

사과 ‘후지’의 기관형성을 통한 식물체 재생에 효율적인 배양방법

이윤경 · 권영주 · 양용준

Optimal culture methods for plant regeneration via shoot organogenesis in the ‘Fuji’ apple

Yoon Kyung Lee · Youngju Kwon · Yong Joon Yang

Received: 14 September 2023 / Revised: 18 September 2023 / Accepted: 18 September 2023 / Published: 13 October 2023
© 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 dark incubation periods in the early stages of culture, pre-treatment methods, the number of explants per culture container, the type of culture containers, and the orientation of the explants on culture media were evaluated to determine the optimal shoot regeneration conditions for ‘Fuji’ apple leaf explants. Light incubation of explants produced minimal response. However, dark incubation of explants for 4 weeks during the initial culture period enhanced shoot regeneration frequency. Comparing the number of explants per container, a higher percentage of shoot regeneration was obtained with nine explants per container compared with four explants per container. Pre-treatment, before culture, by dipping explants in a liquid regeneration medium containing 40 g/L of sorbitol for 2 hours produced the highest shoot formation rate, and the time of shoot formation was accelerated. The percentage of shoot regeneration and number of shoots per regenerating explant reached a maximum of 87.5% and 4.7, respectively. The regenerated shoots were elongated and rooted on a rooting medium of 1/4 MS with 0.2 mg/L IBA. The plantlets were successfully acclimatized, and the regenerated plants produced normal phenotypes.

Keywords Apple, Culture method, Dark incubation, ‘Fuji’, Shoot organogenesis

서론

사과(*Malus domestica* Borkh.)는 장미과의 낙엽 과수로 온대 지방에서 널리 재배되고 있는 과수 중의 하나이다. 전세계적으로 연간 생산량이 약 7천만톤에 이르며, 이는 바나나와 오렌지에 이어 세 번째로 많은 규모이다(Bai et al. 2016). 국내에서도 배, 감귤과 함께 주요 과수 작물로 꼽히는 사과는 재배면적이 꾸준히 증가하여 2022년 기준 33,911 ha로 과수 중 가장 넓고, 생산량은 566,041톤으로 감에 이어 두 번째이다(Statistical Korea 2022). 주로 생과로 소비되는 사과는 비타민 C와 펙틴이 풍부하고 다양한 생리활성물질들이 많아 과산화수소에 의한 산화반응을 억제하는 것으로 알려져 있다(Lee et al. 2004). 특히 과피 부분의 폴리페놀과 플라보노이드는 포도나 고구마에 비해 많은 것으로 보고되어 영양학적 가치를 인정받고 있으며(Kim et al. 2014), 이에 따라 1인당 연간 소비량이 꾸준히 증가하고 있다. 그러나 주요 사과 생산국의 kg당 생산비를 비교해보면 미국은 우리나라 생산비의 43.5%, 중국은 8.3% 수준에 불과하다(Lee et al. 2008). 현재는 신선 사과의 수입이 식물방역법에 의해 금지되어 있지만 최근의 무역자유화 추세를 고려하면 저렴한 수입산 사과와의 경쟁에서 우위를 차지할 수 있는 경쟁력 있는 고품질 기능성 신품종의 육성이 필요하다.

사과는 과수 특성상 유년기가 길어 세대 진전이 느리고, 유전적 조성이 복잡 다양하기 때문에 새로운 품종 육성을 목적으로 하는 교배 육종에 20년 이상의 시간이 요구된다. 이러한 과수 육종의 어려움을 극복하기 위해 유전 공학 기술을 이용한 형질전환 연구가 시작되었으며, 기내 육종의 필수

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

단계인 조직배양을 통한 효율적인 식물체 재생 시스템 확립에 관한 연구도 활발하게 이루어졌다. 국내 주요 품종인 사과 ‘후지’는 재생이 어려운 것으로 알려져 있었으나, 합성 cytokinin을 이용한 연구가 활발하게 진행되면서 효과적인 식물체 재생 시스템이 개발되었다(Guo et al. 2011; Murthy et al. 1998). 그러나 이를 기반으로 한 *Agrobacterium* 매개 형질 전환 연구에서 안정적인 형질전환 식물체를 획득하는데 여전히 제한요인이 되고 있어 식물체 재생 방법의 개선이 필요한 상황이다(Bhatti and Jha 2010; Hanke et al. 2020).

