

기내배양에서 도깨비고비와 참쇠고비의 전엽체 형태형성

정진아, 이철희*

충북대학교 원예과학과 and 생물건강산업개발연구센터

Prothallus Morphogenesis of *Cyrtomium falcatum* (L.) Presl and *Cyrtomium caryotideum* var. *coreanum* Nakai In vitro Culture

Jin-A Jeong and Cheol Hee Lee*

Dept. of Horticultural Science and Research Center for Bioresource and Health,
Chungbuk National University Cheongju, 361-763, Korea

Abstract - The gametophytes of *Cyrtomium falcatum* and *Cyrtomium caryotideum* var. *coreanum* arising from spores were mechanically homogenized and cultured *In vitro*, to study their gametophyte ontogeny and sporophyte development. Homogenized gametophytic tissues formed as one-dimensional filaments after 2 weeks in culture and then grew into blanched gametophytes after 4 weeks. After 6 weeks, which were developed to two dimensional plates with apical notch and meristem in central zone. After 8 weeks in culture, apomictic buds were formed on the midribs without archegonium formation and these buds developed to sporophytes after 10 weeks in culture. Flow cytometric analysis of gametophytes and apomictic sporophytes revealed that both forms had the same ploidy level in *C. falcatum* and *C. caryotideum* var. *coreanum*, respectively. This is to certify that *C. caryotideum* var. *coreanum* was an apomictic fern as well as *C. falcatum*.

Key words - Gametophyte ontogeny, Homogenized, Apomictic fern

서 언

면마과(Dryopteridaceae)에 속하는 도깨비고비(*Cyrtomium falcatum*)와 참쇠고비(*Cyrtomium caryotideum* var. *coreanum*)는 끝이 낮처럼 굽은 독특한 잎 모양을 지니고 있으며, 곧게 뻗은 줄기가 풍성하고 아름다워 관상용으로의 개발가치가 높다 (Jones, 1987; Pak, 1961).

양치식물은 그들이 생성하는 포자의 형태에 따라서 동형포자형(homosporous)과 이형포자형(heterosporous)으로 나뉘는데, 동형포자형은 동일한 크기를 지닌 한 종류의 포자를 생성하며, 이형포자형은 크기가 서로 다른 소포자(microspore)와 대포자(megaspore) 두 종류를 생성한다. 이때 이형포자형 양치식물의 소포자에서는 양성(male) 배우체와 정자가 발달되고 대포자에서는 자성(female) 배우체와 난자가 발달된다. 반면, 동형포자형 양치식물의 포자는 난자와 정자를 모두 생성하는 양성(bisexual) 배우체를 발달시키는데(Bold *et al.*, 1987), 도깨비고비와 참쇠고비는 후자에 속한다.

동형포자형 포자에서 전엽체의 형태발달은 일반적으로 1) 발아, 2) 필라멘트(filament)형에서 주걱형(spatulate) 전엽체로의 전이, 3) v자형 정점(apical notch)이 발달된 심장형(cordiform) 전엽체의 형성, 4) 장란기 쿠션(archegonial cushion) 및 생식기관의 발달, 5) 전엽체의 노화에 따른 v자형 정점 및 장란기 쿠션의 퇴화와 같은 일련의 과정을 거친다(Rubin과 Paolillo, 1983). 장란기 쿠션이란 성숙한 전엽체의 중심부에서 발달되는 다세포 층 구조를 일컫는데 이는 또한 엽맥(vein), 주맥(midrib) 등으로 부르기도 하며, 그 나머지 전엽체의 테두리나 날개(wing) 부분은 단일세포 층으로 이루어져 있다(Shorina, 2001). 장정기(antheridium)와 장란기(archegonium)의 형성 및 발달은 보통 전엽체의 서로 다른 부분에서 이루어지며, 장정기는 전엽체의 크기와 상관없이 발견되는 반면 장란기의 형성은 장란기 쿠션이 발달된 성숙한 전엽체에서만 관찰되는 것으로 보고되고 있다(Emigh와 Farrar, 1977; Nester, 1985; Hickok *et al.*, 1987; Kazmierczak, 2003; Pangua *et al.*, 2003).

