

DNA 표지에 의한 채종원내 소나무 교배양식 구명

홍용표^{1*} · 김영미^{1,2} · 안지영¹ · 박재인²

¹국립산림과학원 산림유전자원과, ²충북대학교 산림학과

Mating System in Seed Orchard of Japanese Red Pines Revealed by DNA Markers

Yong-Pyo Hong^{1*}, Young-Mi Kim^{1,2}, Ji-Young Ahn¹ and Jae-In Park²

¹Division of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847, Korea

²Department of Forest Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

요 약: 소나무 채종원내 클론 간 교배양식을 구명하기 위해서 4개의 nSSR 표지와 6개의 cpSSR 표지를 이용하여 소나무 채종원 내에서의 타가교배율, 기여 화분친 수, 화분오염율을 산출하였다. cpSSR haplotype에 근거한 타가교배율은 94~100%로, 평균 98.9%의 타가교배율이 산출되었다. nSSR genotype에 근거한 타가교배율은 90.3~100%로, 평균 95.9%의 타가교배율이 산출되었다. 별개의 DNA 표지분석에서 자가교배로 확인되었던 종자들을 두 표지를 동시에 비교하여 확인한 결과 타가교배 종자로 최종 확인되었다(누적 타가교배율 100%). 화분오염율은 최소 43.6%(강원10)에서 최대 56.4%(강원12)로 평균 48.9%로 계산되었다. 종자의 cpSSR haplotype을 근거로 확인한 기여 화분친은 경북38에서 21개로 최대치가 확인되었으며, 강원10에서 13개로 최소치가 확인되어 평균 16.2개의 기여 화분친이 확인되었다. 결론적으로, 안면도 소나무 채종원 '77단지내 클론간 높은 타가교배율이 확인됨으로써 채종원산 종자의 유전적 안정성을 기대할 수 있으며, 안면도 소나무 채종원 '77단지내 교배양식 분석을 통해서 확인된 결과가 향후 진진세대 채종원 조성 및 관리에 유용한 정보를 제공할 것으로 기대된다.

Abstract: To investigate the mating system of clones in the seed orchard of Japanese red pine, parameters of mating system, such as outcrossing rates, number of potential pollen contributors, and degree of pollen contamination, were estimated in the seed orchard of Japanese red pines on the basis of DNA data including 4 nSSR and 6 cpSSR markers. Estimates of outcrossing rates were ranged from 94.9 to 100% with an average of 98.9% on the basis of the analysis of cpSSR haplotypes. They were ranged from 90.3% to 100% with an average of 95.9% on the basis of the analysis of nSSR genotypes. However, cross checking of both DNA markers revealed that the seeds presumed to be products of self pollination were turned out to be generated by pollination between mother tree and other tree (i.e., 100% of cumulative outcrossing rate). Estimates of pollen contamination ranged from 43.6% (Gangwon-10) to 56.4% (Gangwon-12) with the average of 48.9%. On the basis of pooled cpSSR haplotype of each seed, maximum number of 21 pollen contributors were verified from the seeds reproduced by Kyungbuk-38. Minimum number of 13 pollen contributors were verified in Gangwon-10. Mean of 16.2 pollen contributors were verified from a total of 5 mother trees. In conclusion, considering pretty high outcrossing rates between clones within a seed orchard, it may be expected that a fairly good genetic potential of the seeds, produced in '77 plot of the seed orchard of Japanese red pines at Anmyeon island, may be guaranteed. Observed results from the analysis of mating system of Japanese red pines in a '77 plot of the seed orchard may also provide useful information for the establishment and management of the seed orchard of the progressive generation.

Key words : Japanese red pines, mating system, pollen contamination, seed orchard, cpSSR haplotype, nSSR genotype, pollen contributor

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

서 론

소나무는 우리나라 산림에 존재하는 수종 중 단일수종 으로서는 가장 넓은 면적을 차지하고 있어 산림생태계에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 고려사나 조선왕조실록 등에 소나무림 보호 및 국가적 차원의 소나무 조림 등에 대한 다수의 기록이 나와 있을 정도로 건축재, 연료재, 선박재, 관곽재, 구황식 등 예로부터 빈번히 이용되어온 문화적, 경제적으로 가장 중요한 우리나라의 대표적 수종 중 하나이다(이창복, 1987; 임업연구원, 1999). 채종원은 전국에 분포하는 우량한 형질의 소나무 개체를 선발하여 증식한 수형목 클론으로 조성된 임분으로, 선발에 의한 임목육종 결과를 조림 및 임업경영의 실제에 적용하는 수단이다. 따라서 유전적으로 개량된 종자의 지속적 대량생산을 통한 조림용 종자의 안정적 공급을 궁극적 목적으로 한다(Oh *et al.*, 2007). 채종원에서 1) 외부 화분오염원으로부터 격리되고, 2) 무작위적 교배가 일어나며, 3) 자·웅화 개화기가 일치해야 하고, 4) 자·웅성 배우체 생산이 균일하고, 5) 최소한의 자가교배가 일어나며, 6) 클론간 화분기여도가 동일 할 때, 채종원산 종자의 개량효과 극대화 및 유전다양성 유지를 위한 이상적 조건이 된다고 하였다(Eriksson *et al.*, 1973; Askew, 1988; Müller-Starck *et al.*, 1983; Roberds *et al.*, 1991; Chaisursri and El-Kassaby, 1993; El-Kassaby and Cook, 1994). 그러나 일반적으로 이상적 조건과는 다른 현실적 문제에 의해 기대되는 값과 상이한 상태에 놓이게 된다. 따라서 유전다양성이 높은, 우수한 품질의 개량종자 생산을 위해서는 이상적 상태로 접근할 수 있도록 현실 문제를 해결하는 것이 채종원 관리의 주요 임무일 것이다.

