

ITS 염기서열에 의한 한국산 쑥속(*Artemisia* L.)의 계통분류학적 연구

이정훈¹, 박충범^{1*}, 박춘근¹, 문성기²

¹국립원예특작과학원 인삼특작부, ²경성대학교 생물학과

A phylogenetic analysis of Korean *Artemisia* L. based on ITS sequences

Jeong-Hoon Lee¹, Chung-Berm Park^{1*}, Chun-Geon Park¹, and Sung-Gi Moon²

¹Department of Herbal Crop Research NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea

²Department of Biology, Kyungsung University, Busan 608-738, Korea

Abstract - Taxa of *Artemisia* collected in Korea were constructed by molecular phylogenetic analysis based on the internal transcribed spacer(ITS) regions of nrDNA. The length of the ITS sequences aligned using the clustal X program was 636~643 bp, and the lengths of the ITS1 and ITS2 regions were 251~255 bp and 217~222 bp, respectively. The total number of variable sites was 95 for the entire sequence, and a parsimony-informative site represented an efficacious site in ITS1 rather than in ITS2. The maximum parsimony tree as calculated by the MEGA 4 program was clustered into five clades. The taxa(*A. capillaris*, *A. japonica* var. *japonica*, *A. japonica* var. *hallaisanensis*, *A. japonica* subsp. *littoricora*) degenerated ovary of clade 1 was supported as the subgenus *Dracunculus* by Ling's classification system. The results show that *A. nakaii* and *A. fukudo* were quite similar genetically(Bootstrap 99%) and that the scientific name of Korean *A. dubia* should be reconsidered. *A. sp.* distributed in Ganghwa province was grouped with *A. argyi*(Bootstrap 89%). These results suggest that the molecular techniques used in this study could be useful for the phylogenetic analysis of Korean *Artemisia* herbs having variations in their morphological characteristics.

Key words - *Artemisia* L., Phylogenetic analysis, ITS, *Dracunculus*

서 언

국화과(Asteraceae Bercht. & J. Presl)는 3아과, 10~17족(Tribe)으로 나누어지며, 지구상에 약 2,500속 30,000여종이 자생하고 있다(Cronquist, 1981). 그 중 Linnaeus에 의해 재설정된 쑥속(*Artemisia* L.)은 국화족(Anthemidea Cass.)에 속하는 가장 큰 속(Genus) 중 하나로써(Oberpreiler et al., 2003), 분류학자에 따라 세계적으로 약 200~400여종이 자생한다고 추정하고 있다(McArthur, 1981; Mabberley, 1990; Ling, 1991, 1992, 1995). 쑥속 분류군은 일년초, 월년초, 다년초, 또는 반관목으로서 식물체에 거미줄 같은 털이 밀생하며, 방향성이

있다. 잎은 호생하며, 줄기는 직립 또는 포복한다. 꽃은 수개의 작은 두상화서가 달려 원추화서 내의 총상 및 수상화서를 이루며 설상화가 없다(Fu and Hong, 1998). 주로 풍매화로 수분기작을 일으키지만 일부는 곤충 매개를 통해 수분이 이루어지는 것도 있다(Watson et al., 2002). 이러한 수분기작은 타가생식을 유도함으로써 현재까지도 비교적 새롭게 진화하고 있는 종인만큼 동정하는데 많은 어려움이 있는 분류군이다. 또한 중앙화(Central floret)는 양성화(Bisexual floret)로 임성 또는 불임성이며, 주변화(Marginal floret)는 자화(Pistillate floret)이고, 열매는 관모가 없는 수과(Achene)이다(Im, 1999).

쑥의 기원은 북아시아에서 발견된 화분화석의 첫 기록을 바탕으로 점신세(Oligocene) 또는 예오세(Lower Eocene)로 추정하며, 빙하시대 3기 후반에서, 4기에 종의 이동 및

*교신저자(E-mail) : parkcb@korea.kr

분화가 시작되어, Laurasian Continent 때 우랄산맥을 통해 유럽으로, 시베리아를 통해 북미, 태평양의 주변섬, Oceania, 남미 등으로 퍼진 뒤 각각의 환경에 맞는 종으로 분화한 것으로 추정된다(Ling, 1995). 지구상의 쑥의 분포는 수평적으로 북아시아에서 북반구의 극지방까지, 그리고 남반구의 열대 및 아열대에서 더운 사막에 이르기까지 광범위하게 분포하고 있으며, 수직적으로는 해안에서부터 해발 2000 m가 넘는 고산지역까지 다양한 환경에 적응하며 분포하고 있다(Lodari et al., 1989).

Artemisia L.의 분류는 Tournefort가 형태의 일반적인 특징으로 *Abrotanum*, *Absinthium*, *Artemisia* 3속으로 분류한 것으로부터 시작되었으며, 그 후 린네가 하나의 속인 *Artemisia*로 통합시킴으로서 쑥속(*Artemisia* L.)이 설정되었다. 그러나 Cassini(1817)는 중앙화의 불임성과 임성, 주변화의 자성(雌性) 등 꽃의 기능적 특징에 따라 쑥속을 *Artemisia*, *Oligosporus* 2속으로 설정하였으며, Candolle(1837)은 화탁모 및 중앙화의 임성 유무에 따라 *Absinthium*, *Abrotanum*, *Seriphidium*, *Dracunculus* 4절로 세분하였다. 이후 Gray(1884), Rouy(1903), Rydberg(1916), Poljakov(1961, 1995), Persson(1974) 등을 비롯한 몇몇의 분류학자들은 Sect. *Artemisia*, Sect. *Absinthium*, Sect. *Seriphidium*, Sect. *Dracunculus*, Sect. *Tridentatae* 을 아속 수준에서 하나로 합치기도 하고 다시 분리함을 시도해왔으며, 중국의 분류학자 Ling(1982, 1991, 1992, 1995)은 쑥속을 Subgen. *Artemisia*, Subgen. *Dracunculus* 의 두 아속 수준에서 분류한 후 9개의 Section을 설정하였고, *Seriphidium*은 *Artemisia* 속과는 별개로 보고 독립된 속으로 인정하였다. 이처럼 많은 학자들에 의해서 쑥속은 여러 형질적 기준에 따라 Section으로 분류하거나 Subgenus로 상향하며, 또는 새로운 Genus로 독립시키는 등 속 및 속이하 분류군의 한계에 있어서 학자 간의 의견이 매우 상이한 실정이다. 그러나, 최근 Kornkven et al.(1998), Torrell et al.(1999), Watson et al.(2002), Vallès et al.(2003) 등에 의해서 종 보존부위인 nuclear ribosomal DNA의 ITS(Internal Transcribed Spacer) 부위의 염기서열을 분석하여 쑥속 내의 Sect. *Artemisia*, Sect. *Absinthium*, Sect. *Dracunculus*, Sect. *Seriphidium*, Sect. *Tridentatae* 의 각 절(Section) 및 각 절에 속하는 분류군들을 계통분류학적 위치를 찾고자 하는 분자생물학적 연구가 수행되고 있다.

