

DNA 표지를 이용한 채종원내 소나무의 교배양식 분석

김영미^{1,2}, 홍용표^{1*}, 안지영¹, 박재인²¹국립산림과학원 산림유전자원과, ²충북대학교 산림학과Mating System of Japanese Red Pines in Seed Orchard
Using DNA MarkersYoung Mi Kim^{1,2}, Yong Pyo Hong^{1*}, Ji Young Ahn¹ and Jae In Park²¹Division of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847, Korea²Department of Forest Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract - To assess parameters of mating system in seed orchard, such as outcrossing rates, number of potential pollen contributors, and degree of pollen contamination, seeds, produced in '77 plot of the Japanese red pine (*Pinus densiflora* S et Z) seed orchard at Anmyeon island, were collected in 2007 and analysed by nSSR and cpSSR markers. Estimates of outcrossing rates ranged from 91.2 to 100% (mean 97.7%) on the basis of the analysis of cpSSR haplotypes and from 81.6 to 100% (mean 95.3%) on the basis of the analysis of nSSR genotypes. By cross checking of both DNA markers, seeds, presumed to be products of self pollination on the basis of single marker, were confirmed as outcrossed seeds, which resulted in cumulative outcrossing rates of 98.9%. On the basis of pooled cpSSR haplotype of each seed, the number of pollen contributors and paternal contribution rates were estimated as 14.8 and 0.512, respectively. In conclusion, considering pretty high level of outcrossing rates observed in a seed orchard, good genetic potential of the seeds, produced in '77 plot of the seed orchard of Japanese red pines at Anmyeon island, may be guaranteed. Investigated results from the analysis of mating system of Japanese red pines in a '77 plot of the seed orchard may also be expected to provide useful information for the management and establishment 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

서 언

산림의 지속적 경영을 위해서는 체계적 계획을 통한 효율적 관리 뿐만 아니라 갱신을 통한 후대림의 육성이 필요하다. 그러나 임분의 조성에서 수확에 이르기까지 수십 년의 기간이 소요되는 산림경영 상의 문제를 방지하기 위해서는 신중한 초기 경영계획의 수립과 재료의 선정이 필요하다. 때문에 경영의 보속성과 안정성을 확보를 위해서는 경영목적에 적합한 수종의 선정과 채종원산 종자의 품질이 매우 중요하다. 채종원에서는 유전적 효율성이 높은 종자의 생산을 목적으로 한다. 유전적 효율성은 자-웅화 개화기, 자-웅화 개화량 등의 채종원내 채종목의 개화생리, 무

작위적 교배와 동등한 화분기여, 화분오염, 자가교배 등 많은 요소에 영향을 받는다(Eriksson *et al.*, 1973; Woessner and Franklin, 1973). 유전적 효율성을 평가하는 주요 요인은 유전다양성과 개량효과로 특정 클론에 의한 편중된 화분기여는 종자의 유전다양성을 저해하며, 자가교배 및 화분오염은 종자의 개량효과 증진을 저해하는 요인이다. 때문에 채종원에서의 자가교배와 편중된 화분기여 그리고 화분오염은 가장 경계되어야 할 요소이다.

임목은 높은 근교약세(inbreeding depression)를 겪는 것으로 알려져 있다(Williams and Savolainen, 1996). 근교약세는 자가교배 혹은 근친교배를 발생시키는 교배양식 뿐만 아니라 유전형질의 영향을 받는다(Byers and Waller, 1999). 열성 유전자의 누적에 따라 개체마다 적응력에 미

*교신저자(E-mail) : yphong@forest.go.kr

치는 근교약세의 유해정도가 다르며 도태에 민감하게 반응한다. 그로 인해서 종자유산을 발생시키며, 발아율 감소, 발아 지연, 유령기 사망률 증가, 성장감소, 유령기 종자생산 감소, 생활사 후반의 형태적 기형의 원인이 된다(Ferriol *et al.*, 2011). 자가교배율의 증가는 치사유전자의 누적으로 귀결되어 충실종자율을 감소시키며, 발아가 산림자원의 생산성에 중요한 부분임을 고려할 때(Choi *et al.*, 2007), 자가교배에 의한 종자의 품질 저하는 생산성을 감소시켜, 파종과 육묘에 소요되는 인력과 비용의 낭비를 초래하여 경영의 효율을 낮춘다. 때문에 수확기 경영목적의 달성을 위해서는 채종원에서의 자가교배는 제한될 필요가 있다.

채종원내 화분오염을 연구에서는 4~86%의 매우 다양한 화분오염율을 보고하고 있다(Hansen and Kjær, 2006; Nuray *et al.*, 2006; Torimaru *et al.*, 2009). 종자개량에 부정적인 영향을 미치는 요인 중 하나인 화분오염율은 채종원산 종자의 개량효과를 감소시키기 때문에 높은 수준의 화분오염율은 우량종자의 대량생산을 목적으로 하는 채종원의 관리에 심각한 문제로 지적되고 있다. Plomion *et al.*(2001)은 *Pinus pinaster* 채종원에서 산출된 36%의 화분오염율로 인해 최소 18.25의 개량효과가 감소할 것으로 추정하였으며, 채종원과 자연임분 간에 유전적 가치의 차이가 클수록 개량효과가 감소됨을 지적하였다. 소나무와 같은 풍매수종으로 조성된 채종원의 경우 화분오염율은 채종목의 수령과 화분 다산성, 주변임분 화분다산성 및 기후환경, 외부화분유입원의 규모와 근접성, 그리고 채종원의 규모와 관리방법에 영향을 받기 때문에 지속적인 모니터링가 필요하다(Bridgwater and Trew, 1981; El-Kassaby *et al.*, 1984; Harju and Muona, 1989; El-Kassaby and Davidson, 1990; Pakkanen and Pulkkinen, 1991; Torimaru *et al.*, 2009).

