

사과 *P.16* × *Malus prunifolia* 교잡실생의 자엽 및 배축배양에 의한 식물체 재분화

김송남* · 오성도 · 김영숙¹

전북대학교 원예학과 (농업과학기술연구소)

¹전북대학교 유전공학연구소

Plant Regeneration from Cotyledon and Hypocotyl Culture in Apple Hybrid Seedling (*P.16* × *Malus prunifolia*)

JIN, Song Nan* · OH, Sung Do · KIM, Young Sook¹

Department of Horticulture, Institute of Agricultural Science & Technology, Chonbuk National University,
Chonju, 561-756, Korea

¹Institute for Molecular Biology & Genetics, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

ABSTRACT Adventitious shoots were induced from cotyledon and hypocotyl explants of apple hybrid seedlings (*P.16* × *Malus prunifolia*) on MS medium supplement with 2,4-D, and various cytokinine (Kn. BA, TDZ). The shoot regeneration from the cotyledon culture was the highest on MS medium supplemented with 1.0 mg/L NAA and 2.0 mg/L BA. Whereas in case of hypocotyl culture, it was the highest on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA. However, in the MS medium without BA there was no shoot regeneration. Hypocotyl culture seemed to be more effective than cotyledon culture in shoot regeneration. Specially, the top position of the hypocotyl found to be the best explant for shoot induction among the other segments of hypocotyls. Regenerated shoots were rooted on half-strength MS medium with 1.0 mg/L NAA. Above results suggest that Apple hybrid (*P.16* × *Malus prunifolia*) can be multiplied via cotyledon or hypocotyl culture systems.

Key words: adventitious shoot induction, *P.16*, *Malus prunifolia*, PGRs effect

서 론

사과나무는 많은 왜성대목 계통이 있으며 대목 종류에 따라 성장습성이 다르기 때문에 재배양식 (planting system)도 매우 다양하다. 그러나 많은 왜성대목들이 환경적응성, 병해충, 생리장애 등의 문제점을 갖고 있으므로 아직도 세계적으로 우량한 왜성대목 육종이 계속되고 있다 (Cummins and Aldwinckle 1983). 과수 대목육성은 일반 품종육종과 달리

잡종체의 많은 영양개체가 필요하다. 즉 그 자체의 생육특성 뿐만 아니라 접목친화성, 토양적응성, 병해충 이병성 등 여러 가지 특성을 동시에 조사해야 하기 때문에 많은 개체가 소요된다. 그러므로 교배잡종을 육성하면서 이들 개체의 영양번식을 동시에 실시해야 한다. 영양개체 번식의 방법으로 조직배양을 이용하면 단기간에 많은 개체를 얻을 수 있는 장점이 있기 때문에 최근 많이 이용되고 있다.

기내 사과나무 식물체 재분화에 대한 보고는 다양한 품종 (Fasolo and Predieri 1990)과 대목 (James et al. 1988; Famiani et al. 1994; Pawlicki and Welander 1994)에서 이루어졌고 사과 왜성대목을 위시한 여러 과수의 대목을 공시하여 조직배양을 통한 식물체 분화를 실험하기도 하였다

