



IDENTIFIKASI KROMOSOM HOMOLOG MELALUI DETEKSI NUCLEOLUS ORGANIZER REGIONS DENGAN PEWARNAAN AgNO_3 PADA TANAMAN BAWANG MERAH

Homologous Chromosomes Identification Revealed by Silver-Stained Nucleolus Organizer Regions in Shallot

Andin Puspita¹, Agus Budi Setiawan², Aziz Purwantoro^{2*}, Endang Sulistyaningsih²

¹Program Studi Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jalan Flora Bulaksumur Yogyakarta 55281 Indonesia

²Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jalan Flora Bulaksumur Yogyakarta 55281 Indonesia

*Email: azizp@ugm.ac.id

ABSTRACT

Generally, the standard procedure for karyotype analysis of shallot is sorted by chromosome sizes. Therefore, the identification of homologous chromosomes is difficult without using a specific probe. Nucleolus Organizing Regions (NORs) can be used as a probe for precise identification of homologous chromosomes. However, the use of NORs for plant karyotyping in Indonesia is poorly investigated. In this study, shallot chromosomes were prepared using modified Carnoy's solution II, fixed in Carnoy's solution, and stained by using aceto-carmine and AgNO_3 for detecting NORs. Chromosome images were analyzed by CHIAS IV. One locus NOR bearing chromosome pair was detected at metaphase and interphase, and it was located at short arms of subtelomeric chromosome number 6. NORs can be used as a probe for precise identification of homologous chromosomes in shallot. Therefore, this technique has the potential to be applied on species closely related to shallot and on other plant species.

Keywords: AgNO_3 , chromosome condensation, NORs, shallot chromosome, shallot karyotype

ABSTRAK

Prosedur kariotipe untuk bawang merah umumnya masih disusun berdasarkan ukuran kromosom, sehingga diperlukan suatu penanda yang dapat mengidentifikasi kromosom homolog secara presisi. Identifikasi kromosom homolog secara presisi menggunakan suatu penanda, khususnya deteksi *Nucleolus Organizing Regions* (NORs), yang di Indonesia masih jarang dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk membuat kariotipe dan mengidentifikasi kromosom homolog bawang merah melalui deteksi NORs menggunakan metode pewarnaan AgNO_3 . Proses fiksasi akar dilakukan dengan menggunakan modifikasi larutan Carnoy II, lalu difiksasi dengan larutan Carnoy, dan kromosom diwarnai dengan aceto-carmine dan larutan AgNO_3 untuk mendeteksi NORs. Selanjutnya, citra kromosom dianalisis menggunakan CHIAS IV. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat sepasang NORs yang terdeteksi pada fase metafase dan interfase yang terletak pada bagian lengan pendek di kromosom subtelosentrik nomor 6. Hasil dari penelitian ini dapat dijadikan sebagai dasar di bidang sitogenetika bawang merah untuk mengidentifikasi kromosom homolog secara presisi menggunakan penanda NOR. Oleh karenanya, teknik ini dapat diaplikasikan pada spesies yang berdekatan dengan bawang merah dan komoditas tanaman lainnya.

Kata Kunci: AgNO_3 , kariotipe bawang, kondensasi kromosom, kromosom bawang, NORs

PENDAHULUAN

Bawang merah termasuk ke dalam genus *Allium*, subfamilia *Allioideae* (*Amaryllidaceae*) (APG 2016), merupakan salah satu genus terbesar dari kelompok monokotil yaitu ~920 spesies, dan merupakan tanaman yang memiliki nilai ekonomi yang penting di dunia pertanian (Herden et al. 2016, Shigyo et al. 2018). Tanaman bawang merah umumnya diploid dengan jumlah kromosom 16 ($2n = 2 \times = 16$) (Firbas and Amon 2014). Bawang merah merupakan tanaman komoditas hortikultura yang sangat penting di Indonesia. Penelitian tanaman bawang merah telah banyak dilakukan oleh para peneliti dunia maupun Indonesia dalam bidang sitogenetika (Sulistyaningsih et al. 2002, Budylin et al. 2014, Kirov et al. 2014, Mancia et al. 2015, Khrustaleva et al. 2019, Kudryavtseva et al. 2019) dan genetika molekuler (Major et al. 2018, Herlina et al. 2019, Xie et al. 2019).

