

옥수수 육종에 배가반수체 기술의 이용 : 이론과 실제

저자

BM Prasanna, Vijay Chaikam, and George Mahuku

역자

이장용, 류시환, 박기진, 박종열, 서영호, 최재근, 김경희



멕시코에 본부가 있는 국제 옥수수·밀 연구소(스페인어 약어 CIMMYT로 알려져 있음)는 비영리 농업연구 및 훈련기관이다. 이 연구소는 개발도상국에서 옥수수와 밀의 생산성을 지속 가능하게 증가시켜 빈곤과 기아를 감소시키기 위해 일하는 곳이다. CIMMYT는 세계에서 가장 큰 옥수수와 밀의 종자은행을 유지하고 있으며 녹색혁명을 시작하여 아시아에서 수백만 명의 생명을 구함으로써 해서 CIMMYT의 노만 볼로그 박사가 노벨 평화상을 수상 한 것으로 잘 알려져 있다. CIMMYT는 CGIAR 컨소시엄의 회원으로 중앙정부, 재단, 개발은행, 그리고 공공 및 민간기구의 지원을 받는다.

©국제 옥수수·밀연구소(CIMMYT) 2012. 모든 권리는 CIMMYT의 소유임. 이 출판물에서 자료의 표현에 사용된 명칭들은 CIMMYT의 어떤 부분에 대한 것이나 또는 어떤 국가, 영토, 도시의 법적 지위와 관련된 CIMMYT의 기여 기관, 지역, 또는 그 지역 당국 또는 국경의 경계 또는 한계와 관련된 어떠한 주장의 표현을 의미하지 않습니다. 표현된 의견들은 저자들의 몫이며 CIMMYT나 CIMMYT 파트너들의 것일 필요는 없습니다. CIMMYT는 이 자료를 공정하게 사용할 것을 권장합니다. 적절한 인용이 요구됩니다.

정확한 인용: B.M Prasanna, Vijay Chaikam and George Mahuku (eds.). 2012. Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice. Mexico, D.F.: CIMMYT.

초록: 이 책은 일차적으로 육종프로그램의 DH 기술을 더 잘 이해하고 이용하고자 하는 국가농업연구 시스템과 개발도상국의 중소 종자회사들의 옥수수 육종가들을 위한 것이다. 호헨하임 대학과 공동으로 성공적으로 개발되고 특히 멕시코에서 DH 계통 육성 CIMMYT Global Maize 프로그램에 이용되는 프로토콜 뿐 아니라 각국의 옥수수 유전학자와 육종가들의 도움으로 축적된 지식을 편집, 통합한 것이다. 이 책에서는 첫 장에서 옥수수 육종에 있어서 DH 기술의 효용 및 응용성에 관한 개요를 설명하고, 다음 장들에 반수체 유도체를 이용한 *in vivo* 모계 반수체 유기, 안토시아닌 표지를 이용한 반수체 종자 확인, 반수체의 염색체 배가, 콜히친 처리 식물체로부터 DH 종자 유도, DH-기반 육종에 분자 표지 통합, 상업적 옥수수 육종에서 DH, 마지막으로 열대적응형 반수체 유도체 제공 및 CIMMYT 파트너들에 대한 DH 서비스에 관한 내용들을 제시하였다.

ISBN: 978-607-95844-9-8

AGROVOC 검색어 : Zea mays; plant breeding; doubled haploids; haploid induction; tropicalized inducers; agronomic management; molecular markers; phenotypic selection; intellectual property.

AGRIS 분류 코드: F30 Plant Genetics and Breeding

Dewey 십진 분류: 633.150575

사사

저자들은 지난 5년간 CIMMYT에서 수행된 DH 연구에 많은 도움을 주신 분들, 연구소 및 자금 지원 기관에 심심한 감사를 표합니다. 이들의 도움이 없이는 이 책이 만들어 질 수 없었을 것입니다. 특히 아래 분들 및 단체에 감사드립니다.

- DH 기술의 CIMMYT 이전 및 DH 생산과정의 여러 단계를 최적화하는데 중요한 지원을 해 주신 Albrecht E. Melchinger 교수, Wolfgang Schipprack 박사, 박사과정 학생을 포함한 호헨하임 대학의 DH 팀(Vanessa Prigge 박사와 Aida Kebede);

- CIMMYT와 호헨하임 대학의 공동연구를 위한 통찰력과 비전 및 지원을 아끼지 않은 Marianne Banziger 박사;

- 최초 CIMMYT와 호헨하임 대학의 공동연구를 이끈 José Luis Araus 박사;

- 콜히친 배가과정 및 콜히친의 안전 취급 훈련 준비에 핵심적인 지원을 한 Natalia Palacios 박사 Luis Galicia 및 Miguel Bojorges Cortés;

- DH 프로그램 강화를 위해 중요한 자료 입력을 해준 CIMMYT 동료들 (특히 Gary Atlin, Daniel jeffers 와 Kevin Pixley 박사들);

- CIMMYT-Mexico의 헌신적인 DH 팀, Leocadio Martinez-Hernandes, Luis Antonio López Rodrigues, Juana Roldán Valencia, Ana Mely Islas Montes, Gustavo alberto Martínez Rodríguez, Zaira Ivette Mata Carrillo, Belem Adriana Cervantes Hernández, Juan Antonio Díaz Ríos, César Muñoz Galindo, Reymundo Blancas, Pablo Ostría, Javed Bahena Torrez, Miguel Ángel Díaz, Marta Cano, Germán Bastián De León, Blanca Flor Pineda González, Dany Fajardo Romero, Edith Hernández Márquez, Francisco Hernández Fajardo, Emiliano Reyes Espinoza, Leonardo Juárez Agustín, Ignacio Morales Guzmán, Faustino López Hernández, Eduardo Fernández Cruz, Yesenic López Vázquez, Marcela Santos Hernández, Verónica Román Álvarez, 와 Belén Paredes Hernández;

- DH 계통 생산에 필요한 포장 물류를 효과적으로 처리해 준 CIMMYT Agua Fria 시험지의 매니저 Raymundo López와 Ciro Sánchez;

- DH 계통 생산의 관점에서 개선을 위한 유용한 피드백을 제공해 준 방문과학자 - Alba Lucía Arcos(콜롬비아), Thanh Duc Nguyen, Hung Huu Nguyen과 Ha Thai (베트남)

- 지적재산권 처리과정에서 귀중한 지원을 해 준 CIMMYT 지적재산권 및 법률팀(특히 Rodrigo Sara와 Carolina Roa);

- CIMMYT와 호헨하임대학의 배가반수체 공동연구를 위한 아낌없는 지원:

- Bill & Melinda Gates 재단

- Hwoard G. Buffett 재단

- SAGARPA, 멕시코 농업, 가축, 농촌진흥, 어업,식품부

- USAID(US Agency for International Development)
- H.C. Herrmann Eiselen 박사 재단 및 Fiat Panis 재단
- Tiberius 재단
- Vilmorin 종자 회사
- DTMA (Drought Tolerant Maize for Africa) 프로젝트
- MasAgro(Sustainable Modernization of Traditional Agriculture)하의
IMIC (Internal Maize Improvement Consortium) 프로젝트

● 자료의 디자인 및 편집에 수고 해 준 CIMMYT 커뮤니케이션 팀, 특히 Mike Listman과 Miguel Mellado.

역자 서문

반수체(n)는 염색체 배가 처리에 의하여 2배체가 될 수 있어 반수체를 육종에 이용할 수 있다면 육종기간을 현저히 단축시키고 비용도 크게 절감할 수 있다. 반수체는 자연적으로 발생하거나 화분배양, 소포자 배양 등 반수체 세포를 배양해서 얻을 수 있는데 옥수수의 경우 조직배양이 쉽지도 않지만 유전형에 따른 차이가 크기 때문에 기내 배양에 의한 반수체 유기 및 이용 연구는 잘 이루어지지 않고 있다. 한편 옥수수의 경우 반수체 유기 계통의 발견 및 지속적인 개선으로 반수체 유기율이 8~10 %에 달하는 반수체 유기체들이 개발되었고 이제는 반수체 유기체들과 배가반수체 기술이 상업적 육종에 널리 이용되고 있으나 우리나라에서는 최근 강원도농업기술원 옥수수연구소를 중심으로 DH 기술의 도입과 정착에 노력하고 있는 단계이다.

국제 옥수수·밀 연구소 (CIMMYT)에서는 독일의 호헨하임 대학과 공동으로 옥수수 육종을 위한 배가 반수체 기술과 관련된 여러 기술들을 개발하고 이를 이용할 수 있는 토대를 확보하였고 "Doubled Haploid technology in Maize Breeding: Theory and Practice" 라는 매뉴얼을 발간하여 이 기술에 대한 상세한 소개와 보급에 노력하고 있습니다. 역자는 한국연구재단 및 강원도농업기술원의 후원으로 옥수수연구소에서 일 하면서 국내에서도 많은 연구자들이 DH 기술에 대한 관심을 갖고 옥수수의 육종 및 유전 연구에도 도움이 되고 나아가서는 우수한 품종들을 신속히 개발하여 세계 종자 시장에 진출할 수 있는 발판을 만들 수 있으면 좋겠다는 생각에서 번역을 진행하였습니다.

번역의 미숙, 전문용어의 부족 등에 대하여는 여러분들의 지적을 겸허히 받아들이겠습니다. 본문에 제시된 국내에서 사용되지 않는 농약, 기자재들은 동일한 기능이 있는 타 제품들을 사용하거나 그 밖의 내용들도 우리나라의 실정에 맞게 조정하여 적용해도 무방할 것입니다.

끝으로 이 매뉴얼이 DH 기술에 관심 있는 분들에게 도움이 되고 DH 기술이 국내에 정착하고 옥수수 육종에 효율적으로 이용되는데 일조할 수 있게 되기를 바랍니다.

목 차

1장. 옥수수 육종과 배가반수체 기술: 개관 (<i>BM Prasanna</i>)	1
2장. 옥수수의 <i>in vivo</i> 모계 반수체 유기 (<i>Vijay Chaikam</i>)	13
3장. 모계 반수체 유기 설계 및 이행 (<i>Vijay Chaikam, George Mahuku, BM Prasanna</i>)	21
4장. 안토시아닌 표지 이용 모계 반수체 확인 (<i>Vijay Chaikam, BM Prasanna</i>)	29
5장. 모계 반수체의 염색체 배가(<i>Vijay Chaikam, George Mahuku</i>)	34
6장. 추정 배가 반수체 유묘: 실험실에서 포장까지 (<i>George Mahuku</i>)	42
7장. 우수한 양친계통과 품종의 신속한 개발 및 제공을 위한 DH-기반 육종에 MAS의 통합(<i>R Babu, Sudha K Nair, BS Viv다, Felix San Vincente, BM Prasanna</i>)	54
8장. 상업적 옥수수 육종에서 DH: 표현형 선발 (<i>Daniel Jeffers, George Mahuku</i>)	62
9장. 열대형 반수체 유기체 제공 및 CIMMYT 파트너에 대한 DH 서비스(<i>M Prasanna, Vijay Chaikam, George Mahuku, Rodrigo Sara</i>)	66

1. 옥수수 육종과 배가반수체 기술 : 개요

BM Prasanna

머릿말

배가반수체 (doubled haploid, DH)란 반수체 세포(n)가 자연적으로 또는 인위적으로 염색체 배가가 이루어져 생성된 유전자형(genotype)을 말한다. Chase (1947, 1951, 1952, 1969)는 옥수수 반수체 연구를 선도하였고 DH 계통들을 육종에 이용하였다. 배가반수체 기술은 99%이상의 동형접합체를 만드는데 데 적어도 6-8세대가 소요되는 기존의 자식계통 육성과정을 2-3세대 내에 완전한 동형접합계통을 개발할 수 있도록 하여 육종기간을 현저히 단축시킬 수 있다 (Forster와 Thomas, 2005; Geiger와 Gordillo, 2009; Chang과 Coe, 2009).

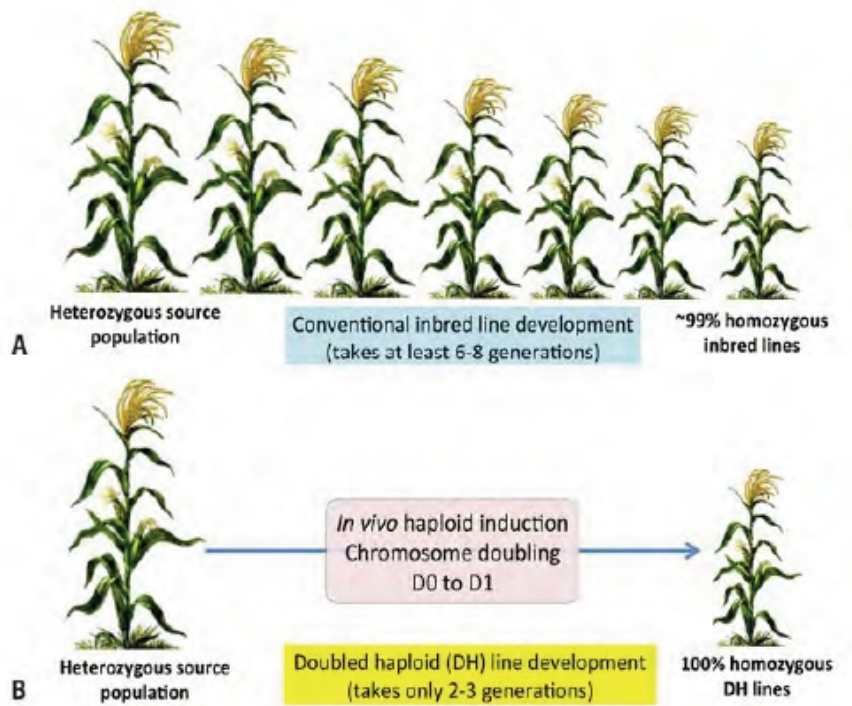


그림 2. (A) 기존육종방법 및 (B) 배가반수체 기술을 이용하여 유전적 순도(동형접합성)에 도달하는 데 필요한 세대 수.

Chase는 처음에는 상업적 적용을 위하여 자연적으로 반수체가 발생하여 배가되는 방법에 의존하였으나 이 방법은 반수체 발생비율이 낮아 별로 활용되지 않았다. 반수체 유도체를 이용한 *in vivo* 반수체 유기의 기초는

Coe(1959)가 Stock6라고 하는 고 반수체 유기계통(반수체 유기율 2.3 %)에 대해 언급한 이후에 탄생하였다. 이 Stock6가 세계의 옥수수 유전학자들의 노력으로 고효율 반수체유기(HIR, haploid induction rates = number of kernels with haploid embryo divided by all kernels investigated)를 위한 반수체 유기체 (inducer)들을 만드는 기본재료로 활용되었다.

몇몇 연구기관에서 *in vitro* 또는 *in vivo* 방법으로 옥수수 DH 계통들이 만들어 졌지만 *in vitro* 방법으로는 좋은 실험실을 갖추고 기술을 갖춘 직원의 필요성 외에도 많은 옥수수 품종들이 조직배양의 어려움이 있기 때문에 거의 성공하기가 어려웠다. 한편 DH 계통 육성을 통한 옥수수 반수체 유기는 상대적으로 용이하였는데 이는 옥수수 유전학자들이 반수체 유기체 유전자원을 확인하고 (Coe, 1959; Coe 와 Sarkar, 1964), 종자 상태 또는 유묘에서 쉽게 반수체를 확인할 수 있도록 안토시아닌 색소 표지를 유기체에 도입하였고(Nanda와 Chase, 1966; Greenblatt와 Bock, 1967; Chase, 1969) 반수체 유기율이 높은 새로운 반수체 유기체를 획득하였기 때문이다.

옥수수 육종에서 DH 기술은 *in vivo* 반수체 유기에 바탕을 두고 있으며 육종 효율을 증진시키는 중요한 방법으로 알려져 있다. 과거 10-15년간, 유럽 (Schmidt, 2003), 북미 (Seitz, 2005), 최근에는 중국에서(Chen 등, 2009) 온대형 반수체 유기계통들을 이용 할 수 있게 되자(Prigge와 Melchinger, 2011) 상업적 옥수수 육종 프로그램에 DH 기술이 성공적으로 채택되었다. 그러나 열대옥수수 재배지인 중남미, 사하라 이남 아프리카, 아시아 지역의 소형, 중형 종자회사 뿐 아니라 공공부문의 옥수수 육종 연구기관은 뒤쳐져 있다 (Prasanna 등., 2010; Kebede 등, 2011). 그 이유는 아마도, DH기술에 대한 이해 부족, 열대적응형 반수체 유기체에 대한 접근성 결핍 또는 DH를 육종 프로그램에 효과적으로 도입할 수 있는 관련된 기술의 결핍과 같은 요인들 때문일 것이다.

옥수수 육종에 왜 DH 인가?

DH 기술은 옥수수 유전학 및 육종에서 여러 가지 이점을 제공하는데 (Rober 등, 2005; Geiger, 2009; Geiger와 Gordillo, 2009) 그중 주요 이점들은

- (1) 2세대 이내에 완전한 동형접합계통 육성으로 육종연한 현저히 단축;
- (2) 새로운 육종계통을 육성하는데 필요한 시간, 노동, 비용 등의 절감 (Geiger와 Gordillo, 2009); 절약된 시간이나 자원은 더욱 효과적인 선발 방법

을 이행하고 우수 품종의 출시를 가속화하는 통로가 될 수 있다.

(3) 분자 마커와 연중육종시스템을 함께 활용하면 선발의 효율과 정밀도를 크게 높일 수 있다(Rober 등, 2005); Geiger와 gordillo, 2009).

(4) 기존의 육종방법으로는 어렵고 장기간이 소요되는, 유전형질을 추적하기 어려운 옥수수 생산성과 재해내성 등과 관련된 여러 유전자가 관련된 형질들과 같은 유용 대립유전자의 신속 집적으로 품종 육성 가속화.

(5) DH에 기초한 양친 계통들의 완전한 동형접합성 동형유전자형으로 품종보호에 요구되는 DUS(distinctness, uniformity, stability; 구별성, 균일성, 안정성)에 완벽히 부응(Geiger와 Gordillo, 2009).

(6) 계통 유지에 필요한 노력 경감(Rober 등, 2005).

(7) 분자표지를 함께 이용하면 잡종품종의 모계 또는 부계에 존재하는 유전자원을 쉽게 이용할 수 있다.

(8) 표지-형질 연관연구, 표지이용 유전자 도입(Forster와 Thomas, 2005), 기능유전체, 분자세포유전학 및 유전공학(Forster 등, 2007; Wijnker 등, 2007) 연구를 수행할 수 있는 기회 제공.

in vivo 모계 반수체유도에 기초한 DH 육성

반수체 유기

반수체 유기체란 정상적인 2배체 옥수수와 교배 하였을 때 얻은 한 이삭의 종자들이 2배체($2n$)와 일부는 비정상적인 수정으로 인하여 반수체(n)로 분리되는 특별한 유전 계통들을 말 한다. 반수체 배를 갖는 종자는 정상적인 3배체($3n$)의 배유를 갖고 있어 2배체 배를 갖는 알곡과 마찬가지로 발아할 수 있다 (Coe와 Sarkar, 1964).

현재 *in vivo* 모계 반수체 유기 체계는 일반적으로 배나 배유에 안토시아닌 착색이 없는 대상 집단과는 달리 반수체 유기체에서는 배(배반)뿐 아니라 호분층(배유의 맨 바깥층)에서 발견되는 *R1-Navajo* (*R1-nj*)라고 하는 우성의 안토시아닌 색소 표지의 존재 여부에 의존된다. *Ri-nj*는 우성 색소표지로 색소 발현여부로 1배체/반수체(monoploid/haploid, n) 종자(배반에는 안토시아닌 색소의 발현이 없고 배유에 전형적인 왕관형태의 색소발현)과 2배체 종자(배와 배반 모두에서 안토시아닌 색소 발현)를 구분할 수 있다(Nanda와 Chase, 1966; Greenblatt와 Bock, 1967; Chase, 1969).

정상적인 색소발현이 없는 종자들은 자가수분 또는 교잡에 의한 오염의 결

과이다. 그러나 *R1-nj* 색소표지발현은 환경적인요인 뿐 아니라 반수체 유기체의 유전적 배경, 반수체유기를 원하는 대상유전자형(source genotype)의 유전적 배경에 따라 현저히 달라질 수 있다(Chase, 1952; Rober 등, 2005; Kebede 등, 2011; Prigge 등, 2011).

온대형 반수체 유기체: 상업적으로 이용하기 위하여 반수체 유기율(haploid induction rate, HIR)이 높은 반수체 유기 계통들이 수년간에 걸쳐 Stock6를 기반으로 만들어 졌으며 그중에는 (1)KMS(Korichnevsky Marker Saratovsky)와 ZMS, 둘 다 Stock 6로부터 유래 (Tyrnov와 Azvalishina 1984, Chebotar와 Chalyk, 1966에 인용); (2)WS14, W23ig와 Stock 6의 교배로 육성(Lashermes와 Beckert, 1988); (3)KEMS (Krasnodor Embryo Marker Synthetic), 교배로 육성(Shatskaya 등, 1994); (4) MHI (Moldovian Haploid Inducer), KMS와 ZMS의 교배로 육성(Eder와 Chalyk, 2002); (5)RWS (Russian inducer KEMS + WS14), KEMS와 WS14의 교배 후대 (Rober 등, 2005); (6)UH400, Hohenheim 대학에서 KEMS로부터 육성 (Chang와 Coe, 2009에 인용); (7)PK6(Barret 등, 2008); (8)HZI1, Stock 6로부터 유래(Zhang 등, 2008); (9)CAUHOI, 중국농업대학에서 Stock 6와 고유 집단(Beijing High Oil Population)과의 교배에서 유래(Li 등, 2009) 및 (10)PHI (Procera Haploid Inducer), MHI와 Stock 6와의 교배에서 유래 (Rotarenco 등, 2010)가 있다.

온대형 유기체 UH400, RWS와 RWS x UH400은 2007년부터 2011년까지 CIMMYT에서 열대와 아열대 유전자원을 대상으로 반수체를 유기하고 doubled haploid(DH)을 개발하는데 성공적으로 이용되었으나 이러한 온대성 유기체들은 열대의 저지대조건에는 잘 적응하지 못하였다(Prigg 등, 2011). 열대옥수수 재배환경에서 온대형 유기체를 이용하여 효과적이면서도 대량의 DH계통들을 생산하기에는 이러한 유기체들이 연약하고, 꽃가루의 생산이 적으며 종자의 착상이 적고 열대 옥수수 병해에 약하기 때문에 제한적일 수밖에 없다.

