

總 說

林木의 同位酵素\*1

朴 龍 求\*2

Forest Genetics of Isozymes\*1

Young Goo Park\*2

同位酵素가 林木分野의 研究에 利用되기 始作한지 10여년이 지난 요즘 많은 分野에서 그 成果가 높히 評價되고 있다. 特히 複雜한 遺傳變異를 가지고 있는 天然林分에서의 遺傳分析으로 많은 것을 밝혀 내어 林木의 遺傳育種學의 側面뿐만 아니라 森林遺傳生態學의 面에서도 큰 도움을 주고 있다.

本 總說은 지금까지 林木에 對한 同位酵素 利用 實例를 中心으로 앞으로 應用 可能分野에 對해 檢討한 것이다.

1. Zymography

a. 同位酵素(Isozyme)

同位酵素의 概念은 乳酸脫水素酵素(LDH)의 精製의 歷史的 過程 가운데 생겨난 것이다. LDH는 1919年 Myerhof에 의해 처음 筋肉속에서 發見되었는데 1940년에는 Straub에 의해 소(牛)의 심장에서 抽出 結晶化되었으며 Neiland등의 電氣泳動實驗에 의해 두가지 成分으로 나누어 짐을 밝혀 냈다. 그후 Markert와 Møller(1959)는 塞天鰐 電氣泳動에 의해 LDH가 다섯가지 成分으로 나누어 짐을 알게 되어 한 酵素를 한개의 遺傳子가 支配한다는 從來의 概念에 反해, 같은 酵素活性을 가지고 있으나 여러개의 遺傳子에 의해 支配받고 있는 構造가 다른 酵素群을 同位酵素라고 定義하였다. 即 生體內에서는 같은 觸媒役割을 하지만 分子의 多型을 나타내는 一團의 酵素群을 同位酵素라고 한다. LDH를 처음으로 하여 지금까지 알려진 同位酵素는 電氣泳動이나 크로마토그래프등에 의해 分離되는 것 뿐만 아니라 各各의 아미노酸 組成이나 反應基質에 對한 觸媒能등이 달라서 免疫化學의 差異에서 確實히 밝혀지고 있다.

b. Zymogram

蛋白質은 分子全體로써 特有한 電荷를 가진 20여개의 아미노酸으로 構成되어 있는데 이 아미노酸들은 正

電荷, 負電荷 또는 中性의 電荷를 가지고 있기 때문에 特定 蛋白質의 電荷는 構成 아미노酸의 種類와 數로써 結定된다. 아미노酸중 負의 電荷를 가진 것은 aspartic acid 및 glutamic acid의 carboxyl基가  $-COOH \rightleftharpoons COO^- + H^+$  反應으로 解離할 적에 만들어 지며 pH가 높아지면 tyrosin의  $-OH$ 基, cysteine의  $-SH$ 基의 解離에서도 나타난다. 正電荷는 lysine, arginine殘基의 amino基  $-NH_2 + H^+ \rightleftharpoons -NH_3^+$  및 histidine의 imidazol基  $=NH + H^+ \rightleftharpoons =NH_2^+$ 에 起因한다. 이와 같은 蛋白質의 電荷差와 分子量의 差에 따라 支持體위에 展開시킨 酵素蛋白質을 그 酵素의 特異한 呈色法에 의해 發見시킬 수 있는 實驗方法을 Zymogram法, 또는 Zymography라고 하며 이것에 의해 나타난 同位酵素型을 Zymogram이라고 한다.

c. 電氣泳動法(Electrophoresis)

Tiselius(1937)에 의해 考案된 電氣泳動法 (free electrophoresis)은 많은 分析 研究에 貢獻해 왔으나 實驗方法이 複雜하고 分離가 不充分한 缺點을 가지고 있어서 支持體를 使用한 電氣泳動法(zone electrophoresis)이 開發되었다(Smithies, 1955). 支持體로는 濾紙, 寒天, 澱粉, 澱粉粒, 아크릴아미드 등이 使用된다.

Zone electrophoresis는 Tiselius의 free electrophoresis에 비해 裝置가 간편하고 값이 싸며 試料量이 極히 적어도 分析이 可能하며 各 成分의 單離가 明確히 이루어 지는 점 등에서 월등한 長點을 가지고 있다.

\*1 Received for Publication on July, 20, 1979.

\*2 林木育種研究所 Institute of Forest Genetics

Zone electrophoresis도 支持體의 種類에 따라 그 特性이 各各 다르다. 濾紙電氣泳動法은 zone electrophoresis 가운데서도 가장 간편한 것이나 濾紙上에서 粒子가 擴散을 일으켜 電氣浸透가 일어나서 溶媒가 한 方向으로만 흐르거나 泳動중에 支持體의 表面에서 溶媒가 蒸發하기 때문에 蛋白粒子가 濾紙內를 移動할 때 꼭 直線으로만 가지않고 비뚤어 지는 경우가 있다. 그러므로 酵素의 移動距離를 精密하게 測定하는 것이 어려워져서 Tiselius法 보다 精度가 떨어 지는 경우도 있다. 이에 비해 아크릴아미드겔은 毒性은 있으나 再現性이 높고 항상 겔을 緩衝液속에서 저장하였다가 使用할 수 있는 간편성 때문에 많이 使用되고 있다. 澱粉겔도 취급이 比較的 간편하며 蛋白質의 分離能도 높아 많은 試料을 짧은 時間에 分析하기 위하여 一般적으로 가장 많이 使用되고 있다.

泳動方式 중에는 水平式, 垂直式, 薄層式의 3가지 방식이 있으며 그 特徵도 各各 다르다. 水平式은 垂直式에 비해 使用하기가 간편하며 薄層式은 유리판위에 두께가 一定한 薄層겔을 만드는 데 약간의 숙련이 必要하다. 또한 各 방식마다 一次元式과 二次元式이 있다. 林木에서 가장 많이 使用 되는 것은 水平式 澱粉겔과 垂直式 포리아크릴아미드겔이며 大部分의 경우 一次元式을 使用한다.

仔細한 實驗方法과 植物酵素分離에 使用되는 緩衝液과 呈色液調製法은 附錄을 參照하기 바란다.

#### d. 酵素變異의 保有機構

自然狀態에 存在하는 分子의 多型의 保有機構에 對해서는 두가지의 서로 다른 見解가 있다. 하나는 自然淘汰와 關係가 없다는 中立說과 다른 하나는 自然淘汰結果 유지 된다는 淘汰說이다. 이 두가지 說은 아직도 쟁쟁히 맞서고 있으며 앞으로도 結論에 도달하기엔 相當한 期間이 必要할 것 같다.

##### ① 中立說

中立說을 支持하는 學者들은 酵素의 對立遺傳子變異의 대부분은 適應과 關係없는 것으로, 生物集團의 遺傳變異는 주로 遺傳子浮動에 의해 생겨난 것으로 主張하고 있다. Kimura(1968)는 各種의 赤血球과 cytochrome-C의 構造的 差異는 進化的으로 意味가 없는 數個의 아미노酸의 機會的 置換에 의해 일어난 것으로 主張하고 있으며 이는 nucleotide의 構造가 밝혀짐에 따라 더욱 確實視되고 있다고 報告하였다. Kimura와 Ohta (1971)는 人間의 酵素多型에 對해 Yamazaki와 Maruyama (1974)는 그때까지 報告된 酵素蛋白質의 1,045個 遺傳子座와 血清蛋白質 26個 遺傳子座에 對한 淘汰型, hetero型, 中立型의 3가지 型으로 나누어 電算

機로 分析한 結果 中立型으로 나타났다고 結論 지었다. 또한 Yamazaki (1971)는 초파리의 EST-5 遺傳子座頻度를 同一하게 만든 實驗集團을 3個의 서로 다른 環境下에서 2年間 連續飼育한 結果 3個 集團 모두가 처음과 같은 遺傳子頻度を 나타냈다고 報告 하였다. O'Brien (1969)는 초파리의 自然集團과 20年間 飼育한 實驗集團에 對해 10個 酵素變異를 調査한 結果 自然集團과 거의 같은 變異를 나타냈다. Gooch (1972)는 深海 (1,000~2,000 feet)의 물고기 血清에 對한 電氣泳動變異가 多型現象을 나타내는 것은 一定한 環境下에서 中立的 突然變異가 蓄積되었기 때문으로 結論지었다.

