

ITS 염기서열을 이용한 한국산 참취속 식물의 유연관계분석

홍수영¹ · 조광수^{1*} · 유기억²

¹농촌진흥청 국립식량과학원 고령지농업연구센터, ²강원대학교 생명과학과

Phylogenetic Analysis of Korean Native *Aster* Plants Based on Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences

Su-Young Hong¹, Kwang-Soo Cho^{1*}, and Ki-Oug Yoo²

¹Highland Agriculture Research Center, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Pyeongchang 232-955, Korea

²Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract. This study was carried out to decide ITS (internal transcribed spacer) sequence of some Korean native *Aster* species and to resolve their relationship among Korean native *Aster*, including *Kalimeris*, *Gymnaster*, *Heteropappus* genus separated from *Aster* in a previously study based on the pappus length. We registered 11 ITS sequences of *Aster* species including *A. glehni* to GenBank and those sequences were used for the cluster analysis with *Kalimeris* species. The size of ITS1 was varied from 248 to 256 bp, while ITS2 was varied from 220 to 222 bp. The G + C content of the ITS region ranged from 49.4 to 53.5%. Pairwise comparison results showed that the substitution rate of ITS1 and ITS2 region was 9% and 10%, respectively. *Kalimeris* sensu strict substitution rate was lower than that of *Aster* sensu strict species. The strict consensus parsimonious cluster analysis showed *A. tripolium* is the first branching from the clade and the next is *A. scaber*. The *Kalimeris* species except for the *A. hispidus* were grouped into the same clade with high bootstrap value (91%) within *Aster*. *Gymnaster* and *Heteropappus* that has been classified by morphological characters were also grouped into broad sense *Aster* clade. These results implied these three genera could be merged together into *Aster* based on the ITS sequences.

Additional key words: cluster analysis, *Gymnaster*, *Heteropappus*, *Kalimeris*, taxonomy

서 언

참취속(Astereae)은 국화과(Compositae)에 속하는 식물로 전세계적으로 170여 개의 속과 3000여종이 보고되어 있다(Bayer et al., 1994). 참취속에 속하는 참취속(*Aster*)에는 약 400여종이 주로 북반구에 분포하고 있으며 지리적 분포에 따라 형태적 변이가 매우 다양한 것으로 알려져 있다(Richard and Rieseberg, 1999). Kitamura(1937)는 한국, 중국 및 일본 등 동아시아지역의 광의의 참취속 식물에 대한 연구를 통해, 관모(pappus)의 길이에 근거하여 *Kalimeris* Cass., *Heteropappus* Less., *Gymnaster* Kitamura(syn. *Miyamayomena* Kitamura) 등 3개의 속으로 세분하였다. 즉, 참취속 식물의 관모는 2mm이상인 반면 *Kalimeris*속은 2mm보다 짧고,

*Gymnaster*는 관모가 없으며, *Heteropappus*는 이형성(dimorphic)으로 혀꽃(설상화, ray floret)은 *Kalimeris*처럼 관모가 짧으나 통꽃(통상화, disc floret)은 참취속처럼 긴 관모를 가지고 있는 것으로 분류하였다. 그러나 관모의 길이는 진화과정에서 많은 변이가 발생하고 있어 외부형태적 특징만으로는 참취속을 세분하기가 어렵다는 보고도 있다(Ito et al., 1998). 특히 *A. proceros*와 *A. smithianus*는 짧은 관모를 가지고 있지만 *Kalimeris*와는 형태적으로 많은 차이를 보이고 있어 관모만으로는 광의의 참취속 내 이들의 분류학적 위치를 결정하기가 어렵다고 보고하였다(Hu, 1967). 한편 Ito et al.(1995)은 관모의 길이는 환경에 따라 변화되어 적용될 수 있어 참취속 식물을 세분하는 형질로 이용하기 어렵다고 보고하였으며 속간의 관계를 보다 명확하게 분류할 수 있는 유전자수

*Corresponding author: kscholove@korea.kr

※ Received 4 December 2011; Revised 16 January 2012; Accepted 25 January 2012.

준 혹은 다른 형질이 필요하다고 하였다.

한국산 참취속 식물은 특산식물인 단양쑥부쟁이(*A. altaicus*), 눈개쑥부쟁이(*A. hayatae*) 등이 포함된 약 26여종이 보고되었으며 특히 별개미취(*A. koraiensis*), 참취(*A. scaber*), 쑥부쟁이(*A. yomena*) 등은 나물 혹은 화단용 화훼로 이용되고 있어 그 효용성이 더욱 증가일로에 있다(Chung and Jeong, 2000). 한국산 참취속에 대한 분류학적 연구는 잎의 형태 및 수과의 구조(Chung and Jeong, 1999, 2000), 화탁, 관모 및 두상화의 구조(Chung and Kim, 1991a, 1991b, 1993)와 체세포 염색체수(Chung and Kim, 1997) 그리고 핵형분석(Huziwaru, 1958)에 대한 연구 등 주로 외부형태에 대한 연구가 이루어졌다. 특히 Chung and Jeong(2000)은 수과의 형태와 이에 존재하는 모용의 특징이 개체간의 차이가 없을 뿐만 아니라 참취속 식물을 *Kalimeris*, *Gymnaster* 및 *Aster* 속의 *Pseudo-calimeris*절과 분류군 간의 차이를 뚜렷이 구분할 수 있어 광의의 참취속을 보다 세분할 수 있는 형질로 이용이 가능하다고 보고하였다.

