인삼 유전자원 장기보존을 위한 종자 초저온보존 조건 구명

라자메토브 셰르조드¹ · 이영이^{1*} · 김영창² · 이석영¹ · 이정윤¹ · 전영아¹ · 성정숙¹ · 이기안¹ · 곽재균¹

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터, ²농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부

Response of Pre and Post Treatments for Cryopreservation of Korean Ginseng Seeds on Recovering Viability

Sherzod Rajametov¹, Young-Yi Lee^{1*}, Young-Chang Kim², Sokyoung Lee¹, Jung-Yoon Yi¹,
Young-Ah Jeon¹, Jung-Sook Sung¹, Gi-An Lee¹, and Jae-Gyun Gwak¹

¹National Agrobiodiversity Center, NAAS, RDA, Suwon, 441-853, Republic of Korea

²Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, 440-706 Republic of Korea

Abstract : We investigated the effect of pre and post-cryopreservation treatment on the dehiscid Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) seeds germination rate. All seeds covered with endocarp and 96.3% of them were opened, initial moisture content (IMC) and germination rate were 55.9% and 84.0%, respectively. According to the pre and post-cryopreservation methods, highest seeds germination rate (GR) was observed in non-precooled seeds which recovered at 40°C, in which MC was 8-12% and desiccated at 15°C. However, by prolonged drying the seeds GR comparatively decreased under MC of below 2.2%, reaching below rate 4% regardless of pre and post- cryo treatments, whereas the seeds dried at 25°C airflow cabinet saved significantly high rate. The effects of desiccation and of cryopreservation on the survival and developmental pattern of roots and stems showed that the earliest appearance of the root in control seeds was detected after 10 days of bedding in GA medium, and the stem started to develop later on the third week of germination test. And, on the 30th day of the investigation stem growth rate significantly increased and showed equivalent data with root rate. Almost the same pattern showed the seeds after cryopreservation, but it significantly delayed in the development compared to control, where term of the investigation continued till 40 day than control 30 day. Additionally, non-precooling seeds in both desiccation and recovery methods were showed high root and stem growth compared to precooled treatments.

Keywords : Seed, Cryopreservation, Precooling, Recovery

서 언

인삼은(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 세계적으로 가장 약효가 널리 알려진 약초 중 하나로서 건강 및 신체활력 뿐만 아니라 수명연장 기능 또한 보고되고 있는 기능성 유전자원이다(Coleman et al. 2003, Ellis & Reddy 2002). 인삼은 종자로 번식 가능하지만 일정 기간동안의 저장기간이 경과하여야만 발아가 이루어지고, 발아과정에서의 환경요인에 따라 발아율이 감소하는 등의 편차를 보이는 특성을 지니고 있다

(Kim et al. 2008, Kwon et al. 2001, Lee et al. 1995, Lee et al. 2004, Yoon et al. 2005).

종자은행의 종자 저장 방법은 국제기준을 비롯하여 많은 문헌에서 언급되어 왔으며(Hong & Ellis 1996), 최근에는 종자 저장수명을 연장하고 장기간 보존할 수 있는 프로토콜 개발을 위한 여러 가지 시도들이 이루어지고 있다. 핵심요인은 종자 수분이라고 할수 있는데 종자를 일정 수준 이상으로 건조시키는 것은 저장수명에 거의 영향을 주지 못하며(Dickie et al. 1995, Ellis & Hong, 2006, Nagel & Borner, 2009), 오히려 노화를 가속화시킬 수 있다는 것(Vertucci & Roos, 1990, Walters, 1998)이 여러 연구를 통해 증명되어 왔다. 한편, 생물조직을 액체질소를 이용하여 극한 저온(-196°C)에 저장하는 초저온보존 방법은 세계적으로 널리 이용되고 있으며

*Corresponding author (E-mail: youngyi@korea.kr, Tel: +82-31-299-1804, Fax: +82-31-299-1894)

(Received on November 26, 2014. Revised on December 17, 2014.
Accepted on December 17, 2014.)

특히 유전자원 보존에 있어서는 자원의 genetic potential 손실 없이 종장기 보존이 가능하게 한다(Benson & Withers, 1998). 이러한 과정은 초저온보존된 조직이 저장기간동안 대사과정을 멈추게 함으로써 이루어진다(Engelmann 2004, Fatima et al. 2009). 이러한 초저온보존 프로토콜은 주로 다양한 종의 건조종자, somatic 및 zygotic embryo를 중심으로 확립되어 왔다(Fatima et al. 2009, Gray et al. 1993, Sakai et al. 1990, Yi et al. 2013).

