

## ITS와 *psbA-trnH* 염기서열에 의한 한국산 메꽃속(*Calystegia* R.Br.)의 분류학적 연구

김상준 · 박선주\*

영남대학교 이과대학 생명과학과

### Molecular Phylogenetic Studies of Korean *Calystegia* R.Br. Based on ITS and *psbA-trnH* Sequences

SangJun Kim and SeonJoo Park\*

Department of Life Science, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

(Received 21 November 2011; Revised 7 December 2011; Accepted 9 December 2011)

**적 요:** 한국산 메꽃속 4종 1변종과 1종의 외군을 대상으로 종의 실체를 확인하고, 유연관계 및 진화경향성을 파악하기 위하여 분자계통학적 연구를 수행하였다. 메꽃속의 주요 형질로는 잎의 모양과 화관의 길이, 털의 유무 등이 있다. 하지만 잎의 형질에서 많은 변이 현상이 나타나고 있어 종 분류에 어려움이 있다. 분자계통학적 연구 결과 갯메꽃이 하나의 분계조를 형성하여 가장 기부에 위치하였고, 애기메꽃과 큰메꽃의 ITS 지역과 *psbA-trnH* 지역에서는 독립적인 분계조를 형성하지 못하여 두 종의 관계가 명확하지 않았다. 따라서 두 종의 관계는 본 연구에 사용된 마커들로는 부족하며 앞으로 더 많은 개체와 다양한 마커들을 통한 연구가 수반되어야 한다. 메꽃은 선메꽃과 유집되어 유연관계가 가까운 것으로 나타났다.

**주요어:** ITS, *psbA-trnH*, 메꽃속, 메꽃과, 분자계통

**ABSTRACT:** Molecular phylogenetic studies were conducted to evaluate evolutionary trends, relationships and species identities among four species, one variety and one outgroup of the Korean Genus *Calystegia*. The important characteristics of *Calystegia* are the shape of the lamina, the length of the corolla and the presence of hair. However, many variations were observed as regards the characteristics of the leaf, making true identification difficult. In molecular phylogenetic studies, *C. soldanella* formed one clade, and it was located mostly in the base. *C. hederacea* and *C. sepium* did not form an independent clade in their ITS regions and *psbA-trnH* regions, and this investigation could not confirm a relationship. Therefore, a relationship between these two species is not sufficiently supported by these markers (ITS and *psbA-trnH*). Consequently, this research should be achieved through many samples and markers. *C. sepium* var. *japonica* and *C. dahurica* are closely related.

**Keywords:** ITS, *psbA-trnH*, *Calystegia*, Convolvulaceae, molecular phylogeny

메꽃속(*Calystegia* R. Br.)은 메꽃과(Family Convolvulaceae)에 속하며, 열대와 아열대 지역 및 온대에 걸쳐 세계적으로 약 25종이 분포하고 있으며, 우리나라에 널리 분포하고 있는 덩굴성 다년생 식물이다(Willis, 1973). 최근 분자적 자료를 이용한 APG 분류체계는 메꽃과를 핵심진정쌍자엽군(Core Eudicots)에 속하는 진정국화군(Euasterids I)의 가지목(Solanales)에 위치시키고 있다(Kim et al., 2008.). 메꽃속에

대한 분류체계는 Roemer and Schultes (1819), Wallich (1824), Choisy (1845), Makino (1912) 등 여러 학자들에 의해 연구되었으며 잎의 모양과 화관의 길이, 화경상부의 날개 유무, 식물체 전체 털의 유무 등의 특징으로 구분한다.

한국산 메꽃속에 관한 연구로는 Palibin (1900)이 *Calystegia pellita* Ledeb., *C. hederacea* Wall., *C. sepium* R. Br., *C. soldanella* R. Br. 4종을 보고하였고, Komarov (1907)가 *C. hederacea*, *C. soldanella*, *C. dahurica* Choisy, *C. sepium* 4종을 보고하였다. Nakai (1911, 1952)가 이들 4종외에 *C. sepium* var. *japonica*

\*Author for correspondence: sjpark01@ynu.ac.kr

Makino와 앞의 중간열편이 뾰족하고 장타원형인 개체군을 *C. sepium* f. *angustifolia* Nakai라고 종을 분리하여 다루었으며, *C. subvolubilis* G. Don을 추가 보고하였다. Park (1949)은 *C. pellita*와 *C. davurica*를 각기 다른 종으로 취급하였는데 Komarov (1907)에 의하면 *C. pellita*는 *C. davurica*의 이명으로 정리하고 있다. Kim and Choi (1983, 1984)는 *C. soldanella*, *C. hederacea*, *C. japonica* (Thunb.) Choisy, *C. sepium* var. *americana* Matsuda 및 *C. davurica* (Sims) Choisy의 4종 1변종에 관해 염색체수와 외부형태 및 해부학적 형질에 관하여 연구하였다. Oh et al. (1995)는 성분분류학적 연구를 통하여 *C. soldanella*, *C. hederacea*, *C. japonica*, *C. sepium* 및 *C. davurica* 5종을 정리하였다. Chung et al. (1995)에 의해 한국산 *C. soldanella*와 *C. japonica*의 알로자임을 이용한 개체군 연구 및 Kim and Chung (1995)에 의해 한국산 *C. soldanella*와 *C. japonica* 개체군의 유전적, 클론 구조 연구가 수행되었으며, 이후 Choi (2007)는 갯메꽃(*C. soldanella* (L.) Roem. & Schult.), 선메꽃(*C. dahurica* (Herb.) Choisy), 애기메꽃(*C. hederacea* Wall.), 큰메꽃(*C. sepium* (L.) R.Br.), 메꽃(*C. sepium* var. *japonica* (Thunb.) Makino)로 정리하였다.