열대형 반수체 유기체: CIMMYT Global Maize Program이 독일의 Hohenheim 대학과 공동으로 2007년부터 열대/아열대 옥수수 재배환경에서 DH기술을 최적화하기 위하여 집중적으로 참여해 왔다. 이 공동연구를 통하여 열대 적응형 유기계통들(tropically adapted inducer lines, TAILs;

8-10% HIR)이 개발되었다(Prigge 등, 2011). 두 지역 (멕시코의 Agua Fria 와 Tlaltizapan)에서 두 계절에 걸친 평가 결과 1세대 TAIL들은 평균 HIR 이 9-14 %로 일정하였다. TAIL sub-set를 이용하여 고 HIR의 단교잡 반수체 유기체를 개발하였다. 개발된 열대형 반수체 유기체들은 정해진 조건하에서 상업적 또는 연구목적으로 사용될 수 있다.

(<http://www.cimmyt.org/en/about-us/media-resources/recentnews/1399-now-available-tropicalized-maize-haploid-inducer-lines>). TAIL을 이용할 수 있게 됨으로써 종자의 착립과, 반수체 유기효율을 증가시키고 유기체 계통들의 유지 및 종자생산비용을 감소시키는 등 DH 계통 육성효율을 현저히 증가시킬 것으로 기대된다.

DH 육성과정 및 추가 개선 범위

효율적인 DH 육성은 고효율 열대형 반수체 유기체의 이용가능성 뿐 아니라 DH 생산과정의 여러 중요한 단계들에 따라 좌우됨을 명심해야 한다. DH 개발에서 중요한 단계들은 : (1) 대상집단(일반적으로 원하는 계통들을 이용하여 얻는 잡종 또는 그 잡종을 자가수분 하여 얻은 F2)을 모친으로 하여 반수체 유기체 꽃가루와 교배; (2) 안토시아닌색소 표지 이용 반수체 종자의 확인(건조종자상태); (3) 반수체 종자의 발아; (4) 반수체 유묘에 콜히친 또는 기타 염색체 배가 처리; (5) D0 유묘의 적절한 관리 및 D0식물의 자가수분에 의한 D1 종자 획득; 그리고 (6) 육종프로그램에 DH 계통들의 지속적 선발 및 이용이다. 다음 장에서는 앞에서 언급한 각각의 단계에 대한 이론적이고도 실질적인 상세한 내용들을 제시할 것이다. 현재 세계 각국의 서로 다른 연구소에서 진행 중인 연구를 통하여 개선되고 있는 몇 가지 중요한 단계들을 다음에 강조하였다.

반수체 확인: $Ri-nj$ -기반 반수체 확인체계가 효과적이긴 하지만 문제가 없는 것은 아니다. 대상집단이나 공여계놈에 $C1-I$, $C2-Idf$ 와 $lnI-D$ 와 같은 우성의 안토시아닌 억제유전자가 존재하거나 dosage effect 때문에 때때로 이러한 표지이용체계가 효과적이지 못할 때가 있다 (Coe 1994,). CIMMYT 우수 유전자원을 대상으로 반수체종자 확인에 이 종자 색 표지가 효과적으로 기능을 하는 비율이 어느 정도인가 조사 중이다. 현재, 다양한 대상 집단에 대한 반수체 유도체 교배집단에서 약 8% 정도만이 $R1-nj$ 색소발현이 억제되는 것으로 나타났다.

건조종자상태에서 반수체의 구분이 불가능한 경우에는 광과 무관하게 식물 조직(초엽과 뿌리)에 자색이 나타나는 *B1(Booster1)*과 *Pl1(Purple1)* 안토시아닌 유전자를 가진 반수체 유기체를 이용하는 것이 적절하다는 것이 밝혀졌다(Rotarencо 등, 2010). 이 경우에는 생육초기에 초엽(coleoptile)이나 뿌리에 자색이 있는 경우에는 2배체, 색이 없는 경우에는 반수체로 간주될 수 있다(Geiger와 Gordill, 2009; Rotarencо 등, 2010). 물론 CIMMYT에는 뿌리착색 표지와 *R1-nj* 유전자를 조합한 여교잡 집단을 몇 개 갖고 있지만 DH 육성에서 고 반수체 유기율(HIR), 농업적 안정성과, 대체 표지체계의 유용성은 확립할 필요가 있다.

건조종자에서 안토시아닌 색소 표지의 발현이 미약하여 반수체의 확인이 잘 못되는 것을 방지하기위하여 Rotarencо 등(2007)은 NMR (Nuclear Magnetic Resonance)을 이용하여 자동적으로 측정할 수 있는 종자 오일함량에 근거한 반수체 확인 방법을 제안하였다. Li 등(2009)은 반수체 유기율이 2 % 정도이며 종자오일의 함량이 높아(78g/kg) *R1-nj*에 의한 배반의 착색이 없거나 배의 오일 함량이 낮은 경우에도 반수체를 확인할 수 있는 Stock-6 에서 유래된 CAUHOI를 개발하였다. 이 새로운 방법은 유망해 보이나 열대형 유전배경을 갖는 DH 대량 생산에 이 방법의 신뢰성이나 적용성에 대해서는 조사가 필요하다. Jones 등(2012)은 모계반수체 유기 후 옥수수 잡종종자로부터 반수체를 구분하는 방법으로 근적외선분광분석방법의 유용성을 검토하였다

염색체 배가 : 자연적으로 염색체 복제가 일어나는 비율이 매우 낮기 때문에 (Chase, 1969; Deimling 등., 1997) CIMMYT를 포함한 여러 연구소에서는 현재 DH 생산에 콜히친을 염색체 배가 시약(또는 체세포분열 억제)으로 이용하고 있다. 그러나 콜히친 처리가 항상 완벽하게 효과적인 것은 아니고, 암수 또는 암수 전체 등 부분적으로 2배체가 나타날 수가 있다. 더욱 중요한 점은 콜히친은 암유발성이 큰 물질로 취급과 사용 후 폐기에 주의해야 한다. Pronamid, APM, trifluralin, oryzalin과 같은 제초제는 체세포분열의 효과적인 억제제로 보고된 바 있다(Hantzschel과 Weber, 2010). 이들은 콜히친에 비해 가격도 싸고 독성도 적으며 취급도 용이하고 폐기도 안전하다. 몇몇 육종회사에서는 콜히친보다 독성이 적고 안전한 염색체 인공배가 처리에 대한 특허를 신청하고 있다 (Geiger와 Gordillo, 2009).

농업적 관리: 5장에 상세히 기술한 바와 같이 콜히친을 처리한 D0 유묘를 1차적으로 온실에서 그 후 포장에서 적절히 관리하는 것이 DH 계통을 성공적으로 육성하는데 매우 중요하다. 관개 방법의 최적화, 시비, 관리의 기계화 그리고 효과적인 잡초 및 병해충관리가 D0 식물에 대한 stress를 최소화 하고 DH계통 생산 성공률을 높이는데 매우 중요하다. 여기에 더하여 DH 운영 장소의 토양과 기상조건도 적절해야 한다.

모계 반수체 유기 기작

2장에서 상세히 기술한 바와 같이 1960년대부터 *in vivo* 모계 반수체 유기에 대한 생물학적 기작을 밝히기 위한 여러 연구가 수행되었다(Eder와 Chalyk, 2002; Geiger와 Gordillo, 2009). 몇몇 중요한 결과들이 있지만 모계 반수체 유기에 대한 정확한 기작은 아직 완전히 밝혀져 있지 않다. 이러한 점 때문에 특히 상업적 옥수수 육종 프로그램에 의해 옥수수 품종을 개발하고 보급하는데 있어 DH 계통의 대량 유기 및 DH 양친계통들의 이용이 제한되지는 않았다.

유전분석에 의해 모계 반수체 유기가 양적형질에 의해 조절된다는 것이 밝혀졌다(Beckert, 1988; Deimling 등, 1997; Riber 등, 2005). *In vivo* 반수체 유기 능력에 대한 QTL mapping 결과 이러한 형질은 하나 또는 몇 개의 주동 QTL 과 몇 개의 수동 (small-effect/modifier) QTL에 의해 조절된다고 하였다. 주동 QTL은 제1염색체 (*qhir1*, in bin 1.04)에 있으며 비유기체 양친과 HIR-증진 QTL을 포함하는 세 집단에서 반수체 유기능의 유전적변이의 최대 66 % 영향을 미친다(Prigge 등, 2012). 이 주동유전자에 대한 이용 가능 표지들을 확인하고 검증하는 것과 표지를 이용한 유용대립인자의 도입은 개선된 고 HIR, 열대적응형 반수체 유도체의 개발과 현지 적응을 촉진할 수 있을 것이다.

DH 기술과 분자표지는 유력한 조합이 될 것이다.

DH 기술로 완전동형접합계통을 신속히 작성할 수 있으므로 유전학연구/분자 육종과제를 수행하는데 시간과 자원을 상당히 절약할 수 있다.

1. 유전지도의 작성 (Chang과 Coe, 2009; Forster 등, 2007), 여러 작물에서 DH 집단을 가장 널리 활용하는 것 중의 하나.
2. 관련이 있는 DH 집단(중요한 표현형 차이를 보이는 대상집단의 양친)을 이용하여 표지-형질 연관 관계를 확인하고 확인된 표지들을 MAS

(marker-assisted selection)에 이용할 수 있도록 함

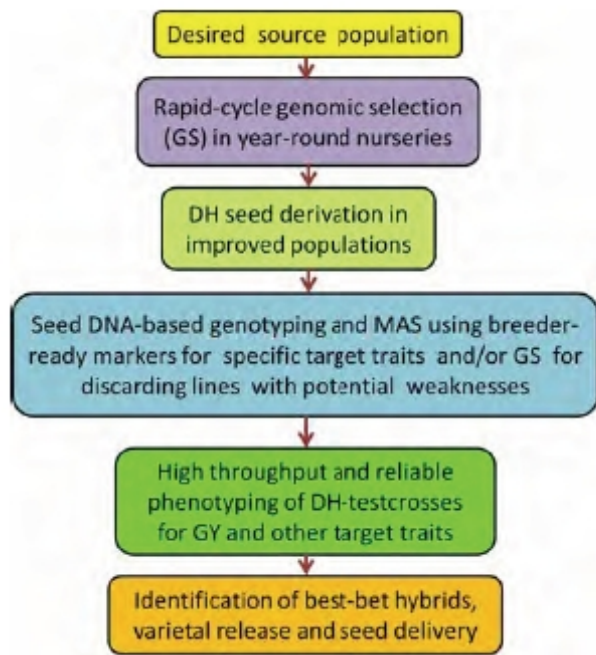


그림 2. 옥수수 육종에서 현대기술/전략의 조합으로 육종효율과 유전적 획득 증진을 위한 체계

3. 추가 시험을 위한 잡종생성에 상보적 유전자형을 갖는 양친계통을 선발하기 위한 DH 계통들의 고밀도 유전자형 작성

4. 표현형변이에 크게 기여할 수 있는 좋은 유전자/대립형질을 이용하여 비교적 단순하게 유전되는 형질에 대한 DH계통들의 MAS에 종자칩핑기술과 결합, DH 계통들의 표현형을 비교하는 것보다 저렴하고 빠르고 효과적이다.

5. 유전력이 낮거나 (예를 들면 종실수량, abiotic stress tolerance) 집단 크기가 작을 때(Bernardo와 Yu, 2007); Lorenzana와 Bernardo,2009; Mayor와 Bernardo, 2009) 복잡한 양적형질을 개선하기 위하여 genome-wide selection을 적용하는데 DH 계통들의 이용가능성, 그리고

6. 교배 양친과 유전적으로 유사한 계통획득 또는 재조합체 또는 특정유전자좌의 측면을 확인하는 것을 목표로 할 때 bi-parental cross로부터 DH계통을 얻기 위해 DH와 MAS의 상호보완 가능성. 이러한 경우 가장 빈번히 적용되는 것은 느리고 전통적인 여교잡보다는 DH 계통 변환 방법이 될 것이다(Forster와 Thomas, 2005).

전망

DH 기술은 의심할 여지없이 교잡종의 개발 보급을 위한, 완전동형접합계통을 얻는데 단순화된 관리와 현저히 적은 자원투자를 통하여 옥수수 육종을 현대화하는 강력한 방법이다. DH 기술의 구현에는 DH 계통의 생산과 DH 계통을 육종에 효과적으로 접목하는 새로운 기술을 필요로 한다. 첫째 DH 계통 생산에서 중요한 단계(반수체 유기, 반수체 확인, 염색체 배가, DH 계통 복구)는 효과적면서도 안전한 작업과 관련 연구자/기술자의 적절한 훈련이 요구된다. 둘째, *in vivo* 유기를 통하여 얻은 반수체나 염색체 배가를 통하여 얻은 옥수수 식물체는 연약하여 과도한 열, 해충, 병해 등 여러 가지 환경재해에 취약하다. 셋째, 유전적인 획득과 육종 효율의 증진, 궁극적으로 우수 잡종의 신속한 개발에 대한 DH 개발 기술의 힘은 MAS와 연중육종시스템과 효과적으로 결합되었을 때 현실화 된다. 따라서 열대나 아열대의 옥수수 재배국가의 연구기관에서 효과적으로 DH 개발을 확대하기 위해서는 이러한 요인들을 잘 고려하여야 한다.

빌 게이트 재단의 재정적 지원으로 CIMMYT는 조만간 사하라 이남 아프리카를 위한 옥수수 DH 설비를 갖출 예정이다. 이러한 설비는 일차적으로 CIMMYT와 ITTA가 리드하는 육종네트워크내 공공연구기관의 DH 요구에 부응할 것이고 또 저가의 DH 서비스를 지역의 소규모 종자회사에 제공할 것이다. 또한 CIMMYT는 국제 옥수수 증진 컨소시엄을 통해 DH 서비스 설비를 남미에서 운용하고 유사한 설비를 아시아에서 운용할 것이다

인용문헌

- Barret P, Brinkmann M, Beckert M (2008) A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize. *Theor. Appl. Genet.* 117: 581-594.
- Bernardo R, Yu J (2007) Prospects for genomewide selection for quantitative traits in maize. *Crop Sci.* 47: 1082-1090.
- Chang MT, Coe EH (2009) Doubled haploids. In: AL Kriz, BA Larkins(eds) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 63. *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, PP. 127-142.
- Chase SS (1947) Techniques for isolating monoploid maize plants. *J. Bot.* 34: 582.
- Chase SS (1951) Production of homozygous diploids of maize from monoploids. *Agron. J.* 44: 263-267.
- Chase SS (1952) *Monoploids in maize*. Iowa State College Press, Ames, Iowa, pp. 389-399.

- Chase SS (1969) Monoploids and monoploid-derivatives in maize (*Zea mays* L.). *The Botanical Review* 35: 117-167.
- Chebotar OD, Chalyk ST (1966) The use of maternal haploids for genetic analysis of the number of kernel rows per ear in maize. *Hereditas* 124: 173-178.
- Chen S, Li L, Li H (2009) Maize doubled haploid breeding [in chinese]. China Agricultural University Press, Beijing.
- Coe EH (1959) A line of maize with high haploid frequency. *Am. Naturalist* 93: 381-382.
- Coe EH (1994) Anthocyanin genetics. In: M Freeling, V Walbot (eds) *The maize handbook*. Springer-Verlag, New York, pp. 279-281.
- Coe EH, Sarkar KR (1964) The detection of haploids in maize. *J. Heredity* 55: 231-233.
- Deimling S, Röber FK, Geiger HH (1997) Methodology and genetics of *in vivo* haploid induction in maize [in German]. *Vortr Pflanzenzüchtg* 38:203-224
- Eder J, Chalyk ST (2002) *In vivo* haploid induction in maize. *Theor. Appl. Genet.* 104: 703-708.
- Forster BP, Heberle-Bors E, Kasha KJ, Touraev A (2007) The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Sci.* 12: 368-375.
- Forster BP, Thomas WTB (2010) Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev.* 25: 57-88.
- Geiger HH (2009) Doubled haploids. In: JL Bennetzen, S Hake (eds) *Maize handbook - volume II: genetics and genomics*. Springer Science and Business Media, New York, pp. 641-657.
- Geiger HH, Gordillo GA (2009) Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica* 54: 485-499.
- Greenblatt IM, Bock M (1967) A commercially desirable procedure for detection of monoploids in maize. *J. Hered.* 58: 9-13.
- Häntzschel KR, Weber G (2010) Blockage of mitosis in maize root tips using colchicine-alternatives. *Protoplasma* 241:99-104.
- Heckenberger M, Bohn M, Melchinger AE (2005) Identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines: I. Simple sequence repeat data from maize inbreds. *Crop Sci.* 45: 1120-1131.
- Jannink J-L, Lorenz AJ, Iwata H (2010) Genomic selection in plant breeding: from theory to practice. *Briefings in Functional Genomics* 9: 166-177.
- Jones RW, Reiont T, Frei UK, Tseng Y, Lubberstedt T, McClelland JF (2012) Selection of haploid maize kernels from hybrid kernels for plant breeding using near-infrared spectroscopy and SIMCA analysis. *Applied Spectroscopy* 66:447-450.
- Kebede AZ, Chillón, B.S., Schipprack, W., Araus, J. L., Banziger, M., Semagan, K., Alvarado, G., and Melchinger AE (2011) Effect of source germplasm and season on the *in vivo* haploid induction rate in tropical maize. *Euphytica* 180: 219-226.
- Lashermes P, Beckert M (1988) Genetic control of maternal haploidy in

- maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. *Theor. Appl. Genet.* 76: 404-410.
- Li L, Xu X, Jin W, Chen S (2009) Genomewide selection and marker-assisted recurrent selection in doubled haploid versus F2 populations. *Crop Sci.* 49: 1719-1725.
- Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819-1829.
- Nanda DK, Chase SS (1966) An embryo marker for detecting monohaploids of maize (*Zea mays* L.). *Crop Sci.* 6:213-215.
- Prasanna BM, Pixley K, Warburton ML, Xie CX (2010) Molecular marker-assisted breeding options for maize improvement in Asia. *Mol. Breed.* 26: 339-356.
- Prigge V, Melchinger AE (2011) Production of haploids and doubled haploids in maize. In: VM Loyola-Vargas, Ochoa-Alejo N (eds) *Plant cell culture protocols*, 3rd edition. Human Press-Springer Verlag, Totowa, New Jersey.
- Prigge V, C Sanchez, BS Chillón, W Schipprack, JL Araus, M Banziger, AE Melchinger (2011) Doubled haploids in tropical maize: I. Effects of inducers and source germplasm on *in vivo* haploid induction rates. *Crop Sci.* 51: 1498-1505.
- Prigge V, Xu XW, Li L, Babu R, Chen SJ, Atlin GN, Melchinger AE (2012) New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. *Genetics* 111: 781-793.
- Röber FK, Gordillo GA, Geiger HH (2005) *in vivo* haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica.* 50:275-283.
- Rotarencu VA, Kirtoca IH, Jacota AG (2007) Possibility to identify kernels with haploid embryo by oil content. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 81:11.
- Rotarencu VA, Dicu G, State D, Fuiá S (2010) New inducers of maternal haploids in maize. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 84:15
- Schmidt W (2003) Hybrid maize breeding at KWS Saat AG. In : Bericht über die Arbeitstagung der Vereinigung der pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, Gumpenstein, Österreich, 25-27 No., pp. 1-6
- Seitz G (2005) The use of doubled haploids in corn breeding. In: Proc. 41st Annual Illinois Corn Breeders' School 2005. Urbana-Champaign, Illinois, pp. 1-7.
- Shatskaya OA, Zabirowa ER, Shcherbak VS, Chumak MV (1994) Mass induction of maternal haploids, *Maize Genetics Coop. Newslett.* 68: 51.
- Smith JSC, Hussain T, Jones ES, Graham G, Podlich D, Wall S, Williams M (2008) Use of doubled haploids in maize breeding: implication for intellectual property protection and genetic diversity in hybrid crops. *Mol. Breed.* 22: 51-59.
- Tyrnov VS, Azvalishina AN (1984) Inducing high frequency of maternal haploids in maize [in Russian]. *Dokl Akad Nauk SSSR* 276: 735-738.
- Wijnker E, Vogelaar A, Dirk R, van Dun K, de Snoo B, van den Berg M, Lelivelt C, de Jong H, Chunting L (2007) Reverse breeding: reproduction

of F1 hybrids by RNAi-induced asynaptic meiosis. *Chromosome Research* 15: 87-88.

2. 옥수수에서 *in vivo* 모계 반수체 유기

Vijay Chaikam

*in vivo*와 *in vitro* 반수체 유기

옥수수에서 반수체는 *in vitro*(androgenesis) 또는 *in vivo* 방법으로 얻을 수 있다. Androgenesis란 미숙화분 또는 소포자 배양을 통하여 반수체를 육성하는 것을 말한다. 약배양 시스템에서는 약내의 소포자가 androgenesis를 통하여 소포자 유래 배상구조(embryo-like structures)를 형성하도록 유도된다. 꽃가루 배양에서는 약에서 소포자를 분리하고 배지에 배양하여 배상구조를 만든다. 배상구조로부터 직접 반수체 식물이 분화하거나 재분화가 가능한 캘러스가 만들어 진후 다시 식물체로 분화한다. 약으로부터 수많은 소포자가 생성되므로 소포자를 배양하는 것은 비교적 용이하다. Androgenesis 방법은 잘 확립되어 있어 일부 작물 중에서는 일반적으로 이용되고 있지만 옥수수에서 androgenesis를 통하여 반수체와 배가 반수체 (DH)를 얻는 것은 효율적이지 못한 것으로 알려져 있다. 옥수수에서 androgenesis는 유전자형 따라 차이가 크며 (genotype-dependent); 대부분의 유전자형은 배양이 어려워 전혀 반응을 보이지 않는다(Brettell 등, 1981; Genovesi와 Collins, 1982; Miao 등, 1981; Spitko 등, 2006). Androgenesis가 가능한 유전자형의 경우에도 그 과정이 수술의 생육단계, 수술을 채취한 식물체 그리고 수술의 전처리를 포함하는 여러 가지 조건들의 영향을 받는다(Wan 등, 1991; Chu 등, 1975; Ku 등, 1978; Genovesi와 Collin, 1982; Miao 등, 1978; Spitko 등., 2006). 따라서 옥수수에서 DH 육성을 위해 기내배양(*in vitro*)방법은 잘 이용되지 않는다.

