

체세포분열과 감수분열 및 bicolor FISH를 이용한 섬시호의 세포유전학적 분석

김수영* · 방재욱** · 이종구*†

*한국생명공학연구원, **충남대학교 생명과학부

Cytogenetic Analysis Using Mitosis, Meiosis Chromosomes and bicolor Fluorescence *in situ* Hybridization of *Bupleurum latissimum* Nakai

Soo-Young Kim*, Jae-Wook Bang**, and Joongku Lee*†

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

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

ABSTRACT : Chromosome analysis using mitosis, meiosis and bicolor FISH were carried out in *Bupleurum latissimum* Nakai, which is one of the endemic plants in Ulleung island of Korea. The somatic metaphase chromosomes number of this plant was $2n = 2x = 16$ and the chromosome complements consisted of six pairs of metacentrics and two pairs of submetacentrics. The size of chromosomes ranged 2.40~4.20 μm and NOR (nucleolus organizer region) chromosome did not observed using conventional staining. In meiosis chromosomes, metaphase-I and anaphase-I were observed. Metaphase-I and anaphase-I showed 8 bivalents and chromosomes migration to make two daughter cells. Using bicolor FISH, one pair of 5S and 45S rDNA signals were detected on the centromeric region of chromosome 3 and the end of short of chromosome 2, respectively. We also observed the NOR using 45S rDNA probe.

Key Words : *Bupleurum latissimum* Nakai, mitosis, meiosis, karyotype, rDNAs, bicolor FISH.

서 언

산형과 (Umbelliferae)에 속하는 시호속 (*Bupleurum*) 식물은 유럽과 중앙아시아에 일부 분포하며, 한국을 비롯하여 중국, 일본 등에 자생하는 다년생 식물이다 (Lee, 1985). 뿌리에 0.5% 시호사포닌 (saikosaponin)을 함유하는 주요 약용식물로 해열작용에 효과가 있다 (Tomita & Umori, 1976). 시호속에 대한 연구로 한국산 시호속을 외부형태학적과 해부학적 특징을 바탕으로 5분류군 (3종 2변종)으로 구분한 분류학적 연구가 보고되었다 (Kim & Yoon, 1990). 염색체 연구는 Darlington과 Wylie (1955)에 의해 처음으로 보고되었으며, 기본 염색체 수는 $x=7, 8$ 이다 (Bell & Constanc, 1957). 일본에서는 지역에 따른 염색체의 수적 변이를 보고하였고 (Kohda *et al.*, 1990) 한국에서도 시호속의 종에 따른 다양한 체세포 수가 보고된 바 있다 (Lee, 1967; Lee, 1969). 또한 재배종 시호(*B. falcatum* L.)에 대한 핵형분석을 수행하여 세포유전학적인 기반을 마련한 바 있다 (Chung *et al.*, 1995).

섬시호 (*Bupleurum latissimum* Nakai)는 울릉도 특산 식물로 환경부 지정 멸종위기 야생식물 II급으로 지정되어 있다 (Kim, 2004). 그러나 시호속과 관련된 염색체 연구에서 섬시호에 관한 세포유전학적 연구는 보고된 바 없다. 식물종의 핵형은 염색체의 구조 및 행동 연구 등 유전체 연구의 기반이 된다. 또한 체세포 증기 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. 그러므로 핵형분석 자료는 종의 동정 및 계통 연구에도 유용한 자료가 될 수 있으며 (Lee *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004a, b; Choi *et al.*, 2005) 유용한 유전자 탐색의 기초자료를 제공할 수 있다.

감수분열은 생식세포를 형성하기 위한 과정으로 핵상이 $2n$ 에서 n 으로 반감되며, 유전적으로 다양성을 갖는 시기이다. 또한 두 번의 분열과정을 거치고 유전적으로 다양한 생식세포를

†Corresponding author: (Phone) +82-42-860-4284 (E-mail) joongku@kribb.re.kr
Received November 6, 2006 / Accepted November 28, 2006

만든다는 점에서 체세포분열과 큰 차이를 보인다. 이러한 이유로 유전학, 육종학, 진화학 그리고 품종개량에 종사하는 농업인들에게 매우 중요한 정보를 제공할 수 있다 (Ham, 1998). 염색체는 유전적 정보를 갖는 물리적 구조물로 세포 분열과 수정을 통해 그 유전 정보를 다음세대로 전달하기 때문에 감수분열을 통한 염색체 연구는 염색체의 행동과 물리적 변화에 대한 정보를 제공해준다 (Shim & Shin, 1996).

