



A cytogenetic study of *Astragalus koraiensis* Y. N. Lee

Sang Eun Han, Hyun-Hee Kim¹ and Kweon Heo*

Department of Applied Plant Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Department of Life Science, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

(Received 12 February 2013; Revised 11 March 2013; Accepted 15 April 2013)

정선황기의 세포유전학적 연구

한상은 · 김현희¹ · 허 권*

강원대학교 식물자원응용공학과, ¹삼육대학교 생명과학과

ABSTRACT: This study was carried out to determine the karyotype and chromosomal localizations of 45S and 5S rDNAs using FISH in *Astragalus koraiensis*. The somatic metaphase chromosome number of this species was $2n = 16$ with basic chromosome number of $x = 8$. The karyotype of *A. koraiensis* was consisted of six pairs of median region chromosomes(chromosome 1, 3, 4, 5, 6, 8) and two pairs of sub-median chromosomes(chromosome 2, 7). Based on the FISH, one pair of 45S rDNA site was detected on the centromeric region of chromosome 5. Whereas, two pair of 5S sites were detected on the short arm of chromosome 4 and centromeric region of chromosome 7, respectively. These are quite different patterns from *A. membranaceus*, *A. membranaceus* var. *alpinus*, and *A. mongholicus*. Although *A. koraiensis* is considered as Korean endemic species, therefore, it should be conducted out comparative FISH study with *A. sikokianus* and *A. bhotanensis* which are very similar to *A. koraiensis* morphologically.

Keywords: *Astragalus* L., *Astragalus koraiensis*, karyotype analysis, FISH, rDNA

적 요: 국내에 자생하는 황기속(*Astragalus* L.) 식물인 정선황기(*A. koraiensis*)의 핵형을 분석하고, 5S 및 45S rDNA 유전자를 이용한 FISH 실험에 기초하여 세포유전학적 연구를 수행하였다. 핵형 분석 결과, 정선황기의 체세포 염색체수는 $2n = 16$ 으로, 기본 염색체수는 $x = 8$ 임을 확인하였다. 염색체 조성은 6쌍의 중부염색체(염색체 1, 3, 4, 5, 6, 8)와 2쌍의 차중부염색체(염색체 2, 7)로 구성되었다. 정선황기의 염색체상에서의 FISH 결과, 1쌍의 45S rDNA signal이 5번 염색체의 동원체 부위에서 관찰되었고, 2쌍의 5S rDNA signal이 4번 염색체의 단완 말단부위와 7번 염색체의 동원체 부위에서 관찰되었다. 이는 기존의 황기 및 제주황기, 몽골황기(*A. mongholicus*)와는 전혀 다른 FISH 패턴을 보이고 있어 정선황기가 고유종임을 암시하지만, 형태학적으로 유사한 갯황기(*A. sikokianus*) 및 *A. bhotanensis*와의 비교연구를 수행하여 정확한 분류학적 처리가 이루어져야 할 것이다.

주요어: 황기속, 정선황기, 핵형 분석, FISH, rDNA

정선황기(*Astragalus koraiensis* Y. N. Lee)는 콩과(Fabaceae)에 속하는 다년생 초본으로 주로 강원도 정선, 태백 등지의 냇가나 노지에서 자생한다(Lee, 1981).

외부형태는 갯황기(*A. sikokianus* Nakai)와 매우 유사하고(Kim, 2004), 제주황기(*A. membranaceus* var. *alpinus* Nakai)와도 유사하나 제주황기는 한라산 꼭대기 돌밭에서 비스듬히 자라는 반면 (Lee, 2003), 정선황기는 가지가 갈라져 포복성으로 자라는 점에서 차이가 있다. 또한, 정선황기는 우리나라의 특산식물 및 약용식물이며, IUCN 평가기준 멸종위기종 및 식물구계학적 특정

*Author for correspondence: laurus@kangwon.ac.kr

http://www.pltaxa.or.kr

Copyright © 2013 the Korean Society of Plant Taxonomists

식물종 V등급으로 분류되어 있어 희귀식물로서 이용 가치가 높다(국립환경과학원, 2013). 하지만 최근 자연 천이 및 무단채취 등으로 인해 자생지 및 개체수가 줄어들고 있어 보호가 시급하다.

