



A systematic study of *Glechoma* L. (Lamiaceae) based on micromorphological characters and nuclear ribosomal ITS sequences

Tae-Soo Jang, Joongku Lee¹ and Suk-Pyo Hong*

Department of Biology & Institute of Basic Sciences, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

(Received 19 July 2013; Revised 17 February 2014; Accepted 3 March 2014)

미세구조학적 형질 및 핵 리보솜 DNA의 ITS 염기서열에 의한 긴병꽃풀속(꿀풀과)의 계통분류학적 연구

장태수 · 이중구¹ · 홍석표*

경희대학교 이과대학 생물학과 및 기초과학연구소, ¹한국생명공학연구원

ABSTRACT: The petal and sepal micromorphology of five species of *Glechoma* (Lamiaceae) was investigated to evaluate their taxonomic significance, and a molecular phylogeny using the sequences of internal transcribed spacers (ITS) regions of nuclear ribosomal DNA was carried out to resolve their phylogenetic relationships. Stomatal complexes were mostly found in the inner and outer part of the sepal from all investigated taxa, and the size length of the guard cell was variable among the taxa. Five types of trichomes (uni-cellular non-glandular trichome, multi-cellular non-glandular trichome, short-stalked capitate glandular trichome, long-stalked capitate glandular trichome, and peltate glandular trichome) were variable among the taxa as well as their distribution and density. In molecular phylogenetic studies, the genus *Glechoma* was composed of three geographically distinct major monophyletic groups (Europe-U.S.A., China-Korea, Japan). *G. longituba* in Korea and China formed well-supported monophyletic group. *G. hederacea* in Europe and U.S.A. formed a monophyletic and well-supported clade with *G. sardoa*, which are endemic species in Italy, with *G. hirsuta* falling as a sister to this clade. However, *G. grandis* did not form any phylogenetic relationships with the remaining taxa. The ITS analyses provided taxonomic boundaries of taxa in *Glechoma* although the petal and sepal micromorphological characters provided weak evidences of the systematic value. As further studies, incorporating more DNA regions to the matrix including other additional morphological analysis will be significant to provide clearer taxonomic structure in *Glechoma*.

Keywords: *Glechoma*, Lamiaceae, petal and sepal micromorphology, nrITS, molecular systematics

적 요: 꿀풀과에 속하는 긴병꽃풀속(*Glechoma*)내 5종에 대한 화판과 악편의 미세 구조를 관찰하여 기재하고 그 분류학적 유용성을 판단하였으며, 분자계통학적 유연관계를 확인하기 위하여 핵 리보솜 DNA의 ITS 염기서열에 기초한 연구를 수행하였다. 기공복합체는 조사된 모든 분류군의 악편에서 분포하였으며, 공변세포의 길이는 분류군마다 다소 차이를 보였다. 긴병꽃풀속 분류군들의 화판과 악에 분포하는 모용은 5 종류(단세포 비선모, 다세포 비선모, 짧은 자루 두상 선모, 긴 자루 두상 선모, 방패형 선모)로 나타났으며, 모용의 종류, 분포, 밀도가 분류군마다 다르게 나타났다. 핵 리보솜 DNA의 ITS 염기서열에 의한 분자계통학적 연구 결과 긴병꽃풀속은 분포지역에 따라 3개의 분계조(유럽-미국, 중국-한국, 일본)로 분리되었다. 한국과 중국에 분포하는 *G. longituba*는 단계

*Author for correspondence: sphong@khu.ac.kr

<http://www.pltaxa.or.kr>

Copyright © 2014 the Korean Society of Plant Taxonomists

통군을 이루었고, 이탈리아의 특산종인 *G. sardoa*와 미국 및 유럽에 분포하는 *G. hederacea*는 단계통군을 형성하였다. *G. hirsuta*는 유럽의 분계조와 자매군 관계를 이루었으나, 일본에 분포하는 *G. grandis*는 나머지 분류군들의 상호 유연관계에서 통계적 지지를 얻지 못하였다. 본 연구 결과에서 긴병꽃풀속내의 중간 한계 설정에 있어 화관 및 악의 미세형태형질의 연구보다 핵 리보솜 DNA의 ITS 염기서열에 기초한 분자 계통학적인 연구가 유용한 방법임이 판명되었다. 그러나 구체적인 본 속내 계통 분류학적인 논의를 위해서는 외부 형태학적 형질에 대한 분석을 동시에 수행할 필요가 있으며, 계통학적 유용성이 보다 높은 DNA 구간을 추가로 분석할 필요가 있다.

주요어: 긴병꽃풀속, 꿀풀과, 화관 및 악편 미세구조, nrITS 염기서열, 분자계통분류

꿀풀과(Lamiaceae Martinov)는 경제적으로 중요한 식물군으로 7개의 아과[Ajugoideae Kostel., Lamioideae Harley, Nepetoideae (Dumort.) Luerss., Prostantheroideae Luerss., Scutellarioideae (Dumort.) Caruel, Symphorematoideae Briq., Viticoideae Briq.]를 포함하고 약 240여 속, 7200여 종 이상이 전 세계적으로 분포하고 있다(Harley et al., 2004). 그 중 Nepetoideae아과는 육구형 및 삼핵성의 화분, 점액성과피의 특성을 나타내며(Erdtman, 1945; Ryding, 1992), 분자분류학적 연구(*rbcL* 염기서열 분석, cpDNA의 제한 효소 변이, 핵 리보솜 DNA의 ITS구간에 대한 염기서열 분석)에 의해 단계통으로 나타났다(Wagstaff et al., 1995; Wagstaff and Olmstead, 1997). Cantino et al. (1992)은 Nepetoideae아과의 세부적인 분류체계를 네 개의 족[Elsholtzieae (Burnett) Sanders & Cantino, Lavanduleae (Endl.) Boiss., Mentheae Dumort., Ocimeae Dumort.]으로 인정하였으나, Harley et al. (2004)은 Ocimeae족내로 Lavanduleae족을 포함시켜 세 개의 족을 제시하였다. 그 중 세 개의 아족[Menthinae (Dumort.) Endl., Nepetinae (Dumortier) Coss. & Germ., Salviinae (Dumort.) Endl.]으로 구성되는 Mentheae족은 형태학적 및 분자계통학적으로 활발한 연구가 이루어지고 있다(Trusty et al., 2004; Moon et al., 2010; Bruchler et al., 2010).

긴병꽃풀속(*Glechoma* L.)은 Nepetinae아족에 포함되며 관상용 및 약용의 가치가 높은 식물군으로 약 8여종이 아시아와 유럽 전반에 분포하며 남미와 북미에는 도입되어 존재한다(Meusel et al., 1978; Li and Hedge, 1994; Bllmann and Scholler, 2004; Jang, 2008). 긴병꽃풀속은 중간 잡종(Govaerts et al., 2014)과 염색체 배수화 현상이 빈번하게 보고된 바 있으며(Zukowski and Slowinska, 1979; Dobe et al., 1997; Jang, 2008; Miura and Iwatsubo, 2010), 넓은 지리적 분포와 서식지에 따른 다양한 형태적 특징 때문에 종의 동정이 매우 어려운 분류군으로 알려져 있다(Meusel et al., 1978; Bllmann and Scholler, 2004; Jang and Hong, 2010a, b).

