

Phylogenetic Analysis of *Dendropanax morbifera* Using Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Region Sequences

Yong Kook Shin*

School of Integrated Oriental Medical Bioscience, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon, Chungbuk 27136, Korea

Received October 12, 2016 / Revised October 17, 2016 / Accepted October 23, 2016

Dendropanax morbifera is an endemic tree species of Korea, it is restricted to the southern parts of Korea. The internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA (nrDNA) for *Dendropanax morbifera* grown at Bogil-do, Korea was determined. We investigated the sequence-based phylogenetic relationships of plants related and clarified its taxonomical position. The determined sequences consisted of 689 residues. ITS1 was 222 bp long while ITS2 was 233 bp long. The 5.8S rDNA was 160 bp long. The ITS region sequences of the *Dendropanax* species included in this study were obtained from GenBank. *Oreopanax polycephalus* was used as the outgroup. A pairwise alignment was calculated using the Clustal X program. A phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method using the Tree view program. Sequence similarities among species including *D. morbifera* Bogil-do isolate showed the range 92.6 to 99.7% in sequence-based phylogenetic analysis using total 615 base pairs of ITS1, 5.8S rDNA and ITS2. *D. morbifera* Bogil-do isolate exhibited the highest degree of relatedness to *D. chevalieri*, sharing 99.7% ITS region similarity. *D. morbifera* Bogil-do isolate also showed to *D. trifidus*, sharing 99.4% ITS region similarity.

Key words : Araliaceae, Bogil-do, *Dendropanax morbifera*, internal transcribed spacer (ITS) region, phylogenetic position

서 론

*Dendropanax*속은 총 92종의 상록수 및 관목으로 구성되어 있으며 아열대, 난대지역의 동아시아, 남미에 분포하고 있다. *Dendropanax*속의 황칠나무(*Dendropanax morbifera*)는 우리나라 보길도, 완도, 해남, 제주도 등의 남부 해안가에 분포하는 우리나라 특산수종이다[4-6].

황칠나무(*Dendropanax morbifera*)의 학명을 살펴보게 되면 목본을 뜻하는 'Dendro'와 전능약이라는 뜻의 'Panax'가 내포되어 있어 약리적 효능 또한 우수하다고 알려져 있다[3, 4]. 또한 줄기에 상처를 내면 노란 수액이 나와 황칠나무라고 불린다. 이 황칠수액은 천연전통도료로 사용되고 있으며, 마음을 안정시키는 안식향을 내는 성분을 포함하고 있다[4, 9, 11]. 이 밖에 황칠나무는 광택이 도는 잎을 가진 상록의 활엽교목이며 수형이 아름다워 관상수, 조경수 등으로 이용가치가 높다[9].

황칠나무에 대한 국내외 연구로는 주로 황칠수액이나 황칠

나무 각 기관의 성분 분석[1, 6, 7], 면역활성[9], 미백[8, 10, 14] 등에 대한 연구가 진행되었다. 황칠나무와 일본황칠나무(*D. trifidus*)의 상관관계를 나타내기 위하여 PCR-RAPD분석[4]을 수행하였으나, 명확한 분자계통학적 위치는 결정하지 못하였다.

따라서 본 연구에서는 약리적으로나 관상용으로써 이용가치가 높으며 천연 전통도료로써 사용되고 있는 황칠나무의 nuclear ribosomal DNA (nrDNA)의 internal transcribed spacer (ITS) 부위의 염기서열[2, 15, 17]을 결정하여 분자계통학적 위치를 명확히 하고자 하였다.

