

사과 ‘후지’의 잎 절편체로부터 신초 기관형성을 통한 식물체 재생에 적합한 배지 조성

이윤경 · 권영주 · 형남인

Optimal Medium Compositions for Plant Regeneration via Adventitious Shoot Formation Using ‘Fuji’ Apple Leaf Explants

Yoon Kyung Lee · Youngju Kwon · Nam-In Hyung

Received: 1 October 2019 / Revised: 28 October 2019 / Accepted: 28 October 2019

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Plant regeneration protocols for adventitious shoot organogenesis from apple (*Malus domestica* ‘Fuji’) leaf explants were developed in the present study. The effects of different basal media, types and concentrations of carbon sources, and concentrations of plant growth regulators were evaluated to determine the optimal shoot regeneration conditions for ‘Fuji’ apple leaf explants. On different treatments involving combinations of basal media, LS and N6 media, and different types and concentrations of cytokinins, 6-benzyladenine (BA) and thidiazuron (TDZ), shoot regeneration rates were the highest in the N6 medium combined with BA. Among the plant growth regulator and carbon source combination treatments, 5.0 mg/L BA, and 0.1 mg/L α -naphthalene acetic acid (NAA) with 40 g/L sorbitol was the optimal combination for shoot regeneration. In addition, the optimal sorbitol concentrations for shoot regeneration were 40 g/L and 60 g/L. The highest regeneration (81.8%) was achieved using 40 g/L sorbitol. The regenerated shoots elongated and rooted on rooting medium, consisting of 1/4 MS medium with 0.2 mg/L indole-3-butyric acid (IBA). The plantlets were acclimatized and the regenerated plants exhibited normal phenotypes.

Keywords Apple, ‘Fuji’, Plant regeneration, Shoot organogenesis, Sorbitol

Y. K. Lee · Y. J. Kwon · N. I. Hyung (✉)
상명대학교 식물식품공학과
(Department of Plant and Food Sciences, Sangmyung University,
Cheonan 31066, Korea)
e-mail: nihyung@smu.ac.kr

서 언

사과(*Malus domestica* Borkh.)는 장미과의 낙엽 과수로 지역 적응성이 높아 온대지방 전역에 재배되고 있으며, 온대 과수 중에서 포도와 함께 중요한 위치를 차지하고 있다. 우리나라에서는 1970년대 개량종이 도입된 이후 생산량이 점차 증가하여 매년 50~60만 톤을 생산하고 있으며, 국내 과수 생산 중에서 감귤류에 이어 두 번째로 많은 양을 차지하고 있다(Statistical Korea 2017).

원예작물 중 과수는 장기간의 육종 연한과 강한 잡종성, 내환경의 약세 현상, 유용 형질에 복합 유전자 관여 등으로 육종에 많은 제약이 따른다. 이를 극복하기 위하여 유전 공학 기술을 이용한 형질전환의 필요성이 크게 강조되고 있다. 기내 육종의 필수 단계인 조직배양을 통한 효율적인 식물체 재생의 체계 확립이 이루어진다면 형질전환 기법이 매우 효과적인 품종 육성 방법으로 자리 잡을 수 있을 것이다(An 1993).

사과의 기내 식물체 재생은 다양한 품종(Defour 1990; Sriskandarajah et al. 1994; Yepes and Aldwinckle 1994)과 대목(Famiani et al. 1994; Welander and Maheswaran 1992)에서 보고되어 있다. 초기에는 재생에 관한 처리나 조건이 품종과 대목들 간의 차이가 크고, 대부분 유럽 및 미주의 주요 품종이나 재생이 용이한 품종 위주로 연구가 이루어졌다. 그러나, 합성 cytokinin을 이용한 식물 성장 및 형태 형성 연구가 활발하게 진행되면서(Guo et al. 2011; Murthy et al. 1998) 재생이 어려운 것으로 알려진 ‘후지’ 품종의 식물체 재생에 관한 연구도 활발히 이루어졌다(Li et al. 2014; Magyar-Tábori et al. 2010). 이를 기반으로 *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환 연구도 보고되고 있으나, 효율이 낮아 식물체 재생 방법의 개선이 필요한 상황이다(Seong et al. 2005).

따라서, 본 연구에서는 국내 주요 품종인 사과 ‘후지’의 기내 잎 절편체로부터 효율적인 식물체 재생을 위한 배지 종류, 식물생장조절제와 당의 종류 및 농도의 영향을 구명하고자 하였으며, 이를 통하여 형질전환 방법을 이용한 과수 육종의 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 신초 배양

본 연구는 사과 ‘후지’의 기내 신초배양에서 얻어진 잎 절편체를 재료로 하여 수행하였다. 기내 신초배양은 LS배지 (Linsmaier and Skoog 1965)에 BA 1 mg/L, NAA 1 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가한 배지를 사용하였으며, 매 4주 간격으로 계대배양을 실시하였다. 모든 배지는 pH를 5.8로 조정 후 agar를 첨가하여 121°C에서 20분간 고압멸균하였다. 모든 배양은 25±2°C인 배양실에서 백색 형광등을 이용한 32 μmol·m⁻²·s⁻¹, 24시간 연속 조명하에서 이루어졌다.

