

## 건조 전처리에 의한 자생 *Aquilegia*속 식물 종자의 초저온 저장과 발아

안영희

중앙대학교 생물자원과학계열

### Cryopreservation and Germination of Native *Aquilegia* Species Seeds by Predehydration Treatment

Young-Hee Ahn

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

#### ABSTRACT

Predehydration effects for cryopreservation in  $-196^{\circ}\text{C}$  liquid nitrogen were studied in Korean native *Aquilegia buergeriana* var. *oxysepala* Kitamura and *A. flabellata* var. *pumila* Kudo seeds. *Aquilegia* species seeds were adjusted to moisture contents between 3.2 and 9.7% by air dry treatments. Seeds were placed in paper envelopes after submerged in liquid nitrogen and rewarming in  $38^{\circ}\text{C}$  water. Seeds moisture contents by duration of drying were identified as controlling factors in the survival of *Aquilegia* species seeds for cryopreservation. *Aquilegia* species seeds having approximate 5% moisture content were able to withstand cooling to  $-196^{\circ}\text{C}$ . Undehydrated seeds of *Aquilegia buergeriana* var. *oxysepala* Kitamura after being cryopreserved in liquid nitrogen have a 10.9% of moisture content and show 52.5% in germination. But, *Aquilegia buergeriana* var. *oxysepala* Kitamura seeds dehydrated by drying for 60 min. to have 6.0% of moisture content before cryopreservation show 84.7% in germination test. Properly dehydrated seeds after being stored in liquid nitrogen showed over 60% in germination rate and also shows an uniform sprouting time, 11~13 days in average. Any morphologically deformity in germinating beds has not been observed. Results from this study suggest that *Aquilegia* species seeds can cryopreservation in liquid nitrogen if the seed moisture content is controlled by a proper amount of dehydration.

**Key words** : Cryopreservation,  $-196^{\circ}\text{C}$ , Seed, Dehydration, Rewarming, Germination

#### 서 언

미래의 복합적인 요구에 부응할 수 있는 새로운  
형질의 작물품종을 육성하기 위하여 다양한 식물유

전자원의 확보가 필수적이다. 지구상에 분포하고 있  
는 귀중한 식물유전자원의 장기보존을 위하여 종자  
를 비롯하여 각종 식물영양계를 적절한 시설 내에서  
보관하거나 재배포장에서 보존하여야 한다(안,

Corresponding author: 안영희, 우 456-756 경기도 안성시 대덕면 내리 산 40-1번지 중앙대학교 산업과학대학  
생물자원과학계열, TEL:(031)670-3041, FAX:(031)676-2425,  
E-mail:ahn3041@post.cau.ac.kr

2001).

식물 종자를 보존하는 경우는 장기간의 저장에 의해서도 종자활력을 정상적으로 유지하여야 하며 변이발생이 최대한으로 억제되어야 한다. 따라서 충분히 건조된 종자를 저온상태에서 밀봉저장하는 방법이 관행적으로 이용되고 있다(Baskin and Baskin, 1998). 그러나 종자수명이 짧은 종자나 난저장성 종자의 경우에는 종자활력 유지 기간의 한계는 물론 번거로운 저장시설을 필요로 한다. 또한 영양변식성 식물은 주로 포장에서 유전자원이 재배 보존되고 있다. 포장보존은 유전자원의 특성평가와 보존을 동시에 할 수 있고 교배육종을 위한 모주로 즉시 사용할 수 있는 장점도 있으나 기상재해 및 병충해 등의 피해를 유지관리를 위한 비용 및 노동력을 필요로 한다.

따라서 최근에 이와 같은 문제점들을 해결하기 위하여 종자는 물론 영양계를 초저온 상태에서 장기간 동안 안정적으로 저장하는 방법들이 연구되고 있다. 액체질소(-196℃)내와 같이 초저온조건에서는 식물체의 모든 생화학적 대사활성이 거의 정지상태에 이르게 되므로 식물체의 유전적인 변이 억제는 물론 최대한의 장기보존이 가능한 이상적인 방법이다(Kumu and Harada, 1983). 식물체의 초저온보존법은 Sakai(1960)에 의해 휴면중인 버드나무 줄기를 -30℃에서 예비 동결하여 1년간 액체질소 내에 보관한 후 정상적인 식물체로 재생시킴으로서 최초로 가능성이 인정되었다.

