

## 10장. 기내 영양번식법

### 1절. 기내 영양번식의 정의

식물의 번식에는 유성번식(有性繁殖, sexual propagation)과 무성번식(無性繁殖, asexual propagation)이 있다. 기내(器內)번식은 무성번식의 범주 안에 있으나 일반 번식법과는 다르게 기내에서 이루어지는 것이다. 이러한 차이로 인하여 기내 영양계 번식(clonal propagation), 기내 영양번식(in vitro vegetative propagation) 이라고도 한다.

본 장에서는 기내 영양번식에 사용되는 기본적인 배양의 형태에 대하여 언급하고자 한다.

- ① 줄기의 끝부분(莖端, shoot tip)을 배양하는 성장점 또는 분열조직 배양
- ② 식물체의 줄기와 잎줄기 사이에 형성된 눈(芽)을 배양하는 액아(腋芽, axillary bud)배양
- ③ 줄기의 일부가 포함된 마디를 절편으로 이용하여 배양하는 마디배양(node culture)
- ④ 성장점이나 액아와 같이 미리 정해진 곳이 아닌 곳에서 형성되는 부정기관(adventitious organ)
- ⑤ 체세포 배(somatic embryo)의 형성
- ⑥ 원형질체 등에서 식물체의 재생 등에 관하여 설명하고자 한다.

### 2절. 식물재료의 조건 및 기내 영양번식의 특성

식물재료의 조건은 식물재료의 영향에 언급되어 있다. 목본류(woody)는 초본류(herbaceous)에 비하여 기내 영양계 번식이 훨씬 어렵다. 그 이유는

- ① 재생력이 낮다.
- ② 회춘을 유도하기가 어렵다.
- ③ 증식률이 낮다.
- ④ 휴면이 있다.
- ⑤ 목본류는 본래의 위치에서 성장과 분화를 지속하려는 습성(topophysis)이 크다.
- ⑥ 유전적 변이가 크다.
- ⑦ 배양시 삼출물이 많다.

### 3절. 기내 영양번식의 형태

#### 3-1. 성장점 배양

성장점 배양은 줄기의 끝 부분(경단(莖端), shoot tip)을 절편으로 이용하는 배양이다. 이 경단절편은 세포분열이 왕성한 분열조직(meristem)이 포함되어 분열조직배양이라고도 한다. 이러한 분열조직이 포함되었기 때문에 다른 부위에 비하여 재생과 재분화가 잘된다. 성장점 배양에는 크게 2가지 목적이 있다 하겠다. 부정아 형성에 의한 번식과 바이러스를 제거하기 위하여 성장점 배양을 한다. 이방법은 유전자 조작없이 하나의 식물체를 빠른시간내에 얻기위해 가장 좋은 방법이다.

### (1) 부정아 형성에 의한 번식

모든 식물의 성장점을 줄기 끝 부분에 있기 때문에 이것이 바로 성장점이 될 수 있다. 그러나 벼과와 같은 식물은 줄기 끝에 한 개의 성장점밖에 없지만 많은 식물에서는 액아가 발생하여 측지로 발생하기 때문에 발육시기에 따라 줄기 끝 부분 이외에도 성장점을 많이 가지고 있다. 그러나 이들은 정단에 존재하는 성장점만큼 분열속도가 왕성하지 못하다.

성장점 배양시 배지에 auxin함량이 높으면 성장점 한 개에서 한 개의 싹으로 신장하지만 cytokinin의 함량이 높으면 한 개의 성장점에서 많은 부정아(不定芽adventitious)가 발생된다. 부정아 발생은 auxin과 cytokinin의 비율에 의하여 결정된다. 물론 배지에 첨가되는 auxin과 cytokinin의 양만이 단독으로 작용하는 것은 아니고 조직 자체에 존재하는 내생적(內生的endogenous)수준도 이에 관여하므로 절편의 성질에 따라 이를 고려하여야 한다.

성장점에서 생산된 부정아(adventitious)는 이미 분화된 기관의 세포들이 만들어 낸 식물체의 측아(側芽)와 같은 것이므로 callus에서 형성된 부정아(不定芽)보다는 유전적인 변화가 적다.

성장점배양을 위한 배지조성과 배양환경은 식물에 따라 차이가 있으나 일반적으로 cytokinin은 BAP, kinetin 등이 이용된다.

