

## 엽록체 DNA 및 핵 DNA *RNApol2\_i23*에 근거한 등굴레복합체 (Ruscaceae)의 계통 연구

박정미 · 정경숙<sup>1</sup> · 오병운<sup>2</sup> · 장창기<sup>3\*</sup>

국립생물자원관 대외협력과, <sup>1</sup>충북대학교 바이오연구소, <sup>2</sup>충북대학교 생물학과, <sup>3</sup>공주대학교 생물교육과

### Phylogeny of the *Polygonatum odoratum* Complex Inferred from Multiple cpDNA and Nuclear *RNApol2\_i23* Sequence Data (Ruscaceae)

Jeong-Mi Park, Kyong-Sook Chung<sup>1</sup>, Byoung-Un Oh<sup>2</sup> and Chang-gee Jang<sup>3\*</sup>

Div. Research Cooperation, National Institute of Biological Resources, Incheon 404-708, Korea

<sup>1</sup>Biotechnology Research Institute, Chungbuk University, Cheongju, 361-763, Korea

<sup>2</sup>Department of Biology, Chungbuk University, Cheongju, 361-763, Korea

<sup>3</sup>Department of Biology Education, Kongju University, Gongju 314-701, Korea

(Received 1 December 2011; Revised 9 December 2011; Accepted 14 December 2011)

**적 요:** 엽록체 DNA(*trnL-F* IGS, *trnL* intron, *trnH-psbA*)와 핵 DNA(*RNApol2\_i23*)의 염기서열을 분석하여 등굴레복합체를 대상으로 계통분류학적 연구를 실시하였다. 유럽산 분류군들은 한 분계조로 뚜렷하게 유집되었고, 이들은 한국산 분류군 중에서 등굴레, 왕등굴레, 풍도등굴레 등과 유집되었다. 풍도등굴레, 왕등굴레와 제주산의 등굴레중 하나가 한 분계조로 유집되어 육지로부터 지리적으로 격리된 섬 지역에서 진행되는 등굴레로부터의 종분화를 추정해 볼 수 있었다. 등굴레복합체에 속하는 분류군들은 기본염색체수를 기준으로 2개의 소그룹( $x=9$ 와  $x=10$ )으로 구분되고 있다. 비록 기본염색체수가 줄어드는 방향으로 진화하는 속 내 분류군들의 진화경향과는 일치하지 않으나, 2개 그룹의 구분에 대해서는 분자적인 자료, 특히 핵 DNA 염기서열 분석결과가 이를 강력하게 지지하였다. 반면에 엽록체 DNA는 분류군을 구분하는 해상도가 낮게 나타났다. 속내 분류군들의 진화나 계통관계를 밝히기 위하여 차후에 좀 더 많은 재료에 대한 세포학적, 형태학적, 지리학적 자료가 축적되어야 할 것이다.

**주요어:** 이수체현상, 엽록체 DNA, 등굴레복합체, 분자계통학, 핵유전자(*RNApol2\_i23*)

**ABSTRACT:** The sequence data of the plastid DNA (*trnL-F* IGS, *trnL* intron, and *trnH-psbA*) and nuclear DNA (*RNApol2\_i23*) markers were utilized to study phylogenetic relationships among the taxa in the *Polygonatum odoratum* complex (Ruscaceae). European *P. odoratum* individuals form a clade with a high bootstrap value, which is a sister to the clade of Korean *P. odoratum* var. *odoratum*, *P. odoratum* var. *pluriflorum* and *P. robustum*. The formation of the clade with *P. odoratum* var. *odoratum*, *P. robustum*, and one accession of *P. odoratum* var. *pluriflorum* indicates geological speciation in isolated populations in the islands following dispersal events from the mainlands. All data sets form two major clades, which are congruent with the subgroups divided by the basic chromosome numbers ( $x=9$  and  $x=10$ ). Although it is not easy to test the hypothesis of the decrease in the basic chromosome number due to scatter taxon sampling in this study, the molecular data strongly suggested that aneuploidy plays an important role in lineage diversification in the genus *Polygonatum*. The cytological data was not strongly supported by the cpDNA sequences. Further investigations of the cytological, morphological, and geographical characteristics with comprehensive sampling are desired to understand the evolution and lineage diversification in the genus.

