

로젯사철란(*Goodyera rosulacea*: Orchidaceae)의 분류학적 위치: ITS와 *trnL* 염기서열에 의한 분자적 증거

이창숙 · 엄상미 · 이남숙*

(이화여자대학교 자연과학대학 생명과학과)

로젯사철란(*G. rosulacea* Y. Lee)은 애기사철란과 유사하나 로젯트형의 잎, 짧은 땅속줄기와 서식지 등의 특징에 의해 한국산 사철란속(*Goodyera* R. Br.) 내의 신종으로 기재된 바 있다. 로젯사철란의 분류군의 실체와 근연종간의 유연관계를 파악하기 위하여 균외균을 포함한 24개의 사철란속 식물을 대상으로 핵 리보솜(ribosomal) DNA의 internal transcribed spacer와 엽록체 DNA의 *trnL* 구간의 염기서열을 분석하였다. 분류군의 실체와 근연종간의 유연관계는 정렬된 염기서열들을 바탕으로 최대절약분석(Maximum parsimony analysis)와 근연결합법(Neighbour Joining method)에 의한 계통수 및 고유 표지유전자 여부로 추정하였다. 분석 결과 로젯사철란은 다수의 고유한 표지유전자를 가지며, ITS와 *trnL* 계통수에서 모두 단계통군을 형성하였다. 로젯사철란과 한국산 사철란속 내 각 분류군간의 유전적 거리(pairwise distance)는 ITS에서 3.49-6.68, *trnL*에서 5.05-9.53으로서 독립된 종으로 간주하기에 무리가 없었다. 따라서 분자적 결과는 로젯사철란을 사철란속내 독립된 종으로 처리하는 것을 지지하였다. 계통수에서 로젯사철란은 형태적으로 유사한 애기사철란(*G. repens*)과 동일한 분계조를 형성하였고, 유전적 거리도 조사한 분류군들 중 가장 낮은 값을 나타냈으므로 가장 가까운 근연분류군임을 나타내었다.

주요어: 사철란속, 로젯사철란, ITS, *trnL*

한국산 사철란속(*Goodyera* R. Br.)은 난과(Orchidaceae)의 난아과(Orchidoideae), 난족(Orchideae), 타래난초아족(Spirantheae), 사철란절(*Goodyerinae*)에 속하는 식물로 아프리카를 제외한 북반구의 온대 및 열대지역인 아시아, 유럽 및 북미 등 전 세계에 약 40여종이 분포하는 것으로 알려져 있다(Li, 1978; Satake *et al.*, 1982; Freudenstein, 2001).

이 속 식물은 지상 또는 착생 난으로, 잎은 호생, 꽃은 소형, 수상화서를 이루며, 등꽃받침은 겹꽃잎에 밀접하여 투구모양으로 되고, 입술꽃잎은 뒷면이 볼록하게 나오며, 끝부분은 뒤로 젖혀지고, 안쪽에 털이 나며, 암술대는 짧고 단면은 둥글다(Lee, 1996). 한국산 사철란속식물로서 Nakai(1911)는 5종(*Goodyera maximowicziana* Makino(섬사철란), *G. schlechtendliana* Rchb. fil.(사철란), *G. repens* (L.) R. Br.(애기사철란), *G. velutina* Maxim(털사철란), *G. similis* Bl.(청사철란)), Chung(1956)은 *G. maximowicziana* Makino(섬사철란), *G. repens* var.

*교신저자: 전화 02-3277-2366, 전송 02-3277-2385, namsook@ewha.ac.kr

koreana Nakai(애기사철란), *G. schlechtendaliana*(사철란)의 2종 1변종을 기록하였다. 한편, Lee(1996)는 *G. maximowiczii*(섬사철란), *G. repens*(애기사철란), *G. macrantha* Maxim.(붉은사철란), *G. schlechtendaliana*(사철란), *G. velutina*(털사철란)의 5종을 기록하였다. 그 후 Lee(2004)는 *G. rosulaceae* Y. Lee(로젯사철란)을 신종으로 기재하였다. 로젯사철란은 애기사철란과 잎의 모양, 꽃의 색, 화서 등의 닮은 점도 있으나 잎이 로젯트형으로 늘어서고, 땅속줄기가 짧으며, 뿌리 여러 개가 직근성으로 자라고, 낙엽 활엽수림 또는 드물게 송백류가 섞인 낙엽 활엽수림 밑에 나며, 생육지도 애기사철란과 달리 낮은 산에 분포하는 특징으로 구별하였다.

한국산 사철란속식물에 관한 분류학적 연구는 한국산 사철란속 식물 5종(사철란, 털사철란, 섬사철란, 붉은사철란, 애기사철란)의 형태와 염색체에 관한 연구(Tae *et al.*, 1997), 잎표피조직에 관한 연구(Tae and Ko, 1999), 그리고 ITS에 의한 계통학적 연구(Shin *et al.*, 2003)가 있었으나, 로젯사철란에 대한 연구는 신종기재 외에 다른 분류학적 연구가 진행된 바 없다.

핵 내 ribosomal DNA의 ITS부위와 엽록체 DNA의 *trnL*부위는 고등식물의 중간 또는 속간의 계통 유연관계를 파악하는데 유용한 자료로 이용되어 왔다(Baldwin *et al.*, 1995; Downie and Katz-Downie, 1996; Corriveau and Coleman, 1988; Cronn and Wendel, 2003; Compton and Culham, 2002). 따라서 본 연구에서는 외부 형태적 특징에 의해 신종으로 기재된 로젯사철란을 하나의 독립된 종으로 처리하는 것이 분류학적으로 타당한지를 분자적으로 규명하기 위하여, 중간 또는 속간의 계통적 유연관계를 파악하는데 유용한 ITS와 *trnL*의 염기서열을 분석하여 밝히고자 한다.

재 료 및 방 법

로젯사철란과 사철란, 애기사철란, 털사철란, 섬사철란, 붉은사철란, 및 학술적으로 정식 발표되지는 않았으나 새로운 분류군으로 추정되는 개체를 포함하여 7분류군 23개체를 군내군으로 사용하였고, 군외군으로 일본산 *G. procera* Hook.를 포함해 총 24개체의 생체 재료를 사용하였으며 모든 확증표본은 이화여자대학교 식물표본실(EWH)에 보관되었다(Table 1).

DNA추출: 생체 잎을 액체질소로 분쇄한 후 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Germany)로 추출하였다(Downie *et al.*, 2000). ITS증폭은 primer ITS4, ITS5, ITS2, ITS3 (White *et al.*, 1990)을 사용하였고, 엽록체 DNA는 *trnL*(Taberlet *et al.*, 1991)을 증폭하였다. ITS구간(ITS 1, 5.8S, ITS 2)의 경계는 기존에 발표된 염기서열과 비교하여 결정하였다(Tsai, 2003; Baldwin *et al.*, 1995; Downie *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004; Lee and Downie, 2006; Yoo *et al.*, 2005). PCR 조건은 94°C에서 1분, 54°C에서 1분, 72°C에서 2분을 cycle로 하여 36회 반복한 후 72°C에서 10분간 더 유지시켰다. PCR 산물은 AccuPrep PCR Purification Kit(Bioneer Inc, Korea)로 정제하였다. 염기서열분석은 Base station sequencer(MJ research, USA)를 사

Table 1. Collection data of *Goodyera rosulacea* and related taxa in Korea.

Taxa(Abbreviation)	Accession number	Voucher(EWH)	Collection locality
<i>G. rosulacea</i> Y. Lee (Gros) 로켓사철란	4, 5, 6 375, 376, 377	Y. Kim 040602, 040603, 040605 C. Lee <i>et al.</i> 060703, 060704, 060705	Seoul, Dobongsan Gwangwon-do, Dukhangsan
<i>G. repense</i> (L.) R. Br. (Grep) 에기사철란	98, 137	Y. Kim 040703, 040709	Gwangwon-do, Taebaeksan
<i>G. schlechtendaliana</i> Rchb. fil (Gsch) 사철란	81 16 257	N. Lee <i>et al.</i> 0408015 N. Lee <i>et al.</i> 0407011 N. Lee 0510003	Jeju-do, Seohori Jeju-do, Seondol Jeju-do, Georinsaseum
<i>G. sp.</i> (Gsp.)	79, 140 241	N. Lee <i>et al.</i> 0408013, 040822 N. Lee 0406003	Jeju-do, Seohori Jeju-do, Seohori
<i>G. velutina</i> Maxim. (Gvel) 털사철란	30 76 269	N. Lee <i>et al.</i> 0407026 N. Lee <i>et al.</i> 040809 N. Lee 0510012	Jeju-do, Seondol Jeju-do, Hallasan Jeju-do, Georinsaseum
<i>G. maximowicziana</i> Makino (Gmax) 섬사철란	47 138 139	N. Lee 0308008 N. Lee <i>et al.</i> 0407032 N. Lee <i>et al.</i> 0408035	Jeju-do, Bijarim Jeju-do, Gyocheon-ri Jeju-do, Eorimok
<i>G. macrantha</i> Maxim. (Gmac) 붉은사철란	22, 33 75	N. Lee <i>et al.</i> 0407012, 0407017 N. Lee <i>et al.</i> 0408007	Jeju-do, Gyocheon-ri Jeju-do, Hallasan
<i>G. procera</i> Hook. (Gpro)	385	N. Lee and S. Yeo 060224	Japan, Okinawa Hyun Nagoshi, Danodake

용 하였다.

