

최 중
연구보고서

천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염
치료제 개발

Development of Stable Production Techniques and Contact
Dermatitis Therapy Device using Chunneyoncho(*Opuntia humifusa*)

충청남도농업기술원
경북대학교
(주) 바이오 피아
(주) 천년초

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염 치료제 개발” (제1세부
과제 : “천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염 치료제 개발”, 제2세부과제 :
천년초선인장의 안전성 및 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검증” 위탁연구과제 : “유전자
분석을 통한 천년초선인장의 기원연구 및 유효성분 분석” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 6월 일

주관연구기관명 : 충청남도농업기술원

총괄연구책임자 : 한 승 호

세부연구책임자 : 한 승 호

연 구 원 : 김 현 호

연 구 원 : 강 영 식

연 구 원 : 김 관 후

연 구 원 : 이 재 철

연 구 원 : 성 봉 재

연 구 원 : 김 선 익

연 구 원 : 이 가 순

연 구 원 : 신 철 우

연 구 원 : 이 중 철

합동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 김 길 수

위탁연구기관명 : (주)바이오피아

위탁연구책임자 : 인준교

참 여 기 관 명 : (주)천년초

참여기업대표자 : 김복현

요 약 문

I. 제목

천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염 치료제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 기술적 측면

- 선인장은 열대지방 원산의 관상용식물로 줄기선인장, 개발선인장, 마디선인장, 부채선인장 등 여러 종이 있으며, 부채선인장은 제주도와 일부지역 등지에 귀화식물로 재배되고 있다(고, 1994).
- 부채선인장은 노화억제 및 암 발생억제에 탁월한 효과와 성인병의 원인이 되는 콜레스테롤이나 지방함량을 낮추어주는 효과가 밝혀져 있으며(Frenandez *et. al.*, 1992), 항산화효과(백승규 등, 1999), 면역세포의 활성화(신태균 등, 1998), 특히 식이요법제 및 당뇨치료제의 효과에 대한 검증이 이루어져 다양한 기능성식품 및 화장품원료로 상업적으로 재배되고 있다(<http://www.nopaljuce.com>). 이 부채선인장은 내한성이 약하기 때문에 원료생산이 제한적이며 늘어나는 수요를 충족시키기 위해 전국적으로 재배가 가능한 품종 육성이 요구되고 있다.
- “천년초선인장”은 줄기 하나하나의 모양은 제주도에서 재배되고 있는 부채선인장(백년초선인장)과 거의 흡사하나, 줄기의 총 길이가 1.5 ~ 2 m, 영하의 온도에서 생육이 불가능한 “백년초선인장”과는 달리, 줄기의 길이가 30~40 cm, 영하 20℃의 혹한에서도 자체 수분을 절반 이하로 감소시켜 얼어 죽지 않고 생명력을 유지하는 특성을 갖고 있어(이경석 등, 2004) 지역특화산업을 위한 신 작물로의 개발이 유망 시 되고 있으나 유전적인 특성이 구명되지 않은 실정이다.
- 제주도에서 경작 또는 일부 자생되는 선인장 중에 *Opuntia*속에 속하는 손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Makino)은 열대지역 유래의 다년초로서 최근 활발하게 효능에 대한 연구가 수행되고 있다. 제주도에서 재배되고 있는 것은 백년초선인장 이라하며 월동이 안되는 것으로 알려져 있으며, 내륙에서 재배되고 있는 것은 천년초선인장 이라하며 한 겨울에도 노지에서 월동이 가능한 것으로 알려져 있다.
- 백년초선인장과 천년초선인장은 그 기원에 대한 연구가 아직 없는 실정으로 일부에서는 동일한 것으로 일컬어지고 있으나 명확한 근거는 없는 실정으로 이들을 식품소재 또는 의약품소재로 하기 위해서는 명확한 구분과 기원에 대한 연구가 필요하다. 이 두

식물체를 구분하기 위해서는 우선 유전적인 동질성 여부를 확인하고 나아가 변이가 심한 특정유전자 영역을 클로닝한 후 염기서열의 비교 분석을 통하여 그 기원을 규명할 수가 있다.

- 천연에 널리 분포하는 사포닌(saponin)은 steroid나 triterpened,의 배당체로 존재하고 여러 가지 생리활성을 나타내는 중요한 식물성분 중의 하나이다. 천연초선인장의 경우에도 사포닌이 함유되어 있는 것으로 알려져 있는데 본 연구를 통하여 천연초선인장의 각 조직 및 시기에 따른 사포닌의 성분을 분석하여 천연초선인장 효능 분석을 위한 기초자료로 활용하고자한다.
- 현대사회는 산업의 발달로 인한 환경오염과 합성물질의 생산 증가로 인하여 알러지성 접촉피부염을 비롯한 피부질환의 발병빈도가 크게 증가하고 있음
- 외부의 다양한 항원에 의한 알러지반응은 일반적으로 유아의 기관지천식, 아토피성 피부염, 비염, 두드러기, 습진 등의 원인중의 하나로 추정됨
- 알러지성 접촉피부염을 유발하는 항원물질들은 점차 일상생활에서의 접촉기회가 늘어남에 따라 임상 및 공중보건학상 중요성이 매우 높아지고 있음
- 알러지성 접촉피부염은 항원이 접촉된 국소부위에 발적, 구진, 소수포, 괴양 등의 증상을 나타내며, 알러지성 항원의 감작과정과 동일항원의 재 접촉에 의해 증상이 발현되는 지연형 과민반응에 속하는 면역질환임.
- 알러지성 접촉피부염은 접촉된 항원이 Langerhans 세포에 전달된 후 항원의 고유과정을 거쳐 Helper T cell에 전달되고 이 Helper T cell이 분열하여 memory cell을 형성하게 되는 감작과정을 거침
- 이후 항원에 재 감작되면 염증반응과 조직손상이 유발되어 증상이 발현
- 이러한 과정에서 IL-2를 비롯한 많은 cytokine이 방출되고 염증관련세포의 이주에 영향을 미치는 ICAM-1이나 phagocytosis를 하는 granulocyte와 monocyte의 표현분자인 CD11b 등이 증가
- 천연초선인장을 비롯한 선인장류는 민간요법 등에서 오랜 기간 사용되어져 온 약용식물이지만 각 선인장별로 성분 및 기능성에 대한 분석 및 평가와 보다 구체적인 사용에 대한 자료가 부족한 실정임
- 천연초선인장의 고기능 건강식품 및 약용식물로서의 제반 조건을 충족시키고 향후 중요자원생물로서의 중요성을 확보하기 위하여 안전성 및 기능의 심도 있는 접근이 반드시 필요함
- 천연초선인장의 일부 작용으로 알려져 있는 항염증 및 항산화작용의 특성을 감안하여 현재 전 세계적으로 발병빈도가 증가하고 있는 알러지성 접촉피부염에 대한 효능을 검증

2. 경제·산업적 측면

- “천년초성인장”은 중부지방에서 60,000여평이 재배되고 있으며, 이식 2년째부터 6천만 원/ha의 농가소득 조건으로 계약재배 되고 있어 새로운 경제작물로 부상하고 있으나 종묘가 고가이고(묘당 5천원), “천년초성인장”의 생산을 위한 재배방법에 대한 연구가 미흡한 실정이다.
- 대개의 선인장은 열대지방이 원산지이기 때문에 생산지역이 제한적인데 비해 “천년초 선인장”은 노지에서 월동이 가능한 특성을 갖고 있어 이를 이용한 다양한 건강보조식품 또는 기능성 화장품 개발연구는 농가소득 증대 및 수출산업을 선도할 신 작물로의 개발이 유력시 된다.
- 예로부터 민간에서는 선인장의 열매 및 줄기를 변비치료, 이뇨작용, 장운동의 활성화 및 식욕증진의 목적으로 사용해 왔고, 특히 줄기는 피부질환, 류마티스 및 화상치료에 민간요법으로 사용되고 있다(김태정, 1996). 현대 의약적으로 진통작용과 소염작용(이경석, 2004), 라디칼 소거 활성, tyrosinase 저해활성 및 항 알레르기 활성이 인정되어(이남호 등, 2000) 선인장을 이용한 기능성 화장품 개발이 이루어지고 있으며, 특히 산업화가 가속되면서 현대인들은 다양한 형태의 allergen에 노출되어 있어서 알레르기 및 아토피에 의한 피부질환의 발생가능성이 높아지면서 이들 질환에 대한 예방 및 치료제의 개발에 대한 관심이 고조되고 있다.
- 천년초선인장은 환경친화적인 식물의 특성을 갖고 토양을 보호하는 무공해식물로 대체 작물로서의 재배가 쉬운 장점이 있음
- 기능성이 입증된 기능성 식품 및 관련 상품의 개발로 농가소득을 증대시킬 수 있음
- 기능성 식품 및 약용식물로서의 잠재성 개발과 효율적인 제품으로의 산업성 증대를 통하여 국민건강의 증진 및 재배 농가의 경제적 소득의 증대를 동시에 도모할 수 있는 부가가치 및 파생이익이 높음
- 천년초선인장은 우리나라의 기후에 생육이 적합한 식물로 기능성이 입증되고 산업화가 이루어지면 경제적 파급력이 매우 높음

3. 사회·문화적 측면

- 최근 국민경제가 따라 육류섭취가 증가하는 등 식생활의 다양한 변화와 더불어 늘어나는 각종 성인병 퇴치를 위한 자연 건강식의 개발과 기능성을 갖는 식품에 대한 요구가 커지고 있다. 특히 식품으로부터 유래하는 생리활성을 나타내는 기능성 식품에 대한 관심이 고조되고 있다.
- 천년초선인장을 이용한 가공식품의 개발로 인하여 천년초성인장의 소비확대에 따른 부가가치와 농가소득 증대 기여와 더불어 WTO와 FTA에 대응할 수 있는 작목으로 대두함으로써 농촌문제 개선에 기여될 것이다.

- 외국의 자원에 기반 한 농가와 대외 경쟁력을 갖는 우리나라 고유 농산품목의 상품 브랜드를 개발
- 천년초선인장의 생리활성물질을 많이 포함한 기능성 식품의 개발로 국민보건증진에 기여
- 천년초선인장을 이용한 가공식품의 개발로 인하여 천년초선인장의 소비확대에 따른 경제력 창출과 농가소득의 증대로 WTO와 FTA에 대응할 수 있는 작목으로 대두함으로써 농촌문제 개선에 기여함
- 천년초선인장을 이용한 가공식품의 개발은 재배농가와 영농조합의 소득증대와 산업체의 경영수지 개선을 함으로서 농촌의 경제와 더불어 국민 경제의 활성화에 기여함

Ⅲ. 연구 개발 내용 및 범위

1. 제 1 세부과제 : 천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉피부염 치료제 개발

천년초선인장의 계통(유사종)의 수집, 특성조사와 몇 가지 실험에 의한 안전 생산기술 개발을 목표로 다음과 같은 시험을 실시하였다. 또한 참여기업과 협의하여 알리지성 접촉피부염에 대한 시제품을 제작하였다.

가. 연구개발 내용

- 1) 유기질비료 종류와 시용량 구명으로 친환경재배기술 개발
- 2) 실생번식기술 개발
- 3) 적정 재식밀도 구명하여 생력재배
- 4) 적정 정식시기 구명
- 5) 적정 멀칭재료 구명으로 잡초방제기술 개발
- 6) 천년초선인장 국내외 계통(유사종)수집 및 특성조사
- 7) 질소 추비시용효과 구명
- 8) 수확시기에 따른 수분함량 변이
- 9) 석회시용효과 구명
- 10) 적정 생장촉진제 선발
- 11) 적정 식재부위 구명
- 12) 차광효과 구명
- 13) 줄기 증수를 위한 꽃 및 열매제거 효과 구명
- 14) 천년초선인장을 이용한 알리지성 접촉피부염 치료제품 제조

나. 연구개발 범위

- 1) 천년초선인장 적정 재식밀도 구명
- 2) 천년초선인장 적정 피복재료 선정
- 3) 천년초선인장 적정 유기물 종류 및 시용량 구명
- 4) 천년초선인장 적정 정식시기 구명
- 5) 천년초선인장 실생번식 연구
- 6) 천년초선인장 적정 수확시기 구명
- 7) 천년초선인장 계통(유사종) 수집 및 특성조사
- 8) 석회시용 효과 구명

- 9) 질소 추비효과 및 성장촉진제 선발
- 10) 수확시기에 따른 수분함량 변이
- 11) 적정 식재부위 구명
- 12) 차광효과 구명
- 13) 줄기 증수를 위한 꽃 및 열매제거 효과 구명
- 14) 천년초선인장의 줄기, 열매, 뿌리를 이용한 접촉성 피부염 치료제품 개발

2. 위탁연구과제 : 천년초선인장의 유전자분석을 통한 기원연구 및 유효성분 분석

가. 연구개발 내용

- 1) RAPD 분석을 통하여 천년초선인장과 백년초선인장의 gene profiling 조사
- 2) 특정유전자(IPS, rbcL, PSII)클로닝 및 염기서열비교 분석을 통한 기원 조사
- 3) SNP marker를 이용한 천년초선인장과 백년초선인장의 유전적인 구분
- 4) 천년초선인장의 유효성분 분석

나. 연구개발 범위

- 1) 천년초선인장, 백년초선인장, 전라도 선인장, 일본선인장, 미국선인장 등으로부터 DNA 추출
- 2) DNA 추출 최적 조건 확립(당이 많기 때문에 DNA 추출이 상당히 어려움)
- 3) 천년초선인장, 백년초선인장, 전라도 선인장, 일본선인장, 미국선인장의 DNA profiling 분석
- 4) Random primer 선발 및 유전자 증폭 최적조건 확립
- 5) 선발된 primer를 이용한 RAPD 분석
- 6) 천년초선인장, 백년초선인장, 전라도선인장, 대전선인장, 미국선인장의 유연관계 분석
- 7) ITS primer 제작
- 8) PCR을 이용하여 ITS 유전자 증폭
- 9) pGEM T easy백터를 이용한 증폭 유전자 산물의 cloning
- 10) ITS의 염기서열분석
- 11) 천년초선인장, 백년초선인장, 전라도선인장, 대전선인장, 미국선인장의 염기서열분석을 통한 SNP marker 탐색
- 12) 천년초선인장 줄기, 열매 등으로부터 사포닌 성분 추출
- 13) 천년초선인장 사포닌 분석을 위한 최적 조건 확립
- 14) HPLC를 이용한 천년초선인장의 사포닌 분석
- 15) 새로운 선발 마커유전자의 증폭을 위한 primer 제작
- 16) PCR을 이용하여 마커유전자의 증폭

- 17) pGEM T easy백터를 이용한 증폭 유전자 산물의 cloning
- 18) 양방향(5', 3') 염기서열분석
- 19) 유전자 분석프로그램을 이용한 SNP 선발마커 유전자의 영역비교
- 20) 마커유전자의 SNP 후보영역의 선발 시스템 디자인
- 21) SNP 분석을 위한 primer의 제작
- 22) 제작된 SNP primer의 PCR 증폭을 통한 증폭여부의 규명
- 23) PCR반응을 위한 최적 DNA 농도 규명
- 24) PCR반응을 위한 최적 primer 농도 규명
- 25) PCR반응을 위한 최적 dNTPmix농도의 규명
- 26) PCR반응을 위한 최적 cycle수의 규명
- 27) 천년초선인장 줄기, 열매로부터 산성다당체 추출
- 28) 산성다당체 분석을 위한 최적 조건 확립
- 29) 산성다당체 및 중성다당체 성분분석
- 30) 적정 Taq polymerase의 농도 분석
- 31) 적정 primer 및 dNTPmix 농도분석
- 32) 반응액의 안정화 방안연구
- 33) One-step mixture의 적정 농도배액 분석
- 34) 개발된 SNP 시제품의 상용화방안 연구

3. 협동연구과제 : 천년초선인장의 안전성 및 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검정

가. 연구개발 내용

- 1) 천년초선인장의 알러지성 접촉피부염 치료제품 개발
- 2) 천년초선인장의 안전성 및 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검정
- 3) 천년초선인장의 완제품의 알러지성 접촉 피부염에 대한 효능 검정

나. 연구개발 범위

- 1) 천년초선인장의 알러지성 접촉피부염에 대한 안전성 검정
 - 가) 경피독성시험(단회 및 14일 반복투여)

- 나) 1차 자극성 시험, 부식, 광과민성, 지연성 과민증의 여부를 시험
 - 다) 1차 자극성 시험 : 토끼를 대상으로 Draize기준에 의하여 실시
 - 기준: 홍반과 가피형성, 부종형성
 - 라) 안 점막 1차 자극시험 : 토끼를 대상으로 천년초선인장 추출물을 한쪽 눈에 점안하고 24, 48, 72시간, 4, 7일 후에 Draize법으로 평가
 - 기준: 각막(불투명도, 혼탁도, 손상영역의 너비) 홍채(벽의 주름, 충혈, 종창, 각막주변 충혈, 빛에 대한 반응성)
 - 결막(발적, 종창, 배출물)
 - 마) 피부 국소 감작성 시험(접촉 알러지성 시험) : Buehler법과 Maximizations법으로 실시
- 2) 천년초선인장 추출물의 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검정
- 가) 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)에 의한 마우스의 알러지성 접촉피부염 유발
 - 나) 천년초선인장 추출물의 농도별 또는 기제별 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검정
 - 다) 면역관련 매개인자의 변화조사(IgE, cytokines)
- 3) 천년초선인장 완제품의 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검정
- 가) 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)에 의한 마우스의 알러지성 접촉피부염 유발
 - 나) 천년초선인장 완제품의 농도별 또는 제형별 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검정
 - 다) 면역관련 매개인자의 변화조사(IgE, cytokines)

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

< 제 1 세부과제 : 천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염 치료제 개발 >

가. 천년초선인장 적정 재식밀도 구명

줄기 길이는 3차줄기와 4차줄기에서 밀식할수록 길어지는 경향이었으며, 줄기두께는 2차 줄기에서 3,310주/10a가 9,920주/10a보다 두꺼웠고, 줄기수는 2차줄기, 3차줄기, 4차줄기가 밀식할수록 많아졌으며, 총 줄기수는 밀식할수록 많아졌으며, 한 주당 줄기무게는 소식할수록 많았다.

주당 열매수는 3,310주/10a가 가장 많았으며, 소식할수록 많아지는 경향이었고, 주당 열매 무게는 3,310주/10a가 가장 무거웠으며, 소식할수록 무거워지는 경향이였다.

나. 천년초선인장 적정 유기물 종류 및 시용량 구명

돈분퇴비의 줄기는 4,800kg/10a가 다소 긴 편이었으며, 줄기수와 줄기무게는 2,400kg/10a와, 4,800kg/10a 가 다소 많거나 무거운 편이었고, 주당 열매 수와 열매무게는 1,200kg/10a와, 2,400kg/10a 가 다소 많거나 무거운 편이었다.

우분퇴비의 줄기길이, 줄기폭, 줄기무게는 2,400kg/10a와, 4,800kg/10a 처리가 다소 양호한 편이었으며, 줄기수와 줄기무게는 시용량이 증가 할수록 많거나 무거워지는 경향이었고, 열매수와 열매무게는 시용량이 증가 할수록 다소 많거나 무거워지는 경향이였다.

계분퇴비의 줄기길이는 시용량이 많을수록 길이가 길어지는 경향이었으며, 줄기수는 시용량이 많을수록 많아지는 경향이었고, 열매수와 열매무게는 4,800kg/10a가 다소 많거나 무거운 편이었다.

다. 천년초선인장 적정 피복비닐 선정 시험

줄기의 길이는 무피복 보다 피복한 모든 처리가 대부분 양호하였으며, 그 중에서 녹색 PE가 가장 길었고, 줄기폭은 투명PE가 다소 넓은 편이었으며, 줄기수는 무피복 보다 피복한 처리가 월등하게 많았는데, 투명PE, 흑색PE, 녹색PE, 흑백PE 순이었다.

열매수와 열매무게 역시 피복한 처리들이 무피복 보다 월등하게 많거나 무거웠으며, 주당 열매무게는 흑색PE 와 투명PE가 양호한 편이었고, 줄기수는 2년생에서는 3차 줄기까지 생성되었으나 1년생은 2차줄기까지만 생성되었다.

라. 천년초선인장 적정 피복재료 선정 시험

2005년에는 피복재료를 추가로 3가지를 더 처리하였다. 줄기길이는 모든 피복재료 처리들이 무피복 보다 길었는데, 녹색PE가 가장 길은 편이었으며, 줄기폭은 흑색PE가 넓은 편이었고,

줄기두께는 흑색PE가 두꺼운 편이었다.

줄기수는 흑백PE, 녹색PE, 흑색PE가 많은 편이었으며, 줄기무게는 녹색PE, 흑백PE, 흑색PE가 많은 편이었는데, 무피복 보다 뚜렷한 차이가 있었고, 열매수는 흑색PE, 흑백PE, 녹색PE, 부직포가 많은 편이었으며, 열매무게는 흑색PE, 흑백PE, 녹색PE가 무거운 편이었다.

마. 천년초선인장 정식시기 구명

1) 봄 정식

5월 상순 정식과 5월 하순 정식은 4차줄기까지 생성되었으나, 6월, 7월 정식은 3차줄기까지만 생성되었으며, 줄기길이는 5월 하순이 길은 편이었고, 줄기 폭은 5월상순과 5월 하순이 넓은 편이었으며, 줄기 수와 줄기무게는 5월 상순이 다소 많은 편이었고, 열매 수는 5월 하순이 많은 편이었으며, 열매 무게도 5월 하순이 많은 편이었다.

2) 가을 정식

2005년 가을에 정식을 하였는데 대부분 고사한 것으로 나타났으며, 10월 10일 이후의 고사율은 98 ~ 96%였으며, 9월 25일의 고사율은 86%였다. 따라서 봄 정식이 좋을 것으로 판단된다.

바. 손바닥선인장 계통 수집 및 특성조사

1) 국내 수집 손바닥선인장

천년초선인장, 백년초선인장, 대전선인장, 전라도선인장 등을 수집하였는데, 줄기길이는 백년초선인장이 길은 편이었으며, 전라도선인장은 4차줄기까지 생성되었으나 다른 선인장은 3차 줄기까지만 생성되었고, 줄기두께는 백년초선인장과 전라도선인장이 두꺼운 편이었으며, 대전선인장이 가는 편이었다.

줄기수는 전라도선인장이 가장 많았으며, 대전선인장이 가장 적었고, 경장은 백년초선인장이 가장 컸으며, 천년초선인장이 가장 작았고, 주당 줄기수와 줄기무게는 전라도선인장이 많은 편이었으며, 대전선인장이 적었다

천년초선인장과 백년초선인장을 노지에 식재하여 월동 상태를 조사한 결과, 천년초선인장은 2005년 겨울을 지나 2006년 봄에 얼어 죽지 않고 살아남았으나, 백년초선인장은 얼어 죽었다. 백년초선인장은 중부지방(예산)에서 겨울을 나지 못하고 얼어 죽는데 반하여 천년초선인장은 월동하는 것으로 나타났다.

2) 국외 수집 손바닥선인장

Opuntia 속 중 *Opuntia humifusa* 등 21종의 외국 수집종 손바닥선인장의 생육특성을 조사한 결과, 줄기 길이가 5.5 ~ 16.0cm, 줄기폭은 0.7 ~ 10.9cm, 줄기두께는 0.7 ~ 11.1mm, 가시수는 1 ~ 210개, 가시 길이는 3.0 ~ 20.0mm 까지 다양한 변이를 나타내었다.

사. 천년초선인장의 종자 발아특성 구명

천년초선인장의 열매를 수확하여 과육을 제거한 후 샐레에서 발아시험을 한 결과 9°C, 18°C,

27°C, 36°C의 온도처리 암 상태나 명 상태에서 9월 28일에 치상을 한 후에 12월 20일까지 조사하였으나 모두 발아를 하지 않았다. 그러나 2005년 4월 6일에 아산군 신창면의 천년초 선인장 포장에서 수집한 종자를 모래땅에 파종한 결과 5월 20일에 발아가 되었다. 따라서 종자 발아를 위해서는 가을에 채종한 종자를 층적처리하여 월동한 후에 파종하여야 할 것으로 판단된다.

아. 천년초선인장 수확시기에 따른 수분함량 변화

천년초선인장은 늦가을부터 줄기가 쭈글쭈글 해지면서, 수분함량이 줄어들었다가 월동기에는 갈색으로 변한다. 그런 후에 월동하는데, 아마도 월동을 하기 위해서 스스로 수분 함량을 줄이는 것으로 판단된다. 가을 수확시기에 시기별 수분함량을 조사하였다. 천년초선인장의 건조비율이 10월 4일에 18.2%이었던 것이 10월 10일에는 21.9%로 늘어났는데, 이는 10월 10일의 수분함량이 10월 4일 보다 20%정도 적어졌다는 것을 말해준다고 할 수 있다.

자. 석회 사용량에 따른 생육, 수량 및 품질 변이 효과 구명

줄기길이는 300kg/10a가 다소 길은 편이었으며, 줄기수나 줄기무게는 처리 간에 차이가 없었다.

차. 천년초선인장 질소추비 사용효과 구명

줄기길이는 질소 222g/20L 처리구가 다소 길은 편이었으며, 줄기수는 사용량이 증가할수록 많아지는 경향이었고, 줄기무게는 사용량이 많을수록 무거워 지는 경향이었으며, 질소를 추비로 사용한 처리가 과장이 길어지는 경향이었고, 열매무게는 질소 222g/20L 처리구가 다소 무거운 편이었다.

카. 천년초선인장 성장촉진제 사용효과 구명

줄기길이는 배추애(50g)처리와 요소(60g)처리가 길은 편이었으며, 줄기폭과 줄기두께는 두 배나(33g) 처리가 양호하였고, 줄기수는 배추애(50g)처리가 많은 편이었으며, 줄기무게는 배추애(50g)처리가 무거운 편이었고, 열매의 길이는 요소(60g) 처리가 길은 편이었으며, 열매무게는 요소(60g) 처리가 무거운 편이었다.

타. 천년초선인장 적정 식재 부위 구명

2년생의 줄기는 1차줄기를 식재 하였을 때는 4차줄기까지 착생이 되었으나, 2차줄기나 3차줄기를 식재한 경우에는 4차줄기는 생성되지 않고 3차줄기까지만 착생이 되었다. 이는 1차줄기를 심는 경우가 생육이 더 왕성한 것으로 판단된다.

줄기길이 중에서 2차줄는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 순으로 길었으며, 3차줄기는 1

차줄기 > 2차줄기 > 3차줄기 순으로 길었다. 줄기폭 중에서 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 순으로 넓은 편이었으며, 3차줄기는 2차줄기 > 1차줄기 > 3차줄기 순으로 넓은 편이었다. 줄기두께 중에서 2차줄기는 2차줄기가 가장 두꺼웠으며, 3차줄기는 2차줄기 > 1차줄기 > 3차줄기 순으로 두꺼웠다.

줄기수 중에서 1차줄기는 1차줄기 > 3차줄기 > 2차줄기 식재 순으로 많았으며, 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 많았고, 3차줄기는 2차줄기 > 3차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 많았다. 줄기무게는 1차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 무거웠으며, 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 무거웠고, 3차줄기는 2차줄기 > 3차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 무거웠다. 총 줄기수는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 많았다.

과장은 2차줄기가 길은 편이었으며, 과경은 2차줄기가 굵은 편이었고, 열매수는 1차줄기와 3차줄기가 다소 많은 편이었으며, 열매무게는 1차줄기 > 3차줄기 > 2차줄기 식재 순으로 무거웠다.

파. 천년초선인장 차광효과 구명

줄기수는 차광율이 높을수록 적어지는 경향이었으며, 줄기길이는 차광율이 높아질수록 길어지는 경향이었고, 줄기폭은 차광율이 높을수록 넓어지는 경향이었으며, 줄기두께는 차광율이 높아질수록 두꺼워지는 경향이었고, 줄기무게는 차광율이 높을수록 무거워지는 경향이었던다.

하. 천년초선인장 줄기 수량증대를 위한 꽃 및 열매 제거효과 구명

봄에 식재하면, 당년에는 주로 영양생장을 하고, 이듬해에는 생식생장을 주로 하게 되는데, 이때 줄기 수량증대를 위하여 꽃 및 열매를 제거 처리한 결과, 줄기길이는 개화전 꽃제거 처리가 4차줄기의 길이가 길었으며, 줄기폭은 3차줄기는 개화전 열매제거 처리가 넓었고, 4차줄기는 개화전 꽃제거 처리가 넓은 편이었으며, 줄기두께는 개화전 열매제거 처리가 2차줄기, 3차줄기에서 두꺼운 편이었다. 줄기갯수는 개화전 열매와 꽃을 제거한 처리가 많았으며, 줄기무게는 개화전 열매 및 꽃제거와 개화후 열매제거 처리가 많았고, 열매무게는 개화종때 꽃제거와 무처리는 비슷하였으며, 개화후 꽃제거는 무처리의 54.5% 수준이었고, 개화전에 열매 및 꽃제거 처리는 열매가 전혀 열리지 않았다.

2차줄기의 무게는 개화전 열매제거와 개화전 꽃제거 및 개화후 열매제거가 무거운 편이었으며, 3차줄기의 무게는 개화전 열매제거와 개화전 꽃제거가 많은 편이었고, 무처리와 개화후 꽃제거가 가벼운 편이었으며, 4차줄기의 무게는 개화전 열매제거와 개화전 꽃제거가 무거운 편이었다.

<위탁연구과제 : 유전자 분석을 통한 천년초선인장의 기원연구 및 유효 성분 분석>

가. RAPD 분석에 의한 천년초 DNA profiling 분석

Opuntia속 선인장 천년초, 백년초, 전라도선인장과 미국에서 구입한 3종의 *Opuntia humifusa*, *Opuntia rufida*, *Opuntia grahamii*를 사용하여 RAPD 분석을 실시하였다. 오펜사의 10-mer 20종을 사용한 결과 9개의 primer(OPK-01, OPK-6, OPK-07, OPK-09, OPK-10, OPY-02, OPY-05, OPY-07, OPY-08)에서 재현성 있는 결과를 얻었다. 9개의 primer로부터 67개의 polymorphic DNA fragments가 관찰되었다.

나. ITS(internal transcribed sequence)유전자 cloning 및 염기서열 분석

천년초선인장으로부터는 685 bp의 ITS 염기정보를 얻었다. 천년초 rDNA영역은 54 bp의 18S rRNA, 162 bp의 5S rRNA, 56 bp의 26S rRNA와 이들 사이에 스페이서 영역인 193 bp의 ITS1과 220 bp의 ITS2로 구성되어 있었다. 6종의 손바닥 선인장으로부터 ITS 유전자를 cloning하여 염기서열을 비교한 결과 미국산 *Opuntia humifusa*, 국내 자생종인 전라도 선인장, 백년초, *Opuntia rufida* 등과 99%의 높은 유사도를 보였다.

다. 천년초선인장의 사포닌성분분석

천년초선인장의 줄기와 열매로부터 사포닌성분의 검출을 실시하였다. 그 결과 줄기에서는 1.1~1.5% 정도, 열매에서는 2.5~3.7% 정도의 조사포닌을 함유하고 있었다. TLC 분석 결과 저분자 사포닌이 천년초선인장의 잎줄기와 열매에서 미량으로 검출되었다. 그러나 정성분석을 위하여 HPLC 분석을 실시한 결과(Fig. 8B) 표준품으로 사용한 인삼 7종 ginsenoside(Rg₁, Rf, Re, Rd, Rc, Rb₂, Rb₁)와는 일치되는 peak가 없었다.

라. PCR에 의한 PSII 및 rbcL 유전자 분석

1) psbA 유전자 cloning 및 sequence 분석

*psbA*에 특이적인 primer 쌍을 제작한 후 13종의 손바닥 선인장으로부터 *psbA* 유전자 영역을 증폭하였다. 염기서열분석을 한 결과 천년초선인장으로부터는 1,007 bp의 크기의 *psbA* 유전자에 대한 염기정보를 얻었고 *O. violacea* 'Gd Bush clnie'와 100%의 유사도를 나타내었고, 국내 자생종인 전라도, 선인장 및 *Opuntia*속의 다른 선인장과도 99%의 높은 유사도를 보였다.

2) rbcL 유전자 cloning 및 sequence 분석

*rbcL*에 특이적인 primer 쌍을 제작한 후 6종의 손바닥 선인장으로부터는 1,425 bp의 크기의 *rbcL* 유전자에 대한 염기정보를 얻었다. 천년초 *rbcL*유전자는 *O. violacea* 'Gd Bush clnie'와 100%의 유사도를 나타내었고, 국내 자생종인 전라도, 선인장 및 *Opuntia*속의 다른 선인장과도 99%의 높은 유사도를 보였다.

마. 천년초 특이적인 SNP primer의 탐색 및 제작

천년초를 판별하기 위한 SNP를 탐색한 결과 PSII와 rbcL에서는 천년초에만 특이적으로 존재하는 SNP를 발견할 수 없었다. 그러나, ITS 유전자 영역에서는 547 bp 영역에서 조사된 다른 선인장의 경우 'C'인데 비하여 천년초와 *Opuntia humifusa*의 경우 'T'이었다. 또한 620 bp에서는 분석된 다른 선인장의 경우 'T'였기인데 천년초에서만 특이적으로 'G'로 분석되어 이 SNP를 활용하여 천년초 특이적인 분자마커로서 개발을 시도하였다.

바. SNP primer의 최적 PCR조건 구명

SNP primer의 농도를 0.5 pmol로 고정하고 control primers 농도를 1~0.001 pmol로 달리하여 조사한 결과 첨가농도가 낮아질수록 control 밴드도 관찰이 되지 않아 control primer의 경우 0.1 pmol 이상을 첨가하여야 만이 DNA 단편의 증폭을 관찰할 수 있었다. 추가적인 실험을 통하여 control primer 농도는 0.4~0.6 pmol, SNP 농도는 0.2~0.7 pmol 정도로 압축이 되었으며, 상호 조합을 통하여 최적 PCR 반응 조건을 탐색하였다.

사. 천년초, 백년초 구별을 위한 one-step kit 개발

1) 적정 *Taq* polymerase의 농도 분석

Taq polymerase의 적정 농도를 조사한 결과 0.5 U 이하에서는 PCR 증폭산물의 농도가 낮아졌고 0.75~1.25 U 농도범위에서 가장 적합하였다. 1.5 U 이상의 고농도에서도 PCR 증폭은 잘 되었으나, pseudoband가 관찰이 되었으며, 단가 면에서도 kit 개발을 위해서는 적정하지 않는 것으로 판단되었다.

2) 적정 primer 및 dNTPmix 농도분석

75 uM 이상에서는 강한 band를 관찰 할 수 있어 천년초 SNP primer를 사용할 경우에는 dNTPmix 농도는 75 uM 정도가 적당하다고 판단되었다.

3) One-step kit화

천년초 특이적인 SNP primer를 이용한 간편 구별키트를 위한 최적 조건은 template DNA 25 ng, *Taq* polymerase 0.75 U, dNTPmix는 75 uM, SNP primer 농도는 0.25 uM로 설정하였다. 2배농도로 첨가하고 여기에 안전성을 부여하기 위해서 1% glycerol 과 bromophenol blue를 첨가하여 1 mL씩 원심분리 튜브에 cocktail하여 -20°C 저장하였다.

아. 천년초 다당체 함량분석

1) 천년초 줄기, 열매의 산성 다당체 함량분석

천년초로부터 산성다당체분석을 위해서 spectrophotometer(Armersharm Bioscience,

USA)를 이용하였고 glucronic acid를 이용한 Carbazole method를 참고로 하여 분석을 실시하였다. 그 결과 천년초 줄기에서는 $15\pm 3.7\%$, 열매조직에서는 $14.1\pm 2.5\%$ 정도의 함량이 관찰되었다.

2) 천년초 줄기, 열매의 중성당 함량분석

중성당 분석은 phenol-sulfuric acid method을 참고로 실시하였고 정량은 glucose(sigma)를 이용하였다. 그 결과 천년초의 잎줄기와 열매 조직으로부터 이들 성분에 대한 분석을 진행한 결과 잎줄기에서는 $27\pm 5.2\%$, 열매조직에서는 $25\pm 7.5\%$ 정도의 함량이 관찰되었다.

<협동연구과제 : 천년초선인장의 안전성 및 알러지성 접촉피부염에 대한 효능검정>

DNCB의 감작과 자극에 의하여 알러지성 접촉성 피부염의 모델을 잘 구축되었으며 천년초 추출물을 크림형태로 최종 제품화하여 피부로 직접 적용하여 접촉성 피부염에 대한 효능을 검색하였다.

정상군에 비하여 DNCB의 2차 도포 후 귀의 부종, 피부의 염증, 출혈, 습진, 홍반, 가피탈피 등의 접촉성 피부염 관련 병변이 발생되었고 이러한 귀의 부종과 염증성 병변은 천년초 추출물 크림을 도포한 결과 부종의 완화와 뚜렷한 염증병변을 경감시켜 정상에 가깝게 회복되었다. 복부피부조직의 변화도 DNCB에 의하여 접촉성 피부염이 유발된 실험군에서 표피층의 비대와 염증세포의 침윤이 명확하게 증가하였는데 천년초 추출물 크림의 도포에 따라서 표피층 및 피하층의 비대가 억제되었고 진피층에서 관찰되던 열공의 출현도 및 염증세포의 침윤도도 낮아졌다. 이로서 천년초 추출물 크림은 직접 피부에 적용하여 강력한 항염증 효과가 있는 것으로 관찰되었다.

DNCB를 도포하여 접촉성 피부염을 유발한 군에서는 IgE의 농도가 정상군보다 6배이상 증가되었는데 천년초 추출물 크림을 도포한 실험군에서는 유의하게 IgE의 농도가 저하되어 천년초 추출물 크림은 면역글로불린의 상승으로 인한 알러지 반응의 감소를 일으키는 것으로 관찰되었다.

DNCB에 의하여 접촉성 피부염을 유발한 마우스의 복부피부조직에서 cytokine의 변화는 IL-1 β , IL-2, IFN- γ 의 농도가 증가되었으며 천년초 추출물 크림을 도포하여 IL-1 β , IL-2와 IFN- γ 가 모두 유의하게 감소되었다. DNCB에 의한 IL-2의 증가는 세포독성 T 임파구의 분열증가를 유도하고 이로 인해 세포성 면역의 증가가 일어난다고 알려져 있는데 천년초 줄기 및 발효추출물의 투여로 IL-2 분비억제는 연이은 세포독성 T 임파구의 감소를 유도하고 IFN- γ 의 감소를 일으켜 알러지 면역반응이 억제되는 것으로 추측되었다.

결론적으로 DNCB에 의한 알러지성 접촉성 피부염에 대한 천년초 추출물 크림의 효능검정을 실시한 바 천년초의 줄기 및 발효상태의 추출물로 실시하여 효능을 관찰한 2차년도 실험결과와 거의 동일한 효능이 확인되어 천년초 추출물 크림의 도포에 따라서도 항염증, 면역조절 및 억제, 조직재생의 효능이 있는 것으로 판단되었다.

2. 활용에 대한 건의

1. 생산분야 : 적정 재식밀도, 적정 피복재료, 적정 유기물 및 시용방법, 생식기관 제거에 의한 줄기 수량증대 등을 영농활용 하였으며, 정식시기, 비료 등 시용방법, 기타 재배법 개발을 통한 농가지도 활용으로 생산성 제고.
2. 기원확인 분야 : 명확한 기원확인과 백년초선인장과의 유전적 구별을 통한 산업화 기반구축.
3. 안전성 효능분야 : 경구독성, 피부 안전성의 확인과 추출물 및 추출물을 이용한 크림에 대한 알러지성 접촉피부염 효능 확인으로 제품 생산 및 판매촉진 가능

SUMMARY

The cactus *Opuntia* is a xerophyte producing about 200–300 species and is mainly growing in arid and semi–arid regions. The prickly pear cactus(*Opuntia spp*) has a world–wide distribution and is an important nutrient and food source. About 1,500 species of cactus are in the genus *Opuntia* produce edible and highly favored fruits. The prickly pear (*Opuntia spp*) is a member of the *Cactaceae family* and is widely distributed throughout the world. Most of Cactaceae family is known to be therapeutic and improvable properties for arthritis, cancer, and so on. *Opuntia humifusa* (OH) is used in folk medicine in Korea. *Opuntia* leaves and fruits used for curing of arteriosclerosis, diabetes mellitus, gastritis, and hyperglycemia. The prickly pear variety *Opuntia humifusa*(OH) is newly developed and used as a functional edible material in Korea.

In relation to this, Studies were conducted by from April, 2005 to April, 2008 in Jong–Keong ri, Shin–Am myean, Yesangyun. ChungCheongNamDo.

The results obtained are summarized as follows;

1. Development of Stable Production Techniques and Contact Dermatitis Therapy Device using Chunneyoncho(*Opuntia humifusa*).

가. Study on a thousand years herbal cactus's proper replanted density.

The tendency was that trunk was lengthen as it was intensively cultivated in the third and fourth trunk; trunk was thickened in the second trunk with 3,310plant/10a more than 9,920 plant/10a; trunk was numbered in the second, third and forth trunk as it was intensively cultivated; the total number of trunk was larger as it was intensively cultivated; trunk per week was weighted more as eaten less. Fruit per week was numbered biggest with 3,310plant/10a; it became the biggest as eaten less. Fruit was weighted most in 3,310plant/10a; and it tent to weight more as eaten less.

나. Study on a thousand years herbal cactus's proper organic type and amount of use.

The trunk of pig feces compost was a little long with 4,800kg/10a; number and weight of trunk was a little much or heavy with 2,400kg/10a & 4,800kg/10a; number

and weight of fruit per trunk was a little much or heavy with 1,200kg/10a & 2,400kg/10a. length, width and weight of trunk of cow faces compost was a little normal with 2,400kg/10a & 4,800kg/10a; number & weight of trunk and of fruit was to be richer and heavier as its use increases. Length of trunk of chicken feces compost was to be longer as its use increases, and number of trunk was to be richer as its use increases, and number & weight of fruit was a little richer or heavier with 4,800 kg/10a.

㉔. Test in selecting a thousand years herbal cactus's proper covering vinyl .

Length of trunk was mostly more normal in every disposition covered than non-covered, of them green PE was the longest, width of trunk was a little wide in transparent PE, number of trunk was far richer in the disposition covered than non-covered, in order of transparent PE, black PE, green PE, black-and-white PE. Number and weight of fruit was far richer or heavier in the disposition covered than non-covered, weight of fruit per trunk was a little heavier in black PE and transparent PE, number of trunk was generated even the third trunk in 2years old, but even the second trunk in 1 year old.

㉕. Test in selecting a thousand years herbal cactus's proper covering material.

Length of trunk was longer in every covering material disposition than in non-covered one, green PE was a little the longest, width of trunk was a little wide in black PE, thickness of trunk was a little thick in black PE. Number of trunk was richer in black-and-white PE, green PE, black PE, weight of trunk was heavy in green PE, black-and-white PE, black PE and had concrete difference in non-covering, number of fruit was richer in black PE, black-and-white PE, green PE, non woven, and weight of fruit was a little heavy in black PE, black-and-white PE, and green PE.

㉖. Study on a thousand years herbal cactus's regular period of implantation.

1) Regular implantation in spring.

Regular implantation in the beginning and end of may was generated even the forth trunk, but regular implantation in June & July was generated even only the third trunk, length of trunk was a little longer in the end of may, width of trunk was a little wider in the beginning and end of may, number and weight of trunk was a little richer in the beginning of may, number of fruit was a little richer in the end of may, weight of fruit was a little richer in the end of may.

2) Regular implantation.

It was regularly implanted in autumn of 2005, mostly shown to be withered, and the withering rate after October 10th was 98 ~ 96%, while withering rate in September 25th was 86%. Therefore, it is decided to be good to implant regularly in spring.

㉑. Cereus line collection and specification research.

1) Nationally collected cereus.

It was collected with a thousand year herbal cactus, a hundred year herbal cactus, Daejeon cactus, Jeonrado cactus, length of trunk was a little longer in a hundred year herbal cactus, Jeonrado cactus was generated even the forth trunk but the other cactus were generated even only the third trunk, thickness of trunk was a little thicker in a hundred year herbal cactus and in Jeonrado cactus, Daejeon cactus was a little thinner. Number of trunk was mostly in Jeonrado cactus, Daejeon cactus was mostly in Daejeon cactus, reformation was the biggest in a hundred year herbal cactus, while the smallest in a thousand year herbal cactus, number and weight of trunk per trunk was a little richer in Jeonrado cactus, while a little poorer in Daejeon cactus. The result of researching the wintering state after implanting a thousand year herbal cactus and a hundred year herbal cactus outdoor was that a thousand year herbal cactus passed through the winter and survived even in spring of 2006, while 1 hundred year herbal cactus was frozen to death. 1 hundred year herbal cactus was frozen to death beyond wintering in the central district (Yesan), while 1 thousand year herbal cactus was shown to be wintered.

2) Internationally collected cereus.

The result of researching internationally collected cereus rearing characteristics of 12 kinds of *Opuntia humifusa* of Opuntia was that different change was given as length of trunk with 5.5 ~ 16.0cm, width of trunk with 0.7 ~ 10.9cm, thickness of trunk with 0.7 ~ 11.1mm, number of thorn with 1 ~ 210, length of thorn with 3.0 ~ 20.0mm.

㉒. Study on 1 thousand year herbal cactus's seed germination characteristics.

The result of testing germination in examples after harvesting a thousand year herbal cactus's fruit and eliminating its flesh was that nothing was germinated although the research was given even December 20th after its posing in September

28th in the dark or bright state of temperature of 9°C, 18°C, 27°C, 36°C. However, the result of sowing the collected seed from a thousand year herbal cactus' covering of sinchang-myon, Asan-gun in April 6th, 2005 was that the germination was given May 20th. Therefore, it is decided that for germinating the seed the sowing should be given after accumulating the seed gathered in autumn and wintering it.

ㅇ). Water content change according to 1 thousand year herbal cactus's harvest time.

A thousand herbal cacti: the trunk of which is wrinkled and turned in brown from the late autumn. It is wintered after that, and it is decided to reduce the water content for its wintering. The research was given for each term's water content in autumn harvest time. a thousand year herbal cactus's drying rate was 18.2% in October 4th and this was increased to 21.9% in October 10th, which is said that water content in October 10th become 20% less than in October 4th .

자). Study on rearing, quantity and quality change effect according to lime test .

Length of trunk was a little longer in 300kg/10a, and number and weight of trunk had no difference among its disposition.

차). Study on 1 thousand year herbal cactus's nitrogen additional fertilizer test effect.

Length of trunk was a little longer in nitrogen disposition of 222g/20 L, and number and weight of trunk was a little richer or heavier as its test is increases, the disposition tested by nitrogen as additional fertilizer was a little longer, weight of fruit was a little heavier in nitrogen 222g/20 L.

카). Study on 1 thousand year herbal cactus's growth promoter effect.

Length of trunk was a little longer in disposing Chinese cabbage baby and its factor(60g), and width and thickness of trunk was normal in twice disposition, number and weight of trunk was a little more normal in Baechoae(50g), and length and weight of fruit was a little more normal in disposing the factor(60g).

타). Study on 1 thousand year herbal cactus's proper implanting part.

Trunk of 2 years was secured even the forth trunk when it implanted the first trunk, but in case of implanting the second and third trunk the forth trunk was not generated but only even the third trunk. The second trunk of length of trunk was long in order of the third trunk>the second trunk>the first trunk, while the third trunk in order of the first trunk>the second trunk>the third trunk. The second trunk of width of trunk was a

little wider in order of the third trunk>the second trunk>the first trunk, while the third trunk in order of the second trunk>the first trunk>the third trunk. The second trunk of thickness of trunk was mostly thick in the second trunk, while the third trunk was thick in order of the second trunk>the first trunk>the third trunk. The first trunk of number of trunk was rich in implantation in order of the first trunk>the third trunk>the second trunk, while the second trunk in order of the third trunk>the second trunk>the first trunk, the third trunk in order of the second trunk>the third trunk>the first trunk. The first trunk of weight of trunk was heavy in implantation in order of the third trunk>the second trunk>the first trunk, while the second trunk in order of the third trunk>the second trunk>the first trunk, the third trunk in order of the second trunk>the third trunk>the first trunk. The total number of trunk was rich in implantation in order of the third trunk>the second trunk>the first trunk.

Exaggeration and are normal in the second trunk, number of fruit was a little richer in the first and third trunk, and weight of fruit was heavier in implantation in order of the first trunk>the third trunk>the second trunk.

과. Study on 1 thousand year herbal cactus's shading effect.

Number of length was a little lesser as the shading rate increases, length of trunk was a little longer as the shading rate increases, width of trunk was a little narrower as the shading rate increases, thickness of trunk was a little thinner as the shading rate increases, weight of trunk was a little thinner as the shading rate increases.

하. Study on flower and fruit eliminating effect for increasing the quantity of a thousand year herbal cactus's trunk.

Length of trunk was that flower eliminating process after long of the forth trunk of effloresce, width of trunk was wide in eliminating fruit before effloresce, the forth trunk was a little heavy in the second and third trunk, number of trunk was mostly dispositions to eliminate fruit and flower before its effloresce, weight of trunk was mostly dispositions to eliminate fruit and flower before its effloresce, weight of fruit was similar, eliminate the flower after effloresce was 54.5%, and no fruit was generated to eliminate flower before evolution, weight of the second trunk was a little heavier in eliminating fruit, flower before was mostly dispositions to eliminate fruit and flower before its effloresce or after it, weight of third was heavier in eliminating fruit and flower before effloresce, non disposition and elimination of flower after effloresce was a little lighter, weight of the forth trunk was a little heavier in eliminating fruit and flower before its effloresce.

2. Study on the genetic relationship and effective components in CheonNyeonCho Opuntia.

가. Analysis of CheonNyeonCho DNA profiling by RAPD method.

RAPD analysis was performed with 6 Opuntia species (CheonNyeonCho, BaekNyeonCho, JunRaDo, *Opuntia humifusa*, *Opuntia rufida*, and *Opuntia grahamii*). Twenty species of Operon 10-mer was used for RAPD analysis. Nine primers (OPK-01, OPK-6, OPK-07, OPK-09, OPK-10, OPY-02, OPY-05, OPY-07, OPY-08) of them were showed regenerability and observed 67 polymorphic DNA fragments.

나. Cloning and Sequenc analysis of ITS (internal transcribed sequence) rDNA.

The rDNA region was cloned in CheonNyeonCho genomic DNA and sequenced with 685 bp nucleotide. There are 54 bp 18S rRNA, 162 bp 5S rRNA, 56 bp 26S rRNA, and 193 bp ITS1 and 220 bp ITS2 in CheonNyeonCho rDNA region. Other 6 ITS rDNAs were cloned in 6 different Opuntia and compared with each nucleotides for the genetic relationship. The ITS nucleotide sequence of CheonNyeonCho was showed high similarity with 99% in *Opuntia humifusa*, BaekNyeonCho, JunRaDo, and *Opuntia rufida*.

다. Saponin analysis in CheonNyeonCho Opuntia.

We analyzed saponin in stemleaf and fruit of CheonNyeonCho. The crude saponin observed with 1.1~1.5% in stemleaf and 2.5~3.7% in fruit. Low molecular saponin at the TLC analysis was detected as a trace in stemleaf and fruit of CheonNyeonCho.

라. Cloning and sequence analysis of *PSII* and *rbcl* genes.

1) Cloning and sequence analysis of *psbA*.

We designed a pair of primers to *psbA* and then amplified it in 13 opuntias. A *psbA* gene in CheonNyeonCho was cloned and sequenced with 1,007 bp nucleotide. The CheonNyeonCho *psbA* gene was showed high similarity with 100% in *O. violacea* 'Gd Bush clnie', and 99% in JunRaDo and 10 other opuntias.

2) Cloning and sequence analysis of *rbcl* genes.

We designed a pair of primers to *rbcl* and then amplified it in 6 opuntias. A *rbcl* gene in CheonNyeonCho was cloned and sequenced with 1,425 bp nucleotide. The CheonNyeonCho *psbA* gene was showed high similarity with 99% in *O. violacea* 'Gd Bush clnie'.

ㄹ. Designed and development of specific SNP primer in CheonNyeonCho.

There were no any SNP primer site for discrimination of CheonNyeonCho in *psbA* and *rbcL* nucleotide sequences. We detected a specific SNP as T at 547 bp nucleotide sequences of CheonNyeonCho ITS, and also 620 bp as G. SNP primers for the discrimination of CheonNyeonCho were developed with SNP1 primer (5-CGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCCTTCGAGGCCYYT-3) and SNP2 primer (5-CGCCTGACCTGGGGTCGCAACGGTTTGTGCTTTYC-3) using two SNP nucleotides existed in ITS sequences.

ㅁ. Establishment of optimum condition for PCR amplification with SNP primers.

To investigate the optimum condition for PCR amplification of SNP primers, SNP primers fixed 0.5 pmol and control primers changed with 1~0.001 pmol. As a results of several tests, we established the optimum PCR condition for SNP primers amplification at 0.4~0.6 pmol control primer and 0.2~0.7 pmol SNP primer.

ㅂ. Development of one-step kit for the discrimination of CheonNyeonCho from BaekNyeonCho.

1) Optimum concentration of *Taq* polymerase.

The concentration of *Taq* polymerase was good at 0.75~1.25 U for PCR amplification. PCR amplification at the over concentration is powerful but observed pseudoband and not economical.

2) Optimum concentration of dNTPmix.

The optimum concentration of dNTPmix were 75 uM.

3) Development of One-step kit.

For the development of one-step kit, supplements were decided with 25 ng template DNA, 0.75 U *Taq* polymerase, 75 uM dNTPmix, and 0.25 uM SNP primer. This kit was bufferized with 2 fold and supplemented with 1% glycerol and bromophenol blue. The cocktails of one-step kit were stored at -20°C refrigerator.

ㅇ. Analysis of polysaccharide in CheonNyeonCho.

1) Analysis of acidic polysaccharide.

To analyze the acidic polysaccharide, the glucuronic acid as a standard was used and the absorbance of spectrophotometer (Armersharm Bioscience, USA) was analyzed.

The acidic polysaccharide was detected with $15\pm 3.7\%$ in stemleaf and $14.1\pm 2.5\%$ in fruit.

2) Analysis of neutral polysaccharide.

To analyze the neutral polysaccharide, the glucose as a standard was used and the absorbance of spectrophotometer (Armersharm Bioscience, USA) was analyzed. The neutral polysaccharide was detected with $27\pm 5.2\%$ in stemleaf and $25\pm 7.5\%$ in fruit.

3. Effect of *Opuntia humifusa* cream and extract on DNCB-induced allergic contact dermatitis in Balb/c mice.

가. Single and 14-day Repeated Oral Toxicity Study of *Opuntia humifusa* extract in Sprague-Dawley Rat.

The prickly pear (*Opuntia spp*) is a member of the *Cactaceae family* and is widely distributed throughout the world. Most of *Cactaceae family* is known to be therapeutic and improvable properties for arthritis, cancer, and so on. *Opuntia humifusa* (OH) is used in folk medicine in Korea. The purpose of this study was to investigate the toxicities of the single and 14 days repeated dose toxicity in Sprague-Dawley rats orally administered with *Opuntia humifusa* extract at dose levels of 0, 500, 1,000, and 2,000 mg/kg body weight/day. The single oral dose of the extracts at 2000 mg/kg did not produce mortality or abnormal gross appearance of the internal organs of SD rats. The results of 14 days orally repeated toxicity showd that there was no difference in body weight change, food intake, water consumption, or relative organ weight among different dose groups, Also we observed no death and abnormal clinical signs during the all experimental period. Among the groups orally administerd OH extract and the control group, there were no statistical significance in hematological tests or serum biochemical values. There were no gross findings at final sacrifice. There was no evidence of histopathological alteration mediated by 14 days treatment with OH extract. These results indicate that no observed adverse effect level(NOAEEL) of OH extract was considered to be more than 2,000 mg/kg in both sexes of SD rats.