**Keywords:** aneuploidy, cpDNA, *Polygonatum* complex, molecular phylogeny, nDNA *RNApol2\_i23*

\*Author for correspondence: cgjang@kongju.ac.kr

등굴레속(*Polygonatum* Mill.)은 Ruscaceae-Polygonateae에 속하는 식물군으로(Rudall et al., 2000; Jang and Pfosser, 2002), 학자에 따라서는 Convallariaceae-Polygonateae (Dahlgren and Clifford, 1982; Dahlgren et al., 1985; Conran and Tamura, 1998) 나 Liliaceae-Polygonatae (Krause, 1930; Hutchison, 1934; Melchior, 1964)로 취급하기도 한다. 본 연구에서는 이러한 견해들 중 다양한 분류학적 기준을 바탕으로 검토되어진 Kubitzki의 분류체계를 적용하였다(Conran and Tamura, 1998). 과의 명칭은 Dahlgren et al. (1985)이 Convallariaceae Horaninow (1834)를 사용하였지만, Rudall et al. (2000)은 Convallariaceae에 비해서 Ruscaceae Sprengel (1826)이 명명규약상 선취권을 가진다고 주장하면서 Ruscaceae-Polygonateae하에 본 속을 취급하였다 (Jang and Pfosser, 2002). 본 속은 북반구에만 약 60여 분류군이 분포하며, 그 중에서 특히 중국과 한반도를 포함한 동북아시아에 약 70%의 분류군이 집중적으로 분포하고 있어 중국 남동부 Yunnan 지역을 본 속의 분포중심지 및 기원지로 추정하고 있다(Jeffrey, 1980, 1982; Jang, 1998). 등굴레복합체의 주요 종인 등굴레(*P. odoratum*)는 북미를 제외한 북반구 전체에 걸쳐서 광범위하게 분포하고 있는 분류군이다. *P. odoratum*은 형태학적으로 변이의 폭이 아주 넓다. 특히 등굴레의 종다양성이 풍부한 한반도에서 종의 한계를 규정하는 기준이 학자에 따라서 많이 다르게 적용되어 왔다. *P. odoratum*의 분포지역은 등굴레속의 기원지로 추정되는 중국을 중심으로 만주, 한반도, 일본, 북미 등의 동쪽 분포역과 서남아시아, 유럽이 속하는 서쪽 분포역으로 구분할 수 있다(Jeffrey, 1980; Tamura, 1993; Jang 1998). 중국과 서쪽 분포역에 생육하는 종들은 변이의 범위가 좁아서 다소 일정한 외부형태를 나타내지만, 동쪽 분포역에 해당하는 지역, 특히 한반도에 분포하는 것들은 아주 다양한 외부형태를 가져 몇 개의 구분된 종이나 변종 수준의 분류계급으로 나뉘어져 취급되고 있다. Tang (1978)과 Jeffrey (1980)는 중국에 생육하는 분류군들을 형태적 변이를 보이는 분류군에 대해 독립된 종으로 취급하지 않고 하나의 넓은 분포범위를 가지는 복합체로서 *P. odoratum s. lat.*로 취급하였다. 반면에 한국에 분포하는 분류군들은 비교적 뚜렷한 외부형태적 차이를 나타내어 등굴레(*P. odoratum* var. *pluriflorum*), 풍도등굴레(*P. odoratum* var. *odoratum*), 왕등굴레(*P. robustum*), 산등굴레(*P. thunbergii*), 선등굴레(*P. grandicaule*), 늦등굴레(*P. infundiflorum*) 등 종이나 변종 수준의 여러 분류군으로 취급되고 있다(Nakai, 1952; Lee, 1996; Jang, 1998, 2002). 이들은 외부형태적으로 줄기의 능각유무나 수술대 모양과 돌기 분포양상 등에서 차이를 보이고 있고 세포학적으로 서로 다른 기본염색체 수를 가지고 있어 2개의 그룹으로 뚜렷하게 구분되어 진다(Jang, 1998; Han et al., 1998; Jang and Kim, 1999).

*P. odoratum s. lat.*내의 분류군들이 몇몇 외부형태학적 형질에 의해서 구분되어 지기는 하지만 동일 분류군 내에서는 물론 일부 지역의 동일 집단 내에서도 영양기관 뿐 아

니라 꽃, 열매 등 생식기관에서도 형태와 색 변이가 심하기 때문에 분류군의 혼동과 학명의 오용을 초래하여 학자에 따라서 학명 사용에 있어서 견해 차이를 보이고 있다(Palibin, 1901; Komarov, 1903; Nakai, 1911, 1952; Chung, 1957, 1965; Lee, 1980; Lee, 1996). 등굴레 속 내 종 수준의 분류군 한계를 규명하는데 주요한 형태형질로 사용되어 온 잎 뒷면의 맥과 엽연의 털이나 돌기유무 및 꽃 수 등은 *P. odoratum s. lat.* 내의 분류군에서 불연속적으로 나타나 종의 동정에 어려움을 더해 왔다. 특히 왕등굴레는 잎 뒷면의 돌기와 꽃의 수만이 다른 분류군과 차이가 나기 때문에 등굴레에 이명처리되거나 등굴레의 변종으로 처리되기도 하였다. 현재까지 주로 형태형질에 의한 분류가 이루어져 와서 분류군의 한계를 설정하고 동정하는데 있어서의 혼동과 학명을 사용하는데 있어서 문제점들이 있어 왔다. 이는 종 수준에서 적용할 수 있는 진단적인 분류형질이 많지 않으며, 학자에 따라 형질의 중요성에 대해 이견이 있어 왔음을 의미한다.

등굴레속 내에서 종수준이나 종하분류군을 대상으로 한 DNA Fingerprinting 방법을 사용한 연구는 극히 제한적으로 수행된 바 있다(Jang and Kim, 1998b; Wu et al., 2001). RAPD 분석 결과에 의하면 *P. odoratum s. lat.*의 구성원들은 등굴레속 내의 다른 분류군들과 비교해 볼 때, 어떤 경우에는 종 수준에서 또 다른 경우에는 종하분류군의 수준에서 다루어지는 것이 타당하므로 상당히 가까운 유연관계를 가지고 있음을 시사한 바 있다(Jang and Kim, 1998b).

엽록체 DNA 표지인 *trnL* intron과 *trnL-F* intergenic spacer (IGS)는 염기서열 다양성이 높아서 계통학적으로 많은 정보를 주는 유전자로 알려져 있으며, Gentianaceae (Gielly and Taberlet, 1996)와 Hyacinthaceae (Pfosser and Speta, 1999) 등의 연구에서 유용한 형질로써 사용되어 졌다. 다른 엽록체 DNA인 *trnH-psbA*는 DNA barcoding에 주로 사용되어져 왔다 (Kress and Erickson, 2007; Whitlock et al., 2010). 핵DNA *RNApo2\_i23*(RPB II) (Denton et al., 1998)는 *Androcymbium*의 계통연구에서 유용하게 사용되었다(Del Hoyo and Pedrola-Monfort, 2008).

