

황기류 식물 3종의 세포유전학적 분석

김수영**** · 최혜운* · 김찬수** · 김정숙*** · 이종구**** · 방재욱*†

*충남대학교 생명과학부, **산림과학원 난대산림연구소, ***작물과학원 인삼약초과, ****한국생명공학연구원

Cytogenetic Analyses of *Astragalus* Species

Soo-Young Kim****, Hae-Woon Choi*, Chan-Soo Kim**, Jung-Sook Sung***
Joongku Lee****, and Jae-Wook Bang*†

*School of Bioscience and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea.

**Warm-Temperate Forest Research Center, Korea Forest Research Institute, Jeju 697-050, Korea.

***National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 441-857, Korea.

****Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-355, Korea.

ABSTRACT : To elucidate cytogenetic differences, karyotype analysis and FISH (fluorescence *in situ* hybridization) with 45S and 5S rDNAs were carried out in the three *Astragalus* species: *Astragalus membranaceus* Bunge, *A. membranaceus* var. *alpinus* Nakai and *A. mongholicus* Bunge. The somatic metaphase chromosome numbers of all three species were $2n = 2x = 16$ and the size of chromosomes ranged 2.19 ~ 5.73 μm . The chromosome complement of *A. membranaceus* consisted of each four pairs of metacentrics (chromosomes 3, 4, 6 and 7) and submetacentrics (chromosomes 1, 2, 4 and 8). In *A. membranaceus* var. *alpinus*, the chromosome complement consisted of two pairs of metacentrics (chromosomes 4 and 8) and six pairs of submetacentrics (chromosomes 1, 2, 3, 5, 6 and 7). *A. mongholicus* had three pairs of metacentrics (chromosomes 6, 7 and 8) and five pairs of submetacentrics (chromosomes 1, 2, 3, 4 and 5). Using bicolor-FISH, one pair of 45S and 5S rDNA signals could be detected on the centromeric regions of chromosomes 8 and 7 of *A. membranaceus* and *A. mongholicus*, respectively. In contrast, *A. membranaceus* var. *alpinus* had one pair of 45S signals on the centromeric region of chromosome 8 and two pairs of 5S rDNA signals on the short arms of chromosomes 7 and 8.

Key Words : *Astragalus membranaceus* Bunge, *A. membranaceus* var. *alpinus* Nakai, *A. mongholicus* Bunge, karyotype, rDNAs, bicolor-FISH

서 언

황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge), 제주황기 (*A. membranaceus* var. *alpinus* Nakai) 그리고 *A. mongholicus* Bunge는 콩과 (Leguminosae)에 속하는 다년생 초본이다. 황기는 우리나라 경북, 강원도 등의 산지에 분포하고 (Lee, 1985), 제주황기는 한국특산 식물로 한라산 고지대에서만 분포하는 희귀식물이다 (Kim, 2004). *A. mongholicus*는 중국의 흑룡강성, 길림성, 하북성 등에 분포하며 황기에 비해 잎이 비교적 많고 작은 편이다 (김 등, 1998). 황기 식물은 뿌리를 약재로 이용하는 약용 식물로, 사지무력증과 허약 체질에 효능을 보이며 소화불량, 식욕감퇴, 결막염, 편도선염을 치료하는데 사용되어 왔다 (Bae, 2000).

우리나라에 서식하는 황기속 식물은 6종 3변종 (Toh, 1971)

으로 알려져 있으며 이들에 대한 세포유전학적 연구는 거의 없다. 황기와 제주황기의 핵형에 대한 보고 (Toh, 1971)가 있고, 자주개황기 (*A. adsurgens* Pall.) 재분화 개체의 염색체를 관찰 결과가 있을 뿐이다 (Luo, 1999).

핵형은 체세포 중기 염색체의 특징을 잘 보여 주며, 염색체의 길이와 동원체의 위치로 구분하여 명명한다 (Battalia, 1955; Levan *et al.*, 1964; Naranjo *et al.*, 1983). 핵형은 염색체의 형태적 특징에 따라 구분하기 때문에 외부 형태적으로 구분이 쉽지 않은 식물에서 세포유전학적 수준에서 종의 구분을 가능하게 한다. 또한 핵형 분석 자료는 종의 동정 및 계통 연구에도 유용한 자료가 될 수 있다 (Lee *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004a, b; Choi *et al.*, 2005).

FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 기술은 염색체에서 특정 유전자 위치를 찾아내는 것으로 상염색체로 구분이

†Corresponding author: (Phone) +82-42-821-5497 (E-mail) bangjw@cnu.ac.kr
Received July 3, 2006 / Accepted July 28, 2006

잘 안 되는 부수체 염색체의 확인을 가능하게 하여 핵형분석과 염색체 구조의 이해에 유용하다 (Jiang & Gill, 1994). 많은 복제수를 갖는 45S와 5S rDNA를 비롯한 여러 DNA 절편들을 탐침으로 한 bicolor-FISH 기술로 하나의 염색체 상에 두 가지 이상의 유전자 확인이 가능하게 되었다 (Mukai and Nakahara, 1993; Ohmido and Fukui, 1995). 특히 rRNA 유전자는 어느 식물에서나 공통적으로 존재하고 복제수가 많아 염색체의 구조 및 핵형분석 (Brown and Carlton, 1997; Nakamura *et al.*, 2001), 식물 진화 과정에서의 계통구조의 비교연구 (Fukui *et al.*, 1994; Fukui *et al.*, 1998; Sang and Ling, 2000; Brutovska *et al.*, 2000; Hasterok *et al.*, 2001)를 위한 탐침으로 널리 사용되어 왔다.

최근 우리나라에 자생하거나 재배되는 약용식물인 당귀속 식물 (Koo *et al.*, 2003a), 개시호 (Koo *et al.*, 2003b), 지모 (Kim *et al.*, 2004), 쨍쨍이풀 (Kim *et al.*, 2005) 그리고 할미꽃속 식물 (Lee *et al.*, 2005) 등에서 45S와 5S rDNA를 이용한 bicolor-FISH 결과가 보고된 바 있다.

본 연구는 세포유전학적 연구가 미흡한 황기, 제주황기 그리고 *A. mongholicus*의 핵형을 확립하고, bicolor-FISH 기법을 이용하여 45S와 5S rDNA의 염색체상에서의 위치를 각각 확인하여 세포유전학적 자료를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

1. 식물재료

본 연구에서 재료로 사용된 황기속 식물 (황기, 제주황기, *A. mongholicus*)의 종자는 작물과학원 (경기도 수원)과 난대산림연구소 (제주도)서 각각 분양받아 페트리디쉬에서 발아시켜 근단을 채취하여 염색체 관찰 재료로 사용하였다.

2. 염색체 관찰 및 핵형분석

채취된 근단은 중기 염색체상을 얻기 위하여 증류수 (4°C)에 담가 24시간 동안 저온처리 한 다음, 1:3 고정액 (glacial acetic acid : ethanol, v/v)에 담가 4°C에 보관하면서 재료로 이용하였다. 염색체 관찰을 위해 고정한 근단을 1N HCl (60°C)에서 5-6 분간 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), 7.0 이상일 경우 단부 염

색체 (T, telocentric)로 구분하여 분석하였으며, 염색체의 배열은 긴 것로부터 짧은 순으로 하여 고유 번호를 부여하였다.

3. 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 40분간 처리 (37°C) 후, 1:3 고정액 (glacial acetic acid : ethanol, v/v)을 이용하여 가는 핀셋으로 슬라이드글라스 위에서 염색체를 전개 한 뒤 상온에서 2-3일간 건조시켰다. 위상차 현미경 하에서 분열상이 양호한 슬라이드를 선별하여 FISH에 이용하였다.

4. 탐침의 준비와 bicolor-FISH

FISH를 위한 탐침으로는 biotin-16-dUTP로 표지된 45S rDNA와 digoxigenin-11-dUTP로 표지된 오이 (*Cucumis sativus* L.)의 5S rDNA를 이용하였으며 (Koo *et al.*, 2002), bicolor-FISH는 Kim 등 (1998)의 방법을 변용하여 사용하였다.

