

## 유전체 시대에 반수체 육종의 재발견

이슬기 · 김정선 · 강상호 · 손성한 · 원소윤

### Rediscovery of haploid breeding in the genomics era

Seulki Lee · Jung Sun Kim · Sang-Ho Kang · Seong-Han Sohn · So Youn Won

Received: 26 November 2015 / Revised: 12 January 2016 / Accepted: 12 January 2016  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Advances in DNA sequencing technologies have contributed to revolutionary understanding of many fundamental biological processes. With unprecedented cost-effective and high-throughput sequencing, a single laboratory can afford to *de novo* sequence the whole genome for species of interest. In addition, population genetic studies have been remarkably accelerated by numerous molecular markers identified from unbiased genome-wide sequences of population samples. As sequencing technologies have evolved very rapidly, acquiring appropriate individual plants or populations is a major bottleneck in plant research considering the complex nature of plant genome, such as heterozygosity, repetitiveness, and polyploidy. This challenge could be overcome by the old but effective method known as haploid induction. Haploid plants containing half of their sporophytic chromosomes can be rapidly generated mainly by culturing gametophytic cells such as ovules or pollens. Subsequent chromosome doubling in haploid plants can generate stable doubled haploid (DH) with perfect homozygosity. Here, classical methodology to generate and identify haploid plants or DH are summarized. In addition, haploid induction by epigenetic regulation of centromeric histone is explained. Furthermore, the utilization of haploid plant in the genomics era is discussed in the aspect of genome sequencing project and population genetic studies.

**Keywords** Next-generation sequencing, Inbred, Tissue culture, Genome, Population

### 서론

반수체(haploid)는 정상적인 개체가 갖는 염색체 수( $2n$ )의 절반, 즉 배우체의 핵형( $n$ )을 갖는 개체를 일컫는다. 반수체 식물은 모본보다 크기가 작고 활력이 낮으며 정상적인 감수분열이 불가능하여 세대의 진전이 불가능한 반면, 반수체가 자연적으로 혹은 인위적으로 염색체가 2배로 증가된 배가반수체(doubled haploid, DH)를 형성하면 상동염색체가 동형(homozygous)인 상태로 안정적으로 발달하고 세대를 진전한다. 이러한 반수체 육종은 5~7회의 반복적인 자가수분을 수행하는 것보다 단기간에 순계화를 가능하게 하여 육종에 걸리는 시간을 단축하고, 열성형질의 표현형도 즉시 확인할 수 있다는 장점이 있다. 1922년도에 독말풀(*Datura stramonium*)에서 반수체 식물이 최초로 발견된 이후(Blakeslee et al. 1922) 많은 식물종에서 반수체를 생산하려는 노력이 활발히 진행되어 반수체 육종은 중요한 육종기술로 여겨져 왔다.

반수체는 감수분열로 염색체의 수가 절반인 생식세포를 기반으로 생산되며, 부계의 옹핵 기원과 모계의 난핵 세포 기원으로 분류된다. 한편, 생성방법에 따라서 자연적 발생과 인위적 유도에 의한 발생으로 구분되며, 인위적 유도는 교배를 통한 생체내(*in vivo*) 유도와 조직배양을 통한 기내(*in vitro*) 유도로 더욱 구분된다. 자연계에서 반수체의 발생 빈도는 매우 드물어 몇몇 종에서만 반수체가 발견되고, 방사선 조사로 불임이 된 화분을 수분시키거나 중간교잡, 속간교잡을 수행할 경우 생체내에서 반수체의 발생빈도가 일부 증가하기도 한다. 그러나 독말풀의 약(anther)과 화분(pollen)을 배지에서 배양하거나(Guha and Maheshwari 1964; Guha and Maheshwari 1966), 보리의 수정되지 않은 자방(ovary)을 배양하여 반수체를 확보하면서(San Noeum 1976) 반수체 육종이 광범위한 식물에서 본격적으로 가능하게 되었다. 현재는 식물조직배양

S. Lee · J. S. Kim · S.-H. Kang · S.-H. Sohn · S. Y. Won (✉)  
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부 유전체과  
(Genomics Division, Department of Agricultural Biotechnology,  
National Academy of Agricultural Science, Rural Development  
Administration, Jeonju, 54578, Republic of Korea)  
e-mail: soyounwon@korea.kr

배지 및 기술 등의 발달로 다수의 종에서 배우체를 기내 배양하여 반수체를 생산하고 이를 기초 및 응용연구에 활용하고 있다.

차세대 염기서열 분석기술(next generation sequencing, NGS)이 도입되면서 반수체 혹은 DH 육종은 더욱 중요해졌다. 전세계적으로 주요 작물의 유전체가 경쟁적으로 해독되었으나 반복서열(repeat)이 많고, 염색체가 배수화되고 이형접합성(heterozygosity)을 보이는 식물은 구조유전체의 해독이 여전히 어려운 실정이어서 순계의 재료를 확보하는 것이 성공적인 계놈 프로젝트의 필수 요소이다. 한편, NGS를 활용하여 유전집단의 유전지도를 초고밀도로 작성하고 mapping을 빠르고 정확하게 수행할 수 있게 됨에 따라 이를 표현형 정보와 통합함으로써 형질과 연관된 유전자와 양적형질 유전자좌(quantitative trait locus, QTL)를 동정할 수 있게 되었다. 그러나 동형접합성(homozygous)의 재조합 자식 계통(recombinant inbred line, RIL)과 같은 유전집단의 확보가 성공적인 집단유전학의 관건이다. 이러한 배경에서 본 논문은 반수체 육성기술 및 판별법에 대하여 논하고, 최근에 보고된 동원체(centromere)의 히스톤 단백질(centromere-specific histone, CENH3)을 활용한 반수체 육성방법을 소개하고자 한다. 또한 반수체 육종으로 확보된 계통 및 집단이 NGS 기술에 접목되어 어떻게 활용될 수 있는지 서술하고자 한다.

