

사과에 있어서 자가불화합 제어제 처리 효과

손태권* · 정일경**†

*(주)이즈텍 기술연구소, **대구가톨릭대학교 생명공학과

Effect of Self-incompatibility Control Substances on the Quality and Fruiting of Apple

Tae-Kwon Son* and Il-Kyung Chung**†

*R&D Center of ISTECH, Science Bldg., Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

**Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

ABSTRACT This study investigated the effect of self-incompatibility control substance 'Apple plus' in improving self-fertilization and quality on apple. Results showed that the rate of fruit setting of disc florets of Fuji apple in the open field increased from 17.2% in 2004 to 44.4% in 2005 for the treated plots and from 0.5% in 2004 to 3.0% in 2005 for the control. In the case of using net covering, the rate of fruit setting increased from 3.3% in 2004 to 5.2% in 2005 for the treated plots and from 0.4% in 2004 to 0.7% in 2005 for the control. For the quality of apple fruits, results showed that there was no significant difference on the fruit L/D and firmness for both control and treated plots. However, the number of seeds was affected by the different substances which produced the following average number of seeds: control, 0.9; IS-1, 1.2; IS-2, 1.2; IS-3, 1.5 and IS-4, 0.7. The SSR genetic analysis showed that the rate of self-fertilization was highest for IS-1 (100%), followed by IS-2 (73%), IS-3 (68%), IS-4 (62%) and control (0%).

Keywords : apple, disc florets, fruit set, self-incompatibility

지구상의 개화 식물 중 약 50% 이상이 자가불화합성 메커니즘을 가지고 있으며(De Nettancourt, 1997), 배우체 자가불화합성 식물의 경우 식물 화주 조직의 특이적 당단백질이 발견되면서 S 유전자군에 의해 자가불화합성이 관여됨을 제시하였다(Anderson *et al.*, 1986; Evert *et al.*, 1989; Harling *et al.*, 1990). 이들 당단백질의 기능과 S-RNase의 정확한 기능은 불명확하였으나(Kao & Huang, 1990; Newbigin *et al.*, 1993), 최근 Ariel *et al.*(2006)에 의하면 같은 유전자

의 꽃가루가 암술 주두에서 발아하여 화분관 신장을 통하여 수정이 이루어지게 되는데, 근친 꽃가루가 들어오면 화주 조직에서 독소 즉 S-RNase를 분비하여 이 화분을 파괴하여 화분관 신장이 되지 못하도록 하는 것을 밝혀내었다. 자가불화합성과 관련된 연구는 야생종 토마토(Chung, 1997; Kang *et al.*, 2000), 담배(Ariel *et al.*, 2006; McClure *et al.*, 1990), 토마토(Kondo *et al.*, 2002), 페튜니아(Entani *et al.*, 1999) 등에서 많이 이루어졌으며, 주요 과수 작물 중 자가불화합성을 나타내는 것은 배, 사과, 자두, 양앵두 등이 이에 속한다(Chung *et al.*, 1999; Hur *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 1997; Beppu, 2003; Sonneveld, 2003; Van Nerum, 2001). 이와 같이 식물의 자가불화합성에 관련된 많은 연구들이 진행되었으나 자가불화합성 제어를 통한 현장에의 적용에 관련된 실험은 극히 드문 실정이다.

본 연구에서는 우리나라 주요 과수 작물 중 하나인 사과의 후지 품종을 대상으로 자가불화합성 제어제 처리에 따른 자가불화합성 타과 정도를 구명하고, 처리에 따른 사과 품질 특성 및 SSR 유전 분석을 통한 자가수분 종자의 유전 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

본 실험은 경북 청송군 현동면 도평리에 위치한 (주)이즈텍 과수 실험 포장에서 실시하였다. 공시품종은 M9 대목의 7년생 후지를 사용하였다. 자가불화합성 제어제의 처리시기는 중심화 개화기인 2004년도에는 4월 20일, 2005년도에는 4월 27일에 살포하였다. 시험처리구는 1나무당 1처리로 3반복 처리하였다. 자가불화합성 제어제의 자가수정 효과 검정을 위하여 실험구에 있어서 과수 전체를 망으로 씌워

