

참다래 × 다래 교잡종의 액아배양 및 캘러스 배양에 의한 기내번식

문흥규* · 권영진 · 이병실¹

임업연구원 생물공학과, 특용수과¹

Micropropagation of the hybrids of *Actinidia deliciosa* × *A. arguta* by tissue culture

MOON, Heung Kyu · KWON, Young Jin · LEE, Byung Sil¹

Division of Biotechnology, Forestry Research Institute (KFRI), Suwon, Omokdong 44-3, Kyonggido, 441-350, Korea

¹Division of Special Tree Breeding, Forestry Research Institute (KFRI), Suwon, Omokdong 44-3, Kyonggido, 441-350, Korea

ABSTRACT Kiwi (*Actinidia deliciosa*) is exotic plant and thus susceptible to cold climate in the middle part of Korean peninsular. Several hybrids have recently been developed to enhance cold tolerance by crossing them with domestic species (*A. arguta*). We have developed an efficient micropropagation technique for the hybrids using both axillary bud and callus culture systems. Shoot proliferation from axillary buds was possible on St medium supplemented with 0.2 mg/L BA and 3.0 mg/L GAs. *In vivo* cuttings of the proliferated shoots were more effective for root induction and subsequent survival than *in vitro* rooting. More than 95% of the plantlets were successfully transferred to field. Effective callus induction was achieved on MS or B₅ medium with 2,4-D or NAA. Although callus induction could be made from any combinations of media and auxins, shoot regeneration was observed only from the callus induced on medium containing NAA.

Key words: Cold-tolerant cultivar, effective micropropagation, new hybrid kiwi

서 론

참다래는 덩굴성 낙엽과수로서 온대에서 아열대지역에 걸쳐 자생하며 세계적으로 50종 이상이 분포되어 있고 주로 중국에 많다. 우리나라에는 다래, 섬다래, 쥐다래 및 개다래 등이 분포되어 있다 (Cho et al. 1995). 참다래는 *A. chinensis*의 재배종을 육성 개량한 것인데 이것의 원산지는 중국 화남지방을 중심으로 장강 이남지역에서 대만에 이르기까지 해발 200~2,300 m까지의 산림지대에서 자생하고 있다 (Kim and Kim 1986). 우리나라에는 1977년경에 뉴질랜드로부터 묘목이 도입되었으나 내한성의 문제로 제주도와 전라남도 및 경상남도의 남해안 일대에 주로 재배되고 있고, 최근에는 충남, 경기 서해안의 극히 일부지역에서도 소규모로 재배하고 있는 실정이다 (Cho et al. 1995).

임업연구원에서는 내한성을 지닌 참다래를 육성하기 위하여 1987년부터 참다래 (Hayward)를 교배모수로 하고 국내 선발 우량다래를 화분수로 인공교잡을 실시하여 교잡종 종자를 얻었으며, 1990년 식재 이후 1994년까지 포지시험을 통해 수원지역에서 전혀 동해를 받지 않는 새로운 교잡종을 육성한 바 있다 (Cho et al. 1995). 이러한 교잡종 참다래의 과실은 참다래보다 다소 작으나 재배종 다래보다는 월등히 크며 (Figure 1A), 맛에 있어서는 참다래보다 당도가 높고 과육의 피에 털이 적은 특징을 지녔다. 이러한 교잡종의 특성을 유지하기 위해서는 접목이나 삽목 등의 무성번식 방법이 요구되나 키위는 생장 특성상 절간길이가 길게 성장하여 접삽목을 위한 대량의 접삽수를 확보하기가 어렵다. 더욱이 접삽목의 시기가 봄철에만 국한되고 작업실행을 위한 재료의 저장 및 상(床)의 준비에 소요경비가 많아 대량양묘의 제한점이 되고 있다. 한편 조직배양을 통한 키위의 번식은 품종의 보존과 실용화의 의미에서 효율적인 방법으로 시사되고 있으며, 아배양, 캘러스 배양, 원형질체 배양 등 다수의 연구가 발표된 바

*Corresponding author. Tel 031-290-1199
E-mail: jesusmhk@hanmail.net

있다 (Barbieri and Morini 1987; Huang and Tan 1988; Kovac 1993; Monette 1986; Oliveira and Pais 1991). 본 연구는 수원지역에서도 재배가 가능한 새로운 교잡종 키위의 조직배양 번식 기술개발에 그 목적이 있다.

