

자작나무 동아의 액체질소 내 초저온 보존

안영희

중앙대학교 생물자원과학계열

Cryopreservation of winter vegetation buds of *Betula platyphylla* var. *japonica* in liquid nitrogen

Young Hee Ahn

Division of Biological Science and Resources, Chungang Univ., Ansong 456-756, Korea

ABSTRACT

In woody plant germplasms, using prefrozen dormant buds for materials is one way to achieve successful cryopreservation. The protocol of cryopreservation for White birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) winter vegetative buds is the following. First, the branches of White birch were collected in January 20, when the vegetative buds were still in a state of quiescence. The winter buds with about 5mm of xylem tissue were removed from the branches. They were dehydrated to moisture contents about 44% by air dry treatment. The buds were prefrozen, with the temperature being decreased by 5~-20℃ and then transferred to the LN(liquid nitrogen) maintained below -196℃. After cryopreservation, the vegetative buds were rapidly thawed in a water bath at 40±5℃. In this case, the cell survival rate of samples was about 86%. After sterilization, buds were then cultured on MS medium. These results demonstrate the feasibility for cryopreservation of winter vegetation buds of *Betula platyphylla* var. *japonica*.

Key words : Quiescence, Dormant bud, Prefrozen, Dehydrate, Rapidly thaw

서 언

다양한 식물 종들이 지니는 형질 다양성은 새로운 식물 육종 및 식물자원 소재로의 활용을 위해 매우 중요하다. 그러므로 풍부한 식물유전자원의 확보와 더불어 식물 종의 장기보존이 필요하다. 그러나 현재 대부분의 식물 종 및 품종의 계통보존은 주로 포장재배에 의해 유지되고 있다. 이와 같은 식물 종

보존을 위한 노지 재배 및 유지관리는 많은 노력과 비용이 소모되며 각종 병해충을 비롯해 급작스런 기상재해에 따른 종 소멸도 우려된다.

따라서 최근에 이와 같은 문제점들을 해결하기 위하여 종자(안, 2001a)는 물론 영양번식성 식물을 위한 식물의 영양계(Ahn and Sakai, 1994)를 초저온 상태에서 장기간 동안 안정적으로 저장하는 방법이 연구되고 있다. 액체질소(-196℃)내와 같이 초저온 조건에서는 식물체의 모든 생화학적 대사활성이 거

의 정지상태에 이르게 되므로 식물체의 생리적, 유전적인 변이 억제는 물론 최대한의 장기보존이 가능한 이상적인 방법이다. 식물체의 초저온보존법은 Sakai(1960)에 의해 휴면중인 버드나무 줄기를 -30℃에서 예비동결하여 1년간 액체질소내에 보관한 후 정상적인 식물체로 재생시킴으로서 최초로 가능성이 인정되었다. 이와 같은 초저온 보존 이론은 다양한 세포 동해방어 물질의 개발과 보존 기술의 발달로 인해 오늘날에는 세포완속동결법(Ahn, 1995a), 간이동결법, 유리화법(vitrification), 인공종자건조법(松本 등, 1996) 등이 널리 시도되고 있다. 특히 최근에는 내한성이 결여된 열대성 식물(Takagi et al, 1997) 유전자원에까지 초저온 보존 방법이 이용되고 있다.

식물유전자원의 초저온 보존 과정에서 식물세포의 동결피해 없이 장기저장하기 위해서 세포의 치명적인 세포내 동결을 회피할 수 있는 적절한 전처리 방법의 적용이 중요하다(Kuma and Harada, 1983). 그러나 각종 동해방어물질 전처리 과정에서의 독성 문제를 비롯하여 전처리 장비의 고가성과 조작상의 번거로움 등이 문제로 지적되고 있다(Ahn, 1995b). 그러므로 건조내성을 지닌 식물조직 혹은 종자의 경우에는 간편한 건조 전처리법이 안전하고 경제적인 방법으로 제시되고 있다.