염기서열의 정렬 및 계통분석: 양방향의 염기서열은 Clustal X program(Gibson *et al.*, 1994)을 이용하여 정렬하였고, 세부 정렬은 수작업으로 완성하였다. 정렬한 염기서열은 다른 피자식물 연구(Baldwin *et al.*, 1995)에서 일반적으로 수행하고 있는 PAUP* version 4.01b (Swofford, 2002)를 이용해 최대절약분석(Maximum parsimony analysis)을 하였으며, Heuristic search를 이용하였고 gap은 형질로 다루어(Simmons and Ochoterena, 2000), 5th character로 처리하였다. 분석은 1000회 random stepwise로 반복하였으며, TBR branch swapping하여 Multrees를 구하였다. Bootstrap values(Felsenstein, 1985)는 100회 반복하여

Table 2. Summary of ITS and *trnL* sequence characteristics for *G. rosulacea* and related taxa.

Characteristic	ITS 1	5.8S	ITS 2	ITS 1+5.8S+ ITS 2	<i>trnL</i>
Length of sequence region(bp)	239-241	172	281-282	691-694	496-530
Aligned length	243	172	283	698	564
Parsimony informative sites	35	2	34	71	76
Uncorrected pairwise distance	0.00-16.54	0.00-1.16	0.00-11.10	0.00-10.49	0.00-9.53

분석하였고, TBR branch swapping하여 simple stepwise option으로 처리하였다.

또한 two-parameter methods(Kimura, 1980)로 계산된 염기변이값을 기초로 근연결합법(Neighbor Joining method)으로 분석하였다(Saitou and Nei, 1987; Farris *et al.*, 1995). 또한 각 분류군들 사이의 염기변이분석은 uncorrected pairwise distance로 처리하였다.

결 과

염기서열분석: ITS- 정렬된 염기는 698 bp이었으며 이 중 587개의 염기는 일정하였고, 나머지 111개의 염기서열에 변화가 있었으며 그 중 71개 염기가 계통학적으로 해상력을 갖는 informative character이었다. 본 결과에서 ITS 1은 239-241 bp, 5.8S는 172 bp, ITS 2 부위는 281-282 bp로 ITS 2 부위가 ITS 1 부위보다 긴 것으로 나타났다. 즉, 대부분의 피자식물에서(Sim *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2003; Downie *et al.*, 2000)와 마찬가지로 ITS 2의 길이가 ITS 1의 길이보다 긴 것으로 나타났다. 로젯사철란의 염기서열은 군외군을 포함하여 조사된 사철란속 내에서 694 bp로 가장 길었고, 부위별 정렬된 특징은 Table 2와 같다.

조사된 전체분류군에서 염기조성의 평균은 A가 23.59%, C가 21.83%, G가 27.93%, T가 26.65%였고, G+C의 염기조성은 48.84-53.11%였다. 조사된 사철란속내 분류군간의 유전적 변이(pairwise distance)는 0.00-10.49%이나 군외군을 제외할 때는 0.00-6.68%이었다. 분류군간 유전적 거리(pairwise distance)에 있어서, 로젯사철란(*G. rosulacea*)과 가장 가까운 분류군은 애기사철란(*G. repens*)으로 3.49%이었고, 군외군을 제외한 군내군 중에서 로젯사철란과 유전적 거리가 가장 먼 종은 붉은사철란(*G. macrantha*)으로 6.53-6.68%이었다(Table 3).

trnL- 정렬된 염기는 564 bp이었으며, 이 중 395개의 염기는 일정하였고, 나머지 169개의 염기서열에 변화가 있었으며 그 중 145개 염기가 계통학적으로 해상력을 갖는 informative character이었다. 섬사철란의 염기서열이 530 positions로 가장 길었고, 부위별 정렬된 특징은 Table 2와 같다. 조사된 전체 분류군에 대한 염기조성의 평균은 A가 38.63%, C가 12.03%, G가 16.09%, T가 33.24%이었고, G+C의 염기조성은 27.92-28.83%로 매우 낮았다. 조사된 사철란속의 유전적 거리는 0.00-9.53%이었다. 군내 분류군 중, 로젯사철란(*G.*

Table 3. Pairwise distance matrix of ITS between *Goodyera rosulacea* and related taxa(all numerical values delt with %).

Taxa	Gros	Grep	Gsch	Gsp.	Gvel	Gmax	Gmac	Gpro
Gros	0.00							
Grep	3.49-3.49	0.00						
Gsch	5.52-5.52	5.06-5.06	0.00					
Gsp.	4.64-4.65	4.04-4.05	2.83-3.00	0.00				
Gvel	5.36-5.36	4.78-4.78	3.90-3.90	0.59-0.74	0.00			
Gmax	5.22-5.22	4.63-4.63	3.63-3.76	1.05-1.19	0.43-0.43	0.00		
Gmac	6.53-6.68	5.50-5.64	5.20-5.35	3.45-3.60	3.19-3.33	3.18-3.33	0.00	
Gpro	10.49-10.49	9.86-9.86	9.58-9.58	8.87-9.04	9.01-9.01	9.01-9.01	9.99-10.14	0.00

Table 4. Pairwise distance matrix of *trnL* between *Goodyera rosulacea* and related taxa.

Taxa	Gros	Grep	Gsch	Gsp.	Gvel	Gmax	Gmac	Gpro
Gros	0.00							
Grep	5.05-5.05	0.00						
Gsch	8.59-8.78	4.87-4.87	0.00					
Gsp.	8.59-8.78	4.87-4.87	0.00	0.00				
Gvel	8.89-9.19	6.58-6.79	3.67-3.87	3.67-3.87	0.00			
Gmax	6.31-6.32	5.86-5.86	5.92-6.11	5.92-6.11	3.18-3.38	0.00		
Gmac	9.53-9.53	6.22-6.22	6.14-6.14	6.14-6.14	3.61-3.80	3.45-3.64	0.00	
Gpro	8.32-8.32	5.67-5.67	6.04-6.04	6.04-6.04	6.54-6.75	6.78-6.99	7.58-7.58	0.00

rosulacea)은 애기사철란(*G. repens*)과 가장 가까운 유전적 거리(5.05%)를 나타내었고, 붉은 사철란(*G. macrantha*)과 가장 먼 유전적 거리(9.53%)를 나타내었으며, 군외군인 *G. procera*와는 8.32%이었다(Table 4). 군외군이 더 적은 수치를 보인 것은 uncorrected pairwise distance로 처리 시 *trnL*구간의 gap handling이 적용되지 않고 missing으로 처리된 결과로 보인다. 염기의 indel부위는 모두 19개였는데 분류군에 따라 4-8개이었으며, 그 중 군외군인 일본산 *G. procera*가 8개이었으며, 군내군 중에서는 애기사철란이 7개, 로젯사철란, 사철란, 사철란의 신변이체(*G. sp.*)이 6개, 털사철란이 5개, 섬사철란과 붉은사철란이 각각 4개로 나타났다.

