

## 기내배양 사과 대목의 기외 삽목 시 발근과 순화에 미치는 배양조건 및 생장조절물질의 효과

권순일<sup>1\*</sup>, 김정희<sup>2</sup>, 강인규<sup>3</sup>, 김목종<sup>1</sup>

<sup>1</sup>원예연구소 사과시험장, <sup>2</sup>원예연구소 원예생명공학과, <sup>3</sup>상주대학교 원예학과

### Effects of Growth Regulators and Culture Environment on *ex vitro* Rooting and Acclimatization of Apple Rootstock *in vitro* Propagated

Soon-Il Kwon<sup>1\*</sup>, Jeong-Hee Kim<sup>2</sup>, In-Kyu Kang<sup>3</sup>, Mok-Jong Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Apple Experiment Station, NHRI, RDA, Kunwi 716-810, Korea

<sup>2</sup>Horticultural Biotechnology Division, NHRI, RDA, Suwon 440-310, Korea

<sup>3</sup>Department of Horticulture, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

**ABSTRACT** Growth of M.9 (*Malus domestica* Bork. cv) and M.26 (*Malus domestica* Bork. cv) of dwarf apple rootstock, cultured on MS agar medium in a vessel with ventilating stopper (VS) and then *in vivo* rooting and acclimatization under combined-treatment by some materials with IBA, were investigated. Concentration of CO<sub>2</sub> and ethylene in the vessel with VS was lower than in the vessel with non-VS. Change of temperature and humidity in the vessel with VS was repeated by light condition. Stomatal pores of tissue in the vessel with VS were immediately closed after plantlets were exposed to room humidity but those in the vessel with non-VS were opened after 20 minutes exposure to room humidity. Leaf area and chloroplast index of tissue in the vessel with VS was higher than in the vessel with non-VS. *In vivo* rooting ratio and acclimatization ratio of M.9 and M.26 was highest in 300 mg/L IBA+3% sucrose dip-treatment among other combined-treatments.

**Key words:** Adventitious root, micropropagation

#### 서 론

사과는 저수고밀식재배체계가 도입되면서 왜성 자근대목의 수요가 급증하고 있다. 사과 왜성 자근대목은 주로 물어떼기에 의해 생산되고 있으나 硬枝挿木 (Seo 1983; Kwon et al. 1999)과 조직배양에 의한 방법 (Yae et al. 1986)도 시도되고 있다. 특히 무병주 생산을 위해서 기내 배양기술이 이용되고 있으며 증식효율과 발근율을 높이기 위한 연구가 다수 수행되어 왔으나 순화율이 낮은 문제가 있다 (Yae et al. 1986; Alvarez et al. 1989; Lee et al.

1990).

배지의 건조나 오염을 방지하기 위해 배양병의 마개를 밀폐시킬 경우 배양병내의 상대습도는 100%로 유지되고 엽록소가 형성된 식물체는 명배양 동안 CO<sub>2</sub> 농도가 보상점 이하로 감소한다 (Desjardins et al. 1988; Alvarez et al. 1989; Infante et al. 1989). Kozai (1991)는 기내배양묘를 순화시킬 때 식물체 기공 형성, 표피의 왁스 형성과 같은 생리적 특성과 잎의 수와 크기 같은 형태적 특성도 생존율이나 생장 정도에 큰 차이를 나타낸다고 하였다. 배양병내의 CO<sub>2</sub> 농도를 증가시키고 광도를 높여 식물이 광합성을 충분히 할 수 있도록 유도하는 자가영양 (autotrophic) 배양법 (Jeong et al. 1996)이 보고되었으며, 배양환경을 조절하여 기내 발근단계를 생략하고 지상부와 지하부의

\*Corresponding author Tel 054-380-3135 Fax 054-380-3125  
E-mail apple-k@rda.go.kr

발달을 동시에 촉진시키는 방법 (Kozai et al. 1987) 등이 시도되고 있다.

