

한국산 피나무속(*Tilia* L.) 식물의 분자 계통학적 연구

부다운, 박선주*

영남대학교 이과대학 생명과학과

Molecular Phylogenetic Study of Korean *Tilia* L.

Daun Boo and Seon Joo Park*

Department of Life Science, Yeungnam University, Gyeongsan 38541, Korea

Abstract - The genus *Tilia* is characterized by linear form bracts of which the lower part is attached to the peduncle of a cyme. This character is distinguished from the others genus of Malvaceae. The purpose of this study is verifying the phylogenetic relationship of genus *Tilia*. Phylogenetic analyses were conducted to evaluate relationships of 10 taxa of *Tilia* in Korea and Japan including one outgroup (*Gossypium hirsutum*). The molecular phylogenetic analyses were conducted with sequences based on ITS, *trnL-F* and *rpl32-trnL* region. The combined data result of ITS, *trnL-F* and *rpl32-trnL* was formed by 6 clades. *T. kiusiana* situated as the most basal clade. *T. amurensis*, *T. taquetii* and *T. rufa* are composed a clade. *T. koreana*, *T. insularis* and *T. japonica* was formed independent clade. *T. insularis* has the closest relationship with *T. japonica*. *T. miqueliana*, *T. mandshurica*, and *T. megaphylla* are composed a clade and showed a sister relationship than other species.

Key words - Malvaceae, Phylogenetic analysis, *rpl32-trnL*, *Tilia insularis*

서 언

피나무속(*Tilia* L.)은 아욱과(Malvaceae)에 속하는 식물로 주로 온대지방 북반구에 분포하며, 미국동부에 3분류군, 멕시코 고산지방에 1분류군, 유럽에 5분류군, 동북아시아에 30-40여분류군이 분포하고 있다(Shishkin, 1974). 국내에는 9종이 자생, 2종이 식재되고 있는 것으로 알려져 있다(Kim and Chung, 1983; Kim and Chung 1986).

국내 자생 피나무속 식물에 대한 분류학적 연구는 Schneider (1909)가 뽕잎피나무(*T. taquetii* Schneid.)를 기재하고, Nakai (1909)가 찰피나무(*T. mandshurica* Rupr. & Maxim.)와 피나무(*T. amurensis* Rupr.)의 분포를 보고하면서 시작되었다. 그 후 Nakai (1914)는 피나무, *T. glabrata* Nakai, 연밥피나무(*T. koreana* Nakai), 찰피나무, *T. maximowiczii* Baker f., 염주나무(*T. megaphylla* Nakai), 개염주나무(*T. semicostata* Nakai), 뽕잎피나무의 국내 분포 보고 하였으며, 1922년에 피나무, 꽃피

나무(*T. amurensis* for. *polyantha* Nakai), 평안피나무(*T. amurensis* var. *grosserrata* Nakai), 섬피나무(*T. insularis* Nakai), 연밥피나무, 찰피나무, 웅기피나무(*T. ovalis* Nakai), 털피나무(*T. rufa* Nakai), 개염주나무, 뽕잎피나무 등 9종 1변종 2품종이 분포하는 것으로 보고하고 1952년에는 9종 5변종 3품종이 분포하는 것으로 재발표하였다. 이후 Chung (1957)은 9종 2변종으로 Lee (1996a)는 11종 1품종, Lee (1996b)는 11종 3품종으로 보고 하였다. 현재는 피나무속 분류군의 분류와 종간변이한계와 분포를 연구한 Kim (1983)의 견해를 따라 국내에 피나무, 섬피나무, 연밥피나무, 찰피나무, 염주나무, 웅기피나무, 털피나무, 개염주나무, 뽕잎피나무, 보리자나무(*T. miqueliana* Maxim.), 구주피나무(*T. kiusiana* Makino & Shiras.) 11종이 분포하고 있는 것으로 보는 것이 일반적이다. 그 중 구주피나무는 일본원산으로 밀원자원으로 도입하여 식재되고 있으며 (Choi, 1987), 보리자나무는 중국원산으로 국내 사찰에 주로 분포하고 구 홍릉임업시험장에 식재된 개체 등 상당수가 일본으로 도입되어 들어온 기록으로 보아 식재종으로 판단된다(Kim and Chung, 1986).

