

## 깽깽이풀의 핵형분석과 McFISH를 이용한 rDNA의 물리지도 작성

김수영\* · 최혜운\* · 구달희\* · 김찬수\*\* · 방재욱\*†

\*충남대학교 생명과학부, \*\*산림과학원 난대산림연구소

### Karyotype Analysis and Physical Mapping of rDNAs Using McFISH in *Jeffersonia dubia* Benth.

Soo-Young Kim\*, Hae-Woon Choi\*, Dal-Hoe Koo\*, Chan-Soo Kim\*\*, and Jae-Wook Bang\*†

\*School of Bioscience & Biotechnology, Chungnam Natl. Univ., Daejeon 305-764, Korea.

\*\*Warm-Temperate Forest Research Center, Korea Forest Research Institute, Jeju 697-050, Korea.

**ABSTRACT :** Karyotype analysis and chromosomal localization of 45S and 5S rDNAs using McFISH (multi-color fluorescence *in situ* hybridization) were carried out in *Jeffersonia dubia* Benth., which is one of medicinal plants belonging to Berberidaceae. The somatic metaphase chromosome number was  $2n=2x=12$  and the size of chromosomes ranged 1.95~3.50  $\mu\text{m}$ . The chromosome complement consisted of two pairs of metacentrics (chromosomes 1 and 3), two pairs of submetacentrics (chromosomes 2 and 4) and two pairs of subtelocentrics (chromosomes 5 and 6). In McFISH, one pair of 45S rDNA site was detected on the centromeric region of chromosome 2 and three pairs of 5S rDNA sites were detected on the short arm of chromosomes 4, 5 and 6, respectively.

**Key words :** *Jeffersonia dubia*, karyotype, rDNAs, McFISH

## 서 언

깽깽이풀 (*Jeffersonia dubia* Benth.)은 매자나무과 (Berberidaceae)에 속하는 보호식물로 다년생 초본이며, 우리나라 전역의 깊은 산에 자생한다. 꽃은 홍자색으로 4~5월에 1~2개의 꽃대 끝에 1개씩 피는데, 관상용으로도 가치가 높다. 열매는 삭과로 타원형이며 끝이 부리처럼 길고, 종자는 타원상 구형으로 검은색이다. 이 식물의 전초는 선황련이라고 하며, 청열, 해독, 건위의 효능이 있을 뿐 아니라, 소화불량, 식욕감퇴, 오심, 장염, 이질, 발열건조, 결막염, 편도선염을 치료하는데 사용되어 왔다 (Lee, 1985; Bae, 2000).

식물의 세포유전적 정보는 유전자원의 보존 및 이용에 기초 자료가 된다. 특히 핵형은 그 종의 체세포 중기 염색체의 특징을 보여 주며, 염색체의 길이와 동원체의 위치로 구분하여 명명한다 (Battalia, 1955; Levan *et al.*, 1964; Naranjo *et al.*, 1983).

FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 기술은 상염색법으로 구분이 잘 안 되는 부수체 염색체의 확인을 가능하게 하여 핵형분석과 계통 구조의 이해에 유용하다. 또한 많은 복제수를 갖는 45S와 5S rDNA 유전자를 비롯한 여러 DNA 질편들을 탐침으로 한 McFISH (multi-color FISH) 기술로 하

나의 염색체 상에 두 가지 이상의 유전자 확인이 가능하게 되었다 (Mukai & Nakahara, 1993; Ohmido & Fukui, 1995). 45S 및 5S rDNA 유전자는 리보솜의 구성 성분으로 45S rDNA는 인형성 부위를 포함하고 있는 부수체 염색체에서만 관찰된다. 두 유전자 모두 염색체상에 1쌍 이상이 존재하고 (Maluszynska & Heslop-Harrison, 1991), 거의 모든 진핵생물의 염색체 상에서 multigene family로 존재한다 (Murata *et al.*, 1997). rDNA는 식물 종에 따라 다양하게 나타나기 때문에 특정 식물의 염색체 지도 작성에서 다른 유용 유전자의 물리적 위치를 탐색하기 위한 기초 자료로 이용될 수 있다 (Leitch & Heslop-Harrison, 1993).

