



## Molecular phylogenetic study of *Pinus* in Korea based on chloroplast DNA *psbA-trnH* and *atpF-H* sequences data

Jeong-Ki Hong, Jong-Cheol Yang, You-Mi Lee and Joo-Hwan Kim<sup>1\*</sup>

Korea National Arboretum, Pocheon, Gyeonggi 487-821, Korea

<sup>1</sup>Department of Life Science, Gachon University, Seongnam, Gyeonggi 461-701, Korea

(Received 13 May 2014; Accepted 13 June 2014)

## 엽록체 DNA *psbA-trnH*와 *atpF-H* 염기서열에 기초한 한국산 소나무속의 분자계통학적 연구

홍정기 · 양종철 · 이유미 · 김주환<sup>1\*</sup>

국립수목원, <sup>1</sup>가천대학교 생명과학과

**ABSTRACT:** This study aims to define the phylogenetic relationship within Korean *Pinus* L. and to find the molecular markers which resolve the phylogenetic relationship in genus *Pinus*. cpDNA *atpF-H* and *psbA-trnH* regions were used as molecular markers. We performed the molecular phylogenetic study on 17 taxa of *Pinus* in Korea. The combined analyses of two gene loci showed that Korean *Pinus* was a monophyletic group supported by 100% BP. According to the results of separate analyses, *psbA-trnH* region seems to work better resolving power to clarify the phylogenetic ambiguity in Korean *Pinus* than those of *atpF-H* region. Also, we tried to checked the value and resolution of two chloroplast DNA loci on phylogenetic implications.

**Keywords:** *Pinus*, subgenus Diploxylon & Haploxylon, *atpF-H*, *psbA-trnH*

**적 요:** 엽록체 DNA *atpF-H*, *psbA-trnH* region을 마커로 활용하여 국내에 분포하는 소나무속 식물들 중 17분 류군에 대한 분자계통학적 연구를 수행하여 한국산 소나무속의 계통학적 유연관계를 규명하고, 소나무속의 유연관계를 잘 나타낼 수 있는 분자마커를 찾아내고자 연구가 수행되었다. *atpF-H*, *psbA-trnH* region의 조합 분석결과 한국산 소나무속은 100%의 BP로 지지되는 단계통군으로 확인되었으며, 소나무아속과 잣나무아속으로 명확히 구분되어졌다. 본 연구에서 이용된 두 개의 분자마커 중 *psbA-trnH* region이 *atpF-H* region보다 한국산 소나무속의 계통 및 유연관계를 규명하는데 다소 높은 해상력을 나타내었다.

**주요어:** 소나무속, 소나무아속, 잣나무아속, *atpF-H*, *psbA-trnH*

소나무속(*Pinus* L.)은 구과목(Coniferales), 소나무과(Pinaceae), 소나무아과(Pinoideae)에 포함되는 식물군으로 대부분이 북반구 온대 지역에 분포하지만 남중부 아메리카와 수마트라, 자바 등에도 일부 종이 자라고 있다. 소나무속은 전 세계적으로 9속 110종이 분포하고 있으며(Fu et

al., 1999; Syring et al., 2005), 그 중 우리나라에는 20여종이 자생하거나 식재되고 있다(Korea National Arboretum and The Plant Taxonomic Society of Korea, 2007). 소나무속은 바늘 잎들이 속생하고, 속생하는 잎의 개수는 종마다 다르며, 잎의 기부를 감싸는 인편 엽초가 존재하고, 구과 실편의 끝에 돌기 특징을 갖는다(Fu et al., 1999; Wang et al., 2000; Lee, 2003; Syring et al., 2005).

소나무과(Pinaceae)에 대한 분자계통학적 연구로는 Wang et al. (2000)이 *matK*, *nad5*, 4CL 유전자를 마커로 이용한 소나무과 6속에 대한 연구를 수행하여, 소나무속

\*Author for correspondence: kimjh2009@gachon.ac.kr

(*Pinus*)이 가문비나무속(*Picea*), 잎갈나무속(*Larix*)과 함께 분계조를 형성하고, 전나무속(*Abies*), 솔송나무속(*Tsuga*), 개잎갈나무속(*Cedrus*)이 함께 분계조를 형성하는 결과를 제시한 바 있다(Fig. 1, D). 하지만 Wang et al. (2000)의 연구에서 소나무속 식물은 3종만이 포함되어 소나무속에 대한 정확한 계통분류학적 검토는 이루어지지 못하였다.