한편, 한국산 쑥속의 연구는 Nakai(1911)에 의해 꽃의 형질에 따라 3절 29분류군을 기록하였고, Mori(1922)는 한국 쑥속의 40분류군을 간단한 목록으로 정리하였다. 이후, 정(1956), 양(1968), 박(1974), 이(1980), 이(1996), 이(2006) 등이 각각 도감 및 명감에 정리한 바 있으며, 표와 최(1996), 박 등(2005) 등에 의해 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 분석을 통하여 일부 분류군에 대한 유연관계 분석이 이루어 졌고, Nam et al.(2004)은 사자발쑥, 사주아리쑥, 인진쑥 3종을 쑥속 내의 계통학적 위치를 파악하기 위한 ITS 기법을 이용한 연구를 수행하였다. 또한, Lee et al.(2006, 2008)에 의하여 한약재로 주로 이용되는 애엽 및 인진쑥을 분자적 수준에서 다른 분류군과 구분할 수 있는 SCAR(Sequence characterized amplified region) Marker를 개발하는 연구가 이루어졌다. 그러나 이러한 연구는 극히 일부 분류군에 대해서만 이루어 졌을 뿐 한국산 쑥속 식물의 분자생물학적 연구는 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 nrDNA의 ITS 염기서열의 분석을 통해 한국산 쑥속의 분류학적 문제점과 함께 종간의 유연관계를 통해 강화약쑥(*A. sp.*)을 포함한 계통분류학적 한계를 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

연구재료

본 연구에 사용된 재료는 2007년 3월부터 2009년 7월까지 한반도 남한을 중심으로 수집되었다. 수집된 개체는 농촌진흥청 인삼특작부 시험포장 및 온실에 이식하여 보존, 증식하였으며, 성숙한 개체들은 증거자료를 위해 석엽표본으로 제작하여 농촌진흥청 국립원예특작과학원의 Korea Medicinal Herbarium에 보관하였다. 연구에 사용된 자료의 정보는 Table 1과 같으며, *A. absinthium*은 국내종은 아니지만 Sect. *Absinthium*의 검정을 위해 이용되어졌다.

DNA 추출

DNA 추출은 각 지역에서 채집한 식물체의 생엽을 사용하였으며, 증류수로 잎을 세척하고, 물기를 제거한 후에 -70°C의 초저온 냉동고에 보관하였다. 냉동 보관된 재료를 액체 질소로 급속 냉동을 유지한 채로 막자와 사발을 이용하여 분말 상태로 분쇄한 후, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN; USA)을 이용하여 DNA를 추출하였다. DNA 추

Table 1. Materials and collection site of *Artemisia* taxa which were used for ITS regions analysis of nrDNA

Taxa	Collection	Voucher(Herbarium)
Subgen. <i>Dracunculus</i> (Bess.) Peterm.		
Sect. <i>Dracunculus</i> Bess.		
<i>A. capillaris</i> Thunb. 사철쑥	CN: Sinduri	MPS001196(KMH)
<i>A. japonica</i> var. <i>japonica</i> 제비쑥	GW: Daekwanyeong	MPS001221(KMH)
<i>A. japonica</i> var. <i>hallaisanensis</i> (Nakai) Kitam. 섬쑥	JJ: Mt. Halla	1129968(KH)
<i>A. japonica</i> subsp. <i>littoricora</i> (Nakai) Kitam. 갯제비쑥	GB: Ulleunggun	MPS002481(KMH)
Subgen. <i>Artemisia</i>		
Sect. <i>Abrotanum</i> Bess.		
<i>A. annua</i> L. 개똥쑥	CB: Eumseong	MPS001818(KMH)
<i>A. caruifolia</i> Buch.-Ham. ex Roxb. 개사철쑥	SE: Nanji	MPS002206(KMH)
<i>A. fukudo</i> Makino 큰비쑥	GG: Wolgot	MPS001340(KMH)
<i>A. gmelinii</i> Weber ex Stechm. 더위지기	GW: Mt. Odae	MPS001219(KMH)
<i>A. keiskeana</i> Miq. 맑은대쑥	GN: Mt. Geumwon	MPS001232(KMH)
Sect. <i>Artemisia</i>		
<i>A. argyi</i> H.Lév. et Vanot 황해쑥	GG: Wolgot	MPS001378(KMH)
<i>A. feddei</i> H.Lév. et Vanot 뽕쑥	GW: Doil-ri	MPS001208(KMH)
<i>A. indica</i> Willd. 쑥	BU: Mt. Hwangryeong	MPS001325(KMH)
<i>A. lavandulaefolia</i> DC. 참쑥	GG: Hantan river	MPS001198(KMH)
<i>A. montana</i> (Nakai) Pamp. 산쑥	GB: Ulleunggun	MPS002482(KMH)
<i>A. rubripes</i> Nakai 덩불쑥	SE: Nanji	MPS001257(KMH)
<i>A. selengensis</i> Turcz. ex Besser 물쑥	GG: Hantan river	MPS001338(KMH)
<i>A. stolonifera</i> (Maxim) Kom. 넓은잎외잎쑥	CN: Chullipo	MPS001276(KMH)
<i>A. sp.</i> * 강화약쑥	GG: Ganghwado	MPS001331(KMH)
Sect. <i>Absinthium</i> DC.		
<i>A. absinthium</i> L.	NIHHS	MPS001346(KMH)
<i>A. nakaii</i> Pamp. 애기비쑥	GG: Wolgot	MPS001769(KMH)
<i>A. sieversiana</i> Ehrh. ex Willd. 산흰쑥	SE: Nanji	MPS001270(KMH)

