한국식물생명공학회지 제29권 제2호
Korean J. Plant Biotechnology
Vol. 29, No. 2, 123~127 (2002)

포도의 기내생장에 미치는 시토키닌의 영향

김승희 · 김선규*
청주시 흥덕구 개신동 산48 충북대학교 원예학과

Effect of Cytokinins on *In Vitro* Growth of Grapes (*Vitis* spp.)

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

ABSTRACT Effect of cytokinins (BA, TDZ, zeatin, 2iP, and kinetin) applied either singly or in combination on in vitro growth of two grape cultivars ('Cabernet Sauvignon' and 'Campbell Early') was investigated as a serial work for mass production of grapevine nursery stocks. In single treatment, shoot growth of two cultivars was most favorable in control. Shoot proliferation was satisfactory with 10 μM BA regardless of cultivars and cytokinin combinations, followed by TDZ. Other treatments resulted in very poor or no branching. Total explants ready for subculture produced by 10 μM BA outnumbered those by other treatments. TDZ was also effective. TDZ significantly increased the fresh weight and callus formation while shoot growth was unsatisfactory. Shoot growth response of two cultivars in combined treatments was also most favorable in control as was in single treatments. When TDZ was combined with zeatin, 2iP, and kinetin which failed to induce branching, proliferous branching was induced though the shoot number was behind that of single treatments of BA and TDZ. TDZ was very effective for total number of explants and fresh weight, showing 10-fold increase.

Key words: Callus, cytokinin combinations, fresh weight, rhizogenesis, shoot growth, shoot proliferation.

서 론

포도는 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 등 (1991)도 눈의 위치에 따른 신초 증식률의 차이를 BA, TDZ, kinetin을 단용 및 혼용 처리하여 연구하였다.

일반적으로 조직 배양시 신초형성에는 고농도의 cytokinin과 저농도의 auxin이 필요하고, 발근에는 저농도의 cytokinin과 고농도의 auxin이 사용되어 왔으며 (George and Sherrington 1984), 포도에서도 신초유도와 증식을 위해서는 고농도의 cytokinin과 저농도의 auxin이 필요하다고 보고되었다 (Chee and Pool 1983; Jona and Webb 1978).

본 실험은 유럽종 양조용 포도인 'Cabernet Sauvignon'과 구미 잡종인 'Campbell Early'를 공시하여, 개별 시토키닌이나 단편적인 조합에 관한 연구는 있었으나 광범한 시토키닌의 종류와 농도 조합에 관한 연구는 없었기 때문에, 이들이 포도의 기내 생장에 어떠한 영향을 미치는 가를 구명하여 포도 기내 대량 생산 체계를 확립하기 위한 기초 자료를 얻기 위하여 수행되었다.

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

재료 및 방법

본 실험에 공시된 품종은 유럽종 양조용 포도인 'Cabernet Sauvignon'과 구미 잡종인 'Campbell Early'로서 충북 옥천군 청성면 소재 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 10~15 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 치상한 다음 6주를 주기로 계대 배양하여 시료를 확보하였다.

포도의 기내 생장에 미치는 생장 조절 물질의 영향을 알아보기 위하여 시토키닌을 단·혼용한 실험에서 단용처리는 BA, TDZ, zeatin, 2iP, kinetin을 각각 5와 10 μM씩 첨가한 배지를 이용하였고, 혼용처리로는 BA 5 μM과 TDZ, zeatin, 2iP, kinetin을 각각 5 μM, TDZ 5 μM과 zeatin, 2iP, kinetin을 각각 5 μM, zeatin 5 μM과 2iP, kinetin을 각각 5 μM, 2iP 5 μM과 kinetin을 5 μM 혼용 처리한 배지에, sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.8로 조절 후 지름이 9cm인 플라스틱 페트리 디시에 분주하여 3개씩 접종하였다. 배양 조건은 25±1℃에서 약 40 μmol · m^{-2} · s^{-1}의 광도로 16시간의 일장으로 조명하였다.

