

M.9 계통 사과 대목의 기내 급속 번식

전지혜^{1*} · 정경호¹ · 정상복¹ · 홍경희² · 강상조³

¹원예연구소 과수육종과, ²원예연구소 나주배연구소, ³농촌진흥청 연구관리국

Rapid Multiplication of M.9 Apple Rootstocks *in vitro*

Ji Hae Jun^{1*}, Kyeong Ho Chung¹, Sang Bouk Jeong¹, Kyung Hy Hong², and Sang Jo Kang³

¹Fruit Tree Breeding Division, National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 440-706, Korea

²Naju Pear Research Institute, National Horticultural Research Institute, RDA, Naju 520-820, Korea

³Research Management Bureau, RDA Suwon 440-707, Korea

*corresponding author

ABSTRACT This experiment was conducted to find out the optimum cultural conditions for the propagation of M.9 apple rootstocks such as EMLA M.9 and NAKB T-337 *in vitro*. Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1.0 mg · L⁻¹ BA, 0.1 mg · L⁻¹ IAA, 30 g · L⁻¹ sucrose, and 8 g · L⁻¹ agar was suitable for shoot proliferation. Removing of apical meristem and horizontal placing of explants on medium increased shoot proliferation significantly. The best rooting was obtained on 1/2 MS medium supplemented with 0.5 mg · L⁻¹ IBA, 20 g · L⁻¹ sucrose, and 8 g · L⁻¹ agar.

Additional key words: auxin, cytokinin, EMLA M.9, NAKB T-337

서 언

최근 우리나라의 사과 재배에서는 M.9 NAKB T-337과 같은 극 왜성 대목을 이용한 저수고 초밀식 재배 방식이 도입되어 M.9 계통 대목의 수요가 늘어나고 있는 실정이지만, 이들 왜성대목은 증식효율이 낮은 stooling 및 layering에 의하여 번식되고 있어 최근 대목의 적기 공급에 문제점을 안고 있다.

조직배양을 통한 급속 증식 방법은 균일한 묘목을 단시일에 급속히 증식할 수 있을 뿐 아니라 바이러스 무독묘 생산이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 경정배양을 통한 사과나무의 번식 방법은 오래 전부터 여러 나라에서 연구된 바 있으나(Dunstan 등, 1985; James와 Thurbon 1981; Jones와 Hartfield, 1976; Jones 등, 1977) 몇몇 품종이나 대목에 있어 기내 발근 및 건전한 신초 형성 등에 문제점을 가지고 있다. 특히 M계, MM계 사과 대목의 경정배양에서는 이상 신초의 발생이 높아 증식률을 떨어뜨리는 문제점을 가지고 있다(Masuda 등, 1988). 따라서 본 연구는 조직배양을 통하여 M.9 계통 사과 대목의 급속 번식 방법을 구명함으로써 M.9 대목을 이용한 저수고 초밀식 재배시스템에서 요구되는 묘목의 조기 공급과 균일한 묘목 생산에 필요한 기초자료를 제공하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

1. 식물재료 및 배양조건

바이러스 무독상태로 온실에서 생육하고 있는 EMLA M.9, M.9 NAKB T-337 사과 대목의 신초를 채취하여 Jun 등(1998)의 방법으로 살균한 다음 호르몬이 첨가되지 않은 MS(Murashige와 Skoog, 1962) 배지에 치상하고, 10일 후 오염되지 않는 건전한 신초만을 1.0mg · L⁻¹ BA, 0.3mg · L⁻¹ IBA, 0.5mg · L⁻¹ GA₃가 첨가된 MS 배지에서 증식하여 시험 처리에 이용하였다. 시험구 배치는 각 처리별로 완전확률화배치법 5반복으로 하되 25mL 배지를 넣은 100mL jar에 절편체를 3개씩 치상하여 1반복으로 하였다. 이때 배지는 8g · L⁻¹ agar가 첨가된 고체배지(pH 5.8)를 사용하였으며, 배양조건은 온도 25℃, 광도 3,000lx, 1일 16시간 형광등 조명이었다. 다만, 발근 유도 시에는 배양초기 10일간 암처리를 실시하였다. 신초 증식 및 발근 정도는 처리 4주 후에 조사하였다.

