

## 건조 및 초저온 처리에 의한 뽕나무 종자의 장기 보존

최영철 · 류근섭\* · 방혜선

농업과학기술원 잠사곤충부, \*경북대학교 농과대학

### Cryopreservation of Mulberry(*Morus*) Seeds in Liquid Nitrogen(LN<sub>2</sub>)

Young Cheol Choi, Keun Sup Ryu\* and Hae Sun Bang

Department of Sericulture and Entomology, National Institute of  
Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

\*College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

#### ABSTRACT

To investigate the possibility of cryopreservation of mulberry seeds in liquid nitrogen(LN<sub>2</sub>), characteristics of the seeds were examined after picking mulberry syncarps and drying-heat treatment. Storage in LN<sub>2</sub> has the potential of providing indefinite preservation of valuable seed germplasm. Determining the tolerance of seeds among given cultivars to LN<sub>2</sub> cooling and subsequent rewarming is the first step to establishing the feasibility of LN<sub>2</sub> storage. Seeds of 4 mulberry varieties were treated to LN<sub>2</sub>(-196°C) for 24 hours after drying heat treatment. Seed moisture content of Daeryukppong was 0.67%, the highest in all varieties, while seed germination rate(91%) of Chosunppong was the highest. As moisture content of mulberry seed was below 1%, storage in LN<sub>2</sub> was safe. And drying heat treatment for 60 minutes was suitable to prevent decreased germination rate and germination vigor of seeds. The seeds of Cheongilppong were unsuitable to cryopreserve in LN<sub>2</sub> for long-term storage.

**Key words** : Mulberry, Cryopreservation, Liquid nitrogen, Germination

#### 서 론

생물 종의 보존과 새로운 품종의 육종을 위한 필수적인 방법으로, 유전자원의 영구보존이 대단히 중요하게 부각되고 있다. 그러나 지금까지의 유전자원 보존 방법은 모본식물을 포장에서 관리하거나 용기에 식재하여 일정한 시설 내에서 보존하고 있는 정도이다. 종자식물의 경우에는 건조 밀봉된 상태에서 특별한 저온 저장실에서 보관되고 있다. 그러나 이와같은 종자 및 영양계의 보존에는 막대한 비용과 인력이 요구될 뿐만아니라 장기간의 보존에도 많은 문제점을 지니고 있다.

따라서 여러 과학 선진국에서는 -196°C의 액체질소 내에 식물의 영양기관 또는 종자 등을 아무런 피해 없이 유전적으로 안정되게 영구적으로 보존할 수 있는 방법을 모색하고 있다(Ahn and Sakai, 1994; Harrison and Carpenter, 1977; Mumford and Grout, 1978; Niino *et al.*, 1992;

Sakai and Kobayashi, 1990; Stanwood and Bass, 1981; Towill, 1990). 특히 이와 같은 초저온 상태에서 유전자원을 보존할 경우 생물체의 생리적인 대사기능이 거의 정지 상태에 이르게 되기 때문에 영구보존이 가능하며 유전적으로도 안전하다고 밝혀져 있다(Gresshoff and Gartner, 1977; Stanwood and Ross, 1979). 또한 최소한의 보존면적과 시설로 충분하며 값싼 액체질소의 이용과 저렴한 관리비용 및 단순함은 장래 생물의 유전자원보존법으로 가치 획기적이라고 할 수 있다.

이와 같은 초저온 동결보존에 관한 연구로는 Polge *et al.*(1949)이 포유동물의 세포를 특별한 동해 방어물질로 처리한 후 냉동처리하여 대사과정을 멈추게 하고 영구히 보존 가능성을 보고한 이후로 많은 학자들이 소의 냉동 정액보존, 수정란 보존 등을 활발히 연구하여 현재는 실용화 단계에까지 이르게 되었다.

