

백년초선인장의 ITS(internal transcribed spacer) 유전자 분석

인준교, 이범수, 김은정, 최관삼¹, 한승호², 신철우², 양덕춘^{3*}

(주)바이오피아 생명공학연구소, ¹충남대학교 응용생물학과, ²충남농업기술원, ³경희대학교 한방재료가공학과

Analysis of the ITS (Internal Transcribed Spacer) Region of *Opuntia ficus-indica*

Jun-Gyo In, Bum-Soo Lee, Eun-Jeong Kim, Kwan-Sam Choi¹, Seung-Ho Han², Cheol-Woo Shin²
and Deok-Chun Yang^{3*}

Research Institute of Biotechnology, BioPia Co., Ltd, Yongin 449-598, Korea

¹Dept. of Applied Biology, Chungnam Nat'l. Univ., Daejeon 305-764, Korea

²Chungnam A.R.E.S., Yesan-gun 340-861, Korea

³Dept. of Oriental Medicine Material and processing, Kyung Hee Univ., Suwon 449-701

Abstract - To investigate the origin of backyeoncho (*Opuntia ficus-indica* var. saboten), we isolated 685 bp clone using ITS primer pairs. The rDNA consists of the genes coding for the partial 54 bp 18S, 162 bp 5.8S, and partial 56 bp 26S. The coding regions are interrupted by two internal transcribed spacers, 193 bp ITS1 and 220 bp ITS2. The ITS2 of backyeoncho in length was shorter than that previously registered in Cucurbitaceae plants. The GC contents was 66.8% in ITS1, and 67.7% in ITS2. The rDNA of backyeoncho matched to the previously reported genes and showed a high similarity with the 95% identity with *Pereskia porteri* (L708037). In the phylogenetic analysis, the backyeoncho rDNA was clustered with *Pereskia porteri* (L708037).

Key words - Backyeoncho, ITS, *Opuntia ficus-indica*, rDNA, rRNA

서 언

부채 또는 손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica* var. saboten)은 선인장과에 속하는 다년초로서 열대지방이 원산지로서, 우리나라에서 연평균 기온이 높은 제주도에서 군락을 형성하면서 자생하고 있는 귀화식물(naturalized plant)로 백년초라 불리우고 있다. 부채 선인장의 열매와 줄기는 당뇨, 변비, 고혈압, 식욕증진 및 기관지 천식에 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 줄기는 피부질환, 류마티스 및 화상치료에 효과가 있어 민간 약재로 오래 전부터 전해져 내려오고 있다(김, 1996; Ahn, 1998). 부채 선인장은 멕시코를 중심으로 남북아메리카에 분포하고 있는데(강 등, 1989), 제주도에는 처음에 관상용으로 들여온 것으로 추정되며, 이들이 서남쪽 해변마을과 마라도 남단 해변에 야생상으로 퍼지고면서 노지에서 월동하여 군락을 형성한 것으로 보인다.

현재 제주도를 중심으로 부채 선인장(백년초)의 재배가 증가하고 있으며 다양한 가공식품으로 개발이 진행되고 있으나, 이들의 정확한 기원에 대한 연구는 전무한 실정이다.

식물에서 염기서열을 기초로 한 초기의 분자계통발생학적 연구들의 대부분은 색소체(plastid) 계통에서 분리된 *rbcL* 유전자와 스페이스(spacer) 영역에 대해서 주로 연구되었다(Catalan *et al.*, 1997; Chase *et al.*, 1993; Clegg, 1993; Olmstead and Palmer, 1994; Olmstead and Reeves, 1995; Soltis *et al.*, 1998). 그러나 색소체의 단위생식적인 유전양상 때문에 색소체유래의 유전자와 염기서열정보를 기초로 한 계통분류학적 추론에 대한 위협성이 제기되었다(Rieseberg and Solitis, 1991; Rieseberg and Wendel, 1993).

