반수체 밀 육성을 위한 밀 및 옥수수 품종 반응

김영진¹ · 손범영¹ · 최인덕¹ · 현종내¹ · 박광근¹ · 윤성중^{2*}

¹농촌진흥청 국립식량과학원, ²전북대학교 농업생명과학대학

Variation in Genotypic Responses of Wheat and Maize for Wheat Haploid Production

Young-jin Kim¹, Beum-young Son¹, Induck Choi¹, Jong-nae Hyun¹, Kwang-Geun Park¹, and Song Joong Yun^{2*}

¹National Institute of Crop Science, RDA, Iksan 570-080, Korea

²Department Crop Science, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Abstract : Doubled haploid (DH) system is an effective tool in improving breeding efficiency and has been widely applied in wheat breeding programs. Wheat x maize hybridization is used for the production of wheat DH because of its efficiency and ease of application. We carried out an experiment to investigate genotype effect of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) on efficiency of wheat haploid production. In various wheat x maize crosses, ten wheat and seven maize genotypes were tested. Haploid embryos were rescued and cultured for plant regeneration. Average seed set, embryo formation and haploid regeneration of five wheat varieties in crosses with a pollinator cv. Gangdaok were about 75%, 19% and 8.4%, respectively. Their haploid regeneration ranged from 3.7~9.8% and cv. Jokyoung showed highest regeneration. Average seed set, embryo formation and haploid regeneration of seven maize genotypes in crosses with a parent cv. Jokyoung were about 78%, 18% and 9.6%, respectively. Their haploid regeneration ranged from 7.6~12.9% and cv. Kwangpyeongok showed highest regeneration followed by cvs. Gangdaok and Gangilok. Analysis of variance for seed set and embryo formation showed highly significant effects of wheat parents and maize pollinators, whereas their interaction effect was only significant for seed set. The effect of maize genotypes on these traits was greater than that of wheat genotypes. Consequently, cvs. Kwangpyeongok, Gangdaok and Gangilok were found to be better pollen donors among the genotypes tested in wheat x maize hybridization for wheat hybrid production.

Keywords : Wheat, Maize, Haploid, Wide hybridization, Seed set, Embryo formation

서 언

밀은 Poaceae과의 *Triticum* 속에 속하는 1년생 작물이다. *Triticum*속은 체세포 염색체 수를 기준으로 이배체(2n=14), 사배체(2n=28) 및 육배체(2n=46)의 3개 계로 나뉘어지며 현재의 재배종 밀은 육배체 밀이다.

작물의 새로운 품종을 개발하기 위해서는 유전적 다양성을 증가시키기 위한 인공교배가 선행되어야 한다. 그리고 반복적인 선발을 통해 목적하는 형질로 고정하는 단계를 거치는데 이를 위하여 많은 세대를 경과해야 한다. 따라서 선발과 고정

단계를 단축하여 품종육종의 소요 연한을 단축하려는 다양한 방법들이 제안되었다. 이 중에서 반수체 육종(doubled haploids) 기술은 유용형질을 빠르게 고정시킬 수 있는 가장 효율적인 방법이다(Almousslem et al. 1998, Niroula & Bimb 2009). 밀의 반수체 육성에서 옥수수 화분(pollen)을 이용하는 원연교잡 방법은 세포학적으로 매우 안정적이며(Kisana et al. 1993, Suenaga 1994, Inagaki 1997, Niroula & Bimb 2009) 육종적으로 효율적인 방법으로 알려져 있다.

밀×옥수수 원연교잡은 옥수수 화분과 제용한 소화가 달린 절취한 밀 이삭을 이용한다. 제용한 밀 소화의 암술머리에 옥수수 화분을 수분시키면 옥수수 화분은 밀의 배주(egg cells)와 성공적으로 결합하여 원연잡종 접합체(hybrid zygotes)를 생성한다(Laurie & Bennett 1986). 잡종 접합체의 배발생 과정에서 옥수수 염색체는 접합체로부터 빠르게 소실되어 밀

*Corresponding author (E-mail: sjyun@jbnu.ac.kr, Tel: +82-63-270-2508, Fax: +82-63-270-2640)

(Received on June 30, 2014. Revised on September 1, 2014.