한편, 생체 (*in vivo*) 반수체 유기방법은 옥수수에서 매우 성공적이었으며 현재는 몇몇의 상업적 육종프로그램에 광범위하게 이용되고 있다. 옥수수 재배시 반수체는 약 0.1% 비율로 자연적으로 나타나는 것으로 알려져 있다 (Chase, 1951). 이 정도의 유기율은 대규모 DH 작업에 효과적으로 이용될 수 없다. 옥수수에서는 앞 장에서 설명한 바와 같이 Stock 6(Coe, 1959)의 발견과 이로부터 유래된 일련의 반수체 유기체들의 개발로 이 기술은 DH 계통이 유래된 대상 유전자원(source germplasm)에 따른 차이가 적기 때문에 옥수수 육종에 DH 기술을 적용하는 혁명을 가져왔다

모계 및 부계 반수체

부계(androgetetic) 반수체 유기는 *ig1*(indeterminate gametophyte)이라고 하는 돌연변이유전자에 근거하는데 이 유전자는 자손의 반수체 발생빈도를 증가 시킨다(Kermicle, 1969, 1971; Lin, 1981). 동형접합 *ig1* 돌연변이체는 핵이 없는 난세포와 같은 여러 가지 발생학적 이상을 나타낸다. 두개의 정핵 세포와 접합 후 난세포는 모계의 세포질을 가지며 부친의 염색체만을 갖는 반수체 배가 된다. 선발된 유전배경을 갖는 것들의 반수체 유기율은 1 %-2 % 정도이다(Kermicle, 1994).

부계 반수체를 만들기 위해서는 반수체 유기체 (*ig1*을 갖는)를 모친으로 이용하며 공여친(대상유전자원)은 부친이 된다. 따라서 부계 반수체는 유기체의 세포질과 공여친의 염색체를 갖는다. 이 방법은 반수체 빈도가 낮고 공여 유전자형으로부터 세포질의 구성이 변화되기 때문에 육종을 위한 자식계를 만드는 데는 매력이 없다. 그러나 *ig1/ig1* 유전자 유전형은 자식계통을 세포질용성불임형으로 전환하는데 유용할 것이다. 이러한 방법으로 얻은 DH 식물체는 용성불임세포질을 갖는 점을 제외하면 부계와 근동질이다. 여러 가지의 CMS유기 세포질을 갖는 반수체 유기 계통들이 탄생되었으며 이들은 새로운 육종계통들을 CMS 세포질로 전환하는데 이용될 수 있다(Pollacsek, 1992; Schneer 등, 2000).

모계 반수체를 만들기 위해서는 반수체 유기체가 교배 시 부계로 이용되고 대상유전자원 또는 공여체가 모친으로 이용된다. 모계반수체는 세포질과 염색체 모두 공여친에서 온다. 이제는 상업적으로 이용될 수 있고 반수체 유기율이 높은 반수체 유기계통들을 사용할 수 있으며 상세한 내용은 1장에서 제시하였다.

열대조건에 적응하는 개량된 반수체 유기체 개발을 위해서 CIMMYT에서 온대형 반수체 유기체(RWS, UH400,과 RWS x RWK, 반수체유기율 8-10 %)와 CIMMYT에서 개발된 3개의 열대옥수수 계통 (CML494, 451, CL02450)과의 교배에서 유래된 분리집단이 개발되었다. 계통육종 후 유전성이 크고 눈으로 확인할 수 있는 형질을 갖는 각각의 F2 식물체의 집단 선발과 진전된 자가수정 및 여교잡 세대에서 반수체유기율과 기타 농업적 특성에 대한 가계기반 선발 (family-based selection)이 뒤따른다. 이렇게 개발된 열대적응 유기체 계통들은 고 HIR (5-13 %)이며 열대 조건하에서 온대형 유기체

에 비해 꽃가루 생산 병 저항성과 식물활력이 증진되었다.

in vivo 모계 반수체 유기 메카니즘

모계 반수체 유기 과정 중 어떠한 일이 일어나는지에 대하여는 아직까지 정확히 밝혀지지 않았다. 모계 반수체 유기를 설명할 몇 가지 가설이 제안되었다. 유기계통이 꽃가루로 이용될 때 반수체 유기가 이루어지므로 반수체 유기체 꽃가루의 수분이 이루어진 후에 정상적인 중복수정이 교란되기 때문이라는 가설이 제기되었다. 정상적인 경우에 중복수정에서는 꽃가루에서 온 두 개의 정핵세포중 하나는 난세포와 수정하여 2배체의 접합자를 만들고 다른 정핵세포는 암 배우체의 중심세포에 있는 두 개의 극핵과 수정하여 3배체의 배유를 만든다. 반수체 유기체의 꽃가루에서 유래된 정핵세포가 중심세포와 결합하지만 다른 정핵세포는 난세포와 결합하지 않는 것과 같이 중복수정 이상을 초래함이 제기되었다. 그러나 수정되어 분리하는 중심세포는 수정안된 반수체 난세포를 자극하여 반수체 배로 발육토록 한다(Chase, 1969). 이와 같은 단일 수정은 꽃가루의 형태적 결합 또는 꽃가루에 정상적인 정핵세포가 오직 하나이기 때문에 나타난 결과일 것이다. Pogna와 Marzetti(1977)는 유기체와 비유기체의 꽃가루를 기내에서 발아시켜 유기체의 꽃가루가 높은 빈도로 두 개의 화분관을 보이는 것을 관찰하였다. 이들은 이러한 비정상적인 화분관 신장이 반수체 유기능과 관련이 있을 것이라고 하였다.

Bylich와 Chalyk(1966)은 반수체 유기계통 ZMS의 약 6.3 %의 꽃가루가 형태적으로 다른 한 쌍의 정핵을 갖고 있는 것을 인지하였다. 형태적인 차이는 두 개의 정핵세포의 발육속도가 달라 한 세포는 수정할 준비가 되어 있고 다른 하나는 안 되어 있는 상태이기 때문에 나타나는 것이라고 하였다. Stock 6의 경우 고빈도의 heterofertilization 이 관찰되었다 (Sarkar와 Coe, 1966, 1971). Rotarenko와 Eder(2003)에 의해서 MHI 유기 계통의 경우에도 유사한 결과가 관찰되었다. Heterofertilization은 보통 수정이 지연된 경우에 나타나는데 HIR과 반수체 유기 기작과 관련이 있음이 제기되었으나 (Sarkar, 2000) 반수체 유기계통의 꽃가루의 두 개의 정핵들 간의 차이는 확인할 수 없었다. Swapna와 Sarkar(2011)는 꽃가루관 신장에서 결합을 찾을 수 없었으며 수정의 지연을 관찰할 수 없었다. 이들은 꽃가루관을 통해 방출된 후 배낭에 들어갈 때 정핵이 감소되는 것이 반수체를 유기하는 원인일 수 있음을 제안하였다.

Chalyk 등(2003)은 반수체 유기계통 MHI와 M471H에서 10~15%가 이수성 화분모세포(microsporocyte) 임을 발견하였다. 이들은 반수체 유기체에서는 화분모세포가 형성될 때 염색체의 비정상적인 분열이 일어나고 이것이 이수성 정자를 만들 것이라고 하였다. 이수성 배우체는 중복수정을 방해하고 수정 없이도 난세포가 배로 발달하는 것을 촉진할 수 있다.

위와 반대로 몇몇 연구자들(Wedzony 등, 2002)은 모계 반수체 유기 중에 정상적인 수정이 여전히 일어날 수 있으나 계속되는 세포분열 중에 유기체의 염색체가 퇴화되어 시원세포로부터 제거되기 때문이라고 하였다. Fisher(2004)는 RWS에 의해 유기된 모계 유래 반수체를 확인하는데 microsatellite 표지를 이용하였다. 약 1.4%의 유전자형에서 하나 또는 간혹 몇 개의 유기체 유전자 단편을 갖고 있었다. 일반적으로 이러한 단편들은 상동의 모계 단편과 대체된 것이다. Li 등(2009)과 Zhang 등(2008)은 수정 후에 유기체로부터 온 염색체가 제거되었음을 제시하는 반수체와 DH의 계놈에 유기체 양친의 염색체 단편이 삽입되어있는 것을 보여주었다.

모든 정보를 종합하여 볼 때, 아직 반수체 유기 기작이 확실히 밝혀지지 못하였다. 다만 비정상적인 생식과정이 관여된다는 점은 확실하며 또한 서로 다른 유기체 들은 모계 반수체 형성과정에서 서로 다른 비정상적인 생식의 원인이 될 수 있다.

모계 반수체 유기 유전학 및 분자표지 분석

반수체 유기체와 비 유기체 양친과의 교배에서 유래된 분리집단의 연구로 반수체 유기 연관 형질이 연속변이 하며 *in vivo* 반수체 유기 형질이 양적형질에 의해 지배된다는 것이 밝혀졌다(Lashermes와 Beckert, 1988; Deimling 등, 1997; Rober 등, 2005, Vanessa 등, 2011). Lashermes와 Beckert(1988)은 Stock 6의 반수체 유기 형질은 우성형질로 몇 개의 주동유전자에 의해 조절됨을 암시하였다.

Deimling 등(1997)과 Rober(1999)은 RFLP 표지를 이용하여 Stock 6와 W23ig를 양친으로 하는 F3 집단에서 염색체 1과 2에 있는 반수체 유기와 관련이 있는 두개의 QTL을 확인하였다. 이러한 QTL들은 함께 17.9 %의 형태적 변이와 반수체 유기율의 유전자형 변이의 40.7 %를 설명한다. 1번 염색체에 있는 양성 QTL은 우성이며 Stock 6에서 유래하였고 2번 염색체

에 있는 QTL은 상가적이며 W23ig에서 유래하였다.

또 다른 연구에서, Barret 등(2008)은 비 유기체와 유기체 계통 PK6의 교배에서 얻은 집단에서 분리왜곡(segregation distortion)을 발견하였다. 이 분석 결과로 반수체 유기에 관련된 주동 유전자좌가 bin 1.04내 11.6 cM에 해당하는 염색체 1에 있음을 밝혔다. 벼 염색체와의 비교에 의한 정밀 지도 작성으로 유기 유전자좌와 근접한(4.5, 4.9 cM) 2개의 STS 표지를 확인하였다. 이 정밀지도 지역 내에는 28개의 추정 발현유전자가 존재한다.

Prigge 등(2012)는 반수체 유기계통 UH400과 두개의 온대형 (CAUHOI, 1680)과 두개의 열대형(CML395, CML495) 자식계를 교배하여 얻은 네 개의 분리집단과 관련된 비교 QTL 지도를 작성하였다. 세 개의 집단에서 66%의 유전적 변이를 설명하는 주동 QTL이 1번염색체(bin 1.04)에 존재함을 확인하였다. 이 세 집단에서 bin 1.04에 있는 유전자좌들은 UH400에 대하여 분리왜곡을 나타내었다. 두개의 유기계통(CAUHOI x UH400)을 양친으로 하는 다른 분리집단에서는 5개 염색체에서 7개의 QTL이 확인되었는데 9번 염색체에 있는 한 QTL은 이 조합의 3 세대에 걸쳐 20% 기여하였다. 이러한 결과는 1번 염색체상의 주동 QTL과 미동 QTL들을 축척하면 반수체 유기 능력을 증진 시킬 수 있을 것임을 보여준다.

반수체 유기를 위한 대상 유전자원 (source germplasm)

반수체 유기를 위한 대상유전자원 또는 공여체는 육종프로그램의 목표에 따라 다르다. 보통 육종가들은 F1 또는 F2집단에서 반수체를 유기한다. F2에서 유래된 DH가 F1집단에서 유래된 것 보다 거의 50 % 넘게 우수 재조합체(best recombinants) 를 포함하는 것으로 추정되었다 (Gallais, 1990). 그러나 F2와 F3에서 유래된 우수재조합체의 빈도의 차이는 작았다. 이러한 결과는 유전자들 간의 연관이 관찰될 때에는 F2집단을 대상으로 한 DH 접근이 유리하다는 것을 시사한다(Gallais, 1990; Bernardo, 2009).

옥수수에는 위대한 열성대립인자들의 돌연변이 부담이 크므로 타가수정하는 재래종들을 교잡육종에 이용하기 어렵다. DH 기술이 유전자 집단에서 위대한 열성형질들을 제거하는 효과적인 접근 방법이 될 수 있을 것이라 제안되었다(Gallais, 1990; Wilde 등, 2010). 재래종에서 유래된 계통들이 농업적으로 중요한 형질들이 우수자식계통과 비교하여 현저한 차이가 있어 교배육종프

로그래에 직접 이용될 수 없을지라도 이들은 MAB(marker-assisted backcrossing)나 육종 전 단계에서 유용한 유전자원이 될 수 있다. 우수 자식계통과 비교하여 재래종에서 유래된 DH 계통들은 하디-와인버그 평형(Hardy-Weinberg equilibrium)에 훨씬 근접해 있어 더욱 정확하고 선명하게 QTL을 검출하고 맵핑할 수 있다. 따라서 재래종에서 유래된 DH 계통들은 표지-형질 연관 연구에 매우 적합하다.

인용문헌

- Barret P, Brinkmann M, Beckert M (2008) A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize. *Theor. Appl. Genet.* 117: 581-594.
- Bernardo R (2009) Should maize doubled haploids be induced among F1 or F2 plants? *Theor. Appl. genet.* 119: 255-262.
- Bylich VG, Chalyk ST (1996) Existence of pollen grains with a pair of morphologically different sperm nuclei as a possible cause of the haploid-inducing capacity in ZMS line. *Maize. Genet. Coop. Newslett.* 170: 33.
- Chalyk S, Baumann A, Daniel g, Eder J (2003) Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize. *Maize Genet. Coop. newsllett.* 77: 29.
- Chase SS (1951) Production of homozygous diploids of maize from monoploids. *Agron. J.* 44: 263-267.
- Chase SS (1969) Monoploids and monoploid-derivatives in maize (*Zea mays* L.). *The Botanical Review* 35: 117-167.
- Chu CC, Wang CC, Sun C, Shu KC, Yin CY, Chu FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18: 659-668.
- Coe EH (1959) A line of maize with high haploid frequency. *Am. Naturalist* 93: 381-382.
- Deimling S, Röber FK, Geiger HH (1997) Methodology and genetics of *in vivo* haploid induction in maize [in German]. *Vortr Pflanzenzüchtg* 38:203-224.
- Fischer E (2004) Molekulargenetische Untersuchungen zum Vorkommen paternaler DNA-Übertragung bei der *in vivo*-Haploiderinduktion bei Mais (*Zea mays* L.). PhD dissertation, University of Hohenheim. Grauer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Gallais A (1990) Quantitative genetics of doubled haploid populations and application to the theory of line development. *Genetics* 124: 199-206.
- Genovesi AD, Collins GB (1982) *In vitro* production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci.* 22: 1137-1144.
- Kermicle JL (1969) Androgenesis conditioned by a mutation in maize. *Science* 166: 1422-1424.
- Kermicle JL (1971) Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize. *Am. J. Bot.* 58: 1-7.

- Kermicle JL (1994) Indeterminate gametophyte (*ig*): biology and use. In: M freeling, V Walbot (eds) The maize handbook, New York. Springer-Verlag, pp. 388-393.
- Ku MG, Cheng WC, Kuo LC, Kuan, YL, An HP, Huang CH (1978) Induction factors and morpho-cytological characteristics of pollen derived plants in maize (*Zea mays*). In: Proc. Symp. Plant Tissue Culture May 25-30, 1978, Beijing China, pp. 35-42. Science Press, Beijing, China.
- Lashermes P, Beckert M (1988) Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. Theor. Appl. Genet. 76: 404-410.
- Li L, Xu X, Jin W, Chen S (2009) Genomewide selection and marker-assisted recurrent selection in doubled haploid versus F2 populations. Crop Sci. 49: 1719-1725.
- Lin BY (1981) Megagametogenetic alterations associated with the indeterminate gametophyte (*ig*) mutation in maize. Rev. Bras. Biol. 41: 557-563.
- Mahendru A, Sarkar KR (2000) Cytological analysis of the pollen of haploidy inducer lines in maize (*Zea mays* L.) Indian J. Genet. Plant Breed. 60: 37-43.
- Miao SH, Kuo CS, Kwei YL, Sun AT, Lu WL, Wang YY (1981) Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. In: Proc. Symp. Plant Tissue Culture, date, Beijing, China, pp. 23-24. Science Press, Beijing, China.
- Pogna NE, Marzetti A (1977) Frequency of two tubes in *in vitro* germinated pollen grains. Maize Genet. Coop. Newslett. 51: 44.
- Pollacsek M (1992) Management of the *ig* gene for haploid induction in maize. Agronomie 12: 247-251.
- Prigge V, C Sanchez, BS Chillon, W Schipprack, JL Araus, M Banziger, AE Melchinger (2011) Doubled haploids in tropical maize: I. Effects of inducers and source germplasm on *in vivo* haploid incution rates. Crop Sci. 51: 1498-1505.
- Prigge V, Xu XW, Li L, Babu R, Chen SJ, Atlin GN, Melchinger AE (2012) New insights into the genetics of *in vivo* induction of maternal haploids, the backbone of doubled haploid technology in maize. Genetics 111: 781-793.
- Röber FK (1999) Fortpflanzungsbiologische und genetische Untersuchungen mit RFLP-markern zur *in-vivo* Haploideninduktion bei Mais. Ph.D. Dissertation, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Röber FK, Gordillo GA, Geiger HH (2005) *In vivo* haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. Maydica. 50:275-283.
- Rotarenco VA, Eder J (2003) Possible effect of heterofertilization on the induction of maternal haploids in maize. Maize Genet. Coop. Newslett. 77: 30.
- Sarkar KR, Coe EH Jr (1966) A genetic analysis of the origin of maternal

- haploids in maize. *Genetics* 54: 453-464.
- Sarkar KR, Coe EH Jr (1971) Analysis of events leading to heterofertilization in maize. *J. Hered.* 62: 118-120.
- Schneerman MC, Charbonneau M, Weber DF (2000) A survey of *ig* containing materials. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 74: 92-93.
- Spitko t, Sagi L, Pinter J, Marton LC, Barnabas B (2006) Haploid regeneration aptitude maize (*Zea mays* L.) lines of various origin and of their hybrids. *Maydica* 51: 537-542.
- Swapna M, Sarkar KR (2011) Anomalous fertilization in haploidy inducer lines in maize(*Zea mays* L.). *Maydica* 56: 221-225.
- Wan Y, Duncan DR, Rayburn AL, Petolino JF, Widholm JM (1991) The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.* 81: 201-211.
- Wedzony M, Röber FK, Geiger HH (2002) Chromosome elimination observed in selfed progenies of maize inducer line RWS. In: XVIIth International Congress on Sex Plant Reports Maria Curie-Sklodowska University Press, Lublin, P. 173.
- Wilde K, Burger H, Prigge V, Presterl T, Schmidt W, Ouzunova M, Geiger HH (2010) Testcross performance of doubled-haploid lines developed from European flint maize landraces. *Plant Breeding* 129: 181-185.
- Zhang Z, Qju F, Liu Y, Ma K, Li Z, Xu S (2008) Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep.* 27: 1851-1860.

3. 모계 반수체 유기체의 설계 및 이행

Vijay Chaikam, George Mahuku, BM Prasanna

대상 집단으로 부터 적절한 수의 DH 계통을 성공적으로 만들기 위해서 중요한 첫 단계는 반수체 유기 교배를 통해 충분한 반수체 종자를 확보하는 것이다. 이는 3가지 중요한 요인에 의해 좌우 된다 : (1) 사용된 유기체의 반수체 유기율 (HIR)과 꽃가루 생산 능력, (2) 성공적인 반수체 유기교배 총수, 그리고 (3) 대상 집단에 안토시아닌 색소 억제자의 부재. 육종포장의 설계 또한 수분처리효율 및 성공적인 교배에 영향을 준다. 이러한 요인들이 유기 포장에 식재하기 전에 충분히 고려되어야 한다.

반수체 유기를 위한 유기계통 선발

반수체 유기계통은 유기체의 HIR, 꽃가루 생산, 초장, 활력과 수량, 개화 특성, 병충해 저항성 및 대상 환경에서 유지관리의 용이성 등이 고려되어야 한다. DH 기술을 대규모로 상업적으로 이용하기 위해서는 고 HIR 계통이 선택되어야 한다. 1장에서 언급된 바와 같이 평균 HIR이 6% 이상인 것들이 여러 종 개발되어 있다. 그러나 이 유기체들 대부분은 온대환경에 더 잘 적응하는 것들이다. CIMMYT에서는 온대성 계통 UH400, RWS 및 이들의 교배계통을 멕시코의 열대 및 아열대에 적응하는 유기체를 만드는데 이용해 왔다. 이 온대성 유기체들은 열대와 아열대 환경에서도 동등한 수준의 반수체유기율 (8-10 %)을 유지한다. 그러나 이들 온대성 유기계통과 이들의 교잡종들은 열대환경에서 농업적 특성이 열악하고 병해에 취약하다. 그럼에도 불구하고, 병충해 약을 수차례 살포하고, 엽면시비 및 최선의 농업적 관리로 반수체 유기를 위한 꽃가루를 얻을 수 있다. 온대형 유기계통과 그 교잡종들은 키가 매우 작아 분리된 블록에서 개방수분이 불가능하여 고비용의 인공수분을 필요로 한다. 매우 일찍 개화하고 화분비산기가 짧아 열대 대상 집단과 개화기를 일치시키기 위해 여러 차례 시차 파종하는 것이 필요하다. 열대 조건하에서는 온대형 유기계통들의 이삭의 크기가 아주 작고 이삭부패병에 약하기 때문에 종자생산 및 유지가 또 다른 문제이다. 멕시코의 열대환경에서 온대형 유기체들은 동계재배가 하계재배에서보다 비교적 나은 생육을 보인다.

한편 CIMMYT에서는 Hohenheim 대학과의 공동연구를 통하여 열대환경에

서 고 HIR(8-12%)을 유지하면서도 개화 및 꽃가루 생산과 같은 농업적 특성이 나은 열대형 반수체 유기계통(TAILS, tropicalized haploid inducer lines)을 육성하였다. 열대형 유기체 교잡종들은 온대형에 비해 키가 커서 격리된 포장에서 자연수분에 이용될 수 있다. 열대환경에서 종자 생산이나 계통 유지도 비교적 용이하다.



그림 1. 멕시코 엘 바탄 소재 CIMMYT에서 온대 및 열대형 유기계통들

유기 교배 수

대상집단에 대한 유기 교배 수는 대상집단에서 얼마나 많은 반수체 종자를 얻기를 원하는가에 따라 다르다. 다시 말하면 DH계통의 생산 목표에 따라 다르다, CIMMYT에서는 각각의 대상집단으로부터 200개의 DH계통을 생산하는 것을 목표로 한다. 염색체 배가 성공률이 10 %라고 하면 200개의 DH계통을 얻기 위해서는 적어도 2,000개의 반수체 종자가 필요하다. 8%의 반수체 유기율과 이삭 당 종자수를 200개로 보면 2,000개의 반수체를 얻기 위해서 125개의 성공적 교배가 필요하다. 발아 실패 및 발아 후 치사를 감안하여 적어도 150개체의 식물체를 심는다.

인공수분 / 자연수분

유기 교배는 자연수분 또는 인공수분 모두 가능하다. 어느 방법을 선택하느냐는 몇 가지 요인에 달려있다.