최근에는 식물에서 분자계통발생학적 유연관계를 조사하기 위해서 세포질에 존재하는 리보솜의 구성성분인 18S, 5.8S, 26S rRNA를 코드하는 핵 유전자들이 과(family)와 더 높은 분류군(taxa) 수준의 분류에 광범위하게 이용되고

* 교신저자(E-mail) : dcyang@khu.ac.kr

있다(Hamby and Zimmer, 1992). 그러나 밀접하게 연관된 속(genera) 또는 종(species) 사이의 계통발생을 분석하기 위해서는, 더 빠르게 진화하는 영역이 분석되어야 한다. Internal transcribed spacer(ITS) 영역은 길이에서 상대적으로 보존되어 있어, 식물에서 계통분류학적 연구를 위한 아주 매력적인 영역이다. 18S-26S rDNA 배열은 핵계놈에 존재하기 때문에, ITS sequences는 양친으로부터 유전되어 엽록체 DNA를 이용한 연구들과는 차별화되는 특성이 있다(Baldwin, 1992; Baldwin *et al.*, 1995).

ITS 영역(ITS1과 ITS2)은 rDNA의 일부로 직렬적으로 반복된 형태로 조직되어 있다. 이들 유전자량은 생물에 따라서 다양하지만, 식물체 계놈의 10% 이상을 차지하기도 한다(Ingle *et al.*, 1975; Hemleben *et al.*, 1982, 1988). 각 rDNA 반복단위는 18S, 5.8S, 26S rRNA를 코드하는 유전자들로 구성되어 있으며, 다음 반복 단위와는 intergenic spacer region(IGS)에 의해서 분리되어 있다. 이들 rRNA 영역은 근연종간에는 거의 유전적 변이가 없는데 반하여 스페이서 영역은 비교적 높은 변이율을 나타낸다. 따라서 핵 ribosomal ITS sequence 데이터는 피자식물에서 다양한 근연종에서 식물의 계통발생을 해결할 수 있는 높은 가능성이 제시된 바 있다(Baldwin *et al.*, 1995)

따라서 본연구에서는 최근 제주도 등지의 남부지방에서 재배가 확대되어 다양한 식품으로 가공되고 있는 백년초의 ITS 영역 유전자를 확보하여 기존에 유전자 은행에 등록되어 있는 선인장들의 유전정보와 비교함으로써 자생하고 있는 백년초 선인장의 기원규명을 시도하였다.

재료 및 방법

식물재료

백년초 선인장은 제주도 농업기술원에서 분양 받은 1년생 줄기를 잘라서 충남농업기술원의 포장에 검정색 비닐로 멀칭한 후 4월에 식재하였다. 이곳으로부터 발생한 백년초 줄기를 9월에 충남농업기술원으로 분양받았으며, 이 중에서 일부를 흐르는 수돗물로 깨끗이 수세한 후 액체질소로 동결시켜 -80℃의 deep freezer에 보관하면서 DNA 추출에 이용하였다.

DNA의 추출

동결 건조한 백년초의 줄기로부터 ITS 유전자 영역을 cloning하기 위한 genomic DNA를 추출하기 위해서 약자사발에 액체질소를 첨가한 후 냉동중인 백년초 줄기시료를 첨가하고 막자사발을 이용하여 완전히 마쇄하였다. 추출버퍼

에 완전히 용해시킨 후 순도 높은 백년초 genomic DNA를 추출하기 위해서 GENE-ALLTM SV column (Generalbiosystem, Korea)을 사용하여 정제하였다. 추출된 DNA는 spectrophotometer(Amersham Biosciences, USA)를 사용하여 정량한 후 0.8% agarose gel에 전기영동하여 확인하였으며, 50 ng/ul로 희석한 후 소량씩 분주하여 -20℃ 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