##### ② 淘汰說

自然淘汰說을 主張하는 대부분의 學者들은 酵素變異와 生育環境變化間의 相關에 重點을 두고 있다. Johnson (1969, 1971)은 野生集團인 개미나 나비 集團의 酵素變異가 生育地의 環境因子와 相關이 있음을 報告 하였으며, Schoff (1971)는 바다에 사는 ectoproct의 自然集團의 EST, MDH, APOH 등이 地理的 傾斜를 나타냈는데 이는 生育하고 있는 場所의 水溫과 關係가 깊은 것으로 結論지었다. Williams (1973)는 맹장어의 APOH, ADH에 나타난 傾斜變異가 自然淘汰에 의한 것으로 推定하였다. 植物에 있어서 Allard (1972)는 大麥을 여러 곳에 植栽한 것의 EST酵素型과 地中海地方에서 導入된 野生 燕麥의 EST酵素型 變異가 植栽地의 環境的 因子와 平行되는 結果를 報告 했으며 Tigerstedt (1974)는 *Picea abies*에서 LAP, EST, APOH, ADH를 調査한 結果 LAP와 EST는 緯도에 따른 相關을 나타냈고 APOH와 ADH는 環境因子와 相關關係가 없었다고 結論지었다.

自然集團에서 雜種接合子頻도가 理論值보다 높게 나타난 것은 雜種接合子가 環境變化에 緩衝作用力이 커서 適應力이 높기 때문에 나타난 現象으로 생각하여 自然淘汰說을 主張하는 사람들도 있다(Ayala, 1976). Marshall (1970)과 Clegg (1973)는 燕麥의 EST遺傳子分析에서 Frydenberg (1973)는 *Zoarces*의 自然集團에서 23種의 同位酵素와 赤血球의 32遺傳子座에서 雜種接合子가 理論值보다 많은 것은 自然淘汰의 結果로 推定하였다.

以上과 같이 두가지 主張이 對立되고 있으나 아직 어느 것이 옳고 그름을 判斷내릴 수 없다. 酵素에 따라서는 어느 쪽인지 確實한 確증이 나타난 것도 있으나 現在 林木에 利用되고 있는 대부분은 아직 確證이 없으며 각기 自己 나름대로의 主張과 主觀下에서 研究에 應用하고 있는 實情이다.

2. 林木에 同位酵素利用

a. 遺 傳

同位酵素는 대부분이 간단한 멘-델식 遺傳을 하는 것으로 밝혀져 있으며 雜種酵素를 만드는 二量體 以上인 경우와 單純遺傳을 하는 單量體인 경우가 있다. 林木酵素는 單量體인 경우가 대부분으로 雜種酵素를 만드는 경우는 매우 드물다.

酵素의 多樣性을 電氣泳動法으로 判別하여 이들의 各遺傳子座內에서 나타내는 遺傳變異를 allozyme이라고 하며 對立同位酵素遺傳子(allelic enzyme)의 뜻으로

使用한다.

針葉樹에 있어서 酵素의 遺傳分析에는 半數體組織인 胚乳의 酵素型과 2n組織인 針葉이나 胚의 酵素型을 比較하여 쉽게 밝혀낼 수 있다. 또한 家系나 個體間 人工交配組合에서 얻은 F<sub>1</sub>과 母樹의 酵素型을 比較하여 遺傳分析하는 경우도 있다.

다음 예는 歐洲赤松 8個 母樹와 이들 6個交配組合에 對해 GOT同位酵素의 遺傳樣式을 分析하기 위해 母樹에서 針葉과 自殖種子를 採取하고 交配次代에서 針葉을 採取하여 澱粉겔 電氣泳動法으로 調査한 것이다.

胚乳組織 (n)과 針葉 (2n)의 遺傳子型을 調査한 結果 다음과 같이 遺傳子型을 推定하였다.

表 1. 歐洲赤松의 自殖과 他殖에 依한 推定 遺傳子型 分析

自殖 및 交配	推定遺傳子型	GOT-A 遺傳子座					調査數
		調査個體 遺傳子型					
		A <sub>1</sub> /A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>	A <sub>2</sub> /A <sub>22</sub>	A <sub>22</sub> /A <sub>22</sub>	
S3006S <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>	0	12	3			15
S3059S <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>			14			14
S3078S <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>			9			9
S3105S <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> /A <sub>22</sub>			1	3	0	4
S3144S <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>			15			15
T6007S <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>			7			7
W3040S <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>			19			19
W6009S <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>			14			14
S3244 × S3006	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub> × A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>		14	27			41
W3040 × S3006	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub> × A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>		19	22			41
W6009 × S3006	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub> × A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>		17	18			35
S3105 × S3059	A <sub>2</sub> /A <sub>22</sub> × A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>			21	4		25
S3244 × S3059	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub> × A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>			16			16
T6007 × S3059	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub> × A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>			26			26

(Rudin, 1975)

表 2. 歐洲赤松 母樹의 推定遺傳子型과 分離比

母 樹	GOT-A 遺傳子座				GOT-B 遺傳子座			調査數
	推定遺傳子型	分 離 比			推定遺傳子型	分 離 比		
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>22</sub>		B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	
S3006	A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>	47	64		B <sub>3</sub> /B <sub>3</sub>		111	111
S3096	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>	39			B <sub>2</sub> /B <sub>3</sub>	18	21	39
S3078	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>	18			B <sub>2</sub> /B <sub>3</sub>	8	10	18
S3105	A <sub>2</sub> /A <sub>22</sub>	52		46	B <sub>3</sub> /B <sub>3</sub>		98	98
S3244	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>	10			B <sub>3</sub> /B <sub>3</sub>		10	10
S6007	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>	19			B <sub>2</sub> /B <sub>3</sub>	8	11	19
W3040	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>	60			B <sub>2</sub> /B <sub>3</sub>	34	33	67
W6009	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>	20			B <sub>3</sub> /B <sub>3</sub>		20	20

(Rudin, 1975)

表 3. 林木에서 推定된 同位酵素遺傳子座數

樹 種	遺傳子座數	分析 組織	報 告 者
<i>Picea abies</i>	EST/1	needle, macrogametophyte	Bartels, 1971
<i>Picea abies</i>	EST/2 LAP/2	needle	Bergmann, 1973
<i>Picea abies</i>	EST/2 LAP/2 PHOS/2	endosperm	Bergmann, 1974
<i>Picea abies</i>	LAP/2	needle	Lundkvist, 1974
<i>Picea abies</i>	PHOS/1	needle	Lundkvist, 1975
<i>Picea sitchensis</i>	LAP/2 MDH/1 PGI/1 PGM/2	endosperm	Simonsen and Wellendorf, 1975
<i>Picea glauca</i>	PEROX/1	needle	Feret, 1971
<i>Pinus sylvestris</i>	EST/4	needle, endosperm	Rudin, 1973
<i>Pinus sylvestris</i>	GOT/2	needle, endosperm	Rudin, 1975
<i>Pinus sylvestris</i>	LAP/2	needle, macrogametophyte	Rudin, 1977
<i>Pinus attenuata</i>	APH/1 LAP/2	embryo	Conkle, 1971
<i>Pinus rigida</i>	6-PGD/2 MDH/2 PGM/2 LAP/2 GOT/2	embryo, megagametophyte	Guries, 1978
<i>Pinus nigra</i>	LAP/2	endosperm	Nicolic, 1974
<i>Pinus taeda</i>	LAP/1 ADH/1 PEROX/1	needle, endosperm	Long, 1972
<i>Pinus densiflora</i>	PEROX/4	needle	Park, 1976
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	PEROX/1	needle	Tajima, 1977
<i>Morus</i> spp.	PEROX/1	leaf blade	Hirano and Nagamura, 1979
<i>Ulmus pumila</i>	PEROX/1	leaf	Feret, 1971

