

## 제주특산 한라참나물(*Pimpinella hallaisanensis*)의 핵형분석과 Bicolor FISH

김수영 · 김찬수<sup>1</sup> · 도재화<sup>1</sup> · 이종구\*

한국생명공학연구원, <sup>1</sup>국립산림과학원 난대산림연구소

제주도 특산식물인 한라참나물의 염색체수를 재조사하기 위해 핵형분석과 bicolor FISH를 수행하였다. 한라참나물의 체세포 염색체수는  $2n=2x=22$ 로 관찰되었고, 염색체의 길이는 3.58-5.82  $\mu\text{m}$ 였다. 염색체의 구성은 2쌍의 중부 염색체(염색체 1과 2번), 4쌍의 차중부 염색체(염색체 3, 4, 6, 8번), 그리고 5쌍의 차단부 염색체(염색체 5, 7, 9, 10, 11번)로 확인되었다. Bicolor FISH를 통해 3쌍의 5S와 4쌍의 45S rDNA 위치를 확인하였으며, 5S rDNA의 경우 염색체 4번의 장완 말단 부위에서 2쌍과 염색체 6번의 장완 중심과 동원체 사이에서 1쌍의 signals가 관찰되었다. 45S rDNA signals는 염색체 4, 6, 10 그리고 11번의 단완 말단에서 각각 확인되었다. 본 종의 염색체수가 핵형분석 및 FISH를 통해 이전의 연구결과와 다르게 분석됨으로써 한라참나물의 염색체수의 재고가 필요하다고 사료되었다.

주요어 : 염색체수, 한라참나물, 핵형분석, bicolor FISH, rDNAs

참나물속(*Pimpinella* L.)은 산형과(Apiaceae)의 산형아과(Apioideae) Ammineae족에 속하는 식물로 세계적으로 150여종이 분포하는 것으로 알려져 있다(Ohwi, 1965; Abebe, 1992). 참나물속은 275속 3,000여종을 포함하는 산형과 내에서 익상 또는 3출상 복엽을 갖거나 드물게 단엽을 가지며, 복산형화서에 0-2개의 총포편을 갖고, 과실은 난형 또는 타원형의 분열과를 갖는 특징으로 다른 속과 구분된다(Kitagawa, 1949; Kitagawa, 1982). 국내에는 제주특산인 한라참나물 [*P. hallaisanensis* (W. T. Lee & G. J. Jang) G. J. Jang, W. K. Paik & W. T. Lee], 한국특산인 그늘참나물 [*P. brachycarpa* (Kom.) Nakai var. *uchiyamana* (Y. Yabe ex Nakai) W. T. Lee & G. J. Jang], 중국과 공통종인 참나물 [*P. brachycarpa* (Kom.) Nakai], 시베리아와 공통종인 노루참나물 [*P. komarovii* (Kitag.) R. H. Shan & F. T. Fu]의 3종 1변종이 분포한다(Lee, 2007).

그러나 본 속 식물은 형태학적 형질에서 변이가 매우 많아 종 동정에 많은 문제를 야기하

\*교신저자: 전화 042-860-4284, joongku@kribb.re.kr

접수: 2008년 2월 1일/완료 2008년 3월 24일

고 있다. 한라참나물의 경우 Jang *et al.* (1995)이 제주도 한라산 물장올계곡(해발 650 m)에서 채집한 표본(KWNU no. 39516, July 17, 1991, G. J. Jang *s.n.*)을 관찰한 결과 전체적으로 참나물과 일본 특산종인 *P. nikoensis*와 유사하였으나 왜소하며, 다세포 털의 마디부분이 잘록하고 화기에 근엽이 남아 있다는 점을 들어 참나물의 신변종 [*P. brachycarpa* (Kom.) Nakai var. *hallaisanensis* W. Lee & G. Jang]으로 설정한 바 있다. 그 후 같은 저자들(Jang *et al.*, 1999)이 신변종 설정 당시와 거의 유사한 외부형태학적 형질과 염색체수( $2n=24$ )가 다른 종과 다르다는 점을 들어 신종 [*P. hallaisanensis* (W. T. Lee & G. J. Jang) G. J. Jang, W. K. Paik & W. T. Lee]으로 격상한 바 있다. 이와 같이 참나물속 식물은 외부형태에 의한 종 동정에 많은 문제점을 드러내고 있어서 염색체 형질의 중요성이 높아지고 있다.

