

RAPD 分析에 의한 전나무 天然集團의 遺傳變異^{1*}

金仁植² · 玄正悟²

Genetic Variation in the Natural Populations of *Abies holophylla* Max. Based on RAPD Analysis^{1*}

In Sik Kim² and Jung Oh Hyun²

要 約

전나무 천연집단의 유전적 다양성 및 유전적 구조를 추정하기 위해서 RAPD 표지자를 사용하였으며, 이의 통계적 분석에 AMOVA 방법을 이용하였다. 전나무 집단 전체의 평균 다형성 RAPD 표지자 비율은 71.9%였으며, 전체 변이량의 대부분은 집단내 개체간의 차이(80.2%)로 설명이 가능하였다. 집단간의 유전적 분화정도(ϕ_{ST})는 0.198로 조사되었다. 전체 집단을 태백산맥과 소백산맥 두 지역으로 나누어 분석하였을 때, 지역간 차이로 설명할 수 있는 변이량이 8.5%로 나타났으며, 통계적 유의성을 확인할 수 있었다. Bartlett 통계량에 의해 집단간 분산의 이질성을 조사한 결과, 태백산 집단과 가리왕산 집단이 특히 이질적인 것으로 나타났으며, 전반적으로 태백산맥 지역의 집단들이 소백산맥 지역의 집단들 보다 상대적으로 유전적 이질성이 큰 것으로 나타났다. 마지막으로 기존 통계량과의 비교를 통해서 유전변이 분석에 있어서 AMOVA 방법의 적용 가능성에 대해서 논의하였다.

ABSTRACT

On the basis of RAPD analysis, genetic diversity and structure of the natural populations of *Abies holophylla* was estimated by AMOVA procedure. The average value of percent of polymorphic markers was 71.9%. Most variation existed among individuals within population(80.2%). Genetic differentiation among populations(ϕ_{ST}) was 0.198. When the populations were grouped as two region(i.e., Taebaek and Sobaek Mountain Regions), 8.5% of the total genetic variation was explained as regional differences. The heterogeneity of molecular variance among populations was investigated with Bartlett's test, which revealed that populations of Mt. Taebaek and Mt. Gariwang were more heterogeneous. Generally, the populations of Taebaek Mountain Reion were more heterogeneous than those of Sobaek Mountain Reion. Finally, the applicability of AMOVA to the populations genetic study was discussed in comparison with other measures of genetic differentiation which were widely used.

Key words : AMOVA, RAPD, Genetic variation, *Abies holophylla*

緒 論

전나무속(genus *Abies*) 수종은 전세계적으로 미국과 유럽의 북반구에 널리 분포하고 있으며, 지역에 따라 다양한 종으로 분화되어 있다(Fady

와 Conkle, 1993, Palmer와 Parker, 1990). 우리나라에 자생하는 전나무속 수종은 전나무(*Abies holophylla* Maxim.), 구상나무(*A. koreana* Wilson), 분비나무(*A. nephrolepis* Maxim.)의 3가지 종류가 있으며, 자생수종은 아니지만 일본에서 도입

¹ 接受 1999年 6月 8日 Received on June 8, 1999.

² 서울대학교 농업생명과학대학 산림자원학과 Dept. of Forest Resources, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea.

* 이 논문은 '97년도 교육부 학술연구조성비 지원에 의하여 수행되었음.

된 일본전나무(*A. firma* Sieb. et. Zucc.)가 일부지역에서 자라고 있다. 전나무는 전국의 산지에 널리 분포하고 있으며, 수직적으로는 표고 100~1,400m에 분포하고 있는 우리나라 고유수종이다(조, 1989). 전나무는 비옥한 토양에서 잘 자라며 7~8년까지는 매우 느리게 자라지만 그 이상이 되면 생장이 빨라지는 특징을 가지고 있다(임업연구원, 1992).

생물다양성 협약이 발효된 이후로 모든 생물은 유전자원으로서 인식되고 있는데, 이러한 경향은 임목의 경우도 마찬가지이다. 유전자원의 보전을 위해서는 유전자원에 대한 탐색 과정으로서 천연 집단의 유전변이에 대한 조사가 필수적인데, 유전변이에 대한 자료를 통해서 차후의 유전자원 보전 및 육종계획의 수립이 가능하기 때문이다(National Research Council, 1991). 특히, 전나무류는 20세기 후반기에 들어와서 그 생장이 현저하게 둔화되어 왔었다고 보고되어 진 수종(김, 1994)으로서 국내에서도 전나무 유전자원 보전과 관련된 유전학적인 연구가 시급히 요구된다고 하겠다. 그러나, 현재까지 이루어진 국내의 전나무 수종에 대한 유전변이 연구는 소나무나 참나무류와 비교했을 때 매우 미비한 실정으로 안(1997)에 의한 전나무 유전변이 연구, 손(1989)에 의한 분비나무의 형태변이 및 유전변이 연구 그리고 심 등(1984)과 정과 이(1985)에 의한 구상나무의 유전양식 및 변이 연구가 있을 뿐이다.

천연집단의 유전변이 분석에는 1970년대 이후에 동위효소 표지자를 사용한 분석이 주류를 이루어 왔는데 최근에는 보다 해상력이 높은 DNA 표지자를 이용한 분석이 활발하게 이루어지고 있다. 특히, RAPD(randomly amplified polymorphic DNA) 분석방법은 RFLP(restriction fragment length polymorphism) 방법보다 빠르고 간편한 방법으로서 유전변이 분석, 품종구분 및 유전자지

도 작성 등에 그 이용성이 높은 것으로 알려져 있다(Williams 등, 1990; 1992; Hadrys 등, 1992). 그러나 RAPD 표지자는 우성(dominant) 표지자로서 이배체 개체를 대상으로 유전변이 분석을 수행하고자 할 경우 모수의 유전자형을 추정하지 못하는 단점이 있어, 반수체 조직인 배유를 가지고 있는 침엽수를 제외한 기타 환엽수종의 유전변이 연구에 적용하는데 한계점을 가지고 있다. 이에 대해 Excoffier 등(1992)은 AMOVA(analysis of molecular variance) 방법을 제안하였는데, AMOVA 방법은 이배체 개체의 유전자형을 추정할 수 없는 경우에도 집단간 및 집단내 개체간의 유전변이를 분산분석을 통해서 파악할 수 있는 방법으로서 환엽수를 포함한 모든 수종에 대한 적용이 가능한 장점을 가지고 있다(Liu와 Furnier, 1993).

