

## ITS 염기서열분석에 의한 한국산, 중국산 및 러시아산 가시오갈피의 유연관계 분석

한효심, 김두영, 이갑연<sup>1</sup>, 박완근<sup>2</sup>, 조인경<sup>3</sup>, 정재성\*

순천대학교 생물학과, <sup>1</sup>국립산림과학원 산림종자연구소, <sup>2</sup>강원대학교 산림자원학부, <sup>3</sup>남부대학교 식품생명과학과

### Comparative Analysis of *Acanthopanax senticosus* Harms from Korea, China and Russia Based on the ITS Sequences of Nuclear Ribosomal DNA

Hyo Shim Han, Doo Young Kim, Kab Yeon Lee<sup>1</sup>, Wan Geun Park<sup>2</sup>, In Kyung Cho<sup>3</sup> and Jae Sung Jung\*

Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

<sup>1</sup>Forest Seed Research Center, Korea Forest Research Institute, Chungju 380-150, Korea

<sup>2</sup>Department of Forestry, Kangwon National University, Chuncheon 200-702, Korea

<sup>3</sup>Department of Food Science and Technology, Nambu University, Gwangju 506-824, Korea

**Abstract** - The genetic analyses of *Acanthopanax senticosus* Harms from Korea, China and Russia, were made by comparing the internal transcribed spacer (ITS) sequences of the nuclear ribosomal DNA. The ITS region of *A. senticosus* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the universal primers and then directly sequenced. The length of the ITS region including 162 bp 5.8S rRNA gene ranged from 608 bp (for Korean and Chinese) to 611 bp (for Russian). The G+C content of ITS region were 60.20% for Korean and Chinese plants and 60.06% for Russian plants. Sequence comparisons indicated that ITS regions of *A. senticosus* from Korea and China were identical, whereas the ITS sequence of *A. senticosus* from Russia showed 99.2% homology with the plants from Korea. Variation in sequences were attributable to 5 bp substitution such as transversion or insertion events. These results suggested that *A. senticosus* Harms from Korea and China were closely related in phylogenetic relationship compared to Russian. In addition, *A. senticosus* Harms were more similar to *Kalopanax pictus* than *A. sessiliflorus* in their ITS sequences.

**Key words** - *Acanthopanax senticosus* Harms, ITS sequence, Siberian ginseng

## 서 언

가시오갈피(*Acanthopanax senticosus* Harms)는 두릅나무과에 속하는 다년생 낙엽관목으로 시베리아 인삼으로 알려져 있으며, 주로 북반구 극동 아시아지역인 시베리아, 중국의 북동부 및 일본의 북해도 등에 자생하고 있다 (Lee, 1979; Yi *et al.*, 2001). 우리나라에는 해발 600m 이상의 고산지대에서 소규모 군락으로 자생하고 있는 것으로 알려져 있으나 (Nakai, 1927), 최근 연구에 의하면 예외적으로 해발 500m 부근에서 자생지가 발견되기도 하였다 (허 등, 2003).

가시오갈피는 강장작용, 류머티즘, 만성기관지염, 고혈압,

위궤양 등에 뛰어난 약리효과가 있는 것으로 알려져 있어 우리나라를 비롯한 동양에서 고대로부터 뿌리, 줄기, 잎, 열매를 약재로 사용하여 왔다 (Fujikawa *et al.*, 1996; Kim, 1997). 또한 최근에는 항산화, 항염증, 항통증, 항알러지, 항세균, 항스트레스, 항암 효과 및 인체면역력 증진 효과 등이 계속적으로 보고되고 있다 (Davydov and Krikorian, 2000; Fujikawa, *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2003; Hibasami *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Yi *et al.* 2002; Zhao, *et al.*, 2001).