### (2) 분열조직배양에 의한 바이러스 제거

바이러스는 많은 식물체에 침범하여 생육을 억제하고 생산물의 질을 저하시킨다. 이들은 많은 경우 가시적인 증상이 없기 때문에 식물체의 생육이 정상적인 것처럼 보인다. 이러한 식물체로부터 바이러스를 제거하면 수량이 크게 향상되는 경우가 많다. 바이러스가 종자를 통하여 다음 세대까지는 전염되지 않으므로 종자로 번식을 하는 식물체는 큰 문제가 없으나 영양번식을 하는 식물체는 한번 이병된 바이러스가 다음세대로 계속 이어지기 때문에 심각한 문제를 초래한다. 이러한 바이러스를 제거할 목적으로 분열조직(성장점)배양이 이용된다. 바이러스에 감염된 식물체일지라도 정단분열조직(頂端分裂組織, apical meristem)에는 바이러스가 없거나, 밀도가 아주 낮으며 이곳으로부터 거리가 멀어짐에 따라 바이러스의 밀도가 증가한다. 영양번식을 하는 중에 굉장히 유리하다. (Banana, sugarcane, potato, strawberry, sweet potato 등)

분열조직에 바이러스가 없는 이유를 밝혀낸 과정은 다음과 같다.

- ① White(1934)가 TMV(담배 모자이크 바이러스)가 담배 뿌리에서 뿌리 끝으로 갈수록 TMV 농도가 낮아져서 뿌리의 끝 즉, 뿌리 성장점 부근에서는 바이러스가 없음을 보고하였다.
- ② Limasset and Cornuet(1949)는 TMV는 줄기나 뿌리의 성장점쪽으로 갈수록 그 농도가 낮아지는 것이지 TMV가 전혀 없는 것은 아니다 라고 보고함.
- ③ 결정적으로 Morel and Martin(1952)은 바이러스에 감염된 dahlia에서 성장점을 분리하는 기발한 생각을 가지고 이를 배양하여 virus free식물체를 얻을 수 있었다.
- ④ Morel과 Martin의 연구 이후로 많은 사람들이 이의 중요성을 인정하였고 현재 분열조직배양은 원예에 널리 이용되고 있다.

분열조직에 바이러스가 없는 이유는 다음과 같이 추정된다. 바이러스는 유관속(vascular system)을 통하여 식물체 내부에 침입한다. 그러나 분열조직에는 유관속이 형성되지 않았

으므로 침입하기 어렵다. 또 다른 침입 방법으로는 원형질연락사(plasmodesmata)를 통해 세포에서 세포로 이동하여 감염된다. 그러나 이러한 이동은 속도가 매우 느리다. 즉, 분열조직이 분열하는 속도보다 늦기 때문에 분열조직에 침입하기 어렵다. 분열조직 세포의 왕성한 대사활동으로 바이러스의 증식이 억제된다. 생장점에는 옥신의 함량이 높기 때문에 바이러스의 증식이 방해 받을지도 모른다.

### 3-2. 액아 배양

액아(腋芽, axillary bud)는 식물체의 줄기와 잎줄기 사이에 형성된 눈(芽)이다. 이 눈은 식물에 따라 가지로 성장하는 것도 있고 눈인 상태로 남아 있는 것도 있다. 그러나 만일 정아가 없어졌을 때는 정아 바로 밑 부분의 액아가 정아를 대신하기 위해서 빠른 속도로 성장한다. 이러한 작용은 정아우세(apical dominance)현상으로 이러한 정아 우세 현상은 cytokinins 처리에 의해서 타파되어 액아를 발달시키거나 부정아를 발달시키기 위해서 cytokinins를 많이 사용한다.

#### (1) 액아(腋芽 axillary bud) 배양과 cytokinins

액아배양은 경단(shoot tip)을 분리하여 이곳에서 액아를 발달시킨 다음 액아로부터 shoot를 발생시키거나 액아를 분리하여 액아로부터 shoot를 발생시키고자 할 때는 비교적 높은 농도의 cytokinin을 처리한다.

##### ① Cytokinins 요구도

대부분 식물은 계대배양을 계속하면 습관성(habituatio)과 회춘(回春)이 증가하여 cytokinins에 대한 요구도가 낮아진다. 또한 성숙기(成熟期)보다 유상기(幼相期)의 재료에서 cytokinins에 대한 요구도가 낮다. 물론 pineapple科의 묘(苗)에서처럼 내생 cytokinins의 함성이 충분한 식물체는 cytokinins이 없는 배지에서도 액아의 형성이 가능하다.