본 속에서 뚜렷이 구분되는 갯메꽃을 제외한 분류군들은 화관과 화병의 길이, 잎 모양의 다양한 변이 때문에 동정의 혼란 또는 종 한계에 문제가 있어왔다. 메꽃은 선메꽃과 유사한 잎모양을 가지고 있으나 큰메꽃의 변종으로 취급하고 (Choi, 2007) 또는 독립된 종(Oh et al., 1995)으로 보고 있다. 애기메꽃과 큰메꽃은 잎 모양이 유사하여 직접적인 관계가 있으나 서로 독립된 종으로 인정하고 있다.

최근 외부형태학적 분류의 한계점을 해결하기 위하여 분자적 자료를 이용한다. ITS 지역은 핵 DNA로 양친 유전성을

가지며 coding지역보다 더 빠르게 진화하여 유전자 간의 변이성이 높은 편이어서 중간 또는 속간의 유연관계와 진화경향성(Baldwin, 1992; Kim and Jansen, 1994; Alvarez and Wendel, 2003) 및 유전적 변이양상(Kim et al., 2005; Son et al., 2009)을 파악하는데 중요한 자료로 이용되고, *psbA-trnH* 지역은 모성 유전을 하는 cpDNA의 non-coding 지역으로 coding 지역보다 빠르게 진화하며 염기치환과 같은 비율로 삽입과 결실이 축적되므로 중간 또는 속간의 계통 유연관계를 파악하는데 유용한 자료로 이용(Curtis and Clegg, 1984; Palmer et al., 1988; Soltis et al., 1992)되고 있다. 따라서 본 연구는 위와 같이 메꽃속의 다양한 잎변이로 인한 종의 실체와 아울러 유연관계 및 진화경향성을 파악하고자 nrDNA의 ITS 지역, cpDNA의 *psbA-trnH* 지역을 비교, 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에 사용된 재료는 2010년 5월부터 2011년 8월까지 자생지에서 직접 채집하여 사용하였다. 채집된 재료는 건조표본으로 제작하여 영남대학교 식물표본관 (YNUH)에 보관하고 강원대 (KWNU), 성균관대 (SKK)에 소장되어 있는 건조표본들도 이용하였다. 외국으로는 메꽃과에 서양메꽃속(*Convolvulus* L.)의 서양메꽃(*Convolvulus arvensis* L.)을 선정하였다(Table 1).

### DNA 추출, PCR 및 염기서열

DNA 추출은 생체 또는 건조표본을 이용하여 Precellys24 Homogenizer (Bertin Technologies, France)를 이용하여 분쇄

Table 1. List of samples used in this study.

| Abbreviation | Voucher           | Taxon   | Locality                         | GenBank accession |                  |
|--------------|-------------------|---|----------------------------------|-------------------|------------------|
|              |                   |   |                                  | ITS               | <i>psbA-trnH</i> |
| SON2         | YU16700080 (YNUH) | <i>C. dahurica</i> (Herb.) Choisy                     | Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do   | JQ062460          | JQ062444         |
| SON3         | YU16700204 (YNUH) | <i>C. dahurica</i> (Herb.) Choisy                     | Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do   | JQ062461          | JQ062445         |
| SON4         | YU16700000 (YNUH) | <i>C. dahurica</i> (Herb.) Choisy                     | Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do   | JQ062462          | JQ062446         |
| CS1          | SJ1009101 (YNUH)  | <i>C. sepium</i> var. <i>japonica</i> (Thunb.) Makino | Cheongsong-gun, Gyeongsangbuk-do | JQ062465          | JQ062453         |
| CS2          | SJ1009102 (YNUH)  | <i>C. sepium</i> var. <i>japonica</i> (Thunb.) Makino | Cheongsong-gun, Gyeongsangbuk-do | JQ062466          | JQ062454         |
| KW12         | 058538 (KWNU)     | <i>C. sepium</i> var. <i>japonica</i> (Thunb.) Makino | Jincheon-gun, Chungcheongbuk-do  | JQ062463          | JQ062451         |
| KW16         | 74714 (KWNU)      | <i>C. sepium</i> var. <i>japonica</i> (Thunb.) Makino | Hongcheon-gun, Gangwon-do        | JQ062464          | JQ062452         |
| P            | SJ1005301 (YNUH)  | <i>C. sepium</i> (L.) R. Br.                          | Pohang-si, Gyeongsangbuk-do      | JQ062469          | JQ062449         |
| JHX2         | SJ1006052 (YNUH)  | <i>C. sepium</i> (L.) R. Br.                          | Jinhae-si, Gyeongsangnam-do      | JQ062470          | JQ062450         |
| JH2          | SJ1006042 (YNUH)  | <i>C. hederacea</i> Wall.                             | Jinhae-si, Gyeongsangnam-do      | JQ062467          | JQ062447         |
| JH3          | SJ1006043 (YNUH)  | <i>C. hederacea</i> Wall.                             | Jinhae-si, Gyeongsangnam-do      | JQ062468          | JQ062448         |
| MC1          | SJ1104301 (YNUH)  | <i>C. soldanella</i> (L.) Rome. & Schult.             | Boryeong-si, Chungcheongnam-do   | JQ062471          | JQ062455         |
| MC3          | SJ1104303 (YNUH)  | <i>C. soldanella</i> (L.) Rome. & Schult.             | Boryeong-si, Chungcheongnam-do   | JQ062472          | JQ062456         |
| JHX1         | SJ1006051 (YNUH)  | <i>C. soldanella</i> (L.) Rome. & Schult.             | Jinhae-si, Gyeongsangnam-do      | JQ062473          | JQ062457         |
| JHX3         | SJ1006053 (YNUH)  | <i>C. soldanella</i> (L.) Rome. & Schult.             | Jinhae-si, Gyeongsangnam-do      | JQ062474          | JQ062458         |
| UL1          | SJ1106201 (YNUH)  | <i>Convolvulus arvensis</i> L.                        | Ulleung-gun, Gyeongsangbuk-do    | JQ062475          | JQ062459         |