국내에 자생하고 있는 가시오갈피는 남획으로 인한 자생지 파괴가 심각하여 산림청과 환경부에서 보호식물로 지정하여 보호하고 있다. 가시오갈피의 주요 약효성분인 eleutheroside E와 chlorogenic acid 등의 함량이 중국산이나 러시아산에 비해 국내산이 월등히 높으며 (Wagner *et al.*,

\* 교신저자(E-mail) : jjung@suncheon.ac.kr

1982), 자생지나 재배지에 따라서 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다 (Ahn *et al.*, 2000). 이러한 물질의 함량 차이는 자생지의 환경조건과 더불어 유전적 배경에 기인하므로 미래 수요에 대한 대처 차원에서라도 가시오갈피에 대한 정확한 유전적 평가가 필요하다.

rDNA는 오래전부터 계통분류학적 연구에 사용되어 온 DNA 구간으로서 18S, 5.8S, 26S 등 세 개의 ribosomal RNA를 coding하는 구간과 이들 coding region을 연결하는 2개의 internal transcribed spacer (ITS 1, ITS 2)로 구성되어 있다. ITS1은 18S와 5.8S 사이에, ITS2는 5.8S와 26S사이에 존재함으로써 양쪽 말단에 ribosomal RNA coding gene이 위치하게 된다. 이들 단위가 intergenic spacer (IGS)로 연결되어 수천-수만개가 반복되는 구조로 되어 있다. rDNA 중 18S, 5.8S, 26S 등의 coding region은 진화속도가 매우 느려 과 (family) 이상의 상위 분류군의 계통학적 진화관계를 연구하는데 활용될 수 있다. 반면에 ITS구간은 진화속도가 비교적 빠르기 때문에 속 (genus) 간, 혹은 속 이하의 분류군이나 집단 내에서 종(species) 분류 등의 연구에 적합하여 최근 이를 이용한 식물계통학의 연구가 활발히 진행되고 있다 (Downie and Katz-Downie, 1996; 신 등, 2003; 한 등, 2000).

본 연구에서는 ITS 부위의 염기서열을 바탕으로 하여 한국, 중국, 러시아에 자생하고 있는 가시오갈피 사이의 종 내 유연관계를 파악하고자 한다. 이러한 연구의 결과는 앞으로 국내산과 외국산 가시오갈피를 손쉽게 구별할 수 있는 marker의 탐색 등에 이용될 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

본 실험에 사용한 시료는 가시오갈피 주 분포지인 강원도의 오대산, 치악산, 삼악산의 자생 군락에서 채취된 각각 1개 체씩과 중국산 3개체 및 러시아산 3개체를 사용하였다. 가시오갈피 시료는 1997년 전국의 자생지와 원산지에서 개체별로 삽수가 채취되어 산림과학원 종자연구소 춘천시협림의 국내포지에 자라고 있는 개체에서 성엽을 채취하였다.

### Genomic DNA의 분리 및 정제

액체질소로 분쇄시킨 엽육 조직에서의 DNA 분리는 이등 (1998)의 방법을 사용하였다. 건조된 DNA는 적당량의 10mM Tris-HCl (pH8.0)에 녹인 후 Hoefer사의 DNA fluorometer (TKO-100)를 사용하여 양을 측정하였다.

### PCR

Primer는 진핵생물에 대한 universal primer로 White 등 (1990)이 고안한 ITS1 primer (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG TG-3')와 ITS4 primer (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 사용하였다.

PCR 반응액은 1 $\mu$ l의 DNA (30ng), 2 U Taq polymerase (Takara Co.), 5  $\mu$ l의 10X buffer (100 mM Tris-HCl, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, pH 8.0), 각각 1  $\mu$ M의 primer, 200 $\mu$ M의 deoxyribonucleoside triphosphates를 넣고 멸균증류수로 최종 반응용액의 부피를 50 $\mu$ l로 조절하였다. Perkin-Elmer사의 GeneAmp PCR system 2400을 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 전 처리한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성, 55 $^{\circ}$ C에서 30초간 재생반응, 72 $^{\circ}$ C에서 20초간 연장반응을 30회 반복하고 마지막 연장반응은 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 실시하였다. 증폭된 DNA 절편은 1.0% agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다.

