Molecular phylogeny and divergence of photosynthetic pathways of Korean Cyperaceae (Cyperaceae)

Jongduk Jung*, Youngil Ryu and Hong-Keun Choi¹

Northeastern Asia Biodiversity Institute, Seoul 05677, Korea

¹Department of Biological Science, College of Natural Sciences, Ajou University, Suwon 16499, Korea

(Received 19 September 2016; Revised 29 September 2016; Accepted 29 September 2016)

한국산 방동사니족(사초과) 식물의 분자계통과 광합성경로의 분화

정종덕* · 류영일 · 최흥근¹

동북아생물다양성연구소, ¹아주대학교 자연과학대학 생명과학과

ABSTRACT: Multiple changes of the photosynthesis pathway are independent evolutionary events occurring in the phylogeny of flowering plants, and such changes have occurred more than five times in Cyperaceae. In the tribe Cyperaceae, the C4 photosynthetic pathway appeared only once and is regarded as a synapomorphy of the C4 plants within this tribe. The morphological delimitation of genera within Cyperaceae does not correspond to their molecular phylogenetic relationships. In this study, the molecular phylogeny was compared with the photosynthetic pathways of Korean Cyperaceae (18 species of *Cyperus*, 1 species of *Kyllinga*, and 1 species of *Lipocarpha*). The photosynthetic pathways were determined by observing the leaf anatomy. The phylogenetic analysis was performed using three DNA regions (nrITS, *rbcL*, and *trnL-F*). According to the position of the photosynthetic tissue, 4 species (*C. difformis*, *C. flaccidus*, *C. haspan*, and *C. tenuispica*) and 16 species (14 *Cyperus* species, *K. brevifolia* var. *leirolepis*, and *L. microcephala*) were confirmed as C3 and C4 plants, respectively. Tribe Cyperaceae was divided into the CYPERUS and FICINIA clades, and all species of Korean Cyperaceae plants belonged to the CYPERUS clade in the phylogenetic analysis. Within the CYPERUS clade, C4 plants were monophyletic but their phylogenetic relationships were unclear. The genera *Kyllinga* and *Lipocarpha* were not supported as an independent genus in either case because they were nested by the *Cyperus* species in the molecular phylogenetic trees in the present and in previous studies. To determine the classification within the CYPERUS clade, a detailed morphological study and a molecular phylogenetic analysis at a high resolution will be necessary.

Keywords: *Cyperus*, *Kyllinga*, *Lipocarpha*, photosynthesis pathway, C4 plant, Kranz anatomy

적 요: 광합성 경로의 전환은 현화식물의 계통에서 여러 번에 걸쳐서 독립적으로 일어난 진화적 사건으로서 사초과에서는 다섯 번 이상 발생한 것으로 추정되고 있다. 방동사니족에서 나타난 C4 광합성 경로로의 전환은 한 번 발생하였으며 이는 방동사니족 내 C4 식물의 공유파생형질로 여겨진다. 방동사니족에 포함된 속들의 형태학적 한계는 분자계통학적 유연관계와 일치하지 않으며, 특히 다계통군으로 여겨지는 방동사니속의 한계는 계통분류학적으로도 논란이 되고 있다. 본 연구에서는 한국산 방동사니족 식물의 광합성 경로와 분자계통을 비교하고자 하였다. 해부학적 관찰을 통해 우리나라 방동사니족 식물 20종(방동사니속 18종, 파대가리속 1종, 세대가리속 1종)의 광합성 경로를 확인하였다. 또한 nrITS, *rbcL*, *trnL-F*의 염기서열에 근거하여 각 분류군의 분자계통학적 위치를 파악하고자 하였으며, 분류군 전체의 계통을 파

*Author for correspondence: jungjongduk@gmail.com

악하기 위하여 선행연구 결과와 함께 분석하였다. 엽록체가 밀집된 광합성 조직의 위치에 따라 우리나라 방동사니속 식물 중 병아리방동사니와 우산방동사니, 모기방동사니, 알방동사니의 네 종은 C3 식물로 확인되었고, 나머지 14종의 방동사니속 식물, 파대가리, 그리고 세대가리는 C4 식물로 결정되었다. 또한 분자계통학적 분석에서 방동사니속은 CYPERUS 분계군과 FICINIA 분계군으로 구분되었으며, 우리나라 방동사니속 식물은 모두 CYPERUS 분계군에 속하였다. CYPERUS 분계군내에서 C4 식물들은 단계통군을 형성하였지만 각 분류군 간의 유연관계는 명확하게 나타나지 않았다. 분자계통수에서 세대가리속과 파대가리속은 C4 식물인 방동사니속 식물들과 함께 단일 분계군을 형성함으로써 각각 독립된 속으로서 지지되지 않는다. 이는 기존의 연구결과와 일치하며, CYPERUS 분계군에 속한 속들의 계통분류체계를 명확하게 하기 위해서는 면밀한 형태학적 연구와 더불어 높은 해상력을 갖춘 분자계통학적 연구가 이루어져야 할 것이다.

주요어: 방동사니속, 파대가리속, 세대가리속, 광합성 경로, C4 식물, 크란츠 구조

사초과(Cyperaceae Juss.) 식물은 극지를 제외한 전세계에 5,400여 종이 분포하는 것으로 알려져 있으며, 이 중 온대와 열대에 분포하는 1,000여 종이 방동사니속(Cyperaceae)에 속한다(Goetghebeur, 1998; Govaerts et al., 2007). 린네는 방동사니속(*Cyperus* L.) 식물의 소수에 인편이 두 줄로 배열하는 점을 들어서 인편이 나선형으로 돌려 나는 고랭이속(*Scirpus* L.)과 구분하였다(Linnaeus, 1753, 1754). 그러나 속의 구분에 사용된 인편의 배열형태는 현대적인 사초과 분류체계에서 방동사니속(Cyperaceae)과 고랭이속(Scirpeae)의 보편적인 특징으로 여겨지고 있으며, 예외적인 경우가 많다(Bruhl, 1995; Goetghebeur, 1998). 최근 분자계통학적 연구에 의해서 밝혀진 사초과 식물에 대한 구분에 따르면, 방동사니속은 네 개의 속으로 구성된 FAEC 분계군(검정방동사니속[Fuireneae]+Abildgaardieae+바늘골족[Eleocharideae]+방동사니속)에 속하며, 방동사니속은 두 개의 분계군(CYPERUS 분계군과 FICINIA 분계군)으로 뚜렷이 나뉜다(Muasaya et al., 2009a; Jung and Choi, 2013). 방동사니속은 전세계적으로 20개 속을 포함하며, 그 중 8개 속(약 150 종)은 FICINIA 분계군에 속하고 나머지 12개 속(약 850종)은 CYPERUS 분계군에 포함된다(Muasaya et al., 2009a; Jung and Choi, 2013).

