

단백질 전기영동상에 의한 제주도 사철란속 4종간의 유전적 유연관계

오문유, 송성희, 김세재

Genetic Relationships among 4 Species of *Goodyera* in Cheju Island by the Electrophoretic Patterns of Proteins

Moon-You Oh, Sung-Hee Song, and Se-Jae Kim

Summary

The genetic relationships among four species (*Goodyera velutina*, *G. marimowicziana*, *G. schlechtendaliana*, *G. macrantha*) in Cheju island were examined by one dimensional(1-D) and two-dimensional gel electrophoretic(2-D) methods.

The protein patterns of four species analysed by 1-D were relatively similar to one another. The genetic distances among four species were estimated by analysing the protein spots obtained by 2-D. The genetic distances between *G. maximowicziana* and *G. schlechtendaliana*, *G. velutina* and *G. macrantha*, *G. maximowicziana* and *G. macrantha* 0.5773, 0.5858, 0.7378, respectively.

The genetic relationships among four species estimated in this study were coincident with their ecological characteristics.

서론

동식물간의 계통 분류 분야의 연구는 형태학적, 세포유전학적 방법에 의해서 많은 연구가 이루어져 왔으며, 최근에 단백질 전기

영동 방법을 종분화에 관한 진화 유전학적 연구에 도입 함으로써 종이나 속간의 유전적 유연관계를 규명하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(Lee, 1972; Dass, 1972; Craig *et al.*, 1974; Aquardo and Avise, 1981:

Beverly *et al.*, 1985 Sung *et al.*, 1985).

전기영동 방법에 의한 동위효소 분석실험으로는 Han등(1977)이 starch gel electrophoresis 방법을 이용하여 제주도 한라산의 벚나무속(*Prunus*) 식물에 대하여 Esterase등 6종의 동위효소를 비교 검토하여 종간 차이와 잡종 여부를 밝힌 바가 있으며, Shim등(1984)은 한국산 구상나무(*Abies koreana*) 종간의 배유를 대상으로 동위효소에 대한 유전양식과 연관관계를 규명한 바 있다. 또한 Chung등(1985)은 대표적인 구상나무(*Abies koreana*) 9개 천연림 선택집단(3개지역)에 대하여 starch gel electrophoresis 방법에 의해 동위효소 변이를 분석, 집단의 유전적 구성을 밝힌 바 있고 Moon(1987)은 starch gel electrophoresis 방법으로 제주도 재래귤(*Citrus*)의 잎에서 동위효소의 표현형 또는 유전인자를 밝히고 교잡 집단에 대하여 이들 유전자의 분리비를 검토한 바 있다.

수용성 단백질 전기영동 pattern에 의한 연구로서 Bang(1984)이 한국산 호밀(*Secale cereale*)을 SDS polyacrylamide gel electrophoresis 방법을 이용하여 각 계통간에 차이를 보고한 바 있으며, 식물의 저장 단백질(storage protein) 연구에서도 마찬가지로 종이나 변종 사이에는 서로 다른 전기영동 pattern을 나타낸다고 보고한 바 있다(Stegemann, 1975). 또한 Vapa와 Borojevica(1978)는 밀의 돌연변이 계통에서 gliadin proteins의 다형현상을 보고 하였으며, Simon과 Peloquin(1980)은 감자(*Solanum tuberosa*)에서 저장 단백질의 전기영동 pattern이 cultivar에 따라 차이를

나타낸다고 밝힌 바 있다.

또한 O'Farrell(1975)이 two-dimensional gel electrophoresis(2-DGE) 방법을 고안한 이래 2차원 전기영동은 종간 유전적 유연관계 연구에 많이 이용되고 있는데, Son등(1984)은 한국산 퉁가리속(*Liobagrus*)에 대하여 종별·수계별로 형태적 특징과 수용성 단백질의 전기영동상을 비교 검토한 바 있으며, Lee등(1987)은 한국산 초파리속(*Drosophila*) 5종에 대하여 전기영동법으로 단백질질을 분석하여 종간의 단백질 특이성과 유전적 거리를 밝히고 이들 종간의 계통적 유연관계를 밝힌 바 있다. Brown과 Langley(1979)는 2-DGE 방법을 사용하여 자연집단의 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)의 heterozygosity의 level을 보고한 바 있고 Aquardo와 Avise(1981)는 2-DGE 방법으로 설치류 9종의 유전적 거리를 산출하고 종래의 starch gel에 의하여 얻어진 유전적 거리와 비교하여 2-DGE 방법이 계통학 연구에 매우 유용한 방법이라고 강조 하였다.