Pembuatan kariotipe merupakan suatu proses penyusunan pasangan kromosom dari suatu organisme menggunakan metode pengecatan yang baku, bertujuan untuk mengungkap karakteristik struktur kromosom (O'Connor 2008). Salah satu tahapan penting dari pembuatan kariotipe adalah penentuan kromosom homolog secara tepat. Dewasa ini, penelitian sitogenetika tanaman di Indonesia, khususnya kariotipe kromosom masih menggunakan pendekatan konvensional, yaitu penyusunan kromosom berdasarkan ukuran kromosom dari besar-kecil. Analisis kromosom dan kariotipe bawang merah telah dilakukan oleh Anggarwulan et al. (1999) dan Setyowati et al. (2013), tetapi penentuan pasangan kromosom homolog masih manual tidak menggunakan suatu penanda yang spesifik.

Nukleolus merupakan struktur yang paling mencolok di dalam nukleus sel serta merupakan tempat untuk transkripsi RNA ribosom (rRNA), pengolahan pre-RNA, dan sintesis subunit ribosom (Kalinina et al. 2018, Bersaglieri dan Santoro 2019). NORs (*Nucleolus Organizing Regions*) merupakan wilayah kromosom yang terdiri dari sekuen berulang dari gen ribosomal RNA (rRNA) di nukleus. NORs merupakan lokus untuk gen 45S ribosomal DNA (rDNA), yang terdiri dari unit transkripsi 18S, 5,8S dan 25S-28S yang disusun secara tandem di dalamnya

(Huang et al. 2012). Selain terkait dengan sintesis ribosom, NORs juga diduga memiliki fungsi lain yang sangat kompleks terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman, seperti tanggapan terhadap cekaman abiotik dan biotik (Kalinina et al. 2018). Bahkan, hasil penelitian menunjukkan bahwa NORs berperan terhadap berbagai aspek biologi sel seperti diferensiasi, pengaturan siklus sel, penuaan (*senescence*), *gene silencing*, aktivitas telomerase, dan sintesis berbagai jenis ribonucleoprotein (RNP) (Greco 2009, Taliansky et al. 2010, Stępiński 2014, Lafontaine 2015, Weis et al. 2015).

NORs dapat divisualisasikan pada kromosom dengan pengecatan perak menggunakan larutan perak nitrat (AgNO_3). NORs aktif akan tervisualisasi jika diberi pewarnaan perak (Schubert 1984). Pada saat metafase, NORs yang aktif memiliki morfologi yang paling gelap (*condensed*) dibandingkan daerah kromosom yang lain (McStay 2016). Pengecatan NORs telah banyak dilakukan pada beberapa spesies tanaman *Allium* (Maragheh et al. 2019), tanaman species *Capsicum* (Scaldeferro dan Moscone 2019), *Amaryllidaceae* (Jara-Seguel et al. 2012), tanaman gandum (Arabbeigi et al. 2011), spesies kerabat tanaman lidah buaya familia *Asphodelaceae* (Sánchez-G et al. 2018), tanaman rerumputan spesies *Spartina pectinata* (Kim et al. 2015) dan serangga (Maryanska-Nadachowska et al. 2018).

Masih minimnya penggunaan suatu penanda untuk kariotipe tanaman di Indonesia, maka deteksi NORs dengan pewarnaan perak penting dilakukan guna menunjang keberhasilan kariotipe tanaman secara presisi. Pengecatan perak merupakan salah satu metode sitogenetika yang digunakan untuk menentukan jumlah, ukuran, dan distribusi NORs pada fase metafase dan interfase (Kim et al. 2015). Deteksi NORs relatif mudah, murah dan efisien dibandingkan dengan teknologi *fluorescence in situ hybridization* yang relatif lebih mahal meskipun lebih presisi karena menggunakan suatu penanda spesifik seperti 45S rDNA yang telah dilabeli dengan suatu fluorochrome, seperti yang dilakukan pada tanaman species *Allium* (Kirov et al. 2014, Mancia et al. 2015, Maragheh et al.

2019), melon (Setiawan et al. 2018a), mentimun (Wibowo et al. 2018), dan *Jatropha curcas* (Muakrong et al. 2018). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kromosom homolog tanaman bawang merah dengan pengecatan perak untuk membantu pembuatan kariotipe kromosom bawang merah secara presisi.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Genetika dan Pemuliaan Tanaman, Departemen Budidaya Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan dari bulan Januari 2018 sampai dengan bulan Januari 2019.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah akar tanaman *Allium cepa* L. Aggregatum group varietas Tiron asal Bantul D.I. Yogyakarta, larutan asam asetat, AgNO₃, sodium sitrat, aquades. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *petri dish*, *moisture chamber*, mikroskop (Olympus CX21FS1), kamera optilab.

