

엽록체 DNA 및 핵 DNA 염기서열에 근거한 한국산 나문재속(명아주과)의 분류학적 연구^{1a}

김석규²·정상옥^{3*}

Phylogenetic study of the Genus *Suaeda*(Chenopodiaceae) based on chloroplast and nuclear DNA sequences from Korea^{1a}

Suk-Kyu Kim², Sang Ok Chung^{3*}

요약

한국산 나문재속 식물에 대한 계통학적 유연관계를 밝히고, 분자계통학적 연구를 통해 나문재속 종간 유연관계를 확인할 수 있는 분자마커를 찾아내기 위해 연구를 수행하였다. 핵 리보솜 DNA ITS와 엽록체 DNA *matK*, *psbA-trnH* 그리고 *trnL-trnF*를 분자마커로 사용하였다. ITS 영역은 칠면초와 해홍나물 그리고 해홍나물과 방석나물을 구분하지 못하였다. *psbA-trnH*와 *trnL-trnF* 영역의 염기서열은 칠면초와 방석나물을 구분하지 못하였다. 그러나 4종의 분자마커 영역을 조합하여 분석한 결과 나문재속 식물 5종이 각각 독립적인 계통을 형성하는 것을 확인하였다. 따라서 나문재속 계통관계 분석을 위해서 여러 개의 분자마커 조합이 유용할 것으로 판단된다. 나문재속 내 분류군 간의 계통관계를 명확히 밝히기 위해 차후에 좀 더 많은 생태학적, 형태학적 자료를 조사해야 할 것으로 보인다.

주요어: DNA 바코드, ITS, *matK*, *psbA-trnH*, *trnL-trnF*

ABSTRACT

The purpose of this study was to identify the phylogenetic relationships of the plants in the Korean genus *Suaeda* and to find out the molecular markers that could confirm the interspecies relationships in the family tree through molecular phylogenetic studies. We used the nuclear ribosomal DNA ITS and the chloroplast DNA *matK*, *psbA-trnH*, and *trnL-trnF* as the molecular markers. We could not distinguish between *S. japonica* and *S. maritima* and between *S. maritima* and *S. australis* in the ITS region and could not distinguish between *S. japonica* and *S. australis* with the base sequence in the *psbA-trnH* and *trnL-trnF* region. However, we analyzed the combinations of four molecular marker regions and confirmed that each of five plant species of the genus *Suaeda* formed the independent line. Therefore, it is considered that combinations of molecular markers would be useful for the analysis of phylogenetic relationships in the genus *Suaeda*. Further investigations of the

1 접수 2018년 10월 1일, 수정 (1차: 2018년 10월 17일), 게재확정 2018년 11월 5일

Received 1 October 2018; Revised (1st: 17 October 2018); Accepted 5 November 2018

2 국립수산물과학원 서해수산연구소 갯벌연구센터 박사후연구원 Tidal Flat Research Center-National Institute of Fisheries Science, Gunsan, Jeonbuk 54014, Korea

3 국립수산물과학원 서해수산연구소 갯벌연구센터 해양수산연구소 Tidal Flat Research Center-National Institute of Fisheries Science, Gunsan, Jeonbuk 54014, Korea

a 이 논문은 국립수산물과학원 수산과학연구사업 갯벌어장환경모니터링(R2018055)의 지원에 의하여 수행되었음.

* 교신저자 Corresponding author: Tel: +82-63-472-8616, Fax: +82-63-467-2675, E-mail: hydbiol@korea.kr

ecological and morphological characteristics would be needed to understand the phylogenetic relationship and lineage diversification in the genus *Suaeda*.

KEY WORDS: DNA barcode, ITS, *matK*, *psbA-trnH*, *trnL-trnF*

서 론

나문재속(*Suaeda*)은 명아주과(Chenopodiaceae), 나문재아과(Spirolobeae)에 포함되는 식물군이다. 나문재속 식물은 두 가지 유형의 서식 분포를 나타내고 있는데, 극지방에서 열대까지의 조간대 습지, 강하구, 해변과 온대 및 아열대 지역의 알카리성 평원이나 염분이 있는 호수가나 내륙사막에 분포한다(Alvarado and Flores-Olvera, 2013; Brandt *et al.*, 2015). 전 세계적으로 약 110여 종이 분포하고 있는 것으로 알려져 있다(Schütze *et al.*, 2003).

