

ITS 염기서열에 의한 한국산 제비꽃속(*Viola*)의 계통 유연관계

유기억* · 장수길 · 이우철

강원대학교 자연과학대학 생명과학부

한국산 제비꽃속 35분류군과 일본산 4집단, 군외군 1분류군 등 총 40집단에 대한 계통 유연관계를 알아보기 위하여 핵 rDNA의 internal transcribed spacer(ITS)지역에 대한 염기서열을 분석하였다. 정렬된 염기서열들은 bootstrap을 포함한 parsimony 방법과 neighbor-joining 방법을 통하여 계통수를 평가하였다. 그 결과 진정제비꽃절의 낚시제비꽃아절은 군내군의 가장 기부에 분계조를 형성하였으며, 장백제비꽃절은 노랑제비꽃절과 자매군을 형성하면서 진정제비꽃절의 낚시제비꽃아절과 콩제비꽃아절, 고깔제비꽃아절, 제비꽃아절 사이에서 단계통군을 형성하였다. 진정제비꽃절은 병계원적인 분계조를 형성하였고 4개 아절은 독립적인 분계조를 형성하였지만 계열 수준에서는 구별이 불가능하였다. 세포학적 연구에 기초한 제비꽃속의 분화에서 기본염색체 수 $x=10$ 을 갖는 낚시제비꽃아절은 $x=6$ 인 군외군에서 독립적으로 분화한 것으로 나타났으며 나머지 분류군들은 $x=6$ 인 노랑제비꽃과 장백제비꽃아절로부터 $x=10$ 또는 12인 콩제비꽃과 고깔제비꽃아절을 거쳐 $x=12$ 인 제비꽃아절로 분화한 특징을 보였다. 형태적인 변이가 매우 심한 분류군으로 알려진 태백제비꽃군(*V. albida* complex)은 *Patellares*아절 내에서 하나의 군으로 유집되어 *Pinnatae*계열로 처리하는 것이 타당할 것으로 생각되며, 뽕제비꽃과 남산제비꽃의 잡종인 우산제비꽃은 형태적 특징에 의한 분류와는 일치하지 않는 것으로 나타났다.

주요어 : 제비꽃속, ITS, 계통유연관계

제비꽃속(*Viola*)은 제비꽃과(Violaceae)에 속하는 초본 또는 소관목으로 제비꽃과 내에서 가장 많은 분류군이 포함되어 있으며 전세계에 약 525-600여 종이 북은대지역을 중심으로 널리 분포한다(Clausen, 1964; Ballard, 1996). 제비꽃속은 Gingins(1823)가 주두의 형태에 따라 5개의 절(section)로 분류한 것이 최초이며, 그 후 속에 대한 종속지적 연구는 Becker(1916, 1917a, 1917b, 1918, 1922, 1923a, 1923b, 1923c, 1924, 1925a)에 의해 폭넓게 수행되었으며, 그

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

접수: 2004년 12월 30일, 완료: 2005년 1월 29일

결과를 기초로 속내 분류계급을 화주의 미세구조에 따라 14절 28아절 7계열로 세분하였다 (Becker, 1925b). 그러나 Clausen(1927, 1929, 1964)은 화관의 색깔과 화주의 모양을 제비꽃속의 계통분류에 유용한 형질로 생각하였으며 염색체 수, 지리적 분포 등도 중요시하여 Becker의 분류체계에서 문제가 있는 분류군에 대한 분류학적 위치를 결정해 주었다. 또한 Gershey (1934)는 줄기의 습성, 특히 줄기의 유무, 포복지의 유무 등을 종의 한계를 결정해주는 중요한 형질로 인정하면서 Clausen과 마찬가지로 Becker의 속 이하 분류체계에 많은 수정을 가하였다(Ballard *et al.*, 1999). 그러나 이러한 분류계급은 연구자에 따라 새로운 계급으로 이전 또는 통합, 상위계급으로 승격 또는 격하 시키는 등 분류계급 설정에 많은 혼란을 야기 시키고 있다(Nakai, 1922b, 1928; Ishidoya, 1929; Takenouchi, 1955; Maekawa and Hashimoto, 1963). 최근 Ballard(1996)는 이러한 문제점들을 지적하고 Becker의 연구 이외에는 제비꽃속 전체에 대한 연구가 없어 현대적 계통분류방법을 통한 중간유연관계 및 속내 분류계급의 재검토가 필요함을 주장하였다. 그는 일부 분류군에 대한 분자계통학적 연구 (Ballard *et al.*, 1997a, b, 1998; Hodges *et al.*, 1995) 뿐만아니라, 형태학적형질, 염색체수, 자연잡종 및 ITS 염기서열분석을 통하여 제비꽃의 속내 분류 및 계통유연관계를 밝힌 바 있으며, 또한 속내 분류계급을 대표할 수 있는 44분류군에 대한 ITS 염기서열 분석을 통하여 계통학적 연구를 수행 한 바 있다(Ballard *et al.*, 1999). 한국산에 관해서는 Palibin(1899)이 15종을 기재한 것을 시점으로 Nakai(1909, 1911, 1916, 1922a, 1922b, 1925, 1928, 1952), Hama (1975), Ishidoya(1929), Maekawa(1954), Hashimoto(1967)등에 의하여 새로운 종의 분포 및 신분류군이 추가되었고, 국내학자인 Chung(1959)은 37종 6변종, 이(1969)는 48종 13변종 3품종, 박(1974)은 43종 3품종, 그리고 최근 이(2003)는 41종 7변종 6품종으로 정리하는 등 국내 분포종이 약 50여 종류 이상이 분포하는 것으로 알려져 있지만 종의 한계나 변이 폭의 설정은 학자에 따라 많은 견해 차이를 보이고 있다. 이외에 한국산에 대한 분류학적 연구는 일부 분류군에 대하여 형태학적 형질(황, 2002), 잎 표피 및 종자의 형태(이와 이, 1968), 염색체수 관찰(Lee, 1967, 1969), 성분분석(이와 육, 1972, 1975; Kim and Ko, 1980), 화분의 형태(황과 김, 1985), 염색체수와 DNA polymorphism (Choi *et al.*, 1996), 종분화론적 연구(김 등, 1991)가 수행된 바 있다. 한편 김(1986)은 30종 1변종을 대상으로 잎의 비교형태학적 연구를 수행한 후 기존의 분류체계와 비교하여 한국산을 3절 6아절 8계열로 정리하였으며, 최근 유 등 (2004)은 32분류군의 34집단에 대한 RAPD, ISSR과 PCR-RFLP 분석을 실시하여 중간유연관계를 밝힌 바 있다.

