

좁나도히초미(*Polystichum braunii* (Spenn.) Fée) 포자체 증식을 위한 기내 포자 발아와 전엽체 배양 조건

권혁준 · 한지현 · 이철희 · 김수영

Conditions of *In Vitro* Spore Germination and Prothallium Culture for Sporophyte propagation of *Polystichum braunii* (Spenn.) Fée

Hyuk Joon Kwon · Ji Hyun Han · Cheol Hee Lee · Soo-Young Kim

Received: 26 July 2017 / Revised: 19 October 2017 / Accepted: 20 October 2017

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study was conducted to investigate the optimal conditions for spore germination, prothallus propagation, sporophyte formation, and seedling growth in *Polystichum braunii* (Spenn.) Fée. The rate of spore germination and early prothallium development was high in Knop (41.2%), which had low mineral content. The optimal medium for prothallus propagation and sexual organ formation was 2MS medium (2% sucrose). Among the various mixtures of cultivation soil (bedding soil, peat moss, perlite, and decomposed granite), a mixture of bedding soil and decomposed granite at a ratio of 2:1 (v:v) had a positive effect on sporophyte formation (276.3 ea/7.5 m²). The most efficient conditions for promoting the growth of sporophytes were pots filled with only bedding soil.

Keywords Braun's holly fern, Fern, Masspropagation, Medium type, Prickly shield fern, Pteridophyta

서 언

좁나도히초미는 관중과 십자고사리속에 속하는 하록성 다년생 양치식물로 초장은 50~100 cm이며, 엽병은 짙은 갈색으로 비늘조각이 밀생하고 엽신은 넓은 피침형으로 2회 우상(羽狀)으로 갈라진다(Lee and Lee 2015). 좁나도히초미의 비늘조각은 가장자리가 밋밋하고 잎몸이 타원상 피침형으로 아래쪽을 향하여 현저히 좁아지는 반면 나도히초미와 참나도히초미는 비늘조각의 가장자리가 불규칙한 돌기가 발달하고 잎몸이 좁아지지 않은 점에서 구별된다(Lee 2010).

우리나라에서는 좁나도히초미를 주로 관상용으로 이용하고 있으나 중국에서는 근경부위를 포랑이궤(布朗耳蕨)이라는 한약재로 지혈, 살충 및 청열해독용으로 사용하여 주로 유행성감기, 볼거리, 구충 등 치료 목적의 처방에 이용된다(Jeong and Kim 2009). 좁나도히초미는 관상, 약용소재 및 천연물 소재로 잠재적 활용가치가 있으나 증식연구가 전무하다. 특히 야생에서 굴취한 묘를 분주하여 상업용으로 유통되고 있어 활용과 보존을 위한 증식연구가 매우 필요할 실정이다.

양치식물은 약 4억년전인 고생대 데본기에 출현한 것으로 알려져 있으며, 지구의 다양한 환경변화에 적응하면서 전엽체(gametophyte)와 포자체(sporophyte)의 세대교번을 통한 번식체계를 가지게 되었다. 포자발아에서 전엽체 증식까지는 반수체(n)이며, 전엽체의 장정기에서 생성된 정자가 장관기로 이동한 후 수정이 일어나 포자체(2n)가 생성된게 된다(Awasthi 2009). 따라서 양치식물 증식 연구는 포자발아, 전엽체 증식, 포자체 형성 등 각 단계별 최적 조건 규명이 매우 중요하다.

포자를 이용한 양치식물 증식은 보존과 활용을 위한 대량

[†]These authors contributed equally to this work.

H. J. Kwon[†] · S.-Y. Kim (✉)

국립생물자원관
(National Institute of Biological Resources, Incheon 22689, Korea)
e-mail: sy7540@korea.kr

J. H. Han[†] · C. H. Lee

충북대학교 축산·원예·식품공학부 생물건강소재산업화사업단
(Brain Korea 21 Center for Bio-Resource Development, Division of Animal, Horticultural, and Food Sciences, Chungbuk National University)

증식에 효과적인 방법으로 알려져 있다. 포자엽 한 장에서 생산되는 포자 개수는 약 7백만개로 매우 많아 이를 이용한 포자의 무균발아 및 전엽체 생산은 양치식물 번식률을 극대화 할 수 있어 효율적인 대량증식과 연중생산이 가능하다 (Fernandez et al. 1999). 또한 일반 재배농가에서 사용되고 있는 무성번식에 비해 증식에 필요한 소요일수를 단축할 수 있으며, 생산량 조절도 용이하다 (Lee 2004; Shin 2007). 그러나 종에 따라 포자 및 전엽체의 증식조건이 달라 종 특성에 따른 연구가 필요하다 (Cox et al. 2003; Fernandez and Revilla 2003; Menendez et al. 2011).

기내 증식을 통해 생산된 전엽체는 기외 순화와 이식을 통해 포자체를 형성하는데 전엽체를 분쇄한 다음 적정 배양토에 치상하면 전엽체의 전형성능이 촉진되어 포자체 형성이 증가한다 (Fernandez et al. 1996; Miller 1968). 또한 배양토 종류에 따른 토양함수량은 전엽체 장정기의 정자 이동과 관련이 있어 포자체 형성에 영향을 미치므로 종 특성에 따른 배양토 조건 연구는 매우 중요하다 (Greer and McCarthy 2000; Huang et al. 2004; Klekowski and Lloyd 1968; Klekowski 1969; Korpelainen 1994).

