

cpSSR haplotype에 근거한 소나무 全兄妹次代木 檢定

洪鎔杓* · 權海燕 · 韓相億 · 崔完鏞 · 金龍律

국립산림과학원 산림유전자원부

Identification of True Full Sib Progenies of Japanese Red Pine via cpSSR Haplotyping

Yong-Pyo Hong*, Hae-Yun Kwon, Sang-Urk Han, Wan-Yong Choi, Yong-Yul Kim

Division of Forest Genetic Resources, Korea Forestry Research Institute, Suwon 440-350, Korea

요 약: 소나무의 2년생 人工交配 全兄妹次代木 114개체를 대상으로 花粉親이 아닌 개체의 화분에 의해 생성된 次代木을 식별하기 위하여 父系遺傳되는 半數體 표지자인 cpSSR 표지자 분석을 실시하였다. 3개의 cpSSR primer를 이용한 PCR 분석을 통하여 花粉親과 3개 母樹의 haplotype 조합을 결정하고, 이에 의해 각 개체의 DNA 지문이 확인되었다. 동일한 cpSSR primer를 사용하여 全兄妹次代 114개 개체목의 haplotype을 확인하고 이를 花粉親 및 3개 母樹에서 확인된 haplotype 조합과 비교한 결과, 이들 중 14개체에서 人工交配 花粉親과 다른 cpDNA haplotype이 확인되어 이들이 교배에 사용된 花粉親이 아닌 타개체로부터 유입된 화분에 의해서 생성된 개체로 동정되었다. 특히, 강원30으로부터 생산된 次代 중 한 개체목은 불완전한 除雄이나 人工交配시 母樹에서 생산된 화분의 유입으로 인해서 야기된 自家交配에 의해서 생성되었을 가능성이 매우 높은 것으로 나타났다. 본 연구에서 분석된 cpSSR 지문분석은 향후 자연림내 親系次代木 감별과 삼목, 집목 및 조직배양에 의한 無性繁殖苗의 동정, 純粹 全兄妹次代의 확인 등 植物法醫學的 分析法에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: To identify the seedlings from controlled pollination between one paternal tree and three maternal trees of Japanese red pine, cpSSR markers of the paternally inherited haploid genome were analyzed in two year old 114 seedlings of full sib families. Individual specific DNA fingerprint like haplotypes of the parental trees were determined by PCR with three cpSSR primers. Haplotypes of the 114 seedlings were also identified by PCR with the same primers. On the basis of the comparison of cpDNA haplotypes of the 114 seedlings with those of the parental trees, 14 seedlings revealed to have distinguished haplotypes from those of the paternal tree. It was tentatively concluded that they were generated via pollination with the non-paternal trees. A seedling of Gangwon30 revealing non-paternal haplotype might have been generated via self pollination with the pollens of maternal tree through improper emasculation or contamination during artificial pollination. DNA fingerprint like cpSSR profiles observed in this study could be successfully applied to the various plant forensic analyses, such as identification of siblings of individual trees, asexually reproduced ramets of a specific clone, vegetatively propagated individuals via tissue culture, and pure full sib progenies.

Key words : Japanese red pine, artificial pollination, full sib progenies, cpSSR, haplotyping

서 론

일반적으로 엽록체 DNA($1\sim3\times 10^{-9}$ substitution/site/year, Wolfe *et al.*, 1987)는 핵 내 DNA($5\sim30\times 10^{-9}$ substitution/site/year, Wolfe *et al.*, 1987)에 비하여 돌연변이율이 10배 정도 낮아 종 간 또는 개체 간의 변이가 매우 적기 때문에, 주로 종 분류에서 분자수준의 指標로 빈번히 이용되어

왔다(Sigurgeirsson and Szmidi, 1993; Wang and Szmidi, 1993; Iketani *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). 그러나 엽록체 DNA 곳곳의 특정부분에는 식물체내 다른 계통 부위에 비해 상대적으로 돌연변이가 매우 빈번하게 발생하는 것으로 밝혀진 SSR(simple sequence repeats, 少數單純 鹽基反復) 부위들이 존재하는데(Provan *et al.*, 1998), 이러한 cpSSR들은 핵 내 계통 상에 1~6개의 염기로 구성된 짧은 염기의 단위가 5~100회 가량 반복된 형태로 무작위로 분포하는 nuclear SSR과는 달리(Tautz, 1993), 주로 단일