본 연구에서는 주로 외부형태 형질에 의해 분류되거나 일부분류군에 대한 분류학적 유연관계가 밝혀졌을 뿐, 최근 유 등(2004)에 의한 연구를 제외하고는 분자계통학적 연구가 수행되지 않은 한국산 제비꽃속 식물에 대하여 제비꽃속의 계통유연관계 분석에 유용한 방법으로 알려져 있고(Ballard, 1996), 종간 또는 속간 유연관계 분석에 널리 이용되고 있는 nuclear ribosomal DNA의 ITS지역(Baldwin, 1992; Baldwin *et al.*, 1995; Alice and Campbell, 1999, Downie *et al.*, 2000; Lia *et al.*, 2001)의 염기서열을 비교하여 종내/간 계통 유연관계를 분석해 보고자 한다.

재 료 및 방 법

실험재료는 2003년 3월부터 2004년 8월까지 우리나라와 일본에서 채집한 생체재료를 강원대학교 온실에 이식하여 사용하였으며, 증거표본은 강원대학교 생물학과 식물표본실(KWNU)에 보관하였다. 넓은 분포역을 갖는 아욱제비꽃, 콩제비꽃, 고깔제비꽃, 왜제비꽃 등은 일본산과 한국산을 구별하여 재료로 사용하였으며 실험에 사용된 분류군 및 채집지 정보는 Table 1과 같다. Outgroup은 Ballard *et al.*(1999)의 ITS연구결과에서 basal branching에 위치하였던 sect. *Rubellium*의 *V. capillaris*를 사용하였다.

실험에 사용한 DNA의 추출은 Doyle and Doyle(1987)의 방법을 따랐으며, 추출한 DNA는 Beckman spectrophotometer로 정량한 후 5ng/ μ l로 희석하여 PCR을 위한 DNA로 사용하였다. DNA 증폭은 DNA Thermal Cycler(Biometra, Whatman Co.)로 수행하였으며 ITS 지역의 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 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 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 하였으며, 분석방법은 Heuristic search를 이용하고, 그에 따른 option으로는 ACCTRAN, MULPARS, 그리고 TBR을 이용하였다. 또한 각 분계도의 지지정도를 알아보기 위하여 bootstrap (Felsenstein, 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).

결 과

ITS 염기서열의 특징 : 본 연구에서 다룬 36분류군의 총 40개체의 ITS 1, ITS 2와 5.8S의 길이는 685-712 bp로 나타났다(Table 2). 이중 ITS 1과 2는 각각 278-293bp, 243-256 bp의 범위로 ITS 1이 ITS 2보다 다소 길게 나타났으며 5.8S는 분류군 모두 163 bp로 변이가 없었다. 전체적으로는 흰뚝제비꽃(*V. lactiflora*)이 712 bp로 가장 길었으며 울릉도산 아욱제비꽃(*V. hondoensis*)이 685 bp로 가장 짧게 나타났다. ITS 1의 경우는 장백제비꽃(*V. biflora*)이

Table 1. Collection data of Korean *Viola* species used in this study.

Taxa	Voucher	Source	GenBank accession
Section <i>Dischidium</i> 장백제비꽃절			
<i>V. biflora</i> 장백제비꽃	Paik s.n. (KWNU)	Japan, Mt. Rishiri	AY928309
Section <i>Chamaemelanium</i> 노랑제비꽃			
<i>V. orientalis</i> 노랑제비꽃	Yoo 924 (KWNU)	Korea, Mt. Samyung	AY928271
<i>V. brevistipulata</i> var. <i>minor</i> 털노랑제비꽃	Yoo 810 (KWNU)	Korea, Mt. Daeam	AY928275
Section <i>Nominium</i> 진정제비꽃절			
Subsection <i>Hypocarpae</i> 아욱제비꽃아절			
<i>V. hondoensis</i> 아욱제비꽃	Yoo 837 (KWNU)	Korea, Ulleungdo	AY928272
<i>V. hondoensis</i> 아욱제비꽃	Yoo 1124 (KWNU)	Japan, Saitamahyun	AY928296
Subsection <i>Trigonocarpae</i> 닭시제비꽃아절			
Series <i>Campylostylae</i> 줄방제비꽃계열			
<i>V. acuminata</i> 줄방제비꽃	Yoo 799 (KWNU)	Korea, Mt. Myoungji	AY928273
<i>V. sachalinensis</i> 왜줄방제비꽃	Kim s.n. (KWNU)	Korea, Mt. Baekdu	AY928276
<i>V. websteri</i> 왕제비꽃	Chon s.n. (KWNU)	Korea, Mt. Yoomyong	AY928274
Series <i>Rostratae</i> 닭시제비꽃계열			
<i>V. ovato-oblonga</i> 긴잎제비꽃	Yoo 931 (KWNU)	Korea, Mt. Halla	AY928277
<i>V. kusanoana</i> 큰줄방제비꽃	Yoo 863 (KWNU)	Korea, Ulleungdo	AY928278
<i>V. grypoceras</i> 닭시제비꽃	Yoo 826 (KWNU)	Korea, Kwanumsa	AY928280
for. <i>albiflora</i> 흰닭시제비꽃	Yoo 868 (KWNU)	Korea, Mt. Halla	AY928281
var. <i>exilis</i> 애기닭시제비꽃	Yoo 833 (KWNU)	Korea, Mt. Halla	AY928282
Subsection <i>Bilobatae</i> 콩제비꽃아절			
Series <i>Verecundae</i> 콩제비꽃계열			
<i>V. verecunda</i> 콩제비꽃	Yoo 975 (KWNU)	Korea, Ulleungdo	AY928283
<i>V. verecunda</i> 콩제비꽃	Yoo 1129 (KWNU)	Japan, Shinzuku	AY928284
var. <i>semilunaris</i> 반달콩제비꽃	Yoo 040507 (KWNU)	Korea, Mt. Jungjok	AY928285
Series <i>Raddeanae</i> 선제비꽃계열			
<i>V. raddeana</i> 선제비꽃	Yoo 030603 (KWNU)	Korea, Wondong	AY928279

Table 1. (Continued).