한국산 소나무속을 포함한 소나무속의 계통학적 연구로는 *rbcL*, *matK*, *trnV* 등을 마커로 활용한 Wang et al. (1999)의 연구 중에 한국산 소나무속 8종[곰솔(*P. Thunbergii* Parl.), 구주소나무(*P. sylvestris* L.), 소나무(*P. densiflora* Siebold & Zucc.), 스트로브잣나무(*P. strobus* L.), 잣나무(*P. koraiensis* Siebold & Zucc.), 눈잣나무(*P. pumila* (Pall.) Regel), 섬잣나무(*P. parviflora* Siebold & Zucc.), 백송(*P. bungeana* Zucc. ex Endl.)]이 포함되어 다루어진 바 있다. 이후 Gernandt et al. (2005)이 *rbcL*과 *matK*를 마커로 활용하여, 우리나라에 분포하는 것으로 알려진 소나무속 20종 중 12종[풍겐스소나무(*P. pungens* Lamb.), 리기다소나무(*P. ridida* Mill.), 테에다

소나무(*P. taeda* L.), 방크스소나무(*P. banksiana* Lamb.), 곰솔, 구주소나무, 소나무, 잣나무, 눈잣나무, 섬잣나무, 스트로브잣나무, 백송]이 포함된 계통학적 연구를 수행하였다. 이러한 유전분석을 통한 소나무속의 계통연구들은 (Wang et al., 1999; Gernandt et al., 2005) 이전의 형태형질 연구(Richardson, 1998)에 의해 구분되어진 두개의 유관속을 갖는 그룹과(subgenus *Diploxylon*) 한 개의 유관속을 갖는 그룹(subgenus *Haploxylon*)에 대한 연구결과를 지지한다.

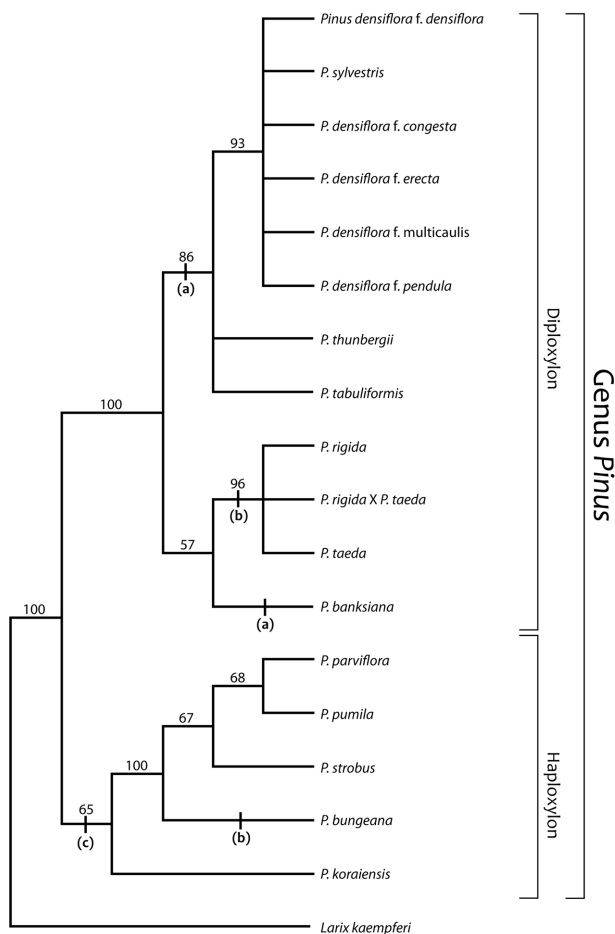
국내에서 연구된 소나무속의 분류에 있어서는 Min (1995)이 침엽의 단면과 화분의 해부학적 특징을 기준으로 소나무과 6속(소나무속, 전나무속, 가문비나무속, 잎갈나무속, 개잎갈나무속, 솔송나무속)의 분류학적 연구를 수행하였는데, 소나무속에서 해송(곰솔), 방크스소나무, 육송(소나무), 그리고 리기다소나무가 소나무아속에 포함되어졌고, 잣나무, 눈잣나무, 섬잣나무, 그리고 스트로브잣나무가 잣나무아속에 포함되었으며, 백송은 어느 아속에도 속하지 못하는 결과가 나타났다.

이후 Lee (2003, 2004, 2008)는 형태학적 특징을 기준으로 소나무아속과 잣나무아속으로 구분하였는데, 소나무아속은 아린이 잎과 같이 떨어지고, 잎의 횡단면의 관다발이 2개라는 특징으로, 잣나무아속은 아린이 잎이 자란 다음 떨어지고, 잎 횡단면의 관다발이 1개라는 특징으로 구분하였다. 그의 연구 결과에 따르면 소나무아속에는 테에다소나무, 리기다소나무, 곰솔, 만주곰솔(*P. tabuliformis* var. *mukdensis* Uyeki), 구주소나무, 소나무, 방크스소나무, 풍겐스소나무가 포함되고, 잣나무아속에는 잣나무, 눈잣나무, 섬잣나무, 스트로브잣나무, 백송이 포함된다. 이는 Min (1995)의 결과와 유사하였으나, 백송을 두 아속 어디에도 포함시키지 못한 것과는 달리 백송을 잣나무아속에 포함시킨 명확한 차이점을 보여주었다.