†Corresponding author: (Phone) +82-53-817-3178
(E-mail) hexa26@istech21.com

외부 요인에 의한 수정을 차단하였고, 망을 씌우지 않은 자연방임구를 대조구로 설정하였다. 망을 씌운 구는 타가수분이 되는 것을 막기 위해서 개화 일주일전 나무 전체를 망으로 씌우는 작업을 하였으며, 처리구당 5마리의 머리빨가위벌을 방사하여 자가수분을 행하였다. 본 실험에 사용한 자가불화합 제어제는 시중에 시판되고 있는 상품명 애플플러스를 사용하였으며, 농도는 1000배액으로 희석하여 잎, 꽃, 가지 등 나무 전체에 분무기를 이용하여 골고루 살포하였다.

품질 특성 조사

처리 약 2주 후에 망을 제거하였고, 그로부터 2주 후에 결실율을 조사하였다.

과실의 중량, L/D, 과색, 경도, 종자수, 당도, 산도 등의 품질조사를 실시하였으며, 후지 수확기에 샘플을 수확하여 중량을 측정 후, 종자수는 과실을 잘라서 확인하였다. 중량측정기는 Mitutoyo Calipers를 사용하여 가장 비대한 부분을 측정하였다. 과색은 일본 농림수산성 발행 원예식물 표준색표를 이용하여 착색 정도를 108(deep red), 107(vivid red), 106(bright red)로 3분류하였다. 당도는 샘플을 강판에 갈아 즙을 낸 후 거즈로 여러 번 정제하고, Toyo 4 거름종이로 필터링 한 후 Atago 제품의 0~53%까지 측정 가능한 PAL-1을 사용하여 측정하였다. 경도는 Fruit pressure tester를 사용하였고, 산도는 정제한 샘플즙 5 ml과 증류수 20 ml로 5배 희석하여 0.1N의 NaOH를 pH 8.0~8.1이 될 때까지 조정하여 조사하였다.

ASA-PCR법을 이용한 자가수정 판정

망을 씌운 후 자가불화합성 제어제를 처리하여 수확한 후

지 처리구의 종자를 채취하여 자가수분 유무를 확인하는 방법으로 S-RNase 대립유전자의 염기배열을 해석하여 판정하였다. 보존성이 높은 영역의 배열을 기본으로 공통의 하류 primer를 설계하고, 5' 측을 형광색소 6-FAM으로 표식한 올리고뉴클레오티드를 합성하였다. 관련 특이성이 높은 배열을 기본으로 각 S-RNase 유전자만을 독자적인 길이로 증폭하는 상류 primer를 설계하여 합성하였다. 각 primer가 대립유전자 특이적 증폭(ASA)으로 있는 것을 확인하기 위해 게놈 DNA를 사용하여 primer를 혼합하여 PCR을 행하였다. 증폭산물의 분석은 내부표준에 GS350TAMRA(ABI)를 사용하였고, 형광 DNA sequence(ABI PRISM 310 및 3100 Avant)로 전기영동하였다. 그리고 GeneScan을 사용하여 ASA-PCR 산물 길이를 결정하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 2004년과 2005년에 걸쳐 자가불화합성 제어제의 처리에 따른 중심화의 결실율을 보여주는 것으로 자연방임과 망을 씌운 상태에서 실험을 실시하였다. 중심화 개화기에 자가불화합 제어제를 살포하였으며, 자연방임 상태에서도 망을 씌운 실험구와 같은 방법으로 자가불화합 제어제를 살포하였다. 자연방임의 경우, 무처리구에서 2004년 0.5%, 2005년 3.0%의 결실율을 보였고, 자가불화합성 제어제 처리구에서는 2004년 17.2%, 2005년 44.4%의 결실율을 보여 자가불화합성 제어제를 살포한 경우가 그렇지 않은 경우보다 각각 34.4배, 14.8배 높은 결실율을 보였다. 2004년의 경우 2005년과 비교하면 자연방임 상태 임에도 불구하고 결실율이 낮게 나타났는데, 이는 2004년 본 실험을 실시한 청