Accepted on September 3, 2014.)

염색체만 남게 된다(Comeau et al. 1992). 밀 이삭의 기부를 sucrose 및 2,4-D 등의 식물생장조절제가 들어있는 용액에서 배양하면 종자가 형성되고 배(embryo)가 자라기 시작한다(Laurie & Bennett 1988, Laurie & Reymondie 1991, Ahmad 2004, Ushiyama et al. 2007). 이삭을 약 14일 동안 배양하여 발달한 종자로부터 배를 적취하여 기내 배배양을 통해 반수체 식물체로 육성된다.

옥수수와의 원연교잡을 이용한 반수체 밀 육성방법은 국제 옥수수밀연구소(CIMMYT)를 비롯한 세계의 여러 밀 육종기관에서 실용화하고 있다. 국내에서는 이 방법의 실용화를 위한 기초기술을 확립하고 있는 중이다. 본 연구에서는 국내 품종을 이용한 밀×옥수수 원연교잡 효율을 높이기 위해서 우선 국내 밀 품종과 화분친으로 사용하는 옥수수 품종들 사이의 배형성 반응 등을 비교하였다. 또한, 밀 F_1 계통과 옥수수 품종들 간의 반수체 생산효율을 비교하여 반수체 밀의 육성에 실제로 적용할 수 있는 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

밀 반수체 육성을 위해 교배 모본으로 사용할 밀 5개 품종(cv. 알찬, 조경, 금강, 수강, 우리)과 밀 F_1 5개 계통(08WG032, 08WG036, 08WG046, 08WG074, 08WG084)을 2008년 10월 22일에 국립식량과학원 벼맥류부 포장(전북 익산 소재)에

파종하였다. 화분친으로 사용할 옥수수는 7개 품종(cv. 광평옥, 강다옥, 강일옥, 장다옥, 미백찰, 미백2호, 미흑찰)을 공시하여 유리온실(30/25℃, 12시간 일장)에서 2009년 2월 5일부터 5일 간격으로 파종하여 재배하였다. 2009년 4월 경 밀의 출수기에 이삭의 기저부를 잘라 채취한 이삭을 물에 담가 놓고 제웅작업을 하였다. 제웅 약 3~4일 후에 밀의 주두가 활짝 열리면 옥수수의 신선한 화분을 채취하여 붓을 이용하여 수분을 시켰다. 수분을 실시한 1일 후에 이삭의 기부를 2,4-dichlorophenoxy acetic acid(2,4-D, 100 mg/L) 및 sucrose (4%)가 들어있는 수용액에 침지하여 22℃, 12시간 일장, 상대습도 50~60% 조건으로 배양하였다(Inagaki 1997). 수분 이후 약 12~14일 동안 배양하여 형성된 종자를 채취하여 70% ethanol에 1분, 2% sodium hypochlorite에 10분간 처리하여 표면을 소독하고 멸균수로 수 회 세척하였다. 표면 소독한 종자로부터 미숙배를 적취(embryo rescue)하여 2% sucrose 및 1mg/L NAA가 첨가된 1/2 MS 배지에 치상하고 25℃ 암실에서 배양하였다(Kim et al. 2011). 암배양 약 5~10일 후에 배가 발아하면 광조건에서 식물체를 재분화 시켰으며, 식물체가 2-3엽기에 도달하면 식물생장조절물질이 들어있지 않는 MS 기본배지로 옮겨 배양하였다. 수분한 이삭 및 배를 배양하면서 종자 형성률, 배 형성률, 및 반수체 식물체 재분화율 등을 조사하였다. Fig. 1은 밀×옥수수 원연교잡을 통한 밀 반수체 생산과정을 나타낸 것이다. A는 수분수로

Fig. 1. Production of haploid wheat in wheat x maize crosses. A : maize genotypes used as pollinators, B and C : seeds set in wheat x maize crosses 14 days after pollination, D : immature embryo developed in haploid seed, E : regeneration of haploid plantlets from immature embryos.