*Corresponding author. Tel 063-270-2577

E-mail jsn0504@kebi.com

(Cheng 1979). 식물체 재분화는 유전자형, 치상체, 배양조건 (Fasolo et al. 1989; Predieri and Fasolo 1989; Druart 1990; Korban et al. 1992)에 따라 많은 차이가 있다. 특히 사과나무의 여러 조직으로부터의 기관분화는 식물생장조절물질이 중요한 역할을 하며 (Famiani et al. 1994), James 등 (1988)은 사과나무 잎조직의 식물체 재분화에 시토키닌과 옥옥신은 필수적인 요인이라 보고하였다. P.16은 폴란드에서 육성된 대목으로 왜화성은 M.9와 같고 내한성이 강하며 생산력도 좋아 유망시되는 대목이다 (Ferree and Carlson 1987). 따라서 본 실험은 사과나무 왜성대목 육종을 위하여 P.16에 우리 나라 환엽해당을 교배한 잡종을 공시재료로 하여 육종을 위한 잡종개체를 조직배양을 통하여 다량증식의 가능성을 조사하고 자 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료는 1996년 5월 미국 제네바에 소재한 뉴욕농업시험장 과수포장에 재식된 P.16 성목에 환엽해당 (*Malus prunifolia*)을 교배하여 채종한 성숙종자를 채종후 전북대 원예학과 과수연구실에서 4°C로 저온 처리하여 휴면 타파시킨 후 버미큘라이트와 모래를 1:1 (v/v)로 채운 파종상에 파종하여 발아 후 15일 된 유묘의 자엽과 배축을 절편체로 사용하였다. 재료의 멸균은 70% 알코올에 수초간 침지한 후 tween 20을 1~2방울 적하시킨 7% calcium hypochlorite 수용액 (w/v)에 10분간 표면살균 시킨 후 멸균수로 3회 수세하였다. 자엽과 배축 절편체로부터 신초를 유도하기 위한 배지는 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 2,4-D, NAA, 키네틴, BA 및 thidiazuron(TDZ)을 각종 농도로 조합하였으며, 유도된 신초의 발근을 위한 배지는 1/2 MS 배지에 NAA를 단용 처리하여 sucrose 30g/L 첨가하고 pH를 5.8로 조정한 후 agar 8g/L을 첨가하였다. 자엽절편과 배축절편은 배지를 10 mL씩 분주한 시험관 (2.5cm×15cm)에 각각 0.3 cm²와 0.5~1cm 정도의 크기로 3개씩 치상하여 8반복으로 하여 암배양하였고 배축의 부위별 분화양상을 조사하기 위하여 발아 후 15일된 어린묘의 배축을 상, 중, 하의 세부위로 나누어 동일한 배지에 치상하였다. 배양 6주 후 자엽절편과 배축으로부터 유도된 신초수를 조사하였으며 분화된 신초의 발근을 위하여 25°C와 3000 lux, 16시간 조명하에 발근배지에서 계대 배양한 후 발근양상을 조사하였다.

결과 및 고찰

신초분화에 미치는 생장조절제의 효과

본 연구에서 사과나무 교배잡종 (P.16 × M. prunifolia) 중

자를 받아시켜 얻은 자엽과 배축조직으로부터 캘러스 형성과 신초 재분화 양상을 전반적으로 관찰하였을 때 암배양 2주 후 자엽은 절편체 절단부위에 담황색의 단단한 캘러스가 형성된 반면 배축조직은 조직의 전반에 캘러스가 형성되는 경우가 많았다 (Figure 2A). 배양 3주 후에는 신초가 형성되기 시작하였고 배양기간이 길어짐에 따라 신초수도 증가되는 경향을 나타내었다. 신초분화 양상은 자엽과 배축의 절단면으로부터 직접 신초가 형성되는 것 (Figure 1A, Figure 2B)과 캘러스를 경유하여 재분화되는 것도 있었다 (Figure 1B, Figure 2C).

자엽절편의 경우, 신초 재분화는 NAA와 BA의 혼용첨가구가 2,4-D와 키네틴을 조합하였을 때보다 더 양호한 반응을 나타내었는데 특히 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA 처리구가 가장 빠른 반응을 보였다. 그러나 1.0 mg/L NAA + 2.0 mg/L BA 처리구가 가장 많은 신초 재분화율과 캘러스 형성률을 보였는데 각각 42%와 67%였으며 BA 무첨가 처리구에서는 신초 재분화가 전혀 이루어지지 않았는데 이는 Mushtaq와 Skirvin (1997)의 보고와 마찬가지로 자엽조직의 신초 재분화에 옥옥신보다 시토키닌의 효과가 큰 것으로 나타났다. 2,4-D와 키네틴을 조합한 배지에서는 신초나 뿌리의 분화가 없는 반면 캘러스 형성율은 1.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L 키네틴의 비교적 고농도의 배지에서 52%로 양호한 편이었다. 한편 2,4-D와 TDZ를 각각 단용처리하였을 때 매우 저조한 반응을 보여 단지 한 개의 직접 신초만 분화되었고 NAA를 단용 처리했을 때는 신초 재분화가 전혀 이루어지지 않는 반면 치상체의 절단면으로부터 캘러스만 형성되거나 뿌리가 많이 분

