

종자 누출물질을 이용한 노화종자의 선별

李東珍* · 林茂相* · 朱勇河** · 鄭吉雄** · 金鳳九**

Sorting of Aged Seeds Using Leakage Substances of Crop Seeds

Dong Jin Lee*, Moo Sang Lim*, Young Ha Chu**, Kil Woong Chung** and Bong Ku Kim**

ABSTRACT: This study was conducted to identify leakage of fluorescent substances out of 56 crops and to develop sorting methods of nonviable seeds of Chinese cabbage. Fluorescent substances were detected from 36 species, Chinese cabbage, radish, broccoli, cauliflower, egg plant and rape seed etc. In Chinese cabbage, the germination rate of non-sorted seeds decreased rapidly with ageing of seeds at 45°C and 100%. After Chinese cabbage seeds soaked for 4hrs and coated with cellulose, the sorting ratio of non fluorescent seeds were decreased 91.3% to 1.7% by increasing ageing periods from control to 8 days, while fluorescent seeds were increased drastically from 8.7% to 98.3%. Also, incubation of water soaked dead seeds of Chinese cabbage treated with 0.5~1.0% ninhydrin and 0.01N sodium thiosulfate for 30~60 minutes at 35°C developed purple color.

Key words: Aged seed, Sorting method, Fluorescent substances, Sinapine, Ninhydrin, Sodium thiosulfate.

우량종자란 다수성, 내병성 및 높은 유전적 순도를 갖추고 있으며 발아율이 높고 발아세가 왕성한 종자를 의미한다. 이러한 우량한 종자를 선별하기 위하여 중량 및 체적에 의한 방법⁸⁾ 및 비중에 의한 방법¹⁵⁾ 주로 사용되고 있다. 종자가 크고, 무거우며, 밀도가 높은 종자들은 상호간에 높은 정의 상관관계를 가지고 있으며 높은 발아력과 왕성한 발아세를 나타낼 뿐 아니라 초기유묘의 생장 및 수량에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 이러한 선별방법은 포장에 직접 대규모로 파종하여 재배하는데는 효과적일 것이나 종자 개별로 활력을 검정하기가 곤란하며 정확성이 높지 않

다. 이외에도 종자활력을 측정하는 방법으로 테트라조리움 검정법⁴⁾이 있는데 이 방법은 종자를 파괴시켜야 하며, 전기전도도 측정법¹²⁾은 종자집단의 시험구에 대한 발아율을 검정하여 추정할 뿐으로 종자 개별로 정확한 활력을 검정하기는 어렵다.

최근에 위의 활력측정 방법과는 달리 종자를 파괴시키지 않고 활력이 낮거나 퇴화된 종자를 선별하는 방법이 연구되고 있다. 활력이 낮거나 퇴화된 종자는 건건종자에 비하여 물속에 침지시키면 수분이 흡수되면서 강한 압력에 의해 membrane에 상처를 입고 이때 세포 내의 가용성 물질이 많

이 논문은 1995년 농촌진흥청 특정연구비 지원에 의하여 연구되었음.

* 농업과학기술원(National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea)

** 단국대학교 농과대학(College of Agriculture, Dankook University, Chonan. 330-714, Korea)

〈'97. 9. 18 接受〉

이 누출된다. 주요 누출물질은 당⁷⁾, 단백질³⁾, 아미노산³⁾, sinapine^{2,17)}, K, Na, Ca 등 무기성분^{10, 14)}이며, 누출정도는 종자의 활력정도⁷⁾, 침지온도⁵⁾, 침지기간¹⁵⁾ 등의 요인들에 의해 달라진다.

특히 sinapine은 phenol 화합물로서 주로 십자화과 채소종자 속에 많이 함유되어 있으며, 퇴화종자나 저활력 종자를 물속에 침지시킬 때 다량 누출되는 것으로 알려져 있다²⁾. Sinapine은 자외선 광하에서 형광을 발하는데 이러한 특성을 이용한 퇴화종자 선별방법이 개발되었으나¹²⁾ 주로 배추, 무, 브로콜리 등의 십자화과 작물에 대하여 연구되었으므로 다른 작물에서도 이용할 수 있는 기술개발이 필요하다.