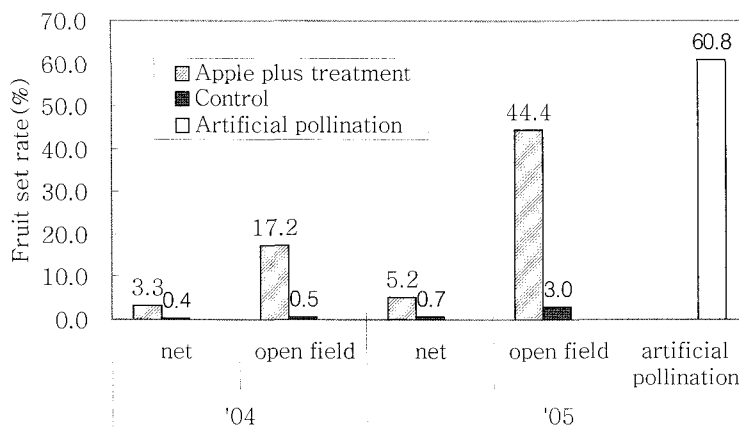


Fig. 1. Effects of self-incompatibility control substances on the rate of fruit setting of disc florets.

Table 1. Quality of Fuji apples as affected by the different self-incompatibility control substances applied to apple trees with covering.

Treatment	Fruit weight (g)	L/D ratio	Fruit color	Firmness (kg / ϕ 5 mm)	Number of seed (ea)	Soluble solids ($^{\circ}$ Bx)	Titrateable acidity (%)
Cont.	212	0.88	108	4.3	0.9	14.7	0.61
IS-1 ^{a)}	250	0.89	107~108	4.2	1.2	16.4	0.66
IS-2	184	0.88	108	4.4	1.2	12.7	0.51
IS-3	213	0.86	107~108	4.6	1.5	14.0	0.43
IS-4	252	0.88	107~108	4.4	0.7	15.4	0.63

^{a)}IS-1~4 : Self-incompatibility control substances.

Table 2. SSR genetic analysis of the rate of self fertilization of Fuji apple as affected by the different self-incompatibility control substances applied to apple trees with net covering.

Treatment	Number of investigated seed	Number of self fertilized seed (a)	Number of cross fertilized seed (b)	Number of unknown seed	Rate of self fertilized seed (a/(a+b)) (%)
Cont.	7.0	-	7.0	-	0
IS-1 ^{a)}	5.5	2.5	-	3.0	100
IS-2	7.0	4.0	1.5	-	73
IS-3	8.5	7.0	1.0	0.5	88
IS-4	6.5	4.0	2.5	-	62

^{a)}IS-1~4 : Self-incompatibility control substances.

송지역에서의 사과 개화 시기의 저온에 의한 영향을 받은 것으로 생각되어진다. 망을 씌운 실험구의 경우, 무처리구에서 2004년 0.4%, 2005년 0.7%의 결실율을 보였고, 자가불화합성 제어제 처리구에서 2004년 3.3%, 2005년 5.2%의 결실율을 보여 처리구가 무처리구에 비해 7.4~8.3배 높은 결실율을 보여, 자가불화합성 제어제 처리가 자연방임 및 망상태 공히 결실율을 촉진하는 것으로 나타났으며 이는 자가불화합성 제어제의 처리가 자가수분율을 향상시키는 것에 기인한 것으로 판단된다(Table 2). 또한 인공수분을 한 실험구에서는 60.8%의 결실율을 보였는데(Fig. 1), 이는 평년보다 20~30%정도 낮게 나타났으며 사용한 화분의 발아율이 낮은 것에 기인한 것으로 확인되었다.

