

자웅이주 식물 수영 (*Rumex acetosa* L.)에서 암·수에 따른 RAPD pattern의 다양성 분석

김동순 · 구달희 · 허윤강 · 방재욱*

충남대학교 자연과학대학 생물학과

Variation of RAPD patterns between Male and Female Genomic DNAs in Dioecious *Rumex acetosa* L.

Dong-Chun Jin, Dal-Hoe Koo, Yoonkang Hur, Jae-Wook Bang*
Department of Biology, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT

The genetic variation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns of genomic DNAs was investigated in dioecious plant *Rumex acetosa* L., which carries different sex chromosome complements in female ($2n=12A+XX$) and male ($2n=12A+XY_1Y_2$). One hundred and twenty random primers consisted of 10-mer were used for PCR amplification. Polymorphic bands were found in 24 primers. Specific bands for female and male were 16 and 18, respectively. Especially, a band of 1,440 bp from the OPC-10 primer was male specific. These sex specific RAPD markers are used to understanding the sex determination mechanism in plants.

Key words : polymorphism, RAPD, *Rumex acetosa*, sex chromosome

서언

수영 (*Rumex acetosa* L.)은 소리쟁이속 (*Rumex*)에 속하는 자웅이주 식물로 개화기는 5~6월이며, 암 개체의 키는 약 80 cm, 수 개체는 50 cm 정도로 자라고, 수꽃은 꽃받침과 수술이 각각 6개이고, 암꽃은 깃털처럼 갈라진 형태를 한 3개의 암술을 지니고 있으며, 종자를 통한 유성생식과 뿌리의 증식을 통한 영양생식을 병행한다 (Lee, 1985).

수영의 암 개체의 염색체 조성은 6쌍의 상염색체와 상염색체에 비해 크기가 큰 1쌍의 X 염색체 ($2n=12A+XX$)로 이루어져 있고, 수 개체의 염색체 조성은 암 개체와 상염색체 조성은 동일하나, 성염색체의 조성은 짝을 이루지 않는 X, Y₁, Y₂로 구분되는 3개의 성염색체 ($2n=12A+XY_1Y_2$)로 이루어져 있어, 암·수 사이에 성염색체 조성이 상이하다 (Kihara와 Ono, 1923a, 1923b; Lee 등, 1991). 수영의 성 결정은 X 염색체와 상염색체의 비율에 의하여

* 교신저자 : E-mail; bangjw@cnu.ac.kr

결정되는 것으로 알려져 있다. 성 결정 시 암 개체의 결정 요소는 X 염색체에 존재하지만, 수 개체의 성 결정 요소는 상염색체에 존재하고 두 개의 Y 염색체는 암성에는 관여하나 성 결정에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고된 바 있으나 (Ono, 1935; Love, 1943; Zuk, 1963), Y 염색체가 수 개체의 성을 결정하는 유전자를 지니고 있다는 보고 (Westergaard, 1958)도 있어, 아직 성 결정 메커니즘이 확실하게 구명되지 못하고 있다. 따라서 분자세포유전학적 수준에서 수영의 성 결정 유전자를 밝히는 것은 식물의 성 결정 메커니즘 구명에 매우 의미 있는 연구이다. 최근 microdissection이나 flow cytometry에 의한 성염색체의 단독 분리 및 성염색체의 특이 library의 구축에 관한 연구 등 분자세포유전학적 수준에서 식물의 성 결정 메커니즘 및 성 결정 유전자를 밝히기 위한 연구들이 활발하게 진행되고 있다 (Dolezel과 Gohde, 1995; Scutt 등, 1997; Willhoef 등, 1998; Matsunaga 등, 1999).

RAPD 기법은 연쇄 중합반응을 이용하여 DNA의 염기 서열을 빠르고 쉽게 알아볼 수 있는 방법으로 특정한 염기 서열에 대한 정보가 없어도 인위적인 primer를 이용하여 DNA의 다형성을 조사할 수 있고, 기존의 RFLP 기술에서보다 더 많은 다형 현상을 쉽게 구명할 수 있으며 (Williams 등, 1990), DNA 수준에서 변이를 알아낼 수 있어 종간 변이는 물론이고 종 내의 계통 분석에도 이용되고 있다 (Chalmers 등, 1992; Foolad 등, 1993; Wilkie 등, 1993). RAPD 기법을 이용한 염색체 특이적인 marker를 탐색하는 연구들도 많이 이루어지고 있다. Svitashv 등 (1998)은 *Flimus*와 *Hodelymus*에서 염색체에 특이적인 RAPD 마커를 클로닝 하여 FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 방법을 통해 서로 다른 염색체 상에서 마커의 signal을 검출한 바 있으며, Alstrom-Rapaport 등 (1998)은 *Salix viminalis* L.에서 560 bp인 성결정 유전자와 연관된 RAPD 마커를 선발하였고, Ruas 등 (1998)은 이배체 자웅이주 식물인 *Atriplex garrettii* (Chenopodiaceae)에서 RAPD를 이용하여 OPF-14 primer에서 2,075 bp의 수 개체 특이적 마커를 선발하여 보고한 바 있다. 자웅이주 식물인 sea

buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.)에서는 primer OPD-15를 이용한 수 개체 특이적인 RAPD 마커가 보고된 바 있다 (Persson과 Nybom, 1998).

본 연구는 식물의 성 결정 유전자의 탐색과 성 결정 메커니즘의 연구에 적합한 자웅이주 식물인 수영 (*R. acetosa*)을 대상으로 RAPD 분석을 통하여 암·수 사이의 유전적 다양성을 검증하고, 암·수에 따른 특이 마커를 선발하여 염색체 상에서의 성 특이 마커의 탐색 및 physical mapping 등 분자세포유전학적 연구에 대한 기초 자료를 마련하고자 수행되었다.

재료 및 방법

식물 재료

본 실험에서는 충남 공주 지역에서 채집한 수영 (*R. acetosa*)에서 염색체 분석을 통하여 암·수가 확인된 개체를 재료로 사용하였다.

DNA 추출

Genomic DNA는 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 방법을 이용하여 수영 암·수 개체의 잎으로부터 추출하였다 (Dellaporta 등, 1984). 추출한 DNA는 spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 O.D.를 측정하여 농도를 결정한 후, 1% agarose gel에서 DNA band를 확인하였고 4℃에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

RAPD 분석

본 실험에서는 수영의 암수개체의 genomic DNA와 Operon kit A, B, C, D, E, F에서 총 120개의 primer를 사용하여 RAPD 분석을 수행하였다. PCR 증폭에서는 1×PCR buffer, 150 μM dNTPs, 5 picomole primer, 1 Unit Taq polymerase, 80 ng 주형 DNA가 혼합된 총 20 μl의 반응 혼합물에 mineral oil 한 방울을 첨가 후, DNA 증폭기에서 94℃에서 5분간 predenaturation 후, 94℃ 30초, 36℃ 30초, 72℃ 120초

간 2 회, 94℃ 20초, 36℃ 15초, 45℃ 15초, 72℃ 90초 간 20 회, 94℃ 20초, 36℃ 15초, 45℃ 15초, 72℃ 120 초간 19회, 마지막으로 72℃에서 10분간 post-elongation시켰다. 반응 생성물을 1% agarose gel에 전기영동 후 Ethidium Bromide로 염색하여 UV 하에서 증폭된 DNA를 확인하고, 사진을 촬영하여 분석하였다.

결과 및 고찰

식물에서 성 결정의 유전적 연구에는 식물 재료의 선택이 중요하다. 현화 식물의 약 7%가 자웅이체이지만 (Brummit, 1992), 그 중 일부 종들만이 형태적으로 구별이 가능한 성염색체를 지니고 있다 (Löptien, 1979; Ye, 1991; Farbos 등, 1999; Nakayama 등, 2001). 수영 (*R. acetosa*)은 소리쟁이속에 속하는 자웅이주 (dioecious) 식물로서 암 · 수 사이에 성염색체 조성이 상이하게 나타나며, 형태적으로 쉽게 구별할 수 있어 (Kihara와 Ono, 1923a, 1923b, 1925) 성 결정 유전자의 탐색을 위한 세포유전학 및 분자생물학적 모델식물 중의 하나이다 (Shibata 등, 1999; 2000).

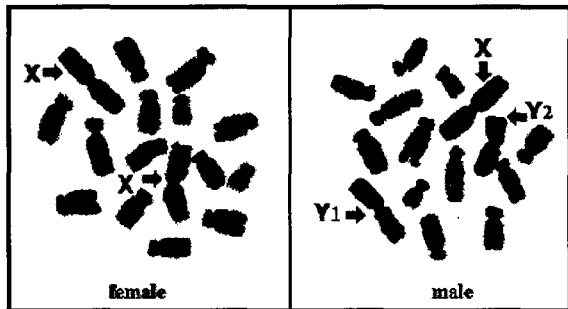


Fig. 1. Somatic metaphase chromosome complements of male ($2n=15+XY_1Y_2$) and female ($2n=14+XX$) plants of *R. acetosa* L. Arrows indicate sex chromosomes.

