

‘자랑’ 포도 생장점 배양으로부터 무병주 식물 대량번식에 미치는 배지 구성물질과 생장 조절제의 영향

이재웅, 이윤상, 홍의연, 이석호, 김홍식¹, 김학현^{2*}

충북농업기술원 포도연구소, ¹충북대학교, ²우송정보대학

Effect of Medium Composition and Growth Regulators on Mass Propagation of Virus-Free Plant from the Meristem Cultures of ‘Jarang’ Grape

Jae Wung Lee, Yun Sang Lee, Eui Yon Hong, Seok Ho Lee, Hong Sik Kim¹ and Hag Hyun Kim^{2*}

Grape Research Institute, Chungcheongbuk-do Agricultural Research & Extension Services, Okcheon-gun 373-881, Korea

¹Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

²Woosong Information Collage, Daejeon 300-715, Korea

Abstract - This study was performed to clarify the effect of medium compositions and plant growth regulators on the shoot, root formation and growth of ‘Jarang’ grape for mass propagation of virus-free plant. The formation and growth of shoot were considerably favorable in half-concentration of MS medium. However, the formation of adventitious root per explants (avg. 2.1) was effective in higher concentration (two times) of MS medium. For sucrose concentration, 1% for the shoot formation, 3% for the adventitious root formation and 1% for the growth were observed as yield significant results. With the addition of 0.05% of activated carbon, the shoot growth was improved, and it was effective for the adventitious root formation and growth as well. A pH of 6.8 in the medium was the most suitable for mass propagation; the results showed significant enhancement in the number of nodes and the length of the shoot, 3.9 and 1.3 cm, respectively. The shoot growth was the most vigorous in BA 1.0 mg/L due to the impact of the growth regulator on the mass propagation in it. Consequently, 16.9 shoots per explant were formed in NAA 1.0 mg/L so good results were obtained.

Key words - Grape, Jarang, Mass propagation, Plant growth regulators, Virus-free plant

서 언

포도는 삼목이나 접목으로 번식하는데, 장기간 영양번식을 시키면 병원균에 의한 오염으로 생육이 불량해져 수량이 감소하고 품질이 저하된다. 특히 virus에 감염될 경우 수량은 30%, 당도는 5~6 °Bx 저하되고, 산도가 높아지며, 착색이 불량하게 된다. 따라서 건전주를 재배하여 수량성과 품질을 높일 필요가 있다(Krul and Worley, 1997; Li and Eaton, 1894; Sadamatsu, 1987; Yu, 1986). 포도에는 leaf roll virus, fan leaf virus 등 10여종의 대표적인virus병이 있으며 포도나무는 열처리법과 경정배양법(Engelbrecht and Human,

1989) 또는 경정배양과 캘러스 배양에 의한 무병주 생산이 가능하다. 국내에서는 유묘의 증식을 위한 경정배양에 적합한 배지조성(Choi *et al.*, 1988; Choi *et al.*, 1992)과 미숙배주 배양을 통한 체세포배 발생에 대한 연구(Park *et al.*, 1993)가 수행되었으나, 무병주의 대량생산에 관한 연구는 아직 부족한 실정이다.

일반적으로 조직배양 시 생장조절제는 초기배양, 증식, 신초의 생장, 발근 등 배양 단계별로 종류와 농도(Sadamatsu, 1987)가 다른데, 신초 형성에는 고농도의 cytokinin과 저농도의 auxin이 필요하고, 발근에는 저농도의 cytokinin과 고농도의 auxin이 사용되어 왔으며(George and Sherrington, 1984), 포도에서도 신초 유도과 증식에는 고농

*교신저자(E-mail) : hkyushu@hanmail.net

도의 cytokinin과 저농도의 auxin이 필요하다(Chee and Pool, 1983; Jona and Webb, 1978). ‘캠벨얼리’와 ‘까베르네 쇼비농’은 BA 3 mg/L의 단용 처리구에서 신초가 많이 발생되었으나, ‘거봉’은 BA 농도가 낮을수록 신초의 발생이 많았다(Kim and Kim, 2002). Hwang 등(1990)은 포도 ‘리자마트’ 품종의 기내 증식에서 BA의 농도가 0.5~1.0 mg/L일 때 효과적이거나, BA 단용 처리보다는 소량의 auxin을 혼용 처리하는 것이 신초 증식에 효과적이었다고 하였다. 이와 같이 생장조절제의 첨가는 포도 품종의 종류에 따라 차이를 보이며, 재분화율, 증식 정도, 배양 효율에서도 상당히 차이가 있다.