최근 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)기법의 사용으로 국내 자생식물을 대상으로 하여 DNA 염기서열을 근거로 하는 분자세포유전학적 연구가 활발히 진행되고 있다 (Koo *et al.*, 2003a; Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006). 또한 5S와 45S rDNA 유전자는 모든 식물에 공통으로 존재하고 반복서열을 갖고 있어 염색체의 구조 분석에 유용한 유전자로 사용되며, 핵형분석을 보다 용이하게 할 수 있으며 (Brown & Carlson, 1997; Nakamura *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006), 진화 과정과 관련된 계통구조의 비교 연구를 위한 탐침 (probe)으로 보편적으로 사용되고 있다 (Sang & Ling 2000; Brutovaska *et al.*, 2000; Hasterok *et al.*, 2001).

본 연구는 염색체 연구가 보고되지 않은 섬시호의 체세포 분열과 감수분열을 통해 세포유전학적 연구의 기반을 마련하고 5S와 45S rDNA 탐침을 이용한 bicolor FISH기법을 이용하여 염색체상에서의 물리적 지도를 작성하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 식물재료

본 연구에 사용한 섬시호는 울릉도 남양에서 채집하여 생명공학연구원 포장에 심어 근단과 꽃봉오리를 채취하여 체세포 분열과 감수분열의 재료로 사용되었다.

2. 체세포 염색체 관찰 및 핵형분석

채취된 근단은 중기 염색체상을 얻기 위하여 증류수 (4°C)에 담가 24시간 동안 저온처리 한 다음, Farmer's solution (glacial acetic acid : ethanol = 1 : 3, v/v)에 담가 4°C에 보관하면서 재료로 이용하였다. 염색체 관찰을 위해 고정된 근단을 1N HCl (60°C)에서 5분간 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 것으로부터 짧은 순으로 하여 고유 번호를 부여하였다.

3. 감수분열 염색체 관찰

감수분열에서의 염색체 관찰은 화분 모세포 (PMC; Pollen Mother Cells)에서 수행하였다. 화분 모세포의 관찰을 위하여 6월 말에서 7월 초순 사이 개화할 무렵에 10-12시에 개화 전의 꽃봉오리 전체를 절취하여 고정액에 담가 냉장고에 보관하면서 재료로 사용하였다. 해부 현미경 하에서 꽃밥을 꺼내어 슬라이드에 놓고, 화분모세포를 꼬집어 낸 다음, 1% aceto-carmine을 떨어뜨리고 잘게 부순 후 압착법으로 슬라이드를 만들어 감수분열 염색체를 관찰하였다.

4. 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 30분간 처리 (37°C) 후, Farmer's solution을 이용하여 가는 핀셋으로 슬라이드글라스 위에서 염색체를 전개 한 뒤 상온에서 2-3일간 건조시켰다. 위상차 현미경 하에서 분열상이 양호한 슬라이드를 선별하여 FISH에 이용하였다.

5. 탐침의 준비와 bicolor-FISH

FISH를 위한 탐침으로는 biotin-16-dUTP로 표지된 45S rDNA와 digoxigenin-11-dUTP로 표지된 5S rDNA를 이용하였으며 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 20 µl의 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 µl의 1% BSA/4XSSC의 혼합액을 슬라이드에 가한 다음

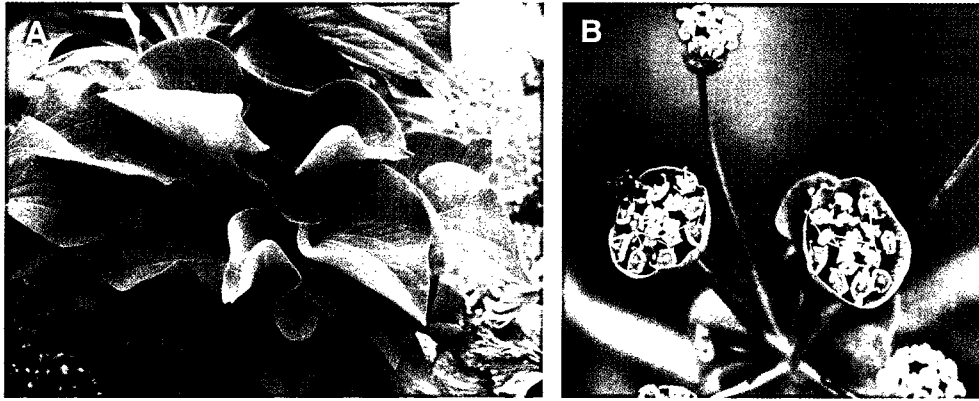


Fig. 1. A, A whole plant and B, flowers of *Bupleurum latissimum* Nakai.