*교신저자(E-mail) : leech@chungbuk.ac.kr

기내에서 전엽체는 주로 무성아(gemmae)나 가지형성(branching) 등에 의하여 영양체적 재생을 하는 것으로 알려져 있다. 가지형성을 통한 증식의 경우 필라멘트형태의 가지가 다수 발달한 후 그로부터 이차원형태의 전엽체가 발달되는데 즉, 포자에서 전엽체가 발달되는 전형적인 과정과 유사한 방법으로 새로운 전엽체가 형성되는 것이다(Sheffield *et al.*, 1997). 무성아는 가근(rhizoid)의 시원세포로부터 분화되는데, 모체로부터 분리되어 새로운 개체로 발달하게 된다. 전엽체에서 무성아에 의한 재생은 기내환경에서뿐만 아니라 자생지에서도 이루어져, 포자체 없이 전엽체 군체만 존재하는 독특한 생태를 가능하게 만드는 것으로 알려져 있다(Sheffield와 Farrar, 1988).

앞서 *Woodwardia virginica* 및 *Dryopteris affinis* sp. *affinis*와 같은 양치식물에서 전엽체를 균질화하여 배양함으로써 단시일 내에 수많은 포자체를 생산하였다고 보고된 바 있다(Fernandez *et al.*, 1999). 도깨비고비와 참쇠고비 또한 전엽체를 균질화하여 배양함으로써 다량의 포자체를 증식시킬 수 있을 것으로 기대되고 있다.

본 연구는 도깨비고비와 참쇠고비의 전엽체에서 단일세포 또는 세포무리로부터 새로운 전엽체가 발생하는 과정과 포자체가 형성되는 과정을 배양기간에 따라 관찰함으로써 이들 전엽체의 기내배양생리를 구명하여, 이후 효율적인 번식체계를 확립하는데 기초자료로 제공하고자 실시하였다.

재료 및 방법

도깨비고비와 참쇠고비의 포자는 실험에 사용하기 전까지 4°C 저온고에서 보관하였다. 포자를 무균발아 시키기 위하여 포자에 증류수를 첨가한 후 2시간 동안 100rpm으로 진탕하여 수분을 충분히 흡수시키고, 65 μ m sieve로 거른 후 15ml 튜브로 옮겨 2,500rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 모아진 포자에 1% sodium hypochlorite를 첨가하고 15분간 살균한 후 멸균수로 3회 헹구어 주었다. 포자에 적당량의 멸균수를 첨가하여 MS기본배지(Murashige와 Skoog, 1962)에 치상하였다. 배양 후 약 20일 만에 전엽체를 얻을 수 있었으며, 이를 한두 달 간격으로 동일배지에 계대배양하여 증식시켰다.

균질화한 전엽체 조직에서 새로운 전엽체가 발생하는 과정을 알아보기 위하여, 각각의 전엽체를 메스로 곱게 다진 후 100mg 씩 MS 기본배지(sucrose 1%, agar 0.8%, pH 5.8)에 치상하여 배양하였다. 배양실 온도는 25 \pm 1°C였으며, 형광등을 이용하여 40 μ mol·m⁻²·s⁻¹로 16시간 조명하였다. 14주의 배양기간 동안에 2주일 간격으로 생체중을 조사하였고, 전엽체의 형태형성, 생식기관의 발달과정 및 포자체의 형성과정을 해부 현미경(Nikon SMZ-U, 일본)과 육안을 이용하여 관찰

하였다.

전엽체 및 포자체의 상대적인 DNA 함량을 측정하기 위하여 각각의 조직을 약 0.5 \times 0.5cm의 크기로 절취한 후, 0.5ml의 Partec HR-A 용액을 떨어뜨린 플라스틱 페트리디시에서 메스로 곱게 다지고 50 μ m nylon mesh로 거른 후, DAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole)가 함유된 Partec HR-B 용액을 첨가하여 DNA를 염색하고, Flow cytometer(Patec PA-1, 독일)를 이용하여 각각 세포의 DNA 함량을 측정하였다(Roux *et al.*, 2001).