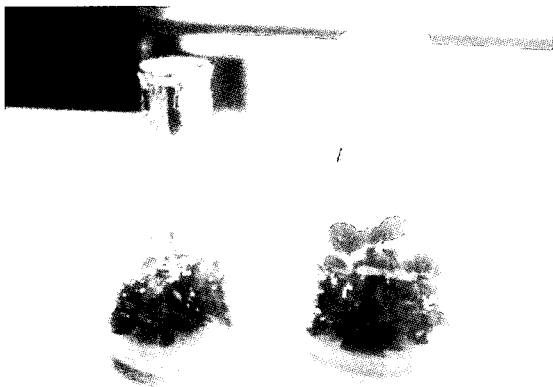
사과 조직배양묘의 기내 발근시 발근 촉진 호르몬으로는 indolebutyric acid (IBA)를 많이 사용 (Yae et al. 1986)하고 있다. Kwon 등 (1999)이 수행한 사과 왜성대목 M.26의 경지삽목시 IBA와 혼용처리된 triazole계 물질 중 uniconazole이 발근 효과가 가장 좋았으며 당류는 sucrose가 가장 우수하였다. Carmen 등 (1991)은 Olive 나무의 삽목에서 삽수 기부의 탄수화물 축적이 발근에 필수적이라 하였으며 Hartmann 등 (1990)은 오옥신의 작용에는 영양원으로 당류를 필요로 하며 chlorogenic acid는 발근 기작에 필요한 보조인자라고 하였다.

본 시험은 사과 왜성대목 M.9와 M.26의 기내배양시 마개의 통기성 유무에 따른 조직배양묘의 생리적 변화와 이 조직배양묘의 기외 삽목시 발근과 순화에 미치는 몇 가지 성장조절제의 효과를 보고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 시험재료

1.0 mg/L BA, 0.3 mg/L IBA, 0.5 mg/L GA<sub>3</sub>를 첨가한 MS배지에서 계대배양을 통해서 유지, 증식된 사과 왜성대목 M.9와 M.26을 재료로 사용하였다. 치상은 시료 정단에서 약 1 cm 길이로 채취하여 5개씩 하였으며 비통기성 마개로 가정용 쿠키용 foil을, 통기성 마개로 실험용 tissue (kimwipe's s-150)를 멸균하여 사용하였다. 비통기성마개는 두겹으로 배양병의 입구를 봉하였으며, 통기성마개는 4겹이 되도록 두 번을 접어서 배양병의 입구를 막은 후 고무밴드를 감아 고정시켰다 (Figure 1). 배양실 내 온도 및 광조건은 25°C, 3,000 lux 정도로 1일 16시간을 조명하였다.



**Figure 1.** Growth comparison of the rootstocks cultured in a vessel either non-ventilating stopper (left) or ventilating stopper (right).

### 배양병 내 에틸렌, CO<sub>2</sub> 온도 및 습도 변화

에틸렌 및 CO<sub>2</sub> 농도는 배양묘 치상 1일, 14일, 28일 후마다 같은 배양병 (300 mL 삼각flask)을 조사 전 8시간 이상 명배양 및 암배양을 시킨 후 각각 밀봉하여 1 mL gas를 채취하여 TCD와 FID를 장착한 GC (HP6990)을 이용하여 분석하였다. 온도와 습도는 치상 3주 후 온·습도기록계 (TR-2)를 이용하여 배양묘 주위의 높이에서 12일간 측정하였다.

### 엽록체농도, 엽면적 및 기공 개폐

엽록체 및 엽면적은 각각 SPAD-502 (Minolta)와 AM-100 (ADC Bioscientific)으로 측정하였다. 기공의 관찰은 배양묘 치상 28일 후 배양병의 마개를 제거한 후 완전히 전개된 배양묘 잎의 뒷면을 셀로판 테이프에 붙여 가볍게 진압한 후 표피를 분리시켜 AgNO<sub>3</sub> 1% 용액으로 염색한 후 광학현미경 (×20배)으로 관찰하였다.

### 기외 삽목

마개 종류별로 4주간 배양된 조직배양묘를 선단에서부터 2 cm 내외의 길이로 절단하여 각 처리구당 30개씩 완전임의배치하여 처리 농도 (Table 3) 별 발근 촉진제에 30초 정도 기부를 침지 시킨 후 1/2 정도로 삽목하였다. 삽목상토는 질석을 사용하였으며 삽목상의 온도 및 광조건은 각각 23°C 및 3,000 lux로 16시간, 암조건 8시간으로 교호로 작동되도록 하였다. 습도는 삽목 직후부터 1주일간은 90~95%, 그 이후는 80%로 유지하였다. 삽목 5주 후에 각 생존 개체의 근수와 근장, 발근율을 조사하고 원예용 상토(부농)를 채운 포트에 이식시킨 후 그늘진 곳에서 5주 더 성장을 시킨 뒤 순화율을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 배양병내의 가스 및 온·습도 변화

