



## A phylogenetic study of Korean *Iris* L. based on plastid DNA (*psbA-trnH*, *trnL-F*) sequences

HyunJung Lee and SeonJoo Park\*

Department of Life Science, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea  
(Received 9 May 2013; Revised 5 June 2013; Accepted 5 August 2013)

## Plastid DNA (*psbA-trnH*, *trnL-F*)의 염기서열에 의한 한국산 붓꽃속(*Iris* L.)의 계통분류학적 연구

이현정 · 박선주\*

영남대학교 이과대학 생명과학과

**ABSTRACT:** Molecular phylogenetic studies were conducted to evaluate taxonomic identities and relationships among 16 species of the Korean genus *Iris* L. Korean *Iris* was grouped by five clades. Series *Laevigatae*, *Tripetalae*, *Laevigatae* and *Sibiricae* was included to Clade I. Series *Chinensis*, and *Easatae* was composed to Clade II. Series *Chinensis* was included to Clade III. Series *Chinensis* was composed to Clade IV. Series *Crossiris*, *Pumilae* and *Pardanthopsis* was included to Clade V. *Iris dichotoma*, *I. mandshurica* and *I. tectorum* formed one clade, and it was located mostly in the basal group. *I. minutiaurea* and *I. koreana* was not formed independent clade, so it is not clear between them about taxonomic identities. *Iris tectorum* was established taxonomic system by Series *Cossiris* in Subgenus *Crossiris*. Series *Chinensis* (*I. odaesanensis*, *I. minutiaurea*, *I. koreana*, *I. rossii* var. *latifolia*, and *I. rossii*) was distinguished is clear by Series *Chinensis* (*I. odaesanensis*, *I. minutiaurea* and *I. koreana*) and Series *Chinensis* (*I. rossii* var. *latifolia* and *I. rossii*). The Genus *Iris* was divided into four subgenus (*Limniris*, *Crossiris*, *Iris* and *Pardanthopsis*). We thought that evolved to subgenus *Limniris* in subgenus *Crossiris*, *iris* and *Pardanthopsis*.

**Keywords:** *psbA-trnH*, *trnL-F*, *Iris*, Molecular phylogeny

**적 요:** 한국산 붓꽃속 16종과 1종의 외군을 대상으로 유연관계 및 분류학적 실체를 파악하기 위하여 분자계통학적 연구를 수행하였다. 연구결과, 한국산 붓꽃속은 5개의 Clade로 나타났으며, Clade I에는 Series *Laevigatae*, *Tripetalae*, *Laevigatae*, *Sibiricae*, Clade II에는 Series *Ruthenicae*, *Easatae*, Clade III에는 Series *Chinensis*, Clade IV에는 Series *Chinensis*, Clade V에는 Series *Crossiris*, *Pumilae*, *Pardanthopsis*로 나타났다. 대청부채, 만주붓꽃, 연미붓꽃은 하나의 단계통을 형성하여 가장 기저부에 위치하였고, 금붓꽃과 노랑붓꽃은 독립적인 분계조를 형성하지 못하여 두 종의 관계가 명확하지 않았다. 연미붓꽃은 *Crossiris*속의 *Crossiris*절로 분류체계를 설정하였다. *Chinensis*계열은 금붓꽃계열(노랑무늬붓꽃, 금붓꽃, 노랑붓꽃)과 각시붓꽃계열(넓은잎각시붓꽃, 각시붓꽃)로 뚜렷히 구분되었다. 붓꽃속은 크게 4아속(*Limniris*, *Crossiris*, *Iris*, *Pardanthopsis*)으로 나뉘지며, *Pardanthopsis*아속, *Iris*아속 그리고 *Crossiris*아속에서 *Limniris*아속으로 분화되는 경향성을 나타내었다.

**주요어:** *psbA-trnH*, *trnL-F*, 붓꽃속, 분자계통

\*Author for correspondence: [sjpark01@ynu.ac.kr](mailto:sjpark01@ynu.ac.kr)

<http://www.pltaxa.or.kr>

Copyright © 2013 the Korean Society of Plant Taxonomists

붓꽃속(*Iris* L.)은 Linneaus(1753)에 의해 설정되었으며, 다년생 초본으로서 APG II 분류 체계에 의하면 외떡잎식물군(monocots), 아스파라거스목(Asparagales), 붓꽃과(Iridaceae)에 속하는 식물이다(APG II, 2003). 전 세계에 300여종이 자생하고 있으며, 주로 북반구 지역을 중심으로 분포하고 있다(Yu et al., 2009). 서식지는 산야지의 개울가와 초지 등에 자생하는 것으로 알려져 있으며(Kim, 1998), 잎과 꽃이 관상 가치가 높아 동서양에서 원예종으로 개발되어 절화 및 분화로 재배되고 있다(Grey-Wilson, 1981; Mathew, 1981). 2012년 5월 환경부에 의해 노랑붓꽃(*I. koreana*), 대청부채(*I. dichotoma*), 솔붓꽃(*I. ruthenica*), 체비붓꽃(*I. laevigata*)은 멸종위기 종으로 지정되었으며, 한국 특산 식물로는 노랑붓꽃(*I. koreana*), 노랑무늬붓꽃(*I. odaesanensis*), 넓은잎각시붓꽃(*I. rossii* var. *latifolia*), 및 흰각시붓꽃(*I. rossii* for. *alba*)가 있다(Koh, 2003). 본 속 식물의 분류체계는 Lawrence (1953), Rodionenko(1961), Waddick(1992), Sim(1998, 2007) 등 여러 학자들에 의해 연구되었으며, 지하경의 종류와 화서의 종류, 화피편의 부속물의 유무와 부속물에 털 유무, 삭과와 종자의 형태 등의 특징으로 구분된다. 또한 분자계통학적인 연구로는 러시아산의 일부 붓꽃속(원예종 다수 포함)에 대한 분자계통학적 연구(Makarevitch et al., 2003)와 엽록체 DNA인 *matK* 유전자를 사용하여 subgenus *Iris*와 *Linniris*의 단계통 여부에 대한 연구(Carol, 2004) 등이 있다. 한국산 붓꽃속에 대한 연구로는 Palibin(1901)이 *I. rossii*, *I. ruthenica* var. *nana*, *I. ensata* var. *chinensis*, *I. sibirica* var. *orientalis*, *I. laevigata* var. *kaempferi* 1속 1종 4변종을 처음 기재로, Nakai(1911, 1914, 1952), Mori(1921), Lee(1976, 1979), Lee(1976, 1996) 등에 의해 단순보고 되었다. Sim(1988)은 붓꽃속 특징으로 잎은 선형 또는 검형이며, 꽃은 화경 끝에 단정화 또는 총상으로 붙고, 화색은 짙은 보라, 보라, 백색, 노란색이며, 내·외화피편은 6장으로 화피편이 짧거나 길고, 부속물의 유무와 자방은 3심피 3실로 중축태와 및 측생배주이며, 삭과는 타원형, 장타원형, 난형, 원형으로 3릉형 혹은 6릉형이며, 성숙시 포배개열을 하고, 종자는 반원형, 다면체형 등가종피의 유무로 구분 했다. 또한, 붓꽃속은 크게 4아속으로 나누었으며, 외화피편에 부속물이 없는 *Linniris*아속, 외화피편에 계관상 돌기가 있는 *Crossiris*아속, 다세포 혹은 단세포의 털이 있는 *Iris*아속, 외화피편에 부속물이 없고, 화경은 수회 둘로 분지하는 *Pardanthopsis*아속으로 분류하였으며, 아속을 다시 9개의 Series (*Laevigatae*, *Tripetalae*, *Sibiricae*, *Ruthenicae*, *Ensatae*, *Chinensis*, *Crossiris*, *Pumilae*, *Pardanthopsis*)로 세분 하기도 하였다. 심(2002),은 ITS염기서열을 결과로 한국산 붓꽃속을 3아속(*Linniris*, *Crossiris*, *Pardanthopsis*) 또는 2속, 1아속으로 분류한 바 있으며, 박(2002)은 한국산 붓꽃속에 대한 계통학적 연구에서 심(2002)과 비슷한 결론을 제시한 바 있다.