세포의 동결 피해 없이 초저온 상태로 장기저장하기 위하여 치명적인 세포 내 동결을 회피할 수 있는 다양한 전처리방법들이 보고되었다. 특히 건조내성을 지닌 식물조직이나 종자에 있어서는 건조 전처리법이 안전하고 경제적인 방법으로 알려져 있다. Stanwood와 Bass(1981)는 작물종자의 건조처리에 의한 초저온보존의 획기적인 경제성 및 가치에 관하여 보고한 바 있다.

*Aquilegia*속 식물은 북미 및 유럽을 비롯하여 아시아 지역에 약 30여종이 자생하는 다년생 초본류로서 화단과 분식은 물론 절화용 화훼로 널리 재배되고 있다. 이 가운데 우리나라에는 매발톱꽃(*A.*

*buergeriana* var. *oxysepala* Kitamura)을 비롯하여 하늘매발톱(*A. flabellata* var. *pumila* Kudo), 노랑매발톱(*A. flabellata* for. *pallidiflora* Nakai) 등이 자생하고 있는데 특히 외국산에 비해 초장이 짧고 꽃의 관상 가치가 높아 금후 화단용 및 분식용으로 육종의 가능성이 높은 자생식물이다(이, 1993). 그러므로 약 4500종의 자생 식물 가운데 육종과 재배 가능성이 높은 귀중한 유전자원으로서 종의 장기보존이 필요한 식물유전자원이다. 그러나 자생 *Aquilegia*속 식물은 종자수명이 짧은 것으로 알려져 있어 채종 즉시 채파하여 재배하고 있는데, 당년에 발아한 어린 묘의 관리 및 종자의 상업적 유통에 많은 어려움이 따르고 있다.

본 연구는 자생 매발톱꽃 및 하늘매발톱의 *Aquilegia*속 종자를 이용하여 반영구적인 식물유전자원 보존방안으로 건조전처리에 의한 초저온보존법에 의해 자생 식물유전자원의 효과적인 장기저장 가능성을 모색하기 위해 수행하였다.

## 재료 및 방법

실험재료는 1995년 6월15일에 경기도 용인군 소재의 한택식물원에서 채종한 매발톱꽃 및 하늘매발톱 종자를 사용하였다. 채취한 종자는 7일간 바람이 잘 통하는 그늘에서 음건시켰다. 초저온보존을 위한 건조 전처리는 송풍 정온 건조기(ADVANTEC FV-320)를 이용하여 60±1℃ 조건에서 10분, 30분, 60분, 120분간 처리하였다. 건조된 종자는 1.8ml의 Cryotube(FALCON)에 밀봉하여 알미늄제의 Canister(WAKEN)에 2개씩 고정시켜 액체질소에 충분히 잠길 수 있도록 질소탱크(SC20)에 6개월간 보존하였다. 초저온보존된 종자는 38±5℃의 수조 내에서 급속 해동하였다. 종자 수분함수량 조사는 103℃ 조건의 건조기에서 24시간 동안 건조시킨 후 1시간 동안 실온에서 식힌 후 화학천평(Sartorius C-200)으로 평량하였다(안과 이, 1995).

*Aquilegia*속 종자의 저온보존은 저장봉지에 밀봉한 종자를 5℃의 냉장고 및 -10℃ 조건의 냉동고에 6개월간 저장하였다. 또한 대조구는 유산지 봉지에

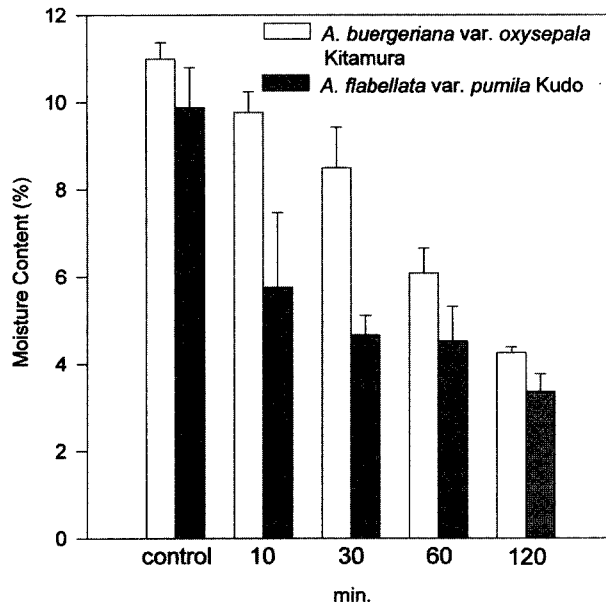


Fig.1. Change in moisture content of *A. buergeriana* var. *oxysepala* Kitamura and *A. flabellata* var. *pumila* Kudo seeds by 60 °C dry heat treatment for 0, 10, 30, 60, 120 minutes.

