

분자마커를 활용한 옥수수 육종

김재윤* · 문준철** · 백성범*** · 권영업*** · 송기태**** · 이병무****†

*고려대학교 생명과학대학 생명공학부, **강원대학교 식물자원응용공학과,
국립식량과학원 전작과, *동국대학교 바이오시스템대학 생명과학과

Genetic Improvement of Maize by Marker-Assisted Breeding

Jae Yoon Kim*, Jun-Cheol Moon**, Seong-bum Baek***, Young-up Kwon***, Kitae Song****, and Byung-Moo Lee****†

*College of Life Science and Biotechnology, Korea University, Anam-dong, Seongbuk-gu, Seoul, 136-713, Korea

**Agriculture and Life Sciences Research Institute, Kangwon National University, Chuncheon 200-713, Korea

***Upland Crop Research Division, NICS, RDA, Suwon, 441-857, Korea

****Department of Life Science, Dongguk University-Seoul, Seoul 100-715, Korea

ABSTRACT Maize is one of the most important food and feed crops in the world including Southeast Asia. In spite of numerous efforts with conventional breeding, the maize productions remain low and the loss of yields by drought and downy mildew are still severe in Asia. Genetic improvement of maize has been performed with molecular marker and genetic engineering. Because maize is one of the most widely studied crop for its own genome and has tremendous diversity and variant, maize is considered as a forefront crop in development and estimation of molecular markers for agricultural useful trait in genetics and breeding. Using QTL (Quantitative Trait Loci) and MAS (Marker Assisted Breeding), molecular breeders are able to accelerate the development of drought tolerance or downy mildew resistance maize genotype. The present paper overviews QTL/MAS approaches towards improvement of maize production against drought and downy mildew. We also discuss here the trends and importance of molecular marker and mapping population in maize breeding.

Keywords : maize, molecular markers, marker-assisted selection, QTL, genome mapping, drought, downy mildew

옥수수(*Zea mays* L.)는 광합성 능력이 높은 C₄ 작물이기 때문에 단위 면적당 생산량이 높고 재배가 용이하여 밀, 벼와 함께 세계 3대 중요 작물(major crop) 중 하나이다(Varshney

et al., 2012). 옥수수는 전분을 원료로 하는 각종 산업의 가장 중요한 작물 중 하나로서 식량과 사료 외에도 의약품, 시약, 화장품, 도료, 인쇄, 제지업 등 산업 및 공업원료로서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다(Kim *et al.*, 2002; Prasanna *et al.*, 2010). 최근에는 전분을 이용한 바이오에탄올과 목질계를 이용한 바이오에탄올 연구에도 옥수수가 다양하게 활용되고 있다.

옥수수의 연간 총 생산량은 전 세계적으로 872,006,700 톤으로서, 지난 60년 동안 다른 식량작물이나 유지작물(oilseed crop)에서는 유래가 없는 6배의 생산량의 증가를 보이고 있으며, 아직도 미국을 중심으로 생산량의 증가세를 보이고 있다(Lee & Tollenaar, 2007; FAOSTAT, 2012). 반면 우리나라의 연간 옥수수 생산량은 불과 83,210톤으로서 일본, 멕시코에 이어 세계 3대 옥수수 수입국(7,758,658 톤)인 실정이다(FAOSTAT, 2012). 우리나라에서 소비되는 대부분의 옥수수는 거의 전량 수입에 의존하고 있는 반면 옥수수의 육종은 국내 타 작물과 비교하여 상당히 부진한 상황이다. 그 동안의 옥수수 육종 방법은 집단선발에 의한 재래식 육종을 통한 방임수분 품종이 재배되었으나, 교잡종 이론이 등장하면서 다양한 교잡종 옥수수 연구를 통하여 복교잡종 품종이 개발되었으며, 근래에는 잡종강세가 우수한 단교잡종 품종이 개발되어 재배되기 시작하였다(Bernardo, 1996; Troyer, 1999; Park *et al.*, 2009). 최근에는 단교잡종을 중심으로 상반 반복 선발 등을 이용한 우수한 자식 계통

†Corresponding author: (Phone) +82-2-2260-3307 (E-mail) bmlee@dongguk.edu

<Received 11 March, 2014; Revised 19 March, 2014; Accepted 21 March, 2014>

개발이나 유전적 다형성을 위한 생식세포향상법(germplasm enhancement)에 대한 관심이 높아지고 있으며, 옥수수 육종 연구를 통해 수집된 옥수수 유전자원들의 유전적 다양성이나 계통 간의 유연관계는 작물 유전체학의 발달과 더불어 새로운 신품종 개발에 이용될 것이다(Lee & Tracy, 2009).

분자유종이란 식물 육종에 분자생물학적 기술을 적용시키는 것으로서 분자 마커를 이용하여 작물 선발에 이용하는 MAS와 QTL mapping, 유전공학, 식물 형질 전환 등의 기술을 의미한다. 본격적인 분자 유전학 기법을 이용한 분자유종 시대는 1980년대 초반 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환체가 처음 개발되면서 시작되었다(Fraley *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983). 그 후 생명공학 기술이 작물 육종과 개발에 활용 가능성이 확인 되면서 형질전환 작물의 상업화에 성공하게 되었다(Koziel *et al.*, 1993). 또한 분자 마커도 육종에 이용될 높은 가능성을 지니고 있다. 분자 마커가 개발되기 전에는 표현형을 이용한 표지 인자를 이용하여 선발이 이루어졌으나 이후 종자 저장 단백질과 같은 생화학적 동위 효소를 이용한 마커가 개발 되었다. 하지만 이 방법은 육종에 활용할 수 있는 시기가 한정적이기 때문에 많이 활성화 되지 못했다(Tanksley *et al.*, 1981; Seo *et al.*, 1995). RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) 기술의 개발은 분자 마커의 새로운 장을 열었으며, 이후 작물에 적용되어 전형적인 분자유종의 새로운 연구 분야를 개척했다. RFLP 마커 개발 이후에는 기존의 마커와는 비교가 되지 않을 정도로 많은 대립 유전자를 분석 할 수 있게 되었다(Botstein *et al.*, 1980; Helentjaris *et al.* 1986). 또한, DNA를 이용한 분자 마커를 이용한 표지인자 시스템이 개발되면서 정교한 수준의 유전자 지도와 분자마커와 농업적으로 중요한 작물의 형질간의 유전적 연관을 활용한 연구도 진행되었으며, 특히 옥수수 육종에서 이용될 잠재력을 인정받게 되었다(Edwards *et al.*, 1987; Paterson *et al.*, 1988). 오늘날에는 분자생물학 기술의 발전으로 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism) 및 SSR(Simple Sequence Repeat)등의 다양한 DNA 분석기법들이 개발되어 있다. 분자마커 기술은 타 식성 작물인 옥수수에 다양한 유전적 변이성과 각 계통 간의 유연관계 등에 대한 정보를 제공 할 수 있기 때문에 신품종의 개량이나 자식 계통의 육성 및 발굴, 그리고 교배 조합의 예측 등 다양하게 유용한 육종 프로그램에 이용될 수 있다(Park *et al.*, 2009; Sa *et al.*, 2011). 본 고에서는 최근 Next Generation Sequencing 시대를 맞아 폭발적으로 성장하고 있는 분자마커를 옥수수 육종에 이용한 활용과 현황을 알아보고자 한다.

분자마커의 종류

Botstein *et al.*(1980)에 의해 처음 RFLP 기술을 genetic mapping에 이용하여 분자마커 기술로 보고한 이후에 여러 가지 분자마커들이 개발되었다. 일반적으로 분자마커 기술은 PCR(Polymerase Chain Reaction) 기반 방법과 비 PCR 기반 방법으로 나누어서 구분한다.

비 PCR 기반(non-PCR-based) 방법

RFLP

RFLP는 제한효소에 의해 잘라진 DNA의 Southern blot에 방사선 동위 원소로 표지된 탐침(probe)을 이용하여 DNA의 다형성을 찾아내는 기술이다. RFLP를 이용하여 서로 다른 DNA의 프로파일을 분석할 수 있는데, 이 프로파일의 차이는 단일 염기 서열의 변화로 인한 염기치환 돌연변이나 유전자의 삽입, 결실, 역위 등에 인한 DNA 재배열에 의해 발생하였음을 의미 한다. RFLP 마커는 상대적으로 높은 다형성과 공유성을 보이며 높은 재현성을 보이는 신빙성 있는 기법이나 많은 양의 DNA가 필요하고, 시간이 많이 필요하다. 이러한 제약으로 인하여 PCR 기반 분자마커가 개발되게 되었다.

PCR 기반(PCR-based) 방법

PCR 기법이 처음 개발된 이후에 다양한 PCR 기반 분자 마커들이 개발 되었다. 그 이유는 PCR 의 간편성과 높은 성공 가능성 때문이라고 할 수 있겠다.

임의의 프라이머(arbitrarily primer)를 이용한 PCR 기반 마커

RAPD

RAPD는 임의의 염기 서열의 단일 프라이머를 이용하여 염기서열의 다형성을 추적하는 기술로서 1가지 종류의 프라이머가 genomic DNA 의 서로 다른 위치의 상보적 염기 서열에 결합을 하여 증폭된 DNA 다형성을 분석하는 기술이다(Williams *et al.*, 1990). RAPD의 장점은 적은 양의 DNA로 분석이 가능하다는 점이며 또한 빠르고, Southern blot의 과정이 필요하지 않다는 편리함이 있으나 프라이머의 길이가 상대적으로 짧아서 비 특이적인 결합을 너무 쉽게 하기 때문에 재현성이 떨어지는 단점이 있다.

AFLP

AFLP는 RFLP 와 RAPD의 단점을 보완하기 위하여 서로의 장점을 이용하여 재현성이 높으면서 PCR 기반으로 개발 된 분자마커이다(Farooq & Azam, 2002). RFLP처럼

제한효소로 잘라준 작은 크기의 DNA를 염기서열을 알고 있는 어댑터(adaptor)를 붙여준 뒤, 선택적 PCR(selective PCR)을 이용하여 DNA 조각을 증폭하여 다형성을 검정하는 방법이다(Vos *et al.*, 1995). 각 프라이머 세트별로 대개 1번의 AFLP 분석에서 50~100 개의 밴드를 생성한다. AFLP의 가장 큰 장점은 많은 수의 DNA 다형성을 만들어 낼 수 있으며, 분석하려고 하는 작물의 DNA 염기서열에 대한 정보가 요구되지 않고, PCR 기반 분자마커이기 때문에 매우 빠르게 진행할 수 있다는 것을 들 수 있다(Farooq & Azam, 2002). 대부분의 AFLP 마커는 유전체상에서 고유의 위치를 가지기 때문에 물리적 지도(physical mapping)에 이용될 수 있으며, 이를 활용하여 서로 가까운 종이나 아종 간의 근연 관계를 분석할 수 있다(Yin *et al.*, 1999; Rouf Mian *et al.*, 2002).

염기서열 특이적 PCR 기반 마커

Microsatellite 기반 마커

VNTR(Variable Number Tandem Repeat)는 짧은 염기서열 구간이 직렬로 반복되어 있는 구간을 말하며 VNTR은 많은 염색체에서 발견되는 각 개인마다 반복되는 길이의 차이가 큰 부분이다. 기본적으로 VNTRs는 microsatellites와 minisatellites로 구분지어 지는데 일반적으로 (TG)_n 또는 (AAT)_n 같이 2개~10개 사이의 염기서열이 반복되는 것을 microsatellite [또는 SSR(Simple Sequence Repeat), STR(Short Tandem Repeat)와도 통용하여 쓰기도 한다.] 이라고 부르며 minisatellite는 기본적으로 반복되는 단위가 더 길 때 사용된다. 요즘은 microsatellite는 반복되는 구간이 5 bp 이하를 의미하고, minisatellite는 10~60 bp 정도의 반복 구간을 의미한다. 개체의 확인과 집단 내 또는 집단 간의 유전적 변이를 연구하기 위해 이상적인 마커는 매우 높은 변이를 보이는 하나의 유전자좌이다. Minisatellite 염기서열을 제공하는 유전자좌에 대한 특이적 probe의 개발은 이러한 매우 다양한 VNTR에 대한 대립유전자적 분석을 가능하게 해준다. 그러나 대부분의 집단 및 생물학적 다양성 연구에서는 일반적으로 minisatellite보다 microsatellite이 이용된다. Microsatellite 나 STR, SSR은 진핵생물이 가지고 있는 염기서열의 반복이 DNA 복제 과정 중 반복 구간의 절단이나 삽입에 의해 변이가 생기게 되는데, 바로 이 차이를 이용하여 분석하는 방법이다(Schlötterer & Tautz, 1992). Microsatellite DNA는 한 유전자좌에 약 30~50개의 대립유전자를 조사할 수 있기 때문에 집단 유전 연구에 흔히 쓰이고 있다. Microsatellite 마커 개발에 있어서 초기의 많은 어려움에도 불구하고 많이 이용되는 것은 독립적인 유전자

좌에 대한 대립형질의 변이에 대해 연구할 때 매우 큰 이점이 있기 때문이다. 그러나 microsatellite의 가장 큰 단점은 프라이머를 개발하는데 많은 시간과 노력이 들어간다는 사실이다(Parker *et al.*, 1998; Mueller & Wolfenbarger, 1999). 이러한 단점으로 인해 하나의 종에서 개발된 microsatellite 마커는 매우 근접한 종 이외의 종에서는 거의 사용할 수 없는 경우가 자주 발생하게 된다. 그러나 일반적으로 새로운 종에서 microsatellite를 이용하여 연구를 할 경우 특이적 프라이머를 새로 개발하는 것이 가장 유리하나 경우에 따라 이미 개발되어 사용 가능한 가장 가까이 연관된 종의 프라이머를 사용할 수 있다.