이에 본 연구에서는 국내 전나무 천연집단에 대한 유전자원 보전에 필요한 유전변이 양상을 파악하기 위해서 RAPD 표지자를 사용하여 각 집단의 유전적 다양성을 조사하였으며, 자료의 분석에는 AMOVA 방법을 적용하였다.

材料 및 方法

1. 시료채취

전나무 천연집단의 유전변이를 조사하기 위해서 설악산, 가리왕산, 태백산, 속리산, 덕유산, 지리산 백사골, 지리산 백부동의 7개 집단을 대상으로 집단당 20개체에서 집음을 채취하였다. 집단내 개체들의 간격은 최소 50m 이상을 유지하였다(Table 1).

2. 침엽 DNA의 분리 및 RAPD PCR

침엽 DNA를 분리하기 위한 방법은 Huff 등(1993)의 방법을 변형하여 사용하였으며, 자세한 분리과정은 다음과 같다. 채집된 침엽을 멸균수

Table 1. Site description and number of samples collected

Population	Latitude	Longitude	Altitude	No. of samples collected
Mt. Sorak	38° 07'N	128 22'E	1,000 - 1,400m	20
Mt. Gariwang	37° 28'N	128 33'E	800 - 1,000m	20
Mt. Taebaek	37° 06'N	128 56'E	600 - 900m	20
Mt. Songni	36° 36'N	127 51'E	700 - 800m	20
Mt. Dukyou	35° 47'N	127 39'E	800 - 900m	20
Mt. Chiri Bamsagol	35° 18'N	127 41'E	800 - 900m	20
Bakmudong	35° 16'N	127 48'E	1,000 - 1,050m	20

로 표면세척한 다음, 막자사발에 넣고 액체질소를 첨가한 후 완전히 마쇄하였다. 마쇄한 분말을 1.5ml Eppendorf centrifuge tube에 옮긴 후 300 μ l의 DNA extraction buffer(100mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 50mM EDTA, 1% SDS, 10mM, β -mercaptoethanol, 0.1% PVP(M.W 360,000))와 300 μ l의 5M potassium acetate 용액을 첨가하고 완전히 섞이도록 흔들어서 다음 65 $^{\circ}$ C에서 15분간 증탕을 하고 얼음위에 10분간 정치하였다. 여기에 600 μ l의 chloroform/isoamylalcohol (24 : 1, v/v)를 첨가하고 4-5분정도 흔들어서 13,000 x g에서 10분간 원심분리를 한 다음, 상등액을 새로운 tube에 옮겨주었다. 이 용액에 100 μ l의 10M ammoniumacetate와 600 μ l의 isopropanol (-20° C)을 첨가하여, -20° C에 1시간 정도 정치한 후, 10,000 x g에서 15분간 원심분리를 하여 DNA pellet을 회수한 다음, 500 μ l의 80% ethanol용액을 첨가하여 분수층을 제거하고 기건시켰다. 100 μ l의 TE buffer를 첨가하여 pellet을 녹인 후, UV-spectrophotometer를 사용하여 260nm/280nm에서 농도 및 순도를 측정 한 후, 흡광도 비율이 1.8이상이었을 때, 25ng/ μ l의 농도로 희석하여 RAPD 분석에 사용하였다.

RAPD PCR은 25 μ l의 반응용액에 1 unit Taq. DNA polymerase, 1.5mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 40ng primer, 50ng template DNA, 0.025% BSA, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH8.3)를 첨가하고 94 $^{\circ}$ C/5초, 36 $^{\circ}$ C/60초, 72 $^{\circ}$ C/70초의 과정을 45회 반복한 후, 72 $^{\circ}$ C/5분간 반응시키는 조건을 사용하였다. 한편, 본 실험에 사용된 PCR thermal cycler는 capillary tube를 사용하는 air-flow방식(대한메디칼社 FTC-2000)으로 ramp time은 1 \times /0.2초이다.

3. Primer의 선별 및 자료수집

RAPD 분석에 사용하는 primer는 임의의 임기 서열을 가지고 있는 10 bp 정도의 single strand oligonucleotide로서 다양한 수의 primer를 사용하여 분석을 수행할 수 있는 장점이 있으나 사용하는 primer에 따라 증폭되는 band의 양상 및 선명도가 크게 달라지기 때문에 실험에 앞서 반드시 primer의 선별 과정을 거쳐야 한다(Williams 등, 1990; Welsh 등, 1991). 본 실험에서는 primer 선별을 위해서 UBC(University of British Columbia)에서 제작된 600 series primer중 일부(47개)와 서

울대학교 유전공학 연구소에 제작 의뢰한 primer (10개, 김, 1995) 등 총 57개 primer를 사용하였으며, 공시재료로는 무작위로 추출한 전나무 10개체의 침엽 DNA를 사용하였다. PCR 증폭 결과 band의 선명성과 다형성을 조사하였으며, 이를 통해서 최종적으로 10개의 primer를 선별하였다(Appendix 1). 선별된 10개의 primer에서 증폭된 표지자의 수는 총 189개 있으며, 증폭된 band의 크기는 최대 2.6kb에서 최소 350bp까지 다양하게 나타났다. RAPD PCR 반응 결과 나타나는 각각의 band는 대부분 서로 독립적인 유전자좌에 존재하는 표지자로 알려져 있어(Yu와 Pauls, 1993), RAPD PCR 반응 결과 얻어진 표지자를 각각 유(1), 무(0)의 형태로 구분하여 계산하였다.

