

白菜rDNA及 $C_{\theta}t-1$ DNA的荧光原位杂交及其核型分析

吴春红¹, 范双莉², 王力军^{3,*}

¹河南理工大学图书馆, 河南焦作454000; ²济源职业技术学院护理系, 河南济源459000; ³中国农业科学院油料作物研究所/油料作物生物学与遗传改良农业部重点实验室, 武汉430062

摘要: 以早熟白菜苔为实验材料, 从其基因组DNA中分离出 $C_{\theta}t-1$ DNA并用生物素标记作探针, 25S rDNA用地高辛标记作探针, 对有丝分裂中期相染色体进行双色荧光原位杂交。每对染色体上均显示出了特定的 $C_{\theta}t-1$ DNA荧光原位杂交带型, 5对染色体上显示出了25S rDNA荧光原位杂交带型。双色荧光原位杂交证实了 $C_{\theta}t-1$ DNA与25S rDNA二者具有一致的染色体位置特征, 表明基于rDNA及 $C_{\theta}t-1$ DNA的荧光原位杂交核型分析技术, 优于目前普遍采用的只基于rDNA的荧光原位杂交核型分析方法。结合 $C_{\theta}t-1$ DNA与25S rDNA的荧光原位杂交带型和传统的染色体的形态学标记分析方法及白菜已公布的基于rDNA分布的核型分析结果, 创建了一个精确的白菜核型。

关键词: 白菜; rDNA; $C_{\theta}t-1$ DNA; 荧光原位杂交; 核型分析

Fluorescence *in situ* Hybridization and Karyotyping Analysis of rDNA and $C_{\theta}t-1$ DNA in *Brassica campestris*

WU Chun-Hong¹, FAN Shuang-Li², WANG Li-Jun^{3,*}

¹Library of Henan Polytechnic University, Jiaozuo, Henan 454000, China; ²Nursing Department, Jiyuan Vocational and Technical College, Jiyuan, Henan 459000, China; ³Institute of Oil Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China

Abstract: With *Brassica campestris* cv. Zaoshu baicaitai as experimental material, $C_{\theta}t-1$ DNA was isolated from the genomic DNA and labeled with Biotin-Nick as a probe, while 25S rDNA was labeled with DIG-Nick. Fluorescence *in situ* hybridized to the mitotic metaphase chromosomes of *B. campestris* showed the specific fluorescence bands of $C_{\theta}t-1$ rDNA on each chromosome pair. However, the specific fluorescence bands of 25S rDNA were detected on 5 chromosome pairs. The dual fluorescence *in situ* hybridization confirmed the $C_{\theta}t-1$ DNA and rDNA had identical chromosome sites. And also the karyotyping technique based on a combination of rDNA and $C_{\theta}t-1$ DNA chromosome landmarks was superior to alone one. Based on a combination of rDNA sites, $C_{\theta}t-1$ DNA fluorescent bands, chromosome lengths and arm ratios, a more exact karyotype idiogram of *B. campestris* was described.

Key words: *Brassica campestris*; rDNA; $C_{\theta}t-1$ DNA; fluorescence *in situ* hybridization; karyotyping

当前, 以甘蓝(Ayele等2005)和白菜(Yang等2005)为代表的国际芸薹属植物基因组计划正在全球迅速展开。在植物基因组中研究最广泛的重复序列就是核糖RNA基因(rDNA)。通过荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术将rDNA在染色体上进行定位, 可以为核型分析提供有效的细胞学标记。人们已成功地利用FISH技术定位了小麦(徐川梅等2007)、大麦(赵丽娟等2005)及甘薯(安婷婷等2012)等的rDNA。芸薹属植物rDNA原位杂交进行核型分析也有很多成功的报道(Koo等2004; 轩淑欣等2007), 然而用rDNA作为染色体识别标记也有其致命弱点, 因为rDNA只分