이에 본 연구는 좁나도히초미 포자의 기내 무균발아와 전엽체 증식조건을 규명하고, 배양토 종류에 따른 전엽체 기외 순화 및 증식을 통해 포자체 형성조건과 우량묘 생산방법을 확립하여 효율적인 대량증식방법을 개발하고자 수행되었다.

재료 및 방법

포자 기내발아

실험재료는 2014년 7월에 강원도 인제군 일대에서 포자낭이 갈색으로 성숙한 좁나도히초미 포자엽을 채집하여 음건한 후 100 μm sieve를 이용하여 정선한 포자를 사용하였다. 정선된 포자는 50 mg을 정량하여 15 mL conical tube에 넣고 멸균수 10 ml를 첨가하여 4°C 저온저장고에서 24시간 동안 침지 처리하였다. 침지가 완료된 포자는 1.4% sodium hypochlorite (NaClO) 용액 10 ml로 13분간 살균하였으며, 멸균수로 3회 세척하였다. 포자의 살균과 세척은 원심분리기(MF 80, Hanil science industrial, Incheon, Korea)로 2000 rpm에서 3분간 처리 후 상등액을 제거하는 방법으로 수행하였다. 살균과 세척이 완료된 포자는 멸균수 40 ml를 첨가하여 실험재료로 사용하였다.

좁나도히초미 포자의 발아용 배지를 선발하기 위해 sucrose 1%, agar 0.7%, pH 5.7로 조절된 Knop 배지(Knop 1865)와 MS 배지(Murashige and Skoog 1962)의 농도를 1/8, 1/4, 1/2, 1배로 달리한 배지를 페트리디시(90 × 15 mm)에 20 ml 씩 분주하였다. 배지종류 및 농도를 달리한 배지에 각각 준비된 포자 용

액을 1 ml씩 파종하였다.

파종이 완료된 페트리디시는 온도 25°C, 광도 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 광주기 16/8 h 조건에 성장상에 완전임의로 배치하였다. 발아율은 광학현미경(Ni-U, Nikon, Japan)을 이용하여 관찰되는 포자 수가 100립 이상일 때 조사하였으며, 페트리디시 당 3회로 4반복하였다.

전엽체 기내배양

기내 무균발아를 통해 형성된 전엽체를 MS 배지를 이용하여 2개월 간격으로 계대 배양하여 실험 재료로 사용하였다. 모든 실험은 200 ml 배양병을 이용하였으며, 배지를 30 ml 씩 분주하고 메스로 곱게 다진 전엽체 30 mg를 멸균수 1 ml과 함께 치상하여 8주간 배양하였다.

전엽체 증식을 위해 최적 배지 선발은 Sucrose 3%, pH 5.7, agarose 0.8%로 조절된 Knop 배지와 농도를 1/8, 1/4, 1/2, 1로 조절된 MS배지를 이용하였다.

Sucrose와 활성탄 농도조건 실험에서는 전엽체 증식 배지로 선발된 2 MS 배지를 사용하였다. Sucrose를 무처리, 1, 2, 3, 4%로 조절한 배지와 활성탄을 무처리, 0.2, 0.4, 0.8%로 농도를 각각 달리한 배지를 이용하였다.

질소 공급원 비율에 따른 전엽체 성장 실험은 2 MS의 총 질소농도인 120 mM를 기준으로 하여 암모니아태질소(NH₄Cl)와 질산태질소(KNO₃)의 mole 농도비를 0:120, 40:80, 80:40, 120:0 mM로 다르게 첨가한 배지를 이용하였다.

배양환경은 온도 25±1.0°C, 광도 30±2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 광주기는 16/8 h으로 조절된 배양실이었으며, 전엽체 형태형성은 실체현미경(SZ-51, Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

기외 포자체 형성 및 생육

전엽체 증식실험을 통해 기내에서 증식된 전엽체를 수세하여 agar를 제거하고 0.03% Hymexazol (다찌가렌, (주)아그로텍, Korea) 희석액에 1시간 침지한 다음 5회 수세한 후 기외 포자체 형성 실험을 위한 재료로 사용하였다. 좁나도히초미의 기외 전엽체 증식 및 포자체 형성에 적합한 배양토를 규명하고자 원예용 상토[B, 한아름상토 2호, (주)신성미네랄, Korea], Peatmoss (Pt, SunShine, Sun Gro Horticulture, Canada), Perlite [Pr, 뉴펄샤인 2호, (주)지에프씨, Korea] 및 마사토(D, 입자크기 2 mm, 김해삼계마사, Korea)를 혼합비율(1:0, 2:1, 1:1:1)을 달리하여 8종류의 배양토를 조성하였다 (Table 1).

조성된 배양토는 사각 화분(7.5 × 7.5 × 8.3 cm, Cosmo corporation, USA)에 담아 평탄화하였으며, 각 처리별로 25 ml 증류수에 전엽체 1 g를 넣어 hand blenders (V 8000, Boowon, Korea)로 10초간 분쇄한 전엽체를 균일하게 분주하였다.

각 처리구는 온도 25±1.0°C, 광도 30±2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (16/8h)로 조절된 배양실에서 12주간 재배하였다. 관수는 1

Table 1 Soil compositions used in this study

Treatment ^z	Soil composition
B ₁	Bedding soil only
Pt ₁	Peat moss only
B ₂ -Pr ₁	Bedding soil : Perlite = 2 : 1
B ₂ -D ₁	Bedding soil : Decomposed granite = 2 : 1
Pt ₂ -Pr ₁	Peat moss : Perlite = 2 : 1
Pt ₂ -D ₁	Peat moss : Decomposed granite = 2 : 1
B ₁ -Pt ₁ -Pr ₁	Bedding soil : Peat moss : Perlite = 1 : 1 : 1
B ₁ -Pt ₁ -D ₁	Bedding soil : Peat moss : Decomposed granite = 1 : 1 : 1

^zB, Bedding soil; Pt, Peat moss; Pr, Perlite; D, Decomposed granite. Subscripts indicate mixture ratios (v : v).