Metode

Penelitian dilakukan dengan mengambil sampel ujung akar dari umbi bawang merah (*Allium cepa* L. Aggregatum group) yang telah dikecambahkan (Gambar 1A dan B). Akar yang dipilih adalah bagian ujung sel meristematis yang masih aktif (Gambar 1C). Pengambilan akar dilakukan



Gambar 1. Preparasi akar bawang merah untuk pengamatan kromosom. Tanaman bawang merah utuh yang tumbuh di media perkecambahan yang berisi air (A). Media perkecambahan untuk menumbuhkan akar bawang merah asal umbi (B). Morfologi akar bawang merah hasil perkecambahan dari umbi (C), akar bawang merah yang memiliki sel meristematis aktif (mata panah), akar bawang merah yang putus tidak memiliki sel meristematis yang aktif (panah)

pukul 08.00–08.30 WIB. Ujung akar difiksasi menggunakan metode modifikasi larutan Carnoy II sesuai dengan metode Setiawan et al. (2018b). Akar direndam larutan etanol: asam asetat : kloroform dengan perbandingan 6:3:1 selama 3 jam pada suhu ruang. Sampel kemudian difiksasi dengan larutan etanol : asam asetat dengan perbandingan 3:1 selama 1–5 hari. Sampel kemudian dicuci dengan aquades sebanyak 3 kali.

Sampel akar direndam dalam larutan aceto-carmine selama minimal 15 menit. Sampel akar dipotong dan ditetesi dengan 15 μ L asam asetat 60%. Preparat kromosom diletakkan di atas kaca objektif dan ditutup dengan kaca penutup lalu di-*squeeze*. Jika preparat kromosom dengan fase metafase yang menyebar sudah diperoleh, maka kaca preparat disimpan di *freezer* -70°C selama semalam. Kaca penutup kemudian dicongkel menggunakan silet dan ditetesi asam asetat 60% dan dikeringkan diatas panas api bunsen beberapa detik. Proses ini dilakukan 2–3 kali hingga warna merah pada preparat pudar. Pembuatan larutan silver berdasarkan metode Goodpasture dan Bloom (1975) dengan beberapa modifikasi. Diawali dengan pembuatan larutan buffer 0,02 g sodium sitrat dalam 500 mL aquades dengan air yang diberi asam formik sehingga memiliki pH 4. Selanjutnya, 1 mL larutan buffer dan 0,5 g AgNO_3 ditambahkan ke dalam *microtube*, dan divortex hingga homogen. Preparat yang sudah siap ditetesi 15 μ L larutan perak, ditutup kaca penutup, dan disimpan dalam *moisture chamber* serta diinkubasi pada suhu 60°C selama 1,5 jam. Preparat diamati di

bawah mikroskop dengan perbesaran $40\times$. Citra kromosom kemudian diambil dengan menggunakan kamera *optilab*.

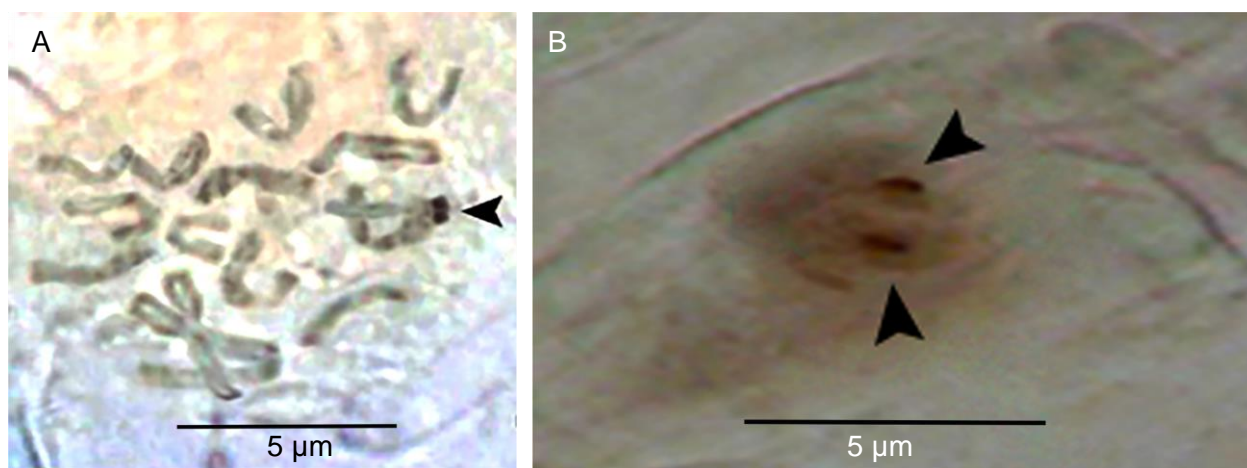
Pola kondensasi dari citra kromosom dianalisis menggunakan CHIAS IV (*Chromosome Image Analysis*) (Kato et al. 2009) dan Adobe photoshop CS6. Variabel kuantitatif yang diamati meliputi: jumlah kromosom, ukuran kromosom (lengan panjang dan pendek), bentuk kromosom berdasarkan ukuran relatif terhadap rasio lengan panjang dan pendek, kariogram, dan ideogram. Klasifikasi bentuk kromosom mengikuti metode Levan et al. (1964).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi NORs kromosom

