

제주고사리삼을 중심으로한 고사리삼과 식물의 계통

선병윤* · 백태규 · 김영동¹ · 김찬수²

전북대학교 생물과학부, ¹한림대학교 생명과학과, ²국립산림과학원 난대산림연구소

Phylogeny of the family Ophioglossaceae with special emphasis on genus *Mankyua*

Byung-Yun Sun*, Tae Gyu Baek, Young-Dong Kim¹ and Chan Soo Kim²

Division of Biological Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

¹Division of Biological Sciences, Hallym University, 39 Hallymdaehak-gil, Chuncheon 200-702, Korea

²Warm-temperate Forest Research Center, Korea Forest Research Institute, Sanghyo-Dong, Seogwipo 697-050, Korea

적 요: 엽록체 *rbcL* gene의 염기서열과 포자의 형태를 바탕으로 고사리삼과 식물의 계통과 제주고사리삼속의 계통학적 위치를 추정하였다. 엽록체 DNA *rbcL* 염기서열의 분석 결과 고사리삼과는 뚜렷하게 고사리삼계보 (Botrychioid lineage)와 나도고사리삼계보 (Ophioglossoid lineage)의 두 군으로 구분되었다. 고사리삼계보에 있어 제주고사리삼속(*Mankyua*)은 *Helminthostachys*속과 함께 분계의 기저에서 고사리삼속(*Botrychium*)의 자매분류군으로 분지하였으나, 이들 고사리삼속(*Botrychium*), 제주고사리삼속(*Mankyua*), 및 *Helminthostachys*속 사이의 계통적 유연관계는 결정되지 못했다. 고사리삼속의 경우 *Sceptridium*아속과 *Botrychium*아속이 뚜렷한 단계통을 형성하였으나, *Botrypus*아속에 속한 분류군들은 고사리삼속의 기저에서 다른 고사리삼속 분류군의 자매분류군으로 분지하면서 단계통이 아닌 것으로 밝혀졌다. 나도고사리삼계보를 형성하는 나도고사리삼속(*Ophioglossum*)의 경우, *Ophioglossum*아속은 단계통을 형성하였으며, *Ophioglossum*아속에 대해 *Cheiroglossa*아속 및 *Ophioderma*아속이 차례로 자매분류군으로 분지하였다. 염기서열 계통수, 포자의 형태 및 외부형태의 고찰에 있어 제주고사리삼속은 *Helminthostachys*와 유사하지만, 계통수에서 patristic distance 뿐 아니라 포자소엽의 형태가 뚜렷이 구분되어 이들 2속은 독립된 속으로 판단된다.

주요어: 고사리삼과, 제주고사리삼속, 고사리삼속, 나도고사리삼속, *Helminthostachys*속, 분자계통, 포자 형태

ABSTRACT: Phylogeny of the family Ophioglossaceae and a phylogenetic position of *Mankyua* were estimated through analyses of chloroplast *rbcL* gene sequences and spore morphology. Sequence analysis of the *rbcL* gene clearly indicated that there are two major lineages in the family Ophioglossaceae: Botrychioid lineage and Ophioglossoid lineage. The Botrychioid lineage is composed of three distinct clades: *Botrychium*, *Helminthostachys* and *Mankyua*, where *Helminthostachys* and *Mankyua* were placed as sister groups to the *Botrychium*. Within the genus *Botrychium*, subgenera *Sceptridium* and *Botrychium* were monophyletic, while taxa of subgen. *Botrypus* branched as sister of the two, successively, thus making a non-monophyletic group. *Ophioglossum* formed the Ophioglossoid lineage, where the subgen. *Ophioglossum* is monophyletic, while subgen. *Cheiroglossa* and *Ophioderma* formed a sister relationship with subgen. *Ophioglossum*. In terms of external morphology and spores, *Mankyua* is most similar to *Helminthostachys*, however, patristic distance in the cladogram and trophophore characteristics of the two genera are distinct. Therefore, *Mankyua* is a well defined genus within the family in terms of morphology as well as molecular phylogeny which places it in basal position of the Botrychioid lineage on the gene tree.

Keywords: Ophioglossaceae, *Mankyua*, *Botrychium*, *Ophioglossum*, *Helminthostachys*, molecular phylogeny, spore morphology

*Author for correspondence: sunby@chonbuk.ac.kr

비종자관속식물 (seedless vascular plant) 또는 관속포자식물 (spore bearing vascular plants)은 최근까지 솔잎난식물문 (Psilophyta), 석송식물문 (Lycophyta), 속새식물문 (Equisetophyta) 및 양치식물문 (Filicophyta)의 4개의 문으로 인식되어 왔다 (Gilford and Foster, 1989). 한편, 분자계통학적 연구에서는 관속식물을 석송식물문 (또는 소엽식물문: Lycophyte)과 진정엽식물문 (또는 대엽식물문: Euphyllophyte)으로 구분하고, 후자에 종자식물문 (Spermatophyte)과 양치식물문 (Monilophyte)을 두어, 비종자관속식물을 단계통군으로 구분한 이전과 다른 견해를 제시하고 있다 (Hasebe et al., 1995; Pryer et al., 2001; Smith et al., 2006; Schuettpelz and Pryer, 2008). 그리고 양치식물문에는 솔잎난강 (Psilotopsida), 속새강 (Equisetopsida), 마라티아강 (Marattiopsida) 및 고란초강 (Polypodiopsida)의 4 강(class)을 두면서, 솔잎난강에 고사리삼과 (Ophioglossaceae)와 솔잎난과 (Psilotaceae)를 두어, 두 과가 계통적으로 가장 가까운 것으로 판단한 바 있다.