긴병꽃풀속 분류군은 다년생 초본으로, 줄기는 사각형이며 잎은 심장형으로 대생한다. 악은 통형에서 종형이며, 화관은 종형으로 윗부분이 팽대하고 가장자리는 입술모양이다. 본 속은 악이 열리는 각도가 90°에서 두 갈래로 분지하며 포복경을 가지고 2-6개의 꽃이 엽액에 달리는 특징에 의해 Nepetinae아족 내 다른 속들과 구별할 수 있다

(Harley et al., 2004). 본 속내 분류군들은 외부 형태적으로 유사하고 분류학적 진단형질이 생식 및 영양형질의 크기에만 국한되어 중간 한계를 설정하는데 많은 어려움이 있다(Pojarkova, 1954; Li and Hedge, 1994; Jang, 2008). 본 속내 분류군에 대한 진단형질은 화관과 악편의 길이, 모양 및 비율, 잎의 모양, 그리고 식물체 전체 모양의 밀도에 따라 각기 다른 종으로 취급하여 정리하고 있으나(Li and Hedge, 1994), 정량적 및 정성적인 형질의 광범위한 중첩성 때문에 동정의 혼란 및 종의 한계 설정에 어려울 뿐만 아니라 학명에 대한 이견 또한 다양하게 존재한다(Li and Hedge, 1994; Usai et al., 2003; Jang, 2008).

G. hederacea L.는 유럽 및 중앙아시아에 널리 분포하며 남미와 북미에 도입되어 나타난다. *G. hirsuta* Waldst. & Kit.는 유럽의 남반구에 제한되어 분포하는 것으로 알려져 있으며(Pojarkova, 1954; Meusel et al., 1978; Li and Hedge, 1994; Bllmann and Scholler, 2004; Jang, 2008), *G. sardoa* (Bég.) Bég.는 이탈리아의 Sardinia 지역과 Corsica 지역에 제한되어 분포하는 고유종이나(Ballero et al., 1997; Usai et al., 2003), 외부형태학적으로 *G. hederacea*와 매우 유사하여 학자에 따라 이명 혹은 종이하 분류군[*G. hederacea* subsp. *sardoa* (Bég.) Soó]으로 처리되기도 한다(Tutin et al., 1972). 중국에는 모두 5종[*G. biondiana* (Diels) C. Y. Wu & C. Chen, *G. grandis* (A. Gray) Kuprian., *G. hederacea*, *G. longituba* (Nakai) Kuprian., *G. sinograndis* C. Y. Wu]이 분포하며, 그 중 식물체 전체에 털이 밀집하고, 악편의 모양이 삼각형을 보이는지(*G. biondiana*), 혹은 삼각상 창형을 보이는가(*G. sinograndis*)에 따라서 중국의 고유종으로 분리되어진다(Li and Hedge, 1994). 중국의 두 고유종(*G. biondiana*, *G. sinograndis*)은 아시아 전반에 분포하고 있는 *G. longituba*와 외부 형태학적 및 화분학적으로 매우 유사하여 종의 한계 설정이 모호하다(Jang, 2008; Jang and Hong, 2010b). 일본에는 *G. grandis* 한 종이 분포하는 것으로 알려져 있으나, 학자에 따라 종 이하 계급으로 정리되기도 한다(*G. hederacea* L. subsp. *grandis* (A. Gray) H. Hara; Murata and Yamazaki, 1993). 한국에 분포하는 긴병꽃풀은 학자에 따라 *G. longituba* (*G. hederacea* var. *longituba*), 또는 *G. grandis* (*G. hederacea* subsp. *grandis*)로 인식되기도 한다(Lee, 2003; Lee, 2006; Suh, 2007; Jang, 2008).

핵 리보솜 DNA의 ITS 염기서열(nrITS)은 고등식물의 속

간, 혹은 매우 근연인 종간의 계통 유연관계를 파악하는데 중요한 자료로 이용되어 왔으며(Baldwin et al., 1995; Gadek et al., 1996), 경제식물로서 중요한 꿀풀과 식물에 관한 활발한 연구가 이루어지고 있다(Steane et al., 1999; Ruiz et al., 2001; Zhong et al., 2010). 최근 *Mentheae*속 및 *Menthinae*아속에 관한 분자계통학적 연구에서 *G. hederacea*가 내군 및 외군으로 포함된 바 있으나(Moon et al., 2010; Bruchler et al., 2010), 본 속내 종간의 유연관계에 대한 분자계통학적 연구는 아직까지 시도된 바가 없다.

식물의 미세 형태 중, 화피의 미세구조는 수분 매개체와의 진화적 상관관계 규명에 중요한 형질로, 피자 식물군에서 분류학적 유연관계 규명에도 많은 연구가 활발하게 진행되고 있다(Hong et al., 1998; Moon and Hong, 2004; Ojeda et al., 2009; Barone Lumaga et al., 2012). 최근 긴병꽃풀속과 근연 분류군에 대한 잎 표피 미세구조학적 연구(Jang and Hong, 2007), 소견과의 외부 형태 및 미세 형태에 관한 연구(Jang and Hong, 2010a), 화분학적인 연구(Jang and Hong, 2010b)가 진행되었으나 본 속내 종간의 한계 설정은 여전히 모호하다.

따라서 본 연구의 주요 목적은 긴병꽃풀속내 분류군의 한계가 다소 명확하다고 판단되는 총 5종(*G. grandis*, *G. hederacea*, *G. hirsuta*, *G. longituba*, *G. sardoa*)를 대상으로 핵 리보솜 DNA의 ITS 구간의 염기서열을 비교하여 종간 계통 유연관계를 분석하고, 주사전자현미경(SEM: Scanning Electron Microscope)을 통한 화판과 악편의 미세형태 구조를 관찰하고 기재하여 분류군간의 식별형질로서의 가치를 파악하고자 한다.

재료 및 방법

재료: 긴병꽃풀 속내 총 5종(9개체)에 대한 핵 리보솜 DNA의 ITS 염기서열 결정을 수행하기 위해 사용된 DNA

시료는 한국, 중국, 유럽 등지에서 직접 채집하거나 국내외 표본관에 소장된 표본에서 절취한 잎으로부터 각각 추출하였다(Table 1; Holmgren and Holmgren, 1998). 중국의 고유종인 *G. biondiana*와 *G. sinograndis*의 경우 종간 한계설정이 불명확하며, 외부형태학 및 화분학적으로 *G. longituba*와 거의 유사하다고 보고되었다(Jang, 2008; Jang and Hong, 2010b). 또한, 표본 자료가 너무 오래 되었고, 식물체 전체가 표본 대지에 완전하게 접촉되어 DNA 추출을 위한 수집 자체가 불가능하여 본 연구에서는 배제되었다. 외군은 외부 형태적 특징에 의해 긴병꽃풀속과 가장 근연이라고 알려진 *Marmoritis* Benth.속내 2종(*M. complanata*, *M. decolorans*)으로 선정하였다(Hedge, 1990).