Kim (2008)은 침엽의 외부형태와 기공의 형태에 따른 소나무속의 분류학적 연구를 통해 소나무속을 Lee (2003, 2004, 2008)와 마찬가지로 잣나무아속과 소나무아속으로 분류하였다.

상기한 연구 등이 한국산 소나무속을 대상으로 한 분류학적 연구의 대부분이고, 한반도에서 이루어진 연구에서는 소나무과 식물의 수종별 분포도, 수형적인 특성, 침엽의 형태 및 목질의 특성 등의 분포조사 및 형태학적 특성을 조사하는 연구가 대부분으로(Nakai, 1909, 1911; Uyeki, 1926; Yim and Kim, 1975; Yim and Kwon, 1976; Yim et al., 1977; Yim and Lee, 1978; Yim and Lee, 1979; Kim et al., 1981; Kim and Kil, 1983; Lee, 1986), 한국산 소나무속에 대하여서는 현대적 계통학적 연구방법을 이용한 분류학적 검토는 이루어진 바 없다.

또한, 나자식물의 분자계통학적 연구에 엽록체 DNA *rbcL*, *matK*, *trnV*, *nad5* 등의 분자마커가 주로 이용되었으나, 본 연구에서 분자마커로 활용한 엽록체 DNA *atpF-H*, *psbA-trnH* region을 이용한 계통학적 연구는 수행된 바 없



**Fig. 1.** Strict consensus tree based on the combined chloroplast DNA [*psbA-trnH+atpF-H*] region sequences of *Pinus* (CI = 0.934, RI = 0.956). Bootstrap value are presented on the branches. a: two needle leaves, b: needle leaves, c: three to five needle leaves.

**Table 1.** The List of taxa, voucher information, and accession numbers for plant materials used in this study.

Taxa	Voucher No.	<i>atpF</i> -H	<i>psbA</i> - <i>trnH</i>
<i>Pinus densiflora</i> f. <i>densiflora</i> 소나무	S-H Park, 71828 (KH)	KJ661347	KJ661365
<i>P. densiflora</i> f. <i>congesta</i> 여복송	K-S Kim, 110033 (KH)	KJ661354	KJ661372
<i>P. densiflora</i> f. <i>erecta</i> 금강소나무	J-K Hong, 120017 (KH)	KJ661355	KJ661373
<i>P. densiflora</i> f. <i>multicaulis</i> 반송	K-S Kim, 110064 (KH)	KJ661356	KJ661374
<i>P. densiflora</i> f. <i>pendula</i> 처진소나무	J-K Hong, 120023 (KH)	KJ661357	KJ661375
<i>P. koraiensis</i> 잣나무	ANH0410211 (KH)	KJ661350	KJ661368
<i>P. parviflora</i> 섬잣나무	G-H Lee, 9-11 (KH)	KJ661358	KJ661376
<i>P. pumila</i> 눈잣나무	K-S Kim, 110118 (KH)	KJ661359	KJ661377
<i>P. thunbergii</i> 곰솔	NGH50470 (KH)	KJ661349	KJ661367
<i>P. banksiana</i> 방크스소나무	J-K Hong, 120001 (KH)	KJ661353	KJ661371
<i>P. bungeana</i> 백송	s.n.	KJ661352	KJ661370
<i>P. rigida</i> 리기다소나무	Park, SH 70429 (KH)	KJ661348	KJ661366
<i>P. rigida</i> X <i>P. taeda</i> 리기테다소나무	J-K Hong, 110157 (KH)	KJ661360	KJ661378
<i>P. strobus</i> 스트로브잣나무	K-S Kim, 110076 (KH)	KJ661361	KJ661379
<i>P. sylvestris</i> 구주소나무	Su, Youngwoo s.n (KH).	KJ661351	KJ661369
<i>P. tabuliformis</i> 흑송	Zhang Xi Liang 22 (KH)	KJ661362	KJ661380
<i>P. taeda</i> 테다소나무	K-S Kim, 110030 (KH)	KJ661363	KJ661381
<i>Larix kaempferi</i> 일본잎갈나무	NAPI-20090377 (KH)	KJ661364	KJ661382

