J. Korean Soc. For. Sci. Vol. 107, No. 3, pp. 258~265 (2018)
https://doi.org/10.14578/jkfs.2018.107.3.258

한국산림과학회지
JOURNAL OF KOREAN SOCIETY OF FOREST SCIENCE
ISSN 2586-6613(Print), ISSN 2586-6621(Online)
http://e-journal.kfs21.or.kr

솜양지꽃(*Potentilla discolor* Bunge)의 초저온동결보존을 위한 최적 조건 탐색

양우형[1] · 용성현[1] · 박동진[1] · 설유원[1] · 최은지[1] · 정미진[2] · 최명석[4*]
[1]경상대학교 환경산림과학부, [2]국립수목원 식물보존과

Optimization Conditions for Cryopreservation of *Potentilla discolor* Bunge

Woo Hyeong Yang[1], Seong Hyeon Yong[1], Dongjin Park[1], Yuwon Seol[1], Eunji Choi[1], Mi Jin Jeong[2] and Myung Suk Choi[1*]
[1]*Division of Environmental Forest Science, Gyeongsang National University (Institute of Agriculture of Life Science), Jinju 52828, Korea*
[2]*Plant Conservation Division, Korea National Arboretum of the Korea Forest Service, Pochen 11186, Korea*

요 약: 본 연구는 희귀자생식물인 솜양지꽃의 효율적인 초저온 보존 조건을 탐색하고자 행하였다. 종자의 활력은 PVS2와 PVS3 용액 처리구에서는 약 80% 이상으로 대조구보다 훨씬 높은 활력을 보였다. 종자의 활력은 PVS3가 PVS2 처리보다 높게 나타났다. 종자의 활력은 sucrose처리에도 불구하고 대조구보다 낮았다. PVS2의 60분 처리구와 PVS3의 30분 처리구에서 95%의 발아율을 보였으나 그 외 처리구에서는 발아율이 낮았다. PVS2와 PVS3 처리구에서 배양된 유묘의 생장은 PVS2와 PVS3 용액 30분 처리구를 제외하고는 대조구에 비해 생장이 좋지 않았다. 두 가지 초저온동결보존법 간 유묘 생장에서는 encapsulation법과 vitrification법을 비교한 결과 미세한 차이를 보였으나 통계적으로는 유의성이 없었다. 본 연구는 솜양지꽃의 보존에 도움이 될 것으로 판단된다.

Abstract: This study was conducted to investigate the effective cryopreservation condition of *Potentilla discolor* Bunge, a rare native plant. Seed viability was more than 80% in PVS2 and PVS3 solution treatments. Seed viability was higher in PVS3 than PVS2 treatment. Seed viability was lower than control in spite of sucrose pretreatment. The germination rate was 95% at 60 min of PVS2 treatment and 30 min of PVS3 treatment but the germination rate was low at other treatments. The growth of the seedling wasn't doing that of the control except for treat PVS2 and PVS3 solution for 30 min. There was no statistically significant difference between the encapsulation method and the vitrification method in the seedling growth between the two cryogenic storage methods. This study is expected to be applied to future conservation methods of *Potentilla discolor*.

Key words: *cyropreservation, encapsulation, fresh weight, germination rate, vitrification*

서 론

솜양지꽃(*Potentilla discolor* Bunge)은 장미과(Rosaceae)에 속하는 다년생 초본식물로, 한방에서는 지혈이나 상처부위의 붓기를 빠지게 하는 효능이 있어 이질, 학질, 토혈, 하혈 등에 약용되며 뿌리는 해열제로 사용되고 있다(Park et al., 2007). 한국 희귀식물 목록집에 의하면 솜양지 꽃은 희귀식물 약관심종(LC)으로 분류되고 있다(Korea National Arboretum, 2009).

유전자원은 장기적 보존과 더불어 효율적인 활용이 이루어 져야 하나 대부분의 유전자원은 포장에 식재되어 보존되고 있다. 이러한 보존방법은 토지, 노동력, 관리 등에서 많은 투자가 필요하며, 보존된 식물은 환경 스트레스와 병해충의 위협에 노출되어 있다(Barrientos-Priego et al., 1992). 또한 종자의 저장 수명은 저장방법이나 건조

* Corresponding author
E-mail: mschoi@gnu.ac.kr
ORCID
Myung-Suk Choi https://orcid.org/0000-0003-1464-1573
Woo Hyeong Yang https://orcid.org/0000-0003-3995-8198
Seong Hyeon Yong https://orcid.org/0000-0001-8567-5004
Dongjin Park https://orcid.org/0000-0002-6089-4064

