

동해안 홍조 지누아리사촌(*Grateloupia acuminata*) 식물의 조직배양

김형근*, 박중구
강릉대학교 해양생명공학부

Tissue Culture of *Grateloupia acuminata* (Rhodophyta) from the Eastern Coast of Koea

Hyung Geun Kim* and Joong Goo Park

Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Gangneung, Gangwondo 210-702, Korea

The Effect of different temperatures and photon irradiance on the growth of crust and the regeneration of tissue fragments of the commercially important red alga *Grateloupia acuminata* Okamura were examined in laboratory cultures. The tetraspore developed into basal crusts and produced upright thalli. Crust grew very fast at 25°C and 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ after one week in indoor culture. However, they stopped growing after three weeks. Maximum growth was 275 μm in diameter. They required four weeks to get upright thalli at 5°C, while only three weeks were required at 10°C. When different light intensities were compared at 15°C, cells of the crusts were well differentiated in 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ and consistently divided so that upright thalli were produced. In aeration culture, the upright thalli grew up to 6.5 cm in length within 4 months. Thus, it is possible to produce mass cultures of *Grateloupia* in the field. In addition, female and male gametophytes developed from the tetraspores and they were fertilized to produce tetrasporophyte thalli. By this procedure, the normal life cycle of the red alga *G. acuminata* was completed.

Keywords: Tissue culture, Crust, Upright thalli, *Grateloupia acuminata*, Rhodophyta

서 론

지누아리사촌(*G. acuminata*) 홍조식물은 점액질이 있어 부드러우며 질긴 맛이 독특하여 식용 해조로 많이 이용되고 있다. 이 식물의 서식처는 동해안과 남해안의 파도의 영향을 받는 조간대 하부 및 저조선에 주로 생육하고 있다(Kang, 1966; Lee, 1987).

우리나라의 지누아리과에 대한 연구는 Kang(1966)이 9속 23종을 지누아리과(Halymeniaceae)에 수록하였으며 그 후, Lee(1987)에 의해 6속 21종에 대한 분류학적 연구가 이루어졌다. 식용 지누아리 종류로는 주로 지누아리사촌외에 참지누아리와 빼지누아리가 있으며 이 식물에는 아연 성분이 많이 함유되어 기능적인 면에서 뛰어난 것으로 알려져 있다(Caliceti et al., 2002). 특히, 강원도에서 건강 해조식품으로서 상품개발이 많이 이루어지고 있다.

지누아리 종류는 포자방출에서 엽상체가 되는 과정에서 사상체 또는 반상근(crust)과 직립사상체(upright filaments)의 형태를

가지며 그 경로가 매우 다양하다. 생활사 과정의 반상근 형태는 극한 환경에 적응성이 매우 뛰어나다(Harlin and Villalard-Bohnack, 2001). 이러한 반상근의 형태는 strain으로서 배양에서 종을 보존하여 필요할 때 이용하는 것이 가능하며 이것은 자연 상태의 포자를 사용하는 것보다 더 빠를 수 있어 종묘로서 매우 유리할 수 있다(Sylvester and Waaland, 1983). Chiang(1993)은 참지누아리의 형태형성은 기부 반상근이 낮은 조도에서 사상체가 유도되어 이런 사상체는 절편을 보존하는데 매우 편리함을 보고한 바 있다.

조직 절편에서 사상체나 기부 반상근(basal crust)을 만들어 해조양식의 종묘로서 이용 가능한 연구는 참지누아리 종류의 경우 반상근 재생에 의한 양식 시험 연구(Migita, 1988)와 절편에서 직립엽체로 재생력을 이용하여 바다양식(Bula-Meyer, 1990)연구가 이루어졌다. 지누아리사촌 종류에서는 반상근과 직립 엽체로부터(Iima et al., 1995) 연구가 수행되었으나 배양관리가 곤란하여 아직 일반화 되지 못하고 있다.