ITS 영역의 PCR 증폭 및 sequencing 분석

백년초로부터 ITS 영역의 유전자를 cloning하기 위해서 ITS-rev(TCC TCCGCTTATTGATATGC), ITS-for(GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG)를 이용하였다. 백년초 DNA 50 ng을 주형으로 첨가한 후 95℃에서 5분간 전처리한 후 95℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 1분 반응을 40 cycle 반복하여 ITS 영역을 증폭시킨 후 72℃에서 15분간 후처리를 하였다. 증폭된 PCR 산물을 1.0%의 agarose gel에 전기영동하여 분리하여 Gel Extraction kit(NucleoGen, Korea)으로 정제한 후 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 cloning하여 blue/white screening을 통하여 선발하였다. 선발된 clone은 37℃ LB 액체배지에서 하루밤 진탕배양(210 rpm)하여 수거한 후 AccuPrep Plasmid Extraction kit(Bioneer, Korea)을 사용하여 plasmid를 정제하였다. 정제된 plasmid는 DNA sequencer(ABI prism 3700)를 이용하여 5'과 3' 양방향의 sequencing primer를 이용하여 전체의 염기서열을 분석하였다. DNASIS 프로그램(Hitachi)을 사용하여 벡터영역을 제거한 후 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 Altschul 등(1990)의 blast algorithm에 따라서 상동성 검색을 실시하였다.

Sequence alignment와 계통분석

백년초에서 분리된 ITS 영역의 nucleotide는 다른 식물체들에서 분리되어 유전자 은행(GeneBank, DDBJ, EMBL)에 등록된 것의 염기를 다운받은 후 fasta format으로 전환한 후 Clustal W (1.82)프로그램을 사용하여 비교·분석하였다(Thompson *et al.*, 1994). 이 결과를 바탕으로 UPGMA법에 따라서 계통수(phylogenetic tree) 분석을 실시하여 유연관계를 추정하였다.

결과 및 고찰

부채 선인장의 원산지는 멕시코를 중심으로 남북아메리카에 분포되어 있는데(강 등, 1989), 우리나라에는 제주도 서남

쪽 해변마을과 마라도 남단 해변에 야생상으로 군락을 형성하고 있다. 제주도에 자생하는 백년초는 다년생 초본으로 높이는 2 m 안팎이고 편평한 가지가 여러 가닥으로 갈라지며 경절은 짙은 녹색이고 긴 타원형 또는 장원형이면서 편평한 육질로 표면에는 잎이 퇴화되어 생긴 1-3 cm 정도되는 가시가 2-5개씩 돌아 있고 바로 옆에 털이 있다(Fig. 1B,C). 7월경에 개화하여 꽃이 피고 꽃색은 황색, 분홍색 또는 흰색으로 줄기의 끝부분에 여러개의 꽃이 피는데 암술은 1개, 수술은 270-290개 정도 있으며 자방이 5개 존재한다(한 등, 1999). 수정이 되면 열매가 성숙되어 장과모양의 붉은 열매가 열리게 된다(Fig. 1A).

부채 선인장은 노화억제 및 암 발생억제에 탁월한 효과와 성인병의 원인이 되는 콜레스테롤이나 지방함량을 낮추어주는 효과가 밝혀져 있으며(Frenandez *et. al.*, 1992), 항산화 및 항균효과(Chung, 2000), 면역세포의 활성화(신과 김, 1998) 등 과학적인 효과에 대한 검증이 이루어져 다양한 기

능성식품 및 화장품원료로 상업적으로 재배되고 있다. 그러나 제주도에 자생하고 있는 백년초 선인장은 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 제작한 후 백년초 DNA를 주형(template)으로 하여 PCR 증폭을 실시하였다. PCR증폭산물을 전기영동하여 확인한 후 agarose gel로부터 정제하였고, pGEM-T easy 벡터에 cloning하여 염기서열분석을 실시하였다. 그 결과 685 bp의 염기정보를 얻었고(Fig. 2B), 이 nucleotide서열을 NCBI blastn 프로그램을 사용하여 Genbank에 등록되어 있는 유전자들과 비교·검색한 결과 ITS 영역과 매우 높은 상동성(homology)을 나타내었다.

