식물생명공학회지 제29권 제2호
Korean J. Plant Biotechnology
Vol. 29, No. 2, 105~110 (2002)

주야 온도차 (DIF)와 시토키닌이 '캠벨얼리' 포도의 기내생장에 미치는 영향

김승희 · 김선규*
청주시 흥덕구 개신동 산48 충북대학교 원예학과

Effect of DIF and Cytokinins on *In Vitro* Growth of 'Campbell Early' Grapes (*Vitis* spp.)

KIM, Seung Heui · KIM, Seon-Kyu*
Dept. of Horticulture, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea

ABSTRACT Effects of difference between day and night temperatures (DIF) and cytokinins on *in vitro* growth of 'Campbell Early' grape plantlets were investigated. Shoot growth was suppressed by -7DIF (18/25℃). Effects of BA and TDZ were not affected by DIF. 0DIF (25/25℃) enhanced the growth with increasing cytokinin level. Kinetin at 10 μM was the most effective for shoot growth with 87 mm among cytokinins used except for control. Zeatin and kinetin each at 5 μM significantly increased shoot growth to respective 162 and 110 mm. In 0DIF, two-fold increase of 162 mm was obtained by 5 μM zeatin. In control, no further shoot proliferation was observed regardless of DIF. In 0 and +7DIF (25/18℃), 4 shoots were observed with 10 μM BA. Zeatin, 2iP and kinetin resulted in poor shoot proliferation while BA at 10 μM resulted in profuse branching in all DIFs.

Key words: BA, branching, kinetin, shoot growth, shoot proliferation, zeatin

서 론

포도는 세계에서 가장 중요한 온대과수로 2000년 현재 생산량은 6,400만 M/T이다 (FAO, 2001). 우리나라에서도 소득작목으로 각광을 받으면서 전국적으로 재배면적과 생산량이 급증하는 추세를 보여, 재배 면적은 1996년 27,196 ha에서 1999년 30,537 ha로 증가했으나, 그 후 조금 감소하여 2001년 현재 26,803 ha인데, 이는 전체 과수 재배면적 166,912 ha의 16.1%이다 (MAF, 2002).

포도는 주로 삽목이나 접목, 취목 등 영양번식을 하는 영년생 과수로서 (Hartmann et al. 2001), 현재 재배되고 있는 주요 품종들은 거의 대부분 virus에 감염되어 있는 것으로 알려져 있어 (Chee and Pool 1987) 묘목을 생산할 때 virus 이병이 가장 큰 문제로 대두되고 있다. 따라서 현재 virus 무독묘를 생산하기 위한 기내배양이 널리 행해지고 있다 (Krul and Worley 1997; Li and Eaton 1984).

포도의 기내 생장에 미치는 생장조절제의 조합 및 농도별 효과 등에 관한 연구도 많이 수행되었는데, Goussard (1982)는 zeatin과 BA의 단용 및 혼용처리가 신초의 생장에 미치는 영향을 조사하였다. Lee와 Wetzstein (1990)은 muscadine 포도의 액아 기내 배양시 BA와 IBA가 신초증식과 발근에 미치는 영향을 구명하였고, Sudarsono와 Goldy (1991)도 눈의 위치에 따른 신초 증식률의 차이를 BA, TDZ, kinetin을 단용 및 혼용처리하여 연구하였다.

절간 신장은 광질 (Appelgren 1991), 광주기 (Erwin et al. 1991; Kozai et al. 1992b; Tutty et al. 1994) 그리고 상대습도 (Kozai et al. 1993)에 의해 억제되고, 주야간온도 조절로 변경시킬 수 있다 (Karlasson et al. 1989; Starrett et al. 1993).