한편 다양한 종자의 수명을 연장하기 위하여 액체산소,

액체수소(Becquerel, 1925) 및 액체질소(Harrison and Carpenter, 1977; Mumford and Grout, 1978; Stanwood and Bass, 1981)를 이용하여 장기 저장하는 방법에 대한 연구가 많이 수행되었다. 이는 저장중인 종자의 유전적 변이의 가능성이 감소되고 보다 나은 생리적인 상태를 유지시킬 수 있기 때문이며(Harrison and Carpenter, 1977; Mumford and Grout, 1978; Stanwood, 1980) 또한 생리학적인 퇴화를 막거나 감소시키고 저장설비나 시설유지에 드는 비용을 절감할 수 있기 때문이다(Stanwood and Bass, 1978, 1981). 그래서 Villiers(1974)가 수분을 충분히 흡수한 상치 종자에서 오랫동안 세포질의 장애가 증가하지 않은 상태에서 활력을 유지할 수 있음을 증명했다. 한편 Harrison(1966)은 저장종자의 세포질적 변이의 증가는 종자의 발아 자체에 영향을 미치지 않는다 하더라도 어떤 작물에서는 유묘형성, 조숙성 등의 저하를 가져올 수 있다고 하였다. 그래서 액체질소에서 세포질적 연속성이 유지된다면 유전 자원을 초저온에서 반영구적으로 장기 저장할 수 있을 것이다.

Sakai and Noshino(1975)에 의하면 초저온 저장의 성패는 종자의 수분함량을 어떻게 초저온 저장이나 해빙에 적합하도록 조절하느냐에 달려있다고 하였다. 몇가지 작물에서는 종자를 초저온에 아무런 피해없이 성공적으로 저장한 보고가 있었다(Gresshoff and Gartner, 1977; Stanwood and Ross, 1979). 뽕나무는 우리나라에서 고래로부터 이어져 내려오던 양잠을 위하여 대단히 귀중한 경제작물이며 유전자원이다. 그러나 최근 농가소득의 악화로 점점 쇠퇴하여 양잠농가에서 뽕나무를 거의 볼 수 없는 실정이다.

따라서 이 연구는 사라져가는 우수 유전자원의 보존을 위하여 뽕나무는 순계가 아니지만 경제적이고 효과적인 뽕나무종자를 공시하여 건조 및 초저온 저장의 가능성을 실험하고 그로써 얻어진 몇가지 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

뽕나무종자의 초저온 보존 가능성을 검정하기 위하여 잠사곤충연구소의 교목포장(수원시 서둔동 소재)에서 1998년 6월 조선뽕(*Morus mongolica* C.K. S<sub>CHN</sub>), 검설뽕(*Morus bombycis* Koidz), 대륙뽕(*Morus Lhou*(S<sub>ER</sub>) Koidz) 그리고 청일뽕(*Morus alba* L.) 등의 오디를 채취하여 건조 및 초저온 저장성의 차이를 시험하였다.

종자수분함량은 직경 10 cm petri dish에 수분을 충분히 살포하여 저온 및 진공상태에서 24시간 방치한 종자를 꺼내어 생체중을 측정하였다. 그리고 건물중을 drying oven(50°C)에서 24시간 동안 건조시킨 후 칭량하여 종자의 수분함량을 산출하였다.

종자의 건조는 50°C의 순환식 정온열풍건조기에서 30분, 60분, 90분 및 180분 동안 실시하였다. 건조한 종자를 5°C → 2.5°C → -10°C → -20°C에 예비동결 후 -196°C 액체질소내에서 24시간 침적한 후 꺼내어 40°C의 온수 중 급속가온하였다. 발아율은 100립씩 3반복으로 25°C의 발아상에 치상하여 2주일간 발아조사를 실시하였는데 유근이 1 mm 정도 출현된 종자를 발아한 것으로 간주하였다.

평균발아기간(Janssen, 1973)은 매일 발아된 종자수에 경과된 일수를 곱한 숫자를 합산하여 이것을 발아율로 나누어서 산출하였다. 발아세는 평균발아일에 발아된 종자수와 평균발아일 전후 1일간에 발아된 종자수를 더한 값을 100으로 나누어서 계산하였다. 그리고 발아속도계수는 Kotowski법(Kotowski *et al.*, 1968)에 의하여 계산하였다.

