Korean J. Plant Res. 29(4):407-418(2016)
http://dx.doi.org/10.7732/kjpr.2016.29.4.407

Print ISSN 1226-3591
Online ISSN 2287-8203

Original Research Article

한국산 수국속(*Hydrangea* L.) 식물의 분자 계통학적 연구

김혜식, 박규태, 박선주*

영남대학교 이과대학 생명과학과

Molecular Phylogenetic Study of Korean *Hydrangea* L.

Hye Sik Kim, Kyu Tae Park and Seon Joo Park*

Department of Life Science, Yeungnam University, Gyeungsan 712-749, Korea

Abstract - In this study, the phylogenetic relationship of Korean *Hydrangea* was evaluated by using sequenced three chloroplast regions and ITS region, including the 7 taxa. The result of phylogenetic analysis indicated that Korean *Hydrangea*, 7 taxa formed the monophyletic group. This analysis also revealed that subsect. *Macrophyllae* of Korea was separated into two groups; *H. serrata* f. *acuminate* and *H. macrophylla* group. The *H. serrata* f. *acuminta* group was included with *H. serrata* f. *buergeri* and *H. serrata* f. *fertilis*. These three species form a monophyletic clade, with no significant differences between their nucleotide sequences. The *H. serrata* f. *acuminta* group showed a monophyletic group with *H. serrata* f. *buergeri* and *H. serrata* f. *fertilis* and there is significant differences between their nucleotide sequences. *H. macrophylla* group was an independent clade distinguished by *H. serrate* f. *acuminate* group. Subsect. *Petalanthe*, *Heteromallae* and *Calyptranthae* form a monophyletic group. *H. petiolaris* which is located in Subsect. *Calyptranthae* was separated into two subgroups; First subgroup: Jeju island (except for Mt. Halla) and Second subgroup: Ulleung island and Japan. Additional studies of two subgroups of *H. petiolaris* should be conducted a geographical study and add more samples.

Key words - *Calyptranthae, Macrophyllae*, Monophyletic, Phylogenetic analysis

서 언

수국속(*Hydrangea* L.)은 APG Ⅳ (2016) 분류체계에 의하면 국화군(Asterids), 층층나무목(Cornales), 수국과(Hydrangeaceae)에 속하는 식물로서 동아시아, 북아메리카 동부 지역을 중심으로 분포하며 전 세계에 23여종이 알려져 있다(McClintock, 1957). 한국산 수국속 연구는 Nakai (1909)에 의해 *H. hortensia* var. *acuminata* (산수국)가 한반도에 분포한다고 기록함으로서 시작되었다. 이후 Nakai (1914)는 산수국을 *H. acuminata*로 변경 하였고, 잎이 매우 두꺼운 특징을 지니는 종인 *H. coreana* (떡잎산수국)와 *H. petiolaris* (등수국)을 기재하였다. Nakai (1926)는 다시 산수국을 *H. serrata* var. *acuminata*로 변경 하였고, 산수국의 중성화인 꽃받침잎의 형질에 따라 *H. serrata* f. *fertilis* (탐라산수국)와 *H. buergeri* (꽃산수국)로 기재하였다. 또한, 등수국을 잎의 형질에 따라 구분지어 각각 *H. petiolaris* var. *ovalifolia* (넌출수국), *H. petiolaris* var. *cordifolia* (등수국)로 기재하였으며, 도합 1종 3변종 1품종으로 보고 하였다. Chung *et al.* (1949)은 1종 3변종 1품종으로 정리하였으며 Nakai (1952)는 덩굴성인 특징을 지니는 등수국을 *Hydrangea* 속이 아닌 *Calyptranthe*속으로 *C. petiolaris* var. *ovalifolia* (넌출수국), *C. petiolaris* var. *cordifolia* (등수국)로 변경하여, *Hydrangea*속 내 2변종 4품종을 정리하였다. 현재 *Calyptranthe* 속은 *Hydrangea*속의 하나의 아절로 인정받고 있다(Krussman, 1978). Lee (1980)의 경우 3종 6품종 도합 9분류군을 정리하였으며, Shin (1989)은 형태학적인 특징을 종합 검토하여 한국산 수국속을 2종 1변종 총 3분류군만이 국내에 분포하는 것으로 확인하였다. Lee (1996)는 1종 2변종 4품종으로 기록하였다. 이후, Moon *et al.* (2004)이 미기록종인 *H. leteovenosa* (성널수국)를 기재하였고 Park (2007)은 3종 5품종을 정리하였다. 국가 생물종 목록집(National List of Species of Korea Vascular Plant

*교신저자 : sjpark01@ynu.ac.kr
Tel. +82-53-810-3874

ⓒ 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회지에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

s」, 2011)에는 *H. arborescens* (미국수국), *H. luteovenosa* (성널수국), *H. macrophylla* f. *otaksa* (수국), *H. paniculata* (나무수국), *H. petiolaris* (등수국), *H. serrata* f. *acuminata* (산수국) 6분류군이 기재되었다(Table 1). 이처럼, 여러 학자에 따른 종 수와 변종, 품종의 차이는 수국속 식물이 분류학적으로 기재되기 전부터 원예종으로 개량되고 식재되면서 많은 잡종들이 만들어져 학명상의 혼란과 종동정상에 많은 어려움을 겪고 있기 때문이다(McClintock, 1957).

수국속의 분자계통학적 선행연구로는 Hufford *et al.* (2001)의 matK와 rbcL을 이용한 분석으로 수국과의 분류를 재검토하여 Jamesioideae와 Hydrangeoideae 2 개의 아과로 분류하고 수국족 이하 분류군으로 수국속을 정리하였으며, De Smet *et al.* (2015)는 ITS 와 plastid sequences를 활용하여 McClintock (1957)에 의해 분류된 아절을 절로 승격시켜 16 개의 절로 분류하였다. 한국산 수국속내 분류는 외부형태학적으로 산수국, 꽃산수국, 탐라산수국의 경우 꽃받침잎인 중성화의 형질로 구분하는데 분류군의 실체가 명확하지 않으며 다양한 변이를 가진다. 이 외에도 산수국은 분류학적 위치에 대한 이견이 있다. Wilson (1923)은 수국과 산수국을 가까운 유연관계를 가지는 독립된 분류군으로 분류하였지만, Makino (1929)는 산수국을 수국의 아종인 *H. marcrophylla* ssp. *serrta*로 기재하였다. 그러나, 최근에는 형태학적, 지리학적 분포의 차이로 *H. marcrophylla* ssp. *serrta*를 종(Species)으로써의 분류학적 위치를 지지해야 한다는 견해도 있다(Lawson-Hall and Rothera, 1995; Dirr, 2004; van Gelderen and van Gelderen, 2004). Zonneveld (2004)는 수국과 산수국의 염색체수는 동일하지만 DNA 함량이 다르다는 점을 확인 하였으며, 원예종이 많은 수국속 내에서는 하나의 분류학적인 형질이 될 수 있다고 주장하였다. 이에,