고사리삼과 식물은 특이한 영양엽편과 포자엽편의 형태와 위치, 환대가 없는 포자낭 및 권상개엽을 하지 않는 점 등으로 다른 양치류와 구분되어 뚜렷한 단계통군으로 인식되고 있으며 (Wagner, 1990; Sun et al., 2001), 한반도의 12종을 포함하여 전세계적으로 약 80여종이 분포하고 있다 (Mabberley, 1990; Lee, 1996). 과내 속은 전통적으로 고사리삼속 (*Botrychium* Sw.), 나도고사리삼속 (*Ophioglossum* L.), *Helminthostachys* Kaulf. 그리고 제주도에서 기재된 제주고사리삼속 (*Mankyua* Sun et al.)의 4개로 구분되며 (Sun et al., 2001), 이들의 형태적 특징은 다음과 같다 (Clausen, 1938; Eames, 1976; Gilford and Foster, 1989; Kato, 1995; Sun et al., 2001).

고사리삼속은 영양엽편과 포자엽편이 우상으로 분지하고 엽맥은 유리맥이며 지하경은 직립하는 특징을 지닌다. 반면에 *Helminthostachys*는 영양엽편이 세 부분으로 나누어지며 각 부분은 다시 우상으로 갈라지고 엽맥은 고사리삼속과 마찬가지로 유리맥을 이룬다. 그러나 고사리삼속과는 달리 짧은 자루에 수 개의 포자낭이 달려 전체적으로 원통 모양의 포자낭수가 생기며 지하경은 횡주하는

특징을 지닌다. 나도고사리삼속은 영양엽편이 단엽으로 전연이며 망상맥을 가지는 특징을 지닌다. 또한 포자낭수는 다육질로서 포자낭이 두 줄로 포자낭수 주변부에 매몰되어 있고 지하경은 직립하며, 뿌리 끝에 흔히 주아가 달려 영양번식을 한다. 제주고사리삼속의 경우, 영양엽편은 *Helminthostachys*와 유사한 3줄 복엽이지만, 포자엽편은 나도고사리삼속과 같이 다육질의 포자낭수에 포자낭이 두 줄로 포자낭수 주변부에 매몰되어 있으며, 지하경은 직립하고 뿌리 끝에 흔히 주아가 달려 영양번식을 한다.

본 과의 분류 및 계통학적 연구에서, Clausen (1938)은 3개의 속 *Botrychium* (s.l.), *Helminthostachys*, *Ophioglossum* (s.l.)을 설정하고 *Botrychium*속의 subgenus *Osmundopteris* (Milde) R.T. Clausen, subgenus *Sceptridium* (Lyon) R.T. Clausen, subgenus *Eubotrychium* (Milde) R.T. Clausen 등 3개의 아속을 규정한 바 있다 (Table 1). 그리고 *Ophioglossum*속에는 subgenus *Euophioglossum* (Prantl) R.T. Clausen, subgenus *Rhizoglossum* (C. Presl) R.T. Clausen, subgenus *Cheiroglossa* (C. Presl) R.T. Clausen, subgenus *Ophioderma* (Blume) R.T. Clausen의 4개의 아속 등 전체적으로 1과 3속 7아속을 설정하였다 (Table 1). 한편 Nishida (1952)는 Clausen의 *Ophioglossaceae* (s.l.)를 *Ophioglossaceae*, *Helminthostachyaceae* 및 *Botrychiaceae*로 세분하고, *Ophioglossaceae* (s.s.) 아래에 *Ophioglossum* (s.s.), *Ophioderma* (Blume) Endl., *Cheiroglossa* C. Presl, *Rhizoglossum* C. Presl의 4속을, *Helminthostachyaceae*에 *Helminthostachys*를, *Botrychiaceae*에 *Botrychium* (s.s.), *Sceptridium* Lyon, *Osmundopteris* (Milde) Small의 3속 등 전체적으로 3과 8속으로 구분하였다 (Table 1). 이어서 Kato (1987)는 형태 및 해부학적 특성을 바탕으로 Clausen의 *Botrychium* (s.l.)을 *Botrychium* (s.s.), *Botrypus* Michx., *Sceptridium* Lyon 및 *Japanobotrychium* Masam.의 4개의 속으로 세분하여 본 과를 *Ophioglossum* (s.l.)과 *Helminthostachys*를 포함하여 6속으로 구분하였다 (Table 1). 반면 Wagner (1990)는 *Ophioglossaceae* (s.l.)를 *Botrychiaceae*와 *Ophioglossaceae*의 두 과로 구분하면서, *Botrychiaceae*내에 subfamily *Botrychioideae* C. Presl과 subfamily *Helminthostachyoideae* C.

Table 1. Comparison of infrafamilial classification system of Ophioglossaceae (s.l.).

Clausen (1938)	Nishida (1952)	Kato (1987)	Wagner (1990)
<i>Botrychium</i> (s. l.)	Botrychiaceae		Botrychiaceae
subg. <i>Eubotrychium</i> (Milde) R.T. Clausen	<i>Botrychium</i> (s. s.)		Botrychioideae C. Presl
subg. <i>Sceptridium</i> (Milde) R.T. Clausen	<i>Sceptridium</i> Lyon		<i>Botrychium</i> (s. s.)
subg. <i>Osmundopteris</i> (Milde) R.T. Clausen	<i>Osmundopteris</i> (Milde) Small	<i>Botrychium</i> (s. s.)	<i>Sceptridium</i> Lyon
<i>Helminthostachys</i>	Helminthostachyaceae	<i>Sceptridium</i> Lyon	<i>Japanobotrychium</i> Masam.
<i>Ophioglossum</i> (s. l.)	<i>Helminthostachys</i>	<i>Japanobotrychium</i> Masam.	<i>Botrypus</i> Michx.
subg. <i>Euophioglossum</i> (Prantl) R.T. Clausen	Ophioglossaceae (s. s.)	<i>Botrypus</i> Michx.	Helminthostachyoideae C. Presl
subg. <i>Rhizoglossum</i> (C. Presl) R.T. Clausen	<i>Ophioglossum</i> (s. s.)	<i>Helminthostachys</i>	<i>Helminthostachys</i>
subg. <i>Cheiroglossa</i> (C. Presl) R.T. Clausen	<i>Rhizoglossum</i> C. Presl	<i>Ophioglossum</i> (s. l.)	Ophioglossaceae
subg. <i>Ophioderma</i> (Blume) R.T. Clausen	<i>Cheiroglossa</i> C. Presl		<i>Ophioglossum</i> (s. s.)
	<i>Ophioderma</i> (Blume) Endl.		<i>Cheiroglossa</i>
			<i>Ophioderma</i>