잎 절편체로부터의 신초 기관형성

사과 ‘후지’의 기내 배양된 잎 절편체로부터 신초 재생에 적합한 조건을 구명하기 위하여 기본배지와 식물생장조절제, 당의 종류 및 농도 등의 배지 조성을 달리하여 실험을 수행하였다.

각 재생 실험에 사용된 잎 절편체는 신초 증식배지에서 배양 3주 된 식물체의 상부에서 완전히 전개된 잎을 절취하여 주맥을 포함하도록 2면 절단한 후, 향측면이 배지에 닿도록 치상하였다. 재생 배지에는 공통적으로 sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가하였으며, 100 mL 삼각플라스크에 30 mL씩 분주하여 사용하였다.

잎 절편체를 배지에 치상하여 3주 동안 암조건에서 배양한 후, 신초배양과 동일한 명조건으로 옮겨 배양하면서 신초 형성을 유도하였다.

기본배지 종류와 식물생장조절제의 효과

1차 실험으로 재생에 적합한 배지 종류와 cytokinin 종류를 구명하고자 하였다. 실험에 사용된 배지는 LS배지와 N6배지 (Chu et al. 1975)에 BA 5.0mg/L와 TDZ 0.2 mg/L을 조합처리하였으며, 모든 배지에 NAA 0.3 mg/L를 첨가하였다.

2차 실험으로 LS, N6배지에 BA 1.0, 3.0, 5.0 mg/L 또는 TDZ 0.2, 0.5, 1.0 mg/L와 NAA 0.1, 0.3 mg/L를 조합하여 총 24개 처리를 하였다.

탄소 공급원의 종류와 식물생장조절제의 효과

재생에 효과적인 식물생장조절제와 탄소 공급원을 알아보기 위하여 N6배지에 BA 1.0, 3.0, 5.0 mg/L 또는 TDZ 0.2, 0.5, 1.0 mg/L와 NAA 0.1, 0.3 mg/L, 탄소 공급원으로 sucrose 30 g/L, sorbitol 40 g/L, sucrose 15 g + sorbitol 20 g/L를 조합하여 총 36개 처리로 실험을 수행하였다.

Sorbitol 농도의 효과

위 실험에서 신초 재생에 효과적인 것으로 밝혀진 sorbitol의 적정 농도를 구명하기 위하여 N6 기본배지(N6 염류와 비타민, BA 5.0 mg/L, NAA 0.1 mg/L, agar 8 g/L)에 sorbitol 0, 20, 40, 60 g/L를 처리하여 실험을 수행하였다.

실험구 및 조사

모든 실험은 용기당 절편체 4개씩 치상한 것을 1반복으로 하여 처리당 5반복으로 하였으며, 완전임의배치법으로 배치하여 배양하였다. 배양 8주 후 신초 형성율과 절편체당 재생된 신초 수를 조사하였으며, 신초 수는 눈으로 식별이 가능한 약 2 mm 크기 이상의 신초를 집계하여 표시하였다.

발근 및 활착

배양 8주 후에 재생된 신초 중 0.5~2 cm 정도 신장한 신초는 절편체에서 분리하여 발근배지로 옮겨 신장 및 발근을 유도하였다. 발근배지는 1/4 MS배지 (Murashige and Skoog 1962)에 IBA 0.2 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가하였으며, 시험관에 20 ml씩 분주하여 사용하였다. 재생된 신초를 용기당 한 개씩 치상하여 1주 동안 암조건에서 배양한 후 명조건으로 옮겨 배양하였다.

발근된 소식물체는 뿌리에 붙어있는 배지를 제거한 후, 고압살균된 인공 토양(비미쿨라이트 1: 펠라이트 1)이 들어 있는 직경 12 cm 화분에 이식하였다. 순화를 위하여 4주 동안 상부를 랩으로 봉한 후 저면관수를 실시하였으며, 성공적으로 순화된 식물체는 온실로 옮겨 재배하였다.

결과

잎 절편체로부터의 신초 유도

사과 ‘후지’의 잎 절편체로부터 신초 기관형성을 유도하고자 기본배지, 식물생장조절제, 탄소공급원의 종류 및 농도를 달리하여 실험을 수행하였다. 신초 기관형성 배지에 치상하여 암조건에서 배양한 잎 절편체는 배양 3주 후부터 절

Table 1 Effects of medium type, BA and TDZ on shoot regeneration in ‘Fuji’ apple leaf explants^a

Medium ^b	Cytokinin (mg/L)	Regeneration (%)	Shoot numbers /Regenerated explant
N6	BA 5.0	33.0 ± 2.0	1.0 ± 8.5
	TDZ 0.2	18.2 ± 8.3	1.5 ± 0.5
LS	BA 5.0	27.7 ± 25.0	4.7 ± 0.5
	TDZ 0.2	0.0	0.0

^aData were collected after culturing for 8 weeks and cultures were dark treated for 3 weeks. Values represent means of 5 replicates ± SE

^bMedium type : N6 medium consisted of N6 (Chu et al. 1975) macroelements and LS (Linsmaier and Skoog 1965) microelements and vitamins

Table 2 Effects of medium type, BA and NAA on shoot regeneration in ‘Fuji’ apple leaf explants^a