*Corresponding author
E-mail: yphong@foa.go.kr

염기, 드물게는 두 개의 염기가 하나의 단위를 이루며 반복 배열된 형태로 존재하며, 염록체 게놈 상에 비교적 고르게 분포하는 것으로 알려져 있다(Wakasugi *et al.*, 1994; Noh *et al.*, 2003). 염록체 SSR 변이체들은 대부분 반복되는 염기 단위의 숫자에서 차이를 보이는데, 이러한 변이체들은 염록체 DNA 복제시 DNA 중합효소의 slippage에 의한 단일염기의 첨가(addition) 또는 결실(deletion)에 의해 생겨나는 frameshift 돌연변이의 생성 과정을 통해 만들어진다(Gragg *et al.*, 2002). 염록체 SSR은 특정 유전자 부위에 존재하여 아미노산 종류를 결정짓는 codon의 일부가 아니기 때문에 자연선택의 대상이 아니며, 표현형에 있어서 공우성적 특성을 나타내므로 집단유전학 분야에 유용한 표지자로 최근 널리 이용되고 있다(Powell *et al.*, 1996; Morgante *et al.*, 1997; Echt *et al.*, 1998; Anzidei *et al.*, 1999). 한편, 임목(침엽수)을 대상으로 한 염록체 SSR 표지자 분석은 Wakasugi *et al.*(1994)에 의해 해송(*Pinus thunbergii*)의 염록체 DNA 염기서열이 완전하게 알려지고 이를 기초로 한 primer들이 개발됨으로서 이용 가능하게 되었다. 특히 대부분의 침엽수종에서 염록체 DNA는 父系遺傳을 하며 세대를 거치는 동안 재조합이 일어나지 않으므로, 염록체 SSR은 집단의 역사를 재구성하기 위한 정보를 얻는데 있어 nuclear SSR 보다 유리하며 (Walter and Epperson, 2001), 또한 집단 내 花粉 散布 (pollen dispersal)와 관련된 gene flow 양상이나 parentage analysis 등에도 유용하게 쓰여질 수 있다(Lian *et al.*, 2001).

임목육종연구에서 人工交配를 통해 조성된 全兄妹次代를 대상으로 한 遺傳檢定 결과는 각 父母樹의 特殊組合能力(speciéh combining ability, SCA)을 판정하는 중요한 자료이며, 때문에 人工交配 과정에서 유입된 외부 花粉으로부터 생성된 개체를 사전에 확인하고 이들을 제거하여 순수한 全兄妹次代를 확보하는 것은 정확한 遺傳檢定 결과의 도출을 위한 선결 조건이다. 본 연구는 소나무의 人工交配 全兄妹次代 중 花粉親이 아닌 他個體의 花粉에 의해 생성된 개체의 존재여부를 검증하기 위하여 침엽수종에서 母系의 영향을 전혀 받지 않고 父系로부터만 유전되는 半數體 게놈인 염록체 DNA cpSSR 표지자 분석을 통해 花粉親과 일치하지 않는 haplotype을 지닌 次代木을 검색하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 공시재료

강원도와 경북 지역에서 선발된 소나무 수형목 중 선발 당시 표현형 및 次代검정 결과를 기준으로 강원30, 경북15 및 경북50 등 3본을 交配母樹로 선발하였다. 人工交配

에 사용된 화분은 수령이 높고 수형이 아름다우며 역사적 보존 가치가 있는 것으로 인정되어 이전의 교배시험에 이용된 바 있는 충북J2로부터 채취하였다. 2001년 5월 안면도 소나무 채종원에서 3개 交配母樹의 클론목에 대하여 人工交配를 실시하였으며, 2002년 가을 구과를 채취하여 종자를 정선한 뒤 냉장 보관하였다. 2003년 봄 人工交配 종자를 파종, 발아시킨 묘묘를 2004년 4월에 한 번 이식하여 수원시 권선구 오목천동 국립산림과학원 산림유전 자원부 구내 포지에서 양묘하였다.

