

## ESTP 표지를 이용한 국내 소나무 집단의 유전변이

안지영<sup>1</sup>, 홍경낙<sup>1\*</sup>, 이제완<sup>1</sup>, 홍용표<sup>1</sup>, 강호덕<sup>2</sup>

<sup>1</sup>국립산림과학원, <sup>2</sup>동국대학교 바이오환경과학과

### Genetic Variation of *Pinus densiflora* Populations in South Korea Based on ESTP Markers

Ji Young Ahn<sup>1</sup>, Kyung Nak Hong<sup>1\*</sup>, Jei Wan Lee<sup>1</sup>, Yong Pyo Hong<sup>1</sup> and Hoduck Kang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Korea Forest Research Institute, Gyeonggi-do, Suwon 441-350, Korea

<sup>2</sup>Department of Biological and Environmental Sciences, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

**Abstract** - Genetic diversity and genetic differentiation of thirteen *Pinus densiflora* populations in South Korea were estimated using nine ESTP (Expressed Sequence Tag Polymorphism) markers. The numbers of allele and the effective allele were 2.2 and 1.8, respectively. The percentage of polymorphic loci (P) was 98.8%. The observed and the expected heterozygosity were 0.391 and 0.402, respectively, and the eleven populations except for Ahngang and Gangneung population were under Hardy-Weinberg equilibrium state. The level of genetic differentiation (Wright's  $F_{ST} = 0.057$ ) was higher than those of isozyme or nSSR markers. We could not find out any relationship between the genetic distance and geographic distribution among populations from cluster analysis. Also, the genetic differentiation between populations was not correlated with the geographic distance ( $r = 0.017$  and  $P = 0.344$  from Mantel test). From the result of  $F_{ST}$ -outlier analysis to identify a locus under selection, six loci were detected at confidence interval of 99% by the frequentist's method. However, only three loci (*sams2+Alu I*, *sams2+Rsa I*, PtNCS\_p14A9+HaeIII) were presumed as outliers by Bayesian method. The *sams2+Alu I* and *sams2+Rsa I* locus were originated from the *sams2* gene and seemed to be the loci under balancing selection.

**Key words** - Population genetic structure, Genetic diversity, Genetic differentiation,  $F_{ST}$ -outlier

## 서 언

소나무(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)는 소나무과(*Pinaceae*) 소나무속(Genus *Pinus*)에 속하는 수종이다. 우리나라에 분포하는 소나무는 중생대 백악기, 신생대 제3기 마이오세, 제4기 플라이스토세, 홀로세 기간을 거쳐 현재 한랭한 북부 고산지대부터 온난한 제주도 해안가에 이른다. 따라서 분포역이 우리나라에 자생하는 소나무 속 수종들 중 가장 넓다(Kong *et al.*, 2014). 소나무와 같은 임목수종은 많은 세대를 거치면서 환경 변화에 지속적으로 영향을 받게 되고 그에 따른 적응과정을 겪는다. 적응과정에서 살아남은 집단이나 개체에서는 선발영향을 받은 유전자에 의해 집단의 유전구조가 변화하게 되는데 이를 적응유전변이(adaptive genetic variation)라 한다(Holderegger *et*

*al.*, 2006). 임목을 대상으로 하는 적응유전변이 연구에는 중요 형질과 관련된 유전자를 찾아 염기서열상의 선발효과를 확인하는 방법과 표지를 이용하여 유전자좌에서 나타난 선발효과를 확인하는 방법이 주로 시도되고 있다(García-Gil *et al.*, 2003). 유전자의 염기서열을 확인하는 방법은 정확성은 높지만 대부분의 중요 형질이 다수의 유전자가 관련되어 있는 양적형질이기에 때문에 관련 유전자를 탐색하기 위해서는 많은 시간과 비용이 필요하다. 표지를 이용하는 방법은 빠르고 간편하게 분석할 수 있는 장점이 있지만, 동위효소나 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats) 같은 대부분의 분자표지는 진화중립적(selectively neutral)으로 적응변이와의 상관성이 없는 것으로 나타났다(González-Martínez *et al.*, 2006a; Karhu *et*

\*교신저자(E-mail) : honeutal@forest.go.kr

al., 1996).

EST (Expressed Sequence Tags) 표지는 유전체 내에서도 coding region에 존재하는 정보를 이용하기 때문에 중요 형질과 관련된 유전자 연구에 적합하다(Krutovskii and Neale, 2005). 짧은 single copy DNA 염기서열 영역을 프라이머로 이용하는 STS (Sequence Tag Site) 방법을 이용하기 때문에 특이성과 재현성이 높은 장점을 가지고 있으며(Olson et al., 1989), 공우성 DNA 표지로 유전자 지도 작성과 비교 연구 및 집단의 유전다양성과 유전구조 추정에 유용하게 사용될 수 있다(Chagné et al., 2004). ESTP 표지는 PCR 산물을 전기영동 하여 나타난 증폭산물의 다형성으로 변이를 확인하지만, PCR 산물만으로 다형성을 확인하지 못할 경우 RFLP 분석을 추가적으로 수행함으로써 제한효소 인식부위에 나타난 변이를 추적한다. EST표지 종류로는 EST-SSR, EST-SNPs, Insertion & Deletion (Indels), ESTP (Expressed sequence tag polymorphism), COS (Conserved orthologue set) 등이 알려져 있다(Gupta and Rustgi, 2004; Seo et al., 2013).

침엽수류를 대상으로 목부 조직형성 및 뿌리 발달과 같은 생장형질이나 bud burst, 내한성, 건조스트레스 같은 환경변화에 대한 생리적 반응 등 적응유전변이 연구를 위해 EST 분석이 이용되었으며(Allona et al., 1998; Cairney et al., 2006; Lorenz et al., 2006; Liang et al., 2007; Ralph et al., 2008), *Picea mariana* (Perry and Bousquet, 1998)를 비롯하여 다수의 침엽수류 대상으로 EST 표지 개발이 이루어졌다(Harry et al., 1998; Temesgen et al., 2001; Komulainen et al., 2003; Chagné et al., 2003; Brown et al., 2004; Chagné et al., 2004; González-Martínez et al., 2006b; Eckert et al., 2009). 최근에는 EST표지를 이용한 침엽수류 집단 수준에서의 적응유전변이 구명도 활발히 이루어지고 있다(Schubert et al., 2001; Jaramillo-Correa et al., 2001; Achere et al., 2005; Tsumura et al., 2007; Eckert et al., 2009).

본 연구는 침엽수류에서 개발된 ESTP 표지를 우리나라 소나무 집단에 적용하여 유전다양성과 유전구조를 분석하고, EST 표지중에서 선발 영향을 받았을 것으로 기대되는 특이적 유전자좌를 구명하여 집단의 유전구조 변화에 미치는 효과를 알아보고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 공시시료

전국에 분포하는 13개 소나무 집단으로부터 개체간 최소 50 m

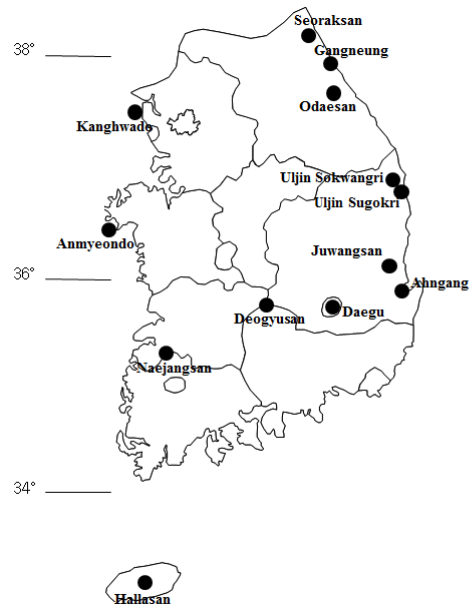


Fig. 1. Location of 13 *Pinus densiflora* populations in South Korea.

