

Phylogenic Study of Genus *Citrus* and Two Relative Genera in Korea by *trnL-trnF* SequenceMan Kyu Huh<sup>2\*</sup>, Hye Jeong Yoon<sup>1</sup> and Joo Soo Choi<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Science Education, Busan National University, Busan 609-735, Korea<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

Received July 30, 2011 / Revised September 8, 2011 / Accepted September 9, 2011

*Citrus* is a common term and genus (*Citrus*) of flowering plants in the rue family, *Rutaceae*. *Citrus* is believed to have originated in the part of Southeast Asia bordered by Northeastern India, Myanmar (Burma) and the Yunnan province of China. The taxonomy and systematics of the genus are complex and the precise number of natural species is unclear, as many of the named species are clonally propagated hybrids, and there is genetic evidence that even some wild, true-breeding species are of a hybrid origin. One of the most popular sequences for phylogenetic inference at the generic and infrageneric levels in plants is the chloroplast *trnL-trnF* region. We evaluated the seven taxa with the *trnL-trnF* region to estimate phenotypic relationships within the genera *Citrus*, *Poncirus*, and *Fortunella* in Korea. Alignment of the DNA sequences required the addition of numerous gaps. Sequence variation within *Citrus* was mostly due to insertion/deletion. Within the genus *Citrus*, *C. limonia* and *C. sinensis* were relatives and sistered with *C. aurantium* in the four phylogenetic analyses (MP, ML, ME, and NJ). However, some external nodes were poorly supported.

**Key words** : *Citrus*, *trnL-trnF*, phylogenetic analyses

## 서 론

운향과(*Rutaceae*) 귤나무속(*Citrus*)은 동남아시아에 약 10여 종이 있으며 그 중 귤은 과일로 널리 알려져 있다. 귤과 형태적으로 유사한 금감속(*Genus Fortunella*)에 금귤 또는 금감(*Fortunella japonica* var. *margarita*) (Swingle) Makino)이 있다. 귤나무를 접목시킨 다양한 귤의 품종이 제주도에는 재배되고 있다. 귤나무속 식물은 인디아 북동지방, 비얀마, 중국의 운남지방이 기원지로 알려져 있다[1,5,6,17]. 이 속의 식물들은 귤, 레몬, 자몽, 라임으로 잘 알려져 있다. 이 속의 분류는 복잡하고 여러 중간 또는 클론 번식으로 중간 교잡이 형성되어 매우 복잡하다[6]. 귤나무속의 분류는 학자마다 견해를 달리하여 이창복[9]와 이영노[10]에 따랐다.

광귤나무(*Citrus aurantium* L.)는 높이가 4~5 m 정도로 잎이 많이 나고 가지에 가시가 있다. 잎은 어긋나고 달걀 모양이며 길이 7~10 cm이다. 잎 끝이 뾰족하고 물결 모양의 톱니가 있으며 잎자루에 날개가 있다. 5월에 흰색 꽃이 총상꽃차례로 1개 또는 몇 개씩 피는데, 꽃잎과 꽃받침은 각각 5개이며 20~24개의 수술과 1개의 암술이 있다. 씨방은 둥글고 녹색이다. 열매는 장과로 둥글면서도 편평하고 지름 6~8 cm이며 10월에 노란빛을 띤 갈색으로 익는다. 종자는 썩기형 달걀 모양이다.

유자나무(*Citrus junos* Tanaka)는 바닷가나 민가부근에서 자란다. 중국 원산이며 남쪽에서 과수로 심는다. 높이가 약 4 m이다. 가지에 뾰족한 가시가 있다. 잎은 어긋나고 달걀 모양 긴 타원형이며 가장자리에 둔한 톱니가 있고 잎자루에 날개가 있다. 꽃은 양성화이며 5~6월에 흰색으로 피는데, 잎겨드랑이에 1개씩 달린다. 꽃받침조각과 꽃잎은 5개씩이고 수술은 20개가 통처럼 합쳐지거나 5개로 나누어진다. 열매는 장과로서 편구형이며 지름 4~7 cm이고 9~10월에 익는다. 빛깔은 밝은 노란색이며 겉이 울퉁불퉁하고 향기가 있다.

레몬(*Citrus limonia* Osbeck)은 히말라야가 원산지로 시원하고 기후의 변화가 없는 곳에서 잘 자란다. 높이는 3~6 m이다. 잎은 어긋나고 어릴 때는 붉은 색을 띠지만 점점 녹색으로 변한다. 꽃은 5~10월에 피고 잎겨드랑이에 하나씩 또는 몇 개씩 무리지어 달린다. 꽃봉오리는 붉은 색이고, 꽃의 안쪽은 흰색, 바깥쪽은 붉은빛이 강한 자주색을 띤다. 열매는 타원 모양이고 겉껍질이 녹색이지만 익으면 노란 색으로 변하며 향기가 강하다. 종자는 달걀 모양이고 양끝이 뾰족하다.