채종원내 종자는 채종원 외부 자연집단의 화분생산량, 개화생리 그리고 채종원 관리기술에 영향을 받기 때문에 채종원에서 개량종자를 생산하기 위해서는 유전적 측면에서 개량이 필수적이지만 이와 더불어 채종원의 효율적인 관리가 수반됨으로써 고품질의 유량종자 생산이 가능하다고 할 수 있다(김 등, 2006). 따라서 자가교배와 화분오염에 대한 정보는 채종원산 종자의 유전적 품질평가 뿐만 아니라, 종자의 유전적 효율 감소를 초래하는 요소의 영향을 제한하는 화분관리 기술을 채종원 관리에 적용하는데도 필요하다.

채종원내 교배양식 연구에 이용되는 표지 중에서 다형성 유전자좌의 확인이 어려운 동위효소나 직접적인 화분친의 확인이 어려운 우성표지는 채종원내 교배양식 구명에는 적합하지 않다. 반면에 일반적으로 침엽수류에서 부계유전을 하는 엽록체 DNA는 반수체 genome로서 소나무의 부계유전을 직접적으로 확인 가능하게 함으로써 통계적 방법을 사용하지 않고 화분친의 확인이 간단한 장점이 있다. 유전자좌의 대립유전자 표현형을 관찰할 수 있는 공우성 DNA 표지인 nSSR(nuclear simple sequence repeats)표지는 핵 DNA 내의 SSR 부위에 존재하는 변이 분석을 통해서 관찰되는 높은 다형성을 갖기 때문에 정밀한 화분친의 확인이 가능한 교배양식 연구에 유용한 표지로, 최근 채종원의 교배양식연구에 많이 이용되고 있다(Pakkad *et al.*, 2008).

본 연구에서는 2007년에 안면도 소나무 채종원 '77단지 내 모수에서 생산된 종자를 대상으로 cpSSR표지와 nSSR 표지를 이용한 교배양식 분석으로 타가교배율, 모수별 기여화분친 수, 채종원 외부로부터 유입된 화분에 의한 화분오염 정도를 확인함으로써, 채종원산 종자의 유전적 효율성검토하고, 채종원의 관리와 개선에 정보를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

안면도 소재 소나무 채종원 '77단지 내에 35개 클론 48개 개체를 포함하는 표준지 1개소(95 × 90 m)를 설치하였다(N 36°28'43", E 126°22'52"). 표준지 채종목 대상으로 Vendramin *et al.*(1996)이 해송의 엽록체 DNA 염기서열을 기초로 개발한 20개의 cpSSR primer 중 소나무에서 다형성을 나타내는 pt1254 등 6개(pt1254, pt30204, pt45002, pt71936, pt100783, pt110048)의 cpSSR primer를 이용하여 표준지 내 채종목의 엽록체 DNA haplotype을 사전에 확인 하였다. 확인된 정보를 이용하여 5개체(강원10, 강원12, 강원15, 강원24, 경북38)가 분석대상으로 결정되었다. 2007년에 채종원내 수형목 클론의 침엽과 표준지 내 클론 별 네 방위에서 구과를 채취하였다. 각 클론의 침엽에서 total DNA를 추출하고, 방위별로 채취된 구과를 실험실에서 탈종하여 상온에서 발아시킨 뒤, 배조직의 total DNA를 추출하였다. 채종원내 클론 침엽 DNA와 각 방위별 최대 10개의 배조직 DNA를 분석에 이용하였다.

