

범용성 DNA 바코드 분석 기반 한국산 천남성속(*Arisaema*) 식물의 분자계통학적 연구

노푸름¹, 한경숙¹, 김옥진¹, 양선규¹, 최고야¹, 고성철², 문병철^{1*}

¹한국한의학연구원 K-herb 연구단, ²한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템과학과

Study on Molecular Phylogenetics of Korean *Arisaema* Species Based on Universal DNA Barcodes

Pureum Noh¹, Kyeongsuk Han¹, Wook Jin Kim¹, Sungyu Yang¹, Goya Choi¹,
Sung Chul Ko² and Byeong Cheol Moon^{1*}

¹K-herb Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 34054, Korea

²Department of Biological Science and Biotechnology, Daejeon 34054, Korea

Abstract - Molecular phylogenetic analysis was conducted to evaluate the taxonomic relationships of genus *Arisaema* L. distributed in Korea and the molecular phylogenetic characteristics of three authentic *Arisaema* species for the herbal medicine *Arisaematis Rhizoma* (the rhizomes of *A. amurense*, *A. heterophyllum*, and *A. erubescens*). The sequences of three DNA barcodes (rDNA-ITS, *matK*, and *rbcL*) were analyzed using 50 samples of nine taxa consisted of eight Korean and one Chinese *Arisaema* with one outgroup (*Dracunculus vulgaris*). Both individual and combined phylogenetic analyses of three DNA barcode sequences revealed that the treated nine taxa are independently classified into six distinct clades (Clade I, *A. amurense* f. *amurense* and *A. amurense* f. *serratum*; Clade II, *A. serratum* and *A. takesimense*; Clade III, *A. ringens*; Clade IV, *A. erubescens*; Clade V, *A. heterophyllum*; Clade VI, *A. thunbergii* subsp. *thunbergii* and *A. thunbergii* subsp. *geomundoense*). These six clades were reasonably divided into three individual sections, *Pedatisecta*, *Sinarisaema*, and *Tortuosa*. Furthermore, the results of comparative DNA barcode sequences analyses provided a significant information for the taxonomic reconsideration of *Arisaema* L. at the specific and intraspecific level. However, we could not confirm the taxonomic characteristics or identity among the three authentic medicinal species through the molecular phylogenetic analyses of genus *Arisaema* L. for *Arisaematis Rhizoma*.

Key words - *Arisaema*, DNA barcode, *matK*, Molecular phylogenetic analysis, rDNA-ITS, *rbcL*

서 언

천남성속(*Arisaema* L.) 식물은 천남성과(Araceae)에 속하는 다년생 초본식물이며, 최근 보고에 의하면 전 세계적으로 117속 4,095종이 분포하는 것으로 알려져 있다(Angiosperm phylogeny website ver. 13, 2016, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>). 이들 중 천남성속은 약 150여 종으로 생태적으로 주로 숲의 하층에 서식하고 있다(Gusman and Gusman, 2002). 그 중 대부분인 140여 종이 히말라야, 스리랑

카, 남인도, 중국, 한국, 일본과 동남아시아 등에 분포하고 1종이 네팔에서부터 사우디아라비아와 오멘을 거쳐 동아프리카까지 분포하는 것으로 알려져 있으며, 5-6종은 동아프리카 고유종으로, 그리고 3종은 북아메리카에 분포하는 고유종으로 알려져 있다(Renner *et al.*, 2004). 천남성속 식물은 독성식물로 알려져 있지만 한국, 중국, 일본 등의 아시아 지역에서는 등근잎천남성(*A. amurense* Maxim. f. *amurense*), 두루미천남성(*A. heterophyllum* Blume), 및 일파산남성(=중국천남성, *A. erubescens* Schott)의 괴경을 예로부터 가래를 삭이고 경련을 멈추며 어혈을 없애는 효능이 있다고 하여 중풍, 얼굴신경마비, 반신불수, 파상풍, 관절통, 급성 및 만성기관지염 등의 치료하는 천남성

*교신저자: bcmoon@kiom.re.kr

Tel. +82-42-868-9530

(天南星, *Arisaematis Rhizoma*)이라는 약재로 사용해 왔다 (Korea Institute of Oriental Medicine, 2017).

국내에 분포하는 천남성속 식물에 대해서는 Ko (2000)과 Ko *et al.* (2006)에서 섬천남성(*A. negishii*)이 2엽성 무늬천남성의 오동정으로 국내에 분포하지 않는다는 견해와 함께 둥근잎천남성(*A. amurense* f. *amurense*), 천남성(*A. amurense* f. *serratum* Nakai), 두루미천남성(*A. heterophyllum*), 무늬천남성(*A. thunbergii* Blume subsp. *thunbergii*), 점박이천남성(*A. serratum* (Thunb.) Schott), 놀뭍이천남성(*A. peninsulaef. convolutum* (Nakai) Y. Kim et S. Ko), 섬남성(*A. takesimensis* Nakai), 큰천남성(*A. ringens* (Thunb.) Schott)의 6종 2품종이 분포하는 것으로 보고되었으며, 2000년대 중반 거문천남성(*A. thunbergii* subsp. *geomundoense* S. C. Ko)이 무늬천남성의 아종으로 추가 보고되었다. 그러나 최근 분류학적 견해에 의하면 놀뭍이천남성, 점박이천남성 및 섬남성의 분류학적 처리, 무늬천남성과 거문천남성의 분류학적 처리, 그리고 둥근잎천남성과 천남성의 분류학적 처리를 재정리하여 국내에는 놀뭍이천남성을 제외한 6종 1아종 1품종에 해당하는 8분류군이 분포하는 것으로 보는 것이 지배적이다(2015 Proceeding of Asian Plant Distribution Research Society, unpublished data).

천남성속 식물은 잎의 개수와 형태, 불염포와 화수부속체의 모양 등을 기준으로 *Tortuosa*절(무늬천남성, 거문천남성, 두루미천남성), *Arisaema*절(둥근잎천남성, 천남성, 점박이천남성, 섬남성), *Pistillata*절(큰천남성)로 분류된다(Ko and Kim, 1985; Ko *et al.*, 1987; Ko *et al.*, 1990; Oh *et al.*, 1990). 하지만 최근 화수 부속체가 S자 모양인지 채찍처럼 길게 늘어지는 것인지를 기준으로 *Tortuosa*절의 일부 또는 다수가 *Flagellariaema*절로 옮겨지거나, 화수 부속체와 약의 형태 등을 기준으로 *Pistillata*절과 *Arisaema*절을 구분하지 않고 *Pistillata*절로 통합하는 방식으로 절의 분류체계가 변화하였다(Gusman and Gusman, 2002; Li *et al.*, 2010). 이에 따르면 국내에 분포하는 두루미천남성과 무늬천남성은 *Flagellariaema*절로, 둥근잎천남성과 점박이천남성, 그리고 큰천남성은 *Pistillata*절로 분류된다(Murata *et al.*, 2014).

최근 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 염기서열 분석법뿐만 아니라 Next Generation Sequencing (NGS)을 이용한 유전체 분석법 등이 빠른 속도로 발달하면서 생물들의 DNA에 저장되어 있는 정보에 보다 쉽게 접근할 수 있게 되었고, 이 정보로 생물들의 과거 진화 경로를 유추하는 연구가 활발하게 진행되고 있다(Park *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2014). 특히 대량

sequencing 기술의 발달에 따른 다양한 식물 DNA 바코드 구간의 발굴은 분자유전학적 분석을 통한 계통유연관계를 밝히는 데 이용되고 있다. 염록체 게놈에 존재하는 *matK*와 *rbcl* 유전자는 식물의 종 동정과 계통분류학적 연구에 적합하다고 보고되고 있으며(Bremer *et al.*, 2002; Bell, 2003; Purushothaman *et al.*, 2014; Techen *et al.*, 2014), 핵에 존재하는 rDNA-ITS 부위는 중간 염기서열 변이가 빈번하게 발생하는 특징으로 인하여 다양한 분류군의 계통분석 및 DNA 바코드 연구에 이용되고 있다(Álvarez and Wendel, 2003; China Plant BOL Group *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2010). 국내에서는 핵의 rDNA-ITS 부위와 염록체 게놈의 다양한 DNA 바코드 염기서열을 이용하여 한국산 팽이눈속의 계통연구(Han *et al.*, 2011), 한국산 담배풀속의 계통분류(Yoo and Park, 2012), 한국산 수국속의 계통연구(Kim *et al.*, 2016), 한국산 피나무속의 계통연구(Boo and Park, 2016) 등 다양한 분류군에 대한 분자계통학적 유연관계를 분석하여 보고하였다.