2. 기내 신초 증식조건 구명

가. 배지 종류

신초 증식에 적합한 배지 종류를 구명하고자 1.0mg · L⁻¹ BA, 0.3mg · L⁻¹ IBA, 0.5mg · L⁻¹ GA₃, 30g · L⁻¹ sucrose가 각각 첨

* Received for publication 13 December 2000. Accepted for publication 27 December 2000. 본 연구는 농림부 농림수산특정과제비의 지원에 의하여 수행되었음.

가된 MS, LS(Linsmaier와 Skoog, 1965), LP(Quorin과 Lepoivre, 1977) 배지에 신초를 수직 치상한 후 신초 증식 정도를 비교 조사하였다.

나. 호르몬 조건

신초 증식에 효과적인 호르몬 조건을 구명하고자 BA와 kinetin을 각각 0, 0.5, 1.0, 2.0mg · L⁻¹ 단용 처리하거나 0.5mg · L⁻¹ BA와 0.5mg · L⁻¹ kinetin를 혼용처리하여 비교하였다. Cytokinin과 auxin 혼용처리 효과는 적정 cytokinin으로 선발된 1.0mg · L⁻¹ BA 단용 처리 및 1.0mg · L⁻¹ BA와 IAA, IBA, NAA 0.1, 0.5mg · L⁻¹을 각각 혼용 처리하여 비교 조사하였다.

다. 치상 방법

신초의 치상 방법이 신초 증식에 미치는 영향을 비교하고자 일반적으로 수행되고 있는 수직치상외에 신초 정단 분열조직을 제거한 수평치상처리, 신초 정단 분열조직을 제거하지 않은 수평치상 처리를 하여 신초 증식정도를 비교 조사하였다.

3. 기내 신초 발근조건 구명

가. 무기염류 농도

기내 신초 발근에 효과적인 배지의 무기염류 농도를 구명하고자 1.0mg · L⁻¹ IBA, 20g · L⁻¹ sucrose, 8g · L⁻¹ agar가 첨가된 1/3 MS, 1/2 MS, 1 MS 배지의 발근 정도를 비교하였다.

나. 호르몬 조건

기내 발근에 효과적인 auxin 종류 및 농도 조건을 구명하고자 20g · L⁻¹ sucrose, 8g · L⁻¹ agar가 첨가된 1/2 MS 기본배지에 IAA, IBA, NAA를 각각 0.2, 0.5, 1.0, 1.5mg · L⁻¹로 처리한 다음 발근정도를 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 신초 증식 조건

가. 배지 종류

EMLA M.9 계통 대목의 기내 신초 증식에 효과적인 배지를 알아보기로 MS, LS, LP 배지를 비교한 결과(Table 1), LS 배지가 절편체당 5.0개의 증식률을 나타내어 가장 효과적이었으나, 신초의 생육면에서는 LS보다 MS에서 신초의 엽색이 진하고 충실하여 생육이 양호하였다. 따라서 MS, LS 배지 모두 M.9 계통 대목의 기내 증식에 효과적인 것으로 판단되었다.

나. 호르몬 조건

기내 치상된 EMLA M.9 대목의 신초 증식에 대한 cytokinin류의 처리 효과를 알아보기 위해 0, 0.5, 1.0, 2.0mg · L⁻¹ BA와 kinetin을 각각 처리한 결과(Table 2), 전반적으로 kinetin 처리보다는 BA 처리구에서 신초 증식수가 높았으며, 특히 고농도 처리에서 신초 증식수가 많아지는 경향을 나타내었다. 그 중 2.0mg · L⁻¹ BA처리에서 절편체 1개당 10.5개의 신초가 증식되고, 생체중도

Table 1. Effect of media on shoot proliferation of EMLA M.9 apple rootstock.

