

안면도 소나무 채종원 교배양식 추정모수의 연간비교

김영미¹ · 홍용표^{1*} · 박재인²

¹국립산림과학원 산림유전자원과, ²충북대학교 산림학과

Two-Year Estimates of Mating System in Seed Orchard of *Pinus densiflora* Revealed by cpSSR and nSSR Markers

Young Mi Kim¹, Yong Pyo Hong^{1*} and Jae In Park²

¹Division of Forest Genetic Resources, National Institute of Forest Science, Suwon 16631, Korea

²Department of Forest Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

요약: 교배양식 유전모수를 확인하기 위하여 nuclear SSR (nSSR) 표지와 chloroplast SSR (cpSSR) 표지를 이용하여 2006년과 2007년에 안면도 소나무 채종원(77년 조성)에서 생산된 종자를 대상으로 타가교배율과 화분오염율, 근친교배율을 확인하였다. cpSSR 유전형에 근거한 타가교배율은 2006년에 94.9~100%(평균 98.9%)이며, 2007년에는 91.2~100%(평균 97.7%)이다. nSSR 유전자형에 근거한 타가교배율은 2006년에 90.3~100%(평균 95.9%), 2007년에 81.6~100%(평균 95.3%)의 타가교배율이 산출되었다. 두 표지를 동시에 비교하여 확인한 결과 2006년 생산종자의 평균 누적 타가교배율 100%, 2007년 생산종자의 평균 누적 타가교배율은 98.9%로 추정되었다. 근친교배율(t_m-t_s : biparental inbreeding)은 2006년에 -0.006과 2007년에 0.007으로 추정되었다. 평균 화분오염율은 2006년에 평균 48.9%, 2007년에 평균 42.4%이며, 종자의 cpSSR 유전형을 근거로 확인한 화분친 기여율(기여화분친 수)은 2006년에 0.458(평균 16.2개), 2007년에 0.512(평균 14.8개)로 확인되었다. 결론적으로, 2006년, 2007년 안면도 소나무 채종원(77년 조성) 내 클론간 높은 타가교배율이 확인됨으로써 채종원산 종자의 유전적 품질은 자가교배로 인한 근교약세가 원인이 되는 불량형질이 발생할 가능성이 낮을 것으로 기대된다. 안면도 소나무 채종원(77년 조성) 내 교배양식 연간 분석을 통해서 확인된 결과가 향후 진전세대 채종원 조성 및 관리에 유용한 정보를 제공할 것으로 기대된다.

Abstract: Nuclear SSR (nSSR) and chloroplast SSR (cpSSR) markers were analyzed to assess the parameters of mating system in seed orchard, such as outcrossing rates, the number of potential pollen contributors, paternal contribution rates, degree of pollen contamination, and biparental inbreeding (t_m-t_s). In 2006, 2007, seeds were collected from the seed orchard of *Pinus densiflora*, established in 1977 at Anmyeon island. Estimates of outcrossing rates ranged from 94.9 to 100% (mean 98.9%) in 2006 and from 91.2 to 100% (mean 97.7%) in 2007 on the basis of the analysis of cpSSR haplotypes and from 90.3 to 100% (mean 95.9%) in 2006 and from 81.6 to 100% (mean 95.3%) in 2007 on the basis of the analysis of nSSR genotypes. By cross checking of both DNA markers, mean cumulative outcrossing rates of 100% and 98.9% were estimated in each year. Mean contamination rates were estimated as 48.9% and 42.4%, respectively. On the basis of cpSSR haplotype observed in each seed, paternal contribution rates (the number of pollen contributors) were estimated as 0.458 (mean 16.2) in 2006 and 0.512 (mean 14.8) in 2007. In conclusion, considering pretty high level of outcrossing rates observed in a seed orchard, there might be little to be influenced by inbreeding depression for genetic potential of the seeds induced by selfing. Estimates of the mating system parameters obtained from the two reproductive years were not statistically different, which revealed stable genetic quality of seeds produced in different years. Observed results from this study may provide useful information for the management and establishment of the seed orchard of the progressive generation.

Key words: *Pinus densiflora*, seed orchard, mating system, pollen contamination, pollen contributor, cpSSR haplotype, nSSR genotype

*Corresponding author
E-mail: ypmhong@korea.kr

서 론

임업이 갖는 특징 중 하나인 장기성은 경영의 불안정성을 제공하는 요소로 경영 초기에 신중한 계획의 수립과 재료의 선정을 요구 한다. 이는 경영에 소요되는 비용 중 낮은 비율을 차지함에도 불구하고 우량종자의 사용이 더욱 강조되는 이유이기도 하다.

채종원의 조성 관리의 최종 목적인 종자의 품질은 모수에서 차대로 유전되는 형질과 관련된 유전적 품질, 종자의 생리적 상태와 관련된 생리적 품질, 그리고 물리적 품질로 나눌 수 있다(Kim et al., 2006). 이 중 채종원산 종자의 유전적 품질을 평가하는 주요 요인은 유전다양성과 개량효과이다(Stoehr et al., 2004). 개략적으로 동등한 클론의 부계 기여는 종자세대에서 유전다양성을 유지할 수 있도록 하며, 이를 재료로 조성된 임분이 미래 생육 환경에서 발생할 수 있는 교란에 대해 적응할 가능성을 향상시킬 수 있다(Burdon, 2001). 반면 높은 종자 손실률과 관련이 있는 근교약제(inbreeding depression)는 자가교배의 증가가 원인이며, 개량되지 않은 자연임분으로부터 유입된 화분은 개량종자의 유전적질을 감소시킨다(Adams et al., 1997). 채종원산 종자가 개량효과를 획득하고 유전다양성을 유지하는데 (1)채종원은 외부로부터 동일수종의 원치 않는 화분이 유입되지 말아야 하고, (2)채종원을 구성하고 있는 수형목 클론인 채종목이 균일한 자·웅성배우체를 생산하고, (3)전체 클론의 자·웅화 개화기가 일치되고, (4)클론 간 완전 임의교배가 이루어지고, (5)자가 수정이 무시될 정도로 적게 일어나는 것을 가정하고 있다(Askew, 1988). 하지만 대부분의 채종원 교배양식 연구에서는 자가교배가 확인되었으며(Moriguchi et al., 2005; Pakkanen et al., 2000; Nuray Kaya et al., 2006; Stoehr and Newton, 2002; Friedman and Adams, 1985; Stoehr et al., 1998), 동종 자연집단이 주변에 존재하는 경우 다수의 연구에서 30%를 넘는 화분오염율(Stoehr et al., 1998; Pakkanen et al., 2000; Moriguchi et al., 2004, 2005)이 보고되고 있다. *Picea glauca* (Schoen and Stewart, 1981), *Pseudotsuga menziesii* (Stoehr et al., 1998), *Pinus thunbergii* (Goto et al., 2002), *Pinus contorta* (Stoehr and Newton, 2002), *Cryptomeria japonica* (Moriguchi et al., 2004) 채종원의 화분유동(pollen flow) 연구에서 클론의 부계 기여가 동일하지 않는 것으로 보고되어 실제 채종원에서는 우량종자의 생산을 위해 가정되고 있는 조건들에 부합되지 않는 경우가 빈번하게 발생하고 있다. 이로 인하여 채종원에서 생산된 종자의 유전적 품질을 보장하고 이를 유지·증진하기 위한 채종원 관리기술의 발전을 위해서는 채종원에서의 교배양식에 대한 이해가 요구된다.