cpSSR haplotype의 확인을 위해서 사전시험과 동일한

6개의 cpSSR primer를 사용하였다(pt1254, pt30204, pt45002, pt71936, pt100783, pt110048). 각 primer의 forward sequence의 5'말단에는 형광물질인 FAM이나 HEX dye를 결합시켜서 합성함으로써 증폭산물 분획 시 레이저 감광에 의해 형광표지가 감지될 수 있도록 하였다. cpSSR PCR 반응은 Hong *et al.* (2010)의 방법으로, 증폭은 반응용액 10 µl 당 template DNA 5 ng, Forward/Reverse cpSSR primer 각 0.1 µM, 0.1 mM의 dNTP, 2.5 mM의 MgCl₂, 1X reaction buffer, 1unit의 *Taq* polymerase (Thermo Fish Scientific Inc)가 포함되도록 하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 초기 열변성 후, 94°C에서 30초간 열변성, 52°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 증폭의 과정을 35회 반복하고 마지막으로 72°C에서 5분간 추가로 반응시켜서 증폭을 마무리시켰다. nSSR 유전자형의 확인을 위해서 Watanabe *et al.* (2006)이 개발한 nSSR primer중에서 다형성을 보이는 4개 primer를 선발하고, 각 primer의 forward sequence의 5'말단에는 형광물질인 FAM이나 HEX dye를 결합하여 증폭에 이용하였다(pdms009, pdms030, pdms065, pdms221). nSSR PCR 반응은 Hong *et al.* (2010)의 방법으로, 반응용액은 12 µl 당 template DNA 10 ng, Forward /Reverse nSSR primer 각 0.2 µM, 1 unit의 *Taq* polymerase, 0.1 mM의 dNTP, 0.67 mM의 MgCl₂, 1X reaction buffer가 포함되도록 하였다. PCR 반응은 4°C에서 4분간 초기 열변성 후, 94°C에서 30초간 열변성, 52°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 증폭하는 과정을 34회 반복하고 마지막으로 72°C에서 5분간 추가로 반응시켜서 증폭을 마무리시켰다. PCR 증폭산물을 Prism 3130 Genetic Analyzer(ABI)를 이용하여 분획하였으며, Gene Scan™-500 Rox™ Size Standard를 동시에 전기영동하여 증폭산물의 크기를 결정하였고, 여기서 얻어진 결과를 Gene Mapper Analysis Software를 이용하여 증폭산물의 크기를 기준으로 각 유전자좌에 대한 염록체 DNA haplotype과 핵 DNA genotype을 결정하였다.

cpSSR 표지 분석결과 종자(배조직)의 haplotype을 종자 생성에 기여한 화분친으로 결정하고, 모수와 동일한 haplotype을 갖는 종자를 모수와 화분수가 동일한 자가교배 종자로 확인하여 타가교배율을 산출하였다. '77단지 내에 존재하는 전체 클론에서 확인되지 않는 haplotype을 갖는 종자를 채종원 '77단지 외부로부터 유입된 화분에 의해서 생성된 종자로 간주하고 화분오염정도를 계산하였다.

nSSR 표지 분석결과 종자생성에 기여한 화분친의 확인은 nSSR genotype에 근거해서 CERVUS 2.0 프로그램을 이용하여 수행하였다(Marshall *et al.*, 1998). 이 프로그램을 이용해서 분석된 모든 유전자좌에서 모수와 종자의 유전자형을 비교하여 각각의 유전자좌에서 모수로부터 유래된 대립유전자를 제외한 나머지 대립유전자 조합을 확인하고 '77단지 내에 존재하는 전체 클론의 유전자형과의 비교를 통해서 화분친으로 추정되는 유전자형을 지닌 모든 개체를 확인 하였다. 모수가 화분친으로 확인된 종자를 자가교배 종자로 확인하고 타가교배율을 산출하였으며 '77단지 내에 존재하는 전체 클론의 유전자형으로부터 유래되지 않는 것으로 확인된 종자를 채종원 '77단지 외부로부터 유입된 화분에 의해서 생성된 종자로 간주하고 화분오염 정도를 계산하였다.

결과 및 고찰

6개의 cpSSR primer를 사용하여 각각의 haplotype을 확인하여 비교한 결과, Table 1에 나타난 바와 같이 2007년에 생산된 종자에서는 강원12에서 생산된 38개의 종자 중 35개의 종자에서 모수와 다른 haplotype이 관찰되어 타가교배율이 92.1%로 나타났다. 강원10에서 생산된 40개의 종자 haplotype에서 모수와 동일한 haplotype이 관찰되지 않았으므로 타가교배율이 100%로 나타났다. 따라서 5개의 모수에서 생산된 종자 중 평균 97.7%가 잠정적으로 모수가 아닌 개체로부터 생산된 화분에 의해 수정된 타가교배 산물인 것으로 추정되었다(92.1~100%, 평균 97.7%). 4개의 nSSR primer를 사용하여 각각의 유전자형을 확인하여 비교한 결과, 2007년에 생산된 종자에서는 분석에 이용된 5개의 모수 중 강원10, 강원15, 경북38에서 생산된 모든 종자는 타가교배에 의한 종자임이 확인되어 최고 타가교배율 100%가 산출되었으며, 강원24에서 생산된 38개의 종자 중 31개가 타가교배에 의한 종자임이 확인됨으로써 최저 타가교배율 81.6%가 산출되었다. 2007년 5개의 모수에서 생산된 종자는 잠정적으로 평균 95.3%가 모수 이외의 소나무에서 생산된 화분이 수정되어 타가교배에 의해 생산된 것으로 추정되었다(81.6~100%, 평균 95.3%). 각각의 DNA 표지 분석을 통해서 타가교배율이 다르게 산출되었는데 Hong *et al.* (2010)은 DNA 표지 특성의 차이에 기인하는 것으로 판단하였다. 즉, 교배양식 분석에 이용된 DNA 표지 중

cpSSR 표지는 재조합 없이 부계로만 유전되는 반수체인 엽록체 DNA의 특성을 근거로 하여 모수와 동일한 haplotype을 갖는 종자가 모수와 화분수가 동일한 자가교배 종자로 확인된다. 반면에 nSSR표지는 2배체 핵 DNA 특성으로 종자와 모수 및 후보 화분수의 genotype을 비교하여 확인하기 때문에, 각 유전자좌에서 모수로부터 종자로 유전된 대립유전자를 제외한 나머지 대립유전자가 분석된 4개의 유전자좌에서 모수가 지닌 대립유전자를 적어도 한 개 이상 보유하고 있는 화분수에서 유전된 경우 자가교배에 의한 종자로 판별될 가능성이 있기 때문에 나타난 결과로 판단되어진다.

