

2배체 담배 *Nicotiana plumbaginifolia*의 핵형 분석과 rDNAs의 Physical Mapping

조혜경, 구달희, 김수영, 방재욱*
충남대학교 자연과학대학 생물학과

Karyotype Analysis and Physical Mapping of rDNAs in Diploid *Nicotiana plumbaginifolia*

Hye-Gyoung Cho, Dal-Hoe Koo, Soo-Young Kim, Jae-Wook Bang*

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

ABSTRACT Karyotype analysis and chromosomal localization of 5S and 45S rDNAs using FISH (fluorescence *in situ* hybridization) technique were carried out in *Nicotiana plumbaginifolia*. Somatic chromosome number of *N. plumbaginifolia* was $2n=20$ and karyotype was composed of three pairs of metacentric chromosomes (1, 2 and 7) and seven pairs of submetacentric chromosomes (3, 4, 5, 6, 8, 9 and 10). Length of chromosomes was ranged from 2.29 to 4.50 μm . Chromosome 1 and 2 were identified as satellite chromosomes. In FISH experiment, one pair of 5S rDNA signals was detected on the centromeric region of chromosome 2 and one pair of 45S rDNA signals was detected on the terminal region of chromosome 1.

Key words: 5S rDNA, 45S rDNA, FISH, karyotype, satellite chromosome

서 론

담배속 (*Nicotiana*) 식물은 가지과 (Solanaceae)에 속하는 열대산의 다년생 식물이나 온대 지방에서 재배하고 있는 식물은 일년초이다. 담배는 아메리카 대륙이 원산지로 세계 여러 나라에서 약 60여 종이 재배되고 있으며, 2배체, 4배체 외에 이수성 (aneuploid)을 지닌 종들도 있다. 2배체로는 *N. sylvestris*, *N. tomentosa*군 (*N. tomentosiformis*, *N. otophora*), *N. paniculata*, *N. undulata*가 있으며, 재배종인 연초 (*N. tabacum*)와 당초 (*N. rustica*)는 4배체 식물이다.

*Nicotiana*속 식물 종들의 기본 염색체 수는 $x=9, 10, 12$ 로 알려져 있으며, *N. plumbaginifolia*는 $2n=20$ 으로 2배체 식물이고, *N. tabacum*는 $2n=48$ 개의 이질4배체로 2배체 식물

($2n=24$)인 *N. sylvestris*와 *N. tomentosa*로부터 육성된 재배 품종이다 (Jamet et al. 1987). 연초와 당초는 흡연용으로 이용되고 있으며, *N. tomentosa*나, 꽃담배 (*N. sanderae*), *N. glauca* 등은 관상용으로, *N. glauca*는 관엽식물로서 이용된다. 특히 *N. plumbaginifolia*는 조직배양 및 담배 품종 육성에 많이 이용되고 있으며, *N. africana*, *N. repanda*, *N. gossei* 등은 유전자원으로 이용되고 있다.

핵형 분석은 일반적으로 염색체의 동원체를 중심으로, 단완 (short arm, S)과 장완 (long arm, L)의 길이의 비 (L/S)에 의해 이루어지는데, Levan 등 (1964)은 arm ratio에 따라 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 구분하는 핵형 분석 방법을 제안한 바 있다. 또한 이질 염색체를 특이적으로 염색하는 여러 종류의 분염법을 사용하여 핵형분석을 정확히 하고자 하는 염색체 동정 시도되었지만 (El-Gadi and Elkington 1975), 최근에는 FISH

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

(fluorescence *in situ* hybridization) 기법의 사용으로 DNA의 염기서열을 근거로 하는 염색체 동정이 가능케 되었다 (Jiang and Gill 1994).