Presl의 두 아과를 설정하고, subfamily Botrychioideae에 *Botrychium* (s.s.), *Scebridium*, *Botrypus*, *Japanobotrychium* 등 4개의 속을, subfamily Helminthostachyoideae에 *Helminthostachys*속을, 그리고 Ophioglossaceae에 *Ophioglossum* (s.s.), *Ophioderma*, *Cheiroglossa* 등의 3개 속 등 전체적으로 2과 8속을 설정한 바 있다(Table 1). 아울러 Sun et al. (2001)은 제주도에서 제주고사리삼속 (*Mankyua* Sun et al.)을 새롭게 기재한 바 있다. 최근의 분자계통학적 연구에 있어서 Hasebe et al.(1993, 1995)은 엽록체 *rbcL* 유전자 염기서열분석 결과를 바탕으로 본 과의 일부 속에 관한 계통을 언급한 바 있었으나 취급한 종 수가 제한적이어서 과 전체의 계통은 논의되지 못하였다. 반면 Hauk et al. (2003)은 *Mankyua*를 제외한 *Botrychium* (s.l.), *Ophioglossum* (s.l.) 및 *Helminthostachys*를 포함하는 과내 36종에 대한 분자계통 및 형태 분석을 바탕으로 과내 계통과 기존의 체계에 대하여 논의한 바 있다.

본 연구에서는 현재까지 최근 새롭게 기재된 제주고사리삼속을 포함한 계통학적 연구가 이루어진 바가 없는 점을 고려하여, 제주고사리삼속의 과내에서의 계통학적인 위치를 파악하고 나아가 제주고사리삼속을 포함하는 과 전체의 계통을 논의하고자 하였다.

재료 및 방법

재료는 2000년 3월부터 2002년 12월에 걸쳐 국내 및 러시아, 일본, 중국 등지에서 채집되었으며, 전북대학교 석엽표본관 (JNU), 서울대학교 석엽표본관 (SNU), 영남대학교 표본관 (YNUH), 제주도 난대산림연구소 및 중국과학원 북경식물표본관 (PE)에 소장된 표본도 이용하였다. 채집된 개체는 석엽표본으로 제작하여 전북대학교 생물과 학부 석엽표본관 (JNU)에 보관하였으며 일부는 생육하는 과정을 관찰하기 위해 온실에 이식 재배하였다. 엽록체 *rbcL* 유전자 염기서열 분석과 포자 관찰에 사용된 재료의 확증표본 목록과 아울러 gene bank에서 염기서열이 입수된 종류는 Table 2에 나타난 바와 같다.

DNA의 추출은 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)를 이용하였다. 석엽표본의 잎을 대상으로 한 일부 분류군은 Doyle and Doyle (1987)의 CTAB 방법을 이용하였고 추출된 DNA는 Ethanol 침전법으로 정제하였다. 정제되어진 total DNA는 EtBr을 넣은 1% agarose gel로 전기영동 하였으며 PCR marker와 비교하여 대략적인 농도를 확인하였다. Target DNA의 증폭은 Polymerase Chain Reaction (PCR) 방법을 통하여 수행하였으며, PCR product는 PEG/NaCl로 정제하였다. DNA thermal cycler (Thermal cycler 9600, Perkin Elmer-Cetus, USA)에서 BigDye Terminator Cyclic sequencing 방식 (ABI protocol, USA)으로 반응한 후, ABI 377 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA)로 염기 서열을 결정했다.

계통의 분석은 Clustal X program을 이용하여 염기를 정

렬한 후 최종적으로 MacClade 프로그램으로 직접 확인하였다. 군외군은 고사리삼과와 유연관계가 깊다고 알려진 마라티아과 (Marratiaceae)의 2종 (*Angiopteris evecta* (G. Forst.) Hottm., *Angiopteris parvifolia* Ching & Fu)과 Pryer et al. (2001)이 고사리삼과와 계통적 유연관계가 밀접한 것으로 판단한 솔잎난과 (Psilotaceae)의 솔잎난 (*Psilotum nudum* (L.) Griseb.)을 선정하였다.

PAUP program (Swofford, 2002)의 parsimony analysis를 이용하여 분지 분석을 수행하였으며, 분석 방법은 Branch-and-bound search를 이용하고, 그에 따른 option으로 ACCTRAN, MULPARS, furthest를 이용하였다. 또한 각 분계의 지지 정도를 알아보기 위하여 bootstrap분석 (Felsenstein, 1985)을 수행하였다. Bootstrap 분석 방법은 1000회를 반복하였으며 이를 통해 각 분계의 통계적 지지도를 추정하였다. 또한 two-parameter method (Kimura, 1980)로 계산된 염기변이 값을 기초로 한 neighbor-joining tree (NJ)를 산출하였다 (Saitou and Nei, 1987; Farris et al., 1996).

포자의 관찰은 초산분해과정 (Erdtman, 1954, 1966)을 이용하여 분류군별로 최소 30개의 정상적인 포자를 선택한 후 극축면의 직경, 적도면의 길이 및 발아구 (laesura)의 길이 등의 정량적인 형질을 측정하여 각 형질의 최소값, 최대값, 평균 및 표준편차를 구하였다.

결 과

엽록체 *rbcL* 염기서열의 분석: *Botrychium* 14종과 *Ophioglossum* 12종, *Helminthostachys*속 1종과 *Mankyua*속 1종 그리고 군외군으로 *Angiopteris* 2종과 솔잎난 (*Psilotum nudum*) 1종 등 총 31종에 대한 엽록체 DNA의 *rbcL* 부위의 염기서열을 결정하였다.