따라서 본 연구에서는 분자유전학적 정보를 사용하여 과내 분류군들 간의 한계를 규명하고자 하며, 또한 분자유전학적 정보를 형태 및 세포형질의 진화경향성과 함께 검토하여 종분화에 대한 추론을 하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 수집

본 연구에 사용한 재료는 한국산 7 분류군의 10 accessions과 Austria, Georgia, Romania 등에서 채집한 *P. odoratum*의 6 accessions과 Spain에서 수집한 *Ruscus hypoglossum*을 균외군으로 사용하였다(Table 1). *Ruscus*속은 등굴레속이 속한 Ruscaceae 내에서 본 속과 가장 가까운 유연관계를 가지고 있는 분류군이라고 알려져 있다(Rudall et al., 2000). 실험에

**Table 1.** Taxa included in the study. All sequence data have been submitted to GenBank and are also available from the corresponding author.

Taxa	Abb.	Locality	Voucher
<i>Polygonatum odoratum</i>	P10	Mdling, Austria	Jang P02010
<i>P. odoratum</i>	P100	Mtskheta-Mtianeti, Georgia	Jang P02100
<i>P. odoratum</i>	P120	Shida Kartli, Georgia	Jang P02120
<i>P. odoratum</i>	P160	Rax, Austria	Jang P02160
<i>P. odoratum</i>	P170	Hochgolling, Austria	Jang P02170
<i>P. odoratum</i>	P180	Zarnesti, Romania	Jang P02180
<i>P. odoratum</i> var. <i>odoratum</i>	P393	Ansan, Korea	Jang P08393
<i>P. odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i>	P335	Jeju, Korea	Jang P08335
<i>P. odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i>	P358	Wonju, Korea	Jang P08358
<i>P. robustum</i>	P383	Is. Ullung-do, Korea	Jang P08383
<i>P. infundiflorum</i>	P388	Ansan, Korea	Jang P08388
<i>P. thunbergii</i>	P398	Jeju, Korea	Jang P08398
<i>P. thunbergii</i>	P408	Danyang, Korea	Jang P08408
<i>P. thunbergii</i>	P418	Gongju, Korea	Jang P08418
<i>P. lasianthum</i>	P351	Goesan, Korea	Jang P08351
<i>P. multiflorum</i>	P50	Vienna, Austria	Jang P02050
<i>P. stenophyllum</i>	P436	Yeongwol, Korea	Jang P08436
<i>Ruscus hypoglossum</i>	L56	Tenerife, Spain	Jang 020502-56

사용한 재료의 증거표본은 공주대학교 표본관(KNH)에 보관하였다.

## 2. DNA 추출, PCR 과 염기서열 및 계통수 분석

분자계통학적 유연관계분석을 위해서 사용한 DNA의 추출은 6X CTAB 방법(Doyle and Doyle, 1987)을 변형하거나 DNEasy Plant Mini Kits (Qiagen, Valencia, California)를 용하였으며 추출한 DNA는 Beckman spectrophotometer로 정량한 후 5 ng/μl로 희석하여 PCR을 위한 DNA로 사용하였다. DNA증폭은 DNA thermal Cycler (Biometra, Whatman Co.)로 수행하였으며 엽록체 DNA makers *trnL-F* IGS, *trnL* intron, *trnH-psbA* 등의 증폭을 위한 primer는 Shaw et al. (2005)를 따랐으며, 핵DNA *RNAPol2\_i2* 구간의 증폭을 위한 primer는 Denton et al. (1998)과 Del Hoyo and Pedrola-Monfort (2008)에서 사용한 것을 동일하게 사용하였다. PCR 조건은 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 2분을 cycle로 하여 35회 반복한 후 72°C에서 10분간 더 유지시켰는데, 경우에 따라 annealing 온도를 조절하여 충분한 양의 PCR DNA product를 얻었다. 염기서열 분석은 BigDye Terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, California)을 이용하여 PCR DNA를 준비하여 ABI prism 377A automated DNA sequencer (Applied Biosystems)를 이용하여 수행하였다.

염기서열은 먼저 BLAST searches (Altschul et al., 1997)를

이용하면 target gene이 분석되었는지를 확인한 후 Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan), Clustal X (Thompson et al., 1997)를 이용하여 정렬하고, 최종 세부정렬은 BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999)에서 수작업을 통해 수행하였다. 모든 분석은 FastGap 1.0.8. (Borchsenius, 2007)을 이용한 simple method (Simmons and Ochoterena, 2000)로 indel을 포함한 후 수행되었다. 정렬된 염기서열은 PAUP 4.02b (Swofford, 2002)을 사용하여 parsimony analysis를 수행하였으며, 분석방법은 Heuristic search를 이용하고, 그에 따른 option으로는 ACCTRAN, MULPARS, 그리고 TBR를 이용하였다. Maximum likelihood analysis는 RAxML 7.0.4 (Stamatakis, 2006)을 이용하여 GTRGAMMA model에서 수행되었다. 또한 각 분계도의 지지정도를 알아보기 위하여 bootstrap (Felsenstein, 1985)을 이용하였다. 분석방법은 1000회를 반복하였으며, 이를 통한 계통수를 찾아내었다. 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). 핵DNA와 엽록체DNA 자료의 병합분석 이전에 두 자료 partitions의 congruence를 결정하기 위하여 PAUP 4.0b를 이용하여 incongruence length difference (ILD) test를 실시하였다(Farris et al., 1994, 1995). 본 연구에서 얻은 모든 염기서열 자료는 GenBank에 제출하였다(Table 1).