우리나라에 자생하는 황기속(*Astragalus* L.) 식물은, 특산 식물인 정선황기(*A. koraiensis*), 제주황기(*A. membranaceus* var. *alpinus*)를 포함하여 현재까지 6종 3변종으로 알려져 있고(Toh, 1971; Kim et al., 2006), 이들에 대한 세포유전학적 연구로는 Toh(1971)의 황기와 제주황기의 핵형에 관한 연구와, Kim 등(2006)의 황기, 제주황기, 몽골황기(*A. mongholicus* Bunge)의 핵형과 FISH 기법을 이용한 세포유전학적 연구 외에 Luo 등(1999)의 자주개황기(*A. adsurgens* Pall.) 재분화 개체의 염색체를 관찰한 결과가 있다. 이밖에 우리나라 황기속에 대한 분류학적 연구로 황기의 뿌리 및 외부와 내부형태에 관한 연구(Lee and Chung, 2004)가 있으며, 분자생물학의 발전과 더불어 DNA 유전정보를 활용한 분류가 시작되어 ITS 마커를 이용한 황기속의 분류와(Kim, 2004), SCAR 마커를 이용하여 황기와 몽골황기(*A. mongholicus*)를 분류한 연구 결과가 보고되어 있다(Lim et al., 2007). 한편, 정선황기는 희귀식물로서 종다양성 차원에서 높은 가치가 있음에도 불구하고, 세포유전학적 연구는 전무한 상태이다. 정선황기는 1981년에 제주황기와 함께 Lee(1981)에 의해 신종으로 발표 되었고, 2004년 한국산 황기속 식물의 ITS 부위의 염기서열을 연구한 결과, 정선황기와 갯황기(*A. sikokianus*)의 외부형태 및 ITS 염기서열의 유사성이 매우 높은 것으로 보고되어 갯황기에 통합해야 한다는 의견이 제시된 바 있다(Kim, 2004).

식물의 세포유전학적 정보는 유전자원의 보존 및 이용에 기초자료가 된다(Kim and Lee, 2007). 특히 핵형은 그 종의 염색체 수, 크기, 형태 등의 특징을 보여주며, 식물은 종마다 고유의 핵형을 가지고 있기 때문에 종을 분류하는데 유용하며(Wang et al., 2011), 염색체의 길이와 동원체의 위치로 구분하여 긴 것으로부터 짧은 것으로 고유번호를 부여하여 명명한다(Battalia, 1955; Levan et al., 1964; Naranjo et al., 1983). 핵형은 염색체의 형태적 특징에 따라 구분하기 때문에 외부 형태적으로 구분이 어려운 식물종에서, 세포유전학적 수준에서 종의 구분을 가능하게 할 뿐만 아니라, 분류군간 계통 유연관계 연구에도 유용한 도구가 될 수 있다(Kim et al., 2006).

FISH(Fluorescence *in situ* hybridization)는 염색체 및 핵에서 특정 염기서열의 위치를 직접 확인하여 물리적 유전자 지도 작성과 genome의 구성 및 계통유연관계 연구에 접근할 수 있는 가장 유용한 방법이다(Seo, 1997). 1970년 핵산 교잡반응을 염색체에 응용하여 특정 염기서열부위를 시각화한 연구(Pardue and Gall, 1970)를 시작으로 1980년대 후반에는 FISH 기법의 원형이 보고되었으며(Bauman et al., 1989), 식물에는 Rayburn과 Gill(1985)

