

포도 莖頂培養에서 얻은 유묘의 器內插木에 의한 무병묘 생산

서정해* · 정재동¹ · 권오창²

경남정보대학 환경조경과, ¹경북대학교 원예학과, ²동아대학교 원예학과

Virus Free Stock Production by *In vitro* Stem Cutting of Shoot Tip Cultures of Grapes

SUH, Jung Hae* · CHUNG, Jae Dong¹ · KWON, Oh Chang²

Dept of Environmental Landscape Architecture, Kyungnam College of Information and Technology,
Pusan, 617-701, Korea

¹Dept of Horticulture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

²Dept of Horticulture, Dong-A University, Pusan, 604-714, Korea

ABSTRACT The experiment was conducted to know the effect of plant growth regulators on axillary bud elongation from *in vitro* stem cutting and the possibility of virus-free stock production. Axillary buds were well elongated in 3/4 strength MS medium supplemented with 0.1 or 0.5 mg/l BA and 0.05 mg/l NAA. Transferred plantlets could be established well in vermiculite and peat moss mixture (3:1, v/v) compare to other mixtures. In virus indexing, all the varieties of mother plants were infected by GLRV III. Infected percentages of the three varieties were ranged from 30% to 75%. But negative response was revealed against the other species of virus, GLRV I, GFLV and ArMV. Plantlet of 'Schuyler' and 'Muscat of Alexandria', which were cultured *in vitro*, showed positive response against GLRV III and infected percentage of the former was 37.5% but the latter, 12.5%. On the other hand, that of 'Campbell Early' negatively responded against all the species of virus indexed.

Key words: GLRV III, node culture, virus

서 론

일반적으로 기내 배양에 의한 증식 방법은 생장점 배양, 마디배양, 절간배양, 잎조직배양, 화경배양 등 다양한 방법에 의해서 가능하다 (Engelbrecht and Human 1989; Sadamatsu 1987, 1989). 이들 방법 중 생장점 배양을 통하여 얻은 기내 증식재료로부터 액아의 신장유도, 원피체나 근경의 유도, 줄기조직의 마디배양 등의 방법은 대량증식과 무병주 생산에 용이한 방법으로 활용되고 있다 (Sasahara et al. 1981). 또한

마디배양은 기내배양한 줄기를 잘라 기내삽목 재료로 사용하고, 기부의 액아를 유도하여 이들의 줄기를 다시 잘라 배양하는 방법을 반복함으로써 유묘를 단기간 내 대량 증식시킬 수 있다. 따라서 본 실험에서는 생장점 배양에서 얻은 기내배양 중인 줄기의 마디를 잘라 배양했을 때 이들 마디의 액아로부터 신장에 적합한 생장조절물질의 종류 및 농도를 규명하고, 증식된 유묘의 virus 검정을 통하여 무병주 생산가능성을 검토하였던 바 증식 효율이 높을 뿐만 아니라 무병주 생산이 가능한 결과를 얻었기에 이를 보고코자 한다.

재료 및 방법

기내삽목

기내에서 재생산 체계를 확립하기 위하여 포도 품종 ‘Schuyler’, ‘Campbell Early’와 ‘Muscat of Alexandria’의 기내 배양한 줄기의 신초끝과 기부를 제거한 중간 부분의 마디를 선별하여 각 마디 당 1매씩의 엽을 부착하여 자른 후 배지에 치상하였다. 치상용 배지로 3/4 MS 배지 (Suh et al. 2001)에 BA 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L와 NAA 0, 0.01, 0.05 mg/L를 단용 또는 혼용 첨가한 12종의 배지를 조제하였다. 이식은 800 mL 배양병 (Figure 1) 당 10개씩 4 반복으로 기내삽목하였으며 배양은 2,000 lux 형광등 (16/8h 광주기) 하에서 25°C 전후로 배양하였다. 배양 8주 후 신초수, 초장, 엽수, 마디 수, 분지수, 근장, 근수 및 전체 생체중을 조사하였다.