화판 및 악편 미세구조의 관찰: 화판과 악편의 형태 및 모양의 분포는, 석엽표본으로부터 각 분류군마다 가능한 여러 집단(1-6개체)을 선정하여 해부현미경으로 관찰하였으며(Appendix I), 성숙한 화판 및 악편을 채취한 후, 연화제(water : agepon solution = 20 : 1)에 넣어 24시간 이상 담가 조직을 부드럽게 한 후, 다시 FAA (formaldehyde - acetic acid - ethanol)에 고정하였다. 이 후 아세톤시리즈(acetone series: 50%, 70%, 90%, 100%에서 각 약 30분-1시간 정도 보관)를 거쳐 탈수한 후, 이산화탄소(CO₂ gas)를 이용한 임계점 건조 처리(critical point drying; JEOL, SPI-13200J-AB, Japan)로 완전히 건조시켰다. 건조된 시료는 알루미늄 스틱(aluminum stub) 위에 올린 다음 이온증착기(ion-sputter; JEOL, JFC-1100, Japan)를 이용하여 백금(Pt)으로 이온증착하고, 주사전자현미경(SEM; JEOL, JSM-5200, Japan)으로 가속전력 20kV에서 관찰하고 사진 촬영하였다. 화판 및 악편에 분포하는 기공복합체의 수가 많지 않은 관계로, 크기 및 형태는 3개를 최소단위로 측정하였다.

DNA추출: DNA추출은 엽병 및 주맥을 제외한 부분을 막자사발에 넣고 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)를 사용하였으며, 모든 과정은 안내서(DNeasy

Table 1. Collections examined in the molecular phylogenetic study of the genus *Glechoma*.

Taxon	Locality and voucher information	GenBank accession number
<i>G. grandis</i> (A. Gray) Kuprian.	Japan, Hashimoto s.n. (UPS)	GQ456141
<i>G. hederacea</i> L. 1	Poland, Gugnacka s.n. (UPS)	GQ456142
<i>G. hederacea</i> L. 2	U.S.A. Gaylon s.n. (GH)	GQ456143
<i>G. hederacea</i> L. 3	Russia, Elias et al. 6920 (US)	GQ456144
<i>G. longituba</i> (Nakai) Kuprian. 1	China, Liu 15286 (UPS)	GQ456145
<i>G. longituba</i> (Nakai) Kuprian. 2	Korea, Jang 415 (KHUS)	GQ456146
<i>G. longituba</i> (Nakai) Kuprian. 3	Korea, Jang 5071 (KHUS)	GQ456147
<i>G. hirsuta</i> Waldst. & Kit.	Austria, Delessert s.n. (G)	GQ456148
<i>G. sardoa</i> (Bég.) Bég.	Italy, Segelberg s.n. (S)	GQ456149
<i>Marmoritis complanata</i> (Dunn) A. L. Budantzev	China, Boufford 29239 (GH)	GQ456150
<i>M. decolorans</i> (Hemsl.) H. W. Li	Nepal, Stainton 5563 (E)	GQ456151

Table 2. Size and G + C contents of ITS 1, ITS 2, and 5.8S regions of nrDNA in *Glechoma*.

Taxon	Length, bp (G + C%)		
	ITS 1	5.8S	ITS2
<i>G. grandis</i>	242 (64.46)	155 (55.48)	209 (65.07)
<i>G. hederacea 1</i>	241 (65.56)	155 (56.77)	210 (66.67)
<i>G. hederacea 2</i>	241 (65.56)	155 (56.77)	210 (66.67)
<i>G. hederacea 3</i>	241 (65.56)	155 (56.77)	210 (66.67)
<i>G. longituba 1</i>	241 (65.98)	155 (56.77)	210 (67.14)
<i>G. longituba 2</i>	241 (65.56)	155 (56.77)	210 (67.14)
<i>G. longituba 3</i>	241 (65.56)	155 (56.77)	210 (67.14)
<i>G. hirsuta</i>	241 (65.56)	155 (56.77)	209 (66.99)
<i>G. sardoa</i>	241 (65.15)	155 (56.77)	210 (66.67)

Plant Mini Handbook, 1996; QIAGEN, Germany)를 따라 수행하였다. 추출한 DNA는 일부를 1.5% agarose gel에 전기영동한 뒤 ethidiumbromide (EtBr)로 염색한 후, UV 조명하에서 밴드를 확인하고 Nanophotometer를 이용하여 농도를 확인하였다.

PCR에 의한 핵 리보솜 DNA의 ITS 증폭: 핵 리보솜 DNA의 ITS부위의 증폭을 위한 PCR은 HL premix (Bioneer, Dae-Jeon)를 사용하였고, PCR 조건은 97°C에서 1분간 pre-denaturation시킨 이후 97°C에서 10초간 denaturation, 48°C에서 30초간의 annealing, 72°C에서 20초간 extension하였으며, extension시간은 첫 회 이후 cycle당 4초씩 증가시켜 40회 반복 한 후 72°C에서 7분간 더 유지시켰다.

염기서열의 정렬 및 자료 분석: 핵 리보솜 DNA의 ITS 염기서열(partial 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, and partial 25S rRNA gene)은 보편적인 ITS 1과 ITS 4 primers에 의해 증폭되어 도출되었다(Lee et al., 2002). 염기서열 분석은 Clustal X program (Thompson et al., 1997)을 이용하여 실행한 후 육안으로 세부정렬을 최종적으로 확인하였다. 정렬한 염기서열은 PAUP* (Swofford, 2002) 프로그램을 이용하여 분자계통수를 도출하였고, G + C 염기조성을 비교하였다(Table 2). 또한 형질에 있어서 가중치는 모두 동일하게 처리하였고, 전체 염기서열 중 gap은 모두 결여형질(missing character)로 처리하였으며, 정렬된 염기서열의 모든 형질은 'unordered', 'unweighted'로 설정하였다. Heuristic search 방법을 이용하여 최대절약 분석(maximum parsimony analysis)을 하였으며, 이에 따른 option으로는 ACCTRAN, 'TBR' branch swapping, 'MULPARS'으로 최적화하였다. 또한 계통수의 각 분계군(clade)의 신뢰도를 평가하기 위한 부트스트랩 값은 파시모니 분석 방법을 통해 구해졌고(Felsenstein, 1985), Kimura's two-parameter method (Kimura, 1980)로 계산된 염기변이 값을 기초로 한 Neighbor-joining tree (NJ)를 산출하였다(Saitou and Nei, 1987; Farris et al., 1996).