이용된 옥수수 품종들의 파종 시기별 온실 생육상황이며, B와 C는 밀×옥수수 원연교잡 14일 후에 종자가 결실된 상태이고, D는 종실 안에 미숙배가 들어있는 상황이며, E는 배배양 후 반수체 식물체로 기내 재분화된 상태를 보여주고 있다.

결과 및 고찰

자방친으로 사용한 국산 밀 5개 품종과 화분친으로 사용한 옥수수(cv. 강다옥)와의 원연교잡에서 평균 종자 형성률, 배 형성률 및 반수체 식물체 재분화율은 각각 약 75%, 19% 및 8%이었다(Table 1). 배 형성률 및 반수체 식물체 재분화율은 품종에 따라 유의한 차이를 보였으나, 종자 형성률은 품종 간에 차이를 보이지 않았다. 각 품종의 종자 형성률은 66~81%이었으며, 금강밀이 가장 높고 우리밀이 가장 낮았다. 배 형성률은 11~22%의 분포를 보였고, 금강밀이 가장 높았으며 다음으로 조정(21.3%), 수강(19.5%) 순으로 높았다. 반수체 식

물체 재분화율은 3.7~9.8%의 분포를 보였는데, 조정이 가장 높았으며 이어서 수강(9.6%), 금강(9.4%) 순으로 높았다(Table 1).

원연교잡을 실제 육종에 적용할 수 있는 가능성을 살펴보기 위해 5종의 밀 F₁ 계통을 자방친으로 하고 옥수수(cv. 강다옥)를 화분친으로 한 교잡에서 평균적인 종자 형성률, 배 형성률 및 반수체 식물체 재분화율은 각각 약 66%, 16% 및 6.6%이었다(Table 2). 자방친을 고정 품종으로 사용하였을 경우보다 종자 형성률, 배 형성률이 각각 9% 및 3%정도 감소하였다. 배 형성률과 식물체 형성률은 계통에 따라 유의한 차이를 보였으나, 종자 형성률은 계통간에 차이를 보이지 않았다. 각 계통의 종자 형성률은 36~82%의 분포를 보여 변이가 컸다. 각 계통의 원연교잡 종자의 반수체 재분화율은 3~10%이었으며, 08WG074가 가장 높았고 08WG084가 가장 낮았다. 원연교잡종 종자에서 적출한 배의 기내 식물체 재분화율은 61% 수준이었다. 반면 원연교잡에 사용한 소화에

Table 1. Responses of wheat cultivars for embryo formation and plantlet regeneration in crosses with maize (cv. Gangdaok) pollens.

Wheat Cultivars	Florets pollinated (A)	Seed set (B)	Embryos rescued (C)	Regenerated plantlets (D)	%			
					B/A	C/B	D/C	D/A
Alchan	270	196	35	25	72.6	17.9	71.4	9.3
Jokyung	254	188	40	25	74.0	21.3	62.5	9.8
Keumkang	286	231	51	27	80.8	22.1	52.9	9.4
Sukang	282	221	43	27	78.4	19.5	62.8	9.6
Uri	268	178	19	10	66.4	10.7	52.6	3.7
Mean	272	203	37.6	22.8	74.6	18.5	60.6	8.4
LSD(0.05)	-	-	-	-	NS	10.6	3.6	2.4
CV(%)					13.9	16.4	14.6	20.7

Table 2. Responses of five selected wheat F₁ lines for embryo formation and plantlet regeneration in crosses with maize (cv. Gangdaok) pollens.