Table 1. Classification of Genus *Hydrangea*

Nakai (1909)	Nakai (1914)	Nakai (1926)	Chung *et al*. (1949)	Nakai (1952)
H. hortensia var. *acuminata* Smith. Franchet & Savatier	*H. acuminata* A. Gray	*H. serrata* (Thunb.) Seringe var. *acuminata* (Siebold & Zucc.) Nakai	*H. serrata* Seringe var. *accuminata* Nakai f. *fertilis* Nakai	*H. serrata* (Thunb.) Seringe var. *acuminata* (Siebold & Zucc.) Nakai
				H. serrata var. *acuminata* f. pubescens (Fanchet & Savatire) Nakai
				H. serrata var. *acuminata* f. *elongata* Nakai
			H. serrata Seringe var. *angustata* E. H. Wilson	
	H. coreana Nakai			*H. serrata* var. *coreana* Nakai
		H. serrata (Thunb.) Seringe f. *fertilis* Nakai		*H. serrata* f. *fertilis* Nakai
		H. buergeri (Siebold & Zucc.) Nakai		*H. serrata* f. *buergeri* (Siebold & Zucc.) Nakai
	H. petiolaris Siebold & Zucc.	*H. petiolaris* Siebold & Zucc. var. *ovalifolia* Franchet & Savatier	*H. petiolaris* Siebold & Zucc.	*C. petiolaris* (Siebold & Zucc.) Nakai var. *ovalifolia* (Franchet & Savatier) Nakai
		H. petiolaris var. *cordifolia* (Siebold & Zucc.) Franchet & Savatier	*H. petiolaris* Siebold & Zucc. var. *cordifolia* Franchet & Savatier	*C. petiolaris* var. *cordifolia* Nakai
			H. macrophlla DC. var. *Otaksa* Honda	

Lee (1980)	Shin (1989)	Lee(1996)	Park (2007)	Lee *et al.* (2011)
H. serrata f. *acuminata* (Siebold & Zucc.) E. H. Wilson	*H. serrata* (Thunb.) Seringe	*H. macrophylla* (Thunb.) Seringe var. *acuminata* (Siebold & Zucc.) Makino	*H. serrata* f. *acuminata* (Siebold & Zucc.) E. H. Wilson	*H. serrata* f. *acuminata* (Siebold & Zucc.) E. H. Wilson
H. serrata f. *coreana* T. Lee	*H. serrata* (Thunb.) Seringe var. *coreana* Nakai	*H. macrophylla* (Thunb.) Seringe f. *coreana* (Nakai) W. Lee	*H. serrata* f. *coreana* (Nakai) T .B. Lee	
H. serrata f. *fertilis* Nakai		*H. macrophylla* (Thunb.) Seringe f. *fertilis* (Nakai) W. Lee	*H. serrata* f. *fertilis* Nakai	
H. serrata f. *buergeri* Nakai		*H. macrophylla* (Thunb.) Seringe f. *buergeri* (Nakai) W. Lee	*H. serrata* f. *buergeri* (Siebold & Zucc.) Nakai	
		H. macrophylla (Thunb.) Seringe f. *elongata* (Nakai) W. Lee		
H. petiolaris Siebold & Zucc.	*H. petiolaris* Siebold & Zucc.	*H. petiolaris* Siebold & Zucc.	*H. petiolaris* Siebold & Zucc.	*H. petiolaris* Siebold & Zucc.
H. macrophylla f. *otaksa* (Siebold & Zucc.) E. H. Wilson		*H. macrophylla* (Thunb.) Seringe var. *macophylla*	*H. macrophylla* f. *otaksa* (Siebold & Zucc.) E. H. Wilson	*H. macrophylla* f. *otaksa* (Siebold & Zucc.) E. H. Wilson
H. arborescens L.			*H. arborescens* L	*H. arborescens* L
H. paniculata Siebold			*H. paniculata* Siebold	*H. paniculata* Siebold
H. paniculata f. *grandiflora* Ohwi				
				H. luteovenosa Koidz

Rinehart *et al.* (2006)가 SSR marker를 활용하여 *H. marcrophylla* ssp. *marcorophylla* 와 *H. marcrophylla* ssp. *serrata*의 분자 계통학적 연구를 Uemachi *et al.* (2014)는 RAPD marker와 Plastid sequence를 활용하여 연구를 수행한바 있으나, 분류학적 위치에 대한 이견은 여전히 남아있다.

따라서, 본 연구는 분자계통학적으로 nuclear ribosomal DNA와 chloroplast DNA의 염기서열에 근거하여 1) 산수국, 탐라산수국, 꽃산수국과 소백산에서 발견된 산수국의 연속적인 변이개체들 사이의 계통학적 유연관계를 규명하고자 하였고 2) 산수국과 수국의 분류학적 위치의 모호함을 해결하고자 하였다. 3) 더 나아가 한국산 수국속의 종간 계통분류학적 유연관계 및 종의 한계를 파악하고자 함에 그 목적이 있다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용된 재료는 2014년 6월부터 2015년 8월에 걸쳐 제주도의 한라산, 울릉도의 성인봉, 경상남도 지리산, 경상북도 팔공산, 충청북도 소백산, 일본의 삿포르 등의 자생지에서 채집하여 사용하였다. 채집된 재료는 석엽표본으로 제작하여 영남대학교 식물표본관(YNUH)에 확증표본으로 보관하였다. 그 외에도 국립수목원 산림생물표본관(KH), 홋카이도대학교(SPA)에 소장된 건조표본들을 연구재료로 이용하였으며, 기록된 출처를 근거로 연구를 수행 하였다. 본 연구에서 사용된 재료는 총 7 분류군으로 outgroup으로는 수국과의 선행 연구에서 유연관계가 가장 가깝다고 판단된 고광나무(*Philadelphus schrenkii*), 말발도리(*Deutzia parviflora*)를 선정하였다(Xiang *et al.*, 2011). 연구에 사용된 분류군 및 채집지 정보는 Table 2와 같다.

DNA 추출 및 Amplification

자생지에서 직접 채집한 생체의 경우 실험실로 운반하여 잎을 채취 한 후 −70℃ deep freezer에서 냉동 보관하였다. 냉동 보관된 재료를 액체질소를 이용하여 분쇄시킨 후 Dolye and Doyle (1987)의 CTAB 방법을 수정한 Saghai-Maroof *et al.*

Table 2. List of Hydrangea samples used in this study

Taxon / Abbreviation	voucher	Locality	GenBank accession NO.			
			ITS	*psb*A-*trn*H	*trn*L-F	*mat*K
H. paniculata HY01	YNUH	Daegok-dong, Dalseo-gu, Daegu	KX065320	KX074111	KX065326	KX074142
HY02	KH	Sohol-eup, Pocheon-si, Gyeonggi-do	KX065321	KX074113	KX065329	KX074146
HY03	YNUH	Namtong-dong, Gumi-si, Gyeongsangbuk-do	KX065322	KX074112	KX065327	KX074147
HYJ01	YNUH	Sapporo, Hokkaido	KX065324	KX074109	KX065331	KX074144
HYJ02	SPA	The Hokkaido University Museum	KX065325	KX074114	KX065328	KX074145
HYJ03	SPA	The Hokkaido University Museum	KX065323	KX074110	KX065330	KX074143
H. petiolaris type 1 HY04	YNUH	Seo-myeon, Ulleung-gun, Gyeongsangbuk-do	KX065289	KX074099	KX065332	KX074148
HY05	YNUH	Buk-myeon, Ulleung-gun, Gyeongsangbuk-do	KX065294	KX074108	KX065339	KX074152
HY06	YNUH	Aewol-eup, Jeju-si, Jeju-do	KX065295	KX074107	KX065333	KX074149
HY07	YNUH	Saekdal-dong, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065297	KX074101	KX065338	KX074150
HY08	YNUH	Mt. halla, Jocheon-eup, Jeju-do	KX065290	KX074102	KX065334	KX074153
H. petiolaris type 2 HY09	YNUH	Saekdal-dong, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065298	KX074103	KX065340	KX074157
HY10	YNUH	Saekdal-dong, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065296	KX074104	KX065341	KX074151
HYJ04	YNUH	Sapporo, Hokkaido	KX065291	KX074100	KX065335	KX074154
HYJ05	YNUH	Sapporo, Hokkaido	KX065292	KX074105	KX065336	KX074155
HYJ06	YNUH	Sapporo, Hokkaido	KX065293	KX074106	KX065337	KX074156
H. macrophylla HY11	YNUH	Cheonjeyeon-ro, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065316	KX074117	KX065356	KX074159
HY12	YNUH	Cheonjeyeon-ro, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065314	KX074130	KX065344	KX074169
HY13	YNUH	Sanghyo-dong, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065315	KX074118	KX065357	KX074173