국내에 분포하는 천남성속 식물의 분자계통분석 연구로는 Renner *et al.* (2004)이 아시아, 북아메리카, 동아프리카에 이르는 범위에 서식하고 있는 천남성속 식물 11개 절에 대한 분자계통학적 유연관계를 보고하면서 국내에 분포하는 일부 천남성이 포함되어 분석된 바 있으며, Jung *et al.* (2004)과 Lee and Kim (2005)은 각각 *trnL-F* 유전자 부위 염기서열 비교 분석, RAPD를 이용한 계통 지문분석을 통해 중간 유연관계를 제안하였으나, 이 보고에서 절을 나누는 형태적 분류기준이 현재와 다르고 분류군의 처리도 현재와 달라 최근에 정리된 국내분포 천남성 6종 1아종 1품종 전체에 대한 DNA 바코드 기반 분자계통학적 유연관계 분석 연구는 진행된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 Consortium for the Barcode of Life (CBOL)에서 식물의 DNA 바코드로서 사용하는 것을 추천한 염록체 유전자인 *matK*와 *rbcl* 부위와 함께(CBOL Plant Working Group, 2009), 약용 식물들과 그 근연종들의 판별에 적합하다고 보고된 rDNA-ITS 부위의 염기서열 정보를 바탕으로(Chen *et al.*, 2010), 약용으로 사용되는 중국 분포 천남성 1종과 국내에 분포하는 천남성속 식물 6종 1아종 1품종을 포함하는 9개 분류군에 대한 분자계통학적 유연관계를 분석하여, 첫째로 한국산 천남성속 식물에 대한 분자계통학적 분석을 기반으로 이들의 절과 종간의 분류학적 유연관계와 형태학적 분류 체계와의 상관성을 확인하고자 하였으며, 둘째로 국내 천남성과 다른 절(*Sinarisaema*절)에 속하고 중국에 주로 분포하며 정품 한약재로 사용 가능한 일파산남성을 포함하여 한약재 천남성으로 약

용할 수 있는 천남성 3종과 사용할 수 없는 천남성 종 간의 분류학적 근연관계를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

분석용 연구재료

본 실험에 사용한 등근잎천남성 7개체, 천남성 6개체, 두루미천남성 6개체, 섬남성 6개체, 점박이천남성 7개체, 큰천남성 6개체, 무늬천남성 6개체는 한국 또는 중국의 다양한 자생지에서 수집하였으며, 일파산남성 3개체 및 거문천남성 3개체는 각각 중국과 한국의 자생지에서 서로 다른 개체를 수집하여 총 50개체의 시료를 분석에 사용하였다(Table 1). 분석에 이용된 재료의 식물명은 The Plant List (<http://www.theplantlist.org/>)를 기준으로 정리하였으며, 약용과 비약용 천남성의 분류학적 특성을 확인하고자 중국천남성(일파산남성)을 포함하였다. 각 시료의 증거표본은 석엽표본으로 제작하여 한국한의학연구원 한약표준표본관(KIOM)에 보관하였다(Table 1).

DNA 추출 및 정제

국내·외 자생지에서 수집하여 -70°C에 보관한 기원식물 생체시료 약 100 mg을 Lysing matrix (MP biomedical, USA)와 Precellys™ Grinder (Bertin technologies, France)를 이용하여 마쇄한 후, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 제작자가 제공한 protocol에 따라 추출·정제하였다. 정제된 DNA의 순도와 품질을 확인하기 위하여 1.5% agarose gel에서 전기영동 후, Ecodye™ Nucleic Acid Staining Solution (Biofact, Korea)으로 염색하여 UV light 상에서 DNA band를 확인하였으며, UV spectrophotometer (Nanodrop, USA)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

DNA 바코드 부위 증폭 및 염기서열 결정

DNA 바코드 부위를 증폭하기 위하여, 각 DNA 바코드 영역에 특이적인 정방향과 역방향 10 pmole primer (Table 2) 각 2 μ l, Solg™ 2X Taq PCR Smart-Mix I (Solgent, Korea) 20 μ l, D.W. 15 μ l, 그리고 15 ng의 genomic DNA 1 μ l를 혼합하여 총 40 μ l의 혼합물을 만들고, 이를 DNA Engine Dyad Thermal Cycler (MJ Research, USA)를 사용하여 증폭하였다. PCR 반응은 95°C에서 5분간 pre-denaturation한 후, 95°C에서 30초 denaturation, 53°C에서 40초 annealing, 72°C에서 1분 extension을 총 35회 반복 수행하고 마지막으로 72°C에서 5분간 final-extension을

거쳐 수행하였다.

DNA 바코드 부위 증폭산물의 확인을 위하여 각각의 증폭산물을 1.5% agarose gel 상에서 Ecodye™ Nucleic Acid Staining Solution (Biofact, Korea)으로 염색한 후, 100 bp DNA ladder (Solgent, Korea)와 함께 전기영동하였다. 정확하게 증폭된 rDNA-ITS 부위, *matK* 및 *rbcl* 유전자 증폭산물을 agarose gel로부터 회수하여 Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 정제한 뒤, pGEM-Teasy Vector Systems (Promega, USA)에 삽입하였다. 삽입된 증폭산물은 XL1-Blue MRF' competent cell (Stratagene, USA)에 형질전환한 뒤, ampicillin과 X-gal/IPTG가 첨가된 LB agar 배지에 도말하여 37°C에서 약 20시간 배양하였다. 배양된 colony들을 대상으로 T7과 SP6 primer를 이용한 colony PCR을 통해 증폭산물이 정확히 삽입되었는지 확인하였다. PCR error, misreading, 지역적 염기서열 변이 등과 같은 요인들의 영향을 낮추기 위하여 각 시료별로 최소 3개의 white colony를 선별하여 각각 액체배양하고 Plasmid Mini Preparation Kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 plasmid DNA를 분리한 후, T7과 SP6 primer를 이용하여 ABI3730 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, USA)에서 염기서열을 해독하였다. 염기서열의 정확성과 신뢰성을 확보하기 위한 Nilsson *et al.* (2012)의 가이드라인에 따라 각 시료별로 분석된 최소 3개의 colony의 염기서열을 비교하고 PCR 증폭과정에서의 오류를 확인한 후, NCBI GenBank BLAST 검색을 통하여 카메라의 존재 유무를 판별하고 종을 확인하는 과정을 거쳐 각 시료에 대한 최종 염기서열을 확정하였다.

분자계통학적 유연관계 분석

확보된 천남성 9분류군 50개체의 DNA 바코드 염기서열과 함께, 군외군으로는 같은 천남성과에 속하였으며 분석대상 부위(ITS, *matK*, *rbcl*)의 염기서열 정보가 모두 NCBI GenBank에 등록되어 있는 종인 *Dracunculus vulgaris*의 염기서열을 내려 받아 계통유연관계를 검토하였다. 총 51개체의 rDNA-ITS, *matK*, *rbcl* 부위의 염기서열을 각각, 그리고 합쳐서 MEGA version 7 (Kumar *et al.*, 2016)의 ClustalW 방법으로 multiple alignment를 수행하여 정렬하였다. 그리고, 동 프로그램을 이용하여 Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) 알고리즘으로 1,000회 반복의 bootstrapping method (Felsenstein, 1985)를 적용하여 Maximum parsimony 분석을 수행한 다음, 10개의 도출된 계통수를 합쳐 consensus tree를 최종적으로 도출하였다. 이때, *matK*와 *rbcl* 유전자의 Gaps/Missing data는 Complete

Table 1. Sample information and Genbank accession numbers of plant materials used in this study