최근 우리나라에 자생하거나 재배되는 약용식물에 대한 세포유전적 연구가 활발하게 이루어지고 있다 (Kim *et al.*, 2002; Koo *et al.*, 2003a, b; Kim *et al.*, 2004a, b; Kim *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). 그러나 약용식물인 깽깽이풀에 대해서는 뿌리 추출물의 살충효과에 대한 연구가 있을 뿐 (Park *et al.*, 1997), 세포유전적 연구는 미진한 실정이며 (Langlet, 1928; Kurita, 1956; Lee, 1971), 분자세포유전학적 연구는 보고된 바 없다. 본 연구는 상염색법을 이용하여 깽깽이풀의 핵형을 확립하고, McFISH 기법을 도입하여 45S 와

†Corresponding author: (Phone) +82-42-821-5497 (E-mail) bangjw@cnu.ac.kr

Received December 30, 2004 / Accepted February 19, 2005

5S rDNA의 염색체상에서의 위치를 확인하여 세포유전학적 기초를 확립하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 식물재료

본 연구에 사용된 식물 재료는 경기도 용인에 위치한 한택 식물원에서 분양받은 깽깽이풀을 충남대학교 포장에서 재배하면서 근단을 채취하여 염색체 관찰 재료로 사용하였다.

### 2. 염색체 관찰 및 핵형분석

염색체 관찰을 위하여 생장이 왕성한 식물에서 근단을 채취하여 증류수 (4°C)에 담가 24시간 동안 저온처리 한 다음, 1:3 고정액 (glacial acetic acid : ethanol, v/v)에 담가 4°C에 보관하면서 재료로 이용하였다. 염색체 관찰을 위해 고정된 근단을 1N HCl (60°C)에서 2분간 연화한 다음, 증류수로 수세하고 Feulgen 용액에서 염색한 후, 1% aceto-carmin을 이용하여 압착법으로 프레파라트를 만들어 염색체를 관찰하였다. 양호한 분열상은 촬영하여 핵형 분석에 사용하였다.

핵형 분석은 Levan 등 (1964)의 방법에 따라 염색체의 동원체를 중심으로 하여, 단완 (short arm, S)과 장완 (long arm, L)의 길이를 이용한 arm-ratio (L/S)를 비교하여, 그 비가 1.0~1.7일 경우 중부 염색체 (M, metacentric), 1.7~3.0일 경우 차중부 염색체 (SM, submetacentric), 3.0~7.0일 경우 차단부 염색체 (ST, subtelocentric), 7.0 이상일 경우 단부 염색체 (T, telocentric)로 구분하여 분석하였으며, 염색체의 배열은 긴 것로부터 짧은 순으로 고유 번호를 부여하였다.

### 3. 슬라이드 제작

FISH용 슬라이드를 제작하기 위해 고정된 근단을 증류수로 수세 후 효소 혼합용액 (2% cellulase, 1.5% macerozyme, 1% pectolyase, 0.5 mM EDTA, pH 4.2)에 담가 40분간 처리 (37°C)한 다음, 1:3 고정액 (glacial acetic acid : ethanol, v/v)을 이용하여 슬라이드글라스 위에서 가는 핀셋으로 염색체를 전개 한 뒤 상온에서 2~3일간 건조시켰다. 위상차 현미경 하에서 분열상이 양호한 슬라이드를 선발하여 FISH를 수행하였다.

### 4. 탐침의 준비와 McFISH

FISH를 위한 탐침으로는 biotin-16-dUTP로 표지된 45S rDNA와 digoxigenin-11-dUTP로 표지된 오이 (*Cucumis sativus* L.)의 5S rDNA를 이용하였으며 (Koo et al., 2004), McFISH는 Kim 등 (1998)의 방법을 변용하여 사용하였다.