일 1회 두상 관수하였고 12주간 재배하여 형성된 포자채 수 및 생육정도를 비교하였다.

통계처리

통계처리는 SAS version 9.1 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA) 을 이용하였으며, 각 처리구의 평균을 구하고 던컨의 다중 검정방법(Duncan's multiple range test)을 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

포자 기내발아

배지종류에 따른 쯤나도히초미의 포자 발아율은 배지 내 무기물 함량이 적었던 Knop 배지에서 41.2%로 가장 높았다 (Fig. 1). 무기물 함량이 증가할수록 발아율이 감소하였고 무기물 함량이 가장 높았던 MS 배지에서는 발아 되지 않았다. Knop 배지에서 파종 후 4일차에 발아가 시작되었고, 1/8~1/2

MS 배지에서는 파종 8일 이후부터 발아되었다. 배지종류와 관계없이 28일차에는 발아세가 감소하고 전엽체 발달이 진행되었다. Knop 배지에서 발아한 포자는 가근이 형성되고 필라멘트형 전엽체로 발달되었으나, MS 배지에서는 무기물 농도에 관계없이 전엽체 발달이 매우 저조하였다. 이상의 결과, 쯤나도히초미의 최적 발아용 배지는 발아율과 초기 전엽체의 형성이 관찰된 Knop배지이다.

돌토끼고사리 [*Microlepidia strigosa* (Thunb.) C. Presl]와 가는 쇠고사리 [*Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale]의 포자발아 연구에서도 본 연구와 같은 경향으로 배지 내 무기물 함량이 적었던 Knop 배지에서 포자 발아율과 초기 전엽체 생육이 우수하다고 보고된 바 있다 (Cho and Lee 2017; Cho et al. 2017). 대다수의 양치식물 포자는 발아를 위한 영양분을 포함하고 있어 물과 소량의 영양분으로 발아와 초기 전엽체 발달이 진행되는 것으로 알려져 있다 (Miller 1968). 그러나 종에 따라 발아 후 초기 전엽체 형성에 다량의 영양분이 필요하며, 저농도 배지에서는 전엽체의 노화 진행속도가 빠르다 (Kwon et al. 2016). 따라서 양치식물의 종 특성에 따른 포자발아 연구는 매우 필요한 것으로 사료된다.

전엽체 기내배양

배지종류

상기 연구에서 포자발아를 통해 증식된 쯤나도히초미 전엽체를 배지종류 및 농도를 달리하여 8주간 배양하였다. 전엽체 증식은 무기물 함량이 가장 높았던 2MS 배지에서 우수하였고 무기물 함량이 감소할수록 생육이 억제되었다 (Fig. 2). 무기물 함량이 낮았던 1/8, 1/4 MS 배지의 전엽체 생체중은 4.2 g, 2.9 g 이었으며, 포자발아율이 높았던 Knop 배지의 생체중은 10.8 g으로 2MS배지에 비해 저조하였다.

전엽체 형태형성은 MS 배지농도가 증가할수록 녹색의 엽질이 짙어졌고, 저농도(1/8, 1/4 MS) 배지에서는 노화와 갈변속도가 빨랐다 (Fig. 3). MS배지를 제외한 모든 처리구에서 관형 전엽체로 발달되었으며, MS 배지의 농도가 낮아질수

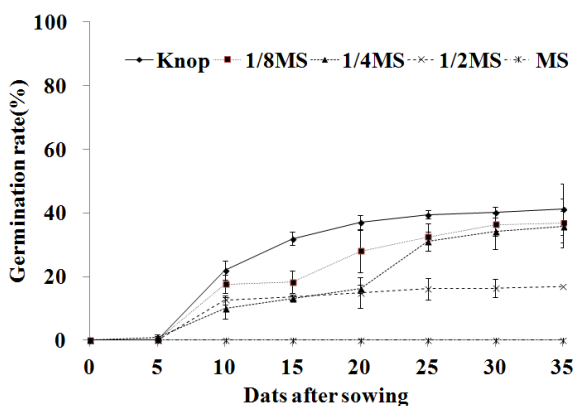


Fig. 1 Effect of culture medium on spore germination of *Polystichum braunii*. Bars represent standard error ($n = 4$)

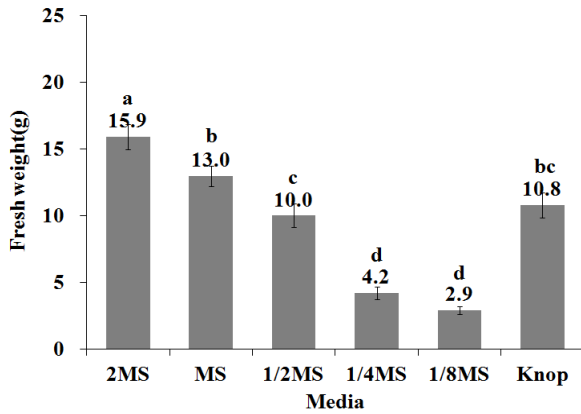


Fig. 2 Effect of culture medium on prothallus growth of *Polystichum braunii* cultured for 8 weeks. Bars represent standard error ($n = 4$). Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, $p < 0.05$

록 전엽체의 가근 수가 많아지고 길어졌으나 노화 진행속도가 빨랐다. Knop 배지에서는 가근 형성이 왕성하였으나 엽질이 매우 얇고, 부분적으로 갈변이 관찰되었으며, 1 MS와 2 MS 배지에서만 장정기가 발달되었다.