간격을 두고 집단 당 30개체 이상에서 침엽을 채취하였다(Fig. 1). 침엽으로부터 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다.

### ESTP 표지 분석

*Pinus taeda* (Temesgen et al., 2001; Komulainen et al., 2003; Brown et al., 2004; González-Martínez et al., 2006b), *Pinus sylvestris* (Komulainen et al., 2003), *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (Eckert et al., 2009)에서 개발된 EST 영역을 포함하는 PCR 분석용 primer를 제작하였다(Table 1). PCR 반응용액은 20  $\mu$ l당 20 ng template DNA, 1  $\times$  reaction buffer, 0.2  $\mu$ M forward primer, 0.2  $\mu$ M reverse primer, 0.2 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 Unit *Taq* DNA polymerase가 포함되었다. PCR 증폭은 94°C에서 5분간 초기 변성 후에 94°C 1분 변성, primer에 따라서 55°C~65°C에서 1분 결합, 72°C 2분의 중합과정을 35회 반복하고, 72°C에서 5분간 최종 중합하였다. PCR 증폭산물의 크기에 다형성이 있는 경우는 EST 표지로 사용하고, 개체 간 크기에 차이가 없는 PCR 증폭산물은 4bp-cutter 제한효소를 이용하여 EST-RFLP 표지를 선발하였다. 증폭산물 분획은 2% agarose gel에서 전기영동 하였다.

### 통계 분석

유전자좌간 연관불평형(Linkage disequilibrium) 검증을 위

Table 1. Information on EST primer sequence, PCR product size, functional gene and the original species

EST marker	Primer sequence	Product size (bp)	Gene	Species	Reference
PtIFG_8744	F:TGCAGATCCTATCTTTGGGG R:CAAGGTCTCGACCCAAAC	340	Cell-wall glycosylatable polypeptide	<i>Pinus taeda</i>	Temesgen <i>et al.</i> , 2001
PtNCS_p14A9	F:GAAACCCGGGGCTCTGAACT R:CCGCAGCGAGGAAAACAA	460	Arabinogalactan-like protein	<i>Pinus taeda</i>	Komulainen <i>et al.</i> , 2003
<i>sams2</i>	F:GTGGACCGAAGTGGGGCAT R:GGTCAATATGTGAATGGAACCGAATA	550	S-adenosylmethionine synthetase 2	<i>Pinus taeda</i>	Brown <i>et al.</i> , 2004
<i>glyhmt1</i>	F:CAAATGCGGTTGCTGTTGGTA R:AATCTGCTCAAATCGGCTTCC	640	Glycine hydroxymethyltransferase	<i>Pinus taeda</i>	Brown <i>et al.</i> , 2004
rd21Alike	F:TIGCTTCTCTTGGTCAATGC R:TCCTGTAAGCGTCACATGAT	1200	Cysteine protease	<i>Pinus taeda</i>	González-Martínez <i>et al.</i> , 2006
CSP	F:AGCCATTGCCTACTATTCTGTG R:CTTCTTGTCATCCATATTCTCCCTG	430	cellulase synthetase protein	<i>Pseudotsuga menziesii</i> var. <i>menziesii</i>	Eckert <i>et al.</i> , 2009
PsARI_dehydrin	F:CTTACCGCACCCACAGTT R:CCGTCGGCTCACATTCATAA	1180	Dehydrin	<i>Pinus sylvestris</i>	Komulainen <i>et al.</i> , 2003
<i>glyhmt2</i>	F:CTTTGTCGTTGAGAGAGTGAAATAGTGTC R:AGTGAGCAAACCTGACGGCTGG	850/680	Glycine hydroxymethyltransferase	<i>Pinus taeda</i>	Brown <i>et al.</i> , 2004
<i>agp4</i>	F:TGAAGTTCCCGCCGAAAGC R:GATCCCCTGAAATCCGTTTACTACATAC	550/500/ 450	Arabinogalactan protein	<i>Pinus taeda</i>	Brown <i>et al.</i> , 2004

하여 마르코프 연쇄 방법으로 조건부 확률 분포(10,000 demorization step, 100 batch, 5,000 iteration)를 구하고 Fisher의 정확성검증(95% 유의수준)을 Genepop v4.2.1 (Rousset, 2008) 프로그램으로 수행하였다. GeneALEX 6.4 프로그램(Peakall and Smouse, 2006)을 이용하여 대립유전자 수( $A$ ), 유효대립유전자 수( $A_e$ ), 다형성 유전자좌 비율( $P$ ), 이형접합도 관찰치( $H_o$ ), 이형접합도 기대치( $H_e$ )를 구하고, Wright의  $F$ 통계량을 추정하였다. FSTAT v2.9.3.2 프로그램(Goudet, 2002)을 이용하여 집단별 근교계수(Inbreeding coefficient:  $F$ )를 구하고, 하디-바인베르그 평형 검증을 수행하였다. Nei의 유전적 거리를 기초로 Phylip v3.695 프로그램(Felsenstein, 2002)을 이용하여 UPGMA 방법으로 군집분석을 실시하였다. Structure v2.3.1(Pritchard *et al.*, 2000)프로그램을 이용한 베이지 군집분석(Bayesian cluster analysis)에서 5,000번 burn-in 후 20,000번의 MCMC 시뮬레이션을 20회 반복하여 최적 군집수를 추정하였다(Evanno *et al.* 2005). 선발 영향을 받은 유전자를 추정하기 위해 Beaumont and Nichols (1996)에 따라 집단의 유전분화는 Island model, mutation은 Infinite allele mutation model로 상정하고 유전자좌별 이형접합도 기대치( $H_e$ )와  $F_{ST}$  값을 추정하였다. 특이값

(outlier)인 유전자좌를 구명하기 위하여 LOSITAN v1.0 프로그램(Antao *et al.*, 2008)에서 200,000번의 시뮬레이션을 수행하고 99% 신뢰수준에서 선별하였다. 베이지 추론을 위하여 BayeScan 프로그램(Foll and Gaggiotti, 2008)에서 50,000번 burn-in 후 300,000번의 MCMC 시뮬레이션을 실시하고, 유전자좌의  $F_{ST}$  값에 대한 확률( $P$ )이 0.99이상이고 모델 적정성을 판단하는 기준인  $\log_{10}$  (Bayes factor)가 2 이상인 유전자좌를 특이값으로 선정하였다.