건조된 슬라이드상의 염색체 변성을 위하여 70% formamide/2xSSC 용액에 2분간 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 표지된 100 ng의 probe DNA, 50% formamide, 2X SSC, 10% dextran sulfate, 10 ng ssDNA)은 90°C에서 10분간 변성시킨 후, 급냉시켜 준비하였다. 건조된 슬라이드상에 15 μ l의 탐침 혼합액을 가한 다음, 커버글라스를 덮고 paper bond로 봉하여, 37°C에서 16시간 이상 혼성화 (hybridization) 하였다.

혼성화 시킨 슬라이드는 40°C의 2xSSC, 50% formamide/2xSSC, 2xSSC, 4xSSC 용액에서 각각 5분씩 수세하였다. 탐침의 비 특이적인 결합을 막기 위해 염색체 슬라이드를 5% BSA/BT (1M NaHCO₃+0.5% Tween-20, pH 8.3) 완충액으로 37°C에서 5분간 blocking한 후, 1%의 avidin-FITC (fluorescein isothiocyanate)와 anti-digoxigenin rhodamine이 포함된 100 μ l의 1% BSA/4xSSC의 혼합액을 슬라이드에 가한 다음 37°C에서 30분 동안 반응시켜 biotin과 digoxigenin으로 표지된 DNA 탐침을 동시에 검출하였다. 4xSSC/0.2% tween-20 완충액으로 37°C에서 5분씩 3번 수세 후, 1 μ 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 signal을 관찰하고 사진을 촬영하였다. 확인된 signal들은 Meta Imaging Series TM 4.6 (Universal Imaging Corporation) 소프트웨어를 사용하여 합성하였다.

Table 1. Analyses of somatic metaphase chromosomes and karyotype formula of *Astragalus* species. A: *A. membranaceus*, B: *A. membranaceus* var. *alpinus*, C: *A. mongholicus*.

Species	Chromosome No.	Chromosome size (μm)	Karyotype formula
A	2n = 16	2.40-3.85	2A sm + 2B sm + 2C ^m + 2D sm + 2E ^m + 2F ^m + 2G ^m + 2H sm
B	2n = 16	2.19-4.89	2A sm + 2B sm + 2C sm + 2D ^m + 2E sm + 2F sm + 2G sm + 2H ^m
C	2n = 16	3.33-5.73	2A sm + 2B sm + 2C sm + 2D sm + 2E sm + 2F ^m + 2G ^m + 2H ^m

m: metacentric, sm: submetacentric

결과 및 고찰

1. 핵형분석

우리나라에서 약용으로 재배되고 있는 황기와 제주도 특산 식물인 제주황기 그리고 중국의 동, 북부 지역에서 서식하며 황기와 마찬가지로 약용으로 사용되는 *A. mongholicus*에 대한 핵형 분석 결과는 Table 1에서와 같다. 황기속 식물의 기본 염색체수는 $x=8, 11, 12$ 인데, 본 연구에서 황기, 제주황기 그리고 *A. mongholicus*의 염색체 관찰 결과 모두 $2n=16$ 으로 기본 염색체수가 $x=8$ 임을 확인하였다. 황기의 염색체 크기는 $2.40\sim 3.85 \mu\text{m}$, arm-ratio는 $1.22\sim 2.08$ 로 나타났다. arm-ratio에 따라 염색체 조성은 4쌍의 중부 염색체 (염색체 3, 5, 6, 7)와 4쌍의 차중부 염색체 (염색체 1, 2, 4, 8)로 구분되었다 (Fig. 1A and A-1). 제주황기의 염색체 크기는 $2.19\sim 4.89 \mu\text{m}$ 로 관찰되었고 arm-ratio는 $1.11\sim 2.70$ 로 나타났다. 염색체 조성은 2쌍의 중부 염색체 (염색체 4, 8)와 6쌍의 차중부 염색체 (염색체 1, 2, 3, 5, 6, 7)로 구분되었다 (Fig. 1B and B-1). *A. mongholicus*의 염색체 크기는 $3.33\sim 5.73 \mu\text{m}$ 로 관찰되었고 arm-ratio는 $1.12\sim 2.08$ 로 나타났다. 염색체 조성은 3쌍의 중부 염색체 (염색체 6, 7, 8)와 5쌍의 차중부 염색체 (염색체 1, 2, 3, 4, 5)로 구분되었다 (Fig. 1C and C-1).