FISH 기법은 중기 염색체 및 핵에서 특정 DNA 서열의 위치를 직접 확인할 수 있는 방법으로, 방사선 물질을 이용해 DNA를 표지하는 기존의 방법과 달리, 탐침 (probe) DNA의 측쇄를 변형시켜 biotin 또는 digoxigenin으로 연결된 dUTP로 표지하고, 이를 특별히 인식할 수 있는 항체와 결합시킨 형광 색소를 이용하여 염색체 위에서 혼성화된 탐침을 직접 검출하는 방법이다. FISH 기법은 포유류 염색체에서 처음으로 시도되었으며, 식물 염색체 연구에는 Schwarzacher 등 (1989)과 Yamamoto와 Mukai (1989)에 의해 처음으로 도입되었다. FISH 기법은 종래의 방사선 동위원소법에 비해 안전하고 간편하며, 염색체에 대한 세포학적 정보와 DNA 서열구조에 대한 분자적 정보를 직접 연관시켜 주기 때문에 유전현상에 대해 보다 정확한 정보를 제공하여 줄 수 있다 (Flavell 1986). FISH 기법은 식물 계놈의 구성 (Schwarzacher et al. 1990), 염색체 구조 (Moore et al. 1993), 유전자의 염색체 상의 위치 탐색 (Mukai et al. 1990), 그리고 염색체 상에서 DNA 염기 서열의 상대적인 순서 (Leitch et al. 1994) 등에 널리 이용되어 왔다. 5S와 45S rDNA를 탐침으로 이용한 물리지도 작성 (Flavell 1986; Fukui et al. 1994)을 시작으로, 다량의 클론화된 DNA 절편의 mapping이 가능하게 되어, 최근에는 고정밀, 고밀도의 세포유전학적 지도가 작성되고 있다 (Fransz et al. 2000). 5S와 45S rDNA는 어느 식물에서나 공통으로 존재하고, 복제 수가 많아 염색체의 분석이나 식물 진화 과정에서의 유전체 구조 비교 연구에 유용하다 (Flavell 1986; Fukui et al. 1994).

*N. plumbagiifolia*에 관한 핵형 분석은 Villa (1984)에 의해 처음으로 보고되었으나, 그는 상염색체에 의한 염색체의 모양, 크기, 부수체의 수 등을 동정하였을 뿐 rDNA를 이용한 FISH 결과는 보고된 바 없다.

본 연구는 담배 품종 육성에 유전자원으로 이용되고 있는 *N. plumbaginifolia*를 대상으로 중기 염색체의 핵형을 확립하고, 5S와 45S rDNA를 탐침으로 FISH 기법을 이용하여 염색체 상에서의 위치를 확인하고자 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에서는 한국인삼연초연구원에서 분양받은 2배체 담배인 *N. plumbaginifolia*를 재료로 이용하였다.

근단의 고정과 염색체 관찰

체세포 염색체 관찰을 위해 근단을 채취하여 1-bromonaph-

thalene 포화 수용액에 2시간 전처리한 후, ethanol : glacial acetic acid (3 : 1, v/v) 용액에 고정하여 냉장고 (4°C)에 보관하면서 재료로 사용하였다.

고정된 근단을 1 N HCl (60°C)로 2~3분 연화 처리한 후, 증류수로 수세하고, Feulgen 염색액에 담가 30분간 염색하였다. 염색된 근단은 1% 아세트카민 용액을 사용하여 압착법으로 프레파라트를 만들었다. 프레파라트를 광학현미경으로 관찰하고, 양호한 분열상의 사진을 촬영하여 핵형 분석에 이용하였다. 핵형 분석은 Levan 등 (1964)의 방법에 따라 염색체의 동원체를 중심으로 하여, 단완 (short arm, S)과 장완 (long arm, L)의 길이를 측정하여 비 (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

FISH를 위해서는 고정된 근단을 효소 혼합 용액 (2% cellulase, 1.5% macerozyme, 1% pectolyase, 0.5 mM EDTA, pH 4.2)에 담가 2시간 처리 (37°C) 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 선발하여 FISH에 이용하였다.

탐침의 준비

5S rDNA의 탐침은 담배의 계놈 DNA 10 ng을 취하여 5S rDNA의 염기 서열에 교잡할 수 있는 한 쌍의 5 pM primer (5'-GATCCCATCAGA ACTCC-3'과 5'-GGTGCTT-TAGTGCTGGTAT-3')를 각각 5 µL, 그리고 2.5 unit *Taq* polymerase 및 biotin-16dUTP를 넣고, PCR (polymerase chain reaction)을 이용하여 표지하였다.