한편 북반구 및 호주와 태평양제도에 걸쳐 분포하는 것으로 알려진 난초과(Orchidaceae)에 속하는 사철란속(*Goodyera*)은 현재까지 100종이 기재되어 있으며(山岸高旺, 1974; 渡邊清彦, 1976), 한국에서는 주로 남부지방 및 울릉도와 제주도에 5종이 분포하고 있다. 이들의 형태적 및 생태적 특징은 Lee(1980)와 Kim(1985)에 의하여 보고된 바 있는데, 제주도 한라산에서 자생하는 사철란속종 *G. maximowicziana*와 *G. schlechtendaliana*는 해발 1,200m이하, *G. velutina*는 해발 700m이

하에서, *G. macrantha*는 해발 600m이하, *G. repens*는 구상나무 숲속에서 자라는 생태적 서식지의 차이가 있으며(Kim, 1985), 외부 형태상으로도 5종은 쉽게 구별이 가능한 종들로서(Lee, 1980; Kim, 1985) 이들의 영양 기관을 조직학적으로 비교 검토한 바에 의하면 조직 수준에서는 종간 차이를 발견할 수 없었다(Kim, 1981).

따라서 형태적 및 생태적으로 다르나, 조직학적으로 종간차이를 규명할 수 없는 제주도 자생 사철란속 식물에 대하여 분자 수준에서 유전적 유연관계와 종간 차이를 규명할 필요성이 요구되어, SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)와 two-dimensional gel electrophoresis(2-DGE) 방법에 의해 단백질 pattern을 비교 검토하고 전기영동상에 나타난 단백질 spot를 분석하여 유전

적 거리를 산출함으로써 이들 종간의 유전적 유연관계를 밝히기 위하여 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 재료는 털사철란(*Goodyera velutina*), 섬사철란(*G. maximowicziana*), 사철란(*G. schlechtendaliana*), 붉은 사철란(*G. macrantha*)등 4종이며, 1987년 6월부터 8월 사이에 한라산에서 채집하여(Table 1), 각 종의 성숙한 잎을 전기영동을 위한 시료로 사용 하였다.

Table 1. Collection localities of *Goodyera* in Halla Mt.

Species	Locality (Altitude)
<i>Goodyera velutina</i>	Halla Mt. (600~700m)
<i>Goodyera maximowicziana</i>	Halla Mt. (1,000~1,200m)
<i>Goodyera schlechtendaliana</i>	Halla Mt. (1,000~1,200m)
<i>Goodyera macrantha</i>	Halla Mt. (600 or lower)

2. 실험방법

1) 시료제조

멸균된 가위로 잘게 자른 각 종의 성숙한

잎 0.5g에 석영사 2g, extraction buffer(2% SDS, 10% glycerol, Tris-HCl pH 6.8) 2.5 ml을 mortar에 넣고 분쇄한 다음 4°C에서 1,500×g로 30분간 원심분리한 후 그 상등액을

취하였다. Lowry등(1951)의 방법을 이용하여 단백질량을 측정한 다음 SDS PAGE에서는 70~80 μ g의 단백질을 sample buffer(1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, 5% glycerol, 0.01% bromophenolblue, 0.1M Tris-HCl pH 6.8)와 혼합하여 끓는 물에서 3분간 중탕 시킨후 전기영동 분석을 위해 약 70 μ g을 단백질 시료로 사용하였으며, 2-DGE에서는 상등액중 95 μ l을 취하여 5 μ l 2-mercaptoethanol과 혼합하여 약 100 μ l(50~60 μ g)을 단백질 시료로 사용 하였다.

2) Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)

사철관속 4종에 대한 SDS PAGE는 Laemmli(1970)의 gel 및 buffer system을 이용하여 LKB vertical electrophoresis kit(16 \times 18 cm \times 0.75mm)에서 실시 하였다. 전기영동은 slab gel당 15 $^{\circ}$ C에서 20mA로 3~4시간 동안 실시하였고, 0.25% Coomassie brilliant blue R-250(Sigma)으로 염색하고 7% acetic acid(35% methanol 포함)로 탈색하였다. 완전히 탈색된 gel을 gel dryer에서 말린후 505nm 파장에서 densitometer로 scanning하였다. 분자량 표지 단백질로는 carbonic anhydrase(from erythrocytes. M.W. 29,000), egg albumin(M.W. 45,000), bovine albumin(M.W. 66,000), phosphorylase b(from rabbit muscle. M.W. 97,400), β -galactosidase(from *E. coli*, M.W. 116,000), myosin(from rabbit muscle. M.W. 205,000)을 사용하였다.

3) Two-dimensional gel electrophoresis (2-DGE)

2차원 전기영동에 의한 단백질 분석은 O' Farrell(1975)의 방법을 변형하여 실시 하였다(McLellan *et al.*, 1983; Celis *et al.*, 1984). 1차 isoelectric focusing은 9.5M urea, 5% 2-mercaptoethanol, 2% Nonidet P-40, 1.6% Ampholine (LKB. pH 5~7.), 0.4% Ampholine(LKB, pH 3.5~10)을 함유하는 polyacrylamide gel을 길이 13cm, 내경 2mm의 유리관에 중합하여 사용 하였으며, 200V에서 15분, 300V에서 30분, 500V에서 30분간 prerunning한 다음 시료를 apply 하여 400V에서 17시간, 800V에서 1시간 총 7,600V·시간으로 isoelectric focusing을 실시하였다. 영동이 끝난 isoelectric focusing gel은 SDS slab gel(12.5%)에서 15 $^{\circ}$ C, 20mA로 4시간 동안 2차원 전기영동을 실시하였다. 2차원 전기영동후 0.25% Coomassie brilliant blue R-250(Sigma)으로 염색하고 7% acetic acid(35% methanol 포함)로 완전히 탈색하여 Coomassie 염색으로 검출되지 않는 적은량의 단백질을 검출하기 위하여 Oakley *et al.* (1980)의 방법으로 silver staining 하였다.

4) Genetic similarity (F)와 Genetic distance (D) 산출

2차원전기영동법에 의한 geneticsimilarity와 genetic distance는 2-DGE에 의하여 나타난 protein spot의 비교에 의해서 먼저 양종의 geneticsimilarity (F)를 $2n_{11}/(n_1+n_2)$ 에 의하여 구하였다. n_1 및 n_2 는 각 종의 전기영동상에 나

타난 protein spot의 총수이며, n_s 는 비교하는 양종에 공통으로 존재하는 protein spot의 총수이다. genetic distance(D)는 1-F로 구하였다(Aquardo and Avise, 1981).

5) Dendrogram 작성

2-DGE에 의해 얻어진 genetic distance를 바탕으로 UPGMA법(unweighted pair group arithmetic average clustering)과 Nei(1975) 방법에 의하여 작성 하였다.

결과 및 고찰

사철란속(*Goodyera*) 4종의 SDS PAGE에 의한 전기영동상은 Fig. 1과 같으며, 단백질 band pattern의 분석에 의하면 약 20여개의 band를 구별할 수 있었다. 이를 densitometer를 사용하여 각 단백질의 banding pattern의 차이를 기록한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 분자량이 큰 표지 단백질에서 부터 a-g로 표시하여 각종의 기록에서 거리상 동일 부위를 나타내었다.

a와 b(M. W. 205,000~116,000) 구간에서 *G. velutina*, *G. maximowicziana*와 *G. macrantha*는 서로 매우 유사한 pattern을 나타낸 반면 *G. schlechtendaliana*는 a와 b구간에서 약간의 농도 차이를 나타내었다. b와 c(M. W. 116,000~97,400) 구간과 c와 d(M. W. 97,400~66,000) 구간에서 *G. velutina*와 *G. maximowicziana*, *G. schlechtendaliana*와 *G. macrantha*가 비교적 유사한 pattern을 나타내

