11장. 반수체식물의 생산 기술(조직배양)

1절. 식물의 반수체

1-1. 반수체의 생성기원

일반적으로 유성생식을 하는 식물은 생식 성장 과정을 거치면서 다음 대의 개체를 형성하게 되는데, 드물게는 접합 없이 난핵 또는 웅핵이 단독으로 발육하여 배를 형성하는 경우도 있다. 이러한 식물체는 염색체의 수가 정상개체의 반수에 해당하는 염색체만 가지게 되므로 반수체(haploid)라고 명명하고 있고, 배수적인 측면에서는 이러한 현상을 반수성(haploidy)라고 부르고 있다. 즉 반수체란 어떤 식물종의 체세포 내에 그들의 배우자가 갖는 염색체의 수와 동일한 수의 염색체를 갖는 개체를 말한다.

자연 상태에서 발견되는 반수체는 일종의 비정상적인 생식과정에 의해 생성되는 것으로서 발생기원 면에서 보면 수정되지 않은 난세포가 발육하여 배를 형성하는 처녀생식(gynogenesis), 웅성배우자나 웅핵이 단독으로 발육하여 배를 형성하는 동정생식(androgenesis), 배낭 내의 체세포 이외의 조세포(synergid)나 반측세포(antipodal cell)가 배를 형성하는 무배생식(apogamy) 등 크게 3가지 과정에 의해 반수체가 발생되지만, 식물에 따라서는 웅핵과 난핵으로부터 유래된 염색체가 각각 반감되어 키메라형 반수체를 형성하는 양핵단위생식(semigamy)도 알려져 있다. 이외에도 재배종 보리와 야생의 보리를 중간 교배시키면 2배체의 접합자를 형성하지만 배가 발육되는 과정에서 야생종에서 온 염색체가 점차 소실되고 재배종 보리의 염색체만 남게 되어 반수체가 되는 bulbosum 법도 있다.

① 난세포 기원의 반수체

정상적인 수정이 이뤄질 경우 염색체 수에 있어서 체세포의 반수에 해당하는 n 개만 갖는 웅핵과 역시 반수의 염색체를 가진 난핵의 접합에 의해 $2n$ 의 배를 형성하게 되므로 부모와 자손의 배수성은 항상 같아지게 되어 있다. 그러나 드물지만 자연계에서 배낭 내의 체세포가 웅성배우자를 받아들이지 않고 단독으로 발육하여 반수성의 배를 형성하는 경우가 있는데 이러한 현상을 처녀 생식이라고 한다.

② 웅핵 기원의 반수체

수분 후에 배낭 속으로 들어가 웅핵이 난핵과 융합하지 못하고 단독으로 발육하여도 반수체가 되는데 이 때 반수체의 핵은 부계에서 유래한 것이고 그 세포질은 모계의 것이다.

③ 무배 생식

배낭 안에 들어있는 체세포 핵 이외의 조세포 핵이나 무측세포 핵이 발달하여 배를 형성하는 경우로 넓은 의미로는 자성생식에 포함된다. 대부분의 경우 조세포가 단독으로 발육하여 배를 형성하는 것으로 알려져 있다.

④ 다배현상에 의한 반수체

식물에 따라서는 하나의 배주 내에 한 개 이상의 배가 형성되는 경우가 있는데 이를 다배현상이라고 하며 이와 같은 과정을 거쳐서도 반수체가 형성된다. 다배현상으로 형성된 배는 모두 2배체일 수도 있고($2n-2n$), 하나는 2배체 다른 하나는 반수체일 수도 있으며($2n-n$), 모든 배가 반수체일 수도 있다($n-n$).

⑤ 양핵단위생식

웅핵이 난세포 속으로 들어가서 난핵과 융합하지 않고 웅핵과 난핵이 각각 독립적으로 분열하여 반수성세포로 구성된 키메라형 배를 형성하는 경우를 말한다.

반수체(haploid)	진정반수체(euhaploid)	단수성반수체(monohaploid)	
		배수성반수체(polyhaploid)	이질배수성반수체 동질배수성반수체
	이수성반수체(aneuhaploid)	disomic haploid	
		addition haploid	
		nullisomic haploid	
substitution haploid			
		misdivision haploid	

반수체 식물은 자연 상태에서 극히 낮은 빈도로 나타나는데 이는 이용하는 측면에서 볼 때에는 불리한 요소로 작용하지만 식물체의 입장에서 자손의 수의 감소와 직결되기 때문이다. 따라서 자연 상태의 반수체의 빈도가 증가하기를 기대하기보다는 인위적으로 제어할 수 있는 방법을 개발하여 사용하고 있다.