망에서의 자가불화합성 제어제 종류별 처리가 사과 품질에 미치는 영향을 알아보기 위하여 중량, L/D, 과색, 경도, 종자수, 당도, 산도 등을 조사하였다. Table 1에서 보는 것과 같이 무처리구에 비해 L/D, 과색, 경도에서는 유의성이 인정되지 않았으나, 과실 중량의 경우 무처리구 212 g인데 비해, IS-1 처리구 250 g, IS-2 처리구 184 g, IS-3 처리구 213 g, IS-4 처리구 252 g으로 IS-4 처리구의 약제가 가장 높게 나타났으며, 과실 중량에 있어서 처리구간 차이가 큰 것은 망

을 씌운 상태에서 자가불화합성 제어제를 처리하여 결실된 과일만을 가지고 조사하였기 때문에 실험구당 맺힌 과실 숫자가 적음에 기인한 것으로 판단된다. 자연방임에서의 타가 인공수분의 경우 일반적으로 6~10개의 종자가 형성되지만 본 실험의 망을 씌운 조건에서 머리빨가위벌에 의한 자가수분을 하였을 경우 Table 1에서 보는 바와 같이 0.7~1.5개로 나타나 자연방임의 타가 인공수분보다 망 조건의 자가수분의 처리구에서 종자수가 적게 나타났다. 자가수분에 의한 종자 형성은 열성 유전을 하여 도태될 확률이 높지만 육종학적 이용 가치는 매우 높을 것으로 판단되고 과일의 경우 후대 이용이 없기에 과일 품질에 미치는 영향은 없을 것으로 판단된다.

망을 씌운 후 자가불화합성 제어제를 살포하여 수확한 후 지 품종의 종자를 이용하여 S 유전자형을 판정하여 자가수분 정도를 판정하는 방법으로 S-RNase 대립유전자의 염기 배열을 해석하여 판정한 결과(Table 2), 무처리구 0%, IS-1 처리구 100%, IS-2 처리구 73%, IS-3 처리구 88%, IS-4 처리구 62%로 나타나 자가불화합성 제어제 종류에 따라 자가수정 정도가 다르게 나타났으며, 이는 자가불화합성 제어제의 S-RNase 활성 억제에 있어 제어제 종류에 따라 차이가 남을 말하는 것으로 현재까지는 자가불화합성 제어제 IS-1

이 가장 우수한 것으로 나타났다. 자식종자율이 높게 나타났다는 것은 자가불화합성 제어제에 의해 화분관 신장을 억제하는 S-RNase의 활동을 저해시키고, 자기 꽃가루로 인한 수분이 이루어졌음을 의미하고, 불명종자라고 하는 것은 실험 도중 DNA가 오염되었거나 판독이 불가능한 것을 말한다. 또한 망을 씌웠음에도 불구하고 IS-2 처리구 1.5개, IS-3 처리구 1.0개, IS-4 처리구 2.5개의 타식 종자가 검출된 것은 매우 흥미로운 것으로 이 부분에 대하여서는 앞으로 더 세밀한 연구가 요구된다.

담배(*N. alata*) 등의 S 당단백질은 *in vitro* 분석에 의해 RNase 활성을 가진다는 것이 보고되었다(Anderson *et al.*, 1986). 현재까지 배우체형 자가불화합성은 화주조직에 RNase의 활성을 가지고 있는 자가불화합성의 locus 산물의 하나인 S-RNase가 화주조직에 시기 및 부위 특이적으로 발현하여 유전자형이 동일한 화분이 화주조직에서 신장할 때 이들을 공격하여 자가불화합을 유발한다고 알려져 있다(Blank & Mckeon, 1989). McClure(1990)에 따르면 S-RNase는 자가의 화분관이 화주내의 전이조직에서 신장을 할 때 그 화분관으로 침투하여 rRNA를 공격한다고 추측하였다. S-RNase는 *in vitro* 상에서 그 특이성에 관계없이 어떠한 유전자형의 화분관으로도 침투가 가능한 것으로 나타났다(Gray *et al.*, 1991). 그러나 S-RNase 기능에서 대립유전자적 특이성은 여전히 의문인 채로 남아 있다. Kim *et al.*(2001)은 배우체형 자가불화합성을 유발하는 S-RNase의 활성을 저해함으로써 자가불화합성을 타파하는 화학물질에 관해 보고하였다. ZnSO₄, CuSO₄를 처리한 후 야생종 토마토의 RNase 활성을 측정할 결과 현저하게 RNase 활성이 감소됨을 관찰하였다. S₁₂S_a (*L. peruvianum*) 유전자형을 가진 화분을 정제된 S₁₂-RNase가 들어있는 화분 발아 배지에 배양했을 때 화분관 신장이 억제되었다(Kim *et al.*, 2001).