## 결 과

### ESTP 표지 선발

침엽수류에서 개발된 EST 표지들 중 소나무 유전분석에 사용한 표지는 9개로 PtIFG\_8744, PtNCS\_p14A9, *sams2*, *glyhmt1*, *glyhmt2*, CSP, rd21Alike, PsARI\_dehydrin, *agp4*였다. EST 정보를 제공한 수종별로는 *Pinus taeda*에서 7개, *Pinus sylvestris*와 *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*에서 각 1개씩의 표지가 개발되었다. 기능별로는 목부 생장에 관련된 유전자(PtIFG\_8744, PtNCS\_p14A9, *agp4*, *sams2*, *glyhmt1*, *glyhmt2*,)가 6

Table 2. Characteristics of 17 EST-RFLP loci and 2 EST loci in *Pinus densiflora* populations

Locus	Allelic frequency	A <sup>z</sup>	G <sup>y</sup>	G <sub>max</sub> <sup>x</sup>
PtIFG_8744+Rsa I	A = 0.719, B = 0.281	2	3	3
PtIFG_8744+Tru1 I	A = 0.343, B = 0.657	2	3	3
PtNCS_p14A9+Mbo I	A = 0.300, B = 0.700	2	3	3
PtNCS_p14A9+HaeIII	A = 0.325, B = 0.675	2	3	3
PtNCS_p14A9+Hpa II	A = 0.128, B = 0.872	2	3	3
sams2+Alu I	A = 0.452, B = 0.548	2	2	3
sams2+Rsa I	A = 0.452, B = 0.548	2	2	3
glyhmt1+FspB I	A = 0.239, B = 0.271, C = 0.491	3	6	6
glyhmt1+Bsm I	A = 0.162, B = 0.838	2	3	3
rd21Alike+Hpa II	A = 0.352, B = 0.648	2	3	3
rd21Alike+Hin6 I	A = 0.877, B = 0.123	2	3	3
rd21Alike+Tai I	A = 0.190, B = 0.810	2	3	3
CSP+Alu I	A = 0.663, B = 0.338	2	3	3
PsARI_dehydrin+HaeIII	A = 0.130, B = 0.686, C = 0.184	3	6	6
PsARI_dehydrin+Mbo I	A = 0.514, B = 0.486	2	3	3
PsARI_dehydrin+Rsa I	A = 0.207, B = 0.658, C = 0.135	3	6	6
PsARI_dehydrin+Alu I	A = 0.154, B = 0.440, C = 0.310, D = 0.096	4	10	10
glyhmt2	A = 0.115, B = 0.885	2	3	3
agp4	A = 0.022, B = 0.356, C = 0.622	3	6	6

<sup>z</sup>A = number of observed allele.

<sup>y</sup>G = number of observed genotype.

<sup>x</sup>G<sub>max</sub> = maximum number of genotype.

개, 건조스트레스에 의해 발현되는 유전자(PsARI\_dehydrin, rd21Alike)가 2개, 내한성에 관련된 유전자(CSP)가 1개 였다. 9 개 EST 표지들 중 2개표지(glyhmt2, agp4)는 전기영동 상에서 개체 간 변이가 확인되었다. 나머지 7개 표지는 RFLP 분석을 추가적으로 수행한 후 개체간 변이를 확인할 수 있었는데, PtIFG\_8744 표지에서 3개, PtNCS\_p14A9표지에서 3개, sams2 표지에서 2개, glyhmt 1 표지에서 2개, rd21Alike 표지에서 3개, CSP 표지에서 1개, PsARI\_dehydrin 표지에서 4개의 개체간 변이가 나타난 EST-RFLP 유전자좌를 확인하였다. 본 연구에서는 17 개의 EST-RFLP 유전자좌와 2개의 EST 유전자좌를 포함한 19 개의 유전자좌를 선발하였다. 각 유전자좌 별로 관찰된 대립유전자는 최소 2개(PtIFG\_8744+Rsa I 등 16개)에서 최대 4개 (PsARI\_dehydrin+Alu I)로 나타났으며, 대립유전자 조합에 따른 기대 가능한 유전자형은 sams2+Alu I, sams2+Rsa I 를 제외한 나머지 유전자좌에서 모두 확인되었다(Table 2).

19개 유전자좌간 연관불평형을 확인한 결과 171개 조합 중 10

개(5.8%)에서 연관불평형이 나타났다( $P < 0.05$ ; data not shown). 연관불평형이 나타난 유전자좌를 제거하면 유전다양성이나 유전분화 모수를 추정할 때 편차가 줄어들 수도 있지만(Excoffier and Heckel, 2006), 본 연구에서는 연관불평형이 나타난 유전자좌 조합이 집단별로 상이해서 교배 양친수의 조합 차이에 의한 것으로 생각된다. 따라서 집단 유전모수 추정에 연관불평형이 나타난 유전자좌를 포함하여 분석에 사용하였다.

### 소나무 집단의 유전다양성

19개의 유전자좌를 이용하여 유전다양성을 추정된 결과 관찰된 평균 대립유전자 수(A)는 2.2개, 평균 유효대립유전자 수(A<sub>e</sub>)는 1.8개, 다형성 유전자좌 비율(P)은 98.8%, 평균 이형접합도 관찰치(H)는 0.391, 평균 이형접합도 기대치(H<sub>e</sub>)는 0.402 였다(Table 3). 근교계수 평균은 0.048이었으며, 내장산, 오대산, 울진 소광리를 제외한 나머지 집단들이 양의 근교계수 값을 갖는 것으로 나타났다. 특히 안강( $F = 0.273$ ;  $P < 0.001$ )과 강릉

Table 3. Genetic diversity within populations of *Pinus densiflora*

Population	$A^z$	$A_e^y$	$P$ (%) <sup>x</sup>	$H_o^w$	$H_e^v$	$F^u$
Juwangsan	2.2	1.8	100	0.414	0.405	0.001
Ahngang	2.2	1.8	100	0.325	0.438	0.273 <sup>***t</sup>
Seoraksan	2.3	1.9	100	0.423	0.425	0.022
Naejangsan	2.3	1.9	100	0.464	0.452	-0.010
Deogyusan	2.3	1.9	100	0.419	0.435	0.056
Daegu	1.9	1.6	89.5	0.336	0.345	0.066
Odaesan	2.3	1.8	100	0.423	0.415	-0.004
Hallasan	2.3	1.7	100	0.373	0.389	0.056
Uljin Sugokri	2.3	1.8	100	0.399	0.408	0.040
Uljin Sokwangri	2.3	1.8	100	0.398	0.386	-0.016
Kanghwado	2.3	1.6	100	0.336	0.337	0.021
Gangneung	2.2	1.8	100	0.370	0.394	0.105 <sup>*t</sup>
Anmyeondo	2.1	1.8	94.7	0.400	0.398	0.019
Mean	2.2	1.8	98.8	0.391	0.402	0.048

<sup>z</sup> $A$  = number of observed alleles.

<sup>y</sup> $A_e$  = number of effective alleles.

<sup>x</sup> $P$  (%) = percentage of polymorphic loci.

<sup>w</sup> $H_o$  = observed heterozygosity.

<sup>v</sup> $H_e$  = expected heterozygosity.

<sup>u</sup> $F$  = inbreeding coefficient.

\*Significant at the  $P < 0.05$ .

\*\*\*Significant at the  $P < 0.001$ .

( $F = 0.105$ ;  $P < 0.05$ )은 하디-바인베르그 평형보다 이형접합체의 관찰빈도가 낮게 나타났다. 집단별로는 내장산( $A = 2.3$ ,  $A_e = 1.9$ ,  $H_o = 0.464$ ,  $H_e = 0.452$ )이 유전다양성이 가장 높았고, 대구( $A = 1.9$ ,  $A_e = 1.6$ ,  $H_o = 0.336$ ,  $H_e = 0.345$ )와 강화도( $A = 2.3$ ,  $A_e = 1.6$ ,  $H_o = 0.336$ ,  $H_e = 0.337$ )의 유전다양성이 비교적 낮았다.