미래 생육환경 변화에 대한 적응력과 각종 질병에 대한 저항력을 향상시키기 위해서는 채종원산 종자의 유전다양성 증진이 필수적이기 때문에 각 클론의 부계 기여는 개략적으로 동등하여야 한다(Burdon, 2001; Zhu *et al.*, 2000). 반면에 높은 종자 손실률과 관련이 있는 자가교배에 의한 근교약화현상(Inbreeding depression) 또는 채종원 외부의 자연임분으로부터의 선별되지 않은 개체의 화분에 의한 오염은 일반적으로 개량효과를 감소시킨다(Fast *et al.*, 1986; Adams *et al.*, 1997). 일반적으로 침엽수류 수종에 있어서 자가교배 또는 근친교배에 의해서 생성된 임목은 상대적으로 각 유전자좌에 있어서 이형접합체 감소 및 이로 인한 열성유전형질의 발현 증가로 인해서 적응형질의 약화현상이 초래되기 때문에 환경적응력의 감소가 초래된다고 알려져 있다(Sorensen, 1969, 1971; Franklin, 1970). 또한 개량효과의 추정에는 채종원 외부의 선별되지 않은 개체에 의한 수정 가능성을 제외한 완전한 타가교배에 근거하고 있으나, 이론적으로 채종원내 수형

목 클론이 주변 임분의 선별되지 않은 개체에 의해 수정될 경우 개량효과가 감소한다고 알려져 있으므로 자연교배 채종원에서의 화분오염은 개량종자의 유전적 질을 감소시키는 심각한 요인 중의 하나라 할 수 있다(Di-Govanni and Kevan, 1991; Wheeler and Jech, 1992; Adams *et al.*, 1997; Stoehr *et al.*, 2004). 자배 개체의 유전적 열성과 종자개량효과의 감소를 고려할 때 우량종자의 대량생산이 목적인 채종원의 경우 타가교배율의 증진과 화분오염으로 인한 원치 않는 유전자의 유입 방지는 채종원 관리의 주요 고려대상의 하나가 되어야 된다. 따라서 채종원 내 모수별 교배양식 추정을 통하여 종자단계에서 유전적 우수성을 판단할 수 있는 화분오염 및 타배에 의해서 생성된 종자의 비율을 추정함으로써 채종원산 종자의 품질을 보증하는 지표로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

채종원의 교배양식에 관한 초기 연구들은 형태적 형질을 이용하거나 동위효소를 이용하였다(Shen *et al.*, 1981; El-Kassaby *et al.*, 1986). 그러나 동위효소를 이용한 교배양식 분석의 경우 분석대상 전 개체의 식별에 충분한 다형성 유전자좌의 확인이 어려운 단점이 있다. 이를 극복하기 위하여 개발된 RAPD(random amplified polymorphic DNA), ISSR(inter simple sequence repeats), AFLP(amplified fragment length polymorphism) 표지 등은 다수의 유전자좌를 용이하게 확인할 수 있으나 우성표지의 특성상 2배체에서 우성 동형접합체와 이형접합체 유전자형의 구분이 불가능함으로 인해 화분기여자의 정확한 확인이 어려운 단점이 있어 채종원내 교배양식 구명에는 적합하지 않다. 반면에 엽록체 DNA는 일반적으로 침엽수류에서 부계에 의해서만 유전되는 반수체 genome으로서 cpSSR(chloroplast simple sequence repeats)표지는 genome 상에 존재하는 단순 반복염기의 반복수 차이에 의한 변이체를 분석하는 것으로 표현형상 공우성적 특성을 나타내는 장점이 있기 때문에 최근 종 및 개체 식별과 집단유전학적 분석 등에 유용한 분자 표지로서 널리 이용되고 있다(Anzidei *et al.*, 1999). 우성 표지와는 달리 핵내 유전자좌에 존재하는 모든 대립유전자 표현형을 관찰할 수 있는 공우성 DNA 표지인 nSSR(nuclear simple sequence repeats)표지는 핵 DNA 내의 SSR 부위에 존재하는 변이 분석을 통해서 관찰되는 정밀한 유전정보를 지닌 표지로서 집단유전학, 가계도 분석, 유전적 연관관계분석, 생태유전학, 진화유전학, 법과학에서의 개체동정 등 다양한 유전학 분야에서 이용되고 있다.

본 연구에서는 안면도 소나무 채종원 '77단지 내 모수에서 생산된 종자를 대상으로 cpSSR 표지와 nSSR 표지를 분석하여 (1) 타가교배율을 산출하고, (2) 채종원 외부로부터 유입된 화분오염 정도를 확인하고, (3) 종자생성에 기여한 화분친을 확인함으로써 채종원산 종자의 유전적

안정성을 검토하고 향후 채종원 관리에 유용한 정보를 제공하고자 수행하였다.

재료 및 방법

2006년에 안면도 소재 소나무 채종원 '77단지 내에 표준지 1개소(95×90 m)를 설치하고(N 36° 28' 43", E 126° 22' 52"), 채종원내 수형목 클론의 침엽과 표준지 내 클론별 네 방위(동서남북)에서 구과를 채취하였다. 각 클론의 침엽에서 total DNA를 추출하고, 방위별로 채취된 구과를 실험실에서 탈중하여 상온에서 발아시킨 뒤, 배조직의 total DNA를 추출하였다. 각 방위별 5개~10개의 배조직 DNA를 분석에 이용하였다.

cpSSR haplotype의 확인을 위해서 해송의 엽록체 DNA 염기서열을 기초로 개발된 20개의 cpSSR primer 중 6개의 primer를 사용하였다(Table 1, Vendramin *et al.*, 1996). 각 primer의 forward sequence의 5'말단에는 추가적으로 M13(-29) 염기서열에 상보적인 19개의 oligonucleotide를 붙여 합성함으로써 PCR 반응시 첨가된 M13(-29) IRD 800 dye-labeled primer(5'-CACGACGTTGTAACGAC-3')와 결합되어 레이저 감광에 의해 형광표지가 감지될 수 있도록 하였다. cpSSR PCR 증폭은 김 등(2002)의 방법을 사용하였는데, 반응용액 11 µL 당 template DNA 5 ng, M13(-29) labeled primer 0.02 µM, Forward/Reverse cpSSR primer 각 0.1 µM, 0.1mM dNTP, 1 unit의 *Taq* polymerase(Thermo fish scientific inc)가 포함되도록 하였다. PCR 반응은 94°C에서 4분간 전처리 후 94°C에서 1분간 열변성, 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 29회 반복하고 마지막으로 72°C에서 5분