Taxon	Locality	Locality Abbrev.	Voucher	GenBank Accession No.		
				ITS	matK	rbcL
<i>Arisaema amurense</i> Maxim. f. <i>amurense</i>	Gwangyang, Jeonnam, Korea	KY	KIOM2013KR02-021	KT634008	KT025764	KT025714
	Yangsan, Gyeongnam, Korea	YS	KIOM201301005688	KT634009	KT025765	KT025715
	Chooja, Jeju, Korea	JJ	KIOM201302KR-006	KT634010	KT025766	KT025716
	Tongyeong, Gyeongnam, Korea	TY	KIOM201201004627	KT634011	KT025767	KT025717
	Inje, Gangwon, Korea	IJ	KIOM2012KR04-010	KT634012	KT025768	KT025718
	Jangsu, Jeonbuk, Korea	JS	KIOM201401009269	KT634013	KT025769	KT025719
	Ansan, Gyeonggi, Korea	AS	KIOM2013KR04-040	KT634014	KT025770	KT025720
<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i> Nakai	Wonju, Gangwon, Korea	WJ	KIOM201101003760	KT634015	KT025771	KT025721
	Aewol, Jeju, Korea	JJ	KIOM2012KR03-019	KT634016	KT025772	KT025722
	Tongyeong, Gyeongnam, Korea	TY	KIOM2012KR05-013	KT634017	KT025773	KT025723
	Yeongcheon, Gyeongbuk, Korea	YC	KIOM201201004753	KT634018	KT025774	KT025724
	Gongju, Chungnam, Korea	GJ	KIOM200901002598	KT634019	KT025775	KT025725
	Ansan, Gyeonggi, Korea	AS	KIOM2013KR04-042	KT634020	KT025776	KT025726
	<i>A. erubescens</i> Schott	Guigang, Guangxi, China	PN1-Cn	KIOM201201005264	KT634021	KT025777
PN2-Cn			KIOM201201005265	KT634022	KT025778	KT025728
PN3-Cn			KIOM201201005266	KT634023	KT025779	KT025729
<i>A. heterophyllum</i> Blume	Sancheong, Gyeongnam, Korea	SC	KIOM201301005890	KT634024	KT025780	KT025730
	Gwangyang, Jeonnam, Korea	KY	KIOM2013KR02-030	KT634025	KT025781	KT025731
	Tongyeong, Gyeongnam, Korea	TY	KIOM201201004628	KT634026	KT025782	KT025732
	Cheongyang, Chungnam, Korea	CY	KIOM201301006066	KT634027	KT025783	KT025733
	Ansan, Gyeonggi, Korea	AS	KIOM201301006091	KT634028	KT025784	KT025734
	Gapyeong, Gyeonggi, Korea	GP	KIOM2013KR07-036	KT634029	KT025785	KT025735
<i>A. takesimense</i> Nakai	Bongrae, Ulleung, Gyeongbuk, Korea	BR1	KIOM2012KR06-029	KT634030	KT025793	KT025743
		BR2	KIOM2012KR06-030	KT634031	KT025794	KT025744
	Nari, Ulleung, Gyeongbuk, Korea	NR1	KIOM201301005960	KT634032	KT025795	KT025745
		NR2	KIOM2012KR06-034	KT634033	KT025796	KT025746
	Naesujeon, Ulleung, Gyeongbuk, Korea	NSJ1	KIOM201201004744	KT634034	KT025797	KT025747
		NSJ2	KIOM2012KR06-037	KT634035	KT025798	KT025748
<i>A. serratum</i> (Thunb.) Schott	Gwangyang, Jeonnam, Korea	KY	KIOM201301005896	KT634036	KT025786	KT025736
	Jangsu, Jeonbuk, Korea	JS	KIOM201301005834	KT634037	KT025787	KT025737
	Geoje, Gyeongnam, Korea	GJ	KIOM2010CN02-047	KT634038	KT025788	KT025738
	Aewol, Jeju, Korea	JJ	KIOM2012KR02-005	KT634039	KT025789	KT025739
	Inje, Gangwon, Korea	IJ	KIOM2012KR04-011	KT634040	KT025790	KT025740
	Ulleung, Gyeongbuk, Korea	UR	KIOM201301005961	KT634041	KT025791	KT025741
	Yanbian, Jilin, China	JL-Cn	KIOM2012CN03-028	KT634042	KT025792	KT025742
<i>A. ringens</i> (Thunb.) Schott	Geoje, Gyeongnam, Korea	GJ	KIOM201001002706	KT634043	KT025799	KT025749
	Tongyeong, Gyeongnam, Korea	TY	KIOM201101003563	KT634044	KT025800	KT025750
	Aewol, Jeju, Korea	JJ GJ	KIOM2012KR01-040	KT634045	KT025801	KT025751
	Jochen, Jeju, Korea	JJ JC	KIOM2012KR02-002	KT634046	KT025802	KT025752
	Seogwipo, Jeju, Korea	SGP	KIOM2012KR02-008	KT634047	KT025803	KT025753
<i>A. thunbergii</i> Blume subsp. <i>thunbergii</i>	Chooja, Jeju, Korea	JJ CJ	KIOM201301005851	KT634048	KT025804	KT025754
		Min1	KIOM201601016305	KT634002	KT444679	KT025755
		Min2	KIOM201601016306	KT634003	KT444680	KT025756
		Min3	KIOM201601016307	KT634004	KT444681	KT025757
	Nohyeong, Jeju, Korea	Min4	KIOM201601016312	KT634005	KT444682	KT025758
		Jok1	KIOM2014KR03-043	KT634006	KT444683	KT025759
<i>A. thunbergii</i> subsp. <i>geomundoense</i> S.C.Ko	Gageo, Jeonnam, Korea	Jok2	KIOM2014KR03-044	KT634007	KT444684	KT025760
		G1	KIOM201601016299	KT633999	KT444676	KT025761
		G2	KIOM201601016300	KT634000	KT444677	KT025762
<i>Dracunculus vulgaris</i> Schott	NCBI GenBank	G3	KIOM2015KR01-009	KT634001	KT444678	KT025763
		-	-	GU067564	GU067614	GU067589

deletion으로 처리하였고, 염기서열 상에 길이 변이가 많은 rDNA-ITS 부위는 Use all sites 방법으로 처리하였다. 그리고 이를 통해 CI 값(Consistency Index)과 RI 값(Retention Index)을 도출하였다. Neighbor-Joining 계통수(Saitou and Nei, 1987; Farris *et al.*, 1996)는 동 프로그램에서 Kimura's two-parameter method (Kimura, 1980) 모델로 계산된 염기변이 값을 기초로 하여, bootstrap 1000회 반복으로 도출하였다. GC 비율과 parsimony informative character, constant character, 그리고 variable character의 수는 DnaSP version 5.10.01 (Librado and Rozas, 2009) 프로그램을 사용하여 계산하였다. 도출된 계통수는 TreeGraph2 version 2.13 (Stöver and Müller, 2010) 프로그램을 사용하여 편집하였다. ITS 부위와 *matK*, *rbcL*의 염기서열을 유합한 combined data의 적합성을 판단하기 위하여 PAUP* version 4.0 (Swofford, 2002)에서 Incongruence Length Difference (ILD) test (Farris *et al.*, 1995)를 수행하였다.

결 과

염기서열 특징 및 변이

천남성 9분류군 50개체로부터 증폭된 rDNA-ITS 부위, *matK* 및 *rbcL* 유전자를 T-vector에 cloning하고 염기서열을 해독하여 각 개체별 증폭산물의 염기서열을 비교한 결과 PCR 과정에서의 오류나 염기서열 해독과정에서의 오류는 확인되지 않았으며, 이들 염기서열을 이용하여 NCBI GenBank BLAST 검색으로 그 종을 확인하였다. 이와 같은 검토를 통해 최종 확정된 각 개체의 rDNA-ITS, *matK* 및 *rbcL* 증폭산물 염기서열과 군외군 1개체를 포함한 전체 51개 시료의 DNA 바코드 염기서열을 분석한 결과, rDNA-ITS 부위는 762-781 bp, *matK* 유전자는 1,286 bp, 그리고 *rbcL* 유전자는 1,517 bp의 염기로 구성되어 있었으며, 이들 염기서열은 ClustalW 방식으로 최대 정렬하였을 경우 각각 795 bp, 1,286 bp, 1,517 bp의 길이로 정렬되었다(Table 3).

Table 2. The information of the primer sequences for the plant DNA barcodes used in this study

Barcode Gene	Primer Name	Primer Sequences (5'-3')	Reference
rDNA-ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> 1990
	ITS4	TCCTCGCTGATTGATATGC	
<i>matK</i>	matK AF	CTATATCCACTTATCTTTCAGGAG	Kato <i>et al.</i> 1998
	matK 8R	AAAGTTCTAGCACAAGAAAGTCGA	
<i>rbcL</i>	rbcL F	ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC	Mansion <i>et al.</i> 2008
	rbcL R	TCCTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG	

Table 3. Values and statistics of the data

	rDNA-ITS (Nuclear)	<i>matK</i> (Plastid)	<i>rbcL</i> (Plastid)	Combined
Number of ingroup taxa	50	50	50	50
Sequence length (bp)	762-781	1286	1517	3565-3584
GC contents (%)	59.3	31.5	42.9	42.3
Aligned length of sequences (bp)	795	1286	1517	3598
Total number of sequences (excluding with gaps/missing data)	749	1286	1517	3554
Number of informative characters	146	31	26	203
Number of constant characters	598	1248	1488	3336
Number of variable characters	151	38	29	218
Tree length	264	67	42	393
Consistency index (CI) of MP tree	0.83	0.99	0.93	0.86
Retention index (RI) of MP tree	0.97	1	0.99	0.98

각 DNA 바코드별 염기서열 변이는 rDNA-ITS부위에서 151개의 염기쌍에서 변이가 확인되어 분석에 사용된 세 유전자 부위 중 가장 변이가 많았고, 그 다음으로 *matK* 유전자가 38개 염기쌍에 변이가 있었으며, *rbcl* 유전자가 29개 염기쌍으로 변이가 가장 적었다. 계통학적으로 유용한 형질은 rDNA-ITS 부위에

서 146 bp, *matK* 및 *rbcl* 유전자에서 각각 31 bp와 26 bp로 확인되어 유용형질 역시 rDNA-ITS 부위가 가장 많은 것으로 나타났다. 각 DNA 바코드 구간의 G+C (%) 함량은 rDNA-ITS 부위 59.3%, *matK* 유전자 31.5% 그리고 *rbcl* 유전자 42.9%로 확인되었다(Table 3).