우리나라에 서식하는 황기속 식물에 대해서는 Toh (1971)가 황기와 제주황기의 핵형에 대한 차이점을 보고 한 바 있는데, 본 연구에서 분석한 결과와 현저한 차이를 보였다. 이것은 중기 염색체 상태와 기존 동원체 위치에 따른 구분 방법에서 오는 차이로 보여진다. 본 연구에서는 황기의 염색체 조성을 4쌍의 중부 염색체 (염색체 3, 5, 6, 7)와 차중부 염색체 (염색체 1, 2, 4, 8)로 각각 구분한 반면 Toh (1971)는 2쌍의 차중부 염색체 (염색체 7, 8)와 6쌍의 차단부 염색체 (염색체 1, 2, 3, 4, 5, 6)로 구분하였다. 제주황기의 경우 본 연구에서는 2쌍의 중부 염색체 (염색체 4, 8)와 6쌍의 차중부 염색체 (염색체 1, 2, 3, 5, 6, 7)로 구분하였는데, Toh (1971)의 보고에서는 2쌍의 중부 염색체 (염색체 7, 8)와 3쌍의 차중부 염색체 (염색체 4, 5, 6) 그리고 3쌍의 차단부 염색체 (염색체 1, 2, 3)로 구분하였다. 핵형은 염색체의 크기와 형태에 따라 구분하는 것으로 동원체의 위치를 기준으로 염색체쌍이 분류된다. Kihara와 Yamamoto (1932)는 v, j, i 형태의 염색체로

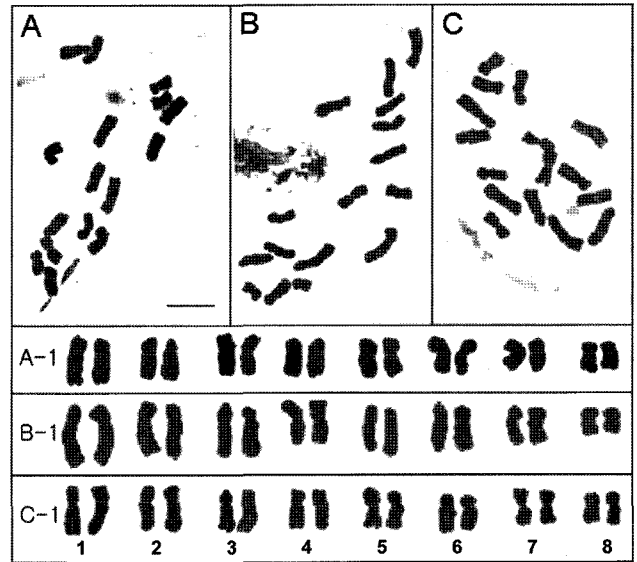


Fig. 1. Somatic metaphase chromosome complements ($2n = 16$) and the karyotype of *Astragalus* species; A and A-1: *A. membranaceus*, B and B-1, *A. membranaceus* var. *alpinus*, C and C-1, *A. mongholicus*. Bar, $5 \mu\text{m}$.

구분하였고, Levan 등 (1964)은 median (중부), submedian (차중부), subterminal (차단부), terminal (단부)로 세분하였으며, White (1940)는 metacentric, submetacentric, subtelo-centric, telocentric (acrocentric)으로 구분하기도 하였다. 최근에 와서는 염색체 구분에 Levan 등 (1964)의 방법을 많이 따르고 있다 (Kim et al., 2002; Koo et al., 2003a, b; Kim et al., 2004a, b; Kim et al., 2004; Lee et al., 2004). 따라서 핵형의 차이는 연구자들 간에 동원체를 중심으로 장완과 단완 사이를 비교한 기준에 따라 약간의 차이를 보일 수도 있다. 그러나 황기속의 경우 본 연구에서 1번과 2번 염색체를 제외한 6쌍의 염색체에서 큰 차이를 보여 핵형으로 황기속 3종의 구분이 가능함을 볼 수 있었다.