Taxa	Voucher	Source	GenBank accession
Subsection <i>Vaginatae</i> 고깔제비꽃아질			
<i>V. rossii</i> 고깔제비꽃	Yoo 030514 (KWNU)	Korea, Haenam	AY928286
<i>V. rossii</i> 고깔제비꽃	Yoo 030823 (KWNU)	Japan, Maruyama	AY928287
<i>V. diamantiaca</i> 금강제비꽃	Yoo 030513 (KWNU)	Korea, Mt. Bokkye	AY928288
<i>V. yazawana</i> 예기금강제비꽃	Yoo 988 (KWNU)	Korea, Mt. Seorak	AY928289
Subsection <i>Patellares</i> 제비꽃아질			
Series <i>Pinnatae</i> 남산제비꽃계열			
<i>V. chaerophylloides</i> 남산제비꽃	Yoo 823 (KWNU)	Korea, Mt. Samyung	AY928290
Series <i>Chinensis</i> 제비꽃계열			
<i>V. woosanensis</i> 우산제비꽃	Yoo s.n. (KWNU)	Korea, Ulleungdo	AY928291
<i>V. albida</i> 태백제비꽃	Yoo 796 (KWNU)	Korea, Mt. Myoungji	AY928292
for. <i>takahashii</i> 단풍제비꽃	Yoo 030520 (KWNU)	Korea, Mt. Daedeok	AY928293
<i>V. phalacrocarpa</i> 털제비꽃	Yoo 030514-1 (KWNU)	Korea, Haenam	AY928294
<i>V. japonica</i> 외제비꽃	Yoo 030428 (KWNU)	Korea, Mt. Halla	AY928295
<i>V. japonica</i> 외제비꽃	Yoo 030823-1 (KWNU)	Japan, Maruyamahyun	AY928304
<i>V. hirtipes</i> 흰털제비꽃	Park 030506 (KWNU)	Korea, Cheolwon	AY928297
<i>V. patrinii</i> 흰제비꽃	Yoo 936 (KWNU)	Korea, Chejudo	AY928298
<i>V. lactiflora</i> 흰젖제비꽃	Yoo 831 (KWNU)	Korea, Mt. Samyung	AY928299
<i>V. mandshurica</i> 제비꽃	Yoo 916 (KWNU)	Korea, Chejudo	AY928300
<i>V. seoulensis</i> 서울제비꽃	Lee & Heo 3029 (KWNU)	Korea, Mt. Sambang	AY928301
<i>V. yedoensis</i> 호제비꽃	Yoo 030520-1 (KWNU)	Korea, Mt. Daedeok	AY928302
Series <i>Variiegatae</i> 알록제비꽃계열			
<i>V. keiskei</i> 잔털제비꽃	Yoo 858 (KWNU)	Korea, Myoungji	AY928303
<i>V. variegata</i> 알록제비꽃	Yoo 967 (KWNU)	Korea, Myoungji	AY928305
var. <i>chinensis</i> 자주알록제비꽃	Yoo 030429 (KWNU)	Korea, Yanggu	AY928306
Series <i>Patellares</i> 피제비꽃계열			
<i>V. selkirkii</i> 피제비꽃	Yoo 030429 (KWNU)	Korea, Mt. Myoungji	AY928307
<i>V. violacea</i> 자주잎제비꽃	Yoo 983 (KWNU)	Korea, Chejudo	AY928308
Outgroup			
<i>V. capillaris</i>	Peñailillo & Mazzeo 7522 (F)	Chile, Concepción	AF097222
			AF097268

Table 2. Characteristics of the two internal transcribed spacers (ITS 1 and 2) and the intervening 5.8S region, separate and combined data for 40 accessions of Korean *Viola* and outgroup.

Character	ITS 1	5.8S	ITS 2	Combined (ITS 1+5.8S+ITS 2)
Length of sequence region (bp)	278-293	163	243-256	685-712
Aligned length	299	163	256	718
No. of Variable sites	133	15	93	241
No. of informative sites	88	5	62	155
GC content (%)	64.1	54.2	61.6	60.1
Sequence distance (%)				
<i>Viola</i> + outgroup	0-45.43	0-3.80	0-26.32	0.14-24.32
Within <i>Viola</i>	0-36.58	0-3.25	0-20.19	0-16.11
No. of alignment gaps	14	0	8	22

292 bp로 가장 길었으며 울릉도산 아욱제비꽃이 가장 짧게 나타났다. ITS 2는 남산제비꽃(*V. chaerophylloides*), 우산제비꽃(*V. woosanensis*), 털제비꽃(*V. phalacrocarpa*), 흰젓제비꽃, 호제비꽃(*V. yedoensis*)이 256 bp로 가장 길었고 왜졸방제비꽃(*V. sacchalinensis*)은 243 bp로 가장 짧게 나타났다. 염기조성 중 G+C의 함량은 ITS 1과 2가 각각 평균 64.1%와 61.6%, 5.8S는 54.2%로 적게 나타났으며 전체적으로는 평균 60.1%로 나타났다. Gap은 대부분 1-3 bp였지만 ITS 1의 102-114번 위치에 13 bp, ITS 2의 40-45번 위치에 6 bp의 삽입된 염기가 있었다. 정렬된 총 718 bp 중 477개는 염기서열의 변화가 없고, 나머지 241개가 염기서열의 변화를 가졌으며 그 중 155개는 계통학적으로 유용한 공유파생형질이었다.