4. Skin and Eye Irritation Tests of *Opuntia humifusa* extract in Rabbit.

The prickly pear (*Opuntia spp*) is a member of the *Cactaceae* family and is widely distributed throughout the world. Most of *Cactaceae* family is known to be therapeutic and improvable properties for various body disturbances and *Opuntia humifusa* (OH) is a member of the *Cactaceae* family. This study was performed to evaluate the skin and eye irritation of *Opuntia humifusa* extract in male New Zealand White rabbits. In skin irritation test, any clinical signs were not seen and there were no observed body weight changes and gross pathologic findings after OH treatment for 24 hours. Also, there were no observed erythema, eschar, and edema on intact and abraded skin and the Primary irritation index was 0. In eye irritation test, there were no chemosis in any eye of rabbits treated with OH extract 0.1ml. The reactions were examined for 7 days after OH treatment. No eye irritation was observed in the eyes treated with the OH extract. Taken together, these results indicate that OH extract may be non-irritant materials on skin and eye.

4. Effect of *Opuntia humifusa* extract on DNCB-induced allergic contact dermatitis in Balb/c mice .

This study was performed to assess the effects of *Opuntia humifusa*(OH) extract using a mouse model of allergic contact dermatitis. Allergic contact dermatitis(ACD) was induced on the ears of Balb/c mice caused by sensitized and repeated application of 1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB). Topical treatment of 10% OH solution was applied once a day for 3 days and ear swelling was measured daily. After 3 days of treatment the mice were sacrificed and ear samples were collected for cytokine determination and histological examination. The repeated application of DNCB induced a relatively steep increment of ear thickness. Significant reductions of swelling, erythema and histopathological inflammation in ears were observed after 3 days of treatment with 10% OH. OH significantly suppressed the levels of IL-1 β , 2 and Interferon(IFN)- γ in the ears and the levels of IgE in serum after DNCB rechallenge. This study demonstrates that OH inhibits DNCB-induced ACD in mice,

and suppresses the levels of inflammatory cytokines, such as IL-1 β , 2 and IFN- γ in the ear. Based on these findings, OH may have antiinflammatory and alleviatory effects in the ACD.

라. Effect of *Opuntia humifusa* cream on DNCB-induced allergic contact dermatitis in Balb/c mice.

This study was performed to assess the effects of *Opuntia humifusa*(OH) cream using a mouse model of allergic contact dermatitis. Allergic contact dermatitis(ACD) was induced on the ears of Balb/c mice caused by sensitized and repeated application of 1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB). Topical treatment of 10% OH cream was applied once a day for 3 days and ear swelling was measured daily. After 3 days of treatment the mice were sacrificed and ear samples were collected for cytokine determination and histological examination. The repeated application of DNCB induced a relatively steep increment of ear thickness. Significant reductions of swelling, erythema and histopathological inflammation in ears were observed after 3 days of treatment with 30% OH cream. OH cream significantly suppressed the levels of IL-1 β , 2 and Interferon(IFN)- γ in the ears and the levels of IgE in serum after DNCB rechallenge. This study demonstrates that OH cream inhibits DNCB-induced ACD in mice, and suppresses the levels of inflammatory cytokines, such as IL-1 β , 2 and IFN- γ in the ear. Based on these findings, OH cream may have antiinflammatory and alleviatory effects in the ACD.

The cactus *Opuntia* is a xerophyte producing about 200-300 species and is mainly growing in arid and semi-arid regions. The prickly pear cactus(*Opuntia spp*) has a world-wide distribution and is an important nutrient and food source. About 1,500 species of cactus are in the genus *Opuntia* produce edible and highly favored fruits. *Opuntia* leaves and fruits used for curing of arteriosclerosis, diabetes mellitus, gastritis, and hyperglycemia. The prickly pear variety *Opuntia humifusa*(OH) is newly developed and used as a functional edible material in Korea. In the biological

researches about *Opuntia spp.*, extracts of *O. ficus-indica var. saboten* were responsible for the radical scavenging activity towards superoxide and hydroxyl anions and ethanol extract of *O. ficus-indica var. saboten* showed analgesic and anti-inflammatory effect against gastric lesions. Also, leaf extracts of *O. megacantha* has hypoglycemic and antiobesity effects in diabetic animals. *Opuntia spp.* have been extensively studied for its biological effects such as its therapeutic properties against arthritis and cancer.

Allergic contact dermatitis(ACD) is a allergic disorder characterized by skin inflammation and itching. It is a common disease with symptoms responsible for 20% of all work related health problems reported to clinicians and is a major cause of loss of working days, and can be induced by a multitude of irritants and/or allergens that are influenced by a range of environmental conditions. ACD is regarded as a prototype of T-cell mediated delayed-type hypersensitivity reactions. During the sensitization phase, epicutaneously applied hapten is taken up and processed by epidermal Langerhans cells, and then presented to naive T cells in the draining lymph nodes. The T cells then convert to hapten-specific T cells. Rechallenge of the same hapten results in the recruitment of hapten-specific T cells, which react to the hapten presented by Langerhans cells, release cytokines and attract other inflammatory cells which play major roles in the pathogenic process of ACD. Some researches reported that multiple cell types, chemical mediators, cytokines and chemokines are involved in the regulation of this process in ACD. The inflammatory cytokines such as IL-1 β , 2 and Interferon(IFN)- γ have been reported to play major roles in the initiation and progression of these processes. Although several therapeutic agents, including steroids and immunomodulators, are available to treat inflammatory skin diseases, specific drugs are not developed until now. Therefore, a safe and better treatment for ACD is needed. The purpose of this study is to assess the effects of OH cream on the ACD mouse model caused by repeated application of 1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB).

Contents

Summary of research	18
Chapter 1. Introduction	31
I. Necessary of research	31
II. Objective of research	34
Chapter 2. Present status of domestic and foreign researches	36
Section 1. Present status of domestic researches	36
Section 1. Present status of foreign researches	37
Chapter 3. Research results	38
Section 1. Development of Stable Production Techniques and Contact Dermatitis Therapy Device using Chunneyoncho(<i>Opuntia humifusa</i>)	38
Section 2. Study on the genetic relationship and effective components in CheonNyeonCho Opuntia	93
Section 3. Effect of <i>Opuntia humifusa</i> cream and extract on DNCB-induced allergic contact dermatitis in Balb/c mice	124
Chapter 4. Degree of target achievement and contribution to the related research fields	152
Chapter 5. Application plan for the results	154
Chapter 6. Information of international technology collected	162
Chapter 7. References	163

목 차

제출문	1
요약문	2
Summary(영문)	18
Contents(영문)	29
목 차	30
제 1장 연구개발과제의 개요	31
제 1 절 연구개발의 필요성	31
제 2 절 연구개발의 목적	34
제 2장 국내외 기술개발 현황	36
제 1 절 국내	36
제 2 절 국외	37
제 3장 연구개발 수행내용 및 결과	38
<천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염 치료제 개발>	38
제 1 절 서론	38
제 2 절 재료 및 방법	38
제 3 절 결과 및 고찰	42
제 4 절 결과요약	88
<천년초선인장의 유전자 분석을 통한 기원연구 및 유효성분 분석>	93
제 1 절 재료 및 방법	93
제 2 절 결과 및 고찰	95
<천년초선인장의 안전성 및 접촉성피부염에 대한 효능 검정>	124
제 1 절 서론	124
제 2 절 재료 및 방법	124
제 3 절 결과 및 고찰	131
제 4 절 결과요약	151
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	152
제 5장 연구개발결과의 활용계획	154
제 1 절 연구개발 결과요약	154
제 2 절 연구개발 결과의 활용계획	161
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	162
제 7장 참고문헌	163

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

- 선인장은 열대지방 원산의 관상용식물로 줄기선인장, 개발선인장, 마디선인장, 부채선인장 등 여러 종이 있으며, 부채선인장은 제주도와 일부지역 등지에 귀화식물로 재배되고 있다(고, 1994).
- 부채선인장은 노화억제 및 암 발생억제에 탁월한 효과와 성인병의 원인이 되는 콜레스테롤이나 지방함량을 낮추어주는 효과가 밝혀져 있으며(Frenandez *et. al.*, 1992), 항산화효과(백승규 등, 1999), 면역세포의 활성화(신태균 등, 1998), 특히 식이요법제 및 당뇨치료제의 효과에 대한 검증이 이루어져 다양한 기능성식품 및 화장품원료로 상업적으로 재배되고 있다(<http://www.nopaljuce.com>). 이 부채선인장은 내한성이 약하기 때문에 원료생산이 제한적이며 늘어나는 수요를 충족시키기 위해 전국적으로 재배가 가능한 품종 육성이 요구되고 있다.
- “천년초선인장”은 줄기 하나하나의 모양은 제주도에서 재배되고 있는 부채선인장(백년초선인장)과 거의 흡사하나, 줄기의 총 길이가 1.5 ~ 2 m, 영하의 온도에서 생육이 불가능한 “백년초선인장”과는 달리, 줄기의 길이가 30~40 cm, 영하 20℃의 혹한에서도 자체 수분을 절반 이하로 감소시켜 얼어 죽지 않고 생명력을 유지하는 특성을 갖고 있어(이경석 등, 2004) 지역특화산업을 위한 신 작물로의 개발이 유망 시 되고 있으나 유전적인 특성이 구명되지 않은 실정이다.
- 제주도에서 경작 또는 일부 자생되는 선인장 중에 *Opuntia*속에 속하는 손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Makino)은 열대지역 유래의 다년초로서 최근 활발하게 효능에 대한 연구가 수행되고 있다. 제주도에서 재배되고 있는 것은 백년초선인장 이라하며 월동이 안되는 것으로 알려져 있으며, 내륙에서 재배되고 있는 것은 천년초선인장 이라하며 한 겨울에도 노지에서 월동이 가능한 것으로 알려져 있다.
- 백년초선인장과 천년초선인장은 그 기원에 대한 연구가 아직 없는 실정으로 일부에서는 동일한 것으로 일컬어지고 있으나 명확한 근거는 없는 실정으로 이들을 식품소재 또는 의약품소재로 하기 위해서는 명확한 구분과 기원에 대한 연구가 필요하다. 이 두 식물체를 구분하기 위해서는 우선 유전적인 동질성 여부를 확인하고 나아가 변이가 심한 특정유전자 영역을 클로닝한 후 염기서열의 비교 분석을 통하여 그 기원을 규명할 수가 있다.
- 천연에 널리 분포하는 사포닌(saponin)은 steroid나 triterpened,의 배당체로 존재하고 여러 가지 생리활성을 나타내는 중요한 식물성분 중의 하나이다. 천년초선인장의 경우에도 사포닌이 함유되어 있는 것으로 알려져 있는데 본 연구를 통하여 천년초선인장의 각 조직 및 시기에 따른 사포닌의 성분을 분석하여 천년초선인장 효능 분석을 위한 기

초자료로 활용하고자한다.

- 현대사회는 산업의 발달로 인한 환경오염과 합성물질의 생산 증가로 인하여 알러지성 접촉피부염을 비롯한 피부질환의 발병빈도가 크게 증가하고 있음
- 외부의 다양한 항원에 의한 알러지반응은 일반적으로 유아의 기관지천식, 아토피성 피부염, 비염, 두드러기, 습진 등의 원인중의 하나로 추정됨
- 알러지성 접촉피부염을 유발하는 항원물질들은 점차 일상생활에서의 접촉기회가 늘어남에 따라 임상 및 공중보건학상 중요성이 매우 높아지고 있음
- 알러지성 접촉피부염은 항원이 접촉된 국소부위에 발적, 구진, 소수포, 괴양 등의 증상을 나타내며, 알러지성 항원의 감작과정과 동일항원의 재접촉에 의해 증상이 발현되는 지연형과민반응에 속하는 면역질환임.
- 알러지성 접촉피부염은 접촉된 항원이 Langerhans 세포에 전달된 후 항원의 고유과정을 거쳐 Helper T cell에 전달되고 이 Helper T cell이 분열하여 memory cell을 형성하게 되는 감작과정을 거침
- 이후 항원에 재 감작되면 염증반응과 조직손상이 유발되어 증상이 발현
- 이러한 과정에서 IL-2를 비롯한 많은 cytokine이 방출되고 염증관련세포의 이주에 영향을 미치는 ICAM-1이나 phagocytosis를 하는 granulocyte와 monocyte의 표현분자인 CD11b 등이 증가
- 천년초선인장을 비롯한 선인장류는 민간요법 등에서 오랜 기간 사용되어져 온 약용식물이지만 각 선인장별로 성분 및 기능성에 대한 분석 및 평가와 보다 구체적인 사용에 대한 자료가 부족한 실정임
- 천년초선인장의 고기능 건강식품 및 약용식물로서의 제반 조건을 충족시키고 향후 중요자원생물로서의 중요성을 확보하기 위하여 안전성 및 기능의 심도 있는 접근이 반드시 필요함
- 천년초선인장의 일부 작용으로 알려져 있는 항염증 및 항산화작용의 특성을 감안하여 현재 전세계적으로 발병빈도가 증가하고 있는 알러지성 접촉피부염에 대한 효능을 검증

2) 경제·산업적 측면

- “천년초성인장”은 중부지방에서 60,000여평이 재배되고 있으며, 이식 2년째부터 6천만원/ha의 농가소득 조건으로 계약재배 되고 있어 새로운 경제작물로 부상하고 있으나 종묘가 고가이고(묘당 5천원), “천년초성인장”의 생산을 위한 재배방법에 대한 연구가 미흡한 실정이다.
- 대개의 선인장은 열대지방이 원산지이기 때문에 생산지역이 제한적인데 비해 “천년초성인장”은 노지에서 월동이 가능한 특성을 갖고 있어 이를 이용한 다양한 건강보조식품 또는 기능성 화장품 개발연구는 농가소득 증대 및 수출산업을 선도할 신 작물로의 개발이 유력시 된다.

- 예로부터 민간에서는 선인장의 열매 및 줄기를 변비치료, 이뇨작용, 장운동의 활성화 및 식욕증진의 목적으로 사용해 왔고, 특히 줄기는 피부질환, 류마티스 및 화상치료에 민간요법으로 사용되고 있다(김태정, 1996). 현대 의학적으로 진통작용과 소염작용(이경석, 2004), 라디칼 소거 활성, tyrosinase 저해활성 및 항 알레르기 활성이 인정되어(이남호 등, 2000) 선인장을 이용한 기능성 화장품 개발이 이루어지고 있으며, 특히 산업화가 가속되면서 현대인들은 다양한 형태의 allergen에 노출되어 있어서 알레르기 및 아토피에 의한 피부질환의 발생가능성이 높아지면서 이들 질환에 대한 예방 및 치료제의 개발에 대한 관심이 고조되고 있다.
- 천년초선인장은 환경 친화적인 식물의 특성을 갖고 토양을 보호하는 무공해식물로 대체 작물로서의 재배가 쉬운 장점이 있음
- 기능성이 입증된 기능성 식품 및 관련 상품의 개발로 농가소득을 증대시킬 수 있음
- 기능성 식품 및 약용식물로서의 잠재성 개발과 효율적인 제품으로의 산업성 증대를 통하여 국민건강의 증진 및 재배 농가의 경제적 소득의 증대를 동시에 도모할 수 있는 부가가치 및 파생이익이 높음
- 천년초선인장은 우리나라의 기후에 생육이 적합한 식물로 기능성이 입증되고 산업화가 이루어지면 경제적 파급력이 매우 높음

3) 사회·문화적 측면

- 최근 국민경제가 따라 육류섭취가 증가하는 등 식생활의 다양한 변화와 더불어 늘어나는 각종 성인병 퇴치를 위한 자연 건강식의 개발과 기능성을 갖는 식품에 대한 요구가 커지고 있다. 특히 식품으로부터 유래하는 생리활성을 나타내는 기능성 식품에 대한 관심이 고조되고 있다.
- 천년초선인장을 이용한 가공식품의 개발로 인하여 천년초선인장의 소비확대에 따른 부가가치와 농가소득 증대 기여와 더불어 WTO와 FTA에 대응할 수 있는 작목으로 대두함으로서 농촌문제 개선에 기여될 것이다.
- 외국의 자원에 기반 한 농가와 대외 경쟁력을 갖는 우리나라 고유 농산품목의 상품 브랜드를 개발
- 천년초선인장의 생리활성물질이 많이 포함된 기능성 식품의 개발로 국민보건증진에 기여
- 천년초선인장을 이용한 가공식품의 개발로 인하여 천년초선인장의 소비확대에 따른 경제력 창출과 농가소득의 증대로 WTO와 FTA에 대응할 수 있는 작목으로 대두함으로서 농촌문제 개선에 기여함
- 천년초선인장을 이용한 가공식품의 개발은 재배농가와 영농조합의 소득증대와 산업체의 경영수지 개선을 함으로서 농촌의 경제와 더불어 국민 경제의 활성화에 기여함

제 2 절 연구개발의 목적

- 연구제목 -

<천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉피부염 치료제품 개발>

1) 연구목표

- 가) 천년초선인장 적정 재식밀도 구명
- 나) 천년초선인장 적정 피복비닐 선정
- 다) 천년초선인장 적정 유기물 종류 및 시용량 구명
- 라) 천년초선인장 적정 정식시기 구명
- 마) 천년초선인장 실생번식 연구
- 바) 천년초선인장 적정 수확시기 구명
- 사) 천년초선인장 계통(유사종) 수집 및 특성조사
 - 아) 석회시용 효과 구명
 - 자) 줄기 증수를 위한 꽃 및 열매제거 효과 구명
 - 차) 질소 추비효과 및 생장촉진제 선발
 - 카) 수확시기에 따른 수분함량 변이
 - 타) 적정 식재부위 구명
 - 파) 차광효과 구명
 - 하) 천년초선인장의 줄기, 열매, 뿌리를 이용한 접촉성 피부염 치료제품 개발

- 연구제목 -

<천년초선인장의 유전자분석을 통한 기원연구 및 유효성분 분석>

1) 연구목표

- 가) RAPD분석을 통하여 천년초선인장과 백년초선인장의 gene profiling 조사
- 나) 특정유전자(ITS, rbcL, PSII) 클로닝 및 염기서열비교 분석을 통한 기원 조사
- 다) SNP marker를 이용한 천년초선인장과 백년초선인장의 유전적인 구분
- 라) 천년초선인장의 유효성분 분석

- 연구제목 -

<천년초선인장의 안전성 및 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검증 >

1) 연구목표

- 가) 천년초선인장의 피부 및 안 자극시험을 통한 안전성 자료의 확보
 - 경피독성시험(단회 및 14일 반복투여)
 - 1차 자극성 시험, 부식, 광과민성, 지연성 과민증의 여부를 시험
 - 1차 자극성 시험 : 토끼를 대상으로 Draize기준에 의하여 실시

기준: 홍반과 가피형성, 부종형성

- 안 점막 1차 자극시험 : 토끼를 대상으로 천년초선인장 추출물을 한쪽 눈에 점안하고 24, 48, 72시간, 4, 7일 후에 Draize법으로 평가

기준: 각막(불투명도, 혼탁도, 손상영역의 너비)

홍채(벽의 주름, 충혈, 종창, 각막주변 충혈, 빛에 대한 반응성)

결막(발적, 종창, 배출물)

- 피부 국소 감작성 시험(접촉 알러지성 시험) : Buehler법과 Maximizations법으로 실시

나) 천년초선인장 추출물의 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검정

- 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)에 의한 마우스의 알러지성 접촉피부염 유발
- 천년초선인장 추출물의 농도별 또는 기제별 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검정
- 면역관련 매개인자의 변화조사(IgE, cytokines)

다) 천년초선인장 완제품의 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검정

- 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)에 의한 마우스의 알러지성 접촉피부염 유발
- 천년초선인장 완제품의 농도별 또는 제형별 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검정
- 면역관련 매개인자의 변화조사(IgE, cytokines)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내

손바닥선인장, 일명 부채선인장은 선인장과(Cactaceae)에 속하는 열대성 식물로 제주도와 남해안 일부지역 등지에 자생하고 있는 귀화식물로 전해지고 있으며, 재배하기 전에는 해변 중심으로 자생하였다(고, 1994). 손바닥선인장은 집안이나 밭 근처에 관상용 또는 울타리 용도로 재배하기 시작하였으며 열매 및 줄기의 약효가 구전되면서 그 이용량이 크게 늘어나게 되었고 현재는 수요량의 증가로 농가 소득작물로 부상하여 대단위 재배단지가 조성되어 많은 양이 생산되고 있다(문, 2002).

부채선인장 열매 및 줄기 추출물의 생리활성(최 등, 2001, 2002a, 2002b)연구와, 항균 및 항산화 연구에서 열매 및 줄기 모두 높은 항균 및 항산화 효과를 나타내었고(김 등, 1995; 이 등, 1999), 항염효과 및 소염작용 역시 뛰어나다고 보고한 바 있다(한 등, 1999). 그리고 방사선 조사전 선인장을 투여한 실험군에서 endogenous spleen colony의 형성정도에는 차이가 없었으나 소장 등에서의 apoptotic cell의 발생율은 선인장 투여군에서는 억제현상이 나타나는 것으로 보아 부채선인장은 방사선 방호식품으로서의 사용 가능성이 있다고 하였다(신과 김, 1998). 또한 다양한 Opuntia속 선인장으로부터 분리된 유효성분은 플라보노이드 중 (+)-*trans*-dihydrokaempferol(+)-*trans*-dihydroquercetin이며(Burrer 등, 1982), 이외에 anhalinin, indicaxanthin, isobetain, betain, saponin 등이 있다(Ghansah 등, 1993). 이밖에도 쥐의 스트레스성 위궤양에 대한 연구에서 부채선인장은 항궤양 효과가 있었으며(이, 1997), 콜레스테롤 흡수에 영향을 주지 않고 간장 콜레스테롤 대사를 변화시킨다고 보고 한 바 있다(Fernandez 등, 1994). 줄기 하나하나의 모양은 제주도에서 재배되고 있는 부채선인장(백년초선인장)과 거의 흡사하나 줄기의 총 길이가 1.5 ~ 2 m, 영하의 온도에서 생육이 불가능한 “백년초선인장”과는 달리 줄기의 길이가 30~40 cm, 영하 20℃의 혹한에서도 자체 수분을 절반 이하로 감소시켜 얼어 죽지 않고 생명력을 유지하는 특성을 갖고 있는 “천년초선인장”은(이경석 등, 2004) 새로운 소득작물로 기대되고 있다. 그러나 “천년초선인장”은 유전적인 특성이 구명되지 않았고, 생산 및 이용연구도 미흡한 실정이다.

천년초선인장“에 대한 약리 효능에 관하여는 진통작용과 소염작용(이경석, 2004), 라디칼 소거 활성, tyrosinase 저해활성 및 항 알레르기 활성이 인정되어(이남호 등, 2000) 선인장을 이용한 건강보조식품 또는 기능성 화장품 개발연구의 소재로 관심이 높아지고 있다.

국내·외의 선인장에 대한 연구는 주로 알로에에 대한 연구가 상대적으로 많이 이루어져 있으며 알로에는 식품(음료)과 미용제품으로 개발되어 널리 이용되고 있지만 각종 기능성 성분이 함유되어 다양하게 민간요법으로 사용되고 있는 천년초선인장에 대한 연구는 거의 전무한 상태임

- 천년초선인장은 주로 일반적인 식품에 이용될 수 있으나 아직까지 식품이나 미용제품 등 상품화가 되어 있지 않은 실정임

제 2 절 국 외

Opuntia속 선인장은 고온, 건조 및 내한성에는 강하나 과습에는 약하며 높이는 2m 정도로 대부분 납작한 부채꼴 줄기를 가진 platvopuntia로서 일명 부채선인장이라 하는데, 미국에서는 prickly pear cactus, 멕시코에서는 nopal이라 불리어지고 있다. 이미 멕시코를 비롯한 남아메리카, 미국, 이탈리아 등의 나라에서도 선인장은 오래 전부터 살균작용, 진정작용, 해독작용, 소화작용 등의 민간요법으로 사용되어 왔으며, 현재는 대부분 상업적으로 재배·생산되고 있다. Opuntia속 선인장의 생육특성 및 재배기술에 관한 연구는 비록 그 역사가 짧지만 여러 분야에서 이루어졌다(Gibson과 Nobel, 1986; Nobel, 1988, 1994).

선인장을 이용한 상품화가 활발한 멕시코를 비롯한 중남미에서는 다양한 선인장의 재배기술에 대한 많은 연구가 수행되어 왔으며 현재 재배기술 체제가 매우 잘 구축되어 있다(Rodriguez-Felix와 Cantwell, 1988). 특히 Opuntia속 선인장은 사막지대에 적응되어 재배가 용이하기 때문에 나라마다 재배기술이 다양하다. 대부분의 선인장의 뿌리 발생은 매우 쉽게 이루어지지만, 그 발생시간은 수주에서 수개월에 걸쳐 차이가 나며 또한 품종에 따라 그 차이는 서로 다르게 나타난다(Mass, 1986). 그리고 온도 및 외부 호르몬 사용에 의하여 발근이 촉진될 수도 있다고 보고하고 있다(Fuentes-Rodriguez, 1991). 넓은 잎줄기인 cladode는 생체 중 약 85~95%가 수분으로 구성되어 있는데, 스트레스를 받은 때에는 그 수분함량이 60%까지 떨어지기도 한다(Nobel, 1994).

멕시코산 *Opuntia ficus-indica*의 종자는 단백질(16.6%), 지방(17.2%), 섬유소(49.6%), 회분(3.0%), 철(9.45mg%)의 함량이 높았으며, Mg, P, K, Zn, Cu 함량은 일일 섭취권장량의 10~20% 정도로 존재하여 영양가가 높다고 알려져 있고, 칼슘의 함량은 일일 섭취권장량의 10% 이하였고, 아스파라긴산, 글루타민산, 아르기닌, 글리신이 주요 아미노산으로 총 아미노산함량의 50%를 차지하였으며 특히 아미노산인 메티오닌과 시스틴의 함량이 높다고 하였다(Sawaya 등, 1983). 또한 Opuntia속 종자에서 추출한 오일은 전체 종자중량의 13.6%이며 불포화도가 82%로 상당히 높았고, 리놀렌산이 73.4%, 팔미틴산 12%, 올레인산 8.8%, 스테아린산 5.8% 등으로 구성되어 사람과 동물에게 유용한 식용유지임이 밝혀졌다(Sawaya 등, 1982). 멕시코에서도 민간요법으로 내려오는 *Opuntia streptacantha* Lemairc의 당뇨효과를 알아보기 위한 계절별 다당활성 분석연구에서 그 효과는 계절적 차이 없이 당뇨치료에 매우 효과적이었다고 보고한 바 있다(Lozoya, 1989). 특히 선인장의 줄기는 비 인슐린 의존성 당뇨병의 혈당치를 낮출 수 있는데(Frati 등, 1983, 1989, 1990), 이는 인슐린 비의존성 당뇨병 환자의 포도당 조절에 효과적이어서 포도당 수준을 낮추고 과혈당상태하에서 인슐린 활성을 증가시킴으로써 혈청중 트리글리세리드, 총 콜레스테롤과 저밀도의 지방단백질, 콜레스테롤 수준을 낮추는 것으로 보고하고 있다(Fernandez 등, 1990; Frati 등, 1983, 1988, 1989, 1990; Inglese 등, 1993).

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

<천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염 치료제 개발>

제 1 절 서론

선인장은 열대지방 원산의 관상용식물로 줄기선인장, 개발선인장, 마디선인장, 부채선인장 등 여러종이 있으며, 부채선인장은 제주도과 일부지역 등지에 귀화식물로 재배되고 있다(고, 1994). 부채선인장은 노화억제 및 암 발생억제에 탁월한 효과와 성인병의 원인이 되는 콜레스테롤이나 지방함량을 낮추어주는 효과가 밝혀져 있으며(Frenandez *et. al.*, 1992), 항산화효과(백승규 등, 1999), 면역세포의 활성화(신태균 등, 1998), 특히 식이요법제 및 당뇨치료제의 효과에 대한 검증이 이루어져 다양한 기능성식품 및 화장품원료로 상업적으로 재배되고 있다(<http://www.nopaljuce.com>). 이 부채선인장은 내한성이 약하기 때문에 원료생산이 제한적이며 늘어나는 수요를 충족시키기 위해 전국적으로 재배가 가능한 품종육성이 요구되고 있다.

백년초선인장과 천년초선인장은 그 기원에 대한 연구가 아직 없는 실정으로 일부에서는 동일한 것으로 일컬어지고 있으나 명확한 근거는 없는 실정으로 이들을 식품소재 또는 의약품소재로 하기 위해서는 명확한 구분과 기원에 대한 연구가 필요하다. 이 두 식물체를 구분하기 위해서는 우선 유전적인 동질성 여부를 확인하고 나아가 변이가 심한 특정유전자 영역을 클로닝한 후 염기서열의 비교 분석을 통하여 그 기원을 규명할 수가 있다.

현대사회는 산업의 발달로 인한 환경오염과 합성물질의 생산 증가로 인하여 알러지성 접촉성피부염을 비롯한 피부질환의 발병빈도가 크게 증가하고 있으며 외부의 다양한 항원에 의한 알러지 반응은 일반적으로 유아의 기관지천식, 아토피성 피부염, 비염, 두드러기, 습진 등의 원인중의 하나로 추정된다.

천년초선인장의 일부 작용으로 알려져 있는 항염증 및 항산화작용의 특성을 감안하여 현재 전세계적으로 발병빈도가 증가하고 있는 알러지성 접촉성피부염에 대한 안전성 및 독성을 확인하고, 효능을 연구하여 사업화를 함으로써 농가의 소득증대 및 소비의 촉진을 목적으로 이 실험을 수행하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 천년초선인장 적정 재식밀도 구명

가. 시험재료 : 천년초선인장 줄기(*Opuntia humifusa*)

나. 처리내용 : 재식밀도(주/10a)

① 9,920 ② 6,610 ③ 4,960 ④ 3,970 ⑤ 3,310

다. 정식기 : 2005년 4월 중순 ※ 수확시기 : 2006년 11월 중순
 라. 시험구 배치 : 난괴법 3반복
 마. 주요 조사내용 : 생육특성, 병해충, 수량성 등

2. 천년초선인장 적정 유기물 종류 및 시용량 구명

가. 시험재료 : 천년초선인장 줄기 (*Opuntia humifusa*)
 나. 유기질비료 종류 : ①우분퇴비 ②돈분퇴비 ③계분퇴비
 다. 시용량(kg/10a) :

① 0 ② 600 ③ 1,200 ④ 2,400 ⑤ 4,800

라. 정식기 : 2005년 4월 중순 ※ 수확시기 : 2006년 11월 중순
 마. 시험구 배치 : 난괴법 3반복
 바. 주요 조사내용 : 생육특성, 수량성 등

※ 우분퇴비는 우분과 톱밥을 60 : 40%로, 계분퇴비는 계분과 톱밥을 50 : 50%로, 돈분퇴비는 돈분과 톱밥을 60 : 40%로 혼합하여 발효시킨 퇴비로서 예산군 신암농협을 통해서 20kg에 3,700원에 구입하여 사용하였다. 퇴비의 성분함량은 표 1 과 같다.

Table 1. 시험에 사용된 유기질비료의 성분함량

구 분	T-N	유기물	유기물/N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO
돈분퇴비	1.21	37.6	31.1	0.6	0.3	0.5	0.3
계분퇴비	1.15	36.9	32.1	1.3	0.6	5.1	0.7
우분퇴비	1.02	33.3	32.6	1.0	0.5	3.4	0.8

※ 질소성분은 돈분이 가장 많았으며 인산, 칼륨, 칼슘 등 성분은 계분퇴비가 많이 함유된 것으로 나타났다.

3. 천년초선인장 피복비닐 선정 시험

가. 시험재료 : 천년초선인장 줄기(*Opuntia humifusa*)
 나. 피복비닐 종류 : ① 무피복 ② 투명PE ③ 흑색PE ④ 흑백PE ⑤ 녹색PE
 다. 2004년 4월 하순 ※ 수확시기 2005년 11월 하순
 라. 시험구 배치 : 난괴법 3반복
 마. 주요 조사항목 : 생육특성, 수량성 등

4. 천년초선인장 적정 피복재료 선정 시험

가. 시험재료 : 천년초선인장 줄기(*Opuntia humifusa*)
 나. 피복비닐 종류 :

- ① 무피복 ② 투명PE ③ 흑색PE ④ 흑백PE
- ⑤ 녹색PE ⑥ 짚 ⑦ 부직포 ⑧ 칼라보온덮개

다. 정식기 : 2005년 4월 하순, ※ 수확시기 2006년 및 2007년 11월 하순

라. 난괴법 3반복

마. 주요 조사내용 : 생육특성, 수량성 등

5. 천년초선인장 적정시기 구명

가. 시험재료 : 천년초선인장 줄기 (*Opuntia humifusa*)

나. 처리내용 :

- 봄 정식 : ① 4월 상순 ② 5월 하순 ③ 6월 하순 ④ 7월 중순

- 가을 정식 : ① 9월 25일 ② 10월 10일 ③ 10월 25일 ④ 11월 11일

다. 정식기 : 2005년 4월 하순, ※ 수확시기 2006년 및 2007년 11월 하순

라. 시험구 배치 : 난괴법 3반복

마. 주요 조사내용 : 생육특성, 병해충, 수량성 등

6. 천년초선인장 실생번식 연구

(-시험내용 : 온도, 광에 따른 발아조건 구명)

가. 시험재료 : 천년초선인장 종자(*Opuntia humifusa*)

나. 처리내용 : 온도(℃)

- 명 상태 : ① 9 ② 18 ③ 27 ④ 36

- 암 상태 : ① 9 ② 18 ③ 27 ④ 36

다. 주요 조사내용 : 발아세, 발아율 등

7. 천년초선인장 적정 수확시기 구명 연구

가. 시험재료 : 천년초선인장 줄기(*Opuntia humifusa*)

나. 처리내용 : ① 10월 4일 ② 10월 10일 ③ 12월 1일

다. 시험구 배치 : 난괴법 3반복

라. 주요 조사내용 : 줄기상태, 수분함량 등

8. 석회 시용량에 따른 생육, 수량 및 품질 변이

가. 시험재료 : 천년초선인장 줄기(*Opuntia humifusa*)

나. 처리내용(석회시용량) : ①무시용 ②150kg/10a ③300kg/10a ④450kg/10a

다. 정식기 : 2006년 4월 하순

라. 시험구 배치 : 난괴법 3반복

마. 주요 조사내용 : 생육특성, 병해충, 수량성 등

9. 질소질 추비시용이 생육, 수량 및 품질에 미치는 영향

- 가. 시험재료 : 천년초선인장 줄기 (*Opuntia humifusa*)
- 나. 정 식 기 : 2006년 4월 하순
- 다. 처리내용(질소시용량) : ① 무처리 ② 질소 74g/20 L
③ 질소 148g/20 L ④ 질소 222g/20 L
- 라. 처리시기 : 8월 중순, 9월 하순(2회 살포)
- 마. 시험구 배치 : 난괴법 3반복
- 바. 주요 조사내용 : 생육특성, 병해충, 수량성 등

10. 생장촉진제 처리에 따른 수량 및 품질변이

- 가. 시험재료 : 천년초선인장 줄기(*Opuntia humifusa*)
- 나. 정 식 기 : 2006년 4월 하순
- 다. 처리내용(생장촉진제) : ① 무처리 ② 두배나(33g) ③ 배추애(50g) ④ 요소(60g)
- 처리 시기 : 8월 14일, 9월 14일 2회 살포
- 라. 시험구 배치 : 난괴법 3반복
- 마. 주요 조사내용 : 생육특성, 병해충, 수량성 등

11. 차광처리에 따른 생육, 수량 및 특징

- 가. 시험재료 : 천년초선인장 줄기(*Opuntia humifusa*)
- 나. 처리내용 : ① 무처리 ② 차광 55% ③ 차광 85% ④ 차광 90%
- 다. 정 식 기 : 2006년 4월 하순
- 라. 시험구 배치 : 난괴법 3반복
- 마. 주요 조사내용 : 생육특성, 병해충, 수량성 등

12. 과실비대를 위한 과실적과 시기시험

- 가. 처리내용 : ① 무처리 ② 개화 전 열매제거 ③ 개화 전 꽃 제거
④ 개화 후 꽃 제거 ⑤ 개화중때 꽃 제거 ⑥ 개화 후 꽃 제거
- 나. 조사내용 : 과실크기, 과실수량, 줄기수량, 줄기크기 등
- 다. 정 식 기 : 2006년 4월 하순
- 라. 시험구 배치 : 난괴법 3반복
- 마. 주요 조사내용 : 생육특성, 병해충, 수량성 등

13. 줄기 차수별 생육 및 수량특성

- 가. 시험재료 : 천년초선인장 줄기 (*Opuntia humifusa*)
- 나. 처리내용(식재부위) : ① 1차 줄기 ② 2차 줄기 ③ 3차 줄기

- 다. 정 식 기 : 2006년 4월 하순
- 라. 시험구 배치 : 난괴법 3반복
- 마. 주요 조사내용 : 생육특성, 병해충, 수량성 등

제 3 절 결 과 및 고 찰

1. 천년초선인장 적정 재식밀도 구명

가. 2년생의 생육특성 및 수량성

줄기길이는 3차줄기와 4차줄기에서 밀식할수록 길어지는 경향이었으며, 줄기두께는 2차 줄기에서 3,310주/10a가 9,920주/10a보다 두꺼웠다.

Table 2. 천년초선인장 재식밀도별 줄기크기

재식밀도 (주/10a)	줄기길이(cm)					줄기폭(cm)					줄기두께(mm)				
	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균
9,920	14.7	13.4	9.4	7.7	11.4	8.1	6.7	5.8	4.9	6.4	9.3	8.4b*	8.6	6.6	8.2
6,610	17.7	11.4	9.6	8.0	10.9	8.1	7.1	5.7	5.3	6.5	10.4	9.2ab	7.9	7.3	8.7
4,960	14.6	11.7	11.3	8.7	11.6	8.4	7.1	6.6	5.4	6.9	10.5	9.3ab	8.5	7.2	8.9
3,970	14.5	11.3	11.2	8.7	11.4	8.4	6.8	6.6	5.3	6.8	11.2	9.5ab	8.5	6.9	9.0
3,310	15.0	11.9	10.8	9.2	11.8	8.6	7.0	6.4	5.4	6.8	11.1	9.8a	8.6	7.5	9.2

※ DMRT 5% 유의수준

줄기수는 2차줄기, 3차줄기, 4차줄기가 밀식할수록 많아졌으며, 총줄기수도 밀식할수록 많아졌다.

Table 3. 천년초선인장 재식밀도별 줄기수

재식밀도 (주/10a)	주당 줄기수(개)				
	1차	2차	3차	4차	계
9,920	6.8b*	8.4a	1.9b	0.3b	17.4
6,610	8.0ab	9.5a	3.3b	0.3b	21.1
4,960	7.6ab	11.7a	5.5ab	0.7ab	25.5
3,970	7.8ab	10.7a	7.1ab	0.7ab	26.3
3,310	8.6a	14.8a	11.9a	1.9a	37.2

※ DMRT 5% 유의수준

한 주당 줄기무게는 소식할수록 많았다.

Table 4. 천년초선인장 재식밀도별 줄기무게

재식밀도 (주/10a)	주당 줄기무게(g)				
	1차	2차	3차	4차	계
9,920	402.4	289.6b*	53.4b	6.9c	752
6,610	484.4	297.7b	67.0b	8.3c	857
4,960	450.9	407.0ab	172.8ab	34.3b	1,065
3,970	512.3	416.0ab	205.6ab	24.8b	1,159
3,310	586.0	636.8a	419.7a	61.3a	1,704

※ DMRT 5% 유의수준

주당 열매수는 3,310주/10a가 가장 많았으며, 소식할수록 많아지는 경향 이었고, 주당 열매 무게는 3,310주/10a가 가장 무거웠으며, 소식할수록 무거워지는 경향이였다.

Table 5. 천년초선인장 재식밀도별 열매수 및 열매무게

재식밀도 (주/10a)	과장 (cm)	과경 (cm)	주당열매수 (개)	주당 열매무게(g)	열매1개의무게 (g)
9,920	4.2	2.1	32.1b*	454.5	14.2
6,610	4.4	2.1	39.6b	598.7	15.1
4,960	4.4	2.1	45.4b	642.3	14.1
3,970	4.0	2.1	68.9ab	864.1	12.5
3,310	4.4	2.1	91.7a	1155.4	12.6

※ DMRT 5% 유의수준

나. 1년생의 생육특성 및 수량성

주당 줄기길이는 3차줄기가 소식할수록 많아지는 경향이었으며, 줄기폭이나 줄기두께는 소식할수록 넓어지거나 두꺼워지는 경향이였다.

Table 6. 천년초선인장 재식밀도별 줄기크기

재식밀도 (주/10a)	줄기길이(cm)				줄기폭(cm)				줄기두께(mm)			
	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균
9,920	13.0	10.6	9.4	11.0	8.6	6.6	5.6	6.9	10.4	8.9	8.5	9.3
6,610	12.2	10.6	9.4	10.7	8.3	7.2	6.0	7.2	10.7	9.7	7.9	9.4
4,960	12.2	10.3	10.8	11.1	8.3	6.6	6.4	7.1	11.0	8.8	8.0	9.3
3,970	12.4	9.8	10.6	10.9	8.7	6.6	6.3	7.2	12.1	9.8	8.0	10.0
3,310	12.5	10.3	11.0	11.3	8.7	6.8	6.4	7.3	12.1	9.8	8.0	10.0

주당 줄기수는 3차줄기에서 3,310주/10a, 3,970주/10a, 4,960주/10a 가 9,920주/10a나 6,610주/10a 보다 많았다.

Table 7. 천년초선인장 재식밀도별 줄기수

재식밀도 (주/10a)	주당 줄기수(개)			
	1차	2차	3차	계
9,920	5.0	8.0	1.4b*	14.4
6,610	4.5	8.7	3.5b	16.7
4,960	4.8	9.5	6.4a	20.7
3,970	4.8	10.4	7.3a	22.5
3,310	4.5	10.1	7.4a	22.0

※ DMRT 5% 유의수준

주당 줄기무게는 3,310주/10a가 9,920주/10a 보다 무거웠다.

Table 8. 천년초선인장 줄기무게

재식밀도 (주/10a)	주당 줄기무게(g)			
	1차	2차	3차	계
9,920	354.8	208.9	37.3b*	601.0
6,610	305.4	237.5	120.9ab	663.8
4,960	353.8	293.1	167.7ab	814.6
3,970	358.3	280.0	211.0ab	849.3
3,310	323.5	306.3	224.5a	854.3

※ DMRT 5% 유의수준

열매무게는 1년차에서는 별 차이가 없었다.

Table 9. 천년초선인장 재식밀도별 열매크기 및 수량성

재식밀도 (주/10a)	과장 (cm)	과경 (cm)	열매무게 (g/주)	열매수 (개/주)
9,920	3.9	2.0	5.7	1.07
6,610	3.9	2.0	6.2	0.40
4,960	3.7	2.0	3.0	0.43
3,970	3.7	1.9	6.3	0.33
3,310	3.9	1.9	4.6	0.47

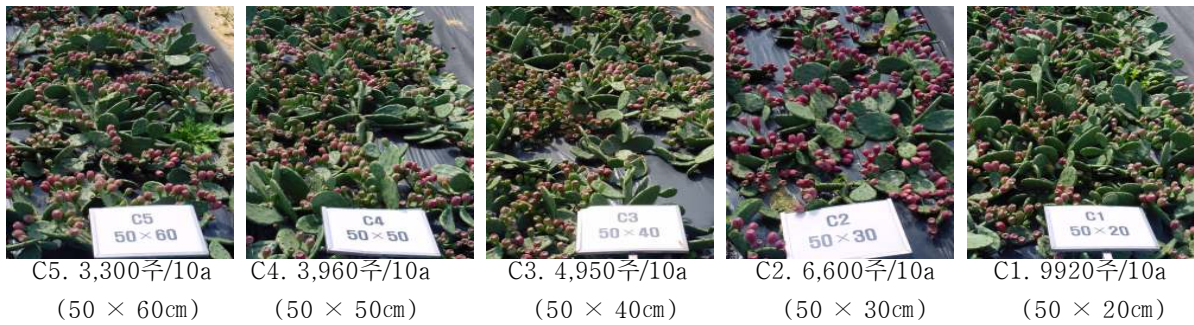


Fig. 1. 천년초선인장의 재식밀도에 따른 생육상황

다. 경제성 분석

< 영농활용 >

활용제목명	천년초선인장 적정 재식밀도					
활용분야	인삼·약초					
활용내용요약	천년초선인장 재배시 재식밀도는 3,100주/10a(50cm*60cm)로 심는 것이 소득이 높았다.					
연구과제명	천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염 치료제 개발					사업구분
세부과제명	천년초선인장 안전 생산기술 개발 (천년초선인장 적정 재식밀도 구명)					농림기술개발과제
구 분	분야	인삼·약초	작 목	천년초선인장	색인어	천년초선인장, 손바닥선인장, 재식밀도
연구개발자	소속기관		성명	전화 및 e-mail주소		
	금산인삼약초시험장		한승호	041-753-8823 abshhan@hanmail.net		
공동개발자	작물연구과		강영식	041-330-6258, kangsk6710@nate.com		
	금산인삼약초시험장		김현호	041-753-8823 ginab@hanmail.net		
	금산인삼약초시험장		김관후	041-753-8823 bulkline@chungnam.net		
	금산인삼약초시험장		김선익	041-753-8823 ginkim@hanmail.net		
	금산인삼약초시험장		성봉재	041-753-8823 gin0601@hanmail.net		
	금산인삼약초시험장		이가순	041-753-8823 lkasn@chungnam.net		
	충남농업기술원		신철우	041-330-6204, cwshin220@hanmail.net		
	금산인삼약초시험장		이종철	abjclee@naver.com		
	(주)천년초		김복현	chunnc@hanmail.net		
	(주)천년초		나영래	02-538-5870, chunnc77@naver.com		

1) 활용

가) 천년초선인장 재배농가가 재식밀도를 결정할 때 참고 자료로 사용할 수 있음.

2) 유사 영농활용 기술과의 차이점

없음

3) 현황 및 문제점

- 가) 천년초선인장은 최근 충남 아산지역을 위주로 재배면적이 급격히 증가하고 있으며 전국에 53ha, 충남에 28ha 정도 재배되는 것으로 추정됨
- 나) 천년초선인장은 식품으로 사용가능하며, 식이섬유, 비타민C, 칼슘, 플라보노이드 등을 많이 함유하고, 면역활성물질도 함유하고 있으며, 항산화활성이 높은 것으로 알려짐.
- 다) 2004년 4월부터 2008년 4월까지 농림기술관리센터(ARPC)에서 우리원이 주관이 되어 경북대학교, 벤처기업 2곳과 같이 연구과제로 선정되어 연구를 수행중에 있음.
- 라) 재배면적은 증가하는 추세이나 재배기술이 확립되어 있지 않아 농민들이 애로를 겪고 있음.

4) 기대효과

○ 경제성 비교

재식밀도 (주/10a, cm)	소득분석(천원/10a)			
	조수입	경영비	소득	지수
9,920 (50×20)	20,843	15,729	5,114	100
6,610 (50×30)	15,766	10,699	5,067	99
4,960 (50×40)	13,832	8,199	5,633	110
3,970 (50×50)	12,410	6,699	5,711	112
3,310 (50×60)	13,481	5,700	7,781	152

- * 종묘비 : 4,545원/주, 100평용을 분양받고, 이것으로 2년 후 1,000평을 재배 할 수 있음.
따라서 10,000천원/100평을 3년으로 나누어 계산함.
- * 경영비는 봄감자 경영비(700천원)에 종묘비를 더한 것으로 계산함.
 - 식재 : 2004년 4월, 2006년 4월, 수확 : 2005년 11월, 2006년 11월
 - 시비량 : 돈분퇴비(돈분 : 톱밥 = 60 : 40%) 2,000kg/10a,
흑색PE 0.03mm × 150cm로 이랑을 피복하여 재배함.
- * 수매가격 줄기 : 2,000원/kg, 열매 : 1,000원/kg
- * 종묘비 : ① 9,920주/10a : 45,086천원 ÷ 3년 = 15,029천원
 ② 6,610주/10a : 29,997천원 ÷ 3년 = 9,999천원
 ③ 4,960주/10a : 22,498천원 ÷ 3년 = 7,499천원
 ④ 3,970주/10a : 17,998천원 ÷ 3년 = 5,999천원
 ⑤ 3,310주/10a : 14,999천원 ÷ 3년 = 5,000천원

5) 적요

- 가) 천년초선인장 재배시 소식(3,310주/10a, 50cm×60cm) 하는 것이 경영에 유리함.

2. 천년초선인장 적정 유기물 종류 및 시용량 구명

가. 돈분퇴비

돈분퇴비의 줄기길이는 4,800kg/10a가 다소 긴 편이었으며, 줄기수와 줄기무게는 2,400kg/10a와, 4,800kg/10a 가 다소 많거나 무거운 편이었다.

Table 10. 천년초선인장 줄기 생육특성

시용량 (kg/10a)	줄기길이(cm)					줄기폭(cm)					줄기두께(mm)				
	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균
무처리	12.9	11.4	9.3	8.7	10.6	7.7	6.8	5.7	5.1	6.5	10.6	8.2	6.9	6.0	7.9
600	12.9	11.3	10.0	7.9	10.5	7.6	6.7	6.2	5.3	6.5	10.0	8.7	7.3	6.9	8.2
1,200	13.4	11.8	10.1	7.7	10.8	7.7	7.0	6.2	5.0	6.5	10.5	8.0	7.3	6.8	8.2
2,400	13.8	12.2	9.8	7.6	10.9	7.9	7.0	6.2	5.0	6.5	10.2	7.9	7.2	7.6	8.2
4,800	13.5	12.4	10.6	8.4	11.2	8.1	7.2	6.3	5.4	6.8	10.2	8.1	7.1	6.9	8.1

Table 11. 천년초선인장 줄기수 및 줄기무게

시용량 (kg/10a)	줄기수(개/주)					줄기무게(g/주)				
	1차	2차	3차	4차	계	1차	2차	3차	4차	계
무처리	8.7	8.8	1.6	0.4	20	493.5	245	49.5	3	791
600	8.9	9.4	2.9	0.6	22	451	270	97.5	15	834
1,200	9.0	11.1	3.0	0.4	24	492.5	335	91	4.5	923
2,400	9.0	13.3	3.8	0.5	27	574.5	455	148	13.5	1,191
4,800	9.4	13.5	3.4	0.3	27	574	457.5	106	9.5	1,147

돈분퇴비의 주당 열매수와 열매무게는 1,200kg/10a와, 2,400kg/10a가 다소 많거나 무거운 편이었다.

Table 12. 천년초선인장 열매특성 및 수량성

시용량(kg/10a)	과장(cm)	과경(cm)	열매수(개/주)	열매무게(g/주)
무처리	4.3	2.1	54.1	559
600	4.2	2.1	53.4	656
1,200	4.3	2.1	65.2	767
2,400	4.3	2.1	67.0	783
4,800	4.5	2.1	56.8	599

나. 우분퇴비

우분퇴비의 줄기길이, 줄기폭, 줄기무게는 2,400kg/10a와, 4,800kg/10a 처리가 다소 양호한 편이었으며, 줄기수와 줄기무게는 시용량이 증가할수록 많거나 무거워지는 경향이였다.

Table 13. 천년초선인장 줄기 생육특성

시용량 (kg/10a)	줄기길이(cm)					줄기폭(cm)					줄기두께(mm)				
	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균
무처리	12.9	11.5	9.5	6.7	10.2	7.7	6.9	5.9	4.2	6.2	9.5	8.1	7.0	6.1	7.7
600	12.9	10.7	9.5	7.5	10.2	7.7	6.5	5.8	5.1	6.3	9.6	8.2	6.3	6.3	7.6
1,200	13.1	11.2	10.5	6.7	10.4	7.9	6.9	6.2	4.7	6.4	9.7	7.2	6.9	6.5	7.6
2,400	13.6	11.5	10.6	9.8	11.4	8.0	7.1	6.4	6.1	6.9	10.6	8.3	7.9	6.9	8.4
4,800	13.8	12.6	10.6	8.4	11.4	8.0	7.2	6.4	5.2	6.7	10.0	8.5	7.2	6.3	8.0

Table 14. 천년초선인장 줄기수 및 줄기무게

시용량 (kg/10a)	줄기수(개/주)					줄기무게(g/주)				
	1차	2차	3차	4차	계	1차	2차	3차	4차	계
무처리	8.8	8.0	1.6	0.3	19	258.8	234.0	44.5	4.0	541
600	9.1	8.4	2.0	0.3	20	482.5	238.5	56.5	5.5	783
1,200	8.8	10.9	2.7	0.4	23	534.0	329.5	95.0	8.5	967
2,400	9.0	11.3	2.2	0.2	25	529.0	362.5	174.0	3.0	1,069
4,800	8.6	12.2	3.2	0.6	25	495.5	383.0	139.0	27	1,045

우분퇴비의 열매수와 열매무게는 시용량이 증가할수록 다소 많거나 무거워지는 경향이였다.

Table 15. 천년초선인장 열매특성 및 수량성

시용량(kg/10a)	과장(cm)	과경(cm)	열매수(개/주)	열매무게(g/주)
무처리	4.3	2.1	60.5	623
600	4.3	2.2	62.5	648
1,200	4.5	2.2	64.0	688
2,400	4.4	2.1	66.5	738
4,800	4.4	2.2	74.0	821

다. 계분퇴비

계분퇴비의 줄기길이는 시용량이 많을수록 길이가 길어지는 경향이었으며, 줄기수도 시용량이 많을수록 많아지는 경향이였다.

Table 16. 천년초선인장 줄기 생육특성

시용량 (kg/10a)	줄기길이(cm)					줄기폭(cm)					줄기두께(mm)				
	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균
무처리	13.0	10.3	9.8	8.3	10.4	7.7	6.6	6.0	5.4	6.4	10.0	8.1	7.6	6.8	8.1
600	13.2	10.2	9.7	8.8	10.5	7.6	6.4	5.8	5.4	6.3	9.9	8.3	7.8	6.4	8.1
1,200	13.2	10.2	9.6	8.3	10.3	7.6	6.4	5.6	5.1	6.2	10.1	8.5	7.3	5.8	7.9
2,400	13.8	10.9	9.5	8.3	10.6	7.8	6.7	5.8	5.4	6.4	10.1	8.5	7.4	7.2	8.3
4,800	13.6	12.0	10.5	7.8	11.0	8.0	7.2	6.2	4.9	6.6	10.3	8.3	7.5	6.5	8.2

Table 17. 천년초선인장 줄기수 및 줄기무게

시용량 (kg/10a)	줄기수(개/주)					줄기무게(g/주)				
	1차	2차	3차	4차	계	1차	2차	3차	4차	계
무처리	8.3	8.3	2.4	0.4	19.4	471.0	218.5	62.0	5.5	757
600	9.0	8.0	2.1	0.1	19.2	478.0	249.0	71.0	4.0	802
1,200	8.9	9.4	2.3	0.3	20.9	461.5	246.5	74.5	5.5	788
2,400	9.1	11.7	3.5	0.5	24.8	498.5	319.0	122.5	17.0	957
4,800	9.3	12.6	3.6	0.4	25.9	517.5	384.0	145.5	5.0	1,052

계분퇴비의 열매수와 열매무게는 4,800kg/10a가 다소 많거나 무거운 편이었다.

