

## 사과 왜성대목 M-9의 기내대량번식에 미치는 배양조건의 영향

정재동\* · 정삼택 · 백영관 · 김창길<sup>1</sup> · 박윤경 · 조동훈 · 박재석  
경북대학교 원예학과, <sup>1</sup>상주대학교 원예학과

### Effects of Several Factors on In Vitro Multiplication of Apple Root Stock, M.9 T-337

CHUNG, Jae Dong\* · CHUNG, Sam Taek · BAEK, Young Ghwan · KIM, Chang Kil<sup>1</sup> · PARK, Yoon Kyung  
CHO, Dong Hoon · PARK, Jae Suk

*Dept. of Horticulture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea*

*<sup>1</sup>Dept. of Horticulture, Sangju National University, Sangju, 742-711, Korea*

**ABSTRACT** The experiments were conducted to establish the in vitro culture system of apple rootstock M.9. The meristem tissue of M.9 were pre-treated in antiox: dant solution containing  $100 \text{ mgL}^{-1}$  ascorbic acid and  $150 \text{ mgL}^{-1}$  citric acid for 30 minutes, transferred to the MS liquid medium added with  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  IBA,  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  GA, and  $30 \text{ gL}^{-1}$  sucrose, which shaken by 50 rpm for 2 weeks, and then, cultured in same composition of MS agar medium. This treatment stimulated shooting from the tissue, the most favorably, compared with other treatments. All young shoots produced normal roots when they were shake-cultured on the 1/2MS liquid medium added with  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  IBA,  $30 \text{ gL}^{-1}$  sucrose and 1,000 times diluted solution of Hormex by 50 rpm for one week, and subsequently transferred to the  $8 \text{ gL}^{-1}$  agar medium of the same composition as pre-culture medium minus Hormex.

**Key words:** Apple root stock, M.9, meristem tissue

### 서 론

우리 나라 사과나무의 왜화재배는 70년대 초부터 M.9, M.26 등의 왜성대목 및 MM.106과 같은 반왜성 대목이 도입되면서 시작되었다. 그 후 왜성 대목별 품질과 수량성 검정 (Cho et al. 1983), 이중 대목 묘의 발근 (Shim et al. 1977)과 왜성 대목의 번식법 (Jones et al. 1976; Noiton et al. 1992; Jun et al. 1997) 등 많은 연구가 행해져 왔다. 그 결과, M.26 대목이 우리 나라 기후 풍토에 적합함은 물론 실용성이 인정되어 (Yun 1998), 70년대 이후 재배농가가 급격히 늘어나 1997년 현재 전체 사과 재배면적의 72.5%에 이르고 있다.

그러나, 사과재배 선진국과는 달리 자근묘목보다는 왜성대목을 실생대목에 접목한 2중 접목묘를 이용함으로써 노동생산성이 크게 떨어졌다. 이와 함께 농업환경의 급격한 변화로

말미암아 열악한 노동환경에 처하게 된 우리 나라의 사과산업은 생력형 사과원으로 전환하기에 이르렀다. 사과재배 방식의 세계적 추이는 M.9와 같은 자근왜성대목을 이용한 저수고 고밀식 재배로서 노동력 절감 및 조기다수확이 가능한 방향으로 변천해 가고 있다. 우리 나라에서도 이러한 사과생산체계를 확립하기 위해서는 우선 이에 적합한 자근대목의 원활한 공급이 필수적이다. 따라서 대목의 대량증식을 위한 방법으로서 조직배양기술을 이용한 M.9 대목의 대량증식의 필요성이 제기되어 왔으나, 지금까지 조직배양기술을 이용한 사과 M.9대목의 대량생산은 그다지 원활하게 이루어지지 못하고 있다 (Webster and Jones 1989). 특히 기내번식 단계에서 발근 유도가 어려운 문제점이 있다 (Harbage et al. 1996; 1998).

본 연구는 M.9 대목의 생장점으로부터 식물체 재분화 및 발근에 미치는 배양조건 및 환경의 효과에 대해 검토코자 하였다.

\*Corresponding author. Tel 053-950-5728  
E-mail jdchung@bh.knu.ac.kr

재료 및 방법

식물재료

1997년 11월 18일 경북대학교 과수포장에 재식된 M.9 T-337의 당해년도 신장지를 약 50cm 길이로 잘라 비닐봉지에 넣어 밀폐한 상태로 5°C 전후에서 저온처리한 것을 1998년 1월 10일 멸균수를 넣은 비커에 꽂아 25°C의 항온실에서 가슴기로 가슴하면서 맹아를 유도하였다. 액아로부터 신초가 2~3cm 정도 신장한 1월 29일에 채취하여 실험재료로 사용하였다. 또한 고온기인 6월 4일에 포장에서 직접 신초를 채취하여 생장점 배양 후 생존율을 조사하였다. 재료의 살균은 신초가 신장한 마디를 잘라 수돗물에 씻은 후, NaOCl 1% 용액에 10분간 살균하고 살균수로 3회 수세한 다음, 잎을 제거한 후 1mm 크기로 생장점 (shoot tip)을 채취하여 배양하였다.

