

혈떡이풀의 핵형분석과 Bicolor FISH를 이용한 물리적 지도 작성

김수영, 이종구*
한국생명공학연구원

Karyotype Analysis and Physical Mapping of rDNAs Using Bicolor-FISH in *Tiarella polyphylla* D. Don

Soo-Young Kim and Joongku Lee*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-355, Korea

Abstract - *Tiarella polyphylla* D. Don (Saxifragaceae) is a perennial herb and distributed in China, Japan, Taiwan and Korea. Especially, it only grows in Ulleung island of Korea. It has been using for asthma, bruise and audition troubles with main components of some Triterpenoids and seven oleanolic Saponins. There is only known its chromosomal number rarely and cytogenetic study was not done. From this study, karyotype analysis and chromosomal localization of 5S and 45S rDNAs using bicolor-FISH (fluorescence *in situ* hybridization) were carried out. The somatic metaphase chromosome number was $2n=2x=14$ and the size of chromosomes ranged $1.66\sim 3.50\mu\text{m}$. The chromosome complement consisted of four pairs of submetacentrics (chromosomes 1, 2, 3 and 6), two pairs of subtelocentrics (chromosomes 5 and 7) and one pair of telocentrics (chromosome 4). We also observed NOR (nucleolus organizer region) on the chromosome 4. In bicolor-FISH, one pair of 5S and 45S rDNA sites was detected on the centromeric region of chromosome 3 and short arm of chromosome 4, respectively. Bicolor FISH was very useful tool for the localization and identification of rDNAs on the chromosomes in *Tiarella polyphylla*.

Key words - *Tiarella polyphylla*, Karyotype analysis, Bicolor-FISH, 5S rDNA, 45S rDNA

서 언

혈떡이풀속(*Tiarella*)은 범의귀과(Saxifragaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 일본, 중국, 한국 및 북미에 6종이 분포하며 (Funamoto and Nakamura, 1991) 한국에는 혈떡이풀 1종만이 울릉도에 분포한다(Lee, 1980). 혈떡이풀은 천식 치료제로 널리 알려져 있어 천식약풀이라고도 하며 타박상과 청각장애의 치료에 이용하는데, 주요 성분으로 Triterpenoid와 7종류의 oleanolic saponin을 함유하고 있다(Park *et al.*, 2002).

혈떡이풀속 식물의 세포유전학적 연구로 염색체의 기본수와 체세포 염색체 수가 보고되었는데 기본수가 $n=7$ (Schoennagel, 1931 Skovsted, 1934)과 $n=9$ (Matsuura and Suto, 1935)로 각각 다르게 알려져 왔으며, 일본에 서식하는 혈떡이풀에 대한 핵형분석이 보고된 바 있다(Funamoto and Nakamura,

1991). 그러나 우리나라에서는 천식치료 목적의 약용작물로써의 높은 가치가 있음에도 불구하고 유전자원의 이용 및 보존을 위하여 기초 자료로 활용되는 세포유전학적 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 최근 국내에 자생하거나 재배되는 약용식물에 대해 분자세포유전학적 접근 방법인 FISH(fluorescence *in situ* hybridization) 기술이 많이 적용되고 있는데(Koo *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006a,b), 특정 DNA 염기서열로 이루어진 탐침(probe)을 사용하여 염색체 상에서 위치를 직접 확인할 수 있는 방법이다. rDNA 유전자는 모든 식물 종에서 그 위치와 수에서 차이를 나타내기 때문에 일반적인 염색법으로 핵형분석이 어렵거나 염색체간의 형태적 차이가 불분명한 경우 FISH를 통한 물리적 지도 작성(physical mapping)으로 보다 정확한 염색체 분석이 가능하며, 중간 또는 속내의 계통간 유연관계 규명과 구조분석에 효과적인 탐침으로도 사용되고 있다(Fukui *et al.*, 1994; Hasterok *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2002). 5S와 45S(18S-