해조양식은 김, 미역, 다시마 위주의 대량 양식에서 점차적으로 지역 특산화 할 수 있는 양식 해조류 개발에 의한 품종 다양

*Corresponding author: kimhg@kangnung.ac.kr

화가 이루어지고 있다(Sohn, 1998). 주요 양식종이 겨울철에 수확되는 반면에 지누아리 식물은 여름철에 수확이 되어 지누아리 양식이 일반화되면 다른 종류와는 계절적으로 차별화될 수 있다. 우리나라에서는 지누아리의 수요량이 늘어나고 있음에도 생산량은 소량의 자연 채취량에만 의존하여 대량 양식 개발의 필요성이 시급한 실정이다.

이 연구에서는 동해안 연안에서 주로 우점하여 분포하는 지누아리사촌(*G. acuminata*) 종류의 조직배양에서 얻어진 포자 및 반상근의 형성과 직립엽체의 발전과정이 어떻게 진행되는지를 분석하고자 하였다. 또한 반상근에서 종묘로서의 환경적응성을 파악하기 위해 조직배양의 과정, 반상근의 온도 및 조도의 영향과 형성을 등을 분석하였다.

재료 및 방법

연구에 이용된 모조는 1998년 3월 3일에 강원도 강릉시 정동진 연안 수심 1 m에서 엽장 14 cm에 달하는 지누아리사촌(*G. acuminata*)의 사분포자체를 채집하였다. 조직배양에 사용된 시료는 이 엽체에서 계대배양을 통해서 유지된 strain을 사용하였다. 종의 동정은 엽상체와 이의 절편을 현미경으로 관찰한 내부 구조 및 생식기관의 형태를 통하여 동정하였다.

조직배양은 분기한 식물의 주지를 5 mm 조직으로 잘라낸 후 멸균해수에서 수회 붓으로 세척하였으며, 멸균해수는 구멍크기 0.4 μm 의 막여과지로 걸러낸 해수를 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 세척한 조직은 60×15 mm 플라스틱 배양용기에 넣어 온도 15°C의 배양기에서 조도 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 조건으로 정치 배양하였다. 조직절편에서 방출된 사분포자를 마이크로 핀셋을 이용해서 다른 샐리에 각각 분리하여 순수배양을 하였다.

1~2 mm의 반상근을 가는 핀셋과 나이프로 가늘게 절단해서 새로운 샐리에 분산시켜서 재생생장의 관찰과 계대배양을 하였다. 재생체와 사분포자에 의한 신생개체의 배양은 300 ml의 원형플라스크에서 15°C, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 조건으로 통기 배양하였다.

반상근의 성장과 형성률은 60×15 mm 플라스틱 배양용기에 조직절편을 배양한 재생체로부터 사분포자를 받아 5, 10, 15, 20, 25°C의 5개 온도 구간에서 각각 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 조건과 15에서 40, 80, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 조건으로 5주간 정치 배양하였다. 배양 중 광주기는 명기 10시간, 암기 14시간(10L:14D)의 조건으로 하였으며, 배양액은 일주일에 한번씩 교환해 주었다.

사분포자체, 수배우체와 암배우체의 각각 생활사의 단계가 다른 식물체를 얻기 위하여 기존의 모조로부터 얻은 조직 배양체를 1 cm 이상의 절편으로 잘라내어 15°C, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 조건에서 통기 배양하여 다량의 식물체(clone)를 얻었으며 암, 수 배우체는 사분포자에서 유래한 신생개체를 통기 배양하여 성숙에 의한 과포자의 방출 유무를 통해 암, 수 배우체를 구분하였다.