## 본 론

### 웅핵기원의 반수체 육성

기내에서 웅성배우체를 자극하여 반수체를 육성하는 것은 가장 보편적인 방법으로 250종의 식물에서 보고되었다. 반수체를 유도하기 위하여 수술대의 끝에 위치한 약을 직접 배양하거나 약으로부터 소포자(microspore)나 화분을 분리하여 배지에 접종하여 배양한다. 약을 꽃에서 분리하여 소독한 후 배지에 접종하고 배양하여 반수체를 유도하는 방법은 소포자/화분 배양보다 기술적으로 용이하며, 다양한 종에서 적용이 가능하다. 그러나 약배양을 통하여 생성된 배양체는 약 내부에 있는 소포자와 화분 뿐만 아니라 약을 감싸고 있는 2배체의 약벽(anther wall) 세포에서도 생성될 수 있으므로 순수한 반수체를 확보하기가 어렵고 이를 반수체와 구분할 방법이 필요하다. 게다가 소포자, 화분 배양은 약벽 세포를 제거한 상태에서 반수체를 유도하기 때문에 약벽 세포의 영향을 배제한 상태로 배지 조성 및 배양 환경만 조절함으로써 반수체 유도할 수 있다는 장점이 있다.

반수체 육성은 생물학적 요인과 환경적 요인이 영향을 준다. 우선 생물학적 측면에서 약, 소포자, 화분을 제공하

는 식물의 종마다 성공률에 차이가 있어서 농업적으로 중요한 벼, 밀, 보리, 옥수수, 담배, 유채 등에서는 반수체를 기내배양으로 성공적으로 확보할 수 있으나, 식물 연구의 모델인 애기장대나 토마토에서는 어려운 것으로 알려져 있다. 같은 종 내에서도 배추, 유채, 밀, 고추 등은 품종간에도 차이가 있어서 이는 공시재료의 유전자형(genotype)이 배발생(embryogenesis)에 영향을 줘서 반수체 육성에 차이가 있는 것으로 여겨진다(Ferrie et al. 1995; Lu et al. 1991; Malik et al. 2008; Shrestha and Kang 2009). 한편, 약을 제공하는 식물체의 생육환경과 약을 분리하는 시기도 약배양의 효율에 영향을 준다. 겨울밀은 온실이나 생장상보다 포장에서 재배될 경우 캘러스 형성율이 높았으며, 고추는 광주기에는 영향을 받지 않으나 26.4°C에서 재배된 어린 식물에서 채취된 약을 이용할 경우 약배양 효율이 가장 높았다(Kristiansen and Andersen 1993; Lu et al. 1991). 또한 카라는 봄이나 가을보다는 겨울에 재배된 식물에서 약배양 효율이 17~25배 이상 높았다(Zhang et al. 2011). 배발생능은 일반적으로 어린 화분, 즉 후기의 소포자(late microspore)가 높고, 이는 화분의 첫 번째 유사분열기가 배발생 유도에 적기임을 암시한다(Seguí-Simarro 2010). 그러나 배발생 유도에 최적인 시기가 매우 짧아서 이를 정확히 규명하기가 어렵고, 일부는 좀더 늦은 시기인 bicellular pollen에서도 배가 발생된다(Seguí-Simarro 2010). 실제로 소포자의 발달 단계를 육안으로는 구분하기 어렵기 때문에 꽃봉오리의 크기에 따라 소포자 발달 상태를 규명한 후에 최적의 꽃봉오리에서만 시료를 확보하거나 다양한 크기의 꽃봉오리로부터 시료를 채취하여 반수체를 육성한다.

반수체를 성공적으로 유도하기 위하여 환경적 요인도 중요하다. 특히 기내배양에 최적인 배지의 조성이 각각의 식물종마다 규명되어 배지의 종류(A2, Gamborg's B5, MS, NLN, N6, W-14 등) 및 호르몬(BA, IAA, Kinetin, NAA 2,4-D) 처리 여부, 당(sucrose, maltose)의 종류 및 함량 등이 보고되었다(Kim et al. 2004; Park et al. 1990; Ryu et al. 1992). 배지에 접종된 약, 소포자, 화분의 배양환경은 보통 25~30°C의 온도가 적온이나 카라의 경우 배양 초기에 2일간 32°C에서 배양한 후에 적온에서 배양하면 반수체 형성율이 향상되었다(Zhang et al. 2011). 배발생에 효과적인 발달단계에 있는 소포자를 최적의 배지 및 환경에서 배양하더라도 배우체의 발달을 억제함과 동시에 배아발생을 촉진하기 위하여 일종의 스트레스를 처리할 필요가 있다. 꽃눈(flower bud), 꽃차례(inflorescence), 약 등에 가해지는 전처리는 고온(배추속 식물, 담배, 밀), 저온(보리, 밀, 옥수수, 벼 등) 등의 온도처리와 당이 첨가되지 않은 배지(sucrose starvation medium)에서의 스트레스가 일반적이거나 그 방법이 식물종마다 현저하게 다르다. 소포자 배양시 독성물질이 방출되어 배의 발생을 억제하기

때문에 주기적으로 배지를 교체해주거나 독성물질을 제거하기 위하여 activated charcoal을 넣기도 한다(Thomas 2008).

옹핵 기원의 반수체는 기내배양으로 육성하는 것이 가장 보편적이지만, 일부 식물종에서는 생체내에서 반수체가 유도되는 옹성발생 혹은 동정생식(androgenesis)이 발생한다. 이는 수정이 된 이후 난핵이 불활성화로 제거되어 옹핵의 유전물질만 존재한 상태에서 발육하여 배를 형성하기 때문에 핵은 부계인 반면 세포질은 모계인 상태로 유전되는 특성이 있다(McKone and Halpern 2003). 이러한 반수체는 소수의 종에서만 매우 드물게 관찰되어 기내배양을 통한 반수체 육성보다는 활용빈도가 현저히 낮다. 다만 옥수수의 경우 indeterminate gametophyte1 (ig1) 유전자에 돌연변이가 발생하면 옹성발생 빈도가 높은 것으로 오래 전부터 보고되어 ig1을 내재한 W23 계통이 옥수수 육종에 활용되어 왔다(Segui-Simarro 2010).

#### 난세포 기원의 반수체 육성

옹성불임이거나 옹성배우체가 기내배양이 되지 않을 경우 수정되지 않은 난세포를 자극하여 배로 발생시켜 기내배양을 함으로써 반수체를 육성할 수 있다. 이러한 방법은 양파(*Allium cepa*), 사탕무(*Beta vulgaris*), 수수(*Pennisetum glaucum*), 코코넛(*Cocos nucifera*), 샤프란(*Crocus sativus*) 등의 몇몇 종에서만 가능하고 배로 발생하는 비율이 낮기 때문에 약배양을 통한 반수체 육성이 더 선호되는 방법이다. 기내배양을 위한 재료로 꽃눈, 배주, 자방 등이 이용된다. 배지는 식물에 따라 MS, Gamborg's B5, Heller's medium, N6 basal 배지 등이 사용되며, 배양 초기에는 일부 작물은 호르몬이 없어도 반수체가 유도되지만 대부분의 경우 성장호르몬이 배 발생의 중요한 요소로서 다양한 농도의 BAP, BA, 2,4-D, NAA, IAA 등이 사용되고 있다(Han et al. 1997; Zhang et al. 2011). 일반적으로 식물의 생육 적온을 벗어나지 않는 온도와 적절한 광, 일부 암처리에서 배 발생을 유도한 후 최적의 생육 배지에 옮겨 식물체를 유도한다. 극히 낮은 빈도로 난세포 이외의 조세포(synergid)나 반축세포(antipodal cell)가 배를 형성하는 무배생식(apogamy)이 나타날 수 있다.