*교신저자: sjpark01@ynu.ac.kr

Tel. +82-53-810-3874

본 속은 겨울눈, 신년지, 포, 화경 성모의 유무, 한 화서에 달리는 꽃의 수, 열매의 능각의 발달 정도 등이 주된 형태적 식별형질로 사용되었다(Nakai, 1914; Nakai, 1922; Nakai, 1952). 하지만 이러한 형질은 각 분류군에서 연속적인 변이로 나타나 분류군의 한계를 명확히 규정하기에 어렵다(Yoon, 2003). 따라서 Liou (1955)는 피나무에 비해 잎의 크기가 작고 3-5개의 꽃이 화서에 달리는 특징을 가진 뽕잎피나무를 피나무의 변종으로 처리하였으며, Yoon (2003)은 섬피나무와 뽕잎피나무를 피나무와 동일한 분류군으로 주장하는 등 현재에도 본 속의 분류군간 한계설정에 대한 이견이 많은 실정이다(Yoon, 2003; Liou and Li, 1955; Pigott, 2008).

nrDNA의 ITS (Internal transcribed spacer) region은 양친 유전을 하며 다른 coding region보다 더 빠르게 진화하여 유전자 간의 변이성이 높은 편으로 종간의 유연관계와 진화경향성 및 유전변이 양상을 파악하는데 유용한 것으로 알려져 있다(Álvarez and Wendel, 2003). 또한 모계 유전을 하는 cpDNA의 non-coding region은 유전자보다 빠르게 진화하고 염기치환과 같은 비율로 indel이 축적되므로 분류군의 유연관계 파악에 중요한 자료로 이용되고 있다(Cai *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016).

따라서 본 연구는 잎의 크기, 성모의 색상, 열매의 능각의 유무 등을 식별형질로 피나무와 구분하고 현재 분류학적 위치에 대하여 이견이 분분한 섬피나무, 털피나무, 뽕잎피나무, 연밥피나무간의 유연관계를 알아보고자 하였으며 함경도에 자생하는 웅기피나무와 개염주나무를 제외한 한국과 일본의 피나무속 10종을 대상으로 nrDNA-ITS, *rp32-trnL* 및 *trnL-F* 염기서열에 근거하여 피나무속의 분류학적 특성과 분류군간 근연관계를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서 사용된 재료는 원기재문을 기준으로 동정하였다. 직접 채집한 식물체는 영남대학교 식물표본관에 확증표본으로 보관하였으며, 국립수목원(KH), 강원대학교 식물표본관(KWNH)의 건조표본을 포함해 한국산 피나무 9종을 사용하였다. 그리고 일본 홋카이도대학교 식물표본관(SAP)의 구주피나무, 일본피나무(*T. japonica* (Miq.) Simonk.)를 포함하여 피나무속 총 10종 26개체를 사용하였다. outgroup으로는 근연관계 멕시코목화(*Gossypium hirsutum* L.)의 GenBank 자료를 사용하였다(Table 1).

DNA추출 및 PCR 증폭

자생지에서 직접 채집한 생체 및 표본관에 수장 중인 건조표본에서 채취한 시료를 Precellys®24 Homogeniser (Bertin Technologies, France)를 이용하여 파쇄시킨 후, Dolye and Doyle (1987)의 CTAB 방법을 수정한 Loockerman and Jansen (1996)의 방법으로 total DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 1.2% agarose gel 상에서 전기영동 후, EtBr 염색법으로 UV 조명 아래서 형광 밝기를 상대 비교하고 흡광도를 측정하여 농도를 확인하였다. ITS region의 증폭은 primer ITS4와 ITS5 (White *et al.*, 1990)를 이용하였으며, *trnL-F* region의 증폭은 primer C와 primer F (Taberlet *et al.*, 1991)를 이용하였다(Table 1). 또한 *rp32-trnL*의 partial region을 primer 400F와 *trnL-R* (modified from Shaw *et al.*, 2005) 이용하여 증폭하고 분석하였다(Table 1). 각 region의 증폭을 위한 PCR 반응용액의 조성은 주형 DNA 20-50 ng, 10× Diastar™Taq DNA Buffer 2.5 µL, 10 mM의 dNTPs 0.5 µL, 10 pmol의 primer를 각각 1 µL, 2.5 unit의 Diastar™Taq DNA Polymerase 0.13 µL (SolGent Co., Korea)를 첨가 후 마지막으로 전체 부피가 25 µL가 되도록 하였다(Table 2). DNA증폭을 위한 PCR반응은 다음과 같이 수행하였다. PCR의 첫 cycle에서는 1차적으로 DNA를 완전히 denaturation시키기 위해서 94°C에서 5분 동안 pre-denaturation 후, 2차적으로 94°C에서 1분 denaturation, primer annealing은 primer에 따라 50°C~58°C에서 40초 annealing, 72°C에서 1분 extension으로 구성된 반응을 30회 반복한 후, 최종적으로 72°C에서 10분간 extension 하였다.