Medium ^z	No. of shoots per explant	Shoot length (cm)	Fresh weight per explant (g)
MS	4.8 ab ^y	0.7 a	3.5 a
LS	5.0 a	0.5 a	3.2 a
LP	4.2 b	0.5 a	2.1 b

^zMS: Murashige & Skoog, LS: Linsmaier & Skoog, LP: Quorin & Lepoivre. Each medium contained 1.0 mg · L⁻¹ BA, 0.3 mg · L⁻¹ IBA, and 0.5 mg · L⁻¹ GA₃. Explants were placed vertically on agar medium.

^yMean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

Table 2. Effect of cytokinins on shoot proliferation of EMLA M.9 apple rootstock^z.

Cytokinin (mg · L ⁻¹)	No. of shoots per explant	Shoot length (cm)	Fresh weight per explant (g)
Control	1.4 d ^y	1.5 a	1.0 b
BA	0.5	5.5 c	1.7 b
	1.0	8.5 b	2.1 ab
	2.0	10.5 a	3.5 a
Kinetin	0.5	2.1 d	1.0 b
	1.0	2.3 d	1.3 b
	2.0	2.3 d	1.8 b
0.5 BA+0.5 kinetin	8.1 b	0.8 bc	2.2 ab

^zMS medium containing 30 g · L⁻¹ sucrose and 8 g · L⁻¹ agar was used and its pH was adjusted to pH 5.8. Explants were placed vertically on agar medium.

^yMean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

높게 나타났으나 callus 발생이 많고 유기된 신초가 총생하여 로켓 트화되거나 신초 잎이 갈변 고사되는 것이 많아 계대배양에 적합하지 못한 것으로 판단되었다.

이와 같은 결과는 사과 대목 MO-84(*Malus prunifolia* Borkh.)의 경정배양에서도 보고된 바 있는데(Masuda 등, 1988), 2cm 가량의 신초를 BA 농도 0.01-10mg · L⁻¹로 처리한 결과, BA 농도가 높을수록 신초 발생률은 높아지는 경향을 나타냈으나 이상 신초 형성률도 높아져 결국 다음의 증식률을 낮추는 결과를 보여, 기내 증식 신초의 이상 개체 출현율은 BA 농도와 상관관계가 높은 것으로 나타났다. 일반적으로 사과의 경정배양에 의한 대량 증식에 사용되는 BA 농도는 1-3mg · L⁻¹이고, 이때 증식률과 신초생육을 고려하여 적정농도를 설정하는 것이 중요한데, 본 연구에서는 비록 2.0mg · L⁻¹ BA 처리구에서 증식률은 높았으나 신초 생육과 증식률을 고려할 때 1.0mg · L⁻¹ BA 처리구나 0.5mg · L⁻¹ BA + 0.5mg · L⁻¹ kinetin 혼용 처리구가 적당할 것으로 판단되었다.

신초 증식에 가장 효과적이었던 1.0mg · L⁻¹ BA 단용처리와 1.0mg · L⁻¹ BA에 auxin을 종류별로 혼용 처리한 결과(Table 3), 1.0mg · L⁻¹ BA 단용처리와 1.0mg · L⁻¹ BA + 0.1mg · L⁻¹ IAA 혼용처리에서 신초의 증식수, 길이, 생체중 등이 높게 나타났다. 신초의 생육은 BA 단용처리구보다는 0.1mg · L⁻¹ IAA 혼용처리구에서 엽색도 좋고 성장 양상도 좋게 나타났는데, 이와 같은 결과는 MO-84 대목의 증식 시 1.0mg · L⁻¹ BA 처리구에 auxin을 농도별로 혼용처리한 결과 이상 신초 발생률이 억제되었다는 보고(Masuda 등, 1988)와 일치하였다. 그러나 본 연구에서는 고농도 auxin 처리구 특히 NAA 처리구에서는 절편체 기부에 callus 발생

이 많고 신초 엽이 노화되는 현상을 나타내어 저농도 0.1mg · L⁻¹ IAA 처리만이 신초 증식 및 생육에 효과적이었다.