자작나무속 식물은 국내에 7종 1변종이 자생하고 있다(이, 1993). 대부분의 종은 성장속도가 빠르며 잎과 줄기의 관상가치가 높고 수형이 아름다워 조경용수로 흔히 식재되며 재질이 가볍고 단단하여 좋은 목재로 이용되고 있다. 그러나 자연상태에서 종간의 교잡이 심각하여 고유의 형질을 지닌 수목이 점차 도태되고 있는 실정이다. 그러므로 실생번식에 의한 자작나무속 교잡종들이 수목시장에 범람하고 있는 현실로서 고유의 형질을 지닌 원종 영양계의 효과적인 장기보존의 중요성이 인식되고 있다.

본 연구는 자작나무 식물유전자원을 반영구적으로 안전하게 보존하는 방안으로서 건조내성 및 내한성이 획득된 겨울철 동아를 이용하여 간편한 건조전처리 방법에 의한 초저온보존 가능성을 모색하여 자작나무 영양계의 효과적인 종 보존 방안을 마련하고

자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 식물 재료

중앙대학교 온실에서 직경 35cm 용기에 재배한 5년생 자작나무(*Betula platyphylla* var. *japonica*)의 휴면중인 겨울철 동아(엽아)를 시료로 1994년 10월부터 1996년 3월까지 실험하였다.

2. 건조 전처리

외형적으로 정상적인 형태의 겨울철 동아를 날카로운 면도칼을 이용하여 줄기의 목질부 조직을 부착하여 채취하였다. 채취한 동아는 송풍정온건조기(Forced Convection Drying Oven; ADVANTEC FV-320)를 이용하여 10분, 20분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간 동안 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ 조건으로 건조 처리하였다(안과이, 1995). 동아의 함수량 조사는 103°C 조건의 건조기(dry oven)에서 24시간 동안 건조시킨 후 밀폐용기에서 1시간 동안 실온상태로 식힌 후 화학천평(Sartorius C-200)으로 평량하였다.

3. 초저온저장 및 해동

건조 처리된 동아는 냉동고의 온도조건을 $0^\circ\text{C} \sim -20^\circ\text{C}$ 에 이르기까지 교환하면서 간이동결하거나, $5^\circ\text{C} \sim -20^\circ\text{C}$ 까지 프로그래밍 세포동결기(SACO, ACF-101)로 완속동결법에 의한 예비동결처리($1^\circ\text{C}/\text{min}$)를 하여 곧바로 1.8ml의 Cryotube(Nunc, Denmark)에 밀봉하여 알루미늄제의 Canister(Waken, Japan)에 3개씩 고정하여 -196°C 의 액체질소 중에 급속냉각시켜 초저온 저장하였다. 완속동결시에는 -2.5°C 에서 액체질소로 냉각된 편셋을 이용하여 냉각 튜브에 식빙하였다(Ahn, 1995b). 액체질소 용기에서 24시간 이상 초저온 저장된 상태의 종자는 $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 의 수조내에서 급속 해동 하였다.

4. 배양 및 생사 판정

초저온 저장이 완료된 자작나무의 동아는 전착제 Tween-20을 첨가한 0.5% Sodium Hypochlorite 용액

에 15분간 멸균하고 멸균수로 3회 이상 세척하여 MS 기본배지에 Myo-Inositol 100mg/l, Thiamine 1mg/l, BAP(6-benzylaminopurine), Sucrose 3%, Agar 0.7%의 고체배지에서 25℃ 조건의 3,000lux 연속광 조사하에서 배양하였다. 발아한 동아의 발근용 배지는 상기의 배지조성에 BAP 대신 IBA(indole-3-butyric acid) 0.1mg/l을 첨가하였다.

자작나무 동아조직 세포의 생존은 0.01% FDA(fluorescein diacetate)로 형광염색하여 실온에서 20분간 방치한 후 형광현미경으로 관찰하였다(안, 2001b).

결과 및 고찰

그림 1에서 보는 바와 같이 자작나무 동아의 수분 함량을 조사한 결과 1994년 10월 20일에 51.93%로 가장 높게 나타났다. 또한 1995년 1월 20일의 동아