등 다양한 요인에 의해 결정된다(Seaton and Hailes, 1989; Pritchard et al., 1999). 그러나 이러한 전통적인 종자저장법과 건조방법은 시간과 노력이 요구되고 장기간 저장이 불가능하다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 종자를 장기간 보존할 수 있는 방법으로 유전자원을 액체질소(-196℃)에서 초저온동결보존법이 세계적으로 널리 이용되고 있다(Rajametov et al., 2014). 이미 여러 선진국에서는 식물의 영양기관 또는 종자 등을 액체질소 내에서 아무런 피해 없이 유전적으로 안정되어 영구적으로 보존하고 있다(Ahn and Sakai, 1994; Niino et al., 1992; Sakai and Kobayashi, 1990; Stanwood and Bass, 1981; Choi et al., 2000). 초저온동결보존법은 생리적 대사과정을 중지시켜 반영구저장하며 인적, 물적 자원을 최소화 할 수 있으며, 유전적 퇴화나 병충해 발생 위험이 없는 것으로 알려져 있다(Panis, 2008; Kaviani, 2011; Engelmann, 2004; Engelmann, 2012; Benson, 2008).

초저온동결보존법은 vitrificaiton법(Sakai et al., 1990), encapsulation법(Gonzalez-Arnao and Engelmann, 2006), 작은방울-유리화법(Pawlowska and Szewczyk-Taranek, 2014)이 잘 알려진 보존 방법이다. Vitrification법은 동결보호제 처리 후 동결시키는 방법으로, 간단하고 저렴하여 가장 많이 이용되고 있다(Galdiano et al., 2012). Encapsulation법은 이러한 vitrification법을 기반으로 만들어진 동결보존법 중 하나로 알긴산칼슘으로 겔화된 캡슐을 이용하여 세포내 얼음 형성을 방지하여 식물 생존을 가능케 한다(Engelmann, 1991).

특히 식물조직의 경우 건조에 대한 민감성이 다양하여 각 종에 적합한 초저온보존 기술의 개발이 필요한 실정이다. 따라서 각 종의 특성에 알맞은 조건을 확립하는 것이 중요하다. 솜양지꽃의 경우 현재 종자의 장기보존에 관한 연구가 전무한 실정이다. 그에 따라 본 연구에서는 솜양지꽃을 이용하여 vitrification과 encapsulation법 간의 초저온동결보존 방법에 대한 효율을 구명하고, 최적 보존 조건을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구는 국립수목원으로부터 분양받은 희귀식물인 솜양지꽃 종자는 4℃ 저온저장고에서 실리카겔이 들어있는 봉투에 밀봉하여 보관하였다. 사용된 종자는 2017년 9월에 채취하였으며, 수분함량은 10.5%, 초저온보존을 위한 실험 전 발아율은 100%였다. 종자는 70% ethyl alcohol에 1분, 2% sodium hypochlorite에 1분간 3번 살균하고 멸균수로 5회 수세하였다. 표면 살균이 이루어진 종자는 액체질소(-196℃)에서 보존되기 전에 각 초저온동결보존법 별로 처리하였다. 발아배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지를 사용하였으며, agar를 첨가하기 전에 pH를 5.8로 조정하였고, 배양은 25±1℃에서 실시하였다.

2. 종자의 초저온 민감성 평가

종자의 초저온 민감성을 평가하기 위하여 아무런 처리 없이 액체질소에 0, 30, 60, 180, 240분간 보존하여 종자의 활력을 조사하였다. 대조구로 액체질소에 처리하지 않고 4℃에 저장된 종자의 활력을 조사하였다.

3. Vitrification 초저온동결보존법

Vitrification 초저온동결보존법은 Hu et al.(2013)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 표면 살균된 종자는 먼저 loading용액(2M glycerol+0.4M sucrose+MS)에 30분간 침지하였다. 그 후 loading용액을 제거한 후 PVS2(30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% DMSO + 0.4M sucrose MS)와 PVS3(50% glycerol + 50% sucrose + MS)에 0, 10, 20, 30, 60분간 각각 처리하였다. 그리고 cryovial에 넣어 -196℃ 액체질소에 30분 동안 처리하였다. 이후 급속해빙 시켜 vitrification solution을 제거한 후, unloading 용액(1.2M sucrose MS)에 10분간 처리하였다. Unloading 용액을 제거한 후에는 MS배지에 종자를 치상하였다.

추가적으로 액체질소 저장기간에 따른 차이를 알아보고자 PVS2에 30분 처리 후, 액체질소에 0분, 30분, 1시간, 3시간, 3일, 1주일 간 액체질소에 보관 후 실험에 사용하였다. 대조구로 액체질소에 처리하지 않고 4℃에 둔 종자를 MS배지에 치상하였고, 이후 종자 활력과 발아율을 조사하였다.