따라서, 본 연구에서는 사과 ‘후지’의 기내 잎 절편체로부터 효율적인 신초 기관형성을 위한 전처리 방법 및 배양 환경의 영향을 구명하고자 하였으며, 재생된 신초의 발근과 활착을 거쳐 완전한 식물체를 획득함으로써 분자 육종의 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 기내 신초배양

본 연구는 사과(*Malus domestica* Borkh.) ‘후지’의 기내 신초 배양에서 얻어진 잎 절편체를 재료로 하여 수행하였다. 기내 신초배양은 LS 배지(Linsmaier and Skoog 1965)에 6-benzyladenine (BA) 1 mg/L, α -naphthaleneacetic acid (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°C, 1.2기압에서 20분간 고압멸균 하였다. 모든 배양은 25 ± 2°C인 배양실에서 백색 형광등을 이용한 32 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 연속 조명하에서 이루어졌으며, 기내 배양을 통해서 얻어진 신초는 아래의 조건을 확립하기 위한 재료로 사용되었다.

잎 절편체로부터의 신초 기관형성

사과 ‘후지’의 기내 배양된 잎 절편체로부터 신초 재생에 적합한 조건을 구명하기 위하여 암배양 기간, 전처리, 용기당 치상 개체수, 배양 용기의 종류 및 절편체 치상 방향을 달리 하여 실험을 수행하였다.

각 재생 실험에 사용된 잎 절편체는 신초 증식배지에서 배양 3주 된 식물체의 상부에서 완전히 전개된 잎을 절취하여 사용하였다. 잎을 절취한 후 주맥을 포함하도록 2면 절단하였고, 향측면이 배지에 닿도록 치상하였다. 신초 재생 배지는 N6 염류와 비타민(Chu et al. 1975)에 BA 5 mg/L, NAA 0.1 mg/L, agar 8 g/L를 첨가하였으며, 탄소공급원의 경우 전처리 효과 실험에서는 sucrose 30 g/L를, 암배양 기간과 용기당 치상 개체수, 배양 용기의 종류 및 절편체 치상 방향의 효과 실험에서는 sorbitol 40 g/L를 첨가하였다. 모든 배지는 100 mL

삼각플라스크에 30 mL씩 분주하여 사용하였으며, 잎 절편체를 배지에 치상하여 4주 동안 암조건에서 배양 한 후, 신초 배양과 동일한 명조건으로 옮겨 배양하면서 신초 형성을 유도하였다.

암배양 기간

잎 절편체로부터 신초 기관형성에 효과적인 암배양 기간을 알아보기 위하여 신초 재생 배지에 절편체를 치상한 후 0, 1, 2, 3, 4, 8주 동안 암조건에서 배양하였다. 암배양은 각 배양 용기를 알루미늄 호일로 감싼 후 배양실에서 실시하였으며, 암처리 이후에는 신초배양과 동일한 명조건에서 배양하였다.

전처리

사과 ‘후지’의 잎 절편체로부터 신초 기관형성에 미치는 전처리의 영향을 알아보기 위하여 절편체를 처리 없이 그대로 재생 배지에 치상한 대조구와 당을 첨가한, 또는 당을 첨가하지 않은 액체 재생 배지에 절편체를 침지한 후 재생 배지에 치상한 처리를 비교하였다. 액체 재생 배지는 N6 염류와 비타민에 BA 5.0 mg/L, NAA 0.1 mg/L를 첨가하였으며, 당은 sorbitol 40 g/L를 사용하였다. 전처리는 2면 절단한 절편체를 액체 재생 배지에 침지한 후, shaking incubator에서 50 rpm으로 2시간 동안 배양하여 실시하였다. 침지 처리 후, 여분의 액체배지를 멸균 filter paper로 흡수시킨 후 고체 재생배지에 치상하여 배양하였다.

배양 용기당 치상 절편체 수

잎 절편체로부터 신초 기관형성에 효과적인 배양 용기당 절편체의 수를 알아보기 위하여 용기당 절편체를 각각 4개, 9개씩 치상하여 비교하였다.

배양 용기와 절편체 치상 방향

잎 절편체로부터 신초 기관형성에 적합한 배양 환경을 구명하기 위하여 배양 용기와 절편체의 치상 방향을 달리하여 실험을 수행하였다. 배양 용기는 100 mL 삼각플라스크와 100 × 15 mm petri-dish를 사용하였고, 잎 절편체를 향측면, 또는 배측면이 배지에 닿도록 치상하여 비교하였다.