4. AMOVA를 이용한 유전변이 분석

AMOVA는 Cockerham(1973)이 제안한 '계 수준에서의 분산분석'을 응용하여 Excoffier 등(1992)이 유전변이 분석에 적용할 수 있도록 고안한 방법으로 직분분석법(Nested design)에 기초한 분석방법이다. 전체 개체간의 유전적 거리를 구한 후 유전적 거리값을 지역, 집단, 개체로 나누어 분산을 구함으로써 각 수준에서의 유전변이량과 집단간의 유전적인 분화정도(Φ_{ST})를 추정할 수 있다.

한편, AMOVA분석을 실시하기 전에 결과 분석상의 偏倚를 없애기 위해서 단형성 표지자와 하나의 집단에만 나타나는 표지자(singleton)을 제외해야 하는데(Armstrong 등, 1994), 전나무의 경우는 증폭된 189개 RAPD 표지자 중에서 단형성을 나타내는 표지자는 없었으나, 한 집단에만 나타나는 표지자는 2개로 나타나 이를 제외한 총 187개 RAPD 표지자를 분석에 이용하였다. 전나무 집단의 유전변이 분석을 위해서 유(1), 무(0) 자료를 거리행렬(distance matrix) 자료로 전환하였는데 거리행렬 계산에는 Excoffier(1992)의 distance를 사용하였고 자료의 계산에는 RAPDistance(ver. 1.04; Armstrong 등, 1994) program을 사용하였다. 계산에 사용된 수식은 다음과 같다.

$$\text{Excoffier's distance} = n \times (1 - n_{11}/n)$$

n : total number of polymorphism band positions
 n_{11} : the number of positions where $x=1$ and $y=1$

Table 2. General design for hierarchical analysis of molecular variance(Excoffier et. al, 1992)

Source of variance	d.f.	MSD	FMS
Among regions	G-1	MSD/(AG)	$\sigma_c^2 + n' \sigma_b^2 + n'' \sigma_a^2$
Among populations within regions	$\sum_{g=1}^G I_g - G$	MSD/(AP/WG)	$\sigma_c^2 + n \sigma_b^2$
Among individuals within populations	$N - \sum_{g=1}^G I_g$	MSD/(WP)	σ_c^2
Total	N-1		

G : number of regions I_g : number of populations at gth region N : total number of individuals

전환된 거리행렬을 사용하여 AMOVA 분석을 수행하였으며, AMOVA 분석에 이용되는 일반적인 모형을 표 2에 나타냈다.

분산의 동질성(homogeneity of variance)은 분산분석의 전제조건으로서 이 가정을 만족하지 못할 경우 비록 집단의 평균이 차이가 난다하더라도 통계적 의미가 유효하지 못하다(Sokal과 Rohlf, 1973). 그러나 AMOVA분석과 같이 분자 표지자를 사용하여 집단의 분산을 분석할 경우, 이러한 가정을 만족하지 않더라도 집단의 분산성분을 통해서 유전적인 차이를 설명할 수가 있으며, Bartlett test를 통해서 유의성을 검정할 수 있다(Stewart와 Excoffier, 1996). 따라서, 본 연구에서는 각 집단별 유전변이 정도 및 유전적 이질성을 파악하기 위해서 집단별 분산을 구하였으며, Bartlett test를 실시하였다. 이상의 자료분석에는 AMOVA program(ver. 1.55; Excoffier, 1995)을 사용하였다.

結果 및 考察

1. 유전적 다양성

선나무 집단의 유전적 다양성을 조사하기 위해서 각 집단별로 RAPD 표지자의 다형성 비율과 primer당 평균 다형성 표지자의 수를 살펴보았으며, AMOVA 분석결과 얻어진 각 집단의 분산성분을 비교하였다(Table 3).

다형성 RAPD 표지자의 비율은 숙리산 집단이 83.4%로서 가장 높았으며, 덕유산 집단과 태백산 집단이 각각 62.3%, 61.2%로서 비교적 낮은 것으로 조사되었다. 선나무 집단 전체의 평균 다형성 RAPD 표지자의 비율은 71.9%였고 primer당 평균 다형성 표지자의 수는 13.6 ± 2.07로 나타났다. 각 집단의 분산을 살펴보면, 지리산 뱀사골 집단이 25.21로서 가장 변이폭이 컸으며, 덕유산 집단이 13.75로 가장 작았다. 다형성 표지자의 비율에서 얻어진 결과와 비교하면 순위상에서 약

Table 3. Percent of polymorphic RAPD marker and mean number of polymorphic markers per primer of *A. holophylla* populations

Populations	P(%)*	Mean number**	Variance***
Mt. Sorak	72.9	13.8 ± 2.11	18.69
Mt. Gariwang	78.1	14.8 ± 1.84	16.79
Mt. Taebaek	61.2	11.6 ± 2.24	13.86
Mt. Songni	83.4	15.8 ± 1.62	19.45
Mt. Dukyou	62.3	11.8 ± 2.26	13.75
Mt. Chiri Bakmudong	69.7	13.2 ± 2.29	18.81
" Bamsagol	74.9	14.2 ± 1.72	25.21
Average	71.9	13.6 ± 2.07	

* percent of polymorphic RAPD marker

** Mean number of polymorphic markers per primer used

*** Within population variance based on AMOVA

간의 차이가 있으나 다형성 표지자의 비율이 높은 집단이 분산의 폭도 큰 것으로 나타났다.