참나물속에 대한 염색체 연구는 *P. anisum*과 *P. peregrina*에서  $2n=2x=18$ 로 염색체수가 처음으로 보고된(Schulz-Gaebel, 1930) 이후 지금까지 약 50여종에서 염색체수가 밝혀졌다. 참나물속 식물이 갖는 기본 염색체수는  $x=9, 10, 11$ 로 보고되었으며, 그 중  $2n=18$ 로 보고된 종은 *P. lithophila*, *P. candolleana*, *P. diversifolia* 그리고 *P. leschenaultia* 등이며(Rostovtseva, 1982; Subramanian, 1986; Hamal *et al.*, 1986; Krishnappa, 1988),  $2n=20$ 으로 보고된 종은 *P. acuminata*, *P. anisoides*, *P. lutea* 그리고 *P. anthriscoides* 등이다(Cauwet marc *et al.*, 1980; Romana *et al.*, 1987; Verlaque, 1992; Daushkevich *et al.*, 1995). 또한  $2n=22$ 로 보고된 종은 *P. monoica*, *P. heyneana*, *P. buchananii*와 *P. trifurcate* 등이 있다(Sinha, 1978; Hore, 1980; Abebe, 1992).

국내에 분포하는 참나물속 식물에 대한 염색체수와 핵형분석에 대한 보고는 참나물(*P. brachycarpa* var. *brachycarpa*), 그늘참나물(*P. brachycarpa* var. *uchiyamana*), 가는참나물(*P. koreana*) 그리고 노루참나물(*P. komarovi*)로써 모두  $2n=2x=22$ 로 보고되었으며(Jang, 1992; Jang *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1996), 제주 특산식물인 한라참나물은  $2n=2x=24$ 로 속내의 다른 분류군과 염색체수가 다르게 보고되었다(Jang, 1992; Jang *et al.*, 1995).

최근에는 핵형분석을 보다 명확히 하고, 물리지도 작성을 위한 분자세포유전학적 방법인 fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 기술이 이용되고 있는데, 체세포의 중기염색체 및 핵 또는 감수분열에서 특정 DNA서열의 위치를 직접 찾아낼 수 있는 실험방법이다. rDNA 유전자와 같은 반복서열을 이용하여 동일한 속 내에서 또는 종간에서 뚜렷이 구별 되는 염색체의 형태적인 특징을 찾을 수 있을 뿐 아니라 다른 유전자를 이용한 물리지도 작성을 위한 기반을 마련할 수 있다(Jiang and Gill, 1994; Fransz *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006a, b). 특히 5S와 45S rDNA는 어느 식물에서나 공통으로 존재하고, 복제수가 많아 핵형분석 뿐만 아니라 식물의 진화 과정에서의 계통구조의 비교 연구에 유용하다(Fukui *et al.*, 1994; Flavell, 1986; Rogers and Bendish, 1987). 최근 국내 자생식물을 대상으로 FISH 기술을 사용하여 DNA 염기서열을 근거로 하는 분자세포유전학적 연구가 활발히 진행되고 있으며(Koo *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006a, b, c), 아직 연구가 되지 않은 식물들에 대한 염색체 정보가 수록된 염색체자료집이 발간되었다(Lee and Kim, 2007).

저자들은 국내 특산식물의 염색체 연구를 진행하던 중에 기존에 발표된 염색체수와 차이를 보이는 한라참나물을 대상으로 핵형분석과 FISH 기법을 통해, 염색체수를 재조사하고 FISH 기법과 관련된 분자세포학적 연구가 마련되지 않은 참나물속의 물리적지도를 작성하고자 본 연구를 수행하였다.

## 재 료 및 방 법

**식물재료:** 본 연구에 사용한 한라참나물 [*P. hallaisanensis* (W. T. Lee & G. J. Jang) G. J. Jang, W. K. Paik & W. T. Lee] 은 제주도 서귀포시 남원읍 물영아리오름(해발 436m)에서 채집하여 한국생명공학연구원 포장에 옮겨 심은 후 근단을 채취하여 핵형분석 및 FISH 재료로 사용하였다. 또한 확정표본(Nov. 23, 2007, Kim *et al.* s.n.)은 국립산림과학원 난대산림연구소(WTFRC) 식물표본관에 보관하였다.