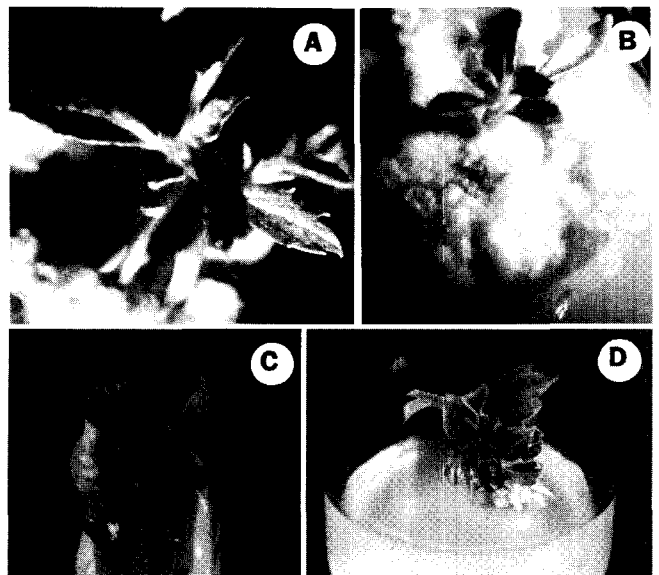


Figure 1. Shoot and root formation through cotyledon segment culture of apple hybrid (P. 16 × M. prunifolia). A, Direct shoot formation; B, Shoot formation from callus; C, Elongated shoot cultured on MS medium supplemented with 1.0 mg/L NAA and 2.0 mg/L BA; D, Rooted plantlet cultured on 1/2 MS medium supplemented with 1.0 mg/L NAA.

화되었다 (Table 1). 사과 품종간 신초 재분화에 대한 생장조절물질의 효과를 보면 Mushtaq와 Skirvin (1997)은 'McIntosh' 잎조직의 경우 TDZ처리가 6-benzylaminopurine (BAP)처리보다 신초 재분화에 더 효과적이라

고 하였으며, Barbieri와 Morini (1987)는 'M.26' 엽배양에서 2,4-D처리가 가장 많은 신초분화를 유도하였다고 보고했고, 'Golden Delicious'의 경우 단지 NAA처리에서 신초가 분화되었다고 하였는데 생장조절물질의 효과가 품종에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다.

배측의 경우, 자엽절편을 배양하였을 때와 마찬가지로 NAA와 BA를 조합한 배지가 2,4-D와 키네티んの 조합보다 신초 재분화와 캘러스 형성률이 더 양호하였다. 2,4-D와 키네티んの 조합은 1.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L 키네티んの 비교적 고농도 처리구에서 신초 재분화율과 캘러스 형성률이 각각 33%와 76%였으나 NAA와 BA의 조합은 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA 처리구에서 신초 재분화율과 캘러스 형성률이 각각 38%와 90%로 가장 높은 반응을 보였다. BA 무첨가구에서는 자엽조직의 경우와 마찬가지로 신초 재분화가 전혀 이루어지지 않았다. 한편 2,4-D 단용처리구에서 캘러스 형성이 없이 뿌리만 분화되는 반면 NAA를 단용처리한 배지에서는 신초의 분화는 없었지만 캘러스 형성과 뿌리의 분화가 비교적 양호하였다. 그러나 TDZ 단용처리구에서는 아무런 반응도 없었다. 전체적으로 볼 때 비교적 저농도의 NAA와 BA를 조합한 처리구에서 신초 재분화가 높게 나타나는 경향이 자엽조직의 비교적 고농도의 NAA와 BA를 혼용한 처리구에서의 신초 재분화와 다른 양상을 나타내었다 (Table 2).