에 의해 최초로 적용되었다. 1989년에는 처음으로 blue(amino methyl coumarin acetic acid = AMCA)와 red(tetramethylrhod-amine isothiocynate = TRITC), 그리고 green(fluorescein isothio-cynate = FITC)으로 표지한 multi-color FISH를 이용하여 염색체 분류에 성공하였다(Ned-erloff et al., 1989). FISH는 초기의 방사선 동위원소법에 비해 탐침의 검출에 필요한 시간이 짧고 해상도가 높으며(Kim et al., 1998), 염색체의 세포학적 정보와 DNA 염기서열 구조에 대한 정보가 상관되어 있기 때문에 유전현상에 대하여 정확한 정보를 제공한다(Cho et al., 2003). 또한, FISH는 상동 염색체의 확인(Seo, 1997), 염색체의 구조(Moore et al., 1993), 염색체 상에서의 유전자의 위치 확인(Mukai et al., 1991) 등에 널리 이용되고 있다. 최근에는 multi-color FISH 기법의 사용으로 각기 다른 분광 범위의 형광 물질을 사용하여 한 번에 두 개 이상의 서로 다른 염기서열을 동시에 검출할 수 있어(Seo, 1997), 염색체상에서 정밀한 분자지도 작성이 가능하게 되었다(Kim et al., 2004). 특히 45S와 5S rDNA는 어느 식물종이나 공통으로 가지고 있기 때문에(Seo, 1997; Koo et al., 2003), 분류군 내에서도 종간의 차이를 구분할 수 있는 유용한 분자 마커로 사용되며, 이를 이용한 물리지도(physical mapping)의 작성은 염색체 구조 및 핵형 분석이나 계통 구조의 비교 연구에 유용하다(Flavell et al., 1986; Rogers et al., 1987; Ricroch et al., 1992; Cho et al., 2003). 또한, 이들이 서로 다른 위치에서 나타나기 때문에 염색체 분염법으로 핵형 분석이 어려운 경우에도 유용하게 사용될 수 있다(Kim and Kim, 2009).

본 연구는 정선황기의 중기 염색체의 핵형을 분석하고, 45S와 5S rDNA를 탐침으로 이용한 FISH 기법을 통해 염색체 물리지도 및 세포유전학적 기초 정보를 제공하여 정선황기의 특산종으로서의 분류학적 위치를 명확히 하고자 실시하였다. 아울러 황기속 전체종의 세포유전학적 연구에 기초자료로 활용하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 정선황기는 강원도 강릉시 강동면 심곡리, 강원도 정선군 화암면 호촌리에서 채종하여 발아시킨 다음, 근단을 채취하여 염색체 관찰 시료로 사용하였다(Table 1). 논문에 인용된 분류군의 학명은 국가표준식물 목록(국립수목원, 한국식물분류학회, 2007)집을 따랐다.

2. 방법

1) 슬라이드 제작 및 핵형 분석

FISH용 슬라이드를 제작하기 위하여 약 2 cm 정도 자란 근단을 채취하여 0.2 mM 8-hydroxyquinoline 용액에 담가서 5시간 전처리한 다음, ethanol과 glacial acetic

Table 1. Collection data of *Astragalus koraiensis* used in this study.

Taxa	Collection site	Collection data	Collector
<i>A. koraiensis</i>	Gangwon-do, Gangneung-si, Simgok-ri,	Oct. 2, 2012	Heo & Han
	Gangwon-do, Jeongsun-gun, Hochon-ri	Oct. 2, 2012	Heo & Han

acid(3:1, v/v) 혼합용액에 24시간 고정 후, 70% ethanol에 냉장 보관하면서 실험재료로 이용하였다. 고정된 근단은 효소 혼합용액(2% cellulase, 1.5% macerozyme, 1% pectolyase, 150 mM citrate buffer, pH 4.5)에 담가 37°C에서 60분간 처리 후, 근단의 분열조직을 적출하여 60% acetic acid를 떨어뜨려 압착하고 건조시킨 뒤, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)를 사용하여 핵형을 확인하였다. 핵형 분석은 Levan et al., (1964)의 방법에 따라 염색체의 동원체를 중심으로 단완(short arm, S)과 장완(long arm, L)의 길이를 이용하여 arm-ratio (L/S)를 구하고 그 비가 1.0~1.7이면 중부염색체(median region, m), 1.7~3.0이면 차중부염색체(submedian, sm), 3.0~7.0이면 차단부염색체(subterminal, st), 7.0~∞이면 단부염색체(terminal region, t)로 구분하여 분석하였다. 염색체는 긴 것로부터 짧은 것 순으로 배열하여 고유 번호를 부여하였고, 실험의 재현성 및 정확성을 위해 3세포 이상을 분석하였다. FISH를 수행하기 전에 프레파라트의 cover glass를 제거한 뒤, 상온에서 70%, 95%, 100% ethanol에 각각 3분씩 처리 후 건조시켜 보관하였다.