한반도의 서·남해안은 갯벌이 잘 발달되어 나문재속 식물이 널리 분포하고 있다. 나문재(*S. glauca* (Bunge) Bunge), 칠면초(*S. japonica* Makino), 해홍나물(*S. maritima* (L.) Dumort) 등은 한국산 나문재속으로 기재되어 있으며(Chung, 1957), 좁은해홍나물(*Suaeda heteroptera* Kitagawa)은 Park(1974)에 의한 최신보고 이후 더 이상 기술되지 않고 있다. 방석나물(*S. australis* (R. Br) Moq)은 Chung(1992)에 의해 한반도 미기록 종으로 보고되었으며, 기수초(*S. malacosperma* Hara)는 Shim *et al.*(2001)에 의해 한반도 미기록종으로 추가되었다. 따라서 한국산 나문재속은 문헌 기록 상 6종으로 보고되어 있으나 최근 기록에서 나타나지 않고 있는 좁은해홍나물을 제외하고 5종이 분포하는 것으로 제시할 수 있다(Chung, 1992; Chung and Lee, 1995; Shim and Choi, 2004; Lee *et al.*, 2007). 이들 중 형태적으로 뚜렷한 특징을 보이고 있는 나문재는 Sect. Schanginia (C.A.Mey.) Iljin에 속하며, 칠면초, 해홍나물, 방석나물, 기수초 등은 Sect. Heterosperma Iljin에 포함된다(Iljin, 1936). 나문재속 식물들은 형태적으로 매우 유사하여 식별하는데 어려움이 있다. 또한 카스피해 주변에 서식하고 있는 Sect. Heterosperma Iljin에 포함된 *S. crassifolia* Pall, *S. salsa* (L.) Pall. 및 *S. prostrata* Pall.도 식별에 큰 어려움을 보이고 있으며 *S. maritima* (L.) Dumort의 아종으로 취급하기도 한다(Freitag and Lomonosova, 2006). 나문재속 종들의 일부는 Freitag *et al.*(1996), Lomonosova and Freitag(2003)등에 의해 식별을 위한 연구가 이루어졌지만, 대부분은 개체 식별, 분포 및 생태에 관한 연구가 불충분한 실정이다. 한반도에 서식하고 있는 칠면초, 해홍나물, 방석나물, 기수초 등은 형태적으로 유사하고, 개체 식별의 주요 형질인 가지의 분지형태, 잎의 모양, 열매의 모양 등이 종내 개체간에도

상당한 변이를 보이고 있어 식별에 어려움이 있는 것으로 알려져 있다(Shim *et al.*, 2001).

DNA 바코드는 짧고 표준화된 DNA 영역의 염기서열을 기반으로 생물 종을 확인할 수 있는 유용한 방법이다(Hebert *et al.*, 2003). 식물은 엽록체에서 추출된 여러 영역이 식물 바코드로서 보편적으로 개체식별에 대한 유용성이 연구되었다(Kress and Erickson, 2007; Fazekas *et al.*, 2008). CBOL Plant Working Group (2009)은 *rbcl* + *matK*의 조합을 육상식물의 핵심 바코드로 제안하였으며, Yao *et al.*(2010)은 ITS2 영역을 식물과 동물에 모두 사용할 수 있는 바코드로 제안하였다. *rbcl* + *matK* 핵심 바코드가 일부 소수 종에 대한 연구를 토대로 제안된 것을 보완하기 위해 *psbA-trnH* 영역에 대한 평가가 수행되었다(China Plant BOL Group1, 2011). 한국산 나문재속에 대한 DNA 바코드 연구는 Shim(2005)에 의해 ITS 염기서열이 분석되었으며, Lee *et al.*(2007)에 의해 ITS 염기서열과 *psbB-psbH* 염기서열의 영역이 분석되어 한국산 나문재속의 계통관계에 관한 연구가 이루어졌음에도 불구하고 여전히 나문재속 식물에 대한 계통관계가 명확하다고 할 수 없다.

따라서, 본 연구는 한반도에 서식하고 있는 나문재속 식물을 대상으로 핵 리보솜 DNA(nrDNA) ITS 구간의 염기서열과 엽록체 DNA(cpDNA) *matK*, *psbA-trnH* 및 *trnL-trnF* 구간의 염기서열 분석을 통해 분류군간 계통학적 위치를 파악하고자 하였다.

연구방법

1. 연구대상

본 연구는 2016년부터 2017년 사이 우리나라 서해안 갯벌에서 채집한 나문재속 5종을 재료로 사용하였다. 나문재(*S. glauca*)는 2개 지역, 칠면초(*S. japonica*)는 7개 지역, 해홍나물(*S. maritima*)은 2개 지역, 방석나물(*S. australis*)은 6개 지역, 기수초(*S. malacosperma*)는 2개 지역에서 채집하였으며 총 21개의 시료를 분석하였다(Table 1). 본 연구 기간 중에 채집된 개체는 Shim(2005)에 의한 형태학적 분류 특징에 따라 동정하고, 석엽표본으로 제작하여 국립수산물과학원 갯벌연구센터 표본실에 확정표본으로 소장하였다.

