

# 교배육종 및 소포자 배양에 의한 뿌리혹병 race4 저항성 배추 계통 육성

박수형<sup>1</sup> · 윤무경<sup>1</sup> · 임용표<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원, <sup>2</sup>충남대학교 원예학과

## Development of clubroot race4 resistant inbreds using conventional breeding and microspore culture method in Chinese cabbage

Suhyoung Park<sup>1</sup>, Moo-Kyoung Yoon<sup>1</sup>, Yong Pyo Lim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Suwon 440-706, Korea

<sup>2</sup>Department of Horticulture, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received on 2 December 2011, revised on 12 December 2011, accepted on 18 December 2011

**Abstract** : To develop clubroot resistant Chinese cabbage inbreds, IT 033820, a clubroot resistant turnip, was cross pollinated with a Chinese cabbage inbred of BP 079. From 2005, conventional breeding and microspore culture method performed using these F1 plants as parental materials. In 2007, conventional breeding method resulted in 21 F3 inbreds. After inoculation of clubroot race 4, one inbred showing 83% resistant was selected and registered as 'Wonkyo 20036ho' in 2008. From 2005, we scanned hybrid cultivars using micro spore culture and developed many doubled haploid (DH) lines in Chinese cabbage. Using Chinese cultivar of 'Zoong-baek 2ho', we developed 26 DH inbreds in 2007. After inoculation of clubroot race 4, one DH inbred showing 77% resistant and yellow inner leaf color was selected and registered as 'Wonkyo 20034' in 2008. We found conventional breeding method was effective using introduced germplasm showing low germination. However, when using hybrid cultivar as starting material, microspore culture method was powerful for developing various inbred in short time.

**Key words** : Chinese cabbage, Clubroot, Breeding, Microspore culture, Inbred

### I. 서론

뿌리혹병은 절대 활물 기생균인 *Plasmodiophora brassicae*에 의해 발생하는 토양전염성 병으로(Braselton, 1995), 처음엔 진균(fungi)으로 분류되었으나 DNA 염기서열 분석 결과 진균과는 연관이 없는 것으로 밝혀졌으며(Castlebury와 Domier, 1998; Down 등, 2002), ribosomal RNA의 발생학적 분류 결과 원생동물(protozoa)로 분류되었다(Van de Peer 등, 2000). 우리나라에서는 1928년 수원 등 경기 지역에서 최초로 발병이 보고되었으나 문제를 일으키지 않았고(Kim과 Oh, 1997), 1990년대 중반 고려지 지역에서 보고된 이후 급속하게 발병 지역이 증가하여(Lee 등, 2001) 현재는 전국의 봄, 여름, 가을 및 월동 재배 작형에서 발병하고 있다. 병이 발생하면 수량의 30~70% 정도를 감소시킬

으로 배추 재배에 큰 위협을 주고 있다.

따라서 뿌리혹병의 방제 방법 및 저항성 품종 개발 관련 연구가 지속적으로 추진되고 있다. 뿌리혹병 방제를 위해 화학 약품, 농약 및 길항균을 이용하는 방법이 개발되었으나(Datnoff 등, 1987; Cheah 등, 2000; Yeoung 등, 2003), 처리 비용(약제비 및 노동비)이 많이 소모되는 문제가 있으며 방제 효과도 처리한 연도의 재배에는 효과가 있으나 이듬해 재배할 경우 휴면포자 상태로 생존한 병원균의 밀도가 높아지면서 병이 다시 발생하는 문제가 발생한다.

이러한 문제점 해결을 위해 육성된 저항성 품종의 경우 초기 육성된 CR계 저항성 품종(Jang 등, 2001)은 병에는 저항성을 보이나, 절임 특성 등 가공 적성이 적합하지 못하여 시장에서 사용을 하지 않게 되었다. 이후 원예적 가공 적성 및 속익 특성을 개선하여 새롭게 육성된 품종들은 품질이 우수하여 시장에서 반응이 좋았으나, 한 지역에서 2년 이상 연작할 경우 병원성이 무너지는 경우가 발생하였다.