간 추가로 반응시켜서 증폭을 마무리시켰다. PCR 증폭산물의 분획은 6.5% long range polyacrylamide gel(FMC)을 사용, LI-COR automatic DNA 4000 sequencer로 1시간 동안 수행하였으며, 증폭산물의 크기를 결정하기 위해서 DNA size standard를 (50~350 bp concentrated sizing standard, LI-COR inc., USA) 동시에 전기영동하여 관찰된 각 primer별 엽록체 DNA의 haplotype은 증폭산물의 크기에 준해서 명명되었다. 모수와 종자(배조직)의 엽록체 DNA haplotype의 비교를 통해서 종자 생성에 기여한 화분친의 엽록체 DNA haplotype으로 결정함으로써 모수의 종자 생성에 기여한 화분친을 확인하고, 모수와 동일한 엽록체 DNA haplotype을 갖는 종자를 자가교배 종자로 확인하고 타가교배율을 산출하였다. '77단지 내에 존재하는 전체 160개 클론에서 확인되지 않은 엽록체 DNA haplotype을 갖는 종자를 채종원 '77단지 외부로부터 유입된 화분에 의해서 생성된 종자로 간주하고 화분오염 정도를 계산하였다.

nSSR 유전자형의 확인을 위해서 소나무 DNA 염기서열 기초로 개발된 12개의 nSSR primer 중 증폭산물의 재현성이 우수한 것으로 판명된 4개 primer를 사용하였다(Table 2, Watanabe *et al.*, 2006). 각 primer의 forward sequence의 5'말단에는 형광물질인 FAM이나 HEX dye를 결합시켜서 합성함으로써 증폭산물 분획 시 레이저 감광에 의해 형광표지가 감지될 수 있도록 하였다. nSSR PCR 반응용액 12 µL 당 template DNA 10ng, Forward /Reverse nSSR primer 각 0.2 µM, 0.1 mM dNTP, 1×PCR reaction buffer, 0.67 mM MgCl₂, 1 unit의 *Taq* polymerase가 포함되도록 하였다. PCR 반응은 94°C에서 4분간 전처리 후 94°C에서 30초간 열변성, 52°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 증폭하는 과정을 34회 반복하고 마지막으로 72°C에서 5분간 추가로 반응시켜서 증폭을 마무리시켰다.

Table 1. List of cpSSR primers.

Primer	Motif	Sequence
pt1254	(T) ₁₇	5'-CAATTGGAATGAGAACAGATAGG-3'
	(T) ₁₅	5'-TGCGTTGCACTTCGTTATAG-3'
p30204	(A) ₁₂ (G) ₁₀	5'-TCATAGCGGAAGATCCTCTT T-3'
	(A) ₉ (G) ₈	5'-CGGATTGATCCTAACCATACC-3'
pt45002	(T) ₁₅	5'-AAGTTGGATTTTACCCAGGTTG-3'
	(T) ₉	5'-GAACAAGAGGATTTTTTCTCATAC A-3'
pt71936	(T) ₁₆	5'-TTCATTGGAAATACACTAGCCC-3'
	(T) ₁₄	5'-AAAACCGTACATGAGATTCCC-3'
pt100783	(T) ₁₀	5'-A ACGTATGTATCCCCTAACTGTCA-3'
	(T) ₁₀	5'-TCAATTTTTGCCATATCCTGA-3'
pt110048	(T) ₁₀	5'-TAAGGGGACTAGAGCAGGCTA-3'
	(T) ₉	5'-TTCGATATTGAACCTTGGACA-3'
M13(-29) labeled primer		5'-(IRDye 800)-CACGACGTTGTAACGAC-3'

Table 2. List of nSSR primers.

Primer	Motif	Sequence
pdms009	(CT) ₃₁ (CA) ₂₀	5'-HEX-CAATGAGTAGAAGATCATGGTGG-3' 5'-CTAGGGAGCCGCATTTACAC-3'
pdms030	(CA) ₁₂ CT(CA) ₅	5'-FAM-GATCACTGTAGGAAGGCTGG-3' 5'-TGGGAAGAGGACAACCTGAG-3'
pdms065	(TG) ₅ TATAATN ₁₀ (TG) ₉ (AG) ₁₀	5'-HEX-GTCAGAAGCCTTATACTGTG-3' 5'-TTGTAAATTCAAATGIAGCC-3'
pdms221	(GA) ₉ G ₃ (GA) ₅	5'-HEX-GAGAGTTGTATGACGGAAATAC-3' 5'-CCCACACAAAAGTGACTTC-3'

PCR 증폭산물을 Prism xl 3130 Genetic Analyzer(ABI)를 이용하여 전기영동 분석하였으며, Gene Scan™-500 Rox™ Size Standard를 동시에 전기영동하여 증폭산물의 크기를 결정하였고, 여기서 얻어진 영상을 Gene Mapper analysis software를 이용하여 증폭산물의 크기를 기준으로 유전자형을 결정하고, 전 개체에서 관찰된 증폭산물의 크기 순으로 대립유전자를 명명하였다.

종자생성에 기여한 화분친의 확인은 nSSR 유전자형에 근거해서 CERVUS 2.0 프로그램(Marshall *et al.*, 1998)을 이용하여 수행하였다. 이 프로그램을 이용해서 분석된 모든 유전자좌에서의 모수와 종자의 유전자형을 비교하여 각각의 유전자좌에서 모수로부터 유래된 대립유전자를 제외한 나머지 대립유전자 조합을 확인하고, '77단지 내에 존재하는 전체 160개 클론의 유전자형과의 비교를 통해서 화분친으로 추정되는 가상의 대립유전자 조합이 생성될 수 있는 유전자형을 지닌 모든 개체들을 확인하였다. 모수가 화분친으로 확인된 종자를 자가교배 종자로 확인하고 타가교배율을 산출하였으며, '77단지 내에 존재하는 전체 160개 클론의 유전자형으로부터 유래되지 않은 것으로 확인된 종자를 채종원 '77단지 외부로부터 유입된 화분에 의해서 생성된 종자로 간주하고 화분오염 정도를 계산하였다. 종자당 기여 화분친 수로 화분친기여율을 산출하고 SAS 프로그램을 이용하여 화분오염율과 화분친 기여율의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