그러나 이러한 형태적 특성은 외부 환경 및 재배 방식 등에 의해 변화 될 수 있는 양적 형질로서 최근에는 분자생물학적 기술을 활용하여 형태적 특성과 함께 DNA 수준에서의 분류학적 위치를 보다 명확하게 구분하는 연구가 이루어지고 있다. 분자생물학적 연구에서는 엽록체 유전자의 염기서열변이(Ito et al., 1995, 1998) 및 핵 DNA의 internal transcribed spacer(ITS), external transcribed spacer(ETS) 및 simple sequence repeat(SSR) 기술을 식물 분류에 활용하는 보고가 증가하고 있다(Ahn et al., 2010; Field et al., 2006; Masuda et al., 2009; Yang et al., 2006). 그 중 ITS는 18S와 26S ribosomal DNA 사이에 존재하는 염기서열로 특히 같은 속 내의 종을 분류 하는데 많이 이용되고 있는데 이는 ITS 부위가 종 혹은 속 단위의 수준에서 진화속도 연구에 적합할 뿐만 아니라(Andreasen and Baldwin, 2003) 현화식물 내에서 ITS의 길이(length) 변화가 적어 분류 해석에 용이하게 사용될 수 있기 때문이다(Martins et al., 2003). 또한 같은 속내에서 보존된 염기서열이 많아 polymerase chain reaction(PCR) 반응을 통해 쉽게 분리해 낼 수 있고 염기서열 분석도 유리한 것으로 알려져 있다(Ahn et al., 2010).

참취속 식물에 대한 ITS 분석은 주로 북미지역의 식물에 대하여 진화 및 분류에 관하여 이루어져 왔다(Cerbah et al., 1998; Kornkven et al., 1998). Noyes and Rieseberg(1999)는 북미지역, 남반구 및 유라시아 지역의 참취속 식물에 대한 ITS 분석결과 북미지역의 참취속 식물은 유라시아 및 남반구 분류군과 뚜렷하게 분리되며 독립적으로 진화된 것으로 보고하였으며, ITS와 외부형태적으로 *Crinitaria* 및

Boltonia 속과 가장 유사하다고 하였다.

그러나 국내 참취속 식물에 대한 분자계통학적 연구와 *Kalimeris* 속과의 유연관계 분석에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 국내 참취속 식물 중 Kitamura(1937)에 의해 *Kalimeris*, *Gymnaster* 및 *Heterpappus* 속으로 분류된 참취속 식물을 포함한 몇 가지 한국산 참취속 식물에 대해 ITS 염기서열을 결정하고 유전자은행(GenBank)에 보고된 참취속 및 *Kalimeris* 속 식물의 ITS 염기서열들을 근거로 이들에 대한 분류학적 유연관계에 대하여 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 ITS 염기서열

본 실험에 사용된 재료는 참취속에 속하는 식물 16분류군의 18개체를 대상으로 하였다. 이 중 섬쑥부쟁이(*A. glehnii*)는 농촌진흥청 고령지농업연구센터에서 수집, 보관중인 개체를 이용하였으며, 쑥개미취(*A. maackii*), 까실쑥부쟁이(*A. ageratoides*), 참취(*A. scaber*), 쑥부쟁이(*A. yomena*), 해국(*A. spathulifolius*), 갯개미취(*A. triplolium*), 눈개쑥부쟁이(*A. hayatae*), 개미취(*A. tataricus*), 갯쑥부쟁이(*A. hispidus*), 별개미취(*A. koraiensis*) 등 10종류는 강원대학교 식물표본실(KWNU)에 소장되어 있는 표본으로부터 잎을 분양 받아 사용하였다(Table 1). 이탈리아 아스터(*A. amellus*), 버드쟁이나물(*A. indicus*), 일본산 *A. bellidiastrum*과 두 종류의 *Kalimeris*속 식물은 유전자은행(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록된 ITS 염기서열을 이용하였다(Table 1). 또한 유전자은행에 등록된 일본산 쑥부쟁이의 변종(*A. yomena* var. *dentatus*)와 개미취(*A. tataricus*)의 ITS 역시 추가하여 국내산 식물과 상동성을 분석하였다. 군외군(outgroup)은 참취속과 가장 근연으로 알려진(Noyes and Reiesberg, 1999), *Boltonia asteroids*와 *Crinitaria linosyris*를 사용하였다.

DNA 추출 및 ITS 염기서열 결정

DNA 추출은 Quiagen 회사의 DNeasy miniprep kit(Quiagen, USA)을 이용하여 추출하였으며, DNA는 ND-1000UV/VIS spectrophotometer(NanoDrop Technologies, USA)로 정량한 후 $10\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 로 희석하여 PCR을 위한 DNA로 사용하였다. PCR은 Ahn et al.(2010)의 방법을 따랐으며 DNA 증폭은 VertiTM 96-well DNA Thermal Cycler(Applied Biosystems, USA)로 수행하였다. ITS 증폭을 위한 primer는 Ahn et al.(2010)이 보고한 ITS-reverse primer(TCCTCCGCTTATTG ATATGC)와 ITS-forward primer(TCCGTAGGTGAACCT GCGG)를 사용하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 전처리

Table 1. List of taxon used for the ITS analysis with voucher and GenBank accession numbers.

