

기내 사과나무 조직의 신초 재분화에 미치는 생장조절물질의 영향

전지혜* · 예병우 · 양미희¹ · 박재복²
원예연구소, ¹고령지 농업시험장, ²서울시립대학교

Influence of Growth Regulators on Adventitious Shoot Regeneration from Tissues of *Malus domestica* cv. 'Gala' in vitro.

JUN, Ji-Hyae* · YAE, Byeong-Woo · YANG, Mi-Hee¹ · PARK, Jae-Bok²

National Horticultural Research Institute, Suwon, 440-310, Korea: ¹National Alpine Agricultural Experiment Station, Hoenggye, 232-950, Korea: and ²Dept. of Environ. Hort., Seoul City Univ., Seoul, 130-743, Korea. *Corresponding author

The most effective cytokinin source for adventitious shoot regeneration of in vitro grown leaves from 'Gala' apple was BA with the concentration of 4.0 mg/L, while auxin source was IAA, IBA and NAA with the concentration of 0.1 mg/L, respectively. As the result of combinational treatment of BA and NAA, 6.0 or 8.0 mg/L BA with 0.5 mg/L NAA was effective for adventitious shoot regeneration from leaf tissues of 'Gala', 0.1 mg/L NAA + 8.0 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA + 8.0 mg/L BA for internode, and 0.1 mg/L NAA + 4.0 mg/L BA for petiole.

Key words: Apple, organogenesis, cytokinin, auxin, leaf, internode, petiole

식물 조직절편이나 세포로부터 식물체를 재분화 할 수 있는 기술은 묘의 번식이나 기내 돌연변이 유기, 유전자 조작에 의한 신품종 육성 등 기내육종이나 묘 번식의 기반 기술로서 중요한 의의를 지닌다. 그러나 일반적으로 목본성 식물은 초본성 식물에 비하여 세포나 조직 등을 이용한 식물체 재분화가 극히 어려운 것으로 알려져 있다.

사과에서 기내 식물체 재분화에 대한 보고는 다양한 품종 (Fasolo and Predieri, 1990)과 대목(Jones et al., 1984)에서 이루어지고 있으나 재분화에 대한 여러 처리나 조건 등이 품종들과 대목간에 많은 차이를 보이고 있다. James 등(1988)은 식물체 재분화 조건중 생장조절물질, 특히 cytokinin과 auxin은 사과 잎조직에서 식물체 재분화에 필수적 요인이며 생장조절물질 농도는 식물체 재분화에 크게 영향을 미치는 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구는 기내 사과나무 'Gala' 조직으로부터 식물체 재분화에 효과적인 생장조절물질의 종류와 농도 조건을 구명하고자 수행되었다.

재료 및 방법

공시 재료는 MS 기본배지에 BA 1.0 mg/L, IBA 0.3

mg/L, GA₃ 0.5 mg/L를 첨가하여 조제한 증식배지에서 3년 이상 계대배양을 통해서 유지, 증식된 사과(*Malus domestica* Borkh cv. Gala) 신초에서 조직을 채취하여 이용하였다. 조직 절편체는 증식배지에서 4주간 자란 신초에서 채취하였는데, 잎은 신초 선단부에서 3~5번째의 전개된 잎을 채취하여 잎의 선단부와 엽병을 완전히 제거하여 0.7 cm² 정도의 크기로 하였고, 절간은 길이가 0.5 cm 정도 되도록 각각 조제하여 이용하였다. 엽병은 전체를 이용하되 액아가 포함되지 않도록 주의하여 조제하였다. 배지내 cytokinin 종류와 농도가 'Gala' 잎조직에서의 신초 재분화에 미치는 영향을 비교하고자 MS + NAA 0.5 mg/L 배지에 BA, kinetin, 2ip 및 zeatin을 각각 2.0, 4.0 및 6.0 mg/L 씩 첨가하였고, auxin 종류와 농도별 재분화 정도는 MS + BA 4.0 mg/L 배지에 2,4-D, IBA, IAA, NAA 및 CPA를 각각 0.1, 0.5, 및 1.0 mg/L 씩 첨가하여 비교하였다. 또한 MS 기본배지에 BA를 0, 2.0, 4.0, 6.0 및 8.0 mg/L, NAA를 0, 0.05, 0.1, 0.5 및 1.0 mg/L로 조합하여 총 25처리로부터 잎, 절간 및 엽병 조직에 대하여 부위별로 신초 재분화 정도를 비교하였다. 실험에 사용한 재분화 배지는 각각 agar 7 g/L와 sucrose 30 g/L를 첨가하였고, pH는 멸균하기 전에 5.8로 조정하였다. 시험

