

한국산 피막이속(*Hydrocotyle* L.) 식물의 분자계통학적 연구

최경수, 박선주*

영남대학교 이과대학 생명과학과

Molecular Phylogenetic Studies of Korean *Hydrocotyle* L.

Kyoung-Su Choi and SeonJoo Park*

Department of life science, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract - Phylogenetic analyses were conducted to evaluate relationships of 5 taxa of Korean *Hydrocotyle*, *H.* spp. found in the Ulleung island including one outgroup (*Centella asiatica*). The molecular phylogenetic methods based on nuclear ribosomal DNA ITS region and cpDNA *trnH-psbA* region. *Centella asiatica* was used outgroup for analysis. As the result, genus Korean *Hydrocotyle* were grouped by 94% bootstrap value. Korean *Hydrocotyle* was grouped by four clades; Clade I - *H. maritima*, *H. sibthorpioides* and *H. yabei* clade Clade II - *H. nepalensis* clade clade III - *H. ramiflora* clade clade IV - *H.* spp. clade. *H. maritima*, *H. sibthorpioides* and *H. yabei* was not distinguished, seperately. *H.* spp. was distinctly distinguished other Korean *Hydrocotyle*.

Key words - *Hydrocotyle*, Phylogenetic analysis, *H.* spp.

서 언

피막이속(*Hydrocotyle* L.)은 두릅나무과(Araliaceae), 피막이풀아속(*Hydrocotyloideae*)에 속하는 식물로 아프리카, 아메리카, 아시아, 유럽의 온대 및 아열대 지역을 중심으로 130여종이 분포하고 있다(Linnaeus, 1753). 피막이속은 잎이 작고 비슷한 형태를 나타내고 있으며, 국내외 분류학적 연구가 미비하고, 종에 대한 확실한 정보가 부족하다.

한국산 피막이속에 관한 연구로는 Paliblin(1898)이 *H. wilfordii*(선피막이) 1종을 기재한 것을 시작으로, Nakai(1914)는 *H. javanica*(큰잎피막이), *H. sibthorpioides*(피막이) 2종을 추가하여 3종을 기재하였고, 이후 Mori(1922)에 의하여 *H. wilfordii*, *H. javanica*, *H. sibthorpioides* 3종을 기재하였으며 Chung(1949)에 의하여 *H. javanica*를 제외한 2종이 보고 되었다.

Nakai(1952)는 *H. japonica*(제주피막이), *H. maritima*(선피막이), *H. nepalensis*(큰잎피막이) 및 *H. ramiflora*

(큰피막이) 4종을 기재 하였으며, Chung(1957)은 *H. sibthorpioides*, *H. wilfordii* 2종을 기재하였다. 또한 Lee and Ahn(1963)은 Nakai(1952)와 Chung(1957)이 각각 제시한 4종과 2종을 합쳐 6종을 기재 하였으며, Lee(1980)은 Nakai(1952)와 같이 4종을 기재 하였다.

Lee(1996)의 경우 *H. nepalensis*를 *H. javanica*로, *H. wilfordii*를 *H. ramiflora*로 *H. japonica*를 *H. yabei*로 이명 처리하여 *H. maritima*, *H. sibthorpioides*를 포함한 5종을 기재 하였으며, 국가표준식물목록(Korea National Arboretum and The Plant Taxonomic of Society Korea, 2007)에는 *H. maritima*, *H. nepalensis*, *H. ramiflora*, *H. sibthorpioides* 및 *H. yabei* 총 5종이 기재 되었다. 위와 같이 한국산 피막이속에 대하여는 주로 종의 열거 및 단순한 기재가 있을 뿐이다. 외부형태학적으로 피막이와 선피막이의 경우 잎 결각과 잎 상부가 사상하는 것을 선피막이, 그렇지 않은 것을 피막이라 구분하였고, 제주피막이와 선피막이의 경우 상록성이 아니지만 피막이의 경우 상록성이라고 알려져 있다(Lee, 1996). 큰피막이의 경우 화경의 길이가 엽병보다 긴 것이 특징이라고 알려져 있다. 이와 같이, 피막이속의 경우 잎의 결각, 화경과 엽병의 길이 차이,

*교신저자(E-mail) : sjpark01@ynu.ac.kr

줄기의 사상 차이 등 생식형질이 아닌 영양형질에 주로 의존하고 있는 실정이다.