일반적으로 조직 배양시 신초형성에는 고농도의 cytokinin과 저농도의 auxin이 필요하고, 발근에는 저농도의 cytokinin

*Corresponding author Tel 043-261-2527
E-mail kimskyu@cbu.ac.kr

과 고농도의 auxin이 사용되어 왔으며 (George and Sherrington 1984), 포도에서도 신초유도와 증식을 위해서는 고농도의 cytokinin과 저농도의 auxin이 필요하다고 하며 (Chee and Pool 1983) 발근은 cytokinin을 첨가하지 않고 저농도의 auxin으로 쉽게 유도된다고 알려져 있다 (Harris and Stevenson 1979).

본 실험은 구미 잡종인 Campbell Early를 공시하여, DIF에 따른 시토키닌의 종류와 농도가 포도의 기내 생장에 미치는 영향을 구명하여, 포도 기내 대량 생산 체계 확립을 위한 기초 자료를 얻기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

본 실험에 공시된 품종은 구미 잡종인 'Campbell Early'로서, 충북 옥천군 청성면에 있는 옥천포도시험장에서 목화가 완전한 1년생 휴면지를 채취하여, 약 30 cm 길이로 잘라 polyethylene film으로 이중 포장하여 4℃ 냉장고에서 6~8주간 저온처리하여 휴면을 타파시킨 후, 7 cm 길이의 1아삽으로 조제한 다음 수삽하였다. 6주 후 신초의 길이가 1~15 cm 자랐을 때, 신초 선단을 1~2 cm로 잘라 Tween 20 3~4방울을 첨가한 1% sodium hypochlorite 용액에 넣어 12분간 진공 살균한 후, clean bench 안에서 멸균수로 4~5회 세척한 다음, 0.7 cm 길이로 잘라 1/2MS 기본 배지에 치상하고 6주를 주기로 계대배양하여 시료를 확보하였다.

포도의 기내 생장에 끼치는 DIF의 영향을 알아보기 위해 사용한 기내에서의 실험에서는 BA, Thidiazuron, zeatin, 2iP, kinetin을 각각 5, 10 μM 첨가한 MS 기본배지에 sucrose 3% 및 agar 0.8%를 첨가하고, pH를 5.8로 조절하여 지름 9 cm 플라스틱 petri dish에 분주하여 3개씩 접종하였다. Metalhalide lamp와 형광등 210 μmol · m^{-2} · s^{-1}의 광양자속 밀도, 70±5% 상대습도, 16시간의 광주기로 조절한 생육상을 이용하여, 주야간 온도를 25/18℃ (+7DIF), 25/25℃ (0DIF), 18/25℃ (−7DIF)로 설정하였다.

배양 4주 후 생장, 분지수, 총절편체수, 절간수, 생체중을 각각 조사하였으며, 모든 실험은 완전임의배치법 3반복으로 시행하였다.

결과 및 고찰

신초 생장

DIF 처리와 시토키닌의 종류와 농도 처리가 포도 기내배양 절편체의 생장에 미친 영향은 Figure 1과 같다. −7DIF의 zeatin 5 μM 처리는 117 mm의 생장으로 20 mm의 생장을 보인 대조구보다 신장은 월등하였지만 전반적인 수세는 부실하였다. +7DIF에서는 kinetin 5 μM 처리가 115 mm로 60 mm의 생장을 보인 대조구보다 좋은 효과를 보였다. BA와 TDZ는 생장이 좋지 않았으며 DIF처리와 상관없이 zeatin, 2iP, kinetin은 저농도에서보다 고농도 처리에서 좋은 생장을 나타냈다. 0DIF에서는 zeatin 5 μM 처리가 162 mm로 대조구보다 약 2배 가량 좋은 생장을 보였고, −7DIF에서는 대조구가 생장이 낮은 것이 특징이었다. 0 및 +7DIF는 전반적으로 생장이 좋았고, −7DIF처리는 생육이 억제되는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 Kozai 등 (1992b; 1995)이 기내배양 감자 절편체의 줄기신장에 미친 DIF의 영향과 비슷하였으며, 여러 식물 종의 줄기생장에 미치는 DIF의 영향에 관한 연구 (Erwin et al. 1991; Moe 1991)에서 보고된 DIF의 일반적인 영향, 즉 + DIF에서는 줄기 신장이 증가하고 -DIF에서는 감소하는 결과와 같은 경향을 보였다.