실험구 및 조사와 통계분석

배양 용기당 치상 절편체 수 처리를 제외한 모든 실험은 배양 용기당 절편체 9개씩 치상한 것을 1반복으로 하여 처리당 5반복으로 하였으며, 완전임의배치법으로 배치하여 배양하였다. 배양 8주 후 신초 형성율과 신초가 형성된 절편체당 재생된 신초 수를 조사하였다. 신초 형성율은 전체 절편체 중 1개 이상의 신초가 형성된 절편체의 수를 백분율로 나타내었고, 신초 수는 눈으로 식별이 가능한 약 3 mm 크기 이상의 신초를 집계하여 표시하였다.

통계분석은 SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) 프로그램을 이용하여 independent sample t-test와 one-way ANOVA를 실시하였고, $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

발근 및 활착

배양 8주 후에 재생된 신초 중 1~2 cm 정도 신장한 신초는 절편체에서 분리하여 발근배지로 옮겨 신장 및 발근을 유도하였다. 발근배지는 1/4 MS배지에 indole-3-butyric acid (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 따뜻한 물을 이용하여 제거한 후, 고압살균 된 인공토양(버미큘라이트 1: 퍼얼라이트 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.

결 과

잎 절편체로부터의 신초 형성

사과 ‘후지’의 잎 절편체로부터 신초 기관형성 유도를 통한 효율적인 식물체 재생을 위하여 암배양 기간, 전처리, 용기당 치상 개체수, 배양 용기의 종류 및 절편체 치상 방향을 달리하여 실험을 수행하였다. 신초 기관형성 배지에 치상하여 암조건에서 배양한 잎 절편체는 배양 3주 후부터 절단면을 따라 흰색의 캘러스와 함께 옅은 노란색의 신초 원기가 형성되기 시작하였다(Fig. 1A-C). 형성된 신초 원기는 명조건으로 옮겨 약 4주간 배양하는 동안 녹색의 정상 신초 형성을 시작하였다(Fig. 1D). 계속되는 계대배양 기간동안 형성된 신초는 뚜렷한 신초 발달과 신장을 나타내다가(Fig. 1E&F) 발근유도배지에 치상한 후에 뿌리를 형성하였다(Fig. 1G&H). 형성된 신초 원기 및 재생된 신초 수는 배양 기간이 경과함에 따라 증가하여 배양 5주에서 6주 사이에 가장 높은 신초 형성율을 나타냈으며, 이후에는 감소하였다. 뿌리가 형성된 식물체들은 고압살균 된 인공토양(버미큘라이트 1: 퍼얼라

