Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2017;36(4):256-262. Korean
Published online 2017 December 20. https://doi.org/10.5338/KJEA.2017.36.4.34

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

들깨 종자 활력 수준별 초저온 동결보존 후 발아율 및 Ascorbate Peroxidase 활성 변화

이영이[1*], 이명희[2], 이정윤[1], 이태윤[3], 손은호[1], 박홍재[1]

[1]농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터, [2]농촌진흥청 국립식량과학원 남부작물부, [3]서울시립대학교 자연과학대학 환경원예학과

Response of Germination Rate and Ascorbate Peroxidase Activity to Cryopreservation of Perilla (*Perilla frutescens*) Seeds with Variable Initial Viabilities

Young-yi Lee[1*], Myeong-hee Lee[2], Jung-yoon Yi[1], Tae-yoon Lee[3], Eun-ho Son[1] and Hong-jae Park[1] ([1]National Agrobiodiveristy Center, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 16613, Korea, [2]Department of Southern Area Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Miryang 27709, Korea, [3]Department of Environmental Horticulture, College of Natural Science, University of Seoul, Seoul 02504, Korea

Received: 16 November 2017/ Revised: 11 December 2017/ Accepted: 13 December 2017

ORCID
Young-yi Lee
http://orcid.org/0000-0002-8452-8157

Abstract

BACKGROUND: Seed of perilla (*Perilla frutescens* var. japonica Hara) is short-lived in conventional storage conditions. For long-term conservation of plant species, cryopreservation is the method currently available. This study was performed to find out reliable methods for a long-term storage of seeds of perilla as a genetic resource. **METHODS AND RESULTS:** Using seeds of 9 perilla cultivars, the effects of desiccation, aging, and cryopreservation on seed germinability and ascorbate peroxidase activity in the seeds were investigated. Initial germinability of the seeds was various, and dry seeds of all cultivars survived cryopreservation without loss of viability. The highest germination was achieved at 4-5% moisture content, and stimulatory effect of cryogenic temperature on the seed germination was observed in some cultivars. Accelerated aging of perilla seeds led to reduction in germination and ascorbate peroxidase activity, and the susceptibility of seeds to aging was different among the tested cultivars. No significant difference in germination was observed for the aged seeds of control and liquid nitrogen exposed. **CONCLUSION:** The results of this study suggest that cryopreservation at 4-5% moisture content would be a suitable method for long-term conservation of perilla seeds without detrimental effects on germination.

Key words: Ascorbate peroxidase, Cryopreservation, Germination, Perilla, Seed

*Corresponding author: Young-yi Lee
Phone: +82-31-299-1804; Fax: +82-31-299-1894;
E-mail: youngyi@korea.kr

서 론

들깨(*Perilla frutescens* var. japonica Hara)는 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 1년생 초본으로 중국, 인도, 일본 등 주로 동부아시아에서 재배되어 왔으며(Nitta *et al.*, 2005), 우리나라도 원산지의 일부로서 삼한시대 이전부터 재배되어온 것으로 추정되고 있다. 들깨 잎과 종자는 식이섬유, 칼슘과 철 등의 미네랄, 그리고 비타민 A, B_2, C 등 여러 유용성분을 함유하고 있다(Asif, 2012; Duke and Duke, 1978). 들깨의 잎과 종실 및 종실유는 특히 우리나라에 많이 소비되고 있으며, 종실유는 omega-3 지방산 함량이 높아 심장질환이나 염증 예방 효능을 가지는 것으로 밝혀지고 있다(Asif, 2011; Chang *et al.*, 2008; Shin and Kim, 1994).

전통 작물의 재래종이 일반적으로 멸종 위기에 있는 것과 마찬가지로 들깨 재래종 역시 Central Himalaya에서는 이미 소실 직전 상태로 알려져 있어(Negi *et al.*, 2011), 오랜 역사를 갖는 인류에게 유용한 식물 종의 보존이 그 어느 때보다도 중요한 시점이다. 일반적으로 각종 식물 종자를 유전

자원으로 종자은행에 보존하고 있으며(Arora, 1997), 들깨와 같이 위기에 처한 약용식물의 유전형 보존을 위한 종자의 장기 보존 방법을 개발하고 이용하는 것은 중요한 일이라고 할 수 있다.

생물조직을 액체질소를 이용하여 극한 저온(-196℃)에 저장하는 초저온 보존 방법은 세계적으로 널리 이용되고 있다. 특히 유전형질 특성의 손실 없이 유전자원을 장기간 보존할 수 있는데(Benson and Withers, 1998), 초저온에서 보존하면 저장기간 동안 조직의 대사과정이 멈추기 때문이다(Engelmann, 2004; Fatima *et al.*, 2009). 초저온 보존 방법은 다양한 식물 종의 건조종자, somatic 및 zygotic embryo를 중심으로 확립되어 왔다(Sakai *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 1993; Fatima *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2013).