본 연구에서 수영의 암 · 수 개체의 염색체를 관찰한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 암 개체는 6쌍의 상염색체와 상염색체에 비해 크기가 큰 1쌍의 X 염색체 ($2n=12+XX$)을 지니고 있고, 수 개체는 상염색체의 조성은 암 개체와 동일하나 성염색체의 조성

은 상염색체 보다 크며, 짝이 이루어지지 않는 3개의 성염색체 ($2n=12+XY_1Y_2$)로 이루어져 있는 것으로 관찰되었다 (Kihara와 Ono, 1923a, 1923b, 1925; Lee 등, 1991). 수영의 성염색체의 특징은 X 염색체는 중부염색체로 모든 염색체중 가장 크며, 염색체의 대부분이 진정염색질 (euchromatin)로 이루어져 있고, 변이가 거의 나타나지 않는다. 이에 비하여 수 개체에 존재하는 Y 염색체는 X 염색체와 같은 중부염색체이지만 대부분이 이질염색질 (heterochromatin)로 구성되어 있고, 많은 다형 현상이 관찰된다 (Wilby와 Parker, 1986). Y 염색체의 변이는 식물 개체의 표현형의 변화, 화분의 염성 및 생존력에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고되어있다 (Ono, 1935; Wilby와 Parker, 1986; 1987).

RAPD 분석에 사용된 수영은 야외에서 채집하여, 염색체 관찰을 통해 암 · 수가 확인된 식물을 대상으

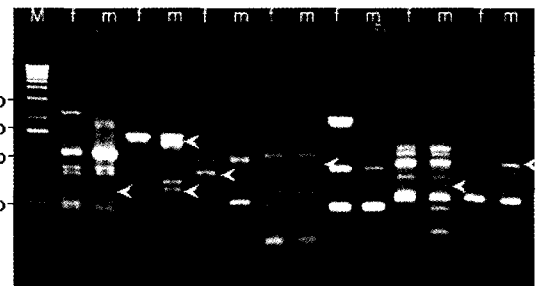


Fig. 2. RAPD patterns of male (m) and female (f) plants in *R. acetosa* L. Arrows indicate specific bands for female or male plants, respectively.

로 계놈 DNA를 추출하였다. PCR을 이용한 RAPD 분석은 목표로 하는 계놈 DNA 염기를 분획적 PCR로 증폭하며, 증폭 가능한 거리 내에 primer 결합 부위가 존재할 때 DNA 절편을 얻을 수 있다. DNA 절편의 수와 크기의 차이로 다형 현상을 분석할 수 있으며, 증폭된 부위의 결실, 삽입 또는 primer 결합 부위를 변화시키는 염기의 변화를 밝혀낼 수 있다 (Baird 등, 1992). 이러한 DNA의 다형 현상은 염기의 차이를 반영하며, 유전자형에 기반을 둔 선발이므로 개체간에도 관찰할 수 있다. 본 연구에서는 개체간의 차이를 줄이기 위하여 암 · 수 각각 10 개체의 DNA를 혼합하여 RAPD 분석에 사용하였다. RAPD

분석에서 식물 종에 따라 적당한 primer 의 선발은 매우 중요하며 (Fritsch 등, 1993), 본 연구에서는 120 개의 primer (OPA-OPF)가 적용되었다. 각각의 primer 에 의해 증폭된 DNA 단편들은 2,500-200 bp에서 관찰되었고, 증폭된 band의 수는 평균 4-5개로 나타났으며, 그 중 24개의 primer에서 각각 암·수 개체에 특이적인 band가 나타났다. 암 개체에 특이적인 band가 16개로 나타난 반면, 수 개체에 특이적인 band는 18개 관찰되었다 (Fig. 2). 특히 OPC-10으로부터 얻은 1,440 bp의 DNA 단편은 모든 수 개체 특이적으로 나타남이 확인되었다 (Fig. 3).

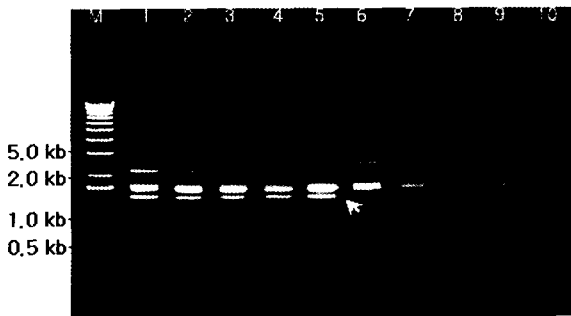


Fig. 3. PCR products using OPC-10 primer. M, 1kb DNA ladder marker; lanes 1-5, male plants; lanes 6-10, 5 female plants. Arrow indicates the specific fragment to male plants of *R. acetosa* L.