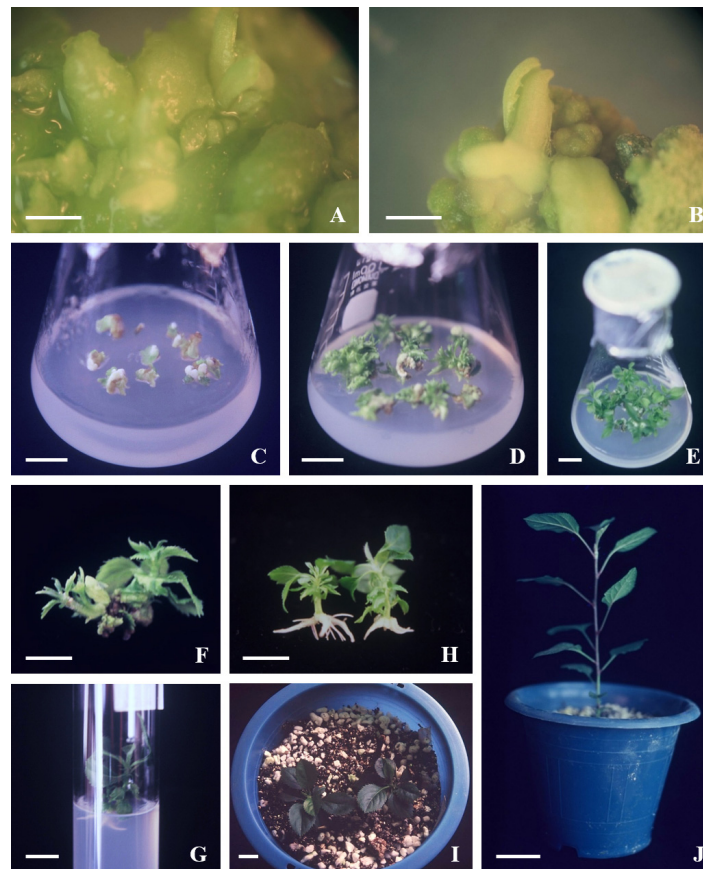


Fig 1 Plant regeneration via adventitious shoot formation in ‘Fuji’ apple leaf explants. (A-C) Single or multiple shoot primordia formation from leaf explants under dark conditions after 3 weeks in Chu (N6) medium supplemented with 5.0 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA. (D) Shoot formation under light conditions after 4 weeks. (E, F) Shoot multiplication and elongation after 8 weeks of culture. (G, H) Rooting of regenerated shoots in 1/4 MS medium with 0.2 mg/L IBA. (I) A regenerated plant transferred to a pot after 3 months. (J) Acclimated plant in greenhouse. Horizontal bar indicates scale as follows: 1 mm (A, B), 1 cm (C-I), and 5 cm (J)

이트 1)이 들어 있는 직경 12 cm 화분에 이식하여 4주 동안 순화를 시키고 후에 온실로 옮겨 재배하였다(Fig. 1I&J).

암배양 기간의 효과

사과 ‘후지’의 잎 절편체로부터 신초 형성을 위한 적절한 암배양 기간을 알아보고자, 배지에 잎 절편체를 치상하여 암배양을 하지 않은 대조구와 1, 2, 3, 4, 8주 동안 암배양 한 후 명배양으로 옮겨준 처리를 비교하였다. 암배양을 하지 않은 대조구에서는 신초가 거의 형성되지 않았고, 암배양을 실시한 처리구는 암배양 기간이 증가함에 따라 신초 형성율과 절편체 당 재생된 신초수 모두 증가하였다. 신초 형성율은 암배양 1주부터 증가하여 4주 처리에서 가장 높게 나타났으며, 절편체당 재생된 신초수는 1주부터 4주 처리까지 꾸준히 증가하다가 8주 처리에서 크게 감소하였다(Fig. 2). 이 결과, 사과 ‘후지’의 경우 2~4주간의 암배양이 신초형성에 효과적이며 신초수에 있어서도 긍정적인 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 모든 처리 가운데, 배양 초기에 4주 동안 암배양 한 처리구에서 신초 형성율 68.8%와 절편체당 신초수 3.6개가 가장 높게 나타났다.

전처리의 효과

사과 ‘후지’의 신초 형성에 있어서 액체배지에서의 침지를 통한 전처리의 효과를 알아보기 위해 전처리를 하지 않은 대조구와 sorbitol 40 g/L를 첨가하거나, 첨가하지 않은 액체 재생배지 처리를 비교하였다(Fig. 3). Sorbitol을 첨가한 액체 재생배지 침지 처리가 신초 형성에 가장 효과적이었으며, 재생된 신초수는 처리에 따른 차이가 나타나지 않았다. Sorbitol을 첨가하지 않은 액체 재생배지 처리는 전처리를 하지 않은 대조구와 처리 간 차이가 나타나지 않아 전처리 효과에 가장 결정적인 역할을 하는 것은 sorbitol의 첨가임을 알 수 있었다.

모든 처리 가운데 sorbitol을 첨가한 액체 재생배지에 침지한 처리에서 신초 형성율 87.5%, 재생 신초수 4.7개로 가장 높았다. 또한, 전처리를 하였을 경우, 배양 초기부터 빠르게 신초를 형성하는 것을 관찰할 수 있었다.

배양 용기당 치상 절편체 수의 효과

사과 ‘후지’의 신초 형성에 있어서 치상 절편체의 수가 신초형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 배양용기 당 4개 또는 9개의 절편체를 치상하여 비교하였다(Fig. 4). 신초 형성율은 용기당 절편체 9개를 치상한 처리가 효과적이었으며, 절편체당 재생된 신초수는 4개를 치상한 처리구에서 다소 높게 나타났다. 이 실험의 결과, 용기당 치상한 절편체의 수가 많은 경우에 규명되지 않은 이유로 신초 형성율이 좋아지는 것을 알 수 있었다. 가장 높은 신초형성율을 나타낸 배양용기 당 절편체 9개를 치상한 경우, 신초 형성율이 61.0%, 절편체당 신초수는 3.6개였고 배양용기 당 절편체를 4개 치상한 경우, 신초 형성율은 45.0%, 절편당 신초수는 4.2개였다.