布在物种的部分染色体上, 不容易鉴别出所有染色体。

$C_{\theta}t-1$ DNA是物种基因组中所有的高度重复序列及中度重复序列, 它的最佳长度为100~300 bp, 符合作为荧光原位杂交探针的条件。目前, 仓鼠和家鼠等动物已经有商品化的 $C_{\theta}t-1$ DNA, 绝大多数植物的 $C_{\theta}t-1$ DNA则由研究人员自己制备。

收稿 2014-01-26 修定 2014-06-25

资助 国家自然科学基金面上项目(30671312)。

致谢 感谢中国农业科学院油料作物研究所魏文辉博士及其实验室给予的技术和设备上的帮助。

* 通讯作者(E-mail: wanglijun@caas.cn; Tel: 027-86711930)。

$C_{\theta}t-1$ DNA作为探针在染色体上显带的技术在人类染色体研究中已有报道, 然而它在植物染色体研究中的应用却很少报道。Zwick等(1997)用山地棉(*Gossypium arboreum*) $C_{\theta}t-1$ DNA作为探针, 运用FISH技术对其在基因组的分布作了初步研究。Wei等(2005)和王太霞等(2006)利用FISH将 $C_{\theta}t-1$ DNA定位于甘蓝型油菜(*Brassica napus*)和甘蓝(*Brassica oleracea*)的中期染色体上, 利用其在染色体上杂交的带型首次构建了甘蓝型油菜和甘蓝每条染色体上都有杂交信号的核型, 开创了利用 $C_{\theta}t-1$ DNA显带对植物进行核型分析的先河。

白菜的rDNA FISH显带已有报道(Koo等2004; 轩淑欣等2007), 但 $C_{\theta}t-1$ DNA和rDNA的双色FISH显带还未见报道。本试验以 $C_{\theta}t-1$ DNA和25S rDNA的双色FISH为基础, 结合传统的染色体的形态学标记分析方法及白菜(Koo等2004)已公布的基于rDNA分布的核型分析结果, 创建一个精确的白菜核型。

材料与方法

1 实验材料与染色体制片

早熟白菜苔(*Brassica campestris* cv. Zaoshu baicaitai)购自市场。种子于室温下萌发生长, 取幼嫩花蕾用于制片, 幼叶用于提取基因组DNA并制备 $C_{\theta}t-1$ DNA。25S rDNA探针由波兰Silesia大学Robert Hasterok博士提供。

染色体制备参照魏文辉等(2000)及Wei等(2003)方法, 略有改动。取早熟白菜苔的幼嫩花蕾放于水中, 4 °C处理1~2 d。将处理好的材料放在卡诺氏固定液中4 °C过夜固定, 固定后用蒸馏水洗3~5次, 每次5 min。将蒸馏水洗过的材料在含1%的纤维素和果胶酶的混合溶液中28 °C酶解3 h, 火焰干燥法制片。制好的染色体制片可直接在Olympus CX-41相差显微镜下观察, 找到好的制片放于-20 °C保存备用。

2 基因组DNA抽提、处理及 $C_{\theta}t-1$ DNA分离

基因组DNA抽提参照Pierre和Laurence (1992)方法。

$C_{\theta}t-1$ DNA分离参照Zwick等(1997)、Wei等(2005)及魏文辉和王力军(1999)方法。用5 mol·L⁻¹ NaCl及无菌水将基因组DNA浓度调为100~500

ng·μL⁻¹, NaCl终浓度为0.3 mol·L⁻¹, 分装于1.5 mL Eppendorf管中, 每管总体积0.5 mL。121 °C下灭菌锅处理5或10 min, 以获得100~1 000 bp基因组DNA片段, 立即冰上放置。然后95 °C变性10 min, 冰上冷却10 s, 65 °C水浴复性。复性结束后, 冰上放置2 min, 取出50 μL进行短片段基因组DNA浓度的测量, 剩余的450 μL加入适量10×S1 buffer, 混合, 再加适量S1酶(每μg DNA加1 U S1酶), 37 °C水浴处理8 min后, 立即加入等体积Tris平衡酚抽提1次, 氯仿:异戊醇(24:1)抽提2次, 取上清, 加2.5倍体积无水乙醇-20 °C沉淀DNA, 过夜。离心, 干燥, 20 μL TE溶解; 琼脂糖凝胶电泳观察 $C_{\theta}t-1$ DNA提取的结果, 紫外分光光度计(Beckman)测定其浓度; -20 °C保存备用。