Tabel 18. 천년초선인장 열매특성 및 수량성

시용량(kg/10a)	과장(cm)	과경(cm)	열매수(개/주)	열매무게(g/주)
무처리	4.4	2.1	60.0	657
600	4.2	2.2	55.0	659
1,200	4.4	2.1	47.5	680
2,400	4.4	2.1	58.5	625
4,800	4.5	2.1	70.0	782



Fig. 2. 계분퇴비 시용량에 따른 천년초선인장 생육상황

라. 경제성 분석

< 영농활용 >

활용제목명	천년초선인장 적정 유기물 종류 및 시용방법					
활용분야	인삼·약초					
활용내용요약	천년초선인장 재배시 유기질 비료는 돈분퇴비를 2,400kg/10a 사용하는 것이 소득이 높았다.					
연구과제명	천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염 치료제 개발				사업구분	
세부과제명	천년초선인장 안전 생산기술 개발 (천년초선인장 적정 유기물 종류 및 시용량 구명)				농림기술개발과제	
구 분	분야	인삼·약초	작 목	천년초선인장	색인어	천년초선인장, 손바닥선인장, 유기질비료, 돈분퇴비, 우분퇴비, 계분퇴비
연구개발자	소속기관		성명	전화 및 e-mail주소		
	금산인삼약초시험장		한승호	041-753-8823 abshhan@hanmail.net		
공동개발자	작물연구과		강영식	041-330-6258, kangsk6710@nate.com		
	금산인삼약초시험장		김현호	041-753-8823 ginab@hanmail.net		
	금산인삼약초시험장		김관후	041-753-8823 bulkline@chungnam.net		
	금산인삼약초시험장		김선익	041-753-8823 ginkim@hanmail.net		
	금산인삼약초시험장		성봉재	041-753-8823 gin0601@hanmail.net		
	금산인삼약초시험장		이가순	041-753-8823 lkasn@chungnam.net		
	충남농업기술원		신철우	041-330-6204, cwshin220@hanmail.net		
	금산인삼약초시험장		이종철	011-454-1513, abjcllee@naver.com		
	(주)천년초		김복현	011-422-7739, chunnc@hanmail.net		
	(주)천년초		나영래	02-538-5870, chunnc77@naver.com		

1) 활용

가) 천년초선인장 재배농가가 재식밀도를 결정할 때 참고 자료로 사용할 수 있으며, 재배시 적용할 수 있는 적당한 유기물 종류와 시용량.

2) 유사 영농활용 기술과의 차이점

없음

3) 현황 및 문제점

가) 천년초선인장은 최근 충남 아산지역을 위주로 재배면적이 급격히 증가하고 있으며 전국에 53ha, 충남에 28ha 정도 재배되는 것으로 추정됨

나) 천년초선인장은 식품으로 사용가능하며, 식이섬유, 비타민C, 칼슘, 플라보노이드 등을 많이 함유하고, 면역활성물질도 함유하고 있으며, 항산화활성이 높은 것으로 알려짐.

다) 2004년 4월부터 2008년 4월까지 농림기술관리센터(ARPC)에서 우리원이 주관이 되어 경북대학교, 벤처기업 2곳과 같이 연구과제로 선정되어 연구를 수행중에 있음.

라) 재배면적은 증가하는 추세이나 재배기술이 확립되어 있지 않아 농민들이 애로를 겪고 있음.

4) 기대효과

○ 경제성 비교

시용량 (kg/10a)	소득분석(천원/10a)			
	조수입	경영비	소득	지수
무처리	13,247	11,177	2,070	36.9
돈분 600	15,370	11,288	4,082	72.8
돈분 1,200	17,280	11,399	5,881	104.8
돈분 2,400	20,932	11,621	9,311	165.9
돈분 4,800	19,133	12,065	7,068	126.0
우분 600	14,641	11,288	3,353	59.8
우분 1,200	17,010	11,399	5,611	100.0
우분 2,400	19,021	11,621	7,400	131.9
우분 4,800	18,858	12,065	6,793	121.1
계분 600	14,650	11,288	3,362	59.9
계분 1,200	14,163	11,399	2,764	49.3
계분 2,400	16,791	11,621	5,176	92.1
계분 4,800	19,086	12,065	7,021	125.1

* 종묘비 : 4,545원/주. 첫해에 100평용을 분양받고, 이것으로 2년 후 1,000평을 재배 할 수 있음. 따라서 10,000천원/100평을 3년으로 나누어 계산함(48쪽 참조)

* 경영비는 봄감자의 경영비(700천원) 퇴비값과 종묘비를 더한 것으로 계산함.

○ 식재 : 2004년 4월, 2005년 4월 수확 : 2005년 11월, 2006년 11월

○ 이랑을 흑색PE(0.03mm × 150cm)로 피복재배함.

5) 적요

가) 천년초선인장 재배시 소식(3,310주/10a, 50cm×60cm) 하는 것이 경영에 유리하며,

유기물은 돈분퇴비(돈분 : 톱밥 = 60 : 40%)를 단보당 2,400kg정도 사용하는 것이 좋았다.

3. 천년초선인장 적정 피복비닐 선정 시험

가. 2년생

줄기의 길이는 무피복 보다 피복한 모든 처리가 양호하였으며, 그 중에서 녹색PE가 가장 길었고, 줄기폭은 투명PE가 다소 넓은 편이었다.

Table 19. 천년초선인장 줄기 생육특성

피복재료	줄기길이(cm)				줄기폭(cm)				줄기두께(mm)			
	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균
무피복	11.5	8.0	7.2	8.9	8.1	6.0	5.3	6.5	9.8	8.5	8.7	9.0
투명PE	13.7	9.6	8.7	10.7	8.3	7.9	5.5	7.2	9.8	8.2	7.5	8.5
흑색PE	12.5	10.5	8.9	10.6	7.6	6.8	5.3	6.6	9.7	8.6	7.3	8.5
흑백PE	12.6	9.0	7.5	9.7	7.7	6.1	5.1	6.3	9.9	9.2	8.8	9.3
녹색PE	12.8	12.4	9.2	11.5	7.5	6.7	6.0	6.7	9.3	8.1	7.9	8.4

줄기수는 무피복 보다 피복한 처리가 월등하게 많았는데, 투명PE, 흑색PE, 녹색PE, 흑백PE 순이었다.

Table 20. 천년초선인장 줄기수 및 줄기무게

피복재료	줄기수(개/주)				줄기무게(g/주)			
	1차	2차	3차	계	1차	2차	3차	계
무피복	7.8	35	0.2	11.0	337	82	4	423
투명PE	8.0	8.1	2.0	18.1	438	269	64	771
흑색PE	7.8	7.9	1.3	17.0	429	255	47	731
흑백PE	7.8	6.9	0.6	15.3	423	161	13	597
녹색PE	8.3	6.9	1.4	16.6	383	257	41	681

열매수와 열매무게 역시 피복한 처리들이 무피복 보다 월등하게 많거나 무거웠으며, 주당 열매무게는 흑색PE 와 투명PE가 양호한 편이었다.

Table 21. 천년초선인장 열매크기 및 열매무게

피복재료	과장(cm)	과경(cm)	열매수(개/주)	열매무게(g/주)
무피복	3.5	2.1	8.6b*	117b
투명PE	4.1	2.1	42.2a	632a
흑색PE	4.2	2.2	41.9a	696a
흑백PE	3.9	2.1	40.1a	584a
녹색PE	4.1	2.2	41.7a	540a

* DMRT 5% 유의수준

나. 1년생

1년생에서는 2년생과 같이 뚜렷하게 차이가 나지는 않았으나 줄기길이는 흑색 PE가 다소 길은 편이었으며, 줄기폭은 투명PE가 다소 넓은 편이었고, 줄기두께는 흑백PE나 흑색 PE가 다소 두꺼운 편이었다.

Table 22. 천년초선인장 줄기 생육특성

피복재료	줄기길이(cm)			줄기폭(cm)			줄기두께(mm)		
	1차	2차	평균	1차	2차	평균	1차	2차	평균
무피복	11.4	6.3	8.9	8.2	5.0	6.6	9.7	7.7	8.7
투명PE	11.4	7.4	9.4	7.8	5.6	8.2	9.5	7.8	8.7
흑색PE	12.9	7.1	10.0	8.4	5.2	6.8	9.9	8.2	9.1
흑백PE	11.0	7.2	9.1	7.3	5.5	6.4	10.1	8.2	9.2
녹색PE	11.3	6.3	8.8	7.8	5.0	6.4	9.5	7.6	8.6

줄기수는 2년생에서는 3차줄기까지 생성되었으나 1년생은 2차줄기까지만 생성되었으며, 줄기수와 줄기무게는 흑색PE와 흑백PE가 다소 많은 편이었다.

Table 23. 천년초선인장 줄기수 및 줄기무게

피복재료	줄기수(개/주)			줄기무게(g/주)		
	1차	2차	계	1차	2차	계
무피복	7.3	1.8	9.1	307	23	330
투명PE	7.5	2.9	10.4	312	62	374
흑색PE	8.6	3.9	12.5	410	78	488
흑백PE	9.6	2.7	12.3	381	53	434
녹색PE	7.4	2.4	9.8	305	37	342



Fig. 3. 피복비닐별 생육상황(2년생)

4. 천년초선인장 적정 피복재료 선정 시험

가. 2년생

2005년에는 피복재료를 추가로 3가지를 더 처리하였다. 줄기길이는 모든 피복재료 처리들이 무피복보다 길었는데, 녹색PE가 가장 길은 편이었으며, 줄기폭은 흑색PE가 넓은 편이었고, 줄기두께는 흑색PE가 두꺼운 편이었다.

Table 24. 천년초선인장 줄기크기

처리 내용	줄기길이(cm)					줄기폭(cm)					줄기두께(mm)				
	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균
무피복	11.3	9.6	7.3	-	9.3	8.2	6.7	5.7	-	6.9	10.4	8.7	6.9	8.7	8.7
투명PE	11.3	9.8	9.8	-	10.3	8.1	6.7	6.3	-	7.1	11.0	8.5	7.5	9.0	9.0
흑색PE	12.3	10.6	9.8	8.1	10.9	9.7	6.8	6.2	6.1	7.6	10.8	7.8	7.7	16.4	10.7
흑백PE	11.7	10.5	9.8	8.8	10.6	7.8	6.7	6.2	6.0	6.9	11.1	8.4	8.2	6.5	8.6
녹색PE	12.5	11.2	10.1	10.1	11.7	8.1	7.0	6.5	7.0	7.2	10.1	7.9	7.1	6.6	7.9
짚	11.6	9.6	8.0	7.3	9.7	7.4	6.7	5.8	5.2	6.6	9.2	7.8	6.8	4.0	7.0
부직포	10.6	10.0	9.6	8.3	10.0	7.5	6.7	6.3	5.7	6.8	10.2	8.2	8.7	5.2	8.1
칼라 보온덮개	11.4	10.1	9.1	7.2	10.2	7.8	6.7	6.3	5.3	6.9	10.8	8.4	7.7	6.4	8.4

줄기수는 흑백PE, 녹색PE, 흑색PE가 많은 편이었다.

Table 25. 천년초선인장 줄기수

처리 내용	줄기수(개/주)				
	1차	2차	3차	4차	계
무피복	12.9	8.0	1.6	-	22.5
투명PE	12.7	15.0	2.8	-	30.5
흑색PE	14.5	27.7	6.3	1.0	49.5
흑백PE	15.8	28.7	13.3	3.4	61.2
녹색PE	14.3	24.9	7.5	3.4	50.1
짚	12.4	14.8	3.0	0.1	30.3
부직포	15.5	18.2	3.8	0.4	37.9
칼라보온덮개	12.3	26.1	7.2	0.8	46.4

줄기무게는 녹색PE, 흑백PE, 흑색PE가 많은 편이었는데, 무피복 보다 뚜렷한 차이가 있었다.

Table 26. 천년초선인장 줄기무게

처리 내용	무게(g/주)				계
	1차	2차	3차	4차	
무피복	201	66	15	-	283
투명PE	329	219	39	-	588
흑색PE	373	327	77	26	802
흑백PE	278	365	131	39	812
녹색PE	403	374	101	45	923
짚	228	246	15	1	491
부직포	296	123	30	7	456
칼라보온덮개	311	173	59	6	546

열매수는 흑색PE, 흑백PE, 녹색PE, 부직포가 많은 편이었으며, 열매무게는 흑색PE, 흑백PE, 녹색PE가 무거운 편이었다.

Table 27. 천년초선인장 열매 특성 및 수량성

처리 내용	과장 (mm)	과경 (mm)	열매수 (개/주)	열매무게 (g/주)
무피복	32.9	18.4	9	53
투명PE	33.8	19.5	12	76
흑색PE	40.7	20.5	34	252
흑백PE	41.8	20.7	29	223
녹색PE	39.3	20.5	25	190
짚	37.3	19.8	14	98
부직포	38.6	19.7	25	140
칼라보온덮개	38.6	19.9	19	136

나. 1년생

줄기길이는 녹색PE와 투명PE가 길었으며, 줄기폭은 녹색PE와 흑색PE가 넓은 편이었고, 줄기두께는 녹색 PE, 흑백PE, 흑색PE 및 투명PE가 두꺼운 편이었다.

Table 28. 천년초선인장 줄기 생육특성

피복재료	줄기길이(cm)				줄기폭(cm)				줄기두께(mm)			
	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균
무피복	9.2b*	6.7	5.5	7.1	7.4	4.9	4.1	5.5	9.1	7.8	7.0	8.0
투명PE	11.5a	9.3	8.3	9.7	8.3	6.3	5.3	6.6	10.8	9.3	7.5	9.2
흑색PE	11.3ab	10.6	9.6	10.5	7.8	6.5	7.0	7.1	10.5	9.3	7.7	9.2
흑백PE	10.6ab	9.5	9.0	9.7	7.9	6.6	5.7	6.7	11.2	9.1	7.5	9.3
녹색PE	12.0a	10.5	10.3	10.9	8.5	7.0	6.3	7.3	11.4	9.7	8.5	9.9
짚	10.2ab	7.5	7.4	8.4	7.6	5.2	4.7	5.8	9.9	8.5	5.9	8.1
부직포	10.3ab	7.9	7.1	8.4	7.6	5.6	4.8	6.0	10.2	8.8	7.0	8.7
칼라보온 덮개	10.9ab	9.6	7.1	9.2	8.0	6.3	4.6	6.3	10.3	9.1	6.7	8.7

※ DMRT 5% 유의수준

줄기수는 흑백PE와 흑색PE가 가장 많은 편 이었으며, 칼라보온덮개, 녹색PE 및 투명PE도 다소 많은 편이었다. 줄기무게는 녹색PE가 가장 무거운 편이었으며, 흑색PE, 흑백PE, 투명PE 및 칼라보온덮개도 무거운 편이었다.

Table 29. 천년초선인장 줄기수 및 줄기무게

피복재료	줄기수(개/주)				줄기무게(g/주)			
	1차	2차	3차	계	1차	2차	3차	계
무피복	3.9bc*	2.1	0	6.0	178de	37b	2c	217
투명PE	4.5ab	6.9	1.4	12.8	310ab	226a	46ab	582
흑색PE	4.3ab	10.3	2.6	17.2	279abc	271a	69a	629
흑백PE	4.6ab	9.8	2.9	17.3	259a-d	283a	70a	612
녹색PE	5.1a	6.9	1.9	13.9	346a	298a	85a	729
짚	3.0c	4.2	1.6	8.8	144e	51b	2b	197
부직포	4.3ab	3.8	0.4	8.5	218cde	89b	11b	318
칼라보온 덮개	4.2ab	9.7	0.7	14.6	242bcd	253a	10b	505

※ DMRT 5% 유의수준

열매수는 1년생에서는 그리 많이 착생하지 않았으며, 흑백PE가 다소 많은 편이었다.

Table 30. 천년초선인장 열매크기 및 무게

피복재료	과장(cm)	과경(cm)	열매수(개/주)	열매무게(g/주)
무피복	3.2	1.8	0.80	6.8
투명PE	3.8	1.8	0.67	3.9
흑색PE	4.1	2.0	0.97	5.1
흑백PE	3.1	1.9	1.17	3.0
녹색PE	3.8	2.0	0.87	6.9
짚	3.3	1.8	0.93	5.0
부직포	3.7	2.1	0.50	4.7
칼라보온덮개	3.4	1.8	0.73	5.7



칼라보온덮개 무피복 흑백PE 흑색PE 녹색PE 부직포

Fig. 4. 천년초선인장 피복재료별 생육상황(1년생)

다. 경제성 분석

< 영 농 활 용 >

활용제목명	천년초선인장 적정 피복재료 및 피복효과					
활용분야	인삼·약초					
활용내용요약	천년초선인장 재배시 비닐로 이랑을 피복하여 재배하는 것이 무피복 재배보다 소득이 높으며, 피복재료 중에서는 흑색PE, 녹색PE, 흑백PE 등이 유리함					
연구과제명	천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염 치료제 개발				사업구분	
세부과제명	천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염 치료제 개발				농림기술개발과제	
구 분	분야	인삼·약초	작 목	천년초선인장	색인어	천년초선인장, 손바닥선인장, 피복재료
연구개발자	소속기관		성명	전화 및 e-mail주소		
	충청남도농업기술원 금산인삼약초시험장		한승호	041-753-8823 abshhan@hanmail.net		
공동개발자	충청남도농업기술원 작물연구과		강영식	041-330-6258, kangsk6710@nate.com		
	충청남도농업기술원 금산인삼약초시험장		김현호	041-753-8823 ginab@hanmail.net		
	충청남도농업기술원 금산인삼약초시험장		김관후	041-753-8823 bulkline@chungnam.net		
	충청남도농업기술원 금산인삼약초시험장		성봉재	041-753-8823 gin0601@hanmail.net		
	충청남도농업기술원 금산인삼약초시험장		김선익	041-753-8823 ginkim@hanmail.net		
	충청남도농업기술원 금산인삼약초시험장		이가순	041-753-8823 lkasn@chungnam.net		
	경북대학교		김길수	053-950-7792, kskim728@mail.knu.ac.kr		
	(주)천년초		김복현	011-422-7739, chunnc@hanmail.net		
	(주)바이오피아		인준교	031-281-5435, jgin@ibiopia.com		

1) 활용

가) 농가가 천년초선인장을 재배할 때 이랑을 피복하는 것이 경영에 유리하며, 피복재료는 흑색PE, 녹색PE, 흑백PE 등이 좋음.

2) 유사 영농활용 기술과의 차이점

없음

3) 현황 및 문제점

- 가) 천년초선인장은 최근 충남 아산지역을 위주로 재배면적이 급격히 증가하고 있으며, 2006년 전국에 53ha, 충남에 28ha 정도 재배되는 것으로 추정됨
- 나) 천년초선인장은 식품으로 사용가능하며, 식이섬유, 비타민C, 칼슘, 플라보노이드 등을 많이 함유하고, 면역활성물질도 함유하고 있으며, 항산화활성이 높은 것으로 알려짐.
- 다) 2004년 4월부터 2008년 4월까지 농림기술관리센터(ARPC)에서 우리원이 주관이 되어 경북대학교, 벤처기업 2곳과 같이 연구과제로 선정되어 연구를 수행중에 있음.
- 라) 재배면적은 증가하는 추세이나 재배기술이 확립되어 있지 않아 농민들이 애로를 겪고 있음.

4) 기대효과

○ 천년초선인장 피복재료별 경제성 비교

피복재료	소득분석					지수
	조수입 (천원/10a)	경영비(천원/10a)			소득 (천원/10a)	
		기본+ 종묘비	피복재료비 및 피복인건비	소계		
무피복	4,125	10,699	0	10,699	-6,574	100
투명PE	8,281	10,699	172	10,871	-2,590	216
흑색PE	12,275	10,699	178	10,877	1,398	333
흑백PE	12,215	10,699	239	10,938	1,277	329
녹색PE	12,208	10,699	225	10,924	1,284	329
짚	7,142	10,699	950	11,649	-4,507	160
부직포	6,958	10,699	616	11,315	-4,357	165
칼라보온덮개	8,121	10,699	750	11,449	-3,328	195

* 종묘비 : 4,545원/주, 100평용을 분양받고, 이것으로 2년 후 1,000평을 재배 할 수 있음. 따라서 10,000천원/100평을 3년으로 나누어 계산함.

* 종묘비 : 6,610주/10a(50cm×30cm) : 29,997천원 ÷ 3년 = 9,999천원(48쪽 참조)

* 경영비는 봄감자 경영비(700천원)에 종묘비를 더한 것으로 계산함.

○ 식재 : 2005년 4월, 2006년 4월, 수확 : 2006년 11월, 2007년 11월

○ 시비량 : 돈분퇴비(돈분 : 톱밥 = 60 : 40%) 2,000kg/10a,

* 수매가격 줄기 : 2,000원/kg, 열매 : 1,000원/kg

5) 적요

가) 천년초선인장 재배시 이량을 피복하여 재배하는 것이 무피복 재배보다 소득이 높으며, 피복재료 중에서는 흑색PE, 녹색PE, 흑백PE 등이 유리함.

5. 천년초선인장 정식시기 구명

가. 봄 정식 (2년생)

5월 상순 정식과 5월 하순 정식은 4차줄기까지 생성되었으나, 6월, 7월 정식은 3차줄기까지만 생성되었으며, 줄기길이는 5월 하순이 길은 편 이었고, 줄기 폭은 5월 상순과 5월 하순이 넓은 편이었다. 줄기 수는 5월 상순이 다소 많은 편이었다.

Table 31. 천년초선인장 봄 정식 시기별 줄기 생육특성

정식 시기	줄기길이(cm)					줄기폭(cm)					줄기두께(mm)				
	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균
5월 상순	11.0	10.5	8.4	6.4	10.0	7.5	6.5	6.0	4.1	7.0	9.9	7.9	7.3	8.3	8.3
5월 하순	13.6	9.7	8.5	7.7	11.0	7.9	6.5	5.7	4.7	7.0	9.1	8.1	7.3	7.4	8.2
6월 하순	11.2	9.6	8.2	-	9.6	7.7	6.3	5.5	-	6.5	10.0	7.6	6.8	-	8.1
7월 중순	11.1	9.9	8.1	-	9.7	7.2	6.6	5.2	-	6.3	9.2	7.9	7.5	-	8.2

Table 32. 천년초선인장 봄 정식 시기별 줄기수

처리 내용	줄기수(개/주)				
	1차	2차	3차	4차	계
5월 상순	9.8	13.1	3.0	0.2	26.1
5월 하순	8.8	10.9	0.6	0.4	21.7
6월 하순	8.4	11.8	2.2	-	22.4
7월 중순	8.3	13.2	2.1	-	23.6

Table 33. 천년초선인장 봄 정식 시기별 줄기무게

처리 내용	무게(g/주)				
	1차	2차	3차	4차	계
5월 상순	369	259	45	3	676
5월 하순	363	242	36	5	647
6월 하순	363	226	26	-	616
7월 중순	357	260	25	-	643

열매수는 5월 하순이 많은 편이었으며, 열매무게도 5월 하순이 많은 편이었다.

Table 34. 천년초선인장 봄 정식 시기별 열매수 및 열매무게

처리 내용	과장 (mm)	과경 (mm)	열매수 (개/주)	열매무게 (g/주)
5월 상순	40.2	19.9	24.4	202
5월 하순	40.1	19.6	41.9	329
6월 하순	39.1	19.7	34.3	268
7월 중순	40.5	19.5	25.6	263

나. 봄 정식 (1년생)

줄기길이는 5월 하순이 길은 편이었으며, 줄기두께는 5월 하순이 두꺼운 편이었다.

Table 35. 천년초선인장 봄 정식시기별 줄기 생육특성

정식시기	1차줄기			2차줄기		
	줄기길이 (cm)	줄기폭 (cm)	줄기두께 (mm)	줄기길이 (cm)	줄기폭 (cm)	줄기두께 (mm)
5월 상순	11.3	7.3	8.9	7.0	4.6	6.8
5월 하순	11.8	8.6	10.2	9.4	6.4	8.5
6월 하순	11.5	8.0	9.9	8.0	7.1	7.9
7월 중순	10.8	6.6	7.7	5.2	3.8	6.1

줄기수는 5월 하순이 많은 편이었으며, 줄기무게는 5월 하순이 무거운 편이었다.

Table 36. 천년초선인장 봄 정식시기별 줄기 수량

정식시기	줄기수(개/주)			줄기무게(g/주)		
	1차	2차	소계	1차	2차	소계
5월 상순	3.7	6.4	10.1	168	80	248
5월 하순	4.5	9.2	13.7	282	227	509
6월 하순	5.8	5.9	11.7	298	111	409
7월 중순	5.4	1.0	6.4	172	13	185



5월 상순

5월 하순

6월 하순

7월 하순

Fig. 5. 천년초선인장 정식시기에 따른 생육상황(봄 정식)

다. 가을 정식 (1년생)

2005년 가을에 정식을 하였는데 대부분 고사한 것으로 나타났으며, 10월 10일 이후의 고사율은 98 ~ 96%였으며, 9월 25일의 고사율은 86%였다. 따라서 봄 정식이 좋을 것으로 판단된다.

Table 37. 천년초선인장 가을 정식시기별 고사율

정식시기	고사율(%)
9월 25일	85.8
10월 10일	97.9
10월 25일	95.8
11월 11일	95.9



9월 25일

10월 10일

10월 25일

11월 11일

Fig. 6. 천년초선인장 정식시기에 따른 생육상황(가을 정식)

6. 손바닥 선인장 계통 수집 및 특성조사

가. 국내수집 손바닥선인장

천년초선인장, 백년초선인장, 대전선인장, 전라도선인장 등을 수집하였으며 줄기길이는 백년초선인장이 길은 편이었으며, 전라도선인장은 4차줄기까지 생성되었으나, 다른 선인장은 3차줄기까지만 생성되었고, 줄기두께는 백년초선인장과 전라도선인장이 두꺼운 편이었으며, 대전선인장이 가는 편이었다.

Table 38. 국내수집종 손바닥선인장의 생육특성

계통(유사종)	줄기길이(cm)				줄기폭(cm)				줄기두께(mm)			
	1차	2차	3차	4차	1차	2차	3차	4차	1차	2차	3차	4차
천년초선인장	12.4	9.8	10.6	-	8.7	6.6	6.3	-	12.1	9.8	8.0	-
백년초선인장	14.9	12.2	9.1	-	7.3	6.3	5.4	-	17.7	12.7	9.4	-
대전선인장	11.6	7.8	4.5	-	7.6	5.8	3.7	-	10.8	8.4	8.1	-
전라도선인장	12.8	11.4	9.6	9.3	8.0	7.2	6.2	6.1	17.9	12.5	9.5	8.3

※ 재식밀도 : 75 × 30cm

줄기수는 전라도선인장이 가장 많았으며, 대전선인장이 가장 적었고, 경장은 백년초선인장이 가장 컸으며, 천년초선인장이 가장 작았고, 주당 줄기수, 줄기무게는 전라도선인장이 많은 편이었으며, 대전선인장이 적었다

Table 39. 국내수집종 손바닥선인장의 수량성

계통(유사종)	줄기수(개/주)					경장 (cm)	줄기무게 (g/주)
	1차	2차	3차	4차	소계		
천년초선인장	4.8	10.4	7.3	-	22.5	12.6	849
백년초선인장	3.2	10.4	9.4	-	23.0	38.8	931
대전선인장	2.8	3.3	0.2	-	6.3	25.6	292
전라도선인장	2.7	9.6	15.6	10.0	38.9	25.6	1,028

천년초선인장과 백년초선인장을 노지에 식재하여 월동 상태를 조사한 결과 그림 7에서 보는 바와 같이 천년초선인장은 2005년 겨울을 지나 2006년 봄에 얼어 죽지 않고 살아남았으나, 백년초선인장은 얼어 죽었다. 백년초선인장은 중부지방(예산)에서 겨울을 나지 못하고 얼어 죽는데 반하여, 천년초선인장은 월동하는 것으로 나타났다.



천년초선인장 ————— 백년초선인장

인장

Fig. 7. 천년초선인장과 백년초선인장의 월동 상태(2005 ~ 2006)

나. 국외 수집 손바닥선인장

Opuntia 속 21종의 외국 수집종 손바닥선인장은 줄기 길이가 5.5 ~ 16.0cm, 줄기폭은 0.7 ~ 10.9cm, 줄기두께는 0.7 ~ 11.1mm, 가시수는 1 ~ 210개, 가시 길이는 3.0 ~ 20.0mm 까지

수집종별 변이가 다양하였다.

Table 40. 외국 수집종 생육특성

학 명	줄기길이 (cm)	줄기폭 (cm)	줄기두께 (mm)	가시수 (개/주)	가시길이 (mm)
<i>O. humifusa</i>	9.1	6.5	4.4	—	—
<i>O. invicta</i>	11	5.3	5.3	210	4.5
<i>O. wilcoxii</i>	13.3	11.2	3.8	—	—
<i>O. rufida</i>	11	10.4	5.1	—	—
<i>O. macrorugza</i>	7.8	4.8	8.1	9	4.5
<i>O. grahamil</i>	5.5	2.5	2.5	69	3.6
<i>O. violacea</i> 'long spini'	12	7.2	1.9	47	6.8
<i>O. aciculata</i>	15	10.8	7.0	1	5.2
<i>O. quinilo</i>	16	9.4	6.2	7.6	11
<i>O. sulfurea</i>	14.2	7.5	5.8	92	3
<i>O. basilaris</i>	13.8	10.9	5.3	—	—
<i>O. erinace</i> v. <i>ursina</i>	12	6	7.9	—	—
<i>O. molesta</i>	15	1.5	9.6	68	6
<i>O. refuxispina</i>	14	1	1	—	—
<i>O. marmae</i>	13.4	0.7	0.7	—	—
<i>O. rosarica</i>	12	1.3	1.3	—	—
<i>O. stuopctala</i>	8.3	6.3	3.4	73	—
<i>O. violacea</i> v. <i>macrocentra</i> ' Gd Bugh cline	9	7	11.1	5.2	20
<i>O. violacea</i> v. <i>sauta</i> Rita	15.5	10.4	7.0	—	—
<i>O. basilaris</i> v. <i>bractglada</i>	5.5	3.5	6.9	—	—
<i>O. basilaris</i> XO. <i>violacea</i> v. <i>sauta</i> Rita	14	8.2	4.7	—	—



Opuntia SP.



Opuntia basilaris v. bractglada



Opuntia violacea 'Gd Bush clnie'



Opuntia basilaris



Opuntia violacea v. Sauta Rita



Opuntia aciculata



Opuntia refuxispina



Opuntia grahamii



Opuntia basilaris XO. violacea v. Sauta Rita



Opuntia marmae



Opuntia fumifusa



Opuntia ficus - Mill. var. saboten Makino

Fig. 8. 외국 수집종 손바닥선인장의 생육모습

7. 천년초선인장의 종자 발아특성 구명

천년초선인장의 열매를 수확하여 과육을 제거한 후 사례에서 발아시험을 한 결과 9°C, 18°C, 27°C, 36°C의 온도처리 암 상태나 명 상태에서 9월 28일에 치상하여 12월20일까지 조사하였으나 모두 발아를 하지 않았다.

Table 41. 천년초선인장종자의 명 상태의 발아율

온도	발아율(%)
9°C	0
18°C	0
27°C	0
36°C	0

* 치상 9월 28일, 발아조사기한 12월 20일

Table 42. 천년초선인장종자의 암 상태의 발아율

온도	발아율(%)
9°C	0
18°C	0
27°C	0
36°C	0

* 치상 9월 28일, 발아조사기한 12월 20일

2005년 4월 6일에 아산군 신창면의 천년조선인장 노지포장에서 수집한 종자를 모래땅에 파종한 결과 5월 20일에 발아가 되었다. 따라서, 종자 발아를 위해서는 가을에 채종한 종자를 증적처리하여 월동한 후에 파종하여야 할 것으로 판단된다.



Fig. 9. 천년조선인장 종자 발아상태(2005. 4. 6 파종)

8. 천년조선인장 수확기에 따른 수분함량 변화

천년조선인장은 늦가을부터 줄기가 쭈글쭈글 해지며, 수분함량이 줄어들었다가 월동기에는 갈색으로 변한다. 그런 후에 월동하는데, 아마도 월동을 하기 위해서 스스로 수분 함량을 줄이는 것 같다. 따라서, 가을 수확시기에 시기별 수분함량을 조사하였다. 천년조선인장의 건조비율이 10월4일에 18.24%이었던 것이 10월 10일에는 21.85%로 늘어났는데, 이는 10월 10일의 수분함량이 10월 4일 보다 20%정도 적어졌다는 것을 말해준다고 할 수 있다.

Table 43. 천년조선인장의 수확시기에 따른 수분함량 변화

수확일시	품종명	수분 함량(%)				비율(%)
		A반복	B반복	C반복	평균	
10월 4일	천년초	16.97	18.02	19.74	18.24	100.0
10월 10일	천년초	21.65	23.76	20.15	21.85	119.8
	천년초	21.20	20.86	22.00	21.35	117.1
12월 1일	백년초	10.00	9.93	10.82	10.25	-
	전라도 선인장	14.42	14.09	14.58	14.36	-
	대전 선인장	15.08	14.88	-	14.98	-

9. 석회시용량에 따른 생육, 수량 및 품질 변이 효과 구명

줄기길이는 300kg/10a가 다소 길은 편이었다.

Table 44. 천년초선인장 줄기 크기(2년생)

처리 내용	줄기길이(cm)					줄기폭(cm)					줄기두께(mm)				
	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균
무시용	12.9	12.3	10.6	9.1	11.9	7.8	7.2	6.2	6.6	7.0	10.2	7.7	6.3	5.5	8.0
150kg/10a	13.2	11.3	10.3	-	11.6	7.9	6.8	6.0	-	6.9	9.0	7.5	6.6	-	7.7
300kg/10a	14.6	11.3	10.8	8.9	12.2	7.9	6.7	6.3	5.2	6.9	8.5	7.5	6.1	5.4	7.3
450kg/10a	13.3	10.9	10.7	6.2	11.6	7.9	6.7	6.3	4.0	6.9	8.9	7.9	6.9	6.7	7.9

줄기수나 줄기무게는 처리 간에 차이가 없었다.

Table 45. 천년초선인장 줄기수

처리 내용	줄기수(개/주)				
	1차	2차	3차	4차	소계
무시용	9.7	11.5	2.7	0.1	24.0
150kg/10a	10.2	9.0	1.5	-	20.7
300kg/10a	10.9	8.5	2.3	0.1	21.8
450kg/10a	9.5	9.0	2.0	0.1	20.6

Table 46. 천년초선인장 줄기무게

처리 내용	줄기무게(g/주)				
	1차	2차	3차	4차	계
무시용	491	383	68	1	943
150kg/10a	517	237	41	9	792
300kg/10a	591	252	56	2	900
450kg/10a	519	264	55	2	840

10. 천년초선인장 질소추비 시용효과 구명

2년생의 줄기길이는 질소 222g/20L 처리구가 다소 길은 편이었으며, 줄기수는 시용량이 증가할수록 많아지는 경향이었고, 줄기무게는 시용량이 많을수록 무거워 지는 경향이였다. 질소를 추비로 사용한 처리가 과장이 길어지는 경향이였으며, 열매무게는 질소 222g/20L 처리구가 다소 무거운 편이었다.

가. 2년생

Table 47. 천년초선인장 줄기 크기

처리 내용	줄기길이(cm)					줄기폭(cm)					줄기두께(mm)				
	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균
무처리	13.2	11.6	10.6	7.4	11.8	7.7	7.1	6.2	4.9	6.5	9.7	7.9	6.8	6.4	8.1
74g/20L	13.7	11.0	8.9	6.3	11.2	8.1	6.8	5.6	4.2	6.2	9.0	7.5	6.4	5.2	7.6
148g/20L	12.9	11.9	9.5	6.9	11.4	7.7	6.8	5.8	5.6	6.5	9.5	7.1	6.5	5.3	7.7
222g/20L	13.5	12.9	10.7	7.9	12.3	8.0	7.2	6.2	4.6	6.5	9.9	7.0	6.8	6.3	7.9

Tabel 48. 천년초선인장 줄기수

처리 내용	줄기수(개/주)				
	1차	2차	3차	4차	평균
무처리	27.1	23.4	2.8b*	0.3	53.6
74g/20 L	36.4	29.6	5.0b	0.8	71.8
148g/20 L	28.0	34.3	5.6ab	0.3	68.2
222g/20 L	26.8	48.4	13.7a	1.7	90.6

※ DMRT 5% 유의수준

Table 49. 천년초선인장 줄기무게

처리 내용	줄기무게(g/주)				
	1차	2차	3차	4차	계
무처리	469	235	90	4	798
74g/20 L	548	265	36	3	852
148g/20 L	537	273	42	-	853
222g/20 L	559	491	101	11	1,162

Table 50. 천년초선인장 열매수 및 열매무게

처리 내용	과장 (mm)	과경 (mm)	열매수 (개/주)	열매무게 (g/주)
무처리	42.7	21.1	45.4	485
74g/20 L	45.7	20.7	48.3	449
148g/20 L	45.0	20.5	45.8	423
222g/20 L	46.2	21.1	50.3	529

나. 1년생

1년생에서는 줄기폭과 줄기두께가 시용량이 증가할수록 넓어지거나, 두꺼워지는 경향이었다.

Table 51. 천년초선인장 줄기 생육특성

처리	줄기길이(cm)				줄기폭(cm)				줄기두께(mm)			
	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균
무처리	9.1	7.4	5.4	7.3	7.5	5.6	3.8	5.6	9.4	7.7	5.8	7.6
74g/20L	10.0	7.9	5.9	7.9	7.8	5.9	4.0	5.9	9.6	7.7	6.5	7.9
148g/20L	9.8	7.5	6.0	7.8	7.7	5.7	4.4	5.9	9.4	7.8	6.5	7.8
222g/20L	9.9	7.6	6.1	7.9	7.8	6.0	4.3	6.0	9.7	8.4	6.6	8.2

11. 천년초선인장 성장촉진제 효과 구명

2년생의 줄기길이는 배추애(50g)처리와 요소(60g)처리가 길은 편이었으며, 줄기폭과 줄기두께는 두배나(33g) 처리가 양호하였다.

가. 2년생

Table 52. 천년초선인장 줄기크기

처리 내용	줄기길이(cm)				줄기폭(cm)				줄기두께(mm)			
	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균
무처리	14.3	11.5	9.4	11.7	8.1	6.9	5.8	6.9	8.5	7.9	7.0	7.8
두배나(33g)	13.7	12.1	9.9	11.9	8.4	7.2	5.9	7.2	9.0	8.8	7.1	8.3
배추애(50g)	13.9	12.5	9.9	12.1	7.6	6.9	5.9	6.8	9.2	7.5	7.1	7.9
요소(60g)	14.3	11.4	10.8	12.2	8.0	6.8	6.1	6.9	8.4	7.6	6.7	7.6

줄기수는 배추애(50g)처리가 많은 편이었으며, 줄기무게는 배추애(50g)처리가 무거운 편이었다.

Table 53. 천년초선인장 줄기수

처리 내용	줄기수(개/주)			
	1차	2차	3차	평균
무처리	9.9	10.2	2.5	22.6
두배나(33g)	8.3	10.8	3.5	22.6
배추애(50g)	11.1	11.8	4.4	27.3
요소(60g)	9.3	11.2	2.0	22.5

Table 54. 천년초선인장 줄기무게

처리 내용	줄기무게(g/주)			
	1차	2차	3차	계
무처리	508	304	56	289
두배나(33g)	475	350	72	299
배추애(50g)	545	365	102	337
요소(60g)	583	327	46	319

열매의 길이는 요소(60g) 처리가 길은 편이었으며, 열매무게는 요소(60g) 처리가 무거운 편이었다.

Table 55. 천년초선인장 열매수 및 열매무게

처리 내용	과장 (mm)	과경 (mm)	열매수 (개/주)	열매무게 (g/주)
무처리	43.3	20.1	67.4	518
두배나(33g)	42.7	20.6	64.6	524
배추애(50g)	42.6	21.1	65.2	517
요소(60g)	46.1	20.8	69.4	610

나. 1년생

1년생의 줄기길이는 두배나(33g) 처리가 길은 편이었으며, 줄기두께는 두배나(33g) 처리가 두꺼운 편이었다.

Table 56. 천년초선인장 성장조정제에 의한 줄기 생육특성

처리	줄기길이(cm)				줄기폭(cm)				줄기두께(mm)			
	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균
무처리	9.1	7.8	6.8	7.9	7.3	6.0	4.8	6.0	9.4	7.6	6.8	7.9
두배나(33g)	9.1	8.0	7.5	8.2	7.3	6.0	5.0	6.1	9.4	7.9	7.0	8.1
배추애(50g)	9.1	7.9	5.8	7.6	7.4	6.0	4.0	5.8	9.9	7.7	6.1	7.9
요소(60g)	8.5	7.7	6.7	7.6	7.1	5.7	4.6	5.8	8.9	7.5	6.4	7.6

12. 천년초선인장 적정 식재 부위 구명

2년생의 줄기는 1차줄기를 식재 하였을 때는 4차줄기까지 착생이 되었으나, 2차줄기나 3차줄기를 식재한 경우에는 4차줄기는 생성되지 않고, 3차줄기까지만 착생이 되었다. 이는 1차줄기를 심는 경우가 생육이 더 왕성한 것으로 판단된다. 줄기길이 중에서 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 순으로 길었으며, 줄기길이 중에서 3차줄기는 1차줄기 > 2차줄기 > 3차줄기 순으로 길었다. 줄기폭 중에서 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 순으로 넓은 편이었으며, 줄기폭 중에서 3차줄기는 2차줄기 > 1차줄기 > 3차줄기 순으로 넓은 편이었다. 줄기두께 중에서 2차줄기는 2차줄기가 가장 두꺼웠으며, 줄기두께 중에서 3차줄기는 2차줄기 > 1차줄기 > 3차줄기 순으로 두꺼웠다.

가. 2년생

Table 57. 천년초선인장 줄기크기

처리 내용	줄기길이(cm)					줄기폭(cm)					줄기두께(mm)				
	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균
1차줄기	13.6	11.9	11.6	6.1	12.4	8.1	6.9	6.4	3.9	7.1	9.1	6.9	5.2	4.8	7.0
2차줄기	15.7	12.9	11.0	-	13.2	7.8	7.0	6.7	-	7.2	7.9	9.1	6.9	-	7.9
3차줄기	15.3	13.1	9.9	-	12.8	7.8	7.2	6.0	-	7.0	8.0	7.0	4.4	-	6.5

2년생은 1차줄기를 식재 하였을 때에는 4차줄기가 출현하였으나, 2차줄기나 3차줄기를 식재 한 경우에는 4차줄기가 생성되지 않았다. 줄기수 중에서 1차줄기는 1차줄기 > 3차줄기 > 2차줄기 식재 순으로 많았으며, 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 많았고, 3차줄기는 2차줄기 > 3차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 많았다. 줄기무게는 1차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 무거웠으며, 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 무거웠고, 3차줄기는 2차줄기 > 3차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 무거웠다. 총 줄기수는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 많았다.

Table 58. 천년초선인장 줄기수

처리 내용	줄기수(개/주)				
	1차	2차	3차	4차	계
1차줄기	9.6	9.1	1.9	0.1	20.1
2차줄기	8.4	9.8	3.9	-	22.1
3차줄기	8.9	13.2	2.8	-	24.9

Table 59. 천년초선인장 줄기무게

처리 내용	줄기무게(g/주)				
	1차	2차	3차	4차	계
1차줄기	237	240	43	-	819
2차줄기	502	307	82	-	891
3차줄기	522	406	61	1	989

2년생의 과장은 2차줄기가 길은 편이었으며, 과정은 2차줄기가 짧은 편이었고, 열매수는 1차줄기와 3차줄기가 다소 많은 편이었으며, 열매무게는 1차줄기 > 3차줄기 > 2차줄기 식재 순으로 무거웠다.

Table 60. 천년초선인장 열매크기 및 수량성

처리 내용	과장	과정	열매수	열매무게
	(mm)	(mm)	(개/주)	(g/주)
1차줄기	44.5	20.6	79.3	644
2차줄기	46.6	21.3	65.5	532
3차줄기	44.7	20.6	76.4	619

나. 1년생

1년생의 줄기생육은 1차줄기를 식재한 경우에는 2차줄기까지만 생성되었으며, 2차줄기와 3차줄기를 식재한 경우에는 3차줄기까지 착생이 되었다. 줄기길이는 1차줄기의 경우에는 1차줄기가 길은 편이었으며, 2차줄기의 경우에는 3차줄기가 길은 편이었고, 3차줄기는 2차줄기가 길은 편이었다. 줄기폭은 1차줄기의 경우에 1차줄기를 식재한 경우가 다소 넓은 편이었으며, 줄기두께의 경우 1차줄기는 2차줄기를 식재한 처리가 두꺼운 편이었고, 2차줄기의 경우에는 3차줄기를 식재한 처리가 두꺼웠다.

Table 61. 천년초선인장 줄기생육 특성

처리	줄기길이(cm)				줄기폭(cm)				줄기두께(mm)			
	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균	1차	2차	3차	평균
1차줄기	10.3	7.8	-	9.1	7.6	6.1	-	6.9	9.3	7.7	-	8.5
2차줄기	9.6	7.9	6.5	8.0	7.5	5.9	4.4	5.9	9.4	7.8	6.1	7.8
3차줄기	9.6	8.1	6.1	7.9	7.3	6.1	4.2	5.9	9.1	8.0	6.3	7.8

13. 천년초선인장 차광효과 구명

줄기수는 차광율이 높을수록 적어지는 경향이었으며, 줄기길이는 차광율이 높아질수록 길어지는 경향이었고, 줄기폭은 차광율이 높을수록 좁아지는 경향이었으며, 줄기두께는 차광율이 높아질수록 가늘어지는 경향이었고, 줄기무게는 차광율이 높을수록 가벼워지는 경향이었다.

Table 62. 천년초선인장 차광처리에 따른 줄기 생육특성

처리	줄기수	줄기길이	줄기폭	줄기두께	줄기무게
	(개/주)	(cm)	(cm)	(mm)	(g/주)
무차광	3.0	11.6	7.5 a*	7.4 a	120 a
50% 차광	2.9	11.5	6.7 ab	5.2 ab	73 ab
85% 차광	2.3	14.1	6.9 ab	3.5 b	68 ab
95% 차광	2.1	13.8	5.0 b	3.3 b	34 b

※ DMRT 5% 유의수준

14. 천년초선인장 줄기 수량증대를 위한 꽃 및 열매 제거효과 구명

봄에 식재하면 영양생장을 주로 하고 생식생장은 미약하다. 2년차인 이듬해에 생식생장을 주로 하게 되는데, 이때 줄기 수량증대를 위하여 꽃 및 열매를 제거 처리한 결과, 줄기길이는 개화전꽃제거 처리가 4차줄기의 길이가 길었으며, 줄기폭은 3차줄기는 개화전열매제거처리가 넓었고, 4차줄기는 개화전꽃제거 처리가 넓은 편이었으며, 줄기두께는 개화전열매제거 처리가 2차줄기, 3차줄기에서 두꺼운 편이었다.

Table 63. 천년초선인장 줄기크기

처리 내용	줄기길이(cm)					줄기폭(cm)					줄기두께(mm)				
	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균	1차	2차	3차	4차	평균
무처리	15.2	11.6	10.8	-	12.5	8.2	7.0	6.4	-	7.2	8.7	7.8	6.7	-	7.7
개화전 열매제거	14.7	11.5	11.0	7.3	12.4	7.9	7.0	7.9	5.3	7.6	8.7	8.8	8.8	7.1	8.7
개화전 꽃제거	14.8	12.0	11.3	9.9	12.7	7.9	7.1	7.0	5.9	7.3	8.4	8.6	7.8	7.6	8.2
개화후 꽃제거	14.2	11.5	10.6	8.7	12.1	7.7	6.9	6.5	5.4	7.0	9.2	8.2	7.0	6.0	8.1
개화중때 꽃제거	13.7	12.6	10.4	6.9	12.2	7.8	7.1	6.3	4.5	7.1	9.5	7.4	7.4	5.3	8.1
개화후 열매제거	14.9	11.5	11.6	7.2	12.6	7.9	6.9	6.5	4.6	7.1	8.6	7.6	7.5	6.1	7.9

줄기갯수는 개화전 열매와 꽃을 제외한 처리가 많았으며, 줄기무게는 개화전 열매 및 꽃제거와 개화후 열매제거구가 많았고, 열매무게는 개화중때 꽃제거와 무처리는 비슷하였으며, 개화후꽃제거는 무처리의 54.5% 수준이었고, 개화전에 열매 및 꽃제거구는 열매가 전혀 열리지 않았다.

Table 64. 천년초선인장 줄기수

처리 내용	줄기수(개/주)				
	1차	2차	3차	4차	계
무처리	9.2	12.9	3.1	-	25.2
개화전 열매제거	9.1	15.0	10.0	0.9	35.0
개화전 꽃제거	9.5	13.3	10.1	2.1	35.0
개화후 꽃제거	10.0	12.5	3.8	0.1	26.4
개화중때 꽃제거	9.5	8.7	10.7	0.2	29.1
개화후 열매제거	7.7	8.1	9.8	0.1	25.7

2차줄기무게는 개화전열매제거와 개화전꽃제거 및 개화후열매제거가 무거운 편이었으며, 3차줄기무게는 개화전열매제거와 개화전꽃제거가 많은 편이었고, 무처리와 개화후꽃제거가 가벼운 편이었으며, 4차줄기무게는 개화전열매제거와 개화전꽃제거가 무거운 편이었다.

Table 65. 천년초선인장 줄기무게

처리 내용	무게(g/주)				
	1차	2차	3차	4차	계
무처리	550	356	75	-	981
개화전 열매제거	549	459	259	39	1,306
개화전 꽃제거	564	446	296	42	1,348
개화후 꽃제거	558	251	96	1	906
개화중때 꽃제거	507	373	168	3	1,051
개화후 열매제거	608	538	128	6	1,278

가. 경제성 분석

< 영 농 활 용 >

활용제목명	천년초선인장 꽃 및 열매 제거에 따른 줄기 수량증대 효과					
활용분야	인삼·약초					
활용내용요약	천년초선인장 재배시 줄기수량을 높이기 위해서는 개화 전에 열매를 제거하거나, 개화 전에 꽃을 제거하면 줄기수량을 각각 33%, 37% 높일 수 있음.					
연구과제명	천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염 치료제 개발				사업구분	
세부과제명	천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염 치료제 개발				농림기술개발과제	
구 분	분야	인삼·약초	작 목	천년초선인장	색인어	천년초선인장, 꽃제거, 열매제거
연구개발자	소속기관		성명	전화 및 e-mail주소		
	충청남도농업기술원 금산인삼약초시험장		한승호	041-753-8823 abshhan@hanmail.net		
공동개발자	충청남도농업기술원 금산인삼약초시험장		김현호	041-753-8823 ginab@hanmail.net		
	충청남도농업기술원 작물연구과		강영식	041-330-6258, kangsk6710@nate.com		
	충청남도농업기술원 금산인삼약초시험장		김관후	041-753-8823 bulkline@chungnam.net		
	충청남도농업기술원 금산인삼약초시험장		성봉재	041-753-8823 gin0601@hanmail.net		
	충청남도농업기술원 금산인삼약초시험장		김선익	041-753-8823 ginkim@hanmail.net		
	충청남도농업기술원 금산인삼약초시험장		이가순	041-753-8823 lkasn@chungnam.net		
	경북대학교		김길수	053-950-7792, kskim728@mail.knu.ac.kr		
	(주)천년초		김복현	011-422-7739, chunnc@hanmail.net		
	(주)바이오피아		인준교	031-281-5435, jgin@ibiopia.com		

1) 활용

가) 농가가 천년초선인장천년초선인장 재배시 줄기수량을 높이기 위해서는 개화전에 열매를 제거하거나, 개화 전에 꽃을 제거하면 줄기수량을 각각 33%, 37%를 높일 수 있음.

2) 유사 영농활용 기술과의 차이점

없음

3) 현황 및 문제점

- 가) 천년초선인장은 최근 충남 아산지역을 위주로 재배면적이 급격히 증가하고 있으며, 2006년 전국에 53ha, 충남에 28ha 정도 재배되는 것으로 추정됨
- 나) 천년초선인장은 식품으로 사용가능하며, 식이섬유, 비타민C, 칼슘, 플라보노이드 등을 많이 함유하고, 면역활성물질도 함유하고 있으며, 항산화활성이 높은 것으로 알려짐.
- 다) 2004년 4월부터 2008년 4월까지 농림기술관리센터(ARPC)에서 우리원이 주관이 되어 경북대학교, 벤처기업 2곳과 같이 연구과제로 선정되어 연구를 수행 중에 있음.
- 라) 재배면적은 증가하는 추세이나 재배기술이 확립되어 있지 않아 농민들이 애로를 겪고 있음.

4) 기대효과

나) 천년초선인장 꽃 및 열매제거에 따른 경제성 비교

피복재료	소득분석					지수
	조수입 (천원/10a)	경영비(천원/10a)			소득 (천원/10a)	
		기본+ 종묘비	피복재료비 및 피복인건비	소계		
무처리	16,405	10,699	239	10,938	5,467	100
개화전 열매제거	17,474	10,699	239	10,938	6,536	120
개화전 꽃제거	17,820	10,699	239	10,938	6,882	126
개화후 꽃제거	15,289	10,699	239	10,938	4,351	80
개화종매 꽃제거	17,340	10,699	239	10,938	6,402	117

- * 종묘비 : 4,545원/주, 100평용을 분양받고, 이것으로 2년 후 1,000평을 재배 할 수 있음. 따라서 10,000천원/100평을 3년으로 나누어 계산함(48쪽 참조).
- * 종묘비 : 6,610주/10a(50cm×30cm) : 29,997천원 ÷ 3년 = 9,999천원
- * 경영비는 봄감자 경영비(700천원)에 종묘비를 더한 것으로 계산함.
 - 식재 : 2006년 4월, 수확 : 2007년 11월
 - 시비량 : 돈분퇴비(돈분 : 톱밥 = 60 : 40%) 2,000kg/10a,
- * 수매가격 줄기 : 2,000원/kg, 열매 : 1,000원/kg

5) 적요

가) 천년초선인장 재배시 줄기수량을 높이기 위해서는 개화 전에 열매를 제거하거나, 개화 전에 꽃을 제거하면 무처리 보다 줄기수량을 33% ~ 37% 높일 수 있으며, 조수입은 무처리 보다 20% ~ 26% 높음.

제 4 절 결과요약

1. 천년초선인장 적정 재식밀도 구명

줄기 길이는 3차줄기와 4차줄기에서 밀식할수록 길어지는 경향이였으며, 줄기두께는 2차 줄기에서 3,300주/10a가 9,920주/10a보다 두꺼웠고, 줄기수는 2차줄기, 3차줄기, 4차줄기가 밀식할수록 많아졌으며, 총 줄기수는 밀식할수록 많아졌으며, 한 주당 줄기무게는 소식할수록 많았다.

주당 열매수는 3,300주/10a가 가장 많았으며, 소식할수록 많아지는 경향이었고, 주당 열매 무게는 3,300주/10a가 가장 무거웠으며, 소식할수록 무거워지는 경향이였다.

2. 천년초선인장 적정 유기물 종류 및 시용량 구명

돈분퇴비의 줄기는 4,800kg/10a가 다소 긴 편이였으며, 줄기수와 줄기무게는 2,400kg/10a와, 4,800kg/10a 가 다소 많거나 무거운 편이였고, 주당 열매 수와 열매무게는 1,200kg/10a와, 2,400kg/10a 가 다소 많거나 무거운 편이였다.

우분퇴비의 줄기길이, 줄기폭, 줄기무게는 2,400kg/10a와, 4,800kg/10a 처리가 다소 양호한 편이였으며, 줄기수와 줄기무게는 시용량이 증가 할수록 많거나 무거워지는 경향이었고, 열매수와 열매무게는 시용량이 증가 할수록 다소 많거나 무거워지는 경향이였다.

계분퇴비의 줄기길이는 시용량이 많을수록 길이가 길어지는 경향이였으며, 줄기수는 시용량이 많을수록 많아지는 경향이였고, 열매수와 열매무게는 4,800kg/10a가 다소 많거나 무거운 편이였다.