난저장(recalcitrant) 식물조직의 경우 초저온 처리 후에도 수명이 유지될 수 있는 수분함량을 유지하면서 보존에 알맞게 탈수시키는 것이 필요한데 매우 까다로운 기술이 요구되는 부분이다. 또한 건조에 대한 민감성이 다양한 여러 종들의 초저온보존 기술 개발은 많은 노력과 시간이 필요한 연구분야라고 할 수 있으며(Chandel et al. 1995, King & Roberts 1980, Pence 1992 1995, Pritchard & Prendergast 1986, Wesley-Smith et al. 1992), 종마다 보존대상 조직부위가 다른 것 또한 이러한 이유 때문이다(Berjak et al. 1993, Farrant et al. 1986, Finch-Savage 1992, Hong & Ellis 1990, Tompsett & Pritchard 1993).

인삼 종자(Kim et al. 2008, Yoon et al. 2005) 및 배배양을 이용한 합성종자(artificial seed)의 효율적인 초저온보존 기술(Choi et al. 1999, Choi & Jeong 2002)은 앞선 연구들에서 보고된 바 있으며, 이들 종자는 건조처리와 냉동조건을 견딜 수 있다는 시험결과가 도출되기도 하였다. 본 연구의 목적은 인삼 종자를 초저온보존하기 위한 몇가지 조건을 구명하고자 하는 것으로서, 인삼 개갑종자의 초저온보존에 있어 사전 동결처리 유무 및 보존 후 해동단계의 조건에 따른 회복 발아율을 조사함으로써 보존효율을 알아내고자 하였다. 또한 종자수분함량 및 초저온보존 처리가 회복된 유묘의 뿌리 및 줄기 발달양상에 미치는 영향을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

종자시료

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 종자는 국립원예특작과학원 인삼특작부에서 2013년에 수확하여 개갑처리 한 후 90일간 2℃에서 층적처리하여 2014년 2월부터 국립농업과학원 농업유전자원센터에서 시료로 이용하였다. 종자의 크기에 따른 발아율 차이는 없다고 보고(Kim et al. 2014)된 바에 따라 크기에 상관없이 임의 선별하여 시험에 사용하였으며 개갑율은 93.6%,

초기 수분함량(IMC)은 55.9%, 초기 발아율은 84.0% 이었다.

수분함량 측정 및 건조처리

종자 수분함량(MC)은 105℃ 오븐에서 24시간 건조하면서 종자 무게를 조사함으로써 산출하였다. 종자가 일정수분함량(DMC)에 이르렀는지를 조사하기 위하여 건조 전후의 종자무게를 이용한 다음의 식을 적용하였다.

$$\text{Weight of seed (g) at DMC\%} = \frac{(100 - \text{initial MC\%}) \times \text{initial seed weight(g)}}{100 - \text{DMC\%}}$$

종자 건조율은 종자량(종자층의 깊이), 건조상 내부의 공기 유동 및 종에 따라 다르다. 본 연구에서는 종자 건조처리를 두가지 방법으로 실시하였다. 첫 번째는 종자를 15℃, RH 10-12% 의 일반적인 종자건조실에 처리하였고, 두 번째는 25℃, RH22-23%로 조절된 airflow 챔버에 처리하였다. 4-5% 미만의 종자수분함량을 설정하기 위해서는 추가적으로 40% 오븐에서 1시간 건조처리 하였으며 모든 시험은 100립씩 3반복으로 시행하였다.

초저온보존, 해동 및 종자발아

종자수분함량 설정 후(2-12%) 각각 5 mL cryovial에 50립씩 담아 액체질소에 사전 동결단계 없이 바로 담그고, 비교구로서 같은 한 세트는 보존 전 동결단계를 거치도록 하였다. 0 ± 0.3℃까지 서서히 온도가 저감되도록 프로그래밍된 챔버에서 24시간 처리한 후 3시간동안 -1℃까지 저감되도록 하고 이후 1시간 간격으로 -24℃까지 저감시킨 후 14시간동안 저장하였다. 액체질소 처리는 30일간 지속하였다.

액체질소 저장 후 해동은 40℃ water bath에서 2시간동안 처리한 구와 4℃ 챔버에서 24시간 상치한 후 실온에 30분 처리한 구를 비교하였다.