구 배치는 완전확률화배치법으로 하였으며, 각 처리당 반복수는 3반복으로 하되 25 mL의 배지를 넣은 페트리디쉬에 절편체를 10개씩 치상하여 1반복으로 하였다. 통계처리는 Duncan의 다중검정 방법으로 하였다. 배양조건은 온도 25°C, 광도 3000 lux 정도로 유지하였으며 4주간 암배양한 후 16시간 일장으로 4주간 명배양하였다. 재분화 조사는 치상 8주 후에 실시하였다.

결과 및 고찰

이 연구를 통한 사과나무 조직의 신초 재분화 양상을 전반적으로 보았을 때, 배양후 3주 정도면 신초 형성을 육안으로 관찰할 수 있었으며 배양 기간이 경과함에 따라 신초수는 증가하는 경향을 나타내었다. 잎과 엽병조직은 절단부위에 약간의 callus가 형성되면서 절단면에서 신초 재분화가 이루어진 반면에 절간조직은 조직 전면에 유백색의 callus가 형성되면서 callus 속에서 신초가 재분화되었다(Figure 1).



Figure 1. Adventitious shoot formation from in vitro leaf(A) and internode(B) of *Malus domestica* Borkh. cv. Gala.

Cytokinin과 auxin의 종류와 농도에 따른 신초 재분화

사과 'Gala' 품종의 잎 조직으로부터 신초 재분화에 미치는 cytokinin의 영향을 구명하고자 BA 등 4종의 cytokinin을 처리한 결과, zeatin, kinetin, Zip는 재분화에 전혀 효과가 없었고 BA에서만 효과가 나타났는데, BA 2.0, 4.0, 및 6.0 mg/L 처리구가 50.0%, 88.0%, 90.0%로 나타나 BA 농도가 증가함에 따라 재분화율도 높아지는 경향이였다(Figure 2). Dufour(1990)는 'Gala' 잎 조직에서, Ancherani 등(1990)은 'MM106'의 잎 조직에서 BA 5 mg/L 처리가 신초 재분화에 효과적이라고 보고하였는데 본 실험의 결과에서도 BA 4.0 ~6.0 mg/L 처리에서 신초 재분화율이 높았다.

BA 4.0 mg/L가 첨가된 MS배지에 2,4-D, IBA, IAA, CPA 및 NAA를 각각 농도별 처리한 결과, 2,4-D에서는 신초 재분화가 전혀 일어나지 않았고, CPA는 0.1 mg/L 처리에서 일부 재분화가 일어난 것외에는 거의 재분화가 되지 않았으며 IAA, IBA 및 NAA 처리구에서는 신초 재분화가 일어