격리포장에서 자연수분을 선택하는 것은:

- 적어도 주변지역의 옥수수 파종 1개월 전에 파종이 가능할 때;
- 대상 집단들의 출사기가 15-20일 이상 차이가 나지 않을 때;
- 대상 집단 수가 50개 이상일 때; 그리고
- 적어도 대상 집단 식물체 착수고보다 키가 큰 유기체 또는 유기체 교잡종을 활용할 수 있을 때

유기포장에서 인공수분이 선호 될 경우:

- 유기할 대상 집단 수가 적을 때
- 대상 집단의 개화기에 대한 정보가 없을 때
- 대상 집단의 숙기가 다양할 때
- 조기 파종에 의한 격리가 불가능할 때; 그리고
- 사용될 유기체의 키가 대상 집단의 키에 비해 상대적으로 작을 때.

유기 포장의 설계

효과적인 인공수분과 반수체유기의 성공을 위해서는 유기 포장을 잘 설계하는 것이 중요하다. 인공수분과 개방수분을 위하여 동일한 포장설계도 가능하다. 대상 집단의 출사기 및 유도체의 출용기에 대한 정보도 포장 설계에 꼭 필요하다. 비슷한 출사기를 갖는 모든 대상 집단들을 각각 그룹으로 하여 쉽게 수분 처리 할 수 있도록 동일한 구역에 파종한다.

CIMMNYT Agua Fria 시험지의 DH 포장에서는 대상 집단의 종자는 4.5 M의 긴 열(그림3의 수직열)에 25cm 간격으로 파종하여 각 열당 19주를 수용한다. 열간 간격은 75 cm으로 유지한다. 반수체 유기 계통들은 길게 심는다. 유기포장의 설계도를 그림 2와 3에 나타내었다. 열대형 및 온대형 유기 계통들이 열대형 대상 집단들 보다 훨씬 일찍 개화하기 때문에 대상 집단은 더 일찍 파종한다. 조기-중기에 개화하는 모든 대상 집단을 포장의 앞쪽에서 중간까지 배치한다. 중기-후기에 개화하는 다른 집단은 중간에서 끝 까지 배치한다. 각각의 대상 집단은 8열씩 배치한다. 각각 4열의 대상 집단 마다 2열의 긴 열 (그림 3의 황색부분)을 유기체 배치를 위해 남겨둔다. 또한 앞뒤에 각각 2열(그림 3의 황색부분 수평배열))을 유기체 배치를 위해 남겨둔다. 유기체는 대상 집단의 출사기에 따라 일주일 간격으로 시차 파종한다. 1차 유기체 파종은 대상집단 파종 1주일 후에 첫 번째 긴 열에. 제 2차 유기체 파종은 대상 집단 파종 14일 후에 두 번째 긴 열에 파종한다. 3차 파종

은 대상 집단 파종 21일 후에 앞 2열에 파종하고 4차 파종은 대상 집단 파종 28일 후에 맨 끝 열에 파종한다. 또 필요하다면 5차로 일주일 후에 맨 끝에 유기체를 한열 추가 파종한다. 이러한 설계로 1ha 당 필요한 수의 유기체 식물과 150개 대상 집단을 수용할 수 있다.



그림 2. 멕시코 소재 CIMMYT Agua Fria 시험지의 반수체 유기 포장

반수체 유기 포장의 관리

격리포장은 다른 옥수수 포장에 비해 매우 일찍 파종하기 때문에 종자나 유묘는 환경이나 지역의 생물학적 스트레스 압력에 따라 곰팡이나 곤충의 공격에 취약할 수 있다. 그러한 경우에는 종자처리 하면 발아 중에 또는 유묘기에 진균병과 곤충의 피해를 줄일 수 있다. 종자는 살균제와 살충제 혼합제로 처리할 수 있다. Gaucho¹⁾와 같은 종자처리 침투성살충제는 유묘기 해충에 효과적이다. 토양 준비 시에 비료 (75-80-60 NPK/ha), 발아 전 제초제 (Atrazine)과 살충제(Lorsban 5G)를 토양에 혼합한다. 파종 전에 시험구에 관개하고 발아 후에는 토양 조건에 따라 관개 한다. 40일 후에 2차 시비 (150-80-60 NPK/ha) 한다. 잡초관리를 위해 40-50일 경 식물체에 Paraquat²⁾를 처리하기도 한다.

반수체 유기 포장에서 유기식물체는 병 해충에 약하고 피해를 받기 쉽기 때문에 특별히 잘 관리해야 한다. 병충해가 발생했을 때에는 살균제와 살충제를 살포 한다. 멕시코의 열대 환경에서는 그을음무늬병(Turcicum leaf blight), 녹병, tar spot complex, 깨씨무늬병(Bipolaris maydis)과 이삭썩음병 등이 옥수수에 피해를 주는 주요 병이다. 이러한 병 들은 Tilt(Propiconazole-0,5L/ha)를 15일 간격으로 살포하면 효과적으로 관리할 수 있다.

주¹⁾ Gaucho: 주성분 imidachloprid, 국내옥수수용 미등록 (벼에는 등록)

주²⁾ Paraquat: 주성분 methyl viologen, 제초제 그라목손.

지역/환경조건에서는 옥수수 stunt complex를 매개하는 메뚜기 (greenhopper)를 생육초기에 방제할 필요가 있다. 이삭 성장기에 상당한 피해를 줄 수 있는 담배거세미나방(Spodoptera litura)도 효과적으로 방제해야 한다.

유기포장에서 수분

인공수분, 개방수분 모두 꽃가루의 오염을 막기 위해 출용초기에 대상집단의 용수를 제거한다. 개방수분을 위한 격리포장에서는 이삭에 봉지를 씌워서는 안 된다. 꽃가루 비산을 위해 수동 송풍기를 사용할 수 있다.

인공수분을 하는 포장에서는 출사 이전에 이삭에 봉지씌우기를 한다. 균일한 수염의 성장을 위해 인공수분 하루 전에 이삭 선단부를 자르기도 한다. 약 10개체의 유기체의 꽃가루를 채집하여 혼합하여 수염에 적절히 묻힌다. 좋고 완전한 착립을 위해 필요시에는 각 이삭을 2일 연속해서 두 차례 수분할 수도 있다. 이삭의 생육과 건조기간 중에 조류의 피해를 받지 않도록 잘 관리한다.

수확한 이삭의 처리

대상집단의 이삭은 그 집단의 이삭이 생리적으로 숙기에 도달하면 다른 대상집단과 분리하여 수확할 수 있다. 이렇게 하면 병충해의 의한 감소를 방지할 수 있다. 동일한 집단의 모든 이삭은 이름표를 명확하게 붙인 한 두개의 망사자루에 수확한다. 수확한 이삭은 충해를 방지하기 위하여 잠깐 살충액 (deltametrina 125ml/200 l)에 담갔다가 햇볕에 완전히 건조한다. 이삭이 건조되면 종자를 떨어 이름표를 붙인 망사자루에 담아 정리 전까지 저온저장고에 보관한다.

참고 : 상업용 농약의 특정 제품명을 언급한 것은 그 제품에 대한 CIMMYT가 공식적으로 보증코자하는 것이 아님. 동일한 문제점 해결을 위해 동일하거나 더 나은 제품이 있을 수 있음.

반수체 유기체들의 HIR 평가

반수체 유기체통들의 HIR 평가를 위해서는 생육초기 유묘 또는 종자에서 반수체를 명확하게 확인할 수 있는 적절한 테스터가 필요하다. 가장 널리 이용되는 테스터는 *liguleless*(엽설부재)나 *glossy*(광택)와 같은 열성유전자를 갖고 있다. *liguleless x inducer*나 *glossy x inducer*로부터 얻은 시험교배종자가 발아할 때 반수체 유묘에서만 *glossy*나 *liguleless* 표현형을 보인다.

이러한 시험은 유묘(3-4엽기)를 대상으로 온실에서 수행할 수 있다. 또한 $R1-nj$ 를 갖고 있는 유기계통들에 대해서는 $R1-nj$ 안토시아닌 표지 시스템을 HIR 평가에 이용하는 것도 가능하다. 이 시스템이 효과적이려면 테스트에 억제 유전자가 없고 서로 다른 환경조건에서 $R1-nj$ 가 잘 발현하는 것이 확인되어야 한다. 유기체들은 그러한 테스트와 교배될 수 있고 HIR은 $R1-nj$ 발현에 근거해 결정된다.

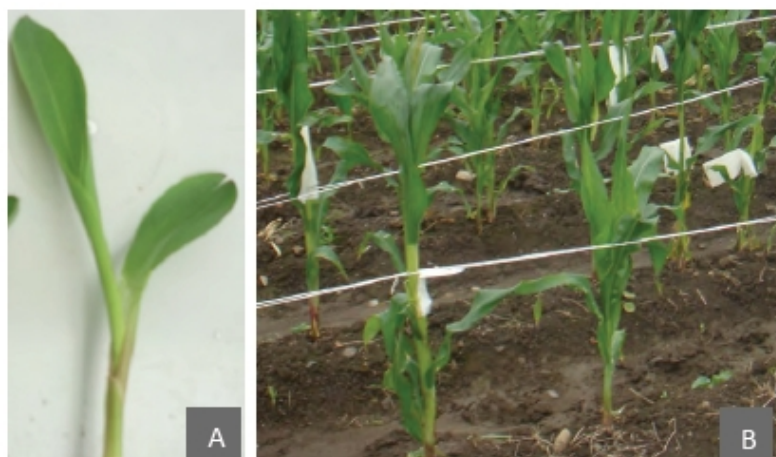


그림 4. 엽설부재 표현형 (A) 유묘기 (B)성숙 식물체. 엽설부재 표현형은 엽설과 엽이가 없고 잎이 직립인 것이 특징.

반수체 유기체의 유지 육종

반수체 유기 분리왜곡과 자연에 반하여 선발되는 반수체 유도를 조절하는 유전적 요인으로서 고 HIR을 유지하기 위해서는 지속적인 선발 및 시험 체계가 수립되어야 한다. 반수체 유기계통들의 유지 육종에 있어서는 고 HIR과 안토시아닌 표지시스템의 유지가 매우 중요하다. 또한 꽃가루 생산 특성과 식물체의 활력도 중요하다. 유기체의 활력을 유지하기 위해서는 자가수분보다는 근친교배(sib-mating)를 하는 것이 좋다.

종자 증식구에서 유기식물체들을 다양한 농업적 표현형적 특성(예를들면 꽃가루 생산능, 초장, 활력, 줄기의 자색발현, 병저항성, 이삭특성)에 따라 점수를 매긴다. 가장 우수한 식물체 들을 선발하여 표시를 한다. 한 줄에서 선발된 식물체에서 수집한 꽃가루들을 합쳐서 (동일한 열 내에서) 근친교배를 하는데 이용하고 또 HIR 평가에 적합한 열성 tester와 시험교배를 하는데 이용한다. 한 열에서 수확한 모든 이삭은 종자를 떨어 분리해서 보관한다.

유기체 증식구의 각 열에서 얻은 시험교배 종자는 구분해서 온실에 파종한

다. 유묘 3-4엽기에 열성형질에 대해 평가하고 HIR을 평가한다. 고 HIR의 유기체 열을 확인하고 그 열의 이삭에서 얻은 종자를 대상으로 배와 배유의 자색의 발현 정도를 조사한다. 농업적 특성이 우수하고 배와 배유의 색소발현이 좋은 식물체로부터 이삭을 선발한다. 이 이삭들이 유기계통들을 유지하는데 사용된다.

4. 안토시아닌 표지 이용 모계 반수체 확인

Vijay Chaikam, BM Prasanna

머리말

반수체 식물은 직립형 잎, 약한 식물체, 불임성과 같은 특성에 의해 배수체 식물과 구분될 수 있다. 이러한 특성들은 반수체가 상당히 생육한 후에야 관찰될 수 있다. 종자 단계에서 반수체를 배수체와 구분할 수 있다면 염색체 배가에 드는 비용을 절감하고, 온실 및 포장 공간, 노력 등을 절감할 수 있다. 따라서 상업적인 규모로 DH 기술을 적용하는 데에는 종자단계에서 반수체를 확인하는 것은 매우 중요하다. 상업적 이용이 가능하도록 종자 단계에서 안토시아닌 색소발현에 근거하여 반수체를 배수체로부터 구분할 수 있는 독창적인 표현형 표지시스템이 1960년대(Nanda와 Chase, 1966; Greenblatt와 Bock, 1967)에 확인되었다. 반수체 유기계통에 안토시아닌 표지의 도입으로 종자단계에서 뿐 아니라 식물생육 여러 단계에서도 반수체의 확인이 가능하게 되었다.

R1-nj 표지 시스템 이용 반수체 종자 확인

R1-nj(R1-Navajo),는 *R1* 유전자좌의 우성 이형 대립유전자이며 옥수수 종자의 반수체검정에 널리 이용된다. *R1-nj*는 안토시아닌 합성경로상의 다른 우성유전자들(*A1*, *A2*, *Bz1*, *Bz2*, *C1*, *C2*)과 조합하여 종자 배유의 관부에 짙게 착색이 되게 하는 유전자이다(Coe, 1994). 더욱이 이 유전자는 배반(scutellum, embryo tissue)의 자색 착색을 조절한다. 이러한 표현형을 Navajo 종자표현형이라고 한다.

현재 일반적으로 이용되고 있는 반수체 유기계통들에는 *R1-nj* 대립유전자가 안토시아닌 생합성에 필요한 다른 유전자들과 함께 통합되어있다. 육종 프로그램에 이용되는 대부분의 옥수수 유전자원은 옥수수 종자나 식물 조직이 자/적색 으로 착색되는 안토시아닌 생합성유전자나 *R1-nj* 대립유전자를 갖고 있지 않다. 유기계통들이 부친으로 안토시아닌 색소 표지가 없는 대상유전자원(모친)과 교배하면 얻는 모든 교배종자는 *R1-nj* 유전자가 무색의 *r1* 대립형질에 대해 우성이므로 배유와 배에서 Navajo 표현형을 보일 것으로 기대된다. 따라서 이러한 *R1-nj*의 발현 차이에 의해 2배체 종자들로부터 모계반수체를 확인할 수 있다. 고 HIR 반수체 유기체를 이용하여 교배하면 모

계 반수체는 6-10%의 비율로 나타난다.

실제로는, 교배로부터 세 가지 형태의 종자가 얻어질 수 있다.

- (1) 배유와 배에 자색 착색된 정상 2배체 또는 교배종자
- (2) 자색 배유와 무색 배를 갖는 반수체 종자, 그리고
- (3) 무색의 배 및 배유를 갖는 종자로 이는 꽃가루의 오염 때문일 수 있다.

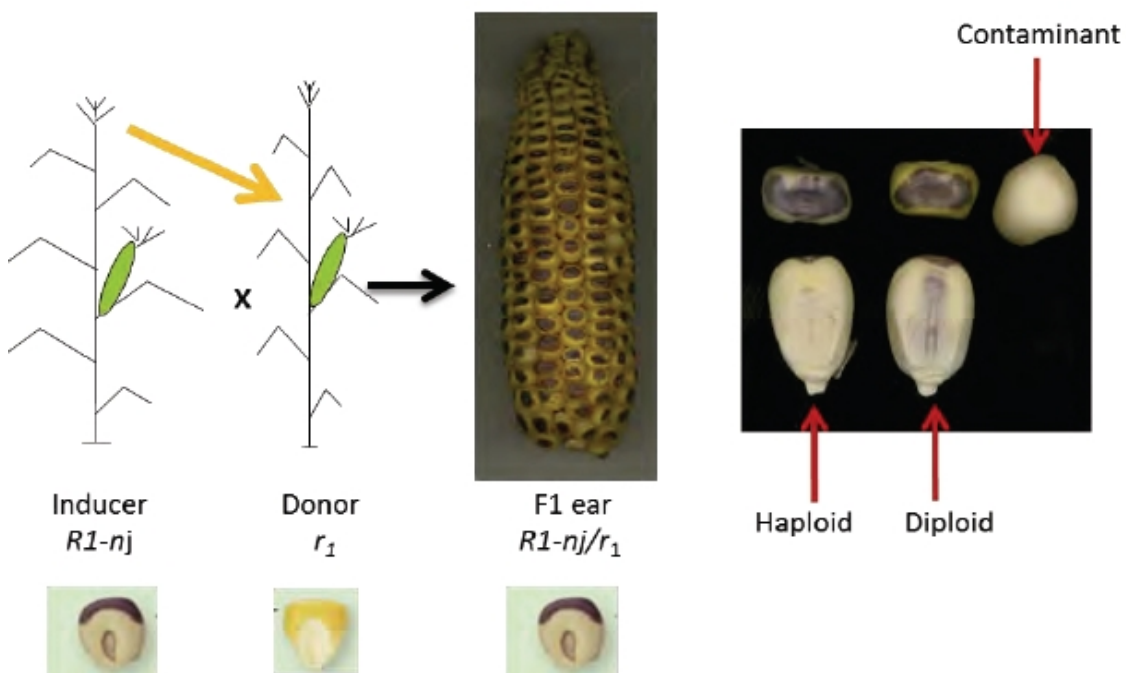


그림 1. 모계 반수체 유기 및 전형적인 유기 교배에 의해 얻어진 종자형태.

R1-nj 표지 시스템이 반수체 확인에 효과적이긴 해도 *R1-nj* 발현은 모친의 유전적 배경에 크게 영향을 받는다. Navajo 관부 착색은 작은 점으로부터 기부를 제외한 전체 호분층에 나타나는 것과 같이 차이가 있다. 또한 호분층에 보이는 색소의 강도는 옅은 색부터 짙은 색까지 차이가 있다. 배반에 나타나는 색도 옅은 색부터 짙은 색까지 차이가 있다(그림 2).

R1-nj 발현 변이로 다음과 같은 다른 결과가 나타날 수 있다:

- (1) 배유 전체와 모든 배 조직이 착색: 반수체 확인 용이.
- (2) 배유 관부와 배반 착색 양호: 반수체 확인 용이.

(3) 배유 관부에 자색 반점 및 배에 약한 발현 : 반수체 확인 가능하나 반수체 확인이 어려워 거짓 양성도 생길 수 있음.

(4) 배 및 배유에서 완전히 발현 억제 : 반수체 확인 불가.

(5) 배유에서 발현 완전 억제되었으나 배에서 어느 정도의 표식이 있음 : 이 경우 배가 착색된 모든 종자는 2배체로 간주. 그러나 이러한 범주에 속하는 것으로부터 반수체와 꽃가루 오염 구분 불가.

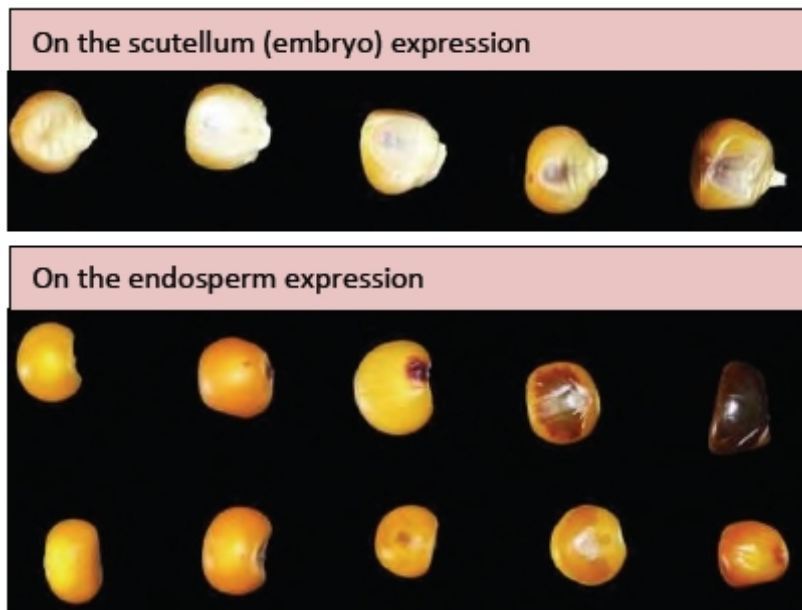


그림 2. 배 및 배유의 *R1-nj* 발현 변이.

R1-nj 시스템의 제한점

(1) 대상집단에 마치종에 일반적으로 존재하는 *C1-1* 과 같은 안토시아닌 억제 우성유전자가 있을 때 *R1-nj* 색소 발현이 완전히 억제되고 반수체 종자의 확인이 거의 불가능하다. CIMMYT의 우수 유전자원을 대상으로 종자 색소 표지가 작용을 하여 효과적으로 반수체 종자를 확인할 수 있는 비율이 어느 정도인지 조사 중이다. 현재, 다양한 대상 집단과 반수체 유기체 집단과의 교배체 중 약 8%에서만 *R1-nj* 색소 발현이 억제되는 것으로 나타났다.

(2) F1 또는 F2 집단이 대상 재료일 때에 그리고 양친 중 한쪽만 억제유전자를 갖고 있을 때에는 종자는 Navajo 표현형에 대해 분리할 것이다. 이러한 경우에는 모든 반수체 종자를 확인할 수 없어 절반 내지는 3/4의 반수체를 잃을 수 있다.

(3) 반수체 확인의 정확성과 속도는 배와 배유의 색소발현을 통한 반수체

확인에 대해 잘 알고 있는 훈련된 직원에 의해 좌우된다.

(4) 이 시스템을 이용하는 반수체 확인의 자동화는 불가능하지는 않겠지만 쉽지 않다.

(5) 수확시기의 종자 수분함량은 색소 발현의 강도에 영향을 줄 수 있다 (Rotarenco 등, 2010).

반수체 확인을 위한 자색 뿌리와 자색 줄기 표지

반수체 확인에 앞서 언급한 *R1-nj* 색소 표지 시스템의 한계라는 관점에서, 몇몇 연구자들은 신뢰할 수 있는 모계 반수체의 식별을 위하여 특히 줄기와 뿌리에서 발현되는 추가적인 색소 표지의 가능성에 대하여 조사하였다. (Rotarenco 등, 2010). 두개의 유전자, 광과 무관하게 식물체 조직에 자색 착색이 되게 하는 *PI1(Purple1)*과 지상부 거의 모든 조직에서 광에 의해 자색 착색이 되게 하는 *B1(Booster1)*(Coe, 1994), 이 그것이다 .

*B1*과 *PI1* 유전자는 유기 계통에 *R1-nj* 표지시스템과 함께 통합될 수 있다. Navajo 착색이 종자에서 발현되지 않을 경우에 반수체는 포장에서 뿌리 또는 줄기의 색으로 확인할 수 있다. 이러한 유기체들이 대상 재료들과 교배될 때 배수체 식물은 자색의 뿌리와 줄기를 갖고 추정 배가반수체에서는 이러한 색소발현이 나타나지 않을 것이다.