종자의 활력이 낮거나 완전 노화된 배추, 무, 브로콜리, 해바라기 종자는 건전종자에 비해 수분침지시 다량의 아미노산이 누출된다고 보고된 바 있다^{6,11)}. 침지한 종자를 cellulose로 코팅한 후 건조하여 여기에 ninhydrin을 살포하고 이를 35℃ 항온기에 약 1시간 정도 둬으로써 코팅된 cellulose 층에 누출된 아미노산이 흡착되며 ninhydrin의 처리에 의해 푸른색으로 발색시켜 유색종자를 만들어 퇴화종자를 선별하는 방법이 개발되었다¹³⁾.

이와 같이 비파괴적인 방법으로 퇴화종자를 선별하는 방법이 개발되었으나 처리과정이 복잡하고 정밀한 기술을 필요로 하는 등 실용화에 어려운 점이 있으므로 과정의 단순화와 색채를 선별할 수 있는 기계가 개발되면 보다 효율적으로 개별종자의 활력을 선별하여 우량종자를 생산할 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 식용작물, 원예작물, 특용작물 등을 공시하여 작물별로 형광물질 및 sinapine 누출을 이용한 노화종자 선별방법 및 아미노산 등의 누출물을 흡착시켜 ninhydrin과 sodium thiosulfate로 발색시켜 노화종자를 선별할 수 있는 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 형광물질 누출을 이용한 노화종자 선별 작물별 건전종자와 노화종자의 형광물질 누출

을 확인하기 위하여 사용된 작물은 벼 외 16종 식용작물, 참깨 외 4종 특용작물, 배추 외 22종 원예작물 및 범부채 외 10종 약용작물 등 총 56작물이었다.

공시작물의 종자를 인위적으로 노화시키기 위하여 'wire mesh tray 방법'¹⁾으로 45℃에서 포화습도를 유지시키면서 작물별 5~10일간 완전히 발아가 되지 않을 때까지 처리한 후 분석재료로 사용하였다. 작물별 건전종자와 노화종자의 형광물질 누출을 확인하기 위하여 흡습시킨 여과지 위에 종자를 치상한 후 작물별 24~48시간 후 자외선 광을 조사하여 여과지에 흡착된 형광물질의 누출 정도를 육안으로 검정하였다.

배추의 노화종자에서 누출되는 sinapine 물질을 종자표면에 흡착시키기 위하여 증류수가 담긴 flask에 건전종자와 노화종자를 각각 넣은 후 기포발생기를 이용하여 산소를 공급해 주었으며 4시간 처리한 후 꺼내어 종자 표면에 묻은 물기를 닦은 후 seed pelleting pan 속에 넣고, 또 pelleting 재료로 cellulose와 석고분말을 이용하였으며, binder로는 CMC(sodium carboxymethyl cellulose)를 넣고 pelleting하였다. Pelleting된 종자는 약 1일 정도 15℃의 저온 및 통풍이 잘 되는 장소에서 건조시켰으며, 암실로 옮긴 후 자외선광을 이용하여 형광종자와 무형광종자를 선별하여 구분하였다.

노화처리 정도에 따른 무형광종자 및 형광종자의 변이를 알아보기 위하여 노화처리를 45℃ 및 포화습도 상태에서 무처리, 2일, 4일, 6일 및 8일 처리를 하였으며, 위의 방법으로 sinapine을 종자에 흡착시킨 후 형광종자와 무형광종자로 나누었다.