CYPERUS 분계군에 속하는 우리나라 식물은 3개 속(방동사니속, 파대가리속[Kyllinga Rottb.], 세대가리속[Lipocarpa R. Br.])이다. 파대가리속과 세대가리속의 식물은 하나의 소수에 들어있는 꽃의 수가 1-수 개로 매우 적어서 꽃의 수가 많은 방동사니속과 형태적으로 구분된다(Goetghebeur, 1998). 세대가리속 식물은 소수의 포가 꽃을 끼고 있는 인편보다 훨씬 크고, 반대로 파대가리속은 인편의 크기가 큰 것이 특징이다(Ohwi, 1944; Goetghebeur, 1998). 방동사니속에 대한 형태학적 속의 한계는 학자들의 견해에 따라 다양하다. 즉, 방동사니속 식물은 소수에 꽃을 끼고 있는 인편이 두 줄로 배열하고, 화피편(또는 화피강모)이 없는 특징을 가지고 있는 것에 근거하여 속의 한계가 넓게 적용된 바(*Cyperus* s.l.)가 있다(Ohwi, 1944; Tucker et al., 2002). 이와 달리 주두열편의 수와 열매(수과)

의 방향성에 따라 *Pycreus* P. Beauv.속과 좁은 의미의 방동사니속(*Cyperus* s. str.)으로 나누어 보는 견해도 있다(Goetghebeur, 1998; Muasaya et al., 2001). 이보다 더 세분된 속(*Cyperus* s. str., *Pycreus*, *Juncellus* C. B. Clarke, *Mariscus* Vahl, *Torulinium* C. B. Clarke 등)으로 다룬 경우도 있지만(Clarke, 1908), *Pycreus*속만을 독립적인 속으로 취급하고 나머지는 방동사니속으로 통합하거나(Goetghebeur, 1998), 모두 광의의 방동사니속(*Cyperus* s.l.)의 아속이나 절로서 다루는 것이 보편적이다(Ohwi, 1944; Tucker et al., 2002). 방동사니속에 속하는 속의 형태학적 특징은 비교적 뚜렷한 것으로 여겨져 왔으나 분자계통학적 유연관계와 부합하지 않아 혼란이 있다(Goetghebeur, 1998; Muasaya et al., 2001, 2009b; Jung and Choi, 2013). 최근에는 분자계통학적 해석에 근거하여 방동사니속과 근연속 대부분의 종들을 하나의 속으로 다루고자 하는 의견도 제시되고 있다(Larridon et al., 2013; Bauters et al., 2014).

C4 광합성 경로는 수렴진화의 대표적인 예로서, 현화식물의 18개과에서 발견되며 45회 이상 일어난 진화적 사건으로 알려져 있으며, 사초과에서는 다섯 번 이상의 변화가 있었던 것으로 추정된다(Sage, 2004; Besnard et al., 2009). 단자엽식물에서는 대표적인 경제작물들이 포함된 벼과(Poaceae)뿐만 아니라, 사초과의 여러 속(골풀아재비속[Rhynchospora Vahl], 하늘지기속[Fimbristylis Vahl], 모기골속[Bulbostylis Kunth], 바늘골속[Eleocharis R. Br.], 방동사니속 등)에 C4 식물이 포함되어 있으며, 방동사니속에서는 C4 식물과 C3 식물이 함께 나타난다(Sage, 2004; Besnard et al., 2009). 분자계통학적 분석을 통해 CYPERUS 분계군 내에서 C3 식물이 C4 식물로 전환된 진화적 단계가 보고되었고 계통관계를 파악하는 데 이용되었다(Muasaya et al., 2002; Larridon, 2011). C4 광합성 경로를 가진 식물은 C3 식물에 비해 덥고 건조한 지역에서 유리한 것으로 알려져 있다(Tieszen et al., 1979). C4 식물은 엽록체가 밀집된 광합성 조직(엽육세포와 유관속초세포)이 유관속을 고리형태로 둘러싼 해부학적 특징(Kranz anatomy)으로 광합성 조직(엽육세포)이 표피 아래에 넓게 분포하

는 C3 식물과 쉽게 구별이 가능하다(Dengler and Nelson, 1999; Lee, 2004). 다만 사초과 C4 식물의 광합성 조직 중에서 유관속초와 유사한 형태의 조직은 전형적인 C4 식물의 유관속초와는 발생학적인 유래가 다른 것으로 알려져 있다(Soros and Bruhl, 2000).

우리나라에는 방동사니족 식물 21종(방동사니속 19종, 파대가리속 1종, 세대가리속 1종)이 분포하는 것으로 보고되었다(Ohwi, 1944; Chung, 1957; Lee, 1996; Lee, 2003; Lee, 2006; Oh, 2007) (Table 1). 다만, 결کم방동사니(*C.*

diaphanus Schrad.)의 국내 분포지는 잘 알려져 있지 않다(Ohwi, 1965; Lee, 1996). 또한 일부 국명이 혼용되어 왔는데 그 예로서 우산방동사니는 *C. flavidus* Retz.와 *C. tenuispica* Steud.의 국명으로 사용되었고, 방동사니는 *C. amuricus* Maxim.와 *C. microiria* Steud.의 국명으로 사용되었다(Chung, 1957; Lee, 2006; Oh, 2007) (Table 1). 우리나라의 방동사니족 식물에 대한 연구로는 방동사니속 18종에 대하여 화서와 꽃, 열매 등 생식기관의 형태학적 특징이 다루어진 바가 있다(Oh and Lee, 1999). 또한 동일한 분류

Table 1. Species list of Korean *Cyperus* and the related genera reported in representative floral literatures.

Taxon	Ohwi (1944, 1965)	Chung (1957)	Lee (1996)	Lee (2003)	Lee (2006)	Oh (2007)	Korean name (Reference)
Genus <i>Cyperus</i> L.							
Subgenus <i>Pycneus</i>							
<i>C. diaphanus</i> Schrad.	●	-	●	-	-	-	Kkeol-kkeum-bang-dong-sa-ni (L1)
<i>C. flavidus</i> Retz. (= <i>C. globosus</i> All.) (= <i>C. nilagiricus</i> Hochst. ex Steud.)	- ●	● -	● -	- ●	- ●	- ●	U-san-bang-dong-san-i (C), Non-ttuk-bang-dong-sa-ni (L1), Deu-reong-bang-dong-sa-ni (L2, L3, O)
<i>C. polystachyos</i> Rottb.	●	-	●	●	●	●	Bam-song-i-bang-dong-sa-ni (L1), Gaet-bang-dong-sa-ni (L2), Jung-bang-dong-sa-ni (L3, O)
<i>C. sanguinolentus</i> Vahl (= <i>Pycneus sanguinolentus</i> (Vahl) Nees)	● -	- ●	● -	● -	● -	● -	Bang-dong-san-i-dae-ga-ri (C), Bang-dong-sa-ni-dae-ga-ri (L1, L2, L3, O)
Subgenus <i>Cyperus</i>							
<i>C. amuricus</i> Maxim. var. <i>laxus</i> (Franch. & Sav.) Nakai	● -	- ●	● -	● -	- -	● -	Bang-dong-san-i (C), Bang-dong-sa-ni (L1, L2, O)
<i>C. cyperoides</i> (L.) Kuntze (= <i>Mariscus cyperoides</i> (L.) Momin)	● -	- ●	● -	● -	● -	● -	Bang-dong-san-i-a-jae-bi (C), Bang-dong-sa-ni-a-jae-bi (L1, L2, L3, O)
<i>C. exaltatus</i> Retz. var. <i>iwasakii</i> (Makino) T. Koyama (= <i>C. iwasakii</i> Makino)	● ¹⁹⁶⁵ ● ¹⁹⁴⁴	- -	● -	● -	● -	● -	Wang-gol (L1, L2, L3, O)
<i>C. glomeratus</i> L.	●	●	●	●	●	●	Mul-bang-dong-sa-ni (C, L1, L2, L3, O)
<i>C. iria</i> L.	●	●	●	●	●	●	Cham-bang-dong-san-i (C), Cham-bang-dong-sa-ni (L1, L2, L3, O)
<i>C. microiria</i> Steud.	●	●	●	●	●	●	Geum-bang-dong-sa-ni (C, L1, L2, O), Bang-dong-sa-ni (L3)
<i>C. orthostachyus</i> Franch. & Sav. var. <i>robustus</i> (Nakai) Hara	● -	- ●	● -	● -	● -	● -	Soe-bang-dong-san-i (C), Soe-bang-dong-sa-ni (L1, L2, L3, O)
<i>C. rotundus</i> L.	●	●	●	●	●	●	Hyang-bu-ja (C, L1, L2, L3, O)
Subgenus <i>Pycnostachys</i>							
<i>C. difformis</i> L.	●	●	●	●	●	●	Al-bang-dong-san-i (C), Al-bang-dong-sa-ni (L1, L2, L3, O)
<i>C. flaccidus</i> R.Br. (= <i>C. hakonensis</i> Franch. & Sav.)	- ●	- ●	● -	● -	● -	- ●	Byeong-a-ri-bang-dong-san-i (C), Byeong-a-ri-bang-dong-sa-ni (L1, L2, L3, O)

Table 1. Continued.