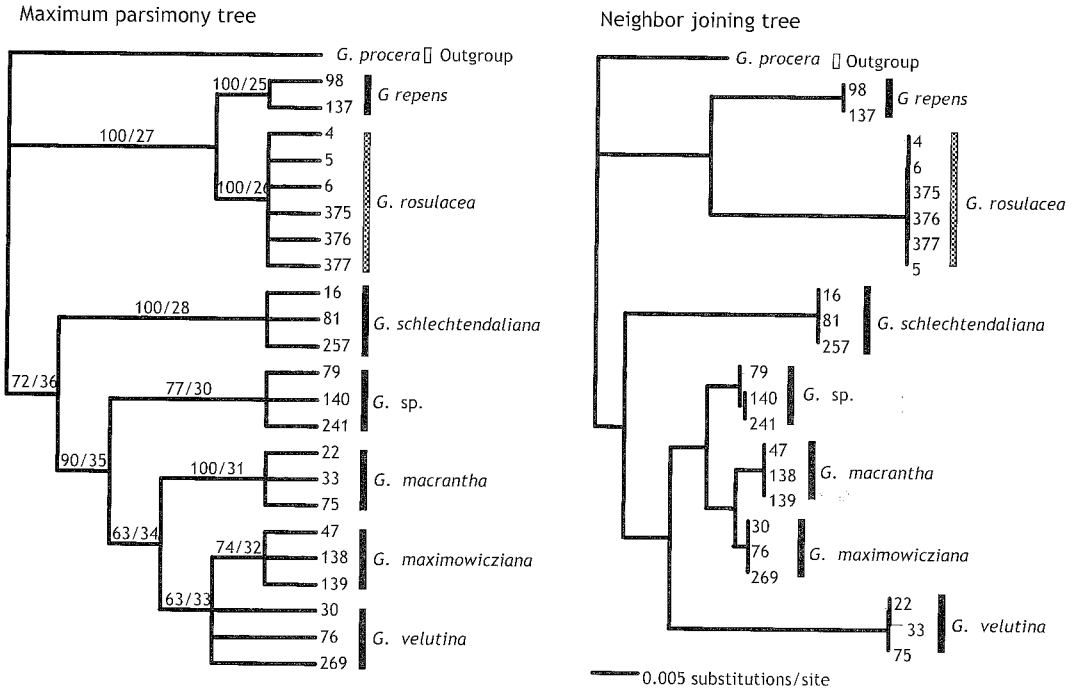


Fig. 1. Phylogenetic trees of *Goodyera rosulacea* and related taxa reconstructing by maximum parsimony and distance method in ITS sequences. The parsimony tree is a strict consensus tree of 140 equally parsimony trees, (CI=0.81, without uninformative characters; RI=0.94). Bootstrap percentages/the number of changes are provided above each branch(white line: outgroup, black line: ingroup).

계통학적 분석

ITS: 24개의 ITS 염기서열의 최대절약분석(Maximum parsimony)결과, 계통수의 길이는 140개였으며, uninformative character를 제외한 Consistency Index(CI)는 0.81, Retention Index(RI)는 0.94, Rescaled Consistency Index(RCI)는 0.82로 나타났다. 최대절약분석 결과 얻어진 Strict consensus tree는 Fig. 1과 같으며, bootstrap values는 63-100%로 평균 85.3%이었다. 분석결과 로젯사철란 (*G. rosulacea*)은 근연분류군인 애기사철란과 27개의 synapomorphic change와 100% bootstrap value로 나머지 분류군과 뚜렷하게 분리된 하나의 분계조(clade)를 형성하였다. 또한 군내군인 사철란(*G. schlechtendaliana*), 제주산 사철란의 신변이체(*G. sp.*), 털사철란(*G. velutina*), 붉은사철란(*G. maximowicziana*), 섬사철란(*G. macrantha*) 그룹은 36개의 synapomorphic change와 72% bootstrap value로 로젯사철란-애기사철란의 분계조와 다른 하나의 분계조를 형성하였다.

Neighbor-joining search한 계통수 분석 결과도 Maximum parsimony결과와 거의 일치하여

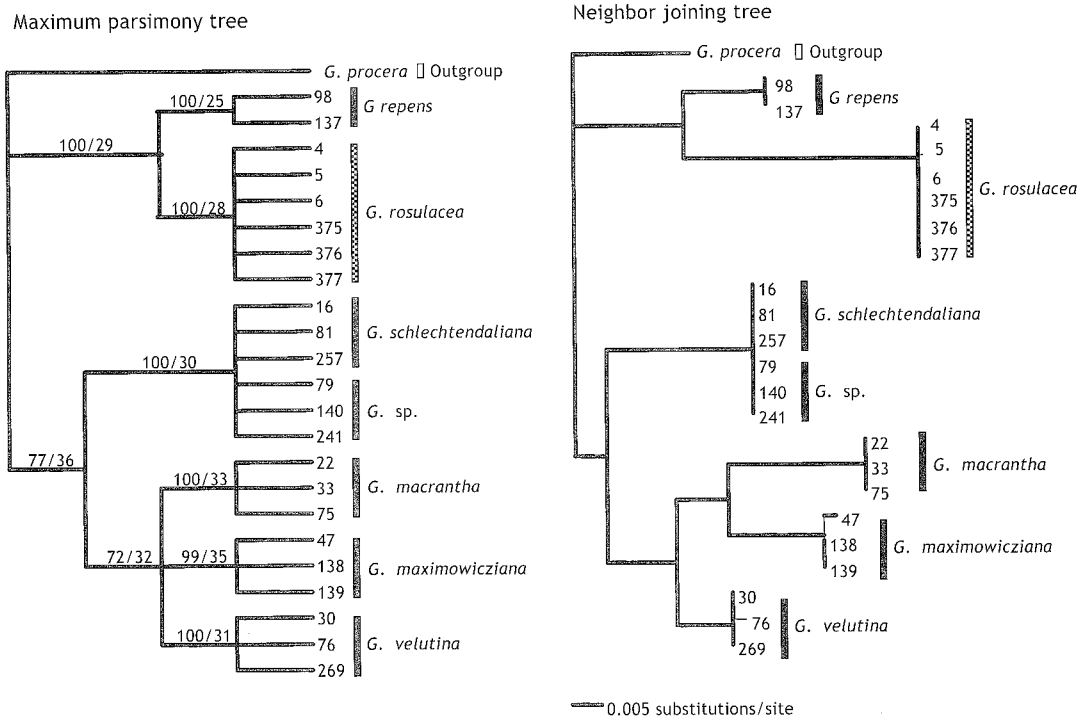


Fig. 2. Phylogenetic trees of *Goodyera rosulacea* and related taxa reconstructing by maximum parsimony and distance method in *trnL* sequences. The parsimony tree is a strict consensus tree of six equally parsimony tree 266 steps, (CI=0.76, without uninformative characters; RI=0.94). Bootstrap percentages/the number of changes are provided above each branch(white line: outgroup, black line: ingroup).

로젯사철란은 계통수 모두 단계통으로 나타났다(Fig. 1). ITS 1과 ITS 2를 분리하여 분석한 계통수는 ITS 1과 ITS 2를 통합하여 분석한 결과와 일치하는 양상을 보였다. 또한 조사한 24개 accessions의 5.8S부위의 염기서열은 거의 변화가 없이 보존적인 양상을 나타내었다.

***trnL*:** 24개의 *trnL* 염기서열의 최대절약(Maximum parsimony)분석 결과, 계통수의 길이는 266개였으며, uninformative character를 제외한 Consistency Index(CI)는 0.76, Retention Index(RI)는 0.94, Rescaled Consistency Index(RCI)는 0.74로 나타났다. 얻어진 Strict consensus tree는 Fig. 2와 같으며, bootstrap values는 55-100%로 평균 94%이었다. 분석결과 로젯사철란(*G. rosulacea*)은 29개의 공유파생형질 변이(synapomorphic change)와 100% bootstrap value에 의해 근연분류군인 애기사철란과 하나의 분계조를 형성하였으며 나머지 분류군들과 뚜렷하게 분리되었다. 또한 근내군인 사철란(*G. schlechtendaliana*), 제주산 사철란의 신변이체(*G. sp.*), 털사철란(*G. velutina*), 붉은사철란(*G. maximowicziana*), 섬사철란(*G. macrantha*) 그룹은 36개의 공유파생형질 변이(synapomorphic change)와 77% bootstrap

Table 5. Informative nucleotide sites in ITS and *trnL* to infer the taxonomic status of *G. rosulacea*. Each vertical 2~3 letters mean nucleotide site and bold letters show marker loci.

Taxa	21111112444444445556	78111111111222222223333344555
	767789911344456991373	7623333699955555666669934134
	6451676164803138177	412348158567890234560118213
Grep	TT--AATGTCGT-CATTCCA	AG-----CT-T-----GAAAGTTCTAGG
Gros	CTGAATTATATGTCCAAAT-	AGGATTAATC-GTATAAAG-TATTTCCAC
Gsch	TC--GAAGCCGT-TATTCCA	CAT-----C--T-----GAAAGAAGCTAGG
Gsp.	TC--GAAGCCGT-TATTCCA	CAT-----C--T-----GAAAGAAGCTAGG
Gvel	TC--GAAGCCGT-TATTCCA	CA-----CC-T-----GAAAGAAGCTAGG
Gmax	TC--GAAGCCGT-TATTCCA	CA-----CC-T-----GAAAGAAGCTAGG
Gmac	TC--GAAGCCGT-TATTCCA	CAA-----CC-T-----GAAAGAAGCTAGG

value로 로젯사철란-애기사철란의 분계조와 분리된 다른 하나의 분계조를 형성하였다.