\*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5739

E-mail address: yplim@cnu.ac.kr

뿌리혹병 저항성 품종 육성을 위해서는 우선적으로 병 저항성 재료가 필요한데, 초기 CR계 품종은 신속한 품종 육성을 위해 일본에서 도입된 품종을 활용하였으며, 이후엔 각 회사에서 다양한 저항성 자원을 도입하여 품종 개발에 이용되어 왔다. 그러나 저항성 품종의 이병화가 신속하게 발생함에 따라 다양한 저항성 자원의 개발이 필요하게 되었다. 그런데 배추에는 뿌리혹병 저항성 자원이 없어서 순무 등에서 저항성 유전자를 도입해야 하므로 저항성 계통의 육성에는 많은 노력과 시간이 소모된다. 전통적 방법인 교배 육종의 경우 저항성 유전자 고정을 위해 최소한 4세대를 전개해야 활용 가능하며 이를 위해 4년 정도가 소요된다. 그런데 배추과 채소는 소포자 배양(Lee와 Nam, 1995)이 비교적 잘 됨으로 이를 활용할 경우 저항성 유전자가 고정된 계통을 1~2년 만에 육성이 가능하다.

따라서 국립원예특작과학원에서는 다양한 뿌리혹병 저항성 배추 품종 개발을 돕고자 병원성이 높은 단포자 유래 균주 race4(Kang 등, 2000)를 이용하여 유용 계통을 육성코자 하였다. 이를 위해 원예원 보유중인 저항성 자원 등과 배추를 교배하여 그 후대를 뇌수분으로 세대진전시키는 방법과 소포자 배양 방법을 활용하여 계통으로 육성코자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

뿌리혹병 저항성 자원으로 원예원에서 선발한 순무(*Brassica rapa* L.) 도입 자원 번호 IT033820을 이용하였다. 순무의 저항성을 배추로 도입하기 위해 원예원에서 육성한 바이러스병 저항성 배추 계통인 BP079와 교배하여 이를 육종 재료로 이용하였다. 또한 배추에 효과적인 소포자 배양 조건 구명을 위해 중국 및 한국 시판 품종을 소포자 배양을 위한 재료로 이용하였다.

### 2. 교배 육종 방법(뇌수분에 의한 세대 진전)

저항성 순무와 이병성 배추 교배 후대 종자 300립을 뇌수분 하기 위해 50공 프리그트레이를 이용하여 온실에 파종하였다. 파종 후 본엽이 3매 정도 전개될 때까지 온실에서 키운 후 5°C가 유지되며 태양광이 공급되는 춘화처리실

에서 약 6주간 재배하면서 춘화처리를 실시하였다. 춘화처리 이후 지름 20 cm 화분에 상토와 흙을 반반 섞어 담은 후 이식하였다. 이식 후 추대가 발생하면 처음 추대는 제거하여 여러 개의 추대를 유도한 후 지지대를 세워 추대가 꺾이지 않도록 관리하면서 교배를 실시하였다. 뇌수분은 꽃 봉오리의 길이가 5 mm 정도로 아직 개화하지 않은 봉오리의 윗부분을 제거하고 봉지 안에서 개화된 동일한 개체의 화분을 이용하여 수분한 후 다시 일주일간 봉지를 씌워 오염 수분을 방지하였다. 뇌수분 후 50~60일이 지나 종자가 노랗게 익으면 꼬투리가 벌어지기 전에 채종하였다.

### 3. 소포자 배양 방법(Lee와 Nam, 1995)

개화한 꽃 봉오리에서 2~3 mm 정도 크기의 화뢰를 30개 수집하여 거즈로 싼 후, 95% EtOH 2초, 차아염소산나트륨(2%) 15분 소독 후 멸균수로 3분간 3회 세척하였다. 이후 B<sub>5</sub> 배지에서 막자사발로 갈아 45 μm 체로 거른 후 동일한 배지로 3회 세척 (세척은 35.7 mL의 B<sub>5</sub> 배지를 넣고 1000 rpm, 3분간 원심분리 후 상징액 버림)한다. 이후 75 mL의 NLN배지로 바꾼 후 2.5 mL씩을 지름 6 cm petridish에 분주하여 parafilm으로 막아준다. 32.5°C에서 24시간 처리한 후 25°C 암상태에서 약 2주 처리 후 명실 shaker 위에서 배양하면서 발생한 배상체를 1/2 MS 배지로 옮겨 키웠다.