**체세포 염색체 관찰 및 핵형분석:** 채취된 근단은 중기 염색체상을 얻기 위하여 증류수(4℃)에 넣어 24시간 동안 저온처리 한 다음, Farmer's solution (glacial acetic acid: ethanol=1:3, v/v)에 담가 4℃에 보관하면서 재료로 이용하였다. 염색체 관찰을 위해 고정된 근단을 1N HCl (60℃)에서 3분간 연화 한 다음, 증류수로 수세하고 Feulgen 용액에서 염색한 후, 1% aceto carmine을 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), 7.0이상일 경우 단부 염색체(T, telocentric)로 판단하였으며, 염색체들을 긴 것으로부터 짧은 순으로 배열하고, 그 순서대로 고유 번호를 부여하였다.

**FISH 슬라이드 제작:** FISH 실험을 위한 슬라이드를 제작하기 위해 고정된 근단을 증류수로 수세한 후 효소 혼합용액(2% cellulase Onozuka R-10, 1.5% macerozyme R-10, 1% pectolyase Y-23, 0.5 mM EDTA, pH 4.2)에 담가 50분간 처리(37℃) 후, Farmer's solution을 이용하여 가는 핀셋으로 슬라이드글라스 위에서 염색체를 전개 한 뒤 상온에서 2-3일간 건조시켰다. 위상차현미경 하에서 분열상을 관찰하고, 그 중 양호한 슬라이드를 선별하여 FISH실험에 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(2006a)의 방법을 변용하여 사용하였다.

건조된 슬라이드상의 염색체 변성을 위하여 70% formamide/2xSSC 용액에 1분간 처리하고, 70% 에탄올(-20°C)에서 급냉 후, 95%와 99% 에탄올에서 각각 5분씩 탈수하여 상온에서 30분 정도 건조시켰다. 탐침 혼합액(biotin-16-dUTP와 digoxigenin-11-dUTP로 각각 표지 된 100 ng의 probe DNA, 50% formamide, 2X SSC, 10% dextran sulfate, 10 ng ssDNA)은 90°C에서 10분간 변성시킨 후, 급냉시켜 준비하였다. 건조된 슬라이드상에 20  $\mu$ l의 탐침 혼합액을 가한 다음, 커버글라스를 덮고 paper bond로 봉하여, 37°C에서 16시간 이상 혼성화(hybridization)하였다.

혼성화 시킨 슬라이드는 42°C의 2xSSC, 50% formamide/2xSSC, 2xSSC, 4xSSC 용액에서 각각 5분씩 수세하였다. 탐침의 비 특이적인 결합을 막기 위해 염색체 슬라이드에 blocking reagent가 포함된 TNB용액에 1%의 avidin-FITC (fluorescein isothiocyanate)와 anti-digoxigenin rhodamine이 포함된 100  $\mu$ l의 혼합액을 가한 다음 37°C에서 50분 동안 반응시켜 biotin과 digoxigenin으로 표지 된 DNA 탐침을 동시에 검출하였다. 4xSSC/0.2% Tween-20 완충액으로 37°C에서 5분씩 3번 수세 후, 1  $\mu$ g/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) 용액을 포함한 Vectashield (Vector Lab.) 15 ml를 도포하여 커버를 덮은 후 cooled CCD 카메라(Cool SNAP, Photometrics)와 형광현미경을 이용하여 염색체 윤곽과 혼성화 결과를 관찰하고 사진을 촬영하였다. 확인된 signal들은 Meta Imaging Serries TM 4.6 (Universal Imaging Corporation) 소프트웨어를 사용하여 합성하였다.

## 결 과 및 고 찰

**핵형분석:** 제주도 특산식물인 한라참나물의 체세포 염색체수는  $2n=2x=22$ 로 기본 염색체수는  $x=11$ 이며 이배체(diploid) 식물이다(Fig. 1). 염색체의 크기는 3.58-5.82  $\mu$ m 였으며, arm-ratio는 1.03-3.95 였다. Arm-ratio에 따라 2쌍의 중부 염색체(염색체 1번과 2번)와 4쌍의 차중부 염색체(염색체 3, 4, 6, 8번) 그리고 5쌍의 차단부 염색체(염색체 5, 7, 9, 10, 11번)로 각각 구분하였다(Table 1). 인형성 부위(NOR, nucleolus organizer region)를 지니고 있는 염색체는 일반염색법으로는 관찰할 수 없었으나 FISH를 통해 알 수 있었다.