1-2. 반수체의 육성방법

- ① 종속 간 교배에 의한 반수체 생산
- ② 지연수분에 의한 반수체 생산
- ③ 다핵식물을 이용한 반수체 생산
- ④ 화분 이용에 의한 반수체 생산
- ⑤ 물리적 처리에 의한 반수체 생산 - X선
- ⑥ 화학적 처리에 의한 반수체 생산

1-3. 반수체식물 유도의 개요

일본인 생물학자 Shimakura(1934)가 꽃가루를 시험관에서 처음 배양한 것은 감수분열에 대한 생리를 연구하기 위한 것이었다. Guha와 Maheshwari(1964)도 같은 목적으로 독말풀(Datura innoxia)의 완숙한 꽃가루를 배양하였다. 이를 통해 kinetin과 코코넛 밀크, 포도주스 등의 natural complex를 포함하는 배지 상에서 약의 안쪽으로부터 무수한 배 형태의 구조물인 배양체(培養體, embryoid)가 나타나는 것을 보았으며, 이들이 결국 소식물체로 되는 것을 관찰하게 되었다. 1966년 그들은 이들이 화분립에서 유래한 배양체인 것을 확인하였다. 화분체에서 기원한 식물은 체세포 염색체가 2배성의 반수로 되어 있는 반수체(haploid)였다. 이 논문은 광범위한 작물로부터 반수체를 생산하기 위하여 약배양 또는 화분배양기술을 발전시키고자 하는 세계적 규모의 흥미로운 연구 자극제가 되었다. 왜냐하면 식물 육종에 있어서 기초적 또는 응용적인 측면에서 무한한 가능성이 있기 때문이었다.

초기에는 대부분 종속간 교잡, 지연수분, 방사선처리 등을 이용하였다. 1964년 기내에서 반수체를 획득한 이후에는 약이나 화분을 배양한 반수체 획득 연구가 활기를 띠게 되었고, 1960년대 후반에는 담배(1967), 벼(1968)의 약배양에서 반수체를 얻었다. 그 이후 식물조직배양과 함께 지속적으로 발전하여 근년에는 260여종 이상에서 반수성 캘러스나 식물체를 얻는데 성공하여 약배양 또는 소포자배양법은 작물육종의 한 방법으로 정착되었으며, 육종연한 단축에 크게 기여하고 있다.

2절. 생체에서 반수체 유도

식물의 육종에서는 반수체를 이용하기 위하여 자연 상태에서 자발적으로 일어나는 반수체를 찾거나 인위적으로 이들을 만들려고 많은 노력을 하였다. 그 중 생체에서 반수체를 생산하는 방법은 다음과 같다.

자성단위생식 (雌性單位生殖)	자연상태에서는 원연간 교잡 특히 속간교잡에서 나타난다. 인위적인 방법으로는 방사선을 조사에 의하여 불임이 된 화분은 수분시키면 자성 배우체만이 성장하여 반수체가 형성된다.
웅성단위생식 (雄性單位生殖)	수정 전에 난세포의 핵이 제거되거나 비활성되어 화분의 핵만을 가진 난세포가 발달함으로써 반수체 개체가 생산된다.
게놈의 배제	극히 일부의 종간과 속간 잡종에서 나타나는 현상으로 수정 후에 genome 하나가 배제되어 하나의 genome만이 있는 배가 발생하여 반수체가 된다. 예를 들면 보리(<i>Hordeum vulgare</i>)와 보리(<i>H. bulbosum</i>)사이의 종간잡종에서는 반수체가 생산된다.
반결합 (semigamy)	난세포의 핵과 발아된 화분의 핵이 각각 반수체 키메라를 만드는 경우가 있다.
화학물질 처리	화학물질을 처리하여 어느 한 쪽의 배우체 염색체가 배제된다면 인위적으로 반수체의 출현을 유도할 수 있다. 이러한 물질로는 toluen blue, maleic hydrazide, nitrous oxide, colchicine, chloramphenicol 및 parafluorphenylalanine 등이 있다.

3절. 기내에서의 반수체 유도

기내에서 자성배우체(female gamete)와 웅성배우체(male gamete)를 자극해서 반수체를 유도할 수 있다. 생체에서 반수체 생산은 대부분 난세포나 조세포가 자극을 받아 수정되거나 수정되지 않고 자라는 자성단위생식에 의해서 이루어진다. 그러나 기내에서는 반수체의 유도는 주로 반수체 세포로부터 직접 기내에서 반수체를 생산하거나 또는 생체에서와 같이 반수체 생산방법은 유사하나 반수체 생산 과정이 기내에서 이루어진다.

