

쪽의 핵형분석과 rRNA 유전자의 염색체상 위치

최혜운* · 이상훈* · 김수영** · 방재욱*†

*충남대학교 생명과학부 생물학과, **한국생명공학연구원

Karyotypic Analysis and Physical Mapping of rRNA Gene Loci in *Persicaria tinctoria*

Hae Woon Choi*, Sang Hoon Lee*, Soo Young Kim**, and Jae Wook Bang*†

*School of Biosci. & Biotech., Chungnam Natl. Univ., Daejeon 305-764, Korea.

**Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT : Karyotypic analysis and FISH (fluorescence *in situ* hybridization) with 45S and 5S rRNA genes were carried out in *Persicaria tinctoria* H Gross. The somatic metaphase chromosomes were ranged from 2.25 μ m to 1.50 μ m in length. Chromosome number was $2n = 4x = 40$ with the basic number of $x = 10$. The chromosome complement of the species consisted of 16 pairs of metacentrics (chromosomes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19 and 20) and 4 pairs of submetacentrics (chromosome 5, 14, 16 and 17). The karyotype formula was $K(2n) = 4x = 32 m + 8 sm$. In FISH analysis, three pairs of 45S rRNA gene loci on the terminal region of submetacentrics (chromosomes 5, 16 and 17) and two pairs of 5S rRNA gene loci on the centromeric region of metacentrics (chromosomes 9 and 11) were detected, respectively.

Key Words : Karyotype, FISH, *P. tinctoria*, rRNA genes

서 언

여뀌속 (*Polygonum* sect. *Persicaria*) 식물은 마디풀과 (*Polygonaceae*)에 속하는 일년생 또는 다년생 초본식물로 전 세계적으로 100여 종이 알려져 있으며, 한반도에는 약 30여종이 분포하는 것으로 보고되어 있다 (Lee, 1985; Kwak *et al.*, 2006). 여뀌속 식물 중 쪽 (*Persicaria tinctoria*; Chinese indigo)은 중국이 원산지로서 오래전부터 염료자원으로 재배되어 왔으며, 대청엽 (大靑葉)이라 부르는 잎은 해열, 지혈, 구갈, 황달, 해독에 효능이 있는 약용식물이다 (Bae, 2000; Park, 2002, 2004).

여뀌속 식물에 대한 연구로는 일본에 분포하는 여뀌 (*P. hydropiper*)를 대상으로 RAPD marker를 이용한 유전적 다양성이 보고된 바 있으며 (Yasuda & Yamaguchi, 2005), rDNA 내의 ITS (internal transcribed spacer) 염기서열의 변이와 종간의 계통적 유연관계가 보고된 바 있다 (Suh *et al.*, 1997; Kwak *et al.*, 2006). *Polygonum*속 식물종인 *P. sachalinense*에서 잎에 함유된 유용 성분인 flavonoid glycoside가 보고 (Kang & Woo, 1982) 된 바 있고, *P. tinctoria*를 대상으로 이차대사산물 추출을 위한 조직배양 연구

(Chung & Chae, 1994)도 이루어진 바 있다.

여뀌속의 기본 염색체수는 $x = 10, 11$ 또는 17로 다양하며, 염색체에 관한 연구로는 여뀌 ($2n = 2x = 20$ or 22), 쪽 ($2n = 4x = 40$), 흰여뀌 ($2n = 2x = 22$) 등 일부 종에서 염색체 수가 보고 (Darlington & Wylie, 1955) 되어 있다. 우리나라에서는 마디풀, 호장근 등에서 염색체 수가 보고 (Lee, 1971) 된 바 있을 뿐 지금까지 여뀌속 식물에 대한 분자세포유전적 연구는 시도된 바 없다.

최근 관심이 높은 자생식물의 보존 및 이용과 관련하여 본 속은 약용으로써 뿐만 아니라 유용 유전자원으로써 이용가치가 높다. 본 연구에서는 우리나라에 분포하는 쪽 (*P. tinctoria*)을 대상으로 상염색체에 의한 핵형을 확립하고, FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 기법을 이용하여 45S 및 5S rRNA 유전자의 염색체상 위치를 확인하여 여뀌속 식물 연구의 기반이 되는 세포유전적 기반을 마련하고자 한다.