본 속 식물에서 문제가 되고 있는 대청부채의 경우 화서에 꽃이 많이 달리고, 꽃의 수명이 매우 짧으며 화피통은 거의 없는 특징을 바탕으로 독립된 속(Lenz, 1972; Mathew, 1981)으로 분류하기도 하며, 한편으로는 화서는 규칙적으로 분지하며 종자에 가종피가 있는 특징으로 붓꽃의 *Pardanthopsis*아속(Rodionenko, 1961; Sim, 1988; Zhao, 1992; Waddick, 1992)으로 분류체계를 설정하기도 한다. 또한, 계관상돌기를 가지고 있는 연미붓꽃에 대해 Rodionenko(1961)와 Sim(1988)은 *Crossiris*아속의 *Crossiris*절로 설정하였고, Waddick(1992)은 *Linniris*아속의 *Crossiris*절로 설정하여 분류체계에 혼돈이 있어왔다. 일부 종에 있어 논란이 되는 금붓꽃계열(금붓꽃, 노랑붓꽃, 노랑무늬붓꽃)과 각시붓꽃계열(각시붓꽃, 넓은잎각시붓꽃)에 대해 하나의 계열(Rodionenko, 1961) 혹은 독립된 계열로 나누어야 한다는 견해가 있다(Sim, 1988). 또한, 금붓꽃과 노랑붓꽃의 경우 Lee(1996)는 형태학적으로 동일종으로 보았으며, Sim(1988)은 금붓꽃은 1개의 꽃이며, 노랑붓꽃은 항상 2개의 꽃이 핀다고 하여 각각 독립된 종으로 취급하였다. 이상과 같이 학자들 마다 분류체계 및 종의 실체에 이견이 있어 이 문제를 해결하고자 분자적인 방법을 이용하였다. 본 연구에서는 chloroplast DNA의 *psbA-trnH*, *trnL-F* 지역을 이용하였으며, non-coding 지역은 coding 지역보다 빠르게 진화하며 염기치환과 같은 비율로 삽입과 결실이 축적되어 중간 또는 속간의 계통유연관계를 파악하는데 유용한 자료로 이용(Curtis and Clegg, 1984; Palmer et al., 1988; Soltis et al., 1992)되고 있다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구를 위해 사용된 재료는 2011년 9월부터 2012년 12월까지 국내 자생지에서 채집한 것을 사용하였다. 일부 개체는 표본으로 제작하여 영남대학교 생명과학과 식물표본관(YNUH)에 소장시켰으며, 채집하지 못한 재료는 국립수목원 식물표본관(KH), 강원대학교(KWNU)에 소장된 표본을 이용하였다. 연미붓꽃은 Sim(1986)에 의해 국내 미기록종으로 지리산에서 분포한다고 하였지만 현재 분포지 미확인으로 Park(2002)의 선행연구와 비교를 위해 국외 표본(P)을 사용하였으며, 체비붓꽃은 분포지 미확인으로 본 연구에서 제외시켰다. 외국으로 Park(2002)의 선행연구에 의해 붓꽃속과 유연관계가 가까운 등심붓꽃속의 등심붓꽃(*Sisyrinchium angustifolium* Mill.)을 선정하였다(Table 1).

### Total DNA 추출과 증폭

DNA 추출은 생체 또는 건조표본을 이용하여 Precellys® 24 Homogeniser (Bertin Technologies, France)를 이용하여 분쇄시킨 후, Dolye and Dolye(1987)의 CTAB 방법을 수정한 Loockerman and Jansen(1996)의 방법으로 추출하였다. 전체 *psbA-trnH* 지역의 증폭은 primer *psbAF*와 *trnHR* (Sang et al.,

