

소포자 배양 유래 계통을 활용한 브로콜리 신품종 조기 육성

곽정호¹ · 박미영¹ · 이준구¹ · 박수형¹ · 김대영¹ · 정승룡¹ · 임용표² · 윤무경^{1*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원, ²충남대학교 원예학과

Development of new broccoli varieties from elite lines obtained by microspore cultivation method

Jung-Ho Kwak¹, Miyoung Park¹, Jun-Gu Lee¹, Suhung Park¹, Dae-young Kim¹, Yong Pyo Lim², Moo Kyoung Yoon^{1*}

¹National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Suwon 440-706, Korea

²Chungnam National University, Dept. of Horticultural Science Daejeon 305-764, Korea

Received on 13 November 2012, revised on 23 December 2012, accepted on 24 December 2012

Abstract : Since the year 2000, the production and consumption of broccoli have rapidly increased in Korea. And, the average production area and amount were about 1,700 ha and 29,000 ton for the past 5 years. Even with the increase of these cultivation and consumption, more than 95% of the broccoli seeds are currently imported from foreign countries such as Japan and Netherlands. Therefore, development of domestic broccoli varieties is needed to relieve Korean farmers' production cost for broccoli. In this situation, National Institute of Horticultural and Herbal Science (NIHHS) of Korea has tried to develop F1 hybrid varieties from elite lines that were obtained by microspore cultivation method from 2008. As the results, about 850 lines of broccoli were obtained and self-pollinated. Then their ploidy levels of the genome were confirmed to select double haploid (D.H.) lines. And the D.H. lines' horticultural traits were evaluated in open field. After the selection of 17 elite D.H. lines, they were cross-pollinated with a male sterile (MS) line to produce F1 hybrid seeds. After 2 to 3 years field trials of these F1 hybrid varieties at the area of Suwon, Gangneung, and Jeju respectively, two hybrid varieties such as 'Wongyo8011' and 'Wongyo8012' are selected for the application of variety protection. With these 4 years of research, we found that the microspore cultivation method is a powerful tool for the conventional breeding program, especially for the development of various inbred lines and even F1 hybrid varieties in short time.

Key words : Broccoli, Microspore Cultivation, New variety

I. 서론

채소 작목으로는 드물게 꽃을 먹는 브로콜리(*Brassica oleracea*)는 라틴 명사 brachium(가지 혹은 팔의 의미)에서 유래한 것과 같이, 큰 원줄기에 마치 나뭇가지가 여러 갈래로 뻗어 나오고 그 위를 아주 작은 미숙 꽃망울들의 무리로 뒤덮은 듯한 형태(화구, 화뢰, 꽃다발)를 띄는 배추과 작물의 하나이다. 원산지는 지중해 동부연안으로, 수천 년의 재배 역사를 가진 케일을 기원으로 하여 브로콜리형, 콜리플라워형, 양배추형, 방울다다기 양배추형 및 콜라비형으로 발전되어 온 것으로 알려져 있다(Wien, 1997). 1490

년 무렵부터 그리스에서 이탈리아로 전파되었고, 17세기 초에는 독일, 프랑스 등 유럽 각지로 전파 되었으나, 이때까지는 브로콜리와 콜리플라워 간의 구별은 없었던 것으로 알려져 있다. 본격적인 품종의 발달은 19세기부터 시작되었고, 이 무렵 유럽에서 미국으로 전파되었으며, 현재 유럽과 일본 등지에서 그 소비가 증가하는 추세이다(Jang, 2003).

국내에서는 2011년 기준으로 생산면적 1,737 ha에 생산량 2 만여 톤에 이르는 채소작목으로 성장하였다(MFAFF, 2012). 이를 2000년도 28 ha의 재배면적에 생산량 778 톤과 비교하면 근대 채소 도입 역사에 있어 가장 급속한 증가를 이룬 채소 작목으로 생각할 수 있다. 이러한 폭발적 수요 증가에 따라 국가 또는 민간에서도 그 품종과 재배법 개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 그러한 노력의 일환으로

*Corresponding author: Tel: +82+31-240-3630

E-mail address: yoonmk@korea.ac.kr

농촌진흥청 국립원예특작과학원에서는 2008년부터 본격적인 브로콜리 계통 및 품종 육성을 위하여 다양한 유전자원을 수집하고, 이를 바탕으로 유용 계통을 개발하여 왔다(Kwak et al., 2012).