MHI(Eder와 Chalyk, 2002)와 Procera (Rotaranco 등, 2010)와 같은 온대형 반수체 유기 계통들은 더욱 효과적으로 반수체를 식별하기 위하여 *R1-nj*를 *B1* 및 *PI1*과 조합하였다.



그림 3. (A) 뿌리의 자색 발현; (B) 2배체 식물의 자색줄기와 추정 배가반수체식물의 정상적인 녹색 줄기

B1과 P11 시스템의 제한점

(1) 많은 대상 재료들이 B1과 P11 유전자를 갖고 있다. 그러한 대상 집단에서는 반수체 식물 역시 뿌리와 줄기에서 착색 발현이 나타나기 때문에 반수체를 식별하는 것이 거의 불가능하다.

(2) B1과 P11 유전자의 발현이 식물생장조건 특히 광과 온도 조건의 영향을 받는다. 자색색소는 저온 조건에서 가장 잘 축적되는 것이 관찰되었다.

앞으로의 가능성

몇몇 연구팀에서 거짓 양성 반응이 최소화 된 자동화 반수체 검출을 촉진할 수 있는 새로운 표지 시스템을 탐색중이다. Rotarenco 등(2007)은 종자의 오일 함량에 기초한 반수체 확인 방법을 제안하였는데 오일 함량은 NMR(nuclear magnetic resonance) 기반 기술로 자동화 될 수 있다. Li 등(2009)은 최근에 Stock6 유래 유기체(약 2% HIR, 종자 오일 고함유 78g/kg) CAUHOI를 개발하였는데 이를 이용하면 R1-nj에 의한 배반의 착색이 없고 배유의 오일함량이 낮은 반수체의 식별이 가능하다. 이 새로운 방법은 유망해 보이나 열대 유전배경을 갖는 DH 대량 생산을 위한 신뢰성 및 이용성에 대해서는 더 조사가 필요하다.

인용문헌

- Coe EH (1994) Anthocyanin genetics. In: M Freeling, V Walbot (eds) The maize handbook. Springer-Verlag, New York, pp. 279-281.
- Eder J, Chalyk ST (2002) *In vivo* haploid induction in maize. Theor. Appl. Genet. 104: 703-708.
- Li L, Xu X, Jin W, Chen S (2009) Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize. Planta 230: 367-376.
- Nanda DK, Chase SS (1966) An embryo marker for detecting monoplasts of maize (*Zea mays* L.). Crop Sci. 6:213-215.
- Rotarenco VA, Kirtoca IH, Jacota AG (2007) Possibility to identify kernels with haploid embryo by oil content. Maize Genet. Coop. Newslett. 81:11.
- Rotarenco VA, Dicu G, State D, Fuia S (2010) New inducers of maternal haploids in maize. Maize Genet. Coop. Newslett. 84:1-7.
- Röber FK, Gordillo GA, Geiger HH (2005) *in vivo* haploid induction in maize-performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. Maydica. 50:275-283.

5. 모계 반수체의 염색체 배가

Vijay Chaikam, George Mahuku

머리말

2배체 식물은 세포내에 한 쌍의 염색체를 갖고 있는데 염색체 하나는 부친, 다른 하나는 모친으로부터 온 것이다. 생식 기관(옥수수의 경우 옹수와 자수)에는 상동염색체 접합 및 재조합이 관여된 감수분열의 결과 반수체 옹성(꽃가루)과 자성(배낭) 배우체가 만들어 진다.

반수체 식물은 세포 내에 한 개의 염색체만을 갖고 있다. *In vivo* 방법으로 얻은 모계반수체는 모친으로부터 유래된 염색체만을 갖고 있다. 반수체의 생식기관에는 상동염색체 접합이 이루어지지 않으므로 감수분열도 진행될 수 없어 옹성 및 자성배우체나 생식세포도 만들어지지 않는다. 따라서 반수체 식물은 보통 불임이다. 염색체 배가의 목적은 반수체(n)로부터 배가반수체(2n)를 만들어 임성을 갖게 하고 이러한 식물체들이 자가수분을 통하여 배가 반수체(DH)계통을 만드는데 있다.

염색체 배가의 기작

몇몇의 반수체식물에서 임성회복을 가져오는 자연적 염색체 배가는 낮은 빈도로 일어난다. 염색체 배가의 자연발생 빈도는 대상 집단의 유전형에 따라 다르다. 지속적이고 고효율의 염색체 배가를 위해서는 반수체 식물체에 유사분열 억제제라고 하는 화학물질을 처리한다. 이러한 화학물질들은 유사분열 후에 세포내 염색체의 수가 배가 되도록 정상적인 유사분열을 변화시킨다. 일반적으로 사용하는 화학물질은 콜히친이라고 하는 것이 있는데 이는 수용성 알칼로이드로 *Colchicum autumnale*(가을 크로커스)의 구근에서 추출한 것이다. 콜히친 존재 하에서 세포분열 중기에 염색체 분열은 정상적으로 일어난다. 콜히친은 튜블린과 결합하여 유사분열 중기에 방추체 미세소관의 형성을 방해한다. 유사분열 후기에 복제된 염색체의 두개의 염색분체는 분리되지만 세포의 양극으로 이동하지 못하고 세포의 중심에 머무르게 된다. 말기에는 분리되지 않은 염색체 주위로 핵막이 형성된다. 따라서 유사분열 후에 염색체 수가 배가 된 세포가 생성된다.

식물에서는 생식기관을 포함한 모든 지상부 기관이 정단분열조직(shoot

apical meristem)에서 발생된다. 정단분열조직에는 분열해서 기관 원기로 분화하는 분열세포가 있다. 반수체 식물의 생식조직에서 완벽한 임성을 갖기 위해서는 분열세포에서 생식기관으로 분화하기 전에 분열세포의 염색체 배가가 이루어져야 한다. 따라서 아주 어린 유묘(파종 후 3-5일 후)에 유사분열 억제제를 처리하는 것이 권장된다.

염색체 배가에 필요한 설비

작업의 안전과 편의를 위하여 염색체 배가 작업은 3가지 작업구역으로 분리할 수 있다.

(1) 종자 처리 및 발아, 그리고 콜히친 처리를 위한 유묘의 준비를 위한 발아실. 이 발아실은 작업자가 종자를 처리하고 유묘 처리 준비를 할 수 있도록 작업대를 갖춘다. 또한 발아실에는 종자 발아를 위한 항온기가 있어야 한다.

(2) 화학물질의 보관, 콜히친 용액의 준비 및 유묘 처리를 하는 콜히친 처리 실험실. 이 방에는 화학물질 보관을 위한 냉장고, 용액 준비를 위한 가스 배출 장치(fume hood), 콜히친 처리 탱크 및 배기시설을 갖추어야 한다.

(3) 화학폐기물 처리 방법으로 처리될 때까지 콜히친 폐기물을 보관할 수 있는 방. 이 방에는 환풍기가 설치되어 있어야 한다.

종자 발아 및 종자 처리에 필요한 물품

발아지
플라스틱 욕조
종자 살포기
외과용 메스 및 날

콜히친 처리와 폐기물 관리에 필요한 물품

냉장고
저울
눈금 실린더 : 5,000ml, 1,000ml, 500ml 100ml
피펫: 1,000 microliters, 200 microliters, 100 microliters
교반기 및 교반 막대
용액 준비를 위한 용기
처리용 금속 탱크
폐기물 수집을 위한 금속 탱크나 폴리프로필렌 용기

방어복, 장갑, 마스크

화학약품

콜히친(colchicine)

DMSO(dimethyl sulfoxide)

표백제

염색체 배가의 각 단계

종자 발아

■ 발아지의 한쪽 구석을 잘라 표시를 하고 곰팡이 생육을 방지하기 위하여 0.05 % 표백제에 적신다.

■ 두장의 발아지를 자른 부분을 서로 맞추어 겹쳐 펼치고 종자 살포기를 이용 종자를 균일하게 펼친다 (그림 1).

■ 종자는 배 부분이 아래를 향하고 뿌리가 나오는 쪽이 발아지의 자른 부분을 향하게 한다(그림 2). 발아지 한 장을 자른 부분이 일치하게 그 위에 덮는다(그림 3).

■ 종자가 있는 이 세 겹의 발아지를 잘 말아서 묶음을 만들고 고무줄로 양쪽 끝을 묶는다 (그림 3,4,5)

■ 동일한 집단의 종자 묶음들은 자른 부분이 아래로 향하게 하여 망사 자루에 수직으로 보관하고 표백제를 채운 플라스틱 용기에 넣는다(그림 6, 7). 용기의 표백제는 곰팡이의 생육을 막고 습도 유지를 돕는다.

■ 플라스틱 용기는 온도가 25-28℃로 유지된 항온기에 넣는다. 종자를 72시간 발아 시킨다.

유묘의 준비

■ 3일 후 종자 묶음을 항온기에서 꺼낸다. 묶음을 작업대에 펼친다(그림 9, 10).

■ 뿌리의 길이가 3-5cm 자엽초의 길이가 약 2cm인 것이 콜히친 처리에 적합하다. 콜히친 처리 전에 뿌리와 싹을 각각 끝에서 2cm, 1cm 부분을 메스 날을 이용하여 자른다(그림 11). 메스 날은 알콜 램프에 살균한다. 뿌리 선단부를 자르면 이식 시 유묘의 취급이 용이하고 싹의 선단부를 제거하는 것은 콜히친 처리 시 정단분열조직(SAM, shoot apical meristem)이 콜히친에 잘 노출되도록 한다.

- 동일한 집단에 속하는 절단 유묘는 망사 자루에 보관한다(그림 12)
- 유묘를 담은 망사자루는 콜히친 탱크에 옮기기 전까지 수 시간 물에 보관 (그림 13).
- 발아가 안 되거나 발아묘의 크기가 작은 발아지는 다시 묶어 향온기에. 동일한 유묘 절단 과정을 다음 날 할 수 있다.



그림 1. 발아지에 종자를 펼친다.



그림6. 묶음을 망사자루에 넣는다.



그림 2. 유근 쪽이 발아지 절단부를 향하고 배가 아래를 향하도록 종자배열.



그림 7. 묶음을 표백제가 담긴 플라스틱 수조에 넣는다.



그림 3. 발아지로 종자 피복.



그림 8. 플라스틱 수조를 향온기에.



그림 4. 종자가 있는 발아지 말기



그림 9. 묶음을 푼다



그림 5. 말은 후 생긴 묶음



그림 10. 발아 된 만수체 묘

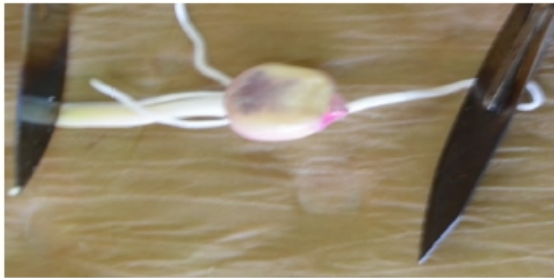


그림 11. 발아묘의 뿌리 및 싹 절단



그림 12. 망사자루에 담은 절단 묘



그림 13. 콜히친 처리 전까지 망사자루에 담아 물에 보관중인 유묘

콜히친 처리

콜히친은 독성이 크고 발암물질이므로 필요한 조치를 하여 노출을 방지토록 하여야 한다. 유묘는 작업자가 직접 콜히친과 접촉하지 않도록 특별히 제작한 탱크에서 암 조건하에서 처리할 수 있다. 이러한 탱크는 부식을 막기 위해 스테인리스로 제작한다 (그림 14). 탱크의 뚜껑에는 입구가 있어 흐르는 물을 공급하거나 콜히친 액을 담은 용기에 연결할 수 있다 (그림 15 A). 또한 탱크의 아래 중앙부에 배출구가 있어 사용한 용액을 방출할 수 있다(그림 15B). 이 탱크는 적당한 높이의 튼튼한 받침대 위에 배치한다. 이렇게 하면 폐기물 수집용기를 아래에 놓을 수 있다. 이동을 용이하게 하기 위해 아래 부분에 바퀴를 부착한다(그림 14).

필요한 콜히친 용액량은 처리 탱크에 절단 유묘를 넣고(그림 16) 유묘가 물에 잠기도록 물을 조심스럽게 공급하여 추정한다. 탱크에서 바닥의 출구(그림 15 B)를 통하여 물을 빼 용기에 담아 그 양을 측정한다. 이렇게 측정된 양이 준비해야 할 콜히친 용액량이다.

0.04% 콜히친, 0.5% DMSO 용액이 염색체 배가에 사용된다. 콜히친 분말을 후드 내에서 무게를 달아 알루미늄 박지로 씌운 플라스틱 용기에 담은 물에 용해한다. 교반기를 이용 DMSO와 함께 2-3시간 물에 녹인다. 이 용액을 준

비하는 사람은 작업복, 장갑, 얼굴가리개를 착용해야 한다. 콜히친 용액을 준비하는데 사용되는 용기는 바닥에 배출구가 있어 관을 연결할 수 있고 자동 분주기로 콜히친 용액을 자동으로 분주할 수 있다. 유묘는 콜히친 탱크에 12시간 처리한다. 편의를 위하여 저녁 8시부터 아침 8시 까지 처리할 수 있다. 사용된 콜히친은 처리 탱크 바닥의 배출구를 통하여 플라스틱 용기에 모은다. 유묘는 증류수를 용기에 펌프하는 방법으로 적어도 3회 이상 세척한다. 폐기물은 대형 플라스틱 용기에 수집하여 처리 전까지 격리된 방에 보관한다.



그림 14. 콜히친 탱크 및 용기로 부터 콜히친 주입.



그림 15.(A) 물 공급이나 콜히친 용기와 연결된 콜히친 탱크 덮개; (B) 바닥 배출구에서 콜히친 폐기물 수집



그림 16. 콜히친 탱크에 있는 망사자루에 담은 절단 유묘.

유묘 이식 및 온실 관리

■ 처리 탱크에서 꺼낸 유묘는 즉시 promix(피트모스)가 담긴 스티로폼 용기에 이식한다(그림 17,18,19). 콜히친 처리 후에 유묘는 매우 약하므로 (부서지기 쉬움) 아주 조심해서 다루어야 한다. 하배축이 긴 유묘는 더욱 손상을 입기 쉽다.

■ 유묘를 28-30℃ 온실에서 스티로폼 용기 내에서 3주간 유지한다. 매일 저녁 조심스럽게 위에서 관수한다. 첫 번째 관수 시에는 물을 주고 두 번째 관수 시부터 Hakaphos(13-40-13 NPK 및 미량요소)를 공급하여 뿌리의 생육 및 유묘의 활착을 돕는다.

■ 진균병 방지를 위하여 Tecto(Thiabendazol)를 3일 간격으로 살포하고 침투성살충제인 Gaucho(imidacloprid)를 충해 방지를 위해 이식 전에 주 1회 살포한다. Hakaphos와 Gaucho는 함께 사용이 가능하다.



그림 17. 처리 유묘의 이식



그림 18. 이식 1주 후의 유묘



그림 19. 이식 3주 후의 유묘

염색체 배가 각 단계에서 성공률

CIMMYT에서는 추정 반수체 종자의 발아율은 보통 85-90 % 정도이다. 대상재료의 유전적 배경과 처리 과정에 따라 다른 콜히친의 독성 때문에 염색체 배가 중에 상당수 유묘의 손실이 초래될 수 있다. 콜히친 처리된 추정 반수체중 약 40-80 % 정도만 포장에 활착될 것이다. 활착된 식물 중에

10-30 %는 가양성(2배체)으로 나타날 수 있고 이러한 것들은 표시를 하고 개화 전에 제거 한다. 나머지 진짜 반수체 중 0-40 %는 꽃가루와 수염을 만들어 성공적인 수분이 가능할 것이다. 꽃가루의 임성 또한 대상 유전자원의 유전자형에 따라 다르다. 보통 수분된 식물체 중 약 30-50 % 만이 종자를 맺는다.

콜히친의 독성 및 주의사항

콜히친 독성

0.1-1g/ml 농도에서 콜히친은 미세소관조직, 특히 방추사를 간섭하여 유사분열 중기에 분열세포의 유사분열 정지를 야기할 수 있다. 콜히친을 삼키거나, 흡입하거나 피부를 통해 흡수되면 치명적이다. 콜히친에의 노출은 호흡기 자극, 피부자극, 눈 자극 및 심각한 눈 손상을 가져오고 또한 발암성이 될 수 있다.

주의사항

- 작업자의 콜히친 노출을 피하기 위해서는 콜히친 분말의 저장 및 콜히친 용액의 준비와 처리에 격리된 방이 지정되어야 한다.
- 실험실은 콜히친 처리를 위한 흡 후드와 화학약품의 냄새와 증기를 제거하기 위한 배기환풍기를 설치하여야 한다.
- 용액의 이동을 위하여 카트를 해당 실험실에 특별히 할당하여야 한다.
- 콜히친은 안전한 잠금장치가 있는 냉장고에 보관하여야 한다.
- 콜히친 처리 과정은 노출을 줄이기 위하여 가능한 한 자동화 하여야 한다.
- 사용되는 모든 화학물질에 대한 물질안전자료표는 실험실내에서 쉽게 볼 수 있어야 한다.
- 콜히친 작업자는 장갑, 호흡기 보호, 눈 보호, 전신덮개를 착용해야 한다.
- 작업자는 콜히친을 취급한 후에는 항상 손을 깨끗이 씻어야 한다.
- 콜히친 폐기물은 자물쇠를 채운 격리된 방에 저장하여야 한다.
- 폐기물은 잘 훈련된 위해폐기물제거팀에 의해 처리되어야 한다.
- 콜히친에 노출된 경우에는 노출된 부위를 몇 분 동안 물로 잘 씻어야 한다. 즉시 독극물 관리센터나 산업안전에 경험이 있는 의사에 연락한다. 물질안전관련서류를 의사에게 제시하여야 한다.

6. 추정 배가 반수체 유묘: 실험실에서 포장까지

George Mahuku

배가반수체 계통 육성의 성공을 위해서 반수체 유묘 관리가 매우 중요하다. 여기에는 두 가지 중요한 단계가 있다: (1) 콜히친 처리 D0 유묘의 관리와 이 유묘들을 온실 조건에서 재정착; (2) 포장 조건에서 추정 DH 식물의 관리. 각 단계에서 DH 계통 육성 성공률에 영향을 주는 추정 DH 식물체의 손실이 일어날 수 있다. 이 장에서는 최적의 DH 계통 복구에 필요한 관련 문제들 (DH 유묘의 처리, 유지를 위한 DH 식물재배의 적절한 설비의 가용성, 그리고 온실과 포장조건에서 추정 DH 계통들의 종자증식 및 적절한 관리)에 대해 다룬다.

D0 유묘의 관리

반수체 유묘를 콜히친 처리 후에 처리용기에서 용액을 배출하고 특별히 지정된 폐수 용기에 수집한다. 처리된 유묘로부터 잔류 콜히친을 제거하기 위해 수돗물로 적어도 3회 이상 세척한다. 세척은 처리 용기내의 모든 유묘가 완전히 잠기도록 물을 채우고 배출한 후 폐액을 적절히 처리하기 위한 특정 독성 폐기물 용기에 수집하는 방법으로 행한다. 100ppm 클로락스를 이용해서 최종 세척하는데 클로락스는 살균제로 종자의 세균과 곰팡이의 감염을 최소화 하는 역할을 한다. 이렇게 하여 유묘를 온실로 이식할 준비가 완료된다.

주: 모든 콜히친 폐기물은 특별히 지정되고 명확히 표시된 용기에 수집하고 공인된 회사/기관에 의해 처리되어야 한다. 특정연구소와 국가에 적용될 수 있는 위험 화학폐기물의 안전 처리와 관련된 법규에 따르기 바란다. 어떠한 환경에서도 일반 개수대에 이러한 독성 잔류물들을 처리해서는 안 된다.

처리 유묘의 취급: 특히 처리 후에는 유묘 관리에 최대한의 주의를 기울여야 한다. 초엽(coleoptile)은 매우 약한 조직이어서 적절히 취급하지 않으면 쉽게 부러진다. 따라서 유묘는 부러지는 것을 방지하기 위하여 종자를 잡는 방법으로 취급하고 뿌리나 자엽초를 만지지 않는다. 유묘의 준비 중 또는 처리된 유묘의 취급 과정 중에 생긴 조직의 피해로 싹의 황화가 발생하고 묘의 고사가 초래될 수 있다.

이식 재료

- **콜히친 처리 유묘:** 이식 중 오인하지 않도록 각 집단은 명확히 표시를 한다.
- **멸균 증류수 용기:** 유묘는 탈수를 방지하기 위해 물 담은 용기에 넣고 온실로 이동해야 한다
- **실험복, 장갑, 작업복:** 유묘가 콜히친 처리되었음을 명심하고; 따라서 처리된 유묘를 취급할 때에는 건강하고 안전한 적절한 운영 방법을 행한다
- **온실 또는 screen house:** 환경(온도, 광, 습도) 조절 장치를 갖추어야 한다.
- **라벨:** 이식될 집단의 확인을 위해 필요
- **매스킹 테이프와 영구 마커:** 모든 필요한 정보의 기록을 위하여.
- **지피 포트(트레이 내)와 포트용 배지:** 가능하면 온실토양(피트모스)을 사용, 그러나 적절히 살균되었으면 어떤 토양도 이용 가능. 유기물 함량이 높은 토양을 사용하고 가능하면 점토 함량이 높은 토양은 배제. CIMMYT에서는 Promix 또는 고급 피트모스 사용. Promix는 더욱 압착된 것으로 즉시 사용할 수 있고 피트모스는 적어도 10 % 이상의 펄라이트(argolita)와 혼합해야 한다.
- **온실 토양:** 유기물 함량이 높고 멸균된 토양 사용.

이식 과정

- 콜히친 처리하고 세척한 유묘를 건조를 방지하기 위해 물 담은 용기에 넣어 온실로 옮긴다.
- 여러 가지 종류의 포트가 이식에 이용될 수 있다: 예산, 재료의 가용성, 이식 방법에 따라 선택.
- 우선 각 포트의 반 정도를 토양으로 채운다(아래 그림1 참조). 조심스럽게 유묘를 토양위에 놓고(싸이나 뿌리 보다는 종자를 잡고) 붙잡은 상태에서 유묘 주변에 토양을 자엽초의 끝이 보일 정도로 채운다(그림1). 토양이 단단해 지도록 살며시 누르고 물줄 때 토양이 유실되지 않도록 한다.
- 신장된 초엽의 많은 부분을 외부에 그대로 남겨두면 피해를 입을 기회가 많아져 성공적으로 포장에 이식될 수 있는 식물체 수가 감소할 것이다.
- 처리 후 유묘는 매우 약해 부러지기 쉬우므로 초엽 부러지는 것을 방지 또는 최소화하기 위해 주의를 기울여야 한다. 이식 시에는 초엽의 크기가 2cm가 넘을 때에는 부러질 위험성이 커서 성공적으로 정착한 DH 식물체 수에도 영향을 미치므로 토양 외부에 보이는 초엽의 크기가 2cm가 넘지 않

도록 해야 한다.