**Table 1.** List of *Iris* samples used in this study.

Taxon	Abbreviation	Voucher	Locality	GenBank accession no.	
				<i>psbA-trnH</i>	<i>trnL-F</i>
<i>I. dichotoma</i> Pall. (대청부채)	IDP	LEE02 (YNUH)	Ongjin-gun, Incheon		
<i>I. ensata</i> var. <i>spontanea</i> (Makino) Nakai (꽃창포)	IEN	LHJ004 (YNUH)	Daegu-si, Gyeongsangbuk-do	KF170866	KF170889
<i>I. koreana</i> Nakai (노랑붓꽃)	IKN	80411 (KH)	Jangseong-gun, Jeollanam-do	KF170858	KF170868
<i>I. koreana</i> Nakai (노랑붓꽃)	IKN01	NCBI		KF170851	KF170878
<i>I. lactea</i> var. <i>chinensis</i> (Fisch.) Koidz. (타래붓꽃)	ILK	020 (YNUH)	Daegu-si, Gyeongsangbuk-do		EU939479
<i>I. mandshurica</i> Maxim. (만주붓꽃)	IMM	0222 (KH)	Jilin-province, China	KF170863	KF170872
<i>I. minutiaurea</i> Makino (금붓꽃)	IM1	8051616 (KH)	Jeongseon-gun, Gangwon-do	KF170844	KF170890
<i>I. minutiaurea</i> Makino (금붓꽃)	IM2	075416 (KWNU)	Gapyeong-gun, Gyeonggi-do	KF170852	KF170881
<i>I. odaesanensis</i> Y.N. Lee (노랑무늬붓꽃)	IOY1	0362 (KH)	Cheongsong-gun, Gyeongsangbuk-do	KF170853	KF170882
<i>I. odaesanensis</i> Y.N. Lee (노랑무늬붓꽃)	IOY2	110075 (KH)	Jeongseon-gun, Gangwon-do	KF170854	KF170879
<i>I. pseudacorus</i> L. (노랑꽃창포)	IPL01	LHJ04 (YNUH)	Busan-si, Gyeongsangnam-do	KF170855	KF170880
<i>I. pseudacorus</i> L. (노랑꽃창포)	IPL02	090527032 (KH)	Kwangju-si, Jeollanam-do	KF170859	KF170869
<i>I. pseudacorus</i> L. (노랑꽃창포)	IPL03	LHJ001(YNUH)	Daegu-si, Gyeongsangbuk-do	KF170860	KF170870
<i>I. rossii</i> Baker (각시붓꽃)	IRB	027 (YNUH)	Seongju-gun, Gyeongsangbuk-do	KF170861	KF170871
<i>I. rossii</i> var. <i>latifolia</i> J.K. Sim & Y.S. Kim (넓은잎각시붓꽃)	IRL	63126 (KH)	Gongju-si, Chungcheongnam-do	KF170847	KF170877
<i>I. ruthenica</i> var. <i>nana</i> (솔붓꽃)	IRK	21111 (KH)	Jecheon-si, Chungcheongbuk-do	KF170848	KF170876
<i>I. sibirica</i> L. (시베리아붓꽃)	ISI	NCBI		KF170862	KF170873
<i>I. sanguinea</i> Donn ex Horn (붓꽃)	ISD1	063104 (KWNU)	Chuncheon-si, Gangwon-do		AF480405 AF480383
<i>I. sanguinea</i> Donn ex Horn (붓꽃)	ISD2	LHJ03 (YNUH)	Busan-si, Gyeongsangnam-do	KF170849	KF170883
<i>I. setosa</i> Pall. ex Link (부채붓꽃)	ISP01	0457 (KH)	Goseong-gun, Gangwon-do	KF170850	KF170884
<i>I. setosa</i> Pall. ex Link (부채붓꽃)	ISP02	LHJ02(YNUH)	Busan-si, Gyeongsangnam-do	KF170856	KF170885
<i>I. tectorum</i> Maxim. (연미붓꽃)	ITM01	LHJ01(YNUH)	Busan-si, Gyeongsangnam-do	KF170857	KF170886
<i>I. tectorum</i> Maxim. (연미붓꽃)	ITM02	2125 (KH)	Liuba county, China	KF170846	KF170887
<i>I. uniflora</i> var. <i>caricina</i> Kitag. (난장이붓꽃)	IUC1	73838(KWNU)	Inje-gun, Gangwon-do	KF170845	KF170888
<i>I. uniflora</i> var. <i>caricina</i> Kitag. (난장이붓꽃)	IUC2	0129 (KH)	Jeongseon-gun, Gangwon-do	KF170864	KF170874
<i>Sisyrinchium angustifolium</i> Mill. (등심붓꽃)	SAM	LEE01(YNUH)	Daegu-si, Gyeongsangbuk-do	KF170865	KF170875

1997)를 이용하였으며, *trnL-F* 지역의 증폭은 primer *trnC*, *trnF* (Pierre et al., 1991)를 이용하였다. *psbA-trnH*, *trnL-F* IGS 지역의 증폭을 위한 Polymerase Chain Reaction (PCR) 반응 용액의 조성은 주형 DNA 20-50 ng, 10X Diastar-*Taq* DNA buffer 2.5  $\mu$ L, 10 mM의 dNTPs mix 0.5  $\mu$ L, 10 pmol의 primer 각각 1  $\mu$ L, 2.5 unit의 Diastar-*Taq* DNA Polymerase 0.13  $\mu$ L (SolGent Co., Korea)에 total volume이 총 25  $\mu$ L가 되도록 증류수를 조정하여 첨가하였다. 조제된 PCR 반응 용액은

*psbA-trnH*의 경우 95°C에서 2분 동안 1차 initial denaturation을 한 후, denaturation은 95°C에서 20초, annealing 52°C에서 40초, 72°C에서 5분간 extension하였으며, *trnL-F* 지역의 경우, 95°C에서 2분 동안 1차 initial denaturation을 한 후, denaturation은 95°C에서 20초, annealing 56°C에서 40초, 72°C에서 5분간 extension하였다. 염기서열 분석은 automatic DNA analyzer system ABI PRISM 3730xl analyzer (Sol Gent Co., Korea)를 이용하였다.

## 계통학적 분석

계통학적 분석으로 forward와 reverse 방향의 각 염기서열들은 Geneious pro v5.6 (Drummond et al., 2011)로 조합하였다. 정렬된 염기서열은 PAUP\* ver. 4.0b10 (Swofford, 2003)을 이용하여 Maximum parsimony (MP)을 수행하였다. Maximum parsimony (MP) 분석방법으로는 Heuristic search을 이용하였으며, option은 1000회 random addition sequence과 TBR branch-swapping algorithm을 적용하였고, Multrees 효과를 가지도록 수행하였다. 또한, 각 분계도의 지지 정도를 알아보기 위하여 Bootstrap (Felsenstein, 1985)과 Jackknife (Farris et al., 1996)를 이용하였다. 이러한 분석방법은 무작위로 1000회 반복하였으며 이를 통해 계통수를 찾아내어 Consistency Index (CI; Kluge and Farris, 1969)와 Retention Index (RI; Farris, 1989)를 구하였으며, nrDNA ITS와 combine data를 얻기 위해 Park(2002)의 Sequence data를 사용하였다. 또한, Bayesian Inference(BI) 방법을 이용하여 계통수를 작성하였다. 분석을 위해 MrBayes 3.1.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003)을 이용하였으며, 이때 GTR 진화모델(Tavar, 1986)을 적용하였다. Markov chain Monte Carlo (MCMC)는 random tree에서 5,000,000 generation을 반복하였으며, 500,000

generation을 burn-in으로 제거하였다(Page, 1996).