Proses pembuatan kariotipe kromosom tanaman diawali dengan mengidentifikasi kromosom homolog. Ketidaksesuaian dalam menentukan pasangan kromosom homolog berakibat pada kesalahan membuat kariotipe kromosom suatu tanaman. Penggunaan penanda dapat mengatasi permasalahan tersebut, dan salah satu penanda yang dapat digunakan adalah NORs yang terletak pada lekukan sekunder (*secondary constriction*) pada kromosom. NORs merupakan tempat sel memproduksi ribosom (Pederson 2011), 60% dari total transkripsi RNA di dalam sel adalah hasil dari DNA ribosom (Shaw dan Brown 2012, Shaw 2013).

Hasil pengecatan NORs pada kromosom metafase dan interfase bawang merah menunjukkan bahwa satu pasang kromosom memiliki 1 lokus NORs (Gambar 2A dan B). Bawang merah memiliki dua satelit



Gambar 2. Pengecatan NORs kromosom bawang merah pada fase metafase (A) dan interfase (B). Tanda mata panah (hitam) menunjukkan NORs aktif yang diwarnai dengan AgNO_3 .

Tabel 1. Ukuran dan bentuk kromosom *Allium cepa* L. Aggregatum group

Nomor Kromosom	Lengan Panjang (µm)	Lengan Pendek (µm)	Panjang Kromosom (µm)	Rasio Lengan Kromosom	Bentuk Kromosom
1a	2,83	1,90	4,73	1,49	metasentrik
1b	2,63	2,07	4,69	1,27	metasentrik
2a	2,17	1,87	4,03	1,16	metasentrik
2b	2,47	2,10	4,57	1,17	metasentrik
3a	2,10	2,10	4,20	1,00	metasentrik
3b	2,13	2,10	4,23	1,01	metasentrik
4a	2,63	1,47	4,09	1,79	submetasentrik
4b	3,13	1,27	4,39	2,47	submetasentrik
5a	2,50	1,40	4,00	1,79	submetasentrik
5b	2,77	1,43	4,19	1,93	submetasentrik
6a	4,50	1,43	4,57	3,14	subtelosentrik
6b	4,00	1,27	3,97	3,16	subtelosentrik
7a	2,43	2,20	4,63	1,11	metasentrik
7b	2,10	1,97	4,07	1,07	metasentrik
8a	1,90	1,40	3,30	1,36	metasentrik
8b	2,03	1,37	3,39	1,49	metasentrik

(NORs) aktif yang terletak pada bagian lengan pendek pada kromosom subtelosentrik nomor 6 (Gambar 2A dan 3A). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat 1 lokus gen ribosom yang aktif pada bawang merah. Hasil ini sesuai dengan penelitian Schubert dan Wobus (1985) pada tanaman spesies *Allium*. Gen yang berasosiasi dengan NORs terdeteksi melalui pengecatan spesifik menggunakan perak sehingga posisi NORs pada kromosom dapat divisualisasi. Hal ini disebabkan karena protein yang berasosiasi dengan gen ribosom di NORs bersifat *argyrophilic*, yang dapat bereaksi dengan perak seperti yang umumnya muncul pada sel interfase (Goodpasture dan Bloom 1975). Deteksi NORs menggunakan perak sangat membantu untuk mengidentifikasi kromosom homolog suatu spesies tanaman. Umumnya pewarnaan kromosom menggunakan aceto-carmine dan *giemsa* hanya dapat menampilkan posisi lekukan utama (*primary constriction*) yang berasosiasi dengan sentromer (Stack dan Comings 1979), sementara lekukan sekunder sulit terdeteksi. Selain itu, jumlah lokus NORs pada tanaman tergantung spesies dan kultivar, seperti kariotipe mentimun menggunakan gen penanda 45S rDNA yang dilakukan oleh Wibowo et al. (2018) menunjukkan adanya

perbedaan jumlah NORs pada berbagai aksesori mentimun berkisar 8–10 lokus, sementara pada bawang bombay, terdapat dua lokus gen 45S rDNA (Mancia et al. 2015). NORs dapat digunakan sebagai penanda untuk mengidentifikasi kromosom homolog tidak hanya pada tanaman bawang merah atau kerabat liarnya tetapi dapat diaplikasikan pada semua spesies tanaman. Menurut Rosato et al. (2016), NORs berasosiasi dengan gen 45S rDNA yang bersifat lestari di semua organisme (*conserve*), gen ini berfungsi untuk sintesis ribosom dan nucleolus, menjaga stabilitas genom, dan mengatur berbagai jenis ekspresi gen di dalam genom.

