

과제 구분	기본연구	Code:LS0104	수행구분	전반기	연구기간	'00 ~ '03(완결)
연구과제명	옥수수 육종기술 개발 및 재배법 개선연구				연구책임자	민황기
세부과제명	분자표지 유전자를 이용한 옥수수 신육종기술 개발					
연구원별임무						
구분	소속	성명	담당임무			
세부과제책임자	옥수수시험장	박종열	시험총괄			
공동연구자	"	류시환	연구지원			
	"	서정식	"			
	강원대학교	김남수	연구과제 협의			
색인용어	분자표지 유전자, 옥수수 수량, SSR, Marker					

## ABSTRACT

Studies were conducted to select the SSR markers related maize yields. 36 F<sub>1</sub> hybrid made by half-diallel cross among 9 corn inbreds were used in this study. The 9 set primers related yields were selected(R<sup>2</sup>=0.7333). The 4 sets of 9 set primers is located in chromosome #7.

### 1. 연구배경

옥수수(*Zea mays*, L.)는 광과 온도의 이용 능력이 뛰어나고 또한 광합성 능력이 높은 C<sub>4</sub> 작물로 고도의 잡종강세를 나타내기 때문에 단위면적당 생산량이 높고 재배도 쉬워 곡물 중 밀(*Triticum aestivum* L. em Thell)과 벼(*Oryza sativa* L.)과 더불어 세계 3대 작물의 하나이다. 옥수수의 이용은 가축사료, 식용, 가공용, 공업용 및 약용재료로 널리 이용되고 있다.

옥수수는 타가수정작물로 보통 1~2개의 이삭이 달리며 또한 옥수수의 광지역 적응성은 열대뿐만 아니라 북위 45° 중국 흑룡강성까지 널리 재배되고 있다. 옥수수 다수확 재배에 필요한 생육기간은 130~140일 정도이다. 옥수수 다수확 재배를 보면 10a당 우리나라는 1.5톤, 세계적으로 2.5톤에 이를만큼 다수확 작물이다.

옥수수 육종방법에 따라 여러 가지 방법으로 구분 발전 되어 왔으나, 기존의 식물유전자 연관관에 대한 연구는 형태학적 형질과 생리학적 형질들을 마커로 이용하는 기본적 연구가 주를 이루었으나, 현재는 복잡한 유전양상 및 유전자 구명을 위한 분자유전학적 기법을 이용한 유전자 지도 작성 등을 직접적으로 육종에 이용하려는 시도가 이루어지고 있다. 1980년대부터 분자유전학적 기법의 개발로 다양한 유전자 마커가 개발되었고, 유전자 지도의 작성이 용이하게 되었다. 그리고 육종의 실질적인 적용 대상인 양적형질(Quantitative Character)의 구명으로 더욱 효율적인 육종이 기대된다.

옥수수 품종개발은 미국의 주도로 이루어져 왔고, 1800년대에는 집단선택에 의한 재래식 육종으로 약 100여종의 방임수분 품종이 재배되었으나(Troyer, 1999), 1900년대에 들어와서 교잡종 이론이 제기되면서 교잡종 옥수수 연구가 이루어져 1960년대 초반까지는 복교잡종이 대부분을 차지하였고 1960년대 후반부터 잡종강세가 우수한 단교잡종이 개발되어 재배되기 시작하였다.

1980년대 후반부터 생물공학 기술을 옥수수 육종에 응용하기 위한 연구가 활발히 수행되었다. 그 동안 개발된 PCR기법을 이용하여 옥수수 잡종강세를 미리 예측하여 노동력 절감과 옥수수 수량증대를 위한 교배 모본의 선발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 분자유전자가 개발되기 전에는 표현형적 마커 위주로 행하여 졌으나 이후 생화학적 동위효소를 이용한 마커 개발은 상당한 가능성은 보였으나 분자유전학적 기법의 발달로 동위효소를 이용한 마커 개발은 그리 활발하지 못하였다(Tanksley et al., 1989).