염기서열 및 분자계통학적 분석 증폭된 산물의 염기서열은 forward와 reverse방향으로 각각 해독하고 이들 단편들의 염기서열은 Genious pro ver. 6.1.8로 조합하였으며, ClustalW을 이용하여 정렬하였다. 정렬결과 발생한 gap은 결여형질(missing character)로 처리 하여 모든 형질에 같은 가중치를 부여하였다. 염기서열 간의 유전적 거리(Kimura's 2 parameter방법) 계산과 Maximum parsimony (MP), Maximum-likelihood (ML) 분석은 MEGA 6.06을 이용하여 수행하였다. ML분석은 Modeltest ver 3.7 (Posada and Crandall, 1998)을 이용하여 적정모델을 선정하였으며, hLRTs의 기준을 적용하였다. MP분석은 heuristic search를 이용하였으며, option으로 1000회 random addition sequence와 TBR branch-swapping algorithm을 적용하였다. 또한 각 분계도의 신뢰도를 구하기 위하여 무작위로 1000회 반복하여 bootstrap value (Felsenstain, 1985)를 구하였으며, Consistency Index (CI: Kluge and Farris, 1969)와 Retention

Table 1. Sample information and GenBank accession numbers of *Tilia* taxa used in this study

Taxon	Abbr.	Locality	Voucher	Accession number		
				ITS	<i>trnL</i> -F	<i>rpl32-trnL</i>
<i>Tilia amurensis</i>	Amu1	Mt. Worak, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do	KH	KX062318	KX062370	KX062344
	Amu2	Mt. Gaji, Miryang-si, Gyeongsangnam-do	YNUH	KX062300	KX062352	KX062326
	Amu3	Mt. Gaji, Miryang-si, Gyeongsangnam-do	YNUH	KX062301	KX062353	KX062327
<i>T. taquetii</i>	Taq1	Mt. Goyang, Jeongseon-gun, Gangwon-do	KH	KX062314	KX062366	KX062340
	Taq2	Mt. Duta, Samcheok-si, Gangwon-do	KH	KX062315	KX062367	KX062341
	Taq3	Mt. Halla Jeju-si, Jeju-do, Korea	KH	KX062316	KX062368	KX062342
<i>T. insularis</i>	Ins1	Mt. Seonginbong, Ulleung-gun, Gyeongsangbuk-do	YNUH	KX062304	KX062356	KX062330
	Ins2	Mt. Seonginbong, Ulleung-gun, Gyeongsangbuk-do	YNUH	KX062305	KX062357	KX062331
	Ins3	Mt. Seonginbong, Ulleung-gun, Gyeongsangbuk-do	YNUH	KX062306	KX062358	KX062332
	Ins4	Nam-myeon, Ulleung-gun, Gyeongsangbuk-do	KH	KX062307	KX062359	KX062333
	Ins5	Seokmun-dong valley, Ulleung-gun, Gyeongsangbuk-do	KH	KX062308	KX062360	KX062334
<i>T. rufa</i>	Ruf1	Mt. Hambaek, Jeongseongun, Gangwon-do	KH	KX062317	KX062369	KX062343
	Ruf2	Mt. Biseul, Cheongdo-gun, Gyeongsangbuk-do	YNUH	KX062299	KX062351	KX062325
<i>T. koreana</i>	Kor1	Mt. Chiak, Wonju-si, Gangwon-do	KWNU	KX062321	KX062373	KX062347
	Kor2	Mt. Chiak, Wonju-si, Gangwon-do	KWNU	KX062322	KX062374	KX062348
<i>T. mandshurica</i>	Man1	Chiljangsan, Anseong-si, Gyeonggi-do	KH	KX062302	KX062354	KX062328
	Man2	Mt. Palgong, Gunwi-gun, Gyeongsangbuk-do	YNUH	KX062303	KX062355	KX062329
<i>T. miqueliana</i>	Miq1	Mt. Seorak, Sokcho-si, Gangwon-do	KWNU	KX062323	KX062375	KX062349
	Miq2	Gwaneumsa, Ara-dong, Jeju-si, Jeju-do	YNUH	KX062324	KX062376	KX062350
<i>T. megaphylla</i>	Meg1	Mt. Seorak, Sokcho-si, Gangwon-do	KWNU	KX062319	KX062371	KX062345
	Meg2	Mt. Seorak, Sokcho-si, Gangwon-do	KWNU	KX062320	KX062372	KX062346
<i>T. kiusiana</i>	Kiu(kr)	Sohol-eup, Pocheon-si, Gyeonggi-do	KH	KX062313	KX062365	KX062339
	Kiu1	Hokkaido Japan, Specimen no.16060	SAP	KX062311	KX062363	KX062337
	Kiu2	Hokkaido Japan, Specimen no.16028	SAP	KX062312	KX062364	KX062338
<i>T. japonica</i>	Jap1	Hokkaido Japan	SAP	KX062309	KX062361	KX062335
	Jap2	Hokkaido Japan	SAP	KX062310	KX062362	KX062336
<i>Gossypium hirsutum</i>	Gos		NCBI	HQ658359	NC-007944	NC-007944