3. 천년초선인장 적정 피복비닐 선정 시험

줄기의 길이는 무피복 보다 피복한 모든 처리가 대부분 양호하였으며, 그 중에서 녹색 PE가 가장 길었고, 줄기폭은 투명PE가 다소 넓은 편이였으며, 줄기수는 무피복 보다 피복한 처리가 월등하게 많았는데, 투명PE, 흑색PE, 녹색PE, 흑백PE 순이였다.

열매수와 열매무게 역시 피복한 처리들이 무피복 보다 월등하게 많거나 무거웠으며, 주당 열매무게는 흑색PE 와 투명PE가 양호한 편이였고, 줄기수는 2년생에서는 3차 줄기까지 생성되었으나 1년생은 2차줄기까지만 생성되였다.

4. 천년초선인장 적정 피복재료 선정 시험

2005년에는 피복재료를 추가로 3가지를 더 처리하였다. 줄기길이는 모든 피복재료 처리들이 무피복 보다 길었는데, 녹색PE가 가장 길은 편이었으며, 줄기폭은 흑색PE가 넓은 편이었고, 줄기두께는 흑색PE가 두꺼운 편이었다.

줄기수는 흑백PE, 녹색PE, 흑색PE가 많은 편이었으며, 줄기무게는 녹색PE, 흑백PE, 흑색PE가 많은 편이었는데, 무피복 보다 뚜렷한 차이가 있었고, 열매수는 흑색PE, 흑백PE, 녹색PE, 부직포가 많은 편이었으며, 열매무게는 흑색PE, 흑백PE, 녹색PE가 무거운 편이었다.

5. 천년초선인장 정식시기 구명

가. 봄 정식

5월 상순 정식과 5월 하순 정식은 4차줄기까지 생성되었으나, 6월, 7월 정식은 3차줄기까지만 생성되었으며, 줄기길이는 5월 하순이 길은 편 이었고, 줄기 폭은 5월상순과 5월 하순이 넓은 편이었으며, 줄기 수와 줄기무게는 5월 상순이 다소 많은 편이었고, 열매 수는 5월 하순이 많은 편 이었으며, 열매 무게도 5월 하순이 많은 편 이었다.

나. 가을 정식

2005년 가을에 정식을 하였는데 대부분 고사한 것으로 나타났으며, 10월 10일 이후의 고사율은 98 ~ 96.%였으며, 9월 25일의 고사율은 86%였다. 따라서 봄 정식이 좋을 것으로 판단된다.

6. 손바닥선인장 계통 수집 및 특성조사

가. 국내수집 손바닥선인장

천년초선인장, 백년초선인장, 대전선인장, 전라도선인장 등을 수집하였는데, 줄기길이는 백년초선인장이 길은 편이었으며, 전라도선인장은 4차줄기까지 생성되었으나 다른 선인장은 3차 줄기까지만 생성되었고, 줄기두께는 백년초선인장과 전라도선인장이 두꺼운 편이었으며, 대전선인장이 가는 편이었다.

줄기수는 전라도선인장이 가장 많았으며, 대전선인장이 가장 적었고, 경장은 백년초선인장이 가장 컸으며, 천년초선인장이 가장 작았고, 주당 줄기수와 줄기무게는 전라도선인장이 많은 편이었으며, 대전선인장이 적었다

천년초선인장과 백년초선인장을 노지에 식재하여 월동 상태를 조사한 결과, 천년초선인장은 2005년 겨울을 지나 2006년 봄에 얼어 죽지 않고 살아남았으나, 백년초선인장은 얼어 죽었다. 백년초선인장은 중부지방(예산)에서 겨울을 나지 못하고 얼어 죽는데 반하여 천년초선인장은 월동하는 것으로 나타났다.

나. 국외 수집 손바닥선인장

Opuntia 속 중 *Opuntia humifusa* 등 21종의 외국 수집종 손바닥선인장의 생육특성을 조사한 결과, 줄기 길이가 5.5 ~ 16.0cm, 줄기폭은 0.7 ~ 10.9cm, 줄기두께는 0.7 ~ 11.1mm, 가시수는 1 ~ 210개, 가시 길이는 3.0 ~ 20.0mm 까지 다양한 변이를 나타내었다.

7. 천년초선인장의 종자 발아특성 구명

천년초선인장의 열매를 수확하여 과육을 제거한 후 샐레에서 발아시험을 한 결과 9°C, 18°C, 27°C, 36°C의 온도처리 암 상태나 명 상태에서 9월 28일에 치상을 한 후에 12월 20일까지 조사 하였으나 모두 발아를 하지 않았다. 그러나 2005년 4월 6일에 아산군 신창면의 천년초선인장 포장에서 수집한 종자를 모래땅에 파종한 결과 5월 20일에 발아가 되었다. 따라서 종자 발아를 위해서는 가을에 채종한 종자를 층적처리하여 월동한 후에 파종하여야 할 것으로 판단된다.

8. 천년초선인장 수확기에 따른 수분함량 변화

천년초선인장은 늦가을부터 줄기가 쭈글쭈글 해지면서, 수분함량이 줄어들었다가 월동기에는 갈색으로 변한다. 그런 후에 월동하는데, 아마도 월동을 하기 위해서 스스로 수분 함량을 줄이는 것으로 판단된다.

가을 수확시기에 시기별 수분함량을 조사하였다. 천년초선인장의 건조비율이 10월 4일에 18.2%이었던 것이 10월 10일에는 21.9%로 늘어났는데, 이는 10월 10일의 수분함량이 10월 4일 보다 20%정도 적어졌다는 것을 말해준다고 할 수 있다.

9. 석회시용량에 따른 생육, 수량 및 품질 변이 효과 구명

줄기길이는 300kg/10a가 다소 길은 편이었으며, 줄기수나 줄기무게는 처리 간에 차이가 없었다.

10. 천년초선인장 질소추비 시용효과 구명

줄기길이는 질소 222g/20L 처리구가 다소 길은 편이었으며, 줄기수는 시용량이 증가할수록 많아지는 경향이었고, 줄기무게는 시용량이 많을수록 무거워 지는 경향이었으며, 질소를 추비로 사용한 처리가 과장이 길어지는 경향이었고, 열매무게는 질소 222g/20L 처리구가 다소 무거운 편이었다.

11. 천년초선인장 성장촉진제 효과 구명

줄기길이는 배추애(50g)처리와 요소(60g)처리가 길은 편이었으며, 줄기폭과 줄기무게는 두 배나(33g) 처리가 양호하였고, 줄기수는 배추애(50g)처리가 많은 편이었으며, 줄기무게는 배추애(50g)처리가 무거운 편이었고, 열매의 길이는 요소(60g) 처리가 길은 편이었으며, 열매무게는 요소(60g) 처리가 무거운 편이었다.

12. 천년초선인장 적정 식재 부위 구명

2년생의 줄기는 1차줄기를 식재 하였을 때는 4차줄기까지 착생이 되었으나, 2차줄기나 3차줄기를 식재한 경우에는 4차줄기는 생성되지 않고 3차줄기까지만 착생이 되었다. 이는 1차줄기를 심는 경우가 생육이 더 왕성한 것으로 판단된다.

줄기길이 중에서 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 순으로 길었으며, 3차줄기는 1차줄기 > 2차줄기 > 3차줄기 순으로 길었다. 줄기폭 중에서 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 순으로 넓은 편이었으며, 3차줄기는 2차줄기 > 1차줄기 > 3차줄기 순으로

넓은 편이었다. 줄기두께 중에서 2차줄기는 2차줄기가 가장 두꺼웠으며, 3차줄기는 2차줄기 > 1차줄기 > 3차줄기 순으로 두꺼웠다.

줄기수 중에서 1차줄기는 1차줄기 > 3차줄기 > 2차줄기 식재 순으로 많았으며, 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 많았고, 3차줄기는 2차줄기 > 3차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 많았다. 줄기무게는 1차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 무거웠으며, 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 무거웠고, 3차줄기는 2차줄기 > 3차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 무거웠다. 총 줄기수는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 많았다.

과장은 2차줄기가 길은 편이었으며, 과경은 2차줄기가 굵은 편이었고, 열매수는 1차줄기와 3차줄기가 다소 많은 편이었으며, 열매무게는 1차줄기 > 3차줄기 > 2차줄기 식재 순으로 무거웠다.

13. 천년초선인장 차광효과 구명

줄기수는 차광율이 높을수록 적어지는 경향이었으며, 줄기길이는 차광율이 높아질수록 길어지는 경향이었고, 줄기폭은 차광율이 높을수록 좁아지는 경향이었으며, 줄기두께는 차광율이 높아질수록 가늘어지는 경향이었고, 줄기무게는 차광율이 높을수록 가벼워지는 경향이었던.

14. 천년초선인장 줄기 수량증대를 위한 꽃 및 열매 제거효과 구명

봄에 식재하면, 당년에는 주로 영양생장을 하고, 이듬해에 생식생장을 주로 하게 되는데, 이때 줄기 수량증대를 위하여 꽃 및 열매를 제거 처리한 결과, 줄기길이는 개화전꽃제거 처리가 4차줄기의 길이가 길었으며, 줄기폭은 3차줄기는 개화전열매제거 처리가 넓었고, 4차줄기는 개화전꽃제거 처리가 넓은 편이었으며, 줄기두께는 개화전열매제거 처리가 2차줄기, 3차줄기에서 두꺼운 편이었다. 줄기갯수는 개화전열매와 꽃을 제거한 처리가 많았으며, 줄기무게는 개화전 열매 및 꽃제거와 개화후열매제거 처리가 많았고, 열매무게는 개화종때꽃제거와 무처리는 비슷하였으며, 개화후꽃제거는 무처리의 54.5% 수준이었고, 개화전에 열매 및 꽃제거 처리는 열매가 전혀 열리지 않았다.

2차줄기의 무게는 개화전열매제거와 개화전꽃제거 및 개화후열매제거가 무거운 편이었으며, 3차줄기의 무게는 개화전 열매제거와 개화전꽃제거가 많은 편이었고, 무처리와 개화후꽃제거가 가벼운 편이었으며, 4차줄기의 무게는 개화전열매제거와 개화전꽃제거가 무거운 편이었다.

※ 천년초선인장의 최적의 재배방법

1. 재식밀도

재식밀도는 단보 당 3,310주(즉, 50cm × 60cm)로 식재하는 것이 단보 당 9,920주(즉, 50cm × 20cm)하는 것보다 줄기수량은 63.1%수준, 열매수량은 61.1%수준이나, 소득분석 결과

52.2% 소득이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 종묘가격이 높기 때문으로 판단된다. 따라서 종묘 가격이 현재보다 저렴해 진다면, 재식밀도를 조정해야 할 필요가 있을 것으로 사료된다.

2. 유기물 종류 및 사용량

천년초선인장은 화학비료를 주지 않고, 유기질비료만 사용하는 재배법, 즉 친환경재배를 하고 있는 현실인데, 적당한 유기질비료의 종류 및 사용량을 알아보고자 시험한 결과는 다음과 같다.

유기질비료의 종류는 돈분퇴배발효퇴비를 사용하는 것이 계분퇴배발효퇴비나 우분퇴배발효퇴비를 사용하는 것 보다 증수하였으며, 전체적으로 소득을 분석한 결과는 돈분퇴배발효퇴비를 단보 당 2,400kg 시용 하였을 경우 우분퇴배발효퇴비 2,400kg/10a를 시용한 경우 보다 소득이 25.8% 증가하였으며, 계분퇴배발효퇴비 2,400kg/10a를 시용한 경우 보다 소득이 79.9% 증가하였다. 따라서 유기질비료는 돈분퇴배발효퇴비를 단보 당 2,400kg 사용하는 것이 소득이 높았다.

3. 적정 피복재료 선정

일반적으로 선인장은 물을 싫어하는 편인데, 천년초선인장은 오히려 물을 좋아하는 것으로 판단된다. 흑색PE 등 8가지 피복재료를 처리하여 시험한 결과, 피복을 하지 않고 재배한 처리보다 흑색PE, 녹색PE, 흑백PE를 피복한 처리들이 생육 및 수량이 양호하였는데, 경제성분석을 한 결과 흑색PE, 녹색PE, 흑백PE를 피복한 처리들이 무피복 재배한 대조구보다 소득이 각각 333%, 329% 및 329% 증가하는 것으로 나타났다.

4. 줄기수량을 높이기 위한 꽃 및 열매 제거 효과

줄기가 열매보다 유용한 기능성 성분이 많은 편이다. 줄기수량을 높이기 위해서, 개화 전후에 꽃과 열매를 제거를 한 시험결과는 다음과 같다.

천년초선인장 재배시 줄기수량을 높이기 위해서는 개화 전에 열매를 제거하거나, 개화 전에 꽃을 제거하면 무처리 보다 줄기수량을 각각 33%, 37% 높일 수 있으며, 소득은 무처리 보다 각각 20%, 26% 높은 것으로 나타났다.

지금까지의 결과를 종합해 볼 때-물론 종묘가격과 수매가격이 현재와 같을 때-재식밀도를 단보 당 3,310주(즉, 50cm × 60cm)로 식재하며, 유기질비료는 돈분퇴배발효퇴비를 단보 당 2,400kg 시용하고, 이알을 흑색PE, 녹색PE, 흑백PE로 피복하여 재배하며, 줄기수량을 높이기 위해서는 개화 전에 열매를 제거하거나, 개화 전에 꽃을 제거하는 것이 현재까지 밝혀진 최적의 재배방법이라고 말할 수 있겠다.

좀 더 보완한다면, 식재는 봄에 실시하는 것이 가을에 식재하는 것보다 유리하며, 재배하는 장소는 햇빛이 잘 드는 곳이 좋고 - 햇빛이 부족하면 수량이 감소하고, 도장을 하게 된다 -, 생육중에 질소 등의 영양제를 엽면 살포 하면 보다 수량을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

〈천년초선인장의 유전자 분석을 통한 기원연구 및 유효성분 분석〉

제 1 절 재료 및 방법

가. 천년초선인장 DNA 추출

선인장에는 당질을 많이 함유하고 있어 DNA 추출이 어렵기 때문에 CTAB method(Doyle et Doyle, 1987)를 다소 변형한 아래의 방법으로 실시한다. 우선 냉동 보관된 약 1.0g의 분말조직을 0.5% 2-β-mercaptoethanol이 첨가된 15 ml의 extraction buffer(2% CTAB; 100 mM Tris, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl)에 넣은 후 65°C에서 20분간 incubation하며, 조직내 phenol 화합물, 타닌등의 불순물을 제거하기 위하여, extraction buffer에 2% PVP-40을 첨가한다. Incubation후 SEVAC 용액(chloroform:Isoamyl alcohol=24:1) 7.5 ml를 첨가하여, 8000 g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하고 이 부피의 2/3이 되는 양의 isopropanol을 첨가한 후 -20°C에서 12시간 이상 보관하였다가 8000 g로 30분간 원심분리하여 DNA를 분리한다. 분리된 DNA pellet은 70% ethanol로 세척한 후 TE buffer(1 M Tris, 0.5 M EDTA, pH 8.0)에 용해하였으며, 그 후 필요에 따라 7.5 M ammonium acetate, 2.5 M sodium acetate 등을 이용한 정제과정을 거친다. 추출된 DNA 용액에 RNA를 제거하기 위하여 RNase(2 unit/ml, 37°C, 1 hour; Berhinger Mannheim)을 처리하며, Geneclean kit(Bio 101 Inc., CA, USA)와 Chelex 100(Bio-Rad Lab., CA, USA)를 이용하여 DNA를 순수 정제한다. 정제된 DNA는 0.7% Agarose gel로 전기영동한 후 1% EtBr로 염색하여 UV illuminator상에서 marker와의 밝기정도를 비교하는 spot-test를 실시하거나, spectrophotometer를 이용하여 그 농도를 계산한다.

나. RAPD분석

유전자 증폭을 통한 gene profiling 분석에는 random 10-mer primer를 사용하고 증폭 반응은 Perkin-Elmer 9600 thermal cycler에서 수행된다. PCR 반응은 전체 50μl 부피로 행하며, 10-50 ng DNA, 1.5 unit Taq DNA Polymerase(Perkin & Elmer, Cetus), 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.5-1.0 μM primer 및 200 μM의 각 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 등을 첨가한 후 ① 94°C에서 2분간 pre-denaturation, ② 94°C에서 1분간, 42°C에서 2분간, 72°C에서 2분으로 구성된 amplifying cycle을 35회 반복하고, ③ 72°C에서 7분 동안 final extension 실시한다. 이때 각각의 primer에 대한 상기의 PCR 과정을 통한 screening을 실시하여, 선택된 primer별로 2회 이상의 반복실험을 수행하여 유용한 표식인자를 제공하는 primer를 선발한다.

다. PCR에 의한 ITS, rbcL, PSII 유전자 분석

천년초선인장의 DNA로부터 ITS, rbcL, PSII 유전자를 각 유전자의 특이 primer를 제작한 후 유전자증폭장치(polymerase chain reaction, PCR)를 이용하여 증폭한다. 0.5×TBE buffer에서 0.7% agarose 겔에서 전기영동하여 PCR 증폭 산물을 분리한 후 gel purification kit (Bioneer, Korea)을 사용하여 정제하고 sequencing 분석을 위해서 TA Cloning kit(IN VITRO GENE, Korea)을 사용하여 cloning한다. 클로닝한 유전자단편들은 automated sequencer(Perkin Elmer Ltd., ABI 3700)로 염기서열분석을 수행한다.

라. Cluster analysis

RAPD결과는 필름상에 나타난 각 band를 하나의 형질로 취급하여 유, 무에 따라 각기 1과 0으로 표시하고, 전체 OTU(operational taxonomic unit)에 대한 자료행렬을 작성한 후, NTSYS-pc에 포함되어 있는 SIMGEND program을 이용하여 Hillis의 unbiased distance로서 유사도지수 자료행렬을 도출한다. 도출된 자료행렬을 가지고 UPGMA clustering 방법에 의해 phenogram을 작성하여 각 OTU간의 유전적 유사성을 검토한다. 한편, 각 OTU별로 분자유전학적 표식인자를 검색하며, 이를 이용하여 산지별 혹은 국가별로 우수한 유전자원을 확보하는데 필요한 식별형질로 사용되도록 한다.

마. 염기서열의 비교분석과 유연관계 분석

클로닝하여 염기서열을 분석한 유전자들은 기존에 발표된 sequence 들과 비교하여 결정하며, ClustalW program, Autoassembly, Sequencer 등을 이용하여 일단 염기서열의 정확도와 sequence alignment를 실행 및 확인한 후, 최종적으로 육안에 의하여 결과를 검토한다. 염기서열분석결과 얻어진 유전정보의 분석은 PHYLIP(Phylogenetic Inference Package, ver. 3.5c)내의 DNADIST program의 Kimura's two parameter에 의한 genetic distance matrix를 작성한다. 또한 PAUP*(Phylogenetic Analysis Using Parsimony) program을 이용하여 molecular phylogenetic tree를 작성하고, 계통도의 신뢰도와 정확성을 구축하기 위하여, Jackknife analysis 및 bootstrap analysis를 수행한다.

바. SNP primer의 제작

SNP primer의 개발 및 분석시스템 개발의 기본원리는 Amplification Refractory Mutation System (ARMS)을 이용한다. 일반적으로 Taq 폴리머라제(polymerase)를 사용하여 PCR증폭을 할 경우에 primer의 3'-nucleotide에서 주형(template DNA)과 mismatch되면 PCR증폭은 일어나지 않는데 이것을 이용하여 primer를 제작한다. 전제조건으로 증폭에 사용되는 Taq 폴리머라제는 3'-exonucleolytic proofreading 활성기능이 없는 것을 사용하여야 한다. ARMS primer들은 G/T 혹은 A/C (primer/template) mismatch를 유발하게끔 제작한다. Primer 제작은 목적으로 하는 유전자의 염기서열 중에서 임의로 적당한 크기의 1차 control primer를 결정하고 1차 control primer 증폭산물의 안쪽에 특이적인 primer 부위를 결정하여 2차 primer를 합성하고 3'nucleotide 부위에

서 특이적인 nucleotide의 바로 앞 nucleotide염기를 임의의 nucleotide로 치환함으로써 특이적으로 증폭되도록 하며, 이때 반드시 primer간에 경합을 시키도록 제작하여야 한다.

사. SNP primer의 최적 PCR조건 구명

SNP 분석시스템은 각각의 개발되는 SNP primer에 따라서 그 반응특성에 차이가 있기 때문에 각 primer의 특성에 맞게 PCR의 반응조건(DNA의 농도, 증폭회수, primer간의 농도 비율, dNTPmix 농도)을 설정한다.

아. 사포닌 분석

천년초선인장의 줄기와 열매를 채취하여 흐르는 수돗물로 깨끗이 세척하여 물기를 제거한 후 70°C 열풍건조기에서 24시간 건조한다. 건조한 천년초선인장 분말시료 0.5 g을 취하여 80°C 욕조에서 80% 메탄올 30 ml로 3회 추출하여 건조시킨 후 메탄올 엑기스를 얻은 다음 에테르로 추출하여 탈지시키고 수포화 1-부탄올로 3회 추출하여 1-부탄올층을 모두 합하여 증류수로 1회 세척한 후 수층은 버리고 1-부탄올층만 건조시킨 후 HPLC용 메탄올 500 μ l에 녹여 0.45 μ m millipore syringe filter로 여과하여 10 μ l를 High Performance Liquid Chromatograph (HPLC); (Waters)기에 주입하여 ginsenosides를 분리 정량한다. 사포닌 화합물의 확인 및 정량에 사용된 개별 사포닌 성분인 ginsenoside 표준품(Rg₁, Rf, Re, Rd, Rc, Rb₂, Rb₁)을 사용하였다.

제 2 절 결과 및 고찰

가. RAPD 분석에 의한 천년초 DNA profiling 분석

식물의 품종간 분류나 판별은 주로 형태적 형질 및 생리적 특성에 근거를 두고 수행되어 왔으나, 최근에는 AFLP(amplified fragment length polymorphism), STR(short tandem repeat), RAPD(random amplified polymorphic DNA) 등의 다양한 분자생물학적인 기법이 현재 많이 이용되고 있다. 이 중에서 RAPD방법은 근연종간의 유연관계 규명에 매우 유익한 분자적 마커를 제공하는 것으로 알려져 있다. RAPD 방법은 여러개의 primer를 사용하기 때문에 DNA polymorphism을 관찰하기가 쉽고 실험조작이 간편한 장점이 있다. 또한 소량의 DNA만 있어도 실험이 가능하고 비교적 단시간 내에 대규모 집단들의 screening에 효과적인 방법으로서 유전적 변이의 감별, 유전자 지도의 작성, 모본의 확인 등 그 이용성이 다양하다. 그러나 RAPD법은 재현성 부족 등의 한계점이 존재하므로 안정적인 PCR 조건의 확립이 우선되어야 한다.

천년초는 백년초와는 달리 추운겨울에 월동이 가능한 손바닥 선인장으로서 백년초와 확연히 다른 형태적, 생리적인 차이점을 가지고 있다. 현재 백년초는 *Opuntia ficus-indica*로 불리우고 있고 천년초는 *Opuntia humifusa*로 통용되고 있으나 그 기원이 명확하지 않고 이들

을 뒷받침할만한 뚜렷한 연구자료가 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 이들의 명확한 기원규명을 목적으로 오페론사의 10-mer 20종을 사용하여 RAPD 분석을 실시하였다(Table 66) 시료는 근연관계가 가까운 *Opuntia*속 선인장 중에서 천년초, 백년초, 전라도선인장과 미국에서 구입한 3종의 *Opuntia humifusa*, *Opuntia rufida*, *Opuntia grahamii*를 사용하였다.

Table 66. Operon 10-mer primers used with RAPD analysis among *Opuntia*.

Code	Nucleotides (5' to 3')	Code	Nucleotides (5' to 3')
OPK-01	CATTCGAGCC	OPY-01	GTGGCATCTC
OPK-02	GTCTCCGCAA	OPY-02	CATCGCCGCA
OPK-03	CCAGCTTAGG	OPY-03	ACAGCCTGCT
OPK-04	CCGCCCAAAC	OPY-04	GGCTGCAATG
OPK-05	TCTGTGAGG	OPY-05	GGCTGCGACA
OPK-06	CACCTTTCCC	OPY-06	AAGGCTCACC
OPK-07	AGCGAGCAAG	OPY-07	AGAGCCGTCA
OPK-08	GAACACTGGG	OPY-08	AGGCAGAGCA
OPK-09	CCCTACCGAC	OPY-09	AGCAGCGCAC
OPK-10	GTGCAACGTG	OPY-10	CAAACGTGGG

다육식물인 선인장은 당질을 많이 함유하고 있어서 DNA를 추출하는데 많은 어려움이 있다. 순도 높은 DNA를 추출하기 위해 CTAB법을 변형하여 DNA를 분리하였다. DNA pellet은 70% ethanol로 세척한 후 TE buffer에 용해하고 7.5 M ammonium acetate와 2.5 M sodium acetate를 이용하여 정제하였고 DNA 용액에 RNase를 처리한 후, GeneClean kit를 이용하여 DNA를 순수 정제하고 spectrophotometer를 이용하여 그 농도를 계산하여 RAPD 분석에 이용하였다.

20개의 10-mer primer를 사용하여 RAPD 분석을 실시한 결과 9개의 primer(OPK-01, OPK-6, OPK-07, OPK-09, OPK-10, OPY-02, OPY-05, OPY-07, OPY-08)에서 재현성 있는 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 10). 9개의 primer로부터 67개의 polymorphic DNA fragments가 관찰되어 비교적 높은 polymorphism을 나타내었다.

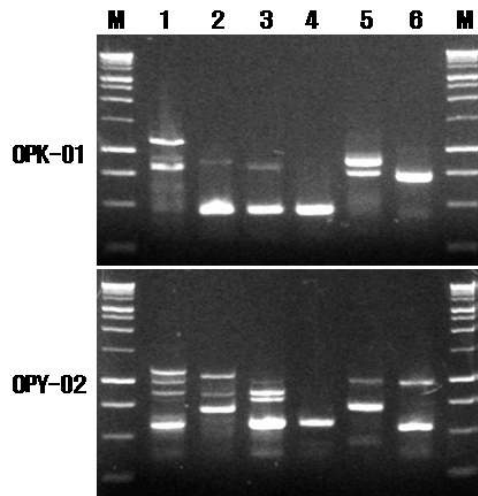


Fig. 10. RAPD analysis using Operon 10-mer primer among Opuntias. M. 1 kb DNA ladder; 1. CheonNyeonCho, 2. BaekNyeonCho (*Opuntia ficus-indica*), 3. JunRaDo, 4. *Opuntia humifusa*, 5. *Opuntia rufida*, 6. *Opuntia grahamii*.

천년초, 전라도 선인장과 백년초의 경우 줄기 하나만을 놓고 관찰하였을 경우에는 형태적으로 거의 유사하였으나, RAPD 분석에 의한 DNA profiling 조사 결과 높은 다형성을 보였다(Fig. 10). RAPD 분석을 통하여 관찰된 DNA fragment의 OTU정렬을 한 후 Jaquard index에 의해서 similarity matrix를 구하고(Table 67), 이를 근거로 하여 유연관계 분석을 실시하였다(Fig. 11). 그 결과 천년초와 근연관계에 있을 것으로 예상되었던 백년초(*Opuntia ficus-indica*)는 *Opuntia rufida*와 매우 밀접한 유연관계를 보였다.

Table 67. Similarity matrix by Jaquard index among Opuntias.

Species*	1	2	3	4	5	6
1						
2	0.909091					
3	0.555556	0.777778				
4	0.875000	0.833333	0.666667			
5	0.900000	0.714286	0.888889	1.000000		
6	0.888889	1.000000	0.875000	1.000000	0.833333	

*1. CheonNyeonCho, 2. BaekNyeonCho (*Opuntia ficus-indica*), 3. JunRaDo, 4. *Opuntia humifusa*, 5. *Opuntia rufida*, 6. *Opuntia grahamii*.

본 연구에서는 근연관계에 있는 손바닥 선인장들의 유전적인 다양성분석을 목적으로 RAPD 분석을 실시하였다. 그 결과 예상과는 다르게 형태적으로 유사한 *Opuntia*속 선인장들은 독특한 다형성(polymorphism)이 관찰되었다. 특히, 국내에서 자생하는 손바닥 선인장 중에서 월동 가능한 천년초와 전라도 선인장은 제주도에서 자생하는 백년초와는 다른 다형성이 관찰되는 것으로 보아 그 기원에 차이가 있을 가능성이 제시되었다.

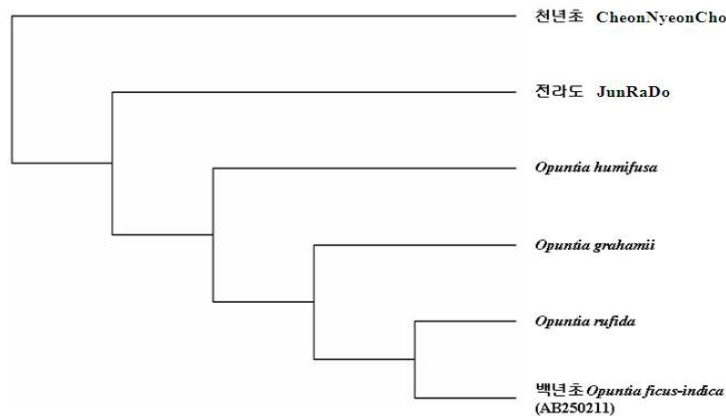


Fig. 11. Relationship analysis by RAPD method in Opuntias.

나. ITS(internal transcribed sequence)유전자 cloning 및 염기서열 분석

손바닥 선인장의 원산지는 멕시코를 중심으로 남북아메리카에 분포되어 있는데, 우리나라에는 제주도 서남쪽 해변마을과 마라도 남단 해변에 야생상으로 군락을 형성하고 있는 백년초와 월동이 가능한 천년초, 전라도 선인장이 자생하고 있다. 최근 손바닥 선인장이 노화억제 및 암 발생억제효과와 성인병의 원인이 되는 콜레스테롤이나 지방함량을 낮추어주고, 항산화 및 항균효과가 있으며, 면역세포의 활성화시키는 등 과학적인 효과에 대한 검증이 이루어져 다양한 기능성식품 및 화장품원료로 상업적으로 재배되고 있다. 그러나 국내에 자생하고 있는 천년초, 전라도 선인장, 백년초의 경우 그 기원에 대한 연구가 아직 없는 실정으로 이들을 식품소재 또는 의약품소재로 하기 위해서는 명확한 구분과 기원 규명이 이루어져야 한다. 따라서 본 연구에서는 식물에서 계통발생분석을 위해서 계놈 DNA 마커로서 가장 많이 이용되고 있는 ITS 영역의 보존부위(conserved region)을 선별하여 ITS primer쌍을 제작하였다. 국내에 자생하는 천년초의 기원 규명을 목적으로 전라도 선인장, 백년초와 더불어 외국산 *Opuntia*속 선인장 22종을 수집하고 이들로부터 DNA를 추출한 후 PCR 증폭을 실시하였다. PCR증폭 산물을 전기영동하여 확인한 후 agarose gel로부터 정제하였고, pGEM-T easy 벡터에 cloning하였다(Fig. 12A, 12B).

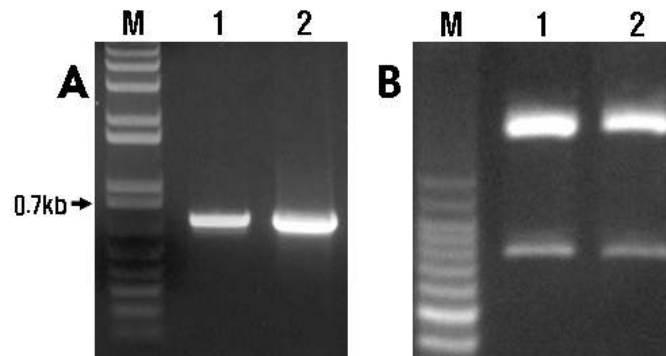


Fig. 12. PCR amplification of ITS region in *Opuntias*. A. ITS DNA fragment, B. ITS DNA fragment restricted with *Eco* RI. M. molecular marker, 1. CheonNyeonCho, 2. BaekNyeonCho (*Opuntia ficus-indica*).

rDNA 영역의 cloning 여부를 확인하고자 *Eco* RI 제한효소를 처리한 후 전기영동하여 insert 유무를 확인하고 염기서열분석을 실시하였다(Fig. 12). 그 결과 천년초선인장으로 부터는 685 bp의 염기정보를 얻었다(Fig. 13B). 천년초 rDNA 영역은 Fig. 13A에서 보는 바와 같이 18S rRNA, ITS1, 5S rRNA, ITS2, 26S rRNA 의 coding gene이 직렬적인 배열로 연결되어 있는 것을 확인하였다. 18S rRNA의 길이는 54 bp로서 3'말단의 partial sequence이고 162 bp의 5S rRNA, 26S rRNA는 56 bp로서 5'부분의 partial sequence로 구성되어 있으며, 이들 사이에 스페이서 영역인 193 bp의 ITS1과 220 bp의 ITS2로 구성되어 있다(Fig. 13).



Fig. 13. Schematic diagram of CheonNyeonCho rDNA region and nucleotide sequence. A pair of ITS primers are boldic and ITS1 and ITS2 spacer region are underlined.

천년초 rDNA 영역의 nucleotide 서열을 NCBI blastn 프로그램을 사용하여 Genbank에 등록되어 있는 유전자들과 homology를 비교·검색한 결과 기존에 보고되어 있는 다육식물들의 ITS 영역과 매우 높은 상동성(homology)을 나타내었다(Fig. 14). 특히 손바닥선인장 아과(Opuntioideae)에 속하는 *Pereskia porteri*로부터 분리된 rDNA와 높은 상동성을 나타내었다.

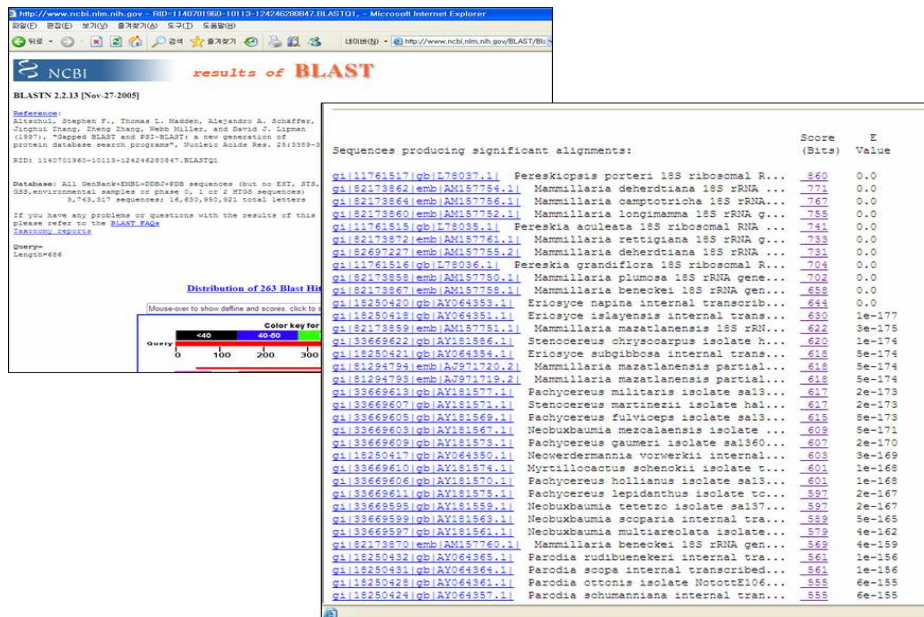


Fig. 14. Homology search using NCBI blast program of CheonNyeonCho rDNA nucleotide sequence.

천년초의 경우 현재 그 학명이 *Opuntia humifusa*로 불리우고 있는 *Opuntia*속(genus)에 속하는 부채 선인장이다. NCBI D/B에서 상동성 검색을 한 결과 아직까지 *Opuntia*속 선인장의 경우에는 ITS 유전자에 대한 등록이 전혀 없는 것으로 밝혀졌다. 천년초선인장의 rDNA와 ITS영역에 가장 높은 상동성을 나타낸 것은 같은 Opuntioideae에 속하는 *Pereskia porteri*(L78037)로 95%의 유사도를 나타내었으며, 조사된 다른 식물체들에서 가장 낮은 경우에도 86% 정도로 비교적 높게 나타났다(Fig. 12).

```

Cheonnyeoncho      GGAAGTAAAAGTCGTAACCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAA 60
Opuntia humifusa   GGAAGTAAAAGTCGTAACCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAA 60
Jeonr adosuninjang GGAAGTAAAAGTCGTAACCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAA 60
Baeknyeoncho      GGAAGTAAAAGTCGTAACCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAA 60
Opuntia rufida     GGAAGTAAAAGTCGTAACCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAA 60
Opuntia invicta    GGAAGTAAAAGTCGTAACCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAA 60
Opuntia grahamii  GGAAGTAAAAGTCGTAACCAAGGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAA 60
*****
Cheonnyeoncho      CCTGCCAGCAGAAAGACC CGCGAACATGTTTCCATGAACACGCGAGGGAGGGGGCCCT 120
Opuntia humifusa   CCTGCCAGCAGAAAGACC CGCGAACATGTTTCCATGAACACGCGAGGGAGGGGGCCCT 120
Jeonr adosuninjang CCTGCCAGCAGAAAGACC CGCGAACATGTTTCCATGAACACGCGAGGGAGGGGGCCCT 120
Baeknyeoncho      CCTGCCAGCAGAAAGACC CGCGAACATGTTTCCATGAACACGCGAGGGAGGGGGCCCT 120
Opuntia rufida     CCTGCCAGCAGAAAGACC CGCGAACATGTTTCCATGAACACGCGAGGGAGGGGGCCCT 120
Opuntia invicta    CCTGCCAGCAGAAAGACC CGCGAACATGTTTCCATGAACACGCGAGGGAGGGGGCCCT 120
Opuntia grahamii  CCTGCCAGCAGAAAGACC CGCGAACATGTTTCCATGAACACGCGAGGGAGGGGGCCCT 120
*****
Cheonnyeoncho      CTGCCCCA-TCCCTGGCGCAACAAACAAACCCGGCGCGGAACCGGCCAAGGAACACGAAC 179
Opuntia humifusa   CTGCCCCA-TCCCTGGCGCAACAAACAAACCCGGCGCGGAACCGGCCAAGGAACACGAAC 179
Jeonr adosuninjang CTGCCCCA-TCCCTGGCGCAACAAACAAACCCGGCGCGGAACCGGCCAAGGAACACGAAC 179
Baeknyeoncho      CTGCCCCA-TCCCTGGCGCAACAAACAAACCCGGCGCGGAACCGGCCAAGGAACACGAAC 179
Opuntia rufida     CTGCCCCA-TCCCTGGCGCAACAAACAAACCCGGCGCGGAACCGGCCAAGGAACACGAAC 179
Opuntia invicta    CTGCCCCA-TCCCTGGCGCAACAAACAAACCCGGCGCGGAACCGGCCAAGGAACACGAAC 180
Opuntia grahamii  CTGCCCCA-TCCCTGGCGCAACAAACAAACCCGGCGCGGAACCGGCCAAGGAACACGAAC 180
*****
Cheonnyeoncho      TAAAGGCGTGC CGCGCCGCGCGCGTCCGCGGCGACGCGGGGGCGGACCTGTCCCTACT 239
Opuntia humifusa   TAAAGGCGTGC CGCGCCGCGCGCGTCCGCGGCGACGCGGGGGCGGACCTGTCCCTACT 239
Jeonr adosuninjang TAAAGGCGTGC CGCGCCGCGCGCGTCCGCGGCGACGCGGGGGCGGACCTGTCCCTACT 239
Baeknyeoncho      TAAAGGCGTGC CGCGCCGCGCGCGTCCGCGGCGACGCGGGGGCGGACCTGTCCCTACT 239
Opuntia rufida     TAAAGGCGTGC CGCGCCGCGCGCGTCCGCGGCGACGCGGGGGCGGACCTGTCCCTACT 239
Opuntia invicta    TAATGGCGTGC CGCGCCGCGCGCGTCCGCGGCGACGCGGGGGCGGACCTGTCCCTACT 240
Opuntia grahamii  TAATGGCGTGC CGCGCCGCGCGCGTCCGCGGCGACGCGGGGGCGGACCTGTCCCTACT 240
*****
Cheonnyeoncho      TAAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGCGTAGC 299
Opuntia humifusa   TAAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGCGTAGC 299
Jeonr adosuninjang TAAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGCGTAGC 299
Baeknyeoncho      TAAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGCGTAGC 299
Opuntia rufida     TAAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGCGTAGC 299
Opuntia invicta    TAAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGCGTAGC 299
Opuntia grahamii  TAAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGCGTAGC 299
*****
Cheonnyeoncho      GAAATGCGTACTTGGTGTGAAITGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA 359
Opuntia humifusa   GAAATGCGTACTTGGTGTGAAITGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA 359
Jeonr adosuninjang GAAATGCGTACTTGGTGTGAAITGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA 359
Baeknyeoncho      GAAATGCGTACTTGGTGTGAAITGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA 359
Opuntia rufida     GAAATGCGTACTTGGTGTGAAITGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA 359
Opuntia invicta    GAAATGCGTACTTGGTGTGAAITGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA 359
Opuntia grahamii  GAAATGCGTACTTGGTGTGAAITGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA 359
*****
Cheonnyeoncho      GTTGGCCCAAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGCTGCGCTGGGCGTCAACGATCGGGTCTC 419
Opuntia humifusa   GTTGGCCCAAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGCTGCGCTGGGCGTCAACGATCGGGTCTC 419
Jeonr adosuninjang GTTGGCCCAAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGCTGCGCTGGGCGTCAACGATCGGGTCTC 419
Baeknyeoncho      GTTGGCCCAAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGCTGCGCTGGGCGTCAACGATCGGGTCTC 419
Opuntia rufida     GTTGGCCCAAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGCTGCGCTGGGCGTCAACGATCGGGTCTC 419
Opuntia invicta    GTTGGCCCAAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGCTGCGCTGGGCGTCAACGATCGGGTCTC 419
Opuntia grahamii  GTTGGCCCAAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGCTGCGCTGGGCGTCAACGATCGGGTCTC 419
*****
Cheonnyeoncho      CCCCCC-GCCTGCCGGGGGG-AAGGATGATGGCTCCCGTACCCTAACCGGGCGGGCT 477
Opuntia humifusa   CCCCCC-GCCTGCCGGGGGG-AAGGATGATGGCTCCCGTACCCTAACCGGGCGGGCT 476
Jeonr adosuninjang CCCCCC-GCCTGCCGGGGGG-AAGGATGATGGCTCCCGTACCCTAACCGGGCGGGCT 476
Baeknyeoncho      CCCCCC-GCCTGCCGGGGGG-AAGGATGATGGCTCCCGTACCCTAACCGGGCGGGCT 476
Opuntia rufida     CCCCCC-GCCTGCCGGGGGG-AAGGATGATGGCTCCCGTACCCTAACCGGGCGGGCT 476
Opuntia invicta    CCCCCC-GCCTGCCGGGGGG-AAGGATGATGGCTCCCGTACCCTAACCGGGCGGGCT 478
Opuntia grahamii  CCCCCC-GCCTGCCGGGGGG-AAGGATGATGGCTCCCGTACCCTAACCGGGCGGGCT 479
*****
Cheonnyeoncho      GGCTTAAACGGGAGCCCGCGGCGACGAGCTGCGAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCT 537
Opuntia humifusa   GGCTTAAACGGGAGCCCGCGGCGACGAGCTGCGAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCT 536
Jeonr adosuninjang GGCTTAAACGGGAGCCCGCGGCGACGAGCTGCGAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCT 536
Baeknyeoncho      GGCTTAAACGGGAGCCCGCGGCGACGAGCTGCGAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCT 536
Opuntia rufida     GGCTTAAACGGGAGCCCGCGGCGACGAGCTGCGAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCT 536
Opuntia invicta    GGCTTAAACGGGAGCCCGCGGCGACGAGCTGCGAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCT 538
Opuntia grahamii  GGCTTAAACGGGAGCCCGCGGCGACGAGCTGCGAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCT 539
*****
Cheonnyeoncho      TCGGCGCCCTGTTTGCATCGCGTCCGGCACGCGACGCGTCCGGAAGAGGGCTCGTTGGAC 597
Opuntia humifusa   TCGGCGCCCTGTTTGCATCGCGTCCGGCACGCGACGCGTCCGGAAGAGGGCTCGTTGGAC 596
Jeonr adosuninjang TCGGCGCCCTGTTTGCATCGCGTCCGGCACGCGACGCGTCCGGAAGAGGGCTCGTTGGAC 596
Baeknyeoncho      TCGGCGCCCTGTTTGCATCGCGTCCGGCACGCGACGCGTCCGGAAGAGGGCTCGTTGGAC 596
Opuntia rufida     TCGGCGCCCTGTTTGCATCGCGTCCGGCACGCGACGCGTCCGGAAGAGGGCTCGTTGGAC 596
Opuntia invicta    TAGAGGCCCCCGTTTGCATCGCGTCCGGCACGCGACGCGTCCGGAAGAGGGCTCGTTGGAC 598
Opuntia grahamii  TAGAGGCCCCCGTTTGCATCGCGTCCGGCACGCGACGCGTCCGGAAGAGGGCTCGTTGGAC 599
*****
Cheonnyeoncho      CCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAACCCGTTCCGACCCAGGTCAAGCGGGGCTACCCCG 657
Opuntia humifusa   CCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAACCCGTTCCGACCCAGGTCAAGCGGGGCTACCCCG 656
Jeonr adosuninjang CCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAACCCGTTCCGACCCAGGTCAAGCGGGGCTACCCCG 656
Baeknyeoncho      CCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAACCCGTTCCGACCCAGGTCAAGCGGGGCTACCCCG 656
Opuntia rufida     CCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAACCCGTTCCGACCCAGGTCAAGCGGGGCTACCCCG 656
Opuntia invicta    CCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAACCCGTTCCGACCCAGGTCAAGCGGGGCTACCCCG 657
Opuntia grahamii  CCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAACCCGTTCCGACCCAGGTCAAGCGGGGCTACCCCG 658
*****
Cheonnyeoncho      TGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 685
Opuntia humifusa   TGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 685
Jeonr adosuninjang TGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 685
Baeknyeoncho      TGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 685
Opuntia rufida     TGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 685
Opuntia invicta    TGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 686
Opuntia grahamii  TGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 687
*****

```

Fig. 15. Alignment of rDNA region among *Opuntia* genus. The Clustal W 1.32 was used.

국내 자생하는 전라도선인장과 백년초으로 부터도 ITS유전자를 분리하여 염기서열 분석을 실시하였으며, 백년초의 ITS 유전자는 *Opuntia*속 선인장으로서 세계 최초로 본 연구에서 유전자은행에 등록(AB250211)하였다. 천년초선인장의 기원을 명확히 하기 위해서는 유연관계가 가까운 *Opuntia*속 선인장들의 ITS 영역의 유전자를 cloning하여 염기서열을 비교할 필요성이 있다. 따라서 본 연구에서는 미국으로부터 천년초와 동일한 *Opuntia humifusa*를 비롯한 21종의 *Opuntia*속 선인장시료를 확보하였다. 이들 시료중에서 우선적으로 *Opuntia humifusa*, *Opuntia rufida*, *Opuntia invicta*, *Opuntia grahamii* 4종으로부터 DNA를 추출하고 ITS 영역을 cloning하여 염기서열을 분석하여 국내에 자생하는 천년초, 전라도 선인장, 백년초와 비교하여 보았다(Fig. 15). 그 결과 천년초와 미국산 *Opuntia humifusa*는 99%의 매우 높은 유사도를 보였지만, 국내 자생종인 전라도 선인장, 백년초, *Opuntia rufida* 등에서도 마찬가지로 99%의 높은 유사도를 보였다.

천년초 ITS영역과 NCBI blastn 검색에서 상동성을 나타낸 선인장을 비롯한 다른 다육 식물체들의 sequence를 fasta format으로 정리한 후 Clustal W 프로그램 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)을 이용하여 유연관계를 조사하였다. 그 결과 그림 16에서 보는바와 같이 천년초는 *Opuntia humifusa* 같은 cluster로 분리되어 매우 가까운 근연관계에 있음을 시사하였다. 그러나 유전자은행에 등록된 *Opuntia*속 선인장들의 rDNA 유전자 정보가 없기 때문에 천년초의 유연관계를 보다 명확히 규명하는 데는 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서 확보한 *Opuntia*속 선인장들의 ITS 유전자를 cloning하여 염기서열을 분석할 필요성이 있다.

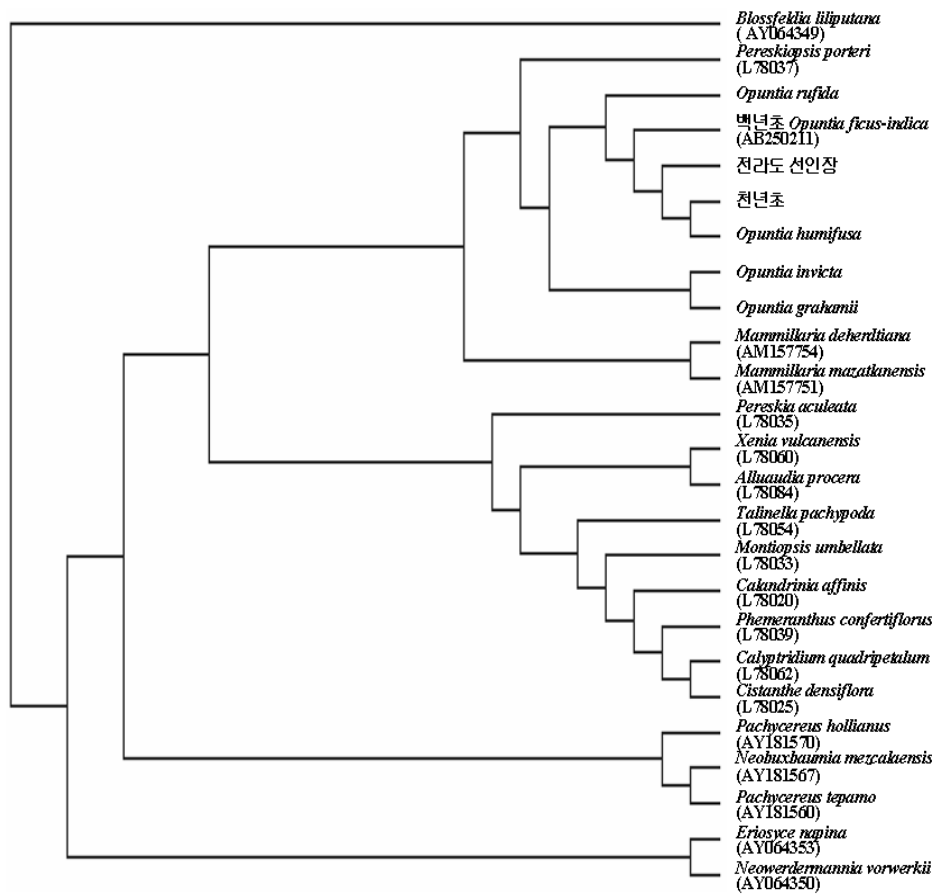


Fig. 16. Phylogenetic analysis using the nucleotide sequence of Opuntia genus rDNA region with UPGMA.

식물에 존재하는 rDNA의 큰 특징 중의 하나는 수평진화(horizontal evolution) 또는 협동진화(concerted evolution)라고 하는 과정을 통하여 일어나는 다중유전자족(multigene family)의 구성원간에서 전체적인 염기서열의 동질성(homogeneity)이 있다는 점이다. 협동진화과정에서 단일돌연변이는 유전자변환이나 비대칭 교차 때문에 상대적으로 짧은 기간에 고정될 수 있는 특징을 가지고 있다. rDNA의 영역에서 rRNA 코드영역은 밀접하게 연관된 종들 사이에서는 염기의 차이가 거의 보이지 않는데 반하여 스페이서인 ITS1과 ITS2 영역에서는 코드영역에 비하여 더 높은 비율로 변이가 존재하기 때문에 식물에서 ribosomal ITS 염기서열정보는 유연관계를 규명하는데 있어서 많은 가능성을 제시하고 있다.

현재 유전자 은행에 등록되어 있는 Opuntia속 선인장의 ITS 유전자 정보가 없어 보다 명확하게 천년초의 기원을 규명하기 위해서는 확보된 Opuntia속 선인장의 ITS 영역의 염기서열분석이 추가될 필요성이 있다. 본 실험을 통하여 규명된천년초를 비롯한 Opuntia속 선인장의 ITS 유전자 등록을 시작으로 보다 많은 동일 속(genus) 선인장의 시료를 확보하여 ITS 영역의 유전자분석을 진행하여 보다 명확한 백년초의 기원규명에 대한 연구를 지속적으로 수행 할 것이다.

다. 천년초선인장의 사포닌성분분석

사포닌(saponin)은 배당체(glycoside)라고 하는 화합물의 일종으로 흔들면 비누처럼 미세한 거품을 내는 일반적인 특성을 가지고 있다. Saponin이란 말의 어원이 비누처럼 거품을 낸다고 하여 sapo에서 유래되어 붙여진 이름이다. 사포닌 성분은 750여종의 식물에 광범위하게 분포되어 있는 이차대사산물(secondary metabolite)이다. 사포닌 함유 식물은 예부터 세정, 거담, 진해를 목적으로 의약품에 사용되어 왔으며, 최근에는 소염, 해열, 건위, 배농, 강장 등 사포닌의 효과가 점차 확대되어 가고 있다. 사포닌은 당부분인 sugar와 비당부분인 aglycone(genin)으로 구성되어 있는 배당체이다. 이러한 사포닌은 인삼에 다량으로 함유되어 있는데 인삼 사포닌은 ginsenosides라고 하며 구조적 특성에 따라 panaxadiol(PD)계와 panaxatriol(PT)계로 구분한다. PD계는 중추신경 진정효과가 있으며, PT계는 콜레스테롤의 함량저하효과가 있는 것으로 알려져 있다. 최근 분리분석 기술의 발달에 따라 지금까지 30여종의 인삼사포닌의 화학구조가 밝혀졌다. 인삼 사포닌 성분들의 개별 효과가 밝혀지면서 의약품 개발에 대한 가능성도 제시되고 있는데, ginsenoside-Rb₂는 암독소 호르몬에 대한 길항작용 및 중앙혈관신생억제작용에 대해서, ginsenoside-Rc는 장내 세균에 의한 대사산물을 이용한 항암제 개발 가능성이 제시되었다.

따라서 본 연구에서는 천년초선인장의 부가가치를 높이기 위해서 천년초 줄기와 열매로부터 사포닌성분의 검출을 실시하였다. 천년초의 잎과 줄기로부터 사포닌 추출을 위해서 시료 약 2g을 정확히 달아 삼각플라스크에 넣고 물포화 부탄올 용액 50ml를 가하여 80℃의 물에서 중탕하면서 1시간동안 환류 추출한 다음 여과지를 이용하여 여과하였다. 잔유물에 물포화 부탄올 용액 50ml를 가하여 다시 환류 추출을 수행하고 여과한 다음 한 번 더 반복실험을 실시하고 잔유물을 물포화 부탄올 용액 10ml로 깨끗이 씻었다. 여액과 세척액을 한군데로 모은 후 250ml분액 여두에 넣고 증류수로 10ml씩 2회 씻어 물포화 부탄올층을 분액하였다. 수층을 물포화 부탄올 10ml로 추출하여 분액한 후 물포화 부탄올 층을 물포화 부탄올층과 혼합하여 감압농축을 실시하였다. 완전히 농축한 후 에테르 50ml를 첨가하여 완전히 용해시킨 후 36℃의 물속에서 30분간 환류추출하여 탈지시킨 다음 에테르 추출액을 제거하였다. 잔유물을 105℃에서 약 2시간 건조시키고 무게를 측정하여 조사포닌 함량을 결정하였다. 그 결과 Table 68에서 보는 바와 같이 천년초의 줄기에서는 1.1~1.5% 정도, 열매에서는 2.5~3.7% 정도의 조사포닌을 함유하고 있는 것으로 조사되었다.