본 연구에서 쯤나도히초미는 2 MS 배지에서 전엽체 생육이 가장 왕성하였으나, 쯤나도히초미와 같이 십자고사리속에 속한 나도히초미 전엽체 증식은 오히려 2 MS에서 억제되고 1/2 MS 배지에서 가장 왕성한 것으로 보고된바 있다(Han 2016). 관중과에 속하는 참곰비늘고사리(*Dryopteris uniformis*)

와 고란초과인 우단일엽(*Pyrrhosia linearifolia*), 고란초(*Crypsinus hastatus*)는 영양물질이 많이 함유된 2 MS 배지에서 전엽체의 생육이 우수하였다(Shin 2007; Yang et al. 2001). 반면 우플과 청나래고사리(*Matteuccia struthiopteris*), 쇠고비과의 도깨비고비(*Cyrtomium falcatum*)는 MS 배지, 고비과의 고비(*Osmunda japonica*)는 1/8MS 또는 Knop 배지 등 양치식물의 전엽체 증식을 위한 배지조건은 각 종에 따라 구분되는 것으로 보고되었다(Jeong and Lee 2006; Shin 2007). 따라서 양치식물의 전엽체는 같은 과, 속에서도 종에 따라 영양분 요구도가 다른 것으로 확인되었다.

Sucrose 및 활성탄 농도

상기 연구에서 쯤나도히초미의 전엽체 증식률이 가장 왕성하였던 2MS 배지를 기본배지로 사용하여 sucrose 농도를 달리한 결과, sucrose 2%에서 전엽체 생체중이 19.2g으로 증식이 가장 우수하였다(Fig. 4). Sucrose 무처리구와 4% 처리구에서는 전엽체 증식이 억제되었으나, Sucrose 1~3% 농도에서는 가근이 형성되고 주걱형 전엽체로 발달되었다(Fig. 5). 특히 sucrose 2%에서 증식된 전엽체에서 쿠션(cushion)과 장란기(archegonium) 발달이 가장 왕성하였다.

활성탄 농도별 실험에서는 2 MS 배지에 활성탄 0.2%를 첨가한 배지에서 증식량이 가장 우수하였으나, 무처리에서 0.4%의 활성탄 농도별 전엽체 증식량은 통계적 유의성이 없

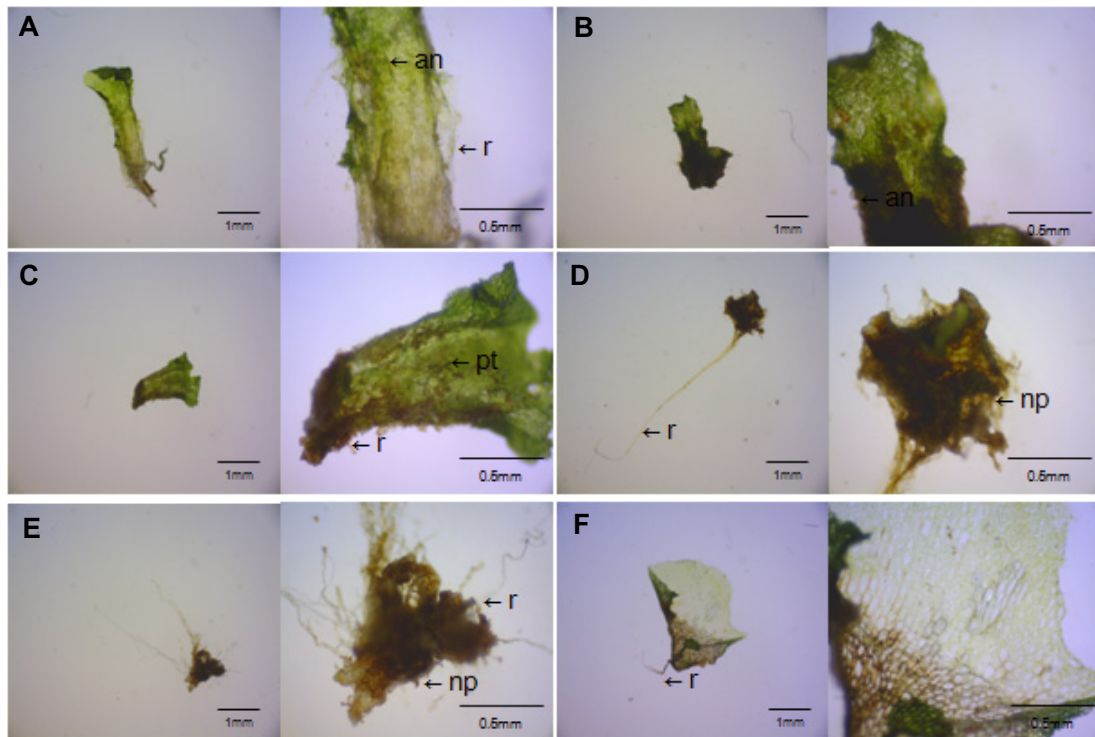


Fig. 3 Cultural response and sexual organ formation from prothallus of *Polystichum braunii* cultured on different media. A, 2 MS; B, MS; C, 1/2 MS; D, 1/4 MS; E, 1/8 MS; F, Knop; an, antheridium; np, necrotic prothallus; r, rhizoid

