

가는쇠고사리의 대량번식에 미치는 배지구성물질과 배양토의 영향

조주성¹ · 한지현² · 이철희^{1,2*}

¹충북대학교 축산·원예·식품공학부 생물건강소재산업화사업단, ²충북대학교 원예과학과

Effects of Medium Components and Composition on Mass Propagation of *Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale

Ju Sung Cho¹, Ji Hyun Han², and Cheol Hee Lee^{1,2*}

¹Department of Horticultural Science, Chungbuk National University, Cheongju, 28644, Korea

²Brain Korea 21 Center for Bio-Resource Development, Division of Animal, Horticultural, and Food Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

*Corresponding author: leech@cbnu.ac.kr

Abstract

This study was conducted to investigate *in vitro* mass propagation methods suitable for each growth stage of *A. aristata* (G. Forst.) Tindale, from spore germination to sporophyte formation. Among spores germinated in 1/8 - 1 × MS medium and Knop medium, Knop medium yielded the highest germination percentage (87.1%). We cultured prothalli obtained from germinating spores for 8 weeks on media with different concentrations of sucrose and active carbon, as well as different concentrations and ratios of nitrogen, to select a suitable growth medium. *A. aristata* (G. Forst.) Tindale prothalli grew most actively in MS medium with 3% sucrose and 20 : 40 mM of NH₄Cl and KNO₃ (total concentration of 60 mM). We investigated sporophyte formation according to soil type, finding that bedding soil mixed with perlite at a 2 : 1(v / v) ratio yielded the highest number of sporophytes per pot (73.8 / 7.5 × 7.5 cm pot). By contrast, when peat moss was used alone or mixed with other substrates, prothallus development and sporophyte formation were suppressed. Therefore, the most effective propagation method for *A. aristata* (G. Forst.) Tindale is to grow prothalli in MS medium and to induce sporophyte formation in a mixture of bedding soil and perlite (v / v = 2 : 1).

Additional key words: Dryopteridaceae, fern, *in vitro* propagation, prothallus, sporophyte

서 언

양치식물의 번식은 포자를 포장조건에서 발아시켜 포자체를 얻는 유성번식이 가능하다. 그러나 이는

 OPEN ACCESS



Hortic. Sci. Technol. 35(1):131-141, 2017
<https://doi.org/10.12972/kjhst.20170014>

pISSN : 1226-8763
 eISSN : 2465-8588

Received: February 23, 2016

Revised: August 7, 2016

Accepted: October 9, 2016

Copyright©2017 Korean Society for Horticultural Science.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution NonCommercial License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

포자의 발아에서부터 포자체 형성까지 오랜 기간이 소요될 뿐만 아니라 외부 환경의 영향을 많이 받아 균일한 식물체를 얻을 수 없다. 또한 엽상체(frond), 포복지(runner), 근경(rhizome) 등의 영양기관을 이용한 무성번식법으로 성숙한 개체를 비교적 쉽게 얻을 수 있으나(Lee, 2004; Shin, 2007), 한 포기의 식물체에서 확보할 수 있는 개체수에는 한계가 있어 효율성이 떨어진다.

양치식물의 포자를 인공적인 환경을 조성하여 기내에서 배양하는 방법은 연중 대량생산을 가능케 한다(Padhya and Mehta, 1982; Higuchi and Amaki, 1989; Bertrand et al., 1999; Fernandez et al., 1999). 따라서 양치식물의 포자를 발아시켜 형성된 전엽체를 증식시키고, 전엽체에서 포자체를 유도하는 각 단계의 적정 배양환경을 구명하여 종별 최적의 번식조건을 확립하는 것은 경제적 가치가 있는 양치식물을 대량생산하기 위해 반드시 필요한 과제라 생각된다.

쇠고사리속(*Arachniodes*)의 가는쇠고사리[*Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale]는 식물구계학적 IV급이며, 전국적으로 분포하는 상록성 다년생 양치식물이다. 초장은 80 cm 내외이며, 톱니 끝이 까락처럼 뾰족한 형태적 특징이 있어 관상가치가 높다(KFS, 2005). 또한 국내에서 실내식물로 도입하기 위하여 수분환경 및 실내습도(Bang and Ju, 2002) 및 광적응성(Shin et al., 2010)에 대한 선행연구가 있어 실내 관상용 식물로 활용가치가 더욱 높아질 것으로 예상된다. 그러나 포자발아, 전엽체 발달 등 가는쇠고사리의 기내 번식방법에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 향후 관상용 소재로 이용가치가 높아 수요가 많아질 것으로 예상되나 효율적인 번식체계가 확립되어 있지 않은 가는쇠고사리의 포자 발아, 전엽체 증식 및 포자체 형성까지의 각 생육단계별 적합한 대량증식법을 구명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

포자 발아

제주도 서귀포시에서 수집된 가는쇠고사리[*A. aristata* (G. Forst.) Tindale]를 청주시의 무가온 비닐하우스에서 재배하였으며, 포자가 성숙되는 2014년 6월에 포자엽을 채취하였다. 이후 7일 동안 음건한 포자엽에서 포자를 정선하여 4°C의 저온저장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 포자파종을 위해 50mg의 정선된 포자를 증류수에 24시간 동안 침지하였으며, 이후 포자가 담긴 현탁액을 3분간 원심분리(MF 80, Hanil science industrial, Incheon, Korea)하여 상등액을 제거하였다. 또한 1.4% sodium hypochlorite액을 첨가하여 13분간 살균 후 세척하여 포자소독을 완료하였다.