: native plants, : introduced plants

으며, CBOL Plant Working Group (2009)이 38분류군의 나자 식물을 포함한 육상식물(land plants)에 대한 DNA barcoding 연구에서 *atpF*-H, *psbA-trnH*를 포함한 7개 분자마커의 활용성 정도를 확인하는 연구가 이루어진 사례가 있을 뿐이다. CBOL Plant Working Group (2009)의 연구결과에 의하면, 그동안 나자식물의 분자계통학적 연구에 널리 이용된 *matK*, *rbcL*이 각각 66%와 61%의 계통학적 해상력을 제공하는 것으로 나타났고, 본 연구에 이용된 *psbA-trnH*는 약 70%, *atpF*-H는 약 55%의 해상력을 갖는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구는 우리나라 소나무속에 대한 DNA *atpF*-H, *psbA-trnH* region의 계통학적 해상력을 검토하고, 이를 기초로 우리나라에 분포하는 소나무속의 정확한 계통 체계를 정립하는 것을 목적으로 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구 재료

국내에 자생하거나 도입되어 식재되고 있는 소나무속 17 분류군에 대하여 국립수목원 식물표본관(KH)에 소장하고 있는 건조표본의 침엽을 실험재료로 사용하였고, 중국산으로 알려져 있는 백송 1개체는 직접 채집한 생체를 이용하였다. 또한 근연분류군으로써 같은 과에 속해있는 잎갈나무속(*Larix* Mill.)의 일본잎갈나무(*Larix kaempferi* (Lamb.)

*Carrerei*)를 군외군(outgroup)으로 이용하였다. 본 연구에서 사용한 식물재료의 표본 정보는 Table 1에 정리하였다.

### 2. DNA 추출

DNA 추출을 위해 확보된 재료의 잎을 사용하였고, Total genomic DNA는 Doyle and Doyle (1987)의 CTAB 방법을 일부 변경한 Kim et al. (2008)과 Kim et al. (2009)의 방법을 이용하여 추출하였다. 건조된 식물의 잎 40 mg을 조직분쇄기 (Tissue Lyser II, QIAGEN)로 분쇄하여 1.5 mL 튜브에 옮긴 후, 500  $\mu$ L의 2X CTAB extraction buffer (2% Hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris (pH 8.0), 5  $\mu$ L의 0.2%  $\beta$ -mercaptoethanol)와 20 mg의 PVP-40을 넣고, 55°C의 water bath에서 1~2시간 증탕하였으며 10분마다 꺼내어 잘 섞어주었다. 증탕 후 500  $\mu$ L의 SEVAC 용액(chloroform : isoamylalcohol = 24 : 1)을 넣어 잘 섞어준 후, 4°C 13,200 rpm (5415R, Eppendorf Co., Germany)으로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 얻어진 상등액을 새로운 Eppendorf 튜브에 옮긴 후, 미리 준비되어 있는 7.5 M ammonium acetate를 0.08 volume 추가하고, 최종 volume의 0.54 volume 만큼의 냉동보관된 isopropanol을 추가하여 -70°C deep freezer에서 하루 동안 침전시켰다. 침전이 완료된 후, 13,200 rpm으로 3분간 원심분리 하여 상등액을 제거하였다. 남아 있는 pellet에

700  $\mu$ L의 alcohol (70%, -20°C)을 추가한 후 13,200 rpm으로 1분간 원심분리 하여 다시 상등액을 제거하고, 700  $\mu$ L의 alcohol (95%, -20°C)을 추가하여 13,200 rpm으로 1분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 pellet은 실온에서 3시간 정도 건조시켜 여분의 alcohol을 제거한 후, pellet의 양에 따라 50~100  $\mu$ L의 1X TE buffer를 추가하여 용해시켰다. 추출한 DNA는 1% agarose gel로 전기영동 하여 추출여부를 확인하였으며, 정확한 DNA의 농도는 GeneQuant pro (Amersham Pharmacia Biotech, Inc. USA)를 이용하여 결정하였다.

### 3. 염기서열 분석지역

본 연구에서 한국산 소나무속의 분자계통학적 분석을 위해 엽록체 DNA *atpF-H* region, *psbA-trnH* region을 이용하였다.

### 4. PCR을 이용한 유전자 증폭반응

유전자 증폭을 위한 증합효소 연쇄반응은 70-80 ng의 정제된 template DNA, 1 unit Taq DNA polymerase (Solgent Co., Korea), 10 $\times$  reaction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) 2.5  $\mu$ L, 2.5 mM의 dNTP (Solgent Co., Korea)와 양방향 primer (5 pmol/ $\mu$ L) 각각 0.5  $\mu$ L에 멸균된 3차 증류수를 첨가하여 최종 volume 25  $\mu$ L의 반응액으로 실시하였다. 유전자 증폭반응은 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems Inc., USA)을 사용하였으며, PCR 반응산물은 LoadingSTAR (DYN-EBIO Co., Korea)와 혼합된 PCR product를 1% agarose gel에서 전기영동하여 증폭여부를 확인하였다. 각각의 유전자 지역을 증폭하기 위해 사용한 primer의 sequence 등은 Table 2에 정리하였다. 각 유전자에 따른 PCR 조건은 다음과 같다.