참나물속 식물의 염색체수는 국외종에서  $2n=2x=18, 20, 22$ 로 다양하게 보고되었고, 국내에 자생하는 참나물속 식물인 참나물, 가는참나물, 그늘참나물 그리고 일본의 특산식물인 *P. nikoensi*의 체세포 염색체수도  $2n=2x=22$ 로 기본 염색체수가  $x=11$ 로 보고된 바 있다(Jang, 1992; Jang *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1996). 기존의 많은 연구 결과를 통해 참나물속의 기본 염색체수는 거의 대부분이  $x=9, 10, 11$ 임을 알 수 있었다. 그러나 제주도 특산식물인 한라참나물에서는 기존의 연구결과와 본 연구결과가 다소 차이를 보였다. 본 연구결과에서는 한라참나물의 염색체수를 한국산 참나물속의 기본 염색체수와 동일하게 판단하였으나 Jang *et al.* (1995)의 결과에서  $2n=2x=24$ 로 보고되어 기본수가  $x=12$ 로 다른 참나물속 식물의 염색체수와

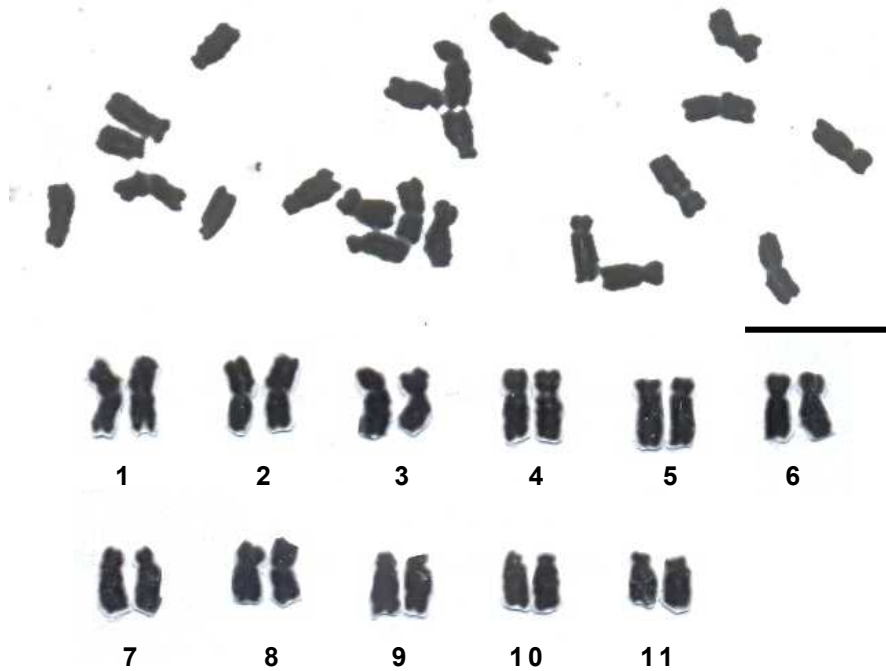
**Table 1.** Analysis of somatic metaphase chromosomes of *Pimpinella hallaisanensis*.

Chromosome No.	Chromosome Size ( $\mu\text{m}$ )			Arm ratio (L/S)	Centromeric Index*
	Long Arm	Short Arm	Total		
1	3.13	2.69	5.82	1.16	M
2	2.77	2.69	5.46	1.03	M
3	3.58	1.57	5.15	2.28	SM
4	3.53	1.57	5.10	2.25	SM
5	4.03	1.02	5.05	3.95	ST
6	3.13	1.57	4.70	1.99	SM
7	3.35	1.12	4.47	3.00	ST
8	2.68	1.57	4.25	1.71	SM
9	3.30	0.90	4.20	3.67	ST
10	3.12	0.90	4.02	3.47	ST
11	2.69	0.89	3.58	3.02	ST

