

기내에서 변산일엽의 식물체 재생에 영향을 미치는 요인들

정진아, 이철희*

충북대학교 원예과학과 and 생물건강산업개발연구센터

Factors Affected on Plant Regeneration of *Phyllitis scolopendrium* (L.) Newm. *In vitro*

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 - This study was conducted to develop the efficient propagation method of fern *Phyllitis scolopendrium* using *In vitro* culture. The influence of the origin of the donor explant sources (rhizome, stipe, three parts of blade) and the homogenization of explants was investigated. Rhizome and stipe explants showed the organogenic capacity among the five explant sources and plant regeneration was promoted by homogenization of culture material. Optimum condition for vigorous and excellent growth of multiple shoots was the half-strength MS medium with 1% sucrose concentration. Generally, addition of NaH_2PO_4 to media enhanced shoot multiplication. The highest rate of shoot proliferation was observed on the media containing 5 μM NAA. Also, combination of activated charcoal (0.1~0.2%) and growth regulators to growth medium prevented the formation of multiple bud primordia, 'nodule'-like bud clusters and improved the normal morphogenesis of sporophytes in *P. scolopendrium*.

Key words - Fern, MS medium, Growth regulators, Activated charcoal

서 언

변산일엽 [*Phyllitis scolopendrium*(L.) Newm.]은 꼬리고사리과(Aspleniaceae)에 속하는 양치식물로서 전 세계적으로 이미 백여 개의 원예품종이 개발되어 있을 만큼 인기 있는 관상식물이다 (Jones, 1987). 식물의 크기는 20~60cm이며, 잎은 좁은 피침형 또는 넓은 피침형으로 기부에서 둥근 귀가 있어 심장형을 이루는데 잎의 가장자리에는 물결모양이 진다. 제주도, 울릉도를 비롯하여 변산반도 산지의 음습한 곳에서 자생하며, 일본을 비롯한 아시아, 유럽, 북아메리카에도 분포하고 있다(Pak, 1961).

양치식물에서 포자파종법을 비롯하여 근경(rhizome)이나 포복지(stolon) 또는 짧은 근경(crown)에서 발생한 새로운 포기를 분주하는 등의 자연적인 번식방법은 연간 증식속도가 매우 느리기 때문에 근래엔 포자(Fernandez *et al.*, 1997a; 1997b; 1999; Jin, 1999)나 영양기관을 기내배양하여 식물체를 대량생산하는 방법이 많이 이용되고 있다. 특히 *Nephrolepis*속 식물(Padhya와 Mehta, 1982; Higuchi *et al.*, 1987)을 비롯하여 *Asplenium nidus*(Higuchi와

Amaki, 1989), *Polypodium cambricum* (Bertr and *et al.*, 1999), *Matteuccia struthiopteris* (Thaker *et al.*, 1998), *Adiantum capillus-veneris* (Salome *et al.*, 1987)와 같이 관상가치가 높은 종의 경우 일찍이 근경이나 포복지절편 등을 배양하여 액아(axillary bud)나 캘러스 또는 부정이를 유도함으로써 식물체를 대량번식하려는 연구들이 시도되었다. 그 결과에 의하면 생장조절물질을 비롯한 여러 배지 조성물질들이 배양조직의 기관형성능력 및 형태형성반응에 많은 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다.

본 연구는 변산일엽에서 포자체 조직의 기내배양을 통한 효율적인 대량번식체계를 확립하기 위하여, 적정 배양재료 및 치상방법을 선별하고 배지의 무기물 및 비타민 농도, 총 질소함량, 당 농도, 생장조절물질의 조합 및 활성탄과 생장조절물질의 혼용처리가 배양재료의 신초 재생능력 및 재생된 식물체의 생육에 미치는 영향을 규명하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

변산일엽의 포자체는 포자를 무균 배양하여 형성된 전엽체로부터

*교신저자(E-mail) : leech@chungbuk.ac.kr

터 기내에서 유도하였으며, 1/2MS배지(sucrose 1%, 활성탄 0.1%, pH 5.8)에서 한두 달 간격으로 2~3회 계대배양하여, 5cm 정도의 크기로 자란 식물체를 실험에 사용하였다. 모든 실험에서 배양온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 였으며, 형광등을 이용하여 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 로 16시간 조명하였다.

포자체의 기내증식에 적합한 배양재료를 찾기 위하여, 5cm 크기의 어린 식물체에서 3mm^2 의 근경 부위와 5~8mm의 엽병(stipe) 부위, 그리고 엽신(blade) 부위를 상중하(5~8mm)로 나누어 각각 배양하였다(Fig. 1). 효율적인 치상방법을 선별하기 위하여 이상 5개 부위의 절편을 그대로 치상하거나 또는 메스로 곱게 다진 후 치상하여 배양하였다.