Taxon	Ohwi (1944, 1965)	Chung (1957)	Lee (1996)	Lee (2003)	Lee (2006)	Oh (2007)	Korean name (Reference)
<i>C. haspan</i> L.	●	-	●	●	●	●	Mo-gi-bang-dong-sa-ni (L1, L2, L3, O)
<i>C. tenuispica</i> Steud.	●		●	●	●	●	U-san-bang-dong-sa-ni (L1, L2, L3, O)
<i>C. pacificus</i> (Ohwi) Ohwi	●	-	●	●	●		Seo-ul-bang-dong-sa-ni (L1, L2), Huin-bang-dong-sa-ni (L3, O)
(= <i>C. michelianus</i> Link var. <i>pacificus</i> Ohwi)	-	-	-	-	-	●	
<i>C. nipponicus</i> Franch. & Sav.	●	-	●	●	●	●	Na-do-bang-dong-san-i (C), Na-do-bang-dong-sa-ni (L1, L2), Pu-reun-bang-dong-sa-ni (L3, O)
(= <i>Juncellus nipponicus</i> (Fr. & Sav.) C. B. Clarke)	-	●	-	-	-	-	
Subgenus <i>Juncellus</i>							
<i>C. serotinus</i> Rottb.	●	-	●	●	●	●	Neo-do-bang-dong-san-i (C), Neo-do-bang-dong-sa-ni (L1, L2, L3), Kkot-bang-dong-sa-ni (O)
(= <i>Juncellus serotinus</i> (Rottb.) C.B. Clarke)	-	●	-	-	-	-	
Subgenus <i>Diclidium</i>							
Not distributed in South Korea	-	-	-	-	-	-	
Genus <i>Kyllinga</i> Rottb.							
<i>K. brevifolia</i> Rottb.	-	-	-	-	-	●	Ga-si-pa-dae-ga-ri (O)
var. <i>leiolepis</i> (Franch. & Sav.) Hara	-	-	-	●	-	-	Pa-dae-ga-ri (C, L1, L2, L3)
(= <i>K. brevifolia</i> Rottb. subsp. <i>leiolepis</i> (Franch. & Sav.) T. Koyama)	-	-	-	-	●	-	
(= <i>C. brevifolius</i> (Rottb.) Hassk. var. <i>leiolepis</i> (Fr. & Sav.) T. Koyama)	●	-	●	-	-	-	
(? <i>K. brevifolia</i> Rottb. var. <i>leiocarpa</i> (Franch. & Sav.) Hara)	-	●	-	-	-	-	
Genus <i>Lipocarpha</i> R. Br.							
<i>L. microcephala</i> (R. Br.) Kunth	●	●	●	●	●	●	Se-dae-ga-ri (C, L1, L2, L3, O)
No. of recognized taxa (genera/species/ infraspecific taxa)	2/21/2	6/15/3	2/21/2	3/20/2	3/19/2	3/20/2	

Subgeneric classification of *Cyperus* is referred to Ohwi (1944) and Tucker et al. (2002). Scientific names and Korean names preferred in this study were represented in bold. Abbreviations of references for Korean name are as follows: C (Chung, 1957), L1 (Lee, 1996), L2 (Lee, 2003), L3 (Lee, 2006), O (Oh, 2007).

군을 대상으로 잎의 표피형과 잎과 줄기의 단면 구조를 포함한 해부학적 형질을 상세히 분석되었으나 광합성 경로의 유형은 고려되지 않았다(Oh et al., 1999). 분자계통학적 연구로는 핵의 rDNA internal transcribed spacer (nrITS), 엽록체의 *rbcL* 유전자와 *trnL-F* 구간을 이용하여 사초과의 전체적인 계통과 국내 종의 계통학적 위치를 파악하는 과정에서 우리나라 방동사니속 식물이 포함되어 다루어진 바가 있다(Jung and Choi, 2013). 사초과의 광합성 경로에 관해서는 C4 식물인 참방동사니(*Cyperus iria* L.)와 C3 식물인 대사초(*Carex siderosticta* Hance)에 대하여 잎의 미세구조가 비교되었다(Kim et al., 1999).

본 연구에서는 해부학적 관찰을 통해 우리나라에 분포하

는 방동사니속과 근연속 식물의 광합성 경로를 파악하고, 분자계통학적 유연관계와 함께 비교 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구의 해부학적 관찰과 염기서열 결정에는 아주대학교 표본관(AJOU)에 소장된 석엽표본을 이용하였으며, 광의의 방동사니속 18종과 근연속에 속하는 파대가리와 세대가리를 포함하여 총 20종을 대상으로 하였다(Appendix 1).

해부학적 관찰을 위하여 석엽표본에서 분리한 잎이나 화서의 포는 0.1 N NaOH 수용액에 1시간 동안 담가두었

다가, 조직이 충분히 부푼 후에 증류수에 1시간씩 2회의 세척과정을 통해 재수화하여 사용하였다(Shobe and Lersten, 1967). 재수화된 조직은 슬라이드글라스 위에서 면도날을 이용해 얇은 절편으로 자른 후, 실체현미경에서 광합성 조직의 분포('Kranz anatomy')에 따라 광합성 경로의 유형을 결정하였다.

우리나라 방동사니속 식물의 분자계통학적 위치를 결정하고, 광합성경로와의 비교를 위하여 nrITS, 엽록체의 *rbcL* 유전자, *trnL-F* 구간의 염기서열을 결정하였다. DNA는 석엽표본이나 -70°C에 보관된 조직으로부터 CTAB 방법을 이용하여 추출되었다(Chen and Ronald, 1999). 목적부위의 증폭과 염기서열 결정을 위해 사용된 프라이머는 nrITS의 경우 P1과 P4 (White et al., 1990), *rbcL*은 1F와 636F (Muasya et al., 1998), 778R과 1400R (Jung and Choi, 2010), *trnL-F* 구간은 c와 f (Taberlet et al., 1991), 647F와 696R (Jung and Choi, 2011)이다. 각 부위의 증폭조건은 선행된 연구에서 제시한 바에 따랐다(Jung and Choi, 2013). 증폭된 산물은 Gel & PCR 정제 키트(SolGent)로 정제한 후, BigDye Terminator v3.1 ready reaction mix (Applied Biosystems)와 ABI Prism 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