## 결 과

### 1. 염기서열의 특징

cpDNA인 *psbA-trnH* 지역을 정렬하여 분석한 결과, 전체 구간의 길이는 521-563 bp로 나타났다. 솔붓꽃이 521 bp로 가장 짧게 나타났으며, 등심붓꽃이 563bp로 가장 길게 나타났다. 정렬된 염기서열 563bp 중 523개는 염기서열 변화가 없었고, 26개가 염기서열 변화가 있었다. 변화가 있었던 염기서열 중 parsimony informative character는 14개로 나타났다. 또한 염기 조성의 평균은 A가 30.3%, C가 18.5%, G가 18.6%, T가 32.5%였고, DNA의 구조 및 물리적 특성을 결정하는 G+C의 함량은 전체적으로 약 37.1%로 계산되었다(Table 2). Intron과 exon을 포함한 *trnL-F* 지역 염기서열의 길이는 694-715bp로 나타났고, ingroup에서 길이가 가장 짧은 분류군은 대청부채로 694bp였으며, 가장 긴 분류군은 715bp로 꽃창포, 노랑붓꽃, 타래붓꽃, 금붓꽃, 노랑꽃창포, 솔붓꽃, 붓꽃, 부채붓꽃, 난장이붓꽃, 등심붓꽃으로 나타났다. 정렬된 전체 염기서열 715bp 중 674개는 변화가 없었

**Table 2.** Size and G+C% of *psbA-trnH*, *trnL-F* of *Iris*.

Taxon abbreviation	<i>psbA-trnH trnL-F</i>			
	length(bp)	C+G(%)	length(bp)	C+G(%)
<i>I. ruthenica</i> var. <i>nana</i> IRK	521	37.4	715	32.4
<i>I. lactea</i> var. <i>chinensis</i> ILK	531	37.1	715	32.0
<i>I. rossii</i> IRB	545	37.1	714	32.5
<i>I. sanguinea</i> ISD1	545	37.1	715	32.5
<i>I. sanguinea</i> ISD2	545	37.1	715	32.5
<i>I. pseudacorus</i> IPL01	546	37.4	715	33.0
<i>I. pseudacorus</i> IPL02	546	37.4	715	33.0
<i>I. pseudacorus</i> IPL03	546	37.4	715	33.0
<i>I. dichotoma</i> IDP	548	36.8	694	31.9
<i>I. ensata</i> var. <i>spontanea</i> IEN	549	37.5	715	32.8
<i>I. odaesanensis</i> IOY01	559	37.0	703	31.4
<i>I. odaesanensis</i> IOY02	559	37.0	703	31.4
<i>I. setosa</i> ISP01	559	37.6	715	32.6
<i>I. setosa</i> ISP02	559	37.6	715	32.6
<i>I. koreana</i> IKN	552	36.8	715	31.7
<i>I. mandshurica</i> IMM	552	36.4	701	31.6
<i>I. uniflora</i> var. <i>caricina</i> IUC1	553	36.5	715	32.2
<i>I. uniflora</i> var. <i>caricina</i> IUC2	553	36.5	715	32.2
<i>I. rossii</i> var. <i>latifolia</i> IRL	554	37.0	709	32.5
<i>I. tectorum</i> ITM01	559	37.0	701	31.3
<i>I. tectorum</i> ITM02	559	37.0	701	31.3
<i>I. minutiaurea</i> IM01	560	37.5	715	31.7
<i>I. minutiaurea</i> IM02	560	37.5	715	31.7
<i>S. angustifolium</i> SAM	563	37.3	715	31.8

고, 22개는 변화가 있었다. 변화가 있었던 염기서열 중 parsimony informative character는 19개로 나타났다. 또한 염기 조성 평균은 A가 30.0%, C가 15.9%, G가 18.4%, T가 35.7%였고, G+C의 함량은 32.2%로 계산되었다(Table 2.). *psbA-trnH* 그리고 *trnL-F*지역을 유합한 염기서열의 길이는 1270-1277bp로 나타났다. 대청부채가 1270bp로 가장 짧게 나타났다. 총 염기서열 1277bp 중 1168개는 변화가 없었고, 76개는 변화가 있었다. 이 중 parsimony informative character는 33개로 나타났다. 또한 염기 조성의 평균은 A가 30.2%, C가 17.0%, G가 18.7%, T가 34.1%였고, G+C의 함량은 전체적으로 약 35.7%로 계산되었다.

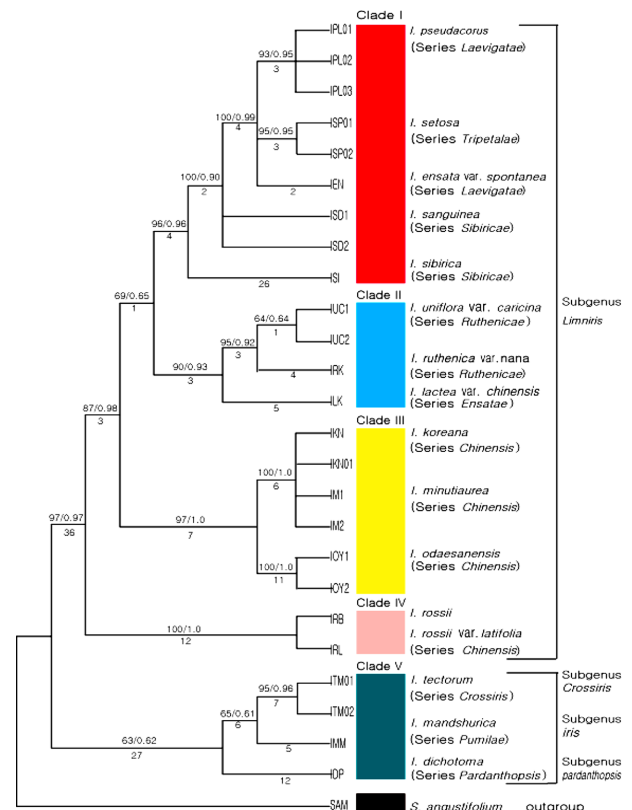
**2. 염기변이**

Kimura's two parameter method를 이용한 분류군 간 유전적거리(Pairwise distance)를 계산한 결과 *psbA-trnH* 지역과 *trnL-F* 지역을 유합한 결과 24개체의 염기변이는 외군을 포함하여 0-0.0416로 높게 나타났으며, 외군을 제외한 23개체의 염기변이는 0-0.039로 낮게 나타났다. 외군을 포함한 자료에서 염기서열의 변이가 없는 분류군은 각시붓꽃과 넓은잎각시붓꽃이었으며, 가장 높은 변이를 보이는 것은 금붓꽃과 등심붓꽃이었다. 내군에서는 노랑무늬붓꽃과 대청부채가 0.0307로 가장 높은 염기변이를 보였다(Table3).