### 염기서열 분석

증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 목적 밴드를 분리한 다음 Ultra clean kit (Mobio Co.)로 정제하였고, ALF-Express automatic sequencer (Pharmacia Biotech, Lyon, France)를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열의 비교분석은 GenBank의 NCBI BLAST search 프로그램을 활용하였다.

## 결과 및 고찰

1990년 후반부터 웰빙에 대한 관심이 높아지면서 가시오갈피의 수요가 급증하여 우리나라에서만 약 100개 이상의 기업이 오갈피 관련 식·의약품을 개발하여 출시하고 있으나 이들 제품의 원료가 대부분 중국이나 러시아로부터 들여오고 있는 실정이다 (한과 최, 2003). 그러나 국산과 수입산을 구별하는 방법이 명확하지 않아 수입산이 국내산으로 둔갑하여 판매되는 등의 문제점이 발생하고 있어 이에 대한 대책이 시급한 실정이다. 본 연구에서는 국내에 자생하고 있는 가시오갈피 군락 중 3개 군락(삼악산, 오대산, 치악산)의 가시오갈피 3개체와 중국 및 러시아에서 자생하고 있는 가시오갈피 3개체씩을 선택하여 ITS부위의 염기서열을 분석함으로써 지리적 차이에 따른 유전적 변이를 파악하고자 하였다.

염기서열의 분석 결과 국내산 가시오갈피의 ITS는 ITS1 영역이 220 bp, 5.8S rRNA 유전자 영역이 162 bp, ITS2 영역이 226 bp, 전체길이가 608 bp였다. 국내산 3개체의 염기서열이 100% 동일하여 국내산 가시오갈피들의 ITS영역

에는 변이가 없는 것으로 확인되었다 (Fig. 1). 홍 등 (2000) 이 국내 가시오갈피 군락의 유전변이 분석을 통해 군락간의 유전변이가 62.8%로 매우 높게 나타나 군락의 유전적 유연성을 찾을 수 없었다는 보고가 있으나 ITS 염기서열 분석 결과는 국내 자생 오갈피들이 동일기원에서 시작하였을 가능성을 보여주었다.

중국산 가시오갈피의 ITS 염기서열은 국내산 가시오갈피와 100% 일치하였다. 그러나 러시아산 가시오갈피의 ITS는

ITS1 영역이 222 bp, 5.8S rRNA 유전자 영역이 162 bp, ITS2 영역이 227 bp, 전체길이가 611 bp로 국내산이나 중국산과 비교했을 때 3 bp의 염기 삽입과 2bp의 염기치환과 같은 변이가 존재하여 99.2%의 상동성을 나타내었다 (Fig. 1).

가시오갈피 ITS 영역의 염기구성을 보면 한국과 중국 가시오갈피는 adenine이 21.05%, guanine이 29.28%, thymine이 18.75%, cytosine이 30.92%로 나타났다. 러시아 가시오갈피는 adenine이 21.28%, guanine이 28.97%,