재료 및 방법

실험시료 확보 및 황칠나무의 기내 캘러스 유도

황칠나무의 묘목은 전라남도 완도군 보길도의 농장에서 구입하여 사용하였다. 화분에 식재 후 정단부의 어린잎과 줄기를 이용하여 캘러스 유도용 재료로 사용하였다. 황칠나무의 캘러스 유도배지의 조성은 1 MS + 30 g/l sucrose + 1 mg/l BA + 1 mg/l 2,4-D + 2.1 g/l gelrite로 121℃, 1.2기압의 고압 멸균기에 25분간 멸균한 뒤 petri dish에 30 ml씩 분주하여 사용하였다[13]. 황칠나무의 어린잎은 주맥을 중심으로 0.5 cm²의 사이즈로 잘라 배지에 8 개씩 치상하였으며, 엽병의 경우 0.5 cm로 잘라 배지에 6 개씩 치상하였다. 약 8주~10주 후 유도된 캘러스를 선발 및 계대하여 nrDNA의 ITS 분석을 위한 재료로 사용하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-43-649-1693, Fax : +82-43-649-1702

E-mail : shinella@semyung.ac.kr

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

DNA의 추출, ITS region의 PCR 증폭 및 DNA sequencing
 황칠나무의 DNA는 유도된 캘러스로부터 Loockerman and Jansen[12] 법에 의해 추출되었다. 추출된 genomic DNA의 정량은 UV-vis spectrophotometer (Geldoc-it™ imaging system, Upland, California, USA)를 사용하여 정량한 후, 5 ng/μl로 희석하여 PCR을 위한 DNA로 사용하였다. DNA 증폭은 PTC-200 thermo cycler (Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Waltham, MA, USA)로 수행하였으며, ITS region의 증폭을 위해 ITS 4R primer(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')와 ITS 5F primer(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAAGG-3')를 사용하였다[19]. PCR 반응조건은 95°C에서 2분간 변성시키고, 95°C에서 20초, 56°C에서 40초, 72°C에서 50초씩 총 35회 반복한 후 72°C에서 5분간 더 유지시켰다. 증폭된 PCR산물은 Gel & PCR purification system kit (Solgent Co., Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 PCR산물은 ABI (Applied Biosystems, California, USA) 3730xl DNA analyzer를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

ITS region의 계통수 분석

결정된 염기서열은 GenBank의 BLAST (Baic Local Alignment Search Tool) 프로그램 (<http://www.ncbi.nlm.nih>. BLAST)을 사용하여 GenBank/EMBL/DDBJ에 등록되어 있는 유연 식물들의 염기서열과 상호 비교 검색하였다. 검색 결과를 토대로 하여 *Dendropanax* 속 33종과 out group으로 *Oreopanax polycephalus* (GU054638)의 ITS region의 염기서열을 수집한 후, CLUSTAL X 프로그램[18]을 사용하여 multiple alignment를 수행하였다. Multiple alignment의 결과를 Tree view 프로그램 상에서 neighbor - joining법[16]으로 계통수를 작성하였다.

결과 및 고찰

본 연구에 사용되어진 보길도의 황칠나무(*Dendropanax moribifera*)의 ITS region의 염기서열을 분석한 결과, 총 689염기를 결정하였다. 결정된 689염기 중에서 ITS1은 222개염기, 5.8S rDNA는 160염기, ITS2는 233염기인 것으로 판명되었다. Gen Bank의 BLAST 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih>.BLAST)을 사용하여 GenBank/EMBL/DDBJ에 등록되어 있는 *Dendropanax* 속 33종(Table 1)의 염기서열을 수집한 후 multiple alignment를 수행한 결과, 유사도는 99.7%(*D. chevalieri*)에서 92.6%(*Dendropanax arboreus*)로 나타났다. 유사도가 99.7%인 *D. chevalieri* (GU054668)종과는 2개의 염기서열이 상이하였으며, 일본황칠나무(*D. trifidus*)와는 4개의 염기서열이 상이(유사도 99.4%)하였고, *D. confertus* (GU054698) 종과는 6개의 염기서열이 상이(유사도 99.0%)하였다. 유사도가 92.6%인 *Dendropanax arboreus* (AY389033) 종과는 46염기서열이 상이하

다. 한편 *Oreopanax polycephalus* (GU054638)를 outgroup하여 계통수를 작성한 결과는 Fig. 1에 나타내었다.