기외이식

기내삽목법에 의해 증식된 ‘Schuyler’의 유묘 (초장 10 cm 전후)를 기외이식하여 최적순화 활착용 이식상토를 검토하였다. 상토는 vermiculite 단용, vermiculite:peat moss를 3:1, vermiculite:peat moss를 1:1, vermiculite:perlite를 1:2, vermiculite:peat moss:perlite를 1:1:1 (v/v) 혼합한 각각의 상토를 PE분에 10주씩 이식하여 2000 Lux (형광등)로 14시간 조명하



Figure 1. The starting stage of *in vitro* node culture in 3/4 MS medium with 0.05 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA.

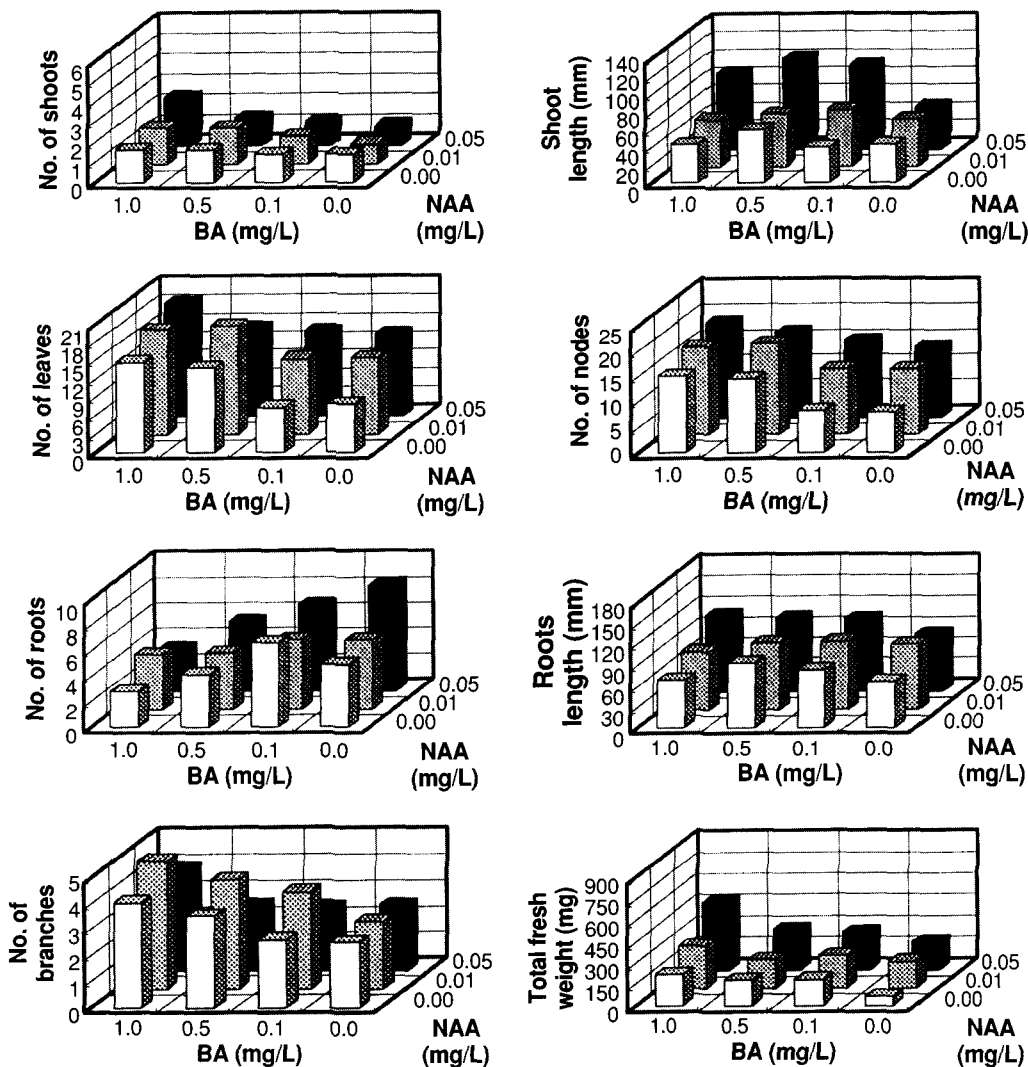


Figure 2. The growth of shoots from *in vitro* node cultures of *V. labruscana* cv. ‘Schuyler’ in 3/4 strength MS medium with various PGRs.

