엽록체 DNA 바코드 분석을 통한 한국산 두릅나무과 식물 14종의 유연관계 분석

황환수 · 최응의

Phylogenetic analysis of 14 Korean Araliaceae species using chloroplast DNA barcode analysis

Hwan Su Hwang · Yong Eui Choi

Received: 16 January 2016 / Revised: 15 March 2016 / Accepted: 18 March 2016
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Most Araliaceae plant species distributed in Korea are economically important because of their high medicinal values. This study was conducted to develop barcode markers from sequence analysis of chloroplast DNA in 14 taxa of Araliaceae species grown in South Korea. Sequencing of seven chloroplast DNA regions was performed to establish the DNA barcode markers, as suggested by the Consortium for the Barcode of Life (CBOL). From the sequence analysis of chloroplast DNA, we identified specific sequences and nucleotides that allowed us to discriminate among each other 14 Korean Araliaceae species. The sequence in the region of *psbA-trnH* revealed the most frequent DNA indels and substitutions of all 7 regions studied. This *psbA-trnH* marker alone can discriminate among all 14 species. There are no differences between Korean and Chinese *Panax ginseng* in all seven sequenced chloroplast DNA regions. A phylogenetic tree constructed using the seven chloroplast DNA regions revealed that *Tetrapanax papyriferus* should be classified as an independent clade. The *Aralia* and *Panax* genera showed a close phylogenetic relationship. Five species in the *Eleutherococcus* genus were more closely related to *Kalopanax septemlobus* than to any *Panax* species.

Keywords DNA barcode, phylogenetic analysis, *matK*, *psbA-trnH*, *psbK-psbI*, *rbcL*, *rpoC1*

서론

두릅나무과(Araliaceae) 식물은 전 세계적으로 약 80~90여개의 속에 900여종이 속해있으며 열대지방인 인도양, 태평양 그리고 동남아시아에 주로 분포하지만 인삼속(*Panax*), 송악속(*Hedera*), 팻두릅나무속(*Oplopanax*) 등 몇몇 속들은 북쪽의 온대지방이나 아열대지방에서 적응하여 서식하고 있다. 최근 연구에 따르면 국내에는 총 9속 14종 4변종으로 18개의 분류군이 분포한다고 알려져 있다(Kim 2007).

두릅나무과 식물은 예전부터 중요한 의약자원으로 인삼(*Panax ginseng*)이나 가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus*) 등의 뿌리나 수피는 약용으로 이용되고 있으며, 최근 사회가 발전함에 따라 두릅나무(*Aralia elata*)나 음나무(*Kalopanax septemlobus*)와 같은 두릅나무과 종들도 고부가가치의 산채류로 취급받고 있다. 인삼은 동양에서 높은 명성을 지닌 약용 식물 중 하나로 강장, 피로회복 등에 효능이 있어(Wen et al. 1996) 고대로부터 이용되어져 왔고, 가시오갈피 또한 강장, 진정작용, 류머티즘, 당뇨병 등에 효과가 있는 것으로 알려져 뿌리, 줄기, 열매를 약재로 사용해왔다(Davydov and Krikorian 2000; Fujikawa et al. 1996; Umeyama et al. 1992). 두릅나무는 항미생물 활성물질이 확인된 이후 항균제나 식품 보존제 등으로 활용할 수 있는 가능성이 제기되었고(Ma et al. 1995, 1996), 순에서 추출된 flavonoid 배당체 화합물은 높은 항산화 활성을 나타내었다(Lee et al. 2009).

두릅나무과는 같은 미나리목(Apiiales)인 산형과(Apiaceae)와 근연관계로, 일부 분류 체계에서는 넓은 의미의 산형과에 포함시키는 경우도 있다. 때문에 국외에서는 산형과의 식물들과 두릅나무과 식물 사이의 유연관계를 알아보거나(Plunkett et al. 1996, 1997) 두 과에 속하는 속들 간

H. S. Hwang · Y. E. Choi (✉)
강원대학교 산림환경과학대학 산림자원학과
(Department of Forest Resources, College of Forest and Environmental Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea)
e-mail: yechoi@kangwon.ac.kr

의 유연관계가 주로 조사되었다(Lowry et al. 2004; Plunkett et al. 2004; Plunkett et al. 2005). 이를 통해 기존에 산형과로 분류되던 피막이속(*Hydrocotyle*)과 병풀속(*Centella*) 등은 두릅나무과와 더 근연관계가 있다는 결과도 발표되었다(Chandler and Plunkett 2004). 국내에서는 두릅나무과 식물의 체계적인 연구가 Nakai (1939)에 의해 발표된 후 한 국산 두릅나무과 식물에 대한 연구가 주로 이루어졌다. Lee and Lee (1991)는 화분분류학적 연구를 통해 팔손이속(*Fatsia*)과 근연분류군에 대해 알아보았으며, Jung et al. (2003)은 음나무의 군집구조 및 유전다양성을 조사하였다. 또한 PCR-RAPD와 ITS서열 분석에 의한 두릅나무과의 유연관계 분석에서는 오갈피속(*Eleutherococcus*)과 음 나무속(*Kalopanax*)이 근연관계이며 두릅나무속과 인삼속이 하나의 계통임이 밝혀졌다(Kim et al. 2004). 하지만 두릅나무과의 식물은 아직까지도 학자에 따라 각자 다른 견해를 보이고 있어 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

DNA 바코드는 종 동정을 위해 생물다양성 협약(Convention on Biodiversity)에서 권고하는 표준 방법으로(Hebert et al. 2003), DNA 염기서열을 이용하여 간편하게 종간의 변이를 확인하고 동정 할 수 있다는 장점 때문에 최근에 활발히 연구되고 있다. 국내에서는 한약재의 감별을 위한 마커개발에 이용되거나(Kim et al. 2015) 형태적으로 뚜렷한 특징이 없는 종들을 동정하기 위하여 사용되고 있다(Lee et al. 2015a). 국제 생물 바코드 컨소시엄(CBOL, the Consortium for the Barcode of Life)에서는 전 세계의 생물 바코드를 수집하여 Database를 구축하고 있으며 또한 생물에 따라 적절한 DNA barcoding marker를 제안하고 있다. 미토콘드