Table 68. Crude saponin analysis in stem and fruit of ChyeonNyeonCho Opuntia.

Species	Content of crude saponin (%)
Stem-1 ¹⁾	1.535 ± 0.12
Stem-2	1.245 ± 0.07
Stem-3	1.135 ± 0.10
Fruit-1	3.700 ± 0.25
Fruit-2	2.515 ± 0.13
Fruit-3	2.740 ± 0.15

* Each experiment was the average in three repeats.

¹⁾ Samples were harvested from each individuals ChyeonNyeonCho Opuntia.

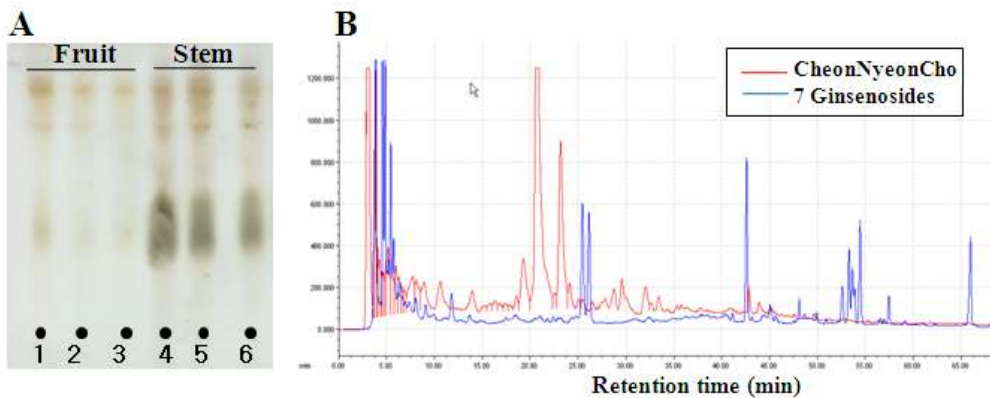


Fig. 17. Saponin analysis in Chunnyeoncho. A. TLC analysis in fruit and stem; B. HPLC analysis.

천년초선인장의 사포닌 분석을 위해서 TLC 분석을 실시한 결과 저분자 사포닌이 천년초선인장의 잎줄기와 열매에서 미량으로 검출되었으며(Fig. 17A), 정성분석을 위하여 HPLC 분석을 실시한 결과(Fig. 17B) 표준품으로 사용한 인삼 7종 ginsenoside(Rg₁, Rf, Re, Rd, Rc, Rb₂, Rb₁)와는 일치되는 peak가 없었다. 이는 담마란계열의 인삼사포닌과는 다른 종류의 사포닌이 천년초선인장에는 존재하고 있다는 것을 제시한다. 따라서 금후 정확한 천년초선인장 사포닌의 분석을 위해서는 천년초사포닌의 표준품 확보가 우선되어야 할 필요성이 있다.

라. PCR에 의한 PSII 및 rbcL 유전자 분석

북제주도에서 군락을 형성하여 자생하는 백년초 선인장은 월동이 불가능하며, 천년초선인장과 같이 월동이 가능한 선인장이 전라도 등에서 발견되고 있으나 생존률은 천년초선인장에 비해서 떨어진다. 손바닥 선인장은 예로부터 기관지, 천식, 기침, 폐질환, 고혈압, 당뇨, 심장병 등에 약재로 사용되어 왔으며, 최근에는 식품원료와 화장품원로서 가치가 높아져 수

요가 점차 증가하고 있다. 소비시장이 확대됨에 따라 명확한 기원 규명의 필요성이 대두되고 있으나, 부채선 인장과 *Opuntia humifusa*와 유사한 형태를 가진 천년초선인장의 유전학적인 기초자료는 매우 부족한 실정이다. *Opuntia* 속 선인장의 유전적 다양성과 연관성에 대한 연구를 수행하고자 photosystem II polypeptide D1(*PSII*)과 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) 유전자를 분리하고 염기서열분석을 통하여 천년초선인장의 기원을 규명하고자 본 연구를 실시하였다.

국내에서 자생하는 천년초, 백년초, 전라도 선인장은 충남 아산시 소재 (주)여러분의 천년초 농장에서 분양 받았으며, 외국산 *Opuntia* 속 선인장은 미국에서 구입하였다. 시료로 사용할 선인장의 줄기는 액체질소로 급속 냉동하여 -80°C 에 보관한 후 0.5 g을 채취하여 GENE \sqrt ALLTM SV column (Generalbiosystem, Korea)으로 정제하여 각각의 시료로부터 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 spectrophotometer (Amersham Biosciences, USA)를 사용하여 정량 한 후 0.8% agarose gel에 전기영동하여 확인하였고, 50 ng/ul로 희석한 후 소량씩 분주하여 -20°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

1) *psbA* 유전자 cloning 및 sequence 분석

유전자는 행에 등록되어 있는 식물의 *psbA* 유전자들의 염기서열을 비교·분석하여 보존되어 있는 영역에서 5' 영역(5'-ATG ACT GCA ATT TTA GAG AGA CG-3')과 3' 영역(5'-CAT TAC GTT CAT GCA TAA CTT CC-3) 특이적인 *psbA* primer 쌍을 제작하였다. 이들 제작된 primer를 사용하여 95°C 1 min, 55°C 30sec, 72°C 1min의 PCR 반응을 35 회 실시하여 *psbA* 유전자 영역을 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 cloning하여 염기서열분석을 실시하였다. PCR 증폭 산물을 전기영동하여 확인한 후 agarose gel로부터 정제하였고, pGEM-T easy 벡터에 cloning하였다. *psbA* 영역의 cloning 여부를 확인하고자 Eco RI 제한효소를 처리한 후 전기영동하여 insert 유무를 확인하고 염기서열분석을 실시하였다. 그 결과 천년초선인장으로 부터는 1,007 bp의 크기의 *psbA* 유전자에 대한 염기정보를 얻었다(Fig. 18).

```

psbA-for ->
ATGACTGCAA TTTTAGAGAG ACGCGAAAGC GAAAGCCTAT GGGGTCGCTT CTGTAACCTGG 60
ATAACCAGCA CCGAAAACCG TCTTTACATT GGATGGTTTG GTGTTTTGAT GATACCTACC 120
TTATTGACTG CAACTTCTGT ATTTATTATA GCCTTCATTG CTGCCCTCC AGTAGATATT 180
GATGGTATTC GTGAACCCGT TTCTGGATCT CTACTTTAGG GAAACAATAT TATTTCTGGT 240
GCCATTATTC CTACTTCTGC AGCTATCGGT TTGCACCTTT ATCCAATATG GGAAGCGGCA 300
TCTGTTGATG AGTGGTTATA CAATGGTGGT CCTTATGAGC TAATTGTTCT ACACTTCTTA 360
CTTGGTGTAG CTTGTTATAT GGGTCGTGAG TGGAACTTA GTTCCCGTCT GGGTATGCGC 420
CCTTGGATTG CTGTTGCATA TTCAGTCCG GTTGCAGCGG CTACCGCTGT TTTCTTGATC 480
TACCCAATAG GTCAAGGAAG CTTTTCTGAT GGTATGCCTT TAGGAATTC TGGTACTTTC 540
AACTTCATGA TTGTATTCCA GGCTGAGCAC AATATCCTTA TGCACCCATT TCACATGTTA 600
GGTGTGCGGG GTGTATTCCG CGGCTCCCTA TTTAGCGCTA TGCATGGTTC CTGGTAACT 660
TCTAGTTTGA TCAGGAAAC CACAGAAAAT GAATCTGCTA ATGAAGGTTA CAGATTCCGGT 720
CAAGAGGAAG AACTTACAA TATCGTGGCT GCTCATGGTT ATTTTGGCCG ATTGATCTTC 780
CAATATGCTA GTTTCACAA TTTCTGTTCT TTACTTCT TCTTAGCTGC TTGGCCTGTA 840
GTGGGTATTT GGTTTACTGC TTTAGGTATT AGTACTATGG CGTTCAACCT AAACGGTTTC 900
AATTTCAATC AGTCCGTAGT TGATAGTCAA GGTCTGTAA TTAATACCTG GGCTGATATC 960
ATTAACCGTG CTAACCTTGG TATGGAAGTT ATGCATGAAC CGTAATG 1007
<- psbA-rev

```

Fig. 18. Nucleotide sequence of *psbA* gene from Chuncheoncho. A pair of *psbA* primers is underlined.

NCBI의 Blastn과 Blastx program을 이용하여 분석한 결과 nucleotide 수준에서는 검색된 식물체들에 대해서 99% 이상의 높은 상동성을 보였고, translated amino acid residue 서열비교에서는 100%의 높은 상동성보여 *psbA* 유전자임을 확인하였다(Fig. 19). 추가적으로 국내에 자생하는 전라도, 백년초와 *Opuntia*속의 *O. humifusa*, *O. rufida*, *O. invicta*, *O. basilaris*, *O. erinacea v. ursina*, *O. molesta*, *O. basilaris v. bractglada*, *O. basilaris X O. Violacea v. Sauti Rita*, *O. violacea 'Gd Bush clnie'*, *O. stuopctala*의 10종의 *psbA* 영역을 cloning하여 염기서열을 분석하여 비교하였다. Bioedit 프로그램(Tom hall)을 사용하여 벡터영역을 제거한 후 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 blast algorithm에 따라서 상동성 검색을 실시하였고, Clustal W (1.83) 프로그램을 사용하여 유연관계를 조사하였다. 그 결과 천년초는 *O. violacea 'Gd Bush clnie'*와 100%의 유사도를 나타내었고, 국내 자생종인 전라도, 선인장 및 *Opuntia*속의 다른 선인장과도 99%의 높은 유사도를 보였다.

천년초 *psbA*영역을 다른 선인장들의 sequence를 fasta format으로 정리한 후 Clustal W 프로그램(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)을 이용하여 유연관계를 조사하였다. 그 결과 Fig. 12에서 보는 바와 같이 천년초, 전라도 선인장, *O. humifusa*는 같은 cluster로 분리되어 매우 가까운 근연관계를 나타내었다. 이에 비하여 제주도에 자생하는 백년초 선인장의 경우에는 천년초나 전라도 선인장과는 비교적 원연관계에 있는 것으로 나타나 천년초와 백년초 선인장의 경우 비교적 원연관계에 있는 것으로 사료된다. 그러나 유전자은행에 등록된 *Opuntia*속 선인장들의 *psbA*영역에 대한 유전자 정보가 없기 때문에 천년초의 유연관계를 보다 명확히 규명하는 데는 어려움이 있다. 따라서 본 연구를 통하여 규명된 천년초를 비롯한 *Opuntia*속 선인장의 *psbA* 유전자 등록을 시작으로 보다 많은 동일 속(genus) 선인장의 시료를 확보하여 *psbA* 영역의 유전자분석을 진행하여 보다 명확한 천년초 기원규명에 대한 연구를 수행 할 것이다.

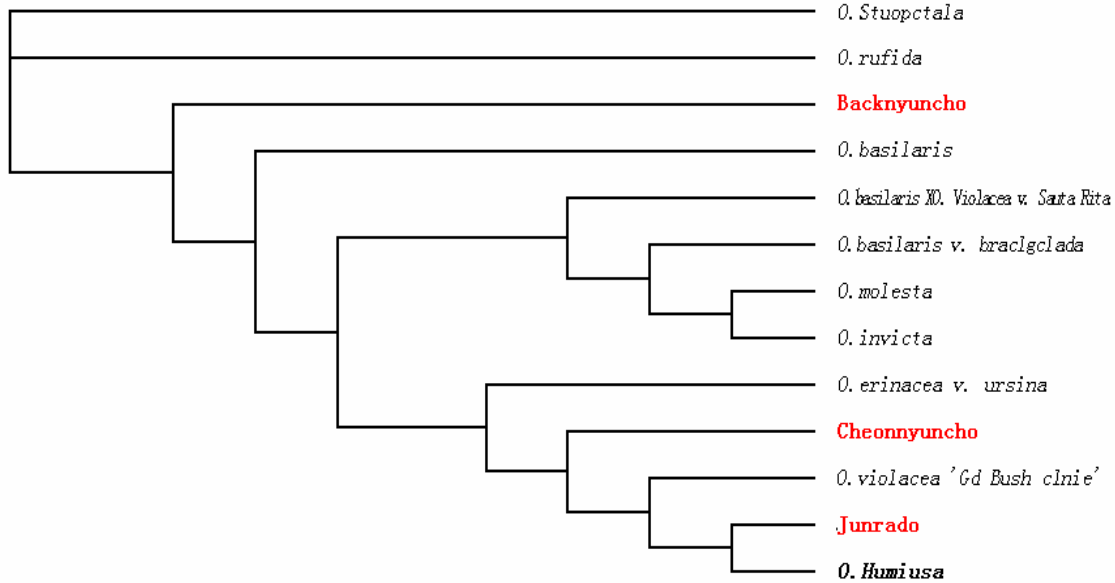


Fig. 19. Phylogenetic analysis of 13 *psbA* genes based on the nucleotide sequence.

2) *rbcL* 유전자 cloning 및 sequence 분석

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit(*rbcL*) 유전자는 식물 genome에서 전사되어 엽록체를 targetting되는 단백질로 탄수화물의 산화·환원에 중요한 역할을 하는 유전자로서 식물종간에 보존성이 높다. 본 연구에서는 국내에서 자생하는 천년초, 백년초, 전라도 선인장과 *Opuntia* 속 외국 손바닥 선인장으로부터 *rbcL* 유전자를 cloning하여 천년초선인장의 유연관계를 규명하고자 하였다. 유전자은행에 등록되어 있는 선인장목 식물들의 *psbA* 유전자들의 염기서열을 비교하여 보존 영역 중 선인장의 염기서열을 비교·분석하여 보존되어 있는 영역에서 5' 영역(5'-GAC TTA TTA TAC TCC CGA ATA TCA ACC CCA-3')과 3' 영역(5'-CAA TTA AGG GAT TTA AGT ACT TAG CCT AGA GTT A-3') 특이적인 *rbcL* primer 쌍을 제작하였다. 이들 제작된 primer를 사용하여 95°C 1 min, 65°C 30sec, 72°C 90sec의 PCR 반응을 35회 실시하여 *psbA* 유전자 영역을 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 cloning하여 염기서열분석을 실시하였다. PCR증폭 산물을 전기영동하여 확인한 후 agarose gel로부터 정제하였고, pGEM-T easy 벡터에 cloning하였다. *rbcL* 유전자의 cloning여부를 확인하고자 *Eco* RI 제한효소를 처리한 후 전기영동하여 insert 유무를 확인하고 염기서열분석을 실시한 결과 천년초선인장으로부터는 1,425 bp의 크기의 *rbcL* 유전자에 대한 염기정보를 얻었다 (Fig. 20). NCBI의 Blastn과 Blastx program을 이용하여 분석한 결과 nucleotide 수준에서는 검색된 상위 100개체들에서 91~98%의 높은 상동성을 나타내었고, translated amino acid residue 서열비교에서는 95~99%의 높은 상동성을 나타내어 천년초의 *rbcL* 유전자임을 확인하였다.

```

rbcl-for ->
GACTTATTAT ACTCCCGAAT ATCAACCCCA GGATACCGAT ATCTTGGCAG CATTCCGAGT 60
AACCCTCAA CCTGGAGTTC CGTCAGAAGA AGCAGGAGCC GCAGTAGCTG GCGAATCTTC 120
TACTGGTACA TGGACAACCTG TATGGACCGA CGGACTTACC AGTCTTGATC GTTACAAAAGG 180
ACGATGCTAC CACATCGATG CCGTTCCTGG AGAAGACAAT CAATATATTT GTTATGTAGC 240
TTACCCATTA GACCTTTTTG AAGAAGGTTT TGTACTAAT ATGTTTACTT CCATTGTGGG 300
TAATGTATTT GGGTTCAAGG CCCTGCGTGC TCTACGTTTG GAGGATTTGC GAATCCCTGT 360
TGCTTATATA AAAACTTTCC AAGGCCCGCC CCACGGTATC CAAGTTGAGA GAGATAAATT 420
GAACAAGTAT GGCCTGCTC TACTGGGATG CACTATTAAG CCGAAATTGG GGTATCCGC 480
TAAAACTAT GGTGAGCAG TTTATGAATG TCTTCGCGGT GGACTTGATT TTACCAAAGA 540
TGACGAAAAC GTGAACTCCC AGCCATTTAT GCGTTGGAGA GACCGTTTCT TATTTTGTGC 600
CGAAGCAATT TATAAAGCAC AGGCCGAAAC AGTGAAATC AAAGGGCATT ACTTGAATGC 660
TACCGCAGGT ACATGCGAAG AAATGATAAA AAGGGCTGTA TTTGCCAGAG AATTGGGTGT 720
TCCTATCGTA ATGCATGACT ACTTAACAGG TGGATTCACT GCAAATACTA GCTTGGCTCA 780
TTATTGCCGA GATAACGGTC TACTCCTTCA CATCCATCGT GCAATGCACG CAGTTATTGA 840
TAGACAGAAG AATCATGGTA TGCACCTCCG TGTACTAGCT AAAGCGTTAC GTCTGTCTGG 900
TGGAGATCAT ATTCATGCTG GTACCGTAGT AGGTAAGCTT GAAGGGGAAA GAGATATCAC 960
TTTAGGCTTT GTTGATTAC TACGTGATGA TTATACTGAA ATAGACGCAA ATCGCGGTAT 1020
TTATTTCACT CAATCTTGGG TTTCCACACC AGGTGTTCTG CCGGTTGCTT CGGGAGGTAT 1080
TCACGTTTGG CATATGCCCG CTCTAACCGA GATCCTTGGG GATGATTCCG TACTACAGTT 1140
CGGTGGAGGA ACTTTAGGGC ACCCTTGGGG GAATGCACCG GGTGCTGTAG CGAATCGAGT 1200
AGCTCTAGAA GCATGTGTAC AAGCTCGTAA TGAGGGACGT GATCTTGCTC GCGAAGGTGC 1260
TACAATTATT CGCGATGCTA GCAAATGGAG TCCTGAACTA GCCGCTGCTT GTGAGGTATG 1320
GAAAGAAATA AAATTTGAGT TCCCAGCAGT GGATACTTTG GATAAAAAGA AAGGATAAAA 1380
GAAAAATAGG ATAACTCTAG GCTAAGTACT TAAATCCCTT AATTG 1425
<- rbcl-rev

```

Fig. 20. Nucleotide sequence of *rbcl* gene from Chunnyeoncho. A pair of *rbcl* primers is underlined.

추가적으로 국내에 자생하는 전라도, 백년초와 *Opuntia*속의 *O. humifusa*, *O. rufida*, *O. violacea* 'Gd Bush clnie'의 5종의 *rbcl* 유전자를 cloning하여 염기서열을 분석하여 비교하였다. Bioedit 프로그램(Tom hall)을 사용하여 벡터영역을 제거한 후 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 blast algorithm에 따라서 상동성 검색을 실시하였고, Clustal W (1.83) 프로그램을 사용하여 유연관계를 조사하였다. 그 결과 천년초는 *O. violacea* 'Gd Bush clnie'와 100%의 유사도를 나타내었고, 국내 자생종인 전라도, 선인장 및 *Opuntia*속의 다른 선인장과도 99%의 높은 유사도를 보였다.

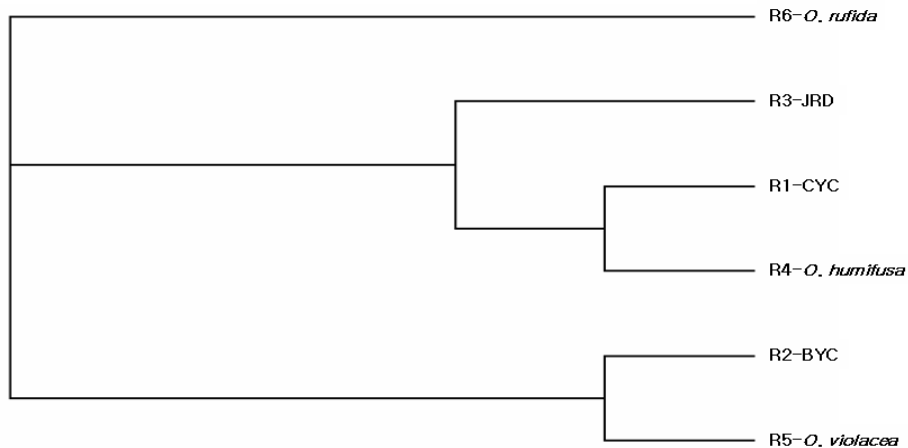


Fig. 21. Phylogenetic analysis of 6 *rbcL* genes based on the nucleotide sequence.

천년초 *rbcL* 유전자를 이용한 유연관계 분석을 위해 5종에서 각각 분리한 *rbcL* sequence를 fasta format으로 정리한 후 Clustal W 프로그램(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)을 이용하여 유연관계를 조사하였다. 그 결과 천년초와 *O. humifusa*가 비교적 근연관계로 분리되었으며, 전라도 선인장도 같은 cluster로 분리되었다(Fig. 21). 이에 비하여 제주도에 자생하는 백년초 선인장의 경우에는 천년초나 전라도 선인장과는 다른 cluster로 분리되어 PSII의 결과와 유사한 것으로 보아 천년초와 백년초 선인장의 경우 비교적 원연관계에 있는 것으로 사료된다. 그러나 유전자은행에 등록된 *Opuntia*속 선인장들의 *rbcL*영역에 대한 유전자 정보가 거의 없고 특히 *Opuntia* 속 선인장은 *Opuntia dillenii*가 유일하게 등록(AY875233.1)되어 있는 실정으로 금후 본 연구를 바탕으로 활성화 될 것으로 기대된다.

마. 천년초 특이적인 SNP primer의 탐색 및 제작

본 연구에서는 천년초의 기원규명과 함께 국내에서 백년초와 혼용되고 있어 이를 구별하기 위해서 천년초로부터 ITS 영역, PSII와 *rbcL* 유전자 분석을 통하여 국내자생 선인장과 외국산 *Opuntia*속 선인장 사이의 유연관계 분석을 시도하였다. 그 결과 분석된 유전자들 사이에서는 90% 이상의 높은 유연관계를 나타내었으며, 그 중에서 특히 천년초 선인장은 국내 자생종인 전라도 선인장과 외국산 부채선인장인 *Opuntia humifusa*와 높은 유연관계를 나타내었다. 천년초를 판별하기 위한 SNP를 탐색한 결과 PSII와 *rbcL*에서는 천년초에만 특이적으로 존재하는 SNP를 발견할 수 없었으나, ITS 유전자 영역에서는 547 bp 영역에서 조사된 다른 선인장의 경우 'C'인데 비하여 천년초와 *Opuntia humifusa*의 경우 'T'이었다(Fig. 22). 또한 620 bp에서는 분석된 다른 선인장의 경우 'T'였기인데 천년초에서만 특이적으로 'G'로 분석되어 이 SNP를 활용하여 천년초 특이적인 분자마커로서 개발을 시도하였다.


```

11-CYC      GGCCTAAAACGGGAGCCCGCGGCGACGAGCTGCAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCC 536
15-OHum    GGCCTAAAACGGGAGCCCGCGGCGACGAGCTGCAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCC 536
13-JRD     GGCCTAAAACGGGAGCCCGCGGCGACGAGCTGCAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCC 536
12-BYC     GGCCTAAAACGGGAGCCCGCGGCGACGAGCTGCAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCC 536
17-ORuf    GGCCTAAAACGGGAGCCCGCGGCGACGAGCTGCAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCC 536
14-OGra    GGCCTAAAACGGGAGCCCGCTGCGACGAGCTGCGGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCC 539
16-OInv    GGCCTAAAACGGGAGCCCGCTGCGACGAGCTGCGGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCC 538
*****

11-CYC      TCGAGGCCCTGTTTGCATCGCGTTCGCGCACGCACGCCGTCGGAGAAGGGCTCGTTGGAC 596
15-OHum    TCGAGGCCCTGTTTGCATCGCGTTCGCGCACGCACGCCGTCGGAGAAGGGCTCGTTGGAC 596
13-JRD     TCGAGGCCCTGTTTGCATCGCGTTCGCGCACGCACGCCGTCGGAGAAGGGCTCGTTGGAC 596
12-BYC     TCGAGGCCCTGTTTGCATCGCGTTCGCGCACGCACGCCGTCGGAGAAGGGCTCGTTGGAC 596
17-ORuf    TCGAGGCCCTGTTTGCATCGCGTTCGCGCACGCACGCCGTCGGAGAAGGGCTCGTTGGAC 596
14-OGra    TAGAGGCCCTGTTTGCATCGCGCGCGCACGCACGCTGCCAGGGAAGGGCTCGTTGGAC 599
16-OInv    TAGAGGCCCTGTTTGCATCGCGCGCGCACGCACGCTGCCAGGGAAGGGCTCGTTGGAC 598
*****

11-CYC      CCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAAACCGTTGCGACCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGC 656
15-OHum    CCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAAACCGTTGCGACCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGC 656
13-JRD     CCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAAACCGTTGCGACCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGC 656
12-BYC     CCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAAACCGTTGCGACCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGC 656
17-ORuf    CCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAAACCGTTGCGACCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGC 656
14-OGra    CCTAAGTTGTTGCTGAAAAGCA-AAACCGTTGCGACCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGC 658
16-OInv    CCTAAGTTGTTGCTGAAAAGCA-AAACCGTTGCGACCCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGC 657
*****

11-CYC      TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 685
15-OHum    TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 685
13-JRD     TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 685
12-BYC     TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 685
17-ORuf    TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 685
14-OGra    TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 687
16-OInv    TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 686
*****

```

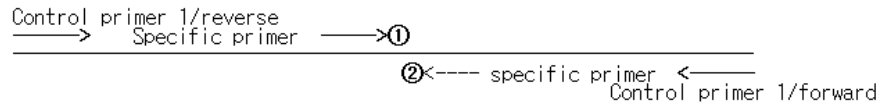
Fig. 22. SNP searching for chunnyeoncho discrimination from baeknyeoncho and others.

SNP primer의 개발 및 분석시스템 개발의 기본원리는 Amplification Refractory Mutation System (ARMS)을 이용한다. 일반적으로 Taq 폴리머라제(polymerase)를 사용하여 PCR 증폭을 할 경우에 primer의 3'-nucleotide에서 주형(template DNA)과 mismatch되면 PCR 증폭은 일어나지 않는데 이것을 이용하여 최대한 특이성이 높은 primer를 제작하여야 한다. 전 제조조건으로 증폭에 사용되는 Taq 폴리머라제는 3'-exonucleolytic proofreading 활성기능이 없는 것을 사용하여야 하고, ARMS primer들은 G/T 혹은 A/C(primer/template) mismatch를 유발하게끔 제작해야 한다(Fig. 23). Primer 제작은 목적으로 하는 유전자의 염기서열 중에서 임의로 적당한 크기의 1차 control primer를 결정하고 1차 control primer 증폭산물의 안쪽에 특이적인 primer 부위를 결정하여 2차 primer를 합성하고 3'nucleotide 부위에서 특이적인 nucleotide의 바로 앞 nucleotide염기를 임의의 nucleotide로 치환함으로써 특이적으로 증폭되도록 하며, 이때 반드시 primer간에 경합을 시키도록 제작하여야 한다. 또한 임의로 염기를 변환처리할 경우에는 mismatch를 최대한 높이기 위해서 구조적으로 다른 염기를 사용하여야 하는데, 치환하고자 하는 nucleotide가 purine 염기의 경우에는 pyrimidine 염기로, pyrimidine일 경우에는 purine 염기로 대처하는 것이 효과적이다. 이러한 원리를 바탕으로 본 연구에서는 천년초 ITS 620 bp 영역의 G를 이용하여 특이적인 SNP primer를 제작하였다. 특이성과 안정성을 높이기 위해서 SNP primer의 길이는 30~60 bp사이로 하여 여러개의 primer를 design 하였다.

1) 목적으로 하는 유전자의 염기서열 중에서 임의로 적당한 크기의 1차 control primer를 결정



2) 1차 control primer 증폭산물의 안쪽에 특이적인 primer 부위를 결정하여 2차 primer 합성 - 3'-nucleotide 부위에서 특이적인 nucleotide의 바로 앞 nucleotide염기를 임의의 nucleotide로 바꾼다.



예) Specific Primer를 design할 경우 (SNP)

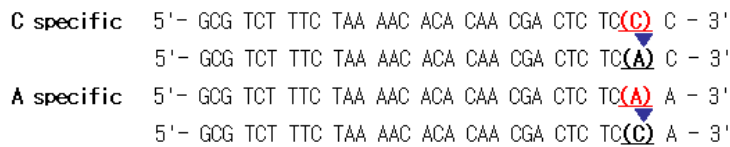


Fig. 23. Scheme of primer design for increasing the specificity of SNP primers.

천년초 판별을 위한 primer 시스템은 control로 500 bp의 DNA 단편과 천년초 특이적인 SNP site 2개를 이용하여 성공적으로 PCR 반응이 되었을 때 3개의 DNA 단편이 증폭되도록 설정하였다(Fig. 24). CYC SNP 1은 547 bp의 SNP를 이용하였고 CYC SNP 2는 620 bp의 SNP를 이용하여 제작하였다. 무작위로 DNA 샘플 또는 시료를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였을 경우에 성공적으로 증폭된다면 500 bp의 control DNA 단편과 140 bp의 CYC SNP 1, 440 bp의 CYC SNP2 DNA 단편이 증폭된다.

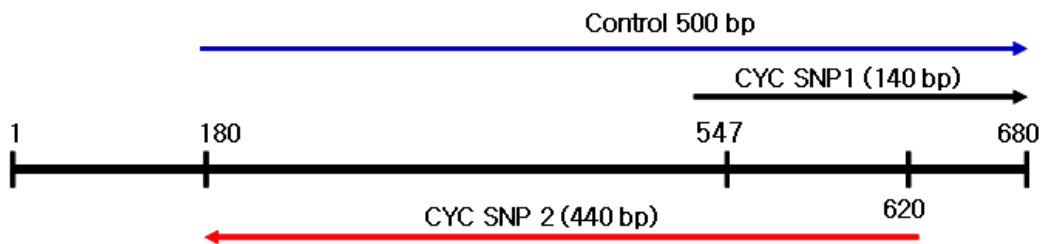


Fig. 24. Schematic diagram for discrimination of chunnyeoncho using CYC SNP primers. Chunnyeoncho specific SNP primers designed for producing specific DNA fragment with 440 bp and 140 bp.

바. SNP primer의 최적 PCR조건 구명

SNP 분석시스템은 각각의 개발되는 SNP에 따라 그 반응특성에 차이가 있기 때문에 각 primer의 특성에 맞게 PCR의 반응조건(DNA의 농도, 증폭회수, primer간의 농도비율, dNTPmix 농도)을 새로이 설정하여야 한다. 제작된 천년초 특이적인 SNP primer를 이용하여 PCR 반응을 조사한 결과 0.5 pmol로 primer를 첨가하여 35 cycle을 하였을 경우에는 전혀 특이성을 나타내지 못하였다(Fig. 25A). Primer의 적정농도를 설정하기 위해서 control primer의 농도를 0.5 pmol로 고정하고 CYC SNP primers 농도를 1~0.001 pmol로 달리하여 조사한 결과 SNP primer 농도가 낮아 질수록 500 bp의 control DNA 단편은 명확히 검출되었으나, SNP 특이적인 밴드는 관찰이 되지 않았다(Fig. 25B). SNP primer의 농도를 0.5 pmol로 고정하고 control primers 농도를 1~0.001 pmol로 달리하여 조사한 결과 첨가농도가 낮아질수록 control 밴드도 관찰이 되지 않아 control primer의 경우 0.1 pmol 이상을 첨가하여야 만이 DNA 단편의 증폭을 관찰할 수 있었다(Fig. 25C). 추가적인 실험을 통하여 control primer 농도는 0.4~0.6 pmol, SNP 농도는 0.2~0.7 pmol 정도로 압축이 되었으며, 상호 조합을 통하여 최적 PCR 반응 조건을 탐색 중에 있다.

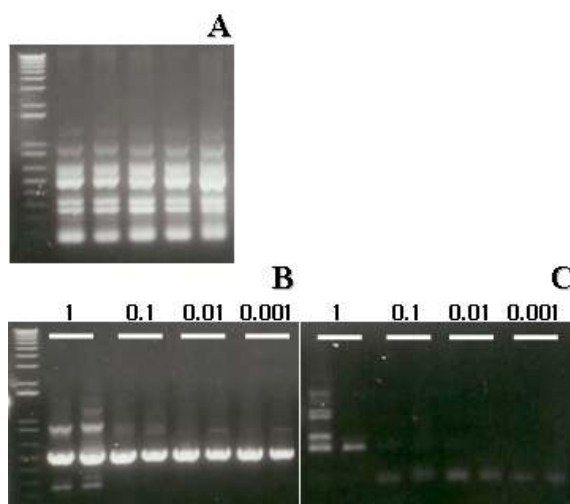


Fig. 25. Analysis of optimal PCR reaction condition for Chunnyeoncho discrimination using SNP primers. A. PCR amplification with 35 cycles; B. 1, 0.1, 0.01, and 0.001 pmol CYC SNP primers combination with 0.5 pmol control primer; C. 1, 0.1 0.01 and 0.001 pmol control primer combination with 0.5 pmol CYC SNP primers.

사. 천년초, 백년초 구별을 위한 one-step kit 개발

1) 적정 Taq polymerase의 농도 분석

천년초의 기원규명 및 관별을 위해 분석된 ITS rDNA, PSII, *rbcl* 유전자들의 염기서열정보로부터 SNP를 탐색하여 primer를 제작하였다. Amplification Refractory Mutation

System (ARMS)을 이용하여 천년초의 판별을 위한 최적 PCR조건을 탐색하기 위해서 우선적으로 *Taq* polymerase의 농도설정분석을 실시하였다. 일반적으로 *Taq* polymerase를 사용하여 PCR증폭을 할 경우에 primer의 3'-nucleotide에서 주형(template DNA)과 mismatch되면 PCR증폭은 일어나지 않는데, 이것을 이용하여 최대한 특이성이 높게 제작된 SNP primer쌍을 제작하였다. 실험에 사용한 *Taq* polymerase(Takara, Japan)는 3'-exonucleolytic proofreading 활성기능이 없는 것을 사용하였다. 농도를 0.1 U, 0.25 U, 0.5 U, 0.75 U, 1.0 U, 1.25 U, 1.5 U, 2.0 U로 농도를 달리하여 실험을 실시하였다. 그 결과 0.5 U 이하에서는 PCR 증폭산물의 농도가 낮아졌고 0.75~1.25 U 농도범위에서 가장 적합하였다. 1.5 U 이상의 고농도에서도 PCR 증폭은 잘 되었으나, pseudoband가 관찰이 되었으며, 단가 면에서도 kit 개발을 위해서는 적정하지 않는 것으로 판단되었다.

2) 적정 primer 및 dNTPmix 농도분석

SNP primer를 이용한 천년초 판별에는 다중 primer를 사용하기 때문에 혼합되어 있는 primer 쌍간의 특성에 맞게 PCR 반응에서 DNA 농도, 증폭회수, primer간의 농도비율, dNTPmix 농도 등 각각의 조건을 설정하여야 한다. PCR 반응에 첨가한 control primer와 천년초 특이 SNP primer를 0.5 pmol 농도로 동일하게 첨가하여 PCR 증폭을 한 결과 전혀 특이성을 보여주지 못하였다. Primer의 적정농도를 설정하기 위해서 control primer의 농도를 0.5 pmol로 고정하고 CYC SNP primers 농도를 2.0~0.5 pmol로 달리하여 조사한 결과 SNP primer 농도가 낮아 질수록 500 bp의 control DNA 단편은 명확히 검출되었으며, SNP 특이적인 밴드도 구분되어 졌다. PCR 증폭에서 중요한 요인 중의 하나가 dNTPmix 농도로 최적농도를 규명하기 위해서 10 uM, 25 uM, 50 uM, 75 uM, 100 uM, 125 uM, 150 uM, 200 uM로 설정하여 실험한 결과, 50 uM 농도 이하에서는 PCR 증폭이 약하였다. 그러나 75 uM 이상에서는 강한 band를 관찰 할 수 있어 천년초 SNP primer를 사용할 경우에는 dNTPmix 농도는 75 uM 정도가 적당하다고 판단되었다.

3) One-step kit화

천년초 특이적인 SNP primer를 이용한 간편 구별키트를 위한 최적 조건은 경제성을 고려하여 template DNA 25 ng, *Taq* polymerase 0.75 U, dNTPmix는 75 uM, SNP primer 농도는 0.25 uM로 설정하였다. 위 구성요소중에서 template를 제외한 *Taq* polymerase, dNTPmix, SNP primer와 PCR buffer 농도를 2배농도로 첨가하고 여기에 안전성을 부여하기 위해서 glycerol을 1% 농도를 첨가하여 잘 혼합한 후 시각화를 위해서 bromophenol blue를 첨가하여 1 mL씩 원심분리 튜브에 cocktail하여 -20°C 저장하였다. One-step kit을 사용하여 천년초와 백년초, 전라도 선인장을 분석한 결과 천년초 특이적인 SNP1 primer (5-CGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCCTTCGAGGCCYYT-3)의 산물인 140 bp의 DNA 단편이 관찰되어 구별할 수 있었으나, SNP2 primer (5-CGCCTGACCTGGGGTCGCAACGGTTTTGTGCTTTYC-3)의 산물로 예측되는 440 bp DNA 단편은 명확하지 않았다(Fig. 26). 이러한 원인은 여러 가지로 생각할 수 있는데

primer간의 경합에 의한 가능성 높다. 그러나 명확히 천년초선인장은 제주도에 자생하는 백년초 선인장과 전라도 선인장과는 구별이 가능하였다.

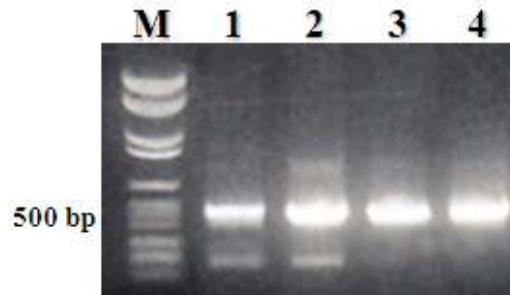


Fig. 26. Discrimination of CheonNyeonCho from BaekNyeonCho and Junrado Opuntia using CheonNyeonCho specific SNP primer. 1, CheonNyeonCho stem; 2, CheonNyeonCho root; 3, BaekNyeonCho stem; 4, Junrado stem.

아. 천년초 다당체 함량분석

1) 천년초 줄기, 열매의 산성 다당체 함량분석

천년초로부터 산성다당체분석을 위해서 spectrophotometer(Armersharm Bioscience, USA)를 이용한 산성다당체의 함량분석을 실시하였다. 산성다당체 정량에는 glucuronic acid를 이용한 Carbazole method를 참고로 하여 분석을 실시하였다. 산성다당체를 정량하기 위해서 standard 물질로서 1mg/ml glucuronic acid (Sigma) stock solution을 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ l씩 각각 준비하고 여기에 증류수를 각각 495, 490, 480, 460, 440, 420, 400 μ l씩 첨가하여 총 500 μ l volume이 되도록 한 후 spectrophotometer를 사용하여 표준 정량곡선을 도출하였다. 천년초 시료로부터의 산성다당체 추출은 우선 잎줄기를 가지고 실시하였다. 천년초 시료 1 g에 H_2SO_4 원액을 3ml 넣고, 80 $^{\circ}C$ 에서 20분간 가열한 후 물에서 식힌 후 0.1% carbazol 시약을 각 tube에 100 μ l씩 넣고 실온에서 2시간 방치하였다. 반응물은 535 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 측정 후 glucuronic acid와 정량·비교하여 천년초의 산성다당체 함량분석을 위한 실험조건을 설정하였다. 그 결과 천년초 줄기에서는 15 \pm 3.7%, 열매조직에서는 14.1 \pm 2.5% 정도의 함량이 관찰되었다.

2) 천년초 줄기, 열매의 중성당 함량분석

중성당 분석은 phenol-sulfuric acid method을 참고로 실시하였다. 중성당의 정량은 glucose(sigma) 1mg/ml 용액을 준비한 후 이를 각각 20, 40, 60, 80, 100 μ l 씩 각각 준비하고 여기에 증류수를 각각 첨가하여 200 μ l씩 조정 후 490 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 표준 정량곡선을 도출하였다. 천년초 시료로부터의 중성당 추출은 잎줄기시료를 반응용액 [200 μ l phenol solution(5% v/v), 200 μ l sample, 1 ml H_2SO_4 (30%)]에 첨가하고

vortexing으로 10분간 반응시켰다. 실온에서 30분후 정치한 후 490nm에서 분광을 측정하여 중성당 분석을 실시하였다. 그 결과 천년초의 잎줄기와 열매 조직으로부터 이들 성분에 대한 분석을 진행한 결과 잎줄기에서는 $27 \pm 5.2\%$, 열매조직에서는 $25 \pm 7.5\%$ 정도의 함량이 관찰되었다.

Appendix I. ITS sequences of *Opuntia* genus analyzed in this study.

① CheonNyeonCho

```
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAACCTGCCCAGC
AGAAAGACCCGCGAACATGTTTTCCCATGAACACGCAGGGAGGGGCGCCTCTGCCCCATCCCTGGCGCAAC
AACAAACCCCGCGCGAACCCGCGCAAGGAACACGAACTAAAGGCGTGCCCGCCCGCGCCCGGTCCGCCGGC
ACGCGGGGGCGGCACCTGTCCCTACTTAAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA
CGCAAGTTGCGCCCAAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCTCCCCCCCG
CCTGCCGGGGGAAGGATGATGGCCTCCCGTACCCTAACCGGGCGCGGCTGGCCTAAAACGGGAGCCCGCGG
CGACGAGCTGCAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCCTTCGAGGCCCTGTTTGCATCGCGTCGCGCACGC
ACGCCGTGCGAGAAGGGCTCGTTGGACCCTAAGGTGTTGCGGAAAAGCACAAACCGTTGCGACCCAGGTC
AGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

② JunRaDo

```
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAACCTGCCCAGC
AGAAAGACCCGCGAACATGTTTTCCCATGAACACGCAGGGAGGGGCGCCTCTGCCCCATCCCTGGCGCAAC
AACAAACCCCGCGCGAACCCGCGCAAGGAACACGAACTAAAGGCGTGCCCGCCCGCGCCCGGTCCGCCGGC
ACGCGGGGGCGGCACCTGTCCCTACTTAAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA
CGCAAGTTGCGCCCAAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCTCCCCCCCG
CCTGCCGGGGGAAGGATGATGGCCTCCCGTACCCTAACCGGGCGCGGCTGGCCTAAAACGGGAGCCCGCGG
CGACGAGCTGCAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCCTTCGAGGCCCTGTTTGCATCGCGTCGCGCACGCA
CGCCGTGCGAGAAGGGCTCGTTGGACCCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAAACCGTTGCGACCCAGGTC
GGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

③ *Opuntia humifusa*

```
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAACCTGCCCAGC
AGAAAGACCCGCGAACATGTTTTCCCATGAACACGCAGGGAGGGGCGCCTCTGCCCCATCCCTGGCGCAAC
AACAAACCCCGCGCGAACCCGCGCAAGGAACACGAACTAAAGGCGTGCCCGCCCGCGCCCGGTCCGCCGAC
ACGCGGGGGCGGCACCTGTCCCTACTTAAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA
CGCAAGTTGCGCCCAAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCTCCCCCCCG
CCTGCCGGGGGAAGGATGATGGCCTCCCGTACCCTAACCGGGCGCGGCTGGCCTAAAACGGGAGCCCGCGG
CGACGAGCTGCAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCCTTCGAGGCCCTGTTTGCATCGCGTCGCGCACGC
ACGCCGTGCGAGAAGGGCTCGTTGGACCCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAAACCGTTGCGACCCAGGTC
AGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

④ *Opuntia rufida*

```
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAACCTGCCCAGC
AGAAAGACCCGCGAACATGTTTTCCCATGAACACGCAGGGAGGGGCGCCTCTGCCCCATCCCTGGCGCAAC
AACAAACCCCGCGCGAACCCGCGCAAGGAACACGAACTAAAGGCGTGCCCGCCCGCGCCCGGTCCGCCGGC
GCGCGGGGGCGGCACCTGTCCCTACTTAAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA
CGCAAGTTGCGCCCAAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCTCCCCCCCG
CCTGCCGGGGGAAGGATGATGGCCTCCCGTACCCTAACCGGGCGCGGCTGGCCTAAAACGGGAGCCCGCGG
CGACGAGCTGCAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCCTTCGAGGCCCTGTTTGCATCGCGTCGCGCACGCA
CGCCGTGCGAGAAGGGCTCGTTGGACCCTAAGGTGTTGCTGAAAAGCACAAACCGTTGCGACCCAGGTC
GGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

⑤ *Opuntia invicta*

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAACCTGCCGAGC
AGAAAGACCCGCGAACATGTTTTCCCATGAACACGCGGGGAGGGGCGCCTCTGCCCCCTCCCTGGCGCAAC
AACAAACCCCGGCGCAACCGCGCCAAGGAACACGAACCTAATGGCGTGCCCGCCTGCGCCCGGTCCGCGCGC
GCGCGAGGGCGGCACCTGTCCCTACTTAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCG
ATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAAC
GCAAGTTGCGCCGAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCTCCCCCCCCG
CCCGTGGGGGGGAAGGATGATGGCCTCCCGTGCCTAATCGGGCGCGGCTGGCCTAAAACGGGAGCCCGCT
GCGACGAGCTGCGGCGCGGATTGGTGGTGGACGAGGCCTTAGAGGCCCGGTTTGCATCGCGCCGCGCACGC
ACGCTGCCAGGGAAGGGCTCGTTGGACCCTAAGTTGTTGCTGAAAAGCAAACCGTTGCGACCCAGGTCA
GGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

⑥ *Opuntia grahamii*

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAACCTGCCAGC
AGAAAGACCCGCGAACATGTTTTCCCATGAACACGCGGGGAGGGGCGCCTCTGCCCCCTCCCTGGCGCAAC
AACAAACCCCGGCGCAACCGCGCCAAGGAACACGAACCTAATGGCGTGCCCGCCGCGCCCGGTCCGCGCGC
GCGCGGGGGCGGCACCTGTCCCTACTTAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCG
ATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAAC
GCAAGTTGCGCCGAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCTCCCCCCCCG
GCCCCTGGGGGGGAAGGATGATGGCCTCCCGTGCCTAATCGGGCGCGGCTGGCCTAAAACGGGAGCCCGC
TGGACGAGCTGCGGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCCTTAGAGGCCCGGTTTGCATCGCGCCGCGCACGC
CACGCTGCCAGGGAAGGGCTCGTTGGACCCTAAGTTGTTGCTGAAAAGCAAACCGTTGCGACCCAGGTCA
AGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

⑦ BaekNyeonCho (AB250211, *Opuntia ficus-indica*)

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAACCTGCCAGC
AGAAAGACCCGCGAACATGTTTTCCCATGAACACGCGGGGAGGGGCGCCTCTGCCCCCTCCCTGGCGCAAC
AACAAACCCCGGCGCAACCGCGCCAAGGAACACGAACCTAATGGCGTGCCCGCCGCGCCCGGTCCGCGCGC
GCGCGGGGGCGGCACCTGTCCCTACTTAAAACGTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATC
GATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA
CGCAAGTTGCGCCCAAGCCTTCCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCTCCCCCCCCG
CCTGCCGGGGGAAGGATGATGGCCTCCCGTACCCTAACCGGGCGCGGCTGGCCTAAAACGGGAGCCCGCGG
CGACGAGCTGCAGCGGCGATTGGTGGTGGACGAGGCCTTCGAGGCCCGGTTTGCATCGCGTTCGCGCACGCA
CGCCCTCGGAGAAGGGCTCGTTGGACCCTAAGTTGTTGCTGAAAAGCAAACCGTTGCGACCCAGGTCA
GGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Appendix II. *psbA* nucleotide sequence of *Opuntia* genus analyzed in this study.