배양 용기와 절편체 치상 방향의 효과

신초 형성에 효과적인 배양 용기와 절편체의 치상방향을 알아보기 위해, 100 ml 삼각플라스크와 100 × 15 mm petri dish 용기에 절편체의 향측면, 또는 배측면이 배지에 닿도록 치상하여 신초 형성을 유도하였다(Table 1). 신초 형성에 있어 배양 용기에 따른 효과는 처리 간의 차이가 매우 컸으며, petri-dish를 사용한 처리의 신초 형성률이 25.9%인데 반해 삼각플라스크를 사용한 처리의 신초 형성율은 66.1%와 77.8%로 약 3배 정도 높았다. 절편체의 치상방향은 배측면이 배지에 닿게 치상한 처리가 신초 형성율과 재생된 신초수에 효과적으로 나타났고, 특히, 100 ml 삼각플라스크에서 배양을 한 경우, 신초형성율과 재생된 신초수에서 높게 나타났다. Petri

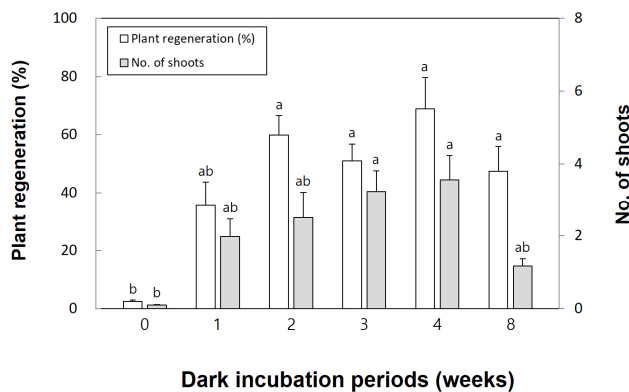


Fig 2 Effects of the duration of dark incubation on shoot regeneration from leaf explants of ‘Fuji’ apple. Data are presented as mean ± SE. Different letters denote significant differences according to Duncan’s multiple range tests at p < 0.05

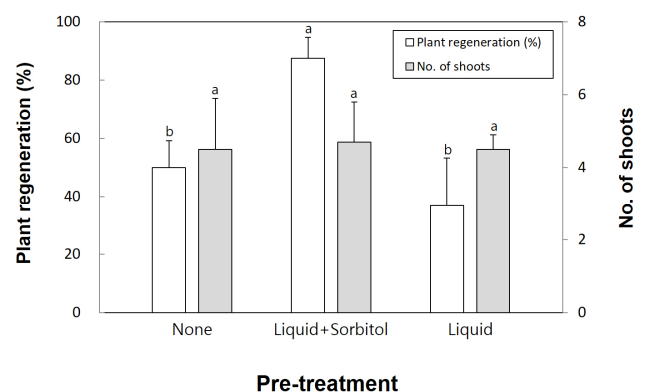


Fig 3 Effects of different pre-treatments on shoot regeneration from leaf explants of ‘Fuji’ apple. Data are presented as mean ± SE. Different letters denote significant differences according to Duncan’s multiple range tests at p < 0.05

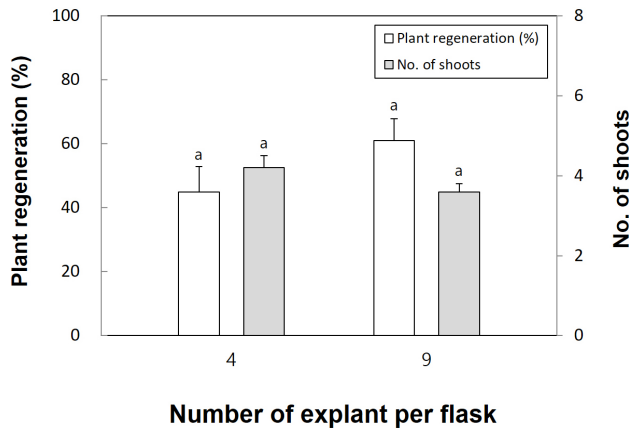


Fig 4 Effects of number of explants per flask on shoot regeneration from leaf explants of 'Fuji' apple. Data are presented as mean \pm SE. Different letters denote significant differences according to independent sample *t*-tests at $p < 0.05$

dish를 사용한 경우, 신초형성율에서는 치상방향에 따른 차이가 없었으나 신초수에서는 배측면을 배지에 닿게 치상한 경우가 높았다. 모든 처리 가운데 삼각플라스크 용기에 절편체의 배측면이 배지에 닿게 치상한 처리가 신초형성율 77.8%, 절편체당 신초수 4.4개로 가장 높게 나타났다.