건조조건에 민감하여 저장하기가 어려운 종자나 식물조직의 경우 초저온 보존 기간 동안 수명이 유지될 수 있는 적정 수분 함량까지 알맞게 탈수시키는 것이 필요한데, 매우 까다로운 기술이 요구되는 부분이다. 또한 건조에 민감한 종의 초저온 보존 기술을 개발하는 데는 많은 노력과 시간이 필요하며(Pritchard and Prendergast, 1986; Wesley-Smith *et al.*, 1992; Chandel *et al.*, 1995), 종마다 보존 대상 조직 부위가 다른 것도 같은 이유이다(Berjak *et al.*, 1993; Farrant *et al.*, 1986; Finch-Savage, 1992; Hong and Ellis, 1996; Tompsett and Pritchard, 1993).

종자은행의 다양한 종자 저장 방법은 국제기준을 비롯하여 많은 문헌에서 언급되어 왔으며(Hong and Ellis, 1996), 최근에는 종자 저장수명을 연장하고 장기간 보존할 수 있는 방법을 개발하기 위해 여러 가지 시도들이 이루어지고 있다. 종자를 장기간 저장하는 핵심 요인은 종자의 수분 상태이며, 종자를 일정 수준 이상으로 건조시키는 것은 저장수명에 거의 영향을 주지 못하고(Ellis and Hong, 2006), 오히려 노화를 가속화시킬 수 있다는 것이 여러 연구를 통해 증명되어 왔다(Vertucci and Roos, 1990; Walters, 1998).

들깨 종자는 유지 함량이 높으며 보존 기간이 경과할수록 활력이 크게 감소하는 단명종자에 속하며, 종자의 수분 함량과 온도, 습도 등 보존조건에 따라 활력의 변화가 크고 휴면이 잦은 특성을 지니고 있다(Lee and Kim, 2004). 따라서 본 연구에서는 이러한 저장 특성을 갖는 들깨 종자를 유전적 진위성(genetic integrity)의 소실 없이 간단한 절차로 장기간 보존할 수 있는 조건을 구명하기 위하여 종자를 액체질소에 초저온 동결보존하기 위한 최적 종자 수분 함량을 구명하고, 이러한 보존 조건이 식물의 산화 스트레스에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 또한 종자의 다양한 활력수준에 따른 보존 후 발아율을 조사함으로써 저활력 종자의 효율적인 보존 방법을 모색하고자 하였다.

재료 및 방법

종자시료

국립식량과학원 남부작물부에서 2015년에 증식한 9종의 들깨 종자를 시료로 이용하였다(Table 1). 수집한 종자는 세척, 소독 등 사전 처리 후 4℃에서 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다. Accession 1-6 종자는 수분함량별 초저온 동결보존 시험에 사용하였고, accession 7-9 종자는 활력수준별 초저온 동결보존 및 효소활성 분석에 사용하였다.

Table 1. Perilla seeds collected for the experiment

Accession No.	Cultivar	Moisture content, %
1	Collected (Jeju)	6.83
2	Collected (Miryang)	6.32
3	Collected (Daegu)	7.98
4	Deulsaem	8.00
5	Bora	7.72
6	Namchon	7.85
7	Dayu	7.22
8	Danjo	6.90
9	Yeobsil	7.85

건조처리 및 종자 수분함량 측정

들깨 종자의 수분함량에 따른 저장성을 조사하기 위해 수집한 종자를 온도와 습도가 각각 15℃ 및 10-12%인 종자건조실에서 건조시켜 3-8% 범위의 초기 수분 함량의 종자 시료를 준비하였다.

종자의 수분함량은 국제종자검사협회(International Seed Testing Association)의 기준에 따라 103℃ 오븐에서 24시간 건조한 후 종자의 무게를 측정하여 산출하였다. 종자의 수분이 목표 함량에 이르렀는지는 건조 전후의 종자 무게를 이용한 아래 식으로 판정하였다.

$$\text{목표 수분함량의 종자 무게 (g)} = \frac{(100-\text{건조 전 수분함량 \%})\times \text{건조 전 종자 무게 (g)}}{(100-\text{목표 수분함량 \%})}$$

인위노화 처리

종자의 활력 수준이 초저온 동결보존 후 발아율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수분함량을 4-5%로 조절한 accession 7, 8, 9 품종의 들깨 종자에 인위적으로 노화처리를 하였다. 기저부에 증류수를 채운 밀폐용기 내에 수위보다 높은 위치에 망을 설치하고, 그 위에 종자를 치상하여 95% 습도조건에서 40℃ 건열기를 이용하여 1-3일간 노화처리를 하였다(Lee and Kim, 2004).