45S rDNA 탐침은 포항공대 남홍길 박사로부터 분양받은 soybean의 45S rDNA (3.4 kb)를 사용하였다 (Kim et al. 1998). 표지는 biotin-16dUTP를 이용한 Nick translation labeling법으로 표지하였다. 표지 혼합액 (1 µg DNA, DNase 1/DNA polymerase (GIBCOBRL), biotin-16dUTP, dNTP)를 15°C에서 90분간 반응시킨 후, 65°C에서 10분간 반응시킨 다음, 실온에서 15분간 방치한 후, 에탄올 침전을 거쳐 formamide에서 처리하였다.

Fluorescence *in situ* hybridization

FISH는 Kim 등 (1998)의 방법을 변용하였다. 건조된 염색체 슬라이드에 600 µL의 RNase 용액 (1 mg/mL RNase A, 2x

SSC)을 60분 동안 (37°C) 처리 후, 슬라이드상의 염색체 변성을 위하여 70% formamide/2x SSC 용액에 담가 2분간 처리한 다음, -20°C의 70% 에탄올에서 급냉 및 수세 후, 95%와 99% 에탄올에서 각각 5분씩 수세하여 상온에서 건조시켰다. 탐침 혼합액 (biotin으로 표지된 100 ng의 probe DNA, 50% formamide, 2x SSC, 10% dextran sulfate, 10 ng ssDNA)은 90°C에서 10분간 변성시킨 후, 급냉시켜 준비하였다. 건조된 슬라이드 상에 25 μ L의 탐침 혼합액을 가한 다음, 커버글라스로 덮고 paper bond로 봉하여, 37°C에서 12시간 이상 hybridization 하였다. Hybridization시킨 슬라이드는 40°C의 2x SSC, 50% formamide/2x SSC, 2x SSC, 4x SSC 용액에서 각각 10분씩 수세하였다. 탐침의 비특이적인 결합을 막기 위해 염색체 슬라이드를 5% BSA/BT (1 M NaHCO₃ + 0.5% Tween-20, pH 8.3) 완충액으로 37°C에서 5분간 blocking 한 후, FITC (fluorescein isothiocyanate)-avidin conjugate (0.1 mg/mL)과 1% BSA/4x SSC의 혼합액을 슬라이드에 떨어뜨린 다음, 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 biotin으로 표지된 DNA 탐침을 검출하였다. BT 완충액으로 40°C에서 10분씩 3번 수세한 후, 600 μ L의 5% goat serum/BT로 37°C에서 5분 동안 blocking 하고, 1%의 biotinylated anti-avidin/BT 완충액으로 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, BT 완충액으로 40°C에서 10분씩 3번 수세하였다. BSA/BT (5%)로 37°C에서 5분간 blocking 한 후, 여분의 avidin-FITC + BT 완충액으로 37°C에서 1시간 동안 반응시키고, 37°C에서 10분씩 BT 완충액으로 2번, 2x SSC로 1번 수세한 다음, 슬라이드에 1 μ g/mL PI (propidium iodide) 용액 15 μ L를 도포하여 커버를 덮어 형광현미경으로 관찰하였다. 확인된 signal들은 PI (red fluorescence)와 FITC (green fluorescence)를 관찰할 수 있는 공초점 현미경 (Confocal microscope, Zeiss)을 이용하여 촬영한 다음 화상 작업을 통하여 결과를 분석하였다.

결과 및 고찰

핵형 분석

*Nicotiana*속 식물들의 염색체 기본 수는 $x=9, 10, 12$ 로 알려져 있는데 (Kovtun et al. 1993), 본 연구에서 *N. plumbaginifolia*는 $2n=20$ 으로 $x=10$ 으로 관찰되었다 (Figure 1). 염색체의 길이는 2.29~4.50 μ m였으며, arm-ratio에 따라 3쌍의 중부 염색체와 7쌍의 차중부 염색체로 구분되었다. 중부 염색체는 1, 2 및 7번 염색체로 arm-ratio가 1.06~1.45였으며, 7쌍의 차중부 염색체로 나타난 3, 4, 5, 6, 8, 9 및 10번 염색체는 arm-ratio가 1.73~2.50로 나타났다. 이 중 1번과 2번 염색체는 부수체 염색체 (satellite chromosome)로 관찰되었다 (Table 1). Villa (1984)는 *N. plumbaginifolia*의 체세포 중기 염색체의 길이를 1.73~4.34 μ m로 보고하였고, 부수체를 가진 염색체를 한 쌍