Table 1. Collection data 5 species of the *Suaeda* used in this study

Species	Sample No.	Locality	Coordinates	Voucher No.
<i>S. glauca</i>	CG-H235	Changgi-ri, Anmyeon-eup, Taean-gun, Chungcheongnam-do	36°34'38.01"N 126°21'48.32"E	TFRC-235
	JP-KS004	Julpo-ri, Julpo-myeon, Buan-gun, Jeollabuk-do	35°35'11.41"N 126°39'31.58"E	TFRC-004
<i>S. japonica</i>	DM-H112	Dongmak-ri, Hwado-myeon, Ganghwa-gun, Incheon	37°35'36.07"N 126°27'17.93"E	TFRC-112
	DG-H043	Donggeom-ri, Gilsang-myeon, Ganghwa-gun, Incheon	37°35'43.17"N 126°30'48.42"E	TFRC-043
	YH-H132	Nae-ri, Yeongheung-myeon, Ongjin-gun, Incheon	37°15'31.22"N 126°29'06.06"E	TFRC-132
	SJ-H137	Seonjae-ri, Yeongheung-myeon, Ongjin-gun, Incheon	37°14'47.22"N 126°31'25.97"E	TFRC-137
	JS-H036	Jinsan-ri, Nam-myeon, Taean-gun, Chungcheongnam-do	36°43'39.75"N 126°16'16.52"E	TFRC-036
	CG-H153	Changgi-ri, Anmyeon-eup, Taean-gun, Chungcheongnam-do	36°34'30.18"N 126°21'51.71"E	TFRC-153
	JP-H080	Julpo-ri, Julpo-myeon, Buan-gun, Jeollabuk-do	35°34'54.17"N 126°39'16.89"E	TFRC-080
<i>S. maritima</i>	JP-H091	Julpo-ri, Julpo-myeon, Buan-gun, Jeollabuk-do	35°35'11.41"N 126°39'28.84"E	TFRC-091
	JP-H092	Julpo-ri, Julpo-myeon, Buan-gun, Jeollabuk-do	35°35'12.26"N 126°39'26.90"E	TFRC-092
	JP-H199	Julpo-ri, Julpo-myeon, Buan-gun, Jeollabuk-do	35°35'14.80"N 126°39'26.85"E	TFRC-199
	HH-H107	Hyeonhwa-ri, Hyeongyeong-myeon, Muan-gun, Jeollanam-do	35°02'12.07"N 126°25'04.72"E	TFRC-107
<i>S. australis</i>	YH-H047	Nae-ri, Yeongheung-myeon, Ongjin-gun, Incheon	37°15'29.39"N 126°29'07.93"E	TFRC-047
	SJ-H144	Seonjae-ri, Yeongheung-myeon, Ongjin-gun, Incheon	37°14'45.03"N 126°31'27.78"E	TFRC-144
	JS-H174	Jinsan-ri, Nam-myeon, Taean-gun, Chungcheongnam-do	36°43'43.22"N 126°16'21.49"E	TFRC-174
	CG-H161	Changgi-ri, Anmyeon-eup, Taean-gun, Chungcheongnam-do	36°34'33.96"N 126°21'47.35"E	TFRC-161
	JP-KS003	Julpo-ri, Julpo-myeon, Buan-gun, Jeollabuk-do	35°35'06.61"N 126°39'38.29"E	TFRC-003
	HH-H100	Hyeonhwa-ri, Hyeongyeong-myeon, Muan-gun, Jeollanam-do	35°02'11.13"N 126°25'05.62"E	TFRC-100
<i>S. malacosperma</i>	YH-H226	Nae-ri, Yeongheung-myeon, Ongjin-gun, Incheon	37°15'28.74"N 126°29'07.09"E	TFRC-226
	HH-H202	Hyeonhwa-ri, Hyeongyeong-myeon, Muan-gun, Jeollanam-do	35°02'08.68"N 126°25'06.72"E	TFRC-202

2. Genomic DNA 추출

DNA 추출에 사용한 시료는 액체질소를 사용하여 급냉한 후 막자사발을 이용하여 분말상태로 마쇄한 후 분말 100mg을 취하여 1.5mL Eppendorf tube에 넣어 Accuprep®GMO DNA Extraction Kit(Bioneer, Korea)제품의 방법에 따라 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 1% 아가로스 겔(STRATAGENE Agarose I, USA)에서 전기영동하고 Ethidium Bromide(EtBr)로 염색하여 DNA 절편을 확인하였다. DNA의 순도와 농도는 분광광도계(ATI Unicam Ltd, UK)를 사용하여 260nm와 280nm에서 흡광도를 측정하여 정량하고, 각각의 농도를 20ng/μl로 희석하여 PCR 반응에 사용하였다.

3. 유전자 부위 PCR 증폭 및 염기서열 분석

약 20ng/μl의 total DNA를 주형으로 각각의 primer (Table 2) 및 HiPi Plus DNA Polymerase (ELPIS-Biotech, Korea)를 최종 20μl의 반응용액에 첨가하여 SimpliAmp Thermal Cycler(Applied Biosystems, USA)를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 증폭은 95℃에서 30초, 57~60℃에서 30초 72℃에서 60초 반복하여 30Cycle을 진행하였다. 반응이 끝난 증폭산물은 1.2% 아가로스 겔 상에서 증폭 여부를 확인하고 단일 DNA 절편으로 확인된 증폭산물은 Accuprep®Gel Purification Kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 정제 회수한 후 염기서열 결정에 사용하였다. 염기서열은 ABI PRISM 3700 GENETIC analyzer(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 확보하고 시료의 표준염기서열로 선정하여 분석하였다.