Taxa (abbreviation)	Voucher	GenBank Accession	Synonyms & Remarks
<i>Aster glehnii</i> F. Schmidt (gle)	GenBank	AY722010 ^Z	
<i>A. maackii</i> Regel (maa)	KWNU20577	HQ154042 ^Z	
<i>A. ageratoides</i> Turcz. (age)	KWNU73563	HQ154047 ^Z	
<i>A. scaber</i> Thunb. (sca)	KWNU72009	HQ154049 ^Z	<i>Doellingeria scaber</i>
<i>A. yomena</i> (Kitam.) Honda (yom)	KWNU158	HQ154048 ^Y	<i>Kalimeris yomena</i>
<i>A. spathulifolius</i> Maxim. (spa)	KWNU2827	HQ154050 ^Z	
<i>A. tripolium</i> L. (tri)	KWNU20664	HQ154043 ^Z	
<i>A. hayatae</i> H. Lév. & Vaniot (hay)	KWNU20571	HQ154041 ^Z	
<i>A. tataricus</i> L. (tat)	KWNU74705	HQ154045 ^Z	
<i>A. hispidus</i> Thunb. (his)	KWNU75378	HQ154044	<i>Heteropappus hispidus</i> , <i>H. villosus</i> , <i>H. noneifolius</i>
<i>A. koraiensis</i> Nakai (kor)	KWNU65035	HQ154046	<i>Gymnaster koraiensis</i> <i>Miyamayomena koraiensis</i>
<i>A. amellus</i> L. (ame)	GenBank	AF046961 ^Z	
<i>A. indicus</i> L. (ind)	"	EF108396 ^Y	<i>Kalimeris indica</i> , <i>Boltonia indica</i>
<i>A. yomena</i> var. <i>dentatus</i> (yom-g)	"	AB095078 ^Y	<i>Kalimeris yomena</i> var. <i>dentatus</i>
<i>A. tataricus</i> L. (tat-g)	"	FJ539125 ^Z	
<i>A. bellidiastrum</i> (L.) Scop. (bel)	"	AF494011 ^Z	
<i>Kalimeris integrifolia</i> Turcz. ex DC. (int)	"	AF046960 ^Y	<i>Aster holophyllus</i>
<i>K. pinnatifida</i> (Maxim.) Kitam. (pin)	"	DQ478988 ^Y	
<i>Boltonia asteroides</i> (L.) L'Hér. (ast)	"	AF046975	Outgroup
<i>Crinitaria linosyris</i> (L.) Rchb. f. (lin)	"	AF046969	Outgroup

^{Z,Y}ITS sequences were used for pairwise comparison analysis as *Aster sensu strict* and *Kalimeris* species, respectively in Table 4.

한 후, 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 2분을 cycle로 하여 35회 반복한 후 72°C에서 10분간 더 유지시켰다. 증폭된 DNA의 정제는 Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega, USA)을 사용하였으며, 염기서열 분석은 마크로젠(주)의 염기서열 분석 서비스를 이용하였다. 분석된 염기서열은 Sequence Scanner(Ver. 1.0, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였으며, CLC Main Workbench(Ver. 4.0, CLC Bio, Denmark)의 alignment 기능으로 정렬 후 최종 세부정렬은 수작업을 통해 수행하였다.

ITS 염기서열 분석

ITS1과 ITS2 부위는 기존에 보고된 참취속 식물의 염기서열을 이용하여 5.8S 및 26S의 ribosomal subunit 부위를 결정한 후 ITS1과 ITS2 부위를 추출하여 정렬하였다. 정렬된 ITS 염기서열은 MEGA5(Tamura et al., 2011)을 이용하여 multiple sequence alignment 후 Kimura's two parameter (Kimura, 1980)를 사용하여 염기서열 분지성(sequence divergence)을 분석하였다.

Phylogenetic tree 분석

정렬된 염기서열은 PAUP*4.02b(Swofford, 1998)을 이용

하여 parsimony analysis를 수행하였으며, 분석방법은 heuristic search를 이용하였고, 그에 따른 option으로는 ACCTRAN, MULTIPARS 그리고 TBR을 이용하였다. 또한 각 분계도의 지지 정도를 알아보기 위하여 bootstrap(Felsenstein, 1985)으로 1000회를 반복하여 분석하였으며, 이를 통한 계통수를 찾아내었다.