***atpF-H* region** : *atpF*(CBOL Plant Working Group, 2009)와 *atpH*(CBOL Plant Working Group, 2009) primer를 이용하여 *atpF-H* region을 증폭하였다(Table 2). *atpF-H*의 증폭은 94°C에서 2분 동안 pre-denaturation을 시킨 후, 94°C에서 1분의 denaturation, 55°C에서 1분의 annealing, 72°C에서 1분

의 extension으로 이루어지는 thermal cycle 과정을 40회 반복하였으며, 마지막으로 72°C에서 final extension 과정으로 구성된 PCR을 통해 이루어졌다.

***psbA-trnH* region** : *trnH* (CBOL Plant Working Group, 2009)와 *psbA* (CBOL Plant Working Group, 2009) primer를 이용하여 *psbA-trnH* region을 증폭하였다(Table 2). *psbA-trnH*의 증폭은 94°C에서 2분 동안 pre-denaturation을 시킨 후, 94°C에서 1분의 denaturation, 64.5°C에서 1분의 annealing, 72°C에서 1분의 extension으로 이루어지는 thermal cycle 과정을 40회 반복하였으며, 마지막으로 72°C에서 final extension 과정으로 구성된 PCR을 통해 이루어졌다.

### 5. PCR product의 정제와 염기서열 결정

PCR products는 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 공급자의 매뉴얼에 따라 정제하였으며, 정제된 PCR products를 cycle sequencing 반응의 주형으로 사용하였다.

Cycle sequencing 반응은 BigDye Terminator V3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc. USA)를 사용하여 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems Inc. USA)에서 공급자의 매뉴얼에 따라 실시하였다. Post reaction clean-up 과정은 Montage SEQ96 sequencing reaction cleanup kit (Millipore Corporation, Bedford, MA)를 이용하여 공급자의 매뉴얼에 따라 정제하였다.

염기서열의 분석(sequencing)은 ABI 3700 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Inc. USA)를 이용하였다.

### 6. 염기서열 정렬과 계통수 구축

Sequencing된 각 유전자의 염기서열은 Sequencher (ver. 4.5, Gene Codes. USA)를 이용하여 조합(assembly)하였다. 염기서열의 분석을 위하여 Clustal X program (ver. 1.83, Thompson et al., 1997)을 이용하여 일차적으로 염기를 정렬시킨 후, 최종적으로 나안으로 직접 염기서열을 수정하여 확인하였다.

PAUP\* program (ver. 4.0b10, Swafford, 2002)을 이용하여 Uncorrected pairwise distance로 각 분류군들 사이의 염기변이 양상을 분석하였다. 계통수 구축을 위하여 형질에 있어서 가중치는 모두 동일하게 처리하였고, 전체 염기서열 중 gap은 모두 결여형질(missing character)로 처리하였으며, 정렬된 염기서열의 모든 character는 'unordered', 'unweighted' character로 설정하였다. PAUP\*에 의해 가장 짧은 경로를 가지는 계통수를 산출하기 위해 heuristic search를 통해 최대절약분석(maximum parsimony analysis)을 실시하였으며, Bootstrap 분석(Felsenstein, 1985)을 1,000회 반복하여 계통도 가지의 지지도를 확인하고자 Bootstrap value를 산출하였다. Maximum likelihood analysis는 GTR+I+ $\Gamma$  모델을 적용하여 RAxML BlackBox(<http://phylobench.vital-it.ch/raxml-bb/>)를 이용하였다.

**Table 2.** Sequences and reference of primers for amplifying and analyzing the sequences of the chloroplast DNA of *atpF-H*, *psbA-trnH* region.

Region	Primer	Sequences (5'-3')	Reference
<i>atpF-H</i>	<i>atpF</i>	ACTCGCACACACTC CCTTTCC	
	<i>atpH</i>	GCTTTTATGGAAGCT TTAACAAT	CBOL Plant Working Group (2009)
<i>psbA-trnH</i>	<i>trnH</i>	CGCGCATGGTGGATT CACAAATCC	
	<i>psbA</i>	GTTATGCATGAACGT AATGCTC	

## 결 과

### 염기서열 변이 양상

**엽록체 DNA *atpF-H* region의 염기서열 변이** : 17분류군에 대한 *atpF-H* region을 분석하였으며, 557 bp의 염기 site로 정렬된 자료행렬을 이용한 계통학적 분석결과, 전체 염기서열 중 510 bp는 일정하고, 47 bp는 변이가 있었으며, 이 중 25 bp가 계통학적으로 유용한 형질이었다. 분석구간의 G+C 함량은 35.6%였다(Table 3).

**엽록체 DNA *psbA-trnH* region의 염기서열 변이** : 17분류군에 대한 *psbA-trnH* region을 분석하였으며, 687 bp의 염기 site로 정렬된 자료행렬을 이용한 계통학적 분석결과, 전체 염기서열 중 620 bp는 일정하고, 67 bp는 변이가 있었으며, 이 중 23 bp가 계통학적으로 유용한 형질이었다. 분석구간의 G+C 함량은 38.7%였다(Table 3).