기준에 RAPD분석을 통해서 얻어진 값들을 살펴보면, 본 연구에서 얻어진 수치는 Yeh 등(1995)이 *Populus tremuloides* Michx.에서 얻은 90.2%와 Szmidt 등(1996)이 *Pinus sylvestris*에서 얻은 90.9%, 그리고 김 등(1995)이 국내 소나무집단을 대상으로 조사하여 얻은 수치인 95.2% 보다는 낮은 수치이나, Vicario 등(1995)이 *Abies alba*와 *A. nebrodensis*를 대상으로 분석한 결과인 65% 보다는 높은 수치를 얻을 수 있다. 일반적으로 RAPD 표지자를 사용할 경우 동위효소 표지자를 사용한 경우 보다 높은 다형성을 나타내는 것으로 알려져 있는데(Peakall 등, 1995; Vicario 등, 1995; Liu와 Furnier, 1993), 동위효소 표지자를 사용한 기준의 연구에서 나타난 나자식물의 평균 다형성 유전자좌의 비율이 71.7%라는 것을 감안할 때(Hamrick 등, 1992), 국내 전나무 집단은 비교적 유전변이가 적은 것으로 생각된다. 이러한 경향은 안(1997)에 의한 동위효소를 이용한 연구에서도 나타나는데, 전나무의 다형성 유전자좌의 비율이 평균 52.0%로서 조사되어 소나무나 곰솔보다 낮은 것으로 보고하고 있다. 또한 본 연구와 같은 다형성 비율을 조사한 자료는 아니지만 Hamrick 등(1992)에 의하면, 나자식물중에서 *Abies*속 수종의 이형접합자율은 *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga*와 비교해서 낮은 편이라고 하여 *Abies*속 수종이 나자식물중 비교적 낮은 유전적 다양성을 가지고 있음을 시사할 수 있다.

일반적으로 수목들의 유전적 다양성은 지리적 분포범위, 교배양식, 전이 단계에 따라서 각기 다르게 나타난다. 분포지가 지역적으로 제한되어 있는 수종들은 분포지가 넓은 수종들보다 유전적 다

양성이 낮게 관찰되며, 교배양식의 경우는 풍매에 의한 타가수분을 선호하는 수종의 유전적 다양성이 가장 높다. 전이단계에 따라서는 극상수종일수록 유전적 다양성이 낮은 것으로 알려져 있다(Hamrick 등, 1992). 전나무는 소나무와 마찬가지로 풍매에 의한 타가수분을 주로 하며, 내음성이 강해 전이의 마지막 단계인 극상수종에 해당한다(이 등, 1996). 이러한 점을 고려할 때 전나무의 유전적 다양성이 낮게 나타난 것은 위에서 언급한 범주에 속하는 수종의 특징을 반영한다고 하겠으며, 역사적으로는 빙하기의 기후변화에 따른 이주 및 집단크기 감소과정을 통해서 이러한 결과가 나타났을 가능성도 생각해 볼 수 있어 이에 대한 연구가 필요한 것으로 생각된다.

2. 집단의 유전적 구조 및 유연관계

전나무 집단을 지역 구분없이 분석하였을 경우 전체 변이중 집단간 차이로 설명할 수 있는 변이량은 19.8%였고, 집단내 개체간 차이로 설명할 수 있는 변이량은 80.2%였다. 임목집단의 경우는 다른 식물종이나 동물에 비해서 집단내 개체간의 유전변이가 더 큰 것으로 알려져 있으며, 지금까지의 여러연구를 살펴볼 때 이러한 경향은 임목집단의 전형적인 유전변이 분포양상인 것으로 생각된다(Bergmann 등, 1990; Diebel과 Feret, 1990; Fady와 Conkle, 1993; Hamrick 등, 1992).

전나무 집단을 태백산맥 지역(철악산, 태백산, 가리왕산)과 소백산맥(지리산, 백사골, 지리산 백무동, 덕유산, 속리산)의 두 지역으로 나누어 분석했을 경우, 전체 변이량중 지역간의 차이로 설명이 가능한 변이량은 8.5%였으며, 통계적으로 유의성이 있는 것으로 나타나 전나무 집단의 유전적 분화에 있어서 태백산맥과 소백산맥이라는

Table 4. Analysis of molecular variance for 140 individuals sampled from 7 populations of *Abies holophylla* Maxim. using 187 RAPD markers

Source of variance	d.f	SS	MS	variance component	% total	p-value
among regions	1	232.909	232.909	2.0970	8.51	
among populations within regions	5	445.5625	89.112	3.5039	14.22	<0.004
among individuals within populations	133	2531.6	19.035	19.0346	77.26	
among populations	6	678.4714	113.079	4.7022	19.81	
among individuals within populations	133	2531.6	19.035	19.0345	80.19	<0.004
among regions	1	232.909	232.909	3.0819	12.50	
among individuals within regions	138	2977.1625	21.574	21.5736	87.50	<0.004

지형적인 구조가 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 이러한 점은 집단을 구분하지 않고 지역으로만 구분했을 경우에 더 명확하게 살펴볼 수 있는데, 지역간의 차이로 설명할 수 있는 변이량은 12.5%였으며, 지역내 개체간의 차이로 설명할 수 있는 변이량은 87.5%로 나타나고 있으며, 통계적으로 유의한 것으로 나타났다(Table 4).

전나무 집단간의 유전적 유연관계를 살펴보면, 전나무 집단은 소백산맥과 태백산맥 지역의 두 분지군으로 뚜렷하게 나누어지고 있으며, 두 분지군의 유전자거리는 0.27로서 나타났다. 각 지역내 집단간의 유전적 거리를 살펴보면, 태백산맥 지역내 집단들의 유전적 거리가 소백산맥 지역내 집단들 경우보다 먼 것으로 나타나고 있어, 태백산맥 지역내 집단들의 유전적 분화정도가 상대적으로 크다는 것을 알 수 있다. 지리산 백무동과 뱀사골 집단은 유전적 거리가 0.04로서 두 집단간의 분화정도가 매우 낮은 것으로 나타났다. 전반적으로 유연관계도를 살펴보면 전나무 집단들의 유전적 거리는 지리적인 거리와 잘 부합되고 있음을 알 수 있다.