밀봉하여 25 °C 실온에 저장하였다. 저장이 끝난 종자는 직경 9cm의 petri-dish에 여과지(Toyo No. 2) 3매씩을 깔고 각 200립의 종자를 3반복으로 파종하였다. 발아상은 25 ± 2 °C 항온으로 2,000Lux 12시간의 광조사 환경으로 조절하였다. 종자발아는 유근이 1mm 정도 돌출된 상태를 조사하였다. 발아율 및 평균발아율 조사는 관행에 준하였으며 발아세는 파종 후 15일간의 발아율을 조사하였다.

### 결과 및 고찰

채종하여 7일간 자연상태로 음건시킨 대조구의 자생 매발톱꽃 및 하늘매발톱 종자 수분함량은 각각 10.9%, 9.8%로 나타났다(그림 1). 그러나 송풍건조기를 이용하여 10분, 30분, 60분, 120분 동안 건조처리한 매발톱꽃 종자의 수분 함수량은 각각 9.7%, 8.3%, 6.0%, 4.2%로 시간의 경과에 따라 점차 감소하였다. 하늘매발톱 종자는 매발톱꽃에 비해 상대적으로 수분함량이 낮아 동일한 조건의 건조 처리에 의

해 5.7%, 4.5%, 4.4%, 3.2%로 나타났다. 안과 이(1995)의 건조 전처리에 의한 양파종자의 초저온보존에 관한 연구에서도 30분~3시간에 걸친 다양한 처리조건에서 시간 경과에 따라 종자 수분함량이 비례적으로 감소함을 보고한 바 있다. 또한 충분히 건조처리된 종자에서의 고온 저항성(Chawan, 1971)은 이미 알려져 있는 바, 해바라기 종자에서 155 °C까지의 고온에 처리한 종자가 52%의 발아율을 나타내기도 하였다(Gain, 1922). 종자 건조 전처리는 종자의 치명적인 물리적, 화학적조건에 대한 내환경압을 증대시키고 종자의 호흡 및 생리대사를 억제시키므로 종자의 장기저장을 위해 최대한의 탈수처리는 필수적으로 알려져 있다(Baskin and Baskin, 1998). 또한 종자의 초저온 보존시에는 액체 질소 또는 액체헬륨 등의 초저온 조건에서 조직이 급속히 냉각되는 동안 세포의 유리화를 위해 반드시 탈수 전처리가 필요하다(Ahn and Sakai, 1994). Roos와 Stanwood(1981)는 종자의 초저온 보존을 위한 종자 내 수분의 효과적인 탈수를 위해 완속동결 처리시, 예비동결 온도조