2) 탐침의 준비

FISH를 위한 탐침으로는 biotin-16-dUTP로 표지된 45S rDNA와 digoxigenin-11-dUTP로 표지된 5S rDNA를 이용하였다. 45S와 5S rDNA의 탐침을 제작하기 위해, 정선황기의 genome DNA(20 ng) 3 µL, 45S rDNA(Son et al., 2010), 5S rDNA(Son et al., 2012; Table 2) primer를 각각 1 µL, 10X buffer 2.5 µL, dNTP 2 µL, Taq polymerase 0.2 µL, 멸균 증류수 16.3 µL를 혼합하였다. PCR(polymerase chain reaction) 조건은 초기 95°C에서 5분간 denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분간 32 cycles, 마지막으로 72°C에서 5분간 elongation 시켰다.

Table 2. A list of the primers for this study.

Primers	Sequences
45S_F	5'-GCGAGAATTCCTGAACT-3'
45S_R	5'-ACGAATTCCTCCGCTTATTGATATGCTTA-3'
5S_F	5'-GATCCCATCAGAACTCC-3'
5S_R	5'-GGTGCTTTAGTGCTGGTAT-3'

PCR로 증폭시킨 45S와 5S rDNA 유전자를 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하고, T-Vector(Promega, USA)로 PCR 증폭산물을 ligation한 후, competent cell로 *E.coli*를 사용하여 transformation한 후에 plasmid DNA를 추출하였다. 이어서 template DNA에 45S rDNA는 biotin-16-dUTP(Roche, Germany)로, 5S rDNA는 digoxigenin-11-dUTP(Roche, Germany)로 nick translation 법에 따라 표지하여 15°C에서 90분간 반응시킨 다음, 0.5 M EDTA(pH 8.0)를 첨가하여 65°C에서 10분간 처리 후 -20°C에 보관하였다.

3) Fluorescence in situ hybridization

FISH는 Waminal and Kim(2012)의 방법을 변형하여 사용하였다. 건조된 염색체 슬라이드에 RNase 용액(100 µg/mL, 2X SSC)을 도포하여 37°C에서 60분간 처리 후 2X SSC 용액에서 5분간 3회 수세하고, 슬라이드 상의 염색체 변성을 위해 4% paraformaldehyde에서 10분간 처리 후, 70%, 90%, 100% ethanol에서 각각 3분간 탈수한 후 상온에서 건조시켰다.

탐침 혼합액(biotin-16-dUTP와 digoxigenin-11-dUTP로 각각 표지된 500 ng의 probe DNA, 50% formamide, 10% dextran sulfate, 2X SSC, 5 ng salmon sperm DNA)은 70°C에서 10분간 변성시킨 후, 곧바로 얼음에서 10분간 급냉시켜 준비하여 건조된 슬라이드상에 40 µL씩 분주하고 cover glass를 덮어 rubber cement로 밀봉한 후, 37°C의 humid chamber에서 16시간 이상 hybridization 시켰다. Hybridization이 완료된 후, 2X SSC 용액에서 5분, 42°C의 0.1X SSC 용액에서 35분, 2X SSC 용액에서 5분간 처리하여 hybridization 되지 않고 남은 여분의 탐침을 제거하였다. 탐침의 비특이적인 결합을 막기 위해 염색체 슬라이드를 실온에서 5분 동안 blocking(Roche, Germany)한 후, biotin으로 표지된 45S rDNA 탐침은 CyTM3-streptavidin conjugate(Zymed, USA)로, digoxigenin으로 표지된 5S rDNA 탐침은 anti-digoxigenin-fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate(Sigma, USA)로 확인하므로, CyTM3-str-ept-avidin과 anti-digoxigeninflourescein isothiocyanate를 blocking 용액과 혼합 후, 슬라이드에 도포하여 37°C의 humid chamber에서 60분간 반응시켜 biotin과 digoxigenin이 검출 되도록 하였다. 이어서 슬라이드를 70%, 90%, 100% ethanol에서 각각 3분씩 처리하여 여분의 형광물질을 제거하고 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)가 함유되어 있

는 vectashield 용액(Vector laboratories Inc., USA)을 각 슬라이드 위에 25 μL 씩 분주한 후, cover glass를 덮어 CCD camera(CoolSNAP™)와 형광현미경(Olympus BX51)을 이용하여 signal을 관찰하고 사진을 촬영하였다. 확인된 signal들은 Cytovision/Genus™(version 3.1) 소프트웨어를 사용하여 작성하였으며 실험의 재현성 및 정확성을 위해 3세포 이상을 분석하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 우리나라에 자생하고 있는 황기속 식물 중 정선황기(*A. koraiensis*)를 대상으로 핵형 분석과 45S rDNA 및 5S rDNA를 이용하여 FISH 기법에 기초한 세포유전학적 연구를 수행하였다.