식물체 재생에 적합한 배양 조건을 찾기 위한 이후의 모든 실험에서는 변산일엽의 근경 및 엽병을 각각 메스로 곱게 다진 후, 30mg씩 5반복으로 실험배지에 치상하였다. 식물체 재생에 적합한 배지의 무기물 및 비타민 농도를 확인하기 위하여, MS 기본배지의 무기물 및 비타민의 농도를 각각 1/8, 1/4, 1/2, 1 및 2배 수준으로 조절한 5종의 배지를 이용하여 실험하였다. 질소급원의 총 함량이 포자체 재생에 미치는 영향을 알아보기 위하여, NH_4Cl 과 KNO_3 를 각각 암모니아태 질소와 질산태 질소의 급원으로 하여 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 의 농도비가 1:2가 되도록 조절한 후, 배지의 총 질소함량을 7.5, 15, 30, 60 및 120mM으로 각기 첨가하였다. 적정 sucrose 농도를 구하기 위하여 0, 1, 2, 3, 그리고 4%의 농도로 배지에 달리 첨가하여 실험하였다. NaH_2PO_4 의 첨가량이 식물체 재생 및 생장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 첨가량을 0, 50, 100, 200 및 $400\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 의 농도로 달리하여 근경 및 엽병조직을 배양하였다. 생장조절물질의 처리가 배양재료의 기관형성능력 및 식물체 발달에 미치

는 영향을 알아보기 위하여, 각각 0, 1, 5, $10 \mu\text{M}$ 의 농도수준으로 kinetin과 NAA를 혼용 처리하거나 kinetin과 IBA를 혼용 처리하여 근경 및 엽병조직을 배양하였다. 생장조절물질이 첨가된 배지에서 활성탄의 흡수효과가 신초 재생에 미치는 영향을 알아보기 위하여, kinetin $5 \mu\text{M}$ +IBA $5 \mu\text{M}$ 이 첨가된 배지에 활성탄을 0, 0.1, 0.2, 0.4 및 0.8%의 농도로 혼용처리한 후 균질화한 배양재료를 치상하였다. 모든 실험에서 배양기간은 16주였으며, 생체중, 포자체 수와 길이, 뿌리의 수와 길이 등을 조사하였다.

결과 및 고찰

배양재료 및 치상방법의 영향

변산일엽의 포자체를 Fig. 1과 같이 근경, 엽병, 상중하의 엽신 등 5개의 부위로 나누어 배양한 결과, 치상방법에 관계없이 근경과 엽병 부위에서만 식물체가 재생되었고, 엽신의 모든 부위는 갈변 고사되었다(Table 1). 치상방법에 따라서는 근경의 경우 절편을 그대로 치상하였을 때 3.5개의 식물체가 재생된 반면, 절편을 다져서 치상한 경우에는 9.8개의 식물체가 재생되었다. 엽병도 이와 유사하게 절편을 그대로 치상하였을 때는 4.3개, 그리고 잘게 다져서 치상하였을 때는 9.5개의 식물체가 재생되었다. 재생된 식물체의 생장 및 발달은 근경에서는 치상방법에 따라서 별 차이가 나타나지 않았으나, 엽병은 절편을 그대로 치상한 것보다 다져서 치상한 처리구에서 포자체의 생장이 현저히 향상되었다.

포자체조직을 이용한 양치식물의 기내배양에는 주로 근경(Bertrand *et al.*, 1999; Higuchi와 Amaki, 1989)이나 포복경 끝(Higuchi *et al.*, 1987; Hvosef-Eide, 1991; Paek *et al.*, 1984), 엽 절편(Camloha *et al.*, 1994; Salome *et al.*, 1987; Teng, 1997), 또는 근경에서 발생한 측아(Thakur *et al.*, 1998) 등이 배양재료로 이용되었다. 한편 Bertrand *et al.*(1999)은 기내배양중인 *Polypodium cambricum*의 어린 포자체를 근경, 엽상체, 엽병 및 뿌리 등으로 나누어 배양한 결과, 뿌리의 기관형성능력이 가장 저조하였고 근경과 엽상체가 우수한 편이었다고 하였다.

포자체의 절편을 배양하는 방법은 주로 일정한 크기로 절취한 절편을 그대로 배지에 치상하는 것이 많이 이용되었으나, *Asplenium nidus*(Fernandez *et al.*, 1993)나 *Pteris ensiformis*(Fernandez *et al.*, 1997b)의 경우 어린 포자체나 근경조직을 균질화하여 배양함으로써 다량의 포자체를 유도하였다고 보고된 바 있다. 변산일엽 또한 근경과 엽병 모두 절편을 일정한 크기로 절취하여 치상한 것보다 곱게 다져서 치상한 경우에 배양재료의 기관형성능력이 크게 향상되는 결과를 보여 절편의 균질화가 식물체 재생을 촉진함을 확인할 수 있었다.

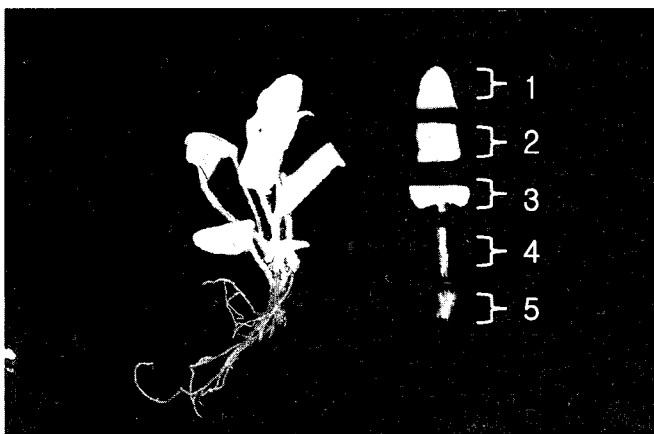


Fig. 1. The five sections of *P. scolopendrium* sporophytes. The numeral letters 1, 2, 3, 4 and 5 represents upper part of blade, middle part of blade, low part of blade, stipe and rhizome, respectively.