Wheat F ₁ ^z	Florets pollinated (A)	Seed set (B)	Embryos rescued (C)	Regenerated plantlets (D)	%			
					B/A	C/B	D/C	D/A
08WG032	252	177	29	14	70.2	16.4	48.3	5.6
08WG036	240	161	26	18	67.1	16.1	69.2	7.5
08WG046	247	203	26	16	82.2	12.8	61.5	6.5
08WG074	264	195	38	27	73.9	19.5	71.1	10.2
08WG084	261	94	14	8	36.0	14.9	57.1	3.1
Mean	253	184	29.8	18.8	65.9	15.9	61.4	6.6
LSD(0.05)	-	-	-	-	NS	4.3	9.4	3.2

^z08WG032 (Prina/Iksan 313), 08WG036 (Joeun/highamy//Joeun), 08WG046 (Uri/D7 (951188-G3-G1)), 08WG074 (Jokyung/Joeun), 08WG084 (Eunpa/Jokyung)

대한 반수체 식물체 재분화율은 6.6% 수준에 불과하였는데, 고정 품종을 자방친으로 사용하였을 경우보다 1.8% 정도 낮았다. Suenaga 등(1994)이 실시한 아시아, 유럽, 북미 등 서로 다른 지역에서 재배되는 47품종의 밀과 55품종(계통)의 옥수수를 이용한 원연교잡에서 배 형성률은 0.9~35.8%의 변이를 보여 품종간의 반응이 매우 다양하였다. 따라서 국내 옥수수 품종을 반수체 밀 육성 원연교잡에 이용하기 위해서는 다수의 국내 옥수수 품종과 유전자원에 대해 반수체 식물체 재분화율을 조사하여 반응이 우수한 자원을 발굴하는 것이 우선적으로 필요하다고 생각된다.

동일한 자방친 밀 품종에 대해 7종의 국내 옥수수 품종을 각각 화분친으로 사용한 원연교잡에서 평균 종자 결실률, 배 형성률 및 반수체 식물체 재분화율은 각각 약 78%, 18%,

9.6%이었으며, 모든 형질이 품종 간에 유의한 차이를 보였다 (Table 3). 옥수수 화분친 품종별 종자 결실률은 68~82%의 분포를 보였으며, 강다옥이 가장 높고 강일옥이 가장 낮았다. 옥수수 화분친 품종별 배 형성률은 12~25%의 분포를 보였으며, 배 효율은 9~17%의 분포를 보였다. 배로부터의 반수체 식물체 재분화율은 7.6~12.9%의 분포를 보였으며, 광평옥이 가장 높았으며 다음으로 미흑찰(10.4%), 강일옥과 강다옥(9.5%)이 높았다. 따라서 밀과의 원연교잡에 화분친으로 우수한 옥수수 품종은 강다옥, 강일옥 및 광평옥이었는데, 미흑찰은 타 품종에 비하여 꽃가루의 양이 적어서 수분수로서의 적합성이 낮았다. 밀과 옥수수의 원연교잡에 의한 반수체 밀 재분화율은 옥수수 화분친 품종 간에 큰 차이가 존재하는데(Inagaki & Tahir 1990; Suenaga & Nakajima 1989;

Table 3. Effects of maize genotypes for embryo development and plantlet regeneration in crosses with wheat (cv. Keumkang).

Maize cultivars	Seed set (%) ^z	Embryo formation (%)	Embryo efficiency (%)	Regenerated plantlets (%)
Gangdaok	82.4	21.7	12.2	9.5
Gangilok	67.9	24.5	16.7	9.5
Jangdaok	81.7	13.4	11.0	7.6
Kwangpyeongok	80.8	14.3	11.5	12.9
Mibaek #2	77.9	11.9	9.3	8.1
Mibaekchal	79.1	14.7	11.6	9.3
Miheukchal	73.3	23.4	16.6	10.4
Mean	77.6	17.7	12.7	9.6
LSD(0.05)	3.8	9.6	7.9	3.4

^zSeed set (%) = (seeds developed/florets pollinated) × 100

Embryo formation (%) = (embryo formed/seeds developed) × 100

Embryo efficiency (%) = (embryo formed/florets pollinated) × 100

Regenerated plantlets (%) = (Regenerated plantlets/florets pollinated) × 100

Table 4. ANOVA for seed set and embryo formation for the different wheat and maize cultivars.