줄기유도

배양초기 조직의 산화방지를 위하여 신초에서 채취한 생장점을 ascorbic acid : citric acid 가 75 : 100 mgL<sup>-1</sup>, 100 : 150 mgL<sup>-1</sup>, 150 : 200 mgL<sup>-1</sup> 등의 비율로 농도를 달리한 혼합용액에 30분간 각각 침지한 후 재료를 배지에 옮겨 배양 3일, 4일, 5일 후 생존율과 갈변율을 조사하였다. 배지는 MS (Murashige and Skoog) 기본배지에 IBA 0.1 mgL<sup>-1</sup>, GA<sub>3</sub> 0.5 mgL<sup>-1</sup>, sucrose 30 gL<sup>-1</sup>, agar 8 gL<sup>-1</sup>를 첨가한 후 pH를 5.8로 조정하였다. 배양은 25°C 전후에서 16시간 일장조건으로 배양하였다.

배양방법에 따른 생장점의 생존율 및 식물체 재분화율을 조사하기 위하여 액체배지와 고체배지를 사용하였으며 고체배지의 지지물로 agar 8 gL<sup>-1</sup> 또는 솜을 사용하였고 여기에 활성탄을 1 gL<sup>-1</sup>를 첨가 또는 첨가하지 않았다. 액체배지에서의 배양은 50 rpm/min의 속도로 2주간 배양 후 솜을 지지물로 사용한 배지로 옮겨 배양하였으며 배양 4주 후 생존율, 갈변율 및 신초 발생률 등을 조사하였다.

발근유도

재분화된 M.9, T-337의 식물체로부터 발근을 유도하기 위하여 1.5 cm 크기의 기내배양 신초를 1/2 MS 기본배지에 IBA 농도 (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mgL<sup>-1</sup>)를 달리하여 배양하였다. 또한 증식된 신초를 IBA 0.5 mgL<sup>-1</sup>가 첨가된 1/2 MS 기본배지로 이식하기 전에 Hormex (Brooker chemical, USA) 1,000배 액이 함유된 동일조성의 액체배지에서 분당 50 rpm의 속도로 7일간 진탕배양한 후 한천 8 gL<sup>-1</sup>가 첨가된 고체배지로 옮겨 발근을 유도하였다. 절편은 배양병당 5개씩 전체 100개를 처리별로 이식하여 계대배양하였으며 배양 8주 후 발근율을 조사하였다.

결과 및 고찰

생장점 배양시 재료의 채취시기와 항산화제의 농도에 따른 조직의 갈변율과 생존율은 table 1과 같다. 전년도의 눈이 생장하기 전인 1월초에 가지를 절취하여 배양상에서 수습하여 신초를 생장시킨 후 생장점을 절취한 다음 항산화제인 ascorbic acid와 citric acid 혼합용액에 침적 처리하였을 경우 처리하지 않은 대조구에 비해 다소 갈변율이 감소하는 경향이 있었다. Hildbrandt와 Harney (1988)는 배지 내에 ascorbic acid: citric acid를 100:150 mgL<sup>-1</sup>를 첨가했을 때 페놀물질의 감소와 더불어 생존율이 높았다고 했으며, Wang (1994) 등은 사과 'Fuji'의 생장점 배양시 ascorbic acid 100~150 mgL<sup>-1</sup> 처리했을 때 무처리보다 갈변율이 1/4로 감소하였으며 생존율도 75%로 향상되었다고 하였다. 이는 본 실험에서 1월에 실내에서 채취한 생장점에서의 결과와 일치하는 것으로 배양 절편체의 갈변을 방지하고 생존율을 높이기 위해서 항산화제인 ascorbic acid와 citric acid 혼합용액으로 처리하거나 경우에 따라 ascorbic acid 단용액에 절편체를 침지한 후 배양하는 것도 갈변방지에 효과가 있는 것으로 생각된다.

또한 6월초에 신초로부터 생장점을 절취하여 배양한 경우

Table 1. Effect of the sampling date and the mixed ratio of ascorbic acid and citric acid on browning and survival of the meristem cultures of M.9 T-337.