소나무와 같은 풍매수종의 경우 교배동태(mating

dynamics)에 영향을 미치는 개화기 동안의 개화량과 화분 생산량 뿐 만 아니라 개화생리와 기후환경에 많은 변이가 있기 때문에 수정에 기여하는 화분원의 유전적 구성이 달라져 종자형성 시기마다 다른 교배양식을 보일 수 있다(Harju and Muona, 1989; Pakkanen and Pulkinen, 1991; Burczyk and Chbicki, 2004). 이처럼 해마다 다른 물리적 생물적 환경으로 인하여 Pakkad et al.(2008)은 교배양식의 일반적 경향의 특징을 연구하는데 있어서 한해로 한정된 연구에 한계가 있음을 주장한바 있다. 임업경영에서 종자가 차지하는 중요성을 고려하였을 때, 채종원 관리 정책의 방향 설정과 경영의 안정성 확보를 위해서는 교배양식 연간분석을 통한 채종원내 교배양식 특성에 대한 이해와 종자품질의 평가가 필요하다.

엽록체 DNA의 SSR 부위를 이용하는 chloroplast SSR(cpSSR) 표지는 부계에 의해서만 반수체 genome의 형태로 유전되는 특징이 있어 화분수의 직접적인 추정이 가능한 장점을 이용하여 개체식별과 화분수 가계 추정 등에 유용한 분자표지로서 널리 이용되고 있다(Anzidei et al., 1999). 핵 DNA의 SSR 부위에 존재하는 변이를 이용하는 nuclear SSR(nSSR) 표지는 공우성적 특성과 높은 다형성을 갖고 있어 높은 식별력을 바탕으로 화분유동이나 화분친 추정에 유용한 표지이며 채종원의 교배양식연구 뿐 만 아니라 새로운 육종전략의 수립에 이용되고 있다(Pakkad et al., 2008).

본 연구에서는 2006년과 2007년에 안면도 소나무 채종원(1977년 조성) 내 모수에서 생산된 종자를 대상으로 cpSSR 표지와 nSSR 표지를 이용한 교배양식 분석을 수행하여, 채종원내 교배양식의 연간분석을 통한 채종원산 종자 품질을 평가하여 임업경영의 안정성 확보와, 채종원의 개선 및 전진세대 채종원 조성에 필요한 정보를 제공하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

1. 조사지 현황 및 시료

조사지는 충청남도 태안군 안면읍 중장리(N 36° 28', E 126° 22', 해발고: 25~50 m)에 위치하여 있으며, 1977년에 29.5 ha의 규모로 조성되었다. 조성당시 192클론 12,832 본으로 구성하였으며, 현재 158개 클론 3,134본이 채종원을 구성하고 있다. 각 클론은 최소 1본에서 160본으로 클론마다 보유하고 있는 라멧의 수가 다양하며 클론당 19.8본(ramet/clone)을 보유하고 있다(Kim et al., 2012).

cpSSR표지의 특성과 다수 라멧(ramet)을 갖는 클론으로 조성된 채종원의 특성상 다른 개체의 화분으로 수정된 종자임에도 불구하고 자가교배 종자로 확인될 가능성이 있으므로 표준지 채종목 대상으로 6개(pt1254, pt30204, pt45002, pt71936, pt100783, pt110048; Vendramin et al.,

1996)의 cpSSR primer를 이용하여 표준지 내 채종목의 엽록체 DNA 유전형(haplotype)을 사전에 확인 하였다. 확인된 정보를 이용하여 표준지 내 35개 클론 48개체 중 표준지 내의 다른 클론과 유전형을 공유하고, 표준지 내에 2개 이상의 라벳이 존재하는 클론을 제외한 나머지 5개체(강원 10, 강원 12, 강원 15, 강원 24, 경북 38)가 분석대상으로 결정되었다.

2006년과 2007년에 채종원내 수형목 클론의 침엽과 표준지 내 분석모수의 네 방위에서 구과를 채취하였다. DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, German)을 이용하여 각 클론의 침엽에서 total DNA를 추출하고, 방위별로 채취된 구과에서 얻은 종자를 발아하여 분리된 KURABO DNA isolation protocol (KURABO INDUSTRIES LTD, Japan)을 이용하여 배조직의 total DNA를 추출하였다. 채종원내 클론 침엽 DNA와 각 방위별 최대 10개의 배조직 DNA를 분석에 이용하였다.

2. 표지분석

cpSSR 유전형의 확인은 곰솔의 엽록체 DNA 염기서열을 기초로 개발된 20개의 cpSSR primer (Vendramin et al., 1996)를 대상으로 소나무에서 다형성을 나타내는 pt1254 등 6개의 primer (pt1254, pt30204, pt45002, pt71936, pt100783, pt110048)를 선발하고 이를 채종원 클론과 종자의 cpSSR 유전형을 확인하는데 이용하였다. 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 증폭은 반응용액 10 μ L 당 template DNA 5 ng, Forward/Reverse cpSSR primer 각 0.1 μ M, 0.1 mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 1 unit의 *Taq* polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.)가 포함되도록 하였다. PCR 반응은 94°C에서 1분간 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 유전형의 확인은 소나무에서 개발된 12개의 nSSR primer (Watanabe et al., 2006)를 대상으로 부계유전자 분석에 이용 가능한 충분한 다형성이 있는 표지를 사전 선발하였다. 돌연변이와 null allele의 문제를 최소화하기 위하여, 소나무 가계 내에서 증폭산물이 확인된 primer의 유전양상을 확인하여 pdms009 등 최종 4개의 primer (pdms009, pdms030, pdms065, pdms221)를 nSSR 유전자형 분석에 이용하였다. cpSSR 표지와 마찬가지로 각 primer의 forward sequence의 5'말단에 형광 dye를 결합시켜 형광표지가 감지될 수 있도록 하였다. nSSR PCR 반응용액 12 μ L 당 template DNA 10 ng, Forward/Reverse

nSSR primer 각 0.2 μ M, 0.1 mM dNTP, 1×PCR reaction buffer, 0.67 mM MgCl₂, 1 unit의 *Taq* polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.)가 포함되도록 하였다. PCR 반응은 cpSSR표지 분석과 동일한 방법을 사용하였다.