## 결과 및 고찰

뽕나무 종자의 초저온에 의한 장기저장의 가능성을 알아보기 위하여 종자를 채취하여 건조처리 하기 전에 그 특성을 조사했다. 그 결과 Table 1과 같이 수분함량은 대륙뽕이 0.67%로 가장 높았고, 검설뽕이 0.3%로 가장 낮았는데, 조사된 4품종의 평균 종자수분함량은 0.46%였다. 그리고 종자의 초기 발아율은 야생뽕인 조선뽕이 91%로 가장 높았으며, 청일뽕이 23% 가장 낮았다. 평균발아기간은 4품종 모두 7일 내외로 나타났으며 대륙뽕이 6.9일로 가장 짧았다. 이와 같은 결과로 보아 뽕나무 종자의 평균수분함량은 0.46%로 나타났고 발아율은 재배뽕 보다는 야생이 훨씬 높은 것으로 나타났으며 재배뽕 중에서는 대륙뽕이 가장 높았다.

건조처리에 따른 오디 종실수분 함량의 변화는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 무처리 및 30분 건조에서는 품종간 수분 함량의 폭이 컸으나 조선뽕과 검설뽕은 수분함량이 같은 수준이었다. 그리고 종자의 건조시간이 경과함에 따라서 종실수분함량은 감소폭이 적었으며, 60분 건조처리에서는 대륙뽕을 제외하고는 거의 같은 수준이었다. 그리고 180분 건조처리구에서는 전 품종 공히 0.1% 미만으로 낮아졌는데, 세포의 결빙에 의한 피해를 받지 않을 것이나 지나친 수분감소로 인한 장애를 받을 수 있을 것으로 생

Table 1. Characteristics of mulberry seeds before drying-heat treatment(Average  $\pm$  SD)

Varieties	Seed moisture content(%)	Germination rate(%)	Average germination period (days)
Chosunppong	0.39 $\pm$ 0.04	91 $\pm$ 4	7.3 $\pm$ 1.1
Keomseolppong	0.30 $\pm$ 0.02	78 $\pm$ 14	7.2 $\pm$ 0.9
Daeryukppong	0.67 $\pm$ 0.06	85 $\pm$ 6	6.9 $\pm$ 0.4
Cheongilppong	0.46 $\pm$ 0.07	23 $\pm$ 4	7.2 $\pm$ 0.4

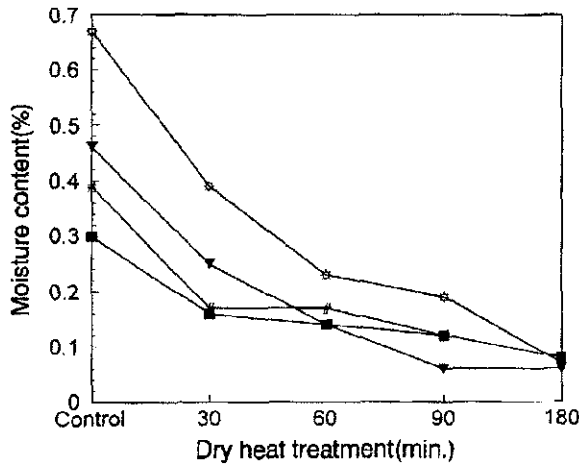


Fig. 1. Moisture content of mulberry seeds after drying-heat treatment for 0, 30, 60, 90 and 180 minutes. ○ : Chosunppong, ■ : Keomseolppong, △ : Daeryukppong, ▼ : Cheongilppong.

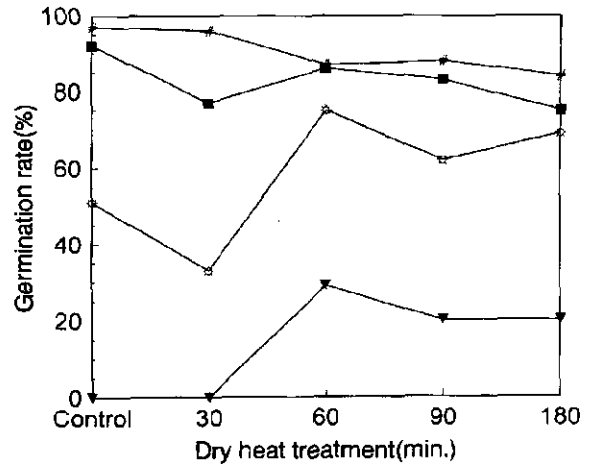


Fig. 2. Changes of germination rate of mulberry seeds stored in LN<sub>2</sub> for 24 hours after drying-heat treatment. Symbols are the same as seen in Fig. 1.