본 연구에서는 *Dendropanax*속 내에서 국내의 보길도에 자생하는 황칠나무의 분자계통학적 위치를 명확히 하였지만, 향후에는 제주도, 완도, 거문도, 해남 등 국내에 자생하는 황칠나무들을 확보하여 국내 자생 종간의 분자계통학적 상관관계를 명확히 할 필요가 있다. 현재 황칠나무와 일본황칠나무는 형태학적으로는 열매의 형태와 수액의 색으로 나누고 있지만, PCR-RAPD 분석결과에 의하면, 일본황칠나무와 서로 명확한 구분이 되지 않고 있는 실정이다[4]. 따라서 약리적으로나 관상용으로써 이용가치가 높으며 천연 전통도료로써 사용되고

Table 1. *Dendropanax* species subjected to phylogenetic analysis and GenBank accession numbers

Species	GenBank accession number
[1] <i>Dendropanax moribifera</i> Bogil-do isolate	This study
[2] <i>Dendropanax arboreus</i>	(AY389033)
[3] <i>Dendropanax bolivianus</i>	(GU054672)
[4] <i>Dendropanax burmanicus</i>	(GU054686)
[5] <i>Dendropanax caloneurus</i>	(GU054617)
[6] <i>Dendropanax capillaris</i>	(GU054629)
[7] <i>Dendropanax caucanus</i>	(GU054631)
[8] <i>Dendropanax chevalieri</i>	(GU054668)
[9] <i>Dendropanax confertus</i>	(GU054698)
[10] <i>Dendropanax cuneatus</i>	(GU054680)
[11] <i>Dendropanax cuneifolius</i>	(GU054667)
[12] <i>Dendropanax dentiger</i>	(KP092536)
[13] <i>Dendropanax globosus</i>	(GU054619)
[14] <i>Dendropanax gonatopodus</i>	(KC952402)
[15] <i>Dendropanax hainanensis</i>	(AF242236)
[16] <i>Dendropanax hoi</i>	(GU054683)
[17] <i>Dendropanax lancifolius</i>	(DQ007370)
[18] <i>Dendropanax latilobus</i>	(GU054656)
[19] <i>Dendropanax macropodus</i>	(GU054620)
[20] <i>Dendropanax maingayi</i>	(DQ007371)
[21] <i>Dendropanax oliganthus</i>	(GU054673)
[22] <i>Dendropanax oligodontus</i>	(GU054673)
[23] <i>Dendropanax pallidus</i>	(GU054696)
[24] <i>Dendropanax palustris</i>	(GU054658)
[25] <i>Dendropanax poilanei</i>	(GU054677)
[26] <i>Dendropanax praestans</i>	(GU054657)
[27] <i>Dendropanax productus</i>	(GU054687)
[28] <i>Dendropanax proteus</i>	(GU054621)
[29] <i>Dendropanax punctatus</i>	(GU054697)
[30] <i>Dendropanax ravenii</i>	(GU054635)
[31] <i>Dendropanax schippii</i>	(GU054682)
[32] <i>Dendropanax sessiliflorus</i>	(GU054691)
[33] <i>Dendropanax trifidus</i>	(AF242238)
[34] <i>Dendropanax umbellatus</i>	(GU054675)
[35] <i>Oreopanax polycephalus</i>	(GU054638)

