilosum* var. *valdepilosum*은 Ohwi에 의해 처음 보고 된 이후 대부분의 학자에 의해 변종으로 인식되어왔다. 그러나 종자의 관찰과 ITS 염기서열 분석결과 종자의 형태는 *C. pilosum*과 *C. sphaerospermum*이 뚜렷한 능각을 형성하는데 비해 본 분류군은 희미하게 능각이 형성되어 큰 차이를 보였으며, ITS염기서열 분석결과 본 분류군의 원종으로 인식되었던 *C. pilosum*과는 자매군의 형성하고 *C. sphaerospermum*과 단계원을 형성하며 서로 다른 진화계열을 보였다. 또한 유연관계가 깊은 *C. sphaerospermum*과는 유전적거리가 3.338-3.992로 다른 분류군의 종내 유전적 거리 0.003-1.881에 비해 큰 차이를 보였다. 따라서 별개의 종으로 인식하는 것이 타당한 것으로 판단되어 계급변경을 하였다.

Examined species

Korea, Gangwon-do: Wonju-si, Mt. Baegunsan, 20 May. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009050-2009051 (NMR); Wonju-si, Mt. Chiaksan, 14 Apr. 1974, 7114 (KWNNU); Inje-gun, Mt. Seoraksan, 24 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 200907-2009076 (NMR), 31 Jul. 1957, *T.B. Lee*, 7117 (KH); Jeongseon-gun, Mt. Geumdaebong,

25 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009073-2009074 (NMR); Cheorwon-gun, Mt. Bokjusan, 30 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009079-2009080 (NMR); Pyeongchang-gun, Mt. Odaesan, 25 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009072 (NMR); Hwacheon-gun, Mt. Hwaaksan, 1 May. 1977, 7119 (KWNNU); **Gyeonggi-do:** Gapyeong-gun, Mt. Myeongjisan, 19 May. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009088-2009089 (NMR). Namyangju-si, Mt. Cheonmasan, 22 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009067 (NMR). **Gyeongsangbuk-do:** Gyeongju-si, Mt. Danseoksan, 11 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009052-2009053 (NMR); Gunwi-gun, Mt. Palgongsan, 11 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009054-2009055 (NMR); Bonghwa-gun, Mt. Munsusan, 28 Apr. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009077-2009078 (NMR). **Chungcheongbuk-do:** Chungju-si, Mt. Woraksan, 28 May. 2009, *S.H. Kang et J.W. Han* 2009096-2009097 (NMR) **China:** Shensi, Kwanshan, 3 Jun. 1936, 1121439, (PE).

요 약

괭이눈속 식물에 대한 계통 유연관계를 알아보기 위하여 핵 rDNA의 internal transcribed spacer(ITS) 지역에 대한 염기서열을 분석하였다. 5.8s를 포함한 ITS 염기서열은 647-653 bp로 그중 219개의 염기에서 유전적 다양성을 나타내었다. 정렬된 염기서열은 bootstrap을 포함한 parsimony 방법과 neighbor-joining 방법을 통하여 계통수를 평가하였다. 그 결과 *C. pseudofauriei*(선괭이눈)이 군내군의 가장 기부에 분계조를 형성하였고, Ser. *Pilosa* and Ser. *Oppositifolia*와 Ser. *Alternifolia* and Ser. *Flagellifera*가 높은 bootstrap 값으로 두 개의 분계조를 각각 형성하였다. Neighbor-joining 분석의 결과도 일치하였다. 본 연구결과 핵 rDNA의 ITS 염기서열 분석은 괭이눈속의 계통학적 연구에 유용한 마커로 확인되었으며, 최종적으로 ITS 염기서열과 종자 형태형질을 바탕으로 *C. sphaerospermum* Maxim. and *C. valdepilosum* (Ohwi) S.H. Kang & J.W. Han에 대한 분류학적 검토를 하였다.