난세포 기원의 반수체 육성은 종간교배(interspecific cross), 속간교배(intergeneric cross), wide cross로 불화합인 개체간에 교배를 하여 부계의 유전적 바탕은 제외되고 모계에서 유래된 염색체만 보존한 상태로 발달시키기도 한다. 이 방법은 보리에서 최초로 시도되어 *Hordeum vulgare*를 모계로 *H. bulbosum*을 부계로 이용하여 교배를 하면 초기에는 잡종의 배가 형성되지만 나중에는 부계의 염색체가 소실되고 배젖이 형성되다 발달이 중단된다. 그러나 배의 퇴화를 막기 위하여 기내로 옮겨 배양하면 최종적으로 *H. vulgare*의 난세포에서 반수체를 얻을 수 있다(Kasha

and Kao 1970). 또한 옥수수의 화분으로 밀을 포함한 여러 곡물을 수분시켜 모계 유래의 반수체가 성공적으로 만들어져 좀더 광범위하게 활용되기도 한다(Wędzony et al. 2009). 배 발달을 자극한 상태에서 배주를 배양하는 이러한 방법은 약배양이나 배주배양으로 반수체를 확보하기 어려운 식물에서 시도해 볼 수 있다.

화분을 X-ray나 화학적 처리로 불활성화한 후 수분을 하여 반수체를 육성하는 위수정 방법은 매우 오래된 기술이다. 불임인 정세포는 난세포와 융합하여 배를 형성할 수는 없으나 염색체가 반수인 상태로 난세포가 발달할 수 있도록 자극하여 모계 유래의 배를 형성하고 반수체를 육성할 수 있도록 한다. 위의 교배에 의한 반수체 생산과 유사하게 배젖의 성장이 위축되고 배의 퇴화가 발생하므로 기내로 옮겨 배양함으로써 배 발생률을 향상시킬 수 있다. 이러한 방법으로 사과, 카네이션, 오이, 키위 등에서 반수체를 생산할 수 있었으며, 4배체인 딸기를 2배체로 만들 수 있었다(Murovec and Bohanec 2011).

#### 동원체 히스톤의 후성적 조절에 의한 반수체 유도

동원체는 염색체의 구조를 유지하고, 세포분열기에 방추미세관(spindle microtubule)이 붙어서 염색체를 딸세포에 정확히 전달함으로써 세포분열을 매개하는 중요한 염색체의 영역이다. 염색체의 DNA는 히스톤 단백질 복합체를 감싸면서 nucleosome을 형성하고 고차원의 구조를 형성하여 핵속에 안정적으로 위치하는데, 동원체 영역에는 일반적인 히스톤 H3 대신에 특이적으로 CENH3가 위치하여 후성적 조절을 받고 있다. 흥미롭게도 동원체의 CENH3가 돌연변이된 애기장대를 정상적인 야생형의 애기장대와 교배한 F<sub>1</sub> 세대에서 돌연변이형 CENH3를 갖고 있는 염색체는 제거되고 야생형의 염색체만 유지되어 반수체를 형성하였다(Ravi and Chan 2010). CENH3의 다형성이 높은 N-terminal tail을 H3로 교체하고 green florescence protein(GFP)으로 표지된 GFP-tailswap을 발현하는 애기장대 계통이 교배를 통하여 3종의 야생형을 반수체로 바꾸었는데, 이는 유사분열방추(mitotic spindle)가 F<sub>1</sub> 세대에서 상동염색체의 동원체에 불균형적으로 작용하여 돌연변이형 CENH3에 의해 후성적 조절을 받는 염색체는 제거되고 정상적인 CENH3로 표지된 염색체만 보존되었기 때문인 것으로 예측된다(Ravi and Chan 2010).

전통적으로 수행되었던 교배 및 배우체 기내배양에 의한 반수체 육성은 유전적 요인과 환경적 요인에 영향을 받는다. 그러나 GFP-tailswap과 같은 반수체 유도계통이 주요 식물종마다 구축되면 조직배양과 계통 특이성이 없이 교배를 통하여 다양한 종에서 반수체를 확보할 수 있다. 애기장대는 배우체 기내배양을 통한 반수체 제작이 어려운 대표적인 식물종으로 동형접합성을 보이는 유전

집단을 구축하기 위하여 반복적인 자가수분을 수행해야만 한다. 애기장대의 RIL 집단을 구축하기 위하여 24개월간 자가수분을 8번 수행한 F<sub>8</sub> 세대의 집단에서는 99.8%의 동형접합성을 보였으나, GFP-tailswap 반수체 유도계통을 활용할 경우 9개월이 소요되며 100%의 동형접합성을 나타내었다(Seymour et al. 2012). 게다가 F<sub>1</sub> 세대 대신에 그 후대의 계통을 반수체 유도계통과 교배하여 유전 집단을 작성할 경우 반복된 감수분열로 유전자재조합이 더욱 빈번하게 발생하여 해상도가 높은 유전지도 제작이 가능하다(Seymour et al. 2012).

CENH3의 후성적 조절에 의한 반수체 유도는 애기장대뿐만 아니라 다른 종으로 확대될 수 있다. 동원체에 위치한 DNA의 염기서열과 히스톤 단백질의 서열은 종간에 변이가 매우 큼에도 불구하고(Niizeki and Oono 1968), 배추(*Brassica rapa*)와 *Lepidium oleraceum*의 CENH3 유전자가 애기장대 *cenh3-1*을 회복시켰다(Maheshwari et al. 2015). 이는 CENH3의 단백질 서열이 높은 다형성을 보이더라도 그 기능이 진화적으로 잘 보존되어 있다는 것을 의미한다. 따라서 유전자 침묵 혹은 CRISPR/Cas와 같은 유전자 편집 기술을 활용하여 내재적인 CENH3의 발현을 저해하거나 불활성화하는 대신에 식물조직배양과 생명공학기술을 활용하여 GFP-tailswap과 같은 돌연변이형 CENH3를 발현하는 반수체 유도계통을 주요 식물종마다 구축하여 반수체 육종을 용이하게 할 수 있을 것이다. 이를 위하여 CENH3 염기서열 정보가 67개의 식물종에서 이미 보고되었고(Maheshwari et al. 2015), 유전체 정보의 누적으로 CENH3의 염기서열 정보를 추가로 확보할 수 있다.

