

태백제비꽃군 ITS DNA 염기서열 분석

황성수*

전북대학교 과학교육학부

Analysis of ITS DNA Sequences of the *Viola albida* Complex

Sung Soo Whang*

Division of Science Education, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

Abstract - ITS DNA sequences from five individuals, representative of five groups designated according to the degree of leaf teeth and lobes from simple to palmate compound leaf in the *Viola albida* complex, established and further analysed in order to solve the taxonomic difficulty. A total 702 bp was sequenced at the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer 1 and 2. The 5.8S coding region is 163 bp, and has no sequence variations. The ITS1 and ITS2 noncoding regions have a little bit sequence variations, and those were further analysed by the methods of the analysis of variance (ANOVA), the analysis of sequence divergence and the phylogenetic analysis. The result of ANOVA showed no significant differences among individuals investigated. The analysis of sequence divergence with Kimura 2-parameter distance revealed that in-groups showed much less than 0.05 in absolute value among individuals, while two out groups more than 0.05, *V. grypoceras* and *V. orientalis*. This result appeared that the sequence divergence among in-groups was not yet occurred in the species level but situated at somewhere below the species level. In the phylogenetic analysis, two outgroups formed the basal clades in order. Five individuals in-groups formed a clade. The clade was, however, not very robust as around 50% in bootstrap value, suggesting that this result was not meaningful in the phylogenetic point of views.

Key words - TS DNA sequences, The *Viola albida* complex

서 언

태백제비꽃군(*Viola albida* complex) 식물은 제비꽃속내에서 유일하게 흰색의 꽃을 피며, 비교적 여성적이고 가련함이 있어 제비꽃 애호가들에게 사랑을 받고 있다(Hashimoto, 1967). 본 군은 향기가 있어 '사향제비꽃'으로도 불리며, 오래 전부터 향신료 추출식물로 이용되어 왔다(Stebbins *et al.*, 1963). 꽃과 잎은 관상용으로 가치가 있어 화훼용으로 적합하며, 가정에서는 오래전부터 식용 및 한약재로 쓰여 왔다(Harborne and Turner, 1984). 또한, 본 군은 진정폐쇄화(true cleistogamy)를 생성하는 식물이다(Berg and Redbo-Torstenson, 1999). 봄에는 타가수정을 통해 유전적 다양성을 유도하는 열개화(chasmogamous flowers)를, 여름과 가을에는 자가수정을 통해 폐쇄화를 맺는 특별한 번식 전략을 갖고 있어 오래전부터 연구자들의 관심의 대상이 되어왔다(Darwin, 1877; Lord, 1981). 또한, 폐쇄화는 환경오염, 영양결핍 그리고 수분부족 같은 스트레스 환경에서 더욱 더 많이 생성되기 때문에 환경 지표종으로도 이용될 수 있다(Waller, 1980; Schmitt and Ehrhardt, 1990).

본 군내 분류군들의 설정은 Linne(1753)가 유럽과 시베리아에 분포하는 제비꽃속 식물 중 잎이 갈라져서 복엽인 종류를 *V. pinnata* L.로 명

명한 것을 시작으로, Ledebour(1829)은 *V. dissecta*를, Regel(1861)은 *V. pinnata* var. *chaerophylloides*를, Becker(1902)는 *V. chaerophylloides*를 차례로 보고하면서 윤곽이 점차 드러났다. 한편, Maximowicz(1877)은 상기의 종류들을 *V. pinnata*의 종내 변종으로 보고 *V. pinnata* var. *dissecta*, *V. pinnata* var. *sieboldiana*, *V. pinnata* var. *chaerophylloides* 등으로 학명 처리하였다. 그러나 Maekawa(1954)는 상기의 종류를 *V. albida*의 종내 분류군으로 취급하여 *V. albida* var. *albida*, *V. albida* var. *chaerophylloides*, *V. albida* f. *sieboldiana* 등으로, Ito(1962)는 일본산을 *V. dissecta*의 종내 분류군으로 보고 *V. dissecta* var. *chaerophylloides*와 *V. dissecta* var. *sieboldiana*로 분류하여 연구기간 학명 취택 및 동정 기준이 다르게 나타났다. 본 연구진은 본 군 식물들을 대상으로 생육양상과 주두, 약편, 잎, 화분 등의 형태 그리고 동위효소의 유전적 변이 분석 등의 특징을 조사하고 본 군을 태백제비꽃(*V. albida* var. *albida*), 단풍제비꽃(*V. albida* var. *takahashii*), 그리고 남산제비꽃(*V. albida* var. *chaerophylloides*) 등의 복합체로 보고한 바 있다(Kim *et al.*, 1991).

