PCR-RFLP와 ITS 염기서열 분석을 이용한 한국산 초롱꽃과 (Campanulaceae)의 계통유연관계

김경아 · 유기억*

강원대학교 자연과학대학 생명과학과

Phylogenetic Relationships of Korean Campanulaceae Based on PCR-RFLP and ITS Sequences

Kyung-Ah Kim and Ki-Oug Yoo*

Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

(Received 26 May 2011 : Accepted 7 June 2011)

적 요: 한국산 초롱꽃과 8속 25분류군과 근외군 2분류군 등 총 27분류군에 대한 계통유연관계를 알아보기 위하여 PCR-RFLP와 ITS 지역의 염기서열 분석을 실시하였다. 엽록체 DNA의 11개 지역을 이용한 PCR-RFLP 분석에서는 증폭된 DNA 각각에 대하여 15가지 제한효소를 처리한 결과 총 244개의 제한효소 절편을 얻었으며, 그 중 59개는 분류군간 차이가 있어 24%의 다형화를 보였다. ITS 지역의 길이는 588-707 bp이었으며, 염기변이는 0-39.36%로 나타났다. 계통 분석 결과, PCR-RFLP와 ITS 지역의 염기서열을 이용한 계통수 모두에서 초롱꽃과는 단계통을 형성하였다. 도라지속과 더덕속은 독립적인 분계조로 유집되었고, 홍노도라지속과 영아자속은 잔대속-금강초롱꽃속을 위한 자매군을 형성하였다. 초롱꽃속도 단계통으로 나타났고, 애기도라지속은 ITS분석에서는 가장 기부에 분계조를 형성하였지만 PCR-RFLP결과에서는 초롱꽃속과 더덕속-도라지속 분계조 사이에 위치하여 차이를 보였다. 금강초롱꽃속은 잔대속과 함께 유집되었으며, 잔대속은 병계원으로 분계조를 형성하여 형태형질에 의한 속내 분류체계와 일치하지 않았다. 본 연구에서 다룬 2가지 자료에 기초한 한국산 초롱꽃과의 계통분석 결과, 속 수준에서는 대부분 일치하는 경향을 보였지만 애기도라지속과 금강초롱꽃속의 계통학적 위치와 잔대속의 속내 분류계급의 유집에서는 차이를 보였다.

주요어: 초롱꽃과, 계통유연관계, PCR-RFLP, ITS.

ABSTRACT: Phylogenetic studies were conducted to evaluate the taxonomic relationships among 27 taxa, including 2 outgroups of Korean Campanulaceae, using PCR-RFLP analysis and ITS sequences. In the PCR-RFLP analysis, 15 restriction endonucleases produced 244 restriction sites and size variations from the chloroplast DNA, and 59 restriction sites (24%) showed polymorphism. The length of the ITS regions ranged from 588 bp to 797 bp. The sequence divergence including the outgroups is 0-39.36%. Phylogenetic analyses based on PCR-RFLP and ITS data suggest that Campanulaceae is monophyletic; *Codonopsis* and *Platycodon* forms an independent clade; the *Peracarpa* and *Asyneuma* clade is a sister to the *Adenophora*-*Hanabusaya* clade; *Campanula* is monophyletic; and *Wahlenbergia* basally branches within the ITS tree, whereas they are placed between *Campanula* and the *Codonopsis*-*Platycodon* clade in the PCR-RFLP tree; *Hanabusaya* is placed within the *Adenophora* clade; and *Adenophora* is paraphyletic and shows discordance to the infrageneric classifications based on morphological data. The present results show two data sets, largely congruent at the generic level, but their phylogenetic positions, in particular the *Wahlenbergia* and *Hanabusaya* and the infrageneric classifications in *Adenophora*, show some incongruence.

Keywords: Campanulaceae, phylogenetic relationships, PCR-RFLP, ITS

*Author for correspondence: yooko@kangwon.ac.kr

초롱꽃과(Campanulaceae)는 초롱꽃목(Campanulales)에 속하는 초본 또는 소관목으로 Jussieu (1789)에 의해 설정되었으며, 전 세계에 약 84속 2,737여 종류가 북반구 온대지역을 중심으로 넓게 분포한다(Fedorov, 1957; Lammers, 2007). 초롱꽃과에 대한 분류체계는 de Candolle (1830, 1839)을 시초로 하여 Hemsley (1889), Schönland (1889), Fedorov (1957), Hutchinson (1959), Hong (1983) 등에 의해 정립되어져 왔다.

한국산에 관해서는 Hemsley (1889)가 인천잔대(*Adenophora remotidens*)를 신종으로 발표하면서 *Adenophora*, *Campanula*, *Lobelia*, *Phyteuma*, *Platycodon* 등 5속 7종을 기재한 것을 시점으로 Makino (1909), Nakai (1909, 1911), Kitamura (1941), Lee (1984), Lee and Lee (1990), Lee et al. (1990), Lee et al. (1997) 등에 의하여 새로운 종의 분포 및 신분류군이 추가되었고, Oh (1981)는 9속 29종 19변종 12품종, Yoo (1995)는 8속 25종 9변종 8품종으로 정리하는 등 국내에는 약 50여 종류가 분포하는 것으로 알려져 있다. 이외에 국내에 분포하는 일부 분류군을 대상으로 한 연구로는 Lee (1967, 1968)와 Chang (1979)이 염색체수 및 화분의 형태에 대한 연구를 수행하였으며 단일 속을 대상으로 한 연구로는 Yoo (1989)와 Lee (1989, 1997)에 의해 더덕속(*Codonopsis*)과 잔대속(*Adenophora*) 식물에 대한 분류학적 연구가 수행된 바 있다. 우리나라 특산속인 금강초롱꽃속(*Hanabusaya*)의 경우는, 초롱꽃과 내에서의 계통학적 유연관계를 밝히기 위해 화분형태연구(Lee et al., 1986)를 비롯하여 RAPD분석(Yoo et al., 1995, Yoo et al., 1996) 및 외부형태형질분석(Park and Ko, 2000) 등이 수행되었으며, 최근에는 Kim et al. (1999)에

의해 핵 DNA의 ITS sequence 분석이 실시된 바 있다. 그러나 학자에 따라 속 또는 종의 한계나 변이 폭의 설정에 차이가 있을 뿐 만 아니라, 동일 분류군 내에서도 변이 폭이 심한 잔대속 분류군의 경우 검증되지 않은 많은 종류들이 세분 또는 통합됨에 따라 종 동정에 많은 혼란을 가져오고 있다.