시킨 후, Loockerman and Jansen (1996)의 방법으로 추출하였다. ITS 지역의 증폭은 primer ITS4, ITS5 (White et al., 1990)를 이용하였으며 *psbA-trnH* 지역의 증폭은 primer *psbAF*와 *trnHR* (Sang et al., 1997)를 이용하였다. ITS지역과 *psbA-trnH* 지역의 증폭을 위한 Polymerase Chain Reaction (PCR) 반응용액의 조성은 주형 DNA 20~50 ng, 10X Diastar-Taq DNA buffer 2.5 µl, 10 mM의 dNTPs mix 0.5 µl, 10 pmol의 primer 각각 1 µl, 2.5 unit의 Diastar-Taq DNA Polymerase 0.13 µl (SolGent Co., Korea)에 total volume이 총 25 µl가 되도록 증류수를 조절하여 첨가하였다. 조제된 PCR반응 용액은 95°C에서 2분 동안 1차 denaturation을 한 후, denaturation은 95°C에서 20초, annealing 56°C에서 40초, 72°C에서 1분으로 구성된 반응을 35회 반복한 후 최종적으로 72°C에서 5분간 extension하였다. 염기서열 분석은 automatic DNA analyzer system ABI PRISM 3730xl analyzer를 이용하였다.

### 염기서열의 정렬 및 계통수 분석

계통학적 분석으로 forward와 reverse 방향의 각 염기서열들은 Geneious pro v5.4 (Drummond et al., 2011)으로 조합, 정렬하였고, 최종 세부 정렬은 수작업을 통해 수행하였다. 정렬된 염기서열은 PAUP\* ver. 4.0b10 (Swofford, 2003)으로 염기서열 간의 유전적 거리 (Kimura's two parameter 방법; Kimura, 1980)로 계산된 염기변이 값을 기초로 하여 Neighbor-joining (NJ) tree를 산출하였다(Saitou and Nei, 1987; Farris et al., 1996). Maximum parsimony (MP) 분석방법으로는 Heuristic search를 이용하였다. Heuristic search의 option으로는 TBR branch-swapping algorithm을 적용하였다.

또한, 각 분계도의 지지정도를 알아보기 위하여 Bootstrap (Felsenstein, 1985)과 Jackknife (Farris et al., 1996)를 이용하였다. 이러한 분석방법은 무작위로 100회를 반복하였으며 이를 통해 계통수를 찾아내어 CI (Consistency Index), RI (Retention Index) 그리고 RC (Rescaled consistency Index)를 구하였다. Maximum likelihood (ML)는 Modeltest ver. 3.7 (Posada and Crandall, 1998)을 이용하여 각 분류군의 염기서열에 맞는 모델을 선정 후 염기들의 transversion과 transition의 실제 수치의 근사값을 적용하여 수행하였다.