조직 배양시 외부 환경이 절편체의 생장과 발달에 큰 영향을 미치며, 온도와 생장사이에는 내생 GA가 영향을 미치는 것으로 추정되고 있다 (Erwin and Pierson 1992; Zieslin and Tsujita 1988). 주야간 온도차가 초장 신장에 영향을 미친다고 보고된 이래 (Erwin et al. 1989), 피망 (Si and Heins 1996), 고추 (Park et al. 1996), 토마토 (Lim et al. 1997), 오이 (Agrawal et al. 1993), 감자 (Kozai et al. 1992b), 임파치엔스 플러그묘 (Lim et al. 1996), 그리고 살비아 (Lim et al. 1997; Lim et al. 1998; Son and Lee 1998) 등에 있어서도 초장 및 절간 신장에 미치는 DIF의 영향이 보고되었다. 본 실험에서도 위에 보고된

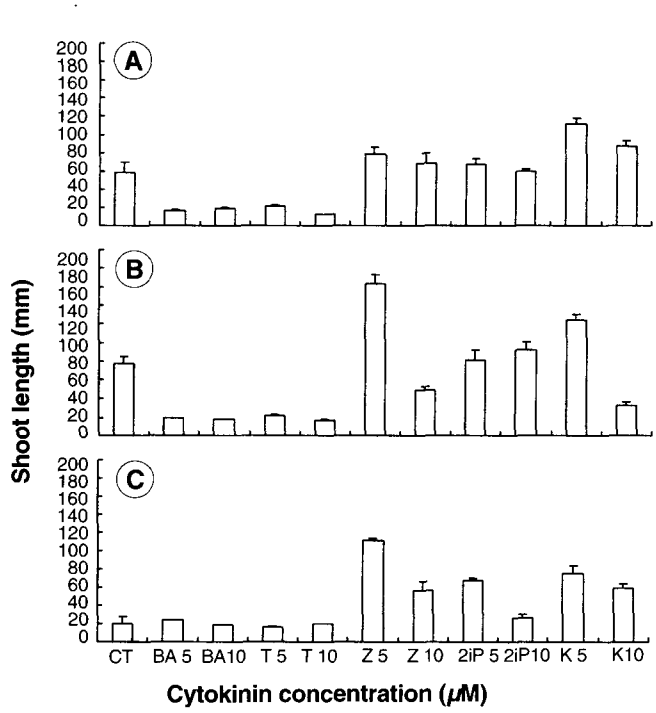

Figure 1. *In vitro* shoot growth of 'Campbell Early' grape explants as affected by cytokinins and DIF (A: +7DIF, B: 0DIF, C: −7DIF) cultured for 4 weeks. CT: control, BA: 6-benzylamino purine, T: thidiazuron, Z: zeatin, K: kinetin.

일반적인 경향과 같이 -DIF보다 +DIF에서 신초 생장이 촉진되었다. 앞으로 식물의 신초 생장에 영향을 미치는 내생 지베렐린의 동향과 작용 메커니즘을 DIF와 연관지워 구명할 필요가 있을 것으로 생각된다.

분지수와 총절편체수

분지수를 보면 (Figure 2) 대조구에서는 분지되지 않았으며, 어떠한 DIF처리에서도 zeatin, 2iP 및 kinetin구에서는 분지되지 않았다. 0DIF처리에서 BA 10 μM구는 분지수가 4개였으며 TDZ 처리도 비슷하게 분지되었다. +7DIF에서는 BA 10 μM과 TDZ 5 μM구에서 약 4개 분지되었고, -7DIF는 BA 10 μM과 TDZ 10 μM에서 분지수가 많았다. 분지는 DIF 처리에 상관없이 시토키닌의 종류에 영향을 받은 것으로 나타났는데, 이는 시토키닌의 분지효과에 관한 많은 보고 (Reisch 1986; Hwang and Kim 1989; Kim et al. 1997; Kim and Kim 1998)와 같은 결과였다.