당귤나무(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)은 상록활엽 관목이다. 잎은 호생하며 타원형이고 넓은 예저 또는 원저이며 길이 5~7 cm로서 가장자리가 밋밋하거나 파상의 잔톱니가 있고 엽병의 날개가 없거나 좁다. 열매는 장과로 지름 3.4 cm의 원형 또는 난형이며 등황색 또는 황적색으로 중심부가 충실하다. 외과피는 얇으며, 과육과 잘 떨어지고 밋밋하며 광택이 난다. 꽃은 6월에 피며 백색이고 향기가 있으며, 열매에 1송이씩 달린다. 꽃받침잎과 꽃잎은 각각 5개이고 20개 정도의 수술과 1개의

## \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1529, Fax : +82-51-890-1521

E-mail : mkhuh@deu.ac.kr

암술이 있다. 높이가 5 m에 달하고 가지에 가시가 없다.

귤나무(*Citrus unshiu* S. Marcov.)는 높이가 3~5 m이고 가지가 퍼지며 가시가 없다. 잎은 어긋나고 타원형으로 가장자리가 밋밋하거나 물결 모양 잔 톱니가 있다. 잎자루의 날개는 뚜렷하지 않다. 꽃은 6월에 흰색으로 핀다. 꽃받침조각과 꽃잎은 5개씩이고 수술은 여러 개이며 암술은 1개이다. 열매는 작은 공 모양이고 지름 5~8 cm이며 노란빛을 띤 붉은색으로 익는다. 이와 비슷하지만 잎이 타원형이고 열매가 원형 또는 달걀 모양이다.

금감(*Fortunella japonica* Swingle var. *margarita* (Swingle) Makino)은 상록 활엽관목이다. 잎은 호생하고 피침형이며 양 끝이 좁고 원저이며 길이 4-9 cm, 너비 2-4 cm로서 가장자리에 톱니가 거의 없고 표면은 녹색, 뒷면은 백록색이며 엽맥이 뚜렷하지 않다. 엽육 중에는 많은 소육점이 있고 엽병에 좁은 날개가 있다. 꽃은 백색으로서 향기가 있으며 1-2개가 엽액에 모여 달리고, 화경은 길이 3-5 mm이며, 꽃받침은 5개, 난형이고 꽃이 핀 후 커지며, 꽃잎도 5개이고 긴 타원형으로 길이 7 mm이며 5-7월에 개화한다. 수술은 많으며 1개의 암술이 있고 자방은 4-5실이다. 열매는 감과로 둥글며 지름 2-3 cm이고 10-11월에 옅은색으로 성숙하고 먹을 수 있다. 종자는 난형이며 길이 7-10 mm이다. 수피는 회청색이고 줄기가 많이 갈라지며 가시가 없다.

탱자나무(*Poncirus trifoliat* L.)는 낙엽 교목이다. 원산지는 중국이며 중국과 한국 중부 이남에 분포한다. 높이 약 3 m 정도까지 자란다. 5 cm 정도의 가시가 나 있다. 잎은 3출 겹잎으로 어긋나는데, 작은 잎은 타원형 또는 달걀 모양이며 끝은 둔하거나 약간 들어가고 밑은 뾰족하며 가장자리에 둔한 톱니가 있다. 가지는 약간 납작하고 녹색이며 가시는 길이 3~5 cm로서 굵고 어긋난다. 꽃은 잎보다 먼저 흰색으로 5월경에 하나씩 피며 잎겨드랑이에 달린다. 꽃잎은 5개이며, 수술은 많다. 열매는 장과로 둥글고 노란색이며 9월에 익는다.

식물의 분자생물학적 분류에 사용되는 엽록체 tRNA (*trn*) 유전자 중 leucine-tRNA (*trnL*)와 Proline-tRNA (*trnF*)의 서열 (*trnL-trnF*)은 한 개의 group I intron, 한 개의 intergenic spacer, 그리고 한 개의 *trnF* exon으로 구성되어 있다. Group I intron은 잘 보존된 핵심 구조로 pre-tRNA로부터 자가 스플라이싱을 촉매하는 활성 자리를 암호화하고 있다[3,11]. *trnL* intron은 group I의 첫 번째 intron이며 tRNA 유전자를 저해한다[2]. 다른 엽록체 DNA group I 인트론은 16S rRNA, *psbA*, *psbC*, 그리고 *psbB* 유전자에서 발견된다. 식물에서 *trnL* 인트론은 보통 양측면의 *trnL* exons에서 보존된 부위이다. intergenic spacer에서 이차 구조 요소(secondary-structural elements) 스프라이싱 부위에서는 발견되지 않는다[2].

국내에서 귤나무속에 대한 임의 DNA 증폭(random amplified DNA, RAPD)에 의한 분자 마커로 분류학적 연구를 수행한 바 있다[15,23,24]. 그러나 이 두 마크 간에 같은 분류군의

위치와 일부 분지군이 tree상에 일치하지 않은 점이 있었다. 따라서 본 연구의 목적은 엽록체 *trnL-trnF* 부위서열을 이용한 귤나무속과 근연 속 분류군에 대한 유연관계를 실행하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에 사용된 귤나무속과 근연 속의 재료는 2010년부터 2011년에 걸쳐 우리나라의 각지에서 총 7종을 채집하여 실험에 사용하였다.

광귤나무(*Citrus aurantium* L.)와 귤나무(*Citrus unshiu* S. Marcov.)는 경기도 포천시 소흘읍에서 채집하였으며, 유자나무(*Citrus junos* Tanaka), 당귤(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), 금감(*Fortunella japonica* Swingle var. *margarita* (Swingle) Makino)는 제주도 애월읍 봉성리에서 채집하였으며, 레몬(*Citrus limonia* Osbeck)과 탱자나무(*Poncirus trifoliat* (L.) Rafinesque)은 경상남도 진주시 이반성면 대천리에서 채집하였다(Table 1).