3 探针标记及荧光原位杂交与检测

早熟白菜苔 $C_{\theta}t-1$ DNA用生物素切刻平移试剂盒标记(Catalogue No. 11745824910; Roche), 25S rDNA用地高辛切刻平移试剂盒标记(Catalogue No. 11745816910; Roche)。原位杂交参照Wei等(2003)方法, 略微修改。首先将杂交液沸水浴10 min, 立即置于冰上, 放置0.5 h以上, 使双链DNA探针变性, 并且不能复性。将制备好的早熟白菜苔的染色体玻片标本于60 °C培养箱中烤片2~3 h; 取出玻片标本, 将其浸在70 °C的70%甲酰胺/2×SSC的变性液中变性2.5 min; 立即按顺序将标本经70%、95%和100%冰乙醇(均为-20 °C)系列脱水, 每次5 min, 然后空气干燥。将已变性的DNA探针杂交液60 μL, 滴于已变性并脱水的玻片标本上, 盖上24×50盖玻片, 放入含有2×SSC的保湿皿中, 90 °C置10 min; 将保湿皿放到室温, 当温度冷却至60~70 °C时, 放到37 °C培养箱中杂交16 h。次日, 将标本从37 °C温箱中取出, 在2×SSC中浸一下, 盖玻片将从载玻片上流下, 在室温, 转移到2×SSC染缸中15 min; 0.1×SSC染缸中15 min; 1×PBS染缸中15 min。此步骤有助于除去非特异性结合的探针, 从而降低本底。PBS未干时, 加入生物素标记的探针的一抗, 1×PBS/1% BSA 50 μL (含50×Streptavidin-Cy3 1 μL), 盖上盖玻片, 37 °C保湿皿30 min以上, 进行抗体结合; 然后去掉盖玻片, 在50 mL染缸中1×PBS洗涤3次, 每次5 min; PBS未干时, 加入生物素标记的探针的二抗, 1×PBS/1% BSA 50 μL (含

50×biotinylated anti-avidin 1 μL), 盖上盖玻片, 37 °C 保湿皿30 min以上, 进行抗体结合; 然后去掉盖玻片, 在50 mL染缸中1×PBS洗涤3次, 每次5 min; PBS未干时, 加入生物素标记的探针的三抗, 即一抗, 1×PBS/1%BSA 50 μL (含50×Streptavidin-Cy3 1 μL), 盖上盖玻片, 37 °C 保湿皿30 min以上; 然后去掉盖片, 在50mL染缸中1×PBS洗涤3次, 每次5 min; 然后进行地高辛的检测, 重复以上过程, 但抗体变为地高辛的抗体, 地高辛的一抗和三抗用的是羊抗-dig-FITC (FITC conjugated antidigoxigenin antibody from sheep), 二抗是兔抗羊-FITC (FITC conjugated anti-sheep IgG from rabbit)。

4 观察和拍照

当检测完毕后, 加入20 μL 2 μg·mL⁻¹ DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole), 盖上盖玻片, 用装有DFC300 CCD照相系统的Leica DM IRB荧光显微镜观察装片, 分别用紫外(UV)、蓝色(WB)和绿色(WG)激发滤光片观察DAPI染色、地高辛标记和生物素标记的杂交信号, 并将好的图片进行拍照保存。