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

Table 1. Effects of kinds and concentrations of cytokinins on plantlet growth of 'Cabernet Sauvignon' cultured *in vitro* after 4 weeks of culture.

Cytokinin (μM)		Shoot length (cm)	No. shoots	No. total explants	Fresh wt. (mg)	Callus wt. (mg)	No. roots
Control		12.4 a[z]	1.1 c	4.0 d	200.8 abc	-[y]	4.7 b
BA	5	3.1 b	3.7 b	7.7 b	209.1 abc	46.4 b	-
	10	2.5 d	6.1 a	10.3 a	180.7 abc	35.4 b	-
TDZ	5	2.6 d	3.0 b	6.3 c	301.6 a	199.8 a	-
	10	2.0 d	3.4 b	6.7 bc	315.0 a	227.0 a	-
Zeatin	5	7.5 b	1.1 c	4.1 d	198.9 abc	72.9 b	2.7 e
	10	6.5 b	1.0 c	6.4 bc	294.6 a	57.8 b	9.1 a
2iP	5	6.8 bc	1.0 c	3.8 d	251.9 ab	100.0 b	5.6 b
	10	5.8 c	1.0 c	3.4 de	143.3 bc	31.6 b	4.4 b
Kinetin	5	3.5 d	1.0 c	2.8 de	103.0 c	48.9 b	2.8 c
	10	3.3 d	1.0 c	2.2 c	97.6 b	39.9 b	2.1 c

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.
[y]-: not formed.

Table 2. Effects of kinds and concentrations of cytokinins on plantlet growth of 'Campbell Early' cultured *in vitro* after 4 weeks of culture.

Cytokinin (μM)		Shoot length (cm)	No. shoots	No. total explants	Fresh wt. (mg)	Callus wt. (mg)	No. roots
Control		7.4 a[z]	1.1 c	3.6 cd	71.1 bc	-[y]	4.2 ab
BA	5	1.6 e	3.4 b	7.0 b	58.4 c	25.8 c	-
	10	2.3 cde	4.4 a	10.6 a	229.4 b	74.6 b	-
TDZ	5	2.2 cd	3.1 b	6.8 b	394.3 a	195.1 a	-
	10	1.8 e	3.1 b	6.0 b	468.0 a	335.4 a	-
Zeatin	5	7.0 a	1.2 c	5.6 b	114.3 bc	54.0 c	4.6 ab
	10	3.5 bcd	1.2 c	3.6 cd	107.9 bc	38.0 c	3.9 b
2iP	5	3.8 bc	1.1 c	3.4 cd	96.8 bc	21.7 c	4.8 ab
	10	4.5 b	1.0 c	3.6 c	154.6 bc	57.3 c	6.2 ab
Kinetin	5	3.7 bc	1.0 c	4.0 c	106.7 bc	21.0 c	5.1 ab
	10	2.4 cde	1.0 c	2.1 d	83.7 bc	17.0 c	4.1 ab

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.
[y]-: not formed.

결과 및 고찰

단용처리

시토키닌 단용 처리의 결과는 Table 1과 Table 2에 나타나 있다. 'Cabernet Sauvignon'에서 신초 생장은 대조구에서 12.4 cm로 가장 좋았고 zeatin과 2iP 처리구가 다음이었으며, 그 외의 처리구는 생장이 나빴다. 분지된 신초수는 BA 10 μM 처리구에서 대조구의 6배 가량인 6.1개로 가장 많았고, TDZ 처리구가 다음으로 많았으며, 대조구를 포함한 그 외 처리구에서는 분지가 거의 되지 않았다. 계대배양에 이용할 수 있는 총절편체수도 BA 10 μM처리구에서 10.3개로 가장 많았으며, 다음으로 BA 5 μM, TDZ 순이었다.