재료 및 방법

액아배양

1998년 2월 초순 교잡종 3개체 (수원-1, 수원-2 및 수원-4)의 줄기를 약 50 cm 길이로 절단하여 온실에서 수경삼목하여 새로운 줄기를 유도하였다. 줄기가 5~10cm로 자랐을 때 액아가 하나씩 볼도록 마디절편으로 조제한 다음, 70% 에탄올에 2분, 2% 차아염소산나트륨 (NaClO)에 10분간 각각 표면 살균하고 멸균수로 5회 이상 씻어 낸 다음 준비된 배지에 치상하였다. 배지는 St 배지 (Standardi 1983)에 BA 0.2 mg/L, 지베렐릭산 (GA₃) 3.0 mg/L를 처리하고 sucrose 2%, 0.3% gelrite로 250 ml flask에 100 ml씩 주입하여 고압멸균 후 사용하였다. 절편은 개체목별로 구분하여 flask당 4개씩 15반복 치상하였다. 배양은 25±2°C로 1일 16시간 조명 (약 3,000 lux)되는 배양실에서 수행하였다. 계대배양은 4주마다 실시하였다.

발근유도 및 포트묘 육성

기내증식되어 약 3 cm 정도로 자란 줄기를 재료로 기내 및 기외발근을 실시하였다. 기내발근은 배지의 염류농도를 1/2로 감량한 1/2 St 배지에 1.0 mg/L IBA, 2% sucrose 로 처리하고 0.3% gelrite로 경화하여 사용하였다. 기외발근은 40×70×20 cm 플라스틱 상자에 perlite, vermiculrite, peatmoss를 등량 용적비 (1:1:1, v/v/v)로 섞어서 상자의 1/3 높이까지 채운 다음 줄기 기부를 1% IBA 수용액에 순간침지 한 다음 삼목하였다. 상자당 70개씩 삼목하여 2반복을 두었다. 삼목 후 충분히 관수하고 상자를 비닐 및 투명 아크릴판으로 덮고 1일 2회씩 spray 관수하며 배양실에서 2주간, 온실에서 2주간 각각 환경순화하였다.

캘러스 배양

액아배양으로 유도된 수원-1개체의 기내줄기의 엽육을 절편으로 엽맥 중심을 따라 약 3~5 mm²의 크기로 절편을 만들어 캘러스를 유도하였다. 배지는 MS 및 B₅ 배지에 NAA 및 2,4-D를 0.2, 0.5 및 1.0 mg/L 처리하고, sucrose 3%, 0.3%의 gelrite로 경화하였다. 배지는 1회용 샤프레 (녹십자주, 11×1 cm)에 25 ml씩 분주하여 사용하였다. 절편은 샤프레당 5개씩 치상하여 3반복 이상을 두었다. 배양은 액아배양과 동일하게