다. 치상 방법

EMLA M.9 대목의 기내 증식률을 향상시키고자 신초를 일반적으로 수직치상하는 것 외에 신초 정단분열 조직을 제거하지 않고 수평 치상하는 경우와 신초 정단분열 조직을 제거한 후 수평치상하는 세 가지 경우를 비교한 결과(Table 4), 신초 정단분열조직을 제거한 후 수평배양할 경우 1개의 신초당 8.5개의 신초가 증식되는 반면, 수직배양 및 신초 정단분열조직을 제거하지 않은 수평배양 시에는 각각 5.8, 5.9개로 신초증식률이 낮았다.

이와 같은 결과는 사과 'Empire', 'Delicious', 'Triple Red Delicious'와 'Vermont Spur Delicious' 품종의 경우 수직치상에 비해 수평치상을 할 경우 신초증식률이 높아졌다는 보고(Yae 등, 1984)와 복숭아 백미조생의 신초 증식에서도 신초 정단분열조직 제거가 신초 증식에 효과적이었던 반면, 신초 정부를 제거하지 않은 경우에는 수평배양과 수직배양 간에 신초증식률에 큰 차이가 없었다는 보고(Jun 등, 1998)와 일치하였다.

2. 기내 발근 조건

가. 무기염류 농도

일반적으로 기내 사과나무 조직의 발근에 사용되는 무기염류 농도는 증식에 사용되는 농도보다 낮추어 사용하는 것이 발근에 효과적인 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서도 증식에 사용되었던 MS 배지의 무기염류 농도를 1/3 MS, 1/2 MS, 1 MS 수준으로

Table 3. Combinational effect of BA and auxins on shoot proliferation of EMLA M.9 apple rootstock^z.

Auxin (mg · L ⁻¹)	No. of shoots per explant	Shoot length (cm)	Fresh weight per explant (g)
Control	12.3 a ^y	1.1 a	4.5 a
IAA	0.1	13.7 a	0.9 ab
	0.5	8.4 b	0.5 b
IBA	0.1	7.5 b	0.6 b
	0.5	7.9 b	1.3 a
NAA	0.1	5.6 b	1.2 a
	0.5	7.0 b	1.0 ab

^zMS medium containing 1.0 mg · L⁻¹ BA, 30 g · L⁻¹ sucrose and 8 g · L⁻¹ agar was used and its pH was adjusted to pH 5.8. Explants were placed horizontally on agar medium.

^yMean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

Table 4. Effect of explant orientation on shoot proliferation of EMLA M.9 apple rootstock^z.

Orientation	No. of shoots per explant	Shoot length (cm)	Fresh weight per explant (g)
Vertical	5.8 b ^x	2.2 a	1.7 a
Horizontal A	5.9 b	0.7 b	2.3 a
Horizontal B ^y	8.5 a	0.5 b	2.1 a

^zMS medium containing 1.0 mg · L⁻¹ BA, 30 g · L⁻¹ sucrose and 8 g · L⁻¹ agar was used and its pH was adjusted to pH 5.8.

^yShoot tip of explant was eliminated.

^xMean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

Table 5. Effect of MS medium strength on rooting of EMLA M.9 apple rootstock^z.

Strength	Percent of rooting (%)	No. of roots per explant	Length of root (cm)	Callus development ^y
1/3 MS	100 a ^x	7.7 a	2.3 a	2.5 a
1/2 MS	91.7 a	8.2 a	2.5 a	2.5 a
1 MS	16.5 b	0.5 a	0.6 a	0.3 b

^zMS medium containing 1.0 mg · L⁻¹ IBA, 20 g · L⁻¹ sucrose and 8 g · L⁻¹ agar was used and its pH was adjusted to pH 5.8.