5 核型分析

选取分散且染色体形态良好的中期分裂相, 洗出照片, 进行剪裁、测量, 按照李懋学和陈瑞阳(1985)的方法计算单倍基因组绝对长度、各染色体的相对长度[(染色体长度/单倍基因组总长度)×100%]和臂比(长臂/短臂)、染色体长度比(最长染色体长度/最短染色体长度), 确定各染色体的类型和核型不对称类型, 染色体按从长到短顺序排列。计算rDNA和*C₀t-1* DNA位点的百分距离[(杂交信号中点(或次缢痕)至着丝粒的长度/染色体臂总长度)×100%]。综合rDNA和*C₀t-1* DNA信号带和染色体测量数据绘制核型模式图。

实验结果

1 白菜基因组DNA抽提、处理及*C₀t-1* DNA分离

早熟白菜苔基因组DNA片段大小均在20 kb以上, 120 °C处理5或10 min后, 绝大部分基因组DNA片段在100~1 000 bp之间, 只有少数片段大于1 kb。制备的*C₀t-1* DNA片段基本上在1 kb以下(图1)。

2 核型分析

早熟白菜苔的染色体数目为20条, 共10对, 根

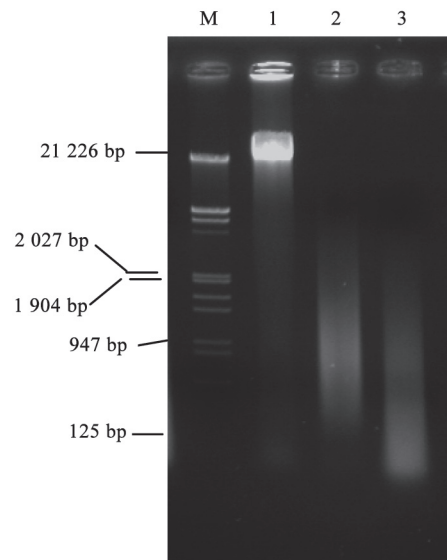


图1 早熟白菜苔*C₀t-1* DNA电泳结果

Fig. 1 *C₀t-1* DNA electrophoresis result of *B. campestris*
M: λDNA/*EcoRI*+*HindIII* marker; 1: 早熟白菜苔总基因组DNA; 2: 灭菌锅处理10 min的基因组DNA; 3: 制备的*C₀t-1* DNA。

据染色体长度和着丝点位置, 这10对常染色体包括9对中部着丝粒染色体和1对亚中部着丝粒染色体, 臂比大于2的染色体的百分比为10%, 最长染色体与最短染色体的比值为2.46, 染色体臂数是40条, 因此根据Stebbins的核型分类标准来划分, 早熟白菜苔的核型为2B型, 核型公式为 $2n=2x=20=18m+2sm$, 其基本臂数NF=40 (表1)。

3 荧光原位杂交

早熟白菜苔核型分析按照从长到短(不包括随体长度)的顺序排列。从图2-B可以看出, *C₀t-1* DNA在早熟白菜苔每对染色体上都有明显而强的荧光杂交带, 杂交信号带稳定, 位于第5号染色体的长臂, 第2、6、7和8号染色体短臂, 第1号染色体着丝粒和长臂位置, 第4号染色体着丝粒和短臂位置, 在第3、9和10号染色体长臂、短臂和着丝粒位置都有*C₀t-1* DNA杂交带(图2~4)。

25S rDNA位于第1、3和5号染色体长臂、第2号和第4号染色体短臂, 其中, 第2号和第3号染色体上的信号特别强, 25S rDNA几乎位于第2号染色体的整个短臂, 第1号染色体上的信号最弱(图2-C)。对应于25S rDNA的染色体上, 有*C₀t-1* DNA杂交带(图2-B), 但是*C₀t-1*杂交带的信号明显要弱。早熟白菜苔的双色荧光原位杂交结果进一步