본 연구에서는 주로 외부형태 형질에 의해 분류되거나 일부 분류군에 대한 분류학적 유연관계가 밝혀졌을 뿐, 최근 일부 연구(Yoo et al., 1996; Kim et al., 1999)를 제외하고는 분자계통학적 연구가 수행되지 않은 한국산 초롱꽃과 식물에 대하여 속 또는 종간 유연관계와 진화경향성을 파악하는데 유용한 것으로 알려져 있는(Kim and Jansen, 1994) PCR-RFLP분석과 ITS지역의 염기서열을 비교·분석하여 계통수를 작성하고, 이를 기존의 외부형태형질에 따른 분류체계(Yoo, 1995)와 비교해 보고자 한다.

재료 및 방법

실험재료는 2009년 6월부터 2010년 9월까지 자생지에서 직접 채집한 생체 재료를 사용하였으며, 일부는 건조된 석엽 표본의 잎을 이용하였고, 증거표본은 강원대학교 생명과학과 식물표본실(KWNU)에 보관하였다. 실험에 사용된 분류군 및 채집지 정보는 Table 1과 같다. 군외군은 초롱꽃과와 가장 유사한 분류군으로 알려진 숫잔대과의 2분류군을 사용하였다.

DNA의 추출은 Doyle and Doyle (1987)의 방법을 따랐으며, 추출한 DNA는 Beckman spectrophotometer로 정량한 후

Table 1. List of samples used in this study.

Taxa	Abbrev.	Voucher	Source	GenBank accession
Family Campanulaceae Juss. 초롱꽃과				
Genus <i>Adenophora</i> Fisch. 잔대속				
Section <i>Microdiscus</i> Fed. 진퍼리잔대절				
<i>A. lamarckii</i> Fisch. 두메잔대	ALM	Yoo53180 (KWNU)	Korea, Mt. Samyeong	HQ704553
<i>A. liliifolia</i> (L.) Besser 나리잔대	ALI	Yoo143 (KWNU)	Korea, Mt. Seorak	HQ704551
Section <i>Platyphyllae</i> (Borbas) Fed. 층층잔대절				
<i>A. verticillata</i> (Pall.) Fisch. 층층잔대	AVE	Yoo75356 (KWNU)	Korea, Seonjaryeong	HQ704531
var. <i>hirsuta</i> F. Schmidt 털잔대	AVH	KHB090825-262 (KH)	Korea, Mt. Jeonggak	HQ704532
<i>A. divaricata</i> Franch. & Sav. 넓은잔대	ADI	Yoo73736 (KWNU)	Korea, Mt. Daedeok	HQ704520
<i>A. kayasanensis</i> Kitam. 가야산잔대	AKA	Yoo75358 (KWNU)	Korea, Mt. Gaya	HQ704523
<i>A. racemosa</i> Joongku Lee et S. Lee 외대잔대	ARA	Yoo58475 (KWNU)	Korea, Mt. Odae	HQ704545
<i>A. triphylla</i> var. <i>japonica</i> (Regel) H.Hara 잔대	ATJ	Yoo63275 (KWNU)	Korea, Mt. Samak	HQ704530
Section <i>Remotiflorae</i> (Baranov) Ponomarchuk 모시대절				
<i>A. grandiflora</i> Nakai 도라지모시대	AGR	Yoo54257 (KWNU)	Korea, Mt. Daedeok	HQ704522
<i>A. remotiflora</i> (S. et Z.) Miq. 모시대	ARE	Yoo75355 (KWNU)	Korea, Mt. Bohyeon	HQ704526
var. <i>hirticalycis</i> Joongku Lee et S. Lee 그늘모시대	ARH	Yoo19500 (KWNU)	Korea, Mt. Jiri	HQ704528
Section <i>Thyrsanthae</i> (Fed.) Baranov 당잔대절				
<i>A. coronopifolia</i> Fisch. 등근잔대	ACO	Yoo18845 (KWNU)	Korea, Mt. Halla	HQ704519

Table 1. Continued.

