

6장. 식물조직배양의 기본기술

1절. 식물재료의 선택

실험의 재료를 채취할 때 식물체의 능력과 생육환경은 배양하는 식물의 성장과 발육에 큰 영향을 끼칠 수 있다. 식물 재료를 선택할 때는 식물의 ①유전자형과 ②나이, ③식물의 생리적 상태와 ④건강 상태, ⑤기상의 영향과 계절적 차이 그리고 ⑥식물체의 부위와 ⑦절편의 크기 등을 고려해야 한다.

① 유전자형(Genotype)

식물은 유전 형질에 따라 재생능력이 다양하게 나타난다. 일반적으로 쌍자엽(dicotyledon) 식물이 단자엽(monocotyledon) 식물보다 재생이 잘 된다. 특히 쌍자엽 식물 중에서도 가지과(Solanaceae), 베고니아과(Begoniaceae), 들나무과(Grasulaceae), 바위담배과(Grasulaceae) 및 배추와 무를 제외한 십자화과(Cruciferae)는 재생이 용이하다. 나자식물은 유묘기 때에는 재생력이 비교적 좋으나 그 후에는 재생력이 약하다. 또한 품종간에도 재생력에 큰 차이가 있을 수 있다. 이처럼 식물에는 유전자형에 따른 재생력의 차이가 존재하므로 유전자형을 염두해 두고 식물재료를 선택해야 할 것이다.

② 식물체의 나이(The age of plant)

생육단계가 어린 식물체일수록 그리고 어린 부분일수록 재생력이 좋다. 일반적으로 종자에서 나온 유식물이 가장 재생력이 높다. 즉, 자엽은 그 다음에 나온 본엽보다 높고, 본엽 중에서도 먼저 나온 것이 재생력이 높다. 다시 말하면 어린 생육단계의 식물체 또는 어린 생육단계의 식물체의 절편이 재생능력이 좋다. 따라서 높은 재생력을 위해서는 가장 어린 식물의 절편을 실험에 이용하는 것이 나중에 배양에 유리할 것이다.

③ 생리적인 상태(The physiological state)

일반적으로 생식 성장기에 있는 식물체에서보다 영양 성장기의 식물체가 재생력이 높다. 초기 재료의 생리적인 조건은 절편의 기내 생육에 중요한 영향을 미칠 수 있으므로 이를 인위적으로 개선해야 한다. 즉, 절편을 채취하기 전에 모식물체에 cytokinin 같은 성장조절제를 처리함으로써 재생력을 높일 수도 있다.

④ 건강상태(The state of health)

채취한 모 식물체의 전반적인 영양상태에 의하여 재생력 등에 차이가 있다. 예를 들면 배추의 약배양시 모본의 관리에 따라 배 발생에 큰 차이가 있었다. 또한 병의 감염 유무에 따라 기관 형성 능력에 차이가 있다. 따라서 모식물체에 충분한 영양분을 공급하고 병에 감염되지 않게 관리하는 것이 중요하다.

⑤ 기상의 영향 또는 계절적 차이(Effect of different year)

포장에서 채배된 식물체를 모 식물체로 하여 절편을 채취하였을 때 그 해의 기상에 따라 기관형성 능력에 차이가 있다. 또한 백합의 경우처럼 봄, 가을에 인편을 채취하면 자구의 형성이 잘 되나 여름과 겨울에 채취하였을 때는 자구의 형성이 불량할 뿐만 아니라 성장도 불량하다.

⑥ 식물체의 부위(Position of the explant within the plant)

식물체상의 위치 또한 절편의 재생 능력에 영향을 미친다. 일반적으로 목본 식물체에서

낮은 부위 일수록 신초나 부정근 형성이 잘된다. 백합의 인편배양에서도 인편의 기부쪽에서 기관형성이 양호하고 상부 조직으로 올라갈수록 기관형성이 억제된다.

⑦ 절편의 크기(Size of the explant)

일반적으로 절편의 크기가 클수록 재생이 잘 된다. 절편속의 영양분과 성장요소가 있기 때문에 절편체가 크면 클수록 그 안의 저장양분이 많아 재생력이 양호하다. 세포배양시에도 세포의 밀도가 높아 군락효과(community effect) 또는 집단효과(mass effect)가 발생되어 세포분열이 잘 된다. 난 종자 발아 시에도 이러한 효과가 뚜렷하다.