**Table 2.** Characteristics of the *trnL*-F IGS, *trnL* intron, *trnH-psbA*, *RNApol2\_i23* and combined data sets. The tree lengths, Consistency index (CI), Homoplasy index (HI), and Retention index (RI) were obtained from maximum parsimony analyses.

Characters	<i>trnL</i> -F IGS	<i>trnL</i> intron	<i>trnH-psbA</i>	<i>cpDNA</i> Combined	<i>RNApol2_i23</i>	All Combined
No. of all characters (Indels only)	376 (7)	550 (3)	678 (13)	1604 (26)	1166 (28)	2770 (54)
No. of informative characters (%)	16 (4.25)	10 (1.81)	14 (2.06)	40 (2.49)	162 (13.89)	202 (7.29)
Tree length	23	11	43	88	224	321
Consistency index (CI)	0.9565	1.0000	0.7674	0.7500	0.9598	0.8754
Homoplasy index (HI)	0.0435	0.0000	0.2326	0.2500	0.0402	0.1246
Retention index (RI)	0.9231	1.0000	0.7872	0.6667	0.9167	0.7701

## 결 과

### 1. 염기서열의 특징

각 표지의 특성을 Table 2에 요약하였다. Indels들을 포함한 정렬된 자료의 길이는 cpDNA의 *trnL*-F IGS는 376 base pairs(bp), *trnL* intron은 550 bp, *trnH-psbA*는 678 bp이며, nDNA인 *RNApol2\_i23*는 1166 bp이었다. cpDNA 표지 중에는 *trnL*-F IGS가 4.25%(16 bp)로 informative characters의 비율이 가장 높았으며, nDNA 표지의 informative characters의 비율은 13.89%(40 bp)로 매우 높게 나타났다. 현화식물의 분자계통학적 연구에 가장 많이 사용되어 온 nDNA ITS의 informative characters가 5-59%인 것과 비교 할 때도(Baldwin et al., 1995; Álvarez and Wendel, 2003), 매우 높은 *RNApol2\_i23*의 informative characters의 비율은 앞으로 이 표지가 다른 분류군들을 대상으로 하는 연구에도 많이 활용될 수 있음을 시사한다. 특히, nDNA 표지에서 indel이 전체 정렬된 자료의 2.4%로 매우 높게 나타났다.