表1 早熟白菜苔的染色体数据分析
Table 1 Data analysis of chromosome of *B. campestris*

染色体序号	相对长度/%			臂比(长臂/短臂)	染色体类型	着丝粒指数/%
	长臂	短臂	总长			
1	9.71	5.83	15.53	1.67	m	37.50
2	7.77	5.34	13.11	1.45	m	40.74
3	9.71	3.40	13.11	2.86	sm	25.93
4	6.31	5.34	11.65	1.18	m	45.83
5	5.83	4.85	10.68	1.20	m	45.45
6	5.34	4.37	9.71	1.22	m	45.00
7	3.88	3.40	7.28	1.14	m	46.67
8	3.40	2.91	6.31	1.17	m	46.15
9	3.88	2.43	6.31	1.60	m	38.46
10	3.40	2.91	6.31	1.17	m	46.15

显示25S rDNA所在位置也是C_{0t-1} DNA所在位置(图2-B~D)。

对图3的核型分析图进行测量计算(表2), C_{0t-1} DNA显带长度在染色体上分布最高的是10号染色体, 占所在染色体的69%, 分布最低的为6号染色体, 占所在染色体的25%; 3号染色体C_{0t-1} DNA相对长度最长, 为8.25, 8号染色体C_{0t-1} DNA相对长度最短, 为1.94; 从整体上看, C_{0t-1} DNA总显带长度占染色体总长度的比例为39.32%, 粗略估计出早熟白菜苔的基因组中高度及中度重复序列占基因组DNA的39.32%。25S rDNA显带长度在染色体上分布最高的是2号染色体, 占所在染色体的41%, 分布最低的为1号染色体, 占所在染色体的3%; 2号染色体25S rDNA相对长度最长, 为5.34, 1

号染色体25S rDNA相对长度最短, 为0.49; 从整体上看, 25S rDNA总显带长度占染色体总长度的比例为15.05%, 粗略估计出早熟白菜苔的25S rDNA占基因组DNA的15.05%。

基于传统的根据染色体长度和臂比值的分析, 以及C_{0t-1} DNA杂交带的位置和长度、25S rDNA的位置和长度, 对早熟白菜苔的核型进行了构建, 并根据其核型画出了其核型模式图(图4)。

讨 论

白菜的每一分裂相的所有染色体都具有C_{0t-1} DNA荧光杂交带, 带型稳定。同源染色体对应位置分布有相同或相近的重复序列, 而非同源染色体之间重复序列的分布存在位置与量上的差别,

表2 早熟白菜苔杂交带长度与染色体长度的比例

Table 2 Proportion of hybridization band length and chromosome length in *B. campestris* dual-color FISH

染色体序号	C _{0t-1} DNA显带			25S rDNA显带		
	C _{0t-1} DNA相对长度/%	C _{0t-1} DNA占所在染色体比例/%	C _{0t-1} DNA在染色体的位置	25S rDNA相对长度/%	25S rDNA占所在染色体比例/%	25S rDNA在染色体的位置
1	4.37	28	P, L	0.49	3	L
2	5.34	41	S	5.34	41	S
3	8.25	63	L, S, P	4.85	37	L
4	3.40	29	S, P	2.43	21	S
5	2.91	27	L	1.94	18	L
6	2.43	25	S			
7	3.40	47	S			
8	1.94	31	S			
9	2.91	46	L, S, P			
10	4.37	69	L, S, P			