3. 집단간의 유전적 이질성

집단간 유전적 이질성을 조사하기 위해서 Bartlett test를 실시한 결과(Table 5), 가리왕산과 태백산 집단은 여타의 집단들과 유전적으로 이질적임을 알 수 있다. 속리산 집단의 경우는 지리산 뱀사골 집단을 제외한 다른 집단들과의 유전적 이질성을 확인할 수 있었다. 이에 비해서 지리산 뱀사골 집단은 태백산 집단을 제외한 다른 집단들과는 유전적으로 이질적이지 않은 것으로 나타났다. 한편, 두 지역간의 유전적 이질성을 조사한 결과, 유의성이 있는 것으로 나타나, 앞에서 살펴본 바와 같이 태백산맥 지역과 소백산맥 지역간에 상당한 유전적 분화가 이루어진 것을 알 수 있다. 이처럼 분산분석을 이용하여 각 집단의 분산을 구하고 각 집단의 분산이 실제로 이질적인지 여부를 Bartlett test를 통해서 확인함으로써 비교대상 집단간의 유전적 다양성 및 이질성을 쉽게 구할 수 있는 것이 AMOVA의 장점이라고 할 수 있다 (Stewart와 Excoffier, 1996). 따라서, AMOVA 분석결과를 통해서 유전자원 보전 계획 수립시 우선적으로 고려해야 할 집단의 선정에 도움을 줄

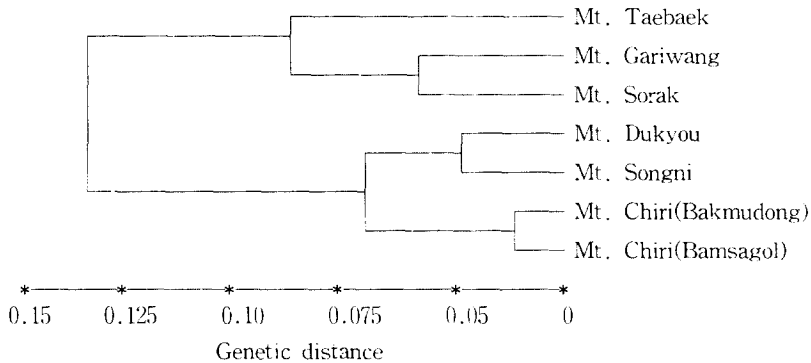


Fig. 1. UPGMA tree of *Abies holophylla* populations

Table 5. Pairwise Bartlett's tests in *Abies holophylla* populations.

Population	Mt. Taebaek	Mt. Sorak	Mt. Dukyou	Mt. Chiri Bakmudong	Mt. Songni	Mt. Chiri Bamsagol
Mt. Sorak	5.7051*					
Mt. Dukyou	6.9504**	7.2555**				
Mt. Chiri Bakmudong	7.3250**	5.3399*	3.5065n.s			
Mt. Songni	9.7932**	6.7656**	7.1973**	4.5763*		
Mt. Chiri Bamsagol	4.2503*	2.2074n.s	3.3506n.s	1.2175n.s	0.2669n.s	
Mt. Gariwang	9.8035**	6.7061**	9.7197**	8.0391**	8.5632**	6.8207**

* : $\alpha=0.05$, ** : $\alpha=0.01$, ns : not significant

수 있다. 지리산 뱀사골 집단과 분산값이 크게 나타나 유전적 다양성이 높기는 하지만(Table 3), 실제로 다른 집단들과 유전적으로 이질적이지 않다는 결론을 얻을 수 있다. 이에 비해서 태백산 집단과 가리왕산 집단은 다른 집단에 비해서 유전적 다양성은 높지 않으나 여타의 집단과 유전적으로 이질적이기 때문에 유전자원 보전 사업에 있어서 우선적인 고려대상이 될 수 있을 것이다.

4. 집단의 유전적분화(Φ_{ST}) 및 기존통계량과의 비교

전나무 집단간의 유전적 분화정도(Φ_{ST})는 0.198로 나타났는데, Hamrick 등(1992)에 의해서 제시된 동위효소를 이용한 연구에서 얻어진 침엽수의 평균치인 0.068(= G_{ST}) 보다 매우 높은 값을 알 수 있다. 안(1997)에 의한 국내 전나무 유전변이 연구를 보면, 12개 전연집단에 대한 동위효소 분석결과 얻은 집단간의 유전적 분화수치(F_{ST})는 0.062였으며, 정과 이(1985)에 의한 동위효소 표지자를 이용한 구상나무 전연집단의 유전변이 분석에서는 집단간의 유전적 분화정도(G_{ST})가 0.0295로 보고된 바 있다.

이러한 두가지 표지자의 특성에 대해서 Vicario 등(1995)은 *Abies alba*와 *A. nebrodensis* 전연집단에 대해서 RAPD 표지자를 사용하여 분석한 결과 Φ_{ST} 수치가 0.16으로 나타났으며, 동위효소 표지자를 사용했을 때 G_{ST} 수치가 0.11로 나타나, 두 가지 표지자를 사용했을 때 집단의 유전적 분화 정도가 유사하게 나타났다고 보고한 바 있다. 그러나 기존의 연구를 살펴보면 RAPD 표지자를 사용한 경우 동위효소 표지자를 사용했을 때 보다 다형성 비율이나 집단의 분화정도가 크게 나타나는 것이 일반적이다(Carlson 등, 1991; Liu와 Furnier, 1993; Szmidi 등, 1996). Baruffi 등(1995)의 연구에서도 이러한 경향을 언급하였는데, *Ceratitidis capitata*에 대한 연구에서 RAPD 표지자를 사용했을 경우 동위효소 표지자를 사용한 경우보다 더 많은 변이를 찾아낼 수 있었으며, 다형성 비율과 집단의 유전적 거리는 RAPD 표지자의 경우가 2배 정도 크게 나타나고 있다. 이에 대해서 Bucci 등(1997)은 RAPD 표지자는 genome의 noncoding 지역에 있는 반복(repetitive) DNA들로부터 증폭되는 것으로 예측하였는데, 이러한 지역은 종간이나 종내에서 진화 속도가 빠른 지역으로 알려져 있어 RAPD 분석을 수행할 경