Table 2. Primer sequences for DNA markers used in this study

	primer	Sequence	Reference
ITS	ITS5	GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS4	CAGGAAACAGCTATGACTCCTCCGCTT	White <i>et al.</i> (1990)
<i>trnL</i> -F	<i>trnL</i> -c	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taverlet <i>et al.</i> (1991)
	<i>trnL</i> -f	ATTTGAACTGGTGACACGAG	Taverlet <i>et al.</i> (1991)
<i>rpl32-trnL</i>	400F	CAGTTCCAAAAAACGTACTTC	McCarthy (2012)
	<i>trnL</i> -R	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	Shaw <i>et al.</i> (2005)

Index (RI: Farris, 1989)는 MEGA 6.06로 구하였다. ITS region 과 *trnL*-F, *rpl32-trnL*의 combined data로서의 적합성을 판

단하기 위하여 ILD (Inconruence Length Difference) test를 수행하였다.

결 과

염기서열의 분석

피나무속 각 분류군의 DNA marker 부위별 염기서열의 길이와 G+C 함량은 Table 3에서 나타내었다. 피나무속 ITS region의 염기서열은 687-691 bp로 나타났으며, 섬피나무, 연밭피나무, 일본피나무가 691 bp로 가장 길게 나타났으며 피나무, 뽕잎피나무, 털피나무, 구주피나무가 687 bp로 가장 짧았다. DNA구조에 영향을 미치는 G+C 함량은 55.9-60.5%로 나타났다. *trnL-F* region의 염기서열은 954-976 bp로 나타났으며, 구주피나무가 976 bp로 가장 길었다. *trnL-F* region의 G+C 함량은 28.4-29.0%로 나타났으며, G+C 함량이 가장 높은 분류군은 *T. kiusiana* 확인되었다. *rp132-trnL* region의 염기서열은 823-825 bp로 나타났으며, G+C 함량은 24.5-25.1%로 나타났다. nrDNA

의 ITS region, cpDNA의 *trnL-F*, *rp132-trnL*을 유합한 Combined data의 정렬된 염기서열에 관하여 Kimura's 2 Parameter method (Kimura, 1980)를 이용한 중간 유전적 거리(Pairwise Distance)를 계산한 결과 구주피나무와 연밭피나무에서 0.011로 가장 높게 나타났다(Table 3).

분자계통학적 분석

본 연구에 사용된 nrDNA의 ITS region, cpDNA의 *trnL-F*, *rp132-trnL*, ITS와 *rp132-trnL* 염기서열을 유합한 data (Combined I), ITS, *trnL-F*와 *rp132-trnL*을 유합한 data (Combined II) 각각의 parsimony informative character를 Table 4에 정리하여 나타내었다. Total length는 Combined I에서는 1510-1515 bp, Combined II는 2466-2486 bp로 나타났다. ITS의 CI (Consistency Index) 값은 0.83이었으며, RI (Retention Index)