분자유전학적 방법은 기존의 마커와는 비교가 되지 않을 정도의 많은 대립 유전자를 분석할 수 있다(Bostein et al., 1980 ; Wyman and White, 1980). DNA 연쇄중합반응(PCR)을 이용한 마커 기법에는 여러 방법이 있지만 대표적인 방법으로 RAPD, SSLP, AFLP 등이 있다. RAPD는 분석이 간단하지만 재현성이 떨어진다. 반면 SSR은 재현성이 뛰어나고, 공유성 마커를 가지기 때문에 최근에 많이 이용하는 기법이다. Song 등(1998)은 한국 재래콩 70여 계통을 7개의 SSR primer로 구분이 가능하다고 하였다. SSR 마커는 농업형질 마커로 이용 가능성이 매우 높아 벼에서 전분 품질관련 2개의 마커가 보고되었다(Koh et al., 1996). SSR 기법은 처음에는 복잡한 과정을 거쳐야 하지만 일단 primer 세트만 갖추어지면 분석이 용이하고 재현성이 뛰어나기 때문에 옥수수, 벼, 콩 등에서 특정농업 형질의 마커가 개발되었다(McCouch et al., 1997). SSR 기법 모식도는 <그림 1>과 같다. AFLP는 RAPD의 간편성과 RFLP의 재현성이 합해진 최근에 개발된 분석법이다(Vos et al., 1995).

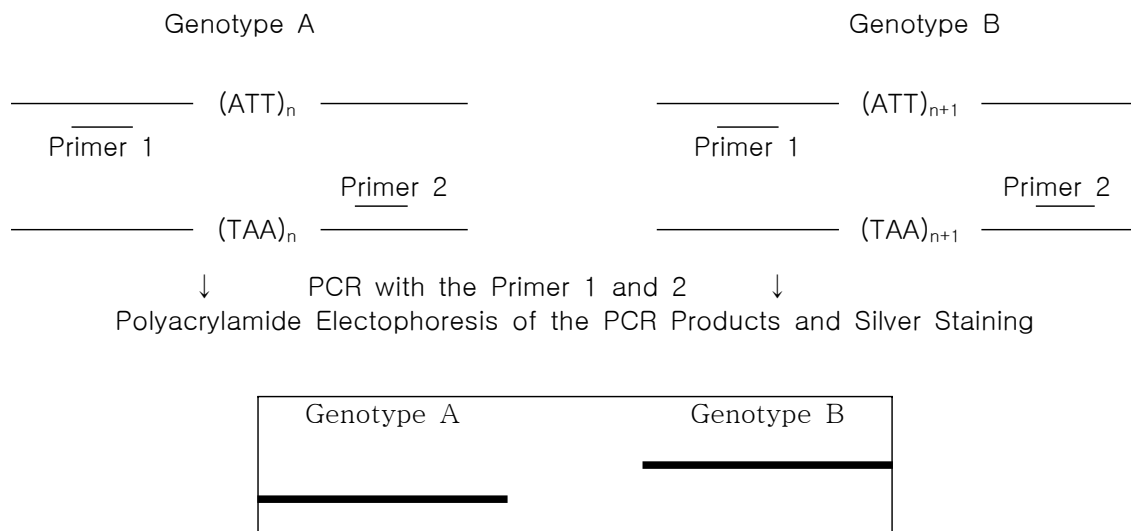


그림 1. SSR 기법에 의한 다형화 모식도

분자유전학적 마커는 육종시 선발지표로 대단히 유용하게 사용된다. 기존 육종방법으로 식물체를 고정시킬 때 표현형이나 병리학적 마커로 선발하였으나, 이런 형질들은 환경의 영향을 받는다. 그러나 분자유전학적 방법은 환경의 영향을 받지 않는다(Tanksley et al., 1989). 분자유전학적 마커의 식물유전 육종의 가장 주목할 만한 사실은 양적형질들의 유전

법칙을 이해할 수 있게 되었다는 것이다. 이들의 염색체내의 위치를 결정하게 되므로 인접한 마커들을 이용하여 육종 선발시 양적 형질들의 분리 예측이 가능하게 되었다(Zheng, 1993 ; Tanksley, 1993 ; Wu, 1996). Fropa 등(1999)은 옥수수에서 분자유전자 지도를 기초로 수량에 대한 양적형질들의 염색체좌를 구명하였는데 이삭장은 3, 6, 7, 8번, 이삭무게는 3, 4, 5, 8번 염색체에서 각각 관찰되었다고 하였다. Sari-Gorla 등(1999)은 옥수수 키와 관련된 형질은 1, 2, 8번, 출웅과 관련된 형질은 1, 2, 7, 8번 염색체에 있다고 하였다.