배지 농도의 영향

기관형성능력이 높게 나타난 근경과 엽병조직의 배양에 적합한 MS배지의 농도를 알아보기 위하여, MS 기본배지의 무기물 및 비타민 농도를 1/8~2배 수준으로 달리 조절한 5종의 배지에서 각 절편을 곱게 다져 배양하였다. 그 결과, 엽병과 근경조직 모두 1/2배 MS에서 각각 9.0개와 9.3개로 가장 많은 포자체가 재생되었다 (Table 2). 그러나 재생된 포자체의 생장은 두 배양재료 모두 MS 기본배지에서 가장 양호하였다. 한편 무기물 함량이 낮은 1/8배나 무기물 함량이 아주 높은 2배 MS에서는 배양조직의 기관형성능력

이 현저히 떨어지는 것으로 확인되었다. 또한 1/8배 MS에서 재생된 식물체는 기늘고 연약했으며, 2배 MS배지에서 재생된 소수의 식물체는 짙은 녹색을 띄었고 뿌리는 거의 발달되지 않았다.

양치식물의 포자체 배양에는 MS 기본배지가 그대로 이용되기도 하지만(Higuchi와 Amaki, 1989; Camloha, 1994), 보편적으로 MS 기본배지에 함유된 무기물의 농도는 포자체조직에서 식물체가 재생되는 것을 억제하는 경향이 있기 때문에 1/2배 MS(Thakur *et al.*, 1998; Teng, 1997)나 1/4배 MS(Higuchi *et al.*, 1987; Bertrand, 1999)와 같이 무기물 함량을 낮춘 배지가 보다 적절한

Table 1. Organogenesis from various segments of young *P. scoropendrium* sporophytes with two different inoculation methods *In vitro*

Culture material	Inoculation method	Fresh weight (g)	Number of shoots	Shoot length (cm)	Number of roots	Root length (cm)
Rhizome	A ^z	0.38	3.5	3.38	22.0	3.38
	B	0.48	9.8	2.60	19.3	3.28
Stipe	A	0.07	4.3	0.73	4.7	0.43
	B	0.45	9.5	2.95	17.3	3.93
Low part of blade	A	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00
	B	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00
Middle part of blade	A	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00
	B	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00
Upper part of blade	A	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00
	B	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00
<i>F</i> -test significance ^y						
Culture material (CM)		**	**	**	**	**
Inoculation method (IM)		**	**	*	**	NS
CM×IM		**	**	**	**	**

^zA, B inoculate with simply divided explant and with chopped explant, respectively.

^ySignificant at 1% level (**), 5% level (*) and not significant (NS).

Table 2. Effect of medium concentration on plant regeneration from homogenized stipe and rhizome segments of *P. scoropendrium* *In vitro*

Medium	Culture material	Fresh weight (g)	Number of shoots	Shoot length (cm)	Number of roots	Root length (cm)
1/8MS	Stipe	0.08	4.0	0.98	4.3	2.23
	Rhizome	0.10	3.5	1.20	5.5	3.83
1/4MS	Stipe	0.15	5.0	1.48	6.8	2.28
	Rhizome	0.17	6.8	1.53	7.5	3.78
1/2MS	Stipe	0.42	9.0	1.90	15.0	2.75
	Rhizome	0.38	9.3	2.15	15.8	4.25
MS	Stipe	0.45	8.3	2.88	12.0	2.35
	Rhizome	0.48	8.0	2.33	14.8	2.48
2MS	Stipe	0.16	4.8	1.08	3.0	0.28
	Rhizome	0.13	3.8	0.75	2.8	0.18
<i>F</i> -test significance ^z						
Medium (M)		**	**	**	**	**
Culture material (CM)		NS	NS	NS	NS	**
M×CM		NS	NS	NS	NS	NS

^zSignificant at 1% level (**), 5% level (*) and not significant (NS).

것으로 제시되고 있다. 재생된 식물체의 형태형성 또한 MS 기본 배지 보다 낮은 무기물 농도를 함유한 배지에서 양호하였다고 보고된 바 있다(Garcia와 Furelli, 1987). 변산일엽 역시 1/2배 MS에서 근경 및 엽병조직 모두 가장 많은 수의 포자체가 재생됨으로써 이와 유사한 결과를 보였다.