ISSR(Inter-simple Sequence Repeat)

ISSR 마커는 서로 반대 방향의 동일한 두개의 microsatellite 사이를 PCR 증폭하여 그 차이를 분석하는 기술이다. 이 방법은 다양한 유전자 좌를 목표로 하는 단일 프라이머를 이용한 PCR 반응으로서 microsatellite을 이용하여 서로 다른 길이의 inter-simple sequence repeats를 증폭시키는 기술이다. PCR 산물들은 역위(inverted)의 microsatellites에 의하여 거의 무제한적이며, 일반적으로 높은 다형성을 보이기 때문에 다양한 변이 분석에 용이하게 이용될 수 있다. 또한 ISSR은 RAPD처럼 매우 간단하나 RAPD에서 사용하는 프라이머(10 mers) 보다 긴 프라이머(15~30 mers)를 이용하기 때문에 좀 더 높은 온도에서 정교하게 사용할 수 있다. ISSR 마커는 microsatellite 마커의 특성을 가지고 있으면서 프라이머 합성 시에 염기서열 정보가 필요하지 않기 때문에 손쉽게 합성할 수 있다는 장점이 있다. ISSR은 간단하고 빠르며 방사선 동위 원소가 필수적이지 않기 때문에 다소 안전한 편에 속한다. 그러나 RAPD처럼 재현성과 우성 유전이 ISSR의 가장 큰 한계점이다.

SNP(Single nucleotide polymorphism)

SNP는 집단내의 각 개체 간의 유전체의 염기서열에 존재하는 한 염기쌍의 차이(single base-pair variation)에서 발생하는 다형성(polymorphism)을 말한다. 그렇기 때문에 가장 많이 존재하는 분자 마커이며, 비록 각 종간에 발생과 분포에 변이가 있기는 하나 SNP는 유전체 전체에 퍼져있는 분자 마커이다. 일반적으로 SNP는 non-coding 부위에서 더 많이 발견되며, 보통 1 kb 당 1개의 SNP가 존재한다고 알려져 있으나 옥수수의 경우에는 60~120 bp 마다 1개의 SNP가 존재한다고 보고되어 있다(Ching *et al.*, 2002). 이처럼 식물체 유전체에서는 빈번한 SNP 다형성 때문에 mapping, MAS 그리고 유전자 지도 기반 클로닝(map-based cloning)

이 가능하게 되었다(Batley *et al.*, 2003). 염기 서열 분석 기술의 발달과 EST(Expressed Sequence Tag) 데이터베이스의 축적으로 SNP 마커 개발이 더 활발해졌다. 그로인해 SNP는 기존 마커들에 비해 고밀도의 유전자 지도를 작성할 수 있게 되었다. 또한 DNA chip, 대립유전자 특이 PCR (allele specific PCR), 프라이머 확장(primer extension) 등을 이용한 high-throughput 기술을 이용하여 마커 개발의 전 과정이 고속으로 자동화 될 수 있다는 점이 다른 분자 표지들과 차별화된 특성이라 할 수 있다(Agarwal *et al.*, 2008).

응용 분자마커(Advanced Molecular Marker)

SCAR(Sequence Characterized Amplified Regions)

SCAR 마커는 짧은 시간에 목표로 하는 유전자에 연관된 마커를 이용하여 선발과 유전자 지도 기반 클로닝에 이용하기 위하여 개발되었다. SCAR는 한 쌍의 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭된 이미 유전적으로 정의된 유전자 좌의 DNA 절편을 말한다. 이 절편은 클로닝을 통하여 염기서열 분석 후 DNA 절편 양끝에서 특이적으로 제작된 15~30 bp의 프라이머를 이용하여 SCAR 마커로 개발할 수 있다(Paran & Michelmore, 1993). 이때 개발된 SCAR 마커는 PCR 기법에서 처음 클로닝했던 것과 크기와 비슷한 단일 PCR 밴드가 나와야 한다. SCAR 마커는 STS (Sequence-Tagged Site) 마커와 매우 유사하다. STS 마커는 200~500 bp의 짧은 단일-copy의 DNA 절편으로서 한 쌍의 프라이머를 이용한 PCR에 의해 고유의 결과물을 증폭해 낼 수 있는 마커를 말한다. 이런 고유의 특성 때문에 STS는 방사선 동위원소 hybrid mapping과 연관이 자주 이용되며 유전체의 물리지도(physical map)에서 DNA 표시인자 역할을 하는데 STS는 기본적으로 중복되는 부분을 가지고 있지 않는다(Olson *et al.*, 1989). 반면에 SCAR은 STS의 장점을 공유하면서도 2가지 측면에서 차이가 있는데, 첫째는 SCAR은 우선적으로 유전적으로 정의되어 있기 때문에 (primarily defined genetically) 유전체에서 물리적 표시인자(physical landmark) 뿐만 아니라 유전적 마커로서의 기능도 할 수 있으며, 둘째는 SCAR은 오직 PCR에 의해서만 분석되기 때문에 반복되는 구간을 가지고 있다는 특징이 있다(Paran & Michelmore, 1993).

CAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

CAPS 마커는 RFLP 마커를 PCR 마커로 전환하여 시간과 노동력을 절감할 수 있는 마커로서 PCR-RFLP 마커라고도 불린다. CAPS 마커는 SNP처럼 한 개의 염기서열이 변하거나 InDel에 의해 발생하는 제한효소에 의해 잘리는 부

위의 변화를 해석할 수 있는 마커이다(Chelkowski & Stephen, 2001). CAPS 마커는 유전자좌에 특이적인 프라이머로 PCR 증폭을 한 후 제한효소로 잘라준 뒤 나타나는 다형성을 분석하는 방법이다. 그렇기 때문에 SSCP, SCAR, AFLP, RAPD 등과 연계하여 다양하게 활용할 수 있다. CAPS 마커는 공우성 마커이고 대립유전자 특이적 마커이기 때문에 식물에서 해당 대립유전자의 동형접합자와 이형접합자의 관계를 확인할 수 있다. 그렇기 때문에 CAPS 마커는 genotyping, positional cloning이나 유전자 지도 기반 클로닝(map-based cloning)에 유용하게 이용된다(Spaniolas *et al.*, 2006).

RAMP(Randomly Amplified Microsatellite Polymorphisms)

Microsatellite 기반 마커들은 높은 대립형질 특이적 다형성을 얻을 수 있으나 매우 노동 집약적인 마커이다. 반면 RAPD 마커는 저렴하고 쉽게 개발할 수 있으나 낮은 다형성을 보이는 마커이다. 이 두 가지를 보완하기 위하여 나온 것이 Wu *et al.*(1994)에 의해 개발된 RAMP 마커로서 단순히 반복되는 염기서열의 바로 옆의 염기서열의 임의의 분포를 기반으로 개발되었다. RAMP 마커는 5' 방향의 anchor 프라이머와 3' 방향의 반복 프라이머로 구성되어 있다. 반복되는 프라이머 방향은 labeling 되어 있기 때문에 anchor 프라이머에 의해 증폭된 PCR 결과물만 확인된다.

SRAP(Sequence-Related Amplified polymorphisms)

SRAP 마커의 목표는 ORF(Open Reading Frame)을 증폭하는 것이다. 기본적으로 17~21 bp의 길이를 가지는 임의의 2개의 프라이머를 이용하여 PCR 증폭 시키며, AT나 GC의 함량이 높은 부분을 증폭시키도록 구성된다(Li & Quiros, 2001). SRAP 마커를 위한 프라이머 제작에는 2가지 중요한 요인이 있다. 첫째는 핵심 염기서열이라고 부르는 13~14 bp의 길이로서 그 중 처음 5' 말단 부분의 10~11 bp은 특별히 중요한 구성 요소가 없으며 이 부분을 filler라고 부른다. 둘째, 핵심 염기서열 이후에는 정 방향 프라이머에는 CCGG가 있으며, 역방향 프라이머에는 AATT로 구성되어 있다. 핵심 염기서열 뒤에는 3' 말단에 3개의 선택적 염기서열(selective nucleotide)이 존재한다. 그리고 한 쌍의 프라이머에서 filler 부분의 염기서열은 반드시 달라야 한다. PCR 프로그램에서는 처음 5 cycle에서는 annealing 온도가 35°C이고, 이후 35 cycle에서는 50°C에서 수행한다. SRAP 마커는 단순성, 재현성, 적정 수준의 대량 분석 정도와 염기분석의 편리성의 조합된 마커이다(Li & Quiros, 2001). SRAP 마커는 ORF를 목표로 하기 때문에 염기서열의 삽입과 결실을 이용하여 적절한 수의 공우성 마커 개발

이 가능하다. SRAP 마커 시스템은 여러 가지 목적으로 서로 다른 작물에 적용되어 왔다(Gulsen *et al.*, 2007).

TRAP(Target Region Amplified Polymorphisms)

TRAP 마커는 생물정보학과 EST 데이터베이스를 이용한 빠르고 효율적인 PCR 기반 마커이다. TRAP 마커는 18 bp 짜리 2개의 프라이머를 이용하여 한 개의 프라이머는 목표로 하는 유전자의 EST 데이터베이스를 기반으로 구성되는 고정 프라이머(fixed primer)이며, 다른 하나는 AT 나 GC 비율이 높은 부분에서 인트론이나 엑손과 결합하도록 구성된 임의의 프라이머를 이용한다(Hu & Vick, 2003). TRAP 마커는 특정 유전자 염기서열에 대해 개발된 마커이기 때문에 germplasm 간의 genotyping이나 농업적으로 유용한 유전 형질에 대한 마커로서 육종에 활용하는 데 많이 이용되고 있다(Hu *et al.*, 2005).

SSCP(Single strand conformation polymorphism)

SSCP는 한 개의 염기서열 변화와 같이 염기서열의 미묘한 차이 때문에 DNA의 단일 가닥이 서로 다르게 접혀지는 원리를 이용하여 단일 DNA 가닥의 이동성의 변화를 분석하여 다형성을 확인 하는 마커이다(Orita *et al.*, 1989). 상보적인 가닥이 없을 때에는 단일 가닥의 내부에서 염기 결합이 생기지 않기 때문에 고리모양이나 접힘이 생기게 되고 이로 인해 독특한 3차원 구조가 생겨 전기영동을 해보면 겔 상에서 서로 다른 이동성을 보인다. 가끔 SSCP 마커는 같은 PCR 결과물의 두 DNA 가닥을 분리하여 다형성을 분석하거나 두 부모 개체에서 동일한 부분의 PCR에서의 다형성을 분석하는데 유용하게 이용되기도 한다. PCR 기반 SSCP 마커는 빠르고, 간편하며, SNP나 InDel 에 대한 감도가 높은 마커이다. 그렇기 때문에 점 돌연변이(point mutation)을 분석해 내는데 유용하게 이용 된다(Fukuoka *et al.*, 1994). SSCP 마커는 대립유전자의 변이를 찾는다는 기술적인 측면에서 RFLP와 유사하나 DNA 조각의 여러 부분에서 돌연변이와 다형성을 찾을 수 있다는 차이가 있다.

RNA 기반 분자마커

RNA 기반 분자 마커는 기존의 마커의 개념보다는 유전적 발현에 의한 생물학적인 반응을 의미하는 바가 더 크다. 그래서 RNA 기반 마커를 통한 깊이 있는 유전 정보는 유전자의 발현에 대한 특이적 발현 양상에 대한 연구를 필요로 한다.

cDNA-AFLP

cDNA-AFLP는 새로운 RNA 지문법의 하나로 특이적으로 발현하는 유전자를 발굴하기 위해 사용되는 마커이다(Bachem *et al.*, 1998). 기본적인 기술은 AFLP 와 유사하나 우선 cDNA를 만들어 준 뒤, 서로 다른 두 개의 제한 효소로 잘라준 뒤 어댑터를 붙여주고 선택적 PCR(selective PCR)을 통하여 다형성을 분석한다. 분석 집단이나 개체에서 나타나는 다형성은 각 밴드마다 특이적인 유전자의 발현을 의미한다.

cDNA-SSCP

cDNA-SSCP는 RT-PCR의 SSCP 분석을 통하여 유전자의 발현 정도를 평가하는 방법이다. 이 방법을 통하여 배수성 유전체를 갖는 식물로부터 매우 높은 유사성을 갖는 상동 유전자에 대한 발현 양상을 검정하는데 매우 유용하게 이용된다. Cronn & Adams(2003)의 보고에 의하면 cDNA-SSCP를 이용한 유전자 발현에 대한 반복 실험에서 99% 이상의 동일함이 증명되었다.

RAP-PCR(RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR)

임의의 프라이머(arbitrary primer)를 이용하여 이중 나선의 cDNA를 합성하고, 합성된 cDNA에서 PCR을 수행하는 방법이다. 이 방법을 통하여 서로 다른 개체의 같은 조직에서 추출한 RNA 또는 같은 개체의 서로 다른 조직에서 추출한 RNA에 대한 fingerprinting이 가능해진다. 이러한 개체별 차이는 바로 염기서열의 차이이기 때문에 genetic mapping에 유용하게 이용되며, 조직 간의 차이는 유전자의 발현 양상의 차이를 검정하는 것이 이용된다.

Transposable element-based molecular markers

전이인자(transposon)는 유동성을 갖는 유전 요소로서 유전체 안에서 자신의 위치를 바꿀 수 있다. Transposon 은 60여 년 전에 옥수수에서 처음 발견되었으며 크게 2개의 클래스로 나뉜다. 클래스 I 전이인자는 우선 DNA에서 RNA로 전사가 일어난 뒤, RNA가 DNA로 역전사가 일어나게 된다. 이때 복제된 DNA는 유전체의 새로운 위치에 삽입되게 된다. 이때 역전사 과정에서 사용되는 역전사효소는 종종 전이인자 자체에서 스스로 코딩되기도 한다.