함수량은 42.43%로 가장 낮게 조사되었으며 이 후 점차 증가하는 경향을 나타내었다. 일반적으로 북반구의 온대지역에 속한 우리나라에서 12월 하순에서 1월 중순까지는 가장 한파가 심한 시기로서 온대성 낙엽수목들의 내동성도 가장 높게 나타나는 시기라 할 수 있다. 본 실험에서 조사된 조직내 수분함량 결과는 자작나무의 내동성 증대 과정에서 겨울철 동아의 성장점 조직 동해방지를 위해 일어나는 동아의 기관의 동결 및 이에 따른 조직의 탈수현상이 진행된 결과로 사료된다. 酒井(1959)는 뽕나무 줄기의 수피조직에서 겨울철의 내동성과 탈수 저항성은 비례적으로 증대됨을 보고한 바 있다. 그러므로 예비실험 과정에서 온대성 수목류의 내한성이 가장 높고 조직의 수분함량이 가장 낮은 1월의 중하순경의 자작나무 동아가 건조내성이 가장 강한 것으로 조사되어 다음의 실험에서는 1월 20일을 전후하여 채취된 동아를 시료로 사용하였다

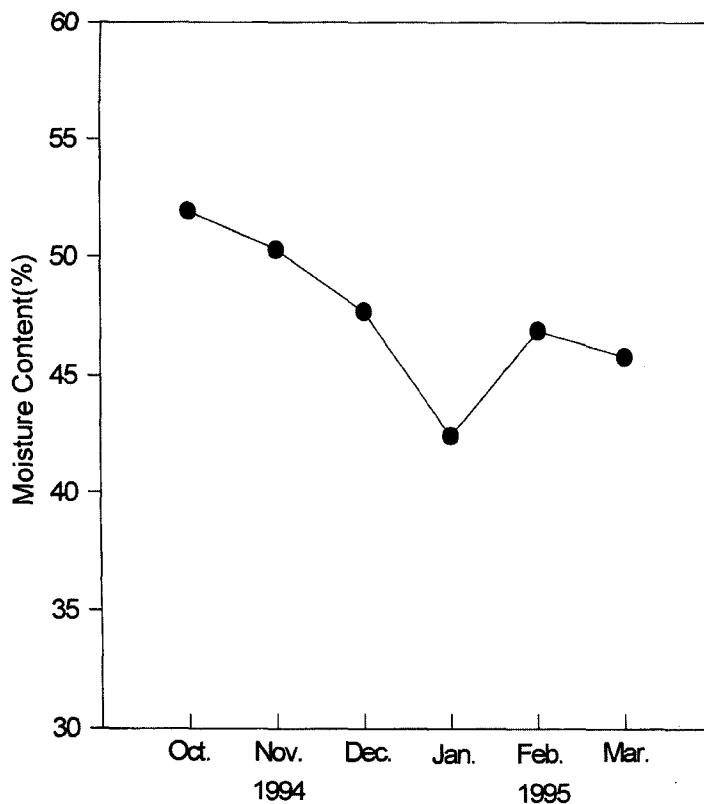


Fig. 1. Changes of moisture contents in *Betula platyphylla* var. *japoica* winter buds collected from Oct.,1994 to Mar.1995

Table 1. Moisture contents and survival rates of *Betula platyphylla* var. *japonica* winter buds dried by various times in the forced convection drying oven.

Drying time	Moisture contents(%)	Survival of winter buds1(%)	
		Before in LN ₂	After in LN ₂ ²
Control	47.80	100	0.00
10 min.	44.32	83.33	83.33
20 min.	31.14	70.00	66.66
30 min.	25.26	46.67	40.00
1 hr.	14.81	26.67	10.00
2 hr.	13.58	6.67	0.00
3 hr.	6.53	0.00	0.00

¹The collection date of materials was Dec. 20. 1994.

²The buds were being stored in LN₂ for 24hrs.

Table 2. Effect of different prefreezing regimes on the survival rates of *Betula platyphylla* var. *japonica* winter buds after storing in LN₂ for 24hrs.

Prefreezing regimes	I	II	III	IV	V
Survival rates(%)	36.67	53.33	80.00	83.33	86.67

Duncan's Multiple Range Test

※ 1. The collection date of materials was Jan. 20. 1995. And all of the materials were dried for 10min. at 50℃ in the forced convection drying oven.

2. Prefreezing regimes :

I : In the ice bath(0℃) for 24hr.

II : 0℃(8hr.) → -5℃(8hr.) → -10℃(8hr.)

III : 5℃ → -10℃(Cooling rate : 1℃/min.)

IV : 0℃(5hr.) → -5℃(5hr.) → -10℃(5hr.) → -15℃(5hr.) → -20℃(5hr.)