총 질소함량의 영향

배지에 첨가된 질소급원의 농도가 근경 및 엽병조직의 기관형성능력 및 재생된 식물체의 생장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 질소급원 외의 무기물 및 비타민 함량은 MS 기본배지의 1/2배 수준으로 조절하고 질소급원(NH₄⁺:NO₃⁻=1:2)의 총 함량은 7.5~120mM로 조절하여 각 절편을 배양하였다. 그 결과, 엽병과 근경 모두 30mM에서 각각 8.8개와 9.5개의 식물체가 재생되어 가장 활발한 재생능력을 보였다(Table 3). 식물체의 성장 및 발달은 7.5~30mM에서 전반적으로 큰 차이를 보이지 않았는데, 60~120mM의 고농도에서는 생장이 현저히 저해되었다. 특히 120mM에서는 식물생장이 매우 불량하였으며 뿌리의 발달은 거의 이루어지지 않았다. 이는 질소화합물의 농도가 높을수록 뿌리의 형성이 저하된다는 Haissig(1974) 또는 Eggens와 Wright(1985)의 보고와 일치하는 결과로 변산일엽 또한 기내배양시 뿌리의 발생수와 생장은 배지 조성물질 중에서 특히 질소원의 함량에 많은 영향을 받는 것으로 확인되었다.

Sucrose 농도의 영향

배지의 sucrose 함량을 달리하여 엽병과 근경조직을 배양한 결과, 1%에서 각각 9.5개와 10.0개의 식물체가 재생되어 가장 양호한 결과를 보였다(Table 4). 신초길이, 뿌리수, 뿌리길이 등의 식물생

장 또한 전반적으로 1%에서 양호하였으며, 반면 농도가 높아질수록 식물체의 형태발달이 억제되어 특히 3% 이상 고농도에서는 재생된 식물체가 정상적인 형태로 발달되지 못하고 다수의 눈(芽)이 뭉쳐있는 듯이 보이는 분열조직을 형성하였다(Fig. 2).

앞선 많은 연구에서 양치식물의 포자체배양에 3%의 sucrose가 이용되고 있지만(Camloha *et al.*, 1994; Higuchi *et al.*, 1987; Hvoslef-Eddie, 1991; Paek *et al.*, 1984; Teng, 1997), Thakur *et al.*(1998)에 의하면 *Matteuccia struthiopteris*의 포자체 절편 배양에서 3% 보다 1.5%의 sucrose에서 식물체의 성장 및 뿌리의 발달이 양호하였다고 하였다. 이는 본 실험결과와 유사한 양상으로 일찍이 양치식물의 포자체 배양에서 1~2%의 sucrose가 포자체의 형태발달을 촉진한다고 보고된 바 있다(Wetmore, 1953). 이러한 결과들을 고려할 때, 양치식물에서 1~2% 수준의 sucrose는 배양재료의 기관형성능력 및 재생된 식물체의 성장을 촉진하는 것으로 여겨지며, 그러나 sucrose가 3% 이상 첨가되면 식물체의 정상적인 형태형성을 억제할 가능성이 있는 것으로 생각되었다.

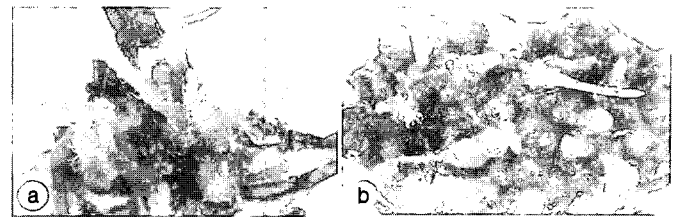


Fig. 2. Effect of different concentrations of sucrose on plant regeneration from homogenized rhizome segments of *P. scolopendrium* *In vitro* culture. (a) Multiple shoots on 1% sucrose, (b) Multiple bud cluster on 4% sucrose

Table 3. Effect of concentration of nitrogen source on plant regeneration from homogenized stipe and rhizome segments of *P. scolopendrium* *In vitro*

Nitrogen source (mM)	Culture material	Fresh weight (g)	Number of shoots	Shoot length (cm)	Number of roots	Root length (cm)
7.5	Stipe	0.53	7.5	2.60	30.0	4.88
	Rhizome	0.58	7.8	2.35	38.0	4.83
15	Stipe	0.49	7.8	2.63	24.3	4.85
	Rhizome	0.51	8.0	2.43	23.0	5.03
30	Stipe	0.55	9.5	2.65	24.0	4.35
	Rhizome	0.59	8.8	2.53	26.8	4.45
60	Stipe	0.35	6.0	2.03	13.0	1.50
	Rhizome	0.36	8.3	2.30	16.3	1.90
120	Stipe	0.12	2.3	1.30	2.0	0.33
	Rhizome	0.23	4.0	1.38	8.8	0.50
<i>F</i> -test significance ^z						
nitrogen source (NS)		**	**	**	**	**
Culture material (CM)		NS	*	NS	*	NS
NS×CM		NS	NS	NS	NS	NS

^zSignificant at 1% level (**), 5% level (*) and not significant (NS).

NaH₂PO₄ 첨가량의 영향

NaH₂PO₄의 첨가량이 근경과 엽병조직의 기관형성능력 및 재생된 식물체의 생장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 0~400mg L⁻¹으로 첨가량을 조절하여 각 절편을 배양하였다. 재생된 식물체의 수는 엽병과 근경 모두 200mgL⁻¹의 NaH₂PO₄가 첨가된 배지에서 12.5개 및 10.8개로 가장 많았다(Table 5). 그러나 식물체의 생장은 엽병이나 근경 모두 NaH₂PO₄의 첨가량에 의하여 유의차를 보이지 않았다.