Table 2. List of Hydrangea samples used in this study (Continued)

Taxon / Abbreviation		voucher	Locality	GenBank accession NO.			
				ITS	*psb*A-*trn*H	*trn*L-F	*mat*K
H. luteovenosa	HY14	KH	Namwon-eup, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065317	KX074133	KX065349	KX074176
	HY15	KH	Namwon-eup, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065319	KX074134	KX065350	KX074177
	HY16	KH	Namwon-eup, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065318	KX074135	KX065361	KX074178
H. serrata f. *acuminata* type1	HY17	KH	Sannae-myeon, Miryang-si, Gyeongsangnam-do	KX065313	KX074127	KX065362	KX074158
	HY18	KH	Hanbando-myeon, Yeongwol-gun, Gangwon-do	KX065303	KX074124	KX065352	KX074171
	HY19	YNUH	Saekdal-dong, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065306	KX074125	KX065345	KX074168
	HY20	YNUH	Mt. halla, 387, Arail-dong, Jeju-si, Jeju-do	KX065307	KX074126	KX065347	KX074167
H. serrata f. *acuminata* type2	HY21	KH	Daegang-myeon, Danyang-gun, Chungcheongbuk-do	KX065305	KX074131	KX065358	KX074161
	HY22	KH	Daegang-myeon, Danyang-gun, Chungcheongbuk-do	KX065299	KX074132	KX065359	KX074174
	HY23	KH	Daegang-myeon, Danyang-gun, Chungcheongbuk-do	KX065304	KX074128	KX065360	KX074160
H. serrata f. *buergeri*	HY24	YNUH	Mt. jiri, Sicheon-myeon, Sancheong-gun, Gyeongsangnam-do	KX065308	KX074119	KX065351	KX074175
	HY25	YNUH	Saekdal-dong, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065302	KX074122	KX065348	KX074165
	HY26	YNUH	Gwangnyeong-ri, Aewol-eup, Jeju-si, Jeju-do	KX065310	KX074129	KX065354	KX074166
	HY27	YNUH	Mt. sobaek, Gagok-myeon, Danyang-gun, Chungcheongbuk-do	KX065312	KX074115	KX065355	KX074163
H. serrata f. *fertilis*	HY28	YNUH	Sanghyo-dong, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065301	KX074116	KX065353	KX074170
	HY29	YNUH	Sanghyo-dong, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065311	KX074120	KX065342	KX074172
	HY30	YNUH	Daepo-dong, Seogwipo-si, Jeju-do	KX065300	KX074123	KX065346	KX074162
	HY31	YNUH	Mt. jiri, Sicheon-myeon, Sancheong-gun, Gyeongsangnam-do	KX065309	KX074121	KX065343	KX074164
Outgroup							
Philadelphus schrenkii	Og1	YNUH	Mt. palgong, Gasan-myeon, Chilgok-gun, Gyeongsangbuk-do	KX074136	KX074138	KX074140	KX074179
Deutzia parviflora	Og2	YNUH	Mt. palgong, Gasan-myeon, Chilgok-gun, Gyeongsangbuk-do	KX074137	KX074139	KX074141	KX074180

(1984)의 방법에 따라 추출하였다. 표본관에 소장된 석엽표본에서 절취한 재료 경우에는 Precellys®24 Homogeniser (Bertin Technologies, France)를 이용하여 분쇄시킨 후, Doyle and Doyle (1987)의 CTAB 방법을 수정한 Loockerman and Jansen (1996)의 방법으로 추출하였다. 추출된 DNA는 1.2% agarose gel 상에서 전기영동 후, EtBr 염색법으로 UV 조명 아래서 형광 밝기를 상대 비교하고 흡광도를 측정하여 농도를 확인하였다. ITS 지역의 증폭은 프라이머 ITS4, ITS5 (White *et al.*, 1990)를 이용하였으며, *psb*A-*trn*H IGS 지역의 증폭은 프라이머 psbAF-trnHR (Sang *et al.*, 1997), *trn*L-F 지역의 증폭은 프라이머 trn-c, trn-f (Taberlet *et al.*, 1991), *mat*K 지역의 증폭은 프라이머 matK472F, matK1248R (Yu *et al.*, 2011)을 이용하였다. ITS, *psb*A-*trn*H, *mat*K 지역의 PCR (Polymerase Chain reaction) 반응 용액의 조성은 주형 DNA 20~50 ng, 10X Diastar™Taq DNA buffer 2.5 μl, 10 mM의 dNTPs mix 0.5 μl, 10 pmol의 primer 각각 1 μl, 2.5 unit의 Diastar™ *Taq* DNA Polymerase 0.13 μl (SolGent Co., Korea)를 첨가 후 total volume이 총 25 μl가 되도록 멸균된 증류수를 조절하여 첨가하였다. *trn*L-F 지역의 경우 앞서말한 조성의 2배를 사용하여 전체부피가 총 50 μl가 되도록 하였다. 조제된 반응용액은 ITS 경우 94℃에서 5분

동안 최초 denaturation 이후, 95℃에서 40초 denaturation, 60℃에서 40초 annealing, 72℃에서 1분 extension으로 구성된 반응을 35회 반복한 후 최종적으로 72℃에서 10분간 extension 하였다. cpDNA의 경우 annealing 온도를 *psb*A-*trn*H 56℃, *trn*L-F 54℃, *mat*K45℃에서 40초, 72℃에서 1분 extension으로 구성된 반응을 35회 반복한 후 최종적으로 72℃에서 10분간 extension 하였다. PCR 반응용액은 Gel & PCR purification system kit (Solgent Co., Korea)로 정제한 후 염기서열 분석은 automatic DNA analyzer system ABI PRISM 3730xl analyzer (Solgent co., Korea)를 이용하였다.

