

사과 자엽의 기내 식물체 재분화와 배양 광조건 및 절편체 극성과의 관계

안현주* · 예병우¹ · 임용표² · 신용익¹

제주농업시험장 감귤시험장, ¹원예연구소, ²충남대학교

Correlation between *in vitro* Plant Regeneration of Apple Cotyledon and Light Condition, Polarity of Explant

AN, Hyun-Joo* · YAE, Byeong-Woo¹ · LIM, Yong-Pyo² · SHIN, Yong-Uk¹

Citrus Experiment Station, RDA, Namwonup, 699-800, Korea

¹National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon, 440-310, Korea

²Dept. of Horticulture, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea

ABSTRACT The experiment was carried out to investigate the influence of light condition and polarity of explant on adventitious shoot formation from cotyledon of apple *in vitro*. The treatment of light culture after 10days dark treatment showed effective result than other treatments on the rate of adventitious shoot formation on light intensity treatments and also the treatment of blue light treatment after 4days dark treatment showed more effective result than other treatments in light quality treatments. The polarity of explant influence on adventitious shoot formation. Adventitious multiple shoot formation occurred at the proximal end of an excised cotyledon. In other words, shoot organogenesis occurred at the proximal cut surfaces of both proximal and distal explants rather than at the distal cut surface of proximal explants.

Key words: Adventitious shoot, apple, light intensity

서 론

과수의 품종 개량 방법으로는 교배 육종, 돌연변이 육종, 배수체 육종, 유전공학적 육종 등의 방법이 있으며, 지금까지는 주로 교배 육종이나 변이의 선발을 통한 신품종 육성법이 사용되고 있다. 그러나, 사과는 자가불화합성이 강한 영년생 작물로서 그 유전적 조성이 잡다하고 유년성이 길어 초기 수년간 영양 성장만 하므로 세대 진전이 느린 특성이 있다 (Malvin 1978). 따라서 묘목의 대량생산 및 과수 신품종육종을 위해서는 조직배양을 이용한 급속 대량증식 및 기내 돌연변이 유기, 체세포 잡종을 통한 신품종자형 창출, 유전자 조작에 의한 신품종 육성 등 고전적 교배육종의 한계를 극복할 수

있는 세포학적, 유전공학적 육종 방법이 상당한 가능성을 지니고 있는 것으로 보여진다. 세포나 조직으로부터 식물체를 재분화할 수 있는 능력은 일반적으로 목본류는 초본류에 비해 재분화율이 극히 낮거나 불가능한 것으로 알려져 왔다. 그러나 Jones 등 (1979)이 사과 성숙조직으로부터 엽 절편체를 채취하여 식물체 재분화를 성공시킨 이래로 사과 조직에서의 식물체 재분화에 대한 연구가 활발히 수행되었다.

신허증식과 발근에 영향을 미치는 요인은 배지의 구성성분, 탄수화물 급원, 성장조절물질의 종류와 농도 및 배양 환경 등 여러가지가 있는데, 많은 연구자들은 배양조건을 향상 시키기 위해 위에서 언급한 요인으로 많은 시험을 수행해 왔고, 특히 Winton (1978)은 광조건이 식물의 기관형성에 미치는 배양 환경조건 중 가장 중요한 요인이라 하였다.

작물에 따라 광조건에 대한 반응이 다르게 나타나고 있는데, 예를 들면 양앵두와 사과의 callus는 포도나 blackberry의 callus와는 달리 명조건보다 암조건에서 더 잘 자란다고

*Corresponding author. Tel 064-730-4141
E-mail hjan@ccri.go.kr

보고되고 있고, Liu 등 (1981)은 'Golden Delicious' 실생의 잎, 자엽 및 배축을 이용하여 광조건에 따른 신초 재분화 정도를 조사한 결과 잎과 자엽조직은 배양초기 3주간 암배양한 후 4주 명배양 처리구에서 신초 재분화율이 7주간 연속 명배양한 경우보다 5~20배 정도 높았으나 배축조직에서는 광조건이 신초 재분화에 큰 영향을 미치지 않았다고 보고하였다.