	▶ ITS1					
Korean 1	CGAAACCTGC	ACAGCA-GAA	CGACCCGCGA	ACACGTTACC	ATACCGGGCG	AGGGACGTGG
Russian 1	.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....
Korean 60	GGTGCGCAAG	TTCCCCAAGT	CGCGAACCCA	TTGTCGGGGA	TCGCCCTCGG	G-CGGTCCTC
Russian 61	.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....
Korean 120	GACTGAACAA	CGTCACCCCG	GCGCGGAATG	CGCCAAGGAA	ATCAAAGTGA	ACTGAACGCG
Russian 122	.....	.....	.....	.....	.....	.....
					◀▶ 5.8S rDNA	
Korean 179	TCCCACCCGT	TCGCGGGCTG	TGGGGGCGTC	TTTTTAAAAC	ACAAACGACT	CTCGGCAACG
Russian 181	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Korean 239	GATATCTCGG	CTCTCGCATC	GATGAAGAAC	GTAGCGAAAT	GCGATACTTG	GTGTGAATTG
Russian 241	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Korean 299	CAGAATCCCG	TGAACCATCG	AGTCTTTGAA	CGCAAGTTGC	GCCCCAAGCC	ATTAGGCCGA
Russian 301	.....	.....	.....	.....	.....	.....
					◀▶ ITS2	
Korean 359	GGGCACGTCT	GCCTGGGCGT	CACGCATCGC	GTCGCCCCCC	AACCCTGCAC	TCCCTCATGG
Russian 361	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Korean 419	GAGTCATGAC	TGAGGGGCGG	ATACTGGCCT	CCCGTGTCTC	ACCGTGCGGT	TGGCCCAAAT
Russian 421	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Korean 479	GTGAGTCCTT	GGGGACGGAC	GTCAGGACAA	GTGGTGGTTG	T-GAAAAGCC	CTCTTCTCCT
Russian 481	.....	.....C.....	.....C.....	.....	.....A.....	.....
Korean 538	GTCGTGCGGT	GGCCCGTCGC	CAGCAAAAGC	TCATGTGACC	CTGTTGTGCC	GTCCTCGACG
Russian 541	.....	.....	.....	.....	.....	.....
		◀				
Korean 598	AGCACTCCGA	C 608				
Russian 601	.....	..... 611				

Figure 1. Aligned sequences of ITS region from Korean and Russian *Acanthopanax senticosus*. The bar(-) indicates the gaps and dot(·) indicates same sequences to the upper sequence. The black arrow heads show start position (▶) and stop position (◀) of ITS1, 5.8S rDNA, and ITS2 region.

Table 1. Base composition of DNA sequences of the ITS region from *A. senticosus* distributed on Korea, China and Russia

Origin	Total (bp)	Composition (%)					
		A	G	T	C	A+T	G+C
Korea	608	21.05	29.28	18.75	30.92	39.8	60.20
China	608	21.05	29.28	18.75	30.92	39.8	60.20
Russia	611	21.28	28.97	18.66	31.09	39.94	60.06

thymine이 18.66%, cytosine이 31.09%로 나타나 adenine과 cytosine의 비율이 한국과 중국 가시오갈피에 비해 더 높았다 (Table 1).

DNA 이중 나선구조 형성에서 중요한 의미를 가지는 A+T 함량은 한국과 중국 가시오갈피가 39.8%, 러시아 가시오갈피가 39.94%였고, G+C 함량은 전자가 60.2%이고 후자가 60.06%로 가시오갈피의 ITS는 A+T보다 G+C의 함량이 더 높았다 (Table 1). 이러한 결과는 백합의 61.4% (Dubouzet and Shinoda, 1999), 밀의 61.4%, 벼의 70.7% (Hsiao et al., 1994)보다는 낮고, 연의 55.83% (신 등, 2003), *Diseae*속의 43-35% (Douzery et al., 1999) 보다는 높았으며 황칠나무의 60.1% (한 등, 2000)와는 비슷한 수준이었다.

한국산 가시오갈피와 동일 속에 속하며 중국 Yunnan, Sichuan 등지에 자생하는 것으로 알려진 *Eleutherococcus simonii* (*Acanthopanax simonii*)와 10 bp 차이를 나타내어 98.4%의 높은 상동성을 나타내었다. 한편 음나무 (*Kalopanax pictus*)와는 97.9%의 상동성을 나타내었으며 오갈피나무 (*Acanthopanax sessiliflorus*)와는 97.2%의 상동성을 나타내었다 (Wen et al., 2001). 따라서 국내에 자생하는 가시오갈피의 경우, ITS 분석만으로는 오갈피나무보다 음나무와 유전적 유연관계가 더 높은 것으로 나타났다.