일반적으로 양치식물의 포복경 끝이나 근경조직의 배양에서 배지에 첨가된 NaH₂PO₄는 식물체의 재생 및 생장을 촉진하는 것

로 알려져 있다(Garcia와 Furelli, 1987; Hvoslef-Eide, 1991; Paek 등, 1984). 본 실험에서 변산일엽의 경우 NaH₂PO₄의 첨가에 의하여 식물체 재생능력은 다소 향상되었으나 식물생육은 큰 차이를 보이지 않았다. 그러므로 기내배양에서 NaH₂PO₄의 첨가에 따른 반응양상은 양치식물의 종에 따라 다소 다른 것으로 생각되었다.

생장조절물질의 영향

생장조절물질 kinetin과 NAA 및 IBA를 단독 처리하거나 또는 kinetin+NAA 그리고 kinetin+IBA의 조합으로 혼용 처리하여 엽

Table 4. Effect of sucrose concentration on plant regeneration from homogenized stipe and rhizome segments of *P. scoropendrium* *In vitro*

Sucrose (%)	Culture material	Fresh weight (g)	Number of shoots	Shoot length (cm)	Number of roots	Root length (cm)
0	Stipe	0.10	5.5	1.05	7.5	3.33
	Rhizome	0.17	7.0	1.70	12.0	3.85
1	Stipe	0.41	9.5	1.88	13.5	2.88
	Rhizome	0.45	10.0	2.58	22.8	4.28
2	Stipe	0.29	9.0	1.18	10.8	2.45
	Rhizome	0.39	8.3	1.93	16.3	3.40
3	Stipe	0.26	7.5	1.38	7.5	1.85
	Rhizome	0.25	8.0	1.10	5.8	1.58
4	Stipe	0.23	6.3	1.05	6.3	1.23
	Rhizome	0.19	5.8	0.98	5.0	0.88
<i>F</i> -test significance ^z						
Sucrose (S)		**	**	**	**	**
Culture material (CM)		NS	NS	**	*	NS
S×CM		NS	NS	*	NS	NS

^zSignificant at 1% level (**), 5% level (*) and not significant (NS).

Table 5. Effect of NaH₂PO₄ concentration on plant regeneration from homogenized stipe and rhizome segments of *P. scoropendrium* *In vitro*

NaH ₂ PO ₄ (mg·L ⁻¹)	Culture material	Fresh weight (g)	Number of shoots	Shoot length (cm)	Number of roots	Root length (cm)
0	Stipe	0.36	8.0	2.20	19.5	3.70
	Rhizome	0.36	8.3	2.08	20.5	2.85
50	Stipe	0.43	8.5	2.33	18.8	4.30
	Rhizome	0.43	9.0	2.10	19.3	3.40
100	Stipe	0.48	8.3	2.35	18.0	4.38
	Rhizome	0.41	9.3	2.35	22.0	3.95
200	Stipe	0.48	12.5	2.63	24.3	4.45
	Rhizome	0.41	10.8	2.13	22.5	3.45
400	Stipe	0.34	9.3	1.90	17.3	2.85
	Rhizome	0.40	8.8	2.33	20.3	4.50
<i>F</i> -test significance ^z						
NaH ₂ PO ₄ (P)		*	**	NS	NS	NS
Culture material (CM)		NS	NS	NS	NS	NS
P×CM		NS	NS	NS	*	NS

^zSignificant at 1% level (**), 5% level (*) and not significant (NS).

병과 근경조직을 배양하였다. 그 결과, 엽병조직은 NAA의 단용처리구에 포자체의 재생이 전반적으로 향상되었는데, 특히 NAA 5 μ M 처리구에서 21.5개로 가장 많은 포자체가 형성되었으며 이는 무처리구의 12.5개에 비하여 두 배 가까이 증가된 결과였다(Table 7). 또한 NAA 1 μ M에서도 20.3개로 비교적 많은 식물체가 재생되었다. 혼용처리구에서는 kinetin 5 μ M와 NAA 1 μ M 또는 IBA 1 μ M의 혼용처리구에서 각각 17.5개와 18.8개로 무처리구에 비하여 향상된 결과를 보였다. 엽병에서 재생된 식물체의 신초길이는 처리구간에 유의차를 보이지 않았는데, 뿌리의 성장 및 발달은 NAA 단용처리구에서 다소 향상된 것으로 나타났다.

근경조직 또한 NAA 5 μ M에서 14.5개로 가장 많은 수의 포자체가 재생되었는데, 이는 무처리구에 비하여 배가된 결과였다(Table 8). 그리고 kinetin 1 μ M과 NAA 1 μ M의 혼용처리구에서도 14.0개로 무처리구의 7.0개에 비하여 향상되었으며, kinetin 5~10 μ M과 IBA 1 μ M의 혼용처리구에서도 14.0~14.3개로 포자체의 수가 무처리구에 비하여 증가하였다. 근경에서 재생된 식물체의 성장 및 뿌리의 발달 또한 NAA 및 IBA의 단용처리구에서 비교적 양호하였는데, kinetin과의 일부 혼용처리구에서도 무처리구에 비하여 생육이 다소 향상되었다.