4. 계통학적 분석

각 시료의 염기서열은 BioEdit 프로그램(version 7.2.5)을 이용하여 편집하고 ClustalW Multiple alignment로 정렬하여 비교 분석하여 계통분석이 가능한 DNA 염기서열을 탐색하였다(Thompson et al., 1994). 전체 분석대상 시료의 유연관계 분석은 21 개체의 각 DNA 바코드 구간 전체 염기서열과 GenBank에 등록된 나문재속의 염기서열 정보를 검색하여 비교하였다. 계통수 작성에 사용된 외군(Outgroup)은 GenBank에서 *Patellifolia patellaris*의 염기서열을 다 운받아 사용하였으며 각각의 accession number는 ITS (LK054290.1), *matK*(LK054319.1), *psbA-trnH*(LK054368.1) 그리고 *trnL-trnF*(AY858603.1)이다. 계통유전학적 거리 측정을 위해 MEGA6 프로그램의 Maximum Likelihood 방법으로 통계처리 하였으며, Bootstrap 분석을 1,000회 반복하여 bootstrap value를 산출하고 염기서열 정렬과정에 나타나는 gap은 모두 사용하여 분석하였다. 일관성지수(CI)와 보존지수(RI)는 Maximum Parsimony 분석방법을 사용하였으며, 초기 계통수 작성은 MCL(Maximum Composite Likelihood) 접근법을 사용하여 추정된 쌍 거리 행렬에 Neighbor-Joining(NJ)방법을 적용하였다.(Tamura et al., 2013).

결 과

1. DNA 바코드 구간 증폭

한국산 나문재속 5종 21개체를 식물의 계통분석에 유용하게 사용되는 DNA 바코드인 ITS, *matK*, *psbA-trnH* 및 *trnL-trnF* 영역을 증폭한 결과, 모든 시료에서 균일하게 증폭되었으며 각각의 바코드 영역 PCR 증폭효율은 100%로

Table 2. The gene and primer sequence information of DNA barcodes used in this study

Gene	Primers name	Sequence(5'→3')	G+C content	Tm(°C)	reference
ITS	ITS1F	TTTCCGTAGGTGAACCTGCGG	57	61.7	White et al(1990)
	ITS4R	CTTAAACTCAGCGGTAGTCC	52	59.7	
<i>matK</i>	<i>matKF</i>	CGTTACTGGTTGAAAGATGCC	47	57.6	Cuenoud et al(2002)
	<i>matKR</i>	GTTCTAGCACAAGAAAGTCGAAG	43	58.7	
<i>psbA-trnH</i>	<i>psbF</i>	CGAAGCTCCATCTACAAATGG	48	57.9	China Plant BOL Group1(2011)
	<i>psbR</i>	ACTGCCTTGATCCACTTGCC	55	59.4	
<i>trnL-trnF</i>	<i>trnF</i>	TCGTGAAGGTTCAAGTCCCT	50	57.3	This study
	<i>trnR</i>	CAACTGAGCTATCCCGACTA	50	57.3	

나타났다. 각각 예상되는 크기의 DNA 절편은 약 ITS 650bp, *matK* 800bp, *psbA-trnH* 350bp 그리고 *trnL-trnF* 400bp로 아가로스 겔 전기영동을 통하여 확인하였다. 각 시료에 대한 염기서열을 분석하여 최종 확정된 바코드 영역의 유전자 증폭산물의 크기는 ITS 영역에서 나문재, 칠면초, 방석나물, 해홍나물, 기수초에서 629bp로 동일하였다. *matK* 영역의 증폭산물은 798bp~803bp였다. *psbA-trnH* 영역은 350bp~363bp 크기로 나타났으며, *trnL-trnF* 영역은 368bp~409bp 크기였다(table 3).

2. 염기서열 변이양상

한국산 나문재속 5종의 염기서열은 BioEdit 프로그램 (version 7.2.5)을 이용하여 편집하고 ClustalW Multiple alignment로 정렬하여 비교 분석하였다. ITS 영역의 염기서열 변이양상은 정렬된 염기서열의 크기는 640bp였으며, 이 중 117bp의 염기서열이 변이를 보였으며 변이율은 18.28%이었다. 보존된 염기서열은 523bp로 나타났으며 구아닌과 시토신(G+C 함량)은 56.88%이었다. *matK* 영역의 염기서열 변이양상은 정렬된 염기서열의 크기는 804bp이고 변이양상을 보이는 염기서열은 32bp로 변이율은 3.98%로 가장 낮은 변이율을 보였으며, 보존된 염기서열은 772bp이었다. *matK* 영역의 G+C 함량은 31.92%로 나타났다. *psbA-trnH* 영역의 염기서열 변이양상을 보면 정렬된 염기서열의 크기

는 363bp로 나타났으며 이중 보존된 염기서열은 348bp이고 변이를 보이는 염기서열은 15bp로 가장 적은 수의 변이를 보였으나 변이율은 4.13%이었고, G+C 함량은 27.02%이었다. *trnL-trnF* 영역의 염기서열 변이 양상은 정렬된 염기서열의 크기는 412bp였으며, 47bp의 염기가 변이를 보이고 있으며 변이율은 11.41%이었다. 365bp의 염기가 보존된 상태를 보였고, G+C 함량은 30.37%이었다(Table 3).