V : 5℃ → -20℃(Cooling rate : 1℃/min.)

표 1에서 1월 20일에 채취된 시료에서 함수율이 47.80%로 조사되었으나 10분간의 건조처리에 의해 44.32%로 초기에 비해 7.3%의 수분저하가 나타났다. 또한 20분간 건조처리에 의해 31.14%, 1시간 처리에 의해 14.81%, 2시간 처리에 의해 13.58%로 나타났다. 3시간 건조처리 이후의 수분함량은 6.53%로 초기에 비해 86.5%의 수분저하를 나타내었다. 자생 *Aquilegia*속 식물의 종자(안, 2001a)에서 120분간의 건조처리는 약 63%의 수분저하를 나타내었던 바, 식물의 종자류에 비해 수분 저하율은 자작나무 동아에서 9%이상 현저하게 나타났다. 건조 무처리 상태의 조직세포 형광염색 검경에 의해 초기에 100% 생존하였던 자작나무의 동아는 -196℃ 조건하의 액체질소에 24시간 이상의 저장상태에서 전혀 생존할 수 없는 것으로 조사되었다. 그러나 10분간의

건조처리에 의해 수분함량이 44.32%로 저하된 동아를 표 2에 나타난 바와 같이 5~-20℃까지 완속동결법으로 예비동결 처리하여 액체질소에 저장하면 83.33%가 생존할 수 있는 것으로 나타났다. 종자는 물론 살아있는 식물조직에 대한 전처리는 -196℃의 액체질소에 의한 치명적인 물리적, 화학적 조건에 대한 내환경압을 증대시키고 종자의 호흡 및 생리대사를 억제시키는데 필수적이다(Roos and Stanwood, 1981). 전처리 과정에서의 조직의 탈수는 식물 세포내의 동결수를 제거해버리므로 초저온 상태의 액체질소에서 급속냉각 시에 발생하는 치명적인 세포내 동결을 방지할 수 있다(Okamura, 1973).

50±1℃ 조건으로 10분간 건조 전처리한 자작나무 동아의 효과적인 초저온보존을 하기위해 적절한 예비동결 조건을 모색하였다. 관행적으로 이용하는

Table 3. Survival rates of the tissue(and/or organs) in *Betula platyphylla* var. *japonica* winter buds cooled to -196°C.

Tissue and/or organs	Survival rate(%)
Meristem in bud	0.0
Bud	73.3
Bud which a part of xylem attached	86.7

※ 1. The collection date of materials was Jan. 20, 1995. And all of the materials were dried for 10min. at 50°C in the forced convection drying oven.

2. All of the samples were prefrozen at 1°C/min. from 5°C to -20°C.

Table 4. Survival rate and leaf formation of *Betula platyphylla* var. *japonica* winter buds by different thawing temperature regimes after storing in LN₂.

Thawing regimes	5°C		25°C		40°C	
	Air	Water	Air	Water	Air	Water
Survival rate(%)	13.3	16.7	40.0	63.3	76.7	86.7
Shoot formation(%)	0.0	6.7	16.7	26.6	33.3	60.0

5가지의 예비동결 방안에 대한 결과는 표 2에 나타내었다. 24시간 동안 0°C 조건의 아이스박스에 전처리한 동아는 초저온보존에 의해 36.67%가 생존하였다. 그러나 냉동고를 이용하여 0°C 조건에서 8시간 -5°C에서 8시간, -10°C에서 8시간과 같이 간이동결법에 의해 순차적으로 동아를 예비동결한 경우에는 초저온 저장을 한 이후에도 53.3%로 생존율이 향상되었다. 식물조직의 예비동결 과정은 구조적으로 차이가 있는 조직내 세포의 균일한 탈수를 유도하기 위한 과정이라 할 수 있다. 그러므로 예비동결에 의한 세포내 수분의 적절한 탈수는 세포내 용액의 점성을 높여 -70°C 이하에 이르기까지 과냉각 상태를 지속시키며 약 -110°C 이하에서 고체상태의 유리화(vitrification)를 유도할 수 있다(Franks, 1981). 그러므로 세포에 치명적인 세포내 동결을 회피시켜 식물조직의 초저온 보존을 가능하게 한다. 또한 동아를 프로그래밍 세포동결기를 이용하여 5°C에서 -10°C까지 1분당 1°C의 속도로 냉각하여 예비동결한 경우에는 80%로 세포의 생존율이 높아졌다. 0°C 조건에서 5시간, -5°C에서 5시간, -10°C에서 5시간, -15°C에서 5시간, -20°C에서 5시간과 같이 냉동고를 이용한 간이동결법 예비동결에 의해서 83.3%로 생존율이 높아졌다. 세포동결기에 의해 5°C에서 -20°C까지 1분당 1°C의 냉각속도로 냉각한 조건에서는 86.6%로