결과 및 고찰

전엽체의 형태발달

메스로 곱게 다진 전엽체 배양물에는 단일세포를 비롯하여 수십 개의 세포로 이루어진 작은 절편과 백 개 이상의 세포로 이루어진 큰 절편 등이 혼재되어 있었다. 절편의 크기에 따라 각각의 재생 과정은 동시적이지 않았고, 또한 다른 양상을 보였기 때문에 전엽체의 발달과정을 일률적으로 특징짓기는 어려웠다. 그래서 10여 개 미만의 세포로 이루어진 작은 절편과 그 이상의 세포로 이루어진 큰 절편을 구분하여 관찰하였다.

도깨비고비의 경우 배양한 지 2주일이 지나자 10여 개의 세포가 일렬로 나열된 필라멘트형과 많은 세포로 이루어진 큰 절편들이 함께 관찰되었다(Fig. 1A, B). 각각에서 다수의 세포가 절반 고사하였고 소수가 생존해 있었는데, 활발한 재생은 관찰되지 않았다. 배양 4주일째에 나타난 가장 특징적인 양상은 많은 가지를 뻗은 형태의 전엽체였다(Fig. 1C, D). 이러한 가지형성은 기내배양 시 전엽체로부터 새로운 전엽체가 무성적으로 증식되는 가장 보편적인 방법 중 하나로 알려져 있다(Sheffield 등, 1997). 배양 6주일째에 이르러 성숙한 전엽체가 관찰되었는데, 이들은 단일세포 또는 세포 수가 10여 개 미만인 작은 절편에서 재생된 것이었다(Fig. 1E). 전엽체의 날개부분을 비롯한 전체 부위에서 다수의 장정기가 확인되었지만, 장란기는 발달되지 않았고, 대신 전엽체의 중심부분에 주변세포와는 다른 모양을 지닌 세포군이 발달되어 있었다(Fig. 1E, F). 이 세포군은 배양기간이 8주 이상 지나자 점점 도출되어 눈(芽)의 형태를 이루었고(Fig. 1G, H), 10주 후에는 포자체로 발달되었다(Fig. 1I). 도깨비고비의 전엽체와 장란기 없이 생성된 이들 포자체의 상대적인 DNA 양을 측정해 본 결과, ploidy level이 동일함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 도깨비고비는 무수정생식(apomixis)을 하는 전형적인 양치식물로 알려져 있는데(Lloyd와 Davis, 1994), 이처럼 본 실험에서도 균질화한 전엽체세포로부터 새로운 전엽체가 재생되고 장란기의 생성 없이 포자체가 발달됨을 확인할 수 있었다.

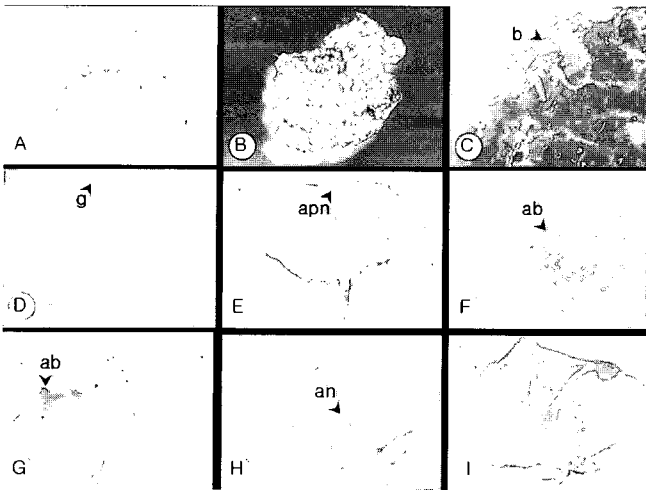


Fig. 1. Gametophyte ontogeny and sporophyte development from homogenized gametophytic tissues in *C. falcatum* for 10 weeks. (A), (B) after 2 weeks; (C), (D) 4 weeks; (E), (F) 6 weeks; (G), (H) 8 weeks; (I) 10 weeks. ab, apomictic bud; an, antheridia; apn, apical notch; b, branched; g, gemmae.

