

꼬리고사리과(*Aspleniaceae*) 양치식물 3종 전엽체의 기내배양에 미치는 배지구성물질의 영향

정진아, 이철희*
충북대학교 원예과학과

Effect of Medium Composition on *In vitro* Prothallus Culture of 3 Fern Species in the Family Aspleniaceae

Jin-A Jeong and Cheol Hee Lee*

Dept. of Horticultural Science, Chungbuk National Univ., Cheongju,
361-763, Korea

Abstract - This experiment was conducted to investigate the effects of medium composition, physical condition and growth regulators on prothallus proliferation in 3 fern species belonging to Aspleniaceae (*Asplenium incisum*, *Camptosorus sibiricus* and *Phyllitis scolopendrium*). In all of the 3 species, the effective medium for prothallus proliferation was Murashige and Skoog's basal medium with 1% sucrose and pH 5.8. The optimum $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ concentration ratio of prothallus proliferation was 20:40mM (1:2 ratio) in *A. incisum* and *P. scolopendrium* and 30:30mM (1:1 ratio) in *C. sibiricus*. However, agar content of medium did not affect the rate of prothallus proliferation. Among the selected 6 kinds of growth regulators (NAA, IAA, 2,4-D, BAP, kinetin and 2ip), cytokinins generally has a promotive effect, but auxins showed an inhibitory effect on prothallus growth.

Key words - *Asplenium incisum*, *Camptosorus sibiricus*, *Phyllitis scolopendrium*, Media composition, Proliferation

서 언

일찍이 양치식물의 전엽체를 기내배양하여 식물체를 대량생산하기 위한 방법들이 연구되어왔는데, *Asplenium nidus*, *Blechnum spicant*, *Dryopteris affinis*, *Pteris ensiformis* 및 *Woodwardia virginica* 등과 같은 양치식물의 경우 MS기본배지처럼 무기영양물질이 풍부한 조건에서 생장이 양호한 것으로 밝혀졌다(Fernandez *et al.*, 1993; 1996; 1997b; 1997c). 그러나 *Osmunda regalis*의 전엽체는 Knop배지처럼 영양물질의 함량이 상대적으로 낮은 배지에서 생장이 촉진되는 것으로 보고되었다(Fernandez *et al.*, 1997a). 또한 대부분의 양치식물은 배지에 sucrose를 첨가함으로써 전엽체의 생장이 촉진되었으나(Fernandez, 1997c; Jin, 1999), *Osmunda regalis*의 전엽체는 sucrose가 첨가되지 않은 배지에서도 양호한 생장을 보여 기내에서 독립영양식물(autotroph)인 것으로 추정되었다(Fernandez *et al.*, 1997a).

이와 같이 전엽체 생장에 적합한 배지의 영양조건은 양치식물의

종에 따라 다소 다른 것으로 알려져 있으며, 그러므로 각각의 종에 따른 적정 배양 조건을 구명할 필요성이 있는 것으로 판단되었다.

꼬리고사리과(Aspleniaceae)에 속하는 꼬리고사리(*Asplenium incisum* Thunb.), 거미고사리(*Camptosorus sibiricus* Rupr.), 변산일엽(*Phyllitis scolopendrium*(L.) Newm.)은 형태 및 생활상이 독특하여 관상식물로서의 개발가능성이 높은 식물들이다. 꼬리고사리와 거미고사리는 각각 10~30cm 및 7~15cm의 소형 양치식물로서(Jones, 1987; Pak, 1961), 바위 위의 얇은 흙을 좋아하여 바위정원(rockery)의 소재로 활용되고 있다. 특히 거미고사리는 상록성 양치식물로서 잎 몸이 위쪽으로 올라갈수록 좁아져서 실마리와 같은 형태를 지니는데, 그 끝에 새로운 식물이 될 수 있는 눈(芽)이 붙어 있는 특징을 지니고 있다. 이들은 우리나라의 전국에 걸쳐 분포하며, 일본, 중국 등에도 자생하는데, 거미고사리의 경우에는 주로 석회암 또는 바위지대에서 발견된다(Pak, 1961). 변산일엽은 20~60cm 크기의 식물로서 전 세계적으로 이미 백여 개의 원예품종이 개발되어 있을 만큼 인기 있는 관상식물 중 하나이