수영의 암 개체는 1쌍의 X 염색체 ($2n=12+XX$)를 지니고 있으며, 수 개체는 X, Y₁, Y₂로 구분되는 3개의 성염색체 ($2n=12+XY_1Y_2$)로 이루어져 있는 세포 유전학적 특성으로 미루어 볼 때, 수영의 암·수 사이의 RAPD pattern에서 차이를 나타내는 band는 수 개체에서 나타날 수 있는 것으로 예측하여 볼 수 있다. 본 연구에서는 암·수에서 모두 차이를 나타내는 band를 관찰할 수 있었는데, 이러한 결과는 수영의 암·수 개체가 형태적으로 동일한 상염색체 조성을 지니고 있지만, DNA 구조적 측면에서 그들은 서로 다른 조성을 지니고 있음을 암시한다. 수영의 암·수 개체가 구조적으로 동일한 상염색체 조성을 지니고 있다고 가정한다면, 암·수에 동시에 존재하는 X 염색체의 DNA는 구조적으로 서로 다른 조성을 지니고 있을 것이다. 또한 암·수 개체에서 상염색체와 X 염색체가 동일한 DNA 구조를 이루고 있

다고 가정한다면, 수 개체에서 수 개체에 특이적인 band들을 관찰할 수 있다는 점은 Y 염색체의 경우, 그 형성 과정과 진화 과정에서 단순하게 상염색체 및 X 염색체의 절단과 재조합으로 이루어진 것이 아니라, 어떤 특이한 과정의 진화가 진행되어 상염색체 및 X 염색체와는 상이한 DNA구조를 형성하여 왔을 것으로 사료된다. 즉 Y 염색체가 수 개체의 성을 결정하는 유전자를 지니고 있을 가능성을 제시해 주고 있다 (Westergaard, 1958).

본 연구에서 얻은 RAPD 분석 결과는 수영의 성 결정 메커니즘의 이해에 매우 중요한 정보를 제공하여 주며 암·수 개체에 나타난 특이적인 마커들은 FISH를 이용한 physical mapping 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

적요

암·수 개체 사이에 상이한 성염색체 조성을 지니는 자웅 이주 식물인 수영 (*Rumex acetosa* L.)에서 120개의 10-mer random primer를 이용하여 RAPD 분석을 수행하였다. 적용한 primer들 중 24개의 primer에서 34개의 암·수 특이 밴드가 관찰되었다. 암 개체 특이 밴드는 16개였으며, 수 개체 특이 밴드는 18개로 나타났다. 특히 OPC-10 primer로부터 얻은 1,440 bp인 DNA 단편은 수 개체 특이적으로 나타났다. 본 연구에서 얻어진 성 특이적인 RAPD 마커들은 식물에서 성 결정 메커니즘 구명의 기본 자료로 활용될 수 있을 것이다.