*교신저자(E-mail) : joongku@kribb.re.kr

5.8S-25S) rDNA 유전자는 모든 식물에 공통으로 존재하고, 복제수가 많으며 염색체 상에 각각 다른 위치에 존재한다. 또한 1쌍 또는 그 이상으로 존재하기 때문에 FISH를 통한 핵형분석과 유전체 구조 비교연구에 유용한 탐침으로 사용되고 있다 (Castilho and Heslop-Harrison, 1995; Benabdelmouna and Darmency, 1997; D' Hont *et al.*, 1998). 따라서 본 연구에서는 약용작물로 이용가치가 높은 혈떡이풀의 핵형분석과 5S와 45S rDNA 탐침을 이용한 물리적 지도 작성을 통해 분자세포유전학적 기초자료를 확립하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에서 재료로 사용된 혈떡이풀(Fig. 1)은 울릉도 성인봉에서 채집하여 한국생명공학연구원 포장에 옮겨 심은 후 근단을 채취하여 핵형분석 및 FISH 재료로 사용하였다.



Fig. 1. Whole plant of *Tiarella ployphylla* D. Don.

염색체 관찰 및 핵형분석

채취된 근단은 증기 염색체상을 얻기 위하여 증류수(4℃)에 넣어 24시간 동안 저온처리 한 다음, 고정액(glacial acetic acid : ethanol, v/v=1:3)에 담가 4℃에 보관하면서 염색체 재료로 이용하였다. 염색체 관찰을 위해 고정한 근단을 1N HCl (60℃)에서 5분간 연화 한 다음, 증류수로 수세하고 Feulgen 용액에서 염색한 후, 1% aceto-carmin을 이용하여 압착법으로 프레파라트를 만들어 염색체를 관찰하였다. 양호한 분열상은 촬영하여 핵형분석에 사용하였다. 핵형분석은 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 것으로부터 짧은 순으로 하여 고유 번호를 부여하였다.

FISH 슬라이드 제작

FISH 실험을 위한 슬라이드를 제작하기 위해 고정된 근단을 증류수로 수세한 후 효소 혼합용액(2% cellulase, 1.5% macerozyme, 1% pectolyase, 0.5mM EDTA, pH 4.2)에 담가 40분간 처리(37℃) 후, 고정액(glacial acetic acid : ethanol, v/v=1:3)을 이용하여 가는 핀셋으로 슬라이드글라스 위에서 염색체를 전개 한 뒤 상온에서 2-3일간 건조시켰다. 위상차 현미경하에서 분열상이 양호한 슬라이드를 선발하여 FISH 실험에 사용하였다.

탐침의 준비와 bicolor-FISH

FISH를 위한 탐침으로는 digoxigenin-11-dUTP로 표지된 5S rDNA와 biotin-16-dUTP로 표지된 45S rDNA를 이용하였으며 bicolor-FISH는 Kim 등(2004)의 방법을 변용하여 사용하였다. 건조된 슬라이드상의 염색체 변성을 위하여 70% formamide/2xSSC 용액에 2분간 처리하고, 70% 에탄올(-20℃)에서 급냉 후, 70%, 90% 그리고 99% 에탄올에서 각각 5분씩 탈수하여 상온에서 30분 정도 건조시켰다. 탐침 혼합액(biotin-16-dUTP와 digoxigenin-11-dUTP로 각각 표지된 100ng의 probe DNA, 50% formamide, 2x SSC, 10% dextran sulfate, 10ng ssDNA)은 90℃에서 10분간 변성시킨 후, 급냉시켜 준비하였다. 건조된 슬라이드상에 15 μ l의 탐침 혼합액을 가한 다음, 커버글라스를 덮고 paper bond로 봉하여, 37℃에서 약 16시간 이상 혼성화(hybridization) 하였다. 혼성화 시킨 슬라이드는 40℃의 2xSSC, 50% formamide/2xSSC, 2xSSC, 4xSSC 용액에서 각각 5분씩 수세하였다. 탐침의 비 특이적인 결합을 막기 위해 염색체 슬라이드를 5% BSA/BT (1M NaHCO₃ + 0.5% Tween-20, pH 8.3) 완충액으로 37℃에서 5분간 blocking한 후, 1%의 avidin-FITC(fluorescein isothiocyanate)와 anti-digoxigenin rhodamine이 포함된 100 μ l의 1% BSA/4xSSC의 혼합액을 슬라이드에 가한 다음 37℃에서 50분 동안 반응시켜 biotin과 digoxigenin으로 표지된 DNA 탐침을 동시에 검출하였다. 4xSSC/0.2% tween-20 완충액으로 37℃에서 5분씩 3번 수세 후, 1 μ g/ml DAPI(4,6-