*교신저자(E-mail) : leech@chungbuk.ac.kr

다(Jones, 1987). 변산일엽의 잎은 좁은 피침형이거나 넓은 피침형으로 기부에 둥근 귀가 있어 심장형을 이루며 잎의 가장자리에 물결모양이 진다. 제주도, 울릉도를 비롯해 변산반도 산지의 음습한 곳에서 자생하며, 일본을 비롯한 아시아, 유럽, 북아메리카에 분포하고 있다(Pak, 1961).

본 연구는 전엽체 배양을 이용하여 꼬리고사리, 거미고사리 및 변산일엽의 효율적인 대량번식체계를 확립하고자, 기내에서 배지의 무기물 및 비타민 농도, 질소급원의 비율, 당농도, pH, agar 함량 그리고 생장조절물질의 종류 및 농도가 전엽체 생장에 미치는 영향을 구명하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

꼬리고사리, 거미고사리 및 변산일엽의 포자는 충북대학교 원예학과 포장에서 재배중인 식물체로부터 채취하였다. 포자를 무균 발아 시키기 위하여 포자에 증류수를 첨가한 후 2시간동안 진탕배양(100rpm)하여 수분을 충분히 흡수시키고, sieve(65 μ m)로 거른 후 15ml 튜브로 옮겨 원심분리(2,500rpm, 3분)하였다. 모아진 포자에 1% sodium hypochlorite를 첨가하고 15분간 살균한 후 멸균수로 3회 세척하였다. 그리고 포자에 적당량의 멸균수를 첨가하여 MS기본배지(Murashige and Skoog, 1962)에 접종하였다. 배양 후 약 30일 만에 전엽체를 얻을 수 있었으며, 이를 한두 달 간격으로 동일 배지에 계대배양하여 증식시켰다.

전엽체 배양의 적정조건을 찾기 위한 이후의 모든 실험에서 전엽체는 메스로 곱게 다진 후 100mg씩 나누어 30ml의 실험배지에 처리 당 4반복으로 접종하여 배양하였으며, 배양온도는 25 \pm 1 $^{\circ}$ C였고, 3,000lux로 16시간 조명하였다.

전엽체 증식에 적합한 배지의 무기물 및 비타민 농도를 구하기 위하여, MS기본배지의 무기물 및 비타민 농도를 1/4, 1/2, 1 및 2배로 조절된 배지와 Hyponex 배지 등 5종을 사용하여 실험하였다. 배지 내 주요 조성물질의 농도와 배지의 물리적 상태가 전엽체의 증식에 미치는 영향을 구명하기 위한 이하 실험에서는 1% sucrose(sucrose 농도 실험 제외), 0.8% agar(agar 농도 실험 제외), pH 5.8(pH 실험 제외)의 MS배지를 기본배지로 사용하였다. 질소급원의 농도비는 NH₄⁺:NO₃⁻=60:0, 50:10, 40:20, 30:30, 20:40, 10:50 및 0:60mM로 각각 조절하였으며, sucrose의 농도는 0, 1, 2, 3, 및 4%로 달리 첨가하여 실험하였다. Agar의 농도는 0, 0.2, 0.4, 0.6 및 0.8%, 그리고 pH는 3.8, 4.8, 5.8, 6.8 및 7.8로 각각 조절하여 실험하였다. 생장조절물질 처리실험은 NAA, IAA, 2,4-D, BAP, kinetin 및 2ip를 각각 0~20 μ M의 농도수준으로 단용 처리하여 전엽체를 배양하였다. 모든 실험에서 배양기간은 12주였으며, 각각의 처리구에서 생체중을 조사하였다.

결과 및 고찰

배지의 종류에 따른 영향

MS기본배지의 무기물 및 비타민 농도를 1/4~2배로 조절한 4종의 배지와 Hyponex배지에서 꼬리고사리, 거미고사리 및 변산일엽의 전엽체를 배양한 결과는 Fig.1과 같았다.