총절편체수는 모든 DIF 처리에서 BA 10 μM구가 가장 많았다 (Figure 3). 신초생장이 좋았던 대조구 및 zeatin, 2iP, kinetin 구보다 생장은 나빴지만 분지수가 많았던 BA와 TDZ처리구에서 총절편체수가 더 많았고, 0DIF처리가 - 및 +7DIF 처리보다 절편체수가 많은 것으로 나타났다. 신초수는 BA 첨가에 의해 현저히 증가했는데, BA 10 μM 처리에서 가장 좋은 결과를 나타내었다. BA 첨가에 의해 마디 사이가 단축되면서 총생하는 생육상을 나타내었으므로 초장은 오히려 BA 첨가에 의해 억제되는 현상을 나타내었는데, 이러한 현상은 BA 처리에 의한 전형적인 현상으로 생각된다 (Pool and Powel 1975). DIF와 상관없이 모든 zeatin과 kinetin 처리에서 신초 형성 효과는 없었고 오히려 억제적으로 작용하였다. 이와 같이 생장이 월등히 좋고 분지가 되지 않는 처리에서는 총절편체수가 적었고, DIF 처리보다는 시토키닌 병행 처리의 영향이 더 컸다. BA와 TDZ처리에서는 총절편체수도 많았지만 각 분지 개체를 모두 기내묘로 쓸 수 있어 아주 유리한 것으로 판단되었다.

절간 생장

절간 생장 결과는 Figure 4에 나타나 있다. 절간수는 0DIF 처리에서 상당히 증가하였으며, 특히 zeatin 5 μM 처리는 대조구의 약 2배였다. BA 5 μM과 2iP 10 μM 처리도 효과가 좋았지만, -7 DIF 및 +7 DIF 처리의 대조구는 절간수가 0DIF의 절반 정도에 불과하였으며, 모든 시토키닌 처리구에서 0DIF 처리보다 절간수가 적었다.

DIF는 초장과 절간장의 가장 효과적인 조절 수단의 하나로 알려져 있으나, 그 메커니즘은 아직 자세히 밝혀져 있지 않고 (Erwin and Heins 1995), +DIF에 의한 초장 신장이 내생 GA의 작용에 의해 조절될 것이라고 추정하고 있다 (Erwin and

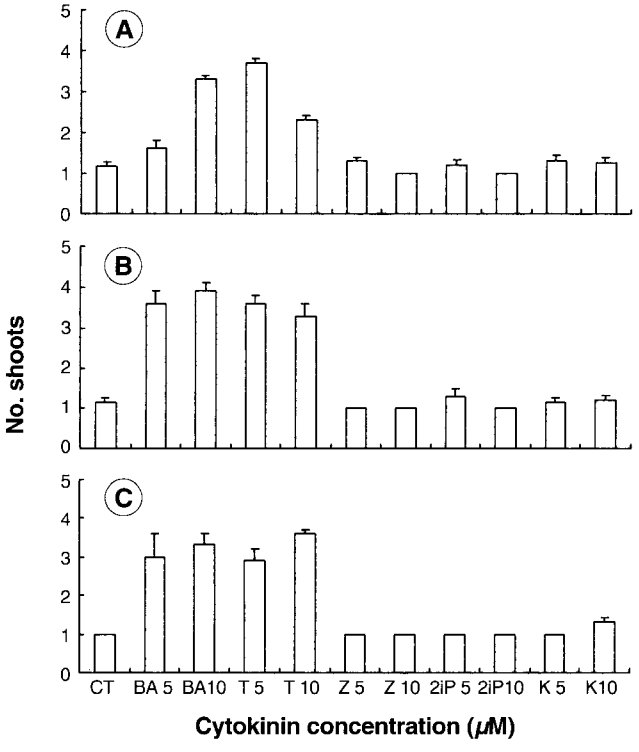

Figure 2. Shoot number of 'Campbell Early' grape explants as affected by cytokinins and DIF (A: +7DIF, B: 0DIF, C: -7DIF) cultured for 4 weeks. CT: control, BA: 6-benzylamino purine, T: thidiazuron, Z: zeatin, K: kinetin.