\* Remarks; PHOS(APH): Acid Phosphatase  
 ADH: Alcohol Dehydrogenase  
 EST: Esterase  
 GOT: Glutamic-Oxaloacetic Transaminase  
 LAP: Leucine Aminopeptidase  
 MDH: Malate Dehydrogenase  
 PEROX: Peroxidase  
 PGI: Phosphoglucose Isomerase  
 PGM: Phosphoglucose Mutase  
 6-PGD: 6-Phosphogluconate Dehydrogenase

以上の 表에서 보는 것과 같이 歐洲赤松의 GOT 同位酵素는 GOT-A, GOT-B 두개의 遺傳子座에 各各 3個와 2個의 對立 遺傳子를 가지고 있는 것으로 推定하였다.

Lundkvist (1975)는 *Picea abies*의 針葉에서 PHOS 同位酵素를 分析한 結果 한개의 遺傳子座에 3個의 對

立 遺傳子가 있음을 發見했으며 아들 3個 (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>) 對立 遺傳子중 A<sub>2</sub>와 A<sub>3</sub> 遺傳子는 雜種酵素를 만드는 二量體로 推定하였다(그림 -1).

現在까지 林木에 있어서 報告된 同位酵素의 遺傳子座를 整理하면 表-3과 같다.

#### b. 近親交配

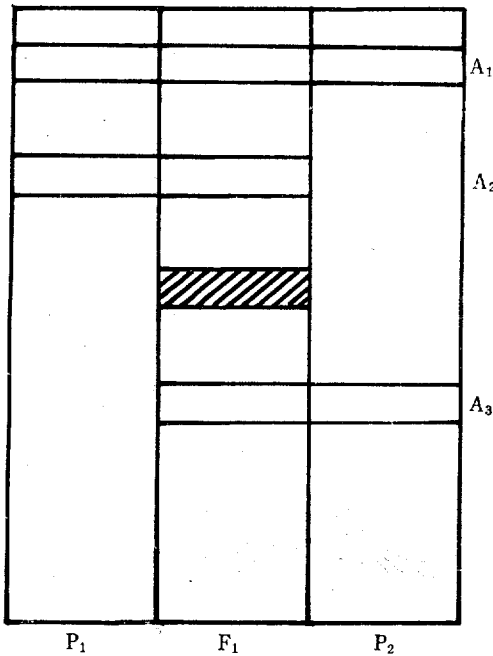


그림 1. 독일가문비 針葉 Acid phosphatase 同位酵素型 A<sub>2</sub>와 A<sub>3</sub> 遺傳子 사이의 雜種酵素型(Lundkvist, 1975)

野生集團인 林木集團에 있어서 交配樣式을 밝혀내는 것은 林木育種의 基礎資料로써 매우 重要한 問題이다. 特히 林木은 近親交配되는 경우 自殖弱勢現象이 매우 심하게 일어나 受精이 이루어 지지 않거나, 受精되었다 하더라도 種子形成過程에서 淘汰되거나, 種子가 形成된 것이라도 發芽段階에서 消滅되거나, 살아서 產地에 나간 것이라 할지라도 初期生長이 나빠 淘汰되거나 初期에 淘汰되지 않는 것이라도 壯老齡期에 가서 生長이 매우 처지는 例가 많이 있다. 人工的으로 造成한 採種園에서 어떻게 clone配置를 하는 것이 自配率을 줄일수 있는나 하는 것이 지금까지 큰 宿題로 남아 있다. 近親交配問題는 健全한 優良種苗를 多量으로 生産하려는 採種園에서는 特히 神經을 써야할 問題이다.

同位酵素를 利用하여 林木의 近親交配率을 計算하는 것은 지금까지 使用되어온 方法보다 간편하고 보다 正確히 測定할 수 있다.

Rudin (1973)은 歐洲赤松의 3個 集團에서 212個體의 針葉를 採取 GOT, EST, LAP의 同位酵素를 分析 이들 3個의 酵素에서 EST-B (6個對立遺傳子), GOT-B (6個對立遺傳子), LAP-B (4個對立遺傳子)의 3個 遺傳子座를 確定하였다. 이들 遺傳子座에 對해 同型對

表 4. 歐洲赤松 3個集團에서 調査된 近親交配率(F)

集團名	EST-B			GOT-B			LAP-B		
	기대치	관찰치	F	기대치	관찰치	F	기대치	관찰치	F
Vägsjöfors	.4863	.4184	.14	.5054	.4610	.09	.1145	.1064	.07
Gårdstjän	.5650	.3788	.33***	.5816	.5909	—	.1150	.1136	.01
Kiruna	.2526	.1538	.39	.5613	.5385	.04	.0979	.1026	—

\*\*\* 0~0.1%

(Rudin et al., 1974)

立遺傳子와 異型對立遺傳子 頻度를 利用, 다음 公式에 依해 近親交配率을 推定하였다.

$$F = \frac{H_0 - H_F}{H_0}$$

F는 近親交配率이고 H<sub>0</sub>는 異型接合子の 期待值 H<sub>F</sub>는 異型接合子の 觀察值이다. 表-4는 3個 集團의 近親交配率(F)을 나타낸 것이다.

이 表에서 F值가 높은 水準에서 有意差를 나타낸 것은 Gårdstjän 集團의 33%였다.

다음은 自殖率을 計算한 例로써 Norway Spruce에서 2倍體인 胚와 半數體인 胚乳의 LAP同位酵素를 分析 LAP-A와 B, 두개 遺傳子座를 確定하였다. 天然林分에서 86個體를 選定 位置圖를 만들어 種子를 採取 特異한 遺傳子를 가진 個體를 再確認한 후 標準木으로 選拔하였다. 選拔된 標準木에서 1,000粒씩 種子를 採

取 LAP-B 遺傳子座에 B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>의 對立遺傳子 頻度를 調査하였다. B<sub>2</sub>B<sub>3</sub>個體를 標準木으로 選拔했으며 B<sub>3</sub>나

表 5. 標準木 (B<sub>2</sub>B<sub>3</sub>)의 987個種子의 LAP-B遺傳子座 分離型

胚乳의 對立遺傳子		胚의 對立遺傳子	
B <sub>3</sub> ♀ (459)	B <sub>3</sub> ♀B <sub>3</sub> ♂ (13)	B <sub>3</sub> ♀B <sub>2</sub> ♂ (81)	B <sub>3</sub> ♀B <sub>1</sub> ♂ (365)
B <sub>2</sub> ♀ (528)	B <sub>2</sub> ♀B <sub>3</sub> ♂ (44)	B <sub>2</sub> ♀B <sub>2</sub> ♂ (325)	B <sub>2</sub> ♀B <sub>1</sub> ♂ (159)

B<sub>3</sub>B<sub>2</sub>와 B<sub>2</sub>B<sub>3</sub>: 自殖에서 나온型 (4個 自殖遺傳子型중 2가지)

B<sub>3</sub>B<sub>2</sub>와 B<sub>2</sub>B<sub>2</sub>: 自殖과 他殖에서 나온型

B<sub>3</sub>B<sub>1</sub>과 B<sub>2</sub>B<sub>1</sub>: 全部 他殖에서 나온型

(Müller, 1976)