diamidine-2-phenylindole dihydrochloride) 용액을 포함한 Vectashield(Vector Lab.) 10ml를 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

핵형분석

한국산 혈떡이풀의 체세포 염색체 수는 $2n=2x=14$ 로 기본수는 $n=7$ 이며 2배체 식물이다(Fig. 2). 염색체의 크기는 $2.0\sim 3.9\mu\text{m}$ 이며, arm-ratio는 $1.41\sim 2.66$ 이었다. Arm-ratio에 따라 염색체 1번과 7번을 중부 염색체, 염색체 2, 5 그리고 6번을 차중부 염색체 그리고 부수체 염색체인 4번을 단부 염색체로 구분하였다. 1번 염색체는 7쌍 중 가장 길이가 긴 염색체로 평균 길이가 $3.9\mu\text{m}$ 이었으며 arm-ratio는 1.60으로 중부 염색체이며, 2번 염색체는 평균 길이가 $3.4\mu\text{m}$ 로 arm-ratio가 1.83으로 차중

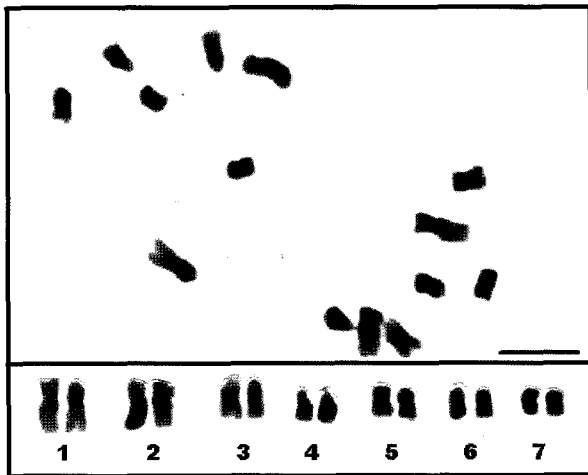


Fig. 2. Somatic metaphase chromosome complements and karyotypes in *T. polyphylla*. Bar, $5\mu\text{m}$.

