

약용식물의 건전종자 선발 및 발아율 검정을 위한 Tetrazolium Test 소개

이가연[†], 민지윤[†], 문병철, 강영민*

한국한의학연구원 K-herb 연구단

Introducing for Healthy Seed Selection and Germination Test of Medicine Herbs using by Tetrazolium (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) Test

Lee Kayoun[†], Min Jiyeon[†], Moon Byeongcheol, Kang Youngmin*

K-herb Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine

Abstract

Propagation technology and evaluation of seed viability is a highly demanded technique in the production of Korean herbal medicine. To produce Raphanus seeds as the examples of Korean herbal medicine, seed germination improvement is very important. In this study, tetrazolium test was used because of rapid and simple method. After the selection of seed groups by the tetrazolium test, healthy seeds were A group and bad seeds were B group. The germination of seeds in A group were significantly different ($\alpha=0.05$) from the germination of seeds in B group the given time. In addition, B seed group could not be cultured and propagated a long time because of tetrazolium chemical damage and had bad embryo physiologically. Also, nondestructive evaluation of viability for individual seeds as X-ray seed analysis or hyperspectral reflectance imaging system was required in future study. These seed analytical studies by tetrazolium test will be improved technology for reproductive medicinal herbs including Raphanus seeds.

Keywords: Propagation Technology, Raphanus Seed, Seed Germination Improvement, Tetrazolium Test

[†]Co-First Author (Lee K. & Min J.): These authors are equally contributed in this article.

* Correspondence: 강영민(Kang Youngmin. Tel: +82-42-868-9684 Fax: +82-42-868-9541 E-mail: ymkang@kiom.re.kr)

· Received 2014-12-30, revised 2015-03-02, accepted 2015-03-09.

서론

최근 기후변화와 생물다양성협약(나고야의정서 발효) 및 FTA 등은 한약자원 관련 국제 정세변화를 야기 시키고 있으며, 이에 따른 중국의 자원 주권강화에 대응하기 위해 국가적 전략 수립과 체계가 필요하다^{1,2)}. 수입 의존이 높은 한약자원의 국내 생산에 필요한 기반기술 개발로 한약자원을 안정적으로 확보하고, 생명공학 기반 증식기술 개발을 다양화하여 대량 생산 체계 확립과 지속적 이용기반 구축이 절실하다. 이에 국내 생산기반 구축을 위해 한약자원의 전략적 발굴, 우량종자 확보, 신품종 개발, 대량증식기술 및 다양한 생산기법 개발 등이 필요하다.

한약재의 기원이 되고 있는 한약기원식물들의 안정적 공급을 위해서는 우량종자를 확보하고 대량증식기술 개발을 증진 시키는 것이 가장 중요하다. 특히 한약재 종자는 크기, 채취시기 및 수분함유량 등 특성이 매우 다양하기 때문에 종자 특성을 평가하는 것이 우선적으로 적용되어야 한다. 이러한 의학적·산업적 활용 가치가 높은 한약자원의 종자특성평가는 사회경제적 측면에서 볼 때, 국내 대량생산의 기반을 구축하여 한약재의 수입비용 절감 및 수급 안정성을 확보 할 수 있다. 그리고 육묘 생산기술 개발을 통한 대량 생산 기반 구축은 한약재의 안정적 생산 및 산업적 활용이 가능한 자원 공급기반을 확보하여 한의약 및 관련 산업의 활성화를 이끌 수 있다.

특히 약용식물 중 내복자(萊菔子)는 쉽게 사용되고 구할 수 있는 한약재로써, 내복자의 기원식물인 무(*Raphanus sativus* L.)는 십자화과(Brassicaceae/Cruciferae)에 속하는 1년생 혹은 다년생 초본으로서 식용 및 약용으로 쓰인다. 한의학에서 약용으로 쓰이는 무의 씨(종자)는 성숙한 적갈색 종자를 의미하며⁹⁻¹¹⁾, 약효와 품질의 동등성 유지 및 대량생산 위해 건전묘 생산이 필요하고, 이를 위해 우량종자의 선별이 필요하다고 할 수 있다. 특히 성숙되거나 종자가 결실이 완전한 것을 사용하여 약효의 증진을 높여야 함으로, 유통상의 건전종자와 불량종자가 혼입되어 있기 때문에 우량종자를 선별하는 것은 큰 의의가 있다.