리아 DNA의 *COI* 유전자는 주로 동물이나 조류(algae)에 사용되며, 식물에서는 미토콘드리아 DNA의 진화속도가 느려 변이가 적다는 이유 때문에 핵이나 엽록체 DNA를 많이 사용한다. 핵 DNA의 경우 rRNA 유전자의 ITS (Internal transcribed spacer) 부위를 이용하며, 엽록체 DNA에서는 *matK*, *psbA-trnH*와 *rbcL* 등의 영역을 주로 이용한다(CBOL Plant Working Group 2009).

현재까지 핵 rRNA 유전자를 이용한 두릅나무과 식물의 ITS 염기서열 분석은 많이 진행되어 왔으며(Artyukova et al. 2004; Kim et al. 2004), 부분적으로는 엽록체 DNA를 이용한 연구도 실행되었다(Lee et al. 2004; Plunkett et al. 1997). 하지만 CBOL에서 엽록체 DNA barcoding marker로 제안한 7가지 영역 모두에 대한 두릅나무과 식물의 연구는 없었기에, 본 연구에서는 한국에 자생하는 두릅나무과 식물 14종 모두를 재료로 하여 식물 DNA 바코드 부위 염기서열 분석을 통해 속 및 종을 명확하게 구별할 수 있는 marker nucleotide 및 DNA marker를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

이 연구에 사용된 14종의 두릅나무과(Araliaceae) 식물들은 자생지에서 직접 채집된 생체 재료를 사용하였으며 Table 1에 나타내었다. 잎은 오염이나 균을 고려해 되도록 어린잎을 채취하였다. 인삼(*Panax ginseng*)의 경우 중국 길림성과 대한민국 강원도 일대에 자생하는 개체들이

Table 1 List of 15 plant samples belonging to the Araliaceae family used in this study

No.	Sample Name	Area	Nation
1	<i>Aralia cordata</i>	Samcheok, Gangwon	Korea
2	<i>Aralia elata</i>	Taebaek, Gangwon	Korea
3	<i>Dendropanax morbiferus</i>	Seogwipo, Jeju	Korea
4	<i>Eleutherococcus divaricatus</i> var. <i>chiisanensis</i>	Gurye, Jeollanam	Korea
5	<i>Eleutherococcus gracilistylus</i>	Seogwipo, Jeju	Korea
6	<i>Eleutherococcus senticosus</i>	Pyeongchang, Gangwon	Korea
7	<i>Eleutherococcus seoulensis</i>	Cheongnyangni, Seoul	Korea
8	<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i>	Pyeongchang, Gangwon	Korea
9	<i>Fatsia japonica</i>	Geoje, Gyeongnam	Korea
10	<i>Hedera rhombea</i>	Seogwipo, Jeju	Korea
11	<i>Kalopanax septemlobus</i>	Samcheok, Gangwon	Korea
12	<i>Oplopanax elatus</i>	Gapyeong, Gyeonggi	Korea
13	<i>Panax ginseng</i>	Inje, Gangwon	Korea
14	<i>Panax ginseng</i>	Jilin, China	China
15	<i>Tetrapanax papyriferus</i>	Seogwipo, Jeju	Korea

수집되었으며, 모든 샘플들은 확보 된 후 액체질소로 급속 냉동하여 사용 전까지 -70°C 에서 냉동보관 하였다.

DNA 추출 및 PCR 증폭

잎을 액체질소에 넣어 얼린 후 막자사발로 분쇄하여 MagExtractor[®] Genomic kit (Toyobo, Japan)을 이용해 전체 DNA를 추출하였다. PCR 증폭은 엽록체 marker로 제안된 *atpF-atpH*, *matK*, *psbA-trnH*, *psbK-psbI*, *rbcL*, *rpoB* 및 *rpoC1*의 양쪽 끝을 primer로 이용하여 양방향으로 수행하였으며, primer의 염기서열은 Table 2에 나타내었다. PCR 조건은 94°C 에서 pre-denaturation 5분 후, denaturation 94°C , 40 sec; annealing 52°C , 45 sec; extension 72°C , 1.5min; 30 cycles 이었고 마지막으로 72°C 에서 5분간 final extension을 실시하였다. 증폭된 DNA는 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 Ethidiumbromide (EtBr)로 염색 후 UV로 확인하였고, 그 후 agarose gel로부터 회수하여 HiYield[™]Gel/PCR Fragments Extraction Kit (RBC, Taiwan)를 이용하여 정제되었다. 모든 샘플은 정확한 결과를 얻기 위해 3반복 되었다.

염기서열 분석

염기서열 분석은 정제된 PCR 산물을 Macrogen (Korea)에 의뢰하여 Applied Biosystems 사의 BigDye (R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits를 이용하여 실시하였다. Applied Biosystems사에서 Recommend하는 방법으로 반응에 참여하지 않은 dNTP와 반응물을 제거한 후, ABI 3730xl DNA Analyzer에 loading하여 sequencing 결과를 확인하였다. 분