PCR 증폭산물을 Prism xl 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies Corp, USA)를 이용하여 분획하였으며, Gene Scan™-500 Rox™ Size Standard (Life Technologies Corp, USA)를 동시에 전기영동하여 증폭산물의 크기를 결정하였고, 여기서 얻어진 영상을 Gene Mapper analysis software ver 4.0 (Life Technologies Corp, USA)를 이용하여 증폭산물의 크기를 기준으로 6개 유전자좌에 대한 엽록체 DNA의 유전형과 4개 유전자좌에 대한 핵 DNA 유전자형을 결정하였다.

3. 유전변이 및 교배양식 분석

타가교배율, 화분오염을 부계유전자 분석 결과를 근거로 산출하였다. 부계유전자 분석은 종자의 유전자형에서 모수에서 기인한 대립 유전자를 제외한 나머지 반수성 대립유전자형과 화분수의 유전자형을 근거로 후보 화분수 중에서 하나의 화분수를 제외한 나머지 화분수를 모두 소거하는 직접추정방법(direct method) 중 소거방법(exclusion method)를 이용하였다. 소거방법으로 교배양식 유전모수를 추정하는 CERVUS ver 3.0.3을 이용하여, 모수 클론과 종자 그리고 채종원내 클론의 유전자형으로 종자의 화분수를 확인하고, 각 모수의 타가교배율과 화분오염율을 산출하였다. cpSSR 표지로 추정하는 부계유전자 분석은 cpSSR 유전형이 부계로 유전되는 특성을 근거로 하여 종자의 cpSSR 유전형으로 기여화분친 수와 외부화분을 추정하였다. 근친교배율(t_m-t_s ; biparental inbreeding)의 추정에는 MLTR 3.2를 이용하였다(Ritland, 2002). 채종원내 타가교배와 집단내 개체간 근친이 있음을 가정하는 통계추정기 본값으로 설정하고 다수유전자좌 타가교배율(t_m)과 단일유전자좌 타가교배율(t_s)을 추정하였으며, 근연간 근친교배율(t_m-t_s ; biparental inbreeding)은 이들의 차로 추정되었다. 최대 우도 값을 갖는 추정모수를 찾는데 EM (Expectation Maximization) 알고리즘을 이용하였다. 표준오차는 1000 bootstraps 으로 얻었으며, 95% 신뢰구간을 산출하는데 이용되었다. GenAlEx ver. 6.41 (Peakall and Smouse, 2006)을 이용하여, 대립유전자 빈도와 대립유전자 수(A), 유효대립유전자 수(A_e), 고유 대립유전자(A_p), 이형접합도 기대치(H_o), Shannon의 유전다양성지수(I)를 산출하였다.

결과 및 고찰

1. 유전변이

안면도 소나무 채종원(1977년 조성)의 유전변이 분석에

사용된 4개의 nSSR primer에서 대립유전자 수가 가장 많은 primer는 29개가 확인된 pdms009이며, pdms030과 pdms221에서 6개로 가장 적은수의 대립유전자가 확인되었다. 유효대립 유전자 수(A_e)는 4.052개이며, pdms009 primer에서 9.575개로 가장 많은 수의 유효대립유전자 수가 확인되었고, pdms065에서 1.480개로 가장 낮은 수치가 확인되었다. 클론에서 확인된 대립유전자 수(A)는 11.750개이며, 종자에서 11.250개(2006년)와 9.500개(2007년)가 확인되었다. 종자에서만 확인된 고유 대립유전자수(A_p)는 2006년 생산된 종자에서 1.250개이며 2007년 생산된 종자에서 0.750개가 확인되었다(Table 1). 유전다양성 지수인 이형접합도 관측치(H_o)와 Shannon의 유전다양성지수 (I)는 클론에서 0.497과 1.370이며, 종자에서는 0.583, 1.341 (2006년)과, 0.610, 1.355 (2007년)으로 확인되었다(Table 1). 유전다양성 지표인 이형접합도 기대치와 유효대립유전자 수, Shannon의 유전다양성지수는 세대간에 유의한 차이가 없다($P > 0.05$). 2006년과 2007년 생산된 종자에서 확인된 고유대립유전자수(A_p)는 채종원 클론이 보유하고 있지 않은 대립유전자를 종자에서 보유하고 있음을 의미하며 이는 외부화분의 유입이 원인으로 생각된다.

2. 타가교배율

6개의 cpSSR primer를 사용하여 각각의 유전형을 확인, 비교한 결과 2006년에 생산된 종자는 강원10에서 타가교배율이 94.9%로 나타났다. 나머지 4개 모수(강원 12, 강원 15, 강원 24, 경북 38)에서 100%의 타가교배율이 산출되었다. 따라서 5개의 모수에서 생산된 종자 중 평균 98.9%

가 잠정적으로 모수가 아닌 개체의 화분으로 수정된 타가교배 산물인 것으로 추정되었다(94.9~100%, 평균 98.9%; Table 2). 2007년에 생산된 종자는 강원 12에서 91.2%로 가장 낮은 타가교배율이 확인되었다. 강원 10, 강원 15와, 경북 38에서 100%의 타가교배율이 확인되었다. 따라서 5개의 모수에서 생산된 종자 중 평균 97.7%가 잠정적으로 타가교배 산물인 것으로 추정되었다(91.2~100%, 평균 97.7%; Table 2).