본 군내 분류군들은 유연관계가 깊기 때문에 여러 연구자들에 의해 동일 절(section)내의 동일 아절(subsection) 혹은 동일 계열(series) 등에 포함되었다. Becker(1925)는 *Nomimium*절 *Adnatae*

*교신저자(E-mail) : whang@chonbuk.ac.kr

아절에, Takenouchi (1955)는 *Nomimium*절 *Pinnatae*계열에, 그리고 Maekawa와 Hahimoto(1963)는 *Patellares*절 *Chinensis*아절 *Pinnatae*계열에, Fu and Teng(1991)은 *Nomimium*절 *Violidium*아절에 본 군을 각각 위치시켰다. 최근 Yoo *et al.* (2004, 2005)은 한국 산을 대상으로 RAPD, ISSR, PCR-RFLP 그리고 ITS 염기서열을 조사하여 태백제비꽃, 단풍제비꽃 그리고 남산제비꽃 등 3종을 독립적인 분류계급으로 설정하거나 *Chinensis*계열에 속하는 태백제비꽃과 단풍제비꽃을 남산제비꽃이 포함되어 있는 *Pinnatae*계열로 이전시키는 것이 타당하다고 보고하였다. 한편, 태백제비꽃의 경우 단엽인 특성으로 연구자에 따라 서로 다른 분류계급에 위치시킨 바도 있었다. Ishido(1929)는 절 아래의 *typus*를 두어 태백제비꽃과 간도제비꽃을 서로 다른 *typus*에 포함시켰으며, Kim(1986)도 엽맥상을 근거로 남산제비꽃과 태백제비꽃을 서로 다른 계열에 포함시킨 바 있다.

태백제비꽃군 식물들은 잎의 특징을 제외한 기타의 형태 형질의 구별이 어려우며, 중간에 거의 자유로운 교잡이 일어난다. 또한, 잎은 단엽에서 장상복엽까지 연속적인 중간형태가 나타나고 있어 분류학적으로 어려운 분류군이다(Russell, 1960; Kim, 1986; Kim *et al.*, 1991). 본 연구진이 여러 생육지에서 관찰한 바에 의하면 반경 2~3 m 이내에도 단엽에서 장상복엽까지 본 군내 분류군의 다양한 중간형이 생육하는 것이 확인되었다(Kim *et al.*, 1991). 이에 동소적으로 생육하면서 잎의 거치 및 결각이 연속적인 중간형들을 대상으로 유전적 분기 정도를 조사할 필요가 있다.

한편, DNA 염기서열 형질은 형태 형질이나 단백질 형질에 비해 환경적 변이가 거의 없고, 직접적인 유전적 변이를 보여주지 때문에 이를 기초로 한 분류학적 행위는 보다 효율적이고 신빙성이 있다(Apples and Honeycutt, 1986; Kim and Jansen, 1994). 특히, ITS 지역들의 DNA 염기서열은 진화의 속도가 빠르게 나타나기 때문에 종 이하의 분류군의 분류에도 유용하게 사용되고 있으며(Sytsma and Schaal, 1985; Sytsma and Smith, 1988; Baldwin, 1992; Downie *et al.*, 2000; Lia *et al.*, 2001), 제비꽃의 분류에도 사용된 바 있다(Hodger *et al.*, 1995; Ballard *et al.*, 1997; 1998; Yoo *et al.*, 2005; Hildebrandt *et al.*, 2006).