포자의 발아용 배지를 선발하기 위해 기본 MS 배지(Murashige and Skoog, 1962)에 함유된 무기물 및 비타민 농도를 1/8, 1/4, 1/2 및 1배로 조절한 것과 Knop 배지(Toole and Tottingham, 1918) 등 총 5종류를 실험에 사용하였다. 포자의 파종은 50mg의 포자에 40mL의 멸균수를 첨가하여 만든 혼탁액을 준비된 배지에 각 1mL씩 접종하였다.

전엽체 대량증식

포자를 적정 발아조건에서 발아시켜 균일한 전엽체를 획득한 다음 2개월 간격으로 MS 배지에 계대배양하며, 전엽체 배양 실험의 재료로 사용하였다. 전엽체는 병당 30mg씩 메스로 곱게 다져 멸균수를 첨가하여 배양하였다.

배양에 적합한 배지의 종류를 구명하기 위하여 포자발아용 배지의 재조방법과 동일하게 무기물 및 비타민의 농도를 1/8, 1/4, 1/2, 1 및 2배로 조절한 MS 배지(sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.8)와 Knop 배지(sucrose 0.5%, agar 0.8%, pH 5.8) 등 총 6종류를 사용하였다. 또한 sucrose의 농도 별 실험에서는 배지 종류별 실험을 통해 선발된 MS 배지에 sucrose(백설탕, CJ제일제당, Incheon, Korea)의 농도를 0, 1, 2, 3, 4%로 달리하였다. 또한 활성탄의 농도 별 실험에서는 MS 배지에 활성탄(083006, Samchun pure chemical, Yeosu, Korea)의 농도를 0, 0.2, 0.4, 0.8%로 조절한 다음 배양하였다.

질소공급원인 암모니아태 질소(NH₄⁺)와 질산태 질소(NO₃⁻)의 공급농도가 전엽체 배양에 미치는 영향을 알아보기 위하여

NH_4Cl 과 KNO_3 를 사용하였다. 적정 공급량을 구명하기 위하여 NH_4Cl 과 KNO_3 의 혼합 비율이 1 : 2가 되도록 조절된 용액을 MS 배지에 각 15, 30 및 60mM씩 달리 첨가하였다. 또한 두 질소급원의 최적 농도 비를 구명하기 위하여, 첨가농도를 60mM로 고정하고 각 질소급원의 비율을 0 : 60, 20 : 40, 40 : 20, 60 : 0mM로 조절하여 첨가하였다.

포자체 형성

실험에 사용된 전엽체는 MS 배지에서 2개월 간격으로 계대배양하여 무균의 균일한 상태를 유지하였다. 이후 계대배양 직전의 전엽체를 사용하여 표면에 남아있는 agar를 제거하고 다짜가렌[하이맥사졸 액제, (주)아그로텍, Sejong, Korea] 1,000배 희석액에 1시간 동안 침지하였으며, 표면이 살균된 전엽체를 흐르는 수돗물로 수세하여 실험에 사용하였다.

실험에 사용된 토양은 원예용 상토[한아름상토 2호, (주)신성미네랄, Geosan, Korea], 피트모스(SunShine, Sun Gro Horticulture, 770 Silver Street Agawam, Kimhae, Canada), 펄라이트[뉴펄샤인 2호, (주)지에프씨, Hongseong, Korea] 및 마사토(마사토 미립자, 김해삼계마사, Kimhae, Korea) 등 4종류이며, 이들의 혼합비를 달리한 8종류의 배양토를 Table 1과 같이 조제하였다. 모든 배양토는 플라스틱 재질의 4각 화분(7.5×7.5×8.3cm, Cosmo corporation, USA)에 상단 1cm를 남기고 4반복으로 충진하였다. 이후 준비된 전엽체를 1.0g씩 정량하여 증류수와 함께 핸드블렌더(V-8000, Boowon, Kimhae, Korea)로 10초간 분쇄한 다음, 각 4각 화분의 상단에 균일하게 분주하였다. 모든 화분은 25L의 뚜껑이 없는 불투명 플라스틱 상자[503×335×195mm, SPC532(DP-D), SH PLASTIC, Gyeongsan, Korea]에 담아 배양실 내에 완전임의 배치하였다.

배양환경 및 조사방법

전엽체 증식연구는 온도 $25 \pm 1.0^\circ\text{C}$, 광도가 $43 \pm 2.0\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 광주기가 명조건 16시간으로 조절된 배양실에서 수행되었으며, 8주 동안 배양한 다음 생체중을 조사하고 처리에 따른 전엽체의 형태형성을 실체현미경(SZ51, Olympus, Tatsuno, Japan)으로 관찰하였다.

포자체 형성 연구는 온도 $25 \pm 1.0^\circ\text{C}$, 광도가 $30 \pm 2.0\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 광주기가 명조건 16시간으로 조절된 배양실에서 수행되었으며, 12주 동안 배양한 다음 형성된 포자체의 수, 초장, 초폭, 엽장, 엽폭, 엽수, 생체중 및 전체중 등의 생육조사를 실시하였다. 한편 재배기간 동안 플라스틱 박스 내 1cm 높이로 저면관수 하였으며, 상부에 투명 유리판을 덮어 자체 습도(RH $72 \pm 2.0\%$)를 유지하였다. 또한 전엽체가 발생하기 시작한 화분에는 1일 1회 두상관수를 실시하였다.

통계 처리

모든 실험은 4반복으로 수행되었으며, SAS version 9.3(SAS institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 각 처리구의 평균과 표준오차를 구하고, Duncan's multiple range test의 $p < 0.05$ 유의수준에서 통계분석 하였다.