**3. 분자계통학적 분석**

*psbA-trnH*, *trnL-F* 지역을 유합한 결과 MP (Maximum parsimony) tree는 133단계로 구성된 1개의 parsimony tree가 얻어졌으며, 계통학적 의미가 있는 부위만을 포함한 이들 계통수는 CI (Consistency Index)는 0.835, RI (Retention Index)는 0.901이었다. 분류군간 MP tree에서 clade V에는 대청부채, 만주붓꽃, 연미붓꽃이 가장 기부에 위치하여 하나의 분계조를 형성하였다. 대청부채의 경우 63% bootstrap값으로 만주붓꽃과 자매군을 형성하며, 만주붓꽃은 65% BS 값으로 연미붓꽃과 자매군을 형성하고 있다. clade IV는 넓은잎각시붓꽃과 각시붓꽃이 100% Bootstrap value로 하나의 단계통을 이루었고, clade III에는 노랑무늬붓꽃과 금붓꽃, 노랑붓꽃이 97%의 지지도로 분계조를 형성하였으며, 금붓꽃과 노랑무늬붓꽃은 97% Bootstrap value로 유연관계를 형성하였다. clade II에는 타래붓꽃, 솔붓꽃, 난장이붓꽃이 90% Bootstrap value로 분계조를 형성하였으며, 타래붓꽃은 90% BS 값으로 난장이붓꽃과 자매군을 형성하였고, 난장이붓꽃은 95% BS값으로 솔붓꽃과 자매군을 형성하였다. 또한, clade I에 시베리아붓꽃은 붓꽃, 꽃창포, 부채붓꽃, 그리고 노랑꽃창포와 96% Bootstrap value로 분계조를 형성하였으며, 꽃창포는 100% BS 값으로 부채붓꽃, 노랑꽃창포와 자매군을 형성하였다. 일부 붓꽃의 경우 독립된 분계조를 형성하지 못해 유전적 특성의 관계를 밝히는데 한계가 있었다(Fig. 1). Bayesian Inference

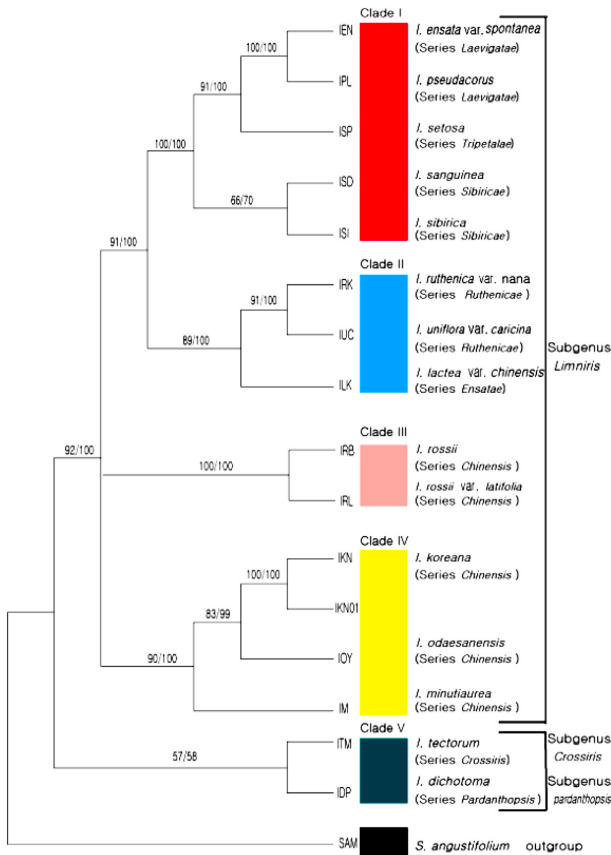
(BI)분석에서도 같은 양상을 보였다(Fig. 1). ITS지역(Park, 2002)과 *psbA-trnH* 및 *trnL-F*지역을 유합한 결과 MP tree는 3개의 parsimony tree가 얻어졌으면 계통학적 의미가 있는 부위만을 포함한 이들 계통수는 CI 는 0.789, RI는 0.580이었다. cpDNA를 유합한 tree와 동일하게 5개의 clade로 구성되었으며, Clade V에는 대청부채와 연미붓꽃은 비교적 낮은 57% BS와 58% JK값으로 가장 기저부에 위치하고 있으며, Clade IV에서 90% 높은 BS 값으로 금붓꽃, 노랑무늬붓꽃, 노랑붓꽃이 가까운 유연관계를 나타내고 있으며, 금붓꽃은 83% BS 값으로 노랑무늬붓꽃, 노랑붓꽃과 자매군을 형성하고 있다. Clade III에서는 100% BS, Jackknife값으로 넓은잎각시붓꽃과 각시붓꽃이 하나의 분계조를 형성하고 있다. Clade III, IV의 경우, *psbA-trnH*, *trnL-F*(Fig. 1)지역의 결과와 위치가 바뀐 형태로 나타났다. Clade II의 경우 89%의 높은 BS값으로 타래붓꽃, 난장이붓꽃, 솔붓꽃이 하나의 분계조를 형성하고 있었다. 타래붓꽃의 경우 91% BS 값으로 난장이붓꽃, 솔붓꽃과 자매군을 형성하고 있다. Clade I의 시베리아붓꽃은 66% BS 값으로 붓꽃과 분계조를 형성하였고, 부채붓꽃과는 자매군을 형성하고 있



**Fig. 1.** MP (strict consensus tree) and Bayesian tree (Length = 133, CI = 0.835, RI = 0.901) based on 26 phylogenetically informative changes in *psbA-trnH* and *trnL-F* sequences of 26 *Iris* taxa. The number of changes is indicated below branches and Bootstrap values / BI values are found above branches.