전체 *rbcL*의 길이는 1,314 bp로 이 중 314개가 계통학적으로 해상도를 가지는 것으로 나타났다. 또한 Kimura's two parameter model로 계산한 염기 서열의 거리는 0에서 0.183으로 나타났으며, 군내군에서는 *B. boreale*와 *O. pendulum*과의 거리가 0.149로 가장 큰 것으로 나타났다. 계통수의 길이는 811 단계로, 단독과생형질을 제외한 Consistency index (CI)가 0.5338이고 Retention index(RI)가 0.8225인 8개의 등가절약계통수를 얻었으며 이를 바탕으로 완전합의계통수를 구하였다. 또한 8개의 등가계통수 중 하나를 선택하여 Bootstrap 분석 값을 표시하였다 (Fig. 1).

완전합의계통수에서 단계통군으로 확실하게 자리잡은 고사리삼과는 크게 두 개의 단계통군으로 구분되었다. 즉 고사리삼속과 *Helminthostachys*속 및 제주고사리삼속을 포함하는 Botrychioide lineage가 단계통군으로 자리잡고 있었으며, 그리고 광의의 나도고사리삼속 (*Ophioglossum*)이 속하는 Ophioglossoid lineage가 bootstrap value 100%로 단계통군을 형성하여 과 내에 두 계보가 구분되는 것으로 나타났다.

Botrychioide lineage내에서 광의의 고사리삼속 (*Botrychium*

Table 2. List of voucher specimens for the analysis of *rbcL* sequence and spore morphology.

Taxa	Voucher specimens and Sources
<i>Botrychium atrovirens</i> (Sahashi) M. Kato	Gene bank, AY138402.
<i>B. biternatum</i> (Savigny) Underw.	Gene bank, L13474.
<i>B. boreale</i> Milde	*Russia: Kamtchatka, 10 Aug. 2002, <i>B.-Y. Sun et al.</i> 2771.
<i>B. dissectum</i> Spreng.	Gene bank, AY138401.
<i>B. japonicum</i> (Prantl) Underw.	Japan: Koyshikawa Bot. Gard. Tokyo Univ, Tokyo, 1 Nov. 2001, <i>B.-Y. Sun</i> 546. *Korea: Isl. Jeju, Seonheulri, 18 Dec. 2001, <i>C.H. Kim et al. s.n.</i> (JNU).
<i>B. lanceolatum</i> (S.G. Gmel.) Angstr.	Russia: Kamtchatka, 10 Aug. 2002, <i>B.-Y. Sun et al.</i> 2538.
<i>B. lunarioides</i> (Michx.) Sw.	Gene bank, AY138406.
<i>B. lunaria</i> (L.) Sw.	*Russia: Kamtchatka, 10 Aug. 2002, <i>B.-Y. Sun et al.</i> 2770.
<i>B. multifidum</i> (S.G. Gmel.) Rupr.	USA: Massachusetts, ?, <i>Kim. s.n.</i>
<i>B. oneidense</i> (Gillbert) House	Gene bank, AY138898.
<i>B. robustum</i> (Rupr.) Underw.	*Korea: Isl. Ullung, 26 Sept. 2002, <i>B.-Y. Sun et al.</i> 3543 Gene bank, D14881.
<i>B. strictum</i> Underw.	*Korea: Mt. Jukyeop, 29 Oct. 2001, <i>T.G. Baek s.n.</i> (JNU).
<i>B. ternatum</i> (Thunb.) Sw.	*Korea: Isl. Bogil, 15 Sept. 2001, <i>T. G. Baek</i> 365.
<i>B. virginianum</i> (L.) Sw.	*Korea: Jeju, Seogwang, 21 June 2001, <i>Sun et al.</i> 5224.
<i>Helminthostachys zeylanica</i> (L.) Hook.	Philippine: Luzon island, Quezon Province, 15 May 2002, ?. *China: Paak Shek Shan, Lam ko-chung Mai Distint, Isl. Hainan, 15 Jun. 1928, ?.
<i>Mankyua chejuense</i> B.-Y. Sun & al.	*Korea: Jeju, Seonheulri, 13 Dec. 2001, <i>B.-Y. Sun et al.</i> 131.
<i>Ophioglossum costatum</i> R. Br.	Gene bank, AY138418.
<i>O. engelmannii</i> Prantl	USA: Texas, 26 May 1966, <i>Correll & Correll s.n.</i>
<i>O. gomezianum</i> Welw. ex A. Braun	Gene bank, AY138419.
<i>O. gramineum</i> Willd.	Gene bank, AY138412.
<i>O. palmatum</i> L.	Dominica: Sabaneta Distr., 20 Nov. 1930, <i>Valeur</i> 550.
<i>O. pendulum</i> L.	Indonesia: Java, Halinium National Park Reseach Center, 15 Feb. 2001, <i>B.-Y. Sun</i> 328.
<i>O. petiolatum</i> Hook.	*Korea: Isl. Bogil, 22 June 2001, <i>T.G. Baek</i> 234
<i>O. pusillum</i> Raf.	Gene bank, AY138413.
<i>O. termale</i> Kom.	Russia: Ussuri, 22 July 2002, <i>B.-Y. Sun & J. K. Ahn</i> 2163.
<i>O. reticulatum</i> L.	Gene bank, AF313582.
<i>O. richardsiae</i> J.E. Burrows.	Gene bank, AY138415.
<i>O. vulgatum</i> L.	*Korea: Jeju, Doneko valley, 20 May 2001, <i>B.-Y. Sun & T. G. Baek</i> 3412.
<i>Angiopteris evecta</i> (G. Forst.) Hoffm.	Indonesia: Bogor Bot. Gard., 15 Feb. 2001, <i>B.-Y. Sun</i> 322.
<i>A. parvifolia</i> Ching & Fu	Philippine: Mt. Makiling, 27 Jan. 2001, <i>B.-Y. Sun et al.</i> PH2004.
<i>Psilotum nudum</i> (L.) P. Beauv.	Gene bank, U30835.