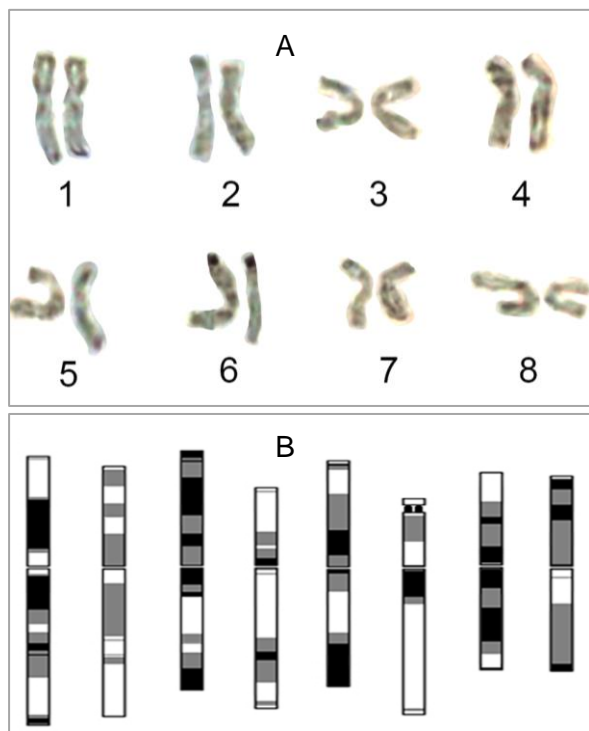
Kariotipe dan ideogram

Setiap kromosom homolog bawang merah memiliki ukuran yang berbeda-beda. Hal ini berimplikasi kepada penentuan bentuk kromosom berdasarkan ukuran relatif rasio lengan panjang-pendek. Tabel 1 menunjukkan bahwa bawang merah yang diuji merupakan tanaman diploid dengan jumlah kromosom sebanyak 8 pasang ($2n = 2 \times = 16$), dengan formula $2n = 5M + 2SM + 1ST$. Kromosom nomor 1, 2, 3, 7, dan 8 memiliki bentuk metasentrik, kromosom 4 dan 5 berbentuk submetasentrik, dan

pasangan kromosom 6 dengan bentuk subtelosentrik. Kromosom nomor 8 memiliki ukuran kromosom terpendek (3,30 μm) dan kromosom nomor 1 memiliki ukuran kromosom terpanjang (4,73 μm). Menurut Sulistyarningsih et al. (2002), formula kromosom bawang merah adalah $2n = 4M + 3SM + 1ST$, sementara menurut Mukherjee dan Roy (2012) adalah $2n = 7M + 1ST$. Perbedaan formula tersebut dapat disebabkan oleh tidak adanya penggunaan penanda sentromer seperti yang telah dilakukan oleh Nagaki et al. (2012). Sentromer merupakan dasar bagi penentuan bentuk kromosom dan salah satu faktor yang menentukan dalam kariotipe. Pada saat pembuatan preparat kromosom tidak semua sel dapat menunjukkan adanya lekukan utama (*primary constriction*) di kromosom. Selain itu, ketelitian peneliti dalam melakukan teknik *squeeze* juga sangat menentukan untuk memperoleh metafase atau prometafase dengan posisi sentromer yang jelas. Disamping itu, pada beberapa spesies tanaman, sentromer sangat sulit ditentukan tanpa menggunakan suatu penanda yang spesifik karena ukuran kromosom yang kecil dan nampak tebal (*condensed*) sehingga posisi sentromer tidak dapat ditentukan

secara visual, seperti pada tanaman melon dan *Abelia* \times *grandiflora* (Setiawan et al. 2018a, Setiawan et al. 2018b).