전통적인 배추과 채소 육종에 있어 일대잡종 품종육성을 위해서는, 적절한 유전자원을 수지하고, 이를 소재로 뇌수분 등을 통해 내혼계통(inbred line)을 육성하는데 최소 4~5년이 소요되며, 이러한 내혼계통 간의 교배를 통해 일대잡종의 개발까지는 다시 2~3년이 걸리는 등 일반적으로 최소 6~8년이라는 긴 육성연한이 소요된다(Biggs, 1985).

채소의 경우, 우수 계통 육성을 통한 신품종 개발에 걸리는 기간 단축을 위해 소포자 배양법이 널리 이용되어왔다(Clement et al., 2005). 특히 배추과(*Brassicae*) 채소는 소포자 배양이 타 작목에 비해 용이한 것으로 알려져 있으나 동일 작목이라 하더라도 유전자원 혹은 계통의 특성에 따라 그 효율은 다른 것으로 보인다(Keller and Armstrong, 1979; Takahata and Keller; 1991, Vicente and Dias, 1996). 브로콜리의 경우에도 다른 배추과 작목과 같이 소포자 배양에 사용되는 배지의 구성에 따라 그 배양 효율이 달라진다. 특히 성장 조절제인 6-benzylaminopurine 및 naphthalene acetic acid 농도, 배지 조성 첨가제인 silver nitrate($AgNO_3$)와 숯(activated charcoal)의 함량 또한 배양 효율을 결정하는 요인이다(Na et al., 2011a). 또한 소포자 배양의 온도와 시간은 물론 배양 중의 변온(heat shock) 조건과 광 등에 따라서도 배양 효율에 큰 영향이 있는 것으로 알려져 있다(Na et al., 2011b).

II. 재료 및 방법

1. 재료

우수 일대잡종 브로콜리(*Brassica oleracea* L. *italica*) 품종 육성의 재료로 소포자 배양 후대의 획득 및 관련 내혼계통 육성을 위해 국립농업유전자원센터(경기도 수원시)에서 분양 받은 유전자원 49 점(IT164978 등)과 국립원예특작과학원 보유하고 있는 유전자원 및 신규수집 유전자원 25 점(92-8-2 등) 등 총 74 점의 브로콜리 유전자원을 소포자 배양 재료로 이용하였다. 또한 응성불임성 일대잡종 품종 육성을 위해 국립원예특작과학원 보유 브로콜리 응성불임 계통(10FA-169)을 모본으로 사용하였다.

2. 염색체 배수성 검정

소포자 배양의 결과로 얻어진 후대 식물체는 유세포 분석기(flow cytometer, PA, Partec GmbH, Germany)를 사용하여 배수성을 검정하였다. 잘게 잘라진 어린 잎을 추출액에 넣은 후 다시 염색액을 추가하였다. 필터로 걸러진 혼합액의 추출액은 유세포 분석기로 브로콜리 표준 배수체 시료($2n=2x=18$)와 비교하여 그 배수성을 확인하였다.

3. 전통 교배 육종

소포자 배양의 결과로 얻어진 후대는 염색체의 배수성 검정을 통해 이중 반수체(double haploid, D.H.) 상태임을 검정한 후, 뇌수분을 통해 종자를 얻었다. 실험실에서 내려온 소포자 배양 순화체는 멸균 상토로 채워진 지름 20 cm 화분에 옮겨 심은 후, 온실에서 2주간 착근 안정화를 거쳐 5°C 온도 조건의 춘화처리실에서 약 6~8 주간 저온처리 하였다.

자식(self-pollination) 종자를 얻기 위해 생육 중인 저온처리 개체의 추대와 꽃다발 형성 상황을 매일 점검하며, 적절히 꽃다발 형성이 완료된 시기에 미개화 상태의 꽃다발을 유산 봉투로 덮어 두었다. 봉투 안의 꽃다발에서 꽃이 피기 시작할 때 길이가 5 mm 이하의 꽃다발 윗부분의 봉우리들을 제거하고, 봉투 내 개화된 꽃을 이용하여 인공 수분한 후, 다시 7~10일 동안 봉투를 씌운 상태로 다른 개체와의 교차 수분을 방지하였다. 자식 교배하고, 약 두 달 후에 종자가 충분히 익었음을 확인하고 채종하였다.