본 연구는 분자유전학적 기법인 SSR(Simple Sequence Repeats) 마커를 이용하여 옥수수 9 자식계통을 분석하여 자식계통간의 반이면교잡(Half-Diallel Cross)에 의해 얻어진  $F_1$  교잡종의 수량과 마커와의 관계를 구명하여 옥수수 수량과 관련된 SSR 마커를 선발하고자 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 1. 연구재료 및 재배법

본 연구는 2000년부터 2003년까지 4년간 강원도농업기술원 옥수수시험장 포장에서 수행하였다. 연구에 사용된 계통은 미국에서 육성한 A632, ND203, Va85, Mo17, B73, Oh43, C103, B14A, Wf9 계통을 사용하였다.

2000년에 포장에서 후폭 60cm, 주간거리 30cm로 9계통을 파종하여 반이면교잡을 하여 36 교잡계를 생산하였다. 생산된 교잡계를 2001년부터 2003년까지 3년간 흥천, 양구, 정선에 파종하여 생육 및 수량요소를 조사하였다. 재배법은 후폭60, 주간거리 30cm로 파종하였고, 시비량은 17.4-3-6.9 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O)kg/10a 시비하였고 질소는 기비와 추비 각 50%로 분시 하였고, 인산과 가리는 전량 기비로 시용하였다. 시험구배치는 난괴법 3반복으로 수행하였다. 파종은 1주 2분을 파종하여 본엽 3~4엽기에 1주 1본씩 남기고 솟아 주었다. 그 외에는 옥수수 표준재배법으로 재배하여 생육 및 수량요소 반응을 조사하였고, 주요조사요령은 농사시험연구 조사기준법에 준하였다.

### 2. 식물 DNA 추출

식물 DNA 추출은 9계통을 포트에 파종 후 3~4엽기 출현 하였을때 어린잎을 채취하여 김 등(1997)의 방법에 의해 추출하였다. 분리된 DNA는 RNase를 처리하여 RNA를 완전히 제거 한 후에 spectrophotometer로 농도를 확인하여 사용하였다.

### 3. SSR 분석 및 상관분석

2000년부터 2003년까지 9개 자식계통에 대해 Research Genetics로부터 구입한 SSR primer 중 500여개의 primer 세트를 사용하여 분석하였다. PCR 증폭은 Senior 등(1996)의 방법을 이용하여 수행하였다. PCR 반응물 6 $\mu$ l를 3X loading 버퍼 3 $\mu$ l와 혼합한 후 polyacrylamide gel에서 80W로 1시간정도 전기영동 후 silver staining 한 후 APC 필름으로 현상하였다.

옥수수 수량과 선발마커의 유전적거리와의 상관 분석은 SAS 8.0 프로그램을 이용하여 분

석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 1. 옥수수 생육 및 수량

옥수수 36교잡계의 생육 및 수량은 <표 1>과 같다. (표 1)의 성적은 2001년 가뭄으로 3 지역(홍천, 양구, 정선)중 홍천, 양구 시험구, 2003년은 정선 시험구가 발아 및 생육부량으로 제외하였다. (표 1)에서 보논바와 같이 단위 면적당 옥수수 수량은 Mo17/B14A가 1,097kg/10a로 가장 많았고, A632/B14A가 Mo17/B14A의 66%정도인 721kg/10a였다. 출사기는 모든 교잡계가 75~78일로 큰 차이는 없었다.

#### 2. SSR 분석

잡종강세가 많이 나타나는 단교잡종 생산을 위하여 자식계통의 계보를 분석한 후 유연관계가 먼 집단에서 선발하여 교잡하면 유리하다.

본 연구에서 500여개의 Primer 세트에 분석하여 관찰하였다(그림 2). 선발된 92개의 Primers를 가지고 옥수수 유연관계는 (그림 3)와 같다. (그림 3)에서 보논바와 같이 Reid Yellow Dent 계보에 속하는 A632, B14A, B73은 Lancaster Sure Crop 계보인 Va85, Mo17과 원연으로 나타났다. (그림 3)에서 두 계보간 완전히 분리가 되지는 않았다. 92개 Primer 중 수량과 관련이 있다고 생각되는 9개 Primer로 분석한 유연관계는 (그림 4)와 같다. (그림 4)의 결과는 (그림 3)과 약간의 차이를 보였다. 이것은 무작위로 선발된 Primer로 분석한 결과와 실질적으로 수량과 관련이 있는 것으로 추정되는 Primer의 분석에 의한 차이인 것으로 생각된다.