### genomic DNA 추출

각 식물체로부터 DNA를 추출하기 위하여 Plant DNA Zol Reagent (Life Technologies Inc., Grand Island, New York, USA)를 사용하였다. 추출방법은 0.3 g의 신선한 잎을 액체질소로 마쇄한 다음 사용자의 지침서에 의거하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 에탄올 등 여액의 제거를 위해 진공 흡입기로 5분간 건조시킨 후 TE 100  $\mu$ l에 용해하여 3일간 냉장 보관하였다. 용해된 시료는 DyNA 200 fluorometer (Amersham Pharmacia Biotech, USA)를 이용하여 DNA 정량을 체크하였고 TE로 DNA 농도가 균질하게 조정하여 본 분석을 위해 사용하거나 -20°C 냉동고에 보관하였다.

### 분석

엽록체의 *trnL* intron과 *trnL-trnF* spacer 부위는 Taberlet *et al* [19]이 고안한 시발체(primer)로 PCR (polymerase chain reaction)을 이용하여 증폭시켰다(Table 2).

PCR 반응을 위하여 추출한 각 분류군의 게놈 DNA 50 ng, 각 dNTP 100  $\mu$ M, 시발체 각 0.2  $\mu$ M, 1x enzyme buffer, Taq polymerase 2 unit를 넣고 증류수로 전체 50  $\mu$ l volume이 되도록 추가하였다. 증폭반응은 초기 94°C에서 90 sec간 변성한 후, 28 사이클로 94°C에서 30 sec, 42°C에서 60 sec, 72°C에서 60 sec간 실시하였고, 추가로 72°C에서 5분간 연장하였다.

PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 분리하였는데 이때 절편들의 상대적 크기를 비교하기 위해 100 bp ladder DNA marker를 같이 loading시켰다. 전기영동 후 젤은 ethidium bromide로 염색하여 밴드를 현상하였다. 현상된 젤은 Alpha Image TM (Alpha Innotech Co, San Leandro, CA, USA)을

Table 1. Accessions used in the molecular study of the genus *Citrus* including population locations

| Code | Korean name   | Scientific name   | Geographic origin   |
|------|---------------|---|---|
| 1    | Gwanggyulnamu | <i>Citrus aurantium</i> L.  | Soheul-eup, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea                      |
| 2    | Yujanamu      | <i>Citrus junos</i> Tanaka  | Bongseong-ri, Aewol-eup, Jeju-si, Jeju-do, Korea                |
| 3    | Lemon         | <i>Citrus limonia</i> Osbeck  | Daecheon-ri, Ibanseong-myeon, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, Korea |
| 4    | Danggyulnamu  | <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck  | Bongseong-ri, Aewol-eup, Jeju-si, Jeju-do, Korea                |
| 5    | Dyulnamu      | <i>Citrus unshiu</i> S. Marcov.   | Soheul-eup, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea                      |
| 6    | Geumgam       | <i>Fortunella japonica</i> Swingle var. <i>margarita</i> (Swingle) Makino | Bongseong-ri, Aewol-eup, Jeju-si, Jeju-do, Korea                |
| 7    | Taengjanamu   | <i>Poncirus trifoliat</i> (L.) Rafinesque                                 | Daecheon-ri, Ibanseong-myeon, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, Korea |

사용하여 밴드 양상을 조사하였다. 이후 젤에서 DNA를 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)로 추출하였다. 증폭된 단편들은 bluescript (Pharmatech)로 클론하였고, ABI Prism 377 Sequencer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)로 서열화하였다. 각각의 종에서 최소 10개 클론들을 분석하였다.

통계 분석

분류군간 유전적 거리(*J*)와 유전적 동질성(*D*)은 분류군간 염기쌍의 비교로 산출하였다[12]. PAUP에서 분류군간 핵산 차이에 의한 유의성 검증, 염기 빈도, 서열쌍 거리, uncorrected "p"에 의한 측정된 거리 등을 산출하였다[18]. 염기자리 당 서열 간 염기 조성 차이, 불일치 계수를 검증하였다[8]

핵산치환 모델 분석은 최적 치환 패턴에 대한 최소 Bayesian Information Criterion (BIC)값을 고려하였다. 각 모델에 대해 Akaike Information Criterion, corrected (AICc)값, Maximum Likelihood value (*lnL*), 척도의 수는 Nei와 Kumar [13]의 식에 의거하였다. 염기 자리 간 진화율에 대한 비균등성은 진화적으로 비변이 부분(+*J*)을 가진 Gamma 분포(+*G*)로 나타낸 모델을 사용하였다. 염기치환의 전이/전형의 비율에 대한 평가(*R*) 역시 이 모델에 근거하여 산출하였다.

서열간 코돈의 중립성 검증은 깎과 결손 서열을 제외하고 500회 반복으로 MEGA5로 실시하였다[22]. 타지마의 여러 통계치( $M$ =number of sites,  $S$ =Number of segregating sites,  $ps=S/M$ , and  $\pi$ =nucleotide diversity.  $D$ =Tajima test statistic)를 산출하였다[20].