Table 3. Sizes and G+C contents of DNA markers used in this study

Taxon	Abbr.	ITS		<i>trnL-F</i>		<i>rp132-trnL</i>	
		Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)
<i>T. amurensis</i>	Amu1	687	58.7	956	28.4	824	24.6
	Amu2	687	58.8	956	28.4	824	24.5
	Amu3	687	58.8	956	28.4	823	24.5
<i>T. taquetii</i>	Taq1	687	58.7	955	28.4	824	24.6
	Taq2	687	58.3	955	28.4	824	24.6
	Taq3	687	58.8	955	28.4	824	24.6
<i>T. insularis</i>	Ins1	691	58.3	956	28.4	824	24.5
	Ins2	691	58.7	956	28.4	824	24.5
	Ins3	691	58.7	955	28.4	824	24.5
	Ins4	691	58.5	955	28.4	824	24.5
	Ins5	691	58.5	955	28.4	824	24.5
<i>T. rufa</i>	Ruf1	687	58.4	955	28.4	824	25.5
	Ruf2	687	58.4	955	28.4	824	25.4
<i>T. koreana</i>	Kor1	691	57.8	959	28.4	824	24.8
	Kor2	691	55.9	959	28.3	824	24.8
<i>T. mandshurica</i>	Man1	689	60.2	956	28.4	823	24.6
	Man2	689	60.1	956	28.4	824	24.6
<i>T. miqueliana</i>	Miq1	689	60.3	955	28.4	824	24.6
	Miq2	689	60.3	955	28.4	824	24.6
<i>T. megaphylla</i>	Meg1	690	60.3	954	28.4	824	24.6
	Meg2	690	60.2	955	28.4	823	24.6
<i>T. kiusiana</i>	Kiu(kr)	687	60.2	976	29.0	823	25.1
	Kiu1	687	60.3	976	29.0	825	25.1
	Kiu2	687	60.5	976	29.0	823	25.1
<i>T. japonica</i>	Jap1	691	58.3	956	28.4	824	24.6
	Jap2	691	58.5	956	28.4	824	24.6
<i>Gossypium hirsutum</i>	Gos	677	56.2	995	30.2	810	24.9

Table 4. Values and statistics of the data matrixes

	Analyses in the <i>Tilia</i> L.				
	ITS	<i>trnL</i> -F	<i>rpl32-trnL</i>	Combined I (ITS, <i>rpl32-trnL</i>)	Combined II (ITS, <i>trnL</i> -F, <i>rpl32-trnL</i>)
Total length	677-691	954-976	810-825	1510-1515	2466-2486
Variable characters	141	39	49	190	229
Informative characters	40	7	10	50	57
Length of tree	187	39	55	242	288
Consistency Index (CI)	0.83	1	1	0.81	0.80
Retention Index (RI)	0.94	1	1	0.92	0.92

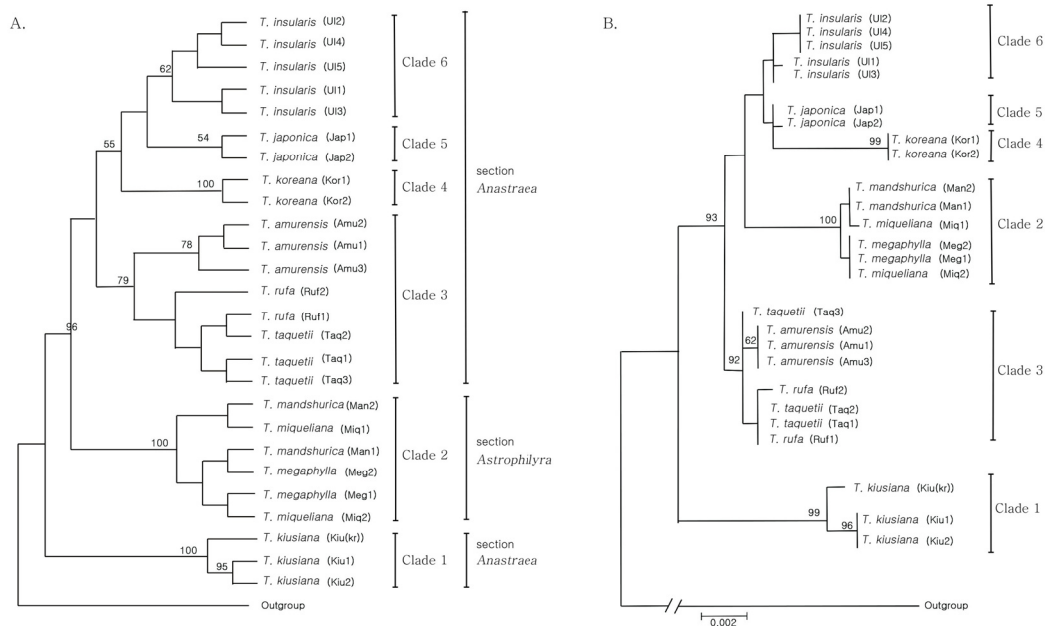


Fig. 1. Phylogenetic relationships of *Tilia* based on the combined data.

