

## 초저온 저장이 다릅나무 종자의 발아와 유묘의 성장 특성에 미치는 영향

한심희, 김찬수\*, 장석성, 이현주

국립산림과학원 산림유전자원부

### Effects of Cryopreservation on the Seed Germination and Growth Properties of Seedlings of *Maackia amurensis*

Sim-Hee Han, Chan-Soo Kim\*, Suk-Seong Jang, and Hyun-Ju Lee

Department of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

#### ABSTRACT

This study was conducted to investigate effects of cryopreservation by vitrification on the seed germination rate and growth and physiological properties of seedlings of *Maackia amurensis*. Cryopreservation significantly decreased the germination rate of seeds of *M. amurensis*, but the reduction of germination rate was mitigated by the treatment of cryoprotectant (plant vitrification solution, PVS2) before plugging into liquid nitrogen and fast thawing rate after cryopreservation. Long-term PVS2 exposure decreased seed germination rate, whereas cryopreservation time didn't have influence on seed germination rate. In addition, growth and physiological properties of seedlings were not affected by PVS2 exposing time and cryopreservation time. Therefore cryopreservation could be widely used as a technique of long-term ex situ conservation without any damage and deterioration of cells or tissues of the forest seeds. However, in order to increase the effect of cryopreservation, we have to develop the lower toxic cryoprotectant and suitable techniques to the structural or chemical properties of a variety of seeds.

**Key words** : vitrification, cryoprotectant, PVS2, thawing rate, *ex situ* conservation.

#### 서언

최근 인간의 산업 활동이 증가하면서 지구 환경이 급격하게 변화되어 많은 지역에서 산림 수목의 천연 분포지역이 파괴되고, 특정 생물의 멸종 속도가 증가하고 있다. 유전다양성 또는 유전 변이는 종간 또는 종내 유전적 차이를 의미하며, 종간 또는 종

내 유전 변이는 기후 변화, 새로운 병의 출현 및 오염의 증가와 같은 환경 변화에 대비한 천연 완충제(natural buffer) 역할을 한다(FAO, 1989). 따라서 유전자원 보존의 최종 목적은 환경 변화에 적응하는 식물의 능력을 안전하게 보호하고, 또한 미래 선발 육종을 위한 기반을 유지하는 것이다(Graudal *et al.*, 1995). 최근 주요 종들에 대한 유전자원 보존은 현지

\*교신저자 : E-mail : kimdaram@chollian.net

내 보존(*in situ* conservation), 현지 외 보존(*ex situ* conservation) 또는 이들 두 가지 방법을 조합하여 수행하고 있으며, 종자 저장은 식물 유전자원의 현지 외 보존을 위한 가장 효과적이고 효율적인 방법으로 평가되고 있다.

최근에 현지 외 유전자원 보존 기술로서 주목을 받고 있는 초저온 저장(*cryopreservation*)은 식물 유전자원을 안정된 상태에서 장기적으로 저장할 수 있는 기술이며, 소요 공간과 유지비용이 적게 든다는 장점을 가지고 있다(Sakai *et al.*, 2003). 초저온 저장은 -196℃의 액체 질소에서 모든 세포 분열과 대사 과정을 멈추게 하고, 식물 세포 또는 조직의 변형이 없이 이론적으로 무기한 저장할 수 있는 기술이다. 고전적인 초저온 저장 방법은 배양세포와 분열조직이 액체 질소에 냉각되기 전에 적당한 동결보호제 속에서 약 -40℃까지 천천히 조절하면서 냉각하는 방식에 의해 수행되었다(Mazur, 1984). 그러나 이러한 기술은 정교하고 값비싼 냉동기가 필요하고 복잡한 과정을 거쳐야 한다는 단점을 가지고 있다(Kartha and Engelmann, 1994). 최근에 개발된 새로운 초저온 저장 기술은 유리화(*vitrification*) 과정을 기초로 한 방법으로 특별한 동결 장치가 필요 없으며, 비교적 간단한 방법으로 다양한 식물의 생식질 저장에 이용하고 있다(Sakai *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 2001; Engelmann, 2003).