Table 2 List of primers for the seven proposed DNA barcoding markers

Marker	Primer sequence
<i>atpF-atpH</i>	Forward: 5'-ACTCGCACACTCCCTTTCC-3;
	Reverse: 5'-GCTTTTATGGAAGCTTTAACAAT-3'
<i>matK</i>	Forward: 5'-CGATCTATTCAATCAATATTTC-3;
	Reverse: 5'-GTTCTAGCACAAGAAAGTCG-3'
<i>psbA-trnH</i>	Forward: 5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3;
	Reverse: 5'-CGCGCATGGTGGATTACAAAATC-3'
<i>psbK-psbI</i>	Forward: 5'-TTAGCCTTTGTTTGCAAG-3;
	Reverse: 5'-AGAGTTTGAGAGTAAGCAT-3'
<i>rbcL</i>	Forward: 5'-ATGTCACCAACAACAGAGACTAAAGC-3;
	Reverse: 5'-CTTCTGCTACAAATAAGAATCGATCTC-3'
<i>rpoB</i>	Forward: 5'-ATGCAACGTCAGCAGTTCC-3;
	Reverse: 5'-GATCCCAGCATCACAATTCC-3'
<i>rpoC1</i>	Forward: 5'-GTGGATACACTTCTTGATAATGG-3;
	Reverse: 5'-CCATAAGCATATCTTGAGTTGG-3'

석된 14종으로부터 분석된 98개 엽록체 염기서열은 NCBI에 등록하였으며 등록번호는 다음과 같다(KF412419-KF412516).

DNA 바코드 및 계통학적 분석

확인된 염기서열은 ClustalW program으로 정렬한 후 육안으로 비교하여 특이성을 갖는 염기와 삽입, 결실 등 종간의 염기서열 차이를 위치별로 정리하였다. 분자계통수는 본 실험으로 결정된 두릅나무과 식물 14종 각각의 염기서열과 두릅나무과와 유연관계가 가까운 산형과(Apiaceae)의 당근(*Daucus carota*)을 외군으로 활용하여 작성하였다. 당근의 염기서열은 NCBI Genbank에 등록되어 있는 정보를 활용하였다. 분자계통학적 유연관계 분석은 MEGA5.2 program (<http://www.megasoftware.net>)을 사용하여 Maximum likelihood analysis (ML) 방법으로 수행되었으며(Tamura et al. 2011), bootstrap test 1,000번을 반복 실행하였다(Felsenstein 1985).

결과 및 고찰

엽록체 DNA 염기서열의 특성 분석

수집된 두릅나무과(Araliaceae) 식물 14종에서 DNA를 분리하고 엽록체 DNA에 존재하는 7개의 바코드 영역(*atpF-atpH*, *matK*, *psbA-trnH*, *psbK-psbI*, *rbcL*, *rpoB* 및 *rpoC1*)을 PCR 증폭한 후 염기서열을 분석하였다. 7개 영역 각각의 sequence 크기 및 G+C 함량을 분석한 결과는 Table 3과 같다. *atpF-atpH* 영역의 sequence를 분석한 경우 음나무(*K. septemlobus*)의 염기서열 길이가 588bp로 가장 길었지만, G+C 함량은 33.5%로 가장 낮게 나타났다. 반대로 *matK*의 경우에는 음나무의 염기서열 길이가 가장 짧아(823bp) 특이성을 나타냈다. *psbA-trnH* 영역의 경우 팔손이(*Fatsia japonica*)가 518bp로 가장 길었고 G+C 함량이 30.7%로 가장 낮았으며, 가장 높은 G+C 함량은 나타낸 수종은 32.4%로 독활(*Aralia cordata*)이었다. *psbA-trnH*나 *psbK-psbI*와 같은 non-coding 영역은 단백질을 coding하는 유전자(*matK*, *rbcL*, *rpoB* 및 *rpoC1*)보다 종간의 차이가 크게 나타났는데 이는 진화적으로 단백질을 coding하는 쪽보다 noncoding쪽의 DNA 변이가 더 많이 발생한다는 걸 말해준다. 통탈목(*Tetrapanax papyriferus*)은 *psbA-trnH* 영역이 377bp로 다른 두릅나무과 종들보다 확연히 짧았으며, *psbK-psbI* 영역에서도 가장 짧은 염기서열 길이(424bp)를 보였다. 또한 통탈목은 단백질을 coding하는 *rpoC1*에서도 G+C 함량이 41.8%로 가장 낮아 개체간의 변이가 거의 없는 다른 종들과는 큰 차이를 나타냈다. 엽록체 DNA 7개의 영역을 모두 합한 염기

Table 3 Variation in size and G+C content of the *atpF-atpH*, *matK*, *psbA-trnH*, *psbK-psbI*, *rbcL*, *rpoB*, and *rpoC1* regions of Araliaceae taxa

Taxon	<i>atpF-atpH</i>		<i>matK</i>		<i>psbA-trnH</i>		<i>psbK-psbI</i>		<i>rbcL</i>		<i>rpoB</i>		<i>rpoC1</i>	
	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)
<i>Aralia cordata</i>	567	34.4	833	35.7	506	32.4	448	31.0	636	32.4	492	41.3	564	42.7
<i>Aralia elata</i>	566	34.5	833	35.4	494	31.2	435	32.6	637	31.2	491	41.1	564	42.7
<i>Dendropanax morbiferus</i>	566	34.5	833	35.3	501	32.1	441	31.5	637	32.1	491	41.3	564	42.7
<i>Eleutherococcus divaricatus</i> <i>var. chiisanensis</i>	565	34.3	832	35.3	498	32.1	442	32.6	637	32.1	490	41.4	564	42.7
<i>Eleutherococcus gracilistylus</i>	564	34.6	832	35.1	491	32.0	442	32.4	637	32.0	491	41.5	564	42.6
<i>Eleutherococcus senticosus</i>	567	34.4	833	35.1	500	31.8	442	32.1	637	31.8	491	41.5	564	42.7
<i>Eleutherococcus seoulensis</i>	565	34.2	833	35.1	498	32.1	442	32.6	637	32.1	490	41.4	564	42.2
<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i>	565	34.2	833	35.4	498	31.9	442	32.6	637	31.9	491	41.8	564	42.6
<i>Fatsia japonica</i>	566	34.6	833	35.6	518	30.7	442	31.9	637	30.7	491	41.3	564	42.4
<i>Hedera rhombea</i>	567	34.7	831	35.4	500	32.2	443	32.1	637	32.2	490	41.4	564	42.4
<i>Kalopanax septemlobus</i>	588	33.5	823	35.4	498	32.1	448	31.0	637	32.1	492	41.1	564	42.9
<i>Oplopanax elatus</i>	566	34.3	833	35.3	499	31.9	437	31.6	638	31.9	494	43.5	564	42.7
<i>Panax ginseng</i>	568	34.7	833	35.3	505	31.9	435	32.4	637	31.9	492	40.9	564	42.7
<i>Tetrapanax papyriferus</i>	567	34.2	833	35.2	377	32.1	424	32.8	637	32.1	490	41.6	564	41.8
Average	568	34.4	832	35.3	492	31.9	440	32.1	637	31.9	491	41.5	564	42.6