결 과

지누아리사촌의 엽체 형태

지누아리사촌(*G. acuminata*) 식물체는 외부적으로 직경 1~3 mm의 작은 반상근에서 수 개체씩 모여서 나며, 하부의 뚜렷한 줄기에서 1~2회 분기하여 편압된 수 개의 주지를 내고 다시 우상으로 분기한다(Fig. 1, A). 주축은 주로 엽상체의 하부에서 2회 차상으로 분기하여 수 개의 주축이 된 후 넓게 우상으로 분기하며 표면과 연변부에서 길이 1 cm 내외의 단조 또는 차상의 부지를 다수 내었다. 엽상체의 절단면을 통한 세포의 배열을 관찰하면 우상분기하는 차상 주지의 경우 피층과 수층이 구분되며, 피층세포열은 7~8개의 세포로 이루어지며 내부로 갈수록 세포는 커진다(Fig. 1, B). 다른 지누아리 종과는 달리 피층세포열이 적고 유연하였다. 포자가 방출되는 부분의 단면을 관찰하여 피층 표면에 매몰되어 있는 사분포자낭을 확인할 수 있었고, 이에 따라 이 식물체가 지누아리사촌의 생활사에서 사분포자체 단계임을 알 수 있다(Fig. 1, C). 강릉 해역에서는 3월부터 싹이 나기 시작하여 7~8월까지 번무하는데, 그 이후에는 식물체의 생육량이 감소하고 있다.

조직 절편의 배양

지누아리사촌 조직 절편의 배양시 포자 방출에서 재생 신탁이 형성되는 과정을 Fig. 1(D~J)에 나타내었다. 사분포자체를 채취하여 4~6 mm 크기의 조직으로 잘라낸 후 이 조직을 정치 배양하였다. 배양 1주 후 100 μm 정도의 재생체가 신장되었으며, 3주 후에는 엽체가 1 mm 정도 되었다. 배양 1개월 후에는 원조직에서 재생체가 1~2 mm 정도 신장되어 독립적인 개체로 성장하였다(Fig. 1, D). 조직배양에서 얻어진 재생체를 통기 배양한 2개월 후에는 이 개체에서 방출한 사분포자가 엽면에 방출되었다(Fig. 1, E와 F). 사분포자는 엽체의 표면에서 방출된 뒤 1일 후에 발아관을 통한 세포질의 이동이 시작되고 발아관을 내게 된다(Fig. 1, G). 발아관에서 계속적인 분열로 환상의 반상근(circular crust)을 만드는데 배양 3주후 딱딱한 각상체로 배양용기 바닥에 붙어 붉은 색의 반상근을 이룬다(Fig. 1, H). 배양 45일 후에는 반상근의 중앙부에서 직립엽체(upright thalli)가 나타난다(Fig. 1, I). 직립엽체는 배양 4개월 후에 길이 6.5 cm까지 성장하였다(Fig. 1, J).

반상근의 성장 및 형성률

사분포자에서 발아하여 반상근이 형성되었는데 이는 대량 종묘생산을 위해서는 신탁으로 발전되는 반상근의 대량 확보가 필요하다. 이 반상근 성장의 최적 온도와 조도 조건을 검토하였다(Fig. 2). 반상근의 크기는 온도와 조도 조건에 따라 다르게 성장이 나타났는데 배양 5주안에서 온도에 따른 성장은 5~25°C의 5개 구간에서 온도 조건이 높을수록 반상근의 성장이 좋게 나타났다. 고온도인 15, 20, 25°C에서는 낮은 온도인 5, 10°C와