表 6. 林木의 自然自殖率

樹 種	調査形質	自然自殖率	報 告 者
<i>Acacia decurrens</i>	marker gene	5~15%	Moffett, 1958
<i>Acacia mollissima</i>	marker gene	10%	Moffett, 1958
<i>Picea pungens</i>	marker gene (albino)	18%	Cram, 1960
<i>Picea glauca</i>	seed characters, germination rate	23~30%	Coles, 1976
<i>Pinus sylvestris</i>	marker gene (albino)	22~37%	Sarvas, 1962
<i>Pinus sylvestris</i>	marker gene (albino)	0~27%	Squillace, 1963
<i>Pinus banksiana</i>	cone serotiny	27~74%	Teich, 1970
<i>Pinus banksiana</i>	cone serotiny	9.6~10.4%	Stitmann, 1971
<i>Pinus elliotii</i>	yellow-oleoresin, virescent	4~36%	Kraus, 1964
<i>Pinus resinosa</i>	seed characters, germination rate, mutant seedlings	10%	Fowler, 1965

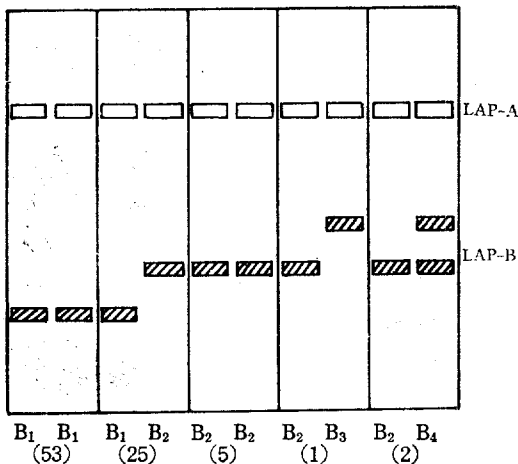


그림 2. 독일 가문비 나무의 胚(2n)와 胚乳(n)의 LAP-A와 LAP-B 遺傳子座의 酵素型(Müller, 1967) ( )안 숫자는 調査種子數

B<sub>4</sub>遺傳子를 가진 個體는 標準木으로 부터 40m以內에서 發見되지 않았다.

B<sub>3</sub>B<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>B<sub>3</sub>의 遺傳子型頻度가 같을 때 全體種子에 對한 이들 種子比를 倍로 해주면 自殖率이 된다.

2×(13+44)=114, 總 987個 種子에 對해 11.6%가 된다. 그러나 B<sub>2</sub>B<sub>3</sub>와 B<sub>3</sub>B<sub>2</sub>間의 比가 다르게 나타난 것은 B<sub>3</sub>의 遺傳子頻度가 낮기 때문에 일어난 것으로 생각하여 13+(3×44)=145 即 14.7%로 推定 할 수 있다(Müller, 1976).

自然自殖率은 大部分이 人工交配에 依해 만들어진 自殖 및 他殖種자와 自然交配된 種子間에 穩性이나 特徵, 播種床에서 變異苗 出現頻度等에 依해 推定되며 標識遺傳子를 가진 個體木을 選拔 採種하여 調査하기도 한다. 表-6에서와 같이 樹種에 따라, 또한 調査方法

이나 地域에 따라, 種子採取 部位에 따라 自殖率이 各各 다르다. 全體의으로 0~74%의 範圍內에 속해 있으며 同位酵素로 推定한 自殖率 값은 이들 範圍안에 들어 있다.

c. 家系分析(Family Analysis)

天然林分內에서 林木의 家系를 알아 낼수만 있다면 林木育種 뿐만아니라 生態學 및 遺傳學的으로도 그 意味는 매우 클 것이다. 아버지의 形質이 어떻게 次代에 이어 지는 지를 오랜 歲月과 努力이 드는 次代檢定法을 통하지 않고서도 알아 낼수 있기 때문이다.

Sakai (1972)는 日本 青森縣의 나한백(*Thujaopsis dolabrata*) 集團에서 個體 位置圖를 對照하면서 peroxidase 同位酵素를 調査한 結果 비슷한 酵素型을 가지고 있는 個體는 서로 가까운 곳에 生育하고 있는 것을 밝혀 었다. 비슷한 程度를 不一致數(disagreement count)로 나타냈는데 豫備實驗에서 遺傳的으로 全혀 關係가 없는 10km정도 바다로 隔離된 두개 集團의 不一致數는 13이었다. 同一 天然林內 集團間의 不一致數를 보기위해 한 個體를 中心으로 해서 半徑 5m의 圓을 설정하여 그속에 있는 個體와 中心個體間의 不一致數를 調査하고 같은 方法으로 半徑 5~10m 사이에 있는 個體들과 中心個體間의 不一致數, 10~15m, 15~20m, 20~25m, 25~30m사이에 있는 個體들과 中心個體間의 不一致數를 調査하였다. 그 結果 가까운 곳에 있는 個體間에는 不一致數가 매우 적은 것만 모여있으나 멀리 떨어져있는 個體間에는 不一致數가 增加되었다. 環境條件이 同位 酵素에 關與하지 않는다면 遺傳的으로 가까운 것이 서로 가까운 距離에 生育하고 있음을 나타낸 것으로 생각 된다. 이와 같이 나한백 天然林에서는 遺傳的으로 가까운 것끼리 即 父母, 兄弟,

親戚끼리 모여 小集團을 形成하고 있는 것을 밝혀 냈다. 이들 關係를 地圖上에 나타낸 것이 家系圖이다. 이 家系圖를 利用하여 耐病性, 生長型等에 對한 調査를 간단히 遂行할 수 있다. 그러나 이러한 家系分析은 對象樹種에 따라서는 調査하기 매우 어려운 것도 있다. 소나무처럼 花粉分散이 멀리까지 일어나는 樹種은 近距離뿐만 아니라 相當히 멀리 떨어져 있는 林分사이에서도 交雜現象이 일어날 수 있어서 나한백集團과 같은 單純한 遺傳關係 만을 나타내지 않기 때문이다.

#### d. 種間鑑別

Linné種에서 種間 區別은 形態의 特性에 依한 것이다. 그러나 林木의 種은 種內 變異가 매우 심한 野生種으로써 種間特性을 完全한 不連續의 으로 區別하기가 困難한 경우가 많다. 뿐만 아니라 單一種의 分布範圍가 매우 廣大하여 林緣集團에서는 가깝게 存在하는 다른 種과 移入交雜現象이 일어나 形態의 으로 區別이 안되는 新種을 形成하는 경우도 있다. 이와 같이 形態의 으로 區別이 되지 않으나 遺傳的으로 그 組成이 다른 雜種이나 單一 種內에서 새로운 分化를 이루어 遺傳的으로 다른 種이 形成되는 경우에 遺傳變異를 찾아 낼 수 있는 方法으로 同位酵素가 利用된다.

*Picea abies*와 *Picea sitchensis*는 알라스카와 캐나다 北部地方에 廣範圍하게 天然分布하고 있는 種이나 이 두 種사이에서 생겨난 새로운 集團에 對해 GDH, LAP와 TO 同位酵素를 調査한 結果 移入交雜에 依해 생겨난 新種 *Picea luzii*가 報告되었다(Copes, 1977). Bonnet (1978)는 *Pinus nigra*에 近緣種인 *P. laricio*, *P. clusiana*, *P. nigricaus*와 *P. pallasiana* 4個種을 GOT同位酵素에 依해 分析한 結果 種間區別을 確實히 하였으며 Esen (1977)은 감귤류 45種에 對해 amylase 同位酵素를 利用 遺傳的 類緣關係를 確립시켰다.