가시오갈피에 대한 ITS의 염기서열 분석 결과, 국내에 자생하는 가시오갈피는 러시아산보다는 중국산과 유전적 유연관계가 더 가까운 것으로 보인다. 또한 ITS 염기서열 분석은 국내산과 러시아산 가시오갈피를 구분할 수 있는 DNA marker로의 가능성을 보여준다.

## 적 요

한국, 중국, 러시아에서 자생하고 있는 가시오갈피에 대한 유전적 유연관계를 파악하기 위해 ITS (internal transcribed spacer)의 염기서열을 분석하였다. Universal primer를 사용하여 PCR로 증폭시킨 후 염기서열을 결정하고 결과 ITS의 길이는 162 bp의 5.8S rRNA 유전자를 포함하여 한국산과 중국산은 608 bp 그리고 러시아산은 611 bp로

나타났다. ITS영역의 G+C 함량은 한국산과 중국산이 60.20%이고 러시아산이 60.06%였다. 한국산과 중국산의 ITS영역은 100% 동일하였으며, 러시아산은 한국산과 비교했을 때 3 bp의 염기삽입과 2 bp의 염기치환이 존재하여 99.2%의 상동성을 나타내었다. 따라서 한국산 가시오갈피는 러시아산보다 중국산과 유전적 유연관계가 더 가까운 것으로 추정된다. 또한 동일 속내에서는 오갈피나무보다는 음나무와 ITS 염기서열이 유사한 것으로 나타났다.