### 분자계통학적 분석결과

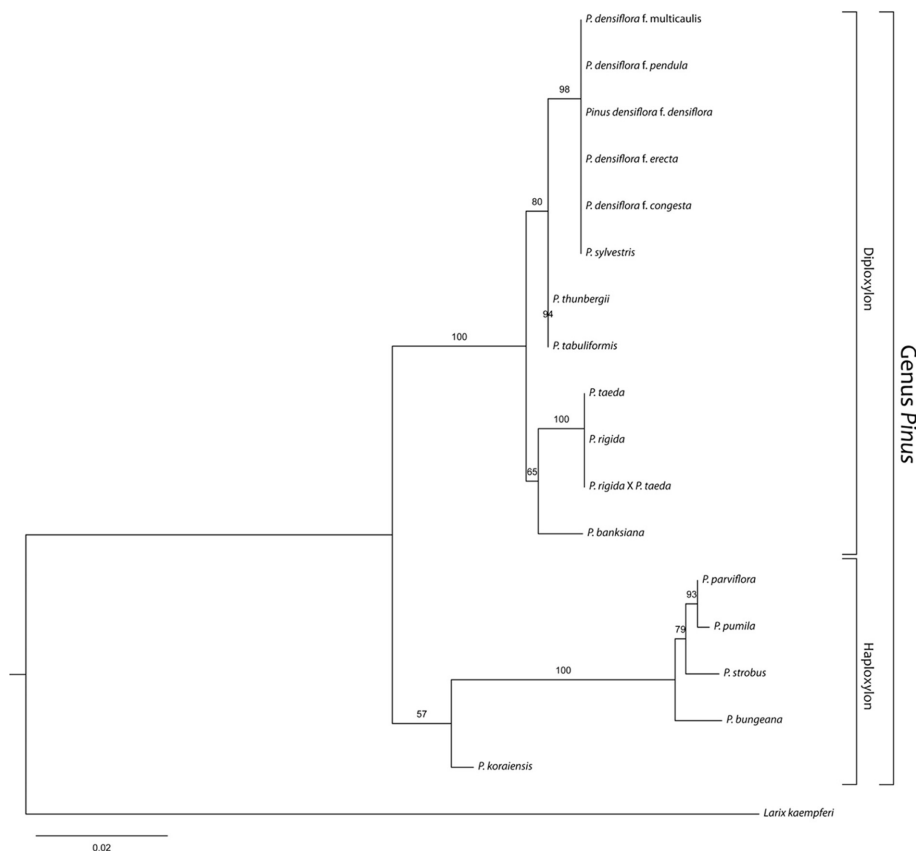
염기서열 분석을 통해 얻어진 자료행렬을 기초로 최단거리 계통도를 작성하였고, 각 유전자별 및 유전자간 조합분석을 실시하였으며, 이를 통해 분류군간의 계통학적 유연관계를 검토하고자 하였다.

**엽록체 DNA *atpF-H* region** : 17분류군에 대한 계통학적

분석 결과 47 step의 tree length를 갖는 3개의 MP tree(CI, RI = 1.000)가 도출되었으며, 이를 통해 Strict consensus tree를 작성하였다. Strict consensus tree에서 소나무속 전체는 100%의 BP 값으로 강하게 지지되었으나, 잣나무아속인 잣나무가 소나무아속과 분리되지 못하고 소나무아속에 포함되는 결과를 보여주었다(Fig. 3, A).

**Table 3.** Values and statistics of the data matrices.

	<i>atpF-H</i> (I)	<i>psbA-trnH</i> (II)	(I+II)
Number of taxa analyzed	17	17	17
Aligned length of sequences	557	687	1,244
Mean of G+C (%)	35.6	38.7	37.3
Number of informative site	25	23	48
Number of constant site	510	620	1,130
Number of variable site	47	67	114
Number of mostparsimonious trees	3	2	7
Tree length	47	68	122
Consistency index (CI) of MP tree	1.000	0.985	0.934
Retention index (RI) of MP tree	1.000	0.990	0.956



**Fig. 2.** ML tree based on the combined chloroplast DNA [*psbA-trnH*+*atpF-H*] region sequences of *Pinus*. Bootstrap value are presented on the branches.



통연구를 실시한 Wang *et al.*, (1999)과 *rbcL*, *matK*를 마커로 활용하여 유라시아산 소나무속의 분자계통연구를 실시한 Gernandt, (2005)의 연구결과와도 일치한다. 리기다소나무+리기테에다소나무+테에다소나무+방크스소나무 분계조는 57%의 다소 낮은 BP에 의해 지지되었으나 소나무, 구주소나무, 곰솔 등과 명확히 구분되어지고, 리기다소나무+리기테에다소나무+테에다소나무 분계조가 96%의 높은 BP값으로 지지되어 선행된 연구결과들과(Wang *et al.*, 1999; Gernandt, 2005)과 일치하였다(Fig. 1).