^y0: No callus development, 5: Very high development of callus.

^xMean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

달리하여 발근 정도를 비교한 결과(Table 5), 1/3 MS, 1/2 MS 조건에서 발근율이 1 MS 조건보다 높게 나타났다. 그러나 무기염류 농도 수준이 낮은 1/3 MS 처리구에서는 신초의 엽이 갈변되고, 줄기 부분이 붉게 변하는 등 양분 결핍 증세를 나타내어 신초 생육에 좋지 않은 것으로 나타나 신초 생육과 발근을 동시에 고려한다면 1/2 MS 수준이 적당할 것으로 판단되었다.

나. 호르몬 조건

기내 발근에 효과적인 auxin 종류를 구명하고자 증식된 EMLA M.9과 M.9 NAKB T-337의 신초를 IAA, IBA, NAA를 각각 0.2,

0.5, 1.0, 1.5mg · L⁻¹ 농도로 처리한 결과(Table 6), 두 계통 모두 발근율은 NAA 처리구에서 대체적으로 높은 경향을 나타내었다. 그러나 NAA 처리구에서는 신초 기부의 callus 발생률이 높고, 신초 잎이 황화되어 생육이 극히 저조한 경향을 나타내었다. 또한 두 계통 모두 1.5mg · L⁻¹ IAA 처리구에서 발근율이 높게 나타났으나 신초 당 발근수가 적고 뿌리 길이가 짧은 경향을 나타내었다. EMLA M.9 계통의 경우 1.5mg · L⁻¹ IBA 처리구에서 발근율, 신초당 발근수, 뿌리 길이 등에서 효과적이었으나 대체적으로 신초 줄기가 비대하고 세균 발달이 적어, 두 계통에서의 발근에 적정 호르몬 조건은 0.5mg · L⁻¹ IBA인 것으로 판단되었다.

Table 6. Effect of auxins on rooting of EMLA M.9 and M.9 NAKB T-337 apple rootstock^z.

Auxin (mg · L ⁻¹)	Percent of rooting (%)	No. of roots per explant	Length of root (cm)	Callus development ^y	
<i>EMLA M.9</i>					
IAA	0.2	42.8 c ^x	3.0 c	2.9 b	0 d
	0.5	57.1 bc	4.0 bc	2.5 bc	0 d
	1.0	80.0 ab	2.8 c	2.5 bc	0 d
	1.5	100.0 a	2.5 c	2.5 bc	0 d
IBA	0.2	85.7 ab	2.0 c	2.9 b	0 d
	0.5	95.0 a	4.5 bc	2.9 b	1.0 c
	1.0	71.4 abc	8.0 b	2.7 b	3.0 bc
	1.5	100.0 a	14.5 ab	4.4 a	3.7 b
NAA	0.2	100.0 a	8.0 b	1.7 c	5.0 a
	0.5	100.0 a	11.0 ab	0.8 cd	5.0 a
	1.0	100.0 a	18.0 a	0.5 d	5.0 a
	1.5	100.0 a	18.5 a	0.2 d	5.0 a
<i>M.9 NAKB T-337</i>					
IAA	0.2	33.2 c	2.1 d	1.8 de	0.0 d
	0.5	60.0 abc	3.3 cd	2.0 cde	0.0 d
	1.0	46.6 bc	3.7 cd	1.7 de	0.7 cd
	1.5	93.4 a	7.1 bcd	2.9 cde	1.2 c
IBA	0.2	80.0 ab	6.2 bcd	4.4 bc	1.8 c
	0.5	93.4 a	9.9 abc	6.7 a	3.2 b
	1.0	86.6 ab	11.5 ab	3.8 bcd	3.8 b
	1.5	93.4 ab	12.7 ab	2.1 cde	3.9 ab
NAA	0.2	93.4 a	11.3 ab	5.8 ab	5.0 a
	0.5	80.0 ab	3.6 cd	0.8 e	3.7 a
	1.0	100.0 a	16.3 a	0.8 e	5.0 a
	1.5	80.0 ab	4.2 cd	0.7 e	3.6 a