서열의 길이는 종에 따라 편차가 있었지만 3,892~4,051bp 범위에 속했으며, 이 중 팔손이가 가장 길고 통탈목이 가장 짧았다.

엽록체 염기서열의 삽입/결실 및 염기치환 분석

조사된 엽록체 DNA 영역들의 삽입/결실(indels)과 염기치환(substitutions)을 분석한 결과는 Figure 1~3과 같다. *atpF-atpH* 영역에서는 14개 종 전체에서 74개의 염기서열이 삽입/결실 또는 치환되었으며, 412, 464번 위치에서 오갈피속(*Eleutherococcus*)만이 갖는 marker nucleotide를 찾을 수 있었다(Fig. 1). 또한 음나무는 *atpF-atpH* 영역에서 다른 식물에 없는 연속적인 염기서열(164~184번 위치)이 삽입된 것을 확인하였다.

psbK-psbI 영역은 92개로 *psbA-trnH* 영역 다음으로 두 번째로 많은 변이가 나타났다. 이 중 통탈목은 88~95, 275~293번 위치에서 결실, 144~148번 위치에서 삽입이 발견되었고 10개의 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) marker nucleotide를 찾을 수 있었다. 팻두릅나무(*Oplopanax elatus*)는 93~97번 위치에서 결실이 나타났고 오갈피속은 140번째 위치에서 염기서열 T가 C로 치환되었다. 인삼(*Panax ginseng*)에서는 16개의 SNP marker nucleotide를 발견하였으며, 조사된 식물 중 인삼과 두릅나무만 230~234번 위치에서 결실이 나타났는데 이는 Kim et al. (2004)의 인삼과 두릅나무의 유연관계가 가깝다는 보고를 지지하는 결

과로 보여진다. 한편 *rbcL*에서는 25개의 변이가 나타났는데 68, 72, 122번 위치에서 두릅나무속 식물들을 구분할 수 있는 염기서열이 발견되었다.

rpoB 및 *matK* 영역의 sequence를 분석한 결과, *rpoB*에서는 팻두릅나무의 SNP marker nucleotide가 49개나 발견되었고(Fig. 2), *matK*에서는 두릅나무(*A. elata*)와 통탈목의 종 감별이 가능한 SNP marker nucleotide를 각각 10개와 15개씩 확인할 수 있었다. 음나무는 778~787번 위치에서 결실이 나타나 다른 종들과 차이를 나타냈다. 이와 같은 결과는 *matK*와 *rbcL* 유전자의 염기서열이 종 동정에 이용하기 어렵다는 Lahaye et al. (2008)의 견해보다 종이나 속에 따라 충분히 동정이 가능하다는 보고(Kress and Erickson 2007; Lee et al. 2015b)와 더 일치했다.

psbA-trnH 및 *rpoC1* 영역을 분석한 결과(Fig. 3)에서는 *psbA-trnH*의 영역의 경우 230개의 위치에서 삽입/결실과 염기서열이 치환이 조사되어 가장 많은 변이를 나타냈으며 조사된 모든 두릅나무과 종들을 구분할 수 있어서 가장 이상적인 바코드 마커로 나타났다. 팔손이는 92~98, 161~173번 위치에서 특이적인 염기서열의 삽입이 있었고, 191번 위치에서는 오갈피속 식물들만이 염기서열 T의 삽입이 있었다. 두릅나무는 225~231번 위치에서 삽입, 417~426, 484~492번 위치에서는 결실이 일어났다. 섬오갈피(*Eleutherococcus gracilistylus*)는 424~432번 위치에서 결실이 나타났으며, 통탈목은 232~360번 위치에서 결실이 일어나 조사된 수종들 중에 가장 특이성을 보였