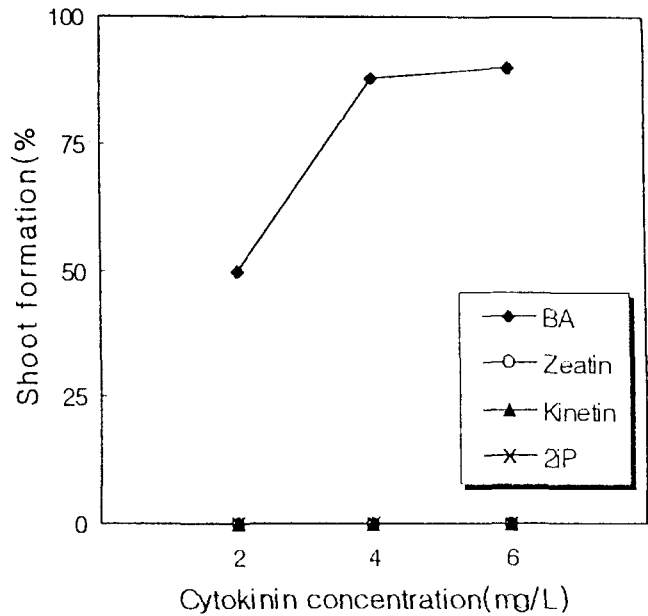


Figure 2. Effect of cytokinin type and concentration on adventitious shoot formation from in vitro leaves of *Malus domestica* cv. Gala. MS medium with NAA 0.5 mg/L was used.

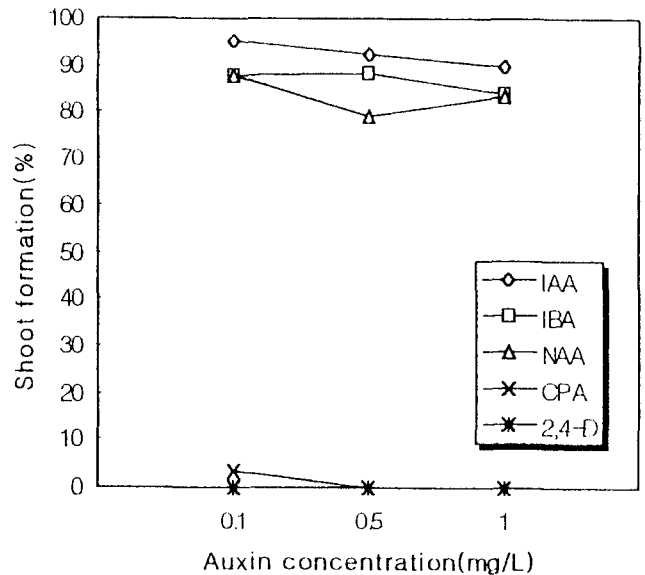


Figure 3. Effect of auxin type and concentration on adventitious shoot formation from in vitro leaves of *Malus domestica* cv. Gala. MS medium with BA 4.0 mg/L was used.

났다. 또한 이들 3종류의 auxin 모두 'Gala' 잎 조직에 효과적인 것으로 나타났으며 특히 IAA 0.1 mg/L 처리구에서 신초 재분화율이 95.0%로써 가장 높았으나 농도가 높아짐에 따라 신초 재분화율은 떨어지는 경향을 보였다(Figure 3). 사과 품종간 신초 재분화에 대한 auxin의 효과를 보면 Barbieri와 Morini(1987)는 'M26' 잎 조직의 경우 2,4-D 처리

구에서 재분화된 신초수가 가장 많았고, 'Golden Delicious' 경우에는 NAA 처리구에서만 신초 재분화가 이루어졌다고 하여 배양재료에 따라 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

Cytokinin과 auxin의 농도별 혼합처리에 따른 조직간의 재분화 효과

BA와 NAA를 농도별로 조합한 25개 처리에 대한 'Gala'의 잎, 절간 및 엽병 조직간의 신초 재분화율을 조사한 결과, 잎이 50.0%, 엽병이 45.3%, 절간은 21.9%로써 조직의 종류에 따라 재분화율의 차이가 현저하게 나타났으며, 조직 절편체당 재분화 신초수는 엽병, 잎, 및 절간조직에서 2.3, 2.0, 1.8개로 나타났다. 재분화된 신초 길이는 절간이 1.1 cm로 가장 길게 나타나 0.6 cm 길이인 잎과 엽병에 비하여 고도의 유의성을 나타내었다(Table 1, Figure 4).