Medium ^b	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	Regeneration (%)	Shoot numbers /Regenerated explant
N6	0.1	1.0	25.0 ± 11.9	1.0 ± 0.0
		3.0	37.5 ± 7.2	3.3 ± 0.8
		5.0	33.0 ± 8.3	1.3 ± 0.3
	0.3	1.0	43.8 ± 10.7	1.5 ± 0.3
		3.0	0.0	0.0
		5.0	0.0	0.0
LS	0.1	1.0	10.0 ± 6.1	2.0 ± 1.0
		3.0	7.0 ± 5.0	3.0 ± 0.0
		5.0	7.0 ± 5.0	2.0 ± 0.0
	0.3	1.0	0.0	0.0
		3.0	0.0	0.0
		5.0	0.0	0.0

^aData were collected after culturing for 8 weeks and cultures were dark treated for 3 weeks. Values represent means of 5 replicates ± SE

^bMedium type: N6 medium consisted of N6 (Chu et al. 1975) macroelements and LS (Linsmaier and Skoog 1965) microelements and vitamins

단면에서 흰색의 캘러스와 옅은 노란색을 띠는 원형의 신초 원기가 형성되기 시작하였다. 형성된 신초 원기는 명조건으로 옮겨 배양하는 동안 녹색의 정상 개체로 발달하였다(Fig. 5a~e). 대부분의 신초는 캘러스와는 별도로 절단면을 따라 분화된 신초 원기로부터 발달하였다. 형성된 신초 원기 및 신초 수는 배양 기간이 경과함에 따라 증가하여, 배양 5주에서 6주 사이에 가장 높은 신초 형성율을 나타냈으며, 이후에는 감소하였다.

기본배지 종류와 식물생장조절제의 효과

사과 ‘후지’의 기내 잎 절편체로부터의 기관형성을 유도하기 위하여 다량원소, NAA, BA와 TDZ의 배지조성을 달리하여 실험을 수행하였다. 1차 실험에서 N6배지와 LS배지를 비교하였을 때, 전체 염농도가 낮고 질산태 질소(NO₃)의 함량이 높은 N6배지가 재생에 효과적이었다. 신초수에 있어서

는 LS배지에 BA 5.0 mg/L을 첨가한 처리가 형성된 신초수 5.7개로 가장 높게 나타났다. BA와 TDZ 처리에서는 BA 5.0 mg/L의 처리가 TDZ 0.2 mg/L 처리보다 재생에 효과적이었다. 배지의 다량원소와 식물생장조절제 처리에서는 N6배지에 BA 5.0 mg/L를 첨가한 처리에서 신초 형성율 33.0%, 절편체당 신초수 1.0개로 가장 높았다(Table 1).

2차 실험에서 신초 재생을 위한 기본배지는 1차 실험에서와 마찬가지로 N6배지가 효과적인 것으로 나타났다. 식물생장조절제 NAA는 N6배지에 BA 1.0 mg/L를 첨가한 처리를 제외하고는 0.1 mg/L 처리구가 0.3 mg/L 처리구보다 전반적으로 효과적이었다. BA의 농도별 처리에서는 각 처리 간의 차이는 나타나지 않았으나, 신초 형성율에 있어서는 1.0 mg/L 처리구가 비교적 효과적이었고, 3.0 mg/L 처리구에서 절편체당 신초수가 많았다. 모든 처리 가운데, N6배지에 BA 1.0 mg/L, NAA 0.3 mg/L를 첨가한 처리구에서 신초 형성율 43.8%와 절편체당 신초수 1.5개로 가장 높게 나타났다(Table 2).

Table 3 Effects of medium type, TDZ and NAA on shoot regeneration in ‘Fuji’ apple leaf explants^a

Medium ^b	NAA (mg/L)	TDZ (mg/L)	Regeneration (%)	Shoot numbers /Regenerated explant
N6	0.1	0.2	0.0	0.0
		0.5	12.5 ± 7.2	1.3 ± 1.0
		1.0	0.0	0.0
	0.3	0.2	25.0 ± 10.2	1.0 ± 0.0
		0.5	0.0	0.0
		1.0	0.0	0.0
LS	0.1	0.2	7.0 ± 0.5	1.0 ± 0.0
		0.5	0.0	0.0
		1.0	0.0	0.0
	0.3	0.2	0.0	0.0
		0.5	0.0	0.0
		1.0	0.0	0.0

^aData were collected after culturing for 8 weeks and cultures were dark treated for 3 weeks. Values represent means of 5 replicates ± SE

^bMedium type: N6 medium consisted of N6 (Chu et al. 1975) macroelements and LS (Linsmaier and Skoog 1965) microelements and vitamins

기본배지와 TDZ, NAA간의 조합 처리는 BA 조합 처리에 비해 전반적으로 재생 효율이 떨어졌다. 기본배지는 다른 처리와 마찬가지로 N6배지가 효과적이었고, 식물생장조절제 처리에서는 TDZ 0.5 mg/L, NAA 0.1 mg/L 처리와 TDZ 0.2 mg/L, NAA 0.3 mg/L의 처리에서만 재생이 이루어졌다(Table 3).

배양기간 동안 신초 형성율의 변화는 N6배지의 경우, 배양 4주 후 신초가 분화되기 시작하여 배양 6주 후 급격히 증가하였으며, LS배지는 5주 후부터 신초가 분화되기 시작하였다. 신초 형성율에 있어서는 N6배지가 효과적이었으며, 절편체당 신초수는 LS배지가 다소 많았다(Fig. 1).