결과 및 고찰

화판 및 악의 미세구조: 긴병꽃풀속에 해당되는 5종에 대하여 화판 및 악의 미세구조학적 형질을 관찰하였으며, 그 결과를 Table 3과 Fig. 1에 제시하였다.

기공복합체(stomatal complex)는 조사된 모든 분류군의 악의 안쪽면과 바깥면에서 분포하였으며, 공변세포의 길이는 22.61-35.68 μm , 폭 10.53-25.82 μm 로 분류군마다 다소 차이를 보였으나, 크기에 대한 변이는 분류군간 중첩되어 분류학적 유연관계를 증명하기에는 미비하였다(Table 3). 조사된 모든 분류군에서 기공복합체의 크기를 제외하고는 형태 및 분포의 차이는 관찰되어지지 않았다(Fig. 1). 일반적으로 피자식물의 잎에서 기공복합체의 크기는 대부분 분류군의 서식지 환경에 의한 변이로 판단되거나 혹은 다배체 현상과 관련이 있는 것으로 보고되었으나(Aryavand et al., 2003; Beck et al., 2003), 화판 및 악편에 존재하는 기공 복합체의 크기는 대부분 기능이 없거나(Fahn, 1979), 꿀을 분비하는 기능과 연관이 있는 것으로 추측되어진다(Bernardello, 2007; Almeida et al., 2013).

조사된 모든 분류군의 화판의 안쪽 및 바깥쪽의 표피세포의 형태는 유두상(papilate)이며, 각피층이 잘 발달되어 있었고(Fig. 1F), 중간 부분은 다각형의 세포(polygonal cell)가 연결되어 나타나며(Fig. 1G), 하단 부분의 세포구조는 직사각형(rectangular)이었다(Fig. 1H). 악의 표피세포 형태는 안쪽면과 바깥쪽 모두 퍼즐형의 세포들로 구성되어 있었으며(Fig. 1P), 이러한 화판과 악의 세포 구조는 모든 분류군에서 동일하게 나타났다(Table 3; Fig. 1). 일반적으로 충매화에서 화판과 악의 세포 표면에 잘 발달된 표피상납질이 나타나며, 이는 수분 매개자에 의한 세포의 손상을 막고, 빛의 포획을 돕는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Gale and Owens, 1983).

모용(비선모: non-glandular trichome와 선모: glandular trichome)은 단세포 비선모(uni-cellular non-glandular trichome; Fig. 1C-D, I, S), 다세포 비선모(multi-cellular non-glandular trichome; Fig. 1A-B, J), 짧은 자루 두상 선모(short-stalked capitate glandular trichome; Fig. 1K, O), 긴 자루 두상 선모(long-stalked glandular trichome; Fig. T), 방패형 선모(peltate glandular trichome; Fig. 1R)등 모두 5 종류가 관찰되었다(Table 3). 단세포 비선모와 다세포 비선모는 모든 분류군의 화판 안쪽 면에 밀집하여 분포하였으나(Fig. 1C, D, I), *G. longituba*와 *G. hirsuta*의 화판 바깥 면에서는 다세포 비선모가 관찰되어지지 않았다(Table 3). 선모의 경우 두상 선모는 *G. sardoa*의 화판의 안쪽 및 바깥 면에서 관찰되었으나(Table 3), 모든 분류군의 악에서는 방패형 선모를 포함한 모든 선모가 산재되어 분포하여 종내 진단형질로써의 가치는 보여주지 않았다(Table 3).