2. 아미노산 발색에 의한 노화종자 선별

노화된 배추 종자의 수분침지시 아미노산이 다량 누출되는 특성을 이용, 노화종자를 선별하기 위하여 앞의 내용과 동일하게 pelleting 처리하고 24시간 동안 15℃의 건조실에서 건조시킨 후, ninhydrin(0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0%)과 0.01N sodium thiosulfate 농도별로 살포처리하였으며, 25, 30 및 35℃의 항온기에서 처리 후 10분부터 3

시간까지 주기적으로 발색 정도를 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 주요 작물별 종자의 형광물질 누출

작물별 노화종자의 형광물질 누출을 확인하기 위하여 흡습된 여과지에 치상하여 UV램프하에서 조사한 결과는 표 1과 같이 56 공시작물 중 36종에서 형광물질이 존재하는 것으로 밝혀졌다. 식용작물의 경우 벼, 밀, 콩, 옥수수 등 10종에서 존재하고 있었으며, 특용작물은 참깨, 들깨 등 5종, 원예작물은 십자화과인 배추, 무, 브로콜리 등 13종 및 약용작물은 방풍, 노랑붓꽃 등 8종에서 확인되었다. Min¹²⁾도 채소작물, 식용작물, 약용작물 및 사료작물 등 다수의 식물종자를 공시하여 수분흡수도록하여 UV광하에서 형광 누출물질을 검정한 결과 십자화과의 채소종자는 퇴화종자가 건전종자에 비하여 형광물질이 다량 누출된다고 보고하였다. 이는 본 실험의 결과에서도 특히 십자화과에 속하는 배추, 무, 브로콜리 및 콜리플라워를 비롯해서 쑥갓, 박, 가지, 범부채 등에서 누출량이 많았다.

2. Sinapine 누출을 이용한 노화종자 선별

수분침지시 건전종자보다는 노화종자에서 sinapine 누출이 현저하게 많았던 배추종자를 이용하여 sinapine을 코팅재료에 흡착하여 형광종자(노화종자 혹은 저활력종자)와 무형광 종자(건전종자)로 분리시킬 수 있었다. 배추종자를 물 속에 4시간 침지 후 꺼내어 cellulose와 석고분말로 코팅한 종자는 육안으로 보면 흰색을 나타내어 건전종자와 노화종자를 선별할 수가 없었으나 자외선광 하에서는 형광을 발하는 종자와 형광을 발하지 않는 종자로 구분되었다. 형광을 발하는 종자는 활력이 낮거나 발아능력이 없는 노화된 종자이다.

Min¹²⁾ 등은 퇴화종자에서 형광물질이 누출되는 것을 이용하여 십자화과채소를 공시하여 코팅한 cellulose에 형광물질을 흡착시킨 후 UV광하에서 퇴화종자를 선별하였고, 이 방법으로 종자개개의 단위로 선별이 가능하다고 하였다.

표 2는 배추종자를 인위적으로 노화시킨 뒤 처리기간에 따른 발아율과 형광종자수에 미치는 영향을 구명한 것으로서 무처리시 무형광 종자는 91.3%였으며, 노화처리 기간이 길어질수록 저하되어 8일 노화처리시 무형광 종자는 1.7%였다.

Table 1. Leakage of fluorescent substances after water imbibition in 56 crop seeds.

Crops	Leakage	Non-leakage
Food crops	Rice, pearl millet, oat, corn, foxtail, bean, barnyard millet, kidney bean, sorghum	Aduzki bean, barley, rye, buck -wheat, job's tears, mungbean
Industrial crops	Sesame, common millet, perilla, sunflower, rape seed	
Vegetables	Radish, Chinese cabbage, white gourd, squash, leaf mustard, egg plant, garden chrysanthem -urn, broccoli, cauliflower, crown daisy	Lettuce, tomato, spinach, gourd, melon, edible burdock, water melon,
Medicinal crops	<i>Glehnia littoralis</i> , <i>Iris koreana</i> , <i>Cassia tora</i> , Ballon flower, <i>Belamcanda chinensis</i> , <i>Amanaedulis</i> , <i>Acanthopanax sessiliflorus</i> , <i>Angelica dahurica</i>	<i>Carpesium abrotanoides</i> , <i>Arnemarrhena asphodeloides</i> , Bunge, Sundrops