염기변이 : 조사된 40개체의 염기변이는 군외군을 포함하여 0.14-24.32%로 높게 나타났으나 군외군을 제외한 39개체의 염기변이는 0-16.11%로 다소 낮게 나타났다. 군외군을 포함한 data에서 염기서열의 변이가 가장 낮은 분류군들은 콩제비꽃 집단이었으며, 24.32%로 가장 높은 변이를 보인 것은 아욱제비꽃-군외군(*V. capillaris*)이었다. 한편 군외군을 제외한 data에서는 뫼제비꽃-서울제비꽃은 변이가 없었고, 자주잎제비꽃-아욱제비꽃이 24.32%로 가장 높게 나타났다(Table 2). 한편 군외군을 포함한 결과의 한국산과 일본산 집단의 비교에서는 콩제비꽃이 0.14%, 고깔제비꽃이 0.43%, 잔털제비꽃은 3.49%, 왜제비꽃은 8.84%의 높은 염기변이를 갖는 것으로 나타났다. 종하분류군에서는 뉘시제비꽃, 애기뉘시제비꽃, 흰뉘시제비꽃이 0.15-0.29%, 태백제비꽃과 단풍제비꽃은 0.58%, 알록제비꽃과 자주알록제비꽃은 0.99%로 비교적 낮게 나타났다.

계통학적분석 : 40개의 ITS 염기서열의 최대절약분석 결과, 전체 613단계의 길이를 갖는 290개의 가장 짧은 계통수를 얻었으며 autoapomorphy를 제외한 consistency index는 0.623,

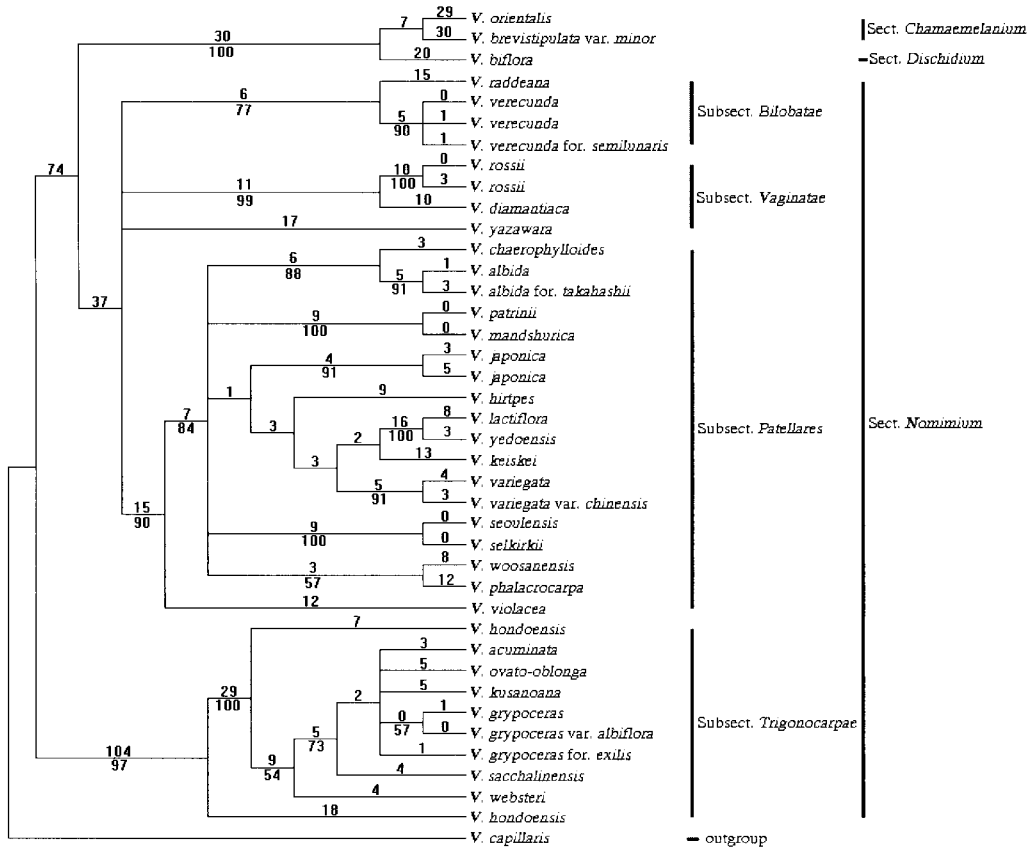


Fig. 1. Strict consensus tree of the 290 equally parsimonious trees (613 steps, CI=0.623, RI=0.833, RC=0.519) based on 155 phylogenetically informative changes in ITS sequences of the Korean *Viola*. The number of changes is indicated above branches and bootstrap values are found below branches.

retention index는 0.833, rescaled consistency index는 0.519을 나타내었다. 얻어진 strict consensus tree는 Fig. 1과 같다. 그 결과 한국산 제비꽃속의 분류군들은 절 및 아절 수준에서 몇 개의 분계조를 형성하였다. 즉, 진정제비꽃절의 낚시제비꽃아절은 104개의 synapomorphic change와, 97%의 bootstrap 지지도를 가지고 군내군의 가장 기부에 분계조를 형성하였으며, 노랑제비꽃절과 장백제비꽃절은 30개의 synapomorphic change, 100%의 bootstrap value를 가지고 분계조를 형성하였다. 콩제비꽃아절은 6개의 synapomorphic change와 77% bootstrap 의 지지도를 가지고 분계조를 형성하였으며 고갈제비꽃아절은 11개의 synapomorphic change 와 99%의 높은 bootstrap value를 가지고 분계조를 형성하였고, 애기금강제비꽃은 17개의

autapomorphic change를 가지고 있었다. 한편 가장 많은 분류군이 포함되어 있는 제비꽃아절은 15개의 synapomorphic change와 90%의 bootstrap 지지도를 가지고 분계조를 형성하였다. 그러나 계열(series) 수준에서는 뚜렷한 분계조를 형성하지 않았다. 한편 maximum likelihood tree는 최대절약분석에 의한 결과와 거의 동일한 분계조를 형성하였고, 염기변이에 기초하여 얻어진 NJ 분석에서도 일부 분류군들의 자리아동을 제외하고는 같은 결과를 보였다 (Fig. 2).