발아 조사를 위하여 1% NaOH 및 70% 에탄올로 소독한 종자를 증류수로 수세한 후 25℃에서 3시간 건조시켜 200 mg/L⁻¹GA₃ 용액으로 적신 paper에 Between Paper법으로 치상하고 10℃ 챔버에서 배양하였다(Kim et al. 2008, Rajametrov et al. 2014, Yoon et al. 2005). 발아 조사는 10일 간격으로 50일간 실시하였으며 3 mm 이상 유근이 출현한 경우를 정상종자로 판정하였다(Kim et al 2008). 초저온보존을 위한 사전 동결처리 및 사후 해동처리 및 유묘생육 영향을 조사하기 위하여 종자에서 출현된 뿌리 및 자엽 생육을 조사하였다.

결 과

종자 건조조건

인삼 개갑종자의 수분함량은 15℃에서보다 25℃에서 빠른 속도로 감소하여 5일만에 임계점까지 떨어졌으나, 15℃에서는 같은 수준으로 떨어지기까지 40일이 소요되었다(Fig. 1).

발아율 변화

종자수분함량 및 초저온보존 전후 처리에 의해 발아율은 Fig. 2와 같이 변화를 보였다. 종자수분 15℃에서 종자수분 8-12%로 건조된 종자가 사전 동결단계를 거치지 않고 초저온보존된 후 40℃에서 2분간 해동처리된 되었을 때 가장 높은 발아율을 보였다. 같은 수분함량의 대조구는 유의하지는 않으나 약간 더 높은 발아율을 나타냈다.

Fig. 1. Effects of the drying methods on the seed desiccation rate.

Fig. 2. Effects of desiccation and recovery conditions on the germination rate of cryopreserved dehiscent Ginseng seeds under different moisture content (FW). Coated seeds were stored in LN for 30 day. The vertical bars indicate SD (n= 3).

특히 초저온보존을 위한 사전 동결처리를 한 모든 종자들은 처리하지 않은 종자들보다 모두 발아율이 낮은 것으로 조사되었다. 또한 15°C에서 건조된 처리구는 해당조건과 무관하게 수분함량 5% 이하로 떨어지면 급속히 발아율이 감소하는 것으로 나타나 25°C 건조 처리구보다 저감율이 빠른 것으로 나타났다.

유근 및 자엽발달에 미치는 영향

종자 건조 및 저장방법에 따라 식물체의 생장은 달라질 수 있으므로 본 연구에서는 15°C에서 수분함량 8.8%로 조절된 종자와 25°C에서 종자수분 9.6%로 조절된 종자를 발아시켜 발아 기간동안 유근과 자엽생장을 조사하였다. 그 결과 유근과 자엽 생장은 건조 방법과 상관없이 사전 동결처리 없이 보

Fig. 3. Effects of desiccation and pre and post cryopreservation treatments on the growth ability of root and stem. The vertical bars indicate SD (n= 3).

Fig. 4. Growth rate of Ginseng seeds hypocotyl (a fused hypocotyl and taproot) depends on pre and post cryopreservation treatments (30 days of culture).

존 후 40℃에서 2분간 해동처리한 구에서 가장 높은 것으로 조사되었다(Fig. 3, 4). 그러나 초저온보존 후 유근 및 자엽의 생장은 초저온처리 하지 않은 일반 종자(IMC 55.9%)보다 현저히 낮은 것으로 나타났다.

대조구에서의 유근 출현은 GA 배지에 치상한지 10일 이내에 관찰되었으며 자엽은 발아한지 3주 후에 발달되기 시작하였다. 30일 동안 자엽생장은 유근생장과 함께 증가세를 나타냈다.

초저온보존 후, 30일 동안 유근 및 자엽 발달은 대조구보다 현저히 감소하는 것으로 나타났으나 40일째 조사결과는 이후 식물체의 생장율이 다른 양상을 나타낼 수도 있음을 시사하였다(Fig. 3, 대조구 종자발아 종료로 데이터 없음).

고 찰

생물 조직의 효율적인 초저온보존을 위해 많은 프로토콜들이 개발되고 있다. 초저온보존은 식물 유전자원의 안정적이고 비용 효율적인 장기보존을 위해 유용하게 활용될 수 있기 때문이다. 식물 종 각각에 적합한 프로토콜 개발을 위해 다양한 연구들이 시도되어 왔다. 보존 전처리 뿐만 아니라 해동, 발아 배지 등과 같은 보존 후처리 또한 장기 보존에 있어 중요한 요인으로서 종자 생육과 활력에 크게 영향을 주는 것으로 알려지고 있다.