A. Maximum parsimony tree. B. Maximum likelihood tree. The number of above branch are bootstrap values.

값은 0.94로 나타났다. ITS와 *rpl32-trnL*을 유합한 data (Combined I)의 CI 및 RI값은 각각 1로 나타났다. ITS와 *trnL*-F, 그리고 *rpl32-trnL*을 유합한 data (Combined II)의 CI 및 RI값은 각각 0.80과 0.92로 나타났다(Table 4).

분류군간 ITS region의 maximum-parsimony tree에서 구주피나무는 단계통군을 형성하였으며, outgroup과 유연관계가 가장 가깝게 나타났다. 일본에 자생하는 구주피나무 개체는 96%의 bootstrap values로 독립된 분계조를 형성하여 한국에 식재되고 있는 개체와 차이를 보여주었다(data not shown). 찰피나무, 보리자나무, 염주나무가 한 분계조를 구성하였으며, 그 피나무, 뽕잎피나무, 털피나무가 75% bootstrap values로 섬피나무, 일본피나무, 연밥피나무는 82% bootstrap values로 각

분계조를 형성하였다(data not shown). cpDNA marker인 *trnL*-F의 MP tree에서는 구주피나무와 연밥피나무 두 종만이 독립된 분계조를 형성하였으며, *rpl32-trnL*의 MP tree에서는 구주피나무, 연밥피나무, 일본피나무가 단계통군을 형성하였다(data not shown). 나머지 7 분류군은 59% bootstrap value로 분계조를 형성하였으며, 이 중 피나무와 섬피나무가 72% bootstrap value로 유집되었다(data not shown).

ITS와 *rpl32-trnL* 염기서열을 유합한 Combined I과 ITS, *rpl32-trnL*, *trnL*-F의 염기서열을 유합한 Combined II의 p-value는 0.05이상으로 나타났다. 두 Combined data의 MP tree와 ML tree는 동일한 topology를 나타내었다. Combined II의 MP tree는 6개의 분계조로 구성되어 있었다(Fig. 1). Clade

1은 구주피나무로 outgroup과 유연관계가 가장 가깝게 나타났다. 나머지 9종은 96%의 bootstrap values로 분계조를 이루었다. 100% bootstrap value로 보리자나무, 찰피나무, 염주나무가 Clade 2를 구성하였다. 피나무, 뽕잎피나무, 털피나무가 79% bootstrap value로 Clade 3으로 구성되었으며, 피나무는 78% bootstrap value로 분계조를 형성하였다. 연밥피나무, 일본피나무와 섬피나무는 각각 Clade 4, 5, 6을 형성하였으며, 55% bootstrap values로 하나의 분계조를 형성하였다. 그 중 섬피나무는 일본피나무와 근연관계에 위치하였다. ML tree도 6개의 분계조로 구성되었으며, MP tree와 같이 구주피나무단계통군을 형성하였다. 피나무, 털피나무, 뽕잎피나무는 Clade 3을 구성하였으며 찰피나무, 보리자나무, 염주나무로 구성된 Clade 2가 Clade 4, 5, 6과 하나의 분계조를 형성하였다(Fig. 1).

고 찰

엽신과 일년지에 성모가 발달하지 않는 피나무속 분류군은 *Anastraea*절에 속하며 본 연구에서 피나무, 뽕잎피나무, 털피나무, 연밥피나무, 섬피나무, 일본피나무, 구주피나무가 이에 포함된다. 엽신의 폭이 매우 좁은 난형의 형태를 가진 구주피나무를 제외한 나머지 6종은 외부형태학적으로 종을 구분하는 유용한 형질을 찾는 데 어려움이 많다. 실험 결과 염기서열 및 염기 조성은 속내에서 큰 차이점이 나타나지 않았다.