Hasil kariogram menunjukkan bahwa satu pasang kromosom homolog dapat diidentifikasi secara presisi dengan adanya NORs sebagai penanda yang terletak pada kromosom nomor 6 (Gambar 3A). Selanjutnya, sebuah ideogram dibuat berdasarkan pola kondensasi dari citra kromosom yang diperoleh menggunakan CHIAS IV. Dengan teknik ini, peta kromosom secara kuantitatif pada bawang merah berhasil dibuat dengan mengkombinasikan hasil analisis kualitatif dari deteksi NORs (Gambar 3B). Hasil ini menunjukkan bahwa setiap nomor kromosom bawang merah memiliki karakteristik yang berbeda. Hasil ini sesuai dengan penelitian pada beberapa spesies tanaman seperti padi (Ohmido et al. 2018), teh (Furukawa et al. 2017), dan *Pueraria lobata* (Ohmido et al. 2013) yang telah menggunakan CHIAS sebagai alat untuk membuat peta kromosom secara kuantitatif. Melalui deteksi NORs dan analisis citra kromosom menggunakan CHIAS IV, karakteristik tiap nomor kromosom dapat ditentukan secara spesifik.



Gambar 3. Kariogram (A) dan ideogram berdasarkan pola kondensasi (B) kromosom bawang merah.

KESIMPULAN

NORs dapat digunakan sebagai penanda untuk identifikasi kromosom homolog bawang merah secara presisi. NORs terletak pada lengan pendek dari tipe kromosom subtelosentrik nomor 6 dengan jumlah 1 lokus. Formula kariotipe kromosom bawang merah adalah $2n = 5M + 2SM + 1ST$.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggarwulan E, Etikawati N, Setyawan AD (1999) Karyotipe kromosom pada tanaman bawang budidaya (Genus *Allium*; Familia Amaryllidaceae). BioSmart 1:13–19
- APG (2016) An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. The angiosperm phylogeny group. Bot J Linn Soc 181:1–20. doi: 10.1111/boj.12385
- Arabbeigi M, Arzani A, Saeidi G (2011) Study of karyotype and nucleolar organizer regions (NORs) in wild, synthetic and

- cultivated wheats. Emir J Food Agric 23:196–203. doi: 10.9755/ejfa.v23i2.6457
- Bersaglieri C, Santoro R (2019) Genome organization in and around the nucleolus. Cells 8:E579. doi: 10.3390/cells8060579
- Budylin MV, Kan LY, Romanov VS, Khrustaleva LI (2014) GISH study of advanced generation of the interspecific hybrids between *Allium cepa* L. and *Allium fistulosum* L. with relative resistance to downy mildew. Russ J Genet 50:387–394. doi: 10.1134/S1022795414040036
- Firbas P, Amon T (2014) Chromosome damage studies in the onion plant *Allium cepa* L. Caryologia 67:25–35. doi: 10.1080/00087114.2014.891696
- Furukawa K, Sugiyama S, Ohta T, Ohmido N (2017) Chromosome analysis of tea plant (*Camellia sinensis*) and ornamental camellia (*Camellia japonica*). Chromosome Sci 20:9–15. doi: 10.11352/scr.20.9
- Goodpasture C, Bloom SE (1975) Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma 53:37–50. doi: 10.1007/BF00329389
- Greco A (2009) Involvement of the nucleolus in replication of human viruses. Rev Med Virol 19:201–214. doi: 10.1002/rmv.614
- Herden T, Hanelt P, Friesen N (2016) Phylogeny of *Allium* L. subgenus *Anguinum* (G. Don. ex W.D.J. Koch) N. Friesen (Amaryllidaceae). Mol Phylogenet Evol 95:79–93. doi: 10.1016/j.ympev.2015.11.004
- Herlina L, Reflinur, Sobir, Maharijaya A, Wiyono S (2019) The genetic diversity and population structure of shallots (*Allium cepa* var. *aggregatum*) in Indonesia based on R gene-derived markers. Biodiversitas 20:696–703. doi: 10.13057/biodiv/d200312
- Huang M, Li H, Zhang L, Gao F, Wang P, Hu Y, Yan S, Zhao L, Zhang Q, Tan J, Liu X, He S, Li L (2012) Plant 45S rDNA clusters are fragile sites and their instability is associated with epigenetic alterations. PLoS One 7:e35139. doi: 10.1371/journal.pone.0035139
- Jara-Seguel P, Palma-Rojas C, Contreras J, von Brand E (2012) Chromosome localisation of nucleolar organizer region in *Rhodophiala bagnoldii* (Herb.) Traub (Asparagales: Amaryllidaceae) determined by silver nitrate staining. Gayana Bot 69:201–203. doi: 10.4067/s0717-66432012000100023
- Kalinina NO, Makarova S, Makhotenko A, Love AJ, Taliensky M (2018) The multiple functions of the nucleolus in plant development, disease and stress responses. Front Plant Sci 9:132. doi: 10.3389/fpls.2018.00132
- Kato S, Ohmido N, Hara M, Kataoka R, Fukui K (2009) Image analysis of small plant chromosomes by using an improved system, CHIAS IV. Chromosome Sci 12:43–50
- Khrustaleva L, Mardini M, Kudryavtseva N, Alizhanova R, Romanov D, Sokolov P, Monakhos G (2019) The power of genomic in situ hybridization (GISH) in interspecific breeding of bulb onion (*Allium cepa* L.) resistant to downy mildew (*Peronospora destructor* [Berk.] Casp.). Plants 8:E36. doi: 10.3390/plants8020036
- Kim S, Lee DK, Rayburn AL (2015) Analysis of active nucleolar organizing regions in polyploid prairie cordgrass (*Spartina pectinata* Link) by silver staining. Cytologia 80:249–258. doi: 10.1508/cytologia.80.249
- Kirov I, Divashuk M, Van Laere K, Soloviev A, Khrustaleva L (2014) An easy “SteamDrop” method for high quality plant chromosome preparation. Mol Cytogenet 7:21. doi: 10.1186/1755-8166-7-21
- Kudryavtseva N, Havey MJ, Black L, Hanson P, Sokolov P, Odintsov S, Divashuk M, Khrustaleva L (2019) Cytological evaluations of advanced generations of interspecific hybrids between *Allium cepa* and *Allium fistulosum* showing resistance to *Stemphylium vesicarium*. Genes (Basel) 10:E195. doi: 10.3390/genes10030195
- Lafontaine DLJ (2015) Noncoding RNAs in eukaryotic ribosome biogenesis and function. Nat Struct Mol Biol 22:11–19. doi: 10.1038/nsmb.2939
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52:201–220. doi: 10.1111/j.1601-