염기서열 정렬 및 계통분석

계통학적 분석으로 얻어진 각 염기서열들은 Geneious pro ver. 6.1.8 (Drummond *et al.*, 2011)로 조합하였으며, Clustal W (Thompson *et al.*, 1994)로 정렬하였다. 최종 세부적인 정렬은 수작업을 통하여 정렬하였으며, 정렬 결과 발생한 gap은 결여형질(missing character)로 처리하여 모든 형질에 동일한 가중치를 부여하였다. 염기서열 간의 유전적 거리(Kimura's 2 parameter 방법; Kimura, 1980)계산과 parsimony analysis, maximum-likelihood는 MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013)를 이용하여 분석하였다. Parsimony analysis는 TBR branch-swapping algorithm을 적용하였으며 maximum-likelihood는 GTR (General Time Reversible) model을 적용하였다. Bayesian 분석은 MrBayes v.3.2.1 (Ronquist *et al.*, 2012)을 이용하여 실시하였다. 또한 각 분계도의 신뢰도를 알아보기 위하여 bootstrap value (Felsenstain, 1985)를 이용하였으며, Consistency Index (CI; kluge and Farris, 1969), Retention Index (RI; Farris, 1989)는 MEGA에서 수행하였다. nrDNA (ITS region)와 cpDNA (*psb*A-*trn*H, *trn*L-F, *mat*K region)의 ILD test는 PAUP ver. 4.0b (Swofford., 2003)을 사용하여 수행하였다.

결 과

염기서열분석

본 연구에서 다룬 outgroup 2 분류군을 포함한 총 39개체에 대한 ITS, *psb*A-*trn*H, *trn*L-F, *mat*K 지역의 염기서열을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 정렬된 유전자의 길이는 *trn*L-F가 961 bp로 가장 길었고, 다음으로는 *mat*K (766 bp), ITS (619 bp), *psb*A-*trn*H (369 bp) 순이었다. ITS의 경우 619 bp 중 429 bp는 염기서열 변화가 없었고 나머지 190 bp는 변화가 있었으며, 4개의 유전자 지역 중 가장 많은 염기(121 bp)가 계통수를 그리는데 유용하게 사용되었다. 분류군간의 염기변이를 Kimura's two parameter distance로 계산하여 백분율로 환산한 결과 외군을 포함한 자료에서는 ITS 지역의 등수국-말발도리가 22.4%로 가장 높았으며 *psb*A-*trn*H 지역에서는 수국-말발도리가 18.1%, *trn*L-F, *mat*K 지역에서는 산수국-말발도리가 각각 6.8%, 5.9%로 가장 높은 염기변이를 보였다. 4개의 지역을 합하여 염기변이를 산출한 결과는 outgroup을 포함해서는 0-10%로 나타났고, outgroup을 제외한 속 내에서의 변이는 0-4.1%로 비교적 낮게 나타났다(Table 3). DNA의 구조 및 물리적 특성을 결정하는 G+C 함량의 빈도는 4개의 유전자 지역을 합하여 산출한 결과 등수국이 38%로 가장 높았으며, 수국과 성널수국이 37.1%로 가장 낮게 나타났다. Combined된 전체적인 염기서열의 길이 변이는 크게 나타나지 않았으며 등수국이 2,614 bp로 가장 길게

Table 3. Statistics from phylogenetic analyses of the various datasets

	Analyses in the *Hydrangea* L.				
	ITS	*psb*A-*trn*H	*trn*L-F	*mat*K	combined
Length variation (Min.-Mix.)	590-598	337-.344	904-918	766-766	2,603-2,621
No. of Variable sites	190	77	98	64	429
No. of Informative sites	121	31	47	28	227
Length of trees	286	92	112	68	559
Consistency index (C.I)	0.83	0.95	0.95	1	0.90
Retention index (R.I)	0.94	0.98	0.98	1	0.96
Sequence distance (%)					
Hydrangea+outgroup	0-22.4	0-18.1	0-6.8	0-5.9	0-10.0
Within *Hydrangea*	0-9.3	0-5.3	0-3.8	0-1.7	0-4.1

나타났으며 성널수국과 수국이 2,608 bp로 가장 짧게 나타났다. nrDNA (ITS region)와 cpDNA (*mat*K, *trn*L-F, *psb*A-*trn*H region)의 적합성을 알아보기 위한 ILD test의 P value 값은 0.93으로 나타났다.

분자계통학적 연구

염기서열 4개의 지역에 대한 분류군간 combined maximum-likelihood tree를 얻었으며, bootstrap value의 경우 값이 50% 이상인 분계조(clade)에 한하여 계통수에 표시하였다. ML 분석 결과 외군을 제외한 5개의 분계조를 이루었다(Fig. 1). *Macrophyllae* 아절은 2개의 분계조를 이루고 있었으며, 산수국(HY17-23), 꽃산수국(HY24-27), 탐라산수국(HY28-31)이 하나의 분계조를 형성하여 85% BS로 지지되었다. 연속적인 변이를 지니는 개체 또한 같은 분계조로 유집되는 양상을 보였다. 수국(11-13)은 98% BS로 독립적인 분계조를 이루고 있었으며, 산수국과 가까운 유연관계를 나타내었다. *Petalanthe* 아절에 속하는 성널수