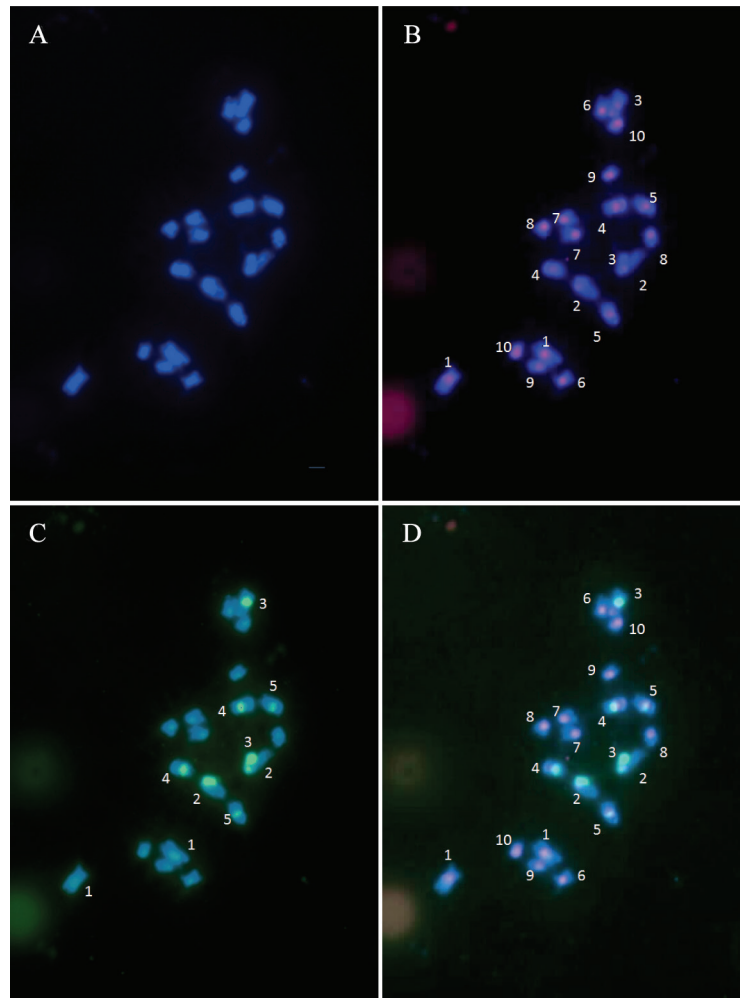


图2 早熟白菜苔有丝分裂中期染色体的25S rDNA及 C_{0t-1} DNA荧光原位杂交

Fig.2 FISH of the C_{0t-1} DNA and 25S rDNA probes to the mitotic metaphase chromosomes of *B. campestris*

A: 分裂相的DAPI染色图; B: C_{0t-1} DNA杂交结果; C: 25S rDNA杂交结果; D: C_{0t-1} DNA及25S rDNA双色荧光原位杂交结果; 其中红色为 C_{0t-1} rDNA信号, 绿色为25S rDNA信号; 图中数字代表染色体序号。标尺=5 μ m。

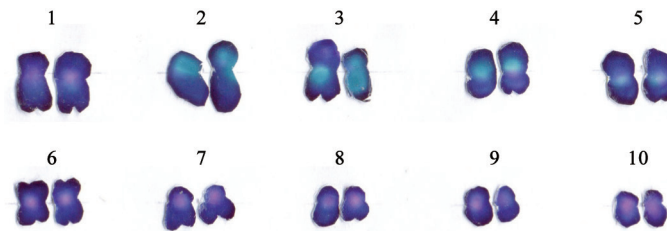


图3 早熟白菜苔的核型分析图

Fig.3 Karyotype of *B. campestris*

使得同源染色体 C_{0t-1} DNA荧光杂交带型相同或相似, 非同源染色体之间带型不同, 这是利用 C_{0t-1} DNA杂交带进行核型分析的基础。 C_{0t-1} DNA既然包含基因组中各种高度重复序列及中度重复序

列, 它就应该分布于白菜的整个染色体组, 在所有染色体上都应有杂交带, 杂交带可能位于着丝粒部位, 也可能位于染色体长臂或短臂, 我们的试验结果充分地证实了这一点。