건조된 슬라이드상의 염색체 변성을 위하여 70% formamide/2xSSC 용액에 2분간 처리 하고, -20°C의 70% 에탄올에서 급냉 후, 95%와 99% 에탄올에서 각각 5분씩 탈수하여 상온에

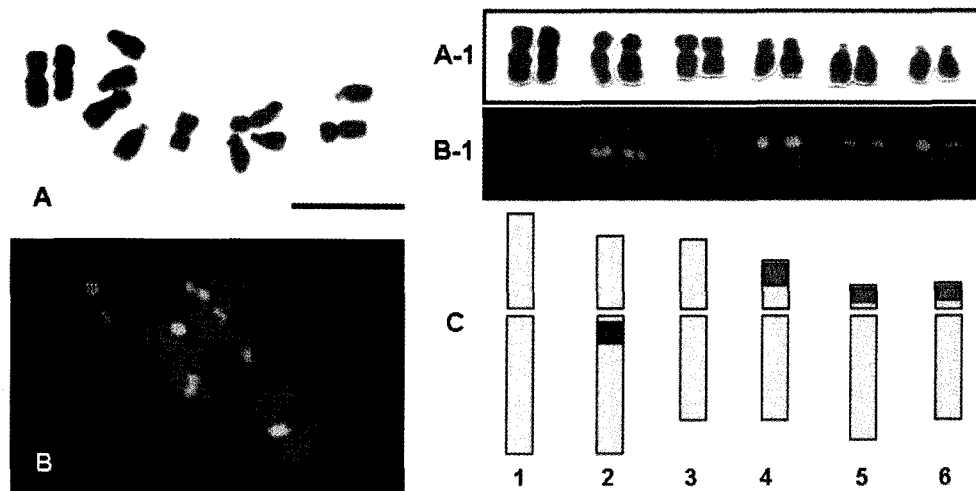
서 30분 정도 건조시켰다. 탐침 혼합액 (digoxigenin-11-dUTP와 biotin-16-dUTP로 각각 표지된 100 ng의 probe DNA, 50% formamide, 2X SSC, 10% dextran sulfate, 10 ng ssDNA)은 90°C에서 10분간 변성시킨 후, 급냉시켜 준비하였다. 건조된 슬라이드상에 15  $\mu$ l의 탐침 혼합액을 가한 다음, 커버글라스를 덮고 paper bond로 봉하여, 37°C에서 16시간 이상 혼성화 (hybridization) 하였다.

혼성화 시킨 슬라이드는 40°C의 2xSSC, 50% formamide/2xSSC, 2xSSC, 4xSSC 용액에서 각각 5분씩 수세하였다. 탐침의 비 특이적인 결합을 막기 위해 염색체 슬라이드를 5% BSA/BT (1 M NaHCO<sub>3</sub> + 0.5% Tween-20, pH 8.3) 완충액으로 37°C에서 5분간 blocking한 후, 1%의 avidin-FITC (fluorescein isothiocyanate)와 anti-digoxigenin rhodamine이 포함된 100  $\mu$ l의 1% BSA/4xSSC의 혼합액을 슬라이드에 가한 다음 37°C에서 30분 동안 반응시켜 biotin과 digoxigenin으로 표지된 DNA 탐침을 동시에 검출하였다. 4xSSC/0.2% tween-20 완충액으로 37°C에서 5분씩 3번 수세 후, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l DAPI (4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride) 용액을 포함한 Vectashield (Vector Lab.) 15  $\mu$ l를 도포하여 커버를 덮은 후 cooled CCD 카메라 (Cool SNAP, Photometrics)와 형광현미경을 이용하여 signal을 관찰하고 사진을 촬영하였다. 확인된 signal들은 Meta Imaging Serries TM 4.6 (Universal Imaging Corporation) 소프트웨어를 사용하여 합성하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 핵형 분석

깽깽이풀의 체세포 염색체 수는  $2n=2x=12$  (Fig. 1A)로 확인 되었으며, 염색체의 크기는 1.95~3.50  $\mu$ m, arm-ratio는 1.40~5.29로 나타났다. arm-ratio에 따라 중부 염색체 (염색체 1번과 3번), 차중부 염색체 (염색체 2번과 4번) 그리고 차단부 염색체 (염색체 5번과 6번)가 각각 2쌍씩 관찰되었다. 본 연구에서 얻은 상동 염색체들의 형태적 특징은 다음과 같다. 1번 염색체는 길이가 가장 긴 염색체로 평균 길이가 3.50  $\mu$ m였으며, arm-ratio는 1.40으로 중부 염색체로 확인되었고, 2번 염색체는 평균 길이가 3.16  $\mu$ m였으며, arm-ratio가 1.80으로 차중부 염색체였다. 3번 염색체는 평균 길이가 2.60  $\mu$ m였으며, arm-ratio가 1.50으로 중부 염색체로 관찰되었고, 4번 염색체의 평균 길이는 2.29  $\mu$ m였으며, arm-ratio는 2.10으로 차중부 염색체였다. 5번 염색체는 평균 길이가 2.20  $\mu$ m였으며, arm-ratio가 5.29로 차단부 염색체로 확인되었고, 6번 염색체는 평균 길이가 1.95  $\mu$ m로 상동 염색체 쌍 중 가장 짧게 나타났으며, arm-ratio는 4.00으로 차단부 염색체였다 (Table 1). Kurita (1956)는 일본에 서식하는 깽깽이풀의 염색체를 2쌍의 차중부 염색체 (염색체 1번과 2번), 1쌍의 차단부 염색체 (염색체 3번) 그리고 3쌍의 단부 염색체 (염색체 4, 5, 그리고 6번)로 구분