부 염색체로 확인되었다. 3번 염색체의 평균 길이는 $2.9\mu\text{m}$ 로 arm-ratio가 1.41로 중부 염색체이며, 4번 염색체는 부수체 염색체로 평균 길이가 $2.7\mu\text{m}$ 이며 arm-ratio는 4.4로 단부 염색체로 관찰되었다. 5번 염색체의 평균 길이는 $2.4\mu\text{m}$ 로 arm-ratio가 2.00으로 차중부 염색체이며, 6번 염색체는 평균 길이가 $2.2\mu\text{m}$ 로 arm-ratio가 2.66으로 차중부 염색체이고, 7번 염색체는 평균 길이가 $2.0\mu\text{m}$ 로 가장 짧으며 arm-ratio는 1.50으로 중부 염색체로 구분하였다(Fig. 2, Table 1). 대다수의 연구결과에서는 기본 염색체 수가 $n=7$ 로 보고되었으나(Schoennagel, 1931; Skovsted, 1934; Kurosawa, 1966; Soltis and Bohm, 1984), Matsuura(1935)는 $n=9$ 로 보고하였다. 1번과 2번 염색체의 길이가 나머지 5쌍의 염색체와 비교해 상대적으로 길게 관찰되어 기존의 결과와 일치하였다(Soltis and Bohm, 1984; Funamoto and Nakamura, 1991). 본 연구결과에서는 1번 염색체는 중부 염색체로 2번 염색체는 차중부 염색체로 각각 구분하였으나, Soltis와 Bohm(1984)은 모두 차중부 염색체로 구분하여 차이를 보였다. 또한 본 연구결과에서는 각각 3쌍의 중부 염색체(염색체 1, 3 그리고 7번)와 차중부 염색체(염색체 2, 5, 그리고 6번) 그리고 1쌍의 단부 염색체(염색체 4)로 구분하였으나 일본에서 서식하는 혈떡이풀의 경우 각각 3쌍의 중부 염색체(염색체 3, 4 그리고 5번)와 4쌍의 차중부 염색체(염색체 1, 2, 6 그리고 7번)로 보고하여 핵형상의 차이를 보였다. 이는 같은 종에서도 염색체의 형태가 지리적인 차이에 따라 다르다는 것을 보여주는 결과이다. 또한 본 연구에서는 4번 염색체가 부수체 염색체로 관찰되었으나 6번과 7번을 부수체 염색체로 보고하기도 하였다(Soltis and Bohm, 1984; Funamoto and Nakamura, 1991).

Bicolor FISH

보다 정확한 핵형분석과 부수체 염색체를 확인하기 위해 5S와 45S rDNA를 탐침으로 한 FISH기법이 수행되었다. 일반 염색법에 의한 핵형분석을 보다 명확하게 뒷받침 하기 위해 digoxigenin-11-dUTP와 biotin-16-dUTP로 각각 표시된 5S

Table 1. Analysis of somatic metaphase chromosomes of *Tiarella polyphylla* D. Don.

Chromosome No.	Chromosome size (μm)			Arm ratio (L/S)	Centromeric Index
	Long arm	Short arm	Total		
1	2.40	1.50	3.90	1.60	M
2	2.20	1.20	3.40	1.83	SM
3	1.70	1.20	2.90	1.41	M
4	2.20	0.50	2.70	4.40	T
5	1.60	0.80	2.40	2.00	SM
6	1.60	0.60	2.20	2.66	SM
7	1.20	0.80	2.00	1.50	M

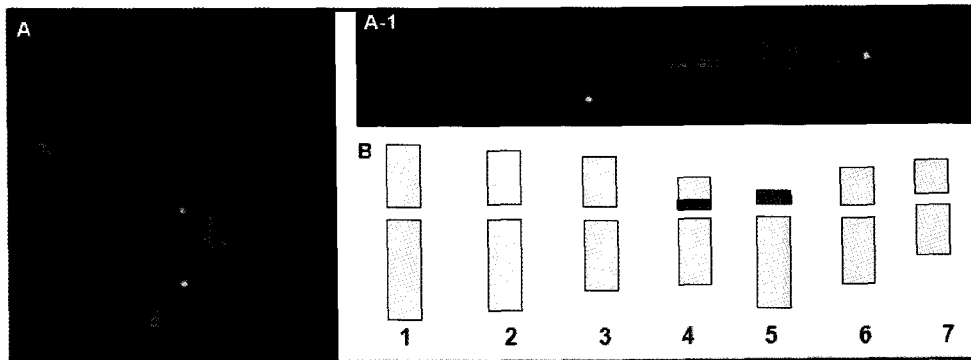


Fig. 3. Bicolor FISH pattern of the metaphase chromosome in *T. polyphylla* using 5S and 45S rDNA probes and ideogram showing the physical location of 5S (red) and 45S (green) loci.