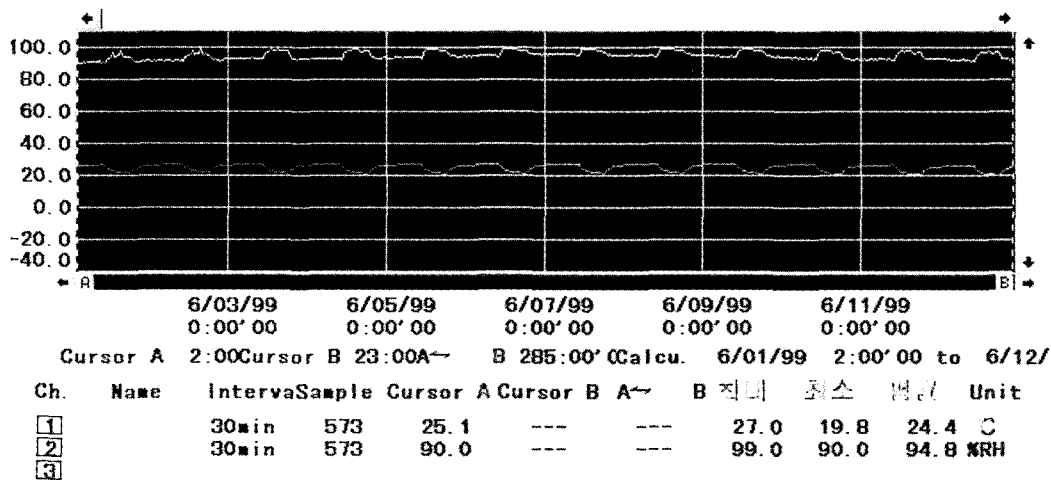
배양병내의 CO<sub>2</sub>와 에틸렌의 농도 변화는 명배양 및 암배양의 치상 1일, 28일 후 모두 통기성 마개 배양병내의 농도가 비통기성마개 배양병내의 농도 보다 월등히 낮았다 (Table 1). 통기성 마개 배양병내의 CO<sub>2</sub>농도는 치상일수간 그리고 명배양과 암배양 사이에 농도변화가 크지 않은 반면 비통기성 마개 배양병내의 농도는 치상일수가 경과될수록 그리고 명배양 보다는 암배양에서 높아지는 경향이 있었다. 이는 암조건하에서 배양묘의 호흡이 진행되기 때문이며 치상일수가 경과 할수록 비통기성 마개 배양병내에 집적된 것으로 추정된다. 통기성 마개 배양병내의 에틸렌의 농도는

**Table 1.** Changes of CO<sub>2</sub> and ethylene concentration in vessel with ventilating and non-ventilating stopper by the different light treatments.

Treatment		CO <sub>2</sub> (mL · kg <sup>-1</sup> )		Ethylene (μL · kg <sup>-1</sup> )	
		after 1 days	after 28 days	after 1 days	after 28 days
ventilating stopper	light	639.4 c <sup>z</sup>	697.1 c	0.006 b	N D <sup>y</sup> b
	dark	620.3 c	929.1 c	0.018 b	N D b
non-ventilating stopper	light	5217.6 b	10626.6 b	0.998 a	0.257 a
	dark	11229.8 a	27265.7 a	0.730 a	0.359 a

<sup>z</sup> Duncan's multiple range test (P≤0.05).

<sup>y</sup> N D : Non-detect



**Figure 2.** Changes of Temperature and humidity in a vessel with ventilating stopper.

치상일수간 그리고 명배양과 암배양 사이에 농도변화가 거의 없는 반면 비통기성 마개 배양병내의 농도는 치상일수가 경과될수록 낮아지는 경향이였다. 통기성마개로 막은 배양병은 외기와 확산에 의한 농도 변화가 가능한 반면 비통기성마개로 막은 배양병은 외기와 차단되므로써 배양기 내부 배양묘의 호흡과 광합성에 따라 각각 농도가 변화된 것으로 추정된다. 또한, 배양기간이 경과함에 따라 배양병 내에 에틸렌이 축적된다 (Kozai and Kitaya 1993)는 보고와는 다르게 나타났다. 습도는 명배양 동안 94.8%정도로 유지되다가 암배양 시에는 99.0%까지 상승하였고 명배양시 다시 하락하여 일정하게 유지되었다 (Figure 2). 그러나 온도는 습도와 반대로 명배양시에 일정하게 24.4°C로 유지되

