

## 개시호 (*Bupleurum longeradiatum*)의 핵형분석과 rDNAs의 Physical Mapping

구달회\* · 성낙술\*\* · 성정숙\*\* · 방경환\*\* · 방재욱\*†

\*충남대학교 생물학과, \*\*작물시험장 특용작물과

### Karyotype Analysis and Physical Mapping of rDNAs in *Bupleurum longeradiatum*

Dal Hoe Koo\*, Nak Sul Seong\*\*, Jong Suk Seong\*\*, Kyong Hwan Bang\*\*, and Jae Wook Bang\*†

\*Department of Biology, Chungnam Natl. Univ., Daejeon 305-764, Korea.

\*\*National Crop Experimental Station, RDA, Suwon 441-100, Korea.

**ABSTRACT** : Karyotype analysis and chromosomal localization of 5S and 45S rDNAs using multi-color fluorescence *in situ* hybridization (McFISH) technique were carried out in *Bupleurum longeradiatum*. Somatic metaphase chromosome number was  $2n=12$ . Karyotype was composed of three pairs of metacentrics (No. 3, 4 and 6) and three pairs of submetacentrics (No. 1, 2 and 5). The length of somatic prometaphase chromosomes ranges from 2.55 to 5.05  $\mu\text{m}$  with total length of 18.15  $\mu\text{m}$ . In FISH experiment, one pair of 5S rDNA signals was detected on the pericentromeric region of chromosome 4 and one pair of 45S rDNA signals was detected on the telomeric region of chromosome 2.

**Key words** : *Bupleurum longeradiatum*, karyotype, multi-color fluorescence *in situ* hybridization, rDNA

## 서 언

산형과 (Umbelliferae)에 속하는 시호속 (*Bupleurum*) 식물은 유럽, 중앙 아시아에 일부 분포하며, 한국을 비롯하여 중국, 일본 등에 널리 자생하는 다년생 식물로 (Lee, 1985), 뿌리에 0.5% 시호사포닌 (saikosaponin)을 함유하는 주요 약용식물 중의 하나이다 (Tomita & Umori, 1976). 시호의 염색체에 관한 연구는 Darlington & Wylie (1955)에 의해 처음 시작되었으며, Bell & Constanc (1957)는 시호 속 식물의 기본 염색체 수를  $X=7, 8$ 로 보고하였다. Koha *et al.* (1990)은 일본에 분포하는 시호가 지역에 따른 염색체의 수적 변이를 보임을 보고하였고, 한국에 분포하는 시호 속의 세포유전학적 연구에서도 체세포 염색체 수가 종에 따라 다양하게 나타남이

보고되었다 (Lee, 1967; Lee, 1969; Chung *et al.*, 1995). Chung *et al.* (1995)은 한국 재배종 시호 (*B. falcatum* L.)에 대한 핵형 분석을 수행하여 세포유전학적 기반을 마련한 바 있다.

개시호 (*B. longeradiatum*)의 염색체 수는  $2n=16$ 으로 보고 (Bell & Constanc, 1957) 되었으며, Kim & You (1990)는 *B. longeradiatum* 염색체 수를  $2n=12$ 로 시호 속 식물 중 가장 적은 염색체 수를 지닌 것으로 보고하였다. 그러나 염색체 수만으로는 *B. longeradiatum*의 유전체 (genome)에 대한 이해가 충분하지 못하며, 근연 종들과의 세포유전학적 비교가 어렵다.

식물의 유전체에 대한 이해는 분자생물학적 기법의 발전과 더불어 크게 발전하였다. 작물이나 식물을 대상으로 RFLP (Tanksley *et al.*, 1989), RAPD (Williams *et al.*,

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

Received October 28, 2003 / Accepted November 14, 2003

1990) 및 AFLP (Vos *et al.*, 1995) 기법 등을 이용한 분자유전학적 지도의 작성은 작물의 종내 또는 종간의 유연관계 구명에 크게 이바지하였다 (Ahn & Tanksley, 1993). 그러나 작물의 유전체에 대한 연구는 아직 초기 단계에 있는데, 이는 대부분의 식물, 특히 작물의 경우 핵 내의 유전체가 매우 크다는데 기인한다.