### 소나무 집단의 유전구조 및 유연관계

ESTP 표지를 이용한 우리나라 소나무 집단에 대한 유전분화도는  $F_{IS} = 0.055$ ,  $F_{IT} = 0.101$ ,  $F_{ST} = 0.057$ 로 나타났다(Table 4). 집단간의 유전분화를 나타내는  $F_{ST}$  값은 유전자좌별로 최소 0.009 (*sams2+Alu I*, *sams2+Rsa I*)에서 최대 0.196 (*PsARI\_dehydrin+Mbo I*)이었다. 건조스트레스 관련 *dehydrin* 유전자 부위에 위치하는 *PsARI\_dehydrin* EST 표지에서 확인된 4개 유전자좌중 3개 유전자좌(*PsARI\_dehydrin+HaeIII*, *PsARI\_dehydrin+Mbo I*, *PsARI\_dehydrin+Alu I*)의  $F_{ST}$  값이 0.1 이상으로 높게 나타났다.

13개 집단에 대한 Nei의 유전적 거리 평균은 0.042이며, 인접

한 울진의 2개 집단(울진 수곡리, 울진 소광리)간 유전적 거리가 0.005로 가장 작게 나타났다. 그러나 UPGMA 방법을 이용한 연관계도에서 집단 간 지리적 인접성에 따른 유전적 연관성을 확인할 수는 없었다(Fig. 2). 이런 결과는 소나무 집단을 대상으로 동위효소(Lee *et al.*, 1997), RAPD (Kim *et al.*, 1995), ISSR (Hong *et al.*, 2007)을 이용한 분석결과에서도 유사하게 나타났다. 한편 RAPD 표지를 이용한 집단유연관계 분석(Kim *et al.*, 1995)에서 한라산은 유전적 거리가 제일 먼 것으로 나타났으며, 침엽수종인 주목(ISSR: Kwon and Kim, 2002)이나 구상나무(nSSR: Hong *et al.*, 2011) 집단의 분석에서도 한라산은 유전적 거리가 가장 먼 것으로 확인되어 본 연구에서도 한라산 집단을 outgroup으로 지정하고 유연관계를 재분석하였지만, 지리적 인접성과 유전적 거리간 뚜렷한 경향을 확인할 수는 없었다(Fig. 2). 따라서 집단 간 지리적 분포특성과 집단들의 유전적 분화양상이 일치하지 않았으며, 지리적 거리와 유전적 거리 간의 상관성도 없는 것으로 나타났다(Mantel 검증;  $r = 0.017$ ,  $P = 0.344$ ). 베이지 군집분석에서 국내 소나무 13집단에 대한 상위 군집수는 최적 3개 군집으로 추정되었다(data not shown).

Table 4. Wright's  $F$  statistics for 17 EST-RFLP loci and 2 EST loci in *Pinus densiflora* populations

Locus	$F_{IT}$	$F_{IS}$	$F_{ST}$
PtIFG_8744+ <i>Rsa</i> I	0.051	0.004	0.047
PtIFG_8744+ <i>Tru1</i> I	-0.203	-0.272	0.054
PtNCS_p14A9+ <i>Mbo</i> I	0.107	0.084	0.024
PtNCS_p14A9+ <i>Hae</i> III	0.097	0.090	0.008
PtNCS_p14A9+ <i>Hpa</i> II	0.644	0.608	0.092
<i>sams2</i> + <i>Alu</i> I	-0.820	-0.837	0.009
<i>sams2</i> + <i>Rsa</i> I	-0.820	-0.837	0.009
<i>glyhmt1</i> + <i>FspB</i> I	0.070	0.030	0.042
<i>glyhmt1</i> + <i>Bsm</i> I	0.140	0.116	0.027
rd21Alike+ <i>Hpa</i> II	0.063	0.033	0.031
rd21Alike+ <i>Hin6</i> I	-0.123	-0.150	0.024
rd21Alike+ <i>Tai</i> I	0.447	0.414	0.057
CSP+ <i>Alu</i> I	0.368	0.346	0.033
PsARI_ <i>dehydrin</i> + <i>Hae</i> III	0.367	0.262	0.143
PsARI_ <i>dehydrin</i> + <i>Mbo</i> I	0.397	0.251	0.196
PsARI_ <i>dehydrin</i> + <i>Rsa</i> I	0.396	0.369	0.043
PsARI_ <i>dehydrin</i> + <i>Alu</i> I	0.300	0.139	0.187
<i>glyhmt2</i>	0.047	0.027	0.020
<i>agp4</i>	0.392	0.374	0.029
Mean	0.101	0.055	0.057

3개 군집에 대한 사후확률을 기준으로 집단을 구분하면 강화도 (Cluster I = 0.729)는 제1군집에 대해 가장 높은 사후확률을 나타냈고, 울진 수곡리, 울진 소광리, 강릉, 주왕산, 오대산, 한라산 등에서 제1군집의 사후확률이 제일 우세하였다(Table 5). 제2군집에서는 안면도(Cluster II = 0.623)에서 높은 확률을 가지고 있었고, 설악산, 내장산, 덕유산, 대구에서 제2군집 할당이 높게 나타났다. 집단 내에서 제3군집의 확률이 우세한 경우는 없었으나, 안강(Cluster II = 0.568, Cluster III = 0.335)이나 한라산(Cluster I = 0.556, Cluster III = 0.251)에서 제3군집의 사후확률이 비교적 높게 나타났다.

베이지 군집분석은 Nei의 유전적 거리를 이용한 빈도주의 군집분석과 유사한 결과를 나타냈다(Table 5, Fig. 2). 최적 군집수(K = 3)에서 제1군집에서 빈도가 높은 집단들은 강화도, 주왕산, 강릉, 울진 수곡리, 울진 소광리, 오대산, 한라산 집단이었으며, 빈도주의 군집분석에서는 outgroup으로 설정한 한라산과 두 군집간 사후확률 차이가 0.1 미만인 오대산을 제외한 5개 집단이 동일한 군집에 속했다. 제2군집에서 빈도가 높은 집단들

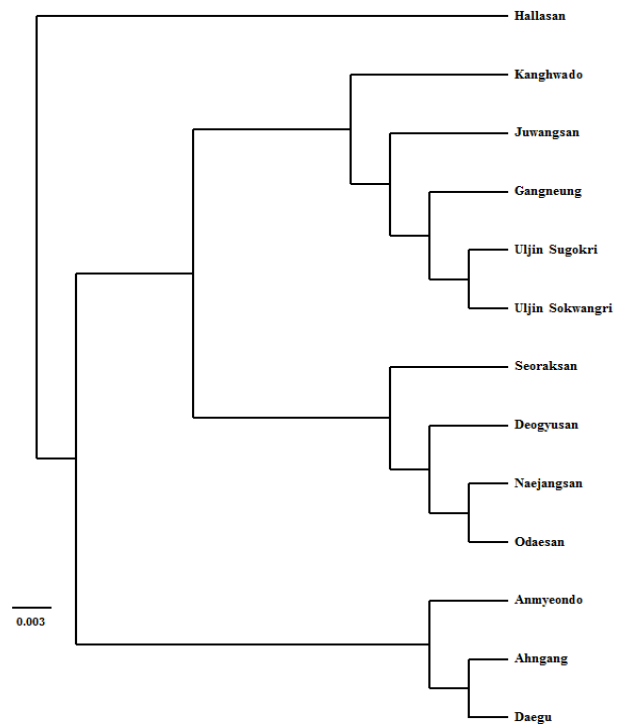


Fig. 2. UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance in *Pinus densiflora* populations.