각된다.

Stanwood(1980)에 의하면 일반적으로 종실의 수분함량이 15% 이상인 종자를 초저온에 침지했을 때 세포의 결빙을 유기시켜 종자의 활력이 급격히 저하된다고 한 바 있다. 뽕나무 종자의 경우 1% 미만의 수분함량을 유지하고 있어서 초저온 저장에 의한 세포결빙이 적으므로 건조처리 없이도 안전하게 유전자원을 보존할 수 있을 것으로 생각된다.

액체질소에 24시간 침적하여 급속 해빙시킨 종자의 발아율 변화는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 건조처리 하지 않는 종자를 액체질소에 침지하여 발아율을 조사하여 보았더니 조선뽕과 검설뽕은 건조처리 시간과 관계 없이 전 처리구에서 80% 이상의 발아율을 보인 반면 대륙뽕은 오히려 건조시간이 길 경우 발아율이 대체로 높게 나타났다. 청일뽕의 경우 건조하지 않고 액체질소에 24시간 침적한 후 급속해빙 시켰을 때 발아가 전혀 되지 않았으며, 이는 종자 내 세포의 결빙으로 인해 종자가 사멸한 것으로 생각된다. 따라서 품종간의 내한성과 건조내성 차이를 고려해서 초저온 저장을 해야 안전하게 유전자원을 보존할 수 있을 것으로 생각된다.

뽕나무 종자의 발아세는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 전 품종 모두 종자의 발아율과 비슷한 경향을 보였다. 건조하지 않고 액체질소에 24시간 침지했을 경우 조선뽕과 검설뽕은 종자의 발아세가 0.8내외로 가장 높았으며 건조시간이 길어질 경우 발아세가 감소하였다. 그러나 대륙뽕과 청일뽕은 종자의 건조시간이 길 경우 발아세가 다소 높게 나타났지만 건조시간을 60분에서 180분까지 길게 했을 경우 건조시간 경과에 따른 발아세가 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 건조시간이 길고 수분함량을 지나치게 낮게 하면 발아세의 저하가 심하여 종자의 발아가 불량해지거나 지

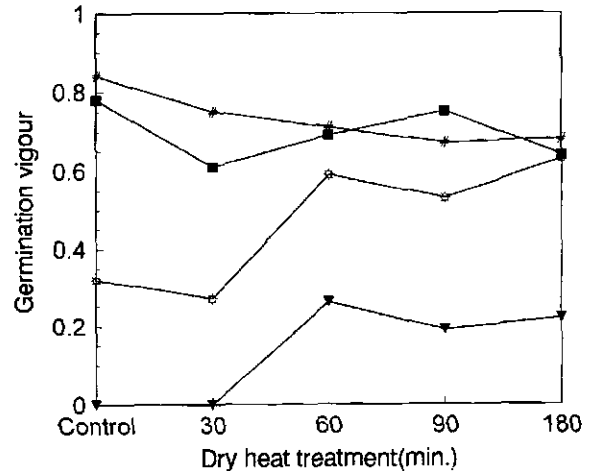


Fig. 3. Changes of germination vigour of mulberry seeds stored in LN<sub>2</sub> for 24 hours after drying-heat treatment. Symbols are the same as seen in Fig. 1.

연되어 정상적인 발육에 장애를 줄 수 있다. 뿐만아니라 장기간 건조에 의한 발아세의 차이가 거의 없으므로 60분 건조 후 액체질소에 침지하는 것이 적당할 것으로 생각된다.

Kotowski법에 따른 뽕나무 종자의 발아속도계수를 보면 Table 2에서 보는 바와 같다. 건조처리 전과 30분 건조구에서는 청일뽕에서만 발아가 전혀 되지 않아 발아속도가 0을 나타냈으며, 야생뽕인 조선뽕이 건조 처리구에 관계없이 대조와 비슷한 발아속도를 나타냈다. 청일뽕의 경우 전 처리구에서 발아속도가 매우 낮았으며 액체질소 내 저장은 부적합한 품종으로 생각된다.