Taxa	Abbrev.	Voucher	Source	GenBank accession
<i>A. polyantha</i> Nakai 수원잔대	APO	Yoo62036 (KWNU)	Korea, Mt. Hakga	HQ704524
<i>A. stricta</i> Miq. 당잔대	AST	Yoo61921 (KWNU)	Korea, Podaebong	HQ704529
Genus <i>Campanula</i> L. 초롱꽃속				
<i>C. punctata</i> Lam. 초롱꽃	CPU	Yoo75339 (KWNU)	Korea, Mt. Balgyo	HQ704535
<i>C. takesimana</i> Nakai 섬초롱꽃	CTA	KHB090723-016 (KH)	Korea, Ulleungdo	HQ704536
<i>C. glomerata</i> var. <i>dahurica</i> Fisch. ex Ker Gawl. 자주꽃방망이	CGD	Yoo75359 (KWNU)	Korea, Mt. Daedeok	HQ704534
Genus <i>Codonopsis</i> Wall. 더덕속				
<i>C. lanceolata</i> (S. et Z.) Trautv. 더덕	CLA	Yoo62006 (KWNU)	Korea, Mt. Bonghwa	HQ704521
<i>C. pilosula</i> (Franch.) Nannf. 만삼	CPI	Yoo75340 (KWNU)	Korea, Mt. Gyeonggang	HQ704538
<i>C. ussuriensis</i> (Rupr. & Maxim.) Hemsl. 소경불알	CUS	Yoo56567 (KWNU)	Korea, Seowon-myeon	HQ704539
Genus <i>Hanabusaya</i> Nakai 금강초롱꽃속				
<i>H. asiatica</i> (Nakai) Nakai 금강초롱꽃	HAS	Yoo75337 (KWNU)	Korea, Mt. Hwaak	HQ704540
Genus <i>Asyneuma</i> Griseb. & Schenk 영아자속				
<i>A. japonicum</i> (Miq.) Briq. 영아자	AJA	Yoo75333 (KWNU)	Korea, Seonjaryeong	HQ704533
Genus <i>Peracarpa</i> Hook. f. Thomson 홍노도라지속				
<i>P. carnosa</i> var. <i>circaeoides</i> (F.Schmidt ex Miq.) Makino 홍노도라지	PCA	Yoo75152 (KWNU)	Korea, Gyora-ri	HQ704541
Genus <i>Platycodon</i> A. DC. 도라지속				
<i>P. grandiflorus</i> (Jacq.) A. DC. 도라지	PGR	Yoo75331 (KWNU)	Korea, Mt. Yak	AF134863
Genus <i>Wahlenbergia</i> Schrad. ex Roth 애기도라지속				
<i>W. marginata</i> (Thunb.) A. DC. 애기도라지	WMA	Yoo75148 (KWNU)	Korea, Dalsanbong	HQ704542
Family Lobeliaceae Juss. 숫잔대과				
<i>L. chinensis</i> Lour. 수염가래꽃	LCH	Yoo63251 (KWNU)	Korea, Mt. Bukbae	HQ704543
<i>L. sessilifolia</i> Lamb. 숫잔대	LSE	Yoo75343 (KWNU)	Korea, Mt. Daeam	HQ704544

5 ng/μl로 희석하여 PCR을 위한 DNA로 사용하였고, DNA 증폭은 DNA Thermal Cycler(Biometra, Whatman Co.)로 수행하였다.

PCR-RFLP는 Demesure et al. (1995)에 따라 9부분의 cpDNA non-coding region을 비롯하여 *atpF*-H (Kress et al., 2005)와 *rpl16* (Jordan et al., 1996) 지역을 대상으로 하였다. PCR 조건은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분을 cycle로 하여 40회 반복한 후 72°C에서 10분간 더 유지시켜주었다. 증폭된 DNA는 15개의 제한효소(*Bam*HI, *Bcl*II, *Bgl*II, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Hinf*I, *Msp*I, *Pst*I, *Rsa*I, *Taq*I, *Xba*I, *Xho*I)를 처리하여, 2% agarose gel에 전기영동 한 후, UV하에서 band를 확인하고 digital camera로 촬영하였다. 분자량 비교를 위한 marker로는 1 Kb Plus DNA Ladder를 사용하였다. 유연관계분석은 촬영된 gel 사진을 근거로 증폭된 밴드를 각각 하나의 운영분류단위(OTU, operational taxonomic unit)로 취급하여 자료행렬(data matrix)을 작성하였다.

ITS 지역의 증폭을 위한 primer는 White et al. (1990)에 의한 ITS1과 ITS4를 사용하였다. PCR 조건은 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 2분을 cycle로 하여 35회 반복한 후 72°C에서 10분간 더 유지시켰다. 증폭된 DNA는 1.2% agarose

gel에 전기영동한 후 UV하에서 확인하였으며, Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega Co., Madison, WI, USA)을 이용하여 정제하였다. 분자량 비교를 위한 marker로는 1 Kb Plus DNA Ladder를 사용하였다. 염기서열 분석은 ABI PRISM 3730XL analyzer(Applied Biosystems)를 이용하였다. 염기서열은 Sequencher(Gene codes Corporation, Ann Arbor, Michigan)와 Clustal X를 이용하여 정렬하였고, 최종 세부 정렬은 수작업을 통해 수행하였다.

PCR-RFLP 결과로 작성된 자료행렬과 ITS를 기초로 정렬된 염기서열은 PAUP* 4.02b10 (Swofford, 2003)을 사용하여 parsimony분석을 수행하였으며, 분석방법은 heuristic search를 이용하고, 그에 따른 option으로는 ACCTRAN, MULPARS, 그리고 TBR을 이용하였다. 작성된 분계도의 지지정도를 알아보기 위한 bootstrap값(Felsenstein, 1985)은 형질 재추출 과정을 1,000회 반복하였으며, ITS 지역 염기서열에 의해 작성된 계통수의 사후확률(Posterior probabilities, PP)은 Modeltest(ver. 3.7, Posada and Crandall, 1998)를 이용하였다. 염기서열자료에 적합한 치환모델은 Akaike Information Criterion(AIC; Posada and Buckley, 2004)에 근거하여 선택하였으며, 그 결과 ITS를 위한 모델은 GTR+G가 가장 적합

한 것으로 나타났다. 이 모델을 기초로 MrBayes(ver. 3.1.2, Huelsenbeck and Ronquist, 2001)을 이용하여 Bayesian 분석을 수행하였고, 분석방법은 Markov Chain Monte Carlo method (MCMC; Hastings, 1970)를 사용하였다. 염기변이는 Kimura two-parameter methods(Kimura, 1980)로 계산된 값을 산출하였다(Farris et al., 1996).

결 과

PCR-RFLP 분석

Primer pair 분석

엽록체 DNA 상의 11개 유전자 지역을 대상으로 PCR을 수행한 결과, 5개 primer pair에서 반응을 보였다(Table 2). 5개 지역에서 증폭된 약 7.12 Kb의 DNA 각각에 대하여 15가지의 제한효소를 처리한 결과, 총 244개의 restriction

site를 얻었고 그 중 59개는 polymorphic하게 나타나 약 24%의 다형성을 보였다. Primer pair별 polymorphic site는 *trnH*[tRNA-His(GUG)]-*trnK*[tRNA-Lys(UUU)exon1]가 18개로 가장 많았고, *rpl16F71-rpl16R1516*이 8개로 가장 적었다(Table 2). 다형화를 보인 59 site에 대한 자료행렬은 Table 3과 같다.