잣나무아속의 경우 *atpF-H*와 *psbA-trnH*의 조합분석에서 잣나무아속이 65%의 다소 낮은 BP에 의해 지지되었는데(Fig. 1), 이는 *atpF-H*의 분석결과 잣나무가 소나무아속으로 포함되는 결과에 의한 것으로 생각되며, *psbA-trnH*의 분석결과에서는 잣나무아속이 92%의 높은 BP에 의해 지지되는 분계조를 형성하였다(Fig. 3). 또한 *psbA-trnH*에서의 잣나무아속 분계조는 선행된 여러 분자계통학적 연구결과들과도 유사한 결과를 나타내고 있다(Wang *et al.*, 1999; Gernandt, 2005).

Min (1995)의 연구결과에서 소나무아속과 잣나무아속 중 어디에도 포함되지 않았던 백송은 본 연구결과 잣나무아속에 포함되는 것으로 나타났다(Fig. 1, 2). 백송은 침엽이 3장씩 속생하여 5엽인 다른 잣나무아속의 식물들과 차이가 있지만 유관속이 1개인 특징으로 잣나무아속과 공통점을 가진다. 이처럼 백송은 형태학적으로 소나무아속과 잣나무아속의 중간 형질을 가지고 있으며 향후 소나무속 내 두 아속간의 진화학적연구에 중요한 종으로 판단된다.

본 연구에서 계통분석에 이용된 2개의 유전자는 각각의 분석결과가 다소 상이했다. 염색체 DNA *psbA-trnH* region은 선행연구에 비해 계통학적으로 유효한 염기site가 상대적으로 적음에도 불구하고(3.4%), 다른 유전자들을 이용한 선행연구와 유사한 topology를 보이며 소나무속의 계통학적 유연관계 분석에서 높은 해상력을 제공할 수 있을 것으로 나타났다. 반면, *atpF-H* region은 *psbA-trnH* region에 비해 계통학적으로 유효한 site가 많았음에도 불구하고(4.5%) 소나무속내의 유연관계를 규명하는데 있어서 다소 낮은 해상력을 제공하였다. 이는 CBOL Plant Working Group (2009)의 연구에서 *psbA-trnH* region은 70%, *atpF-H* region은 55%의 해상력을 가진다는 결과와도 유사한 결과이다.

새로운 분자마커를 활용한 본 연구결과, 소나무속은 뚜렷한 단계통군으로 생각되고, 한국산 소나무속은 소나무아속과 잣나무아속으로 구분하는 것이 타당하고, 소나무아속은 소나무+구주소나무 분계조, 곰솔, 만주곰솔의 세 그룹으로 분류하는 것이 타당할 것으로 생각된다. *psbA-trnH* region은 나자식물의 분자분류학적 연구에 있어서 속 수준의 분석에 다소 유용한 것으로 나타났지만, 과수준에서 더욱 높은 해상력을 제공할 수 있을 것으로 생각되며, *atpF-H* region은 과수준이나 과이상의 상위분류군 분석에

유용할 것으로 생각된다. 또한, 향후 본 연구에 포함되지 않았던 전 세계에 분포하는 소나무속 또는 소나무과의 분류군들을 포함하는 추가적인 연구를 수행하여 이에 대한 더 명확한 결과가 재검토되어야 할 것으로 생각된다.