⑧ 기타

절편체의 절단면적이 넓으면 배지의 영양소와 조절제의 흡수가 증가한다. 그러나 이와 동시에 절단면에서 ethylene 발생량이 많아지게 되며 phenol 물질도 배지내에 많이 분비가 되어 성장을 억제하게된다. 또한 접종시 무극성으로 배지에 치상하면 일반적으로 재생이 더 빠르다.

2절. 실험재료의 살균

배양이 오염될 수 있는 원인으로는 원칙적으로 5가지가 있다.

1. 물체 내부와 외부의 오염.
2. 배지의 불충분한 살균.
3. 기구와 초자의 불충분한 살균.
4. 공기로부터의 오염.
5. 작업자의 작업미숙.

온실이나 재배실내의 조절된 조건하에서 자란 식물체와 포장에서 자란 식물체들은 어떤 종류의 미생물이든 지간에 오염되어 있다고 간주해야 한다. 가장 손쉽게 할 수 있는 방법으로는 재료를 용기에 담아 수돗물을 계속 흐르게 하는 것이다. 이것은 지하부에 있던 부분, 즉 뿌리나 줄기 밑부분을 사용할 때 흙을 제거하는 일과 함께 실시한다. 야외에서 채취된 식물체는 대부분 많은 수의 포자와 박테리아가 묻어 있으므로 이들을 제거하기 위해서 적당한 크기의 용기에 청정제를 푼물과 함께 흔들어 세척하고 수돗물로 여러번 헹구어 내면 식물체의 표면에 묻어 있던 상당수의 미생물이 제거된다.

조직배양시 배양절편을 채취하는데 있어서 고려해야 할 기술적인 방법은 다음과 같다.

1. 식물체 표면에 부착되어 있는 미생물을 완전히 제거하는 방법.
2. 배양절편으로 이용할 식물체의 일부분만 살균하는 방법.
3. 종자를 살균하여 무균조건하에서 재배하여 식물체의 일부를 이용하는 방법.

식물체 또는 식물체의 일부분을 화학약품을 처리하여 미생물을 제거하는 방법은 다음과 같다.

- Alcohol

보통 에틸알콜(C_2H_5OH)을 의미하며, 에탄올(ethanol)이라고도 부른다. 알콜은 강한 탈수작용으로 원형질 분리를 일으켜 세포를 죽게 함으로 특히 세균의 살균에 효과가 있으나 반면에 침투성이 강하여 식물세포에도 해가 있기 때문에 장시간의 처리는 좋지 않다.

일반적으로 식물 살균에는 70% 알콜을 사용하는데 그 이유는 높은 농도에서는 식물세포에 탈수작용이 일어나기 때문이며, 기구나 무균대의 살균에서는 95% 이상의 것을 사용하는데, 그 이유는 알콜이 증발한 후 물기를 남기지 않도록 하기 위해서 이다.

알콜은 미생물을 죽이기도 하지만 살균액 처리 전 다음과 같은 이유로 처리하기도 한다.

1. 식물체 표면의 wax층을 제거하기 때문에 살균액이 식물체에 잘 묻도록 하기 위하여 처리한다.
2. 알콜은 조직의 미세한 구멍까지 스며들기 때문에 살균액을 처리하기 전에 수초 간 담가 두면 공기가 제거되어 다음의 다른 살균액에 담갔을 때 기포가 생기지 않고 식물체의 모든 표면이 살균액과 접촉하게 된다.

표면이 단단한 종자나 과실의 살균은 95% 알콜에 담그고 화염으로 살균하는 방법도 있다. 알콜 소독의 단점은 식물조직에 해를 주는 것 뿐만 아니라 균류, 특히 포자는 잘 제거하지 못하는 점도 있다.

- Sodium hypochlorite (NaOCl)

이것은 흔히 가정에서 이용하는 표백제로서 유한락스, Clorox, Purex 등으로 시판되고 있다. 이러한 제품은 유효성분(NaOCl)의 함량이 4%정도이어서 시약급(10%)을 많이 이용한다. 이 약제는 염소기에 의하여 살균이 되는 것으로 염소기는 공기 중에서 쉽게 분해되어 버리기 때문에 배양절편에 미치는 약해가 적다.

- Calcium hypochlorite (Ca(ClO)₂)

이것은 분말형태로서 물에 풀어 안정시킨 다음 상층액을 여과해서 사용한다. 일반적으로 10%의 농도에서 여과해서 5 ~ 30분간 살균한다. 이것은 NaOCl보다 천천히 조직 속에 침투되어 배양재료 절편에 해가 적다. 또한 이것은 염소의 함량이 24 ~ 37% 정도이며 공기 중에서 수분을 흡수하면 빨리 분해되기 때문에 건조한 곳에 밀봉하여 보관한다.