초저온 동결 저장된 생식질의 능력에 영향을 주는 가장 중요한 인자는 수분 함량으로 종자의 수분 함량이 높으면 액체 질소 내 저장된 후, 종자의 생존율은 감소한다(Stanwood, 1980). 일반적으로 대부분의 장명 종자(건조종자, *orthodox seed*)들은 자연 상태에서 탈수되기 때문에 특별한 전처리 없이도 동결 보존이 가능하다. 그러나 수분을 많이 포함하고 있는 난 저장성(*recalcitrant*) 종자들은 동결에 대한 내성이 없기 때문에 초저온 저장 시 세포나 조직이 심하게 손상된다. 따라서 이러한 종자들은 동결에 의한 손상으로부터 보호하기 위하여 인위적으로 탈수할 필요가 있다(Mazur, 1984). 최근에 개발된 조직의 유리화(*vitrification*) 기술은 조직내 수분을 직접 액체 상태에서 부정형(*amorphous*) 상태 또는 유리

(*glass*) 상태로 전환시켜 결정화된 얼음이 형성되는 것을 방지하여 동결에 의한 손상을 감소시킨다(Fahy *et al.*, 1984).

본 연구는 수목 종자를 대상으로 다양한 초저온 동결 조건을 적용하고, 초저온 저장 후에 나타나는 종자의 발아 특성 및 유묘의 생리적인 특성을 조사함으로써, 향후 난 저장성 수목 종자의 초저온 저장 기술을 개발하기 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시재료

초저온 저장에 이용한 공시재료는 우리나라의 표고 100~1,800m에 자생하며, 내한성, 내음성, 내조성(耐潮性) 및 내건성이 강하고, 각종 공해에도 잘 견디며 조경수로서 많이 식재하는 다릅나무(*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim)의 종자였다. 다릅나무 종자는 2001년 가을에 오대산에 채취하여 정선한 후, 4℃의 냉장고에 저장해온 것을 이용하였다. 실험 전에 다릅나무 종자의 수분 함량은 20.3%였다.

### 2. 종자의 탈수 및 초저온 저장

다릅나무 종자의 탈수와 초저온 저장은 동결보호제 처리 유무, 동결된 종자의 해빙 속도, 동결보호제 노출시간 및 초저온 동결 저장 기간에 따른 효과를 파악하기 위하여 구분하여 실시하였다. 탈수 과정에서 사용한 동결보호제는 전 세계적으로 널리 이용하고 있는 식π<sup>∞</sup> 유리화 용액(*plant vitrification solution*, PVS2)을 사용하였으며, PVS2는 30%(w/v) glycerol, 15%(w/v) ethylene glycol과 15%(w/v) DMSO로 구성되었다(Sakai *et al.*, 1990).

초저온 저장 전 종자의 동결보호제 노출시간에 따른 효과를 파악하기 위하여 노출시간은 10분, 30분, 60분, 120분으로 구분하였으며, 또한 초저온 동결 저장 기간에 따른 효과를 파악하기 위하여, 저장 기간은 1시간, 12시간, 24시간, 48시간, 96시간, 192시간으로 하였다. 유리화 절차는 다릅나무 종자를