우 동위효소 표지자 보다 높은 수치를 나타낼 것으로 추정할 바 있다. Szmidi 등(1996)은 *Pinus sylvestris*에 대한 연구에서 두 가지 표지자의 특성을 비교하였는데, RAPD 표지자를 사용하여 개체의 완전한 유전자형을 확인할 수 있는 경우(예로서, 침엽수의 배유조직 이용)에는 동위효소 표지자와 마찬가지로 집단의 유전구조 분석에 효과적으로 사용할 수 있다고 하였다. 그러나 이배체 조직을 사용하여 얻은 자료를 Lynch와 Milligan(1994)이 제안한 방법처럼 Hardy-Weinberg 조건을 만족한다는 가정하에서 분석했을 경우에도 부정확한 결과를 도출할 수 있다고 하였으며, 특히 침엽수 경우에는 일반적으로 이형접합자 과다현상이 있어 그 편이 정도가 더 크게 나타날 수 있다고 하였다.

동일한 RAPD 표지자를 사용하더라도 분석방법에 따라서 집단의 분화정도를 나타내는 수치는 다르게 나올 수 있다. 강(1997)은 이배체 시료를 사용한 AMOVA에서 얻어진 결과와 반수체시료를 사용하여 모수의 유전자형을 추정된 후 Wright의 F 통계량을 사용하여 얻어진 결과를 비교한 바 있는데, AMOVA에서 얻어진 수치(0.258)가 약 2배정도 높은 것으로 조사되었다. 이처럼 RAPD 표지자는 표지자의 특성상 과대치를 나타낼 가능성이 상존하고 있어 문제점으로 지적되고 있지만 기존의 연구들을 살펴보면 RAPD 표지자를 사용한 연구결과는 동위효소에 의한 연구결과와 그 경향이 일치되는 것으로 알려져 있어(Lifante와 Aguinagalde, 1996; Vicario 등, 1995; Isabel 등, 1995), RAPD 표지자를 집단의 유전변이 및 유전적구조 분석에 적용하여도 무리가 없을 것으로 생각되며, 보다 많은 수종을 대상으로 RAPD 표지자를 이용한 분석이 수행됨으로써 축적된 자료에 근거한 RAPD 표지자의 변이에 대한 해석기준이 마련되어야 할 것으로 생각한다.

한편, 동일한 속성의 자료를 사용하더라도 분석방법에 따라 집단의 분화정도를 나타내는 수치가 달라질 수 있다. 본 연구에서 얻어진 집단의 유전적 분화수치와 기존에 빈번하게 이용되고 있는 Wright(1969)의 F_{ST} , Weir와 Cockerham(1984)의 θ 및 Lynch와 Milligan(1994)의 기준에 따른 F_{ST} 등의 통계량을 비교하여 분석방법에 따른 차이를 살펴보았다(Table 6).

Wright의 F_{ST} 값은 광우성 표지자에 적용하는 방법으로서 완전한 유전자형을 추정할 수 있을

Table 6. Comparison of the measures of population subdivision obtained by different methods in *Abies holophylla*.

Species	Φ_{ST}	F_{ST}	θ	F_{ST} (Lynch)
<i>Abies holophylla</i>	0.198	0.183	0.181	0.314

때 적용이 가능하다. 그러나 RAPD 표지자는 우성 표지자로서 이 수치의 직접 적용이 곤란하다. 따라서, RAPD 유전자좌가 모든 아집단들에서 Hardy-Weinberg 평형상태에 있으며, 각 유전자좌에서 우성이라는 가정하에서만 적용이 가능하다. 이러한 가정하에서 계산한 결과 Φ_{ST} 보다는 작은 수치를 보여주고 있는데, 실제 자연집단은 Hardy-Weinberg 평형을 만족하는 집단이 존재할 수 없어 이러한 가정에 의한 계산은 편의된 수치를 얻을 수밖에 없는 한계가 있다.

Weir와 Cockerham의 θ 값은 분산분석을 응용한 방법으로서 기본적으로는 Wright의 F_{ST} 와 유사한 통계량이나 sample 수가 적거나 sample의 크기가 다를 경우에 적용이 가능하도록 보정한 수치이다. 대체로 θ 와 F_{ST} 는 유사한 값을 나타내나, F_{ST} 가 과대치를 보이는 반면 θ 는 과소치를 보이는 경향이 있는데, Apostol 등(1996)은 F_{ST} 와 θ 값의 차이가 나타나는 것은 이형접합자 추정에서 분산과 공분산에 대한 보정에 따른 차이라고 설명하고 있다. 한편, Slatkin과 Barton(1989)은 F_{ST} 와 θ 를 여러 가지 조건하에서 비교한 결과 집단이 안정적일 때는 두가지 방법 모두 유사한 결과를 나타내지만, 실제 자연조건하에서는 F_{ST} 값이 보다 나은 결과를 나타낸다고 하였다.

Lynch와 Milligan(1994)의 F_{ST} 의 경우는 Hardy - Weinberg 평형을 만족한다는 가정하에서 null allele 빈도로부터 이형접합자율을 추정하고 있는데 작은 수의 표본추출에 의한 편의를 없애기 위해서 $Nq^2 > 3$ 인 조건을 만족하는 대립유전자만을 선별하여 계산할 것을 제안하고 있다. 이 수치의 경우는 나머지 세가지 수치보다 과대치로 나타나고 있는데, Black(1995)도 위의 네 가지 수치의 비교에서 Lynch와 Milligan의 F_{ST} 가 과대치로 나타난다고 하였다. Lynch와 Milligan(1994)이 제안한 기준에 의해서 대립유전자를 선별할 경우 동형접합으로 존재하는 유전자좌가 제외되는 경향이 강하며, 집단에 따라 제외되는 대립유전자가 다를 수 있다. RAPD와 같은 공우성 표지자

를 사용할 경우 집단간 및 집단내 개체간 유전적 분화정도의 추정에 편의가 발생할 수 있어, 이를 피하기 위해서는 적어도 집단당 100개체의 표본을 추출해야 하며, 50개이상의 표지자를 사용해야 한다고 제안한 바 있다(Lynch와 Milligan, 1994). 그러나 이러한 제안은 다수의 집단을 분석할 경우에는 경제적인 면에서 현실성이 없는 제안으로 생각된다.