Sampling date	Ascorbic acid : citric acid (mgL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Browning (%)			Survival (%)		
		3 days	4 days	5 days	3 days	4 days	5 days
Jan. 29	control	20.0	22.0	25.0	80.0	78.0	75.0
	75 : 100	17.3	17.3	20.0	58.4	82.7	80.0
	100 : 150	15.0	15.0	16.6	60.2	85.0	83.4
	150 : 200	14.7	14.7	15.2	61.9	85.3	84.8
June. 4	control	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	75 : 100	28.3	70.0	100.0	58.4	27.1	0.0
	100 : 150	26.0	63.6	100.0	60.2	30.4	0.0
	150 : 200	23.7	59.4	100.0	61.9	31.2	0.0

<sup>a</sup>Soaked in ascorbic acid and citric acid solution for 30 minutes.

ascorbic acid와 citric acid 혼합용액에 침지 처리하지 않고 생장점을 배양한 대조구에서는 배양 직후부터 심하게 갈변하기 시작하여 배양 3일 후에는 100% 갈변되었으나, ascorbic acid와 citric acid 혼합용액에 농도별로 침지 처리한 후 배양한 생장점은 농도가 높을수록 배양 4일째까지 대조구에 비해 갈변 정도가 낮아 갈변방지에 효과가 나타났으나 배양 5일째에는 처리농도에 상관없이 모두 갈변하여 생존개체가 전혀 없었다. 이상의 결과로 볼 때, 생장점의 채취시기를 앞당기는 것이 필요하며 6월 초에 채취한 생장점의 배양 전 산화방지제인 ascorbic acid와 citric acid 혼합용액에 침지효과는 인정되지 않았다. 따라서 기내 생존율을 증가시키기 위해서는 식물체 내에서의 갈변물질의 활성도가 낮은 시기인 휴면기 또는 5월 이전에 재료를 채취하여 배양하는 것이 효과적인 것으로 생각되었다. 그러나 영년생 과수류의 경우 생장점의 채취시기가 일정시기에 국한된다면 기내 배양묘의 안정적인 생산에 어려움이 있을 것으로 예상되는 바 이를 해결하기 위한 방법이 모색되어야 할 것으로 판단된다.

생장점 배양시 배지종류, 활성탄 첨가유무 및 지지물에 따른 생육양상은 table 2와 같다. 고체배지보다 신초로부터 채취한 생장점을 ascorbic acid와 citric acid를 각각 100 mgL<sup>-1</sup>와 150 mgL<sup>-1</sup>로 혼합한 용액에 전처리 후 활성탄이 첨가된 MS 액체배지에서 50 rpm 으로 2주간 진탕배양한 다음, 솜을 지지물로 사용한 MS 배지에 이식하였을 때와 활성탄이 첨가되지 않은 동일배지 조성의 MS 액체배지에서 진탕배양한 후 한천 8 gL<sup>-1</sup>가 첨가된 배지로 옮긴 것 모두 생존율은 100%로 다른 처리구에 비해 가장 양호하였다. 뿐만 아니라 이들 두 처리에

서는 신초 형성시 캘러스 형성이 전혀 이루어지지 않았으며 100% 모두 신초를 형성하였다. 이는 화목류 배양에서 배지내 활성탄을 첨가함으로써 절편체의 갈변방지에 효과적이라는 보고 (Preil and Engelhardt 1977)와 일치하는 결과를 나타내었다. 그러나 활성탄이 첨가된 액체배지에서 배양할 경우 배양기간 중 활성탄이 신초에 묻어 그 후의 생장이 저조한 편이었으므로 활성탄이 첨가되지 않은 액체배지에 배양한 다음 한천배지에 옮겨 배양하는 것이 가장 적합한 것으로 생각되었다.

기내에서 증식된 사과 후지 왜성대목인 M.9 T-337의 배양묘 (Figure 1)로부터 발근유도에 미치는 IBA의 효과는 table 3과 같다. IBA 0.5 mgL<sup>-1</sup>가 첨가된 배지에서 발근율이 60%로 다른 처리구에 비하여 높았으며 뿌리의 직경 및 근장 역시 양호하였고 특히 신초 길이가 현저히 길었다.