*: voucher specimens for spore morphology

s.l.)은 32개의 공통파생형질과 bootstrap value 100%로 완벽한 단계통을 나타내고 있으나, *Helminthostachys*속과 제주고사리삼속과의 계통적 유연관계는 해상력이 낮은 것으로 나타났다. 즉 *Helminthostachys*속과 제주고사리삼속이 *Botrychium*과의 결속력은 크지 않은 것으로 나타났다. 아울러 고사리삼속내에서는 *Sceptridium*아속이 공통파생형질 2개와 bootstrap value 67%로서 단계통군을 유지하고 있으며 *Botrychium*아속은 공통파생형질 11개와 bootstrap value 100%로 완벽한 단계통군을 형성하는 반면, *Botrypus*아속의 *B. strictum*과 *B. virginianum*은 상기 두 아속의 자매군으로 순차적으로 분지하여 단계통이 아닌 것으로 나타났다. 광의의 나도고사리삼속(*Ophioglossum s.l.*)은 56개의 공통파생형질과 bootstrap value 100%로 지지되는 매우 안정된 단계통군을 형성하고 있다. 나도고사리삼속내에서는 *Ophioglossum*아속이 공통파생형질 28개와 bootstrap value 60%로 단계통군을 이루고 있으나, *Ophioglossum*아

속과 *Cheiroglossa*아속, 그리고 *Ophioderma*아속 사이의 명확한 계통적 유연관계는 해석되지 않고 있다. 이상의 계통학적 특성은 Neighbor Joining tree에서도 동일하게 나타나고 있다 (Fig. 2).

포자의 형태: 관찰된 포자의 극면 형태는 고사리삼속(*Botrychium*) 식물은 삼각형이지만, 제주고사리삼을 포함한 나머지 종들은 모두 원형이다. 근극부는 고사리삼속과 나도고사리삼속은 돌출하거나 편평하지만, *Helminthostachys*속과 제주고사리삼속은 돌출한다. 포자의 크기는 다양하여 고사리삼속, *Helminthostachys*속 그리고 제주고사리삼속은 극축의 직경과 적도면의 길이가 20-50 μm 이고 나도고사리삼속은 24-70 μm 로 나타났다 (Table 3).

표벽의 미세 형태는 고사리삼속은 분류군에 따라 결절상 돌기, 유두상 돌기, 불규칙한 망상 무늬, 과립상 돌기, 또는 자상 돌기를 가지지만, 나도고사리삼속은 유공상 또

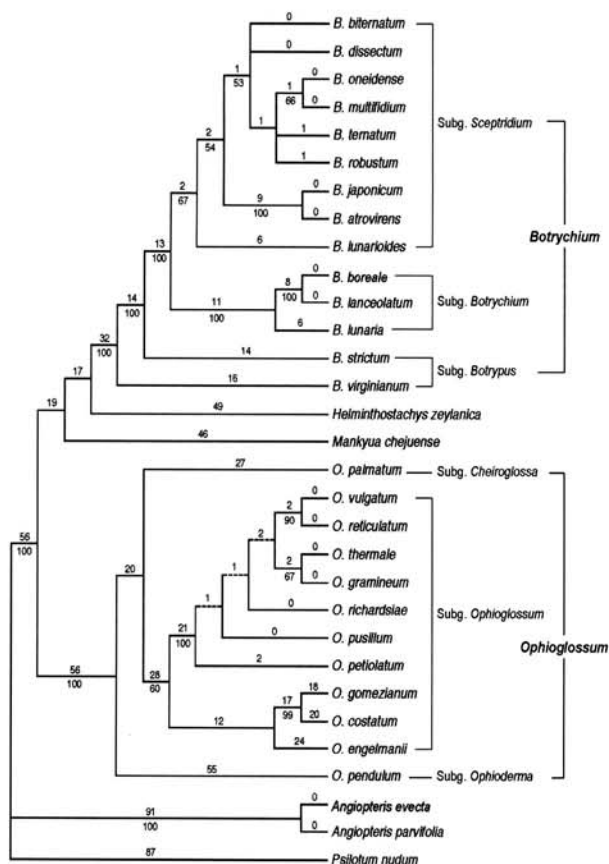


Fig. 1. One of eight equally parsimonious trees constructed by branch-and-bound option. Numbers above and below the branches indicate numbers of nucleotide changes and bootstrap values (those of over 50% are shown), respectively. Clades collapsed in the strict consensus tree are denoted as dashed lines.

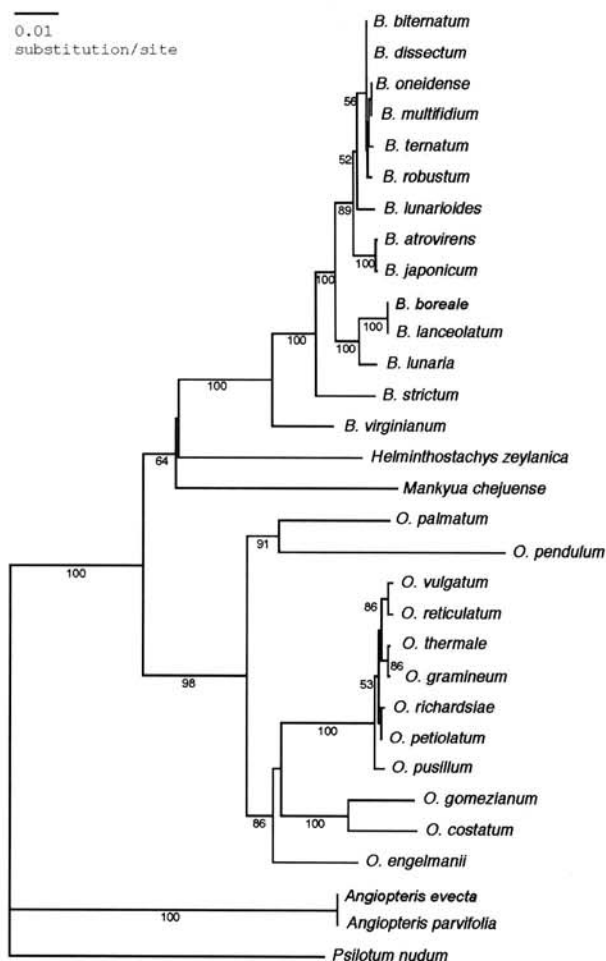


Fig. 2. Neighbor-joining tree constructed by the Kimura's 2-parameter model. Bootstrap values over 50% are shown below the branches.