극한 저온에서 일정 식물조직을 장기간동안 보존하기 위해서는 수분이 가장 중요한 요인으로 작용하는데, 이는 초저온 보존된 세포의 결빙(ice crystallization) 유도로 인한 피해의 원인이기 때문이다(Ashworth 1992, Kim et al. 2008, Sparks et al. 2001, Yoon et al. 2005). 뿐만 아니라 수분함량은 배 생장, 호르몬 농도, 화학조성 및 대사활성과 같은 생물·생리적 상태에 중요한 역할을 하므로 수분함량은 해당 조직의 장기 보존에 있어 가장 중요한 결정 요소라고 할 수 있다(Kim et al. 2008, Kim et al. 2014).

최근 Kim 등(2014)은 몇몇 인삼 종자의 내생 GA 호르몬(GA₁₋₃₄)이 배 생장율을 현저히 증가시킨다고 보고하였고, 발아기간 단축 및 휴면 타파를 목적으로 GA₃가 주로 사용되고 있으나, GA₄가 가장 효과적이라는 연구도 발표된 바 있다(Kim et al. 2008, Rajametov et al. 2014, Yoon et al. 2005).

본 연구에서는 인삼 개갑종자의 수분함량이 25℃ air flow 챔버에서 15℃ 건조실에서 보다 빠르게 감소하였고, 종자수분 임계점까지 이르는 시간도 각각 5일, 30일로 나타났다. 즉,

종자 수분을 10%로 조절하기 위해서 25℃ 챔버에서 30시간, 15℃ 건조실에서 5일이 소요되는 것으로 조사되었다. 이는 생육상 및 건조실에서 인삼종자를 건조처리 및 비교한 다른 연구 결과들과도 유사한 양상을 보였다(Kim et al. 2008, Yoon et al. 2005). Kim 등(2008)은 건조 및 흡습 방법을 달리 하여도 건조 종자의 발아율에는 영향이 없다고 보고한 바 있으나 처리된 온도 및 상대습도 조건에 대한 정보는 기술되어 있지 않다. 본 연구에서는 다양한 식물종을 서서히 건조시키는데 사용되는 15℃ 건조실(Hong & Ellis 1996, Hong & Ellis 2006)을 이용하여 종자수분이 4-5%로 떨어지는데에 40일이 소요되었다.

특정 종의 식물은 종자수분이 일정 수준 이하로 감소하면 종자 활력 및 생육이 불가능해 진다는 것은 잘 알려진 사실이다(Vertucci et al. 1990). 또한 일정 수준의 수분함량은 식물 조직의 저장 수명을 결정하는데, 이때의 수분함량 수준은 식물 종마다의 ‘안전 최소수분(LSMC)’ 및 ‘어느점을 견딜 수 있는 최대수분(HMFL)’이 고려되어야 한다. 건조된 일반종자는 액체질소 처리시 2-28%의 수분함량 조건에서(유지 종자의 경우 3% 전후, 전분 종자의 경우 4-6%) 생존 가능한 것으로 알려져 있다(Chin & Krishnapillay 1989, Das Bhowmik et al. 2011, Fassil & Engels 1997, Hong & Ellis 1996, Stanwood 1985, Yoon et al. 2005).

Yoon 등(2005) 및 Kim 등(2008)에 의하면 인삼 종자의 LSMC는 7%, HMFL은 12-13%로서 인삼 종자수분이 13.5% 이상이면 결빙현상에 의해 결과적으로 탄수화물에 비해 지질과 단백질의 비율이 높아지는 현상을 초래하게 된다. 따라서 액체질소 저장에 의한 종자 피해를 방지하기 위해 본 연구에서는 종자수분은 2-12%로 설정하였다. 이 경우 높은 발아율을 보인 종자의 수분함량은 HMFL에 가까웠고, 60% 이하의 낮은 발아율을 보인 종자의 수분함량은 LSMC에 가까웠다. 본 연구에서는 15℃에서 건조된 종자시료에서 HMFL은 약 12%로 조사되었고, LSMC는 7% 이상으로 가장 낮은 발아율을 보여 선행 연구들과 유사한 결과를 보였다. 반면 25℃에서 건조된 종자는 다소 다른 양상을 보였다.

액체질소에 저장된 개갑종자의 발아율은 보존 전후처리에 따라 다른 결과를 나타냈다. 가장 높게 나타난 발아율은 80.7%로 수분함량이 12.4%이고 사전처리 없이 보존 후 40℃에서 해동처리한 종자에서 관찰되었다. 그러나 종자 수분이 2.2% 이하로 감소하면 발아율은 감소하였고 4% 이하가 되면 초저온보존 전후 처리효과는 영향이 없게 되는 것으로 나타났다.