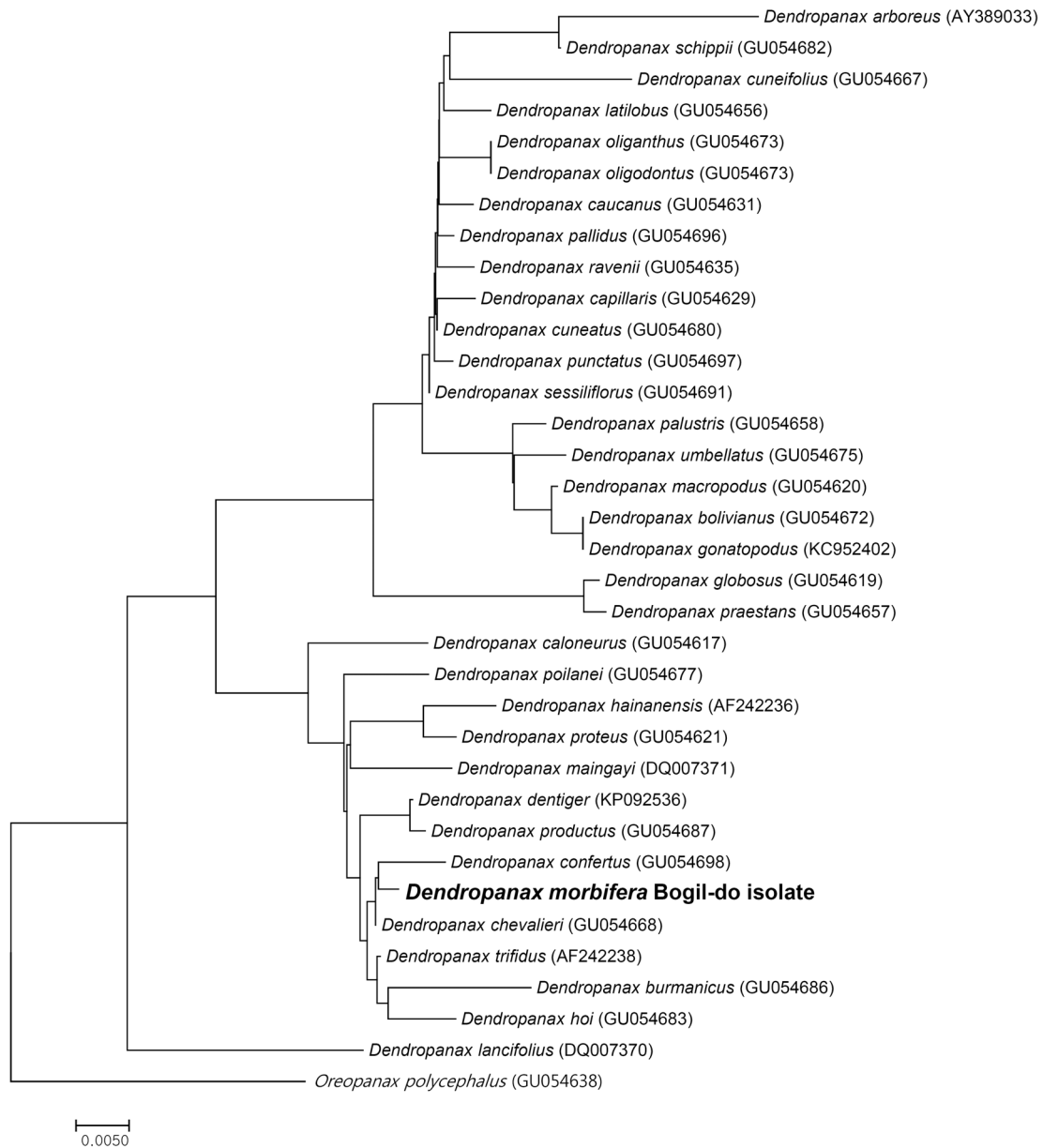


Fig. 1. Phylogenetic tree of based on ITS region sequences showing the position of *D. morbifera* Bogil-do isolate, *Dendropanax* species and *Oreopanax polycephalus*. The strains of which the ITS region sequences were determined in this study are indicated in bold. *Oreopanax polycephalus* were used as outgroups. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

있는 국내 자생 황칠나무의 보존을 위해서 일본의 각지에 자생하는 황칠나무와의 명확한 분자계통학적 연구가 필요하다고 사료되어 진다.

References

- Ahn, J. C., Kim, M. Y., Kim, O. T., Kim, K. S., Kim, S. H., Kim, S. H. and Hwang, B. 2002. Selection of the high yield capacity of Hwangchil lacquer and identification of aromatic components in essential oil of *Dendropanax morbifera* Lev. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **10**, 126-131.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S. and Donoghue, M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **82**, 247-277.
- Bea, K. H., Kim, J. A. and Choi, Y. E. 2009. Induction and in vitro proliferation of adventitious roots in *Dendropanax morbifera*. *J. Plant Biotechnol.* **36**, 163-169.
- Han, S. H., Jung, Y. H., Oh, M. H., Ko, M. H., Oh, Y. S., Koh, S. C., Kim, M. H. and Oh, M. Y. 1998. Phylogenetic relationships of the *Dendropanax morbifera* and *D. trifidus* based on PCR-RAPD. *Kor. J. Genetics* **20**, 173-181.