한약기원식물의 건전종자 및 우량종자 선별방법에는 형태학적 검정, 화학적 검정 및 비파괴영상 검정이 있다³⁻⁸⁾. 먼저 형태학적 검정은 외부검사와 내부 검사가 있으며, 이를 이용하여 바이러스에 감염된 박과 종자를 선별하기 위해 종피의 변색과 반점 증상을 확인한 연구가 이루어졌다. 형태학적 검정 이외에도 비파괴적 선별방법으로 화학적 검정이 많이 사용되고 있다. 주로 많이 이용되는 방법은 Tetrazolium염을 이용한 발색법이 있으며 최근 여러 작물에서 노화종자를 물에 침지시켰을 때 누출되는 물질을 이용한 선별방법도 연구되고 있다. 마지막으로 비파괴영상 검정은 X-ray 회절영상분석법, 초분광반사광 영상기법 등이 있으며, 근적외선 분광분석법이 주로 이용되고 있다. 이 중 초분광 영상기술은 기존의 분광 기술과 영상 기술을 융합한 첨단 영상기술로서 물리적, 화학적 특성 분석이 가능하다. 이를 이용하여 최근 농산물 품질의 측정 연구가 증가하고 있다. 이러한 종자특성평가를 통해 선별된 건전종자 및 우량종자는 종자 발아 테스트 및 활력 검사를 실시하여 최적 발아 조건을 규명하고, 종자생리 및 휴면타파 조건 규명을 통해 발아 촉진 기술개발에 적용 할 수 있다. 본 연구에서는 한약기원식물의 건전종자를 빠르게 식별하기 위한 방법으로 Tetrazolium염 (TTC; 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride)^{4,6)}을 이용하여 내복자의 화학적 발색법을 통한 건전종자 선별과 발아율 검정을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

동북아 각국 공정서에도 내복자의 기원규정이 명시되어 있으며(표 1), 우리나라 약전에는 십자화과(Cruciferae) 무(*Raphanus sativus* Linné)의 잘 익은 씨를 내복자라 한다. 본 연구에 사용된 내복자는 한의학적으로 일반 무의 씨와는 구별되는 한약재이며, 한국한의학회연구원 한약표준표본관에 분양받아 사용하였다(광명당 제약에서 제조하여 2013년 11월 05일 입고된 내복자로서 한약표준표본관 관리번호 2-13-17로 수장하여 보관 중).

표 1. 동북아 각국 공정서의 내복자 기원 규정

국가	약명	기원
한국	내복자(萊菔子)	십자화과(Cruciferae) 무(<i>Raphanus sativus</i> Linné)의 잘 익은 씨
중국	萊菔子	십자화과(十字花科) 식물 무(<i>Raphanus sativus</i> L.)의 잘 익은 씨를 말린 것
일본	-	-
대만	萊菔子	십자화과(十字花科, Cruciferae) 식물 무(<i>Raphanus sativus</i> L.)의 잘 익은 씨를 말린 것
북한	'무우씨'(라복자)	배추과(Brassicaceae) 무우(<i>Raphanus sativus</i> L.)의 여문씨

가. TTC 용액 제조

인산완충용액은 증류수 1,000mL에 9.078g의 potassium phosphate (KH_2PO_4)를 녹인 용액 (A)와 증류수 1,000mL에 9.472g의 sodium phosphate (Na_2HPO_4)를 녹인 용액 (B)를 조제한 후, 용액 (A)와 용액 (B)를 2:3의 비율로 섞고 HCl과 NaOH를 이용하여 pH7.0으로 조정하여 제조하였다^{4,6)}. 인산완충용액 100mL과 Tetrazolium염(TTC; 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) 1g을 혼합하여 (W/V) 1%로 제조 후 실험에 사용하였다. 조제된 TTC 용액은 빛을 차단한 후 냉장 보관하여 실험에 사용하였다.

나. 종자활력 검정

TTC 발색법은 종자의 호흡 시 배출되는 이산화탄소(CO_2)와 TTC가 반응하여 종자내부에 위치한 배(胚) 혹은 종자표면의 색깔 변화를 통해서 종자의 활력을 구분하는 방법이다^{4,6)}. 대부분 건전종자에서 호흡량이 활발하기 때문에 붉은색으로 나타난다. 실험 전 내복자의 종피를 쉽게 제거하기 위해 25°C 증류수에 24시간 침지 처리하였다(그림 1). 그 후 다시 25°C 압조건 하에서 1% TTC 용액에 4시간 침지하였으며 50rpm의 속도로 교반하여 TTC 용액의 활성을 높여 주었다.