발근 및 활착

본 실험을 통해 재생된 신초를 절단하여 발근배지에서 배양하였을 때 2-3주후부터 뿌리 형성이 관찰되었고 4주 후에는 성공적으로 발근이 이루어졌다. 뿌리가 형성된 식물체는 인공 토양(버미큘라이트 1: 퍼얼라이트 1)이 들어 있는 화분에서 4주 동안 순화과정을 거쳐 활착시킬 수 있었다(Fig. 11). 활착된 식물체를 온실로 옮겨 재배하였을 때, 식물체는 정상적인 표현형을 나타내었다(Fig. 1J).

고찰

과수는 목본성 식물의 특성상 식물체 재생이 어렵기 때문에 신초형성율을 증가시키기 위한 여러 연구가 진행되어왔다.

그 중 기관발생에 있어서 배양 초기 암처리하는 반드시 필요한 것으로 인정되어 있으며(Magyar-Tábori et al. 2010; Mitić et al. 2012), 사과와 같은 경우는 약 2-4주간 암배양 해주는 것이 가장 유효한 것으로 보고되고 있다(Bhatti and Jha 2010, Li et al. 2014, Welander 1988). 본 실험에 있어서도 사과 '후지'의 재생에 암배양은 필수적이었으며, 암배양을 하지 않은 처리에서는 재생이 거의 이루어지지 않았다. 사과 '후지'에서 암배양의 적정 기간은 4주로 나타났으며 8주 동안 처리했을 경우 신초형성율이 감소되었다. IAA는 빛에 의해 파괴되기 때문에 재생에 있어서 암배양은 조직의 내생 auxin이 증가하는 효과가 나타난다. 이러한 효과는 외생 auxin의 처리로 대체될 수 없으며(Famiani et al. 1994), 이는 내생 auxin의 효과와 외생 auxin의 첨가 효과는 다르다는 것을 의미한다.

이러한 암배양의 적정 기간은 품종마다 반응이 다르게 나타나는데, Fasolo 등(1989)은 'Paladino Spur McIntosh', 'Triple Red Delicious'와 'Gala' 품종에서 2주의 암배양이 효과적이고, 'McIntosh'의 경우는 1주의 암배양이 효과적이었다고 보고하였다. 각 품종마다 암배양의 기간에 따른 반응이 다른 것은 기관이 형성되기 위한 능력 획득 및 결정이 일어나는 과정에서 내생 auxin에 대한 요구가 각각 다르기 때문이며, 암배양이 기관형성에 있어 표현임계인자로 작용하여 품종마다 다르게 반응하는 것으로 판단된다. 또한 광은 신초형성 과정 중 형태발생을 억제하는 기능이 있어 배양 초기의 암처리하는 광노출에 의한 저해효과를 감소시킬 수 있다(Welander 1988).

배양 중 사용하는 용기는 배양과정에서 발생하는 가스 조성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 배양 기간 중 기내 가스 조성을 조사해보면 절편체로부터 방출되는 CO₂ 및 ethylene의 집적, O₂의 감소 외에 ethanol과 acetaldehyde 등의 물질이 검출되며(Buddendorf-Joosten and Woltering 1994), 이러한 기내 가스는 기관형성에 영향을 주기도 한다. 다량의 ethylene은 절편체로부터 기관형성의 유도단계에서 저해제로 작용하고 재생 후에는 증식에 효과적으로 작용한다고 알려져 있다(Huxter et al. 1981). 실제로 재생 과정에서 STS나 AgNO₂, AVG와 같은 에틸렌 억제제 처리가 효과적이었고(Chi et al. 1991; Mitić et al. 2012), 에틸렌 처리는 식물체 증식

Table 1 Effects of the culture vessel and explant orientation on shoot regeneration from leaf explants of 'Fuji' apple²