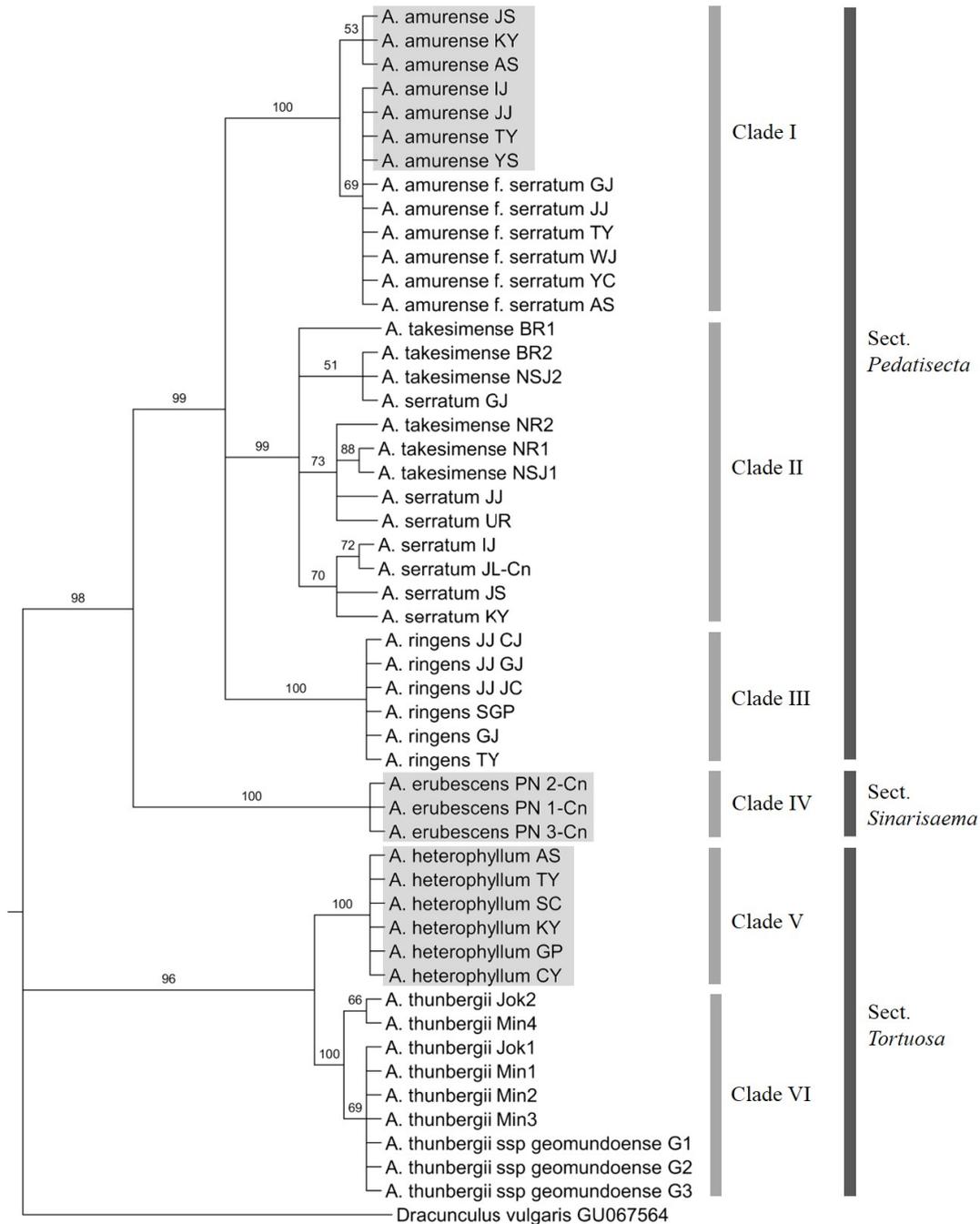


Fig. 1. Bootstrap consensus tree inferred using the Maximum Parsimony method based on nuclear rDNA-ITS sequences of the *Arisaema* species. Branches in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The numbers above branches indicate bootstrap values. The samples in the grey rectangles are the authentic medicinal *Arisaema* species.

분자계통학적 유연관계 분석

천남성속 9 분류군의 rDNA-ITS 부위와 *matK* 유전자 개별 염기서열을 이용한 Maximum Parsimony (MP) 계통수 분석 결과, rDNA-ITS 부위를 이용한 계통수는 264단계로 구성되어 있었고, CI (Consistency Index) 값은 0.83, RI (Retention Index) 값은 0.97로 나타났다. *matK* 유전자의 경우 67단계로 구성되어

있었으며, CI 값과 RI 값은 각각 0.99, 1.0으로 나타났다(Table 3). rDNA-ITS 부위와 *matK* 유전자를 이용한 strict consensus tree에서는 두 DNA 바코드 구간 모두 세 개의 절(*Pedatisecta*, *Sinarisaema*, *Tortuosa*)이 뚜렷하게 분계조로 구분이 되었는데, 1차적으로 크게 *Pedatisecta*절 및 *Sinarisaema*절로 구성된 부분과 *Tortuosa*절로 구성된 부분으로 나뉘었다(Fig. 1-2). 첫

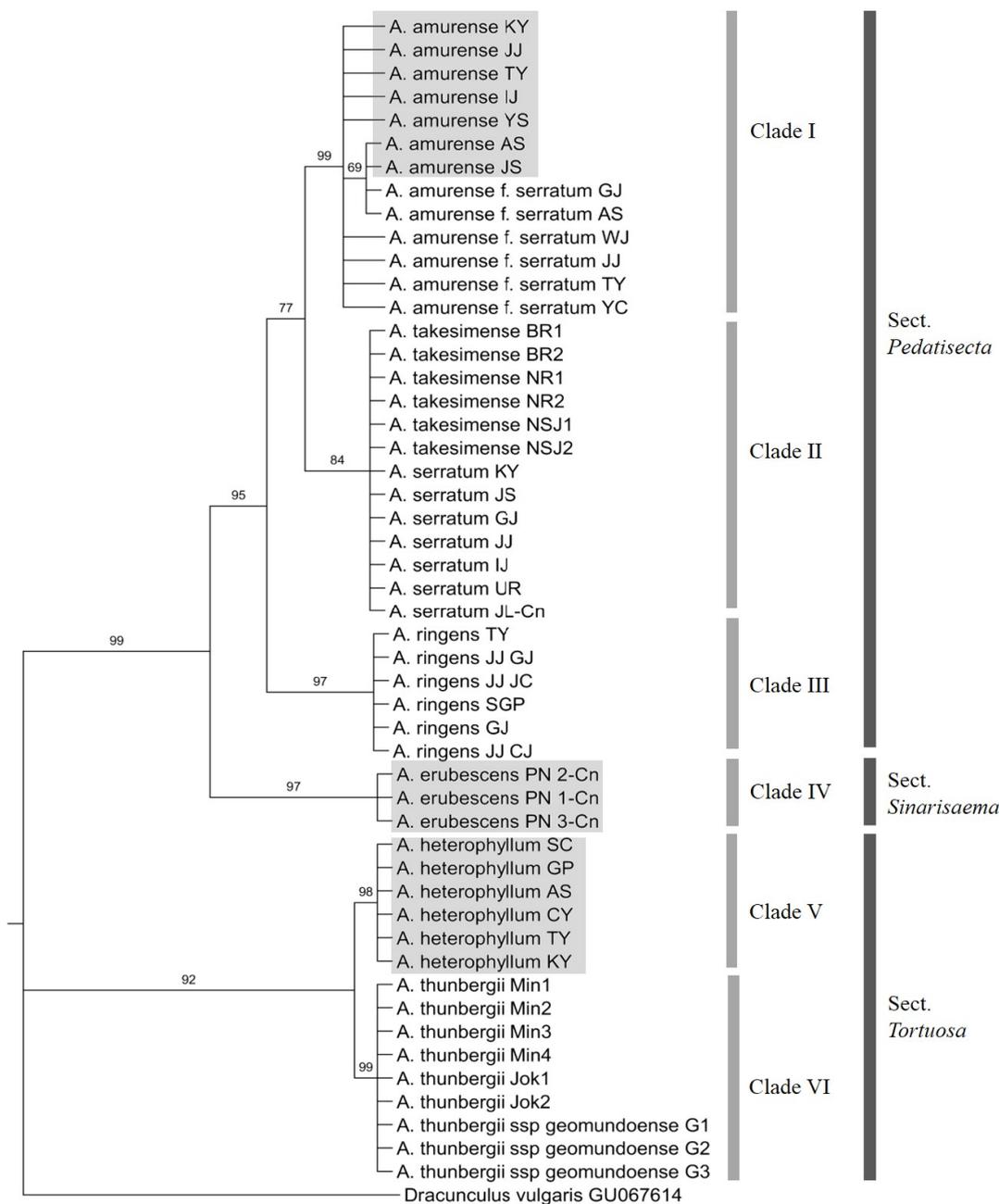


Fig. 2. Bootstrap consensus tree inferred using the Maximum Parsimony method based on chloroplast *matK* sequences of the *Arisaema* species. Branches in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The numbers above branches indicate bootstrap values. The samples in the grey rectangles are the authentic medicinal *Arisaema* species.