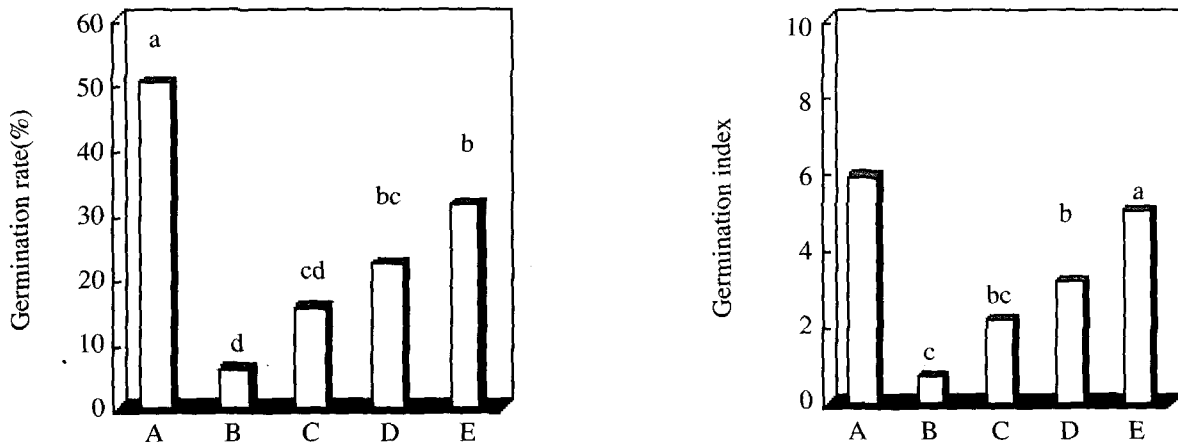


Fig. 1. Changes of germination rate and index of the seed of *M. amurensis* by the exposure of cryoprotectant before plugging into liquid nitrogen and thawing rate after cryopreservation. The different letters indicate significantly different at the probability level of 5% by Duncan's multiple range test. A: control, B: without cryoprotectant + slow thawing (25 °C), C: with cryoprotectant + slow thawing (25 °C), D: without cryoprotectant + fast thawing (45 °C), E: with cryoprotectant + fast thawing (45 °C).

25 °C에서 동결보호제 15 ml가 담긴 50 ml 튜브에 넣고, 각각의 정해진 시간에 도달한 후 액체 질소에 저장하였으며, 또한 정해진 저장시간이 경과한 후, 액체 질소 내 저장하였던 다릅나무 종자를 꺼내어 해빙하였다. 해빙 방법은 실온 해빙(25 °C)과 급속 해빙(45 °C)으로 구분하여 실시하였으며, 완전히 해빙된 다릅나무 종자는 수돗물로 세척하였다.

### 3. 발아 특성 및 유묘의 생리적 특성 조사

초저온 저장 후 해빙된 다릅나무 종자는 피트모스, 펄라이트 및 모래를 1 : 1 : 1로 혼합하여 만든 배양토에 처리 당 50립씩 3반복으로 파종하였으며, 온실 내에 임의로 배치한 후, 매일 관수하였다. 처리 방법에 따라 매일 발아된 종자의 수를 기록하여 발아율(germination rate)과 발아지수(germination index, GI)를 계산하였다. 발아지수는  $GI = \sum T_i N_i / S$ 의 식을 이용하였다(Scott *et al.*, 1984). 여기서 T<sub>i</sub>는 파종 후 경과일수이고, N<sub>i</sub>는 i일에 발아된 종자의 수, S는 파종된 종자의 총수이다.

발아 시험이 종료된 후, 유묘들은 처리별로 포지에 이식하고, 초저온 동결로 인한 유묘의 성장 및 생리적 특성 변화에 관한 영향을 파악하기 위하여 수

고, 잎 내 엽록소 함량 및 엽록소 형광반응을 측정하였다. 성장 특성은 이식 초기와 성장 종료 시점에 측정된 수고를 이용하여 상대수고생장율을 구하였으며, 상대수고생장율은  $[Ln(x_2) - Ln(x_1)] / (t_2 - t_1)$ 의 식으로 계산하였다(Beadle, 1993). 여기서 x<sub>2</sub>와 x<sub>1</sub>은 성장 종료 후(t<sub>2</sub>)와 이식 초기(t<sub>1</sub>)의 수고를 나타낸다. 잎 내 엽록소 함량은 SPAD 502(Minolta, Japan)의 측정값을 이용하였으며, 엽록소 형광 반응은 잎을 30분 동안 암 상태에 적응시킨 후, OS5-FL Modulated Fluorometer (OPTI - SCIENCES, USA)를 이용하여 PSII의 광화학 효율을 결정하였으며, Fv/Fm의 비로 표현하였다(Bolhar-Nordenkamp and Öquist, 1993).

## 결과 및 고찰

### 1. 동결보호제 및 해빙 속도에 의한 발아 특성 변화

다릅나무 종자는 액체 질소 내 동결 저장할 경우 발아 특성이 크게 변하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 즉 대조구에서 다릅나무 종자의 발아율과 발아지수는 각각 50%와 5.9였으나, 액체 질소 내 동결 보존된 다릅나무 종자의 발아율과 발아지수는 6.0%와 0.7