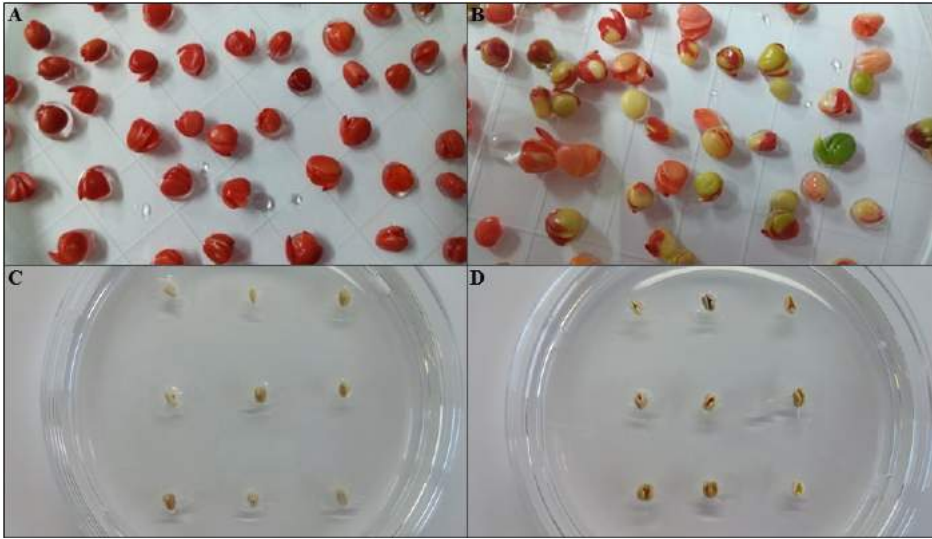


그림 1. TTC 발색법에 의해 선발된 불량종자 및 건진종자의 무균기내배양
 A: TTC 발색법에 의해 선발된 건진 종자. B: TTC 발색법에 의해 선발된 불량 종자. C: 선발된 건진종자의 무균기내배양 모습. D: 선발된 불량종자의 무균기내배양 모습

다. 발아율 검정을 위한 기내 배양

TTC 발색법으로 1차 선발된 개체들은 표면소독(70% EtOH, 3% NaClO) 후 MS배지(3% sucrose, w/vitamines)¹²⁾에 치상하였고 25°C에서 4주 동안 암조건으로 무균 기내배양을 실시하였다. TTC 발색법으로 선발된 건진종자와 불량종자는 각각 50립의 종자를 3번 반복(생물학적 3 반복 및 기술학적 3 반복)하여 발아율을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. TTC 발색법을 통한 종자활력 검정

TTC 용액에 4시간 동안 침지 후 내복자의 표면과 내부가 분홍색 또는 붉은색으로 변하는 것을 관찰할 수 있었다(그림 2). 배가 완전히 염색되거나 배유 1/2 이상 염색이 되면 정상이며, 배가 부분적으로 염색되거나 배유 1/2 이상 염색되지 않으면 비정상이고, 배유와 상관없이 배가 염색되지 않은 것은 불량으로 분류하였다.

이를 바탕으로 색의 변화가 거의 없거나 분홍색으로 변한 종자는 불량종자로 구분하고 붉은색으로 진하게 변한 개체는 건진종자로 분류하였다. 분류된 각각의 종자의 물기를 제거한 후 실체현미경(DP21-SZX16, Olympus, USA)를 이용하여 내복자의 배(胚, Embryo)를 세부적으로 살펴보았다(그림 3).