6개의 cpSSR primer를 사용하여 cpSSR 표지 분석결과 총 25개의 변이체가 관찰되었다[Pt1254(3개 변이체), Pt30204(3개), Pt71936(9개), Pt45002(4개), Pt100783(2개), Pt110048(4개), 평균 4.2개/primer]. cpSSR primer를 사용하여 각각의 haplotype을 확인, 비교한 결과 강원10에서 생산된 39개의 종자 중 37개의 종자에서 모수와 다른 haplotype이 관찰되어 타가교배율이 94.9%로 나타났다. 경북38에서 생산된 39개의 종자 haplotype에서 모수와 동일

한 haplotype이 관찰되지 않았으므로 타가교배율이 100%로 나타났다. 나머지 3개 모수(강원12, 강원15, 강원24)에서 생산된 모든 종자는 타가교배에 의한 종자임이 확인되었다. 따라서 5개의 모수에서 생산된 종자 중 평균 98.9%가 잠정적으로 모수가 아닌 개체로부터 생산된 화분에 의해 수정된 타가교배 산물인 것으로 추정되었다(94.9~100%, 평균 98.9%, Table 3).

4개의 nSSR primer를 사용하여 nSSR 표지 분석결과 총 52개의 변이체가 관찰되었다[pdms009(29 variants), pdms030(7), pdms065(9), pdms221(7), 평균 13 variants/primer]. 4개의 nSSR primer를 사용하여 각각의 유전자형을 확인, 비교한 결과, 분석에 이용된 5개의 모수 중 강원10, 강원12에서 생산된 모든 종자는 타가교배에 의한 종자임이 확인되어 최고 타가교배율 100%가 산출되었으며, 강원15에서 생산된 31개의 종자 중 28개가 타가교배에 의한 종자임이 확인됨으로써 최저 타가교배율 90.3%가 산출되었다. 따라서 5개의 모수에서 생산된 종자는 잠정적으로 평균 95.9%가 모수 이외의 소나무에서 생산된 화분이 수정되어 타가교배에 의해 생산된 것으로 추정되었다(90.3~100%, 평균 95.9%, Table 3).

타가교배율 추정에 DNA 표지분석을 이용한 연구에서 cpSSR 표지를 분석한 결과 Michael 등(2002)은 *Pinus contorta*에서 98%의 타가교배율을 보고하였으며, nSSR 표지 분석에 의한 연구에서는 96.7%(*Eucalyptus grandis*, Chaix *et al.*, 2003)와 97.8%(*Cryptomeria japonica*, Moriguchi *et al.*, 2004)의 타가교배율이 보고되어 안면도 소나무 채종원에서 추정된 수치와 상응하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 cpSSR 표지 분석결과 확인된 타가교배율이 nSSR 표지 분석결과 보다 더 높게 관찰된 것은 분석된 표지에 따른 특징 차이에 기인하는 것으로 생각할 수 있다. nSSR 표지 분석은 nuclear DNA내에 존재하는 microsatellite 부위를 증폭하여 유전정보를 분석하는 것이지만, cpSSR 표지 분석은 엽록체 DNA의 microsatellite 부위를 분석대상으로 한다. 일반적으로 엽록체 게놈은 반수체이며 엽록체 DNA의 염기서열은 핵 DNA(nuclear DNA)에 비해 낮은

돌연변이율을 보인다. 또한 생식세포분열 시 야기될 가능성이 있는 염색체 교차에 의한 유전정보의 교환 과정을 거치지 않고 부모 중 한 쪽에 의해서만 자식에게 일방적으로 전달되며(uniparental inheritance), 소나무는 부계유전하기 때문에 수종 및 개체 간 변이가 핵에 존재하는 DNA의 경우보다 훨씬 적다(홍용표 등, 2006). 따라서 cpSSR 표지의 경우 종자가 모수의 haplotype과 동일한 haplotype을 갖는 경우에 자가교배에 의한 종자로 판별할 수 있지만, 부모로부터 각각 절반씩의 유전정보를 전달받는 nSSR 표지의 경우에는 종자와 모수의 유전자형이 비교 되었을 때 분석된 4개의 유전자 좌에서 공히 모수가 지닌 대립유전자가 한 개 이상 존재하는 화분수에 의해 수정되었을 경우 실제로는 타가교배에 의해서 생성된 종자임에도 불구하고 자가교배에 의한 종자로 판별될 가능성이 있기 때문에 나타난 결과로 생각할 수 있다.

표지별로 확인된 각각의 haplotype과 genotype을 기초로 각 표지에서 타가교배 유무가 다르게 나타났는데, cpSSR 표지 분석결과 강원10을 제외한 나머지 개체의 타가교배율은 100%로 나타났다. 강원10은 cpSSR 표지에서는 94.9%로 나타났으나 nSSR 표지 분석결과 타가교배율이 100%로 관찰되어 강원10에서 채취 분석된 종자의 진정한 타가교배율은 100%로 확인됨으로써 분석된 5개 모수에서 생산된 모든 종자는 모수 이외의 개체로부터 생산된 화분에 의해 수정되어 생성된 종자로 확인되었다(Table

3). 대부분의 침엽수류에서 자가교배는 열성형질의 노출이 증가함에 따라 야기되는 자식약세효과로 인하여 배의 발달, 종자발아, 유묘의 생존에 부정적 영향을 미치며, 타가교배율이 높아질수록 생존능력이 높은 종자의 비율이 증가하므로 성숙종자가 증가한다고 알려져 왔다(Goto *et al.*, 2005; Moran and Brown, 1980). 따라서 안면도 소나무 채종원에서 생산된 종자의 타가교배율이 매우 높게 나타난 것에 비추어 볼 때 자가교배에 의한 유전적 약화현상이 배제된 우수한 유전적 품질을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