**Table 3.** Pairwise sequence divergence values( $\times 100$ ) of *psbA-trnH*, *trnL-F* region combine based on Kimura's two parameter method.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
IDP	-																								
IEN	0.0197	-																							
IKN	0.0236	0.0181	-																						
ILK	0.0189	0.0141	0.0188	-																					
IMM	0.0134	0.0267	0.0290	0.0244	-																				
IMI	0.0236	0.0180	0.0000	0.0188	0.0291	-																			
IM2	0.0236	0.0180	0.0000	0.0188	0.2907	0.0000	-																		
IOY01	0.0252	0.0220	0.0150	0.0212	0.0307	0.0150	0.0150	-																	
IOY02	0.0252	0.0220	0.0150	0.0212	0.0307	0.0150	0.0150	0.0000	-																
IPL01	0.0220	0.0040	0.0204	0.0149	0.0275	0.0203	0.0203	0.0227	0.0227	-															
IPL02	0.0220	0.0040	0.0204	0.0149	0.0275	0.0203	0.0203	0.0227	0.0227	0.0000	-														
IPL03	0.0220	0.0040	0.0204	0.0149	0.0275	0.0203	0.0203	0.0227	0.0227	0.0000	0.0000	-													
IRB	0.0189	0.0204	0.0235	0.0172	0.0244	0.0235	0.0235	0.0259	0.0259	0.0196	0.0196	-													
IRL	0.0189	0.0204	0.0235	0.0172	0.0244	0.0235	0.0235	0.0239	0.0259	0.0196	0.0196	0.0196	-												
IRK	0.0204	0.0141	0.0188	0.0094	0.0244	0.0188	0.0188	0.0196	0.0196	0.0149	0.0149	0.0196	0.0000	-											
ISD1	0.0165	0.0047	0.0149	0.0094	0.0220	0.0149	0.0149	0.0172	0.0172	0.0549	0.0549	0.0149	0.0182	0.0182	-										
ISD2	0.0165	0.0047	0.0149	0.0094	0.0220	0.0149	0.0149	0.0172	0.0172	0.0549	0.0549	0.0549	0.0157	0.0157	0.0110	0.0000	-								
ISP01	0.0220	0.0034	0.0204	0.0149	0.0275	0.0204	0.0204	0.0212	0.0121	0.0047	0.0047	0.0549	0.0157	0.0157	0.0110	0.0055	0.0055	-							
ISP02	0.0220	0.0034	0.0204	0.0149	0.0275	0.0204	0.0204	0.0212	0.0121	0.0047	0.0047	0.0549	0.0157	0.0157	0.0110	0.0055	0.0055	0.0000	-						
ITM01	0.0087	0.0204	0.0228	0.0197	0.0094	0.0228	0.0228	0.0244	0.0244	0.0212	0.0047	0.0047	0.0212	0.0212	0.0149	0.0157	0.0157	0.0212	0.0212	-					
ITM02	0.0087	0.0204	0.0228	0.0197	0.0094	0.0228	0.0228	0.0244	0.0244	0.0212	0.0047	0.0047	0.0212	0.0212	0.0149	0.0157	0.0157	0.0212	0.0212	0.0000	-				
IUC1	0.0197	0.0133	0.0180	0.0070	0.0236	0.0180	0.0180	0.0204	0.0204	0.0141	0.0141	0.0212	0.0181	0.0181	0.0197	0.0086	0.0086	0.0141	0.0141	0.0187	0.0187	-			
IUC2	0.0197	0.0133	0.0180	0.0070	0.0236	0.0180	0.0180	0.0204	0.0204	0.0141	0.0141	0.0212	0.0181	0.0181	0.0197	0.0086	0.0086	0.0141	0.0141	0.0187	0.0187	0.0000	-		
SAM	0.0307	0.0369	0.0376	0.0345	0.0270	0.0376	0.0376	0.0416	0.0416	0.0392	0.0392	0.0141	0.0165	0.0165	0.0039	0.0337	0.0337	0.0376	0.0376	0.0314	0.0314	0.0337	0.0337	-	



**Fig. 2.** Maximum parsimony (MP) tree of combined (ITS and *psbA-trnH*, *trnL-F*) data of 17 *Iris* taxa. Bootstrap/Jackknife values are found above branches.

었다. 또한 부채붓꽃은 91% BS, 100% JK 값으로 노랑꽃창포, 꽃창포와 자매군을 형성하였다(Fig. 2).

## 고찰

cpDNA의 *psbA-trnH* 지역과 *trnL-F* 지역의 염기서열을 분석한 결과, 대청부채, 만주붓꽃, 연미붓꽃은 63% BS, 0.62 PP로 가장 기부에 하나의 분계조를 이루고 있었으며 (Fig. 1, 2), 형태학적으로 대청부채, 만주붓꽃, 연미붓꽃의 잎은 넓은검형 또는 검형의 공통형질을 가지고 있었지만, 화서의 형태, 돌기의 유무에서 차이를 나타냈다. 대청부채의 경우 산형화서로서 나머지 14분류군과 확연한 차이를 가지고 있고, 만주붓꽃은 2송이의 꽃, 연미붓꽃은 총상화서로 차이를 나타내고 있으며, 위의 3가지 분류군은 크게 단모와 계관상 돌기의 유무로 나눌 수 있다. 또한 만주붓꽃은 단모가 존재하며, 연미붓꽃의 경우 외화피편 중간부에 계관상 돌기를 가지고 있고, 대청부채의 경우 단모와 계관상 돌기가 없는 특징으로 세분된다. 특히, 대청부채의 경우 학자들에 따라 독립된 속(Lenz, 1972; Mathew, 1981) 또는 붓꽃의 아속(Rodionenko, 1961; Sim, 1988; Zhao, 1992;

Waddick, 1992)으로 해야 한다는 견해 중 본 연구결과 MP tree에서는 기저부 안에서도 가장 아래에 위치하고 있었으며 만주붓꽃, 연미붓꽃과 함께 하나의 분계조를 형성하고 있었다(Fig. 1). 이는 ITS의 결과(Park, 2002)와도 일치하며 (Fig. 2), BI tree에서도 같은 양상으로 나타났다(Fig. 1). 따라서 하나의 독립된 속보다는 아속으로 보는 것이 타당하다고 사료된다. 또한 분류체계의 설정에 있어서 문제가 되고 연미붓꽃에 대해 본 연구결과 기저부에 위치하였으며, *Limniris*아속에 포함되지 않고 대청부채와 만주붓꽃과 가깝게 묶여 Waddick(1992)의 *Limniris*아속의 *Crossiris*절 보다 Rodionenko(1961)와 Sim(1988)의 견해와 같이 *Crossiris*아속의 *Crossiris*절로 설정하는 것이 타당하다고 본다(Fig. 1, 2). 하지만 Carol(2004)에 의하면 *Limniris*아속은 단계통으로 이루어져 있다고 주장한 바, *Limniris*아속에 대한 단계통여부는 본 결과에서 명확히 밝히기에는 다소 무리가 있어 추후 다양한 마커와 많은 종들을 포함하는 연구가 수반되어야 할 것으로 생각된다. 또한 외부형태학적으로 단모와 계관상돌기가 없는 구조인 대청부채아속에서 단모와 계관상돌기가 있는 구조인 만주붓꽃아속이나 연미붓꽃아속으로 경향성을 나타낸다는 Rodionenko(1962)의 견해와 본 연구결과가 일치하였다(Fig. 1, 2).