## 결 과

### 1. 염기서열의 특징

ITS 지역 염기서열의 길이는 597~600 bp로 나타났고, 이 중 ITS 1 지역 염기서열 길이는 207~209 bp였으며, 5.8S 지역 염기서열 길이는 165 bp, ITS 2 지역 염기서열 길이는 225~226 bp의 범위로 ITS 1 지역 보다 길게 나타났다. 전체적으로 애기메꽃이 600 bp로 가장 길었으며, 서양메꽃이 597 bp로 가장 짧게 나타났다. 정렬된 ITS 지역의 총 염기서열은 601 bp였으며, 이 중 537 bp는 염기서열 변화가 없고, 나머지 64개는 변화가 있었으며, 이 중 16개는 계통학적으로 유용한 형질이었다. 염기 조성의 평균은 A가 19.1%, C가 30.4%, G가 28.7%, T가 21.8%였고, DNA의 구조 및 물리적 특성을 결정하는 CG의 함량은 ITS 1 지역이 55.0%, ITS 2 지역은 65.9%, 5.8S는 54%로 측정되어 ITS 2 지역이 ITS 1 지역에 비해 높았으며, 전체적으로 약 59.1%로 계산되었다(Table 2). *psbA-trnH* 지역 염기서열 길이는 229~243 bp로 나타났다. 전체적

**Table 2.** Size and G + C% of ITS1, 2, 5.8S and *psbA-trnH* of *Calystegia*.

| Taxon                                      | ITS1       |        | 5.8S        |        | ITS2        |        | <i>psbA-trnH</i> |        |
|--|------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|------------------|--------|
|  | length(bp) | G + C% | length (bp) | G + C% | length (bp) | G + C% | length(bp)       | G + C% |
| <i>Calystegia soldanella</i> MC1           | 207        | 55.0   | 165         | 54.5   | 226         | 66.1   | 243              | 33.3   |
| <i>C. soldanella</i> MC3                   | 207        | 55.0   | 165         | 54.5   | 226         | 66.1   | 242              | 33.3   |
| <i>C. soldanella</i> JHX1                  | 207        | 55.0   | 165         | 54.5   | 226         | 66.1   | 243              | 33.3   |
| <i>C. soldanella</i> JHX3                  | 207        | 55.0   | 165         | 54.5   | 226         | 66.1   | 243              | 33.3   |
| <i>C. dahurica</i> SON2                    | 207        | 55.0   | 165         | 53.9   | 226         | 66.5   | 230              | 32.9   |
| <i>C. dahurica</i> SON3                    | 207        | 55.0   | 165         | 53.9   | 226         | 66.5   | 230              | 32.9   |
| <i>C. dahurica</i> SON4                    | 207        | 55.0   | 165         | 53.9   | 226         | 66.5   | 230              | 32.9   |
| <i>C. hederacea</i> JH2                    | 209        | 55.5   | 165         | 53.9   | 226         | 66.1   | 229              | 32.9   |
| <i>C. hederacea</i> JH3                    | 209        | 55.5   | 165         | 53.9   | 226         | 66.1   | 229              | 32.9   |
| <i>C. sepium</i> P                         | 208        | 55.5   | 165         | 53.9   | 226         | 66.1   | 229              | 32.9   |
| <i>C. sepium</i> JHX1                      | 209        | 55.5   | 165         | 53.9   | 226         | 66.1   | 229              | 32.9   |
| <i>C. sepium</i> var. <i>japonica</i> KW12 | 207        | 55.0   | 165         | 53.9   | 226         | 66.1   | 230              | 33.3   |
| <i>C. sepium</i> var. <i>japonica</i> KW16 | 207        | 55.0   | 165         | 53.9   | 226         | 66.1   | 230              | 33.3   |
| <i>C. sepium</i> var. <i>japonica</i> CS1  | 207        | 55.0   | 165         | 53.9   | 226         | 66.5   | 230              | 33.3   |
| <i>C. sepium</i> var. <i>japonica</i> CS2  | 207        | 55.0   | 165         | 53.9   | 226         | 66.5   | 230              | 33.3   |
| <i>Convolvulus arvensis</i> UL1            | 207        | 53.1   | 165         | 52.7   | 225         | 65.9   | 232              | 32.5   |
| Mean                                       | 207.4      | 55.0   | 165         | 54.0   | 225.9       | 65.9   | 233              | 33.1   |

으로 갯메꽃이 242–243 bp로 가장 길었으며, 애기메꽃과 큰메꽃이 229 bp로 가장 짧았다. 정렬된 *psbA-trnH* 지역의 총 염기서열은 243 bp였으며, 이 중 238 bp는 염기서열 변화가 없고, 나머지 5개는 변화가 있었으며 이 중 1개가 계통학적으로 유용한 형질이었다. 염기조성의 평균은 A가 33.1%, C가 13.1%, G가 21.4%, T가 32.4%였고 CG의 함량은 전체적으로 약 33.1%로 계산되었다(Table 2). ITS 지역과 *psbA-trnH* 지역을 유합한 염기서열 길이는 828–841 bp로 나타났다. 전체적으로 갯메꽃이 840–841 bp로 가장 길었으며, 외군을 포함한 나머지 분류군들은 828–829 bp로 나타났다. 정렬한 유합된 자료의 총 염기서열은 844 bp였으며, 이 중 775 bp는 염기서열 변화가 없고, 나머지 69개는 변화가 있었으며 이 중 17개가 계통학적으로 유용한 형질이었다. 염기조성의 평균은 A가 23.0%, C가 25.5%, G가 26.7%, T가 24.8%였고 CG의 함량은 전체적으로 약 52.2%로 계산되었다(Table 2).