가장 높은 세포생존율을 나타내었다. 본 실험에서 나타난 바와 같이 프로그래밍 세포동결기를 이용한 완속동결법 예비동결처리가 초저온보존 시 세포생존율이 향상시킨다는 것을 알 수 있다. 그러나 세포동결기는 고가의 장비이며 조작성의 번거로움에 따르기 때문에 일반적으로 쉽게 이용하기 어려운 단점이 있다. 그러므로 본 실험에서 사용한 자작나무 동아와 같은 시료에 있어서는 여러 대의 냉동고를 이용한 간이동결법으로도 초저온보존에서 세포의 생존율을 높일 수 있다고 사료된다.

표 3은 자작나무 동아의 건조처리 및 초저온 보존시에 효과적인 시료의 조제방법에 대해 조사한 결과이다. 자작나무 동아를 멸균하여 높이 2mm 정도로 조제한 경정부는 앞에서 나타낸 전처리 및 액체질소 초저온보존 과정에서 생존할 수 없었다. 그러나 자작나무 줄기에서 동아를 상하지 않게 온전하게 채취하여 전처리 과정을 거쳐 초저온 보존한 경우에는 73.3%가 생존하는 것으로 나타났다. 또한 동아에 줄기의 목질부 조직을 일부 붙여 시료로 채취하여 동일한 전처리 과정과 초저온보존을 수행한 경우에는 86.7%가 생존할 수 있었다. 이와 같은 결과는 동아에 붙어있는 목질부 조직이 생장점 조직의 세포동결을 기계적으로 완충시킬 수 있으며 진달래과 식물에서 보고된 바(Ishikawa and Sakai, 1981) 있는 목질부



Fig. 2. Shoot and root regeneration of *Betula platyphylla* var. *japonica* cryopreserved in LN2.

에 기관의 동결을 유도하여 남아있는 동아의 수분을 탈수시켜 동결저항성을 높여주기 때문이라고 사료된다(酒井 and 西山, 1977).

표 4는 초저온보존 한 동아를 5℃ 및 25, 40℃의 공기 중 및 온수 중에서 각각 해동시킨 결과를 나타낸 것이다. 5℃ 조건의 공기 중에서 서서히 해동한 경우의 동아 조직 세포생존율은 13.3%를 나타내었으나 배양에 의해 식물체 재생은 전혀 불가능하였다. 동일한 온도조건의 온수 중에서 해동하였을 때에도 세포생존율은 16.7%, 식물체 재생율은 6.7%로 저조하였다. 그러나 25℃ 조건의 온수 중에서 동아를 해동시키면 26.6%를 배양에 의해 식물체로 재생할 수 있었다. 또한 40℃의 온수 중에서 급속 해동하였을 경우에는 86.7%의 조직세포 생존율이 나타났고 동아배양에 의해 60%의 식물체 재생율을 나타내어 본 실험에서 가장 효과적인 해동방법으로 조사되었다(그림 2). 식물의 세포 또는 조직을 낮은 온도에서 서서히 해동하는 경우에 초저온보존 과정에서 세

포내에 형성된 얼음핵(innocuous intracellular icecrystals)이 급작스럽게 성장하여 식물의 세포구조를 파괴하였기 때문이라고 사료된다(Yamada 등, 1990). 그러므로 초저온 보존 이후의 식물체 해동과정은 본 실험에서도 나타난 바와 같이 30~40℃의 온수 중에서 급속하게 가온하여 얼음핵의 성장을 방해하는 방법이 바람직하다고 제안하는 바이다.