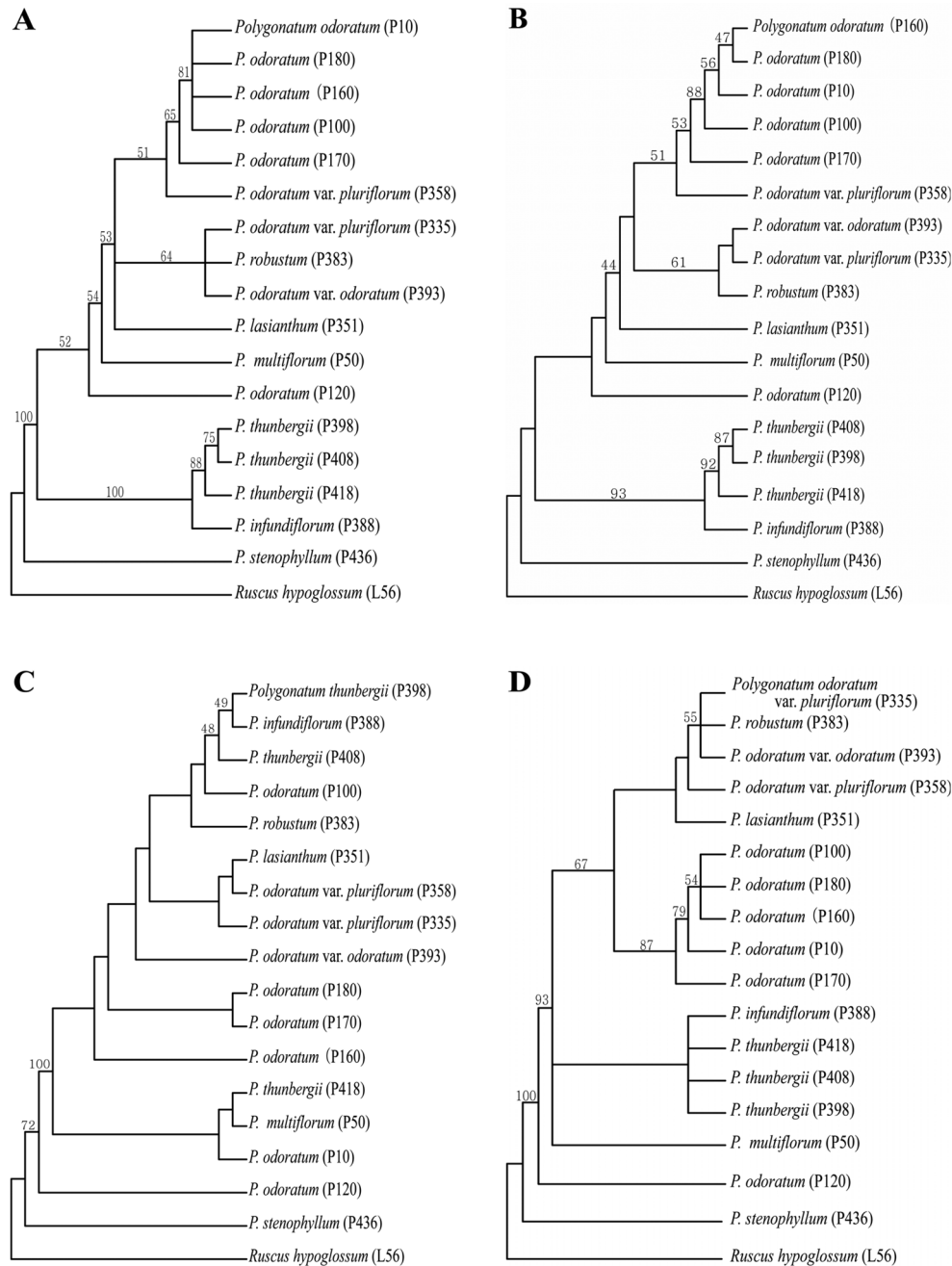
### 2. 계통분석

각 표지는 3가지의 분석 (Neighbor-joining, Maximum parsimony, Maximum likelihood)에서 모두 대체적으로 비슷한 topology를 보여주었다. 모든 cpDNA 자료를 병합했을 때, 자료 전체는 1604 bp (indels 포함) 이고, CI는 0.75이며, MP analysis에서 총 tree length는 88 step이었다(Table 2). MP consensus tree에서 *Polygonatum stenophyllum* (P436)을 제외한 나머지 군내군이 높은 bootstrap(BS = 72%) 값으로 지지되었으며(Fig. 1), 군내군 내에서는 잘 지지된 분계조를 만들지 않았고, ML analysis에서도 비슷한 결과가 발견되었다. nDNA (*RNApol2\_i23*)는 MP analysis에서 총 224 step이며, CI는 0.9598로 매우 높게 나타났다. MP와 ML 모두에서 *P. stenophyllum* (P436)을 제외한 나머지 군내군 분류군들이 상대적으로 비교적 높은 bootstrap으로 지지되었고(Fig. 1), 군내군 내에서 적어도 하나 이상의 잘 지지된 분계조를 형성하였다(Fig. 1). 특히, *P. thunbergii* (P398, P408, P418)과 *P. infundiflorum* (P388)이 높은 지지도(MP에서 100, ML에서 93)로 분계조를 형성하였다.

엽록체DNA와 핵DNA의 전체 자료를 대상으로 수행한 ILD test에서 P 값이 0.01로 두 자료를 상동의 모집단에서 수집되었다는 귀무가설(null hypothesis)을 증명하지 못하였다. 어떤 samples에 의하여 두 자료간에 이러한 차이를 나타내는지 알아보기 위해서 특정한 sample들을 제외하고 ILD test를 반복적으로 실시한 결과, P100 (*P. odoratum*), P383 (*P. robustum*), P408 (*P. thunbergii*)를 제외하였을 때, P값이 0.2로 두 자료간의 매우 높은 상동성을 지지하였다. 현화식물의 분자계통학적 연구에서 모계의 엽록체DNA가 핵DNA와 다른 결과를 나타내는 경우는 이미 많이 알려져 있으며, lineage sorting (Doyle, 1992) 또는 deep coalescence (Maddison, 1997) 등의 가설들이 제안된 바 있다. 등굴레속에서 이러한 현상이 보고된 바는 아직 없으며, 좀 더 많은 분류군과 유전자 수집을 통해서 이러한 현상을 설명할 수 있는 가설들을 검증할 필요가 있다. 한편 ILD test가 자료간의 congruence를 추정할 수 있지만, 이러한 결과가 계통수들간의 상이한 topology를 추정하고 있는지는 혹은 정확도에 대하여 이견이 존재한다(Baum et al., 1998; Darlu and Lecointre, 2002; Hipp et al., 2004). 본 연구에서도 congruence가 높지 않은 두 자료 (엽록체DNA와 핵DNA)를 병합하여 얻은 tree가 핵DNA 계통수의 topology에는 아무런 변화가 없었고 MP 분석에서는 더 높은 해상도를 보여주었으며(Fig. 1. A, D), ML 분석 결과에서는 기본염색체수가 x=10인 분류군이 포함된 유럽산 clade의 BP값이 증가하였다(Fig. 1. B, Fig. 2).

## 고 찰

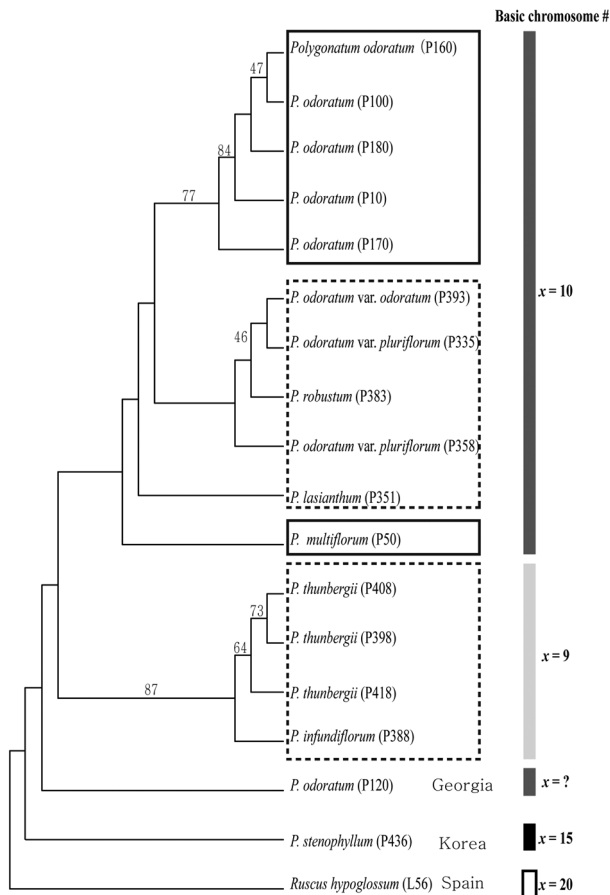
한국산 등굴레속 염색체 수에 관한 연구에서 등굴레복합체는 기본염색체수가 x=9인 진황정(*P. falcatum*)과 x=10인 죽대(*P. lasianthum*), 각시등굴레(*P. humile*) 등과 함께 등굴레절(sect. *Polygonatum*)에 속하였고, 기본염색체수에 따라 2개의 그룹으로 구분되었다(Han et al., 1998; Jang, 2002). 본 연구 결과에서도 등굴레복합체에 속하는 분류군들은 염색체수를 기준으로 기본염색체수가 x=9인 산등굴레와 늑등굴레가 하나의 소그룹, x=10인 등굴레, 풍도등굴레, 왕등굴레 등이 다른 소그룹을 형성하였다(Fig.2) 형태적으로