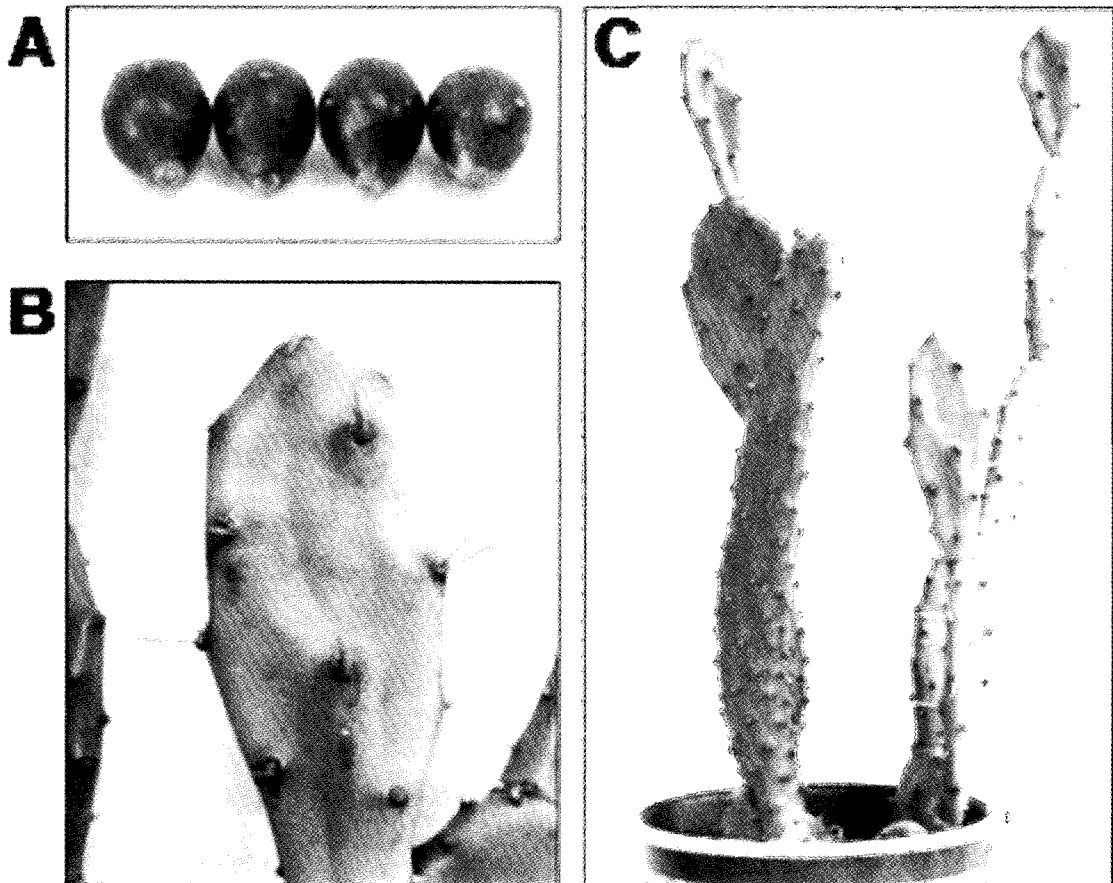


Fig. 1. Photographs of backnyeoncho (*Opuntia ficus-indica*). A, fruit; B, stem; C, 2-year old backnyeoncho.