### 반수체의 검정 및 배수화

기내배양 및 교배 등을 통하여 확보된 반수체의 염색체 개수를 검정하기 위한 가장 정확한 방법은 현미경을 이용하여 염색체의 크기, 모양, 개수 등을 직접 관찰하는 핵형분석(karyotyping)이다. 이는 가장 오래된 방법으로 염색체의 수적, 구조적 이상도 확인할 수 있는 강력한 방법이나 염색체 검정을 위한 현미경과 기술이 필요하고, 관찰을 위한 전처리가 복잡하여 분석 시간이 길고 많은 시료를 동시에 검정할 수 없다. 그러나 배수성 판별기(flow cytometry)를 이용하여 반수체와 정상 식물체간의 DNA 함량 차이를 그래프 상에서 피크의 위치를 비교하여 측정함으로써 단시간에 많은 양의 재료를 확인할 수 있다. 다만 분석 기체가 별도로 요구되며 식물에 따라 실험조건을 조절해야 하므로 기술이 필요하다. 한편, 식물체의 형태적, 해부학적 특성을 관찰함으로써 반수성을 간접적으로 검정할 수 있다. 반수체인 아프리카 제비꽃(*Saintpaulia ionantha*)은 정상적인 개체보다 느리게 자라고 크기가 작았으며(Smith et al. 1981), 반수체 유체는 기

공의 크기가 줄어든 대신 밀도가 증가하였으며 화분의 크기가 감소하였다(Mohammadi et al. 2012). 또한 반수체인 고추는 공변세포내의 엽록체의 개수가 이배체 고추보다 감소하였다(Qin and Rotino 1995). 그러나 식물체의 표현형은 발달 단계와 생육환경에 따라 변이의 폭이 크므로 핵형분석이나 배수성 판별기에 의한 분석보다는 정확도가 떨어진다.

기내배양으로 확보된 반수체의 일부는 자연적으로 배수화되어 염색체가 동형접합인 배가반수체를 형성하기 때문에 배가반수체와 체세포에서 유래된 이형접합체를 판별할 필요가 있다. 이는 DNA 염기서열의 다형성(polymorphism)을 기반으로 한 분자마커를 이용하여 분석되며, 대표적으로 AFLP (Zhang et al. 2011), SSR (Diao et al. 2009; Murovec and Bohanec 2013; Tang et al. 2006; Wang et al. 2014), RAPD (Pathirana et al. 2011) 등이 활용되었다. 한편, 활용할 수 있는 분자마커가 없는 종은 과거에 TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) 기술에서 활용되었던 방식으로 배가반수체를 검정할 수 있다(Hofinger et al. 2013). 다형성 영역을 PCR로 증폭한 후 변성(denaturation)과 재생(renaturation)을 하면 이형접합체는 다형성 영역에서 mismatch가 단가닥의 bubble을 형성한 반면, 배가반수체는 bubble이 형성되지 않는다(Hofinger et al. 2013). 이러한 차이점에 착안하여 단가닥특이 핵산분해효소(single-strand-specific nuclease)를 처리하면 이형접합체는 PCR 산물보다 크기가 작은 DNA를 전기영동으로 확인할 수 있으나, 배가반수체의 경우 PCR 산물 단일밴드만 확인되어 이형접합체와 배가반수체를 구분할 수 있다(Hofinger et al. 2013). 실제로 2개의 보리 품종을 교배하여 얻은 F<sub>1</sub> 세대에서 약배양으로 배가반수체를 확보하고 동형접합성을 검정한 결과 TILLING 방법이 SSR 마커를 활용한 방법보다 효과적이었다(Hofinger et al. 2013). 최근에는 NGS 기술로 여러 식물종의 염기서열 정보가 확보되어 이를 기반으로 PCR primer를 설계할 수 있으며, 염기서열 정보가 없더라도 진화적으로 여러 식물에서 보존된 유전자 영역의 염기서열이나 근연종의 염기서열을 활용하여 primer를 설계할 수 있으므로 TILLING 기반의 동형접합성 검정은 활용범위가 높다.

자연적으로 배수화가 일어나지 않은 반수체는 활력이 떨어지고 감수분열이 불가능하여 다음 세대로 진전이 불가능하므로 배수화가 필수적이다. 가장 빈번하게 활용되는 방법으로는 튜블린(tubulin) 단백질에 결합하여 미세소관(microtubule)의 형성을 억제함으로써 세포분열시 염색체의 분리를 방해하는 미세소관 형성 억제제, 콜히친을 처리하는 것이다. 또는 제초제로 사용되는 oryzalin, amiprophosmethyl (APM), trifluralin, pronamide를 처리하여 배수화를 유도한다. 이러한 화학적 방법의 배수화는 식물종마다 처리하는 화합물의 종류, 농도, 기간 등이 다르며 반수체의 발

달단계 또한 차이가 있다.

식물 유전체 해독에 반수체/배가반수체 활용

식물의 염색체는 배수화가 되고 반복염기서열이 많아 그 크기가 거대하고 상동염색체간에 이형접합성이 높아 유전체의 염기서열을 해독하기가 어렵다. 따라서 자가수분

을 반복하여 동형접합성이 높은 근교계(inbred lines)를 대상으로 유전체가 해독되는 사례가 많아, 현재까지 유전체 염기서열이 발표된 60종 이상의 식물 중 절반이 근교계를 이용하여 유전체가 밝혀졌다(Table 1). 파파야(*Carica papaya*) (Ming et al. 2008)는 25회 이상, 오이(*Cucumis sativus*) (Huang et al. 2009)는 20회, 포도(*Vitis vinifera*) (Jaillon et al. 2007)는 9회의 자가수분을 통하여 확보된 근교계를 대