배측의 부위별 배양효과를 조사하고자 배측을 상, 중, 하의 세 부위로 나누어 NAA 0.5 mg/L와 BA 0.5 mg/L을 첨가한 배지에 치상하여 배양 6주 후 조사한 결과는 table 3과 같다. 신초 분화와 캘러스 형성은 배측의 상위, 중위, 하위순으로 나타난 반면 발근양상은 배측의 상위, 하위, 중위순으로 나타났다. Mushtaq와 Skirvin (1997)은 'McIntosh' 잎조직의 경우

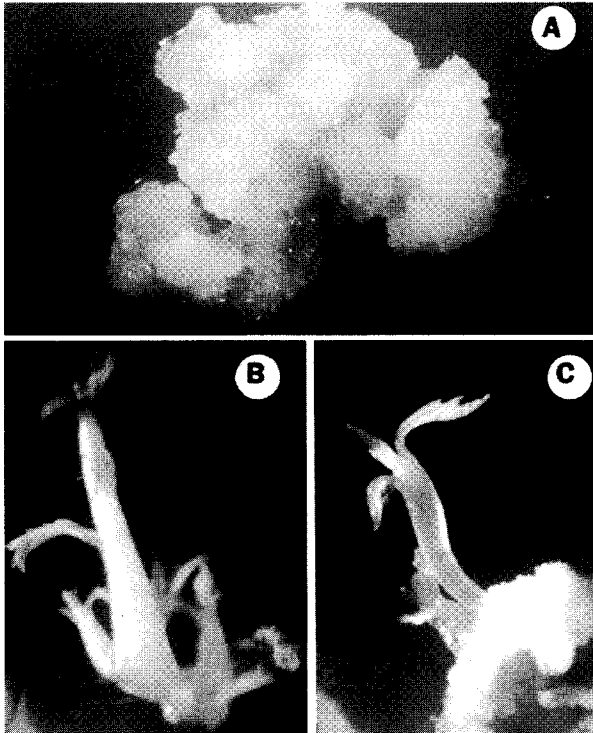


Figure 2. Callus and shoot induction from the hypocotyl segment culture of apple hybrid (*P. 16 × M. prunifolia*). A, Callus formed on MS medium supplemented with 0.5mg/L NAA and 0.5 mg/L BA; B, Multiple shoots formed directly from the edge of explant; C, Regenerated shoots from callus.

Table 1. Effect of PGRs regulators on shoot induction through cotyledon segment culture in apple hybrid (*P.16 × M. prunifolia*)^a.

Plant Growth Regulators (mg/L)					No. of explants cultured	No. of regenerated shoots	Percentage of ^b		
2,4-D	Kinetin	NAA	BA	TDZ			Shoot formation	Callus formation	Root formation
0.2	0.1	-	-	-	24	-	-	-	
0.2	0.5	-	-	-	24	-	-	-	
0.5	-	-	-	-	24	1	-	-	
0.5	0.5	-	-	-	24	-	-	-	
0.5	1.0	-	-	-	24	-	11	-	
1.0	2.0	-	-	-	24	-	52	-	
-	-	0.2	0.1	-	24	4	17	70	
-	-	0.2	0.5	-	24	7	29	64	
-	-	0.5	-	-	24	-	-	22	
-	-	0.5	0.5	-	24	1	4	58	
-	-	0.5	1.0	-	24	8	33	57	
-	-	1.0	2.0	-	24	10	42	67	
-	-	-	-	0.01	24	-	-	-	
-	-	-	-	0.05	24	2	8	-	
-	-	-	-	0.1	24	-	-	3	

^aMS basal medium was used.

^bPercentage to inoculated explants.

Table 2. Effects of PGRs on shoot induction through hypocotyl segment culture in apple hybrid (*P.16 × M. prunifolia*)^a.