3. 종간 유연관계 분석

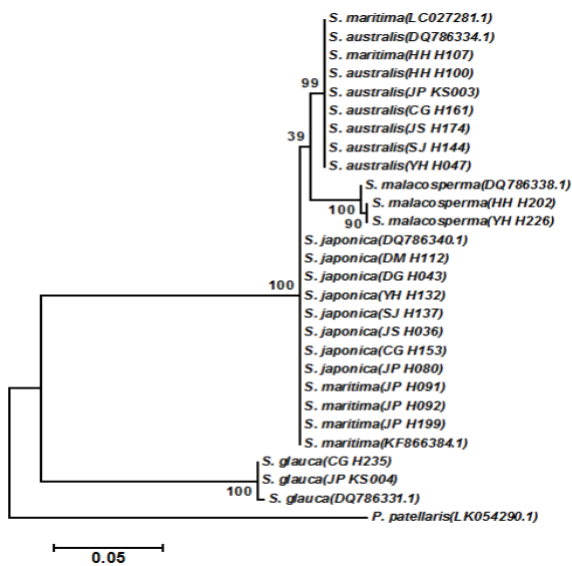
한국산 나문재속 5종 21개체의 ITS, *matK*, *psbA-trnH* 그리고 *trnL-trnF* 바코드 영역 각각의 염기서열과 NCBI database에서 Blast-search를 통해 확보한 지중해 서부 및 북아프리카에 서식하는 명아주과 식물인 *Patellifolia patellaris*의 염기서열을 외군(outgroup)으로 사용하여 종간 유연관계를 분석한 결과 ITS 영역에서 bootstrap value(BP)는 71~100%로 나타났으며 나문재가 독립적으로 그룹을 형성하였다. 방석나물과 해홍나물이 하나의 그룹을 형성하고 기수초 계통과 가장 가까운 유연관계를 보였으며, 칠면초와 해홍나물이 하나의 그룹으로 묶인 계통과 비교적 가까운 유연관계가 나타났다. ITS 영역을 분석한 나문재속은 4개의 계통을 형성하는 것을 확인하였으며(Figure 1A), tree length는 231이고 MP tree의 일관성지수(CI)는 0.978, 보존지수(RI)는 0.978이었다. 따라서 칠면초, 해홍나물, 방석나

Table 3. Values and statistics of the data matrices

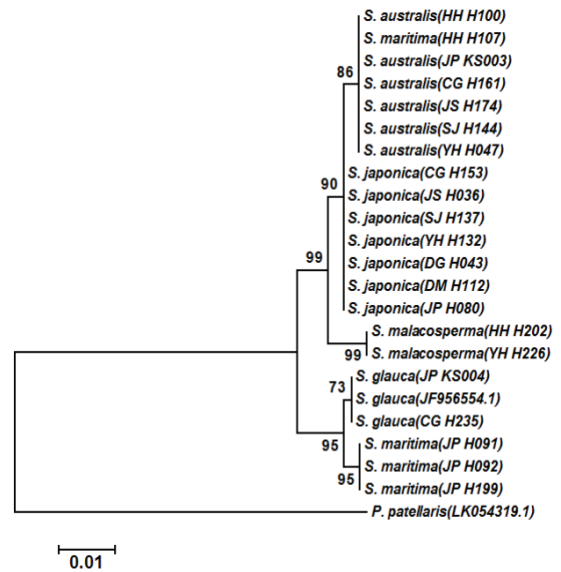
Sequence characteristics	<i>matK</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnL-trnF</i>	ITS	All Combined	
Number of taxa	5	5	5	5	5	
Amplicon length(bp)	S. glauca	802	350	409	629	2,190
	S. japonica	800	356	369	629	2,154
	S. maritima	798	350	368	629	2,145
	S. australis	800	356	369	629	2,154
	S. malacosperma	803	363	369	629	2,164
Aligned sequences(bp)	804	363	412	640	2,219	
Dataset sequences(bp)	796	350	365	607	2,147	
G+C(%) ratio	31.92	27.02	30.37	56.88	38.08	
Number of conserved site	772	348	365	523	2,008	
Number of variable site(%)	32(4.0)	15(4.1)	47(11.4)	117(18.3)	211(9.5)	
Number of most parsimonious trees	84	100	93	81	82	
Tree length	110	100	94	231	523	
Consistency index	0.963	0.980	0.989	0.978	0.915	
Retention index	0.964	0.966	0.987	0.978	0.952	
Composite index	0.929	0.946	0.977	0.956	0.910	

물, 기수초 4종이 유전적으로 가깝게 형성되고 있으며 나문재는 타 4종에 비해 상당한 유전적 차이를 보이고 있다. *matK* 영역의 유연관계 분석 결과 79~100%의 BP가 나타났으며, 칠면초와 방석나물이 93%의 BP로 각각 그룹을 형성하고 나문재와 해홍나물이 BP 94%로 유전적으로 가깝게 그룹을 형성하였으며 기수초는 칠면초, 방석나물과 유전적으로 가깝게 그룹을 형성하는 것을 확인 하였다(Figure 1B). *matK* 영역의 tree length는 110이고 MP tree의 일관성지수는