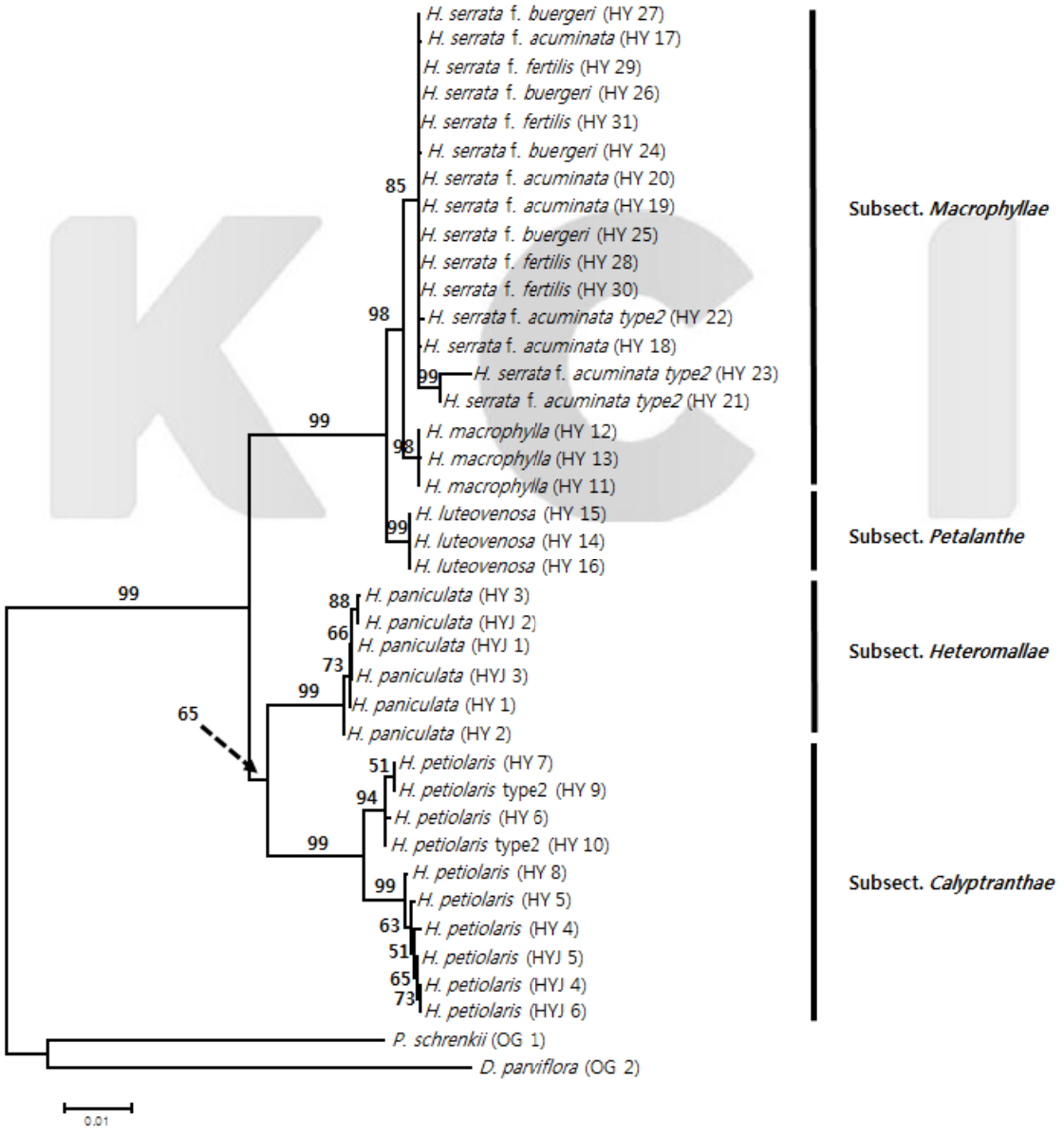

Fig. 1. Phylogenetic relationships of *Hydrangea* based on the combined (ITS, *psb*A-*trn*H, *trn*L-F and *mat*K regions) ML tree molecular dataset. Numbers in the nodes ara the bootstrap values from 1000 replicates.

국(HY14-16)은 99%의 BS로 높은 지지를 받으며 하나의 분계조를 형성하였으며 수국, 산수국과 가까운 유연관계를 보였다. *Heteromallae* 아절에 속하는 나무수국(HY1-3, HYJ1-3)은 식재되는 분류군으로써 일본개체들과 하나의 분류군으로 유집되어 독립적인 분계조를 형성하는 것을 확인할 수 있었다. *Calyptranthae* 아절에 속하는 등수국(HY4-10, HYJ4-6)은 하나의 독립적인 분계조를 형성하였으나 2개의 소분계조를 이루었다. 소분계조는 제주도 한라산 집단의 한 개체(HY08)를 제외한 제주도 집단과 일본, 울릉도 집단으로 나뉘는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). MP 분석결과 CI, RI 값은 각각 0.90, 0.96으로 나타났으며, Bayesian 분석과 함께 ML 분석과 유사한 패턴을 보였다(Fig. 2, 3). 계통수 제작에 가장 유용하다고 판단된 ITS 지역을 NCBI 자료와 함께 ML 분석을 시행한 결과 *Macrophyllae*, *Petalanthe*, *Americanae*, *Heteromallae*, *Asperae*, *Calyptranthae* 아절이 독립적인 분계조를 형성하였으며, 단계통군을 이루는 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 한국산 수국속 식물들은 combined data 분석과 유사한 패턴을 보였다(Fig. 4).

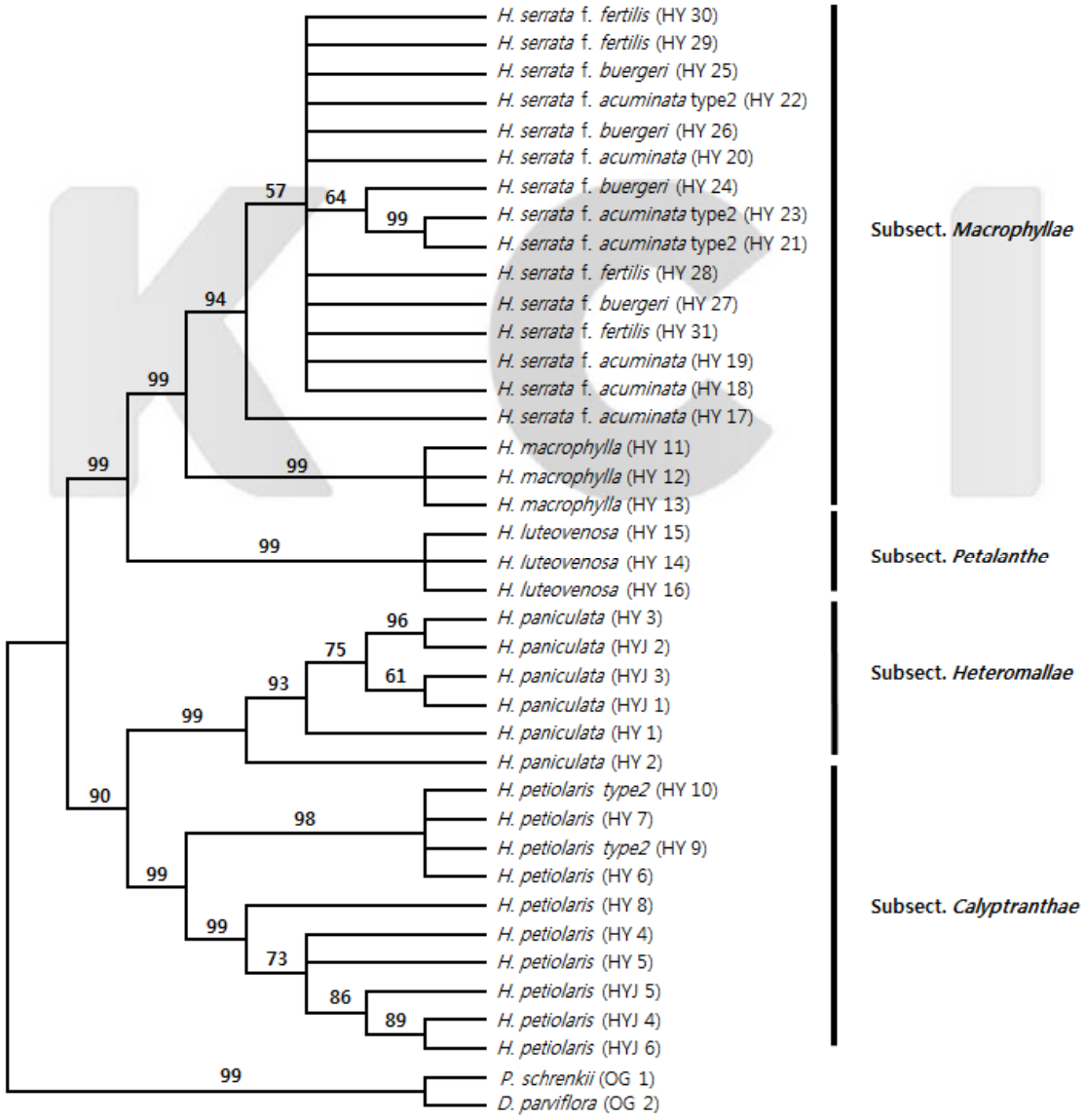

Fig. 2. Phylogenetic relationships of *Hydrangea* based on the combined (ITS, *psb*A-*trn*H, *trn*L-F and *mat*K regions) one of the most parsimonious tree molecular dataset. Numbers in the nodes ara the bootstrap values from 1000 replicates.