cpSSR 표지와 nSSR 표지의 분석결과를 종합하여 타가교배율을 확인한 결과 경북38의 경우 cpSSR 표지에서는 타가교배율이 96.3%로 나타났으나 nSSR 표지 분석결과 타가교배율이 100%로 관찰되어 100%의 타가교배율이 확인되었고, 강원24는 cpSSR 표지에서는 타가교배율이 100%

로 나타났으나 nSSR 표지 분석결과 타가교배율이 81.6%로 관찰되어 100%의 타가교배율이 확인되었다. 강원12는 cpSSR 표지에서는 타가교배율이 91.2%로 나타났으나 nSSR 표지 분석결과 타가교배율이 94.7%로 관찰되어 두 표지 모두에서 확인된 타가교배율이 94.7%로 나타남에 따라 2007년에 '77단지 채종원에서 생산된 종자의 평균 타가교배율은 98.9%로 확인되었다(Table 1). Table 2에 나타낸 바와 같이 기존의 연구에서도 대부분 80%~98%의 높은 화분오염율이 보고되고 있는데(Lewandowski and Burcayk, 2000; Lian *et al.*, 2001; Moriguchi *et al.*, 2005, 2010; Nuray *et al.*, 2006; O'Connell *et al.*, 2006; Stoehr *et al.*, 1998; Stoehr and Newton, 2002; Torimaru *et al.*, 2009) 높은 타가교배율은 침엽수종에서는 일반적으로 나타나는 경향이다. 이는 근교약세의 원인인 자가교배나 근친교배에 의해서 발생된 비립종자가 분석에 이용되지 못하기 때문에 자가교배율의 과소치가 추정되었을 가능성을 배제

Table 1. Estimates of outcrossing rate

Mother	N ^a	Outcrossing rate		Cumulative outcrossing rate
		cpSSR	nSSR	
Gangwon 10	40	100	100	100
Gangwon 12	38	92.1	94.7	94.7
Gangwon 15	7	100	100	100
Gangwon 24	38	100	81.6	100
Gyeongbuk 38	27	96.3	100	100
Mean	30	97.7	95.3	98.9

^anumber of seeds per mother tree.

Table 2. Outcrossing rate observed in seed orchard and natural population

Stand	Species	Marker	Outcrossing rate (%)	Reference
	<i>Cryptomeria japonica</i>	nSSR	97.8	Moriguchi <i>et al.</i> (2005)
	<i>Pinus sylvestris</i>	nSSR	97.7	Torimaru <i>et al.</i> (2009)
Seed orchard	<i>Cryptomeria japonica</i>	nSSR	72.8 (indoor) 94.4 (outdoor)	Moriguchi <i>et al.</i> (2010)
	<i>Pinus contorta</i>	cpSSR	98	Stoehr and Newton (2002)
	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	cpSSR	94	Stoehr <i>et al.</i> (1998)
	<i>Pinus brutia</i>	Allozyme	94.7	Nuray <i>et al.</i> (2006)
Natural population	<i>Picea gluca</i>	Allozyme	94	O'Connell <i>et al.</i> (2006)
	<i>Pinus densiflora</i>	nSSR	95.5	Lian <i>et al.</i> (2001)
	<i>Pinus cembra</i>	Allozyme	81	Lewandowski and Burczyk. (2000)

할 수 없으나 그럼에도 불구하고 자연집단을 대상으로한 대부분의 연구에서 80%이상의 타가교배율이 보고된 반면 채종원을 대상으로 한 연구에서는 94%이상의 타가교배율이 보고되고 있어 대부분 채종원에서 자연집단보다 높은 타가교배율이 보고되고 있다. 이는 자연집단과는 달리 채종원내 개체들이 일정한 간격으로 식재 및 관리되어 상대적으로 임분밀도에 차이가 있어서 채종원내에서 비교적 화분의 이동이 용이하게 일어나기 때문인 것으로 사료된다. Hong *et al.* (2010)은 2006년 '77단지 채종원에서 생산된 종자를 대상으로 한 연구에서 100%의 타가교배율을 보고한 바 있는데 이는 본 연구에서 확인된 타가교배율보다 다소 높은 수치이지만 유의한 차이를 보이지 않았다(T-test, $P>0.1$).