이상에서 살펴본 것처럼 서로 다른 통계량을 적용할 경우 각 통계량에 따른 가정과 계산방법에 따라서 집단의 유전적 분화수치가 각기 다르게 나타나고 있으나 앞에서 살펴본 것처럼 네 가지 통계량 모두가 동위효소를 통한 연구에서 얻어진 수치보다 과다하게 나타나고 있음을 알 수 있다. 이러한 문제는 Szmidt 등(1996)이 언급한 것처럼 우성 표지자인 RAPD 표지자의 한계로 생각된다. 그러나 RAPD 표지자는 동위효소 보다 더 많은 변이를 확인할 수 있는 방법이며 전체 genome을 폭 넓게 탐색할 수 있는 방법이기 때문에 clone 동정과 식물분류 연구 및 집단의 유전적 구조 분석과 유전자원 보전 연구에 유리한 면을 가지고 있다(Szmidt 등, 1996; Cacccone 등, 1997; Avise, 1994). 따라서 기존에 Hamrick 등(1992)이 동위효소를 사용하여 기 수행된 연구를 종합하여 정리한 것처럼 RAPD 표지자를 사용한 연구자료의 축적을 통한 표지자의 특성 및 통계량에 따른 차이를 극복할 수 있는 종합적인 기준이 마련되어야 할 것으로 생각된다.

結 論

우리나라의 대표적인 고산수종인 전나무 천연 집단의 유전자원보전에 필요한 기초자료를 축적하기 위해서 RAPD 표지자와 AMOVA 분석방법을 적용하여 각 집단내의 유전적 다양성과 집단간의 유전적 분화정도를 조사하였다. 전나무 집단의 평균 다형성 band 비율은 71.9%였으며, 각 집단별로는 속리산 집단이 83.4%로 가장 높았고, 태백산 집단이 61.2%로 가장 낮은 것으로 조사되었다. 유전적 다양성 분석결과, 전체변이량의 80.2%는 집단내 개체간의 차이에서 기인하며, 집단의 유전적 분화정도(Φ_{ST})는 0.198로 나타났다. 전체집단을 태백산맥과 소백산맥의 두 지역으로 구분하여 분석한 결과, 지역간의 차이로 설명 가능한 변이량은 8.5%로 나타났으며,

통계적으로 유의성이 있는 것으로 조사되었다. 각 집단 간의 분산을 비교한 결과, 지리산 뱀사골 집단이 25.2로서 가장 높았고, 덕유산 집단이 13.8로서 가장 낮았다. Bartlett의 통계량을 사용하여 집단 간 분산의 이질성을 비교한 결과, 가리왕산 집단과 태백산 집단은 특히 유전적 이질성이 큰 것으로 조사되어 유전자원 보전사업에 있어서 우선적인 고려대상이 될 수 있을 것으로 생각된다. UPGMA 방법에 의해서 각 집단의 유전적 유연관계를 조사한 결과, 태백산맥 지역 집단과 소백산맥 지역 집단의 구분이 뚜렷하였으며, 지리적 인 분포와도 일치되는 경향을 보여주었다. 아울러 기존의 분석방법과 AMOVA 방법의 비교를 통해 유전변이 분석에 있어서 AMOVA 방법의 적용에 대해서 논의하였다.

引用 文 獻

1. 강범용. 1997. AMOVA 분석을 이용한 소나무 천연집단의 유전변이 연구. 서울대학교 석사학위논문.
2. 김용욱. 1995. RAPD 분석에 의한 소나무 10개 천연집단의 유전변이 연구. 서울대학교 박사학위 논문.
3. 김은식. 1994. 환경변화와 고산시대 수목생장 쇠퇴현상과 상관성 해석. 한국과학재단보고서. pp.89.
4. 손두식. 1989. 분비나무 중 천연림의 유전적, 형태적 변이조사에 관한 연구. 농지논문집(산학협동편) 32 : 531-538.
5. 심상영·정현관·이석구. 1984. *Abies koreana*의 5종류 Polymorphic Isozyme의 유전분석. 임육연보. 20 : 95-101.
6. 안진권. 1997. 전나무 천연집단의 동위효소에 의한 유전변이와 생장 및 침엽의 형태적 특성. 경북대학교 대학원. 박사학위논문. pp.96.
7. 이경준·한상섭·김지홍·김은식. 1996. 산림생태학. 향문사. pp.395.
8. 임업연구원. 1992. 한국수목도감. 산림청. pp.562.
9. 정현관·이석구. 1985. *Abies koreana* 9개 천연림 집단의 동위효소 실험에 의한 유전분석. 임목육종연구보고 21 : 89-95.
10. 조무연. 1989. 원색한국수목도감. 아카데미서적. pp.498.
11. Armstrong, J., A. Gibbs, R. Peakall, and G. Weiller. 1994. The RAPDistance Package (version 1.04). Distributed by the author. Australian National Univ., Canberra, Australia.
12. Apostol, B.L., W.C. Black, P. Reiter, and B.R. Miller. 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers : the breeding structure of *Acedes aegypti* in Puerto Rico. Heredity 76 : 325-334.
13. Avise, J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, New York. pp.511.
14. Baruffi, L., G. Damiani, C.R. Guglielmino, C. Bandi, A.R. Malacrida, and G. Gasperi. 1995. Polymorphism within and between populations of *Ceratitidis capitata* : comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. Heredity 74 : 425-437.
15. Bergmann, F., H.-R. Gregorius and J.B. Larsen. 1990. Levels of genetic variation in European silver fir(*Abies alba*) : Are they related to the species' decline?. Genetics 82 : 1-10.
16. Black, B. 1995. RAPDFST 3.0 - A FORTRAN Program to estimate F(ST) and effective migration rate among subpopulations using RAPD-PCR files. Department of Microbiology, Colorado State University.
17. Bucci, G., G.G. Vendramin, L. Lelli, and F. Vicario. 1997. Assessing the genetic divergence of *Pinus leucodermis* Ant. endangered populations : use of molecular markers for conservation purposes. Theor. Appl. Genet. 95 : 1138-1146.
18. Cacccone, A., G. Allegrucci, C. Fortunato, and V. Sbordoni. 1997. Genetic differentiation within the European sea bass(*D. labrax*) as revealed by RAPD-PCR assays. J. Heredity 88 : 316-324.
19. Carlson, J.E., L.K. Tulsieram, J.C. Glaubitz, V.W.K. Luk, C. Kauffeldt and R. Rutledge. 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F₁ progeny of conifers. Theor. Appl. Genet. 83 : 194-200.
20. Cockerham, C. 1973. Analysis of gene fre-