Table 5. Proportion of cluster memberships at the population level in *Pinus densiflora* by Bayesian cluster analysis

Population	Cluster I	Cluster II	Cluster III
Juwangsan	0.594	0.272	0.134
Ahngang	0.097	0.568	0.335
Seoraksan	0.416	0.493	0.091
Naejangsan	0.404	0.451	0.145
Deogyusan	0.394	0.447	0.159
Daegu	0.425	0.500	0.075
Odaesan	0.488	0.419	0.093
Hallasan	0.556	0.193	0.251
Uljin Sugokri	0.563	0.324	0.113
Uljin Sokwangri	0.596	0.287	0.117
Kanghwado	0.729	0.220	0.051
Gangneung	0.588	0.330	0.082
Anmyeondo	0.316	0.623	0.061

은 안면도, 설악산, 내장산, 덕유산, 대구, 안강 집단이었으나 제2군집의 빈도가 높은 안면도, 안강, 대구 집단이 빈도주의 군집분석에서 하나의 그룹을 형성하였다. 제1군집과 제2군집의 사후확률 차이가 0.1 미만인 설악산, 덕유산, 내장산, 오대산이

빈도주의 군집분석에서 별도의 그룹을 형성하였다. 그러나 지리적 인접성에 따른 군집 구별을 확인할 수 없었다.

값 2 이상의 기준에서 특이값으로 판정되었다(Table 6, Fig. 4).

### 고 찰

#### ESTP 유전자좌의 특이값(outlier) 추정

선발 영향(selection effect)을 받은 유전자좌를 추정하기 위해  $F_{ST}$ -outlier 분석(Beaumont and Nichols, 1996)을 실시하였다. 특이값으로 판정된 유전자좌는 전체 19개 중 6개(31.6%)였다(Table 6, Fig. 3). 99% 신뢰수준에서 신뢰하한 보다 낮은  $F_{ST}$  값을 나타낸 3개의 유전자좌인 *sams2+Alu I*, *sams2+Rsa I*, PtNCS\_p14A9+*HaeIII*는 balancing selection의 후보 유전자좌로 추정되었고, 신뢰상한 보다 높은  $F_{ST}$  값을 나타낸 3개의 유전자좌 *PsARI\_dehydrin+HaeIII*, *PsARI\_dehydrin+Mbo I*, *PsARI\_dehydrin+Alu I* 는 positive selection을 겪은 유전자좌로 추정되었다. 그러나 베이즈 방법(Foll and Gaggiotti, 2008)에서는 낮은  $F_{ST}$  값을 갖는 3개(15.8%) 유전자좌만 Bayes factor의 로그

#### ESTP 표지를 이용한 소나무의 유전다양성 및 유전구조

ESTP 표지로 확인된 국내 소나무의 유전다양성( $H_e = 0.402$ )은 nSSR 표지로 확인된 국내 소나무의 유전다양성( $H_e = 0.672$ ; J.Y. Ahn *et al.*, in press)보다 낮았다. ESTP 표지를 이용한 소나무의 유전다양성 정도는 *Picea abies* ( $H_e = 0.505$ ; Achere *et al.*, 2005)에 비해 낮았으나, *Picea lauca* ( $H_e = 0.313$ ; Jaramillo-Correa *et al.*, 2001)와 *Cryptomeria japonica* ( $H_e = 0.322$ ; Tsumura *et al.*, 2007) 보다는 높았다. 그러나 nSSR 표지로 분석한 *Picea abies* ( $H_e = 0.796$ ; Achere *et al.*, 2005), *Cryptomeria japonica* ( $H_e = 0.770$ ; Takahashi *et al.*, 2005) 보다 소나무의 유전다양성이 낮게 나타났다. 전반적으로

Table 6. Outlier loci detected by Frequencist's method (Beaumont and Nichols, 1996) and Bayesian method (Foll and Gaggiotti, 2008)

Locus	Frequencist			Bayesian
	$H_e$	$F_{ST}$	$P$	$P$
<i>sams2+Alu I</i>	0.495	-0.005	0.002	0.993
<i>sams2+Rsa I</i>	0.495	-0.005	0.002	0.992
PtNCS_p14A9+ <i>HaeIII</i>	0.441	-0.006	<0.001	0.993
<i>PsARI_dehydrin+HaeIII</i>	0.473	0.128	0.999	0.041
<i>PsARI_dehydrin+Mbo I</i>	0.505	0.187	1.000	0.068
<i>PsARI_dehydrin+Alu I</i>	0.710	0.172	1.000	0.072

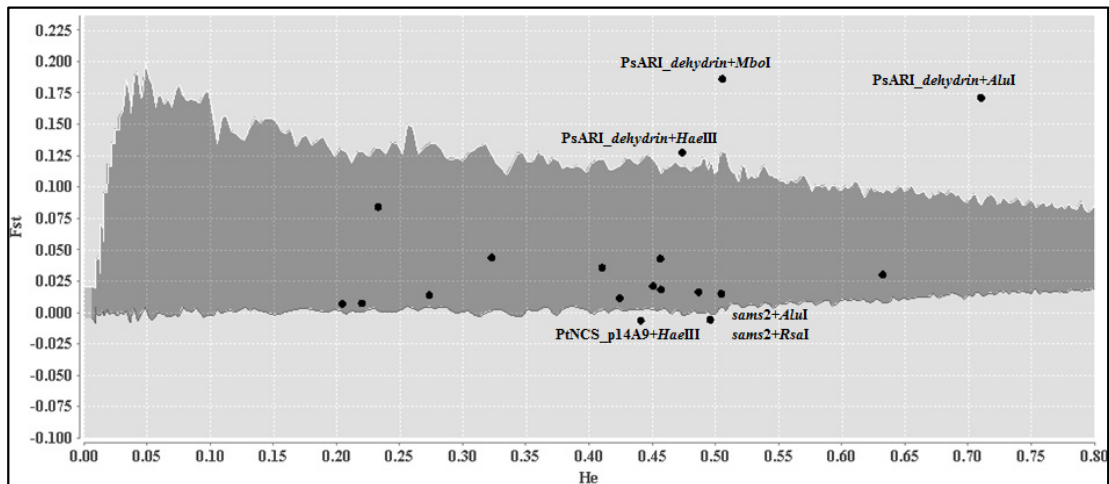


Fig. 3. Outliers estimated from the locus-specific  $F_{ST}$  values against the expected heterozygosity ( $H_e$ ) (Beaumont and Nichols, 1996) in *Pinus densiflora* populations. Black dots are represented 19 EST loci. The dark grey indicates the region with 99% confidence interval and the six outlier loci were shown in the light grey region.