주: 콜히친 처리한 유묘를 취급할 때에는 반드시 장갑을 착용해야 한다

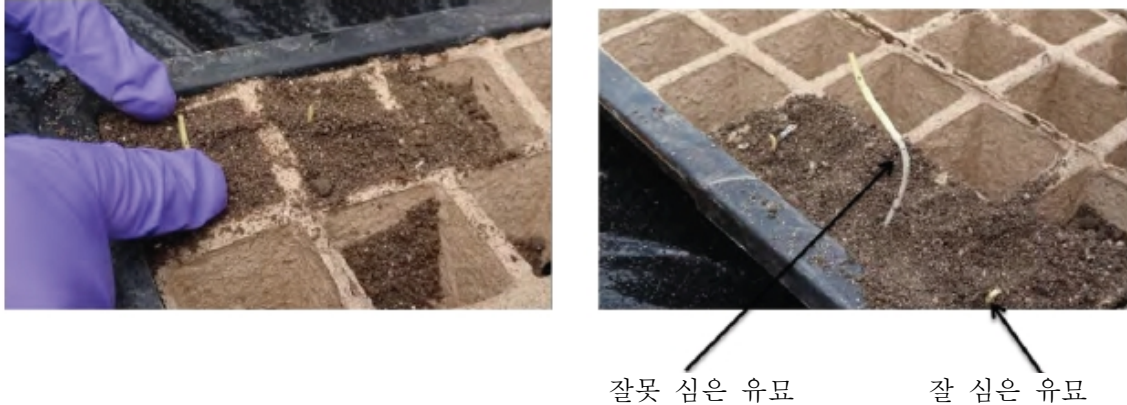


그림 1. 콜히친 처리 DH(DO) 유묘의 온실 내 지피 포트 이식. (초엽의 끝부분이 보이도록 하여 식물체가 손상되고 유실되는 것을 피한다 [사진: G. Mahuku]

D0 온실의 관리

온실 이식을 위한 포트의 종류 : 여러 형태의 포트가 이용될 수 있다 : (1) 내구성 플라스틱으로 만들어 재이용이 가능한 전형적인 플라스틱 포트(약 5x 5x8 cm)가 온실 실험 및 원예에 일반적으로 이용; (2) 커피와 차에 일반적으로 이용되는 값이 싸지만 내구성이 적은 스티로폼 컵; 또는 (3) 생분해성 재질로 만들어져 토양에서 분해되기 때문에 유묘를 포트와 함께 이식할 수 있기 때문에 이식기를 이용할 수 있는 포트(그림 2). 모든 포트는 과잉의 물이 배출될 수 있도록 바닥에 구멍이 있어야 한다.

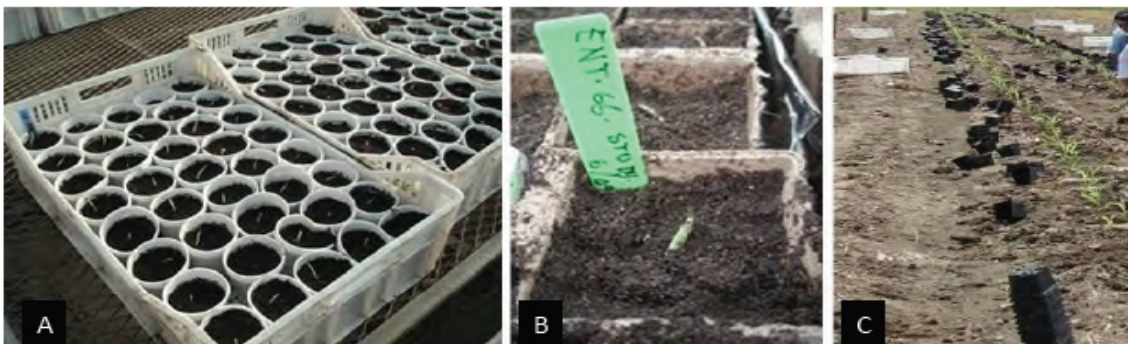


그림 2. 처리 유묘의 포트 이식: (A) 커피용 스티로폼 컵, (B) 지피 포트, (C) 플라스틱 포트. 포트는 유기물 함량이 높은 멸균토양으로 채운다. 포트를 취급과 관리가 용이한 용기에 담는다. [사진 A와 B: V. Prigge, 사진C: G. Mahuku]

온실에서 유묘의 관리: 포트에 심은 유묘를 특정 용기에 담아 온실 내에 약 10일에서 2주간 두어 콜히친 처리로부터 회복되고 3-4엽기 까지 자라게 한다. 적절한 시비와 병충해 관리를 하여 처리된 식물체가 잘 회복되고 활력이 있게 하는 것이 중요하다. 이 기간 중에는 다음 조건들을 유묘의 생육에 좋게 유지한다:

토양수분이 과잉되지 않도록 유지한다. 관수는 하루에 1회 또는 필요시.

필요한 량의 비료를 용액의 형태로 관개수와 함께 공급한다. 뿌리의 생육을 촉진하기 위하여 고 인산 비료 사용을 권장.

이식 3일 후에 Triple20 사용 - 티스푼 2개 분량의 비료를 20리터의 물에 녹여 포장에 이식할 때까지 관수.

이식 1주일 후에 Hakaphos violet(13-40-13; NPK) 2g을 물 1리터 비율로 녹여 엽면 살포. Hakaphos 는 뿌리의 성장과 발육 촉진

이식 10일 후 또는 포장 이식 1주일 전에 Gaucho(침투성살충제) 살포; 넘치지 않고 용기를 충분히 적실 정도로만 사용. Gaucho 농도는 0.12g/l; 살포량은 처리 식물체 수에 따라 다르다.

온실 조건: 온실은 식물 생육에 적합한 조건이어야 한다. 온도는 30℃ 이하로 유지하고 밤에는 20℃ 이하로 내려가면 안 된다. 너무 높거나 낮은 온도는 식물에 스트레스를 주어 식물의 활착과 발육에 영향을 끼친다. 가능하면 데이터 로거를 이용하여 온실내의 온도나 상대습도를 추적한다.

D0 유묘의 포장 이식

포장 조건: 성공적인 DH 계통 개발을 위해서 최적의 위치를 선정하는 것이 중요하다. 가능하다면 병충해의 압력이 없거나 최소인 곳을 선정한다. 생육 기간 중에 온도가 30℃가 넘는 경우가 드물고 야간 온도가 20℃ 이하로 내려가지 않아야 한다. 따라서 기후적인 변이를 조사하기 위해 포장에 데이터 로거가 있는 것이 중요하다(그림 3). 만약 광도가 너무 높을 때에는 50 % 알루미늄 차광막(http://www.greenhousemegastore.com/Stock_Shadecloth-50-aluminet/productinfo/SC-ST50A)을 사용 한다; 이렇게 하면 식물에 그늘을 만들고 차광막 아래의 온도도 내릴 것이다.

주: 알루미늄은 온실내부용과 외부용이 있다. 알루미늄 차광막은 광도를 50 % 감소시키며 이는 식물의 활착과 꽃가루 발생에 도움이 될 것이다. 알루미늄 천은 식물체 4-5m 위에 설치하고 충분한 공간을 남겨 포장내의 작업이 가능토록 해야 한다. 또한 환기가 잘 되도록 해야 한다: 그렇지 않으면 온도가 상승하여 꽃가루 발생과 비산에 영향을 준다.



그림 3. 식물에 대한 스트레스를 최소화하기 위한 포장 관리: (A) 식물스트레스 및 수술 열상 방지를 위해 광도와 온도를 낮추기 위해 50 % 알루미늄 차광막 이용. (B) 광도와 온도측정을 위한 데이터 로거. (C) 상대습도와 온도 측정용 Hobo 데이터 로거. 데이터 로고는 매 30분 마다 기록하도록 프로그래밍.[사진: G. Mahuku]

재료:

유묘: 온실에 미리 정착시킨 2주일 묘.

플라스틱 저장 용기: 식물에 피해를 주지 않고 유묘를 포장에 운반하는데 필요.

D0 양묘장 설치를 위한 포장준비: 포장은 점적관수와 비닐멀칭을 하는 것이 바람직함. 필요하다면 차광막도 있는 것이 좋음.

유묘의 포장 이송: 유묘의 수에 따라 트랙터 부착 트레일러나 픽업트럭을 이용.

포장 이식 : 잘 활착된 유묘는 2주(최장) 후에 포장에 이식되어야 한다:

유묘를 온실에서 꺼내 D0 육종포장에 가까운 스크린 하우스에 넣고 포장 조건에 순화되도록 1-3일 놓아둔다. 플라스틱 용기에 있는 유묘를 피해를 최소화 하고 스트레스를 받지 않도록 트랙터나 픽업트럭을 이용 운반한다.

집단들이 섞이거나 혼동되지 않도록 집단별로 유묘를 편성하고 함께 이식 한다.

이식 약 1시간 전에 잘 관수 한다.

이식은 한 낮은 고온을 피하기 위해 이른 아침에 하고 이식된 식물은 스트레스를 피하기 위해 즉시 관개해야 한다. 만약 토양 점토함량이 높다면 지피포트가 잘 분해되지 않아 식물에 스트레스를 주는 환경이 될 수 있다. 이러한 경우에는 식재 직전에 지피포트를 제거 한다.

이식 직후(또는 한 열의 이식 완료 시)에 점적관수 꼭지를 열고 관수를 시작한다.

이식된 식물 전체에 대한 목록을 작성한다.

주: 포장 이식은 손으로 하거나 이식기(그림 4)를 이용할 수 있다. 대규모 이식 시 편리하다.



그림 4. 토양 유형, 노동력, 집단의 크기에 따라 유묘를 포장에 손(A)이나 또는 트랙터 부착 이식기(B)로 이식할 수 있다.[사진: G. Mahuku]

농업적 관리: 농업적인 관리는 DH 계통 개발 과정에서 D0 유묘를 성공적으로 회복시키기 위해서 가장 중요한 요소이다. 농업적 관리가 잘 되지 않으면 다른 단계들이 성공적으로 실행되었다 하더라도 성공률이 낮을 것이다. D0 식물체에 대한 스트레스를 최소화하기 위해 관개 방법 및 시비의 최적화, 잡초 및 병충해의 효과적인 관리가 매우 중요하다. D0 식물은 시작부터 매우 약하므로 모든 종류의 스트레스는 DH 계통의 성공과 복구비율을 저하시킬 것이다. 적합한 기상 조건이 요구 된다; 가능하다면 병충해에 대한 압력이 없거나 적으며 토양 유형과 비옥도가 적합한 지역을 선택한다. 관개 시비 제초제 및 병충해 방제를 적기에 하는 것이 식물의 활착을 위해 매우 중요하다. 개화기에 땅을 이용 차광하는 것이, 특히 온도가 비정상적으로 높을 때에, 도움이 된다. 차광망을 설치하면 온도를 낮추고 식물에 광 스트레스를 감소시킨다(그림 3).

관개: D0 유묘는 정상의 자식계통이나 교배종에 비해 뿌리가 약하고 물을 훨씬 적게 이용한다. 따라서 적절한 식물 생육을 위해서는 적당량의 물을 공급하는 것이 중요하다. 물이 너무 적으면 식물에 스트레스를 주고 정상적인 활착과 생육에 영향을 준다. 물이 너무 많으면 줄기가 가늘고 백화 현상이 나타나며 결과적으로 이삭의 크기와 꽃가루 생산에 영향을 미친다. 토양 유형과 수분 보유능력에 따라 수분과 양분의 이용이 최적화되도록 적절한 관개 일정이 수립되어야 한다. 이러한 관점에서 특히 D0 포장에서는 점적관수가 적절하다; 가능하다면 점적관수와 동시에 D0 포장의 여러 곳에 토양 수분을 조사할 수 있는 탐침을 설치해 적절한 관개 일정을 잡는데 도움을 주어야 한다(그림 5).



그림 5. D0 포장에서 수분 관리를 위한 점적관수. 비료도 점적관수 시스템을 이용 효과적으로 사용될 수 있다

적절한 시비: 적절한 시비는 식물의 생육에 매우 중요하며 점적관수를 하는 곳에서는 관개수와 함께 용액상태로 사용될 수 있다. 이식 후 최초 관개 시에는 뿌리의 생육과 식물의 활착을 돕기 위해 인산 고함유 비료 (예를 들면 Haifa polyfeed drip 13-36-13이나 Peter's Professional 9-45-15(NPK))를 포함한다. 물이 너무 많거나 비가 많이 올 때에는 대부분이 용탈되기 때문에 양분 가용성에 영향을 줄 수 있다. 이러한 점은 우기에 문제가 될 수 있는데 만약 비가 자주 온다면 비료를 줄로 사용하고 토양이 포화되지 않도록 해야 한다. 이랑을 만들고 플라스틱 멀칭을 하면 이러한 문제점을 최소화 할 수 있다. 점적관수를 하는 곳에서는 비료 탱크를 벤추리 관으로 주 관개구와 연결하고 단위면적당 원하는 비료 사용량을 계산하여 관개수에 농축액을 공급한다. 식물 활착과 개화 촉진을 위해 미량요소들도 매우 중요하다. 미량요소들은 추천량과 사용빈도에 따라 식물 전 생육 기간 중에 엽면살포 할 수 있다. 포장 준비 시에 75 % 질소, 100 % 인, 100 % 가리를 토양에 혼입하

고 비료는 또한 점적관수로 개화 직전에 사용된다. 식물 성장과 발육을 증진하기 위해 양분의 엽면시비가 꼭 필요하다. 이식 3일 후 부터 Hakaphos Violet (A 13-40-13(NPK) 0.12g/l (water))와 Impulsor (2.4ml/l (0,75리터 impulsor/ha))를 주 1회 살포 한다. 식물체를 지속적으로 관찰하고 필요 시에는 엽면살포 또는 시비하는 것이 중요하다.

잡초 관리: 경쟁을 피하고 D0 식물체가 이용할 양분가용성을 최대화하기 위해서 적절한 잡초관리가 필수적이다. 손 제초가 더 좋으며 대부분의 D0 식물체가 잔류 제초제에 매우 민감하며 식물 생육과 정착에 영향을 주기 때문에 가능하다면 제초제의 사용은 최소화 하는 것이 좋다. 플라스틱 멀칭이 아주 좋은 저비용 잡초관리 방법이며 원예작물에서는 일상적으로 이용된다. 잡초 관리와는 별도로 플라스틱 멀칭은 근계내의 습도와 온도 조절을 도와 균일한 DH 식물의 활착과 성장을 가져온다. 점적관수관과 플라스틱 멀칭은 트랙터 부착기를 활용 동시에 설치할 수 있다(그림 6).



그림 6. 잡초관리 및 토양 수분과 습도를 조절하기 위한 플라스틱 멀칭. 플라스틱 멀칭 한 DH 식물은 멀칭 안한 식물에 비해 생육이 우수하였음. [사진: G. Mahuku]0

병충해 관리: 열대지역에서는 병충해압력이 DH 계통들의 회복에 영향을 미칠 수 있는 중요한 문제이다. 식물 피해를 최소화하고 DH 계통의 회복을 위해 현명한 병충해 관리 계획이 필요하다. 개화, 특히 꽃가루 비산에 대한 영향을 최소화하기 위해 살충제와 살균제의 사용시기가 매우 중요하다. 병충해 발생 빈도에 따라 추천된 농약을 사용한다. 그을음무의병과 깨씨무늬병과 같은 잎에 발생하는 병은 살균제 Tilt(Propiconazole)를 파종 30일 후 또는 증상이 나타났을 때 그리고 그 후 2주 간격으로 헥타 당 0.75리터를 사용한

다. 이 약제는 대부분의 잎에 발생하는 병에 대해서 효과가 있으나 개화 1-2주 전에는 사용하지 말아야 한다. Gaucho는 침투성살충제로 유묘기에 살포하며 대부분의 곤충으로부터 식물체를 방어한다(그림 7). Cutworm은 헥타 당 40kg의 Lorsban Grana lade 3 % 살충제를 이용 방제하며 포장 준비 시에 이량에 혼합한다. 옥수수 조명나방은 헥타 당 1리터의 Lorsban 480 EM이나 헥타 당 0.5 리터의 Karate Zeon을 사용하여 방제한다.

주: 화학물질(비료, 살균제, 살충제)의 특정 상품명을 언급하는 것은 CIMMYT가 해당 제품을 공식 승인하고자 함이 아님. 동일한 문제를 해결하기 위해 유사하거나 더 나은 상품이 시장에 있을 수 있음.



그림 7. Ear worm은 피해가 심하기 때문에 이 곤충을 관리하기 위한 적절한 계획이 필요. (A) 옥수수 ear worm (*Heliothis* sp.)에 의한 피해와 (B)충해 방제를 위한 살충제 사용

새로운 DH 계통을 얻기 위한 D0 식물의 자가수분: 이 단계에서는 종자증식을 위한 또는 육종가에 의해 이용될 새로운 DH계통인 D1 종자를 얻기 위해 추정 배가반수체(D0)를 신중하게 자가수분 한다. 콜히친 처리로 유묘의 모든 세포 염색체가 균일하고 완전하게 염색체가 배가될 수도 있고, 배가되지 않을 수도 있다. 이러한 현상을 sectoral diploidization이라 한다. 특히 유전형과 콜히친 처리에 따라 그 효과는 가변적이다. 어떤 식물체는 풍부한 꽃가루를 생산하는 수술을 갖고 있을 수 있으며, 반면에 ,대부분의 경우, 수술의 일부에서만 꽃가루 생산 약이 있거나 전혀 없을 수도 있다(그림8). 결과적으로 자가수분이 어려울 수도 있다. 그러므로 자가수분이 안 되어 유전자형이 유실되는 것을 피하기 위해서는 잘 훈련된 직원이 필요하다.

D0 포장에서 배수체 식물의 확인 및 거짓 (배수)식물체의 폐기: 색소 표현형 표지의 불충분한 발현, 우성 안토시아닌 색소 억제 유전자의 존재와 훈련된 사람의 부족 때문에 반수체 종자가 가끔 잘 못 분류될 수 있다. 그러나 추정 DH 식물은 포장 조건에서 정상적인 2배체 식물과 쉽게 구분될 수 있다. 식물체 활력, 잎의 특성, 수술의 크기, 줄기의 안토시아닌 착색에 근거하여 DH

식물은 정상 2배체 식물과 구분될 수 있다. 개화기 전에 추정 DH 식물 줄기의 착색을 관찰하고 줄기가 자색으로 착색된 식물을 제거 한다. 거짓 DH 식물은 참 DH 식물과 빛, 물, 양분과의 경쟁을 피하고 꽃가루의 오염을 피하기 위해 그리고 참 DH 식물 유지에 노력을 집중하기 위해 적시에 제거되어야 한다.



그림 8. 추정 DH 식물의 꽃가루 생산: (A) 상당한 량의 꽃가루 생산; (B) 몇 개의 가지에서만 꽃가루가 생산되고 나머지는 sectorial diploidization에 의해 불임; (C) 불임의 웅수, D0 포장에서 관찰될 수 있는 일반적인 문제. [사진: G. Mahuku]

새로운 DH 계통의 유지 및 종자 증식을 위한 자가수분

재료:

1. 맞춤형 글래스 봉투(또는 수염 봉투, silk bag) 와 일반 수분 봉투(또는 tassel bag, Lawson No.501)
2. 훈련된 전담 인력

수술 출현 관찰: 수술 출현 관찰을 위해 잘 훈련된 포장 직원이 중요하다. DH 식물은 일반적으로 약하고, 흔히 몇 개 안되는 꽃가루 비산 수술을 갖고 있으며 며칠 간 제한된 양의 꽃가루를 비산시킨다. 따라서 꽃가루를 날리는 D0 식물체의 위치를 지속적으로 관찰하고 (임성의 수술을 갖고 있지 않은 많은 식물체 중에), 즉시 꽃가루를 수집하여 자가수분 하는 것이 D1 종자의 획득과 DH 계통의 개발을 위해 매우 중요하다. 이전의 모든 단계가 완벽하게 수행되었다 해도 자가수분이 적절하게 수행되지 않으면 DH 유전형은 소실될 수 있음을 명심해야 한다. 수분은 노동 집약적인 단계이고 이 기간 중

에는 수분할 준비가 되어 있는 식물체를 빠뜨리지 않기 위해서 숙련된 인력이 포장에 상주해야 한다.

주: DH 작업의 성패는 잘 훈련된 직원 특히 실험실과 포장 인력에 달려 있다. 경험이 중요하고, 매 주기 효율이 증가한다. 따라서 직원의 잦은 회전은 성공률에 중대한 영향을 미칠 수 있으므로 배제한다.

수분: 옥수수 수염이 나오기 전에 ear shoot를 덮는다. 코팅 안된 투명한 글래스 봉투나 수염봉투(약 6 x 20cm)가 자가수분을 위해 추정 DH 식물로부터 꽃가루를 수집하기에 가장 적당하다. 때때로 몇몇 식물에서만 꽃가루가 생산되기 때문에 투명한 봉투를 이용하면 자가수분을 위한 꽃가루의 양을 육안으로 확인할 수 있다. 필요하다면, 수분을 다음날에도 반복할 수 있다. 수분이 끝나면 일반 수분봉투 또는 수술봉투를 이삭을 덮기 위해 사용할 수 있다. 수분을 위해서 수분 예정일 전에 수분용 봉투를 수술에 씌우고 각각의 식물에 자가수분 한다. 수분이 끝난 이삭은 수술봉투로 잘 씌우고 스테이플러로 단단히 고정한다(그림 9).



그림 9. D0 포장에서 수분: (A) 추정 DH로부터 자가수분용 꽃가루 수집을 위해 사용되는 코팅 안된 투명 봉투 또는 수염 봉투; (B) 성공적으로 수분된 식물. [사진: G. Mahuku]

생리적 성숙 후 자가수분 이삭의 수확: 흔히 DH 식물의 이삭에는 몇 개의 종자만 달린다(그림 10). 따라서 포장에서 종자가 유실되지 않도록 최대한 주의를 기울이는 것이 필요하다. 이삭은 조심스럽게 수확하고 탈곡 및 건조를 위한 창고로 이송 중에는 적당한 뚜껑이 있는 가방에 보관하여야 한다. 이 종자는 앞으로의 연구나 육종을 위해 사용될 수 있도록 종자 증식을 위해 다시 파종 될 수 있는 새로 개발된 완전한 동형접합 DH 계통을 대표한다. 만약 자색의 종자가 있는 이삭이 있다면 이전 단계에서 누락되어야 했던

잘 못 분류된 식물체 (정상 2배체, DH 아님)이므로 폐기한다. (1) 대상 유전자원에서 만수체 유기 및 염색체 배가에 대한 유리한 반응을 부여하는 유전자들에 대한 선발이 일어나고 (2) DH 작업에 관여하는 기술 및 포장 인력이 경험을 획득했기 때문에 DH 식물에 대한 종자 생산은 다음 주기의 DH 생산에서는 증가될 것으로 기대된다.