유연관계 분석

각 식물종 *trnL* intron과 *trnL-trnF* spacer 부위에서 얻은 크로마토그램(chromatogram)은 소프트웨어 Sequence Navigator 1.0.1 (Applied Biosystems Inc.)로 편집하였다. *trnL* intron과 *trnL-trnF* spacer 부위 서열에서 결손부위를 포함한 서열 배당은 MEGA5와 Clustal X program으로 분석하였다 [22]. 배당된 서열에서 gap의 부위는 missing data로 처리하였다. 그러나 계통학적으로 정보적인 인텔은 이진법 처리로 데이터에 삽입하였다.

최절약법에 의한 tree (maximum parsimonious tree, MP)는 heuristic search, branch-swapping options, tree bisection-reconnection에 따랐다[18]. 최우법(maximum likelihood tree, ML), N-J법(neighbor-joining tree, NJ)으로 tree 작성을 실시하여 비교하였다. 계통분석의 분지는 PHYLIP version 3.57의 NEIGHBOR, neighbor-joining (NJ) 방법에 의해 구성하였다[4,16,21]. 분류군의 가지에 대한 Bootstrap 분석은 500회 반복법으로 실시하였다.

결 과

굴나무속 7개 분류군에 대한 *trnL-trnF* 부위의 profiles는 100 bp ladder DNA marker로 크기를 비교한 결과 평균 651 nucleotides (bp)의 크기를 가지고 있었다(Table 3). 이들 밴드를 purification하여 DNA 염기서열을 분석한 결과 굴나무속 식물은 610-707 bp이었다. 최고와 최저의 차이는 삽입과 결실에 의한 것이다.

A+T 함량은 70.2-76.9%였으며, 분류군간 염기 차이는 4분

Table 2. Synthetic Primer (5'-3') used for Sequencing the *trnL-trnF* CP gene in genus *Citrus*

| Name    | Sequences of primers | Reference                   |
|---------|----------------------|-----------------------------|
| Forward | CGAAATCGGTAGACGCTACG | Taberlet <i>et al.</i> [19] |
| Reverse | ATTGAACTGGTGACACGAG  | Taberlet <i>et al.</i> [19] |

류군 염기 단지 *Citrus junos*의 C에서만 유의성을 나타내었다.

서열 쌍 거리 분석에서 광귤나무와 레몬, 광귤나무와 당귤, 레몬과 당귤이 유전적 거리가 0.007로 근연하였다(Table 4). 반면에 유자나무와 탕자나무는 유전적 거리가 0.719로 가장 먼 유연관계를 나타내었다. 유자나무는 나머지 분류군의 쌍에 비해 유전적 거리가 높았다.

모든 염기 자리마다 불일치 지수(disparity index) 또는 불균등 지수를 산출하였다(Table 5). 0 보다 클 경우 서열 간 진화 분화의 차이가 우연에 의한 예상 값보다 염기 조성 편향에서 큰 차이를 나타내게 된다. 많은 분류 쌍에서 0.05 보다 작을 경우 서열이 같은 패턴을 가지고 진화했다는 귀무가설을 수용할 수 없는 결과가 나타났다.

DNA 서열에서 염기 치환이 같은 패턴으로 진화해왔다는 가설을 몬테-카를로 테스트(500 반복)로 검증하였다(Table 6). C에서 T로 치환이 22.84로 가장 높았으며 G에서 A의도 15.23으로 높았다. 또한 치환에 대한 24 핵산 치환 모델을 적용하였다(Table 7). 베이시안 정보 기준은 Hasegawa-Kishino-Yano 척도 3846.4에서 가장 낮았다. 알카이케 정보 기준도 3751.3에서 3974.2로 유사하였다. 염기치환의 전이/전형의 비는 0.79에서 1.31로 모델 간 큰 차이가 나타났다.

타지마(Tajima)의 중립성 검증에서 자리 수는 7일 때 분리되는 자리 수는 2900이었으며 이들의 비는 0.482였고, 다양도는 0.197로 나타났다(Table 8). 중립설의 검증 결과는 음의 값을 나타내므로 유전적 변이를 증가시키는 힘이 도태에 의한

Table 3. Base frequencies of genus *Citrus*

| Taxa                | A     | C     | G      | T     | Sites |
|---------------------|-------|-------|--------|-------|-------|
| <i>C. aurantium</i> | 0.280 | 0.130 | 0.122  | 0.468 | 671   |
| <i>C. junos</i>     | 0.291 | 0.160 | 0.139  | 0.410 | 707   |
| <i>C. limonia</i>   | 0.280 | 0.130 | 0.1229 | 0.468 | 671   |
| <i>C. sinensis</i>  | 0.283 | 0.126 | 0.1249 | 0.467 | 668   |
| <i>C. unshiu</i>    | 0.290 | 0.127 | 0.126  | 0.457 | 613   |
| <i>C. margarita</i> | 0.302 | 0.128 | 0.136  | 0.433 | 616   |
| <i>C. trifoliat</i> | 0.280 | 0.111 | 0.120  | 0.489 | 610   |
| Mean                | 0.287 | 0.131 | 0.127  | 0.455 | 650.9 |

Table 4. The estimates of evolutionary divergence between sequences in a multiple alignment among species of genus *Citrus* using *trnL-trnF* analysis

| Taxa | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| 1    | -     |       |       |       |       |       |   |
| 2    | 0.694 | -     |       |       |       |       |   |
| 3    | 0.007 | 0.704 | -     |       |       |       |   |
| 4    | 0.007 | 0.708 | 0.007 | -     |       |       |   |
| 5    | 0.065 | 0.740 | 0.067 | 0.063 | -     |       |   |
| 6    | 0.086 | 0.729 | 0.088 | 0.090 | 0.059 | -     |   |
| 7    | 0.032 | 0.719 | 0.032 | 0.038 | 0.057 | 0.072 | - |

The taxon codes of first line are the same as those of first column are the same as Table 1.