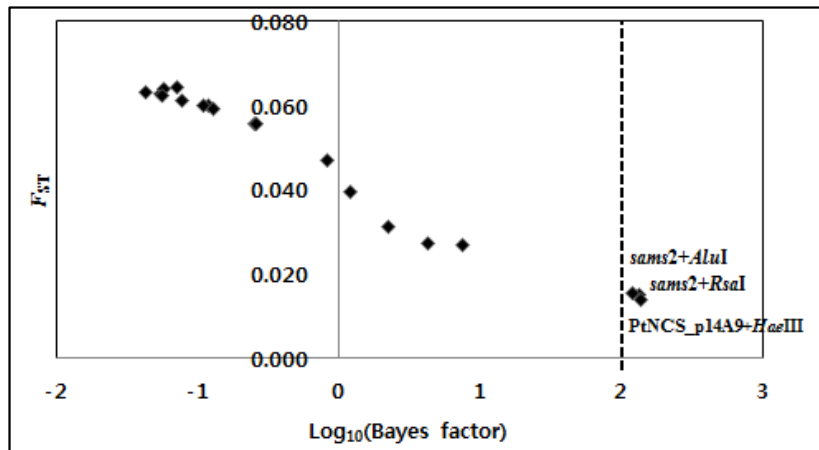


Fig. 4. Outliers estimated from the  $F_{ST}$  values and the Bayes factors for 19 EST loci (Foll and Gaggiotti, 2008) in *Pinus densiflora* populations. The dashed line indicates the threshold of 2 as  $\log_{10}$  transformed Bayes factor that provides decisive evidence for selection corresponding to a posterior probability of 0.99.

소나무 유전다양성은 *Picea abies*, *Cryptomeria japonica* 보다 낮은 것으로 사료된다. 본 연구의 유전다양성( $A = 2.2$ 개,  $H_b = 0.391$ ,  $H_e = 0.402$ )은 동위효소로 확인된 국내 소나무의 유전다양성( $A = 2.4$ 개,  $H_b = 0.262$ ,  $H_e = 0.263$ ; Kim *et al.*, 1994)과 대립유전자 수는 비슷했으나, 이형접합도 관찰치나 기대치는 더 높게 나타났다. *Picea abies*에서 동일한 개체들을 대상으로 동위효소와 EST 표지 분석을 수행했을 때 대립유전자 수( $A$ : 동위효소 = 3.00개, EST = 3.33개)와 이형접합도 기대치( $H_e$ : 동위효소 = 0.60, EST = 0.67)는 비슷했지만 이형접합도 관찰치( $H_o$ : 동위효소 = 0.23, EST = 0.50)는 EST 표지가 더 크게 나타났다 (Schubert *et al.*, 2001). 따라서 동위효소와 EST 표지로 소나무의 유전다양성을 추정할 경우에 대립유전자 수는 비슷하게 나타나도 이형접합체의 관찰빈도는 EST 표지가 더 높은 것으로 생각된다. ESTP 표지를 이용한 국내 소나무의 유전분화( $F_{ST}$ )는 0.057로, 동위효소( $F_{ST} = 0.038$ ; Kim *et al.*, 1994)나 nSSR 표지로 추정된 유전분화( $F_{ST} = 0.031$ ; J.Y. Ahn *et al.*, in press)보다 더 심한 것으로 나타났다. 일반적으로 EST 표지로 추정된  $F_{ST}$ 값이 다른 표지로 추정된 값보다 크게 나타난다. *Picea glauca*의 유전분화는 EST 표지( $F_{ST} = 0.020$ )가 동위효소( $F_{ST} = 0.014$ )보다 크게 나타났으며 (Jaramillo-Correa *et al.*, 2001), *Picea abies*의 유전분화도 EST 표지( $F_{ST} = 0.025$ )가 nSSR 표지( $F_{ST} = 0.009$ )보다 크게 나타났다 (Achere *et al.*, 2005). *Cryptomeria japonica*에서도 EST 표지( $F_{ST} = 0.059$ ; Tsumura *et al.*, 2007)의 유전분화가 동위효소( $F_{ST} = 0.034$ ; Tomaru *et al.*, 1994)나 nSSR 표지( $F_{ST} = 0.028$ ; Takahashi *et al.*, 2005)보다 더 크게 나타났다. 따라서 소나무 유전분화는 *Picea abies*, *Picea*

*glauca*, *Cryptomeria japonica* 보다 심화된 것으로 생각된다.

#### 선발 영향을 받는 유전자좌의 추정

$F_{ST}$ -outlier 추정은 유전자좌별 선발 영향을 확인하는 방법으로 초창기의 Lewontin-Krakauer test를 시작으로 다양한 집단 분화모형을 가정한 방법들이 제안되고 있다 (Beaumont and Nichols, 1996; Vitalis *et al.*, 2001). 그러나 *Cryptomeria japonica* 경우에서 보듯이 집단 분화 모델에 따라 outlier로 판정된 유전자좌의 비율이 크게 차이날 수도 있다 (Island model = 5%, split model = 19.4%; Tsumura *et al.*, 2007). 이러한 변동은 집단 분화에 미치는 요인이 선발뿐 아니라 또 다른 생물학적 요인이나 집단의 계층 구조 등에 의해서도 영향 받을 수 있기 때문이며, 이런 경우에는 분화모델에 따라 outlier 결정의 제1종 오류가 발생할 가능성도 높아질 수 있다 (Beaumont, 2005; Narum and Hess, 2011; Bierne *et al.*, 2013). 빈도주의 통계방법과 더불어 베이지 추론을 이용한  $F_{ST}$ -outlier 추정 방법도 이용되고 있는데 (Foll and Gaggiotti, 2008), *Picea glauca*에서 두 가지 통계방법을 각기 적용했을 때 outlier로 판정된 유전자좌의 비율이 빈도주의 방법 3.7%, 베이지 방법 9.2%로 다르게 나타났다 (Namroud *et al.*, 2008). 본 연구의 특이값 추정에서도 빈도주의 방법에서 6개로 확인된 특이값이 베이지 방법에서는 3개로 판정되었는데, 두 방법에서 공통적으로 확인된 특이값은 *sams2+Alu I*, *sams2+Rsa I*, *PtNCS\_p14A9+HaeIII* 등이다. 빈도주의 방법에서 확인된 *PsARI\_dehydrin+HaeIII*, *PsARI\_dehydrin+Mbo I*, *PsARI\_dehydrin+Alu I*는 베이지 방법에서 유의하지 않은 것으로 판명되었다. *PsARI\_dehydrin*에서 유래된 이들 3