탄소 공급원과 식물생장조절제의 영향

잎 절편체로부터의 기관형성에 미치는 탄소 공급원과 식물생장조절제의 영향을 알아보기 위하여, sucrose 30 g/L, sucrose 15 g/L + sorbitol 20 g/L, sorbitol 40 g/L 처리에 NAA 0.1, 0.3 mg/L와 BA 1.0, 3.0, 5.0 mg/L, 또는 TDZ 0.2, 0.5, 1.0 mg/L를 조합 처리하였다. 탄소 공급원과 NAA, BA의 조합 처리에서 신초 재생은 sorbitol 40 g/L, sucrose 15 g/L + sorbitol 20 g/L, sucrose 30 g/L의 순으로 sorbitol의 농도가 높을수록 효과적이었다(Table 4). 또한 NAA 농도는 0.1 mg/L 처리구가 0.3 mg/L 처리구에 비해 효과적이었으며, BA는 농도에 따른 차이가 없었다. 가장 높은 신초 형성율을 나타낸 처리는 sorbitol 40 g/L에 BA 5.0 mg/L, NAA 0.1 mg/L를 첨가한 처리로 신초 형성율이 55.5%, 절편체당 신초수는 4.7개였다.

탄소 공급원과 NAA, TDZ와의 조합 처리에서는 탄소공급원이 신초 재생에 가장 큰 영향을 미치는 요인인 것으로 나

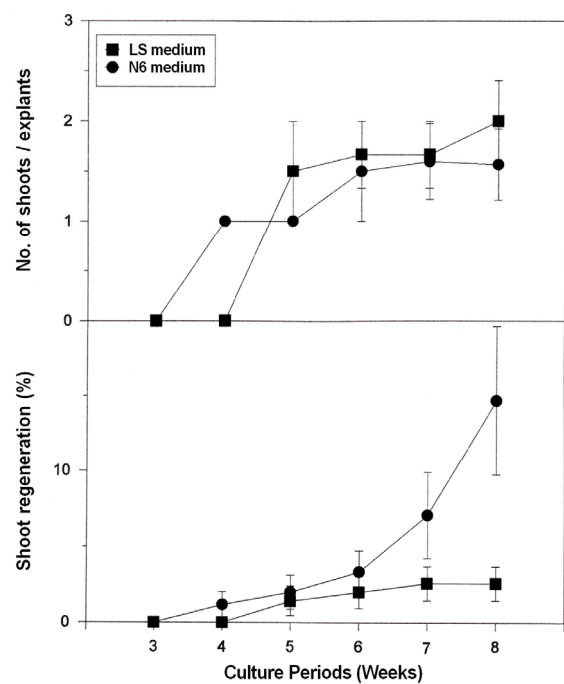


Fig. 1 Shoot regeneration rates of ‘Fuji’ apple leaf explants under different culture periods and different media. Vertical bars represent standard errors of means

타났으며, BA와의 조합 처리에서와 마찬가지로 sorbitol의 농도가 높을수록 효과적이었다. NAA 농도에 따른 효과는 sucrose 30 g/L와 sucrose 15 g/L + sorbitol 20 g/L의 처리구에서는 나타나지 않았으나, sorbitol 40 g/L 처리구에서 NAA 0.1 mg/L를 첨가하였을 때 신초 형성율이 40~50%로 가장 높았다. TDZ의 경우 농도에 따른 처리간의 차이가 나타나지 않

Table 4 Effects of carbon source, BA and NAA on shoot regeneration of ‘Fuji’ apple leaf explants^a

Carbon Source (g/L)	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	Regeneration (%)	Shoot numbers /Regenerated explant
Sucrose 30	0.1	1.0	25.0 ± 11.2	1.3 ± 0.3
		3.0	25.0 ± 9.4	3.0 ± 0.7
		5.0	25.0 ± 14.4	1.3 ± 0.0
	0.3	1.0	25.0 ± 6.3	1.3 ± 0.4
		3.0	0.0	0.0
		5.0	0.0	0.0
Sucrose 15 +Sorbitol 20	0.1	1.0	15.0 ± 6.1	2.0 ± 1.0
		3.0	25.0 ± 7.9	1.4 ± 0.2
		5.0	15.0 ± 6.1	2.7 ± 1.7
	0.3	1.0	13.0 ± 10.0	3.2 ± 0.3
		3.0	10.0 ± 6.1	1.4 ± 0.5
		5.0	25.0 ± 9.4	2.7 ± 0.5
Sorbitol 40	0.1	1.0	25.0 ± 13.7	2.2 ± 0.7
		3.0	40.0 ± 10.0	2.7 ± 0.3
		5.0	55.0 ± 2.2	4.7 ± 0.3
	0.3	1.0	25.0 ± 0.0	1.9 ± 0.8
		3.0	20.0 ± 9.4	1.6 ± 0.2
		5.0	20.0 ± 3.7	2.0 ± 0.0

^aData were collected after culturing for 8 weeks and cultures were dark treated for 3 weeks. Values represent means of 5 replicates ± SE

Table 5 Effects of carbon source, TDZ and NAA on shoot regeneration of ‘Fuji’ apple leaf explants^a