초저온 보존 및 해동

수분함량을 조절하거나 노화처리를 한 종자 시료에 대하여 초저온 보존처리를 하였다. 각 종자 시료를 5 mL cryovial에 150립씩 담아 사전 동결처리 없이 바로 액체질소 탱크에 담갔으며, 24시간 후 실온에서 해동하였다. 액체질소

를 이용한 초저온 보존 처리는 액체질소를 가득 채운 탱크에서 종자를 액체질소 내에 보존하는 Liquid zone 처리 방법(-196℃)을 적용하였다.

종자 발아 실험

건조처리와 초저온 보존처리가 종자의 발아율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수집 초기조건의 종자, 건조처리로 수분함량을 조절한 종자 및 초저온 처리를 한 종자의 발아율을 조사하였다. 70% 에탄올로 소독한 종자를 증류수로 세척한 후 실온에서 3시간 건조시킨 다음 증류수로 적신 여과지를 페트리 접시에 넣고 그 위에 각 처리별 종자를 100립씩 치상하였으며, 5반복으로 실험을 수행하였다. 20℃ 생장상에서 21일간 배양하면서 7일차에 1차 발아립수, 21일차에 최종 발아립수를 조사하여 합산, 백분율로 환산하였다.

Ascorbate peroxidase 활성 분석

보존 및 노화 처리 들깨 종자를 20℃ 생장상에서 21일간 배양하여 유묘를 생산하였으며, 유묘의 ascorbate peroxidase 활성을 Lee 등(2001)의 방법을 적용하여 측정하였다. 유묘 시료 0.2 g에 1 M ascorbic acid를 함유한 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 2 mL를 가하여 균질화하였다. 이를 12,000*g*에서 3분간 원심분리한 후 상등액 60 μL를 취하여 반응용액(H_2O 2.34 mL, pH 6.5 1 M potassium phosphate buffer 300 μL, 10 mM ascorbic acid 180 μL, 5 mM H_2O_2 120 μL)과 잘 혼합한 후 290 nm에서 흡광도를 측정하여 30초간 H_2O_2에 의해 산화되는 아스코르빈산을 측정하였다. 분석은 4℃ 이하의 암상태에서 5반복으로 수행되었으며, 효소의 활성은 유묘 시료 무게당 생성된 dehydroascorbate의 양으로 표시하였다.

결과 및 고찰

종자 건조

들깨 종자의 수집 당시 초기 수분함량은 품종별로 차이를 보였는데(Table 1), 초기 수분 함량이 7% 이하인 accession 1, 2의 경우에는 건조처리 72 시간 만에 임계점 약 3.5%에 이르렀고, 7% 이상인 나머지 품종의 경우에는 같은 시간 경과 후에 약 4% 내외까지 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 또한 들깨 종자를 흡습처리하거나 소독과 수세 후 건조시킬 경우, 10% 이상의 수분을 함유한 종자를 15℃에서 24시간 건조시키면 수분함량이 4-5%로 감소하였다.

수집 종자의 초기 발아율

실험에 사용한 accession 1-6 들깨 품종 종자의 건조처리 전 초기 수분함량은 6.3-8.0%이었으며, 수집 당시 수분함량 조건에서의 발아율은 품종별로 다양하게 나타났다(Fig. 2). Accession 1의 발아율이 94%로 가장 높았으며, Accession 6의 발아율은 40% 이하로 가장 낮았다. 발아실험에서 종자에 GA_3를 처리할 경우 모든 품종의 발아율은 95% 이상으로 균일하였다. 이러한 결과는 들깨 품종별로 종자의 휴면 특성과 생화학적 물리적 특성이 다르며, 수확 후 여러 가지 관리 및 보존 조건에 대한 민감도가 다르기 때문일 것이다. 저장기간이 짧은 신선한 들깨 종자의 발아율은 높지만 저장기간이 길어지면 발아율이 낮아지며, 품종에 따라서는 급격히 발아율이 감소하기도 한다(Masumoto and Ito, 2010). 들깨 종자는 온도 변화에 민감하여 온도의 변화가 잦을 경우 쉽게 휴면에 돌입하는 것으로 알려져 있다(Lee and Kim, 2004). GA_3에 의해 종자의 발아율이 크게 증가하는 경우에는 근본적으로 수확기에 이미 휴면강도가 강하거나 수확 후 온도 변화에 노출되면서 휴면에 돌입할 수 있는 종자로 판단되며, GA_3를 처리하지 않아도 발아율이 높은 품종의 경우에는 종자가 쉽게 휴면에 돌입하지 않거나 저장기간 중 온도 변화에 대한 내성이 강하고 저장성이 높은 것으로 판단된다.