초저온에 저장했던 뽕나무 종자를 급속해빙 시킨 후 평균발아기간을 조사한 결과가 Table 3이다. 여기에서 보는 바와 같이 대조구에서는 평균발아기간이 7.1일이었는데 이들 종자를 건조하지 않거나 30분 건조처리를 했을 때에

**Table 2.** Changes of Kotowski velocity of mulberry seeds stored in LN<sub>2</sub> for 24 hours after drying-heat treatment for 30, 60, 90 and 180 minutes

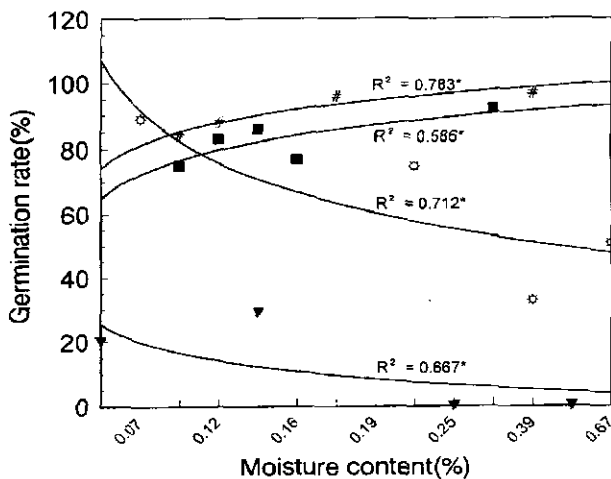
Varieties	Control	Dry heat treatment(min.)				
		0	30	60	90	180
Chosunppong	11.61	11.53	10.45	9.74	9.41	9.24
Keomseolppong	10.42	10.27	8.53	9.85	10.52	8.93
Daeryukppong	9.72	4.22	3.69	5.69	6.73	9.95
Cheongilppong	2.77	0	0	3.95	2.96	3.03

**Table 3.** Changes of average germination period of 4 mulberry varieties stored in LN<sub>2</sub> for 24 hours after drying-heat treatment for 30, 60, 90 and 180 minutes (Unit : days)

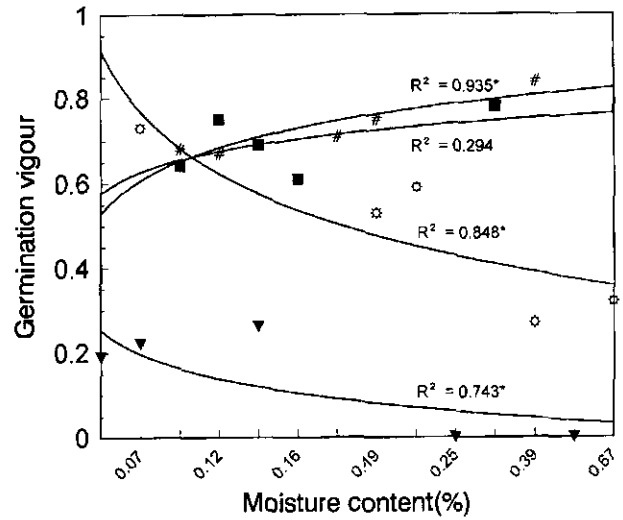
Varieties	Control	Dry heat treatment(min.)				
		0	30	60	90	180
Chosunppong	7.3	7.3	7.2	7.0	7.1	7.4
Keomseolppong	7.2	7.3	7.3	7.0	7.1	7.1
Daeryukppong	6.9	5.1	7.7	7.4	7.7	7.1
Cheongilppong	7.2	0	0	6.8	6.5	7.4

는 청일뽕의 경우 발아가 전혀 되지 않았고 건조처리별로 평균발아기간을 비교해 보면 60분 건조처리를 할 경우 7일 정도로 품종간에 큰 차이를 나타내지 않았다.