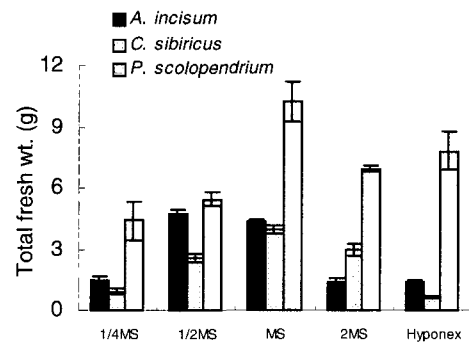


Fig. 1. Effect of culture media on proliferation of prothallus. Bar indicate standard error.

꼬리고사리에서 전엽체의 증식률은 1/2MS 및 MS배지에서 다른 처리구에 비하여 월등히 높았는데, 1/2MS배지에서 발달된 전엽체는 MS배지에 비하여 다소 얇고 밝은 녹색을 띄었다. 거미고사리의 전엽체는 MS배지에서 생장이 가장 양호하였으며, 그 보다 무기물의 농도가 낮거나 높으면 생체중이 1/3배 정도로 감소하였다. 변산일엽의 전엽체 역시 MS배지에서 생체중 증가율이 가장 컸으며 2MS배지와 Hyponex배지에서도 비교적 양호하였다.

이처럼 꼬리고사리, 거미고사리 및 변산일엽 모두 MS기본배지의 무기물 및 비타민 농도에서 전엽체의 생장이 가장 양호함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 봉의꼬리, 석위, *Blechnum spicant*, *Asplenium nidus*, *Dryopteris affinis*, *Pteris ensiformis* 및 *Woodwardia virginica*(Jin, 1999; Fernandez *et al.*, 1997c; Fernandez and Revilla, 2003) 등에서 보고된 결과와 유사한 것이었다.

전엽체의 형태형성 역시 배지의 종류에 따라 차이를 보였는데, MS배지에서는 온전한 심장형의 녹색 전엽체가 발달된 데 반해, Hyponex배지에서는 1/4MS배지에서처럼 전엽체가 황록색을 띄었으며, 2MS배지에서 성장한 전엽체는 짙은 녹색의 작고 잘 부스러지는 알갱이 모양의 세포 덩어리 조직을 생성하였다(Fig. 2). 일찍이 Steeves *et al.*(1955)은 Bracken의 전엽체 배양에서 배지 내 무기물성분의 변화가 전엽체의 증식속도는 물론 형태형성에도 중요한 영향을 미친다고 제기한 바 있다

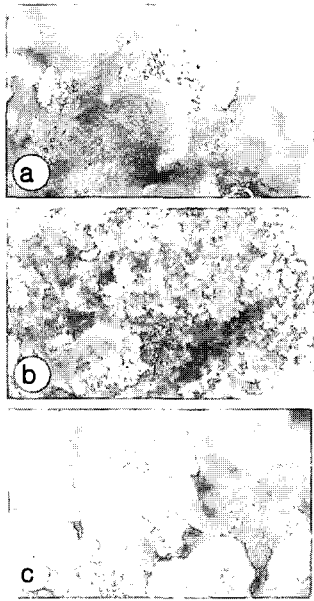


Fig. 2. Prothalli of *P. scolopendrium* grown on different culture media. (a) MS basal medium, (b) Two-fold MS medium, (c) Hyponex medium.

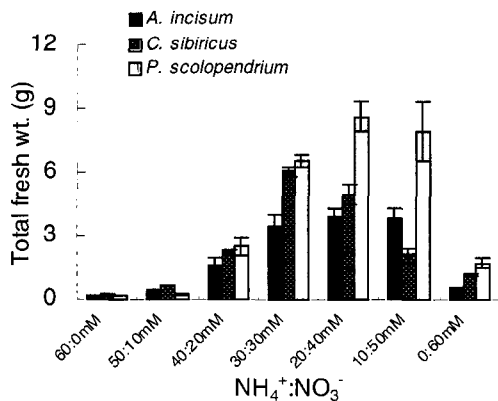


Fig. 3. Effect of ratio of nitrogen source on proliferation of prothallus. Bar indicate standard error.