분자계통의 추론에는 본 연구에서 새로이 분석된 5종 12개의 염기서열과 선행연구에서 분석된 78분류군의 174개 염기서열이 함께 분석되었다(Appendix 2). 각 부위의 염기서열은 MUSCLE (Edgar, 2004)을 이용하여 다중 정렬하였으며, 이 과정에서 형성된 gap은 FastGap 1.2 (Borchsenius, 2009)을 이용하여 이진수 형질로 전환하였다. 내군은 CYPERUS 분계군의 13속 55종(국내 3속 20분류군)을 포함하였고, 외군으로는 사초과 전체의 계통분석에서 자매군으로 나타난 FICINIA 분계군의 5속 23종을 사용하였다(Muasya et al., 2009b; Jung and Choi, 2013). 계통분석에는 최대절약법(maximum parsimony method)과 베이즈 추론(Bayesian inference)을 이용하여 각 염기서열 자료(nrITS, 엽록체의 *rbcL*, 엽록체의 *trnL-F*)에 대하여 분석한 후, 세 염기서열자료를 병합하여 분석하였다. 최대절약법은 PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002)을 이용하였고, 최소형질 변화 단계를 가진 계통수를 탐색하기 위해 heuristic search를 사용하였다. 계통수 탐색조건으로 simple addition sequence replicates, tree-bisection-recombination branch swapping을 설정하였고, 최대저장계통수의 수는 10,000개로 제한하였다. 계통수의 길이와 일관성지수(consistency index, CI), 유지지수(retention index, RI)는 PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002)을 이용하여 구하였다. 각 branch의 지지도를 파악하기 위하여 bootstrap 분석(BS)을 1,000회 반복 실시하였으며, 분석조건은 최대저장계통수의 수를 1,000개로 제한한 것을 제외하고 최대절약법의 계통수 탐색조건과 동일하다.

베이즈 추론에 근거한 계통수 작성을 위해, MrModeltest

2.3 (Nylander, 2004)과 PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002)를 사용하여 세 염기서열 구간에 대한 염기치환 모델을 검토하고, Akaike information criterion (Posada and Buckley, 2004)에 따라서 선택하였다. 베이즈 추론은 MrBayes v3.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003)를 이용하여 수행하였으며, 각 구간에 대하여 선택된 염기치환모델을 적용하여 수행하였다. 두 개의 독립적인 Markov Chain Monte Carlo run을 수행하였고, 각 run에는 4개의 chain이 포함되었으며, 1×10^7 회를 진행하였다. 매 1,000회 마다 각 'run'에서 계통수를 취하였고, 그 중 30%의 계통수는 우도(likelihood) 그래프와 split frequency에 따라서 'burn-in'과정에서 제외되었다. 나머지 계통수를 이용하여 50% 합의계통수를 작성하고 사후확률(posterior probability, PP)을 구하였다.

결 과

해부학적 관찰에 의한 광합성 경로의 결정

방동사니속 18종과 근연속인 파대가리속 1종, 세대가리속 1종 총 20종의 잎이나 화서의 포에서 횡단면의 광합성 조직 분포 형태에 따라서 각 식물의 광합성 경로(즉, C3 식물과 C4 식물)를 파악하였다. 이 중 16종은 유관속 주위에 엽록체가 집중된 것으로 관찰되어 C4 식물로 결정되었고, 나머지 4종은 엽록체가 표피 아래의 엽육 조직에 분포하는 것으로 확인되어 C3 식물로 결정하였다(Fig. 1). 분류군 별로는 방동사니속의 5개 아속 중에서 *Pycreus*아속에 속하는 3종(드렁방동사니 *Cyperus flavidus* Retz., 갯방동사니 *C. polystachyos* Rottb., 방동사니대가리 *C. sanguinolentus* Vahl)은 C4 식물이었다(Fig. 1A–C). *Cyperus*아속의 8종[방동사니 *C. amuricus*, 방동사니아재비 *C. cyperoides* (L.) Kuntze, 왕골 *C. exaltatus* Retz. var. *iwasakii* (Makino) T. Koyama, 물방동사니 *C. glomeratus* L., 참방동사니, 금방동사니 *C. microiria* Steud., 쇠방동사니 *C. orthostachyus* Franch. & Sav., 향부자 *C. rotundus* L.]은 모두 C4 식물이었다(Fig. 1D–K). *Pycnostachys*아속의 6종 중 4종(알방동사니 *C. difformis* L., 병아리방동사니 *C. flaccidus* R. Br., 모기방동사니 *C. haspan* L., 우산방동사니 *C. tenuispica* Steud.)은 C3 식물로 확인되었다(Fig. 1L–O). *Pycnostachys*아속의 나머지 2종[서울방동사니 *C. pacificus* (Ohwi) Ohwi, 나도방동사니 *C. nipponicus* Franch. & Sav.]은 C4 식물로 확인되었다(Fig. 1P, Q). *Juncellus*아속의 너도방동사니(*C. serotinus* Rottb.)는 C4 식물로 결정되었다(Fig. 1R). 파대가리속의 파대가리와 세대가리속의 세대가리도 모두 C4 식물로 확인되었다(Fig. 1S, T).

방동사니속(Cypereae) 식물의 분자계통분류학적 유관계

외군(FICINIA 분계군)을 제외한 내군(CYPERUS 분계군)에서 nrITS 염기서열은 549–594 bp의 길이변이가 있었

Fig. 1. Determination of photosynthesis pathway based on the presence or absence of Kranz anatomy. Twenty species of *Cyperus* L. and the two related genera (*Kyllinga* Rottb. and *Lipocarpus* R. Br.) were examined by cross section of leaf or leafy bract. **A.** *C. flavidus* Retz. (C4). **B.** *C. polystachyos* Rottb. (C4). **C.** *C. sanguinolentus* Vahl (C4). **D.** *C. amuricus* Maxim. (C4). **E.** *C. cyperoides* (L.) Kuntze (C4). **F.** *C. exaltatus* Retz. var. *iwasakii* (Makino) T. Koyama (C4). **G.** *C. glomeratus* L. (C4). **H.** *C. iria* L. (C4). **I.** *C. microiria* Steud. (C4). **J.** *C. orthostachyus* Franch. & Sav. (C4). **K.** *C. rotundus* L. (C4). **L.** *C. difformis* L. (C3). **M.** *C. flaccidus* R. Br. (C3). **N.** *C. haspan* L. (C3). **O.** *C. tenuispica* Steud. (C3). **P.** *C. pacificus* (Ohwi) Ohwi (C4). **Q.** *C. nipponicus* Franch. & Sav. (C4). **R.** *C. serotinus* Rottb. (C4). **S.** *Kyllinga brevifolia* Rottb. var. *leiolepis* (Franch. & Sav.) Karthik. (C4). **T.** *Lipocarpus microcephala* (R. Br.) Kunth (C4). The red arrows indicate photosynthetic tissue concentrated around bundle in C4 plant. Length of scale bars are 100 μ m.

Table 2. Statistics of nrITS, *rbcL*, *trnL-F*, and combined data set used in the molecular phylogenetic analyses.

Characteristic	nrITS	<i>rbcL</i>	<i>trnL-F</i>	Combined data set
Number of operational taxonomic units	41	78	67	78
Aligned length (after gap coding)	629 (694)	1,291 (1,291)	1,306 (1,625)	3,226 (3,610)
Number of variable characters (%)	407 (58.6)	176 (13.6)	801 (49.3)	1,384 (38.3)
Number of parsimonious informative characters (%)	307 (44.2)	99 (7.6)	342 (21.0)	719 (19.9)
Number of most parsimonious trees	3	>10,000	5,773	>10,000
Length of tree	1,035	293	1,332	2,726
Consistency index (CI)	0.5712	0.6984	0.6664	0.6145
Retention index (RI)	0.8376	0.8998	0.7386	0.8029
Nucleotide substitution model	GTR+Γ	HKY+I+Γ	HKY+Γ	-

nrITS: internal transcribed spacer of nuclear rDNA.