(그림 4)에 나타난 결과를 가지고 옥수수 수량과 유전적 거리와 상관을 분석하였다(그림 5). 상관분석을 위한 옥수수 수량평가는 ND203이 활옥수수 계통이고 고정도가 떨어졌기 때문에 ND203이 포함된 교잡계는 제외하고 분석하였다. 그림에서 보논바와 같이 옥수수 수량과 선발된 9개 Primer로 분석한 유전적 거리와는 고도의 유의성( $R^2=0.733$ )을 보였다. 선발된 9개 Primer는 <표 2>와 같으며, 선발된 Primer는 7번 염색체 4, 8번 염색체 2개, 2, 5, 10번 염색체 각 1개씩 위치하였다. 9개의 Primer를 가지고 실내실험을 통하여 노동력 절감 및 옥수수 수량예측이 가능 할 것이라고 생각된다.

표 1. 옥수수 생육 및 수량특성(3년 평균)

교잡계	출웅일 수(일)	출사일 수(일)	간장 (cm)	착수고 (cm)	이삭(cm)			100립중 (g)	종실중 (kg/10a)
					길이	착립 길이	폭		
A632/ND203	73	76	226	112	16.3	15.8	4.1	32.4	887
A632/Mo17	73	76	247	130	17.7	17.2	4.2	31.5	955
A632/Oh43	72	76	229	106	15.8	15.0	3.9	31.5	845
A632/C103	73	76	226	105	16.2	15.5	4.3	26.2	808
A632/B14A	73	76	233	111	14.8	13.9	4.1	32.6	721
A632/Va85	74	76	242	124	18.3	17.6	4.5	32.1	1,015
A632/Wf9	73	76	247	125	16.9	16.5	4.5	31.9	977
A632/B73	75	78	228	107	15.1	14.4	4.4	30.9	844
ND203/Mo17	73	76	239	132	17.6	17.3	4.2	31.1	849
ND203/Oh43	73	76	246	127	18.9	18.5	4.3	33.4	824
ND203/C103	73	76	233	117	18.6	17.9	4.2	32.3	859
ND203/B14A	73	77	251	134	18.1	17.4	4.4	34.2	944
ND203/Va85	77	79	241	122	17.5	17.1	4.4	31.1	968
ND203/Wf9	73	76	255	136	16.4	15.9	4.4	33.9	862
ND203/B73	72	76	243	128	17.0	16.7	4.3	33.0	888
Mo17/Oh43	72	75	232	109	18.1	17.5	4.3	34.3	889
Mo17/C103	73	76	229	106	17.5	16.9	4.1	27.8	802
Mo17/B14A	73	76	248	122	18.1	17.5	4.6	36.4	1,097
Mo17/Va85	73	76	247	119	19.7	19.2	4.5	34.3	1,080
Mo17/Wf9	72	75	263	133	17.6	17.2	4.5	35.0	1,068
Mo17/B73	74	77	225	104	18.2	17.8	4.3	33.4	805
Oh43/C103	74	77	224	108	17.1	16.6	4.1	29.1	816
Oh43/B14A	74	77	219	103	16.6	15.8	4.0	31.3	757
Oh43/Va85	72	75	244	115	20.0	19.1	4.4	36.1	995
Oh43/Wf9	75	76	259	134	16.5	16.2	4.2	28.7	864
Oh43/B73	73	76	237	112	18.7	17.9	4.3	34.4	876
C103/B14A	74	76	238	110	17.5	16.5	4.4	29.3	896
C103/Va85	73	76	245	118	18.2	17.5	4.4	29.4	889
C103/Wf9	73	76	266	134	16.8	16.3	4.6	31.1	975
C103/B73	74	77	236	108	17.5	16.8	4.4	29.4	759
B14A/Va85	74	77	255	120	18.7	18.1	4.6	34.4	1,045
B14A/Wf9	73	77	258	139	17.8	17.1	4.5	35.5	978
B14A/B73	75	77	228	103	17.1	16.2	4.3	31.2	938
Va85/Wf9	73	75	269	143	18.4	17.8	4.5	31.0	1,017
Va85/B73	74	76	240	112	19.1	18.6	4.4	32.8	1,064
Wf9/B73	73	76	272	142	16.3	15.9	4.6	32.5	1,012