분석된 별개의 DNA 표지 분석결과를 동시에 고려해서 화분오염율을 추정하기 위해서 일차적으로 5개 모수에서 생산된 각각의 종자 배조직의 nSSR 유전자형과 모수의 유전자형 및 채종원 '77단지 내에 존재하는 전체 160개 클론에서 확인된 160개 유전자형을 동시에 비교하여 화분친으로 기여했을 가능성이 있는 클론들이 잠정적으로 선별되었다. 유전자형이 비교대상 종자의 생성에 기여했을 가능성이 있는 모든 클론들의 cpSSR haplotype의 확인을 통해서 최종적으로 종자생성에 기여한 화분친이 결정되었다. 이들 5개 모수에서 생산, 분석된 종자 중 채종원 내에 존재하는 160개 클론으로부터 생산된 화분에 의해 수정된 것으로 확인된 종자를 제외한 나머지 종자들은 소나무 채종원 '77단지 외부로부터 유입된 화분에 의해서 수정된 종자로 결정되었다. 분석결과 화분오염율은 강원10에서 생산된 종자 중 17개가 외부 화분친에 의해 생성된 종자임이 확인되어 최저치인 43.6%로 계산되었다. 강원12에서 생산된 종자 중 22개가 외부 화분친에 의해 생성된 종자임이 확인되어 최고치인 56.4%가 산출되었다. 결론적으로 5개의 모수에서 생산된 종자의 평균 48.9%가 소나무 채종원 '77단지 외부에 존재하는 소나무에서 생산된 화분이 유입되어 생성된 것으로 추정되었다(Table 4, 43.6~56.4%, 평균 48.9%). 채종원내 화분오염율과 관련된 기존의 연구에서 nSSR 표지 분석결과 *Eucalytus grand*에서 39.2%(Chaix *et al.*, 2003)와 *Crytomeria japonica*에서 47.8%의 화분오염율(Moriguchi *et al.*, 2004)이 보고되어

Table 3. Estimates of outcrossing rate and effective pollen contributor.

Mother	N ^a	Outcrossing rate		Cumulative outcrossing rate
		cpSSR	nSSR	
Gangwon 10	39	94.9	100	100
Gangwon 12	39	100	100	100
Gangwon 15	31	100	90.3	100
Gangwon 24	30	100	96.7	100
Gyeongbuk 38	39	100	92.3	100
Mean	35.6	98.9	95.9	100

^anumber of seeds per mother tree.

Table 4. Estimates of contamination rate.

Mother	N ^a	Contamination rate				CN _c ^c	Cumulative Contamination rate
		N _c ^b	cpSSR	N _c ^b	nSSR		
Gangwon 10	39	0	0	5	12.8	17	43.6
Gangwon 12	39	3	7.7	6	15.4	22	56.4
Gangwon 15	31	0	0	5	16.1	16	51.6
Gangwon 24	30	3	10	3	10	14	46.7
Gyeongbuk 38	39	2	5.1	5	12.8	18	46.2
Mean	35.6	1.6	4.6	7	13.4	17.4	48.9

^anumber of seeds per mother tree, ^bnumber of contaminant seeds, ^cnumber of contaminant seeds verified via comparative evaluation with both DNA markers.

본 연구결과와 유사한 수준의 화분오염율이 보고 된 바 있다. Goto 등(2005)이 nSSR 표지를 이용한 연구에서 *Pinus thunbergii*에서 9.9%의 비교적 낮은 화분오염율을 보고 하였는데, 이는 연구 대상지 주위 1 km 이내에 해송 자연임분이 존재하지 않아, 채종원이 인근 해송임분으로부터 지리적으로 비교적 잘 격리되어 있기 때문에 나타난 결과이며, Michael 등(2002)도 *Pinus contorta* 채종원을 대상으로 cpSSR 표지를 분석해서 5%의 낮은 화분오염율을 보고한 바 있는데 이는 채종원 인근에 동일 수종의 자연임분 부재로 인한 결과로 추정되며, 5%의 화분오염에 기여한 화분은 인근 200 m 위치에 조성된 별개의 채종원으로부터 유입된 화분에 의해 생성된 종자일 가능성을 제기하였다. 동위효소 분석결과 Pakkanen 등(2000)이 *Picea abies*에서 69-71%의 높은 화분오염율을 보고하였는데 독일 가문비는 핀란드 산림의 25%를 차지하는 주요수종으로 채종원 인근에 가문비나무 자연임분이 분포하고 있어 인근 임분과 격리 되지 못한 결과이며, Nuray 등(2006)도 *Pinus brutia*에서 85.7%의 높은 화분오염율을 보고한 바 있는데 이는 채종원 남쪽과 서쪽 인근 100 m 거리에 자연임분이 둘러싸고 있으며, 자연임분에 비하여 채종원내 클론은 수령이 어리기 때문에 화분생산능력에 차이가 나며 상대적으로 화분생산량이 많은 자연임분으로부터 유입된 화분들이 종자생산에 더 많은 기여를 했을 가능성을 제기하였다. 화분오염율은 기상상태, 채종원과 외부의 자용화 개화시기, 채종원 내부의 화분생산량, 채종원 외부의 화분생산량 등에 따라 달라진다고 보고된 바 있는데(Harju and Muona, 1989; Pakkanen and Pulkinen, 1991) 기존의 연구를 통해서 관찰된 채종원에서 발생하는 화분오염 정도의 차이는 수종에 따른 개화특성과 채종원 조성 및 관리기법의 차이뿐만 아니라 채종원이 조성된 입지의 지형적인 차이에 대한 고찰이 함께 이루어져야 될 것으로 생각된다. 안면도 소나무 채종원 '77단지'의 주변에는 추가적인 선발을 통해서 연차적으로 조성된 소나무 채종원 3개 단지가 존재하는데('78, '79, '80단지) 이들 채종원에만 별도로 존재하는 클론('77단지내에는 존재하지 않는 37개 클론)에서 생산된 화분이 유입되어 생성된 종자가 존