으며, 쇠방동사니가 가장 짧았고 병아리방동사니가 가장 길었다(Table 2). nrITS 염기서열을 다중정렬을 하였을 때 629 bp였고, gap coding 후에는 694개 형질로 전환되었다(Table 2). 이 중 407개(58.6%)에서 변이가 있었으며 307개(44.2%)가 최대절약분석에 유효한 형질이었다(Table 2). 엽록체 *rbcL* 유전자 염기서열은 1,291 bp로 일정하였으나, 외군으로 포함된 *Isolepis marginata* (Thunb.) A. Dietr.의 *rbcL* 유전자에만 3 bp의 결실이 있다(Table 2). 정렬 후에도 *I. marginata*를 제외한 다른 종에서는 gap이 발생하지 않았으며, 176개(13.6%)가 변이형질, 99개(7.6%)가 유효형질이었다(Table 2). 엽록체 *trnL-F* 구간의 염기서열은 805 bp (*C. laevigatus* L.)–1,008 bp (우산방동사니)의 길이변이가 있었으며, 다중정렬을 하였을 때 1,306 bp였고, gap coding 후에는 1,625개 형질로 전환되었으며, 이 중 801개(49.3%)의 변이가 있었으며 342개(21.0%)가 유효한 형질이었다(Table 2).

nrITS 염기서열자료에 근거해서 탐색한 최대절약계통수는 3개(1,033 steps)였고, 엽록체 *rbcL* 유전자 자료에서는 293 step을 가진 계통수가 10,000개 이상 추정되었으며, 엽록체 *trnL-F* 구간의 경우에는 5,773개(1,332 steps)가 구해졌다(Table 2). 세 염기서열자료를 병합한 자료를 최대절약법으로 분석한 결과 2,726 step을 가진 계통수(CI=0.6145, RI=0.8029)가 10,000 개 이상 나타났다(Table 2).

최대절약분석법에 의해 세 구간의 염기서열로부터 각각 추정된 모든 합의계통수에서 FICINIA 분계군과 CYPERUS 분계군은 뚜렷이 구분되었으나, 방동사니속 및 근연속들의 유연관계에 대해서는 해상력이 낮게 나타났다(자료 생략).

베이즈 추론에 의한 50% 합의계통수에서 나타난 분계군들을 사후확률과 최대절약분석법에서 적용된 부트스트랩으로 평가한 결과, 방동사니속 내의 FICINIA 분계군과 CYPERUS 분계군의 구분은 강하게 지지되었다(PP=1.00,

BS=98) (Fig. 2). CYPERUS 분계군 내에서 세대가리속(PP=1.00, BS=88)과 *Ascolepis*속(PP=1.00, BS=86)은 단계통을 형성하였고 잘 지지되었지만, 방동사니속과 파대가리속, *Kyllingiella*속, *Alinula*속은 단계통을 형성하지 못하였다(Fig. 2). 우리나라 방동사니속 식물 중 *Pycnostachys*아속에 속하는 병아리방동사니, 모기방동사니, 우산방동사니는 가까운 유연관계를 나타내었고 강하게 지지되었으며(PP=1.00, BS=97), 같은 아속의 알방동사니는 *C. dichrostachyus* Hochst. ex A. Rich와 가깝게 나타났다(Fig. 2). *Pycneus*아속의 3종(드렁방동사니, 갯방동사니, 방동사니대가리)이 포함된 분계군은 금방동사니(*Cyperus* 아속)를 제외하고는 모두 *Pycneus*아속의 종들로 구성되었지만 약하게 지지되었다(PP=0.65, BS<50) (Fig. 2). *Cyperus*아속에 속한 종들은 뚜렷한 분계군을 형성하지 못하였고 산재되어 있었으며, 나도방동사니와 서울방동사니만 강한 유연관계를 보였다(PP=1.00, BS=100) (Fig. 2). *Juncellus*아속의 너도방동사니는 쇠방동사니(*Cyperus*아속)의 자매군으로 나타났고 강하게 지지되었다(PP=1.00, BS=97) (Fig. 2).

고 찰

한국산 방동사니속 식물의 광합성 경로와 분류

방동사니속에서 일어난 광합성 경로의 전환은 사초과에서 일어난 네 번의 독립적인 C4 식물 출현 중 하나로서(Sage, 2004), 현재까지 알려진 바로는 CYPERUS 분계군에서 C3 식물인 *Kyllingiella polyphylla* (A. Rich.) Lye의 분기 이후 *Cyperus cuspidatus* Kunth와 나머지 C4 식물의 공통조상에서 변화가 일어난 것으로 보여지며, 이후 이로부터 분화된 무리를 C4 분계군으로 칭한다(Larridon et al., 2011) (Fig. 2). 해부학적 관찰을 통해 우리나라의 방동사니속 식물 4종은 C3 식물로 확인되었으며, 나머지 14종은 C4 식물로 관찰되었다(Fig. 1). 또한 세대가리와 파대가리는 C4

Fig. 2. Bayesian majority-rule (50%) consensus tree with mean branch lengths based on combined data set of *nrITS*, *rbcL*, and *trnL-F* from 78 species of the tribe Cyperaceae ($-lnL = 19,703.289$). Numbers at branches indicate support values (Bayesian posterior probability [PP]/maximum parsimony bootstrap value [BS]). Twenty Korean Cyperaceae are shown with a black rectangle. Scale bar represents expected changes per site.

식물로 확인되었다(Fig. 1). 우리나라의 방동사니속 식물 중 C3 광합성 경로를 지닌 식물은 *Pycnostachys*아속에 속

하는 병아리방동사니, 모기방동사니, 우산방동사니, 알방동사니이다(Figs. 1L–O, 2). 이 중 3종(병아리방동사니, 모

기방동사니, 우산방동사니)은 엽신이 잘 발달하지 않고 납작한 소수가 수지상으로 달리는 형태적 특징이 있고, *Haspami*절과 일치한다. 그에 비하여 알방동사니는 일년생이고 매우 작은 인편과 수과로 구별되는 *Fusci*절에 속한다(Larridon et al., 2011). *Pycnostachys*아속의 나머지 두 종(서울방동사니, 나도방동사니)은 C4 식물로 확인되었는데(Fig. 1P, Q), 소수가 덜 납작하고 두상으로 밀집되어 달리며, 인편이 다소 나선상으로 배열하는 특징 때문에 *Dichostylis*절로 구분되기도 하였다(Ohwi, 1944). 또한 이 두 종은 다른 방동사니속 식물들의 주두가 2개 또는 3개로 확연히 구별되는 것과는 달리 주두가 2-3개로 갈라지는 특징을 공유하며(Ohwi, 1944), 분자계통분석에서도 뚜렷한 유연관계를 보였다(Fig. 2). C4 분계군내 다른 종들에서는 형태학적 특징과 분자계통과의 관계가 명확하게 파악되지 않는다(Fig. 2).