		<i>atpF-atpH</i>	
		7	20
<i>Aralia cordata</i>		G	A
<i>A. elata</i>		-	A
<i>Dendropanax moribiferus</i>		-	A
<i>Eleutherococcus divaricatus</i>		-	A
var. <i>chitsanensis</i>		-	A
<i>E. gracilistylus</i>		-	A
<i>E. senticosus</i>		-	A
<i>E. seoulensis</i>		-	A
<i>E. sessiliflorus</i>		-	A
<i>Fatsia japonica</i>		-	A
<i>Hedera rhombea</i>		-	A
<i>Kalopanax septemlobus</i>		-	A
<i>Oplopanax elatus</i>		-	A
<i>Panax ginseng</i>		-	A
<i>Tetrapanax papyriferus</i>		-	A
		118	144
<i>Aralia cordata</i>		G	A
<i>A. elata</i>		-	A
<i>Dendropanax moribiferus</i>		-	A
<i>Eleutherococcus divaricatus</i>		-	A
var. <i>chitsanensis</i>		-	A
<i>E. gracilistylus</i>		-	A
<i>E. senticosus</i>		-	A
<i>E. seoulensis</i>		-	A
<i>E. sessiliflorus</i>		-	A
<i>Fatsia japonica</i>		-	A
<i>Hedera rhombea</i>		-	A
<i>Kalopanax septemlobus</i>		-	A
<i>Oplopanax elatus</i>		-	A
<i>Panax ginseng</i>		-	A
<i>Tetrapanax papyriferus</i>		-	A
		207	265
<i>Aralia cordata</i>		C	T
<i>A. elata</i>		-	A
<i>Dendropanax moribiferus</i>		-	A
<i>Eleutherococcus divaricatus</i>		-	A
var. <i>chitsanensis</i>		-	A
<i>E. gracilistylus</i>		-	A
<i>E. senticosus</i>		-	A
<i>E. seoulensis</i>		-	A
<i>E. sessiliflorus</i>		-	A
<i>Fatsia japonica</i>		-	A
<i>Hedera rhombea</i>		-	A
<i>Kalopanax septemlobus</i>		-	A
<i>Oplopanax elatus</i>		-	A
<i>Panax ginseng</i>		-	A
<i>Tetrapanax papyriferus</i>		-	A
		394	422
<i>Aralia cordata</i>		G	T
<i>A. elata</i>		-	A
<i>Dendropanax moribiferus</i>		-	A
<i>Eleutherococcus divaricatus</i>		-	A
var. <i>chitsanensis</i>		-	A
<i>E. gracilistylus</i>		-	A
<i>E. senticosus</i>		-	A
<i>E. seoulensis</i>		-	A
<i>E. sessiliflorus</i>		-	A
<i>Fatsia japonica</i>		-	A
<i>Hedera rhombea</i>		-	A
<i>Kalopanax septemlobus</i>		-	A
<i>Oplopanax elatus</i>		-	A
<i>Panax ginseng</i>		-	A
<i>Tetrapanax papyriferus</i>		-	A
		510	528
<i>Aralia cordata</i>		G	T
<i>A. elata</i>		-	A
<i>Dendropanax moribiferus</i>		-	A
<i>Eleutherococcus divaricatus</i>		-	A
var. <i>chitsanensis</i>		-	A
<i>E. gracilistylus</i>		-	A
<i>E. senticosus</i>		-	A
<i>E. seoulensis</i>		-	A
<i>E. sessiliflorus</i>		-	A
<i>Fatsia japonica</i>		-	A
<i>Hedera rhombea</i>		-	A
<i>Kalopanax septemlobus</i>		-	A
<i>Oplopanax elatus</i>		-	A
<i>Panax ginseng</i>		-	A
<i>Tetrapanax papyriferus</i>		-	A

Fig. 1 Marker nucleotides of the *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, and *rbcL* regions in Araliaceae species

		<i>rpoB</i>	
		13	21
<i>Aralia cordata</i>		A	A
<i>A. elata</i>		-	A
<i>Dendropanax moribiferus</i>		-	A
<i>Eleutherococcus divaricatus</i>		-	A
var. <i>chitsanensis</i>		-	A
<i>E. gracilistylus</i>		-	A
<i>E. senticosus</i>		-	A
<i>E. seoulensis</i>		-	A
<i>E. sessiliflorus</i>		-	A
<i>Fatsia japonica</i>		-	A
<i>Hedera rhombea</i>		-	A
<i>Kalopanax septemlobus</i>		-	A
<i>Oplopanax elatus</i>		-	A
<i>Panax ginseng</i>		-	A
<i>Tetrapanax papyriferus</i>		-	A
		36	56
<i>Aralia cordata</i>		A	G
<i>A. elata</i>		-	A
<i>Dendropanax moribiferus</i>		-	A
<i>Eleutherococcus divaricatus</i>		-	A
var. <i>chitsanensis</i>		-	A
<i>E. gracilistylus</i>		-	A
<i>E. senticosus</i>		-	A
<i>E. seoulensis</i>		-	A
<i>E. sessiliflorus</i>		-	A
<i>Fatsia japonica</i>		-	A
<i>Hedera rhombea</i>		-	A
<i>Kalopanax septemlobus</i>		-	A
<i>Oplopanax elatus</i>		-	A
<i>Panax ginseng</i>		-	A
<i>Tetrapanax papyriferus</i>		-	A
		136	156
<i>Aralia cordata</i>		A	G
<i>A. elata</i>		-	A
<i>Dendropanax moribiferus</i>		-	A
<i>Eleutherococcus divaricatus</i>		-	A
var. <i>chitsanensis</i>		-	A
<i>E. gracilistylus</i>		-	A
<i>E. senticosus</i>		-	A
<i>E. seoulensis</i>		-	A
<i>E. sessiliflorus</i>		-	A
<i>Fatsia japonica</i>		-	A
<i>Hedera rhombea</i>		-	A
<i>Kalopanax septemlobus</i>		-	A
<i>Oplopanax elatus</i>		-	A
<i>Panax ginseng</i>		-	A
<i>Tetrapanax papyriferus</i>		-	A

Fig. 2 Marker nucleotides of the *rpoB* and *matK* regions in Araliaceae species

Fig. 3 Marker nucleotides of the *psbA-trnH* and *rpoC1* regions in Araliaceae species

Table 4 Pairwise sequence divergence values of concatenated sequences based on Kimura's two parameter model