## 인용문헌

- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (31): 12794-12797.
- Chaw, S. M., A. Zharkikh, H. M. Sung, T. C. Lau and W. H. Li. 1997. Molecular Phylogeny of Extant Gymnosperms and Seed Plant Evolution: Analysis of Nuclear 18S rRNA Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 14: 56-68.
- Chaw, S. M., C. L. Parkinson, Y. Cheng, T. M. Vincent and J. D. Palmer. 2000. Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: Monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers. *Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (8): 4086-4091.
- Fu, L.-K., L. Nan, and R. R. Mill. 1999. *Flora of China*. Vol. 4. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. Pp. 11-25.
- Gernandt, D. S., G. Lopez, S. O. Garcia and A. Liston. 2005. Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* 54: 29-42.
- Helander, J. 2000. Phylogeny of Gymnosperms: Fact and Fiction. *Gymnosperms, Gnetales, Coniferales, Pinaceae, Pinus, Abies*. Poul Mollers Vej 7, Copenhagen.
- Kim, H. J. 2008. Systematic Studies on Stomatal Type of Genus *Pinus*. MS thesis. Sangji University. (in Korean)
- Kim, J. H. D.-K. Kim and J.-H. Kim. 2009. Genetic variation and relationships of *Artemisia capillaris* Thunb. (Compositae) by RAPD analysis. *Korean Journal of Plant Resources* 22 (3): 242-247. (in Korean)
- Kim, J. U. and B. S. Kil. 1983. A Study on the Distribution of *Pinus thunbergii* in the Korean Peninsula. *Journal of Ecology and Environment* 6(1): 45-54. (in Korean)
- Kim, Y.-H., K.-H. Tae and J.-H. Kim. 2008. Genetic variations and relationships of *Persicaria thunbergii* (Sieb. & Zucc.) H. Gross ex Nakai (Polygonaceae) by the RAPD analysis. *Korean Journal of Plant Resources* 21(1): 66-72. (in Korean)
- Kim, Y. S., S. C. Ko, and B. H. Choi. 1981. Distribution Atlas of plants of Korea (4) Atlas of Pinaceae in Korea. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 11(1,2): 53-75. (in Korean)
- Korea National Arboretum and The Plant Taxonomic Society of Korea. 2007. A Synonymic List of Vascular Plants in Korea. Korea National Arboretum. Pocheon. (in Korean)
- Lee, T. B. 2003. *Coloured Flora of Korea*. Hyangmunsa. (in Korean)

- Lee, T. B. 2004. (New) Dendrology. Hyangmunsa. (in Korean)
- Lee, T. B. 2008. (New) Plant Taxonomy. Hyangmunsa. (in Korean)
- Lee, Y. N. 1986. Coniferopsida in Korea. Ewha Womans University Press. (in Korean)
- Min, J. K. 1995. Systematic studies on Pinaceae 6 genera in Korea. MS thesis. Konkuk University. (in Korean)
- Nakai, T. 1909. Flora koreana. Pars prima. Journal of the College of Science, Imperial University of Tokyo 26: 1-304.
- Nakai, T. 1911. Notulae ad plantas Japoniae et Koreae. Botanical Magazine Tokyo 25: 52-64.
- Richardson, D.M. 1998. Ecology and Biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press.
- Syring, J., A. Willyard, R. Cronn and A. Liston. 2005. Evolutionary relationships among *Pinus* (Pinaceae) subsections inferred from multiple low-copy nuclear loci. American Journal of Botany 92: 2086-2100.
- Uyeki, H. 1926. Corean Timber Trees, vol. 1. Ginkgoales and Coniferae. The Forestry Experiment Station, Government General of Chosen. (in Japanese)
- Wang, X. R., Y. Tsumura, H. Yoshimaru, K. Nagasaka and A. E. Szmidt. 1999. Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcL*, *matK*, *rpl20-rps18* spacer, and *trnV* intron sequences. American Journal of Botany 86: 1742-1753.
- Wang, X.-Q., D. C. Tank, and T. Sang. 2000. Phylogeny and divergence times in Pinaceae: evidence from three genomes. Molecular Biology and Evolution 17: 773-781.
- White, T. J., T. D. Bruns, S. Lee and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 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, New York. Pp. 315-322.
- Yim, K. B. and K. J. Lee. 1978. The variation of natural population of *Pinus densiflora* S. et Z. in Korea, (VII) Characteristics of needle and wood of Wangsan, Bonghwa and Yangju Populations. Journal of Korean Forest Society 40: 1-18. (in Korean)
- Yim, K. B. and K. J. Lee. 1979. The variation of natural population of *Pinus densiflora* S. et Z. in Korea, (IX) Needle and wood characteristics of six populations. Journal of Korean Forest Society 43: 20-30. (in Korean)
- Yim, K. B. and K. W. Kwon. 1976a. The Variation of Natural Population of *Pinus densiflora* S. et Z. in Korea (II) -Characteristics of Needle and Wood of Myong-Ju, Ul-Jin, and Suweon Populations-. Journal of Korean Forest Society 31: 8-20. (in Korean)
- Yim, K. B. and K. W. Kwon. 1976b. The variation of natural population of *Pinus densiflora* S. et Z. in Korea, (III) Genetic variation of the progeny originated from Mt. Chu-wang, An-Myon Island and Mt. O-Dae Populations. Journal of Korean Forest Society 32: 36-63. (in Korean)
- Yim, K. B. and Z. S. Kim. 1975. The variation of natural population of *Pinus densiflora* S. et Z. in Korea, (I) Characteristics of needle and wood of Chuwang-san, An-Myeon-do and Odae-san Populations. Journal of Korean Forest Society 28: 1-20. (in Korean)
- Yim, K. B., K. W. Kwon and K. J. Lee. 1977. The variation of natural population of *Pinus densiflora* S. et Z. in Korea, (V) Characteristics of needle and wood of Injye, Jeongsun, Samchuk Populations. Journal of Korean Forest Society 36: 9-25. (in Korean)