방동사니족에서 속의 한계와 분자계통학적 유연관계

방동사니족은 20개 속 1,000 여 종을 포함하는데, 연구자에 따라 FICINIA 분계군에 포함된 8개 속을 별개의 족(즉, Ficineae)으로 다루거나 인편이 나선형으로 배열하는 점을 들어 고랭이족(Scirpeae)에 포함시키기도 하였다(Bruhl, 1995). 그러나 많은 분자계통학적 증거들에 근거하여 FICINIA 분계군이 CYPERUS 분계군의 자매군으로서 방동사니족에 포함되며, 두 분계군의 구분은 본 연구결과에서도 잘 지지되었다(Muasya et al., 2009a, 2009b; Jung and Choi, 2013) (Fig. 2). 방동사니족에서 5종 미만의 종들로 구성된 속은 15개 속이며 주요 5개 속(*Ascolepis* 22종, 방동사니속 812종, 파대가리속 73종, 세대가리속 36종, *Ficinia* 74종)에 대부분의 종들이 속해있다(Goetghebeur, 1998; Govaerts et al., 2007). 최근 사초과의 분류체계에서 적은 수의 종을 포함한 속들에 대하여 많은 재검토가 이루어지고 있다. 그 예로서 한 종으로만 구성된 FICINIA 분계군의 *Desmoschoenus* Hook. f. 속은 분자계통학적 연구결과에서 *Ficinia*속과 함께 단계통을 형성하여 속의 재설정 주장된 바 있다(Muasya and Lange, 2010).

우리나라 종들이 포함된 CYPERUS 분계군내의 분류체계는 보다 유동적이다. 그 예로서 *Hemicarpha* Nees속과 *Rikliella* J. Raynal속은 독립된 속으로 다루어지기도 하였지만, 발생학적 증거에 따라 세대가리속에 포함시켰다(Goetghebeur, 1998). 최근에는 더 나아가 형태 및 발생학적 증거와 분자계통학적 증거를 바탕으로 세대가리속과 *Hemicarpha*속, *Rikliella*속 전체를 방동사니속 내 절 수준으로 포함하자는 의견도 제시되었다(Bauters et al., 2014). 파대가리속이나 세대가리속의 경우 본 연구 결과와 기존의 몇몇 연구에서 각각 단계통을 형성하지 못하였다(Muasya et al., 2009a, 2009b; Jung and Choi, 2013) (Fig. 2). 반면 상대적으로 해상력이 높은 것으로 알려진 핵의 ETS1f와 엽록체의 *trnH-psbA*, *rpl32-trnL* 구간의 염기서열

을 이용한 최근의 연구에서는 방동사니속 식물에 둘러 싸이긴 하지만 파대가리속 식물은 단계통을 형성하였고, 세대가리속도 *Volkiella* Merxm.속을 포함하여 단계통을 형성하였다(Larridon et al., 2013).

방동사니속이 측계통이라는 분자계통학적 증거는 지속적으로 제시되어 왔으며, 본 연구결과와 모든 분자계통연구에서 제시된 계통수에서 방동사니속 식물이 CYPERUS 분계군 전체에 산재되어 있는 것으로 나타났다(Muasya et al., 2009a, 2009b; Jung and Choi, 2013; Larridon et al., 2013) (Fig. 2). 방동사니속은 *Pycneus*속과 협의의 방동사니속으로 나누어 보는 견해가 있는데, *Pycneus*속의 형태적 특징은 두 개로 갈라진 주두와 소수의 측에 대해서 세로로 납작한 수과이며, 협의의 방동사니속은 세 개(간혹 두 개)로 갈라진 주두와 삼릉형이거나 측에 대해서 가로로 납작한 수과를 특징으로 한다(Goetghebeur, 1998, Muasya et al., 2001). *Pycneus*속은 분자계통수에서 몇몇 협의의 방동사니속 식물과 함께 분계군을 형성하지만 강하게 지지되지는 않는다(Larridon et al., 2013) (Fig. 2).

현재까지 CYPERUS 분계군의 분자계통수에서 도출된 속을 대표하는 분계군들은 모두 방동사니속의 종들에 의해 둘러 싸여 계통학적 측면에서는 독립된 속의 지위를 부여하기가 어렵다. 따라서 분자계통학적 증거와 분류체계를 일치시키기 위해서는 12개 속이 포함된 CYPERUS 분계군을 하나의 방동사니속으로 인정하거나, 많은 수의 신속을 설정해야만 한다(Muasya et al., 2009b). 이에 대해 기존의 형태학적 속의 기준과 분자계통학적 유연관계를 절충한 속의 구분이 제시되었지만(Muasya et al., 2009b), 최근에는 상세한 분자계통연구와 더불어 발생학적 증거들을 통해 기존의 속들을 광의의 방동사니속의 아속이나 절 수준의 속내 분류군으로 포함하는 의견이 제시되고 있다(Larridon, 2011; Larridon et al. 2013; Bauters et al., 2014). 다만, C4 분계군 내에서는 과거의 급격한 종분화 과정 때문에 분자계통수의 해상력이 낮고(Sage, 2004; Besnard et al. 2009) (Fig. 2), 사후확률이나 부트스트랩 평가에 의해 강한 지지를 받지 못하여 속내 분류체계를 확정하기에도 어려움이 있다(Muasya et al., 2009a, 2009b; Larridon et al., 2013). 따라서 C4 분계군에 속한 종들의 유연관계를 파악하여 방동사니족(Cypereae, Cyperaceae)의 분류체계를 정립하기 위해서는 많은 종의 검토와 형태학적, 발생학적 연구와 더불어 해상력이 높은 염기서열 부위를 이용한 면밀한 분자계통학적 분석이 필요한 것으로 여겨진다.

사 사

이 논문은 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 연구비를 받아 수행되었습니다(NRF 2012R1A1A2008497).