사사

본 연구는 2000년 충남대학교 학술진흥장학재단 연구비 (PI: 방재욱)와 한국학술진흥재단 연구비 (KRF-2000-DP0401: PI: 허운강) 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Alstrom-Rapaport C., Lascoux M., Wang Y. C., Roberts G., and Tuskan G. A. 1998. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in the basket willow (*Salix viminalis* L.). *Journal of Heredity* 89: 44-49.
- Baird E., Cooper-Bland S., Wang R., Demaine M., and Powell W. 1992. Molecular characterization of inter- and intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Mol. Gen. Genet.* 233: 469-475.
- Brummit R. K. 1992. Vascular plant families and genera. *Royal Botanic Gardens Rev.* 1: 120-127.
- Chalmers K. J., Waugh R., Sprent J. I., Simons A. J., and Powell W. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69: 456-472.
- Dellaporta S. L., Wood J., and Hicks J. B. 1984. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Dolezel J. and Gohde W. 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19: 103-106.
- Farbos I., Veuskens J., Vyskot B., Oliveira M., Hinnisdaels S., Aghmir A., Mouras A., and Negrutiu L. 1999. Sexual Dimorphism in White Campion: Deletion on the Y chromosome results in a floral asexual phenotype. *Genetics* 151: 1187-1196.
- Foolad M. R., Jones R. A., and Rodriguez R. L. 1993. RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic maps. *Plant Cell Reports* 12: 293-297.
- Fritsch P., Hanson M. A., Spore C. D., Pack P. E., and Rieseberg L. H. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 10-20.
- Kihara H. and Ono T. 1923a. Cytological studies on *Rumex* I. Chromosomes of *Rumex acetosa* L. *Bot. Mag. (Tokyo)* 37: 84-90.
- Kihara H. and Ono T. 1923b. Cytological studies on *Rumex* II. On the relation of chromosomes number and sexes in *Rumex acetosa* L. *Bot. Mag. (Tokyo)* 37: 147-149.
- Kihara H. and Ono T. 1925. The sex chromosomes of *Rumex acetosa*. *Zeitschrift Indukt. Abstamm. und Vererbungslehre* 39: 1-7.
- Lee C. B. 1985. *Illustrated Flora of Korea*. Hyangmoonsa Co. Ltd. p 279. (in Korean)
- Lee M. K., Choi H. W., and Bang J. W. 1991. Karyotype and chromosomal polymorphism in *Rumex acetosa* L. *Korea J. Genetics* 13: 271-280. (in Korean)
- Löptien H. 1979. Identification of the sex chromosome pair in *Asparagus* (*Asparagus officinalis* L.). *Z. Pflanzenzucht* 82: 162-173.
- Love A. 1943. A Y-linked inheritance of asynapsis in *Rumex acetosa*. *Nature (London)* 152: 358-359.
- Matsunaga S., Kawano S., Michimoto T., Higashiyama T., Nakao S., Sakai A., and Kuroiwa T. 1999. Semi-automatic laser beam micodissection of the Y chromosome and analysis of Y chromosome DNA in a dioecious plant, *Silene latifolia*. *Plant Cell Physiol.* 40: 60-68.
- Nakayama S., Fujishita M., Sone T. and Ohyama K. 2001. Additional locus rDNA sequence specific to the X chromosome of the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Chromosome Res.* 9: 469-473.
- Ono T. 1935. Chromosomen und Sexualität von *Rumex Acetosa*. *Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ.* 10: 41-210.
- Persson H. A. and Nybom H. 1998. Genetic sex determination and RAPD marker segregation in the dioecious species sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Hereditas* 129: 45-51.
- Ruas C. F., Fairbanks D. J., Evans R. P., Stutz H. C., Andersen W. R., and Ruas P. M. 1998. Male-specific DNA in the dioecious species *Atriplex garrettii*

- (Chenopodiaceae). Amer. J. Bot. 5: 162-167.
- Scutt C. P., Kamisugi Y., Sakai F., and Gilmartin P. M. 1997. Laser isolation of plant sex chromosomes: Studies on the DNA composition of the X and Y sex chromosomes of *Silene latifolia*. Genome 40: 705-715.
- Shibata F., Hizume M., and Kuroki Y. 1999. Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of a Y chromosome specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*. Chromosoma 108: 266-270.
- Shibata F., Hizume M., and Kuroki Y. 2000. Differentiation and the polymorphic nature of the Y chromosomes revealed by repetitive sequences in the dioecious plant, *Rumex acetosa*. Chromosome Research 8: 229-236.
- Svitashev S., Bryngelsson T., Li X., and Wang R. C. 1998. Genome-specific repetitive DNA and RAPD markers for genome identification in *Elymus* and *Hordelymus*. Genome 41: 120-128.
- Westergaard M. 1958. The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. Advanced Genetics 9: 217-281.
- Wilby A. S. and Parker J. S. 1986. Continuous variation in Y-chromosome structure of *Rumex acetosa*. Heredity 57: 247-254.
- Wilby A. S. 1987. Population structure of hypervariable Y-chromosomes in *Rumex acetosa*. Heredity 59: 135-143.
- Wilkie S. E., Issac P. G., and Slater R. J. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. Theor. Appl. Genet. 86: 497-504.
- Willhoeft U., Mueller-Navia J., and Franz G. 1998. Analysis of the sex chromosomes of the Mediterranean fruit fly by microdissected DNA probes. Genome 41: 74-78.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., and Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic makers. Nucleic Acid Res. 18: 6531-6535.
- Ye D. 1991. Sex determination in the dioecious *Melandrium*. The X/Y chromosome system allows complementary cloning strategies. Plant Sci. 80: 93-106
- Zuk J. 1963. An investigation on polyploidy and sex determination within the genus *Rumex*. Acta Soc. Bot. Pol. 32: 5-67.

(접수일 2002. 11. 20)

(수락일 2003. 1. 5)