였으며, 27°C에서 1개월간 순화시킨 후 활착률을 조사하였다.

Virus 검정

기내배양에서 얻은 유묘의 virus 제거 여부를 검정하여 무병주를 선발 육성할 목적으로 다음과 같은 실험을 수행하였다. 재료는 포장에서 재배중인 모주 ‘Schuyler’, ‘Campbell Early’와 ‘Muscat of Alexandria’ 등 3품종을 대상으로 각각 8~10 개체의 엽에서 얻은 시료와 기내정정 배양 묘도 품종당 10 개체에서 채취한 잎을 사용하였다. Virus 검정은 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 행하였으며 Grape leafroll virus I type (GLRV I)과 III type (GLRV III), Grape fanleaf virus (GFLV), Grape arabis mosaic virus (ArMV)를 검정하였다. GLRV I, GLRV III, GFLV, ArMV에 대한 항혈청은 Swiss Bioreba사 제품을 사용하였으며, conjugate immunoglobulin G (IgG)는 alkaline phosphatase가 결합된 것을 이용하였으며 ELISA 검정을 수행하였다.

결 과

다아괴체로부터 절간신장이 이루어진 줄기의 마디를 잘라서 기내삽목한 결과, ‘Schuyler’ (Figure 2)의 신초수와 초장은 NAA 0.05 mg/L에 BA 1.0 mg/L 혼용배지에서 신초수가 다소 많고 초장이 비교적 짧았으나, BA 0.1 또는 0.5 mg/L 혼용배지에서는 신초수는 적고 초장이 길게 신장하였다. 엽수와 마디 수는 BA 1.0 mg/L에 NAA 0.05 mg/L를 첨가한 혼용배지에서 가장 양호하였으며, NAA와 BA 농도가 낮을수록 부진하였다. 분지수는 NAA 0.01 mg/L에 BA 농도가 증가함에 따라 많았다. 근수는 NAA 0.05 mg/L 단용 배지에서 가장 많았고, 근장은 BA와 NAA의 고농도로 혼용한 배지에서 가장 길었다. 생체중은 BA와 NAA 농도가 높아짐에 따라 생체중이 증가하는 경향이였다. 이상의 결과로 보아 ‘Schuyler’의 기내삽목을 위해서 신초수, 초장, 엽수, 마디수, 근장과 생체중은 BA 1.0 또는 0.5 mg/L에 NAA 0.05 mg/L 혼용배지에서,