재할 가능성을 배제할 수 없기 때문에 단순하게 본 연구에서 확인된 화분오염의 결과로서 생성된 종자 전부가 주변의 자연림으로부터 유입된 화분에 의해서 생성된 것이라고 결론지을 수는 없을 것으로 사료된다. 일반적으로 채종원 외부로부터의 화분오염은 동일한 화분기여도와 무작위 교배 및 높은 타가수정율과 마찬가지로 채종원내 종자의 유전다양성을 증가시키는 긍정적인 효과가 있으나 선발된 우량 개체간 교배를 통한 종자의 개량이 목적인 채종원의 경우 개량효과의 증진에 부정적 요소가 될 가능성을 배제할 수는 없다(Fast *et al.*, 1986). 그러나 채종원은 자연임분으로부터 선발된 유전적으로 우량한 수형목으로 조성되어 있는 임분으로 채종원 내 수형목 간의 교배에 의해서 생성된 종자뿐만 아니라 외부 화분이 유입되어 생성된 종자일지라도 채종원내 가계가 자연임분 가계보다 상대적으로 일반조합능력 평균치가 우수할 것으로 기대되며, 따라서 일반자연임분에서 생산된 종자에 비해 상대적으로 유전적 개량을 기대할 수 있을 것으로 생각된다. Pakkanen 등은(2000) *Picea abies*는 핀란드의 중요 수종으로 개화시기에 대기 중에 높은 농도의 화분이 존재하게 되어 외부로부터의 화분유입이 불가피하기 때문에 채종원에서 화분오염을 완전히 방지하는 것은 불가능하다고 주장한 바 있다. 우리나라의 경우 국토 전역에 걸쳐서 소나무가 자연분포하고 있는 실정이며 안면도 소나무 채종원의 경우 바다에 의한 지리적 격리의 잇점을 피하고자 섬에 조성된 채종원이긴 하나 기존 안면도 내 자연임분에 존재하는 소나무로 인해서 채종원 외부로부터의 화분유입을 자연상태에서 100% 방지할 수는 없을 것으로 생각된다.

6개의 cpSSR primer를 사용하여 모수별 종자의 haplotype을 확인, 비교한 결과 평균 16.2개의 기여 화분친이 확인되었고, 분석된 종자 수에 대한 기여 화분친 수의 비율인 화분친 기여율이 경북38에서 0.558으로 나타나 최대치를 보였으며, 강원10에서 0.333으로 최소치를 보였다(Table 5). 일반적으로 다수의 화분수로부터의 동일한 화분기여는 높은 수준의 유전적 품질을 갖는 종자의 생산에 가장 중요한 작용을 한다(Moriguchi *et al.*, 2005; Kang *et al.*,

Table 5. Estimates of effective pollen contributor.

Mother	N ^a	N ₂ ^b	PC ^c	N ₃ ^d	N ₄ ^e	PC ₂ ^f
Gangwon 10	39	13	0.333	3	10	0.256
Gangwon 12	39	17	0.436	9	8	0.205
Gangwon 15	31	14	0.452	4	10	0.323
Gangwon 24	30	16	0.533	7	9	0.300
Gyeongbuk 38	39	21	0.538	8	13	0.333
Mean	35.6	16.2	0.458	6.2	10	0.283

^anumber of seeds per mother tree, ^bnumber of pollen contributors, ^cpaternal contribution rates, ^dnumber of pollen contributors from outside of seed orchard, ^enumber of internal pollen contributors ^finternal paternal contribution rates.

2001). *Pinus echinata* 천연집단에서 cpSSR 표지를 이용하여 3~6개의 화분친이 확인되었고(Dyer and Sork, 2001), *Picea mariana*에서 STS 표지를 이용하여 기여 화분친을 추정 한 연구에서 6~9개의 화분친이 확인되어(Pery and Bousquet, 2001) 대부분의 연구에서 10개 미만의 화분친이 확인되었다(Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004). 이것은 채종원을 대상으로 한 본 연구의 cpSSR 표지 분석에서 확인된 16.2개 보다 낮은 수치이다. 클론의 화분기여는 개체간의 거리, 화분생산력, 개화생리의 영향을 받는다(Moriguchi *et al.*, 2005). 자연상태에서 임분이 생성되고 갱신되는 과정을 반복한 자연임분의 경우에는 개체 간 간격이 무작위로 형성되었으며, 간벌에 의하여 개체간 공간이 조절되지 못하여 흔히 수관이 폐쇄되어 있을 정도로 밀식되어 있는 경우가 빈번하다. 반면 채종원의 경우 일정한 간격을 두고 모수를 식재하여 조성되었으며, 개체가 성장함에 따라 유전간벌 및 수형조절을 수행함으로써 화분 이동에 유리한 공간이 충분히 확보된다. 따라서 모수당 화분친 수의 차이는 채종원과 자연임분 간에 임분밀도, 수관유효도 등의 입지조건에 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 한 등(2004)이 주왕산 소나무 천연집단을 대상으로 하여 동위효소 분석 결과 3.94개의 화분친이 확인되었으며, Lee 등(2003)이 안면도 소나무 천연집단을 대상으로 동위효소 분석을 한 결과 1.14개의 화분친이 확인되었다고 보고한 바 있는데 이것은 천연집단을 대상으로 분석된 결과임을 감안하더라도 본 연구의 결과와 비교하였을 때 매우 낮은 수치이다. 따라서 분석대상 전 개체의 식별에 충분한 다형성 유전자좌의 확보가 어려운 동위효소분석법의 한계 때문에 화분친 판별과정에서 과소치가 추정되었을 가능성을 배제할 수 없다. 실제로 설악산 잣나무 천연집단을 대상으로 동위효소 표지와 cpSSR 표지를 동시에 분석한 결과 동위효소 분석을 통해서 2.21개의 화분친이 확인된 반면에 cpSSR 표지분석을 통해서 12.4개의 화분친이 확인되어 표지에 따른 개체식별력의 차이로 인한 결과임이 확인된 바 있다(Hong *et al.*, 2009).