확보된 우수 선발 계통과 응성불임 개체간의 교배 역시 자식 종자를 얻기 위한 절차와 동일한 과정을 거쳤다. 한 가지 다른 점은 선발 계통의 꽃에서 얻어진 꽃가루를 응성불임 개체의 꽃으로 인공 수정한 것이었다.

4. 소포자 배양법

Na 등(2011a)에 의해 수행된 브로콜리 소포자 배양법을 기반으로 실험이 진행되었는데(Fig. 1), 단핵 상태(uninucleate stage)의 브로콜리 소포자를 얻기 위해 꽃봉우리 길이가 암술 길이보다 짧은 상태의 꽃봉우리를 온실 재배 중인 브로콜리 개체에서 채취하였다. 약 2~3 mm 크기의 꽃봉우리 30개 정도를 거즈로 싸 후, 1% 차아염소산나트륨($NaClO$) 용액 속에서 15분간 진탕(70 rpm)하며 살균 후 멸균수로

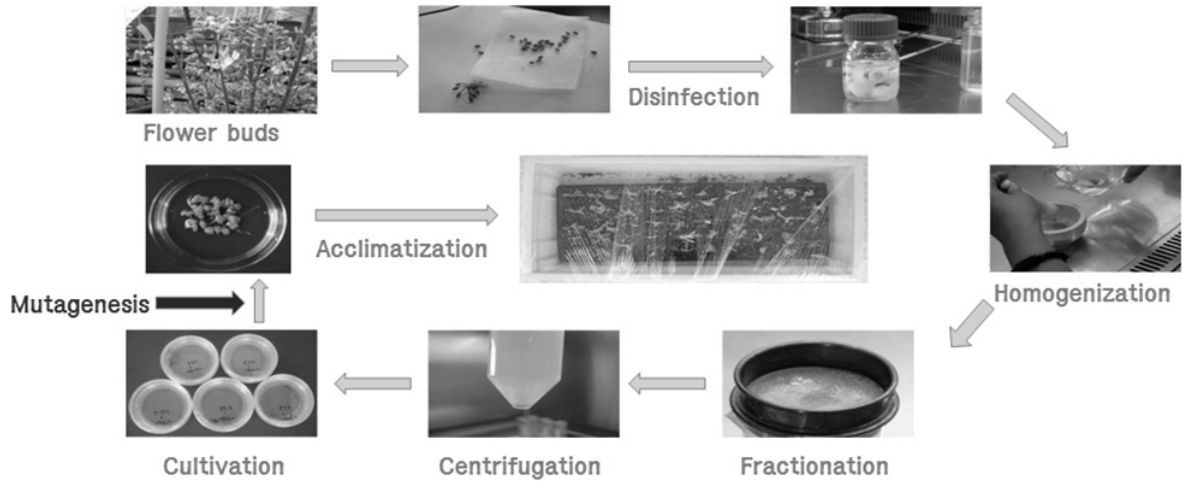


Fig. 1. Diagram of microspore cultivation for broccoli.

세척하였다. 3회의 멸균과 세척을 반복 후, B₅-13 배지 (Gamborg et al., 1968)에서 막자사발로 갈아 45 μm 금속 체로 거른 후 여과액은 50 mL 폴리에틸렌 시험관에 모아졌다. 동일한 배지와 원심분리기(1,000 rpm, 3분)를 사용하여 3회 세척을 반복하였고, 마지막 세척 단계의 침전물은 NLN 배지(Lichter, 1982)를 이용하여 약 40,000 세포자·mL⁻¹ 농도의 현탁액으로 만들어졌다. 이때 현탁액은 13%의 자당(sucrose)을 포함하고 있으며, 이렇게 만들어진 세포자 현탁액은 각 2.5 mL 용량으로 배양용기(60 x 15 mm)로 분주 후 parafilm으로 밀봉하였다. 사용된 배지는 모두 산도(pH)를 5.8로 맞춘 후, 25 μL 규격의 필터(low protein binding membrane filter)로 걸러 사용하였다. 세포자 현탁액이 분주된 배양용기는 32.5°C 암 상태에서 24 시간 동안 열처리(heat shock)를 거친 후, 다시 25°C 암상태로 2주간 평판 진탕기 위(60 rpm)에서 배양하였다. 암상태로 2주간의 진탕 배양을 마친 배양용기는 다시 명-암 교차 상태로 진탕 배양하며(16 시간 광상태/일, 50 μmol·m⁻²·s⁻¹) 발생한 배상체를 1/2 MS 배지로 옮겨 배양하였다.