#### e. Clone鑑別

林木의 遺傳的 改良이 推進됨에 따라 많은 優良 clone이 생겨 나게 되었다. 有實樹의 營養體繁殖은 옛 부터 試圖되어 이제는 clone品種으로 固定되었고 포푸라나 삼나무와 같은 樹種에서도 대부분이 優良 clone에 依한 營養繁殖으로 造林되고 있다. 소나무나 잣나무와 같은 用材林에서도 採種園 造成으로 인해 秀型木의 clone化가 試圖되고 있다. 같은 clone에서 나온 營養體(ramet)는 形態의 特性에 依해 區別할 수도 있으나 그 特性이 發現되지 않는 時期에나 clone間에 特性이 없는 경우에는 形態의 特性만으로 區別하기 困難하다. 같은 clone은 遺傳形質이 똑같기 때문에 同位酵素型도 똑 같아서 쉽게 區別 할 수가 있다.

Miyazaki (1969)는 삼나무 삼목 clone인 구모토시

에 對해 各地域에 植栽된 53 ramet를 調査 眞偽 clone을 밝혀 냈고 朴(1974)은 소나무 clone 保存園에 植栽된 ramet의 眞偽를 가려 내는데 成功하였다. Rasmuson (1971)은 歐洲赤松의 接木 clone에 對한 眞偽性을 調査하여 同位酵素가 clone감별에 有用한 手段임을 밝혀 냈다.

#### f. 林木集團의 遺傳變異

林木集團이 가지고 있는 遺傳變異를 크게 나누면 自然淘汰의 結果 他發的으로 일어난 緯度變異와 生態變異, 그리고 그 樹種이 分布域을 넘혀 나갈때 系統이나 分布經路의 差異에서 自發的으로 생겨난 系統發生變異나 分布變異가 있으며 突然變異의 蓄積에 따라 생겨난 個體變異와 이들 個體間의 繁殖方法에 따라 생겨난 家系變異등으로 나눌 수 있다.

이들 變異는 林分內에 各各 獨立的으로 存在하는 것이 아니고 서로 열리고 설켜서 複雜한 樣相을 띄우고 있는 것이 普通이다. 이러한 複雜한 變異를 하나씩 調査分析하여 그 本性을 알아 내므로써 林木集團研究에 크게 도움이 될 것이다. 林木集團은 그 分布域이 넓기 때문에 種子產地間에 여러가지 形態의 特性에 差異가 많음이 報告되어 왔으며 그 가운데는 林業的으로 重要な 것이 많아 產地試驗이란 이름으로 여러나라에서 대대적으로 實施되고 있다. 이러한 形態의 特性과는 달리 遺傳的인 特性을 가진 同位酵素는 林木集團에 對한 遺傳分析을 할수있는 새로운 方法이 되고 있다. 研究例를 들면 다음과 같다.

北海道地方에 天然分布하고 있는 *Abies sachalinensis*의 天然林分에 對해 Mastuura (1972)는 peroxidase同位酵素를 利用 7個集團에 對한 系統發生經路를 밝혔고 Chu (1972)는 中國本土에서 대만에 導入되었은 85個 Clone의 대나무集團에 對해 peroxidase 同位酵素를 利用 遺傳的으로 同一한 8個群으로 나누어 한 地域內에 植栽되고 있는 群數에 따라 대만의 中西部地方 Taichung과 Chaiyi를 導入中心地로 推定하였다. 朴 (1977)은 우리나라와 日本에 自生하는 소나무 27個 集團(韓國 12集團, 日本 15集團)에 對해 peroxidase變異를 調査한 結果 各地域集團間에 傾斜變異가 있음을 밝혀 냈으며 이들 傾斜變異는 兩地域間에 反對되는 傾向을 나타내어 兩地域의 소나무天然林은 遺傳的으로 그 組成이 다르다고 推論하였다. 이러한 結果는 日本地域의 花粉化石의 結果와도 一致하며 우리나라와 日本의 農耕文化의 發達經路에서도 推論되었다. 日本의 海松集團에 對해서 Hayashi (1976)는 南쪽에서 北쪽으로 向한 傾斜變異를 報告했으며 이는 緯度보다 經度에 따른 높은 相關을 나타내어 遺傳子浮動(genetic random drift)에

依한 結果로 推論하였다. Sakai와 Park (1971)은 *Cryptomeria japonica*의 3個 小集團內의 peroxidase 變異를 調査한 結果 가까운 距離에 있음에도 불구하고 遺傳的으로 매우 다름을 報告했으며 이는 遺傳子流動(gene flow)의 隔離 때문에 일어난 結果로 推定했으나 Grant (1977)는 *Abies lasiocarpa*와 *Picea engelmannii*의 分化를 peroxidase變異를 利用 調査한 結果 兩集團間에 遺傳子流動이 想像外로 많이 일어나고 있으나 이들 集團間에 일어난 遺傳的 分化는 곰팡이 類에 對한 抵抗性과 눈사태로 인한 淘汰때문에 일어난 것으로 報告하였다. Feret (1974)는 18~42km 떨어진 *Pinus pungens* 3個 小集團을 選拔 peroxidase와 EST同位酵素를 調査한 結果 3個集團은 하나의 panmictic 集團에서 分化된 것으로 結論지었다.

以上은 앞서 言及한 同位酵素變異가 自然淘汰와 관련 없이 일어난다는 中立說(1-d)을 土臺로 하여 利用한 例이며 自然淘汰와 관련된다는 立場에서 利用한 例도 있다.

Tigerstedt (1973, 1974)는 *Picea abies*의 集團에서 LAP, EST, ADH, APH를 調査한 結果 緯도에 따른 傾斜變異가 있음을 밝혀졌고 이들 集團間에 특히 林緣集團에서는 雜種接合子의 頻도가 높은 것도 있어서 酵素에 따라 適應力에 差異가 있다고 結論지었다. Yang (1977)은 Douglas-fir의 9個 產地에 對해 LAP, EST, GOT를 어린 幼苗에서 調査한 結果 雜種接合子 頻도에 傾斜變異가 있음을 밝혀냈다. 또한 Mush (1974)는 Douglas-fir 14個 產地에 對해 96個體씩 peroxidase變異를 調査한 結果 產地間에 差異를 報告하였고 Bergmann (1973)은 *Picea abies* 8個 產地에 對해 EST 2 遺傳子座에 對해 調査한 結果 北쪽에서 南쪽으로 向한 傾斜變異를 밝혀냈다. 導入種과 鄉土種과의 遺傳分化를 調査한 例로는 中國의 Chinese Ailanthus와 導入된지 約 200餘년이 된 美國種과 比較하였다. 그 結果 美國 것은 產地內 變異가 中國것보다 높게 나타났다. 이것은 導入당시 遺傳變異가 큰 集團이 導入된 것으로 推測되었다(Feret, 1974). 또한 Lundkvist (1977)는 *Picea abies*에 對한 導入된 林分이 國內林分보다 雜種接合子의 比가 增加됨을 報告하였다.

### 3. 林木同位酵素의 利用 展望

同位酵素가 林木研究에 利用된지 10餘년이 지나는 동안 많은 發展을 해왔다. 同位酵素實驗法은 野生集團인 林木集團의 遺傳變異를 밝혀내는데 획기적인 계기가 되어 交雜種의 判別, 種間分類, clone鑑別, 遺傳子

流動, 家系分析, 系統發生變異 등을 研究하는데 重要한 手段이 되고 있다. 지금까지 遺傳的 背景이 확실히 밝혀진 酵素가 많으며 앞으로 이들 酵素의 遺傳關係나 連鎖關係가 밝혀지면 有用形質과의 相關에 依한 選拔 指標로도 利用될수 있을 것이다.

林木에 利用되고 있는 酵素種類는 動物이나 作物에 비해 적다. 특히 針葉樹인 경우 여러가지 複合物質이 酵素發現을 妨害하고 있기 때문에 생각되어 지고 있다. Hamaker (1973)는 *Pinus pealustris*에 對해 53種類의 酵素를 分析한 結果 19種의 酵素를 發現시켰으며 이중 9가지 種類는 遺傳變異를 나타냈다고 報告하였다.