DNA 집적체인 염색체를 대상으로 하는 세포유전학적 연구는 식물의 거대한 유전체의 구조 분석에 반드시 요구되고 있다. 염색체의 형태는 식물의 외부 형태 비교와 같은 분류학적 특징으로 이용될 수 있으며 (Thomas *et al.*, 1996), 식물의 진화학적 연구에도 매우 중요하다 (Ramachandran & Shasadri, 1986).

특정 DNA 단편을 세포학적으로 준비된 염색체에 hybridization시킨 후 형광현미경하에서 교잡된 부위를 확인하는 FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 기법의 도입으로 거대 식물 유전체의 미세 구조와 기능의 확인이 용이해졌다 (Jiang *et al.*, 1994). 최근 FISH 기법은 유전자의 염색체 상의 위치탐색 (Laptian *et al.*, 1997) 및 염색체 상에서 DNA 염기 서열의 상대적 순서 결정 (Jackson *et al.*, 1998) 등의 연구에 이용되고 있으며, 5S와 45S rDNA를 이용한 FISH 분석은 염색체의 구조분석 및 핵형 분석 (Brown & Carlton, 1997; Nakamura *et al.*, 2001; Koo *et al.*, 2002, 2003)에 매우 유용하게 이용되고 있다.

본 연구는 약용작물의 유전자원으로 중요한 개시호를 대상으로 염색체 관찰을 통해 핵형을 확립하고, 5S와 45S rDNA의 염색체 상에서의 위치를 확인하고자 수행되었으며, 또한 이 종에 대한 세포유전학적 특성을 밝혀 품종육성의 기초 자료를 마련하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 식물 재료

본 연구에서 사용된 *B. longeradiatum*는 작물시험장 특용작물과에서 분양 받았으며, 충남대학교 온실에서 재배하면서 근단을 채취하여 재료로 이용하였다.

### 염색체 관찰 및 핵형 분석

핵형 분석을 위한 중기 염색체 상을 많이 얻기 위해 채취된 근단을 1 ml의 증류수 (5°C)에서 20~22시간 동안 전처리 한 후, ethanol : glacial acetic acid (3:1, v/v) 용액에 고정하여 4°C에 보관하면서 재료로 이용하였다. 염색체 관찰을 위해 고정된 근단을 1N HCl (60°C)에서 2~3분 연화 처리 후, 증류수로 수세하고, Feulgen 염색액에 담가 30분간 염색하였다. 염색된 근단은 1% aceto carmine 용액을 사용하여 압착법으로 프레파라트를 만들

었다. 프레파라트를 광학현미경으로 관찰하고, 양호한 분열상의 사진을 촬영하여 핵형 분석에 이용하였다. 핵형 분석은 Levan *et al.* (1964)의 방법에 따랐다.

### FISH용 슬라이드 제작

고정된 근단에서 acetic acid를 제거하기 위해 수세용 완충액 (10 mM sodium citrate, pH 4.5)에 담가 10분간 수세 후, 효소 혼합용액 (2% cellulase, 1.5% macerozyme, 1% pectolyase, 0.5 mM EDTA, pH 4.2)에 담가 37°C에서 30분간 해리 후, ethanol : glacial acetic acid (3:1 v/v) 용액을 이용하여 슬라이드 글라스 위에 염색체를 전개 후 건조시켰다. 위상차 현미경 (ZEISS Axiolab) 하에서 건조된 프레파라트를 관찰하고 분열상이 양호한 슬라이드를 선별하여 FISH 실험에 이용하였다.