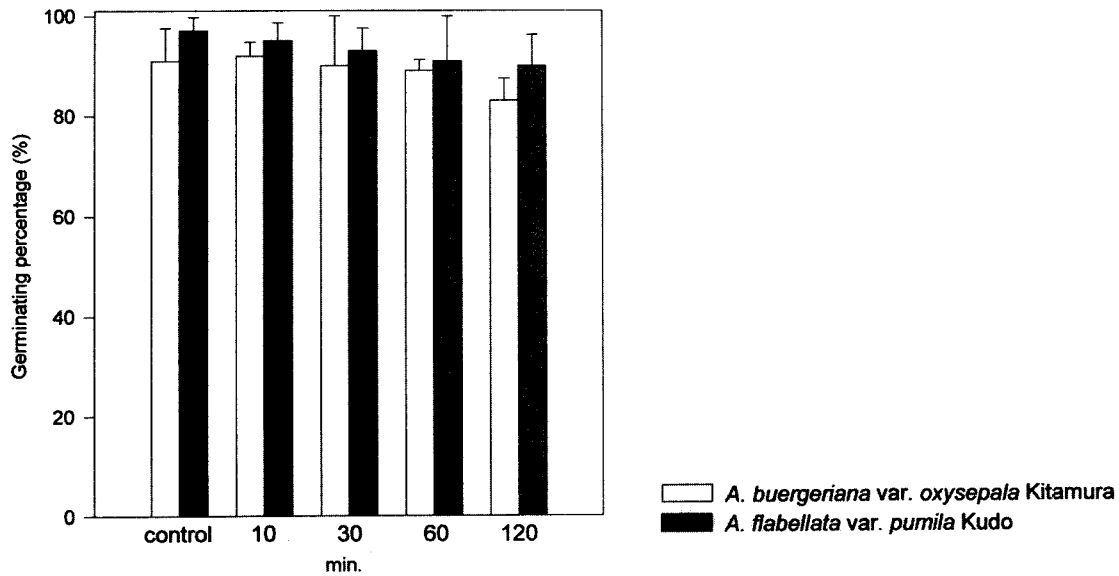


Fig.2.Changes of germinating percentage of *A. buergeriana* var. *oxysepala* Kitamura and *A. flabellata* var. *pumila* Kudo seeds imbibed to dry heat treatment.

건 및 처리시간 등이 작물종자의 생존에 큰 영향을 준다고 보고하였다. 그러나 완속동결과 같은 탈수방법은 고가의 장비가 필요하고 시간과 번거로움이 요구되는 건조처리 방법이다. 그러므로 건조내성을 지니는 종자라면 본 연구에서와 같이 간단한 건조기를 이용한 건조처리 방법이 이상적이라고 사료된다.

그림 2는 건조 전처리 한 종자를 곧바로 파종하여 나타난 발아율을 조사한 결과이다. 건조 무처리 대조구에서 매발톱꽃은 90.2%가 발아하였으며 하늘매발톱은 97.4%의 발아율을 나타내었다. 그러나 10분간 건조 전처리 한 매발톱꽃 종자의 발아율은 90.5%, 하늘매발톱은 95.0%로 나타났다. 또한 120분간을 건조 전처리한 매발톱꽃 종자는 81.0%, 하늘매발톱은 90.0%가 발아하였다. 본 결과에서 보는 바와 같이 자생 매발톱속 식물 종자의 건조 무처리구를 비롯하여 각 처리시간 조건의 건조 전처리구에서 최저 81%의 발아율에서 최대 97.4%의 범위에서 발아율이 나타났다. 결국 매발톱꽃 및 하늘매발톱 종자의 경우에 종자 수분함량이 약 4% 전후까지 건조 처리하여도 8~11% 정도의 발아율 저하가 나타나는 건조내성 종자임을 알 수 있었다. Nakayama(1974)도 황산과 80℃ 가열처리에 의해 종자수분 함량이 1~

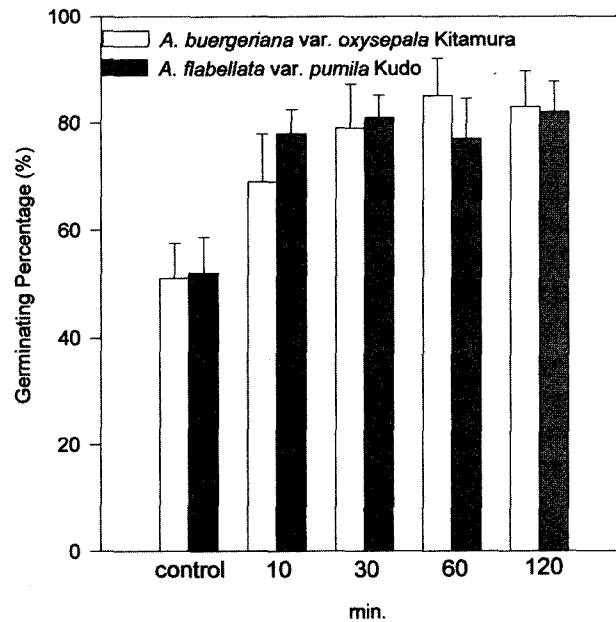
2%까지 건조처리 된 밀과 보리 종자에서 장기보존과 정상적인 발아력을 보고한 바 있다.