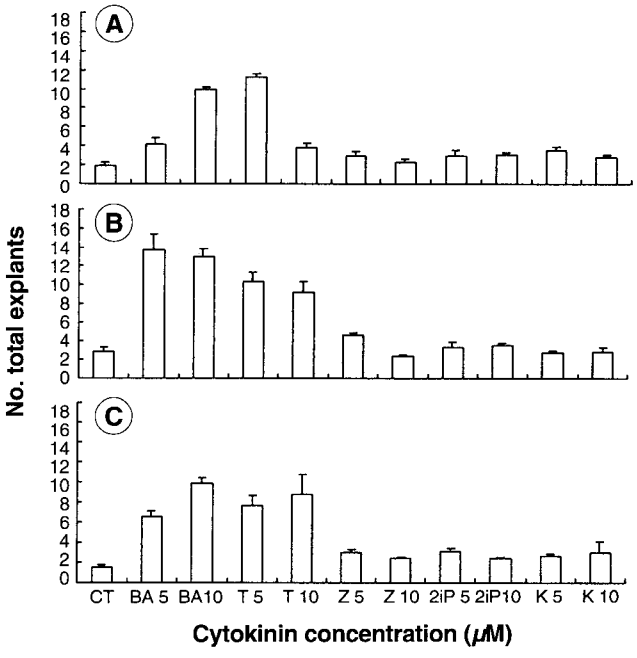

Figure 3. Number of total explant 'Campbell Early' grape explants as affected by cytokinins and DIF (A: +7DIF, B: 0DIF, C: -7DIF) cultured for 4 weeks. CT: control, BA: 6-benzylamino purine, T: thidiazuron, Z: zeatin, K: kinetin.

Pierson 1992; Erwin et al. 1989; Moe et al. 1991; Zieslin and Tsujita 1988). 아직 이러한 초장 조절 능력이 GA에 의해 조절된다는 증거가 명확하지 않으므로 (Katsumi and Ishida 1991) 계속적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

생체중

시토키닌과 DIF가 포도 기내생장에 미치는 영향 중에서 생체중의 결과는 Figure 5에 나타나 있다. +7DIF 처리에서 BA 5 μM을 제외한 나머지 모든 처리구에서 대조구보다 높게 나타났고, 2iP 10 μM이 410 mg으로 가장 높았다. 0DIF 처리의 zeatin 5 μM과 2iP 10 μM구에서 각각 900 mg과 840 mg으로 대조구의 약 8배에 달했으며, kinetin 10 μM 처리가 가장 낮게 나타났다. −7DIF에서는 모든 처리구가 대조구보다 좋은 효과를 보였으나, 다른 DIF 처리보다는 낮았다.

이와 같이 DIF 처리가 포도 기내배양의 생체중에 약간의 영향을 미치는 것으로 나타났는데, 이는 신초의 생장과 관계가 깊은 것으로 추정된다. 시토키닌의 종류와 농도에 따른 차이가 컸고, 0DIF 처리에서만 효과가 좋았으며, −DIF와 +7DIF에서는 생체중이 낮았을 뿐 아니라 모든 DIF처리의 대조구도 생체중이 상당히 낮았다. 또한 대조구는 −DIF에서 +DIF로 갈수록 생체중이 증가하였다. 이것은 Kozai 등 (1992a; 1995)의 결과와 비슷하였는데, 생체중은 생장과 관계가 깊었지만 분지수와는 큰 관련이 없는 것으로 나타났다.