### Multi-color Fluorescence *in situ* hybridization (McFISH)

FISH를 위한 탐침 (probe)으로는 digoxigenin-11dUTP로 표지된 오이 (*Cucumis sativus* L.)의 5S rDNA와 biotin-16dUTP (Boehringer Mannheim)로 표지된 45S rDNA가 이용되었다 (Koo *et al.*, 2003). McFISH는 Koo *et al.* (2002)의 방법을 변용하였다. 건조된 염색체 슬라이드에 600  $\mu$ l의 RNase용액 (1 mg/ml RNase A, 2 X SSC)을 60분 (37°C) 동안 처리 후, 슬라이드 상의 염색체 변성을 위하여 70% formamide/2 X SSC 용액에 2분간 처리한 다음, -20°C의 70% 에탄올에서 급냉 및 세척 후, 90%와 100% 에탄올로 각각 3분씩 세척하여 상온에서 건조시켰다. 탐침 혼합액 (biotin/digoxigenin으로 표지된 각각의 100 ng의 probe DNA, 50% formamide, 2 X SSC, 10% dextran sulfate, 10 ng ssDNA)은 97°C에서 10분간 변성시킨 후, 5분 동안 급냉시켜 준비하였다.

건조된 슬라이드 상에 25  $\mu$ l의 탐침 혼합액을 가한 후, 플라스틱 커버를 덮고 37°C에서 12시간 이상 hybridization 시켰다. Hybridization시킨 슬라이드는 40°C의 2 X SSC, 50% formamide/2 X SSC, 2 X SSC, 4 X SSC 용액에서 각각 10분씩 세척하였다. 탐침의 비 특이적인 결합을 막기 위해 염색체 슬라이드를 blocking 용액 (5% BSA/4 X SSC/0.2% tween-20)으로 37°C에서 5분간 처리한 후, 1%의 avidin-FITC (fluorescein isothiocyanate)와 anti-digoxigenin rhodamine (Sigma)이 포함된 100  $\mu$ l의 5% BSA/4 X SSC/0.2% tween-20 혼합액을 슬라이드에 떨어뜨린 다음 커버를 덮고, 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 biotin과 digoxigenin으로 표지된 DNA 탐침이 동시에 검출되도록 하였다. 슬라이드를 4 X SSC/0.2% tween-20 완충액으로 37°C에서 5분씩 3번 세척한 후 1  $\mu$ g/ml DAPI (Sigma)용액을 포함한 Vectashield (Vector

Lab.) 15  $\mu\text{l}$ 를 도포하여 커버를 덮은 다음, cooled CCD camera (CoolSNAP, Photometrics)가 장착된 형광현미경 하에서 FITC-DAPI-Rhodamine filter (Nikon, Japan)를 사용하여 촬영하였다. 확인된 signal들은 소프트웨어 Meta imaging series™ 4.6 (Universal Imaging Corporation)을 이용하여 합성하였다.

### 결과 및 고찰

#### 핵형 분석

개시호 (*B. longeradiatum*) 체세포 중기 염색체는  $2n=12$ 로 관찰되었고 (Kim & You, 1990), 염색체 길이는 1.5~2.50  $\mu\text{m}$ 로 크기와 모양만으로는 6쌍의 상동염색체의 구분이 쉽지 않았다 (Fig. 1a). 시호속 (*Bulpleurum*) 식물들의 염색체 기본 수는  $x=7, 8$ 로 알려져 있으며 (Darlington & Wylie, 1955; Bell & Constanc, 1957), 전체 염색체 중 길이가 상대적으로 긴 4개의 큰 염색체는 안정되어 있고, 나머지 짧은 염색체는 15-29개로 나타나는 것으로 보고되어 있다 (Koha, 1990). 그러나 본 연구에서는 4개의 긴 염색체는 관찰되지 않은 반면, 6쌍의 염색체가 크기와 모양이 비슷한 것으로 관찰되었다.

핵형 분석을 위하여 응축 정도가 덜한 체세포 전중기 (prometaphase) 염색체를 이용한 결과 중기 세포에서보다 염색체의 길이가 더 길고, 상동 염색체간의 염색 패턴이 특징을 보여 염색체 쌍을 명확하게 구분할 수 있었다 (Fig. 1b, Fig. 3a). 전중기 염색체의 핵형 분석에서 염색체의 길이는 2.55~5.05  $\mu\text{m}$ 로 나타났으며, 총 길이는 18.15  $\mu\text{m}$ 로, 중기 염색체에 비해 약 1.5배 정도로 관찰되었다. 핵형은 3쌍의 중부 염색체와 3쌍의 차중부 염색체로 구분되었으며, 상동염색체 쌍 구분의 척도가 되는 centromeric index는 중부 염색체인 3번, 4번 및 6번에서 41.2~49.5%, 차중부 염색체인 1번, 2번 및 5번에서는