본 연구의 목적은 반경 2~3m 이내 거리에 동소적으로 생육하면서 단엽에서 장상복엽까지 연속적인 중간형의 표현형을 갖는 태백제비꽃군내 개체들을 대상으로 ITS 염기서열을 조사하고 분류학적 의의를 확인하는데 있다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에 사용된 태백제비꽃군(*V. albida* complex) 식물 재료는 내장산에서 채집하여 사용하였다. 채집된 식물은 잎의 결각 정도에 따라 5개 집단 즉 태백제비꽃, 태백제비꽃과 단풍제비꽃의 중간형, 단풍제비꽃, 단풍제비꽃과 남산제비꽃의 중간형, 그리고 남산제비꽃 등으

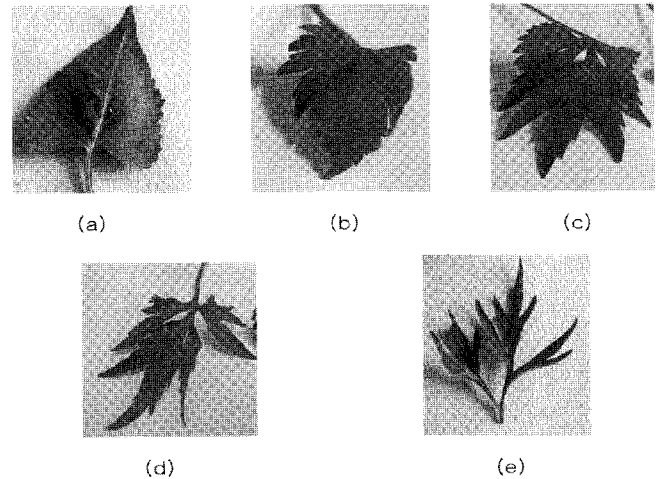


Fig. 1. Leaf shapes in the *Viola albida* complex. (a) *V. albida* var. *albida* (GenBank acc. DQ112179), (b) the intermediate between *V. albida* var. *albida* and *V. albida* var. *takahashii* (GenBank acc. DQ112180), (c) *V. albida* var. *takahashii* (GenBank acc. DQ112181), (d) the intermediate between *V. albida* var. *takahashii* and *V. albida* var. *chaerophylloides* (GenBank acc. DQ112182), (e) *V. albida* var. *chaerophylloides* (GenBank acc. DQ112183).

로 구분하고(Fig. 1), 각 집단별 대표적인 개체를 대상으로 염기서열을 조사하고, GenBank에 보고 하였다(GenBank accession number DQ112179~DQ112183).

DNA 추출

식물체로부터 전체 DNA 추출은 Doyle와 Doyle(1987)의 방법을 따랐다. 추출한 DNA의 농도는 Biotech Photometer (Biochrom Ltd, WPA UV1101T, Cambridge, UK)를 사용하여 계산하였다. DNA를 5 ng/ μ l의 농도로 희석한 뒤 universal primer (White *et al.*, 1990)를 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 52 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 1회전으로 하여 모두 30회전을 돌려 ITS 지역을 PCR(polymerase chain reaction, Applied Biosystems, PCR system 2700, Singapore) 하였다. ITS DNA의 증폭여부를 확인하기 위해 1% agarose gel을 사용하여 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하고 UV trans-illuminator (Vilber Lourmat, TFX-20M, Cedex, France)를 사용하여 관찰하였다. PCR 산물은 QIA-quick PCR purification kit (Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA)를 사용하여 정제하였다. 염기서열은 ABI Prism 377A automated DNA sequencer (Perkin-Elmer Corp., Foster City, California, USA)을 사용하여 결정되었다.

염기서열 분석

염기서열 정렬은 Clustal X(Gibson *et al.*, 1994)를 이용하여 기계적으로 1차 정렬한 뒤, 최종 섬세한 정렬은 MacClade(3.05 version) 프로그램을 이용하여 수작업으로 하였다. 이 때 염기서열 정렬은 군내

군으로 본 실험에서 확인된 태백제비꽃군내 5개 집단의 5개체와 군외 군으로 Yoo *et al.*(2005)의 의해 NCBI에 보고된 노랑제비꽃(GenBank acc. AY928271)과 낚시제비꽃(GenBank acc. AY928280)을 함께 하였다. 노랑제비꽃은 태백제비꽃군이 속한 진정제비꽃절(*Nonimium*)과 제비꽃속내에서 유연관계가 적은 노랑제비꽃절(*Chamaemelanium*)내 대표 분류군으로서, 낚시제비꽃은 진정제비꽃절내에 유경종의 대표 분류군으로서 각각 군외군으로 설정했다(Kim, 1986; Yoo *et al.*, 2005).