최근 외부형태학적 분류의 한계점을 해결하기 위하여 분자적 자료를 이용한다. ITS 지역은 핵 DNA로 양친 유전성 (bioparental inheritance)를 가지며 유전자간의 변이성이 높은 편이어서 종간 또는 속간의 유연관계와 진화경향성 및 유전적 변이 양상을 파악하는데 중요한 자료로 이용되어 왔다(Álvarez and Wendel, 2003; Son *et al.*, 2007). 또한 모성유전을 하는 cpDNA의 non-coding 지역은 coding지역보다 빠르게 진화하며 염기치환과 같은 비율로 삽입과 결실이 축적되므로 유용한 자료로 이용되고 있다(Soltis *et al.*, 1992). 따라서 본 연구는 위와 같이 외부형태학적 형질 중 영양형질로 분류되고 있는 피막이속 종의 실제와 아울러 유연관계를 파악하고자 nrDNA의 ITS 지역, cpDNA의 *trnH-psbA* 지역을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서 사용된 재료는 2009년 6월부터 2010년 6월 까지 6분류군에 대하여 자생지에서 직접 채집하여 사용하였으며, 채집된 재료는 건조 표본으로 제작하여 영남대학교 생명과학과 식물표본관(YNUH)에 확증표본으로 보관하였다. 또한 국내 국립수목원 식물표본관(KH)에 소장된 건조표본들을 연구재료로 사용하였다. 본 연구에서 사용된 total genomic DNA는 총 6분류군으로 outgroup으로는 산형과(Umbelliferae)에 속하는 병풀(*Centella asiatica*)를 선정하였다. Outgroup의 경우 피막이속에 대한 선행되어온 연구에서 유연관계가 가장 가깝다고 판단된 병풀을 사용하였다(Van De Wiel *et al.*, 2009). 연구에 사용된 분류군 및 채집지 정보는 Table 1과 같다.

Table 1. Plant materials for this study. Vouchers are deposited at YNUH (Yeungnam University), KH and DNA accession number were obtained from Genbank

Taxon	Abbreviation	Collector/Voucher	Locality	accession number	
				ITS	<i>trnH-psbA</i>
<i>Hydrocotyle maritima</i>	HY05	K.S. Choi 200907221(YNUH)	Jeollanam-do Naju-si Dado-myeon Masan-ri	JQ425411	JQ425418
	HY06	K.S. Choi 20090812(YNUH)	Jeollanam-do Wando-gun Nohwado	JQ247227	JQ425421
<i>H. nepalensis</i>	HY26	ParkSH62119(KH)	Jeju-do Jeju-si Seonheul-ri Dongbaeckdong-san	JQ247226	JQ425425
<i>H. ramiflora</i>	HY01	K.S. Choi 20090822(YNUH)	Daejun Usung-gu	JQ247229	JQ425420
	HY03	K.S. Choi 20090624(YNUH)	Ulsan Ulju-gun Onsan-eup	JQ425413	JQ425424
<i>H. sibthorpioides</i>	HY25	WR-080723-120(KH)	Jeollanam-do Sadong-ri Geumil-eup	JQ247229	JQ425416
	HY18	ParkSH41944(KH)	Jeollanam-do Sinan-gun Songgong-ri Mt.Songgongsan	JQ425409	JQ425423
<i>H. yabei</i>	HY27	ParkSH61077(KH)	Jeju-do Seogwip-si Daejeong-eup Mt.Songak-san	JQ425410	JQ425415
	HY16	K.S. Choi 20090522(YNUH)	Jeju-do Aewol-eup	JQ247230	JQ425414
<i>H. sp.</i>	HY28	ParkSH61921(KH)	Ulleng-gun Ulleng-eup Dodong	JQ425412	JQ425419
	HY23	K.S. Choi <i>et al.</i> 20090522(YNUH)	Ulleng-gun Ulleng-eup Dodong	JQ247231	JQ425417
<i>Centella asiatica</i>	HY20	K.S. Choi 20090522(YNUH)	Jeollanam-do Wando-gun Nowha-eup Sinri	JQ247225	JQ425422