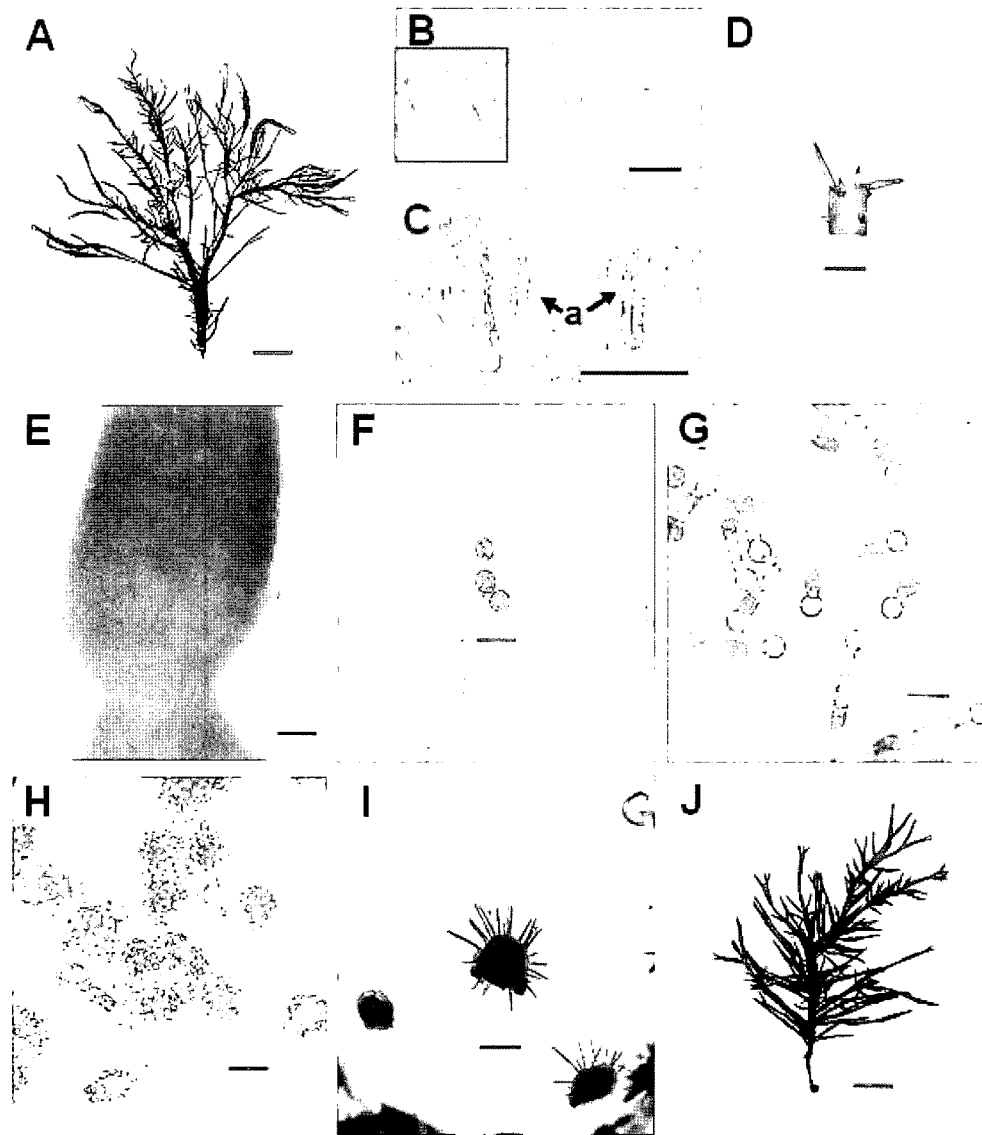


Fig. 1. Development of *Grateloupia acuminata* in indoor culture. A: tetrasporangial plant scale, 2 cm B: cross-section of blade. scale, 50 μm C: tetraspore. scale, 50 μm D: regenerated thallus from tissue. scale, 5 mm E: spore released on surface of tissue. scale, 80 μm F: tetraspore. scale, 40 μm G: germination of tetraspore. scale, 40 μm , H: circular crusts. scale, 40 μm , I: upright thalli. scale, 5 mm J: new blade scale, 1 cm.

큰 차이를 보였다. 특히 배양 2주~4주에 걸치는 배양시기에 성장이 급격히 높아졌다.

25°C의 가장 높은 온도에서는 배양 2주에서 3주가 될 때 가장 빠른 성장을 보였다. 조도별 비교시 15°C의 동일 온도 조건에서 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 과 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 에서 보다 성장이 좋았다. 그러나 조도에 따른 성장의 차이는 크게 나타나지 않았다.