분산분석

정렬된 염기서열은 통계학적으로 분류군 간에 유의성이 있는지를 확인하기 위해 SPSS(12.0 version) 프로그램을 사용하여 분산분석하였다. 분산분석을 위한 형질 부호화(character coding)는 ITS1 및 ITS2 지역에서 정렬된 모든 분류군의 동일 위치에 변이가 없을 경우는 모두 0의 값을 부여했고, 변이가 있을 경우에는 아라비아숫자 순으로 동일 위치에 가장 많이 나타나는 염기의 값을 0으로 두 번째로 많이 나타나는 염기의 값을 1로 세 번째로 많이 나타나는 염기의 값을 2 등으로 연차적인 순서로 부호화하였다.

계통학적 분석

염기서열을 사용한 계통학적 연구를 위해 PAUP(4.02 version; Swofford, 1998) 프로그램을 사용하였다. ITS DNA 염기서열의 변이

정도를 확인하기 위해 Kimura 2-parameter distance matrix를 통해 염기서열 분지(sequence divergence)을 조사하였다. 계통학적 분석을 위해서는 최소가정의 분석(parsimony analysis)을 적용하였으며, 발견적 조사(heuristic search)로 완전일치분계도(strict consensus tree)를 얻었다. 각 분계조의 지지도는 1000번의 부트스트랩(bootstrap; Felsenstain, 1985)에 의해 측정되었다. PAUP 사용시 모든 염기서열 형질은 미가중방법(unweighted)을 사용하였고, 비상등에 의한 핵산 침식(indels)으로 생성된 간격(gap)은 소실(missing) 처리하였다.

결과 및 고찰

한국산 태백제비꽃군은 엽신의 거치 및 결각의 정도에 따라 태백제비꽃, 단풍제비꽃 그리고 남산제비꽃 등 3 분류군으로 구분하고 있다(Kim *et al.*, 1991). 그러나 본 군내 분류군들이 반경 2~3m내에 동소적으로 생육할뿐더러, 단엽에서 장상복엽까지 연속적인 중간형이 동일한 장소에서 출현하기 때문에 분류학적 어려움이 크다(Kim *et al.*, 1991). 본 연구에서는 동일한 지역에서 생육하는 본 군내 종류를 잎의 거치와 결각 정도에 따라 5개 집단으로 구별하고, 집단별 대표적인 개체를 선별하여 ITS 염기서열을 결정하고(Fig. 1), 이를 근거로 분산분석, 염기서열 분기 분석, 분계도 분석 등을 시도하였다. ITS DNA 염기서열은 진화의 속도가 빨라 속내 분류 또는 복합체와 같은 근연종의 분류에 이용된다(Sytsma and Schaal, 1985; Sytsma and Smith,

Table 1. The result of the analysis of variance using ITS DNA sequences of the eight individuals in the *V. albida* complex. (* See Fig. 1 for details of the groups designated. 1. *V. albida* var. *albida*; 2. *V. albida* var. *takahashii*; 3. Intermediate between *V. albida* var. *albida* and *V. albida* var. *takahashii*; 4. Intermediate between *V. albida* var. *takahashii* and *V. albida* var. *chaerophylloides*; 5. *V. albida* var. *chaerophylloides*; 6. *V. albida* (from GenBank, acc. AY928292); 7. *V. albida* f. *takahashii* (from GenBank, acc. AY928293); 8. *V. chaerophylloides* (from GenBank, acc. AY928290)