Table 5. The disparity index (below diagonal) per site and index test (upper diagonal) for all sequence pairs in genus *Citrus* using *trnL-trnF* analysis

| Taxa | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1    | -     | 1.519 | 0.000 | 0.000 | 0.343 | 0.990 | 0.013 |
| 2    | 0.012 | -     | 1.742 | 1.589 | 0.499 | 0.231 | 1.855 |
| 3    | 1.007 | 0.000 | -     | 0.000 | 0.418 | 1.108 | 0.000 |
| 4    | 1.000 | 0.000 | 1.000 | -     | 0.334 | 0.962 | 0.000 |
| 5    | 0.000 | 0.104 | 0.000 | 0.002 | -     | 0.115 | 0.369 |
| 6    | 0.000 | 0.206 | 0.000 | 0.000 | 0.026 | -     | 1.008 |
| 7    | 0.240 | 0.008 | 1.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | -     |

The taxon codes of first line are the same as those of first column are the same as Table 1.

Table 6. Maximum likelihood estimate of the pattern of nucleotide sequences

| Base | A           | T            | C           | G           |
|------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| A    | -           | <i>11.26</i> | <i>3.15</i> | 6.69        |
| T    | <i>6.96</i> | -            | 6.38        | <i>3.06</i> |
| C    | <i>6.96</i> | 22.84        | -           | <i>3.06</i> |
| G    | 15.23       | <i>11.26</i> | <i>3.15</i> | -           |

Each entry shows the probability of substitution ( $r$ ) from one base (row) to another base (column). Substitution pattern and rates were estimated under the Tamura-Nei model. Rates of different transitional substitutions are shown in bold and those of transversional substitutions are shown in italics.

중립가설보다는 삽입과 결실에 의한 결실돌연변이설로 설명된다( $D=-1.080$ ).

꿀나무속 7분류군에 대한 *trnL-trnF* 서열을 이용한 계통관계 분석에서 4개의 분지도 모두 탱자나무가 다른 분류군과 가장 먼 유연관계를 나타내었는데(Figs. 1-4). MP tree에서는 유자나무와 금감속이 속이 다름에도 불구하고 같은 분지군을 형성하였으며 이는 꿀나무가 금감과 같은 분지군을 형성한 ML tree, ME tree, NJ tree와 가장 큰 차이이다. 4개의 trees 모두 레몬과 당귤이 가장 근연하였고 이들은 광꿀나무와 sister관계를 나타내었으며 높은 지지도를 나타낸 반면 다른 외부마디는 지지도가 높지 않았다.

고 찰

꿀나무속과 근연한 것을 금감속(genus *Fortunella*), 탱자나

Table 7. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

| Model    | Param | BIC    | AICc   | lnL     | Invariant | Gamma | R      |
|----------|-------|--------|--------|---------|-----------|-------|--------|
| HKY      | 15    | 3846.4 | 3751.3 | -1860.6 | n/a       | n/a   | 0.7922 |
| HKY+G    | 16    | 3848.6 | 3747.2 | -1857.5 | n/a       | 3.018 | 0.824  |
| HKY+I    | 16    | 3850.6 | 3749.2 | -1858.5 | 0.173     | n/a   | 0.826  |
| HKY+G+I  | 17    | 3854.5 | 3746.7 | -1856.3 | 0         | 1.071 | 0.859  |
| TN93     | 16    | 3854.7 | 3753.3 | -1860.6 | n/a       | n/a   | 0.792  |
| T92      | 13    | 3854.8 | 3772.4 | -1873.1 | n/a       | n/a   | 0.807  |
| TN93+G   | 17    | 3856.9 | 3749.2 | -1857.5 | n/a       | 3.029 | 0.823  |
| T92+G    | 14    | 3858.2 | 3769.5 | -1870.7 | n/a       | 3.320 | 0.839  |
| TN93+I   | 17    | 3858.9 | 3751.1 | -1858.5 | 0.173     | n/a   | 0.825  |
| T92+I    | 14    | 3860   | 3771.3 | -1871.6 | 0.156     | n/a   | 0.844  |
| TN93+G+I | 18    | 3862.8 | 3748.7 | -1856.3 | 0         | 1.072 | 0.858  |
| T92+G+I  | 15    | 3865.1 | 3770   | -1870   | 0         | 1.498 | 0.870  |
| GTR      | 19    | 3877.9 | 3757.5 | -1859.7 | n/a       | n/a   | 0.807  |
| GTR+G    | 20    | 3879   | 3752.3 | -1856   | n/a       | 2.457 | 0.855  |
| GTR+I    | 20    | 3880.5 | 3753.7 | -1856.8 | 0.208     | n/a   | 0.881  |
| GTR+G+I  | 21    | 3884.8 | 3751.8 | -1854.8 | 0         | 0.958 | 0.907  |
| JC+I     | 12    | 4043.1 | 3967   | -1971.5 | 0.291     | n/a   | 0.500  |
| JC       | 11    | 4044.1 | 3974.3 | -1976.1 | n/a       | n/a   | 0.500  |
| JC+G     | 12    | 4045.1 | 3969   | -1972.5 | n/a       | 2.736 | 0.500  |
| K2+I     | 13    | 4047.5 | 3965.1 | -1969.5 | 0.252     | n/a   | 0.743  |
| JC+G+I   | 13    | 4049.4 | 3966.9 | -1970.4 | 0         | 0.780 | 0.500  |
| K2       | 12    | 4055.5 | 3979.4 | -1977.7 | n/a       | n/a   | 1.147  |
| K2+G     | 13    | 4057.3 | 3974.9 | -1974.4 | n/a       | 1.675 | 1.296  |
| K2+G+I   | 14    | 4062.9 | 3974.2 | -1973   | 0         | 0.731 | 1.309  |