5223.1964.tb01953.x

- Major N, Goreta Ban S, Urlić B, Ban D, Dumičić G, Perković J (2018) Morphological and biochemical diversity of shallot landraces preserved along the Croatian coast. *Front Plant Sci* 9:1749. doi: 10.3389/fpls.2018.01749
- Mancia FH, Sohn SH, Ahn YK, Kim DS, Kim JS, Kwon YS, Kim CW, Lee TH, Hwang YJ (2015) Distribution of various types of repetitive DNAs in *Allium cepa* L. based on dual color FISH. *Hortic Environ Biotechnol* 56:793–799. doi: 10.1007/s13580-015-1100-3
- Maragheh FP, Janus D, Senderowicz M, Haliloglu K, Kolano B (2019) Karyotype analysis of eight cultivated *Allium* species. *J Appl Genet* 60:1–11. doi: 10.1007/s13353-018-0474-1
- Maryanska-Nadachowska A, Kuznetsova VG, Golub NV, Anokhin BA (2018) Detection of telomeric sequences and ribosomal RNA genes in holokinetic chromosomes of five jumping plant-lice species: First data on the superfamily Psylloidea (Hemiptera: Sternorrhyncha). *Eur J Entomol* 115:632–640. doi: 10.14411/eje.2018.061
- McStay B (2016) Nucleolar organizer regions: genomic ‘dark matter’ requiring illumination. *Genes Dev* 30:1598–1610. doi: 10.1101/gad.283838.116
- Muakrong N, Kikuchi S, Fukuhara S, Tanya P, Srinives P (2018) Two jatropha karyotypes constructed from meiotic pachytene chromosomes: Pericentric distribution of heterochromatin and variation in repetitive DNAs. *PLoS One* 13:e0208549. doi: 10.1371/journal.pone.0208549
- Mukherjee A, Roy S (2012) Karyotype analysis of five species of *Allium*. *Ind J Fundam Appl Life Sci* 2:374–383
- Nagaki K, Yamamoto M, Yamaji N, Mukai Y, Murata M (2012) Chromosome dynamics visualized with an anti-centromeric histone H3 antibody in *Allium*. *PLoS One* 7:e51315. doi: 10.1371/journal.pone.0051315
- O’Connor C (2008) Karyotyping for chromosomal abnormalities. *Nat Educ* 1:27
- Ohmido N, Iwata A, Kato S, Wako T, Fukui K (2018) Development of a quantitative pachytene chromosome map and its unification with somatic chromosome and linkage maps of rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS One* 13:e0195710. doi: 10.1371/journal.pone.0195710
- Ohmido N, Shimoura A, Kato S, Isobe S, Tabata S (2013) Kudzu (*Pueraria lobata* Ohwi) karyotyping using FISH and Chromosome Image Analysis System IV. *Chromosome Sci* 16:17–21. doi: 10.11352/scr.16.17
- Pederson T (2011) The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a000638. doi: 10.1101/cshperspect.a000638
- Rosato M, Kovařík A, Garilletei R, Rosselló JA (2016) Conserved organisation of 45S rDNA sites and rDNA gene copy number among major clades of early land plants. *PLoS One* 11:e0162544. doi: 10.1371/journal.pone.0162544
- Sánchez-G Y, Raymúndez MB, Imery J, Acosta MC, Moscone E (2018) Characterization of eight species of *Aloe* (Asphodelaceae) from the nucleolar organizing region. *Rodriguesia* 69:363–372. doi: 10.1590/2175-7860201869208
- Scaldeferro MA, Moscone EA (2019) Cytology and DNA content variation of *capsicum* genomes. In: Ramchiary N, Kole C (eds) *The capsicum genome. Compendium of plant genomes*. Springer, Cham, pp 57–84. doi: 10.1007/978-3-319-97217-6_4
- Schubert I (1984) Mobile nucleolus organizing regions (NORs) in *Allium* (Liliaceae s. lat.)? - Inferences from the specificity of silver staining. *Plant Syst Evol* 144:291–305. doi: 10.1007/BF00984139
- Schubert I, Wobus U (1985) In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92:143–148. doi: 10.1007/BF00328466
- Setiawan AB, Teo CH, Kikuchi S, Sassa H, Kato K, Koba T (2018a) Cytogenetic variation among *Cucumis* accessions revealed by fluorescence *in situ* hybridization using ribosomal RNAs genes as the probes. *Chromosome Sci* 21:67–73. doi: 10.11352/scr.21.67
- Setiawan AB, Teo CH, Kikuchi S, Sassa H, Koba T (2018b) An improved method for inducing prometaphase chromosomes in plants. *Mol Cytogenet* 11:32. doi: 10.1186/s13039-018-0380-6