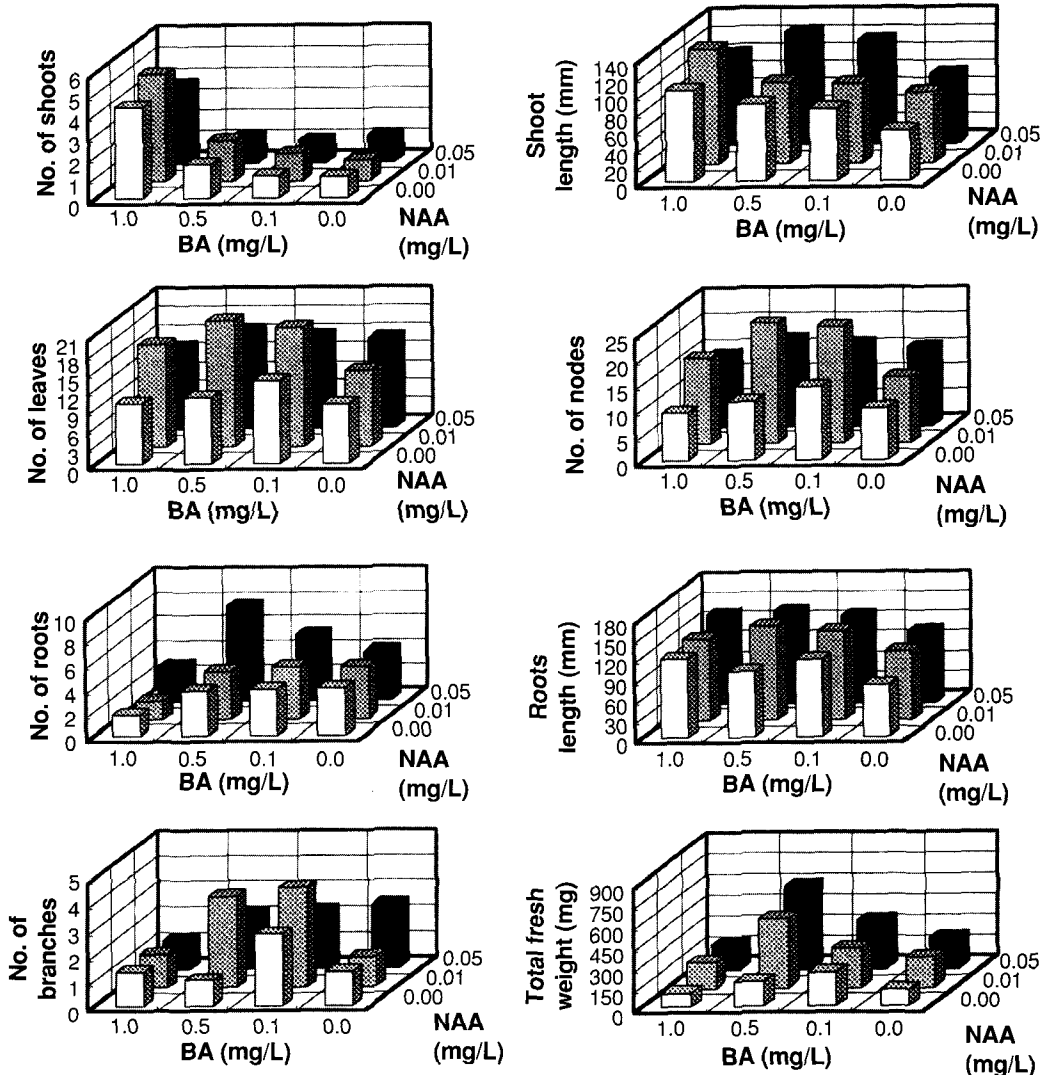


Figure 3. The growth of shoots from *in vitro* node cultures of *V. labruscana* cv. “Campbell Early” in 3/4 strength MS medium with various PGRs.

근수는 NAA 0.05 mg/L 단용배지에서 생장이 양호하였다.