계통분석

본 연구에서 다룬 27분류군에 대하여 계통분석을 실시한 결과, 다형화를 보인 59개의 site 중 48개의 절편이 계통수를 그리는데 유용한 공유과생형질로 확인되었으며, 총 98단계의 길이를 갖는 3개의 계통수를 얻었고, consistency index(CI)는 0.602, retention index(RI)는 0.812, 그리고 rescaled consistency index(RC)는 0.489로 나타났다. Strict consensus tree는 총 5개의 분계조를 형성하였는데(Fig. 1) 가장 먼저 도라지속과 더덕속이 단계통을 형성하며 군내군의 가장 기부에 위치하

Table 2. Number of polymorphic restriction sites generated by single digests of 15 restriction enzymes and the sizes of cpDNA fragments amplified by each primer pair.

amplified by each primer pair.													No. of polymorphic site	Size (bp)
Primer pair ^a	4-bp cutter				5-bp cutter		6-bp cutter							
	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Hin</i> fI	<i>Bcl</i> I	<i>Bgl</i> II	<i>Dra</i> I	<i>Eco</i> RI	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> I			
A	2	4	3	3	2	1	1	1	-	-	1	18	1690	
B	1	-	2	1	3	-	1	1	1	1	4	15	1680	
C	3	-	-	4	1	-	-	1	-	-	-	9	1700	
D	-	3	1	1	2	-	-	-	2	-	-	9	750	
E	2	1	3	-	-	-	-	-	2	-	-	8	1300	
Total	8	8	9	9	8	1	2	3	5	1	5	59	7120	

^aA. *trnH*[tRNA-His(GUG)]-*trnK*[tRNA-Lys(UUU)exon1]; B. *psbC*[psbI44kd protein]-*trnS*[tRNA-Ser(UGA)]; C. *trnS*[tRNA-Ser(UGA)]-*trnM*[tRNA-fimet(CAU)]; D. *atpF-atpH*; E. *rpl16F71-rpl16R1516*.

Table 3. Data matrix of cpDNA restriction sites in Korean Campanulaceae.

No.	Enzyme	*Primer	Variation(bp)	#1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	<i>Dra</i> I	A	1240+250=1490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	<i>Msp</i> I	A	1690=850+840	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
3	<i>Msp</i> I	A	600+250=850	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	<i>Msp</i> I	A	480+360=840	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
5	<i>Msp</i> I	A	320+160=480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
6	<i>Bgl</i> II	A	1690=1300+390	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
7	<i>Pst</i> I	A	1690=1190+500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0
8	<i>Bcl</i> I	A	900+790=1690	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
9	<i>Taq</i> I	A	1690=1250+440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
10	<i>Taq</i> I	A	400+390=790	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
11	<i>Taq</i> I	A	400+290=690	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
12	<i>Hin</i> fI	A	500+550=1350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
13	<i>Hin</i> fI	A	650+550=1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
14	<i>Rsa</i> I	A	1690=850+840	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
15	<i>Rsa</i> I	A	500+350=850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
16	<i>Rsa</i> I	A	950+540=1490	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0

No.	Enzyme	*Primer	Variation(bp)	#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
17	HaeIII	A	720+550=1270	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
18	HaeIII	A	460+450=910	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
19	HinI	B	200+120=320	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
20	HinI	B	240+130=370	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
21	HinI	B	320+160=480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
22	DraI	B	1680=1280+400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1
23	HaeIII	B	500+250=750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
24	PstI	B	1680=1400+280	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
25	PstI	B	1100+300=1400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
26	PstI	B	900+200=1100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
27	PstI	B	330+300=630	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
28	TaqI	B	1680=850+830	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
29	BglII	B	1680=1600+80	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
30	EcoRI	B	630+550=1180	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
31	RsaI	B	1680=1100+580	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
32	RsaI	B	250+180=430	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
33	HindIII	B	1680=1550+130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
34	DraI	C	1700=1050+650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
35	HaeIII	C	720+150=870	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1												

*1, ALA; 2, ALI; 3, AVE; 4, AVH; 5, ADI; 6, AKA; 7, ARA; 8, ATJ; 9, AGR; 10, ARE; 11, ARH; 12, ACO; 13, APO; 14, AST; 15, CPU; 16, CTA; 17, CGD; 18, CLA; 19, CPI; 20, CUS; 21, HAS; 22, AJA; 23, PCA; 24, PGR; 25, WMA; 26, LCH; 27, LSE. Abbreviations of the OTUs are given in Table 1.

였고, 애기도라지속은 독립적으로 유집되었으며, 초롱꽃속 또한 97%의 높은 bootstrap 값을 가지고 단계통을 형성하였다. 홍노도라지속과 영아자속은 하나의 clade를 형성하며 초롱꽃속과 잔대속 사이에 위치하였고(BS = 51%), 금강초롱꽃속은 잔대속과 크게 하나의 분계조를 형성하였다. 더덕속 내에서는 만삼이 더덕과 소경불알이 포함된 clade를 위한 자매군을 형성하면서 유집되었으나, 초롱꽃속에 속하는 분류군들은 차이가 없어 중간 구별이 불가능하였다. 한편 국내의 초롱꽃과 중 가장 많은 분류군이 포함되어 있

는 잔대속의 경우 잎이 윤생하는 특징을 가지는 충충잔대절 분류군들이 하나의 분계조를 형성한 반면(BS = 59%), 진퍼리잔대절, 당잔대절, 그리고 모시대절은 병계원적인 유집양상을 보여 절 또는 계열간 구별이 불가능하였다.