근연결합법(Neighbor joining method)로 분석한 계통수에서도 최대절약 분석(Maximum parsimony analysis)결과와 마찬가지로 로젯사철란은 단계통으로 나타났다(Fig. 2).

로젯사철란의 표지유전자: ITS의 염기서열에서 로젯사철란은 11개의 염기, 즉 27번(C), 196번(T), 216번(A), 436번(A), 444번(T), 448번(G), 491번(C), 493번(A), 518번(A), 531번(A), 577번(T)에서 고유한 표지유전자를 갖는다. 또한, 로젯사철란은 174번, 175번, 450번 염기에서 각각 (G), (A), (T)의 삽입된 고유 염기를 나타내었고, 637번 염기는 결실되었다(Table 3). 한편, 각 분류군의 고유한 표지유전자는 애기사철란에서 5개, 사철란에서 9개, *G. sp.*에서 6개, 붉은사철란에서 14개, 섬사철란에서 1개, 털사철란에서 1개로 나타났다. 로젯사철란이 애기사철란과 공유한 표지유전자(marker gene)는 5개로, 166번(T), 181번(A), 197번(T), 411번(T), 463번(C)이었다(Table 5, Appendix 1).

엽록체 DNA의 *trnL* 염기서열에서 로젯사철란은 11개의 염기, 즉 124번(G), 168번(A), 262번(A), 263번(G), 365번(T), 366번(A), 431번(T), 448번(C), 512번(C), 531번(A), 543번(C)에서, 종 고유의 표지유전자(species-specific marker gene)를 나타내었고, 두 개(198번, 364번)의 결실과 131번-134번(ATTA), 195번(C), 255번-260번(GTATAA) 염기에서의 삽입이 있었다(Table 5). 각 분류군 고유의 표지유전자는 애기사철란에서 4개, 붉은사철란에서 9개, 섬사철란에서 2개, 및 털사철란에서 2개이었으며, 사철란과 *G. sp.*는 9개의 동일한 표지유전자를 갖는다. 로젯사철란이 애기사철란과 공유하는 표지유전자(marker gene)는 5개의 염기로, 77번(A), 86번(G), 191번(T), 390번(T), 391번(T)이었다(Table 5, Appendix 2).

고 찰

로젯사철란은 잎의 모양과 잎맥, 화서에 달린 꽃의 수, 꽃의 모양, 색깔, 털의 형태 및 분포 등에 있어서 애기사철란과 유사하다. 그러나 로젯사철란은 애기사철란보다 잎의 수가 더 많고, 잎의 기부가 0.2-0.3cm 정도의 짧은 엽초모양이며 잎이 꽃줄기의 기부에 모여 엽신이 수평으로 퍼지는 로젯트형을 이루고 화서에는 꽃이 성글고, 포의 길이가 꽃 길이의 거의 1/2이다. 도봉산이나 덕향산 200-600m 정도 되는 낮은 지역의 낙엽수림 아래에 자라며 6월에 개화한다. 한편 애기사철란은 잎의 기부가 0.7-1cm의 긴 엽초모양이고 엽신이 위로 향하며, 화서에는 꽃들이 조밀하고, 포의 길이가 거의 꽃의 길이와 같고, 백두산이나 한라산 1200-1600m 정도의 고산에서 자라며, 7-8월에 개화한다. 따라서 로젯사철란은 외부형태형질, 개화기 및 분포지에 있어서 애기사철란과 뚜렷이 구분된다.

로젯사철란은 ITS와 *trnL* 염기서열 분석 결과에서 애기사철란과 가장 가까운 유전적 거리를 나타냈으며, 계통분석 결과 tree내에서 애기사철란과 하나의 분계조를 형성하였고, 또한 다수의 표지유전자를 애기사철란과 공유하고 있으므로 애기사철란과 유연관계가 가까운 분류군으로 추정된다.

피자식물의 종간 유전적 거리는 매우 다양한 양상을 나타내는데, 쌍자엽식물의 경우 *Magnolia*속의 cpDNA부위에서 종간 유전적 거리는 0.03-1.05%이었으며(Qiu *et al.*, 1995), *Cicuta*속의 ITS와 cpDNA 연구에서 ITS의 종간 유전적 거리가 1.20-4.10%가 나타났고, cpDNA *psbI-trnK* 5' 부위의 종간 유전적 거리는 0.81-1.40%이었다(Lee and Downie, 2006), 국내 ITS에 의한 제비꽃속의 연구에서 종간 유전적 거리는 3.00-16.11%이었고, 종하분류군들간의 유전적 거리는 1.00% 이하로 나타났다(Yoo *et al.*, 2005). 국내산 털개구리미나리와 근연 종간 유전적 거리는 0.16-1.15%로 매우 낮았다(Lee *et al.*, 2004). 단자엽식물의 경우, *Agavaceae*의 ITS 부위에서 종간 유전적 거리는 0.80-34.60%로 다양하게 나타났다(Bogler and Simpson, 1996). 난과식물의 종간 유전적 거리에 관한 연구로는 *Phalaenopsis*속 식물 57 분류군을 대상으로 한 연구에서, ITS 부위의 종간 유전적 거리가 0.00-24.20%이었으며, *Phalaenopsis*속내 *Parishianae*아속의 종간 유전적 거리는 1.00-5.30%이었고, *Polychilos*아속내 종간에서 0.00-20.60%이었으며, *Aphyllae*아속에서 0.60-3.30%로 매우 다양하게 나타났다. 또한 *Phalaenopsis*속 식물 57분류군의 *trnL* 부위에서 종간 유전적 거리는 0.10-16.70%로 변이의 폭이 다양하였다(Tsai, 2003). 본 사철란속의 종간 유전적 거리는 ITS에서 0.00-10.49%이었고 *trnL*에서 0.00-9.53%로 나타났으며 이 중 로젯사철란과 애기사철란의 유전적 거리는 ITS에서 3.49%로 *Phalaenopsis*속내 종간변이 폭에 속하였는데, *Parishianae*아속과 *Polychilos*아속내 종간 변이에 비하면 낮은 편이나 *Aphyllae*아속내 종간 유전적 거리 보다는 크게 나타났다. 또한 *trnL*에서도 5.05%로 *Phalaenopsis*속의 종간 유전적 거리의 범주에 포함되었다. 이처럼 종간 유전적 거리의 폭이 다양하여 염기변이의 수적 차이에 의해 종의 한계를 결정하는 문제를 일률적으로 판단하기 어려우나 본 연구 결과 종간 유전적 거리에 의

해서 로젯사철란을 종으로 처리하는데 무리가 없고, 애기사철란과는 형태, 개화기, 생육지에 있어서도 뚜렷한 차이를 나타내므로 독립된 종으로 처리되는 것을 뒷받침하고 있다. 결과적으로 본 염기분석 결과는 로젯사철란(*G. rosulacea*)이 애기사철란과 유연관계가 가까운 독립된 종으로 취급한 Lee(2004)의 분류학적 처리를 지지하였다.

사 사

본 연구는 환경부 차세대핵심환경기술개발사업의 연구비 지원(과제 번호 052-061-025)으로 수행되었습니다. 아울러 본 연구가 수행되는데 재료와 생육지 정보를 제공해 주신 김유성 선생님과 이경서 선생님께 깊은 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Camoell, and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247-277.
- Bogler D. J. and B. B. Simpson. 1996. Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation. *Amer. J. Bot.* 83: 1225-1235.
- Compton, J. A. and A. Culham. 2002. Phylogeny and circumscription of tribe Actaeae Ranunculaceae. *Sys. Bot.* 27: 502-511.
- Corriveau, J. L. and A. W. Coleman. 1988. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *Amer. J. Bot.* 75: 1443-1458.
- Cronn, R. and J. F. Wendel. 2003. Cryptic trysts, genomic mergers, and plant speciation. *New Phytologist.* 161: 133-142.
- Chung, T. H. 1956. Korean Flora II. Shinzisa, Seoul. Pp. 1009-1010. [In Korean]
- Downie, S. R. and D. S. Katz-Downie. 1996. A molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Amer. J. Bot.* 83: 234-251.
- _____, _____, and K. Spalik. 2000. A phylogeny of Apiaceae tribe Scandiceae: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Amer. J. Bot.* 87: 76-95.