따라서 본 연구는 바이러스 무병묘의 대량 증식을 위한 기초 자료를 얻기 위해서 포도 ‘자랑’ 품종의 신초와 뿌리의 형성 및 생장에 미치는 배지조성 물질과 생장조절제의 영향을 구명하고자 수행되었다.

재료 및 방법

시험재료

시험재료는 충북농업기술원 포도연구소 조직배양실에서 생장점 배양에서 재생된 ‘자랑’ 품종의 신초를 1 cm 길이로 잘라 배지에 치상하였다.

배양조건

시험재료의 배양은 직경 9 cm의 petri-dish에 반복당 6절편으로 하였으며 완전임의 배치법 3반복으로 비교 분석하였다. MS배지(Murashige and Skoog, 1962) 구성물질의 적정 농도 실험(3% sucrose 첨가), sucrose 실험을 제외한 모든 실험은 3% sucrose를 첨가하고 pH 5.8로 조절한 후 0.8% agar를 첨가한 MS배지를 기본으로 하여 배양하였다.

처리내용

‘자랑’ 품종의 신초 성장 및 발근에 적합한 배지를 선별하기 위하여 MS배지 구성물질의 적정 농도(2MS, MS, 1/2MS, 1/4MS배지), sucrose의 농도(1, 3, 5, 7%), 활성탄의 농도(0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5%), pH(3.8, 4.8, 5.8, 6.8, 7.8), cytokinin류인 BA(0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg/L)와 auxin류인 NAA(0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg/L)으로 각각 혼합 처리하여 조사하였다.

조사내용 및 방법

모든 실험의 배양조건은 25±1°C, 40 μmol/m²/s의 광으로 16시간 조명하였고, 생장점 배양으로부터 얻은 신초의 절편을 직경 9 cm의 petri-dish에 각각 6개씩 치상하여 완전임의 배치 3반복으로 수행하였으며 4주간 배양한 후 신초 및 부정근의 수와 길이 등을 조사하였다.

결과 및 고찰

배지 종류의 영향

자랑 포도의 기내 배양시 MS 배지의 무기염의 농도를 달리하여 배양한 신초의 마디수는 1/2MS배지에서 많았으며, 신초의 길이도 0.7 cm로 가장 길었다(Fig. 1). 고농도인 2MS배지에서는 신초의 마디수가 적어지고 신장이 억제되었으나 부정근은 무기염의 농도가 높아짐에 따라 많아져

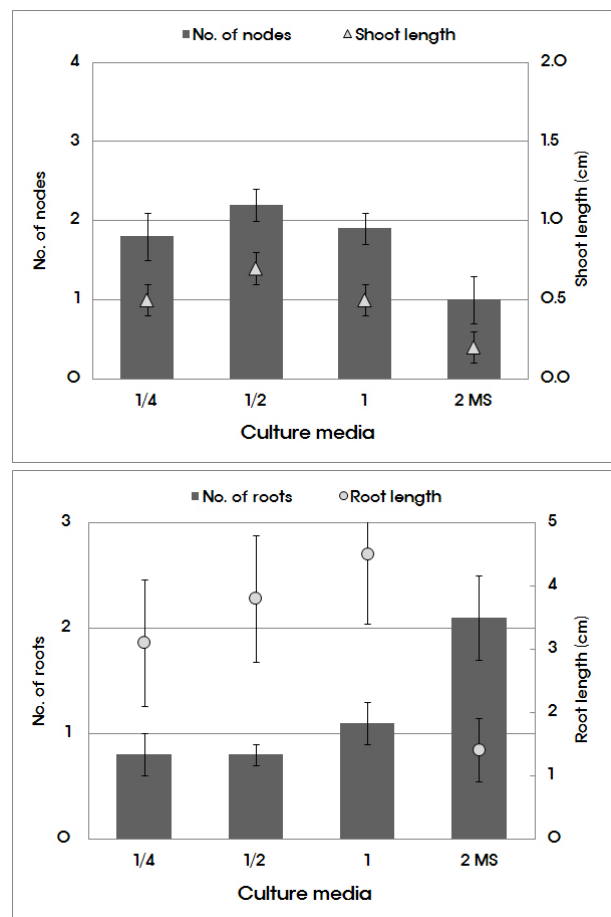


Fig. 1. Effect of culture media on virus-free plant from the meristem culture of ‘Jarang’ grape after 4 weeks.