3-1. 약배양

약(藥)은 화기 중에서 수술대의 끝에 달린 수생기관이다. 약배양에 이용되는 부분은 약이지만 실체는 화분 또는 화분의 초기발육 상태인 소포자들이다. 약배양은 화분립을 배양하는 것보다 식물체로의 재생은 쉽지만 약벽을 구성하고 있는 2n조직이 재생될 가능성이 있고 캘러스가 형성될 가능성도 높아 순수한 2배체의 획득률이 화분립이나 소포자 배양에서 보다는 낮다.

미국 가시독말풀(*Datura stramonium*)의 어린 봉오리로부터 약을 빼내어 배양한 결과 식물체가 형성되는 것을 볼 수 있었다. 또 이 식물체의 유래를 조사한 결과 약 안에 있는 화분(anther)이 분열하여 배발생(embryogenesis)과 같은 형태변화(morphogenesis)를 거쳐 온전한 식물체가 형성됨을 알 수 있었고, 더욱이 이 식물체의 염색체가 화분과 같이 체세포의 반수밖에 없는 것으로 판명되었다. 이것이 반수성 부정배형성이라 불리는 현상이다. 현재 담배, 벼, 보리, 유채 외에 감자, 가지 등의 작물이나 커피, 고무 등의 목본성식물, 백합, 프리자 등의 구근식물 등에서도 반수체를 얻어내고 있지만 아직까지는 분열하는 화분울도 낮고 전혀 반수체를 얻지 못하고 있는 유용식물도 많이 있다. 그래서 기술적으로 여러 연구

가 이루어지고 있는데 그 내용은 다음과 같다.

- ① 일정기간 동안 봉오리를 10℃ 저온에 처리한 후 약을 끄집어내어 배양하는 것
- ② 약을 염기 조건하에 두는 것
- ③ 환원제로 처리하는 것
- ④ 정제도가 높은 한천을 사용하는 것
- ⑤ 액체 배지상에 약을 띄워서 배양하는 방법

<약배양에 영향을 미치는 요인>

공여식물체의 성장환경	약은 모체의 영향을 많이 받기 때문에 식물체의 연령과 생육환경에 따라 약배양의 성공여부가 결정된다. 연령은 어린 식물체일수록 재생율이 높고 같은 개체 내에서도 일찍 출현된 가지가 나중에 나온 것보다 좋다. 모체는 온도, 광성 및 습도 등의 환경이 조절되는 곳에서 재배할 때 재현성 있는 결과를 얻을 수 있다. 일장에 따라서도 반응에 차이가 있다. 담배나 유채는 8시간의 단일 빛 조건에서 재배된 식물체에서 재생률이 높다. 또한 질소 시용량에 따라서도 차이가 있는 바 담배는 질소질 비료를 충분하게 시용한 것보다 부족하게 준 식물체의 약에서 재생률이 높았다.
인자형의 선택	약배양은 재료의 인자형에 따라 재생률에 차이가 있다. 즉, 같은 종 내의 품종은 물론 계통 간에도 반응의 차이가 있다. 밀의 25개 품종을 가지고 실험한 결과에 따르면 겨울밀은 봄밀보다 약배양이 잘되며 변이성도 크고 밀과 호밀의 교잡종이 약배양이 가장 잘된다고 한다. 꽃양배추의 약배양에서는 품종간에 차이가 있을 뿐만 아니라 배지간에도 유의성 있는 차이가 있음이 보고되었고 하계종보다 동계종의 반응이 더 우수하다고 한다.
약 분리 시기	약배양시 약을 분리하는 시기가 중요하다. 대부분의 연구 결과에서 나타난 분리 시기는 핵이 4분자기(tetrad)기 이후에서부터 제1화분립 유사 분열기사이의 단핵소포자기(單核小孢子期)임이 밝혀졌다. 즉, 4분자로부터 방출되는 시기와 제1화분집 유사 분열기 사이계 있는 단핵소포자기의 상태의 약을 분리하였을 때가 약배양의 적기이다. 정확한 발육단계는 현미경을 이용하거나 형태적인 특성을 기준으로 판단할 수 있다. 담배에서 꽃봉오리 채취 시기는 꽃잎이 바로 보일 때가 가장 좋다. 배추에서는 꽃잎이 수술의 1/2일 때가 적기이다.
전처리	전처리는 화분의 배형성을 촉진시키기 위하여 배양 전에 가해지는 자극으로서 저온, 고온, 원심분리, 강압 등의 처리가 있다. 이 중에 가장 효과가 큰 것은 저온처리이다. 저온처리의 온도범위와 기간은 종에 따라 다르다. 중요한 점은 처리시기가 화분의 발육단계와 맞추어 이루어져야 한다는 것이다. 처리방법은 줄기의 기부를 잘라 물병에 꽂거나 꽃봉오리에 식물체의 일부를 붙여 비닐 봉지나 foil에 싸서 4~10℃에 둔다. 처리기간은 1~30일 사이이다.
접종 및 배양	일반적으로 꽃봉오리를 sodium hypochlorite 0.5~1%액에 10~15분간 표면살균하고 증류수로 3회 세척한 다음 멸균수로 3회 정도 세척한 다음 이로부터 약을 분리한다. 약 분리 할 때 약에 손상이 가지 않도록 조심해야 한다. 약배양은 접종 후 온도나 일장에 영향을 받는데 온도는 30~35℃이고 처리기간은 1일에서부터 30~40일까지 다양하다. 온도처리 이후에는 20~25℃로 낮추어 배양한다. 일장은 식물에 따라 크게 차이가 있으나 배 발생 시에는 조명을 해주어야 한다.