① CheonNyeonCho

ATGACTGCAATTTTAGAGAGACGCGAAAGCGAAAGCCTATGGGGTCGCTTCTGTAACCTGGATAAACCAG
CACCGAAAACCGTCTTTACATTGGATGGTTTGGTGTGTTTGGATGATACCTACCTTATTGACTGCAACTT
CTGTATTTATTATAGCCTTCATTGCTGCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAACCCGTTTCT
GGATCTCTACTTTACGGAACAATATTTCTGGTGCCATTTATTCCTACTTCTGCAGCTATCGGTTT
GCACTTTTATCCAATATGGGAAGCGGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGTCTTATGAGC
TAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTCGTGAGTGGGAACCTAGTTCCCGT
CTGGGTATGCGCCCTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCGGTTGCAGCGGCTACCGCTGTTTTCTTG
ATCTACCAATAGGTCAAGGAAGCTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATTTCTGGTACTTTCAACTT
CATGATTGTATTCCAGGCTGAGCAACAATATCCTATGCACCCATTTACATGTTAGGTGTGCGGGTG
TATTCGGCGGCTCCCTATTTAGCGCTATGCATGGTTCCCTGGTAACCTTAGTTTGTATCAGGAAACC
ACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAACTTACAATATCGTGG
CTGCTCATGGTTATTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTTCTCGTTCTTTACAC
TTCTTCTTAGCTGCTTGGCCTGTAGTGGGTATTTGGTTTACTGCTTTAGGTATTAGTACTATGGCGTT
CAACCTAAACGGTTTTCAATTTCAATCAGTCCGTAGTTGATAGTCAAGGTCGTGTAATTAATACCTGGG
CTGATATCATTAAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACCGTAATG

② BaekNyeonCho

ATGACTGCAATTTTAGAGAGACGCGAAAGCGAAAGCCTATGGGGTCGCTTCTGTAACCTGGATAAACCAG
CACCGAAAACCGTCTTTACATTGGATGGTTTGGCGTTTTGATGATACCTACCTTATTGACTGCAACTT
CTGTATTTATTATAGCCTTCATTGCTGCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAACCCGTTTCT
GGATCTCTACTTTACGGAACAATATTTCTGGTGCCATTTATTCCTACTTCTGCAGCTATCGGTTT
GCACTTTTATCCAATATGGGAAGCGGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGTCTTATGAGC
TAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTCGTGAGTGGGAACCTAGTTTCCCGT
CTGGGTATGCGCCCTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCGGTTGCAGCGGCTACCGCTGTTTTCTTG

ATCTACCCAATAGGTCAAGGAAGCTTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATTTCTGGTACTTTCAACTT
CATGATTGTATTCAGGCTGAGCACAACATCCTTATGCACCCATTCACATGTTAGGTGTCGCGGGTG
TATTCGGCGGCTCCCTATTTAGCGCTATGCATGGTTCCTTGGTAACTTCTAGTTTGTATCAGGGAAACC
ACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAACTTACAATATGTGG
CTGCTCATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTTCTCGTTCTTTACAC
TTCTTCTTAGCTGCTTGGCCTGTAGTGGTATTTGGTTTACTGCTTTAGGTATTAGTACTATGGCGTT
CAACCTAAACGGTTTTCAATTTCAATCAGTCCGTAGTTGATAGTCAAGGTCGTGTAATTAATACCTGGG
CTGATATCATTAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACCGTAATG

③ *JunRaDo*

ATGACTGCAATTTTAGAGAGACGCGAAAGCGAAAGCCTATGGGGTCGCTTCTGTAACCTGGATAAACCAG
CACCGAAAACCGTCTTTACATTGGATGGTTTGGTGTTTTGGATGATACCTACCTTATTGACTGCAACTT
CTGTATTTATTATAGCCTTCATTGCTGCCCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAACCCGTTTCT
GGATCTCTACTTTACGGAACAATATTTTCTGGTGCCATTTATTCCTACTTCTGCAGCTATCGGGTT
GCACTTTTATCCAATATGGGAAGCGGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGTCTTATGAGC
TAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTCGTGAGTGGGAACCTAGTTTCCGT
CTGGGTATGCGCCCTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCGGTTGCAGCGGCTACCGCTGTTTTCTTG
ATCTACCCAATAGGTCAAGGAAGCTTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATTTCTGGTACTTTCAACTT
CATGATTGTATTCAGGCTGAGCACAATATCCTTATGCACCCATTTACATGTTAGGTGTCGCGGGTG
TATTCGGCGGCTCCCTATTTAGCGCTATGCATGGTTCCTTGGTAACTTCTAGTTTGTATCAGGGAAACC
ACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAACTTACAATATCGTGG
CTGCTCATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTTCTCGTTCTTTACAC
TTCTTCTTAGCTGCTTGGCCTGTAGTGGGATTTGGTTTACTGCTTTAGGTATTAGTACTATGGCGTT
CAACCTAAACGGTTTTCAATTTCAATCAGTCCGTAGTTGATAGTCAAGGTCGTGTAATTAATACCTGGG
CTGATATCATTAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACCGTAATG

④ *Opuntia Humifusa*

ATGACTGCAATTTTAGAGAGACGCGAAAGCGAAAGCCTATGGGGTCGCTTCTGTAACCTGGATAAACCAG
CACCGAAAACCGTCTTTACATTGGATGGTTTGGTGTTTTGGATGATACCTACCTTATTGACTGCAACTT
CTGTATTTATTATAGCCTTCATTGCTGCCCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAACCCGTTTCT
GGATCTCTACTTTACGGAACAATATTTTCTGGTGCCATTTATTCCTACTTCTGCAGCTATCGGTTT
GCACTTTTATCCAATATGGGAAGCGGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGTCTTATGAGC
TAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTCGTGAGTGGGAACCTAGTTTCCGT
CTGGGTATGCGCCCTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCGGTTGCAGCGGCTACCGCTGTTTTCTTG
ATCTACCCAATAGGTCAAGGAAGCTTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATTTCTGGTACTTTCAACTT
CATGATTGTATTCAGGCTGAGCACAATATCCTTATGCACCCATTTACATGTTAGGTGTCGCGGGTG
TATTCGGCGGCTCCCTATTTAGCGCTATGCATGGTTCCTTGGTAACTTCTAGTTTGTATCAGGGAAACC
ACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAACTTACAATATCGTGG
CTGCTCATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTTCTCGTTCTTTACAC
TTCTTCTTAGCTGCTTGGCCTGTAGTGGGATTTGGTTTACTGCTTTAGGTATTAGTACTATGGCGTT
CAACCTAAACGGTTTTCAATTTCAATCAGTCCGTAGTTGATAGTCAAGGTCGTGTAATTAATACCTGGG
CTGATATCATTAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACCGTAATG

⑤ *Opuntia rufida*

ATGACTGCAATTTTAGAGAGACGCGAAAGCGAAAGCCTATGGGGTCGCTTCTGTAACCTGGATAAACCAG
CACCGAAAACCGTCTTTACATTGGATGGTTTGGCCTTTTGGATGATACCTACCTTATTGACTGCAACTT
CTGTATTTATTATAGCCTTCATTGCTGCCCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAACCCGTTTCT
GGATCTCTACTTTACGGAACAATATTTTCTGGTGCCATTTATTCCTACTTCTGCAGCTATCGGTTT
GCACTTTTATCCAATATGGGAAGCGGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGTCTTATGAGC
TAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTCGTGAGTGGGAACCTAGTTTCCGT
CTGGGTATGCGCCCTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCGGTTGCAGCGGCTACCGCTGTTTTCTTG
ATCTACCCAATAGGTCAAGGAAGCTTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATTTCTGGTACTTTCAACTT
CATGATTGTATTCAGGCTGAGCACAACATCCTTATGCACCCATTTACATGTTAGGTGTCGCGGGTG
TATTCGGCGGCTCCCTATTTAGCGCTATGCATGGTTCCTTGGTAACTTCTAGTTTGTATCAGGGAAACC
ACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAACTTACAATATGTGG
CTGCTCATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTTCTCGTTCTTTACAC
TTCTTCTTAGCTGCTTGGCCTGTAGTGGGATTTGGTTTACTGCTTTAGGTATTAGTACTATGGCGTT
CAACCTAAACGGTTTTCAATTTCAATCAGTCCGTAGTTGATAGTCAAGGTCGTGTAATTAATACCTGGG
CTGATATCATTAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACCGTAATG

⑥ *Opuntia invicta*

ATGACTGCAATTTTAGAGAGACGCGAAAGCGAAAGCCTATGGGGTCGCTTCTGTAACCTGGATAAACCAG
CACCGAAAACCGTCTTTACATTGGATGGTTTGGTGTTTTGGATGATCCCTACCTTATTGACTGCAACTT
CTGTATTTATTATAGCCTTCATTGCTGCCCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAACCCGTTTCT

GGATCTCTACTTTACGGAAACAATATTATTTCTGGTGCCATTATTCCTACTTCTGCAGCTATCGGTTTT
GCACTTTTATCCAATATGGGAAGCGGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGTCTTATGAGC
TAATTGTTCTACACTTCTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTGCTGAGTGGGAACCTAGTTCCCGT
CTGGGTATGCGCCCTTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCGGTTGCAGCGGCTACCGCTGTTTTCTTG
ATCTACCCAATAGGTCAAGGAAGCTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATTTCTGGTACTTTCAATTT
CATGATTGTATTCCAGGCTGAGCACAACATTTCTATGCACCCATTTACATGTTAGGTGTCGCGGGTG
TATTCGGCGGTTCCCTATTTAGCGCTATGCATGGTTCCTTGGTAACTTCTAGTTTTGATCAGGGAAACC
ACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAAACTTACAATATCGTGG
CTGCTCATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTTCTCGTTCTTTACAC
TTCTTCTTAGCCGCTTGGCCTGTAGTGGGTATTTGGTTTTACTGCTTTAGGTATTAGTACTATGGCGTT
CAACCTAAACGGTTTTCAATTTCAATCAGTCCGTAGTTGATAGTCAAGGTGCTGTAATTAATACCTGGG
CTGATATCATTAAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACCGTAATG

⑦ *Opuntia basilaris*

ATGACTGCAATTTTAGAGAGACGCGAAAGCGAAAGCCTATGGGGTCGCTTCTGTAACCTGGATAAACCAG
CACCGAAAACCGTCTTTACATTGGATGGTTTTGGTGTTTTGGTATACCTACCTTATTGACTGCAACTT
CTGTATTTATTATAGCCTTCATTGCTGCCCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAACCCGTTTTCT
GGATCTCTACTTTACGGAAACAATATTATTTCTGGTGCCATTATTCCTACTTCTGCAGCTATCGGTTTT
GCACTTTTATCCAATATGGGAAGCGGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGTCTTATGAGC
TAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTGCTGAGTGGGAACCTAGTTCCCGT
CTGGGTATGCGCCCTTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCGGTTGCAGCGGCTACCGCTGTTTTCTTG
ATCTACCCAATAGGTCAAGGAAGCTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATTTCTGGTACTTTCAACTT
CATGATTGTATTCCAGGCTGAGCACAACATCTTATGCACCCATTTACATGTTAGGTGTCGCGGGTG
TATTCGGCGGCTCCCTATTTAGCGCTATGCATGGTTCCTTGGTAACTTCTAGTTTTGATCAGGGAAACC
ACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAAACTTACAATATCGTGG
CTGCTCATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTTCTCGTTCTTTACAC
TTCTTCTTAGCTGCTTGGCCTGTAGTGGGTATTTGGTTTTACTGCTTTAGGTATTAGTACTATGGCGTT
CAACCTAAACGGTTTTCAATTTCAATCAGTCCGTAGTTGATAGTCAAGGTGCTGTAATTAATACCTGGG
CTGATATCATTAAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACCGTAATG

⑧ *Opuntia erinacea v. ursina*

ATGACTGCAATTTTAGAGAGACGCGAAAGCGAAAGCCTATGGGGTCGCTTCTGTAACCTGGATAAACCAG
CACCGAAAACCGTCTTTACATTGGATGGTTTTGGTGTTTTGGTATACCTACCTTATTGACTGCAACTT
CTGTATTTATTATAGCCTTCATTGCTGCCCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAACCCGTTTTCT
GGATCTCTACTTTACGGAAACAATATTATTTCTGGTGCCATTATTCCTACTTCTGCAGCTATCGGTTTT
GCACTTTTATCCAATATGGGAAGCGGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGTCTTATGAGC
TAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTGCTGAGTGGGAACCTAGTTCCCGT
CTGGGTATGCGCCCTTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCGGTTGCAGCGGCTACCGCTGTTTTCTTG
ATCTACCCAATAGGTCAAGGAAGCTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATTTCTGGTACTTTCAACTT
CATGATTGTATTCCAGGCTGAGCACAACATCTTATGCACCCATTTACATGTTAGGTGTCGCGGGTG
TATTCGGCGGCTCCCTATTTAGCGCTATGCATGGTTCCTTGGTAACTTCTAGTTTTGATCAGGGAAACC
ACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAAACTTACAATATCGTGG
CTGCTCATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTTCTCGTTCTTTACAC
TTCTTCTTAGCTGCTTGGCCTGTAGTGGGTATTTGGTTTTACTGCTTTAGGTATTAGTACTATGGCGTT
CAACCTAAACGGTTTTCAATTTCAATCAGTCCGTAGTTGATAGTCAAGGTGCTGTAATTAATACCTGGG
CTGATATCATTAAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACCGTAATG

⑨ *Opuntia molesta*

ATGACTGCAATTTTAGAGAGACGCGAAAGCGAAAGCCTATGGGGTCGCTTTTGTAACTGGATAAACCAG
CACCGAAAACCGTCTTTACATTGGATGGTTTTGGTGTTTTGGTATACCTACCTTATTGACTGCAACTT
CTGTATTTATTATAGCCTTCATTGCTGCTCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAACCCGTTTTCT
GGATCTCTACTTTACGGAAACAATATTATTTCTGGTGCCATTATTCCTACTTCTGCAGCTATCGGTTTT
GCACTTTTATCCAATATGGGAAGCGGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGTCTTATGAGC
TAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTGCTGAGTGGGAACCTAGTTCCCGT
CTGGGTATGCGCCCTTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCGGTTGCAGCGGCTACCGCTGTTTTCTTG
ATCTACCCAATAGGTCAAGGAAGCTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATTTCTGGTACTTTCAACTT
CATGATTGTATTCCAGGCTGAGCACAACATCTTATGCACCCATTTACATGTTAGGTGTCGCGGGTG
TATTCGGCGGTTCCCTATTTAGCGCTATGCATGGTTCCTTGGTAACTTCTAGTTTTGATCAGGGAAACC
ACAGAAAACGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAAACTTACAATATCGTGG
CTGCTCATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTTCTCGTTCTTTACAC
TTCTTCTTAGCTGCTTGGCCTGTAGTGGGTATTTGGTTTTACTGCTTTAGGTATTAGTACTATGGCGTT
CAACCTAAACGGTTTTCAATTTCAATCAGTCCGTAGTTGATAGTCAAGGTGCTGTAATTAATACCTGGG
CTGATATCATTAAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACCGTAATG

⑩ *Opuntia basilaris* v. *braclglada*

ATGACTGCAATTTT TAGAGAGACGCGAAAGCGAAAGCCTATGGGGTCGCTTCTGTAACCTGGATAACCAG
CACCGAAAACCGTCTTTACATTGGATGGTTTGGTGTGTTTGGATGATACCTACCTTATTGACTGCAACTT
CTGTATTTATTATAGCCTTCATTGCTGCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAACCCGTTTCT
GGATCTCTACTTTACGGAACAATAATTATTTCTGGTGCCATTATTCCTACTTCTGCAGCTATCGGTTT
GCACTTTTATCCAATATGGGAAGCGGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGTCCTTATGAGC
TAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTCGTGAGTGGGAACCTAGTTTCCGT
CTGGGTATGCGCCCTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCGGTTGCAGCGGCTACCGCTGTTTCTTG
ATCTACCCAATAGGTCAAGGAAGCTTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATTTCTGGTACTTTCAACTT
CATGATTGTATTCCAGGCTGAGCACAACATCCTTATGCACCCATTCACATGTTAGGTGTCGCGGGTG
TATTCGGCGGCTCCCTATTTAGCGCTATGCATGGTTCCCTGGTAACTTCTAGTTTGTATCAGGGAAACC
ACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAACTTACAATATCGTGG
CTGCTCATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTTCTCGTTCTTTACAC
TTCTTCTAGCTGCTTGGCCTGTAGTGGGTTATTTGGTTTACTGCTTTAGGTATTAGTACTATGGCGTT
CAACCTAAACGGTTTCAATTTCAATCAGTCCGTAGTTGATAGTCAAGGTCGTGTAATTAATACCTGGG
CTGATATCATTAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACCGTAATG

⑪ *Opuntia basilaris* × *O. violacea* v. *Sauta Rita*

ATGACTGCAATTTT TAGAGAGACGCGAAAGCGAAAGCCTATGGGGTCGCTTCTGTAACCTGGATAACCAG
CACCGAAAACCGTCTTTACATTGGATGGTTTGGTGTGTTTGGATGATACCTACCTTATTGACTGCAACTT
CTGTATTTATTATAGCCTTCATTGCTGCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAACCCGTTTCT
GGATCTCTACTTTACGGAACAATAATTATTTCTGGTGCCATTATTCCTACTTCTGCAGCTATCGGTTT
GCACTTTTATCCAATATGGGAAGCGGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGTCCTTATGAGC
TAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTCGTGAGTGGGAACCTAGTTTCCGT
CTGGGTATGCGCCCTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCGGTTGCAGCGGCTACCGCTGTTTCTTG
ATCTACCCAATAGGTCAAGGAAGCTTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATTTCTGGTACTTTCAACTT
CATGATTGTATTCCAGGCTGAGCACAACATCCTTATGCACCCATTCACATGTTAGGTGTCGCGGGTG
TATTCGGCGGCTCCCTATTTAGCGCTATGCATGGTTCCCTGGTAACTTCTAGTTTGTATCAGGGAAACC
ACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAACTTACAATATCGTGG
CTGCTCATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTTCTCGTTCTTTACAC
TTCTTCTTAGCTGCTTGGCCTGTAGTGGGTTATTTGGTTTACTGCTTTAGGTATTAGTACTATGGCGTT
CAACCTAAACGGTTTCAATTTCAATCAGTCCGTAGTTGATAGTCAAGGTCGTGTAATTAATACCTGGG
CTGATATCATTAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACCGTAATG

⑫ *Opuntia violacea* "Gd Bush clnie"

ATGACTGCAATTTT TAGAGAGACGCGAAAGCGAAAGCCTATGGGGTCGCTTCTGTAACCTGGATAACCAG
CACCGAAAACCGTCTTTACATTGGATGGTTTGGTGTGTTTGGATGATACCTACCTTATTGACTGCAACTT
CTGTATTTATTATAGCCTTCATTGCTGCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAACCCGTTTCT
GGATCTCTACTTTACGGAACAATAATTATTTCTGGTGCCATTATTCCTACTTCTGCAGCTATCGGTTT
GCACTTTTATCCAATATGGGAAGCGGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGTCCTTATGAGC
TAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTCGTGAGTGGGAACCTAGTTTCCGT
CTGGGTATGCGCCCTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCGGTTGCAGCGGCTACCGCTGTTTCTTG
ATCTACCCAATAGGTCAAGGAAGCTTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATTTCTGGTACTTTCAACTT
CATGATTGTATTCCAGGCTGAGCACAATATCCTTATGCACCCATTCACATGTTAGGTGTCGCGGGTG
TATTCGGCGGCTCCCTATTTAGCGCTATGCATGGTTCCCTGGTAACTTCTAGTTTGTATCAGGGAAACC
ACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAACTTACAATATCGTGG
CTGCTCATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTTCTCGTTCTTTACAC
TTCTTCTTAGCTGCTTGGCCTGTAGTGGGTTATTTGGTTTACTGCTTTAGGTATTAGTACTATGGCGTT
CAACCTAAACGGTTTCAATTTCAATCAGTCCGTAGTTGATAGTCAAGGTCGTGTAATTAATACCTGGG
CTGATATCATTAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACCGTAATG

⑬ *Opuntia Stuopectala*

ATGACTGCAATTTT TAGAGAGACGCGAAAGCGAAAGCCTATGGGGTCGCTTCTGTAACCTGGATAACCAG
CACCGAAAACCGTCTTTACATTGGATGGTTTGGCGTTTGGATGATACCTACCTTATTGACTGCAACTT
CTGTATTTATTATAGCCTTCATTGCTGCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCGTGAACCCGTTTCT
GGATCTCTACTTTACGGAACAATAATTATTTCTGGTGCCATTATTCCTACTTCTGCAGCTATCGGTTT
GCACTTTTATCCAATATGGGAAGCGGCATCTGTTGATGAGTGGTTATACAATGGTGGTCCTTATGAGC
TAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTTGTATATGGGTCGTGAGTGGGAACCTAGTTTCCGT
CTGGGTATGCGCCCTGGATTGCTGTTGCATATTCAGCTCCGGTTGCAGCGGCTACCGCTGTTTCTTG
ATCTACCCAATAGGTCAAGGAAGCTTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATTTCTGGTACTTTCAACTT
CATGATTGTATTCCAGGCTGAGCACAACATCCTTATGCACCCATTCACATGTTAGGTGTCGCGGGTG
TATTCGGCGGCTCCCTATTTAGCGCTATGCATGGTTCCCTGGTAACTTCTAGTTTGTATCAGGGAAACC
ACAGAAAATGAATCTGCTAATGAAGGTTACAGATTCGGTCAAGAGGAAGAACTTACAATATCGTGG
CTGCTCATGGTTATTTTGGCCGATTGATCTTCCAATATGCTAGTTTCAACAATTTCTCGTTCTTTACAC
TTCTTCTTAGCTGCTTGGCCTGTAGTGGGTTATTTGGTTTACTGCTTTAGGTATTAGTACTATGGCGTT
CAACCTAAACGGTTTCAATTTCAATCAGTCCGTAGTTGATAGTCAAGGTCGTGTAATTAATACCTGGG
CTGATATCATTAACCGTGCTAACCTTGGTATGGAAGTTATGCATGAACCGTAATG

Appendix III. *rbcL* nucleotide sequence of *Opuntia* genus analyzed in this study.

① CheonNyeonCho

GACTTATTATACTCCCGAATATCAACCCCAGGATACCGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCCCTCAAC
CTGGAGTTCCGTCAGAAGAAGCAGGAGCCGCAGTAGCTGGCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGT
ATGGACCGACGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGATGCCGTTCCCTGGAG
AAGACAATCAATATATTTGTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTACTAATA
TGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAGGCCCTGCGTGCTCTACGTTTGGAGGATTTGCG
AATCCCTGTTGCTTATATAAAAACTTTCCAAGGCCCGCCCCACGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTG
AACAAGTATGGCCGTCCTTACTGGGATGCACTATTAAGCCGAAAATTGGGGTTATCCGCTAAAAACTATG
GTCGAGCAGTTTATGAATGTCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGACGAAAACGTGAACCTCCA
GCCATTTATGGGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTTTGTGCCGAAGCAATTTATAAAGCACAGGCCGAAACA
GGTGAAATCAAAGGGCATTACTTGAATGCTACCGCAGGTACATGCCGAAGAAATGATAAAAAAGGGCTGTA
TTTGCCAGAGAAATGGGTGTTCCCTATCGTAATGCATGACTACTTAACAGGTGGATTCACTGCAAAATACTA
GCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAACGGTCTACTCCTTCACATCCATCGTGCAATGCACGCAGTTATTGA
TAGACAGAAGAATCATGGTATGCACTTCCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTCTGTCTGGTGGAGATCAT
ATTCACTCCGTTACTACAGTTCCGTTGGAGGAACTTTAGGGCACCTTGGGGGAAATGCACCGGGTGCCTAG
CTACGTGATGATTATACTGAAATAGACGCAAAATCGCGGTATTTATTTCACTCAATCTTGGGTTTCCACAC
CAGGTGTTCTGCCCGTTGCTTCGGGAGGTAATCAGTTTGGCATAATGCCCGCTCTAACCGAGATCTTTGGG
GATGATTCGTTACTACAGTTCCGTTGGAGGAACTTTAGGGCACCTTGGGGGAAATGCACCGGGTGCCTAG
CGAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGCAAGGTGC
TACAATTTATTCGCGATGCTAGCAATGGAGTCTGAACTAGCCGCTGCTTGTGAGGTATGGAAAGAAATA
AAATTTGAGTTCCCGCAGTGGATACTTTGGATAAAAAAGAAAGGATAAAAAAGAAAATAGGATAAECTTA
GGCTAAGTACTTAAATCCCTTAATTG

② BaekNyeonCho

GACTTATTATACTCCCGAATATCAACCCCAGGATACCGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCCGTCAA
CCTGGAGTTCCGTCAGAAGAAGCAGGAGCCGCAGTAGCTGGCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTG
TATGGACCGACGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGATGCCGTTCCCTGG
AGAAGACAATCAATATATTTGTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTACTAATA
TATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAGGCCCTGCGTGCTCTACGTTTGGAGGATTTG
CGAATCCCTGTTGCTTATATAAAAACTTTCCAAGGCCCGCCCCACGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTG
TGAACAAGTATGGCCGTCCTTACTGGGATGCACTATTAAGCCGAAAATTGGGGTTATCCGCTAAAAACTA
TGGTCGAGCAGTTTATGAATGTCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGACGAAAACGTGAACCTCC
CAGCCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTTTGTGCCGAAGCAATTTATAAAGCACAGGCCGAAA
CAGGTGAAATCAAAGGGCATTACTTGAATGCTACCGCAGGTACATGCCGAAGAAATGATAAAAAAGGGCTG
TATTTGCCAGAGAATTTGGGTGTTCCCTATCGTAATGCATGACTACTTAACAGGTGGATTCACTGCAAATAC
TAGCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAACGGTCTACTCCTTCACATCCATCGTGCAATGCACGCAGTTATT
GATAGACAGAAGAATCATGGTATGCACTTCCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTCTGTCTGGTGGAGATC
ATATTCATGCTGGTACCGTAGTAGGTAAGCTTGAAGGGGAAAGAGATATCACTTTAGGCTTTGTTGATT
TACTACGTGATGATTATACTGAAATAGACGCAAAATCGCGGTATTTATTTCACTCAATCTTGGGTTTCCAC
ACAGGTGTTTCTGCCCGTTGCTTCGGGAGGTAATCAGGTTTGGCATAATGCCCGCTCTAACCGGATTTTAG
GGGATGATTCGCTACTACAGTTCCGTTGGAGGAACTTTAGGGCACCTTGGGGGAAATGCACCGGGTGCCTG
AGCGAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGCAAGGTG
GCTACAATTTATTCGCGATGCTAGCAAAATGGAGTCTGAACTAGCCGCTGCTTGTGAGGTATGGAAAGAAA
TAAAATTTGAGTTCCCGCAGTGGATACTTTGGATAAAAAAGAAAGGATAAAAAAGAAAATAGGATAAECTT
TAGGCTAAGTACTTAAATCCCTTAATTG

③ JunRaDo

GACTTATTATACTCCCGAATATCAACCCCAGGATACCGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCCCTCAAC
CTGGAGTTCCGTCAGAAGAAGCAGGAGCCGCAGTAGCTGGCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGT
ATGGACCGACGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGATGCCGTTCCCTGGAG
AAGACAATCAATATATTTGTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTACTAATA
TGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAGGCCCTGCGTGCTCTACGTTTGGAGGATTTGCG
AATCCCTGTTGCTTATATAAAAACTTTCCAAGGCCCGCCCCACGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTG
AACAAGTATGGCCGTCCTTACTGGGATGCACTATTAAGCCGAAAATTGGGGTTATCCGCTAAAAACTATG
GTCGAGCAGTTTATGAATGTCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGACGAAAACGTGAACCTCCA
GCCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTTTGTGCCGAAGCAATTTATAAAGCACAGGCCGAAACA
GGTGAAATCAAAGGGCATTACTTGAATGCTACCGCAGGTACATGCCGAAGAAATGATAAAAAAGGGCTGTA
TTTTGCCAGAGAAATGGGTGTTCCCTATCGTAATGCATGACTACTTAACAGGTGGATTCACTGCAAAATACTA
GCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAACGGTCTACTCCTTCACATCCATCGTGCAATGCACGCAGTTATTGA
TAGACAGAAGAATCATGGTATGCACTTCCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTCTGTCTGGTGGAGATCAT
ATTCATGCTGGTACCGTAGTAGGTAAGCTTGAAGGGGAAAGAGATATCACTTTAGGCTTTGTTGATTTA
CTACGTGATGATTATACTGAAATAGACGCAAAATCGCGGTATTTATTTCACTCAATCTTGGGTTTCCACAC
CAGGTGTTCTGCCCGTTGCTTCGGGAGGTAATCAGGTTGGCATAATGCCCGCTCTAACCGAGATCTTTGGG
GATGATTCGTTACTACAGTTCCGTTGGAGGAACTTTAGGGCACCTTGGGGGAAATGCACCGGGTGCCTAG
CGAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGCAAGGTGC

TACAATTATTCGCGATGCTAGCAAATGGAGTCTGAACTAGCCGCTGCTTGTGAGGTATGGAAAGAAATA
AAATTTGAGTTCCCGGCAGTGGATACTTTGGATAAAAAAGAAAGGATAAAAAAGAAAATAGGATAACTCTA
GGCTAAGTACTTAAATCCCTTAATTG

④ *O. humifusa*

GACTTATTATACTCCCGAATATCAACCCCAGGATACCGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCCCTCAAC
CTGGAGTTCGGTCAGAAGAAGCAGGAGCCGCGAGTAGCTGGCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTGT
ATGGACCGACGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGATGCCGTTCCCTGGAG
AAGACAATCAATATATTTGTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAATA
TGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAGGCCCTGCGTGCTCTACGTTTGGAGGATTTGCG
AATCCCTGTGCTTATATAAAAACTTTCCAAGGCCCGCCCCACGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAAATTG
AACAAGTATGGCCGCTCTACTGGGATGCACTATTAAGCCGAAATTTGGGGTTATCCGCTAAAACTATG
GTCGAGCAGTTTATGAATGTCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGACGAAAACGTGAACTCCCA
GCCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTTGGAGCCGAAGCAATTTATAAAGCACAGGCCGAAACA
GGTGAAATCAAAGGCCATTACTTGAATGCTACCGCAGGTACATGCGAAGAAATGATAAAAAAGGGCTGTA
TTTGCCAGAGAATTTGGGTGTTCCCTATCGTAATGCATGACTACTTAACAGGTGGATTCACTGCAAACTACTA
GCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAACGGTCTACTCCTTCACATCCATCGTGCAATGCACGCAGTTATTGA
TAGACAGAAGAATCATGGTATGCACTTCCGTGTACTAGCTAAAGCGTTACGTTCTGTCTGGTGGAGATCAT
ATTCATGCTGGTACCGTAGTAGGTAAGCTTGAAGGGGAAAGAGATATCACTTTAGGCTTTGTTGATTAC
CTACGTGATGATTATGCTGAAATAGACGCAAAATACCGGTTATTTATTTCACTCAATCTTGGGTTTCCAC
CAGGTGTTCTGCCCGTTGCTTCCGGGAGGTATTCAGTTTGGCATATGCCCGCTTAACCGAGATCTTTGGG
GATGATTCGGTACTACAGTTCCGTTGGAGAACTTTAGGGACCCCTTGGGGGAATGCACCCGGTGTCTGTAG
CGAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGTCTCGCAAGGTGC
TACAATTATTCGCGATGCTAGCAAATGGAGTCTGAACTAGCCGCTGCTTGTGAGGTATGGAAAGAAATA
AAATTTGAGTTCCCGGCAGTGGATACTTTGGATAAAAAAGAAAGGATAAAAAAGAAAATAGGATAACTCTA
GGCTAAGTACTTAAATCCCTTAATTG

⑤ *O. violacea*

GACTTATTATACTCCCGAATATCAACCCCAGGATACCGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCCGTC
CCTGGAGTTCGGTCAGAAGAAGCAGGAGCCGCGAGTAGCTGGCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTG
TATGGACCGACGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGATGCCGTTCCCTGG
AGAAGACAATCAATATATTTGTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAA
TATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAGGCCCTGCGTGCTCTACGTTTGGAGGATTTG
CGAATCCCTGTGCTTATATAAAAACTTTCCAAGGCCCGCCCCACGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAAAT
TGAACAAGTATGGCCGCTCTACTGGGATGCACTATTAAGCCGAAATTTGGGGTTATCCGCTAAAAACTA
TGGTTCGAGCAGTTTATGAATGTCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGACGAAAACGTGAACTCC
CAGCCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTTGTGCCGAAGCAATTTATAAAGCACAGGCCGAAA
CAGGTGAAATCAAAGGCCATTACTTGAATGCTACCGCAGGTACATGCGAAGAAATGATAAAAAAGGGCTG
TATTTGCCAGAGAATTTGGGTGTTCCCTATCGTAATGCATGACTACTTAACAGGTGGATTCACTGCAAATAC
TAGCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAACGGTCTACTCCTTCACATCCATCGTGCAATGCACGCAGTTATT
GATAGACAGAAGAATCATGGTATGCACTTCCGTGTAGTAGTAAAGCGTTACGTTCTGTCTGGTGGAGATC
ATATTCATGCTGGTACCGTAGTAGGTAAGCTTGAAGGGGAAAGAGATATCACTTTAGGCTTTGTTGATT
TACTACGTGATGATTACTGAAATAGACGCAAAATCGCGGTATTTATTTCACTCAATCTTGGGTTTCCAC
ACCAGGTGTTCTGCCCGTTGCTTCCGGGAGGTATTCAGTATGGCATATGCCCGCTTAACCGGATCTTAG
GGATGATTCGGTACTACAGTTCCGTTGGAGAACTTTAGGGACCCCTTGGGGGAATGCACCCGGTGTCTGT
AGCGAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGTCTCGGAAGGT
GCTACAATTTCCGCGATGCTAGCAAATGGAGTCTGAACTAGCCGCTGCTTGTGAGGTATGGAAAGAAA
TAAAATTTGAGTTCCCGGCAGTGGATACTTTGGATAAAAAAGAAAGGATAAAAAAGAAAATAGGATAACTC
TAGGCTAAGTACTTAAATCCCTTAATTG

⑥ *O. rufida*

GACTTATTATACTCCCGAATATCAACCCCAGGATACCGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACCCGTC
CCTGGAGTTCGGTCAGAAGAAGCAGGAGCCGCGAGTAGCTGGCGAATCTTCTACTGGTACATGGACAACCTG
TATGGACCGACGGACTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGATGCCGTTCCCTGG
AGAAGACAATCAATATATTTGTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAAGGATCTGTTACTAA
TATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGGTTCAAGGCCCTGCGTGCTCTACGTTTGGAGGATTTG
CGAATCCCTGTGCTTATATAAAAACTTTCCAAGGCCCGCCCCACGGTATCCAAGTTGAGAGAGATAAAAT
TGAACAAGTATGGCCGCTCTACTGGGATGCACTATTAAGCCGAAATTTGGGGTTATCCGCTAAAAACTA
TGGTTCGAGCAGTTTATGAATGTCTTCGCGGTGGACTTGATTTTACCAAAGATGACGAAAACGTGAACTCC
CAGCCATTTATGCGTTGGAGAGACCGTTTCTTATTTTGTGCCGAAGCAATTTATAAAGCACAGGCCGAAA
CAGGTGAAATCAAAGGCCATTACTTGAATGCTACCGCAGGTACATGCGAAGAAATGATAAAAAAGGGCTG
TATTTGCCAGAGAATTTGGGTGTTCCCTATCGTAATGCATGACTACTTAACAGGTGGATTCACTGCAAATAC
TAGCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAACGGTCTACTCCTTCACATCCATCGTGCAATGCACGCAGTTATT
GATAGACAGAAGAATCATGGTATGCACTTCCGTGTAGTAGTAAAGCGTTACGTTCTGTCTGGTGGAGATC
ATATTCATGCTGGTACCGTAGTAGGTAAGCTAGAAGGGGAAAGAGATATCACTTTAGGCTTTGTTGATT
TACTACGTGATGATTACTGAAATAGACGCAAAATCGCGGTATTTATTTCACTCAATCTTGGGTTTCCAC
ACCAGGTGTTCTGCCCGTTGCTTCCGGGAGGTATTCAGTATGGCATATGCCCGCTTAACCGGATCTTAG
GGATGATTCGGTACTACAGTTCCGTTGGAGAACTTTAGGGACCCCTTGGGGGAATGCACCCGGTGTCTGT
AGCGAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGTCTCGGAAGGT
GCTACAATTTCCGCGATGCTAGCAAATGGAGTCTGAACTAGCCGCTGCTTGTGAGGTATGGAAAGAAA
TAAAATTTGAGTTCCCGGCAGTGGATACTTTGGATAAAAAAGAAAGGATAAAAAAGAAAATAGGATAACTC
TAGGCTAAGTACTTAAATCCCTTAATTG

GGGATGATTCCGTA CTACAGTTCCGGTGGAGGAACTTTAGGGCACCTTGGGGGAATGCACCGGGTGCTGT
AGCGAATCGAGTAGCTCTAGAAGCATGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGATCTTGCTCGCGAAGGT
GCTACAATTATTCGCGATGCTAGCAAATGGAGTCTGAACTAGCCGCTGCTTGTGAGGTATGGAAAGAAA
TAAAATTTGAGTTCCCGGCAGTGGATACTTTGGATAATAAGAAAGGATAAAAAGAAAAATAGGATAACTC
TAGGCTAAGTACTTAAATCCCTAATTG

< 천년초선인장의 안정성 및 접촉피부염에 대한 효능 검증 >

제 1절 서론

식물로부터 유래된 제제들은 전통적으로 민간요법에서 다양한 방면에서 신체의 기능을 개선하고 질병의 완화를 위하여 사용되어져 오고 있으며 현재도 많은 연구자들에 의하여 효능 및 유효성분에 대해서 심도 있는 연구가 진행되고 있다. 특히 식물로부터 유래하는 생리활성물질의 규명과 활용에 대해서는 매우 중요한 관심사이기도 하다.

선인장은 지구상에 약 4,000여종이 전세계적으로 널리 분포하고 있으며 중요한 영양 및 식량자원의 하나로 이용되고 있다. 그들중 약 1,500여종이상이 식용으로 가능하고 열매를 맺는다. 선인장의 잎과 열매는 동맥경화증, 당뇨병, 위장염, 고혈당 등에 사용되고 있다(Florian과 Reinhold, 2005). 천년초선인장은 널리 국내에 분포되어 재배되고 있으며 기능성 식품의 소재로 사용되고 있다. 천년초선인장의 기능에 관한 연구로는 항산화효과(Cho 등, 2006; 이 등, 2005), 항균효과(이 등, 2004), 위궤양 치유효과(Kim 등, 2005), 간기능 보호효과(Kim 등, 2005), 접촉성 피부염 완화효과(Kim 등, 2007) 등이 알려져 있다. 이와 같이 천년초선인장의 기능에 관한 연구는 활발하게 이루어지면서 다양한 기능성 식품으로의 가능성이나 적용범위가 넓어지고 있으나 안전성에 관련된 연구자료는 거의 찾아볼 수가 없는 상황이다. 따라서, 천년초선인장의 추출물을 대상으로 안전성평가를 통하여 건강기능식품 원료로서의 활용 가능성을 알아보고자 단회투여 및 14일 반복투여 독성시험을 실시하였다.

제 2 절 재료 및 방법

본 연구는 천년초추출물의 안전성을 평가하기 위하여 의약품 등의 독성시험 기준(식품의약품 안전청, 2005)과 비임상시험 관리기준을 참조하여 실시하였다.

< SD랫드에서 천년초 추출물의 단일 및 14일 반복 경구투여 독성 연구 >

1) 시험물질

본 시험에 사용된 시험물질은 주식회사 패션푸드의 천년초농장에서 공급받은 천년초의 추출물을 사용하였다. 천년초는 열매와 줄기를 완전히 건조시킨 후 건조중량 1 kg당 3L의 증류수를 가하여 열수에 4시간 동안 추출한 다음 여과하여 여과액을 최종용량이 0.5kg/L가 되도록 감압농축시켰다.

2) 실험동물

본 독성실험에 사용한 실험동물은 6주령의 암수 Sprague-Dawley 랫드(오리엔트바이오, 성남)를 사용하였다. 실험동물은 입수후 1주일간의 순화 및 검역기간을 거쳐 육안적으로 일반 증상을 관찰하여 건강한 상태를 확인한 후에 실험에 사용하였다. 본 연구에서의 모든 동물 실험은 경북대학교 수의과대학 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인하에 수행되었다.

3) 사육환경

온도는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 조명시간은 명암시간이 12시간주기 (오전 6시 점등 오후 6시 소등), 환기횟수 13~18회/hr 및 조도 200~300 Lux로 설정된 경북대학교 수의독성학 실험동물실에서 사육하였다. 사육환경 모니터링을 위하여 온·습도는 주기적으로 측정하였으며 기타 환경은 정기적으로 점검하여 일정한 표준치를 유지하였다. 랫드는 폴리카보네이트제 케이지(400W X 250L X 180H)에서 케이지당 5두씩 사육하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(퓨리나코리아, #5057, 서울)를 자유급식 시켰으며, 물은 상수도수를 살균정수기로 소독시킨 후 자유롭게 섭취시켰다.

4) 단회투여 독성시험

용량을 설정하기 위하여 천년초추출물을 1ml당 천년초추출물을 200 mg의 비율로 증류수를 첨가하여 희석시켜 식약청 고시에 명시된 최고농도인 2,000 mg/10 ml/kg 용량으로 경구투여용 주사기를 이용하여 위내투여를 하였으나 24시간이 경과될 때까지 아무런 독성 및 이상을 관찰할 수 없었다. 이러한 결과를 기반으로 2,000 mg/kg을 암수 각 5두에게 투여하고 14일간 관찰을 하였다.

5) 14일 반복투여 독성시험

최대투여 허용량인 2,000 mg/kg을 투여한 단회투여 독성시험에서 시험물질의 투여로 인한 독성 및 이상소견이 관찰되지 않았기 때문에 2,000 mg/kg/day를 고용량으로 하고 공비 2를 적용하여 1,000 mg/kg/day 및 500 mg/kg/day을 중간용량과 저용량으로 설정하여 투여하였다. 대조군은 동일한 양의 증류수만을 경구투여하였다.

6) 시험방법

시험물질의 투여용량은 예비실험을 통하여 결정하였다. 랫드의 경우 6주령의 실험동물(체

중 수컷 167-196 g, 암컷 156-180 g)을 사용하였으며, 투여용량은 500, 1,000, 2,000 mg/kg의 용량으로 암수 각각 군당 5두씩 경구투여용 주사기를 이용하여 경구투여한 후, 14일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

7) 관찰 및 검사항목

* 일반증상관찰: 단회투여 독성시험의 경우 투여당일은 투여 후 1, 3, 그리고 6시간 간격으로, 투여의일로부터 14일까지는 매일 1회씩 일반증상의 변화, 운동성, 외관의 독성증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다. 14일 반복투여독성시험의 경우 시험기간중 모든 동물에 대하여 매일 2회 일정한 시간에 일반증상의 변화, 운동성, 외관의 독성증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

* 체중측정: 단회 및 반복투여 독성시험에 해당되는 모든 동물에 대하여 투여 직전과 투여 후, 부검 직전까지 매일 체중을 측정하였다.

* 사료 및 음수 섭취량의 측정: 단회 및 반복투여 독성시험 모두 동일하게 실험 개시 후 매일 일정량의 사료와 음수를 오전 10시에 공급하고 익일 같은 시간에 잔량을 측정하였다.

* 부검 및 장기중량 측정: 단회 및 반복투여 독성시험 모두 실험종료 전일부터 12시간 절식시켰다. 에테르로 가볍게 마취시킨 다음 복대정맥으로부터 채혈을 실시하고 희생시켜 충분히 방혈을 시킨 후 육안으로 모든 장기를 관찰하고, 전체 실험동물에 대하여 간, 신장, 비장, 흉선, 폐, 심장, 고환, 난소의 중량을 측정하였다.

* 혈액학적 검사: 부검전일 20-24시간 절식시킨 동물을 에테르 마취하에 복대동맥으로부터 전채혈하여 얻은 혈액의 일부를 EDTA tube(BD vacutainer, USA)에 넣어 보관한 다음 3시간 이내에 적혈구수(red blood cells, RBC), 적혈구용적(hematocrit), 혈색소량(hemoglobin), 혈소판(platelets) 및 백혈구수(white blood cells, WBC)와 호중구(neutrophils), 호산구(eosinophils), 호염기구(basophils), 림프구(lymphocytes) 및 단핵구(monocytes)의 백분율을 자동혈액측정기(Sysmax SE-9000, Japan)를 이용하여 측정하였다.

* 혈액생화학적 검사: 혈액생화학적 검사는 부검전일 20-24시간 절식시킨 동물을 에테르 마취하에, 복대동맥에서 전채혈해서 얻은 혈액을 실온에 30분간 방치하여 응고시킨 다음, 원심분리(3,000 rpm에서 15분)해서 얻은 혈청에 대하여 aspartate transaminase(AST), alanine transaminase(ALT), alkaline phosphatase(ALP), creatinine, blood urea nitrogen(BUN), uric acid, cholesterol, total protein, albumin, albumin/globulin (A/G) ratio의 혈액생화학적 검사를 자동분석기(Hitachi-747, Hitachi medical, Japan)를 사용하여 측정하였다.

* 조직병리학적 검사: 적출한 장기는 10% 중성 포르말린용액에 3일 이상 충분히 고정시킨 후 조직처리를 하고 파라핀 포매하여 4 μ m의 절편을 만들어 hematoxylin & eosin으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

8) 통계처리

모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, Levene's test를 통해 분산이 균일하게 나온 경우 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)을 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과의 유의차가 있는 시험군을 알아내기 위하여 Dunnett's t-test를 실시하였다.

< 토끼에서 천년초추출물의 피부 및 안자극 시험 >

제 1실험 천년초추출물의 토끼에서 피부자극시험

1) 실험동물 및 사육환경

본 실험에서는 3개월령의 New Zealand White 계통 수컷토끼를 삼육실험동물센터 (경기 수원)로부터 구입하여 1주일간의 순화 및 검역을 거친 후 사용하였다. 입수시 12두(체중, 2,04-2,49g)를 구입하여 최종적으로 피부에 이상이 없고 건강한 10두(체중, 2,11-2,55g)를 확인 및 선발하여 시험에 이용하였다. 사육조건은 온도 22 \pm 3 $^{\circ}$ C, 상대습도 50 \pm 20 %, 환기횟수 12~15회/시간, 조명 150~300 Lux로 12시간주기 (인공조명, 오전 6시-오후 6시)로 하였으며, 순화, 검역 및 시험기간 동안 3단 4열의 사육상자대에 배열된 스테인레스제 사육상자(420W \times 500L \times 300H mm)에 개체별로 수용하였다. 사육상자에는 시험번호와 동물번호를 기재한 개체식별카드를 부착하였다. 사료는 토끼용 고품사료 (퓨리나 코리아, 펄택)를, 물은 여과를 하여 정수한 상수도수를 자유롭게 섭취시켰다. 본 연구에서의 모든 동물실험은 경북대학교 수의과대학 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인하에 수행되었다.

2) 천년초추출물의 준비

본 시험에 사용된 시험물질은 주식회사 패션푸드의 천년초농장에서 공급받은 천년초추출물을 사용하였다. 천년초는 열매와 줄기를 완전히 건조시킨 후 건조중량 1 kg당 2L의 증류수를 가하여 열수에 4시간 동안 추출한 다음 여과하여 여과액을 최종용량이 0.5kg/L가 되도록 감압농축시켰다.

3) 시험군의 구성 및 시험물질의 적용

시험물질을 적용하기 위해 적용 전날에 동물의 등쪽부분(가로세로 약 15 cm씩)을 제모하였다. 동물의 척추를 중심으로 좌우 각각 2개소 (각각 찰과 및 비찰과 부위, 2.5 cm×2.5 cm 크기)를 설정하여, 좌측구획은 무처리 대조구획으로, 우측구획은 천년초추출물을 적용하는 처치구획으로 정하여 시험하였다. 찰과는 주사침을 이용하여 표피만 손상되고 출혈이나 진피에 손상이 가지 않을 정도로 “#” 모양으로 실시하였다. 투여 당일 오전에 “천년초추출물” 원제를 500 mg/ml의 농도로 우측의 찰과부위 1개소와 비찰과부위 1개소에 각각 0.5 ml를 적용하였고, 대조구획에는 처치를 하지 않았다. 적용 후 처치구획 및 대조구획을 거즈로 덮은 후 비자극성 테이프로 잘 고정하여 24시간 동안 적용시켰다. 시험물질을 적용하고, 24시간 경과 후 잔류하는 시험물질을 제거하기 위해 미온수로 적용부위를 부드럽게 세정하였다.

4) 일반증상 및 사망의 관찰

검역 및 순화기간에는 매일 1회씩 모든 동물에 대해 관찰하였고, 천년초추출물의 적용기간에는 투여 전과 후에 1회씩 일반증상 및 사망의 유무에 관하여 관찰하였다.

5) 체중측정

동물 입수 시와 시험물질 적용 전, 적용 후 24 및 72시간째에 개체별 체중을 측정하였다.

6) 적용부위의 관찰 및 자극성의 평가

적용부위의 피부반응 평가는 식품의약품안전청의 “의약품등의독성시험기준”에 표시된 피부반응의 평가기준에 따라 실시하였다. 24시간 동안 시험물질을 적용한 후 패취를 제거하여 24시간째 (패취제거 직후) 및 72시간째 (패취제거 후 48시간째)에 유발된 홍반 (erythema)과 가피 (eschar), 부종 (edema) 등의 자극성 반응을 관찰하였다. 모세혈관의 울혈에 의한 피부 발적 등 여러 가지 원인으로 인하여 혈액에 의해 피부에 나타난 적색반응은 홍반으로 평가하였고, 부식작용 또는 괴저에 의하여 생긴 피부조직의 부육상태는 가피로 하였으며, 체액이 피하조직에 축적되어 부어오른 것은 부종으로 평가하였다. 결과에 대한 자극성의 정도판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize의 일차피부자극지수 (primary skin irritation index, PII)의 산출방법에 따랐다.

제 2실험 천년초추출물의 토끼에서 안자극시험

1) 시험동물 및 사육환경

본 시험에서는 3개월령의 New Zealand White 계통의 수컷토끼 10두를 삼육실험동물센터 (경기 수원)로부터 구입하여 1주일간의 순화 및 검역을 거친 후 시험에 사용하였다. 실험동물의 준비는 피부자극시험에서와 동일하게 실시하였다.

2) 천년초추출물의 준비

본 실험에 사용된 시험물질은 주식회사 패션푸드의 천년초농장에서 공급받은 0.5kg/L의 농도로 조성된 천년초추출물을 사용하였다.

3) 시험물질의 적용

토끼를 시험 개시 하루전에 미리 안검사를 실시하여 안구손상 등 각막 등에 손상이 없는 토끼를 선정하였다. 천년초추출물의 처치는 안구에 0.1 ml을 점안하여 투여하였다.

4) 일반증상 및 사망의 관찰

검역 및 순화기간에는 매일 1회씩 모든 동물에 대해 관찰하였고, 시험물질 적용기간에는 투여 전과 후에 1회씩 일반증상 및 사망의 유무에 관하여 관찰하였다.

5) 체중측정

동물 입수 시와 시험물질 적용 전, 적용 후 24 및 72시간째에 개체별 체중을 측정하였다.

6) 적용부위의 관찰 및 자극성의 평가

대조군(처치하지 않은 한쪽 눈)과 투여군(천년초추출물을 투여한 한쪽 눈)으로 나누어서 판정을 하는데, 시험물질 투여 후 1, 2, 3, 4, 7 일에 각막, 홍채, 결막에서의 자극성을 점수화하여 판정하였다.

< Balb/c 마우스에서 DCNB로 유발시킨 알러지 접촉성 피부염에 대한 천년초 추출물의 효과 >

1) 시험물질

시험물질로는 천년초 발효추출물이 주성분으로 조제되어 있는 크림제제(천년초 발효추출물 함유량 30%)를 (주)패션푸드로부터 공급받아 사용하였다.

2) 실험동물

실험동물은 수컷 Balb/c 마우스(6주령, 20 - 23 g)는 오리엔트(주)(경기도 성남)로부터 공급받아 약 1주간 실험실 순화과정을 거친 후 사용하였다. 동물은 마우스용 케이지 (220 x 200 x 145mm)에 2마리씩 수용하였다. 동물실험실의 환경은 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 10\%$, 환기횟수 12회/시간, 조명주기 12시간 (07:00 - 19:00), 조도 150 - 300 lux로 조절되었다. 실험동물용 pellet형 고형사료인 Purina Rat Chow[®] 바이오피아(경기도 군포)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 여과정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 실험은 경북대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee IACUC)의 승인 하에 동 기관의 표준작업지침서(Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행되었다.

3) DCNB에 의한 ear swelling(귀부종) 반응

자연형 과민반응의 항원으로서 DCNB(2,4-dinitrochlorobenzene)를 아세톤과 올리브오일의 혼합용액에 5%가 되게 용해한 후 오른쪽 살바위쪽 복부 2cm²에 도포하여 1차 면역시켰다. 1차 면역 7일 경과 후 오른쪽 귀와 오른쪽 살바위 복부 2.5% DCNB 4 μ l와 25 μ l를 각각 도포하여 2차 면역을 실시하였으며, 2차 항원투여 후 48시간이 경과했을 때 오른쪽 귀의 두께를 vernical calipers로 측정 후 ear swelling 평균값을 구하여 각각의 차이를 비교하였다.

4) 피부의 조직표본 제작

피부에 나타나는 농양성 염증, 출혈, 습진, 홍반, 가피탈피등의 피부염 관련 병변을 관찰하고 항원을 투여하지 않은 정상군과 DCNB만을 처리한 대조군, DCNB처리 후 천년초 추출물크림을 처치한 군을 최종 DCNB처리 후 1,2,3일에 마우스를 희생시켜DCNB처리된 부위의 피부 조직을 분리하였다. 분리된 피부조직을 10% 중성포르말린용액에 24시간동안 고정 후 통상적인 방법에 따라 파라핀에 포매하여 5 μ m두께로 연속절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin염색과 Toluidine blue염색을 실시하여 피부 조직을 광학현미경으로 관찰하여 표피와 진피에서의 피부염에 관련된 병변 및 비만세포 탈과립에 대해 분석하였다.

5) 통계학적 분석

실험결과는 mean \pm S.E.로 나타내었다. 각각의 실험결과에 대한 분산의 동질성을 비교하기 위해 Levene's test를 실시하고, 분산이 동질성을 갖는 경우 one-way analysis of variance(ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과의 유의적인 차이가 있는 시험군을 알아내기 위해 Dunnett

test를 실시하였다. 양성대조군으로부터의 차이를 확인하기 위해 $P < 0.05$ 의 수준에서 유의성을 검정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

< SD랫드에서 천년초추출물의 단일 및 14일 반복 경구투여 독성 연구 >

가. 단회 경구투여 독성시험

단회 경구투여 독성 시험의 결과로 암수모두 전 실험물질 투여군에서 사망동물이 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 근거로 한 천년초의 개략의 치사량(minimum lethal dose)은 암수 모두 최소 2,000 mg/kg 이상이였다. 체중측정 결과, 투여일로부터 시험종료시까지 모든 랫드에서 체중이 증가되는 현상을 보였으나, 대조군 및 농도별 투여군을 비교하여 보았을 때 유의성 있는 체중변화 현상이 관찰되지 않았다. 사료 및 음수섭취량에서도 대조군 및 실험군 별 모두에서 주목할 만한 차이가 관찰되지 않았다. 부검결과, 모든 실험동물에서 천년초추출물 투여와 관련된 어떠한 육안적 병변도 관찰되지 않았다. 따라서 단회 경구투여 독성시험의 결과로 천년초 물추출물의 무관찰부작용량(no observed adverse effect level, NOAEL)은 암수 모두 2,000 mg/kg이상이었음을 확인할 수 있었다.

나. 14일 반복투여 독성시험

일반증상을 관찰한 결과 모든 실험군이 실험종료시까지 사망한 개체는 발견되지 않았으며 유의할만한 외관상의 이상 및 행동적인 변화도 관찰되지 않았다(자료로 제시하지 않았음).

체중의 변화는 Fig. 27에 나타낸 바와 같이 투여일로부터 실험종료시까지 모든 암수랫드에 서 정상적으로 체중이 증가되는 현상을 보여 실험 종료시 개시점에 비해 55 - 60%의 증가를 보였으며, 정상대조군 및 천년초 물추출물의 용량별 투여군을 비교할 경우 모든 별다른 유의성있는 체중변화의 차이가 관찰되지 않았다.

사료 및 음수섭취량의 변화를 살펴보면 실험기간동안 각 실험군당 사료 및 음수섭취량의 변화는 대조군과 비교하여 모든 천년초추출물 투여군에서 암수 모두 유의할만한 차이가 인정되지 않았다(자료로 제시하지 않았음). 부검 및 장기중량은 부검결과 모든 실험동물에서 본 천년초추출물 투여와 관련된 어떠한 육안적 병변이나 이상이 관찰되지 않았다. 또한 체중에 따른 절대적 장기무게를 측정된 결과 천년초추출물의 투여와 관련하여 용량의 변화와 관련된 어떠한 무게의 증감도 관찰되지 않았다(Table 68).

혈액학적 및 혈액 생화학적 검사결과는 각각 Table 69와 70에 제시한 바와 같다. 대조군과 천년초추출물 투여군에서 용량별 천년초추출물 투여 후 혈액학적 및 혈액 생화학적 검사항목에서 유의할만한 변화가 관찰되지 않았다.

조직병리학적 검사를 실시한 결과 대조군과 모든 천년초추출물의 용량별 투여군의 간, 신장, 비장, 흉선, 난소, 정소 등에서 대조군과 비교하여 주목할 만한 형태학적인 변화나 이상병변이 관찰되지 않았다(자료로 제시하지 않았음).

이상의 결과를 종합하여 요약하면 천년초추출물에 대한 단회 및 14일 반복 경구투여 독성시험을 SD 랫드를 대상으로 암수 각각 5마리씩을 한군으로 하여 500, 1,000, 2,000 mg/kg의 용량으로 실시한 결과 사망동물, 일반증상, 체중변화, 부검소견, 혈액학 및 혈액생화학적 변화에 있어서 천년초추출물 투여로 인한 어떠한 변화나 이상현상이 관찰되지 않았다. 본 시험에서 시험물질 투여군 2,000mg/kg/day의 용량은 경구투여 급성독성시험법에서 추천하는 최대한계허용량(OECD 2001)으로서 천년초추출물의 경구독성은 거의 없으며 SD랫드에서 경구투여에 의한 천년초추출물의 치사량은 암수 모두 최소 2,000mg/kg을 상회하는 것으로 판정된다. 이러한 결과는 천년초나 그 추출물을 주재료로 이용한 상품이 경구투여 시 독성이나 기타 다른 부작용을 일으킬 가능성이 낮다는 점을 시사한다.

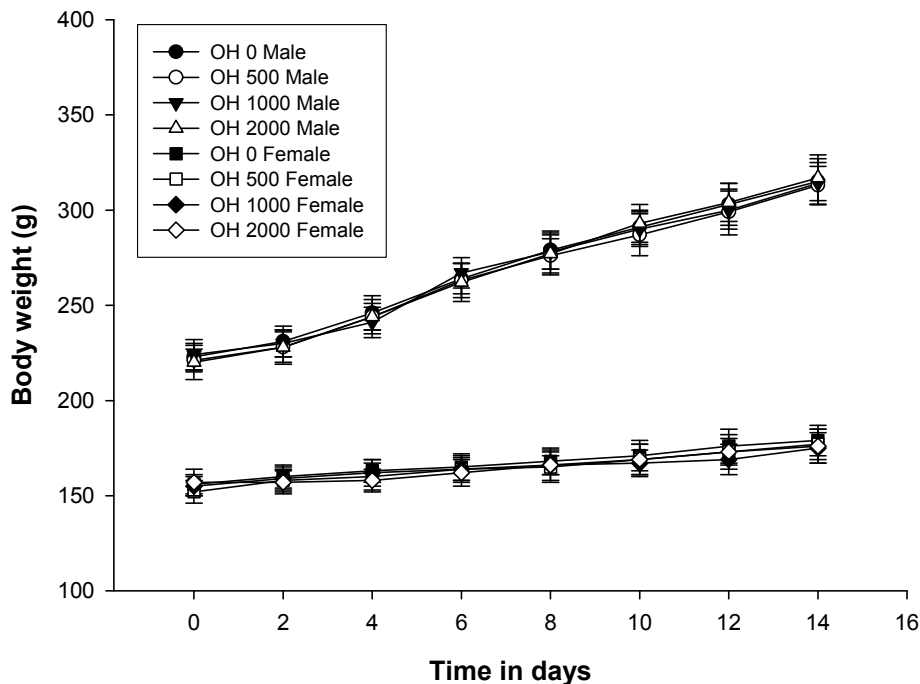


Fig. 27. Changes of body weight of SD rats during treatment with *Oputia humifusa* water extract for 14 days. Values are represented as mean \pm S.D

Table 69. Absolute organ weights(g) in SD rats administered with *Oputia humifusa* water extract for 14-day repeated toxicity test.

Male				
Groups	OH 0	OH 500	OH 1000	OH 2000
Liver(g)	8.75 ± 0.65	8.95 ± 0.68	9.02 ± 0.74	9.01 ± 0.82
Kidney(g)	2.51 ± 0.13	2.55 ± 0.18	2.53 ± 0.14	2.51 ± 0.16
Spleen(g)	0.57 ± 0.07	0.58 ± 0.11	0.55 ± 0.08	0.56 ± 0.09
Adrenals(mg)	48.5 ± 2.6	47.3 ± 2.8	46.9 ± 2.7	49.5 ± 2.8
Testes(g)	2.72 ± 0.21	2.68 ± 0.27	2.69 ± 0.25	2.67 ± 0.29
Brain(g)	2.01 ± 0.15	2.03 ± 0.14	2.02 ± 0.19	2.02 ± 0.15
Thymus(mg)	502.1 ± 29.6	498.2 ± 32.1	501.8 ± 33.4	491.8 ± 28.3
Female				
Groups	OH 0	OH 500	OH 1000	OH 2000
Liver(g)	5.98 ± 0.36	5.87 ± 0.38	6.02 ± 0.46	5.88 ± 0.34
Kidney(g)	1.59 ± 0.06	1.62 ± 0.08	1.63 ± 0.09	1.58 ± 0.06
Spleen(g)	0.43 ± 0.04	0.42 ± 0.03	0.43 ± 0.02	0.42 ± 0.03
Adrenals(mg)	59.9 ± 3.7	57.2 ± 2.9	57.6 ± 2.6	58.7 ± 3.1
Ovaries(g)	71.6 ± 3.7	71.4 ± 3.2	71.8 ± 3.4	71.3 ± 3.8
Brain(g)	1.91 ± 0.09	1.93 ± 0.12	1.95 ± 0.15	1.92 ± 0.09
Thymus(mg)	457.1 ± 26.3	449.7 ± 29.4	461.2 ± 28.2	458.7 ± 27.5

Table 70. Hematological analysis in SD rats administered with *Oputia humifusa* water extract for 14-day repeated toxicity test.