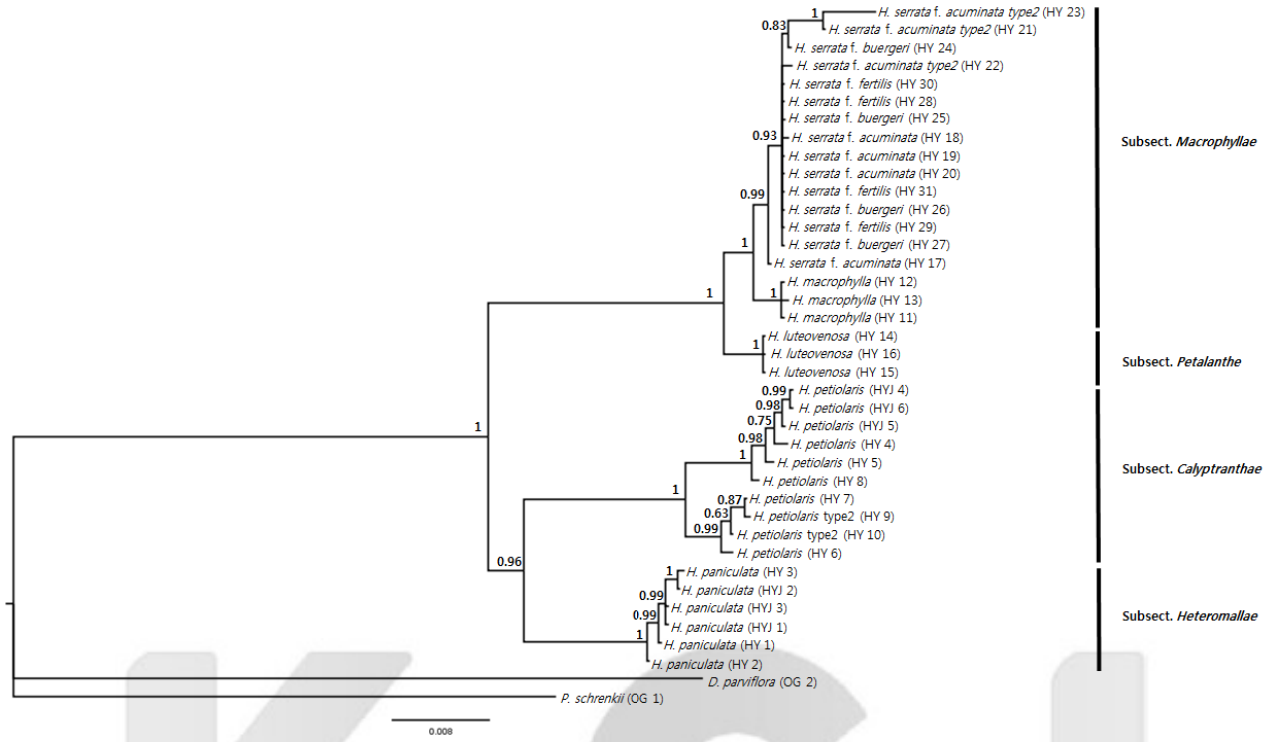

Fig. 3. Consensus Bayesian tree derived from the combined data set. Numbers in the nodes are posterior probabilities.

고 찰

본 논문에서는 한국산 수국속에 속하는 7 분류군과 일본의 2 분류군에 대해서 nrDNA ITS지역과 cpDNA의 non-coding region *psb*A-*trn*H, *trn*L-F와 coding region *mat*K의 염기서열을 이용한 분자계통학적 연구를 수행하여 종의 한계설정 및 유연관계를 확인하고자 하였다.

먼저 *Macrophyllae* 아절에 속하는 산수국은 중성화 형태에 따라 거치를 지니는 개체를 꽃산수국, 암술과 수술이 나타나는 종을 탐라산수국으로 구별하였으나 3 분류군 사이에서 연속적인 변이가 발견되어, 본 실험에서는 이 두 가지 형질을 모두 지니는 소백산의 개체를 포함하여 진행하였다. combined ML data의 분자적 분석결과, 3 분류군 모두가 85% bootstrap value로 하나의 분계조를 이루고 있었다. combined MP tree의 분자적 분석결과, 한 개체의 산수국을 제외하고는 57% BS로 하나의 분계조로 유집되는 양상을 보였다. Bayesian 분석 또한 하나의 분계조를 이루었으며, 이는 산수국과 탐라산수국, 꽃산수국 3 분류군이 매우 가까운 유연관계를 이루고 있음을 시사하고 있다. 지금까지는 이 3 분류군을 품종으로 각각 분리하고 있지만 꽃받침잎의 형태로는 종의 실체를 명확히 구분하기 힘들며, 분자적 결과 역시 염기서열상으로도 큰 차이가 나타나지 않아 생육환경의 차이로 일어나는 변이일 가능성이 크다. 따라서, 분자계통학적인 결과로 보았을 때 이들은 하나의 분류군으로 보는 것이 타당하다고 판단된다.

또한, 산수국은 분류학적으로 수국의 아종으로 보는 견해(Makino, 1929; Hara, 1955; McClintock, 1957)와 두 분류군을 가까운 유연관계를 가지는 독립된 분류군으로 보는 견해(Wilson, 1923; Nakai, 1926; Krussman, 1978)로 분류학적 위치의 모호함을 가지고 있다. 본 실험 결과, combined ML tree에서는 *Macrophyllae* 아절에 속하는 수국과 산수국이 98%와 85%, ITS ML tree에서는 99%와 88%의 bootstrap value로 각각 하나의 독립된 분계조를 형성하였으며, Bayesian 분석에서도 수국과 산수국이 독립적인 분계조를 형성하여 Wilson (1923), Nakai (1926), Krussman (1978)의 견해를 지지하였다. 수국의 경우 잎이 거의 무모이며 비후화 되어있고, 엽두의 형태가 뭉툭하거나 예두의 형태를 지니지만, 산수국의 경우 잎이 막질로 되어 있으며, 잎 가장자리와 상하면의 맥을 중심으로 털이 밀생하는 특징을 지닌다. 엽두의 형태도 수국과 달리 점첨두의 형태를 지닌다. 이와 같은 외부형태학적 형질과 Zonneveld (2004)가 주장한 수국과 산수국의 DNA 함량의 차이, 본 논문의 분자적 분

