

Multicolor FISH와 Feulgen 염색법을 이용한 *Angelica*속 식물의 세포유전학적 분석

구달희, 김수영, 방경환¹, 성낙술¹, 방재욱*
충남대학교 생물학과, ¹작물시험장 특용작물과

Cytogenetic Analyses of *Angelica* Plants Using Feulgen Staining and Multicolor Fluorescence *in Situ* Hybridization

Da-Hoe Koo, Soo-Young Kim, Kyong-Hwan Bang¹, Nak-Sul Seong¹, Jae-Wook Bang*

Department of Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

¹Industrial Crop Division, National Crop Experimental Station, RDA, Suwon, 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 two *Angelica* species. The numbers of diploid chromosomes were the same in two species as $2n=22$, however the lengths of chromosomes were varied from 4.25 to 6.50 μm in *A. gigas* and 4.95 to 8.50 μm in *A. acutiloba*. The chromosomes of *A. gigas* were composed of five metacentric and six submetacentric pairs, while those of *A. acutiloba* were six metacentric, one submetacentric and four subtelocentric pairs. In FISH experiments, the numbers and size of 45S rDNA signals were varied between two species, however each signal of the 5S rDNA was observed in two species.

Key words: *Angelica* species, karyotype, multi-color fluorescence *in situ* hybridization

서 론

식물의 세포유전학적 연구 결과는 분류와 진화학적 연구에 매우 중요한 정보를 제공해 주며, 핵형 분석은 종간의 유연 관계를 정의하는데 중요한 도구로 이용되어 왔다 (Ramachandran and Seshadri 1986). 염색체의 구조 및 행동연구와 함께 유전체 연구에 기반이 되는 핵형 분석은 체세포 증식 염색체의 특징에 따라 이루어지며, 동원체의 위치는 염색체의 형태적 구별에 이용되는데, Levan 등 (1964)은 동원체를 중심으로 장완 (long arm, L)과 단완 (short arm, S)의 상대적인 길이의 비 (arm-ratio, L/S)에 따라 염색체를 중부 (M; metacentric), 차중부 (SM; submetacentric), 차단부 (ST; subtelocentric) 및 단

부 (T; telocentric) 염색체로 구분하였다. 염색체의 식별은 전체 길이나 arm-ratio 외에 부수체의 위치에 따라 구별되기도 하며, 1970년대 초에 개발된 C-분염법은 이형염색질의 특이적 염색으로 상동염색체를 쉽게 구분 할 수 있는 장점이 있어, 여러 식물의 핵형 분석에 사용되어져 왔다. (Gill and Kimber 1974; Vosa 1976). 최근 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 기법의 사용으로 DNA 염기서열을 근거로 하는 분자세포유전학적 연구가 활발히 진행되고 있다 (Jiang and Gill 1994; Fransz et al. 2000). 특히 5S와 45S rDNA는 어느 식물에서나 공통으로 존재하고, 복제수가 많아 염색체의 구조분석 및 핵형분석 (Brown and Carlon 1997; Nakamura et al. 2001; Koo et al. 2002), 식물 진화 과정에서의 계통구조 비교연구 (Fukui et al. 1994; Fukui et al. 1998; Sang and Ling 2000; Brutovaska et al. 2000; Hasterok et al. 2001)을 위한 probe로 널리 사용되고 있다.