적 요

포도 Campbell Early을 공시하여 기내 배양에 의한 대량 증식과 건전묘의 생산시 영향을 미치는 DIF 조건과 cytokinin의 종류 (BA, TDZ, zeatin, 2iP, kinetin) 및 농도의 최적 조건을 구명 하고자 수행한 실험의 결과는 다음과 같다. 신초생장은 0 (25/25℃) 및 +7DIF (25/18℃) 처리에서 좋았고, −7DIF (25/18℃)에서는 생장이 전반적으로 나빴다. DIF 처리와 관계없이 BA와 TDZ 처리에서는 생장이 나빴으며 −7DIF 처리는 생육이 억제되었다. 분지수와 총절편체수도 모든 DIF 처리에서 신초 생장이 적었던 BA와 TDZ 처리에서 분지가 많았고, 총절편체수도 BA와 TDZ 처리에서 많은 것으로 나타났다. DIF와 상관없이 모든 zeatin과 kinetin 처리는 신초형성 효과는 없었고 오히려 억제적으로 작용하였다. 모든 DIF 처리구에서 주온과 야온에 상관없이 대조구와 같거나 약간 낮았다. 0DIF 처리에서 절간수가 증가하였으며 − 및 +7DIF 처리에서는 모든 시토키닌 처리구에서 0DIF 처리보다 낮은 결과를 보였다. 생체중은 0DIF 처리에서만 효과가 좋았으며 모든 DIF 처리의 대조구도 생체중이 상당히 낮았다. DIF 처리는 포도 기내배양의 생체중에 영향을 미쳤는데, 이는 신초 생장과 관계가 깊은 것으로 추정된다.

사사 - 본 논문은 한국과학재단 (KOSEF) 지정 충북대학교 첨

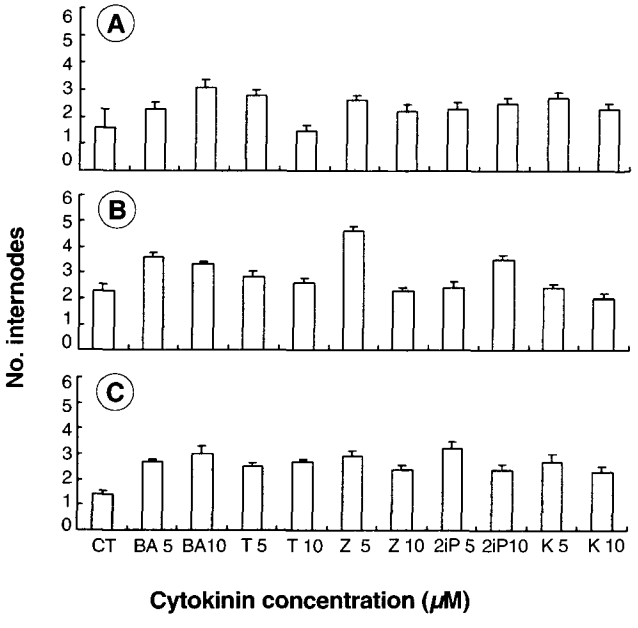

Figure 4. Number of internodes of 'Campbell Early' grape explants as affected by cytokinins and DIF (A: +7DIF, B: 0DIF, C: −7DIF) cultured for 4 weeks. CT: control, BA: 6-benzylamino purine, T: thidiazuron, Z: zeatin, K: kinetin.