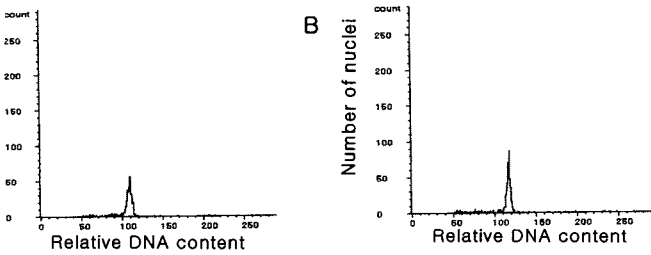


Fig. 2. DNA content of nuclei in *C. falcatum*. Histograms represent number of nuclei per unit of fluorescence intensity (arbitrary units). (A) Gametophytic tissues, (B) Sporophytic tissues.

참쇠고비의 균질화한 전엽체로부터 새로운 전엽체가 발달되는 과정은 도깨비고비와 매우 유사하였다. 배양 2주일째에 세포들이 일차원적으로 길게 늘어진 필라멘트형과 많은 세포로 이루어진 큰 절편들이 함께 관찰되었는데, 활발한 재생은 보이지 않았다 (Fig. 3A, B). 배양 4주일이 지나자 절편에서 수많은 가지형태가 발달되었다(Fig. 3C). 한편 상처가 있는 비정상적인 형태의 전엽체가 관찰되었는데, 이는 세포 수가 많은 큰 절편으로부터 형성된 것이었다(Fig. 3D). 세포 수가 적은 절편과는 달리 이들 큰 절편의 경우 가지형성이나 무성아 발달을 통한 영양체적 재생을 하는 대신 부피생장을 통하여 이러한 비정상적인 전엽체를 형성하는 경향이 높았다. 6주일의 배양기간이 지나자 성숙한 전엽체가 관찰되었는데, 도깨비고비와 마찬가지로 전엽체 중심부에서 작은 돌출부위가 확인되었다(Fig. 3E, F). 8주의 배양기간이 지나자 대부분의 전엽체에서 중심부에서 돌출부위가 관찰되었으며, 이

돌출부위가 정상적인 눈(芽)의 형태로 발달하지 못하고 전엽체 전체를 세로로 가로지르고 있는 비정상적인 형태도 출현하였다 (Fig. 3G). 배양 10주일째가 되자 전엽체에서 눈 형태가 더욱 돌출되었으며(Fig. 3H, I), 이후 점차 포자체로 발달하였다. 참쇠고비에서 전엽체와 장란기의 생성 없이 발달된 포자체의 상대적인 DNA 양을 분석한 결과, 도깨비고비와 마찬가지로 두 세대의 ploidy level이 동일함을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그러므로 참쇠고비 또한 배우자의 수정 없이 포자체가 형성되는 양치식물 종임을 알 수 있었다.

도깨비고비와 참쇠고비 모두에서 균질화한 전엽체를 배양한지 12~14주가 지나자 다수의 포자체가 발달되는 것을 육안으로도 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