번째 분계조에서는 일파산남성이 rDNA-ITS 부위와 *matK* 유전자가 각각 bootstrap value 100%와 97%로 기부에서 독립적으로 분지되어(Clade IV) 단계통의 *Sinarisaema* 절을 형성하였다(Fig. 1-2). *Pedatisecta* 절에 해당되는 부분에서는 rDNA-ITS

부위의 경우에는 동근잎천남성과 천남성이 하나의 독립된 분계조(Clade I)를 형성하였고, 큰천남성이 단일종으로 분계조를 형성하였으며(Clade III), 섬남성과 점박이천남성이 bootstrap value 99%로 하나의 분계조(Clade II)를 이루었다(Fig. 1).

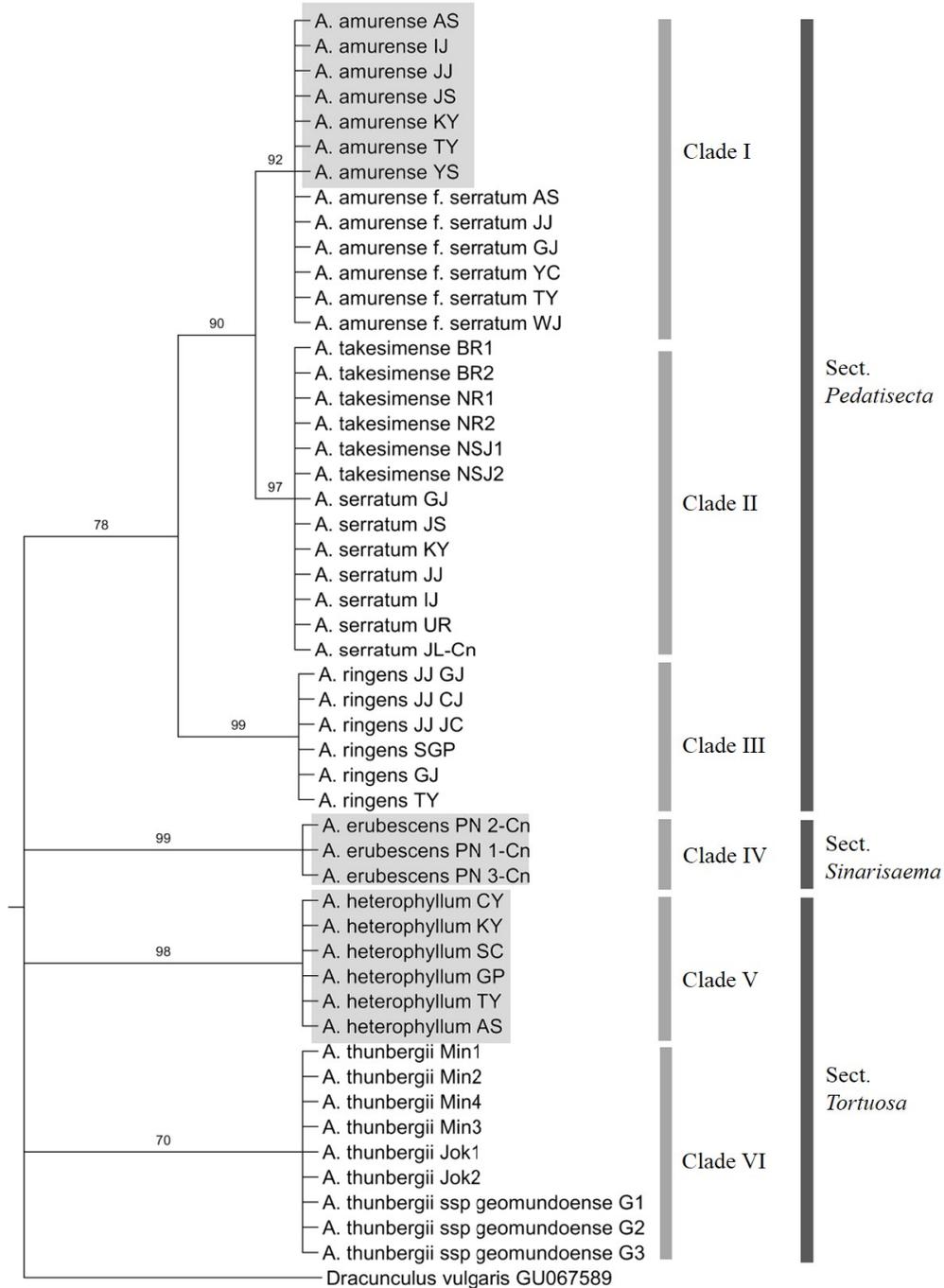


Fig. 3. Bootstrap consensus tree inferred using the Maximum Parsimony method based on chloroplast *rbcL* sequences of the *Arisaema* species. Branches in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The numbers above branches indicate bootstrap values. The samples in the grey rectangles are the authentic medicinal *Arisaema* species.

를 형성하였고, 등근잎천남성과 천남성이 bootstrap value 92%로(Clade I), 섬남성과 점박이천남성이 bootstrap value 97%로(Clade II) 각각의 분계조를 이루었다(Fig. 3). 일파산남성(Clade IV), 두루미천남성(Clade V), 그리고 무늬천남성과 거문천남성

이 형성한 단일의 분계조(Clade VI)는 근외군인 *Dracunculus vulgaris*와 함께 모두 basal node에서 각각 분지된 형태를 보이며, rDNA-ITS와 *matK* 유전자에서 *Tortuosa*절이 하나의 단계 통군을 형성했던 것과는 다른 양상을 보였다(Fig. 1-3).

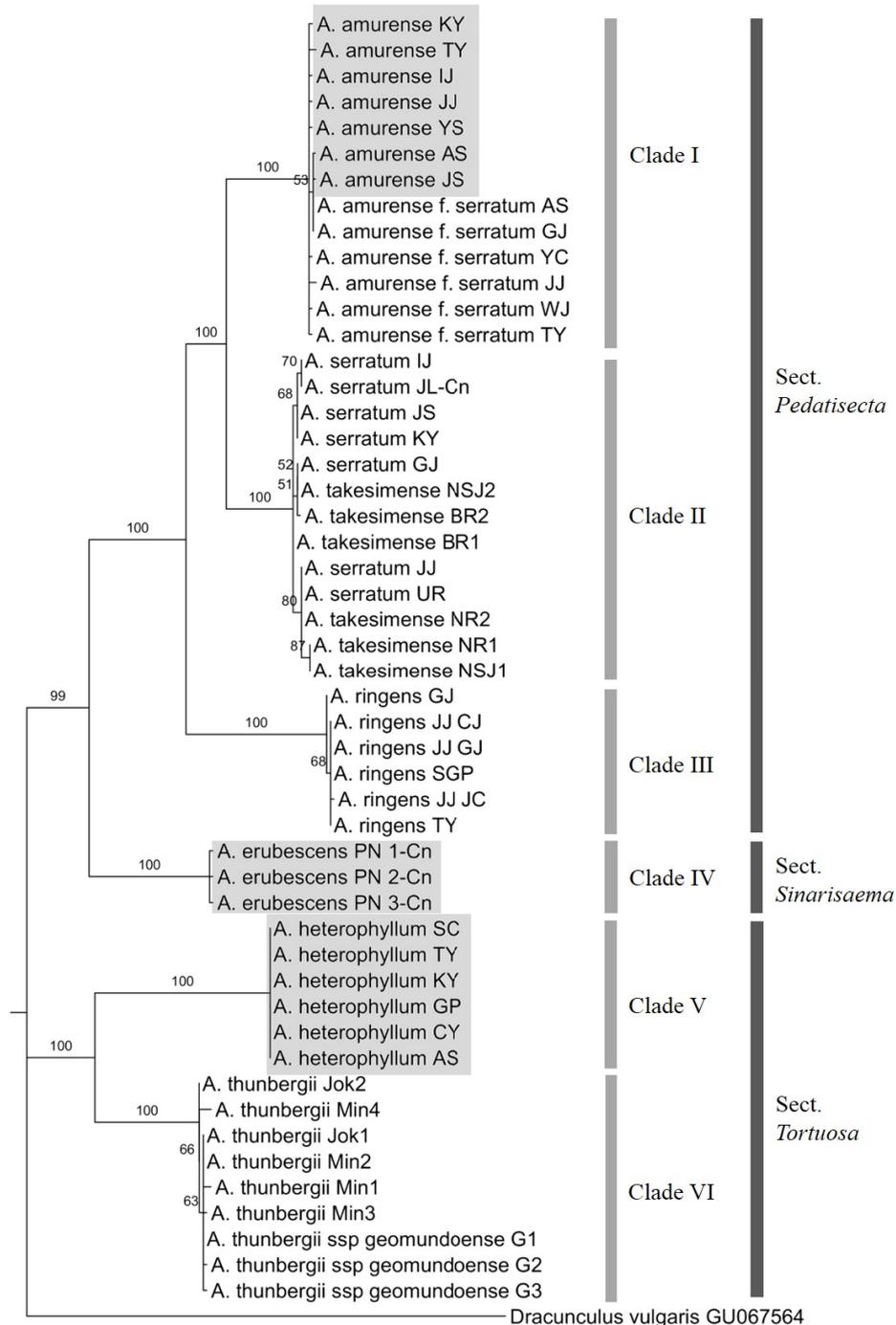


Fig. 5. Phylogenetic tree inferred using the Neighbor-Joining method based on the combined sequences (rDNA-ITS, *matK*, and *rbcL*) of the *Arisaema* species. Branches in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The numbers above branches indicate bootstrap values. The samples in the grey rectangles are the authentic medicinal *Arisaema* species.