질소급원의 농도비에 의한 영향

배지 내의 암모니아태질소와 질산태질소 농도의 비율을 달리하여 3종의 전엽체를 배양한 결과, 꼬리고사리는 NH₄⁺:NO₃⁻가 20:40mM인 배지에서 생체중 3.91g으로 전엽체의 생육이 가장 양호하였고, 10:50mM인 배지와 30:30mM인 배지에서도 비교적 활발한 생장을 보였다. 거미고사리는 NH₄⁺:NO₃⁻가 30:30mM인 배지에서 생체중 6.09g으로 전엽체의 증식률이 가장 높았으며, 20:40mM의 처리에서도 비교적 전엽체의 생장이 양호하였다. 그러나 그 밖의 처리구에서는 생체중이 0.93~2.23g으로 증식률이 낮게 조사되었다. 변산일엽의 전엽체는 NH₄⁺:NO₃⁻가 20:40mM

인 처리구에서 생체중이 8.66g으로 가장 높았고, NH₄⁺:NO₃⁻가 10:50mM인 배지에서도 7.93g으로 전엽체 생장이 비교적 양호하였다(Fig. 3).

앞서 부싯깃고사리 또한 NH₄⁺:NO₃⁻의 농도비가 20:40mM인 처리구와 30:30mM인 처리구에서 전엽체의 생장이 비교적 활발하였다고 보고된 바 있는데(Jin, 1999), 대부분의 양치식물들은 NH₄⁺:NO₃⁻가 20:40mM 혹은 30:30mM의 일정한 비율로 모두 첨가된 배지에서 전엽체의 생장이 촉진되는 것으로 판단되었다.

Sucrose 농도의 영향

배지의 sucrose 농도를 0~4%로 달리하여 3종의 전엽체를 배양한 결과, 종에 관계없이 전엽체의 증식률은 무처리구에 비하여 3~4%의 처리구에서 8배 이상 증가하였다(Fig. 4). 개고비, 봉의꼬리, 석위(Jin, 1999), 및 *Blechnum spicant*(Fernandez *et al.*, 1997c)의 전엽체 역시 본 실험결과와 마찬가지로 2~4%의 sucrose 첨가에 의하여 생체중이 현저히 증가하였다고 보고되었다.

그러나 전엽체의 형태형성을 관찰한 결과, sucrose가 2% 이상 첨가된 배지에서는 흐린 녹색의 작고 두터운 전엽체가 발달되어 비정상적인 성장반응을 보였고, 특히 3% 이상 고농도에서는 일부 조직이 갈변되었다. 그러므로 양치식물의 전엽체 배양에서 적정 sucrose 농도는 1~2%인 것으로 판단되었다.

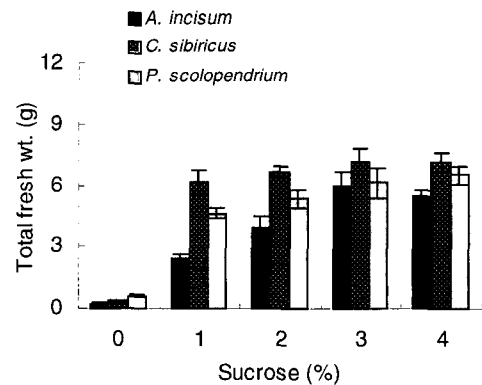


Fig. 4. Effect of sucrose on proliferation of prothallus. Bar indicate standard error.

pH에 따른 영향

실험배지의 pH를 3.8~7.8로 달리하여 3종의 전엽체를 배양한 결과, pH 3.8~5.8의 산성 및 약산성 배지에서 전엽체의 생장이 전반적으로 활발하였다. 이들 처리구에서 생체중은 꼬리고사리의 경우 3.12~3.18g이었고, 거미고사리는 3.10~4.13g, 그리고 변산일엽은 6.00~6.71g이었다. 반면, pH 7.8의 약알칼리성 배지에서는 증식률이 절반 이상 감소되거나 거의 성장하지 못했다(Fig. 5).