- Farris, J. S., M. Källersjö, A. G. Kluge and C. Bult. 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10: 315-319.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Freudenstein J. V. 2001. A Systematic Study of Endothelial Thickenings in the Orchidaceae. *Amer. J. Bot.* 78: 766-781.
- Gibson, T., D. Higgins and J. Thompson. 1994. Clustal X Program. EMBL, Heidelberg, Germany.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*: 11-120.
- Lee, C. S., N. S. Lee and S. H. Yeau. 2004. Molecular phylogenetic relationships and speciation of *Ranunculus cantoniensis* (Ranunculaceae). *Korean J. Pl. Taxon.* 34: 335-358. [In Korean]
- _____ and S. R. Downie. 2006. Phylogenetic relationships within *Cicuta* (Apiaceae tribe Oenantheae) inferred from nuclear rDNA ITS and cpDNA sequence data. *Canad. J. of Bot.* 83: 453-468.
- Lee, Y. 1996. Flora of Korea. Gyohaksa, Seoul. [In Korean]
- _____. 2004. I. New Taxa of Korean Flora. *Bulletin of Koran Plant Research.* 4: 2-4. [In Korean]
- Li, H. L. 1978. Flora of Taiwan. vol. 5. Epoch Pub. Co., Taipei, Taiwan. Pp. 1006-1019.
- Nakai, T. 1911. Flora Koreana II. *J. Coll. Sci. Imp. Univ.* 31: 226-227.
- Qiu, Y-L., C. R. Parks and M. W. Chase. 1995. Molecular divergence in the Eastern Asia-Eastern North America disjunct section *Rytidospermum* of *Magnolia* (Magnoliaceae). *Amer. J. Bot.* 82: 1589-1598.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The Neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Satake, Y. J., S. Ohwi, S. Kitamura, S. Watari and T. Tominari. 1982. Wild Flowers of Japan. Monoco. [1]. Heibonsha, Tokyo.
- Sim, J-K., H-D. Park and S-J. Park. 2002. Phylogenetic study of Korean *Iris* (Iridaceae) based on nrDNA ITS sequences. *Korean J. Pl. Taxon.* 32: 33-53.
- Shin, K-S., Y. K. Shin, J-W. Kim and K-H. Tae. 2003. Phylogeny of the Genus *Goodyera*(Orchidaceae; Cranichideae) in Korea Based on Nuclear Ribosomal DNA ITS Region Sequences. *J. Plant Biol.* 45: 182-187.
- Simmons, M. P. and H. Ochoterena. 2000. Gaps as Characters in Sequence-Based phylogenetic Analyses. *Syst. Bot.* 49: 369-381.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other

- methods), Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tae, K. H., E. H. Lee and S. C. Ko. 1997. A systematic study of the genus *Goodyera* in Korea by morphological and cytological characters. Korean J. Pl. Taxon 27: 89-116. [In Korean]
- _____ and S. C. Ko. 1999. Interspecific relationship of the genus *Goodyera* in Korea using cluster analysis. Korean J. Pl. Taxon 29: 63-73. [In Korean]
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Pl. Molec. Biol. 17: 1105-1109.
- Tsai, C. 2003. Molecular phylogeny, biogeography, and evolutionary trends of the genus *phalaenopsis* (Orchidaceae). Ph. D. thesis in Univ. of National Sun Yat-sen, Kaohsiung, Taiwan, Pp. 224.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. in PCR Protocols: A guide to methods and applications, eds. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. Academic Press, San Diego.
- Yoo, K., S. Jang and W. Lee, 2005. Phylogeny of Korean *Viola* based on ITS sequences. Korean J. Pl. Taxon. 35: 7-23. [In Korean]

Appendix 1. Aligned ITS sequences in nrDNA from the 24 accessions examined. Dashes and gaps required for alignment. Dots in the sequences denote same nucleotide state as the first taxon.

[10	20	30	40	50	60	70	80	90	100]
[
G_procera_385		TCGAGACCTAAAAGGATTGGATGACTTTTGACAACAATGTGACGACCGGCGGATTGCGGTCGTAGACACCATCCATTCCTCTTGATGG	[100]								
G_repens_98		A.....ATT.....T..A.A...G...T.....T.....	[100]								
G_repens_137		A.....ATT.....T..A.A...G...T.....T.....	[100]								
G_rosulacea_4		C.....ATT.....T..A.T...G...T.....T.....	[100]								
G_rosulacea_5		C.....ATT.....T..A.T...G...T.....T.....	[100]								
G_rosulacea_6		C.....ATT.....T..A.T...G...T.....T.....	[100]								
G_rosulacea_375		C.....ATT.....T..A.T...G...T.....T.....	[100]								
G_rosulacea_376		C.....ATT.....T..A.T...G...T.....T.....	[100]								
G_rosulacea_377		C.....ATT.....T..A.T...G...T.....T.....	[100]								
G_schlechtendaliana_16		C.....ATT.....C..T..A.....T..A...C....	[100]								
G_schlechtendaliana_81		C.....ATT.....C..T..A.....T..A...C....	[100]								
G_schlechtendaliana_257		C.....ATT.....C..T..A.....T..A...C....	[100]								
G_sp_79		C.....G..TT.....T..A.A.....T.....T.....	[100]								
G_sp_140		C.....G..TT.....T..A.A.....T.....T.....	[100]								
G_sp_241		C.....G..TT.....T..A.A.....T.....T.....	[100]								
G_macrantha_22		C...A...TT.....T.....G...T.....A...T...	[100]								
G_macrantha_33		C...A...TT.....T.....G...T.....A...T...	[100]								
G_macrantha_75		C...A...TT.....T.....G...T.....A...T...	[100]								
G_maximowicziana_47		C...G..TT.....T..A.A.....T.....T.....	[100]								
G_maximowicziana_138		C...G..TT.....T..A.A.....T.....T.....	[100]								
G_maximowicziana_139		C...G..TT.....T..A.A.....T.....T.....	[100]								
G_velutina_30		C.....G..TT.....T..A.A.....T.....T.....	[100]								
G_velutina_76		C.....G..TT.....T..A.A.....T.....T.....	[100]								
G_velutina_269		C.....G..TT.....T..A.A.....T.....T.....	[100]								
[110	120	130	140	150	160	170	180	190	200]
[
G_procera_385		GAGATACAAITGAAAAGATGGAAGGAGAAA-AA-CTCGG-CGGGTTATGTGCCAAGGATGATGCGGCATAA--GCAACGCCCATACCCCGGATAAAG	[195]								
G_repens_98		C...C...A...C...G...A...AT...ATT...T...T...AATGG...TTCCG...A...T...	[195]								
G_repens_137		C...C...A...C...G...A...AT...ATT...T...T...AATGG...TTCCG...A...T...	[195]								
G_rosulacea_4		C...C...A...T...A...A...A...AT...TT...T...GA...T...AATGG...TTCCG...ATT...	[197]								
G_rosulacea_5		C...C...A...T...A...A...A...AT...TT...T...GA...T...AATGG...TTCCG...ATT...	[197]								
G_rosulacea_6		C...C...A...T...A...A...A...AT...TT...T...GA...T...AATGG...TTCCG...ATT...	[197]								
G_rosulacea_375		C...C...A...T...A...A...A...AT...TT...T...GA...T...AATGG...TTCCG...ATT...	[197]								
G_rosulacea_376		C...C...A...T...A...A...A...AT...TT...T...GA...T...AATGG...TTCCG...ATT...	[197]								
G_rosulacea_377		C...C...A...T...A...A...A...AT...TT...T...GA...T...AATGG...TTCCG...ATT...	[197]								
G_schlechtendaliana_16		G.C...A...T...G...A...AT...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[195]								
G_schlechtendaliana_81		G.C...A...T...G...A...AT...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[195]								
G_schlechtendaliana_257		G.C...A...T...G...A...AT...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[195]								
G_sp_79		C...C...A...T...G...A...A...AT...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[195]								
G_sp_140		R.C...A...T...G...A...A...AT...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[196]								
G_sp_241		R.C...A...T...G...A...A...AT...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[196]								
G_macrantha_22		C...C...A...C...G...A...A...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[196]								
G_macrantha_33		C...C...A...C...G...A...A...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[196]								
G_macrantha_75		C...C...A...C...G...A...A...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[196]								
G_maximowicziana_47		C...C...A...T...G...A...A...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[195]								
G_maximowicziana_138		C...C...A...T...G...A...A...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[195]								
G_maximowicziana_139		C...C...A...T...G...A...A...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[195]								
G_velutina_30		C...C...A...T...G...A...A...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[195]								
G_velutina_76		C...C...A...T...G...A...A...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[195]								
G_velutina_269		C...C...A...T...G...A...A...T...T...T...ATGG...TTCCG...A...T...	[195]								
[210	220	230	240	250	260	270	280	290	300]
[
G_procera_385		CCTGACGGGCTTAGCGAGTGGCTTGTGATGCTTCTAAGTATGTGACTCTGGGCAATGGATATCTTGGGCTTGCATCGATGAAGCGCCAGCGAAA	[295]								
G_repens_98		C..T...T.....T...T...T...I.....	[295]								
G_repens_137		C..T...T.....T...T...T...T.....	[295]								
G_rosulacea_4		C..GT...G...A...T...T...T.....	[297]								
G_rosulacea_5		C..GT...G...A...T...T...T.....	[297]								
G_rosulacea_6		C..GT...G...A...T...T...T.....	[297]								
G_rosulacea_375		C..GT...G...A...T...T...T.....	[297]								
G_rosulacea_376		C..GT...G...A...T...T...T.....	[297]								
G_rosulacea_377		C..GT...G...A...T...T...T.....	[297]								
G_schlechtendaliana_16		C..GT...G...TG...T...A.....	[295]								
G_schlechtendaliana_81		C..GT...G...TG...T...A.....	[295]								
G_schlechtendaliana_257		C..GT...G...TG...T...A.....	[295]								
G_sp_79		C..G...G...T...TG...T...Y.....	[295]								
G_sp_140		C..G...G...T...TG...T.....	[296]								
G_sp_241		C..G...G...T...TG...T.....	[296]								