4개의 nSSR primer를 사용하여 각각의 유전자형을 확인, 비교한 결과, 2006년에 생산된 종자는 분석에 이용된 5개의 모수 중 강원 10, 강원 12에서 100%의 타가교배율이 확인되었으며, 강원 15에서 가장 낮은 90.3%의 타가교배율이 산출되었다. 따라서 2006년 5개의 모수에서 생산된 종자는 잠정적으로 평균 95.9%가 타가교배에 의해 생산된 것으로 추정되었다(90.3~100%, 평균 95.9%; Table 2). 2007년에 생산된 종자는 강원 10, 강원 12, 경북 38에서 100%가 확인되었으며, 강원 24에서 가장 낮은 81.6%가 확인되었다. 따라서 2007년 5개의 모수에서 생산된 종자는 잠정적으로 평균 95.3%가 타가교배에 의해 생산된 것으로 추정되었다(81.6~100%, 평균 95.3%; Table 2).

각각의 표지에서 타가교배율이 다르게 산출되었는데, 그 원인은 두 표지가 갖는 특성의 차이에서 기인하는 것으로 판단된다. 교배양식 분석에 이용된 표지 중 cpSSR 표지는 비멘델성 표지로 부계로부터 유전되는 엽록체 DNA의 특성을 근거로 하여 반수성의 cpSSR 유전형을 화분수로 가정하고 종자와 모수의 cpSSR 유전형과 동일한 경우 모수가 화분수로 작용한 자가교배의 결과로 판별한다. 반

Table 1. Genetic diversity of clones and the seeds from *Pinus densiflora* seed orchard '77 plot in Anmyeon island using 4 nSSR markers (The standard deviation is in parentheses).

	N	A	A_e	A_p	H_o	I
Clone	160	11.750 (4.802)	3.676 (1.682)		0.497 (0.119)	1.370 (0.434)
Seed ^z	178	11.250 (4.626)	3.807 (1.716)	1.250 (0.629)	0.583 (0.135)	1.341 (0.393)
Seed ^y	150	9.500 (3.663)	3.953 (1.647)	0.750 (0.479)	0.610 (0.139)	1.355 (0.370)

^zthe seeds produced in 2006, and ^ythe seeds produced in 2007, N=number of sample, A=number of alleles, A_e =number of effective alleles, A_p =number of alleles unique to a single population, H_o =observed heterozygosity, and I=Shannon's information index.

Table 2. Outcrossing rate in *Pinus densiflora* seed orchard '77 plot in Anmyeon island using 6 cpSSR and 4 nSSR markers.

Mothe	2006				2007			
	N ^x	Outcrossing rate		Cumulative outcrossing rate	N ^z	Outcrossing rate		Cumulative outcrossing rate
		cpSSR	nSSR			cpSSR	nSSR	
Gangwon 10	39	94.9	100	100	40	100	100	100
Gangwon 12	39	100	100	100	38	91.2	94.7	94.7
Gangwon 15	31	100	90.3	100	7	100	100	100
Gangwon 24	30	100	96.7	100	38	100	81.6	100
Gyeongbuk 38	39	100	92.3	100	27	96.3	100	100
Mean	35.6	98.9	95.9	100	30	97.7	95.3	98.9

^xnumber of seeds per mother tree.

면, nSSR표지는 2배체 핵 DNA를 대상으로 하는 멘델성 표지로 종자의 유전자형에서 모수에서 유래한 대립유전자를 제외한 나머지 대립유전자를 근거로 화분친을 추정한다. 본 연구에서 사용된 유전양상이 다른 두 표지는 채종원내 클론을 구별하는데 있어서 다른 식별력(genetic resolution)을 보이고 있다. *Pseudotsuga menziesii* 와 *Pinus contorta* 채종원 교배양식 연구에서 cpSSR 표지의 식별력으로 인하여 채종원내 모든 클론의 유전형을 확인하지 못했으며(Stoehr et al., 1998; Stoehr and Newton, 2002), 본 연구에서 역시 cpSSR 표지의 경우 채종원 전체 160개 클론을 대상으로 한 분석결과 유전형이 58개로 채종원내 모든 클론의 유전형이 확인되지 않았다. 반면 nSSR 표지는 160개의 유전자형을 확인하여 nSSR 표지가 보다 높은 식별력을 갖는 것으로 확인되었다. 때문에 nSSR 표지 분석 결과 타가교배율이 높게 나타나는 것은 표지간 식별력의 차이에 의한 것으로 판단된다. nSSR 표지의 보다 높은 식별력에도 불구하고, 2006년 강원 15, 강원 24, 경북 38, 그리고 2007년 강원 24에서 생산된 종자의 타가교배율이 cpSSR 표지에서 보다 높게 나타나고 있다. 앞서 설명한 것처럼 nSSR과 같은 멘델성 공우성 표지는 직접적인 화분수의 추정이 불가능하기 때문에, 종자의 두 대립유전자가 모수로부터 유래한 대립유전자와 화분수에서 유래한 대립유전자를 구분할 수 없는 경우 모수와 화분수를 유전적으로 구분할 수 없는 어려움이 있다. 2006년에 생산된

Table 3. Frequency of common allele (≥ 0.05) of clones and the seeds from *Pinus densiflora* seed orchard '77 plot in Anmyeon island using 4 nSSR markers (The number of samples is in the parenthesis).

Locus ¹	Allele	Allele frequency			
		Total (488)	Clone (160)	Seed ^d (178)	Seed ^e (150)
pdms009	138	0.131	0.172	0.121	0.100
	142	0.215	0.256	0.211	0.177
	154	0.085	0.050	0.093	0.113
	164	0.042	0.016	0.062	0.047
	170	0.108	0.053	0.110	0.163
	174	0.115	0.044	0.149	0.150
	178	0.019	0.050	0.006	0.003
pdms030	112	0.661	0.681	0.673	0.623
	114	0.181	0.113	0.176	0.260
	116	0.118	0.138	0.120	0.093
	148	0.105	0.134	0.079	0.103
pdms065	151	0.814	0.809	0.828	0.803
	170	0.038	0.003	0.051	0.060
pdms221	175	0.373	0.541	0.295	0.287
	177	0.392	0.297	0.478	0.393
	181	0.071	0.041	0.070	0.103
	183	0.161	0.116	0.154	0.217

¹the seeds produced in 2006, and ²the seeds produced in 2007

강원 15의 경우 nSSR 분석에서 자가교배로 확인된 3개 종자의 유전자형(142,142; 112,112; 151,151; 177,177)은 동일하며, 각 유전자좌에서 가장 높은 빈도를 갖는 대립유전자를 보유함으로써(Table 3), 화분수가 모수와 다른 개체임에도 불구하고 모수가 후보 화분수에서 제외되지 않았을 가능성이 높아짐에 따라 나타난 결과로 생각된다. 반면 강원 24와 경북 38의 경우 강원 15와는 달리 cpSSR 유전형의 빈도가 원인으로 추측된다.