Kouider 등 (1984a)은 'Red Delicious'의 자엽조직을 4일간 암처리한 후 명상태로 옮길 때 3주 안에 callus를 형성하고 그 callus에서 신초가 분화되었으나 암처리를 하지 않고 계속 명배양할 경우에는 신초 형성이 지연되었다고 하였고 따라서 암조건이 사과 조직의 신초 재분화에 효과적이라고 보고하였다.

Atreya 등 (1984)은 peanut의 자엽 절편과 배축으로 부터 MS + 2 mg/L BA를 사용하여 성공적으로 식물체가 재분화되었음을 보고하였다. 신초 유기는 배축의 기부쪽 자엽 절편에서 현저하게 일어나고 식물 재분화력이 자엽의 말단 부위에 가까운 곳에서 감소하며 재분화력의 변화는 자엽 내에 존재하고 있다는 가설을 세웠다. Kouider 등 (1984b)은 사과 자엽으로부터 multiple shoot를 형성하고자 여러 가지 방법으로 자엽을 절제 처리한 결과 많은 중요한 차이점들을 관찰했다. 그들은 adventitious multiple shoot의 형성이 절제된 자엽의 기부 끝쪽에서만 발생했다고 보고하였다. Browning 등 (1987)은 높은 빈도의 신초 기관형성이 말단부 절편체의 기부쪽 절단면에서보다는 기부쪽 자엽 절편체의 말단부 절단면에서 획득되어진다고 보고하였다. 그들은 multiple shoot 재분화는 절편체가 한 방향으로의 극성을 지니고 있다는 사실과는 독립적이라고 하여 Kouider 등이 보고한 내용과는 다른 결과를 나타내었다. 따라서 본 실험은 *Malus domestica* 'Fuji'의 자엽조직으로부터 식물체를 재분화시키는 데 있어서 광조건 및 절편체 극성과의 관계를 알아보려 수행하였다.

재료 및 방법

본 시험에 사용한 'Fuji' 품종 과실은 원예연구소 과수육종과 시험포장에서 수확한 것을 분양받아, 과실에서 종자를 채취하여 실험에 이용하였다. 채취된 종자는 70% ethanol에 수초간, Tween 20이 첨가된 1% NaOCl 용액에 15분간 침적처리하여 표면 살균한 후 멸균 증류수로 3~4회 세척하여 소독액을 제거하였다. 이 무균화된 종자는 종피를 제거하고, 자엽은 종경기준으로 상단부와 하단부를 각각 20% 정도씩 제거한 후 치상하였다.

시험에 사용한 배지는 1/2 MS(half - strength MS)배지에 BA 3.0 mg/L, NAA 0.5 mg/L, Difco Bacto-agar 0.7%, sucrose 3%를 첨가하였고 pH는 멸균하기 전에 5.8로 조정하였다. 배양조건은 온도 25±2°C, 광도 3000 lux 정도로 유지하

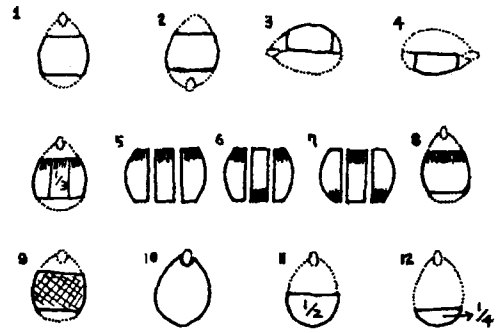


Figure 1. Diagrammatic description of excision treatments.

였으며 재분화 조사는 치상 후 60일만에 실시하였다.

광조건의 영향

'Fuji' 품종의 과실에서 종자를 채취하여 자엽조직을 분리한 후 신초 재분화 배지에 치상하여 16시간 장일조건처리, 1일 암배양 후 16시간 장일처리, 4일간 암배양 후 16시간 장일처리, 4일간 암배양 후 적색광으로 16시간 장일처리, 4일간 암배양 후 청색광으로 16시간 장일처리, 7일간 암배양 후 16시간 장일처리, 10일간 암배양 후 16시간 장일처리, 명배양 1주 후부터 7일간 암배양 후 16시간 장일처리, 명배양 4일 후부터 7일간 암배양 후 16시간 장일처리, 치상하여 조사일까지 계속 암배양하여 각 처리별 신초 재분화 정도를 비교하였다.