반면에, 클래스 II는 RNA로 전사되는 단계를 거치지 않고 자신의 위치에서 잘려 나와서 새로운 위치에 들어가는 (cut and paste) 형태를 가지고 있다(Grzebelus, 2006).

역전이인자(Retrotransposon) 기반 분자마커

커다란 유전체를 가진 식물에서는 역전이인자(retrotransposon)가 전체 유전체의 40~60%를 구성하는 반복되는 DNA의 주요 클래스에 해당 된다(Kumar & Bennetzen, 1999). 역전이인자는 LTRs(Long Terminal Direct Repeats), LINEs(Long Interspersed Elements), SINEs(Short Interspersed Elements)로 3가지 부분으로 분류되는데 LTR 역전이인자는 100 bp~5 kb 에 이르는 직접적으로 반복되는 LTR을 가지고 있으며, LTR 역전이인자는 다시 copia-like, gypsy-like, 그리고 BEL-Pao-like groups 으로 유전자의 유사성과 유전자가 코딩되는 순서에 따라 3종류로 분리 된다. 일반적으로 LTR 역전이인자는 레트로바이러스(retrovirus)와 유전자의 코딩 단백질이 유사하며 copia-like나 gypsy-like 역전이인자는 식물에서 많이 발견된다. 역전이인자는 염기서열의 보존(conserved), 충분한 길이, 그리고 새로운 삽입으로 인한 다형성의 생성으로 분자 마커로 개발하기 유리하다(Kalendar *et al.*, 1999). Non-LTR 역전이인자에는 LINEs와 SINEs 이 있다. 이들 역시 식물체에서 25 만개가 넘는 높은 copy 수를 가지고 있으며 진핵세포에서 넓게 분포되어 있다. LINEs 은 2개의 ORF를 가지고 있으며, 이것들은 역전이 과정에서 필요로 역전사효소와 엔도뉴클리아제(endonuclease) 기능을 가지고 있으면, 또한 리보뉴클레오단백질(ribonucleoprotein)을 형성하는데 필요한 핵산의 결합하는 기능도 가지고 있다. 반면, SINEs 은 역전사효소의 기능이 없으며 전이를 위한 다른 요인을 따르게 된다.

역전이인자 기반 분자 마커는 한 개의 프라이머는 역전이인자에 결합하고, 또 다른 하나는 이웃하는 유전체에 결합을 한다. SSAP(Sequence-Specific Amplified Polymorphisms)의 경우는 역전이인자가 삽입되어 있는 부분과 어댑터가 결합되어 있는 부분의 제한효소 부분에 결합하여 DNA를 증폭시킨다(Waugh *et al.*, 1997). IRAP(Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism)에서는 인접하고 있는 2개의 역전이인자는 각 LTR 사이의 DNA를 증폭하여 다형성을 분석하는 기술이다. REMAP(Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism)은 역전이인자의 삽입된 부분과 microsatellite 의 부분을 증폭한다. RBIP(Retrotransposon-Based Amplified Polymorphism)은 역전이인자가 비었거나 발생한 곳을 추적할 수 있다.

TD(Transposable Display)

TD는 AFLP를 변형시킨 방법으로서 많은 copy 수의 계통에서부터 많은 TE(Transposon Element)를 동시에 확인할 수 있는 기술이다. 이 기술은 서로 다른 2개의 제한효소

를 이용하나 1개는 genomic DNA 중 일부를 잘라주고, 다른 하나는 TE 의 회문부분을 잘라주는 제한효소를 이용한다. 그 뒤 AFLP처럼 어댑터를 결합 시킨뒤, TIR(Terminal Inverted Repeat)에 결합하는 프라이머나 삽입된 부분에 결합하는 프라이머를 이용하여 표현형과 부합하는 개체를 선발하는 마커로 활용한다(van den Broeck *et al.*, 1998).

IMP(Inter-MITE polymorphism)

TD 기술을 활용하여 MITE(Miniature Inverted-repeat Transposable Elements)라고 불리는 특이한 특성을 갖는 TE가 개발되었다(Casa *et al.*, 2000). 이 기술은 원칙적으로 IRAP 와 매우 유사하다. 그러나 IMP는 역전이인자가 아닌 MITE 전이인자를 이용하여 PCR 증폭을 한다. MITE 는 짧고, 클래스 II 전이인자이기 때문에 저절로 전이 되지 않는다. 또한 기식물의 유전체에 많이 퍼져있고, 풍부하며 다양한 크기와 염기를 가지고 있는 많은 copy 가 존재한다.

DArT(Diversity Arrays Technology)

DArT 기술은 genotyping이나 다른 유전 분석을 위한 염기 서열 수준의 마커를 개발하기 위한 기술이다. DArT는 어떤 개체나 집단의 전체 genomic DNA의 representation에서 특정 DNA 절편의 존재 여부를 추적하는 기술로서 벼에서 처음 개발된 기술이다(Jaccoud *et al.*, 2001). 최근에는 애기장대, 카사바, 보리, 수수, 귀리, 밀, 호밀 등 다양한 작물에서 활용이 되고 있으며, DArT는 개발도상국이나 농업 후진국에서 작물에 대한 유전적 다양성과 유전자 지도를 연구하도록 많이 장려되고 있다. DArT는 microarray를 기반으로 하기 때문에 유전체 전체에 분포되어 있는 많은 다형성 유전자좌를 동시에 분류하는 것을 가능하게 해 준다(Jaccoud *et al.*, 2001). DArT는 배수체 식물에서 SNP 추적을 기반으로 하는 다른 array 와 비교하여 확실히 편리한 장점이 있다(Wenzl *et al.*, 2004). 그 외에 DArT는 연구할 품종의 참고 염기서열 정보가 필요하지 않다는 장점 이외에도 효율이 매우 좋고 빠르며 재현성이 매우 높으며 SSR 마커와 같은 다른 분자 마커와 비교해보면 얻어지는 데이터 대비 소요 비용이 매우 저렴하다는 장점이 있다.

NGS(Next-Generation Sequencing)

그동안의 염기서열 분석은 Sanger 방법(Sanger *et al.*, 1977)을 기본으로 시행되었지만 최근에는 NGS 방법이 제시되어 많이 활용되고 있다. NGS는 'sequencing by synthesis' 원리를 이용하여 하나의 염기에 대한 서열분석과 합성이 일어난 뒤 다음 염기의 분석이 순차적으로 진행되는 방법이

다. NGS 방법은 DNA 염기를 증폭 시킨 뒤 형광 표지 인자를 인식하여 영상화 과정을 통하여 각 DNA의 염기 서열 정보를 분석한다. 그렇기 때문에 분석 장비에 따라 분석할 수 있는 길이(read length), 데이터의 크기와 형식, 그리고 염기서열 분석 방법 등이 모두 다르지만 분석이 병렬식이라 동시에 수백만 개를 분석해 낼 수 있다는 장점이 있다. NGS 기법이 발달하면서 식물 유전자원의 분석을 그동안에 유용하게 활용되던 몇 가지의 분자 마커에 의존하지 않고 식물의 유전체 전체를 읽어주는 분석 정보를 활용할 수 있게 되었다. 또한 식물의 유전체 분석 정보는 품종 및 유전자원의 순계 유지에도 활용이 되고 있으며 SNP 마커 개발에 유용하게 이용되고 있다(Davey *et al.*, 2011). 이와 더불어 유용한 유전자원의 다형성 발굴과 양적 형질과 관련된 후보 유전자 군도 발굴해 낼 수 있다(Mackay *et al.*, 2009).

분자 표지 인자와 mapping population을 활용한 옥수수 육종

유전체학의 발달은 지난 십 수 년간 옥수수에서 수많은 DNA 표지 인자를 개발해냈다. 대부분 microsatellite 나 SSR 마커 등이 이용되었으며, 최근에는 SNP나 InDel 마커 등이 활용되고 있다. 더군다나 SSR 마커나 SNP 마커는 식물발달, 생물/비생물(biotic/abiotic) 스트레스에 저항성, 작물의 질 등과 같은 부분을 조절하는 수많은 유전자들이 옥수수에서 발굴 및 발현 검정이 이루어져서 분자 마커를 이용한 육종에 이용되고 있다(Prasanna *et al.*, 2010). 요즘은 수많은 정보의 공유성과 편리성, 효율성 때문에 SSR 마커가 옥수수에서 가장 일반적으로 이용되고 있는 표지인자이다. PCR을 기반으로 하는 유전적으로 공우성 마커들은 강력하며, 재현성이 좋고, 과변이성이며, 식물체의 유전체에 균일하게 퍼져있다(Powell *et al.*, 1996). SSR 과 SNP 모두 대량으로 분자 육종에 이용되고 있지만 최근에는 SNP가 SSR 보다 자동화 시스템에 적합하기 때문에 유전과 육종의 목표에 더 부합하고 있다. 다른 작물의 유전체와 비교하여 옥수수의 SNP의 빈도는 매우 높으며, 대략 28~124 bp의 염기서열 당 1개의 SNP가 발견되고 있다(Tenaillon *et al.*, 2001; Ching *et al.*, 2002; Vroh Bi *et al.*, 2006). 옥수수에 대한 SNP의 데이터베이스와 자료들은 옥수수의 유전자형, 표현형, 다형성 자료를 옥수수의 inbred line과 population에 대하여 정립되어 있다(Zhao *et al.*, 2006; <http://www.panzea.org>). 최근에는 여러 개의 대량 유전자형 분석 플랫폼이 개발되어 백만 개의 SNP 마커를 동시에 분석할 수 있게 되었으며, 최근에는 1536 SNP가 포함된 맞춤형 GoldenGate assay가 개발되어 옥수수의 SNP 정보의 대중화에 크게 기

여하였다(Yan *et al.*, 2009).

마커 시스템 이외에도 옥수수에서는 B73 X Mo17의 중간 종(intermediate) 집단(IBM)이나 IBM에서 개발한 RIL (Recombinant Inbred Line)에 대한 다양한 mapping population을 이용하여 육종에 활용하고 있다(Lee *et al.*, 2002; Coe *et al.*, 2002; Cone *et al.*, 2002). 또 다른 최근 개발된 옥수수 주요 유전자원으로는 NAM(Nested Association Mapping) 집단이 있는데, NAM 집단(population)은 245 개의 집단에서 200 개씩 총 5000개의 RIL 계통을 구축해 놓은 옥수수 유전자원 집단이다(Fig. 1(A)). NAM집단은 QTL mapping의 통계적 처리와 거의 유전자 수준에 다다른 높은 염색체 수준의 mapping 해상도를 가지는 association mapping을 조합하여 근원적인 다중 형질에 대한 연구 및 육종에 활용할 수 있는 옥수수 집단이다. NAM population은 양친 중 1개의 부모계통을 공유하나 각기 다른 두 번째 부모계통을 갖는 세트로 되어있는(nested) 계통이다. 즉, 모든 25개의 family들은 미국 옥수수 육종에서 가장 중요한 B73 계통을 공유하고 있다. B73 계통은 미국 옥수수 분자 육종에서도 중요한 유전자원이기 때문에 옥수수 육종에서 B73의 자식 계통들이 광범위하게 차지하고 있으며, B73의 유전체는 이미 염기서열 분석이 끝났기 때문에 분자육종 연구에서 다양하게 활용되고 있는 계통이다(Schnable *et al.*, 2009). NAM

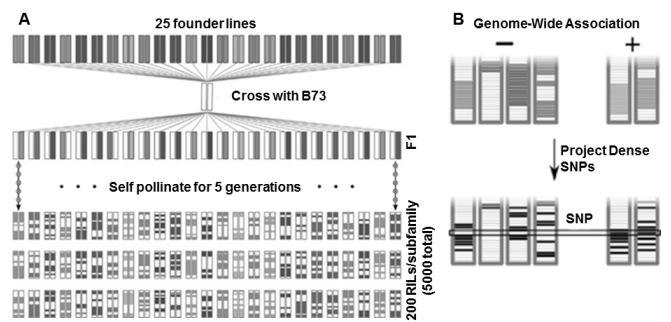


Fig. 1. Schematic design of Nested Association Mapping (NAM). (A) The maize NAM population was created by crossing 25 founder lines by the B73. Single-seed descent and self-pollination for five generations were then used to generate 200 recombinant inbred lines (RILs) for each subfamily. (B) Genome-Wide Association uses the information of which chromosomal segments were inherited from which parent (top) to project dense genotyping from the founder lines onto the progeny for improved resolution (bottom). Colored bars show which parent the chromosomal segment originated from. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in panel c are shown as either matching the allele present in B73 (white) or as the alternative allele (black). Figure based on Wallace *et al.* (2014).

집단의 교배친들은 미국 옥수수 육종에서 농업적으로 중요하다고 평가받는 inbred line이며, 전 세계에서 수집된 94개의 SSR 마커로 분석하여 유전적 다양성을 획득하기 위한 계통을 중심으로 선정되었다(Liu *et al.*, 2003; Flint-Garcia *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008). NAM 집단에 사용된 대표적인 교배친들로는 Suwan(태국계통), Ki3(한발 감수성), Ki11(한발 저항성) 등이 교배친으로 이용되었으며, 또한 CIMMYT에서 개발한 열대성 품종 8개(CML52, CML69, CML103, CML228, CML247, CML277, CML322, CML333) 등이 이용되었다(Yu *et al.*, 2008). NAM 집단의 유전적 다양성을 고려하여 각 유전자 연관 연결지도(association mapping)가 활용이 되었으나, 옥수수 육종에 RIL을 이용하기에는 가끔 너무 많은 표현형을 보이거나 또는 특정 재배환경에 적응력이 떨어지는 경우가 있다. 그래서 더욱 지역 특이적 유전자 연관 지도(association mapping)를 실행하여 재배 지역에 적합한 유전자원을 개발하는 것이 중요하다. 최근에는 중국에서 유전자 연관 지도(association mapping)를 이용하여 온대 지역 적합 germplasm을 갖는 155 inbred 계통을 개발하는 등 분자 마커가 육종에 다양하게 이용되고 있다(Yang *et al.*, 2010).