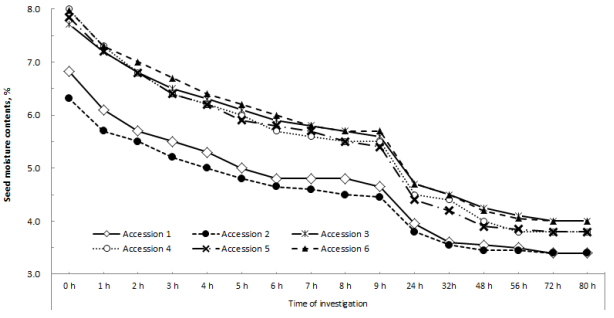

Fig. 1. Changes of seed water content of 6 perilla accessions during desiccation. The seeds were desiccated in airflow chamber at 15°C and 10-12% of relative humidity.

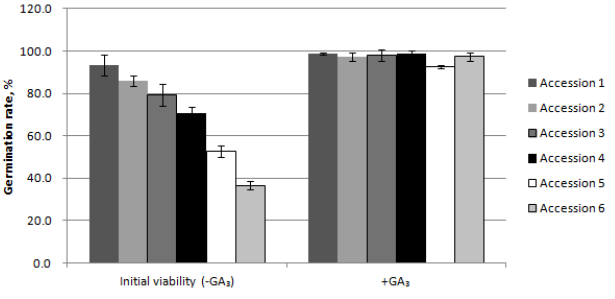

Fig. 2. Seed germination rate of 6 perilla accessions with the initial moisture content of 6.3-8.0%. In the treatment of GA_3, seeds were immersed in GA_3 solution of 100 mg/L for 1 hour before the germination test. Data represent mean±SD (n=5).

수분 함량별 종자의 초저온 처리 후 발아율

들깨 종자의 최적 저장 수분함량을 구명하기 위하여 수분함량을 여러 수준으로 조절한 종자를 액체질소에 보관하여 초저온 처리를 한 후 발아율을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같았다.

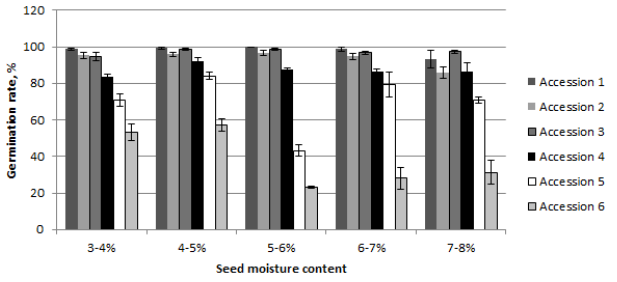

Fig. 3. Effect of cryopreservation on the germination of perilla seeds of various water contents. Data represent mean±SD (n=5).

Accession 1, 2, 3 들깨 품종 종자의 초저온 처리 후 발아율은 수분함량의 영향을 거의 받지 않았으며, 3-7%의 수분함량 수준에서 모두 발아율이 95% 이상이었다. Accession 5와 6 품종 종자의 발아율은 다른 품종에 비해 낮았으며, 수분함량이 높을수록 상대적으로 종자의 발아율이 더 낮은 경향이었다. 특히 accession 6 품종의 경우 종자의 수분함량이 5-7%일 경우에 발아율이 40% 이하이며, 4-5%일 경우 55% 이상으로 나타났다. 수분함량 4-5%와 3-4% 수준의 종자에 대한 발아율을 비교하면, accession 4, 5, 6 품종 종자의 발아율은 수분함량 4-5%에서 상대적으로 높게 나타났다.

수분함량 7-8% 종자의 초저온 처리 후 발아율을 Fig. 2의 초기 발아율과 비교하면, accession 3, 4, 5 품종의 경우 초저온 처리에 따라 발아율이 증가하였고 accession 1, 2, 6 품종의 경우에는 초저온 처리 전후 발아율 차이가 없었다. 휴면강도, 종피의 구조와 경도, 수분함량 등의 특성이 다른 66종의 열대 식물 종자에 대한 액체질소 초저온 저장성을 조사한 결과를 보면(Salomao, 2002), 대부분의 종자에서 초저온 처리 전후의 발아율의 변화가 없었지만 휴면강도나 종피의 경도가 높은 일부 종자의 경우에는 저온 처리에 따라 발아율이 증가하였다. 물론 종자의 수분함량이나 냉각속도 등이 적절하지 않은 경우에는 발아율이 감소하기도 한다.