	Group*	Character	Average	SD	F	Sig.
ITS1	1	289	.01038	.10153	0.761	0.620
	2	289	.01384	.11703		
	3	289	.01384	.11703		
	4	289	.00346	.05882		
	5	289	.01384	.11703		
	6	289	.01038	.10153		
	7	289	.00346	.05882		
	8	289	.00346	.05882		
ITS2	1	248	.02016	.14084	0.828	0.564
	2	248	.01210	.14176		
	3	248	.00403	.06350		
	4	248	.01210	.10954		
	5	248	.01613	.12623		
	6	248	.00403	.06350		
	7	248	.02419	.17833		
	8	248	.01210	.10954		

1988; Baldwin, 1992; Hildebrandt *et al.*, 2006).

ITS 염기서열을 이용한 분산분석

본 연구에서 결정된 ITS DNA 염기서열이 집단간에 통계학적 차이가 있는지 혹은 없는지를 확인하기 위해 분산분석을 하였다(Table 1). 분산분석에 사용된 식물의 염기서열은 Fig. 1에서 설정한 5 집단내 5 개체와 Yoo *et al.*(2005)에 의해 GenBank에 등록된 본 군내 3 분류군 즉 태백제비꽃, 단풍제비꽃 그리고 남산제비꽃이다. 염기서열 형질의 부호화는 정렬된 원자료를 가장 잘 설명할 수 있는 방법으로 하였다(Whang *et al.*, 2002). 그 결과 ITS1에 대한 본 군내 8 개체 식물의 F 값은 0.761로, 유의 확률은 0.620으로 나타나 조사된 집단간 개체별로 유의한 차이가 있다고 말할 수 없었다. ITS2에서도 8 개체 식물에서 F 값이 0.828, 유의 확률은 0.564로 나타나 종류별로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 1). 이는 ITS DNA 염기서열을 사용한 통계학적 분석의 결과는 기존에 보고된 태백제비꽃군내 여러 분류군이 하나의 종 또는 동일 종내 하위 분류군일 가능성을 시사하며, 기존 Kim *et al.*(1991)의 분류학적 처리를 지지하는 결과이다.

ITS 염기서열 분석

단엽에서 장상복엽까지 표현형의 연속성을 보이는 태백제비꽃군 식물의 ITS1과 ITS2 그리고 5.8S 등 지역의 염기서열 분기 정도를 조사하였다. 또한, 군외군으로서 GenBank에 등록되어 있는 두 분류군 즉 제비꽃절 태백제비꽃군에 속하는 낚시제비꽃과 노랑제비꽃절에 속하는 노랑제비꽃의 동일 지역 염기서열을 같이 분석하였다. 본 분석에서는 조사대상 군내군 및 군외군의 염기서열을 정렬하여 모두 702 bp를 비교하였다. 5.8S는 조사된 모든 분류군에서 163 bp로 나타났으며 염기서열 변이가 나타나지 않았다. ITS1에서 289 bp와 ITS2에서 250 bp를 분석에 이용하였다(GenBank acc. DQ112179~DQ112183). 군내군 개체간의 염기서열 분기 정도를 Kiumara 2-parameter distance로 계산한 결과 조사된 모든 개체에서 그 절대치가 0.05 이하로 나타나서 매우 낮은 것으로 확인되었다(Table 2). 일반

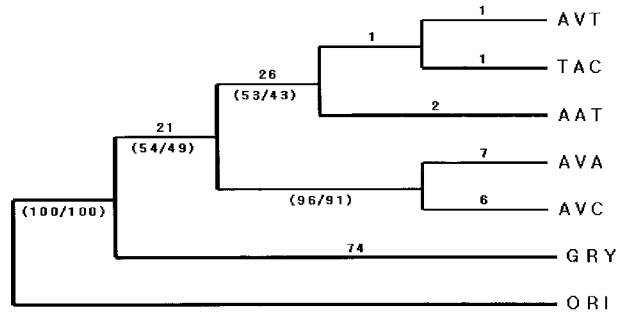


Fig. 2. Strict consensus tree based on ITS DNA sequences of the *V. albida* complex. (AVT: *V. albida* var. *takahashii*; TAC: intermediate between *V. albida* var. *takahashii* and *V. albida* var. *chaerophylloides*; AAT: intermediate between *V. albida* var. *albida* and *V. albida* var. *takahashii*; AVA: *V. albida* var. *albida*; AVC: *V. albida* var. *chaerophylloides*; GRY: *V. grypoceras*; ORI: *V. orientalis*)