앞으로 針葉樹의 酵素發現을 妨害하는 phenol性物質을 除去하는 方法이 開發되면 보다 많은 酵素를 調査 利用할 수 있게되어 林木遺傳育種分野에 새로운 章을 열 것으로 기대된다.

## 附 錄

### I. 겉 및 試料調製

一般的으로 가장 많이 使用되는 水平式 澱粉겐에 對해 記述한다.

#### ① 澱粉의 加水分解

加水分解된 澱粉이 試藥으로 市販되고 있으나 製造會社에 따라 質이 一定치 않고 高價여서 市販되는 감자 분말을 加水分解하여 使用하는 것이 無難하다. 電氣定溫湯器에 물을 채우고 水溫 50°C로 調節한 후 3/用 비커속에 감자분말 1kg에 990ml의 아세톤을 넣고 유리봉으로 5~10分間 잘 짓는다. 蒸發을 防止하기 위하여 Saran wrap으로 덮어 고무밴드로 고정하여 電氣定溫湯器속에 넣어 4時間 處理後 유리봉으로 잘지어 10ml의 濃鹽酸을 添加한 뒤 正確히 85分間 加水分解시킨다. 時間이 되면 電氣定溫湯器에서 꺼내어 1/蒸溜水を 넣고 지어 漏斗위에서 陰歷시켜 2/蒸溜水로 씻어낸 다음 250ml의 아세톤으로 다시 씻어내어 48時間 以上 乾燥시켜(冷暗所) 40~42mesh 체로 쳐서 정제후 保管 使用한다. 한번 加水分解한 澱粉은 夏期엔 2個月 以內에 使用해야 하며 冬期에도 3個月 以上 使用하면 分離能 이 低下되는 傾向이 있다.

#### ② 겉 調製

加水分解된 澱粉 54~56g을 1/用 環底후라스크 속에 500ml 겉緩衝液과 같이 넣어 攪拌시킨 후 中湯器에서 100°C以上으로 10~20分間 加熱 겉이 透明하게 된후 진공 펌프로 공기를 除去 겉 bridge(12個)에 하나씩 부어 넣어 뚜껑을 덮어 문진으로 눌러 12시간 固化 시킨다.

#### ③ 試料分析



澱粉겔의 元點(陰極쪽에서 8cm 되는 곳)을 垂直 罐로 잘라 分析하려는 試料(針葉인 경우 約 300mg)를 乳鉢에 넣어 잘아 汁液을 낸다(試料나 酵素種類에 따라서는 여러가지 緩衝液을 첨가하는 수도 있다). 汁液을 Watmann No. 1 濾紙片(5mm×18mm)에 흡수 시켜 元點에 挿入한다. Bridge를 泳動槽에 넣은 다음 소정의 電壓으로 一定 時間동안 泳動시킨다. 泳動이 끝난 겔(peroxidase인 경우 200 Volt에서 4시간)은 水平罐로 두께의 半으로 잘라서 色呈溶液을 넣어서 원하는 酵素를 發色시킨다. 酵素에 따라서는 日光에 直接노출이 되면 活性이 없어 지는 것도 있으며 時間이 지남에 따라 發色이 흐려지 없어지는 것도 있으므로 發色된 酵素型은 되도록 빨리 사진을 찍고 sketch를 해두는 것이 좋다.

## II. Buffer System

- (A) Lithium-Borate Buffer (pH 8.3, 0.2M)
1. Lithium hydroxide 1.2g
  2. Boric acid 11.89g
  3. Distilled water 1000ml
- (B) Tris-Citric Buffer (pH 8.3, 0.2M)
1. Tris 6.2g
  2. Citric acid 1.6g
  3. Distilled water 1000ml
- (C) Sodium-Borate Buffer (pH 8.5, 0.2M)
1. Boric acid 18.5g
  2. Sodium hydroxide 3.4g
  3. Distilled water 1000ml
- (D) Phosphate Buffer (pH 4.3, 0.2M)
1. Sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 27.8g
  2. Distilled water 1000ml
- (E) Phosphate Buffer (pH 9.2, 0.2M)
1. Sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 53.63g
  2. Distilled water 1000ml
- (F) Tris-Maleate Buffer (pH 3.3, 0.2M)
1. Tris 24.2g
  2. Maleic anhydride (or Maleic acid) 19.6g (23.2g)
  3. Distilled water 1000ml
- (G) Sodium Hydroxide Buffer (pH 14.0, 0.2M)
1. Sodium hydroxide 7.99g
  2. Distilled water 1000ml
- (H) Tris-Glycine Buffer (PH 8.7, 0.2M)
1. Tris 3.0g
  2. Glycine 14.4g
  3. Distilled water 1000ml
- (I) Acetate Buffer (pH 4.0, 0.2M)

1. 0.2M Acetic acid 410ml
  2. 0.2M Sodium acetate 90ml
  3. Distilled water 500ml
- (J) Tris-HCl Buffer (pH 8.0, 0.2M)
1. Tris 12.1g
  2. Distilled water 1000ml
  3. Adjust pH with HCl
- (K) Tris-Acetate Buffer (pH 4.0, 0.01M)
1. Tris 2.1g
  2. Acetic acid 30ml
  3. Distilled water 1000ml

## III. Enzyme staining on the gels

Note: An effective buffer system for assaying most plant isozymes discussed in this review is the following: (a) Gel buffer: Use 9 parts of buffer B and 1 part of buffer A. (b) Electrode trays: Use only buffer A. For a continuous buffer system, use buffer C or buffer H in both the gel and the trays.

### (A) Leucine Aminopeptidase (LAP)

1. Distilled water 30ml
2. L-Leucyl  $\beta$ -naphthylamide HCl 10mg
3. Black-K salt 20mg
4. Buffer F 50ml
5. Buffer G 20ml

Incubate 45 min. at 37°C; wash and fix in 5 : 5 : 1 (water : methanol : acetic acid)

### (B) Esterases (EST)

1. Distilled water 40ml
2.  $\alpha$ -Naphthyl acetate (1% in 1 : 1 acetone-water) 2ml
3. Fast Blue R R salt 40mg
4. Buffer D 50ml
5. Buffer E 10ml

Incubate for 45 min. at 37°C; wash and fix

### (C) Catalase

1. Pour a solution of 0.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  over cut surface of gel and allow to stand for about 30 sec.
2. Wash gel by rinsing with running distilled water.
3. Pour 1.5% KI solution, acidified with glacial acetic acid (12 drops/30ml), over surface of gel.
4. Photograph immediately

### (D) Alkaline Phosphatase

1. Tris-citric acid buffer (pH 8.5, 0.1M) 100ml
2.  $\alpha$ -Naphthyl acid phosphate-Na salt 100mg

- |                                  |                   |
|----------------------------------|-------------------|
| 3. Fast blue R R salt            | 100m <sup>g</sup> |
| 4. 10% Aqueous MgCl <sub>2</sub> | 10 drops          |
| 5. 10% Aqueous MnCl <sub>2</sub> | 10 drops          |

Incubate at 25°C for approximately 8 hr.

## (E) Acid Phosphatase (APH)

- |                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| 1. Buffer I                          | 100ml    |
| 2. $\alpha$ -Naphthyl acid phosphate | 100mg    |
| 3. Fast Garnet GBC                   | 100mg    |
| 4. 10% Aqueous MgCl <sub>2</sub>     | 10 drops |

Incubate at room temperature (25°C) for approximately 5 hr.