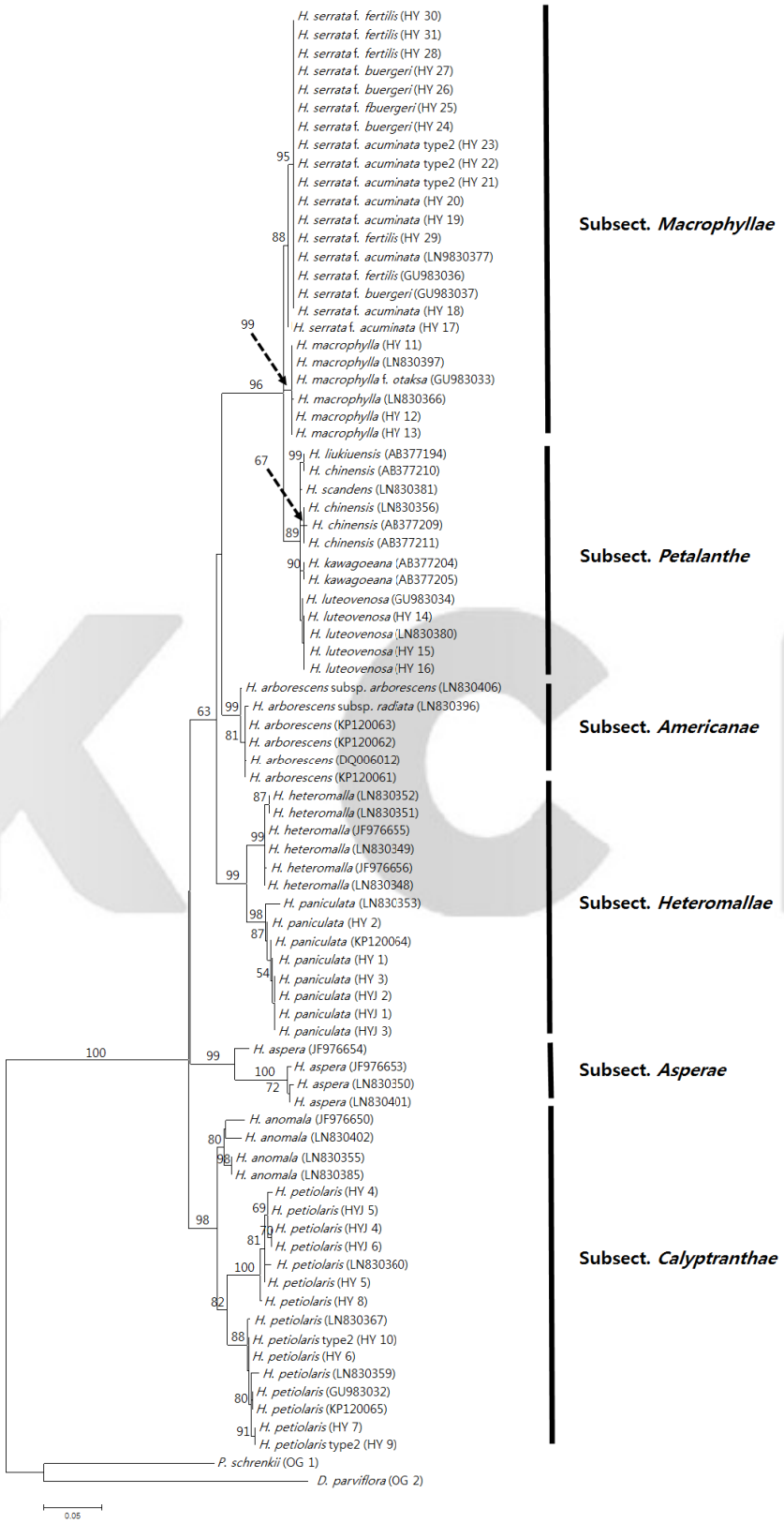

Fig. 4. Phylogenetic relationships of *Hydrangea* based on the ITS ML tree molecular dataset. Numbers in the nodes ara the bootstrap values from 1000 replicates.

석결과를 통해 두 분류군은 각각 독립된 분류군으로 처리하는 것이 타당하다고 판단된다.

Petalanthe 아절에 속하는 성널수국과 *Heteromallae* 아절에 속하는 나무수국의 경우 독립된 종으로 분류한 Lee (1980)와 Moon *et al.* (2004)의 견해와 같이 본 연구결과, 각각 하나의 독립된 분계조를 이루고 있었다. 성널수국은 엽신의 길이와 폭, 엽병의 길이, 양성화의 꽃잎 등이 수국속 내 다른 분류군과 뚜렷하게 구별되는 특징을 지닌다. 또한, 나무수국의 경우 다른 수국속 식물들과 달리 원추화서를 지니며 엽서의 형태는 2~3개씩 윤생하는 특징을 지니고 있어 독립된 분류군으로써의 분류계급을 지지하는 결과를 보였다.

Calyptranthae 아절에 속하는 등수국은 다른 수국속 식물들과 다르게 덩굴성인 특징과 울릉도, 제주도 등의 섬 지역에서만 자생하는 특징을 지니고 있다(Lee, 1980; Cho *et al.*, 2014). 본 실험에서는 중성화에 거치를 지니는 개체와 그렇지 않은 개체들을 구분짓고 type을 선정하여 실험을 수행하였다. 일본개체의 경우 모두 중성화에 거치를 지니고 있었다. Combined data의 분자적 결과 등수국은 독립된 분계조를 형성하였지만 중성화 거치의 유무와는 관계없이 두 개의 소분계조를 이루었다. 지역적으로는 제주도의 한라산 개체를 제외한 제주도 집단과 울릉도, 일본 집단으로 나뉘는 것을 확인하였다. 등수국은 엽저의 형태에 따라 심장저인 개체와 원저인 개체를 구분하기도 하였지만 현재는 하나의 분류군으로 처리하고 있으며(Chun, 1954; Krussman, 1978; Ohwi, 1978; Shin, 1989) 본 실험의 개체들 또한 한 개체 내에서 심장저와 원저인 형태를 모두 지니는 개체들을 확인할 수 있었다. 또한 오동정을 확인하기 위하여 분류학적 위치로 같은 아절에 속하는 *H. anomala*와 등수국을 비교하였지만 수술 수와 잎의 거치 등에 차이를 보였으며, ITS ML tree에서 각각 80%와 82%의 bootstrap value로 독립적인 분계조를 이루는 것을 확인 하였다. 따라서, 이러한 등수국의 소분계조에 대한 추가적인 연구는 지리학적 연구와 함께 다양한 개체수와 분자마커를 포함한 집단분석이 필요할 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 ITS region과 3개의 엽록체 DNA region을 활용하여 한국산 수국속 7 분류군에 대한 계통학적 유연관계를 규명하고자 수행되었다. 계통학적 분석 결과 한국산 수국속의 7분류군은 단계통군을 형성하였으며, *Macrophyllae* 아절은 산수국과 수국의 두 개의 분계조로 나뉘었다. 산수국의 분계조는 꽃산수국과 탐라산수국이 유집되어 하나의 단계통군을 형성하였으며, 염기서열상으로도 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다. 수국의 분계조는 산수국의 분계조와 독립된 분계조를 형성하며 뚜렷이 구분되었다. 수국속 분계조 내의 *Petalanthe*, *Heteromallae*, *Calyptranthae* 아절은 단계통군을 형성하였지만, *Calyptranthae* 아절에 속하는 등수국은 한라산 개체를 제외한 제주도 집단과 울릉도, 일본 집단으로 두 개의 소분계조를 이루었다. 등수국의 두 개의 소분계조에 대한 추가적인 연구는 더 많은 양의 채집과 지리학적인 연구가 추가 되어야 할 것으로 판단된다.

References

APG (The Angiosperm Phylogeny Group). 2016. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Bot. J. Linn. Soc. 181(1):1-20.

Cho, J. S., J.H. Jeong, S.Y. Kim, J.Y. Lee and C.H. Lee. 2014. Several factors affecting seed germination of *Hydrangea petiolaris* Siebold & Zucc. Korean J. Plant Res. 27(5): 534-539 (in Korean).

Chun, W.Y. 1954. A census and preliminary study of the Chinese Hydrangeoideae. Acta Phytotaxon. Sin. 3:101-206 (in Chinese).

Chung, T.H., B.S. DO and H.J. Sim 1949. Nomina Plantarum Koreanum Ⅱ. Chosen Biology Society pp. 39-40 (in Korean with Japanese).

De Smet, Y., C. Granados Mendoza, S. Wanke, P. Goetghebeur and M.S. Samain. 2015. Molecular phylogenetics and new (infra) generic classification to alleviate polyphyly in tribe Hydrangeeae (Hydrangeaceae, Cornales). Taxon 64(4):741-753.