재료 및 방법

1. 식물재료

본 연구에서 사용한 재료는 한국생명공학연구원 (KRIBB)에

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

Received April 30, 2008 / Revised June 16, 2008 / Accepted June, 17, 2008

서 쪽 (*P. tinctoria* H. Gross)을 분양받았으며, 재료 식물을 화분에 옮겨 심은 후 근단을 채취하여 염색체를 관찰하였다.

2. 염색체 관찰 및 핵형 분석

중기 염색체 관찰을 위해서 근단을 채취하여 냉운 처리 (4°C, 24 hr)한 다음 1:3 고정액 (glacial acetic acid: ethanol, v/v)에 고정하여 냉장실에 보관하였다. 고정한 근단은 1N HCl (60°C)에서 6분간 연화시킨 다음 수세하여 Feulgen 용액에서 염색한 후 1% aceto-carmin 용액을 이용하여 압착법으로 슬라이드를 제작하여 현미경으로 염색체를 관찰하였다.

핵형은 Levan *et al.* (1964)의 방법에 따라 arm-ratio ($R = L/S$)를 비교하여 $R = 1.0 - 1.7$ 일 경우 중부 염색체 (m, median), $R = 1.7 - 3.0$ 일 경우 차중부 염색체 (sm, submedian), $R = 3.0 - 7.0$ 일 경우 차단부 염색체 (st, subterminal), $R = 7.0$ 이상일 경우 단부 염색체 (t, terminal)로 상동염색체 쌍을 구분하였으며, 염색체의 배열은 긴 것로부터 짧은 순서로 하여 고유 번호를 부여하였다.

3. 슬라이드 제작

FISH용 슬라이드는 다음과 같이 제작하였다. 고정된 근단을 증류수로 10분간 수세한 다음 효소 혼합용액 (2% cellulase, 1.5% macerozyme, 1% pectolyase, 0.5 mM EDTA, pH 4.2)에서 1시간 (37°C) 처리하여 1:3 고정액 (glacial acetic acid: ethanol, v/v)을 이용하여 슬라이드 위에서 핀셋으로 근단을 전개하고 상온에서 1일 이상 건조하였다. 위상차현미경 하에서 분열상이 양호한 슬라이드를 선별하여 냉동실에 보관하면서 FISH 실험에 사용하였다.

4. rDNA의 FISH

FISH 실험을 하기 위한 탐침 (probe)으로 digoxigenin-11-dUTP로 표지된 45S rDNA와 biotin-16-dUTP로 표지된 5S rDNA를 사용하였고 FISH 과정은 Choi *et al.* (2007)의 방법을 따랐다. 먼저 슬라이드상의 염색체 변성을 위하여 70% formamide/2xSSC, 용액에서 2분간 처리하고 -20°C 에탄올 (70%, 95%, 100%)에서 각각 5분씩 탈수하여 건조하였다. 건조한 슬라이드는 탐침 혼합액 (digoxigenin-11-dUTP와 biotin-16-dUTP로 각각 표지된 100 ng의 DNA, 50% formamide, 2xSSC, 10% dextran sulfate, 10 ng salmon sperm DNA)에 담가 98°C에서 10분간 변성시킨 후 급냉하였다. 건조된 슬라이드에 준비된 탐침 혼합액을 15 μ l를 가하고 커버글라스를 덮은 후 paper bond로 봉하여 humid chamber에서 16~18시간 (37°C) 혼성화 반응을 진행하였다.

혼성화된 슬라이드는 42°C의 2xSSC, 50% formamide/2xSSC, 2xSSC, 4xSSC 용액에서 각각 5분간 수세하였다. 수세한 슬라이드에 1% avidin-FITC (fluorescein isothiocyanate)

와 anti-digoxigenin rhodamine이 포함된 100 μ l의 5.0% BSA/4xSSC 혼합액을 가하여 1시간 (37°C) 동안 반응시켜 탐침을 검출 하였다. 이 슬라이드를 다시 0.2% tween-20/4xSSC 완충액으로 37°C에서 5분간 3번 수세 후 1 μ g/ μ l DAPI 용액이 함유된 Vectashield (Vector Lab.) 20 μ l를 가하여 커버글라스를 덮고 cooled CCD 카메라 (Cool SNAP, Photometrics)가 장착된 형광현미경을 이용하여 FISH signal들을 확인하고 촬영하였다. 형광 signal들은 다시 Meta Imaging Series™ 4.6 (Universal Imaging Corporation) 소프트웨어를 사용하여 합성하고 Photoshop ver. 7.0을 사용하여 최종 이미지를 얻었다.