인용문헌

- Baldwin, B.G., M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski, C.S. Campbell 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.
- Buss, C.C., T.G. Kammers and R.R. Wise. 2001. Seed coat morphology and its systematic implications in *Cyanea* and other genera of Lobelioidae (Campanulaceae). *American J. Bot.* 88(7):1301-1308.
- Chung, T.H. 1965. Illustrated encyclopedia of Fauna & Flora of Korea. Vol. 5. Tracheophyta. Genus *Chrysosplenium*. Ministry of Education. Seoul, Korea. pp. 497-483.
- Chung, T.H., B.S. To, D.B. Lee and H.J. Lee. 1937. Genus *Chrysosplenium* In *Nomina plantarum Koreanum*. Chosen Nat. Hist. Inst., Seoul, Korea. pp. 80-81.
- Chung, Y.H. and Y.D. Kim, 1988. Monographic Study of Endemic Plants in Korea X. Taxonomy and Interspecific Relationship of the Genus *Chrysosplenium*. *Korean J. Environ. Biol.* 6(2):33-63.
- 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. Kallersjo, 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* 36:789-791.
- Forbes, F.B. and W.B. Hemsley. 1887. An enumeration of all the plants known from China proper, Formosa, Heinan, Corea, the Luchu Archipelago and Island of Hong Kong. *J. Linn. Soc. Bot.* 23:271.
- Franchet, A.R. 1890. Monographie du genre *Chrysosplenium* Tournfort. *Nouv. Arch. Mus. Hist. Nat. Paris III.* 2:87-114.
- Gibson, T., D. Higgings and J. Thompson. 1994. Clustal X program. EMBL., Heidelberg, Germany.
- Han, J.W., S.G. Yang, H.J. Kim, C.G. Jang and S.H. Kang. 2010. Morphological characteristics and distribution of Korean endemic *Chrysosplenium flaviflorum* Ohwi. *Korean J. Plant Res.* 23(5):480-485 (in Korea).
- Hara, H. 1957. Synopsis of Genus *Chrysosplenium* L. J. Fac. Sci. Univ. Tokyo, Bot. 7:1-90.
- Iwatsuki, K., D. Boufford, and H. Ohba. 2001. *Chrysosplenium* L. In *Flora of Japan*, Vol. IIb. Kodansha, Tokyo, Japan. pp. 58-70.
- Kato, K. and T. Shimizu. 1989. Microstructure of seed surfaces and classification of the Genus *Chrysosplenium* from Japan, Annual report of Botanic Garden, Faculty of Science, Kanazawa University. 12:1-50.
- Kim, K.J. and R.K. Jasen. 1994. Comparisons of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*, Asteraceae): Additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Plant Syst. Evol.* 190:157-185.
- Kim, Y.D. 2007. Saxifragaceae. In *Flora of Korea* Editorial Committee (eds.). The Genera of Vascular Plants of Korea, Academy Publishing Co., Seoul, Korea.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rays of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Lee, T.B. 1976. Vascular plants and their uses in Korea. *Bull. Kawnak Arb.* 1:1-137.
- Lee, W.T. 1996a. Standard Illustration of Korean Plants. Academy Press, Seoul, Korea.
- Lee, Y.N. 1996b. *Flora of Korea*. Kyohak Publishing Co, Seoul, Korea.
- Linne, C. 1753. *Species Plantarum*. p. 398.
- Maximowicz, C.J. 1877. *Diagnosis plantarum novarum asiaticarum* scripsit. *Bull. Acad. Sci. St. Petersburg.* 23:340-350.
- Nakai, T. 1909. *Flora Koreana* I. J. Coll. Sci. Univ. Tokyo. 26:220.
- Orndruff, R. 1978. Reproductive characters and taxonomy. *Systematic Botany* 3(4):420-427.
- Palibin, J. 1898. *Conspectus florum Koreae. Pars Prima.* Acta. Horti. Petropol. p. 90.
- Pan, J. 2001. *Chrysosplenium* L. In Wu, Z.Y. & P.H. Raven (eds.). *Flora of China*, Vol. 8. Science Press and Missouri Botanical Garden Press, Beijing and St. Louis. pp. 346-358.
- Park, M.K. 1949. Genus *Chrysosplenium*. In *An enumeration of Korean plants*. Ministry of Education. Seoul, Korea. pp. 83-85.
- Park, M.K. 1974. Genus *Chrysosplenium*. In *Keys to the Herbaceous plants in Korea (Dicotyledoneae)*. Chungeumsa. Seoul, Korea. pp. 208-210.
- Rejdali, M. 1990. Seed morphology and taxonomy of the North African species of *Sideritis* L. (Lamiaceae). *J. Linn. Soc. Bot.* 103:317-324.
- Sa, R., D. Su, and Z. Debreczy, 2010. Taxonomic notes on the *Hedysarum gmelinii* complex (Fabaceae). *Ann. Bot. Fennici.* 47:51-58.

- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new for reconstructing phylogenetic tree, *Molec. Bio. Evol.* 4:406-425.
- Sang, T., D.J. Crawford, T.F. Stuessy and O.M. Silva. 1995. ITS sequences and the phylogeny of the genus *Robinsonia* (Asteraceae). *Syst. Bot.* 20:55-64.
- Sharma, S.K., C.R. Babu, B.M. Johri and A. Hepworth. 1997. SEM studies on seed coat patterns in *Phaseolus mungo-radiatus-sublobatus* complex. *Phytomorphology* 27: 106-111.
- Soltis, D.E., M. Tago-Nakazawa, Q.-Y. Xiang, S. Kawano, J. Murata, M. Wakabayashi and C. Hibsich-Jetter. 2001. Phylogenetic relationships and evolution in *Chrysosplenium* (Saxifragaceae) based on matK sequence data. *Am. J. Bot.* 88:883-893.
- Sponberg, G.L. 1972. The genera of Saxifragaceae in the southeastern United States. *J. Arnold Arb.* 53:409-494.
- Suh, Y., L.B. Thien, H.E. Reeve and E.A. Zimmer. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *Am. J. Bot.* 80:1042-1055.
- Swofford, D.L. 1988. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods. Version 4.02b Sinauer Asso. Inc., Massachusetts, USA.
- Wen, J. and E.A. Zimmer. 1996. Phylogeny and biogeography of *panax* L. (the Ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6:166-177.
- (접수일 2011.2.15; 수정일 2011.5.3; 채택일 2011.5.17)