본 연구에서 조사한 들깨 품종(accession 1-6)의 경우 초저온 처리 후에도 대부분 수분함량에 관계없이 초기의 발아율을 그대로 유지하거나 발아율이 증가하기도 하였다. 따라서 들깨 종자는 액체질소를 이용한 초저온 저장이 가능한 것으로 판단되며, 초저온 처리 후 발아율이 종자의 수분함량의 영향을 받지 않는 품종도 있지만 저장기간 중의 품질 저하를 최소화하기 위해서는 모든 들깨 품종에 대하여 종자의 수분함량을 4-5%로 건조시켜 초저온 저장하는 것이 타당할 것으로 판단된다. 들깨 종자를 -10℃에 저장할 경우에도 5% 수분함량이 가장 적합하며, 이론적인 종자 수명 반감기가 50년 정도라는 보고도 있다(Nagamine *et al.*, 2000). 입고 종자를 2-3일간 일반 건조실 조건(15℃)에서 건조시키면 이 수준의 수분 함량에 이를 수 있다(Fig. 1).

인위노화 종자의 초저온 처리 후 발아율

인위노화 처리를 한 들깨 종자의 초저온 처리 여부에 따른 발아율을 조사한 결과는 Table 2와 같았는데, 인위노화 처리 기간에 따라서 들깨 종자의 발아율은 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 온도에 민감한 들깨 종자의 특성이 반영된 것으로 판단된다. 노화 처리에 따른 들깨 종자의 발아율 저감 정도는 품종별로 크게 달리 나타났다. Accession 9의 경우 인위노화 1일 처리 후 발아율이 유의하게 감소하였고, Accession 8은 3일 처리 후 발아율이 대조 종자에 비해 절반 수준으로 감소하였다. Accession 7의 경우 인위노화 3일 처리 후에도 81.3%의 발아율을 유지하여 노화처리에 강한 저항성을 보여 저장성이 강한 품종으로 판단된다. Accession 7과 Accession 9는 모두 인위노화 1일 처리 후 발아율 감소가 가장 크게 나타났다. 일본에서 재배되고 있는 들깨를 대상으로 조사된 결과를 보면(Masumoto and Ito, 2010), 수확 후 1-4년간 냉장 보관한 종자는 80% 이상의 발아율을 유지하였는데, 5-8년 후에는 65% 수준으로 낮아졌고 9년 이상 저장한 종자는 발아력을 상실하였다. 특히 유지 함량이 높은 종자는 수분함량과 저장온도에 따라서 수명이 크게 달라지는데, 인위 노화처리 실험을 통해 수분함량이 낮고 보관 온도가 낮을수록 들깨 종자의 장기 저장성이 증가하는 것으로 밝혀져 있다(Nagamine *et al.*, 2000).

노화 처리 들깨 종자에 초저온 동결보존 처리를 했을 경우, 발아율이 일부 증가하거나 감소하기도 하였으나 3가지 품종 모두에서 초저온 처리 전후의 발아율 차이는 크지 않았다.

Table 2. Germination rate of perilla seeds submitted to artificial aging and cryopreservation treatments

Artificial aging	Cryopreservation	Germination rate, %		
		Accession 7	Accession 8	Accession 9
Control	Control	94.0±1.63	72.0±2.16	71.3±4.78
	Liquid nitrogen	89.3±1.89	80.0±3.56	79.3±1.70
1 day	Control	86.7±3.40	71.3±5.56	55.3±5.44
	Liquid nitrogen	78.5±8.26	82.7±4.64	52.7±1.89
2 days	Control	88.0±1.41	74.0±2.16	54.0±1.63
	Liquid nitrogen	92.7±0.47	73.3±4.19	50.7±8.08
3 days	Control	81.3±4.50	37.3±11.1	51.3±5.56
	Liquid nitrogen	85.3±3.86	42.0±5.35	55.3±4.71

Accession 8의 경우 최저 37.3% 이상 범위의 모든 발아율 수준에서 초저온 처리에 의한 발아율 감소는 관찰되지 않았다. Accession 9의 경우, 인위노화 2일 처리 후 초저온 처리를 하였을 때 발아율이 54%에서 50.7%로 약 4% 감소하였다. 초저온 처리에 따른 발아율 감소는 10% 이내이지만 활력이 낮은 종자의 경우에는 발아율 감소 정도가 높은 활력 종자와 유사하더라도 더욱 치명적으로 종자의 장기 보존을 저해하는 요소가 되며, 인위노화 1일 처리 후에 급격히 활력이 떨어지는 품종의 종자는 온도 조건에 민감함을 알 수 있다.