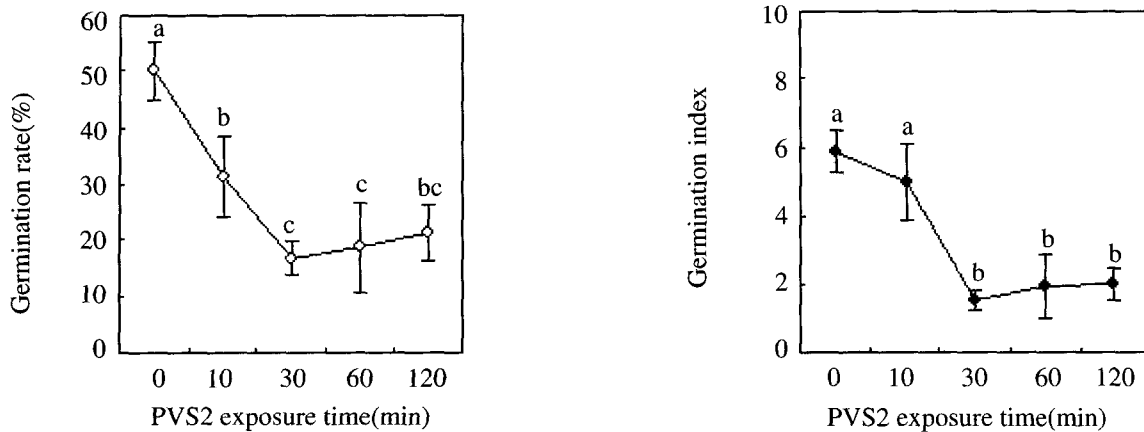


Fig. 2. Effects of PVS2 exposure time on the germination rate and index of the seed of *M. amurensis* before plugging into liquid nitrogen. The different letters indicate significantly different at the probability level of 5% by Duncan's multiple range test.

까지 감소하였다. 그러나 동결 저장된 다릅나무 종자의 발아율과 발아지수는 동결보호제를 처리할 경우 증가되는 것으로 나타났다. 즉 동결보호제를 처리할 경우, 급속 해빙된 다릅나무 종자의 발아율은 31.3%로 동결보호제를 처리하지 않은 경우의 발아율 15.3% 보다 2배 정도 증가하였다. 또한 다릅나무 종자는 동결 저장한 후, 해빙 속도에 따라 발아 특성이 다르게 나타났는데, 동결보호제가 처리되지 않은 종자의 발아율은 25℃에서 천천히 해빙될 경우 6%로 매우 낮았으나, 45℃에서 급속 해빙할 경우는 15%로 증가하였다. 또한 동결보호제가 처리된 종자의 발아율은 45℃에서 급속 해빙할 경우 22%에서 31.3%로 증가하였으며, 발아지수는 3.14에서 4.98로 증가하였다.

본 연구에서 다릅나무 종자는 초기 수분 함량이 20%로 매우 높은 수분상태에서 동결 저장되었다. 일반적으로 종자의 수분 함량이 15% 이상인 경우, 초저온 저장 시 세포내 얼음 결정이 형성되어 종자의 활력이 급격히 저하되는 것으로 알려져 있다 (Stanwood, 1980). 본 연구에서 종자의 수분 함량이 높은 상태에서 초저온 저장을 시도한 것은 난 저장성 종자와 같이 탈수가 어려운 종자의 초저온 저장 기술을 개발하기 위한 것이다. 즉 수분 함량이 높은 종자의 경우, 본 연구 결과에서 보여 주는 것과 같이

초저온 저장 시 동결로 인한 심각한 피해를 받는 것을 알 수 있었다. 그러나 동결보호제를 이용한 경우, 초저온 저장된 종자의 발아율이 증가하는 것으로 판단해 볼 때, 적절한 동결보호제 이용 및 노출 시간 설정은 수분 함량이 높은 난 저장성 종자의 초저온 저장을 가능하게 할 것으로 판단된다.

또한 동결된 조직의 해빙 속도는 동결 재료의 생명을 유지하는데 매우 중요한 인자로 작용한다. 즉 동결과정과 마찬가지로 유리화 용액이 해빙되는 동안 유리 상태에서 결정 상태로 전이되는 경우 조직에 큰 손상을 일으킬 수 있으며, 분열조직의 재생장이 방해된다(Lambardi *et al.*, 2000). 따라서 빠른 해빙 속도는 해빙속도가 늦은 경우에 일어나는 세포내 얼음 결정의 형성을 방지하여 동결된 조직을 보호하는데 적합한 것으로 알려져 있다(Niino and Sakai, 1992; Wang *et al.*, 2001). 본 연구의 결과에서도 해빙 속도가 빠른 경우, 높은 발아율을 얻을 수 있었다. 따라서 수분 함량이 높은 종자의 초저온 저장 시 동결보호제의 이용은 필수적이며, 저장 후 급속해빙은 동결조직의 재생력을 증가시킬 수 있을 것으로 판단된다.