채종원산 종자의 생성에 기여한 화분친수를 산출하기 위해 6개의 cpSSR primer를 사용하여 모수별 종자의 haplotype을 종합하여 비교한 결과 평균 14.8개의 기여 화분친이 확인되었고(3~20개, 평균 14.8개), 분석된 종자 수에 대한 기여 화분친 수의 비율인 화분친 기여율이 경북38

에서 0.593으로 나타나 최대치를 보였으며, 강원15에서 0.429으로 최소치를 보였다(Table 3, 0.429~0.593, 평균 0.489). 기여화분친수는 임분의 밀도에 따라 영향을 받는 것으로 판단되어 지고 있다. 그러나 설악산 잣나무 집단의 경우 동일한 재료를 이용하여 동위효소와 cpSSR표지를 이용하여 기여화분친 수를 추정할 결과 cpSSR표지에서 더욱 많은 수의 기여화분친이 확인되어, 표지에 따른 개체식별력의 차이로 인한 다른 결과를 보일 수 있음이 지적되었다(Hong *et al.*, 2010). 분석에 이용된 표지에 따라 결과의 차이가 있겠으나, 자연집단을 대상으로한 대부분의 연구에서 10개 미만의 화분친이 확인되어, 채종원을 대상으로한 본 연구의 cpSSR 표지 분석에서 확인된 14.8개 보다 적은 수의 화분친이 보고된 바 있다(Table 4, Dyer and Srok, 2001; Hong *et al.*, 2009; Pery and Bousquet, 2001). 채종원을 대상으로 한 연구에서는 *Pinus contorta* 채종원과 *Pinus densiflora* 채종원에서 15개 이상의 기여 화분친이 보고되었다(Table 4, Stoehr and Newton, 2002; Hong *et*

Table 3. Estimates of effective pollen contributor

Mother	N ^a	N ₂ ^b	PC ^c	N ₃ ^d	N ₄ ^e	PC ₂ ^f
Gangwon 10	40	18	0.450	3	15	0.375
Gangwon 12	38	20	0.526	9	11	0.289
Gangwon 15	7	3	0.429	2	1	0.142
Gangwon 24	38	17	0.447	6	11	0.289
Gyeongbuk 38	27	16	0.593	7	9	0.333
Mean	30	14.8	0.489	5.4	9.4	0.286

^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, and ^finternal paternal contribution rates.

Table 4. Effective pollen contributor observed in seed orchard and natural population

Stand	Species	Marker	No of pollen contributor	Reference
Natural population	<i>Pinus echinata</i>	cpSSR	3-6	Dyer and Srok (2001)
	<i>Pinus koraiensis</i> (Mt Seorak)	Allozyme	2.21	Hong <i>et al.</i> (2009)
	<i>Pinus koraiensis</i> (Mt Seorak)	cpSSR	12.4	Hong <i>et al.</i> (2009)
	<i>Picea mariana</i>	STS	6-9	Pery and Bousquet (2001)
Seed orchard	<i>Pinus densiflora</i>	cpSSR	16.2	Hong <i>et al.</i> (2010)
	<i>Pinus contorta</i>	cpSSR	19	Stoehr and Newton (2002)

Table 5. Estimates of contamination rate

Mother	N ^a	cpSSR		nSSR		CN ^c	Cumulative contamination rate (%)
		N _C ^b	Contamination rate (%)	N _C ^b	Contamination rate (%)		
Gangwon 10	40	0	0	8	20.0	16	40
Gangwon 12	38	5	13.5	1	2.7	14	36.8
Gangwon 15	7	1	14.3	1	14.3	3	42.9
Gangwon 24	38	2	6.5	10	26.3	21	55.3
Gyeongbuk 38	27	3	11.1	1	3.7	10	37
Mean	30	2.2	9.1	4.2	13.4	12.8	42.4

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

al., 2010).

기여화분친 수는 임분밀도와 부의 상관에 있다(Dyer and Sork, 2001; Smouse and Sork, 2004). 따라서, 임분의 형태에 따른 기여화분친 수의 차이는 타가교배율의 경우와 마찬가지로 채종원은 지속적인 공간관리가 이루어지는 육종집단인 반면에 자연임분은 범위와 접근성의 문제로 임분 밀도 조절과 유지를 위한 지속적 관리가 어려운 집단으로 두 집단 간 화분이동의 차이로 인해 나타난 결과로 예상된다. Hong *et al.* (2010)은 2006년 '77단지 채종원에서 생산된 종자를 대상으로 교배양식을 분석한 연구에서 16.2개의 기여화분친수, 평균 0.458의 화분친 기여율을 보고하였다. 이 결과는 본 연구에서 확인된 기여화분친수 14.8개와 화분친 기여율 0.489과 유의한 차이는 없었으나 2007년에 생산된 종자에 보다 다양한 화분친이 기여 한 것으로 확인되었다(T-test, P>0.1). 결론적으로 채종원 내에서는 다양한 화분친이 기여할 수 있는 기회가 제공됨으로써 채종원 내 수형목 클론간에 원활한 교배가 이루어지고 있음을 알 수 있었으며, 2007산 종자는 종자 2개 당 별도의 화분수가 기여한 것으로 나타나(각각 평균 종자수 / 평균 화분수 = 30/14.8, Table 3) 채종원 표준지내 모수에서 생산된 종자의 유전적 배경이 다양함을 확인할 수 있었다.