QTL mapping

방대하면서 쉽게 눈에 보이지 않는 DNA 수준의 가변성의 발견은 분자마커 분석과 양적형질에서 일치를 보이는 변이 분석에 대한 통계 패키지의 발달과 더불어 옥수수 및 다양한 작물에서 농업적으로 중요한 형질의 배열에 영향을 미치는 QTL mapping으로 발전되어왔다. QTL은 양적형질에 연관(association)되어 영향을 끼치는 유전체의 지역으로 정의되는데 개념적으로 QTL은 한 개의 유전자나 혹은 형질에 영향을 끼치는 단단히 연관(linkage)된 군집이다. QTL mapping과 분자 마커 발굴은 목적형질에 주도적으로 영향을 끼치는 QTL과 매우 가깝게 연관되어 있어서 여교잡, 계통도, 집단의 유전적 향상을 위한 MAS에 이용된다. 1987년에 수량 관련 형질로 옥수수 QTL이 실시된 후 전 세계의 수많은 옥수수 연구자들이 농업적으로, 과학적으로 필요한 다양한 형질에 대한 유전자/QTL에 tagging 되는 분자 마커를 개발하기 시작하였다(Stuber *et al.*, 1987). 분자 마커는 수량, 순화, 환경적응, 병해충 저항성, 한발 및 열 스트레스 저항성 등 다양한 형질에 연관된 QTL을 발굴하여 특성 검정을 위하여 사용되어 왔다. 이러한 정보는 Maize DB(<http://agron.missouri.edu>)를 이용하여 확인해 볼 수 있다. 여기에서는 옥수수 재배를 제약하는 두 가지 가장 중요한 생물학적 스트레스와 환경적 스트레스인 downy mildew

와 한발 스트레스에 대한 QTL 분석에 대하여 알아보도록 하겠다.

Drought tolerance 육종

한발 스트레스는 옥수수 생산과 육종에서 가장 큰 제약을 주는 스트레스이다. 그렇기 때문에 특히 남동아시아 지역에서는 한발저항성 연구가 최우선되고 있다. 옥수수는 특히 영양 생장기 동안 물 부족으로 인한 스트레스에 매우 민감한데, 그 이유는 이 시기의 한발 스트레스가 바로 수량과 직결되기 때문이다. 분자마커 시대의 도래로 인하여 스트레스와 비 스트레스에 조절되는 목적 형질에 관여하는 유전체 부분의 발굴이 가능해 졌다. QTL은 스트레스 조건 하에서는 한발 저항성과 관련된 유전체의 집단을 찾을 수 있게 하였다. 한발 저항성 관련 유전자들도 수분 공급이 제대로 될 때에는 식물 생육에 관련하는 것을 조절하는 것으로 알려졌다. 그럼에도 QTL 집단들은 수분 공급이 제대로 될 때와 안 될 때 모두 발견되는데 그 이유는 식물이 수분 환경에 대해 광범위하게 적응하도록 관여하기 때문이라고 유추되고 있다(Ribault *et al.*, 2008).

옥수수에서 QTL 분석을 이용하여 한발 저항성에 대한 유전분석이 1995년 처음 실시된 이후에(Lebreton *et al.*, 1995), 옥수수에 수분 공급이 제한된 상태에서 수량이나 중요한 생태적 생리 형질을 조절하는 QTL을 발굴하기 위한 연구가 많이 진행되었다. 또한 여러 변이 품종에서의 QTL 연구를 통하여 단일 유전자 지도를 엮어서 옥수수 유전체에 걸쳐 분포되어 있는 한발 스트레스에 관련이 있는 QTL을 찾아냈다(Tuberosa *et al.*, 2002b). 옥수수와 그 외 다른 작물들의 비 생물학적 환경스트레스 저항성과 연관된 주동 유전자와 QTL 데이터는 웹사이트를 통하여 확인할 수 있으며(Plantstress: <http://www.plantstress.com/biotech/index.asp?Flag=1>), Plantstress에 수집된 데이터를 기반으로 옥수수의 한발 스트레스 관련 형질에 대한 QTL 자료들은 Table 1에 정리되어 있다.

Khavkin & Coe(1997)는 옥수수에서 큰 영향을 미치는 많은 QTL들은 사실 항상성 유전자와 전사 인자 유전자와 같은 유전자의 집단이며, 이 유전자 집단을 이용하여 식물 발달과정이 조절되며, 또한 이런 유전자 집단들에 의해 많은 식물이 비 생물학적 스트레스에 반응한다고 추측하였다. 옥수수에서 한발 저항성 QTL 연구와 육종 프로그램에서 MAS에 QTL을 적용시키기 위한 추진 전략은 많은 논문과 연구에 진행되었다(Araus *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2008). 한발 스트레스가 쉽게 일어나기 쉬운 환경에서 옥수수 생육의 유전적 분석은 DNA 마커의 이용을 통하여 많은 유리함

Table 1. Summary of QTLs identified for drought tolerance-related traits in maize.

Specific root and shoot responses under drought				
Trait	Population	Type	QTL	Reference
Leaf elongation rate in correct with ASI	Ac7643 and Ac 7729/TZSR	RIL	5	Welcker et al., 2007
Leaf elongation under stress in several population	Several	NA	19	Welcker et al., 2011
Leaf temperature and seedling DM under drought stress	Zong3 * 87-1	RIL	9	Liu et al., 2011
Roots traits and yield	Lo964 * Lo1016	F3	<11	Tuberosa et al., 2002a
Roots traits and yield	Lo964 * Lo1016	NIL	1	Landi et al., 2010
Seedling root traits in PEG solution	Ac7643 * Ac 7729 / TZSRW	RIL	13	Ruta et al., 2010
seedling survival	BC inbred of 11 crosses	BC2F ₂	7	Hao et al., 2009
Various shoot & root traits	Tropical population	RIL	30	Messmer et al., 2011
Whole plant and crop drought resistance				
Adaptation and constitutive traits	12 population * 22 locations		Many	Hao et al., 2010
Flowering parameters under drought, ASI	Ac7643S5 * Ac7729/TZSRWSS	F2	7	Ribaut et al., 1996
Plant height, ear number, day to silking, yield	SD34 * SD35	F3	5	Agrama and Moussa 1996
QTL * environment interaction		F2-F3	-	Vargas et al., 2006
Yield and ASI under field drought	X178 * B73	F2-F3	2 clusters (45&60 QTLs)	Hao et al., 2008
Grain yield and ASI over location	3 population		83&62	Almeida et al., 2013
Hormonal responses under drought				
Leaf ABA concentration	Os420 * IABO78	F3	16	Tuberosa et al., 1998
Leaf ABA concentration, yield	Os420 * IABO78	F4	17	Sanguineti et al., 1999
Water-use and photosynthetic activity under drought				
Adventitious root formation under waterlogging	CV B64 * teosinte	F2	2	Mano et al., 2005
Vacuolar invertase activity	F2 * 10	RIL	18	Pelleschi et al., 1999

을 얻을 수 있는 반면(Messmer *et al.*, 2009; Szalma *et al.*, 2007), 지금까지 실질적으로 옥수수 육종 프로그램에 직접 적용되는 경우는 별로 없었다. QTL은 각 QTL의 원래의 유전적 배경과 목적 형질의 단일 유전자의 영향에 특이적이기 때문에, 많은 수의 마커를 활용한 육종 실험에서 한발 저항성을 증진시키는 것이 제한적이다. 이런 현실적 괴리는 유전적 바탕의 복잡성과 유전적 배경의 영향 때문이며, 식물 발달 단계와 환경에 QTL이 영향을 받는 것, 부적합한 표현형의 fine mapping을 진행하는 과정에서의 시간과 비용적 측면, 그리고 유전자와 유전자 사이의 영향 등에 의해 생긴다(Tuberosa *et al.*, 2002b; Campos *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2009).

최근에는 한발 저항성에 대한 분자 육종의 개념적인 구상이 제시되고 있다. 이 개념은 수량을 나타내는 Passioura 방정식에 기반을 둔 것으로 수분의 이용(WU), 수분 이용 효율(WUE), 수확지수(HI)을 이용하여 수량을 설명하는 것으로 Salekdeh *et al.*(2009)에 의해 제시되었다. 이 방정식의 QTL과 Omics 연구에서의 활용은 각 QTL 실험에 의해 제공되는 정보의 균일성을 놀랄 만큼 증진시킬 수 있을 것이며, CMTV 같은 소프트웨어나 MetaQTL을 이용한 안정적인 다중 집단이나 환경에 대한 QTL을 실현 가능하게 할 수 있다(Sawkins *et al.*, 2004). McMullen *et al.*(2009)은 두 접근법의 장점들을 조합하여 NAM 집단을 개발하였다. 이 NAM 집단을 이용하여 Buckler *et al.*(2009)은 옥수수의 개

화 시기의 유전적 변이를 연구하였는데, 개화 시기의 차이는 많은 작은 QTL들의 효과가 누적된 결과이며, 유전적 상위성이나 환경적인 효과는 거의 없으며, 어떤 단일 QTL 도 2일 이상의 개화 시기의 차이가 나는 변이를 설명할 수 없다고 결론지었다. NAM 집단은 옥수수에서 높은 해상도의 유전자 지도를 작성할 수 있는 매우 중요한 유전적 도구임에도 한발 저항성 연구에서 사용하기에는 부모 계통의 염기 서열 분석과 유전적 다형성 분석, 그리고 5000 개나 되는 RIL에 대한 한발 저항성에 대한 표현형의 분석이 결코 쉬운 일이 아니라는 문제점이 존재한다. 대부분의 이전의 한발 저항성 QTL 연구는 옥수수에 존재하는 자연상의 변이체와 목적형질에 대한 표현형의 변이를 최대화하기 위한 육종적 가치가 없는 한 개의 부모 계통을 사용한 많은 변이체를 중심으로 연구하였고, 그로 인해 육종 프로그램에 MAS를 이용하는데 발견된 QTL의 이용성에 제약이 있었다(Ali *et al.*, 2011). 이런 문제점을 극복하기 위하여 엘리트 육종 계통에서 화학적 돌연변이에 의해 생성된 돌연변이체에 QTL을 활용한 연구가 진행되었다. 또한 한발 저항성에 대한 옥수수의 QTL mapping 은 230 개의 CIMMYT에서 개발된 RIL을 통해서 주동 QTL 이 1, 2, 8, 10번 염색체라는 것을 알아내게 되었다(Prasanna, 2009). RIL 데이터 분석을 통하여 염색체 1, 2, 8, 10번에 같이 존재하는 한발 스트레스에서 특이적 형질에 영향을 끼치는 QTL 도 찾아내었다. 또한 다른 주요 QTL 보다 한발 스트레스에서 옥수수 이삭 당 종자의 개수에 영향을 키치는 확실한 양성 상위성 QTL 도 발굴되었으며, 중국에서 한발 저항성으로 가장 많이 재배되는 X178의 F_{2:3} 집단에서 ASI(Anthesis-Silking Interval)과 식물개체 당 이삭 숫자에 대한 주동 QTL을 발굴해 냈다(Xiao *et al.*, 2005; Hao *et al.*, 2008). 이 QTL 들은 염색체 1번(bin 1.03)과 염색체 9번(bins 9.03~9.05)에 위치하고 있으며 이들은 한발 스트레스에서 다른 실험에서 발굴된 주동 QTL과 일치한다(Tuberosa *et al.*, 2007). 이와 같이 서로 다른 mapping 집단을 이용한 서로 다른 실험에서 발굴되는 한발 저항성 옥수수에 대한 동일한 QTL 들로 판명되는 것은 발굴된 QTL 마커가 수분 부족 조건에서 옥수수 생산량을 늘리기 위한 MAS 에 이용될 가능성이 매우 높은 QTL 후보군이라고 할 수 있다(Prasanna *et al.*, 2010).