분자계통학적 분석

DNA 추출 및 PCR : DNA 추출은 생체 혹은 건조표본을 이용하였다. 야외에서 직접 채집한 생체의 경우 실험실로 운반하여 즉시 잎을 채취하여 -70°C 에서 냉동 보관하였다. 냉동 보관된 재료를 액체 질소를 이용하여 분쇄시킨 후 Dolye & Dolye(1987)의 CTAB 방법을 수정한 Loockerman & Jansen(1996)의 방법에 따라 추출하였다. 표본관에 소장된 석엽 표본에서 절취한 재료의 경우에는 Precellys® 24 Homogeniser를 이용하여 분쇄시킨 후, Dolye and Doyle(1987)의 CTAB 방법을 수정하여 Loockerman and Jansen(1996)의 방법으로 추출하였다. 추출된 DNA는 1.2% agarose gel 상에서 전기영동 후, EtBr 염색법으로 UV 조명아래서 형광 밝기를 상대 비교하고 흡광도를 측정하여 농도를 확인 하였다. PCR(Polymerase chain reation) 반응 용액의 조성은 다음과 같다. 주형 DNA 20-50 ng, 10X *Taq* polymerase reaction buffer 5 µl, 각 10mM의 dNTPs mix 1 µl, 10pmol 의 primer 각각 2 µl, 2.5 unit의 Diastar-*Taq* DNA polymerase 0.25 µl (SolGent Co.)에 total volume이 총 50 µl가 되도록 증류수를 조절하여 첨가 하였다.

염기서열의 정렬 및 자료 분석: 각 염기서열들은 Sequnecher program(Gene Code, USA)으로 조합하여 MacClade 4.0 (Sinauer Associates, Inc.)을 사용하여 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. 염기서열 간의 유전적 거리(Kimura's 2 parameter 방법: Kimura, 1980)계산과 Parsimony analysis, Maximum likelihood 는 PAUP* ver. 4.0b(Swofford, 2002)를 사용하여 수행하였다. Parsimony analysis는 Heuristic search를 이용하였으며, Heuristic search의 option으로 TBR branch-swapping algorithm을 적용하였다. 또한 각 분계도의 지지정도를 알아보기 위하여 Bootstrapping(Felsenstain, 1985)과 Jackknifing (Farris *et al*, 1996)을 이용하였다. Maximum-Likelihood analysis는 Modeltest ver 3.7(Posda and Crandall, 1998)을 이용하여 적정 모델을 선정하였으며, hLRTs의 기준을 적용하여 수행하였다. Heuristic search의 option으로 TBR branch-swapping algorithm을 적용하였다. Consistency Index(Kluge and Farris, 1969), Retention Index(Farris, 1989) 값은 PAUP* ver. 4.0b에서 구하였다.

결 과

염기서열의 분석

12개의 ITS 염기서열을 정렬한 결과 길이는 총 617-622bp로 나타났으며, ITS1과 2의 길이는 각각 202-205bp, 256bp였으며 5.8S는 161bp로 나타났다. 전체적으로 ITS2 지역이 ITS1 지역보다 길어 다른 피자식물의 경우와는 차

Table 2. Variation size and G+C% of ITS region of *Hydrocotyle* and related taxa

Taxon, abbreviation	ITS 1		5.8S		ITS2		<i>trnH-psbA</i>		
	length(bp)	G+C(%)	length(bp)	G+C(%)	length(bp)	G+C(%)	length(bp)	G+C(%)	
<i>H. maritima</i>	HY 05	205	67.8	161	51.5	256	65.2	272	27.9
	HY 06	205	67.8	161	51.5	256	65.2	272	27.9
<i>H. nepalensis</i>	HY 26	202	65.8	160	51.2	255	65.4	275	27.6
<i>H. ramiflora</i>	HY 01	204	65.7	161	50.3	256	62.5	271	28.7
	HY 03	204	65.7	161	50.3	256	62.5	271	28.7
<i>H. sibthorpioides</i>	HY 25	205	67.3	161	51.5	256	65.2	272	27.9
	HY 18	205	67.3	161	51.5	256	65.2	272	27.9
<i>H. yabei</i>	HY 27	205	67.3	161	51.5	256	65.2	272	27.9
	HY 16	205	67.3	161	51.5	256	65.2	272	27.9
<i>H. sp.</i>	HY 23	204	63.7	161	50.3	256	65.2	271	28.7
	HY 28	204	63.7	161	50.3	256	62.8	271	28.7
<i>Centrella asiatica</i>	HY 20	204	63.7	161	50.3	256	62.8	402	31.6