25℃에서 수분함량 3%로 건조된 종자는 15℃에서 건조된 종자의 같은 수분함량 수준에서보다 높은 발아율을 나타냈는데 이는 온도, 상대습도와 같은 건조 조건이 발아율 뿐만 아니라 관련된 호흡율, 대사 및 수명과 밀접한 관계가 있음을 시사한다(Lasseran 1988, Leon-Lobos et al. 2005, Miranda et al. 2010, Sanderson et al. 1989, Vertucci 1989). 일정 범위의 종자 수분은 산소 흡수, 단백질 혹은 생물학적 조직 변화에 영향을 주고(Leopold & Vertucci 1989, Senaratna et al. 1986, Vertucci et al. 1990), 더 나아가서는 세포 조직의 구조적, 생리적 변화를 초래할 수 있다(Wesley-Smith et al. 2001).

Vertucci(1989) 및 Leopold와 Vertucci(1989)는 산소가 빠르게 소모되기 시작하는 수분함량은 ATP 합성, 호흡억제와 같이 미토콘드리아의 전자공여가 일어날 수 있는 수분함량이라고 하였다. 탈수 과정이 일어나는 동안 발아율 감소로 인한 생물학적 기작들 중에서 세포막 기능의 손상은 전도도, 지질 과산화 및 용출전해질, 종자 탄수화물 등으로 측정될 수 있다(Chandel et al. 1995, Crowe et al. 1984, Roberts 1979, Senaratna & McKersie 1986). 본 연구에서 15℃에서 건조된 수분함량 7% 이하의 인삼 개갑종자는 상대적으로 발아율이 낮았는데 이는 상대적으로 긴 건조기간동안 탈수과정이 지속되면서 액포의 민감도 증가에 의해 종자 노화 및 종피 손상, 세포의 기계적 상해 등이 유도됨으로써 나타난 결과일 가능성도 고려해야 한다(Wesley-Smith et al. 2001). 가장 낮은 발아율은 25℃에서 수분함량 11%로 건조된 종자에서 조사되었는데, 이는 짧은 건조 기간동안 갑작스런 대사속도의 변화로 호흡 및 수분 손실이 증가하여 세포 내외부 전반적인 수분함량 불균형에 기인한 것으로 생각될 수 있다. 수분함량이 완전한 hydration과 기능장애로 인한 유해반응을 줄이는 대사를 조절할 수 있을 때 정상적인 기능은 이루어진다(Berjak & Pammenter 1997 and 1999, Leprince et al. 2000, Pammenter et al. 1991, Walters et al. 2001).

앞서 언급한 바와 같이 전처리 없이 액체질소에 보존 후 40℃에서 빠르게 해동한 종자가 유의하게 높은 발아율을 나타냈으나, 보존 전 동결처리구는 유근과 자엽 생장율이 상대적으로 높게 나타났다. 시각적으로 유근 및 자엽 생장은 건조방법 및 종자수분 함량과는 무관하게 보였으나(Fig. 4) 종자수분 함량이 감소함에 따라 유근과 자엽 생장율은 유의하게 감소하였고 발달이 저해되었으며 이 때의 종자는 15℃에서 수분함량 5% 이하로 건조된 상태였다.

본 연구 결과, 인삼 개갑종자의 초저온보존 최적 조건은 종자를 전처리 없이 바로 액체질소 보존하고 40℃ 해동처리하는 것이다. 그러나 종자의 수분함량과 세포기능 활성화는 유근과 자엽 발달단계에 유의한 영향을 줄 수 있고 초저온보존시 최적 종자수분은 식물조직의 생리적 단계에 따라 다르게 나타날 수 있다. 종자를 전처리 없이 액체질소에 담갔을 때 생체 활성화는 일시적으로 정지함으로써 내부 결빙 형성이 사전 동결처리한 종자보다 유의하게 적게 이루어져 사전 동결처리가 초저온에 대한 순화효과 보다는 오히려 저온스트레스 요인으로 작용한 것으로 생각된다. 수분함량 13% 이상의 인삼 종자가 동결이나 해동될 때, 지질의 결빙(응고)이 일어난다고 보고된 바도 있으며(Kim et al. 2008), 이는 세포 내외에 불규칙한 모양의 ice를 생성함으로써 결과적으로 세포벽에 상해를 초래한다고 알려져 있다(Leprince et al. 2000, Rajashekar & Burke 1996). 또한 즉각적인 동결 및 해동은 극저온쇼크와 같은 스트레스와 일시적인 생체활성 변환을 최소화하는데 유효할 것으로 생각된다.