적으로 절대 값이 0.05 보다 적으면 생물학적 의미를 부여하지 않는다(Whang *et al.*, 1998). 따라서 염기서열 분기는 종 보다 낮은 종 이하 수준으로 판단되고, 이 결과는 Kim *et al.*(1991)과 일치한다. 그러나 군외군과 군내군 간에는 염기서열 분기 정도는 절대치가 모두 0.05 이상 즉 0.07010~0.11987까지로 높게 나타나서 서로 뚜렷하게 구별되었다(Table 2). 군내군에서 태백제비꽃과 남산제비꽃의 염기서열 분기가 0.00434로 나타나 가장 적었으며, 태백제비꽃과 단풍제비꽃의 염기서열 분기가 0.01305로 높게 나타났다(Table 2).

계통학적 분석

군내군인 5개체와 군외군 2개체의 ITS DNA 염기서열을 정렬한 결과 총 702 bp 중 103개는 염기서열 변이가 있고, 599개는 변이가 없었다. 염기서열 변이가 발생한 형질 중 계통학적으로 해상력이 있는 informative character는 19개이고 나머지 84개는 uninformative character인 것으로 나타났다. Fig. 2의 완전일치분계조에서 세로선의 위에 표기한 아라비아 숫자는 공통파생형질(synapomorphy)이고,

Table 2. Kimura 2-parameter distance matrix between ITS DNA sequences determined from the *V. albida* complex and two outgroups. (See Fig. 1 for details of the groups designated. 1. *V. albida* var. *albida*, 2. *V. albida* var. *chaerophylloides*, 3. *V. albida* var. *takahashii*, 4. Intermediate between *V. albida* var. *takahashii* and *V. albida* var. *chaerophylloides*, 5. Intermediate between *V. albida* var. *albida* and *V. albida* var. *takahashii*, 6. *V. orientalis* (GenBank, acc. AY928271), 7. *V. grypoceras* (GenBank, acc. AY928280)

Taxa	1	2	3	4	5	6	7
1	-						
2	0.00434	-					
3	0.01305	0.01167	-				
4	0.01013	0.00874	0.00288	-			
5	0.01305	0.01166	0.00577	0.00578	-		
6	0.07268	0.07010	0.07463	0.07464	0.07463	-	
7	0.11462	0.11347	0.10981	0.10822	0.10984	0.11987	-

세로선의 아래 숫자는 차례로 부트스트랩수치(bootstrap value)와 잭크나이프수치(Jackknife value)이다. 군외군인 노랑제비꽃과 뉘시제비꽃은 군내군과 뚜렷이 구별되게 연속해서 기저클레이드(basal clade)를 이루고 있어 기존의 연구 연구들과 잘 일치하여(Kim, 1986; Ballard *et al.*, 1999; Yoo *et al.*, 2004, 2005) 군외군의 설정이 적절한 것으로 판단된다. 군내군의 경우는 21개의 공통파생형질을 갖고, 54% 부트스트랩수치 및 49% 잭크나이프수치를 각각 나타냈다. 일반적으로 붕괴지수가 70% 보다 낮을 경우 계통도의 신뢰도가 떨어져 생물학적인 의미가 크지 않다. 따라서 ITS DNA 염기서열에 의한 태백제비꽃군의 계통학적인 연구는 본 군내 일의 다형현상에 대한 분류학적 해결을 주지 않는 것으로 판단되며, 집단간 교잡에 의한 중이하수준의 방사진화가 일어나고 있는 것으로 추측된다(Whang *et al.*, 2002).