*Corresponding author Tel 042-821-5497 Fax 042-822-9690
E-mail bangjw@cnu.ac.kr

산형과에 속하는 당귀속 (*Angelica*) 식물은 다년생 초본식물로 뿌리를 약용으로 사용하는 한방의 중요 생약재로 널리 재배되고 있다 (Lee 1985). 당귀는 참당귀 (*Angelica gigas* NAKAI), 중국당귀 (*Angelica sinensis* DILES), 일당귀 (*Angelica acutiloba* KITAGAWA)로 분류되는데, 같은 속 식물이지만 뿌리에 함유되어 있는 주요성분이 달라서 한국, 중국 및 일본에서 각각 다르게 이용되고 있다. 그러나 *A. sinensis*와 *A. acutiloba*의 약효 성분과 DNA 수준에서의 유전적 거리 (Watanabe et al. 1998)는 매우 유사하다는 보고도 있다. 우리나라에서 주로 재배되고 있는 종은 *A. gigas*와 *A. acutiloba*로 *A. gigas*는 국내 한방에서 주로 소비되고 *A. acutiloba*는 수출량이 많아 수출을 목적으로 재배되고 있다. *Angelica*속 식물종에 대한 염색체 연구는 Ogawa (1929)에 의하여 처음 시작되었으며, 그는 *A. pubescens*의 염색체 수를 $2n=22$ 로 보고하였다. 그 후 *A. glabra*, *A. pachycarpa*, *A. ursine* 및 *A. sylvestris* 염색체수가 모두 $2n=22$ 로 관찰되었다. 특히 *A. sylvestris*는 $2n=6x=66$ 로 관찰되어 자연계에서 6배체 식물도 존재함이 확인되었지만 (Ogawa 1929), 약용식물로 중요한 *A. gigas*와 *A. acutiloba*에 대한 염색체 연구는 지금까지 보고된바 없다.

본 연구는 약용식물로 많이 재배되고 있는 *A. gigas*와 *A. acutiloba*를 대상으로 Feulgen 염색법을 통한 염색체 관찰을 통해 핵형을 확립하고, McFISH 기술을 이용하여 5S와 45S rDNA의 염색체 상에서의 위치를 확인하고자 수행되었다.

재료 및 방법

식물 재료

본 연구에서 사용된 *A. gigas*와 *A. acutiloba*는 작물시험장 특용작물과에서 분양받았으며, 충남대학교 온실에서 재배하면서 근단을 채취하여 재료로 이용하였다.

염색체 관찰 및 핵형분석

채취된 근단은 중기 염색체상을 많이 얻기 위해 1 mL의 증류수로 0°C에서 20~22 시간 동안 전처리한 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 만들었다. 프레파라트를 광학현미경으로 관찰하고, 양호한 분열상의 사진을 촬영하여 핵형 분석에 이용하였다. 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 이용하여, 1.00~1.70을 중부 염색체 (M;

metacentric), 1.71~3.00을 차중부 염색체 (SM; submetacentric), 3.01~7.00을 차단부 염색체 (ST; subtelocentric), 그리고 7.01 이상을 단부 염색체 (T; telocentric)로 구분하였다.

FISH용 슬라이드 제작

고정된 근단에서 acetic acid를 제거하기 위해 washing buffer (10 mM sodium citrate, pH 4.5)로 10분간 수세 후, 효소 혼합 용액 (2% cellulase, 1.5% macerozyme, 1% pectolyase, 0.5 mM EDTA, pH 4.2)에 넣고, 37°C에서 30분 처리 후, ethanol : glacial acetic acid (3:1 v/v) 용액을 이용하여 슬라이드 글라스 위에 염색체를 전개 후 건조시켰다. 위상차 현미경 (ZEISS Axiorab)하에서 건조된 프레파라트를 관찰하고 분열상이 양호한 슬라이드를 선별하여 FISH에 이용하였다.

Multi-color Fluorescence *in situ* hybridization

FISH를 위한 탐침 (probe)으로는 digoxigenin-11dUTP로 표지된 오이 (*Cucumis sativus* L.)의 5S rDNA와 biotin-16dUTP (Boehringer Mannheim)로 표지된 45S rDNA를 이용하였으며 (Koo et al. 2003), McFISH는 Koo 등 (2002)의 방법을 변용하였다. 건조된 염색체 슬라이드에 600 μ L의 RNase용액 (1 mg/mL RNase A, 2 \times SSC)을 60분 (37°C) 동안 처리 후, 슬라이드 상의 염색체 변성을 위하여 70% formamide/2 \times SSC 용액에 2분간 처리한 다음, -20°C의 70% 에탄올에서 급냉 및 세척 후, 90%와 100% 에탄올을 각각 3분씩 세척하여 상온에서 건조시켰다. 탐침 혼합액 (biotin/digoxigenin으로 표지된 각각의 100 ng의 probe DNA, 50% formamide, 2 \times SSC, 10% dextran sulfate, 10 ng ssDNA)은 97°C에서 10분간 변성시킨 후, 5분 동안 급냉시켜 준비하였다. 건조된 슬라이드 상에 25 μ L의 탐침 혼합액을 가한 다음, 플라스틱 커버를 덮고 37°C에서 12시간 이상 hybridization시켰다. Hybridization시킨 슬라이드는 40°C의 2 \times SSC, 50% formamide/2 \times SSC, 2 \times SSC, 4 \times SSC 용액에서 각각 10분씩 세척하였다. 탐침의 비 특이적인 결합을 막기 위해 염색체 슬라이드를 blocking 용액 (5% BSA/4 \times 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 μ L의 5% BSA/4 \times 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 \times SSC/0.2% tween-20 완충액으로 37°C에서 5분씩 3번 세척한 후 1 μ g/mL DAPI (Sigma)용액을 포함한 Vectashield (Vector Lab.) 15 μ L를 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)를 이용하여 합성하였다.