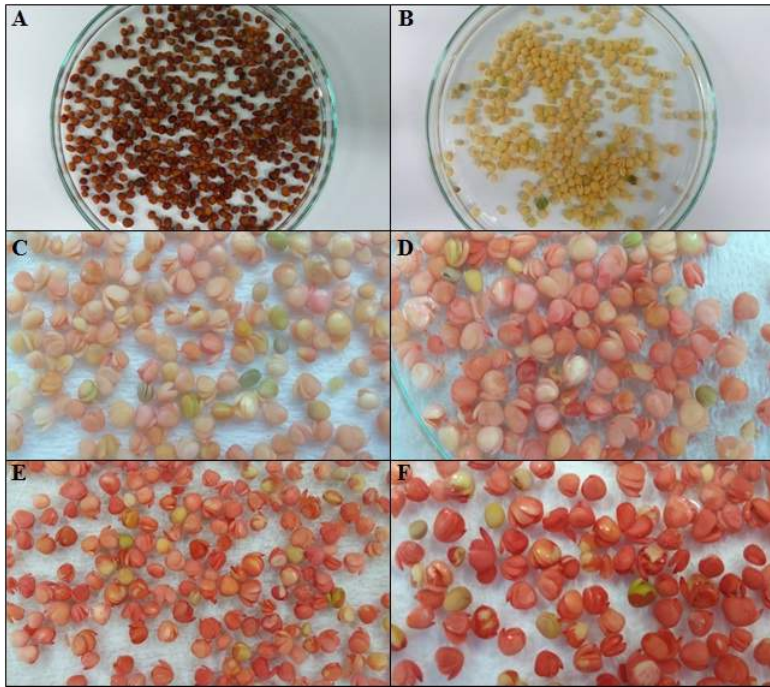


그림 2. Tetrazolium 발색법을 이용한 시간대별 내복자 염색 결과

A: 내복자의 종피 제거 전. B: 내복자의 종피 제거 후. C: 1% TTC처리 1시간. D: 1% TTC처리 2시간. E: 1% TTC처리 3시간. F: 1% TTC처리 4시간



그림 3. TTC 용액을 처리하여 선별한 종자와 배 세부 모습 (DP21-SZX16, Olympus, USA)

A: 선발된 건전 종자(bar=2mm). B: 선발된 불량종자(bar=2mm). C: 건전 종자의 배(胚) 세부 모습(bar=1mm). D: 불량 종자의 배(胚) 세부 모습(bar=1mm)

2. 선발된 불량종자와 건전종자의 기내 배양

TTC 발색법으로 선발된 종자는 두 그룹(A와 B)로 구분하였으며, 건전종자군인 A 그룹과 불량종자군 B그룹으로 나누어, MS 배지에 치상하여 4주 동안 배양하였다. 그 결과 건전종자군(A)은 약 98%의 배가 갈라지면서 shooting이 되어 발아가 되었고, 불량종자군(B)은 약 78%만 배가 갈라지면서 shooting이 되어 발아되었다. 통계분석(SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC)을 실시한 후 발아율을 조사하였으며, TTC 발색법으로 선발된 건전종자군(A)은 불량종자군(B)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 발아율이 높았다(그림 4). 불량종자군(B)의 일부가 발아가 된 것은 배가 부분적으로 염색된 것 중 배유 1/2 이상 염색되지 않은 부분이 포함되어 있을 수 있으며, 일부 발아가 되었지만 그 개체들이 완전한 식물체를 성장하지는 못한 이유는 TTC의 화학적 데미지로 인한 것과 생리적으로 무씨의 배(胚, Embryo)가 상한 상태일 가능성이 높다. 본 결과와 유사한 결과를 보인 황산처리(黃槿, Hamabo Mallow) 종자의 발아촉진 연구와 종자발색법을 통한 활력도 조사 연구를 비교해보면^{4,5)}, 화학적발색법으로 인한 종자의 데이지와 선별 후 분류한 불량종자의 발아는 감소함을 알 수 있다. TTC발색법은 어느 집단에서나 건전종자와 불량종자를 빠른 시간 내에 대표 선별할 있는 기법으로써, 종자의 수명 상실여부를 검사하거나 염색유무에 따라 발아력이 좋은 것과 나쁜 것을 구별하는데 이용될 수 있다고 사료된다. 또한 TTC발색법을 통해 기내 배양체 확립이 최종목적이 아니라, 우수종자군을 선별하는데 그 의의가 있다고 할 수 있다. 그림 4의 결과를 보면, TTC 발색법으로 선발된 건전종자군(A)의 98%가 발아되어 식물체로 성장한 것을 보면, 종자선발의 유의성이 매우 높음을 알 수 있다.

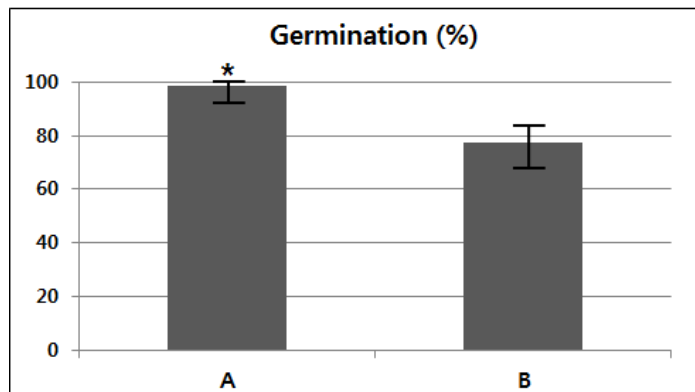


그림 4. TTC 발색법을 통해 선발된 개체군의 무균기내배양 후 발아율 검정

* indicates that the germination of seeds in A group were significantly different ($\alpha=0.05$) from the germination of seeds in B group the given time. The statistical analysis of germination test was performed by two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($\alpha=0.05$) for randomized complete block design (RCBD) using SAS program (SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC). All treatment was three time duplicated at the experiments.