## 2. 동결보호제 노출 시간에 따른 종자 발아와 유묘 특성 변화

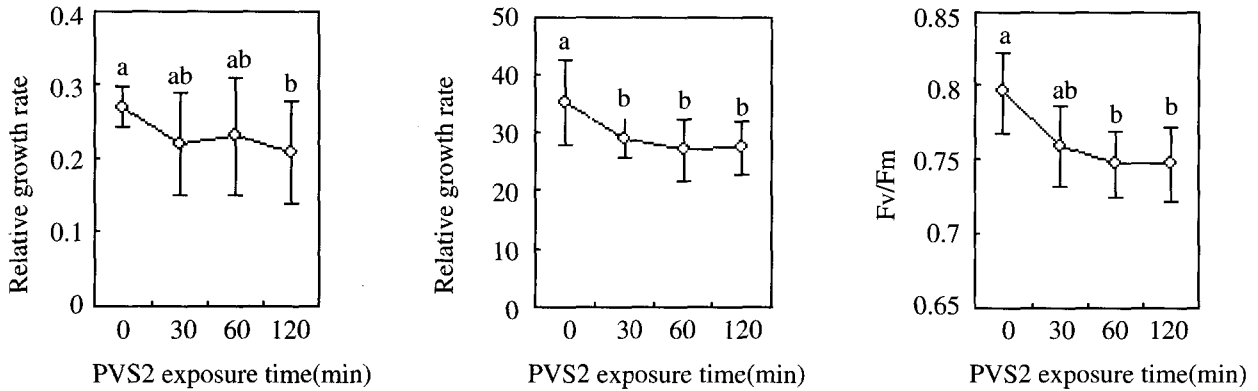


Fig. 3. Effects of PVS2 exposure time on the relative growth rate of height, SPAD values and photochemical efficiency (Fv/Fm) in the leaves of one-year-old seedling of *M. amurensis* before plugging into liquid nitrogen. The different letters indicate significantly different at the probability level of 5% by Duncan's multiple range test.

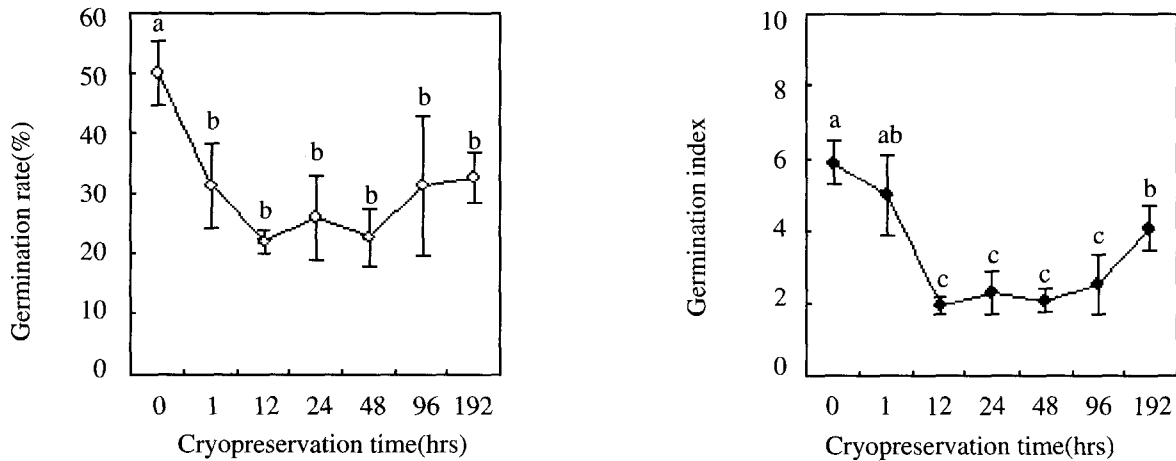


Fig. 4. Effects of cryopreservation time on the germination rate and index of the seed of *M. amurensis*. The different letters indicate significantly different at the probability level of 5% by Duncan's multiple range test.

다릅나무 종자는 동결보호제 노출 시간이 길어지면서 발아율과 발아지수가 크게 감소하였다(Fig. 2). 즉 동결보호제에 10분간 노출된 다릅나무 종자의 발아율과 발아지수는 각각 31.3%와 4.98이었으나, 120분 동안 동결보호제에 노출된 다릅나무 종자의 발아율과 발아지수는 21.3%와 1.99로 크게 감소하였다. 그러나 초저온 동결 저장 전 동결보호제의 노출시간은 유묘의 성장과 생리적 특성에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3).