2. bicolor-FISH

황기속 식물의 염색체에서 45S와 5S rDNA의 위치를 확인하기 위하여 digoxigenin으로 표지한 45S rDNA는 rhodamin으로, biotin으로 표지한 5S rDNA는 FITC로 bicolor-FISH를 수행한 결과, 황기 (Fig. 2I-A and B)와 *A. mongholicus* (Fig.

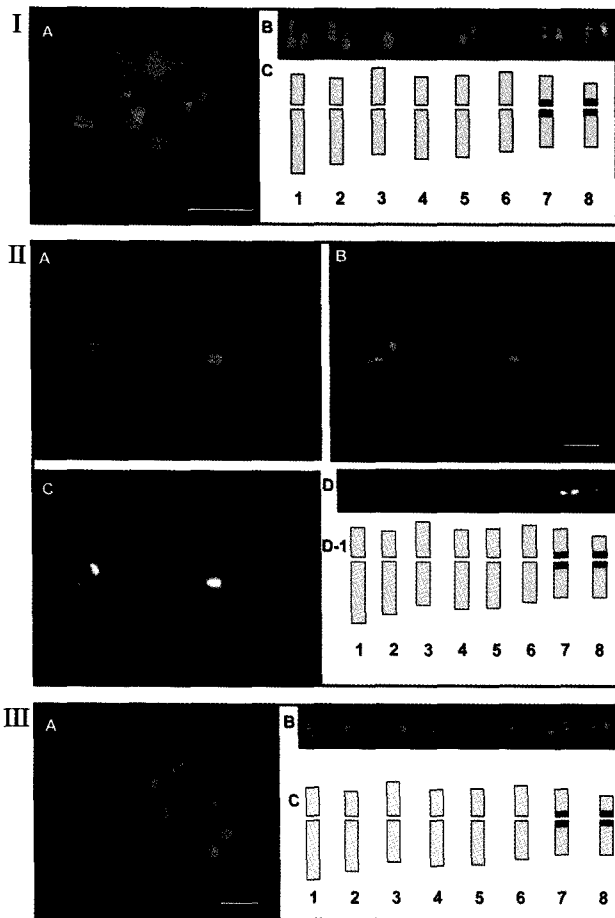


Fig. 2. Bicolor-FISH patterns of the metaphase chromosomes of *Astragalus* species using both 45S and 5S rDNA probes. Digoxigenin-labeled 45S rDNA probe was detected with anti-digoxigenin rhodamine conjugate (red). Biotin-labeled 5S rDNA probe was detected with avidin-FITC conjugate (green). I: A. *membranaceus*, A and B, bicolor FISH and C, ideogram showing the physical location of the 45S (red) and 5S rDNA (green) loci. II: A. *membranaceus* var. *alpinus*, A, digoxigenin-labeled 45S rDNA probe; B, biotin-labeled 5S rDNA probe; C and D, bicolor-FISH and D-1, ideogram showing the physical location of the 45S (red) and 5S rDNA (green) loci. III: A. *mongholicus*, A and B, bicolor FISH and C, ideogram showing the physical location of the 45S (red) and 5S rDNA (green) loci. Bar, 5 μ m.

2III-A and B)의 경우 45S와 5S rDNA signal이 7번 염색체와 8번 염색체의 동원체 부위에서 각각 1쌍씩 관찰되었다. 반면 제주황기의 경우 1쌍의 45S rDNA signal (Fig. 2II-A)과 2쌍의 5S rDNA signal (Fig. 2II-B)이 관찰되었다. 45S rDNA의 경우 7번 염색체의 동원체 부위에서 관찰되었으며, 2쌍의 5S rDNA signal은 7번과 8번 염색체의 동원체 부위에서 각각 관찰되었다. 7번 염색체의 경우 45S와 5S signal이 함께 관찰되어 bicolor-FISH를 통하여 이들 rDNA 유전자들의 위치를 확인한 결과 같은 위치에 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 2II-C and D). 황기, 제주황기 그리고 *A. mongholicus*에서 FISH를