결과 및 고찰

포자 발아

포자를 파종하여 기간별 발아율을 분석한 결과, 연구에 사용된 배지 중에서 함유 영양분의 종류가 적고 sucrose의 농도가 6배 낮게 함유된 Knop 배지에서 최종 발아율이 87.1%로 가장 높은 결과를 보였다(Fig. 1). 또한 Knop 배지에서는 파종 후 2-3일만에 발아가 시작되어, 농도 별 MS 배지에 비해서도 빠른 발아개시일을 기록하였다.

영양물질의 함량이 낮은 배지에서 양치식물 포자의 발아율이 높은 이유는 종자와 유사하게 발아와 성장에 요구되는 모든

Table 1. Soil compositions used in this study.

Treatment ¹	Soil composition
B1	Bedding soil only
Pt1	Peat moss only
B2 - Pr1	Bedding soil : Perlite = 2 : 1
B2 - D1	Bedding soil : Decomposed granite = 2 : 1
Pt2 - Pr1	Peat moss : Perlite = 2 : 1
Pt2 - D1	Peat moss : Decomposed granite = 2 : 1
B1 - Pt1 - Pr1	Bedding soil : Peat moss : Perlite = 1 : 1 : 1
B1 - Pt1 - D1	Bedding soil : Peat moss : Decomposed granite = 1 : 1 : 1

¹B, bedding soil; Pt, peat moss; Pr, perlite; D, decomposed granite.

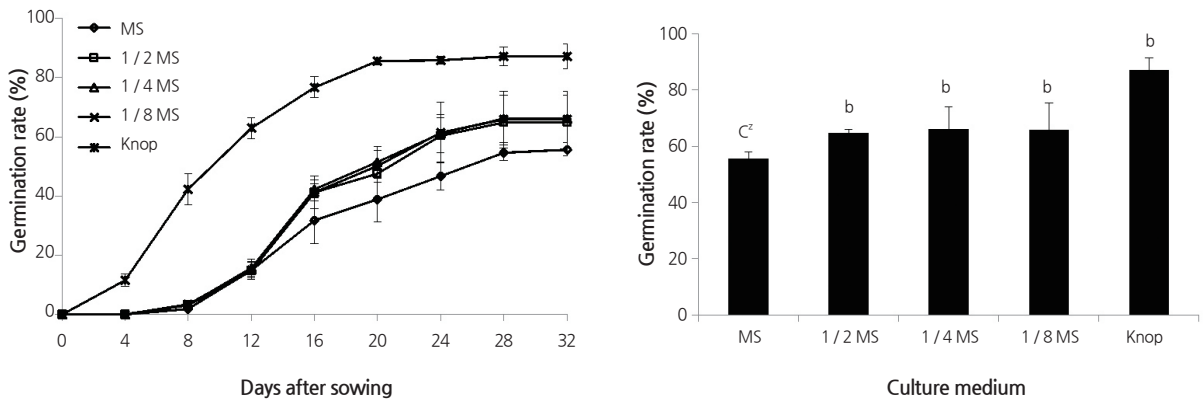


Fig. 1. Effects of culture medium on spore germination in *Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale. Bars represent standard error (n = 4).

²Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, $p < 0.05$.

영양소를 지니고 있기 때문에 보고된 바 있다(Whittier, 1975). 또한 영양분의 농도가 상대적으로 낮은 배지에서 삼투압이 낮아져 포자의 수분흡수가 용이함과 동시에 발아개시에 유리한 환경을 제공할 수 있기 때문이다(Cox et al., 2003). 본 연구에서 사용한 가는쇠고사리의 포자발아를 위해 적합한 배지는 Knop배지로 판단되었다.

전엽체 대량증식

배지의 종류

가는쇠고사리의 전엽체를 종류별 배지에 접종하여 8주간 배양한 결과, MS 배지에서 전엽체의 생육이 가장 우수하였으며, 생체중이 약 483배 증가하였다(Fig. 2). 또한 MS계열의 배지에서는 1/8부터 MS 배지까지 무기물 및 비타민의 농도가 높아 질수록 전엽체의 생체중이 증가하는 경향을 보였으나, 고농도인 2X MS 배지에서는 전엽체의 생체중 증가량이 급격하게 저하되었다.

배지의 종류 및 농도에 따른 전엽체의 형태형성을 관찰한 결과, 1/8 - MS 배지에서는 가근이 발달된 판모양의 전엽체가 발달하였으며, 영양물질의 농도가 높은 2X MS 배지에서는 전엽체의 생육이 억제되는 경향을 보였다(Fig. 3). 특히 MS 배지에서는 전엽체를 신장시키는 역할을 하는 apical cell이 존재하는 apical notch가 형성되어 심장형의 정상적인 전엽체가 발달하였다. 한편 1/8 - 1/2 MS 및 Knop 배지에서는 단세포 모용과 다세포 모용의 형성이 관찰되었다. Perez - Garcia et al.(2010)은

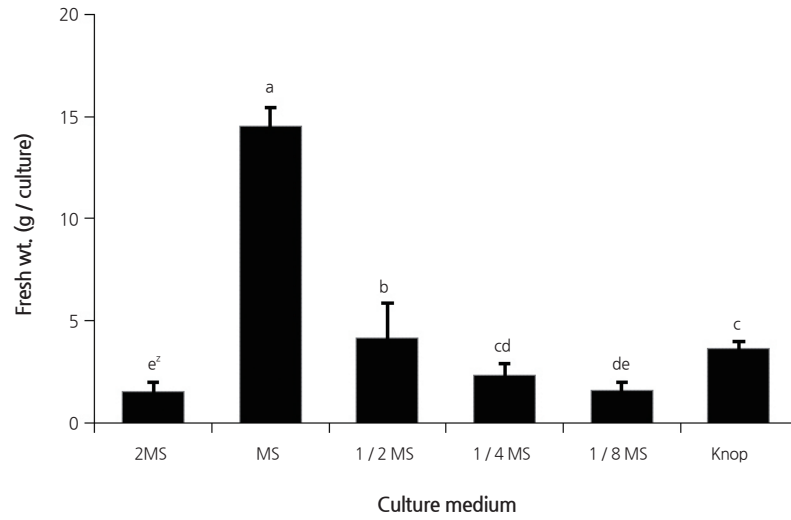


Fig. 2. Effects of culture medium on prothallus growth in *Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale cultured for 8 weeks. Bars represent standard error (n = 4).

²Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, $p < 0.05$.

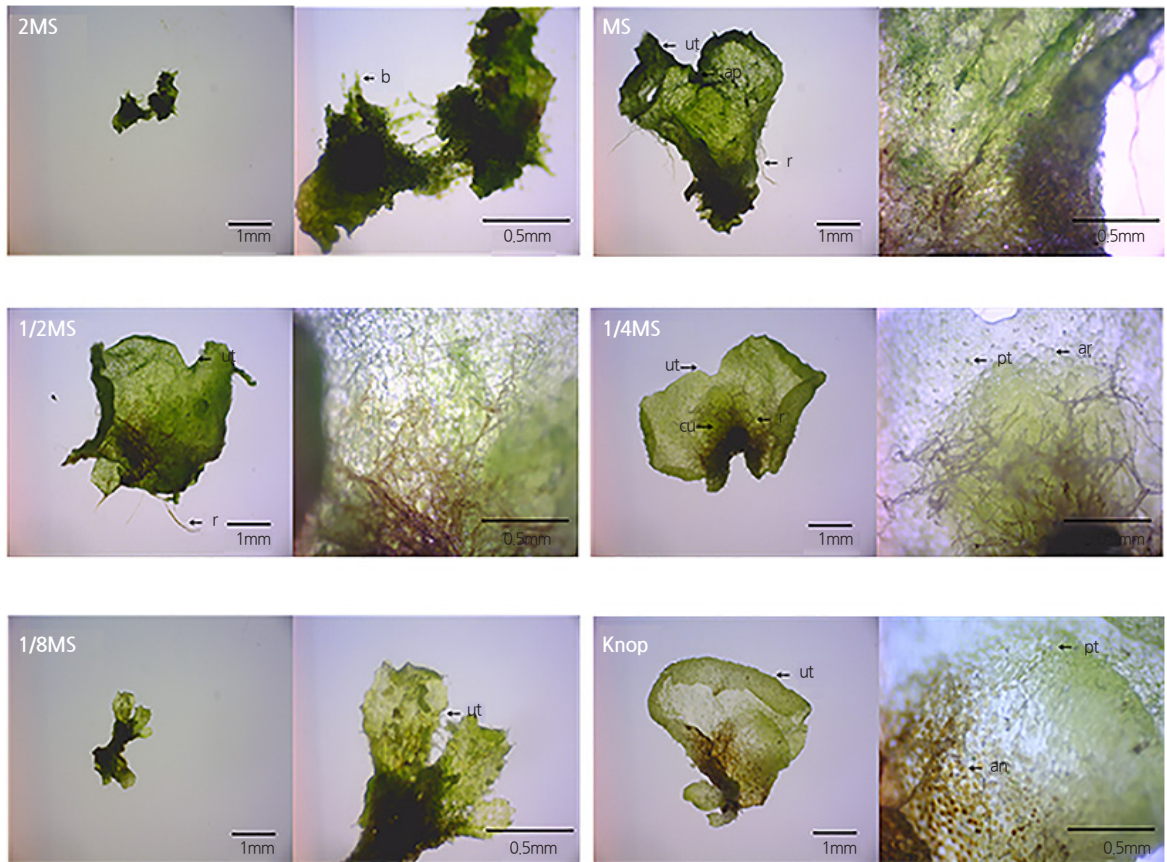


Fig. 3. Cultural responses and sexual organ formation in *Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale prothalli cultured on different media. an, antheridium; ap, apical notch; ar, archegonium; b, branched; cu, cushion; pt, pluricellular trichome; r, rhizoid; and ut, unicellular trichomes.

전엽체의 형태형성에서 모용은 오직 판(plate) 모양의 전엽체에서만 발생하며, 특히 다세포 모용은 어린 전엽체 단계에서는 발달하지 않는다고 보고하였다. 본 연구의 가는쇠고사리 전엽체 표면에 다세포 모용의 형성을 관찰되는 것은 전엽체가 충분히 성숙한 단계임을 판단하는 지표로써 사용이 가능할 것으로 생각되었다.

Sucrose 및 활성탄의 농도

상기의 연구에서 전엽체 증식이 가장 우수하였던 MS 배지를 기본배지로 하여, sucrose의 농도에 따른 전엽체의 생체중 변화량을 분석하였다. 연구의 결과, 전엽체는 sucrose 3% 첨가구에서 생육이 가장 우수하였으며, 무처리구 및 sucrose 1, 2, 4% 첨가구에서 유의적으로 생체중 증가량이 감소된 경향을 보였다(Fig. 4).

소포자낭균(leptosporangiate)에 속하는 양치식물은 영양분이 첨가된 배지에 sucrose를 추가할 경우 전엽체의 성장이 촉진된다는 보고가 있다(Dyer, 1979). 그러나 본 연구의 가는쇠고사리는 소포자낭균에 속하지만 전엽체의 생육이 sucrose의 특정 농도에서 급격히 향상되었다. 또한 적정 sucrose 농도(3%)가 초과된 범위에서는 오히려 생육이 억제되었으므로(Fig. 4), 가는쇠고사리 전엽체의 생육은 배지에 첨가된 sucrose의 농도에 민감하게 반응하는 것으로 생각되었다.