**Fig. 1.** Comparison of phylogenetic trees from Maximum Parsimony (MP) and Maximum Likelihood (ML) analyses of cpDNA and nDNA. A. MP consensus tree of *RNApol2\_i23*; B. ML tree of *RNApol2\_i23*; C. ML tree of cpDNA combined; D. MP consensus tree of all data combined. The numbers above the branches are bootstrap values. Tree topology from both analyses is consistent overall, and the phylogenetic tree from data combined data (D) shows similar topology with the nDNA trees (A and B).

$x=9$ 인 소그룹은 줄기의 관절 아래부분에 능각이 없고 줄기가 상부까지 직립으로 자라는 특징을 공유한다. 특히 산둥굴레와 늦둥굴레는 잎이나 꽃기관의 유사성이 큰 분류군이다(Jang, 2002). 산둥굴레의 경우 분포는 광범위하나 같은 분류군들끼리 뚜렷하게 유집되었고, 늦둥굴레와도

견고하게 유집되었다. 한편  $x=10$ 인 소그룹은 줄기의 관절 아래부분까지 능각이 있고 줄기가 하부에서부터 옆으로 기울어지는 특징을 가진다. 이 중 왕둥굴레(*P. robustum*)는 학자에 따라서 *P. odoratum*의 변종(*P. odoratum* var. *robustum*)이나 둥굴레(*P. odoratum* var. *pluriflorum*)의 이명으로 취급



**Fig. 2.** Maximum likelihood tree from all data combined with basic chromosome numbers. The numbers above the branches are bootstrap values. The clade with the basic chromosome number  $x = 9$  well excludes the taxa with other basic chromosome numbers. Solid and dotted lines indicate European and Korean taxa, respectively.

되기도 하였다(Komarov, 1903; Koidzumi, 1919). 본 연구결과 형태학적 유사성을 뒷받침할만한 증거가 될 수 있을 정도로 강하게 지지되지는 않았지만 이들은 낮은 bootstrap 값으로 한 분계조에 묶였다(Fig. 2). 또한 RAPD방법을 통한 유집의 양상과도 일치하여 이들 두 소그룹 간의 유연관계를 지지한다(Jang and Kim, 1998a). 엽록체 DNA를 통한 분석에서는 이들 구분을 뚜렷하게 지지하지는 않았지만, 핵DNA를 통한 분석에서는 이를 명확하게 지지하였다. 본 연구 결과 그룹 내의 분화정도는 뚜렷하게 보여주지 않았지만, 분자생물학적인 증거는 이들 두 그룹을 구분짓는 유용한 형질임이 확인되었다. 따라서 두 소그룹은 등굴레복합체내에서 기본염색체 수가 달라지므로 인해 뚜렷하게 종분화 되었다고 여겨진다(Tamura, 1993).

유럽에서 채집되어진 *P. odoratum*에 속하는 분류군 중에서 Georgia에서 채집된 1개 분류군(P120)은 형태학적으로 잎이 넓고 크기가 대형인 점으로 미루어 산지나 초지에 분포하는 다른 *P. odoratum*들과는 Kura강을 포함한 웅장한

Gori계곡의 지리적 장벽으로 인하여 생태적 또는 지리적으로 격리되어 종분화가 진행되고 있을 것이라 추정해 볼 수 있다. 차후로 이들은 다른 방법의 분석을 통해서 종분화 진행여부를 밝혀야 할 것이다. 한편 Georgia산 *P. odoratum* 이외의 *P. odoratum* 분류군들은 한국산 분류군 중에서 변종으로 취급되어지는 var. *odoratum* 및 var. *pluriflorum*과 뚜렷이 구분되어 하나의 분계조로 견고하게 유집되었다(Fig. 2). 이 결과는 형태적으로는 거의 차이점이 없으나(Jang, 1998), 지리적 거리나 분포중심지에서의 이동으로 인해 유전적으로 차이를 나타내었다고 사료된다. 따라서 아시아에 분포하는 모든 등굴레복합체 분류군들을 *P. odoratum*의 이명으로 처리한 Jeffrey (1978)의 견해는 타당하지 않다고 여겨진다.

제주에서 채집된 등굴레 [*P. odoratum* var. *pluriflorum* (P335)]는 잎의 형태가 작고 등근 형태를 가져 한반도 내륙의 것들과 차이가 있다. 이들은 풍도의 풍도등굴레나 울릉도의 왕등굴레 등과 유집되었고, 이들 간에는 외부형태적으로 잎 이외의 형질에서 차이를 나타내고 있지 않아서 지리적인 격리로 인한 종분화가 진행되고 있을 가능성을 열어 두는 것이 타당하다고 사료된다.