Table 1. Effect of explant type on adventitious shoot formation from in vitro tissues of *Malus domestica* cv. 'Gala'.

Explant	Percentage of shoot formation	No. of shoots per explant	Shoot length (cm)
Leaf	50.0 ^b a ^a	2.0 b	0.6 b
Internode	21.9 c	1.8 b	1.1 a
Petiole	45.3 b	2.3 a	0.6 b

^aMeans separation by Duncan's multiple range test, P=0.05.
^bMean of 25 treatment.



Figure 4. Adventitious shoot formation from in vitro leaf(A), petiole(B) and internode(C) of *Malus domestica* Borkh. cv. Gala. MS medium with BA 4.0 mg/L and NAA 0.5 mg/L was used

잎조직의 경우, 가장 높은 신초 재분화율을 보인 처리구는 0.5 mg/L NAA + 6.0 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA + 8.0 mg/L BA이며 이때의 재분화율은 93.3%였다. BA 무첨가 처리구에서는 신초 재분화가 전혀 이루어지지 않았고, NAA 무첨가 처리구에서는 신초 재분화율이 극히 저조하였으나 신초 재분화가 이루어졌다(Table 2). 이는 Dufour(1990)의 보고와 마찬가지로 'Gala' 잎조직은 배지내 auxin이 없어도 신초 재분화가 가능한 것으로 나타났다.

Table 2. Combinational effect of NAA and BA on the rate of adventitious shoot formation from *Malus domestica*, cv. Gala leaf, in vitro.

NAA (mg/L)	BA(mg/L)					mean
	0	2.0	4.0	6.0	8.0	
0	0 f ^a	36.7 e	10.0 f	6.8 f	10.0 f	12.7
0.05	0 f	83.3 abc	76.8 abc	86.8 ab	66.8 bc	62.7
0.10	0 f	73.3 abc	86.7 ab	90.0 ab	83.3 abc	66.7
0.50	0 f	40.0 de	76.7 abc	93.3 a	93.3 a	60.7
1.00	0 f	20.0 ef	83.3 abc	60.0 cd	73.3 abc	47.3
mean	0	50.7	66.7	67.4	65.3	50.0

^aMeans separation by Duncan's multiple range test, P=0.05
MS medium with 30 g/L sucrose and 7 g/L Difco-Bacto agar was used.
Data evaluated after 8 weeks of culture.

Table 3. Combinational effect of NAA and BA on the rate of adventitious shoot formation from *Malus domestica*, cv. Gala internode, in vitro.

NAA (mg/L)	BA(mg/L)					mean
	0	2.0	4.0	6.0	8.0	
0	0 e ^a	10.0 cde	26.7 bcd	3.3 de	0 e	8.0
0.05	0 e	6.7 cde	13.3 cde	16.7 cde	6.7 cde	8.7
0.10	0 e	3.3 de	26.7 bcd	6.7 cde	66.7 a	20.7
0.50	0 e	30.0 bc	63.3 a	50.0 ab	46.7 ab	38.0
1.00	0 e	26.7 bcd	30.0 bc	46.7 ab	66.7 a	34.0
mean	0	15.3	32.0	24.7	37.4	21.9

^aMeans separation by Duncan's multiple range test, P=0.05
MS medium with 30 g/L sucrose and 7 g/L Difco-Bacto agar was used.
Data evaluated after 8 weeks of culture.

절간조직은 잎조직에 비해 신초 재분화율이 상당히 저조했다. 그러나, 잎조직과 마찬가지로 절간조직에서도 BA 무첨가구에서는 신초 재분화가 전혀 이루어지지 않았으며, NAA 무첨가 처리구에서는 신초 재분화가 이루어졌다. 신초 재분화율은 0.1 mg/L NAA + 8.0 mg/L BA와 1.0 mg/L NAA + 8.0 mg/L BA 처리구에서 66.7%로 가장 높게 나타났으며 비교적 고농도의 BA와 NAA에서 재분화율이 높은 경향이였다(Table 3).