**Table 1** Plant genomes that have been sequenced using doubled haploid or inbred plants

	Scientific name	Common name	Plant material used for genome sequencing	Genome size (Mb)	Repeat (%)	Gene (#)	Sequencer
1	<i>Malus x domestica</i>	apple	The doubled haploid of the 'Golden Delicious' cultivar	742	67	57,386	Sa,4
2	<i>Solanum tuberosum</i>	potato	The doubled haploid	844	62	39,031	Sa,4,I
3	<i>Cucumis melo</i>	melon	The doubled haploid(DHL92)	450	20	27,427	Sa,4,I
4	<i>Musa acuminata</i>	banana	The doubled haploid(DH-Pahang)	523	44	36,542	Sa,4,I
5	<i>Prunus persica</i>	peach	The doubled haploid of cv. Lovell	265	37	27,852	Sa
6	<i>Coffea canephora</i>	coffee	The doubled haploid(DH 200-94) from the clone IF200	710	50	25,574	Sa,4,I
7	<i>Beta vulgaris</i>	sugar beet	The doubled haploid(KWS2320)	731	42	27,421	Sa,4,I
8	<i>Vitis vinifera</i>	grape	The inbred cultivar(PN40024) from 9 generations of selfing of Pinot Noir	475	41	30,434	Sa
9	<i>Carica papaya</i>	papaya	The inbred cultivar(SunUp) from more than 25 generations of selfing	372	43	28,629	Sa
10	<i>Cucumis sativus</i>	cucumber	The inbred line(Chinese long)	350	24	26,682	Sa,I
11	<i>Brachypodium distachyon</i>	brachypodium	The inbred cultivar(Bd21) from 8 generations of selfing	272	28	25,532	Sa
12	<i>Ricinus communis</i>	castor bean	The inbred cultivar(Hale, NSL 4773)	320	50	31,237	Sa
13	<i>Theobroma cacao</i>	cocoa	The inbred cultivar(B97-61/B2)	430	24	28,798	Sa,4,I
14	<i>Fragaria vesca</i>	strawberry	The inbred cultivar(H4X4) from 4 generations of selfing	240	23	34,809	4,S,I
15	<i>Arabidopsis lyrata</i>	lyrata	The inbred cultivar(MN47) from 5 generations of selfing	207	30	32,670	Sa
16	<i>Thellungiella parvula</i>	thellungiella	The inbred cultivar from 8 generations of selfing	160	8	30,419	4,I
17	<i>Cucumis sativus</i>	cucumber	The inbred cultivar(line B10) from 20 generations of selfing	367	NA	26,587	Sa,4
18	<i>Cajanus cajan</i>	pigeon pea	The inbred line(ICPL 87119, popularly known as Asha)	833	52	48,680	Sa,I
19	<i>Setaria italica</i>	foxtail millet	The inbred cultivar(Yugu1)	510	40	35,471	Sa
20	<i>Solanum lycopersicum</i>	tomato	The inbred line(Heinz 1706)	900	63	34,727	Sa,4,I,S
21	<i>Linum usitatissimum</i>	flax	The inbred line from 19 generations of selfing of the original cross between NorMan and genotype FP857	373	24	43,484	I
22	<i>Gossypium raimondii</i>	cotton D	The inbred line(D5-3) from 6 generations of selfing	880	57	40,976	I
23	<i>Citrullus lanatus</i>	watermelon	The inbred line(cultivar 97103)	425	45	23,440	I
24	<i>Triticum aestivum</i>	wheat	The inbred line(Chinese Spring, CS42) from 8 generations of selfing	17,000	80	94,000	4,S,I
25	<i>Cicer arietinum</i>	chickpea	The inbred line	738	49	28,269	I
26	<i>Picea abies</i>	norway spruce	Haploid megagametophyte for fosmid pools, diploid leaf for shotgun data	19,600	70	28,354	I
27	<i>Eucalyptus grandis</i>	eucalypt	The line(BRASUZ1) from one generation of selfing	640	50	36,376	Sa
28	<i>Nicotiana tabacum</i>	tobacco	The inbred line	4,410	79	NA	I
29	<i>Phalaenopsis equestris</i>	orchid	The inbred line	1,160	62	29,431	I

Abbreviations: NA (not available), Sa (Sanger), 4 (Roche/454), S (SOLiD), I (Illumina)

으로 유전체 염기서열이 규명되었다. 그러나 자가수분을 반복하여도 실제로 배가반수체와 동일한 동형접합성을 달성하기는 불가능하다. 자가수분을 9회 수행하여 확보된 포도의 근교계는 SSR 마커로 검정된 102개의 유전자 영역 중 7개의 영역은 여전히 이형접합성을 보였다(Jaillon et al. 2007). 근교계 대신에 배가반수체를 활용하여서 유전체가 해독된 식물종으로는 사과(*Malus × demestica*) (Velasco et al. 2010), 감자(*Solanum tuberosum*) (Consortium 2011), 멜론(*Cucumis melo*) (Garcia-Mas et al. 2012), 바나나(*Musa acuminata*) (D’Hont et al. 2012), 복숭아(*Prunus persica*) (Verde et al. 2013), 커피(*Coffea canephora*) (Denoëud et al. 2014), 사탕무(*Beta vulgaris*) (Dohm et al. 2014)가 있다. 한편, 독일가문비나무(*Picea abies*)는 반수체를 이용하는 대신 염색체가 반수인 대배우체(megagametophyte)와 2배체인 앞에서 DNA를 분리하여 염기서열을 각각 분석하고 통합함으로써 20Gb의 거대유전체가 해독되었다(Nystedt et al. 2013).

유전체가 발표된 대부분의 식물종은 농업적으로 중요한 식량, 원예작물 등으로 계놈 프로젝트가 착수되기 이전에 이미 유전육종의 기초 연구가 오랫동안 수행되었다. 따라서 최소한 4세대 이상 자가수분을 수행하여 근교계를 확보하고 유전분리집단 및 유전지도가 구축된 상태였으며 국제컨소시엄에서 유전체 염기서열이 해독되었다. 그러나 최근에 NGS 기술이 도입됨에 따라 유전체를 단일 실험실 수준에서도 분석할 수 있고, 유전체가 기초 연구 및 응용에 중요해짐에 따라 순계가 아닌 시료를 이용하여 계놈 프로젝트가 진행되고 있다. 특히 약용작물이나 환경스트레스 저항성인 자생식물을 수집하고 이들의 유전체를 해독하여 종특이적인 기작을 조절하는 유전자군을 발굴하는 연구가 보고되기 시작했다(Upadhyay et al. 2015; Xiao et al. 2015; Zeng et al. 2015). 그러나 염기서열 분석 장비와 프로그램이 발달하더라도 복잡하고 거대한 식물 유전체를 순계화가 되지 않은 상태에서 완성하기가 여전히 어려운 실정이다. 따라서 이러한 야생수집종의 경우 다년간의 교배로 근교계를 확보하는 대신에 조직배양을 통하여 빠른 시간에 반수체/배가반수체를 육성하여 유전체 해독에 활용하는 것을 고려할 필요가 있다. 실제로 어류인 복어(*Takifugu rubripes*)를 비순계와 DH계통으로 유전체를 해독하여 비교한 결과 DH계통에서 유전체 조립완성도가 2.6~5.4배 향상되었다(Zhang et al. 2014).