각 모수에서 확인된 기여 화분친 중 화분오염 종자에서만 확인된 화분친과 채종원 내 160개 클론에서 확인되지 않은 엽록체 haplotype이 관찰된 화분친을 채종원 외부 기여 화분친으로 간주하고, 채종원 내부 기여 화분친 수를 산출한 결과 평균 10개의 화분친이 확인되었다. 모수별로 종자당 내부 화분친 기여 가능성(분석된 전체 종자 수에 대한 채종원 내부 기여 화분친 수의 비율)이 경북38에서 0.333으로 나타나 최대치를 보였으며, 강원12에서 0.205으로 최소치를 보였다(Table 5). 본 연구에서 관찰된 비교적 높은 화분오염율을 고려할 때 다양한 외부 화분의 유입이 이루어져 상대적으로 각 모수에서의 화분친 기여율이 증가될 것으로 기대되었으나 실제 5개 모수에서의 화

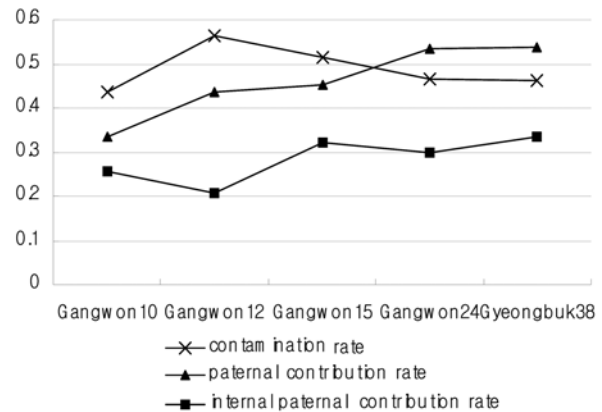


Figure 1. Correlation of contamination rate with paternal contribution rate.

분오염율과 종자생성에 기여한 화분친 기여율 간의 상관계수는 0.052로 통계적으로 유의성이 없는 것으로 나타나, 비록 외부로부터의 화분오염이 비교적 높게 관찰되었으나(48.9%), 화분오염율의 증가에 따른 외부 기여 화분친 수의 증가는 상대적으로 적게 나타나 채종원 외부에 존재하는 제한적인 개체로부터 생산된 화분이 채종원 내부로 한정적으로 유입되었음을 알 수 있었다(Figure 1). 결론적으로 채종원내 수형목 클론간에 원활한 교배가 이루어지고 있음을 알 수 있었으며, 종자 2.2개 당 별도의 화분수가 기여한 것으로 나타나(평균 종자수/평균 화분수 = 35.6/16.2, Table 5) 채종원 표준지내 모수에서 생산된 종자의 유전적 배경이 다양함을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 관찰된 높은 화분오염율(48.9%)과 우리나라 전국에 분포하고 있는 소나무 분포양상을 고려해볼 때 소나무 채종원에 대한 원천적인 화분오염방지는 기술적으로 매우 어려울 것으로 생각된다. 따라서 차대검정 결과에 근거해서 유전간벌을 시행하거나, 1.5세대 채종원 및 2세대 채종원을 조성할 경우 이들 품대 채종원에 존재하는 선발 클론 간에만 한정된 교배를 보장할 수 없을 것으로 생각된다. 결론적으로 우리나라 소나무 분포특성상 피할 수 없는 화분오염을 고려할 때 전진세대 채종원산 종자의 평균개량효과의 증진이 보장되기 위해서는 차대검정 결과 중 특수조합능력(special combining ability; SCA) 뿐만 아니라 모수별 일반조합능력(general combining ability; GCA) 평균치도 동시에 고려되어야 할 것으로 생각된다.

인용문헌

1. 김영중, 송정호, 조경진, 김용율, 구영분. 2002. 準人工交配에 의한 리기다x테다 소나무 잡종종자 大量生産과 雌花芽의 生長特性. 한국육종학회지 34(3): 228-235.
2. 이창복. 1987. 수목학. 향문사. 서울. pp. 74-83.
3. 임업연구원. 1999. 소나무 소나무림. pp. 9-13.