적요

자작나무 식물유전자원의 효과적인 장기보존 방안을 구명하기 위해 동결전처리 된 겨울철 동아를 건조처리에 의해 초저온보존 시험하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 자작나무 동아는 내동성이 최고조에 달한 1월 20일경의 함수율이 42.43%로 가장 낮게 나타났다. 1월 20일에 채취한 동아를 10분간의 건조처리와 5~20℃까지 1분당 1℃ 하강조건으로 완속동결 전처리하여 -196℃의 액체질소에 초저온 보존한 경우의 세포생존율은 83.33%로 가장 이상적인 처리 조건으로 조사되었다. 자작나무 동아의 시료조제는 동아에 약간의 목질부 조직을 붙여 초저온 보존하는 경우에 86.7%로 세포생존율이 높게 나타났다. 24시간 이상 액체질소에 초저온 보존한 자작나무 동아는 40±5℃의 온수 중에서 급속 해동하는 경우가 86.6%의 세포생존율을 비롯하여 60%의 식물체 재생율을 나타내어 본 실험에서 가장 효과가 좋은 것으로 조사되었다.

인용문헌

Ahn, Y. H. 1995a. Cryopreservation of axillary buds of *Dendrathera grandiflorum* and subsequent plant regeneration. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 36:540-547.

Ahn, Y. H. 1995b. Survival by vitrification of *Dendrathera grandiflorum* axillary buds cooled to -196℃. C. A. U. Genet. Engin. Research. 7:6-12.

Ahn, Y. H. and A. Sakai. 1994. Survival by vitrification of *Dendrathera grandiflorum* shoot tips for cryopreservation. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 35:499-506.

- Franks, F. 1981. The nucleation of ice in undercooled aqueous solutions. *Cryo-Letters*. 2:27-31.
- Ishikawa, M. and A. Sakai. 1981. Freezing avoidance mechanisms by supercooling in some *Rhododendron* flower buds with reference to water relations. *Plant & Cell Physiol.*, 22:953-967.
- Kumu, Y. and T. Harada. 1983. Development of a whole plant from a shoot tip of *Asparagus officinalis* frozen to -196°C. *Jour. Facult Agr. Hakkaido Univ.* 61:285-294.
- Okamura, T. 1973. Studies on the state of water in soybean in relation to moisture content. *Res. Bull. Obihiro Zotech. Univ., Ser. I* . 8:89-317.
- Roos, E. F. and P. C. Stanwood. 1981. Effects of low temperatures, cooling rate, and moisture content on seed germination of lettuce. *Jour. Amer. Sci. Hort. Sci.* 106: 30-34.
- Sakai, A. 1960. Survival of twigs of woody plants at -196°C. *Nature* 185:393-394.
- Takagi, H., N. T. Thinh, O. M. Islam, T. Senboku and A. Sakai. 1997. Cryopreservation of vegetatively propagated tropical crops by vitrification. *Acta Horticulturae*. 461:485-494.
- Yamada, T., A. Sakai, T. Matsumura, and S. Hoguchi. 1990. Cryopreservation of apical meristems of white clover by vitrification. *Plant Sci.* 78:81-87.
- 松本敏一, 酒井昭, 高橋千昭, 山田員人. 1996. Encapsulation-Vitrification法によるユリ培養 莖頂の超低温保存. *植物組織培養*. 13(1):29-34.
- 酒井昭, 西山保直. 1977. リンゴの冬芽の液體窒素中での凍結保存. *園藝學會誌*. 46:169-172.
- 酒井昭. 1959. 木本類の耐凍性増大過程. *低温科學 (生物篇)*. 17:35-41.
- 안영희. 2001a. 건조전처리에 의한 자생 *Aquilegia*속 식물 종자의 초저온 저장과 발아. *한국자원식물학회지* 14(3):251-258.
- 안영희. 2001b. 식물 유전자원의 초저온 보존 in 백기엽 외 22인. *식물조직배양 기술(15장)*. 향문사. 서울. pp.321-339.
- 안영희, 이수성. 1995. 건조처리에 의한 양파 종자의 초저온 보존에 관한 연구. *중앙대학교 유전공학연구소 논문집*, 8(1):41-46.
- 이창복. 1993. *대한식물도감(5판)*. 향문사. 서울. pp.266-267

(접수일 2002. 5. 6)

(수락일 2002. 5.19)