ITS 분석

염기서열 분석

본 연구에서 다룬 총 27분류군의 ITS 1, ITS 2 그리고 5.8S

Fig. 1. Strict consensus tree of three equally parsimonious trees (98 steps, CI = 0.602, RI = 0.812, RC = 0.489) based on analysis of PCR-RFLP produced by five primer pairs. The bootstrap values greater than 50% are below the clades.

의 길이는 588-707 bp의 범위로 나타났으며 정렬된 염기서열은 총 869 bp이었다. 이 중 ITS 1과 ITS 2는 각각 204-280 bp, 220-267 bp의 범위였으며, 5.8S는 모든 분류군이 161 bp로 동일하였다. 전체적으로는 애기도라지가 588 bp로 가장 짧았고, 영아자와 홍노도라지가 707 bp로 가장 길게 나타났다. ITS 1의 경우는 애기도라지가 204 bp로 가장 짧았으며, 영아자가 280 bp로 가장 길게 나타났다. ITS 2는 숫잔대가 220 bp로 가장 짧았고, 홍노도라지가 267 bp로 가장 길게 나타났으며, 정렬된 ITS 1과 ITS 2는 각각 370 bp와 338 bp로, ITS 1이 ITS 2 보다 다소 길었다. 정렬된 총 869 bp 중 501개는 염기서열의 변화가 없었고, 나머지 368개가 염기서열의 변화를 가졌으며 그 중 193개는 계통학적으로 유용한 공유파생형질이었다. 군외군을 포함한 염기변이는 0-39.36%로 도라지-숫잔대가 가장 높았으며, 군내군에서는 0-36.31%로 홍노도라지-도라지가 가장 높은 염기 변이를 보였다. 한편 DNA의 구조 및 물리적 특성을 결정하는 구아닌(G)과 시토신(C)의 함량은 ITS 1이 59.05%, ITS 2가 58.42%, 그리고 5.8S는 54.77%였으며, 전체적으로는 평균 57.81%로 나타났다(Table 4).

계통분석

ITS 염기서열의 최대절약 분석 결과(Fig. 2), 초롱꽃과 식물들은 단계통을 형성하는 것으로 나타났으며 계통수는 크게 5개의 분계조를 형성하였다. 먼저 애기도라지가 가장 기부에 독립적인 분계조를 형성하였고, 더덕속과 도라지속 분류군들이 높은 지지율(BS=99%, PP=1.00)을 가지고 하나의 분계조로 유집되었으며, 초롱꽃속도 단계통을 형성하였다(BS=100%, PP=1.00). 홍노도라지속과 영아자속은 하나의 분계조를 형성하며 초롱꽃속과 잔대속-금강초롱꽃속이 포함된 clade 사이에 위치하였고(BS=93%, PP=1.00), 금강초롱꽃속은 잔대속과 크게 하나의 분계조를 형성하였다(BS=99%, PP=1.00). 더덕속 내에서는 더덕과 소경불알이 높은 지지도로 함께 유집되었으며(BS=96%, PP=

0.97), 초롱꽃속 내에서는 자주꽃방망이가 초롱꽃과 섬초롱꽃이 포함된 clade를 위한 자매군을 형성하였다. 잔대속과 금강초롱꽃속이 포함된 분계조 내에서는 층층잔대절의 층층잔대와 털잔대가 가장 먼저 분지되었다(BS=99%, PP=1.00). 또한 모시대절은 독립적인 clade를 형성하며(BS=76%, PP=0.96) 금강초롱꽃속과 가까운 유연관계를 형성하였고, 수원잔대를 제외한 당잔대절 또한 하나의 분계조를 형성하였다(BS=60%, PP=0.98). 그러나 이를 제외한 나머지 분류군들은 외부형태형질에 따른 절 또는 계열 수준에서의 구분이 명확하지 않았으며, 이러한 유집양상은 Bayesian 분석에서도 같은 경향을 보였다.

고찰

초롱꽃과는 Jussieu (1789)에 의해 처음 과가 설정된 후, 숫잔대과의 통합 여부에 대한 논란이 많이 있어 왔다. 이에 대하여 Yoo (1995)는 한국산 초롱꽃과 식물의 외부형태학, 해부학 그리고 화학학적 연구를 통해 두 과가 공통정보보다는 상이한 점이 더 많아 숫잔대과를 초롱꽃과에 포함시키는 것은 무리라고 언급한 바 있는데, 본 분자계통학적인 연구에서도 초롱꽃과에 속한 분류군들과는 뚜렷하게 구분되어 기존의 연구결과와 일치하는 것으로 나타났다.

속의 분화 과정에 대해 화학학적 측면에서 초롱꽃과 대부분은 공형 발아구를 갖는데 비해 더덕속과 도라지속은 보다 원시적인 형태인 구형 또는 공구형의 발아구를 갖는 것으로 알려져 있고(Avetisian, 1948), 최근에 수행된 분자계통학적 연구(Eddie et al., 2003; Harberle et al., 2009)에서도 더덕속과 도라지속이 군외군으로 부터 가장 먼저 분지되는 것으로 확인되었다. 이러한 양상은 본 연구에서 다룬 PCR-RFLP에 의한 계통수와 일치하는 것이나, ITS분석에서는 애기도라지속이 군내군의 가장 기부에 위치하여 차이를 보였다.