2. DNA 추출 및 cpDNA 분석

2004년 6월 3개 交配母樹로부터 생산된 종자에서 발아된 총 114개(강원30 34개체, 경북15 54개체, 경북50 27개체)의 2년생 次代木으로부터 소량의 침엽 시료를 채취하였으며, 각 침엽으로부터 automatic DNA isolation system PI50- α (Kurabo, Japan)를 이용해서 total DNA를 추출하였다. cpSSR haplotype의 확인을 위해 해송의 염록체 DNA 염기서열을 기초로 개발된 cpSSR primer(Vendramin *et al.*, 1996) 중 소나무에서 다형성을 나타내는 것으로 판명된 7개 primer를 사용하였으며(Pt1254, Pt100783, Pt110048, Pt15169, Pt30204, Pt45002, Pt71936), 각 primer의 forward sequence의 5' 말단에는 19 base pair의 oligonucleotide를 붙여 합성함으로써 PCR 반응시 첨가된 M13(-29) IRD 800 dye-labeled primer와 반응하여 형광표지가 감지될 수 있도록 하였다. PCR 증폭은 김 등 (2002)의 방법을 사용하였는데, 반응용액 11 μ l 당 template DNA 5 ng, M13(-29) labeled primer 0.02 μ M, Forward/Reverse SSR primer 각 0.1 μ M, 0.1 mM dNTP, 1 unit의 *Taq* polymerase가 포함되도록 하였다. PCR 반응은 94°C에서 1분간 열변성후 57°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 증폭이 이루어지는 과정을 6회 반복한 후, 다시 94°C에서 30초간 열변성, 52°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 증폭의 과정을 30회 반복하고 마지막으로 72°C에서 5분간 추가로 증폭되도록 하였다. PCR 증폭산물은 Li-Cor automatic DNA 4000 sequencer를 이용, 6.5% long range polyacrylamide gel(FMC)상에서 1시간 동안 전기영

Table 1. CpSSR primer sequences used for 114 progenies analysis (Vendramin *et al.*, 1996).

Primer	Sequence	Location*
Pt1254	5'-CAATTGGAATGAGAACAGATAT-AGG-3' 5'-TGCGITGCACTTCGTTATAG-3'	<i>psbA-trnK</i> (UUU)spacer
Pt15169	5'-CTTGGATGGAATAGCAGCC-3' 5'-GGAAGGGCATTAAAGGTCATTA-3'	<i>rps2</i>
Pt71936	5'-TTCATTGGAAATACACTAGCCC-3' 5'-AAAACCGTACATGAGATCCCC-3'	IRF169

*Vendramin *et al.*, 1996.

동한 후 이를 직접 scan한 화상을 통해 관찰되었으며, 증폭산물의 size 크기를 기준으로 haplotype을 결정하였다. 먼저 7개 다형적 cpSSR primer를 사용하여 花粉樹와 3개 교배母樹의 haplotype 조합을 결정한 뒤, 이들 중 각 개체를 확실히 식별할 수 있는 정보를 제공하는 것으로 나타난 3개 primer(Table 1)를 선정하여 114개 次代木에 대한 cpSSR 변이 분석을 수행하고, 추정된 次代木의 haplotype 조합을 花粉樹 및 각 교배母樹의 것과 비교·분석하였다.

결과 및 고찰

7개의 cpSSR primer를 이용하여 PCR을 수행한 후 花粉親(충북J2)과 3개 母樹의 haplotype 조합을 결정하였다. 분석 결과 사용된 7개 primer 중 3개의 cpSSR primer에 의한 조합만으로도 분석된 花粉樹와 母樹들을 서로 구분할 수 있었으며, 이러한 개체 특이적 haplotype 조합의 확인을 통하여 본 연구에 사용된 cpSSR 표지자가 DNA 지문 분석에 적합한 표지자임이 확인되었다. 한편, 이를 전국에서 선발된 안면도 채종원 동일 단지 내 소재 소나무 수형목 138본을 대상으로 동일한 3개 primer를 사용하여 얻어진 분석 결과와 비교한 결과, 花粉親과 동일한 cpSSR haplotype 조합을 지닌 개체는 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구결과의 해석에 있어서 花粉親과 동일한 cpSSR hap-

lotype을 지닌 채종원 내 다른 수형목의 화분유입으로 인한 문제는 없을 것으로 생각된다.