결과 및 고찰

핵형 분석

*Angelica*속 식물들의 염색체 기본 수는 $x=11$ 로 알려져 있다 (Ogawa 1929). 본 연구에서 *A. gigas*와 *A. acutiloba*의 염색체 관찰 결과 모두 $2n=22$ 로 기본수가 $x=11$ 로 기존의 연구결과와 일치하였다 (Figure 1a, b). *A. gigas*의 염색체 길이는 $4.25\sim 6.50\ \mu\text{m}$ 로 총 길이는 $57.55\ \mu\text{m}$ 로 나타났고, 5쌍의 중부 염색체와 6쌍의 차중부 염색체로 구분되었다. 중부 염색체는 1, 2, 3, 4 및 9번 염색체로 arm-ratio가 $1.07\sim 1.36$ 이었으며, 6쌍의 차중부 염색체로 나타난 5, 6, 7, 8, 10 및 11번 염색체는 arm-ratio가 $1.77\sim 2.40$ 였다 (Table 1a). 부수체를 지닌 염색체는 Feulgen 염색 방법으로는 관찰하기가 어려웠다. *A.*

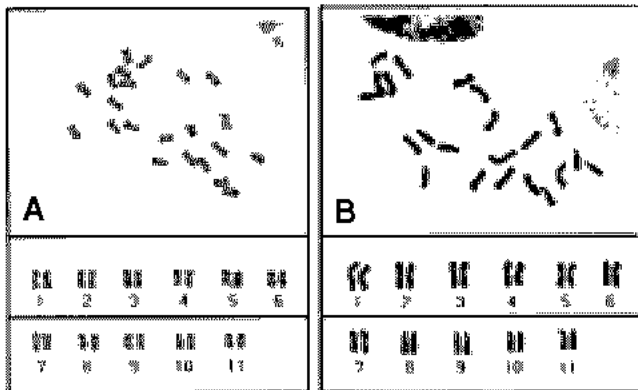


Figure 1. Somatic metaphase chromosome complements ($2n=22$) and the karyotype of *Angelica* species. A: *A. gigas*, B: *A. acutiloba*

Table 1. Analyses of somatic metaphase chromosomes of *Angelica* species. a: *A. gigas*, b: *A. acutiloba*

Chrom- osome No.	Chromosome size (μm)				Arm ratio		Centromeric index			
	Long arm		Short arm		L/S		a b			
	a	b	a	b	a	b	a	b		
1	3.75	4.50	2.75	4.00	6.50	8.50	1.36	1.13	M	M
2	3.55	4.20	2.70	3.25	6.25	7.45	1.31	1.29	M	M
3	3.00	4.20	2.80	3.00	5.80	7.20	1.07	1.40	M	M
4	3.25	3.75	2.50	3.25	5.75	7.00	1.30	1.15	M	M
5	3.75	4.45	1.75	2.40	5.50	6.85	2.14	1.78	SM	SM
6	3.15	3.50	1.75	3.25	4.90	6.75	1.80	1.08	SM	M
7	3.10	3.55	1.75	3.00	4.85	6.55	1.77	1.18	SM	M
8	3.15	4.95	1.50	1.55	4.65	6.50	2.10	3.19	SM	ST
9	2.45	5.00	2.15	1.40	4.60	6.40	1.13	3.57	M	ST
10	2.45	4.30	1.60	1.30	4.50	5.60	1.81	3.31	SM	ST
11	3.00	3.95	1.25	1.00	4.25	4.95	2.40	3.95	SM	ST