그러나 발근율이 그다지 높지 않아 이를 향상시키고자 배양 전 1주일간 발근 촉진제인 Hormex 1,000 배액이 첨가된 발근유도 배지에서 액체 진탕배양한 다음 IBA 0.5 mgL<sup>-1</sup>가 첨가된 한천배지에 옮겨 배양한 결과 (Table 4), 모든 배양묘로부터 100% 발근을 유도할 수 있었으며 (Figure 2), 전배양을 거치지 않은 것은 앞서 실험과 비슷한 55%의 발근율을 보여 Hormex액이 첨가된 발근유도 기본배지에서 1주일간 진탕배양한 전배양 방법이 발근에 상당한 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. James (1993) 등은 Malus domestica Borkh. 'Gala'에 IBA 1.5 μM 처리시, 뿌리의 원기는 24시간 내에 나타나며 4일 후에는 뿌리조직이 발생하고 14일이면 뿌리가 형성된다고 하였다. Puente와 Marin (1997)은 1/2 MS

**Table 2.** Effects of the cultural methods and media on survival, browning and shooting from the meristem cultures of M.9 T-337.

Cultural method	Survival (%)	Browning (%)	Callus (%)	Shooting (%)
Agar	95	50	25	74
Agar+charcoal	90	40	60	33
Cotton	75	25	25	50
Cotton+charcoal	70	30	35	35
Liquid+charcoal→cotton <sup>a</sup>	100	0	0	100
Liquid→agar <sup>b</sup>	100	0	0	100

<sup>a</sup> Transplant to MS cotton media after shaking culture in MS liquid media added with 1 gL<sup>-1</sup> charcoal.

<sup>b</sup> Transplant to MS agar media after shaking culture in MS liquid media without charcoal.

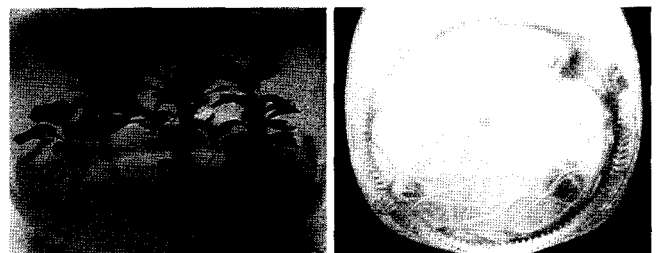
**Table 3.** Effects of IBA concentration on rooting of M.9 T-337.

IBA (mgL <sup>-1</sup> )	Fresh weight (g)	Rooting (%)	No. of Roots	Root diameter (mm)	Root length (mm)
0.1	0.25 ± 0.02 <sup>z</sup>	40	0.40 ± 0.01	0.29 ± 0.04	18.02 ± 0.51
0.5	0.42 ± 0.09	60	1.75 ± 0.71	0.38 ± 0.04	21.51 ± 0.13
1.0	0.24 ± 0.02	30	0.2 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.75 ± 0.12
2.0	0.26 ± 0.04	20	1.4 ± 0.06	0.38 ± 0.05	13.2 ± 0.30

<sup>z</sup> Figures were represented as mean value ± standard error.



**Figure 1.** Shooting (left) and multiple shoots (right) from the meristem cultures of M.9 T-337 on MS basal medium added with 0.1 mgL<sup>-1</sup> IBA, 0.5 mgL<sup>-1</sup> GA, 30 gL<sup>-1</sup> sucrose and 8 gL<sup>-1</sup> agar.



**Figure 2.** Well established plantlets (left) and their roots (right) of M.9 T-337 in 1/2 MS basal salts added with 0.5 mgL<sup>-1</sup> IBA, 30 gL<sup>-1</sup> sucrose and 8 gL<sup>-1</sup> agar. Plantlets were precultured on the MS medium containing 1,000 times diluted of Hormex.

**Table 4.** Effects of preculture method on rooting from M.9 T-337.

Preculture method	No. of explants cultured	No. of shoots with root	Rooting (%)
Hormax+Cultural medium <sup>z</sup>	20	20	100
Cultural medium <sup>y</sup>	20	11	55

<sup>z</sup>Shoots were precultured on 1/2 MS liquid media added with hormex diluted in 1,000 times for one week, and then transferred to the cultural medium.

<sup>y</sup>1/2 MS medium containing with 0.5 mgL<sup>-1</sup> IBA, 30 gL<sup>-1</sup> sucrose and 8 gL<sup>-1</sup> agar.

배지에 IBA 0.98 μM을 처리하였을 때 한달 후에 싹에서 5개의 뿌리가 발생하였다고 보고하였으며, James와 Thurbon (1979)은 M.9 대목용 가지에 IBA 3 mgL<sup>-1</sup>와 PG 1629 mgL<sup>-1</sup> 처리시 발근에 효과적이었다고 하였다. 본 실험에서는 IBA 0.5 mgL<sup>-1</sup>를 처리한 배지에서 배양하였을 때 50~60%의 발근율을 나타내어 IBA처리 효과가 인정되었으나 Hormex 처리에 의해 100% 발근을 유도할 수 있었는데 이 결과는 왜성 대목의 증식에 있어서 문제가 되어온 발근을 해결할 수 있는 새로운 방법으로 효과적일 것으로 판단된다.