넓은잎각시붓꽃과 각시붓꽃은 화서의 형태, 근경의 종류와 색깔, 내·외화피편의 형태, 꽃의 색깔, 포의 수 등 형태학적 특징은 동일하나, 잎의 차이로 구별된다. 각시붓꽃의 경우 선형의 잎을 가지며 끝이 뾰족한 특징을 가지고 있지만, 넓은잎각시붓꽃의 경우 잎이 넓으며 밀이 갑자기 좁아져 초상을 이루고 있는 것이 특징이다. 본 연구결과 100% BS값으로 유집되어, 두 분류군의 유연관계는 매우 가까운 것으로 판단된다. 분류체계의 논란이 되고 있는 노랑무늬붓꽃, 금붓꽃, 노랑붓꽃 계열의 경우, 노랑무늬붓꽃이 노랑붓꽃의 변종(Lee, 1984) 또는 품종(Lee and Lee, 1964)으로 설정하였는데, 노랑무늬붓꽃과 노랑붓꽃의 경우 화경 끝에 2개의 꽃을 가지며, 잎은 넓은 선형으로 삭과 모양 등에서 공통형질을 가지고 있으며, 노랑붓꽃의 경우 외화피편은 노란색을 띄고 있지만, 노랑무늬붓꽃의 경우 흰색이며, 기부 무늬 차이가 있는 특징이 있으며, 본 연구결과, 노랑무늬붓꽃은 금붓꽃과 노랑붓꽃의 자매군을 형성하였고, 독립과생형질 11개를 가지고 있었으며 (Fig. 1), nrDNA ITS (Park, 2002)와 유합한 결과 독립된 분계조를 형성하여, 변종, 또는 품종보다는 독립된 종으로 보는 것이 타당하다는 Lee(1996)와 Sim(1988) 그리고 Park(2002)의 견해와 일치한다. 하지만 금붓꽃과 노랑붓꽃의 경우 본 연구결과 두 종의 관계가 명확하지 않아 더 많은 개체와 다양한 marker를 이용한 연구가 필요하다고 판단된다. 금붓꽃계열은 식물체의 크기, 화주, 화피열편, 종자 등의 형태적 특징으로 각시붓꽃계열로 구분(Kim, 2002)되며, 본 연구결과 각시붓꽃계열(넓은잎각시붓꽃, 각시붓꽃)과 금붓꽃계열(노랑무늬붓꽃, 금붓꽃, 노랑붓

꽃)의 경우 각각 분계조를 형성하여 독립된 계열로 양분되어야 한다는 Sim(1988)과 Park(2002)의 견해와 일치한다. 솔붓꽃, 난장이붓꽃은 하나의 분계조를 형성하여 타래붓꽃과 자매군을 이루고 있었으며, 90%의 높은 BS값을 가지며 유연관계가 매우 가까운 것으로 나타났다(Fig. 1). 시베리아붓꽃, 붓꽃, 꽃창포 그리고 부채붓꽃, 노랑꽃창포의 형태학적 특징은 시베리아붓꽃과 붓꽃은 2-3송이의 꽃이 피며, 꽃창포와 부채붓꽃 및 노랑꽃창포의 경우 총상화서를 가진다. 또한 시베리아붓꽃과 붓꽃, 꽃창포는 선형의 잎을 가지지만 부채붓꽃과 노랑꽃창포는 검형의 잎을 가지고 있고, 돌기의 유무와 꽃의 색, 내화피편과 외화피편의 차이, 지하부구조 등의 차이를 가진다. 본 연구결과 100% BS값으로 유집되며 5종이 가까운 유연관계를 나타내고 있었다. 하지만 붓꽃의 경우 공유파생형질이 없어 개체들이 하나의 clade를 이루지 못하였다(Fig. 1). Park(2002)에 의하면, 꽃창포와 노랑꽃창포, 그리고 부채붓꽃과 붓꽃, 시베리아붓꽃이 서로 가까운 유연관계를 가진다고 하였다. nrDNA ITS지역과 유합한 결과, *Sibricae*계열에 속하는 시베리아붓꽃과 붓꽃은 100% BS값으로 *Tripetaalae*계열에 속하는 부채붓꽃과 자매군을 형성하여 가까운 분류군임을 시사하고 있으며, 부채붓꽃은 91% BS값으로 *Laevigatae*계열에 속하는 노랑꽃창포, 꽃창포와 함께 자매군을 형성하여 유연관계가 가까운 것으로 나타났다(Fig. 2). 하지만 일부 종에 있어 붓꽃과 부채붓꽃, 꽃창포의 경우 Makarevitch et al. (2003)의 결과와의 차이를 보이고 있다. Makarevitch et al. (2003)은 주로 러시아산 자생종과 원예종 22종을 대상으로 엽록체 DNA의 non-coding 지역의 자료를 통하여 분류군의 유연관계를 유추를 시도하였다. 즉, 붓꽃과 시베리아붓꽃이 100%로 유집된다고 하였으나 본 연구결과에서는 붓꽃과 가장 가까운 유연관계를 나타내는 종이 시베리아 붓꽃으로 나타내어 다소 차이를 보이고 있으나 이는 분석된 붓꽃속의 종의 수가 다르기 때문에 다른 결과를 가져올 수 있다고 생각되며, 차 후 이 둘의 관계는 좀 더 면밀하게 검토할 필요가 있다고 생각된다. Carol(2004)은 *Iris*아속과 *Limniris*는 다계통군으로써, 본 연구결과와 차이가 있어 추후 연구가 제반되어야 한다. 국소적이지만 한국산 붓꽃속은 크게 4아속(*Limniris*, *Crossiris*, *Iris*, *Pardanthopsis*)으로 나뉘지며, *Pardanthopsis*아속, *Iris*아속, *Crossiris*아속에서 *Limniris*아속으로 분화되는 경향성을 나타내었다.