핵형 분석 결과, 정선황기의 체세포 염색체수는 $2n = 16$ 이며 기본 염색체수는 $x = 8$ 로, 이배체(diploid) 식물임이 확인되었다(Fig. 1A). 이전의 연구에서 자주개황기(Luo et al., 1999)와 황기, 제주황기(Kim et al., 2006) 또한 기본 염색체수가 $x = 8$ 로 보고된 점을 미루어보아 우리나라에 분포하는 황기속 식물의 기본 염색체수는 $x = 8$ 인 것으로 판단되어진다. 또한 정선황기의 염색체 크기는 2.68~3.45 μm 범위, arm-ratio는 1.42~1.84 범위로 나타났다. Arm-ratio에 따라 염색체 조성은 6쌍의 중부염색체와 2쌍의 차중부염색체로 구분되었다(Table 3).

각 상동염색체의 형태적 특징은 다음과 같다. 1번 염색체는 상동 염색체 중 길이가 가장 긴 염색체로 평균 길이가 3.45 μm 이었고, arm-ratio는 1.51로 중부염색체로 관찰되었고, 2번 염색체는 평균 길이가 3.19 μm 이

었으며, arm-ratio는 1.84로 차중부염색체이었다. 3번 염색체는 평균 길이가 3.14 μm 이었고, arm-ratio는 1.66으로 중부염색체로 확인되었고, 4번 염색체는 평균 길이가 3.03 μm 이었고, arm-ratio는 1.50으로 역시 중부염색체로 관찰되었다. 5번 염색체는 평균 길이가 2.88 μm 이었고, arm-ratio는 1.42이므로 중부염색체로, 6번 염색체는 평균 길이가 2.83 μm , arm-ratio가 1.54로 중부염색체로 확인되었다. 7번 염색체는 평균 길이가 2.74 μm 이었고, arm-ratio는 1.71로 차중부 염색체로 관찰되었으며, 8번 염색체는 평균 길이가 2.68 μm 로 상동염색체 중 가장 짧게 나타났으며, arm-ratio는 1.55로 중부염색체로 확인되었다(Table 4).

FISH 결과, 1쌍의 45S rDNA signal과 2쌍의 5S rDNA signal이 관찰되었는데(Fig. 1B), 45S rDNA signal은 5번 염색체에서 관찰되었고, 5S rDNA signal은 4번 염색체와 7번 염색체에서 관찰되었다(Fig. 2; Fig. 3). 45S rDNA는 리보솜의 구성 성분으로, 모든 식물종의 염색체상에서 1쌍 이상이 존재하고(Leitch and Heslop-Harrison, 1993), 18S, 5.8S, 26S의 모든 식물종마다 거의 보존적인 coding 지역과 ITS(internal transcribed spacer) 지역이 반복적으로 배열된 구조를 가지며, 특히 ITS는 종의 식별(Jobes and Thien, 1997; Son et al., 2009)과 계통 분석(Hsiao et al., 1995; Liu et al., 2006; Son et al., 2010)에 유용한 분자 마커이다. 한편, 45S rDNA signal은 부수체가 없는 염색체에서도 나타나기는 하지만, 부수체 염색체의 경우 45S rDNA signal이 염색체의 인 형성 부위(NOR; nucleolar organizing region)에서 나타나며(Kim and Lee, 2007), 식물 종은 대부분 부수체 염색체를 한 쌍 이상 가지고 있으므로 정선황기에서는 45S rDNA signal이 5번 염색체

Table 3. Karyotype analysis of the *Astragalus koraiensis*.

Species	Chr. No.	Chr. length (μm)	Karyotype formula (2n)
<i>A. koraiensis</i>	$2n = 16$	2.68 ~ 3.45	6 m + 2 sm

Table 4. Chromosome size and arm ratio of *Astragalus koraiensis*.

Species	Chr. No.	Short arm (μm)	Long arm (μm)	Total length (μm)	Arm ratio (L/S)	Form*
<i>A. koraiensis</i>	1	1.37	2.08	3.45	1.51	m
	2	1.12	2.07	3.19	1.84	sm
	3	1.18	1.96	3.14	1.66	m
	4	1.21	1.82	3.03	1.50	m
	5	1.19	1.69	2.88	1.42	m
	6	1.11	1.72	2.83	1.54	m
	7	1.01	1.73	2.74	1.71	sm
	8	1.05	1.63	2.68	1.55	m

*m, median region; sm, submedian.