\*M: metacentric, SM: submetacentric, ST: subtelocentric

는 수적으로 차이를 보였다. 뿐만 아니라 핵형분석 결과에서도 차이를 보였는데, 본 연구결과에서는 2쌍의 중부 염색체(염색체 1번과 2번)와 4쌍의 차중부 염색체(염색체 3, 4, 6 그리고 8 번) 그리고 5쌍의 차단부 염색체(염색체 5, 7, 9, 10 그리고 11번)로 구별한 것과는 다르게 4 쌍의 중부염색체, 차중부 염색체 그리고 차단부 염색체로 각각 구분하였고 국내에 분포하는 참나물속 식물보다 차단부 염색체 1쌍을 더 많이 갖고 있는 핵형학적 특성을 고려하여 다른 참나물속 식물과 구분하였다. 한국 특산식물이면서 제주 특산식물인 한라참나물의 염색체수는 기존의 다른 참나물속 식물의 염색체수와 본 연구결과를 바탕으로 종합한 결과  $2n=22$ 로 국내에 분포하는 다른 참나물속 식물의 염색체수와 일치하였다. 따라서 참나물속의 기본 염색체수인  $x=11$ 에 부합되며, 국내 참나물속에서 한라참나물을 염색체수로 종의 특징을 구별하는 것보다는 핵형학적 특성을 고려하는 것이 더 바람직할 것으로 사료된다.

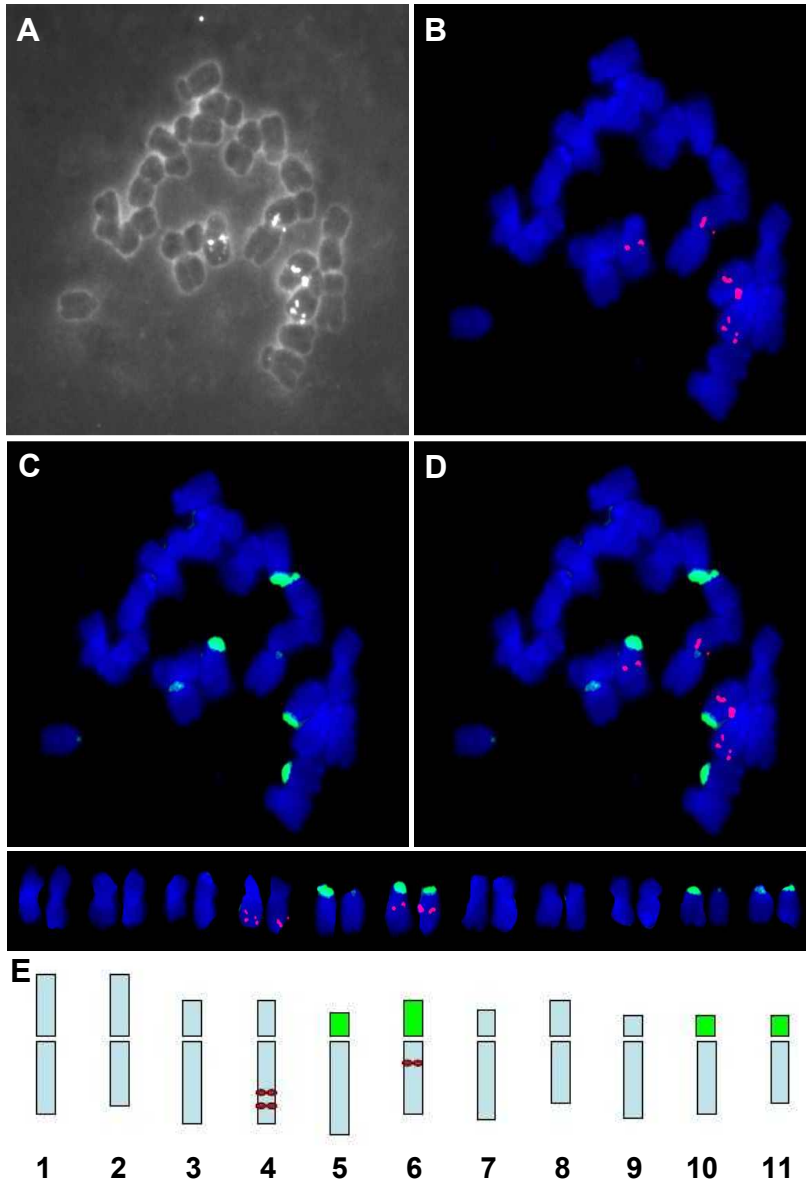
Bicolor FISH: 한라참나물의 보다 정확한 핵형분석과 일반염색법으로 관찰되지 않은 부수체 염색체를 확인하고, 5S와 45S rDNA를 탐침으로 한 물리지도 작성을 위해 bicolor FISH를 수행하였다. Cooled CCD 카메라를 이용하여 슬라이드상에 전개된 염색체상을 monochrome 이미지로 관찰하여 염색체수( $2n=22$ )를 정확히 확인하였다(Fig. 2A). Digoxigenin-11-dUTP와 biotin-16-dUTP로 각각 표지된 5S와 45S rDNA를 탐침(probe)으로 이용한 FISH 결과는 다음과 같다. 5S rDNA loci는 2쌍의 차중부 염색체(염색체 4번과 6번)에서 3쌍으로 관찰되었다