2MS배지에서 2.1개로 가장 많이 형성되었다. 부정근의 생장은 1MS배지에서 가장 좋았으며, 2MS배지에서는 부정근의 생장이 빈약하였다. 이는 ‘Himrod Seedless’에서 MS배지의 무기염 농도를 3/4으로 감량한 배지나 1/2MS배지에서, 그리고 ‘S9110’은 1/2MS배지에서 지상부의 생육이 양호하다(Choi *et al.*, 1992; Suh *et al.*, 2001)는 보고와 유사하였다. ‘거봉’의 신초 재생도 1/2MS배지가 가장 적합하며, 배지의 무기염소 중 질소의 농도를 감소하는 것이 반드시 필요하고, 이외에 칼륨과 인의 감소도 효과적이며(Kwon *et al.*, 2000), 기타 포도 품종에서도 1/2MS배지를 사용하는 것이 좋았다고 하였다(Stamp *et al.*, 1990; Tang and Mullins, 1990). 또한 과수류 조직배양의 기본배지는 주로 MS배지이나, MS배지의 무기염 농도는 공시재료에 따라 차이가 있었으며, 전량 또는 1/2로 감량한 배지(Fukui *et al.*, 1990)가 주로 사용되었다. 이러한 결과로 보아 자랑의 신초 형성에 적합한 배지는 무기물의 함량을 어느 정도 감량하여 이용하는 것이 좋은 것으로 나타났으나, 부정근의 형성에는 신초 형성과 달리 2MS배지에서 좋았기 때문에 배양목적에 따라서 배지의 선택이 달라져야 할 것으로 판단되었다.

Sucrose 농도의 영향

배지의 탄소원인 sucrose의 농도를 1, 3, 5 및 7%의 농도로 첨가해서 배양한 결과 신초의 마디수는 sucrose의 농도가 낮아질수록 증가하는 경향이었고 생장도 좋았다(Fig. 2). 저농도인 1% Sucrose에서 마디수가 절편체당 2.4개로 고농도인 7%에 비해 약 2배 이상 많이 형성되었다. 부정근의 형성과 생장은 농도에 따른 일정한 경향은 없었으나 농도가 높아질수록 억제되었으며 부정근 형성은 3%에서, 생장은 1% 농도에서 각각 가장 양호하였다. 본 실험의 결과는 고구마 절간배양에 있어 sucrose의 농도가 3%이하로 낮아질수록 뿌리수가 감소하며(Jarret and Gawel, 1991), 카네이션과 토마토의 기내 소식물체의 생장에 있어서 sucrose 함량이 낮으면 생장이 억제된다는(Schnapp and Preece, 1986) 보고와 상이하였다. 사과 MM 대목의 경우 부정근의 생장은 sucrose 농도와 관계가 있으며(Snir and Erez, 1980) 조직배양 시 sucrose가 발근에 필수적인 요소라고 하였다(Gautheret, 1969). 본 실험에 이용된 ‘자랑’에서도 고농도의 sucrose는 식물체의 신장이나 뿌리의 형성을 억제시키는 것으로 나타났다.

활성탄의 영향

활성탄의 첨가에 따른 신초와 뿌리의 형성과 생장은 대조구(활성탄 무첨가구)에서 신초의 마디수가 2.0개, 길이가 0.6 cm인데 비하여 활성탄을 0.05% 첨가하였을 때는 신초의 마디수가 3.3개로 증가하였으며, 신초의 길이도 1.0 cm로 더 길었다(Fig. 3). 부정근의 형성 및 신장에 활성탄의 첨가가 효과적으로, 0.05% 활성탄을 첨가하였을 때는 부정근이 7.8개 형성되고 길이도 8.9 cm로 가장 좋았으나 그 이상으로 활성탄을 첨가하면 오히려 생장이 감소하였다(Fig. 4). 일반적으로 활성탄은 배양절편으로부터 유출되는 독성물질을 흡수하고, 배양액의 갈변화를 방지하여 생존율을 높이며 배형성이나 뿌리의 발생을 촉진시킨다(George and Sherrington, 1984). 또한 Lee 등(1984)은 한란의 rhizome 배양 시 배지에 활성탄을 첨가하면 분지수와 생장이 증가되고, 배지의 산화를 방지하여 신초 분화가 촉진시킨다고 하였다. 본 연구의 결과에서도 0.05% 활성탄 첨가가 신초 및