For each model, AICc value (Akaike Information Criterion, corrected), Maximum Likelihood value ( $lnL$ ), and the number of parameters are also presented. Non-uniformity of evolutionary rates among sites may be modeled by using a discrete Gamma distribution (+G) with 5 rate categories and by assuming that a certain fraction of sites are evolutionarily invariable (+I). Assumed or estimated values of transition/transversion bias ( $R$ ) are shown for each model, as well. GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

Table 8. Results from Tajima's neutrality test for trnL - trnF sequences of *Citrus* using trnL-trnF analysis

| M | S    | ps    | $\theta$ | $\Pi$ | D      |
|---|------|-------|----------|-------|--------|
| 7 | 2900 | 0.482 | 0.197    | 0.160 | -1.080 |

M=number of sites, S=Number of segregating sites, ps=S/M,  $\theta=ps/a1$ , and  $\pi$ =nucleotide diversity. D is the Tajima test statistic.

무속(genus *Poncirus*), 그리고 호주의 *Microcitrus*속과 *Eremocitrus*속을 들고 있으며, 현재 대부분 식물분류학자들은 *Microcitrus*속과 *Eremocitrus*속을 *Citrus*속에 포함하고 있다 [14]. 그 외 두 추가적인 속으로 *Triphasia*속과 *Clymenia*속이 있지만 이들은 *Citrus*속의 일부로는 간주하지 않는다.

감귤류는 다배성으로 종속간 교잡이 가능[7]하여 형태만으로는 분류형질을 설정하기 힘들다. Swingle의 감귤속 분류 체계에 따르면 파페디아속(subgenus *Papeda*)은 야생종 16종을 설정하였고, 감귤아속(subgenus *Citrus*)에는 재배종은 설정하였다. 반면에 Tanaka는 화서의 유무에 따라 초생감귤아속(subgenus *Archicitrus*)과 후생감귤아속(subgenus *Metacitrus*)으로 157종을 기록하여 분류학자들에 따라 큰 차이를 나타낸다[15].

한국 내 분포하는 귤나무속 식물은 광귤나무, 유자나무, 당

귤나무, 귤나무, 레몬이다. 레몬은 도감에 따라 제외하기도 한다. 이 다섯 종 중에서 광귤나무, 당귤나무, 레몬은 같은 분지군 내에 있다(Figs. 1-4). 반면에 유자나무는 귤나무는 다른 분지군에 있으면서 금감과 분지군을 형성한다. 탕자나무는 가장 분화된 것으로 구분된다. 이는 형태적 분류와 일치하지 않는다. 이런 차이는 종 분류에 사용된 trnL-trnF 서열이 약 650 bp로 정보가 적은 탓에 기인한다. 보다 정확한 분자계통분류를 위해서는 보다 많은 서열과 염록체 외에 핵 부위의 서열을 추가하는 것이 더 분해능을 높일 수 있을 것이다.

한편 앞서 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 마커에 의한 연구[15]는 탕자나무와 금감, 유자나무를 다른 분지군으로 분리하여 유자나무를 제외하고는 본 결과와 유사한 양상을 나타내었다. 특히 우[23]에 의한 감귤류(*Citrus*)와 탕자나무(*Poncirus*)의 종속간 분석에서 탕자나무와 탕자나무와 교

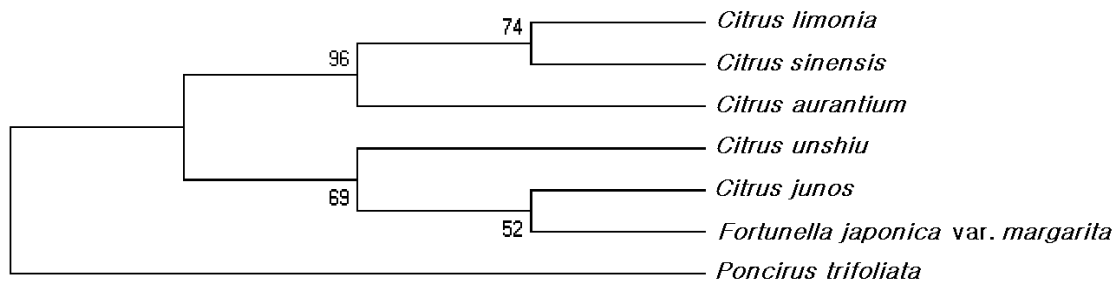


Fig. 1. The maximum parsimonious tree for *Citrus* based on trnL-trnF analysis using PAUP 4b10, exhaustive search, unweighted parsimony analysis, gaps = fifth state) from the 751 aligned positions of the initial matrix. The values of bootstrap were shown in side of vertical line.