### 4. 뿌리혹병 접종법

각 계통 및 자원의 종자 25~30립을 9 cm petridish 등에 여과지 2장을 깔고 파종한 후 물이 마르지 않도록 관리하였다. 파종 온도에 따라 떡잎 전개 시기가 다르지만 대체로 7~9일이 되어 떡잎이 완전하게 펼쳐지면 단포자 분리로 획득된 race4(Kang 등, 2000)를 증류수에 같은 후 약 5 × 10<sup>5</sup> 농도로 계산된 접종액으로 접종하였다. 접종 1일 이후 상토를 채운 50공 프리그 트레이에 정식한 후 접종액이나 관주 양액이 밖으로 흘러나가 주변을 오염시키지 않도록 트레이 물받침을 받혀주었다. 육묘용 한방 양액으로 4~6주간 재배 후 뿌리를 조사하였다(Park 등, 2008).

### 5. 원예적 특성 평가(원예원 가을 재배)

육성된 계통의 원예적 특성을 평가하기 위해 수원시 장

안구 이목동 소재 국립원예특작과학원 채소과 노지 포장에서 가을에 재배하였다. 파종은 2008년 8월 13일, 정식은 8월 29일 이었으며 재배방법은 표준영농교본 배추 재배법에 준하여 재배하였다. 11월 20일 생육조사를 실시하였다.

### III. 결과 및 고찰

뿌리혹병 저항성 자원으로 이용하고 있는 순무 IT033820은 국립원예특작과학원 채소과에서 2003년에 농업유전자원센터에서 분양 받은 순무 자원 300점을 병접종하여 선발한 자원으로, 뿌리혹병에는 저항성이나 액아가 많이 발생하고 결구를 전혀 형성하지 못하여 국내 배추 품종에 바로 이용하기는 어렵다. 따라서 채소과 육성 계통인 배추 BP079와 교배하여 그 후대를 이용하여 뇌수분과 소포자 배양을 병행하였다. 뇌수분을 위하여 300개의 F<sub>1</sub>종자를 2005년에 파종하여 2007년 까지 세대를 진전시킨 결과 42점의 F<sub>3</sub>

계통을 육성하였다. 저항성 순무의 경우 20℃ 이상에서는 발아가 잘 되지 않았는데, 그 후대들 중 일부는 발아력이 매우 낮아 식물체를 획득하지 못하였고, 교배를 하더라도



Fig. 1. The shape of clubroot resistant inbred of 'Wonkyo 20036ho'.

Table 1. Result of clubroot inoculation using F<sub>3</sub> lines derived from cross pollination between turnip (IT033820) and Chinese cabbage (BP079).

Label	Resistance (No.)	Medium sensitive (No.)	Sensitive (No.)	Total (No.)	Disease grade <sup>z</sup> (%)
07-R78	2	3	0	5	40.0
07-R79	7	3	0	10	70.0
07-R81	10	10	0	20	50.0
07-R82	0	22	1	23	0.0
07-R83	4	21	0	25	16.0
07-R84	4	19	2	25	16.0
07-R85	6	15	4	25	24.0
07-R86	3	20	2	25	12.0
07-R87	1	19	2	22	4.5
07-R88	4	6	0	10	40.0
07-R89	9	12	3	24	37.5
07-R90	9	14	0	23	39.1
07-R91	4	15	0	19	21.1
07-R92	15	9	2	26	57.7
07-R93	19	4	0	23	82.6
07-R94	1	19	0	20	5.0
07-R95	5	18	0	23	21.7
07-R96	4	20	0	24	16.7
07-R97	6	16	0	22	27.3
07-R98	0	10	5	15	0.0
07-R99	0	12	1	13	0.0

<sup>z</sup>Number of resistance plants/Number of total plants x 100, 30 seeds were sown in each line, inoculated with race 4 isolates in 5×10<sup>5</sup> concentration after 7 days, cultivated for 8 weeks using hydroponic solution in a restricted place.