Platyserium bifurcatum(Camloha와 Gogala, 1991; Camloha

Table 7. Effects of kinetin, NAA and IBA on plant regeneration from homogenized stipe segments of *P. scoropendrium* *In vitro*

Growth regulator (μ M)			Fresh weight (g)	Number of shoots	Shoot length (cm)	Number of roots	Root length (cm)
Kinetin	NAA	IBA					
0	0	0	0.44	12.5	1.70	17.8	2.38
0	1	0	0.91	20.3	2.15	41.5	6.30
0	5	0	0.83	21.5	2.08	37.5	5.13
0	10	0	0.72	13.8	2.10	37.3	5.48
0	0	1	0.55	13.5	2.23	20.5	4.83
0	0	5	0.50	12.5	2.13	17.8	4.75
0	0	10	0.54	11.5	2.23	23.5	4.88
1	0	0	0.60	15.3	2.35	26.0	5.28
1	1	0	0.66	16.5	2.25	38.3	4.93
1	5	0	0.54	12.0	2.33	21.8	5.10
1	10	0	0.68	12.3	2.30	27.8	4.68
1	0	1	0.59	14.5	2.38	28.5	5.33
1	0	5	0.54	14.0	2.00	27.5	3.63
1	0	10	0.63	15.8	2.03	28.5	4.98
5	0	0	0.46	16.8	2.10	25.8	5.05
5	1	0	0.61	17.5	2.08	27.3	4.18
5	5	0	0.59	13.8	2.10	23.5	4.30
5	10	0	0.49	12.8	1.90	15.0	3.93
5	0	1	0.59	18.8	2.10	31.0	3.53
5	0	5	0.61	14.0	2.10	32.0	3.63
5	0	10	0.61	12.8	2.08	28.8	3.58
10	0	0	0.59	17.5	2.03	26.5	4.23
10	1	0	0.55	15.8	2.08	26.0	3.70
10	5	0	0.66	14.3	2.28	26.5	4.80
10	10	0	0.56	12.0	2.25	20.0	3.53
10	0	1	0.41	13.3	3.23	32.0	2.97
10	0	5	0.49	14.0	3.20	33.3	2.93
10	0	10	0.50	8.0	3.70	31.3	3.70
F-test significance ^z							
Kinetin			**	NS	NS	NS	**
NAA			**	**	NS	**	NS
IBA			NS	**	NS	NS	NS
Kinetin×NAA			**	**	NS	**	**
Kinetin×IBA			**	*	NS	*	**

^zSignificant at 1% level (**), 5% level (*) and not significant (NS).

등, 1994)의 경우 성장조절물질이 첨가되지 않은 배지에서도 신초 증식이 왕성하였다고 보고되었으나, 일반적으로 양치식물의 포자체 배양에서 성장조절물질의 첨가는 눈(芽)의 형성이나 분열조직의 발달을 촉진하는 것으로 알려져 있다. GGB(green globular body) 또는 MNs(meristematic nodules) 등으로 불리는 이 분열조직은 형태적으로는 캘러스와 유사하나 기능적으로는 싹의 시원체(shoot primordia)와 유사한 것으로 보고되었다(Bertrand 등, 1999).

본 실험의 경우 성장조절물질 첨가 배지에서 분열조직형태가 아니라 정상적인 포자체가 재생된 것은 상대적으로 낮은 농도(1%)의

sucrose를 사용한 것과 또한 0.1%의 활성탄을 성장조절물질과 혼용 처리하였기 때문인 것으로 추정된다. 활성탄은 배양조직으로부터 분비되는 유해물질 뿐만 아니라 성장조절물질을 흡수하는 것으로 알려져 있다.

활성탄과 성장조절물질의 혼용처리 효과

Teng(1997)의 연구에 의하면 BA와 NAA의 혼용배지에 0.2%의 활성탄을 첨가하여 *Platyserium bifurcatum*의 엽 세포를 배양한 결과, 활성탄 무처리구에 비하여 정상적인 포자체의 재생이 증가하였고, 분열조직형태의 형성이 억제되었으며, 재생된 식물체

Table 8. Effects of kinetin, NAA and IBA on plant regeneration from homogenized rhizome segments of *P. scoropendrium* *In vitro*