Downy Mildew 저항성 육종

전 세계적으로 옥수수의 수량과 생산성에 영향을 끼치는 여러 병원균 중에 노균병(downy mildews)가 병원균의 지리적 분포와 수량의 감소에 대한 잠재적 능력의 면에서 가장 심각한 병원균으로 생각되고 있다(Nair *et al.*, 2005). 노균

병의 감염으로 인한 가장 큰 옥수수 수량의 손실은 필리핀, 대만, 인도네시아, 태국, 인도, 서아프리카, 베네수엘라, 일본, 오스트리아, 유럽, 북아메리카 등에서 기록되고 있다(Bonde, 1982). 노균병은 열대와 아열대 지역에서 두드러지게 발병하며, 전 세계적으로 열대의 저지대와 아열대, 중간 고도의 점이지대, 고지대에서 옥수수 재배지의 30%에서 노균병 감염으로 경제적 손실을 겪고 있다(Jeffers *et al.*, 2000). 특히 아시아에서는 노균병이 옥수수 생산량을 저해시키는 가장 중요한 생물학적 스트레스로 여겨지고 있다(Agrama *et al.*, 1999; Jampatong *et al.*, 2013). 동남아시아의 가장 문제가 되는 노균병 균주로는 인도의 *Peronosclerospora sorghi*(수수노균병, sorghum downy mildew)와 *P. heteropogoni*(라자스탄 노균병, Rajasthan downy mildew), 인도네시아의 *P. maydis*(자바노균병, Java downy mildew), 태국의 *P. zeaе*, 필리핀의 *P. philippinensis* 등이 있다(Prasanna *et al.*, 2010). 노균병에 저항성을 갖는 Ki3와 감수성인 CML139를 양친으로 사용하여 개발된 RIL을 이용하여 동남아시아의 아열대 지역의 5가지 노균병의 저항성에 연관된 QTL이 mapping 되었다(George *et al.*, 2003). 5개의 주요 노균병에 확실히 저항성을 갖는 QTL 연구는 6번 염색체(bin 6.05)의 QTL 이 가장 중요하여 5개의 모든 노균병에 대한 저항성에 영향을 미치고, 수수노균병과 라자스탄노균병의 저항성에 대해 20~31% 정도의 표현형의 변이를 보인다. 6번과 3번 염색체에 각각 존재하는 2개의 주동 QTL은 수수노균병에 감수성인 CM139와 수수노균병 저항성인 NAI116을 양친으로 하여 개발된 여교배 집단을 이용하여 QTL을 검정하였다(Nair *et al.*, 2005). BC₂F₁과 BC₂F₂의 세대에서 두 개의 주동 QTL에 대한 중요한 선발과 54개 SSR 마커를 이용한 반복된 부모의 유전체에 대한 여교배 선발과 BC₂F₃세대에서 인위적으로 감염을 시켜 수수노균병에 대한 표현형을 선발하는 MAS 방법에 의해 수수노균병에 저항성을 갖는 CM139 계통과 여러 QTL-NIL을 개발해 내었다(Prasanna, 2009). QTL-NIL 계통과 같은 MAS에서 개발된 계통은 노균병 저항성 옥수수 잡종 개발에 이용되었고, 노균병 스트레스에서에 대한 전사체 프로파일링 연구가 진행되었다(Singh *et al.*, 2009). 최근에는 노균병에 저항성을 갖는 Nei9008(태국품종)과 감수성인 CML289(CIMMYT)의 교배를 통해 나온 251개의 F_{2:3} 계통에 대하여 SSR 마커를 이용하여 QTL 분석을 한 결과 수수노균병의 저항성 관련하여 9개의 QTL을 발굴 하였다(Jampatong *et al.*, 2013). 각 QTL 들은 2, 3, 4, 6번 염색체상에 각 1개씩 존재하며, 염색체 5번에 3개, 염색체 9번에 2개가 존재한다. Jampatong 등(2013)은 수수노균병에 저항성 QTL 지도상에 참고 문헌

을 통해 다른 병해충 저항성 관련 QTL을 겹쳐서 나타내었다(Jompatong *et al.*, 2002; Sabry *et al.*, 2006, Phumichai *et al.*, 2012). 그 결과 서로 매우 유사한 위치에 존재한다는 것을 알 수 있는데, 이 결과를 통해 옥수수에서 병해충저항성 관련 유전자들은 유전체 전반에 걸쳐 자유롭게 분포되어 있는 것이 아니라 군집을 이루어 위치한다는 것을 의미한다. 노균병 저항성 품종에 대한 연구와 메타락실(metalaxyl)과 같은 진균제의 살포에도 불구하고, 습한 아열대, 열대 지대를 중심으로 노균병 피해가 계속되고 있다(Lukman *et al.*, 2013). 종자 처리를 위한 진균제의 처리 비용과 그로 인한 발생할 수 있는 내성 병원균 문제들이 도래하고 있다. 이런 문제를 해결 하기 위해서는 좀더 가격 효율적이고, 환경 안정적인 방법을 이용한 저항성 품종을 개발하는 것이 중요하다.

Association Mapping

앞에서 설명한 것처럼 QTL mapping은 식물이나 동물에서 복잡한 양적 형질의 유전을 연구하는데 매우 유용하고 잘 정리된 연구 방법이다. 특히 연관지도(association mapping)은 새로운 유전자나 혹은 관련될 것으로 예측하는 유전자의 검정을 위하여 매우 유용하고 효율적인 방법으로 이용되고 있다(Altshuler *et al.*, 2008; Hunter and Crawford, 2008). 특히 식물에서는 동물보다 더 유용성이 뛰어나기 때문에 작물 육종 분야에서 활용도가 점차 증가하고 있는 추세이다(Zhu *et al.*, 2008). 일반적인 유전자 연관지도(linkage mapping)와는 다르게 association mapping은 주어진 유전자 집단에서 높은 해상도로 모든 재조합체나 돌연변이체를 분석할 수 있다(Yu & Buckler, 2006). 하지만 association mapping은 육종에서의 높은 유용성을 가지고 있음에도 불구하고 일반 연관지도(linkage mapping)에 비해 빈도가 낮은 대립유전자에서는 활용 가치가 낮은 편이다(Visscher, 2008). LD(linkage disequilibrium)은 2개 혹은 그 이상의 유전자 좌에서 대립 유전자들이 비 임의적으로 연합(non-random association)되어 있는 현상을 말한다. 이런 현상은 같은 염색체에 존재하는 대립유전자의 집단에 관한 내용으로 정의되어 있는데, 비록 LD가 집단을 기반으로 나타나는 현상(population-based phenomenon)이라 할지라도 일반적으로 더 가깝게 위치한 대립유전자 사이에서는 높은 LD를 갖는 것으로 나타나는 경향이 있다. 그래서 임의의 대립유전자 사이의 연합에서는 연관이 줄어들고 그로인해서 소위 불균형(disequilibrium)이라고 불리는 현상이 나타나게 된다. 그러나 GWA(Genome-Wide Association)의 기술발달과 그로인한 그 데이터의 증가는 상업적으로 옥수수 수집 중에서 LD decay(주어진 두 대립유

전자 사이에서 다시 random association으로 돌아오는 비율)가 상대적으로 낮다는 것을 알게 되었다. 그러나 두 개의 서로 분화된 옥수수 품종에서 LD decay는 각 재료들 사이의 높은 재조합 비율 때문에 1~10 kb 정도의 짧은 간격에서도 빠르게 일어난다(Gore *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009). Linkage mapping과 association mapping 연구 모두 표현형의 변화나 또는 둘 사이의 물리적 거리가 충분히 가깝게 연관되어 있기 때문에 육종가가 분화된 집단에서 그 대립형질을 전형적으로 선발하고 다룰 수 있는 기능을 갖는 염기 변이체(대립유전자)를 찾아내는데 활용 할 수 있다. 전통적인 연관지도 연구는 분리되는 각 개체가 수백, 수천 개의 분자 마커를 이용하여 유전자형을 분석하는 것인데, 이 때 이들 마커가 스스로 기능을 갖는 유전자이거나 또는 유전자와 매우 가깝게 연관될 가능성은 실제로 매우 낮다(Yan *et al.*, 2010). 염색체의 물리적 거리와 더불어 유전적 부동, 자연선택, 인공선택, 교배시스템, 다른 집단과의 혼합 등으로 인하여 LD의 변형(breakdown)에 영향을 준다(Flint-Garcia, 2003; Yu & Buckler, 2006). 여러 통계적 매개변수가 LD의 규모를 추정하는데 이용된다고 알려져 있다(Hedrick, 1987). 가장 일반적으로 두 개의 주어진 다형성의 위치에 있는 대립유전자 상태 사이의 상관관계를 예측하기 위하여 r^2 이 사용된다. 옥수수에 적용된 연구를 분석해 보면 LD decay의 범위는 원시 품종(landrace)은 1 kb 보다 작게 나타나는 것부터 엘리트 육종 계통에서는 100 kb 이상이 되는 넓은 범위를 가지고 있다(Ching *et al.*, 2002). 이러한 상관관계에서 연관 분석(association analysis)은 해상도가 연관지도패널(association mapping panel)의 선택에 의해 조절되어 질 수 있기 때문에 옥수수에서 특히 유용하다. 다시 말해 더 좋은 엘리트 계통에서는 LD가 높고, 더 많이 분화되거나 외국에서 들어온 계통들에서는 LD가 낮다는 것을 보여준다(Yan *et al.*, 2010).

LD는 샘플 사이즈가 이미 사용된 50 개의 개체들 보다 작으면 과평가 되어 있는 것으로 실제 유전적 거리(genomic distance)가 더 커지게 된다. LD decay도 서로 다른 염색체 상 위치에서 넓은 변이를 보인다. 이것은 재조합율이 염색체를 따라서 큰 변이가 있다는 것을 보여주는 것으로 염색체에서 재조합율이 높고, 동원체에서는 재조합율이 낮다. 또한 높은 재조합율은 역전이인자가 삽입되었다는 것을 의미 하는 것이기도 하다(Dooner & He, 2008). 간혹 매우 광범위한 LD가 강력하게 선택적 분석된 지역에서 발견되기도 한다(Tian *et al.*, 2009). 옥수수의 종실에서 카르테노이드 생산을 조절하는 Y1 유전자 주변에서 그런 예가 발견되기도 하는데, 이 유전자 주변의 높은 수준의 염기서열의 다

양성이 흰색 옥수수 품종에서 발견되었으나 현대의 노란색 품종에서는 발견되지 않는다(Palaisa *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2010). 이런 표현형적 형질을 이용하여 인간이나 동물에게 카르테노이드의 건강상의 장점으로 인하여 주도적으로 선발되어지고 있으며 이런 선발이 가능하게 된 이유는 노란색 옥수수의 *Y1* 유전자 주변 LD가 수백 kb 정도의 거리들을 두기 때문이다. 또 다른 10번 염색체의 일부 부분에서는 1 Mb가 넘는 지역을 조절 할 수 있는 긴 LD를 포함하고 있는데 이것은 최근 재조합이 결여되거나 선발 때문에 염기서열의 다양성이 결여되었다는 것을 의미한다. 그러나 근원의 유전자는 아직 밝혀지지 않고 있다(Tian *et al.*, 2009). 27 개의 다양한 inbred line의 서로 다른 길이의(수천~수백만 bp)의 100개 이상의 LD 블록이 옥수수 유전체에서 발굴되었다(Gore *et al.*, 2009). 어떤 세트의 germplasm에 대한 서로 다른 길이의 LD 블록들 안에서 목표 유전자의 기능상 돌연변이에 매우 가깝게 연관되어 있는 분자마커를 발굴해 내는 것은 아마 불가능할 것이다. 이런 이유 때문에 목표 유전자 또는 그 주변의 재조합이나 돌연변이 수를 최대화하기 위하여 적절한 germplasm의 선택은 association analysis의 성공을 위한 매우 중요한 요인 중의 하나이다(Yan *et al.*, 2010). 일반적으로 유전적 연관지도(linkage map) 연구는 교배가 되고, 오직 몇 세대의 재조합만 일어나서 양친의 mapping population을 만들었을 때, 분자 마커보다 약간 더 떨어져 있는 실제 발현되는 유전자의 염기 서열 사이의 연관(linkage)을 검정하는 것이다. 이를 통해 임의의 마커에 대해 LD가 기능을 갖고 있는 유전자와 계속 함께 있는지를 검정할 수 있는 가능성을 높이는 것이다. 그러나 이 방법으로 개발된 연관 마커는 근연관계가 없는 옥수수들의 육종에서 MAS로 적합하지 않다. 왜냐하면 마커와 유용한 기능적 변이 사이에서는 연관이 근연관계가 없는 유전자형들의 재조합 과정 도중에 끊어지기 때문이다. 옥수수의 association mapping에 사용되는 임의의 마커는 다양한 association mapping panel에서 LD의 와해(breakdown) 때문에 통계적 유의차가 있는 association을 위한 기능을 갖는 대립유전자에 반드시 매우 가깝게 존재하여야 한다. 많은 세대의 재조합은 두 계통의 교배에서부터 몇 세대까지 유전적 연관지도 집단(linkage mapping population)의 계통과 비교되는 가장 최근의 공통의 조상에서부터 시작된 다양성 association panel에서 근연관계가 없는 계통을 분리해낸다(Yan *et al.*, 2010). 어떤 주어진 association mapping panel에서 각 개체의 유전자형 분석에 사용된 마커 가운데서 LD의 수준은 association 연구를 성공하기 위한 중요한 지표 중 하나인데, 그 이유는 유의차가 있는 연관(association)의 검정을 위해 필요로 하

는 최소한의 마커 수와 해상도를 가늠할 수 있게 도와주기 때문이다(Yan *et al.*, 2009).

Genome-Wide Association Mapping

유전자를 기반으로 한 association mapping은 잠재적 후보 유전자의 자세한 사전 정보가 요구되는 가정 구동 접근(hypothesis-driven approach) 방법이다. 옥수수에서 이 연구 방법이 많이 사용되었으나 임의의 마커를 기반으로 한 낮은 association 분석 능력으로 특히 옥수수에서 빠른 LD decay 때문에 문제가 되기도 한다(Gore *et al.*, 2009). 하지만 옥수수에서 이용할 수 있는 SNP 마커는 점점 증가하여 옥수수 유전체의 모든 염색체에 고루 퍼져있으며, 복잡한 목표 유전 형질에 가깝게 연관되어 있다. 그래서 GWAS(Genome-wide association studies)라고 부르는 연구가 여러 작물에서 폭넓게 이용되고 있다(Altshuler *et al.*, 2008; Hunter and Crawford, 2008). GWAS는 수십만 개 이상의 SNP를 필요로 하는 각 LD 블록에서 충분한 다형성을 보이는 마커를 가지고 수집된 각 개체의 유전자형의 특성검정을 가지고 시작한다. 이 genotyping의 밀도는 array를 이용한 시스템을 이용하여 동시에 genotyping을 백만 개 씩 할 수 있다(Gupta *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2010). 그렇지 않으면, 염기서열 분석 능력의 발달과 NGS 기술을 이용한 단위당 단가의 하락은 GWA 연구의 대용량 genotyping의 필요를 위해 두 개를 연결할 것이다(Metzker *et al.*, 2010).