동일한 cpSSR 유전형을 갖는 클론이 1개에서 24개로, 채종원 클론의 cpSSR 유전형은 빈도가 다르게 나타나며, 4.6개의 클론이 동일한 cpSSR 유전형을 갖는 것으로 확인되었다. 반면에 경북 38의 cpSSR 유전형은 2개의 클론이 동일한 cpSSR 유전형을 보유하고 있으며, 특히 2006년과 2007년 생산된 종자 모두 cpSSR 표지 분석에서 높은 타가교배율이 확인된 강원 24의 경우 cpSSR 유전형이 강원 24만 보유하고 있는 것으로 확인되었다. 결과적으로 클론이 보유하고 있는 cpSSR 유전형이 상대적으로 낮은 빈도로 존재함으로써 빈도가 높은 cpSSR 유전형을 갖는 클론에 비해 모수 외 다른 클론이 화분수로 확인될 가능성이 낮아질 것으로 추측된다. 그 결과 일부 모수에서 cpSSR 표지분석으로 추정된 타가교배율이 높게 나타났을 것으로 추정된다.

소거법을 사용하는 데 있어서 두 표지가 보유하고 있는 단점을 보완하기 위하여 두 표지를 모두 고려하여 타가교배율을 확인한 결과, 2006년에 생산된 종자에서는 cpSSR 표지 분석 결과 강원 10을 제외한 나머지 개체의 타가교배율은 100%로 나타났다. 강원 10은 cpSSR 표지 분석에서는 94.9%로 나타났으나 nSSR 표지 분석에서 타가교배율이 100%로 관찰되어 강원 10에서 채취 분석된 종자의 누적(cumulative) 타가교배율은 100%로 확인되었다. 결과적으로 2006년 분석에 이용된 모든 종자는 타가교배에 의한 것으로 확인되었다(Table 2). 2007년에 생산된 종자에서는 경북 38의 경우 cpSSR 표지에서는 타가교배율이 96.3%로 나타났으나 nSSR 표지 분석결과 타가교배율이 100%로 관찰되어 100%의 타가교배율을 확인하였다. 강원 12는 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 2007년 생산종자의 평균 타가교배율은 98.9%로 확인되었다(Table 2). 2006년 생산종자에 비해 2007년 생산종자에서 비교적 낮은 타가교배율이 확인되었으나, 두 생산 시기별 타가교배율은 유의한 차가 없는 것으로 확인 되었다($P > 0.05$). 풍매수종 채종원의 교배양식 연구에서는 대부분 90%이상의 타가교배율을 보고하고 있다 (Table 4). 본 연구에서 확인된 타가교배율은 앞서 보고된 결과와 유사한 수준으로 확인되었다.

Table 4. outcrossing rate observed in seed orchard.

Species	Marker	Outcrossing rate (%)	Reference
<i>Cryptomeria japonica</i>	nSSR	97.8	Moriguchi et al. (2005)
<i>Picea abies</i>	Allozyme	89-93	Pakkanen et al. (2000)
<i>Pinus brutia</i>	Allozyme	94.7	Nuray Kaya et al. (2006)
<i>Pinus contorta</i>	cpSSR	98	Stoehr and Newton (2002)
<i>Pinus taeda</i>	Allozyme	98-99	Friedman and Adams (1985)
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	cpSSR	94	Stoehr et al. (1998)

채종원에서는 수형목의 선발과 채종원 조성에 이르는 과정에서 근친교배를 방지하는 계획이 포함되어 있기 때문에 자연집단에 비해 근친교배에 의한 근교약세 현상이 낮게 나타날 가능성이 높다. 하지만, 우수임분에 편중된 수형목의 선발이나, 채종목의 배치방법의 오류 등 현실에서 발생할 수 있는 문제로 인하여 채종원내 근친교배를 평가할 필요가 있다. 근친교배를 판단하는 다수 유전자좌 타가교배율과 단일유전자좌 타가교배율의 차($t_m - t_s$)가 2006년에 -0.006과 2007년에 0.007으로 확인되었다. 이들 값이 음의 값을 갖을 경우 근친교배(biparental inbreeding)는 존재하지 않는 것으로 여겨지므로(Ritland and Jain, 1981), 안면도 소나무 채종원(1977년 조성)에서는 근친교배가 없거나 매우 낮은 수준의 타가교배가 이루어지고 있음을 알 수 있다.

일반적으로 타가교배율에 영향을 미치는 요인은 개화량, 임분밀도, 임분내 개체수령, 개화생리 등으로 알려져 있다(Farris and Mitton, 1984; Snyder et al., 1985; El-Kassaby et al., 1988). Han et al.(2001)은 안면도 소나무 채종원(1977년 조성) 내 99클론의 자·웅화 평균 개화량 특성 조사에서 소나무는 10년 전후 성숙 단계로 접어들어 15년이 경과한 1993년 이후에서는 연도간 풍흉의 차이는 있으나 비교적 안정된 경향을 보이고 있음을 보고하였다. 채종원은 수형목 클론으로 조성된 임분으로 개체의 수령과 수령에 따른 개화량은 자연임분에 비해서 유사한 수준을 유지하고 있을 것으로 판단되며, 안면도 소나무 채종원(1977년 조성)은 1993년 이후 안정된 개화량을 유지하는 성숙한 채종원임을 고려할 때, 임분내 수령과 개화량 보다는 임분밀도와 개화생리 등이 타가교배율에 보다 많은 영향을 미치는 요소로 예상된다. 채종원은 조성단계에서부터 지속적으로 관리가 이루어진다. 채종원에서는 관리방법 중 하나인 유전간벌을 통해 차대검정 등 유전검정을 통해 유전적으로 불량하다고 판단되는 클론들을 제거함으로써 개량효과를 높이고 채종목간 배우자 생산의 균일성을 증진시키며, 임분의 밀도를 조절한다(Oh et al., 2007). 따라서 안면도 소나무 채종원(1977년 조성) 종자의 연간분석에서 비교적 높은 타가교배율과 낮은 생산년도 간의 변이가 산출되어 자가교배에 의한 유전적 약화현상

이 감소된 개량종자의 유전적 품질과 생리적 품질을 기대할 수 있을 것으로 예상되며, 이는 타가교배율 증진에 긍정적으로 영향을 미치는 지속적인 관리에 의한 결과로 판단된다.