미국의 유전자원 장기 보존소인 National Center for Genetic Resource Preservation (NCGRP)에서는 초저온 동결보존 전후 발아율 변화가 10% 이내인 종자의 경우 액체질소를 이용한 초저온 동결 저장법을 장기 보존으로 추천한다(Yi and Lee, 2014). 따라서 Fig. 2와 Table 2의 결과를 고려하면, 액체질소를 이용한 초저온 동결 방법을 이용하여 들깨 종자를 발아력의 훼손 없이 장기간 보관할 수 있을 것으로 판단된다. 특히 노화가 급속히 진행되는 accession 9와 같은 품종의 경우는 70% 이상의 고활력 자원을 확보하거나 GA_3로 휴면을 타파시킨 후 초저온 동결 보존하는 것이 적합한 장기보존방법이 될 것으로 생각된다.

인위노화처리 종자의 항산화 효소 활성

종자를 저장하는 동안 자유라디칼에 의한 비효소적인 지질의 과산화로 인해 지방산 함량이 증가하며 단백질의 불활성화로 인해 단백질과 효소의 기능적 특성이 소실되는데, 이러한 현상은 들깨와 같은 유료 종자의 저장성을 신속히 훼손하는 주요 원인이 된다(Shaban, 2013). 그리고 종자가 노화될수록 세포 내 여러 소기관에서 활성산소의 수준을 조절하는데 있어서 가장 핵심적인 역할을 하는 ascorbate peroxidase를 비롯하여 catalase, superoxide dismutase 등의 항산화 효소 활성도 낮아진다(Caverzan *et al.*, 2012; Sung and Chiu, 1995).

인위노화와 초저온 동결 보존처리를 한 들깨 종자에서 생산된 유묘의 ascorbate peroxidase 활성을 조사한 결과는 Table 3과 같았다. Ascorbate peroxidase 활성은 들깨 품종별로 또 인위노화 처리에 따라서 달리 나타났다. Accession 7의 경우 노화처리에 의해 ascorbate peroxidase 활성이 유도되었으나, accession 8과 9에서는 노화처리에 따라 ascorbate peroxidase 활성이 크게 감소하고 2일간 노화 처리한 종자의 유묘에서는 효소의 활성이 측정되지 않았다. 초저온 처리에 따른 ascorbate peroxidase 활성 변화를 accession 7에서 조사된 결과로 비교해보면, 초저온 처리는 들깨 종자의 ascorbate peroxidase 활성에 영향을 미치지 않았다.

이와 같은 노화처리 종자의 항산화 효소 ascorbate peroxidase 활성 변화는 Table 2에 제시된 노화처리 종자의 발아율과 부합하는 결과이다. 즉, 노화처리에 의해 발아율이 감소하는 accession 8과 9 품종의 종자에서는 발아율 감소와 함께 ascorbate peroxidase 활성이 감소하거나 측정되지 않았으며, 노화처리에도 불구하고 발아율이 80% 이상으로 유지되었던 accession 8 종자에서는 ascorbate peroxidase 활성 또한 유도되었다. 이와 같은 결과를 보면, 들깨 품종별로 종자의 저장기간 중 노화속도가 크게 다르며, 활성산소를 소거할 수 있는 항산화 효소 시스템이 저장 조건이나 기간에 따라서 불활성화 되기 쉬운 종자일수록 저장성이 낮은 것으로 판단할 수 있다. 기존의 연구결과에서도 신선한 종자에 비해 노화된 종자의 peroxidase 활성이 낮은 것으로 밝혀져 있으며(Scialabba *et al.*, 2002), 종자를 노화시키면 H_2O_2 등의 peroxide와 자유라디칼은 축적되지만 한편으로 이들을 소거하여 산화스트레스를 억제할 수 있는 효소들의 활성이 저해되어 종자의 수명이 단축되는 것으로 밝혀져 있다(Sung and Jeng, 1994; Sung and Chiu, 1995).

초저온 동결 방법을 통해 종자를 장기간 안정적으로 보존할 수 있지만 급속한 냉동 및 해동 처리과정에서 활성산소의 생성이 증가하며, 이에 따른 산화스트레스가 종자의 활력을 훼손시킬 수 있다(Chen *et al.*, 2015). 본 연구의 결과에서는 초저온 동결 처리를 한 종자와 대조 종자에서 생산된 들깨 유묘 중의 ascorbate peroxidase 활성의 차이가 품종별로 없거나 크지 않았다(Table 3). 그리고 초저온 처리가 들깨 종자의 발아율에도 불리하게 작용하지 않았으므로(Table 2), 초저온 처리과정에 발생할 수 있는 산화스트레스에 의한 지질의 과산화 등에 따른 피해가 들깨 종자를 액체질소에 동결 보존하는데 있어서 제한 요인으로 작용하지는 않을 것으로 판단된다.