GWAS를 성공하기 위한 최소한의 필요한 마커의 수는 유전체의 크기와 LD decay의 비율을 따르게 된다. 예를 들어 유전체 크기가 125 Mbp인 애기장대의 경우에는 140,000개의 마커로 충분히 가능하나, 옥수수의 경우는 유전체 크기가 2300 Mbp이나 되며 또한 LD decay 비율이 애기장대보다 훨씬 더 빠르기 때문에 천만 개 이상의 마커가 필요할 것으로 추정하고 있다(Kim *et al.*, 2007; Myles *et al.*, 2009). 그러나 현재로는 실험적인 명확한 마커의 수는 아직 정확히 알 수 없으며, 오직 NGS를 통한 re-sequencing만이 해당 genotyping의 수준에 대한 마커수를 제공할 수 있으며 그렇기 때문에 reference genome을 가지고 있는 종에서만 가능하다(Lupski *et al.*, 2010). 더욱이 그 결과로 생긴 데이터들의 통계적 분석은 현재의 데이터 취급의 커다란 도전과제를 제시하는 것이다. Association mapping panel을 구축을 위한 엘리트 계통을 이용한다면 옥수수에서 GWAS를 위해 필요한 마커의 수를 대폭 줄일 수 있을 것이다(Yan *et al.*, 2010). 즉, 모든 유전자의 발현되는 부분을 이용한 다형성을 통하여 지속적인 QTL 분석의 감소 없이 필요한 마커의 수를 줄일 수 있다는 의미이다. 이것은 유전자 부분의

다형성이 임의로 선발된 마커를 이용한 다형성과 비교하였을 때 기능적으로 중요한 것일 것이기 때문이다. 이것은 그동안 연구된 이미 클로닝 되어 있는 대부분의 QTL에 의해서도 입증 된다(Alonso-Blanco *et al.*, 2005; Salvi & Tuberosa, 2005). 비록 목표 유전자의 상단과 말달 방향으로 10 kb 정도의 부분이 빠질 수 있기 때문에 *cis*- 조절 인자와 같은 기능적으로 중요한 인자를 놓칠 수 있더라도 단기적으로 GWA는 유전자 중심적 접근을 통하여 발견되는 부분을 중심으로 진행되게 될 것이다(Jorgenson & Witte, 2006; Ng *et al.*, 2010). 옥수수의 유전체는 이미 염기서열이 밝혀진 B73을 기준으로 32,000 개의 유전자가 있을 것으로 예상하며 평균적으로 약 1.4 kb의 cDNA 가 생성될 것으로 예상된다(Alexandrov *et al.*, 2009; Schnable *et al.*, 2009). 그래서 이런 유전자들의 각 내부의 월등히 우세한 다형성을 찾아내는 것이 가능할 것이고 GWAS를 위하여 대량의 강력한 유전자 기반 마커가 제공될 것이다. 만약 옥수수의 유전자가 5만개이고 각 발현 유전자 부분에서 10~20개의 마커가 개발된다고 가정해보면, 만약 50만~100만 개의 잘 선발된 마커가 이용된다면 옥수수 GWAS는 충분한 QTL 검정 능력을 가지게 될 것이다. 이렇게 하여 옥수수 유전체의 발견되는 부분으로부터 개발된 마커의 이용은 1000만~1500만개가 필요한 것으로 예상하는 임의의 마커를 사용할 때와 비교하여 필요한 마커수를 대략 10~20배로 줄일 수 있다(Myles *et al.*, 2009).

앞에서 설명한 NAM 집단은 association mapping을 이용한 매우 유용한 유전자원이다. NAM 집단은 근본적으로 공통의 부모에 의해 연관된 25개의 아주 유사한 양친의 집단의 시리즈이기 때문에 연관 지도(linkage mapping)과 연합 지도(association mapping)의 장점을 모두 가지고 있다. NAM 집단의 디자인에서 가장 뛰어난 장점 중 하나는 정교한 유전자형이 조상 계통에 대한 정교한 genotyping에 의해 전체 집단에 대해 부여될 수 있다는 것이며, 그래서 자식 계통에게 저 밀도 유전자 마커를 기반으로 유전자형을 계획할 수 있다는 것이다(Wallace *et al.*, 2014). 이것으로 인하여 GWAS 가 아주 세밀한 규모에서 형질과 유전자 좌 사이의 association을 찾기 위한 조상집단의 재조합 과정에 대한 모든 장점을 가질 수 있게 한다(Fig. 1(B)). NAM 집단 외에도 많은 정교한 association 집단이 GWAS와 연계되고 있다(Fint-Garcia *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010).

결 론

DNA를 기반으로 한 분자 마커가 처음 개발된 지 30년이

넘었다. 그 이후로 많은 연구자들은 수많은 분자마커를 개발하고, 직접 활용하기 위한 이용성을 증명하기 위하여 많은 노력을 기울였다. 최근 들어 옥수수에서 MAS를 활용하기 위한 기술적 기회는 급격히 증가하고 있으며, 그로인해 국제적으로 옥수수 유전과 육종에 대한 생물 다양성을 위한 분자 마커의 이용성이 활발히 연구 되고 있으나 여전히 가야할 길은 멀다. 옥수수 germplasm에서 표현형과 분자 마커를 이용한 다양성 검정과 특히 한발 스트레스나 노균병에 대한 저항성과 같은 다양한 농업 형질에 영향을 미치는 QTL의 발굴 등이 많은 나라에서 발 빠르게 진행되고 있다. 그러나 마커를 육종에 응용하여 옥수수 종실의 생산성을 증가시키는 연구는 우리나라는 물론 동남아시아 일대에서는 여전히 취약한 분야이다. 이를 해결하기 위해서는 분자마커를 육종에 활용하는 것은 매우 유용한 방법으로 평가 받는다. 과거에는 작물 육종가들은 자식계통과 표현형 분석, 일반적으로 특별하게 조합된 능력의 지식이 포함된 데이터베이스를 이용하여 육종을 하였으나 이제는 작물 육종가가 분자 마커와 지문법, 마커와 표현형이 연관된 작물 유전체 전체를 이용하는 데이터베이스를 이용하는 추세로 변하고 있다. 또한 분자마커기술을 이용한 다양성 분석이 폭넓게 이루어지고 있으며, 대량 변이 분석을 위한 DNA chip 기술과 database를 이용한 생명정보 기술은 앞으로 더욱 중요하게 이용될 것이다. 마지막으로 분자 육종가들이 분자마커를 육종에 활용하기 위한 기술 개발에 더욱 현명하고 더욱 집중적인 실질적인 해결방안을 개발하기 위하여 더욱 노력해야 할 것이다.

사 사

본 연구는 농림축산식품부 동남아시아 적응 수출용 옥수수 품종 및 수출 촉진화 기술 개발(213001-04-1-SB920)에 의해 이루어진 것임.

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ00993 9032013)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌(REFERENCES)

- Agarwal, M., N. Shrivastava, and H. Padh. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 27 : 617-631.
- Agrama, H. A. S. and M. E. Moussa. 1996. Mapping QTLs in breeding for drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica.* 91 : 89-97.
- Agrama, H. A., M. E. Moussa, M. E. Naser, M. A. Tarek,

- and A. H. Ibrahim. 1999. Mapping of QTL for downy mildew resistance in maize. *Theor. Appl. Genet.* 99 : 519-523.
- Alexandrov, N. N., V. V. Brover, S. Freidin, M. E. Troukhan, T. V. Tatarinova, H. Zhang, T. J. Swaller, Y. P. Lu, J. Bouck, R. B. Flavell, and K. A. Feldmann. 2009. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Mol. Biol.* 69 : 179-194.
- Ali, Q., M. Elahi, B. Hussain, N. H. Khan, F. Ali, and F. Elahi. 2011. Genetic improvement of maize (*Zea mays* L.) against drought stress: An overview. *Agricultural Science Research J.* 1(10) : 228-237
- Almeida, G. D., D. Makumbi, C. Magorokosho, S. Nair, A. Borem, J. Ribaut, M. Banziger, B. M. Prasanna, J. Crossa, and R. Babu. 2013. QTL mapping in three tropical maize populations reveals a set of constitutive and adaptive genomic regions for drought tolerance. *Theor. Appl. Genet.* 126 : 583-600.
- Alonso-Blanco, C., B. Mendez-Vigo, and M. Koornneef. 2005. From phenotypic to molecular polymorphisms involved in naturally occurring variation of plant development. *Int. J. Dev. Biol.* 49 : 717-732.
- Altshuler, D., M. J. Daly, and E. S. Lander. 2008. Genetic mapping in human disease. *Science.* 322(5903) : 881-888.
- Araus, J. L., G. A. Slafer, C. Royo, and M. D. Serret. 2008. Breeding for yield potential and stress adaptation in cereals. *Crit. Rev. Plant Sci.* 27 : 377-412.
- Bachem, C. W. B., R. J. F. J. Oomen, and R. G. F. Visser. 1998. Transcript Imaging with cDNA-AFLP : A Step-by-Step protocol. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16 : 157-173.
- Batley, J., G. Barker, H. O'Sullivan, K. J. Edwards, and D. Edwards. 2003. Mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/Deletions in maize expressed sequence tag data. *Plant Physiol.* 132(1) : 84-91.
- Bernardo, R. 1996. Testcross Selection Prior to Further Inbreeding in Maize : Mean Performance and Realized Genetic Variance. *Crop Sci.* 36(4) : 867-871.
- Bonde, M. R. 1982. Epidemiology of downy mildew diseases of maize, sorghum and pearl millet. *Tropical Pest Management.* 28(1) : 49-60.
- Bostein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32 : 314-331.
- Buckler, E. S., J. B. Holland, P. J. Bradbury, C. B. Acharya, P. J. Brown, C. Browne, E. Ersoz, S. Flint-Garcia, A. Garcia, J. C. Glaubitz, M. M. Goodman, C. Harjes, K. Guill, D. E. Kroon, S. Larsson, N. K. Lepak, H. Li, S. E. Mitchell, G. Pressoir, J. A. Peiffer, M. O. Rosas, T. R. Rocheford, M. C. Romay, S. Romero, S. Salvo, H. S. Villeda, H. S. Silva, Q. Sun, F. Tian, N. Upadyayula, D. Ware, H. Yates, J. Yu, Z. Zhang, S. Kressovich, and M. D. McMullen. 2009. The genetic architecture of maize flowering time. *Science.* 325(5941) : 714-718.
- Campos, H., M. Cooper, J. E. Habben, G. O. Edmeades, and J. R. Schussler. 2004. Improving drought tolerance in maize : a view from industry. *Field crops Resear.* 90 : 19-34.
- Casa, A. M., C. Brouwer, A. Nagel, L. Wang, Q. Zhang, S. Kressovich, and S. R. Wessler. 2000. The MITE family HeartBreaker(Hbr) : molecular markers in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(18) : 10083-10089.
- Chelkowski, J. and L. stepien. 2001. Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. *J. Appl. Genet.* 42(2) : 117-126.
- Ching, A., K. S. Caldwell, M. Jung, M. Dolan, O. S. Smith, S. Tingey, M. Morgante, and A. J. Ragalski. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC genetics.* 3 : 19.
- Coe, E., K. Cone, M. McMullen, S-S Chen, G. Davis, J. Gardiner, E. Liscum, M. Polacco, A. Paterson, H. Sanchez-Villeda, C. Soderlund, and R. Wing. 2002. Access to the maize genome : an integrated physical and genetic map. *Plant Physiol.* 128(1) : 9-12.
- Collins, N. C., F. Tardieu, and R. Tuberosa. 2008. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Physiol.* 147 : 469-486
- Cone, K. C., M. D. McMullen, I. V. Bi, G. L. Davis, Y. S. Yim, J. M. Gardiner, M. L. Polacco, H. Sanchez-Villeda, Z. Fang, S. G. Schroeder, S. A. Havermann, J. E. Bowers, A. H. Paterson, C. A. Soderlund, F. W. Engler, R. A. Wing, and E. H. Coe Jr. 2002. Genetic, physical, and informatics resources for maize. on the road to an integrated map. *Plant Physiol.* 130(4) : 1598-1605.
- Cronn, R. C. and K. L. Adams. 2003. Quantitative analysis of transcript accumulation from genes duplicated by polyploidy using cDNA-SSCP. *Biotechniques.* 34 : 726-734.
- Davey, J. W., P. A. Hohenlohe, P. D. Etter, J. Q. Boone, J. M. Catchen, and M. L. Blaxter. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 12 : 499-510.
- Dooner, H. K. and L. He. 2008. Maize genome structure variation : interplay between retrotransposon polymorphisms and genic recombination. *Plant Cell.* 20 : 249-258.
- Edwards, M. D., C. W. Stuber, and J. F. Wendel. 1987. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. *Genetics.* 116 : 113-125.
- Faostat. 2012. Agricultural trade <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>.
- Farooq, S. and F. Azam. 2002. Molecular markers in plant breeding-1: concepts and characterization. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 5(10) : 1135-1140.
- Flint-Garcia, S. A. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plant. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 : 357-374