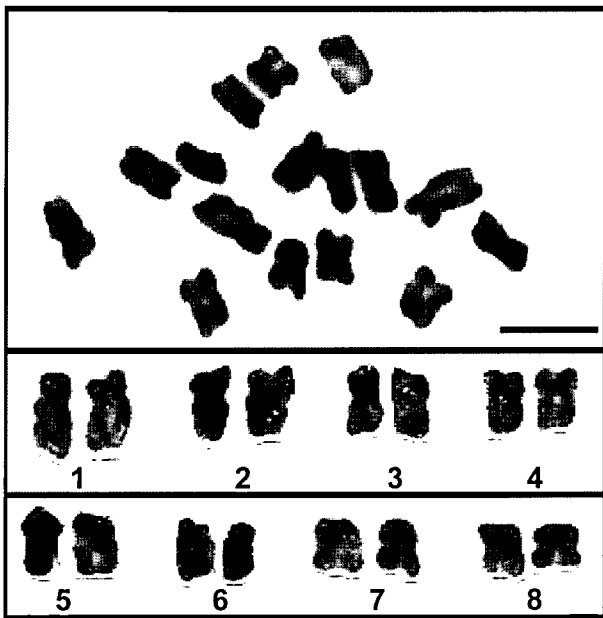


Fig. 2. Somatic metaphase chromosome complements and karyotype in *B. latissimum* ($2n = 16$). Bar, $5 \mu\text{m}$.

37°C에서 30분 동안 반응시켜 biotin과 digoxigenin으로 표지된 DNA 탐침을 동시에 검출하였다. 4xSSC/0.2% tween-20 완충액으로 37에서 5분씩 3번 수세 후, 1 μg/ml DAPI (4,6-diamidine-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.

결과 및 고찰

울릉도 특산 식물인 섬시호 (Fig. 1)의 체세포 염색체 수는

Table 1. Analysis of somatic metaphase chromosomes of *Bupleurum latissimum* Nakai.

Chromosome No.	Chromosome size (μm)			Arm ratio (L/S)	Centromeric Index
	Long arm	Short arm	Total		
1	2.80	1.40	4.20	2.00	SM
2	2.10	1.50	3.60	1.40	M
3	1.90	1.60	3.50	1.18	M
4	1.90	1.30	3.20	1.46	M
5	1.78	1.40	3.18	1.27	M
6	1.80	1.20	3.00	1.50	SM
7	1.40	1.20	2.60	1.16	M
8	1.30	1.10	2.40	1.18	M

M : metacentric, SM : submetacentric

$2n = 2x = 16$ 으로 확인 되었으며 (Fig. 2), 염색체의 크기는 2.40~4.20 μm, arm-ratio는 1.16~2.00로 나타났다. Arm-ratio에 따라 6쌍의 중부 염색체 (염색체 2, 3, 4, 5, 7 그리고 8번)와 2쌍의 차중부 염색체 (염색체 1번과 6번)로 각각 구분되었는데 (Table 1), 이는 섬시호를 대상으로 이루어진 핵형 확립에 대한 최초의 보고이다. 본 연구에서 얻은 상동염색체들의 형태적 특징은 다음과 같다.

염색체 1: 길이가 가장 긴 염색체로 평균 길이가 4.20 μm였으며, arm-ratio는 2.00으로 차중부 염색체로 관찰되었다.

염색체 2: 염색체의 평균 길이는 3.60 μm였으며, arm-ratio는 1.40으로 중부 염색체로 관찰되었다.

염색체 3: 염색체의 평균 길이는 3.50 μm였으며, arm-ratio는 1.18로 중부 염색체로 관찰되었다. 2번 염색체와 구별이 어려웠으나 여러 개의 세포를 관찰하여 비교한 결과 길이에서 약간의 차이를 보였다.

염색체 4: 염색체의 평균 길이는 3.20 μm였으며, arm-ratio는 1.46으로 중부 염색체로 관찰되었다.