Carbon source (g/L)	NAA (mg/L)	TDZ (mg/L)	Regeneration (%)	Shoot numbers /Regenerated explant
Sucrose 30	0.1	0.2	0.0	0.0
		0.5	6.3 ± 6.0	3.0 ± 0.5
		1.0	0.0	0.0
	0.3	0.2	18.8 ± 6.3	1.3 ± 0.2
		0.5	0.0	0.0
		1.0	0.0	0.0
Sucrose 15 +Sorbitol 20	0.1	0.2	10.0 ± 6.1	1.5 ± 0.5
		0.5	15.0 ± 6.1	2.7 ± 1.2
		1.0	10.0 ± 11.1	3.2 ± 0.5
	0.3	0.2	10.0 ± 6.1	1.0 ± 0.0
		0.5	15.0 ± 10.1	1.3 ± 0.3
		1.0	25.0 ± 7.9	1.3 ± 0.4
Sorbitol 40	0.1	0.2	40.0 ± 12.7	2.3 ± 0.4
		0.5	50.0 ± 16.5	2.5 ± 0.7
		1.0	44.0 ± 18.7	4.6 ± 1.0
	0.3	0.2	15.0 ± 6.1	1.3 ± 0.3
		0.5	25.0 ± 15.8	2.8 ± 1.1
		1.0	30.0 ± 18.4	2.0 ± 0.5

^aData were collected after culturing for 8 weeks and cultures were dark treated for 3 weeks. Values represent means of 5 replicates ± SE

았으나, 신초 형성율에 있어서는 대체적으로 0.5 mg/L 처리 구에서 양호한 결과를 나타내었고, 절편체 당 신초수는 농도에 비례하였다(Table 5).

탄소 공급원 처리에 따른 재생은 3주 후부터 관찰되기 시작하여 배양 기간 동안 지속적으로 증가하였다. 처리에 따른 재생의 차이는 배양 초기부터 나타났고, 신초 형성율 및

절편체당 신초수는 sorbitol 40 g/L, sucrose 20 g/L+ sorbitol 15 g/L, sucrose 30 g/L의 순으로 높았다(Fig. 2).

Sorbitol 농도의 영향

신초 재생에 효과적인 것으로 나타난 탄소 공급원 sorbitol의

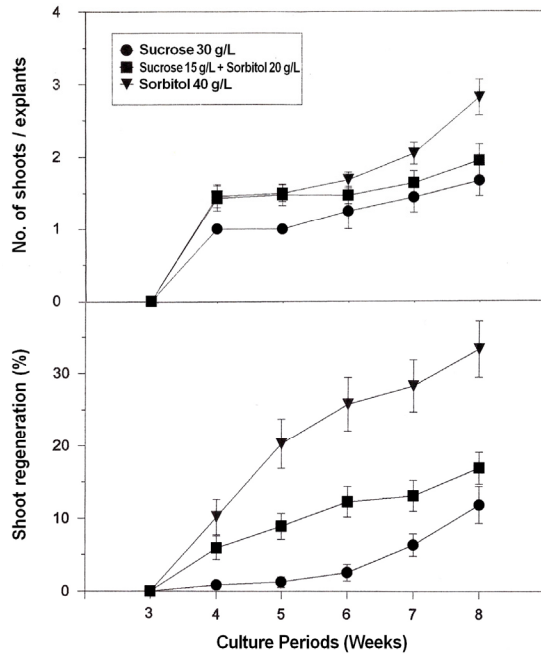


Fig. 2 Shoot regeneration rates of 'Fuji' apple leaf explants under different culture periods and various carbon sources. Vertical bars represent standard errors of means

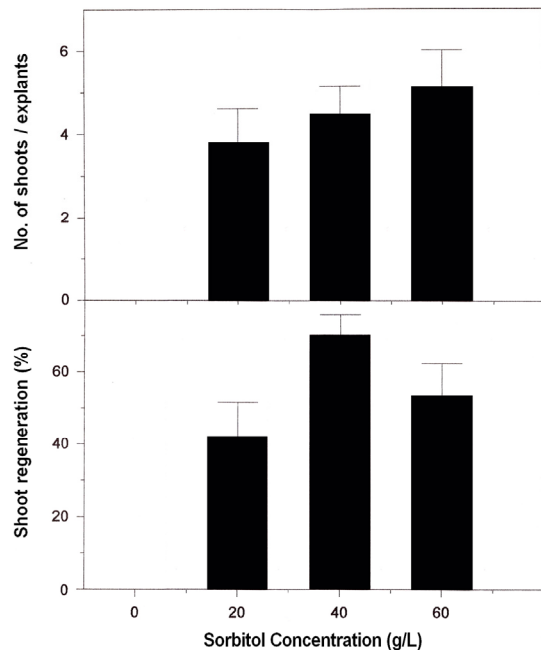


Fig. 3 Effects of different sorbitol concentrations on shoot regeneration rates of 'Fuji' apple leaf explants. Vertical bars represent standard errors of means

적정 농도를 구명하기 위하여 sorbitol의 농도를 달리하여 실험을 수행하였다. Sorbitol 40 g/L 처리구가 신초 형성율 67.3%로 가장 높았으며, sorbitol의 농도가 감소할수록 신초 형성율도 감소하여 탄소 공급원을 첨가하지 않은 처리구에서는 재생이 전혀 일어나지 않았다. 절편체당 신초수는