20.0~36.8%로 나타났다 (Table 1). 부수체를 지닌 염색체는 상염색법으로 구분하기 어려웠다. 개시호에서와 같이 체세포 중기 염색체의 크기가 작고, 그 형태가 비슷할 경우 핵형 분석이 용이하지 않은데, 그 이유는 크기가 작고, 응축된 중기 염색체에서는 동원체의 위치가 명확하지 않아 동원체를 중심으로 한 장완과 단완의 길이를 정확하게 측정할 수 없기 때문이다. 이러한 단점을 해결하기 위해 감수분열 비후기 (pachytene) 염색체를 이용한 핵형 분석이 베히 (Cheng *et al.*, 2001), 애기장대 (Fransz *et al.*, 1998) 등에서 보고되었다. 이는 감수분열 비후기의 염색체 길이가 체세포 중기 염색체 보다 10~25배 길고, 진정 염색질 (euchromatin)과 이형염색질 (heterochromatin)이 뚜렷이 구분되어 각각의 염색체 동정이 용이하기 때문이다. 그러나 감수분열 비후기 염색체는 실험 재료로 연중 이용할 수 없고, 프레파라트 제작 과정이 복잡하며, 한 세포 안에서 모든 염색체를 관찰할 수 없다는 단점이 있다 (Dong *et al.*, 2001). 그에 비하여 체세포 전중기 염색체는 고도로 응축된 중기 염색체에 비해 그 길이가 길고, 응축된 패턴이 분명하게 구분된다. 이러한 장점을 이용하여 Fukui *et al.* (1998)은 Giemsa 분염법을 이용하여 배추

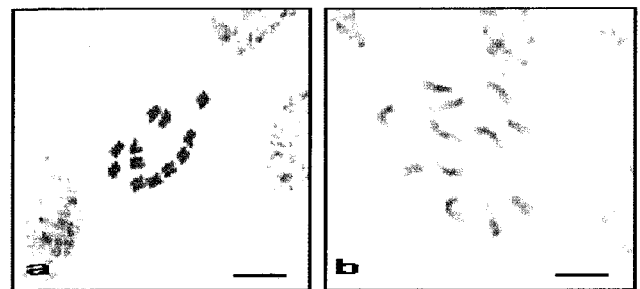


Fig. 1. Feulgen stained mitotic metaphase (a) and prometaphase (b) chromosome spreads of *B. longeradiatum* ( $2n=12$ ). Bars, 5  $\mu\text{m}$ .

Table 1. Average lengths and centromeric index of individual chromosomes and positions of 5S rDNA and 45S rDNA on chromosomes. Chromosomes were arranged in order of decreasing length.

| Parameter                     | Chromosome no. |      |      |      |      |      | Total |
|-------------------------------|----------------|------|------|------|------|------|-------|
|                               | 1              | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |       |
| Average length <sup>†</sup>   | 5.05           | 4.07 | 3.45 | 3.03 | 3.00 | 2.55 | 18.15 |
| Centromere index <sup>†</sup> | 20.7           | 36.8 | 47.8 | 49.5 | 20.0 | 41.2 |       |
| FISH signals <sup>‡</sup>     |                |      |      |      |      |      |       |
| 5S rDNA                       | -              | -    | -    | L    | -    | -    |       |
| 45S rDNA                      | -              | S    | -    | -    | -    | -    |       |

<sup>†</sup> Chromosome length in  $\mu\text{m}$

<sup>†</sup> Centromeric index is percentage of short arm/total length in chromosomes (Levan *et al.*, 1964)

<sup>‡</sup> Positions of the rDNAs on short arm (S) or long arm (L).