## 2. 염기변이

Kimura's two parameter method를 이용한 분류군 간 유전적 거리(pairwise distance)를 계산한 결과 ITS 지역과 *psbA-trnH* 지역을 유합한 16개체의 염기변이는 외군을 포함하여 0–7.394%로 높게 나타났으나 외군을 제외한 15개체의 염기변이는 0–2.055%로 낮게 나타났다. 외군을 포함한 자료에서 염기서열의 변이가 없는 분류군은 큰메꽃과 애기메꽃이었으며, 가장 높은 변이를 보이는 것은 메꽃과 서양메꽃이었다. 내군에서는 갯메꽃과 선메꽃이 2.055%로 가장 높은 염기 변이를 보였다(Table 3).

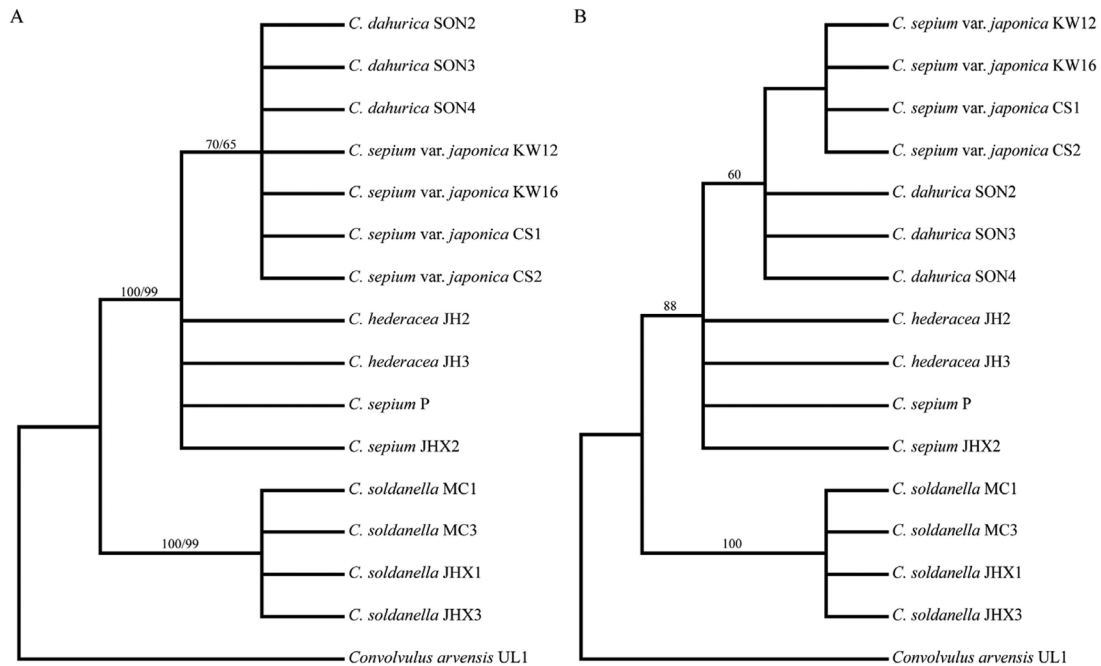
## 3. 분자계통학적 분석

ITS 지역의 MP (Maximum parsimony) 분석 결과 64단계로 구성된 6개의 parsimony tree가 얻어졌으며 계통학적 의미가 있는 부위만을 포함한 이들 계통수들의 CI는 1, RI는 1 그리고 RC는 1이었다. 분류군간 MP tree는 서양메꽃이 나머지 종들과 뚜렷이 구별되었으며 갯메꽃이 100%의 높은 bootstrap value로 가장 기부에 위치하고 있으며 나머지 100% bootstrap value의 선메꽃, 메꽃, 애기메꽃, 큰메꽃으로 나누어지는 두 개의 분계조를 형성하여 단계통군을 형성하였다. 잎의 형태와 생육형태가 유사하고 식물체 전체 털의 유무에 따라 분류되는 선메꽃과 메꽃의 경우 70% bootstrap value와 65% jackknife value로 같은 분계조를 형성하였다. 화경 상부 날개 유무로 구분되는 애기메꽃과 큰메꽃은 polytomy를 형성하였다(Fig. 1). ITS 지역과 *psbA-trnH* 지역을 유합한 결과 MP tree는 70단계로 구성된 1개의 MP tree를 얻었으며 이들 계통수들의 CI는 0.986, RI는 0.985 그리고 RC는 0.971이었다. ITS tree와 동일하게 서양메꽃은 뚜렷이 구별되었으며 갯메꽃이 100%의 높은 bootstrap value로 가장 기부에 위치하고 있었다. 선메꽃, 메꽃, 애기메꽃, 큰메꽃은 99% bootstrap value로 단계통군을 형성하였다. 선메꽃과 메꽃이 63% bootstrap value로 하나의 분계조를 이루었다. 선메꽃과 메꽃의 분계조 안에서 메꽃은 낮은 bootstrap value를 나타내며 분계조를 형성하였다. 나머지 애기메꽃과 큰메꽃은 별도의 그룹을 형성하지 않았다. ML tree에서도 같은 양상을 보였다(Fig. 1).