Plant Growth Regulators (mg/L)					No. of explants cultured	No. of regenerated shoots	Percentage of ^b		
2,4-D	Kinetin	NAA	BA	TDZ			Shoot formation	Callus formation	Root formation
0.2	0.1	-	-	-	24	-	13	-	
0.2	0.5	-	-	-	24	-	17	-	
0.5	-	-	-	-	24	-	-	8	
0.5	0.5	-	-	-	24	-	25	4	
0.5	1.0	-	-	-	24	1	57	-	
1.0	2.0	-	-	-	24	8	76	-	
-	-	0.2	0.1	-	24	-	88	4	
-	-	0.2	0.5	-	24	2	67	-	
-	-	0.5	-	-	24	-	58	21	
-	-	0.5	0.5	-	24	9	90	-	
-	-	0.5	1.0	-	24	2	63	-	
-	-	1.0	2.0	-	24	1	80	-	
-	-	-	-	0.01	24	-	-	-	
-	-	-	-	0.05	24	-	-	-	
-	-	-	-	0.1	24	-	-	-	

^aMS basal medium was used.

^bPercentage to inoculated explants.

가운데 부분을 치상하였을 때 신초 재분화가 가장 높았다고 하였는데 이는 조직의 부위에 따라 생장조절물질의 효과가 다를 수 있었다.

위의 실험 결과에서 사과나무 교배잡종의 조직간과 조직의 부위에 따라 오옥신과 시토키닌에 대한 반응이 다르게 나타났으므로 식물체 재분화에 있어 조직과 부위에 따라 생장조절물질의 종류와 적정농도를 구명할 필요가 있을 것으로 생각되었다.

신초로부터 뿌리분화

일반적으로 목본식물의 뿌리분화에 있어서는 IBA를 주로 사용하지만 (Hartmann et al. 1990) 본 연구에서 자엽과 배축 절편 모두 NAA 단용처리구에서 신초 재분화는 없는 반면 뿌리 분화가 많았기에 NAA를 0.5~2.0 mg/L의 농도로 첨가한 배지에 신초를 계대배양하여 조사한 결과 NAA 1.0 mg/L 첨가구에서 비교적 발근이 양호하였다 (Figure 3). 오옥신은 일반적으로 발근하기 힘든 목본식물에 처리하면 내초부분의 세포분열을 촉진하여 지근 또는 부정근의 형성을 촉진한다고 알려졌다 (Kwak et al 1996). De Klerk 등 (1997)은 기내 사과나무 'Jork 9' 신초의 뿌리분화에서 IAA가 IBA와 NAA보다 더 효과적이었으나 NAA는 비교적 저농도에서 뿌리가 8개정도 분화되었다고 하였고 왜성대목의 경우 신초를 계대배양할 때 NAA 첨가 배지에서 발근이 양호하였다는 보고 (Lane 1980)가 있음을 볼 때 사과대목 및 품종에 따라서는 IBA보다 NAA가 더 효과적인 경우도 있음을 알 수 있다. 발근된 개체는 정상적인 식물체로 성장하였다 (Figure 1D). 따라서 사과나무 교배잡종 (*P.16 × M. prunifolia*)을 조직배양

시 MS 배지에 식물생장조절물질을 적절히 첨가하므로써 완전히 식물체의 분화가 실현되었으므로 조직배양에 의한 증식이 가능할 것으로 추정되었다.

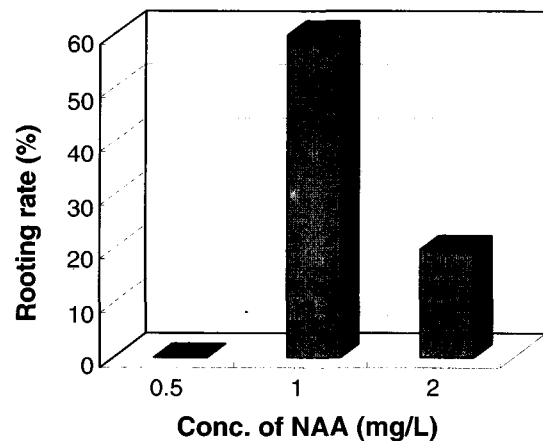


Figure 3. Effect of NAA on root formation from shoot after 30 days of culture in apple hybrid (*P.16 × M. prunifolia*).

Table 3. Position effect of hypocotyl segment on plant regeneration in apple hybrid (*P.16 × M. prunifolia*)^a.