BU: Busan, CB: Chungcheongbuk-do, CN: Chungcheongnam-do, GB: Gyeongsangbuk-do, GG: Gyeonggi-do, GN: Gyeongsangnam-do, GW: Gangwon-do, JJ: Jeju-do, SE: Seoul, NIHHS: National Institute of Horticultural and Herbal Science, KMH: Korea Medicinal Herbarium. Samples marked with asterisk was collected in Ganghwa Agricultural Technology Service Center for analysis of ITS region.

출을 위한 재료의 양은 100~150 mg을 사용하였으며, 추출 방법은 제조사의 Manual에 따라 수행하였다. 추출된 DNA는 1.2% Agarose gel에 표준 DNA와 함께 전기 영동하여 EtBr 염색법으로 UV 조명아래서 형광 밝기를 상대 비교하여 농도를 측정하였다. 각각의 최종 DNA 농도는 멸균된 증류수를 이용하여 5 ng/μl 로 조정하였다.

ITS regions의 PCR 증폭

핵 Ribosomal DNA의 ITS1, ITS2 및 5.8S 부위(Fig. 1)에 대한 PCR 증폭 산물을 얻기 위하여 18S rDNA 부위에서 제작된 ITSF(5'-GTCCACTGAACCTTATCATT-3'; Kim et al., 2007)와 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; White et al., 1990) 조합을 이용하였다(Taberlet et al.,

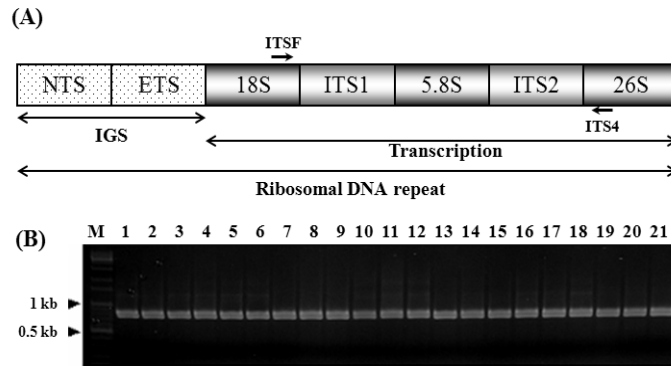


Fig. 1. (A) A diagram of the nuclear internal transcribed spacer. Arrows indicate the positions and directions of the primers used for ITS PCR. (B) PCR amplification of *Artemisia* species on 1.2% agarose gel. Lane M is 1 kbp plus 100 bp Marker(Elpos Biotech, Korea).

1991). ITS region의 증폭을 위한 PCR 반응액은 주형 DNA 20 ng, 각각의 0.25 mM dNTP, 75 mM Tris-HCl(pH 9.0), 15 mM의 (NH₄)₂SO₄, BSA(100 ug/ml), 2.5 mM의 MgCl₂, 각각의 primer 0.4 uM, 0.5 U의 *Taq* polymerase (Neurotics, Korea)를 첨가하여 총 부피가 50 µl가 되도록 멸균된 증류수로 조정하였다. ITS region의 PCR 반응은 다음의 조건하에서 이루어졌다. 95°C에서 5분간 초기 Denaturation을 한 후, 40회의 반복으로 95°C에서 30초간 Denaturation, 55°C에서 30초간 Annealing, 그리고 72°C에서 1분간 Extension을 진행하였으며, 마지막으로 72°C에서 10분간 최종 Extension을 실행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.2% Agarose gel에서 전기영동 하였으며, Ethidium bromide(EtBr)에 염색한 후 UV상에서 분석하였다. Agarose gel에서 확인된 PCR 산물을 AccuPrep® Gel Purification Kit(Bioneer, Korea)을 이용하여 정제하였으며, (주) 솔젠트에 염기서열 결정을 의뢰하였다.

nrDNA ITS regions 염기서열의 계통학적 분석

ITS region의 염기서열은 Bioedit(Hall, 1999)을 이용하여 편집하였고, no gap으로 저장한 후 Clustal X(Thompson et al., 1997)로 정렬하였다. 정렬 결과 발생한 gap은 결여형질(Missing character)로 처리하여 모든 형질에는 같은 가중치를 부여하였다. 계통학적 분석은 MEGA 4(Tamura et al., 2007)을 이용하였고, 분계도 작성의 유전적 거리 계산은 Kimura-2 parameter (Kimura, 1980)를 이용하였으며, Maximum parsimony (MP)기법으로 분계도를 작성하였다. 각 분계도의 지지

정도를 알아보기 위하여 Bootstrap을 이용하였으며, 무작위로 1000회 반복하였다(Felsenstein, 1985).