##### ② Cytokinins에 대한 반응

일반적으로 BA처리가 효과가 좋고 kinetin, 2iP는 효과가 낮다(물론 식물체에 따라 다소의 차이는 있다. 예를 들면 철쭉류는 액아형성에 2iP가 좋다).

##### ③ Auxins/cytokinins의 비율

일반적으로 auxins의 농도를 낮게하고 cytokinins의 농도를 높게 하는 것이 좋다. 대개의 비율은 1:10으로 cytokinins의 농도가 낮으면 auxins의 기능이 활발하여 절편체에서 callus가 형성되고 부정아의 발생이 안된다.

#### (2) 실제의 응용

기내번식에서 딸기, 거베라, 안개초 등은 액아법을 이용하여 실제 번식에 응용이 되고 있다. 이들 식물은 배양초기에 shoot tip을 분리하는데 어려움이 있지만 식물체의 생장이 양호하고 유전적으로 비교적 안전하기 때문에 많이 이용된다.

딸기: 배양을 하여 무병개체를 생산한 후 배지에 cytokinins 류 특히 BA 나 kinetin을 첨가하여 액아발생을 유도한다. 이후부터는 액아배양으로 계속 계대배양을 한다. 그러나 계대배양을 계속하면 생리적인 변이에 의한 이형체가 나타날 수 있으므로 계대배양을 12회로 제한하는 것이 좋다고 한다.

\* 딸기의 기내배양 장점

- virus free 영양계를 이용할 수 있다.
- 선충(nematode) 또는 토양전염성 병원체 제거가능
- 무병의 신품종을 신속히 번식 가능- 주년생산 가능

거베라 : 높은 농도의 auxin 배지에 shoot tip을 접종하면 많은 수의 잎원기를 가진 액아가 발 달된다. 액아로부터는 싹이 발달하게 되는데 여기서 발달된 싹을 cytokinins이 첨가된 배지에 이식하게 되면 싹으로부터는 다시 액아가 발달하고 이 액아로부터 싹이 발달하게 된다.

과수 : 과서류 번식에 액아법을 이용하면 생체에서 실시하는 접목을 행할 필요가 없기 때문에 다음과 같은 장점이 있다.

- 새로운 품종이나 식물재료의 증식이 빠르다.
- 접목을 할 필요가 없다.
- 계절에 관계없이 번식이 가능하다.

### 3-3. 마디 배양

마디배양은 줄기의 일부가 포함된 마디를 절편으로 이용하는 것이고 액아배양과는 달리 정아우세현상이 나타나도록 유도하고 배지에 cytokinins을 첨가하지 않기 때문에 많은 액아가 형성되지 않는다. 이 방법은 삽목의 방법과 같은 것이기 때문에 번식률은 이용 가능한 눈의 수에 달려 있다. 장미, 감자, 담쟁이, araucaria 등의 번식에 이용된다.

## 4절. 부정기관 재생

절편체를 분리하였을 때 절편체에 존재하지 않았던 기관을 재생시키는 일은 매우 복잡한 과정이다. 절편체로부터 생기는 재생기관으로는 부정아와 부정근이 있다. 이러한 부정아와 부정근은 기관화되지 않은 callus로부터 재생될 수도 있다. 여기서는 부정아와 부정근에 대해서 살펴보기로 한다.

### 4-1. 부정아 형성

부정아(不定芽)는 생장점이나 액아와 같이 미리 정해진 곳이 아닌 곳에서 나오는 눈을 말한다. 즉, 줄 기, 잎, 뿌리 등에서 눈이 형성되는 것을 의미한다. 잎, 뿌리, 줄기 등의 절편체로부터 부정아가 형성되는 과정에는 두 가지의 경우가 있다. 첫째는 절편체에서 직접 부정아가 형성되는 경우와 둘째, 절편체에서 callus 가 형성되고 이 callus에서 부정아가 형성되는 경우가 있다.

일반적으로 절편체에서 직접 부정아 를 형성하는 식물은 비교적 재생력이 좋은 베고니아, 백합등이 있고, callus에서 부정아를 형성하는 식물은 비교적 재생력이 낮은 감귤류, 야자등을 들 수 있다. Callus 세포의 상당 부분은 倍數性(polyploidy)이거나 異數性(aneuploidy)를 나타내기 때문에 callus 과정을 거쳐 나온 식물체들은 본래의 특성과는 다른 식물체가 될 수 있다.