결론적으로 인삼 개갑종자는 고유의 건조 내성을 갖고 있으며, 수분함량과 극저온에 대한 민감도가 발아율과 유근 및 자엽 생장에 유효한 영향을 미친다. 종자수분함량이 8-12%인 인삼 종자는 액체질소 내에 잘 저장될 수 있으며 40℃에서 해동처리하면 보존 후 발아에 효과적이다.

적 요

인삼 개갑종자의 초저온보존 효과 및 최적조건을 구명하기 위하여 건조 조건과 수분함량 및 액체질소 보존 전 동결처리와 보존 후 해동처리에 따른 초저온보존 효과를 조사하였다. 건조처리는 25℃ air flow 챔버(RH 10~12%)와 15℃ 건조실(RH 22~25%)을 이용하여 실시하였고 보존 전 동결은 -24℃에서 30일간 처리하였으며 보존 후 해동은 4℃에서 24시간, 40℃에서 2분 처리구를 각각 비교하였다. 그 결과 15℃에서 종자수분 8-12%로 건조된 종자가 보존 전 처리 없이 액체질소에 보존된 후 40℃에서 해동되었을 때 발아율이 가장 높은 것으로 나타났다. 그러나 종자수분이 2.2% 이하일 때 건조가 지속되면 발아율은 감소하는 것으로 나타났으며, 4% 이하에 이르면 보존 전후 처리효과는 나타나지 않는 것으로 조사되었다. 반면 25℃에서 건조된 종자는 상대적으로 높은 발아율을 유지하였다. 건조 및 초저온보존에 의한 인삼 개갑종자의 유근 및 자엽 생장율을 조사한 결과, GA배지 치상 10

일 후 무처리한 대조구에서 첫 유근이 출현하였으며 3주 후에는 자엽발달이 시작되었다. 30일째에는 자엽생장율이 유근발달과 함께 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 치상 30일까지 초저온보존에 의한 생장율은 같은 양상을 보이면서 대조구보다 현저히 낮게 나타났으나 40일째에는 양상은 같았으나 회복율이 대조구보다 증가세를 보였다. 또한 보존 전 동결처리 없었던 종자는 동결처리한 종자보다 모든 처리구에서 높은 유근 및 자엽 생장율을 보였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(과제명: 종자 유전자원 안전보존 및 품질관리체계 구축 연구, 과제번호: PJ008553)의 지원으로 이루어진 것임.

REFERENCES

- Ashworth EN. 1992. Formation and spread of ice in plant tissues. Hort. Rev. 13: 215-255.
- Benson EE, Withers LA. 1998. The application of germplasm storage in biotechnology. In Plant cell biotechnology 18. Pais MSS, Mavituna F, Novais JM (eds). NATO ASI Series. Springer. pp.431-444.
- Berjak P, Pammenter NW. 1997. Progress in the understanding and manipulation of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds. In Basic and applied aspects of seed biology. Ellis RH, Black M, Murdoch AJ, Hong TD (eds). Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. pp.689-703.
- Berjak P, Vertucci CW, Pammenter NW. 1993. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation-sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. Seed Sci. Res. 3: 155-166.
- Berjak P, Walker M, Watt MP, Mycock DJ. 1999. Experimental parameters underlying failure or success in plant germplasm conservation: A case study on zygotic axes of *Quercus robur* L. Cryo-Letters 20: 351-262.
- Chandel KP, Chaudhury R, Radhamani J, Malik SK. 1995. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit. Ann. Bot. 76: 443-450.
- Chin HF, Krishnapillay B. 1989. Cryogenic storage of some horticultural species. Acta Hort. 253: 107-112.
- Choi YE, Jeong JH. 2002. Dormancy induction of somatic embryos of Siberian ginseng by high sucrose concentrations enhances the conservation of hydrated artificial seeds and dehydration resistance. Plant Cell Rep. 20: 1112-1116.
- Choi YE, Yang DC, Yoon ES, Choi KT. 1999. High-efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis from preplasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos. Plant Cell Rep. 18: 493-499.
- Coleman CI, Hebert JH, Reddy P. 2003. The effects of *Panax ginseng* on quality of life. J. Clin. Pharm. Ther. 28: 5-15.
- Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. Science 223: 701-703.
- Das Bhowmik SS, Kumaria S, Tandon P. 2011. Long-term conservation through cryopreservation of immature seed of *Mantisia spathulata* and *Mantisia wengeri*; two endangered plants of north-east India. CryoLetters 32: 498-505.
- Dickie JB, Ellis RH, Kraak HL, Ryder K, Tompsett PB. 1990. Temperature and seed storage longevity. Ann. Bot. 65: 197-204.
- Ellis RH, Hong TD. 2006. Temperature sensitivity of the low-moisture-content limit to negative seed longevity-moisture content relationships in hermetic storage. Ann. Bot. 97: 785-791.
- Ellis JM, Reddy P. 2002. Effects of *Panax ginseng* on quality of life. Ann. Pharmacother 36: 375-379.
- Engelmann F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 40: 427-433.
- Farrant JM, Berjak P, Pammenter NW. 1986. The increasing desiccation sensitivity of recalcitrant *Avicennia marina* seeds with storage time. Physiologia Plantarum 67: 291-298.
- Fassil H and Engels J. 1997. Seed conservation research: IPGRI's strategies and activities. Vol. 2 No. 9 - December 1997.
- Fatima S, Mujib A, Nasim SA, Siddiqui ZH. 2009. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions of *Catharanthus roseus* L. (G) Don. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 98: 1-9.
- Finch-Savage WE. 1992. Embryo water status and survival in the recalcitrant species *Quercus robur* L.: Evidence for a critical moisture content. J. Exp. Bot. 43: 663-669.
- Gray DJ, McColley DW, Michael EC. 1993. High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of