기내삽목한 ‘Campbell Early’ (Figure 3)의 신초수는 BA 1.0 mg/L에 NAA 0.01 mg/L에서 가장 많았고 BA농도가 낮을수록 적었다. 초장은 NAA 0.05 mg/L에 BA 0.1 또는 0.5 mg/L 첨가배지에서 양호하였으며, NAA 0.01 mg/L에 BA 1.0 mg/L 첨가배지와 BA 1.0 mg/L 단용배지에서는 초장은 길었으나 신초수가 많아서 우량 묘로는 부적합하였다. 엽수와 마디 수는 NAA 0.01 mg/L와 BA 0.1 또는 0.5 mg/L 혼용배지에서 많았고, NAA 0.05 mg/L와 BA 0.1 또는 0.5 mg/L 혼용배지에서도 많은 경향이였다. 분지수는 NAA 0.01 mg/L와 BA 0.1 또는 0.5 mg/L 혼용배지에서는 대조구보다 3배나 많았다. 근수는 NAA 0.05 mg/L와 BA 0.1 또는 0.5 mg/L 혼용배지에서 많았고, BA 단용배지는 대조구보다 적었다. 근장은 NAA 0.01 또는 0.05 mg/L와 BA 0.5 mg/L 혼용배지에서 길었으며, BA 단용보다는 NAA를 혼용했을 때 뿌리의 신장은 촉진되었다. 생체중은 NAA 0.01 또는 0.05 mg/L와 BA 0.5 mg/L와 혼용배지에서 무거웠다. 이상의 결과로 보아 ‘Campbell Early’의 기내삽목은 NAA 0.05 mg/L와 BA 0.5 mg/L 혼용배지에서 초장, 근수, 근장과 생체중이 양호하였고 (Figure 4), 엽수와 마디 수는 NAA 0.01 mg/L에 BA 0.5 mg/L를 혼용한 배지에서 촉진되었다.

기내에서 배양한 유묘를 기외 이식용 인공상토에 이식해서 재배한 결과 (Table 1), vermiculite: peat moss를 3:1로 혼용한 상토에서 80% (Figure 5), vermiculite 100% 단용 상토에서 60%의 활착률을 나타낸 반면, vermiculite와 perlite를 혼용한 상토에서는 과습으로 인해 뿌리 부분이 부패하여 모두 고사하였다.

Table 1. Survival percentage of the transferred plantlets of grape cultivar ‘Schuyler’ at different composts mixture.

Vermiculite	Mixing ratio		Survival (%)
	Peat moss	Perlite (%)	
100	0	0	60 (12/20) ²
75	25	0	80 (16/20)
50	50	0	20 (4/20)
34	0	66	0 (0/20)
34	33	33	0 (0/20)

²Number of survival plantlets/number of plantlets transferred at each compost.

Table 2. Virus indexing of mother plant (M) and regenerate plant (R) from shoot tip culture of grape.

Cultivars	Virus indexing (Infected %)							
	GLRV I		GLRV III		GFLV		ArMV	
	M	R	M	R	M	R	M	R
Schuyler	-	-	++(75)	++(37.5)	-	-	-	-
Muscat of Alexandria	-	-	+(40)	+(12.5)	-	-	-	-
Campbell Early	-	-	+(30)	-	-	-	-	-
Infected control	++	++	++	++	nd	nd		

- : Negative reaction; + : Mild positive reaction; ++ : Severe positive reaction.

포장에서 재배되고 있는 포도 ‘Schuyler’ 외 2품종을 대상으로 8~10개체씩 임의 선별하여 virus를 검정한 결과 (Table 2), 포장식물의 경우 (M), 이병정도는 GLRV I의 경우 대조구만 양성반응을 나타내었고 공시품종 모든 개체에서 음성반응을 나타내었다. GLRV III의 경우 대조구를 포함 모두 양성반응을 나타내어 이병정도가 대단히 심각하였으며, ‘Schuyler’ 75%, ‘Muscat of Alexandria’ 40%, ‘Campbell Early’ 30%로서 virus의 농도와 이병률이 대단히 높았다. 경정배양을 통해 얻은 유식물체의 경우 (R), GLRV I의 경우는 감염 대조구만 양성반응을 나타내었을 뿐, 공시품종 모든 개체에서 음성반응으로 나타났다.

GLRV III의 경우는, ‘Schuyler’와 ‘Muscat of Alexandria’ 품종에서 양성반응을 나타내어 이병되어 있음이 확인되었으며, 각각 포장 재배에서 보다 낮은 37.5%, 12.5%의 이병률을 나타내어 경정배양에 의한 무병주 생산 가능성이 인정되었다.