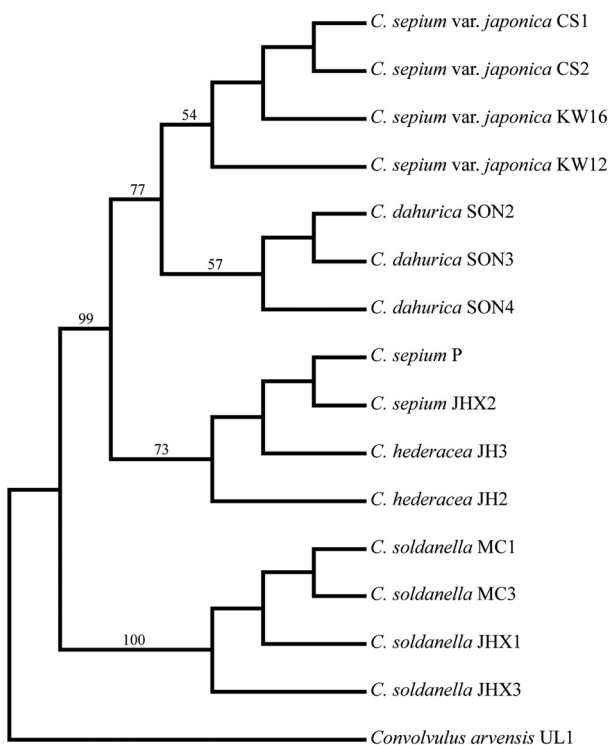
염기변이에 기초한 NJ tree 분석결과 외군에서 100%

**Table 3.** Pairwise sequence divergence values( $\times 100$ ) of ITS region and *psbA-trnH* region combin based on Kimura's two parameter method.

|         | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1 SON2  | -     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 2 SON3  | 0.000 | -     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 3 SON4  | 0.000 | 0.000 | -     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 4 KW12  | 0.121 | 0.121 | 0.121 | -     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 5 KW16  | 0.121 | 0.121 | 0.121 | 0.000 | -     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 6 CS1   | 0.121 | 0.121 | 0.121 | 0.000 | 0.000 | -     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 7 CS2   | 0.121 | 0.121 | 0.121 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | -     |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 8 JH2   | 0.241 | 0.241 | 0.241 | 0.241 | 0.242 | 0.361 | 0.361 | -     |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 9 JH3   | 0.241 | 0.241 | 0.241 | 0.241 | 0.242 | 0.361 | 0.361 | 0.000 | -     |       |       |       |       |       |       |    |
| 10 P    | 0.241 | 0.241 | 0.241 | 0.241 | 0.242 | 0.361 | 0.361 | 0.000 | 0.000 | -     |       |       |       |       |       |    |
| 11 JHX2 | 0.241 | 0.241 | 0.241 | 0.241 | 0.242 | 0.361 | 0.361 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | -     |       |       |       |       |    |
| 12 MC1  | 2.053 | 2.053 | 2.053 | 1.812 | 1.814 | 1.934 | 1.934 | 1.808 | 1.808 | 1.810 | 1.808 | -     |       |       |       |    |
| 13 MC3  | 2.055 | 2.055 | 2.055 | 1.814 | 1.815 | 1.936 | 1.936 | 1.810 | 1.810 | 1.812 | 1.810 | 0.000 | -     |       |       |    |
| 14 JHX1 | 2.053 | 2.053 | 2.053 | 1.812 | 1.814 | 1.934 | 1.934 | 1.808 | 1.808 | 1.810 | 1.808 | 0.000 | 0.000 | -     |       |    |
| 15 JHX3 | 2.053 | 2.053 | 2.053 | 1.812 | 1.814 | 1.934 | 1.934 | 1.808 | 1.808 | 1.810 | 1.808 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | -     |    |
| 16 UL1  | 7.271 | 7.271 | 7.271 | 7.275 | 7.289 | 7.394 | 7.394 | 7.047 | 7.047 | 7.054 | 7.047 | 7.235 | 7.243 | 7.235 | 7.235 | -  |



**Fig 1.** A. Strict consensus tree (Length = 64, CI = 1, RI = 1) based on 16 phylogenetically informative changes in ITS sequences of 16 taxa. The bootstrap/jackknife values are found below branches. B. Maximum likelihood (ML) tree of ITS and *psbA-trnH* sequences of 16 taxa. Bootstrap values are found below branches.



**Fig 2.** Neighbor-joining (NJ) tree (Rectangular cladogram) of combined ITS and *psbA-trnH* sequences of 16 taxa. Bootstrap values are found above branches.

bootstrap value로 갯메꽃과 나머지 4 분류군으로 유집되었고, 애기메꽃과 큰메꽃이 73% bootstrap value, 선메꽃과 메꽃이 77% bootstrap value로 각각 유집되었다. 이후 선메꽃과 메꽃이 각각 57%, 54% bootstrap value로 유집되는 형태를 보여주었다(Fig. 2).