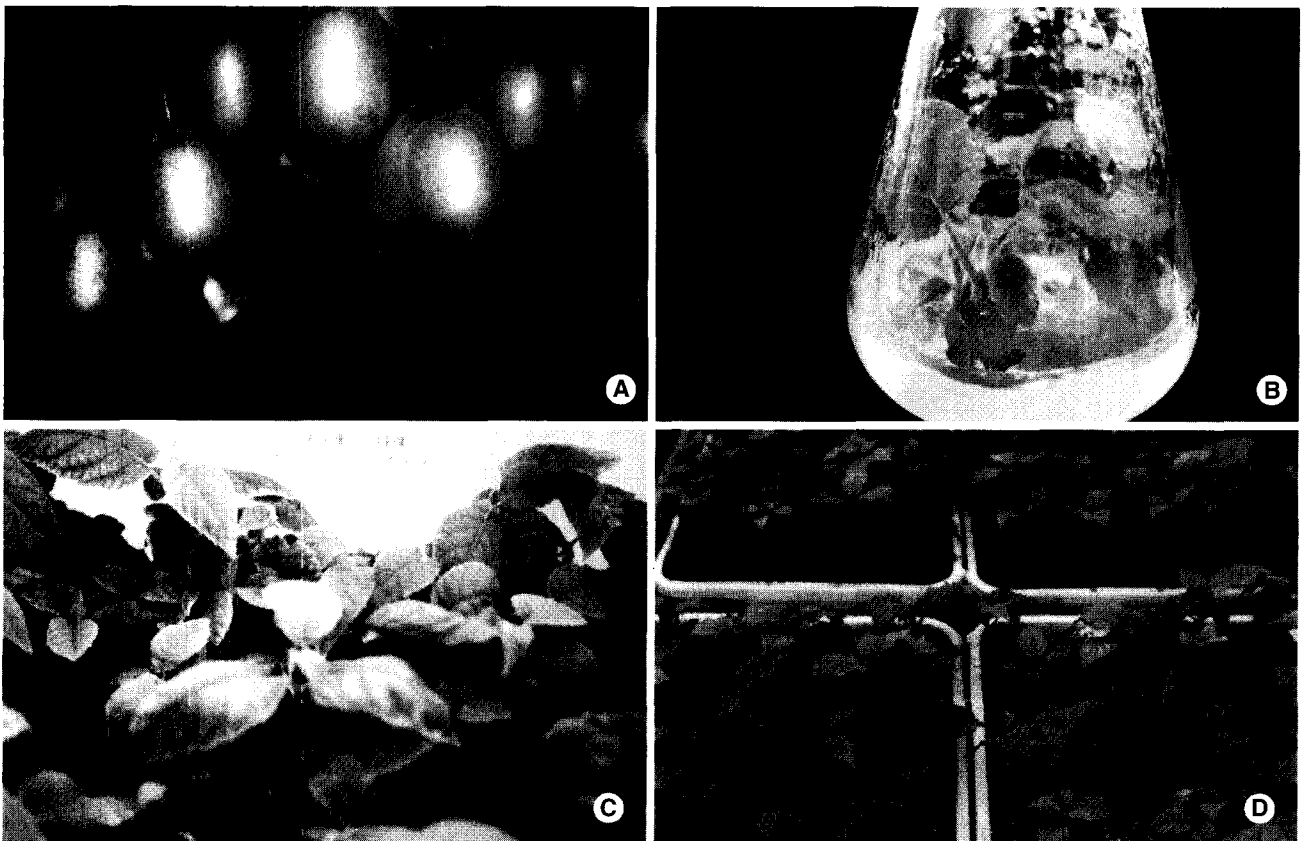


Figure 1. Micropropagation of the new hybrid kiwi, *Actinidia deliciosa* x *A. arguta*. A, Fruits of the hybrid kiwi, 'Suwon-1'; B, Multiple shoot on St medium containing 0.2 mg/L BA and 3.0 mg/L GA₃; C, *In vivo* cutting plantlets in the artificial soil mixture; D, 2-month-old acclimatized plants outside.

실시하였으며, 배양 4주 후 MS+zeatin 3.0 mg/L, sucrose 3%, gelrite 0.3%의 시험관 (2.5×15 cm)로 옮겨 기관유도를 시험하였다.