3-2. 화분배양

화분(pollen grain)은 성숙된 약으로부터 분산되기 전후의 상태를 의미한다. 화분배양시 일

반적으로 성숙된 화분보다 화분 발생초기의 소포자(microspore)상태의 화분을 이용하므로 소포자배양이라고도 표현하고 있다. 어느 정도 성숙된 화분을 이용하는 경우도 있으므로 소포자배양과 화분배양을 구분하여야 될 것이다. 화분배양(pollen culture)은 약 안에 있는 화분을 꺼내어 접종하는 것이다.

배양에 이용되는 배지는 고체 또는 액체배지에서 모두 가능하다. 당분의 농도는 일반적으로 2~4%이지만 배추 등에서처럼 10%인 것도 있다. Mineral의 요구도는 일반적으로 MS배지나 Nitsch의 대량염류배지가 흔히 사용된다. 약으로부터 방출되는 독성물질 등을 제거하고자 activated charcoal이 이용되기도 한다.

(1) 소포자의 분열

약이나 화분을 배지에 접종하면 이 중에서 반응을 나타내어 일부는 소포자가 세포분열을 하여 다세포가 되어 화분배를 형성한다. 소포자의 일반적(정상적)인 분열형태는 그림에서 in vivo와 같이 비대칭분열(非對稱分裂, asymeric division)이고 분열 후에는 생식세포와 영양세포(생식세포보다 크다)가 생긴다. 생식세포는 처음에 화분립의 내막에 붙어 있다가 마침내는 영양세포질 속에 나타나서 분열을 계속하지만 영양세포는 그대로 있다. 그러나 in vitro 에서는 위에서의 정상세포(in vivo)와는 그림과 같이 3~4가지 경로로 이루어진다. 3가지 경로에서는 제1차 화분 유사분열에 의해서 두 개의 대칭적인 영양핵이나 생식핵이 형성된다. ①제1차 화분 유사분열 후 형성된 비대칭적인 2개의 핵(영양핵, 생식핵)중 영양핵만이 분열하고 생식핵은 퇴화된 후 반수체의 배가 형성되는 경우 ②①과 유사하나 생식핵의 퇴화된 없이 영양핵만이 분열하여 반수체배가 형성되는 경우 ③②와 유사하게 분열하는 것으로 생식핵만이 분열하여 반수체배가 형성되는 경우가 있다. 4가지 경로에서는 3가지 경로에 한 가지를 더 추가하여 영양세포와 생식세포가 모두 분열하여 반수체 배를 형성하는 것으로 현재까지 독말풀에서만 발견되었다. 이상과 같이 반수체배가 형성되는 경로가 다양하다. 따라서 화분으로부터 유래된 반수체 식물은 서로 동일하지 않을 수 있다.

3-3. 기타 배양

배배양 (胚培養, embryo culture)	극히 일부의 종간과 속간 잡종에서 나타나는 현상으로 수정 후에 genome 하나가 배제되어 하나의 genome만이 있는 배가 발생하여 반수체가 된다. 예를 들면 보리(Hordeumvulgare)와 보리(H.bulbosum)사이의 종간잡종에서는 반수체가 생산된다.
배주배양 (胚珠培養, ovule culture)	수정되지 않은 배주를 배양하는 방법이다(보리, 거베라, 페튜니아에서 반수체식물이 생산되었음).
방사선 조사	배우체(配偶, gametophyte)에 방사선 등을 조사(照射)하여 자방배양 등의 방법을 통해서 반수체를 유도할 수 있다. 예를 들면 페튜니아의 수술에 방사선을 조사하여 정상인 페튜니아에 이를 수분시킨 후 자방배양을 하면 기내에서 반수체 식물을 유도할 수 있다.