Table 3. Pairwise sequence divergence values ($\times 100$) of ITS regions based on Kimura's two parameter method

	CFSE1	CFSE2	CFLV1	CFLV2	CPIL	CSPH1	CSPH2	CSPH3	CSPH4	CSPH5	CVAL1	CVAL2	CVAL3	CVAL4	CJAP1	CJAP2	CJAP3	CJAP4	CALT	GRAM	CFGL1	CFGL2	PELT	MILT	ASTI	SAXF	
CFSE1	-																										
CFSE2	0.775	-																									
CFLV1	15.063	15.253	-																								
CFLV2	14.882	15.054	0.003	-																							
CPIL	15.142	15.312	5.290	5.294	-																						
CSPH1	13.280	13.450	4.647	4.635	5.618	-																					
CSPH2	13.096	13.266	4.483	4.490	5.451	0.154	-																				
CSPH3	13.292	13.461	4.649	4.655	5.618	0.309	0.154	-																			
CSPH4	13.287	13.455	4.647	4.654	5.616	0.309	0.154	0.309	-																		
CSPH5	13.590	13.554	5.153	5.156	5.985	1.727	1.569	1.727	1.727	-																	
CVAL1	13.872	14.040	5.300	5.306	6.125	3.828	3.666	3.830	3.501	4.493	-																
CVAL2	13.874	14.041	5.468	5.474	6.296	3.990	3.828	3.992	3.662	4.661	0.465	-															
CVAL3	13.689	13.856	5.134	5.140	5.956	3.664	3.503	3.666	3.338	4.329	0.155	0.310	-														
CVAL4	13.903	14.072	5.147	5.155	6.136	3.833	3.670	3.834	3.505	4.505	0.311	0.465	0.155	-													
CJAP1	12.910	12.691	11.731	11.558	11.475	10.071	9.894	10.078	10.075	10.697	10.269	10.809	10.447	10.646	-												
CJAP2	11.639	11.426	10.600	10.431	10.550	8.977	8.802	8.981	8.981	9.577	9.891	10.071	9.715	9.913	1.722	-											
CJAP3	12.974	12.753	11.748	11.576	11.690	10.278	10.099	10.282	10.282	10.901	10.852	11.395	11.031	11.233	0.782	1.564	-										
CJAP4	13.106	12.885	11.920	11.746	11.663	10.254	10.077	10.261	10.258	10.885	10.455	10.956	10.633	10.833	0.154	1.881	0.937	-									
CALT	12.709	12.494	11.145	10.973	11.086	9.507	9.329	9.508	9.508	9.940	10.423	10.606	10.248	10.447	2.361	1.090	2.357	2.517	-								
GRAM	14.246	14.621	8.977	8.992	9.140	8.439	8.265	8.442	8.443	8.851	8.445	8.802	8.449	8.633	12.999	11.536	13.033	13.190	12.253	-							
CFGL1	15.624	15.397	14.537	14.525	14.851	12.425	12.240	12.428	12.426	14.143	14.528	14.149	14.363	9.294	8.771	9.486	9.302	9.245	14.683	-							
CFGL2	15.223	14.997	14.145	14.145	14.459	12.049	11.866	12.053	12.052	12.317	13.758	14.141	13.764	13.977	8.931	8.409	9.124	8.941	8.879	14.280	0.462	-					
PELT	21.459	21.697	20.614	20.646	21.255	20.318	20.112	20.332	20.323	20.646	21.031	20.809	20.824	20.449	18.475	18.213	19.309	18.267	18.867	19.736	19.430	18.986	-				
MILT	25.266	25.510	23.059	23.114	24.657	23.994	23.778	24.004	24.002	24.577	24.057	23.836	23.862	24.501	23.785	24.967	24.956	24.899	25.254	26.669	26.190	23.412	-				
ASTI	24.580	24.570	23.620	23.213	24.128	22.449	22.237	22.466	22.454	23.252	23.397	22.960	23.176	23.240	24.092	23.341	24.127	24.323	23.834	26.186	24.476	24.213	25.611	26.900	-		
SAXF	30.433	31.403	32.996	32.837	33.522	32.921	32.687	32.952	32.951	33.609	33.824	33.287	33.584	33.312	31.629	30.586	31.853	31.834	31.695	31.886	34.544	29.989	26.611	36.553	-		