4. Encapsulation 초저온동결보존법

Encapsulation 초저온동결보존법은 Flachsland et al.(2000)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 소독된 종자는 3% alginate와 0.1M sucrose MS 액체배지에 넣고 30분간 교반한 후 0.1M $CaCl_2$와 0.1M sucrose가 함유된 MS 액체배지에 떨어뜨려 직경 3-5mm의 bead를 만들었다. Bead는 증류수를 이용하여 세척하였고, 0.75M sucrose가 든 MS 액체배지에서 0, 1, 2, 3, 6, 12시간별로 전처리를 하였다. 처리된 bead는 24시간동안 자연건조 시킨 뒤, cryovial에 넣어 -196℃ 액체질소에 30분간 처리하였다. 액체질소에서 꺼낸 bead는 37-40℃에서 급속해동 후, MS 배지에 치상하였다.

또한 액체질소 보관에 따른 변화를 관찰하기 위하여 종자를 0.75M sucrose MS 액체배지에서 2시간 전처리 후, 캡슐화하여 액체질소에 넣고 0분, 30분, 1시간, 3시

Table 1. Low temperature storage sensitivity test on liquid nitrogen of *P. discolor* Bunge seeds.

Storage time (min)	0	30	60	180	240
TTC stainability	99.2±0.80[a]	58.92±0.55[b]	33.54±0.21[c]	0±0[d]	0±0[d]

* Values are means of 5 replicates±SD. Values with different letters within the columns indicate statistical differences at the 5% levels by Duncan's multiple range test

간, 3일, 1주일간 보관한 후 액체질소에 보관 후 실험에 사용하였다. 대조구로 액체질소에 처리하지 않고 4℃에 둔 종자를 MS배지에 치상하였고, 이후 활력과 재생률 그리고 관련 인자들을 조사하였다.

5. 초저온 처리된 종자 활력 조사

초저온 처리된 종자 활력 조사는 TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)법을 사용하였다(Porter et al., 1947). 솜양지꽃의 종자 활력 조사는 각 처리구 별로 Petri dish에 종자를 30립씩 5반복으로 진행하였으며 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 1% 용액에 3일 동안 30-40℃에서 침지 시킨 후 증류수로 종자를 세척 한 후 종자의 염색정도를 실체현미경으로 평가하였다.

6. 초저온 처리된 종자의 발아율 조사

액체질소 보존 기간에 따른 종자의 발아율을 조사하기 위하여 초저온 보존한 종자들을 MS배지에 치상하고 1주일 후 발아된 개체 수를 조사하였다. 전체 총 종자수와 발아된 개체수의 백분율로 발아율(germination rate %)을 계산하였다. 또한 종자의 발아 특성에 맞춰 평균발아일수(Mean germination time: MGT), 발아속도(Mean daily germination: MDG), T_{50}(Days to reach at 50% seed germination)을 아래식을 이용하여 계산하였다.

$$MGT = \sum(Ti \times Ni) / N$$

(Ti: 치상 후 조사일수; Ni: 조사 당일 발아 수; N, 총 발아수)

$$MDG = N / T$$

(N:총 발아 수; T: 총 조사 일수)

$$T50 = Ti + [((N + 1) / 2 - Ni) / (Ni - Nj)] \times (Ti - Tj)$$

(N: 발아조사 종결일까지의 총 발아수; Ni: N에 대한 50% 직전까지의 총발아수; Nj: N에 대한 50% 직후까지의 총 발아수; Ti: Ni 시점까지 소요된 발아기간; Tj: Nj 시점까지 소요된 발아기간)

7. 초저온처리된 종자로부터 발아된 식물체의 생장 조사

액체질소 보존 기간에 따른 실험처리별 유묘의 생장정도를 조사하기 위하여 초저온 보존 이후 솜양지꽃의 조건별로 초저온 처리된 종자는 발아배지에 치상하고 4주 뒤의 식물의 생중량을 측정하였다. 발아된 유묘의 엽형태 등 형태적 특징은 육안조사를 통해 행하였다.

8. 데이터분석

모든 실험은 종자 30립씩 5반복으로 행하였고, 모든 데이터는 Duncun의 다중검정법을 통해 평균간 차이의 유의성을 유의수준 5%로 검정하였다. 통계 분석은 SAS version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 실시되었다.

결과 및 고찰

1. 초저온동결보존법에 따른 종자 활력 조사

솜양지꽃 종자의 초저온 민감성을 평가하기 위해 실험을 진행한 결과는 Table 1과 같다. 초기 활력과 비교하였을 때 저장시간이 길어질수록 점차 감소하는 경향을 보이다 180분 이상 저장하였을 때 종자 활력이 완전히 없어짐을 알 수 있었다. 따라서 솜양지꽃은 초저온에 민감함을 알 수 있었으며, 이후 vitrification법과 encapsulation법을 이용하여 초저온 실험을 진행하였다.