액체질소에 침적한 후 발아시킨 뽕나무 종자의 수분함량과 발아율과의 상관관을 보면 Fig. 4와 같다. 발아율이 높은 조선뽕과 검설뽕은 수분함량이 높을수록 발아율도 높았던 반면에 대륙뽕과 청일뽕은 수분함량이 낮을수록 발아율은 높은 경향을 나타냈다. 대륙뽕의 경우 수분함량이 0.06%일 때 가장 높은 발아율을 나타냈으며, 특히 청일뽕의 경우는 수분함량에 관계없이 발아율이 대체로 낮았다. 따라서 뽕나무 종자의 수분율과 발아율은 야생뽕인 조선뽕과 재배뽕인 검설뽕은 수분율 1% 내에서는 수분율이



**Fig. 4.** Log regression between moisture content and germination rate of mulberry seeds stored in LN<sub>2</sub> for 24 hours after drying-heat treatment. Symbols are the same as seen in Fig. 1. \* Significant in 5% level.

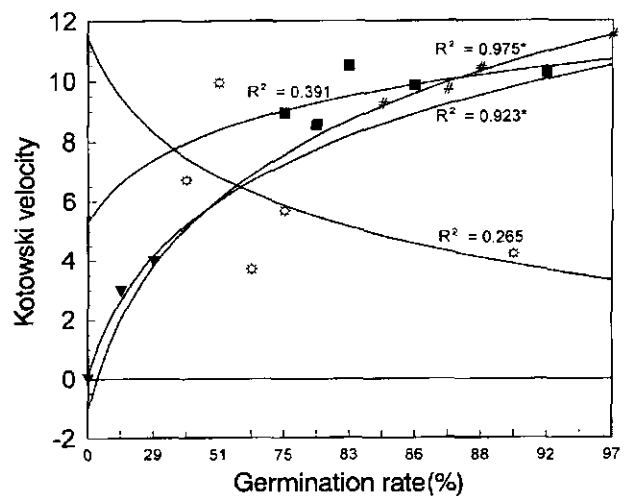


**Fig. 5.** Log regression between moisture content and germination vigour of mulberry seeds stored in LN<sub>2</sub> for 24 hours after drying-heat treatment. Symbols are the same as seen in Fig. 4.

높을수록 발아율도 높았으며 종자의 건조시간이 짧을수록 발아율이 높았다.

일정수분함량에서의 발아세의 변화는 발아율의 변화와 밀접한 관계를 가지고 변화하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 조선뽕과 검설뽕은 발아율의 변화와 비슷한 경향으로 수분함량이 증가할수록 발아세도 높았으며, 대륙뽕과 청일뽕은 역시 수분함량이 높아짐에 따라 발아세는 낮아졌다.

발아율의 변화와 Kotowski 발아속도간의 상관관을 Fig. 6에서 보면 조선뽕을 비롯한 대부분의 품종에서는 발아력의 상승에 따라 발아속도가 상승하고 있었으며, 대륙뽕은 오히려 발아율이 상승함에 따라 발아계수는 감소하였다.



**Fig. 6.** Log regression between germination rate and Kotowski velocity of mulberry seeds stored in LN<sub>2</sub> for 24 hours after drying-heat treatment. Symbols are the same as seen in Fig. 4.

이와 같은 결과로 보아 뽕나무 종자의 액체질소 내 장기 저장을 위해서는 종자의 수분율이 1% 이내 이므로 건조 처리 없이도 장기저장이 가능하나 60분 정도의 건조처리 후 액체질소 내에 저장하는 것이 안전할 것으로 생각된다. 뽕나무 종자는 품종에 관계없이 초저온에 의한 장기저장이 가능하나 청일뽕의 종자는 초저온에 의한 장기저장이 부적합한 품종으로 판단된다.

적 요

뽕나무 종자의 액체질소 내 초저온 장기보존의 가능성을 알아보기 위하여 오디를 채취하여 건조 및 초저온 저장에 의한 종자의 특성을 조사한 결과는 다음과 같다.

뽕나무 종자의 수분함량은 대륙뽕이 0.67%로 가장 높았고 검설뽕이 0.30%로 가장 낮았다. 종자의 발아율은 조선뽕이 91%로 가장 높았고 청일뽕이 23%로 가장 낮았으며, 평균발아기간은 4품종 모두 7일 내외였다.