*Intermediate crops in fluorescent leakage : Wheat, Welsh onion, Onion, Red pepper

Table 2. Germination rate and sorting ratio under ultraviolet (UV) light as affected by duration of artificial ageing treatment in Chinese cabbage

Ageing treatment ¹⁾ (days)	Germination (%)	Ratio of sorting under UV light(%)	
		Non-fluorescent	Fluorescent
Control	88.7a	91.3a	8.7d
2	85.7a	87.3a	12.7c
4	44.3b	47.7b	52.3b
6	7.0c	8.3c	91.7a
8	1.3d	1.7d	98.3a

1) 45°C, saturated humidity.

2) Means followed by the same letter in a column are not significantly different at the 5% level by DMRT.

무형광증자는 노화처리 기간에 따라 감소되었으나 형광증자의 경우 무처리에서 8.7%였으나 노화 8일 처리시 98.3%로 증가하였다.

노화처리에 따른 발아율을 보면 무처리는 88.7%였으나 처리기간이 길어질수록 감소되어 8일 처리시 1.3%를 나타냈다. 이와 같은 결과는 종자

Table 3. Effect of temperature and time on changes in color of pelleted seeds by spray of ninhydrin solution in Chinese cabbage seeds

Temperature (°C)	Time (min)	Concentration of ninhydrin (%)				
		0.1	0.3	0.5	0.7	1.0
25	10	·	·	·	·	·
	20	·	·	·	·	·
	30	·	·	·	·	·
	40	·	-	-	-	-
	50	-	+	+	+	+
	60	-	+	+	+	++
	120	+	+	+	++	++
	180	+	+	++	++	++
30	10	·	·	·	·	·
	20	·	·	·	·	·
	30	·	·	·	·	·
	40	·	-	-	-	-
	50	-	+	+	+	+
	60	-	+	+	+	++
	120	+	+	+	++	++
	180	+	+	++	++	++
35	10	·	·	·	·	·
	20	·	-	-	-	-
	30	-	+	+	+	+
	40	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
	60	+	+	++	++	++
	120	+	++	++	++	++
	180	++	++	++	++	++

*Degree of color : · White(not changed), - trace of color from white to purple, + light purple, ++ purple.

가 노화됨에 따라 형광종자수는 증가되지만 발아율은 반대로 감소하는 것으로 형광종자와 종자활력과는 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다. 민¹²⁾ 등도 십자화과 채소에서 종자코팅을 통하여 형광종자와 무형광종자로 구분하여 형광종자를 제거시킴으로써 5~35%의 발아율을 향상시켰다고 보고한 바 있다. 형광종자의 경우 대부분 발아하지 않았으며 발아가 되어도 비정상묘를 나타내므로 상품가치를 크게 저하시킬 것으로 보인다. 종자집단 내에서 sinapine을 누출, 흡착시켜 선별하는 방법을 대량으로 처리하기 위해 sorting machine을 이용하여 선별할 수 있는 방법이 개발되고 있다.

3. 아미노산의 누출을 이용한 노화종자 선별

인위노화시킨 배추 종자를 사용하여 물 속에 4시간 침지시킨 후 꺼내서 cellulose와 석고분말로 pelleting한 후 ninhydrin으로 발색시키는데 필요한 적정 조건을 조사한 결과는 표 3에서 보는 바와 같다. 온도는 25℃에서 35℃로 높아질수록 그리고 ninhydrin 용액의 농도는 0.1%에서 1.0%까지 높은 농도에서 발색을 시키는데 효과적인 반응을 보였다. Ninhydrin 0.5~1.0% 용액을 살포하고 35℃에 치상한 경우 처리후 20분 경부터 발색현상이 시작되어 60분 경에는 purple색을 나타냈으며, 120~180분이 되면 다소 진해지는

Table 4. Effect of temperature and time on changes in color of pelleted seeds by spray of ninhydrin and sodium thiosulfate solution in Chinese cabbage seeds