Male				
Groups	OH 0	OH 500	OH 1000	OH 2000
RBC($10^6/\mu\ell$)	7.85 ± 0.31	7.88 ± 0.31	7.86 ± 0.27	7.86 ± 0.29
Hemoglobin(g/dℓ)	15.2 ± 0.65	15.3 ± 0.67	15.5 ± 0.54	15.6 ± 0.53
Hematocrit(%)	46.2 ± 2.1	46.4 ± 2.0	45.4 ± 1.9	46.0 ± 2.2
Platelets($10^3/\mu\ell$)	1,115 ± 69	1,153 ± 71	1,174 ± 63	1,143 ± 74
WBC($10^3/\mu\ell$)	9.5 ± 0.3	9.6 ± 0.4	9.7 ± 0.3	9.4 ± 0.4
Neutrophils(%)	10.2 ± 0.6	10.9 ± 0.7	10.1 ± 0.6	9.8 ± 0.7
Lymphocytes(%)	85.6 ± 3.8	87.2 ± 4.6	88.2 ± 3.6	88.7 ± 3.9
Monocytes(%)	1.25 ± 0.06	1.23 ± 0.05	1.20 ± 0.05	1.22 ± 0.06
Eosinophils(%)	0.85 ± 0.03	0.84 ± 0.04	0.87 ± 0.05	0.88 ± 0.04
Basophils(%)	0.112 ± 0.005	0.111 ± 0.008	0.120 ± 0.004	0.122 ± 0.005
Female				
Groups	OH 0	OH 500	OH 1000	OH 2000
RBC($10^6/\mu\ell$)	7.63 ± 0.36	7.62 ± 0.26	7.52 ± 0.29	7.47 ± 0.45
Hemoglobin(g/dℓ)	15.1 ± 0.59	15.2 ± 0.68	15.4 ± 0.57	15.4 ± 0.56
Hematocrit(%)	43.8 ± 2.6	44.2 ± 2.1	43.6 ± 2.3	43.4 ± 2.3
Platelets($10^3/\mu\ell$)	1,198 ± 78	1,210 ± 69	1,231 ± 72	1,214 ± 65
WBC($10^3/\mu\ell$)	7.8 ± 0.4	7.9 ± 0.4	7.7 ± 0.4	7.5 ± 0.4
Neutrophils(%)	11.1 ± 0.5	10.7 ± 0.6	11.2 ± 0.5	10.9 ± 0.6
Lymphocytes(%)	82.8 ± 4.5	85.7 ± 4.3	86.7 ± 4.3	86.9 ± 4.8
Monocytes(%)	1.36 ± 0.07	1.45 ± 0.06	1.29 ± 0.04	1.35 ± 0.04
Eosinophils(%)	0.94 ± 0.05	0.87 ± 0.06	0.87 ± 0.09	0.87 ± 0.09
Basophils(%)	0.120 ± 0.006	0.112 ± 0.009	0.127 ± 0.009	0.117 ± 0.007

RBC, red blood cells; WBC, white blood cells.

Table 71. Serum biochemical analysis in SD rats administered with *Oputia humifusa* water extract for 14day repeated toxicity test.

Male				
Groups	OH 0	OH 500	OH 1000	OH 2000
AST(U/l)	232.7 ± 27.4	236.1 ± 54.1	229.7 ± 28.6	223.4 ± 26.3
ALT(U/l)	79.5 ± 8.4	77.2 ± 8.8	75.7 ± 7.2	78.9 ± 8.2
ALP(U/l)	167.1 ± 7.2	164.2 ± 8.3	167.1 ± 7.6	167.3 ± 7.2
Creatinine(mg/dl)	0.51 ± 0.03	0.49 ± 0.03	0.49 ± 0.05	0.49 ± 0.06
BUN(mg/dl)	17.8 ± 0.9	18.1 ± 0.8	17.6 ± 0.8	17.5 ± 0.7
Uric acid(mg/dl)	0.80 ± 0.02	0.81 ± 0.03	0.79 ± 0.02	0.81 ± 0.03
T-protein(g/dl)	6.37 ± 0.31	6.57 ± 0.35	6.54 ± 0.35	6.58 ± 0.31
Albumin(g/dl)	3.91 ± 0.21	3.98 ± 0.20	3.96 ± 0.23	3.88 ± 0.22
A/G ratio	1.65 ± 0.06	1.63 ± 0.05	1.67 ± 0.04	1.67 ± 0.05
Cholesterol(mg/dl)	68.5 ± 3.5	66.2 ± 3.9	67.5 ± 3.7	67.7 ± 3.9
Triglyceride(mg/dl)	102.3 ± 5.6	103.8 ± 6.8	105.6 ± 5.2	107.5 ± 6.4
Female				
Groups	OH 0	OH 500	OH 1000	OH 2000
AST(U/l)	229.3 ± 26.1	236.7 ± 26.7	227.4 ± 28.3	220.1 ± 26.0
ALT(U/l)	71.8 ± 6.3	76.2 ± 8.9	75.2 ± 10.2	75.2 ± 11.0
ALP(U/l)	170.1 ± 6.3	171.2 ± 5.8	174.2 ± 4.6	177.8 ± 7.2
Creatinine(mg/dl)	0.52 ± 0.04	0.49 ± 0.03	0.48 ± 0.06	0.49 ± 0.04
BUN(mg/dl)	17.7 ± 1.0	17.6 ± 0.9	17.6 ± 1.1	17.5 ± 1.1
Uric acid(mg/dl)	0.79 ± 0.02	0.81 ± 0.03	0.78 ± 0.05	0.81 ± 0.06
T-protein(g/dl)	6.35 ± 0.26	6.50 ± 0.23	6.49 ± 0.25	6.48 ± 0.24
Albumin(g/dl)	3.94 ± 0.23	3.94 ± 0.26	3.89 ± 0.29	3.88 ± 0.29
A/G ratio	1.64 ± 0.04	1.65 ± 0.05	1.66 ± 0.04	1.69 ± 0.04
Cholesterol(mg/dl)	66.5 ± 3.6	66.7 ± 3.4	67.4 ± 3.5	67.2 ± 4.4
Triglyceride(mg/dl)	103.5 ± 6.3	105.1 ± 7.2	109.1 ± 10.2	106.7 ± 8.5

AST, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; T-protein, total protein; A/G, albumin/globulin

< 2. 토끼에서 천년초추출물의 피부 및 안자극 시험 >

가. 피부 자극시험

일반적인 임상증상의 관찰항목 및 결과는 Table 71에 나타낸 바와 같다. 천년초추출물을 적용하여 폐사가 되거나 다른 이상으로 인정할 만한 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았다. 체중변화를 살펴보면 모든 천년초추출물을 도포한 토끼에서 적용 후 72시간째의 체중은 천년초추출물 도포개시일과 비교하여 유의할 만한 체중의 변화는 관찰되지 않았다. 천년초추출물 도포부위의 피부자극성은 천년초추출물의 적용 후 1, 24, 48 및 72 시간에 각각 관찰한 결과, 비찰과부위와 찰과부위에서의 홍반, 부종 및 가피형성은 거의 관찰되지 않았다(Table 72). 모든 실험군의 동물에서 생리식염수를 도포한 무처리 대조구획의 특이적인 변화는 관찰되지 않았다.

나. 안점막 자극시험

일반적인 임상증상의 관찰항목 및 체중의 변화는 Table 73에 나타낸 바와 같다. 천년초추출물 투여 즉시부터 72시간까지 모두 아무런 임상증상이 나타나지 않았으며, 천년초추출물을 투여한 오른쪽 눈은 대조군이 되는 왼쪽 눈에 비하여 시험물질에 의하여 발생되었다고 판단되는 아무런 이상을 관찰할 수 없었다. 또한 모든 토끼에서 천년초추출물의 적용 후 72시간째의 체중은 도포개시일의 체중과 비교하여 시험물질과 관련된 체중의 변화는 관찰되지 않았다. 천년초추출물을 도포하고 시간경과에 따른 안구의 외관모습은 Fig. 28에 보여주는 바와 같이 어떠한 이상소견도 관찰되지 않았다. 천년초추출물 도포부위의 안구자극성은 천년초추출물투여 후 1, 24, 48, 72, 96 시간 및 7일째에 각각 각막, 홍채, 결막에 대한 안구병변의 등급을 점수로 표시하였는데 천년초추출물의 도포에 따른 실험군간의 차이를 인정할 수 없었으며 그 결과는 Table 74에 나타내었다.

이상의 실험결과를 종합하여 천년초추출물은 피부 및 안점막 독성이 거의 없었으며 직접적으로 피부 및 안구에 투여를 하여도 어떠한 자극이나 이상반응을 보이지 않았다. 이러한 결과로 천년초가 주요한 원재료로 여러 가지 피부 및 안구에 적용할 수 있는 상품이 개발되어도 천년초추출물에 의한 자극성이나 독성이 없어 안전성이 높다고 판단되었다.

Table 72. Mortality and clinical signs of rabbits treated with *Opuntia humifusa* extract

Summary of mortality and clinical sign	
No. of rabbits examined	10
Decreased locomotor activity (%)	0
Anorexia (%)	0
Found dead (%)	0

Table 73. Results of skin reaction of rabbits treated with *Opuntia humifusa* extract

Sites	Control site								Test site							
	Erythema & Eschar				Edema				Erythema & Eschar				Edema			
Phases	Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded	
Time (h)	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72
Animal No.																
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total score	0								0							
Pll	0								0							

Erythema was scored as follows: no erythema = 0, very slight erythema (barely perceptible) = 1, well-defined erythema = 2, moderate to severe erythema = 3, and severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth = 4. Edema formation was scored as follows: no edema = 0, very slight edema (barely perceptible) = 1, slight edema (edges of area well-defined by definite raising) = 2, moderate edema (raised approximately 1 mm) = 3, and severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure) = 4. Primary irritation index = total score/4

Table 74. Clinical signs and body weight changes of rabbits ocularly treated with *Opuntia humifusa* extract.

Concentration (mg/ml)	Dose (ml)	N	Sex	Body weight gain (kg)		Clinical signs	Death rate	
				Day 0	Day 7			
500	0.1	10	Male	2.16 ±0.28	2.26±0.33	0	Normal	0/10

Values were expressed as mean±S.D.

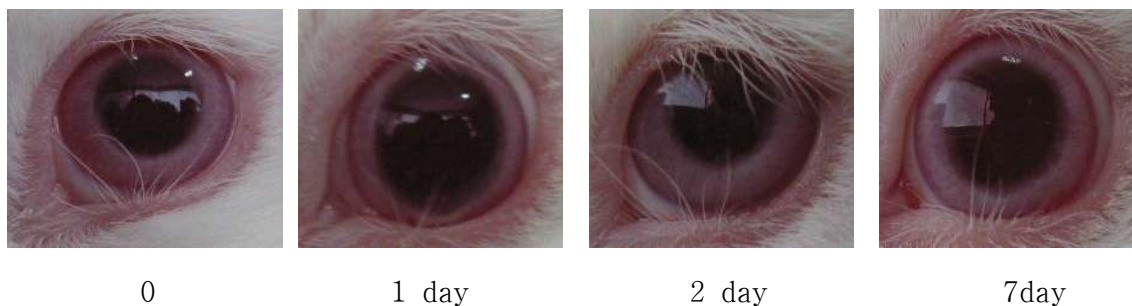


Fig. 28. Gross appearances of rabbit eye treated with *Opuntia humifusa* extract.

Table 75. Effect of *Opuntia humifusa* extract on eye irritation in rabbit

Animal No.	Tissue	Time after application					A.O.I.
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 7	
1	Cornea	0	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0	0
2	Cornea	0	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0	0
3	Cornea	0	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0	0
4	Cornea	0	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0	0
5	Cornea	0	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0	0
6	Cornea	0	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0	0
7	Cornea	0	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0	0
8	Cornea	0	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0	0
9	Cornea	0	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0	0
10	Cornea	0	0	0	0	0	0
	Iris	0	0	0	0	0	0
	Conjunctiva	0	0	0	0	0	0
M.O.I.		0	0	0	0	0	

M.O.I.: Mean Ocular irritation Index

< 3 Balb/c 마우스에서 DNCB로 유발시킨 알러지 접촉성 피부염에 대한 천년초추출물의 효과 >

가. Ear thickness에서의 변화

지연형 과민반응에 대한 항원물질로 DNCB를 아세톤과 올리브오일 혼합액에 용해시켜 마우스의 우측 살바부위의 상부쪽 복부에 도포하여 1차 감작시킨 후 7일 경과후 오른쪽 귀와 복부피부에 DNCB를 도포하여 2차 면역을 일으켜 접촉성 과민반응을 유발시킨 후 천년초 추출물(열매, 줄기, 발효)을 매일 도포하면서 24시간 간격으로 3일간 귀의 두께를 측정하여 부종의 정도를 관찰하였다. 정상군에 비하여 DNCB의 2차 도포 후 귀의 부종이 급격하게 발생하여 지속적으로 두께가 증가되었다. 천년초 열매추출물을 투여한 군에서는 귀의 부종 정도에 완화효과가 없었고 오히려 다소 부종이 증강되는 양상을 나타내었으며, 천년초 줄기추출물을 투여한 군에서는 2일째부터 유의하게 부종이 완화되었고 천년초 발효추출물을 투여한 군에서는 1일째부터 3일째까지 지속적으로 부종이 완화되어 정상 귀의 두께에 가까워졌다. 이로서 천년초 발효추출물과 천년초 줄기추출물에 항염증효과가 있는 것으로 관찰되었다(Fig 29).

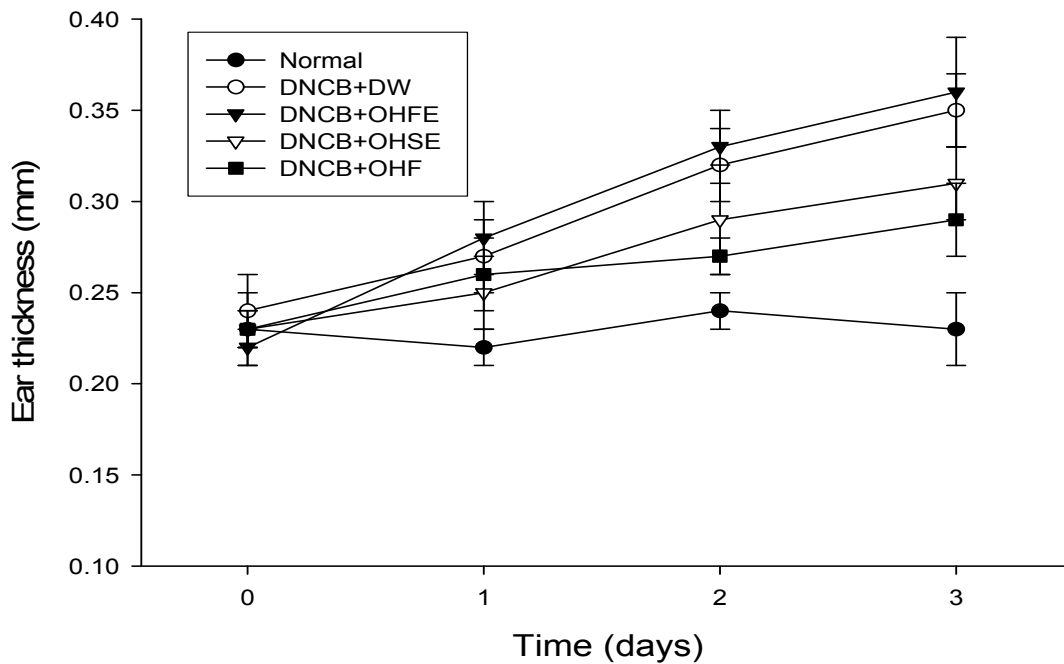


Fig. 29. The time course of the ear thickness in the *Opuntia humifusa* treated mice after exposure of DNCB. Balb/c mice were sensitized with DNCB on the right ear and abdomen skin before 7 day. OHFE(*Opuntia humifusa* Fruit Extract), OHSE(*Opuntia humifusa* Stem Extract), and OHF(*Opuntia humifusa* Fermentation)

나. 혈청내 IgE의 변화

혈청 IgE 수준은 랫드용 IgE ELISA kit를 사용하여 450nm에서 측정하였다. 정상군에 비하여 DNCB를 도포하여 접촉성 피부염을 유발한 군에서는 IgE의 농도가 5배이상 증가되었다.

천년초 열매추출물을 투여한 군은 DNCB 대조군과 거의 차이가 없었으나 천년초 줄기추출물과 천년초 발효추출물을 투여한 군에서는 2일째부터 유의하게 IgE의 수준이 저하되었다. 이로서 천년초 추출물은 줄기와 발효상태에서 면역글로불린의 상승으로 인한 알러지 반응의 감소를 일으키는 것으로 관찰되었다(Fig 30).

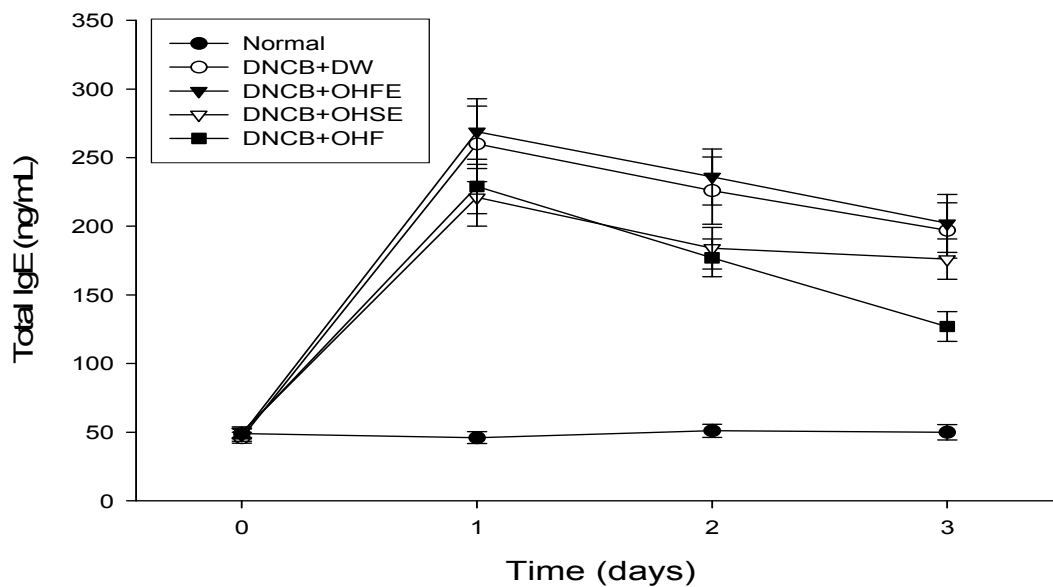
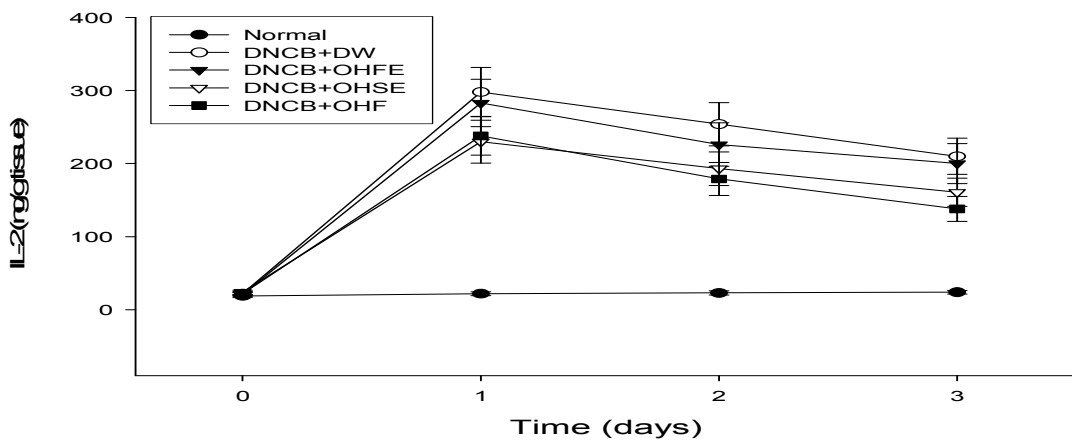
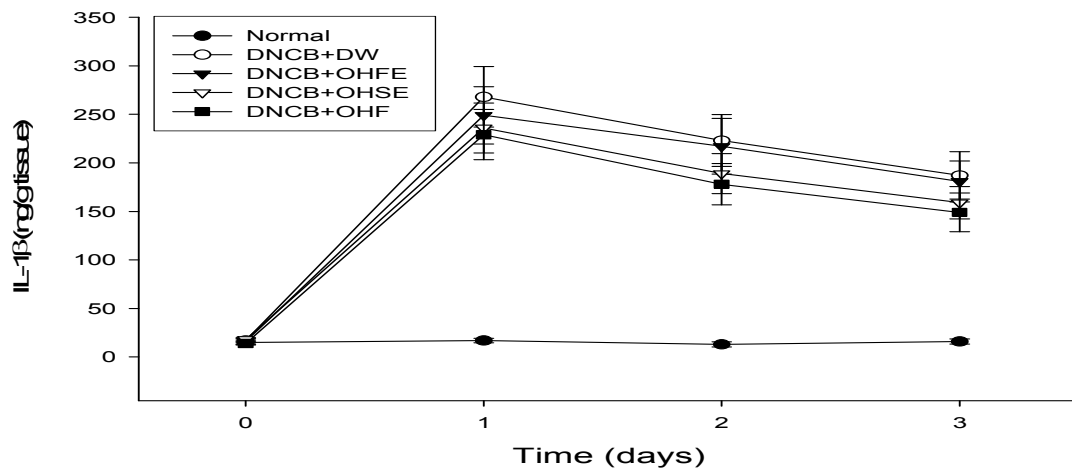


Fig. 30. The time course of total IgE levels in serum in the *Opuntia humifusa* treated mice after exposure of DNCB. Balb/c mice were sensitized with DNCB on the right ear and abdomen skin before 7 day. The total IgE levels in serum were measured with ELISA at time points(day) after each challenge from day 0 to 3. OHFE(*Opuntia humifusa* Fruit Extract), OHSE(*Opuntia humifusa* Stem Extract), and OHF(*Opuntia humifusa* Fermentation)

다. 마우스 복부피부조직에서 cytokines의 측정

마우스의 복부피부조직에서 cytokine의 변화를 보면 DNCB에 노출되어 정상군에 비하여 알러지성 접촉성 피부염을 유발한 군에서는 IL-1 β , IL-2, IFN- γ 의 증가가 관찰되었다. 천년초 열매추출물을 투여한 군에서는 DNCB에 의하여 증가된 IL-1 β 의 수준에 변화가 거의 없

었으나 IL-2와 IFN- γ 의 경미한 감소를 나타내었으며, 천년초 줄기추출물과 천년초 발효추출물을 투여한 군에서는 IL-1 β 의 경미한 감소를 나타내었으며, DNCB로 인한 접촉성 피부염 유발 후 3일째까지 IL-2와 IFN- γ 의 농도가 유의하게 억제되었다. DNCB에 의한 IL-2의 증가는 세포독성 T 임파구의 분열증가를 유도하고 이로 인해 세포성 면역의 증가가 일어난다고 알려져 있는데 천년초 줄기 및 발효추출물의 투여로 IL-2 분비 억제는 연이은 세포독성 T 임파구의 감소를 유도하고 IFN- γ 의 감소를 일으켜 알러지 면역반응이 억제되는 것으로 추측되었다(Fig 31).



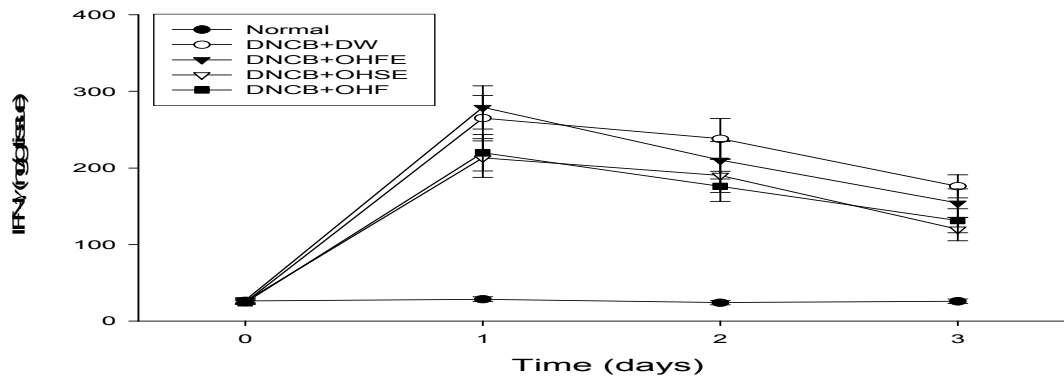


Fig. 31. The time course of IL-1 β , IL-2, and Interferon(IFN)- γ levels in the abdomen skin tissue in the *Opuntia humifusa* treated mice after exposure of DNCB. Balb/c mice were sensitized with DNCB on the right ear and abdomen skin before 7 day. OHFE(*Opuntia humifusa* Fruit Extract), OHSE(*Opuntia humifusa* Stem Extract), and OHF(*Opuntia humifusa* Fermentation)

라. 접촉성 피부염 유발 마우스 귀와 복부피부의 조직병리학적 변화

DNCB에 의하여 접촉성 피부염이 유발된 실험군의 귀의 조직병리학적 변화는 정상군에 비하여 표피층의 비대와 피하층의 확장 등이 명확하게 나타났으며 표피하층으로 비특이적인 염증세포의 출현이 높게 관찰되었다. 천년초 열매추출물을 투여한 군에서는 표피하층 및 피하층의 확장이 억제되었고 염증세포의 출현빈도가 낮아졌다. 천년초 줄기추출물을 투여한 군에서는 표피층의 비대가 현저히 줄었고 염증세포의 빈도도 낮아졌으나 피하층의 확대된 양상은 접촉성 피부염 대조군에 비하여 변화가 없었다. 천년초 발효추출물을 투여한 군에서 귀조직의 표피층의 비대는 대조군과 유사하였으나 염증세포의 출현도와 진피층 및 피하층의 확대는 거의 정상화되어 세포층간의 분리가 다른 천년초 추출물투여군보다 명확하게 일정한 배열을 나타내어 정상군에 거의 유사한 양상을 나타내었다(Fig 32).

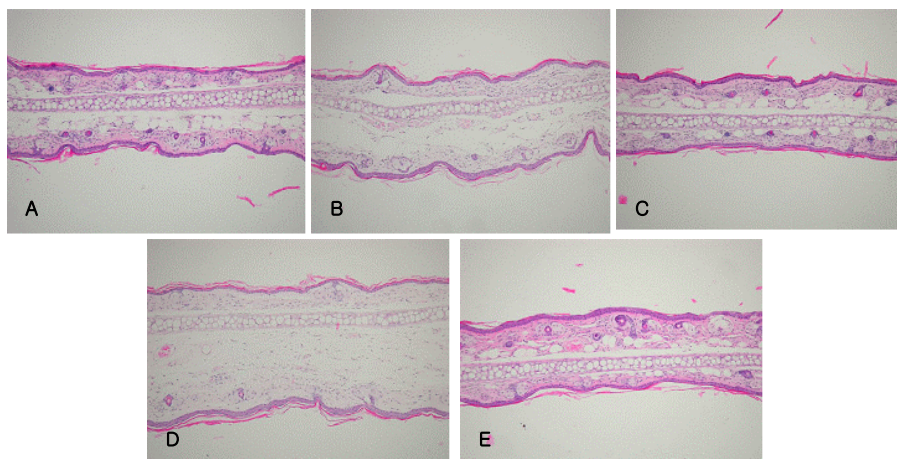


Fig. 32. Histopathology of the *Opuntia humifusa* treated mouse ear after exposure of DNCB. Balb/c mouse ears were excised 72h after the final application of *Opuntia humifusa* extracts and stained with hematoxylin & eosin. (A) Normal control, (B) DNCB-DW, (C) DNCB-OHFE(*Opuntia humifusa* Fruit Extract), (D) DNCB-OHSE(*Opuntia humifusa* Stem Extract), (E) DNCB-OHF(*Opuntia humifusa* Fermentation)

DNCB에 의하여 접촉성 피부염이 유발된 실험군의 복부피부의 조직병리학적 변화는 정상군에 비하여 표피층의 비대와 염증세포의 침윤이 명확하게 증가하였으며 천년초 열매추출물을 투여한 군에서는 표피층 및 피하층의 확장이 억제되었고 염증세포의 침윤정도 및 진피층에서 관찰되던 열공의 출현도도 낮아졌다. 천년초 줄기추출물을 투여한 군에서는 표피층의 비대가 감소되었고 염증세포의 침윤정도 및 진피층에서 관찰되던 열공의 출현도도 낮아졌다. 천년초 발효추출물을 투여한 군에서 복부 피부조직의 표피층의 비대는 여전히 관찰되었으나 염증세포 및 다핵세포의 출현정도와 진피층의 세포기관 등의 변형 등이 관찰되지 않아 정상군과 유사한 구조를 나타내었다(Fig 33).

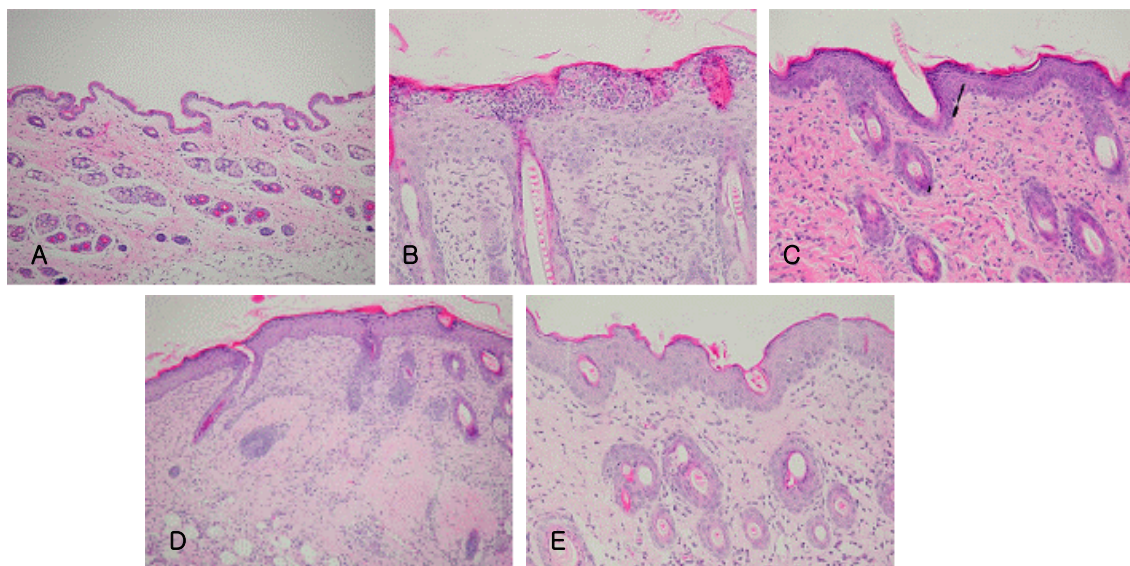


Fig. 33. Histopathology of the *Opuntia humifusa* treated mouse abdomen skin after exposure of DNCB. Balb/c mouse abdomen skins were excised 72h after the final application of *Opuntia humifusa* extracts and stained with hematoxylin & eosin. (A) Normal control, (B) DNCB-DW, (C) DNCB-OHFE(*Opuntia humifusa* Fruit Extract), (D) DNCB-OHSE(*Opuntia humifusa* Stem Extract), (E) DNCB-OHF(*Opuntia humifusa* Fermentation)

< 4. Balb/c 마우스에서 DNCB로 유발시킨 알러지 접촉성 피부염에 대한 천년초크림의 효과 >

가. 귀 및 복부피부의 외관상의 변화

지연형 과민반응에 대한 항원물질로 DNCB를 아세톤과 올리브오일 혼합액에 용해시켜 마우스의 우측 살바부위의 상부쪽 복부에 도포하여 1차 감작시킨 후 7일 경과후 오른쪽 귀와 복부피부에 DNCB를 도포하여 2차 면역을 일으켜 접촉성 과민반응을 유발시킨 후 천년초 발효추출물이 포함된 크림제를 매일 도포하면서 24시간 간격으로 3일간 귀 및 복부피부의 외관상을 관찰하였다. 정상군에 비하여 DNCB의 2차 도포 후 귀의 부종, 피부의 염증, 출혈, 습진, 홍반, 가피탈피 등의 피부염 관련 병변이 관찰되었고 천년초크림을 도포한 군에서는 귀의 부종과 복부피부의 염증성 병변이 현저하게 경감되어 나타났다(Fig. 34).

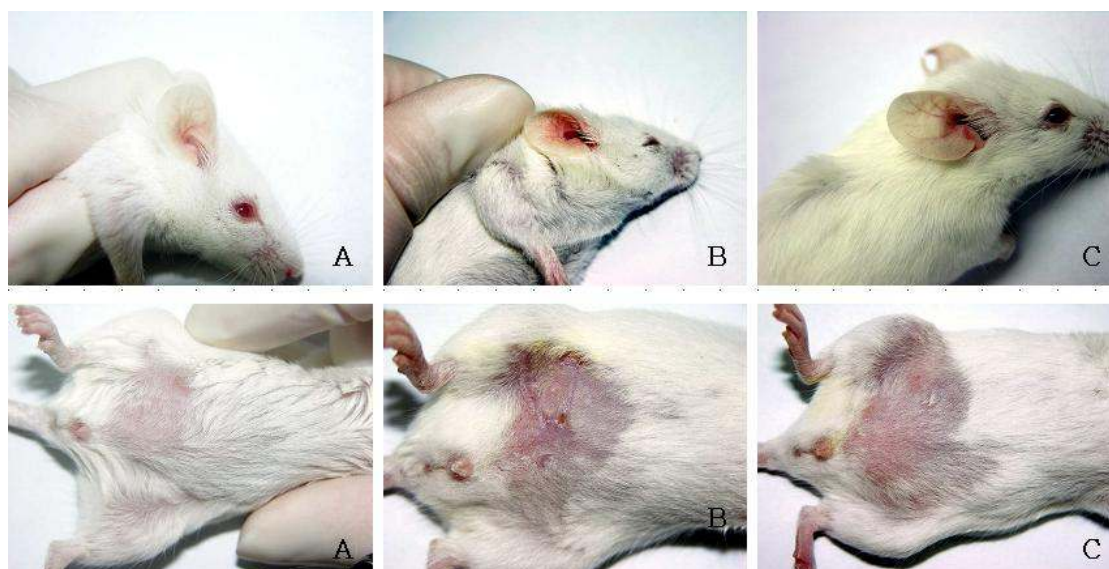


Fig. 34. Gross appearances of the *Opuntia humifusa* cream treated mouse ear and abdomen skin after exposure of DNCB. Balb/c mouse abdomen skins were excised 72h after the final application of *Opuntia humifusa* extracts and stained with hematoxylin & eosin. (A) Normal control, (B) DNCB-V (Vehicle) (C) DNCB-OHC (*Opuntia humifusa* Cream)

나. Ear thickness에서의 변화

천년초 발효추출물이 포함된 크림제를 매일 도포하면서 24시간 간격으로 3일간 귀의 두께를 측정하여 부종의 정도를 관찰하였다. 정상군에 비하여 DNCB의 2차 도포 후 귀의 부종이 급격하게 발생하면서 지속적으로 두께가 증가되었다.

천년초 추출물크림을 투여한 군에서 2일째부터 유의하게 부종이 완화되었고 3일째까지 지속적으로 부종이 완화되어 정상 귀의 두께에 가까워졌다. 이로서 천년초 추출물크림에는 항염증작용이 강하여 강력한 피부염증 억제작용이 있는 것으로 관찰되었다(Fig 35).

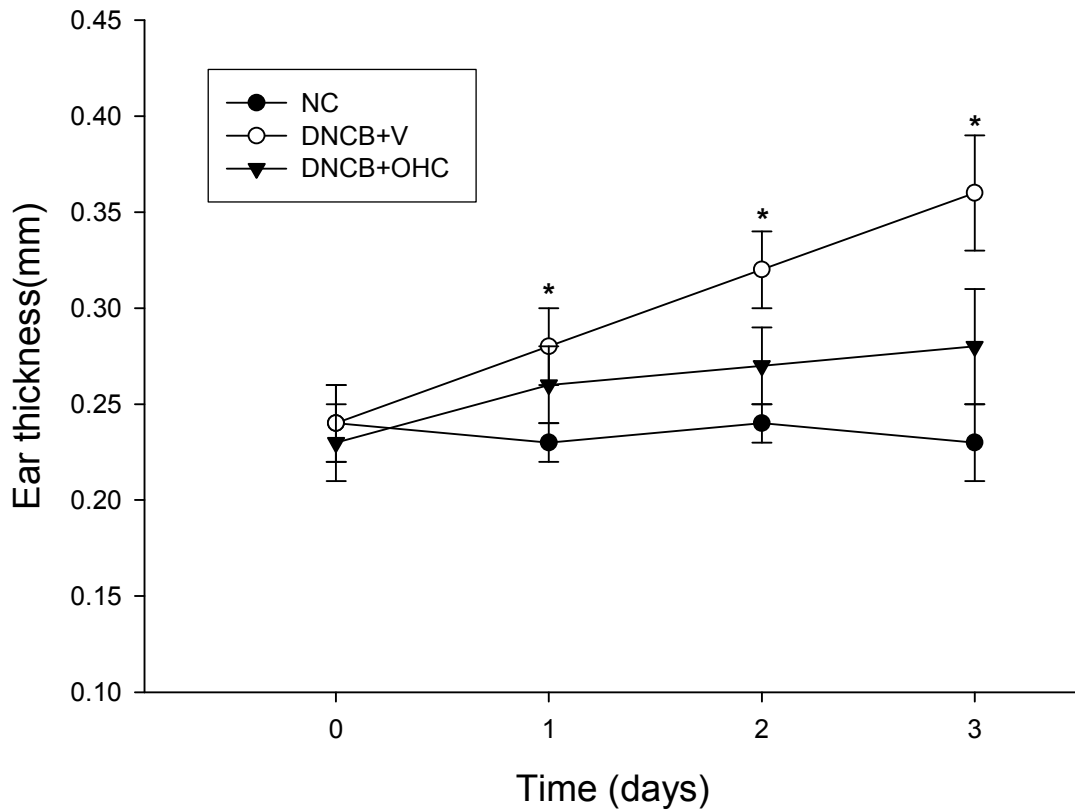


Fig 35. The time course of the ear thickness in the *Opuntia humifusa* cream treated mice after exposure of DNCB. Balb/c mice were sensitized with DNCB on the right ear and abdomen skin before 7 day. V(Vehicle), OHC(*Opuntia humifusa* Cream)

다. 혈청내 IgE의 변화

혈중 IgE 수준은 IgE ELISA kit를 사용하여 450nm에서 측정하였다. 정상군에 비하여 DNCB를 도포하여 접촉성 피부염을 유발한 군에서는 IgE의 농도가 6배 이상으로 증가되었다.

천년초 추출물크림을 도포한 군은 DNCB 대조군에 비하여 2일째부터 유의하게 IgE의 수준이 저하되어 3일째는 대조군과 정상군의 중간정도의 수준을 나타내었다. 이로서 천년초 추출물크림은 면역글로불린의 상승으로 인한 2차적인 피부염증과 같은 알러지 반응의 감소를 일으키는 것으로 관찰되었다(Fig 36).

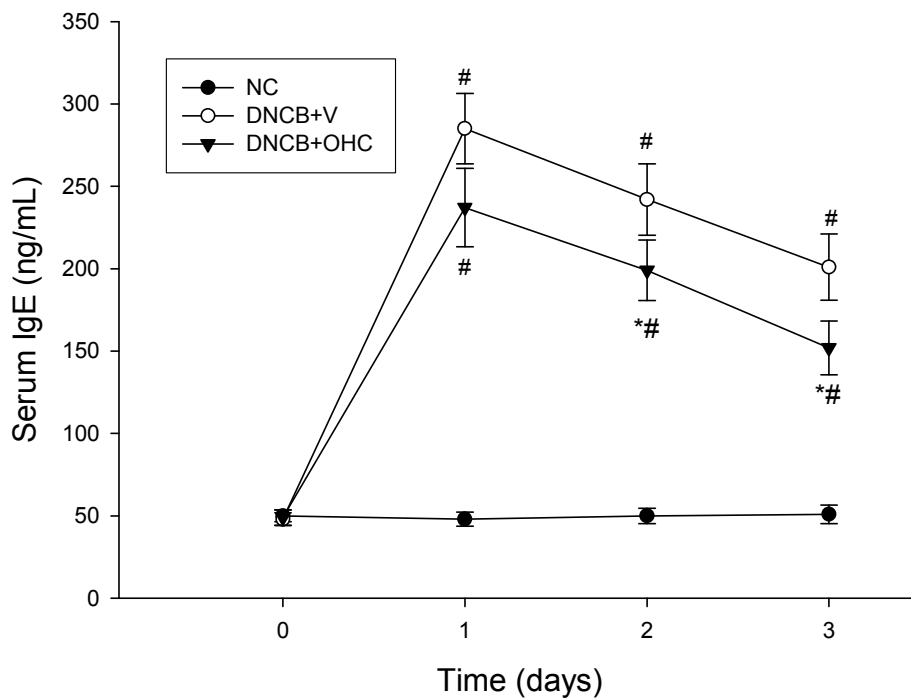
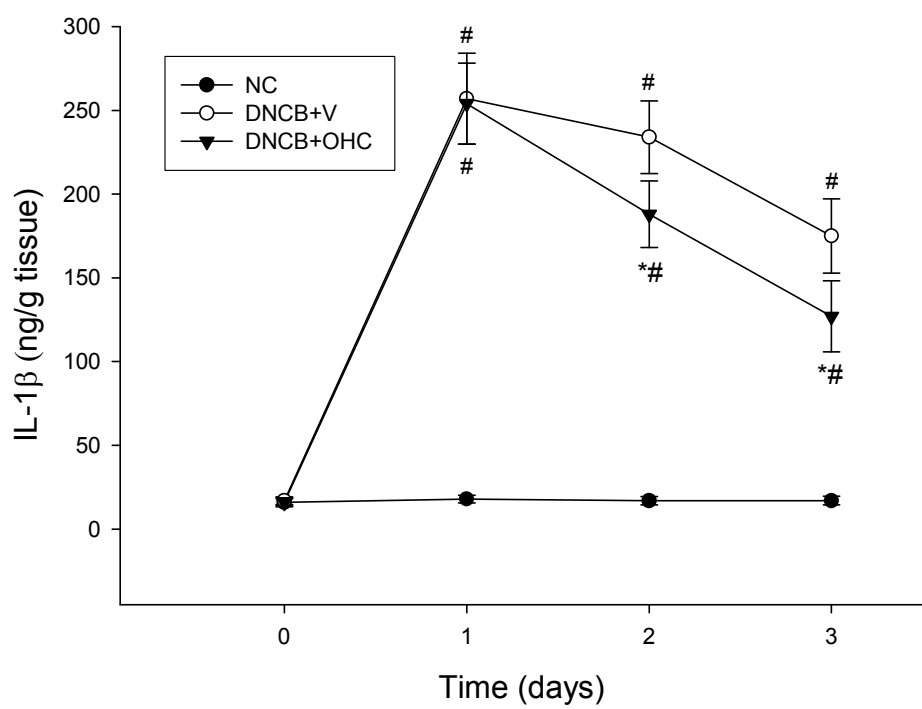
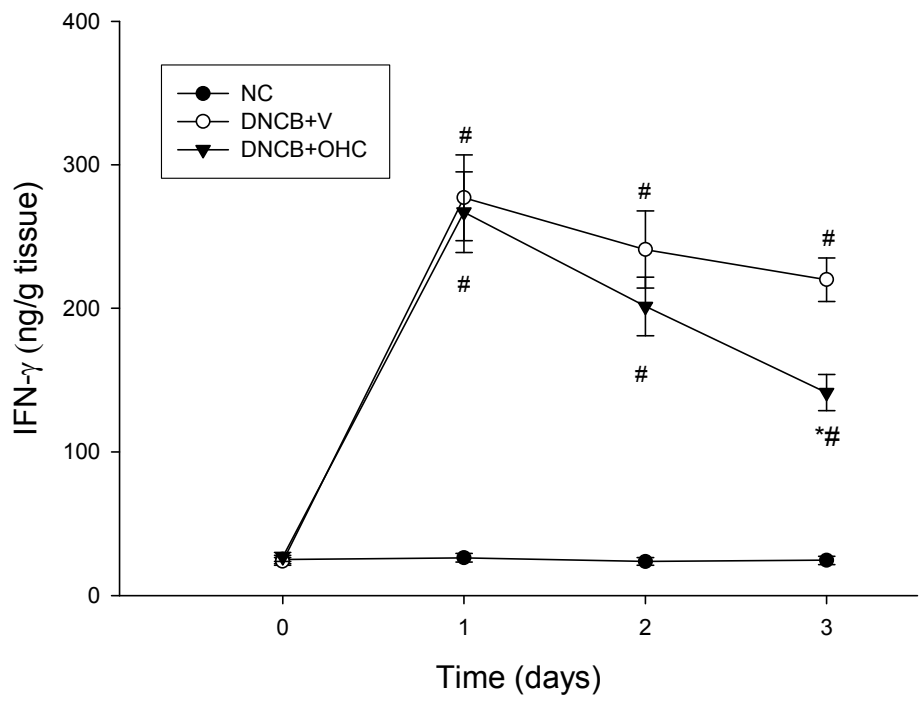


Fig 36. The time course of total IgE levels in serum in the *Opuntia humifusa* cream treated mice after exposure of DNCB. Balb/c mice were sensitized with DNCB on the right ear and abdomen skin before 7 day. The total IgE levels in serum were measured with ELISA at time points(day) after each challenge from day 0 to 3. V(Vehicle), OHC(*Opuntia humifusa* Cream)

라. 마우스 복부피부조직에서 cytokines의 측정

마우스의 복부피부조직에서 cytokine의 변화를 보면 DNCB에 노출되어 알러지성 접촉성 피부염이 발생된 피부조직에서는 정상군에 비하여 IL-1 β , IL-2, IFN- γ 의 급격한 증가가 관찰되었다. 천년초 추출물크림을 도포한 실험군에서는 2일 및 3일 경과 후 DNCB에 의하여 증가된 IL-1 β 의 수준이 유의하게 감소되었고 IL-2와 IFN- γ 의 수준도 3일후에 유의하게 감소되었다. DNCB에 의한 IL-2의 증가는 세포독성 T 임파구의 분열을 촉진시키고 이러한 현상에 연이어 세포성 면역의 증가가 일어난다고 알려져 있는데 천년초 추출물 크림의 투여로 IL-2 분비 억제제는 연이은 세포독성 T 임파구의 감소를 유도하고 IFN- γ 의 감소를 일으켜 알러지 면역반응이 억제되는 것으로 추측되었다(Fig 37).



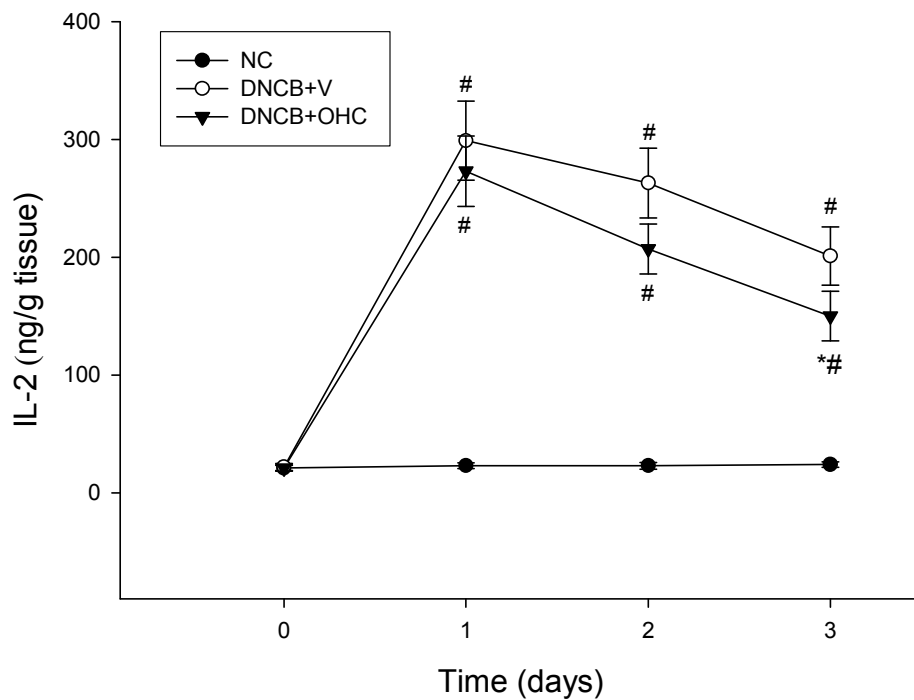


Fig 37. The time course of IL-1 β , IL-2, and Interferon(IFN)- γ levels in the abdomen skin tissue in the *Opuntia humifusa* cream treated mice after exposure of DNCB. Balb/c mice were sensitized with DNCB on the right ear and abdomen skin before 7 day. V(Vehicle), OHC(*Opuntia humifusa* Cream)

마. 접촉성 피부염 유발 마우스 귀와 복부피부의 조직병리학적 변화

DNCB에 의하여 알러지성 접촉성 피부염이 유발된 실험군의 귀의 조직병리학적 변화는 정상군에 비하여 표피층의 확장과 피하층의 위축과 층구조의 배열이 불규칙하고 피하조직의 공포성 변성 등이 명확하게 나타났으며 표피하층으로 비특이적인 염증세포와 단핵구의 침윤도 관찰되었다. 천년초 추출물크림을 도포한 실험군에서는 표피층의 비후 등의 개선과 함께 표피하층 및 피하층에서 염증세포의 출현빈도가 낮아졌다(Fig 38).



Fig 38. Histopathology of the *Opuntia humifusa* cream treated mouse ear after exposure of DNCB. Balb/c mouse ears were excised 72h after the final application of *Opuntia humifusa* cream and stained with hematoxylin & eosin. (A) Normal control, (B) DNCB-V(Vehicle) (C) DNCB-OHC(*Opuntia humifusa* Cream)

DNCB에 의하여 접촉성 피부염이 유발된 실험군의 복부피부의 조직병리학적 변화는 정상군에 비하여 표피층의 비대와 염증세포의 침윤이 명확하게 증가하였으며 천년초 추출물 크림을 도포한 실험군에서는 표피층 및 피하층의 비대가 억제되었고 진피층에서 관찰되던 열공의 출현도 및 염증세포의 침윤도도 낮아졌다(Fig 39).

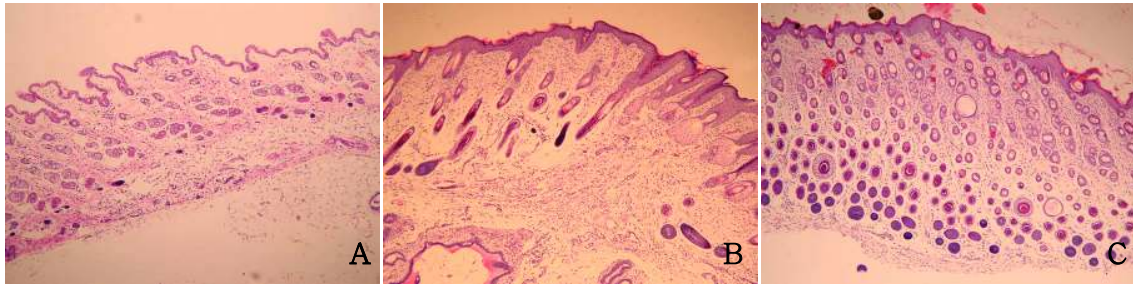


Fig 39. Histopathology of the *Opuntia humifusa* cream treated mouse abdomen skin after exposure of DNCB. Balb/c mouse abdomen skins were excised 72h after the final application of *Opuntia humifusa* extracts and stained with hematoxylin & eosin. (A) Normal control, (B) DNCB-V(Vehicle) (C) DNCB-OHC(*Opuntia humifusa* Cream)

실험군의 복부피부의 비만세포(mast cell)의 변화는 Toluidine blue 염색을 실시하여 관찰하였다. 정상군에 비하여 DNCB에 의하여 접촉성 피부염이 유발된 피부에서 현저하게 비만세포의 출현과 탈과립된 양상을 관찰하였다. 천년초 추출물 크림을 도포한 실험군에서는 전체적으로 진피층을 따라서 비만세포의 출현과 탈과립된 빈도가 현저히 감소되는 것을 확인하였다. 이로써 DNCB로 인한 알러지성 접촉성 피부염에서 histamine의 유리 및 혈중으로의 이행이 증가된다는 점과 이러한 비만세포의 탈과립이 천년초 추출물 크림을 도포한 피부조직에서는 억제되어 histamine에 대한 직접적인 자극효과가 감소될 수 있음을 확인할 수 있었다(Fig 40).

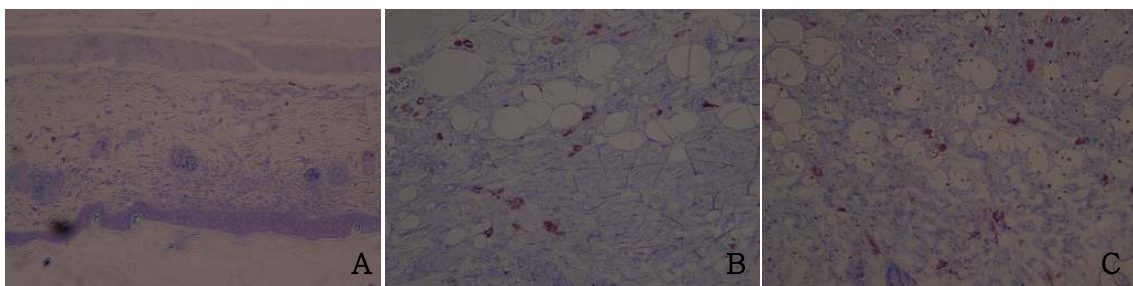


Fig 40. The mast cell of the *Opuntia humifusa* cream treated mouse abdomen skin after exposure of DNCB. Balb/c mouse abdomen skins were excised 72h after the final application of *Opuntia humifusa* extracts and stained with Toluidine blue. (A) Normal control, (B) DNCB-V(Vehicle) (C) DNCB-OHC(*Opuntia humifusa* Cream)

제 4 절 결과요약

DNCB의 감작과 자극에 의하여 알러지성 접촉성 피부염의 모델을 잘 구축되었으며 천년초 추출물을 크림형태로 최종 제품화하여 피부로 직접 적용하여 접촉성 피부염에 대한 효능을 검색하였다.

정상군에 비하여 DNCB의 2차 도포 후 귀의 부종, 피부의 염증, 출혈, 습진, 홍반, 가피탈피 등의 접촉성 피부염 관련 병변이 발생되었고 이러한 귀의 부종과 염증성 병변은 천년초 추출물 크림을 도포한 결과 부종의 완화와 뚜렷한 염증병변을 경감시켜 정상에 가깝게 회복되었다. 복부피부조직의 변화도 DNCB에 의하여 접촉성 피부염이 유발된 실험군에서 표피층의 비대와 염증세포의 침윤이 명확하게 증가하였는데 천년초 추출물 크림의 도포에 따라서 표피층 및 피하층의 비대가 억제되었고 진피층에서 관찰되던 열공의 출현도 및 염증세포의 침윤도도 낮아졌다. 이로서 천년초 추출물 크림은 직접 피부에 적용하여 강력한 항염증 효과가 있는 것으로 관찰되었다.