결 과

한국산 쑥속 분류군의 ITS1, ITS2 및 5.8S 부위의 PCR 결과 Agarose gel에서 약 750 bp의 단일 band를 확인하였다(Fig. 1(B)). 이들 PCR 산물의 염기서열은 Clustal X를 이용하여 정렬되었으며, 정렬된 염기서열의 총 길이는 635~643 bp로 나타났다. ITS1과 ITS2 부위의 길이는 각각 251~255 bp와 217~222 bp로 나타났으며, 5.8S 부위는 167 bp로 동일하였다(Table 2). ITS1과 ITS2 부위에서의 염기 변이를 보이는 site는 95개로 나타났으며, 그 중 72개의 염기가 계통학적으로 유효한 것으로 나타났다. 95개의 변이를 보이는 site 중 60개의 염기가 ITS1에 존재하였고, 35개의 염기는 ITS2에 존재하였다. 계통학적으로 유효한 site는 ITS1에서 47개, ITS2에서 25개의 염기가 유효한 것으로 나타나, ITS1이 ITS2에서보다 다양한 종 분화의 변이가 발생하는 것으로 나타났다. 또한, Nuclear의 ribosomal DNA는 일반적으로 Genome에서 다중 반복의 Cistron(18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA-ITS2-26S rRNA)으로 존재하며(Wen and Zimmer, 1996), 3개의 rRNA를 coding하는 부위는 매우 보존적으로 존재하는 반면, 식물계의 종 수준에서 ITS1과 ITS2 부위의 염기서열의 상동성은 극히 적으므로, 쑥속 식물에서도 각각의 분류군으로의 분화에 있어서, ITS1과 ITS2 부위의 변이 양상과 유사한 방향을 형성하고 있음을 알 수 있다(Koo et al., 2007).

Table 2. Variation size in ITS regions of *Artemisia* spp. collected in Korea

Taxa	ITS1	5.8S	ITS2	ITS1+ITS2
<i>A. absinthium</i>	252	167	217	469
<i>A. annua</i>	254	167	219	473
<i>A. argyi</i>	253	167	219	472
<i>A. capillaris</i>	251	167	220	471
<i>A. caruifolia</i>	251	167	218	469
<i>A. feddei</i>	255	167	219	474
<i>A. fukudo</i>	253	167	219	472
<i>A. gmelinii</i>	253	167	219	472
<i>A. indica</i>	253	167	219	472
<i>A. japonica</i> var. <i>japonica</i>	251	167	220	471
<i>A. japonica</i> var. <i>hallaisanensis</i>	251	167	220	471
<i>A. japonica</i> subsp. <i>littoricora</i>	251	167	221	472
<i>A. keiskeana</i>	251	167	218	469
<i>A. lavandulaefolia</i>	253	167	219	472
<i>A. montana</i>	253	167	222	475
<i>A. nakaii</i>	253	167	219	472
<i>A. rubripes</i>	253	167	219	472
<i>A. selengensis</i>	253	167	219	472
<i>A. sieversiana</i>	254	167	222	476
<i>A. stolonifera</i>	253	167	219	472
<i>A. sp.</i>	253	167	219	472
Min	251	167	217	468
Max	255	167	222	476
P/V	47/60	0	25/35	72/95

V: Variable site.

P: Parsimonious informative site.

또한, 염기서열 분기 값(Sequence divergency)을 Kimura-2 parameter 방법으로 계산한 결과 황해쑥(*A. argyi*)과 강화약쑥(*A. sp.*), 큰비쑥(*A. fukudo*)과 애기비쑥(*A. nakaii*), 제비쑥(*A. japonica* var. *japonica*)과 섬쑥(*A. japonica* var. *hallaisanensis*)에서 0으로 염기서열의 다양성 정도가 가장 낮았으며, 염기의 구성이 거의 동일한 것으로 나타났다. 그러나, 갯제비쑥(*A. japonica* subsp. *littoricora*)은 염기서열 분기 값이 큰비쑥 및 애기비쑥과 0.11로 나타나 가장 높은 분기를 보였다(Table 3).

한편, 염기서열이 확정된 분류군을 Mega 4 프로그램을 통해 형태적 형질이 가장 잘 반영된 Maximum-parsimony

tree를 얻었으며, CI(Consistency Index) 0.714, RI(Retention Index) 0.834, RCI(Rescaled Consistency Index) 0.596로 산출되었다. 그 결과 쑥속 내에 5개의 Clade를 형성하였다(Fig. 2). Clade 1(Bootstrap value 99%)은 사철쑥(*A. capillaris*), 제비쑥, 섬쑥, 갯제비쑥의 4분류군이, Clade 2(Bootstrap value 71%)는 맑은대쑥(*A. keiskeana*), 개사철쑥(*A. caruifolia*)의 2분류군이, Clade 3(Bootstrap value 74%)은 산흰쑥(*A. sieversiana*), *A. absinthium*, 더위지기(*A. gmelinii*), 개똥쑥(*A. annua*), 큰비쑥, 애기비쑥의 6분류군이, Clade 4(Bootstrap value 78%)는 물쑥(*A. selengensis*)의 1분류군이, Clade 5

Table 3. Estimates of pairwise divergency between ITS sequences of *Artemisia* plants by Kimura-2 parameter