**Fig. 1** Somatic metaphase chromosome complements ( $2n=2x=22$ ) and karyotypes in *Pimpinella hallaisanensis*. Bar, 5  $\mu$ m.

(Fig. 2B). 염색체 4번의 장완 말단부위에 2쌍의 loci를 확인하였고, 6번 염색체의 장완 중심과 동원체 사이에서 1쌍의 loci를 관찰하였다. 45S rDNA loci는 3쌍의 차단부 염색체(염색체 5, 10 그리고 11번)와 1쌍의 차중부 염색체(염색체 6번)에서 각각 관찰되어 모두 4쌍이다(Fig. 2C). 45S rDNA는 일반염색법으로 구별할 수 없는 부수체 염색체에서 관찰되었는데, 4쌍 모두 단완 말단부위에서 관찰되었다. 또한 6번 염색체에서는 5S와 45S rDNA 유전자가 단완의 말단과 장완의 중심위치에서 각각 관찰되어 두 유전자가 같은 염색체내에 존재함을 알 수 있었다(Fig. 2D). FISH를 통해 확인된 5S와 45S rDNA loci에 근거하여 작성한 핵형의 ideogram은 Fig. 2E에서 보는 바와 같다.

5S와 45S rDNA는 리보솜의 구성 성분으로, 5S rDNA의 경우 120 bp의 conserved coding sequence를 포함한 200-500 bp의 반복적인 배열을 하고 있으며, 하나의 loci에서 rDNA 복제수의 변화가 심하여 수의 변이와 위치 분포가 식물 종간의 관계와 진화에 유용하게 사용되고 있다(Mukai *et al.*, 1991; Maluszynska and Heslop Harrison, 1993; Castilho and Heslop-Harrison, 1995). 45S rDNA는 인형성 부위를 포함하고 있는 부수체 염색체에서



**Fig. 2.** Bicolor FISH pattern of the metaphase chromosomes of *P. hallaisanensis* using 5S and 45S rDNA probes. A, monochrome image of chromosomes preparation; B, digoxigenin-labeled 5S rDNA loci (red); C, biotin-labeled 45S rDNA loci (green); D, bicolor FISH using both 5S and 45S rDNA genes and E, ideogram showing the physical location of the 5S (red circles) and 45S (green rectangles) loci.

관찰되는데(Leitch and Heslop-Harrison, 1992), 모든 식물종의 염색체 상에서 1쌍 이상이 존재하고(Maluszynska and Heslop Harrison, 1991), 5S rDNA와 동일한 위치에서 나타나지 않는다. 따라서 일반 염색법으로 핵형분석이 어렵거나, 동일한 속내에서의 종간의 차이를 구분할 수 있는 유용한 유전자로 사용된다. 따라서 최근에는 국내에서도 이러한 rDNAs를 이용하여 종간의 차이를 구분하고, 식물의 계통연구와 염색체지도 작성 그리고 분자세포생물학 분야 등 여러 식물 분야에 전반적으로 FISH기술이 이용되고 있다(Lee *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006b, c). Aceto-carmin을 이용한 상염색법이 염색체의 형태적인 특징만을 보여주는데 반해 FISH기법과 같은 분자세포유전학적 방법은 다양한 반복서열을 탐침으로 하여 형광염색을 이용하기 때문에 모양과 크기가 유사한 염색체를 구분하기에 용이하고, 계통을 연구하는데 있어 매우 유용한 기술이라 할 수 있다(Fukui *et al.*, 1994).