**Fig. 1.** A karyotype and McFISH of *Jeffersonia dubia*. A and A-1, somatic metaphase chromosome complement (2n=12) and karyotype; B and B-1, McFISH of metaphase chromosomes using 45S and 5S rDNA probes; C, ideogram showing the physical location of the 45S (green) and 5S rDNA (red) loci. Biotin-labeled 45S rDNA probe was detected with avidin-FITC conjugate. Digoxigenin-labeled 5S rDNA probe was detected with anti-digoxigenin rhodamine. Bar, 5  $\mu$ m.

**Table 1.** Analysis of somatic metaphase chromosome of *Jeffersonia dubia*.

Chromosome no.	Chromosome size ( $\mu$ m)			Arm ratio (L/S)	Centromeric Index <sup>†</sup>
	Long arm	Short arm	Total		
1	2.07	1.43	3.50	1.40	M
2	2.07	1.09	3.16	1.80	SM
3	1.56	1.04	2.60	1.50	M
4	1.56	0.73	2.29	2.10	SM
5	1.85	0.35	2.20	5.29	ST
6	1.56	0.39	1.95	4.00	ST

<sup>†</sup>M : metacentric, SM : submetacentric, ST : subtelocentric.

하였으며, 3쌍의 부수체 염색체 (염색체 4, 5 그리고 6번)를 보고하여 본 연구 결과와 차이를 보였다. 염색체의 형태는 같은 종에서도 지리적인 차이를 보이는데 갯쟁이풀의 경우도 일본에서 보고된 것과 차이를 보였다. 본 연구에서는 부수체 염색체는 관찰되지 않았는데, 상염색으로 관찰되지 않는 부수체 염색체의 존재는 rDNA를 탐침으로 한 FISH 기법으로 확인이 가능하였다.

## 2. McFISH

갯쟁이풀의 염색체 상에서 45S와 5S rDNA의 위치를 확인하기 위하여 biotin으로 표지한 45S rDNA는 FITC로, digoxigenin으로 표지한 5S rDNA는 rhodamine으로 McFISH를 수행한 결과 45S rDNA signal은 4번, 5번 그리고 6번 염색체의 단완 말단 부위에서 각각 한 쌍씩 확인되었는데, 특히 4번 염색체의 단완 말단 부위에서 확인된 signal이 가장 강하게 관찰되었다. 5S signal은 2번 염색체의 동원체 부위에서 한 쌍이 관찰되었다 (Fig. 1B). 6쌍의 상동 염색체 중에서 1번과 3

번 염색체를 제외한 나머지 네 쌍의 상동 염색체에서 rDNA loci가 존재함을 관찰할 수 있었다. McFISH를 통한 45S와 5S rDNA signal의 위치에 따른 체세포 염색체의 ideogram은 Fig. 1C에서 보는 바와 같다.

본 연구에서는 갯쟁이풀의 염색체상에서의 rDNA 분석에 McFISH 기술을 처음으로 도입하여 염색체상에서 rDNA의 위치를 확인하였다. McFISH의 결과는 갯쟁이풀의 분자세포유전학적 기초 자료로 사용될 수 있을 것이다.