## 사 사

본 연구를 위해 귀중한 표본을 대여하여 주신 강원대학교(KWNU) 유기억교수님과 국립수목원 관계자분들, 재료 채집에 도움을 주신 국립수목원 손성원 박사님 그리고 본 원고에 좋은 지적을 해 주신 송임근 박사님, 최경수 박사과정, 손오경 박사과정님께도 감사드립니다. 또한 본 연구의 실험에 도움을 준 대학원생 최진향에게 고마움을 전합니다.

## 인용문헌

- APG II. 2003. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of Linnean Society* 141: 399-436.
- Curtis, S. and Clegg, M. T. 1984. Molecular evolution of chloroplast DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 1: 291-301.
- Doyle, J. J. and J. A. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Drummond, A. J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, C. Duran, M. Field, J. Heled, M. Kearse, S. Markowitz., R. Moir, S. Stones-Havas, S. Sturrock, T. Thierer, A. Wilson, 2011. Geneious v5.6, Available from <http://www.geneious.com/>.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4): 783-791.
- Farris, J. S. 1989. The retention index and homoplasy excess. *Systematic Zoology* 38(4): 406-407.
- Farris, J. S., V. A. Albert, M. Kallersjo, D. Lipscomb and A. G. Kluge. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- Grey-Wilson, C. and B. Mathew. 1981. Bulbs-Thebulbous plant of europe and their allies-iris. Pp. 153-165.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. *Journal of molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kim, S. C. and S. J. chum. 1998. Effect of NAA and BAP on organogenesis of callus and detection of virus in bulbous dach iris. *RDA. Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 40: 58-63.
- Kluge, A. G. and J. S. Farris. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* 18(1): 1-32.
- Koh J C, Lee J M. 2003. Effect of Colchicine on Chromosome Doubling in *Iris* spp. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* 44(2): 245-250.
- Lawrence, G. H. M. 1953. A reclassification of the genus *Iris*. *Gent Hebert.* 8: 346-371.
- Lee, T. B. 1976. *Bulletin of the Kwanak Arboretum* (1). Pp. 128-129. (in Korean)
- Lee, T. B. 1979. *Illustrated Flora of Korea*. Hyangmoonea, Seoul. Pp. 247-248. (in Korean)
- Lee, T. B. 1984. Outline of Korean endemic plants and their distribution. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 14: 21-32. (in Korean)
- Lee, W. T. and W. H. Lee. 1964. Report on study of a new forma of Iridaceae plants. *Seoul Agricultural College*: 1-4.



- Lee, Y. N. 1996. Flora of Korea. Kyohak Publishing Co., Seoul. Pp. 951-956. (in Korean)
- Lenz, L. W. 1972. The status of *Pardanthopsis* (Iridaceae). *Aliso* 7: 401-403.
- Linnaeus, C. 1753. *Species Plantarum*. Vol. 1. Ed. 1. Holmiae (Stockholm).
- Loockerman, D. J. and R. K. Jansen. 1996. The use of herbarium material for DNA studies. In *Sampling the green world*. Stuessy, T. J. and S. Sohmer (des.), Columbia University Press, New York, USA. Pp. 205-220.
- Mathew, B. 1981. *The Iris*. Batsford, London.
- Makarevitch et al. 2003. Phylogenetic Relationships of the siberian *Iris* Species Inferred from noncoding chloroplast and Sequences. *International Journal of Plant Sciences* 164(2): 229-237.
- Mori, T. 1921. An enumeration of plants hitherto known from Korea. The Government of Chosen, Seoul.
- Nakai, T. 1911. *Flora Koreana II*. Journal College Science Important. University Tokyo. 31: 230-234.
- Nakai, T. 1914. Report in the vegetation of Quelpart and Wanto Island. The Government of Chosen, Seoul. Pp. 1-156.
- Nakai, T. 1914. *Plantae novae Coreanae et Japonicae I*. Feddes Repertorium 13: 248-249.
- Nakai, T. 1952. A Synoptical Sketch of Korean Flora. Bulletin of the National Science Museum, Tokyo. Pp. 31: 148.
- Palibin, J. W. 1901. *Conspectus florum Koreae II*. *Acta Horti Petropolitani* 19: 106-108.
- Palmer, J. D., B. Osorio and W. F. Thompson. 1988. Evolution significance of inversions in legume chloroplast DNAs. *Current Genetics* 14: 65-74.
- Page, R. D. M. 1996. Tree view an application to display phylogenetic trees on personal computers, *Computer Application Biosciences* 12: 357-358.
- Park, S. J. 2002. A molecular systematic study of Korean *Iris* (Iridaceae) Based on RAPD analysis. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 32(4): 383-396. (in Korean)
- Sim, J. K., Park, H. D., Park, S. J. 2002. Phylogenetic study of Korean *Iris* (Iridaceae) based on nrDNA ITS sequences. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 32(1): 33-53.
- Park, C.-W. and S. P. Hong. 2007. *Iris* L. In *The Genera of Vascular Plants of Korea*. Park, C.-W. (ed.), Academy Publishing Co., Seoul. Pp. 1328-1331.
- Pierre, T., G. Ludovic, P. Guy, and B. Jean. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding region of chloroplast DNA. *Plan Molecular Biology*. 17: 1105-1109.
- Rodionenko, G. I. 1961. The genus *Iris*. Academy of Science USSR, Leningrad and Moscow.
- Ronquist, F., Huelsenbeck. 2003. MrBayes3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Sang, T., D. J. Crawford and T. F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticular evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84: 1120-1136.
- Sim, J. K. 1988. A taxonomic study on Iridaceae in Korea. Ph. D. thesis, Korea University Seoul. (in Korean)
- Soltis, P. D., J. J. Doyle and D. E. Soltis. 1992. Molecular data and polyploid evolution in plants. in: *Molecular Systematics of plant*. Soltis, P. D., J. J. Doyle and D. E. Soltis. (eds.), Chapman & Hall. New York. Pp. 177-201.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP\* : Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). ver. 4.0b10 Sinauer Associates. Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- Tavar, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences, *Lect. Mathematical Life Science* 17: 57-86.
- Waddick, J. W. 1992. *Chinese Iris in the Wild and in the Garden*. Timber Press, Portland, Oregon.
- Yu, Z., Y. Z. 2009. Karyotype studies on ten *Iris* species (Iridaceae) from Sichuan, China. Vol. 62(3): 253-260.
- Zhao, Y. T. 1992. *The Iris of China*. Timber Press, Portland, Oregon.