- 승홍 (昇汞, mercuric chloride, HgCl₂)

물에 용해하여 사용하는 것으로 살균효과가 있지만 수은(水銀, mercury)은 살균수로 여러 번 세척하지 않으면 잘 제거되지 않아 식물에 독성을 유발할 위험성이 크고 중금속이어서 근래에는 거의 이용하지 않는다.

3절. 조직배양 기본기술

절편의 분리, 접종 및 계대배양은 모두 무균조건하에서 이루어져야 한다. 이러한 무균조건은 모두 clean bench에서 이루어지므로 작업시간 10분전쯤에 이것을 가동시키고 작업대를 알콜 등으로 미리 소독한다.

3-1. 절편의 분리

살균된 식물체를 분리하는 데는 식물체의 형태와 배양계획에 따라 다르다. 분리시 고려해야 될 사항은 절편체의 크기, 절단면의 크기 및 절단방향 등이다. 절편체가 크면 그 만큼 상처 부위가 커지므로 ethylene과 phenolic compound가 나와 배양에 나쁜 영향을 준다.

3-2. 접종(接種, inoculation)

이것은 절편을 배지에 심는 과정이다. 접종시 접종방향과 심는 깊이에 따라 분화양상이 차이가 있다. 줄기는 대부분 극성을 가지고 있으며 이러한 성질은 분리된 절편에서도 그대로 유지되어 아랫부분에서는 뿌리가 나오고 윗부분에서는 부정아가 형성된다.

3-3. 계대배양(繼代培養, subculture)

자라고 있는 배양체를 새로운 배지에 옮겨주는 것을 계대배양이라 한다. 계대배양의 필요성은 다음과 같다.

- 배지를 오래 사용하여 결핍현상이 나타날 경우.
- 배지가 건조하여 염분과 당의 농도가 높을 때.
- 배양체가 용기에 차 있을 때.
- 배지의 색이 변화되었을 때.
- 성장과 발육이 빨라 다르게 할 필요성이 있을 때.
- pH가변화되었을 때.
- 기타

4절. 내부감염(internal infection)

대개 건전한 식물체는 내부에 미생물이 존재하지 않지만 이병된 것이나 식물체의 구조상 뿌리나 지상부의 상처를 통하여 감염될 수 있다. 접종되는 조직 속에 단 하나의 세균이라도 감염되어 있으면 배양 중에 오염이 된다.

■ 내부감염 확인

2 ~ 3%의 tryptone, amino acid, vitamin 및 pepton을 첨가한 배지에 절편체를 배양한다.

■ 내부감염 세균

식물체에서 내부감염은 흔히 간상세균에 의한 것으로 특히 *Bacillus licheniformis* 나 *B. subtilis*가 많다. 이들의 포자는 열, 건조, 저온 등의 불량환경과 자외선 및 살균액에도 견디므로 이들을 제거하기 위해서는 식물재료 뿐만 아니라 실험실 내의 공기와 바닥까지도 청결하게 유지해야만 한다.

■ 내부감염 방지법

내부감염을 방지하는 방법에는 두 가지가 있다. 배양의 절편을 선택할 때 오염이 되지 않는 분열조직을 배양하는 것과 항생제를 이용하여 세균을 제거하는 방법이 있다. 항생제로는 penicillin(8mg/l), ampicillin (2mg/l), gentamicin(4mg/l), tetracycline(4mg/l), chloramphenicol(8mg/l), imipenem(2mg/l) 및 kathon (8mg/l) 등이 있다. 항생제의 사용으로 세균의 번식은 억제할 수 있으나 흔히 식물독성(phytotoxin)을 나타내므로 배양의 효과는 높지 않다. 그러므로 가장 효과적인 방법으로 내부감염을 극복하기 위해서는 분열조직 절편을 이용하는 것이 좋고 항생제는 보조수단으로 이용하는 것이 좋다.

■ 배양용기의 봉합

접종이 끝난 배양용기는 배양실로 옮기기 전에 적절한 방법으로 마개를 하게 된다. 마개는 주로 배지의 건조를 막고 외부로부터 미생물의 침입을 막기 위한 것이지만 기내에서 식물체가 형성한 CO₂와 ethylen을 밖으로 방출하고 필요한 O₂가 외부에서 들어 갈 수 있는 역할을 할 수 있어야 한다.