이가 있었다(Baldwin *et al.*, 1995; Suh *et al.*, 1993; Kim and Jansen, 1994; Sang *et al.*, 1995; Yoo and Park, 2012). 길이 변이는 ITS1 지역이 ITS2 에 비해 더 높게 나타났으나 두 지역 모두 길이의 변이가 심하게 나타나지는 않았다. Ingroup에서 ITS1의 길이가 가장 짧게 나타난 분류군은 큰잎피막이였으며, 제주피막이, 피막이, 선피막이가 가장 긴 길이를 가지는 분류군으로 나타났다. 염기 조성은 평균 A가 18.2%, C가 29.7%, G가 28.7%, T가 21.8% 였고, DNA의 구조 및 물리적 특성을 결정하는 C+G의 함량은 ITS1 지역에서는 선피막이가 58.7%로 가장 높게 나타났으며, ITS2 지역에서는 *H. sp*가 62.8-65.2%로 가장 높게 나타났고, 5.8S에서는 피막이와 제주피막이가 67.3%로 가장 높게 나타났다(Table 2). *trnH-psbA* 지역의 경우 큰잎피막이가 275bp로 가장 길게 나타났으며 큰피막이와 *H. sp*가 271bp로 가장 짧게 나타났다. C+G함량의 경우 큰피막이와 *H. sp*가 28.7%로 가장 높게 나타났으며, 큰잎피막이가 27.6%로 가장 낮게 나타났다. 염기 조성의 평균은 A가 32.7%, C가 18.7%, G가 14.2%, T가 34.4%로 나타났으며 C+G의 함량은 전체적으로 31.4%로 나타났다 (Table 2).

분자계통학적 연구

본 연구에서 사용한 nrDNA의 ITS 지역과 cpDNA non-coding 지역인 *trnH-psbA* 그리고 ITS, *trnH-psbA*, combined data의 염기의 변화와 parsimony-informative character의 경우 Table 3에 정리하였다. Outgroup인 병풀을 포함하여 ITS 지역의 경우 염기 서열의 길이는 617-622bp, *trnH-psbA*의 경우 271-402bp, ITS, *trnH-psbA*

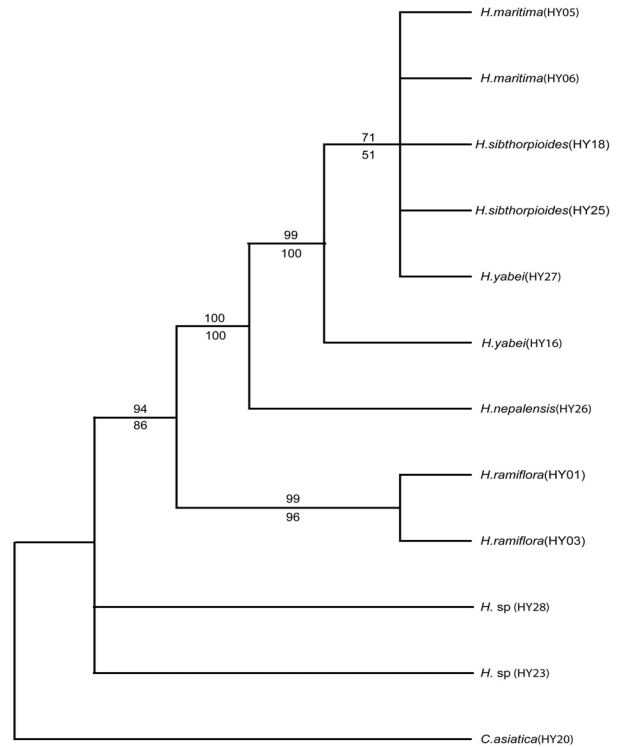


Fig. 1. Maximum parsimony tree obtained from the sequence of ITS. The bootstrap values are above branches and jackknife values are below branches.

combined data의 경우 950-1081bp를 나타내었다. ITS의 경우 총 53개의 지역, *trnH-psbA* 지역의 경우 88개, combined data의 경우 141개의 지역에 변이가 있었으며, 그 중 informative characters의 경우 각각 30개, 4개, 34개가 존재하였다. ITS MP tree의 경우 CI, RI 값이 각각 1.0, 1.0으로 나타났으며, *trnH-psbA* MP tree의 경우 CI, RI 값이 0.98, 0.90, combined data의 경우 CI, RI 값이 0.99, 0.99로 나타났다.