고 찰

염기변이와 군외군의 선정: 제비꽃속에 속하는 종류들은 근연종간 형태적 유사성으로 식별이 어려울 뿐만 아니라, 종내에서도 변이가 심하게 나타나 종의 한계를 설정하는데 어려움이 있고, 종간교잡에 의한 중간형들이 출현하므로 분류학적으로 취급하기 어려운 분류군이 많은 것으로 알려져 있다(Russell, 1960). 따라서 종간/내 염기변이도 매우 심하게 나타나는데 특히 *V. capillaris*와 *V. clauseniana*의 ITS sequence divergence는 28.8%로 지금까지 알려진 제비꽃속의 종간 변이가 가장 큰 것으로 알려져 있으며(Ballard *et al.*, 1999), 이외에도 *Arceuthobium*(Nickrent *et al.*, 1994), *Senecio*속(Bain and Jansen, 1995)도 염기변이가 심한 분류군으로 알려져 있다. 본 연구에서도 군내군의 종간 염기변이는 0-16.11%로 높게 나타났으며, 잔털제비꽃과 아욱제비꽃은 같은 절에 포함되어 있음에도 불구하고 한국산 중에는 가장 높은 염기변이를 보였고 종내 변이에서도 염기의 다양성을 보여 종내 유연관계 분석도 용이하였다. 그러나 이와는 반대로 군내군을 위한 군외군의 설정에 있어서는 너무 심한 염기변이 때문에 alignment가 불가능하게 나타났다. 이러한 결과는 제비꽃속의 *nrITS*(Ballard *et al.*, 1999)와 *rbcL*(Hodges *et al.*, 1995)에 대한 연구에서도 나타났으며 본 연구에서도 근연속들 중 4종, 즉 *Hybanthus verticillatus*, *Rinorea lanceolata*, *R. benghalensis*, *Melicytus ramiflorus*를 군외군으로 사용하였으나 alignment가 불가능하여 Ballard *et al.* (1999)에 의한 ITS결과에서 basal position에 분계조를 형성한 section *Rubellium*의 *V. capillaris*를 군외군으로 사용하였다.

속내 분류계급의 유연관계: 제비꽃속의 속내 분류체계는 주두의 형태, 꽃의 색깔, 지하경의 유무, 탁엽의 모양, 엽맥의 유형에 따라 설정되어 왔다(Gingins, 1823; Becker, 1925b; Yuzepchuk, 1949; Wang, 1991; 김, 1986). 이에 의하면 한국산 제비꽃속은 3개의 절, 즉 *Chamaemelanium*(노랑제비꽃)절, *Dischidium*(장백제비꽃)절, *Nomimium*(진정제비꽃)절로 대별된다(Kim, 1986). 최근 유 등 (2004)은 장백제비꽃을 제외한 나머지 2절에 대한 RAPD, ISSR, PCR-RFLP분석을 통하여 한국산 제비꽃속이 절간 구분은 명확하지 않더라도 아절과 계열수준에서는 잘 유집되는 것으로 보고한 바 있다. 본 연구에서 ITS에 의한 결과는 장백제비꽃절과 노랑제비꽃절은 서로 자매군을 형성하면서 독립된 분계조를 형성하였지만 진정제비

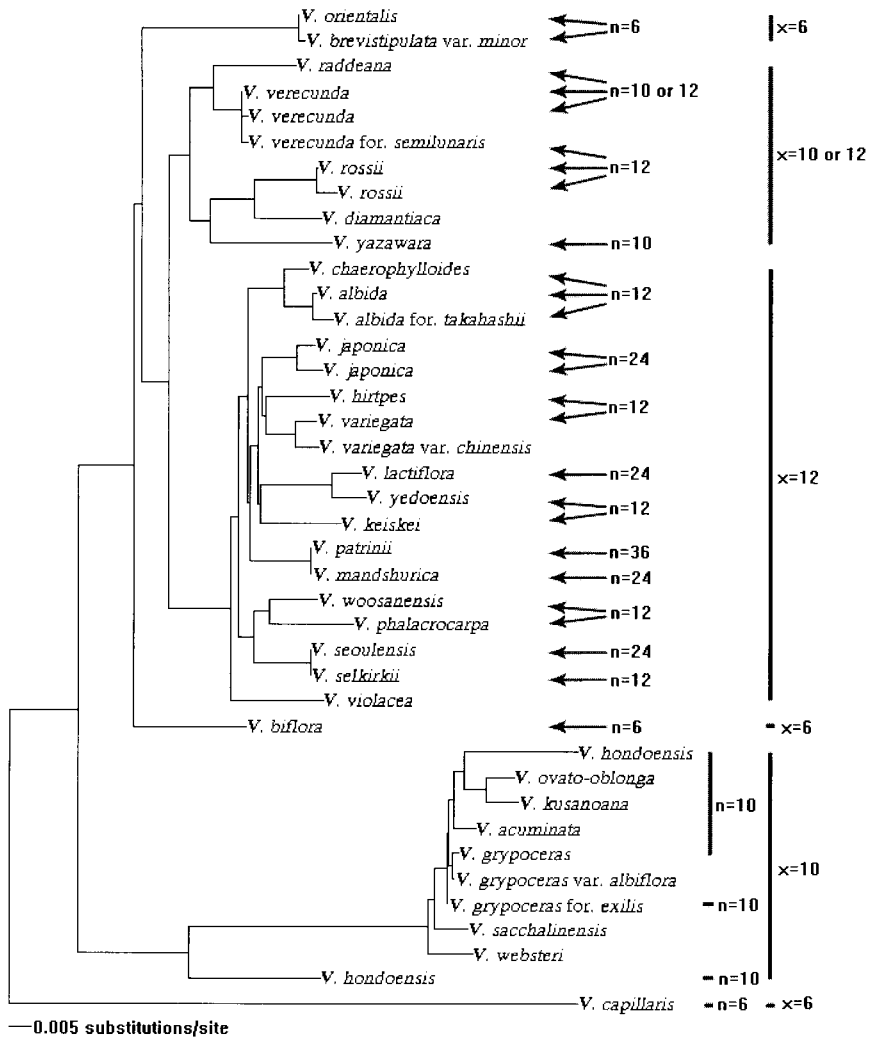


Fig. 2. Neighbor-Joining tree of Korean *Viola* by Kimura-two-parameter distance based on ITS sequences.