염색체 5: 염색체의 평균 길이는 3.18 μm였으며, arm-ratio는 1.27로 중부 염색체로 관찰되었다. 4번 염색체의 길이와 arm-

ratio가 큰 차이를 보이지 않았으나 여러 개의 세포를 평균으
로 하여 구분하였다.

염색체 6: 염색체의 평균 길이는 3.00 μm 였으며, arm-ratio는
1.50으로 차중부 염색체로 관찰되었다.

염색체 7: 염색체의 평균 길이는 2.60 μm 였으며, arm-ratio는
1.16으로 중부 염색체로 관찰되었다.

염색체 8: 염색체의 평균 길이는 2.40 μm 로 상동 염색체쌍
중 가장 길이가 짧게 관찰되었으며, arm-ratio는 1.18로 중부
염색체로 관찰되었다. 인형성 부위 (NOR, nucleolus organizer
region)를 지니고 있는 염색체는 현미경 하에서 관찰되지 않았
으나 FISH를 통해 알 수 있었다. 시호속 식물의 기본 염색체
수는 $x=7$, 8로 알려져 있으며 (Bell & Constanc, 1957), 개
시호 (*B. longeradiatum*)의 경우 $2n=12$ (Kim & Yoon,
1990)와 $2n=16$ 으로 (Bell & Constanc, 1957) 각각 다르게
보고된 바 있다. 또한 Chung 등 (1995)은 한국 재배종 시호
(*B. falcatum*)의 세포유전학적 분석을 통해 $2n=20$ 과 $2n=26$
으로 염색체수를 밝힌 바 있다. 염색체의 구조와 행동을 관찰
하기 위해 개화기에 채집하여 고정된 꽃밥의 화분 모세포에서
섬시호 감수분열을 관찰하였다. Aceto-carminc 용액을 이용하
여 화분모세포를 확인한 결과 감수분열 제1분열의 중기과정
(Fig. 3A)과 후기과정 (Fig. 3B)을 각각 관찰할 수 있었다. 중
기과정에서는 8쌍의 2가 염색체 (bivalents)를 관찰할 수 있었
는데, 2가 염색체는 상염색체 쌍이 서로 짝짓기를 하여 세포
중앙에 배열된 모습으로 관찰되었다. 또한 감수분열 제1분열
의 후기세포에서는 8개의 상동 염색체들이 똑같이 나뉘어져
양극으로 이동하여 각각의 딸세포를 형성함을 관찰 할 수 있
었다. 감수분열에 대한 연구로 성염색체의 행동과 구조 변화
를 관찰하기 위해 *Humulus*속 식물 (Shephard *et al.*, 2000)과
수영 (*Rumex acetosa*)에서 감수분열이 보고되었고 (Swietli-
nska, 1963), 벼의 감수분열이 각 시기별로 보고된 바 있다
(Shim & Shin, 1996). 본 연구의 감수분열 결과는 시호속 식

물의 최초의 결과이다. 체세포와 감수분열 염색체의 관찰로는
인형성 부위를 갖는 염색체를 관찰 할 수 없었으나 FISH를
통해 보다 정확한 위치를 확인하여 핵형을 수행 할 수 있었
다. 섬시호의 염색체 상에서의 5S와 45S rDNA유전자의 물리
적 지도를 작성하기 위해 digoxigenin-16dUTP로 표지한 5S
rDNA는 rhodamine으로, biotin-11dUTP로 표지한 45S rDNA
는 FITC로 bicolor FISH를 수행한 결과 45S rDNA유전자는
3번 염색체의 동원체 주변에서 한 쌍의 signal을 5S rDNA유
전자의 경우는 2번 염색체의 단원 부위에서 한 쌍의 signal을
각각 관찰할 수 있었다. 45S rDNA 유전자는 리보솜의 구성
성분으로 그 위치가 인형성 부위를 포함하고 있는 부수체 염
색체에서 관찰되며, 염색체 상에 반복적으로 위치하여 어느 식
물 중에서도 한 쌍 이상 존재 한다 (Leitch & Heslop-Harris-
son, 1992). 본 연구에서 상염색체으로는 인형성 염색체를 관
찰 할 수 없었으나, 45S rDNA유전자를 이용한 FISH 결과
한 쌍의 부수체 염색체를 2번 염색체의 단원 말단 부위에서
관찰 할 수 있었다. 식물 중에서 염색체의 다양성 연구에 유
용한 분자 유전학적 방법으로 FISH 기법이 보편적으로 사용
되는데 (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 1993), 상염색체
이 염색체의 형태적인 특징만을 보여주는데 반해 FISH기법과