Vitrification법은 동결보호제인 PVS2와 PVS3 용액종류별로, 또 처리 시간별 종자 활력을 조사하였다(Figure 1). 종자의 활력은 대조구에서 약 60%로 가장 낮게 나타나는 반면 나머지 PVS2와 PVS3 용액 처리구에서는 약 80%이상으로 훨씬 높은 활력을 보였다. 두 용액 간 종자의 활력은 전반적으로 PVS3가 PVS2 처리보다 높게 나타났다. PVS3처리구에서 종자의 활력은 PVS2와 달리 처리시간별로 비슷한 결과를 보였다. 그러나 PVS2는 10분 처리구에서 가장 높은 값을 나타내었고, 60분 처리구에서 가장 낮게 나타났다.

초저온동결보존의 효율성을 증대시키기 위해 적절한 vitirificaition용액의 선정과 탈수시간은 매우 중요하다(Ferrari et al., 2016). 본 연구에서는 종자의 활력에 있어 PVS2와 PVS3 처리 시간별로 서로 다른 결과를 나타내었는데 이는 vitirificaition 용액 종류에 따른 삼투압스트레스와 독성에 대한 반응이 다르기 때문이다(Kim et al. 2009). 솜양지꽃의 종자활력 유지를 위해서는 PVS2는 10분처리 또는 PVS3는 60분 처리가 적합할 것으로 보인다.

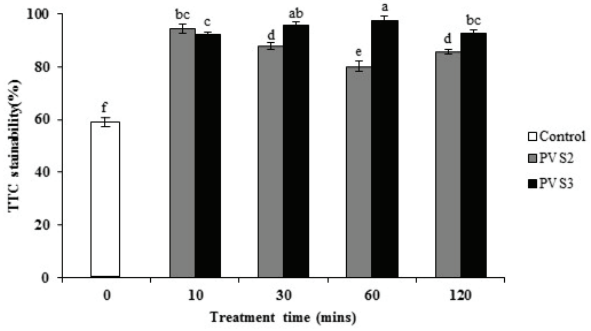

Figure. 1. Effects of seed vitality according to PVS solutions and treatment time. Bars are means of 5 replicates±SD. The control seeds were incubated at 4°C without treatment with liquid nitrogen.

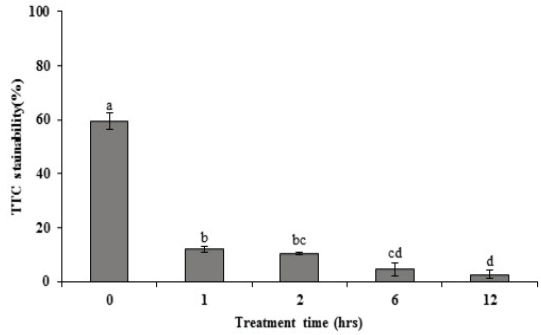

Figure. 2. Seed vitality according to treatment time of sucrose pretreated at encapsulation method. Bars are means of 5 replicates±SD. The control seeds were incubated at 4°C without treatment with liquid nitrogen.

Table 2. Effect of vitrification and encapsulation, and storage duration on TTC stainability and germination rate, fresh weight of *P. discolor* Bunge.

Treatment	LN storage time	TTC stainability (%)	Germination rate (%)	Fresh weight (g)
Control	0min	89.46±1.01^{a*}	83.3±16.6	0.502±0.03^{a}
Vitrification	30min	89.09±0.97^{a}	72.33±14.68	0.574±0.013^{a}
	1hr	83.00±1.22^{abc}	89.00±11.00	0.589±0.048^{a}
	3hr	86.70±2.51^{ab}	80.67±9.94	0.230±0.001^{b}
	3day	87.80±1.71^{ab}	78.00±11.00	0.572±0.018^{a}
	1week	80.40±3.52^{bc}	80.67±9.94	0.248±0.006^{b}
	1month	77.69±0.93^{c}	72.33±2.67	0.339±0.008^{ab}
Encapsulation	30min	48.40±1.60^{d}	75.00±14.43	0.136±0.010^{b}
	1hr	43.20±0.92^{de}	41.50±21.00	0.136±0.009^{b}
	3hr	44.52±5.55^{de}	55.67±29.42	0.116±0.006^{b}
	3day	45.00±2.09^{de}	43.25±22.89	0.105±0.005^{b}
	1week	40.30±0.73^{e}	54.25±8.14	0.143±0.002^{b}
	1month	32.94±3.45^{f}	42.50±20.29	0.086±0.001^{b}

* Values are means of 5 replicates±SD. Values with different letters within the columns indicate statistical differences at the 5% levels by Duncan's multiple range test. The control seeds were incubated at 4°C without treatment with liquid nitrogen.