채종이 되지 않는 경우가 많아 획득된 계통의 숫자가 적었다. 따라서 저항성 유전자의 유실 여부를 조사하기 위해 2007년에 채종량이 100립 이상인 21개 F<sub>3</sub> 계통의 뿌리혹병

접종 실험 실시 결과 저항성이 높은 계통을 선발할 수 있었다(Table 1). 이들의 후대를 진전하여 2008년에 접종액의 농도를 높여 2차 접종하였을 때도 저항성을 보여 저항성

**Table 2.** Result of clubroot inoculation using F<sub>4</sub> inbreds derived from cross pollination between turnip (IT033820) and Chinese cabbage (BP079).

Label	Parental Line	Resistance (No.)	Medium sensitive (No.)	Sensitive (No.)	Disease grade <sup>z</sup> (%)
08-RU11 <sup>y</sup>	07-R90	1	3	4	13
08-RU12	07-R91	3	1	4	38
08-RU13	07-R92	0	2	4	0
08-RU14	07-R93	4	0	2	67

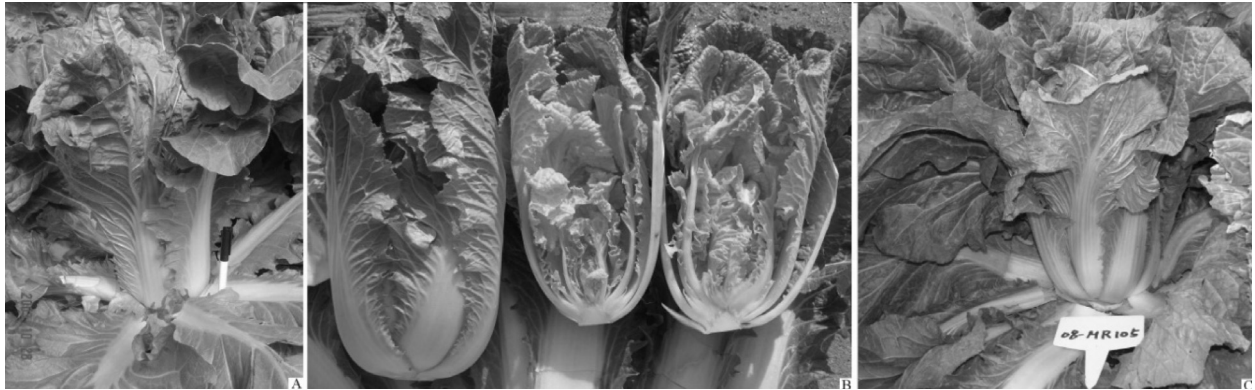
<sup>z</sup>Number of resistance plants/Number of total plants x 100, 20 seeds were sown in each inbred, inoculated with race 4 isolates in 1 x 10<sup>8</sup> concentration after 7 days, cultivated for 8 weeks using hydroponic solution in a restricted place.

<sup>y</sup>Among 21 lines, 8 lines produced seeds and only 4 lines produced enough seeds for clubroot inoculation test.