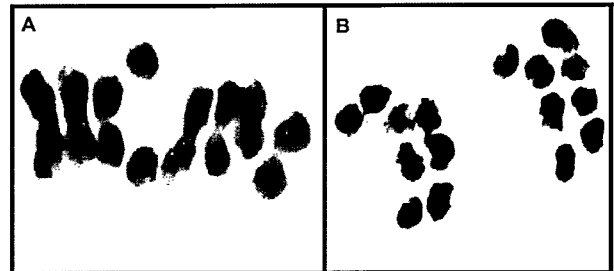


Fig. 3. Meiosis in *B. latissimum* ($2n = 16$) after carmine staining
A, metaphase-I showing 8 bivalents B, anaphase-I showing
8-8 chromosomes migration.

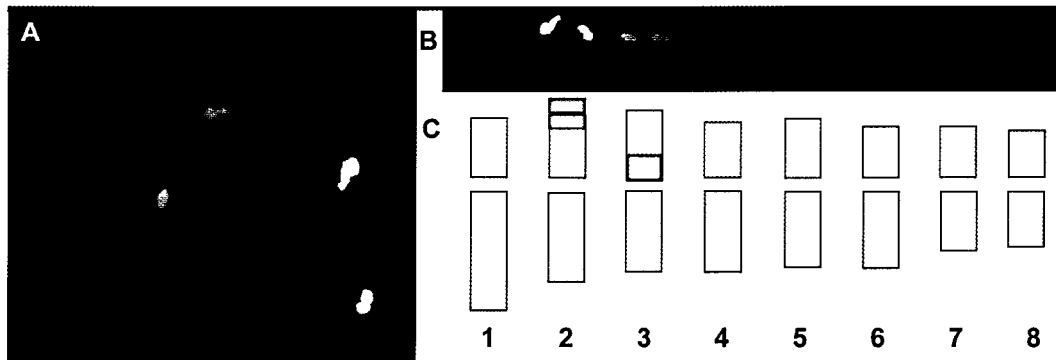


Fig. 4. Bicolor FISH pattern of the metaphase chromosomes in *B. latissimum*
using both 5S and 45S rDNA probes. Digoxigenin-labeled 5S rDNA probe
was detected with anti-digoxigenin rhodamine conjugate (red). Biotin-
labeled 45S rDNA probe was detected with avidin-FITC conjugate (green).
A and B, bicolor FISH and C, ideogram showing the physical location of
the 5S and 45S loci.

같은 분자세포유전학적 방법은 다양한 반복서열을 탐침으로 하여 형광 염색을 이용하기 때문에 모양과 크기가 유사한 염색체를 구분하기에 용이하고, 계통을 연구하는데 있어 매우 유용한 기술이라 할 수 있다 (Fukui *et al.*, 1994). 다른 시호속 식물인 개시호의 경우 한 쌍의 5S 와 45S rDNA 유전자가 4번 염색체 장완의 동원체 주변과 2번 염색체의 단완 말단 부위에서 각각 관찰되었다 (Koo *et al.*, 2003b). 본 연구결과는 다른 시호속 식물이나 계통이 다른 식물을 대상으로 한 연구에 적용될 수 있을 거라 사료된다. 본 연구에서 확립한 핵형과 감수분열 그리고 rDNAs의 세포유전학적 지도 작성은 섬시호의 유전체 구조의 연구와 유전자의 물리적 위치 탐색을 통해 시호속의 다른 종들의 유연관계를 분석하기 위한 기본적인 자료로 이용될 수 있을 것이다.

적 요

울릉도 특산 식물인 섬시호를 대상으로 체세포분열과 감수분열 그리고 bicolor FISH를 통해 염색체 분석을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 섬시호의 체세포 염색체수는 $2n = 2X = 16$ 이며, arm-ratio 비교를 통한 핵형분석에서 6쌍의 중부염색체와 2쌍의 차중부 염색체로 관찰되었다. 염색체의 길이는 2.40~4.30 μm 로 나타났으며, 상염색법으로 인형성 염색체를 관찰할 수 없었다. 감수분열 염색체의 관찰결과 감수분열 제 1분열의 중기와 후기 세포를 각각 관찰 하였다. 중기세포에서 8쌍의 2가 염색체가 중앙에 배열된 모습을 관찰 할 수 있었고 후기세포에서는 8쌍의 상동 염색체들이 두 개의 딸세포를 형성하기 위해 분리되는 모습을 관찰하였다. 5S와 45S rDNA유전자를 탐침으로 하여 bicolor FISH를 수행한 결과 3번 염색체의 동원체 주변에서 한쌍의 5S signal과 2번 염색체의 단완 말단 부위에서 한쌍의 45S signal을 각각 관찰 할 수 있었고, 상염색법으로 관찰되지 않은 인형성 염색체를 FISH를 통해 확인할 수 있었다.