화분오염율의 추정은 Hong *et al.* (2010)이 사용한 방법과 동일한 방법으로 분석된 별개의 DNA 표지 분석결과를 동시에 고려해서 화분오염율을 추정하였다. 일차적으로 5개 모수에서 생산된 각각의 종자 배조직과 모수, 채종원 '77단지 내에 존재하는 전체 클론에서 확인된 nSSR 유전자형을 동시에 비교하여 화분친으로 기여했을 가능성이 있는 클론들을 잠정적으로 선별한 후 이들 화분친 후보 클론

들의 cpSSR haplotype의 확인을 통해서 최종적으로 종자 생성에 기여한 화분친이 결정되었다. 5개 모수에서 생산, 분석된 종자의 화분친이 채종원 내부 클론으로 확인 되지 않은 종자가 소나무 채종원 '77단지 외부로부터 유입된 화분에 의해서 수정된 종자로 확인되었다. 분석결과 화분오염율은 강원12에서 생산된 종자 중 14개가 외부 화분친에 의해 생성된 종자임이 확인되어 최저치인 36.8%로 계산되었다. 강원24에서 생산된 종자 중 21개가 외부 화분친에 의해 생성된 종자임이 확인되어 최고치인 55.3%가 산출되었다. 따라서 2007년 생산된 종자의 평균 42.4%가 소나무 채종원 '77단지 외부에 존재하는 소나무에서 생산된 화분이 유입되어 생성된 것으로 추정되었다(Table 5, 36.8~55.3%, 평균 42.4%). 채종원내 화분오염율 연구에서는 4~86%의 매우 다양한 화분오염율이 보고되고 있다. *Abies nordmanniana*에서 4.3%(nSSR), *Pinus thunbergii*에서 9.9%(nSSR), *Pinus contorta*에서 5%(cpSSR)의 낮은 화분오염율이 보고되었는데, 이는 연구 대상지 주위에 동종의 자연임분이나 교배가 가능한 근연종으로 구성된 자연임분이 존재하지 않아, 채종원이 인근 임분으로부터 지리적으로 비교적 잘 격리되어 있기 때문에 나타난 결과로 추정된다(Goto *et al.*, 2005; Hansen and Kjær, 2006; Stoehr and Newton, 2002). 반면 주요 산림수종으로 조성된 채종원의 경우, *Pinus pinaster*에서 36%(cpSSR), *Pinus sylvestris*에서 52%(nSSR), *Pseudotsuga menziesii*에서 40%(cpSSR), *Cryptomeria japonica*에서 47.8%(nSSR), *Pinus brutia*에서 85.7%(Allozyme)의 높은 화분오염율이 보고된 바 있다(Stoehr *et al.*, 1998; Plomion *et al.*, 2001; Moriguchi *et al.*, 2005; Nuray *et al.*, 2006; Torimaru *et al.*, 2009).

30%이상의 화분오염율이 확인된 이 연구들에서는 높은 화분오염율의 원인을 동종 자연임분에 비하여 유시단계에 있는 채종원내 클론의 충분하지 못한 화분생산량과 충분한 화분을 생산하는 성숙한 채종원임에도 불구하고 주변 동종의 자연임분으로부터 유입된 화분이 화분오염율을 증가시키기 때문에 나타난 결과로 판단된다. 안면도 '77단지 채종원은 1993년 이후 안정된 개화량을 보이는 성숙한 단계의 채종원임에도 불구하고, 2006년에 생산된 종자에서도 48.9%의 높은 화분오염율이 보고되었으며(Han *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2010) 2007년산 종자의 결과와 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(T -test, $P > 0.1$). 주요 산림수종으로 조성된 채종원을 대상으로 종자의 품질을 평가한 다수의 연구에서 높은 화분오염율이 보고되는 원인은 이들이 대면적에 분포한 수종으로 조성되는 경우가 대부분으로 개화시기에 대기 중에 높은 농도의 화분이 존재하게 되어 외부로부터의 화분유입이 불가피함으로 인한 결과로 예상된다. 소나무 역시 우리나라 전국에 걸쳐 자연 분포하는 주요 수종으로 안면도 소나무 채종원의 경우도 마찬가지로 자연임분에 존재하는 소나무로 인해서 나타난 결과이며, 안면도 외에 다른 지역의 경우도 유사한 문제가 발생할 것으로 예상된다. 일본의 *Cryptomeria japonica* 역시 우리나라의 소나무 채종원과 동일한 문제가 제기되었다. Moriguchi 등(2010)은 개화기간에 외부와 차단된 온실내에서 수정이 이루어지도록 하는 인위적 환경인 indoor miniature 채종원을 조성하고, 생산된 종자에서 화분오염율을 추정할 결과 4.4%로 outdoor 채종원에서 생산된 종자에서의 48.9%와, 2005년의 47.8%에 비해 괄목할 만한 감소가 확인되었다. 그러나 indoor 채종원에서 자가교배율이 27.2%로, outdoor 채종원에서의 5.6%에 비해 높은 자가교배율이 확인되어 자가교배에 의한 종자의 개량효과 감소가 극복해야할 문제점으로 지적되었다. 외부 화분오염을 방지하기 위하여 인공 환경의 조성으로 동종 임분으로부터 고립시키는 방법 뿐 아니라 조성 시 동종 자연임분과 격리된 입지 선정, 그리고 채종원 관리측면에서 고안된 방법이 있다. 주로 제시되는 방법으로는 채종원내 분무관수로 온도를 떨어뜨려서 채종원내 개체들의 개화시기를 인위적으로 지연시키는 방법, 지베렐린 처리나 환상박피 방법을 이용한 개화촉진처리로 화분생산량을 증대하여 외부 화분유입을 감소시키는 방법, 인공교배 방법인 supplement pollen을 처리하는 방법, 바람에 의해 전달되는 외부 화분을 차단하는 방풍 등이 있다