신초 재분화 유기와 절편체의 극성과의 관계

본 시험은 'Fuji' 품종을 공시하여 자엽의 polarity가 신초 재분화에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 자엽 절단 방법을 12가지로 각각 달리하여 신초 재분화 배지에 치상하여 재분화 효율을 비교하였다. 절단방법은 다음과 같다 (Figure 1). ①자엽 절편체의 기부와 말단부를 각각 20%씩 제거한 후 기부쪽 절단면이 배지 위로 오게 치상, ②기부쪽 절단면을 거꾸로 하여 배지 속에 묻히도록 치상, ③자엽의 상, 하단부를 20%씩 제거하고 수직으로 1/2등분하여 절단면이 배지 위로 오게 치상, ④절단면이 배지 속에 묻히도록 치상, ⑤, ⑥자엽 절편체의 말단부 2/3부분을 수직으로 3등분하여 기부쪽 절단면에 칼집을 낸 후 기부쪽 절단면을 배지 위로 오게 치상, ⑦절단면이 배지 속에 묻히도록 치상, ⑧자엽의 기부쪽 절단면에 칼집을 내어 치상, ⑨자엽의 표면에 칼집을 내어 치상, ⑩자엽의 배만 제거한 후 치상, ⑪자엽의 말단부 1/2만 배양, ⑫자엽의 말단부 1/4만 배양.

결과 및 고찰

배양환경 조건 중 광조성이 신초재분화에 미치는 영향

Table 1. Effect of dark pretreatment on adventitious shoot formation from *Malus domestica* 'Fuji' cotyledon *in vitro*.

Treatments	Shoot formation (%)	No. of shoot/explant	Shoot length (mm)
16h Daylight	28.2	1.5	3.3
1 day D + 16h	25.6	1.8	2.5
4 day D + 16h	38.5	1.8	4.9
7 day D + 16h	47.5	2.6	4.2
10 day D + 16h	57.0	3.7	4.4
7 day D + 16h after 4 week	25.5	1.5	2.4
7 day D + 16h after 4 days	42.5	2.4	2.6
Dark	37.0	1.2	2.7

Table 2. Effect of light quality on adventitious shoot formation from *Malus domestica* 'Fuji' cotyledon *in vitro*.

Treatments	Shoot formation (%)	No. of shoot/explant	Shoot length (mm)
4 day D + 16h Red	42.5	2.0	3.5
4 day D + 16h Blue	47.5	2.4	5.5

'Fuji' 자엽 조직에서 신초 재분화에 영향을 미치는 광조건을 구명하고자 전처리로서 암배양의 효과와 광질의 효과를 조사하였다. 전처리로서 암배양 기간에 따른 신초 재분화율 (Table 1)을 보면, 1~10일간 암배양한 처리구에서 암처리하지 않은 처리구에 비해 높은 재분화율을 보였으며 암배양 기간이 길수록 재분화율이 증가하는 경향이었고, 초기 명배양 후 암배양하는 것보다는 초기 암배양하는 것이 암배양의 효과가 더 높음을 알 수 있었다. 가장 높은 재분화율을 보인 처리구는 배양 초기 10일간 암처리한 후 명배양한 처리구이며, 이때의 신초 재분화율은 57.0%로 나타났다. 광질별로 비교할 때 (Table 2) 가장 높은 신초 재분화율을 보인 처리구는 전처리로 4일간 암배양한 후 청색광을 사용한 처리구이며, 형광등 처리구에서 가장 낮은 재분화율을 나타냈다. 사과 조직에서 식물체 재분화에 암처리가 중요한 요인이라는 것은 Christel 등 (1990)이 왜성대목 M26, M9의 잎조직에서, Liu 등 (1981)이 'Golden Delicious'의 잎과 자엽 조직에서 품종이나 치상 절편체에 따라 다소 차이가 있지만 대체적으로 배양 초기 2~3주간 암처리를 하는 것이 신초 재분화에 효과적이라고 보고한 바 있다. 암처리가 신초 재분화에 효과적인 원인은 정확히 밝혀진 것은 아니나, 첫째는 암배양 조건하에서는 polyphenol 산화제 활동이 감소되어 phenol과 관련된 독성 물질의 생성을 감소시키기 때문이며, 둘째는 광조건에 의해 휴면되는 요인 즉 phytohormone이 암조건에서 활동이 유도되어 신초 형성을 촉진하는 것으로 Kouider 등 (1984a)은 설

명하고 있다.