## 고 찰

한국산 메꽃속의 분류는 잎의 모양과 화관의 길이, 식물체 전체 털의 유무 등의 차이가 있으나 이들 분류군간에 외부형태에 의한 형질 분석 결과로 보았을 때 메꽃속 5종의 개체들은 다양한 잎 변이 현상이 나타났다.

갯메꽃은 해안가에 주로 자생하는 식물로 메꽃속의 다른 분류군과는 확연한 차이를 보이는 신장형의 엽신과 엽육이 두꺼운 다육성 잎을 가지는 특징을 가진다. nrDNA의 ITS 지역의 MP tree와 ITS 지역과 cpDNA의 *psbA-trnH* 지역을 유합한 MP, ML tree에서도 100%의 bootstrap value로 강력하게 유집이 되는 것을 확인하여 독립된 분류군임을 확인하였으며, 메꽃속 내에서도 가장 기부에 위치하였다. 이러한 결과는 다른 연구자(Kim and Choi, 1984)들의 견해와도 일치하였다.

애기메꽃과 큰메꽃은 잎의 밑부분이 양쪽으로 뺨족하고, 각각 2개로 다시 갈라지며, 피침상 삼각형으로 점차 좁아진다. 또한 잎의 밑부분이 약간 심장저이고 위 끝이 뺨족한 특징을 가지는 잎의 전체적인 형태는 애기메꽃과 큰메꽃이

비슷한 모양을 가지나 잎 변이가 매우 심하여 두 종의 명확한 실체를 파악하기가 힘들며(Oh et al., 1995) 오직 화경상부의 날개 유무에 따라 애기메꽃과 큰메꽃을 구분하고 있는 실정이다. 본 연구결과에서도 MP, ML tree 모두 다계통을 형성하여(Fig. 1), 두 종의 관계가 명확하지 않은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Oh et al. (1995)의 견해와 일치하고 있다.

메꽃(*C. sepium* var. *japonica*)은 Ohwi (1965)가 *C. japonica*의 이명으로 취급하였고, Oh et al. (1995) 또한 성분분류학적 연구를 통하여 *C. japonica*로 취급하였다. 그러나 Choi (2007)는 화관의 크기 등의 특징으로 *C. japonica*를 기본명으로 큰메꽃의 변종으로 취급하였다. 본 연구 결과에서는 선메꽃과 같은 분계조를 형성하여 큰메꽃보다 선메꽃과 가깝다고 판단되며, nrDNA와 cpDNA의 유합자료에서는 각기 독립된 분계조를 형성하여 모종인 큰메꽃과는 독립적인 분화 양상을 보여 주었다(Fig. 1). 이는 모종인 큰메꽃의 변종으로 처리한 Choi (2007)의 견해와는 상이한 결과를 보여주었고, *C. sepium* var. *japonica*를 *C. japonica*로 이명처리한 Oh et al. (1995)의 견해가 타당하는 것으로 생각되나, 본 종은 잎 변이가 너무 심하여 개체간에도 중분화가 진행되는 분류군으로 생각되며, 이러한 활발한 중분화로 인하여 정확한 분류계급은 개체수준의 다양한 분석방법이 필요하다고 생각된다.

### 유연관계 및 진화경향성

NJ tree에서는 ITS 지역의 MP tree, ITS 지역과 *psbA-trnH* 지역을 유합한 ML tree에서와 동일하게 가장 기부에 갯메꽃이 위치했으며 애기메꽃과 큰메꽃 그리고 선메꽃과 메꽃이 가까운 유연관계를 나타내었다. ITS와 *psbA-trnH* 자료를 근거로 다루어진 외군을 제외한 한국산 메꽃속 5분류군에 대한 세부적인 계통도는 다육성 잎을 가지고 해안가에 자생하며, 잎의 모양이 신장형인 특징을 가지는 갯메꽃이 100%의 높은 bootstrap value를 가지며 가장 기부에 위치하고 있는 것으로 보아 갯메꽃에서 나머지 분류군들이 파생되었을 가능성을 추측할 수 있었다. 그리고 선메꽃과 메꽃이 함께 분지하였는데 이는 두 종의 잎 형태가 유사하다는 결과와도 일치된다. 다음으로 애기메꽃과 큰메꽃은 자생지의 특이성이 없고, 애기메꽃의 화경상부에 날개가 있는 형태적 특징에서 분류가 되지만 분자계통학적 연구결과에서 분계조가 붕괴됨에 따라 두 종의 실체에 대한 연구는 보다 많은 개체수와 지역별 분석을 통해 결정되어야 한다고 생각된다.

## 사 사

이 논문은 2011년도 교육과학기술부 지정 정책중점연구소 지원 사업에 의해서 연구되었습니다.