DNCB를 도포하여 접촉성 피부염을 유발한 군에서는 IgE의 농도가 정상군보다 6배이상 증가되었는데 천년초 추출물 크림을 도포한 실험군에서는 유의하게 IgE의 농도가 저하되어 천년초 추출물 크림은 면역글로불린의 상승으로 인한 알러지 반응의 감소를 일으키는 것으로 관찰되었다.

DNCB에 의하여 접촉성 피부염을 유발한 마우스의 복부피부조직에서 cytokine의 변화는 IL-1 β , IL-2, IFN- γ 의 농도가 증가되었으며 천년초 추출물 크림을 도포하여 IL-1 β , IL-2와 IFN- γ 가 모두 유의하게 감소되었다. DNCB에 의한 IL-2의 증가는 세포독성 T 임파구의 분열증가를 유도하고 이로 인해 세포성 면역의 증가가 일어난다고 알려져 있는데 천년초 줄기 및 발효추출물의 투여로 IL-2 분비억제는 연이은 세포독성 T 임파구의 감소를 유도하고 IFN- γ 의 감소를 일으켜 알러지 면역반응이 억제되는 것으로 추측되었다.

결론적으로 DNCB에 의한 알러지성 접촉성 피부염에 대한 천년초 추출물 크림의 효능검정을 실시한 바 천년초의 줄기 및 발효상태의 추출물로 실시하여 효능성을 관찰한 2차년도 실험결과와 거의 동일한 효능이 확인되어 천년초 추출물 크림의 도포에 따라서도 항염증, 면역조절 및 억제, 조직재생의 효능이 있는 것으로 판단되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
○ 천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 수집종 특성조사	○ 천년초선인장의 적정 재식밀도 구명 및 피복재료 선정 ○ 천년초선인장의 유기물종류 및 시용량 규명 ○ 정식시기 및 수확시기 구명 ○ 계통(유사종) 수집 및 특성조사	100
○ 천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 수집종 특성조사	○ 천년초선인장의 적정 재식밀도 구명 및 피복재료 선정 ○ 천년초선인장의 유기물종류 및 시용량 규명 ○ 정식시기 및 수확시기 구명 ○ 계통(유사종) 수집 및 특성조사 ○ 질소질비료 및 석회시용효과 구명 ○ 천년초선인장 실생번식 연구	100
○ 천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 수집종 특성조사 ○ 천년초선인장을 이용한 접촉성피부염 치료제 시제품 개발	○ 천년초선인장의 적정 명 피복재료 선정 ○ 정식시기 및 수확시기 구명 ○ 계통(유사종) 수집 및 특성조사 ○ 질소질비료 및 석회시용효과 구명 ○ 천년초선인장 실생번식 연구 ○ 생장촉진제 시용, 줄기 증수를 위한 꽃 및 열매제거 효과 연구, 차광재배 연구 등 ○ 천년초선인장을 이용한 접촉성피부염 치료시제품 개발	100

연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
○ RAPD 분석에 의한 DNA profiling 분석 ○ ITS유전자 cloning 및 염기서열 분석 ○ 천년초선인장의 유효성분 분석	○ RAPD 분석에 의한 DNA profiling 분석 ○ ITS 유전자 분석 ○ 천년초 사포닌 성분분석	100
○ <i>rbcL</i> , PSII 유전자 cloning 및 염기서열 분석 ○ 유전자 분석을 통한 SNP marker 탐색 ○ SNP primer 제작 ○ PCR 분석을 위한 최적 조건 규명	○ <i>rbcL</i> , PSII 유전자 분석 ○ SNP marker 탐색 ○ SNP primer 개발 ○ PCR 최적 조건 규명	100
○ 천년초선인장의 유효성분 분석 ○ 천년초, 백년초 구별을 위한 one-step kit 개발	○ 재분화 천년초선인장의 유전자 동질성 분석 ○ 천년초, 백년초 구별을 위한 one-step kit 개발 ○ 천년초 산성다당체 및 중성다당체 함량분석	100

목 표	연구개발 수행내용	달성도(%)
○ 천년초선인장의 안전성 및 독성 구명 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 피부자극성 및 안자극성 시험 ○ 관련문헌의 자료 조사 확보 (100%) ○ 선인장류의 약리효과에 근거한 향후 효능대상 설정(유사결과 논문 투고, 100%) ○ 단회 및 반복 독성시험 추가 실시(100%) 	100
○ 천년초선인장 추출물의 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2, 4 - dinitrochlorobenzene (DNCB)에 의한 마우스의 알러지성 접촉피부염 유발 ○ 천년초선인장 추출물의 농도별 또는 기제별 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검정 ○ 면역관련 매개인자의 변화조사(IgE, cytokines) ○ 마우스를 대상으로 질환모델 동물(알러지성 접촉피부염)을 제작하여 천년초추출물의 농도별 적용 	100
○ 천년초선인장 완제품의 알러지성 접촉피부염에 대한 효능 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ DNCB도포로 알러지성 접촉피부염의 유발 ○ Contact hypersensitivity assay ○ 피부의 조직표본 제작 ○ 면역매개인자의 변화조사(IgE, cytokines) 	100

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발 결과요약

1. 천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성피부염 치료제 개발

1) 천년초선인장 적정 재식밀도 구명

줄기 길이는 3차줄기와 4차줄기에서 밀식할수록 길어지는 경향이었으며, 줄기두께는 2차 줄기에서 3,300주/10a가 9,920주/10a보다 두꺼웠고, 줄기수는 2차줄기, 3차줄기, 4차줄기가 밀식할수록 많아졌으며, 총 줄기수는 밀식할수록 많아졌으며, 한 주당 줄기무게는 소식할수록 많았다.

주당 열매수는 3,300주/10a가 가장 많았으며, 소식할수록 많아지는 경향이었고, 주당 열매 무게는 3,300주/10a가 가장 무거웠으며, 소식할수록 무거워지는 경향이였다.

2) 천년초선인장 적정 유기물 종류 및 시용량 구명

○ 동분퇴비의 줄기는 4,800kg/10a가 다소 긴 편이었으며, 줄기수와 줄기무게는 2,400kg/10a와, 2,400kg/10a 가 다소 많거나 무거운 편이었고, 주당 열매 수와 열매무게는 1,200kg/10a와, 2,400kg/10a 가 다소 많거나 무거운 편이었다.

○ 우분퇴비의 줄기길이, 줄기폭, 줄기무게는 2,400kg/10a와, 4,800/10a 처리가 다소 양호한 편이었으며, 줄기수와 줄기무게는 시용량이 증가 할수록 口날거나 무거워지는 경향이었고, 열매수와 열매무게는 시용량이 증가 할수록 다소 많거나 무거워지는 경향이였다.

○ 계분퇴비의 줄기길이는 시용량이 많을수록 길이가 길어지는 경향이었으며, 줄기수는 시용량이 많을수록 많아지는 경향이었고, 열매수와 열매무게는 4,800kg/10a가 다소 많거나 무거운 편이었다.

3) 천년초선인장 적정 피복비닐 선정 시험

줄기의 길이는 무피복 보다 피복한 모든 처리가 대부분 양호하였으며, 그 중에서 녹색 PE가 가장 길었고, 줄기폭은 투명PE가 다소 넓은 편이었으며, 줄기수는 무피복 보다 피복한 처리가 월등하게 많았는데, 투명PE, 흑색PE, 녹색PE, 흑백PE 순이었다.

열매수와 열매무게 역시 피복한 처리들이 무피복 보다 월등하게 많거나 무거웠으며, 주당 열매무게는 흑색PE 와 투명PE가 양호한 편이었고, 줄기수는 2년생에서는 3차 줄기 까지 생성되었으나 1년생은 2차줄기까지만 생성되었다.

4) 천년초선인장 적정 피복재료 선정 시험

2005년에는 피복재료를 추가로 3가지를 더 처리하였다. 줄기길이는 모든 피복재료 처리들이 무피복 보다 길었는데, 녹색PE가 가장 길은 편이었으며, 줄기폭은 흑색PE가 넓은

편이었고, 줄기두께는 흑색PE가 두꺼운 편이었다. 줄기수는 흑백PE, 녹색PE, 흑색PE가 많은 편이었으며, 줄기무게는 녹색PE, 흑백PE, 흑색PE가 많은 편이었는데, 무피복 보다 뚜렷한 차이가 있었고, 열매수는 흑색PE, 흑백PE, 녹색PE, 부직포가 많은 편이었으며, 열매무게는 흑색PE, 흑백PE, 녹색PE가 무거운 편이었다.

5) 천년초선인장 정식시기 구명

가. 봄 정식

5월 상순 정식과 5월 하순 정식은 4차줄기까지 생성되었으나, 6월, 7월 정식은 3차줄기까지만 생성되었으며, 줄기길이는 5월 하순이 길은 편 이었고, 줄기 폭은 5월 상순과 5월 하순이 넓은 편이었으며, 줄기 수와 줄기무게는 5월 상순이 다소 많은 편이었고, 열매수는 5월 하순이 많은 편이었으며, 열매 무게도 5월 하순이 많은 편이었다.

나. 가을 정식

2005년 가을에 정식을 하였는데 대부분 고사할 것으로 나타났으며, 10월 10일 이후의 고사율은 98 ~ 96%였으며, 9월 25일의 고사율은 86%였다. 따라서 봄 정식이 좋을 것으로 판단된다.

6) 손바닥선인장 계통 수집 및 특성조사

가. 국내수집 손바닥선인장

천년초선인장, 백년초선인장, 대전선인장, 전라도선인장 등을 수집하였으며 줄기길이는 백년초선인장이 길은 편이었으며, 전라도선인장은 4차줄기까지 생성되었으나 다른 선인장은 3차줄기까지만 생성되었고, 줄기두께는 백년초선인장과 전라도선인장이 두꺼운 편이었으며, 대전선인장이 가는 편이었다.

줄기수는 전라도선인장이 가장 많았으며, 대전선인장이 가장 적었고, 경장은 백년초선인장이 가장 컷으며, 천년초선인장이 가장 작았고, 주당 줄기수와 줄기무게는 전라도선인장이 많은 편이었으며, 대전선인장이 적었다.

천년초선인장과 백년초선인장을 노지에 식재하여 월동 상태를 조사한 결과, 천년초선인장은 2005년 겨울을 지나 2006년 봄에 얼어 죽지 않고 살아남았으나, 백년초선인장은 얼어 죽었다. 백년초선인장은 중부지방(예산)에서 겨울을 나지 못하고 얼어 죽는데 반하여 천년초선인장은 월동하는 것으로 나타났다.

나. 국외 수집 손바닥선인장

Opuntia 속 중 *Opuntia humifusa* 등 21종의 외국 수집종 손바닥선인장의 생육특성을 조사한 결과, 줄기 길이가 5.5 ~ 16.0cm, 줄기폭은 0.7 ~ 10.9cm, 줄기두께는 0.7 ~ 11.1mm, 가시수는 1 ~ 210개, 가시 길이는 3.0 ~ 20.0mm까지 다양한 변이를 나타내었다.

7) 천년초선인장의 종자 발아특성 구명

천년초선인장의 열매를 수확하여 과육을 제거한 후 사례에서 발아시험을 한 결과 9℃, 18℃, 27℃, 36℃의 온도처리 암 상태나 명 상태에서 9월 28일에 치상을 한 후에 12월20일까지 조사하였으나 모두 발아를 하지 않았다. 그러나 2005년 4월 6일에 아산군 신창면의 천년초선인장 포장에서 수집한 종자를 모래땅에 파종한 결과 5월 20일에 발아가 되었다. 따라서 종자 발아를 위해서는 가을에 채종한 종자를 층적처리하여 월동한 후에 파종하여야 할 것으로 판단된다.

8) 천년초선인장 수확기에 따른 수분함량 변화

천년초선인장은 늦가을부터 줄기가 쭈글쭈글 해지면서, 수분함량이 줄어들었다가 월동기에는 갈색으로 변한다. 그런 후에 월동하는데, 아마도 월동을 하기 위해서 스스로 수분 함량을 줄이는 것으로 판단된다. 가을 수확시기에 시기별 수분함량을 조사하였다. 천년초선인장의 건조비율이 10월4일에 18.2%이었던 것이 10월 10일에는 21.9%로 늘어났는데, 이는 10월 10일의 수분함량이 10월 2일보다 20%정도 적어졌다는 것을 말해준다고 할 수 있다.

9) 석회사용량에 따른 생육, 수량 및 품질 변이 효과 구명

줄기길이는 300kg/10a가 다소 길은 편이었으며, 줄기수나 줄기무게는 처리 간에 차이가 없었다.

10) 천년초선인장 질소추비 시용효과 구명

줄기길이는 질소 222g/20L 처리구가 다소 길은 편이었으며, 줄기수는 시용량이 증가할수록 많아지는 경향이었고, 줄기무게는 시용량이 많을수록 무거워 지는 경향이었으며, 질소를 추비로 시용한 처리가 과장이 길어지는 경향이었으며, 열매무게는 질소 222g/20L 처리구가 다소 무거운 편이었다.

11) 천년초선인장 생장촉진제 효과 구명

줄기길이는 배추애(50g)처리와 요소(60g)처리가 길은 편이었으며, 줄기폭과 줄기두께는 두배나(33g) 처리가 양호하였고, 줄기수는 배추애(50g)처리가 많은 편이었으며, 줄기무게는 배추야(50g)처리가 무거운 편이었고, 열매의 길이는 요소(60g) 처리가 길은 편이었으며, 열매 무게는 요소(60g) 처리가 무거운 편이었다.

12) 천년초선인장 적정 식재 부위 구명

2년생의 줄기는 1차줄기를 식재 하였을 때는 4차줄기까지 착생이 되었으나, 2차줄기나 3차줄기를 식재한 경우에는 4차줄기는 생성되지 않고 3차줄기까지만 착생이 되었다. 이

는 1차줄기를 심는 경우가 생육이 더 왕성한 것으로 판단된다.

줄기길이 중에서 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 순으로 길었으며, 3차줄기는 1차줄기 > 2차줄기 > 3차줄기 순으로 길었다. 줄기폭 중에서 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 순으로 넓은 편이었으며, 3차줄기는 2차줄기 > 1차줄기 > 3차줄기 순으로 넓은 편이었다. 줄기두께 중에서 2차줄기는 2차줄기가 가장 두꺼웠으며, 3차줄기는 2차줄기 > 1차줄기 > 3차줄기 순으로 두꺼웠다.

줄기수 중에서 1차줄기는 1차줄기 > 3차줄기 > 2차줄기 식재 순으로 많았으며, 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 많았고, 3차줄기는 2차줄기 > 3차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 많았다. 줄기무게는 1차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차 줄기 식재 순으로 무거웠으며, 2차줄기는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 무거웠고, 3차줄기는 2차줄기 > 3차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 무거웠다. 총 줄기수는 3차줄기 > 2차줄기 > 1차줄기 식재 순으로 많았다.

과장은 2차줄기가 길은 편이었으며, 과경은 2차줄기가 굵은 편이었고, 열매수는 1차줄기와 3차줄기가 다소 많은 편이었으며, 열매무게는 1차줄기 > 3차줄기 > 2차줄기 식재 순으로 무거웠다.

13) 천년초선인장 차광효과 구명

줄기수는 차광율이 높을수록 적어지는 경향이었으며, 줄기길이는 차광율이 높아질수록 길어지는 경향이었고, 줄기폭은 차광율이 높을수록 좁아지는 경향이었으며, 줄기두께는 차광율이 높아질수록 가늘어지는 경향이었고, 줄기무게는 차광율이 높을수록 가벼워지는 경향이였다.

14) 천년초선인장 줄기 수량증대를 위한 꽃 및 열매 제거효과 구명

2006년 식재하면, 2006년에는 주로 영양생장을 하고, 2007년에 생식생장을 주로 하게 되는데, 이때 줄기 수량증대를 위하여 꽃 및 열매를 제거 처리한 결과, 줄기길이는 개화전 꽃제거 처리가 4차줄기의 길이가 길었으며, 줄기폭은 3차줄기는 개화전 열매제거 처리가 넓었고, 4차줄기는 개화전 꽃제거 처리가 넓은 편이었으며, 줄기두께는 개화전 열매제거 처리가 2차줄기, 3차줄기에서 두꺼운 편이었다. 줄기갯수는 개화전 열매와 꽃을 제거한 처리가 많았으며, 줄기무게는 개화전 열매 및 꽃제거와 개화후 열매 제거 처리가 많았고, 열매무게는 개화중때 꽃제거와 무처리는 비슷하였으며, 개화후 꽃제거는 무처리의 54.5% 수준이었고, 개화전에 열매 및 꽃제거 처리는 열매가 전혀 열리지 않았다. 2차줄기의 무게는 개화전 열매제거와 개화전 꽃제거 및 개화후 열매제거가 무거운 편이었으며, 3차줄기의 무게는 개화전 열매제거와 개화전 꽃제거가 많은 편이었고, 무처리와 개화후 꽃제거가 가벼운 편이었으며, 4차줄기의 무게는 개화전 열매제거와 개화전 꽃제거가 무거운 편이었다.

2. 천년초선인장의 안정성 및 알러지성 접촉피부염에 대한 효능검정

DNCB의 감각과 자극에 의하여 알러지성 접촉성 피부염의 모델을 잘 구축되었으며 천년초 추출물을 크림형태로 최종 제품화하여 피부로 직접 적용하여 접촉성 피부염에 대한 효능을 검색하였다.

정상군에 비하여 DNCB의 2차 도포 후 귀의 부종, 피부의 염증, 출혈, 습진, 홍반, 가피 탈피 등의 접촉성 피부염 관련 병변이 발생되었고 이러한 귀의 부종과 염증성 병변은 천년초 추출물 크림을 도포한 결과 부종의 완화와 뚜렷한 염증병변을 경감시켜 정상에 가깝게 회복되었다. 복부피부조직의 변화도 DNCB에 의하여 접촉성 피부염이 유발된 실험군에서 표피층의 비대와 염증세포의 침윤이 명확하게 증가하였는데 천년초 추출물 크림의 도포에 따라서 표피층 및 피하층의 비대가 억제되었고 진피층에서 관찰되던 열공의 출현도 및 염증세포의 침윤도도 낮아졌다. 이로서 천년초 추출물 크림은 직접 피부에 적용하여 강력한 항염증효과가 있는 것으로 관찰되었다.

DNCB를 도포하여 접촉성 피부염을 유발한 군에서는 IgE의 농도가 정상군보다 6배이상 증가되었는데 천년초 추출물 크림을 도포한 실험군에서는 유의하게 IgE의 농도가 저하되어 천년초 추출물 크림은 면역글로불린의 상승으로 인한 알러지 반응의 감소를 일으키는 것으로 관찰되었다.

DNCB에 의하여 접촉성 피부염을 유발한 마우스의 복부피부조직에서 cytokine의 변화는 IL-1 β , IL-2, IFN- γ 의 농도가 증가되었으며 천년초 추출물 크림을 도포하여 IL-1 β , IL-2와 IFN- γ 가 모두 유의하게 감소되었다. DNCB에 의한 IL-2의 증가는 세포독성 T 임파구의 분열증가를 유도하고 이로 인해 세포성 면역의 증가가 일어난다고 알려져 있는데 천년초 줄기 및 발효추출물의 투여로 IL-2 분비억제는 연이은 세포독성 T 임파구의 감소를 유도하고 IFN- γ 의 감소를 일으켜 알러지 면역반응이 억제되는 것으로 추측되었다.

결론적으로 DNCB에 의한 알러지성 접촉성 피부염에 대한 천년초 추출물 크림의 효능검정을 실시한 바 천년초의 줄기 및 발효상태의 추출물로 실시하여 효능성을 관찰한 2차년도 실험결과와 거의 동일한 효능이 확인되어 천년초 추출물 크림의 도포에 따라서도 항염증, 면역조절 및 억제, 조직재생의 효능이 있는 것으로 판단되었다.

3. 천년초선인장의 유전자 분석을 통한 기원연구 및 유효 성분 분석

1) RAPD 분석에 의한 천년초 DNA profiling 분석

Opuntia속 선인장 천년초, 백년초, 전라도선인장과 미국에서 구입한 3종의 *Opuntia humifusa*, *Opuntia rufida*, *Opuntia grahamii*를 사용하여 RAPD 분석을 실시하였다. 오페론사의 10-mer 20종을 사용한 결과 9개의 primer(OPK-01, OPK-6, OPK-07, OPK-09, OPK-10, OPY-02, OPY-05, OPY-07, OPY-08)에서 재현성 있는 결과를 얻었다. 9개의 primer로부터 67개의 polymorphic DNA fragments가 관찰되었다.

2) ITS(internal transcribed sequence)유전자 cloning 및 염기서열 분석

천년초선인장으로 부터는 685 bp의 ITS 염기정보를 얻었다. 천년초 rDNA영역은 54 bp의 18S rRNA, 162 bp의 5S rRNA, 56 bp의 26S rRNA와 이들 사이에 스페이서 영역인 193 bp의 ITS1과 220 bp의 ITS2로 구성되어 있었다. 6종의 손바닥 선인장으로부터 ITS 유전자를 cloning하여 염기서열을 비교한 결과 미국산 *Opuntia humifusa*, 국내 자생종인 전라도 선인장, 백년초, *Opuntia rufida* 등과 99%의 높은 유사도를 보였다.

3) 천년초선인장의 사포닌성분분석

천년초선인장의 줄기와 열매로부터 사포닌성분의 검출을 실시하였다. 그 결과 줄기에서는 1.1~1.5% 정도, 열매에서는 2.5~3.7% 정도의 조사포닌을 함유하고 있었다. TLC 분석 결과 저분자 사포닌이 천년초선인장의 잎줄기와 열매에서 미량으로 검출되었다. 그러나 정성분석을 위하여 HPLC 분석을 실시한 결과(Fig. 8B) 표준품으로 사용한 인삼 7종 ginsenoside(Rg₁, Rf, Re, Rd, Rc, Rb₂, Rb₁)와는 일치되는 peak가 없었다.

4) PCR에 의한 PSII 및 rbcL 유전자 분석

가) psbA 유전자 cloning 및 sequence 분석

*psbA*에 특이적인 primer 쌍을 제작한 후 13종의 손바닥 선인장으로부터 *psbA* 유전자 영역을 증폭하였다. 염기서열분석을 한 결과 천년초선인장으로 부터는 1,007 bp의 크기의 *psbA* 유전자에 대한 염기정보를 얻었고 *O. violacea* 'Gd Bush clnie'와 100%의 유사도를 나타내었고, 국내 자생종인 전라도, 선인장 및 *Opuntia*속의 다른 선인장과도 99%의 높은 유사도를 보였다.

나) rbcL 유전자 cloning 및 sequence 분석

*rbcL*에 특이적인 primer 쌍을 제작한 후 6종의 손바닥 선인장으로 부터는 1,425 bp의 크기의 *rbcL* 유전자에 대한 염기정보를 얻었다. 천년초 *rbcL*유전자는 *O. violacea* 'Gd Bush clnie'와 100%의 유사도를 나타내었고, 국내 자생종인 전라도, 선인장 및 *Opuntia*속의 다른 선인장과도 99%의 높은 유사도를 보였다.

5) 천년초 특이적인 SNP primer의 탐색 및 제작

천년초를 판별하기 위한 SNP를 탐색한 결과 PSII와 *rbcL*에서는 천년초에만 특이적으로 존재하는 SNP를 발견할 수 없었다. 그러나, ITS 유전자 영역에서는 547 bp 영역에서 조사된 다른 선인장의 경우 'C'인데 비하여 천년초와 *Opuntia humifusa*의 경우 'T'이었다. 또한 620 bp에서는 분석된 다른 선인장의 경우 'T'염기인데 천년초에서만 특이적으로 'G'로 분석되어 이 SNP를 활용하여 천년초 특이적인 분자마커로서 개발을 시도하였다.

6) SNP primer의 최적 PCR조건 구명

SNP primer의 농도를 0.5 pmol로 고정하고 control primers 농도를 1~0.001 pmol로 달리하여 조사한 결과 첨가농도가 낮아질수록 control 밴드도 관찰이 되지 않아 control primer의 경우 0.1 pmol 이상을 첨가하여야 만이 DNA 단편의 증폭을 관찰할 수 있었다. 추가적인 실험을 통하여 control primer 농도는 0.4~0.6 pmol, SNP 농도는 0.2~0.7 pmol 정도로 압축이 되었으며, 상호 조합을 통하여 최적 PCR 반응 조건을 탐색하였다.

7) 천년초, 백년초 구별을 위한 one-step kit 개발

가) 적정 *Taq* polymerase의 농도 분석

Taq polymerase의 적정 농도를 조사한 결과 0.5 U 이하에서는 PCR 증폭산물의 농도가 낮아졌고 0.75~1.25 U 농도범위에서 가장 적합하였다. 1.5 U 이상의 고농도에서도 PCR 증폭은 잘 되었으나, pseudoband가 관찰이 되었으며, 단가 면에서도 kit 개발을 위해서는 적정하지 않는 것으로 판단되었다.

나) 적정 primer 및 dNTPmix 농도분석

75 uM 이상에서는 강한 band를 관찰 할 수 있어 천년초 SNP primer를 사용할 경우에는 dNTPmix 농도는 75 uM 정도가 적당하다고 판단되었다.

다) One-step kit화

천년초 특이적인 SNP primer를 이용한 간편 구별키트를 위한 최적 조건은 template DNA 25 ng, *Taq* polymerase 0.75 U, dNTPmix는 75 uM, SNP primer 농도는 0.25 uM로 설정하였다. 2배농도로 첨가하고 여기에 안전성을 부여하기 위해서 1% glycerol 과 bromophenol blue를 첨가하여 1 mL씩 원심분리 튜브에 cocktail하여 -20°C 저장하였다.

8) 천년초 다당체 함량분석

가) 천년초 줄기, 열매의 산성 다당체 함량분석

천년초로부터 산성다당체분석을 위해서 spectrophotometer(Armersharm Bioscience, USA)를 이용하였고 glucronic acid를 이용한 Carbazole method를 참고로 하여 분석을 실시하였다. 그 결과 천년초 줄기에서는 15±3.7%, 열매조직에서는 14.1±2.5% 정도의 함량이 관찰되었다.

나) 천년초 줄기, 열매의 중성당 함량분석

중성당 분석은 phenol-sulfuric acid method을 참고로 실시하였고 정량은 glucose(sigma)를 이용하였다. 그 결과 천년초의 잎줄기와 열매 조직으로부터 이들 성분에 대한 분석을 진행한 결과 잎줄기에서는 27±5.2%, 열매조직에서는 25±7.5% 정도의 함량이 관찰되었다.

제 2절 연구개발결과의 활용계획

가. 연구개발성과 활용실적

1) 생산 분야 :

가) 안전 생산기술 개발 보급 : 4건(적정 재식밀도, 적정 유기물 종류와 시용방법, 적정 피복재료 선발, 줄기수량 증대를 위한 꽃 및 열매제거 효과)

나) 기타 진행 중인 재배실험중은 결과를 추가로 영농활용 채택 노력.

2) 기원확인, 성분분석 :

가) 천년초선인장의 유사종과의 유전적 차이를 확인. 이를 특허출원 준비 중이며,

나) 유효성분으로 사포닌의 함량을 확인하고, 그 분석법을 확립하였음.

3) 안전성 및 효능확인

가) 천년초선인장의 피부 및 경구에 대한 안전성을 동물실험을 통하여 확인하였으며,

나) 추출물 및 추출물로 제조한 크림에 대하여 알러지성 접촉피부염에 대한 효능을 확인하였다.

4) 시제품 생산 : 상기의 결과를 참고로 하여 알러지성 접촉피부염에 대한 크림타입, 로션타입의 시제품을 생산하였으며, 그 효능을 검증하는 중이다.

5)종합 : 본 연구를 통하여, 영농활용 4건, 관련논문 발표 13건(계제 6건, 발표 7건), 특허출원 준비 1건(유전자를 이용한 구별법), 기술교육 6회 325명, 방송홍보 2건 등의 성과가 있었다.

나. 연구성과 활용계획

1) 생산 분야 : 지금까지 개발된 기술과 앞으로 진행 중인 재배실험 결과를 추가로 영농활용으로 채택되도록 노력하여, 교육 및 기술지도 자료로 활용함.

2) 기원확인, 성분분석 : 유사종과의 구별법을 특허출원하며, 유효성분은 산업기반 구축에 사용.

3) 안전성 및 효능확인 : 안전성 및 효능연구 결과는 제품생산 및 판매에 활용.

4) 시제품 생산 : 알러지성 접촉피부염에 대한 크림타입 등의 시제품의 효능을 검증하여 기술이전 및 산업화에 활용함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

외국의 순바닥선인장 21종을 수집하여 재배를 하면서 특성검정을 하였으며, 유전자분석을 하여 천년초선인장의 분류의 참고자료로 활용하였다.

제 7 장 참고문헌

1. Abma E.M., Blanken R. and DeHeide L.J. (2002) Cushing syndrome caused by topical steroid therapy for psoriasis. *Neth. J. Med.* 60, 148-150.
2. Ahmad, A., et al., Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. *Antiviral Res* 1996 May;30(2-3):75-85.
3. Akhavan A. and Cohen S.R. (2003) The relationship between atopic dermatitis and contact dermatitis. *Clin. Dermatol.* 21, 158-62.
4. Alarcon-Aguilar, F.J., et al., Hypoglycemic activity of two polysaccharides isolated from *Opuntia ficus-indica* and *O. streptacantha*. *Proc West Pharmacol Soc* 2003;46:139-42.
5. Askar, A., and S.K. El-Samahy. 1981. Chemical composition of prickly pear fruit. *Deutscheebensmittel-Rundschau* 77:279-281.
6. 배인영, 윤은주, 우정민, 김주신, 이현규, 양차범. 2002. 손바닥 선인장 열매를 이용한 전통주 개발 *J.korean soc.Agric. 초드. Biotechnol* .45(1):11~17
7. Barbera, G., F. Carimi, and P. Inglese. 1993. *La coltura del ficodindia*. Edagricole. Bologna. Italy.
8. Barbera, G., P. Inglese, and T. La Manita. 1994. Seed content and fruit characteristics in cactus pear. *Scientia Horticulturae* 58:161-165
9. Barbera, G., P. Inglese, and E. Pimienta-Barrios. 1995. *Agroecology. cultivation and uses of cacyus pear*. F.A.O. Rome. Italy.
10. Brown, T. (2004) Strategies for prevention: occupational contact dermatitis. *Occup. Med. (Lond.)* 54, 450- 457.
11. Bruch-Gerharz D., Fehsel K., Suschek C., Michel G., Ruzicka T. and Kolba-Bachofen V. (1996) A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J. Exp. Med.* 184, 2007-2012.
12. Bruch-Gerharz D., Ruzicka T. and Kolb-Bachofen V. (1998) Nitric Oxide in Human Skin: Current Status and Future Prospects. *J. Invest. Dermatol.* 110, 1-7.
13. Budinsky, A., et al., Regular ingestion of opuntia robusta lowers oxidation injury.

- Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2001 Jul;65(1):45–50.
14. Burrer, F., Lebreton, P.H. and Voirin, B. 1982. Les aglycones falvoniques de cactus. *J. Nat. Prod.* 45:687.
 15. Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M., Pintaudi, A.M., Kohen, R. and Livrea, M.A. (2002) Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *J. Agric. Food. Chem.* 50, 6895–6901.
 16. Bwititi, P., Musabayane, C.T. and Nhachi, C.F. (2000) Effects of *Opuntia megacantha* on blood glucose and kidney function in streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 69, 247–52.
 17. Castellar, R., et al., Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2003 Apr 23;51(9):2772–6.
 18. Charman C., Morris A.D. and Williams H.C. (2000) Topical corticosteroid phobia in patients with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 142, 931–936.
 19. 최화정, 박승춘, 홍태희, 2005. 손바닥선인장의 발효액의 화학적 성분과 자궁경부암 세포주에 대한 항암작용. *한국식품영양학회지*.34(10):1525~1530.
 20. 최종원, 이정규, 이영철, 문영인, 박희중, 한용남. 2001. 손바닥 선인장 열매 및 줄기 추출물의 생리활성 I – 일반약리검색. *생약학회지*.32(4):330~337.
 21. 최종원, 이정규, 이영철, 문영인, 박희중, 한용남. 2002a. 손바닥 선인장 열매 및 줄기 추출물의 생리활성(II) 흰쥐의 식이성 고지혈증에 미치는 영향. *생약학회지* 33(3):230–237.
 22. 최종원, 이정규, 이영철, 문영인, 박희중, 한용남. 2002b. 손바닥 선인장 열매 및 줄기 추출물의 생리활성(III) 흰쥐의 알콜성 고지혈증에 미치는 영향. *생약학회지* 33(3):238–244.
 23. Chiu TH, Chen TR, Hwang WZ, Tsen HY. 2005. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S–23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. *Int J Food Microbiol.* 97(3):259–265.
 24. Coskuner, Y., et al., Effect of pH and temperature on the thermostability of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) yellow–orange pigments. *Nahrung* 2000 Aug;44(4):261–3.23;51(9):2772–6.
 25. de La Barrera, E. and Nobel, P.S. (2004) Carbon and water relations for developing fruits of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller, including effects of drought and gibberellic acid. *J. Exp. Bot.* 55, 719–729.

26. Denduangboripant J, Cronk QC. 2000. High intraindividual variation in internal transcribed spacer sequences in *Aeschynanthus* (Gesneriaceae): implications for phylogenetics. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 267(1451):1407–15.
27. Dok-Go, H., Lee, K.H., Kim, H.J., Lee, E.H., Lee, J., Song, Y.S., Lee, Y.H., Jin, C., Lee, Y.S. and Cho, J. (2003) Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res.* 965, 130–136.
28. Enk A.H. and Katz S.I. (1992) Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89(4), 1398–1402.
29. Enk A.H., Angeloni V.L., Udey M.C. and Katz S.I. (1993) An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 beta in the initiation of primary immune responses in skin. *J. Immunol.* 150(9), 3698–3704.
30. Faten R, Mohamed M, Mohamed M. 2002. Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of ribosomal internal transcribed spacer region analysis on polyacrylamide gel electrophoresis reveals two haplotypes coexisting in *Myzus*. *Electrophoresis.* 23(2):186–188.
31. Fernandez, M.L., E.C.K.Lin, A. Trejo, and D.J. McNamara. 1992. Prickly pear (*Opuntia* sp) pectin reverses low density lipoprotein receptor suppression induced by a hypercholesterolemic diet in guinea pigs. *J. Nutr.* 122:2330–2339.
32. Fernandez, M.L., E. C. K. Lin, A. Trejo, and D. J. McNamara. 1994. Prickly pear (*Opuntia* sp) pectin alters hepatic cholesterol metabolism without affecting cholesterol absorption in guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. *J. Nutrition.* 124:817–824.
33. Fisher D.A. (1995) Adverse effects of topical corticosteroids use. *West. J. Med.* 162, 123–126.
34. Flath, R.A. and J.M. Takahashi. 1978. Volatile constituents of Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica* Mill., de Castilla Variety. *J. Agric. Food Chem.* 26:835–837.
35. Flores, V.C. 1991. The present and potential market conditions of both cactus leaves and cactus pear in Mexico, and the exportation possibilities to the United States and other countries. In: *Proc. Second Annual Texas Prickly Pear Council Meeting.* Texas A & I Univ., Kingsville p. 94–101.
36. Florian, C.S. and Reinhold C. (2005) Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their

- chemistry, technology, and uses. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 175–194.
37. Frarti, A. C., B. E. Gordillo, P. A. Altamirano and C. R. Ariza. 1988. Hyperglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lemaire in non–insulin–dependent diabetes. *Diabetes Care* 11:63–66.
 38. Frarti, A.C., B.E. Grodillo, P.A. Altamirano, C.R. Ariza, Islas, and A. Chavez–Negrete. 1990. Acute hyperglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lemaire in non–insulin–dependent diabetes. *Diabetes Care* 13:455–456.
 39. Frarti, A.C., J.A. Fernandez–Harp., H. De La Riva., R. Ariza–Andraca, and M. Del Carmen–Torres. 1983. Effect of nopal(*Opuntia* spp.) on serum lipids, glycemia and body weight. *Arch. Invest. med. Mexico* 14:117–1125.
 40. Frarti, A.C., M.D. Valle–Martinez, C.R. Ariza, Islas, and A. Chavez–Negrete. 1989. Hyperglycemic effect of different doses of nopal (*Opuntia streptacantha* Lemaire) in patients with type II diabetes mellitus. *Arch. Invest. Med. Mexico* 20:197–201.
 41. Frati–Munari, A.C., et al., [Effect of a dehydrated extract of nopal (*Opuntia ficus indica* Mill.) on blood glucose].*Arch Invest Med (Mex)* 1989 Jul–Sep;20(3):211–6.
 42. Fuentes–Rodringuez. J. 1991. A survey of the feeding parctieces, costs and production of dairy and beef cattle in Northern Mexico p. 118–123.
 43. Fujii Y., Takeuchi H., Tanaka K., Sakuma S., Ohkubo Y. and Mutoh S. (2002) Effects of FK506 (tacrolimus hydrate) on chronic oxazoloneinduced dermatitis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 456(1–3), 115–121.
 44. Galati, E.M., et al., Biological effect of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae) waste matter. Note I: diuretic activity.*J. Ethnopharmacol* 2002 Jan;79(1):17–21.
 45. Galati, E.M., Tripodo, M.M., Trovato, A., Miceli, N. and Monforte, M.T. (2002) Biological effect of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae) waste matter. Note I: diuretic activity. *J. Ethnopharmacol.* 79, 17–21.
 46. Gibson. A. C., and P. S. Nobel. 1986. The cactus primer. Harvard Univ. Press. Cambridge. MA.
 47. Gi–Sang Kim, Mohammad Lalmoddin Mollah, Tae–Wan Kim, Seung–Chun Park, Zae Young Ryoo, Yong–Pil Cheon, Kil–Soo Kim Effect of *Opuntia humifusa* on Picryl Chloride–induced Atopic Dermatitis in NC/Nga mice. *한국실험동물학회지* 6(0):314.
 48. Gi–Sang Kim, Mohammad Lalmoddin Mollah, Tae–Wan Kim, Seung–Chun Park, Zae

- Young Ryoo, Yong-Pil Cheo, Kil-Soo Kim, Effect of *Opuntia humifusa* on Picryl Chloride-induced Atopic Dermatitis in NC/Nga mice .2007. 한국실험동물학회지 6(0):314.
49. 굴전 만. 1989. 세계유용식물사전 p.53.
 50. 고경식. 1994. 광속 식물분류학. 세문사 p. 314-316.
 51. Gurrieri, S., et al., Chemical characterization of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) and perspectives for the storage of its juice. J. Agric. Food Chem. 2000 Nov;48(11):5424-31.
 52. Hackett BJ, Gimnig J, Guelbeogo W, Costantini C, Koekemoer LL, Coetzee M, Collins FH, Besansky NJ. 2000. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon .Insect Mol Biol.9(4):369-74.
 53. Han, Y.N., et al., Monoamine oxidase B inhibitors from the fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. Arch Pharm. Res. 2001 Feb;24(1):51-4.
 54. 허승담, 박달수, 고경민, 김문관, 손원근, 이두식, 신태균 .2003. 양식념치에서 손바닥 선인장 발효물의 항균 효과. 한국수의공중보건학회지 27(3):143~144.
 55. Inglese, P., G. Barbera, and T. La Martia. 1993. Research strategies and improvement of cactus pear (*Opuntia ficus-india*) fruit quality and production. Proc. Forth Annual Texas Prickly Pear Council Meeting. Texas A & I Univ., Kingsville p. 24-40.
 56. Jacobo, C.M. and S.P. Gonzalez. 1994. Reyna(syn. Alfajayucan) is the leading cactus pear cultivar in central Mexico. Fruit Varieties J. 48:134-136.
 57. 장경원, 박상희, 하상도 (2003) 기능성식품 기술동향. 식품과학과 산업 3: p. 8-16.
 58. 정미숙, 김경희. 1996. 선인장 붉은 열매에서 추출한 Betanine 색소의 안전성. 한국식품영양학회지. 12(4):506~507.
 59. 정세준. 전기용. 강태현. 고응배, 김윤철. 1999. 손바닥 선인장 열매의 Flavonoid 성분. 생약학회지 30(1):84~97.
 60. 정해정 2000. 손바닥 선인장의 항산화 및 항균특성 한국식품학회지 16(2):160~161.
 61. Kalish R.S. (1996) Recent developments in the pathogenesis of allergic contact dermatitis. Arch. Dermatol. 127, 1558-63.
 62. 강소신의학원. 1985. 중약대사전. 상해과학기술출판사 p.2731.
 63. Kato H, Terauchi R, Utech FH, Kawano S. 1995. Molecular systematics of the

- Trilliaceae sensu lato as inferred from rbcL sequence data. *Mol Phylogenet Evol.* 4(2):184-93.
64. Kil-Soo Kim, Mi-Jee, Gi-Sang Kim, Seung-Chun Park, Man-Hee Rhe, Jun-Gyo In, Bok-Hyun Kim, Young-Lae Nah, Hyun Ho Kim, Seung-Ho Han .2007. Effects of *Opuntia humifusa* Extract on DNCB-Induced Allergic Contact Dermatitis in BALB/c Mice , *Laboratory Animal Research* Vol. 23(2):169~173.
65. 김인환, 김명희, 김홍만, 김영언, .1995. 선인장열매 적색 색소의 열안전성에 대한 항산화제의 효과. *한국식품영양학회지* 27(6):1013~1016.
66. Klein RR, Houtz RL. 1995. Cloning and developmental expression of pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit N-methyltransferase. *Plant Mol Biol.* 27(2):249-61.
67. Kondo S. and Sauder D.N. (1995) Epidermal cytokines in allergic contact dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 33, 786-800.
68. 권대근, 송영주 .2005. 손바닥 선인장이 흰쥐의 유산소 운동에 미치는 영향. *운동영향학회지.* 9(2):183~188.
70. Kovacs GM, Rudnoy S, Vagvolgyi C, Lasztity D, Racz I, Bratek Z. 2001. Intraspecific invariability of the internal transcribed spacer region of rDNA of the truffle *Terfezia terfezioides* in Europe. *Folia Microbiol (Praha).* 46(5):423-426.
71. Kuti. J.O. 1992. Growth and compositional changes during the development of prickly pear fruit. *J. Horticultural Sci.* 67:861-868.
72. Lee, E.B., et al., Effects of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten* stem on gastric damages in rats. *Arch Pharm Res* 2002 Feb;25(1):67-70.
73. Lee, E.B., Hyun, J.E., Li, D.W. and Moon, Y.I. (2002) Effects of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten* Stem on Gastric Damages in Rats. *Arch. Pharm. Res.* 25(1), 67-70.
74. 이후장. 1997. 랫드의 스트레스성 위궤양에 대한 선인장의 항궤양작용에 관한 연구. 서울대학교 보건대학원 석사학위논문.
75. Lee, J.C., et al., Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *J. Agric. Food Chem.* 2002 Oct 23;50(22):6490-6.
76. 이경석, 김민국, 이기영. 2004. 병원성 식중독 미생물에 대한 천년초선인장 추출물의 항균 활성. *한국식품영양과학회지.* 33(8):1268~1272.
77. 이경석, 오창석, 이기영. 2005. 천년초선인장 추출물의 항산화 효과. *한국식품과학회지.*

- 37(3):474~478.
78. 이세희. 2000. 선인장 열매의 색소 추출물에 의한 양모섬유의 염색. 대구효성카톨릭대학교 대학원 석사학위논문.
 79. 이삼빈, 황기, 하영득. 1998. 선인장 열매로부터 추출된 점질물 a;c 색소의 기능성 . 한국식품영양학회지 27(5):821~826.
 80. 이상덕, 정승일, 김민지, 김소희, 김관기, 김순재, 손기철. 2003. 광도 광주기 및야간 온도가 선인장의 일중 Co2교환 속도에 미치는 영향. J.korean soc..Hort. sci. 44(5):774~779.
 81. 이상덕, 정승일, 김소희, 김민지, 김여정, 남궁견, 손기철 2002. 식물체 co₂ 교환 측정장치를 이용한 선인장 종에 따른 주. 야간 co₂교환 특성 비교. 한국식품 학회지. 44(5):767~773.
 82. 이상빈, 황 기, 하영득. 1998. 선인장 열매로부터 추출된 점질물 및 색소의 기능성. 한국식품영양과학회지. 27(5):821-826.
 83. 이영철, 신경아, 정승원, 문영인, 김성대, 한용남. 1999. 손바닥선인장 분말을 첨가한 생면의 품질특성. Korean J. Food Sci. Technol. 31(6):1604-1612.
 84. 이영철, 황금희, 한동휴.김성태, 1997 손바닥선인장의 성분 특성 한국식품학회지 29(5):847~853.
 85. Letko E., Bhol K., Pinar V., Foster C.S. and Ahmed A.R. (1999) Tacrolimus (FK 506). *Ann. All. Asthma Immunol.* 83, 179-190.
 86. Loro, J.F., I. del Rio, and L. Perez-Santana, Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Opuntia dillenii* aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 1999 Nov 1;67(2):213-8.
 87. Lozoya. M. 1989. Hypoglycaemic activity of *Opuntia streptacantha* throughout its annual cycle. *Am. J. Chin. Med.* 17:221-224.
 88. Maguire H.C.Jr. (1995) Murine recombinant IL-12 increases the acquisition of allergic contact dermatitis in the mouse. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 106, 166-168.
 89. Manen JF, Natali A. 1995. Comparison of the evolution of ribulose-1, 5-biphosphate carboxylas (rbcL) and atpB-rbcL noncoding spacer sequences in a recent plant group, the tribe Rubieae (Rubiaceae). *J Mol Evol.* 41(6):920-7.
 90. Martre, P., G.B. North, and P.S. Nobel, Hydraulic conductance and mercury-sensitive water transport for roots of *Opuntia acanthocarpa* in relation to soil drying and rewetting. *Plant Physiol* 2001 May;126(1):352-62.
 91. Mass, E.V. 1986. Salt tolerance of plants. *Appl. Arg. Res.* 1:12-26.

92. McGovern, T.W. and T.M. Barkley, Botanical briefs: prickly pear cactus—*Opuntia Miller*. *Cutis* 2001 Sep;68(3):188–90.
93. Merin, U., S. Gagel, G. Popel, S. Bernstein, and I. Rosenthal. 1987. Thermal degradation Kinetics of prickly-pear-fruit red pigment. *J. Food Sei.* 50: 485–486.
94. 문영인. 2002. 2002손바닥선인장 처리결과. 북제주군농업기술센터.
95. 문영인. 2004. 손바닥선인장의 재배기술과 성분분석 및 기능성에 관한 연구. 제주대학교박사 학위논문.
96. Nerd, A., and Y. Mizrahi. 1996. Reproductive biology of cactus fruit crops. *Hort. Rev.*18: 321–346.
97. Nerd, A., R. Mesika., and Y. Mizrahi. 1993. Effect of N fertilization on autumn flowering and N metabolism in prickly pear. *J. Hort. Sci.* 68:337–342.
98. Nobel, P. S. 1988. Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge Univ. Press. New York.
99. Nobel, P. S. 1994. Remarkable agaves and cacti. *New Phytol.* 119:183–205.
100. 박달수, 이기현, 문창중, 손원근, 신태균. 2004. 손바닥 선인장 발효물의 급여가 이유자돈의 성장에 미치는 영향. *한국수의 공중보건학회지*28(1):23~24.
101. Park, E.H. and Chun, M.J. (2001) Wound healing activity of *Opuntia ficus-indica*. *Fitoterapia.* 72, 165–167.
102. Park, E.H. and M.J. Chun, Wound healing activity of *Opuntia ficus-indica*. *Fitoterapia* 2001 Feb;72(2):165–7.
103. Park, E.H., et al., An anti-inflammatory principle from cactus. *Fitoterapia* 2001Mar;72(3): 288–90.
104. Park, E.H., Kahng, J.H. and Paek, E.A. (1998) Studies on the pharmacological action of cactus: identification of its anti-inflammatory effect. *Arch. Pharm. Res.* 21, 30–34.
105. Piguet P.F., Garu G.E., Hauser C. and Vassalli P. (1991) Tumor Necrosis Factor is a critical mediator in hapten-induced irritant and contact hypersensitivity reactions. *J. Exp. Med.* 173, 673–679.
106. Pimienta-Barrios. E. 1990. El nopal tunero Universidad de Guadalajara, Guadalajara Jalisco.
107. Pimienta-Barrios. E. 1991. An overview of prickly pear production in the central part of

- Mexico. Proc. Second Annual Texas Prickly Pear Council Meeting. Texas A & I Univ., Kingsville p. 1–15.
108. Pimienta–Barrios. E. 1994. Prickly pear(*Opuntia spp.*): a valuable fruit crop for semi–arid lands of Mexico. *J. Arid Environ.* 28:1–11.
 109. Pintado, A.I., et al., Caseinolytic activity of fruit extract from *Opuntia ficus–indica* on bovine, caprine and ovine sodium caseinates. *Biotechnol Prog* 2001 Jul–Aug;17(4):643–6.
 110. Retamo S., Remitz A. and Kyllchen H. (2002) Topical corticosteroid immunomodulation in the treatment of atopic dermatitis. *Am. J. Clin. Dermatol.* 3, 381–388.
 111. Rodriguez–Felix, A., and M. Cantwell. 1988. Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (Nopalitos). *Plant Foods for Human Nutrition* 38:83–93.
 112. Saenz, C., Sepulveda, E., Araya, C., and Calvo. C. 1993. Color changes in concentrated juices of prickly pear(*Opuntia ficus–indica*) during storage different temperature. *Lebensmittel–Wiss. Technol.* 26:417–421.
 113. Satta, M.A. and A. Sisini, [Glucose–6–phosphatase and fructose–1,6–diphosphatase activity in *Opuntia ficus–indica*]. *Boll Soc. Ital. Biol. Sper.* 1964 Sep 30;40(18):1109–10.
 114. Sawaya, W.N., J.K. Khalil, and M.M. Al–Mohammad. 1983. Nutritive value of prickly pear seeds (*Opuntia ficus–indica*). *Quality Plant Foods Hum. Nutr.* 33:91–97.
 115. Schwarz T. (1995) Interleukin–12 and its role in cutaneous sensitization. *Res. Immunol.* 146, 494–499.
 116. Seo, K., K. Yang, and S. KH, Antimicrobial and antioxidative activities of *Opuntia ficus–indica* var. *Saboten* extracts. *Korean J. POSTHARVEST SCI. TECHNOL*, 1999. 6(3): p. 355–359.
 117. Seung–Ho Han, Hyun–Ho Kim, Young–Sik Kang, Jun–Gyo In, Bok–Hyun Kim, Zae–Young Ryoo, Sang–Gyu Lee, Kil–Soo Kim, Skin and Eye Irritation Tests of *Opuntia humifusa* Extract in Rabbits. *Laboratory Animal Research.* 2007. 23(4):363~367.
 118. Seung–Ho Han, Hyun–Ho Kim, Young–Sik Kang, Jun–Gyo In, Bok–Hyun Kim,

- Zae-Young Ryoo, Sang-Gyu Lee, Kil-Soo Kim. .Single and 14-Day Repeated Oral Toxicity Studies of *Opuntia humifusa* Extract in Sprague-Dawley Rats 한국실험동물학회지. 23(4):263 ~ 266.
119. Seung-Ho Han, Hyun-Ho Kim, Young-Sik Kang, Jun-Gyo In, Bok-Hyun Kim, Zae-Young Ryoo, Sang-Gyu Lee, Kil-Soo Kim, 2007. Single and 14-Day Repeated Oral Toxicity Studies of *Opuntia humifusa* Extract in Sprague-Dawley Rats. 한국실험동물학회지 23(4):357~361.
120. Shornick L.P., De Togni P., Mariathasan S., Goellner J., Strauss-Schoenberger J., Karr RW., Ferguson T.A. and Chaplin D.D. (1996) Mice deficient in IL-1beta manifest impaired contact hypersensitivity to trinitrochlorobenzene. *J. Exp. Med.* 183(4), 1427-1436.
121. 신두호.이연화. 2005. 손바닥 선인장 열매 분말 첨가 식빵의 품질 특성. 한국식품영양학회지 18(4):341~348.
122. 신지은, 한명주. 이인경, 문영인, 김동현 Alloxan 및 streptozotocin유도 당뇨병모델 동물에서 손바닥 선인장의 혈당강화 효과 생약학회지.34(1):75~79.
123. 신지은, 한명주, 이영철. 문영인. 김동현 .2002. db/db당뇨 모델 생쥐에서 손바닥 선인장의 항당뇨 효과 생약학회지 33(4):332~336.
124. 신태균, 김성호. 1998. 손바닥선인장의 방사선 방호효과. 제주생명과학연구 1(1):25-32.
125. 신태균.이선주. 김세재. 1998. 손바닥 선인장 추출물이 면역세포에 미치는 영향. 한국수의 병리학회(2):31~35.
126. Stevens R.L. and Austen K.F. (1989) Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol. Today.* 10, 381-386.
127. Tamura MN, Fuse S, Azuma H, Hasebe M. 2004. Biosystematic studies on the family Tofieldiaceae I. Phylogeny and circumscription of the family inferred from DNA sequences of matK and rbcL. *Plant Biol (Stuttg).* 6(5):562-7.
128. Varga J, Toth B, Rigo K, Teren J, Hoekstra RF, Kozakiewicz Z. 2000. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Circumdati* based on sequences of the internal transcribed spacer regions and the 5.8 S rRNA gene. *Fungal Genet Biol.* 30(1):71-80.
129. Weiss, J., A, Nead, and Y. Mizrahi. 1993. Vegetative parthenocarpy in the cactus pear *Opuntia ficus-indica*(L.) Mill. *Ann. Bot.* 72:521-526.
130. Wessels, A. B. 1998. Spineless prickly pear First Perskor. Johannesburg, South Africa.

131. Wiese, J., McPherson, S., Odden, M.C. and Shlipak, M.G. (2004) Effect of *Opuntia ficus indica* on symptoms of the alcohol hangover. *Arch. Inter.*
132. Yang EC, Boo SM. 2004. Evidence for two independent lineages of Griffithsia (Ceramiaceae, Rhodophyta) based on plastid protein-coding psbA, psbA, and rbcL gene sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 31(2):680-8.
134. Yoo-Ri Kim, Mi-Ree Lee, Seung-Chun Park, Man-Hee Rhee, Bok-Hyeon Kim, Young-Lae , Zae-Young Ryoo, Kil-Soo Kim .2005. Effect of *Opuntia humifusa* Extract on Indomethacin-induced Gastric Ulcer in Sprague Dawley Rat. 한국실험동물학회 학술발표대회 논문집 2005년 한국실험동물학회 춘계학술대회 6(0):334.
135. Yoo-Ri Kim, Mi-Ree Lee, Young-Hoan Kim, Bong-Jun Jang, Seung-Chun Park, Seung-Ho Han, Bok-Hyun Kim, Zae-Young Ryoo, Kil-Soo Kim, .2005. Effect of *Opuntia humifusa* Extract on Indomethacin-induced Gastric Ulcer in Sprague Dawley Rat. 한국실험동물학회지. 21(4):375~378.
136. Young-Hoan Kim, Seung-Chun Park, Wha-Young Son, Man-Hee Rhee, Tae-Wan Kim, Seung-Ho Han, Bok-Hyun Kim, Kil-Soo Kim. 2005. Hepatoprotective Effects of *Opuntia humifusa* against Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Rats. 한국실험동물학회지. 23(4)169~173.
137. Young-Hoan Kim, Seung-Chun Park, Wha-Young Son, Man-Hee Rhee, Tae-Wan Kim, Seung-Ho Han, Bok-Hyun Kim, Kil-Soo Kim .2005. Hepatoprotective Effects of *Opuntia humifusa* against Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury in Rats. 한국실험동물학회지. 21(3):263~266.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

천년초선아침의 안전 생산기술 개발 및 절충성외부염 치료제 개발 농림수산식품부