4. 한상돈, 홍용표, 양병훈, 이석우, 김찬수. 2004. 주왕산 소나무 집단내 교배양식 모수 추정. 한국임학회 학술연구발표 논문집 1: 315-316.
5. 홍용표, 권혜연, 김용울. 2006. 국내 소나무 집단에 있어서 cpSSR 표지자 변이체 분포양상. 한국임학회지 4: 435-442.
6. Adams, W.T., Hipkins, V.D., Burczyk, J. and Randall, W.K. 1997. Pollen contamination trends in a maturing Douglas-fir seed orchard. Canadian Journal Forest Research 27: 131-134.
7. Anzidei, M., Madaghiele, A., Sperisen, C., Ziegenhagen, B. and Vendramin, G.G. 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.
8. URL <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
9. Askew, G. R. 1988. Estimation of gamete pool compositions in clonal seed orchard. *Silvae Genetica* 37: 227-232.
10. Burdon, R.D. 2001. Genetic diversity and disease resistance some considerations for research, breeding, and deployment. Canadian Journal Forest Research 31: 596-606.
11. Chaisursri, K. and El-Kassaby, Y.A. 1993. Estimation of clonal contribution to cone and seed crops in Sitka spruce seed orchard. *Annals of Forest Science*. 50: 461-467.
12. Chaix, G., Gerber, S., Razafimaharo, V., Vigneron, P., Verhaegen, D. and Hamon, S. 2003. Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 705-712.
13. Di-Giovanni, F. and Kevan, P.G. 1991. Factor affecting pollen dynamics and its importance to pollen contamination: a review. Canadian Journal Forest Research 21: 1155-1170.
14. Dyer, R.J. and Sork, V.L. 2001. Pollen pool heterogeneity in Shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Molecular Ecology* 10: 859-866.
15. El-Kassaby, Y.A., Parkington, J. and Devitt, W.J.B. 1986. The effect of crown segment on mating system in a Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) seed orchard. *Silvae Genetica* 35: 76-82.
16. El-Kassaby, Y.A. and Cook, C. 1994. Female reproductive energy and reproductive success in a Douglas-fir seed orchard and its impact on genetic diversity. *Silvae Genetica* 43: 243-246.
17. Eriksson, G., Jonsson, A. and Lindgren, D. 1973. Flowering in a clone trial of *Picea abies* Karst. *Studia. Forestalia. Suecica* 110: 1-45.
18. Fast, W., Dancik, B.P. and Bower, R.C. 1986. Mating system and pollen contamination in a Douglas-fir clone bank. *Canadian Journal Forest Research* 16: 1314-1319.
19. Franklin, E.C. 1970. Survey of mutant forms and inbreeding depression in species of the family *Pinaceae*. USD A Forest Service Research Paper Se-61.
20. Goto, S., Watanabe, A., Miyahara, F. and Moriguchi, Y. 2005. Reproductive success of pollen derived from selected and non-selected sources and its impact on the performance of crops in a nematode-resistant Japanese black pine seed orchard. *Silvae Genetica* 54: 69-76.
21. Harju, A. and Muona, O. 1989. Background pollination in *Pinus sylvestris* seed orchards. *Scandinavian Journal Forest Research* 4: 513-520.
22. Hong, Y.-P., Ahn, J.-Y., Kim, Y.-M., Yang, B.-H. and Hur, S.-D. 2009. Outcrossing Rates of Korean Pines in Natural Population of Mt. Seorak in Korea Revealed by Allozyme and cpSSR Marker Analysis. *Proceeding of 2009 Symposium of Western Forest Genetics Association*. pp. 17.
23. Kang, K.S., Lindgren, D. and Mullin, T.J. 2001. Prediction of genetic gain and gene diversity in seed orchard crops under alternative management strategies. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1099-1107.
24. Lee, S.W., Jang, S.S., Jang, K.H. and Kim, C.S. 2003. Estimation of mating system parameters in the natural population on *Pinus densiflora* of Anmyon island, Korea using allozyme markers. *Journal of Korea Forestry Society* 92(2): 121-128.
25. Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L. and Pemberton, T.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
26. Michael, U.S. and Newton, C.H. 2002. Evaluation of mating dynamics in a Lodgepole pine seed orchard using chloroplast DNA markers. *Canadian Journal Forest Research* 32: 469-476.
27. Moran, G.F. and Brown, A.H.D. 1980. Temporal heterogeneity of outcrossing rates in Alpine ash (*Eucalyptus delegatensis* R.T. Bak). *Theoretical and Applied Genetics* 57: 101-105.
28. Moriguchi, Y., Taira, H., Tani, N. and Tsumura, Y. 2004. Variation of paternal contribution in a seed orchard of *Cryptomeria japonica* determined using microsatellite markers. *Canadian Journal Forest Research* 34: 1683-1690.
29. Moriguchi, Y., Tani, N., Itoo, S., Kanehara, F., Tanaka, K., Yomogita, H., Taira, H. and Tsumura, Y. 2005. Gene flow and mating system in five *Cryptomeria japonica* D. Don seed orchards as revealed by analysis of microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes* 1: 174-183.

30. Müller-Starck, G., Ziehe, M. and Hattemer, H.H. 1983. Reproductive systems in conifer seed orchard. 2. Reproductive selection monitored at an LAP gene locus in *Pinus sylvestris* L. *Theoretical and Applied Genetics* 65: 309-316.
31. Nuray, K., Isik, K. and Adams, W.T. 2006. Mating system and pollen contamination in a *Pinus brutia* seed orchard. *New Forest* 31: 409-416.
32. Oh, C.Y., Kang, K.S., Choi, W.Y., Han, S.U. and Kim, C.S. 2007. Seed orchard management considering the correlation between vegetative and reproductive in *Pinus koraiensis* S. et Z. *Korean Journal Breed Science* 39: 419-426.
33. Pakkanen, A. and Pulkien, P. 1991. Pollen production and background pollination levels in Scots pine seed orchards of Northern Finnish origin. Pollen contamination on seed orchards. Proceedings of meeting of the Nordic group for tree breeding. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Forest Genetics and Plant Physiology Report 10: 14-21.
34. Pakkanen, A., Nikkanen, T. and Pulkkinen, P. 2000. Annual variation in pollen contamination and outcrossing in a *Picea abies* seed orchard. *Scandinavian Journal Forest Research* 15: 399-404.
35. Perry, D.J. and Bousquet, J. 2001. Genetic diversity and mating system of post-fire and post-harvest black spruce: an investigation using codominant sequence-tagged-site (STS) markers. *Canadian Journal Forest Research* 31: 32-40.
36. Roberds, J.H., Friedmann, S.T. and El-Kassaby, Y.A. 1991. Effective number of pollen parents in clonal seed orchard. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 313-320.
37. Robledo-Arnuncio, J.J., Smouse, P.E., Gil, L. and Alia, R. 2004. Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. *Forest Ecology and Management* 197: 243-253.
38. Shen, H., Rudin, D. and Lindgren, D. 1981. Study of the pollination pattern in a Scots pine seed orchard by means of isozyme analysis. *Silvae Genetica* 40: 7-15.
39. Sorensen, F.C. 1969. Embryonic genetic load in coastal Douglas-fir, *Pseudotsuga menziessi*. *American Naturalist* 103: 389-398.
40. Sorensen, F.C. 1971. Estimate of self-fertility in coastal Douglas-fir from inbreeding studies. *Silvae Genetica* 20: 115-120.
41. Stoehr, M.U., Webber, J.E., Hollefreund, C.C.A. and Painter, R.A. 2004. Potential pollen contamination effects in progeny from an off-site Douglas-fir seed orchard: 9-year field results. *Canadian Journal Forest Research* 34: 981-984.
42. Vendramin, G.G., Lelli, L., Rossi, P. and Morgante, M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molecular Ecology* 5: 111-114.
43. Watanabe, A., Iwaizumi, M.G., Ubukata, M., Kondo, T., Lian, C. and Hogoetsu, T. 2006. Isolation of Microsatellite markers from *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. using a dual PCR technique. *Molecular Ecology* 6: 80-82.
44. Wheeler, N.C. and Jech, K.S. 1992. The use of electrophoretic markers in seed orchard research. *New Forests* 6: 311-328.
45. Zhu, Y., Chen, H., Fan, J., Wang, Y., Li, Y., Chen, J., Fan, J.X., Yang, S., Hu, L., Leung, H., Mew, T.W., Teng, P.S., Wang, Z. and Mundt, C.C. 2000. Genetic diversity and disease control in rice. *Nature* 406: 718-722.

(2010년 3월 9일 접수; 2010년 4월 26일 채택)