결과 및 고찰

본 연구에서 관찰된 쪽의 염색체 수는 $2n = 4x = 40$, 기본 염색체 수는 $x = 10$ 으로 확인 (Fig. 1A, E)되어 기존의 보고와 일치하였다 (Darlington & Wylie, 1955). 쪽의 염색체의 길이는 2.25~1.50 μ m로 나타났다. 핵형분석 결과 염색체의 조성은 16쌍의 중부염색체 (염색체 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19 및 20)와 4쌍의 차중부염색체 (염색체 5, 14, 16 및 17)로 구분되어 핵형은 $K(2n) = 4x = 32m + 8sm$ 로 나타났다. 여뀌속 식물 중 기본 염색체 수가 $x = 10$ 인 식물은 기존에 알려진 여뀌 ($2n = 20$), 만주겨이삭여뀌 ($2n = 20$), 장대여뀌 ($2n = 20$) 등의 이배체 식물과 마디풀 ($2n = 40$) 외에 고마리 ($2n = 40$, 미발표), 쪽 등이 사배체 식물로 이배체에서 십배체까지 다양한 배수체 양상을 보여 주고 있다 (Darlington & Wylie, 1955; Nahar and Alam, 1998).

본 속 식물의 염색체는 크기가 매우 작아 관찰뿐만 아니라 핵형분석이 어려워 세포유전적 연구가 쉽지 않다. 또한 본 속은 형태적으로 유사한 식물이 많고 지역이나 환경에 따라 변이가 심하여 동정이나 분류에 어려움이 있는 것으로 알려져 있어 본 속을 여러 형태적 형질의 유연관계에 기초하여 *Persicaria*, *Tovara*, *Echinocaulon* 등의 절 (section)로 세분하여 연구가 진행되고 있다 (Hong & Lee, 1983; Suh *et al.*, 1997; Kwak *et al.*, 2006). 이렇게 형태적으로 유사한 식물의 경우 세포유전적 특성은 종의 동정에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

일반염색법으로는 염색체에서 관찰하기 어려운 핵의 rRNA 유전자의 수와 위치를 알아보기 위하여 digoxigenin-11-dUTP와 biotin-16-dUTP로 각각 표지된 45S와 5S rRNA 유전자 탐침 (probe)을 사용하여 FISH 실험을 수행하였다.

FISH 결과 45S rRNA 유전자는 3쌍의 차중부 염색체 (염색체 5, 16 및 17)의 단완 말단 부위에서 관찰되었고, 5S rRNA 유전자는 2쌍의 중부염색체 (염색체 9와 11) 동원체 부위에서 관찰되었다 (Fig. 1B-E). 핵 리보솜 유전자는 진핵생물에서 1개 이상의 유전자 좌에서 수백~수만 개의 복제 단위