고 있었다. d와 e(M. W. 66,000~45,000) 구간에서 4종 모두 매우 유사한 pattern을 보였으나, *G. velutina*만이 약간의 농도 차이를 나타내었다. e와 f(M. W. 45,000~29,000) 구간에서 *G. maximowicziana*와 *G. macrantha*가 비교적 유사한 pattern을 나타내고 있으며 *G. velutina*와 *G. schlechtendaliana*에서 특이한 peak가 보이고 있었다. f와 g(M. W. 29,000미만) 구간에서 *G. velutina*와 *G. maximowicziana*, *G. macrantha*가 비교적 유사한 pattern을 보이고 있으며, *G. schlechtendaliana*에서 특이한 peak가 약간씩 보이고 있었다. 전체적으로 볼때 약간의 농도 차이만 보이고 있을뿐 사철란속 4종은 서로 유사한 pattern을 나타내었다.

2-DGE에 의한 사철란속 4종의 전기영동상에서는 약 57~75개의 protein spot가 나타났다(Fig. 3, Table 2). 각 종간의 genetic distance(D)와 genetic similarity(F)는 Table 3에서 보여주는 바와 같다.

*G. maximowicziana*와 *G. schlechtendaliana*의 genetic distance는 0.5773으로서 가장 가까운 수치를 나타내었다. *G. velutina*에 대한 *G. maximowicziana*와 *G. schlechtendaliana*, 그리고 *G. macrantha*의 genetic distance는 각각 0.6061, 0.6029, 0.5858이며, *G. macrantha*에 대한 *G. schlechtendaliana*의 genetic distance는 0.7100이며 *G. maximowicziana*와는 가장 먼 0.7378을 나타내었다. Kim등(1981)이 사철란속을 조직학적으로 비교 검토한 바에 의하면 조직수준에서는 종간 차이를 발견할 수 없었다고 하였으나, 2-DGE 방법을

이용한 전기영동상에서는 사철란속 4종간의 단백질 spot의 비교에 의해서 종간 차이를 발견한 수 있었으며, 특히 *G. maximowicziana*와 *G. schlechtendaliana*는 2-DGE에 의하여 나타난 단백질 spot 분포가 유사하여 이들 두종은 유연관계가 가까운 것으로 사료된다. 2-DGE에 의하여 얻어진 genetic distance를 바탕으로 작성한 dendrogram은 Fig. 3와 같으며, 산철란속 4종간의 유연관계를 추정할 수 있었다.

2-DGE 방법에 의해 얻어진 결과에 의하면 *G. maximowicziana*와 *G. schlechtendaliana* 사이에는 genetic distance가 0.5773으로서 가장 가까운 유연관계를 나타내었으며, *G. maximowicziana*와 *G. macrantha*간의 genetic distance는 0.7378로서 가장 먼 유연관계를 나타내었다. *G. velutina*와 *G. maximowicziana*, *G. velutina*와 *G. schlechtendaliana*, 그리고 *G. velutina*와 *G. macrantha*간의 genetic distance는 각각 0.6061, 0.6029, 0.5858로서 *G. velutina*와는 *G. maximowicziana*와 *G. schlechtendaliana*보다는 *G. macrantha*에 가깝게 나타났고 *G. macrantha*와 *G. maximowicziana*, *G. macrantha*와 *G. schlechtendaliana*간의 genetic distance는 0.7378, 0.7100으로 *G. macrantha*는 *G. maximowicziana* 보다 *G. schlechtendaliana*에 가까운 것으로 나타났다.

따라서 조직학적 관찰결과 *G. velutina*만이 잎의 상주 표피세포가 외부로 돌출된 형태를 가지고 있다는 조직학적 연구결과와 2차원

전기영동상에 의한 연구결과가 다름을 알 수 있으며, 이들 4종간의 유연관계는 이들의 생태적 특징(Table 1)과 거의 일치하는 것으로 사료되며, 본 실험에서 채집되지 못했던 애기사철란(*G. repens*)을 포함하여 앞으로 세포 유전학적, 발생학적 및 생화학적 방법을 이용한 비교 검토가 필요하다고 본다.

