韓蠶學誌 37(2), 186~187 (1995)
Korean J. Seric. Sci.
〈短 報〉

뽕나무 冬芽의 液體窒素내 凍結保存

방혜선 · 이완주 · 안영희*
농촌진흥청 잠사곤충연구소, *중앙대학교 산업대학

Cryopreservation of Mulberry Winter Buds in Liquid Nitrogen

Hye-Son Bang, Won-Chu Lee and Young-Hee Ahn*
National Sericulture and Entomology Research Institute, RDA, Suwon, Korea
**College of Industrial Study, Chung-Ang University*

緖 論

遺傳資源은 생물 종의 保存과 새로운 품종의 육성을 위한 필수적인 재료로서, 그것의 永久保存이 중요한 문제로 대두되고 있다. 그러나, 지금 현재의 遺傳資源 保存은 母本植物을 포장에서 관리하거나 용기에 식재하여 적절한 시설 내에서 보존하고 있는 실정이다. 또 種子의 경우에는 건조 밀봉된 상태에서 특별한 低溫貯藏室에서 보관되고 있는데, 이와 같은 방법은 막대한 費用과 人力이 요구될 뿐 아니라 長期間 保存에도 많은 문제점을 지니고 있다. 따라서, 植物의 營養기관 또는 종자 등을 아무런 변화없이 유전적으로 안정되게 永久的으로 보존할 수 있는 方法으로 液體窒素內 貯藏을 모색하고 있다. 특히 이와 같은 超低溫 상태에서의 遺傳資源 保存은 생물체의 生理적인 代謝機能이 거의 정지 상태에 이르기 때문에 伴永久的인 保存이 가능하며 遺傳的으로 安定하다고 밝히고 있다. 이 硏究는 우수 遺傳資源 保存의 일환으로 효과적인 超低溫 凍結保存에 의한 뽕나무 유전자원의 보존을 시도한 바 結果를 얻었기에 報告한다.

材料 및 方法

사용한 材料는 1995년 2월 13일에 채취한 신광뽕의 冬芽로 枝條부분이 일부분 붙어 있는 것으로, 冬芽의 아래 지조부분을 V자형으로 잘라서 25~65℃에서 3시간 동안 건조를 시켰다. 처리한 冬芽를 1.8 ml cryotube에 2~3개를 넣고 canister에 끼워 0℃에서 하루 보관 후 −5±1, −10±1, −15±1, −20±1, −25±1, −30±1로 설정한 循環式 低溫冷凍機에서 24시간씩 각각 방치하여 豫備凍結을 하였고, 液體窒素에 바로 넣어 1일 이상 浸積시켜 本凍結을 실시하였으며, 融解는 液體窒素로부터 꺼낸 후 동아를 넣은 용기 그대로 0~40℃ 물에서 1~3분 동안 급속히 행하였다. 融解한 冬芽는 70% ethanol에서 15분간, sodium hypochloride에서 15분간 처리하여 殺菌 후, 滅菌수로 2회 水洗하였다. 배지는 MS기본배지에 3% Fructose를 첨가한 0.8% 寒天 배지를, pH 6.0으로 조정하여 120℃, 15분 autoclave에서 殺菌하였으며, 莖頂은 冬芽로부터 길이 2~3 mm, 폭 1.5 mm의 크기로 자르고, 배지에 올려놓았다. 培養環境은 25℃, 16시간 조명을 행하였고, 배양 2일 후에 재생조사를 하였으며, Shoot formation은 2주 후에 조사하였다. 시험은 각구 25개 莖頂, 2반복으로 행하였다.

結果 및 考察

1. 乾燥 速度 및 乾燥 溫度

25℃에서 3시간 건조시킨 동아의 수분함량은 41.1%로 再生率과 shoot formation이 각각 92.0%, 84.0%인데 비해 60℃에서 3시간 건조시킨 동아의 수분함량은 38.3%로 전혀 발아되지 않았다. 이것으로 볼 때 乾燥 후 冬芽의 水分含量은 液體窒素 保存 후 shoot formation에 큰 영향을 미치는 것임을 알 수 있었다.

2. 豫備凍結 速度 및 溫度

豫備凍結에서의 동결속도는 0℃에서 −25℃에 까지

Table 1. *Survival and shoot formation rate of mulberry winter buds after drying, thawing and cryoprotectant treatments*

Drying temp. and time	Thawing temp. and time	No. of sample	Cryoprotectant solution*	Survival rate	Shoot formation rate
25℃ 3 hr	37 3 min	25	+	0	0
25℃ 3 hr	37 3 min	25	−	23(92.0%)	21(84.0%)
60℃ 3 hr	0 3 min	25	+	0	0
60℃ 3 hr	0 3 min	25	−	0	0

*2M glycerol + 0.4M sucrose

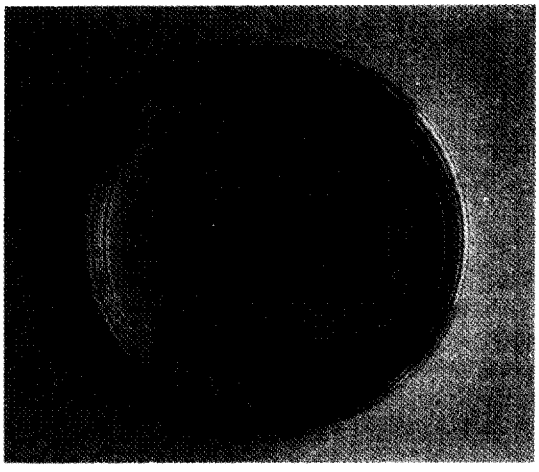

Fig. 1. *Recovery of mulberry winter buds from shoot tips frozen in liquid nitrogen.*

이르는 동안 1일에 −5℃씩 낮춘 것에서만 再生을 확인할 수 있었고, 0℃에서부터 −30℃나 −40℃까지 −5℃/5 min 속도로 豫備凍結시킨 것은 再生을 확인할 수 없었다.

3. 融解溫度에 따른 再生率

融解溫度에 따른 再生率을 보면 37℃에서 3분간 행한 것이 再生率과 Shoot formation이 각각 92.0%, 84.0%로 고도로 높은 경향을 보였다.

摘 要

凍結保存에서 가장 再生率이 높은 品種은 組織培養에서 發根力이 뛰어난 것으로 알려져 있는 신광뽕으로 최고 92.0%의 再生率을 보였으나, 개량, 용천 및 검설뽕에서는 재생을 보이지 않았다. 또, 乾燥過程을 거치지 않은 것이나, 乾燥過程과 豫備凍結 過程을 거치지 않고, 凍結防禦劑만을 사용한 것의 재생은 전혀 확인할 수 없었다. 금후, 凍結保存한 冬芽의 再生에서 突然變異 有無는 RAPD로 확인될 수 있을 것이다.

引 用 文 獻

Akira Sakai (1992) Cryoperservation of dried shoot tips of mulberry winter buds and subsequent plant regeneration. Cryo-Letters. **13**: 51-5

Akira Sakai (1991) クワ冬芽の改良液體窒素保存方法. 日蠶雜. **60**(5): 394-399

新野孝男 (1990) 培養したクワ莖頂からの液體窒素保存後の植物體再生. 日蠶雜. **59**(2): 111-117

新野孝男 (1992) ナシ培養莖頂の一つの簡易凍結保存法. 植物組織培養. **8**(3): 185-189

Ahn Young-hee (1994) Vitrification을 이용한 국화 경정부의 초저온 동결 보존. 韓國園藝學會誌. **35**(5): 499-506