염기서열 및 염기변이 분석: 긴병꽃풀속 핵 리보솜 DNA의 ITS 1과 ITS 2, 5.8S의 염기서열 길이와 G + C 염기

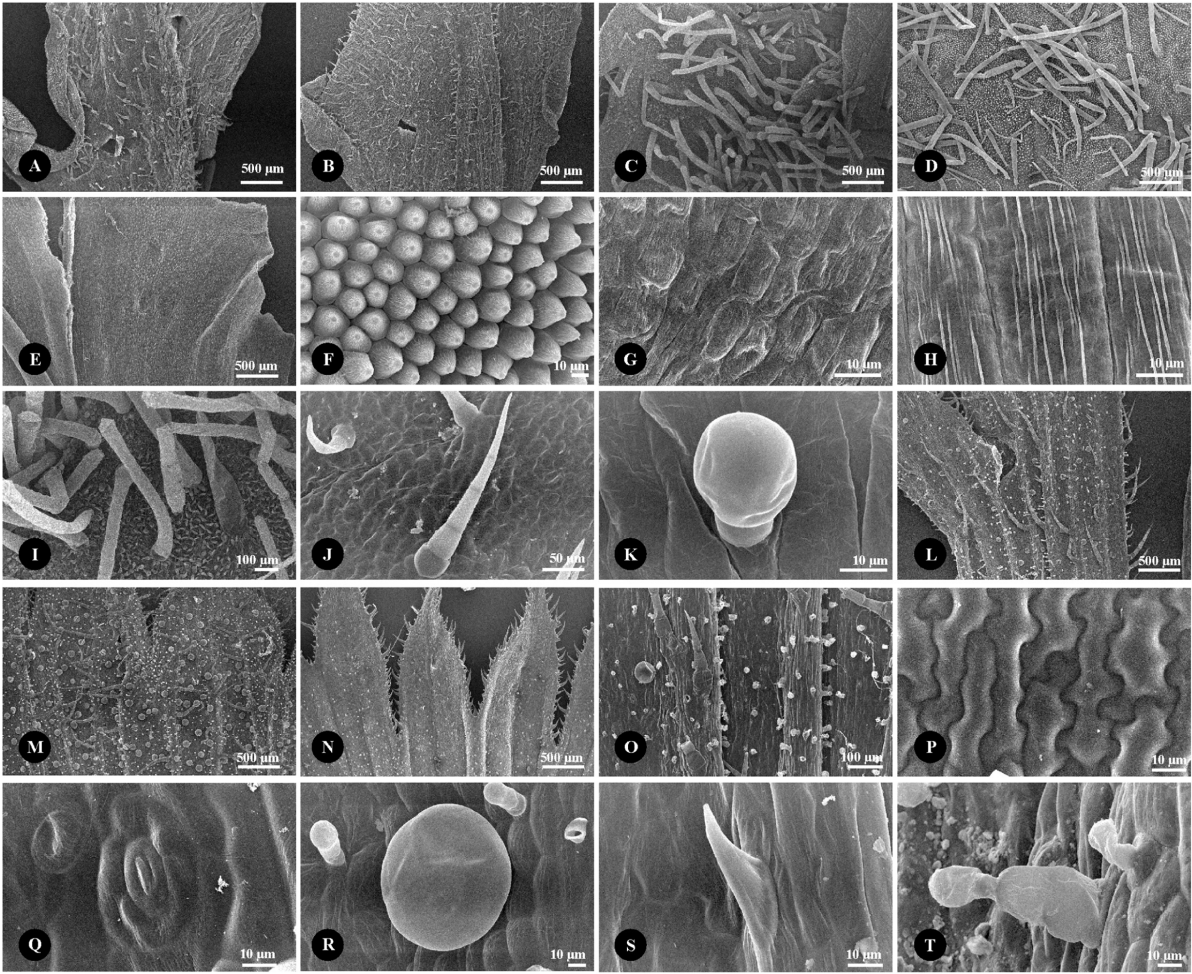


Fig. 1. Scanning electron microscopy (SEM) images of petal and sepal surface in *Glechoma*. A: *G. hederacea* (Jeppesen 286), B: *G. grandis* (Hashimoto s.n.), C: *G. hirsuta* (Richer 678), D: *G. longituba* (Jang 514), E: *G. longituba* (Liu 15286), F: *G. longituba* (Jang 514), G: *G. grandis* (Hashimoto s.n.), H: *G. sardoa* (Segelberg s.n.), I: *G. hirsuta* (Richer 678), J: *G. longituba* (Jang 514), K: *G. sardoa* (Segelberg s.n.), L: *G. longituba* (Jang 514), M: *G. sardoa* (Segelberg s.n.), N: *G. longituba* (Jang 514), O: *G. grandis* (Hashimoto s.n.), P: *G. hederacea* (Jeppesen 286), Q: *G. longituba* (Jang 514), R: *G. sardoa* (Segelberg s.n.), S: *G. grandis* (Hashimoto s.n.), T: *G. hirsuta* (Richer 678). A-B: outer side of petal, C-H: inner side of petal, L-M: outer side of sepal, O-T: inner side of sepal. C-D, I, S: uni-cellular non-glandular trichomes, J: multi-cellular non-glandular trichome, K: short-stalked capitate glandular trichome, R: peltate glandular trichome, T: long-stalked glandular trichome.

Table 3. Comparative sepal and petal micromorphology in *Glechoma*.

Taxon			Guard cell size (μm)		NGT			GT		Surface cells	Voucher information
			L: min(mean)max	W: min(mean)max	U	M	S	L	P		
<i>G. grandis</i>	sepal	i	27.32(31.33)35.68	18.36(21.03)23.74	+	+	+	-	-	puzzle shape	<i>Hashimoto s.n.</i> (UPS)
		o	29.34(30.52)31.37	20.89(21.88)23.08	-	+	+	-	+	puzzle shape	
	petal	i	-	-	+	+	-	-	-	pap, poly, rect	
		o	-	-	+	+	+	-	-	pap, poly, rect	
<i>G. hederacea</i>	sepal	i	22.61(25.05)27.78	18.66(19.28)21.08	+	-	+	-	-	puzzle shape	<i>Jeppesen 286</i> (US)
		o	25.96(26.95)28.65	14.84(15.82)16.70	-	+	+	-	+	puzzle shape	
	petal	i	-	-	+	+	-	-	-	pap, poly, rect	
		o	-	-	+	+	+	-	-	pap, poly, rect	

Table 3. Continued.

Taxon			Guard cell size (μm)		NGT			GT		Surface cells	Voucher information
			L: min(mean)max	W: min(mean)max	U	M	S	L	P		
<i>G. longituba</i>	sepal	i	30.11(30.78)31.25	20.18(21.31)22.63	-	-	+	-	-	puzzle shape	<i>Jang 514</i> (KHUS)
		o	26.90(29.86)32.85	19.47(21.20)23.97	-	+	+	-	+	puzzle shape	
	petal	i	-	-	+	+	-	-	-	pap, poly, rect	
		o	-	-	-	+	+	-	+	pap, poly, rect	
<i>G. hirsuta</i>	sepal	i	23.48(26.86)29.26	15.45(17.90)20.02	+	-	+	-	-	puzzle shape	<i>Richer 678</i> (UPS)
		o	27.26(32.63)35.43	19.86(21.97)25.82	+	+	+	+	+	puzzle shape	
	petal	i	-	-	+	+	-	-	-	pap, poly, rect	
		o	-	-	-	+	+	-	-	pap, poly, rect	
<i>G. sardoa</i>	sepal	i	25.98(28.74)30.71	18.44(19.51)20.78	+	+	+	-	-	puzzle shape	<i>Segelberg s.n.</i> (S)
		o	18.03(26.15)31.46	10.53(20.38)25.18	+	+	+	-	+	puzzle shape	
	petal	i	-	-	+	+	+	-	-	pap, poly, rect	
		o	-	-	+	+	+	+	+	pap, poly, rect	

List of abbreviations: i, inner side; o, outer side; NGT, non-glandular trichome (U, uni-cellular trichome; M, multi-cellular trichome); GT, glandular trichome (S, short-stalked capitate glandular trichome; L, long-stalked capitate glandular trichome; P, peltate glandular trichome); pap, papillate; poly, polygonal; rect, rectangular.

Table 4. Pairwise sequence divergence value (100) of nrITS regions among the investigated taxa of *Glechoma* based on Kimura's two parameter method.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>Glechoma grandis</i>	-								
2. <i>G. hederacea</i> 1	2.69	-							
3. <i>G. hederacea</i> 2	2.69	0.00	-						
4. <i>G. hederacea</i> 3	2.69	0.00	0.00	-					
5. <i>G. hirsuta</i>	2.52	0.50	0.50	0.50	-				
6. <i>G. longituba</i> 1	3.22	2.02	2.02	2.02	1.85	-			
7. <i>G. longituba</i> 2	3.05	1.68	1.68	1.68	1.51	0.17	-		
8. <i>G. longituba</i> 3	2.71	1.51	1.51	1.51	1.34	0.17	0.33	-	
9. <i>G. sardoa</i>	2.70	0.00	0.00	0.00	0.50	2.02	1.68	1.51	-

조성은 Table 2에 정리하였다. 외군(outgroup)을 제외한 분류군간 ITS길이는 ITS 1과 2 부분이 각각 241-242 bp, 209-210 bp이었으며, 5.8S 부분을 포함한 ITS 구간의 전체 길이는 604-606 bp로 나타나 다른 현화식물에서 보고된 결과 (ITS 1, 187-298; ITS 2, 187-240)와 유사하였다(Baldwin et al., 1995). 연구된 분류군들의 G+C 염기조성은 ITS 1부분이 64.46-65.98%, ITS 2부분은 65.07-67.14%로 ITS 2부분이 ITS 1부분보다 높은 G+C 염기조성을 보였으며, 5.8S의 경우 55.48-56.77%로 ITS 1, ITS 2부분에 비해 낮은 것으로 나타났다(Table 2). 정렬된 염기서열 617 bp중 계통학적 분석에 유용한 정보는 55개였다. 분류군간 유전적 거리(pairwise distance)를 계산한 결과는 외군을 제외한 긴병꽃풀속 내 분류군 간에는 0.00-3.22%의 유전적 거리를 보였다(Table 4).