활성탄의 농도를 0, 0.2, 0.4 및 0.8%(w/v)로 달리한 MS 배지에 가는쇠고사리의 전엽체를 8주간 배양하였을 때, 활성탄을 첨가하지 않은 배지에서 첨가한 배지에 비해 농도에 관계없이 증식률이 약 3배 이상 높았다(Fig. 5). 처리구별 전엽체의 형태형성을 관찰한 결과, 무처리구에서는 형태적으로 정상 발달한 심장형의 전엽체가, 활성탄 첨가구에서는 농도에 관계없이 전엽체의 다세포 모용이 특징적으로 관찰되었다(Fig. 6). 또한 활성탄 첨가구에서는 전엽체 중앙부에 다수의 세포층으로 이루어진 쿠션(cushion)이 확인되었으며 활성탄의 농도가 높아질수록 쿠션부분이 두꺼워지는 경향을 보였다.

전엽체의 형태형성 시 쿠션이 발달되지 않을 경우 전엽체의 생식기관인 장란기의 발달이 어려울 수 있다(Takahashi et al., 2009). 따라서 가는쇠고사리 전엽체의 형태형성 및 포자체 발생을 위해서는 배지에 활성탄을 첨가하는 것이 유리할 것으로 생각되며, 전엽체 단계의 대량생산을 위해서는 활성탄을 배제한 조건에서 배양하는 것이 효과적일 것으로 판단되었다.

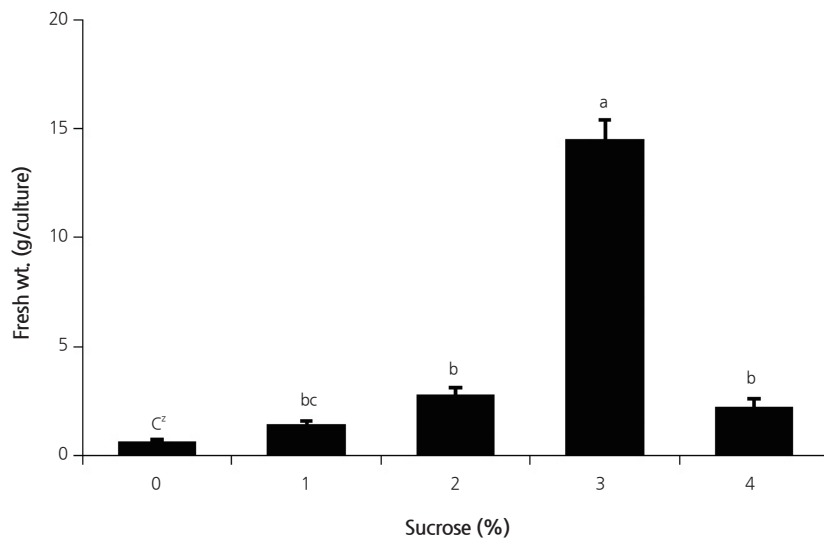


Fig. 4. Effects of sucrose concentration on prothallus growth in *Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale cultured for 8 weeks. Bars represent standard error (n = 4).

²Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, $p < 0.05$.

질소급원의 농도 및 비율

MS 기본배지에 질소급원의 총 농도를 30, 60 및 120mM로 달리한 결과, 전엽체의 생육은 MS 배지와 동일한 수준인 60mM 처리구에서 가장 왕성하였다(Fig 7). 한편 30과 120mM에서는 각 5.5, 0.4g으로 전엽체의 생육이 현저히 억제되었다. 특히 30mM 처리구에서는 전엽체가 노화되어 엽질의 녹색이 옅어지는 현상을 확인할 수 있었으며, 120mM 처리구에서는 전엽체의 형태를 찾기 어려웠다(Figure not shown).

다양한 양치식물의 전엽체에서 질소의 결핍 증상으로 성장감소, 표백, 분열조직의 결여, 세포 내 전분함량 증가, 장란기 성장 및 장정기의 표현 중단 등을 나타내는데(Czaja, 1921; Schwabe, 1951; Laurent and Lefebvre, 1980), 가는쇠고사리의 전엽체

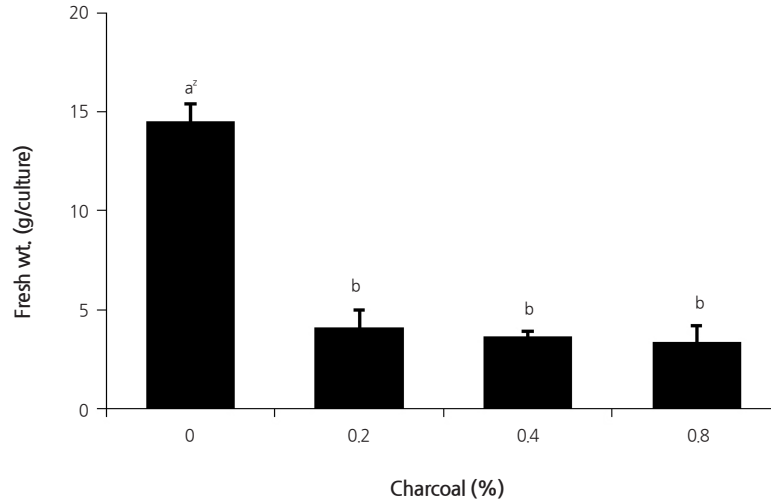


Fig. 5. Effects of charcoal concentration on prothallus growth in *Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale after 8 weeks of culture. Bars represent standard error (n = 4).

²Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, $p < 0.05$.