반수체 기술을 활용한 식물 유전집단 구축

식물 유전연구 및 육종프로그램은 유전자원의 유용한 형질을 엘리트 품종에 빠르고 정확하게 도입하는 것을 목표로 한다. 이를 위하여 형질이 고정된 두 순계로 F<sub>2</sub> 혹은 RIL 집단을 구축한 후 genotyping과 phenotyping을 수행

하여 형질을 조절하는 유전적변위(genetic variants) 혹은 좌위(locus)를 linkage, association, 혹은 QTL mapping 등으로 밝혀왔다. 그러나 F<sub>2</sub> 집단은 이형접합성이 높아서 후대에서 표현형이 분리되어 반복실험이 어렵고 열성유전자는 찾기 어려운 반면, RIL 집단은 불변집단이나 여러 세대의 single seed descent가 필요하여 육성기간이 길다. 두 집단의 절충안으로 DH 집단을 구축하는 방법이 있으며 이는 모본, 부본을 교배한 F<sub>1</sub> 세대를 대상으로 약배양 및 소포자배양을 수행함으로써 동형접합성의 불변집단을 단기간에 구축하여 표현형을 반복검정하고 열성형질도 관찰할 수 있다. 이러한 F<sub>2</sub>, RIL, DH 집단을 활용한 유전연구는 두 순계의 유전적 다형성을 기반으로 작성된 유전연관지도(genetic linkage map)를 이용하기 때문에 주요 작물에서만 가능하였다. 그러나 최근에는 NGS 기술이 보편화되면서 다양한 종의 유전체가 해독되고 restriction-site associated DNA sequencing (RAD-seq), genotyping-by-sequencing (GBS)과 유사한 기술을 활용하여 유전집단을 전계놈 수준으로 빠르게 mapping할 수 있게 되어 유전연구 및 분자육종이 광범위한 식물에서 기술적으로 가능하게 되었다. 따라서 위와 같은 유전연구와 육종프로그램을 수행하기 위하여 고정된 계통과 집단은 필수적이며 이를 빠르게 구축하기 위하여 배가반수체 기술은 더욱 중요하다.

두 개의 순계로 구축된 유전집단의 경우 검정할 수 있는 형질의 범위가 두 계통에 한정되고, F<sub>1</sub>에서 확보된 DH 집단은 1회의 감수분열만 있었기 때문에 유전자 재조합(genetic recombination)의 빈도가 낮아 QTL 혹은 linkage mapping에 더 큰 집단과 높은 해상도의 유전지도가 필요하다. 이를 보완하기 위하여 2개의 순계로 분리집단(biparental population)을 구축하는 대신에 유전적 다양성이 큰 8개의

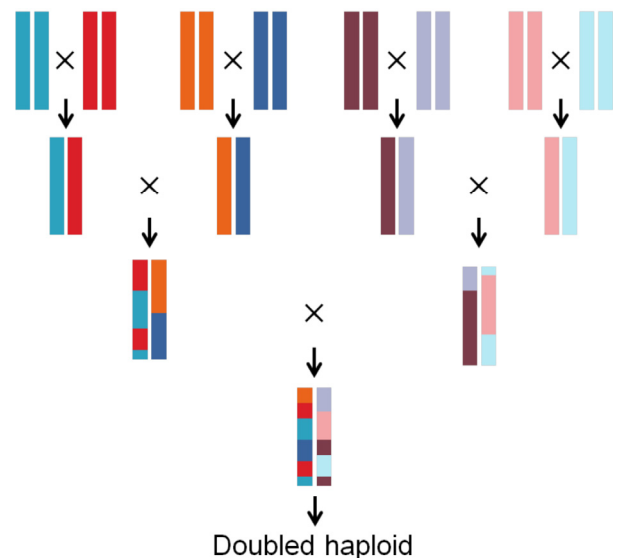


Fig. 1 Generation of multiparent advanced generation inter-cross (MAGIC) population

순계를 순차적으로 상호교배하여 염색체를 통합한 후 반수체 배양으로 순계화함으로써 유전적 혹은 표현형의 다양성이 높고 재조합이 더욱 빈번하게 발생한 MAGIC (multiparent advanced generation inter-cross) 집단을 구축할 수 있다(Fig. 1) (Huang et al. 2015). 대표적으로 애기장대 (Kover et al. 2009), 밀(Huang et al. 2012; Mackay et al. 2014), 벼(Bandillo et al. 2013), 보리(Sannemann et al. 2015), 토마토 (Pascual et al. 2015) 등에서 수행되었다. NGS를 활용하여 MAGIC 집단 전체를 전체놈 수준에서 mapping이 가능해짐에 따라 식물 유전연구를 더욱 가속화할 수 있을 것이다.

## 결론

NGS 기술이 보편화되면서 식물의 유전체, 유전학 연구에 큰 변화가 있었다. 기존에 식물 유전체의 해독은 농업적으로 중요한 작물에서 주로 수행되어 다수의 식량, 원예작물의 유전체가 해독되었으나, 2015년부터 극한의 환경에서 수집된 비순계인 식물의 유전체가 해독되어 보고되고 있다. 한편, NGS를 활용하여 염색체 전체에 대하여 genotyping을 수행할 수 있음에 따라 이론적으로만 가능했던 집단유전학 연구가 실현되고 분자유종을 위한 기반으로 활용할 수 있게 되었다. 그러나 저비용에 염기서열 데이터를 대량생산하고 다양한 분석프로그램이 개발되어 기술적 한계가 극복되어도 표현형이 고정된 순계와 계획적으로 구축된 집단의 필요성은 더욱 증대하고 있다. 이러한 배경에서 다양한 육종 소재를 단기간에 구축하기 위한 전략으로 이미 식물 육종프로그램에서 큰 역할을 수행한 반수체 육종은 더욱 중요해졌다. 본 논문은 식물의 반수체 육성 방법에 대하여 개괄적으로 논의하였으며 특히 동원체의 후성학적 조절에 의한 반수체 육종에 대하여 소개하였고 반수체 육성기술이 NGS와 함께 어떻게 활용될 수 있는지 서술하였다. 향후 반수체 육종과 NGS 기술을 접목함으로써 식물 기초연구 및 분자유종은 더욱 가속화할 것으로 기대된다.