## 적 요

고밀도 저수고형의 성공적인 왜화재배를 위한 사과 왜성대 목인 M.9 T-337의 대량증식체계를 확립하기 위하여 실험한 결과를 요약하면 다음과 같다. 초기 생장점 배양은 채취한 경정조직을 ascorbic acid와 citric acid를 각각 100 mgL<sup>-1</sup>와 150 mgL<sup>-1</sup>로 혼합한 용액에 30분간 전처리한 다음, IBA 0.1 mgL<sup>-1</sup>, GA 0.5 mgL<sup>-1</sup>와 sucrose 30 gL<sup>-1</sup>가 첨가된 MS 액체 배지에서 50 rpm으로 2주간 진탕배양한 후, 한천 8 gL<sup>-1</sup>가 첨가된 동일조성의 MS 배지에서 배양하는 것이 싹형성에 가장 좋았다. 발근은 증식된 싹을 1주일간 Hormex 1,000배액이 첨가된 1/2 MS 기본배지에 IBA 0.5 mgL<sup>-1</sup>, sucrose 30 gL<sup>-1</sup> 등이 함유된 배지에서 50 rpm으로 진탕배양한 다음 Hormex를 제외한 동일 조성의 한천배지에 옮겨 배양하였을 때 배양된 모든 유묘로부터 정상적인 발근을 유도할 수 있었다.

사사 - This research was financially supported by the Young-Ju City Agriculture Technology & Extension Center, Young-Ju, Kyungbuk, Korea.

## 인용문헌

Cho JT (1977) Effect of several treatments to promote rooting from

interstocks grafted with Fuji apple scion and dwarf interstocks. These collections, graduated school, Chungbuk Nat'l Univ Sci 4:48-63

Cho MD, Kim KY, Kim JK, Kim JH, Kim MS, Kim YJ (1983) Effect of M.7, M.26, M.106, and 'Malus prunifolia B.' seeding root stocks on the yield of nine apple cultivars. Res Rept RDA (Hort). 25:96-107

Harbage JF, Stimart DP (1996) Effect of pH and indole-3-butyric acid(IBA) on rooting of apple microcuttings. J Amer Soc Hort Sci 121(6):1049-1053

Harbage JF, Stimart DP, Auer C (1998) pH affects 1H-indole-3-butyric acid uptake but not metabolism during the initiation phase of adventitious root induction in apple microcuttings. J Amer Soc Hort Sci 123(1):6-10

Hildebrant V, Harney PM (1988) Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of *Pelargonium × hortorum*, Bailey 'Sprinter Scarlet'. J Hort Sci 63:651-657

James DJ, Thurbon IJ (1979) Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M.9. J Hort Sci 54(4):309-311

James FH, Dennis PS, Ray FE (1993) Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh. 'Gala' J Hort Sci 118(5):680-688

Jones OP, Hatfield SGS (1976) Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. Hort J Sci 51:495-499

Jun JH, Yae BW, Yang MH, Hwang JH, Park JB (1997) Influence of growth regulators on adventitious shoot regeneration from tissues of *Malus domestica* cv. 'Gala' *in vitro*. Kor J Plant Tiss Cult 24(3):125-128

Noiton D, Vine JH, Mullins MG (1992) Endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in apple microcuttings in relation to adventitious root formation. Plant Growth Regul 11:63-67

Preil WE, Engelhardt M (1977) Meristem culture of azaleas (*Rhododendron simsii*). Acta Hort 78:203-207

Puente J, Marin JA (1997) *In vitro* root ability of clonal apple microcuttings, derived from rooted and unrooted shoots. Scientia Horticult 68:227-230

Shim KK, Yim YJ (1977) Effect of planting methods on the early growth of soft wood grafted dwarf apple trees. J Kor Soc Hort Sci 18:117-124

Wang Q, Tang H, Quan Y, Zhou G (1994) Phenol induced browning and establishment of shoot-tip explants of 'Fuji' apple and 'Jinhua' pear cultured *in vitro*. J Hort Sci 69(5):833-839

Webster CA, Jones OP (1989) Micropropagation of the apple rootstock M.9: Effect of sustained subculture on apparent rejuvenation *in vitro*. J Hort Sci 64(4):421-428

Yun CT (1998) The present situation of research for densing cultivation as apple rootstocks in Kor Hort Sci Tech 16:261-264