다가 암배양시에 하락하여 최저 19.8°C까지 하락하였으나 명배양시 다시 상승하여 일정하게 유지되었다. 배양병 마개가 배양중인 식물체의 성장과 배양용기내 가스 조성에 영향을 미치며 배양병내의 습도가 낮아지고 동화효율을 증가시킨다 (Kozai 1991)는 보고와 일치하였다.

**배양묘 잎의 특성**

치상 4주후 배양묘의 엽록체 지수와 엽면적은 M.9와 M.26 모두 통기성마개 배양병에서 유의하게 높았다 (Table 2). 이는 통기성 마개 배양병은 외기와 가스교환이 이루어져서 배양병 내의 습도 변화에 따른 기공 개폐 능력이 있었

**Table 2.** Growth of M.9 and M.26 plantlets in vessel with and without ventilating stopper after 4 weeks of culture.

Treatment		chloroplast index (unit)	leaf area (cm <sup>2</sup> )	leaf width (cm)	leaf length (cm)
M.9	ventilating stopper	40.69 a <sup>z</sup>	1.013 a	1.148 a	1.530 a
	non-ventilating stopper	28.47 b	0.214 c	0.383 b	0.691 a
M.26	ventilating stopper	36.11 a	0.557 b	0.720 b	1.071 a
	non-ventilating stopper	28.70 b	0.223 c	0.461 b	0.706 a

<sup>z</sup> Duncan's multiple range test (P≤0.05).

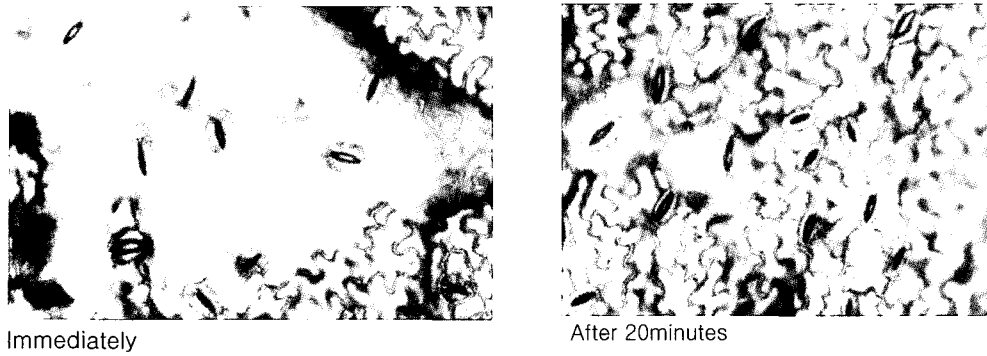


Figure 3. Change of stomatal opening in the air of cultivated tissue for 4 weeks in a vessel with ventilating stopper.

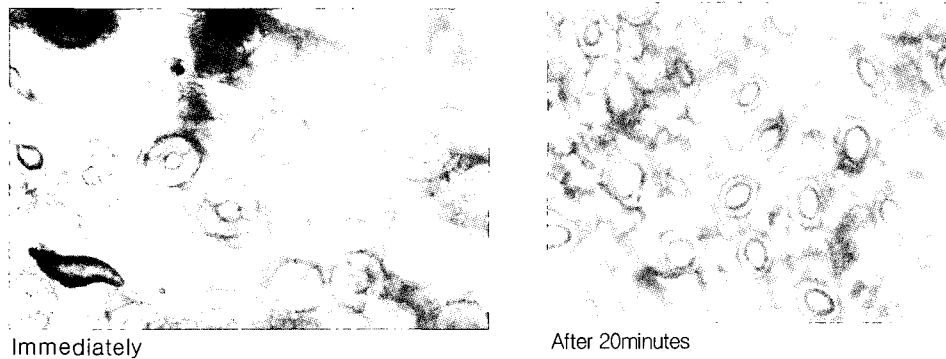


Figure 4. Change of stomatal opening in the air of cultivated tissue 4 weeks in a vessel with non-ventilating stopper.