꽃절은 paraphyletic하게 유집되는경향을 보였다. 절 이하의 분류계급에서 아절과 일부 계열은 구별이 가능하였지만 제비꽃아절에 속하는 계열들은 서로 중복되는 분계조를 형성하였다. Clausen (1929)은 노랑제비꽃절과 장백제비꽃절에 속하는 분류군들의 염색체수와 꽃 색깔이 같고 주두형태가 비슷하여 같은 절로 통합해야 한다고 주장했지만 김(1986)은 엽맥의 특징이 서로 상이하여 독립적인 절로 인정하는 것을 지지했는데 ITS에 의한 결과에서도 두 절은 두

렷하게 구별되어 분계조를 형성하였으며 두 절간 염기변이도 5.95-6.11%로 높게 나타나 김(1986)의 견해를 지지하였다. 한편 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 차이가 있다. 본 연구 결과에서 $x=6$ 인 군외군을 중심으로 가장 먼저 기부에 분계조를 형성한 것은 $x=10$ 을 가지는 유경종인 진정제비꽃절의 낚시제비꽃아절과 아욱제비꽃으로 다른 분류군들과는 기원에 있어 차이를 보였다. 노랑제비꽃절과 장백제비꽃절은 진정제비꽃절의 아절 사이에 위치하면서 낚시제비꽃과 아욱제비꽃아절을 제외한 3개 아절의 기원이 되는 자매군으로 분계되었는데 3개 아절 중 $x=10$ 또는 12인 선제비꽃, 콩제비꽃아절과 고깔제비꽃아절이 하나의 분계조를 형성하였으며, $x=12$ 이고 무경종으로 구성된 제비꽃아절 역시 뚜렷하게 구별되는 분계조를 형성하였다. 김(1986)은 잎맥의 특징으로 기본염색체수 $x=6$ 을 갖는 노랑제비꽃절과 장백제비꽃절이 가장 원시적이고, 진정제비꽃절 중 $x=10$ 인 낚시제비꽃아절, 아욱제비꽃아절, $x=12$ 인 제비꽃아절, 고깔제비꽃아절, 엷은잎제비꽃아절의 분화에 있어 $x=10$ 또는 12를 갖는 콩제비꽃아절이 중간역할을 한 것으로 추정하였는데 본 연구 결과에서 다른 ITS에 의한 결과와는 차이를 보였다. Ballard (1996)는 진정제비꽃절에서 보여지는 $x=10$ 인 분류군들이 $x=12$ 를 가지는 것으로부터 기원되었을 것이고 sect. *Melanium*에서 보여지는 $x=10$ 인 개체들은 $x=6$ 으로부터 aneuploid drop에 의해 기원되었을 것으로 추측하면서 앞으로 제비꽃속의 계통과 세포학적 유연관계, 특히 노랑제비꽃절, *Melanium*절, 진정제비꽃절에 대한 추가적인 연구의 필요성을 제기하였다. 또한 Ballard *et al.* (1999)은 ITS분석을 통해 노랑제비꽃절이 진정제비꽃절의 $x=12$ 이며 무경종인 group들 사이에 위치하고, 유경종이며 $x=10$ 인 무리들은 *Melanium*절이나 sect. *Nosphinium*절과 clade를 형성하여 제비꽃속의 속하 분류체계에 대한 재설정이 필요하다고 주장한 바 있다. 본 연구에서도 진정제비꽃절의 $x=10$ 인 낚시제비꽃아절은 군외군으로부터 가장 먼저 분지되어 독립된 분계조를 형성하였고, 나머지 분류군들도 $x=6$ 인 분류군으로부터 $x=10$ 또는 12인 종류와 단계통으로 분지되어 기존의 분류체계와는 차이를 보였다. 그러나 한국에 분포하는 종류들 중 노랑제비꽃절과 장백제비꽃절은 1-2종류만이 분포하며 대부분이 진정제비꽃절에 편중되므로 한국산에 한정하여 분류계급의 이전이나 통합 등을 논의하는 것은 무리가 있다고 생각된다. 또한 염색체수에 있어서도 자생지에 따라 같은 종 내에서 많은 변이가 나타나는 것으로(Choi *et al.*, 1996) 보고되고 있으므로 제비꽃속의 계통을 논하기 위해서는 다양한 유전자분석과 충분한 세포학적 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다. 한편 아절 이하 분류계급의 유연관계에서 *Trigonocarpae*아절의 *Rostratae*계열 *Campylostylae* 계열은 다른 분류계급으로 이전 또는 같은 군으로 통합하기도 하는데(Anonymous, 1977), 본 연구에서 두 계열은 9개의 synapomorphic change와 54%의 bootstrap value로 분계조를 형성하였지만 계열별 유집은 불가능하여 같은 군으로의 통합 가능성도 제시해 주었다. Becker(1925b)와 Ishidoya (1929)는 왕제비꽃을 콩제비꽃이나 선제비꽃과 같은 군으로 묶기도 하였는데 ITS에 의한 결과는 왕제비꽃이 콩제비꽃아절과는 전혀 다른 분계조를 형성하여 왕제비꽃을 줄방제비꽃계열