더덕속의 만삼은 더덕과 소경불알을 위한 자매군을 형성하였는데, 이러한 유집 양상은 기존의 RAPD분석(Yoo et al., 1995)이나 외부형태형질분석(Yoo, 1995)에 의한 분계도와 일치하는 것으로 확인되었다. 한편 한라산 근처의 해발 1,100m에만 생육지가 한정되어 있는 애기더덕은 외부형태(Yoo, 1995)와 RAPD 분석(Yoo et al., 1995)에서 각각 더덕 그리고 소경불알과 하나의 분계조를 형성하였으나, 본 연구에서는 이들의 중간 유연관계를 확인하지 못하였으므로 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

애기도라지속은 외부형태(Yoo, 1995)와 RAPD 분석(Yoo et al., 1995)에 의한 연구 결과에서 홍노도라지속과 분계조를 형성했는데, 본 연구에서 다룬 두 가지 분석에서는 독립적인 분계조를 형성하여 차이를 보였다. 그러나 전 세계적으로 약 150종 이상이 분포하는 애기도라지속에 대한 계통을 우리나라에 분포하는 애기도라지 1종만으로 단정 짓기에는 무리가 있을 것으로 생각된다.

Table 4. Characteristics of two internal transcribed spacers (ITS 1 and 2) and the intervening 5.8S region, separate and combined data for 27 taxa of Korean Campanulaceae.

Characters	ITS 1	5.8S	ITS 2	Combined (ITS 1+5.8S+ITS 2)
Length of sequence region(bp)	204-280	161	220-267	588-707
Aligned length	370	161	338	869
No. of variable sites	172	35	161	368
No. of informative sites	97	7	89	193
Sequence distance(%)				
Campanulaceae + outgroup	0-39.36	0-18.63	0-34.64	0-30.55
Within Campanulaceae	0-36.31	0-4.97	0-31.40	0-24.38
G + C content(%)	59.05	54.77	58.42	57.81
Model selected	TrN+G	K80	GTR+G	GTR+G

Fig. 2. Strict consensus tree of the two equally parsimonious trees (588 steps, CI = 0.823, RI = 0.843, RC = 0.694) based on 193 phylogenetically informative changes in ITS sequences of the Korean Campanulaceae. The bootstrap values greater than 50% are below the clades, and the Bayesian posterior probabilities are shown above the clades.

초롱꽃속은 외부형태형질분석에 의한 분계도(Yoo, 1995)에서 자주꽃방망이가 꽃이 위를 향해 피는 특징에 의해 영아자속과 도라지속 사이에 위치하여 단계통을 형성하지 않는 것으로 나타났지만 본 연구에서는 초롱꽃속 분류군들이 독립적인 분계조를 형성하여 기존의 RAPD분석(Yoo et al., 1995)에 의한 결과를 지지하였다.

영아자속은 학자에 따라 주로 유럽에 분포하는 *Phyteuma* 속과 혼동되어 사용되기도 하는데(Yoo, 1995), 최근의 분자계통학적인 연구(Eddie et al., 2003; Roquet et al., 2008; Haberle et al., 2009)에서도 영아자속은 *Phyteuma* 속과 비교적 가까운 유연관계를 형성하여 두 속이 근연임이 뒷받침되었다. 본 연구 결과에서는 영아자속이 아시아와 히말라야

지역에 분포하는 홍노도라지와 분계조를 형성하였다. 그러나 홍노도라지속에 대한 분자계통학적 연구는 거의 전무한 것으로 알려져 있어(Lammers, 2007), 이들의 뚜렷한 계통유연관계를 파악하기 위해서는 영아자속, 홍노도라지속, 그리고 *Phyteuma*속 분류군들을 대상으로 한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

초롱꽃과 중 가장 많은 분류군이 포함되어 있는 잔대속은 엽서와 화반의 형태에 따라 경엽이 호생하고 화반이 배상인 무리를 진퍼리잔대절, 경엽이 윤생하며 화반이 원통상인 무리를 충충잔대절, 경엽이 호생하고 화반이 원통상인 당잔대절, 그리고 엽병이 있으며 영성한 원추화서를 갖는 모시대절로 구분되어 지나(Baranov, 1963; Ponomarchuk, 1971), 생태형들이 분류의 기준으로 채택되어 형태학적 측면에서 이들의 유집이나 종동정의 애매함이 지적된 바 있다(Lee et al., 1988). 한편 최근 광범위한 분류군을 대상으로 한 초롱꽃과의 분자계통학적인 연구(Eddie et al., 2003; Haberle et al., 2009)에서도 초롱꽃과 식물 중 가장 넓은 분포역을 가지는 초롱꽃속 분류군들이 다수 포함되어 있을 뿐, 주로 동아시아에 분포하는 잔대속은 적은 분류군만이 포함되어 있어 이들의 뚜렷한 유연관계를 파악하는 데는 무리가 있다. 본 연구결과 PCR-RFLP 분석에서는 잎이 윤생하는 특징을 가지는 충충잔대절이 하나의 분계조를 형성하였고, ITS 분석에 의한 분계도에서는 충충잔대절의 충충잔대와 털잔대가 잔대속 내에서 가장 먼저 분지되었으며 다음으로는 모시대절이 하나의 분계조를 형성하여 차이를 보였다. 그러나 이와 같이 각각 하나의 분계조를 형성한 충충잔대절과 모시대절 내 분류군들은 계열 간 구분이 불가능하였으며, 잔대속의 나머지 분류군들 또한 병계원적인 유집양상을 보여 외부형태에 의한 절 또는 계열간 구별이 불가능하였다. 이러한 종의 한계에 대한 문제점은 기존의 외부형태에 관한 연구(Lee, 1989)에서도 지적된 바 있는데 잔대속 내 분류군들이 초롱꽃과 식물 중 가장 최근에 분화했다는 사실에 비추어 볼 때(Arano and Saito, 1975), 활발한 종내 분화의 진행으로 인해 외부형태 형질의 변이 정도가 다양한 것으로 생각되므로 잔대속 내 분류군들의 뚜렷한 중간 유연관계를 파악하기 위해서는 변이 정도에 따른 분류군과 개체 수준에서의 다양한 분석이 필요할 것으로 생각된다.