3. 화분오염율

유전특성이 다른 별개의 DNA 표지 분석결과를 동시에 고려하여 종자생성에 기여한 화분친을 확인하였다. 이 방법은 소거법을 이용하여 채종원내 클론중에서 화분수로의 기여 가능성이 높은 후보 화분수를 선발하고 이들 가운데 종자의 cpSSR 유전형 동일한 클론을 최종적으로 각 종자의 화분수로 지정하는 과정으로 이루어진다. 이 결과를 근거로 채종원 내에 존재하는 클론에서 생산된 화분에 의해 수정된 것으로 확인된 종자 외 나머지 종자를 안면도 소나무 채종원(1977년 조성) 외부에서 유입된 화분에 의해서 수정된 종자로 결정하고 화분오염율을 추정하였다.

분석결과 2006년에 생산된 종자의 화분오염율은 강원 10에서 가장 낮은 43.6%가 확인되었으며, 강원 12에서 가장 높은 56.4%의 화분오염율이 확인되었다. 따라서 2006년 5개의 모수에서 생산된 종자의 평균 48.9%가 안면도 소나무 채종원(1977년 조성) 외부에서 화분이 유입된 결과로 추정되었다. 2007년 생산된 종자의 화분오염율은 강원 12에서 가장 낮은 36.8%가 확인되었으며, 강원 24에서 가장 높은 55.3%가 확인되었다. 2006년 5개의 모수에서 생산된 종자는 평균 42.4%가 화분오염종자로 확인되었다(Table 5). 2007년에 비해 2006년 생산 종자에서 보다 높은 화분오염율이 산출되었으나, 두 생산년도 간에 화분오염은 유의한 차가 없는 것으로 확인되었다($P > 0.05$).

채종원이 인근 임분으로부터 지리적으로 비교적 잘 격리되어 있는 *Pinus thunbergii*와 *Pinus contorta* 채종원의 경우 10% 미만의 화분오염율이 보고되었으나, 주요 산림수종으로 조성된 채종원을 대상으로 분자표지를 이용하여 종자의 품질을 평가한 연구에서 대부분의 채종원에서 30% 이상의 높은 화분오염율이 보고되었다(Table 6). 주요수종으로 조성된 채종원의 높은 화분오염율은 개화시기에 대기 중에 높은 농도의 화분이 존재하게 되어 외부로부터의 화분유입이 불가피함으로 인해 나타난 결과로

Table 5. Pollen contamination rate in *Pinus densiflora* seed orchard '77 plot in Anmyeon island.

Mother	2006			2007		
	N ^z	CN ^y	Cumulative Contamination rate	N ^z	CN ^y	Cumulative Contamination rate
Gangwon 10	39	17	43.6	40	16	40
Gangwon 12	39	22	56.4	37	14	36.8
Gangwon 15	31	16	51.6	7	3	42.9
Gangwon 24	30	14	46.7	31	21	55.3
Gyeongbuk 38	39	18	46.2	27	10	37
Mean	35.6	17.4	48.9	30	12.8	42.4

^znumber of seeds per mother tree, and ^ynumber of contaminant seeds verified via comparative evaluation with both DNA markers

Table 6. Pollen contamination rate observed in seed orchard.

Species	Marker	Contamination rate (%)	Reference
<i>Cryptomeria japonica</i>	nSSR	47.8	Moriguchi et al. (2005)
<i>Eucalyptus grandis</i>	nSSR	39.2	Chaix et al. (2003)
<i>Pinus thunbergii</i>	nSSR	9.9	Goto et al. (2005)
<i>Pinus contorta</i>	cpSSR	5	Michael et al. (2002)
<i>Pinus brutia</i>	Allozyme	85.7	Nuray Kaya et al. (2006)
<i>Picea dbies</i>	Allozyme	69-71	Pakkanen et al. (2000)

예상되며, 우리나라의 소나무 역시 전국에 걸쳐 자연분포하는 주요수종으로 안면도 소나무 채종원(1977년 조성)의 경우도 마찬가지로 자연임분에 존재하는 소나무로 인해서 채종원 외부로부터 다수의 화분이 유입되어 나타난 결과로 예상된다.

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 개량효과와 감소가 크게 발생할 수 있음을 지적하였다. 외부화분유입을 방지하는 데는 동종 자연임분과 격리된 입지가 필수적이지만, 소나무와 같이 풍매로 교배가 이루어지면서 광역분포하는 수종으로 조성된 채종원의 경우 화분오염율은 채종원 내부와 외부 임분의 수령과 화분의 다산성, 채종원의 규모와 관리 방법 등 다양한 요인이 관여한다(Bridgwater and Trew, 1981; Harju and Muona, 1989; El-Kassaby and Davidson, 1990; Pakkanen and Pulkkinen, 1991; Torimaru et al., 2009). 이와 같은 경우 방풍, 개화촉진, 개화지연(bloom delay), 준인공교배(supplemental mass pollination) 등 채종원 관리기술이 적용되고 있다. 주요 채종원 관리기술인 개화지연은 무작위교배와 타가교배를 증진시키고 화분오염율을 감소시키는 효과가 있으며(Fashler and El-Kassaby, 1987; El-Kassaby and Ritland, 1986; El-Kassaby and Davidson, 1990), 인공교배는 타가교배를 특히 개화생리가 다른 개체간의 타가교배율을 증가시키고 화분오염율을 감소시키는데 효과가 있다(El-Kassaby et al., 1988; Askew,

1992; Stoehr et al., 1998; El-Kassaby and Ritland, 1986; El-Kassaby et al., 1990). 반면 인공교배 성공률이 *Pinus sylvestris* 채종원에서 4%, *Pseudotsuga menziesii* 채종원에서 15%, *Pinus taeda* 채종원에서 80%로 보고되고 있어(Yazdani et al., 1986; Bridgwater et al., 1987), 관리기술을 적용하는데 있어서 성공률은 방법이나 경험적 정보에 따라서 다양한 결과를 보이고 있다. 안정적이면서도 개량효과가 보장되는 종자의 생산을 위해서는 화분관리기술의 적용과 교배양식 분석을 기반으로 하는 화분관리기술의 효과검증에 대한 지속적인 모니터링이 필요하다.