^zMS medium contained 20g · L⁻¹ sucrose and 8 g · L⁻¹ agar was used and its pH was adjusted to pH 5.8.

^y0: No callus development, 5: Very high development of callus.

^xMean separation within columns by Duncan's multiple range test, P=0.05.

일반적으로 사과나무의 기내 발근 시 고농도의 IBA, NAA 처리 구에서는 신초 기부 절단면에 callus 발생률이 높고, 뿌리는 callus 에서 분화되어 출현하여 신초와 뿌리 사이에 층을 형성함으로써 순화시 생존율을 낮추는 반면에 고농도 IAA나 저농도의 IBA는 신초 기부에서 바로 뿌리가 형성됨으로써 순화시 생존율을 높일 수 있다고 보고된 바 있으며, 사과 'Northern Spy', 'Stayman', 'Nugget', 'Delicious' 품종의 발근에 가장 효과적인 호르몬 조건은 0.1-0.3 mg · L⁻¹ IBA인 것으로 보고되었다(Zimmerman, 1983).

초 록

사과 M.9 자근대목의 효과적인 기내 급속 대량 번식법을 구명하기 위하여 본 연구를 수행한 결과, 신초 증식에 적합한 배지는 1.0mg · L⁻¹ BA, 0.1mg · L⁻¹ IAA, 30g · L⁻¹ sucrose, 8g · L⁻¹ agar가 첨가된 MS 배지이며, 치상방법은 신초 정단부를 제거한 후 수평치상하는 것이 효과적이었다. 발근에 적합한 배지는 0.5mg · L⁻¹ IBA, 20g · L⁻¹ sucrose, 8g · L⁻¹ agar가 첨가된 1/2 MS 배지였다.

추가 주요어 : 옥신, 시토키닌, EMLA M.9, NAKB T-337

인용문헌

Dunstan, D.I., K.E. Turner, and W.R. Lazaroff. 1985. Propagation *in vitro* of apple rootstock M4: Effect of phytohormones on shoot quality. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 4:55-60.

James, D.J. and I.J. Thurbon. 1981. Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M.9 and the promotive effects of phloroglucinol. *J. Hort. Sci.* 56:15-20.

Jones, O.P. and S.G.S. Hartfield. 1976. Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. *J. Hort. Sci.* 51:495-499.

Jones, O.P., M.E. Hopgood, and D. O'Farrell. 1977. Propagation *in vitro* of M.26 apple rootstock. *J. Hort. Sci.* 52:235-238.

Jun, J.H., K.H. Chung, S.J. Kang, S.Y. Park, and B.W. Yae. 1998. Influence of medium composition, carbon source, addition agent and explant orientation of shoot proliferation from *Prunus persica in vitro*. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 25:99-102.

Linsmaier, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18:27-100.

Masuda, T., Y. Yoshida, H. Bessho, S. Komori, and S. Tsuchiya. 1988. Studies on cell, tissue and shoot-tip culture in apple. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. C* 15:21-28.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Quorin, M. and P. Lepoivre. 1977. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Hort.* 78:437-442.

Yae, B.W., H.M. Jo, Y.H. Lee, and Y.J. Yim. 1984. Studies on the shoot-tip culture of apple, cv. 'Fuji'. *Res. Rept. Rural Dev. Admin.* 26:51-57.

Zimmerman, R.H. 1983. Factors affecting *in vitro* propagation of apple cultivars. *Acta Hort.* 131:171-178.