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 <i>A. abinthium</i>	-																				
2 <i>A. annua</i>	0.046	-																			
3 <i>A. argyi</i>	0.041	0.063	-																		
4 <i>A. capillaris</i>	0.091	0.094	0.090	-																	
5 <i>A. caruifolia</i>	0.068	0.086	0.075	0.086	-																
6 <i>A. nakaii</i>	0.051	0.020	0.068	0.105	0.087	-															
7 <i>A. feddei</i>	0.034	0.051	0.016	0.080	0.066	0.056	-														
8 <i>A. fukudo</i>	0.051	0.020	0.068	0.105	0.087	0.000	0.056	-													
9 <i>A. gmelinii</i>	0.044	0.044	0.060	0.091	0.086	0.051	0.048	0.051	-												
10 <i>A. indica</i>	0.039	0.055	0.020	0.090	0.075	0.061	0.009	0.061	0.053	-											
11 <i>A. japonica</i> var. <i>japonica</i>	0.091	0.094	0.090	0.002	0.083	0.105	0.080	0.105	0.091	0.090	-										
12 <i>A. japonica</i> var. <i>hallaisanensis</i>	0.091	0.094	0.090	0.002	0.083	0.105	0.080	0.105	0.091	0.090	0.000	-									
13 <i>A. japonica</i> subsp. <i>littonicora</i>	0.096	0.099	0.095	0.007	0.088	0.111	0.085	0.111	0.096	0.095	0.004	0.004	-								
14 <i>A. keiskeana</i>	0.053	0.071	0.070	0.068	0.046	0.076	0.060	0.076	0.070	0.070	0.065	0.065	0.070	-							
15 <i>A. lavandulaefolia</i>	0.036	0.058	0.004	0.085	0.070	0.063	0.011	0.063	0.055	0.016	0.085	0.085	0.090	0.065	-						
16 <i>A. montana</i>	0.036	0.053	0.013	0.080	0.066	0.058	0.002	0.058	0.050	0.011	0.080	0.080	0.085	0.060	0.009	-					
17 <i>A. rubripes</i>	0.039	0.060	0.018	0.090	0.075	0.066	0.011	0.066	0.058	0.020	0.090	0.090	0.096	0.070	0.018	0.013	-				
18 <i>A. selengensis</i>	0.053	0.080	0.048	0.080	0.091	0.083	0.041	0.083	0.065	0.050	0.080	0.080	0.085	0.080	0.043	0.043	0.046	-			
19 <i>A. sieversiana</i>	0.023	0.054	0.051	0.093	0.076	0.054	0.043	0.054	0.044	0.048	0.093	0.093	0.099	0.058	0.046	0.046	0.048	0.060	-		
20 <i>A. stolonifera</i>	0.036	0.053	0.013	0.085	0.070	0.058	0.007	0.058	0.050	0.007	0.085	0.085	0.090	0.065	0.009	0.004	0.018	0.048	0.046	-	
21 <i>A. sp.</i>	0.041	0.063	0.000	0.090	0.075	0.068	0.016	0.068	0.060	0.020	0.090	0.090	0.095	0.070	0.004	0.013	0.018	0.048	0.051	0.013	-

(Bootstrap value 80%)는 쑥(*A. indica*), 넓은잎외잎쑥(*A. stolonifera*), 참쑥(*A. lavandulaefolia*), 황해쑥, 뽕쑥(*A. feddei*), 덩불쑥(*A. rubripes*), 강화약쑥(*A. sp.*)의 8 분류군이 하나의 Clade를 형성하였다.

고 찰

한국의 쑥속 식물종 인진(茵陳; 사철쑥, 더위지기), 애엽(艾葉; 쑥, 산쑥, 황해쑥), 청호(菁蒿; 개똥쑥, 개사철쑥), 암려(菴藪; 맑은대쑥) 등은 오랫동안 민간요법 및 한약재로 사용해 왔으며(정과 신, 1990; 문, 1984), 오늘날에는 향수, 향신료 등의 산업생산 및 소재원료로 이용되고 있다. 또한, 항말라리아, 항암, 항염증, 항동맥경화 등 의약적 효능을 과학적인 방법을 통해 입증되었다(인천시 강화군, 2007). 그러나, 광범위하고 다양한 산업분야에서 응용되고 있는 쑥속 분류군들은 형태적 변이의 폭이 연속적이므로 동정 및 분류하는데 다소 어려움이 있을 뿐 아니라 약초 및 기능성 소재로 개발하는데 한계가 있다. 따라서, 본 연구는 수집된 각 분류군들을 토대로 nrDNA의 ITS 부위의 분자 수준의 연구를 통하여 계통학적 분석을 시도하였다.

ITS 부위의 계통학적 분석(MP tree)에서 Clade 1의 사

철쑥, 제비쑥, 섬쑥, 갯제비쑥 등 4분류군은 쑥속 분류군들 중 가장 먼저 분기되었으며, 자매군들과 각각 다르게 수렴진화(Convergent evolution)한 것으로 판단된다(Vallès et al., 2003). Clade 1의 분류군 특징은 중앙화의 자방이 공통적으로 퇴화되었으며, 이러한 특징에 의해 Watson et al.(2002), 및 Vallès et al.(2003) 등은 Clade 1의 분류군들을 Subgen. *Dracunculus*으로 취급하고 있다. 또한, Ling(1992)은 *Artemisia* L.내에 Subgen. *Artemisia*, Subgen. *Dracunculus*로 설정하고 있으며, 본 연구의 결과에서도 한국산 쑥속을 2아속(Subgen. *Artemisia*, Subgen. *Dracunculus*)으로 설정하는 것이 타당하다고 여겨진다.

쑥속 분류군중 화탁에 백색모가 존재하는 특징에 의해 독립적인 Sect. *Absinthium*로 분류되고 있는 산흰쑥과 애기비쑥은 Sect. *Abrotanum*에 속하는 더위지기, 개똥쑥, 큰비쑥의 분류군과 유집됨으로써 Sect. *Absinthium*에 속하는 분류군이 Sect. *Abrotanum*에 속하는 분류군과 근연관계에 있는 것으로 나타났다. 또한, Sect. *Abrotanum*에 속하는 개사철쑥과 맑은대쑥이 하나의 Clade를 형성하지 못함으로써 Kitamura(1939)가 쑥속 분류군을 두화의 형태적 특징에 따라 3절로 분류한 결과와는 다소 상이한 견