Encapsulation법에서 sucrose 전처리에 따른 종자의 활력을 조사하였다(Figure 2). 종자의 활력은 sucrose 무처리 대조구에서 약 60%로 관찰되었으나 반면 sucrose의 모든 처리구에서 20% 미만의 종자 활력이 나타났다. 이미 많은 선행연구에서 sucrose 전처리는 초저온동결보호 시 종자나 식물체의 생존율 높이는 것으로 보고되어져 있으나(Matsumoto et al., 1994; Kuranuki and Sakai 1995), 본 연구결과에서는 sucrose 전처리가 이루어지지 않은 대조구에서 가장 높은 활력을 보였는데, 이는 sucrose 전처리가 솜양지꽃의 초저온보존에서는 종자 활력에 긍정적인 결과를 가져오지 않는 것으로 판단된다.

수용성 설탕은 삼투압제, 영양소 그리고 지질층과의 상호 작용 등의 역할을 할 뿐만 아니라 저온 스트레스로 인한 손상으로부터 식물 세포를 보호하는 긍정적인 효과를 발휘한다(Seijo, 2000). 이러한 기능 외에도 대사 신호 전달에 있어 중요한 메신저 역할을 하기도 한다. 반면에 당도가 높을수록 식물의 노화를 유발할 수 있는데 이는 저온에 대한 순화 과정에서 수용성 당이 축적되면 식물에 부정적 영향을 미칠 수 있다(Ma et al., 2009). 본 연구에서 sucrose전처리에 따른 종자활력이 대조구보다 저조한 것은 sucrose의 축적이 항산화효소 등의 활성을 저해하였거나 삼투압 쇼크를 받아 부정적 영향을 미쳤을 것으로 추정된다.

Vitrification법과 Encapsulation법으로 처리된 종자를 액체질소에 넣고 보존 시간에 따른 종자의 활력을 조사하였다(Table 1). Vitrification 처리법의 경우 대조구

와 비교 하였을 때 3일까지는 종자 활력의 변화가 없었으나 이후 활력이 10% 정도 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 보존기간 1주일과 4주 후의 차이는 크지 않았다. 반면에 Encapsulation 방법의 경우 대조구와 비교하였을 때 현격히 낮은 종자 활력을 보였다.

2. 초저온보존된 종자의 발아

동결보존제인 PVS2와 PVS3의 처리시간에 따른 종자 발아율을 조사하였다(Figrue 3 and 4). 종자의 재생률은 대조구의 경우 95% 이상의 발아율을 보여 주었으며, 처리구의 경우 PVS3의 30분처리에서 95%의 발아율을 보였다. 이외의 처리구에서는 대조구에 비하여 종자 발아율은 낮았으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다. 동결보호제 처리가 대조구보다 낮은 발아율을 보이는 것은 동결보호제의 독성물질과 과도한 삼투압에 의해 식물세포가 피해를 받기 때문인 것으로 보인다(Niino et al., 1992). 따라서 종자의 초저온 피해를 최소화하기 위해서는 최적의 동결보호제와 처리시간이 중요할 것으로 보인다.

Encapsulation법으로 처리된 종자 발아율은 매우 낮게 나타났다. Sucrose 전처리구는 발아가 이루어지지 않는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 솜양지꽃의 초저온에서는 Encapsulation법이 적절치 않은 것으로 판단된다. Sucrose 전처리에 따른 초저온 보존된 종자의 생존율과

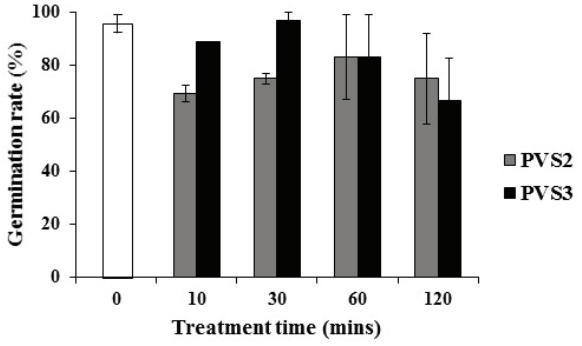

Figure 3. Germination rate of seeds according to treatment time of freeze protection agents PVS2 and PVS3. Bars are means of 5 replicates±SD. The control seeds were incubated at 4°C without treatment with liquid nitrogen.