반상근의 형성율(Fig. 3)은 온도 조건에서는 15~25°C 구간에서는 배양 2주 후에 95% 이상이었다. 그러나 저온도인 5°C와 10°C 조건에서는 70% 이하를 나타내어 고온도 조건과는 뚜렷한 차이를 보였다. 조도를 달리한 온도 15°C 동일 조건에서 반상근의 형성율은 배양 1~2주에 큰 차이를 보였으나 배양 4주에

모두 95% 이상을 보였다. 배양 1주에서는 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 조건의 반상근 형성율이 90% 이상으로 가장 좋았으며 그 다음 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 순이었다.

암, 수 배우체 및 포자체 식물

사분포자에서 발생한 직립의 유엽을 두 개체씩 통기배양한 결과, 배양 3개월 후에 과포자를 방출하는 암배우체로 성장하였다. 이 개체와 함께 배양한 개체는 수배우체로 성장하였으며, 성숙에 의한 유성생식을 통해 과포자의 방출이 이루어졌다. 이후 암배우체와 수배우체를 분리배양하여 순수한 암·수 배우체를 유지하였다. 사분포자체는 조직배양한 개체를 대상으로 실내에서 배양·유지하여 이 식물의 3상을 확보하였다. 사

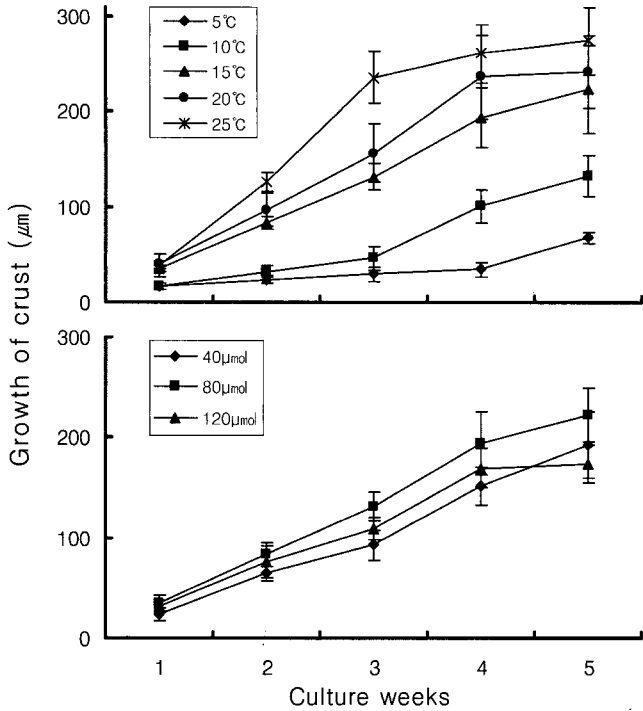


Fig. 2. Growth of crust of *Grateloupia acuminata* in different water temperatures (°C) and photon irradiance ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

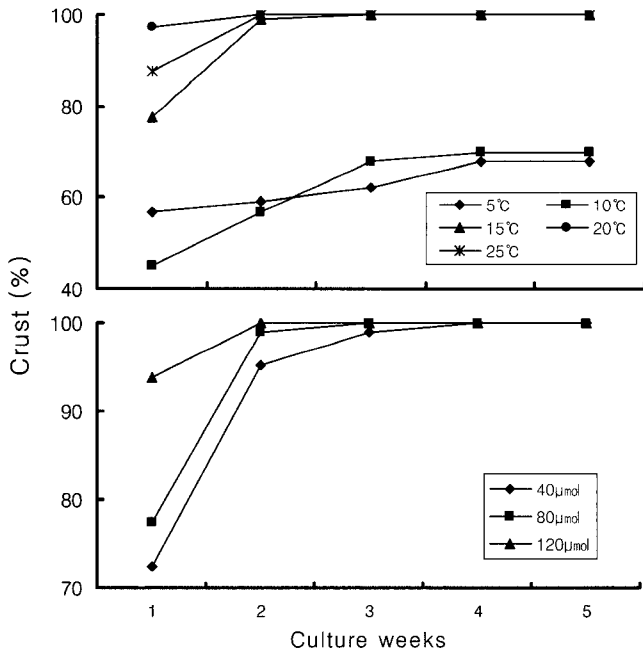


Fig. 3. Fomation rates of crusts of *Grateloupia acuminata* in different water temperatures (°C) and photon irradiance ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