- Cucumis melo* cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118: 425-432.
22. Hong TD, Ellis RH, Tam BN, Le Tam VT. 2005. Effects of desiccation on seed germination, cracking, fungal infection and survival in storage of *Sterculia foetida* L. Seed Sci. Technol. 33: 705-712.
 23. Hong TD, Ellis RH. 1996. A protocol to determine seed storage behavior. International Plant Genetic Resources Institute. pp.21-27.
 24. Kim YH, Ahn IO, Khan AL, Kamran M, Waqas M, Lee JS, Kim DH, Jang SW, Lee IJ. 2014. Regulation of endogenous gibberellins and abscisic acid levels during different seed collection periods in *Panax ginseng*. Hort. Environ. Biotechnol. 55: 166-174.
 25. Kim HH, Lee JH, Shin DJ, Ko HC, Hwang HS, Kim T, Cho EG, Engelmann F. 2008. Desiccation sensitivity and cryopreservation of Korean ginseng seeds. CryoLetters 29: 419-426.
 26. King MW, Roberts EH. 1980. Maintenance of recalcitrant seeds in storage. In Recalcitrant crop seeds. Chin HF & Roberts EH (eds). Kuala Lumpur. Tropical Press. SDM. BHD. pp.53-89.
 27. Kwon WS, Lee JH, Lee MG. 2001. Optimum chilling terms for germination of the dehisced ginseng seeds *Panax ginseng* C.A. Meyer. J. Ginseng Res. 25: 167-170.
 28. Lasseran JC. 1988. The Aeration of grains and the measurement of grain temperature in storage bins (Silo-Thermometry). In preservation and storage of grains, seeds and their by-products, trans. New York: Lavoisier Publishing, pp.664-748.
 29. Lee MK, Jung CM, Lee JH, Jung YY, Kang JY, Kim MS, Choi KT. 1995. In Annual Report of Korean Ginseng and Tobacco Research Institute. KT&G. pp.341-417.
 30. Lee JH, Lee SS, Ahn IO, Kang JY, Lee MG. 2004. Relationship between storage periods and germination ability of Dehisced seeds of *Panax ginseng* C.A. Meyer. J. Ginseng Res. 28: 215-218.
 31. Leon-Lobos P and Ellis RH. 2005. Seed survival in *Chilean nothofagus* in response to desiccation and storage. Seed Sci. Res. 15: 113-123.
 32. Leopold AC, Vertucci CW. 1989. Moisture as a regulator of physiological reaction in seed moisture content. CSSA Special Publication. No 14. Stanwood PC & McDonald MB (eds). Crop Science Society of America. Madison. WI. USA. pp.51-67.
 33. Leprince O, Harren FJM, Buitink J, Alberda M, Hoekstra FA. 2000. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. Plant Physiol. 122: 597-608.
 34. Miranda M, Vega-Gálvez A, López J, Parada G, Sanders M, Aranda M, Uribe E, Scala KD. 2010. Impact of air-drying temperature on nutritional properties, total phenolic content and antioxidant capacity of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) Indus. Crops Prod. 32: 258-263.
 35. Nagel M, Börner A. 2009. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. Seed Sci. Res. 20: 1-12.
 36. Pammenter NW, Vertucci CW, Berjak P. 1991. Homeohydrous (recalcitrant) seeds: dehydration, the state of water and viability characteristics in *Landolphia kirkii*. Plant Physiol. 96: 1093-1098.
 37. Pence VC. 1992. Desiccation and the survival of *Aesculus*, *Castanea*, and *Quercus* embryo axes through cryopreservation. Cryobiology 29: 391-339.
 38. Pence VC. 1995. Cryopreservation of recalcitrant seeds. In Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 32. Bajaj YPS (ed). Cryopreservation of plant germplasm I. Berlin. Heidelberg. Springer-Verlag. pp.29-50.
 39. Pritchard HW, Prendergast FG. 1986. Effects of desiccation and cryopreservation on the *in vitro* viability of the recalcitrant seed species *Araucaria hunstenii* K. Schum. J. Exp. Bot. 37: 1388-1397.
 40. Rajashekar CB, Burke M. 1996. Freezing characteristics of rigid plant tissues: development of cell tension during extracellular freezing. Plant Physiol. 111: 597-603.
 41. Rajametov ShN, Kim YC, Yi JY, Lee YY, Jeon YA, Lee HS etc. 2014. Effect of temperature and gibberellin treatment on germination rate, development of radicle and epicotyle of Korean ginseng seeds. Abstracts of conference on 'Improvement of Crop Productivity Response to Climate Change' of the Korean Society of Crop Science. Korean J. Crop Sci. p.256.
 42. Roberts EH. 1979. Seed deterioration and loss of viability. Adv. Res. Technol. Seeds 4: 25-42.
 43. Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Rep. 9: 30-33.
 44. Sanderson DB, Muir WE, Shina RN, Tuma D, Kitson CI. 1989. Evaluation of a model of drying and deterioration of stored wheat at near-ambient conditions. J. Agric. Eng.