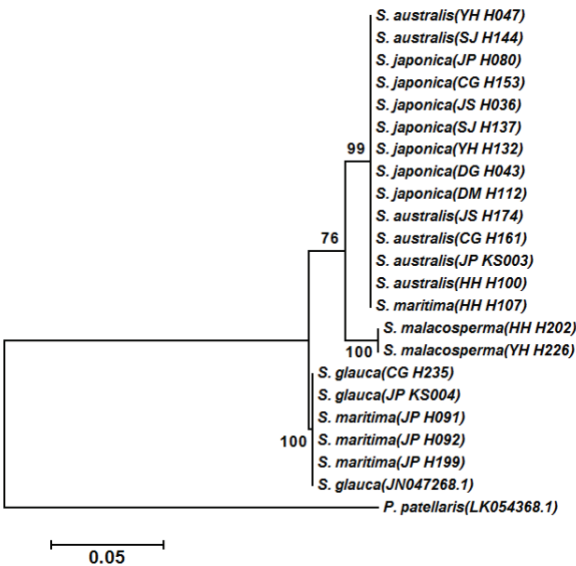
0.963, 보존지수는 0.964로 나타났다. *psbA-trnH* 영역의 중간 유연관계 분석에서 BP는 80~99%로 나타났으며 기수초가 독립적으로 하나의 그룹을 형성하였고 칠면초와 방석나물이 99%의 BP로 하나의 그룹을 형성하였으며 나문재와 해홍나물이 BP 99%로 하나의 그룹을 형성하였다(Figure 1C). *psbA-trnH* 영역의 tree length는 100이고 일관성지수와 보존지수는 각각 0.980, 0.966으로 나타났다. *trnL-trnF* 영역의 경우 BP는 66~99%로 나타났다. 나문재가 하나의



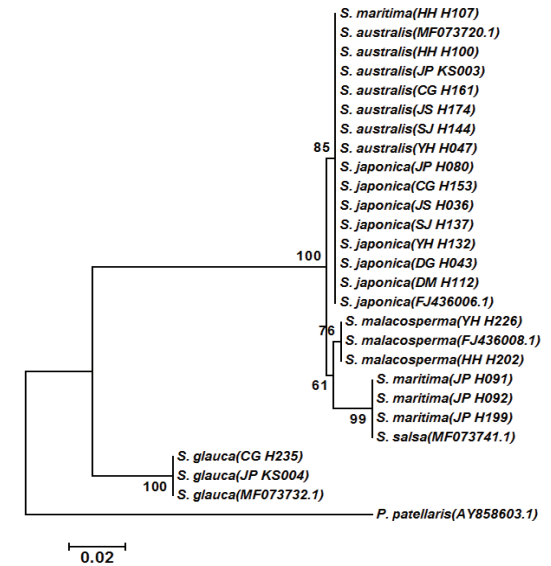
(A)



(B)



(C)



(D)

Figure 1. Phylogenetic tree among 21 samples of five species by MEGA6 program. Maximum Likelihood statistics with 1,000 bootstrap replicated based on the (A) ITS, (B) *matK*, (C) *psbA-trnH*, (D) *trnL-trnF* sequences. Outgroup: *Patellifolia patellaris*

독립적 그룹을 형성하였으며 칠면초와 방석나물이 하나의 그룹으로 기수초와 해홍나물이 각각 그룹을 형성하고 나문재에 비해 비교적 유전적으로 가까운 거리를 나타내었다 (Figure 1D). *trnL-trnF* 영역의 tree length는 94였으며 MP tree의 일관성지수는 0.989, 보존지수는 0.987이었다. DNA 바코드 4개 영역의 중간 유연관계를 확인한 결과 ITS 영역에서는 칠면초와 해홍나물이 하나의 그룹을 형성하고 *psbA-trnH*과 *trnL-trnF* 영역에서 칠면초와 방석나물이 하나의 그룹을 형성하는 것을 볼 수 있었으며, *psbA-trnH* 영역에서 나문재와 해홍나물이 하나의 그룹을 형성하는 것으로 나타났기 때문에 중간 구분이 명확하지 않았다. 그러나 DNA 바코드 4개의 영역을 조합하여 분석한 결과 5개의 그룹을 형성하는 것을 확인 하였다(Figure 2). BP는 84~100%로 나타났으며, 칠면초와 방석나물이 유전적 유연관계가 가장 가까웠고 나문재가 가장 유전적 유사성이 낮게 나타났다. 4개 영역 조합을 통한 계통수의 tree length는 523 이고 MP tree의 일관성지수 0.915, 보존지수는 0.952로 나타났다(Table 3).

고찰

나문재속 식물은 아시아, 아프리카, 아메리카, 유럽, 오세아니아에 이르기까지 전 대륙에 걸쳐 세계적으로 서식하고 있는 것으로 알려져 있으며 형태적 유사성과 특이한 서식지역으로 인해 나타나는 많은 생태형 때문에 중간 구분이 매우 어렵다(Fisher *et al.*, 1997). 한반도에는 5종의 나문재속이 분포하는 것으로 알려져 있으며 이 중 나문재는 형태적으로 매우 뚜렷한 특징을 보이고 있어 구분이 쉬우나 칠면초와 해홍나물은 형태적 유사성으로 인해 구분이 매우 어렵다. 방석나물(Chung, 1992)과 기수초(Shim *et al.*, 2001)는 비교적 최근에 국내 미기록종으로 보고되었다.