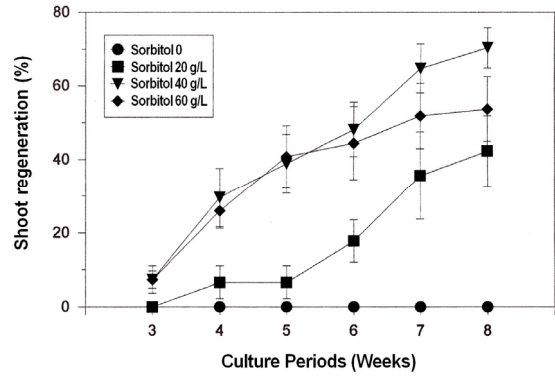


Fig. 4 Regeneration rates of 'Fuji' apple leaf explants under different culture periods and various sorbitol concentrations. Vertical bars represent standard errors of means

sorbitol 60 g/L 처리구에서 5.1개로 가장 많았으나, 재생된 신초의 하단부 및 절간 사이에 붉은색 색소가 띠 모양으로 침적되었다(Fig. 3).

배양 기간에 따른 재생을 살펴보면, sorbitol 40 g/L와 60 g/L 처리구에서 20 g/L 처리구에 비해 1주 정도 빠르게 신초가 분화되기 시작하여 배양 기간 증가와 함께 신초 형성율이 증가하였다. 그러나 배양 8주 후에는 sorbitol 40 g/L 처리구가 가장 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 4).

발근 및 활착

잎 절편체로부터 재생된 신초는 신장 및 증식배지에서 4주 동안 배양한 후, 발근배지에서 발근을 유도하였다(Fig. 5f).

Sucrose를 첨가한 배지에서 재생된 신초의 발근율은 약 10~20% 정도로 매우 저조하였으나, sorbitol이 첨가된 배지에서 재생된 신초는 발근율이 약 80%에 이르렀고, 1차근의 수가 평균 3~4개로 더 많았다. 고농도의 sorbitol에서 재생된 개체에서 나타났던 붉은 색소의 침적과 TDZ 처리구에서 관찰되었던 외형상의 변이는 증식배지와 발근배지에서 배양하는 동안 정상적인 개체로 회복되었다. 발근이 이루어진 식물체는 인공 토양(버미큘라이트 1: 펄라이트 1)이 들어 있는 화분에서 4주간의 순화과정을 거쳐 성공적으로 활착이 이루어졌다(Fig. 5g). 활착된 식물체를 온실로 옮겨 재배하였을 때, 식물체는 정상적인 표현형을 나타내었다.

고찰

산업적으로 유용한 작물의 재생은 작물의 급속증식이나 유전 육종에 이용될 수 있고, 단일 세포 및 조직에서 callus 단계를 거치지 않은 안정적인 재생 방법을 요구한다. 이를 위해 재생에 효과적인 여러 처리를 통해 신초 형성율을 높이기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 재생의 처리에 따른 반

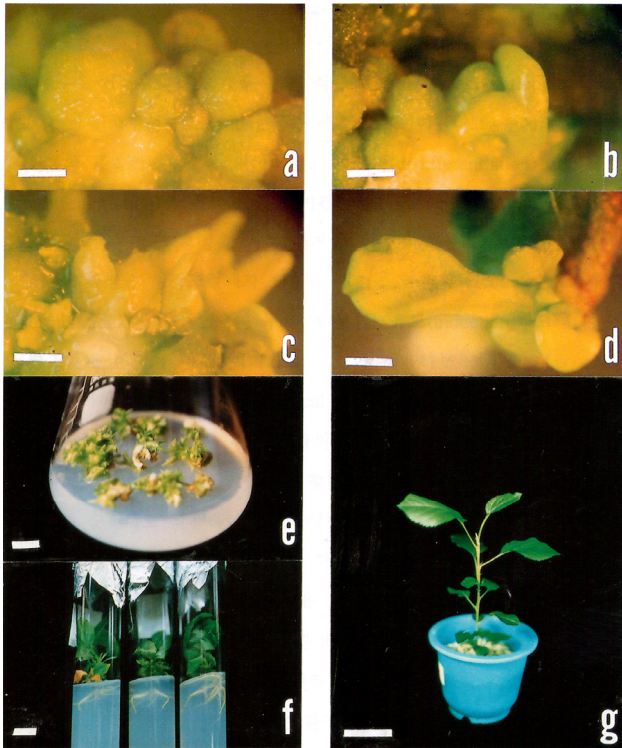


Fig. 5 Plant regeneration via adventitious shoot formation in ‘Fuji’ apple leaf explants. (a) Granule type tissue formation on the cut surfaces of leaf explants; (b and c) Differentiated single or multiple shoot primordia, respectively; (d and e) Shoots with normally expanded leaves; (f) Rooting of regenerated shoots in 1/4 MS medium with 0.2 mg/L IBA after culture for 4 weeks; (g) A regenerated plant transferred to pot after 3 months. Bar = 1 mm (a-d), 1 cm (e-f), 5 cm (g)

응은 각 작물별, 유전형에 따라 상당한 차이를 나타낸다.