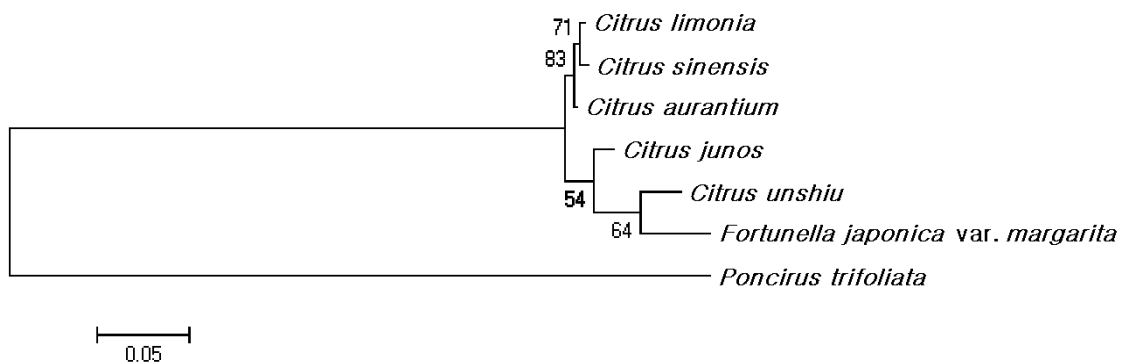


Fig. 2. The maximum likelihood tree for genus *Citrus* based on trnL-trnF analysis using MEGA5. The values of bootstrap were shown in side of vertical lines of branch were shown in below of horizontal line.

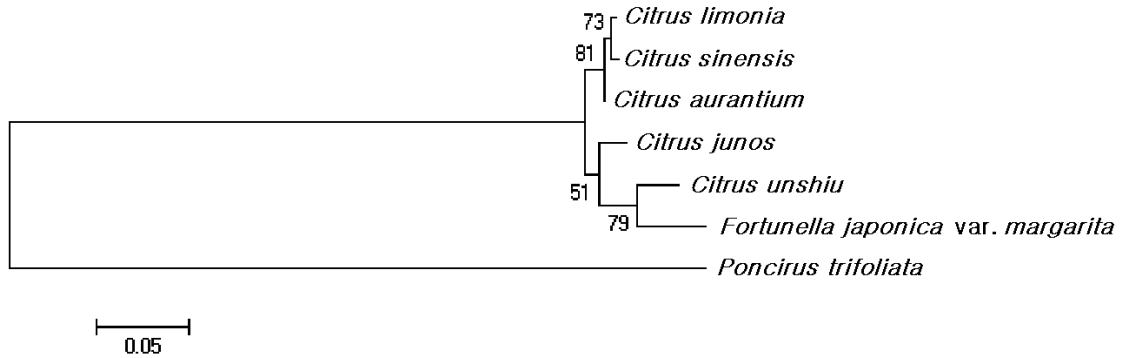


Fig. 3. The minimum evolution tree for genus *Citrus* based on *trnL-trnF* analysis using MEGA5. The values of bootstrap were shown in side of vertical lines were shown in below of horizontal line.

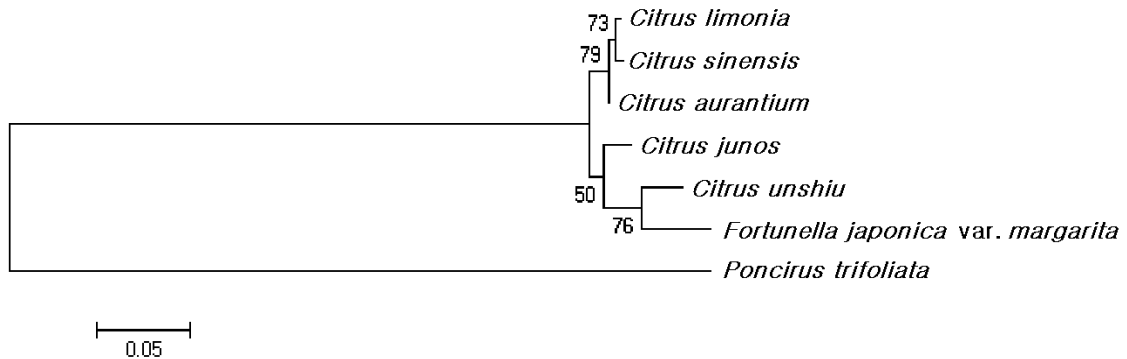


Fig. 4. The neighbor-joining tree for genus *Citrus* based on *trnL-trnF* analysis using MEGA5. The values of bootstrap were shown in side of vertical lines of branch were shown in below of horizontal line.