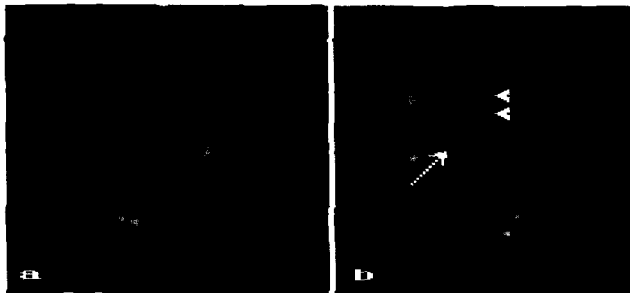
(*Brassica campestris*)에서 10쌍의 염색체를 명확히 구분하여 보고한 바 있다. 본 연구에서도 체세포 전중기 염색체가 중기 염색체에 비해 핵형 분석에 더 효과적인 것으로 나타났다.

**Multicolor Fluorescence *in situ* hybridization**

개시호의 5S와 45S rDNA의 염색체 상에서의 위치를 확인하기 위해 McFISH를 수행한 결과 5S rDNA의 signal은 4번 염색체 장완의 동원체 주변에서 관찰되었고, 45S rDNA의 signal은 2번 염색체의 단완 말단 부위에서 확인되었다 (Fig. 2a).

염기서열 중 A-T가 집중적으로 분포하는 부위에 더 강하게 염색되는 DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) 염색 (Plader *et al.*, 1998)을 통하여 개시호의 염색체를 관찰한 결과 전중기 염색체에서는 뚜렷한 패턴이 관찰되었다 (arrow in Fig. 2b). 이러한 과잉 이형염색질 (supernumerary heterochromatin) 절편은 개시호에서 염색체 마커로 종간의 유연 관계 비교에 유용할 것으로 여겨지는데, 이러한 현상은 Shibata *et al.* (2000)에 의해 보고된 바 있다. 그들은 일본에 자생하는 수영 (*Rumex acetosa* L.)을 대상으로 지역에 따른 핵형의 다형성 조사에서 다형성의 원인이 본 연구에서 관찰된 바와 같은 이형염색질 절편 때문인 것으로 보고하면서 그 부위에 대한 염기서열을 밝혀 수영의 분자적 진화 관계를 설명하였다.

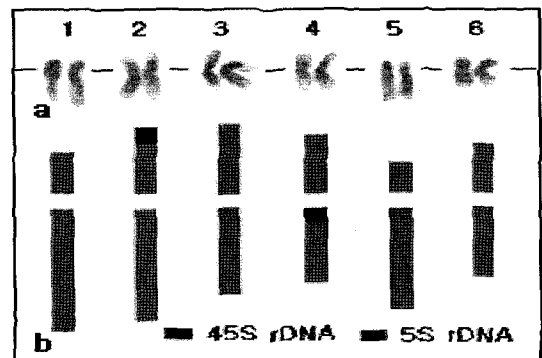
45S rRNA 유전자는 리보솜 구성 성분으로 그 위치가 인형성 부위 (NORs)를 포함하고 있는 부수체 염색체에서



**Fig. 2.** Multicolor FISH patterns of the mitotic metaphase (a) and prometaphase (b) chromosomes of *B. longerradiatum* using 5S and 45S rDNA probes. Digoxigenin-labeled 5S rDNA probe was detected with antidigoxigenin rhodamine conjugate (red). Biotin-labeled 45S rDNA probe was detected with avidin-FITC conjugate (green). Arrow indicates the supernumerary heterochromatic segment and arrowheads indicate the nucleolar organizing regions (NORs).

관찰되며, 염색체 상에 반복적으로 위치하여 1쌍 이상 존재한다 (Leitch & Heslop-Harrison, 1992). 본 연구에서 상염색법으로는 부수체 염색체를 구별하기 어려웠지만, 45S rDNA를 이용한 FISH 결과 1쌍의 부수체 염색체를 확인할 수 있었으며, 이러한 양상은 전중기 염색체에서 더 분명하게 확인되었다 (arrow heads in Fig. 2b).