본 실험에서 사과 ‘후지’의 잎 절편체로부터 신초 재생에 미치는 배지의 효과를 보면 LS배지에 비해 N6배지가 효과적이었다(Tables 1, 2, 3, Fig. 1). 이는 N6배지의 낮은 질소 농도, 염 농도에 대한 효과일 뿐만 아니라, 질소의 농도만 감소하는 것보다 질소의 비율($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=4:1$)이 재생에 영향을 준다는 보고와 일치하는 것이다(Yepes and Aldwinckle 1994). 품종에 따른 반응을 보면 McIntosh, Åkerö, McIntosh Wijcik, Gravenstein, M26의 재생에 N6배지가 MS배지에 비해 효과적이라고 보고되었다(Welander 1988). 또한, 사과 8개 품종을 대상으로 N6, MS, 1/2MS, LS배지에 따른 재생 비교에 있어서도 Empire, Freedom, Liberty, M26, M7A, Mutsu의 신초 재생에 N6배지가 다른 배지에 비해 양호한 반응을 나타내었고, Golden Delicious만이 MS배지가 효과적이라고 보고되었다(Yepes and Aldwinckle 1994).

식물생장조절제는 신초 재생에 필수적인 요인으로, 사과의 잎 절편체로부터 신초 재생에는 높은 cytokinin과 낮은 auxin의 비율이 재생을 촉진한다고 보고되었다(Predieri and Fasolo 1989). 사과의 신초 재생에서 가장 많이 사용되는 cytokinin은 BA, auxin은 NAA이다(Magyar-Tábori et al. 2010). 사과 ‘후

지’의 잎 절편체를 재료로 사용한 본 실험에서도 신초 재생에는 BA 5.0 mg/L와 NAA 0.1 mg/L를 첨가한 처리가 가장 효과적이었다. Liberty, Malling 7A, Malling 26, McIntosh를 사용한 연구에서도 같은 농도인 BA 5.0 mg/L에서 가장 높은 신초 형성율을 보여주었다(Yepes and Aldwinckle 1994).

최근 들어 과수류의 신초 재생에 효과적인 cytokinin류로 TDZ가 보고되고 있다(Carl and Preece 1993; Li et al. 2014). BA보다 10배의 활성을 갖는 TDZ는 사과의 신초 재생에서도 그 효과가 보고되고 있으며, BA보다 신초 재생에 더 효과적인 것으로 나타났다(Li et al. 2014; Mitić et al. 2012). 그러나, 본 실험에서는 TDZ 처리구가 BA 처리구에 비해 신초 형성율이 낮아 이전의 보고와는 다른 결과를 나타내었는데, 이러한 결과는 내생 호르몬의 차이에 기인한 것으로 보인다.

사과의 재생에 주로 사용되는 auxin은 NAA이며, 0.2 ~ 0.3 mg/L의 낮은 농도가 사용되고 있다(Welander 1988; Welander and Maheswaran 1992). Welander와 Maheswaran (1992)은 사과의 신초 재생에 있어 BA보다 NAA가 많은 영향을 주었으며, NAA의 농도가 신초 형성율에는 영향을 주었으나 재생된 신초 수에는 영향을 주지 않는 것으로 보고하였다. 또한, Li 등 (2014)은 사과 ‘후지’의 재생에서 TDZ 2~3 mg/L를 단독으로 사용했을 경우보다, IBA 0.5 ~ 1.0 mg/L와 조합하여 사용했을 경우 신초 형성율이 증가한다고 보고하였다. 이는 본 실험에서 BA 5.0 mg/L에 NAA 0.1 mg/L를 조합한 처리구가 0.3 mg/L 조합 처리구에 비해 효과적이었던 것과 유사한 결과이다. 그러나, TDZ와의 조합 처리에 있어서는 처리 간의 유의성이 인정되지 않았다. 이는 차이가 나타나기에는 전반적인 신초 형성율이 낮기 때문인 것으로 판단되어 향후 TDZ 최적 농도 구명 후 추가적인 검증이 이루어져야 할 것으로 보인다.

탄소공급원의 종류와 농도는 다양한 식물 중에서 신초 재생 및 증식과 체세포배형성에 에너지원이 되고 삼투압을 조절하는 중요한 역할을 한다. 대부분의 목본식물은 탄소공급원으로 sucrose를 사용하고 있지만 사과(Karhu 1997), 배(Kadota and Niimi 2004)와 살구(Marino et al. 1991)의 경우에는 sorbitol이 효과적인 것으로 보고되었다. 장미아과 사과속 식물의 조직배양에서 탄소 공급원으로 sorbitol을 사용한 것은 sorbitol이 사과속 식물의 도관 내 주요 이동 물질이며(Loescher et al. 1982), 광합성의 일차 산물이라는 것이 밝혀지면서 시작되었다(Wallart 1980). Pawlicki와 Welender(1994)는 Jork 9의 잎 절편체로부터의 신초 재생에 sorbitol 220 mM이 가장 효과적이며, 275 mM 처리에서는 재생율이 감소하고 삼투 스트레스가 나타났다고 보고하였다. 본 실험에서도 가장 효과적인 탄소 공급원의 종류와 농도는 sorbitol 40 g/L로 sucrose 30 g/L 처리에 비해 신초 형성율이 높았다(Tables 4, 5). 신초 형성율과 형성된 신초수는 sorbitol 40 g/L와 sorbitol 60 g/L 처리가 각각 효과적이었으나(Fig. 3) sorbitol 60 g/L 처리구에서는 붉은 색소가 침적되는 삼투 스트레스 반응을 나타냈다.