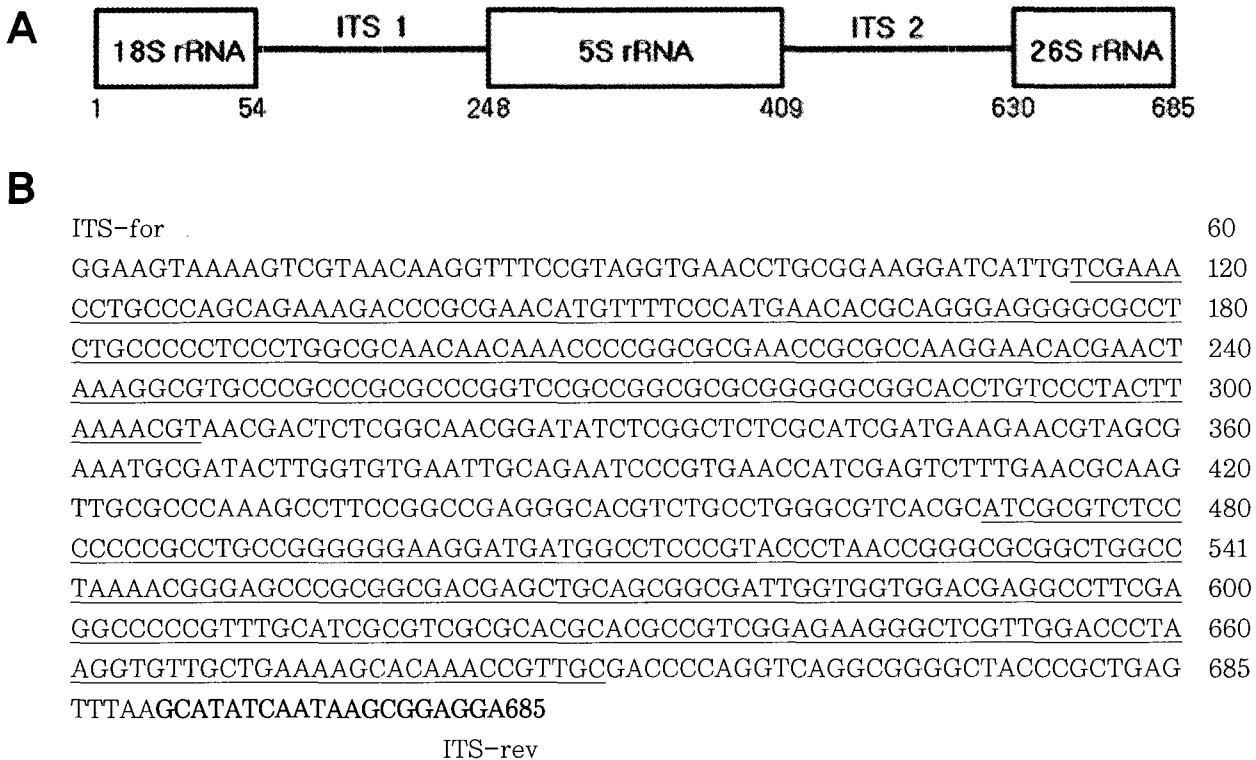


Fig. 2. Schematic representation and nucleotide sequence of the rDNA region of backnyeoncho. ITS primer pairs was represented in bold. ITS1 and ITS 2 spacer region was underlined. The nucleotide sequence data reported will appear in the EMBL, GenBank and DDBJ Nucleotide Sequencing Database under the accession number AB250211.

백년초 ITS 영역을 분석한 결과 Fig. 2A에서 보는 같이 18S rRNA, ITS1, 5S rRNA, ITS2, 26S rRNA 배열이 직렬적으로 연결된 구조로 구성되어 있는 것을 확인하였다. 18S rRNA의 길이는 54 bp로서 3'말단의 partial sequence이고 26S rRNA는 56 bp로서 5'부분의 partial sequence로 구성되어있으며, ITS1은 193 bp, ITS2는 220 bp로 구성되어 있다(Fig. 2). 백년초 ITS 영역은 기존에 보고된 Cucurbitioideae 식물들의 ITS 영역(Jobst *et al.*, 1998)에 비하여 ITS2 스페이스 영역의 239-254 bp보다는 다소 짧았다. 그러나 이들 스페이스 영역의 GC 함량은 백년초의 경우 ITS1은 66.8%, ITS2의 경우에는 67.7%로 Cucurbitioideae 식물들에서 보다 높은 GC 함량을 나타내었다.

제주도에 자생하는 백년초는 학명이 *Opuntia ficus-indica*로 *Opuntia*속(genus)에 속하는 부채 선인장이다. NCBI D/B에서 상동성 검색을 한 결과 아직까지 *Opuntia*속 선인장의 경우에는 ITS 유전자에 대한 등록이 없는 것으로 나타나 본 연구에서 처음으로 *Opuntia*속 선인장에 대한 rDNA 영역을 분리하고 유전자은행에 등록(AB250211)하였

다(Fig. 2). 백년초 선인장의 rDNA 영역에 가장 높은 상동성을 나타낸 것은 같은 *Opuntioideae*에 속하는 *Pereskiaopsis porteri*(L78037)로 95%의 유사도를 나타내었으며, 조사된 다른 식물체들에서 가장 낮은 경우에도 86% 정도로 비교적 높게 나타났다(Fig. 3).