5. Im, H. T. 1992. Plant geographical study for the plant of Cheju. *Kor. J. Plant Tax.* **22**, 219-234.
6. Jeong, B. S., Jo, J. S., Pyo, B. S. and Hwang, B. 1995. Studies on the distribution of *Dendropanax morbifera* and component analysis of the golden lacquer. *Kor. Society Biotechnol. Bioeng.* **10**, 393-400.
7. Kim, H. R. and Chung, H. J. 1999. Seasonal Changes in Chemical Components of the Leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. *J. Kor. Forest Society* **88**, 562-567.
8. Lee, M. K., Lee, I. S. and Lee J. S. 2013. For the utilization of native plant resources as high-value materials; evaluation on demelanizing activity of *Dendropanax morbifera* in bogildo. *J. Kor. Island* **25**, 227-240.
9. Lee, S. H., Lee, H. S., Park, Y. S., Hwang, B., Kim J. H. and Lee H. Y. 2002. Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **10**, 109-115.
10. Lee, S. Y., Choi, E. J., Bae, D. H., Lee, D. W. and Kim, S. O. 2015. Effects of 1-tetradecanol and β -sitosterol isolated from *Dendropanax morbifera* Lev. on skin whitening, moisturizing and preventing hair loss. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* **41**, 73-83.
11. Lim, K. P., Chung, W. Y. and Hong, D. H. 1998. Studies on the development of traditional korea golden vamish (Hwangchil) (III) main component analysis of korea golden vamish traditionally refined from the exudates of hwangchil namu (*Dendropanax morbifera* Lev.). *Mokchae Konghak* **26**, 73-80.
12. Loockerman, D. J. and Jansen, R. K. 1996. The use of herbarium material for DNA studies. pp. 205-220. In: Stussey, T. J. and Sohmer, S. (eds.), *Sampling the Green World*, Columbia Univ. Press, New York.
13. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
14. Park, S. A., Park, J., Park, C. I., Jie, Y. J., Hwang, Y. C., Kim, Y. H., Jeon, S. H., Lee, M. H., Ha, J. H., Kim, K. J. and Park, S. N. 2013. Cellular antioxidant activity and whitening effects of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 407-415.
15. Rogers, S. O. and Bendich, A. J. 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol. Biol.* **9**, 509-520.
16. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
17. Schaal, B. A. and Learn Jr, G. H. 1988. Ribosomal DNA variation within and among plant populations. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **75**, 1207-1216.
18. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4876-4882.
19. White, T. J., Birns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: Gelfand, D., J. Sninsky and T. White (eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego.

초록 : Internal transcribed spacer (ITS) region의 염기서열 분석에 의한 보길도산 황칠나무의 분자 계통학적 연구

신용국*

(세명대학교 한방바이오융합과학부)

보길도에서 자라고 있는 황칠나무(*Dendropanax morbifera*)를 구입하여, 캘러스로 유도한 후, ribosomal DNA (nrDNA)의 internal transcribed spacer (ITS) region의 염기서열을 결정하였다. 보길도의 황칠나무(*Dendropanax morbifera*)의 ITS region의 염기서열을 분석한 결과, 총 689염기를 결정하였다. 결정된 689염기 중에서 ITS1은 222개염기, 5.8S rDNA는 160염기, ITS2는 233염기인 것으로 판명되었다. GenBank의 BLAST 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.BLAST>)을 사용하여 GenBank/EMBL/DDBJ에 등록되어 있는 *Dendropanax* 속 33의 염기서열을 수집한 후 multiple alignment를 수행한 결과, 유사도는 99.7%(*D. chevalieri*)에서 92.6%(*Dendropanax arboreus*)로 나타났다. 일본황칠나무(*D. trifidus*)와는 유사도가 99.4%로 판명되었다.