유리화 과정에서 내성이 낮은 세포가 PVS2에 직

접 노출되는 것은 삼투 스트레스와 화학물질의 독성 때문에 해로운 효과가 나타나는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 동결보호제의 노출시간이 길어지면서 종자의 발아율과 발아지수가 급격하게 감소하였는데, 이것도 동결보호제에 의한 피해로 여겨진다. 최근 동결보호제에 의해 나타나는 피해를 완화시키기 위해 동결보호제 처리 전에 전처리를 하거나 동결보호제의 농도를 낮춰 단계적으로 실시하는 방법을 개발하여 대안으로 제시하였다(Turner *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 2003). 특히 수목 종자는 종피의 구

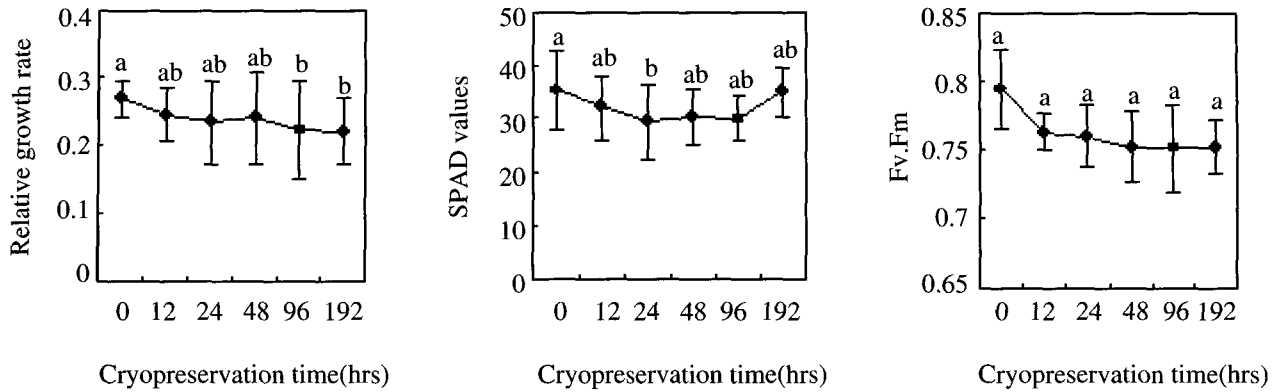


Fig. 5. Effects of cryopreservation time on the relative growth rate of height, SPAD values and photochemical efficiency (Fv/Fm) in the leaves of one-year-old seedling of *M. amurensis*. The different letters indicate significantly different at the probability level of 5% by Duncan's multiple range test.

조에 따라 동결보호제의 침투력이 매우 다르게 나타나기 때문에 각 수종에 적합한 동결보호제 및 처리 방법의 개발이 시급히 요구된다.

범으로 적절히 이용될 수 있을 것으로 판단된다 (Engelmann, 1997).

### 3. 초저온 동결 저장 기간에 따른 종자 발아와 유묘 특성 변화

액체 질소 내 동결 저장 기간은 다릅나무 종자의 발아율에 큰 영향을 주지 않았다(Fig. 4). 즉 액체 질소 내 1시간 동안 동결 저장된 다릅나무 종자의 발아율은 31.3% 나타냈는데, 액체 질소 내 196시간(8일간) 동안 동결 저장한 다릅나무 종자의 발아율은 32.7%로 1시간 동결 저장한 다릅나무 종자의 발아율과 큰 차이를 보여 주지 않았다. 그러나 발아지수는 동결 저장 기간에 따라 차이를 보였으며, 1시간 동결 저장시보다 저장기간이 길어질수록 발아지수는 낮게 나타났다.

또한 초저온 동결 저장된 다릅나무의 종자로부터 생산된 유묘의 상대수고생장율, 엽록소함량 및 상대적인 유묘의 활력 지표로 이용된 광화효율도 저장 기간과 상관없이 나타났(Fig. 5). 즉, 초저온 저장은 종자의 발아 특성에 약간의 영향을 미쳤을 뿐 유묘의 성장이나 생리적인 특성에는 전혀 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 따라서 수목 종자의 초저온 저장은 세포 조직의 변형이나 손상 없이 장기간 저장이 가능한 현지 외 유전자원 보존 방

### 적요

본 연구는 산림 수목 종자를 대상으로 다양한 초저온 동결 조건을 적용하고, 초저온 저장 후에 나타나는 종자의 발아 특성 및 유묘의 성장 특성, 조사하기 위해 수행되었다.