- Fint-Garcia, S. A., A. Thuillet, J. Yu, G. Pressoir, S. M. Romero, S. E. Mitchell, J. Doebley, S. Kresovich, M. M. Goodman, and E. S. Buckler. 2005. Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *Plant J.* 44 : 1054-1064.
- Fraley, R. T., S. G. Rogers, R. B. Horsch, P. R. Sanders, J. S. Flick, S. P. Adam, M. L. Bittner, L. A. Brand, C. L. Fink, J. S. Fry, G. R. Galluppi, S. B. Goldberg, N. L. Hoffmann, and S. C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80 : 4803-4807.
- Fu, Zhiyuan., J. Yan, Y. Zheng, M. L. Warburton, J. H. Crouch, and J. S. Li. 2010. Nucleotide diversity and molecular evolution of the PSY1 gene in *Zea mays* compared to some other grass species. *Theor. Appl. Genet.* 120 : 709-720.
- Fukuoka, S., T. Inoue, A. Miyao, L. Monna, H. S. Zhong, T. Sasaki, and Y. Minobe. 1994. Mapping of Sequence-Tagged Sites in Rice by Single Strand conformation Polymorphism. *DNA Res.* 1 : 271-277.
- George, M. L. C., B. M. Prasanna, R. S. Rathore, T. A. S. Setty, F. Kasim, M. Azrai, S. Vasal, O. Balla, D. Hautea, A. Canama, E. Regalado, M. Vargas, M. Khairallah, D. Jeffers, and D. Hoisington. 2003. Identification of QTLs conferring resistance to downy mildews of maize in Asia. *Theor. Appl. Genet.* 107 : 544-551.
- Gore, M. A., J. Chia, R. J. Elshire, Q. Sun, E. S. Ersoz, B. L. Hurwitz, J. A. Peiffer, M. D. McMullen, G. S. Grills, J. Ross-Ibarra, D. H. Ware, and E. S. Buckler. 2009. A first-generation haplotype map of maize. *Science.* 326(5956) : 1115-1117.
- Grzebelus, D. 2006. Transposon insertion polymorphism as a new source of molecular markers. *J. Fruit ornamental Plant Res.* 14(1) : 21-29.
- Gulsen, O., S. Karagul, and K. abak. 2007. Diversity and relationships among Turkish okra germplasm by SRAP and phenotypic marker polymorphism. *Biol. Brat.* 62(1) : 41-45.
- Gupta, P. K., S. Rustgi, and R. R. Mir. 2008. Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity.* 101 : 5-18.
- Hao, Z. F., X. H. Li, C. X. Xie, M. S. Li, D. G. Zhang, L. Bai, and S. H. Zhang. 2008. Two consensus quantitative trait loci clusters controlling anthesis-silking interval, ear setting and grain yield might be related with drought tolerance in maize. *Ann. Appl. Biol.* 153 : 73-83.
- Hao, Z., X. Liu, X. Li, C. Xie, M. Li, D. Zhang, S. Zhang, and Y. Xu. 2009. Identification of quantitative trait loci for drought tolerance at seedling stage by screening a large number of introgression lines in maize. *Plant Breeding.* 128 : 337-341.
- Hao, Z., X. Li, X. Liu, C. Xie, M. Li, D. Zhang, and S. Zhang. 2010. Meta-analysis of constitutive and adaptive QTL for drought tolerance in maize. *Euphytica.* 174 : 165-177.
- Hedrick, P. W. 1987. Gametic disequilibrium measures : proceed with caution. *Genetics.* 117 : 331-341.
- Helentjaris, T., M. Slocum, S. Wright, A. Schaefer, and J. Nienhuis. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 72 : 761-769.
- Herrera-Estrella, L., M. D. Block, E. Messens, J. -P. Hermalsteens, M. V. Montagu, and J. Schell. 1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* 2(6) 987-995.
- Hu, J. and B. A. Vick. 2003. Target region amplification polymorphism : a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Mol. Biol. Rep.* 21 : 289-294.
- Hu, J., O. E. Ochoa, M. J. Truco, and B. A. Vick. 2005. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. *Euphytica.* 144 : 225-235.
- Hunter, K. W. and N. P. S. Crawford. 2008. The future of mouse QTL mapping to diagnose disease in mice in the age of whole-genome association studies. *Annu. Rev. Genet.* 42 : 131-141.
- Jaccoud, D., K. Peng, D. Feinberg, and A. Kilian. 2001. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res.* 29 : e25
- Jamptong, C., M. D. McMullen, B. D. Barry, L. L. Darrah, P. F. Byrne, and H. Kross. 2002. Quantitative trait loci for first-and second-generation European corn borer resistance derived from the maize inbred Mo47. *Crop Sci.* 42(2) : 584-593.
- Jamptong, C., S. Jamptong, C. Jompuk, T. Sreewongchai, P. Grudloyma, C. Balla, N. Prodmatee. 2013. Mapping of QTL affecting resistance against sorghum downy mildew (*Peronosclerospora sorghi*) in maize (*Zea mays* L.). *Maydica.* 58 : 119-126
- Jeffers, D., H. Cordoca, S. Vasal, G. Srinivasan, D. Beck, and M. Barandiaran. 2000. Status in breeding for resistance to maize diseases at CIMMYT. In : Vasal SK, Gonzalez Cenicerros F, Xingming F (eds) Proc 7th Asian Regional Maize Workshop. PCARRD. Los Banos, Philippines. pp. 257-266.
- Jorgenson, E. and J. S. Witte. 2006. A gene-centric approach to genomewide association studies. *Nat. Rev. Genet.* 7 : 885-891.
- Kalender, R., T. Grob, M. Regina, A. Suoniemi, and A. Schulman. 1999. IRAP and REMAP : two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor. Appl. Genet.* 98 : 704-711.

- Khavkin, E. and E. Coe. 1997. Mapped genomic locations for developmental functions and QTLs reflect concerted groups in maize (*Zea mays* L.) Theor. Appl. Genet. 95 : 343-352.
- Kim, S., V. Plagnol, T. Hu, C. Toomajian, R. Clark, S. Ossowski, J. Ecker, D. Weigel, and M. Nordborg. 2007. Recombination and linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. Nat. Genet. 39 : 1151-1155.
- Kim, S. L., H. G. Moon, and Y. H. Ryu. 2002. Current status and prospect of quality evaluation in maize. Kor J Crop Sci. 47(S) : 107-123.
- Kozziel, M. G., G. L. Beland, C. Bowman, N. B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Launis, K. Lewis, D. Maddox, K. McPherson, M. R. Meghji, E. Merlin, R. Rhodes, G. W. Warren, M. Wright, and S. V. Evola. 1993. Field Performance of Elite Transgenic Maize plant Expressing an Insecticidal Protein Derived from *Bacillus thuringiensis*. Nat. Biotechnol. 11 : 194-200.
- Kumar, A. and J. L. Bennetzen. 1999. Plant retrotransposons. Annu. Rev. Genet. 33 : 479-532.
- Landi, P., S. Giuliani, S. Salvi, M. Ferri, R. Tuberosa, and M. C. Sanguineti. 2010. Characterization of root-yield-1.06, a major constitutive QTL for root and agronomic traits in maize across water regimes. J. Exp. Bot. 61(13) : 3553-3562.
- Lebreton, C., V. Lazic-jancic, A. Steed, S. Pekic, and S. A. Quarrie. 1995. Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits. J. Exp. Bot. 46(7) : 853-865.
- Lee, E. A. and M. Tollenaar. 2007. Physiological basis of successful breeding strategies for maize grain yield. Crop Sci. 47(S3) : S202-215.
- Lee, E. and W. F. Tracy. 2009. Modern Maize Breeding. In: Bennetzen and S. Hake (eds). Handbook of Maize; Vol. 2. Genetics and Genomics. Springer Science, New York, NY. pp. 141-162,
- Lee, M., S. Natlya, B. William, D. Beavis, G. David, and K. Maria. 2002. Expanding the genetic map of maize with the intermated B73×Mo17 (IBM) population. Plant Mol. Biol. 48(5).
- Li, G., C. F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. Theor. Appl. Genet. 103 : 455-461.
- Liu, K., M. Goodman, S. Muse, J. S. Smith, E. D. Buckler, and J. Doebley. 2003. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. Genetics. 165 : 2117-2128.
- Liu, Y., C. Subhash, J. Yan, C. Song, J. Zhao, and J. Li. 2011. Maize leaf temperature responses to drought : thermal imaging and quantitative trait loci (QTL) mapping. Environ. Exp. Bot. 71 : 158-165.
- Liu, Z. H., H. L. Xie, G. W. Tian, S. J. Chen, C. L. Wang, Y. M. Hu, and J. H. Tang. 2008. QTL mapping of nutrient components in maize kernels under low nitrogen conditions. Plant Breeding. 127 : 279-285.
- Lukman, R., A. Affuddin, and T. Lubberstedt. 2013. Unraveling the genetic diversity of maize downy mildew in Indonesia. J. Plant Pathol. Microb. 4 : 2.
- Lupski, J. R., J. G. Reid, C. Gonzaga-Jauregui, D. R. Deiros, D. C. Y. Chen, L. Nazareth, M. Bainbridge, H. Dinh, C. Jing, D. A. Wheeler, A. L. Mcguire, F. Zhang, P. Stankiewicz, J. J. Halperin, C. Yang, C. Gehman, D. Guo, R. K. Irikat, W. Tom, N. J. Fantin, D. M. Muzny, and R. A. Gibbs. 2010. Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. N. Engl. J. Med. 362 : 1181-1191.
- Mackay, T. F. C., E. A. Stone, and J. F. Ayroles. 2009. The genetics of quantitative traits : challenges and prospects. Nat. Rev. Genet. 10 : 565-577.
- Mano, Y., M. Muraki, M. Fujimori, T. Takamizo, and B. Kindiger. 2005. Identification of QTL controlling adventitious root formation during flooding conditions in teosinte (*Zea mays* ssp. *huehuetenangensis*) seedlings. Euphytica. 142 : 33-42.
- McMullen, M. D., S. Kresovich, H. S. Villeda, P. Bradbury, H. Li, Q. Sun, S. Flint-Garcia, J. Thornsberry, C. Acharya, C. Bottoms, P. Brown, C. Browne, M. Eller, K. Guill, C. Harjes, D. Kroon, N. Lepak, S. E. Mitchell, B. Peterson, G. Pressoir, S. Romero, M. O. Rosas, S. Salvo, H. Yates, M. Hanson, E. Jones, S. Smith, J. C. Glaubitz, M. Goodman, D. Ware, J. B. Holland, and E. S. Buckler. 2009. Genetic properties of the maize nested association mapping population. Science. 325(5941) : 737-740.
- Messmer, R., Y. Fracheboud, M. Banziger, M. Vargas, P. Stamp, and J. Ribaut. 2009. Drought stress and tropical maize : QTL-by-environment interactions and stability of QTLs across environments for yield components and secondary traits. Theor. Appl. Genet. 119 : 913-930.
- Messmer, R., Y. Fracheboud, M. Banziger, P. Stamp, and J. Ribaut. 2011. Drought stress and tropical maize : QTLs for leaf greenness, plant senescence, and root capacitance. Field Crops Res. 124 : 93-103.
- Metzker, M. L. 2010. Sequencing technologies-the next generation. Nat. Rev. Genet. 11 : 31-46.
- Mueller, U. G. and L. LaReesa Wolfenbarger. 1999. AFLP genotyping and Fingerprinting. Cell. 14(10) : 389-394.
- Myles, S., J. Peiffer, P. J. Brown, E. S. Ersoz, Z. Zhang, D. E. Costich, and E. S. Buckler. 2009. Association mapping : critical considerations shift from genotyping to experimental design. Plant Cell. 21 : 2194-2202.

- Nair, S. K., B. M. Prasanna, A. Garg, R. S. Rathore, T. A. S. Setty, and N. N. Singh. 2005. Identification and validation of QTLs conferring resistance to sorghum downy mildew (*Peronosclerosora sorghi*) and Rajasthan downy mildew (*P. heteropogoni*) in maize. *Theor. Appl. Genet.* 110 : 1384-1392.
- Ng, S. B., K. J. Buckingham, C. Lee, A. W. Bigham, H. K. Tabor, K. M. Dent, C. D. Huff, P. T. Shannon, E. W. Jabs, D. A. Nickerson, J. Shendure, and M. J. Bamshad. 2010. Exome sequencing identifies the cause of a Mendelian disorder. *Nat. Genet.* 42 : 30-35.
- Olson, M., L. Hood, C. Cantor, and D. Botstein. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science.* 245 : 1434-1435.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 2766-2770.
- Palaisa, K. A., M. Morgante, M. Williams, and A. Rafalski. 2003. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. *Plant Cell.* 15 : 1795-1806.
- Paran, I. and R. W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85 : 985-993.
- Park, J. S., K. J. Sa, K. J. Park, J. S. Jang, and J. K. Lee. 2009. Genetic variation of parental inbred lines for Korean waxy corn hybrid varieties revealed by SSR markers. *Kor. J. Breed. Sci.* 41(2) : 106-114.
- Parker, P. G., A. A. Snow, M. D. Schug, G. C. Booton, and P. A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations : choosing and using a molecular marker. *Molecular Techniques in Ecology.* 79(2) : 361-382.
- Paterson, A. H., E. S. Lander, J. D. Hewitt, S. Peterson, S. E. Lincoln, and S. D. Tanksley. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature.* 335 : 721-726.
- Pelleschi, S., S. Guy, J. Kim, C. Pointe, A. Mahe, L. Barthes, A. Leonardi, and J. Prioul. 1999. *Ivr2*, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene-specific expression under water stress. *Plant Mol. Biol.* 39 : 373-380.
- Phumichai, C., J. Chunwongse, S. Jampatong, P. Grudloyma, T. Pulam, W. Dounchan, A. Wongkaew, N. Kongsiri. 2012. Detection and integration of gene mapping of downy mildew resistance in maize inbred lines through linkage and association. *Euphytica.* 187 : 369-379.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breeding.* 2 : 225-238.
- Prasanna, B. M. 2009. Molecular markers for maize improvement in Asia. In : Proceedings of 10th Asian regional maize workshop (October 20-23, 2008, Makassar, Indonesia). CIMMYT. Mexico DF. pp. 202-210.
- Prasanna, B. M., K. Pixley, M. L. Warburton, and C. X. Xie. 2010. Molecular marker-assisted breeding options for maize improvement in Asia. *Mol Breeding.* 26 : 339-356.
- Ribaut, J. M., D. A. Hoisington, J. A. Deutsch, C. Jiang, and D. Gonzalez-de-Leon. 1996. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 1. Flowering parameters and the anthesis-silking interval. *Theor. Appl. Genet.* 92 : 905-914.
- Ribaut, J. M., J. Betran, P. Monneveux, and T. Setter. 2008. Drought tolerance in maize. In: J. Bennetzen and S. C. Hake (eds.). *Handbook of Maize: Its Biology.* Springer, Netherlands. pp. 311-344.
- Rouf Mian, M. A., A. A. Hopkins, and J. C. Zwonitzer. 2002. Determination of genetic diversity in tall fescue with AFLP markers. *Crop Sci.* 42 : 944-950.
- Ruta, N., M. Liedgens, Y. Fracheboud, P. Stamp, and A. Hund. 2010. QTLs for the elongation of axile and lateral roots of maize in response to low water potential. *Theor. Appl. Genet.* 120 : 621-631.
- Sa, K. J., J. A. Kim, K. J. Park, J. Y. Park, B. D. Goh, and J. K. Lee. 2011. Analysis of genetic diversity and population structure for core set of waxy and normal maize inbred lines using SSR markers. *Kor. J. Breed. Sci.* 43(5) : 430-441.
- Sabry, A., D. Jeffers, S. K. Vasal, R. Frederiksen, and C. Magill. 2006. A region of maize chromosome 2 affects response to downy mildew pathogens. *Theor. Appl. Genet.* 113 : 321-330.
- Salekdeh, G. H., M. Reynolds, J. Bennett, and J. Boyer. 2009. Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. *Cell.* 14(9) : 488-496.
- Salvi, S. and R. Tuberosa. 2005. To clone or not to clone plant QTLs : present and future challenges. *Cell.* 10(6) : 1360-1385.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74(12) : 5463-5467.
- Sanguineti, M. C., R. Tuberosa, P. Landi, S. Salvi, M. Maccaferri, E. Casarini, and S. Conti. 1999. QTL analysis of drought-related traits and grain yield in relation to genetic variation for leaf abscisic acid concentration in field-grown maize. *J. Exp. Bot.* 50(337) : 1289-1297.
- Sawkins, M. C., A. D. Farmer, D. Hoisington, J. Sullivan,