생체중은 TDZ 5, 10 μM 처리가 301.6, 315.0 mg이었고, zeatin 10 μM 처리가 294.6 mg으로 생체중이 높았다. 캘러스는 생체중이 높았던 TDZ 처리와 2iP처리 순으로 많이 생성되었으며 대조구에서는 발생되지 않았다. 뿌리수는 zeatin 10 μM 처리가 9.1개로 상당히 높았고, 2iP 5 μM이 5.6개, 대조구가 4.7개 발생되었으며, 분지가 많이 되었던 BA와 TDZ 처리구에서는 발근되지 않았다.

'Campbell Early'의 신초 생장은 'Cabernet Sauvignon'과 마찬가지로 대조구가 7.4 cm로 가장 좋았다. 분지수는 BA 10 μM 처리가 4.4개, BA 5 μM과 TDZ 5 μM이 각각 3.4, 3.1개의 순으로 대조구에 비해 3~4배 많았으며, 다른 처리에서는 분지가 되지 않았다. 총 절편체수도 'Cabernet Sauvignon'과 비슷하게 BA 10 μM처리가 10.6개로 가장 좋은 효과를 보였으며, TDZ는 6.8개로 그 다음을 차지했다. 생체중은 다른 처리에 비해 TDZ 처리가 394.3 mg과 468.0 mg으로 월등히 높았다. TDZ 처리구에서는 캘러스 형성률도 높았는데 캘러스가 많이 생긴 반면 신초 생장은 나빴다. 발근은 2iP 10 μM 처리가 6.2개로 가장 많았는데, kinetin과 zeatin, 그리고 대조구에서 발근되었으며, BA와 TDZ 처리에서는 발근되지 않았다.

시토키닌 중 BA가 포도의 신초증식에 아주 효과적인 것으로 많이 보고되었으며 (Hwang and Kim 1989; Pool and Powell 1975; Reisch 1986; Kim et al. 1997; Kim and Kim 1998; Shim 1998), 5~40 μM의 범위에서 10 μM이 신초 증식에 가장 좋은 것으로 알려져 있는데 (Li and Wetzstein 1990; Singh et al. 1992), 본 실험에서도 같은 결과를 나타내었다. 고농도에서는 생장, 특히 신초 증식이 억제되는 것으로 보고되었다 (Li and Wetzstein 1990; Singh et al. 1992; Suh et al. 2001). TDZ는 저농도에서도 높은 시토키닌 활력을 보이는데 10 μM에서보다 1 μM에서 분지된 신초수가 더 많은 것으로 보고되어 (Gribaudo and Fronda 1991), 본 실험에서의 농도가 조금 높았을지도 모른다.

혼용처리

시토키닌 혼용 처리의 결과는 Table 3과 Table 4에 나타나 있다. 'Cabernet Sauvignon' 혼용 처리에서 신초 생장은 단용 처리에서와 마찬가지로 대조구가 12.4 cm로 월등히 좋았다. 분지수와 총절편체수는 BA와 zeatin, TDZ와 2iP, TDZ와 zeatin의 혼용 처리에서 비슷하게 좋은 효과를 보였다. 단용처리에서 분지가 되지 않았던 2iP와 kinetin을 TDZ와 혼용 처리했을 때 2개 이상 분지되었다. Zeatin은 BA와 더불어 포도의 기내 배양시 개화를 유도하고 정상적인 화기의 발달에 도움이 되는 것으로 보고되었다 (Srinivasan and Mullins 1978). 생체중은 단용 처리에서 캘러스가 많이 형성됐던 TDZ 처리구에서 역시 좋았는데, TDZ와 zeatin 혼용 처리가 1506.1 mg, TDZ와 2iP 혼용 처리가 1254.7 mg이었고 다음으로 BA와 TDZ 혼용 처리한 구가 1000.4 mg로 좋게 나타났다. 캘러스도 TDZ 처리에서 많이 형성되었고, 대조구는 생성되지 않았다. 혼용 처리에서는 대조구만이 발근되었다.

Table 3. Effects of combination of cytokinins on plantlet growth of 'Cabernet Sauvignon' cultured *in vitro* after 4 weeks of culture.