결과 및 고찰

줄기증식 및 발근

초대배양 후 줄기분화율은 약 30%로 나타났다. 줄기분화가 안 된 것은 오염으로 고사되거나 표면살균시 약해로 고사되었기 때문으로 추정되었다. 배양 2주 후에는 절편에 따라 0.5~1.5 cm까지 줄기가 성장하였다. 증식률은 개체목 간에 다소 차이가 있었으며 배양 4주 후 수원-1, 수원-4 개체가 절편당 3개, 수원-2개체는 절편당 2개의 줄기발생을 보였다 (Table 1). 이러한 증식률로 볼 때 절편 30개로 연간 10만 개 이상의 줄기 증식이 가능할 것으로 추정되었다. 줄기는 대개 하나의 우세줄기로 자랐고 (Figure 1B) 나머지 줄기는 절편의 하부에서 다경의 형태로 형성되었다. 절편의 기부에서는 예외 없이 부풀어오르는 형태의 캘러스가 형성되었다.

키위에 대한 기내배양 연구는 Revilia 등 (1992)의 총설에 의해 종합적으로 정리된 바 있고 Standardi (1983)는 키위의 절단 분열조직을 이용한 기관분화, 줄기의 증식, 발근유도 및 식물체 환경순화의 체계를 수립하였다. 그는 키위의 기내증식에서 성장조절제로 BAP 및 GA를 각각 1.0 mg/L 처리하여 줄기증식의 적정화를 가져왔다고 하였으나 본 실험의 예비 실험결과 교잡종 키위의 줄기 증식은 0.2 mg/L BA 및 1.0 mg/L GA₃ 처리가 더 효과적인 것으로 나타났다 (데이터 미제시). 따라서 본 실험에서는 이 농도 조건에서 실험을 수행하였다. 더욱이 Standardi (1983)의 결과와 같이 1.0 mg/L의 BA 및 GA 처리는 절편기부에 캘러스가 과다하게 형성되어 오히려 줄기의 생장이 억제되는 것으로 나타났다.

증식된 줄기의 발근은 기외발근이 양호하였다 (Figure 2, Figure 1C). 기내발근시 절편기부가 캘러스가 형성되며 발근이 시작되었는데 개체에 따라 다소 차이를 보였으나 평균 65%의 발근력을 나타냈다. 한편 기외발근시에는 100% 발근되어 기내발근보다 월등히 양호하였고, 더욱이 발근과 더불어 환경순화를 가져올 수 있어 기내발근보다 장점이 많은 것으로 나타났다 (Figure 1D). 순화묘는 포지로 이식하여 95% 이상 활착이 가능했다.

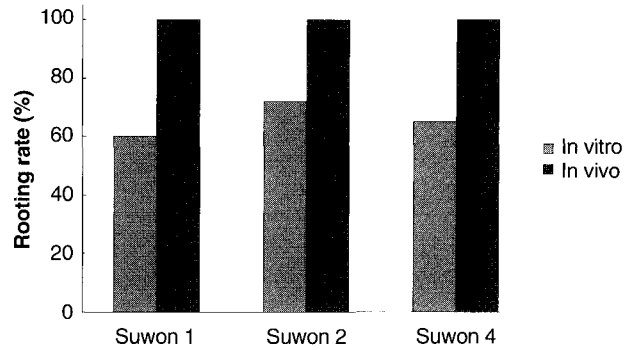


Figure 2. Rooting rate of the hybrid kiwi individuals by *in vitro* or *in vivo* cutting system. *In vitro* rooting was conducted on 1/2 MS medium supplemented with 1.0 mg/L IBA. *In vivo* cuttings were conducted on artificial soil mixture. The soil mixture was composed of perlite, vermiculrite and peatmoss (1:1:1 v/v/v).