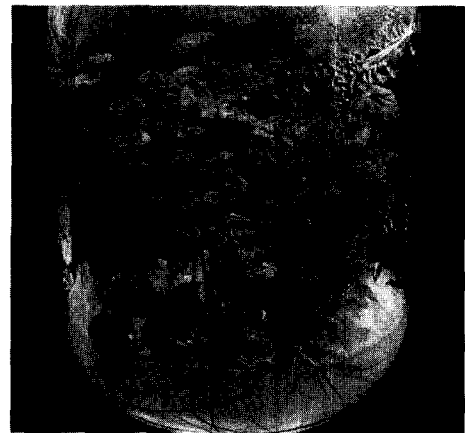


Figure 4. The elongation of shoots after shooting from node cultures of ‘Campbell Early’ in 3/4 MS medium with 0.05 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA.

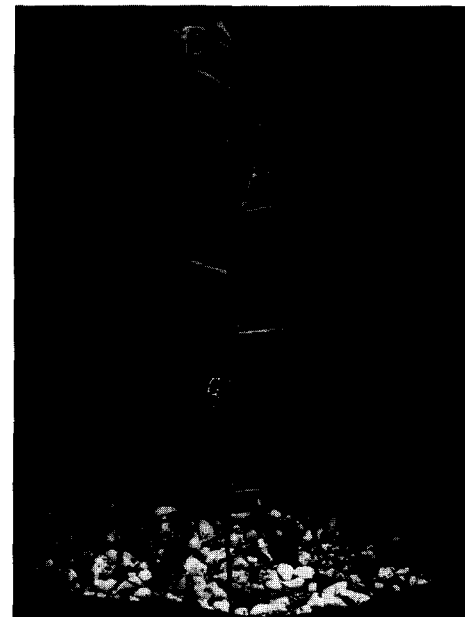


Figure 5. The well established plantlet of ‘Campbell Early’ in compost mixture of with vermiculite and peatmoss (3:1, v/v).

고 찰

기내배양을 통한 유묘의 증식방법은 다아괴체를 유도하여 이들로부터 신초를 신장시켜 유묘로 이용하는 방법과, 다아괴체로부터 신장한 신초줄기의 마디를 잘라 기내 삽목방법을 통해 재증식을 유도하는 방법으로 대별되는데 포도의 경우 Sadamatsu (1987, 1989)는 전자의 방법, Sasahara 등 (1981)은 후자의 방법을 이용하였는데, 본 실험의 결과 전자의 방법을 이용하면 계속되는 계대배양에 의한 다아괴체 형성능률의 감소, 신초신장의 지연 및 발근상태 불량 등이 나타났으며, 후자의 방법을 이용했을 때는 신장된 신초를 계속적으로 배양 재료로 이용하더라도 증식능률에는 전혀 차이가 나타나지 않아 후자의 방법으로 유묘증식을 기하는 것이 효율성이 높을 것으로 판단되었다. 재배종을 대상으로 virus 이병유무를 조사한 결과는 대단히 많은데 (Imata and Seizawa 1984; Tanaka 1985), 가장 광범위하게 이병되어 있는 virus GLRV로서 거의 모든 재배종에 이병 (Engelbrecht and Human 1989; Hu et al. 1991; Monette et al. 1989)되어 있으며, GFLV의 이병도 상당히 심각한 문제로 대두되고 있다 (Rowhaxi et al. 1992). 본 실험에서도 GLRV 중 III type은 가장 많이 이병되어 있었다. 이와 같은 현상으로 보아 기내배양을 통한 무병주 생산 및 공급의 필요성이 증대되고 있다. Altmayer (1989), Barba 등 (1989)과 Iri 등 (1982)에 의해서 무병주 생산이 시도되었는데 경정배양을 통해서 무병주의 획득률이 54.5%에서 100%에 이른다고 하였으며, 열처리 방법 또는 화학처리 방법 등, 이들을 혼용한 방법을 이용하게 되면 100% virus를 제거시킬 수 있다고 하였다. 본 실험의 결과 경정배양을 이용했을 때 GLRV III의 경우 62.5%에서 100%까지 virus 제거가 가능하였으며 품종에 따라 배양의 효율성에 차이가 있었다. 이들 결과로 보아 경정배양 또는 몇 가지 방법을 병행함으로써 100% 무병주 생산에 근접할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 타 연구자와 마찬가지로 본 연구에서도 100% virus 제거가 가능한 품종도 있으나 품종에 따른 난이도 차이가 심하여 기존방법에 의해서는 제거가 어려운 품종도 있기 때문에 금후 virus 내성 품종의 육성 또는 기내배양을 통한 무병주 생산체계가 연구되어야 할 것으로 판단된다.