5. 원예적 특성 평가

육성된 브로콜리 계통과 품종의 원예적 특성은 국립원예특작과학원(경기도 수원시) 채소과, 고령지농업연구센터(강원도 평창군), 제주도농업기술원(제주특별자치도 서귀포시) 노지포장에서 봄 또는 가을 작기로 계통의 경우 최소 2작기, 품종의 경우 3작기 재배하여 평가하였다. 재배방법

은 표준영농교본 '양채류 재배'에 준하였으며, 생육 및 화퇴 특성 조사는 국제 식물 신품종 보호 연맹(UPOV, International Union for the Protection of New Varieties of Plants) 기준에 따랐다.

III. 결과 및 고찰

다양한 브로콜리 유전자원 중에서 기본 세포자 배양 조건(Na et al., 2011a)을 바탕으로 배양 가능성 유무를 시험하였다. 자원 별로 각 20개씩의 배양용기에 치상하여 실험한 결과 자원 별 세포자 유래 배상체 발생률(embryo formation ratio)은 배양용기 당 0~30.1의 수치를 보였다. 총 74점의 유전자원 중에서 배상체 발생이 전혀 없었던 31점을 제외한 나머지 43점의 유전자원을 대상으로 배상체 발생효율 증진 시험을 진행하였고, 배지 조성이나 배양 조건 등에 따른 배상체 발생효율을 비교하였다(Table 1). Yuan 등 (2011)의 보고에 의하면 브로콜리 꽃봉오리의 저온처리가 세포자 배상체 발생효율을 높일 수 있다고 하였으나, 본 실험 결과에서는 05-8-1과 08-8-50의 비교에서 보이는 것과 같이 그 효과가 자원에 따라 상반될 수 있음을 확인하였다. 또한 미량원소와 AgNO₃의 배지 첨가 효과 역시 08-SA3과 08-SA9의 비교에서와 같이 상반된 결과를 초래함을 발견하였다. 08-SA134-2에서 흥미로운 결과가 관찰되었다. 기본 배지에 미량원소와 AgNO₃를 각각 첨가 처리하였을 때 배양효율이 좋아졌으나, 함께 처리하였을 때는 오히려 낮아지는 것이 관찰되었다.

총 43점의 브로콜리 유전자원을 대상으로 수행한 세포

Table 1. Result of microspore embryo formation by the different medium composition and incubation condition among broccoli germplasm.

Label	Medium	Cold shock (4°C for 24 hr) No ¹⁾	of microspore embryo formation/p.d. (±S.D ²⁾)
92-8-4	Basic ³⁾	1	0.5±0.1
92-8-4	Basic	0	1.9±0.3
05-8-1	Basic	1	1.4±0.2
05-8-1	Basic	0	0.3±0.1
08-8-50	Basic	1	0.8±0.1
08-8-50	Basic	0	2.3±0.3
08-SA3	Basic	1	0
08-SA3	Basic	0	3.1±0.3
08-SA3	Basic	0	1.5±0.1
08-SA9	Basic	1	1.2±0.1
08-SA9	Basic	0	4.0±0.1
08-SA9	Basic+Ag ⁴⁾ +m ⁵⁾	0	5.9±0.2
08-SA134-2	Basic	0	8.7±0.4
08-SA134-2	Basic+Ag	0	9.8±0.3
08-SA134-2	Basic+m	0	10.1±1.1
08-SA134-2	Basic+Ag+m	0	7.5±0.5

¹⁾Average of 20 petri dishes

²⁾Standard deviation

³⁾Basic NLN medium composition

⁴⁾AgNO₃(0.1 mg·L⁻¹)

⁵⁾0.5 x micro elements

자 배양의 결과로 852 점의 최종 순화 식물체를 얻었다. 약 2개월간 4°C의 춘화처리를 마친 후, 온실에서 재배하며 추대와 개화를 유도하였고 염색체 배수성 검사를 병행하였다. 배수성 검사 결과 정상적 이배체 형성율은 약 24%이었다. 개화 후 정상 화기 형성 여부 확인을 통해 최종적으로 205 개체를 대상으로 자식(Self-pollination)을 통해 종자를 획득하였다. 이들 종자를 파종하여 2010년부터 2011년 기간 중 최소 두작기에 걸쳐 각각의 원예적 형질을 조사하였다(Table 2). 작기 별 숙기, 안토시아닌 등의 색소발현 여부, 초장, 엽장, 엽폭, 구형, 구중 등의 원예적 형질을 조사해 평균적인 생육과 수량 안정성을 기준으로 총 17 개 우수 계통을 선발하였다. 이들 선발 계통과 국립원예특작과학원 보유 응성불임 계통간의 교배를 통해 17 조합의 일대잡종 품종 별 종자를 획득하고, 2011년~2012년 기간 중, 수원, 평창, 서귀포 등의 지역에서 최소 3 작기 이상의 지역 생육 적응성 평가를 수행하였다.