는 추문상 무늬를 가지며, *Helminthostachys*는 섬세한 봉상 돌기를, 제주고사리삼은 뾰뾰한 자상 또는 봉상 돌기를 가진다. 발아구는 제주고사리삼을 제외한 모든 종에서 뚜렷하지만, 제주고사리삼은 뾰뾰한 돌기로 인해 발아구가 주변부와 구분되지 않는 형태이다 (Fig. 3).

고 찰

고사리삼과의 계통: Sun et al. (2001) 및 Hauk et al. (2003)이 논의한 대로, 형태적으로 본 과는 다른 양치식물에 비하여 매우 독특한 것으로 보고되고 있다. 즉 고사리삼과식물은 잎이 영양엽편과 포자엽편이 서로 배복성을 가지고 뚜렷하게 구분되며, 환대 (annulus)가 없는 포자낭을 지니고, 어린 식물은 권상개엽을 하지 않으며, 엽저가 엽초로 둘러싸이고, 지하경이 부분적으로 이차생장을 하는 점 등으로 다른 양치류와는 크게 달라 독립된 단계통군으로 잘 인식되고 있다 (Wagner, 1990; Sun et al., 2001). 또한 화분학적인 특징에서도 외표벽 (exine) 구조와 표면 무늬가 타 양치와 잘 구분되고

있다 (Tryon and Lugardon, 1991). 엽록체 *rbcL* 염기 서열 분석을 바탕으로한 본 연구에서도 고사리삼과 식물이 단계통군임이 확실하게 나타나고 있다. 즉 계통수의 기저마디에서 고사리삼과는 56개의 공통파생형질과 bootstrap value 100%로 지지되는 매우 안정된 단계통군을 형성하고 있다.

제주고사리삼속의 계통학적 위치: 제주고사리삼속은 botrychioid lineage내에 포함되어 *Helminthostachys*와 고사리삼속의 자매군으로 위치하고 있다. 한편, Hauk et al. (2003)이 제주고사리삼속을 제외하고 수행한 연구 결과와 제주고사리삼속을 포함한 본 연구 결과를 비교해 보면 *Botrychium s.l.*와 *Ophioglossum s.l.* 및 *Helminthostachys*속의 계통학적인 위치는 변하지 않았으나, *Helminthostachys*속의 botrychioid lineage내에서의 계통학적 결속력이 약화된 것과 함께 제주고사리삼이 *Helminthostachys*속의 자매군으로 자리하고 있는 점이 차이가 난다. 즉, Hauk et al. (2003)의 분석한 결과에서는 *Helminthostachys*가 bootstrap value 75% 이상으로 나타나서 뚜렷하게 botrychium lineage

Table 3. Spore characteristics of the Ophioglossaceae.

Species	Surface sculpture	Laesura	*Equatorial diameter(mm)	*Polar length(mm)	*Laesura length(mm)
<i>Botrychium boreale</i>	tuberosa and scabrate	prominent	36.00-50.00 (43.00 ± 2.82)	38.00-50.00 (43.87 ± 3.10)	14.00-26.00 (18.80 ± 3.27)
<i>B. lunaria</i>	irregularly papillate to verrucate	prominent	18.00-27.00 (23.23 ± 1.97)	18.00-33.00 (22.97 ± 3.41)	7.50-15.00 (11.45 ± 2.07)
<i>B. ternatum</i>	reticulate or rugulate	prominent	26.00-36.00 (30.87 ± 3.18)	24.00-36.00 (29.07 ± 2.91)	10.00-16.00 (12.53 ± 1.66)
<i>B. robustum</i>	reticulate or rugulate	prominent	24.00-30.00 (27.13 ± 1.80)	22.00-30.00 (26.87 ± 2.01)	12.00-20.00 (15.27 ± 1.78)
<i>B. japonicum</i>	baculate or verrucate	prominent	30.00-40.00 (34.10 ± 2.88)	27.50-37.50 (32.42 ± 3.22)	12.50-22.50 (12.62 ± 4.41)
<i>B. virginianum</i>	scarbrate or baculate	prominent	26.00-34.00 (29.67 ± 1.97)	26.00-34.00 (29.43 ± 2.11)	8.00-14.00 (11.07 ± 1.80)
<i>B. strictum</i>	tuberosa	prominent	24.00-35.00 (29.10 ± 2.33)	20.00-32.00 (29.45 ± 2.01)	9.01-14.00 (10.00 ± 1.42)
<i>Ophioglossum vulgatum</i>	reticulate with foveolate	prominent	24.00-36.00 (31.10 ± 2.35)	28.00-36.00 (30.83 ± 2.00)	10.00-14.00 (11.80 ± 1.69)
<i>O. petiolatum</i>	fossulate	prominent	40.00-48.00 (42.87 ± 1.80)	38.00-44.00 (39.83 ± 1.62)	10.00-16.00 (12.93 ± 1.55)
<i>Mankyua chejuense</i>	not fused baculate or echinate	weak	30.00-42.50 (35.45 ± 3.72)	25.00-42.50 (33.93 ± 3.71)	12.50-22.50 (15.47 ± 2.69)
<i>Helminthostachys zeylanica</i>	more or less fused baculate with delicate projections	prominent	37.50-55.00 (45.97 ± 5.19)	32.50-52.50 (40.58 ± 5.53)	12.50-25.00 (18.27 ± 3.04)