花粉親과 母樹의 haplotype 결정에 사용된 3개 cpSSR primer를 사용하여 3개 全兄妹次代 114개체를 분석하여 각 개체목의 haplotype을 확인하였다. Pt1254 primer에 의한 PCR 분석 결과 3가지 서로 다른 size의 증폭산물이 관찰되었는데(Figure 1), 강원30으로부터 생산된 次代木 중에서 10개체가 花粉親과 다른 haplotype을 보였으며 이 중 2개체는 母樹와도 다른 haplotype을 지닌 것으로 나타나 이들은 주변의 다른 개체목으로부터 날아온 花粉에 의해서 수정된 것임을 알 수 있었다. 경북50으로부터 생산된 27개 개체목들은 모두 花粉親과 동일한 haplotype을 보여 오염된 花粉에 의해 생성된 개체가 없음을 알 수 있었고, 강원15로부터 생산된 개체목 중에서는 4개체가 花粉親과 다르며 이들은 母樹와 동일한 haplotype으로 확인되었다. Pt15169 primer에 의한 PCR 분석결과 총 5개 변이체가 관찰되었는데, 강원30으로부터 생산된 次代木 중 Pt1254 primer에 의한 PCR 분석에서 오염된 花粉에 의해서 생성된 것으로 확인된 10개체가 역시 花粉親과 다른 haplotype을 보였으며, Pt1254 primer에 의해서 母樹와 동일한 haplotype을 지닌 것으로 관찰된 8개체 중 1개체만이 母樹와 동일한 haplotype을 보였고 나머지 7개체는 母樹와 다른 haplotype을 보여 역시 인근 소나무로부터 유입된 花粉에

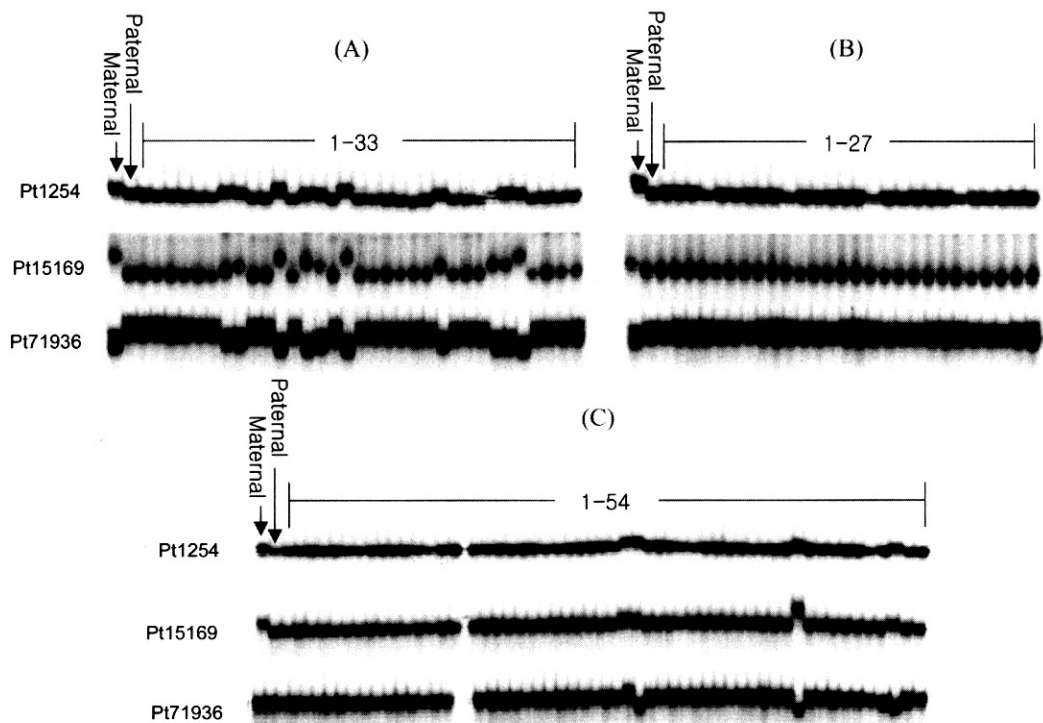


Figure 1. Results of cpSSR screening with 3 primers (Pt1254, Pt15169, Pt71936). Numbers on top of the gel photos designated full sib family members of (A) Gangwon30, (B) Gyeongbuk50, and (C) Gyeongbuk15. Blanks shown in (C) was resulted from being combined two gel photos which were run separately.