에 포함시킨 Takenouchi(1955)의 결과를 지지하였다. 제비꽃아절의 아절 내 분류체계는 잎의 형질에 많은 변이가 있어 분류계급 설정에 이견이 있는 종류로 김(1986)은 한국산을 4개의 계열로 정리하였는데 본 연구결과는 지지되지 않았다. 형태적으로 매우 유사한 태백제비꽃군 (*V. albida* complex), 즉 *Chinensis* 계열의 태백제비꽃과 단풍제비꽃, *Pinnatae* 계열에 속하는 남산제비꽃은 같은 아절 또는 같은 계열에 포함시키기도 하며(Becker, 1925b; Takenouchi, 1955; Maekawa and Hashimoto, 1963; Anonymous, 1977), 독립적인 종으로 취급되기도 한다(Ishidoya, 1929; 김, 1986). 한국산에 대하여 김 등(1991)은 이 그룹의 모종을 태백제비꽃으로 하고 단풍제비꽃과 남산제비꽃은 변종으로 취급하였다. 최근 유 등(2004)에 의한 결과는 이들 3분류군이 *Patellares* 아절 내에서 독립적인 군을 형성하여 다른 종들과는 차이를 보이는 것으로 나타나 Wang(1991)의 연구에서 처럼 독립적인 분류계급으로 설정하거나 태백제비꽃과 단풍제비꽃을 남산제비꽃이 포함되어 있는 *Pinnatae* 계열로 이전시키는 의견을 제시한 바 있다. ITS에 의한 결과에서도 3분류군들은 제비꽃질 내에서 다른 분류군들과는 구별되는 분계조를 형성하므로 유 등(2004)의 결과와 일치하는 경향을 보였다. 그러나 잎 거치의 형태, 열편의 모양 등은 개체에 따라 많은 변이를 보이므로 이 그룹에 대한 종합적인 연구가 필요하다고 생각된다. 한편 남산제비꽃과 뒤희제비꽃의 잡종형인 우산제비꽃(Lee, 1998)은 털제비꽃과 분계조를 형성하였고 뒤희제비꽃은 서울제비꽃, 남산제비꽃은 태백제비꽃, 단풍제비꽃과 분계조를 형성하여 형태적 특징에 의한 분류와는 일치하지 않는 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 지역대학우수과학자지원 연구(R05-2003-000-10566-0)지원으로 수행되었음. 식물재료 수집에 도움을 주신 전의식선생님, 백원기박사님, 정규영박사님, 김영동박사님, Mr. Masashi Igari 그리고 Kew Botanical Garden의 Mr. Edith Kapos에게 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Alice, L. A. and C. S. Campbell. 1999. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *Amer. J. Bot.* 86: 81-97.
- Anonymous. 1977. *Flora Plantarum Herbacearum Chinae Boreali-Orientalis*. Tomus 6. Sci. Publ. Pp. 79-129.
- Bain, J. F. and R. K. Jansen. 1995. A phylogenetic analysis of the aureoid *Senecio* (Asteraceae) complex based on ITS sequence data. *Pl. System. Evol.* 195: 209-219.
- Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Mol. Phyl. Evol.* 1: 3-16.
- _____, 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.
- 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.
- _____ and K. J. Sytsma. 1997a. Further relevations on adaptive radiation in Hawaiian *Viola* (Violaceae) based on Internal Transcribed Spacer DNA sequences. *Amer. J. Bot.*(supplement) 84: 177.
- _____, M. D. Devine and K. J. Sytsma. 1997b. Centrifugal allopatric speciation in the *Viola canadensis* complex (Violaceae) based on ITS DNA sequences. *Amer. J. Bot.*(supplement) 84: 177.
- _____, K. Inoue and K. J. Sytsma. 1998. Phylogenetic relationships and biogeography of Japanese violets (*Viola*) based on ITS DNA sequences. *Amer. J. Bot.* (supplement) 85: 108.
- _____, 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. 1916. *Violae Asiaticae et Australenses*. I. Beihefte zum botanischen Centralblatt, Abt. II, 34: 208-266.
- _____. 1917a. *Violae Asiaticae et Australenses*. I. Bearbeitung der Gruppe

- “Sandvicenses” W. Bckr. ined. Beihefte zum botanischen Centralblatt 34, Abt. II: 209-216.
- _____. 1917b. *Violae Asiaticae et Australenses*. II. Beihefte zum botanischen Centralblatt, Abt. II. 34: 373-433.
- _____. 1918. *Violae Asiaticae et Australenses*. III. Beihefte zum botanischen Centralblatt, Abt. II, 36: 15-59.
- _____. 1922. *Violae novae Americanae meridionalis*. Feddes Repertorium 18: 180-186.
- _____. 1923a. *Violae Asiaticae et Australenses*. IV. Beihefte zum botanischen Centralblatt, Abt. II, 40: 20-68.
- _____. 1923b. *Violae Asiaticae et Australenses*. V. Beihefte zum botanischen Centralblatt, Abt. II, 40: 69-171.
- _____. 1923c. *Violae Mexicanae et Centrali-Americanae*. I. Feddes Repertorium 19: 392-400.
- _____. 1924. *Violae Mexicanae et Centrali-Americanae*. II. Feddes Repertorium 20: 1-12.
- _____. 1925a. Beiträge zur Kenntnis der südamerikanischen *Violae*. Feddes Repertorium 21: 349-361.
- _____. 1925b. *Viola*. In Engler, A. and K. Prantl, 2nd eds., 21 Bd. Die Natürlichen 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.
- Chung, T. H. 1959. A key of the species of *Violaceae* from Korea. J. Plant Biol. 2: 25-26.
- Clausen, J. 1927. Chromosome number and the relationship of species in the genus *Viola*. Ann. Bot. 41: 677-714.
- _____. 1929. Chromosome number and the relationship of some North American species of *Viola*. Ann. Bot. 43: 741-764.
- _____. 1964. Cytotaxonomy and distributional ecology of western North American violets. Madrõno 17: 173-204.
- Downie, S. R., D. S. Katz-Downie and K. Spalik. 2000. A phylogeny of *Apiaceae* tribe *Scandiceae*: evidence from molecular ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Amer. J. Bot. 87: 76-95.
- 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* 39: 789-791.
- Gershoy, A. 1934. Studies in North American violets. III. Chromosome numbers and species characters. Vermont Agricultural Experiment Station Bulletin no. 367. pp. 91
- 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.
- Hama, E. 1975. The wild violets of Japan in color. Sungmoondang, Tokyo.
- Hashimoto, T. 1967. Violets of Japan. Sungmoondang, Tokyo.
- Hodges, S. A., H. E. Ballard, Jr., M. L. Arnold and M. W. Chase. 1995. Generic relationships in the Violaceae: data from morphology, anatomy, chromosome numbers and *rbcL* sequences. *Amer. J. Bot.* (supplement) 82: 136.
- Ishidoya, T. 1929. Review of *Viola* from Korean and Manshuria. *Jour. Chosen Nat. Hist. Soc.* 8: 15-17.
- Kim, C. M. and W. J. Ko. 1980. Chemotaxonomic study on the genus *Viola* in Jeju Island. *J. Plant Biol.* 23: 85-90.
- 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 numbers of flowering plants in Korea (1). *J. Kor. Res. Inst.* 11: 455-478.
- _____. 1969. Chromosome numbers of flowering plants in Korea (2). *J. Kor. Res. Inst. B.L.* 2: 141-145.
- _____. 1998. New taxa on Korean flora (6). *Kor. J. Plant Tax.* 28: 25-39.
- Lia, V. V., V. A. Confalonieri, C. I. Comas and J. H. Hunziker. 2001. Molecular phylogeny of *Larrea* and its allies (Zygophyllaceae): reticulate evolution and the probable time of creosote bush arrival to North America. *Molec. Phylogenet. Evol.* 21: 309-320.
- Maekawa, F. 1954. Violaceae. *In Enumeratio Spermatophytarum Japonicum*. III. Hara, H. (ed.), Iwanami, Tokyo. Pp. 194-227.
- _____. and T. Hashimoto. 1963. Violets of Japan : 2. Shibundo-shinko-sha, Tokyo. Pp. 1-9.