*minimum-maximum; (), average

에 포함되는 것으로 나타나고 있다. 본 연구에서 제주고사리삼을 포함하여 동일한 *rbcL* 염기서열을 분석한 결과에서는 *Helminthostachys*를 포함한 제주고사리삼속 모두 50% 미만의 bootstrap value로 botrychioid lineage에 속하지만 계통학적 결속력은 크지 않음을 보여주고 있다. 이렇게 제주고사리삼속이 계통 분석에 추가되면서 *Helminthostachys* 속의 *Botrychium*속에 대한 계통학적 결속력이 약화된 것은 *Helminthostachys*가 제주고사리삼속과 계통학적 결속력을 보임으로써 상대적으로 *Botrychium*속에 대하여 계통학적으로 느슨한 관계를 보이는 것으로 해석될 수 있다. 이러한 점은 *rbcL* gene tree에서 제주고사리삼속은 *Helminthostachys*속의 자매군으로 위치하고 있을 뿐 아니라 외부 형태, 특히 영양소엽의 형태와 엽맥 그리고 지하경의 특징이 두 속에서 서로 유사하며, 아울러 포자의 형태에서도 *Ophioglossum*과 *Botrychium*과는 달리 *Helminthostachys*속과 제주고사리삼속은 봉상돌기를 지녀 두 속 간에 가장 유사한 것으로 나타나고 있다.

그러나 이러한 유사성에도 불구하고 두 속은 뚜렷히 구분되어 독립된 속으로서의 위치는 확고한 것으로 나타나고 있다. 즉 *rbcL* gene tree에서 *Helminthostachys*와 제주고사리삼속의 계통학적 위치를 보면 어떤 경우에도 두 속이 *Botrychium* (*s.l.*)속의 근내군에 포함되는 경우가 없을 뿐 아니라, 제주고사리삼은 46개의 독립파생형질을 지니는 점, 그리고 *Helminthostachys*속은 49개의 독립파생형질을 지녀 두 속의

patristic distance도 크게 나타나서 별 개의 속으로 구분짓는 것이 타당한 것으로 나타나고 있다. 뿐만 아니라 외부 형태적인 특징, 즉 포자소엽의 형태에서 제주고사리삼은 *Helminthostachys*와 크게 차이가 나서 오히려 *Ophioglossum*과 유사하다. 또한 현재까지 본 과 내에서 *Ophioglossum*속의 일부 종에서만 일어나는 드문 현상으로 보고되는 영양 번식이 (Wagner, 1990), 제주고사리삼에서도 관찰되고 있다. 이 두 특징을 제외한 나머지는 *Ophioglossum*과 많은 차이를 보이고 있다. 또한 본 종은 *Botrychium*과는 영양소엽의 엽맥 상이 개방 차상맥이란 점 외에는 공통적인 특성이 없으며 따라서 형태적인 관점에서 과내 속들 중 *Botrychium*과 가장 동떨어진 것으로 나타나고 있다. 이상에서 제주고사리삼속이 일부 기존의 속들과 공통되는 특징이 있으나 형태 및 분자계통학적 특성에서 *Ophioglossaceae* 내의 기존의 속들과 뚜렷히 구분되는 것으로 나타나서 독립된 속으로 처리하는 것이 타당함을 지지하고 있다.

사 사

본 연구는 학술진흥재단 선도연구자지원 연구비 (KRF-2001-041-D00210)의 지원으로 이루어진 것입니다. 아울러 귀중한 표본을 임대해 주신 서울대학교 석엽표본관 (SNU), 영남대학교 표본관 (YNUH), 제주도 난대삼림연구소 및 중국과학원 북경식물표본관 (PE)에 감사드립니다.