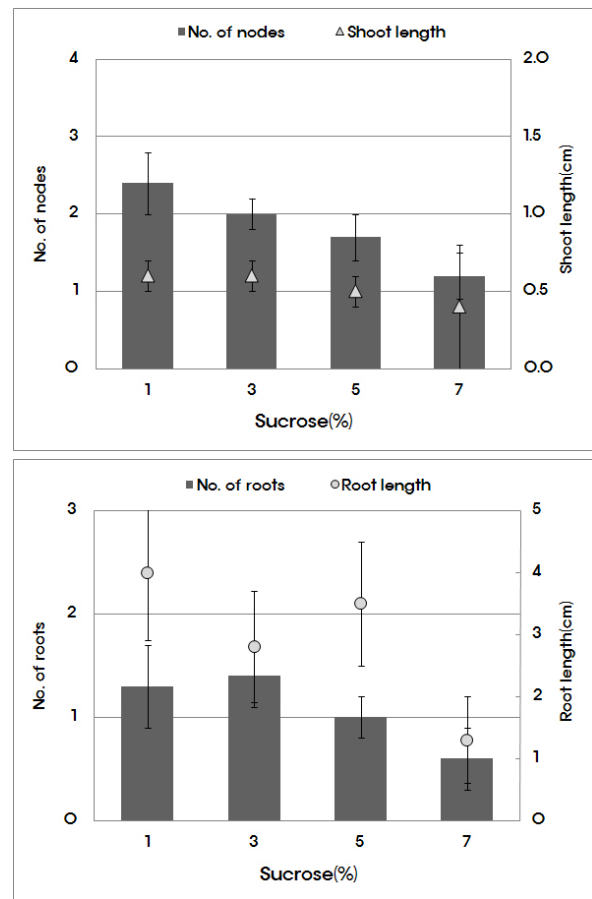


Fig. 2. Effect of sucrose on virus-free plant from the meristem culture of ‘Jarang’ grape after 4 weeks.

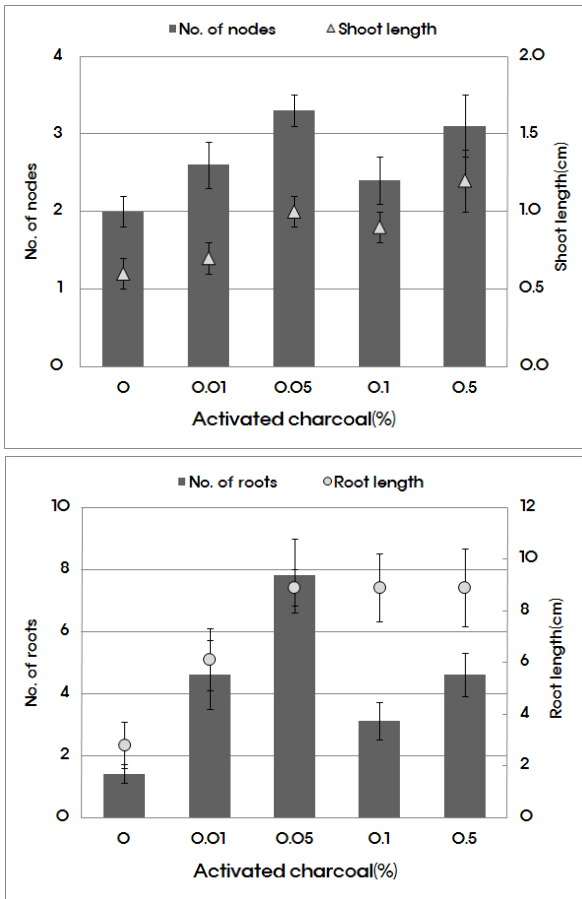


Fig. 3. Effect of activated charcoal on virus-free plant from the meristem culture of 'Jarang' grape after 4 weeks.