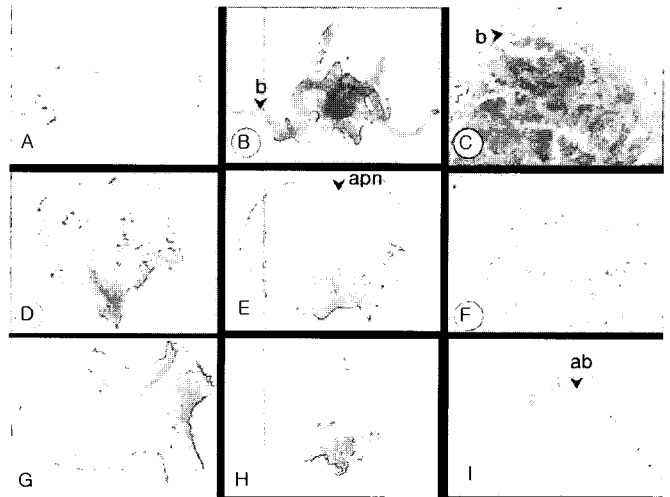


Fig. 3. Gametophyte ontogeny and sporophyte development from homogenized gametophytic tissues in *C. caryoptideum* var. *coreanum* for 10 weeks in culture. (A), (B) after 2 weeks; (C), (D) 4 weeks; (E), (F) 6 weeks, (G) 8 weeks; (H), (I) 10 weeks. ab, apomictic bud; apn, apical notch; b, branched.

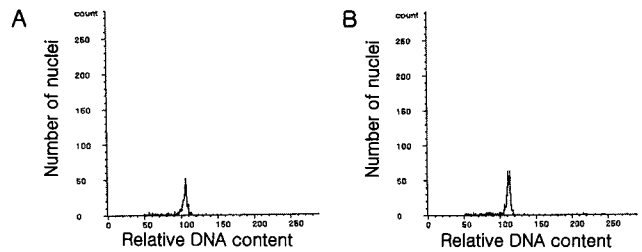


Fig. 4. DNA content of nuclei in *C. caryoptideum* var. *coreanum*. Histograms represent number of nuclei per unit of fluorescence intensity (arbitrary units). (A) Gametophytic tissues, (B) Sporophytic tissues.

양치식물 중에 약 10%는 무수정생식에 의하여 번식이 이루어지는 것으로 알려져 있는데, 도깨비고비와 참쇠고비에서처럼 장란기는 종 종 발달되지만 장란기는 형성되지 않고, 배우자의 수정 없이 직접 포자체가 유도되는 것으로 알려져 있다. *Polypodium dispersum*(Bold *et al.*, 1987), *Dryopteris affinis* sp. *affinis*(Fernandez *et al.*, 1996), *Dryopteris remota*(Schneller *et al.*, 1998), *Dryopteris nipponensis*(Ishikawa *et al.*, 2003) 등이 여기에 속하며, 또한 *Diplazium* 속 양치식물 중에서 삼배체성 식물의 일부가 무수정생식을 하는 것으로 보고되었다(Takamiya *et al.*, 1999).

양치식물의 이러한 무수정생식에는 두 가지 형태가 존재하는데, 그 하나는 감수분열을 하는 형태로 포원세포(archesporial cell)가 정상적으로 세 번의 분열을 하여 8개의 포자정모세포(sporocyte)를 생성하지만, 네 번째 분열에서 세포분열이 전기 혹은 중기에서 멈추어 원래 세포에 비하여 염색체의 수가 배가된 8개의 포자정모세포가 생성되는 것으로 알려져 있다. 이후 포자정모세포는 정상적인 감수분열을 하여 포자체와 염색체의 수가 동일한 포자를 생성하는데, 도깨비고비가 여기에 속한다. 또 다른 종류는 *Polypodium dispersum*처럼 포자체나 전엽체 모두에서 감수분열이 이루어지지 않음으로써 염색체의 수가 두 세대에서 동일하게 보존되는 형태이다(Bold *et al.*, 1987). 그 밖에 정상적으로 유성생식을 하는 양치식물 중에서도 건조한 자연조건이나(Bold *et al.*, 1987), 또는 기내 배양조건을 조절함으로써 무배생식을 유도할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Kuriyama와 Maeda, 1999).