본 시험에서도 사과 조직의 식물체 재분화는 암조건 뿐만 아니라 어느 일정범위의 광질에 영향을 받는 것으로 나타났으며 따라서 적절한 광조건하에서 식물체를 배양할 때 식물 조직의 재분화 능력이 최대한으로 발휘되는 것으로 생각된다.

신초 재분화 유기와 절편체 극성과의 관계

절편체의 절단 방법에 따른 신초 재분화율의 효과와 절편체가 지니고 있는 극성의 영향에 대해 살펴보고자 12가지의 절단처리를 한 결과 (Table 3) 형성된 신초의 수에서 차이점들이 있었다. 자엽 절편체의 기부와 말단부를 각각 20%씩 제거한 후 기부쪽 절단면이 배지 위로 오게 치상한 처리①에서 신초 재분화율은 30%로 낮았고 기부쪽 절단면을 거꾸로 하여 배지 속에 묻히도록 치상한 처리②에서는 68%의 높은 신초 재분화율을 나타내었으나 투명화된 비정상적인 식물체의 분화가 많았다. 자엽의 상,하단부를 20%씩 제거하고 수직으로 1/2등분하여 절단면이 배지 위로 오게 치상한 처리③에서는 70%의 신초 재분화율을 나타내었고 기부쪽 절단면에서만 다량의 신초가 분화되었다. 재분화된 신초들의 길이는 중간치였다. 수직으로 절단된 절단면 자체에서는 신초의 재분화가 이루어지지 않았다 (Figure 2). 자엽 절편체의 말단부 2/3부분을 수직으로 3등분하여 기부쪽 절단면에 칼집을 낸 후 3가지의 다른 방법으로 치상했을 때 (처리⑤, ⑥, ⑦) 신초 재분화 부위를 배지 위로 오게 치상한 처리⑤, ⑥의 경우 재분화율이 65%, 75%로 높았으나 기부쪽 절단면을 배지 속에 묻히도록 한 처리⑦에서는 50%로 재분화율이 저조하였다. 따라서 이들 결과로 보면 모든 신초들은 기부쪽 절단면에서만 재분화 되었다.

이는 배의 자엽 절편체에서 Browning 등 (1987)이 기부조직 또는 말단부조직의 절단면이 배지 속에 묻히도록 하는 것보다는 오히려 위로 향하게 유지시킬 때 multiple shoot 재분화가 향상되어진다고 보고한 내용과 유사한 결과를 나타내었다. 처리⑩과 같이 배만 제거했을 때 아주 건전한 상태의 신



Figure 2. Effect of polarity of explant on adventitious shoot formation from *Malus domestica* 'Fuji' cotyledon. Treat. No.1,2 (above) 3,4 (below).

Table 3. Effect of polarity of explant on adventitious shoot formation from *Malus domestica* 'Fuji' cotyledon *in vitro*.

No. of excision treatments	Shoot formation (%)	No. of shoot/explant	Shoot length (mm)	No. of leafy shoots
1	30	4.2	1.1	50
2	68	5.5	1.4	827
3	70	3.5	1.1	689
4	26	4.4	1.6	325
5	65	4.5	1.0	351
6	75	3.0	0.9	652
7	50	3.3	1.7	720
8	53	3.8	0.9	132
9	58	3.4	0.7	112
10	75	3.2	1.1	244
11	37	3.3	0.8	8
12	20	5.5	0.7	77

초들이 다량으로 형성되었고 신초의 길이 또한 길었다. 처리 ⑩에서처럼 자엽의 말단부 1/2쪽만 배양할 경우 재분화된 신초의 수는 감소되었고 1/4쪽만 배양할 경우 (처리 ⑫)에도 그 재분화율은 현저히 감소하였다 (Figure 3).