## 사 사

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임

## 인용문헌

- Ahn, J.K., W.Y. Lee, S.J. Oh, Y.H. Park, S.D. Hur and M.S. Choi. 2000. The contents of chlorogenic acid and eleutheroside E in *Eleutherococcus senticosus* Harms. J. Korea. For. Sco. 89: 216-222.
- Davydov M. and A.D. Krikorian. 2000. *Elutherococcus senticosus* Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. J. Ethnopharmacol. 72: 345-393.
- Douzery, E.J.P., A.M. Pridgeon, P. Kores. H.P. Linder, H. Kurzweil and M.W. Chase. 1999. Molecular phylogenetics of *Diseae*(Orchidaceae): A contribution from nuclear ribosomal ITS sequences. Amer. J. Bot. 86: 887-899.
- Downie, S.R. and D.S. Katz-Downie. 1996. A molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Amer. J. Bot. 83: 234-251.
- Dubouzet, J.G. and K. Shinoda. 1999. Phylogenetic analysis of the internal transcribed spacer region of Japanese *Lilium* species. Theor. Appl. Genet. 98: 954-960.
- Fujikawa T., A. Yamaguchi, I. Morita, H. Takeda and S. Nishibe. 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: 1277-1230.
- Fujikawa, T., S. Miguchi, N. Kanada, N. Nakai, M. Ogata, I. Suzuki and K. Nakashima. 2005. *Acanthopanax senticosus* Harms as a prophylactic for MPTP-induced Parkinson's disease in rats. J. Ethnopharmacol. 97: 375-381.
- Han S.B., Y.D. Yoon, H.J. Ahn, H.S. Lee, C.W. Lee, W.K. Yoon, S.K. Park and H.M. Kim. 2003. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*. Int. Immunopharmacol. 3: 1301-1312.
- Hibasami, H., T. Fujikawa, H. Takeda, S. Nishibe, T. Satoh, T. Fujisawa and K. Nakashima. 2000. Induction of apoptosis by *Acanthopanax senticosus* Harms and its components, sesamin in human stomach cancer Kato III cell. Onco. Rep. 7: 1213-1216.
- Hsiao, C., N.J. Chatterton, K.H. Asay and K.B. Jensen. 1994. Phylogenetic relationships of 10 grass species: An assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. Genome 37: 112-120.
- Jung H.J., H.J. Park, R.G. Kim, K.M. Shin, J. Ha, J.W. Choi, H.J. Kim, Y.S. Lee and K.T. Lee. 2003. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects of liriodendrin isolated from the stem bark of *Acanthopanax senticosus*. Planta Med. 69: 610-616.
- Kim, C.H. 1997. Systematics of *Eleutherococcus* and related genera (Araliaceae). Chonbuk National University, Ph.D. these paper p263.
- Kim, C.H. and J.C. Nam. 1985. Effect of some environmental factors on Japanese yew (*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc). J. Korean For. Soc. 70: 1-6.
- Lee S., D.S. Shin, K.B. Oh and K.H. Shin. 2003. Antibacterial compounds from the leaves of *Acanthopanax senticosus*. Arch. Pharm. Res. 26: 40-42.
- Lee, S., D. Son, J. Ryu, Y.S. Lee, S.H. Jung, J. Kang, S.Y. Lee, H.S. Kim and K.H. Shin. 2004. Anti-oxidant activities of *Acanthopanax senticosus* stems and their lignan components. Arch. Pharm Res. 27: 106-110.
- Lee, W.T. 1979. Distribution of *Acanthopanax* plants in Korea. Korean J. Pharmacognosy 10: 103-107.
- Nakai, T. 1927. Araliaceae flora sylvatica Koreana. For. Exp. Sta Govern. Seoul. 16: 1-15.
- Wagner, H., Y.H. Heur, A. Obermeier, G. Tittel and S. Bladt. 1982. Die DC- and HPLC- analysis der *Eleutherococcus* Droge. J. Medicinal Plant Res. 44: 193-198.
- Wen, J., G.M. Plunkett, A.D. Mitchell and S.J. Wagstaff. 2001. The evolution of Araliaceae: A phylogenetic analysis based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. J. Syst. Bot. 26: 144-167.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. Innis, S. Gelfand, J. Sninsky, and T. White (eds.), PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego. pp. 315-322.
- Yi, J.M., M.S. Kim, S.W. Seo, K.N. Lee, C.S. Yook and H.M. Kim. 2001. *Acanthopanax senticosus* root inhibits mast cell-dependent anaphylaxis. Clinica. Chimica. Acta. 312: 163-168.
- Yi, J.M., S.J. Hong, J.H. Kim, H.K. Kim, H.J. Song and H.M. Kim. 2002. Effect of *Acanthopanax senticosus* stem on mast cell-dependent anaphylaxis. J. Ethnopharmacol. 79: 347-352.
- Zhao, M., Y. Wang and L. Kang. 2001. Study on activity of inner inhibitory substance of *Acanthopanax senticosus* Harms fruits and seeds. Zhongguo. Zhong. Yao. Za. Zhi. 26: 534-538.
- 신세균, 윤종선, 윤태, 심우경. 2003. 연의 ITS 염기서열 분석에 의한 유연관계 분석. 한국원예학회지 44: 451-457.
- 이효연, 한효심, 이갑연, 한상섭, 정재성. 1998. RAPD 표지인자를 이용한 흑오미자의 자웅동주 및 자웅이주 식물의 동정. 식물조직배양학회지 25: 309-313.
- 한상현, 정용환, 고미희, 오유성, 고석찬, 김문홍, 오문유. 2000. 핵리보솜 DNA ITS 염기서열 분석에 의한 황칠나무와 일본 황칠나무의 계통유전학적 유연관계. 한국유전학회지 22: 257-264.
- 한정연, 최용의. 2003. 세포배양을 통한 가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus*) 묘목의 대량 생산 시스템 개발. 식물생명공학학회지. 30: 167-172.
- 허성두, 박유현, 이갑연, 유세걸. 2003. 오갈피나무와 가시오갈피의 자생지 생장 및 엽 특성. 2003 한국임학회 학술연구발표논문집 pp. 271-273.
- 홍경낙, 조정진, 박유현, 허성두, 홍용표, 강범영. 2000. 국내 가시오갈피 군락의 유전변이 분석. 한국임학회지 89: 645-654.

(접수일 2005. 7. 27; 수락일 2006. 1. 11)