Source of variation	Degree of freedom	Mean squares	
		Seed set	Embryo formation
Replications	2	106.7	8.4
Wheat cultivars (W)	4	157.6**	218.7**
Maize cultivars (M)	6	768.2**	846.3**
W × M interaction	24	159.4**	46.7
Error	70	37.9	6.8
Mean	-	73.5	9.4
CV (%)	-	16.4	15.6

**Significant at $P < 0.01$.

Ushiyama et al. 1991), 재래종 옥수수가 교잡종(hybrid) 옥수수보다 반수체 육성 효율이 좋은 경향이 있다(Ahmad 2004).

밀과 옥수수 원연교잡에서 종자 결실률과 배 형성률은 자방친과 화분친의 품종에 따라 고도로 유의한 차이를 보였다(Table 4). 이들 형질의 품종간 차이는 자방친 품종보다는 화분친인 옥수수 품종 사이에 더 컸다. 이들 형질이 밀 품종보다 옥수수 품종 간에 더 큰 차이를 보이는 현상은 여러 연구자에 의해 관찰된 바 있다(Suenaga 1994; Verma et al. 1999). 밀과 옥수수 품종의 상호작용 효과는 종자 결실률에 대해서는 고도로 유의하였으나, 배 형성률에 대해서는 차이가 인정되지 않았다. Bitsch 등(1998)도 밀×옥수수 원연교잡에 사용하는 밀 자방친과 옥수수 화분친의 품종이 배 형성과 반수체 생산에 크게 영향을 미친다고 보고하였다.

반수체는 품종의 개발이나 유전자 지도 작성용 집단의 육성 등에 매우 유용하게 사용되고 있다(Niu et al. 2014). 반수체를 이용한 품종 육성에 가장 중요한 것은 반수체를 유도하는 기술의 효율성이다. 중국 등 여러 나라에서 밀 품종육성에 이용하고 있는 밀×옥수수 원연교잡은 반수체를 얻는 효율이 약배양보다 약 3~4배 높은 것으로 알려져 있다(Sadasivaiah et al. 1999). 또한 원연교잡은 약배양에 비하여 품종특이적 반수체 유도 저하문제가 적고, 활용이 간편하며 신속하다(Niroula & Bimb 2009). 공지의 사실과 같이 밀 품종육성에 반수체 밀을 활용하면 품종의 육성기간을 절반 이상 단축시킬 수 있고 육종효율도 향상시킬 수 있다. 따라서 우리나라 밀 품종 육종 사업에 반수체 육종을 효율적으로 활용하기 위해서는 밀×옥수수 원연교잡에서 배 형성률과 반수체 식물체 재분화율이 높은 국산 밀과 옥수수의 유용 유전자원을 발굴하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

적 요

밀×옥수수 원연교잡은 타 방법에 비하여 반수체 밀 육성에 매우 효과적이어서 외국에서는 밀 품종의 육종연한 단축 등을 위하여 많이 활용하고 있다. 본 연구에서는 국내 밀 품종(계통)과 옥수수 품종을 이용한 반수체 밀 생산체계를 구축하기 위하여 원연교잡에 사용하는 품종에 따른 반수체 생산 효율을 조사하였다. 자방친으로는 금강밀 등 총 5종의 품종과 5종의 F₁계통을 사용하였고, 화분친으로는 강다옥 등 총 7종의 옥수수 품종을 사용하였다. 자방친으로 사용한 국산 밀 품종의 평균 종자 형성률, 배 형성률 및 반수체 식물체 재분화율

은 각각 약 75%, 19% 및 8.4%이었다. 반수체 식물체 재분화율은 3.7~9.8%의 분포를 보였는데, 조경이 가장 높았다. 밀 F₁ 계통 자방친의 평균적인 종자 형성률, 배 형성률 및 반수체 식물체 재분화율은 각각 약 66%, 16% 및 6.6%이었다. 밀 계통의 반수체 재분화율은 3~10%의 분포를 보였으며 08WG074 계통이 가장 높았다. 한편, 7종의 옥수수 품종의 자방친(금강밀)에 대한 평균 종자 결실률, 배 형성률 및 반수체 식물체 재분화율은 각각 약 78%, 18%, 9.6%이었다. 반수체 재분화율은 7.6~12.9%의 분포를 보였으며, 광평옥이 가장 높았다. 밀×옥수수 원연교잡에서 종자 결실률과 배 형성률은 자방친과 화분친의 품종에 따라 고도로 유의한 차이를 보였으며, 이들 형질의 품종간 차이는 자방친 품종보다는 화분친인 옥수수 품종 사이에서 더 컸다. 본 연구에서 조사한 품종 중에서는 광평옥, 강다옥 및 강일옥 품종이 밀×옥수수 원연교잡의 화분친으로서 우수한 결과를 나타내었다.