4절. 반수체의 이용

(1) 육종연한 단축

반수체(haploid)는 한 쌍의 염색체만 갖고 있어서 체세포와 같이 두 쌍의 염색체를 갖는

이배체(diploid)에서는 표현형으로서 나타나지 않는 열성형질도 표현형으로 나타나기 때문에 유리한 열성유전자를 검출하는데 대단히 유리하다. 그러나 약배양이나 화분배양이 현실화되어 반수체를 쉽게 얻게 되었고 육종 연한도 대폭 단축할 수 있는 경우도 나왔다. 반수체 이용의 좋은 예로는 돌연 변이 세포의 생산이며 열성의 치사성 유전자에서는 특히 유효하다. 일반적으로 반수체로부터 분리된 원형질체나 반수성세포를 돌연변이원에서 처리 하여 원하는 형질을 갖는 돌연변이주를 찾아내면 된다.

(2) 동형접합체의 생산

반수체를 생산하여 염색체를 배가시키면 가장 빠른 방법으로 동형접합체(homogote)를 유기할 수 있다. 즉, 이형접합체는 후대에 계속 변이를 하므로 이를 동형 접합체로 만들기 위해서는 5~7세대동안 자가수분을 계속하여야 한다.

(3) 돌연변이체 생산

반수성세포를 사용한 돌연변이주 생산은 여러 가지 영역에서 사용되고 있는데 기초 연구뿐만 아니라 응용으로의 길도 열리고 있다. 예를 들면 돌연변이원에서 처리한 반수성세포를 염 농도가 높은 배지에서 생육시켜 선발하여 내염성 식물을 육성하려는 시도나 고온 또는 저온 하에서 생육시켜 내서성 또는 저온내성 식물을 육성하려는 시도 등이 있다. 같은 방법으로 농약이나 병원균이 생산하는 독소에 대한 내성식물도 육성하고 있어 응용가치가 넓어졌다.

(4) 체세포 잡종을 통한 육종

반수성세포나 반수성 부정배에서 육성한 식물은 일반적으로 약간 몸이 가늘어져 정상적으로 생육하여 꽃을 피운다. 그러나 반수체에서는 화분이 형성되지 않거나 또는 수정능력이 없는 화분만 형성된다. 이것은 염색체가 한조밖에 없어서 정상적인 감수분열이 되지 않기 때문이며 이 상태로는 어떤 우량형질을 갖고 있더라도 사용할 수 없다. 그래서 어린 싹은 콜히친과 같은 염색체를 배화제로 처리하는 방법이 취해지고 있다. 이 방법으로 배화된 식물체는 완전히 같은 유전조성을 가진 두 쌍의 염색체를 갖고 있어서 열성형질도 그대로 표현형으로서 나타나고 화분도 정상적으로 만들어지기 때문에 육종에 이용될 수 있다.

(5) 초용성주의 육성

특수한 이용 방법으로서 초용성주의 육성을 들 수 있다. 아스파라거스에는 수주와 암주가 있는데 각각의 포기에는 수꽃, 아니면 암꽃만이 핀다. 이 암수의 결정은 성염색체에 의해 이루어지기 때문에 X염색체를 가진 화분에서 수정하여 형성된 종자에서는 암주가, Y염색체를 가진 화분에서 수정하여 형성된 종자에서는 수주가 출현하는데 그 출현률은 반반이다. 그런데 아스파라거스의 생산성은 수주쪽이 높기 때문에 얻어진 종자가 모두 수주가 된다면 대단히 유리하다. 이러한 목적을 달성하기 위해 화분배양에서 반수체를 육성 하여 배화처리를 하였다. 그 결과 X염색체를 가진 화분에서 육성한 식물의 성염색체는 XX가 되어 암주가 되었지만 Y염색체를 가진 화분에서 육성한 식물의 성염색체는 YY가 되어 이 식물의 화분은 모두 Y염색체를 갖는 셈이 되고 교배하여 된 종자는 모두 수주가 되어 본래 목적은 달성되었다. 여기서 YY의 성염색체 조성을 가진 수주를 초용성주라 하는데 그의 이용가치가 대단히 높다. 한편 체세포를 배양하면서 염색체를 감수시켜 반수성세포를 얻는 방법도 고려되고 있어 미생물에서 쓰이고 있는 파라플루오르페닐알라닌은 배양 중에 자연히 일어나는 염색체 배화를 억제하는 효과가 있어 반수성세포를 반수성 그대로 유지하는데 이용할 수가 있다.