적 요

제주도 사철란속(*Goodyera*) 4종(*Goodyera velutina*, *G. maximowicziana*, *G. schlechtendaliana*, *G. macrantha*)에 대하여 SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)와 two-dimensional gel electrophoresis(2-DGE) 방법을 이용하여 유전적 유연관계를 조사 하였다.

SDS PAGE 방법을 이용한 사철란속 4종간의 단백질 pattern은 서로 유사 하였다. 2-DGE 방법을 이용한 genetic distance는 *G. maximowicziana*와 *G. schlechtendaliana*가 0.5773으로서 가장 가까운 유연관계를 나타내었고 *G. velutina*와 *G. macrantha*간의 genetic distance는 0.5858로 나타났다. 이들에 비해 *G. maximowicziana*와 *G. macrantha*간의 genetic distance는 0.7378로서 가장 먼 유연 관계를 나타내었다.

이상과 같은 결과로 미루어 볼 때 사철란속 4종간의 유전적 유연관계는 이들의 생태적 특징과 거의 일치하는 것으로 사료된다.

Table 2. The numbers of common protein spots between two species in *Goodyera* analysed by two-dimensional gel electrophoresis

	<i>G. velutina</i> (75)	<i>G. maximowicziana</i> (57)	<i>G. schlechtendalianana</i> (66)	<i>G. macrantha</i> (65)
<i>G. velutina</i>				
<i>G. maximowicziana</i>	26			
<i>G. schlechtendalianana</i>	28	26		
<i>G. macrantha</i>	29	16	19	

The numbers in parenthesis indicate those of the total protein spots of each species.

Table 3. Genetic distances and similarities between two species of *Goodyera* estimated by analysing protein spots upon two-dimensional gel electrophoresis

	<i>G. velutina</i>	<i>G. maximowicziana</i>	<i>G. schlechtendalianana</i>	<i>G. macrantha</i>
<i>G. velutina</i>		<u>0.6061</u>	<u>0.6029</u>	<u>0.5858</u>
<i>G. maximowicziana</i>	0.3939		<u>0.5773</u>	<u>0.7378</u>
<i>G. schlechtendalianana</i>	0.3971	0.4227		<u>0.7100</u>
<i>G. macrantha</i>	0.4142	0.2622	0.2900	

The underlined numbers indicate genetic distance.