- quencies. *Genetics* 74 : 679-700.
21. Diebel, K.E. and P.P. Feret. 1990. Isozyme variation within the Fraser fir(*Abies fraseri* (Pursh) Poir.) population on Mount Rogers, Virginia : Lack of Microgeographic Differentiation. *Silvae Genetica* 40 : 79-85.
 22. Excoffier, L. 1995. AMOVA version 1.55.
 23. Excoffier, L., P. Smouse, and J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131 : 479-491.
 24. Fady, B. and M.T. Conkle. 1993. Allozyme Variation and Possible Phylogenetic Implication in *Abies cephalonica* Loudon and Some Related Eastern Mediterranean Firs. *Silvae Genetica* 42 : 351-359.
 25. Hadrys, H., M. Balick, and B. Schierwater. 1992. Applications of RAPD in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1 : 55-63.
 26. Hamrick, J., M. Godt, and S. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *In* Population Genetics of Forest Trees. *Ed by* W. Adams *et al.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 95-124.
 27. Huff, D., R. Peakall, and P. Smouse. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss(*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.). *TAG* 86 : 927-934.
 28. Isabel, N., J. Beaulieu, J. Bousquet. 1995. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 6369-6373.
 29. Lifante, Z.D., and I. Aguinalgalde. 1996. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the study of taxonomical relationships among species of *Asphodelus* sect. *verinea*(*Asphodelaceae*). *Am. J. Botany* 83 : 949-953.
 30. Liu, Z. and G. Furnier. 1993. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theor. Appl. Genet.* 87 : 97-105.
 31. Lynch, M. and G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3 : 91-99.
 32. National Research Council. 1991. Managing Global Genetic Resources. National Academy Press. Washinton, D. C. pp.228.
 33. Palmer, C.L., and W.H. Parker. 1990. Phenotypic variation in Yukon populations of subalpine fir. *Can. J. Bot.* 69 : 1491-1500.
 34. Peakall, R., P. Smouse, and D. Huff. 1995. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Mol. Ecol.* 4 : 135-147.
 35. Slatkin, M. and Barton, N.H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43 : 1349-1368.
 36. Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. 1973. *Biostatistics*. W.H. Freeman and Company. San Francisco. pp.368.
 37. Stewart, C.N. Jr. and L. Excoffier. 1996. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data : Application to *Vaccinium macrocarpon*(American Cranberry). *J. Evol. Biol.* 9 : 153-171.
 38. Szmidt, A.E., X-R Wang, and M-Z. Lu. 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris*(L.) using haploid tissue analysis. *Heredity* 76 : 412-420.
 39. Vicario, F., G. Vendramin, P. Rossi, P. Lio, and R. Giannini. 1995. Allozyme, chloroplast DNA and RAPD markers for determining genetic relationships between *Abies alba* and the relic population of *Abies nebrodensis*. *Theor. Appl. Genet.* 90 : 1012-1018.
 40. Weir, B.S., C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38 : 1358-1370.
 41. Welsh, J., Peterson, C. and McClelland, M. 1991. Polymorphisms generated by arbitrary primed PCR in the mouse: application to

- strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acid Research* 19 : 303-306.
42. Williams, G. K., M. K. Hanafey, J. A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1992. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Method in Enz.* 217 : 704-741.
43. Williams, J., A. Kubelik, K. Livak, J. Rafalski, and S. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18 : 6531-6535.
44. Wright, S. 1969. *Evolution and the Genetics of Population*. Vol. 2. The Theory of Gene Frequencies. University of Chicago Press. Chicago. pp.511.
45. Yeh, F., D. Chong, and R. Yang. 1995. RAPD variation within and among natural populations of Trembling aspen(*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. *J. Heredity* 86(6) : 454-460.
46. Yu, K. and K. Pauls. 1993. Segregation of RAPD markers and strategies for molecular mapping in tetraploid alfalfa. *Genome* 36 : 844-851.

Appendix 1. The sequence and GC content of primers used in this study

Primer Name	Sequence (5'-3')	GC content (%)
FOR 03	-GCG CAT TAG A-	50
FOR 04	-CCA CTC ACC G-	70
FOR 05	-GGC TAG GGC G-	80
FOR 11	-CCG TAC GGA C-	70
FOR 22	-GTC CCG ACG A-	70
UBC 625	-CCG CTG GAG C-	80
UBC 628	-GTC TGG TTA G-	50
UBC 635	-CTC AGC TCA G-	60
UBC 651	-TCA TTT CGC C-	50
UBC 680	-AAT GAG AGC C-	50
UBC 681	-CCC CCG GAC T-	80