## 적요

DNA 염기서열 분석기술의 진보는 많은 근본적인 생명현상을 이해하는데 기여해왔다. 유례없는 저비용에 염기서열을 대량으로 분석을 할 수 있게 되어 단일 규모의 실험실에서도 관심이 있는 종의 신규유전체를 해독할 수 있다. 게다가 유전집단의 전체 염기서열을 편향되지 않은 채 분석하여 무수한 분자마커를 발굴할 수 있게 됨에 따라 집단유전학 연구도 두드러지게 가속화되어 왔다. 그러나 식물의 유전체가 이형접합성, 반복염기서열, 배수

성과 같은 복잡한 특성이 있다는 것을 고려해 볼 때 기술이 매우 빠르게 진화함에 따라 적절한 개체 혹은 집단을 확보하는 것이 식물 연구에서 주요한 문제가 되었다. 이러한 난제는 오래되었지만 매우 효율적인 기술인 반수체 육성을 통하여 극복될 수 있을 것이다. 정상적인 개체가 갖는 염색체의 절반을 보유하는 반수체 식물은 주로 자방이나 화분과 같은 배우체 세포를 배양함으로써 빠르게 구축될 수 있다. 뒤이은 반수체 식물의 염색체 배수화는 완벽한 동형접합성을 보이는 안정된 배가반수체를 만든다. 본 논문에서는 반수체 식물을 육성하고 판별하기 위한 고전적인 방법론을 요약할 것이다. 게다가 동원체의 히스톤을 후성적으로 조절함으로써 반수체를 유도하는 방법을 설명할 것이다. 마지막으로, 유전체 시대에 반수체 식물의 활용 방안을 유전체 해독과 집단 유전학의 측면에서 논의할 것이다.

## 사사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(PJ01035802)의 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

- Bandillo N, Raghavan C, Muyco PA, Sevilla MAL, Lobina IT, Dilla-Ermita CJ, Tung C-W, McCouch S, Thomson M, Mauleon R (2013) Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: progress and potential for genetics research and breeding. *Rice* 6:11
- Blakeslee AF, Belling J, Farnham ME, Bergner AD (1922) A haploid mutant in the jimson weed, "*Datura Stramonium*". *Science* 55:646-647
- Consortium PGS (2011) Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475:189-195
- D'Hont A, Denoeud F, Aury J-M, Baurens F-C, Carreel F, Garsmeur O, Noel B, Bocs S, Droc G, Rouard M (2012) The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature* 488:213-217
- Denoeud F, Carretero-Paulet L, Dereeper A, Droc G, Guyot R, Pietrella M, Zheng C, Alberti A, Anthony F, Aprea G (2014) The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science* 345:1181-1184
- Diao W-P, Jia Y-Y, Song H, Zhang X-Q, Lou Q-F, Chen J-F (2009) Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. *Scientia horticulturae* 119:246-251
- Dohm JC, Minoche AE, Holtgrawe D, Capella-Gutierrez S, Zakrzewski F, Tafer H, Rupp O, Sorensen TR, Stracke R, Reinhardt R, Goesmann A, Kraft T, Schulz B, Stadler PF, Schmidt T, Gabaldon T, Lehrach H, Weisshaar B, Himmelbauer

- H (2014) The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). *Nature* 505:546–549
- Ferrie AMR, Epp DJ, Keller WA (1995) Evaluation of *Brassica rapa* L. genotypes for microspore culture response and identification of a highly embryogenic line. *Plant Cell Reports* 14:580–584
- Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, González VM, Hénaff E, Câmara F, Cozzuto L, Lowy E (2012) The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:11872–11877
- Guha S, Maheshwari SC (1964) In vitro production of embryos from anthers of datura. *Nature* 204:497–497
- Guha S, Maheshwari SC (1966) Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of datura in vitro. *Nature* 212:97–98
- Han D-S, Niimi Y, Nakano M (1997) Regeneration of haploid plants from anther cultures of the Asiatic hybrid lily ‘Connecticut King’. *Plant cell, tissue and organ culture* 47:153–158
- Hofinger BJ, Huynh OA, Jankowicz-Cieslak J, Müller A, Otto I, Kumlehn J, Till BJ (2013) Validation of doubled haploid plants by enzymatic mismatch cleavage. *Plant methods* 9:43
- Huang BE, George AW, Forrest KL, Kilian A, Hayden MJ, Morell MK, Cavanagh CR (2012) A multiparent advanced generation inter-cross population for genetic analysis in wheat. *Plant biotechnology journal* 10:826–839
- Huang BE, Verbyla K, Verbyla A, Raghavan C, Singh V, Gaur P, Leung H, Varshney R, Cavanagh C (2015) MAGIC populations in crops: current status and future prospects. *Theor Appl Genet* 128:999–1017
- Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X, Fan W, Lucas WJ, Wang X, Xie B, Ni P (2009) The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature genetics* 41:1275–1281
- Jaillon O, Aury J-M, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:463–467
- Kasha K, Kao K (1970) High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 225:874–876
- Kim K-M, Nam W-I, Kwon Y-S, Sohn J-K (2004) Development of doubled-haploid population and construction of genetic map using SSR markers in rice. *Korean J Plant Biotechnol* 31:179–184
- Kover PX, Valdar W, Trakalo J, Scarcelli N, Ehrenreich IM, Purugganan MD, Durrant C, Mott R (2009) A multiparent advanced generation inter-cross to fine-map quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 5:e1000551
- Kristiansen K, Andersen S (1993) Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 67:105–109
- Lu CS, Sharma HC, Ohm HW (1991) Wheat anther culture: effect of genotype and environmental conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 24:233–236
- Mackay IJ, Bansept-Basler P, Barber T, Bentley AR, Cockram J, Gosman N, Greenland AJ, Horsnell R, Howells R, O’Sullivan DM (2014) An eight-parent multiparent advanced generation inter-cross population for winter-sown wheat: creation, properties, and validation. *G3: Genes| Genomes| Genetics* 4:1603–1610
- Maheshwari S, Tan EH, West A, Franklin F, Comai L, Chan S (2015) Naturally occurring differences in CENH3 affect chromosome segregation in zygotic mitosis of hybrids. *PLoS genetics* 11:e1004970–e1004970
- Malik MR, Wang F, Dirpaul JM, Zhou N, Hammerlindl J, Keller W, Abrams SR, Ferrie AMR, Krochko JE (2008) Isolation of an embryogenic line from non-embryogenic *Brassica napus* cv. Westar through microspore embryogenesis. *Journal of Experimental Botany* 59:2857–2873
- McKone MJ, Halpern SL (2003) The Evolution of Androgenesis. *The American Naturalist* 161:641–656
- Ming R, Hou S, Feng Y, Yu Q, Dionne-Laporte A, Saw JH, Senin P, Wang W, Ly BV, Lewis KL (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* 452:991–996
- Mohammadi PP, Moieni A, Ebrahimi A, Javidfar F (2012) Doubled haploid plants following colchicine treatment of microspore-derived embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108:251–256
- Murovec J, Bohanec B (2011) Haploids and doubled haploids in plant breeding, p. 87–106. In: I.Y. Abdurakhmonov (ed.). *Plant Breeding*. InTech, Croatia.
- Murovec J, Bohanec B (2013) Haploid induction in *Mimulus aurantiacus* Curtis obtained by pollination with gamma irradiated pollen. *Scientia Horticulturae* 162:218–225
- Niizeki H, Oono K (1968) Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proceedings of the Japan Academy* 44:554–557
- Nystedt B, Street NR, Wetterbom A, Zuccolo A, Lin Y-C, Scofield DG, Vezzi F, Delhomme N, Giacomello S, Alexeyenko A (2013) The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature* 497:579–584
- Park C-H, Lee M-S, Choi D-G, Cho J-H, Hyun S-W, Hwang C-J, So J-D, Choi B-J (1990) Effect of pollen stage and growth regulators on anther culture of *Pulsatilla koreana* Nakai. *Korean J Plant Tissue Culture* 17:239–248
- Pascual L, Desplat N, Huang BE, Desgroux A, Bruguier L, Bouchet JP, Le QH, Chauchard B, Verschave P, Causse M (2015) Potential of a tomato MAGIC population to decipher the genetic control of quantitative traits and detect causal variants in the resequencing era. *Plant biotechnology journal* 13:565–577
- Pathirana R, Frew T, Hedderley D, Timmerman-Vaughan G, Morgan E (2011) Haploid and doubled haploid plants from developing male and female gametes of *Gentiana triflora*. *Plant cell reports* 30:1055–1065
- Qin X, Rotino GL (1995) Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of in vitro-grown androgenic pepper plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41:145–149
- Ravi M, Chan SW (2010) Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* 464:615–618
- Ryu J-H, Doo H-S, Kwon T-H (1992) Induction of haploid plants by anther culture in sesame. *Korean J Plant Tissue Culture* 19:171–177
- San Noeum L (1976) Haploides d'*Hordeum vulgare* L. par culture