기 때문에 생각된다. 스타티스 (*Limonium* spp. cv. Misty Blue)의 배양기내에 CO<sub>2</sub>를 공급해준 경우 엽면적이 작아졌다 (Lee 1998)는 보고와 차이가 있었다. 이 배양묘 기공의 실내 습도에서 변화를 보면 통기성 마개 배양묘의 기공을 관찰하였을 때 기공이 닫혀있었으며, 실내 습도하에서 20분 방치 후 제작한 표본을 관찰 시에도 같은 결과였다 (Figure 3). 즉시 제작된 표본의 관찰시에도 기공이 닫힌 이유는 기공을 관찰을 위한 잎을 채취하여 신속히 표본을 만들었으나 그 시간이 십여 초가 되어 그 사이 기공이 닫힌 것으로 추정되며 낮은 습도하에서 기공이 신속히 반응한다고 추정되었다. 그러나 비통기성마개에서 배양된 배양묘의 기공을 즉시 관찰시 기공이 열려 있었으며 실내습도에서 20분 방치 후 제작한 표본을 관찰 시에도 같은 결과였다 (Figure 4). 이는 배양병내의 포화습도에서 성장한 배양묘는 기공이 개폐 기능을 못하고 항상 열려 있다는 것으로 추정할 수 있으며, 이는 배양병 내의 높은 습도와 낮은 광도에서 자란 식물체는 기공이 제 구실을 못한다 (Kozai and Kitaya 1993)는 보고와 일치하였다.

기의 삼목 시 발근 및 순화

M.9 배양묘의 발근율은 300 mg/L IBA+3% sucrose 처리구에서 통기성 및 비통기성 마개 배양병 모두 80% 이상의

높은 발근율 나타내어 발근촉진 효과가 가장 우수하였다 (Table 3). 300 mg/L IBA 단독처리구는 통기성마개 배양묘가 58.3% 발근되었으나, 그 외의 처리들은 발근 촉진 효과가 비슷하거나 낮았다. 무처리구는 전혀 발근이 되지 않아 기외 삼목 시 발근촉진제처리가 반드시 필요함을 알 수 있다. M.26 배양묘의 발근율은 300 mg/L IBA + 3% sucrose 처리구의 통기성마개 배양병에서 70%로 가장 높았다 (Table 4). 300 mg/L IBA + 50 mg/L chlorogenic acid 처리구의 통기성마개 배양묘의 발근율이 43.33%였고 모든 처리구에서 통기성마개 배양묘 발근율이 비통기성마개 배양묘의 발근율을 보다 높았다. 오옥신의 작용에 요구되는 영양원인 당류 중 sucrose는 에너지원으로 필요하며 (Hartmann et al. 1990), 사과 'Fuji'의 기내 발근시 배지내 sucrose의 농도가 증가함에 따라 발근율도 증가한다 (Yae et al. 1986)고 하였는데 본 실험에서도 같은 경향이였다. M9의 근수 및 근장은 300 mg/L IBA + 100mg/L uniconazole 처리구의 통기성 마개 배양묘가 6.8개로 가장 많았으나 다른 처리구들도 비통기성 마개 배양묘 보다 비슷하거나 조금 적은 경향이였다(Figure 5). M.26의 근수는 300 mg/L IBA + 3% sucrose와 300 mg/L IBA + 50 mg/L chlorogenic acid 처리구의 통기성마개 배양묘가 가장 많았고 근장은 300 mg/L IBA + 100 mg/L uniconazole와 300 mg/L IBA처리구의 통기성마개 배양묘가 길었다. 순화율은 M.9와 M26 모두

**Table 3.** Effects of combined-treatments with IBA, sucrose, uniconazole and chlorogenic acid on rooting and acclimation of M.9 plantlets grown in vessel with and without ventilating stopper after 4 weeks of culture.