rDNA-ITS, *matK* 및 *rbcl* 세 개의 부위를 유합한 combined data의 ILD test를 수행한 결과, p-value가 0.91로, 세 부위들이 homogeneous 한 관계에 있다는 귀무가설을 기각하지 못하므로 combined data로서 적합한 것으로 판단되었다. 이에 따라 천남성속 9개 분류군에 대한 MP 분석 결과, 393단계로 구성된 계통수를 도출하였으며, CI 값은 0.86, RI 값은 0.98로 나타났다(Table 3). 유합한 MP 계통수 역시 세 개의 절(*Pedatisecta*, *Sinarisaema*, *Tortuosa*)이 뚜렷하게 구분이 되었는데, 1차적으로 크게 *Pedatisecta*절 및 *Sinarisaema*절로 구성된 부분과 *Tortuosa*절로 구성된 부분으로 나뉘었다. 동근잎천남성과 천남성, 점박이천남성과 섬남성은 모두 100%의 bootstrap value로 하나의 분계조를 이루며 단계통을 형성하고 큰천남성과 자매군을 이루며 *Pedatisecta*절로 분류되었다(Fig. 4). 국내 분포종이 아닌 일파산남성은 동근잎천남성 및 천남성, 점박이천남성, 섬남성 및 큰천남성으로 구성된 *Pedatisecta*절과 하나의 분계조를 이루며 가장 먼저 분지하여 *Sinarisaema*절을 형성하였다(Fig. 4). 또한 무늬천남성과 거문천남성이 하나의 분계조를 이루고, 두루미천남성이 이들 분계조와 함께 단계통군을 형성하면서 *Tortuosa*절로 분류되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 앞에서 설명한 rDNA-ITS와 *matK* 유전자로부터 얻은 계통수에서 분계조를 이루는 형태와 같은 결과이다. NJ 계통수 분석 결과에서도 마찬가지로 동근잎천남성과 천남성, 그리고 점박이천남성과 섬남성이 100% bootstrap value로 하나의 계통을 형성하면서 자매군인 큰천남성과 함께 *Pedatisecta*절로 분류되었고, 거문천남성과 무늬천남성이 100%의 bootstrap value로 두루미천남성과 *Tortuosa*절을 이루었으며, 일파산남성 역시 *Pedatisecta*절과 분계조를 이루며 분류되었다(Fig. 5). 즉, 본 연구에서 분석한 rDNA-ITS, *matK* 및 *rbcl* 유전자 및 이들 세 개의 부위를 유합하여 도출한 MP 및 NJ 계통수 모두 유사한 형태로 종과 절을 분류하였으나, rDNA-ITS와 *matK* 유전자가 분계조를 이루는 형태와 *rbcl* 유전자가 분계조를 이루는 형태를 비교하였을 경우, 세 개의 범용성 DNA 바코드 구간 중 *rbcl* 유전자 보다 rDNA-ITS나 *matK* 유전자 부위가 천남성속의 계통 분류와 유연관계 분석에 더 적합한 DNA 바코드 부위임을 지지하는 결과를 얻었다(Fig. 1-5).

고 찰

천남성속 식물의 분류체계와 계통학적 유연관계 분석에 있어서 잎의 수, 소엽편의 배열양상 및 화수부속체의 모양은 중요한

형태적 형질들로 알려져 있다(Ko, 2000). 이들 형태적 특징들에 대한 정성적·정량적 형질이 비교적 상세히 검토된 Murata (1984, 1990, 1991)의 분류 기준에 따라, 천남성속 식물은 화수부속체가 채찍모양으로 불염포 밖으로 길게 나오며 기부에 병이 없는 분류군인 *Tortuosa*절과, 화수부속체가 원주형 또는 곧봉형으로 불염포보다 짧으며 기부에 병이 있는 분류군인 *Pedatisecta*절로 세부분류 되었다(Ko, 2000). 본 연구에서 엽록체 게놈에 존재하는 *matK*와 *rbcl* 유전자 염기서열과 핵의 rDNA-ITS 염기서열을 이용하여 천남성속 식물에 대한 분자계통학적 유연관계를 분석한 결과, *rbcl* 유전자의 경우 종 및 절간 유연관계 분석에 있어 해상력이 다소 낮게 나타났으나, rDNA-ITS와 *matK* 유전자의 경우 천남성속의 속 이하 분류에 분자마커로서 충분히 활용할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 1-3). 뿐만 아니라 국내에 분포하는 천남성속 식물 중 동근잎천남성, 점박이천남성, 큰천남성 등과 같이 화수부속체의 모양이 원주형이고 기부가 평저이며 병이 있는 형태와, 두루미천남성과 같이 기부가 비후되어 있으면서 직립하지만 sigmoid형으로 구부러진 형태, 그리고 무늬천남성과 같이 기부가 비후되어 있으며 가는 실 모양으로 길게 늘어진 형태의 3가지 화수부속체 모양에 따라 절이 분류되지 않았음을 확인하였다(Fig. 1-3)(Ko, 2000). 그리고 일파산남성이 *Sinarisaema*절로 분계조를 이루고 큰천남성이 동근잎천남성이나 점박이천남성과 유전적 거리를 두고 독립된 분계조를 이루는 것으로 보아 화수부속체의 모양과 같은 하나의 형태학적 특징으로 절과 아절을 분류하는 것은 적절하지 않음을 분자계통 분석을 통해 다시 확인할 수 있었다(Gusman and Gusman, 2002).

*Tortuosa*절의 경우 무늬천남성을 하나의 type으로 하고 *Flagellarisaema*속과 두루미천남성을 하나의 type으로 하여 *Heteroarisaema*속이라는 새로운 속의 분류군으로 처리하기도 하였으며, *Arisaema*속의 *Tortuosa*절로 포함되었다가 *Fagellarisaema*절로 일부종이 옮겨지기도 하였고, 다시 *Tortuosa*절을 *Tortuosa*아절과 *Flagellarisaema*아절로 분류하기도 하였다(Nakai, 1950; Ko, 2000; Gusman and Gusman, 2002). 본 연구에서 세 가지 유전자 부위를 유합하여 얻은 계통학적 유연관계를 분석한 결과, 무늬천남성과 두루미천남성이 Clade V와 Clade VI를 아우르는 하나의 분계조로 묶이는 것으로 보아 위경의 길이와 화분 돌기 사이의 형태적 특징 등을 고려하여 *Tortuosa*절로 분류했던 기존의 연구결과를 지지하는 것으로 나타났다(Engler, 1920; Nakai, 1950; Ko, 2000; Gusman and Gusman, 2002). 그러나 최근 분자계통 연구와 세포학적 연구를 토대로 *A. tortuosum*만을

*Tortuosa*절에 포함시키고 나머지를 *Flagellarisaema*절로 처리하는 등 학자에 따라 이견이 있으므로, *A. tortuosum*이 포함된 추가적인 분자계통학적 유연관계 분석연구 수행을 통해 보다 명확하게 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다(Murata *et al.*, 2014).

*Pedatisecta*절의 경우에는 큰천남성(*A. ringens*)이 과거 *Ringentia*절로 분류되었으며, 학자에 따라 *Pistillata*절로 포함시키거나 *Pedatisecta*절 내 *Pistillata*아절로 세부분류하기도 하였고, *Ringentiarum ringens*로 새로운 속에 포함시키기도 하는 등 분류학적으로 그 위치에 대한 변화가 있었다(Engler, 1920; Nakai, 1950; Ko and Kim, 1985; Gusman and Gusman 2002). 최근 연구에는 세포학적 연구결과와 분자계통학적 연구결과에 의해 점박이천남성, 둥근잎천남성 등과 함께 *Pistillata*절에 포함시켰다(Murata *et al.*, 2014). 과거 학자에 따라 *trnL-trnF* spacer 구간을 이용하여 큰천남성만을 *Pistillata*절에 포함시키기도 하였으나(Jung *et al.*, 2004) 본 연구에서는 Fig. 1-5에서 보는 바와 같이 최근 발표된 논문과 같은 독립된 분계조를 형성하며 둥근잎천남성, 점박이천남성과 함께 유집되어 *Pedatisecta*절로 처리하는 것을 지지하는 결과를 얻었다(Gusman and Gusman, 2002).