와 45S rDNA로 bicolor FISH를 한 결과 부수체 염색체인 4번 염색체의 단완 말단 부위에서 1쌍의 45S rDNA signal과 5번 염색체의 동원체 주변에서 5S rDNA signal이 관찰되었다(Fig. 3A; 3A-1). FISH를 통해 확인된 5S와 45S rDNA signal에 근거하여 작성한 핵형의 ideogram은 Fig. 3B에서 보는 바와 같다. 5S와 45S rDNA는 리보솜의 구성 성분으로 특히 45S rDNA는 인형성 부위를 포함하고 있는 부수체 염색체에서 관찰되는데(Leitch and Heslop-Harrison, 1992), 모든 식물종의 염색체 상에서 1쌍 이상이 존재하고(Maluszynska and Heslop-Harrison, 1991), 두 유전자가 동일한 위치에서 나타나지 않기 때문에 일반 염색법으로 핵형분석이 어렵거나, 동일한 속내에서의 종간의 차이를 구분할 수 있는 유용한 유전자이다. 이러한 rDNA는 식물종에 따라 다양하게 나타나고, 속내에서도 종간의 차이를 구분할 수 있어(Lee et al., 2005; Kim et al., 2006b, c), 식물의 계통연구와 염색체지도 작성 그리고 분자세포생물학 분야 등 여러 식물 분야에 전반적으로 이용될 수 있으리라 사료된다.

본 연구에서 수행된 핵형분석 및 rDNA를 이용한 물리적 지도작성은 혈떡이풀의 계통구조를 이해하고, 유전자의 물리적 위치를 탐색하는 기초적인 연구로서 혈떡이풀의 세포유전학적 기초자료로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

적 요

혈떡이풀은 다년생 초본으로 중국, 일본, 대만 그리고 한국에 분포한다. 특히 우리나라에서는 울릉도에서만 분포하는데, 천식 치료, 타박상 그리고 청각 장애의 치료에 사용된다. 약용작물로서의 높은 가치에도 불구하고 염색체 수를 제외한 다른 세포유전학적인 연구가 거의 이루어지지 않았다. 따라서 핵형분석 뿐만 아니라 bicolor FISH를 통한 5S와 45S rDNA의 물리

적 지도작성에 관한 연구가 수행되었다. 체세포 염색체 수는 $2n=2x=14$ 로 염색체의 길이는 $1.66\sim 3.50\mu\text{m}$ 이다. 또한 염색체의 구성은 4쌍의 차중부 염색체(염색체 1, 2, 3, 6)와 2쌍의 차단부 염색체(염색체 5, 7) 그리고 1쌍의 단부 염색체(염색체 4)로 확인되었다. 또한 4번 염색체가 부수체 염색체로 관찰되었다. Bicolor-FISH를 통해 각각 1쌍의 5S와 45S rDNA 위치를 확인하였는데, 5S rDNA의 경우 염색체 3번의 동원체 부위에서 확인되었고, 45S rDNA는 염색체 4번의 단완 말단 부위에서 관찰되었다. Bicolor-FISH는 혈떡이풀 염색체상에 rDNA 유전자의 위치 확인에 매우 유용한 정보를 제공하는 기술로 사용되었다.

사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용 기술개발사업단의 연구비 지원(과제번호: PF0300201-00, PI 이종구)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Benabdelmouna, A. and A.M. Darmency. 1997. Distribution and chromosomal organization of 18S-5.8S-25S and 5S rDNA in *Petunia* species. *Agronomie (Plant Genet Breed)* 17: 349-360.
- Castilho, A. and J.S. Heslop-Harrison. 1995. Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. *Genome* 38: 91-96.
- D' Hont, A. Ison, K. Alix, C. Roux and J.G. Glaszmann. 1998. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome* 41: 221-225.