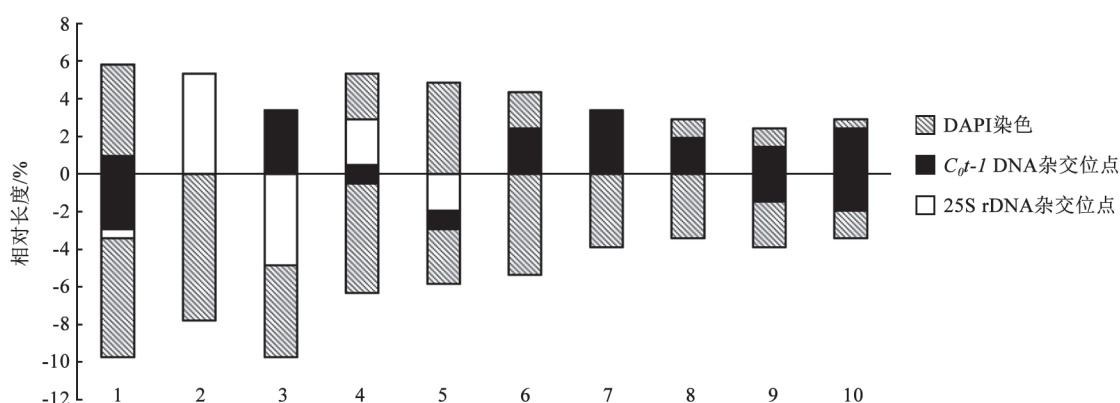


图4 早熟白菜苔核型模式图

Fig.4 Idiogram of *B. campestris*

$C_{\theta t-1}$ DNA是指一个物种的基因组中所有的高度重复序列及中度重复序列, rDNA是中度重复序列中的一种, 因此, 从一个物种基因组中分离得到的 $C_{\theta t-1}$ DNA就包含有rDNA。从理论上讲, 凡是能检测到rDNA杂交信号的位置就能检测出 $C_{\theta t-1}$ DNA杂交信号。在早熟白菜苔的双色FISH中, 发现了在有25S rDNA显带的地方也有 $C_{\theta t-1}$ DNA的杂交带, 并且在有25S rDNA显带的地方 $C_{\theta t-1}$ DNA杂交带相对较弱, 因为在杂交的过程中25S rDNA和 $C_{\theta t-1}$ DNA竞争杂交位点。这充分证明了 $C_{\theta t-1}$ DNA含有25S rDNA序列, 二者位置是一致的。

Koo等(2004)定位的3个重复序列(5S、45S rDNA和C11-350H)所在的染色体位置是第2号染色体的短臂, 第4和6号染色体的短臂和着丝粒位置, 第1、3、5、7、8、9和10号染色体的短臂、长臂和着丝粒。既然 $C_{\theta t-1}$ DNA为物种基因组中所有高度和中度重复序列, 这3个重复序列就应该被包含在 $C_{\theta t-1}$ DNA所在的带内, 但事实上它们并没有被包含在本实验所检测 $C_{\theta t-1}$ DNA位置内, 有一定的差别。我们推测, 重复序列的在染色体上的位置是不定的, 或者说重复序列在染色体的位置具有不确定性。

本实验检测到有5对染色体上有25S rDNA的杂交信号, 这与前人的研究结果相一致(Koo等2004), 但Koo等(2004)定位的45S rDNA位于第1、2、4和5号染色体的短臂和着丝粒位置及第7号染色体的长臂, 和本实验所检测的位置有所不同, 强弱也有不同。我们推测rDNA位置存在种间差异,

或rDNA位点具有不确定性(Weiss等2000)。

我们精确地确定了各个 $C_{\theta t-1}$ DNA和25S rDNA位点在染色体上的位置, 并得出了各位点间的相对距离, 识别染色体时, $C_{\theta t-1}$ DNA结合rDNA的双色荧光原位杂交技术比使用二者之一的单色荧光原位杂交技术更为可靠。结合白菜已公布的基于rDNA分布的核型分析结果(Koo等2004)、染色体长度与臂比及25S rDNA与 $C_{\theta t-1}$ DNA的杂交位置和带型, 鉴定了白菜的全部10对染色体, 获得了早熟白菜苔的所有染色体都有荧光杂交带型的核型分析图(图3), 并画出了基于 $C_{\theta t-1}$ DNA和25S rDNA荧光带型的核型模式图(图4), 这比目前使用的其它方法更能准确地识别白菜的所有染色体, 而且简单快速。