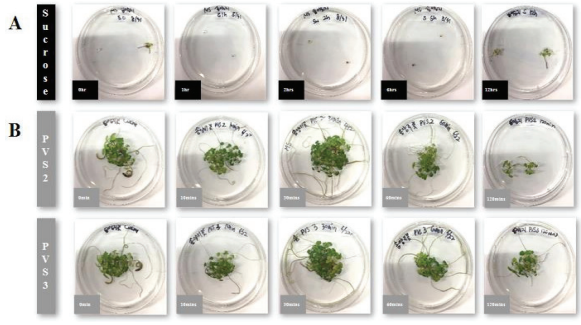

Figure 4. Seed germination and seedling growth of P. discolor Bunge in each treatment. Germination was measured 1 week after incubation in MS basal medium and seedling growth was measured 4 weeks after germination in MS basal medium. A: Encapsulation and B: Vitrification.

Table. 3. Effect of vitrification and encapsulation, and storage duration on Mean germination time, Germination rate, T50 of *P. discolor* Bunge.

Treatment	LN storage time	Mean germination time (day)	Germination energy	T_{50}
Control	0min	22.02±0.63	1.31±0.27	23.76±0.52
Vitrification	30min	21.00±0.25	1.17±0.30	22.39±0.20
	1hr	21.07±0.45	1.42±0.10	22.95±0.25
	3hr	21.70±0.17	1.19±0.11	23.06±0.24
	3day	21.83±0.47	1.18±0.04	23.69±0.20
	1week	21.80±0.36	1.18±0.04	23.22±0.28
	1month	21.17±0.58	1.15±0.14	22.85±0.46
Encapsulation	30min	21.43±0.43	1.22±0.20	23.10±0.22
	1hr	22.27±0.94	0.62±0.18	24.56±0.47
	3hr	21.10±0.46	0.90±0.24	22.78±0.93
	3day	20.83±0.84	0.68±0.14	23.25±0.78
	1week	21.77±0.55	0.84±0.15	24.42±0.10
	1month	21.93±0.09	0.65±0.23	23.53±0.90

* Values are means of 5 replicates±SD. The control seeds were incubated at 4°C without treatment with liquid nitrogen.

발아율 저하는 삼투압 스트레스에 내성이 떨어져 생긴 것으로 판단된다. 포장이나 기내에서 초세가 약한 야생 식물의 경우에는 동결보존 후의 발아율이 낮은 것이 문제점이다(Schäfer-Menuhr, 1997). 열대 난과식물인 *Vanda tricolor*의 초저온 보존된 종자의 발아율은 실온에 저장된 종자의 발아율에 비해 낮아진다고 보고되어졌다(Jitsopakul et al., 2012).

액체질소 보존 시간 별 발아율의 변화를 조사하였다(Table 1). Vitrification법과 Encapsulation법 모두 초저온 보존 기간이 길어질수록 발아율이 감소하는 경향을 보였으나, 통계적으로는 유의성이 없었다(p=0.518, p>0.05). 평균발아일수와 발아속도, 그리고 T50을 조사한 결과는 대조구와 일원배치분산분석을 시행한 결과 통계적으로 유의미한 차이를 보이지 않았다(Table 3). 이러한 결과들은 초저온보관을 위한 Vitrification법과 Encapsulation법이 종자의 발아에 큰 영향을 주지 않음을 의미하며, 이는 초저온보관에 이용할 수 있음을 보여준다.

3. 초저온동결 방법에 따른 유묘의 생장

액체질소 보존 기간에 따른 유묘의 생장정도를 조사하였다(Table 1). 두 가지 초저온동결보존법 간 유묘 생장에서는 encapsulation법이 vitrification법으로 처리한 것보다 생중량이 높게 나왔으며, Vitrification을 시행한 처리구의 유묘의 생장은 액체질소 보존 시간이 길어질수록 약간 저조하였지만 큰 차이를 나타내지 않았다. 초저온보존법을 통해 발아된 유묘는 초저온보존 후에도 큰 생장억제가 관찰되지 않았고, 형태적인 변이 또한 관찰되지 않았다(Figure 4). 초저온보존된 종자로부터 발아된 유묘는 대조구 유묘와 차이가 없이 정상적으로 생육을 하였고, 유묘의 건전성이 확인되었다. 초저온보존법으로 보존된 종자는 유전적 변이의 가능성이 적고, 보다 나은 생리적 상태로 유지할 수 있다고 알려져 있다(Stanwood, 1980). 그러나 일부에서는 식물이 스트레스를 받게되면 식물의 변형을 일으킬 수 있으며(Engelmann, 2011), 액체질소에 의한 식물의 생리학적 정지는 동결 후 생존에 해로운 영향을 미칠 수 있다고 보고되고 있다(Engelmann et al., 1995; Michalak et al., 2013).