표 1은 채종 후 음건하여 종자 수분함량이 10.9%인 매발톱꽃 종자와 9.8% 상태인 하늘매발톱 종자를 25℃의 건조한 실온조건을 비롯하여 5℃ 냉장고, -10℃ 조건의 냉동고에서 6개월간 저장한 후 종자를 파종하여 나타난 결과이다. 앞의 결과에서 본 바와 같이 음건하여 곧바로 채파한 매발톱꽃 종자의 발아율이 90.2%(그림2)이었으나 실온에서 6개월간 저장한 후에는 26.3%로 현저히 감소하는 경향을 보여주었다. 하늘매발톱 종자도 97.4%(그림 2)에서 6개월 이후 16.7%로 감소하였다. 그러나 냉장 저장한 경우에는 상태가 호전되어 매발톱꽃이 67.7%, 하늘매발톱이 63.3%가 발아하였다. 결국 자생 매발톱꽃 종자의 냉장 및 냉동저장에 의해서도 25% 및 30% 정도의 발아율 저하를 보여주었으며 하늘매발톱의 경우에도 동일한 조건에서 36% 및 38%의 발아율 저하를 나타내었다. 이와 같은 결과는 자생 *Aquilegia*속 종자의 활력을 장기간 유지할 수 있는 안전한 장기저장법을 확립할 필요성을 시사하는 바이다. 佐藤(1991)은 유전자 은행에서 5~7%로 건조 전처리 한 작물종자를 -1℃, 상대습도 30% 조건의 저장시설에

**Table 1.** Effect of different storage method on germination of *A. buergeriana* var. *oxysepala* Kitamura and *A. flabellata* var. *pumila* Kudo seeds

Treatment	Cultivars	Germinating Percentage (%)	Germinating* Energy (%)	Average Germination Time (days)
Room temp. (25°C)	<i>A. buergeriana</i> var. <i>oxysepala</i> Kitamura	26.33 ± 2.52	22.00 ± 5.20	13.54 ± 0.53
	<i>A. flabellata</i> var. <i>pumila</i> Kudo	16.67 ± 4.04	13.67 ± 4.62	13.24 ± 0.82
Cold temp. (5°C)	<i>A. buergeriana</i> var. <i>oxysepala</i> Kitamura	67.67 ± 2.52	58.67 ± 1.15	13.34 ± 0.75
	<i>A. flabellata</i> var. <i>pumila</i> Kudo	63.33 ± 6.51	44.00 ± 6.56	12.47 ± 1.80
Cold storage (-10°C)	<i>A. buergeriana</i> var. <i>oxysepala</i> Kitamura	63.67 ± 10.60	46.67 ± 8.74	12.32 ± 1.74
	<i>A. flabellata</i> var. <i>pumila</i> Kudo	62.00 ± 8.89	45.33 ± 20.84	12.87 ± 1.48

\* 15 days after seeding



**Fig.3.** Changes of average germinating time of *A. buergeriana* var. *oxysepala* Kitamura and *A. flabellata* var. *pumila* Kudo seeds imposed to LN for 6months after dry heat treatment.

장기 저장하면서 작물의 발아율 변화를 조사한 결과를 보고하였다. 장기 보존성 종자는 16~20년까지 활력의 저하가 거의 나타나지 않지만 단명종자의 경

우에는 5년 이내에 현저한 발아율 저하가 나타난다고 하였다.