Platyserium bifurcatum(Camloh and Gogala, 1992)의 전엽

체 역시 이와 유사하게 pH 5.5에서 생장이 가장 양호한 것으로 보고된 반면, *Blechnum spicant*(Fernandez *et al.*, 1997c) 및 *Asplenium nidus*(Fernandez *et al.*, 1997b)의 전엽체는 pH 4.7~8.7의 범위에서 생장에 차이를 보이지 않았다고 하였다. 그러므로 양치식물의 종에 따라서 전엽체 배양에 적합한 배지의 pH는 다소 다른 것을 알 수 있었다.

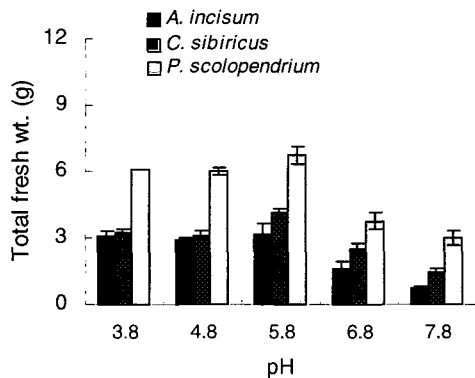


Fig. 5. Effect of pH on proliferation of prothallus. Bar indicate standard error.

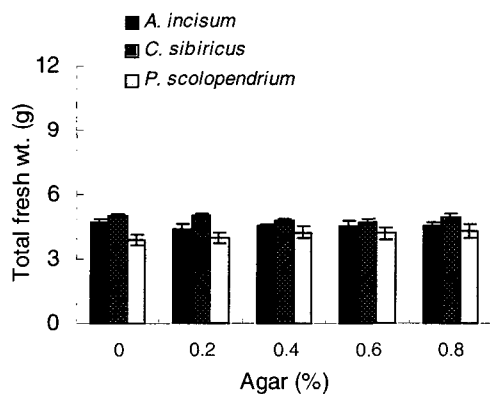


Fig. 6. Effect of agar on proliferation of prothallus. Bar indicate standard error.

Agar 첨가량의 영향

많은 연구결과에서 배지 내에 첨가된 agar 농도가 높아질수록 전엽체의 생장이 억제되었다고 보고되었으나(Calmloh and Gogala, 1992; Douglas and Sheffield, 1990; Fernandez *et al.*, 1997c; Thentz and Moncousin, 1984), 꼬리고사리를 비롯한 3종의 양치식물들은 0~0.8%의 agar 농도 범위에서 전엽체의 생장에 별다른 차이를 보이지 않았다(Fig. 6). 다만 0~0.2%의 액체배지 속에 잠긴 채 성장한 전엽체는 과도한 수분으로 인해 유리질화되는 경향을 보였고, 0.4% 이상의 agar가 첨가된 처리구에서는

반고체배지 및 고체배지 위에서 전엽체가 덩어리를 이루며 증식하였다.

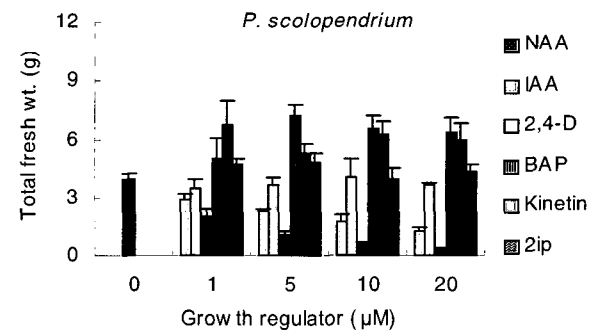
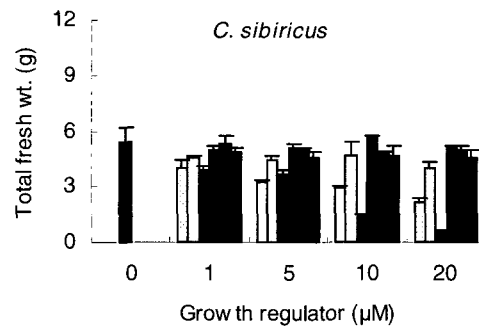
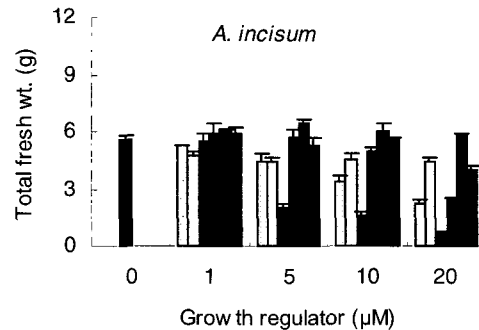