Treatment (mg/L)	stopper	rooting (%)	No. of root	length of root (cm)	acclimation (%)
IBA 300+sucrose 3 <sup>z</sup>	ventilating	81.7 a <sup>y</sup>	3.8 bc	1.8 ab	71.7 a
	non-ventilating	86.5 a	3.7 bc	1.8 ab	21.7 d
IBA 300+uniconazole 100	ventilating	16.7 e	6.8 a	2.3 a	15.0 de
	non-ventilating	25.6 de	3.6 bc	0.4 d	8.3 e
IBA 300+chlorogenic acid 50	ventilating	45.0 bc	5.4 ab	1.9 ab	33.3 c
	non-ventilating	41.0 bcd	5.3 ab	1.5 bc	8.3 e
IBA 300	ventilating	58.3 b	4.5 bc	1.9 ab	48.3 b
	non-ventilating	33.3 cde	2.6 c	1.0 c	8.3 e
Non-treatment	ventilating	0.0 f	-	-	-
	non-ventilating	0.0 f	-	-	-

<sup>z</sup> % concent.

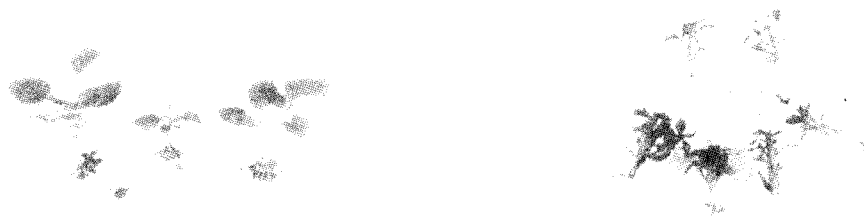
<sup>y</sup> Duncan's multiple range test (P≤0.05)

**Table 4.** Effects of combined-treatments with IBA, sucrose, uniconazole and chlorogenic acid on rooting and acclimation of M.26 plantlets grown in a vessel with and without ventilating stopper after 4 weeks of culture.

Treatment (mg/L)	stopper	rooting (%)	No. of root	length of root (cm)	acclimation (%)
IBA 300+sucrose 3 <sup>z</sup>	ventilating	85.4 a <sup>z</sup>	6.1 a	1.5 bc	70.0 a
	non-ventilating	43.6 c	3.1 b	1.0 cd	15.0 d
IBA 300+uniconazole 100	ventilating	21.7 e	2.6 b	2.7 a	13.3 de
	non-ventilating	15.4 e	2.7 b	0.3 e	1.7 f
IBA 300+chlorogenic acid 50	ventilating	61.7 b	6.2 a	1.7 b	43.3 b
	non-ventilating	12.8 e	4.6 ab	0.8 de	5.0 f
IBA 300	ventilating	40.0 cd	3.4 ab	2.5 a	23.3 c
	non-ventilating	26.5 de	2.6 b	0.3 e	6.7 ef
Non-treatment	ventilating	0.0 f	-	-	-
	non-ventilating	0.0 f	-	-	-

<sup>z</sup> % concent.

<sup>y</sup> Duncan's multiple range test(P≤0.05)



**Figure 5.** Ex vitro rooting of plantlets acclimatized in a vessel with (left) or without (right) ventilating stopper after 4 weeks of culture.

300mg/L IBA + 3% sucrose 처리구의 통기성마개 배양묘가 70.0% 이상으로 가장 우수하였으며, 다른 침지처리구들의 통기성마개 배양묘들도 모두 비통기성마개 배양묘들보다 높았다. 이는 통기성이 있는 통기성 마개 배양병내의

gas 이동과 습도 변화에 따라 기공이 개폐능력을 가지고 있어서 낮은 습도에서도 순화율을 높이고 생장을 촉진시키기 위해서 기내에서 정상적인 기공이 잘 발달되어야 한다 (Kozai and Kitaya 1993)는 보고와 동일하였다. 본 시험 결

과 사과 왜성대목 M.9와 M.26 배양묘의 성공적인 기외 삼목을 위해서는 통기성 마개 배양병에서 증식시켜 300 mg/L IBA + 3% sucrose에 침지처리가 가장 우수하다고 생각되었다. 이러한 발근과 순화에 미치는 배양 조건과 기외삼목시 발근촉진제 효과에 대한 본 결과는 조직배양 사과의 기외 이식시 이용될수 있을 것이다.