G_macrantha_22	..C.G.T..G.....A...TG...T...T.....	[296]
G_macrantha_33	..C.G.T..G.....A...TG...T...T.....	[296]
G_macrantha_75	..C.G.T..G.....A...TG...T...T.....	[296]
G_maximowicziana_47	..C.G....G.....T...TG...T...T.....	[295]
G_maximowicziana_138	..C.G....G.....T...TG...T...T.....	[295]
G_maximowicziana_139	..C.G....G.....T...TG...T...T.....	[295]
G_velutina_30	..C.G....G.....T...TG...T...T.....	[295]
G_velutina_76	..C.G....G.....T...TG...T...T.....	[295]
G_velutina_269	..C.G....G.....T...TG...T...T.....	[295]

[310 320 330 340 350 360 370 380 390 400]

G_procera_385	TGCGATACGTGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAATTTTGAACGCAAGTTCGCCCGAGGCCAATTGGCTAAGGGCACGTCCGCTGGGGG	[395]
G_repens_98G.....	[395]
G_repens_137G.....	[395]
G_rosulacea_4G.....	[397]
G_rosulacea_5G.....	[397]
G_rosulacea_6G.....	[397]
G_rosulacea_375G.....	[397]
G_rosulacea_376G.....	[397]
G_rosulacea_377G.....	[397]
G_schlechtendaliana_16G.....	[395]
G_schlechtendaliana_81G.....	[395]
G_schlechtendaliana_257G.....	[395]
G_sp_79G.....	[395]
G_sp_140G.....	[396]
G_sp_241G.....	[396]
G_macrantha_22G.....T.....	[396]
G_macrantha_33G.....T.....	[396]
G_macrantha_75G.....T.....	[396]
G_maximowicziana_47G.....	[395]
G_maximowicziana_138G.....	[395]
G_maximowicziana_139G.....	[395]
G_velutina_30G.....	[395]
G_velutina_76G.....	[395]
G_velutina_269G.....	[395]

[410 420 430 440 450 460 470 480 490 500]

G_procera_385	TCAAGCATTACGTCTTCATCCGGAACAGCTGCCGCTATCGTGTTC--GCGGTGCCGGTTTGAACGGGAGAGTGGCCCTTCGCGCATGCTGTGGCG	[493]
G_repens_98T...C...AT...AA...T.....C...T.....CA.....	[493]
G_repens_137T...C...AT...AA...T.....C...T.....CA.....	[493]
G_rosulacea_4T...C...AT...A.AA...TT...GTT...C...T.....CC.A...A	[497]
G_rosulacea_5T...C...AT...A.AA...TT...GTT...C...T.....CC.A...A	[497]
G_rosulacea_6T...C...AT...A.AA...TT...GTT...C...T.....CC.A...A	[497]
G_rosulacea_375T...C...AT...A.AA...TT...GTT...C...T.....CC.A...A	[497]
G_rosulacea_376T...C...AT...A.AA...TT...GTT...C...T.....CC.A...A	[497]
G_rosulacea_377T...C...AT...A.AA...TT...GTT...C...T.....CC.A...A	[497]
G_schlechtendaliana_16T...AC...AT...AA.G.T...--T.....CA...A	[493]
G_schlechtendaliana_81T...AC...AT...AA.G.T...--T.....CA...A	[493]
G_schlechtendaliana_257T...AC...AT...AA.G.T...--T.....CA...A	[493]
G_sp_79T...AC...AT...AA.R.T...T--T.....CA...A	[494]
G_sp_140T...AC...AT...AA.R.T...T--T.....CA...A	[495]
G_sp_241T...AC...AT...AA.R.T...T--T.....CA...A	[495]
G_macrantha_22AT...TC...AT...AA...T...--T.....CAT...A	[494]
G_macrantha_33AT...TC...AT...AA...T...--T.....CAT...A	[494]
G_macrantha_75AT...TC...AT...AA...T...--T.....CAT...A	[494]
G_maximowicziana_47T...AC...AT...AA...T...T--G.T.....CA...A	[494]
G_maximowicziana_138T...AC...AT...AA...T...T--G.T.....CA...A	[494]
G_maximowicziana_139T...AC...AT...AA...T...T--G.T.....CA...A	[494]
G_velutina_30T...AC...AT...AA...T...T--G.T.....CA...A	[494]
G_velutina_76T...AC...AT...AA...T...T--G.T.....CA...A	[494]
G_velutina_269T...AC...AT...AA...T...T--G.T.....CA...A	[494]

[510 520 530 540 550 560 570 580 590 600]

G_procera_385	CGGGTTGAAGAATCGTTTCCTTCCTCCGCCATGTTTGTAAATGGGTGGAATGATGCTGCCATTGGCCACGGCTATCATCTCATGCTCGAGGAG	[593]
G_repens_98CG.....T.....G.....A.....	[593]
G_repens_137CG.....T.....G.....A.....	[593]
G_rosulacea_4CG...A.....T...A.....G.....T.....	[597]
G_rosulacea_5CG...A.....T...A.....G.....T.....	[597]
G_rosulacea_6CG...A.....T...A.....G.....T.....	[597]
G_rosulacea_375CG...A.....T...A.....G.....T.....	[597]
G_rosulacea_376CG...A.....T...A.....G.....T.....	[597]
G_rosulacea_377CG...A.....T...A.....G.....T.....	[597]
G_schlechtendaliana_16GA.....T...A.....G.....	[593]
G_schlechtendaliana_81GA.....T...A.....G.....	[593]
G_schlechtendaliana_257GA.....T...A.....G.....	[593]

G_sp_79CT.....T.....G.....	[594]
G_sp_140CT.....T.....G.....	[595]
G_sp_241CT.....T.....G.....	[595]
G_macrantha_22CA.....T.A.....G.....	[594]
G_macrantha_33CA.....T.A.....G.....	[594]
G_macrantha_75CA.....T.A.....G.....	[594]
G_maximowicziana_47CG.....T.A.....G.....	[594]
G_maximowicziana_138CG.....T.A.....G.....	[594]
G_maximowicziana_139CG.....T.A.....G.....	[594]
G_velutina_30CT.....T.A.....G.....	[594]
G_velutina_76CT.....T.A.....G.....	[594]
G_velutina_269CT.....T.A.....G.....	[594]
[610 620 630 640 650 660 670 680 690]	
[
G_procera_385	GATACGCGTAGACTTTCGGCGCTGATCACCGGATGAATATCGCAGGTGGCGCCTTGAATTGGACCCAGGATGGCGGGATGCCCGCTGAGTTTAA	[691]
G_repens_98	...TTT...A...T...CA...G...A...T.G...A...	[691]
G_repens_137	...TTT...A...T...CA...G...A...T.G...A...	[691]
G_rosulacea_4	...T.T...A...T...A...A...T...A...	[694]
G_rosulacea_5	...T.T...A...T...A...A...T...A...	[694]
G_rosulacea_6	...T.T...A...T...A...A...T...A...	[694]
G_rosulacea_375	...T.T...A...T...A...A...T...A...	[694]
G_rosulacea_376	...T.T...A...T...A...A...T...A...	[694]
G_rosulacea_377	...T.T...A...T...A...A...T...A...	[694]
G_schlechtendaliana_16	...T.T...A...T...A...AC...G...A...A...	[691]
G_schlechtendaliana_81	...T.T...A...T...A...AC...G...A...A...	[691]
G_schlechtendaliana_257	...T.T...A...T...A...AC...G...A...A...	[691]
G_sp_79	...T.T...A...T...A...G...A...A...A...	[692]
G_sp_140	...T.T...A...T...A...G...M...A...A...	[693]
G_sp_241	...T.T...A...T...A...G...M...A...A...	[693]
G_macrantha_22	...C.T.T...A...T...G...CAT...G...T...G.A...	[692]
G_macrantha_33	...C.T.T...A...T...G...CAT...G...T...G.A...	[692]
G_macrantha_75	...C.T.T...A...T...G...CAT...G...T...G.A...	[692]
G_maximowicziana_47	...T.T...A...T...A...G...T...A...	[692]
G_maximowicziana_138	...T.T...A...T...A...G...T...A...	[692]
G_maximowicziana_139	...T.T...A...T...A...G...T...A...	[692]
G_velutina_30	...T.T...A...T...A...G...T...A...A...	[692]
G_velutina_76	...T.T...A...T...A...G...T...A...A...	[692]
G_velutina_269	...T.T...A...T...A...G...T...A...A...	[692]