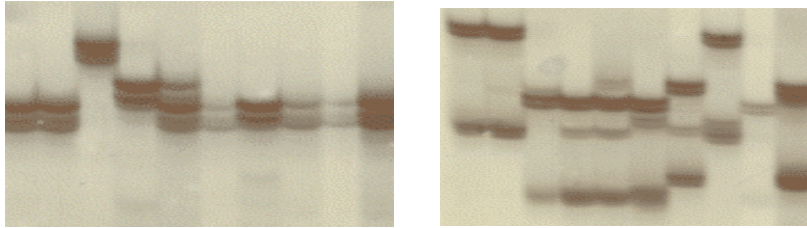


그림 2. 옥수수 9계통의 SSR 분석

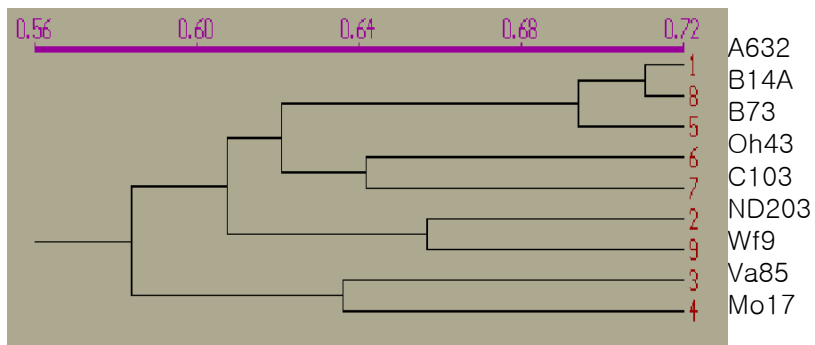


그림 3. 92개 Primer로 분석한 옥수수 9계통의 유연관계

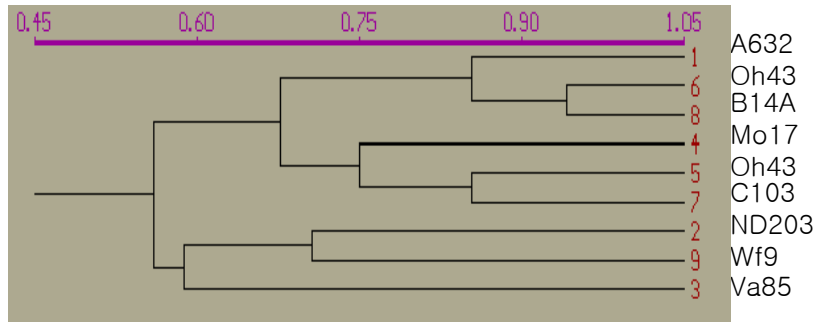


그림 4. 9개 Primer로 분석한 옥수수 9계통의 유연관계

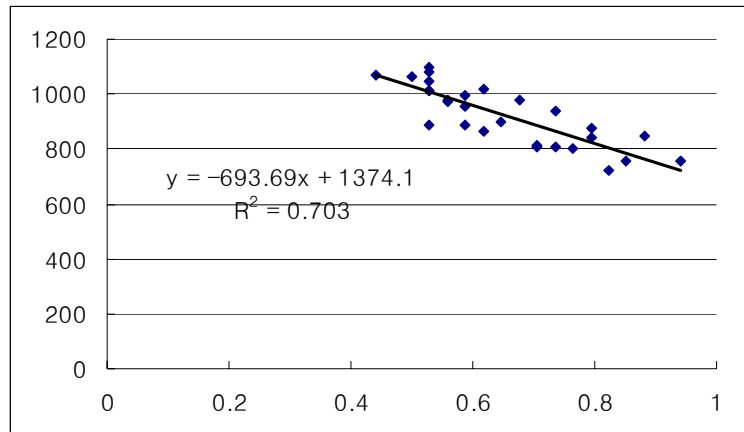


그림 5. 옥수수 수량과 유전적 거리와 상관분석

표 2. 선발된 SSR Primer Sequence.