본 연구 결과에서 제시하고 있는 4개 영역의 DNA 바코드 염기서열을 조합한 중간 유연관계 분석은 한국산 나문재속의 분류군이 5계통이라는 것을 지지하고 있다(Figure 2). 이러한 결과는 RAPD 분석을 통한 나문재속의 종 구분 결과와 일치하고(Shim and Choi, 2004), ITS 영역과 *psbB-psbH* 영역의 염기서열을 근거로 방석나물과 해홍나물을 하나의 그룹으로 제시한 Lee *et al.*(2007)의 연구결과와는 다르게 나타났다. 각각의 바코드 영역에서 확인한 결과를 보면 ITS 영역의 경우 칠면초와 해홍나물 그리고 방석나물과 해홍나물의 구분이 모호하게 나타나고 있다(Figure 1A). 이는 Shim(2005)의 연구에서 제시한 칠면초와 해홍나물의 ITS 염기서열이 같은 것과 일치하였다. 이 결과는 아메리카에 서식하고 있는 나문재속 13종 중 7종이 동일한

ITS 염기서열을 갖는 것으로 알려져 있는 것과 유사하다 (Brandt *et al.*, 2015). 그리고 엽록체 DNA인 *matK* 영역은 나문재속 식물 간 구분이 *psbA-trnH*과 *trnL-trnF* 영역에 비해 잘 이루어지는데 *psbA-trnH*과 *trnL-trnF* 영역에서는 칠면초와 방석나물이 구분되지 않는 것을 알 수 있다 (Figure 1C, D). 한편 *psbA-trnH* 영역에서는 나문재와 해홍나물이 구분되지 않았다(Figure 1C). 이는 향나무절 식물의 계통수 분석에서 나타난 결과와 같다(Hong *et al.*, 2014). 본 연구에서 각 종에 대한 서식지역별 염기서열의 차이는 4개의 DNA 바코드 영역에서 나타나지 않았다. 이는 동일 종 내에서 엽록체 DNA 염기서열이 차이를 보이지 않는 것으로 제시한 Kim *et al.*(2008)의 연구와 같은 결과를 보이고 있다. 다만 해홍나물의 경우 전북 부안(JP)과 전남 무안(HH)에서 채집하였는데 부안에서 채집한 해홍나물은 하나의 분류군을 형성한 반면 무안에서 채집한 해홍나물(HH H107)의 경우 방석나물과 같은 염기서열을 형성하여 방석나물 생태형을 해홍나물로 잘못 구분한 것으로 판단된다 (Figure 2). 해홍나물(JP H091, H092, H199)은 *trnL-trnF* 영역에서 *S. salsa*(MF073741.1)와 염기서열이 동일하게 나타났으며(Figure 1D) *psbA-trnH* 영역에서는 *S. glauca* (JN047268.1)와 염기서열이 같았다(Figure 1C). 따라서 본 연구의 결과, 해홍나물로 분류한 나문재속 식물의 명확한 명명을 제시하기 위해서는 향후 보다 정밀한 형태학적 자료와 더불어 생태학적 자료가 필요할 것으로 보인다.

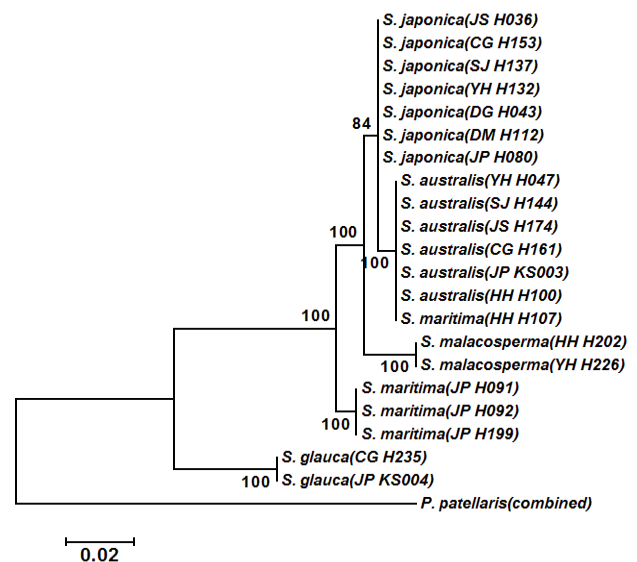


Figure 2. Phylogenetic tree among 21 samples of five species by Maximum Likelihood statistics with 1,000 bootstrap replicated based on the all combined sequences. Outgroup: *Patellifolia patellaris*

본 연구의 계통수분석에 사용한 4개 영역의 DNA 바코드의 염기서열 분석결과는 각각 다른 계통수를 형성하여 차이를 보이고 있었지만, 핵과 엽록체 DNA 염기서열 조합을 통해 유용한 계통분류의 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 한국산 나문재속 식물들에 대해 보다 정확한 진화적 계통관계를 파악하기 위해서는 향후 형태, 생태, 생리학적 다양한 방법의 세부조사가 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 국립수산물과학원 수산과학연구사업 깃벌어장 환경모니터링(R2018055)의 지원으로 수행된 연구입니다. 또한 좋은 논문이 될 수 있도록 고견을 주신 심사위원께 감사의 말씀 드립니다.