적 요

태백제비꽃군내 식물들은 동소적으로 생육하면서 단엽에서 장상복엽까지 연속적인 중간형을 나타내어 분류학적 어려움이 있다. 본 연구의 목적은 태백제비꽃, 단풍제비꽃, 남산제비꽃 그리고 각 분류군 사이의 중간형을 일의 형태에 따라 5 집단으로 구분하고 각 집단별 대표적인 개체를 선별하여 ITS DNA 염기서열을 분석하고 분류학적 어려움을 해결하는데 있다. 정렬된 ITS1, ITS2 그리고 5.8S 지역의 염기서열은 702 bp로 나타났다. 5.8S 지역은 163 bp로 조사된 모든 개체에서 변이가 없었으며, ITS1과 ITS2는 일부 변이가 있어 분산분석, 염기서열 분기 조사 그리고 분계분석에 이용하였다. 분산분석 결과 조사된 일 형태별 개체들 간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 염기서열 분기 조사 결과, 군외군으로 설정한 뉘시제비꽃과 노랑제비꽃의 경우 Kimura 2-parameter distance에서 절대치가 0.05보다 훨씬 높게 나타나서 뚜렷한 차이가 확인되었다. 그러나 군내군 5 개체는 절대치가 모두 매우 낮게 나타나서 염기서열 분기는 종 수준이 아닌 중이하의 수준으로 판단되었다. 분계분석에서 군외군으로 설정한 2 종은 기저 분계조를 형성하였다. 군내군은 하나의 분계조를 형성하였지만, 부트스트랩이 50% 이하로 나타나 계통학적 의미는 적은 것으로 사료된다.

사 사

본 실험에 일부 도움을 준 박소현양에게 고마움을 전한다. 본 연구는 전북대학교 2004년 해외연구년제 연구교수 지원에 의해 수행되었다.

인용문헌

Apples, R. and R.L. Honeycutt. 1986. rDNA evolution over a billion years. In S.K. Dutta (ed.), DNA Systematics. CRC Press, Boca Raton. pp. 81-135.
Baldwin, B.G. 1992. Phylogenetic utility of the transcribed

spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: two examples from the Madiinae (Asteraceae). *Mol. phylogenet. Evol.* 1: 3-16.
Ballard, H.E. and K.J. Sytsma. 1997. Further revelations on adaptive radiation in Hawaiian *Viola* (*Violaceae*) based on Internal Transcribed Spacer DNA sequences. *Amer. J. Bot.* (supplement) 84: 177.
Ballard, H.E., 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.
Ballard, H.E., 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. 1902. *Violaceae*. *Bull. Herb. Boiss. ser. II* 2: 856.
Becker, W. 1925. *Viola*. In A. Engler and K. Prantl (eds), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* 21: 363-377.
Berg, H. and P. Redbo-Torstensson. 1999. Offspring performance in three cleistogamous *Viola* species. *Plant Ecol.* 145: 49-58.
Darwin, C. 1877. *The different forms of flowers on plants of the same species*. John Murray, London.
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.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 789-791.
Fu, P. Y. and Y. C. Teng. 1977. *Flora Plantrum Herbacearum Chinae Boreali-Orientalis*. *Tornus* 6. *Sci. Publ.* pp.79-129.
Gibson, T., D. Higgins and J. Thompson. 1994. *Clustal X Program*. EMBL, Heidelberg, Germany.
Harborne, J.B. and B.L. Turner. 1984. *Plant chemosystematics*. Academic Press, London.
Hashimoto, T. 1967. *Violets of Japan*. Sungmoondang, Tokyo.
Hildebrandt, U., K. Hoef-Emden, S. Backhausen, H. Bothe, M. Bozek, A. Siuta and E. Kuta. 2006. The rare, endemic zinc violets of Central Europe originate from *Viola lutea* Huds. *Pl. Syst. Evol.* 257: 205-222.
Hogers, S.A., H.E. Ballard, Jr., M.L. Arnold and M. W. Chase. 1995. Generic relationships in the *Violaceae*: data from mor-