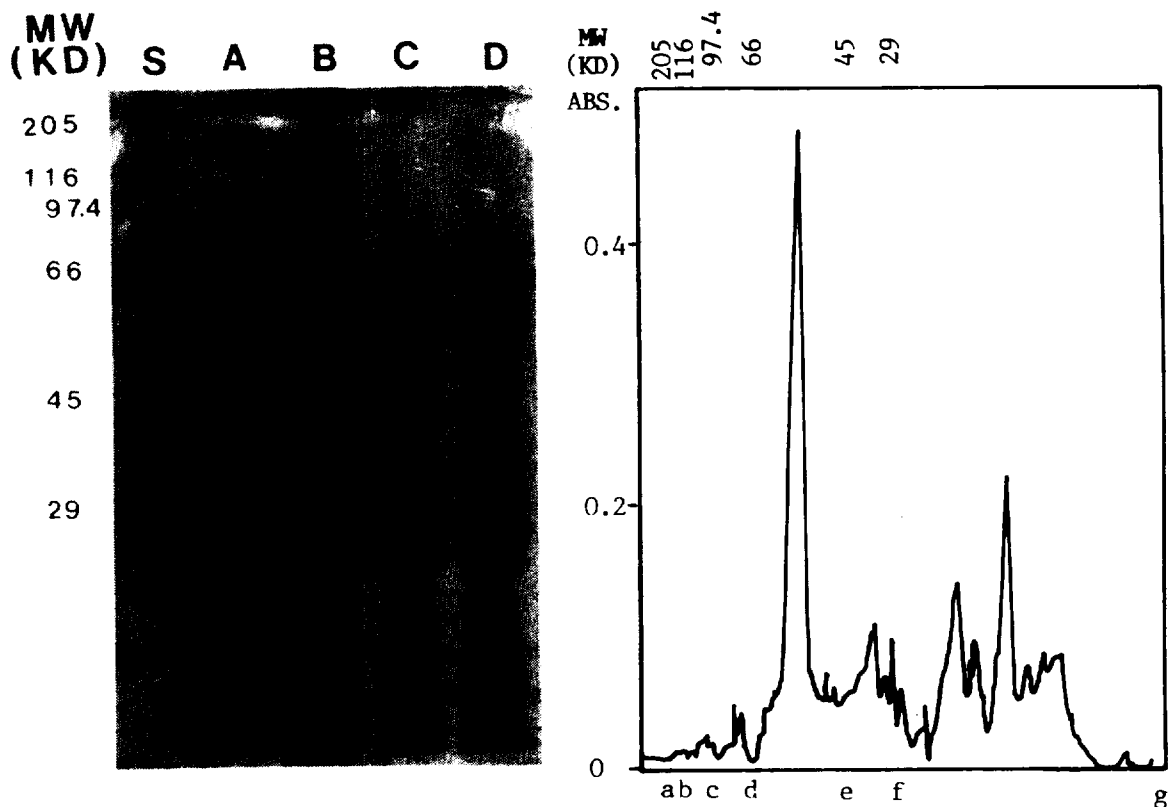


Figure 1. Protein patterns and its typical gel scanning separated by SDS-PAGE in 4 species of *Goodyera*. S, molecular markers; A, *G. velutina*; B, *G. maximowicziana*; C, *G. schlechtendaliana*; D, *G. macrantha*.



Figure 2. Two-dimensional gel electrophoretic patterns in 4 species of *Goodyera*. The proteins were detected by silver staining. A, *G. velutina*; B, *G. maximowiczina*; C, *G. schletendaliana*; D, *G. macrantha*.

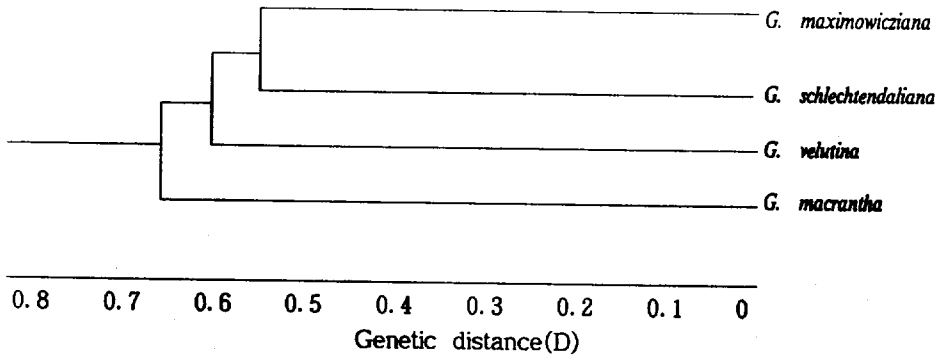


Figure 3. Dendrogram of genetic distance among four species of *Goodyera* based on two-dimensional gel electrophoretic patterns.

참 고 문 헌

- Aquardo, C. F. and J. C. Avise, 1981. Genetic divergence between rodent species assessed by using two-dimensional electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 78 : 3784~3788.
- Bang, J. W., 1984. Cytogenetic studies on Korean variety of Rye(*Secale cereale* L.). Ph. D. thesis, Seoul Nat'l. Univ.
- Beverly, S. M. and A. C. Wilson, 1985. Ancient origin for Hawaiian Drosophilinae inferred from protein comparisons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 4753~4757.
- Celis, J. E. and R. Bravo, 1984. Two-dimensional gel electrophoresis of proteins. Academic Press Inc. Orlando. pp.1~36.
- Chung, H. G. and S. K. Lee, 1985. Isozyme analysis of nine natural populations of *Abies koreana* Wilson in Korea. *Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea* 21 : 89~95.
- Craig, I. L., B. E. Murray, and T. Rajhathy, 1974. *Avena canariensis*: Morphological and electrophoretic polymorphism and relationship to the *A. magna*-*A. murphyi* complex and *A. sterilis*. *Can. J. Genet. Cytol.* 16 : 677~689.
- Dass, H. C. 1972. Analysis of species relationships in *Avena* by thin-layer