MP분석에서 구주피나무가 단계통군을 형성하며 outgroup과 가장 가깝게 나타났다(Fig. 1). *Anastraea*절의 다른 분류군과 다르게 형태적으로 난형의 엽형을 가지고 있으며, 유사한 외부형태를 가지는 종이 없어, 독립된 종으로 판단된다. 피나무, 뽕잎피나무와 털피나무는 잎의 크기와 하나의 화서에 달리는 꽃의 수, 엽병의 단모의 유무에 따라 구분하고 있다. 이러한 형질은 종을 구분하기에 다소 모호하여 Liou (1955)는 뽕잎피나무를 피나무의 잡종으로 주장하였으며, Pigott (2008)은 뽕잎피나무와 털피나무를 피나무의 아종으로 처리하는 등 세 종의 분류학적 한계가 불분명하다. 본 연구에서 피나무는 형태적으로 잎의 크기와 화서에 달리는 꽃의 수, 엽병의 단모의 유무에 있어서 연속적인 변이가 있었으며, 염기서열 분석결과 피나무는 뽕잎피나무와 털피나무와 유집되어 세 분류군의 유연관계는 가까운 것으로 판단된다(Fig. 1). 이러한 결과는 뽕잎피나무와 털피나무가 고도와 지리적 차이에 의한 피나무의 아종일 가능성이 크다는 Pigott (2012)주장을 지지 하였다. 전반적인 외부형질이 피나무와 유사하지만 열매에 능각이 있으며 서양배 모양의 특

징을 가진 연밥피나무에 대하여 Pigott (2012)은 *T. amurensis* subsp. *taquetii*의 이명으로 처리하였다. 하지만 실험결과 연밥피나무는 독립적인 분계조를 형성하였으며, 피나무보다 섬피나무, 일본피나무와 근연관계를 보여주었다. 또한 형태형질 중 열매모양 뿐만 아니라 원형의 피목을 갖는 특징으로 피나무와 차이가 있었다. 일본피나무는 피나무에 비해 화경의 길이가 길고 5개의 헛수술을 가진다는 차이점이 있다(Pigott, 2012). 계통수에서도 피나무와 다른 분계조에 위치하였으며, 연밥피나무 및 섬피나무와 가까운 유연관계를 보여주었다(Fig. 1). 울릉도 특산식물인 섬피나무는 일부학자에 의해 피나무와 동종이라는 견해(Yoon, 2003 and Pigott, 2008)가 있으나, 본 염기서열분석결과에서 섬피나무는 단계통군을 형성하며, 일본피나무와 가까운 관계를 보여주었다(Fig. 1). 형태적으로 잎 전면 맥 위 암갈색 방추형 단모가 밀집하는 특징이 일본피나무와 함께 관찰되었으며, 이러한 형질은 피나무와 구분되었다. 식물체 전체에 높은 밀도의 성모의 특징을 가진 *Astrophilyra*절에 속하는 보리자나무, 찰피나무, 염주나무는 형태적으로 헛수술과 수술의 길이 차이, 열매능각으로 구분하지만 염기서열분석결과 비 단계통군으로 하나의 분계조를 구성하였다. 세 종이 독립된 종인지 판단할 수 없었으나 서로 가까운 근연관계에 있음을 확인하였다(Fig. 1). 본 계통학적 연구결과 섬피나무, 일본피나무, 연밥피나무, 피나무, 구주피나무가 단계통군을 형성하였으며 털피나무, 뽕잎피나무, 보리자나무, 찰피나무, 염주나무의 경우 독립된 분계조를 나타내지 않아 이들의 분류학적 실체에 대해서는 다른 marker를 이용한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구는 nrDNA의 ITS region과 cpDNA의 *trnL-F*, *rp32-trnL* region 염기서열을 분석하여 한국산 피나무속 (*Tilia*)식물의 계통학적 유연관계를 파악하고자 하였다. 섬피나무는 피나무와 다른 분계조를 형성하며, 일본피나무와 좀 더 가까운 유연관계에 있음을 확인할 수 있었다. 피나무와 비교하여 열매에 결각이 발달하고, 원형의 피목을 갖는 연밥피나무는 독립적인 분계조를 형성하여 피나무와 차이를 확인할 수 있었다.

적 요

피나무속 식물은 화경의 아래에 부착된 선형의 포를 특징적으로 가지고 있으며 이러한 형질은 아욱과의 다른 속과 구분된다. 본 연구는 피나무속의 중간 계통학적 유연관계를 규명하고자 하였다. 계통학적 분석은 한국과 일본의 피나무속 10종,

outgroup으로 멕시코목화를 선정하여 수행하였다. nrDNA의 ITS와 cpDNA의 *trnL-F*, *rp32-trnL*의 염기서열을 확보하여 분석하였다. ITS, *trnL-F*와 *rp32-trnL*의 data를 유합한 결과 계통수는 6개의 분계조로 구성되었다. 구주피나무는 outgroup과 가장 가깝게 나타났다. 피나무, 뽕잎피나무 그리고 털피나무는 한 분계조를 형성하였다. 연밥피나무, 섬피나무, 일본피나무는 각각 독립적인 분계조를 형성하였다. 섬피나무는 일본피나무와 가장 가까운 관계를 보여주었다. 보리자나무, 찰피나무, 염주나무는 하나의 분계조를 형성하여 서로 근연관계에 있음을 보여주었다.