본 실험에서 사용한 자가불화합성 제어제의 경우 자가수분을 촉진시키는 것은 자가불화합성을 일으키는 주요 효소인 S-RNase 활성을 억제시키는 것으로 추측된다.

식물의 양성화에 있어서 자가불화합성이라고 하는 것은 자식 약세를 방지하고 종내의 유전적 다양성을 유지하기 위한 기구이고, F1 잡종종자 생산에 있어서 이용되어지고 있는 농업상 아주 중요한 형질 가운데 하나이다. 이러한 기구의 이해 위에 인위적 제어법의 확립은 새로운 식물 육종법 개발에의 혁신을 가져다 준다는 것은 더할 나위 없는 현실인 것이다.

우리나라에서의 사과는 과수 산업에 있어 주력 작물 중 하나로서 특히 후지의 경우 사과 재배 면적의 약 75%를 차

지하고 있는데 자가불화합성이 강한 것으로 알려져 있다. 사과 재배시 나타나는 주요 문제점 중 수정율 저하 및 결실량 미확보에 따른 품질저하 및 수확량 감소의 대책으로 자가불화합성 제어제 처리에 의한 안정적 수정을 통한 결실량 확보가 필요할 것으로 판단된다.

적 요

사과 재배시 대두되고 있는 수정 불량 및 안정된 수정을 통한 품질 향상을 위한 방안을 모색하고자 자가불화합성 제어제(상품명 : 애플플러스)를 이용한 SSR 유전 분석을 통한 자가수정 향상 정도 및 촉진 효과, 품질 특성에 미치는 영향을 검토하였다.

1. 후지 품종에 있어서 증심화 결실율은 자연방임시 무처리구의 경우 2004년 0.5%, 2005년 3.0%인데 비하여 자가불화합성 제어제 처리의 경우 2004년 17.2%, 2005년 44.4%로 높게 나타났다.
2. 망을 씌워 자가불화합성 제어제를 처리한 실험구에서도 무처리구에서는 2004년 0.4%, 2005년 0.7%, 처리구에서는 2004년 3.3%, 2005년 5.2%의 결실율을 보여 처리구가 7.4~8.3배정도 결실율이 높게 나타났다.
3. 망을 씌워 자가불화합성 제어제 처리한 실험구와 무처리구를 비교하면 L/D, 경도에서는 유의성이 인정되지 않았으며, 종자수에서는 무처리구 0.9개, IS-1 처리구 1.2개, IS-2 처리구 1.2개, IS-3 처리구 1.5개, IS-4 처리구 0.7개로 나타나 약제 종류에 따라 효과가 다르게 나타났다.
4. SSR 유전자 분석에 의한 후지 품종 종자의 자가수분 정도는 무처리구에서 0%, IS-1 처리구 100%, IS-2 처리구 73%, IS-3 처리구 88%, IS-4 처리구 62%로 나타나 IS-1의 약제가 가장 높게 나타났다.

인용문헌

- 강삼석, 조현모, 조광식, 고갑천, 김기열. 1997. 남방형 동양배 (*Pyrus pyrifolia nakai*) 자가결실성 품종 육성에 관한 연구 I. 배 재배품종의 자가불화합성 정도. 원예작물연구논문집. 39(1) : 117-126.
- Anderson, M. A., E. C. Cornish, S. L. Mau, E. G. Williams, R. Hoggart, A. Atkinson, I. Bonig, B. Grego, R. Simpson, P. J. Roche, J.D. Haley, J. D. Penschow, H. D. Niall, G. W. Tregear, J. P. Coghlan, R. J. Crawford and A. E. Clarke. 1986. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nico-*