결 과

염기서열 길이 분석

본 연구에서 사용한 섬쑥부쟁이 등 11개의 국내 참취속 식물의 ITS지역 염기서열은 PCR과 sequencing 결과를 통해 유전자 은행에 등록하였다(Table 1). ITS1 부위는 일본산 *A. yomena* var. *dentatus*가 249bp로 가장 짧은 반면 갯개미취는 253bp로 가장 길게 나타났으나 평균은 251bp로 큰 차이가 없었다(Table 2). ITS2 부위 역시 일본산 *A. yomena* var. *dentatus*가 181bp로 가장 짧게 나타난 반면 가는쑥부쟁이(*Kalimeris integrifolia*)는 217bp로 가장 길게 나타났다. 균외균으로 선정한 *B. asteroides*는 ITS1과 2가 각각 251bp 및 216bp로 조사되었으며, *C. linosyris*는 252 bp와 214bp로 나타났다(Table 2). Noyes and Riseberg(1999)는 북미지역

Table 2. Sequence characteristics of ITS 1 and ITS 2 regions in *Aster* and *Kalimeris* species.

Taxa	ITS 1		ITS 2	
	Length (bp)	G + C (%)	Length (bp)	G + C (%)
<i>Aster glehnii</i>	251	48.2	216	51.9
<i>A. maackii</i>	250	49.6	215	53.5
<i>A. ageratoides</i>	251	48.2	215	53.5
<i>A. scaber</i>	253	49.4	215	53.0
<i>A. yomena</i>	251	49.4	215	51.6
<i>A. spathulifolius</i>	250	50.4	215	51.6
<i>A. tripolium</i>	253	47.0	210	50.0
<i>A. hayatae</i>	251	49.0	215	52.1
<i>A. tataricus</i>	252	51.2	215	53.5
<i>A. hispidus</i>	251	49.4	215	51.6
<i>A. koraiensis</i>	251	48.2	215	52.6
<i>A. amellus</i>	250	49.2	215	53.5
<i>A. indicus</i>	251	49.0	215	53.5
<i>A. yomena</i> var. <i>dentatus</i> (GenBank)	249	49.0	181	50.8
<i>A. tataricus</i> (GenBank)	252	51.2	215	54.4
<i>A. bellidiastrum</i>	251	51.0	215	50.9
<i>Kalimeris integrifolia</i>	252	48.6	217	51.9
<i>K. pinnatifida</i>	251	48.2	215	52.1
<i>Boltonia asteroides</i>	251	50.6	216	48.8
<i>Crinitaria linosyris</i>	252	50.8	214	51.9

의 참취속 식물의 ITS 분석결과 ITS1은 251bp로 ITS2는 215bp로 보고하여 본 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 특히 일본산 *A. yomena* var. *dentatus*는 ITS1의 시작부분 2bp와 ITS2 부위의 마지막 30bp가 결실되어 있는 것으로 나타나 차이를 보였는데 이는 진화상의 변화라기 보다는 ITS 염기서열 결정 혹은 유전자은행 등록상의 에러로 판단된다. ITS의 5.8S지역은 모두 164bp로 일정하였으며 5.8S를 포함한 전체 ITS지역의 길이는 594bp에서 632bp로 나타났다. ITS 염기서열의 G + C 함량은 ITS1이 47-51%였고 ITS2가 48-54%로 ITS2 부위가 약간 높은 것으로 나타났으며(Table 2) 이러한 결과는 Ahn et al.(2010)이 보고한 국화과 식물인 곰취의 ITS 분석결과와 유사한 것이다. 한편 ITS의 in/del을 분석한 결과 ITS1 부위는 114bp 지역에서 1-2bp의 in/del이 발생하는 hot spot 지역이었으며, 좁개미취와 해국 및 이탈리아 아스터의 90bp 위치에 2bp의 in/del이 존재하는 것으로 나타났다. ITS2 부위는 *A. bellidiastrum*와 *C. linosyris*의 염기서열 28bp 위치에 1-2bp의 in/del이 관찰되었으나 ITS1 지역보다는 적게 발생함을 알 수 있었다(자료 미제시).

염기서열 분지성(Sequence Divergence) 분석

ITS 염기서열의 쌍별비교(pairwise comparison) 결과 별

개미취와 개미취 두 종간에는 ITS1 부위가 그리고 쑥부쟁이와 갯쑥부쟁이는 ITS1 및 ITS2 부위가 동일하게 나타나 0%의 치환율(substitution rate)을 보였다(Table 3). 또한 한국산 쑥부쟁이와 일본산 쑥부쟁이의 변종간 ITS 염기서열 분석 결과, ITS2 부위는 동일하였지만 ITS1 지역은 0.41%의 치환율이 나타났다. 개미취 역시 한국산과 유전자은행에 등록된 ITS1 부위는 두 식물간 100% 보존되어 있었으며 ITS2 부위는 1.13%의 치환율을 나타냈다(Table 3). 전체 분류군간 ITS1과 2의 치환율은 한 site당 9%와 10%로 나타나 ITS1과 2 부위간의 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 4). 이러한 결과는 Baldwin et al.(1995)이 ITS1과 ITS2 지역의 치환율이 비슷하여 두 지역의 종(혹은 속) 진화속도와 변이는 비슷할 것으로 예측한 결과와 일치하는 것이다.