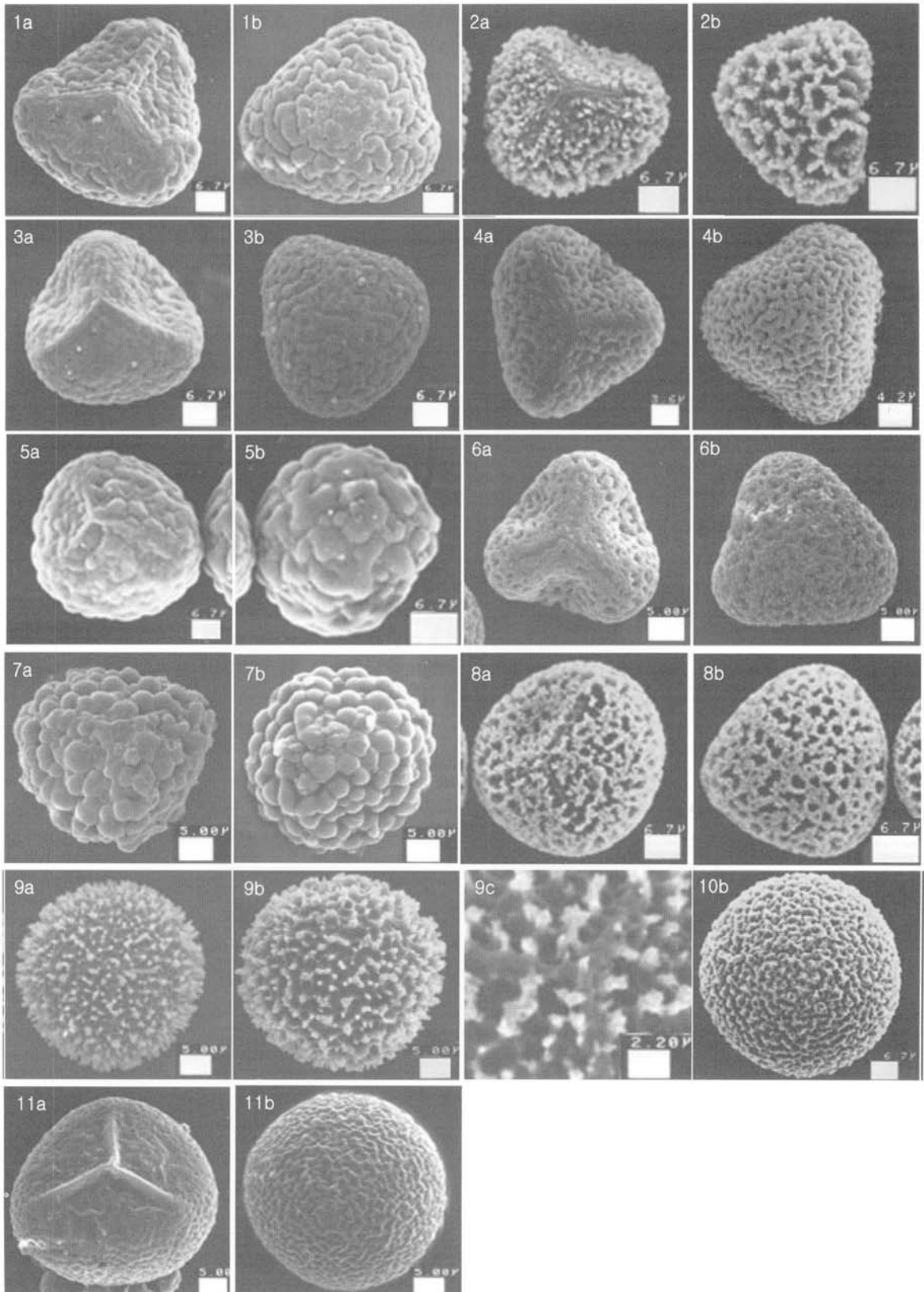


Fig. 3. Scanning electron microphotographs of spore of Ophioglossaceae (a, proximal face; b, distal face; c, laesura). 1: *B. boreale*, 2: *B. japonicum*, 3: *B. lunaria*, 4: *B. robustum*, 5: *B. strictum*, 6: *B. ternatum*, 7: *B. virginianum*, 8: *Helminthostachys zeylanica*, 9: *Mankyua chejuense*, 10: *O. petiolatum*, 11: *O. vulgatum*.

인용문헌

- Clausen, R. T. 1938. A monograph of the Ophioglossaceae. Mem. Torrey Bot. Club 19: 1-177.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.
- Eames, A. J. 1976. Morphology of Vascular Plants: Lower Groups (Psilophytales to Filicales). R. E. Krieger Pub. Co., New York.
- Erdtman, G. 1954. An Introduction to Pollen Analysis. Chronica Botanica Co. P. 204.
- Erdtman, G. 1966. Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms- An Introduction to Palynology. I - Hafner Publishing Co., N.Y., USA.
- Farris, J., V. Albert., M. Kallersjo, D. Lipscomb and A. Kluge. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. Cladistics 12: 99-124.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evol. 39: 783-791.
- Gifford, E. M. and A. S. Foster. 1989. Morphology and Evolution of Vascular Plants, 3rd ed. W. H. Freeman and Company, New York.
- Hasebe, M., M. Ito, R. Kofuji, K. Ueda and K. Iwatsuki. 1993. Phylogenetic relationships of ferns deduced from *rbcL* gene sequence. J. Mol. Evol. 37: 476-482.
- Hasebe, M., P. G. Wolf, K. M. Pryer, K. Ueda, M. Ito, R. Sano, G. J. Gastony, J. Yokoyama, J. R. Manhart, N. Murakami, E. H. Crane, C. H. Haufler and W. D. Hauk. 1995. Fern phylogeny based on *rbcL* nucleotide sequences. Amer. Fern Jour. 85: 134-181.
- Hauk, W. D., C. R. Parks and M. W. Chase. 2003. Phylogenetic studies of Ophioglossaceae: evidence from *rbcL* and *trnL-F* plastid DNA sequences and morphology. Mol. Phylogenet. Evol. 28: 131-151.
- Kato, M. 1987. A phylogenetic classification of Ophioglossaceae. Gard. Bull. Sing. 40: 1-14.
- Kato, M. 1995. Ophioglossaceae. In Flora of Japan, vol. 1. Pteridophytes and gymnospermae. Iwatsuki, K., T. Yamasaki, D. E. Boufford and H. Ohba (eds.), Kodansha, Tokyo. Pp. 22-28.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparable studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111-120.
- Lee, W. T. 1996. Lineamenta Florae Koreae. Academy press, Seoul, Korea. Pp. 12-16 (in Korean).
- Mabberley, D. J. 1990. The Plant-Book. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Nishida, M. 1952. A new system of Ophioglossales. J. Jap. Bot. 27: 271-278.
- Pryer, M. K., H. Schneider, A. R. Smith, R. Cranfill, P. G. Wolf, J. S. Hunt and S. D. Sipes. 2001. Horsetails and ferns are monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. Nature 409: 618-622.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbour-joining method: A new method of reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
- Schuettpelz, E. and K. M. Pryer. 2008. Fern Phylogeny. In The Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes. Ranker, T.A. and C. H. Haufler (eds.), Cambridge Univ. Press. Pp. 395-416.
- Smith, A. R., K. M. Pryer, E. Schuettpelz, P. Korall, H. Schneider and P. G. Wolf. 2006. A classification for extant ferns. Taxon 55: 705-731.
- Sun, B. Y., M. H. Kim, C. H. Kim and C.-W. Park. 2001. *Manlyua* (Ophioglossaceae): a new fern genus from Cheju Island, Korea. Taxon 50: 1019-1024.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods). Ver. 4.0b. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tryon, A. F. and B. Lugardon. 1991. Spores of the Pteridophyta. Springer-Verlag, New York, USA. Pp. 28-37.
- Wagner, W. H. 1990. Ophioglossaceae. In The Families and Genera of Vascular Plants: Pteridophytes and Gymnosperms, vol. 1. Pteridophytes and Gymnosperms. Kramer, K. U. and P. S. Green (eds.), Springer-Verlag, New York. Pp. 193-197.