통해 확인된 45S와 5S rDNA signal의 위치를 기본 핵형에 근거하여 표시한 ideogram은 Figure 2I-C, 2II-D-1 그리고 2III-C에서와 같다. 45S rRNA 유전자는 그 위치가 인형성 부위 (이차 협착 부위)를 포함하고 있는 부수체 염색체에서 관찰되며 (Leitch & Heslop-Harrison, 1992), 염색체 상에서 반복서열 (tandem repeats)로서 1쌍 이상 존재 한다 (Maluszynska & Heslop-Harrison, 1991). 본 연구에서는 일반적인 상염색체 방법으로 부수체를 가지고 있는 염색체를 관찰할 수 없었지만, 45S rDNA로 FISH를 수행한 결과 모든 종에서 7번 염색체의 동원체 부위에 1쌍의 부수체를 가진 염색체가 존재한다는 사실을 확인하였다. 반면 5S rRNA 유전자의 경우는 황기와 *A. mongholicus*에서는 각각 1쌍이, 제주황기에서 2쌍이 관찰되어 중간 차이를 보였다. 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)에서는 ecotype에 따라 2~3쌍의 5S rDNA가 관찰되어 같은 종 내에서도 다양성을 보이는 경우도 있다 (Fransz *et al.*, 1998). 또한 할미꽃속 5종의 FISH 결과에서도 4종에서는 2쌍의 signal이 보존적임을 알 수 있었으나 한 종에서 3쌍의 5S rDNA가 관찰되어 같은 속내에서 종간의 차이를 보인 바 있다 (Lee *et al.*, 2005).

본 연구에서 상염색체와 rRNAs 유전자의 염색체에서의 위치를 이용한 핵형의 확립과 중간 rRNAs 유전자좌의 다형현상과 같은 세포유전학적 차이점은 황기속 식물 연구의 기본 자료로 이용될 수 있을 것이다.

적 요

황기속 식물 3종 (황기, 제주황기, *A. mongholicus*)을 대상으로 핵형 분석과 45S와 5S rDNA를 이용한 bicolor-FISH를 수행하였다. 체세포 염색체 수는 모두 $2n=2x=16$ 으로 관찰되었고, 염색체의 평균 길이는 2.19~5.73 μ m이었다. 황기의 염색체는 4쌍의 중부염색체 (염색체 3, 5, 6, 7)와 차중부 염색체 (염색체 1, 2, 4, 8)로 구분되었다. 제주황기는 2쌍의 중부 염색체 (염색체 4, 8)와 6쌍의 차중부 염색체 (염색체 1, 2, 3, 5, 6, 7)로 *A. mongholicus*는 2쌍의 중부 염색체 (염색체 7, 8)와 6쌍의 차중부 염색체 (염색체 1, 2, 3, 4, 5, 6)로 각각 구분되었다. bicolor-FISH 기법을 이용하여 45S와 5S rDNA의 염색체상의 위치를 확인한 결과, 황기와 *A. mongholicus*에서는 1쌍의 45S와 5S rDNA가 8번과 7번 염색체의 동원체 부위에서 각각 관찰되었다. 제주황기의 경우 1쌍의 45S rDNA는 8번 염색체의 동원체 부위와 2쌍의 5S rDNA는 7번과 8번 염색체에서 각각 관찰되어 세포유전학적 차이를 보였다.

사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용 기

술개발사업단의 연구비 지원 (과제번호 : PF0300201-00, PI 방재욱)에 의해 수행되었습니다.