수원 지역은 봄과 가을 작기 모두를 대상으로 생육 적응 시험을 수행하였고, 평창 지역은 여름 작기, 서귀포 지역은

가을 및 월동 작기를 시험하였다. 고랭지(평창) 지역 재배 적응 시험의 결과, 대부분의 품종에서 지역 우점종(그레이스 등)과 비교해 수량성이 낮았으며, 구형 역시 균일하지 못하였다. 특히 구속잎의 출현율이 높아 상품성 있는 품종을 선발할 수 없었다. 수원에서의 봄 작기 시험결과에서도 우수한 품종을 선발하지 못하였다. 특히 정식 초기 낮은 노지 기온 등에 의한 조기 출뢰 및 화퇴 부위 안토시아닌 색소 발현이 많았다. 그렇지만 동일 품종의 가을 재배에서는 우점 재배종(녹제 등)과 비교해 상품성과 수량성이 대등하거나 오히려 높은 품종을 선발할 수 있었다. 특히 제주 지역 월동 재배에서 가장 좋은 성적을 얻었는데, 이는 국내 브로콜리 생산의 70% 이상을 차지하는 제주 지역 적품종으로 보급하기에 유리할 것으로 보인다. 최종 선발된 ‘원교 8011’은 난지 월동재배로 정식 후 90 일 이후 수확 가능한 중-만생형 품종이고, ‘원교8012’는 일반 내륙 중간지의 가을재배 또는 난지권 월동재배로 정식 후 약 80 일 이후 수확 가능한 중생형 품종이다(Table 3).

Table 2. Summary of field trials for elite broccoli lines from microspore cultivation.

Label ¹⁾	Plant height (mm±S.D. ²⁾)	Curd weight (g±S.D.)	Pigment formation	Maturation
09-M38	342±12	198±14	Light purple	Early heading
09-M42	287±19	169±24	Light purple	Early heading
09-M89	208±15	93±11	No pigment	Early heading
09-M158	407±20	207±14	Purple	Middle heading
09-M174	297±16	164±13	No pigment	Early heading
09-M181	421±31	210±11	No pigment	Middle heading
09-M127	401±11	198±13	Light purple	Late heading
09-M138	354±22	201±18	Light purple	Early heading
09-M232	362±31	215±14	Light purple	Early heading
10-M11	277±18	159±17	Light purple	Early heading
10-M33	411±32	221±21	Light purple	Middle heading
10-M79	400±19	209±19	No pigment	Middle heading
10-M114	275±16	145±22	No pigment	Middle heading
10-M134	312±34	201±30	Purple	Middle heading
10-M153	299±15	177±12	Light purple	Early heading
10-M195	501±29	238±17	Light purple	Late heading
10-M201	385±20	199±10	Light purple	Middle heading

¹⁾All data were average of 2 different field trials, and each trial had 3 duplicated block that contain 20 broccoli plants per line.

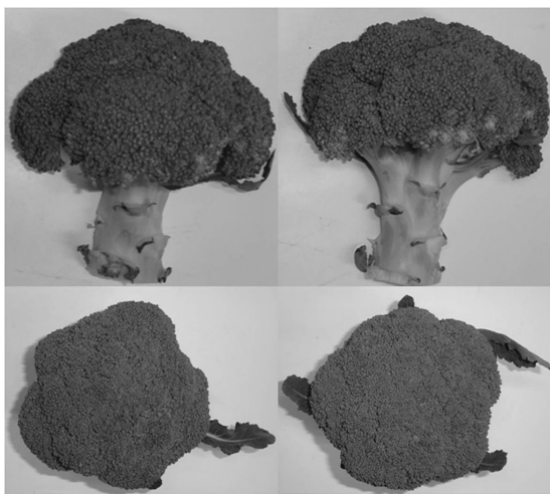
²⁾Standard Deviation

Table 3. Summary of horticultural traits for new broccoli varieties.