Cytokinin 5μM:5μM		Shoot length (cm)	No. shoots	No. total explants	Fresh wt. (mg)	Callus wt. (mg)	No. roots
Control		12.4 a[z]	1.1 bc	4.0 cde	200.8 e	-[y]	4.7±0.6[x]
BA	TDZ	2.5 bc	1.6 bc	4.3 cd	1000.4 bc	728.6 b	-
	Zeatin	2.7 bc	2.3 a	7.0 a	190.9 e	91.6 d	-
	2iP	2.8 bc	1.2 bc	2.9 de	294.7 e	209.2 d	-
	Kinetin	3.0 bc	1.4 bc	3.7 de	358.4 de	112.1 d	-
TDZ	Zeatin	2.8 bc	1.8 ab	4.8 bcd	1506.1 a	1002.4 a	-
	2iP	2.7 bc	2.4 a	6.0 ab	1254.7 ab	623.0 bc	-
	Kinetin	2.6 bc	2.3 a	5.9 abc	673.0 cd	461.1 bc	-
Zeatin	2iP	3.5 b	1.0 c	2.3 e	216.7 e	132.1 d	-
	Kinetin	3.7 b	1.0 c	2.3 e	305.9 e	178.1 d	-
2iP	Kinetin	1.6 c	1.0 c	1.6 e	149.8 fg	86.1 ef	-

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.
[y]-: not formed.
[x]SE: standard errors.

Table 4. Effects of combination of cytokinins on plantlet growth of 'Campbell Early' cultured *in vitro* after 4 weeks of culture.

Cytokinin 5μM:5μM		Shoot length (cm)	No. shoots	No. total explants	Fresh wt. (mg)	Callus wt. (mg)	No. roots
Control		7.4 a[z]	1.1 e	3.6 cd	71.1 g	-[y]	4.2±0.5[x]
BA	TDZ	2.4 c	2.3 bc	4.3 c	474.2 cd	323.9 cd	-
	Zeatin	1.7 bc	1.9 cd	4.0 cd	140.2 fg	82.1 ef	-
	2iP	2.8 bc	1.4 de	3.2 cd	321.6 de	240.0 de	-
	Kinetin	1.9 bc	1.3 e	2.8 de	107.1 fg	-	-
TDZ	Zeatin	2.6 bc	3.3 a	9.9 a	680.6 b	586.2 b	-
	2iP	3.1 b	3.2 a	9.1 a	969.8 a	807.3 a	-
	Kinetin	2.7 bc	2.7 b	7.0 b	570.7 bc	461.1 bc	-
Zeatin	2iP	2.6 bc	1.0 e	1.9 e	257.0 ef	194.3 de	-
	Kinetin	2.5 bc	1.0 e	1.7 e	241.6 fg	150.9 ef	3.6±0.4
2iP	Kinetin	1.6 b	1.0 e	1.6 e	149.8 fg	86.1 ef	-

[z]Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.
[y]-: not formed.
[x]SE: standard errors.

'Campbell Early' 혼용 처리에서 신초 생장은 단용 처리에서와 마찬가지로 대조구가 7.4 cm로 가장 좋았다. 분지수는 TDZ에 zeatin 처리가 3.3개, TDZ에 2iP 처리가 3.2개, BA에 TDZ처리가 2.3개 순으로 나타났다. 'Cabernet Sauvignon'과 마찬가지로 단용 처리에서는 분지되지 않았던 zeatin과 2iP, kinetin에 TDZ를 혼용 처리했을 때 분지는 아주 잘 되었으나, BA나 TDZ를 단용 처리한 결과의 분지수에는 미치지 못하였다. 총절편체수도 TDZ의 처리구에서 좋은 효과를 보였다. 생체중은 TDZ 처리구가 가장 높아 TDZ에 2iP 처리를 한 구는 969.8 mg으로 71.1 mg의 생체중을 보인 대조구의 10배 이상이었다. 대조구에서 4.2개의 발근이 되었으며 zeatin에 kinetin을 처리한 구에서도 예외적으로 3.6개의 발근이 되었다.