Appendix 2. Aligned *trnL* sequences in cpDNA from the 24 accessions examined. Dashes and gaps required for alignment. Dots in the sequences denote same nucleotide state as the first taxon.

[10	20	30	40	50	60	70	80	90	100]
[
G_procera_385	AAGGGATAGTGCAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGGAATGAAATTTACTACGTTAGATTAGTAGCTAAAAGACTTCTATCAAAAAGAAAGATTGAA									[100]
G_repens_98A.....G..T.....									[100]
G_repens_137A.....G..T.....									[100]
G_rosulacea_4A.....G..T.....									[100]
G_rosulacea_5A.....G..T.....									[100]
G_rosulacea_6A.....G..T.....									[100]
G_rosulacea_375A.....G..T.....									[100]
G_rosulacea_376A.....G..T.....									[100]
G_rosulacea_377A.....G..T.....									[100]
G_schlechtendaliana_16A.....T.....T.....T.....									[100]
G_schlechtendaliana_81A.....T.....T.....T.....									[100]
G_schlechtendaliana_257A.....T.....T.....T.....									[100]
G_sp_79A.....T.....T.....T.....									[100]
G_sp_140A.....T.....T.....T.....									[100]
G_sp_241A.....T.....T.....T.....									[100]
G_macrantha_22A.....T.....T.....T.....									[100]
G_macrantha_33A.....T.....T.....T.....									[100]
G_macrantha_75A.....T.....T.....T.....									[100]
G_maximowicziana_47T.....T.....T.....T.....									[100]
G_maximowicziana_138T.....T.....T.....T.....									[100]
G_maximowicziana_139T.....T.....T.....T.....									[100]
G_velutina_30T.....T.....T.....T.....									[100]
G_velutina_76C.....T.....T.....T.....									[100]
G_velutina_269T.....T.....T.....T.....									[100]
[
[110	120	130	140	150	160	170	180	190	200]
[
G_procera_385	ATGACAGAAAAGGATGACCTTA-----TATACCTAATACGTTATGTATACACTTACATAACAAGCGATTAAATCAATTTCTTTCCTTC-TTT-C									[186]
G_repens_98A.....G.....C.....T.....									[186]
G_repens_137A.....G.....C.....T.....									[186]
G_rosulacea_4T?TACTTAATTA.....A.....GA.....C.....T.....C.....									[198]
G_rosulacea_5TACTTAATTA.....A.....GA.....C.....T.....C.....									[198]
G_rosulacea_6TGTACTTAATTA.....A.....GA.....C.....T.....C.....									[198]
G_rosulacea_375TGTACTTAATTA.....A.....GA.....C.....T.....C.....									[198]
G_rosulacea_376TGTACTTAATTA.....A.....GA.....C.....T.....C.....									[198]
G_rosulacea_377TGTACTTAATTA.....A.....GA.....C.....T.....C.....									[198]
G_schlechtendaliana_16TTTA.....A.....G.....C.....A.....									[183]
G_schlechtendaliana_81TTTA.....A.....G.....C.....A.....									[183]
G_schlechtendaliana_257TTTA.....A.....G.....C.....A.....									[183]
G_sp_79TTTA.....A.....G.....C.....A.....									[183]
G_sp_140TTTA.....A.....G.....C.....A.....									[183]
G_sp_241TTTA.....A.....G.....C.....A.....									[183]
G_macrantha_22A.....TATCTTA.....G.....G.....C.....									[193]
G_macrantha_33A.....TATCTTA.....G.....G.....C.....									[193]
G_macrantha_75A.....TATCTTA.....G.....G.....C.....									[193]
G_maximowicziana_47G.....G.....C.....									[186]
G_maximowicziana_138G.....G.....C.....									[186]
G_maximowicziana_139G.....G.....C.....									[186]
G_velutina_30G.....G.....C.....									[165]
G_velutina_76G.....G.....C.....									[165]
G_velutina_269G.....G.....C.....									[165]
[
[210	220	230	240	250	260	270	280	290	300]
[
G_procera_385	TTTATATTACTATTATC-----TTATCTACTCTTA-----GTATATGAGTATAGGATAAGGATATATAGAAAAACCTCT									[256]
G_repens_98T.....A.....G.....G.....C.....									[256]
G_repens_137T.....A.....G.....G.....C.....									[256]
G_rosulacea_4ATATTACTATTATC.....A.....GTATAA.AG...AG.AT.....G...C.....									[284]
G_rosulacea_5ATATTACTATTATC.....A.....GTATAA.AG...AG.AT.....G...C.....									[284]
G_rosulacea_6ATATTACTATTATC.....A.....GTATAA.AG...AG.AT.....G...C.....									[284]
G_rosulacea_375ATATTACTATTATC.....A.....GTATAA.AG...AG.AT.....G...C.....									[284]
G_rosulacea_376ATATTACTATTATC.....A.....GTATAA.AG...AG.AT.....G...C.....									[284]
G_rosulacea_377ATATTACTATTATC.....A.....GTATAA.AG...AG.AT.....G...C.....									[284]
G_schlechtendaliana_16TTATTTACTA.....TA.T.ACIATTA-----G.....G.....C.....									[268]
G_schlechtendaliana_81TTATTTACTA.....TA.T.ACIATTA-----G.....G.....C.....									[268]
G_schlechtendaliana_257TTATTTACTA.....TA.T.ACIATTA-----G.....G.....C.....									[268]
G_sp_79TTATTTACTA.....TA.T.ACIATTA-----G.....G.....C.....									[268]
G_sp_140TTATTTACTA.....TA.T.ACIATTA-----G.....G.....C.....									[268]
G_sp_241TTATTTACTA.....TA.T.ACIATTA-----G.....G.....C.....									[268]
G_macrantha_22T.....A.....G.....A.....G.....C.....									[263]
G_macrantha_33T.....A.....G.....A.....G.....C.....									[263]

<i>G. macrantha_75</i>T.....A.....G.....A.....G.....C.....	[263]
<i>G. maximowicziana_47</i>ATATTACTATTATC.....A.....G.....G.....C.....C.....	[266]
<i>G. maximowicziana_138</i>ATATTACTATTATC.....A.....G.....G.....C.....C.....	[266]
<i>G. maximowicziana_139</i>ATATTACTATTATC.....A.....G.....G.....C.....C.....	[266]
<i>G. velutina_30</i>TATATTACTA.....TA.....ACTATTAA.....G.....G.....C.....	[245]
<i>G. velutina_76</i>TATATTACTA.....TA.....ACTATTAA.....G.....G.....C.....	[245]
<i>G. velutina_269</i>TATATTACTA.....TA.....ACTATTAA.....G.....G.....C.....	[245]

[310 320 330 340 350 360 370 380 390 400]