Position of hypocotyl	No. of explants cultured	No. of regenerated shoots	% of Shoot formation	Callus formation	% of Root formation
Top	24	7	29	+++ ^b	67
Middle	24	2	8	++	4
Base	24	-	-	++	21

^aMS basal medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA was used.

^b++, Moderate; +++, good.

적 요

사과나무 교배잡종 (*P.16 × M. prunifolia*)의 자엽과 배축 조직을 배양하여 신초의 재분화에 미치는 2,4-D, NAA, 키네틴, BA, thidiazuron의 처리효과를 조사하였다. 자엽조직은 1.0 mg/L NAA + 2.0 mg/L BA 처리구에서, 배축조직은 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA 처리구에서 가장 많은 수의 신초가 분화하였으며, BA 무첨가구에서는 신초의 재분화가 전혀 이루어지지 않았다. 자엽조직보다는 배축조직을 배양하는 것이 더 효과적이었으며 특히, 배축의 상위부분을 치상하였을 때 신초 재분화가 더 양호하였다. 재분화된 신초를 1/2 MS에 1.0 mg/L NAA를 첨가한 발근배지에 계대배양한 결과 발근이 양호하였으며 정상적인 식물체로 성장하였다.

인용문헌

- Barbieri C, Morini S (1987) *In vitro* regeneration from somatic tissues and seed explants of apple. *Adv Hort Sci* 1:8-10
- Cheng T-Y (1979) Micropropagation of clonal fruit tree rootstocks. *Compact Fruit Tree* 12:127-137
- Cummins JN, Aldwinckle HS (1983) Breeding apple rootstocks. *Plant Breed Rev* 1:294-394
- De Klerk GJ, Ter Brugge J, Marinova S (1997) Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthalene acetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. *Plant Cell Tiss Org Cult* 49:39-44
- Druart P (1990) Effect of culture conditions and leaf selection on organogenesis of *Malus domestica* cv McIntosh 'Wijcik' and *Prunus canescens* 'GM.79'. *Acta Hort* 280:117-124
- Famiani F, Ferradini N, Staffolani P, Standardi A (1994) Effect of the leaf excision time and age, BA concentration and dark treatments on *in vitro* shoot regeneration of M.26 apple rootstock. *J Hort Sci* 69:679-685
- Ferree DC, Carlson RF (1987) Apple root stocks. pp. 107-143. In: R.C. Rom and R.F. Carlson (eds.), *Rootstocks for fruit crops*. Wiley-Interscience, New York.
- Fasolo F, Zimmerman RH, Fordham I (1989) Adventitious shoot formation on excised leaves of 'in vitro' grown shoot of apple cultivars. *Plant Cell Tiss Org Cult* 16:75-87
- Fasolo F, Predieri S (1990) Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple. *Acta Hort* 280:61-68
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT (1990) *Plant Propagation: Principles and Practices*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ
- James DJ, Passey AJ, Rugini E (1988) Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultured *in vitro*. *J Plant Physiol* 132:148-154
- Korban SS, O'Connor PA, Elobeidy A (1992) Effects of thidiazuron, naphthalene acetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves. *J Hort Sci*. 67:341-349
- Kwak BW, Lim HB, Sohn EY, Kim YW (1996) Plant growth and hormone. *Plant Physiology*, Ed3, Hyang Mun Sa, Seoul, pp 197-205
- Lane WD (1980) Test tube propagation of apple and pear. *Canada Agri* 25:24-26
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497
- Mushtaq S, Skirvin RM (1997) Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'McIntosh' apple (*Malus × domestica* Borkh.) *in vitro*. *Sci Hort* 68:95-100
- Pawlicki N, Welander M (1994) Adventitious shoot regeneration from leaf segments of *in vitro* cultured shoots of the apple rootstock Jork 9. *J Hort Sci* 69:687-696
- Predieri S, Fosolo F (1989) High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple root stock M26 (*Malus pumila* Mill). *Plant Cell Tiss Org Cult.* 17:133-142

(접수일자 2000년 6월 26일)