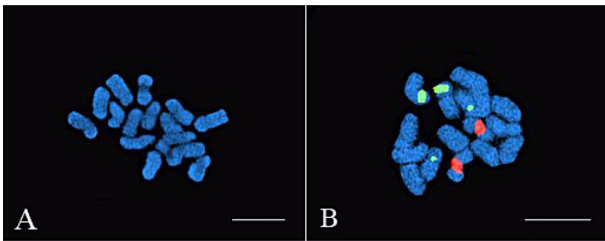


Fig. 1. Diploid somatic chromosomes from metaphase plate(A) and FISH patterns of the metaphase chromosomes of *A. koraiensis* using 45S rDNA(red) and 5S rDNA(green) (B). Scale bars are 5 μ m.

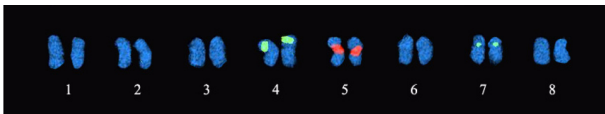


Fig. 2. FISH mapping of *A. koraiensis*. 45S rDNA and 5S rDNA are shown as red and green signals, respectively.

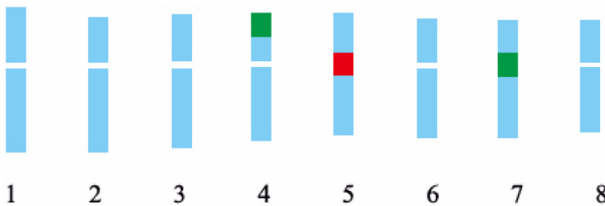


Fig. 3. FISH idiogram of 45S rDNA and 5S rDNA loci on the chromosomes of *A. koraiensis*. 45S rDNA and 5S rDNA are shown as red and green, respectively.

의 NOR 부위에 나타난 것으로 판단할 수 있다. 따라서 정선황기에서는 5번 염색체가 부수체 염색체라고 말할 수 있다. 이러한 결과는 Kim et al. (2006)의 연구에서 황기, 몽골황기(*A. mongholicus* Bunge), 제주황기의 45S rDNA signal이 7번 염색체에서 관찰된 결과와는 다르게 관찰되었으므로, 위의 세 종과 분류학적으로 차이가 있는 것으로 판단되어진다. 5S rDNA는 식물종에서 120bp의 거의 보존적인 염기서열을 가지고 있는 지역과 NTS(non-transcribed spacer) 지역이 반복적으로 배열되어 있는 구조를 가지며, 하나의 locus에서 rDNA의 복제수의 변화가 심하여 수의 변이와 위치 분포가 식물종간의 유연관계와 진화 연구에 유용하고(Mukai et al., 1991; Maluszynska and Heslop-Harrison, 1993), 복제수와 유전자의 위치변화가 빨라 배양세포에서 관찰이 가능하다(Leitch et al., 1993; Seo, 1997). 5S rDNA의 경우 Kim et al. (2006)의 연구에서 황기와 몽골황기(*A. mongholicus* Bunge)에서는 1쌍, 제주황기에서는 2쌍으로 관찰되었는데, 이번 연구에서는 2쌍이 4번 염색체와 7번 염색체에서 관찰되었다. 이렇게 같은 속 내에서도 종간의 차이를 보이는 이유는 5S rDNA의 반복서열 부위의 대부

분이 non-coding sequence이기 때문에 진화 과정동안 rDNA의 복제수의 변화가 심하여 빠른 염기서열의 진화과정을 거치기 때문으로 생각된다(Seo, 1997).

염색체 연구는 종을 동정하고 중간 유연관계를 추정하는데 유용한 세포유전학적 방법으로(Park et al., 2006), 본 연구에서는 정선황기의 핵형 분석 및 FISH 기법을 이용하여 45S와 5S rDNA의 물리지도(physical mapping)를 작성하였다. 특히, 정선황기는 세포유전학적 연구를 처음으로 시도하였는데, 정확한 분류학적 위치를 밝히기 위해서는 이전의 연구결과로 미루어 정선황기와 갯황기 및 *A. bhotanensis*와의 rDNA의 위치 비교 연구가 수행되어야 할 것으로 판단되어진다.