그림 10. D0 포장에서 수확한 이삭. D1 이삭에 생산된 종자량은 한두 개에서 50개 이상까지 상당한 변이가 있을 수 있다. 그러므로 수확 중에 종자를 잃어버리지 않도록 적절한 주의를 해야 한다.[사진: G. Mahyku]

7. 우수한 양친계통과 품종의 신속한 개발 및 제공을 위한 DH-기반 육종에 MAS의 통합

R Babu, Sudha K Nair, BS Viv다, Felix San Vincente, BM Prasanna

서언

최근에 배가반수체(DH)와 분자표지는 응용 옥수수 육종 프로그램에 있어 동형접합계통을 개발하는 방법에 혁명을 가져온 두 가지의 가장 강력한 기술로 등장하였다(Mayor와 Bernardo, 2009). 앞서 이 책에서 논의된 바와 같이 DH 기술은 유전적으로 동형접합이고 순수한 계통들을 얻는데 전통적인 육종에 비해 필요한 기간을 현저히 단축시킨다. 육종 프로그램에 DH 계통을 이용해서 얻는 중요한 이점들에는 선발단위들 간의 최대 유전적 변이와 DH 계통과 DH 계통의 시험 교배들의 유전형적 가치 추정 시 정밀도의 증가가 포함된다(Gordillo와 Geiger, 2008). 더욱이 DH 계통을 육종 프로그램에 이용하면 예비교잡종의 조기 선발이 가능하고, 자식계통 종자 증식 및 유지 관리를 단순화시키고 양적 유전자좌(QTL)에 있는 유리한 대립형질의 신속한 고정이 가능하다(Mayor와 Bernardo, 2009; Lubberstedt와 Ursula, 2012). 특히 영양(예를들면 *crtRB1*-지배 베타카로틴 함량)이나 병 저항성에 효과가 큰 유전자 부위에 대하여 종자 DNA를 기반으로 한 유전자형 분석기술과 결합할 때, DH-기반 분자 육종은 시간, 노력, 토지와 그 밖의 자원들을 상당히 절약할 수 있다.

계통 육성과 순환선발(RS)에 의한 집단 개선은 옥수수 육종 프로그램에 있어 가장 일상적으로 적용되는 두 가지 활동이다. 순환선발에 의해 얻어지는 개선된 대상 집단은 자식계통을 얻기 위한 새로운 대상 유전자원으로 또는 자원 부족 지역농부의 재배를 위해 직접 출시될 수 있는 합성품종으로 이용된다. 여기서는 DH-기반 육종 프로그램에 MAS 전략을 통합하는 두 가지 가능성 있고 실용적인 방법에 대해서 논의하고자 한다.

DH-기반 계통육종에 MAS의 통합

계통육종은 다양한 목표 환경에서 광범위 다 지역 시험과 함께 세계의 옥수수 개선 프로그램의 기둥이 되어왔다. 계통육종은 서로 상보적인 형질을 갖는 두개의 우수 유전자형(좋은 농업적 특성, 비생물학적 재해 내성, 병저항

성, 영양의 질과 같은)을 교배하는 것으로 시작하고 다음 세대에서 서로 다른 유망한 형질을 갖는 우수한 자손을 F7-F8 세대에서 동형접합성이 달성될 때까지 선발하는 것이다. DH 기술의 출현으로 기존의 전형적인 계통육종에서 7-8세대가 필요하던 것과는 달리 동형접합계통을 단 2세대 안에 획득하는 것이 가능해 졌다. DH 기술로 시간 절약이 가능한 반면에 이 방법은 어느 정도는 육종가가 여러 세대에 걸쳐 선발할 수 있는 기회를 빼앗았다. 일반적으로 옥수수 육종에서 시간을 절약하기 위해 F1 세대에 반수체를 유기하는 것이 일상적인 관행이었다. 그러나 F1-유래 배가 반수체는 재조합이 감소된 경향이 있고(단지 1회의 감수분열이 있기 때문에) 1회 또는 수회의 선택압에 대한 반응이 감소하는 것이 밝혀졌다(Riggs와 Snape, 1977; Jannink와 Abadie, 1999).

100개 이상의 QTL에 의해 조절되는 형질에 관해서 Bernardo(2009)는 모의 실험에 기초하여 선발에 대한 누적반응은 F2 유래 DH 계통들이 F1 유래 DH 계통들보다 4-6% 컸으며 따라서 장기적으로 향상된 선발 반응을 유지하기 위해서는 F1 보다는 F2에서 반수체를 유기할 것을 제안하였다. 그러나 F1과 F2중에서 결정하는 것은 육종프로그램을 위한 시간과 자원의 절충과 관련이 있다. Bernardo(2009)가 제안한 바와 같이, 만약 육종프로그램에서 최초의 F1이 불확실한 근거에서 만들어 졌다면 F2 단계에서 반수체를 유기하는 것이 시간을 더 허비하는 것이 아닐 것이다.

재조합의 향상 외에도 F2에서 반수체를 유기하는 것의 중요한 이점은 각각의 F2 개체들이 (종자 및 식물체 수준에서) 요구되는 표현형적 뿐 아니라 유전자형적 선택압에 대상이 될 수 있는 기회가 주어진다라는 점이다. 육종프로그램의 목표 형질과 그러한 형질들을 지배하는 특정 유전자좌에 관한 분자표지 정보의 가용성에 따라 F2 종자는 각각 비과외 표본추출(Gao 등, 2009)을 통하여 개개의 종자의 유전자형 확인이 가능하고 동형접합상태의 불리한 대립형질을 지닌 종자들은 제거될 수 있다. 이러한 과정을 F2 enrichment라 한다(Howes 등, 1998; Bonnett 등, 2005; Wang 등, 2007). 현재 옥수수에서는 이러한 접근방법의 실행이 가능한 형태적인 효과가 큰 몇 개의 유전자좌가 확인되었다.

Crtrb1, 카로틴 수산화 유전자 (Yan 등, 2010)는 다양한 유전배경을 가진 열대 옥수수 유전자원에서 배타카로틴 함량에 2-10배 효과를 갖는 것을 보여주었다(Babu 등, 곧 출시). 종자 DNA에 근거한 *crtRB1*의 유전

자형은, 특히 F2나 F3 같은 상위 세대에서는, CIMMYT의 HarvestPLUS-Maize 육종 프로그램에서 일상적으로 이용되고 있으며, 충분한 자금 지원으로 보통의 황색옥수수의 1-2 ppm보다 현저히 높은 (15-20ppm) 함량의 프로비타민 A를 보이는 계통들을 개발되기에 이르렀다.

*Opaque2 (o2)*는 변이 대립형질을 갖는 옥수수의 배유에 라이신과 트립토판 함량이 보통의 옥수수에 비해 2배가 되게 하는 전사조절 인자이며 관련된 endosperm modifier와 함께 있을 때에는 QPM이라 한다 (Prasanna 등, 2001). *o2* 내에 위치한 분자표지는 일반 옥수수계통의 QPM을 신속하게 개발하는데 성공적으로 이용되었다(Babu 등, 2005).

옥수수 줄무늬 바이러스(MSV)는 사하라 이남 아프리카 대부분 지역에서 중요한 병해이다; MSV저항성을 조절하는 효과가 큰 QTL이 1번 염색체에 있다는 것이 여러 유전적 배경에서 확인되었다(Welz 등, 1998; Lu 등, 1999; Kyetere 등, 1999). CIMMYT Global Maize Program은 최근 이 유전자 부위에서 표현형에 의한 선발 없이도 MSV의 저항성과 감수성을 효과적으로 구분하는 데 사용될 수 있는 일련의 SNP 표지를 동정(그리고 현재 유효성을 확인중)하였다. MSV 저항성에 영향을 하는 부가적인 미동 유전자좌가 유전자의 다른 부위에 존재하거나 다른 유전자원에 존재할 수 있으나 *msv1* 은 아마도 이 병에 대한 적절한 수준의 저항성을 얻는데 필요한 전제조건으로 간주될 수 있다(Sudha, 개인소통).

전체게놈연구(Genome-Wide Association Studies, GWAS)의 광범위한 채택으로 옥수수 유전학 공동체는 앞으로 수년 내에 많은 수의 표지-형질 관계를 해석하고 검증할 것이며 이렇게 되면 옥수수에서 바람직한 접근 방법으로 F2의 확장이 가능하게 할 것으로 기대되며 DH 유기에 앞서 대상 유전자를 미리 선발할 범위를 제공한다. 표지 선발된 개체들이 포장에서 자랄 때 식물의 활력, 형태, 그 밖의 특성과 같이 추가적인 표현형적 선발을 할 수 있고 좋은 유전자형 만 DH 유기 대상이 됨을 확인할 수 있다.

DH 기반 MAS 방법을 그림 1에 설명하였다. 여기서는 계통육종에서 한발저항성과 병 저항성 형질을 조합하는 것을 목표로 한다. 앞서 언급한 바와 같이 MSV 저항성에 크게 영향을 주는 유전자 부위가 확인되었고 다양한 유전적 배경에서 이 유전부위의 표현형적 효과가 검증되었다. 분자표지에 근거한 개개의 F2 종자의 *msv1* 유전자 검정으로 *msv1* 대립형질이 동형접합으로

존재하는 개체를 제거하는데 도움이 되고 식물체 자체 및 식물 활력과 관련된 특성들에 대한 추가적인 표현형 검정으로 반수체 유기에 사용될 대상으로부터 약한 식물체들을 확실하게 제거할 수 있다. 그 후에, 표지선별과 표현형으로 선발된 식물들을 열대형 반수체 유기체와 교배하고 추정 반수체 종자를 확인한다. 염색체 배가 후 D0 식물체의 자가수분 및 D1 종자 단계에서는 동시에, D0 식물체의 꽃가루 (만약 적당한 량이 있다면)를 검정교배에 이용할 수 있다. 일단 충분한 수의 DH-TC가 만들어지면(D0 또는 D1 이용), 목표 환경집단을 대표하는 여러 지역의 건조 및 정상 조건에서 성능이 평가될 수 있다. 이러한 평가로 적절한 수준의 MSV 저항성이 조합된 최상의 내한발성을 확인되고 국가 성능 검정을 위해 선발되며 해당되는 양친 계통들은 유지된다. 추가적으로 DH 계통들의 유전자형 확인으로 한발 및 최적 성능에 대한 표지 효과 추정이 가능하고 이러한 결과는 수년간 육종 프로그램에서 매년 생성되는 검정하지 않은 DH 계통들을 계놈-기반 예측에 기여할 수 있어 선발 및 표현형 확인에 요구되는 것들을 최소화 할 수 있다

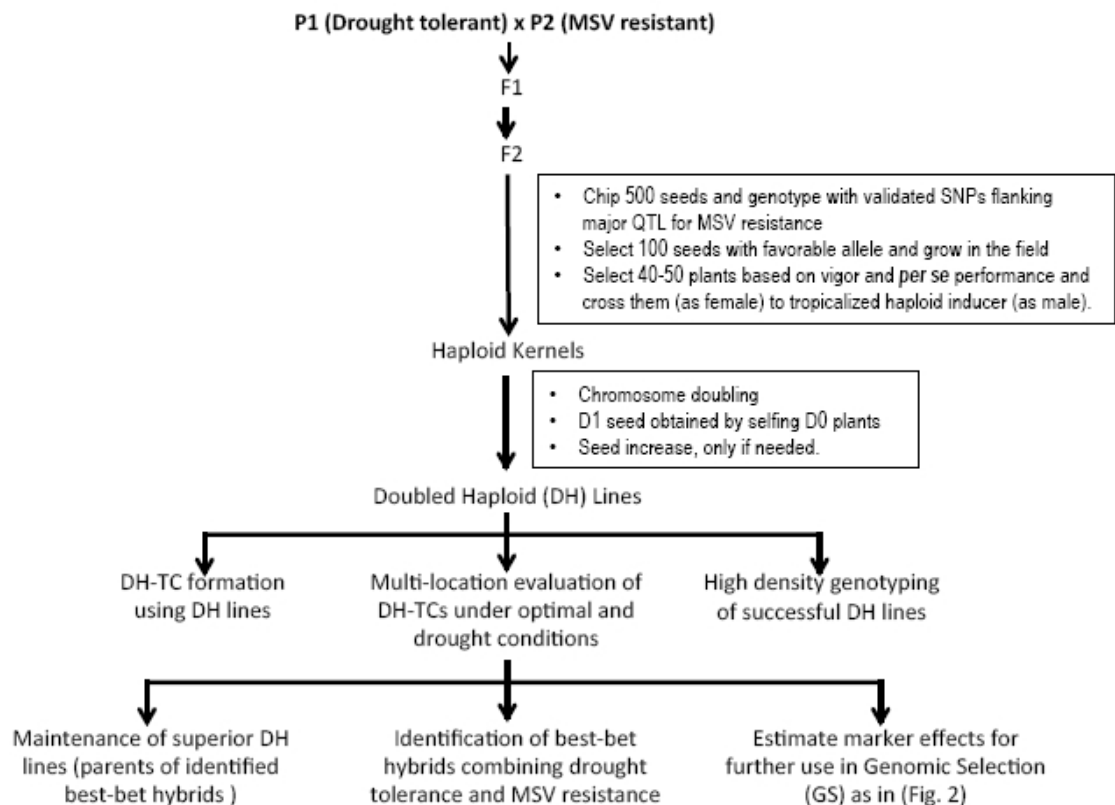


그림 1. 계통육종프로그램에서 내한발성 및 병저항성 조합을 위한 DH-기반 MAS. MSV, Maize Streak Virus; D0, 반수체 배가처리 후 추정 DH 유묘; D1, D0 식물 유래 종자; TC, 검정교배

신속-순환, 개방-대상 계능 선발

순환선발은 특히 한발 이나 내열성과 같은 매우 복잡한 양적 대상 형질과 같은 바람직한 대립형질의 빈도가 현저하게 증가된 개선된 대상 집단을 개발하기 위한 옥수수 육종에 중요한 수단으로 사용되어 왔다. 효과적인 방법이긴 하지만 RS는 표현형에만 의존하기 때문에 검정교배 자손 육성 및 모든 선발 단계 전에 반복된 여러 지역에서 평가를 해야 하기 때문에 시간이 소요되고 자원이 요구된다. 따라서 4회의 RS를 시도할 때에는 적어도 4 작기의 검정교배세대 및 또 다른 4 작기 동안 여러 지역에서의 성능 평가가 수반된다. 계능 선발 (genomic selection, GS)은 대표 지역에서 표현형 분석이 된 본보기 조의 양성 개체들을 근거로 한 개체의 전 유전가를 예측하는데 고밀도 유전자형 분석결과를 이용하는 새로운 방법이다. GS 기반 방법은 일반적으로 QTL의 수와 위치에 관한 정보를 무시하고 유전적인 근거를 이해하기보다는 양적형질의 유전적 개선에 집중한다. 성능 예측에 집중하는 고밀도 유전자형 분석에 기초한 과정들의 유용성은 대상 형질의 기본 유전학에 대한 명확한 이해 없이도 복잡한 형질을 개선할 선발도구로서 표지들이 이용될 수 있음을 나타낸다. 신속 순환 계능 선발 (Rapid-cycle GS,RCGS)은 각 조의 교배 자손들의 표현형 확인 없이 순환 선발의 속도를 증가시키는 편리한 도구이다. RCGS는 또한 대표적인 지역에서 한 작기만 표현형을 조사하기 때문에 상당한 량의 물질 자원을 절약할 수 있다. 다음 세대에는 교배된 개체들의 유전형만 조사하고 이들의 유전적 가치는 앞서 추정된 표지 효과를 근거로 예측한다.

폐쇄 다계집단에서의 RCGS를 그림 2에 제시하였다. 다계집단에서의 순환선발은 대상자원이 필요하고 다수 집단의 평가를 허용하지 않는 2계집단에 비하여 매우 효과적일 수 있다. 특히 내한발성, 병저항성, 영양성분 증진 등과 같은 형질이 보완된 8-12개의 우수 옥수수 계통들이 각각의 헤테로 그룹 내에서 선택되고 half-diallel들이 모든 가능한 조합을 얻기 위해서 만들어 있다. F1들은 큰 F2 집단을 만들기 위해 격리되거나 인공수분으로 교배 된다. 특정한 농업-생태에 대한 목표형질에 따라 그리고 그러한 형질에 대한 분자정보의 가용성에 따라 앞서 계통 육종에서 설명한 바와 같이 F2를 강화할 수 있다. F2 종자는 병저항성 QTL과 옥수수 배유의 베타카로틴 함량을 증진시키는 주동유전자 *crtRB1*의 양쪽에 있는 4개의 검증된 SNP로 선별된다.

다음 작기에 F2 선별 후에, 적어도 500개의 S2개체(C0)를 유전자형 확인과

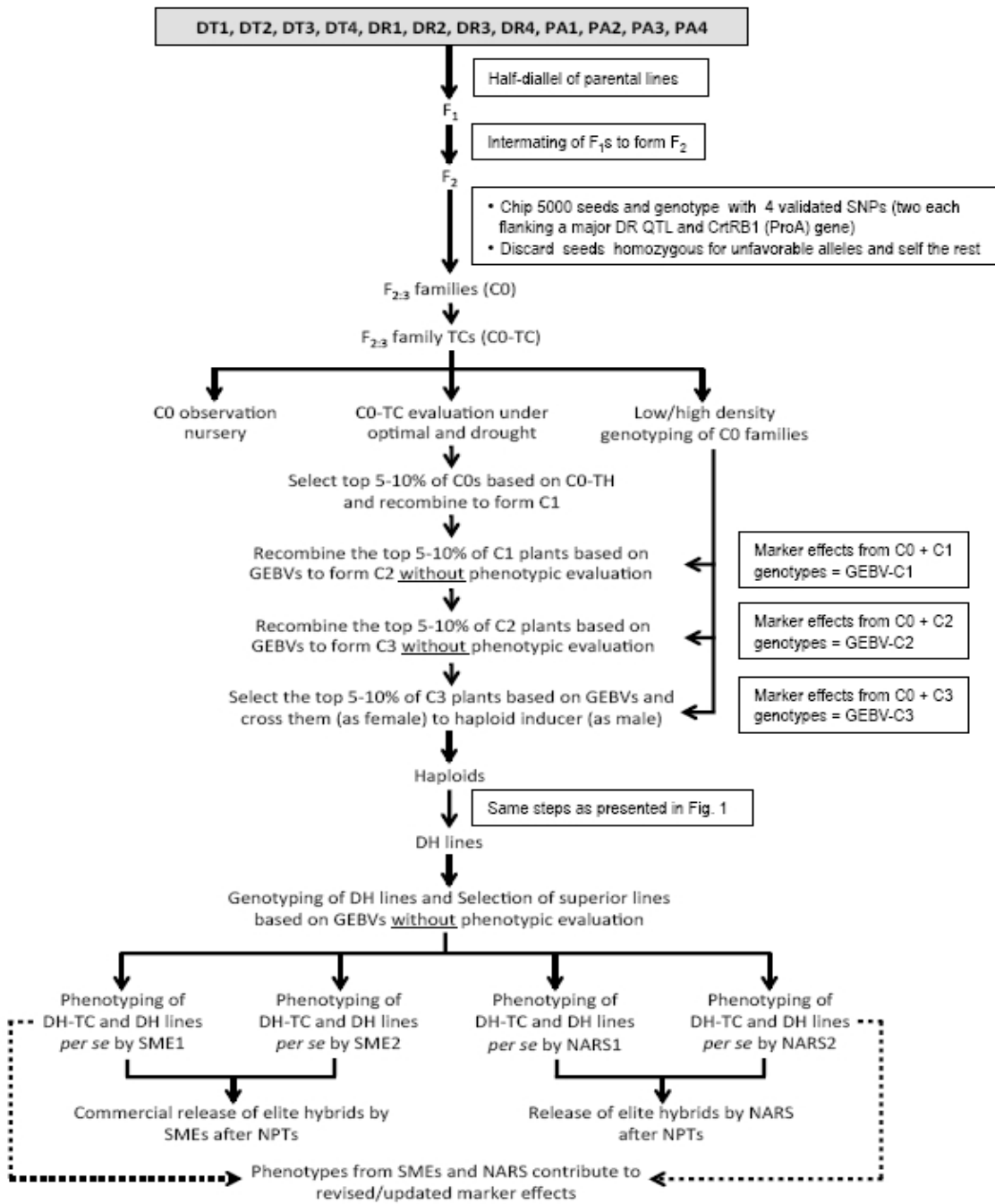


그림 2. 내건성, 내병성 및 영양의 질이 우수한 계통을 신속하게 보급하기 위한 분자표지와 DH 기술을 통합한 개방-자원 다계 순환 선발모델. DT, drought tolerance; DR, disease resistance; PA, provitamin A; C0, cycle 0; C1, cycle 1; C2, cycle 2; C3, cycle 3; TC, testcross; GEBV, genomic estimated breeding value; SME, small and medium enterprises; NARS, national agricultural research system; NPTs, national performance trials.

검정교배를 할 각각의 다계집단으로 설정한다. 다음작기에, 검정교배한 것들을 대표적 지역의 건조 및 최적 조건에서 표현형을 조사하고 표지/haplotype/QTL 효과를 추정할 것이다. C0집단의 상위 5-10 %를 검정교배 성적에 근거하여 선발하고 C1을 만들기 위해 재조합한다 (순환1). C1의 각 개체는 유전자형 확인을 하고 앞서 계산한 C0 표지 효과를 근거로 GEBVS(Genomic Estimated Breeding Values)를 추정하고 상위 5-10 %에 해당하는 C1 개체들을 형태적인 평가 없이 재조합하여 C2를 만든다. 이러한 과정을 C3까지 1회 더 반복할 수도 있다, 이때 GEBV-선발 개체들은 DH 계통 생산을 위해 반수체 유기체와 교배한다. 만약 육종 프로그램이 C3로 부터 다수의 DH 계통을 얻기 위해 관리 된다면 표현형 평가 없이 우수한 계통의 일부를 선발하는 방법은 GEBV(C0의 표지효과 + DH 계통의 유전형 정보)에 근거할 수 있다. GEBV-선발 DH 계통들은 중 소형 기업 (SMEs)과 국가농업연구시스템 파트너들에게 목표로 하는 생산 환경에서 각각의 평가(자체 및 검정교배)을 하기 위해 배포할 수 있다. SME나 NARS에 의해 생산된 표현형 정보는 공유될 수 있고 이렇게 하여 표지효과가 수정되고 최신화 되어 앞으로의 예측에 도움을 줄 것이다. 건조와 적정 조건에 대한 강력한 표지효과 추정치에 근거한 수회의 순환선발과 결합된 F2개체의 사전선발(영양의 질 과/또는 병저항성 형질에 대한 특정 표지 정보 이용)로 C3-유래 DH 계통들이 정상적인 조건에 비해 수량 손실 없이 건조 조건에서 잘 자랄 뿐 아니라 영양의 질적으로 그리고 병저항성이 우수하다는 것을 보장한다. 제안된 계획의 개방자원성도 서로 다른 파트너 연구소에 의해 생산된 표현형 정보들이 물질 자원에 대한 특허들은 기관들이 유지하지만 공유될 것임을 보장한다. 개선된 대상 집단 C3는 관심 있는 국가농업연구 시스템과 공유할 수 있고 국가연구기관은 이를 우수한 합성/OPV로 농가 재배포 또는 우수한 내혼계통을 만들기 위한 자체 육성프로그램에 이용한 수 있다. 육종 사이클을 가속화하기 위하여 주년육종시스템을 이용하면 제안된 계획으로부터 더 많은 이득을 취할 수 있다.