Vessel	Surface contact with medium	Shoot regeneration (%)	Number of shoots/Regenerated explants
Erlenmeyer flask (100 mL)	Abaxial	77.8 \pm 7.8 ^a	4.4 \pm 0.6 ^a
	Adaxial	61.1 \pm 16.7 ^a	3.3 \pm 0.4 ^{ab}
Petri dish (100 \times 15 mm)	Abaxial	25.9 \pm 13.7 ^b	3.1 \pm 0.3 ^b
	Adaxial	25.9 \pm 7.4 ^b	2.0 \pm 0.3 ^b

²Data were collected after 8 weeks of culture, including 4 weeks of dark incubation. Data are presented as mean \pm SE from five replicates. Different superscript letters within the same column indicate significant differences according to Duncan's multiple range tests ($p < 0.05$).

을 촉진하는 효과가 있는 것으로 보고 되었다(Kevers et al. 1992). 본 실험에서 삼각플라스크에 알루미늄호일로 밀봉하는 방법이 petri-dish에 sealing film으로 밀봉하는 방법에 비해 신초 재생 효율이 높게 나타났는데, 이는 가스 교환이 자유로워 배양 중에 에틸렌 집적에 의한 재생 저해 현상이 감소하였기 때문이라 판단된다.

사과에 있어 절편체의 치상 방향이 신초형성에 미치는 영향에 대한 보고를 보면 잎의 향측면이 배지에 닿게 하는 치상 방법이 절편체로부터의 신초 재생에 효과적인 것으로 알려져 있다. 이는 잎의 기공을 윗부분에 위치하도록 하여 산소 교환이 증가하거나(Yepes and Aldwinckle 1994), 잎의 도관 조직에서 호르몬 이동의 극성에 의한 것으로 추정하였다(Welander 1988). 본 실험에서는 배측면이 배지에 닿게 치상한 처리가 향측면에 비해 신초 형성율과 재생된 신초수에 있어서 다소 높게 나타났다. 이는 Welander (1988)가 보고한 것처럼 후지의 경우, 치상방향이 신초형성에 영향을 주지 않은 것으로 보이며, 'Akerö', 'McIntosh', 'Wijick', 'Gravenstein', M.26은 식물생장조절제의 첨가에 의해 극성의 효과를 무효화 된 것으로 생각된다.

기관형성을 통한 식물체 재생에 있어서 배양에 사용되는 절편체의 생리적인 상태는 신초 형성율에 영향을 미치는 중요한 요인 중 하나이다. 조직 내의 내생 물질 수준에 따라 재생 배지에 대한 반응이 달라지기 때문에 사용된 엽령과 절편체의 유래는 재생에 있어서 중요한 요인으로 작용한다. 또한, 치상 전 절편체의 전처리가 재생에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 암처리(Magyar-Tábori et al. 2010), 저온 처리(Pawlicki and Welander 1994) 등이 효과적인 것으로 보고되었다. 본 실험에서는 효과적인 식물체 재생을 위하여 신초 증식배지에서 배양 3주 된 신초의 상부에서 완전히 전개된 잎을 사용하였으며 전처리는 *Agrobacterium* 매개 형질전환 과정을 고려하여 액체 재생배지 침지 효과 실험을 수행하였다. 당이 포함된 액체 재생배지에 2시간 동안 절편체를 침지하여 전처리를 실시한 경우 87.5%의 높은 신초 형성율과 절편체당 신초수 4.7개로 효과가 있는 것으로 나타났다.

결론적으로 본 연구를 통하여 사과 '후지'의 잎 절편체로부터 신초 기관형성을 통한 식물체 재생에 적합한 배양방법은 잎 절편체를 sorbitol 40 g/L가 첨가된 액체 재생배지에 2시간 동안 침지하여, 100 ml 삼각플라스크에 분주한 재생배지에 배측면이 배지에 닿게 9개씩 치상하고, 4주 동안 암조건으로 배양한 후 명조건으로 옮겨 배양하였을 때, 신초 형성율 87.5%와 절편체당 신초수 4.7개의 결과를 얻을 수 있었다. 또한 발근배지에서 재생 신초의 발근 및 신장을 유도한 후 활착시켜 온실에서 재배하였을 때 정상적인 표현형을 보이는 식물체를 생산할 수 있었다.