솜양지꽃 종자의 초저온보존에는 vitrification법이 encapsulation보다 더 효율이 높게 나타났다. Vitrification법은 동결 시간을 줄이고, 세포 및 분열조직을 저온 보존할 수 있는 것으로 알려져 있다(Fahy et al., 1984; Langis et al., 1989; Sakai et al., 1990). 또한 효율적인 솜양지꽃의 초저온보존에는 loading 용액도 좋은 영향을 미쳤을 것으로 추정된다. Loading 용액은 vitrification 용액에 비해 보통 낮은 농도의 화합물로 구성되어 있으며, 이러한 loading 용액은 식물의 동결방지에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Gonzalez-Arnao et al., 2008). 최종적으로 솜양지꽃 종자의 초저온보존에는 적절한 초저온법과 동결보호제의 적정 농도의 선택, 솜양지꽃의 재생률 급감에 따른 원인 즉 발아억제물질의 축적 또는 2차 휴면 등 생리적 변화에 의한 것인지 또는 앞서 언급한 독성 피해인지는 추후 연구가 요망된다. 본 연구는 초저온 기간이 너무 짧아 초저온보존의 효과가 분명치 않아 상기 초저온보존 조건으로 솜양지꽃 종자를 장기 보존 연구가 요망된다. 본 연구는 야생 유전자원 보존에 널리 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 국립수목원 위탁연구과제(과제번호KNA-17-C-19)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

Ahn, Y.H. and Sakai, A. 1994. Survival by vitirification of shoot tips of *Chrysanthermum morifolium* L. cooled to –195℃. Journal of Korean Society for Horticultural Science 35: 451-457.

Barrientos-Priego, A.F., Borys, M.W., Escamilla-Prado, E., Ben-Ya'acov, A., Cruz-Torres, E. and Lopez-Lopez, L. 1992. A study of the avocado germplasm resources, 1988–1990 IV Findings in the Mexican Gulf region. Proceedings of the Second World Avocado Congress. 551-558.

Benell, C., Carlo, A.D. and Engelmann, F. 2013. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia, Diospyros, Malus, Olea, Prunus, Pyrus* and *Vitis*. Biotechnology Advances 31: 175-185.

Benson, E.E. 2008. Cryopreservation theory. pp.15-32. In: Reed, B.M. (Ed.) Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer, New York, U.S.A.

Choi, Y.C., Ryu, K.S. and Bang, H.S. 2000. Cryopreservation of Mulberry(*Morus*) Seeds in Liquid Nitrogen(LN2). Korean Journal of Sericultural and Entomological Science 42: 1-5.

Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. Euphytica 57: 227-243.

Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 40: 427-433.

Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the

conservation of plant biodiversity. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 47: 17-25.

Engelmann, F. 2012. Germplasm collection, storage and preservation. In: Altman A, Hazegawa PM, editors. Plant biotechnology and agriculture - Prospects for the 21st Century. Oxford: Academic Press. New York, U.S.A. pp. 255-268.

Engelmann, F., Dumet, D., Chabrillange, N., Abdelnour-Esquivel, A., Assy-Bah, B., Dereuddre, J. and Duval, Y. 1995. Factors affecting the cryopreservation of coffee, coconut and oil palm embryos. Plant Genetic Resources News 103: 27-31.

Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A. and Meryman, H.T. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 21: 407-26.

Ferrari, E.A.P., Columbo, R.C., Faria, R.T., Takane, R.J. 2016. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. Revista Ciencia Agronomica 47: 172-177.

Flachsland, E., Terada, G., Scocchi, A., Mroginski, L. and Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of Seed and in vitiro-cultured protocorms of *Oncidium bifolium* sims. (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration. Cryo Letters 27(4): 235-42.

Galdiano, R.F., Lemos, E.G.M., Faria, R.T. and Vendrame, W.A. 2012. Cryopreservation of Dendrobium hybrid seeds and protocorms as affected by phloroglucinol and Supercool X1000. Journal of Scientia Horticulturae 148: 154-160.

Gonzalez-Arnao, M.T., Panta, A., Roca, W.M., Escobar, R.H. and Engelmann, F. 2008 Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. Plant Cell Tissue and Organ Culture 92: 1-13.

Gonzalez-Arnao, M.T. and Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. Cryo Letters 27: 155-68.

Hu, W.H., Yang, Y.H., Liaw, S.I. and Chang, C. 2013. Cryopreservation the seeds of a Taiwanese terrestrial orchid, *Bletilla formosana* (Hayata) Schltr. by vitrification. Botanical studies 54: 33.

Jeong, H.R., Choi, K. and Park, K.W. 2012. The regional folk plants in Southern Inland area of Gyeonggi-do. Korean Journal of Plant Resources 25: 523-542.

Jitsopakul, N., Thammasiri, K., Yukawa, T. and Ishikawa, K. 2012. Effect of cryopreservation on seed germination and protocorm development of *Vanda tricolor*. ScienceAsia 38: 244-249.