엽병조직의 경우, 0.1 mg/L NAA + 4.0 mg/L BA 처리구가 신초 재분화율이 100%로써 다른 처리구에 비하여 현저히 높게 나타났으며, BA 무첨가 처리구와 NAA 무첨가 처리구에서는 신초 재분화가 전혀 이루어지지 않아, NAA 무첨가 처리구에서 신초 재분화가 이루어진 잎이나 절간조직의 경우와는 다른 양상을 나타냈다. 전체적으로 보아 비교적 저농도의 BA와 고농도의 NAA 처리구에서는 신초 재분화율이 낮게 나타나는 경향이 잎조직의 신초 재분화율과 유사한 양상을 나타냈다(Table 4).

위의 실험 결과로 볼 때, 동일 품종내에서도 조직간에 생장조절물질에 대한 반응이 다르게 나타났음을 알 수 있었

Table 4. Combinational effect of NAA and BA on the rate of adventitious shoot formation from *Malus domestica*, cv. Gala petiole in vitro.

NAA (mg/L)	BA(mg/L)					mean
	0	2.0	4.0	6.0	8.0	
0	0 e ^a	0 e	0 e	0 e	0 e	0
0.05	0 e	73.3 bc	80.0 ab	90.0 ab	83.3 ab	65.3
0.10	0 e	76.7 abc	100.0 a	86.7 ab	83.3 ab	69.3
0.50	0 e	40.0 d	73.3 bc	96.7 ab	80.0 ab	58.0
1.00	0 e	13.3 e	56.7 cd	56.7 cd	43.3 d	34.0
mean	0	40.7	62.0	66.0	58.0	45.3

^aMeans separation by Duncan's multiple range test, $P=0.05$

MS medium with 30 g/L sucrose and 7 g/L Difco-Bacto agar was used.

Data evaluated after 8 weeks of culture.

다. 따라서 식물체 재분화에 있어 조직 부위의 선택에 따라 적정 성장조절물질의 종류와 농도를 구명할 필요가 있을 것으로 생각되었다.

적 요

'Gala' 잎조직의 신초 재분화에 효과적인 cytokinin 종류와 농도는 BA 4.0 mg/L였고, auxin 종류와 농도는 IAA, IBA, 및 NAA 각각 0.1 mg/L였다. BA와 NAA를 농도별로 조합 처리하여 'Gala'의 잎, 절간 및 엽병의 신초 재분화 정도를 비교한 결과, 잎조직은 0.5 mg/L NAA + 6.0 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA + 8.0 mg/L BA 처리구에서, 절간조

직은 0.1 mg/L NAA + 8.0 mg/L BA와 1.0 mg/L NAA + 8.0 mg/L BA 처리구에서 신초 재분화율이 가장 높게 나타났으며, 엽병조직은 0.1 mg/L NAA + 4.0 mg/L BA 처리구에서 가장 높았다.

인 용 문 헌

- Ancherani, M., S. Predieri, and P. Rosati** (1990) Adventitious shoot formation from in vitro leaves of MM106 apple clonal rootstock. *Acta Horticulturae* **280**: 95-98.
- Barbieri, C. and S. Morini** (1987) In vitro regeneration from somatic tissues and seed explants of apple. *Adv Hort Sci* **1**: 8-10.
- Dufour, M.** (1990) Improving yield of adventitious shoot in apple. *Acta Horticulturae* **280**: 51-60.
- Fasolo, F. and S. Predieri** (1990) Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple. *Acta Horticulturae* **280**: 61-68.
- James, D.J., A.J. Passey, and E. Rugini** (1988) Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultured in vitro. *J Plant Physiol* **132**: 148-154.
- Jones, O.P., J.A. Gayner, and R. Watkins** (1984) Plant regeneration from callus tissue cultures of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium* × *P. pseudocerasus*) and the apple rootstock M25 (*Malus pumila*). *J Hort Sci* **59**: 463-467.

(1997년 1월 9일 접수)