부정아 형성에 영향을 미치는 요인들은 다음과 같다.

① 생장조절제

부정아 형성은 주로 auxins 과 cytokinins 의 상호작용에 의해서 이루어지며 식물체에 따라 그 비율이 매우 다양하다. 또한 대부분의 경우 부정아 형성에는 adenine 과 cytokinin을 함께 혼용처리하는 것이 좋다. 물론 베고니아, 담배, 느릅나무 등은 adenine 단독처리로 부정아형성이 잘 된다 Abscisic acid(ABA)는 일반적으로 부정아 형성을 억제하지만 고구마에서는 부정아 형성을 촉진한다. 기내배양시 NAA 첨가, 고온처리, 절편의 상처, TIBA 첨가 등으로 기내의 ethylene 농도가 높아지는데 배양중 ethylene의 농도가 높아지면 백합의 경우에는 자구형성이 높아진다. 이상과 같이 부정아 형성에는 식물에 따라 첨가물질에 대한 반응이 다양하다. 따라서 어떤 식물에서 부정아 형성을 촉진시키고자 할 때는 실험 전에 문헌을 충분히 검토한 후에 배지에 첨가되는 물질을 결정하는 것이 좋다.

② 무기영양소

목본류에서는 일반적으로 배지내 염농도가 낮을 경우에 부정아 형성이 잘 된다.

③ 배양환경

일반적으로 광은 부정아 형성을 촉진하고 온도는 고온일 때 부정아 형성이 촉진 되고, 접종시 절편체가 배지에 수평이 되었을 때 부정아 형성이 유리하다.

④ 기타

어린 식물체는 비교적 쉽게 부정아 형성에 되며 당분은 부정아 형성에 중요한 역할을 한다. 그리고 시클라멘, 느릅나무, 아카시아 나무 등에서 비타민은 부정아 형성에 효과가 있다.

#### 4-2. 부정근 형성

생장점배양, 액아배양, 마디배양 등과 부정아 형성 등을 통하여 생산된 식물체들은 발근이 이루어져야 성공적으로 토양에서 생장이 가능하다 하겠다. 부정근 형성에는 부정아 형성과 마찬가지로 식물체의 종뿐만 아니라 품종에 따라서도 부정근 형성 요구 조건이 각기 다르기 때문에 일반화하여 설명하기에는 어려움이 있으나 다음과 같이 정리하였다.

① 식물체의 연령과 발달단계

일반적으로 성숙식물체에서 보다는 미숙식물체에서 부정근 의 형성이 잘 되며 개화하는 식물체에서 부정근 형성이 잘 된다.

② 절편체의 위치

백합의 인편(bulb scale)배양시 기부와 절편이 끝부분의 절편보다 재생이 잘 된다.

③ 식물체의 종과 품종

초본성(草本性)식물은 목본성(木本性) 식물보다 재생이 쉽게 된다. 초본성 식물중에서도 때로는 품종이 다르면 재생능력이 달라진다.

④ 상처

철쭉류와 사과에서는 상처에 의해서 발근이 촉진 된다.

⑤ 접종방향

절편의 방향을 거꾸로 하는 무극성(apolar)으로 접종하면 부정근 의 형성이 촉진된다. 이러한 원인은 아마도 기부가 배지위에 노출되어 O<sub>2</sub> 의 공급이 원활하거나 절편체내 물질의 축적 등과 관계가 있을 것으로 추정하고 있다.

⑥ 광

조직배양시 광은 발근에 負의 영향을 갖는데 왜 광이 뿌리형성에 억제효과를 갖는지는 아직

알지 못하고 있다.

⑦ 당분

부정근 형성에 꼭 필요한 물질이다.

⑧ 무기영양소

부정근 형성에 무기영양소의 영향에 관해서는 별로 알려진 바는 없으나 일반적으로 배지의 무기염류 농도를 낮추면 부정근 형성이 잘 된다.

⑨ 생장조절제

Auxins은 부정근 형성을 촉진하나 cytokinins, gibberellins 및 abscisic acid(ABA)는 부정근 형성을 억제한다.

⑩ 기타

한천, 삼투값(osmotic value), 산(pH)가 뿌리형성에 미치고 영향에 관해서는 별로 알려진 바가 없으나 활성탄(活性炭activated charcoal)은 부정근 형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다.