키위의 기내증식에 있어 적정배지와 성장조절물질의 종류 및 농도는 품종에 따라 다르게 보고되고 있다. Kovac (1993)는 *A. kolomikta*의 응화지 마디절편의 증식시험에서 MS 배지에 10 μM BA와 0.1 μM IBA의 처리로 절편당 9.5개의 줄기증식을 가져왔으며, 발근유도는 절편 기부에 IBA를 순간침지 기외 삽목법으로 90% 이상 발근이 가능하다고 하였다. Monette (1986)는 *A. chinensis*의 정아배양에서 MS 배지에 2.0 mg/L BAP 처리로 증식이 가능하였고, 고체배지보다 액체배지가 증식에 더 효과적이라 하였다. 더욱이 서로 다른 크기의 flask를 사용한 결과 125 ml이 50, 150 및 500 ml보다 증식이 잘되는 것으로 보고하였다. 이러한 결과는 키위의 기내번식 적정화에 있어 배지나 성장조절제의 처리는 물론 배양용기의 선택도 중요함을 시사하는 것이다. 그는 발근을 위해 줄기의 기부를 0.05% IBA 수용액에 침지하는 기외삽목의 방법으로 93% 이상 발근 및 활착이 가능하다고 하였는데 이것은 본 실험결과와도 유사한 내용이다. 이밖의 몇몇 결과에서도 시사된 바 있지만 기내증식된 키위의 발근은 기외삽목법이 더욱 효과적인 것으로 나타나 앞으로 교잡종 키위의 기내번식은 증식된 줄기의 기외삽목법으로 대량번식이 가능할 것으로 생각된다.

한편 대부분 키위의 기내번식은 MS 배지를 주로 사용하였는데 (Huang and Tan, 1988), 교잡종 키위에 대한 증식은 St 배지나 MS 배지 간에 뚜렷한 차이를 나타내지 않아 (데이터 미제시) 두 가지의 배지에 BA와 zeatin의 처리로 줄기 증식에 크게 어려움이 없을 것으로 생각된다.

Table 1. Shoot induction and multiplication of the hybrid kiwi cultured on St medium supplemented with 0.2 mg/L BA and 3.0 mg/L GA₃.

Tree No.	No. of explants cultured	No. of explants forming shoots (%)	No. of shoots/explant after 4 wks in culture*
Suwon-1	60	38 (63.3)	3.2±0.3
Suwon-2	60	42 (70.0)	2.0±0.2
Suwon-4	60	40 (66.7)	3.2±0.3

* Mean ± standard deviation

캘러스 배양

캘러스는 배지 및 오옥신의 처리에 관계없이 모든 절편의 절단면에서 형성되기 시작하여 점차 조직 전체가 캘러스화되었다. 캘러스는 모든 처리구에서 형성되었으며, 2,4-D 처리시는 백색 계통으로, NAA 처리시는 연녹색과 백색이 섞인 상태로 오옥신에 따른 차이를 보였다. 캘러스의 생장은 대체로 2,4-D 처리시 양호하였다. 처리별로 얻어진 캘러스를 MS 배지에 3.0 mg/L zeatin 처리하여 줄기 재분화를 도모한 결과 배양 3주 후부터 기관분화가 가능했으며, 배양 4주 후 평균 64% 줄기가 재분화되었다. 캘러스로부터 줄기의 발생은 NAA 처리로 유도된 캘러스에서만 가능한 반면 2,4-D 처리로 유도된 캘러스에서는 일부 뿌리만 유도되었을 뿐 줄기는 유도되지 않았다. 이같은 결과는 캘러스 유도시에 처리된 오옥신의 종류가 차후 줄기의 분화에 크게 영향한다는 사실을 나타내는 것으로 Huang과 Tan (1988)의 결과에서도 관찰된 바 있다. 따라서 교잡종 키위의 캘러스 배양을 통한 줄기의 재분화를 위해서는 NAA 처리로 캘러스를 유도할 필요가 있다.

캘러스에서 재분화된 작은 줄기는 St 배지에 0.2 mg/L BA, 3.0 mg/L GA₃ 처리 혹은 MS 배지에 1.0~3.0 mg/L의 zeatin 처리하여 정상적인 줄기로 생장이 가능했다. 한편 캘러스에서 재분화되는 줄기는 과수화 (hyperhydration) 현상이 흔히 관찰되어 시험관보다는 보다 큰 배양병이나 플라스틱 용기로 계대배양시킬 필요가 있었다. 과수화된 줄기는 큰 배양용기로 계대배양 후에 정상줄기로 생장이 가능했다.

