

ITS(internal transcribed sequence) 분석을 통한 천년초 선인장(*Opuntia humifusa*)의 유연관계분석

인준교, 이범수, 한승호¹, 신철우¹, 양덕춘^{2*}

(주)바이오피아 생명공학연구소, ¹충남농업기술원, ²경희대학교 한방재료가공학과

*E-mail. dcyang@khu.ac.kr

연구목적

제주도에서 자생하는 손바닥 선인장인 백년초는 내한성이 매우 약한데 비하여, 내륙지방에서 재배되고 있는 것은 손바닥 선인장인 천년초는 한 겨울에도 노지에서 월동이 가능하다. 백년초와 천년초는 그 기원에 대한 연구가 아직 없는데 일부에서는 동일한 것으로 일컬어지고 있으나, 명확한 근거가 없는 실정으로 이들을 식품소재 또는 의약품소재로 하기 위해서는 명확한 구분과 기원에 대한 연구가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 우리나라에서 재배되고 있는 천년초, 백년초, 전라도 선인장의 유전적인 동질성 여부를 확인하기 위해서 ITS(internal transcribed sequence) 영역을 클로닝한 후 염기서열의 비교·분석을 통하여 유연관계를 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료: 천년초, 백년초, 전라도 선인장은 충남 아산시 소재 (주)여러분의 천년초 농장에서 분양 받았다. 각 선인장의 줄기를 액체질소로 얼린 후 유탕에서 마쇄하고 Plant DNA isolation kit (NucleoSpin Plant, Macherey-Nagel)을 이용하여 genomic DNA를 추출한 후 agarose gel 전기영동과 spectrophotometer를 사용하여 정량분석을 실시하였다.

ITS cloning 및 sequence 분석: 선인장의 ITS 영역의 유전자를 cloning하기 위해서 식물체에서 보존되어 있는 영역을 비교하여 ITS5F(5'-GGAAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')와 ITS4R(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 두 primer를 제작한 후 사용하였다. 추출한 선인장 genomic DNA 20 ng을 이용하여 PCR 증폭(pre-denaturation, 94°C, 5 min; denaturation, 94°C, 30 sec, annealing, 58°C, 30 sec, extension, 72°C, 30 sec에서 35 cycles)한 후 pGEM-T easy 벡터(Promega)에 클로닝한 후 sequence 분석을 실시하였다. 이들 ITS sequence의 염기서열은 CLUSTAL W(1.82) 프로그램을 사용하여 sequence alignment와 유연관계 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

천년초, 백년초, 전라도 손바닥 선인장으로부터 genomic DNA를 추출하고 conserved ITS primer를 이용하여 PCR로 ITS 영역을 증폭하였다. 각각의 PCR 산물은 pGEM-T 벡터에 클로닝한 후 plasmid를 추출하여 제한효소 처리한 후 전기영동하여 insert를 확인하여 선별하였고 각각 유전자를 3개씩 선별하여 sequencing을 하였다. 이들의 염기서열을 분석한 결과 천년초, 백년초, 전라도 선인장으로부터 각각 685 bp의 ITS sequence를 얻을 수 있었다. CLUSTAL W(1.82)프로그램을 이용하여 3개의 손바닥 선인장 ITS 영역을 비교·분석하였다. 그 결과 천년초, 백년초, 전라도 선인장의 ITS 영역은 매우 높은 보존성을 보였는데, 서로간에 99%의 상동성을 나타내었다. 천년초와 백년초의 ITS에서는 685 bp 중 4개의 염기에 차이가 있었으며, 천년초와 전라도 선인장의 경우에는 3개, 백년초와 전라도 선인장의 경우에는 3개의 염기에 차이가 있었다. NCBI의 blast 프로그램을 이용하여 이들 ITS sequence의 상동성(identity)을 조사한 결과 *Pereskopsis porteri* 18S ribosomal RNA gene에 95%로 높은 유사도를 나타내었다.