Kouider 등 (1984b)은 사과 자엽으로 부터 multiple shoot를 형성하고자 여러 가지 방법으로 자엽을 절제 처리한 결과 많은 중요한 차이점들을 관찰했다. 그들은 adventitious multiple shoot의 형성이 절제된 자엽의 기부 끝쪽에서만 발생했다고 보고하였다. 다시 말해서, 신초의 기관형성은 기부쪽 절편체의 말단부 절단면에서 보다는 기부쪽 절편체와 말단부 절편체의 기부쪽 절단면에서만 발생한다고 보고하였다.

이러한 결과는 자엽 절편체에서의 식물체 재분화는 한 방향으로의 극성이 존재함을 시사한다

적 요

사과 자엽조직으로부터 기내에서 식물체를 재분화시키는 데에 있어서 배양 광조건 및 절편체 극성과의 관계를 살펴 보고자 사과 'Fuji' 품종의 자엽을 재료로하여 광조건 및 광질을 달리하여 배양하였고, 또한 여러 가지 형태의 절편체를 사용하여 시험을 수행하였다. 배양환경조건 중 광조성에 따른 신초 재분화율을 본 결과 배양 초기 10일간 암배양한 후 명배양한 처리구에서 가장 높은 재분화율을 나타내었으며, 배양 중기의 암처리는 효과가 없었다. 광질별로 비교할 때 전처리로 4일간 암배양한 후 청색광을 조사한 처리구에서 높은 신초 재분화율을 나타내었다.

신초 재분화 유기와 절편체 극성과의 관계를 보면 모든 신초의 형성은 절제된 자엽의 기부 끝쪽에서만 이루어졌다. 즉, 기부쪽 절편체의 말단부 절단면에서보다는 기부쪽 절편체와



Figure 3. Effect of polarity of explant on adventitious shoot formation from *Malus domestica* 'Fuji' cotyledon. Treat. No. 5,6,7 (above) and 10,11,12. (below)

말단 절편체의 기부쪽 절단면에서 식물체의 재분화가 이루어 짐을 알 수 있었다. 신초 유기는 배측의 기부쪽 자엽 절편체에서 매우 높게 나타난 반면 자엽의 말단부위에 가까운 곳에서는 현저히 감소하였다.

인용문헌

- Atreya CD, Rao JP, Subrahmanyam NC (1984) *In vitro* regeneration of peanut (*Arachia hypogaea* L.) plantlets from embryo axes and cotyledon segments. *Plant Sci Lett* 34:379-383.
- Browning G, Ognjanov V, Passey AJ, James DJ (1987) Multiple shoot and root regeneration from pear embryo cotyledon explants *in vitro*. *J Hort Sci* 62:305-311
- Christel TH, Hedtrich RT (1990) Influence of TDZ and BA on adventitious shoot regeneration from apple leaves. *Acta Hort* 280:195-199
- Jones OP, Pontikis CA, Hopgood ME (1979) Propagation *in vitro* of five apple scion cultivars. *J Hort Sci* 54 (2) 155-158
- Kouider M, Skirvin RM, Korban SS, Widhem JM, Havptmann R (1984a) Adventitious shoot formation from Red Delicious apple cotyledons *in vitro*. *J Hort Sci* 59 (3) 259-302
- Kouider M, Korban SS, Skirvin RM, Chu MC (1984b) Influence of embryonic dominance and polarity on adventitious shoot formation from apple cotyledons *in vitro*. *J Amer Soc Hort Sci* 109:381-385
- Liu JR, Sink KC, Dennis FG (1981) Regeneration of *Malus domestica* cv. Golden Delicious callus, cotyledon, hypocotyl and leaf explants. *HortSci* 16: 460

Melvin NW (1978) Temperate-zone pomology. W.H. Freeman and company. pp.40-46

Winton LL (1978) Morphogenesis in clonal propagation of woody plants. *In*: Thorpe T.A.(ed). Frontiers of plant tissue culture 1978. Calgary: The International Association for Plant Tissue Culture, pp 419-436

(접수일자 1999년 10월 14일)