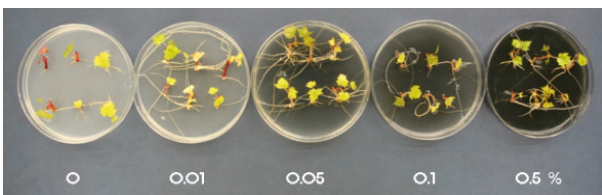


Fig. 4. Cultural response from virus-free plant from the meristem culture of 'Jarang' grape on MS medium supplemented with different concentrations of activated charcoal concentration after 4 weeks.

부정근의 형성 및 생장에 효과적인 것으로 나타나 '자랑'의 기내 대량증식을 위한 배지의 구성물질로써 이용이 가능할 것으로 판단되었다.

pH의 영향

pH의 차이에 따른 신초의 마디수는 pH 6.8까지 pH가 높

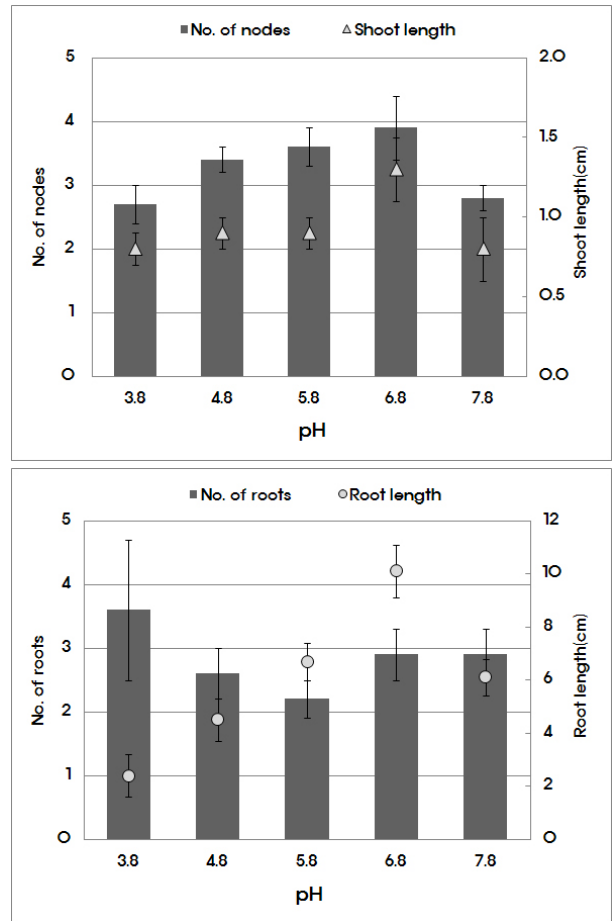


Fig. 5. Effect of pH on virus-free plant from the meristem culture of 'Jarang' grape after 4 weeks.

아짐에 따라 증가하였으나 pH 7.8에서는 감소하였다(Fig. 5). pH 3.8에서 신초의 마디수는 2.7개, 신초의 길이는 0.8 cm인데 비하여 pH 6.8에서는 신초의 마디수와 길이가 각각 3.9개와 1.3 cm로 증가하였다. 부정근의 발생은 pH가 낮은 수준에서 많았으나 부정근의 신장은 높은 수준의 pH에서 왕성하였다. 식물조직배양 시 일반적인 배지의 pH 범위는 5.5~5.8이며, 포도의 조직배양에 있어서도 알맞은 pH는 5.7~6.0으로 알려져 있다(Choi *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2002; Kwon *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 2001). 또한 식물재료에 따라 배양에 적합한 pH 범위는 다양하여, rhododendron의 신초 증식에는 pH 4.5 (Anderson, 1975)가 적합하며 독말풀 모상근의 성장률에는 pH 6.3 (Yang *et al.*, 1997)에서 증가되었다고 보고하였다. 이 같은 결과들로 볼 때 배지의 적정 pH는 각 식물체간에 많은 차이가 있으며 '자랑'의 적정 pH의 범위는 5.8~6.8로 판단된다.

생장조절물질 농도의 영향

MS 기본배지에 BA와 NAA를 각각 0.1~5.0 mg/L 첨가하여 기관분화에 미치는 영향을 볼 때 신초의 형성은 BA 0.5 mg/L 첨가에서 1.1개로 대조구의 0.9개에 비하여 다소 많았으나, 신초의 생장은 처리간에 차이가 없었다(Fig. 6). Lee 등(1989)도 BA를 첨가한 경우, 'Armon', 'Cabernet sauvignon', 'S9110', 'Aligote' 품종의 신초 생장이 양호하다고 하였다.