Literature Cited

- Bauters, K., I. Larridon, M. Reynders, P. Asselman, A. Vrijdaghs, A. M. Muasya, D. A. A. Simpson and P. Goetghebeur. 2014. A new classification for *Lipocarpa* and *Volkiella* as infrageneric taxa of *Cyperus* s.l. (Cyperaceae, Cyperoideae, Cyperaceae): insights from species tree reconstruction supplemented with morphological and floral developmental data. *Phytotaxa* 166: 1–32.
- Besnard, G., A. M. Muasya, F. Russier, E. H. Roalson, N. Salamin and P.-A. Christin. 2009. Phylogenomics of C₄ photosynthesis in sedges (Cyperaceae): multiple appearances and genetic convergence. *Molecular Biology and Evolution* 26: 1909–1919.
- Borchsenius, F. 2009. FastGap 1.2. Department of Biosciences, Aarhus University, Denmark. Retrieved Sep. 19, 2016, from http://www.aubot.dk/FastGap_home.htm.
- Bruhl, J. J. 1995. Sedge genera of the world: relationships and a new classification of the Cyperaceae. *Australian Systematic Botany* 8: 125–305.
- Chen, D.-H. and P. C. Ronald. 1999. A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 53–57.
- Chung, T. 1957. Korean Flora. Shinjisa, Seoul, 1025 pp.
- Clarke, C. B. 1908. New genera and species of Cyperaceae. *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Gardens, Kew) Additional Series* 8: 1–196.
- Dengler, N. and T. Nelson. 1999. Leaf structure and development in C₄ plants. In *C₄ Plant Biology*. Sage, R. F. and R. K. Monson (eds.), Academic Press, San Diego, CA. Pp. 133–172.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Goetghebeur, P. 1998. Cyperaceae. In *The Families and Genera of Vascular Plants*. Vol. 4. Kubitzki, K. (ed.), Springer Verlag, Berlin. Pp. 141–190.
- Govaerts, R., D. A. Simpson, P. Goetghebeur, K. L. Wilson, T. Egorova and J. Bruhl. 2007. *World Checklist of Cyperaceae: Sedges*. Royal Botanical Garden, Kew, 765 pp.
- Jung, J. and H.-K. Choi. 2010. Systematic rearrangement of Korean *Scirpus* L. s.l. (Cyperaceae) as inferred from nuclear ITS and chloroplast *rbcL* sequences. *Journal of Plant Biology* 53: 222–232.
- Jung, J. and H.-K. Choi. 2011. Taxonomic study of Korean *Scirpus* L. s.l. (Cyperaceae) II: Pattern of phenotypic evolution inferred from molecular phylogeny. *Journal of Plant Biology* 54: 409–424.
- Jung, J. and H.-K. Choi. 2013. Recognition of two major clades and early diverged groups within the subfamily Cyperoideae (Cyperaceae) including Korean sedges. *Journal of Plant Research* 126: 335–349.
- Kim, I. S., J.-H. Pak, B.-B. Seo and S.-D. Song. 1999. Ultrastructure of leaves in C₄ *Cyperus iria* and C₃ *Carex siderosticta*. *Journal of Plant Biology* 42: 213–221.
- Larridon, I. 2011. Exploring giant genera and their satellites, tales from the C₃ *Cyperus* universe. PhD dissertation, Ghent University, Ghent, Belgium, 402 pp.
- Larridon, I., M. Reynders, W. Huygh, K. Bauters, A. Vrijdaghs, O. Leroux, A. M. Muasya, D. A. Simpson and P. Goetghebeur. 2011. Taxonomic changes in C₃ *Cyperus* (Cyperaceae) supported by molecular data, morphology, embryography, ontogeny and anatomy. *Plant Ecology and Evolution* 144: 327–356.
- Larridon, I., K. Bauters, M. Reynders, W. Huygh, A. M. Muasya, D. A. Simpson and P. Goetghebeur. 2013. Towards a new classification of the giant paraphyletic genus *Cyperus* (Cyperaceae): phylogenetic relationships and generic delimitation in C₄ *Cyperus*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 172: 106–126.
- Lee, K. B. 2004. *Plant Anatomy*. Lifescience Publishing Co., Seoul, 140 pp.
- Lee, T. B. 2003. *Coloured Flora of Korea*. Hyang-Mun Publishing Co., Seoul, 914 pp.
- Lee, W. T. 1996. *Lineamenta Florae Koreae*. Academy Press, Seoul. Pp. 1695–2383.
- Lee, Y. N. 2006. *New Flora of Korea*. Kyo-Hak Publishing Co., Seoul, Vol. 1, 975 pp, Vol. 2, 885 pp.
- Linnaeus, C. 1753. *Species Plantarum*. Ray Society, London, 176 pp.
- Linnaeus, C. 1754. *Genera Plantarum*. Ray Society, Stockholm, 26 pp.
- Muasya, A. M., D. A. Simpson, M. W. Chase and A. Culham. 1998. An assessment of suprageneric phylogeny in Cyperaceae using *rbcL* DNA sequences. *Plant Systematics and Evolution* 211: 257–271.
- Muasya, A. M., D. A. Simpson and M. W. Chase. 2001. Generic relationships and character evolution in *Cyperus* s.l. (Cyperaceae). *Systematics and Geography of Plants* 71: 539–544.
- Muasya, A. M., D. A. Simpson and M. W. Chase. 2002. Phylogenetic relationships in *Cyperus* L. s.l. (Cyperaceae) inferred from plastid DNA sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society* 138: 145–153.
- Muasya, A. M., D. Simpson, G. Verboom, P. Goetghebeur, R. F. C. Naczi, M. W. Chase and E. Smets. 2009a. Phylogeny of Cyperaceae based on DNA sequence data: current progress and future prospects. *The Botanical Review* 75: 2–21.
- Muasya, A. M., A. Vrijdaghs, D. A. Simpson, M. W. Chase, P. Goetghebeur and E. Smets. 2009b. What is a genus in Cyper-

- ae: phylogeny, character homology assessment and generic circumscription in Cyperaceae. *The Botanical Review* 75: 52–66.
- Muasya, A. M. and P. J. de Lange. 2010. *Ficinia spiralis* (Cyperaceae) a new genus and combination for *Desmoschoenus spiralis*. *New Zealand Journal of Botany* 48: 31–39.
- Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest 2.3. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala.
- Oh, Y. C., C. S. Lee and K. M. Ko. 1999. Anatomical study of Korean *Cyperus* Linne. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 29: 325–354.
- Oh, Y. C. and Y. H. Lee. 1999. A systematic study on *Cyperus* L. of Korea (Cyperaceae). *Korean Journal of Plant Taxonomy* 29: 37–62.
- Oh, Y. C. 2007. Cyperaceae. In *The Genera of Vascular Plants of Korea*. Park, C.-W. (ed.), Academy Publishing Co., Seoul. Pp. 1113–1181.
- Ohwi, J. 1944. Cyperaceae Japonicae, II. A synopsis of the Rhynchosporoideae and Scirpoideae of Japan, including the Kuriles, Saghalin, Korea, and Formosa. *Memoirs of the College of Science; Kyoto Imperial University Series B, (botany, zoology, geology) biology* 18: 1–182.
- Ohwi, J. 1965. *Flora of Japan*. Shibundo, Tokyo, 1067 pp.
- Posada, D. and T. R. Buckley. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53: 793–808.
- Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Sage, R. F. 2004. The evolution of C_4 photosynthesis. *New Phytologist* 161: 341–370.
- Shobe, W. R. and N. R. Lersten. 1967. A technique for clearing and staining Gymnosperm leaves. *Botanical Gazette* 128: 150–152.
- Soros, C. L. and J. J. Bruhl. 2000. Multiple evolutionary origins of C_4 photosynthesis in the Cyperaceae. In *Monocots: Systematics and Evolution*. Wilson, K. L. and D. A. Morrison (eds.), CSIRO Publishing, Melbourne. Pp. 629–635.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Ver. 4.0b10. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Tieszen, L. L., M. M. Senyimba, S. K. Imbamba and J. H. Troughton. 1979. The distribution of C_3 and C_4 grasses and carbon isotope discrimination along an altitudinal and moisture gradient in Kenya. *Oecologia* 37: 337–350.
- Tucker, G. C., B. G. Marcks and J. R. Carter. 2002. *Cyperus*. In *Flora of North America North of Mexico*. Vol. 23. Flora of North America Editorial Committee (ed.), Oxford University Press, New York. Pp. 141–191.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds.), Academic Press, San Diego, CA, Pp. 315–322.

Appendix 1. Information of vouchers used for the anatomical observation and the molecular phylogenetic study. All specimens are deposited in Herbarium of Ajou University (AJOU).