분포자체는 포자를 방출한 조직배양체를 대상으로 통기배양한 결과, 배양 3~4개월마다 주기적인 사분포자의 방출을 관찰할 수 있었다.

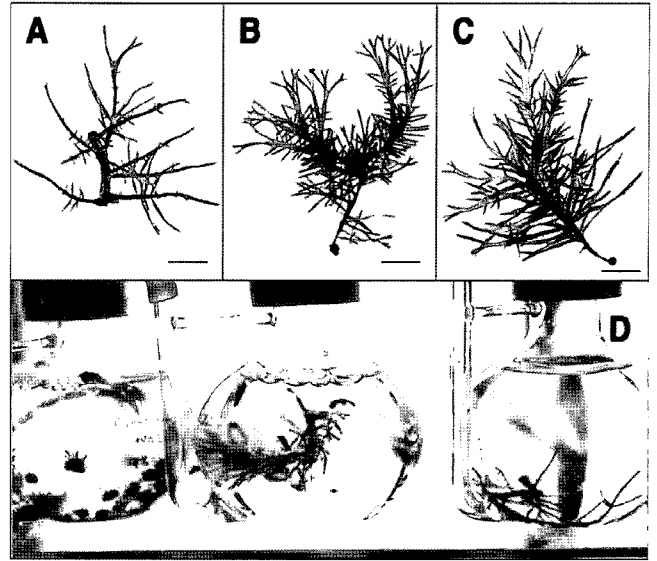


Fig. 4. Three different phase of individual and cultured plants (A~C) of *Grateloupia acuminata*. (A: tetrasporophyte, B: male gametophyte, C: female gametophyte. Scale, 1 cm).

고 찰

지누아리사촌(*G. acuminata*)의 조직배양에서 반상근(crust)을 거쳐 직립엽체(upright thalli)를 만든 후 실내배양에서 성체로 성장이 되었다. 지누아리류의 대량생산을 위한 종묘는 사상체나 반상근의 형태로 배양 strain을 보존하여 필요할 때 이용하는 것이 가능함을 보여 주었다. 참지누아리뿐 아니라 생활사 양식이 이와 유사한 미끌도박, 풀가사리와 도박 종류도 기부 반상근(basal crust)에서 엽체가 재생하고 이런 방법은 다른 종에도 적용시킬 수 있다(Chiang, 1993; Migita, 1988).

지누아리 종류의 생활사를 보면 포자에서 작은 반상근으로 발전하고 이는 사상체나 엽체가 되기도 하고 사상체나 반상근은 새로운 반상근을 만들어내거나 또는 새로운 엽체는 이전의 반상근에서 생기게 된다. 기부 반상근(basal crust)은 극한 환경에 더 잘 적응할 수 있어서 crust를 만들지 않는 해조보다 더 적응성을 높게 된다. 이러한 다양한 생식전략을 갖는 것은 적합하지 않은 환경조건에 생존하기 위해 생물의 적응 능력을 높여 주고 형태변이가 매우 다양해짐을 알 수 있다(De Clerck et al., 2005; Harlin and Villalard-Bohnsack, 2001). 북미 북동연안에는 *G. doryphora* 종류는 보고되지 않았으나 1994년에 로드아일랜드에 출현한 이래 빠르게 확산되고 다양한 재가입 전략은 이 종이 이입종으로서 성공하고 있음을 부분적으로 설명할 수 있다. 북미와 프랑스 연안에서는 지누아리 종이 외부 침입종으로 최근 연안에 확산되는 경향을 보인다(Marston and Villalard-Bohnsack, 2002; Simon and Deslandes, 2001).