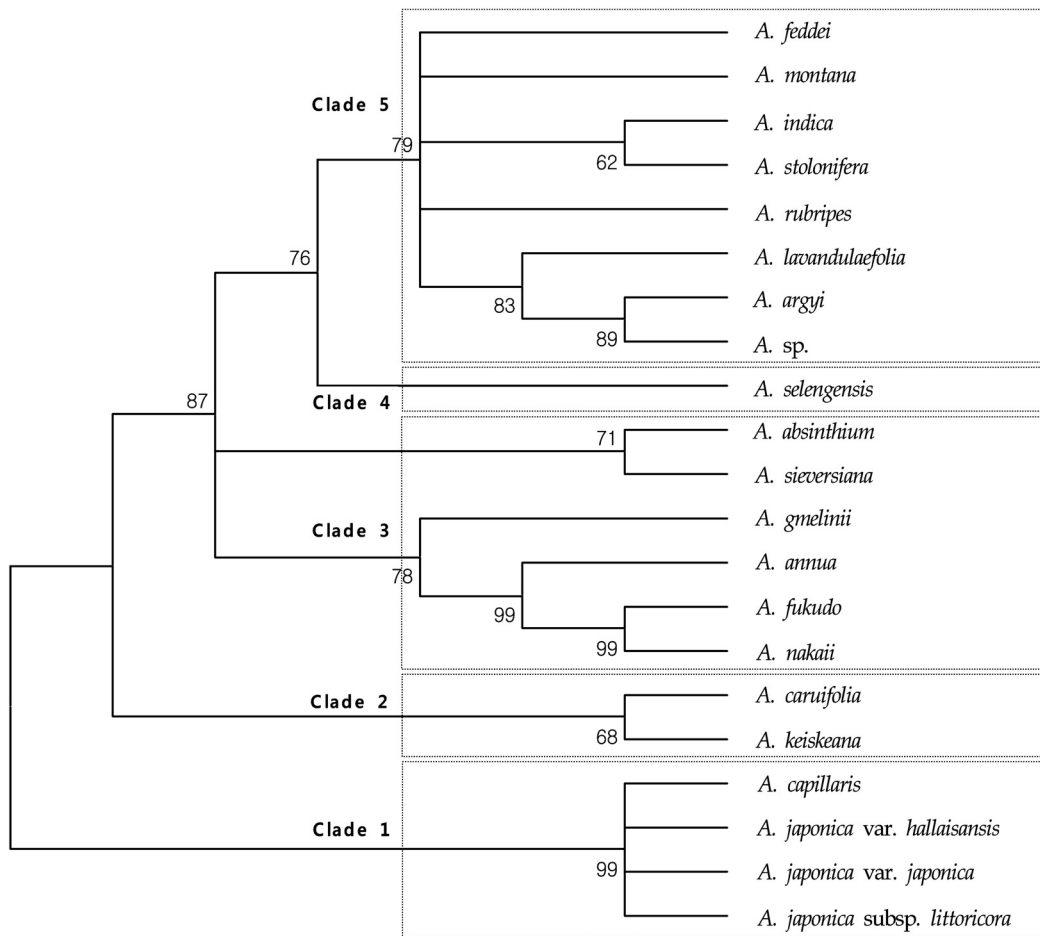


Fig. 2. Maximum parsimony (MP) tree of ITS sequences of 21 taxa. Bootstrap (1000 replicates) values are found above branches (50%). The MP tree was obtained using the Close-Neighbor-Interchange algorithm with search level 3.

해를 보이며, *Abrotanum*절 내의 유전적 및 형태적 다양성을 인정하는 결과로 나타났다. 한편, 산흰쑥이 *Absinthium*절에 속하는 *A. absinthium*과 높은 상동성을 형성하였으나(Bootstrap value 86%), 애기비쑥과는 상이성을 보였으며, ITS 염기서열분석에서 화탁모가 존재하는 애기비쑥은 큰비쑥과 99%의 Bootstrap value로 거의 동일한 유전적 정보를 제시함으로써 형태적으로 서로 다른 Section임에도 두 분류군은 다소 높은 유전적 근연 관계가 높은 것으로 확인되었다. 그러나, 본 연구자는 Phylogenetic analysis 결과로 애기비쑥이 *A. fauriei* Nakai 인지는 알 수 없지만, 수집당시 본 분류군의 집단들이 화탁모가 관찰되었으나, 수집된 개체를 모본으로 파종한 개체들은 화탁모의 존재가 있거나 또는 없기도 하여 Kitamura(1940)가 제안한 *A. fukudo* Makino와 *A. nakaii* Pamp.의 교잡종인 *A. fauriei* Nakai일 가능성이 추측된다.

본 연구에서 Sect. *Artemisia*에 속하는 분류군들은 대부분 하나의 분계조(Clade 5)로 형성되었지만, 물쑥은 독립된 Clade를 형성함으로써 Sect. *Artemisia* 내에 근연 분류군과 형태 및 생태학적 차이로 인해 다소 이질적인 집단으로 표현된 것으로 판단된다. 한편, 한국산 참쑥은 정(1956)과 이(1980)에 의해 각각 *A. mongolica* var. *tenuifolia*와 *A. lavandulaefolia*로 기록하였으며, 이(1996)는 *A. lavandulaefolia*를 *A. dubia*의 이명으로 처리하였다. 또한, 임(1999)은 *A. mongolica*을 참쑥으로 표기하고 있다. 그러나, Kitamura(1940)는 *A. conocephala*를 *A. lavandulaefolia*의 이명으로 처리하고 있고, Iwatsuki(1995)는 *A. lavandulaefolia*와 *A. dubia*를 *A. conocephala*의 이명으로 처리하였다. 하지만, Ling(1987)은 Kew에서 isotype을 통해 *A. dubia*를 중앙화의 자방이 퇴화된 형질적 특징을 확인한 후 Subgen. *Dracunculus*의 하위 분류

군으로 정리하였다. 그러므로, 현재 혼용되고 있는 한국산 참쑥의 학명은 재고 되어야하며, 명확한 분류군을 설정할 수 있는 심층적인 연구가 필요하다.