의해 생성된 次代木임을 알 수 있었다. 경북50로부터 생산된 개체목들은 Pt1254 primer에 의한 결과와 마찬가지로 모두 花粉親과 동일한 haplotype을 보여 오염된 花粉에 의해서 생성된 개체가 없음을 알 수 있었고, 경북15로부터 생산된 次代木들 중에서 母樹와 동일한 haplotype을 지닌 것으로 확인된 4개체 중 1개체만이 母樹와 동일한 haplotype을 보였고 나머지 3개체는 母樹와 다른 haplotype을 보여 인근 소나무로부터 유입된 花粉에 의해서 생성된 次代木임을 알 수 있었다. 또한 Pt71936 primer에 의한 PCR 분석 결과 총 4가지 서로 다른 size의 증폭산물이 관찰되었으며, 강원30의 次代木 중 위의 두 primer에 의한 분석 결과에서 유일하게 母樹와 동일한 haplotype을 지닌 것으로 관찰된 29번째 개체목은 역시 母樹와 동일한 haplotype을 보여 母樹로부터 생산된 화분에 의해 自家交配되어 생성된 次代木일 가능성이 큰 것으로 나타났다. 경북50의 次代木들은 위의 두 primer에 의한 결과와 마찬가지로 모두 花粉樹와 동일한 haplotype을 지닌 것으로 나타나 경북50을 母樹로 이용한 人工交配는 외부 花粉의 유입 없이 온전한 숲가꾸기 次代木만이 생산된 것으로 잠정적인 결론을 내릴 수 있었다. 경북15의 次代木 중에서는 위의 두 primer에 의한 결과에서 母樹와 동일한 haplotype을 지닌 것으로 나타난 52번째 개체목은 母樹와 다른 haplotype을 보여서 경북15로부터 생산된 次代木 중에는 自家交配에 의해서 생성된 개체는 없는 것으로 나타났다.

전체적으로 볼 때, 3개 母樹에 대한 人工交配를 통해서 얻어진 숲가꾸기 次代木 3가계, 총 114개체의 haplotype 조합을 비교한 결과, 이들 중 14개체에서 人工交配 花粉親과 다른 cpDNA haplotype 조합이 확인됨으로서 이들이 교배에 사용된 花粉親이 아닌 개체로부터 유입된 花粉에 의해서 생성된 개체인 것으로 확인되었으며, 이들 중 강원30으로부터 생산된 次代木 중 29번째 개체목은 自家交配에 의해서 생성되었을 가능성이 매우 높은 것으로 나타났다. 분석된 대다수 次代木(87.7%)의 haplotype이 花粉親과 동일한 haplotype을 지니고 있는 결과에 근거하여 침엽수종에서 父系에 의해서만 유전되는 것으로 알려진 엽록체 게놈이 소나무에서도 父系에 의해서만 유전됨을 간접적으로 확인할 수 있었다.

일반적으로 엽록체 DNA는 핵 내 DNA에 비하여 돌연변이율이 낮은 것으로 알려져 있다(Wolfe *et al.*, 1987). 그러나 주로 單一反復鹽基로 조성된 cpSSR의 특성을 고려할 때, 生殖細胞 分裂 중 엽록체 DNA의 복제시 DNA 중합효소의 부정확한 반응에 의해 초래되는 frameshift 돌연변이에 의해 nucleotide 1개씩의 차이를 보이는 indel들이 빈번하게 생성될 가능성이 크다(Gragg *et al.*, 2002). 아직까지 다양한 식물체를 대상으로 cpSSR 표지자의 돌연변이율이 계산되지는 못하였으나, *Pinus torreyana*를 대상으