**Table 3.** Result of clubroot inoculation using Doubled haploid lines derived from Chinese cabbage ‘Zoong-baek 2 ho’.

Label	Resistance (No.)	Medium sensitive (No.)	Sensitive (No.)	Total (No.)	Disease grade <sup>z</sup> (%)
07-R52	0	19	0	19	0
07-R55	0	5	0	5	0
07-R59	0	25	0	25	0
07-R60	0	23	1	24	0
07-R63	0	24	0	24	0
07-R70	0	17	0	17	0
07-R64	2	17	6	25	8
07-R56	3	22	0	25	12
07-R68	2	13	0	15	13
07-R61	3	18	1	22	14
07-R67	3	14	4	21	14
07-R71	2	5	3	10	20
07-R66	5	17	2	24	21
07-R51	6	16	1	23	26
07-R65	7	17	0	24	29
07-R62	8	17	0	25	32
07-R47	9	16	0	25	36
07-R46	9	13	1	23	39
07-R58	10	12	1	23	43
07-R49	11	13	1	25	44
07-R57	14	11	0	25	56
07-R45	15	10	0	25	60
07-R53	16	10	0	26	62
07-R48	14	6	0	20	70
07-R54	17	4	1	22	77
07-R69	20	4	0	24	83

<sup>z</sup>Number of resistance plants/Number of total plants x 100, 30 seeds were sown in each line, inoculated with race 4 isolates in 5x10<sup>5</sup> concentration after 7 days, cultivated for 8 weeks using hydroponic solution in a restricted place.



**Fig. 2.** The shape of clubroot resistant inbred of 'Wonkyo 20034 ho' and 'Zoong-baek 2 ho'. A, Outer shape of 'Zoong-baek 2 ho'; B, Inner shape of 'Wonkyo 20034ho'; C, Outer shape of 'Wonkyo 20034ho'.

계통으로 선발하였으며(Table 2) '원교 20036호'로 품종등록 하였다. 그러나 육성 계통은 결구를 형성하지 않으며 액아도 많아 원예적 형질은 좋지 못하였다(Fig. 1).

2005년 봄부터 뿌리혹병 저항성 순무 자원을 소포자 배양을 실시하였으나 배양을 성공하지 못하여 배양법 개발을 위해 국내 및 중국 수집 배추 품종의 배양을 병행하였다. 2005년 겨울에 다양한 배추 시판종 유래 배상체를 획득하였으며 저항성 순무와 교배된 자원의 배양도 성공하였다. 그러나 저항성 순무와 교배된 자원의 경우 다른 품종에 비교하여 배상체를 얻기가 어려웠다. 배추의 배 발생률이 품종간 차이가 크다는 보고(Kim과 Lee, 1995)에 의해 동일한 조건에서 다양한 국내, 외 시판품종을 배양한 결과 몇몇 품종에서는 많은 배상체를 획득하였다. 중국 품종인 '북경소잡 61호'의 경우 1년 배양으로 150여 점의 배상체를 획득하였으나 저항성 순무는 2년간 더 많은 노력을 기울여 배양하여 배상체를 약 40여 점을 획득하였다. 순무 교배 자원 유래 배상체는 채종도 어려워 2년간 증식하여 2계통에서 100립 이상 종자를 수확할 수 있었다. 중국 품종인 '북경소잡61호'를 2년간 배양하여 311점의 배상체 유래 계통을 육성하였으며 이 중 채종량이 200립 이상인 26계통의 뿌리혹병 접종 결과 저항성 비율 0~72% 까지 다양한 결과를 보였다(자료미제시). 또 다른 중국 품종인 '중백2호'의 소포자 배양 결과 69점의 배상체 유래 계통을 육성하였으며 이 중 채종량이 100립 이상인 26계통의 병 접종 결과 저항성 비율 0~83%의 결과를 보였다(Table 3). '중백 2호' 유래 계통 중 뿌리혹병 race4 저항성 77%이며 속잎이 노랑고 느슨한 결구를 형성하는 원예적 형질이 양호한 계통을 선발하여 '원교 20034호'로 품종등록 하였다(Fig. 2). 육성된 계통들

은 추후 국내 종묘회사에 분양되어 뿌리혹병 저항성 일대잡종 품종의 육종에 이용될 계획이다.