*acutiloba*의 염색체 길이는 가장 작은 염색체가 $4.95\ \mu\text{m}$ 로 나타났고, 가장 큰 염색체가 $8.50\ \mu\text{m}$ 로 전체 염색체의 길이는 $73.75\ \mu\text{m}$ 로 나타나 *A. gigas*와 차이를 보였다. 핵형은 6쌍의 중부 염색체와 한 쌍의 차중부염색체 및 4쌍의 차단부 염색체로 구분되었다. 중부 염색체는 1~7번 염색체로 arm-ratio가 $1.08\sim 1.36$ 였으며, 차단부 염색체는 8~11번 염색체로 arm-ratio는 $3.19\sim 3.95$ 였다. 5번 염색체는 arm-ratio가 1.78로 차중부 염색체로 확인되었다 (Table 1b). *Angelica*속 2종을 대상으로 핵형분석을 수행한 결과 각각의 염색체 수는 $2n=22$ 로 동일하게 관찰되었으나, 염색체의 크기 및 동원체의 위치에 따른 장완과 단완의 비 (arm-ratio)는 큰 차이를 보였다.

Multicolor Fluorescence in situ hybridization

*A. gigas*와 *A. acutiloba*에서 5S와 45S rDNA의 염색체 상에서의 위치를 확인하기 위해 McFISH를 수행한 결과 *A. gigas*에서 5S rDNA의 signal은 10번 염색체의 동원체 주변에서 관찰되었고, 45S rDNA의 signal은 3번 염색체의 단완 말단 부위에서 확인되었다 (Figure 2a). *A. acutiloba*의 FISH에서는 5S rDNA의 signal은 4번 염색체의 동원체 부위에서 관찰되었다. 45S rDNA는 8번 염색체 상에서 signal들이 서로 다른 크기로 관찰되었으며, 9번 염색체에서는 상동 염색체 중 하나의 염색체에서만 약하게 관찰되는 특징을 보였고, 간기 (interphase)에서는 4개의 signal이 관찰되는 변이를 볼 수 있었다 (Figure 2b). 체세포 분열 과정에서 중기 와 간기 세포의 FISH signal의 수는 일치하는 것이 일반적이거나, 본 연구에서는 모든 중기 염색체에서 45S rDNA signal이 3개로 관찰되었고, 대부분의 간기에서는 4개의 signal이 관찰된 결과로 미루어 볼 때 상동 염색체 간에 45S rDNA 복제수가 서로 다르거나 또는 중기 염색체의 응축 정도에서 차이가 있는 것으로 생각된다 (Arrow in Figure 2b). 45S rDNA 유전자는 리보솜 구성 성분으로 그 위치가 인형성 부위 (이차 협착 부위)를 포함하고 있는 부수체 염색체에서 관찰되며 (Leitch and Heslop-Harrison 1992), 염색체 상에 반복적으로 위치하여 1쌍 이상 존재한다 (Maluszynska and Heslop-Harrison 1991). 본 연구에서는 일반적인 상염색체으로는 부수체를 가지고 있는 염색체를 관찰할 수 없었지만, 45S rDNA로 FISH를 수행한 결과 *A. gigas*에서는 1쌍, 그리고 *A. acutiloba*에서는 1쌍 이상의 부수체를 가진 염색체가 존재한다는 사실을 확인하였다. 특히 *A. acutiloba*에서는 45S rDNA signal의 크기와 그 위치가 많은 변이를 보였는데, 이러한 결과는 각각의 상동염색체간의 45S rDNA 복제수가 서로 다르다는 것을 의미하지만, 실험 조건이나 염색체의 응축정도에 따라 변이를 보일 수 있다. 45S rDNA 위치가 중기 염색체 상에서 비상동성으로 관찰된 경우는 식물 계층에서 극히 드문 일이다 (Koo et al. unpublished results). 그러나 식물의 성염색체에 45S rDNA 위치가 독립적으로 나타나는 경우는 보고된 바 있다 (Nakayama et al. 2001). 결론적으로 두