국내 참취속 식물과 *Kalimeris* 속 간의 유연관계를 보다 명확하게 분석하기 위하여 혐의의 참취속 식물(*Aster sensu strict*)과 *Kalimeris* 속 식물만을 이용하여 ITS1과 2 부위의 분지성을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 혐의의 참취속 식물은 Kitamura(1937)가 제시한 *Kalimeris*, *Gmnaster*, *Heteropappus* 속을 제외한 섬쑥부쟁이 등 국내 8개의 종과 이탈리아 아스터 등 유전자 은행에 등록된 3개를 포함한 11개의 염기서열을 이용하였으며, *Kalimeris*의 경우는 쑥부쟁이 1종과 유전

Table 3. Values of pairwise sequence divergence between species in ITS2 (lower part) and ITS1 (upper part) calculated with Kimura two-parameter methods.

Species ^z	gle	hay	kor	age	his	yom	ind	tat	tat-g	maa	spa	int	pin	ame	yom-g	sca	tri	bel	lin	ast
gle	0.0	2.1	0.0	0.4	2.1	2.1	2.5	5.1	5.1	6.5	6.0	2.1	2.5	4.7	2.5	13.6	16.7	13.5	15.6	18.1
hay	2.3	0.0	2.1	2.5	2.5	2.5	2.9	5.1	5.1	6.9	6.5	2.5	2.9	5.1	2.9	13.6	18.8	13.0	16.2	19.2
kor	2.9	0.6	0.0	0.4	2.1	2.1	2.5	5.1	5.1	6.5	6.0	2.1	2.5	4.7	2.5	13.6	16.7	13.5	15.6	18.1
age	1.1	1.1	1.7	0.0	2.5	2.5	2.9	5.5	5.5	6.9	6.5	2.5	2.9	5.1	2.9	14.1	16.7	13.5	15.7	18.1
his	5.2	4.0	4.6	4.0	0.0	0.0	0.4	4.7	4.7	6.0	5.5	0.8	1.2	5.1	0.4	12.1	17.7	13.4	15.6	18.6
yom	4.6	3.5	4.0	3.5	0.6	0.0	0.4	4.7	4.7	6.0	5.5	0.8	1.2	5.1	0.4	12.1	17.7	13.4	15.6	18.6
ind	4.6	3.5	4.0	3.5	0.6	0.0	0.0	5.1	5.1	6.4	6.0	1.2	1.7	5.5	0.8	12.6	18.2	13.9	16.1	19.1
tat	6.5	6.5	5.8	6.5	7.1	6.4	6.4	0.0	0.0	2.9	1.7	4.7	5.1	2.9	5.1	11.6	18.9	11.5	14.1	20.8
tat-g	6.5	5.2	4.6	5.2	5.8	5.2	5.2	1.1	0.0	2.9	1.7	4.7	5.1	2.9	5.1	11.6	18.9	11.5	14.1	20.8
maa	5.8	4.6	4.0	4.6	5.2	4.6	4.6	2.9	1.7	0.0	2.9	6.0	6.5	4.3	6.4	12.6	17.2	12.0	12.6	20.8
spa	8.3	7.1	6.5	7.1	7.7	7.1	7.1	5.2	4.0	3.5	0.0	5.5	6.0	3.8	6.0	12.6	18.9	12.5	13.1	20.2
int	5.2	4.0	4.6	4.0	2.3	1.7	1.7	7.1	5.8	5.2	7.7	0.0	1.2	5.1	1.2	12.1	17.7	13.4	15.6	18.6
pin	4.6	3.5	4.0	3.5	2.9	2.3	2.3	6.4	5.2	4.6	7.1	2.9	0.0	5.6	1.7	12.6	18.3	14.0	16.2	19.2
ame	5.8	4.6	4.0	4.6	5.2	4.6	4.6	2.9	1.7	1.1	3.4	5.2	4.6	0.0	5.5	12.1	17.8	11.0	14.2	19.7
yom-g	4.6	3.5	4.0	3.5	0.6	0.0	0.0	6.4	5.2	4.6	7.1	1.7	2.3	4.6	0.0	12.6	17.7	13.9	16.1	18.6
sca	15.7	14.3	13.6	14.3	16.3	15.6	15.6	13.6	12.2	10.9	12.9	16.3	15.6	11.6	15.6	0.0	20.2	13.9	17.0	22.3
tri	20.8	22.4	21.6	20.8	24.1	23.3	23.3	23.2	21.7	20.1	22.4	24.2	24.8	19.4	23.3	18.5	0.0	18.1	14.6	21.9
bel	19.3	17.8	18.6	17.8	17.7	17.0	17.0	17.8	16.4	14.9	17.1	17.8	16.3	14.3	17.0	16.3	15.8	0.0	13.0	18.1
lin	17.0	17.1	17.8	15.6	17.7	17.0	17.0	17.2	15.8	14.3	17.8	17.8	16.3	13.7	17.0	16.3	20.7	18.5	0.0	15.1
ast	21.6	20.1	20.9	20.1	20.8	20.0	20.0	20.3	18.8	18.0	18.7	20.8	18.6	16.6	20.0	18.7	27.3	19.9	12.9	0.0

^zSpecies abbreviations were designated in Table 1.

Table 4. Estimation of average evolutionary divergence (%; 100x) overall sequence pairs and number of position.