로 계산된 cpSSR의 돌연변이율은 핵 내 DNA의 돌연변이율 보다 1,000배 이상 높은 것으로 나타났다(Provan *et al.*, 1998). 이처럼 cpSSR이 식물체내 다른 게놈 부위에 비해 상대적으로 돌연변이율이 매우 높다는 것은 個體識別을 위한 유전변이 분석 시 cpSSR 표지자가 기존의 DNA 표지자들 보다 식별력이 높은 DNA지문 수준의 정보를 제공할 수 있다는 것을 의미한다. 또한 현재까지 보고된 임분 내 花粉의 散布와 관련된 연구들에 따르면, 전반적으로 바람에 의한 임분 내 花粉 散布의 범위는 다소 제한적이며 불균일하게 일어남으로서 母樹와 이웃한 花粉樹들이 주로 교배에 참여하여 종자를 생산할 확률이 높은 것으로 알려져 있다(Dow and Ashley, 1998; Streiff *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 2001; Robledo-Arnuncio and Gil, 2005). 한 예로 Robledo-Arnuncio와 Gil(2005)은 *Pinus sylvestris* 천연림에서 cpSSR 및 nSSR 표지자를 이용한 paternity analysis를 통해 집단 내 花粉 散布에 대해 조사한 결과, 34개 母樹에서 생산된 800 여개의 종자 가운데서 절반가량이 自家受粉을 포함하여 각 母樹의 10 m 범위 내에 있는 개체들의 花粉에 의해 受粉된 것이며, 200 m 이상 떨어진 개체로부터 생산된 花粉에 의한 受粉으로 생성된 개체는 약 7%에 불과하다고 보고한 바 있다. 국내에서는 아직까지 이와 유사한 花粉親과 母樹의 거리 분석에 관한 연구 결과가 보고된 바는 없으나, 최근 안면도와 주왕산의 소나무 자연임분을 대상으로 수행된 동위효소 유전자좌의 분석을 통해서 交配樣式을 추정된 결과, 단일 母樹에 대하여 교배에 주로 참여한 것으로 추정되는 花粉樹의 수($1/n_p$)가 각각 1.14(Lee *et al.*, 2003)와 3.94(한 등, 2004)로 나타나 실제로 자연 상태에서 風媒에 의한 교배 시 종자생산에 주로 기여하는 花粉樹의 수는 매우 제한적인 것으로 추정되었다. 그러므로 人工交配 시 花粉樹가 아닌 개체로부터 생산된 花粉의 유입에 의한 花粉汚染으로 종자가 생성되더라도, 상대적으로 거리가 먼 채종원 외부의 개체로부터 유입된 花粉에 의해서 受粉될 가능성 보다는 동일 채종원내 이웃하는 개체들로부터 유입된 花粉일 가능성이 훨씬 높을 것으로 추정된다. 따라서 花粉樹가 주변 수형목들과 차별되는 DNA 지문을 지니고 있다는 사실을 고려해 볼 때, 次代木의 DNA 지문 분석결과 숲가꾸기 次代木으로 확인된 100개의 개체목들이 花粉樹와 동일한 cpSSR haplotype을 지닌 채종원 외부에 존재하는 임의의 개체로부터 유입된 花粉에 의해서 생성되었을 가능성은 매우 희박할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구에서 관찰된 바와 같이 향후 주요 침엽수종들의 人工交配 시 父系遺傳되는 엽록체 DNA의 특성을 이용하여 花粉樹들에 대한 cpSSR 분석을 실시함으로써 花粉樹별 DNA 지문의 특성을 보이는 cpDNA haplotype을 확인하게 되면, 林木育種研究에서 遺傳檢定の 정

확성 증대에 필수적인 純粹 全兄弟次代 家系助成에 효율적인 이용이 가능할 것으로 기대된다.