중간의 45S rDNA 위치가 다양성을 보이는 반면 5S rDNA 1쌍의 signal로 보존적임을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 *Capsicum*속 5종의 식물에서 1쌍의 5S rDNA 위치가 보존적으로 나타난 결과와 유사하다 (Park et al. 2000). 그러나 *Arabidopsis thaliana*에서는 ecotype에 따라 2~3쌍의 5S rDNA 위치가 관찰되어 같은 종 내에서도 다양성을 보이는 경우도 있다 (Frensz et al. 1998). *A. gigas*와 *A. acutiloba*에서 FISH를 통해 확인된 5S와 45S rDNA signal의 위치를 기본 핵형에 근거하여 작성한 ideogram은 Figure 3a, b에서와 같다.

최근 당귀의 종 관별을 위한 DNA 수준에서의 연구가 활발히 진행되고있다 (Lee et al. 2000; Bang et al. 2002). Bang 등 (2002)은 RAPD 방법으로 OPC 02 primer로부터 *A. gigas* 특이적인 DNA 마커를 보고하였고, Lee 등 (2000) 또한 같은 방법으로 *A. acutiloba*에 특이적인 3개의 DNA 단편을 보고하였다. 이러한 RAPD 마커들은 FISH를 이용하여 종간의 유전체 분

석 (Benabdelmouna et al. 1999)과 핵형분석 (Koo et al. 2003)을 위한 염색체 마커로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서 수행된 핵형 분석 및 rDNAs의 physical mapping은 당귀의 게놈 구조의 이해에 필수적이며, 유전자의 물리적 위치를 탐색하는 기초연구로서 당귀의 세포유전학적 염색체 지도의 구축을 위한 중요한 자료로 이용될 수 있을 것이다.

사사 - 본 연구는 농진청 Biogreen 21 특용작물연구단 지원 연구비 (PI: 방재욱)에 의해 수행되었습니다.

적 요

Angelica 속 식물을 대상으로 Feulgen 염색법과 Multicolor FISH를 이용한 5S와 45S rDNA의 염색체상의 위치와 핵형분석을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. *A. gigas*와 *A. acutiloba*의 염색체 수는 $2n=22$ 로 관찰되었고, 염색체의 길이는 *A. gigas*가 4.25~6.50 μm , *A. acutiloba*에서는 3.95~8.50 μm 로 나타났다. 핵형은 *A. gigas*에서 6쌍의 submetacentrics와 5쌍의 metacentrics가 관찰되는 데 비하여 *A. acutiloba*는 6쌍의 metacentrics, 4쌍의 subtelocentrics 및 1쌍의 submetacentric 염색체가 관찰되어 차이를 보였다. McFISH 실험에서 45S rDNAs signal들의 수와 크기는 두 종 사이에서 다양하게 관찰되었으며, 5S rDNA signal은 두 종 사이에서 염색체는 서로 다르지만 공통적으로 한 쌍이 관찰되었다.

인용문헌

Bang KH, Yu HS, Koo DH, Cho JH (2002) Selection of RAPD marker to discriminate the bolting-resistant varieties and commercial dried medicinal materials of *Angelica* species. Korean J Medicinal Crop Sci 10: 46-50

Benabdelmouna A, Peltier D, Humbert C, Abirached-Damency M (1999) Southern and fluorescent *in situ* hybridization detect three RAPD-generated PCR products useful as introgression markers in *Petunia*. Theor Appl Genet 98: 10-17

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

Brutovska R, Cellarova E, Schubert I (2000) Cytogenetic characterization of three *Hypericum* species by *in situ* hybridization. Theor Appl Genet 101: 46-50

Fransz P, Armstrong S, Alonso-Blanco C, Fischer TC (1998) Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. Plant J 13: 867-876