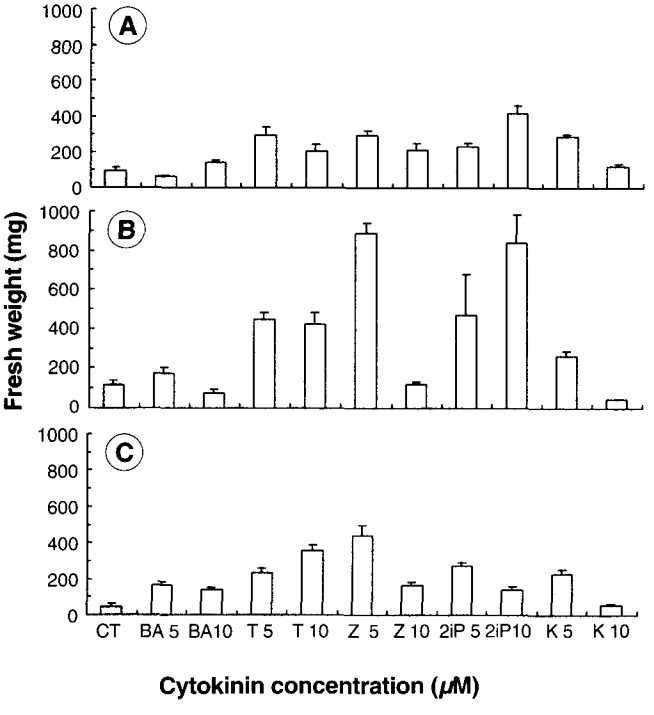

Figure 5. *In vitro* fresh weight of 'Campbell Early' grape explants as affected by cytokinins and DIF (A: +7DIF, B: 0DIF, C: −7DIF) cultured for 4 weeks. CT: control, BA: 6-benzylamino purine, T: thidiazuron, Z: zeatin, K: kinetin.

단원예기술개발연구센터 (HortTech)의 지원에 의한 것입니다.

인용문헌

Agrawal M, Krizek DT, Agrawal SB, Kramer GF, Lee EH, Mirecki RM, Rowland RA (1993) Influence of inverse day/night tem perature on ozone sensitivity and selected morphological and physiological responses of cucumber. J Amer Soc Hort Sci **118**:649-654

Appelgren M (1991) Effects of light quality on stem elongation of *Pelargonium in vitro*. Sci Hortic **45**:345-351

Chee R, Pool RM (1983) *In vitro* propagation of *Vitis*: Application of genotypes. Vitis **22**:363-374

Chee R, Pool RM (1987) Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. Sci Hortic **32**:85-95

Erwin JE, Heins RD (1995) Thermo-morphogenic responses in stem and leaf development. HortScience **30**:940-949

Erwin. JE, Heins RD, Karlasson MG (1989) Thermo-morphogenesis in *Lilium longiflorum* Thunb. Amer J Bot **76**:47-52

Erwin JE, Heins RD, Moe R (1991) Temperature and photoperiod on *Fuchsia* × *hybrida* morphology. J Amer Soc Hort Sci **116**: 955-960

Erwin JE, Pierson G (1992) Interaction between diurnal temperature fluctuations and gibberellins on *Lycopersicon* stem elongation and chlorophyll content. HortScience **27**:657

FAO. 2001. Production Yearbook. FAO, Rome.

George EF, Sherrington PD (1984) Plant propagation by tissue culture. British Library, London. pp 284-307

Goussard PG (1982) Effects of cytokinins on elongation, prolif-eration and total mass of shoots derived from shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. Vitis **20**:228-234

Harris RE, Stevenson JH (1979) Virus elimination and propagation of grapes *in vitro*. Pro Int Plant Prop Soc **29**:95-108

Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, Jr, Geneve RL (2001) Plant Propagation, Principles and Practices. 7th ed. Prentice-Hall. pp 746-749

Hwang JH, Kim SK (1989) *In vitro* multiplication of grape shoots at different dormancy stages as affected by plant growth regulators. J Kor Soc Hort Sci **31**:142-149

Karlasson M, Heins H, Erwin J, Berghage R, Carlson W, Biernbaum J (1989) Temperature and photosynthetic photon flux influence chrysanthemum shoot development and flower initiation under short-day conditions. J Amer Soc Hort Sci **114**:158-163

Katsumi M, Ishida K (1991) The gibberellin control of cell elongation. In: Takahashi N, Phinney BO, MacMillan A(eds.). Gibberellins. New York, Springer-Verlag. pp 211-219

Kim SH, Kim SK (1998) Effects of kind and level of cytokinins on *in vitro* growth of grapes. J Agr Sci Chungbuk Nat'l Univ **15**:39-47

Kim SK, Jeon SH, Lee JS (1997) Effects of BA, NAA, 2,4-D, and inorganic strength of media on *in vitro* growth of grapes. J Agr Sci Chungbuk Nat'l Univ **14**:77-85