금강초롱꽃속은 취약용예를 가지는 특징으로 *Symphyanandra asiatica*로 발표된 후(Nakai, 1909), *Symphyanandra*속과는 달리 근출엽이 없고, 잎이 줄기 상부에 모여 나는 특징 등에 의해 한국 특산속으로 승격되었다(Nakai, 1911). 하지만 Fedorov (1957)는 초롱꽃과내에서 취약용예라는 특징은 속을 나누는 특별한 형질이 될 수 없다고 주장하며 금강초롱꽃을 유럽에 분포하는 *Symphyanandra*속에 포함시키거나 전 세계적으로 넓은 분포역을 가지는 초롱꽃의 변이품종으로 처리하는 것이 적절하다고 주장하였다. 이에 따라 주로 국내 학자들에 의해 금강초롱꽃속의 정확한 분류학적 위치를 밝히기 위한 많은 연구가 수행되었는데, 그 중 Lee et al. (1996)의 연구

결과에서는 화분 표면에 난선돌기가 융합하고 틈이 발달하는 등 화분학적 특징이 초롱꽃속과 매우 유사하여 독립된 속으로 처리하지 않는 것이 타당하다고 언급하였으며, 외부형태형질을 이용한 연구(Park and Ko, 2000) 결과에서는 두 속이 자매군으로 유집되어 가까운 유연관계를 보였지만 꽃받침과 암술머리에 털의 분포 유무, 그리고 꽃받침 부속지의 존재유무 등의 특징에 의해 뚜렷이 구분된다고 주장하였다. 한편 핵 DNA의 ITS sequence 분석 결과(Kim et al., 1999)에서는 기존의 화분 및 형태학적 연구와는 달리 잔대속의 모시대절과 가깝게 유집되어 본 연구의 ITS 분석에 의한 계통수와 일치하는 것으로 나타났다. 그러나 두 속이 각각 독립적인 분계조를 형성하지 않았을 뿐 만 아니라 PCR-RFLP에 의한 결과에서는 잔대속 분계조 내에 위치하여 독립적인 속으로서의 계통학적 위치를 확인할 수 없었다. 한편 금강초롱꽃속과 *Symphyanandra*속의 3분류군이 포함된 Eddie et al. (2003)과 Haberle et al. (2009)의 연구 결과에서는 각각 잔대속의 *Adenophora*절 그리고 충충잔대절과 가까운 유연관계를 형성하였다. 그러나 이러한 선행연구들은 취약용예라는 특징을 가지는 *Zeugandria*속이 포함되어 있지 않을 뿐 만 아니라, *Symphyanandra*속의 일부 분류군만을 대상으로 수행되었으므로 금강초롱꽃속의 정확한 계통학적 유연관계를 규명하기 위해서는 이러한 분류군들을 포함한 광범위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 분자계통학적인 연구 결과 초롱꽃과 분류군들은 속 수준에서의 구분은 가능하였으나 이를 외부형태분석(Yoo, 1995)에 의한 계통수와 비교하였을 때, 각각의 속이 유집되는 위치에 있어서는 차이를 보였다. 또한 형태적으로 변이가 심하게 나타나는 잔대속의 경우 중간 변이가 나타나지 않아 속 이하 분류체계를 파악하기에는 어려움이 있었다. 따라서 초롱꽃과 식물에 대한 계통유연관계를 명확히 파악하기 위해서는 더 많은 분류군을 대상으로 한 다양한 유전자 분석이 필요할 것으로 생각되며, 절이나 계열 등 속 내 하위 분류군에 대한 연구는 전 세계에 분포하는 많은 집단을 대상으로 한 종합적인 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

사 사

이 연구는 강원대학교 부속 환경연구소의 지원으로 수행되었습니다.

인용문헌

- Arano, H. and H. Saito. 1975. Cytological studies in family Campanulaceae II. Karyotypes in *Adenophora*. Kromosomo 99: 3072-3081.
- Avetisian, E. 1948. Palynologica caucasica III. Pollen of the caucasian representatives of the family Campanulaceae. Trudy Bot. Inst. Akad. Nauk Armjansk. SSR. 5: 199-206.