백년초 rDNA와 NCBI blatsn 검색에서 상동성을 나타낸 선인장과 다른 식물체들의 sequence를 fasta format으로 정리한 후 Clustal W 프로그램(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)을 이용하여 유연관계를 조사하였다(Fig. 4). 그 결과 백년초는 같은 *Opuntioideae*에 속하는 *Pereskiaopsis porteri*(L78037)와 같은 cluster로 분리되었다. 그러나 유전자은행에 등록된 *Opuntia*속 선인장들의 rDNA 유전자 정보가 없어 백년초의 유연관계를 명확히 규명하는 데는 어려움이 있다.

식물에 존재하는 rDNA의 큰 특징 중의 하나는 수평진화(horizontal evolution) 또는 협동진화(concerted evolution)(Brown *et al.*, 1972; Zimmer *et al.*, 1980)라고 하는 과정을 통하여 일어나는 다중유전자족(multigene family)의 구성원간에서 전체적인 염기서열의 동질성(homogeneity)이 있다는 점이다. 협동진화과정에서 단일들

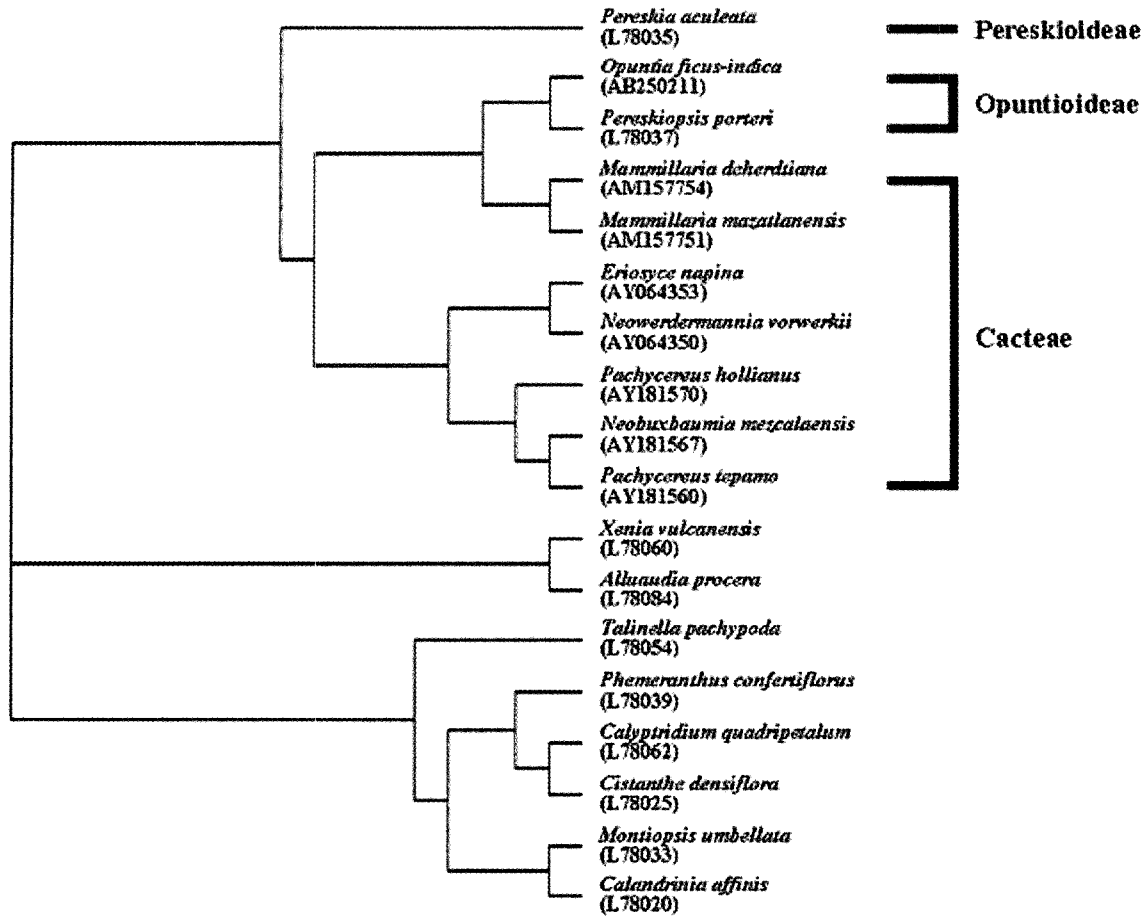


Fig. 4. Phylogenetic analysis of the rDNA region isolated in backnyeoncho (*Opuntia ficus-indica*) and other plants. The phylogenetic tree was reconstructed by UPGMA. The respective accession number is described under the scientific name.

연변이는 유전자변환이나 비대칭 교차 때문에 상대적으로 짧은 기간에 고정될 수 있는 특징을 가지고 있다(Smith, 1976; Ohta, 1984). rDNA의 영역에서 rRNA 코드영역은 밀접하게 연관된 종들 사이에서는 염기의 차이가 거의 보이지 않는데 반하여 스페이서인 ITS1과 ITS2 영역에서는 코드 영역에 비하여 더 높은 비율로 변이가 존재하기 때문에 식물에서 ribosomal ITS 염기서열정보는 유연관계를 규명하는데 있어서 많은 가능성을 제시하고 있다.