뽕나무 종자를 건조 처리한 후 수분율의 변화는 무처리 및 30분 건조구에서는 품종간 수분함량의 폭(0.3~0.68%)이 컸으나 건조시간이 경과함에 따라 차이가 적었으며, 60분 건조처리 시 대륙뽕을 제외하고 0.18% 정도로 거의 같은 수준이었다.

액체질소 내 24시간 침적 후 종자의 발아율은 조선뽕과 검설뽕은 건조처리 시간에 관계 없이 전 처리구에서 80% 이상의 발아율을 보였으며 평균발아기간은 7일내외이고 건조처리 시간은 60분 건조가 효과적인 것으로 나타났으며, 발아세도 발아율과 비슷한 경향을 보였다.

따라서 뽕나무 종자의 초저온 장기보존을 위해서는 뽕나무 종자의 수분율이 1%내외 이므로 액체질소 내 저장에는 문제가 없을 것으로 생각되나, 건조시간을 60분 이내로 하는 것이 안전할 것이다. 뽕 품종에 관계없이 초저온 장기저장이 가능하나 청일뽕의 종자는 부적합한 것으로 판단된다.

사 사

이 연구는 '97년도 경북대학교 공모과제 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

인용문헌

Ahn, Y. H. and A. Sakai(1994) Survival by vitrification of shoot tips of *Chrysanthemum morifolium* L. cooled to -195°C. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **35**(5) : 451-457.  
 Becquerel, P.(1925) Sur la suspension momentanee de la vie chez certaines graines. *Cr. hebdomadaire Seances Acad. Sci. Paris* **181** : 805-807.

Gresshoff, P. and E. Gartner(1977) Cryopreservation of *Arabidopsis thaliana* and other seeds by storage in liquid nitrogen. *Arabidopsis information service* **14** : 12-13.  
 Harrison, B. J.(1966) Seed deterioration in relation to storage conditions and its influence upon germination, chromosomal damage and plant performance. *J. natn. Inst. agric. Bot.* **10** : 664-663.  
 Harrison, B. J. and R. Carpenter(1977) Storage of *Allium cepa* seed at low temperatures. *Seed Sci. and Technology* **5** : 699-702.  
 Janssen, J. G. M.(1973) A Method of recording germination curves. *Ann. Botany* **37** : 705-708.  
 Kotowski, T. T., M. N. Sarin and A. Narayanan (1968) Effect of soil salinity and growth regulators on germination and seedling metabolism of water. *Physiol. Plant* **21** : 1201-1209.  
 Munford, D. M. and B. W. Grout(1978) Germination and liquid nitrogen storage of Cassava seed. *Ann. Bot. (London)* **42** : 255-257.  
 Niino, T., A. Sakai, S. H. Yakuwa and K. Nojiro (1992) Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **28** : 261-266.  
 Polge, C., A. U. Smith and A. S. Parker(1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature(London)* **164** : 666.  
 Sakai, A. and S. Kobayashi(1990) A simple and efficient procedure for cryopreservation of nuclear cells of navel orange by vitrification. *Cryobiology* **27** : 657.  
 Sakai, A. and Noshino(1975) Some factors contributing the survival of crop seeds cooled to temperature of liquid nitrogen. In crop genetic resources for today and tomorrow.(eds. O. H. Frankel and J. G. Hawkes), *Cambridge University Press* pp. 317-326  
 Stanwood, P. C.(1980) Tolerance of crop seeds to cooling and storage in liquid nitrogen. *J. Seed Technol.* Vol. 5(1) : 26-31.  
 Stanwood, P. C. and L. N. Bass(1978) Ultracold preservation of seed germplasm. In P. Li and A. Sakai (ed) *Plant cols hardiness and freezing stress. Academic Press, NewYok* pp. 361-371.  
 Stanwood, P. C. and L. N. Bass(1981) Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Sci. and Technol.* **9** : 423-437  
 Stanwood, P. C. and E. E. Ross(1979) Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). *Hort-science* **14** : 628-630.  
 Towill, L. E.(1990) Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification. *Plant Cell Rep.* **9** : 178-180.  
 Villers, T. A.(1974) Seed aging; Chromosome stability and extend viability of seeds stored fully imbibed. *Plant Physiol.* **53** : 875-878.