4. 기여화분친 수

기여화분친 수를 산출하기 위해 6개의 cpSSR primer를 사용하여 모수별 종자의 유전형을 확인하고 이를 비교한 결과 2006년 생산된 종자에서는 평균 16.2개의 기여 화분친이 확인되었고, 분석된 종자 수에 대한 기여 화분친 수의 비율인 화분친 기여율이 경북 38에서 0.558으로 나타나 최대치를 보였으며, 강원 10에서 0.333으로 최소치를 보였다(0.333~0.538, 평균 0.458; Table 7). 2007년 생산된 종자에서는 평균 14.8개의 기여 화분친이 확인되었고, 화분친 기여율은 경북 38에서 0.593으로 나타나 최대치를 보였으며, 강원 10에서 0.450으로 최소치를 보였다(0.450~0.593, 평균 0.512; Table 7). 2006년 생산종자에서 2007년 생산종자에 비해 더 많은 수의 기여화분친이 확인되었지만, 화분친 기여율은 2007년 생산종자에서 보다 높게 산출되었다. 이는 모수와 종자 생산 시기에 따라 분석

Table 7. Effective pollen contributor in *Pinus densiflora* seed orchard '77 plot in Anmyeon island using 6 cpSSR markers.

Mother	2006			2007		
	N ^z	N ₂ ^y	PC ^x (%)	N ^z	N ₂ ^y	PC ^x (%)
Gangwon 10	39	13	0.333	40	18	0.450
Gangwon 12	39	17	0.436	37	20	0.540
Gangwon 15	31	14	0.452	7	3	0.429
Gangwon 24	30	16	0.533	31	17	0.548
Gyeongbuk 38	39	21	0.538	27	16	0.593
Mean	35.6	16.2	0.458	30	14.8	0.512

^znumber of seeds per mother tree, ^ynumber of pollen contributors, and ^xpaternal contribution rates (%).

Table 8. Effective pollen contributor observed in natural population.

Species	Marker	No of pollen contributor	Reference
<i>Pinus echinata</i>	cpSSR	3-6	Dyer and Srok (2001)
<i>Pinus densiflora</i> (Anmyeon island)	Allozyme	1.14	Lee et al. (2003)
<i>Pinus densiflora</i> (Mt Juwang)	Allozyme	3.94	Han et al. (2004)
<i>Pinus koraiensis</i> (Mt Seorak)	Allozyme	2.21	Hong et al. (2013)
<i>Pinus koraiensis</i> (Mt Seorak)	cpSSR	12.4	Hong et al. (2013)
<i>Picea mariana</i>	STS	6-9	Pery and Bousquet (2001)

에 이용된 종자 수가 일정 하지 않으므로 인하여 나타난 결과로 판단되며, 종자 당 기여한 화분친 수를 의미하는 화분친 기여율로 확인하는 것이 적당하다. 따라서 2006년 종자에서 보다 많은 기여화분친 수가 확인되었지만 2007년에 생산된 종자에서 상대적으로 다양한 화분친이 기여한 것으로 확인되었다. 반면 두 생산년도 별 화분친 기여율은 유의한 차가 없는 것으로 확인되었다($P > 0.1$).

자연집단의 경우 대부분 10개 미만의 화분친이 기여하는 것으로 보고하고 있어(Table 8), 채종원을 대상으로 한 본 연구 결과는 자연집단에 비해 비교적 많은 수의 기여화분친 수를 보유하고 있는 것으로 확인되었다. 이는 자연상태에서 임분의 생장과 갱신이 반복되는 자연임분과는 달리 채종원은 일정한 간격을 두고 모수를 식재하여 조성되었으며, 지속적 관리를 통해 밀도가 조절되는 임분이기 때문에 나타난 결과로 판단된다.

대표적 채종원 관리 방법의 하나인 수형조절은 수관울폐로 인한 수광량 감소, 종자의 품질 저하, 채종원 내의 화분 밀도의 불균일화를 조절하며, 유전간별은 채종목간 배우자 생산의 균일성을 증진시키고 임분밀도와 수관울폐도를 조절하여 특정 클론에 의한 편향된 종자생산을 인위적으로 조절하기 위해 수행된다(Kang et al., 2001). 따라서 수형조절, 유전간별 등 지속적인 채종원 관리를 통해 암꽃의 개화와 화분생산 등 자·웅성 배우체의 관리와 화분이동에 적절한 공간구조의 확보로 화분밀도가 비교적 균일하게 조절되어 다양한 화분친이 기여할 수 있는 기회가 제공되는 것으로 판단된다. 결론적으로 채종원내 수형목 클론간에 원활한 교배가 이루어지고 있음을 알 수 있

었으며, 2006년에는 종자 2.2개 당 별도의 화분수가 기여하며, 2007년에는 종자 2개 당 별도의 화분수가 기여한 것으로 나타났다(평균 종자수/평균 화분수=35.6/16.2; 30/14.8). 종자 생산과정에서 클론별 가계 기여도는 종자의 유전적 가치를 좌우하는 중요한 인자로 일반적으로 다수의 화분수로부터의 동일한 화분기여는 유전다양성을 확보하여 종자의 유전적 품질의 증진에 중요한 역할을 한다(Moriguchi et al., 2005; Kang et al., 2001; Han et al., 2001). 따라서 안면도 소나무 채종원(1977년 조성)의 2006년, 2007년 생산종자에서 다양한 유전적 배경이 확인됨으로써 비교적 유전다양성이 높은 채종원산 종자의 유전적 품질을 기대 할 수 있을 것으로 예상된다.

주요수종으로 조성된 채종원의 교배양식은 채종원 내부와 채종원 외부 동종 자연집단의 화분생산량, 개화생리 그리고 채종원 관리기술에 영향을 받기 때문에, 종자의 품질 증진을 위해서는 유전적 측면에서 개량이 필수적이지만 이와 더불어 채종원의 효율적인 관리가 수반됨으로써 고품질의 유량종자 생산이 가능하다(Kim et al., 2006). 따라서 자가교배와 화분오염등 교배양식모수의 추정은 채종원산 종자의 유전적 품질평가 뿐 만 아니라, 화분관리 기술을 채종원 관리에 적용하는데도 유용한 정보를 제공한다. 안면도 소나무 채종원(1977년 조성)에서는 타가교배율이 높고 근친교배가 낮으며 다수의 화분친이 교배에 기여하였으므로 종자는 높은 유전다양성을 보유하고 있으며, 근교양제에 의해 유전적으로 불량한 형질이 발생할 가능성이 낮을 것으로 예상된다. 다만 높은 화분오염율이 확인되었고, 채종원 외부에서 유입된 화분의 유전적 능력

에 대한 정보를 확보하는데 제약이 있으므로 화분오염에 의한 유전적 개량효과의 추정에 어려움이 예상된다. 때문에 외부 화분 유입을 방지하는 기술의 개발과 효과검증을 통해 채종원산 종자의 유전적 품질과 생리적 품질의 보증이 필요할 것으로 판단된다.