Label ¹⁾	Plant height (mm±S.D. ²⁾)	Curd weight (g±S.D.)	Pigment formation	Maturation
Control	576±11	280±19	Light purple	Middle heading
Wongyo8011	569±10	298±15	Light purple	Middle heading
Wongyo8012	571±13	275±12	Light purple	Middle heading

¹⁾All data is average of 3 different regional adaptation trials, and each trial has 3 duplicated block that contain 20 broccoli plants per line.

²⁾Standard Deviation

**Fig. 2.** New broccoli varieties(left: 'Wongyo8011', right: 'Wongyo8012')

IV. 결론

전통 육종에 필요한 기간 단축을 위해 본 연구에서 사용된 소포자 배양법은 기존에 알려진 것과 같이, 2년의 짧은 기간 동안 수백 점 이상의 브로콜리 계통을 육성해 내는 시험에 결정적으로 기여하였다. 다만 모든 브로콜리 유전자원에 일괄 적용 가능한 배지와 배양 조건을 찾을 수는 없었다. 특정한 유전자원만을 대상으로 우수 계통을 조기 확보해야 하는 경우에는 배양 중 변온 처리, 배지 내 AgNO₃ 및 미량원소의 추가 혹은 감량 등의 다양한 방법을 시도해 보아야 할 것으로 판단된다.

최종 지역적응 시험의 대상으로 선발된 17 품종은 최초

수원지역 가을재배 형으로 선발된 계통의 후대인 탓으로 강원지역 여름 재배용 혹은 수원지역 봄 재배용으로는 부적합하였다. 따라서 품종 육성에 있어 초기 우수 계통의 선발은 최종적으로 계획한 신품종의 목표 재배 지역에서 이루어져야 할 것으로 판단된다.

본 연구에서 육성된 우수 계통과 품종은 현재 품종 출원 중에 있으며, 계통의 경우 추후 국내 종묘회사 혹은 개인 육종가에 분양되어 국내 브로콜리 일대잡종 품종 육성에 사용될 예정이다.

참고 문헌

- Biggs AG. 1985. Vegetable Seed Production. In: *Principles of Vegetable Crop Production* edited by Fordham R. pp. 198-209. Collins, London, UK.
- Clement C, Sangwan RS, Sangqan-Norreel B. 2005. Microspore embryo induction and development in higher plants. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 56:53-72.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Jang SU, 2003. The Cultivation of Cauliflower and Broccoli. In: *The Cultivation of Western Vegetable* edited by Kim Y.U. pp. 95-149. Sammi, Suwon, Korea.
- Keller WA, Armstrong KC. 1979. Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. *Theoretical and Applied Genetics* 55:65-67.
- Kwak JH, Park MY, Kim KT, Yon MK, Park S, Kim DY, Cheong SR. 2012. Analysis of Horticultural Character and Genetic Relatedness of Broccoli Germplasm and Lines. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 30 (suppl. II):88.
- Lichter R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassic napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 105:427-434. MFAFF(Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries). 2012. Assessed in <http://www.mifaff.go.kr/main.jsp> on 5 November 2012.
- Na H, Kwak JH, Chun CH. 2011a. The effects of plant growth regulators, activated charcoal, and AgNO₃ on microspore derived embryo formation in broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*). *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 52(5):524-529.
- Na H, Hwang G, Kwak JH, Yoon MK, Chun CH. 2011b. Microspore derived embryo formation and doubled haploid plant production in broccoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) according to nutritional and environmental conditions. *African Journal of Biotechnology* 10(59):12535-12541.
- Takahata Y, Keller, WA. 1991. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Science* 74:232-242.
- Vicente JG, Dias JS. 1996. Production of embryos from microspore cultures of Portuguese tronchuda cabbage landraces. *Acta Horticulturae* 407:219-226.
- Wien HC, Wurr DCE. 1997. Cauliflower, Broccoli, Cabbage and Brussels sprouts. In: *The Physiology of Vegetable Crops* edited by Wein H.C. pp.511-552. CAB International, Oxon, UK.
- Yuan SX, Liu YM, Fang ZY. 2011. Effect of Combined Cold Pretreatment and Heat Shock on Microspore Cultures in Broccoli. *Plant Breeding* 130(1):80-85