개 유전자좌는 일부 소나무 집단에서 null allele 빈도가 높게 나타났는데(대구 = 92.5%, 강릉 = 85.4%, 안면도 = 60.8%), 이러한 자료의 특성이 각 통계방법의 특이값 판정결과에 다른 강도로 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 빈도주의 방법은 유전자좌가 중립적(neutral)이라는 가정에서 벗어나는 분화값을 나타내는 유전자좌를 특이값으로 추정하는 것에 비하여, 베이지 방법은 중립적 집단유전학 모델(neutral population genetic model)에서 추정된 유전모수를 기준으로 특이값을 판정하기 때문에 이러한 오류를 어느 정도 감소시킬 수 있다(Foll and Gaggiotti, 2008). 빈도주의 방법과 베이지 방법에서 공히 특이값으로 판정된 3개 유전자좌는 balancing selection을 받았을 것으로 추정된다. selection을 받았을 것으로 판정된 3개의 유전자좌를 제외하고 유전분화를 다시 추정한 결과  $F_{ST}$  값은 0.066으로 유의한 차이가 없었으며( $P = 0.65$ ), 3개의 유전자좌는 집단 분화에 미미한 영향을 미치는 것으로 판단된다. 유전자좌에 대한 선발(selection)이 발생할 경우에 balancing selection은 집단간 대립유전자 빈도가 비슷하게 분포하기 때문에 유전분화도( $F_{ST}$ )가 낮거나 유전다양성( $H_e$ )이 높게 나타난다. 반면에 positive selection이 나타난 유전자좌는 대립유전자 빈도가 특정 집단에서 높게 되서 유전분화도는 높지만 유전다양성이 낮게 나타나게 된다(Luikart *et al.*, 2003, Excoffier *et al.*, 2009). 본 연구에서 선발 영향을 받는 특이값으로 판정된 3개 유전자좌에서 추정된 유전다양성과 유전분화 수준은 매우 유사하게 나타났으며(Table 6), 각 유전자좌의 대립유전자 빈도는 *sams2* 표지에서 확인된 2개 유전자좌(*sams2+Alu I*, *sams2+Rsa I*)의 대립유전자별 관찰빈도가 유사하게 나타난 것에 비하여 PtNCS\_p14A9+*HaeIII* 유전자좌는 제1대립유전자 빈도보다 제2대립유전자 빈도가 2배 이상 높은 것으로 관찰되었다(Table 2). 따라서 소나무 집단에서 *sams2* 표지가 위치한 목부 생장과 관련된 유전자 S-adenosyl methionine synthetase 2에서 balancing selection이 나타난 것으로 판단된다. 이들 유전자좌를 제외한 나머지 유전자좌들에 대한 Ewens-Watterson Neutrality Test (Watterson, 1977)를 실시한 결과(data not shown), 선발 영향을 받지 않는 중립적 유전자좌(neutral loci)들로 확인되었다.

## 적 요

소나무의 유전다양성과 유전구조를 추정하기 위해 9개의 ESTP 표지를 13개 소나무 집단에 적용하였다. 소나무 집단의 유전다양성은 관찰된 대립유전자 수( $A$ )가 2.2개, 유효 대립유

전자 수( $A_e$ )가 1.8개, 다형적 유전자좌 비율( $P$ )이 98.8%, 이형접합도 관찰치( $H_o$ )가 0.391, 이형접합도 기대치( $H_e$ )가 0.402로 나타났다. 안강과 강릉 집단을 제외한 11개 집단이 하디-바인베르그 평형을 만족하였다. 집단간 유전분화도( $F_{ST}$ )는 0.057으로, 동위효소나 nSSR 표지분석 결과보다 강하게 나타났다. 군집분석에서 집단의 유전적 거리와 지리적 분포간에 뚜렷한 연관성은 확인할 수 없었으며, 집단의 유전분화와 지리적 인접성도 상관성이 없는 것으로 나타났다(Mantel 검증,  $r = 0.017$ ,  $P = 0.344$ ). 유전자좌에 대한  $F_{ST}$ -outlier 분석을 실시한 결과, 빈도주의 방법에서는  $F_{ST}$  값이 신뢰가능한 이하인 3개 유전자좌와 신뢰가능한 이상인 3개 유전자좌가 특이값으로 추정되었고, 베이지 방법에서는 3개 유전자좌들만 특이값으로 확인되었다. 두 방법에서 공히 특이값으로 판정된 3개 유전자좌(*sams2+Alu I*, *sams2+Rsa I*, PtNCS\_p14A9+*HaeIII*)중 *sams2* 표지에서 유래된 2개 유전자좌는 balancing selection의 영향을 받는 것으로 추정되었다.

## References

- Achere, V., J.M. Favre, G. Besnard and S. Jeandroz. 2005. Genomic organization of molecular differentiation in Norway spruce (*Picea abies*). *Mol. Ecol.* 14:3191-3201.
- Allona, I., M. Quinn, E. Shoop, S.S. Cyr, J. Carlis, J. Riedl, E. Retzel, M.M. Campbell, R. Sederoff and R.W. Whetten. 1998. Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(16):9693-9698.
- Antao, T., A. Lopes, R.J. Lopes, A. Beja-Pereira and G. Luikart. 2008. LOSITAN: a workbench to detect molecular adaptation based on a *Fst*-outlier method. *BMC Bioinformatics* 9:323.
- Beaumont, M.A. and R.A. Nichols. 1996. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.* 263:1619-1623.
- Beaumont, M.A. 2005. Adaptation and speciation: What can  $F_{ST}$  tell us? *Trends Ecol. Evol.* 20(8):435-440.
- Bierne, N., D. Roze and J.J. Welch. 2013. Pervasive selection of it? why are  $F_{ST}$  outliers sometimes so frequent? *Mol. Ecol.* 22:2061-2064.
- Brown, G.R., G.P. Gill, R.J. Kuntz, C.H. Langley and D.B. Neale. 2004. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in loblolly pine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(42):15255-15260.

- Cairney, J., L. Zheng, A. Cowels, J. Hsiao, V. Zismann, J. Liu, S. Ouyang, F. Thibaud-Nissen, J. Hamilton, K. Childs, G.S. Pullman, Y. Zhang, T. Oh and C.R. Buell. 2006. Expressed sequence tags from loblolly pine embryos reveal similarities with angiosperm embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 62:485-501.
- Chagné C., G. Brown, C. Lalanne, D. Madur, D. Pot, D.B. Neale and C. Plomion. 2003. Comparative genome and QTL mapping between maritime and loblolly pines. *Mol. Breeding* 12:185-195.
- Chagné, D., P. Chaumeil, A. Ramboer, C. Collada, A. Guevara, M.T. Cervera, G.G. Vendramin, V. Garcia, J.M. Frigerio, C. Echt, T. Richardson and C. Plomion. 2004. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theor. Appl. Genet.* 109:1204-1214.
- Eckert, A.J., J.L. Wegrzyn, B. Pande, K.D. Jermstad, J.M. Lee, J.D. Liechty, B.R. Tarse, K.V. Krutovsky and D.B. Neale. 2009. Multilocus patterns of nucleotide diversity and divergence reveal positive selection at candidate genes related to cold-hardiness in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). *Genetics* 189(1):289-298.
- Evanno, G., S. Reanaut and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14:2611-2620.
- Excoffier, L. and G. Heckel. 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nat. Rev. Genet.* 7:745-758.
- Excoffier, L., T. Hofer and M. Foll. 2009. Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. *Heredity* 103:285-298.
- Felsenstein, J. 2002. *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, Sunderland, MA (USA).
- Foll, M. and O. Gaggiotti. 2008. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. *Genetics* 180:977-995.
- Garcia-Gil, M.R., M. Mikkonen and O. Savolainen. 2003. Nucleotide diversity at two phytochrome loci along a latitudinal cline in *Pinus sylvestris*. *Mol. Ecol.* 12:1195-1206.
- González-Martínez, S.C., K.V. Krutovsky and D.B. Neale. 2006a. Forest-tree population genomics and adaptive evolution. *New Phytol.* 170:227-238.
- González-Martínez, S.C., E. Ersoz, G.R. Brown, N.C. Wheeler and D.B. Neale. 2006b. DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. *Genetics* 172:1915-1926.
- Goudet, J. 2002. FSTAT version 2.9.3 program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Available from: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.html>.
- Gupta, P.K. and S. Rustgi. 2004. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Funct. Integr. Genomics* 4:139-162.
- Harry, D.E., B. Temesgen and D.B. Neale. 1998. Codominant PCR-based markers for *Pinus taeda* developed from mapped cDNA clones. *Theor. Appl. Genet.* 97:327-336.
- Holderegger, R., U. Kamm and F. Gugerli. 2006. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecol.* 21:797-807.
- Hong, Y.P., H.Y. Kwon and I.S. Kim. 2007. I-SSR markers revealed inconsistent phylogeographic patterns among populations of Japanese red pine in Korea. *Silvae Genet.* 56(1):22-26.
- Hong, Y.P., J.Y. Ahn, Y.M. Kim, B.H. Yang and J.H. Song. 2011. Genetic variation of nSSR markers in natural populations of *Abies koreana* and *Abies nephrolepis* in South Korea. *J. Korean For. Soc.* 100(4):577-584 (in Korean).
- Jaramillo-Correa, J.P., J. Beaulieu and J. Bousquet. 2001. Contrasting evolutionary forces driving population structure at expressed sequence tag polymorphism, allozymes and quantitative traits in white spruce. *Mol. Ecol.* 10:2729-2740.
- Karhu, A., P. Hurme, M. Karjalainen, P. Karvonen, K. Kärkkäinen, D.B. Neale and O. Savolainen. 1996. Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? *Theor. Appl. Genet.* 93:215-221.
- Kim, Z.S., C.H. Yi and S.W. Lee. 1994. Genetic variation and sampling strategy for conservation in *Pinus* species: In Kim, Z.S. and H.H. Hattemer (eds.), *Conservation and Manipulation of Genetic Resources in Forestry*, Kwang Moon Kag Publishig Co., Seoul, Korea. pp. 294-321.
- Kim, Y.Y., J.O. Hyun, K.N. Hong, T.B. Choi and K.S. Kim. 1995. Genetic variation of natural populations of *Pinus densiflora* in Korea based on RAPD marker analysis. *Korean J. Breeding* 27(1):23-48 (in Korean).
- Komulainen, P., G.R. Brown, M. Mikkonen, A. Karhu, M.R. Garcia-Gil, D. O'Malley, B. Lee, D.B. Neale and O. Savolainen. 2003. Comparing EST-based genetic maps between *Pinus sylvestris* and *Pinus taeda*. *Theor. Appl. Genet.* 107:667-678.
- Kong, W.S., S.G. Lee, H.N. Park, Y.M. Lee and S.H. Oh. 2014. Time-spatial distribution of *Pinus* in the Korean Peninsular.