이는 BA 1.0 mg/L 농도에서 가장 왕성한 신초의 생장을 보인 본 실험의 결과와 유사하였다. 고농도의 BA는 신초의 생장에 좋지 않다(Goussard, 1981; Pool and Powell, 1975)고 하였으나 '자랑'의 경우 고농도 첨가구에서 약간의 생장억제는 있었으나, 저농도에 비해 그 정도는 그다지 크지 않았다. 부정근의 형성 및 생장은 BA 0.1 mg/L 첨가에서 다소 이루어졌으나, 1.0 mg/L 농도 이상에서는 발근이 되지 않았다. NAA 첨가에 따른 신초 형성수는 대조구가 0.9개인데 비하여 NAA 0.5 mg/L 이상에서는 0.1개 이하로 크게 감소하

였으며, 생장도 저조하였다(Fig. 7). 부정근의 형성은 농도에 관계없이 모든 NAA 첨가에서 양호하여 NAA 0.5 mg/L와 1.0 mg/L 첨가에서 절편체당 부정근이 16개 이상 형성되었다. 부정근의 생장은 NAA 농도가 낮을수록 양호하여 NAA 0.1 mg/L 첨가에서 가장 왕성하게 성장하였다. Chee and Pool (1987)은 포도의 생장점 배양 시 NAA 1.0 mg/L 첨가에서 발근이 양호하다고 하였다. 'Crabapple'(Singha, 1982)과 복숭아 기내증식(Miller *et al.*, 1982)에서도 NAA를 첨가하면 발근이 크게 향상되었다. 본 실험의 결과도 기 연구와 일치하여 '자랑'의 신초 형성과 생장은 NAA에 의하여 억제되지만, 부정근의 형성과 생장은 NAA에 의하여 촉진되어 부정근 형성에는 NAA가 적합한 생장조절제로 판단된다.

이와 같이 생장조절제의 첨가는 배양식물의 종류에 따라 차이를 보이며, 재분화율, 증식정도, 배양효율에서도 상당히 차이가 있으므로 본 실험의 결과로 보아 '자랑'의 기내

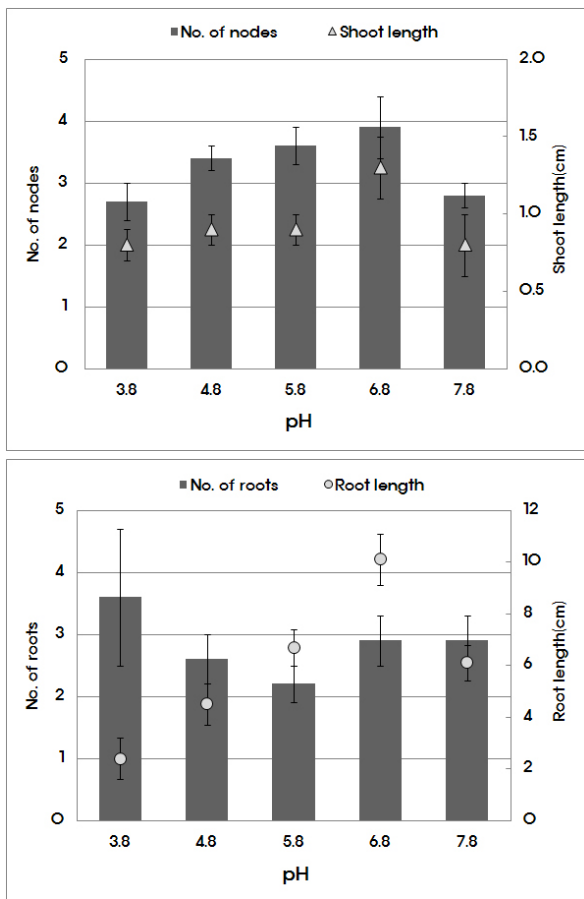


Fig. 6. Effect of BA on virus-free plant from the meristem culture of 'Jarang' grape after 4 weeks.