Fig. 7. Effect of growth regulators on proliferation of prothallus. Bar indicate standard error.

생장조절물질의 영향

6종의 성장조절물질(NAA, IAA, 2,4-D, BAP, kinetin 및 2ip)을 각각 0~20μ M의 농도수준으로 배지에 달리 첨가하여 3종의 전엽체를 배양한 결과 시토키닌류 처리구에서는 다소 성장촉진효과가 관찰된 반면 옥신류 처리구에서는 전반적으로 성장억제효과가 나타났다(Fig. 7).

꼬리고사리는 kinetin 처리구와 5μ M 이하의 BAP 및 2ip 처리구에서 전엽체의 증식률이 무처리와 유사하거나 미미하게 향상되

적 요

본 실험은 꼬리고사리과에 속하는 3종의 양치식물들(꼬리고사리, 거미고사리 및 변산일엽)에서 배지의 조성물질과 물리적 조건 및 성장조절물질이 전엽체 생장에 미치는 영향을 구명하기 위하여 수행하였다. 3종 모두에서 전엽체 배양에 적합한 배지는 MS배지로 확인되었다. 배지 내 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 의 적정 농도비율은 꼬리고사리와 변산일엽의 경우 20:40mM(1:2 비율) 이었으며, 거미고사리는 30:30mM(1:1 비율) 이었다. 전엽체 생장에 적합한 당 농도는 1~2%였으며, pH는 3.8~5.8이었다. 배지에 첨가된 agar 농도는 전엽체 생장에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 6종의 성장조절물질(NAA, IAA, 2,4-D, BAP, kinetin 및 2ip)을 배지에 첨가하여 3종의 전엽체를 배양한 결과, 시토키닌류의 경우 생장촉진효과가 관찰되었으나 옥신류는 농도가 높아질수록 전엽체의 생장을 저해하는 것으로 확인되었다.

사 사

본 연구는 산업자원부 · 한국산업기술평가원 지원의 지역협력연구센터인 충북대학교 생물건강산업개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

인용문헌

- Camloha, M. and N. Gogala. 1992. *In vitro* culture of *Platyserium bifurcatum* gametophytes. *Sci. Hort.* 51: 343-346.
- Douglas G.E. and E. Sheffield. 1990. A new technique for the culture of fern gametophytes. *Plant Cell Rep.* 8: 632-634.
- Fernandez, H., A.M. Bertrand and R. Sanchez-Tames. 1993. *In vitro* regeneration of *Asplenium nidus* L. from gametophytic and sporophytic tissue. *Sci. Hort.* 56: 71-77.
- Fernandez, H., A.M. Bertrand and R. Sanchez-Tames. 1996. Influence of tissue culture conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* sp. *affinis* *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 45(1): 93-97.
- Fernandez, H., A.M. Bertrand and R. Sanchez-Tames. 1997a. Gemmation in *Osmunda regalis* L. gametophyte cultured *In vitro*. *Plant Cell Rep.* 16: 358-362.
- Fernandez, H., A.M. Bertrand and R. Sanchez-Tames, 1997b. Plantlet regeneration in *Asplenium nidus* L. and *Pteris ensiformis* L. by homogenization of BAP treated rhizomes. *Sci. Hort.* 68: 234-247.
- Fernandez, H., A.M. Bertrand, I. Feito and R. Sanchez-Tames.