- Quatern. Int. 1-10.
- Krutovskii, K.V. and D.B. Neale. 2005. Forest genomics and new molecular genetic approaches to measuring and conserving adaptive genetic diversity in forest trees: *In* Geburek, T. and J. Turok (eds.), Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe, Arbora Publishers, Zvolen, Slovakia. pp. 369-388.
- Kwon, H.Y. and Z.S. Kim. 2002. I-SSR variation within and among Korean Populations in *Taxus cuspidata*. *J. Korean For. Soc.* 91(5):654-660.
- Lee, S.W., Y.Y. Kim, J.O. Hyun and Z.S. Kim. 1997. Comparison of genetic variation in *Pinus densiflora* natural populations by allozyme and RAPD analysis. *Korean J. Breeding* 29(1):72-83 (in Korean).
- Liang, C., G. Wang, L. Liu, G. Ji, L. Fang, Y. Liu, K. Carter, J.S. Webb and J.F.D. Dean. 2007. Conifer EST: an integrated bioinformatics system for data reprocessing and mining of conifer expressed sequence tags (ESTs). *BMC Genomics* 8:1-10.
- Lorenz, W.W., F. Sun, C. Liang, D. Kolychev, H. Wang, X. Zhao, M.M. Cordonnier-Pratt, L.H. Pratt and J.F.D. Dean. 2006. Water stress-responsive genes in loblolly pine (*Pinus taeda*) roots identified by analyses of expressed sequence tag libraries. *Tree Physiol.* 26:1-16.
- Luikart, G., P.R. England, D. Tallman, S. Jordan and P. Taberlet. 2003. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nat. Rev. Genet.* 4:981-994.
- Narum, S. and J.E. Hess. 2011. Comparison of  $F_{ST}$  outlier tests for SNP loci under selection. *Mol. Ecol. Resour.* 11:184-194.
- Namroud, M.C., J. Beaulieu, N. Juge, J. Laroche and J. Bousquet. 2008. Scanning the genome for gene single nucleotide polymorphisms involved in adaptive population differentiation in white spruce. *Mol. Ecol.* 17:3599-3613.
- Olson, M., L. Hood, C. Cantor and D. Botstein. 1989. A common language for Physical Mapping of the Human Genome. *Science* 245:1434-1435.
- Peakall, R. and P.E. Smouse. 2006. GENEALEX 6: genetic analysis in Excel. population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6:288-295.
- Perry, D.J. and J. Bousquet. 1998. Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes: development, characterization and analysis of linkage in black spruce. *Genetics* 149:1089-1098.
- Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Ralph, S.G., H.J.E. Chun, N. Kolosova, D. Cooper, C. Oddy, C.E. Ritland, R. Kirkpatrick, R. Moore, S. Barber, R.A. Holt, S.J.M. Jones, M.A. Marra, C.J. Douglas, K. Ritland and J. Bohlmann. 2008. A conifer genomics resource of 200,000 spruce (*Picea* spp.) ESTs and 6,464 high-quality, sequence-finished full-length cDNAs for Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *BMC Genomics* 9:484.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8:103-106.
- Schubert, R., G. Mueller-Starck and R. Riegel. 2001. Development of EST-PCR markers and monitoring their intrapopulation genetic variation in *Picea abies* (L.) Karst. *Theor. Appl. Genet.* 103:1223-1231.
- Seo, D.H., K.M. Jung, S.J. Kim and K.M. Kim. 2013. Development of EST-SSR markers and analysis of genetic diversity using persimmon (*Diospyros kaki* Thunb) cultivars collecting from domestic. *Korean J. Plant Res.* 26(4):491-502 (in Korean).
- Takahashi, T., N. Tani, H. Taira and Y. Tsumura. 2005. Microsatellite markers reveal high allelic variation in natural populations of *Cryptomeria japonica* near refugial areas of the last glacial period. *J. Plant Res.* 118:83-90.
- Temesgen, B., G.R. Brown, D.E. Harry, C.S. Kinlaw, M.M. Sewell and D.B. Neale. 2001. Genetic mapping of expressed sequence tag polymorphism (ESTP) markers in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Theor. Appl. Genet.* 102:664-675.
- Tomaru, N., Y. Tsumura and K. Ohba. 1994. Genetic variation and population differentiation in natural populations of *Cryptomeria japonica*. *Plant Spec. Biol.* 9(3): 191-199.
- Tsumura, Y., T. Kado, T. Takahashi, N. Tani, T. Ujino-Ihara and H. Iwata. 2007. Genome scan to detect genetic structure and adaptive genes of natural populations of *Cryptomeria japonica*. *Genetics* 107:2393-2403.
- Vitalis, R., K. Dawson and P. Boursot. 2001. Interpretation of variation across marker loci as evidence of selection. *Genetics* 158:1811-1823.
- Watersson, G.A. 1977. Heterosis or neutrality? *Genetics* 85:789-814.

(Received 13 September 2014 ; Revised 12 November 2014 ; Accepted 17 November 2014)