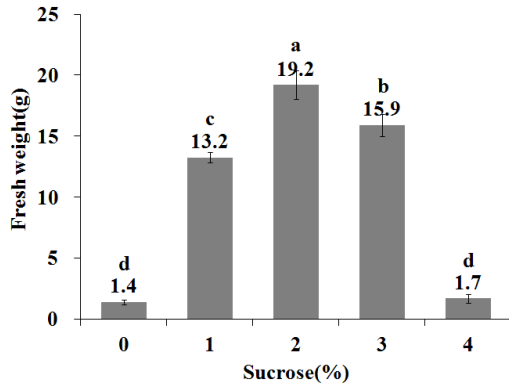


Fig. 4 Effect of sucrose concentration on prothallus growth of *Polystichum braunii* cultured for 8 weeks. Bars represent standard error ($n = 4$). ^aMean separation within columns by Duncan's multiple range test, $p < 0.05$

었다(Fig. 6). 활성탄 농도가 가장 높았던 0.8% 처리구에서는 전엽체 생육이 감소하였다.

양치식물의 전엽체 기내 배양에서 배지에 첨가되는 sucrose와 활성탄은 무기물과 함께 삼투압을 변화시켜 증식 및 생식기관 형태형성에 영향을 미치므로 종별 연구가 중요하다(Menéndez et al. 2011). 본 연구에서도 sucrose 농도에 따라 좀나도히초미의 장란기 및 장정기의 생식기관 형태형성이 다르게 나타났고, 활성탄 농도에서는 유의적인 차이가

없었다. 따라서 좀나도히초미 전엽체 증식에서는 sucrose 2%의 2 MS 배지를 이용하는 것이 장란기를 촉진시켜 포자체 증식에 유리할 것으로 사료된다.

좀나도히초미를 포함한 관중과 *Dryopteris affinis*와 *D. corleyii*를 비롯하여 공작고사리과 *Adiantum capillus-veneris*, 꼬리고사리과 *Asplenium adiantum nigrum*, *A. nidus* 등의 sucrose 농도별 실험에서도 본 연구와 동일한 sucrose 2%에서 증식량이 가장 우수하였다(Fernández et al. 1996, 1997, 1999; Somer et al. 2010).

질소급원 비율

상기 연구에서 전엽체 증식배지로 규명된 2MS 배지의 NH_4^+ 와 NO_3^- 의 비율을 달리하여 8주간 배양한 결과, $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^- = 40:80$ 및 $80:40$ mM 처리구에서 각 15.9 g, 15.3 g으로 왕성한 생육을 보였으며, 두 처리구간의 유의적인 차이는 없었다(Fig. 7). NH_4^+ 단용으로 배양하였을 때에는 생육이 감소하고, 전엽체가 다른 처리구보다 옅은 색을 보였다(Fig. 8).

$\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^- = 0:120 \sim 80:40$ mM 비율에서는 판모양 전엽체로 발달되었으며, 가근 형성이 왕성하였다. 반면 NH_4^+ 단용인 $120:0$ mM 처리구에서는 가근 형성이 억제되고 비정상적인 전엽체로 발달되었다. 생식기관 형성은 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^- = 40:80$ mM 처리구에서만 심장형 전엽체로 apical notch가 관찰되었다.

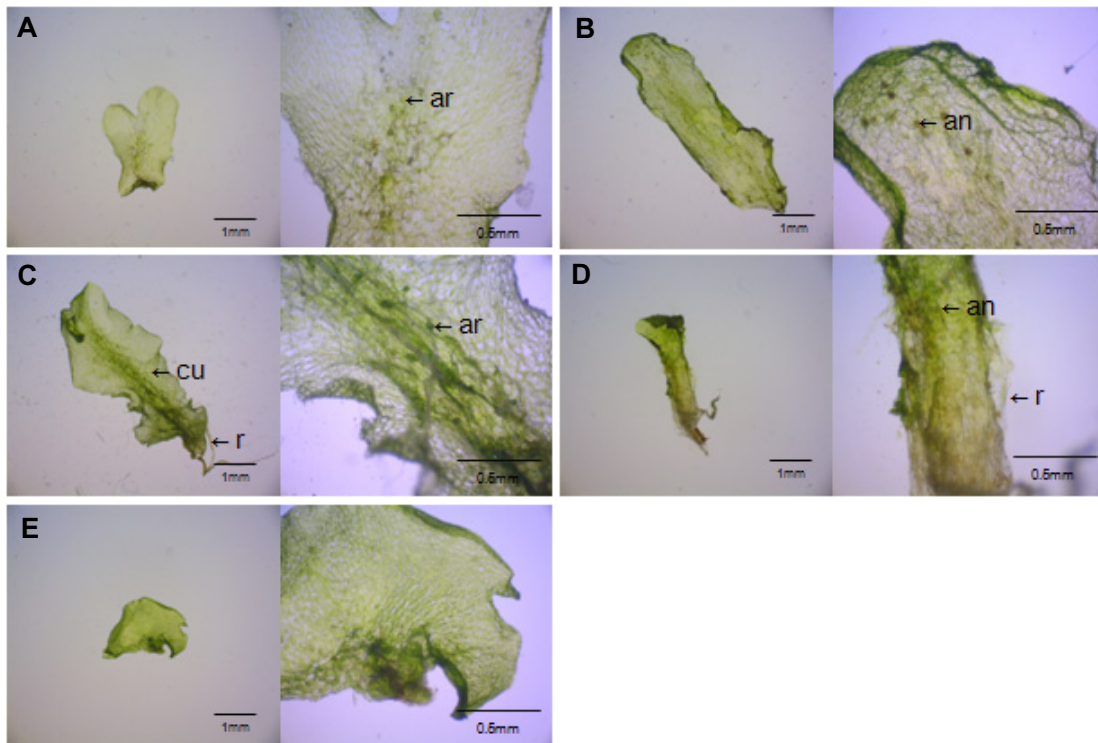


Fig. 5 Cultural response and sexual organ formation from prothallus of *Polystichum braunii* cultured on MS medium containing different concentrations of sucrose: ap, apical notch; ar, archegonium; pt, pluricellular trichome; r, rhizoid; ut, unicellular trichome. A, 0%; B, 1%; C, 2%; D, 3%; E, 4%; an, antheridium; ar, archegonium; cu, cushion; r, rhizoid