Table 3. Statistics from phylogenetic analyses of the various datasets

	Analyses in the <i>Hydrocotyle</i> L.		
	ITS	<i>trnH-psbA</i>	ITS, <i>trnH-psbA</i> combined
Total length	617-622	271-402	1082
Variable characters(including gaps)	53	88	141
Informative characters(including gaps)	30	4	34
Length of trees	53	89	142
Consistency index(C.I)	1	0.98	0.99
Retention index(R.I)	1	0.90	0.99

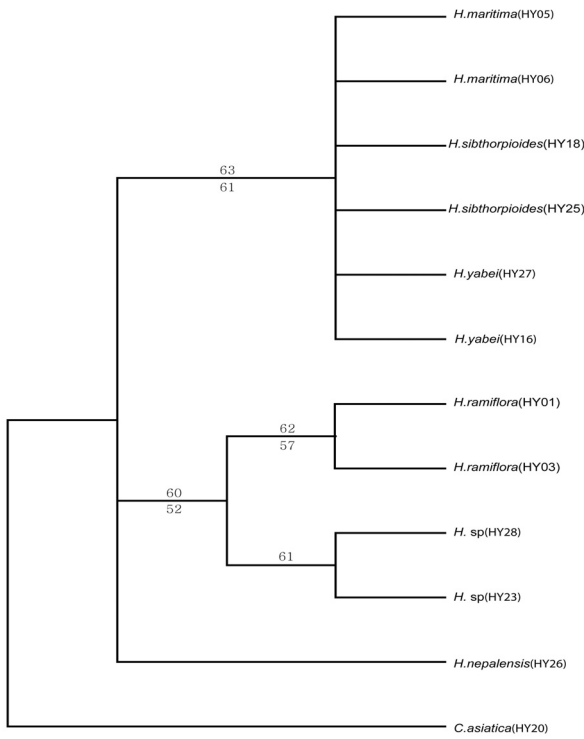


Fig. 2. Maximum parsimony tree obtained from the sequence of *trnH-psbA*. The bootstrap values are above branches and jackknife values are below branches.

분류군간 ITS maximum-parsimony tree(Fig. 1)에서 outgroup을 제외하고 *H. sp.*(HY23, HY28)와 나머지 group으로 대별되며, 가장 기저부에 큰피막이(HY01, HY03)가 한 분계조를 이루고 있다. 그 위로 큰잎피막이(HY26)가 하나의 분계조를 이루고 있으며, 제주피막이(HY16)는 독립되어 분계조를 형성하거나 또는 피막이, 선피막이와 같은 분계조를 형성하며 71% bootstrap value로 지지하고 있다. *H. sp.*, 큰피막이 그리고 큰잎피막이의 경우 확연히 다른 분계조를 이루고 있었으나, 선피막이, 피막이 그리고 제주피막이 한 개체의 경우 71% bootstrap value로 가까운 유연관계에 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 cpDNA marker인 *trnH-psbA* 지역에서는 크게 4개의 분계조로 나타났다. 큰잎피막이(HY26), *H. sp.*(HY23, HY28), 큰피막이(HY01, HY03)가 각각의 분계조를 형성하였고, 피막이(HY18, HY25), 선피막이(HY05, HY06), 제주피막이(HY16, HY27)의 경우 한 분계조에 속하면서 매우 가까운 유연관계를 이루고 있었지만 63%의 bootstrap value로 높은 지지도는 아니었다(Fig. 2). ITS와 *trnH-psbA*의 combined data를 이용한 MP tree 결과 Clade IV: *H. sp.*(HY23, HY28)가 가장 기저부를 형성하고 있었다. 선피