## 적 요

보호식물이며, 약용식물인 갯쟁이풀 (*Jeffersonia dubia*)을 대상으로 핵형 분석과 McFISH 기법을 이용한 염색체 분석을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 체세포 염색체 수는  $2n=2x=12$ 였으며, 2쌍의 중부 염색체 (염색체 1, 3), 2쌍의 차중부 염색체 (염색체 2, 4) 그리고 2쌍의 차단부 염색체 (염색체 5, 6)로 구분되었고, 염색체의 평균 길이는 1.95~3.50  $\mu$ m이었다. McFISH 기법을 이용하여 45S와 5S rDNA의 염색체상의 위치를 확인한 바, 3쌍의 45S rDNA signal은 4번, 5번 그리고 6번 염색체의 단완 말단 부위에서 관찰되었고, 한 쌍의 5S rDNA signal은 2번 염색체의 동원체 부위에서 관찰되었다.

## 사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용 기술개발사업단의 연구비 지원 (과제번호: PF001201-03, PI 방재욱)에 의해 수행되었습니다.

LITERATURE CITED

- Bae KH** (2000) The Medicinal Plants of Korea. Kyohaksa Co Ltd. p. 546.
- Battalia E** (1955) Chromosome morphology and terminology. *Caryologia* 8:179-187.
- Kim SY, Choi HW, Bang JW** (2004) Physical Mapping of rDNAs using McFISH in *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 12:515-518.
- Kim SY, Lim YP, Bang JW** (1998) Cytogenetic analysis of *Brassica campestris* var. *pekinensis* using C-banding and FISH. *Korean J. Genetics* 20:285-294.
- Kim SY, Koo DH, Bang JW** (2002) Karyotype analysis of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 10:144-146.
- Kim HH, Park YW, Yoon PS, Choi HW, Bang JW** (2004a) Cytogenetic analysis of four *Hosta* species native to Korea. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 12:397-400.
- Kim HH, Park YW, Yoon PS, Choi HW, Bang JW** (2004b) Karyotype analysis of eight Korean native species in the genus *Iris*. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 12:401-405.
- Koo DH, Seong NS, Seong JS, Bang KH, Bang JW** (2003a) Karyotype analysis and physical mapping of rDNAs in *Bupleurum longeradiatum*. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 5:402-407.
- Koo DH, Kim SY, Bang KH, Seong NS, Bang JW** (2003b) Cytogenetic analyses of *Angelica* plants using Feulgen staining and multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Korean J. Plant Biotech.* 30:123-127.
- Koo DH, Hur YK, Bang JW** (2004) FISH mapping of rDNAs and repeated DNA sequences on pachytene chromosomes of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant & Animal genome XI*. p. 145.
- Kurita M** (1956) Karyotype studies in *Berberidaceae*. 1. Mem. Ehime Univ. Sect. II (Science), Ser. B p. 3.
- Langlet O** (1928) Einige beobachtungen über die zytologie der Berberidaceen. *Svensk Bot. Tidskrift* 22:169.
- Lee CB** (1985) Illustrated Flora of Korea. Hyangmoonsa Co. Ltd. p. 372.
- Lee WK, Choi HW, Bang JW** (2004) Karyotype analysis of five species of genus *Pulsatilla*. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 12:490-493.
- Lee YN** (1971) Chromosome number of flowering plants in Korea (4) *Korean Res. Inst. Better Living* 8:21-31.
- Leitch IJ, Heslop-Harrison JS** (1993) Physical mapping of four sites of rDNA sequences and one site of the  $\alpha$ -amylase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 36:517-523.
- Levan A, Frekga K, Sandberg A** (1964) Nomenclature for centromeric position in chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.
- Maluszynska J, Heslop-Harrison JS** (1991) Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 1:159-166.
- Mukai Y, Nakahara Y** (1993) Simultaneous discrimination of the three in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome* 36:489-494.
- Murata M, Heslop-Harrison JS, Motoyoshi F** (1997) Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. *Plant J.* 12:31-37.
- Naranjo CA, Poggio L, Brandham PE** (1983) A practical method of chromosome classification on the basis of centromere position. *Genetica* 62:51-53.
- Ohmido N, Fukui K** (1995) Cytological studies of African cultivated rice, *Oryza glaberrima*. *Theor. Appl. Genet.* 91:212-217.
- Park SJ, Lee SG, Shin SC, Lee BY, Ahn YJ** (1997) Larvicidal and antifeeding activities of Oriental medicinal plant extracts against four species of forest insect pests. *Applied Entomology & Zoology* 32:601-608.