결론적으로 본 연구를 통하여 사과 ‘후지’의 잎 절편체로

부터 신초 기관형성을 통한 식물체 재생에 적합한 배지조성을 구명하였다. 잎 절편체를 N6 기본배지에 BA 5.0 mg/L, NAA 0.1 mg/L와 sorbitol 40 g/L를 첨가한 배지에서 3주간 암배양 후 명조건으로 옮겨 총 8주간 배양하였을 때, 신초 형성을 67.3%, 절편체당 신초수 4.3개의 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 그러나, 형질전환 연구에 활용하기 위해서는 향후 본 연구에 비해 높은 농도의 TDZ, IBA와의 조합 처리 효과와 다양한 배양방법에 대한 추가 검증이 필요할 것으로 생각된다.

적 요

사과 ‘후지’의 잎 절편체로부터 신초 기관형성을 통한 효율적인 식물체 재생 시스템을 확립하기 위하여 배지 조성 중 식물생장조절제, 기본배지와 당의 종류 및 농도를 달리하여 실험을 실시하였다. 식물생장조절제 NAA가 첨가된 상태에서 기본배지 중 N6와 LS, cytokinin 중 BA와 TDZ를 비교하였을 때, N6 배지에 BA 5.0 mg/L를 사용하는 것이 신초 형성과 절편체당 재생 신초수에서 효과적이었다. BA보다 신초 형성에 효과적인 것으로 알려진 TDZ는 본 실험에서는 전반적으로 신초 형성율이 낮았다. 탄소 공급원과 식물생장조절제의 조합 처리에서는 sorbitol 40 g/L의 처리가 신초 형성을 67.3%, 절편체당 신초수 4.3개로 가장 좋았고, 식물생장조절제는 BA 5.0 mg/L와 NAA 0.1 mg/L의 혼합처리가 가장 효과적이었다. 암조건에서 3주간 배양한 후 명조건으로 옮겨 총 8주간 배양하여 재생된 신초는 1/4MS에 IBA 0.2 mg/L가 첨가된 배지에서 발근을 유도한 후 활착시켜 온실에서 재배하였을 때 정상적인 표현형을 보여주었다.

References

- An G (1993) Current status and future perspectives of biotechnology using plant tissue culture techniques (III). *Kor J Plant Tiss Cult* 20:59-62
- Carl AH, Preece JE (1993) Thidiazuron: A potent cytokinin for plant tissue culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 33:105-119
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Hort* 18:659-668
- Defour M (1990) Improving yield of adventitious shoots in apple. *Acta Hort* 280:51-60
- Famiani F, Ferradini N, Staffolani P, Standardi A (1994) Effect of leaf excision time and age, BA concentration and dark treatments on in vitro shoot regeneration of M.26 apple rootstock. *J Hort Sci Biotechnol* 69:679-685
- Guo B, Abbasi BH, Zeb A, Xu LL, Wei YH (2011) Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *Afr J Biotechnol* 10:8984-9000
- Kadota M, Niimi Y (2004) Influences of carbon sources and their concentrations on shoot proliferation and rooting of ‘Hosui’ Japanese pear. *HortScience* 39:1681-1683
- Karhu ST (1997) Sugar use in relation to shoot induction by sorbitol and cytokinin in apple. *J Amer Sor Hort Sci* 122:476-480
- Li BQ, Feng CH, Hu LY, Wang MR, Chen L, Wang QC (2014) Shoot regeneration and cryopreservation of shoot tips of apple (*Malus*) by encapsulation-dehydration. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 50:357-368
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18:100-127
- Loescher WH, Marlow GC, Kennedy RA (1982) Sorbitol metabolism and sink-source interconversions in developing apple leaves. *Plant Physiol* 70:335-339
- Magyar-Tábori K, Dobránszki J, da Silva JAT, Bulley SM, Hudák I (2010) The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell Tiss Org Cult* 101:251-267
- Marino G, Magnanini E, Battistini S, Righetti B (1991) Effect of hormones and main carbon energy sources on in vitro propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cvs. ‘San Castrese’ and ‘Portici’. *Acta Hort* 293:355-362
- Mitić N, Stanišić M, Milojević J, Tubić L, Ćosić T, Nikolić R, Ninković S, Miletić R (2012) Optimization of in vitro regeneration from leaf explants of apple cultivars ‘Golden Delicious’ and ‘Melrose’. *HortScience* 47:1117-1122
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1998) Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 34:267-275
- 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, Fasolo F (1989) High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.) *Plant Cell Tiss Org Cult* 17:133-142
- Seong ES, Song KJ, Jega S, Yu CY, Chung IM (2005) Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine affect *Agrobacterium*-mediated apple transformation. *Plant Growth Reg* 45:75-82
- Srskandarajah S, Goodwin PB, Speris J (1994) Genetic transformation of apple scion cultivar ‘Delicious’ via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 36:317-329
- Statistical Korea (KOSTAT) (2017) Statistics annual report. Daejeon Korea
- Wallart RA (1980) Distribution of sorbitol in Rosaceae. *Phytochemistry* 19:2603-2610
- Welander M (1988) Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised in vitro from mature apple trees. *J Plant Physiol* 132:738-744
- Welander M, Maheswaran G (1992) Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple rootstocks. *J Plant Physiol* 144:223-228
- Yepes LM, Aldwinckle HS (1994) Factors that leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 37:257-269