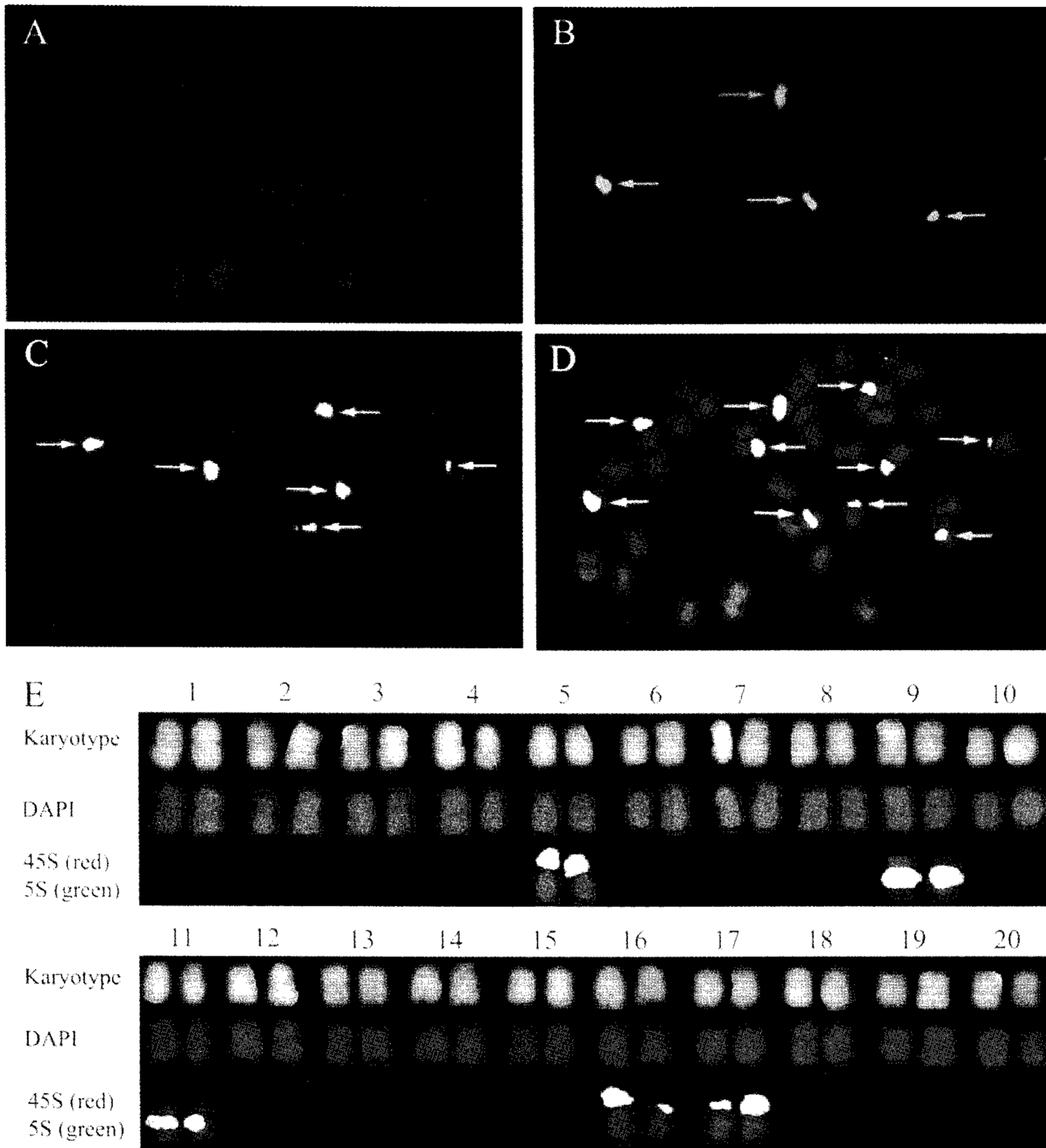


Fig. 1. FISH pattern of 45S and 5S rRNA genes and karyotype of the metaphase chromosomes in *Persicaria tinctoria*. A, DAPI counterstaining (blue); B, FISH with biotin-labeled 5S rDNA probe (green signals); C, FISH with digoxigenin-labeled 45S rDNA probe (red signals); D, merged image of B and C; E, karyotype of $K(2n) = 4x = 32m + 8sm$.

로 구성되어 있으며, 진화과정에서 매우 보존적 (conserved)인 염기서열이다 (Lapitan, 1992). 따라서 rDNA marker는 FISH 기법이 식물에 도입 (Schwarzacher *et al.*, 1989) 된 이후 핵형, 종동정의에도 계놈의 구성, 유연관계를 비롯하여 배수체 식물의 진화 및 계통 연구에도 널리 이용되어 왔으며 (Jiang and Gill, 2006), 특히 최근에 천궁 (Koo *et al.*, 2003) 지모 (Kim *et al.*, 2004), 섬시호 (Kim *et al.*, 2006a), 황기 (Kim *et al.*, 2006b), 인삼 (Choi *et al.*, 2007) 등의 약용식물의 세포유전적 연구에서도 유용하게 이용되고 있다.

최근 ITS 염기서열 분석에 의한 *Persicaria* 종 분류 (Kwak

et al., 2006)에서 쪽은 여뀌, 만주겨이삭여뀌, 장대여뀌 등과 유연관계가 높게 나타났으며 이 결과는 $x = 10$ 인 기본 염색체 수와 관련된 세포유전적 연구 결과와도 일치함을 보여 주었다.

본 연구에서 FISH 기법을 이용한 쪽의 핵형과 염색체에서 rRNA 유전자 좌의 확인 결과는 여뀌속 식물 연구에 주요 세포유전적 기본 자료로 이용될 수 있을 것이다.