현재 유전자 은행에 등록되어 있는 *Opuntia*속 선인장의 ITS 유전자 정보가 없어 이번 실험을 통하여 백년초의 ITS 유전자의 등록을 시작으로 보다 많은 동일 속(genus) 선인장의 시료를 확보하여 ITS 영역의 유전자분석을 진행하여 보다 명확한 백년초의 기원규명에 대한 연구를 지속적으로 수행 할 것이다.

적 요

제주도에 자생하는 부채 선인장인 백년초의 기원 규명을 목적으로 ITS primer를 이용하여 685 bp의 ITS 영역을 분리하였다. ITS 영역의 염기서열을 분석한 결과 18S rRNA의 길이는 54 bp, 26S rRNA는 55 bp, ITS1은 193 bp, ITS2는 220 bp로 구성되어 있었다. 백년초 ITS 영역은 기존에 보고된 Cucurbitoideae 식물들의 ITS 영역에 비하여 ITS2 스페이서 영역의 239-254 bp보다는 다소 짧았다. 그러나 이들 스페이서 영역의 GC 함량은 백년초의 경우 ITS1은 66.8%, ITS2의 경우에는 67.7%로 Cucurbitoideae 식물들에서 보다 높은 GC 함량을 나타내었다. 백년초 선인장의 rDNA 영역에 가장 높은 상동성을 나타낸 것은 같은 Opuntioideae에 속하는 *Pereskopsis porteri*(L78037)로 95%의 유사도를 나타내었다. 백년초 rDNA Clustal W 프

로그그램을 이용하여 유연관계를 조사한 결과 같은 Opuntioideae에 속하는 *Pereskia porteri*(L78037)와 같은 cluster로 분리되었다.

사 사

본 연구는 농림기술개발과제(ARPC)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 대해 심심한 감사를 표하는 바이다.