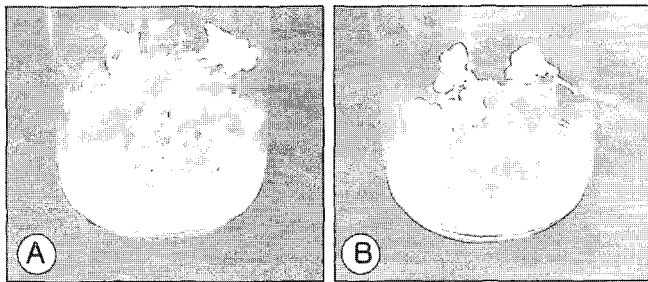


Fig. 5. Development of apomictic sporophytes after 14 weeks *In vitro* culture. (A) *C. falcatum*, (B) *C. caryotideum* var. *coreanum*

전엽체의 증식속도

전엽체를 메스로 다진 후 배지에 치상하여 14주 동안 배양하면서 2주 간격으로 생체중을 조사한 결과, 도깨비고비와 참쇠고비는 유사한 성장반응을 나타냈다(Fig. 6). 도깨비고비와 참쇠고비 모두 2~4주의 배양기간에는 생체중 증가율이 매우 미미하였는데, 전엽체를 메스로 다지는 과정에서 또는 그 후에 다수의 세포가 기계적 상처 및 스트레스에 의하여 갈변 고사하였고, 생존세포의 재생속도 또한 느리기 때문인 것으로 생각되었다. 배양 4~8주 사이에 전엽

체의 생체중은 서서히 증가하였는데, 그 후 무수정생식에 의하여 발달된 포자체가 성장함에 따라 배양 8~14주 사이에 이르러 생체중의 증가율이 급격히 높아졌다.

한편 참쇠고비에 비하여 도깨비고비의 생체중 증가율이 다소 높은 편이었는데, 이는 전엽체를 균질화하는 과정에서 손상된 세포 또는 조직의 양에 차이가 있기 때문이라기보다는 생존세포의 재생 능력이 종에 따라 다르기 때문인 것으로 추정된다.

이상의 실험결과를 고려할 때 도깨비고비와 참쇠고비의 전엽체를 각각 균질화한 후 8주 동안 배양하고, 다시 균질화하여 계대배양할 경우 기내에서 전엽체를 효율적으로 대량증식할 수 있을 것으로 생각되었다. 또한 균질화한 전엽체를 10주 이상 배양하여 무수정생식에 의한 포자체 bud를 다량 유도한 후 이를 토양에 이식할 경우 도깨비고비와 참쇠고비의 포자체를 안정적으로 대량생산할 수 있을 것으로 기대되었다.

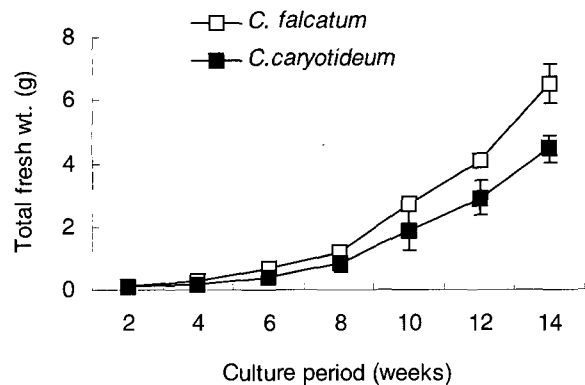


Fig. 6. Proliferation rate of prothalli *In vitro* culture. Bars indicate \pm SE.

적 요

도깨비고비와 참쇠고비의 포자발아에서 얻은 전엽체를 균질화하여 배양함으로써 전엽체 개체발생과 포자체 형성과정을 연구하였다. 배양 2주일이 지나자 균질화한 전엽체 세포들이 일차원의 필라멘트 형태를 형성하였고, 4주일째에는 다수의 가지를 뻗은 형태의 전엽체가 출현하였다. 배양 6주일째에 apical notch가 발달된 전엽체가 형성되었는데, 중심부에는 분열조직이 발달되었다. 8주의 배양기간이 지나자 전엽체의 중심부에서 장란기의 형성 없이 무수정생식에 의한 bud가 관찰되었다. 10주일이 지나자 무수정생식에 의한 bud는 포자체로 발달되었는데, flow cytometric 분석 결과 도깨비고비와 참쇠고비 모두에서 전엽체와 포자체는 동일한 ploidy level을 지닌 것으로 확인되었다. 이는 도깨비고비뿐만 아니라 참쇠고비 또한 무수정생식을 하는 양치식물임을 증명하는 결과로 생각된다.