Cyperus amuricus, KOREA, Chungcheongbuk-do: Yeongdong-gun, Mt. Cheonmamsan, 13 Sep 2010, *J. Jung* 1009030; *C. cyperoides*, KOREA, Jeollanam-do: Jindo-gun, 23 Oct 2010, *J. Jung* 1010273; *C. difformis*, KOREA, Chungcheongnam-do: Taean-gun, Uihang-beach, 11 Aug 2008, *J. Jung* 808012; *C. exaltatus* var. *iwasakii*, KOREA, Incheon: Ganghwa-gun, Ganghwado Isl., 11 Aug 1992, *H.-K. Choi s.n.*; *C. flaccidus*, KOREA, Gangwon-do: Yanggu-gun, Soyan Lake, 24 Aug 2010, *J. Jung* 1008002; *C. flavidus*, KOREA, Jeollanam-do: Jindo-gun, Geumgye-ri, 23 Oct 2010, *J. Jung* 1010285; *C. glomeratus*, KOREA, Jeollabuk-do: Buan-gun, Chungho reservoir, 23 Sep 2009, *J. Jung* 909173; *C. haspan*, KOREA, Gyeongsangnam-do: Geoje-si, Beopdong-ri, 19 Oct 2010, *J. Jung* 1010177; *C. iria*, KOREA, Jeollabuk-do: Gochang-gun, Yongdae reservoir, 23 Sep 2009, *J. Jung* 909166; *C. microiria*, KOREA, Gangwon-do: Yanggu-gun, Soyang lake, 24 Aug 2010, *J. Jung* 1008005; *C. nipponicus*, KOREA, Chungcheongnam-do: Seochon-gun, Wolho-ri, 14 Sep 2010, *J. Jung* 1009073; *C. orthostachyus*, KOREA, Chungcheongbuk-do: Yeongdong-gun, Mt. Cheonmamsan, 13 Sep 2010, *J. Jung* 1009032; *C. pacificus*, KOREA, Gyeonggi-do: Icheon-si Yongpung reservoir, 4 Jul 2008, *J. Jung* 807040; *C. polystachyos*, KOREA, Gyeonggi-do: Whaseong-si, Ujeong-eup, 16 Sep 2010, *J. Jung* 1009077; *C. rotundus*, KOREA, Jeju-do: Jeju-si, Gujwa-eup, Haengwon-ri, 2 Nov 2010, *J. Jung* 1007126; *C. sanguinolentus*, KOREA, Chungcheongbuk-do: Yeongdong-gun, Mt. Cheonmamsan, 13 Sep 2010, *J. Jung* 1009043; *C. serotinus*, KOREA, Gyeongsangnam-do: Geoje-si, Haksan-ri, 19 Oct 2010, *J. Jung* 1010170; *C. tenuispica*, CHINA, Chaling: Hunan, 17 Jul 2008, *J. Jung* 807091; *Kyllinga brevifolia* var. *leiolepis*, KOREA, Chungcheongbuk-do: Yeongdong-gun, Mt. Cheonmamsan, 13 Sep 2010, *J. Jung* 1009007; *Lipocarpha microcephala*, KOREA, Gyeongsangbuk-do: Ulju-gun, Wangpi river, 6 Oct 2010, *J. Jung* 1010132.

Appendix 2. GenBank accession numbers of DNA sequences (nrITS/rbcL/trnL-F) used in the molecular phylogenetic analyses.

Alinula lipocarpoides (-/AM999784/-), *A. paradoxa* (-/AJ278290/AJ295756), *Androtrichum trigynum* (-/EF178547/-), *Ascolepis brasiliensis* (-/AM999785/-), *A. capensis* (-/Y13003/AY040594), *A. protea* (-/Y13002/-), *Courtoisina assimilis* (-/AY040590/AY040595), *Cyperus alternifolius* subsp. *flabeliformis* (JX644851/JX644653/JX644796), *C. amuricus* (JX644852/JX644654/JX644799), *C. compressus* (-/AF449506/AF449555), *C. congestus* (-/AM234972/AF449556), *C. cuspidatus* (-/AF449508/AF449557), *C. cyperoides* (JX644853/JX644655/JX644800), *C. dichrostachyus* (-/Y12965/-), *C. difformis* (JX644854/JX644656/-), *C. exaltatus* (-/JX644657/-), *C. flaccidus* (JX644855/JX644658/-), *C. flavescens* (-/Y13005/AJ295763), *C. flavidus* (JX644856/JX644659/JX644798), *C. glomeratus* (-/JX644660/-), *C. haspan* (JX644857/JX644661/-), *C. involucratus* (AY242052/Y12967/AJ295758), *C. iria* (AB261666/AM999807/-), *C. kerstenii* (-/Y13018/AY040597), *C. laevigatus* (-/Y13017/-), *C. longus* (-/AM999810/AY040598), *C. michelianus* subsp. *pygmaeus* (-/AJ404698/AJ295760), *C. microiria* (JX644858/JX644662/JX644801), *C. mundtii* (-/AF449517/AF449566), *C. nipponicus* (JX644859/JX644663/JX644804), *C. nuerensis* (-/Y13004/AY040603), *C. orthostachyus* (JX644860/JX644664/JX644802), *C. pacificus* (JX644861/JX644665/JX644805), *C. papyrus* (AY242048/AM999811/AJ295759), *C. polystachyos* (JX644862/JX644666/JX644806), *C. pygmaeus* (-/AJ404698/AJ295760), *C. pseudovestitus* (-/AF449513/AF449562), *C. pulchellus* (-/AM999812/-), *C. rigidifolius* (-/Y13016/AY040600), *C. rotundus* (-/JX644667/JX644807), *C. sanguinolentus* (JX644896/JX644701/AF449567), *C. serotinus* (JX644863/JX644668/JX644803), *C. tenuispica* (JX644864/JX644669/JX644793), *C. ustulatus* (DQ385558/AM999816/-), *Desmoschoenus spiralis* (DQ385562/AJ404701/AJ295753), *F. esterhuyzeniae* (GU012400/EF178549/EF178590), *F. indica* (GU012402/AM999831/EF178597), *Hellmuthia membranacea* (GU012384/AM999838/AJ295815), *Isolepis Aucklandica* (DQ385573/AJ404704/AJ295773), *I. cernua* (DQ385576/AM999840/AF285070), *I. costata* (GU012414/Y12981/AJ295776), *I. crassiuscula* (AB261668/AB236355/AB236356), *I. digitata* (GU012415/AJ404708/AJ295779), *I. habra* (GU012386/AJ404710/AJ295783), *I. hystrix* (GU012388/AJ404711/AJ295785), *I. inundata* (DQ385581/AJ404712/AJ295786), *I. levynsiana* (-/AF449514/AF449563), *I. marginata* (GU012418/AJ404714/AJ295790), *I. prolifera* (DQ385584/AM999841/AJ295796), *I. rubicunda* (GU012420/AJ404719/AJ295797), *I. sepulchralis* (GU012391/AJ404720/AJ295798), *I. setacea* (JX644893/JX644698/JX644794), *I. sulcata* (GU012393/AJ404722/AJ295802), *I. venustula* (GU012421/AJ404724/AJ295804), *Kyllinga appendiculata* (-/Y13007/AJ295761), *K. brevifolia* var. *leiolepis* (JX644894/JX644699/JX644808), *K. bulbosa* (-/Y12979/AY040601), *Kyllingiella microcephala* (-/AY040592/AJ295807), *K. polyphylla* (-/Y13013/-), *Lipocarpha microcephala* (JX644895/JX644700/JX644797), *L. nana* (-/AM999847/AJ295762), *Oxycaryum cubense* (-/AM999850/-), *Queenslandiella hyalina* (-/AM999854/-), *Remirea maritima* (-/AM999855/AY040604), *Scirpoides holoschoenus* (-/AM999871/AY344176), *S. thunbergii* (-/AJ404727/AJ295812), *Sphaerocyperus erinaceus* (-/AM999876/AJ295764), *Volkiella disticha* (-/EF178561/-).