Kaviani, B. 2011. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. Australian Journal of Crop Science 5: 778-800.

Kim, H.H., Lee, Y.G., Ko, H.C., Gwag, J.G., Cho, E.G. and Engelmann, F. 2009. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. Cryo Letters 30: 320-334.

Korea National Arboretum. 2009. Rare Plants Data Book of Korea. Geobook Publishing. Seoul, Korea pp.332.

Kuranuki, Y. and Sakai, A. 1995. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of tea (C*amelia sinensis*) by vitrification. Cryo Letters 16: 345-352.

Langis, R., Schnable, B., Earle, E.D. and Steponkus, P.L. 1989. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. Cryo Letters 10: 421-8.

Ma, Y.Y., Zhang, Y.L,, Lu, J. and Shao, H.B. 2009. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. African Journal of Biotechnology 8: 2004-2010.

Matsumoto, T., Sakai, A. and Yamada, K. 1994. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of Wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. Plant Cell Reports 13: 442-446.

Michalak, M., Plitta, B.P. and Chmielarz, P. 2013. Desiccation sensitivity and successful cryopreservation of oil seeds of European hazelnut (*Corylus avellana*). Annals of Applied Biology 163: 351-358.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Niino, T.A., Yakuwa, S.S.H. and Nojiro, K. 1992. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of apple and pear by vitrification. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 28: 261-266.

Panis, B. 2008. Cryopreservation of monocots. In: Reed, B. (Ed.), Plant Cryopreservation: A Practical Guide - Springer pp. 241-280. New York.

Park, H.J., Lee, K.T. and Park, J.H. 2007. Isolation of two steroids and a triterpenoid from the roots of *Potentilla discolor*. Korean Journal of Pharmacognosy 38: 354-357.

Pawlowska, B. and Szewczyk-Taranek, B. 2014. Droplet vitrification cryopreservation of *Rosa canina* and *Rosa rubiginosa* using shoot tips from in situ plants. Scientia Horticulturae 168: 151-156.

Porter, R., Durrell, M. and Romm, H. 1947. The use of 2, 3, 5-triphenyl-tetrazoliumchloride as a measure of seed germinability. Plant Physiology 22: 149-159.

Pritchard, H.W., Poyner, A.L.C. and Seaton, P.T. 1999. Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-dry storage and cryopreservation. Lindleyana 14: 92-101.

Rajametov, S., Lee, Y.Y., Kim, Y.C., Lee, S., Yi, J.Y., Jeon, Y.A., Sung, J.S., Lee, G.A. and Gwak, J.G. 2014. Response of pre and post treatments for cryopreservation of Korean ginseng seeds on recovering viability. Korean Journal of Breeding Science 46: 408-416.

Reed, B.M. 2011. Choosing and applying cryopreservation protocols to new plant species or tissues. Acta Horticulturae 908: 363-372.

Sakai A., Kobayashi, S. and Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis Osb*. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports 9: 30-3.

Sakai, A. and Engelmann, F. 2007. Vitrification, encapsulation – vitrification and droplet-vitrification: a review. Cryo Letters 28: 151-172.

Sakai, A. and Kobayashi, S. 1990. A simple and efficient procedure for cryopreservation of nuclear cells of naverl orange by vitrification. Cryobiology 27: 657.

Salomaao, A.N., Santos, I.R.I., Josee, S.C.B.R., Silva, J.P.D. and Laviola, B.G. 2016. Methods to assess the viability of cryopreserved *Jatropha curcas* L. seed germplasm. Recista Brasileira de Plantas Medicinais 18: 391-398.

Schäfer-Menuhr, A., Schumacher H.M. and Mix-Wagner, G. 1997. Long-term storage of old potato varieties by cryopreservation of shoot tips in liquid nitrogen. Plant Genetic Resources Newsletter 111: 19-24.

Seaton, P.T. and Hailes, N.S.J. 1989. Effect of temperature and moisture content on the viability of *Cattleya aurantiaca* seed. In: Pritchard HW (ed) Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management. Cambridge University Press. Cambridge, U.K. pp. 17-29.

Seijo, G. 2000. Effects of preculture with sucrose and ABA on cell suspensions water status and its relation with vitrification resistance. Brazilian Journal of Plant Physiology 12: 166-180.

Stanwood, P.C. 1980. Tolerance of crop seeds to cooling and storage in liquid nitrogen. Journal of Seed Technology 5: 26-31.

Stanwood, P.C. and Bass, L.N., 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. Seed Science and Technology 9: 423-437.

Manuscript Received : April 16, 2018
First Revision : June 11, 2018
Second Revision : September 10, 2018
Accepted : September 11, 2018