<i>G. procera_385</i>	ATCTTATATCTAAITTAGATTCTATA-----TGAATTAGAAATGATAAACTATGAAAAGTTTT--TGAAGTTGAAAAAGAATCAAA----	[336]					
<i>G. repens_98</i>T.....T.....A.....AATGAG.A.....TTGA.T.....	[339]	
<i>G. repens_137</i>T.....T.....A.....AATGAG.A.....TTGA.T.....	[339]	
<i>G. rosulacea_4</i>T.....T.....T.....-TA.....AAT.CG.A.....TTGA.T.A.....	[366]
<i>G. rosulacea_5</i>T.....T.....T.....-TA.....AAT.CG.A.....TTGA.T.A.....	[366]
<i>G. rosulacea_6</i>T.....T.....T.....-TA.....AAT.CG.A.....TTGA.T.A.....	[366]
<i>G. rosulacea_375</i>T.....T.....T.....-TA.....AAT.CG.A.....TTGA.T.A.....	[366]
<i>G. rosulacea_376</i>T.....T.....T.....-TA.....AAT.CG.A.....TTGA.T.A.....	[366]
<i>G. rosulacea_377</i>T.....T.....T.....-TA.....AAT.CG.A.....TTGA.T.A.....	[366]
<i>G. schlechtendaliana_16</i>T.....A.....G.....CAT.AG.A.....GTTGA.AA.G.ATTGA	[356]	
<i>G. schlechtendaliana_81</i>T.....A.....G.....CAT.AG.A.....GTTGA.AA.G.ATTGA	[356]	
<i>G. schlechtendaliana_257</i>T.....A.....G.....CAT.AG.A.....GTTGA.AA.G.ATTGA	[356]	
<i>G. sp_79</i>T.....A.....G.....CAT.AG.A.....GTTGA.AA.G.ATTGA	[356]	
<i>G. sp_140</i>T.....A.....G.....CAT.AG.A.....GTTGA.AA.G.ATTGA	[356]	
<i>G. sp_241</i>T.....A.....G.....CAT.AG.A.....GTTGA.AA.G.ATTGA	[356]	
<i>G. macrantha_22</i>T..TC..T.....ATTAGATTCTATA.T.....T.G.....CAT.CT.A.....GTTGA.AA.G.ATAGA	[363]	
<i>G. macrantha_33</i>T..TC..T.....ATTAGATTCTATA.T.....T.G.....CAT.CT.A.....GTTGA.AA.G.ATAGA	[363]	
<i>G. macrantha_75</i>T..TC..T.....ATTAGATTCTATA.T.....T.G.....CAT.CT.A.....GTTGA.AA.G.ATAGA	[363]	
<i>G. maximowicziana_47</i>T..TC..T.....ATTAGATTCTATA.T.....T.....CAT.CT.A.....GTTGA.GAA.G.ATCAA	[366]	
<i>G. maximowicziana_138</i>T..TC..T.....ATTAGATTCTATA.T.....T.....CAT.CT.A.....GTTGA.AA.G.ATCAA	[366]	
<i>G. maximowicziana_139</i>T..TC..T.....ATTAGATTCTATA.T.....T.....CAT.CT.A.....GTTGA.AA.G.ATCAA	[366]	
<i>G. velutina_30</i>T..TC..T.....ATTAGATTCTATA.T.....T.....CAT.CT.A.....GTTTA.AA.G.ATCGA	[345]	
<i>G. velutina_76</i>T..TC..T.....ATTAGATTCTATA.T.....T.....CAT.CT.A.....GTTTA.AA.G.ATCGA	[345]	
<i>G. velutina_269</i>T..TC..T.....ATTAGATTCTATA.T.....T.....CAT.CT.A.....GTTTA.AA.G.ATCGA	[345]	

[410 420 430 440 450 460 470 480 490 500]

<i>G. procera_385</i>	-TTCAAATATTCAGTGATCAAATGAAATCCAGAGTTTTATAGATTTTTGAAGATGAATCCGACGAGAATAAAGAGAGAGTCCCAATTTTACATGTCA	[435]				
<i>G. repens_98</i>T.....G.....G.....G.....G.....	[432]
<i>G. repens_137</i>T.....G.....G.....G.....G.....	[432]
<i>G. rosulacea_4</i>G.....T.....G.....C.....G.....	[459]
<i>G. rosulacea_5</i>G.....T.....G.....C.....G.....	[459]
<i>G. rosulacea_6</i>G.....T.....G.....C.....G.....	[459]
<i>G. rosulacea_375</i>G.....T.....G.....C.....G.....	[459]
<i>G. rosulacea_376</i>G.....T.....G.....C.....G.....	[459]
<i>G. rosulacea_377</i>G.....T.....G.....C.....G.....	[459]
<i>G. schlechtendaliana_16</i>	A..G.....G.....G.....G.....G.....	[436]
<i>G. schlechtendaliana_81</i>	A..G.....G.....G.....G.....G.....	[436]
<i>G. schlechtendaliana_257</i>	A..G.....G.....G.....G.....G.....	[436]
<i>G. sp_79</i>	A..G.....G.....G.....G.....G.....	[456]
<i>G. sp_140</i>	A..G.....G.....G.....G.....G.....	[456]
<i>G. sp_241</i>	A..G.....G.....G.....G.....G.....	[456]
<i>G. macrantha_22</i>	A.....G.....G.A.A.....G.....G.....	[463]
<i>G. macrantha_33</i>	A.....G.....G.A.A.....G.....G.....	[463]
<i>G. macrantha_75</i>	A.....G.....G.A.A.....G.....G.....	[463]
<i>G. maximowicziana_47</i>	A.....G.....G.....G.....G.....	[466]
<i>G. maximowicziana_138</i>	A.....G.....G.....G.....G.....	[466]
<i>G. maximowicziana_139</i>	A.....G.....G.....G.....G.....	[466]
<i>G. velutina_30</i>	A.....G.....G.....T.....G.....	[445]
<i>G. velutina_76</i>	A.....G.....G.....T.....G.....	[445]
<i>G. velutina_269</i>	A.....G.....G.....T.....G.....	[445]

[510 520 530 540 550 560]

<i>G. procera_385</i>	ATACCGACAACAATGAAATTTAGAGTAAGAGGAAAATCCGTCCAAATTGAAAAATCGTGAGGGTT	[499]		
<i>G. repens_98</i>G.....	[496]		
<i>G. repens_137</i>G.....	[496]		
<i>G. rosulacea_4</i>C.....A.....C.....	[523]
<i>G. rosulacea_5</i>C.....A.....C.....	[523]
<i>G. rosulacea_6</i>C.....A.....C.....	[523]
<i>G. rosulacea_375</i>C.....A.....C.....	[523]
<i>G. rosulacea_376</i>C.....A.....C.....	[523]
<i>G. rosulacea_377</i>C.....A.....C.....	[523]
<i>G. schlechtendaliana_16</i>	[520]		
<i>G. schlechtendaliana_81</i>	[520]		
<i>G. schlechtendaliana_257</i>	[520]		
<i>G. sp_79</i>	[520]		
<i>G. sp_140</i>	[520]		

G_sp_241	[520]
G_macrantha_22A.....G.....	[527]
G_macrantha_33A.....G.....	[527]
G_macrantha_75A.....G.....	[527]
G_maximowicziana_47	[530]
G_maximowicziana_138	[530]
G_maximowicziana_139	[530]
G_velutina_30	[509]
G_velutina_76	[509]
G_velutina_269	[509]

Taxonomic status of *Goodyera rosulacea* (Orchidaceae): molecular evidence based on ITS and *trnL* sequences

Chang Shook Lee, Sang Mi Eom and Nam Sook Lee*

(Division of Molecular & Life Sciences, College of Natural Sciences,
Ewha Womans University, Seoul 120–750, Korea.)

Goodyera rosulacea, which is morphologically similar to *G. repens*, is described recently as a new species based on its distinct morphological characters such as rosette-formed leaves, short rhizome and habitat. To verify the taxonomic identity of *G. rosulacea* and its taxonomic relationships within Korean *Goodyera* taxa, sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA and the *trnL* region of cpDNA from 24 accessions including 1 outgroup accession were analyzed. Aligned sequences were analyzed using maximum parsimony and distance method, and the taxonomic identity and the taxonomic relationships among the related taxa were estimated by the existence of private marker gene and the phylogenetic tree of the aligned sequences. Molecular data indicate that *G. rosulacea* has several private marker genes and shows monophyly in phylogenetic trees of both ITS and *trnL* sequences. The pairwise distance between *G. rosulacea* and the other taxa of Korean *Goodyera* was 3.49–6.68% for ITS region and 5.05–9.53% for *trnL* region, indicating that *G. rosulacea* could be treated as an independent species. Therefore, our molecular data support the taxonomic treatment of *G. rosulacea* as a distinct species of Korea. In phylogenetic trees, *G. rosulacea* formed same clade with *G. repens*, which has similar morphological characters with *G. rosulacea*, and showed the lowest pairwise distance with *G. repens* among Korean *Goodyera* taxa. These molecular data suggested that *G. rosulacea* and *G. repens* are closely related taxa.

Key words: *Goodyera*, *G. rosulacea*, ITS, *trnL*

*Corresponding author: Phone +82-2-3277-2366, Fax +82-2-3277-2385, namsook@ewha.ac.kr