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Aralia cordata</i>	-														
<i>Aralia elata</i>	0.016	-													
<i>Dendropanax moribiferus</i>	0.016	0.017	-												
<i>Eleutherococcus divaricatus</i> <i>var. chiisanensis</i>	0.018	0.018	0.010	-											
<i>Eleutherococcus gracilistylus</i>	0.017	0.018	0.008	0.009	-										
<i>Eleutherococcus senticosus</i>	0.017	0.018	0.008	0.009	0.003	-									
<i>Eleutherococcus seoulensis</i>	0.019	0.019	0.009	0.004	0.007	0.007	-								
<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i>	0.019	0.020	0.009	0.005	0.008	0.007	0.002	-							
<i>Fatsia japonica</i>	0.016	0.017	0.006	0.010	0.006	0.006	0.009	0.009	-						
<i>Hedera rhombea</i>	0.017	0.017	0.007	0.011	0.007	0.007	0.008	0.010	0.005	-					
<i>Kalopanax septemlobus</i>	0.015	0.017	0.007	0.011	0.008	0.008	0.010	0.010	0.006	0.007	-				
<i>Oplopanax elatus</i>	0.026	0.026	0.018	0.023	0.019	0.019	0.022	0.022	0.018	0.020	0.020	-			
<i>Panax ginseng</i>	0.019	0.019	0.017	0.016	0.018	0.018	0.020	0.020	0.017	0.018	0.018	0.028	-		
<i>Tetrapanax papyriferus</i>	0.027	0.030	0.023	0.027	0.024	0.025	0.025	0.026	0.024	0.024	0.024	0.033	0.030	-	
<i>Daucus carota</i>	0.090	0.094	0.087	0.089	0.088	0.087	0.088	0.088	0.088	0.089	0.090	0.088	0.090	0.094	-

다. 한편 *rpoC1* 영역은 분석 결과 조사된 영역 중 가장 작은 변이(21개)가 나타났지만 오갈피속 수종 5종 모두를 구별할 수 있는 독특한 염기서열 차이를 확인할 수 있었다.

전체 7개 엽록체 바코드 마커 영역을 합하여 sequence를 분석한 경우 가장 많은 차이를 보인 수종은 통탈목으

로 *psbA-trnH*와 *psbK-psbI* 영역에 수많은 삽입, 결실과 염기치환을 보였고, 팻두릅나무와 음나무 등도 다른 종들과 구별되는 연속적인 염기서열이 나타났다.

Pairwise distance 분석

분석실험에 사용된 모든 영역을 통합하여 Kimura's two parameter method를 이용한 유전적 거리(Pairwise distance)를 알아본 결과, 외군을 포함한 분류군간의 염기변이는 0.002 ~ 0.094였으며, 외군을 제외한 내군의 염기변이는 0.002 ~ 0.033으로 나타났다(Table 4). 외군을 포함하여 당근(*Daucus carota*)과 두릅나무 그리고 당근과 통탈목이 0.094로 가장 높은 염기변이를 보였고, 가장 낮은 염기변이(0.002)를 보인 분류군은 서울오갈피(*Eleutherococcus seoulensis*)와 오갈피(*Eleutherococcus sessiliflorus*)였다. 외군을 제외한 분류군에서는 팻두릅나무와 통탈목이 0.033으로 가장 높은 변이를 보였다.

계통학적 분석

전 세계적으로 분포하는 두릅나무과 식물의 계통분석은 rDNA의 ITS염기 서열을 중심으로 분석한 Wen et al. (2001)의 연구와 ITS영역과 엽록체의 *trnL-trnF* 영역의 서열을 함께 분석한 Plunkett et al. (2004)의 연구가 있다. 전자는 두릅나무과 식물을 크게 2개의 큰 monophyletic 그룹(*Aralia*-*Polyscias*-*Pseudopanax*와 *Eleutherococcus*-*Dendropanax*-*Schefflera*)으로 구분하였고, 후자는 3개의 큰 그룹(*Aralia*, *Polyscias*-*Pseudopanax*, 및 *Aisan Palmate*)으로 구분하고 있다. Wen et al. (2001)이 주장한 *Eleutherococcus*-*Dendropanax*-*Schefflera*와 Plunkett et al. (2004)이 주장한 *Aisan Palmate* 그룹은 같은 내용이고, 이들 연구의 차이점은 Wen et al. (2001)은 *Aralia*-*Polyscias*-*Pseudopanax*을 한 그룹으로 포함시켰지만 Plunkett et al. (2004)은 *Aralia*와 *Polyscias*-*Pseudopanax*로 나눈 것이다. 여기에서 *Polyscias*-*Pseudopanax* 그룹은 태평양

과 인도양에 걸쳐 분포하는 그룹으로 우리나라의 식물과는 모두 다른 종들이다. 따라서 본 연구에서도 우리나라 두릅나무과 식물은 크게 2그룹으로 구분되었는데 이는 앞의 연구자들과 같은 결과라고 할 수 있다. 한 가지 특징적인 것은 귀화식물로 알려진 통탈목은 본 연구에서는 독립적으로 분지되었으나, Wen et al. (2001)의 연구에서는 *Eleutherococcus*-*Dendropanax*-*Schefflera* 그룹, Plunkett et al. (2004)의 연구에서는 *Aisan Palmate* 그룹에 속하는 것으로 나타나 본 연구와 차이를 보였다. 본 연구는 엽록체 DNA의 7개 영역을 모두 종합하였기 때문에 통탈목이 독립적인 그룹에 속한다고 밝혀진 객관적인 데이터로 판단된다.

앞에서 기술한 바와 같이 전 세계에 분포하는 두릅나무과 식물의 계통학적 연구는 수행되었으나, 이들 모두의 연구는 우리나라에 분포하는 두릅나무과 식물의 일부만이 분석에 사용되어 있어서 우리나라 두릅나무과 식물 종의 심층적인 분석과는 거리가 멀다. 한편 우리나라 두릅나무과 식물종의 체계적인 DNA 염기서열분석을 통한 계통학적 분석 또는 마커의 개발에 대한 연구는 없기 때문에 본 연구의 가치가 크다고 생각된다. 국내에서는 두릅나무과 식물 중 두릅나무속, 인삼 및 오갈피속 식물 종만을 RAPD와 ITS 염기 서열을 분석한 결과가 있고 우리나라에 자생하는 대부분의 두릅나무 식물을 재료로 한 연구는 없다.