적 요

사과 '후지'의 잎 절편체로부터 신초 기관형성을 통한 효율적인 식물체 재생 시스템을 확립하기 위하여 암처리 기간, 전처리 방법, 배양 용기당 치상 절편체 수, 배양 용기의 종류와 배지 위의 절편체 치상방향 등을 달리하여 실험을 실시하였다. 배양 초기 암조건에서의 배양은 신초 형성에 필수적이며, 4주 동안 배양한 후 명조건으로 옮겨 배양하는 것이 신초 재생에 가장 효과적이었다. 배양 전 전처리로는 sorbitol 40 g/L가 포함된 액체 재생배지에 2시간 동안 침지하였을 때 신초 형성율이 87.5%까지 증가하였으며, 신초 형성 시기가 빨라지는 것으로 나타났다. 배양 용기당 치상 절편체 수는 9개를 치상하는 것이 신초 재생에 효과적이었으며, 배양 용기는 100 ml 삼각플라스크를 사용하는 것이 petri dish를 사용하는 것에 비해 신초 형성율이 약 3배 정도 증가하였다. 잎 절편체의 배지 위 치상방향은 배측면이 배지에 닿게 치상했을 때, 신초 형성율과 재생된 신초수가 다소 높게 나왔다. 암조건에서 4주간 배양한 후 명조건으로 옮겨 총 8주간 배양하여 재생된 신초는 1/4 MS에 0.2 mg/L의 IBA가 첨가된 배지에서 발근을 유도한 후 활착시켜 온실에서 재배하였을 때 정상적인 표현형을 보여주었다.

사 사

본 연구는 고인이 되신 형남인 교수님의 지도로 이루어진 것이며 이에 깊은 감사와 존경을 표합니다.

References

- Bai L, Guo S, Liu Q, Cui X, Zhang X, Zhang L, Yang X, Hou M, Ho CT, Bai N (2016) Characterization of nine polyphenols in fruits of *Malus pumila* Mill. by high-performance liquid chromatography. *J Food Drug Anal* 43:1071-1081
- Bhatti S, Jha G (2010) Current trends and future prospects of biotechnological interventions through tissue culture in apple. *Plant Cell Rep* 29:1215-1225
- Buddendorf-Joosten JMC, Woltering EJ (1994) Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development in vitro. *Plant Growth Regul* 15:1-16
- Chi GL, Pua EC, Goh CJ (1991) Role of ethylene on de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp *pekinensis* (Lour) Olsson in vitro. *Plant Physiol* 96:178-183
- 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 Sin* 18:659-668
- 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* 69:679-685
- Fasolo F, Zimmerman RH, Fordham I (1989) Adventitious shoot formation on excised of in vitro grown shoot of apple cultivars. *Plant Cell Tiss Org Cult* 16:75-87
- Guo B, Abbasi BH, Zeb A, Xu LL, Wei YH (2011) Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *Afr J Biotech* 10: 8984-9000
- Hanke MV, Flachowsky H, Peil A, Emeriewen OF (2020) “Malus x domestica apple,” in *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*
- Huxter TJ, Thorpe TA, Reid DM (1981) Shoot initiation in light-and dark-grown tobacco callus: the role of ethylene. *Physiol Plant* 53:319-326
- Kevers C, Boyer N, Courduroux JC, Gaspar T (1992) The influence of ethylene on proliferation and growth of rose shoot cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 28:175-181
- Kim MJ, Kim YG, Kim HS, Cheong C, Jang KH, Kang SA (2014) Effects of antioxidant activities in ethanol extract of apple peel, grape peel, and sweet potato peel as natural antioxidant. *J Kor Acad-Ind Coop Soc* 15:3766-3733
- Lee IK, Ko BN, Woo SG (2008) Competitiveness and enhancing strategy for Korean apples. *Kor J Intl Agri* 20:184-189
- Lee KW, Lee SJ, Kang NJ, Lee CY, Lee HJ (2004) Effects of phenolics in Empire apples on hydrogen peroxide-induced inhibition of gap-junctional intercellular communication. *Biofactors* 21:361-365
- 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
- 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
- Mitić N, Stanišić M, Milojević J, Tubić L, Čosić T, Nikolić R, Miletić R (2012) Optimization of in vitro regeneration from leaf explants of apple cultivars Golden Delicious and Melrose. *HortScience* 47:1117-1122
- 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. *Hortscience* 69:687-696
- Statistical Korea (KOSTAT) (2022) Statistics annual report Daejeon, Korea
- 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
- 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