REFERENCES

- Ahmad J. 2004. Improvements in wheat x maize crossing system of doubled haploid production in bread wheat. Ph. D thesis, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan. pp.1-210.
- Almousslem AB, Jauhar PP, Peterson TS, Bommineri VR, Rao MB. 1998. Haploid durum wheat production via hybridization with maize. *Crop Sci.* 38: 1080-1087.
- Bitsch C, Groger S, Lelley T. 1998. Effect of parental genotypes on haploid embryo and plantlet formation in wheat × maize crosses. *Euphytica* 103: 319-323.
- Comeau A, Nadeau P, Plourde A, Simard R, Maes O, Kelly S, Harper L, Lettre J, Landry B, St-Pierre CA. 1992. Media for the in ovulo culture of proembryos of wheat and wheat-derived interspecific hybrids or haploids. *Plant Sci.* 81: 117-125.
- Inagaki M. 1997. Technical advances in wheat haploid production using ultra-wide crosses. *JIRCAS J.* 4:51-62.
- Inagaki MN, Tahir M. 1990. Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize. *Japan. J. Breed.* 40: 209-216.
- Kim YJ, Lee KW, Kim HS, Cheong YK, Park KG, Kim KJ. 2011. Effects of plant growth regulators on haploid production of wheat. *Korean J. Breed. Sci.* 43: 50-55.
- Kisana NS, Nkongolo KK, Quick JS, Johnson DL. 1993.

- Production of doubled haploids by anther culture and wheat X maize method in a wheat breeding programme. Plant Breed. 110: 96-102.
9. Laurie DA, Bennett MD. 1986. Wheat × maize hybridization. Can. J. Genet. Cytol. 28: 313-316.
 10. Laurie DA, Bennett MD. 1988. The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. Theor. Appl. Genet. 76: 393-397.
 11. Laurie DA, Reymondie S. 1991. High frequencies of fertilization and haploid seedling production in crosses between commercial hexaploid wheat varieties and maize. Plant Breed. 106: 182-189.
 12. Niroula RK, Bimb HP. 2009. Overview of wheat X maize system of crosses for dihaploid induction in wheat. World Appl. Sci. J. 7: 1037-1045.
 13. Niu Z, Jiang A, Hammad WA, Oladzadabbasabadi A, Xu SS, Mergoum M, Elias EM. 2014. Review of doubled haploid production in durum and common wheat through wheat × maize hybridization. Plant Breed. 133: 313-320.
 14. Sadasivaiah RS, Orshinsky BR, Korzub GC. 1999. Production of wheat haploids using anther culture and wheat × maize hybridization technique. Cereal Res. Comm. 27: 33-40.
 15. Suenaga K. 1994. Doubled haploid system using the intergeneric crosses between wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*). Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour. (Japan) 9: 83-139.
 16. Suenaga K, Nakajima K. 1989. Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum*) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*). Plant Cell Rep. 8: 263-266.
 17. Ushiyama T, Kuwabara T, Yoshida T. 2007. Effects of various phytohormones on haploid wheat production in wheat x maize crosses. Plant Prod. Sci. 10: 36-41.
 18. Ushiyama T, Shimizu T, Kuwabara T. 1991. High frequency of haploid production of wheat through intergeneric cross with Teosinte. Japan. J. Breed. 41: 353-357.
 19. Verma V, Bains NS, Mangat GS, Nanda GS, Gosal SS, Singh K. 1999. Maize genotypes show striking differences for induction and regeneration of haploid wheat embryos in the wheat x maize system. Crop Sci. 39: 1722-1727.