계통학적 분석: 핵 리보솜 DNA의 ITS 염기서열의 파시모니 분석 결과 2개의 가장 짧은 계통수를 얻었으며, CI (consistency index)는 0.9314, RI (retention index)는 0.9103, RC (rescaled consistency index)는 0.8478을 나타내었다. 분류군간 strict consensus tree에서 긴병꽃풀속 내에서는 3개의 분계조(유럽-미국, 일본, 한국-중국)로 구분 지을 수 있었다. 한국과 중국에 분포하는 *G. longituba*는 89%의 부트스트랩 값으로 단계통군을 형성하였으며, 유럽에 분포하는 *G. sardoa*와 미국 및 유럽에 분포하는 *G. hederacea*는 91%의 부트스트랩 값으로 단계통군을 형성하였다(Fig. 2). 북미에 광범위하게 도입되어 분포하는 *G. hederacea*의 개체는 핵 리보솜 DNA의 ITS 지역에서 유럽에 분포하는 종과 유전적 차이를 보여주지 않았으며, 19세기 이후에

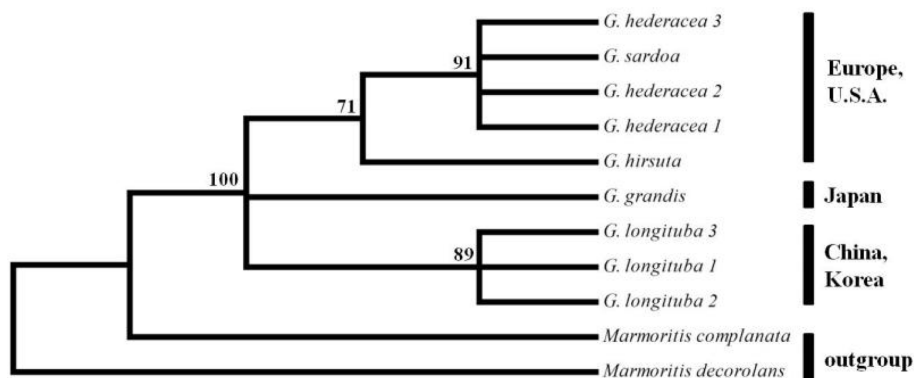


Fig. 2. Strict consensus tree from maximum parsimony analysis of *Glechoma* based on nrITS data (CI = 0.9314, RI = 0.9103). The numbers above branches are bootstrap values.

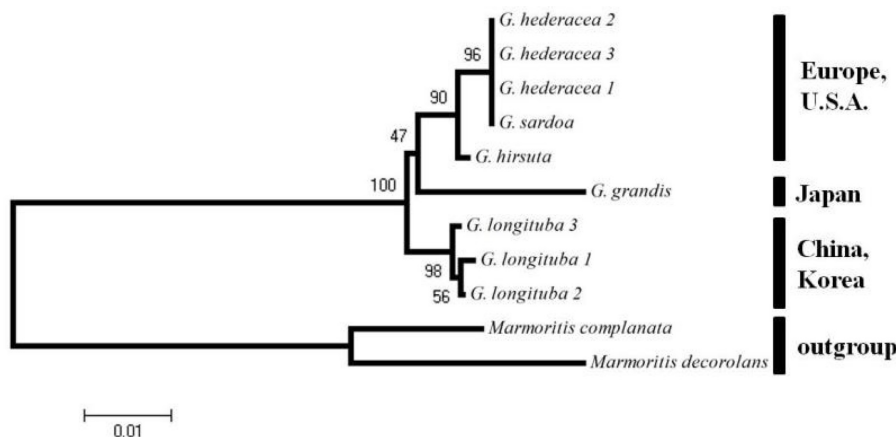


Fig. 3. Neighbor-Joining (NJ) tree of *Glechoma* based on nrITS sequences. The numbers above branches are bootstrap values.

유럽에서 북미지역으로 빠르게 확산된 것으로 추정하고 있다(Billmann and Scholler, 2004). 이는 긴병꽃풀속 분류군들이 포복경을 가지고 무성 생식으로 빠르게 번식하는 특이성으로 인하여 유전적인 차이를 보이는 지리적 변이가 나타나지 않은 것으로 판단되나 추가적인 연구에 의해 확인되어야 할 필요가 있다. 한편, 이탈리아의 고유종으로 기록되어있는 *G. sardoa*는 핵 리보솜 DNA의 ITS 염기서열이 *G. hederacea*와 일치하였으나, 화관 및 악에 존재하는 선모와 방패형 선모의 밀도가 긴병꽃풀속내 다른 분류군에 비해 밀집되어 나타나는 것으로 확인되었다(Table 3; Fig. 1M). 이는 이탈리아의 Sardinia 지역과 Corsica 지역에 제한되어 분포하는 생태적인 변이에 의한 결과로 생각된다(Ballero et al., 1997; Usai et al., 2003). 또한 *G. hirsuta*는 71%의 지지도로 유럽의 분계조와 자매군 관계를 이루었으나, 일본에 분포하는 *G. grandis*는 나머지 분류군들의 상호 유연관계에서 통계적 지지를 얻지 못하였다(Fig. 2). 유럽·미국의 분계조에 속하는 *G. hirsuta*의 경우 식물 전체에 털이 밀생하고, 악편의 갈라짐 정도가 *G. hederacea*에 비해 길다는 차이가 있다(Pojarkova, 1954; Jang and Hong, pers.

obs.). 비록 잎 표피 미세구조학적 형질(Jang and Hong, 2007), 소견과의 형태학적 형질(Jang and Hong, 2010a), 화분학적 형질(Jang and Hong, 2010b)등이 긴병꽃풀속 내에서 중간 큰 차이를 나타내지 않았으나, 핵 리보솜 DNA의 ITS 염기서열에 의하면 71%의 부트스트랩 값으로 *G. hirsuta*는 *G. hederacea*와는 다른 독립된 분류군임을 지지해 주었다(Fig. 2). 한편 염기변이에 기초한 Neighbor-joining tree (NJ)분석 결과 얻은 계통수는 Fig. 2과 유사한 결과를 얻었다(Fig. 3).

한국산 긴병꽃풀은 악편의 길이 및 갈라짐 정도, 화관의 길이 및 모용의 분포 밀도에 따라서 종이하 분류군으로 인식되기도 하며(Nakai, 1921; Lee, 2003; Lee, 2006; Jang, 2008), *G. longituba* (Li and Hedge, 1994), 또는 *G. grandis*로 인식되거나(Suh, 2007), 동종으로 통합기도 한다(Murata and Yamazaki, 1993). 핵 리보솜 DNA의 ITS 염기서열의 결과에서 한국산 긴병꽃풀은 중국산 *G. longituba*와 함께 89%의 부트스트랩 값을 갖는 단계통군을 이루며 일본의 *G. grandis*와는 분리되어 나타났다(Figs. 2-3). 따라서 한국산 긴병꽃풀은 중국산 *G. longituba*와 매우 가까운 유전적

거리를 가지는 분류군으로 판단되나, 화관 및 악의 미세 구조에 따르면 분류군간에 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 3; Fig. 1). 그러나 본 연구는 소수 분류군만을 대상으로 수행하였기 때문에 보다 정확한 한국산 긴병꽃풀의 분류학적 위치를 증명하기 위해서는 일본 및 중국의 더 많은 분류군이 추가되어야 할 것으로 판단된다.