잡한 황금귤은 감귤류와 분리된다. 그리고 유자나무와 재래유자나무 등은 계통도에서 다른 분지군과 합류됨으로 유자나무는 종내 변이가 크거나 채집 지역 간 변이가 크다는 것을 시사한다. 이는 본 연구에서도 유자나무의 서열이 다른 감귤속 식물에 비해 서열이 크게 다른 것과 일치한다. 한편 우[23]에 의한 탱자나무와 유자나무를 교잡했을 때 그 자손은 삼출엽(ternate or trifoliate)인 탱자나무와 단신복엽(simple compound leaf)인 유자나무의 잎 형태를 가지고 있다. 부계를 어떤 종으로 교잡해도 단신복엽의 비율이 매우 높고 탱자나무속을 제외하고는 귤나무속 식물은 거의 단신복엽이다. 따라서 귤나무속이 탱자나무속보다 감귤속에 더 유연관계가 있다고 볼 수 있다.

귤나무는 우리나라가 점차 아열대 기후로 접어들면 제주도에서 남해안 지역으로 확대될 수 있을 것이다. 본 연구 결과 유전적으로 유사한 근연관계에 있는 분류군은 비록 형태적으로 달라도 유전적으로 크게 다르지는 않는 것으로 볼 수 있다. 따라서 육종 측면에서 교잡이나 다양도를 높이는 방안으로 본 연구 결과가 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Andrews, A. C. 1961. Acclimatization of citrus fruits in the Mediterranean region. *Agricultural History* **35**, 35-46.
2. Bonnard, G., F. Michel, J. H. Well, and A. Steinmetz. 1984. Nucleotide sequence of the tRNA<sup>Leu</sup> gene from *Vicia faba* chloroplasts: evidence for structural homologies of the tRNA<sup>Leu</sup> intron with intron from the autosplicable *Tetrahymena* ribosomal RNA precursor. *Mol. Gen. Genet.* **194**, 330-336.
3. Cech, T. R. 1988. Conserved sequences and structures of group I introns: building an active site for RNA catalysis - a review. *Gene* **73**, 259-271.
4. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5s, Distributed by the author. Department of Genetics, Univ. Washington, seattle.
5. Freitas, de A. E., de Q. L. Paganucci, and M. A. Machado. 2003. What is Citrus? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe *Citreae* (Rutaceae subfamily Aurantioideae). *Organisms Diversity & Evolution* **3**, 55-62.

6. Gmitter, F. and X. Hu. 1990. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutaceae). *Economic Botany* **44**, 267-277.
7. Hirai, M. and I. Kajiura. 1987. Genetic analysis of leaf isozyme in *Citrus*. *Japan J. Breed.* **37**, 377-388.
8. Kumar, S. and S. R. Gadagkar. 2001. Disparity Index: A simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences. *Genetics* **158**, 1321-1327.
9. Lee, T. B. 2003. Coloured Flora of Korea. Hyangmoon-sa, Seoul. Korea.
10. Lee, Y. N. 2007. New Flora of Korea. Kyo-Hak Publishing Co., Seoul. Korea.
11. Michel, F. and B. Dujon. 1983. Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial-, chloroplast- and nuclear-encoded members. *EMBO J.* **2**, 33-38.
12. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3321-3323.
13. Nei, M. and S. Kumar. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
14. Nicolosi, E., Z. N. Deng, A. Gentile, S. La Malfa, G. Continella, and E. Tribulato. 2000. *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* **100**, 1155-1166.
15. Oh, J. B. and D. K. Moon. 2002. RAPD and phylogenetic relationship of *Citrus* growing in Jeju Island. *J. Subtropical Agri. Biotech.* **18**, 1-10.
16. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
17. Scora, R. W. 1975. On the history and origin of citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **102**, 369-375.
18. Swofford, D. L. 2003. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4. Sunderland, Sinauer Associates, Inc. MA.
19. Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1105-1109.
20. Tajima, F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.
21. Tamura, K., M. Nei, and S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **101**, 11030-11035.
22. Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* (In Press).
23. Woo, H. S. 1997. Studies on RAPD analysis hybrid plants of interspecific and intergeneric among *Citrus* and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. MS. Thesis, Chonnam National University, Gwangju, Korea.
24. Yun, S. H. 2001. Classification of genus *Citrus* and its related genera using RAPD. MS. Thesis, Jeju Natl. Univ., Jeju, Korea.

#### 초록 : *trnL-trnF* 서열에 의한 한국 귤나무속과 두 근연 식물종의 계통분류학적 연구

허만규<sup>2\*</sup> · 윤혜정<sup>1</sup> · 최주수<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>부산대학교 생물교육과, <sup>2</sup>동의대학교 분자생물학과)

귤나무속은 운향과(Rutaceae)에 속한다. 동남아시아, 미얀마, 중국 운남에서 기원된 것으로 알려져 있다. 이 속의 분류관계는 복잡한데 클론번식과 야생식물과 교잡이 빈번하다. 식물에서 속간 속내 계통관계 추론을 위해 널리 이용되고 있는 엽록체 *trnL-trnF* 부위가 있다. 이 귤나무속과 두 근연한 탱자나무속과 금감속에 속하는 7종간 계통 관계를 평가하였다. 많은 삽입이 발견되었고 속내 중간 변이는 결실/삽입에 의한 것으로 밝혀졌다. 이 속의 레몬과 당귤나무은 네 계통도(MP, ML, ME, and NJ)에서 모두 같은 분지군을 형성하여 가장 근연관계에 있었고 광귤나무(향귤나무)과 자매군을 형성하였다. 유자나무는 이들과 많은 서열 차이를 나타내었다. 외부 분지군은 낮은 지지도를 나타내었다.