본 연구에서 두릅나무과 식물의 계통학적 분석은 Maximum likelihood analysis (ML) method로 수행되었다. 당근을 외군으로 7가지 엽록체 DNA 염기서열을 융합하여 작성한 계통수에선 통탈목이 가장 기부에 독립적인 분계조를 형성하며 다른 종들과 근연관계가 다소 먼 것으로 나타났

Fig. 4 Phylogenetic tree formed from chloroplast nucleotide sequence alignment of Araliaceae species in South Korea. The distance between each plant was calculated using CLUSTAL W. Bootstrap analysis values are shown at the nodal branches

다(Fig. 4). 인삼(*Panax ginseng*)의 경우 81% bootstrap 값으로 두릅나무속(*Aralia*)과 자매군을 형성했는데, 이는 두릅나무과에서 두릅나무속, 인삼속(*Panax*)이 하나의 계통이라는 연구(Kim et al. 2004; Wen et al. 2001; Plunkett et al. 2004)의 보고와 일치한다. 한편 한국과 중국에서 인삼 샘플을 각각 수집하여 엽록체 염기서열을 비교한 결과, 조사한 모든 영역에서 유전적인 차이가 전혀 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 수천 년 전부터 중국과 대한민국에 독자적으로 인삼이 자생하였다면 어떠한 염기서열의 차이가 있어야 한다고 여겨지기 때문에, 두 나라 중 한쪽의 종자가 다른 나라로 건너간 것이라고 판단되어진다. 땃두릅나무와 황칠나무(*Dendropanax moribiferus*)는 독립적으로 분지(76% Bootstrap value)되었다. 팔손이(*F. japonica*)와 송악(*Hedera rhombea*)은 타 속에 비해서 유연관계가 높은 것을 알 수 있었다. 오갈피 속내에선 가시오갈피(*E. senticosus*)가 섬오갈피(*E. gracilistylus*)와 더 가까운 유연관계를 보인 반면 오갈피(*E. sessiliflorus*)와는 비교적 먼 유연관계를 나타냈다. Neighbor-Joining 분석 방법으로 도출된 계통수 역시 ML의 분석결과와 유사한 패턴을 보여줬다(data not shown). 오갈피속(*Eleutherococcus*)의 종들은 서로 높은 유연관계를 나타냈으며 특히 서울오갈피(*E. seoulensis*)와 오갈피(*E. sessiliflorus*)가 100% 높은 bootstrap 값을 나타내며 함께 유집되었다. 오갈피속과 음나무속은 관목 및 교목으로 수형에 큰 차이를 보이지만 가장 가까운 근연관계를 보였다. 이 결과는 오갈피속은 음나무와 근연관계라는 화분형태학적인 연구와도 일치하는 것으로 나타났다(Park and Lee 1989). 그러나 종자의 외부형태학적 특성 분석을 통하여 황칠나무와 근연관계가 있다는 최근 연구(Kim et al. 2015)와는 다른 결과로 나타났다. 오갈피나무속의 지리산오갈피(*E. divaricatus* var. *chiisanensis*)는 한국 특산으로 chiisanoside, chiisanogenin, 24-hydroxychiisanogenin, 22-hydroxychiisanogenin 등과 같은 3,4-secolupane 타입의 트리테노이드를 가지고 있으며 항간독성, 항바이러스, 항당뇨 등의 효과가 있는 것으로 보고되었다(Bae et al. 2001; Hahn et al. 1984; Oh et al. 2000). 이 식물은 서울오갈피 및 오갈피와는 유연관계가 높지만 독립적으로 구분되어 있고 엽록체 유전자 또한 이 종을 구분할 수 있는 마커를 확인할 수 있었다.

적 요

한국에 분포하는 두릅나무과 식물 대부분은 중요한 약용 식물로 경제적인 가치가 크다. 본 연구는 분자적 방법인 엽록체 DNA 바코드 염기서열 분석을 통해 한국에 자생하고 있는 두릅나무과 식물 14종 전체의 속 및 종간 유연관계를 파악해 보고 이를 구별할 수 있는 마커를 개발하

기 위해 수행되었다. 국제 생물 DNA 바코드 컨소시엄(CBOL, the Consortium for the Barcode of Life)이 DNA barcoding marker로 제안한 엽록체 DNA 7영역의 염기서열을 분석한 결과, *psbA-trnH*영역에서 가장 많은 삽입, 결실 및 염기치환이 나타났으며 조사된 한국의 두릅나무과 식물 14종 모두 구분 될 수 있었다. 또한 각각의 영역에서 특정 속과 종만이 지니는 특이적인 염기서열을 찾을 수 있었다. 인삼의 경우 중국삼과 한국삼의 염기서열에는 차이가 전혀 없었다. 7영역을 모두 유합하여 작성한 계통수에서는 통탈목이 특이성을 나타내며 가장 기부에 분계조를 형성하였다. 두릅나무속과 인삼속은 자매군을 형성하였고, 오갈피속 5 종 역시 서로 높은 유연관계를 나타내었다. 결론적으로 한국에 자생하는 14종의 두릅나무과 식물들이 모두 엽록체 DNA 바코드 마커 개발을 통해 동정이 가능함을 확인하였다.

사 사

본 연구는 다부처 유전체사업(Post-Genome Multi-Ministry Genome Project)의 일환으로 산림청 산림자원 유전체 해독사업(Forest Resources Genome Project)으로 수행되었다.