본 연구에서 수행된 핵형분석 및 rDNA를 이용한 물리지도작성은 특산식물인 한라참나물의 계통구조를 이해하고, 유전자의 물리적 위치를 탐색하는 기초 연구로써 한라참나물의 세포유전학적 기초자료로 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 또한 염색체수를 재고함에 따라 한라참나물이 참나물속내에서의 세포학적 동일성을 갖고 있음을 확인하면서, 다른 참나물속 식물이나 계통이 다른 식물을 대상으로 한 연구에 적용될 수 있을 것으로 사료되며 유사 종들간의 유연관계를 분석하기 위한 기본 자료로 이용될 수 있을 것이다.

## 사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용 기술개발사업단의 연구비 지원(과제번호: PF 06100-00)에 의해 수행되었습니다.

## 인 용 문 헌

- Abebe, F. L. S. 1992. Systematic studies in the genus *Pimpinella* L. (Umbelliferae) from tropical Africa. *Botanical J. Linn. Society* 110: 327-372.
- 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.
- Cauwet-marc, A. M., J. Carbonnier, M. Farille. 1980. Contribution a l' etude caryologique des Ombelliferes du Nepal. I. 35: 497-510.
- Daushkevich, J. V., T. V. Alexeeva and M. G. Pimenov. 1995. IOPB chromosome data 10. *International Organization of Plant Biosystematists Newsletter* 25L: 7-8.
- Flavell, R. B. 1986. The structure and control on expression of ribosomal RNA genes.



- Oxford Surveys Plant Mol. Cell Biol. 3: 251-274
- 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.
- Fransz, P. F., S. Armstrong, J. H. de Jong and L. D. Pamell. 2000. Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. Cell 100: 367-376.
- Hamel, I. A., A. Langer and A. K. Koul. 1986. Nucleolar organizing region in the Apiaceae (Umbelliferae). Plant Systematics and Evolution 154: 11-30.
- Hore, A. 1980. Structure and behavior of chromosomes as an aid to the study of phylogeny of Umbelliferae with special reference to the tribe Apieae (Ammineae) and Saniculeae. Cytologia 45: 389-402.
- Jang, G. J., W. K. Jang and W. C. Lee. 1995. *Pimpinella brachycarpa* var. *hallaisanensis* (Apiaceae): A new variety from Korea. Korean J. Plant Tax. 25: 7-12
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1999. Taxonomy of the genus *Pimpinella* (Umbelliferae) in Korea. Korean J. Plant Tax. 29: 151-167.
- Jiang, J. and B. S. Gill. 1994. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first ten years. Genome 37: 717-725.
- 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.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and J. W. Bang. 2004. Physical mapping of rDNAs using McFISH in *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. Korean J. Med. Crop Sci. 12:515-518.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, D. H. Koo, W. K. Lee, J. K. Lee and J. W. Bang. 2006a. Characterization of eight *Rumex* species by FISH (fluorescence *in situ* hybridization) and 5S rDNA spacer sequences. Korean J. Genetics 28: 243-251.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, C. S. Kim, J. S. Sung, J. K. Lee and J. W. Bang. 2006b. Cytogenetic analysis of *Astragalus* species. Korean J. Med. Crop Sci. 14: 250-254.
- \_\_\_\_\_, J. W. Bang and J. K. Lee. 2006c. Cytogenetic analysis using mitosis, meiosis chromosomes and bicolor fluorescence *in situ* hybridization of *Bupleurum latissimum* Nakai. Korean J. Med. Crop Sci. 14: 354-359.
- Kitagawa, M. 1949. Miscellaneous Notes on Apiaceae (Umbelliferae) of Japan and Manchuria (IV). Japanese J. Bot. 17: 557-562.
- \_\_\_\_\_. 1982. Umbelliferae (Apiaceae). In Wild Flowers of Japan. Satake, Y., J.