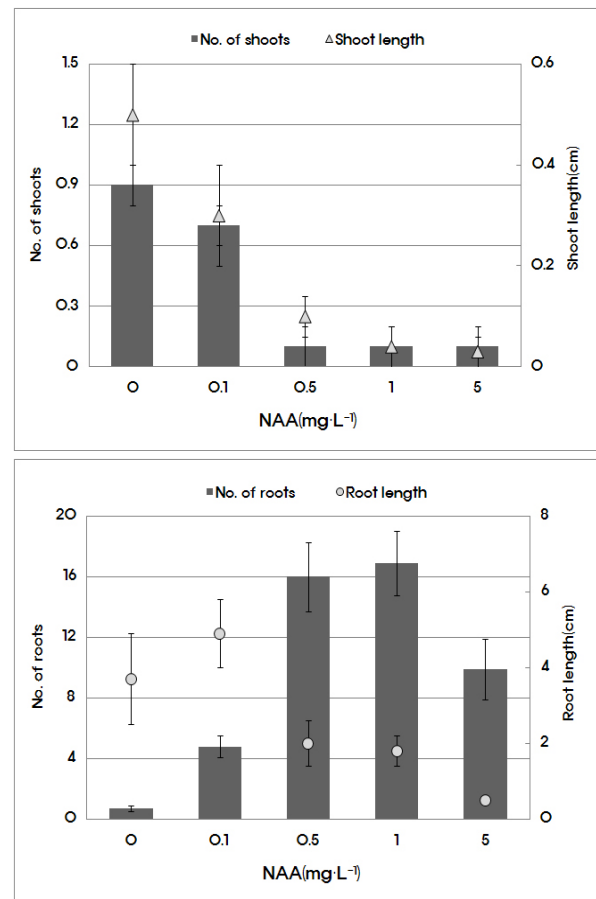


Fig. 7. Effect of NAA on virus-free plant from the meristem culture of 'Jarang' grape after 4 weeks.

배양을 이용한 대량번식을 위해서는 1/2MS를 기본배지로 하고, 배지에 첨가되는 성장조절제의 종류와 농도는 배양 목적에 따라서 다르게 조성되어야 할 것으로 판단되었다.

적 요

본 연구는 바이러스 무병묘의 대량 증식을 위한 기초 자료를 얻고자 포도 ‘자랑’ 품종의 신초와 뿌리의 형성 및 생장에 미치는 배지조성물질과 성장조절제의 영향을 구명하고자 수행되었다. 배지의 무기염 농도가 낮을수록 신초의 형성은 많아지는 경향으로, 특히 1/2MS배지에서 신초의 형성 및 생장이 가장 양호하였다. 부정근의 형성은 무기염의 농도가 높아질수록 양호하여 2MS배지에서 부정근의 수가 2.1개로 가장 많았다. Sucrose의 경우, 신초의 형성은 1%, 부정근의 형성은 3%, 생장은 1% 농도구에서 가장 좋았다. 활성탄의 0.05% 첨가에 의해 신초의 생장은 양호했으며, 특히, 부정근의 형성 및 생장에 효과적이었다. ‘자랑’의 대량 증식을 위한 배지의 pH는 6.8이 가장 적합하여 신초의 마디 수와 길이가 각각 3.9개와 1.3 cm로 가장 좋았다. 기내 대량 증식에 미치는 성장조절제의 영향으로 BA 1.0 mg/L에서 신초의 생장이 가장 왕성하였으며, NAA 1.0 mg/L에서 절편체당 16.9개의 신초가 형성되어 양호한 결과를 얻었다.

인용문헌

Anderson, W.C. 1975. Production of rhododendrons by tissue culture. I. Development of a culture medium for multiplication of shoots. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 25:129-135.

Chee, R. and R.M. Pool. 1983. *In vitro* propagation of *Vitis* : Application of genotypes. *Vitis* 22:363-374.

Chee, R. and R.M. Pool. 1987. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro*. *Sci. Horticult.* 16:17-27.

Choi, I.M., M.I. Hyung and S.B. Kim. 1992. Effects of medium compositions and on shoot multiplication and rooting in shoot tip cultures of ‘Kyoho’ and ‘Campbell Early’ grapes. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 19:59-66.

Choi, S.Y., J.Y. Oh, J.S. Kim, D.M. Park, J.H. Lim, S.B. Lee, D.Y. Choi, G.H. Kim and Y.H. Kim. 1988. Studies on the meristem culture in grapevine (*Vitis*). *J. Kor. Soc. Hort. Abstracts* 6:164-165.