Kozai T, Kino S, Jeong BR, Hayashi M, Kinowaki M, Ochiai M, Mori K (1992a) A sideware lighting system using diffusive optical fibers for production of vigorous micropropagater plantlets. Acta Hort **319**:237-242

Kozai T, Kushihashi S, Kubata C, Fujiwara K (1992b) Effects of the difference between photoperiod and dark period temperatures, and photosynthetic photon flux density on the shoot length and growth of the potato plantlets *in vitro*. J Jap Soc Hort Sci **61**:93-98

Kozai T, Tanaka K, Jeong BR, Fujiwara K, Watanabe K, Kira S (1993) Effect of relative humidity in the culture vessel on the growth and shoot elongation of potato (*Solanum tuberosum* L) plantlets *in vitro*. J Jap Soc Hort Sci **62**:413-417

Kozai T, Watanabe K, Jeong BR (1995) Stem elongation and growth of *Solanum tuberosum* L *in vitro* in response to photo synthetic photon flux, photoperiod and difference in photoperiod and dark period temperature. Sci Hortic **61**:1-9

Krul WR, Worley KF (1997) Formation of adventitious embryos in callus cultures of 'Seyval', a French grape. J Amer Soc Hort Sci **102**:360-363

Lee N, Wetzstein HY (1990) *In vitro* propagation of Muscadine grape by axillary shoot proliferation. J Amer Soc Hort Sci **115**:324-329

Li JR, Eaton GW (1884) Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro*. HortScience **19**:64-66

Lim KB, Son KC, Chung JD (1996) Influences of DIF on plug seeding's growth and flowering of *Impatiens wallerana*. J Kor Soc Hort Sci **37**:796-801

Lim KB, Son KC, Chung JD (1997) Influences of DIF on growth of plug seedlings and development after transplanting of *Salvia splendens*. J Kor Soc Hort Sci **38**:408-414

Lim KB, Son KC, Chung JD (1998) Effect of photosynthesis by different DIF and light intensity regimes on the growth of salvia plug seedlings. J Kor Soc Hort Sci **39**:610-614

MAF (2002) Crop Production Statistics for 2001. MOAF.

Moe R, Heins RD, Erwin JE (1991) Stem elongation and flowering of the long-day plant *Campanula isophylla* Moretti in response to day and night temperature alternations and light quality. Sci Hortic **43**:291-305

Park HY, Son KC, Gu EG, Lim KB, Kim BH (1996) Effect of different day and night temperature regimes on the growth of hot pepper plug seedlings. J Kor Soc Hort Sci **37**:617-621

Pool RM, Powell LE (1975) The influence of cytokinins *in vitro* shoot development of 'Concord' grape. J Amer Soc Hort Sci **100**:200-202

Reisch BI (1986) The influence of genotype and cytokinins on *in vitro* shoot proliferation of grapes (*Vitis* spp.). J Amer Soc Hort

Sci **111**:138-141

Si Y, Heins RD (1996) Influence of day and night temperature on sweet pepper seedling development. J Amer Soc Hort Sci **121**:699-704

Son KC, Lee MI (1998) Effect of DIF and temperature drop/rise on the stem elongation of plug seedlings of *Salvia splendens*. J Kor Soc Hort Sci **39**:615-620

Starrett MC, Blazich FA, Warren SL (1993) Initial growth of rosebay rhododendron seedlings as influenced by day and night temper atures. HortScience **28**:705-707

Sudarsono, Goldy RG (1991) Growth regulator and axillary bud position effects on *in vitro* establishment of *Vitis rotundifolia*. HortScience **26**:304-307

Tutty JR, Hicklenton PR, Kristie DN, McRae KB (1994) The influence of photoperiod and temperature on the kinetics of stem elongation in *Dendranthema grandiflorum*. J Amer Hort Soc **119**:138-143

Zieslin N, Tsujita MJ (1988) Regulation of stem elongation of lilies by temperature and the effect of gibberellin. Sci Hortic **37**:165-169

(접수일자 2002년 5월 17일)