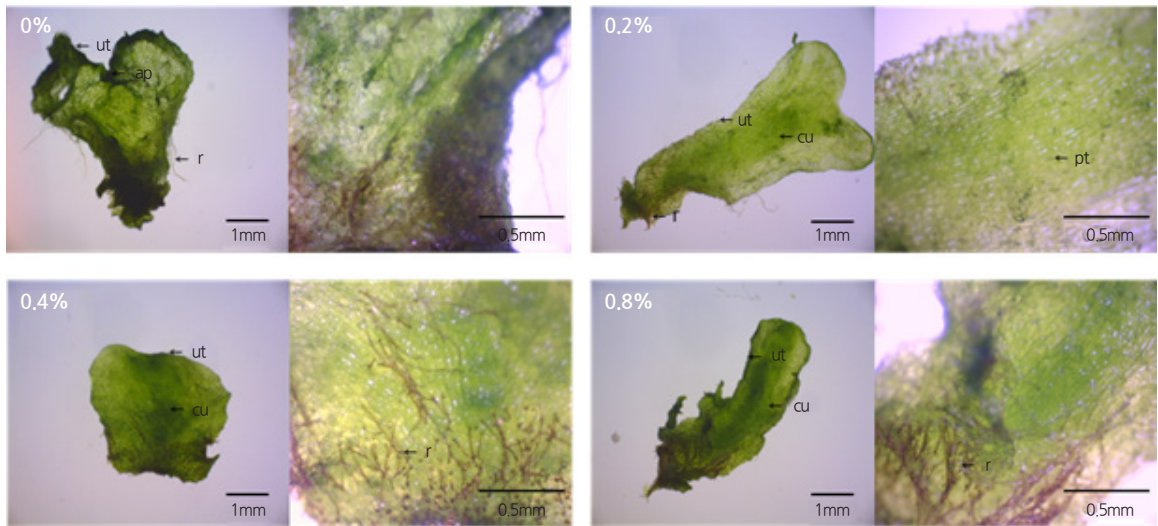


Fig. 6. Cultural responses and sexual organ formation in *Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale prothalli cultured on MS medium containing different concentrations of charcoal. ap, apical notch; ar, archegonium; cu, cushion; pt, pluricellular trichome; r, rhizoid; and ut, unicellular trichome.

또한 30mM 처리구에서 표백, 성장감소와 같은 질소결핍의 현상을 보였다. 또한 전엽체 생육단계에 적합하지 않은 고농도 (120mM)의 질소급원은 다져진 전엽체의 재생을 오히려 억제하는 결과를 보였으므로, 가는쇠고사리 전엽체의 적정 질소급원 농도는 60mM로 판단된다.

질소급원의 비율을 달리하여 실험한 결과, 암모니아태질소의 비율이 비교적 낮은 0 : 60과 20 : 40mM 처리구에서 전엽체의 생육이 가장 우수하였으며, 질산태질소의 비율이 낮아질수록 생육이 감소되는 상반된 결과를 보였다(Fig 8). 또한 전엽체의 형태형성에 있어서 질산태질소 무첨가구에서 판모양 전엽체의 전 단계인 여러 개의 세포가 길게 이어진 branch형의 전엽체가 발달한 반면, 0 : 60 - 40 : 20mM 처리구에서는 일반적인 판모양의 전엽체가 정상적으로 형성되었다(Figure not shown).

양치식물의 전엽체 증식에 있어서 질소급원의 종류뿐만 아니라 공급 농도 또한 전엽체의 생육에 큰 영향을 미치며, 식물 종에 따라서도 달라질 수 있다(Shin, 2007). 본 연구의 결과, 가는쇠고사리 전엽체의 증식 및 발달에는 MS배지의 기본 질소급원 비율인 암모니아태 질소 : 질산태 질소 = 20 : 40mM로 구명되었으며, 총 질소급원의 농도뿐만 아니라 비율도 전엽체의 생육 및 형태형성에 밀접한 연관성을 보였다.

포자체 형성

배양토의 종류를 달리하여 전엽체를 접종한 다음 12주 동안 재배한 결과, pot(56,25cm²) 당 발생한 포자체의 수는 B2 - Pr1 처리구에서 73.8개로 가장 많았으며, 다음은 B2 - D1 처리구(62.8개)와 B1 처리구(26.5개) 순으로 조사되었다(Table 2). 또한 개별 포자체의 생체중과 건체중도 B2 - Pr1 처리구에서 유의적으로 높은 중량을 보였다.

한편 피트모스를 단용하거나 첨가한 토양에서는 전엽체의 재생과 관계없이 공통적으로 포자체 발생이 억제되었다(Table 2). 이는 가는쇠고사리 성체를 실내식물로 도입하기 위하여, 피트모스가 함유된 인공 혼합토양은 자연 혼합토양[마사토 : 부엽토 2 : 1(v/v)]에 비해 생육을 저하시킨다는 결과(Ju and Bang, 2005)와 일치한다. 따라서 가는쇠고사리의 포자체 형성을 위한 배양토 구성에 피트모스를 사용하는 것은 가급적 피해야 할 것으로 판단되었다.