요 약

식물 종자를 비롯한 각종 유전자원을 액체질소에 저장하면 유전형질 특성의 손실 없이 장기간 보존할 수 있다. 본 연구에

Table 3. Ascorbate peroxidase activities of perilla seedlings produced from seeds submitted to artificial aging and cryopreservation treatments

Artificial aging	Cryopreservation	Dehydroascorbate mg/g seedling		
		Accession 7	Accession 8	Accession 9
Control	Control	0.30±0.03	0.39±0.04	0.21±0.02
	Liquid nitrogen	0.46±0.02	0.65±0.03	0.90±0.08
1 day	Control	2.36±0.14	0.01±0.08	0.30±0.02
	Liquid nitrogen	2.59±0.12	0.08±0.05	ND
2 days	Control	4.35±0.23	ND	ND
	Liquid nitrogen	4.30±0.59	ND	ND

서 보존조건이 까다로워 단명 종자로 분류되는 들깨 종자를 초저온 동결저장 방법으로 보존할 수 있는지를 조사하였다.

수집한 들깨 품종별 종자의 초기 발아율은 40-95% 수준으로 다양하였는데, 수분함량을 3-8%로 조절한 종자를 액체질소에 처리하여도 발아율은 감소하지 않았다. 종자의 수분함량이 4-5%인 종자의 초저온 처리 후 발아율이 가장 높았으며, 초기 발아율이 낮은 품종에서는 초저온 처리에 의해 발아율이 증가하기도 했다. 인위 노화처리에 따라 종자의 발아율과 ascorbate peroxidase 활성은 감소하였으며, 품종별로 종자의 활력 저하 정도는 크게 달리 나타났다. 대조 처리 종자와 비교하였을 때, 초저온 처리과정에 발생할 수 있는 산화스트레스가 들깨 종자의 활력을 저해하지는 않을 것으로 추정되었다.

따라서 들깨 종자를 4-5% 수분함량으로 건조시켜 초저온 동결 저장하면 활력 손실 없이 장기간 보존할 수 있을 것으로 판단되며, 노화가 급속히 진행되는 품종의 경우에는 고활력 자원을 확보하거나 휴면타파 처리 후 초저온 동결 보존하는 것이 유리할 것으로 생각된다.

Notes

The author declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of "Development of long-term conservation techniques for several vegetatively propagated crops and short-lived seed species, and quality control for long-term conserved germplasm (Project No. PJ011996)", National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

Arora, R. K. (1997). Plant genetic resources of Northeastern region: diversity, domestication trends, conservation and uses. Proceedings of Indian National Science Academy, B63(3), 175-186.

Asif, M. (2011). Health effects of omega-3,6,9 fatty acids: *Perilla frutescens* is a good example of plant oils. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 11(1), 51–59.

Asif, M. (2012). Phytochemical study of polyphenols in *Perilla Frutescens* as an antioxidant. Avicenna Journal of Phytomedicine, 2(4), 169-178.

Benson, E. E., & Withers, L. A. (1998). The application of germplasm storage in biotechnology. Plant cell biotechnology (eds. Pais, M. S. S., Mavituna F., and Novais, J. M.), pp. 431–444. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology) vol. 18, Springer, Berlin.

Berjak, P., Vertucci, C. W., & Pammenter, N. W. (1993). Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of Camellia sinensis. Seed Science Research, 3(3), 155-166.

Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. Genetics and Molecular Biology, 35(4, suppl), 1011-1019.

Chandel, K. P. S., Chaudhury, R., Radhamani, J., & Malik, S. K. (1995). Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit. Annals of Botany, 76(5), 443-450.

Chang, H. H., Chen, C. S., & Lin, J. Y. (2008). Dietary perilla oil inhibits proinflammatory cytokine production in the bronchoalveolar lavage fluid of ovalbumin-challenged mice. Lipids, 43(6), 499–506.

Chen, G., Ren, L., Zhang, J., Reed, B. M., Zhang, D., & Shen, X. (2015). Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in Arabidopsis seedlings. Cryobiology, 70(1), 38-47.

Duke, J., & Duke, P. (1978). Tempest in the teapot: Mints. Quarterly Journal of Crude Drug Research, 16(2), 71–95.

Ellis, R. H., & Hong, T. D. (2006). Temperature sensitivity of the low-moisture-content limit to negative seed longevity-moisture content relationships in hermetic storage. Annals of Botany, 97(5), 785-791.

Engelmann, F. (2004). Plant cryopreservation: Progress and prospects. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 40(5), 427-433.