(Adams *et al.*, 1997; Plomion *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2008). 특히 분무관수의 방법은 *Pseudotsuga menziesii*에서 42%의 외부 화분오염을 감소효과가 보고되었으며, 인공교배(supplemental mass pollination)는 *Pseudotsuga menziesii*에서 대략 50%의 감소효과가 확인된 바 있다(Wheeler and Jech, 1986; Stoehr *et al.*, 1998). Hong *et al.*(2010)은 소나무 채종원을 대상으로 한 교배양식연구에서 외부화분의 유입에 대한 물리적 방지가 불가능 할 때, 채종원산 종자의 평균 개량효과의 증진이 보장되기 위해서는 전진세대 채종원의 조성에서 특수조합능력뿐만 아니라 모수별 일반조합능력 평균치도 동시에 고려하는 방법을 제시하였다.

타가교배율은 화분오염율과 더불어 채종원산 종자의 유전개량을 판단하는 모수로서, 채종원내 개체의 자가교배는 열성 유전형질의 발현 가능성을 증가시켜 충실종자율과 발아율, 성장의 감소를 초래하여 생존능력이 낮고 유전개량이 저하된 종자를 생산한다. 안면도 '77단지 소나무 채종원에서 높은 타가교배율이 확인됨에 따라, 자가교배에 의한 유전적 약화현상이 감소된 개량종자의 유전적 품질을 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서 높은 화분오염율이 확인되었는데 소나무가 전국적으로 분포하고 있는 수종임을 고려할 때 채종원 외부에 존재하는 소나무로부터 격리에 의한 지리적 이점을 이용한 화분오염방지를 기대하기 어려운 실정이다. 따라서 채종원내 종자생성에 외부 화분친의 기여를 최소화하기위한 집약적인 화분관리 기술의 적용이 필요한데 외부 화분친으로부터의 기여는 채종원산 종자의 유전적 개량효과를 떨어뜨리기는 하지만 반면에 채종원내 한정된 개체간의 교배를 통해 생산된 종자에서 형성된 genetic base의 크기를 증대시켜 이들 채종원산 종자를 이용해서 조성된 미래 소나무숲의 환경적응력을 높여주는데 필요한 유전다양성 증진을 기대할 수도 있을 것이다. 결론적으로 채종원산 종자의 개량효과를 보장하기 위해서는 모수별 일반조합 능력을 고려한 전진세대 채종원 조성과 화분관리 기술이 적용된 집약적인 채종원 관리가 동시에 고려되어야할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Adams, W.T., V.D. Hipkins, J. Burczyk and W.K. Randall. 1997. Pollen contamination trends in a maturing Douglas-fir

- seed orchard. *Canadian J. Forest Res.* 27:131-134.
- Bridgwater, F.E. and I.F. Trew. 1981. Supplemental mass pollination: *In* Franklin, E.C. (ed.), *Pollen Management Handbook*. USDA. Agriculture Handbook, Washington D.C., USA. pp. 15-19.
- Byers, D.L. and D.M. Waller. 1999. Do plant populations purge their genetic load? Effects of population size and mating history on inbreeding depression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30:479-513.
- Choi, C.H., K.J. Cho and W.S. Tak. 2007. Effect of immersion temperatures and times on moisture absorption and germination of *Cryptomeria japonica* seeds. *J. Korean Plant Res.* 20:398-403 (in Korean).
- Dyer, R.J. and V.L. Sork. 2001. Pollen pool heterogeneity in Shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Mol. Ecol.* 10: 859-866.
- El-Kassaby, Y.A., A.M. Fashler and O. Sziklai. 1984. Reproductive phenology and its impact on genetically improved seed production in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genet.* 33:254-259.
- El-Kassaby, T.A. and R. Davidson. 1990. Impact of crop management practices on the seed crop genetic quality in a Douglas-fir seed orchard. *Heredity* 66:49-55.
- Eriksson, G., A. Jonsson and D. Lindgren. 1973. Flowering in a clone trial of *Picea abies* Karst. *Studia Forestalia Suecica* 110:1-45.
- Ferriol, M., C. Pichot and F. Lefèvre. 2011. Variation of selfing rate and inbreeding depression among individuals and across generations within an admixed *Cedrus* population. *Heredity* 106:146-157.
- Goto, S., A. Watanabe, F. Miyahara and Y. Moriguchi. 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 Genet.* 54:69-76.
- Hansen, O.K. and E.D. Kjær. 2006. Paternity analysis with microsatellites in a Danish *Abies nordmanniana* clonal seed orchard reveals dysfunctions. *Canadian J. Forest Res.* 36:1054-1058.
- Han, S.U., W.Y. Choi, K.H. Chang and B.S. Lee. 2001. Estimation of population numbers and sexual asymmetry based on flowering assessment in clonal seed of orchard *Pinus densiflora*. *Korean J. Breeding* 33:29-34 (in Korean).
- Harju, A. and O. Muona. 1989. Background pollination in *Pinus sylvestris* seed orchards. *Scand. J. Forest Res.* 4:513-520.
- Hong, Y.P., J.Y. Ahn, Y.M. Kim, B.H. Yang and S.D. Hur. 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*. CA, USA. p. 17.
- Hong, Y.P., Y.M. Kim, J.Y. Ahn and J.I. Park. 2010. Mating system in seed orchard of Japanese red pines revealed by DNA markers. *J. Korean For. Soc.* 99:344-352 (in Korean).
- Kim, I.S., J.H. Kim, J.T. Kang and B.S. Lee. 2008. Clonal variation in female flowering of *Larix leptolepis*. *J. Korean Plant Res.* 21:1-4 (in Korean).
- Lewandowski, A. and J. Burczyk. 2000. Mating system and genetic diversity in natural populations of European larch (*Larix decidua*) and stone pine (*Pinus cembra*) located at higher elevations. *Silvae Genet.* 49:158-161.
- 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.
- Marshall, T.C., J. Slate, L. Kruuk and T.M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7:639-655.
- Moriguchi, Y., N. Tani, S. Ito, F. Kanehara, K. Tanaka, H. Yomogia, H. Taira and T. Tsumura. 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.
- Moriguchi, Y., Y. Yamazaki, H. Taira and Y. Tsumura. 2010. Mating patterns in an indoor miniature *Cryptomeria japonica* seed orchard as revealed by microsatellite markers. *New Forest.* 39:261-273.
- Nuray, K., K. Isik and W.T. Adams. 2006. Mating system and pollen contamination in a *Pinus brutia* seed orchard. *New Forest.* 31:409-416.
- O'Connell, L.M., A. Mosseler and O.P. Rajora. 2006. Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity* 97:418-426.
- Pakkad, G., S. Ueno and H. Yosimura. 2008. Genetic diversity and differentiation of *Quercus semiserrata* Roxb. in northern Thailand revealed by nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Forest Ecol. Manag.* 255:1067-1077.
- Pakkanen, A. and P. Pulkkinen. 1991. Pollen contamination on seed orchards: *In* Lindgren, D. (ed.), *Pollen Production and Background Pollination Levels in Scots Pine Seed Orchards of Northern Finnish Origin*, *Proceedings of*