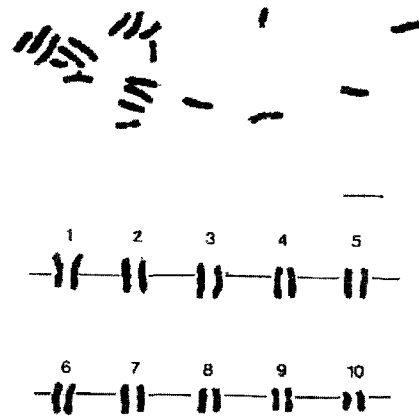


Figure 1. Somatic metaphase chromosome complement ($2n=20$) and karyotype of *N. plumbaginifolia*. Bar; 5 μ m.

Table 1. Analyses of somatic metaphase chromosomes of *N. plumbaginifolia*.

Chromosome No.	Chromosome size (μ m)			Total	Arm ratio (L/S)	Centromeric index
	Long arm	Short arm	Satellite segment			
1*	1.80	1.70	1.00	4.50	1.06	M
2*	2.25	1.60	0.50	4.35	1.41	M
3	3.00	1.30	-	4.30	2.31	SM
4	2.90	1.30	-	4.20	2.23	SM
5	2.75	1.20	-	3.95	2.29	SM
6	2.60	1.33	-	3.93	1.95	SM
7	2.10	1.45	-	3.55	1.45	M
8	2.25	0.90	-	3.15	2.50	SM
9	1.90	1.10	-	3.00	1.73	SM
10	1.60	0.70	-	2.30	2.29	SM

M: metacentric, SM: submetacentric
Asterisks indicate satellite chromosomes.

으로 밝힌데 비하여 본 연구에서는 염색체 길이는 2.29~4.50 μm , 부수체를 가지는 염색체가 2쌍으로 관찰되어 차이를 보였다. 또한 Arm ratio에 따른 3쌍의 중부염색체와 7쌍의 차중부 염색체는 Villa (1984)가 3쌍의 중부염색체, 2쌍의 차중부 염색체, 2쌍의 차단부 염색체 그리고 3쌍의 단부 염색체로 구분한 연구와 차이를 보였다. 이와 같이 종 또는 품종에 따라서 핵형의 다양성을 보이는 경우는 배추나 오이 등 다른 식물에서도 보고된 바 있다 (Kim et al. 1998; Koo et al. 2002).

Fluorescence *in situ* hybridization

식물 중에서 염색체의 구조와 다양성 연구에 유용한 분자 유전학적 방법으로 FISH 기법이 제시되고 있는데 (Heslop-Harrison and Schwarzacher 1993), 이는 상염색법이 염색체의 형태적 특징만을 제공하는 데 비하여, FISH 기법과 같은 분자 세포유전학적인 방법은 다양한 반복서열을 탐침으로 한 형광 염색을 이용해 염색체의 크기가 작고 모양이 유사한 염색체의 관찰도 용이하게 하기 때문이다. 5S와 45S rDNA는 복제 수가 많고, 염기서열이 안정되어 있기 때문에 근연 종간의 유전 관계나 계통간 유전 관계 및 계통의 기원 등의 세포유전학적 연구에 있어 매우 유용하다 (Fukui et al. 1994).

N. plumbaginifolia 염색체 상에서 5S와 45S rDNA의 위치를 확인하고, 상동 염색체를 구분하기 위해 FISH를 수행한 결과, biotin으로 표지된 5S와 45S rDNA는 FITC로 검출하고, 염색체는 PI로 대비 염색하여 관찰할 수 있었다. rDNAs의 FISH에서 5S rDNA 유전자는 2번 염색체에서 확인되었으며, 이들 signal은 염색체의 동원체 주변에서 관찰되었다 (Figure 2A). 45S rDNA의 signal은 1번 염색체의 부수체 부위 (NOR, nucleolus organizer region)에서 확인되었으나 2번 염색체의 NOR에서는 관찰되지 않는 특징을 보였다 (Figure 2B).