인용문헌

- Ahn, D.K. 1998. Illustrated book of Korean Medicinal herbs. Kyohaksa. pp. 497.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Baldwin, B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1: 3-16.
- Baldwin, B.G., M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski, C.S. Campbell and M.J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247-277.
- Brown, D.D., P.C. Wensink and E. Jordan. 1972. Comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: The evolution of tandem genes. *J. Mol. Biol.* 63: 57-73.
- Catalan, P., E.A. Kellogg and R.G. Olmstead, 1997. Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast *ndhF* gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 8: 150-166.
- Chase, M.W., D.E. Soltis, R.G. Olmstead, D. Morgan, D.H. Les, B.D. Mishler, M.R. Duvall, R.A. Price, H.G. Hills, Y.-L. Qiu, K.A. Kron, J.H. Rettig, E. Conti, J.D. Palmer, J.R. Manhart, K.J. Sytsma, H.J. Michaels, W.J. Kress, K.G. Karol, W.D. Clark, M. Hedren, B.S. Gaut, R.K. Jansen, K.-J. Kim, C.F. Wimpee, J.F. Smith, G.R. Furnier, S.H. Strauss, Q.-Y. Xiang, G.M. Plunkett, P.S. Soltis, S.M. Swensen, S.E. Williams, P.A. Gadek, C.J. Quinn, L.E. Eguiarte, E. Golenberg, G.H. Learn, S.W. Graham Jr., S.C.H. Barrett, S. Dayanandan and V.A. Albert. 1993. Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid *gene rbcL*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80: 528-580.
- Chung, H.J. 2000. Antioxidative and antimicrobial activities of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Korean J. Soc. Food. Sci.* 16: 160-166.
- Clegg, M.T. 1993. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 363-367.
- 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.
- Hamby, R.K. and E.A. Zimmer. 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In "Molecular Systematics of Plants" (P.S. Soltis, D.E. Soltis and J.J. Doyle, Eds), Chapman and Hall, London. pp. 50-91.
- Hemleben, V., B. Leweke, A. Roth and I. Stadler. 1982. Organization of highly repetitive satellite DNA of two Cucurbitaceae species (*Cucumis melo* and *Cucumis sativus*). *Nucleic Acids Res.* 10: 631-644.
- Hemleben, V., M. Ganai, J. Gerstner, K. Schiebel and R.A. Torres. 1988. Organization and length heterogeneity of plant ribosomal RNA genes. In "The Architecture of Eucaryotic Genes" (G. Kahl, Ed.), VCH, Weinheim. pp. 371-383.
- Ingle, J., J. Timmis and J. Sinclair. 1975. The relationship between satellite deoxyribonucleic acid, ribosomal ribonucleic acid gene redundancy, and genomic size in plants. *Plant Physiol.* 55: 496-501.
- Jobst, J., K. King and V. Hemleben. 1998. Molecular evolution of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and phylogenetic relationships among species of the family Cucurbitaceae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9: 204-219.
- Ohta, T. 1984. Some models of gene conversion for treating the evolution of multigene families. *Genetics* 106: 517-528.
- Olmstead, R.G. and J.D. Palmer. 1994. Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. *Am. J. Bot.* 81: 1205-1224.
- Olmstead, R.G. and P.A. Reeves. 1995. Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences. *Ann. Missouri Bot. Garden* 82: 176-193.
- Rieseberg, L.H. and D.E. Soltis. 1991. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evol. Trends Plant* 5: 65-84.
- Rieseberg, L.H. and J.F. Wendel. 1993. Introgression and its consequences in plants. In: Harrison, R. (Ed.), *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford University Press, Oxford, pp. 70-109.
- Smith, G.P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* 191: 528-535.
- Soltis, D.E., P.S. Soltis and J.J. Doyle (Eds.). 1998. *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*. Kluwer Academic, Boston.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gilson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap

- penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Zimmer, E.A., S.L. Martin, S.M. Beverley, Y.W. Kan and A.C. Wilson. 1980. Rapid duplication and loss of genes coding for the α -chains of hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2158-2162.
- 강석호, 이광수, 김병우, 김선영. 1989. 최신화해원예각론. 선진문화사, 서울. pp. 479.
- 김태정. 1996. 한국자원식물도감, 향문사, 서울. pp. 559.
- 신태균, 김성호. 1998. 손바닥선인장의 방사선 방호효과. *제주생명과학연구* 1(1): 25-32.
- 한용남, 윤상태, 이영철, 최종원. 1999. 손바닥 선인장의 열매와 줄기를 이용한 기능성식품개발 및 생리활성 연구. 농림부, 서울. pp. 5.

(접수일 2005.9.30; 수락일 2006.2.2)