적 요

포도의 기내 삽목방법을 이용하였을 때 액아의 신장에 미치는 성장조절제의 영향과 이들 유묘의 virus 이병 정도에 대해 검정한 결과를 요약하면 다음과 같다. 3/4 MS 기본배지에 BA 0.1 또는 0.5 mg/L와 NAA 0.05 mg/L를 혼용한 것이 액아로부터 신초의 신장에 적합하였다. 기외이식용 상토는 ver-

miculite와 peat moss를 3:1 등량용적 비율로 혼합한 경우 활착률이 가장 높았다. 포장에서 재배되고 있던 'Schuyler' 외 2 품종을 ELISA 검정한 결과 3품종 모두 GLRV I, GFLV, ArMV에는 음성반응을 나타내었으나 GLRV III에는 감염되어 있었으며, 이병률은 30~75%로 품종 간 차이가 현저하였다. 경정배양에서 얻은 유묘의 virus 검정 결과, GLRV I, GFLV, ArMV는 3품종 모두 음성반응을 나타내었으나 'Schuyler'와 'Muscat of Alexandria'는 GLRV III에 양성반응을 나타내어 이병률은 각각 37.5%와 12.5%였다.

인용문헌

- Altmayer B (1989) Elimination of different nepoviruses and grapevine leafroll by *in vitro* apical culture of grapevines. ICVG 159-163
- Barba M, Cupidi A, Faggioli F (1989) *In vitro* culture of grapevine infected by clustervirus type III. Phytopathology 126:225-230
- Engelbrecht DJ, Human R (1989) Absence of grapevine virus a correlated with elimination of leafroll disease. ICVG 159-163
- Hu JS, Gonsalves D, Boscia D, Maixner M, Golino D (1991) Comparison of rapid detection assays for grapevine leaf roll disease associated closteroviruses. Vitis 30:167-175
- Imata Z, Seizawa SK (1984) ELISA test. Indexing of Grapevine fanleaf virus. Bull Fruit Tree Res Stn E 5:71-76
- Iri M, Shimura T, Togawa H, Ueno K (1982) Elimination of grapevine leafroll virus by heat treatment and meristem tip culture. Ann Phytopath Soc Jap 48:685-687
- Monette PL, James D, Godkin SE (1989) Comparison of RNA extracts from *in vitro* shoot tip cultures of leafroll-affected and leafroll-free grapevine cultivars. Vitis 28:229-235
- Rowhaxi A, Walker MA, Rokni S (1992) Sampling strategies for the detection of grapevine fanleaf virus and the grapevine strain of tomato ringspot virus. Vitis 31:35-44
- Sadamatsu MO (1987) Virus-free from shoot culture of grape. Plant protection. 41(6):418-422
- Sadamatsu MO (1989) Production of virus-free stock of grape 'Goho'. BioHorti 1:109-113
- Sasahara H, Tada K, Iri M, Takezawa T, Tazaki M (1981) Regeneration of plantlets by meristem tip culture for virus free grapevine. J Jap Soc Hort Sci 50(2):169-175
- Suh JH, Chung JD, Kwon OC (2001) Effect of plant growth regulators on multiple shoot formation and elongation from shoot tip cultures of grape species. Kor J Plant Tiss Cult 28(1):25-32
- Tanaka H (1985) Rapid indexing of grapevine corky bark by greenwood grafting. Bull Fruit Tree Res Stn A. 12:125-132