- tiana alata*. *Nature*. 321 : 38-44.
- Ariel, G., K. Kondo, Christopher B. Lee, C. Nathan Hancock, M. Sivaguru, S. Vazquez-Santana, S. Kim, Thomas E. Phillips, F. Cruz-Garcia, and B. McClure. 2006. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*. 439 : 805-810.
- Beppu, K. 2003. Determination of S-haplotypes of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars by PCR and cross-pollination tests. *J. Hort. Sci and Biotech.* 78(3) : 315-318.
- Blank, A., and T. A. McKeon. 1989. Single-strand-prefering nuclease Activity in wheat leaves is increased in senescence and is negatively photoregulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86 : 3169-3173.
- Chung, I. K. 1997. Characterization of S glycoprotein associated with gametophytic self-incompatibility of *Lycopersicon peruvianum*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 38(3) : 205-210.
- Chung, I. K., S. Y. Lee, P. O. Lim, S. A. Oh, Y. S. Kim, and H. G. Nam. 1999. An S-RNase gene of *lycopersicon peruvianum* L. is highly expressed in transgenic tobacco but does not affect self-incompatibility. *J. Plant Physiol.* 154 : 63-70.
- Chung, K. H., J. H. Jen, and S. J. Kang. 1998. Selection of suitable pollinizers for major Japanese Plums. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 39(5) : 560-563.
- De Nettancourt, D. 1977. Incompatibility in angiosperms. (Monographs on Theoretical and Applied Genetics, vol 3) Eds : Frankel, R., Gall, G. A. E., Grossman, M and Linskens, H. F. Springer, Berlin.
- Ebert, P. R., M. A. Anderson, R. Bernatzky, M. Altschuler, and A.E. Clarke. 1989. Genetic polymorphism of self-incompatibility in flowering plants. *Cell*. 56 : 255-262.
- Gray, J. E., B. A. McClure, I Bonig, M. A. Anderson, and Clarke A. E. 1991. Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana alata* (S-RNase) on *in vitro* grown pollen tubes. *Plant Cell*. 3 : 271-283.
- Haring, V., J. E. Gray, B. A. McClure, M. A. Anderson, and A. E. Clarke. 1990. Self-incompatibility : a self-recognition system in plant. *Science*. 250 : 937-941.
- Hur, B. J., M. H. Kim, and I. K. Chung. 2002. Purification and characterization of S protein associated with self-incompatibility in 'Fuji' apple. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 43(4) : 447-451.
- Kang, N. Y., M. H. Kim, K. H. Cho, D. I. Shin, D.U. Kim, H.S. Park, and I. K. Chung. 2000. The role of S-RNase associated with gametophytic self-incompatibility in tomato (*Lycopersicon peruvianum*). *Korean J. Plant Tissue Culture*. 27(3) : 219-226.
- Kim, H. T., D. Y. Shin, H. S. Hwang, J. H. Hwang, Y. U. Shin, Y. Hirata, and I. S. Nou. 2002. Determination of S-genotype of korean-bred *Pyrus pyrifolia* strains based on PCR-CAPS. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 43(2) : 113-119.
- Kao, T. H., and S. Huang. 1994. Gametophytic self-incompatibility : A mechanism for self/nonself discrimination during sexual reproduction. *Plant Physiol.* 105 : 461-466.
- Kondo, K., M. Yamamoto, Daniel P. Matton, T. Sato, M. Hirai, S. Norioka, T. Hattori, and Y. Kowiyama. 2002. Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. *The Plant Journal*. 29(5) : 627-636.
- Kim. M. H., D. I. Shin, H. S. Park, and I. K. Chung. 2001. *In vitro* function of S-RNase in *Lycopersicon peruvianum*. *Molecules and Cells*. 12(3) : 329-335.
- McClure, B. A., V. Haring, P. R. Ebert, M. A. Anderson, R. J. Simpson, F. Sakiyama, and A. E. Clarke. 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature*. 342 : 955-957.
- Newbigin, E., M. A. Anderson, and A. E. Clarke. 1993. Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell*. 5 : 1315-1324.
- Sonneveld, T. 2003. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S₁ to S₁₆ using consensus and allele-specific primers. *Theoretical & Applied Genetics*. 107(6) : 1059-1070.
- Entani, T., S. Takayama, M. Iwano, H. Shiba, F. S. Che, and A. Isogai. 1999. Relationship between polyploidy and pollen self-incompatibility phenotype in *Petunia hybrida* Vilm. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(11) : 1882-1888.
- Van N. I. 2001. Re-examination of the self-incompatibility genotype of apple cultivars containing putative 'new' S-alleles. *Theoretical & Applied Genetics*. 103(4) : 584-591.