그림 3은 다양한 처리시간으로 건조 전처리 한

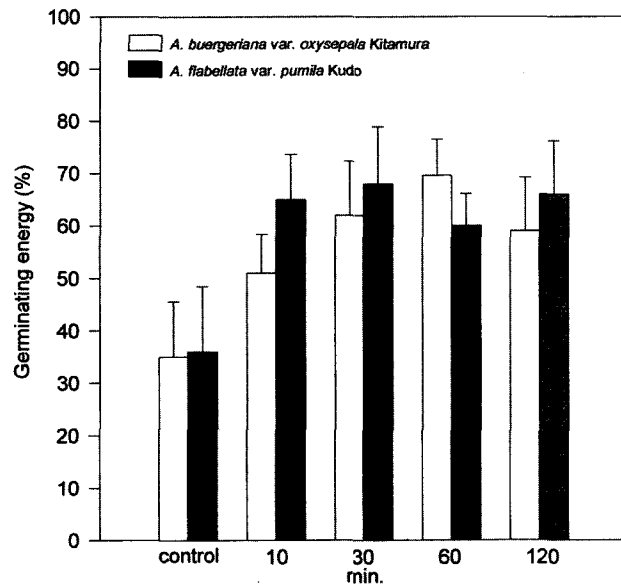


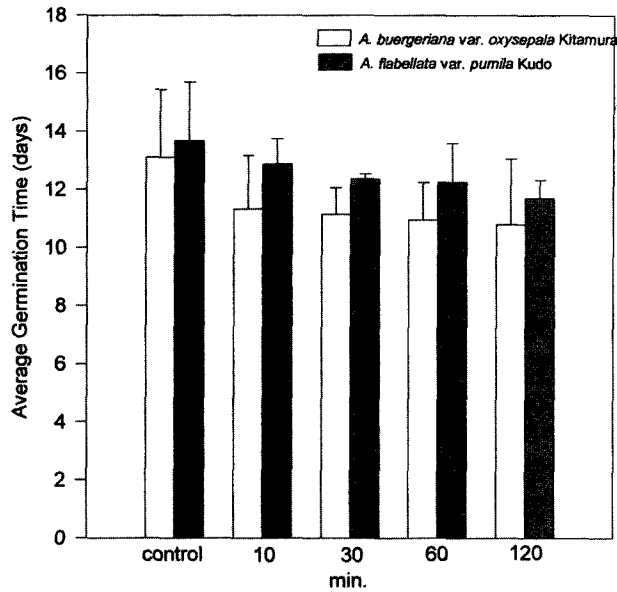
Fig.4. Change of germinating energy of *A. buergeriana* var. *oxysepala* Kitamura and *A. flabellata* var. *pumila* Kudo seeds imposed to LN for 6 months after dry heat treatment.

*Aquilegia*속 종자를 -197℃의 액체질소 내에 6개월간 초저온 저장한 후 파종하여 나타난 발아율을 보여주고 있다. 건조 무처리 상태로 종자수분 함량이 10% 전후인 상태로 초저온 저장한 후 발아시킨 매발톱꽃과 하늘매발톱 종자는 각각 52.5% 및 53.7%가 발아하여 초저온 처리에 의해 각각 41.8% 및 45.1%의 발아율 저하가 나타났다. 그러나 60분간의 건조 전처리에 의해 종자수분 함량이 6%로 탈수 건조되어 초저온 저장한 매발톱꽃 종자의 발아율은 84.7%로 초저온 처리 이전의 발아율 85.1%(그림 2)에 비해 0.5%의 발아율 저하가 나타났을 뿐이다. Harrington(1972)은 대부분의 온대성 식물종자의 성공적인 초저온 저장을 위한 종자 수분함량을 5% 전후로 보고하였는데, 본 연구에서 종자를 120분간 건조 처리하여 수분함량이 3.2%인 하늘매발톱 종자를 초저온 처리하여 81.8%의 발아율을 나타내었다. 이와 같이 자생 *Aquilegia*속 종자와 같은 야생식물의 종자뿐만 아니라 Stanwood 와 Roos(1979)는 14종의 채소 종자 및 화훼 종자를 완속동결법으로 탈수 건조시켜 액체질소 내에서의 장기 초저온 저장과 성공적인 발아를 보고하였다.

건조 전처리 한 *Aquilegia*속 종자를 파종하여 나타

난 발아세(그림 4) 및 평균발아기간(그림 5)은 60분간 건조처리하여 액체질소에 저장한 매발톱꽃 종자에서 70.0%의 발아세를 나타내었다. 10분간 건조처리한 매발톱꽃을 제외하고는 60% 이상의 높은 발아세가 조사되었다. 또한 평균 발아기간에서 모든 전처리 조건에서 11~13일의 고른 결과를 보여주고 있다. 이와 같은 결과는 적절한 전처리가 된 자생 *Aquilegia*속 종자를 장기간동안 액체질소에 저장하여 식물 유전자원 보존을 꾀하거나 종묘유통을 위해서도 안정된 방법이라는 것을 시사한다. Sakai(1960)는 액체질소 중에 보존된 식물체는 장기저장에 의해서도 유전적인 변이는 물론 영양요구성 변화 등의 가능성이 거의 없는 식물 유전자원보존법이라고 보고하였다. 그러나 금후 육종의 소재 및 자원식물로 자생식물을 유전자원으로 활용하기 위한 장기보존 방안으로 초저온 보존을 행한다면 유전적인 변이 발생 및 생리생화학적인 검토는 검증되어야 한다고 제안하는 바이다.