인용문헌

1. 김영중, 송정호, 조경진, 김용율, 구영분. 2002. 準人工交配에 의한 리기다×테다 소나무 잡종종자 大量生産과 雌花芽의 生長特性. 한국육종학회지 34(3): 228-235.
2. 한상돈, 홍용표, 양병훈, 이석우, 김찬수. 2004. 주왕산 소나무 집단의 교배양식 모수 추정. 한국 임학회 정기총회 및 학술발표회 자료집. pp. 315-316.
3. Anzidei, M. A. Madaghiele, C. Sperisen, B. Ziegenhagen, and G.G. Vendramin. 1999. Chloroplast microsatellites for analysis of the geographic distribution of diversity in conifer species. In: Gillet, E.M. (ed.). *Which DNA Marker for Which Purpose?* Final Compendium of the Research Project Development, optimization and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity. URL <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
4. Dow, B.D. and M.V. Ashley. 1998. Factors influencing male mating success in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *New Forest* 15 : 161-180.
5. Echt, C.S., L.L. DeVerno, M. Anzidei, and G.G. Vendramin. 1999. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology* 7 : 307-316.
6. Gragg, H., B.D. Harfe, and S. Jinks-Robertson. 2002. Base composition of mononucleotide runs affects DNA polymerase slippage and removal of frameshift intermediates by mismatch repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 22(24) : 8756-8762.
7. Iketani, H., T. Manabe, N. Matsuta, T. Akihama, and T. Hayashi. 1998. Incongruence between RFLPs of chloroplast DNA and morphological classification in east Asian pear (*Pyrus* spp.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 45(6) : 533-539.
8. Lee, S.W., S.S. Jang, K.H. Jang, and C.S. Kim. 2003. Estimation of mating system parameters in the natural population of *Pinus densiflora* of Anmyun island, Korea using allozyme markers. *Journal of Korean Forestry Society* 92(2) : 121-128.
9. Lian, C., M. Miwa, and T. Hogetsu. 2001. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity* 87 : 88-98.
10. Morgante, M., N. Felice, and G.G. Vendramin. 1997. Analysis of hypervariable chloroplast microsatellite in *Pinus halepensis* reveals a dramatic genetic bottleneck. In: Karp, A., P.O. Issac, and D.S. Ingrams.(eds.). *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. pp.407-412.
11. Noh, E.W., J.S. Lee, Y.I. Choi, M.S. Han, Y.S. Yi, and S.U. Han. 2003. *Pinus koraiensis* chloroplast, complete genome. [gi|295655556|ref|NC_004677.1|\[16975\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/295655556)
12. Powell, W., G. Machray, and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* 1 : 215-222.
13. Provan, J., N. Soranzo, N.J. Wilson, D.B. Goldstein, and W. Powell. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* 153 : 943-947.
14. Robledo-Arnuncio, J.J. and L. Gil. 2005. Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity* 94 : 13-22.
15. Sigurgeirsson, A. and A.E. Szmidt. 1993. Phylogenetic and biogeographic implications of chloroplast DNA variation in *Picea*. *Nordic Journal of Botany* 13 : 233-246.
16. Streiff, R., A. Ducouso, C. Lexer, H. Steinkellner, J. Gloessl, and A. Kremer. 1999. Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus rubur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Molecular Ecology* 8 : 831-841.
17. Tautz, D. 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena S.D.J., R. Chakraborty, J.T. Epplen, and A.J. Jeffreys (eds.). *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 21-28.
18. Vendramin G.G., L. Lelli, P. Rossi, and M. Morgante. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molecular Ecology* 5 : 111-114.
19. Wakasugi T., J. Tsudzuki, S. Ito, M. Shibata, and M. Sugiura. 1994. A physical map and clone bank of the black pine (*Pinus thunbergii*) chloroplast genome. *Plant Molecular Biology Report* 12 : 227-241.
20. Walter, R. and B.K. Epperson. 2001. Geographical pattern of genetic variation in *Pinus resinosa*: area of greatest diversity is not the origin of post glacial populations. *Molecular Ecology* 10 : 103-111.
21. Wang, X.-R. and A. Szmidt. 1993. Chloroplast DNA-based phylogeny of Asian *Pinus* species. *Plant Systematics and Evolution* 188 : 197-211.
22. Wang, X.-R., A.E. Szmidt, and H.N. Nguyen. 2000. The phylogenetic position of the endemic flat-needle pine *Pinus krempfii* (Lec., Pinaceae) from Vietnam, based on PCR-RFLP analysis of chloroplast DNA. *Plant Systematics and Evolution* 220 : 21-36.
23. Wolfe, K.H., W.H. Li, and P.M. Sharp. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNA. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 84 : 9054-9058.