본 연구 결과는 정선황기의 세포유전학적 정보를 처음으로 보고하게 되는 것일 뿐만 아니라, 황기속 전체의 계통분류학적 연구에 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 산림청 ‘산림과학기술개발사업(과제번호: S211013L020110)’의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

인용문헌

- Battalia, E. 1955. Chromosome morphology and terminology. *Caryologia* 8: 179-187.
- Bauman, J. G., J. A. Bayer and H. van Dekken. 1989. Fluorescent *in situ* hybridization to detect cellular RNA's by flow cytometry and confocal microscopy. *Journal of Microscopy* 157(1): 73-81.
- Cho, H. G., D. H. Koo, S. Y. Kim and J. W. Bang. 2003. Karyotype analysis and physical mapping of rDNAs in diploid *Nicotiana plumbaginifolia*. *Korean Journal of Plant Biotechnology* 30(1): 7-11. (in Korean)
- Flavell, R. B., M. O'Dell, W. F. Thompson, M. Vincentz, R. Sardana and F. Barker. 1986. The differential expression of ribosomal RNA genes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 314: 379-385.
- Jobs, D. and L. Thien. 1997. A conserved motif in the 5.8S ribosomal RNA (rRNA) gene is a useful marker for plant internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 326-334.
- Kim, S. Y., Y. P. Kim and J. W. Bang. 1998. Cytogenetic analysis of *Brassica campestris* var. *pekinensis* using C-banding and FISH. *Korean Journal of Genetics* 20(4): 285-294. (in Korean)
- Kim, S. Y., H. W. Choi and J. W. Bang. 2004. Physical