Engelbrecht, D.J. and R. Human. 1989. Absence of grapevine

virus a correlated with elimination of leafroll disease. *ICVG*: 159-163.

Fukui, H., K. Nishimoto and M. Nakamura. 1990. Varietal differences in shoot tip culture of Japanese persimmon (*Diospyros Kaki* Thunb.). *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 59:51-57.

Gautheret, R.J. 1969. Investigations on the root formation in the tissue of *Helianthus tuberosus* cultured *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 56:702-717.

George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. British Library, London, UK. pp. 284-307.

Goussard, P.G. 1981. Effects of cytokinins on elongation, proliferation and total mass of shoots derived from shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. *Vitis* 20:228-234.

Hwang, J.H. and S.K. Kim. 1990. Effect of plant growth regulators on *in vitro* growth of differentially chilled grape shoots. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 31:142-149.

Jarret, R.L. and N. Gawel. 1991. Chemical and environmental growth regulation of sweet potato (*Ipomoea batatas*(L.) Lam.) *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 25:153-159.

Jona, R. and Webb, K.J. 1978. Callus and axillary bud culture of *Vitis vinifera*, ‘Sylvaner Riesling’. *Hort. Sci.* 9:55-60.

Kim, S.H. and S.K. Kim. 2002. Effect of cytokinins on *in vitro* growth of grapes (*Vitis* spp.). *Korean J. Plant Biotechnology* 29:123-127.

Krul, W.R. and K.F. Worley. 1997. Formation of adventitious embryos in callus cultures of ‘Seyval’ a French grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102:360-363.

Kwon, Y.J., C.H. Lee and N.I. Hyung. 2000. Effects of medium composition and culture condition on plant regeneration via organogenesis of ‘Kyoho’ Grape. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 41:276-280.

Lee, H.J., J.S. Lee and S.K. Kim. 1989. Effect of BA and strength of media on *in vitro* growth of grapes. *Res. Rep. Agr. Sci., Chungbuk Nat’l Univ.* 7:17-26.

Lee, J.S., B.H. Kwack, B.K. Lee and J.D. Chung. 1984. Studies on *Cymbidium Kanran* native to Korea. I. On rhizome culture *in vitro*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 25:129-135.

Li J.R. and G.W. Eaton. 1894. Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro*. *Hort. Sci.* 19:64-66.

Miller, G.A., D.C. Coston, E.G. Denny and M.E. Romeo. 1982. *In vitro* propagation of ‘Nemagard’ peach rootstock. *Hort. Sci.* 17:194.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-479

- Park, H.B., E.G. Choi and B.M. Park. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature ovule of *Vitis flexuosa* Thunberg. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 20:109-112.
- Pool, R.M. and L.E. Powell. 1975. The influence of cytokinins in vitro shoot development of ‘Concord’ grape. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100:200-202.
- Sadamatsu, M.O. 1987. Virus free stock production by shoot-tip culture of grape. Plant Production 41:418-422
- Schnapp, S.R. and J.E. Preece. 1986. *In vitro* growth retardation of tomato and carnation microplants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 6:3-8.
- Singha, Suman. 1982. *In vitro* propagation of crabapple cultivars. Hort. Sci. 17:191-192.
- Snir, I. and A. Erez. 1980. *In vitro* propagation of malling merton apple root stocks. Hort. Sci. 15:597-598.
- Stamp, J.A., S.M. Colby and C.P. Meredith. 1990. Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis sp.*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 22:127-133.
- Suh, J.H., J.D. Chung and O.C. Kwon. 2001. Effect of plant growth regulators on multiple shoot formation and elongation from shoot tip cultures of grape species. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 28:25-32.
- Tang, F.A. and M.G. Mullins. 1990. Adventitious bud formation in leaf explants of some grapevine rootstock and scion cultivars. Vitis 29:151-158.
- Yang, D.C., H.M. Kang, K.S. Lee, Y.H. Kim and D.C. Yang. 1997. Effects of pH, sucrose and vitamins on the growth and tropine alkaloid production of hairy roots of *Datura stramonium* var. *tatula* Torr. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 24:143-148.
- Yu D.H. and Carole P. Meredith. 1986. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111: 972-975.

(Received 8 January 2013 ; Revised 10 April 2013 ; Accepted 22 April 2013)