사 사

본 연구는 산업자원부한국산업기술평가원지원의 지역협력연구센터인 충북대학교 생물건강산업개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

인용문헌

- Bold, H.C., C.J. Alexopoulos and P. Delevoryas. 1987. Morphology of Plants and Fungi. Fifth edition. Harper Collins Publishers, New York.
- Emigh, V.D. and D.R. Farrar. 1977. Gemmae: A role in sexual reproduction in the fern *Vittraia*. Science 198: 297-298.
- 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: 93-97.
- 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.
- Hickok, L.G., T.R. Warne and M.K. Slocum. 1987. *Creautopeis richardii*: Application for experimental plant biology. Amer. J. Bot. 74: 1304-1316.
- Ishikawa, H., M. Ito, Y. Watano and S. Kurita. 2003. Electrophoretic evidence for homoeologous chromosome paring in the apogamous fern species *Dryopteris nipponensis* (Dryopteridaceae). J. Plant Res. 116: 165-167.
- Jones, D.L. 1987. Encyclopedia of ferns. Timber press, Portland.
- Kazmierczak, A. 2003. Induction of cell division and cell expansion at the beginning of gibberellin A₃-induced precocious antheridia formation in *Anemia phyllitidis* gametophytes. Plant Sci. 165: 933-939.
- Kuriyama, A. and M. Maeda. 1999. Direct production of sporophytic plants from spores of *Equisetum arvense*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 58: 77-79.
- Lloyd, R.M. and M. Davis. 1994. Spore germination and isozyme patterns in the apomictic fern *Cytomium facatum*. Botanical J. of the Linnean Society 115: 1-8.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physical plantarum 15: 473-479.
- Nester, J.E. 1985. Scanning electron microscopy of antheridia and archegonia of *Anemia mexicana* Klontzch. Amer. J. Bot. 72: 777-780.
- Pak, M.K. 1961. Flora of Korean Pteridophyta. Kyohakdos Co., Seoul.
- Pangua, E., L.G. Quintanilla, A. Sancho and S. Pajaron. 2003. A comparative study of the gametophytic generation in the *Polysticum aculeatum* group (Pteridophyta). Int. J. Pant Sci. 164: 295-303.
- Rubin, G. and D.J. Paolillo, Jr. 1983. Development of *Onoclea sensibilis* on agar and soil media without the addition of antheridiogen. Amer. J. Bot. 70: 811-815.
- Roux, N., J. Dolezel, R. Swennen and F.J. Zapata-Arias. 2001. Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimeras in *Musa* spp. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 66: 189-197.
- Takamiya, M., C. Takaoka and N. Ohta. 1999. Cytological and reproductive studies on Japenes *Diplazium* (Woodsiaceae; Pteridophyta): Apomictic reproduction in *Diplazium* with evergreen bi- to tripinnate leaves. J. Plant Res. 112: 419-436.
- Schneller, J., R. Holderegger, F. Gugerli, K. Eichenberger and E. Luiz. 1998. Patterns of genetic variation detected by RAPD suggest a single origin with subsequent mutation and long-distance dispersal in the apomictic fern *Dryopteris remota* (Dryopteridaceae). Amer. J. Bot. 85: 1038-1042.
- Sheffied, E. and D.R. Farrar. 1988. Cryo SEM examination of gemma formation in *Vittaria graminifolia*. Amer. J. Bot. 75: 894-899.
- Sheffied, E., G.E. Douglas and D.J. Cove. 1997. Growth and development of fern gametophytes in an airlift fermenter. Plant Cell Rep. 16: 561-564.
- Shorina, N.I. 2001. Population biology of gametophytes in homosporous Polypodiophyta. Russ. J. Ecol. 32: 164-169.

(접수일b 2006.3.11 ; 수락일 2006.4.17)