Dirr, M.A. 2004. Hydrangeas for American Gardens (Vol. 4). Timber Press, Portland, OR (USA).

Doyle, J.J. and J.A. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15.

Drummond, A.J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, C. Duran, M. Field, J. Heled, M. kearse, S. Markowitz, R. Moir, S. Stones-Havas, S. Sturrock, T. Thierer and A. Wilson. 2011. Geneious v6.1. from http://www.geneious.com.

Farris, J.S. 1989. The retention index and homoplasy excess. Syst. Biol. 38(4):406-407.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.

Hara, H. 1955. Critical notes on some type specimens of East-Asiatic plants in foreign herbaria (5). J. Jpn. Bot. 30:271-278.

Hufford, L., M.L. Moody and D.E. Soltis. 2001. A phylogenetic analysis of Hydrangeaceae based on sequences of the plastid gene *matK* and their combination with *rbcL* and morphological data. Int. J. Plant Sci. 162(4):835-846.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16(2):111-120.

Kluge, A.G. and J.S. Farris. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. Syst. Biol. 18(1):1-32.

Krussmann, G. 1978. Manual of Cultivated Broad-leaved Trees and Shrubs. (translated by Michael E. Epp, 1986. Timber Press, Portland, OR (USA). Vol. Ⅰ. p. 448, Vol. Ⅱ. p. 445, Vol. Ⅲ. p. 510.

Lawson-Hall, T. and B. Rothera. 1995. Hydrangeas, A gardeners Guide. Timber Press, Portland, OR (USA).

Lee, B.Y., G.H. Nam, J.Y. Lee, C.H. Park, C.E. Lim, M.H. Kim, S.J. Lee, T.K. Roh, J.A. Lim, J.E. Han and J.H. Kim. 2011. National List of Species of Korea (Vascular Plants) National Institute of Biological Resources Incheon, Korea. p. 190 (in Korean).

Lee, T.B. 1980. Illustration flora of Korea. Hyangmunsa Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 419-420 (in Korean).

Lee, W.T. 1996. Lineamenta Florae Koreae. Academy Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 446-448 (in Korean).

Lookerman, D.J. and R.K. Jansen. 1996. The use of herbarium material for DNA studies: *In* Stussey, T. J. and S. Sohmer (eds.), Sampling the Green World, Columbia Univ. Press, New York, USA. pp. 205-220.

Makino, T. 1929. A contribution to the knowledge of flora of Japan. J. Jpn. Bot. 6:9-13 (in Japanese).

McClintock, E. 1957. A monograph of the genus Hydrangea. Proc. Calif. Acad. Sci. 29:147-256.

Moon, M.O., Y.J. Kang. C.H. Kim and C.S. Kim. 2004. An unrecorded species in Korea flora: *Hydrangea luteovenosa* Koidz. (Hydrangeaceae). Korea J. Pl. Taxon 34:1-7 (in Korean).

NaKai, T. 1909. Flora Koreana Ⅰ. Journal of the College of Science, Imperial Univ. Press, Tokyo, Japan. pp. 223-224.

_____. 1914. Chosen Shokubutsu. Seibi-do, Tokyo, Japan. pp. 339-341 (in Japanese).

_____. 1926. Flora Sylvatica koreana. Vol. 15. Government General of Chosen, Seoul, Korea. pp. 68-74 (in Japanese).

_____. 1952. A synoptical sketch of Korean flora. Bulletin of National Science Museum. Tokyo, Japan. 31:1-152 (in Japanese).

Ohwi, J. 1978. Flora of Japan. Sinbundo, Tokyo, Japan. p. 1584 (in Japanese).

Park, C.W. 2007. The Genera of Vascular Plants of Korea. Flora of Korea Editorial Committee. (eds.), Academic Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 507-508 (in Korean).

Rinehart, T.A., B.E. Scheffler and S.M. Reed. 2006. Genetic diversity estimates for the genus Hydrangea and development of a molecular key based on SSR. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 131(6):787-797.

Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M.A. Suchard and J.P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61(3):539-542.

Sang, T., D.J. Crawford and T.F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of Paeonia (Paeoniaceae). Am. J. Bot. 84(8):1120-1120.

Saghai-Maroof, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen and R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. 81(24): 8014-8018.

Shin, H. 1989. A Monograph of the Family Hydrangeaceae in Korea. Ph.D. Thesis, Seoul National Univ. Press, Seoul, Korea. pp. 101-113 (in Korean).

Swofford, D.L. 2003. PAUP* : Phylogenetic Analysis Using Parsimony(*and other methods), ver. 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.

Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. 17(5):1105-1109.

Tamura, K., G. Steche, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol., mst197.

Uemachi, T., Y. Mizuhara, K. Deguchi, Y. Shinjo, E. Kajino and H. Ohba. 2014. Phylogenetic relationship of *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. and H. serrata (Thunb.) Ser. evaluated using RAPD markers and plastid DNA sequences. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 83(2):163-171.

van Geldern, C. J. and D. M. van Gelderen. 2004. Encyclopedia of Hydrangeas. Timber Press, Portland, OR (USA).

Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence

alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22(22):4673-4680.

White, T.J., T. Bruns, S.J.W.T. 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(1):315-322.

Wilson, E.H. 1923. The hortensias. *Hydrangea macrophylla* DC. and *Hydrangea serrata* DC. J. Arnold Arboretum 4:233-246.

Xiang, Q.Y.J., D.T. Thomas and Q.P. Xiang. 2011. Resolving and dating the phylogeny of Cornales–effects of taxon sampling, data partitions, and fossil calibrations. Mol. Phylogenet. Evol. 59(1):123-138.

Yu, J., J.H. XUE and S.L. ZHOU. 2011. New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. J. Syst. Evol. 49(3):176-181.

Zonneveld, B.J.M. 2004. Genome Size in Hydrangea. Encyclopedia of Hydrangeas. Timber Press, Portland, OR (USA). pp. 245-252.

(Received 18 April 2016 ; Revised 17 June 2016 ; Accepted 7 July 2016)

Appendix 1. List of NCBI data

	Taxon	GenBank accesion NO.		Taxon	GenBank accesion NO.
1	*H. serrata* f. *acuminata*	LN830377	13	*H. heteromalla*	LN830348
2	*H. serrata* f. *buergeri*	GU983037			LN830349
3	*H. serrata* f. *fertilis*	GU983036			LN830351
4	*H. macrophylla*	LN830397			LN830352
		LN830366			JF976655
5	*H. macrophylla* f. *otaksa*	GU983033			JF976656
6	*H. liukiuensis*	AB377194	14	*H. paniculata*	LN830353
7	*H. chinensis*	LN830356			KP120064
		AB377209	15	*H. aspera*	JF976653
		AB377210			JF976654
		AB377211			LN830350
8	*H. scandens*	LN830381			LN830401
9	*H. kawagoeana*	AB377204	16	*H. anomala*	LN830355
		AB377205			LN830385
10	*H. luteovenosa*	GU983034			LN830402
		LN830380			JF976650
11	*H. arborescens*	KP120061	17	*H. petiolaris*	LN830359
		KP120062			LN830360
		KP120063			LN830367
		DQ006012			GU983032
12	*H. arborescens* subsp. *arborescens*	LN830396			KP120065
		LN830406			