사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용 기술개발사업단의 연구비 지원 (과제번호 : PF0300201-00, PI 이종구)에 의해 수행되었습니다.

LITERATURE CITED

- Battalia E** (1955) Chromosome morphology and terminology. *Cytologia* 8:179-187.
- Bell CR, Constanc L** (1957) Chromosome numbers in *Umbelliferae*. *American J. Bot.* 44:565-572.
- 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, Bang JW** (2005) Cytogenetic analysis of seven *Angelica* species. *Korean J. Med. Crop Sci.* 13:118-121.
- Chung SH, Bang JW, Choi HW** (1995) Cytogenetic analysis of *Bupleurum falcatum* L. cultivated in Korea. *Korean J. Med. Crop Sci.* 3:61-65.
- Darlington CD, Wylie AP** (1955) *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. 2nd ed. George Allen and Unwin L.T.D., London.
- 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, Jrnkins G, Langdon T, Jones RN, Maluszynska J** (2001) Ribosomal DNA is an effective marker of *Brassica* chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 103:486-490.
- Harn CY** (1998) Recent advancement on the knowledges of meiotic division (I). *Korean J. Plant Tissue Culture* 6:453-475.
- Heslop-Harrison JS, Schwarsacher T** (1993) Molecular cytogenetics-biology and applications in plant breeding. *Chromosomes Today* 11:191-198.
- 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.
- 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, Choi HW, Kim CS, Sung JS, Lee JK, Bang JW** (2006) Cytogenetic analysis of *Astragalus* species. *Korean J. Med. Crop Sci.* 14:250-254.
- Kim YS, Yoon CY** (1990) A taxonomic study on the genus *Bupleurum* in Korea. *Korean J. Tax.* 20:209-242.
- Kohda H, Namera A, Hamamoto** (1990) Propagation of *Bupleurum falcatum* by shoot tip culture. *Shoyakugaku Zasshi* 44:38-41.
- Koo DH, Kim SY, Bang KH, Seong NS, Bang JW** (2003a) Cytogenetic analysis of *Angelica* plants using Feulgen staining and multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Korean J. Plant Biotechnology* 30:123-127.
- Koo DH, Seong NS, Seong JS, Bang KH, Bang JW** (2003b) Karyotype analysis and physical mapping of rDNAs in *Bupleurum longeradiatum*. *Korean J. Crop Sci.* 11:402-407.
- Lee CB** (1985) *Illustrated Flora of Korea*. Hyangmoonsa Co., Ltd, p. 587.
- Lee WK, Choi HW, Bang JW** (2004) Karyotype analysis of five species of genus *Pulsatilla*. *Korean J. Med. Crop Sci.* 12:490-

- 493.
- Lee YN** (1967) Chromosome number of flowering plants in Korea. J. Korean Res. Inst. 2:141-145.
- Lee YN** (1969) Chromosome number of flowering plants in Korea. J. Korean Cult. Inst. 12:455-478.
- 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.
- 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.
- Sang Y, Ling GH** (2000) Comparative physical mapping of the 18S-5.8S-26S rDNA in three *Sorghum* species. Genome 43: 918-922.
- Shim YS, Shin YB** (1996) Meiosis in rice plant (*Oryza sativa* L.). J. Agr. Sci. 7:11-24.
- Shephard HL, Parker JS, Darby P, Ainsworth CC** (2000) Sexual development and sex chromosomes in hop. New Phytol. 148:397-411.
- Swietlinska Z** (1963) Cytogenetic relationships among *Rumex acetosa*, *Rumex arifolius* and *Rumex thyrsiflorus*. Acta. Soc. Bot. Pol. 32:215-279.
- Tomita Y, Umori A** (1976) Production of *Bupleuri radix*. Japanese Patent 76:16440.