한국에서 기능성과 약효 등을 입증하였으나 학명의 기원이 모호하여 국제적 약용자원으로써 제한이 있는 강화약쑥(*A. sp.*)은 Clade 5에 속하였으며, 황해쑥과 가장 가까운 유연관계를 보였다(Fig. 2). 이러한 ITS Phylogenetic analysis 통한 결과로 볼 때, 강화약쑥은 계통학적으로 쑥속 내에 Sect. *Artemisia*로 분류되어졌다. 그러나, 강화약쑥의 학명의 기원은 강화군 농업기술센터에서 선발되어 재배되는 개체와 강화도 내에 강화약쑥을 재배하는 농가들의 개체들을 수집하여 형태학적, 분자생물학적으로 분석을 통해 정확한 분류학적 연구가 필요할 것으로 판단된다.

이상의 연구 결과를 종합해볼 때, 한국의 쑥속은 현재 까지도 계속적인 분화과정에 있어 분류군간의 형태적 형질의 변이가 다소 연속적으로 나타남으로써 DNA 염기서열에 기초한 분자계통학적 연구가 유용한 방법으로 판단된다. 또한, 본 ITS 연구결과는 한국산 쑥속의 계통분류를 이해하는데 유용한 형질로 기여할 것으로 기대된다. 그러나 한국산 쑥속의 계통분류학적 연구는 일본 및 중국의 분류군들을 포함한 비교 연구와 족(Tribe) 수준에서의 연구를 통해 한국의 쑥속 분류군들에 대하여 보다 심층적인 계통 및 진화적 고찰이 필요할 것으로 사료된다.

적 요

한국산 쑥속 분류군의 계통분류학적 연구를 위해 Nuclear ribosome DNA의 ITS 염기서열 분석을 실시하였다. 정렬된 염기의 총 길이는 635~643 bp이며, ITS1과 ITS2 부위의 길이는 각각 251~255 bp와 217~222 bp로 나타났다. 염기서열 변이를 보이는 site는 95개로 확인되었다. 그 중 ITS1이 35개, ITS2가 26개로 총 72개의 site가 계통학적으로 유효한 것으로 나타남으로써 ITS1이 ITS2보다 종 분화의 변이가 다양하게 발생하는 것으로 확인되었다. ITS 염기서열을 기초한 계통학적 분석은 쑥속 내에 5개의 Clade를 형성하였다. 그 결과 자방이 퇴화된 분류군들(사철쑥, 제비쑥, 섬쑥, 갯제비쑥)이 하나의 분계조(Clade 1)를 형성함으로써 아속 수준(Subgen. *Dracunculus*)으로 취급되는 결과를 뒷받침 하였다. 애기비쑥과 큰비쑥은 거의 동일한 유전적 정보를 보였으며(Bootstrap 99%), 한국산 참쑥의

학명은 재고 되어야할 것으로 사료된다. 또한, 강화약쑥(*A. sp.*)은 황해쑥과 매우 가까운 상동성을 보였다(Bootstrap 89%). 따라서, 형태적 형질의 변이가 다소 연속적인 쑥속은 DNA 염기서열에 기초한 분자계통학적 연구가 유용한 방법으로 판단되며, 본 ITS 연구결과는 한국산 쑥속의 계통분류를 이해하는데 유용한 형질로 기여할 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 2009년도 농촌진흥청 국립원예특작과학원 박사후 연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

Candolle, A.P.De. 1837. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis pars VI*. Treuttel et Wurtz, Paris.

Cassini, A.H.G. 1817. *Aperçu des genres formés par M. Cassini dans la famille des Synantherées. Troisième fasciule*. Bull. Sci. Soc. Philom. Paris. 3: 31-34.

Chung, T.H. 1956. *Korean Flora 2*. Sinjisa, Seoul(in Korean).

Cronquist, A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia university Press. New York.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783-791.

Fu, L.K. and T. Hong. 1998. *Higher plants of China*. Qingdao Publishing House, Qingdao.(in Chinese).

Gray, A. 1884. *Caprifoliaceae to Compositae*, In *Synoptical flora of North America*. Am. Book Co., New York.

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.

Im, R.J. 1999. *Flora coreana 7*. The Science and Technology Publishing House, Pyongyang.(in Korean).

Incheon metropolitan city Ganghwa couty. 2007. *Artemisia princeps* in Ganghwa. Academy Press, Seoul.(in Korean).

Iwatsuki, K., T. Yamazaki, D. E. Boufford and H. Ohba. 1995. *Flora of Japan 3b*. Kodansha, Tokyo.

Jung, B.B. and M.K. Shin. 1990. *An unabridged dictionary of a herb medicine*. Younglimsa, Seoul.(in Korean).

Kim, O.T., K.H. Bang, D.S. IN, J.W. Lee, Y.C. Kim, Y.S. Shin, D.Y. Hyun, S.S. Lee, S.W. Cha and N.S. Seong. 2007. Molecular authentication of ginseng cultivars by comparison of internal transcribed spacer and 5.8S rDNA