References

- 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.
- Askew, G.R. 1988. Estimation of gamete pool compositions in clonal seed orchard. *Silvae Genetica* 37: 227-232.
- Askew, G.R., 1992. Potential genetic improvement due to supplemental mass pollination management in conifer seed orchards. *Forest Ecology Management* 47: 135-147.
- Bridgwater, F.E., Bramlett, D.L., and Matthews, F.R. 1987. Supplemental mass pollination is feasible on an operational scale. pp. 216-222. Proceedings of 19th outhern forest tree improvement conference held at College Station, Texas, USA.
- Burczyk, J. and Chybicki, I.J. 2004. Cautions on direct gene flow estimation in plant populations. *Evolution* 58: 956-963.
- Burdon, R.D. 2001. Genetic diversity and disease resistance some considerations for research, breeding, and deployment. *Canadian Journal Forest Research* 31: 596-606.
- 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.
- Dyer, R.J. and Sork, V.L. 2001. Pollen pool heterogeneity in Short leaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Molecular Ecology* 10: 859-866.
- El-Kassaby, Y.A. and Ritland, K., 1986. The relation of outcrossing and contamination to reproductive phenology and supplemental mass pollination in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genetica* 35: 240-244.
- El-Kassaby, YA., Ritland, K., Faschler, A.M.K., and Devitt, W.J.B., 1988. The role of reproductive phenology upon the mating system of a Douglas-fir seed chard. *Silvae Genetica* 37: 76-82.
- El-Kassaby, Y.A. and Davidson, R. 1990. Impact of crop management practices on the seed crop genetic quality in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genetica* 39: 230-237.
- Farris, M.A. and Miton, J.B. 1984. Population density, outcrossing rate, and heterozygosity in Ponderosa pine. *Evolution* 38: 1151-1154.
- Fashler, A.M.K. and El-Kassaby, Y.A. 1987. The effect of water spray cooling treatment on reproductive phenology in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genetica* 36: 245-249.
- Friedman, S.T. and Adams, W.T. 1985. Estimation of gene flow into two seed orchards of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 69: 609-615.
- Goto, S., Miyahara, F., and Ie, Y. 2002. Monitoring male reproductive success in a Japanese black pine clonal seed orchard with RAPD markers. *Canadian Journal Forest Resources* 32: 983-988.
- 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.
- Han, S.U., Choi, W.Y., Chang, K.H., and Lee, B.S. 2001. Estimation of effective population numbers and sexual asymmetry based on flowering assessment in clonal seed of orchard *Pinus densiflora*. *Korean Society of Breeding Science* 33(1): 29-34. (in Korean)
- Han, S.D., Hong, Y.P., Yang, B.H., Lee, S.W., and Kim, C.S. 2004. Estimation of mating system parameters in the natural population of *Pinus densiflora* of Mt Juwang. pp. 315-316. Preceeding of Journal of Korean Forest Society. (in Korean)
- Harju, A. and Muona, O. 1989. Background pollination in *Pinus sylvestris* seed orchards. *Scandinavian Journal Forest Research* 4: 513-520.
- Hong, Y.P., Ahn, J.Y., Kim, Y.M., Hong, K.N., and Yang, B.H. 2013. Mating system in natural population of *Pinus koraiensis* at Mt. Seorak based on allozyme and cpSSR markers. *Journal of Korean Forest Society* 102(2): 264-271. (in Korean)
- 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.
- Kim, I.S., Kim, J.H., and Jang, K.H. 2006. The strategy of management in seed orchard to produce superior seed. pp. 36. In: I.S. Kim, J.H. Kim, K.H. Jang, B.S. Lee, ed. The strategy to massedly produce and systematically supply of superior seed in seed orchard. Korea forest seed and variety center. Chung-ju. Korea. (in Korean)
- Kim, W.W., Bae, L.S., Park, B.C., Kim, W.J. 2012. Report on actual condition of seed orchard management. National Forest Seed and Variety Center. pp198. chungju, korea. (in Korean)
- 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.
- 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.
- 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.
- Moriguchi, Y., Tani, N., Ito, 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.
- 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.
- 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. (in Korean)
- Pakkad, G., Ueno, S., and Yosimura, H. 2008. Genetic diversity and differentiation of *Quercus semisetata* Roxb. in northern Thailand revealed by nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Forest Ecology Management* 255: 1067-1077.
- 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. pp. 14-21. Proceedings of meeting of the Nordic group for tree breeding. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Forest Genetics and Plant Physiology Report.
- 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.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6.41: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- 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.
- Plomion, C., LeProvost, G., Pot, D., Vendramin, G., Gerber, S., Decroocq, S., Brach, J., Raffin, A., and Pastuszka, P. 2001. Pollen contamination in a maritime pine polycross seed orchard and certification of improved seeds using chloroplast microsatellites. *Canadian Journal Forest Research* 31: 1816-1825.
- Ritland, K. and Jain, S. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. *Heredity* 47: 35-52.
- Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity* 88: 221-228.
- 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.
- Snyder, T.P., Steward, D.A. and Strickleret, A.F. 1985. Temporal analysis of breeding structure in jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.). *Canadian Journal Forest Research* 15: 1159-1166.
- Stoehr, M.U., Orvar, B.L., Vo, T.M., Gawley, J.R., Webber, J.E. and Newton, C.H. 1998. Application of a chloroplast DNA marker in seed orchard management evaluations of Douglas-fir. *Canadian Journal Forest Research* 28: 187-195.
- Stoehr, M.U. 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.
- Stoehr, M., Webber, J., and Wood, J. 2004. Protocol for mating seed orchard seed lots in British Columbia quantifying genetic gain and diversity. *Forestry* 77: 297-303.
- Torimaru, T., Wang, X.R., Fries, A., Andersson, B., and Lindgren, D. 2009. Evaluation of pollen contamination in an advanced Scots pine seed orchard in Sweden. *Silvae Genetica* 58: 262-269.
- 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.
- 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.
- Yazdani, R., Hadders, G., and Szmidt, A. 1986. Supplemental mass pollination in a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. investigated by isozyme analyses. *Scandinavian Journal of Forest Research* 1: 309-315.
- 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.