- Res. 42: 219-233.
45. Sparks Jed P, Gaylon S, Campbell R, Black A. 2001. Water content, hydraulic conductivity and ice formation in winter stems of *Pinus contorta*: a TDR case study. *Oecologia* 127: 468-475.
 46. Stanwood PC. 1985. In Cryopreservation of plant cells and organs. Kartha KK (ed). CRC Press. pp.199-226.
 47. Senaratna T, McKersie BD. 1986. Loss of desiccation tolerance during seed germination: a free radical mechanism of injury. In Membranes, metabolism and dry organisms. Leopold AC (ed). Ithaca: Cornell University Press. pp.85-101.
 48. Tompsett PB, Pritchard HW. 1993. Water status changes during development in relation to germination and desiccation tolerance of *Aesculus hippocastanum* L. seeds. *Ann. Bot.* 71: 107-116.
 49. Vertucci CW. 1989 The effects of low water contents on physiological activities of seeds. *Physiol. Plant.* 77: 172-176.
 50. Vertucci CW, Roos EE. 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiol.* 94: 1019-1023.
 51. Walters C. 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci. Res.* 8: 223-244.
 52. Walters C, Pammenter NW, Berjak P, Crane J. 2001. Desiccation damage: 'Accelerated aging' and metabolism in desiccation tolerant and sensitive seeds. *Seed Sci. Res.* 11: 135-148.
 53. Wesley-Smith J, Vertucci CW, Berjak P, Pammenter NW, Crane J. 1992. Cryopreservation of desiccation sensitive axes of *Camellia sinensis* in relation to dehydration, freezing rate and the thermal properties of tissue water. *J. Plant Physiol.* 140: 596-604.
 54. Wesley-Smith A, Pammenter NW, Berjak P, Walters C. 2001. The effects of two drying rates on the desiccation tolerance of embryonic axes of recalcitrant jackfruit (*Artocarpus Heterophyllus* Lamk.) seeds. *Ann. Bot.* 88: 653-664.
 55. Yi JY, Lee GA, Chung JW, Lee SY, Lim KB. 2013. Efficient cryopreservation of *Lilium* spp. shoot tips using droplet-vitrification. *Plant Breed. Biotech.* 1: 131-136.
 56. Yoon JW, Kim HH, Lee JH, Choi JK, Lee SS, Choi YM, Kim TS. 2005. Optimal Desiccation condition and moisture content of dehisced seeds of Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) for cryopreservation. *Korean J. Crop Sci.* 50: 406-410.