## (F) Peroxidase (PEROX)

- |                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| 1. O-Dianisidine                 | 50ml  |
| 2. $\beta$ -Naphthol             | 30mg  |
| 3. Aceton                        | 20mg  |
| 4. Buffer K                      | 10ml  |
| 5. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 0.3ml |

Added distilled water 100ml

## (G) Alcohol Dehydrogenase (ADH)

- |                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| 1. Buffer J                     | 50ml  |
| 2. Distilled water              | 130ml |
| 3. KCN (0.002M)                 | 2ml   |
| 4. NAD (0.01M)                  | 2ml   |
| 5. PMS (0.01M)                  | 2ml   |
| 6. Ethanol (100%)               | 1ml   |
| 7. NBT (nitro blue tetrazolium) | 50mg  |

Incubate at 37°C for approximately 30 min.

## (H) Malate Dehydrogenase (MDH)

- |                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| 1. Buffer J                     | 50ml  |
| 2. Distilled water              | 50ml  |
| 3. DL-Malic acid (0.2M)         | 1.38g |
| 4. KCN (0.1M)                   | 0.4ml |
| 5. NAD(0.01M)                   | 1ml   |
| 6. PMS (phenazine methosulfate) | 1.6mg |
| 7. NBT                          | 50mg  |

## (I) Glutamic-Oxaloacetic Transaminase (GOT)

- |   |       |
|---|-------|
| 1. DL-Aspartic acid (0.04M)             | 532mg |
| 2. $\alpha$ -Ketoglutaric acid (0.005M) | 72mg  |
| 3. Pyridoxal phosphate                  | 50mg  |
| 4. Fast violet B                        | 200mg |
| 5. Phosphate Buffer (0.034M, pH7.0)     | 100ml |

## (J) Phosphoglucomutase (PGM)

- |  |       |
|--|-------|
| 1. Na <sub>2</sub> glucose-1-phosphate (0.0046M) | 576mg |
| 2. NADP  | 10mg  |
| 3. PMS   | 2mg   |

- |                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| 4. Glucose-6-phosphate dehydrogenase | 0.36mg |
| 5. NBT                               | 30mg   |
| 6. Tris Buffer (0.03M, pH 8.0)       | 100ml  |

## Reference

- Allard, R.W., Kahler, A.L. and Weir, B.S. 1972. The effect of selection on esterase allozymes in a barley population. *Genetics* 72: 489-503
- Arvy, L. 1969. The enzymes of the embryonic nephron. *International Review of Cytology* 25: 333-361
- Ayala, F.J. ed. 1976. *Molecular evolution*. Sinauer Assoc. Inc. Publishers, Sunderland Mass.
- Bartels, M. 1971. Genetic control of multiple esterases from needles and macrogametophytes of *Picea abies*. *Planta* 99: 283-289
- Bergmann, F. 1973. Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzyme-Identifizierung. *Silvae Genetica* 22: 63-66
- Bergmann, F. 1974. The genetics of some isoenzyme systems in spruce endosperm (*Picea abies*). *Genetica (Yugoslavia)* 6: 353-360
- Chu, Y.E., Chou, T.S., Li, Y.S., Shin, C.Y. and Woo, S.C. 1972. Identification of bamboo clones, *Dendrocalamus latiflorus*, in Taiwan. *Bot. Bull. Academia Sinica* 13: 11-18
- Clegg, M.T. and Allard, R.W. 1973. Viability versus fecundity selection in the slender wild oat, *Avena barbata* L. *Science* 181: 667-668
- Coles, J.F. and Folwer, D.P. 1976. Inbreeding in neighboring trees in two white spruce populations. *Silvae Genetica* 25: 29-34
- Conkle, M.T. 1971. Inheritance of alcohol dehydrogenase and leucine aminopeptidase isoenzyme in knobcone pine. *For. Sci.* 17: 190-194
- Copes, D. and Beckwith, R.C. 1977. Isozyme identification of *Picea abies*, *P. sitchensis* and *P. lutzii* populations. *Bot. Gazette* 138: 512-521
- Cram, W.H. 1960. Shelterbelt tree breeding. *Pro. 7th Meeting Con. For Tree Breed Canada II*; D 1-5
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 404-427

14. Endo, T. 1973. Isozyme loci and a strategy of differentiation in plants. *Seiken Zihō* 24: 89-104
15. Esen, A. and Scora, R.W. 1977. Amylase polymorphism in citrus and some related Genera. *Amer. J. Bot.* 64:305-209
16. Feret, P.P. 1971. Isozyme variation in *Picea glauca* (Moench.) Voss seedling. *Silvae Genetica* 20:46-50
17. Feret, P.P. 1974. Genetic differences among three small stands of *Pinus pungens*. *TAG* 44:173-177
18. Feret, P.P. and Bryant, R.L. 1974. Genetic differences between American and Chinese *Ailanthus* seedlings. *Silvae Genetica* 23:144-148
19. Feret, P.P. and Stairs, R.R. 1971. Peroxidase inheritance of some polymorphic isozymes in pith pine (*Pinus rigida* Mill.). *Heredity* 40: 27-32
20. Fowler, D.P. 1965. Effects of inbreeding in red pine, *Pinus resinosa* Ait. II. Pollination studies. *Silvae Genetica* 14: 12-23
21. Frydenberg, O. and Simonsen, V. 1973. Genetic of *Zoarcas* populations. V. Amount of protein polymorphism and degree of genic heterozygosity. *Hereditas* 75: 221-232
22. Gooch, J.L. and Schoff, T.J.M. 1972. Genetic variability in the deep sea relation to environmental variability. *Evolution* 26:545-552
23. Grant, M.C. and Mitton, J.B. 1977. Genetic differentiation among growth forms of engelmann spruce and subalpine fir at tree line. *Arctic and Alpine Research* 9: 259-263
24. Hamaker, J.M. and Snyder, E.B. 1973. Electrophoresis of needle enzymes in long leaf and sondergger pine. *Southern Forest*, U.S. Dep. of Agri. U.S. Forest Service Research Note So 151: 1-8
25. Hayashi, S., Sakai, K.I. and Murai, M. 1976. Genetic studies in natural populations of *Pinus*. II. Geographical variation in relation to natural selection. *The Memories of the Faculty of Agriculture, Kagoshima Univ.* XI (21): 87-102
26. Hirano, H. and Naganuma, K. 1979. Inheritance of peroxidase isozymes in mulberry (*Morus* spp.). *Euphytica* 28:73-79
27. Johnson, F.M. 1971. Isozyme polymorphisms in *Drosophila ananassae*: Genetic diversity among island populations in the South Pacific. *Genetics* 68:77-95
28. Johnson, F.M., Schaffer, H.E., Gillaspay, J.E. and Rockwood, E.S. 1969. Isozyme genotype-environmental relationships in natural populations of harvester ant, *Pogonomyrmex barbatus* from Texas. *Biochem. Genet.* 8: 429-450
29. 金鼎錫, 李錫求, 朴龍求. 1973. 아까시아 나무의 Peroxidase의 變異. *임목육종연구보고* 10: 35-42
30. Kimura, M. 1968. Evolutionary rate of the molecular level. *Nature* 217:624-626
31. Kimura, M. and Ohta, T. 1971. Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. *Nature* 229: 467-469
32. Kraus, J.F. and Squillace, A.E. 1964. Selfing vs. outcrossing under artificial conditions in *Pinus elliottii* Engelm. *Silvae Genetica* 13: 72-76
33. 李鍾樂, 朴龍求. 1973. Zymography에 의한 Clone 鑑別. *慶熙大學校 産業大學研究報告* 1:1-7.
34. Long, E.M. 1972. Genetic polymorphism of isozymes in loblolly pine seed. Thesis for PhD Texas A & M University 55p
35. Lundkvist, K. 1974. Inheritance of leucine aminopetidase isozymes in *Picea abies* K. *Hereditas* 76:91-96
36. Lundkvist, K. 1975. Inheritance of acid phosphatase isozymes in *Picea abies*. *Hereditas* 79: 221-226
37. Lundkvist, K. 1978. Allozymes in population genetic studies of Norway spruce (*Picea abies* K.). Umea, Sweden PhD Thesis: 1-42
38. Lundkvist, K. and Rudin, D. 1977. Genetic variation in eleven populations of *Picea abies* as determined by isozyme analysis. *Hereditas* 85: 67-74
39. Markert C.L. and Møller, F. 1959. Multiple forms of enzymes: Tissues, ontogenetic and species-specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 45: 753-763
40. Marshall, D.R. and Allard, R.W. 1970. Maintenance of isozyme polymorphisms in natural populations of *Avena barbata*. *Genetics* 66:393-399
41. Matsuura, T. and Sakai, K.I. 1972. Geographic variation on an isozyme level in *Abies sachalinensis*. *Proc. IUFRO Genetic-SABRAO Joint Symp.*