거문천남성의 경우 무늬천남성과 유사하나 화수부속체의 색과 기부의 주름여부를 기준으로 무늬천남성의 아종으로 분류하였으나(Ko *et al.*, 2006), rDNA-ITS, *matK* 및 *rbcl* 유전자를 이용하여 분석한 계통수 모두에서 무늬천남성과 하나로 유집되어 나타났(Fig. 1-5). 이는 두 분류군의 유연관계가 종 이하 분류군이라는 기존의 연구를 지지하는 결과로 두 분류군간의 유전적 변이는 확인되지 않았다(Fig. 1-5). 천남성과 둥근잎천남성의 경우 품종 관계로서 형태상으로 엽연에 거치가 있는 것을 천남성, 거치가 없는 것을 둥근잎천남성으로 분류하였다(Lee 1996; Lee 2003; Lee 2006). 둥근잎천남성은 거치가 있는 것과 없는 것이 모두 있어 현재는 두 종을 따로 구분하지 않고 둥근잎천남성으로 통합하고 있다(Satake *et al.*, 1982; Chang *et al.*, 2014). 본 연구결과 얻어진 rDNA-ITS, *matK* 및 *rbcl* 유전자 염기서열을 이용한 계통분석 결과, 둥근잎천남성과 천남성을 따로 구분하지 않는 기존의 분류체계를 지지하였으며 이들의 종내 분류군과 종간 분류군의 유전적 거리 사이에 차이가 없었다. 이를 기준으로 두 종을 통합할 경우 과거 자주큰천남성(*A. ringens*)과 큰천남성(*A. ringens* f. *praecox*)을 구별하여 분류하지 않고 큰천남성(*A. ringens*)로 통합한 것처럼(Ko *et al.*, 1993), 천남성(*A. amurense* f. *serratum*) 역시 둥근잎천남성(*A. amurense*)으로 처리를 검토해야 할 필요성이 있다(Ko and

Kim, 1985; Ko, 2007). 또한 점박이천남성(*A. serratum*)과 특산종인 섬남성(*A. takesimensis*)의 경우 *matK* 유전자와 *rbcl* 유전자 구간에서는 유전자 변이가 없고 rDNA-ITS 부위에서 일부 염기서열 변이가 확인되었으나 종 특이적인 변이가 아닌 개체간 변이로서 계통수에서는 두 분류군이 혼재되어 단계통을 이루었다(Fig. 1-5). 이러한 결과로 보아, 앞의 무늬의 유무로 종을 분류한 섬남성 역시 종의 지위에 대한 재검토가 필요할 것으로 사료된다.

현재 대한민국약전은 약용으로 사용할 수 있는 천남성 종류를 둥근잎천남성, 두루미천남성 및 천남성으로 규정하여 기재하고 있는데, 이중 학명이 *A. erubescens* (일파산남성)인 중국 천남성을 천남성으로 잘못 표기하고 있어, 우리나라에 분포하는 천남성(*A. amurense* f. *serratum*)과 혼동을 주고 있는 실정이다(Korea Institute of Oriental Medicine, 2016). 또한, 분포지역이 넓고 개체수가 많은 점박이천남성이나 큰천남성이 약용으로 혼·오용될 가능성이 매우 높다는 문제점이 있다. 본 연구에서 rDNA-ITS, *matK* 및 *rbcl* 염기서열 분석을 통해 이들 약전에 수재된 3종과 다른 천남성 종의 분류학적 특징을 분석한 결과, 속 이하의 분류체계에서 대한민국약전에 수재되어 있는 3종의 천남성이 같은 절에 속하지 않고 각각 다른 절에 속하는 것을 확인하였다(Fig. 1-5). 한방에서 널리 사용되는 한약재 중 하나인 감초(*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*)의 경우, 약전에 수재되어 있는 종인 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fischer), 광과감초(光果甘草, *Glycyrrhiza glabra* Linné) 및 창과감초(脹果甘草, *Glycyrrhiza inflata* Batal)가 *rbcl* 염기서열을 이용한 분자계통분석에서 단계통군을 이루며 동속의 다른 종들보다 이들 3종이 가까운 관계에 있는 것으로 나타났는데(Hayashi *et al.*, 2000), 이와 달리 천남성속 식물은 한약재로 이용되는 3종(둥근잎천남성, 두루미천남성, 일파산남성)사이에 뚜렷한 연관성을 찾을 수 없었다(Fig. 1-5). 따라서 대한민국약전에 수재되어 있는 천남성 식물종과 다른 천남성속 식물의 본초학적 약성 이론, 중간 성분 비교 분석, 효능비교 등과 연계된 계통분류학적 연구를 통해 대한민국약전에 수재된 한약재 천남성에 대한 기원종의 범위를 재설정할 필요가 있는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합하면 rDNA-ITS, *matK* 및 *rbcl* 염기서열 분석을 통해 국내에는 2절 5분류군의 천남성속 식물이 분포하는 것으로 나타났으며, 둥근잎천남성과 천남성, 무늬천남성과 거문천남성, 그리고 점박이천남성과 섬남성에 대하여 종내 분류군에 대한 재검토가 필요할 것으로 사료된다. 하지만 DNA 바코드 분석을 통한 종 동정이나 계통분류학적 유연관계 분석이

종 이하의 분류군에 적합하지 않다는 기존의 보고를 고려한다면 전체 엽록체계놈 염기서열 분석, 전체 계놈을 이용한 RAPD 분석 및 AFLP 분석과 같은 DNA 지문분석 등을 통해 이들 분류군의 분류학적 위치에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

적 요

국내에 분포하는 천남성속의 계통학적 유연관계와 한약재 천남성(*Arisaematis Rhizoma*)으로 사용되는 천남성 3종(동근잎천남성, 두루미천남성, 일파산남성)에 대한 분류학적 특징을 분석하기 위하여 천남성속 식물에 대한 분자계통학적 연구를 수행하였다. 3개의 범용성 DNA 바코드(ITS, *matK*, *rbcL*) 염기서열을 이용하여 국내 분포 천남성속 8분류군과 중국에 분포하는 약전수재 중 1분류군을 포함하는 9종 50개 시료와 같은과의 *Dracunculus vulgaris*를 군외군으로 하여 유연관계를 분석하였다. 3개의 개별 DNA 바코드 염기서열과 이들을 유합한 염기서열로 계통학적 유연관계를 분석한 결과, 천남성속의 9 분류군은 6개의 독립적인 분계조를 형성하며 구별되었으며(Clade I, 동근잎천남성 및 천남성; Clade II, 점박이천남성 및 섬남성; Clade III, 큰천남성; Clade IV, 일파산남성; Clade V, 두루미천남성; Clade VI, 무늬천남성 및 거문천남성), 이들 6개의 분계조는 각각 *Pedatissecta*절, *Sinarisaema*절, 및 *Tortuosa*절로 분류되었다. 또한 이들 DNA 바코드 구간의 비교 결과는 천남성속 식물의 종 및 종 이하 분류 단위의 분류학적 재검토의 필요성에 대한 중요한 정보를 제공하였다. 하지만 대한민국약전에 수재되어 한약재로 사용가능한 3종의 천남성 기원종의 종내 분류학적 연관성이나 분자계통학적 특징은 확인되지 않았다.

사 사

본 연구는 한국한의학연구원 K-herb 연구단에서 진행 중인 ‘기원검증 체계 구축을 통한 한약자원 국내생산 기반기술 개발(K16403)’ 과제의 지원에 의해 수행되었으며, 일부는 한의본초활용기반구축사업(K13020)의 지원에 의해 수행되었습니다. 본 연구 수행을 위한 기원식물 분류·동정에 도움을 주신 한국한의학연구원의 분류·동정 자문위원님들과 연구시료를 제공해 주신 한국한의학연구원 한약표준표본관(Index Herbariorum 코드 KIOM)에 감사드립니다.

References

- Álvarez, I. and J.F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29(3):417-434.
- Angiosperm phylogeny website. version 13. 2017. Araceae. Retrived Jul. 1, 2017, from <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb>.
- Bell, C.D. 2003. Preliminary phylogeny of Valerianaceae (Dipsacales) inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31(1):340-350.
- Boo, D. and S.J. Park. 2016. Molecular phylogenetic study of Korean *Tilia* L.. *Korean J. Plant Res.* 29(5):547-554 (in Korean).
- Bremer, B., K. Bremer, N. Heidari, P. Erixon, R.G. Olmstead, A.A. Anderberg, M. Källersjö and E. Barkhordarian. 2002. Phylogenetics of asterids based on 3 coding and 3 non-coding chloroplast DNA markers and the utility of non-coding DNA at higher taxonomic levels. *Mol. Phylogenet. Evol.* 24(2): 274-301.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *PNASU.* 106(31):12794-12797.
- Chang, C.S., H. Kim and K.S. Chang. 2014. Provisional checklist of vascular plants for the Korea peninsula flora (KPF). Designpost, Paju. Korea. pp. 60-62.
- Chen, S., H. Yao, J. Han, C. Liu, J. Song, L. Shi, Y. Zhu, X. Ma, T. Gao, X. Pang, K. Luo, Y. Li, X. Jia, Y. Lin and C. Leon. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE* 5(1): e8613.
- China Plant BOL Group, D.Z. Li, L.M. Gao, H.T. Li, H. Wang, X.J. Ge, J.Q. Liu, Z.D. Chen, S.L. Zhou, S.L. Chen, J.B. Yang, C.X. Fu, C.X. Zeng, H.F. Yan, Y.J. Zhu, Y.S. Sun, S.Y. Chen, L. Zhao, K. Wang, T. Yang and G.W. Duan. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *PNASU.* 108(49):19641-19646.
- Farris, J.S., M. Källersjö, A.G. Kluge and C. Bult. 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10:315-319.
- 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. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4):783-791.