5S rRNA는 리보솜 구성 성분 중의 하나로 이를 해독하는 유전자는 거의 모든 진핵생물에서 multigene family로 염색체 상에 위치하며 (Murata et al. 1997), 대마에서는 여러 쌍 (Schneeberger et al. 1989), 보리에서는 4쌍 (Leitch and Heslop-Harrison 1993) 등 식물 종에 따라 다른 양상을 보이는데, *N. plumbaginifolia*에서는 한 쌍만 관찰되었다. 45S rRNA 유전자 역시 리보솜 구성 성분으로 그 위치는 인형성 부위를 포함하고 있는 부수체 염색체로 확인되며, 1쌍 이상의 염색체 상에 반복적으로 위치하고, 거의 모든 고등 생물에서 매우 안정하게 보존되어 있다. 본 연구 결과 45S rDNA signal이 *N. plumbaginifolia*에서는 1쌍만 관찰되었으나 배추속 (*Brassica*) 식물 6종에서 2~6쌍, 애기장대속 (*Arabidopsis*) 식물 3종에서 2~8쌍 (Maluszynska and Heslop-Harrison 1993a, 1993b) 등 식물종에 따라 차이를 보인다.

분자 마커를 이용한 FISH 기법을 통하여 각각의 염색체를 동정할 수 있는데, *N. tabacum* 식물에서 얻은 GRD (geminivirus-related DNA)의 반복서열이 마커로 활용된 바 있으며

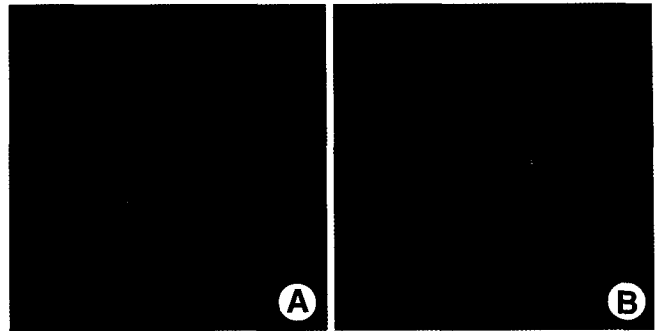


Figure 2. 5S (A) and 45S (B) rDNA signals on chromosomes of *N. plumbaginifolia*. Chromosome preparation was counterstained with PI and biotinylated 5S and 45S rDNA probes were detected with FITC.

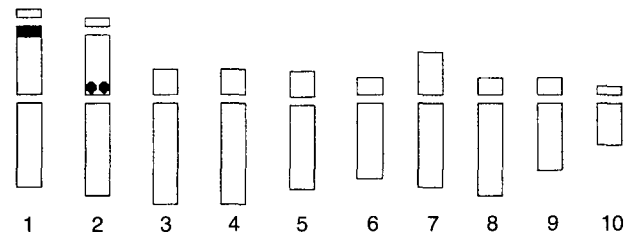


Figure 3. Ideogram of 5S and 45S rDNA loci on the chromosomes of *N. plumbaginifolia*. Dark circle; 5S rRNA gene loci, Dark bar; 45S rRNA gene loci.

(Kenton et al. 1995), *N. plumbaginifolia*에서 분리한 말단 반복서열 (repeated telomere sequences)도 염색체적 마커로서 이용된 바 있는데 (Chen et al. 1997), 담배속 식물의 경우 기본 수가 다른 염색체를 지닌 많은 근연 종들이 있기 때문에 유전체의 기원에 관한 연구에 있어 FISH가 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

상염색법을 이용한 *N. plumbaginifolia*의 염색체 분석과 FISH를 통해 확인된 5S와 45S DNA signal에 근거하여 작성한 핵형의 ideogram은 figure 3에서 보는 바와 같다.

적 요

2배체 담배인 *Nicotiana plumbaginifolia*를 대상으로 상염색법과 FISH 기법을 통한 염색체 분석을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. *N. plumbaginifolia*의 체세포 염색체 수는 $2n=20$ 이며, arm ratio 비교를 통한 핵형 분석에서 중기 염색체 조성은 3쌍의 중부 염색체 (염색체 1, 2 및 7)와 7쌍의 차중부 염색체 (염색체 3, 4, 5, 6, 7, 9 및 10)로 관찰되었다. 염색체의 길이는 2.29~4.50 μm 로 나타났으며, 염색체 1번과 2번은 부수체 염색체로 관찰되었다. 5S와 45S rDNA를 탐침으로 FISH를 수행한 결과 2번 염색체의 동원체 부위에서 한 쌍의 5S signal이 확인되었고, 1번 염색체의 부수체에서 한 쌍의 45S signal이 관찰되었다.