- A. Tolopko, Z. Jiang, and J. M. Ribaut. 2004. Comparative map and trait viewer (CMTV) : an integrated bioinformatic tool to construct consensus maps and compare QTL and functional genomics data across genomes and experiments. *Plant Mol. Biol.* 56 : 465-480.
- Schlotterer, C. and D. Tautz. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20(2) : 211-215.
- Schnable, P. S., D. Ware, R. S. Fulton, J. C. Stein, F. Wei, S. Pasternak, C. Liang, J. Zhang, L. Fulton, T. A. Graves, P. Minx, A. D. Reily, L. Courtney, S. S. Kruchowski, C. Tomlinson, C. Strong, K. Delehaunty, C. Fronick, B. Courtney, S. M. Rock, E. Belter, F. Du, K. Kim, R. M. Abbott, M. Cotton, A. Levy, P. Marchetto, K. Ochoa, S. M. Jackson, B. Gillam, W. Chen, L. Yan, J. Higginbotham, M. Cardenas, J. Waligorski, E. Applebaum, L. Phelps, J. Falcone, K. Kanchi, T. Thane, A. Scimone, N. Thane, J. Henke, T. Wang, J. Ruppert, N. Shah, K. Rotter, J. Hodges, E. Ingenthron, M. Cordes, S. Kohlberg, J. Sgro, B. Delgado, K. Mead, A. Chinwalla, S. Leonard, K. Crouse, K. Collura, D. Kudrna, J. Currie, R. He, A. Angelova, S. Rajasekar, T. Mueller, R. Lomeli, G. Scara, A. Ko, K. Delaney, M. Wissotski, G. Lopez, D. Campos, M. Braidotti, E. Ashley, W. Golser, H. Kim, S. Lee, J. Lin, Z. Dujmic, W. Kim, J. Talag, A. Zuccolo, C. Fan, A. Sebastian, M. Kramer, L. Spiegel, L. Nascimento, T. Zutavern, B. Miller, C. Ambroise, S. Muller, W. Spooner, A. Narechania, L. Ren, S. Wei, S. Kumari, B. Faga, M. J. Levy, L. McMahan, P. V. Buren, M. W. Vaughn, K. Ying, C. Yeh, S. J. Emrich, Y. Jia, A. Kalyanaraman, A. Hsia, W. B. Barbazuk, R. S. Baucom, T. P. Brutnell, N. C. Carpita, C. Chaparro, J. Chia, J. Deragon, J. C. Estill, Y. Fu, J. A. Jeddelloh, Y. Han, H. Lee, P. Li, D. R. Lisch, S. Liu, Z. Liu, D. H. Nagel, M. C. McCann, P. SanMiguel, A. M. Myers, D. Nettleton, J. Nguyen, B. W. Penning, L. Ponnala, K. L. Schneider, D. C. Schwartz, A. Sharma, C. Soderlund, N. M. Springer, Q. Sun, H. Wang, M. Waterman, R. Westerman, T. K. Wolfgruber, L. Yang, Y. Yu, L. Zhang, S. Zhou, Q. Zhu, J. L. Bennetzen, R. K. Dawe, J. Jiang, N. Jiang, G. G. Presting, S. R. Wessler, S. Aluru, R. A. Martienssen, S. W. Clifton, W. R. McCombie, R. A. Wing, and R. K. Wilson. 2009. The B73 maize genome : complexity, diversity, and dynamics. *Science.* 326(5956) : 1112-1115.
- Seo, Y. W., R. A. Graybosch, C. J. Peterson, and D. R. Shelton. 1995. Assessment of Enzyme-Linked Immunoassay of Rye Secalins as a Tool in the Prediction of IRS Wheat Quality. *Cereal Chem.* 72(3) : 252-254.
- Singh, P., H. S. Rao, L. Dubey, P. Naik, and B. M. Prasanna. 2009. Graphical genotyping of genomic resources (QTL-NILs and RILs) and transcriptome profiling of maize genotypes in response to sorghum downy mildew (*Peronosclerospora sorghi*) in India. In : proceedings of 10th Asian regional maize workshop (October 20-23, 2008, Makassar, Indonesia). CIMMYT, Mexico DF. pp. 220-223.
- Spaniolas, S., S. T. May, M. J. Bennett, and G. A. Tucker. 2006. Authentication of coffee by means of PCR-RFLP analysis and lab-on-a-Chip capillary electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* 54 : 7466-7470.
- Stuber, C. W., M. D. Edwards, and J. F. Wendel. 1987. Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. factors influencing yield and its component traits. *Crop Sci.* 27(4) : 639-648
- Szalma, S. J., B. M. Hostert, J. R. LeDeaux, C. W. Stuber, and J. B. Holland. 2007. QTL mapping with near-isogenic lines in maize. *Theor. Appl. Genet.* 114 : 1211-1228.
- Tanksley, D., H. Medina-Filho, and C. M. Rick. 1981. The effect of isozyme selection on metric characters in an interspecific backcross of tomato-basis of an early screening procedure. *Theor. Appl. Genet.* 60 : 291-296.
- Tenaillon, M. I., M. C. Sawkins, A. D. Long, R. L. Gaut, J. F. Doebley, and B. S. Gaut. 2001. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays ssp. mays* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(16) : 9161-9166.
- Tian, F., M. N. M. Stevens, and E. S. Buckler IV. 2009. Tracking footprints of maize domestication and evidence for a massive selective sweep on chromosome 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106(1) : 9979-9986.
- Troyer, A. F. 1999. Background of U.S. hybrid corn. *Crop Sci.* 39(3) : 601-626.
- Tuberosa, R., M. C. Sanguineti, P. Landi, S. Salvi, E. and Casarini, S. Conti. 1998. RFLP mapping of quantitative trait loci controlling abscisic acid concentration in leaves of drought-stressed maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97 : 744-755.
- Tuberosa, R., M. C. Sanguineti, P. Landi, M. M. Giuliani, S. Salvi, and S. Conti. 2002a. Identification of QTLs for root characteristics in maize grown in hydroponics and analysis of their overlap with QTLs for grain yield in the field at two water regimes. *Plant Mol. Biol.* 48 : 697-712.
- Tuberosa, R., S. Salvi, M. C. Sanguineti, P. Landi, M. Maccaferri, and S. Conti. 2002b. Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield : case studies, shortcomings and perspectives in drought- stressed maize. *Ann. Bot.* 89 : 941-963.
- Tuberosa, R., S. Salvi, M. C. Sanguineti, M. Bellotti, S. conti, and P. Landi. 2007. Genome-wide approaches to investigate and improve maize response to drought. *Crop Sci.* 47(3) : 120-141.
- van den Broeck, D., T. Maes, M. Sauer, J. Zethof, P. D.

- Keukeleire, M. D'Hauw, M. V. Montagu, and T. Gerats. 1998. Transposon Display identifies individual transposable elements in high copy number of lines. *Plant J.* 13(1) : 121-129.
- Vargas, M., F. A. Eeuwijk, J. Crossa, and J. Ribaut. 2006. Mapping QTLs and QTL \times environment interaction for CIMMYT maize drought stress program using factorial regression and partial least squares methods. *Theor. Appl. Genet.* 112 : 1009-1023.
- Varshney, R. K., J-M. Ribaut, E. S. Buckler, R. Tuberosa, A. Rafalski, and P. Langridgem. 2012. Can genomics boost productivity of orphan crops? *Nat. Biotechnol.* 30 : 1172-1176.
- Visscher, P. M. 2008. Sizing up human height variation. *Nat. Genet.* 40(5) : 489-490.
- Vos P, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. V. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414
- Vroh Bi, I., M. D. McMullen, H. Sanchez-Villeda, S. Schroeder, J. Gardiner, M. Polacco, C. Soderlund, R. Wing, Z. Fang, and E. H. Coe, Jr. 2006. Single nucleotide polymorphisms and insertion-deletions for genetic markers and anchoring the maize fingerprint contig physical map. *Crop Sci.* 46 : 12-21.
- Wallace, J. G., S. J. Larsson, and E. S. Buckler. 2014. Entering the second century of maize quantitative genetics. *Heredity* 112 : 30-38
- Waugh, R., K. Mclean, A. J. Flavell, S. R. Pearce, A. Kumar, B. B. T. Thomas, and W. Powell. 1997. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms(S-SAP). *Mol. Gen. Genet.* 253 : 687-694.
- Welcker, C., B. Boussuge, C. Bencivenni, J. Ribaut, and F. Tardieu. 2007. Are source and sink strengths genetically linked in maize plants subjected to water deficit? A QTL study of the responses of leaf growth and of anthesis-silking interval to water deficit. *J. Exp. Bot.* 58(2) : 339-349.
- Welcker, C., W. Sadok, G. Dignat, M. Renault, S. Salvi, A. Charcosset, and F. Tardieu. 2011. A common genetic determinism for sensitivities to soil water deficit and evaporative demand : meta-analysis of quantitative trait loci and introgression lines of maize. *Plant Physiol.* 157 : 718-729.
- Wenzl, P., J. Carling, D. Kudrna, D. Jaccoud, E. Huttner, A. Kleinhofs, and A. Kilian. 2004. Diversity arrays technology (DART) for whole-genome profiling of barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(26) : 9915-9920.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22) : 6531.
- Wu, K., R. Jones, L. Danneberger, and P. A. Scolnik. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res.* 22(15) : 3257-3258.
- Xiao, Y. N., X. H. Li, M. L. George, M. S. Li, S. H. Zhang, and Y. L. Zheng. 2005. Quantitative trait locus analysis of drought tolerance and yield in maize in China. *Plant Mol. Biol. Rep.* 23 : 155-165.
- Xu, Y., D. J. Skinner, H. Wu, N. Palacios-Rojas, J. L. Araus, J. Yan, S. Gao, M. L. Warburton, and J. H. Crouch, 2009. Advances in maize genomics and their value for enhancing genetic gains from breeding. *Int. J. Plant Genomics.* 2009.
- Yan, J., T. Shah, M. L. Warburton, E. S. Buckler, M. D. McMullen, and J. Crouch. 2009. Genetic Characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers. *Plos One.* 4(12).
- Yan, J., X. Yang, T. Shah, H. Sanchez-Villeda, J. Li, M. Warburton, Y. Zhou, J. H. Crouch, and Y. Xu. 2010. High-throughput SNP genotyping with the goldengate assay in maize. *Mol. Breeding.* 25 : 441-451.
- Yang, X. I., J. Yan, T. Shah, M. L. Warburton, Q. Li, L. Li, Y. Gao, Y. Chai, Z. Fu, Y. Zhou, S. Xu, G. Bai, Y. Meng, Y. Zheng, and J. Li. 2010. Genetic analysis and characterization of a new maize association mapping panel for quantitative trait loci dissection. *Theor. Appl. Genet.* 121(3) : 417-431
- Yin, X., P. Stam, C. J. Dourleijn, and M. J. Kropff. 1999. AFLP mapping of quantitative trait loci for yield-determining physiological characters in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 99 : 244-253.
- Yu, J. and E. S. Buckler. 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opin. Botechnol.* 17 : 155-160.
- Yu, J. J. B. Holland, M. D. McMullen, and E. S. Buckler. 2008. Genetic design and statistical power of nested association mapping in maize. *Genetics.* 178 : 539-551.
- Zhao, W., P. Canaran, R. Jurkuta, T. Fulton, J. Glaubitz, E. Buckler, J. Doebley, B. Gaut, M. Goodman, J. Holland, S. Kresovich, M. McMullen, L. Stein, and D. Ware. 2006. Panzea : a database and resource for molecular and functional diversity in the maize genome. *Nucleic Acids Res.* 34(1) : D752-757.
- Zhu, C., M. Gore, E. S. Buckler, and J. Yu. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *Plant Genome.* 1 : 5-20.