- in vitro d'ovaries non fécondes. *Ann Amelior Plant* 26:751-754
- Sannemann W, Huang BE, Mathew B, Léon J (2015) Multi-parent advanced generation inter-cross in barley: high-resolution quantitative trait locus mapping for flowering time as a proof of concept. *Molecular Breeding* 35:1-16
- Seguí-Simarro J (2010) Androgenesis Revisited. *Bot Rev* 76:377-404
- Seymour DK, Filiault DL, Henry IM, Monson-Miller J, Ravi M, Pang A, Comai L, Chan SW, Maloof JN (2012) Rapid creation of Arabidopsis doubled haploid lines for quantitative trait locus mapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:4227-4232
- Shrestha S, Kang W-H (2009) Effect of genotype of donor plants on the success of anther culture in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Korean Journal of Plant Resources* 22:506-512
- Smith R, Kamp M, Davies R (1981) Reduced plant size of haploid african violets. *In Vitro* 17:385-387
- Tang F, Tao Y, Zhao T, Wang G (2006) In vitro production of haploid and doubled haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays*). *Plant cell, tissue and organ culture* 84: 233-237
- Thomas TD (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26:618-631
- Upadhyay A, Chacko A, Gandhimathi A, Ghosh P, Harini K, Joseph A, Joshi A, Karpe S, Kaushik S, Kuravadi N, Lingu C, Mahita J, Malarini R, Malhotra S, Malini M, Mathew O, Mutt E, Naika M, Nitish S, Pasha S, Raghavender U, Rajamani A, Shilpa S, Shingate P, Singh H, Sukhwal A, Sunitha M, Sumathi M, Ramaswamy S, Gowda M, Sowdhamini R (2015) Genome sequencing of herb Tulsi (*Ocimum tenuiflorum*) unravels key genes behind its strong medicinal properties. *BMC Plant Biology* 15:212
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature genetics* 42:833-839
- Verde I, Abbott AG, Scalabrin S, Jung S, Shu S, Marroni F, Zhebentyayeva T, Dettori MT, Grimwood J, Cattonaro F (2013) The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nature genetics* 45:487-494
- Wang H, Dong B, Jiang J, Fang W, Guan Z, Liao Y, Chen S, Chen F (2014) Characterization of in vitro haploid and doubled haploid *Chrysanthemum morifolium* plants via unfertilized ovule culture for phenotypical traits and DNA methylation pattern. *Frontiers in plant science* 5:738
- Wędzony M, Forster BP, Żur I, Golemic E, Szechyńska-Hebda M, Dubas E, Gotębiowska G, Wędzony M (2009) Progress in doubled haploid technology in higher plants, p 1-33. In: A. Touraev, B. Forster, SM Jain (eds). *Advances In Haploid Production In Higher Plants*. Springer, Netherlands.
- Xiao L, Yang G, Zhang L, Yang X, Zhao S, Ji Z, Zhou Q, Hu M, Wang Y, Chen M (2015) The resurrection genome of *Boea hygrometrica*: A blueprint for survival of dehydration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:5833-5837
- Zeng X, Long H, Wang Z, Zhao S, Tang Y, Huang Z, Wang Y, Xu Q, Mao L, Deng G (2015) The draft genome of Tibetan hulless barley reveals adaptive patterns to the high stressful Tibetan Plateau. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:1095-1100
- Zhang H, Tan E, Suzuki Y, Hirose Y, Kinoshita S, Okano H, Kudoh J, Shimizu A, Saito K, Watabe S, Asakawa S (2014) Dramatic improvement in genome assembly achieved using doubled-haploid genomes. *Scientific Reports* 4:6780
- Zhang X, Wu Q, Li X, Zheng S, Wang S, Guo L, Zhang L, Custers JB (2011) Haploid plant production in *Zantedeschia aethiopica* 'Hong Gan' using anther culture. *Scientia horticulturae* 129: 335-342