었다. 거미고사리는 BAP 10 μ M 처리구에서 무처리구에 비해 전엽체의 증식이 다소 향상된 것으로 조사되었으며, 그 외의 BAP 처리구와 kinetin 및 2ip 처리구에서는 무처리구와 별다른 차이를 보이지 않았다. 변산일엽의 전엽체는 꼬리고사리와 거미고사리에 비하여 시토키닌류 첨가구에서 전엽체의 증식이 현저히 촉진되었는데, 특히 BAP 5 μ M 처리구와 kinetin 1 μ M 처리구에서 가장 양호한 결과를 보였다. 반면 3종의 옥신 처리구에서는 농도가 높아질수록 전엽체의 증식률이 감소되는 양상을 보였으며, 이는 2,4-D 처리구에서 가장 뚜렷하게 나타났다.

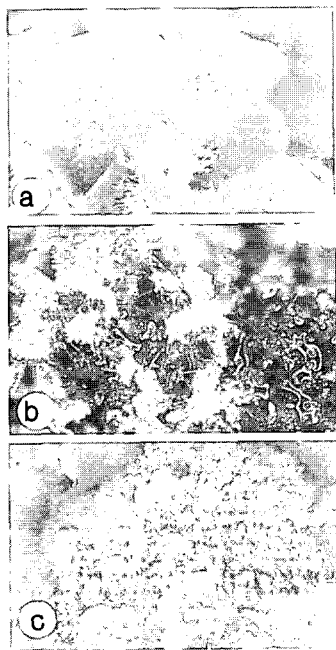


Fig. 8. Growth responses of prothallus after 12 weeks *In vitro* culture. (a) *A. incisum* on growth regulator free medium, (b) *C. sibiricus* on medium with 10 μ M NAA, (c) *A. incisum* on medium with 10 μ M BAP.

성장조절물질의 처리는 전엽체의 증식속도뿐만 아니라 형태 형성에도 많은 영향을 미치는 것으로 관찰되었는데, 거미고사리의 전엽체는 고농도의 NAA가 처리된 배지에서 짙은 녹색의 쉽게 부스러지는 알갱이를 형성하였고 일부는 괴사하였다(Fig. 8). 또한 고농도(10~20 μ M)의 성장조절물질이 처리된 대부분의 배지에서는 필라멘트형의 어린 전엽체가 많이 관찰되었고, 저농도(1~5 μ M)의 2,4-D 처리구에서는 캘러스 유사형태가 나타났다.

이상의 실험결과에 의하면 꼬리고사리과 식물의 경우 저농도의 시토키닌류 처리에 의하여 전엽체의 생장을 촉진시킬 수 있는 것으로 생각되며, 그러나 고농도의 시토키닌류나 옥신류의 성장조절물질은 전엽체의 정상적인 발달과정을 지체시키거나 저해시키는 것으로 판단되었다.

- 1997c. Gametophyte culture *In vitro* and antheridiogen activity in *Blenchum spicant*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 50(1): 71-74.
- Fernandez, H., A.M. Bertrand and R. Sanchez-Tames. 1999. Biological and nutritional aspects in fern multiplication. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 56: 211-214.
- Fernandez, H. and M.A. Revilla. 2003. *In vitro* culture of ornamental ferns. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 73: 1-13.
- Jin, Y.H. 1999. Masspropagation of pteridophyta native to Korea by tissue culture. M.S. Thesis, Chungbuk National Univ. pp. 1-62.
- Jones, D.L. 1987. Encyclopedia of ferns. Timer press, Portland.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Pysiol. plant. 1: 474-497.
- Pak, M.K. 1961. Flora of Korean Pteridophyta. Kyohakdoso Co., Seoul.
- Steeves, T.A., I.M. Sussex and C.R. Partanen. 1955. *In vitro* studies on abnormal growth of prothalli of the Blecken fern. Amer. J. Bot. 42: 232-245.

(접수일 2006.1.10 ; 수락일 2006.3.22)