- (Tokyo) A-9 (V):1-12
42. Miyazaki, Y. and Sakai, K.I. 1969. Use of zymography for identification of a in *Cryptomeria japonica* D. Don. J. Jap. For. Soc. 51: 235-239
  43. Moffett, A.A. 1956. Genetical studies in *Acacia*. I. The estimation of natural crossing in black wattle. Heredity 10: 57-67
  44. Muhs. H.-J. 1974. Distinction of Douglas-fir provenances using peroxidase-isozyme-patterns of needles. Silvae Genetica 23:71-76
  45. Müller, G. 1976. A simple method of estimating rate of self fertilization by analysing isozymes in tree seeds. Silvae Genetica 25: 15-17
  46. 中野徹夫. 1976. ザイモグラフィ法による品種系統識別試験. 石川縣林試 業務報告 第14號:2-4
  47. Nolic, D.J. and Bergmann, F. 1974. Genetic variation of leucine aminopeptidase isoenzymes in seeds of *Pinus nigra* Arn. Genetica (Yugoslavia) 6: 361-365
  48. 沼知健一. 1973. 海洋學講座「資源生物論」東京出版會 5-25
  49. O'Brien, S.J. and MacIntyre, R.J. 1969. An analysis of gene-enzyme variability in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. The American Naturalist 103:97-113
  50. 朴龍求. 1977. 소나무 天然生林의 集團遺傳學的研究. 林木育種研究報告 13:1-80
  51. 朴龍求, 崔定錫. 1973. Isoperoxidase變異型에 依한 소나무 Clone 鑑別. 韓國林學會誌 18:24-30
  52. Par Bonnet, Masimbert M. et Bikay-Bikay, V. 1978. Variabilité intraspécifique des isozymes de la glutamate-oxaloacé-tétransaminase chez *Pinus nigra* Arnold. Intérêt Pour la taxonomic des sous espèces. Silvae Genetica 27:71-79
  53. Peirce, L.C. and Brewbaker, J.L. 1973. Application of isozyme analysis in horticultural science. Hortiscience 8: 17-22
  54. Rasmuson, B. and Rudin, D. 1971. Variations in esterase zymogram patterns in needles of *Pinus silvestris* from provenances in northern Sweden. Silvae Genetica 20: 39-41
  55. Rudin, D. 1975. Inheritance of glutamate-oxalate-transaminases (GOT) from needles and endosperms of *Pinus silvestris*. Hereditas 80: 297-300
  56. Rudin, D. 1976. Isozymes as markers guiding selection for advanced generation breeding. IUFRO Joint Meeting on Advanced Generation Breeding Bordeaux-June 14-18. Session 6: Biochemical Genetics and Selection 1-20
  57. Rudin, D. 1977. Leucine-amino-peptidases (LAP) from needles and macrogametophytes of *Pinus sylvestris* L. Inheritance of allozymes. Heredity 85: 219-226
  58. Rudin, C. and Ekberg, I. 1978. Linkage studies in *Pinus sylvestris* L.-Using macrogametophyte allozymes. Silvae Genetica 27:1-12
  59. Rudin, D., Eriksson, G., Ekberg, I. and Rasmuson, M. 1974. Studies of allele frequencies and inbreeding in Scots pine populations by the aid of the isozyme technique. Silvae Genetica 23: 10-13
  60. Rudin, D. and Lindgren, D. 1977. Isozyme studies in seed orchards. Studia Forestalia Suecica 139:1-23
  61. Rudin, D. and Rasmuson, B. 1973. Genetic variation in esterases from needles of *Pinus silvestris* L. Hereditas 73: 89-98
  62. Sakai, K.I., Hayashi, S. and Iyama, S. 1974. Genetic studies in natural populations of *Pinus*. I. Genetic variability in local populations from several prefectures. The Memories of the Faculty of Agriculture, Kagoshima Univ. X(19):37-49
  63. Sakai, K.I. and Miyazaki, Y. 1972. Genetic studies in natural populations of forest trees. II. Family analysis: A new method for quantitative genetic studies. Silvae Genetica 21:149-154
  64. Sakai, K.I. and Miyazaki, Y. and Mastuura, T. 1971. Genetic studies in natural populations of forest trees. I. Genetic variability on the enzymatic level in natural forests of *Thujopsis dolabrata*. Silvae Genetica 20: 168-173
  65. Sakai, K.I. and Park, Y.G. 1971. Genetic studies in natural populations of forest trees. III. Genetic differentiation within a forest of *Cryptomeria japonica*. TAG 41: 13-17
  66. Sarvas, R. 1962. Investigations on the flowering and seed crop of *Pinus silvestris*. Commun. Inst. Forestal Fenn. 53: 198p
  67. Scandalios, J.G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: A review.

- Biochem. Genet. 3: 37-79
68. Schoff, J.M. and Gooch, J.L. 1971. Gene frequencies in a marine ectoproct: A cline in natural populations related to sea temperature. *Evolution* 25: 286-289
69. Shaw, C.R. 1965. Electrophoretic variation in enzymes. *Science* 149: 936-943
70. Simonsen, V. and Wellendorf, G.M. 1975. Some polymorphic isozymes in the seed endosperm of sitka spruce (*Picea sitchensis*(Bong.) Carr.). *Forest Tree Improvement* 9: 1-21
71. Squillace, A.E. and Kraus, J.F. 1963. The degree of natural selfing in slash pine as estimated from albino frequencies. *Silvae Genetica* 12:46-50
72. Stitmann, K. and Tyson, H. 1971. Estimates of inbreeding in *Pinus banksiana*. *Can. J. Bot.* 49: 1241-1243
73. Tajima, M., Miyazaki, Y. and Miyazima, H. 1977. Genetic analysis for peroxidase isozymes in *Chamaecyparis obtusa* Endl. *Jap. For. Soc.* 59: 173-177
74. Teich, A.H. 1970. Cone serotiny and inbreeding innatural populations of *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.* 48:1805-1810
75. Tigerstedt, P.M.A. 1973. Studies on isozyme variation in marginal and central populations of *Picea abies*. *Hereditas* 75:47-60
76. Tigerstedt, P.M.A. 1974. Genetic structure of *Picea abies* populations as determined by the isozyme approach. *Pro. Joint IUFRO Meeting. S* 02. 04. 1-3. Stockholm Seesion V. 283
77. Williams, G.C., Koehn, R.K. and Mitton, J.B. 1973. Genetic differentiation without isolation in the America cel, *Anguilla rostrata*. *Evolution* 27:192-204
78. Yamazaki, T. 1971. Measurement of fitness at the esterase-5 locus in *D.pseudoobscura*. *Genetics* 67: 579-603
79. Yamazaki, T. and Maruyama, T. 1974. Evidence that enzyme polymorphisms are selectively neutral but blood group polymorphisms are not. *Science* 183: 1091-1092
80. Yang, C., Ching, T.M. and Ching, K.K. 1977. Isozyme variation of coastal Douglas-fir. I. A study of geographic variation in three enzyme systems. *Silvae Genetica* 26:10-18