적 요

여뀌속 식물인 쪽 (*P. tinctoria*)을 대상으로 핵형 분석과

45S 및 5S rRNA 유전자를 이용한 FISH 실험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 쪽의 기본염색체 수는 $x=10$, 체세포 염색체 수는 $2n=4x=40$ 으로 관찰되었으며, 염색체의 크기는 $2.25\sim 1.5\ \mu\text{m}$ 로 나타났다. 핵형분석 결과 쪽의 염색체 조성은 16쌍의 중부염색체 (염색체 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 19 및 20)와 4쌍의 차중부염색체 (염색체 5, 14, 16 및 17)로 확인되었으며, 핵형은 $K(2n)=4x=32m+8sm$ 로 구분되었다. FISH 결과 45S rRNA 유전자는 3쌍의 차중부 염색체 (염색체 5, 16 및 17)의 단완 말단 부위에서 관찰되었고, 5S rRNA 유전자는 2쌍의 중부염색체 (염색체 9와 11)의 동원체 부위에서 관찰되었다.

사 사

이 논문은 2006년도 충남대학교 학술연구비의 지원에 의하여 연구되었음

LITERATURE CITED

- Bae KH (2000) The Medicinal Plants of Korea. Kyohaksa Publishing Co., Seoul., p. 85.
- Choi HW, Koo DH, Bang KH, In DS, Kim YC, Seong NS, Bang JW (2007) Molecular cytogenetics in *Panax ginseng* and its related species. 16th Int. Chromosome Confer. p. 32.
- Chung ES, Chae YA (1994) Factors affecting cell growth in suspension cultures of *Polygonum tinctorium* Lour. Korean J. Breed. 26:172-176.
- Darlington CD, Wylie AP (1955) Chromosome Atlas of Flowering Plants. The McMillan Co., New York., p. 73.
- Hong SP, Lee S (1983) A palynotaxonomic study of Korean Polygonaceae. Korean J. Plant Tax. 13:63-76.
- Jiang J, Gill BS (2006) Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. Genome 49:1057-1068.
- Kang SS, Woo WS (1982) A flavonoid glycoside from the leaves of *Polygonum sachalinense* (II). Arch. Pharm. Res. 5:13-15.
- 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, Bang JW, Lee JK (2006a) Cytogenetic analyses using mitosis, meiosis chromosomes and bicolor fluorescence *in situ* hybridization of *Bupleurum latissimum* Nakai. Korean J. Medicinal Crop Sci. 14:354-359.
- Kim SY, Choi HW, Kim CS, Sung JS, Lee JK, Bang JW (2006b) Cytogenetic Analyses of *Astragalus* species. Korean J. Medicinal Crop Sci. 14:250-254.
- Kwak M, Kim MH, Won H, Park CW (2006) Variation of nuclear ribosomal ITS sequences of *Polygonum* section *Persicaria* (Polygonaceae) in Korea. Korean J. Plant Tax. 36:21-39.
- Koo DH, Kim SY, Bang KH, Seong NS, Bang JW (2003) Cytogenetic analyses of *Angelica* plants using Feulgen staining and multicolor fluorescence *in situ* hybridization. Korean J. Plant Biotech. 30:123-127.
- Lapitan NLV (1992) Organization and evolution of higher plant genomes. Genome 35:171-181.
- Lee TB (1985) Illustrated Flora of Korea. Hyangmoonsa Co., Seoul., p. 305-313.
- Lee YN (1971) Chromosome numbers of flowering plants in Korea. J. Kor. Res. Inst. Better Living 8:21-31.
- Levan A, Frekga K, Sandberg A (1964) Nomenclature for centromeric position in chromosomes. Hereditas 52:201-220.
- Nahar KK, Alam SS (1998) Differential chromosome banding in *Persicaria posumbu* (Hamilton ex. D Don) H Gross (Polygonaceae). Bangl. J. Bot. 27:103-107.
- Park JH (2002) The Encyclopedia of Chinese Crude Drugs. Shinilsangsa Publishing Co., Seoul., p. 1-973.
- Park JH (2004) Medicinal Plants of Korea. Shinilsangsa Publishing Co., Seoul., p. 988-1017.
- Schwarzacher T, Leitch AR, Bennet MD, Heslop-Harrison JS (1989) *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. Ann. Bot. 64:315-4324.
- Suh Y, Kim S, Park CW (1997) A phylogenetic study of *Polygonum* sect. *Tovara* (polygonaceae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. J. Plant Biol. 40:47-52.
- Yasuda K, Yamaguchi H (2005) Genetic diversity of vegetable water pepper (*Persicaria hydropiper* (L.) Spach) as revealed by RAPD markers. Breed. Sci. 55:7-14.