- chromatography and disc electrophoresis. *Can J. Genet. Cytol.* 14 : 305~316.
- Harn, C. Y., Y. J. Kim, S. Y. Yang, and H. J. Chung, 1977. Studies on the origin of *Prunus yedoensis* Matsu-mura(1. A comparative electrophoretic study on wild *P. subhirtella* in Mt. Hanla, cultivated *P. yedoensis* and *P. doirium*). *Korean J. Bot.* 20(1) : 1~5.
- Kim, K. S. and M. H. Kim, 1981. An anatomical study on genus *Goodyera* in Jeju-do. *Jour. Cheju Nat'l Univ.* 12 : 179~183.
- Kim, M. H., 1985. 濟州道 植物圖鑑. Cheju, pp.517~519.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227 : 680~685.
- Lee, C. B., 1980. Illustrated Flora of Korea. Hyang Moon Sa. Seoul. pp.233~234.
- Lee, J. S., 1977. Studies on the biochemical features of soybean seeds for highly protein variety—with emphasis on accumulation during maturation and electrophoretic pattern of proteins. *J. Korea Crop Sci.* 22 : 1~3.
- Lee, T. J. and G. J. Joo, 1981. Genetic relationships within the *Quinaria* species group of the genus *Drosophila*. *Kor. J. Genet.* 9(1) : 11~18.
- Leigh Brown, A. J. and C. H. Langley, 1979. Reevaluation of level of genic heterozygosity in natural population of *Drosophila melanogaster* by two-dimensional electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 2381~2384.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265~275.
- McClellan, T., G. F.—L. Ames, and K. Nikaido, 1983. Genetic variation in proteins : Comparison of one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Genetics* 104 : 381~390.
- Moon, D. K., 1987. Isozymes as genetic markers in *Citrus* growing in Cheju and their use for identification of nucellar and zygotic seedlings. Ph. D. thesis, Seoul Nat'l. Univ.
- Nei, M., 1975. Molecular population genetics and evolution. North Holland Publ. Co. Amsterdam. pp.175~209.
- Oakley, B. R., D. R. Kirsch, and N. R. Morris, 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal.*

- Biochem. 105 : 361~363.
- O'Farrell. P. H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 : 4007~4021.
- Shim, S. Y., H. G. Chung, and S. K. Lee, 1984. Inheritance of five polymorphic isozymes in *Abies koreana*. *Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea* 20 : 95~101.
- Simon, P. W. and S. J. Peloquin, 1980. Inheritance of electrophoretic variants of tuber proteins in *Solanum tuberosa* haploids. *Biochem. Genet.* 18 : 1055~1063.
- Son. Y. M., E. Y. Choi, and T. I. Ahn, 1984. Comparisons among fishes of genus *Liobagrus* in Korea by their morphology and electrophoretic pattern of proteins. *Kor. J. Zool.* 27 : 25~34.
- Sung, K. C., J. S. Kim, D. I. Kim, and Y. S. Kim, 1985. The genetic relationships of *Drosophila quinaria* species group. *Jour. Sung Kyun Kwan Univ.* 36 : 1~10.
- Stegemann, H., 1975. Properties of and physiological changes in storage proteins. In: *The chemistry and biochemistry of plant proteins.* Academic Press Inc. London. pp.71~88.
- Vapa, L. and K. Norojevic, 1978. Gliadin polymorphism in mutant lines of the variety san pastore. *Proc. 5th Inter. Wheat. Genetic Symp.* : 565~573.
- 渡邊清彦. 1876. 植物分類學(種子植物). 風間書房
- 山岸高旺. 1974. 植物分類學の基礎. 圖鑑の北陸館.