- Miyaji, Y. 1929. Studien über die Zahlen Verhältnisse der Chromosomen bei der Gattung *Viola*. Cytologia 1: 28-58.
- Nakai, T. 1909. Flora Koreana I. J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo 26: 62-74.
- _____. 1911. Flora Koreana II. J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo 31: 445-447.
- _____. 1916. *Viola coreanae*. Bot. Mag. (Tokyo) 30: 276-289.
- _____. 1922a. *Violae Novae Japonicae*. Bot. Mag. (Tokyo) 34: 29-39.
- _____. 1922b. Notes on *Viola*. Bot. Mag. (Tokyo) 36: 52-61, 84-93, 118-121.
- _____. 1925. Notes sur les Violettes du Japan. Bull. Soc. Bot. (France) 73: 180-195.
- _____. 1928. *Violae ad Floram Japonicum Novae*. Bot. Mag. (Tokyo) 42: 556-566.
- _____. 1952. A synoptical sketch of Korean Flora. Bull. Nat. Sci. Mus. 31: 1-152.
- Nickrent, D. L., K. P. Schuette and E. M. Starr. 1994. A molecular phylogeny of *Arceuthobium* (Viscaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Amer. J. Bot. 81: 1149-1160.
- Palibin, J. 1899. Conspectus Florae Koreae I. Acta Horti. Petrop. 17: 30-36.
- Russell, N. H. 1960. Studies in the photoperiodic responses of violets (*Viola*). The Southwestern Naturalist 5: 177-186.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new for reconstructing Phylogenetic trees, Molec. Biol. Evol. 4: 406-425.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods. Version 4.02b Sinauer Asso. Inc., Massachusetts, USA.
- Takenouchi, M. 1955. Brief notes on the taxonomy, ecology and geographic distribution of species of *Viola* indigenous to Manchuria and Inner-Mongolia. Sci. Contr. Tung-pei Teach. Univ. 5: 65-95.
- Wang, C. 1991. Reipublicae Popularis Sinicae. Science Press. 51: 1-148.
- 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.
- 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.
- _____, 선병윤, 황성수, 정국현. 1991. 한국산 제비꽃속의 종분화론적 연구-태백제비꽃군의 비교형태학적 연구. 식물학회지 34: 229-238.
- 박만규. 1974. 한국쌍자엽식물지. 정음사, 서울. Pp. 272-279.

- 유기억, 이우철, 권오근. 2004. RAPD, ISSR과 PCR-RFLP를 이용한 한국산 제비꽃속(*Viola*)의 종간 유연관계. 식물분류학회지 34: 43-61.
- 이우철, 육창수. 1972. 금강제비꽃 잎의 flavonoid 배당체에 대하여. 식물분류학회지 5: 43-45.
- _____, _____. 1975. 한국산 제비꽃속의 성분에 의한 분류. 식물분류학회지 6: 1-7.
- 이영로, 이우철. 1968. 제비꽃속 식물의 잎표피와 종자의 형태학적 연구. 생활과학논문집 1: 35-39.
- 이창복. 1969. 우리나라의 식물자원. 서울대논문집, 농생계. 20: 158-159.
- _____. 2003. 원색대한식물도감. 향문사, 서울.
- 황성수. 2002. 한국산 제비꽃속 노랑제비꽃절의 분류학적 연구-형태학적 형질을 중심으로. 식물분류학회지 32: 397-416.
- _____. 김경식. 1985. 제비꽃속 화분의 형태학적 연구. 전북대 기초과학연구소 논문집 8: 53-59.

Phylogeny of Korean *Viola* based on ITS sequences

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

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

Molecular phylogenetic studies were conducted to evaluate interspecific relationships in 40 populations of *Viola* including 35 Korean taxa, four Japanese populations and one outgroup using nuclear ribosomal ITS sequences. The phylogenetic analyses were conducted using parsimony and neighbor-joining methods. Subsection *Trigonocarpae* of section *Nomimium* appeared as the most basal clade within the Korean *Viola*. Section *Dischidium* and *Chamaemelanium* was monophyletic(bootstrap 100%) and placed between subsect. *Trigonocarpae* and three other subsections of sect. *Nomimium*. Sect. *Nomimium* was paraphyletic. Although each subsectional grouping was in accordance with previous infrageneric classification based on morphological characters, yet discordance remained at the series level. Two evolutionary trends observed in the ITS tree were as follows. First, subsect. *Trigonocarpae*(x=10) was derived from the outgroup(x=6); Second, subsects. *Bilobatae* and *Vaginatae*(x=10 or 12), and subsect. *Patellares*(x=12) of sect. *Nomimium* were originated from sects. *Dischidium* and *Chamaemelanium*(x=6). *Viola albida* complex including three very closely related taxa was recognized as independent group within subsect. *Patellares* in parsimony tree. This result suggested that they should be treated as a taxa in series *Pinnatae*. Phylogenetic position of a putative hybrid species, *Viola woosanensis* was not supported with previous morphological hypothesis.

Key words: ITS, phylogenetic relationships, *Viola*

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