- Setyowati M, Sulistyarningsih E, Purwantoro A (2013) Induksi poliploidi dengan kolkisina pada kultur meristem batang bawang wakegi (*Allium x wakegi* Araki). *J Ilmu Pertan* 16:58–76. doi: 10.22146/ipas.2526
- Shaw P (2013) The plant nucleolus. In: Leitch IJ, Greilhuber J, Dolezel J, Wendel JF (eds) *Plant genome diversity volume 2*. Springer, Vienna, pp 65–76. doi: 10.1007/978-3-7091-1160-4_5
- Shaw P, Brown J (2012) Nucleoli: Composition, function, and dynamics. *Plant Physiol* 158:44–51. doi: 10.1104/pp.111.188052
- Shigyo M, Khar A, Abdelrahman M (2018) *The Allium Genomes*. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-95825-5_3
- Stack SM, Comings DE (1979) The chromosomes and DNA of *Allium cepa*. *Chromosoma* 70:161–181. doi: 10.1007/BF00288404
- Stępiński D (2014) Functional ultrastructure of the plant nucleolus. *Protoplasma* 251:1285–1306. doi: 10.1007/s00709-014-0648-6
- Sulistyarningsih E, Yamashita K, Tashiro Y (2002) Genetic characteristics of the Indonesian white shallot. *J Jpn Soc Hortic Sci* 71:504–508. doi: 10.2503/jjshs.71.504
- Taliansky ME, Brown JW, Rajamäki ML, Valkonen JPT, Kalina NO (2010) Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: Parallels with animal pathosystems. *Adv Virus Res* 77:119–158. doi: 10.1016/B978-0-12-385034-8.00005-3
- Weis BL, Kovacevic J, Missbach S, Schleiff E (2015) Plant-specific features of ribosome biogenesis. *Trends Plant Sci* 20:729–740. doi: 10.1016/j.tplants.2015.07.003
- Wibowo A, Setiawan AB, Purwantoro A, Kikuchi S, Koba T (2018) Cytological variation of rRNA genes and subtelomeric repeat sequences in Indonesian and Japanese cucumber accessions. *Chromosome Sci* 21:81–87. doi: 10.11352/scr.21.81
- Xie DF, Yu HX, Price M, Xie C, Deng YQ, Chen JP, Yu Y, Zhou SD, He XJ (2019) Phylogeny of Chinese *Allium* species in section *Daghestanica* and adaptive evolution of *Allium* (Amaryllidaceae, Alliioideae) species revealed by the chloroplast complete genome. *Front Plant Sci* 10:460. doi: 10.3389/fpls.2019.00460