- sequences. *Plant Biotechnol. Rep.* 1(3): 163-167.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution.* 16: 111-120.
- Kitamura, S. 1939. A classification of *Artemisia*. *Acta Phytotax. Geobot.* 8: 62-66.(in Japanese).
- Kitamura, S. 1940. *Compositae japonicae. Pars secunda.* Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B. 15(3): 376-436. (in Japanese).
- Koo, J.K., M.S. Chae, J.K. Lee and S.S. Whang. 2007. Analysis of ITS DNA sequences of Korean *Oxalis* species(Oxalidaceae). *Korean J. Taxon* 37(4): 419-430.(in Korean).
- Kornkven, A.B., L.E. Waton and J.R. Estes. 1998. Phylogenetic analysis of *Artemisia* section *Tridentatae*(Asteraceae) based on sequences from the internal transcribed spacers(ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Amer. J. Bot.* 85(12): 1787-1795.
- Lee M.Y., E.J. Doh, C.H. Park, Y.H. Kim, E.S. Kim, B.S. Ko and S.E. Oh. 2006. Development of SCAR marker for discrimination of *Artemisia princeps* and *A. argyi* from other *Artemisia* herbs. *Biol. Pharm. Bull.* 29(4): 629-633.
- Lee M.Y., E.J. Doh, E.S. Kim, Y.W. Kim, B.S. Ko and S.E. Oh. 2008. Application of the multiplex PCR method for discrimination of *Artemisia iwayomogi* from other *Artemisia* herbs. *Biol. Pharm. Bull.* 31(4): 685-690.
- Lee, T.B. 1980. *Illustration flora of Korea.* Hyangmunsa, Seoul.(in Korean).
- Lee, W.T. 1996. *Lineamenta florum Koreae.* Academy Press, Seoul.(in Korean).
- Lee, Y.N. 2006. *Flora of Korea.* Gyohaksa, Seoul.(in Korean).
- Ling, Y.R. 1982. On the system of the genus *Artemisia* Linn. and the relationship with its allies. *Bull. Bot. Res.* 2(2): 1-60.
- Ling, Y.R. 1987. On the status of *Artemisia dubia* Wall. ex Bess. and *A. myriantha* Wall. ex Bess.(Compositae). *Kew Bullutin.* 42(2): 443-448.
- Ling, Y.R. 1991. A review of the classification, distribution and application of *Artemisia* L. and *Seriphidium*(Bess.) Poljak.(Compositae) in China. *Guihaia.* 11(1): 19-35.
- Ling, Y.R., 1992, The old world *Artemisia*(Compositae), *Bull. Bot. Res., Harbin,* 12(1): 1-108.
- Ling, Y.R. 1995. The new world *Artemisia* L. In Hind D.J.N., C. Jeffrey and G.V. Pope(eds.) *Advances in Compositae systematics.* Kew. pp. 255-281.
- Lodari, C., K. Hattori and Y. Futsuhara. 1989. Morphological difference on leaf surface and pollen grains in genus *Artemisia*. *Japan J. Breed.* 39: 9-14.
- Mabberley D. J., 1990, *The plant-book second edition.* Cambridge university Press, Cambridge.
- McArthur, E.D., C.L. Pope and D.C. Freeman. 1981. Chromosomal studies of subgenus *Tridentatae* of *Artemisia*: evidence for autopolyploidy, *Amer. J. Bot.* 68: 589-605.
- Moon, K.S. 1984. *Component and use of medicinal herbs.* Ilwol Press, Seoul.(in Korean).
- Mori, T., 1922, *An enumeration of plants hitherto known from Corea, The government of Chosen,* Seoul.
- Nakai, T. 1911. *Flora Koreana (2).* J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo 2: 27-33.
- Nam, H.Y., B.R. Kim and Y.J. Chang. 2004. Phylogenetic analysis of Korean mugworts based on internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA. *Agric. Chem. Biotechnol.* 47(4): 181-184.
- Oberpreiler, C., R. Vogt and L. Watson. 2003. Tribe Anthemideae, In J Kadereit(ed.) *Families and genera of vascular plants.* Springer-Verlag. Press, Berlin.
- Park, M.K. 1974. *Key to the herbaceous plant in Korea.* Jeongeumsa, Seoul.(in Korean).
- Park, S.K., B.H. Chung, H.S. Kim and Y.G. Cho. 2005. Classification of *Artemisia* spp. collections based on morphological characters and RAPD analysis. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13(6): 278-286.(in Korean).
- Persson, K. 1974. Biosystematic studies in the *Artemisia maritima* complex in Europe. *Opera Bot.* 35: 1-188.
- Poljakov, P.P. 1961. *Materialy k sistematike roda polyn' - Artemisia L., Trudy Inst. Bot. Akad. Nauk Kazahsk. S.S.R.* 11: 134-177.
- Poljakov, P.P. 1995. *Artemisia* L. In Komarov V.L.(ed.) *Flora of the U.S.S.R.* 26: 488-722.
- Pyo, H.J. and K.S. Choi. 1996. Analysis of genetic polymorphism among six Korean wild *Artemisia* spp. by using RAPD method. *Jour. Agri. Sci.* 23(1): 99-107.
- Rouy G., 1903, *Flore de France, 8.* Asnières, Paris & Rochefort.
- Rydberg, P.A. 1916. *Artemisia and Artemisiastrum.* N. Amer. Fl. 34: 244-285.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology.* 17:

- 1105-1109.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis(MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.
- Thompson, J.D. and T.J. Gibson. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
- Torrell, M., N. Garca-Jacas, A. Susanna and J. Vallès. 1999. Phylogeny in *Artemisia*(Asteraceae, Anthemideae) inferred from nuclear ribosomal DNA(ITS) sequences, *Taxon*. 48: 721-736.
- Vallès, J., M. Torrell, T. Garnatje, N. Garcia-Jacas, R. Vilatersana and A. Susanna. 2003. The genus *Artemisia* and its allies: phylogeny of the subtribe Artemisiina (Asteraceae, Anthenideae) based on nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). *Plant biol.* 5: 274-284.
- Watson, L., P. Bates, P. Evansx, M. Unwin and J. Estes. 2002. Molecular phylogeny of Subtribe *Artemisia*(Asteraceae), including *Artemisia* and its allied and segregate genera. *BMC Evolutionary Biology*. 2(17): 1-12.
- Wen, J. and E.A Zimmer. 1996. Phylogeny and biogeography of *Panax* L.(the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 6: 167-177.
- White, T.J., T.D. Bruns, S.B. Lee and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White(eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, London.
- Yang, I.S. 1968. Study of Korean Compositae 3. *Kyungpook Univ. Theses Coll.* 12: 105-108.(in Korean).

(접수일 2010.3.11; 수락일 2010.8.13)