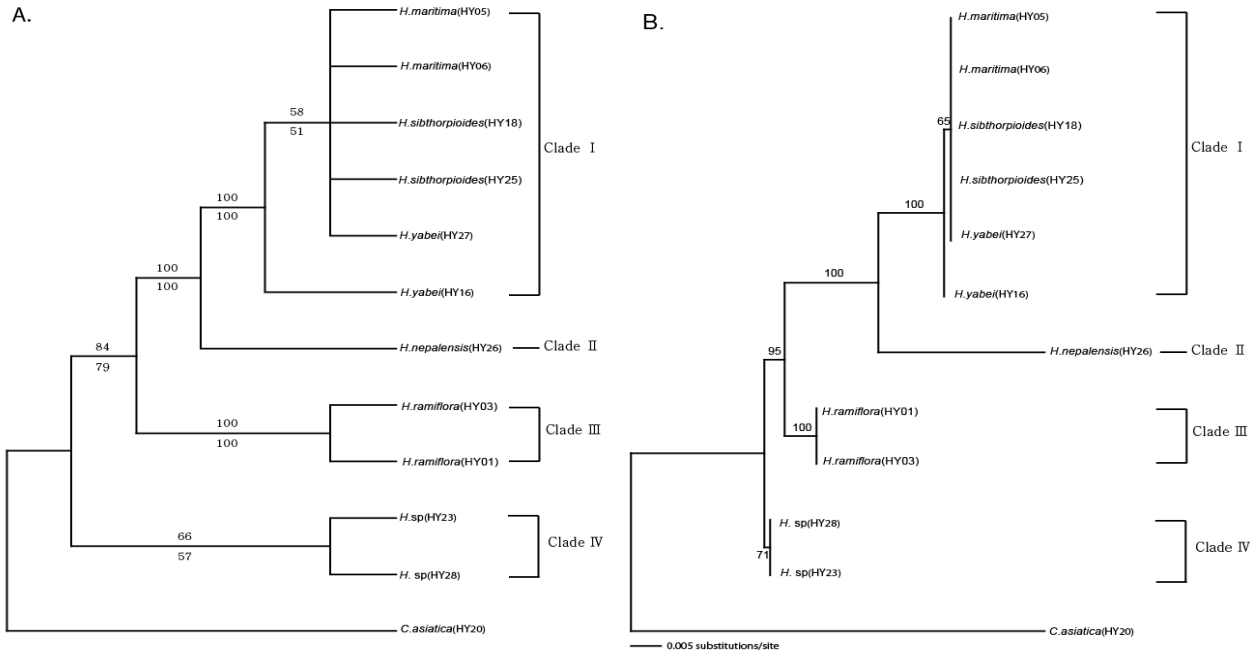


Fig. 3. Phylogenetic relationships of *Hydrocotyle* based on the combined molecular dataset. A. MP(Maximum Parsimony) tree. The number of above branches are bootstrap values and below branches are jackknife values. B. ML(Maximum likelihood) tree. The number of above branches are bootstrap values.

막이(HY05, HY06), 피막이(HY18, HY25), 제주피막이(HY16, HY27)의 경우 매우 가까운 유연관계를 나타내며 Clade I 을 형성하였다. 큰잎피막이(HY26), 큰피막이(HY01, HY03), *H. sp*(HY23, HY28)의 경우 각각 다른 Clade II, III, IV를 형성하였다(Fig. 3). ML tree도 MP tree와 유사한 패턴으로 형성하였다. Clade I의 선피막이(HY05, HY06), 피막이(HY18, HY25), 한 개체의 제주피막이(HY27)가 65% bootstrap value로 묶이는 양상을 보였다. Clade II, III, IV는 각각 큰잎피막이, 큰피막이, *H. sp*가 독립적인 분계조를 이루고 있었다.

고 찰

본 논문은 nrDNA의 ITS지역과 cpDNA의 *trnH-psbA* 지역을 바탕으로 피막이속의 실체파악과 종의 한계 설정 및 유연관계를 확인하고자 하였다. ITS의 염기서열 길이 및 염기 조성은 속내에서 비교하여 큰 차이점을 보여주지는 않았다.

큰잎피막이의 경우 잎의 크기가 다른 분류군들에 비해 뚜렷이 크고, 엽병과 화경에 털이 없으며, 분자적 자료 역시 선피막이, 피막이, 제주피막이, 큰피막이 그리고 *H. sp* 등의 분계조와는 독립적인 분계조를 이루고 있으며 종으로써의 분류계급을 지지하는 결과를 보여주어 Nakai(1952), Lee and Ahn(1963)의 견해와 일치하였다.

선피막이의 경우 화경의 길이가 엽병의 길이보다 짧고, 잎보다 밑에서 꽃이 피며 줄기가 곧추 서고, 피막이와 제주피막이의 경우 외부형태학적으로 화경과 엽병의 길이가 비슷하며 줄기가 기는 것이 공통점이지만 겨울철에 땅 속에서 월동하는 제주피막이와 월동하지 않는 피막이로 두 분류군을 구분하고 있다. ITS, *trnH-psbA* 그리고 combined data 등 3개의 분자적 분석결과, 한 개체의 제주피막이를 제외하고는 71% bootstrap value로 한 분계조를 이루고 있었다. 이는 제주피막이에서 선피막이와 피막이가 분지되었을 가능성을 가지고 있다. 또한 세 종이 매우 가까운 관계를 이루고 있음을 시사하고 있다. 지금까지는 이 세 종을 일부 학자에 의해 각각 독립된 종으로 간주하였지만 영양형질인 잎의 특징으로는 종의 실체를 명확히 구분하기 힘들며, 분자적 결과 역시 매우 가까운 유연관계를 나타냄에 따라 생육환경의 차이로 일어나는 변이일 가능성이 크며, 생육지 조사 및 더 많은 개체수와 다른 유용한 분자 marker

를 이용하여 정확한 분류계급의 설정이 필요하다고 사료된다.