References

- Artyukova EV, Gontcharov AA, Kozyrenko MM, Reunova GD, Zhuravlev YN (2005) Phylogenetic relationships of the far eastern Araliaceae inferred from ITS sequences of nuclear rDNA. *Russ J Genet* 41:649–658
- Bae E, Yook C, Oh O, Chang S, Nohara T, Kim D (2001) Metabolism of chiisanoside from *Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus* by human intestinal bacteria and its relation to some biological activities. *Biol Pharm Bull* 24:582–585
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:12794–12797
- Chandler GT, and Plunkett GM (2004) Evolution in Apiales: nuclear and chloroplast markers together in (almost) perfect harmony. *Bot J Linn Soc* 144:123–147
- Davydov M, Krikorian AD (2000) *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. *J Ethnopharmacol* 72:345–393
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Fujikawa T, Yamaguchi A, Morita I, Takeda H, Nishibe S (1996) Protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. *Biol Pharm Bull* 19:1227–1230
- Hahn D, Kasai R, Kim J, Taniyasu S, Tanaka O (1984) A new glycosyl ester of a 3, 4-seco-triterpene from korean medicinal plant, *Acanthopanax chiisanensis* (Araliaceae). *Chem Pharm*

- Bull 32:1244-1247
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Waard JRd (2003) Biological identifications through DNA barcodes. P. R. Soc. London, Series B 270:313-321
- Jung S, Huh H, Hong J, Choi J, Chun H, Bang K, Huh M (2003) Genetic diversity and population structure of *Kalopanax pictus* (Araliaceae). J Plant Biol 46:255-262
- Kim CH (2007) Araliaceae, The Genera of Vascular Plants of Korea, flora of Korea editorial committee (eds), 155, Academy publishing Co., Seoul, Korea. pp.725-732
- Kim GR, Kim HR, Choi HS, Han JG, Kim SY, Kim CS (2015) Phylogenetic relationship of Araliaceae in Korea by seed morphological characteristics. J Wetlands Research 17:139-145
- Kim NH, Yang DC, Eom AH (2004) A phylogenetic relationships of Araliaceae based on PCR-RAPD and ITS sequences. Korean J Plant Res 17:82-93
- Kim WJ, Ji Y, Lee YM, Kang YM, Choi G, Moon BC (2015) Development of molecular markers for the authentication of *Zanthoxyla Pericarpium* by the analysis of rDNA-ITS DNA barcode regions. Kor J Herbology 30:41-47
- Kress WJ, Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. PLoS ONE 2:e508
- Lahaye R1, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. Proc Natl Acad Sci U S A 105:2923-2928
- Lee CH, Lee ST (1991) A palynotaxonomic study of the genus *Fatsia Decne.* et Planch. and its relatives (Araliaceae). Kor J Pla Tax 21:9-25
- Lee CH, Wen J (2004) Phylogeny of *Panax* using chloroplast *trnC-trnD* intergenic region and the utility of *trnC-trnD* in interspecific studies of plants. Mol Phylogenet Evol 31:894-903
- Lee GH, Jung JW, Ahn EM (2009) Antioxidant activity of isolated compounds from the shoot of *Aralia elata* Seem. Kor J Herbology 24:137-142
- Lee J, Kim CS, Lee IY (2015a) Discrimination of *Echinochloa colona* (L.) Link from other *Echinochloa* species using DNA Barcode. Weed Turf Sci 4:225-229
- Lee J, Kim CS, Lee IY (2015b) Molecular identification of Pooideae, Poaceae in Korea. Weed Turf Sci 4:18-25
- Lowry II PP, Plunkett GM, Wen J (2004) Generic relationships in Araliaceae: looking into the crystal ball. S Afr J Bot 70: 382-392
- Ma SJ, Kuk JH, Ko BS, Park KH (1995) Isolation of 3,4-dihydroxybenzoic acid with antimicrobial activity from bark of *Aralia elata*. Agr Chem Biotechnol (1):46
- Ma SJ, Kuk JH, Ko BS, Park KH (1996) Isolation and characterization of 4-hydroxycinnamic acid with antimicrobial activity from *Aralia elata*. Agr Chem Biotechnol 39:265-267
- Nakai T (1939) Flora Sylvatica Koreana, Vol. X VI, Forestal experiment station, Government general of Chosen, Seoul, Korea, pp.1-48
- Oh O, Chang S, Yook C, Yang K, Park S, Nohara T (2000) Two 3, 4-seco-lupane triterpenes from leaves of *Acanthopanax divaricatus* var. *albeofructus*. Chem Pharm Bull 48:879-881
- Park WC, Lee ST (1989) A palynotaxonomic study of the Korean Araliaceae. Kor J Pla Tax 19:103-121
- Plunkett G, Soltis D, Soltis P (1997) Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on *matK* and *rbcL* sequence data. Am J Bot 84:565-565
- Plunkett GM, II PPL, Frodin DG, Wen J (2005) Phylogeny and geography of Schefflera: pervasive polyphyly in the largest genus of Araliaceae. Ann Mo Bot Gard 92:202-224
- Plunkett GM, Wen J, Lowry II PP (2004) Intrafamilial classifications and characters in Araliaceae: Insights from the phylogenetic analysis of nuclear (ITS) and plastid (*trnL-trnF*) sequence data. Plant Syst Evol 245:1-39
- Plunkett GM, Soltis DE, Soltis PS (1996) Higher level relationships of Apiales (Apiaceae and Araliaceae) based on phylogenetic analysis of *rbcL* sequences. Am J Bot 83:499-515
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28:2731-2739
- Umeyama A, Shoji N, Takei M, Endo K, Arihara S (1992) Ciwujianosides D1 and C1: Powerful inhibitors of histamine release induced by anti-immunoglobulin E from rat peritoneal mast cells. J Pharm Sci 81:661-662
- Wen J, Plunkett GM, Mitchell AD, Wagstaff SJ (2001) The evolution of Araliaceae: a phylogenetic analysis based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Syst Bot 26:144-167
- Wen J, Zimmer EA (1996) Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Mol Phylogenet Evol 6:167-177