Region	Taxa	Number of position analyzed on divergence (bp)	Mean Divergence ^z (SE) ^y
ITS1	Over all ^x	244	9.06(1.10)
	<i>Aster sensu strict</i> ^w	249	9.55(1.16)
	<i>Kalimeris</i> ^v	249	1.05(0.41)
ITS2	Over all	178	10.43(1.33)
	<i>Aster sensu strict</i>	211	9.48(1.28)
	<i>Kalimeris</i>	180	1.47(0.59)

^zThe number of base substitution per site from average over all sequence pairs are shown in mean divergence (100x, %). All positions containing gaps and missing data were eliminated and analyzed in MEGA5.

^yStandard error estimates were obtained by a bootstrap procedure, 1000 replicates (100x, %).

^{x,w,v}The analysis involved 20, 11, 5 nucleotides sequences, respectively and were shown in Table 1.

자 은행에 등록된 4개를 포함한 5개의 염기서열을 이용하였다. 분석결과 ITS1의 경우 참취속 및 *Kalimeris* 속 모두 249개의 유효한(informative) site가 이용되어 치환율은 참취속 9.6%, 그리고 *Kalimeris* 속은 1.1%로 나타났다(Table 4). ITS2의 경우 참취속은 211bp, *Kalimeris* 속은 180bp의 유효 site가 사용되어 치환율은 참취속은 9.5%, *Kalimeris* 속은 1.5%로 나타나 ITS1과 2 지역 모두 참취속 식물의 치환율이 높은 것으로 나타났다.

유연관계 분석

참취속 식물의 ITS parsimony analysis 결과, 총 474bp의 염기서열 중 276bp는 변화가 없었으며 104bp는 최대절약에서 계통학적으로 유효한 형질(parsimony informative)을, 94bp는 유효하지 않은 형질(uninformative)을 나타내었다. 이때 consistency index(CI)와 retention index(RI)는 각각 0.766과 0.730으로 나타났다. 계통수에서는 갯개미취가 균외균으로부터 가장 먼저 분계조를 형성하였으며 이후 일본산 *A. bellidiastrum*이 독립적으로 유집되었다. 개미취, 좀개미취, 해

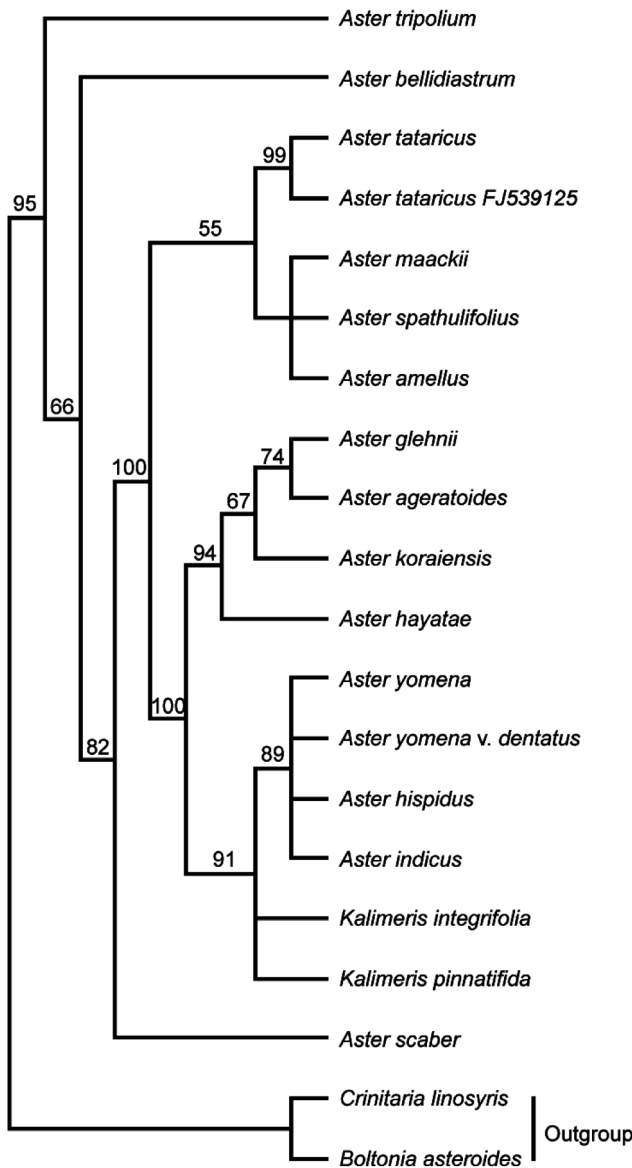


Fig. 1. Strict consensus tree of 6 equally parsimonious trees (321 steps, CI = 0.766, RI = 0.730, RC = 0.577) based on 104 phylogenetically informative changes in ITS sequences of the Korean *Aster*. The bootstrap values greater than 50% are above the clades.