즉대나 *P. multiflorum* 등은 유전적으로 등굴레복합체에 속하는 분류군들과 거리가 멀지 않았다. 이들은 기본 염색체수가  $x = 10$ 으로 등굴레복합체 분류군들 중 등굴레, 왕등굴레, 풍도등굴레와 같으며, 이들과 유럽산 *P. odoratum*의 분류군들로 이루어진 분계조의 외군으로 위치하고 있었다. 따라서 즉대는 외부형태형질을 통한 분계분석에서 등굴레복합체 분류군들 중  $x = 10$  분류군들의 기저그룹으로 나타났다(Jang and Kim, 1998b). 이로 미루어 볼 때, 등굴레복합체에 속하는 분류군들은  $x = 9$ 인 조상형과  $x = 10$ 인 서로 다른 조상형에서 다른 분화경로를 거쳐 유사하게 묶여진 것으로 추정할 수도 있을 것 같다. 또 다른 가능성은  $x = 10$ 인 그룹에서  $x = 9$ 인 그룹으로 분화되었다고 추정해 볼 수 있다. 이는 염색체수의 감소가 동반된 종분화의 예와 일치한다(Tamura, 1993). 또한 등굴레속내의 다른 분류군들은 잎이 윤생(다수의 염색체수)에서 대생, 호생(소수의 염색체수)인 분류군으로 포가 있는 분류군(다수의 염색체수)에서 포가 없어지는 방향으로 분화되었다는 진화방향과는 서로 일치하지 않았다. 하지만 본 연구는 분류군들이 유집되는 정도가 강하게 지지되지 않았고, 일부 유전자를 바탕으로 한 결과이며, 등굴레속의 분포 중심지라고 알려진 중국에 생육하는 분류군들이 포함되지 않았으므로 차후에 이들 분류군이 포함되고 더 많은 유전학적 정보가 추가되어야 등굴레복합체의 종분화 경로를 추적할 수 있을 것으로 여겨진다.

이들의 분화 및 이동 경로는 분포중심지인 중국에서 서쪽 분포역으로 향하는 *P. odoratum* 및 동쪽 분포역으로 향한 *P. odoratum*이 각각 다른 경로로 서진, 동진하였다고 추정된다. 이들 중 서진하는 분류군들 중 일부는 *P. multiflorum*이나 Georgia에 생육하는 분류군(P120) 등으로 분화되었고, 동진하는 분류군들은 즉대나  $x = 9$ 인 분류군들로 분화되었

다고 여겨진다. 또한 등굴레와 형태적으로 뚜렷한 차이가 없는 울릉도의 왕등굴레(P383)와 등굴레와 잎 모양에서만 차이가 나는 제주도산 등굴레(P335)의 위치는 울릉도나 제주도 등 격리된 지역에서 현재도 지리적인 종분화가 진행되고 있을 수 있음을 시사한다.

등굴레복합체 분류군들을 2개 그룹으로 구분하는데 대해서는 분자적인 자료, 특히 핵 DNA 염기서열 분석결과가 이를 강력하게 지지하였지만, 속내 분류군들의 진화나 계통 관계를 밝히기 위하여 차후에 좀 더 많은 재료에 대하여 세포학적, 형태학적, 지리학적 자료가 축적되어야 할 것이다.

## 사 사

이 논문은 “2008년도 유망여성과학자 지원사업 과제번호 KRF-2008-C00025”에 의해 지원을 받아 연구되었음.

## 인용문헌

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Álvarez, I. and J. F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 19: 417-434.
- Baldwin, B., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell and M. J. Donogh. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247-277.
- Baum, D. A., R. Small and J. F. Wendel. 1998. Biogeography and floral evolution of Baobabs (*Adansonia*, Bombacaceae) as inferred from multiple data sets. *Syst. Biol.* 47: 181-207.
- Borchsenius, F. 2007. FastGap 1.0.8. Software distributed by the author ([http://192.38.46.42/aubot/fb/FastGap\\_home.htm](http://192.38.46.42/aubot/fb/FastGap_home.htm)).
- Chung, T. H. 1957. Korean Flora II. 947-951. Schinzisa, Seoul (in Korean).
- Chung, T. H. 1965. Illustrated Encyclopedia of Fauna and Flora of Korea, Vol. 5. Tracheophyta. Samhwa, Seoul (in Korean).
- Conran, J. G. and M. N. Tamura. 1998. Convallariaceae. *In* The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. 3. Kubitzki (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NewYork. Pp. 186-198.
- Dahlgren, R. M. T. and H. T. Clifford. 1982. The monocotyledon: A comparative study. Academic Press.
- Dahlgren, R. M. T., H. T. Clifford and P. F. Yeo. 1985. The Families of the Monocotyledons. Springer-verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Darlu, P. and G. Lecointre. 2002. When Does the Incongruence Length Difference Test Fail? *Mol. Biol. Evol.* 19: 432-437.
- Del Hoyo, A. and J. Pedrola-Monfort. 2008. Phylogeny of *Androcymbium* (Colchicaceae) based on morphology and DNA sequences. *Pl. Syst. Evol.* 273: 151-167.
- Denton, A. L., B. L. Mc Conaughy and B. D. Hall. 1998. Usefulness of RNA Polymerase II Coding Sequences for Estimation of Green Plant Phylogeny. *Mol. Biol. Evol.* 15(8): 1082-1085.
- Doyle, J. J. 1995. Gene tree and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. *Syst. Bot.* 17: 144-163.
- Dolye, J. J. and J. L. Dolye. 1887. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.* 19: 11-15.
- Farris, J. S., M. Källersjö, A. G. Kluge and C. Bult. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.
- Farris, J. S., M. Källersjö, A. G. Kluge and C. Bult. 1995. Constructing a significance test for incongruence. *Syst. Biol.* 44: 570-572.
- Farris, J. S., V. A. Albert, M. Källersjö, D. Lipscomb and A. G. Kluge. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- Felsenstein, J. S. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Gielly, L. and P. Taberlet 1996. A phylogeny of the European gentians inferred from chloroplast *trnL* (UAA) intron sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* 120: 57-75.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Han, M. K., C. G. Jang, B. U. Oh and Y. S. Kim. 1998. A cytotoxic study of genus *Polygonatum* in Korea. *Korean J. Pl. Taxon.* 28: 187-208 (in Korean).
- Hipp, A. L., J. C. Hall, and K. J. Sytsma. 2004. Congruence versus phylogenetic accuracy: revisiting the incongruence length difference (ILD) test. *Syst. Biol.* 53: 81-89.
- Hutchison, J. 1934. The Families of Flowering Plants 2. Monocotyledons. Oxford University Press. Macmillan, London.
- Jang, C. G. 1998. A systematic study of the genus *Polygonatum* (Liliaceae): with a special reference to Korean species. Ph.D. dissertation, Korea University Seoul. Pp. 458 (in Korean with English abstract).
- Jang, C. G. 2002. A taxonomic review of Korean *Polygonatum* (Ruscaceae). *Korean J. Pl. Taxon.* 32: 417-447 (in Korean).
- Jang, C. G. and Y. S. Kim. 1998a. Relationship of the Korean *Polygonatum* (Liliaceae) using the RAPDs analysis. *Korean J. Pl. Taxon.* 28: 371-384 (in Korean).
- Jang, C. G. and Y. S. Kim. 1998b. Cluster and cladistic analyses of the Korean *Polygonatum* (Liliaceae). *Korean J. Pl. Taxon.* 28: 357-370 (in Korean).
- Jang, C. G. and Y. S. Kim. 1999. Morphological evolution and relationships of Korean *Polygonatum* (Liliaceae). *Korean J. Pl. Taxon.* 29: 135-149 (in Korean).