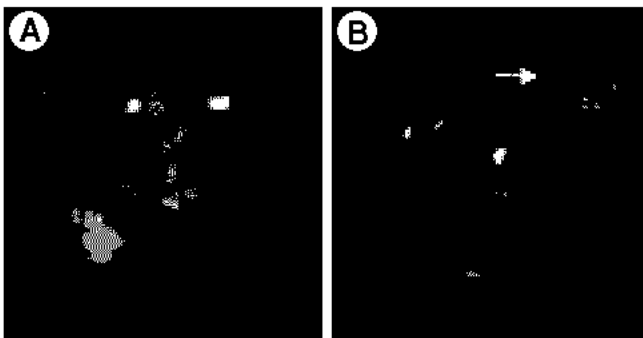


Figure 2. Multicolor FISH patterns of the metaphases chromosomes of *Angelica* species using both 5S and 45S rDNA probes. Digoxigenin-labeled 5S rDNA probe was detected with antidigoxigenin rhodamine conjugate (red). Biotin-labeled 45S rDNA probe was detected with avidin-FITC conjugate (green). Arrow indicates the interphase nucleus. A: *A. gigas*, B: *A. acutiloba*

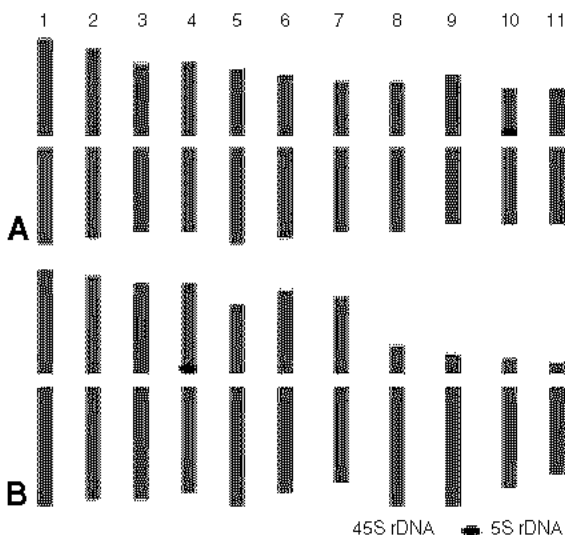


Figure 3. Ideogram of karyotype showing the physical location of the 5S and 45S rDNAs. A: *A. gigas*, B: *A. acutiloba*

- Fransz PF, Armstrong S, de Jong JH, Pamell LD (2000) Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. *Cell* 100: 367-376
- 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
- Gill BS, Kimber G (1974) A Giemsa C-banded karyotype of rye. *Proc Natl Acad Sci* 71: 1247-1249
- Hasterok R, Jenkins G, Langdon T, Jones RN, Maluszynska J (2001) Ribosomal DNA is an effective marker of *Brassica* chromosomes. *Theor Appl Genet* 103: 486-490
- Jiang J, Gill BS (1994) Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first ten years. *Genome* 37: 717-725
- 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, Hur Y, Bang JW (2003) FISH mapping of rDNAs and repeated DNA sequences on pachytene chromosomes of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant & Animal Genome XI* pp: 145
- Lee MY, Im SH, Ju YS, Han KS (2000) Discrimination of the three *Angelica* species using the RAPDs and internal root structure. *Korean J Medicinal Crop Sci* 8: 243-249
- Lee TB (1985) Illustrated Flora of Korea. Hyangmoonsa Co Ltd, p587 (in Korean)
- 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
- Maluszynska J, Heslop-Harrison JS (1991) Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1: 159-166
- 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
- Nakayama S, Fujishita M, Sone T, Ohyama K (2001) Additional locus of rDNA sequence specific to the x chromosome of the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Chromosome Research* 9: 469-473
- Ogawa (1929) Chromosome atlas of flowering plants. p210
- Park YK, Park CH and Kim NS (2000) Chromosomal localization and sequence variation of 5S rRNA gene in five *Capsicum* species. *Mol Cells* 10: 18-24
- 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
- Sang Y, Ling GH (2000) Comparative physical mapping of the 18S-5.8S-26S rDNA in three Sorghum species. *Genome* 43: 918-922
- Vosa CG (1976) Heterochromatic patterns in *Allium*. 1. The relationship between the species of the *Cepa* group and its allies. *Heredity* 36: 383-393
- Watanabe A, Araki S, Kobari S, Sudo H (1998) In vitro propagation, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA analyses of *Angelica* plants. *Plant Cell Reports* 18: 187-192

(접수일자 2003년 3월 13일, 수리일자 2003년 4월 19일)