rDNA 복제 수에 의한 signal 수의 변이는 종간 유연 관계와 진화 연구에 유용한 자료로 이용될 수 있다. 서로 다른 유전체 조성을 지니는 벼를 대상으로 45S rDNA 유전자좌의 수적 변이의 확인 결과 일본과 중국산 *japonica* 변종에서는 1개의 좌위 (locus)가 관찰된 반면, *indica*와 *javanica* 변종에서는 2개의 좌위에서 관찰되어 차이를 보이는 것으로 보고된 바 있다 (Fukui *et al.*, 1994). 개시호의 경우 45S rDNA는 2번 염색체 쌍 단완 (short arm) 말단에서 1쌍이 관찰되었는데, 이는 다른 시호속 식물이나 계통이 다른 식물을 대상으로 한 FISH 연구에 적용될 수 있을 것이다. 5S rRNA 유전자도 리보솜 구성 성분중의 하나로 이를 해독하는 유전자는 거의 모든 진핵생물에서 multigene family로 염색체 상에 위치한다 (Murata *et al.*, 1997). 본 연구에서 5S rDNA는 4번 염색체의 장완의 동원체 주변에서 1쌍이 관찰되었는데, 이러한 결과는 *Angelica*속 식물 2종 (Koo *et al.*, 2003)과 *Capsicum*속 식물 (Park *et al.*, 2000) 5종에서 각각 1쌍씩 관찰되었다는 보고와는 일치하나, 애기장대에서 생태형에 따라 2~3쌍이 분포한다는 결과와는 차이를 보였다 (Fransz *et al.*, 1998). 본 연구에서 FISH를 통해 확인된 5S와 45S rDNA signal의 위치를 기본으로 하여 작성한 개시호 핵형의 ideogram은 Fig. 3b에서와 같다. 본 연구에서 확립한 핵형과 rDNAs의 세포학적 지도 작성은 시호속 식물의 유전체 구조의 연구와 유전자의 물리적 위치 탐색을 통한 유사 종들의 유연 관계 분석에 기본 자료로 이용될 수 있을 것이다.



**Fig. 3.** Feulgen stained karyotype (a) and Ideogram of karyotype (b) showing the physical localization of the 5S and 45S rDNAs.

## 적 요

개시호 (*Bupleurum longeradiatum*)를 대상으로 상염색체 법과 FISH 기법을 통한 염색체 분석을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 개시호의 체세포 염색체 수는  $2n=12$ 이었으며, centromeric index를 전중기 염색체를 이용한 핵형 분석에서 염색체 조성은 3쌍의 중부 염색체 (3번, 4번 및 6번)와 3쌍의 차중부 염색체 (1번, 2번 및 5번)로 구분되었다. 염색체의 길이는 2.55~5.05  $\mu\text{m}$ 로, 전체 길이는 18.15  $\mu\text{m}$ 로 나타났다. 5S와 45S rDNA를 탐침으로 FISH를 수행한 결과 4번 염색체의 동원체 부위에서 한 쌍의 5S rDNA signal이 확인되었고, 2번 염색체의 부수체에서 한 쌍의 45S rDNA signal이 관찰되었다.

## 사 사

본 연구는 BioGreen 21 연구개발사업비 지원 (PI: 방재욱)에 의해 수행되었습니다.