결론적으로 긴병꽃풀속내의 중간 한계 설정에 있어 화관 및 악의 미세형태형질의 연구보다 핵 리보솜 DNA의 ITS 염기서열에 기초한 분자 계통학적인 연구가 유용한 방법임이 판명되었다. 그러나 구체적인 본 속내 계통 분류학적인 논의를 위해서는 누락된 중국의 고유종 두 분류군을 포함한 확장된 분류군에 대한 조사를 수행하고, 외부 형태학적 형질에 대한 분석을 동시에 수행할 필요가 있으며, 계통학적 유용성이 보다 높은 DNA 구간을 추가로 분석할 필요가 있다.

사 사

본 연구는 한국연구재단 기본연구비(No. 2012004149)의 일부 지원으로 수행되었으며, 이에 깊이 감사드립니다. 귀중한 표본대여를 허락하여 주신 BM, E, F, G, GH, KHUS, KRIB, S, UPS, US의 각 표본관장 및 관계자에게 감사드립니다. 또한 논문심사 과정 중 많은 유용한 조언과 보다 정확한 논문이 되도록 교정을 해주신 익명의 두 분 심사자들에게 감사드립니다. 끝으로 본 연구과정에 여러모로 도움을 아끼지 않은 경희대학교 생물학과 식물계통분류학 연구실(KHUS)의 모든 동료들에게 고마운 마음을 전합니다.

인용문헌

- Almeida, O. J. G., J. H. Cota-Sánchez and A. A. S. Paoli. 2013. The systematic significance of floral morphology, nectaries, and nectar concentration in epiphytic cacti of tribes Hylocereeae and Rhipsalideae (Cactaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 15: 255-268.
- Aryavand, A., B. Ehdaie, B. Tran, and J. G. Wainess. 2003. Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 175-182.
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Ballero, M., R. Floris and F. Poli. 1997. Le piante utilizzate nella medicina popolare nel territorio di Laconi (Sardegna centrale). *Bollettino della Società Sarda Scientifica Naturalistica* 31: 207-229.
- Barone Lumaga, M. R., G. Pellegrino, F. Bellusci, E. Perrotta, I. Perrotta and A. Musacchio. 2012. Comparative floral micromorphology in four sympatric species of *Serapias* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 714-724.
- Beck, S. L., R. W. Dunlop and A. Fossey. 2003. Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 177-181.
- Bernardello, G. 2007. A systematic survey of floral nectaries. In *Nectaries and Nectar*. Nicolson, S. W., M. Nepi and E. Pacini (eds.), Springer, Berlin. Pp. 19-128.
- Böllmann, J. and M. Scholler. 2004. *Glechoma hederacea* (Lamiaceae) in North America: invasion history and current distribution. *Feddes Repertorium* 115: 178-188.
- Bräuchler, C., H. Meimber and G. Heubl. 2010. Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae) - Taxonomy, biogeography and conflicts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 501-523.
- Cantino, P. D., R. M. Harley and S. J. Wagstaff. 1992. Genera of Labiatae: status and classification. In *Advances in Labiate Science*. Harley, R. M. and T. Reynolds (eds.), Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 511-522.
- Dobea, C., B. Hahn and W. Morawetz. 1997. Chromosomenzahlen zur Gefäßpflanzen-Flora Österreichs. *Linzer Biologische Beiträge* 29: 5-43.
- Erdtman, G. 1945. Pollen morphology and plant taxonomy. IV. Labiatae, Verbenaceae and Avicenniaceae. *Svensk Botanisk Tidskrift* 39: 279-285.
- Fahn, A. 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press, New York.
- Farris, J. S., V. A. Albert, M. Källersjö, D. Lipscomb and A. G. Kluge. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Gadek, P. A., E. S. Fernando, C. J. Quinn, S. B. Hoot, T. Terrazas, M. C. Sheahan and M. W. Chase. 1996. Sapindales: molecular delimitation and infraordinal groups. *American Journal of Botany* 83: 802-811.
- Gale, R. M. and S. J. Owens. 1983. Cell distribution and surface morphology in petals, and androecia and style of Commelinaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 87: 247-262.
- Govaerts, R., J. Dransfield, S. F. Zona, D. R. Hodel and A. Henderson. 2014. World Checklist of *Glechoma*. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://apps.kew.org/wcsp/> Retrieved 2014-02-18
- Harley, R. M., S. Atkins, A. L. Budantsev, P. D. Cantino, B. J.