이 실험에서 반상근의 성장 적온을 분석하기 위한 연구에서 배양 2~4주 시기에 고수온인 15~25 °C에서 성장이 급격히 좋았

으며 25 °C에서는 배양 2~3주에서 가장 빠른 성장을 보였다. 반상근의 형성율도 고온도에서 높게 나타났다. 이는 지누아리가 다른 해조 양식종에 비해 여름 식물로 이 식물의 양식은 여름철 양식 가능성을 보여 주었다. 바다 양식에서 여름철 양식은 겨울철 양식에 비해 양식어장의 휴어기를 이용할 수 있으므로 시설이나 노동력 면에서 유리하다. 지누아리류는 광염성이며 낮은 조도에서도 잘 자라고 미역이나 다시마 양식장 기존의 로우프를 이용할 수 있다(Wong and Chang, 2000). 지누아리 식물은 동형세대교번을 하는 종으로 암, 수배우체 및 포자체가 모두 육안적인 크기로 야외에서는 구분하기가 쉽지 않다. 각기 다른 이 식물체의 성장도나 성분 차이로 어떤 종묘가 대량양식에 우수한 strain인지를 결정할 수 있다.

지누아리사촌 식물은 5주 후에는 2 mm 이상의 분지를 형성하여 빠지누아리의 1 mm 크기에 비해 성장이 양호하였다. 이러한 빠른 생장은 종묘생산 실험을 위한 재료로서 적합하였다. Iima et al.(1995) 등은 지누아리사촌 종류의 basal crust의 절편에서 재생력을 이용하여 실내배양으로 직립엽체를 만들어 내고 crust의 절편으로 김발과 굴뚝데끼에 붙여 바다양성을 시도하였다. 시험적으로 엽체의 양성이 가능하였지만 아직 양식 산업화하지 못하고 있다.

우리나라에서 해조양식종으로 보편화된 미역, 다시마 종류는 포자를 씨줄에 부착시켜 어미줄에 감아주는 형태로 갈조류는 대부분 이런 형태로 양식되고 있다. 홍조식물인 김은 조가비 사상체를 유도하여 포자가 기질에 붙게 하는 형태이다. 반상근 형태인 딱딱한 종묘를 로우프에 부착시키는 것은 포자의 부착과는 큰 차이를 보인다. 콜롬비아의 Bula-Meyer(1990)은 PVC 파이프 틀을 일정 수심에 고정시켜 지누아리 절편을 부착시킨 후 양식을 실시하여 좋은 효과를 보였으나 부착생물로 인해 양성이 실패하였다. Sylvester and Waaland(1983)은 들가사리 작은 절편의 재생과정 연구에서 부착부(holdfast)를 만든 뒤 무균화 처리한 나일론 네트의 인공기질에 절편의 재생력을 이용하여 양성하였다. 이러한 기법은 종의 배양 잠재력을 확산시키고 다른 해조의 영양번식에 응용될 수 있다.

요 약

유용 해조류인 지누아리사촌(*Grateloupia acuminata* Okamura) 사분포자체의 실내배양에서 조직 절편의 재생과 각상체의 성장에 대한 온도와 조도의 영향을 분석하였다. 조직절편에서 얻은 재생엽에서 사분포자를 얻고 이것은 기부반상근과 직립엽체로 발전하였다. 온도별 반상근의 성장은 배양 1주후에 온도 25 °C 조도 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 조건에서 275 μm 로 가장 좋았다. 그러나 고온도의 조건에서는 3주후에 더 이상 성장하지 않았다. 반상근에서 직립엽체로 발전하는데 온도 10 °C에서는 3주 걸린 반면 5 °C에서는 4주간 걸려 저온도에서 성장이 천천히 나타났다. 15 °C의 동일 온도조건에서 조도의 영향은 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의

조건에서 반상근의 성장과 분화가 잘 이루어졌다. 통기배양에서 직립엽체는 4개월 후에 6.5 cm 크기의 엽체로 자랐다. 또한 사분포자에서 암, 수배우체가 형성되었으며 여기에서 사분포자체를 확보하게 되므로 배양실험을 통해 지누아리사촌의 생활사 과정을 완성하였다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 강릉대학교 장기해외파견 연구 지원에 의하여 수행되었다.