국, 그리고 이탈리아 아스티도 하나의 분계조를 형성하였고 참취는 100%의 높은 지지도를 가지고 이 분계조를 위한 자매군으로 유집되었다. 또한 관모가 퇴화되어 Kitamura(1937)에 의해 *Gymnaster* 속으로 분류된 별개미취의 경우 섬쑥부쟁이, 까실쑥부쟁이 및 눈개쑥부쟁이와 함께 94%의 높은 bootstrap 지지도를 가지고 single clade으로 유집되어 기존의 분류체계와 상이한 결과를 나타내었다. 한편 쑥부쟁이, 일본산 *A. yomena* var. *dentatus*, 갯쑥부쟁이, 버드쟁이나물 등은 2종류의 *Kalimeris* 속 식물과 함께 91%의 높은 지지율로 유집되었다(Fig. 1).

Gu and Hoch(1997)는 *Kalimeris*속은 *K. incisa*, *K. indica* 등 8종으로 구성되어 있으며 주로 동북아시아 지역에 분포하고, *Heteropappus* 속은 12종이, 그리고 *Gymnaster*는 5종류가 있는 것으로 보고하였다. 그러나 Ito et al.(1998)은 일본산 참취속 식물의 엽록체 DNA다형성(RFLP)을 분석한 결과 *Kalimeris*, *Heteropappus* 및 *Gymnaster*등이 관모의 길이에 따라 구분되지 않고 참취속 내에 여러 분류군에 포함되어 이들 속간 구별 형질로 이용하지 못한다고 보고하였다. 본 연구의 ITS 분석결과 역시 *Gymnaster*속으로 분류된 별개미취가 광의의 참취속 식물인 섬쑥부쟁이, 까실쑥부쟁이 및 눈개쑥부쟁이와 같은 clade로 유집되어(Fig. 1) 관모의 길이에 따른 분류체계와 일치하지 않아 Ito et al.(1998)의 결과를 지지하는 것으로 나타났다. 그러나 갯쑥부쟁이를 제외한 *Kalimeris* 속 식물은 높은 지지도(91%)를 가지고 참취속내에 유집되어 이후 ITS 염기서열은 광의의 참취속을 구분 짓는데 유용한 것으로 생각되며 ITS 지역은 진화과정 동안 매우 빠르게 변화되어 종 혹은 속간의 유연관계 분석에 매우 유용하게 이용될 수 있다는 보고(Masuda et al., 2009)를 고려할 경우 *Kalimeris* 속 식물의 치환율이 참취속 식물보다 매우 낮은 것은 본 연구에서 이용된 *Kalimeris* 속 간의 식물간 매우 유사한 근연관계(Fig. 1)일 뿐 아니라 이후 *Kalimeris* 속을 분류하는 중요한 형질로 이용될 수 있을 것으로 판단된다. Ito et al.(1995)은 엽록체 유전자의 변이로 세가지 속의 구분이 어려워 광의의 참취속으로 통합시키기보다는 더욱 세분화될 5개의 속(*Aster*, *Asteromoea*, *Pseudo-calimeris*, *Teretiachaenium*, *Tripolium*)으로 세분화할 필요가 있다고 보고하여 본 연구에서 이용된 ITS의 결과와 상이한 결과를 제시하여 엽록체 유전자 염기서열 변이 및 ITS 염기서열 변이의 통합연구가 필요할 것으로 판단된다. 그러나 *Kalimeris* 및 *Heteropappus*속 식물에 대한 분류학적 위치를 보다 명확히 하기 위해서는 보다 많은 종과 다양한 지역 변이 및 개체 변이를 대상으로 한 광범위한 연구가 필요한 것으로 판단된다.

초록

본 연구는 국내산 참취속 식물의 ITS(internal transcribed spacer) 염기서열을 결정하고 이들을 이용하여 *Kalimeris*, *Gymnaster*, *Heteropappus* 속 식물들간의 유연관계를 분석하고자 수행되었다. 섬쑥부쟁이(*A. glehnii*) 등을 포함한 11종의 참취속 식물의 ITS 염기서열을 결정하였으며 유전자 은행에 등록된 *Kalimeris* 속 식물의 ITS 염기서열을 포함하

여 군집분석을 실시하였다. ITS1의 길이는 249-253bp로, ITS2의 길이는 181-217bp로 나타났으며 G + C 함량은 47-54%의 변이를 나타내었다. 본 연구에서 다른 16종의 18개체간 염기 치환율은 한 site당 ITS1의 경우는 9%, ITS2는 10%로 나타나 ITS1과 2 부위간의 차이가 거의 없는 것으로 나타났다. 또한 협의의 참취속(*Aster sensu strict*) 식물과 *Kalimeris* 속 식물의 치환율을 비교한 결과 ITS1과 ITS2 지역 모두 *Kalimeris* 속 식물이 낮게 나타났다. 계통분석결과, 갯개미취는 근외군으로부터 가장 먼저 분지하였으며, 일본산 *A. bellidiastrum* 이 나머지 분류군들을 위한 자매군으로 유집되었다. 참취는 다른 참취속 식물들과 분리되어 독립적인 분계조를 형성하였다. 갯쭉부쟁이(*A. hispidus*)를 제외한 *Kalimeris* 속 식물은 91%의 높은 지지율을 가지고 광의의 참취속내로 유집되었으며 *Gymnaster*와 *Heteropappus* 속 식물 역시 광의의 참취속으로 유집되었다. 이러한 연구결과는 *Kalimeris*, *Gymnaster* 및 *Heteropappus*로 세분되었던 참취속을 ITS 염기서열을 바탕으로 통합될 수 있을 것으로 판단된다.