## 적 요



**Fig.5.** Change for average germinating time of *A. buergeriana* var. *oxysepala* Kitamura and *A. flabellata* var. *pumila* Kudo seeds imposed to LN for 6 months after dry heat treatment.

한국 자생 매발톱꽃속 종자 식물유전자원의 장기 저장을 위해 건조 전처리에 의해 종자 수분함수율을 저하시킨 후 액체질소(-196℃) 중에서 생존 가능성 및 보존에 관해 시험하였다. 종자 수분함수율은 10분~2시간에 걸친 다양한 건조조건에 의해 9.7~3.2%로 비례적으로 감소하였다. 건조 전처리한 매발톱꽃속 종자를 액체질소 내에 6개월간 저장하여 38±5℃ 온수에 해동시켜 발아율 및 발아세, 평균 발아기간을 조사하였다. 건조 무처리 한 수분 함수율 10.9% 조건의 매발톱꽃 종자는 초저온 보존 후, 발아율이 52.5%로 나타났으나 60분간 건조 전처리하여 수분 함수율이 6.0%로 조정된 종자의 경우는 84.7%가 발아하였다. 또한 발아세에 있어서도 수분 함수율이 5% 내외로 적절히 건조 전처리 한 매발톱꽃속 종자는 초저온 보존 이후에 60% 이상의 높은 발아세와 11~13일의 고른 평균 발아기간이 나타났다.

본 시험의 결과, 적절한 처리시간에 의해 건조 전처리한 자생 매발톱꽃속 종자를 초저온 조건의 액체질소에 장기 저장하여도 대조구에 비해 발아율은 약 0.5%가 저하하였으나 발아세, 평균 발아율에는 큰 차이가 나타나지 않았다. 또한 발아묘의 기형적인

형태적 변화도 관찰되지 않았다. 그러므로 단명성인 자생 매발톱꽃속 종자의 초저온 보존은 식물 유전자원을 유전적으로 안전하고 경제적으로 저장할 수 있는 방법으로 사료된다.

## 인 용 문 헌

- Ahn, Y. H. and A. Sakai. 1994. Survival by vitrification of *Dendrathera grandiflorum* shoot tips for cryopreservation. *Jour. Kor. Soc. Hort. Sci.* 35:499-506.
- 안영희, 이수성. 1995. 건조처리에 의한 양파 종자의 초저온 보존에 관한 연구. 중앙대학교 유전공학연구소 논문집 8(1):41-46.
- 안영희. 2001. 식물 유전자원의 초저온 보존. pp.321-339. In 백기엽 외 22인. 식물조직배양 기술 (15장). 향문사. 서울.
- Baskin, C. C. and J. M. Baskin. 1998. *Seed*. Academic press. San Diego. pp.107-111.
- Chawan, D.D. 1971. Role of high temperature pretreatments on seed germination of desert species of *Sida*. *Oecologia* 6:343-349.

- Gain, E 1922. Comp. Rend. Science. Paris. pp.174.
- Harrington, J. F. 1972. Seed storage and longevity. pp.145-245. in : T. T. Kozłowski (ed) Seed biology, vol. 3. Academic press. New York.
- 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.
- 이창복. 1993. 대한식물도감(5판). 향문사. 서울. pp.358.
- Nakayama, K . 1975. Physiology of seed germination. Uchida Rokakuho. Tokyo. pp.11-14.
- Roos, E. F. and P. C. Stanwood. 1981. Effects of low temperatures, cooling rate, and moisture content on seed germination of lettuce. Jour. Amer. Hort. Sci. 106: 30-34.
- Sakai, A. 1960. Survival of twigs of woody plants at -196 °C. Nature 185:393-394.
- 佐藤賢. 1991. 作物種子の長期貯藏と壽命に関する研究. 生物年報. 6:95-110.
- Stanwood, P. C. and L. N. Bass. 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. Seed Sci. & Technol. 9:423-437.
- Stanwood, P. C. and E. F. Roos. 1979. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen(-196 °C). Hort. Sci. 14:628-630.

(접수일 2001. 9. 10)

(수락일 2001. 10. 1)