- Fukui, K., N. Ohmido and G.S. Khush. 1994. Variability in rDNA loci in the genus *Oryza* detected through fluorescence *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 87: 893-899.
- Funamoto, T. and T. Nakamura. 1991. Karyomorphological study on Japanese *Tiarella polyphylla* (Saxifragaceae). *Chromosome Information Service* 51: 14-15.
- Hasterok, R., G. Jenkins, T. Langdon, R.N. Jones and J. Maluszynska. 2001. Ribosomal DNA is an effective marker of *Brassica* chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 103: 486-490.
- Han, Y. H., L.J. Li, Y.C. Song, Z.Y. Li, Z.Y. Xiong and D.Y. Li. 2002. Physical mapping of the 5S and 45S rDNA in *teosintes*. *Hereditas* 137: 16-19.
- Kim, S.Y., H.W. Choi and J.W. Bang. 2004. Physical mapping of rDNAs using McFISH in *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Korean J. Med. Crop Sci.* 12: 515-518 (in Korean).
- Kim, S.Y., H.W. Choi, D.H. Koo, C.S. Kim and J.W. Bang. 2005. Karyotype analysis and physical mapping of rDNAs using McFISH in *Jeffersonia dubia* Benth. *Korean J. Med. Crop Sci.* 13: 48-51 (in Korean).
- Kim, S.Y., H.W. Choi, C.S. Kim, J.S. Sung, J.K. Lee and J.W. Bang. 2006a. Cytogenetic analysis of *Astragalus* species. *Korean J. Med. Crop Sci.* 14: 250-254 (in Korean).
- Kim, S.Y., J.W. Bang and J.K. Lee. 2006b. Cytogenetic analysis using mitosis, meiosis chromosomes and bicolor fluorescence *in situ* hybridization of *Bupleurum latissimum* Nakai. *Korean J. Med. Crop Sci.* 14: 354-359 (in Korean).
- Kim, S.Y., H.W. Choi, D.H. Koo, W.K. Lee, J.K. Lee and J.W. Bang. 2006c. Characterization of eight *Rumex* species by FISH (fluorescence *in situ* hybridization) and 5S rDNA spacer sequences. *Korean J. Genetics* 28: 243-251 (in Korean).
- Koo, D.H., N.S. Seong, J.S. Seong, K.H. Bang and J.W. Bang. 2003. Karyotype analysis and physical mapping of rDNAs in *Bupleurum longerradiatum*. *Korean J. Crop Sci.* 11: 402-407 (in Korean).
- Kurosawa, S. 1966. Cytological studies on some Eastern Himalayan plants. In *The flora of Eastern Himalaya* (Compiled by Hitoshi Hava, Univ. of Tokyo Press. Japan). pp. 658-670.
- Lee, W.K., H.W. Choi, D.H. Koo, S.Y. Kim and J.W. Bang. 2005. Molecular cytogenetics of five *Pulsatilla* species to the 5S, 45S rDNA genes by fluorescence *in situ* hybridization. *Korean J. Genetics* 27: 179-185 (in Korean).
- Lee, T.B. 1980. *Illustrated Flora of Korea*. Hyangmoonsa Co., Ltd (in Korean).
- Leitch, I.J. and J.S. Heslop-Harrison. 1992. Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rDNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome* 53: 1013-1018.
- Levan, A., K. Frekga and A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position in chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Maluszynska, J. and J.S. Heslop-Harrison. 1991. Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 1: 159-166.
- Matsuura, H. and T. Suto. 1935. Contributions to the ideogram study in Phanerogamous plants I. *Jour. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Ser. 5, Bot.* 5: 33-75.
- Park, S.H., S. R. Ohi, K.S. Ahn, J. G. Kim and H.K. Lee. 2002. Structure determination of a new lupen-type tetrapene, tiarellic acid, isolated from *Tiarella polyphylla*. *Arch Pharm Res.* 25: 57-60.
- Schoennagel, E. 1931. Chromosomenzahl und Phylogenie der Saxifragaceen. *Bot. Jahrb.* 64: 266-308.
- Skovsted, A. 1934. Cytological studies in the tribe Saxifrageae. *Dansk Bot. Ark.* 8: 1-52.
- Soltis, D.E. and B.A. Bohm. 1984. Karyology and flavonoid chemistry of the disjunct species of *Tiarella* (Saxifragaceae). *Syst. Bot.* 9: 441-447.

(접수일 2007. 5. 25 ; 수락일 2007. 8. 22)