LITERATURE CITED

- Bae KH** (2000) The Medicinal Plants of Korea. Kyohaksa Co., Ltd., p. 242.
- Battalia E** (1955) Chromosome morphology and terminology. *Caryologia* 8:179-187.
- 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.
- Choi HW, Koo DH, Lee WK, Kim SY, Sung JS, Seong NS, Suh Y, Bang JW** (2005) Cytogenetic analysis of seven *Angelica* species. *Korean J. Med. Crop Sci.* 13:118-121.
- Franz P, Armstrong S, Alonso-Blanco C, Fischer TC** (1998) Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 13:867-876.
- 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.
- 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) Non isotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome* 37:717-725.
- Kihara H, Yamamoto** (1932) Karyomorphologische untersuchungen an *Rumex acetosa* L and *Rumex montanus* Desf. *Cytologia* 3:84-118.
- Kim HH, Park YW, Yoon PS, Choi HW, Bang JW** (2004a) Cytogenetic analysis of four *Hosta* species native to Korea. *Korean J. Med. Crop Sci.* 12:397-400.
- Kim HH, Park YW, Yoon PS, Choi HW, Bang JW** (2004b) Karyotype analysis of eight Korean native species in the genus *Iris*. *Korean J. Med. Crop Sci.* 12:401-405.
- Kim MY** (2004) Korean Endemic Plants. Solkwahak Co. Ltd. p. 114.
- Kim SY, Choi HW, Bang JW** (2004) Physical mapping of rDNAs using McFISH in *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Korean J. Med. Crop Sci.* 12:515-518.
- Kim SY, Choi HW, Koo DH, Kim CS, Bang JW** (2005) Karyotype analysis and physical mapping of rDNAs using McFISH in *Jeffersonia dubia* Benth. *Korean J. Med. Crop Sci.* 13:48-51.
- Kim SY, Koo DH, Bang JW** (2002) Karyotype analysis of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Korean J. Med. Crop Sci.* 10:144-146.
- Kim SY, Lim YP, Bang JW** (1998) Cytogenetic analysis of *Brassica campestris* var. *pekinensis* using C-banding. *Korean J. Genet.* 20:85-295.
- Koo DH, Hur YK, 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, Kim SY, Bang KH, Seong NS, Bang JW** (2003a) Cytogenetic analyses of *Angelica* plants using Feulgen staining and multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Korean J. Plant Biotech.* 30:123-127.
- Koo DH, Seong NS, Sung JS, Bang KH, Bang JW** (2003b) Karyotype analysis and physical mapping of rDNAs in *Bupleurum longerradiatum*. *Korean J. Med. Crop Sci.* 5:402-407.
- Lee CB** (1985) Illustrated Flora of Korea. Hyangmoonsa Co., Ltd., p. 492.
- Lee WK, Choi HW, Bang JW** (2004) Karyotype analysis of five species of genus *Pulsatilla*. *Korean J. Med. Crop Sci.* 12:490-493.
- Lee WK, Choi HW, Koo DH, Kim SY, Bang JW** (2005b) Molecular cytogenetics of five *Pulsatilla* species to the 5S, 45S rDNA genes by fluorescence *in situ* hybridization. *Korean J. Genet.* 27:179-185.
- 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.
- Luo JP, Jia JF, Gu YH, Liu J** (1999) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* Pall. *Plant Sci.* 143:93-99.
- Maluszynska J, Heslop-Harrison JS** (1991) Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 1:159-166.
- Mukai Y, Nakahara Y** (1993) Simultaneous discrimination of the three in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome* 36:489-494.
- 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.
- Naranjo CA, Poggio L, Brandham PE** (1983) A practical method of chromosome classification on the basis of centromere position. *Genetica* 62:51-53.
- Ohmido N, Fukui K** (1995) Cytological studies of African cultivated rice, *Oryza glaberrima*. *Theor. Appl. Genet.* 91:212-217.
- Sang Y, Ling GH** (2000) Comparative physical mapping of the 18S-5.8S-25S rDNA in three *Sorghum* species. *Genome* 43:918-922.
- Toh CA** (1971) A cytotoxic study on the *Astragalus membranaceus* and *Astragalus membranaceus* var. *alpinus*. *Korean J. Plant Tax.* 3:57-61.
- White MDJ** (1940) The origin and evolution of multiple sex chromosome mechanisms. *J. Genet.* 40:303-336.
- 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 (1998) 중약대사전. 정담. 서울., p. 6460-6461.