REFERENCES

- Alvarado, R.E. and H. Flores-Olvera(2013) *Suaeda pulvinata* (Chenopodiaceae), a new species from saline lakes of central Mexico. *Willdenowia* 43: 309-314.
- Brandt, R., M. Lomonosova, K. Weising, N. Wagner and H. Freitag(2015) Phylogeny and biogeography of *Suaeda* subg. *Brezia* (Chenopodiaceae/Amaranthaceae) in the Americas. *Plant System Evolution* 301: 2351-2375.
- CBOL Plant Working Group(2009) A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:12794.12797.
- China Plant BOL Group1 (2011) Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *PNAS* 108(49): 19641-19646.
- Chung, T.H.(1957) Korean Flora II. Sinjisa, Seoul. (in Korea)
- Chung, Y.J. and S.T. Lee(1995) Pollen morphology of some Korean Chenopodiaceae. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 25: 255-276. (In Korean with English abstract)
- Chung, Y.J.(1992) A Taxonomic Study of the Korean Chenopodiaceae. Ph.D. Thesis, Sungkyunkwan University, Korea. (In Korean with English abstract)
- Cuenoud, P., V. Savolainen, L.W. Chatrou, M. Powell, R.J. Grayer and M.W. Chase(2002) Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcl*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *American Journal of Botany* 89: 132-144.
- Fazekas, A.J., K.S. Burgess, P.R. Kesanakurti, S.W. Graham and S.G. Newmaster(2008) Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE* 3:e2802.
- Fisher, D.D., H.H. Schenk, A. Jennifer, Thorsch and W.R. Ferren JR(1997) Leaf anatomy and subgeneric affiliations of C3 and C4 species of *Suaeda*(Chenopodiaceae) in North America. *American Journal of Botany* 84(9): 1198-1210.
- Freitag, H. and M. Lomonosova(2006) Typification and identity of *Suaeda crassifolia*, *S. prostrata* and *S. salsa*, three often confused species of *Suaeda* sect. *Brezia* (Chenopodiaceae, Suaedoideae). *Willdenowia* 36: 21-36.
- Freitag, H., J. Walter and W. Wucherer(1996) Die Gattung *Suaeda* (Chenopodiaceae) in Österreich, mit einem Ausblick auf die pannonischen Nachbarländer. *Ann. Naturhist. Mus. Wien* 98B (Suppl.): 343-367.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball and J.R. deWaard(2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biology Science* 270: 313-321.
- Hong, J.K., J.C. Yang, 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 Journal of Plant Taxonomy* 44(1): 51-58. (in Korean with English abstract)
- Ilijin, M.(1936) Chenopodiaceae Less. pp. 2-353 in *Flora SSSR*: vol. 6, eds. V. L. Komarov and B. K. Shishkin. Moskva/Leningrad, USSR: Akademia Nauk. (English translation *Flora of USSR*. 1985. Singh/Koeltz, Dehra Dun).
- Kim, M.K., J. Baigalmaa, H. Sun and D.C. Yang(2008) Phylogenetic Analysis of Ji-Mo (*Anemarrhena asphodeloides*) on the Basis of *trnL-F* Sequences. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16(1): 1-7. (in Korean with English abstract)
- Kress, W.J. and D.L. Erickson(2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2: e508.
- Lee, J.S., D.S. Park, B.S. Ihm and W.J. Lee(2007) Taxonomic Reappraisal on *Suaeda australis* (Chenopodiaceae) in Korea based on the Morphological and Molecular Characteristics. *Journal of Plant Biology* 50(6): 605-614.
- Lomonosova, M.N. and H. Freitag(2003) A new species of *Suaeda* (Chenopodiaceae) from the Altai, Central Asia. *Willdenowia* 33: 139-147.
- Park, M.K.(1974) Keys to the Herbaceous Plants in Korea (Dicotyledoneae). *Chungeumsa*, Seoul. (in Korea)
- Shim, H.B. and B.H. Choi(2004) RAPD marker variations between and within the species of Korean *Suaeda*. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 34: 63-74 (in Korean with English abstract)
- Shim, H.B.(2005) Systematics of *Suaeda*(Chenopodiaceae) and floristic Study of halophytes in Korea. Ph.D. Thesis, Inha University, Korea. (in Korean with English abstract)
- Shim, H.B., J.Y. Chung and B.H. Choi(2001) One unrecorded

- species from Korea: *Suaeda malacosperma* Hara. Korean Journal of Plant Taxonomy 31(4): 383-387. (in Korean with English abstract)
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 30: 2725-2729.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and J.J. Gibson(1994) CLUSTAL W. improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 11 : 4673-4680.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J.W. Taylor(1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications 18: 315-322.
- Yao, H., J. Song, C. Liu, K. Luo, J. Han and Y. Li(2010) Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. PLoS ONE 5(10): e13102.