参考文献

- 安婷婷, 汤佳立, 孙健英, 曹清河, 马代夫, 李宗芸(2012). 甘薯栽培种及其近缘野生种的DAPI核型及rDNA-FISH分析. 西北植物学报, 32 (4): 682~687
- 李懋学, 陈瑞阳(1985). 关于植物核型分析的标准化问题. 武汉植物学研究, 3 (4): 297~302
- 王太霞, 吴春红, 黄进勇, 魏文辉(2006). 甘蓝rDNA及 $C_{\theta t-1}$ DNA荧光原位杂交及其核型分析. 武汉大学学报, 52 (2): 230~234
- 魏文辉, 覃瑞, 宋运淳, 郭乐群, 谷明光(2000). 玉米×二倍体多年生类玉米后代的GISH分析. 武汉大学学报(自然科学版), 46 (6): 745~750
- 魏文辉, 王力军(1999). 植物 $C_{\theta t-1}$ DNA的快速制备方法. 湖北民族学院学报(自然科学版), 17 (4): 7~10
- 轩淑欣, 申书兴, 赵建军, 张成合, 陈雪平, 鄯丽娟(2007). 25S rDNA和5S rDNA在大白菜中期染色体上的FISH定位. 中国农业科学, 40 (4): 782~787

- 徐川梅, 别同德, 王春梅, 周波, 陈佩度(2007). 45S rDNA在小麦及其近缘物种染色体上的分布. 遗传, 29 (9): 1126~1130
- 赵丽娟, 李立家, 覃瑞, 熊怀阳, 宋运淳(2005). 大麦45S和5S rDNA定位及5S rDNA伸展纤维的FISH分析. 武汉植物学研究, 23 (1): 15~19
- Ayele M, Haas BJ, Kumar N, Wu H, Xiao Y, Van Aken S, Utterback TR, Wortman JR, White OR, Town CD (2005). Whole genome shotgun sequencing of *Brassica oleracea* and its application to gene discovery and annotation in *Arabidopsis*. Genome Res, 15: 487~495
- Koo DH, Plaha P, Lim YP, Hur YK, Bang JW (2004). A high-resolution karyotype of *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* revealed by pachytene analysis and multicolor fluorescence *in situ* hybridization. Theor Appl Genet, 109: 1346~1352
- Linares C, Gonzalez J, Ferrer E, Fominaya A (1996). The use of double FISH to physically map the positions of 5S rDNA genes in relation to the chromosomal location of 18S-5.8S-26S rDNA and a C genome specific DNA sequence in the genus *Avena*. Genome, 39: 535~542
- Pierre G, Laurence MD (1992). Isolation of plant DNA: a fast, inexpensive, and reliable method. Plant Mol Biol Rep, 10 (1): 60~65
- Wei WH, Zhao WP, Song YC, Liu LH, Guo LQ, Gu MG (2003). Genomic *in situ* hybridization analysis for identification of introgressed segments in alloplasmic lines from *Zea mays*×*Zea diploperennis*. Hereditas, 138: 21~26
- Wei WH, Zhao WP, Wang LJ, Chen B, Li YC, Song YC (2005). Karyotyping of *Brassica napus* L. based on *C₀t-1* DNA banding by fluorescence *in situ* hybridization. J Integr Plant Biol, 47: 1479~1484
- Weiss H, Maluszynska J (2000). Chromosomal rearrangement in autotetraploid plants of *Arabidopsis thaliana*. Hereditas, 133 (3): 255~261
- Yang TJ, Kim JS, Lim KB, Kwon SJ, Kim JA, Jin M, Park JY, Lim MH, Kim HI, Kim SH et al (2005). The Korea *Brassica* genome project: a glimpse of the *Brassica* genome based on comparative genome analysis with *Arabidopsis*. Comp Funct Genome, 6: 138~146
- Zwick MS, Hanson RE, McKnight TD, Islam Faridi MN, Stelly DM, Wing RA, Price HJ (1997). A rapid procedure for the isolation of *C₀t-1* DNA from plants. Genome, 40: 138~142