결론

21세기 약용식물들의 안정적 공급을 위해서는 우량종자를 확보하고 신속하게, 대량증식기술개발을 하는 것이 매우 중요하다. 본 연구에서는 한약기원식물의 종자특성을 평가하는 방법 중 TTC 발색법을 통하여 간편하면서도 신속하게 건전종자군(A)과 불량종자군(B)을 선별하였으며, 내복자 한약기원식물인 무씨의 발아율을 조사하였다. TTC 발색법으로 1차적인 종자개체군의 대단위적 선별발색법으로써, 간편하고 신속하게 건전종자군을 스크리닝 할 수 있었고 추후 종자 소수 개체의 특성을 평가하는 방법, 즉 X-ray 회절영상분석법, 초분광반사광 영상기법 등 비파괴영상검정을 이용하여 상호보완적인 검증방법 통한 연구가 필요하다고 사료된다. 또한 약용식물 유통 측면에서 보면, 건전종자와 불량종자가 혼입되어 있기 때문에 우량종자를 선별하는 것은 큰 의의가 있다. 성숙되거나 종자의 결실이 완전한 것을 사용하여 약효의 증진을 높여야 함으로, 본 연구에서 사용된 TTC발색법을 통해 약용식물의 우량종자의 선별이 필요하다고 할 수 있다. 결론적으로 본 논문은 무씨를 대상으로 TTC발색법을 소개하였고, 이를 통한 내복자 외 한약기원식물중 약용부위가 종자인 식물을 지속적으로 활용할 수 있는 비파괴종자선별법이라고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원의 한약자원 국내 생산 기반 기술 개발 연구과제 (K14417 & K15417) 연구비를 지원 받아 수행하였습니다. 실험재료를 제공한 한국한의학연구원 최교야 박사님과 종자특성 평가 실험에 도움을 준 한남대학교 생명공학과 홍지혜 학생과 고애숙 연구원, 김미선 연구원에게 깊은 감사를 표합니다.

참고문헌

1. 고광국. 나고야의정서가 전통지식보호에 미치는 영향과 그 대응책 -한의학에 관한 전통지식을 중심으로. 한남대학교 과학기술법연구원. 과학기술법연구. 2013;19(1):305-52.
2. 정환목. 한방산업육성 타당성 조사 -한약자원개발센터 조성사업. 대구가톨릭대학교. 2006.
3. 안치국, 조병관, 모창연, Moon S. Kim. 초분광 반사광 영상을 이용한 상추(*Lactuca sativa* L.) 종자의 활력 비파괴측정기술 개발에 관한 연구. 비파괴검사학회지. 2012;32:518-25.
4. 김삼식. 염화트리페닐테트라졸륨에 의한 종자활력검정에 관한 연구. 한국임학회지. 1975;26:23-30.
5. 서상흠, 박민우, 장미하, 장일용, 심상인, 나영왕, 김수영, 김석현. 황산처리에 의한 불투수성 황근 종자의 발아촉진에 관한 연구. 한국국제농업개발학회지. 2012;24(3):316-24.
6. Patil VN, Dadlani M. 14. Tetrazolium test for seed viability and vigour. Retrieved from http://se.ednet.gov.in/Material/Handbook_of_seed_testing/Chapter%2014.pdf. 2009;209-41.
7. 김은희, 상채규. 자생 할미꽃(*Pulsatilla cernua* var. *koreana*)의 적정 발아 환경과 종자수명 및 tetrazolium test에 의한 사활 판별에 관하여. 한국원예학회발표지. 1990;8(1):154-5.
8. 홍바른. 종자 침출액의 닐하이드린 발색을 이용한 발아율 예측. 대구대학교 대학원 석사학위논문. 2012.

9. 김호경, 강은정, 고병섭. 내복자(Raphani Semen)로부터 Sinapic acid esters의 분리. 생약회지 2000;31(4):434-7.
10. 이종록, 신정훈, 현성휘, 박숙자, 조미정, 박상미, 구세광, 김상찬. 고지방 식이를 한 생쥐 내에서 내복자(蘿蔔子)의 물 추출물의 항비만 효과와 지방저하효과. 한국응용생명화학회. 2009;52(1):50-7.
11. 안치국, 모창연, 강점순, 조병관. 초분광 반사광 영상을 이용한 무(*Raphanus sativus* L.) 종자의 발아와 불발아 비파괴 판별. 한국농업기계학회. 2012;37(6):411-9.
12. Murachige E. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia plantarum. 1962;15:473-97.