캘러스에서 재분화 조건의 확립은 차후 형질전환을 통한 새로운 품종의 육성에 있어 중요한 내용이 된다. 키위는 비교적 재분화 능력이 뛰어나 캘러스나 원형질체 배양으로 식물체의 재분화가 가능한 것으로 보고된다 (Barbieri and Morini 1987; Oliverira and Pais 1991). Huang과 Tan (1988)은 키위의 캘러스 배양에서 여러 성장조절제의 처리에 따라 20-80%의 캘러스 유도가 가능하다고 하였으며, zeatin의 단독 처리보다는 zeatin에 NAA나 2,4-D의 공조 처리로 캘러스 유도 빈도가 높아짐을 관찰했다. 그들은 줄기의 재분화에 있어 zeatin 1.0 mg/L 수준에서 적정농도가 될 것으로 시사하였다. 본 실험에서 MS 배지에 zeatin 3.0 mg/L 처리로 평균 64%의 재분화 빈도를 보인 것은 좀더 성장조절제 처리를 개선하면 재분화 빈도가 높일 수 있음을 나타내 준다.

적 요

내한성이 강하여 수원지역에서 재배가 가능한 참다래×다래 교잡종의 기내번식은 액아배양과 캘러스 배양으로 증식이

가능한 것으로 나타났다. 액아에서 줄기유도는 St 배지에 0.2 mg/L BA, 3.0 mg/L GA₃ 처리로 4주마다 약 3배의 증식이 가능했다. 줄기의 발근은 기내발근보다 기외삽목이 매우 효과적이며 환경순화 후 포지에서 95% 이상 활착되었다. 한편 캘러스 유도는 엽육을 절편으로 MS 및 B₅ 배지에 2,4-D 및 NAA 처리로 100% 가능하였으며 처리 농도에 따른 차이는 없었다. 캘러스에서 줄기의 재분화는 NAA 처리로 유도된 캘러스에서만 가능하였다. 줄기의 재분화는 MS 배지에 3.0 mg/L zeatin 처리로 평균 64% 가능했으며 정상적인 생장이 가능했다. 이상의 결과로 볼 때 새로운 키위 교잡종은 기내배양으로 대량번식이 가능할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Barbieri C, Morini S (1987) Plant regeneration from *Actinidia* callus cultures. *J Horticult Sci* 62(1):107-109
- Cho JK, Lee BS, Hong SH, Hur SD, Noh EW (1995) Characteristics of the hybrids *Actinidia deliciosa* × *A. arguta*. *Forest Genetics Research Institute Research Note No. 51*, pp 8
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158
- Huang ZG, Tan CY (1988) Chinese gooseberry, kiwifruit (*Actinidia* spp.). In: Bajaj YPS (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol 6. Crop II. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 166-180
- Kim HY, Kim KK (1986) Studies on freezing tolerance in kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planch). *Res Rep RDA (Hort)* 28:82-94
- Kovac J (1993) Micropropagation of *Actinidia kolomikta*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 35:301-303
- Monette, PL (1986) Micropropagation of kiwifruit using non-axenic shoot tips. *Plant Cell Tiss Org Cult* 6:73-82
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Oliveira MM, Pais MS (1991) Plant regeneration from protoplast of long-term callus cultures of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayword (kiwifruit). *Plant Cell Rep* 9:643-646
- Revilla MA, Rey MA, Gonzalez-Rio F, Gonzalez MV, Dizz-Sala C (1992) Micropropagation of kiwi (*Actinidia* spp.). In: Bajaj YPS (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 18. Springer-Verlag Press, pp 399-423
- Standardi A (1983) La micropropagazione nella moltiplicazione dell'*actinidia*. *Frutticoltura* 45(2):17-22