#### IV. 결론

Hong 등(2005)이 소포자 배양법으로 뿌리혹병에 저항성인 다양한 계통을 육성하였다는 보고가 있어 신속한 병 저항성 계통의 육성을 위해 소포자 배양을 우선적으로 활용코자 하였으나, 소포자 배양 결과 획득되는 배상체 유래 계통의 bias 현상에 관한 우려가 제기되어 교배 육종도 함께 진행하였다. 동일한 시기에 전통 교배 육종 법과 소포자 배양법을 병행하여 계통을 육성한 결과 발아력 및 채종력이 낮은 유전자원을 활용할 경우 교배 육종법이 오히려 소포자 배양법 보다 계통 육성에는 효과적이었다. 그러나 일대잡종 품종을 소포자 배양 재료로 이용하였을 때 전통적인 교배 육종법으로는 3년내에 수백점의 계통 육성이 불가능 하지만 소포자 배양법으로는 가능하였으며, 뿌리혹병 race4에 저항성인 계통의 선발도 가능하였다. 따라서 육종에 사용할 재료가 발아력, 채종력 등이 우수한 일대잡종 품종일 경우 소포자 배양법은 단기간에 다수의 계통을 육성하기에 매우 효과적인 방법으로 판단되었다.

#### 참고 문헌

- Braselton JP. 1995. Current status of the plasmodiophorids. *Critical Reviews in Microbiology*. 21: 263-275.
- Castlebury LA, Domier LL. 1998. Small subunit ribosomal RNA gene phylogeny of *Plasmodiophora brassicae*. *Mycologia*. 90: 102-107.
- Cheah LH, Veerakone S, Kent G. 2000. Biological control of

- clubroot on cauliflower with *Trichoderma* and *Streptomyces*. Spp. New Zealand Plant Protection 53: 18-21.
- Datnoff LE, Kroll TK, Lacy GH. 1987. Efficacy of chlorine for decontaminating water infected with resting spores of *Plasmodiophora brassicae*. Plant Disease 71: 734-736.
- Down GJ, Grenville LJ, Clarkson MJ. 2002. Phylogenetic analysis of Spongospora and implications for the taxonomic status of the plasmodiophorids. Mycological Research. 106: 1060-1065.
- Hong SY, Cho KS, Moon JY, Ryu SY, Lee HC, Yoon HK. 2005. Microspore Culture and its Progeny Test for Resistant Line to Clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in Chinese Cabbage. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 23(3): 45-45.
- Jang CS, Piao Z, Park YJ, Lim YP. 2001. Development of anther-derived lines resistant to clubroot disease in Chinese cabbage. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 42: 689-694.
- Kang WJ, Yoon MK, Kim DH, Kim JS, Harn JS, Om YH. 2000. Classification and selection for resistance to clubroot in Cruciferous vegetables. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 18(2): 187.
- Kim DW, Oh JH. 1997. Incidence, pathogenicity of club root fungus (*Plasmodiophora brassicae*) and viral resistance in Chinese cabbage. Korean J. Plant. Pathol. 13: 95-99.
- Kim YH, Lee SS. 1995. Culture of microspore of *B. campestris*ssp. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 10: 372-373.
- Lee JT, Ru GL, Lee JN, Kweon HJ, Lee EH, Kim WB, Park HY. 2001. Selection of alternative crops on Chinese cabbage in alpine. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 19(suppl II): 63.
- Lee SS, Nam SC. 1995. Microspore culture of Broccoli. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 36(5): 635-640.
- Park S, Kwak JH, Yoon MK. 2008. Development of an effective inoculation method for large quantities of clubroot disease using hydroponics in Chinese cabbage. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 26(4): 449-453.
- Van de Peer Y, Baldauf SL, Doolittle WF, Meyer A. 2000. An updated and comprehensive rRNA phylogeny of eukaryotes based on rate-calibrated evolutionary distances. J. Mol. Evol. 51: 565-576.
- Yeoung YR, Kim JH, Kim BS, Jeon JY, Yoon CS. 2003. Effects of beneficial antagonists (*Bacillus*sp., *Pseudomonas*sp., and *Trichoderma*sp.) on control of club root of Chinese cabbage. 2003. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 21(3): 194-198.