- mapping of rDNAs using McFISH in *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. Korean Journal of Medicinal Crop Science 12(6): 515-518. (in Korean)
- Kim, S. Y. 2004. Taxonomic study on the genus *Astragalus* (Leguminosae) in Korea. Inha University, Thesis of Master of Science. (in Korean)
- Kim, S. Y., H. W. Choi, C. S. Kim, J. S. Sung, J. K. Lee and J. W. Bang. 2006. Cytogenetic analyses of *Astragalus* species. Korean Journal of Medicinal Crop Science 14(4): 250-254. (in Korean)
- Kim, S. Y. and J. G. Lee. 2007. Karyotype analysis and physical mapping of rDNAs using bicolor-FISH in *Tiarella polyphylla* D. Don. Korean Journal of Plant Resources 20(5): 446-450. (in Korean)
- Kim, S. Y. and C. S. Kim. 2009. Cytogenetic study of *Maackia amurensis* Rupr. & Maxim. and *M. fauriei* (Levl.) Takeda using karyotype analysis and the FISH technique. Korean Journal of Plant Taxonomy 39(3): 193-198. (in Korean)
- Kim, S. Y. and C. S. Kim. 2010. Analysis of FISH patterns using 5S and 45S rDNAs in *Codonopsis minima* and *C. lanceolata* from Jeju island. Korean Journal of Medicinal Crop Science 18(3): 186-190. (in Korean)
- Koo, D. H., S. Y. Kim, K. H. Bang, N. S. Seong and J. W. Bang. 2003. Cytogenetic analyses of *Angelica* plants using feulgen staining and multicolor fluorescence *in situ* hybridization. Korean Journal of Plant Biotechnology 30(2): 123-127. (in Korean)
- Korea National Arboretum. 2007. A Synonymic List of Vascular Plants in Korea. Pocheon, Gyeonggi-do. p. 143. (in Korean)
- Lee, Y. N. 1981. New taxa of Korean flora. Korean Journal of Botany 24(1): 27-30. (in Korean)
- Lee, Y. J. and K. H. Chung. 2004. A study on a morphological identification of *Astragalus* root. Korean Journal of Herbology 19(3): 61-68. (in Korean)
- Lee, T. B. 2003. Coloured Flora of Korea. Hyangmoonsa, Seoul p. 636. (in Korean)
- Leitch, I. J. and J. S. Heslop-Harrison. 1993. Physical mapping of four sites of 5S rDNA sequences and one site of the α -amylase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). Genome 36: 517-523.
- Levan, E., K. Fredga and A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position in chromosomes. Hereditas 52: 201-220.
- Lim, J. H., D. C. Jin, J. S. Sung, K. H. Bang, O. T. Kim, S. W. Cha and H. W. Park. 2007. Discrimination of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge from *A. membranaceus* (Fisch) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) with SCAR marker. Korean Journal of Medicinal Crop Science 15(1): 51-55. (in Korean)
- Luo, J. P., J. F. Jia, Y. H. Gu and J. Liu. 1999. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in callus cultures of *Astragalus adsurgens* Pall. Plant Science 143: 93-99.
- Maluszynska, J. and J. S. Heslop-Harrison. 1993. Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 1: 159-166.
- Moore, G, S. Abbo, W. Cheung, T. Foote, M. Gale, R. Koebner, A. Leitch, L. Leitch, T. Money and P. Stancombe. 1993. Key features of cereal genome organization as revealed by the use of cytosine methylation-sensitive restriction endonucleases. Genomics 15: 472-482.
- Mukai, Y., T. Endo and B. S. Gill. 1991. Physical mapping of the 18S, 26S rRNA multigene family in common wheat: Identification of a new locus. Chromosoma 100: 71-78.
- Naranjo, C. A., L. Poggio and P. E. Btandham. 1983. A practical method of chromosome classification on the basis of centromere position. Genetica 62: 51-53.
- Nederlof, P. M., D. Robinson, R. Abuknesha, J. Wiegant, A. H. Hopman, H. J. Tanke and A. K. Raap. 1989. Three-color fluorescence *in situ* hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. Cytometry 10: 20-27.
- National Institute of Environmental Research. 2013. Manual of the 4th Nature and Environment Survey.
- Pardue, M. L. and J. G. Gall. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science 168: 1356-1358.
- Park, Y. W., D. M. Kim, Y. J. Hwang, K. B. Lim and H. H. Kim. 2006. Karyotype analysis of five *Iris* species native to Korea. Korean Journal of Plant Biotechnology 33(1): 39-43. (in Korean)
- Rayburn, A. L. and B. S. Gill. 1985. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosome. Heredity 76: 78-81.
- Ricroch, A., E. B. Peffley and R. J. Baker. 1992. Chromosome location of rDNA in *Allium in situ* hybridization using biotin and fluorescein labelled probe. Theoretical and Applied Genetics 83: 413-418.
- Rogers, S. O. and A. J. Bendich. 1987. Ribosomal RNA gene in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. Plant Molecular Biology 9: 509-520.
- Seo, B. B. 1997. Physical mapping using multicolor fluorescence *in situ* hybridization in *Allium* species. Bull. Res. Inst. Gene Eng. KyungPook Univ. 12: 199-228. (in Korean)

- Son, S. W., J. K. Kim, K. J. Kim and S. J. Park. 2009. Molecular evidence for the hybridity of *Ilex* × *wandoensis* and the phylogenetic study of Korean *Ilex* based on ITS sequence data. *Genes & Genomics* 31: 53-63. (in Korean)
- Son, J. H., K. C. Park, T. W. Kim, Y. J. Park, J. H. Kang and N. S. Kim. 2010. Sequence diversification of 45S rRNA ITS, *trnH-psbA* spacer, and *matK* genic regions in several *Allium* species. *Genes & Genomics* 32: 165-172.
- Son, J. H., K. C. Park, S. L. Lee, E. J. Jeon, H. H. Kim and N. S. Kim. 2012. Sequence variation and comparison of the 5S rRNA sequences in *Allium* species and their chromosomal distribution in four *Allium* species. *Journal of Plant Biology* 55: 15-25.
- Toh, C. A. 1971. A cytotaxonomic study on the *Astragalus membranaceus* and *Astragalus membranaceus* var. *alpinus*. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 3: 58-61. (in Korean)
- Waminal, N. E. and H. H. Kim. 2012. Dual-color FISH karyotype and rDNA distribution analyses on four Cucurbitaceae species. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 53(1): 49-56.
- Wang, X., T. Zhang, Z. Wen, H. Xiao, Z. Yang, C. Guoxiong and Z. Xin. 2011. The chromosome number, karyotype and genome size of the desert plant diploid *Reaumuria soongorica* (Pall.) Maxim. *Plant Cell Reports* 30: 955-964.