포도 세 품종에 대한 생장조절제 (AdSO4, NAA, BA) 실험에서, BA 단용 처리구에서는 3~5 mg/L의 농도 범위 중 3 mg/L에서만 신초가 발생했으나, AdSO4 80 mg/L와 혼용되었을 때는 4 mg/L에서도 신초가 발생하는 경우가 보였는데, 특히 'Himrod'의 경우, 신초수가 3 mg/L의 0.5개에 비해 3개로 6배나 더 많았다 (Suh et al. 2001). TDZ는 아주 저농도에서도 사과의 신초증식에 효과적인 것으로 보고되었는데 (Yae et al. 1987), 본 실험에서도 같은 결과를 보였다.

적 요

포도 두 품종 ('Cabernet Sauvignon', 'Campbell Early')을 공시하여 기내 생장에 영향을 미치는 cytokinin의 종류 (BA, TDZ, zeatin, 2iP, kinetin) 및 농도의 최적 조건을 구명 하고자 수행한 실험의 결과는 다음과 같다. Cytokinin의 단용 처리에서 신초 생장은 두 품종이 비슷한 경향을 보여 대조구가 가장 좋았다. 분지수는 BA 10 μM 처리구에서 가장 많았고 TDZ 처리구가 그 다음이었으며, 그 외 처리구에서는 거의 분지되지 않았다. BA 10 μM 처리에서 총절편체수도 가장 많았으며, TDZ 처리가 그 뒤를 이었다. TDZ 처리에서 생체중이 월등히 높았으며 캘러스 형성도 많이 되었으나 신초 생장은 좋지 않았다. 'Cabernet Sauvignon'은 zeatin 10 μM 처리에서 발근되었고 'Campbell Early'는 2iP 10 μM 처리에서 많이 되었으며, BA와 TDZ 처리에서는 발근되지 않았다. Cytokinin 혼용 처리는 두 품종 모두 단용 처리에서와 마찬가지로 대조구에서 신초생장이 가장 좋았다. 단용 처리에서는 분지되지 않았던 zeatin과 2iP, kinetin에 TDZ를 혼용 처리했을 때 분지가 잘 되었으나, BA나 TDZ 단용 처리보다는 분지수가 적었다. 총절편체수와 생체중도 TDZ 처리구에서 좋은 효과를 보였으며 대조구보다 최고 10배나 높았다. 발근은 대조구에서만 되었으나, 'Campbell Early'에서 예외적으로 zeatin과 kinetin 혼용 처리구에서 발근이 되었다.

사사 - 본 논문은 한국과학재단 (KOSEF) 지정 충북대학교 첨단원예기술개발연구센터 (HortTech)의 지원에 의한 것입니다.

인용문헌

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

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

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

Gribaudo I, Fronda A (1991) Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. HortScience **26**:1083

Harris RE, Stevenson JH (1970) *In vitro* propagation of *Vitis*. Vitis **21**:22-32

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

Jona R, Webb KJ (1978) Callus and axillary bud culture of *Vitis vinifera*, 'Sylvaner Riesling'. Sci Hortic **9**:55-60

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

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 (1894) Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro*. HortScience **19**:64-66

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

Shim SW (1998) Effects of environmental condition and concen tration of medium and cytokinins on organogenesis in grapes. MS Thesis, Chungbuk Nat'l Univ.

Singh AK, Sharma BB, Pandey RM (1992) Rapid in vitro multi plication of *Vitis vinifera* L. through shoot tips and nodal segments. Acta Hort **321**:601-605

Srinivasan C, Mullins MG (1978) Control of flowering on the grapevine (*Vitis vinifera* L). Formation of inflorescences in vitro by isolated tendrils. Plant Physiol **61**:127-130

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

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. Korean J. Plant Tissue Culture **28**:25-32

Yae BW, Shin YU, Lee DK, Hwang HS (1987) Studies on plant tissue culture and cell culture: basic study on *in vitro* breeding of grapes. Res Rpt RDA(Hort) pp 115-117

(접수일자 2002년 5월 17일)