- Gusman, G. and L. Gusman. 2002. The Genus *Arisaema*: A Monograph for Botanists and Nature Lovers. A.R.G. Gantner Verlag K.G., Ruggell, Liechtenstein. pp. 1-438.
- Han, J.W., S.G. Yang, H.J. Kim, C.G. Jang, J.M. Park and S.H. Kang. 2011. Phylogenetic study of Korean *Chrysosplenium* based on nrDNA ITS sequences. Korean J. Plant Res. 24(4): 358-369 (in Korean).
- Hayashi, H., N. Hosono, M. Kondo, N. Hiraoka, Y. Ikeshiro, M. Shibano, G. Kusano, H. Yamamoto, T. Tanaka and K. Inoue. 2000. Phylogenetic relationship of six *Glycyrrhiza* species based on *rbcL* Sequences and chemical constituents. Biol. Pharm. Bull. 23(5):602-606.
- Hong, J.K., J.C. Ynag, S.H. Oh, and Y.M. Lee. 2014. Molecular phylogenetic study of section *Sabina* (Genus *Juniperus*) in Korea based on chloroplast DNA *matK* and *psbA-trnH* sequences data. Korean J. Pl. Taxon. 44(1):51-58 (in Korean).
- Jung, Y.H., E.Y. Song, S.J. Chun, K.C. Jang, M. Kim, S.H. Kang and S.C. Kim. 2004. Phylogenetic analysis of plastid *trnL-trnF* sequence from *Arisaema* species (Araceae) in Korea. Euphytica 138:81-88.
- Kato, H., K. Oginuma, Z. Gu, B. Hammel and H. Tobe. 1998. Phylogenetic relationships of Betulaceae based on *matK* sequences with particular reference to the positions of *Ostryopsis*. Acta Phytotax. Geobot. 49:89-97.
- Kim, H.S., K.T. Park and S.J. Park. 2016. Molecular phylogenetic study of Korean *Hydrangea* L.. Korean J. Plant Res. 29(4): 407-418 (in Korean).
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. J. Mol. Evol. 6:111-120.
- Ko, S.C. 2000. Monographs on Korean Vascular Plants I. Academy Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 259-284 (in Korean).
- _____. 2007. Araceae. In The Genera of Vascular Plants of Korea. Flora of Editorial Committee (eds.), Academy Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 1091-1093.
- Ko, S.C. and Y.S. Kim. 1985. A taxonomic study on genus *Arisaema* in Korea. Korean J. Pl. Taxon. 15:67-109.
- Ko, S.C., S.L. O'Kane, Jr. and B.A. Schaal. 1993. Intraspecific taxonomy and comparisons of NrDNA ITS-2 sequences of *Arisaema ringens* (Araceae). Rhodora 95(883/884):254-260.
- Ko, S.C., B.U. Oh, H.S. Lee and Y.S. Kim. 1990. A phylogenetic study of *Arisaema* by anatomical and palynological characters (I). -Anatomical characters. Korean J. Pl. Taxon. 20:9-35 (in Korean).
- Ko, S.C., D.B. Lee, Y.H. Shin and K.H. Tae. 2006. *Arisaema thunbergii* subsp. *geomundoense* S.C. Ko (Araceae), a new subspecies from Korea. Korean J. Pl. Taxon. 36:209-216.
- Ko, S.C., K.H. Tae, T.O. Kwon and Y.S. Kim. 1987. A cytotoxic study on some species of *Arisaema*. Korean J. Pl. Taxon. 17:189-205 (in Korean).
- Korea Institute of Oriental Medicine. 2017. Defining Dictionary for Medicinal Herbs. Retrived. Jul. 1, 2017, from <http://boncho.kiom.re.kr/codex/> (in Korean).
- Kumar S., Stecher G. and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33:1870-1874.
- Lee, J.S. and B.M. Kim. 2005. Analysis of genetic relationship among *Arisaema* Species using RAPD. Korean J. Hortic. Sci. Technol. 23:459-464 (in Korean).
- Lee, T.B. 2003. Coloured Flora of Korea. Hyangmunsa, Seoul, Korea. pp. 640-643 (in Korean).
- Lee, W.T. 1996. Coloured Standard Illustrations of Korean Plants. Academy Publishing Co., Seoul, Korea. p. 446 (in Korean).
- Lee, Y.N. 2006. New Flora of Korea. Gyohaksa, Seoul, Korea. pp. 597-600 (in Korean).
- Li, H., G. Zhu and J. Murata. 2010. *Arisaema Martius*. In Wu, Z.Y., P.H. Raven and D.Y. Hong (eds.), Flora of China, Vol. 23. Science Press, Beijing, China and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, USA. pp. 43-69.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25(1):1451-1452.
- Mansion, G., G. Rosenbaum, N. Schoenenberger, G. Bacchetta, J.A. Rossell and E. Conti. 2008. Phylogenetic analysis informed by geological history supports multiple, sequential invasions of the Mediterranean basin by the angiosperm family Araceae. Syst. Biol. 57:269-285.
- Murata, J. 1984. An attempt at infrageneric classification of the genus *Arisaema* (Araceae). J. Fac. Sci. Univ. Tokyo. 12:281-336.
- Murata, J. 1990. Introduction to the plants of *Arisaema* recently recognized from Japan. Aroideana 13(1-4):34-43.
- Murata, J. 1991. The systematic position of *Arisaema nepenthoides* and *A. wattii* (Araceae). Kew Bulletin 46:119-128.
- Murata, J., S. Wu, K. Sasamura and T. Ohitoma. 2014. Comments on the taxonomic treatment of *Arisaema* (Araceae) in Flora of China. Acta Phytotax. Geobot. 65(3):161-176.
- Nakai, T. 1950. Classes, Ordines, Familiae, Subfamiliae, Tribus,

- Genera nova quae attinent ad plantas Koreanas (Supplimentum). J. Jap. Bot. 25:5-7.
- Nilsson, R.H. L. Tedersoo, K. Abarenkov, M. Ryberg, E. Kristiansson, M. Hartmann, C.L. Schoch, J.A.A. Nylander, J. Bergsten and T.M. Porter. 2012. Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences. MycoKeys. 4:37-63.
- Oh, B.U., S.C. Ko, W.P. Hong and Y.S. Kim. 1990. A phylogenetic consideration of *Arisaema* by anatomical and palynological characters II. - Palynological characters. Korean J. Pl. Taxon. 20:37-52 (In Korean).
- Park, S., H.J. Kim and S.J. Park. 2012. Molecular evolution of cpDNA *trnL-F* region in Korean *Thalictrum* L. (Ranunculaceae) and its phylogenetic relationships: Impacts of indel events. Korean J. Pl. Taxon. 42(1):13-23 (in Korean).
- Purushothaman, N., S.G. Newmaster, S. Ragupathy, N. Stalin, D. Suresh, D.R. Arunraj, G. Gnanasekaran, S.L. Vassou, D. Narasimhan and M. Parani. 2014. A tiered barcode authentication tool to differentiate medicinal *Cassia* species in India. Genet. Mol. Res. 13(2):2959-2968.
- Renner, S.S., L.B. Zhang and J. Murata. 2004. A chloroplast phylogeny of *Arisaema* (Araceae) illustrates Tertiary floristic links between Asia, North America, and East Africa. Am. J. Bot. 91(6):881-888.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.
- Satake, Y. 1982. Wild Flowers of Japan I. Herbaceous Plants (including Dwarf Subshrubs). Heibonsha, Tokyo, Japan. pp. 303.
- Stöver, B.C. and K.F. Müller. 2010. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. BMC bioinformatics 11(1):7.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts (USA).
- Techen, N., I. Parveen, Z. Pan and I.A. Khan. 2014. DNA barcoding of medicinal plant material for identification. Curr. Opin. Biotechnol. 25:103-110.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics. In PCR Protocols: A Guide to Methods and applications. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. (eds.). Academic Press, Inc., New York, USA. pp. 315-322.
- Yoo, K.P. and S.J. Park. 2012. A phylogenetic study of Korean *Carpesium* L. based on nrDNA ITS sequences. Korean J. Plant Res. 25(1):96-104 (in Korean).

(Received 13 October 2017 ; Revised 4 December 2017 ; Accepted 19 January 2018)