- Conn, R. Grayer, M. M. Harley, R. De Kok, T. Krestovskaja, R. Morales, A. J. Paton, O. Ryding and T. Upson. 2004. Labiatae. In *Flowering Plants, Dicotyledons: Lamiales* (except Acanthaceae including Avicenniaceae). Kadereit, J. W. (ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. Pp. 167-275.
- Hedge, I. C. 1990. Labiatae. In *Flora of Pakistan*. Ali, S. L. and Y. J. Nasir. (eds.). 192: 1-310.
- Holmgren, P. K. and N. H. Holmgren. 1998. Index herbariorum. Retrieved Feb. 18, 2014, from <http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>.
- Hong, S.-P., L. P. Ronse Decraene and E. Smets. 1998. Systematic significance of tepal surface morphology in tribes Persicarieae and Polygoneae (Polygonaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 127: 91-116.
- Jang, T.-S. and S.-P. Hong. 2007. The taxonomic consideration of leaf epidermal microstructure in *Glechoma* L. (Nepetinae, Lamiaceae). *Korean Journal of Plant Taxonomy* 37: 239-254. (in Korean)
- Jang, T.-S. 2008. Systematics of the genus *Glechoma* L. and related genera (Nepetinae, Lamiaceae). MS thesis. Kyung Hee University, Seoul.
- Jang, T.-S. and S.-P. Hong. 2010a. The nutlet morphology of the genus *Glechoma* L. (Lamiaceae) and its related taxa. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 40: 50-58. (in Korean)
- Jang, T.-S. and S.-P. Hong. 2010b. Comparative pollen morphology of *Glechoma* and *Marmoritis* (Nepetinae, Lamiaceae). *Journal of Systematics and Evolution* 48: 464-473.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Lee, T. B. 2003. Coloured flora of Korea. Hyangmunsa, Seoul. (in Korean).
- Lee, J., B. G. Baldwin, and L. D. Gottlieb. 2002. Phylogeny of *Stephanomeria* and related genera (Compositae - Lactuceae) based on analysis of 18S-26S nuclear rDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of Botany* 89: 160-168.
- Lee, Y. N. 2006. New flora of Korea. Kyohaksa, Seoul. (in Korean).
- Li, X. and I. C. Hedge. 1994. Lamiaceae. In *Flora of China*, Vol. 17 (Verbenaceae to Solanaceae). Wu, Z.-Y. and P. H. Raven (eds.), Science Press and Missouri Botanical Garden, Beijing and St. Louis. Pp. 30-299.
- Meusel, H., E. Jäger, S. Rauschert and E. Weinert. 1978. Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora. Vol. 2. Jena.
- Miura, N. and Y. Iwatsubo. 2010. Cytogeography of *Glechoma hederacea* subsp. *grandis* (Labiatae) in Japan. *Cytologia* 75: 255-260.
- Murata, G. and T. Yamazaki. 1993. Lamiaceae (Labiatae). In *Flora of Japan*, Vol. IIIa, Iwatsuki, K., T. Yamazaki, D. E. Boufford and H. Ohba (eds.), Kodansha Ltd. Tokyo. Pp. 272-321.
- Moon, H.-K. and S.-P. Hong. 2004. The taxonomic consideration of petal and sepal micromorphology in *Lycopus* L. (Menthae-Lamiaceae). *Korean Journal of Plant Taxonomy* 34: 273-285. (in Korean)
- Moon, H.-K., E. Smets and S. Huysmans. 2010. Phylogeny of tribe Menthae (Lamiaceae): the story of molecules and micromorphological characters. *Taxon* 59: 1065-1076.
- Nakai, T. 1921. Labiatae coreanae. *The Botanical Magazine* (Tokyo) 35: 173-174.
- Ojeda, I., J. Francisco-Ortega and Q. C. B. Cronk. 2009. Evolution of petal epidermal micromorphology in Leguminosae and its use as a marker of petal identity. *Annals of Botany* 104: 1099-1110.
- Pojarkova, A. I. 1954. Nepetinae. In *Flora of the U.S.S.R.*, Vol. 20, Shihkin, B. K. (ed.), Academy of Science of the USSR, Moscow, Leningrad. Pp. 273-492.
- Ruiz, E., C. Marticorena, D. Crawford, T. Stuessy, F. González, R. Montoya, M. Silva and J. Becerra. 2001. Morphological and ITS sequence divergence between taxa of *Cuminia* (Lamiaceae), an endemic genus of the Juan Fernandez Islands, Chile. *Brittonia* 52: 341-350.
- Ryding, O. 1992. The distribution and evolution of myxocarpy in Lamiaceae. In *Advances in Labiatae Sciences*. Harley, R. M. and T. Reynolds (eds.), Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 85-96.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Steane, D. A., R. W. Scotland, D. J. Mabberley and R. G. Olmstead. 1999. Molecular systematics of *Clerodendrum* (Lamiaceae): ITS sequences and total evidence. *American Journal of Botany* 86: 98-107.
- Suh, Y. 2007. *Glechoma*. In *The genera of vascular plants of Korea*. Park, C.-W. (ed.), Academy Publishing Co., Seoul. Pp. 824-825.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), ver. 4.0b, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Trusty, J. L., R. G. Olmstead, D. J. Bogler, A. Santos-Guerra and J. Francisco-Ortega. 2004. Using molecular data to test a biogeographic connection of the Macaronesian genus *Bystropogon* (Lamiaceae) to the New World: a case of conflicting phylog-

- enies. *Systematic Botany* 29: 702-715.
- Tutin, T. G., V. H. Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. H., Valentine, S. M. Walters and D. A. Webb. 1972. *Flora Europaea*. Vol. 3. Diapensiaceae to Myoporaceae. Cambridge.
- Usai, M., C. Juliano, G. Pintore and M. Chessa. 2003. Preliminary study of composition and antimicrobial activity of essential oil of *Glechoma sardoa* Bég. *Acta Horticulturae* 597: 125-128.
- Wagstaff, S. J., R. G. Olmstead and P. D. Cantino. 1995. Parsimony analysis of cpDNA restriction site variation in subfamily Nepetoideae (Labiatae). *American Journal of Botany* 82: 886-892.
- Wagstaff, S. J. and R. G. Olmstead. 1997. Phylogeny of Labiatae and Verbenaceae inferred from *rbcL* sequences. *Systematic Botany* 22: 165-179.
- Zhong, J. S., J. Li, L. Li, J. G. Conran and H. W. Li. 2010. Phylogeny of *Isodon* (Schrader ex Benth.) Spach (Lamiaceae) and related genera inferred from nuclear ribosomal ITS, *trnL-trnF* region, and *rps16* intron sequences and morphology. *Systematic Botany* 35: 207-219.
- Zukowski, W. and T. Slowinska. 1979. Chromosome numbers of angiosperms of Northwestern Poland. *Fragmenta Floristica Geobotanica* 25: 477-483.

Appendix I: Specimens investigated.

***Glechoma grandis*:** Japan, no detailed locality and date, 1955, *Hashimoto s.n.* (UPS)*; Japan, Honshu, 9. May 1965, *Murata 19473* (U); Japan, Nishinomiya, 21. Apr. 1957, *Murata 11099* (U); Japan, Hondo, 15. Apr. 1956, *Kobayashi 13245* (S). - ***G. hederacea*:** Denmark, no detailed locality and date, 1967, *Jeppesen 286* (US); Poland, Torun-Rybaki, no detailed date, 1974, *Gugnacka s.n.* (UPS)*; USA, Tuscaloosa, no detailed date, 1965, *Gaylon s.n.* (GH)*; USA, Pownal, 27. May 1967, *Charette 2947* (GH); Russia, Siberia, 30. June 1983, *Elias et al. 6920* (US)*; Switzerland, Bernex, 13. Mar. 1973, *Curchod et al. s.n.* (S). - ***G. longituba*:** Korea, Moon-San, 14. May 2006, *Jang 514* (KHUS); Korea, Na-Ju, 14. Apr. 2006, *Jang 415* (KHUS)*; Korea, Moon-San, 14. May 2006, *Jang 5071* (KHUS)*; China, Sichuan, 7. Mar. 1996, *Liu 15286* (PE)*; China, Anhui, 11. May 1984, *Yao 8865* (NY); China, no detailed locality, 4. May 1997, *Lai et al. 1306* (MO). - ***G. hirsuta*:** Hungary, no detailed locality and date, 1874, *Richer 678* (UPS); Austria, Leopoldsberg, no detailed date, 1914, *Delessert s.n.* (G)*; Austria, no detailed locality and no collecting date, *Wettstein s.n.* (WU); Serbia, silvis, 8. May 1965, *Mayer 55894* (G); Italy, Verona, 12. Apr. 1982, *Kramer 8400* (U); Croatia, Tukaruci, 3. May 1972, *Nilsson s.n.* (UPS). - ***G. sardoa*:** Italy, Sardinia, 20. May 1975, *Segelberg s.n.* (S)*

*, used for nrDNA ITS sequence analysis and floral micromorphology.