Temperature (℃)	Time (min)	Concentration of ninhydrin(%) + 0.01N Na ₂ O ₂ S ₃				
		0.1	0.3	0.5	0.7	1.0
25	10
	20
	30
	40	.	.	-	-	-
	50	-	-	+	+	+
	60	-	+	++	++	++
	120	+	+	++	++	++
	180	+	++	++	++	++
30	10
	20	.	.	-	-	-
	30	.	.	-	-	-
	40	.	-	-	-	-
	50	-	+	+	+	+
	60	-	+	+	+	++
	120	+	++	++	++	++
	180	+	++	++	++	++
35	10
	20	-	-	-	-	-
	30	+	+	++	++	++
	40	+	++	++	++	++
	50	+	++	++	++	++
	60	+	++	++	++	++
	120	+	++	++	++	++
	180	++	++	++	++	++

*Degree of color : . White(not changed), - trace of color from white to purple, + light purple, ++ purple.

정도에서 ninhydrin을 이용한 최적발색조건은 0.5~1.0%의 농도에서 35℃에서 1시간 정도 처리하는 것으로 나타났다. 한편 발색시약으로 ninhydrin에 0.01N sodium thiosulfate를 첨가한 용액은 ninhydrin 용액 단독처리보다 더 빨리 발색반응이 나타났다(표 4).

Ninhydrin과 sodium thiosulfate를 혼합하여 살포처리한 경우 ninhydrin을 단독으로 살포처리한 결과와 마찬가지로 25℃ 및 30℃보다 35℃에서, 그리고 ninhydrin 농도가 높아질수록 발색반응이 빨리 나타나 white에서 purple색으로 변화하였다. 혼합용액으로 발색시 적정조건은 0.5~1.0% ninhydrin + 0.01N sodium thiosulfate 용액으로 spray하여 35℃에서 30분~1시간 처리로 나타났다. Ninhydrin 단독용액보다 ninhydrin에 sodium thiosulfate를 혼합한 용액에서 더 빨리 발색반응이 일어난 것은 수분침지시 아미노산 뿐만 아니라 sucrose 및 glucose 등의 당이 다량 누출되어 흡착되는데 sodium thiosulfate가 당을 정색반응시키기 때문인 것으로 생각되었다. 발색반응 직후 육안으로 유색종자의 선별이 가능하며, 유색종자는 아미노산 및 당의 누출이 코팅재료에 흡착된 것으로서 저활력 종자 혹은 노화종자이나, 발색되지 않은 흰색종자는 건전종자로서 물질의 누출이 없거나 적은 종자이다¹³⁾.

Ninhydrin과 sodium thiosulfate를 이용하여 노화종자에서 누출되어 종자에 흡착된 아미노산과 당을 발색시키는 방법은 흰색을 유색으로 바꾸어 선별할 수 있는 방법으로서 color sorting machine을 이용하면 대량 및 자동적으로 선별이 가능할 것으로 사료되었다. 발색처리 후 발색 정도가 시간이 경과됨에 따라서 탈색현상이 나타나는데 이에 대한 세밀한 연구도 병행되어야 할 것이다.

십자화과 채소종자 이외의 주요작물의 노화종자에서 형광누출이 확인된 바, 이들 작물 종자별로 형광물질의 분리 동정이 이루어져야 하며, 작물별 노화종자 선별을 위한 생리, 생화학적인 기초연구가 필요하다고 본다.

적 요

본 실험은 노화종자를 비파괴적인 방법으로 선별하여 종자의 품질을 증진시키기 위한 것으로 주요 작물종자의 형광 누출을 확인하여 노화종자 선별기술개발 및 아미노산과 당 등의 누출물을 흡착, 시약에 의해 발색시켜 유색종자, 즉 노화종자를 선별하는 기술을 개발하고자 수행하였다.