## 적 요

본 연구는 사과 왜성대목 M.9와 M.26 조직 배양묘를 통기성 마개와 비통기성 마개의 MS배지에서 생장 특성을 비교하기 위해 시험되었다. 또한 배양묘의 생육 변화와 이 배양묘를 발근촉진제 침지 처리 후 기외 삼목을 하여 발근 및 순화를 동시에 시키기 위해 실시하였다. 배양병내의 CO<sub>2</sub>와 에틸렌의 농도는 통기성 마개 배양병이 비통기성마개 배양병 보다 낮았다. 통기성 마개 배양병내의 온·습도 변화는 광조건에 따라 일정하게 반복되었다. 통기성 마개 배양묘의 기공은 외기에서 즉시 관찰 시 닫혀 있었으나 비통기성마개 배양묘의 기공은 외기에서 20분 후 관찰 시에도 열려 있었다. 통기성 마개 배양묘의 엽록체 지수와 잎 면적은 모두 비통기성 마개의 것 보다 높았다. 기외 삼목시 발근율은 M.9와 M.26 모두 300 mg/L IBA + 3% sucrose 침지 처리구에서 각각 86.5%와 85.4%로 가장 높았으며 순화율은 각각 71.7%와 70.0%로 가장 높았다. 통기성 마개 배양묘의 순화율은 비통기성마개 배양묘 보다 모든 침지 처리구에서 순화율이 비슷하거나 높았다.

## 인용문헌

- Alvarez R, Nissen SJ, Sutter EG (1989) Relationship between indole-3-acetic acid levels in apple (*Malus pumila* Mill) rootstocks cultured *in vitro* and adventitious root formation in the presence of indole-3-butyric acid. *Plant Physiol* 89: 439-443
- Carmen DR, Rallo L, Carallero JM (1991) Effects of carbohydrate content on the seasonal rooting of vegetative and reproductive cuttings of Olive. *J Hort Sci* 66: 301-309
- Desjardins YF, Laforge C, Lussier, A Gosselin (1988) Effect of CO<sub>2</sub> enrichment and high photosynthetic photon flux on the development of autotrophy and growth of tissue culture strawberry, raspberry and asparagus plants. *Acta Hort* 230: 45-53
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT (1990) *Plant propagation principles and practices*. 5th ed. Prentice Hall Career and Technology, Englewood Cliffs, New Jersey
- Infante R, Magnanini E, Righetti B (1989) The role of light and CO<sub>2</sub> in optimizing the conditions for shoot proliferation of *Actinidia deliciosa in vitro*. *Physiol Plant* 77: 191-195
- Jeong BR, Yang CS, Lee EJ (1996) Photoautotrophic growth of *Dianthus caryophyllus in vitro* as affected by photosynthetic photon flux and CO<sub>2</sub> condition. *Acta Hort* 440: 611-615
- Kozai T, Hayashi M, Hirokawa Y, Kodama T, Watanabe I (1987) Environmental control for acclimation *in vitro* cultured plantlets, 1. Development of the acclimatization unit for accelerating the plantlet growth and the test cultivation. *Jour Agr Met* 42: 349-358
- Kozai T (1991) Photoautotrophic micropropagation. *In Vitro Cell Dev Biol* 27: 47-51
- Kozai T, Kitaya Y (1993) Environmental control for production of quality plantlets *in vitro* at low costs in a large scale. *Advances in Developmental Biology and Biotechnology of Higher Plants. Proceedings of the first Asia-Pacific Conference on Plant Cell and Tissue Culture* pp 71-100
- Kwon SI, Kim KR, Kim HY, Kim MJ (1999) Effect of various mixed-treatment by some growth regulators, sugars and inorganic matters with IBA on rooting in hardwood cuttings of M.26 apple rootstock. *J Kor Soc Hort Sci* 40: 447-450
- Lee CH, Kim SB, Choi IM, Hyung NI (1990) Effects of growth regulators and medium composition on the growth of each stage in shoot tip culture of apple rootstock M.26. *J Kor Soc Hort Sci* 31: 385-392
- Lee EJ (1998) Study on the autotrophic culture of *Limonium* spp. cv. Misty Blue. MS thesis, Kyung Sang University
- Seo HS (1983) Study on cutting propagation of apple. *Ann Rep Hort Exper Stat* pp. 245-247
- Yae BW, Yim YJ, Jo HM (1986) Factors affecting shoot proliferation and root initiation of apple 'Fuji' *in vitro*. *J Kor Soc Hort Sci* 27: 353-358

(접수일자 2004년 3월 3일, 수리일자 2004년 5월 14일)