배양토의 종류에 따른 포자체의 생육반응을 조사한 결과, 포자체의 발생량이 가장 많았던 B2 - Pr1 처리구에서 초장(22.9mm), 초폭(23.3mm) 및 엽장(28.3mm)이 가장 길었다(Table 3). 또한 본엽의 발생도 가장 많아(11.8장) 전체적으로 우수한

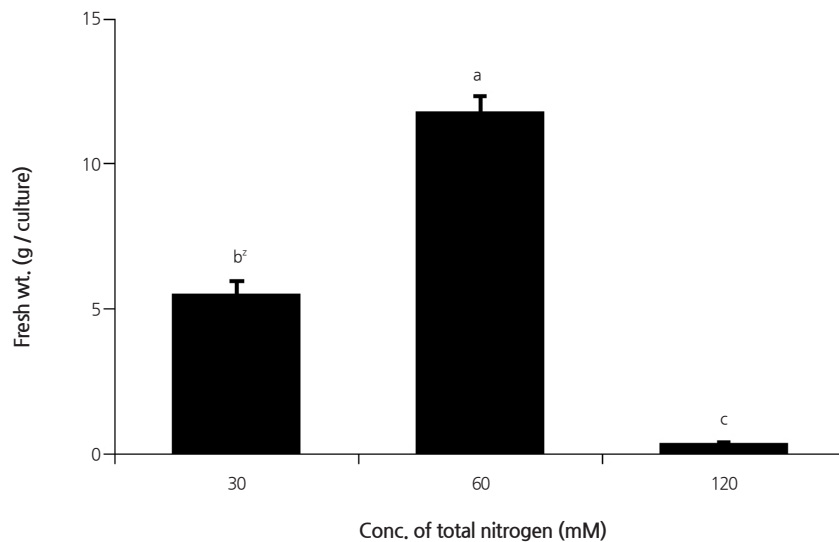


Fig. 7. Effects of total nitrogen concentration on prothallus growth in *Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale after 8 weeks of culture. Bars represent standard error (n = 4).

²Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, $p < 0.05$.

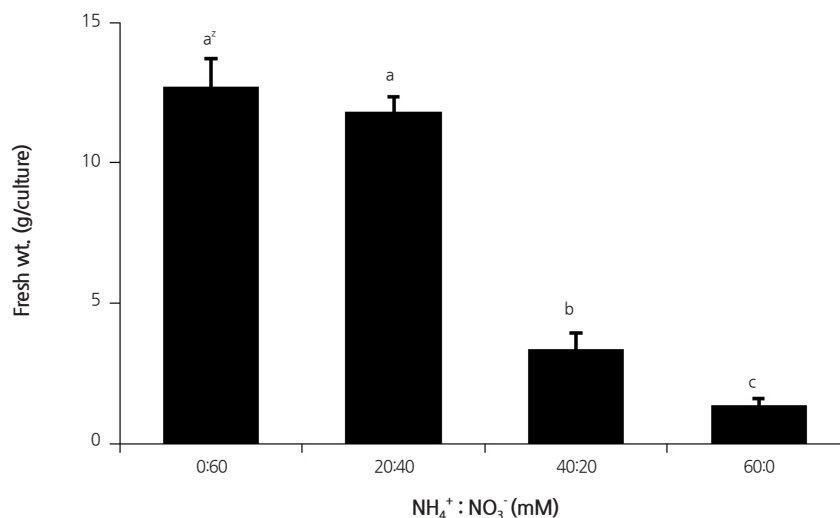


Fig. 8. Effects of NH₄⁺ and NO₃⁻ ratio on prothallus growth in *Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale after 8 weeks of culture. Bars represent standard error (n = 4).

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

Table 2. Effects of soil type on sporophyte formation and biomass in *Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale.

Medium ^z	No. of sporophytes / pot ^y (ea)	Fresh weight (mg / sporophyte)		Dry weight (mg / sporophyte)	
		Aerial parts	Underground parts	Aerial parts	Underground parts
B1	26.5 ± 8.7 b ^x	17.4 ± 4.3 c	7.3 ± 1.8 b	2.3 ± 0.6 c	0.6 ± 0.2 b
Pt1	0.0 ± 0.0 c	-	-	-	-
B2 - Pr1	73.8 ± 11.4 a	42.7 ± 6.2 a	16.8 ± 3.4 a	5.7 ± 0.9 a	1.8 ± 0.3 a
B2 - D1	62.8 ± 6.1 a	33.0 ± 4.4 b	17.7 ± 3.4 a	3.8 ± 0.3 b	1.6 ± 0.3 a
Pt2 - Pr1	0.0 ± 0.0 c	-	-	-	-
Pt2 - D1	0.0 ± 0.0 c	-	-	-	-
B1 - Pt1 - Pr1	0.0 ± 0.0 c	-	-	-	-
B1 - Pt1 - D1	0.0 ± 0.0 c	-	-	-	-

^zRefer to Table 1.

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

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

Table 3. Effects of soil type on sporophyte growth in *Arachniodes aristata* (G. Forst.) Tindale.

Medium ^z	Shoot		No. of leaves / plant (ea)	Leaf		SPAD value
	Length (mm)	Width (mm)		Length (mm)	Width (mm)	
B1	15.3 ± 2.0 c ^y	15.8 ± 2.7 b	4.0 ± 0.4 b	17.4 ± 2.1 c	8.2 ± 0.8 b	8.3 ± 1.6 a
Pt1	-	-	0.0 ± 0.0 c	-	-	-
B2 - Pr1	22.9 ± 1.1 a	24.3 ± 1.4 a	11.8 ± 0.7 a	28.3 ± 1.5 a	5.1 ± 0.3 c	10.2 ± 1.0 a
B2 - D1	18.1 ± 0.6 b	19.0 ± 1.0 b	4.7 ± 0.3 b	21.4 ± 0.6 b	10.7 ± 0.5 a	9.9 ± 0.8 a
Pt2 - Pr1	-	-	0.0 ± 0.0 c	-	-	-
Pt2 - D1	-	-	0.0 ± 0.0 c	-	-	-
B1 - Pt1 - Pr1	-	-	0.0 ± 0.0 c	-	-	-
B1 - Pt1 - D1	-	-	0.0 ± 0.0 c	-	-	-

^zRefer to Table 1.