- meeting of the Nordic group for tree breeding in Sweden, Swedish University of Agricultural Sciences, Dept. of Forest Genetics and Plant Physiology Report, Umeaa, Sweden. 10:14-21.
- Perry, D.Y. and J. Bousquet. 2001. Genetic diversity and mating system of post-fir and post-harvest black spruce; an investigation using codominant sequence-tagged-site (STS) markers. *Canadian J. Forest Res.* 31:32-40.
- Plomion, C., G. LeProvost, D. Pot, G. Vendramin, S. Gerber, S. Decroocq, J. Brach, A. Raffin and P. Pastuszka. 2001. Pollen contamination in a maritime pine polycross seed orchard and certification of improved seeds using chloroplast microsatellites. *Canadian J. Forest Res.* 31:1816-1825.
- Smouse, P.E and V.L. Sork. 2004. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *Forest Ecol. Manag.* 197:21-38.
- Stoehr, M.U., B.L. Orvar, T.M. Vo, J.R. Gawley, J.E. Webber and C.H. Newton. 1998. Application of a chloroplast DNA marker in seed orchard management evaluations of Douglas-fir. *Canadian J. Forest Res.* 28:187-195.
- Stoehr, M.U. and C.H. Newton. 2002. Evaluation of mating dynamics in a lodgepole pine seed orchard using chloroplast DNA markers. *Canadian J. Forest Res.* 32:469-476.
- Torimaru, T., X.R. Wang, A. Fries, B. Andersson and D. Lindgren. 2009. Evaluation of pollen contamination in an advanced Scots pine seed orchard in Sweden. *Silvae Genet.* 58:262-269.
- Vendramin, G.G., L. Lelli, P. Rossi and M. Morgante. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Mol. Ecol.* 5:111-114.
- Watanabe, A., M.G Iwaizumi., M. Ubukata, T. Kondo, C. Lian and T. Hogoetsu. 2006. Isolation of microsatellite markers from *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. using a dual PCR technique. *Mol. Ecol.* 6:80-82.
- Wheeler, N.C. and K.S. Jech. 1986. Pollen contamination in a mature Douglas-fir seed orchard: *In* Wei, R.J. (ed.), *Proc. IUFRO Conf. Breeding, Theory, Progeny Testing of Seed Orchards*. North Carolina State University, Raleigh. Williamsburg, VA, USA. pp. 160-171.
- Williams, C.G. and O. Savolainen. 1996. Inbreeding depression in conifers: implications for breeding strategy. *Forest Sci.* 42:102-117.
- Woessner, R.A. and E.C. Franklin. 1973. Continued reliance on wind pollinated southern pine seed orchards-is it reasonable? *Proceedings of 12th South. For. Tree Improve. Conf.* Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA, and U.S.D.A. Southern Forest Experimental Station, USA. pp. 64-73.
- 김인식, 김종한, 장경환. 2006. 고품질 우량종자생산을 위한 채종원 관리방안. 산림종자연구소. p. 36.
- (접수일 2011.5.18; 수정일 2011.9.6; 채택일 2011.12.2)