- phology, anatomy, chromosome numbers and *rbcL* sequences. Amer. J. Bot. (supplement) 82: 136.
- Ishidoya, T. 1929. Review of *Viola* from Korean and manshuria. J. Chosen Nat. Hist. Soc. 8:15-17.
- Ito, E. 1962. Observations on the variations of *V. chaerophylloides* in Japan. Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo 6: 194-202.
- Kim, K.S. 1986. Studies of comparative morphology on the Korean *Viola* species. Ph. D. thesis, Sung Kyun Kwan Univ., Korea.
- Kim, K.-J. and R.K. Jansen. 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, K.S., B.Y. Sun, S.S. Whang and G.H. Chung. 1991. Biosystematic study on the genus *Viola* in Korea - comparative morphology of the *Viola albida* complex. Kor. J. Bot. 34: 229-238. (in Koeran)
- Ledebour, C.F. 1829. *Flora Altaica I*. Berlin. p. 225.
- 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. Mol. Phylogenet. Evol. 21: 309-320.
- Linne, C. 1753. *Species Plantarum*. II, pp. 936.
- Lord, E.M. 1981. Cleistogamy: a tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. Bot. Rev. 47: 421-449.
- Maekawa, F. 1954. *Violaceae*. In H. Hara, (eds.). Enumeratio Spermatophytarum Japonicum. 3: 194-227.
- Maekawa, F. and T. Hashimoto. 1963. *Violets of Japan*: 2. Shibundo-shinko-sha, Tokyo, pp. 1-9.
- Maximowicz, C.J. 1877. Diagnoses plantarum novarum asiaticarum. Bull. Acad. St.-Pet. 23: 312-314.
- Regel, E. 1861. *Violaceae*. Pl. Radd. 1: 222.
- Russell, N.H. 1960. Studies in the photoperiodic responses of violets (*Viola*). The Southwestern Naturalist 5: 177-186.
- Schmitt, J. and D.W. Ehrhardt. 1990. Enhancement of inbreeding depression by dominance and suppression in *Impatiens capensis*. Evolution 44: 269-278.
- Stebbins, G.L., B.L. Harvery, E.L. Cox, J.N. Rutger, G. Jelencovic and E. Yagil. 1963. Identification of the ancestry of an amphiploid *Viola* with the aid of paper chromatography. Amer. J. Bot. 50: 830-839.
- Swofford, D.L. 1998. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods. Version 4.02b Sinauer Asso. Inc., Massachusetts, USA.
- Sytsma, K.J. and B.A. Schaal. 1985. Phylogenetics of the *Lisianthus skinneri* (Gentianaceae) species complex in Panama utilizing DNA restriction fragment analysis. Evolution 39: 594-608.
- Sytsma, K.J. and J.F. Smith. 1988. DNA and morphology: Comparisons in the Onagraceae. Ann. Miss. Bot. Gard. 75: 1217-1237.
- Takenouchi, M. 1955. Brief notes on the taxonomy, ecology and geographic distribution of species of *Viola* indigenous to Manchuria and Inner-Mongolia. Sci. Cont. Tung-pei Technical Univ. 5: 65-95.
- Waller, D.M. 1980. Environmental determinants of outcrossing in *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). Evolution 34: 747-761.
- Whang, S.S., K. Choi, R.S. Hill and J.-H. Pak. 2002. A morphometric analysis of infraspecific taxa within the *Ixeris chinensis* complex (Asteraceae, Lactuceae). Bot. Bull. Acad. Sin. 43: 131-138.
- Whang, S.S., K. Kim and W.M. Hess. 1998. Variation of silica bodies in leaf epidermal long cells within and among seventeen species of *Oryza* (Poaceae). Amer. J. Bot. 85: 461-466.
- White, T.J., T. Birn, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In D. Gelfand, J. Sninsky and T. White (eds.), PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.
- Yoo, K.-O., O.-K. Kwon and W.-T. Lee. 2004. Interspecific relationships of Korea *Viola* based on RAPD, ISSR, PCR-RFLP analyses. Kor. J. Pl. Taxon. 34:43-61. (in Korean)
- Yoo, K.-O., S.-K. Jang and W.-T. Lee. 2005. Phylogeny of Korean *Viola* based on ITS sequences. Kor. J. Pl. Taxon. 35: 7-23. (in Korean)

(접수일 2006.8.24 ; 수락일 2006.10.10)