### 인용문헌

Álvarez, I. and J. F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant

- phylogenetic inference. *Mol. Phylogen. Evol.* 29: 417-434.
- Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants : An example from the Compositae. *Mol. Phylogen. Evol.* 1: 3-16.
- Choi, B. H. 2007. Convolvulaceae. In *The genera of vascular plants of Korea*. Flora of Korea Editorial Committee (eds.). Academy Publishing Co, Seoul. Pp. 794-796.
- Choisy, J. D. D. 1845. Convolvulaceae. In *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*. 9: 433.
- Chung, M. G., S. T. Kim, H. G. Chung and M. S. Chung. 1995. Allozyme Diversity in Korean Populations of *Calystegia soldanella* and *C. japonica* (Convolvulaceae). *J. Pl. Biol.* 38(2): 173-180.
- Curtis, S. and Clegg, M. T. 1984. Molecular evolution of chloroplast DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1: 291-301.
- 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 v5.4, Available from <http://www.geneious.com/>.
- Farris J. S., Albert V. A., KLLersjo M., Lipscomb D. and Kluge A. G. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Kim, K. J. and R. K. Jansen. 1994. Comparisons of phylogenetic hypotheses among the different data sets in dwarf dandelion (*Krigia*, Asteraceae) : Additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Pl. Syst. Evol.* 190: 157-185.
- Kim, K. J., Y. D. Kim, J. H. Kim, S. J. Park, C. W. Park, B. Y. Sun, K. O. Yoo, B. H. Choi and S. T. Kim. 2008. Phylogenetic classification of Korean vascular flora according to the recent APG classification system. *Korean J. Pl. Taxon.* 38: 197-222 (in Korean).
- Kim, S. T. and M. G. Chung. 1995. Genetic and clonal structure in Korean populations of *Calystegia japonica* (Convolvulaceae). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 36: 135-141.
- Kim, Y. D., C. W. Park., B. Y. Sun, K. J. Kim, E. J. Lee and S. H. Kim. 2005. ITS sequence variations in common ragweed and giant ragweed. *Korean J. Pl. Taxon.* 35: 273-285 (in Korean).
- Kim, Y. S. and B. H. Choi. 1983. Chromosome number, morphological and anatomical study on *Calystegia* in Korea. *Korean J. Pl. Taxon.* 13: 89-101 (in Korean).
- Kim, Y. S. and B. H. Choi. 1984. A numerical taxonomic study of *Calystegia* in Korea by the cluster analysis and principal component analysis. *Korean J. Pl. Taxon* 27: 33-41 (in Korean).
- 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.
- Komarov, V. L. 1907. *Flora Manshuriae*. vol. III. Pp. 303-308.

- Lookerman, D. J. and R. K. Jansen. 1996. The use of herbarium material for DNA studies. In *Sampling the green world*. Stussey, T. J. and S. Sohmer (eds.), Columbia university Press, New York. Pp. 205-220.
- Makino, T. 1912. *Index Plantarum Japonicarum Sive Enumeratio Plantarum Omnium*. 2(2): 516.
- Nakai, T. 1911. *Calystegia*. In *Flora Koreana*. Pars secunda. J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo. 31: 108-110.
- Nakai, T. 1952. *Calystegia*. In *A Synoptical Sketch of Korean Flora*. Bull. Natl. Sci. Mus. 31: 94-95.
- Oh, Y. C., C. S. Lee., and E. J. Park. 1995. A chemotaxonomic study on the genus *Calystegia* (Convolvulaceae) in Korea. *Korean J. Pl. Taxon*. 25: 13-24 (in Korean).
- Ohwi, J. 1965. *Calystegia*. In *Flora of Japan*. Smithsonian Institution, Washington, D.C. Pp. 752-753.
- Palmer, J. 1900. *Conspectus florum*. Pars. secunda. trudy Imo. S. -Peterburgsk. Bot. Sada. 18: 147-198.
- Park, M. K. 1949. *An Enumeration of Korean Plants*. Seoul, Korea. p. 197.
- Pamer, J. D., B. Osorio and W. F. Thompson. 1988. Evolution significance of inversions in legume chloroplast DNAs. *Curr. Genet*. 14: 65-74.
- Posada, A. D. and K. A. Crandall. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Roemer, J. J. and J. J. A. Schultes. 1819. *Calystegia*. *Systema vegetabilium*. 4: 184.
- Sang, T., D. J. Crawford and T. F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticular evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Amer. J. Bot.* 84: 1120-1136.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new for reconstructing Phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- 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.
- Son, S. W., J. H. Kim, K. J. Kim and S. J. Park. 2009. Molecular evidence for the hybridity of *Ilex* × *wandoensis* and the phylogenetic study of Korean *Ilex* based on ITS sequence data. *Gene & Genomics* 31(1): 53-63.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP\*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Wallich, N. 1824. *Calystegia*. In *Flora Indica; or descriptions of Indian Plants*. 2: 94-95.
- White, T. J., T. Birns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols : A guide to methods and applications*. D. G. M. Innis, J. Sninsky, and T. White (eds.), Academic Press, San Diego, C. A. Pp. 315-322.
- Willis, J. C. 1973. *A Dictionary of the Flowering Plant and Ferns*. 8th ed. Cambridge Univ. Press, London.