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

생육이 확인되었으나, 펄라이트가 첨가되지 않은 B1 및 B2 - D1 조건에서는 상대적으로 생육이 저조하였다. 따라서 가느쇠고사리의 전엽체로부터 효과적으로 포자체를 형성시키기 위해서는 원예용 상토와 펄라이트를 2 : 1(v/v)로 혼합한 배양토를 사용하는 것이 적합할 것으로 판단된다.

초 록

본 연구는 면마과 가느쇠고사리 [*A. aristata* (G. Forst.) Tindale]의 각 생육단계에 적합한 기내 대량증식법을 구명하기 위해 수행되었다. 포자를 1/8 - 1배로 조절된 MS 배지와 Knop 배지에 파종한 결과, Knop 배지에서 최종 발아율이 87.1%로 가장 높았다. 또한 전엽체를 배지의 종류, sucrose와 활성탄의 농도, 질소급원의 농도 및 비율을 다르게 처리하여 8주간 배양하였다. 실험의 결과, 가느쇠고사리의 전엽체는 sucrose 3%의 MS배지에서 NH_4Cl 과 KNO_3 의 비율을 20 : 40mM로 하여 총 농도를 60mM로 조절된 배지에서 증식이 가장 왕성하였다. 토양 종류에 따른 포자체 형성을 관찰한 결과, 상토:펄라이트를 2 : 1(v/v)로 혼용하였을 때, 단위면적 당 발생한 포자체의 수가 73.8개/7.5×7.5cm로 가장 많았다. 반면 피트모스를 단용 및 혼용 처리한 조건에서는 전엽체 발달 및 포자체 형성이 억제되었다. 따라서 가느쇠고사리는 MS 배지에서 전엽체를 증식시킨 다음 상토 : 펄라이트(v/v = 2 : 1) 혼합토양에서 포자체 형성을 유도하는 것이 효과적인 증식법으로 생각된다.

추가주요어: 면마과, 양치식물, 기내대량증식, 전엽체, 포자체

Literature Cited

- Bang KJ, Ju JH (2002) Effects of indoor relative humidity conditions on the growth of *Arachniodes aristata* and *Pyrrosia lingua* in native ferns. *J Korean Env Res & Reveg Technol* 5:34-38
- Bertrand AM, Albuerne MA, Fernandez H, Gonzalez A, Sanchez-Tames R (1999). *In vitro* organogenesis of *Polypodium cambricum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 57:65-69. doi: 10.1023/A:1006348628114
- Cox J, Bhatia P, Ashwath N (2003) *In vitro* spore germination of the fern *Schizaea dichotoma*. *Sci Hort* 97:369-378. doi: 10.1016/S0304-4238(02)00152-8
- Czaja AT (1921). Über befruchtung, bastardierung and geschlechtertrennung bei prothallien homosporer Farne. *Z Bot* 13:545-589
- Dyer AF (1979) The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In Dyer AF ed, *The Experimental Biology of Ferns*. Academic press, London, pp. 253-305
- Fernandez H, Bertrand AM, Sanchez-Tames R (1999) Biological and nutritional aspects in fern multiplication. *Plant Cell Tiss Org Cult* 56:211-214. doi: 10.1023/A:1006277229136
- Higuchi H, Amaki W (1989) Effect of 6-benzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *in vitro* propagation. *Sci Hort* 37:351-359. doi: 10.1016/0304-4238(89)90146-5
- Ju JH, Bang KJ (2005) Effects of irrigation interval, medium composition and drainage on the growth response of Korea native fern *Rumohra aristata* at indoor. *J Kor Inst Landscape Archit* 32:103-108
- Korea Fern Society (KFS) (2005). *Illustrated fern native to Korea*. Geobook, Seoul
- Laurent S, Lefebvre MF (1980) Etude de leffet de differentes carences en elemets mineraux sur la teneur en tanoides de gametophytes de filicinees. *Bull Soc Bot Fr Lett Bot* 127:119-127
- Lee CH (2004) Propagation and technique of masspropagation of Pteridophyta native to Korea. *Kor Wild Res Assn* 3:91-96
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Padhya MA, Mehta AR (1982) Propagation of fern (*Nephrolepis*) through tissue culture. *Plant Cell Rep* 1:261-263. doi: 10.1007/BF00272634
- Perez-Garcia B, Mendoza-Ruiz A, Espinosa-Matias S, Gomez-Pianataro LD (2010) Gametophyte morphology of *Platyserium andinum* Baker and *Platyserium wandae* Racif. *Micron* 41:806-813. doi: 10.1016/j.micron.2010.05.005
- Schwabe WW (1951) Physiological studies in plant nutrition XVI. The mineral nutrition of bracken. *Ann Bot* 15:417-446
- Shin HC, Park NC, Choi KO (2010) Light responses and introduction plan of the native evergreen 'Filicales plant' into the interior landscape space. *J Kor Soc People Plants Env* 13:109-116

- Shin SL** (2007) Several factors affecting *in vitro* masspropagation of eight fern species. MS Thesis, Chungbuk Natl Univ Cheongju, Korea
- Takahashi N, Hashino M, Kami C, Imaichi R** (2009) Developmental morphology of strap-shaped gametophytes of *Colysis decurrens*: a new look at meristem development and function in fern gametophytes. *Ann Bot* 104:1353-1561. doi: 10.1093/aob/mcp245
- Toole EH and Tottingham WE** (1918) The influence of certain added solids upon the composition and efficiency of Knop's nutrient solution. *Am J Bot* 5:452-461. doi: 10.2307/2435152
- Whittier DP** (1975) The influence of osmotic conditions on induced apogamy in *Pteridium* gametophytes. *Phytomorphology* 25:246-249