1. 노화종자에서 형광물질 누출이 많은 작물은 배추, 무, 브로콜리, 콜리플라워, 유채, 박, 쑥갓, 범부채 등이었으며, 이외에도 28종 등 총 36종에서 누출물질을 확인하였다.
2. 배추 종자는 노화처리 기간이 무처리에서 8일까지 길어질수록 무형광 종자 비율은 91.3%에서 1.7%로 저하되었으며 형광종자 비율은 8.7%에서 98.3%로 증가되었다.
3. 배추의 노화종자에서 sinapine이 누출되는 특성을 이용하여 종자를 수분침지 후 cellulose와 석회분말로 pelleting하여 누출물질을 흡착시킨 후 자외선 광하에서 형광종자(저활력 종자 혹은 노화 종자) 및 무형광 종자(건전종자)로 판별이 가능하였다.
4. 아미노산과 당 등 누출물질의 최적 발색조건은 0.5~1.0% 이상의 ninhydrin 용액과 sodium thiosulfate 용액을 살포 처리한 후 35℃에서 30분~1시간 처리하는 것이었으며 이 방법으로 유색종자를 만들어 노화종자를 선별할 수 있었다.

LITERATURE CITED

1. Association of Official Seed Analysis. 1983. Seed vigor testing handbook. No. 32.
2. Bouchereau A, Hamelin J, Lamour I, Renard M and Larher F. 1991. Distribution of sinapine and related compounds in seed of *Brassica* and allied genera. *Phytochem.* 30(6): 1873-1881.

3. Ching T.M. 1972. Aging stresses on physiological and biochemical activities of crimson clover (*Trifolium incarnatum* L. var. Dixie) seeds. *Crop Sci.* 12: 415-418.
4. 최봉호, 강광희. 1984. 종자학. 홍익제. 384p.
5. Dadlani M and Agrawal P.K. 1983. Factors influencing leaching of sugars and electrolytes from carrot and okra seeds. *Scientia Horticulturae* 19: 39-44.
6. Halder S and Gupta K. 1980. Effect of storage of sunflower seeds in high and low relative humidity on solute leaching and internal biochemical changes. *Seed Sci. & Technol.* 8: 317-321.
7. Hong S.B and Lee S.S. 1995. Sugar leakage from differently-aged seeds of rape, Chinese cabbage and radish. *Korean J. Crop Sci.* 40(3): 322-327.
8. 국립종자공급소. 1980. 곡물종자 정선 가공기술. 22p.
9. Lee D.J, Chae J.C and Kim B.K. 1995. Methods of nitrogen application and enhancing high density grains in two rice cultivars. *Korea J. Crop Sci.* 40(Supplement 1): 34-35.
10. Loomis E.L and Smith O.E. 1990. The effect of artificial ageing on the concentration of Ca, Mg, Mn, K and Cl in imbibing cabbage seed. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105(5): 647-650.
11. 민태기. 1994. 종묘 수출시장 확대를 위한 현황 분석 및 첨단 육종방법 개발 연구-종자코팅을 이용한 *Brassica* 채소의 퇴화종자 선별법 연구. 농촌진흥청 농업 특정 연구과제 보고서 5: 1-20.
12. Min T.G. 1994. Screening method for non viable seeds in Brassicaceae vegetable crops by sinapine leakage. *Korean J. Crop Sci.* 39(5): 473-479.
13. _____. 1994. Studies on the development of technical methods to upgrade crop seed quality by exploiting chemical leakage. KOSEF, 1-45.
14. Nautiyal, A. R., and Purohit A.N. 1985. Seed viability in sal III. Membrane disruption in ageing seeds of *Shorea robusta*. *Seed Sci. & Technol.* 13: 77-82.
15. Powell, A. A. 1986. Cell membranes seed leakage conductivity in relation to the quality of seed sowing. *J. Seed Technol.* 10: 81-100.
16. Taylor, A. G., and Kenny T.G. 1985. Improvement of germinated seed quality by density separation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110(3): 347-349.
17. _____, Paine D.H and Paine C.A. 1993. Sinapine leakage from *Brassica* seeds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118(4): 546-550.