사사 - 본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물 이용기술개발사업단의 연구비 지원 (과제번호 PF0012 01-03 : PI 방재욱)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Chen CM, Chen CC, Wang CT, Ho CH, Keo YY (1997) Two tandemly repeated telomere-associated sequences in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Chromosome Res* 5: 561-568
- El-Gadi A, Elkington TT (1975) Comparison of the Giemsa C-band karyotype and the relationships of *Allium cepa*, *A. fistulosum* and *A. glantum*. *Chromosoma* 51: 19-23
- Flavell RB, O'Dell M, Thompson WF, Vincentz M, Sardana R, Barker RF (1986) The differential expression of ribosomal RNA genes. *Philops Trans R Soc London, Ser B* 314: 379-385
- Fransz PF, Armstrong S, de Jong JH, Parnell LD, van Druenen C, Zabel P, Bissing T, Jones GH (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, 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
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T (1993) Molecular cytogenetics-biology and applications in plant breeding. *Chromosomes Today* 11: 191-198
- Jamet E, Durr A, Fleck J (1987) Absence of some truncated genes in the amphidiploid *Nicotiana tabacum*. *Gene* 59: 213-21
- Jiang J, Gill BS (1994) New 18. 26S ribosomal RNA gene loci: chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. *Chromosoma* 103: 179-185
- Kenton A, Khashoggi A, Parokony A, Bennett MD, Ichtenstein C (1995) Chromosomal location endogenous geminiviruses-related DNA sequences in *Nicotiana tabacum* L. *Chromosome Res* 3: 346-350
- Kim SY, Lim YP, Bang JW (1998) Cytogenetic analysis of *Brassica campestris* var. *pekinensis* using C-Banding and FISH. *Korean J Genetics* 20: 285-294
- Koo DH, Hur YK, Jin DH, 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
- Kovtun YV, Komarnitsky IK, Gleba YY (1993) A new middle repetitive sequence of *Nicotiana plumbaginifolia* genome. *Plant Mol Biol* 23: 435-438
- Leitch IJ, Heslop-Harrison JS (1993) Physical mapping of four sites of rDNA sequences and one site of the α -amylase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 36: 517-523
- Leitch IJ, Leitch AR, Heslop-Harrison JS (1994) Physical mapping of plant DNA sequences by simultaneous *in situ* hybridization of two differently labelled fluorescent probes. *Genome* 34: 329-333
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220
- Maluszynska J, Heslop-Harrison JS (1993a) Molecular cytogenetics of the genus *Arabidopsis*: *In situ* hybridization of rDNA sites, chromosome numbers and diversity in centromeric heterochromatin. *Ann Bot* 71: 479-484
- Maluszynska J, Heslop-Harrison JS (1993b) Physical mapping of rDNA loci in *Brassica* species. *Genome* 36: 774-781
- Moore G, Cheung W, Foote T, Gales M, Koebner R, Leitch AR, Leitch IJ, Money T, Stacombe P, Yano M, Flavell R (1993) Key features of cereal genome organization as revealed by the use of cytosine methylation-sensitive restriction endonucleases. *Genomics* 15: 472-482
- Mukai Y, Endo T, Gill BS (1990) Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. *J Hered* 81: 290-295
- Murata M, Heslop-Harrison JS, Motoyoshi F (1997) Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. *Plant J* 12: 31-37
- Schneeberger RG, Creissen GP, Cullis CA (1989) Chromosomal and molecular analysis of 5S gene organization in flax, *Linum usitatissimum*. *Gene* 83: 75-84
- Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD, Heslop-Harrison JS (1989) *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot* 64: 315-324
- Schwarzacher T, Leitch AR, Heslop-Harrison JS (1990) *In situ* hybridization and the architecture of the nucleus. *Trans R Microscop Soc* 1: 669-674
- Villa A (1984) The chromosome idiogram of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Genetica (The Hague)* 64: 145-148
- Yamamoto M, Mukai Y (1989) Application of fluorescence *in situ* hybridization to molecular cytogenetics of wheat. *Wheat Inf Serv* 69: 30-33

(접수일자 2002년 12월 24일, 수리일자 2002년 12월 31일)