*H. sp*의 경우 가장 유사한 큰피막이와 비교해 보았을 때, 잎의 크기가 큰피막이의 1/2정도 되었으며, 큰피막이의 잎의 형태의 경우 엽형이 원두형(roundish)에 가까웠지만 *H. sp*의 경우 엽형이 원두형(roundish)과 결각이 심한 중간 형태를 나타내고 있었으며, 잎의 앞, 뒷면에 털이 존재하지 않는 특징을 가지고 있다. 분자적 실험 결과 ITS, *trnH-psbA* 그리고 combined data 등의 모든 tree에서 큰피막이와 *H. sp*의 경우 별개의 분계조를 형성하고 있어 독립된 분류군으로 처리 하는게 타당하다고 생각된다.

이를 종합적으로 판단하였을 때 국가표준식물목록(Korea National Arboretum and The Plant Taxonomic of Society Korea, 2007)에서 제시되고 있는 선피막이, 피막이, 제주피막이, 큰잎피막이, 큰피막이 5종 중 큰잎피막이, 큰피막이와 *H. sp*만 독립된 분계조를 형성하고 있었으며, 선피막이, 피막이, 제주피막이의 경우 모든 tree에서 매우 가까운 유연관계를 보임에 따라 분류군의 계급설정은 좀더 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료 된다. 또한 *H. sp*의 경우 다른 종과는 다르게 잎의 앞, 뒷면, 화경, 엽병에 털이 존재하지 않았으며, 분자적 실험에서도 독립적인 분계조를 나타냄에 따라 새로운 분류군으로써의 가능성을 보여주었다.

따라서 본 연구는 nrDNA의 ITS 지역과 cpDNA의 *trnH-psbA* 지역 염기서열을 비교 분석하여 국부적이지만 한국산 피막이속(*Hydrocotyle*) 식물의 종내 한계 설정과 유연관계를 파악하고자 하였으며, 피막이, 선피막이, 제주피막이의 경우 확실한 독립된 분계조가 나타나지 않아 많은 개체와 지역별 분석을 실시하여야 할 것이며, 이번 연구에서 나타난 *H. sp*의 경우 분자적으로 확연히 다른 분계조를 형성함에 따라 추가적인 연구를 통해 결정되어야 한다고 생각된다.

적 요

한국산 피막이속(*Hydrocotyle* L.)의 5종과 울릉도에서 새로 발견한 *H. sp* 그리고 outgroup인 병풀 (*Centella asiatica*)을 포함하여 총 7분류군을 대상으로 분자계통학적 연구를 수행하여 종의 실체 및 문제점을 검토하고 유연관계를 살펴보았다. 분자계통학적 연구의 marker로는 nrDNA의 ITS 지역과 cpDNA의 *trnH-psbA* 지역을 사용

하였다. 한국산 피막이속은 94%의 지지도로 묶였으며, 크게 4개의 분계조를 형성하였다. 선피막이 (*H. maritima*)와 피막이 (*H. sibthorpioides*), 제주피막이 (*H. yabei*)와 큰잎피막이 (*H. nepalensis*), 큰피막이 (*H. ramiflora*) 그리고 *H. sp*가 각각의 분계조를 형성하였다. 그러나 선피막이, 피막이, 제주피막이의 경우 독립된 분계조를 형성하지 않았으며, *H. sp*의 경우 분자적으로 독립적인 분계조를 형성하고 있어 새로운 종으로써의 가능성을 제시하였다.

사 사

이 논문은 2011년 과학기술부 지정 정책중점연구소 지원 사업 및 2010년 영남대학교 학술연구 조성비에 의해서 연구되었음.