Locus	Sequence	Chrom. No.
phi51	GGCGAAAGCGAACGACAACAATCTT	7
	CGACATCGTCAGATTATATTGCAGCCA	
phi57	CTCATCAGTGCCGTCGTCCAT	7
	CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC	
phi80	CACCCGATGCAACTTGCGTAGA	8
	TCGTCACGTTCCACGACATCAC	
phi112	TGCCCTGCAGGTTTACATTGAGT	7
	AGGAGTACGCTTTGGATGCTCTTC	
phi113	GCTCCAGGTCGGAGATGTGA	5
	CACAACACATCCAGTGACCAGAGTT	
phi125	ACCGCCGGTGCGAGTTGAAG	8
	GTTGGGATTGCCCTCATCCAC	
phi127	ATATGCATTGCCTGGAAGTGAAGGA	2
	AATTCAAACACGCCTCCCGAGTGT	
bngl210	GCCTCGCACCAAGACATAATA	10
	TGCCCCATTTGAGTAGACTTC	
bngl398	CGTCGGCCAACAGGGTATC	7
	CTCGCACGCGGTCTTCTTC	

#### 4. 적 요

본 연구는 분자유전학적 기법인 SSR(Simple Sequence Repeats) 마커를 이용하여 옥수수 9 자식계통을 분석하여 자식계통간의 반이면교잡(Half-Diallel Cross)에 의해 얻어진 36 F<sub>1</sub> 교잡종의 수량과 마커와의 관계를 구명하여 수량과 관련된 SSR 마커를 선발하고자 수행하였다.

1. 옥수수 수량은 Mo17/B14A가 1,097kg/10a로 가장 많았고, A632/B14A가 Mo17/B14A의 66%정도인 721kg/10a였다. 출사기는 모든 교잡계가 75~78일로 큰 차이는 없었다.
2. 92개의 SSR Primer로 분석한 결과 Reid Yellow Dent 계보에 속하는 A632, B14A, B73은 Lancaster Sure Crop 계보인 Va85, Mo17과 원연으로 나타났다.

3. 옥수수 수량과 선발된 9개 Primer로 분석한 유전적 거리와는 고도의 유의성( $R^2=0.733$ )을 보였다.
4. 선발된 9개 Primer 중 4개가 7번 염색체에 위치하였다.

## 5. 인용문헌

- 김남수, 조윤상. 1997. Microsatellite를 이용한 식물 계통분석. Res. Appl. Biol. in Kongju Nat'l Univ. 1 : 29-34.
- Bostein D., White R. 1980. A highly polymorphic locus in human DNA. Proc. Acad. Sci. USA. 77 : 6574-6578.
- Frova C, Krajewski P, Di Fonzo N, Villa M, Sari-Gorla M.. 1999. Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. I. Yield components. Theor. Appl. Genet. 99 : 280-288.
- Koh H.J., Heu M.H. and McCouch S.R. 1996. Molecular mapping of the ges gene controlling the super-giant embryo character in rice. Theor. Appl. Genet. 93 : 257-261.
- McCouch S.R., Chen X., Pan명 O., Temnykh S., Xu Y., Cho Y.G., Huang N., Ishii T. and Blair M. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. Plant Mol. Bio. 35 : 89-99.
- Sari-Gorla M., Krajewski P., Di Fonzo N, Villa M, Frova C. 1999. Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. II. Plant height and flowering. Theor. Appl. Genet. 99 : 289-295.
- Senior M.L., E.C.L. Chin, M. Lee, J.S.C. Smith and C.W. Stuber. 1996. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the Genebank database : Map Construction. Crop Sci. 36 : 1676-1683.
- Song Q., Choi Z.Y., H대 N.K. and Kim N.S. 1998. Genotype fingerprinting differentiation and association between morphological traits and SSR loci of soybean landraces. Plant Res. 1 : 81-91.
- Tanksley S.D. 1993. Mapping polygenes. Ann. Rev. Genet. 27 : 205-233.
- Tanksley S.D., Young N.D., Paterson A.H. and Nonierbale M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding : New tools for an old sciences. Bio/Tech. 7 : 257-264.
- Troyer A.F. 1999. Background of u.s. hybrid corn. Crop Sci. 39 : 601-626.
- Vos P., Hoder R., Bleeker M., Reijans M., Lee V.T., Hornes M. Fritjers A., Pot J., Peleman J., Kuiper and Zabeau M. 1995. AFLP : A new concept for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res. 23 : 4407-4414.
- Wu R.L. 1996. Quantitative genetics dissection of complex traits in a QTL-mapping pedigree. Theor. Appl. Genet. 93 : 447-457.
- Zheng Z.B. 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene affects in mapping quantitative traits loci. Proc. Natl. Acad. USA 90 : 10972-10976.

## 6. 연구결과 활용제목

- 기초자료로 활용