Growth regulator (μ M)			Fresh weight (g)	Number of shoots	Shoot length (cm)	Number of roots	Root length (cm)
Kinetin	NAA	IBA					
0	0	0	0.26	7.0	1.33	5.3	2.00
0	1	0	0.59	10.3	2.35	29.3	4.18
0	5	0	0.49	14.5	2.05	25.5	4.00
0	10	0	0.51	12.0	2.13	21.0	4.30
0	0	1	0.56	12.8	2.25	24.3	5.38
0	0	5	0.49	12.5	2.13	22.5	4.35
0	0	10	0.50	12.3	2.25	23.5	3.98
1	0	0	0.41	10.8	1.80	10.0	2.63
1	1	0	0.52	14.0	2.05	23.3	4.35
1	5	0	0.51	13.7	1.80	24.7	4.40
1	10	0	0.43	9.0	1.78	15.0	3.45
1	0	1	0.33	11.3	1.68	8.8	3.28
1	0	5	0.35	11.0	1.93	13.8	3.88
1	0	10	0.55	14.0	2.20	21.5	5.38
5	0	0	0.45	14.0	2.13	20.8	3.20
5	1	0	0.53	13.8	2.33	23.8	3.03
5	5	0	0.44	11.0	2.27	18.7	3.07
5	10	0	0.51	10.5	1.75	18.3	3.63
5	0	1	0.46	14.3	1.78	22.0	3.80
5	0	5	0.45	11.5	1.85	13.3	3.93
5	0	10	0.53	12.0	1.95	20.0	3.90
10	0	0	0.44	11.3	1.73	18.8	4.03
10	1	0	0.58	11.8	2.33	26.3	3.73
10	5	0	0.48	12.3	2.13	17.7	3.60
10	10	0	0.37	10.0	1.95	12.5	3.53
10	0	1	0.53	14.0	2.10	21.5	3.30
10	0	5	0.50	12.5	2.75	21.5	3.28
10	0	10	0.49	10.5	1.93	15.0	3.38
F-test significance ^z							
Kinetin			**	NS	NS	*	*
NAA			**	**	**	**	**
IBA			**	**	*	*	**
Kinetin×NAA			**	**	*	**	**
Kinetin×IBA			**	**	*	**	**

^zSignificant at 1% level (*), 5% level (**), and not significant (NS).

의 과수화(hyperhydricity)가 방지되었다고 하였다. 이처럼 식물 조직 및 세포의 기내배양에서 생장조절물질과 혼용처리된 활성탄은 식물체의 형태형성에 질적 및 양적으로 영향을 미치는 것으로 보이며, 이러한 효과는 활성탄의 흡수능력에 기인한 것으로 여겨진다.

변산일엽에서 생장조절물질과 활성탄의 혼용처리가 배양조직의 기관형성능력 및 재생된 식물체의 형태발달에 미치는 영향을 구명하기 위하여, kinetin 5 μ M+IBA 5 μ M이 첨가된 배지에 활성탄의 농도를 0~0.8%로 달리 조절하여 근경과 엽병을 배양하였다. 그 결과, 식물체의 재생은 엽병과 근경조직 모두 활성탄 0.1% 처리구에서 다소 증가되었으나, 0~0.2%의 저농도 처리구에서 유의차를 보이지 않았다(Table 9). 반면 활성탄이 0.4% 이상 첨가된 배지에서는 식물체 재생률이 무처리구에 비하여 감소되었다.

한편 재생된 식물체의 생장 및 뿌리의 발달은 0.1~0.2%에서 현저히 촉진된 것으로 조사되었는데, 엽병의 경우 무처리구에서 신초 길이는 0.95cm였던 것에 비하여 0.1~0.2%의 처리구에서는 2.5~3.13cm로 향상되었다. 뿌리길이는 무처리구에서 0.28cm였던 것에 비하여 0.1~0.2%의 처리구에서는 2.67~3.10cm로 향상되었다. 이러한 결과를 볼 때, 생장조절물질과 0.1~0.2%의 활성탄을 혼용처리하면 배양재료의 기관형성능력은 무처리구와 큰 차이를 보이지 않는 반면, 재생된 식물체의 생장을 크게 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다. 이는 활성탄이 배양 전 기간에 걸쳐 생장조절물질을 균형 있게 분배함으로써 배양물로부터 분열조직형태가 아닌 정상적인 포자체가 재생되는 것을 촉진하기 때문인 것으로 여겨진다.

이상의 실험결과를 바탕으로 변산일엽의 근경 및 엽병조직을 기내배양하여 재생된 소식물체를 상토와 버미큘라이트(1:1)가 혼용된

토양에 이식한 후 성장상(25 $^{\circ}$ C, 습도 75%)에서 순화함으로써 변산일엽의 포자체를 다량으로 얻을 수 있었다(Fig. 3).

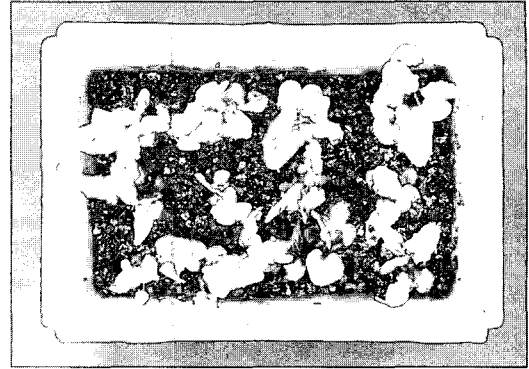


Fig. 3. Plantlets of *P. scolopendrium* were grown for 3 weeks after transplanting to growth chamber.