## LITERATURE CITED

- Ahn S, Tanksley SD (1993) Comparative linkage maps of rice and maize genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. 90:7980-7984.
- Bell CR, Constanc L (1957) Chromosome numbers in *Umbelliferae*. Amer. J. Bot. 44:565-572.
- Brown GR, Carlson JE (1997) Molecular cytogenetics of the genes encoding 18S-5.8S-25S rRNA and 5S rRNA in two species of spruce (*Picea*). Theor. Appl. Genet. 97:1-9.
- Cheng Z, Robin-Buell C, Wing RA, Gu M, Jiang J (2001) Toward a cytological characterization of the rice genome. Genome Res. 11:2133-2141.
- Chung SH, Bang JW, Choi HW (1995) Cytogenetic analysis of *Bupleurum falcatum* L. cultivated in Korea. Korean J. Med. Crop Sci. 3:61-65.
- Darlington CD, Wylie AP (1955) Chromosome Atlas of Flowering Plants. 2nd ed. 205. George Allen and Unwin LTD., London.
- Dong F, Song J, Naess SK, Helgeson JP, Gebhardt C, Jiang J (2000) Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. Theor. Appl. Genet. 101:1001-1007.
- Fransz P, Armstrong S, Alonso-Blanco C, Fischer TC (1998) Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 13:867-876.
- Fukui K, Nakayama S, Ohmido N, Yoshiaki H, Yamabe M (1998) Quantitative karyotyping of three diploid *Brassica* species by imaging methods and localization of 45S rDNA loci on the identified chromosomes. Theor. Appl. Genet. 96:325-330.
- Fukui K, Ohmido N, Khush GS (1994) Variability in rDNA loci in the genus *Oryza* detected through fluorescence *in situ* hybridization. Theor. Appl. Genet. 87:893-899.
- Jackson SA, Wang GL, Jiang J (1998) Application of Fiber-FISH in genome analysis of *Arabidopsis thaliana*. Genome 41:566-572.
- Jiang J, Gill BS (1994) Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first ten years. Genome 37:717-725.
- Kim YS, You CY (1990) A taxonomic study on the genus *Bupleurum* in Korea. Korean J. Plant Tax. 20:209-242.
- Kohda H, Namera A, Hamamoto (1990) Propagation of *Bupleurum falcatum* by shoot tip culture. Shoyakugaku Zasshi 44:38-41.
- Koo DH, Hur Y, Jin DC, Bang JW (2002) Karyotype analysis of a Korean cucumber cultivar (*Cucumis sativus* L. cv. Winter Long) using C-banding and bicolor fluorescence *in situ* hybridization. Mol. Cells 13:413-418.
- Koo DH, Seong NS, Bang JW (2003) Cytogenetic analyses of *Angelica* plants using Feulgen staining and multicolor FISH. Korean J. Plant Biotech. 30:123-127.
- Laptian NLB, Brown SE, Knudson DI (1997) FISH physical mapping with barley BAC clones. Plant J. 11:149-156.
- Lee CB (1985) Illustrated Flora of Korea. Hyangmoonsa Co Ltd, p. 587 (in Korea).
- Lee YN (1967) Chromosome number of flowering plants in Korea. J. Korean Res. Inst. 2:141-145.
- Lee YN (1969) Chromosome number of flowering plants in Korea. J. Korean Cult. Res. Inst. 12:455-478.
- Leitch IJ, Heslop-Harrison JS (1992) Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rDNA genes in barley by *in situ* hybridization. Genome 35:1013-1018.
- Levan A, Frekga K, Sandberg A (1964) Nomenclature for centromeric position in chromosomes. Hereditas 52:201-220.
- Murata M, Heslop-Harrison JS, Motoyoshi F (1997) Physical mapping of the 5S rDNA in *A. thaliana* by FISH with cosmid clones. Plant J. 12:31-37.
- Nakamura R, Kitamura S, Ohmido N, Fukui K (2001) Karyotype analysis of *Nicotiana Kawakamii* Y. Ohashi using DAPI banding and rDNA FISH. Theor. Appl. Genet. 102:810-814.
- Park YK, Park CH, Kim NS (2000) Chromosomal localization and sequence variation of 5S rRNA gene in five *Capsicum* species. Mol. Cells 10:18-24.
- Plader W, Hoshi Y, and Malepszy S (1998) Sequential fluorescent staining with CMA and DAPI for somatic chromosome identification in cucumber (*Cucumis sativus* L.). J. Appl. Genet. 39:249-258.
- Ramachandran C, Seshadri VS (1986) Cytological analysis of the genome of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and muskmelon (*Cucumis melo* L.). Z. Pflanzenzuchtg 96:25-38.
- Shibata F, Hizume M, Kuroki Y (2000) Molecular cytogenetic analysis of supernumerary heterochromatic segments in *Rumex acetosa*. Genome 43:391-397.
- Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW (1989) RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old

개시호 (*Bupleurum longerradiatum*)의 핵형분석과 rDNAs의 Physical Mapping

- science, BioTechnology 7:257-264.
- Tomas HM, Haper, JA, Meredith MR, King IP** (1996)  
Comparson of ribosomal DNA sites in *Lolium* species by FISH. Chromosome Res. 4:486-490.
- Tomita Y, Umori A** (1976) Production of *Bupleuri radix*. Japan Patent 76:16440.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Zabeau M** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414.
- Williams JGK, Kubeik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.