유리화 과정을 기초로 한 초저온 저장은 다릅나무 종자의 발아율을 크게 감소시켰으나, 초저온 저장 전 동결보호제 처리와 초저온 저장 후의 빠른 해빙은 종자의 발아율 감소를 완화시켰다. 초저온 저장 전 동결보호제 노출 시간은 종자의 발아율에 영향을 주었다. 즉 동결보호제 노출시간이 길어짐에 따라 종자의 발아율은 감소하였다. 그러나 초저온 저장 기간은 종자의 발아율에 영향을 주지 않았다. 또한 동결보호제의 노출 시간과 초저온 저장 기간은 유묘의 성장 특성에 영향을 주지 않았다. 따라서 수목 종자의 초저온 저장은 조직의 손상이나 변형 없이 장기간 저장할 수 있는 현지 외 보존 기술로 적절하다고 판단된다. 그러나 산림 종자의 보다 효율적인 초저온 저장을 위해서는 각 수종의 종자 특성에 맞는 동결보호제 및 처리 기술이 개발되어야 할

것으로 판단된다.

## 인용문헌

- Beadle, C.L. 1993. Growth analysis. In Hall, D.O., J.M.O. Scurlock. H.R. Bolhar-Nordenkamp, R.C. Leegood and S.P. Long (eds) Photosynthesis and Production in a Changing Environment, A Field and Laboratory Manual. Chapman & Hall, London. pp. 36-46.
- Bolhar-Nordenkamp, H.R. and G. Öquist. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In Hall, D.O., J.M.O. Scurlock. H.R. Bolhar-Nordenkamp, R.C. Leegood and S.P. Long (eds) Photosynthesis and Production in a Changing Environment, A Field and Laboratory Manual. Chapman & Hall, London. pp. 193-206.
- Engelmann, F. 1997. *In vitro* conservation methods. In Ford-Lloyd, B.V., J.H. Newbury and J.A. Callow (eds) Biotechnology and Plant Genetic Resources. CAB International, Oxford. pp. 119-161
- Engelmann, F. 2003. Current research status and utilization of plant cryopreservation. In Proceedings of the International Workshop on Cryopreservation of Bio-Genetic Resources. Suwon, Republic of Korea. pp. 19-37.
- Fahy, G.M., D.R. MacFarlane, C.A. Angell and H.T. Meryman. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21:407-426.
- FAO. 1989. Plant Genetic Resources. Their Conservation *In Situ* for Human Use. FAO. Rome.
- Graudal, L., E.D. Kjaer and S. Canger. 1995. A systematic approach to conservation of genetic resources of trees and shrubs in Denmark. *Forest Ecology and Management* 73:117-134.
- Kartha, K.K. and F. Engelmann. 1994. Cryopreservation and germplasm storage. In Vasil, I.K. and T.A. Thorpe (eds) Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer, Dordrecht. pp. 195-230.
- Lambardi, M., A. Fabbri and A. Caccavale. 2000. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips. *Plant Cell Reports* 19: 213-218.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and applications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 247: C125-C142.
- Niino, T and A. Sakai. 1992. Cryopreservation of alginate-coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Science* 87: 199-206.
- Sakai, A., D. Hirai and R. Charoensub. 2003. History and current issues of plant cryopreservation research. In Proceedings of the International Workshop on Cryopreservation of Bio-Genetic Resources. Suwon, Republic of Korea. pp. 1-18.
- Sakai, A., S. Kobayashi and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9: 30-33.
- Scott, S.J., R.A. Jones and W.A. Williams. 1984. Review of data analysis methods for seed germination. *Crop Science* 24: 1192-1199.
- Stanwood, P.C. 1980. Tolerance of crop seeds to cooling and storage in liquid nitrogen. *Journal of Seed Technology* 5(1): 26-31.
- Turner, S.R., T. Senaratna, E. Bunn, B. Tan, K.W. Dixon and D.H. Touchell. 2001. Cryopreservation of shoot tips from six endangered Australian species using a modified vitrification protocol. *Annals of Botany* 87: 371-378.
- Wang, Q., E. Tanne, A. Arav and R. Gafny. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63:41-46.
- (접수일 2004. 2. 05)  
(수락일 2004. 5. 31)