적 요

본 연구는 기내배양을 통하여 양치식물인 변산일엽의 효과적인 번식방법을 개발하기 위해 실시되었다. 절편의 기원(근경, 엽병, 엽신의 세 부분)과 절편의 균질화가 식물재생에 미치는 영향을 조사한 결과, 오직 근경과 엽병에서만 기관형성능력이 관찰되었으며, 식물체 재생은 절편을 균질화함으로써 촉진되었다. 다수의 신초가 활발한 생장을 보이는 적정조건은 sucrose 1%가 함유된 1/2MS 배지였다. 전반적으로 NaH₂PO₄의 첨가는 신초의 증식을 촉진하였으며, 가장 높은 신초증식률을 보인 것은 NAA 5 μ M이

Table 9. Effect of activated charcoal on plant regeneration from homogenized stipe and rhizome segments of *P. scoropendrium* on medium supplemented with growth regulator

Activated charcoal (%)	Culture material	Fresh weight (g)	Number of shoots	Shoot length (cm)	Number of roots	Root length (cm)
0	Stipe	0.20	8.5	0.95	2.0	0.28
	Rhizome	0.26	10.5	1.13	9.8	2.40
0.1	Stipe	0.56	8.7	3.13	23.7	2.67
	Rhizome	0.60	12.8	2.70	24.0	4.08
0.2	Stipe	0.31	8.5	2.53	13.0	3.10
	Rhizome	0.30	10.0	2.10	14.0	3.30
0.4	Stipe	0.16	5.0	1.18	6.8	3.03
	Rhizome	0.17	8.0	1.70	8.0	3.00
0.8	Stipe	0.10	2.3	0.68	1.3	0.58
	Rhizome	0.17	9.0	1.25	9.3	1.58
F-test significance ^z						
Activated charcoal (AC)		**	**	**	**	**
Culture material (CM)		NS	**	NS	**	**
AC×CM		NS	NS	*	NS	NS

^zSignificant at 1% level (**), 5% level (*) and not significant (NS).

첨가된 배지였다. 또한 0.1~0.2%의 활성탄과 생장조절물질을 혼용 처리한 결과, 다수의 싹이 뭉쳐있는 듯한 'nodule' -like bud clusters의 생성을 억제하고 포자체의 정상적인 형태형성을 향상시켰다.

사 사

본 연구는 산업자원부한국산업기술평가원지원의 지역협력연구센터인 충북대학교 생물건강산업개발연구센터의 지원에 의한 것입니다.

인용문헌

- Bertrand, A.M., M.A. Albuerno, H. Fernandez, A. Gonzalez and R. Sanchez-Tames. 1999. *In vitro* organogenesis of *Polypodium cambricum*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 57: 65-69.
- Camloha, M. and N. Gogala. 1991. *Platycerium bifurcatum*-adventitious bud and root formation without growth regulators *In vitro*. Acta Hort. (ISHS) 289: 89-90.
- Camloha, M., N. Gogala and J. Rode. 1994. Plant regeneration from leaf explants of the fern *Platycerium bifurcatum* *In vitro*. Sci. Hort. 56: 257-266.
- Eggens, J.L. and C.P.M. Wright. 1985. Nitrogen effects on monostands and polystands of annual bluegrass and creeping bentgrass. HortScience 20: 109-110.
- 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. 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 and R. Sanchez-Tames. 1999. Biological and nutritional aspects in fern multiplication. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 56: 211-214.
- Garcia, E. and L. Furelli. 1987. Clonal mass propagation of the fern *Cyrtomium falcatum*. Acta Hort. (ISHS) 212: 655-660.
- Haissig, B.E. 1974. Metabolism during adventitious root primordium initiation and development. For. Sci. 4: 324-337.
- Higuchi, H., W. Amaki and S. Suzuki. 1987. *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia* Prsel. Sci. Hort. 32: 105-113.
- Higuchi, H. and W. Amaki. 1989. Effect of 6-benzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *In vitro* propagation. Sci. Hort. 37: 351-359.
- Hvoslef-Eide, A.K. 1991. The effect of temperature, daylength and irradiance on the growth of mother plants of *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott and on the subsequent growth *In vitro* of runner tip explants. Sci. Hort. 47: 137-147.
- 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. Timber press, Portland.
- Padhya, M.A. and A.R. Mehta. 1982. Propagation of fern (*Nephrolepis*) through tissue culture. Plant Cell Rep. 1: 261-263.
- Paek, K.Y., H.C. Lee, J.K. Choi and B.H. Kwack. 1984. Masspropagation *Nephrolepis exaltata* by runner tips *In vitro*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 25: 313-321.
- Pak, M.K. 1961. Flora of Korean Pteridophyta. Kyohakdos Co., Seoul.
- Salome, M., S. Pais and M. Casal. 1987. Propagation of the fern *Adiantum capillus-veneris* through tissue culture of the circinate part of young leaves. Acta Hort. (ISHS) 212: 651-654.
- Teng, W.L. 1997. Activated charcoal affects morphogenesis and enhances sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platycerium bifurcatum*. Plant Cell Rep. 17: 77-83.
- Teng, W.L. and M.C. Teng. 1997. *In vitro* regeneration patterns of *Platycerium bifurcatum* leaf cell suspension culture. Plant Cell Rep. 16: 820-824.
- Thakur R.C., Y. Hosoi and K. Ishii. 1998. Rapid *In vitro* propagation of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Todaro - An edible fern. Plant Cell Rep. 18: 203-208.
- Wetmore, R.H. 1953. Carbohydrate supply and leaf development in sporeling ferns. Science 118: 578.

(접수일 2006.3.11 ; 수락일 2006.4.17)