- Jang, C. G. and M. Pfosser, 2002. Phylogenetics of Ruscaceae *s. lat.* based on plastid *rbcL* and *trnL-F* DNA sequences. *Stafia* 80: 333-348.
- Jeffrey, C. 1980. The genus *Polygonatum* (Liliaceae) in eastern Asia. *Kew Bull.* 34: 435-471.
- Jeffrey, C. 1982. Further note on eastern Asian *Polygonatum* (Liliaceae). *Kew Bull.* 37: 335-339.
- 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.
- Koidzumi, G. 1919. *Contribuciones ad floram Asiae Orientalis*. Bot. Mag. (Tokyo) 33: 110-122.
- Komarov, V. L. 1903. *Florae Manshuriae*. Z. Act. Hort. Petrop. 22: 1-787.
- Krause, K. 1930. Liliaceae. In *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* 2. Aufl. Engler, A. and K. Prantl (eds.) 15a, Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig. Pp. 368-370.
- Kress W. J. and D. L. Erickson. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One* 2: e508.
- Lee, T. B. 1980. *Illustrated Flora of Korea*. Hyangmoonsa, Seoul. Pp. 213-214 (in Korean).
- Lee, W. T. 1996. *Lineamenta Florae Koreae*. Academy Press, Seoul. Pp. 1271-1276 (in Korean).
- Maddison, W. P. 1997. Gene trees in species trees. *Syst. Biol.* 46: 523-536.
- Melchior, H. 1964. A Engler's syllabus der Pflanzenfamilien II. Gebr der Borntraeger. Pp. 521-522.
- Nakai, T. 1911. *Flora Koreana* II. J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo 31: 246-249.
- Nakai, T. 1952. A Synoptical Sketch of Korean Flora. *Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo* 31: 1-152.
- Palibin, J. 1901. *Conspectus Florae Koreae* III. *Acta Hort. Petrop.* 19: 103-105.
- Pfosser, M. and F. Speta. 1999. Phylogenetics of Hyacinthaceae based on plastid DNA sequences. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 86: 852-875.
- Rudall P. J., J. G. Conran and M. Chase. 2000. Systematics of Ruscaceae-Convallariaceae: a combined morphological and molecular investigation. *Bot. J. Linean Soc.* 34: 73-92.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new for reconstructing Phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Shaw, J., E. B. Lickey, J. T. Beck, S. B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K. C. Siripun, C. T. Winder, E. E. Schilling and R. L. Small. 2005. The Tortoise and the hare II: Relative Utility of 21 Noncoding Chloroplast DNA Sequences for Phylogenetic Analysis. *Am. J. Bot.* 92: 142-166.
- Simmons, M. P. and H. Ochoterena. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Syst. Biol.* 49: 369-81.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods (ver. 4.0), Sinauer Associates, Sunderland.
- MA Thomas, G. S. 1960. 'Geranium for ground cover' *Gardeners chronicle*, London. Pp. 147, 408-1, 504, 508-9.
- Tamura, M. N. 1993. Biosystematic studies on the genus *Polygonatum* (Liliaceae) III. Morphology of staminal filaments and karyology of eleven European species. *Bot. Jahrb. Syst.* 115:1-26.
- Tang, Y. C. 1978. *Polygonatum* Mill. In *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*. Vol. 15. Wang, F.T. and T. Tang (eds.). Science Press, Beijing (in Chinese). Pp. 52-81, 250.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
- Whitlock, B. A., A. M. Hale and P. A. Groff. 2010. Intraspecific Inversions Pose a Challenge for the *trnH-psbA* Plant DNA Barcode. *PLoS ONE* 5(7): e11533.
- Wu S., J. Yang and G. Rao 2001. Systematic position of *Polygonatum simizui* (Convallariaceae) based on morphological, cytological and chloroplast DNA sequence data. *Bot. J. Linean Soc.* 137: 291-296.