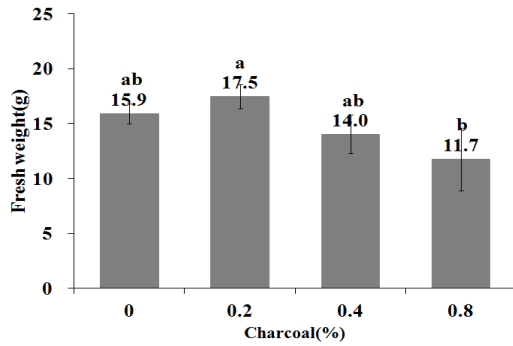


Fig. 6 Effect of charcoal concentration on prothallus growth of *Polystichum braunii* cultured for 8 weeks. Bars represent standard error ($n = 4$). ^zMean separation within columns by Duncan’s multiple range test, $p < 0.05$

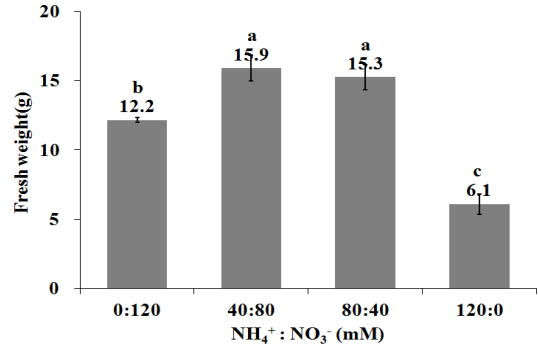


Fig. 7 Effect of NH₄⁺ and NO₃⁻ ratio on protallus growth of *Polystichum braunii* after 8 weeks in culture. Bars represent standard error ($n = 4$). ^zMean separation within columns by Duncan’s multiple range test, $p < 0.05$

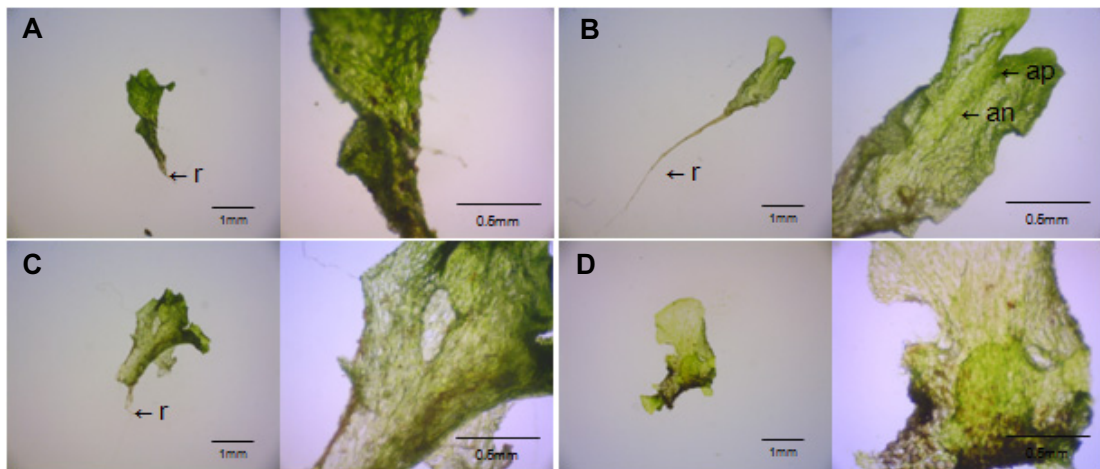


Fig. 8 Cultural response and sexual organ formation from prothallus of *Polystichum braunii* cultured on MS medium containing different ratios of NH₄⁺ and NO₃⁻; ap, apical notch; ar, archegonium; b, branched; pt, pluricellular trichome; r, rhizoid; ut, unicellular trichome. A, 0:120 mM; B, 40:80 mM; C, 80:40 mM; D, 120:0 mM; ap, apical notch; an, antheridium; r, rhizoid

Table 2 Effect of soil types on sporophyte formation and biomass of *Polystichum braunii*

Soil types ^z	No. sporophyte / Pot ^y (ea)	Fresh weight (g)		Dry weight (g)	
		A	U	A	U
B ₁	264.0a ^w	7.1a	3.2b	1.5a	0.4a
Pt ₁	0.0c	-	-	-	-
B ₂ -Pr ₁	155.8b	8.2a	4.3a	1.3a	0.4a
B ₂ -D ₁	276.3a	3.8b	3.0b	0.8b	0.4a
Pt ₂ -Pr ₁	0.0c	-	-	-	-
Pt ₂ -D ₁	0.0c	-	-	-	-
B ₁ -Pt ₁ -Pr ₁	21.3c	1.9c	1.4c	0.4c	0.2b
B ₁ -Pt ₁ -D ₁	26.0c	2.9bc	1.0c	0.4c	0.2bc

^zB, bed soil; Pt, peatmoss; Pr, perlite; D, decomposed granite.