참고문헌

- Bula-Meyer, G., 1990. Experimental culture in the sea of the red macroalgae *Grateloupia filicina*. In Oliveira EC de, Kautsky N (eds), Workshop Proceedings, Cultivation of Seaweeds in Latin America, April 2-8, 1989. Univ. Sao Paulo/International Foundation for Science, 101-104.
- Caliceti, M., E. Argese, A. Sfriso and B. Pavoni, 2002. Heavy metal contamination in the seaweeds of the venice lagoon. *Chemosphere*, 47, 443-454.
- Chiang, Y. M., 1993. The developmental sequence of the marine red alga *Grateloupia filicina* in culture. *Korean J. Phycol.*, 8(2), 231-237.
- De Clerck O., A. Gavio, S. Fredericq, I. Barbara and E. Coppejans, 2005. Systematics of *Grateloupia filicina*(Halymeniaceae, Rhodophyta), based on the sequence analyses and morphological evidence, including the reinstatement of *G. minima* and the description of *G. capensis* sp. nov. *J. Phycol.*, 41, 391-410.
- Harlin, M. M. and M. Villalard-Bohnsack, 2001. Seasonal dynamics and recruitment strategies of the invasive seaweed *Grateloupia doryphora*(Halymeniaceae, Rhodophyta) in Narragansett Bay and Rhode Island Sound, Rhode Island, USA. 40(5), 468-474.
- Kang, J. W., 1966. On the geographical distribution of marine algae in Korea. *Bull. Pusan Fish. Coll.*, 7, 1-136.
- Lee, H. B., 1987. A systematic study of Halymeniaceae(Rhodophyta, Cryptonemiales) in Korea. Ph. D. thesis, Seoul Nat. Univ., Seoul, Korea. pp. 390.
- Iima, M., T. Kinoshita, S. Kawaguchi and S. Migita, 1995. Cultivation of *Grateloupia acuminata*(Halymeniaceae, Rhodophyta) by regeneration from cut fragments of basal crusts and upright thalli. *J. Appl. Phycol.*, 7, 583-588.
- Marston, M. and M. Villalard-Bohnsack, 2002. Genetic variability and potential sources of *Grateloupia doryphora*(Halymeniaceae, Rhodophyta), an invasive species in Rhode Island waters (USA). *J. Phycol.*, 38, 649-658.
- Migita S., 1988. Cultivation of *Grateloupia filicina*(Rhodophyta, Cryptonemiales) by regeneration of crusts. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 1923-1927 (in Japanese).
- Simon, C., E. ArGall and E. Deslandes, 2001. Expansion of the red alga *Grateloupia doryphora* along the coasts of Britt-

- any(France). *Hydrobiologia*, 443, 23–29.
- Sohn, C. H., 1998. The seaweed resources of Korea. In *Seaweed resources of the world*. Japan Inter. Cooper. Agency. pp. 431.
- Sylvester, A. W. and J. R. Waaland, 1983. Cloning the red alga *Gigartina exasperata* for culture on artificial substrates. *Aquacultures*, 31. 305–318.
- Wong, S. L. and J. Chang, 2000. Salinity and light effects on growth, photosynthesis, and respiration of *Grateloupia filicina* (Rhodophyta). *Aquaculture*, 182, 387–395.
-

원고접수 : 2006년 7월 31일

수정본 수리 : 2006년 8월 23일