- Baranov, A. I. 1963. Materials to the monograph of the species of *Adenophora* of N. E. China. Quart. Jour. Taiwan Mus. 16: 143-179.
- Chang, N. K. 1979. Pollen of Korean plant. Seoul Nat. Univ. Press, Seoul.
- de Candolle, A. P. 1830. Monographie des Campanulees. V. Desray, Paris.
- de Candolle, A. P. 1839. Campanulaceae. In Prodrum systematis naturalis regni vegetabilis, Vol. 7. de Candolle, A. P. (eds.), Treuttel and Würtz, Paris. Pp. 492-493.
- Demesure, B., N. Sodzi and R. J. Petit. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. Molec. Ecol. 4: 129-131.
- Doyle J. J. and J. S. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.
- Eddie, W. M. M., T. Shulkin, J. Gaskin, R. C. Haberle and R. K. Jansen. 2003. Phylogeny of Campanulaceae s. str. inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Ann. Missouri Bot. Gard. 90: 554-575.
- Farris, J., V. Albert, M. Källersjö, D. Lipscomb and A. Kluge. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. Cladistics 12: 99-124.
- Fedorov, A. A. 1957. Campanulaceae. In Flora of the U.S.S.R., Vol. 24. Shishkin, B. K. (eds.), Akademia Nauk, Moskva-Leningrad. Pp. 126-450.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 789-791.
- Haberle, R. C., A. Dang, T. Lee, C. Penaflor, H. Cortes-Burns, A. Oestreich, L. Raubeson, N. Cellinese, E. J. Edwards, S. T. Kim, W. M. M. Eddie and R. K. Jansen. 2009. Taxonomic and biogeographic implications of a phylogenetic analysis of the Campanulaceae based on three chloroplast genes. Taxon 58(3): 715-734.
- Hastings, W. K. 1970. Monte carlo sampling methods using markov chains and their applications. Biometrika 57(1): 97-109.
- Hemsley, W. B. 1889. Campanulaceae. In The Journal of the Linnean Society Botany, Vol. 26. Williams and Norgate (eds.), Longmans green and Co., London. Pp. 2-14.
- Hong, D. Y. 1983. Flora reipublicae popularis sinicae. Science Press, Beijing 73(2): 1-144 (in Chinese).
- Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17: 754-755.
- Hutchinson, J. 1959. The families of flowering plants I. Dicotyledons. Clarendon Press, Oxford.
- Jordan, W. C., M. W. Courtney and J. E. Neigel. 1996. Low levels of intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast DNA locus in North American Duckweeds(Lemnaceae). Amer. J. Bot. 83(4): 430-439.
- Jussieu, A. de. 1789. Genera plantarum secundum ordines naturales disposita. Herissant and Barrois, Paris.
- Kim, K. J. and R. K. Jansen. 1994. Comparisons of phylogenetic hypotheses among the different data sets in dwarf dandelion (*Krigia*, Asteraceae): Additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. Pl. Syst. Evol. 190: 157-185.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J. Molec. Evol. 16: 111-120.
- Kim, Y. D., J. K. Lee, Y. B. Suh, S. T. Lee, S. H. Kim and R. K. Jansen. 1999. Molecular evidence for the phylogenetic position of *Hanabusaya asiatica* Nakai(Campanulaceae), an endemic species in Korea. J. Plant Biol. 42(2): 168-173.
- Kitamura, S. 1941. On *Adenophora triphylla* DC. Acta Phyto. Geobot. 10: 305-311 (in Japanese).
- Kress, W. J., K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt and D. H. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 102: 8369-8374.
- Lammers, T. G. 2007. World checklist and bibliography of Campanulaceae. Royal botanic gardens, Kew, Richmond.
- Lee, J. K. 1989. A taxonomic study of the genus *Adenophora* in Korea. M. S. Dissertation. Sungkyunkwan Univ., Seoul (in Korean).
- Lee, J. K. 1997. Taxonomy of *Adenophora* sect. *Remotiflorae* (Campanulaceae). Ph. D. Dissertation. Sungkyunkwan Univ., Seoul (in Korean).
- Lee, J. K. and S. T. Lee. 1990. *Adenophora recemosa*(Campanulaceae), a new species from Korea. Korean J. Pl. Taxon. 20(2): 121-126.
- Lee, S. T., J. K. Lee and S. T. Kim. 1997. A New species of *Adenophora* (Campanulaceae) from Korea. J. Plant Res. 110: 77-80.
- Lee, S. T., Y. J. Chung and J. K. Lee. 1988. A palynotaxonomic study of the Korean Campanulaceae. Korean J. Pl. Taxon. 18(2): 115-131 (in Korean).
- Lee, S. T., Y. J. Chung and J. K. Lee. 1990. A new variety of *Adenophora*, *A. remotiflora* var. *hirticalyx*. Korean J. Pl. Taxon. 20(3): 191-194 (in Korean).
- Lee, S. T., Y. M. An and K. R. Park. 1986. Palynological relationship of *Hanabusaya asiatica* Nakai within the Campanulaceae. Korean J. Pl. Taxon. 16(1): 25-37 (in Korean).
- Lee, T. B. 1984. Endemic and rare plants of Mt. Sorak. Seoul Nat. Univ. Coll. Agric. Res. 9: 1-6.
- Lee, Y. N. 1967. Chromosome numbers of flowering plants in Korea. Jour. Kor. Cult. Res. Inst. 11: 455-477.
- Lee, Y. N. 1968. Chromosome numbers of flowering plants in Korea(2). Jour. Kor. Res. Inst. Better Living 2: 141-153.
- Makino, T. 1909. Observation on the flora of Japan. Bot. Mag. (Tokyo) 23: 21-22.
- Nakai, T. 1909. Plantae novae Asiaticae. Bot. Mag.(Tokyo) 23: 185-192.

- Nakai, T. 1911. Flora Koreana II. Jour. Coll. Sci. Tokyo Univ. 31: 64-68.
- Oh, S. Y. 1981. A review of the family Campanulaceae of Korea. Res. Rev. Kyungpook Nat. Univ. 31: 311-386.
- Park, K. R. and M. S. Ko. 2000. Taxonomic position of *Hanabusaya asiatica* Nakai within Korean Campanulaceae: Phylogenetic analysis using morphological data. J. Basic Sci. Res. Inst. 14: 171-181.
- Ponomarchuk, G. I. 1971. The taxonomy and nomenclature of *Adenophora remotiflora* (S. et. Z.) Miq. Bull. Gl. Bot. Sada. Nauk. SSSR. 79: 57-61.
- Posada, A. D. and K. A. Crandall. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14: 817-818.
- Posada, A. D. and T. R. Buckley. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantage of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. Syst. Biol. 53: 793-808.
- Roquet, C., L. Sàez, J. J. Aldasoro, S. Alfonso, M. L. Alarcón and N. García-Jacas. 2008. Natural delineation, molecular phylogeny and floral evolution in *Campanula*. Syst. Bot. 33(1): 203-217.
- Schnland, S. 1889. Campanulaceae. In Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Teil IV. A. Engler and K. Prantl (eds.), W. Engelmann, Leipzig.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- 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. D. G. M. Innis, J. Sninsky, and T. White (eds.), Academic Press, San Diego, C. A. Pp. 315-322.
- Yoo, K. O. 1989. A taxonomic study of the genus *Codonopsis* in Korea. M. S. Dissertation. Kangwon Nat. Univ., Chuncheon (in Korean).
- Yoo, K. O. 1995. Taxonomic studies on the Korean Campanulaceae. Ph. D. Dissertation. Kangwon Nat. Univ., Chuncheon (in Korean).
- Yoo, K. O., W. T. Lee, N. S. Kim, J. H. Kim and H. T. Lim. 1996. Comparative studies on the *Hanabusaya asiatica* and its allied groups based on randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 37(2): 324-328 (in Korean).