인용문헌

- Babu R, Nair SK, Kumar A, Venkatesh S, Sekhar JC, Singh NN, Srinivasan G, Gupta HS (2005) Two-generation marker aided backcrossing for rapid conversion of normal maize lines to Quality Protein Maize (QPM). *Theor. Appl. Genet.* 111:888-897.
- Babu R, Palacios N, Gao S, Yan J, Pixley K (forthcoming) Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRB1* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations. *Theor. Appl.*

Genet.

- Bernardo R (2009) Should maize doubled haploids be induced among F1 or F2 plants? *Theor. Appl. genet.* 119: 255-262.
- Bonnett DG, Rebetzke GJ, Spielmeyer W (2005) Strategies for efficient implementation of molecular markers in wheat breeding. *Mol. Breed.* 15: 75-85.
- Gao S, Martinex C, Debra J, Krivanek AF, Crouch JH, Xu Y (2009) Development of a seed DNA-based genotyping system for marker-assisted selection in maize. *Mol. Breed.* 22: 477-494.
- Gordillo A, Geiger HH (2008) Alternative recurrent selection strategies using doubled haploids lines in hybrid maize breeding. *Crop Sci.* 48: 911-922.
- Howes NK, Woods SM, Townley-Smith TF (1998) Simulations and practical problems of applying multiple marker assisted selection and doubled haploids to wheat breeding programs. *Euphytica* 100: 225-230.
- Jannink JL, Lorenz AJ, Iwata H (2010) Genomic selection in plant breeding: from theory to practice. *Briefings in Functional Genomics* 9: 166-177.
- Kyeterere DT, Ming R, McMullen MD, Pratt RC, Brewbaker J, Musket T (1999) Genetic analysis of tolerance to maize streak virus in maize. *Genome* 42: 20-26.
- LU XW, Brewbaker JL, Nourse SM, Moon HG, Kim SK, Khairallah M (1999) Mapping of quantitative trait loci conferring resistance to maize streak virus. *Maydica* 44: 313-318.
- Lubberstedt T, Ursula K (2012) Application of doubled haploids for target gene fixation in backcross programmes of maize. *Plant Breed.* doi: 10.1111/j.1439-0523.2022.01948.x
- Mayor P, Bernardo R (2009) Doubled haploids in commercial maize breeding: one-stage and two-stage selection versus marker-assisted recurrent selection. *Maydica* 54: 439-448.
- Prasanna BM, Vasal SK, Kassahun B, Singh NN (2001) Quality protein maize. *Curr. Sci.* 81: 1308-1319.
- Riggs TM, Sanpe JW (1977) Effects of linkage and interaction in a comparison of theoretical populations derived by diploidized haploid and single seed descent methods. *Theor. Appl. Genet.* 49: 111-115.
- Wang J, Chapman SC, Bonnett, DG, Rebetzke GJ, Crouch J (2007) Application of population genetic theory and simulation models to efficiently pyramid multiple genes via marker-assisted selection. *Crop Sci.* 47: 582-588.
- Welz HG, Schechert A, Pernet A, Pixley KV, Geiger HH (1998) A gene for resistance to maize streak virus in the African CIMMYT maize inbred CML202. *Mol. Breed.* 4: 147-154.
- Yan J, Kandianis C, Harjes CE, Li B, Kim EH, Yang X, Skinner DJ, Zhiyuan F, Mitchell S, Li Q, Salas Fernandez MG, Zaharieva M, Babu R, Yang F, Palacios Rojas N, Li J, Dellapenna D, Brutnell T, Buckler ES, Warburton ML, Rocheford T (2010) Rare genetic variation at *Zea mays cerR1* increases beta-carotene in maize grain, *Nat. Genet.* 42: 322-327.

8. 상업적 옥수수 육종에서 DH: 표현형 선발

Daniel Jeffers, George Mahuku

서언

배가반수체(DH)를 상업적 옥수수 육종 프로그램에 이용하여 종자 산업에 육종 작업 운영과 관련된 경비의 절감, 생산물을 시장에 가져가는 육종 사이클을 가속화, 특성 검정 효율 증진 및 새로운 유전자원의 탐색과 같은 이익을 제공하였다. 따라서 DH 기술은 대형 종자회사에서 종자 육성과정에 핵심 요소가 되었다. 이 장에서는 어떻게 고속이면서 비교적 정확한 표현형 분석과 결합된 DH의 이용이 상업적 육종 프로그램에 이용되는지에 대해 논의한다.

옥수수의 배가반수체는 옥수수 육종을 위해 1940년대부터 미국에서 생산되어 왔고(Chase, 1947,1949) 상업적 교배종의 양친 계통으로 1960년대 초기부터 이용되어 왔다 (Troyer, 2004; Forster와 Thomas, 2005). Dekalb640은 고밀도 재식 내성 교배종으로 미국에서 최초로 널리 사용된 교배종으로 이 혈통에는 3개의 DH 계통이 포함되어 있다(Chang와 Coe, 2009). 처음에는 반수체 유기율 및 염색체 배가율이 낮았지만 우수 계통육성 프로그램에서 개발된 동형접합계통들은 상업적 옥수수 육종 프로그램에 매우 유용한 것으로 확인되었다.

상업적 육종을 위해서는 DH 기술을 이용하여 육종기간을 단축하는 것이 계통 육성에 필요한 자원들을 현저히 감소시켜 크게 이익이 된다. 상업적 육종 회사에서는 DH 기술을 이용함으로써 조기세대 자식계통에 대한 Stage1 검정을 하지 않는다. D1 계통을 개발한 후 적어도 3-4 작기 동안 상업적 교배종으로 이용될 새로운 계통들은 스트레스 평가 양묘장 및 여러 장소 시험으로 평가될 수 있고 상업 전 교배종의 스트립 플롯 테스트를 위하여 상업용 종자 생산 단위로 전달된다. 2011년에 파이오니아사는 최초 80년간 육종 노력으로 생산된 자식계통 총수 보다 더 많은 DH 계통들을 생산했다고 한다. 이것은 전체 다국적 종자 기업의 전형적인 예이다. 이제는 새로 만들어진 DH 계통들의 표지이용선발(MAS, marker=assisted selection)과 대량 표현형분석을 강조하게 되었다

DH는 다양한 환경 조건하에서 성능이 우수한 육종 재료를 확인할 수 있는

능력을 증진 시킨다

대형의 상업적 육종프로그램에서는, DH 계통들은 여러 환경에 대한 농업적 능력과 비생물학적, 생물학적 스트레스에 대한 특성 검정 전에 분자 마커를 이용해서 신속하게 평가하고 선발한다. 이러한 것들에는 최적의 조건보다 열악한 조건에서 생산량에 대한 정보를 제공할 수 있는 제어된 스트레스 환경 (Campos 등, 2004)이 포함 된다. 완전 동형접합 DH 계통들과 이들 교배종의 평가를 통하여 표현형과 유전형을 연계시킬 수 있다. 생물병에 대한 반응의 우수 표현형적 특성 검정을 결합한 상업적 규모의 DH 프로그램을 사용하여 브라질에 있는 다우 애그로사이언스사에서는 그들이 갖고 있는 우수한 자식 계통들이 갖고 있던 병 감수성을 신속한 재순환을 통하여 다중 병 저항성으로 신속하게 변환하였고 다중 병 저항성 교배종의 강력한 상업적 공급선을 개발되었다. 이러한 것은 DH 자식계통들의 유전자형 확인에 분자적인 방법을 일상적으로 이용하기 이전에 이루어 졌다 (D. Jeffers, 개인적 정보).

지난 십 년간 대형국제종자회사는 유전자형분석능력이 크게 향상되었고 표현형 분석능력은 이를 따르지 못하였다(Campos 등, 2004). 그러므로 “표현형 플랫폼”을 이용한 최적 및 스트레스 조건하에서 옥수수 유전자원을 평가하기 위한 대량 표현형분석 능력을 개선하기 위해 많은 투자가 이루어졌다. Phenomics란 용어는 생물정보학과 관련된 디지털 영상, 스펙트럼 분석과 작물 캐노피 온도 측정과 같은 기술을 포함하는 현대 기술을 사용하여 개선된 표현형 특성의 모든 분야에서 사용된다(Finkle, 2009; Gonzalez-Perez 등 2011; Montes 등, 2011; Patil과 Kumar, 2011). 이 기술들은 생물적, 비생물적 스트레스에 대하여 최적 및 스트레스 조건하에서 작황을 검토하기 위해 이용되어 왔으며 유전자원들의 반응에 대한 더욱 더 양적인 측정 방법을 제공한다. 또한 정밀성이 개선되어 다양한 스트레스 반응에 대한 유전적 기초를 더 잘 이해 할 수 있는 기회를 제공한다.

육종의 이익을 가속화 하기위한 DH 와 타 기술과의 연계

배가반수체는 상업적 육종 프로그램이 육종 효율을 높이고 육종 사이클 당 육종 이익을 증가시킬 수 있게 하는 기술 패키지의 한 요소일 뿐이다. 더 나은 생산물을 개발하고 제공하기 위한 분자육종, 생물정보학, 배가반수체, 식물유전체학, 정밀표현형분석 및 의사결정지원 도구를 포함하는 Pioneer 종자회사의 AYT (Accelerated Yield Technology) 시스템 이용이 그 한 예이다. 정밀 표현형은 거시적 수준에서, 또한 반응에 대한 유전적 기초가 이

해되면 분자 수준에서 표현형 반응을 검토하는 능력을 제공한다. 단백질체학 (Proteomics, Liebler, 2002)과 대사체학 (Metabolomics, Daviss, 2005) 과 같은 표현형 도구들은 더 낮은 유전자원 특성검정을 위해 이용될 수 있다.

앞으로의 전망

포장에서의 적당한 정밀도의 대량 신속 표현형 분석은 옥수수 식물체가 환경에 반응하고 최종적으로는 작황에 영향을 받는 것에 대한 이해의 중요한 발전과 더불어 현대 옥수수 육종 사업에서 중요한 역할을 한다. 이 반응의 유전적 기초에 대한 더 많은 정보가 얻어짐에 따라 분자표현형은 상업적 옥수수 산물에 대한 유전적 반응을 예측하는 표현형 분석 과정의 더 큰 요소가 될 것이다. 이러한 활동은 기반 조성에 많은 투자가 필요하기 때문에 다국적 종자회사를 포함하는 대형 연구소에서 수행될 수 있다. 반수체 기술은 동형 접합 형질전환식물을 신속하게 생산하여 형질전환 기술을 확립하는데 도움이 되는 유용한 도구가 될 수 있다.

반수성과 MAS, 유기 돌연변이, 형질전환기술과 같은 여타 기술들과 결합하면 작물개선이 가속화 될 것이다. 배가반수체는 이러한 활동을 촉진할 산물을 제공하고 상업적 제품에 유전적 개선을 전개하는 신속한 방법을 제공할 것이다.

인용문헌

- Campos H, Cooper M, Habben JE, Edmeades GO, Schussler JR (2004) Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crops Res.* 90: 19-34.
- Chang MT, Coe EH (2009) Doubled haploids. In: AL Kriz, BA Larkins(eds) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 63. Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, PP. 127-142.
- Chase SS (1947) Techniques for isolating monoploid maize plants. *J. Bot.* 34: 582.
- Chase SS (1949) The reproductive success of monoploid maize. *Am. J. Bot.* 35: 582.
- Daviss B (2005) Growing pains for metabolomics. *The Scientist* 19: 25-28.
- Finkle E (2009) With 'Phenomics' plant scientists hope to shift breeding into overdrive. *Science* 325: 380-381.
- Forster BP, Thomas WTB (2005) Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev.* 25: 57-88.
- Gonzalez-perez JL, Espino-Gudino MC, Torres-Pacheco I, Guevara-Gonzalez RG, Herrera-Ruiz G, Rodriguez-Hernandez V (2001) Quantification of virus syndrome in chilli peppers. *African J. Biotech.* 10: 5236-5250.

- Liebler DC (2002) Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 201pp. Montes JM, Technow F, Dhillon BS, Mauch F, Melchinger AE (2011) High-throughput non-destructive biomass determination during early plant development in maize under field conditions. *Field Crops Research* 121: 268-273.
- Patil JK, Kumar R (2011) Advances in image processing for detection of plant diseases. *J. Advanced Bioinformatics Applications and Research* 2: 135-141.
- Troyer AF (2004) Persistent and popular germplasm in seventy centuries of corn evolution. In: CW Smith, J Betran, ECA Runge (eds) *Corn: Origin, History, Technology and Production*. Wiley-Hoboken, pp. 133-232.

9. 열대형 반수체 유기체 제공 및 CIMMYT 파트너에 대한 DH 서비스

BM Prasanna, Vijay Chaikam, George Mahuku, Rodrigo Sara

열대형 반수체 유기체

소형이나 중형의 종사회사 뿐 아니라 국가농업연구기관의 옥수수 육종 연구소가 DH 기술을 채택하는 데에는 열대/아열대 조건에 적응된 유기체가 없어 어려움이 있다. CIMMYT의 세계옥수수프로그램은 Hohenheim(UHo) 대학 연구소(Institute of Plant Breeding, Seed Science and Population Genetics)와 공동으로 이러한 문제점을 해결하여 아래에 요약된 이용 약관에 따라 관심 있는 연구소들과 공유할 반수체 유기체들을 확보하고 있다.

CIMMYT와 호헨하임대학이 개발한 열대적응형유기계통들은 반수체 유기율이 높고(8-10 %) 멕시코의 CIMMYT 시험장 (Agua Fria와 Tlaltizapan) 에서 온대형 유기체에 비해 더 나은 작황을 보이는 것으로 확인되었다. 이러한 열대적응형유기계통(TAIL)을 이용해서 얻은 배가반수체 교배종들은 열대 조건에서 식물활력과 꽃가루 생산이 잡종강세를 나타내었으며 반수체 유기율은 비슷하게 (8-10%) 유지되었다. CIMMYT와 호헨하임 대학은 열대형 반수체 유기계통 중의 하나(반수체 유기체의 양친중 하나)와 F1 유기체종자를 관심 있는 지원자들에게 물질양도계약(MTA)에 서명한 후에 유기 계통들에 대한 지적재산권을 보호하기 위한 정해진 제한조건 하에 종자를 공유하고 이용할 수 있는 권한을 부여기로 결정하였다.

열대형 반수체 유기체 획득을 위한 가이드라인

연구와 상업적 이용을 목적으로 반수체 유기체들을 얻기 위한 일반적 가이드라인은 다음과 같다.

국가 연구기관의 연구용: 특별한 목적으로, 예를 들어 육종 프로그램에 이용될 DH 계통들을 육성하는, 반수체 도입에 관심 있는 국가 연구기관 의향서를 CIMMYT에 보낼 수 있다. 자격이 있는 국가 연구소에는 CIMMYT와 호헨하임 대학에서 연구이용 MTA에 서명한 후에 반수체 유기체를 무료로 제공한다. 국가연구기관에서 자체의 또는 타인(기관)의 상업적 목적으로 이용할 때에는 별도의 상업적 이용을 위한 사용권 협약에 따라야 한다(아래 명시).

상업적 이용: 상업적 이용을 목적으로 사용할 지원자는 CIMMYT와 호헨하이름 대학의 물질양도 및 사용 협약(Material Transfer and License Agreement, MTLA)에 서명하고 제공 받을 수 있다. 지원자는 두개의 반수체 유기체 종자(반수체 유기교잡종의 양친중 하나 및 반수체 유기교잡종) 제공에 대한 1회 사용료(US\$ 25,000)를 지불해야 한다. 만약 반수체 유기교잡종의 또 다른 양친을 원한다면 추가로 1회 사용료로 미화 10,000 달러를 호헨하이름 대학에 지불한다.

위에 언급한 반수체 유기체 종자는 필요에 따라 MTA(연구용) 또는 MTLA(상업용)에 서명하고 1회 사용료를 받은 후 3주 이내에 CIMMYT에 의해 제공된다.

IMIC(International Maize Improvement Consortium)파트너들에 대한 CIMMYT의 옥수수 DH 서비스

CIMMYT는 최근에 멕시코 푸에블라주의 Agua Fria 시험지에 DH 생산 시설을 설치하였다. 이 설비로 DH 계통 생산 서비스가 아시아 및 라틴 아메리카에서 운영되는 IMIC(IMCA-Asia와 IMIC-LA) 회원들에게 비용회수기준으로 제공될 것이다. 어떻게 콘소시엄 회원이 되는가에 대한 정보에 관하여는 CIMMYT 옥수수 프로그램 디렉터와 문의하기 바란다.

Agua Fria 시험지에서는 5월 말 경에 반수체 유기를 위한 대상 재료들을 포장에 심고 종자는 9월에 수확한다. 반수체 종자는 종자 색 표지를 이용해 확인하고 유묘는 즉시 반수체 배가 처리를 한다. 반수체(D0) 유묘는 11월-4월에 기른다. DH 계통들의 D1 종자들은 유전자원 수출 프로토콜에 따라 파트너들에게 보낸다.

육종 프로그램에 DH 기술을 채택하기 위해 가능한 모델

모델1-전체 서비스: 이 경우에는 파트너는 대상 유전자원(DH 계통 육성을 위한 집단)을 보내고 CIMMYT에서는 DH 계통 육성에 필요한 모든 단계(유기, 분류, 염색체 배가, D1종자 획득)를 수행한다. 최종적으로 CIMMYT는 DH 계통(D1 종자)에서 생산된 모든 종자는 고객에게 보낸다. 이 경우 일이 효과적으로 진행되기 위해 파트너는 사전에 CIMMYT와 상담하고 DH 계통 육성을 위해 집단을 보낼 의향이 있다는 표해야 한다.

모델 2-일부 서비스: 이 모델에는 두 가지 가능성이 있다 :(1) 파트너가 반수체 종자를 유기하고 그 종자를 선발, 염색체 배가와 DH 계통 생산을 CIMMYT 설비에서 하거나; (2) 파트너가 반수체 유기 및 반수체 종자 선별을 하고 반수체 종자만을 보내 염색체 배가 및 이 후 DH 계통 생산을 CIMMYT 시설에서 하는 것.

DH 서비스 주문은 어떻게?

현재는 CIMMYT Agua Fria 시험지의 DH 서비스 설비로 DH 계통 생산을 위한 내 외부 요구에 부응하기 위해 년 간 총 150 집단을 처리할 수 있다. 관심 있는 파트너는 최대 5-10 집단을 반수체 유기 및 DH 계통 생산을 위해 제출할 수 있다.

매년 1월 DH 계통 생산 요청을 권유하는 공고를 한다. 이 서비스 이용하기를 원하는 파트너는 CIMMYT와 함께 MTA에 2월 말까지 서명할 필요가 있다.

MTA에 서명하고 필요한 비용을 지불한 후에(아래 세부사항에 따라 비용 회수로 적용) 파트너는 반수체 유기를 위한 각각의 집단별로 200립의 종자를 4월 말까지 보내야 한다. 종자와 함께 개화기 정보 (특히 출사기)와 적응성(열대/아열대/고지대)도 제공해야 한다.

만약 분류된 반수체 종자만을 일부 서비스(염색체 배가와 DH 계통 생산)를 위해 보내려면 반수체 종자를 CIMMYT(MTA에 서명하고 적절한 비용을 지불한 후에)에 10월 1일 이전까지 보내야 한다.

CIMMYT는 파트너로부터 받은 대상집단에서 DH 계통 생산에 성공했는지의 여부를 통보 한다. 대상 집단이 신뢰할 수 있는 반수체 종자 확인을 방해하는 종자 색 억제 유전자를 갖고 있는 경우에는 CIMMYT 는 관련 파트너에게 통보하고 그 특정 대상 집단은 더 이상 DH 계통 생산을 지속하지 않는다. 그러한 경우에는 반수체 유기 비용(집단 당 US \$200)만 파트너에게 청구된다.

민간 부문의 파트너들은 MTA에 서명하고 DH 생산 작업을 시작하기 전에 DH 서비스 비용을 지불해야 한다. 공공 부문 연구소의 파트너들은 MTA가 서명되기 전에 공동연구자의 예산을 사용할 수 있다. 만약 요청이 승인되면 서비스 비용은 CIMMYT 내부적으로 공동연구자의 예산에서 공제될 것이다. 공동 예산이 없는 공공 부문 파트너들은 MTA가 서명하고 CIMMYT에 의해 작업이 시작되기 전에 DH 서비스에 대한 자금을 마련해야 한다.

모든 취소된 DH 서비스 작업에 대한 취소 비용이 청구 된다. 비용은 공식적인 파트너로부터 주문된 DH 서비스의 공식적인 취소 요청을 받기 이전에 이미 수행된 일의 양에 비례하여 청구된다.

DH 계통 생산 서비스 비용 회수

전체 또는 일부 서비스 비용은 아래와 같다

- 1) 반수체 유기: 반수체 유기 처리된 각 대상집단 당 미화 200불.
- 2) 반수체 종자 확인 및 염색체 배가 : 각 DH 계통 당 미화 25불.
- 3) 염색체 배가 및 DH(D1) 종자 생산 : 각 DH 계통 당 미화 22불
- 4) 전체 DH 서비스(반수체 유기, 반수체 확인, 염색체 배가 및 DH 계통 생산 포함) : 각 DH 계통 당 미화 30불.

주 : 비용은 전적으로 비용회수 차원이며 매년 운영비용에 따라 CIMMYT에 의해 재고되거나 변경될 수 있다.

더욱 상세한 것은 아래로 문의:

Dr BM Prasanna, Director, Global Maize Program, CIMMYT(b.m.prasanna@cgiar.org)
또는

Dr Vijay Chaikam, DH Specialist, Global Maize Program, CIMMYT(V.chaikam@cgiar.org)