Farrant, J. M., Pammenter, N. W., & Berjak, P. (1986). The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. Physiologia Plantarum, 67(2), 291-298.

Fatima, S., Mujib, A., Nasim, S. A., & Siddiqui, Z. H. (2009). Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of *Catharanthus roseus* L. (G) Don. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 98(1), 1-9.

Finch-Savage, W. E. (1992). Embryo water status and survival in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: Evidence for a critical moisture content. Journal of Experimental Botany, 43(5), 663-669.

Gray, D. J., McColley, D. W., & Compton, M. E. (1993). High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science, 118(3), 425-432.

Hong, T. D., & Ellis, R. H. (1996). *A protocol to determine*

seed storage behavior. pp. 21-27, International Plant Genetic Resources, Rome, Italy.

Lee, D. J., & Kim, H. W. (2004). Seed viability and fatty acid composition of perilla seed as affected by artificial aging treatment. Korean Journal of International Agriculture, 16(3), 244-248.

Lee, Y. Y., Kang, Y. J., & Lee, Y. B. (2001). The induction of secondary toxic substances and antioxidative enzymes by SO_2 fumigation in foliage plants. Korean Journal of Environmental Agriculture, 20(1), 44-49.

Masumoto, N., & Ito, M. (2010). Germination rates of perilla (*Perilla frutescens* (L.) Britton) mericarps stored at 4oC for 1-20 years. Journal of Natural Medicines, 64(3), 378–382.

Nagamine, T., Miyashita, S., & Nishikawa, T. (2000). Seed longevity of perilla (*Perilla frutescens* (L.) Britt var. frutescens. Seed Science and Technology, 28(3), 875-879.

Negi, V. S., Rawat, L. S., Phondani, P. C., & Chandra, A. (2011). *Perilla frutescens* in transition: a medicinal and oil yielding plant need instant conservation, a case study from Central Himalaya, India. Environment & We an International Journal of Science & Technology, 6(4), 193-200.

Nitta, M., Lee, J. K., Kang, C. W., Katsuta, M., Yasumoto, S., Liu, D., Nagamine, T., & Onishi, O. (2005). The distribution of perilla species. Genetic Resource and Crop Evolution, 52(7), 797-804.

Pritchard, H. & Prendergast, F. G. (1986). Effects of desiccation and cryopreservation on the in vitro viability of the recalcitrant seed species *Araucaria hunstenii* K. Schum. Journal of Experimental Botany, 37(9), 1388-1397.

Sakai, A., Kobayashi, S., & Oiyama, I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports, 9(1), 30–33.

Salomao, A. N. (2002). Tropical seed species' responses to liquid nitrogen exposure. Brazilian Journal of Plant Physiology, 14(2), 133-138.

Scialabba, A., Bellani, L. M. & Dell'aquila, A. (2002). Effects of ageing on peroxidase activity and localization in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. European Journal of Histochemistry, 46(4), 351–358.

Shaban, M. (2013). Review on physiological aspects of seed deterioration. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 6(11), 627-631.

Shin, H. S., & Kim, S. W. (1994). Lipid composition of perilla seed. Journal of the American Oil Chemists' Society, 71(6), 619–622.

Sung, J. M., & Chiu, C. C. (1995). Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. Plant Science, 110(1), 45-52.

Sung, J. M., & Jeng, T. L. (1994). Lipid peroxidation and peroxides scavenging-enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. Physiological Plantarum, 91(1), 51-55.

Tompsett, P. B., & Pritchand, H. (1993). Water status changes during development in relation to germination and desiccation tolerance of *Aesculus hippocastanum* L. seeds. Annals of Botany, 71(2), 107-116.

Vertucci, C. W., & Roos, E. E. (1990). Theoretical basis of protocols for seed storage. Plant Physiology, 94(3), 1019-1023.

Walters, C. (1998). Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. Seed Science Research, 8(2), 223-244.

Wesley-Smith, J., Vertucci, C. W., Berjak, P., Pammenter, N. W., & Crane, J. (1992). Cryopreservation of desiccation sensitive axes of *Camellia sinensis* in relation to dehydration, freezing rate and the thermal properties of tissue water. Journal of Plant Physiology, 140(5), 596-604.

Yi, J. Y., Lee, G. A., Chung, J. W., Lee, S. Y., & Lim, K. B. (2013). Efficient cryopreservation of Lilium spp. shoot tips using droplet-vitrification. Plant Breeding and Biotechnology, 1(2), 131-136.

Yi, J., & Lee, Y. (2014). Plant germplasm preservation research system of National center for genetic resources preservation (NCGRP) in United State. Journal of the Korean Society for Seed Science and Industry, 11(3), 10-17.