인용문헌

- Álvarez, I. and J.F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogen. Evol.* 29:417-434.
- Baldwin, B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants : An example from the Compositae. *Mol. Phylogen. Evol.* 1:3-16.
- Chung, T.H., B.S. Do, D.B. Lee and F.J. Lee. 1937. *Nominia plantarum koreanum*. Chosen Nat. Hist. Soc. Seoul, Korea. p. 136 (in Korean).
- Chung, T.H., B.S. Do, D.B. Lee and H.J. Sim. 1949. *Nomina Plantarum Koreanum I*, Chosen Biology Society pp. 54-55 (in Korean).
- Chung, T.H. 1957. *Illustrated flora of Korea*. Herb. Sinjisa pp. 88-98 (in Korean).
- Curtis, S. and M.T. Clegg. 1984. Molecular evolution of chloroplast DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1:291-301.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure of small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.* 19:11-15.
- Farris, J.S., Albert V.A. Killersjö M, Lipscomb D. 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* 39:783-791.
- Gregory, M. Plunkett and Antoine, N. Nicolas. 2009. The demise of subfamily Hydrocotyloideae (Apiaceae) and the re-alignment of its genera across the entire order Apiales. *Mol. Phylogen. Evol.* 53:134-151.
- Kim, K.J. and R.K. Jansen. 1994. Comparisons of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*, Asteraceae): Additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Plant Syst. Evol.* 190:157-185.
- Kim, K.J, Y. D. Kim, J.H. Kim, S.J. Park, C.W. Park, B.Y. Sun, K.O. Yoo, B.H. Choi and S. T. Kim. 2008. Phylogenetic classification of Korean vascular flora according to the recent APG classification system. *Korean J. Pl. Taxon* 38:197-222 (in Korean).
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- Korea National Arboretum and The Plant Taxonomic Society of Korea. 2007. *A Synonymic List of Vascular Plants in Korea*. Korea National Arboretum, Pocheon. Korea. p. 203 (in Korean).
- Lee, C.R. and H.S. Ahn. 1963. *Nomina Plantarum Koreanum*. Pahaksa, Publishing Co., Seoul. Korea. p. 469 (in Korean).
- Lee, T.B. 1980. *Illustration flora of Korea*. Hyangmunsa Publishing Co., Seoul. Korea. pp. 827-829 (in Korean).
- Lee, W.T. 1996. *Lineamenta florum Koreae*. Academy Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 795-797 (in Korean).
- Linnaeus, C. 1753. *Species Plantarum*. Holmiae, Stockholm, Sweden. pp. 116.
- Lookerman, D.J. and R.K. Jansen. 1996. The use of herbarium material for DNA studies. *In* Sampling the green world. Stussey, T. J. and S. Sohmer (eds.), Columbia University Press, New York, USA. pp. 205-220.
- Mori, T. 1922. *An Enumeration of plants Hitherto known Corea*. The government of Chosen. Seoul, Korea. p. 271.
- Nakai, T. 1914. *Tyosen-syokuhtu*. Seongmidang. Tokyo, Japan. pp. 39-46.
- _____. 1952. *In* A synoptical Sketch of Korean Flora. *Bull. Natl. Sci. Mus.* p. 87.
- Palibin, J. 1901. *Consepectus Florae Koreae III*. *Acta Hort. Petrop.* p. 323.
- Sang, T., D.J. Crawford, T.F. Stuessy and O.M. Silva. 1994. ITS sequences and the phylogeny of the genus *Robinsonia* (Asteraceae). *Syst. Bot.* 20:55-64.
- Soltis, P.D., J.J. doyle and D.E. Soltis. 1992. Molecular data and polyploid evolution in plants. *In* *Molecular Systematics of Plant*. Soltis, P.D., J. J. doyle and D. E. Soltis. (eds.), Chapman

- & Hall. NewYork, USA. pp. 177-201.
- Son, S.W., J.H. Kim, K.J. Kim and S.J. park. 2007. Molecular evidence for the hybridity of *Ilex* × *wandoensis* and the phylogenetic study of Korean *Ilex* based on ITS sequence data. *Gene & Genomics* 31(1): 53-63.
- Suh, Y., L.B. Thien, H.E. Reeve and E.A. Zimmer. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *American J. Bot.* 80:1042-1055.
- Sworfford, D.L. 2002. PAUP* : Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), ver. 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface : Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nuc. Acids Res.* 25:4876-4882.
- Van De Wiel. C.C.M, J. Van Der Scoot, J.L.C.H. Van Valkenburg, H. Duistermaat and M.J.M. Smulders. 2009. DNA barcoding discriminates the noxious invasive plant species, floating pennywort (*Hydrocotyle ranunculoides* L.F.), from non-invasive relatives. *Molecular Ecology Resources* 9:1086-1091.
- White, T.J., T. Birns, S.Lee, and J.Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In PCR protocols : A guide to methods and applications*, Innis, M., D. Gelfand, J. Sninsky and T. White (eds.), Academic Publishing Co., San Diego, USA. pp. 315-322.
- Yoo, K.P and S.J. Park. 2012. A Phylogenetic Study of Korean *Carpesium* L. Based on nrDNA ITS Sequence. *Korean J. Plant. Res.* 25(1):96-104.

(Received 15 June 2012 ; Revised 14 August 2012 ; Accepted 30 August 2012)