^yPot (7.5×7.5×8.5 cm) containing 0.4 L cultural medium was used for this experiment.

^wMean separation within columns by Duncan’s multiple range test, $p < 0.05$.

배양토 종류에 따른 포자체 형성

기내에서 증식된 전엽체를 배양토 종류를 달리하여 기외에 치상한 결과, 포자체는 원예용 상토와 마사토를 2:1 (B₂:D₁)로 혼합한 배양토에서 276.3 ea/7.5 cm²로 가장 많이 형성되었

다(Table 2). 반면 피트모스(Pt)가 포함된 처리구에서는 포자체의 발생이 억제되었다(Fig. 9).

발생된 포자체를 배양토 종류를 달리한 후 이식하여 재배한 결과, 포자체 생육은 원예용 상토 단용(B₁)에서 생체중 및 견체중이 우수하였으며, 초폭, 엽수, 엽폭 및 엽록소의 함량

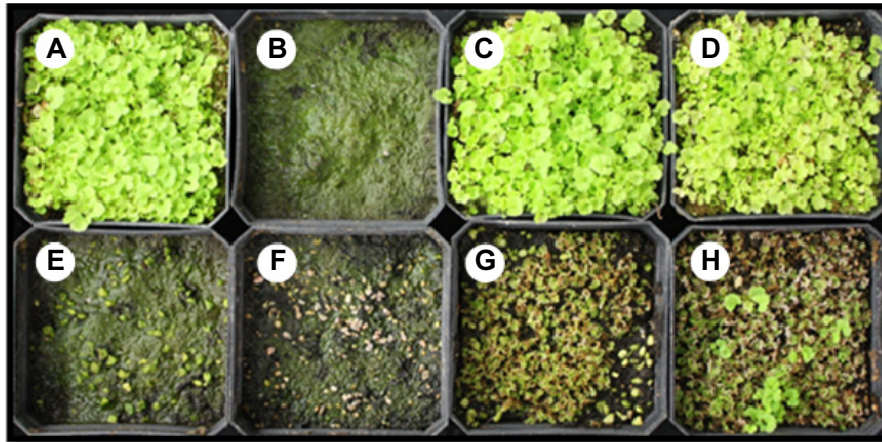


Fig. 9 Sporophyte formation of *Polystichum braunii* after 12 weeks cultivation according to soil types. A, B₁; B, Pt₁; C, B₂-Pr₁; D, B₂-D₁; E, Pt₂-Pr₁; F, Pt₂-D₁; G, B₁-Pt₁-Pr₁; H, B₁-Pt₁-D₁. B, Bed soil; Pt, Peatmoss; Pr, Perlite; D, Decomposed granite

Table 3 Effect of soil types on sporophyte growth of *Polystichum braunii*

Soil types ^z	Plant			Leaf		SPAD
	Length (cm)	Width (cm)	No. Leaf (ea)	Length (cm)	Width (cm)	
B ₁	10.3b	13.9a	4.0a	13.2b	14.0a	18.0
Pt ₁	-	-	-	-	-	-
B ₂ :Pr ₁	13.6a	12.9a	3.0b	15.0a	8.0b	11.8b
B ₂ :D ₁	9.8b	10.4b	3.3b	10.5c	5.2c	7.3c
Pt ₂ :Pr ₁	-	-	-	-	-	-
Pt ₂ :D ₁	-	-	-	-	-	-
B ₁ :Pt ₁ :Pr ₁	6.7c	8.9b	2.3c	9.1d	5.1c	5.7c
B ₁ :Pt ₁ :D ₁	6.1c	6.9c	2.1c	8.3d	5.4c	4.5c

^zB, bed soil; Pt, peatmoss; Pr, perlite; D, decomposed granite.

^yPot (7.5×7.5×8.5 cm) containing 0.4 L cultural medium was used for this experiment.

^xMean separation within columns by Duncan's multiple range test, $p < 0.05$.

도 유의적으로 높았다(Table 3). 반면, 포자체 형성수가 많았던 원예용 상토:마사토=2:1 (B₂:D₁) 배양토에서는 포자체 생육이 저하되는 경향을 보였다. 봉의꼬리와 도깨비고비 전엽체는 피트모스가 포함된 배양토에서 왕성한 생육을 보인 반면(Suh et al. 2006), 가는쇠고사리(Cho et al. 2017)는 피트모스가 포함된 배양토에서는 생육이 억제되어 본 연구와 같은 경향을 보였다.

이상의 실험결과, 쯤나도히초미의 기외 포자체 증식은 원예용 상토와 마사토를 2:1 (v:v) 비율로 혼합한 배양토를 이용하여 포자체를 형성시킨 후 원예용 상토로 이식하여 재배하는 방법이 쯤나도히초미의 우량묘를 대량생산할 수 있는 방법으로 사료되었다.

적 요

본 연구는 쯤나도히초미(*Polystichum braunii* (Spenn.) Fée)의 효율적인 증식방법을 규명하기 위해 기내 포자발아, 전엽체

증식, 기외 포자체 형성 등 단계별 배양조건을 찾고자 수행되었다. 포자 발아율과 초기 전엽체 발달은 무기물 함량이 적은 Knop 배지에서 41.2%로 가장 높았다. 전엽체의 증식 및 생식기관 형성을 위한 배지는 2% sucrose가 포함된 2 MS 배지였다. 또한 배양토 종류와 혼합비율을 달리하여 전엽체를 기외 이식한 결과, 원예용 상토와 마사토를 2:1 혼합한 배양토에서 재배하였을 때 포자체 형성이 276.3개/7.5 m²로 가장 많았다. 반면, 피트모스가 포함된 조건에서는 전엽체 증식 및 포자체 형성이 억제되었다. 포자체 육묘는 상토 단용처리구에서 재배하였을 때 생육이 가장 왕성하였다.