References

- Álvarez, I. and J.F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29:417-434.
- Cai, J., P.F. Ma, H.T. Li and D.Z. Li. 2015. Complete plastid genome sequencing of four *Tilia* species (Malvaceae): A comparative analysis and phylogenetic implications. *PLoS ONE* 10(11): e0142705. doi:10.1371/journal.pone.0142705
- Choi, S.Y. 1987. Studies in foraging activity of honeybees during the blooming of the basswood (*Tilia kiusiana* Makino et Shiras). *Koreana J. Apiculture* 2(2):21-29 (in Korean).
- Chung, T.H. 1957. Tiliaceae. In *Korean Flora*, Vol 1. Sinjisa Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 338-344.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* v.19. pp.11-15.
- Farris, J.S. 1989. The retention index and homoplasy excess. *Syst. Zool.* 38(4):406-407.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Kim, H.S., Park, K.T. and Park, S.J. 2016. Molecular Phylogenetic Study of Korean *Hydrangea* L. *Korean J. Plant Res.* 29(4):407-418.
- Kim, K.J. and Y.H. Chung. 1983. Monographic study of the endemic plants in Korea 11. Taxonomy and interspecific relationships of the genus *Tilia*. *Proceedings College of Natural Science, Seoul National University* 8:121-160 (in Korean).
- _____. 1986. A study on the distribution of Genus *Tilia*. *Korean J. Apiculture* 1(1) :24-25 (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.
- Kluge, A.G. and J.S. Farris. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst Zool* 18:1-32.
- Lee, Y.N. 1996a. *Flora of Korea*. Kyohaksa Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 483-484 (in Korean).
- Lee, W.C. 1996b. *Limeamenta Flora of Korea*. Hyangmoonsa. Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 700-704 (in Korean).
- Liou, T.N. and I. Li. 1955. *Illustrated flora of ligneous plants of North Eastern China*. Academic Press, Beijing, China. pp. 1-42.
- Loockerman, 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.
- McCarthy, D. 2012. *Systematics and Phylogeography of the Genus Tilia in north america*. Department of Biological Sciences, Ph.D. Thesis, Illinois Univ., Chicago, USA. pp. 45.
- Nakai, T. 1909. *Flora Koreana by Nakai vol.1*. Imperial University of Tokyo. Tokyo, Japan. pp. 105-106.
- _____. 1914. *Chosen Shokubutsu I*. Seongmidang. Tokyo, Japan. pp. 172-175 (in Japanese).
- _____. 1922. *Flora Sylvatica Koreana, XII*. For. Exp. Sta. Govern. Chosen. Tokyo, Japan. pp. 27-58.
- _____. 1952. A synoptical sketch of Korean flora. *Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo.* 31:1-152.
- Pigott, C.D. 2008. The identity of limes labelled *Tilia insularis*. *Plantsman (new series)* 7:194-195.
- _____. 2012. *Lime-trees and Basswoods a biological monograph of the Genus Tilia*. Cambridge university press, New York (USA). pp. 150-155.
- Posada, D. and K.A. Crandall. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9):817-818.
- Schneider, C. K. 1909. Einige neue *Tilia* aus Ostasien. *Repert. Sp. Nov. Fedde* 7:200-201.
- Shaw, J.E., B. Lickey, J.T. Beck, S.B. Farmer, W.S. Liu, J. Miller, K.C. Siripun, C.T. Winder, E.E. Schilling and R.L. Small. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.* 92:142-166.
- Shishkin, B.K. 1974. Einige neue *Tilia* aus Ostasien. *Repertorium*

- Specierum Novarum Regni Vegetabilis Herausgegeben Von Professor Dr. Phill Friedrich Fedde 7:200-201.
- Taberlet, P.L., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17:1105-1109.
- White, T.J., T. Birns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics: *In* Gelfand, D., J. Sninsky and T. White (eds.), PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, USA. pp. 315-322.
- Yoon, J.G. 2003. Species delimitation of *Tilia amurensis*, *T. taquetii*, and *T. japonica*. *Bulletin of the arvoretum Seoul National University* 23:78-88 (in Korean).

(Received 28 April 2016 ; Revised 17 June 2016 ; Accepted 27 July 2016)