- Ohwi, S. Kitamura, S. Watari and T. Tominari (eds.), Heibonsha Ltd., Publishers, Tokyo. Pp. 276-290.
- Koo, D. H., S. Y. Kim, K. W. Bang, N. S. Seong and J. W. Bang. 2003. Cytogenetic analysis of *Angelica* plants using Feulgen staining and multicolor fluorescence *in situ* hybridization. Korean J. Plant Biotechnology 30: 123-127.
- \_\_\_\_\_, Y. K. Hur, D. C. Jin and J. W. Bang. 2002. Karyotype analysis of Korean cucumber cultivar (*Cucumis sativus* L. cv Winter long) using C-banding and bicolor fluorescence *in situ* hybridization. Mol. Cells 13: 413-418.
- Krishnappa, D. G. and A. N. Basappa. 1988. SOCGI plant chromosome number reports-VI. J. Cytology and Genetics 23: 38-52.
- Lee, B. Y. 2007. *Pimpinella* L., Sp. Pl. 263, 1753. In The Genera of Vascular Plants of Korea. Flora of Korea Editorial Committee, Academy Publishing Co., Seoul. Pp. 750-751.
- Lee, J. K. and S. Y. Kim. 2007. Chromosome Index of Plants in Korea 2007. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology.
- 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.
- 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.
- \_\_\_\_\_. and \_\_\_\_\_. 1993. Physical mapping of rDNA in *Braddica* species. Genome 36: 774-781.
- Mukai, Y., T. R. Endo and B. S. Gell. 1991. Physical mapping of the 18S rRNA multigene family in common wheat: identification of a new locus. Chromosoma 100: 71-78.
- Ohwi, J. 1965. *Pimpinella*. In Flora of Japan. Shibundo Co., Tokyo. Pp. 667-685.
- Romana, S., P. Mazzola and F. M. Raimondo. 1987. Numeri cromosomic per la flora Italiana: 1106-1117.
- Rogers, S. O. and A. J. Bendich. 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. Plant Mol. Biol. 9: 509-520.
- Rostovtseva, T. S. 1982. The chromosome numbers of some species of the family Apiaceae. III. Botaniceskij žurnal SSSR 67: 206-210.

- Schulz-Gaebel, H. H. 1930. Entwicklungsgeschichtlich-zytologische studien an der Umbelliferen-Unterfamilie der Apioideen. Beitr. Biol. Pfl. 18: 345-398.
- Sinha, B. M. B. and A. K. Sinha. 1978. Cytomorphological studies of the colchipsoid *Pimpinella monoica* Daiz. J. Indian Botanical Society 57: 342-345.
- Subramanian, D. 1986. Cytotaxonomical studies in south Indian Apiaceae. Cytologia 51: 479-488.
- Sun, B. Y., J. H. Park, M. J. Kwak, C. H. Kim and K. S. Kim. 1996. Chromosome counts from the flora of Korea with Emphasis on Apiaceae. J. Plant Biol. 39: 15-22.
- Verlaque, R. J. 1992. Contandriopoulos and A. Aboucaya. IOPB chromosome data 4 18/19: 9-10.
- 장근정. 1992. 한국산 참나물속(*Pimpinella* L.) 식물의 분류학적 연구. 이학석사 학위논문. 강원대학교.

## Karyotyping Analysis and Bicolor FISH of *Pimpinella hallaisanensis*, an Endemic to Jeju Island

Soo-Young Kim, Chan-Soo Kim<sup>1</sup>, Jae-Hwa Tho<sup>1</sup> and Joongku Lee\*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806;

<sup>1</sup>Warm-Temperate Forest Research Center, Korea Forest Research Institute, Jeju  
697-050, Korea

Chromosome analysis using karyotyping and bicolor FISH were carried out in *Pimpinella hallaisanensis* which is one of the endemic plants in Jeju island of Korea. The somatic metaphase chromosomes number of this plant was  $2n=2x=22$  and the size of this chromosomes ranged from 3.58 to 5.82  $\mu\text{m}$ . The chromosome complements consisted of two pairs of metacentrics (chromosomes 1 and 2), four pairs of submetacentrics (chromosomes 3, 4, 6 and 8) and five pairs of subtelocentrics (chromosomes 5, 7, 9, 10 and 11). Using bicolor FISH, three pairs of 5S and four pairs of 45S rDNA loci were observed. Two pairs of 5S rDNA signals were detected on the end of the long arm of chromosome 4 and one pair of them were observed between long arm end and centromere. Another 45S rDNA signals were detected on the end of short arm of chromosome 4, 6, 10 and 11, respectively. Hence, the chromosome number reexamined using both conventional staining and FISH methods was different from previous report.

Key words: bicolor FISH, chromosome number, karyotyping, *Pimpinella hallaisanensis*, rDNAs

---

\*Corresponding Author: Phone +82-42-860-4284, joongku@kribb.re.kr

Received: 1 February 2008/Accepted: 24 March 2008