사 사

본 연구는 국립생물자원관 연구사업 “식물자원의 보존과 활용성 증대를 위한 국가야생식물종자은행 운영(NIBR2017 16102)”의 지원을 받아 수행되었다.

References

- Awasthi DK (2009) Cryptogams: Algae, Bryophyta and Pteridophyta. Krishna Prakashan Media, India
- Cho JS, Han JH, Lee CH (2017) Effects of medium components and composition on mass propagation of *Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale. Hort Sci Technol 35:131-141
- Cho JS, Lee CH (2017) Several factors affecting mass production of *Microlepia strigosa* (Thunb.) C. Presl sporophytes. Hort Sci Technol 35:46-58
- Cox J, Bhatia P, Ashwath N (2003) *In vitro* spore germination of the fern *Schizaea dichotoma*. Sci Hort 97:369-378
- Fernández H, Bertrand A, Sánchez-Tamés R (1997) Plantlet regeneration in *Asplenium nidus* L. and *Pteris ensiformis* L. by homogenization of BA treated rhizomes. Sci Hort 68: 243-247
- Fernandez H, Bertrand A, Sanchez-Tames R (1999) Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. Plant Cell Tissue Organ Cult 56:211-214
- Fernandez H, Bertrand AM, Sanchez-Tames R (1996) Influence of tissue culture conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* sp. *affinis*. Plant Cell Tiss Org Cult 45:93-97
- Fernandez H, Bertrand AM, Sanchez-Tames R (1999) Biological and nutritional aspects in fern multiplication. Plant Cell Tiss Org Cult 73:1-13
- Fernandez H, Revilla MA (2003) *In vitro* culture of ornamental ferns. Plant Cell Tiss Org Cult 73:1-13
- Greer GK, McCarthy BC (2000) Patterns of growth and reproduction in a natural population of the fern *Polystichum acrostichoides*. Am Fern J 90:60-76
- Han JH (2016) Establishment of *in vitro* culture system for mass propagation in eight ferns of Dryopteridaceae. Master Diss Chungbuk Natl Univ Cheongju, Korea
- Huang YM, Chou HM, Chiuo WL (2004) Density affects gametophyte growth and sexual expression of *Osmunda cinnamomea* (Osmundaceae: Pteridophyta). Ann Bot 94:229-232
- Jeong JA, Lee CH (2006) Prothallus morphogenesis of *Cyrtomium falcatum* (L.) Presl and *Cyrtomium caryotideum* var. *creanum* Nakai *in vitro* culture. Kor J Plant Res 19:360-364
- Jeong JG, Kim CH (2009) A herbological study on the plants of Aspidiaceae in Korea. Kor J Herb 24:57-65
- Klekowski EJ (1969) Reproductive biology of the Pteridophyta. II. Theoretical considerations. Bot J Linn Soc 62:347-359
- Klekowski EJ, Lloyd RM (1968) Reproductive biology of the Pteridophyta. I. General considerations and a study of *Onoclea sensibilis* L. Bot J Linn Soc 60:315-324
- Knop W (1865) Quantitative untersuchungen uber die ernahrung-sprozesse der pflanzen. Landwirsch Vers Stn 7:93-107
- Korpelainen H (1994) Growth, sex determination and reproduction of *Dryopteris filix-mas* (L). Schott gametophytes under varying nutritional conditions. Bot J Linn Soc 114:357-366
- Kwon HJ, Shin SL, Lim YK, Kim SY (2016) Spore germination and prothallium development conditions of *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw. Kor J Plant Res 29:400-406
- Lee CH (2004) Propagation and technique of masspropagation of Pteridophyta native to Korea. Kor Wild Res Assn 3:91-96
- Lee CS, Lee KH (2015) Pteridophytes of Korea : Lycophytes & Ferns. Geobook, Seoul, Korea
- Lee YN (2010) New Flora of Korea I. Kyohak, Seoul, Korea
- Menéndez V, Arbesú R, Somer M, Revilla A, Fernández H (2011) From Spore to Sporophyte: How to Proceed *In Vitro*: In Fernandez H, Kumar A, Revilla A (eds.), Working with Ferns: issues and applications, Springer, New York, USA. pp 97-110
- Miller JH (1968) Fern gametophytes as experimental material. Bot Rev 34:361-440
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
- Shin SL (2007) Several factors affecting *in vitro* masspropagation of eight fern species. Master Diss. Chungbuk Natl Univ Cheongju, Korea
- Somer M, Arbesú R, Menéndez V, Revilla MA, Fernández H (2010) Sporophytes induction studies in ferns *in vitro*. Euphytica 171:203-210
- Suh JT, Yoo DL, Lee HS, Nam CW, Kim SJ (2006) Effects of Culture Soil Combinations on Growth of *Pteris multifida*, *Cyrtomium falcatum* and *Cheilanthes argentea*. Kor J Plant Res 19:517-520
- Warncke PD (1986) Analysing greenhouse growth media by the saturation extraction method. Hort Science 211:223-225
- Yang HH, Jeong J, Kim HH, Lee CH (2001) Effect of culture condition on mass propagation of *Crypsimis hastatus* by *in vitro* culture. Kor J Plant Res 14:111-113