추가 주요어 : 군집분석, *Gymnaster*, *Heteropappus*, *Kalimeris*, 식물분류

인용문헌

Ahn, S.Y., K.S. Cho, K.O. Yoo, and J.T. Suh. 2010. Phylogenetic relationship of *Ligularia* species based on RAPD and ITS sequence analysis. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:638-647.

Andreason, K. and B.G. Baldwin. 2003. Reexamination of relationships, habitat evolution, and phylogeography of checker mallows (Sidalcea; Malvaceae) based on molecular phylogenetic data. *Am. J. Bot.* 90:436-444.

Bayer, R.J., D.E. Soltis, and P.S. Soltis. 1996. Phylogenetic inferences in *Antennaria* (Asteracea: Gnaphalieae: Cassiniinae) based on sequences from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Am. J. Bot.* 83:516-527.

Chung, G.Y. and H.J. Jeong. 1999. Study on the leaf morphology of Korean *Aster* L. and its allied taxa. *Korean J. Plant. Res.* 12:50-61.

Chung, G.Y. and H.J. Jeong. 2000. Taxonomic study on the achene morphology of Korea *Aster* L. and its allied taxa. *Korean J. Plant. Res.* 13: 179-187.

Chung, G.Y. and Y.S. Kim. 1991a. A taxonomic study of the pappus morphology on the genus *Aster* L. and its allied groups in Korea. *Korean J. Pl. Taxon.* 21:197-209.

Chung, G.Y. and Y.S. Kim. 1991b. A taxonomic study of the receptacle morphology on the genus *Aster* L. and its allied groups in Korea. *Korean J. Pl. Taxon.* 21:229-238.

Chung, G.Y. and Y.S. Kim. 1993. A study on the capitulum morphology of the genus *Aster* L. and its allied taxa in Korea. *Korean J. Pl. Taxon.* 23:105-118.

Chung, G.Y. and Y.S. Kim. 1997. Study on the somatic chromosome numbers of Korean *Aster* L. and its allied taxa. *Korean J. Plant Res.* 10:292-299.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:789-791.

Field, B.L., A. Houben, J.N. Timmis, and C.R. Leach. 2006. Internal transcribed spacer sequences analyses indicate cytoevolutionary patterns within *Brachycome* Cass. (Asteraceae). *Plant Syst. Evol.* 259:39-51.

Gu, H. and P.C. Hoch. 1997. Systematics of *Kalimeris* (Asteraceae: Astereae). *Annal. Missouri Bot. Gard.* 84:762-814

Huziwaru, Y. 1958. Karyotype analysis in some genera of Compositae. IV. The karyotype within the genera *Gymnaster*, *Kalimeris*, and *Heteropappus*. *Cytologia* 23: 33-45.

Ito, M., A. Soejima, M. Hasebe, and K. Watanabe. 1995. A chloroplast-DNA phylogeny of *Kalimeris* and *Aster*, with reference to generic circumscription. *J. Plant Res.* 108:303-304.

Ito, M., A. Soejima, and K. Watanabe. 1998. Phylogenetic relationships of Japanese *Aster* (Asteraceae, Astereae) sensu lato based on chloroplast-DNA restriction mutations. *J. Plant Res.* 111:217-223.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate base substitution comparative studies nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.

Kitamura, S. 1937. Compositae Japonicae. *Mem. Coll. Sci. ser.* 8:299-377.

Martin, L., C. Oberprieler, and F.H. Hellwig. 2003. A phylogenetic analysis of Primulaceae s.l. based on internal transcribed spacer (ITS) DNA sequence data. *Plant Syst. Evol.* 237:75-85.

Masuda, Y., T. Yukawa, and K. Kando. 2009. Molecular phylogenetic analysis of members of *Chrysanthemum* and its related genera in the tribe Anthemideae, the Asteraceae in East Asia on the basis of the internal transcribed spacer (ITS) region and the external transcribed spacer (ETS) region of nrDNA. *Chromosome Botany* 4:25-36.

Matoba, H., A. Soejima, and Y. Hoshi. 2007. Identification of parental genomes and genomic organization in *Aster microcephalus* var. *ovatus*. *J. Plant Res.* 120:585-593.

Richard, D. and L.H. Rieseberg. 1999. ITS sequence data support a single origin for North American *Astereae* (Asteraceae) and reflect deep geographic division in *Aster*. *Am. J. Bot.* 83:398-412.

Shin, S.K., J.S. Yun, T. Yun, and W.K. Sim. 2003. Taxonomic relationship of Lotus (*Nelumbo nucifera*) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 44:451-457.

Swofford, D.L. 1998. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods. Version 4.02b Sinauer Asso. Inc., Massachusetts, USA.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731-2739.

Yang, W., B.J. Glover, G.Y. Gao, and J. Yang. 2006. Molecular evidence for multiple polyploidization and lineage recombination in the *Chrysanthemum indicum* polyploidy complex (Asteraceae). *New Phytologist* 171:875-886.